



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 2012

AGREGATION

SECTION :

BIOCHIMIE GENIE BIOLOGIQUE

**Rapport de jury présenté par Françoise GUILLET
Présidente 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 d'admissibilité	
Épreuve de biochimie Rapport de jury :	6
Épreuve de microbiologie Rapport de jury :	9
Épreuve de biologie cellulaire et physiologie Rapport de jury	10
Épreuves d'admission	
Epreuve pratique de biochimie – physiologie	12
Rapport sur l'épreuve de biochimie-physiologie	27
Epreuve pratique de microbiologie	29
Rapport sur l'épreuve de microbiologie	49
Epreuve pratique de chimie	59
Rapport sur l'épreuve de chimie	77
Epreuves orales	
Rapport sur les leçons	81
Rapport sur les études critiques de dossiers	84
Conclusion générale	92

COMPOSITION DU JURY

Président

Mme Françoise GUILLET, Inspectrice générale de l'éducation nationale

Vice-président

M. Henri-Jean BOULOUIS Professeur des universités Ecole Nationale Vétérinaire Maison Alfort

Secrétaire général

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

Membres

Xavier BATAILLE - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS
Romain BARBE - Professeur Agrégé - Lycée Victor Hugo à Besançon
Christophe BELOIN - Personne à Compétences Particulières - Institut Pasteur de Paris à PARIS
Caroline BONNEFOY - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique Régional - Académie de VERSAILLES
Fabien CEZARD - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS
Pascal CHILLET - Professeur Agrégé - Lycée Polyvalent Jean Mermoz à MONTPELLIER
Jeanne-Laure DORMIEUX - Professeur Agrégé - Lycée Général et Technologique D'Arsonval à ST MAUR DES FOSSES
Olivier DOUMEIX - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS
Frédéric DUCANCEL - Ingénieur De Recherche - Commissariat à l'Energie Atomique CEA à GIF-SUR-YVETTE
Mélanie FERRIERES - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS
Marc LANDRY - Professeur des Universités - Institut François Magendie à BORDEAUX
Françoise LATOURRE - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS
Philippe LEJEUNE - Professeur des Universités - Institut National des Sciences Appliquées à VILLEURBANNE
Nicolas MEUNIER - Maitre de Conférences des Universités - Int Nat de La Recherche Agronomique à JOUY-EN-JOSAS
Alain MOREL - Professeur des Universités - Université Angers à ANGERS
Sabine ORSONI - Professeur Agrégé - Lycée Général Et Technologique Vallée de Chevreuse à GIF-SUR-YVETTE
Benoît SCHNEIDER - Charge De Recherches Cnrs - dep Med Légale Et Droit Med Université Paris Descartes à PARIS
Sophie WARIN - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Candidats inscrits	275
Candidats présents à l'épreuve d'admissibilité	73
Nombre de postes	14
Candidats admissibles	31
Candidats présents aux épreuves d'admission	30
Candidats proposés pour l'admission	14
Barre d'admissibilité	06.10
Barre d'admission	08.78

Epreuves d'admissibilité

Moyenne générale des candidats présents	05.82
Moyenne générale des candidats admissibles	08.67

Biochimie

Moyenne des candidats présents	04.29
Moyenne des candidats admissibles	06.70
Note maximale	14.40

Microbiologie

Moyenne des candidats présents	06.91
Moyenne des candidats admissibles	10.09
Note maximale	17.00

Biologie cellulaire et Physiologie

Moyenne des candidats présents	05.46
Moyenne des candidats admissibles	09.22
Note maximale	17.00

Epreuves d'admission

Moyenne générale des candidats présents 08.92

Moyenne générale des candidats admis 11.59

Travaux pratiques de biochimie-physiologie

Moyenne des candidats présents 09.23

Moyennes des candidats admis 11.11

Note maximale 18.70

Travaux pratiques de microbiologie

Moyenne des candidats présents 09.23

Moyennes des candidats admis 11.60

Note maximale 19.70

Travaux pratiques de chimie

Moyenne des candidats présents 07.35

Moyennes des candidats admis 10.04

Note maximale 16.00

Leçon

Moyenne des candidats présents 08.50

Moyennes des candidats admis 11.21

Note maximale 18.00

Epreuve critique de dossier

Moyenne des candidats présents 10.08

Moyennes des candidats admis 13.32

Note maximale 17.25

Ensemble du concours

Moyenne des candidats présents 08.86

Moyenne des candidats admis 11.21

Épreuves écrites d'admissibilité

BIOCHIMIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

SUJET

Mobilités structurales des macromolécules biologiques: conséquences fonctionnelles

RAPPORT

Etabli par Alain MOREL, Benoît SCHNEIDER

Le sujet « Mobilités structurales des macromolécules biologiques : conséquences fonctionnelles » est un sujet d'une importance fondamentale en biochimie, qu'il fallait aborder bien évidemment sous l'angle de la biologie structurale, mais également traiter les aspects de biologie cellulaire en lien avec les changements structuraux présentés. Il fallait faire preuve d'un esprit de synthèse à la fois en biochimie et biologie cellulaire pour structurer un devoir au plus haut niveau de ses connaissances. Le plan du devoir n'étant pas indiqué, le candidat se devait de proposer et justifier un plan logique faisant apparaître, dans l'introduction, la problématique du sujet proposé et les objectifs à développer. Il était donc tout particulièrement important de rappeler, comme préliminaire incontournable, la définition des macromolécules biologiques en insistant sur les différents degrés d'organisation de ces macromolécules. La complexité structurale des macromolécules alors décrite permettait de poser les questions relatives aux changements structuraux associés à ces macromolécules, les méthodes d'études permettant d'appréhender les changements de structure, la nécessité et l'impact d'une modification de structure pour réaliser une fonction biologique.

On ne peut que déplorer que bon nombre de candidats ne maîtrise pas la définition de macromolécule biologique, notion pourtant enseignée depuis le premier cycle universitaire. Les différents niveaux structuraux d'organisation des protéines, depuis la séquence jusqu'à la structure quaternaire, sont rarement présentés correctement ou le plus souvent de façon

simpliste. Quelques candidats se sont hasardés à représenter la structure tridimensionnelle de la double hélice d'ADN, dont le bénéfice, eu égard de l'information qu'il en ressort, était faible. En effet, de trop rares copies développent de façon précise les interactions interchaines, l'enroulement de l'ADN autour des histones, la notion de superenroulement et de compaction de l'ADN (associée au chromosome métaphasique par exemple). Les aspects touchant à la dynamique conformationnelle entre les différents degrés structuraux ne sont pratiquement jamais évoqués. Enfin, il est à noter que les méthodes et expériences qui permettaient de caractériser la structure et les changements structuraux des protéines ou de l'ADN (RMN, cristallographie aux rayons X, dichroïsme circulaire, échanges deutérium/proton...) n'ont été présentées que par très peu de candidats.

Les mobilités structurales associées aux protéines et à la molécule d'ADN sont souvent mal illustrées et peu rapportées à une fonction biologique. En ce qui concerne la molécule d'ADN, il fallait particulièrement aborder la problématique de compaction de la molécule d'ADN et division cellulaire. Le jury attendait notamment une description très précise des mécanismes assurant la réplication de la molécule d'ADN, qui ne devait pas se limiter à un schéma élémentaire de première année de licence et la simple mention de l'existence de topoisomérases, gyrases... dont les fonctions sont, pour beaucoup de candidats, totalement méconnues. De même, les mobilités structurales de la molécule d'ADN devaient être traitées en rapport avec l'expression de l'information génétique. L'ouverture de l'ADN pour faciliter l'accès au complexe de transcription, les différents effecteurs jouant sur la courbure de l'ADN et l'activation ou inhibition de la transcription, ... devaient être abordés. Au niveau ARN, les mécanismes supportant le phénomène d'atténuation de l'opéron tryptophane par exemple et la dynamique structurale des ARN messagers (fusion des structures tige-boucle) accompagnant la traduction étaient attendus.

Pour les protéines, au delà de la simple description des différents degrés d'organisation structurale des protéines, très peu de candidats se sont penchés sur la problématique du repliement des protéines accompagnant l'acquisition de la structure tridimensionnelle. En outre, à partir de plusieurs exemples (hémoglobine, enzymes, protéines du cytosquelette), il fallait dégager les concepts de structuration (« folding »), d'ajustement induit, d'allostérie, et de polymérisation/dépolymérisation des protéines et décrire les mécanismes mis en jeu (nature des interactions chimiques, modification des surfaces d'interaction, rotation de domaines structuraux...). Dans ce contexte, l'influence de facteurs modulateurs (pH, T°C, protéines chaperons, phosphorylation...) sur la mobilité de domaines structuraux en rapport avec la fonction biologique (contraction musculaire, catalyse enzymatique, régulation des flux métaboliques, transporteurs et échanges ioniques...) de la/des protéines considérées devait être abordée. Enfin, aborder les aspects cinétiques, *i.e.* les vitesses associées aux changements conformationnels, en relation avec la fonction biologique réalisée permettait de répondre entièrement à la problématique posée. Comme pour les années précédentes, le jury remarque encore que les illustrations sont soit d'une qualité insuffisante soit excessivement schématisées, ce qui attestent le plus souvent d'un manque de maîtrise ou de connaissance.

Pour l'ensemble des copies, les conclusions sont un pâle résumé de l'exposé. Quelques candidats ont donné des exemples de mobilités structurales de protéines associés à l'émergence d'un état pathologique (cas de la protéine prion cellulaire et de sa conversion transconformationnelle en protéine prion « scrapie » à l'origine de la maladie de Creutzfeld-Jakob), ce qui a été particulièrement apprécié par les membres du jury de Biochimie.

Enfin, il faut souligner que la plupart des copies sont présentées convenablement et sont rédigées en bon français.

En conclusion, le jury a regretté que dans de nombreux devoirs, les bases élémentaires de biochimie ne paraissent pas acquises, ce qui ne permet pas la construction d'un devoir de qualité, que l'on est en droit d'attendre dans le cadre du concours de l'agrégation.

Le jury a par contre particulièrement apprécié les meilleurs devoirs, dans lesquels les exemples choisis sont traités avec une maîtrise remarquable et les illustrations sont soignées, correctement légendées et accompagnées d'une explication appropriée.

MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

SUJET

L'énergie chez les bactéries : sources, stockages et utilisations

RAPPORT

Etabli par Henri-Jean BOULOUIS, Philippe LEJEUNE

Même si l'intitulé du sujet en suggérait le plan, l'introduction devait permettre aux candidats d'en délimiter le champ et de décrire la démarche adoptée pour la rédaction. Le tableau classique des différents types métaboliques, avec les sources et les accepteurs d'électrons, constituait une manière simple et claire d'ouvrir l'exposé. Il a été donné dans beaucoup de copies.

La génération d'ATP et de pouvoir réducteur impliquait une description détaillée des voies des métabolismes chimio-lithotrophes ainsi que de la photosynthèse oxygénique et anoxygénique. Des illustrations claires de la mise en place des gradients de protons et de leur utilisation étaient incontournables et ont été assez souvent présentées. En revanche, des exemples de métabolismes de fermentation n'ont été décrits que dans très peu de copies.

Les formes de stockage de l'énergie chez les bactéries ont semblé assez peu connues de la majorité des candidats. Les inclusions de glycogène, les granules de lipides ou de polyphosphates constituent pourtant des réserves que les microbes synthétisent couramment dans des environnements déséquilibrés en nutriments. L'évocation de l'utilisation de polyhydroxy-alcanoates comme source de bio-plastiques ou de triglycérides comme bio-carburants aurait constitué une ouverture technologique appréciée des correcteurs.

Les exemples d'utilisation de l'énergie par les bactéries sont si nombreux qu'une réflexion sur la structuration de leur exposé s'imposait. Beaucoup de candidats se sont limités à égrener une série de processus, sans s'interroger sur leur représentativité. Parmi les activités très consommatrices d'énergie, les processus anaboliques et de mise en place des constituants cellulaires, les mécanismes de transport entrants et sortants, les déplacements et la quête du fer étaient attendus comme cadres à la présentation d'exemples particuliers.

BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

SUJET

Rôles des systèmes cardiovasculaire et rénal dans le maintien de la pression artérielle. Vous insisterez sur l'interdépendance entre ces deux systèmes.

RAPPORT

Etabli par Marc LANDRY, Nicolas MEUNIER

Le sujet portait sur les régulations de la pression artérielle mises en place de manière interdépendante par le cœur et les reins.

Il convenait en introduction de rappeler l'origine et les rôles de la pression artérielle dans l'organisme avant de passer aux régulations proprement dites. Cette introduction est encore trop souvent négligée et certains devoirs partent directement dans les régulations sans avoir défini le cadre du sujet.

Le sujet insistait clairement sur les régulations autour de la pression artérielle. Il n'était donc pas utile de détailler les origines de cette pression mais il fallait par contre s'attarder sur les systèmes permettant d'aboutir à des régulations. Ainsi, la présentation détaillée du cycle cardiaque était hors-sujet, mais par contre il fallait insister sur les régulations possibles du rythme cardiaque et de la force de contraction. De même, il n'était pas utile de décrire l'ensemble du système cardiovasculaire ou encore l'anatomie *in extenso* des reins.

Il était attendu une présentation des systèmes de détection. Les barorécepteurs sont assez bien connus mais se retrouvent souvent bien seuls. Les autres systèmes sont rarement présentés voire, dans le cas des osmorécepteurs hypothalamiques et des volorécepteurs cardiaques, quasiment jamais évoqués.

Il fallait également traiter des systèmes de contrôles. Là encore, le contrôle nerveux est relativement bien traité, les autres systèmes de régulations sont bien souvent mal connus. Ainsi, si l'angiotensine II se retrouve dans de nombreux devoirs, ses effets sont survolés, l'action sur les corticosurrénales ou encore sur le système nerveux central n'étant que trop rarement abordés.

Quelques copies ont abordées les adaptations de la pression artérielle lors d'un effort physique, ces notions pouvaient permettre d'ouvrir le sujet en conclusion mais n'étaient pas attendues dans le cœur du sujet.

D'un point de vue de la forme, la plupart des plans étaient cohérents. Les schémas sont souvent nombreux mais ne doivent pas se suffire à eux-mêmes et nécessitent un texte d'accompagnement qui est parfois absent. Les aspects pathologiques ont souvent été exploités et nous ne pouvons qu'encourager l'insertion de tels aspects pour appuyer le fonctionnement normal des organes. Enfin les conclusions restent bien souvent dénuées d'ouverture alors que le sujet s'y prêtait particulièrement.

En bilan, un grand nombre de candidats n'ont que très peu de connaissances sur ce sujet pourtant très classique, 39 des 68 copies ont obtenu moins de 5/20 et seulement 14 copies ont obtenu la moyenne.

ÉPREUVES D'ADMISSION

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE ET OU DE PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

SUJET

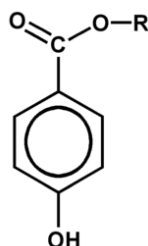
Évaluation de la toxicité du propylparabène sur un modèle de cellules en culture

Sujet proposé par : Caroline Bonnefoy, Olivier Doumeix, Frédéric Ducancel, Sabine Orsoni et Florence Rivenet.

INTRODUCTION

Les parabènes sont des molécules utilisées comme conservateurs dans les cosmétiques, les médicaments et les aliments. Leur activité antimicrobienne permet d'éviter ou de limiter la dégradation des produits dans lesquels ils sont présents.

Les parabènes sont des esters de l'acide parahydroxybenzoïque :



*Structure chimique générale d'un parabène (parahydroxybenzoate d'alkyle)
où R est un alkyle*

Les principaux parabènes utilisés dans l'industrie sont le méthylparabène, l'éthylparabène et le propylparabène. Ils sont synthétisés par voie chimique mais existent aussi à l'état naturel dans certains aliments comme l'orge, la fraise, le cassis, la vanille, l'oignon...

Malgré leur efficacité, ils suscitent la controverse à cause de leur caractère allergisant mais surtout de leur action perturbatrice sur le système endocriné. Différents travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* ont montré, dans certaines conditions expérimentales, leur toxicité cellulaire avec des incidences possibles sur la santé humaine. Par ailleurs, des parabènes ont été détectés dans différents fluides biologiques humains et mis en cause dans des cas de cancers du sein. Ces

observations conduisent les agences sanitaires françaises et européennes à s'interroger sur la nécessité d'interdire leur utilisation.

Afin de trouver un modèle cellulaire pour les tests de toxicité, nous proposons d'étudier les effets induits par le parahydroxybenzoate de propyle (propylparabène, PPB) sur des cellules Vero (cellules épithéliales de rein du singe vert africain *Cercopithecus aethiops*).

Pour cela, plusieurs tests sont envisagés :

- Mesures de la viabilité cellulaire par deux méthodes :
- méthode colorimétrique au MTT : **partie 1**
- dosage des protéines cellulaires totales : **partie 2**
- Identification et dosage du PPB et de ses dérivés par CLHP dans les milieux de culture : **partie 3** ;
- Dosage de thiols cellulaires : **partie 4**.

Les quatre parties sont indépendantes.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les cellules Vero ont été cultivées à 37°C sous atmosphère enrichie en CO₂ dans du milieu DMEM supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal, 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 80 000 cellules.mL⁻¹ et déposée dans les puits de deux plaques pour culture cellulaire. Celles-ci ont été incubées une nuit à 37°C sous atmosphère enrichie en CO₂. Après élimination du milieu de culture, le tapis cellulaire a été lavé avec du PBS et recouvert de milieu DMEM complet contenant 200 ou 500 µmol.L⁻¹ de propylparabène (PPB). Un contrôle sans PPB (NT) a également été réalisé. Les cellules sont fournies après 24h de culture dans ce milieu.

Avertissement

L'**annexe 6** présente les données de sécurité relatives aux produits chimiques manipulés. Procéder à l'évaluation des risques encourus afin d'adopter les moyens de prévention adaptés.

Partie 0 : OBSERVATIONS PREALABLES

- Observer au microscope inversé les cellules traitées et non traitées de la plaque 6 puits « protéines ».

Q1. Décrire l'aspect du tapis cellulaire, des cytoplasmes et des noyaux.

Q2. Conclure sur l'effet du traitement au PPB sur les cellules.

Partie 1 : ETUDE DE LA CYTOTOXICITE DU PROPYLPARABENE (PPB) PAR LA METHODE AU MTT

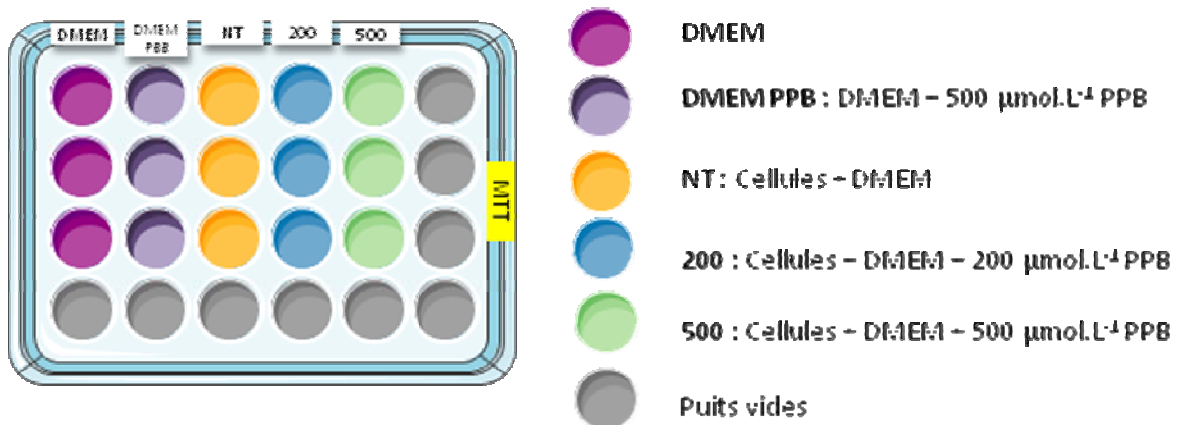
1.1 Principe de la méthode

La méthode au MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium permet une quantification de la viabilité cellulaire. Le MTT est transformé en formazan en présence d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan obtenus sont solubles dans l'isopropanol. La solution absorbe à la longueur d'onde de 570 nm.

1.2 Protocole

Cellules et réactifs :

- 1 plaque 24 puits, notée « MTT », dont le plan est présenté ci-dessous ; 9 puits sont ensemencés à J-2 avec $8 \cdot 10^4$ cellules qui sont ensuite traitées ou non à J-1 au PPB :



- MTT à 5 mg.mL^{-1} ;
- Isopropanol.

Mode opératoire :

- Ajouter 100 μL de MTT dans chaque puits.
- Agiter manuellement et délicatement la plaque.
- Incuber 2h à 2h30 à 37°C sous atmosphère enrichie en CO_2 .
- Pencher légèrement la plaque et éliminer la totalité du surnageant en posant l'extrémité du cône sur la paroi latérale du puits, et en utilisant successivement une micropipette P1000 puis P200.
- Ajouter 600 μL d'isopropanol dans tous les puits.
- Pour chaque puits, dissoudre totalement les cristaux de formazan par aspirations-refoulements. L'ensemble des cristaux est dissous lorsque la coloration de la solution obtenue est homogène.
- Transférer 100 μL de chacun des puits dans une plaque 96 puits à fond plat.
- Lire l'absorbance à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

1.3 Questions

- Q3.** Établir la formule de calcul du pourcentage de cellules vivantes par puits.
- Q4.** Calculer ce pourcentage pour les puits traités avec du PPB à la concentration de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et de 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.
- Q5.** Conclure.

Partie 2 : ETUDE DE L'EFFET DU PROPYLPARABENE (PPB) SUR LE TAUX DE PROTEINES CELLULAIRES

2.1 Principe

Le taux de protéines extraites des cellules adhérentes est corrélé à la viabilité cellulaire et au niveau d'activité de synthèse protéique après traitement au PPB.

Les protéines sont extraites des cellules puis dosées par une méthode normalisée en présence de glucose.

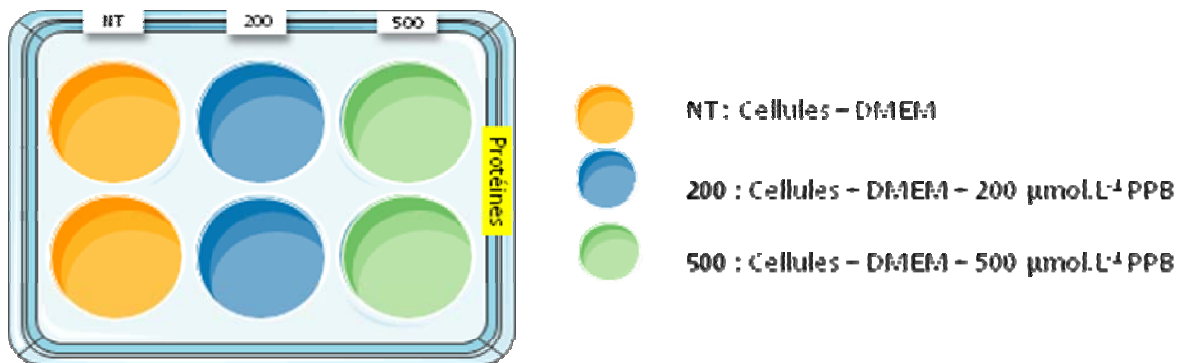
Les résultats seront exprimés en pourcentage de protéines dosées dans les extraits des cellules traitées par rapport aux protéines des extraits des cellules non traitées.

2.2 Lyse des cellules

a) Protocole

Cellules et réactifs :

- 1 plaque 6 puits, notée « Protéines », dont le plan est présenté ci-dessous ; chaque puits est ensemencé à J-2 avec $2,4 \cdot 10^5$ cellules qui sont ensuite traitées ou non à J-1 au PPB :



- Tampon de lyse P : Tris HCl 10 mmol.L^{-1} ; NaCl 150 mmol.L^{-1} ; 10 % glycérol; 0,5 % Triton X-100; glucose 2 g.L^{-1} ; pH 7,5 ;
- PBS ou tampon phosphate de sodium : KH_2PO_4 $1,76 \text{ mmol.L}^{-1}$; Na_2HPO_4 10 mmol.L^{-1} ; KCl $2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$; NaCl 137 mmol.L^{-1} ; pH 7,2.

Mode opératoire :

Les cellules des 6 puits seront traitées en parallèle selon le mode opératoire ci-dessous.

- Aspirer délicatement le milieu de culture à l'aide d'une pipette compte-gouttes.
Attention : un échantillon (environ 2 mL) **des milieux de culture « 200 » et « 500 » doit être transféré** dans un pot en plastique à bouchon rouge, et conservé dans la glace pour le dosage du PPB par CLHP.
- Rincer les cellules avec 3 mL de PBS.
- Éliminer le PBS.
- Ajouter 2 mL de PBS.
- Racler le fond du puits à l'aide d'un râteau, en appuyant fortement, tout en évitant les projections.
- Aspirer la suspension cellulaire et l'introduire dans un tube conique de 10 mL.
- Rincer le puits avec 2 mL de PBS puis transférer la solution de rinçage dans le tube conique de 10 mL précédent.
- Centrifuger à 3000 rpm pendant 5 minutes et à température ambiante.

-
- Éliminer le surnageant en veillant à ne pas emporter de cellules.
 - Déposer 50 μL de tampon de lyse P sur le culot cellulaire.
 - Homogénéiser par aspirations-refoulements puis transférer dans un microtube.
 - Rincer le tube conique de 10 mL avec 50 μL de tampon de lyse P, puis transférer dans le microtube précédent.
 - Laisser à température ambiante pendant 30 minutes.
 - Centrifuger 15 min à 13000 rpm et à température ambiante.
 - Transférer les surnageants dans des microtubes et les stocker dans la glace.

Les surnageants obtenus constituent les « lysats cellulaires ».

2.3 Dosage des protéines dans les lysats cellulaires

Après l'étape de centrifugation des cellules en tube conique, il est difficile d'enlever la totalité du surnageant avant l'ajout des 100 μL (2 fois 50 μL) de tampon de lyse P. Pour pallier ce problème, le tampon de lyse P contient du glucose à la concentration finale de 2,0 g.L^{-1} . Ainsi le dosage du glucose dans les lysats cellulaires permet de prendre en compte les variations de volume de surnageant résiduel entre les différents tubes testés.

a) Dosage des protéines

a.1 Protocole

Réactifs :

- Solution étalon de sérumalbumine bovine « SAB » à 0,1 g.L^{-1} ;
- Réactif de Bradford.

Mode opératoire :

- Suivre la méthode décrite dans l'**annexe 1** en respectant les deux modifications suivantes :
- utiliser la sérumalbumine bovine comme étalon ;
- réaliser l'étalonnage en simple essai.

Donnée :

la concentration en protéines des lysats cellulaires est comprise entre 1,0 et 5,0 g.L^{-1} .

a.2 Questions

- Q6.** Justifier la composition des différentes cuves préparées.
- Q7.** Exploiter les résultats expérimentaux du dosage par la méthode de Bradford à l'aide de la feuille de calculs « Excel » mise à disposition sur les postes informatiques. La régression utilisée est de type polynômial de degré 2.
- Q8.** Déterminer les concentrations en protéines en g.L^{-1} de lysat cellulaire.

b) Dosage du glucose dans les lysats cellulaires

b.1 Protocole

Réactifs :

- Solution étalon de glucose à 2,0 g.L^{-1} ;
- Réactif RTU.

Mode opératoire :

- Utiliser la fiche technique du kit « glucose RTU » fournie dans l'**annexe 2** pour doser le glucose dans les lysats cellulaires.

b.2 Questions

- Q9.** Justifier la composition des différentes cuves préparées.
- Q10.** Déterminer les concentrations en glucose dans les lysats cellulaires.
- Q11.** Utiliser ces valeurs de concentrations en glucose dans les lysats cellulaires, pour exprimer en g.L^{-1} **de tampon de lyse P** les concentrations en protéines précédemment déterminées.
- Q12.** En considérant le taux de protéines des cellules non traitées à 100 %, calculer le % de protéines des cellules traitées par le PPB.

Partie 3 : ETUDE DE LA METABOLISATION DU PROPYLPARABENE (PPB) DANS LES SURNAGEANTS DE CULTURE PAR CLHP EN PHASE INVERSE

3.1 Objectif de l'étude

Le but de cette étude est de mesurer, pour les deux concentrations de propylparabène testées, le PPB résiduel dans le milieu de culture des cellules Vero afin d'évaluer le caractère dose-dépendant de la perméabilité membranaire au PPB.

3.2 Principe de la méthode

La CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) est une technique de séparation et de dosage.

Une phase mobile traverse la phase stationnaire de la colonne. Les composants de l'échantillon, entraînés par la phase mobile, sont séparés selon leurs interactions différentielles avec les phases mobile et stationnaire.

Dans des conditions chromatographiques données, le temps de rétention caractérise qualitativement un soluté et la surface d'un pic est proportionnelle à la quantité de soluté.

3.3 Protocole**a) Préparation des échantillons****Réactifs :**

- Milieux de culture « 200 » et « 500 » mentionnés dans la partie 2.2., récupérés à partir de la plaque « protéines ».

Mode opératoire :

- A l'aide d'une seringue, passer chaque milieu de culture sur filtre de porosité 0,20 μm .
- Préparer 1 mL d'une dilution au 1/20 de chaque milieu de culture filtré, en utilisant la phase mobile (acétonitrile/eau (60/40)) comme diluant.

b) Analyse chromatographique

Les deux milieux de culture seront traités dans les mêmes conditions.

NB. : un examinateur guidera les candidats pour la prise en main de l'appareil.

Conditions opératoires :

- **Phase stationnaire** : silice greffée C18, 150 mm x 4,6 mm, granulométrie 5 μm ;
- **Phase mobile** : acétonitrile/eau (60/40) ;
- Régime d'élution : isocratique ;
- **Détecteur** : spectrophotomètre UV réglé à 254 nm ;
- **Injecteur** : boucle rhéodyne de 20 μL ;
- **Débit** : 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;
- Température : 35°C ;
- Temps d'acquisition : 2 min.

Mode opératoire :

- Rincer la microseringue avec la solution à analyser.
- Remplir la microseringue.
- Éliminer les bulles d'air éventuellement présentes dans le corps de la seringue ou dans l'aiguille.
- Introduire l'aiguille dans l'orifice de l'injecteur jusqu'à la butée.
- Appuyer sur le piston de la microseringue pour charger la boucle d'injection. Vérifier que du liquide s'écoule de la purge de l'injecteur.
- Basculer la vanne d'injection en position *inject*.
- Après la seconde acquisition, imprimer les chromatogrammes.

3.4 Questions

Q13. Justifier le choix de la phase stationnaire et de la phase mobile.

Q14. Sur les chromatogrammes obtenus expérimentalement, identifier le PPB dans les milieux de culture « 200 » et « 500 ». Justifier.

Q15. Calculer les concentrations en PPB dans les deux milieux.

Q16. Conclure.

Partie 4 : ETUDE DE L'EFFET DU PROPYLPARABENE (PPB) SUR LE STRESS OXYDATIF CELLULAIRE PAR LE DOSAGE DES THIOLS CELLULAIRES

4.1 Principe

Le taux cellulaire de thiols est l'un des marqueurs du stress oxydatif. On distingue dans les cellules des thiols libres (glutathion principalement) et des thiols protéiques. La méthode de dosage choisie ne permet pas de doser spécifiquement les thiols libres. L'étude proposée va donc s'effectuer en deux parties : le dosage des thiols totaux et celui des thiols libres obtenus après précipitation des protéines à l'acide trichloroacétique (TCA).

Des cellules Vero sont traitées avec du PPB à la concentration de 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Un contrôle sans PPB est réalisé en parallèle. Après lyse cellulaire des échantillons, les protéines totales sont dosées puis la concentration en protéines des lysats est normalisée à 10,0 mg de protéines. $\cdot\text{L}^{-1}$.

Les thiols seront dosés selon la méthode d'Ellman. Son principe est décrit dans l'**annexe 3**.

Une étude préalable a été réalisée sur des hépatocytes avec le butylparabène. Les résultats obtenus sont donnés dans l'**annexe 4**.

4.2 Protocole

Échantillons et réactifs :

- Tampon T : phosphate de sodium $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 8 ; EDTA 1 mmol.L^{-1} ;
- Réactifs d'Ellman : DTNB 4 mg.mL^{-1} ;
- 2 extraits cellulaires normalisés à $10 \text{ mg de protéine.L}^{-1}$: extrait non traité « E_{NT} » et extrait traité par PPB « E_T » ;
- acide trichloroacétique « TCA » 100 g.L^{-1} .

Mode opératoire :

Traiter les deux extraits (non traité « E_{NT} » et traité « E_T ») en parallèle et en simple essai selon le mode opératoire suivant :

a) Précipitation des protéines :

- Dans un microtube de 1,5 mL, ajouter :
- 200 μL d'extrait ;
- 2 fois 100 μL de TCA.
- Homogénéiser.
- Laisser 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 2 minutes à 13000 rpm et à température ambiante.

b) Dosage des thiols totaux et des thiols libres

- Doser les thiols totaux (dans E_{NT} et E_T) et les thiols libres (dans les surnageants correspondants) selon le protocole décrit dans l'**annexe 3**.

4.3 Questions

Q17. Donner la composition des différentes cuves préparées.

Q18. Calculer la concentration en thiols libres et en thiols protéiques des extraits E_{NT} et E_T . en nmol de thiols. mg^{-1} de protéines.

Q19. Conclure.

Q20. A partir des **annexes 3 et 4**, justifier le fait de ne pas avoir dilué les extraits E_{NT} et E_T pour le dosage.

Partie 5 :BILAN

Q21. En s'appuyant sur l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus au cours de cette étude, et de l'**annexe 5**, indiquer si les cellules Vero constituent un modèle pertinent pour l'étude de la toxicité cellulaire des parabènes.

Référence :

Pérez Martin et al. *Oxidative damage contributes to the toxic activity of propylparaben in mammalian cells.* Mutation Research 702 (2010) 86-61

For the French version, please refer to the
document "Méthode de dosage des protéines"

The Bradford Method for Protein Quantitation

Nicholas J. Kruger

Introduction

A rapid and accurate method for the estimation of protein concentration is essential in many fields of post-*in vivo* study. An assay originally described by Bradford has become the preferred method for quantifying protein in many laboratories. This technique is simpler, faster, and more sensitive than the Lowry method. Moreover, when compared with the Lowry method, it is subject to less interference by common reagents and non-protein components of biological samples.

The Bradford assay relies on the binding of the dye Coomassie Blue G250 to protein. Detailed studies indicate that the free dye can exist in four different ionic forms for which the pK_a values are 1.15, 1.82, and 12.4. Of the three charged forms of the dye that predominate in the acidic assay reagent solution, the more cationic red and green forms have absorbance maxima at 470 nm and 630 nm, respectively. In contrast, the more anionic blue form of the dye, which binds to protein, has an absorbance maximum at 595 nm. Thus, the quantity of protein can be estimated by determining the amount of dye in the blue ionic form. This is readily achieved by measuring the absorbance of the solution at 595 nm.

The dye appears to bind most readily to arginyl and lysyl residues of proteins. This specificity can lead to variation in the response of the assay to different proteins, which is the main drawback of the method. The original Bradford assay shows large variation in response between different proteins. Several modifications to the method have been developed to overcome this problem. However, these changes generally result in a less sensitive assay that is often more susceptible to interference by other chemicals.

Consequently, the original method devised by Bradford remains the most convenient and widely used formulation.

Methods

Microassay Method

This form of the assay is more sensitive to protein.

1. Pipet duplicate samples containing between 1 and 30 μg in a total volume of 100 μl , into 1.5-ml. polycarbonate microcups, tubes. If the approximate sample concentration is unknown, assay a range of dilutions (1, 1/10, ...100, 1/1000).
2. For the calibration curve, pipet duplicate volumes of 10, 20, 40, 60, 80, and 100 μl of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, γ -globulin standard solution into microcups, tubes, and adjust the volume to 100 μl with water. Pipet 300 μl of distilled water into a tube for the reagent blank.
3. Add 1 ml. of protein reagent to each tube and mix gently, but thoroughly.
4. Measure the absorbance of each sample between 2 and 60 min after addition of the protein reagent. The A_{595} value of a sample containing 10 μg γ -globulin is 0.15. Figure 1 shows the response of three common protein standards using the microassay method.

The standard curve is not linear, and the positive absorbance varies depending on the age of the assay reagent. Consequently, it is essential to construct a calibration curve for each set of assays.

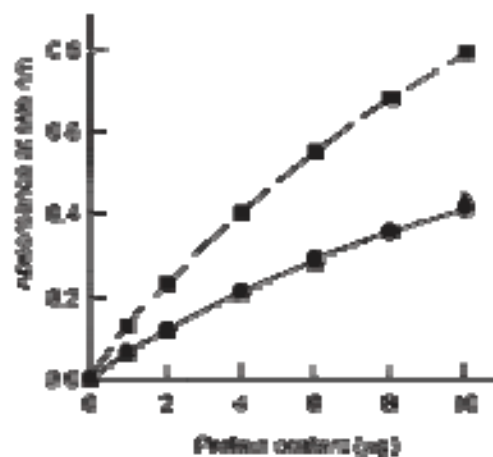


Fig. 1. Variations in the response of proteins in the final assay. The extent of protein-cye complex formation was determined for bovine serum albumin (\square), γ -globulin (\circ), and ovalbumin (\triangle) using the microassay. Each value is the mean of four determinations. For each set of measurements the standard error is as a % of the mean value. The data allow comparisons to be made between estimates of protein content obtained using these protein standards.

The standard curve is nonlinear because of problems introduced by depletion of the amount of free dye. These problems can be avoided, and the linearity of the assay improved, by plotting the ratio of absorbances at 595 and 530 nm. If this approach is adopted, the absolute optical density of the free cye and cye-protein complex must be determined by measuring the absorbance of the mixture at each dye-absorbance ratio in a cuvette containing only water (and no dye reagent). As well as improving the linearity of the calibration curve, taking the ratio of the absorbances at the two wavelengths increases its accuracy and improves the stability of the assay by up to 30-fold.

Annexe 2 : Extrait de la fiche technique Glucose RTU™ de Biomérieux

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.

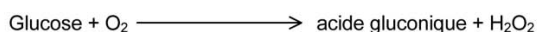
En conditions physiologiques normales, le glucose n'est pas excrété dans les urines.

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

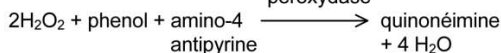
Le glucose est dosé en utilisant la séquence glucose oxydase – peroxydase – chromogène :

glucose oxydase



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

peroxydase



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		

ETALONNAGE

Utiliser la solution étalon fournie.

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

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

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

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

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

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).

Annexe 3 : Extrait de la fiche technique de *Pierce Biotechnology* pour le dosage des thiols par la méthode d'Ellman

Principe .



Ellman's Reagent
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
 $C_{12}H_{10}N_2O_6S_2$
 Mol. Wt.: 396.33

Figure 1. Structure of Ellman's Reagent



Figure 2. Reaction of Ellman's Reagent

Table 1. Molar extinction coefficients of Ellman's Reagent at various wavelengths

$\lambda = 360\text{nm}$	$\epsilon = 11200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
$\lambda = 380\text{nm}$	12800
$\lambda = 410\text{nm}$ (pH > 8, with EDTA)	11100
Unreacted thiol (cysteine, free-cysteine)	11700
$\lambda = 410\text{nm}$ (with EDTA)	11800
$\lambda = 415\text{nm}$	11200

Limit of linearity (LOL) = 0.01 nmol/L

Procedure for Quantifying Sulfhydryl Groups Based on Molar Absorptivity

A. Material Preparation

- Reaction Buffer: 0.1M sodium phosphate, pH > 8, containing 1 mM EDTA
- Ellman's Reagent Solution: 100 mg of Ellman's Reagent in 1 mL of Reaction Buffer

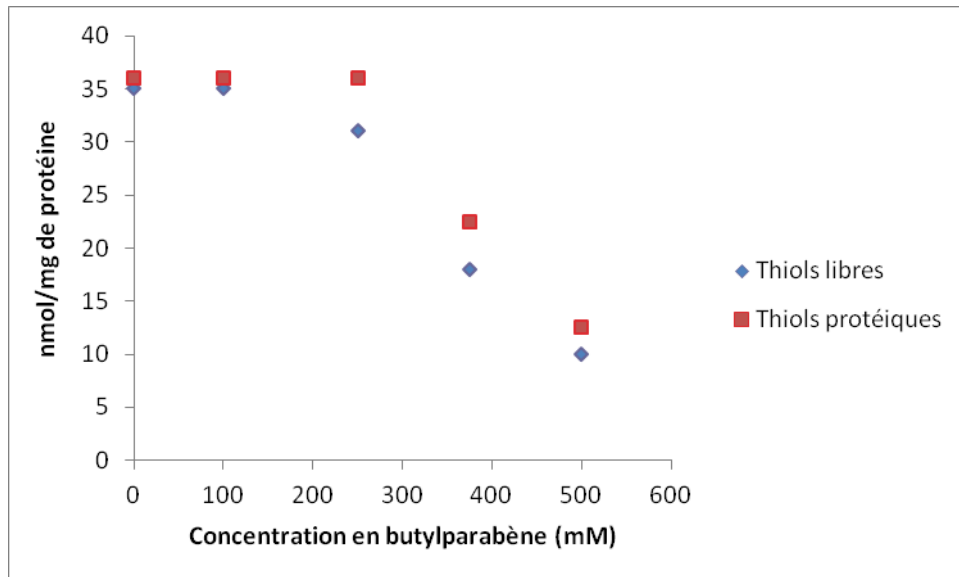
B. Measure Absorbance

- 1 For each unknown sample to be tested, prepare a tube containing 50 μL of Ellman's Reagent Solution and 5 μL of Reaction Buffer
- 2 Add 20 μL of each unknown to the separate test tubes prepared in step 1. Use a blank cell (200 μL of Reaction Buffer) as a separate test tube prepared in Step 1.

Note: For the unknowns, ensure dilutions so that the 20 μL sample applied to the assay solution does not dilute Ellman's reagent below that 1:10000 concentration necessary for the assay and the sulfhydryl will result in high absorbance values and low accurate detection of the concentration based on the constant coefficient.

- 3 Mix and incubate in a water bath at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes.
- 4 With a spectrophotometer at 410 nm, read the absorbance of the blank and then measure absorbance of each sample.
- 5 Calculate the amount and concentration of sulfhydryl in the sample from the molar extinction coefficient of TNB.

Annexe 4 : Effet d'un traitement au butylparabène sur les thiols cellulaires d'hépatocytes








Source : *Toxicology*, 120 (1997), 29-36

Annexe 5 : Profils de migration (en duplicate) de l'ADN génomique extrait de cellules Vero, non traitées (NT) ou traitées 24 h par du PPB à 500 mmol.L⁻¹ sur gel d'agarose à 1,5%



Annexe 6 : Éléments de sécurité pour le risque chimique

Isopropanol	
 <p>ATTENTION</p>	<p>Irritation oculaire classe 2 H 319 Provoque une sévère irritation des yeux</p> <p>Toxicité spécifique pour certains organes cibles — exposition unique classe 3 H 336 Peut provoquer somnolences et vertiges</p>
 <p>DANGER</p>	<p>Liquides inflammables classe 2 H 225 liquides et vapeurs très inflammables</p>
Acide trichloracétique	
 <p>DANGER</p>	<p>Irritation cutanée classe 1A H314 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.</p>
 <p>ATTENTION</p>	<p>Toxicité aquatique aiguë classe 1 H400 Très toxique pour les organismes aquatiques.</p> <p>Toxicité aquatique chronique classe 1 H410 Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.</p>
DTNB ou 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)	
 <p>ATTENTION</p>	<p>Irritation cutanée classe 2 H315 Provoque une irritation cutanée.</p> <p>Irritation oculaire classe 2 H319 Provoque une sévère irritation des yeux.</p> <p>Toxicité spécifique pour certains organes cibles — exposition unique classe 3 H335 Peut irriter les voies respiratoires.</p>

Seuils pour la classe de danger « Irritation oculaire »

Table 3.3.3: Concentration of ingredients of a mixture classified as skin Category 1 and/or eye Category 1 or 2 that would trigger classification of the mixtures as hazardous to the eye (Category 1 or 2)

Sum of ingredients classified as	Concentration triggering classification of a mixture as	
	Irreversible eye effects	Reversible eye effects
	Category 1	Category 2
Eye or skin Category 1	≥ 3%	≥ 1% but < 3%
Eye Category 2/2A		≥ 10%
(10 × eye Category 1) + eye Category 2/2A		≥ 10%
Skin Category 1 + eye Category 1	≥ 3%	≥ 1% but < 3%
10 × (skin Category 1 + eye Category 1) + eye Category 2A/2B		≥ 10%

Seuils pour la classe de danger « Irritation cutanée »

Table 3.2.3: Concentration of ingredients of a mixture classified as skin Category 1, 2 or 3 that would trigger classification of the mixture as hazardous to skin (Category 1, 2 or 3)

Sum of ingredients classified as:	Concentration triggering classification of a mixture as:		
	Skin corrosive	Skin irritant	
	Category 1 (see note below)	Category 2	Category 3
Skin Category 1	≥ 5%	≥ 1% but < 5%	
Skin Category 2		≥ 10%	≥ 1% but < 10%
Skin Category 3			≥ 10%
(10 × Skin Category 1) + Skin Category 2		≥ 10%	≥ 1% but < 10%
(10 × Skin Category 1) + Skin Category 2 + Skin Category 3			≥ 10%

NOTE: Only some authorities will use the sub-categories of skin Category 1 (corrosive). In these cases, the sum of all ingredients of a mixture classified as skin Category 1A, 1B or 1C respectively, should each be ≥ 5% in order to classify the mixture as either skin Category 1A, 1B or 1C. In case the sum of the skin Category 1A ingredients is < 5% but the sum of skin Category ingredients 1A+1B is ≥ 5%, the mixture should be classified as skin Category 1B. Similarly, in case the sum of skin Category 1A + 1B is < 5% but the sum of Category 1A + 1B + 1C is ≥ 5% the mixture would be classified as Category 1C.

RAPPORT

Rapport de l'épreuve de travaux pratiques de biochimie-physiologie

Rapport établi par : Caroline Bonnefoy, Olivier Doumeix, Frédéric Ducancel, Sabine Orsoni, Florence Rivenet

Résultats :

≥ 5 et < 6	4	≥ 10 et < 11	3	≥ 16 et < 17	1
≥ 6 et < 7	4	≥ 11 et < 12	1	≥ 17 et < 18	0
≥ 7 et < 8	5	≥ 12 et < 13	3	≥ 18 et < 19	1
≥ 8 et < 9	5	≥ 13 et < 14	1		
≥ 9 et < 10	3	≥ 15 et < 16	0		

Description de l'épreuve :

Le sujet portait sur la cytotoxicité des parabènes, conservateurs largement utilisés dans les cosmétiques, les médicaments et les aliments, mais dont l'innocuité est de plus en plus mise en doute. Le modèle étudié était le couple propylparabène/cellules Vero. Après une observation directe, au microscope, de l'effet du traitement à différentes concentrations, il s'agissait d'une part de mettre en œuvre plusieurs tests classiques de cytotoxicité, d'autre part de doser le propylparabène dans les milieux de culture par chromatographie liquide haute performance (CLHP).

Les tests de toxicité visaient à mesurer l'influence du propylparabène sur la viabilité cellulaire (par la méthode au MTT et par dosage colorimétrique des protéines cellulaires totales), et sur l'état d'oxydation de la cellule (dosage des thiols cellulaires), indice d'un stress oxydatif. Le dosage des protéines totales était complété par un dosage du glucose dans les lysats cellulaires, qui permettait de normaliser le dosage des protéines, c'est-à-dire de prendre en compte l'inévitable fluctuation, d'un tube de centrifugation à l'autre, du volume laissé après élimination du surnageant.

Les dosages par CLHP servaient à évaluer la perméabilité des cellules à la molécule testée à différentes concentrations.

Commentaire sur le travail des candidats :

Les différentes manipulations étaient de durée très inégale. Un ordre de passage était imposé pour la réalisation des injections chromatographiques. Pour les autres parties, l'organisation était à l'initiative des candidats.

Les deux études portant sur les cellules fournies en plaques multi-puits ont été réalisées en priorité au détriment, dans de nombreux cas, du dosage des thiols, pourtant très court.

Les protocoles, détaillés dans le corps du sujet ou présents sous forme de fiches techniques en annexe, ont été dans l'ensemble bien exécutés. Le calcul du taux de viabilité cellulaire par la méthode au MTT ne semble pas avoir posé de problèmes, pas plus que le commentaire de son évolution en fonction de la concentration en parabène. En revanche, les calculs préliminaires de dilution des échantillons, pour le dosage des protéines, ont été rarement bien menés. Les données de ces calculs étaient pourtant très classiques, du type de celles fournies à des étudiants de BTS. Les résultats de dosage du glucose dans les lysats cellulaires ont été exploités de façon satisfaisante.

Par ailleurs, seule une minorité de candidats a su poser correctement les calculs d'exploitation du dosage des thiols, calculs pourtant aussi très classiques. Il s'agissait d'utiliser l'absorbance linéique molaire du réactif d'Ellman réduit en appliquant la loi de Beer-Lambert, sans oublier deux dilutions : celle de l'échantillon dosé dans le milieu de lecture et, pour les échantillons déprotéinisés, celle de l'échantillon dans le réactif de précipitation.

L'analyse chromatographique de la composition en propylparabène des surnageants de culture impliquait également la réalisation d'une dilution, à prendre en compte dans le calcul des concentrations. Là encore, le taux de bonnes réponses a été très faible. En revanche, l'analyse des chromatogrammes pour déterminer la concentration des surnageants en parabène a été bien faite. Concernant la manipulation, l'homogénéisation de la dilution et le rinçage de la seringue

utilisée pour charger l'injecteur étaient indispensables pour obtenir des résultats expérimentaux quantitativement conformes.

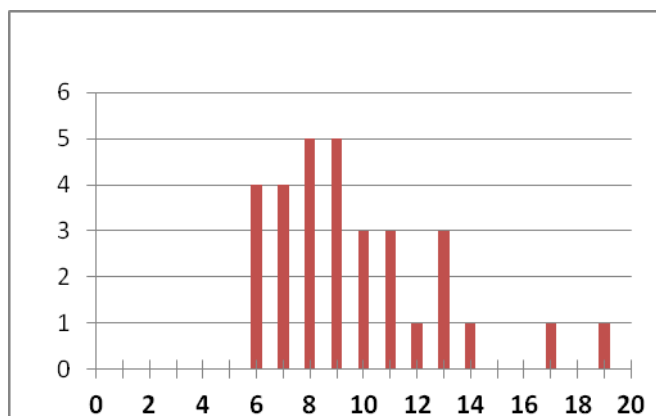
Enfin, l'effort de synthèse demandé à la dernière question a été accompli dans quelques copies.

Il ressort de ces commentaires que de nombreux candidats, devant l'ampleur du travail demandé en travaux pratiques, semblent perdre une partie de leurs moyens et en viennent à faire des erreurs sur des calculs assez simples. Le jury conseille donc de se recentrer sur « les fondamentaux » : prévision de dilutions pour un dosage en fonction de données de concentration et de limite de linéarité, prise en compte de dilution préalable d'échantillons dans les calculs finaux, prise en compte de la dilution de l'échantillon dans le milieu de lecture lors de l'application de la loi de Beer-Lambert, etc. Il s'agit de notions cardinales de biochimie technique, qu'un futur agrégé se doit de maîtriser parfaitement, y compris en condition de stress.

La quantité de travail demandée en manipulations et rédaction de compte-rendu, suppose une planification des manipulations prenant en compte les temps d'attente.

La rigueur dans la gestuelle et dans l'organisation de la paillasse constituent aussi des éléments clé de réussite.

Histogramme de répartition des notes



TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

SUJET

Sujet proposé par : Christophe Beloin, Fabien Cezard, Pascal Chillet, Mélanie Ferrières, Françoise Latourre

Les colicines

INTRODUCTION

Dans la nature, différentes espèces bactériennes partagent souvent le même écosystème. Ces populations bactériennes sont donc amenées à interagir : il existe des interactions bénéfiques (symbiose) et des interactions antagonistes (compétition). Dans le cadre de la compétition, il a été identifié chez de nombreux genres bactériens la production de toxines protéiques appelées **bactériocines**. Elles sont actives sur des bactéries cibles mais pas sur la bactérie productrice, qui possède un mécanisme d'immunité la protégeant.

Parmi les bactériocines, les **colicines** sont des protéines produites par certaines souches d'*E. coli*. Ces colicines, pour atteindre leurs cibles, doivent pouvoir pénétrer à l'intérieur des cellules cibles. Elles utilisent des voies d'entrées (récepteurs, translocateurs, systèmes fournisseurs d'énergie) parfois communes avec celles de nutriments spécifiques, comme des nucléosides, des sidérophores ou encore des vitamines. Selon la voie de passage dans le cytoplasme, on distingue alors deux groupes de colicines, A et B (**annexe 1**).

Les colicines sont des protéines présentant trois domaines fonctionnels :

- un domaine N-terminal, nécessaire à la translocation à travers la membrane externe et au transit dans le périplasma ;
- un domaine central, nécessaire à la fixation au récepteur de la membrane externe ;
- un domaine C-terminal, portant l'activité biologique.

Cette activité biologique permet de classer les colicines en deux groupes fonctionnels :

- les colicines « ionophoriques » : formation de pores dans la membrane et la paroi bactérienne, aboutissant à la lyse des bactéries cibles ;
- les colicines « à activité enzymatique » : arrêt des synthèses (notamment la traduction, mais aussi la synthèse du peptidoglycane), dommages à l'ADN ou à l'ARN (nucléases)...

Le sujet aborde différents aspects de la biologie des colicines en faisant appel à des souches d'*Escherichia coli*, dont les caractéristiques majeures sont présentées dans l'**annexe 2**.

- La **partie A** concerne le mode et le spectre d'action d'une colicine.
- La **partie B** permet de mettre en évidence la voie d'entrée de certaines colicines dans les bactéries cibles.
- La **partie C** s'intéresse aux effets des colicines sur les bactéries cibles, ainsi qu'à la régulation de leur production.

L'**annexe 5**, relative à la **partie B2**, sera partiellement remplie le premier jour, et **rendue avec la copie**. Elle sera complétée le deuxième jour.

Avertissements

- Les **manipulations** des différentes parties sont **indépendantes** ; il convient d'en mener certaines en **parallèle**.
- Un ordre de passage sera attribué pour les dépôts dans la **partie C2**.

TRAVAIL DU PREMIER JOUR

DONNEES

- 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 à 37°C présente une concentration bactérienne comprise entre $1,5 \cdot 10^9$ et $3,0 \cdot 10^9$ bactéries $\cdot mL^{-1}$.

0- Travail préliminaire

La mise en œuvre du sujet nécessite la préparation de suspensions bactériennes ajustées ainsi que de solutions de colicines.

Certaines suspensions bactériennes sont fournies déjà ajustées à $DO_{600} \approx 0,05$ (dans la glace) : **T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8**.

D'autres doivent être ajustées par le candidat : **T1, Sa, P1-Km, P1^{MUT}**.

Cultures

Cultures de 18 h en bouillon LB à 37°C, en tubes à hémolyse contenant 5 mL :

T1	<i>E. coli</i> , souche cible des colicines
Sa	<i>S. aureus</i> , souche éventuellement cible des colicines
P1, P1-Km, P1^{MUT}, P2	<i>E. coli</i> , souches éventuellement productrices de colicines

Cultures de 18 h en bouillon LB + ofloxacin à $0,0315 \mu g \cdot mL^{-1}$ à 37°C, en tubes à hémolyse contenant 5 mL :

P1*, P1^{MUT*}, P2*	<i>E. coli</i> , souches éventuellement productrices de colicines
------------------------------------	---

Réactif

$\varnothing 9$ mL (eau physiologique) stérile : tubes de 9 mL

Milieux de culture

Bouillon **LB** stérile : 200 mL en flacon

Gélose **LA** en surfusion : 2 flacons de 60 mL (**à demander à un examinateur**)

Matériel spécifique

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Semi-microcuves

Tubes à hémolyse stériles de 10 mL, et tubes à essai stériles

Flacon vide stérile de 30 mL

Pipettes graduées stériles de 1 mL, 5 mL, 10 mL et 25 mL

Microtubes stériles de 2 mL

Microcentrifugeuse

6 seringues stériles de 5 mL + 6 filtres stériles de porosité $0,22 \mu m$

6 boîtes de Petri de 90 mm vides stériles

MANIPULATIONS

01- Préparation des suspensions ajustées

À partir des souches **T1, Sa, P1-Km, P1^{MUT}**, préparer une suspension ajustée en bouillon LB. Pour cela :

- Mesurer la densité optique à 600 nm de chaque souche judicieusement diluée contre un blanc adapté.
- Pour **T1** :
 - préparer 25 mL de suspension **ajustée à $DO_{600} \approx 0,05$** dans un flacon vide stérile de 30 mL ;
 - préparer 10 mL de suspension **ajustée à $DO_{600} \approx 0,1$** dans un tube à essai stérile.
- Pour **Sa, P1-Km** et **P1^{MUT}**, préparer 5 mL de suspension **ajustée à $DO_{600} \approx 0,1$** dans un tube à hémolyse stérile de 10 mL.

Toutes les mesures de DO_{600} seront réalisées en présence d'un examinateur.

Les suspensions ainsi obtenues doivent être conservées dans la glace.

02- Dénombrement d'une suspension ajustée

Il s'agit de vérifier l'ajustage à $DO_{600} \approx 0,1$ de la suspension **T1** préparée dans la **partie 01**. Cette vérification se fera en deux temps : mesure de la DO_{600} et dénombrement dans la masse, sur 3 dilutions judicieusement choisies, et en double essai.

- Mesurer la densité optique à 600 nm de la suspension **T1** ajustée à $DO_{600} \approx 0,1$ préparée dans la **partie 01**.

La mesure de DO_{600} sera réalisée en présence d'un examinateur.

- À partir de la suspension **T1** ajustée à $DO_{600} \approx 0,1$ réaliser autant de dilutions décimales que nécessaire, en utilisant les tubes d'eau physiologique de 9 mL.

Une dilution sera réalisée en présence d'un examinateur.

- Réaliser le dénombrement dans la masse de gélose **LA** (1 flacon de 60 mL permet de couler 3 boîtes).
- Incuber les 6 boîtes à 37°C.

03- Préparation des solutions de colicines

À partir de chaque souche **P1**, **P1^{MUT}**, **P2**, **P1***, **P1^{MUT*}**, **P2***, préparer une solution de colicine. Pour cela :

- Centrifuger les souches :
 - pour **P1** et **P1^{MUT}** : préparer pour chacune 2 microtubes de 2 mL contenant 1,7 mL de culture ;
 - pour **P2**, **P1***, **P1^{MUT*}**, **P2*** : préparer pour chacune 1 microtube de 2 mL contenant 1,7 mL de culture ;
 - centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes.
- Filtrer les surnageants obtenus. Pour chaque souche :
 - retirer le piston d'une seringue stérile de 5 mL ;
 - adapter un filtre stérile de porosité 0,22 μ m sur le corps de la seringue ;
 - transférer délicatement à la pipette automatique, le maximum de surnageant dans le corps de la seringue ;
 - remettre le piston en place et filtrer.

Pour **P1** et **P1^{MUT}**, le filtrat obtenu sera récupéré dans un tube à hémolyse. Pour toutes les autres souches, chaque filtrat obtenu sera récupéré dans un microtube de 2 mL.

Réaliser une filtration dans son ensemble en présence d'un examinateur.

Les solutions ainsi obtenues (**colP1**, **colP1^{MUT}**, **colP2**, **colP1***, **colP1^{MUT*}**, **colP2***) doivent être conservées dans la glace.

COMPTE-RENDU

1. Présenter, sous forme d'un tableau, l'ensemble des résultats des mesures de DO_{600} et les calculs permettant la réalisation des suspensions ajustées dans la **partie 01**.
2. Justifier le choix des 3 dilutions ensemencées dans la **partie 02**.

PARTIE A

Mode et spectre d'action d'une colicine

Il est proposé de mettre en évidence l'effet des colicines en mélangeant des souches sensibles ou résistantes aux colicines soit avec des souches productrices ou non de colicines, soit avec des solutions de colicines.

Les objectifs de cette partie sont de définir si l'effet de la colicine **colP1** :

- nécessite ou pas un contact entre la souche productrice et la souche cible ;
- s'exerce sur les bactéries à Gram- et/ou à Gram+ ;
- est bactériostatique ou bactéricide.

Cultures

Cultures ajustées à $DO_{600} \approx 0,1$ des souches éventuellement cibles des colicines :

T1 *E. coli*, souche cible des colicines (Amp^R)

Sa *S. aureus*, souche éventuellement cible des colicines

Cultures ajustées à $DO_{600} \approx 0,1$ des souches éventuellement productrices de colicines :

P1-Km *E. coli*, souche productrice de colicine (Km^R)

P1^{MUT} *E. coli*, souche mutante de P1, non productrice de colicine (Km^R)

Réactifs

Solutions de colicines : **colP1**, **colP1^{MUT}**

Eau Δ (eau distillée) stérile : 100 mL en flacon

Milieux de culture

1 gélose **LA+Amp** : gélose LA + ampicilline à $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, coulée en boîte de Petri carrée 120 x 120

1 gélose **LA+Km** : gélose LA + kanamycine à $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, coulée en boîte de Petri carrée 120 x 120

Matériel spécifique

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Semi-microcuvettes

Tubes à hémolyse stériles de 10 mL

Pipettes graduées stériles de 2 mL

Bain thermostaté à agitation à 37°C

Microplaque stérile à fonds ronds + couvercle

Chronomètre

MANIPULATIONS

A1- Mise en culture des six mélanges

- Réaliser les 6 mélanges ci-dessous dans 6 tubes à hémolyse stériles de 10 mL :

	1	2	3	4	5	6
T1 ajustée à $DO_{600} \approx 0,1$	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL		
P1-Km ajustée à $DO_{600} \approx 0,1$	1,5 mL					
P1^{MUT} ajustée à $DO_{600} \approx 0,1$		1,5 mL				
Sa ajustée à $DO_{600} \approx 0,1$					1,5 mL	1,5 mL
Solution de colicine colP1			1 mL		1 mL	
Solution de colicine colP1^{MUT}				1 mL		1 mL

- À t_0 , transférer :
 - 100 μL des mélanges **1** et **2** dans la microplaque, en vue des dénombrements (cf. **partie A2**) ;
 - 700 μL des mélanges **3, 4, 5, 6** en cuves pour une mesure de la densité optique (cf. **partie A3**).
- Incuber les 6 tubes sous agitation à 37°C pendant 2 h.
- À t_{2h} , placer les tubes dans la glace, puis transférer :
 - 100 μL des mélanges **1** et **2** dans la microplaque, en vue des dénombrements (cf. **partie A2**) ;
 - 700 μL des mélanges **3, 4, 5, 6** en cuves pour une mesure de la densité optique (cf. **partie A3**).

A2- Dénombrements des mélanges 1 et 2

- Réaliser les dénombrements de ces 2 mélanges à t_0 et t_{2h} :
 - à partir de chaque mélange, préparer en microplaque et en eau distillée, 8 dilutions décimales allant jusqu'à 10^{-8} (dilution dans un volume total de 200 μL ; homogénéisation de chaque dilution par 10 aspirations/refoulements) ;
 - selon le gabarit fourni en **annexe 3**, déposer 10 μL de chaque mélange et de ses dilutions (en travaillant en pipetage inverse) sur gélose **LA+Amp** et sur gélose **LA+Km** ;

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

- laisser les gouttes sécher.
- Incuber les boîtes à 37°C.

A3- Suivi opacimétrique des mélanges 3, 4, 5, 6

- Mesurer la DO_{600} sur chaque prélèvement à t_0 et t_{2h} .

Toutes les mesures de DO_{600} seront réalisées en présence d'un examinateur.

COMPTE-RENDU

3. Justifier le choix des milieux sélectifs **LA+Amp** et **LA+Km** utilisés pour les dénombrements des mélanges 1 et 2 (**partie A2**).
4. Consigner les résultats des mesures de DO_{600} des mélanges 3 à 6 (**partie A3**) dans un tableau.
5. Conclure par rapport aux objectifs fixés.

PARTIE B

Entrée des colicines dans les bactéries cibles

B1- Mise en évidence de la voie d'entrée des colicines

Les colicines, pour pénétrer dans la bactérie cible utilisent différents récepteurs et translocateurs. Leur entrée nécessite une source d'énergie qui est fournie par deux systèmes différents (**annexe 1**).

Il est proposé de mettre en évidence certains éléments de la voie d'entrée de différentes colicines en utilisant des souches de bactéries sensibles mutées dans des gènes codant différentes protéines intervenant dans cette voie (**annexe 2**).

Cultures

Cultures ajustées à $DO_{600} \approx 0,05$ des souches cibles des colicines, en tubes à hémolyse contenant 5 mL :
T1 (ajustée en **partie 01**), **T2**, **T3**, **T4**, **T5**, **T6**, **T7** (fournies déjà ajustées)

Cultures de 18 h en bouillon LB à 37°C, en tubes à hémolyse contenant 5 mL :
E. coli, souches éventuellement productrices de colicines notées **P1**, **P1^{MUT}**, **P2**

Réactifs

Solutions de colicines : **colP1**, **colP1^{MUT}**, **colP2**

Milieux de culture

7 géloses **LA**, coulées en boîtes de Petri

MANIPULATIONS

- À partir de chaque souche cible **T1**, **T2**, **T3**, **T4**, **T5**, **T6**, **T7** ajustée à $DO_{600} \approx 0,05$ ensemencer une gélose **LA**. Pour cela :
 - inonder la surface de la gélose avec 5 mL de la culture ajustée à $DO_{600} \approx 0,05$;
 - aspirer l'excès de culture et l'éliminer ;
 - faire sécher la boîte sous PSM (au moins 15 min).

- Pour chaque boîte, déposer selon le gabarit (**annexe 4**), une série de gouttes de 5 μL :
 - de chaque souche éventuellement productrice de colicine **P1**, **P1^{MUT}**, **P2** ;
 - de chaque solution de colicine **colP1**, **colP1^{MUT}**, **colP2**.
- Laisser les gouttes sécher.
- Incuber les 7 boîtes à 37°C.

B2- Récepteur utilisé par la colicine colP2 pour son entrée dans les bactéries cibles

Les colicines pénètrent dans les bactéries cibles par l'intermédiaire de récepteurs qui peuvent être aussi utilisés pour l'entrée de différentes molécules, dont la vitamine B12.

Culture

Culture ajustée à $\text{DO}_{600} \approx 0,05$ de la souche cible des colicines **T1**

Réactifs

Solution de colicine : **colP2**

Solution de vitamine **B12** à $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en eau distillée stérile : 1,2 mL en microtube rose

Milieu de culture

Bouillon **LB** stérile : 200 mL en flacon

Matériel spécifique

Flacon vide stérile de 30 mL

Microtubes stériles de 2 mL

Microplaque stérile à fonds ronds + couvercle

Agitateur de microplaques

MANIPULATIONS

Il s'agit de tester l'effet de la vitamine B12 sur l'activité de la colicine **colP2** vis-à-vis de la souche cible **T1**. Pour cela, on réalisera en microplaque :

- sur les **lignes A à F** : une gamme de vitamine B12 (*cf. partie B21*) ;
- sur la **ligne H** : 5 témoins dont la composition sera précisée sur l'**annexe 5** (**À RENDRE AVEC LA COPIE**).

B21- Réalisation d'une gamme de vitamine B12

À partir de la solution de vitamine B12, préparer une microplaque selon le protocole suivant (voir aussi **annexe 5**) :

- Sur chaque **ligne A à F** : onze dilutions en série en LB de la vitamine B12, selon une suite géométrique de raison 1/2 (cupules 1 à 11 de chaque ligne ; homogénéisation de chaque dilution par aspirations/refoulements).

La première cupule de chaque ligne contiendra la vitamine B12 non diluée.

Le volume dans chaque cupule doit être égal à 50 μL avant l'ajout de l'inoculum bactérien.

À ce stade, la cupule 12 de chaque ligne contient 50 μL de LB : elle servira de témoin.

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

- Couvrir la microplaque et la conserver sur la paillasse le temps de réaliser la suite.

B22- Préparation de l'inoculum T1

À partir de la souche **T1** ajustée à $\text{DO}_{600} \approx 0,05$ préparer 20 mL d'une suspension bactérienne en LB dans un flacon vide stérile de 30 mL, de telle sorte que la concentration *finale* dans chaque cupule soit de $5 \cdot 10^5$ bactéries $\cdot \text{mL}^{-1}$.

Cette dilution constitue l'**inoculum T1** (à conserver dans la glace avant utilisation).

B23- Inoculation

- Ensemencer toutes les cupules des **lignes A à F** avec 100 μL de l'**inoculum T1**.

- Ensemencer le(s) témoin(s) (**ligne H**) qui le nécessite(nt) avec 100 µL de l'**inoculum T1**.
- Couvrir la microplaque, et incuber sous agitation douce 15 minutes à température ambiante.

B24- Réalisation d'une gamme de colicine colP2

Préparer en microtubes et en LB, 5 dilutions décimales de la colicine **colP2** allant jusqu'à 10^{-5} (dilution dans un volume total de 1 mL).

B25- Ajout de la colicine

- Sur les **lignes A à F** (cupules 1 à 12) ajouter 50 µL de la solution de colicine **colP2** et de ses dilutions, selon l'**annexe 5**.
- Sur la **ligne H**, ajouter 50 µL de colicine **colP2** non diluée dans le(s) témoin(s) qui le nécessite(nt).
- Incuber la microplaque à 37°C.

COMPTE-RENDU

6. Compléter le tableau de l'**annexe 5** (**À RENDRE AVEC LA COPIE**) : volumes pour les dilutions de la vitamine B12, concentrations finales en vitamine B12, compositions des témoins.
7. Préciser, sur l'**annexe 5**, le rôle de chaque témoin réalisé ainsi que la lecture attendue pour chacun d'eux.
8. Présenter les calculs permettant la réalisation de l'**inoculum T1**.

PARTIE C

Effets sur les bactéries cibles et régulation de la production de colicines

C1- Induction d'un stress par la colicine colP2

Certaines colicines, de même que certains antibiotiques, induisent un stress chez les bactéries. Différents systèmes de réponse au stress existent chez *E. coli* (**annexe 6**).

Ce stress peut être mis en évidence grâce à une souche cible ayant une construction génétique particulière faisant intervenir le gène *lacZ*. Cette construction génétique est présente dans la souche **T8**.

La kanamycine est un antibiotique de la famille des aminosides dont la cible est la sous-unité 30S des ribosomes.

L'ofloxacin est un antibiotique de la famille des fluoroquinolones dont la cible est l'ADN gyrase.

Culture

Culture ajustée à $DO_{600} \approx 0,05$ de la souche cible des colicines, en tubes à essai contenant 10 mL : **T8**

Milieu de culture

Gélose **LA+Xgal** : gélose LA + XGal à $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, coulée en boîte de Petri carrée 120 x 120

Réactifs

Eau Δ (eau distillée) stérile : 100 mL en flacon

Solution de colicine : **colP2**

Km (solution de kanamycine) à $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en eau : 300 µL en microtube jaune

OFLO (solution d'ofloxacin) à $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en eau : 300 µL en microtube vert

Matériel spécifique

Microplaque stérile à fonds ronds + couvercle

MANIPULATIONS

C11- Réalisation de gammes de colicine colP2 et d'antibiotiques

À partir de la solution de colicine **colP2**, de la solution de kanamycine et de la solution d'ofloxacine, réaliser en eau distillée stérile et sous un volume total de 100 μL , 8 dilutions en série de la solution à tester selon une suite géométrique de raison 1/2, dans une microplaque stérile.

C12- Ensemencement et mise en contact

- Ensemencer une gélose **LA+Xgal**. Pour cela :
 - inonder la surface de la gélose avec 10 mL de la culture de la souche **T8** ajustée à $\text{DO}_{600} \approx 0,05$;
 - aspirer l'excès de culture et l'éliminer ;
 - faire sécher la boîte sous PSM (au moins 15 min).
- Déposer selon le gabarit (**annexe 7**), une série de gouttes de 5 μL des solutions non diluées et de chaque dilution des gammes préparées en **partie C11**.
- Laisser les gouttes sécher.
- Incuber la boîte à 37°C.

COMPTE-RENDU

9. Préciser l'intérêt de tester les solutions d'ofloxacine et de kanamycine.

C2- Activité de la colicine colP2

On se propose ici de mettre en évidence l'activité biologique d'une colicine.

Réactifs

Solution de colicine : **colP2**

ADN de lambda (ADN du bactériophage λ) à 30 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$: 45 μL en microtube orange

Eau ultrapure : 50 μL en microtube bleu

Tampon test d'activité 10X (Tris HCl 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl 800 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, MgSO_4 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,0) : 20 μL en microtube vert

Tampon test d'activité + EDTA 10X (Tris HCl 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl 800 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,0) : 20 μL en microtube jaune

Tampon de charge 6X (40% (m/v) saccharose, bleu de bromophénol 0,25% (m/v) en eau distillée) : 20 μL en microtube

Matériel spécifique

Microtubes stériles de 1,5 mL

Bain thermostaté à 37°C

Bain thermostaté à 80°C

Portoir flottant pour microtubes et systèmes de fermeture pour microtubes (clips)

Gel d'agarose à 0,7% (m/v) additionné de colorant GelRed™, préparé en tampon TBE 1X (10,8 g de Tris base, 5,5 g d'acide borique, 0,93 g EDTA disodique, qsp 1 L H_2O , pH 8,0)

Cuve d'électrophorèse et générateur

Chronomètre

MANIPULATIONS

C21- Préparation des essais et du témoin

- Dans un microtube de 1,5 mL, chauffer 20 µL de solution de colicine **colP2** à 80°C pendant 10 minutes (tube cliqué, sur portoir flottant).
- 3 essais sont réalisés en microtubes de 1,5 mL :
 - **Essai 1** : 300 ng d'ADN du bactériophage λ sont placés au contact de 8 µL de solution de colicine **colP2**, et de **tampon test d'activité** à la concentration finale de 1X.
 - **Essai 2** : 300 ng d'ADN du bactériophage λ sont placés au contact de 8 µL de solution de colicine **colP2 chauffée à 80 °C pendant 10 minutes**, et de **tampon test d'activité** à la concentration finale de 1X.
 - **Essai 3** : 300 ng d'ADN du bactériophage λ sont placés au contact de 8 µL de solution de colicine **colP2**, et de **tampon test d'activité + EDTA** à la concentration finale de 1X.
- Un témoin approprié sera réalisé.
- Centrifuger brièvement à vitesse maximale.

C22- Incubation

Essais et témoin sont incubés à 37°C pendant 20 minutes.

C23- Dépôts et migration sur gel d'agarose 0,7% (m/v)

- Préparer les dépôts : 2 µL de tampon de charge 6X + 10 µL de chacun des essais et témoin, dans des microtubes de 1,5 mL.
Si le dépôt n'a pas lieu immédiatement, conserver les échantillons dans la glace.
- Déposer la totalité des préparations dans les puits du gel d'agarose à 0,7% (m/v).
Les dépôts se feront avec des gants.

Un dépôt sera réalisé en présence d'un examinateur.

Un horaire pour les dépôts sera imposé :

Le dépôt d'un marqueur de taille, la migration et la révélation du gel seront réalisés par les examinateurs.

COMPTE-RENDU

10. Présenter un tableau complet de préparation des tubes essais et témoin.

11. Préciser le rôle du témoin.

C3- Effet de l'induction du système SOS sur la production de colicines

Certaines molécules ont la propriété, quand elles sont présentes dans le milieu de culture, d'activer le système SOS des bactéries : l'ofloxacine en fait partie. La manipulation suivante permet d'étudier les effets de l'induction du système SOS sur la production de colicines lors de la croissance bactérienne.

Culture

Culture ajustée à $DO_{600} \approx 0,05$ de la souche cible des colicines : **T1**

Milieu de culture

Gélose **LA**, coulée en boîte de Petri

Réactifs

Solutions de colicines obtenues à partir de souches cultivées en LB :

colP1, colP1^{MUT}, colP2

Solutions de colicines obtenues à partir de souches cultivées en LB + ofloxacine à $0,0315 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$:

colP1*, colP1^{MUT*}, colP2*

MANIPULATIONS

- Ensemencer une gélose **LA** avec la souche cible des colicines **T1** ajustée à $DO_{600} \approx 0,05$. Pour cela :
 - inonder la surface de la gélose avec 5 mL de la culture ajustée à $DO_{600} \approx 0,05$;
 - aspirer l'excès de culture et l'éliminer ;
 - faire sécher la boîte sous PSM (au moins 15 min).
- Déposer selon le gabarit (**annexe 4**), une série de gouttes de 5 μ L de chaque solution de colicine **colP1**, **colP1^{MUT}**, **colP2**, **colP1***, **colP1^{MUT*}**, **colP2***.
- Laisser les gouttes sécher.
- Incuber la boîte à 37°C.

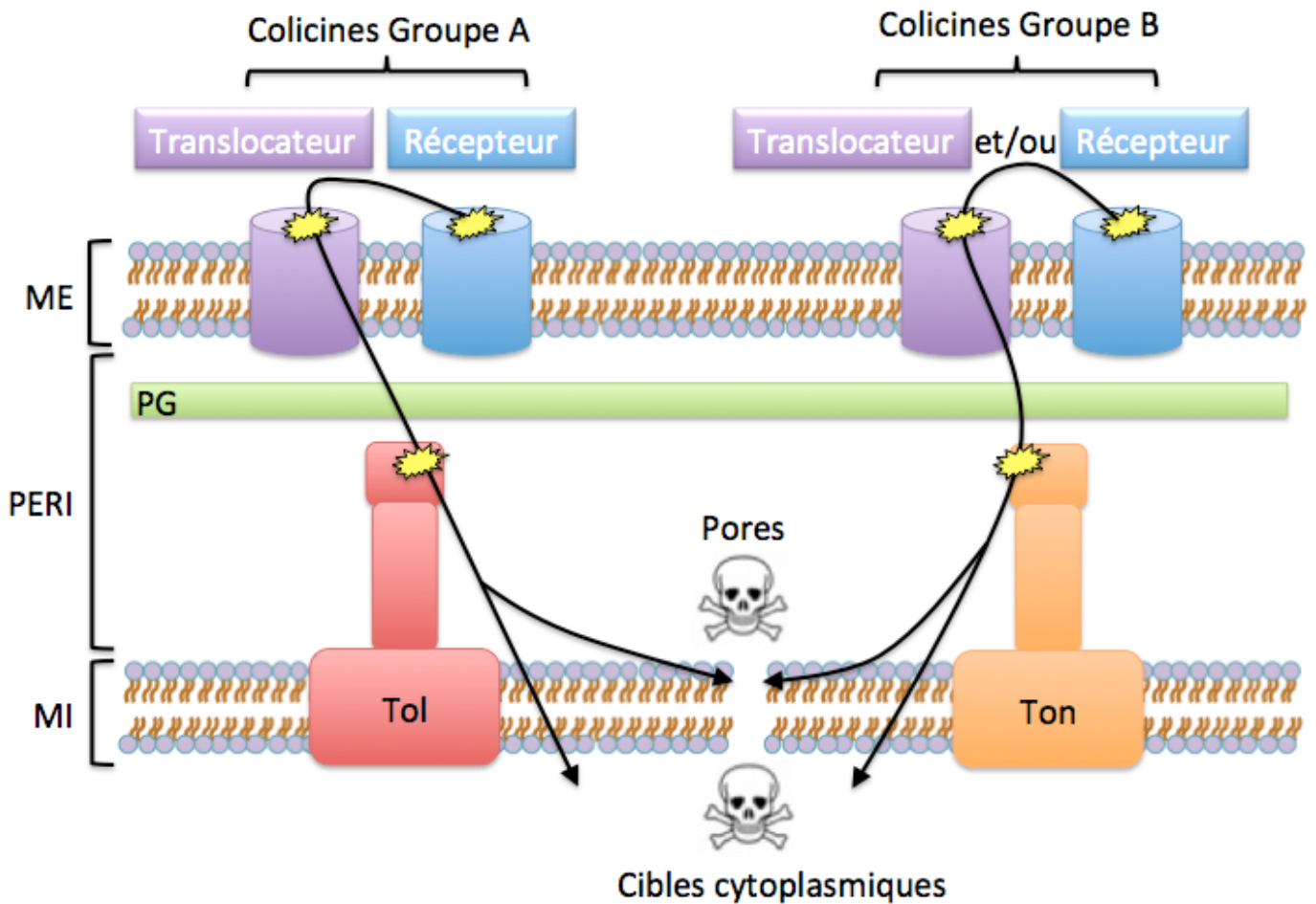
COMPTE-RENDU

12. Préciser l'intérêt d'avoir préalablement cultivé les souches en LB et en LB + ofloxacine.

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

ANNEXE 1

Mécanismes de transport des colicines à l'intérieur des bactéries cibles



ME membrane externe
PERI périplasme

MI membrane interne
PG peptidoglycane

Les colicines s'attachent à un récepteur avant d'être *transloquées* à travers la membrane externe, puis de transiter dans le périplasme (*transit périplasmique*), et enfin de passer éventuellement dans le cytoplasme (*translocation à travers la membrane interne*).

Il existe deux groupes de colicines (A et B) qui se différencient essentiellement par le système qui fournit l'énergie permettant leur entrée dans la cellule :

- le système **Tol** (TolAQRB) fournit l'énergie pour le transport des colicines du groupe A qui requiert en outre la présence de deux protéines sur la membrane externe, un récepteur et un translocateur ;
- le système **Ton** (TonB-ExbB-ExbD) fournit l'énergie pour le transport des colicines du groupe B qui semble, dans la plupart des cas, ne nécessiter la présence que d'une seule protéine sur la membrane externe, jouant à la fois le rôle de récepteur et de translocateur.

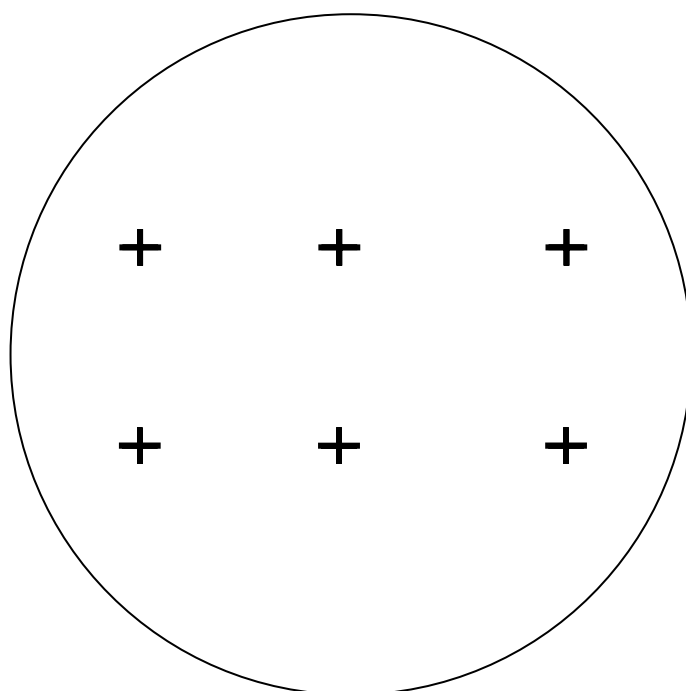
ANNEXE 2
Souches d'*Escherichia coli* K-12 utilisées dans le sujet

SOUCHES		GENOTYPE	COMMENTAIRE
Souches PRODUCTRICES	P1	Sauvage	Souche d' <i>E. coli</i> commensale productrice de la colicine colP1 .
	P1-Km	Comme P1 mais Km ^R	Souche d' <i>E. coli</i> commensale productrice de la colicine colP1 . Souche résistante à la kanamycine .
	P1 ^{MUT}	Comme P1 mais $\Delta colP1$, Km ^R	Souche dérivée de la souche P1, mutée dans le gène permettant la production de la colicine colP1 . Souche résistante à la kanamycine .
	P2	Sauvage	Souche d' <i>E. coli</i> commensale productrice de la colicine colP2 .
Souches CIBLES	T1	MG1655 Amp ^R	Souche d' <i>E. coli</i> commensale MG1655. Souche sensible aux colicines. Souche résistante à l' ampicilline .
	T2	MG1655_ $\Delta tolA$	MG1655 délétée du gène <i>tolA</i> qui code une protéine de la membrane interne. TolA fait partie du système TolABQR qui est impliqué dans l'apport d'énergie pour la translocation de molécules à l'intérieur d' <i>E. coli</i> .
	T3	MG1655_ $\Delta btuB$	MG1655 délétée du gène <i>btuB</i> qui code une porine de la membrane externe. BtuB permet l' import de vitamine B12.
	T4	MG1655_ Δtsx	MG1655 délétée du gène <i>tsx</i> qui code une porine de la membrane externe. Tsx permet l' import de nucléosides.
	T5	MG1655_ $\Delta tonB$	MG1655 délétée du gène <i>tonB</i> qui code une protéine cytoplasmique. TonB fait partie du système TonB-ExbB-ExbD qui est impliqué dans l'apport d'énergie pour la translocation de molécules à l'intérieur d' <i>E. coli</i> .
	T6	MG1655_ $\Delta ompA$	MG1655 délétée du gène <i>ompA</i> qui code une porine de la membrane externe. OmpA permet l' import non spécifique de solutés de petite taille.
	T7	MG1655_ $\Delta fhuA$	MG1655 délétée du gène <i>fhuA</i> qui code une porine de la membrane externe. FhuA permet l' import d'un sidérophore, le ferrichrome.
	T8	MG1655_ <i>geneY::lacZ</i>	MG1655 portant une fusion transcriptionnelle entre le gène <i>lacZ</i> codant la β -galactosidase et le gène Y qui est induit lors d'un stress.

ANNEXE 3
Gabarit pour les dépôts (partie A2)

	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Mélange 1 à t_0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mélange 2 à t_0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mélange 1 à t_{2h}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mélange 2 à t_{2h}	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ANNEXE 4
Gabarit pour les dépôts (parties B1 et C3)



ANNEXE 5

Plan de microplaque (partie B2)
 – à rendre avec la copie – N° de poste :

ESSAIS

CUPULES	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
LB (µL)												50
Solution B12 100 µg·mL ⁻¹ (µL)												
Redistribuer (µL)												
Inoculum T1 (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Solution colP2 dilution 10 ⁰ (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
[B12] _r (µg·mL ⁻¹)												
Lecture (J2)												
CUPULES	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
LB, B12, inoculum	<i>Voir ci-dessus (mêmes dilutions, même ensemencement)</i>											
Solution colP2 dilution 10 ⁻¹ (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Lecture (J2)												
CUPULES	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
LB, B12, inoculum	<i>Voir ci-dessus (mêmes dilutions, même ensemencement)</i>											
Solution colP2 dilution 10 ⁻² (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Lecture (J2)												
CUPULES	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
LB, B12, inoculum	<i>Voir ci-dessus (mêmes dilutions, même ensemencement)</i>											
Solution colP2 dilution 10 ⁻³ (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Lecture (J2)												
CUPULES	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
LB, B12, inoculum	<i>Voir ci-dessus (mêmes dilutions, même ensemencement)</i>											
Solution colP2 dilution 10 ⁻⁴ (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Lecture (J2)												
CUPULES	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
LB, B12, inoculum	<i>Voir ci-dessus (mêmes dilutions, même ensemencement)</i>											
Solution colP2 dilution 10 ⁻⁵ (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Lecture (J2)												

ANNEXE 5 (suite)	
Plan de microplaque (partie B2)	
- A RENDRE AVEC LA COPIE - N° de poste :	

TEMOINS SUPPLÉMENTAIRES

CUPULES	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
LB (µL)												
Solution B12 100 µg·mL ⁻¹ (µL)												
Inoculum T1 (µL)												
Solution colP2 dilution 10 ⁰ (µL)												
Lecture (J2)												

Utiliser pour la lecture les **symboles** : « + », et « - », en précisant la signification attribuée.

- + :
- :

SIGNIFICATION ET LECTURE ATTENDUE DES TEMOINS

CUPULES	RÔLE	LECTURE ATTENDUE
Cupule 12 de chaque ligne de A à F		
H1		
H3		
H5		
H7		
H9		

ANNEXE 6
Différents systèmes de stress chez *E. coli*

Chez *E. coli* il existe différents systèmes répondant à différents types de stress (voir tableau ci-dessous). Ces systèmes entraînent l'induction d'un groupe de gènes qui permettent à *E. coli* de mettre en place une réponse adaptée suite aux stress subis.

NOM DU SYSTEME DE STRESS	SIGNAUX INDUISANT CE SYSTEME DE STRESS	EXEMPLES DE GENES INDUITS PAR LE SYSTEME DE STRESS
Cpx	Adhésion sur une surface, accumulation de protéines dans le périplasme	<i>cpxR, cpxA, degP</i>
SOS	Dommages à l'ADN dont cassures double brin	<i>recA, sulA, dinF</i>
Sigma S	Entrée en phase stationnaire de croissance	<i>rpoS, dps, osmC</i>
Stress oxydatif	Espèces réactives oxygénées ou azotées	<i>oxyR, katG, sodC</i>

ANNEXE 7
Gabarit pour les dépôts (partie C1)

	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Km	+	+	+	+	+	+	+	+	+
colP2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OFLO	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TRAVAIL DU DEUXIÈME JOUR

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

0- Travail préliminaire

02- Dénombrement d'une suspension ajustée

MANIPULATIONS

- Compter les colonies sur les boîtes.

COMPTE-RENDU

- 13.** Présenter les résultats
- 14.** Calculer la concentration bactérienne dans la suspension ajustée **T1**.
- 15.** Conclure sur la qualité de l'ajustage réalisé.

PARTIE A

Mode et spectre d'action d'une colicine

MANIPULATIONS

A2- Dénombrements des mélanges 1 et 2

- Pour chaque dépôt, compter les colonies.
On retiendra comme comptable tout dépôt ayant moins de 40 colonies.

COMPTE-RENDU

- 16.** Présenter les résultats.
- 17.** Calculer les concentrations des bactéries cibles **T1** et productrices **P1-Km** et **P1^{MUT}** à t_0 et à t_{2h} de contact.
- 18.** Conclure sur l'activité bactériostatique ou bactéricide de la colicine analysée.

PARTIE B

Entrée des colicines dans les bactéries cibles

B1- Mise en évidence de la voie d'entrée des colicines

MANIPULATIONS

- Observer les résultats obtenus.

COMPTE-RENDU

- 19.** Donner la lecture des résultats obtenus sous forme de tableau.
- 20.** Comparer les résultats obtenus pour les dépôts de cultures de souches productrices de colicines ou de solutions de colicines.

-
- 21.** Pour les colicines **colP1** et **colP2**, conclure sur le(s) récepteur(s) / translocateur(s) utilisé(s) et le système fournissant l'énergie à la translocation pour pénétrer dans les bactéries cibles, à l'aide des géotypes des souches annoncés dans l'**annexe 2**. Justifier.
- 22.** Classer ces colicines dans les groupes A ou B (**annexe 1**). Justifier.

B2- Récepteur utilisé par la colicine colP2 pour son entrée dans les bactéries cibles

MANIPULATIONS

- Observer le résultat de la croissance de la souche **T1** dans les différentes cupules.

COMPTE-RENDU

- 23.** Compléter l'**annexe 5** rendue, avec la lecture des résultats obtenus.
- 24.** Interpréter les témoins réalisés.
- 25.** Nommer le récepteur impliqué dans l'entrée de la colicine **colP2**. Justifier, en indiquant le phénomène mis en évidence.

PARTIE C

Effets sur les bactéries cibles et régulation de la production de colicines

C1- Induction d'un stress par la colicine colP2

MANIPULATIONS

- Observer les résultats obtenus.

COMPTE-RENDU

- 26.** Présenter les résultats sous forme d'un tableau.
- 27.** Pour la solution de colicine testée ainsi que chaque solution d'antibiotique, déterminer s'il y a induction de l'expression du gène *lacZ* rapporteur, et si oui, jusqu'à quelle concentration d'antibiotique(s) ou dilution de colicine **colP2**.

C2- Activité de la colicine colP2

COMPTE-RENDU

- 28.** Interpréter la photographie de l'électrophorégramme obtenu.
*Données : le génome du bactériophage λ est un ADN double brin, linéaire de 48502 nucléotides. Le marqueur de taille est présenté en **annexe 8**.*
- 29.** Proposer un contrôle qui aurait permis de vérifier que l'activité observée correspond seulement à celle de la colicine **colP2**. Préciser le résultat qui aurait été obtenu.
- 30.** À l'aide des résultats des **parties C1 et C2**, conclure sur le type de stress induit par la colicine **colP2**.

C3- Effet de l'induction du système SOS sur la production de colicines

MANIPULATIONS

- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition de culture.

COMPTE-RENDU

31. Présenter les résultats sous forme d'un tableau.
32. Interpréter les résultats obtenus.

BILAN

COMPTE-RENDU

33. Présenter sous forme d'un schéma l'ensemble des phénomènes mis en évidence.

Ce sujet a été proposé par Mélanie FERRIÈRES, Françoise LATOURRE, Christophe BELOIN, Fabien CÉZARD et Pascal CHILLET.

Bibliographie

- Colicin Biology. Cascale E. & al.
Microbiology and Molecular Biology Reviews (2007), volume 71 (1), p.158-229
- Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation.
Kleanthous C.
Nature Reviews - Microbiology (2010), volume 8, p.843-848
- Colicin E2 Production and Release by *Escherichia coli* K12 and Other *Enterobacteriaceae*. Pugsley A., Goldzahl N. & Barker R.
Journal of General Microbiology (1985), volume 131, p. 2673-2686
- Colicin E2 is a DNA endonuclease. Schaller K. & Nomura M.
PNAS (1976), volume 73 (11), p. 3989-3993

Les souches d'E. coli utilisées dans ce sujet sont issues de l'Institut Pasteur.

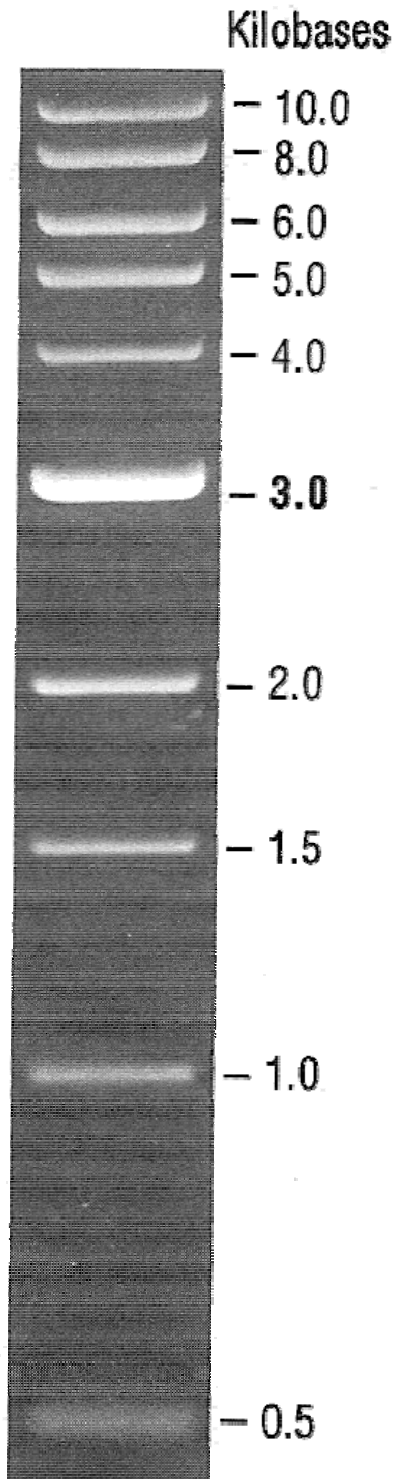
ANNEXE 8
Marqueur de taille « 1kb DNA Ladder » (partie C2)

DESCRIPTION :

Des plasmides ont été totalement digérés par des enzymes de restriction appropriées, puis ont subi une extraction au phénol et ont été mis en solution en tampon Tris HCl 10 mM (pH 8) et EDTA 1 mM, afin d'obtenir 10 bandes utilisables comme marqueurs de poids moléculaire pour les électrophorèses en gel d'agarose.

L'ADN digéré inclut des fragments allant de 0,5 à 10 kilobases (kb).

Le fragment à 3,0 kb présente une intensité accrue, afin de servir de bande de référence.



RAPPORT L'ÉPREUVE PRATIQUE DE MICROBIOLOGIE
Établi par Mélanie FERRIÈRES, Françoise LATOURRE, Christophe BELOIN, Fabien CÉZARD et Pascal CHILLET

Moyenne : 9,2.

Meilleure note : 19,7 ; note la plus basse : 3,6.

13 notes sur 31 (42%) sont supérieures ou égales à 10.

≥ 3 et < 4	1	≥ 9 et < 10	2	≥ 15 et < 16	0
≥ 4 et < 5	2	≥ 10 et < 11	5	≥ 16 et < 17	2
≥ 5 et < 6	4	≥ 11 et < 12	1	≥ 17 et < 18	0
≥ 6 et < 7	4	≥ 12 et < 13	3	≥ 18 et < 19	0
≥ 7 et < 8	4	≥ 13 et < 14	0	≥ 19 et < 20	1
≥ 8 et < 9	1	≥ 14 et < 15	1		

Le sujet de cette année portait sur l'étude des colicines. Il comportait quatre parties qui ne présentaient pas de difficultés techniques particulières : ajustages de suspensions, préparations de solutions de colicines par centrifugation et filtration, dénombrements dans la masse et en surface, suivis opacimétriques, ensemencements par inondation et dépôts de gouttes de cultures ou de solutions, culture en microplaque et électrophorèse d'ADN en gel d'agarose.

La mise en œuvre du sujet nécessitait la réalisation d'une partie préliminaire, les autres parties pouvant être traitées de manière indépendante.

Certains candidats ont eu des difficultés à s'organiser de façon efficace afin de réaliser l'ensemble des manipulations. Ceci peut être expliqué en partie par des ajustages laborieux dans la partie préliminaire, mais aussi par la contrainte de l'ordre de passage dans la **partie C2**.

Dans plusieurs parties du sujet, des boîtes étaient ensemencées par inondation puis devaient être séchées pendant au moins 15 minutes. Ce temps de séchage n'a pas toujours été correctement anticipé, ce qui a eu pour conséquence des manipulations réalisées de façon incomplète ou incorrecte.

Bien qu'il ait été précisé que certaines opérations devaient être réalisées devant un examinateur, quelques candidats ont parfois oublié de se manifester.

Il a été constaté peu de fautes importantes de sécurité, cependant il convient de faire particulièrement attention à certains gestes :

- les cuves de spectrophotomètre doivent être correctement obturées par du parafilm, qu'il ne faut pas enlever avant la lecture car celles-ci contiennent des suspensions microbiennes ;
- le matériel nécessaire à la rédaction du compte rendu (sujet, copies, trousse, stylos...) ne doit pas se trouver sur la pailasse mais sur la tablette prévue à cet effet.

Il est rappelé que les candidats doivent organiser le poste de travail à leur convenance afin d'optimiser leurs manipulations. Notamment, il est judicieux de disposer le vortex, le portoir de tubes et la poubelle contenant de la javel de telle sorte à ne pas croiser les bras.

Le jury insiste sur la nécessité d'identifier et d'annoter clairement les boîtes incubées.

La rédaction des comptes-rendus a été souvent décevante en termes d'organisation (la numérotation des réponses doit être visible et respectée par rapport au sujet...) et de présentation (les tableaux de résultats doivent être soignés et facilement lisibles...). Néanmoins, le jury a apprécié les efforts rédactionnels de certains candidats (identification claire des parties, schémas, code couleur...).

D'autre part, il serait souhaitable que les candidats fassent preuve de plus de rigueur dans l'utilisation des termes scientifiques spécifiques au sujet (colimicine ou colchicine à la place de colicine, aflatoxine ou oflotine à la place d'ofloxacin...).

Enfin, sur le fond, un trop grand nombre de candidats n'ose pas approfondir les interprétations des 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. Il convient de préciser aux candidats que l'évaluation de cette épreuve porte autant sur l'aspect technique que sur l'aspect rédactionnel du compte-rendu.

Le jury félicite les quelques candidats qui ont su traiter l'ensemble des manipulations proposées, et répondre à l'ensemble des questions posées.

Partie 0 - Travail préliminaire

La mise en œuvre du sujet nécessitait la préparation de suspensions bactériennes ajustées ainsi que de solutions de colicines.

Dans une première étape, certaines suspensions fournies devaient être ajustées. Cette manipulation est extrêmement classique et apparaît chaque année dans l'épreuve de travaux pratiques de microbiologie. Le jury est donc étonné qu'elle ait présenté des difficultés techniques et rédactionnelles pour de nombreux candidats. Il était attendu que cette partie soit traitée rapidement et efficacement ; dans le cas contraire, le temps perdu a été très préjudiciable pour arriver à mener à bien l'ensemble des manipulations.

Il était précisé dans le sujet des données relatives aux mesures de DO_{600} (linéarité du spectrophotomètre, coefficient de correspondance, concentration bactérienne d'une culture de nuit agitée).

Pour réaliser ces ajustages de façon correcte, il convenait :

- d'estimer, par un calcul, la DO_{600} de la culture de nuit ;
- de calculer un facteur de dilution de la culture judicieuse, afin d'obtenir une DO_{600} comprise dans le domaine de linéarité du spectrophotomètre ;
- de faire une mesure de DO_{600} sur cette suspension diluée ;
- d'en déduire la DO_{600} de la culture ;
- de calculer le volume de culture fournie à prélever pour préparer la suspension ajustée demandée. Il est plus judicieux de calculer directement ce volume sans passer par un calcul de facteur de dilution.

Il était demandé de présenter les résultats et les calculs sous forme d'un tableau. Certains n'ont pas respecté cette consigne, ce qui a conduit à des comptes rendus très confus.

Dans une deuxième étape, un des ajustages réalisés précédemment devait être vérifié par dilutions décimales successives en tubes de 9 mL d'eau physiologique, puis par un classique dénombrement dans la masse. Les protocoles correspondants n'avaient volontairement pas été détaillés dans le sujet. Le jury s'étonne que des techniques aussi courantes de microbiologie soient méconnues de certains candidats. Par exemple, dans le cas présent, toutes les colonies (dans la masse et en surface) devaient être comptées.

Dans une troisième étape, on préparait des solutions de colicines. Pour cela, il fallait centrifuger les cultures fournies, puis filtrer le surnageant obtenu. La réalisation de la filtration a posé des problèmes d'organisation et de sécurité à certains candidats.

Il était mentionné dans le sujet que les suspensions ajustées et les solutions de colicines obtenues devaient être conservées dans la glace. Cette contrainte n'a pas été respectée par certains candidats, ce qui a nui à la qualité des résultats.

PARTIE A

Mode et spectre d'action d'une colicine

Il était proposé de mettre en évidence l'effet des colicines en mélangeant des souches sensibles ou résistantes aux colicines soit avec des souches productrices ou non de colicines, soit avec des solutions de colicines.

Les objectifs de cette partie étaient clairement indiqués dans le sujet, et permettaient d'orienter les interprétations dans les réponses aux questions.

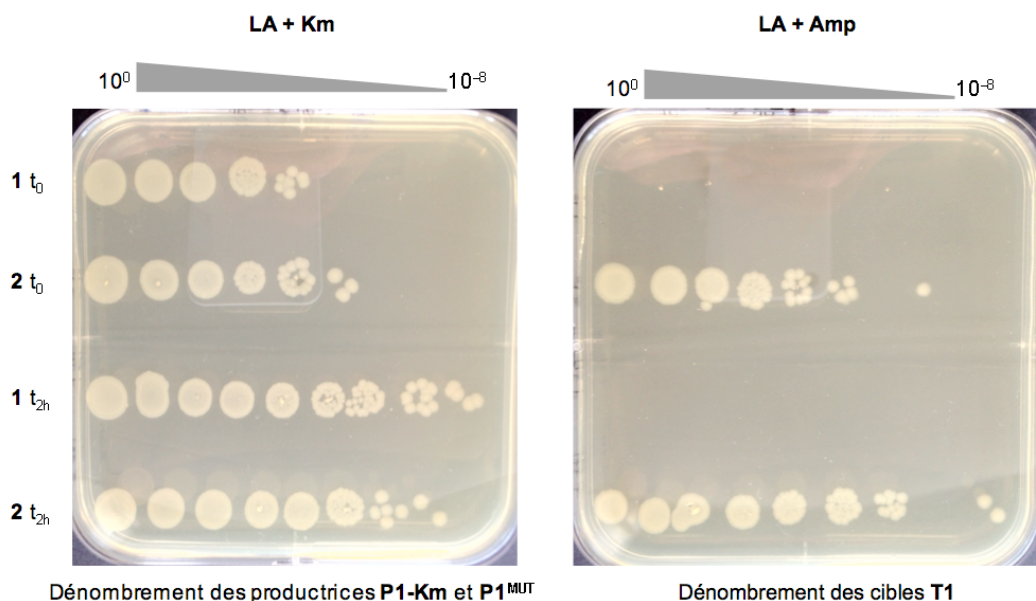
Dans un premier temps, des mélanges étaient réalisés par mise en contact de différentes souches supposées sensibles avec des souches éventuellement productrices de colicines ou avec leurs surnageants filtrés de culture.

Cette manipulation nécessitant deux heures d'incubation, il fallait en tenir compte dans l'organisation générale de l'épreuve. Un trop grand nombre de candidats a commencé cette mise en culture tardivement (deux heures voire moins avant la fin de l'épreuve).

Dans un deuxième temps, des dénombrements en surface de certains mélanges à t_0 et à t_{2h} étaient réalisés par une technique en gouttes : 10 μ L des dilutions étaient déposés par pipetage inverse sur deux géloses sélectives. Ce mode de pipetage n'est pas maîtrisé par certains candidats alors qu'il est utile pour éviter les projections de culture lorsqu'il s'agit de délivrer un volume faible et exact dans le cadre d'un dénombrement. En outre, cette méthode conduisant à la présence de liquide résiduel dans le cône, il convient donc d'en changer entre chaque dépôt.

Ces dénombrements sur deux géloses sélectives différentes permettaient (*voir photos*) :

- de dénombrer séparément les deux souches des mélanges **1** et **2** (souche **T1** résistance à l'ampicilline et souches **P1-Km** et **P1^{MUT}** résistantes à la kanamycine) ;
- de voir que dès t_0 , la souche **T1** est tuée par **P1** produisant de la colicine **colP1** (mélange **1**) mais pas par **P1^{MUT}** n'en produisant pas (mélange **2**) ;
- de voir qu'en 2h, les productrices (**P1-Km** et **P1^{MUT}**) étaient capables de croître (UFC même aux plus faibles dilutions), de même que les cibles **T1** dans le cas du mélange **2**, confirmant l'innocuité de la souche **P1^{MUT}** vis-à-vis de la souche cible **T1**.



Dans un troisième temps, des mesures de DO_{600} des autres mélanges étaient réalisées, afin de mettre en évidence :

- qu'un contact entre la souche productrice et la souche cible n'est pas nécessaire, la colicine étant sécrétée dans le surnageant (le mélange **3** montre une action de la colicine, alors qu'il n'y a pas de souche productrice ; le mélange **4** sert de témoin puisque la solution **colP1^{MUT}** ne contient pas de colicine au vu du génotype de la souche **P1^{MUT}**) ;
- que l'effet des colicines ne s'exerce que sur la souche à Gram- testée (les mélanges **5** et **6** ne présentent pas d'effet sur la souche de Staphylocoque) ;
- que cet effet est bactéricide (la DO_{600} baisse entre t_0 et t_{2h} pour le mélange **1**).

PARTIE B

Entrée des colicines dans les bactéries cibles

B1- Mise en évidence de la voie d'entrée des colicines

Les colicines, pour pénétrer dans la bactérie cible utilisent différents récepteurs et translocateurs. Leur entrée nécessite une source d'énergie qui est fournie par deux systèmes différents.

Il était proposé de mettre en évidence certains éléments de la voie d'entrée de différentes colicines :

- en ensemençant par inondation des souches de bactéries sensibles mutées dans des gènes codant différentes protéines intervenant dans cette voie ;
- et en déposant sur ces tapis bactériens des gouttes de suspensions de souches éventuellement productrices de colicines et de solutions de colicines correspondantes.

Cette partie ne présentait pas de difficultés techniques majeures, elle a pourtant été dans l'ensemble réalisée de façon peu soignée (tapis bactérien non homogène, boîtes déplacées avant que les gouttes ne soient sèches, confusions dans les souches déposées...). Ceci rendait l'interprétation des résultats délicate.

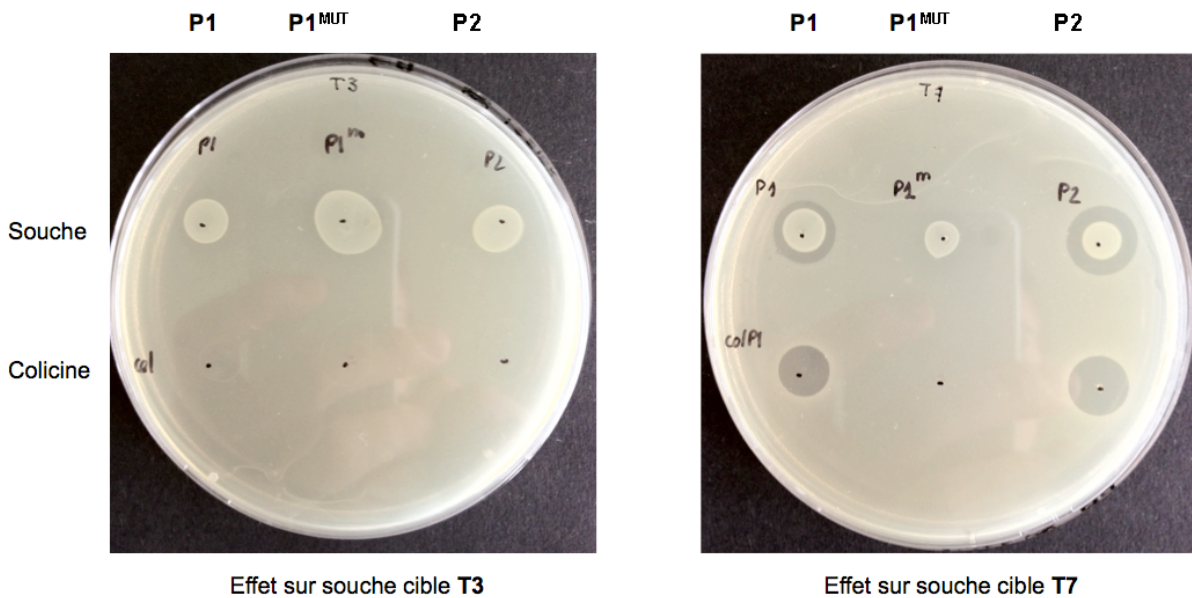
La présentation des résultats en tableau a été généralement claire et les réponses fournies par les candidats satisfaisantes.

Sur les exemples ci-après (*voir photo*), on voit que :

- **T3** ne présente aucune sensibilité à aucune des colicines testées (ni à partir des souches productrices, ni à partir des solutions de colicine) ;
- **T7** présente une sensibilité aux colicines **colP1** et **colP2** (aussi bien avec les souches qu'avec les solutions de colicine), **P1^{MUT}** servant de témoin (non producteur de **colP1**).

L'analyse des résultats, combiné à la lecture des génotypes des souches en annexe, permet de dire :

- que la porine BtuB (mutée dans **T3**) est nécessaire à l'import des colicines **colP1** et **colP2** ;
- que la porine FhuA (mutée dans **T7**) n'est pas nécessaire à leur import.



L'étude comparée de tous les résultats pour les différents mutants permettait de conclure pour chaque colicine sur un récepteur ou système récepteur/translocateur emprunté pour le passage ainsi qu'un système fournisseur d'énergie utilisé pour la translocation.

COLICINE	RECEPTEUR / TRANSLOCATEUR	SYSTEME FOURNISSEUR D'ENERGIE	CLASSE
colP1	BtuB/OmpA	Tol	A
colP2	BtuB	Tol	A

B2- Récepteur utilisé par la colicine colP2 pour son entrée dans les bactéries cibles

Les colicines pénètrent dans les bactéries cibles par l'intermédiaire de récepteurs qui peuvent être aussi utilisés pour l'entrée de différentes molécules, dont la vitamine B12.

Cette partie, qui mettait en œuvre deux gammes croisées en vitamine B12 et colicine **colP2** (technique par analyse matricielle entrecroisée ou « *criss-cross serial-dilution analysis* »), a été traitée par moins de la moitié des candidats.

Le geste technique de la dilution en série en microplaque semble correctement maîtrisé. Cependant, la préparation de l'inoculum T1 à partir de la suspension ajustée préalablement a souvent été mal réalisée. Elle se faisait en calculant l'ajustage à réaliser pour obtenir une concentration finale en bactéries dans chaque cupule. Cela nécessitait de prendre en compte la dilution au 1/2 introduite lorsque l'on ajoute 100 µL d'inoculum dans un volume total de 200 µL par cupule. Une densité correcte d'inoculum est indispensable pour assurer des résultats techniques fiables.

De plus, le calcul de la concentration finale en vitamine B12 (important pour l'interprétation finale) devait prendre en compte la dilution au 1/4 de la vitamine dans chaque puits.

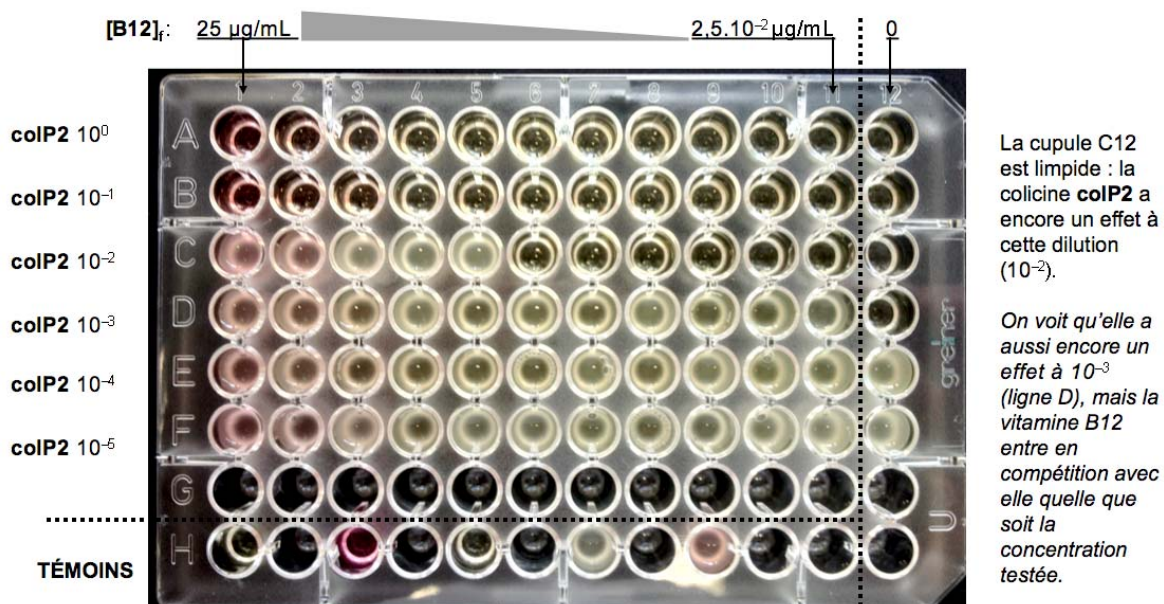
Enfin, il est indispensable que la composition précise des témoins figure clairement dans le compte-rendu (ou en l'occurrence sur l'annexe). Ces témoins, permettant de contrôler les différents réactifs / solutions / suspensions utilisés, doivent être qualitativement et quantitativement judicieusement choisis : notamment, les volumes doivent correspondre à ceux des essais, et il ne faut pas oublier d'ajouter 100 µL de LB lorsque l'on teste la stérilité des solutions (B12 et **colP2**), sans quoi les éventuels contaminants ne pourraient pas cultiver. Les témoins attendus sur la ligne H étaient :

- un témoin de stérilité du bouillon LB (*en H1 sur la photo ci-dessous*) ;
- des témoins de stérilité de la vitamine B12 (*en H3*) et de la colicine colP2 (*en H5*) ;
- un témoin de croissance de la souche **T1** en LB (*en H7*) ;
- un témoin de croissance de la souche **T1** en présence de vitamine B12 (*en H9*).

Au second jour, la conformité de ces témoins doit être vérifiée, afin de valider la technique avant l'interprétation des résultats. Le puits 12 des lignes A à F, ne contenant pas de vitamine B12, devait aussi être analysé, afin de s'assurer que la croissance observée dans les autres puits de la même ligne soit bien due à la vitamine B12 et non à une absence d'activité de la colicine à cette dilution.

Le phénomène mis en jeu était une compétition pour le récepteur BtuB de la vitamine B12. Celle-ci peut en effet présenter un effet protecteur contre la colicine **colP2**, jusqu'à une « concentration minimale compétitrice », visible sur la microplaque entre le dernier puits trouble et le premier puits limpide, sur une ligne où la concentration en **colP2** le permettait (dans l'image ci-dessous, sur la ligne C entre les cupules 5 et 6, soit pour $0,78 \mu\text{g/mL} < [\text{B12}] \leq 1,56 \mu\text{g/mL}$ et une dilution 10^{-2} de **colP2**).

Il est possible qu'à cause des dilutions décimales de **colP2**, on n'observe pas cet effet compétiteur directement sur une ligne donnée, mais qu'on puisse le constater en comparant deux lignes successives (à condition que le puits 12 soit limpide, traduisant un effet de la colicine à cette dilution).



Un candidat a souligné, à juste titre, que l'effet néfaste de la colicine **colP2** pouvait être à la fois « direct » (effet bactéricide, voir **parties C1 et C2**) et « indirect » (en occupant le récepteur BtuB, elle limite l'entrée de nutriments).

PARTIE C

Effets sur les bactéries cibles et régulation de la production de colicines

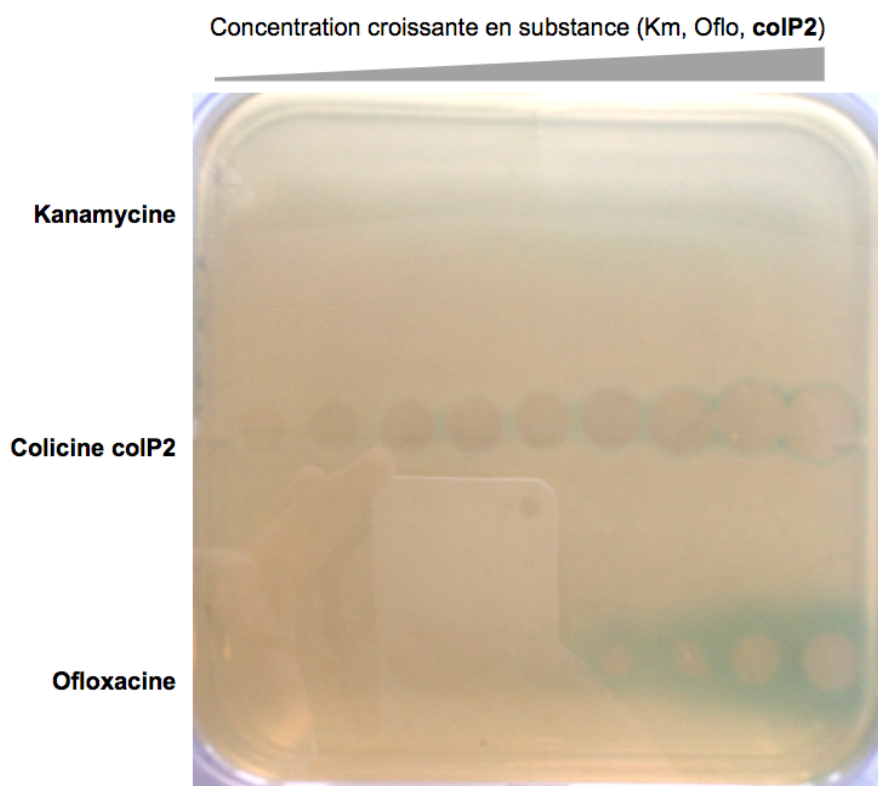
C1- Induction d'un stress par la colicine colP2

Certaines colicines, de même que certains antibiotiques, induisent un stress chez les bactéries. Différents systèmes de réponse au stress étaient présentés dans un tableau en annexe.

Ce stress était mis en évidence grâce à une souche cible ayant une construction génétique particulière faisant intervenir une fusion entre le promoteur d'un gène induit par un stress dont il fallait déterminer l'identité et le gène rapporteur *lacZ*. En parallèle, des antibiotiques (kanamycine, ofloxacine) étaient utilisés comme contrôle d'induction de ce stress à identifier. Une lecture judicieuse des informations fournies dans les annexes permettait d'ores et déjà de suggérer que l'ofloxacine, de part son action sur l'ADN gyrase, entraîne des dommages à l'ADN et donc induit le système SOS, alors que la kanamycine agissant sur la sous-unité 30S du ribosome n'induit pas ce système SOS.

Cette partie a été peu traitée dans l'ensemble, mais les résultats obtenus étaient satisfaisants.

La lecture des résultats devait comporter plusieurs informations : l'absence ou la présence de culture, l'évolution du diamètre de la zone d'inhibition en fonction de la concentration en antibiotique(s) ou de la dilution de colicine, l'absence ou la présence d'une coloration bleue de la gélose autour du halo.



Les résultats obtenus pour la kanamycine n'ont souvent pas été interprétés. Cet antibiotique n'inhibait pas le développement de la souche testée et n'induisait pas l'expression du gène *lacZ* rapporteur. Ceci permettait de conclure que la souche **T8** était résistante à la kanamycine et que cette dernière ne permettait pas d'induire le système de stress à identifier (à savoir ici, le système SOS).

L'ofloxacine inhibait pour les plus fortes concentrations testées la croissance de la souche et induisait l'expression du gène *lacZ* rapporteur. Ce résultat venait donc étayer l'hypothèse d'une induction par l'ofloxacine d'une réponse de type SOS.

La colicine **colP2**, quant à elle, inhibait la croissance pour toutes les dilutions testées (avec un effet-dose plus ou moins marqué) et induisait l'expression du gène *lacZ* rapporteur pour les dilutions les plus faibles (donc lorsque **colP2** est concentrée). À ce stade, on pouvait donc présumer que **colP2** induit également un stress de type SOS.

L'interprétation ne consistait donc pas à déterminer une CMI mais une concentration (ou une dilution) minimale induisant l'expression du gène *lacZ* rapporteur, et donc la réponse SOS.

C2- Activité de la colicine colP2

On se proposait de mettre en évidence l'activité biologique d'une colicine sur l'ADN. Cette expérience avait pour but de mimer l'action de cette colicine **colP2** après son entrée dans les cellules cibles.

La manipulation consistait à incuber un ADN viral (l'ADN du bactériophage λ) et la solution de colicine **colP2** chauffée ou non à 80°C en présence ou non d'EDTA. La migration sur gel d'agarose permettait de mettre en évidence la dégradation ou non de l'ADN par la solution de colicine **colP2** dans les conditions opératoires susmentionnées.

Un ordre de passage pour les dépôts était imposé, ce qui nécessitait de s'organiser correctement, en particulier pour prévoir les deux temps d'incubation lors de la préparation des essais et du témoin.

Les dépôts ont été dans l'ensemble correctement effectués, et les résultats obtenus satisfaisants.

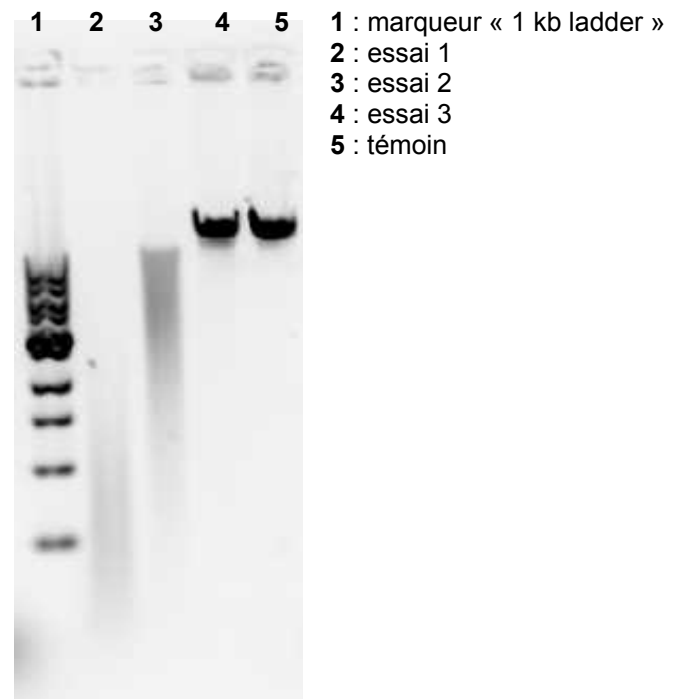
Le témoin devait contenir 10 μ L d'ADN de λ , 2 μ L de tampon test d'activité 10X, et 8 μ L d'eau ultrapure, son rôle étant de vérifier l'intégrité de l'ADN utilisé.

Lors du second jour, l'interprétation nécessitait d'abord de valider la technique par vérification de la conformité du témoin.

L'essai 1 présente une trainée (ou *smear*), constitué de courts fragments d'ADN coupé par la solution de **colP2**. Il est à noter que **colP2** n'est pas une enzyme de restriction, elle ne coupe donc pas l'ADN au niveau de sites spécifiques : on n'attend donc pas de bande définie. Il s'agissait de faire l'hypothèse ici d'une activité de type DNase pour la colicine **colP2**.

L'essai 2 présente un *smear* décalé vers le haut, constitué de fragments d'ADN plus longs. La solution de **colP2** ayant été chauffée à 80°C, elle a perdu une partie de son activité. Ceci permettait de conclure que **colP2** était une protéine thermosensible.

L'essai 3 présente une bande unique, identique au témoin, constituée d'ADN intact. L'EDTA chélatant les cations divalents, en particulier le Mg^{2+} , indique que l'activité enzymatique contenue dans la solution **colP2** est cation divalent-dépendante, ce qui est compatible avec une activité DNase.



En général, les interprétations sont restées partielles.

Pour s'assurer que l'activité DNase était bien portée par la colicine **colP2**, on demandait de proposer un contrôle : il aurait fallu disposer d'une souche mutante $P2^{MUT} \Delta colP2$. Le résultat obtenu aurait été une bande intacte, comme dans l'essai 3 et le témoin.

Les liens des résultats obtenus dans les **parties C1 et C2** permettaient donc d'expliquer pourquoi la colicine **colP2** entraîne l'induction d'une réponse de type SOS. En effet, comme l'ofloxacin qui induit, par son action sur la gyrase, des cassures double brin, la colicine **colP2**, de part son activité

de type DNase, induit ce même type de dommages à l'ADN, et donc entraîne aussi une induction du système SOS après son entrée dans les cellules cibles.

C3- Effet de l'induction du système SOS sur la production de colicines

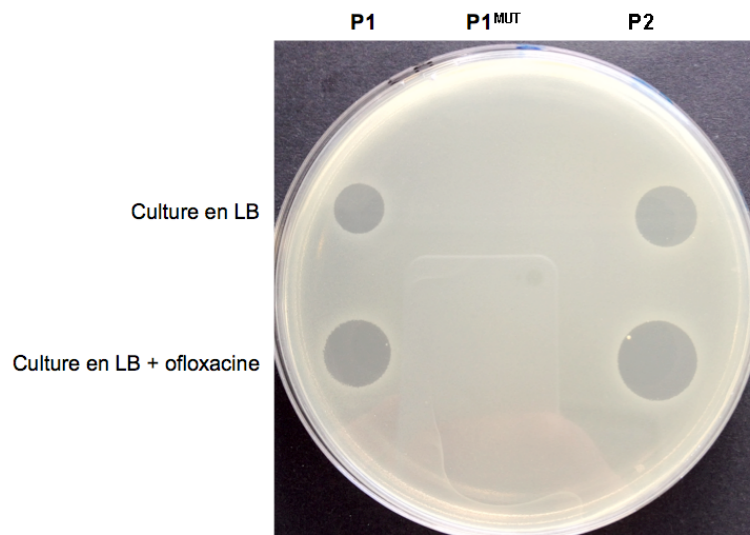
Certaines molécules ont la propriété, quand elles sont présentes dans le milieu de culture, d'activer le système SOS des bactéries : l'ofloxacin en fait partie. La manipulation proposée permettait d'étudier les effets de l'induction du système SOS sur la production de colicines lors de la croissance bactérienne. Il s'agissait ici de voir la réciprocity du phénomène d'induction observé, à savoir : la colicine **colP2** induit une réponse SOS chez les bactéries cibles, mais sa production peut-elle être aussi elle-même régulée par le système SOS dans les bactéries productrices?

L'induction du système SOS dans les bactéries productrices de colicine **colP2** était assurée par l'ajout dans les cultures d'une concentration sub-inhibitrice d'ofloxacin.

Cette manipulation étant la dernière du premier jour, elle n'a été réalisée que par un tiers des candidats. Elle ne présentait pourtant aucune difficulté technique : la préparation des solutions de colicines issues de cultures ayant poussé en absence ou présence d'ofloxacin avaient été préparées lors de la **partie préliminaire 0**. Cette dernière manipulation reprenait ensuite des gestes techniques identiques à ceux effectués dans les **parties A et B**

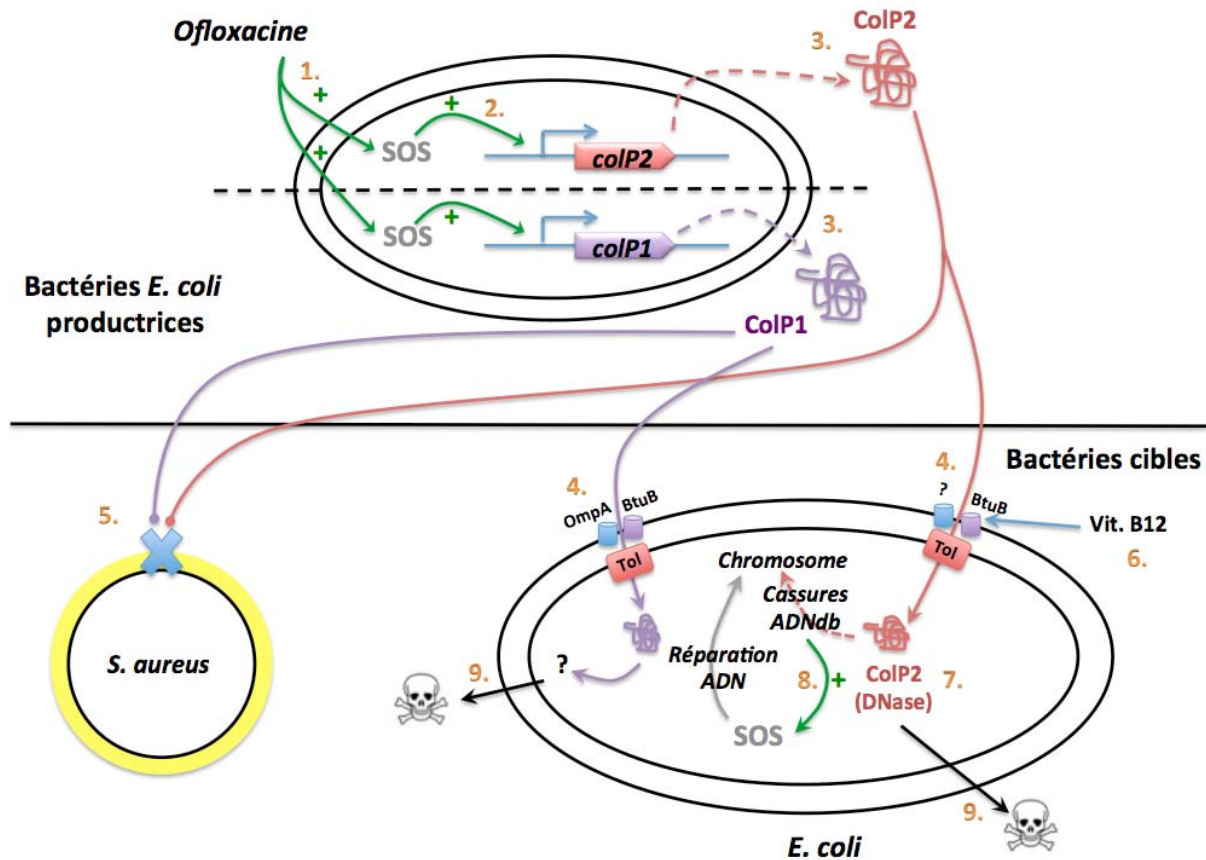
Lors de l'interprétation des résultats, il fallait prendre en compte que les résultats obtenus avec **colP1^{MUT}** constituaient un contrôle, cette souche ne produisant pas de colicine **colP1**.

Au second jour, la présence d'un halo d'inhibition plus grand pour les colicines produites en milieu additionné d'ofloxacin a conduit les candidats à conclure, de façon pertinente, que l'ofloxacin induit une production accrue de colicine. Cette conclusion est toutefois incomplète : on pouvait affirmer grâce aux différentes manipulations que l'ofloxacin induit le système SOS qui stimule la production de colicine chez les bactéries productrices.



BILAN :

Un schéma-bilan était demandé en dernière question : il devait reprendre toutes les conclusions tirées des différentes manipulations (voir ci-dessous).



1. **partie C1** : les antibiotiques de la famille des fluoroquinolones, comme l'ofloxacin, entraînent par leur action sur l'ADN gyrase des dommages à l'ADN. Ces derniers induisent le système SOS (via une activation de RecA et un clivage du répresseur LexA).

2. **partie C3** : l'induction du système SOS (clivage de LexA) entraîne une dérépression de l'expression des gènes codant les colicines *colP1* et *colP2* (dont les opérons sont contrôlés par un promoteur réprimé par LexA, non démontré ici).

3. **partie A** : les colicines *colP1* et *colP2* sont libérées à l'extérieur des bactéries productrices et vont agir sur des bactéries sensibles.

4. **partie B1** : ces colicines vont agir sur *E. coli*. Elles vont entrer dans ces bactéries en utilisant, pour la colicine *colP1*, le récepteur ou translocateur OmpA et BtuB et le système Tol, et pour la colicine *colP2*, le récepteur BtuB et le système Tol. Les deux colicines sont des colicines de groupe A.

5. **partie A** : ces deux colicines n'agissent pas sur la bactérie à Gram positive *Staphylococcus aureus*.

6. **partie B2** : la vitamine B12 qui utilise aussi le récepteur BtuB pour son import dans *Escherichia coli* peut entrer en compétition avec la colicine *colP2* et ainsi empêcher celle-ci de pénétrer dans les bactéries et d'atteindre ces cibles.

7. **partie C2** : la cible de la colicine *colP1* n'a pas été étudiée dans ces travaux pratiques, en revanche, l'activité de type DNase de la colicine *colP2* a été formellement démontrée par sa capacité à entraîner des cassures double brins dans l'ADN.

8. **partie C1** : cette activité DNase a pour effet d'induire le système SOS afin de tenter de réparer ces cassures.

9. **partie A** : ces deux colicines *colP1* et *colP2* (non démontré ici) ont une activité de type bactéricide.

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE GENERALE ET ANALYTIQUE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

SUJET

Sujet proposé par : Xavier Bataille, Romain Barbe, Jeanne-Laure Dormieux, Sophie Warin

Sommaire

A. PARTIE EXPERIMENTALE

A.1. RECRISTALLISATION 60

A.2. TITRAGE D'UNE SOLUTION DE PEROXYDE D'HYDROGENE 61

B. ANALYSE DE LA PARTIE EXPERIMENTALE

B.1. RECRISTALLISATION

B.2. TITRAGE D'UNE SOLUTION DE PEROXYDE D'HYDROGENE

C. LE PEROXYDE D'HYDROGENE

C.1. LA MOLECULE DE PEROXYDE D'HYDROGENE

C.2. PROPRIETES REDOX

C.3. UN PEU DE CINETIQUE

D. LE PEROXYDE D'HYDROGENE EN BIOLOGIE

D.1. ROLE DE H_2O_2 DANS LES MECANISMES DE BIODEGRADATION

D.2. DETECTION DU RADICAL HYDROXYLE PAR FLUORESCENCE

ANNEXE 1 : LES ETAPES DE LA RECRISTALLISATION

ANNEXE 2 : SPECTRE RMN DU PROTON ET SPECTRE IR DE L'ESTER (B

ANNEXE 3 : TABLE DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES RMN DU PROTON

ANNEXE 4 : TABLE DES NOMBRES D'ONDE EN SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

ANNEXE 5 : PHRASES H ET P

ANNEXE 6 A RENDRE AVEC LA COPIE : DIAGRAMME D'OM DU RADICAL HYDROXYLE HO^\bullet

ANNEXE 7 A RENDRE AVEC LA COPIE : MECANISME REACTIONNEL D'ESTERIFICATION

FEUILLE DE RESULTATS

1. RECRISTALLISATION

2. TITRAGE DE LA SOLUTION DE PEROXYDE D'HYDROGENE

LE PEROXYDE D'HYDROGÈNE

Dans l'organisme, 2 à 5 % du dioxygène est transformé en espèces dites espèces réactives de l'oxygène dont le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci possède une activité délétère sur les tissus biologiques du fait de sa capacité à générer le radical hydroxyle.

En chimie, son caractère à la fois oxydant et réducteur, ainsi que sa propension à former des espèces radicalaires font du peroxyde d'hydrogène une espèce à multiples facettes et donc polyvalente. De plus, son utilisation est valorisée par l'absence de toxicité des sous-produits formés : l'eau et le dioxygène.

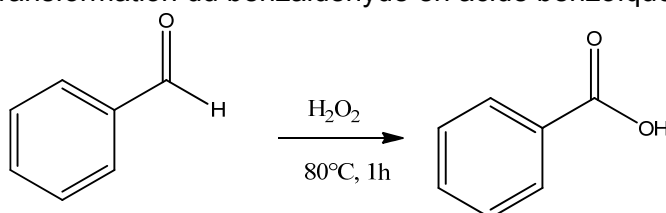
Il est proposé dans ce sujet d'étudier le caractère oxydant du peroxyde d'hydrogène en illustrant ces propriétés par l'utilisation de l'eau oxygénée en tant que réactif d'oxydation de molécules organiques et par le titrage d'une solution de peroxyde d'hydrogène.

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). Les résultats expérimentaux seront consignés dans la feuille de résultats fournie en annexe.

A . Partie expérimentale

A.1. Recristallisation

Le peroxyde d'hydrogène a de nombreuses utilisations en chimie organique. Il permet de former des époxydes à partir d'alcènes mais il joue aussi le rôle d'oxydant en chimie « verte ». Ainsi, dans la synthèse proposée ci-dessous, H_2O_2 a été utilisé comme oxydant dans la réaction de transformation du benzaldéhyde en acide benzoïque :



Cette réaction s'accompagne de la formation de sous-produits autres que l'acide benzoïque. Il est donc nécessaire de purifier le solide obtenu.

Partie expérimentale : vous disposez de 2,2 g de produit (noté « Brut ») obtenu par oxydation de 4,3 g de benzaldéhyde en présence d'un léger excès de peroxyde d'hydrogène. Le solide obtenu doit être purifié par recristallisation dans l'eau.

Le principe et les étapes de la recristallisation sont rappelés dans l'annexe 1.

- Mettre en œuvre le protocole de recristallisation de l'acide benzoïque contenu dans le brut : mesurer le volume de solvant utilisé.
- Effectuer une filtration sur Büchner et laver le solide avec un minimum d'eau glacée.
- Sécher le solide sur papier filtre et appeler le jury avant de le mettre à sécher à l'étuve.
- Réaliser une chromatographie sur couche mince (sur gel de silice contenant un indicateur fluorescent) à trois dépôts : acide benzoïque de référence, produit « brut », solide recristallisé sec. Le dépôt de solide recristallisé sera préparé à environ 1% dans de l'éther diéthylique. L'éluant est un mélange acétone / cyclohexane : 1/2 (V/V). Révéler sous lampe UV à 254 nm.

Compléter la feuille de résultats.

A.2. Titration d'une solution de peroxyde d'hydrogène

On se propose dans cette partie de titrer une solution de peroxyde d'hydrogène à environ $5.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

Dans un erlenmeyer rodé de 250 mL, verser 10 mL de solution d'acide sulfurique à 2 mol.L^{-1} dans 20 mL de solution d'iodure de potassium à 100 g.L^{-1} . Refroidir si nécessaire puis ajouter 10,00 mL de la solution aqueuse de H_2O_2 à doser. Boucher l'erlenmeyer et le laisser 5 min à l'obscurité.

Réaliser le titrage par une solution de thiosulfate de sodium (2 Na^+ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) de concentration $1,00.10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$. Le titrage sera suivi par potentiométrie à courant nul.

Compléter la feuille de résultats.

B. Analyse de la partie expérimentale

B.1. Recristallisation

Q1. Ecrire l'équation de la réaction entre le benzaldéhyde et H_2O_2 .

Q2. En quoi le peroxyde d'hydrogène peut être qualifié d'oxydant « vert », ou encore « respectueux de l'environnement » ? Cette expression est-elle critiquable ?

Q3. Pour obtenir le produit « brut », l'acide benzoïque est extrait du milieu réactionnel par une solution d'hydroxyde de sodium. Puis la phase aqueuse est acidifiée ce qui permet de récupérer l'acide benzoïque solide. Expliquer le principe de cette extraction.

Q4. Calculer le volume théorique d'eau nécessaire à la recristallisation des 2,2 g de brut. Conclure

Q5. Expliquer sur quel principe repose la CCM.

Q6. Expliquer le principe de la révélation sous UV et justifier son emploi ici.

Q7. Interpréter l'allure de la CCM obtenue.

Q8. Déterminer les rendements de la recristallisation et de la réaction d'oxydation du benzaldéhyde.

Compléter la feuille de résultats.

B.2. Titration d'une solution de peroxyde d'hydrogène

Q9. Ecrire les équations des réactions se déroulant lors des différentes étapes.

Q10. Montrer que les ions iodure sont en excès par rapport à l'eau oxygénée. Justifier ce choix.

Q11. Déterminer l'expression de la concentration molaire de la solution d'eau oxygénée et la calculer.

Compléter la feuille de résultats.

C. Le peroxyde d'hydrogène

C.1. La molécule de peroxyde d'hydrogène

Q12. Donner la configuration électronique de l'oxygène dans son état fondamental et dans un état excité.

Q13. Donner la représentation de Lewis de la molécule de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

Q14. Selon la méthode VSEPR, quelle est la géométrie des doublets liants et non-liants autour de chaque atome d'oxygène dans la molécule de peroxyde d'hydrogène ? Proposer une structure tridimensionnelle stable de H_2O_2 .

Q15. Justifier le fait que la molécule de peroxyde d'hydrogène est polaire.

Q16. L'énergie de liaison de la liaison simple O-O du peroxyde d'hydrogène est $D^\circ(\text{O-O}) = 38 \text{ kJ.mol}^{-1}$ tandis que celle de la liaison O-H (eau en phase gaz) est $D^\circ(\text{O-H}) = 492 \text{ kJ.mol}^{-1}$. De même, $D^\circ(\text{H-H}) = 435 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et $D^\circ(\text{O=O}) = 491 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Que peut-on en conclure ?

C.2. Propriétés redox

Q17. L'atome d'oxygène présente trois nombres (degrés) d'oxydation. Préciser ces nombres d'oxydation et donner un exemple d'édifice moléculaire pour chacun.

Q18. Ecrire l'équation de la réaction de dismutation de H_2O_2 .

Q19. Calculer la constante thermodynamique d'équilibre de cette réaction à 298 K. Que peut-on en conclure ?

Q20. Une solution de peroxyde d'hydrogène est dite à x volumes si la réaction de dismutation d'un litre de la solution libère x litres de dioxygène à 273 K et à la pression atmosphérique. Déterminer le titre en volumes de la solution titrée en A.2.

C.3. Un peu de cinétique

En l'absence de catalyseur, la réduction de H_2O_2 par les ions iodure est une réaction relativement lente. La vitesse de cette réaction admet un ordre partiel égal à 1 par rapport à H_2O_2 et H^+ et n par rapport aux ions iodure. On cherche à mettre en évidence que l'ordre partiel n est égal à 1.

Le protocole mis en œuvre est le suivant : dans un erlenmeyer, on introduit à 20°C , un volume $V_1 = 10,00 \text{ mL}$ d'une solution de peroxyde d'hydrogène de concentration égale à $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$, un volume $V_2 = 10,00 \text{ mL}$ d'une solution d'iodure de potassium de concentration égale à $4 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ et 80 mL d'une solution tampon qui maintiendra le pH égal à 1,4.

La concentration en diiode aqueux dans le milieu réactionnel est déterminée au cours du temps. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

t / s	60	120	240	480
$[\text{I}_2] / \text{mol.L}^{-1}$	$1,45 \cdot 10^{-2}$	$1,68 \cdot 10^{-2}$	$1,83 \cdot 10^{-2}$	$1,91 \cdot 10^{-2}$

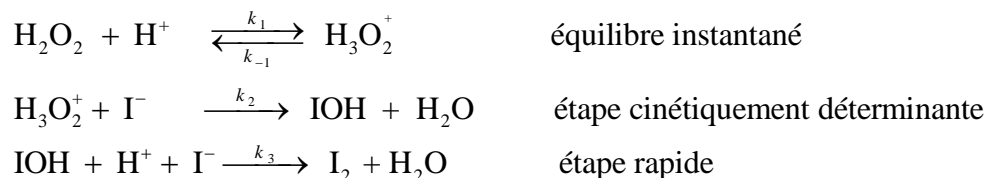
Q21. En tenant compte des conditions de la réaction redox étudiée, montrer que la vitesse de réaction peut se mettre sous une forme simplifiée fonction d'une constante de vitesse apparente et de la concentration en ions iodure.

Q22. Proposer un protocole pour déterminer la concentration en diiode aqueux.

Q23. En déduire la loi d'évolution temporelle donnant la concentration en ions iodure en fonction du temps en supposant que l'ordre partiel n est égal à 1.

Q24. Par régression linéaire montrer que les données expérimentales sont compatibles avec l'ordre $n = 1$ et en déduire la valeur de la constante apparente de vitesse à 20°C .

Le mécanisme réactionnel proposé pour la réaction de H_2O_2 par les ions iodure fait intervenir les étapes suivantes :

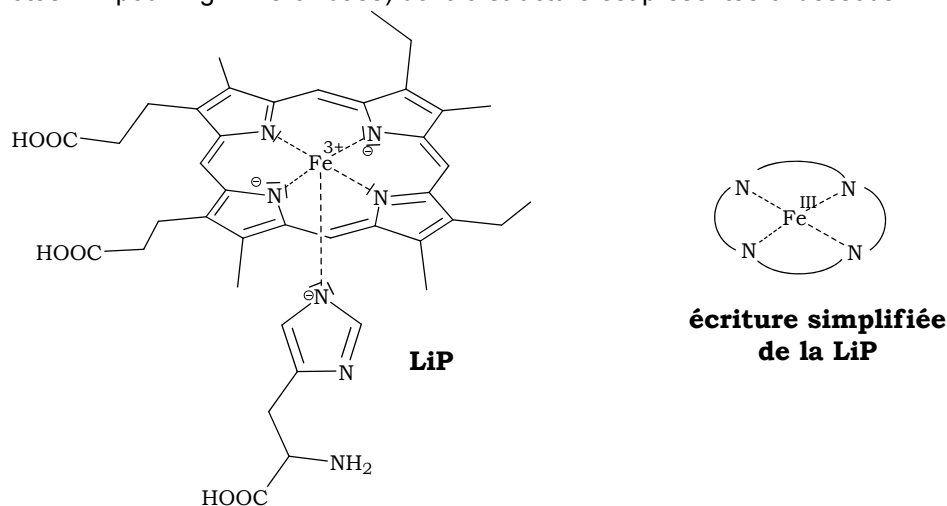


Q25. A partir du mécanisme, montrer que l'expression de la vitesse de la réaction confirme les résultats expérimentaux et exprimer k en fonction de certaines constantes cinétiques k_i des actes élémentaires.

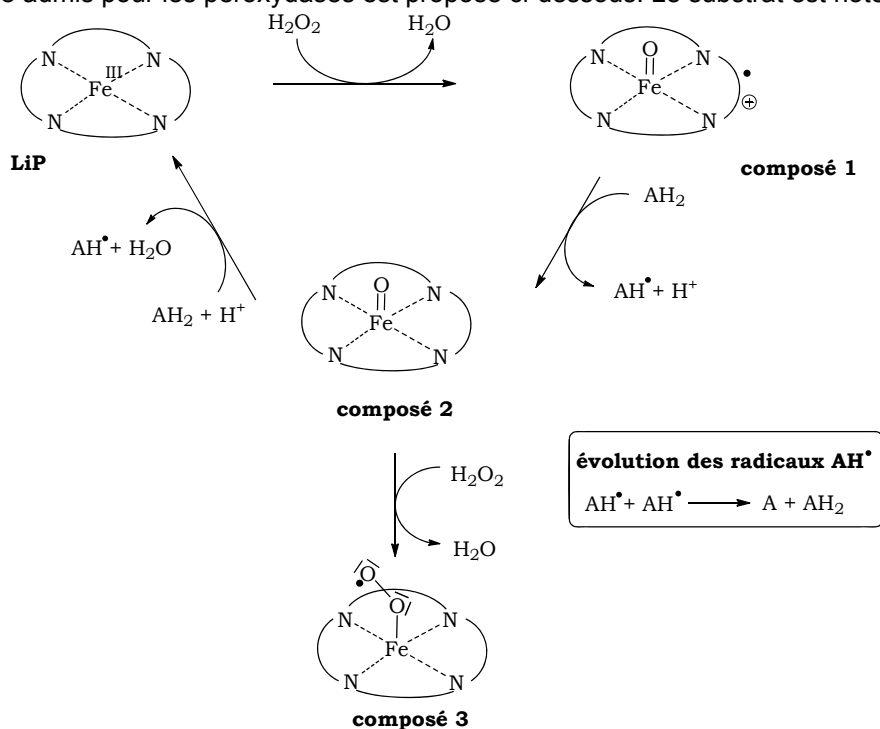
D. Le peroxyde d'hydrogène en biologie

D.1. Rôle de H_2O_2 dans les mécanismes de biodégradation

Le peroxyde d'hydrogène sert d'agent d'oxydation pour toute une gamme d'enzymes ubiquistes intervenant dans la biodégradation de nombreuses molécules organiques : les peroxydases. Ces dernières sont généralement des protéines hémiques comme par exemple la ligninase (notée LiP pour **L**ignin**P**eroxydase) dont la structure est présentée ci-dessous.



Le mécanisme admis pour les peroxydases est proposé ci-dessous. Le substrat est noté AH_2 .



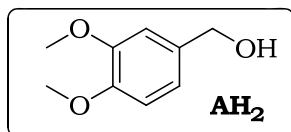
- Le passage de la LiP au composé 1 s'accompagne de la perte d'un électron par la porphyrine pour former un radical délocalisé (signalé par un point sur la figure).
- Si la présence de H_2O_2 est excessive, une voie secondaire abortive est envisageable. Elle conduit au composé 3 (qui est formellement équivalent à une LiP dont le centre métallique est lié à un anion superoxyde) et donc à l'inactivation de l'enzyme.

Q26. Proposer une structure de Lewis de l'anion superoxyde O_2^- .

Q27. Donner, en le justifiant, le nombre d'oxydation du fer dans les composés 1, 2 et 3. On pourra s'aider du nombre d'électrons échangés lors des différentes transformations.

Q28. Pour les quatre transformations, préciser si le fer joue le rôle d'un oxydant ou d'un réducteur.

Dans cet exemple, la LiP a été étudiée en utilisant comme substrat le (3,4-diméthoxyphényl)méthanol, noté AH₂.



Q29. Quelle fonction chimique de AH₂ peut être concernée par l'oxydation ménagée due à la LiP ?

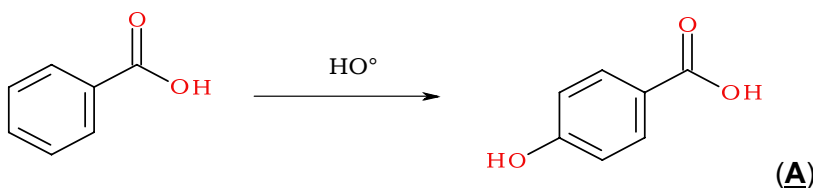
Q30. Proposer une formule topologique pour AH[•], sachant que la stabilité de ce radical peut être justifiée par l'écriture de plusieurs formules mésomères. Ecrire trois formules mésomères possibles pour AH[•].

D.2. Détection du radical hydroxyle par fluorescence

L'eau oxygénée doit sa toxicité à sa capacité à générer le radical hydroxyle HO[•] qui peut réagir avec de nombreux composants cellulaires (par échange d'électrons, addition sur les doubles liaisons, arrachement d'atome d'hydrogène) et ce de façon très rapide.

Q31. Compléter le diagramme d'orbitales moléculaires du radical hydroxyle fourni en annexe 6. Que peut-on en conclure ?

Plusieurs techniques existent pour déterminer la présence du radical hydroxyle par fluorescence. L'une d'entre elles consiste à mettre dans le milieu de l'acide benzoïque. Il se produit alors la réaction suivante :



La présence de (A) est déterminée par fluorescence. Cette espèce fluoresce avec un décalage spectral de 110 nm.

Q32. L'hydroxylation peut aussi se faire en « ortho » du groupe carboxyle. Représenter l'espèce ainsi formée et indiquer quel est son nom d'usage courant.

Q33. « Cette espèce fluoresce avec un décalage spectral de 110 nm ». Décrire brièvement le phénomène de fluorescence et interpréter cette phrase.

En présence de propanol et d'un catalyseur acide, le groupe carboxyle de la molécule (A) est estérifié. On obtient le produit (B).

Q34. Représenter la molécule (B).

Q35. Le mécanisme réactionnel de l'estérification est schématisé dans l'annexe 7. Compléter ce mécanisme en représentant les mouvements de doublets d'électrons par des flèches courbes et compléter les cases (A) à (F) en utilisant les catégories de réaction proposées dans l'annexe.

Q36. Interpréter les bandes à 3275, 1678 et 1169 cm⁻¹ du spectre IR de l'ester (B) fourni en annexe 2.

Q37. Attribuer les signaux observés sur le spectre RMN 1H (annexe 2) aux groupes d'atomes d'hydrogène de l'ester (B).

La réaction d'estérification est caractérisée par les grandeurs thermodynamiques (à 298 K) suivantes :

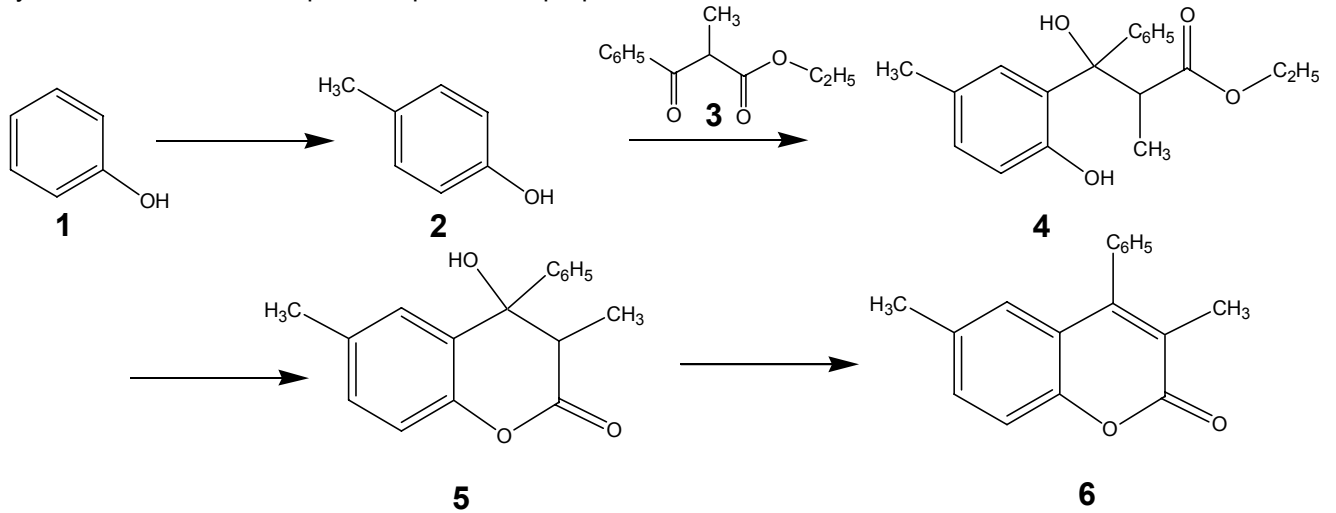
$$\Delta_r H^\circ = -1,4 \text{ kJ.mol}^{-1} \quad \Delta_r S^\circ = 7,2 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$$

Q38. En déduire la valeur de la constante thermodynamique de l'équilibre d'estérification à 298 K. Conclure.

Q39. Quelle est l'influence de l'augmentation de la température sur l'équilibre d'estérification ?

Q40. Indiquer comment déplacer de façon significative l'équilibre d'estérification dans le sens de formation de l'ester.

Une autre méthode consiste à utiliser des coumarines comme sondes de radical hydroxyle : une synthèse de coumarine à partir du phénol est proposée ci-dessous :



Q41. Quel type de réaction est mis en jeu lors de la formation du composé **2** ? Indiquer les réactifs nécessaires et proposer une structure de l'électrophile impliqué lors de cette réaction.

Q42. En milieu acide et par chauffage, le composé **5** se déshydrate pour donner la coumarine **6**. Proposer un mécanisme pour cette étape.

Données

Pour simplifier et ne pas surcharger les écritures, les ions en solution aqueuse sont écrits sans la notation (aq) ; les espèces solides, liquides ou gazeuses sont, elles, suivies de la notation (s), (l) ou (g).
Les grandeurs thermodynamiques sont données à 298K.

Masses molaires en g.mol⁻¹

H : 1,01 C : 12,01 O : 16,00 S : 32,06 K : 39,10 I : 126,9

Constantes universelles

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

A 298 K :

$$\frac{5.1.a.1.1}{F} \ln a = 0,059 \log a$$

Volume molaire dans les CNTP (0°C et 1 atm) : 22,4 L.mol⁻¹

Température en Kelvin : $T / \text{K} = \theta / ^\circ\text{C} + 273,15$

1 atm = 1 bar = 1,013.10⁵ Pa

Potentiels standard d'oxydo-réduction à 298 K et pH = 0, en solution aqueuse

$$E^\circ(\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}(\text{l})) = 1,77 \text{ V}$$

$$E^\circ(\text{O}_2(\text{g})/\text{H}_2\text{O}) = 1,23 \text{ V}$$





$$E^\circ(\text{O}_2(\text{g})/\text{H}_2\text{O}_2) = 0,68 \text{ V}$$

$$E^\circ(\text{I}_2 / \text{I}^-) = 0,62 \text{ V}$$

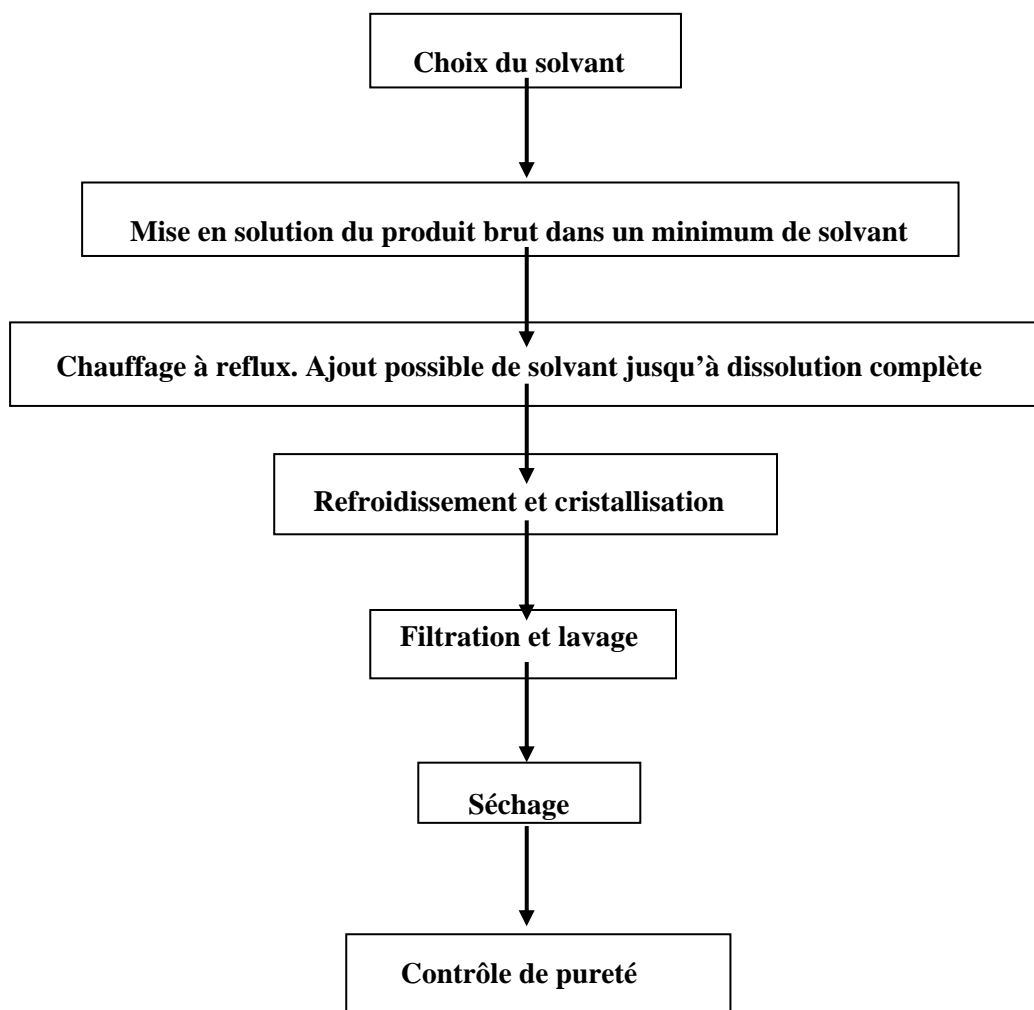
$$E^\circ(\text{S}_4\text{O}_6^{2-} / \text{S}_2\text{O}_3^{2-}) = 0,09 \text{ V}$$

Extrait de la classification périodique des éléments

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

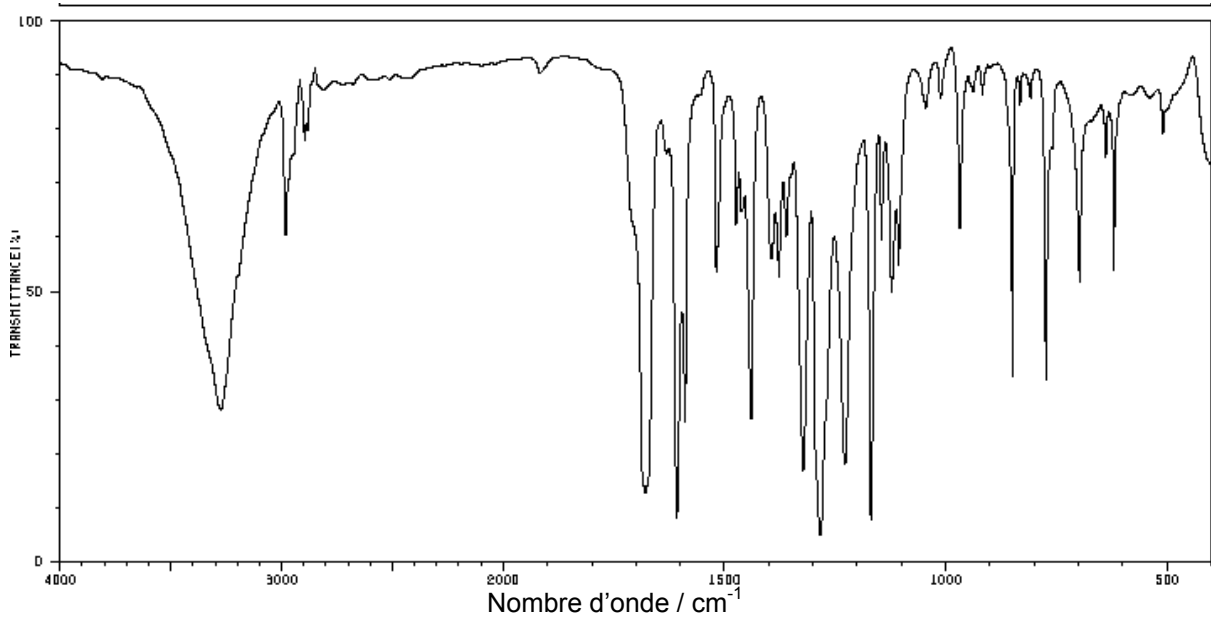
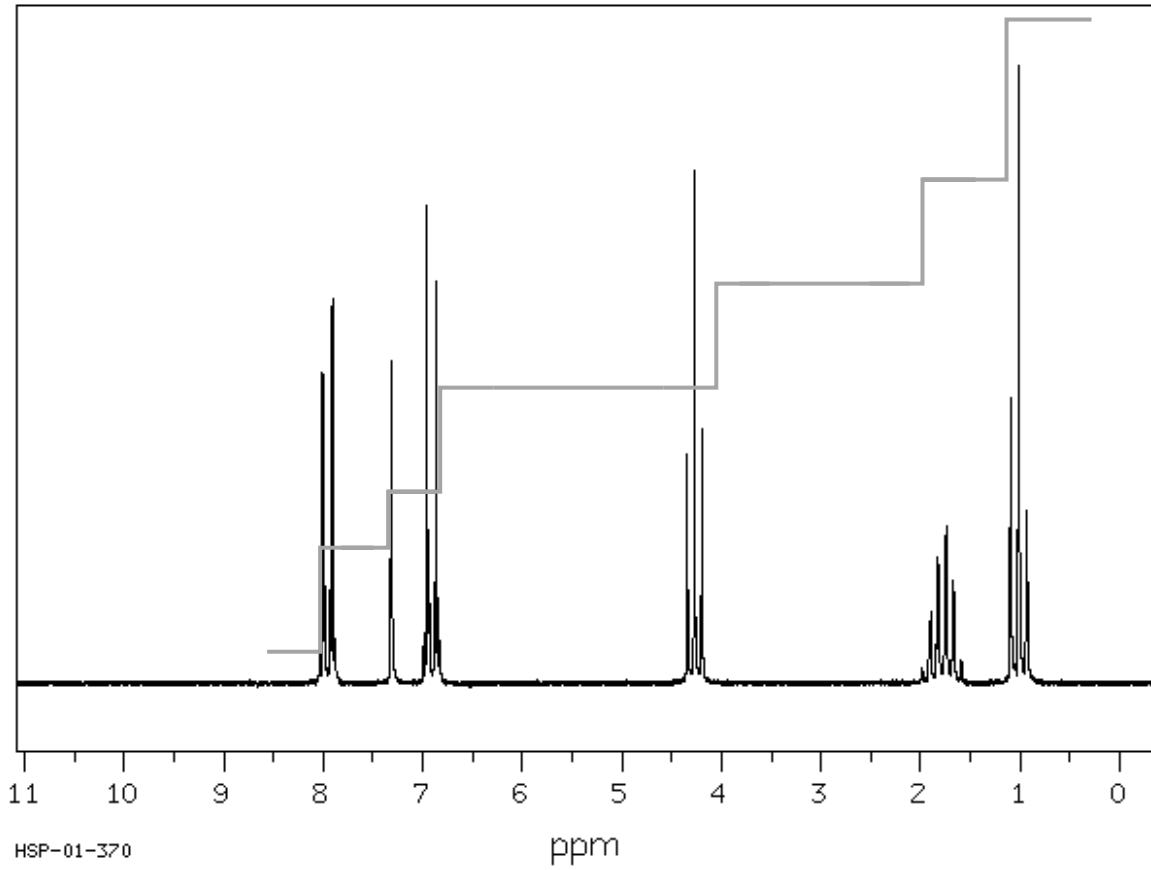
Produit	Propriétés	sécurité											
Benzaldéhyde	$M = 106,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$		H302										
Acide benzoïque	$M = 122,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $\theta_{\text{fus}} = 122^\circ\text{C}$ $\text{pK}_A = 4,2$ Soluble dans l'éthanol Solubilité dans l'eau : <table border="1" data-bbox="639 696 1031 770"> <thead> <tr> <th>T /°C</th> <th>0</th> <th>10</th> <th>25</th> <th>95</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>s / g.L⁻¹</td> <td>1,7</td> <td>2,1</td> <td>2,9</td> <td>68</td> </tr> </tbody> </table>	T /°C	0	10	25	95	s / g.L ⁻¹	1,7	2,1	2,9	68	 	H318- H335 P261 P280 P305+ P351 + P338
T /°C	0	10	25	95									
s / g.L ⁻¹	1,7	2,1	2,9	68									
Solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène	$M(\text{H}_2\text{O}_2) = 34,01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$												
Solution aqueuse d'iodure de potassium à 100 g.L⁻¹	$M(\text{KI}) = 166,00 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$												
Solution aqueuse de thiosulfate de sodium à 0,05 mol.L⁻¹	$M(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 158,11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$												
Solution aqueuse d'acide sulfurique à 2 mol.L⁻¹			H314 P280 P305 + P351 + P338 P310										

Annexe 1 : les étapes de la recristallisation



Principe. La recristallisation repose sur la différence de solubilité qui peut exister entre l'espèce à purifier et les impuretés présentes. La solubilité de la plupart des solides augmentant avec la température, la recristallisation consiste à dissoudre le solide à purifier dans un **minimum de solvant à ébullition** puis à laisser refroidir la solution. Dans le cas traité ici, les impuretés (en faibles quantités) sont solubles dans le solvant à chaud et à froid. Lors du refroidissement, le solide cristallise tandis que les impuretés se retrouvent dans le filtrat : le solide est alors récupéré par filtration sur Büchner. Cette technique exige de trouver un solvant ou un mélange de solvants dans lequel la différence de solubilité de l'espèce à purifier et des impuretés soit notable.

**Annexe 2 : spectre RMN du proton
et spectre IR de l'ester (B)**



Annexe 3 : table des déplacements chimiques RMN du proton

**Domaines de déplacements chimiques des protons
des groupes M (méthyle CH₃, méthylène CH₂ et méthyne CH)
en α ou en β de groupes caractéristiques.**

type de proton	δ en ppm	type de proton	δ en ppm
M-CH ₂ R	0,8-1,6	M-C-CH ₂ R	0,9-1,6
M-C=C	1,6-2,0	M-C-C=C	1,0-1,8
M-C≡C	1,7-2,8	M-C-C≡C	1,2-1,8
M-Ph	2,2-2,8	M-C-Ph	1,1-1,8
M-F	4,2-4,8	M-C-F	1,5-2,2
M-Cl	3,0-4,0	M-C-Cl	1,5-2,0
M-Br	3,4-4,1	M-C-Br	1,8-1,9
M-I	3,1-4,2	M-C-I	1,7-2,1
M-OH et M-OR	3,2-3,6	M-C-OH et M-C-OR	1,2-1,8
M-OPh	3,8-4,6	M-C-OPh	1,3-2,0
M-O-CO-R	3,6-5,0	M-C-O-CO-R	1,3-1,8
M-O-CO-Ph	3,8-5,0	M-C-O-CO-Ph	1,6-2,0
M-CHO et M-CO-R	2,1-2,6	M-C-CHO	1,1-1,7
M-CO-Ph	3,8-5,0	M-C-CO-R	1,1-1,8
M-CO-OH et M-CO-OR	1,8-2,6	M-C-CO-Ph	1,1-1,9
M-CO-NR ₂	1,8-2,2	M-C-CO-OR	1,1-1,9
M-C≡N	2,2-3,0	M-C-CO-NR ₂	1,1-1,8
M-NH ₂ et M-NR ₂	2,2-3,0	M-C-C≡N	1,2-2,0
M-N ⁺ R ₃	3,0-3,6	M-C-N ⁺ R ₃	1,4-2,0
M-NH-CO-R	3,0-3,8	M-C-NH-CO-R	1,1-1,9
M-NO ₂	4,1-4,4	M-C-NO ₂	1,6-2,5
M-SH et M-SR	2,1-5,1	M-C-SH et M-C-SR	1,3-1,9

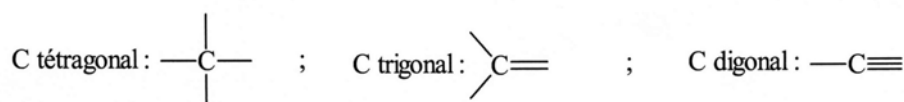
Domaines de déplacements chimiques de divers protons.

type de proton	δ en ppm	type de proton	δ en ppm
>C(cycle)=CH ₂	4,6	-CO-OH	8,5-13
>C=CH ₂	5,3	>C=C-OH	11-17
-C=CH-	5,1	PhH	7,2
-C=CH- (cyclique)	5,3	R-OH	0,5-5,5
R-C≡C-H	3,1	Ar-OH	4,0-7,5
Ar-H	7,0-9,0	Ar-OH (avec liaison H intramoléculaire)	5,5-12,5
>C=CH-CO-	5,9	R-NH-	0,5-3,0
-CH=C-CO-	6,8	Ar-NH	3,0-5,0
R-CHO	9,9	R-CO-NH-	5,0-8,5
Ar-CHO	9,9	CHCl ₃	7,2
H-CO-O-	8,0	H ₂ O	≈5,0
H-CO-N<	8,0		

Annexe 4 : table des nombres d'onde en spectroscopie infrarouge

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

F : fort ; m : moyen ;
f : faible



Annexe 5 : phrases H et P

Mentions de danger

<u>H200</u> : Explosif instable.	<u>H335</u> : Peut irriter les voies respiratoires.
<u>H201</u> : Explosif ; danger d'explosion en masse.	<u>H336</u> : Peut provoquer somnolence ou vertiges.
<u>H202</u> : Explosif ; danger sérieux de projection.	<u>H340</u> : Peut induire des anomalies génétiques
<u>H203</u> : Explosif ; danger d'incendie, d'effet de souffle ou de projection.	<u>H341</u> : Susceptible d'induire des anomalies génétiques
<u>H204</u> : Danger d'incendie ou de projection.	<u>H350</u> : Peut provoquer le cancer
<u>H205</u> : Danger d'explosion en masse en cas d'incendie.	<u>H350i</u> : Peut provoquer le cancer par inhalation.
<u>H220</u> : Gaz extrêmement inflammable.	<u>H351</u> : Susceptible de provoquer le cancer
<u>H221</u> : Gaz inflammable.	<u>H360</u> : Peut nuire à la fertilité ou au fœtus
<u>H222</u> : Aérosol extrêmement inflammable.	<u>H360F</u> : Peut nuire à la fertilité.
<u>H223</u> : Aérosol inflammable.	<u>H360D</u> : Peut nuire au fœtus.
<u>H224</u> : Liquide et vapeurs extrêmement inflammables.	<u>H360FD</u> : Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
<u>H225</u> : Liquide et vapeurs très inflammables.	<u>H360Fd</u> : Peut nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.
<u>H226</u> : Liquide et vapeurs inflammables.	<u>H360Df</u> : Peut nuire au fœtus. Susceptible de nuire à la fertilité.
<u>H228</u> : Matière solide inflammable.	<u>H361</u> : Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus
<u>H240</u> : Peut exploser sous l'effet de la chaleur.	<u>H361f</u> : Susceptible de nuire à la fertilité
<u>H241</u> : Peut s'enflammer ou exploser sous l'effet de la chaleur.	<u>H361d</u> : Susceptible de nuire au fœtus
<u>H242</u> : Peut s'enflammer sous l'effet de la chaleur.	<u>H361fd</u> : Susceptible de nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.
<u>H250</u> : S'enflamme spontanément au contact de l'air.	<u>H362</u> : Peut être nocif pour les bébés nourris au lait maternel.
<u>H251</u> : Matière auto-échauffante ; peut s'enflammer.	<u>H370</u> : Risque avéré d'effets graves pour les organes
<u>H252</u> : Matière auto-échauffante en grandes quantités ; peut s'enflammer.	<u>H371</u> : Risque présumé d'effets graves pour les organes
<u>H260</u> : Dégage au contact de l'eau des gaz inflammables qui peuvent s'enflammer spontanément.	<u>H372</u> : Risque avéré d'effets graves pour les à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
<u>H261</u> : Dégage au contact de l'eau des gaz inflammables.	<u>H373</u> : Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
<u>H270</u> : Peut provoquer ou aggraver un incendie ; comburant.	<u>H300+H310</u> : Mortel par ingestion ou par contact cutané.
<u>H271</u> : Peut provoquer un incendie ou une explosion ; comburant puissant.	<u>H300+H330</u> : Mortel par ingestion ou par inhalation.
<u>H272</u> : Peut aggraver un incendie ; comburant.	<u>H310+H330</u> : Mortel par contact cutané ou par inhalation.
<u>H280</u> : Contient un gaz sous pression ; peut exploser sous l'effet de la chaleur.	<u>H300+H310+H330</u> : Mortel par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.
<u>H281</u> : Contient un gaz réfrigéré ; peut causer des brûlures ou blessures cryogéniques.	<u>H301+H311</u> : Toxique par ingestion ou par contact cutané.
<u>H290</u> : Peut être corrosif pour les métaux.	<u>H301+H331</u> : Toxique par ingestion ou par inhalation.
<u>H300</u> : Mortel en cas d'ingestion.	<u>H311+H331</u> : Toxique par contact cutané ou par inhalation.
<u>H301</u> : Toxique en cas d'ingestion.	<u>H301+H311+H331</u> : Toxique par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.
<u>H302</u> : Nocif en cas d'ingestion.	<u>H302+H312</u> : Nocif en cas d'ingestion ou de contact cutané.
<u>H304</u> : Peut être mortel en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires.	<u>H302+H332</u> : Nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation.
<u>H310</u> : Mortel par contact cutané.	<u>H312+H332</u> : Nocif en cas de contact cutané ou d'inhalation.
<u>H311</u> : Toxique par contact cutané.	<u>H302+H312+H332</u> : Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation.
<u>H312</u> : Nocif par contact cutané.	<u>H400</u> : Très toxique pour les organismes aquatiques.
<u>H314</u> : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.	<u>H410</u> : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
<u>H315</u> : Provoque une irritation cutanée.	<u>H411</u> : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
<u>H317</u> : Peut provoquer une allergie cutanée.	<u>H412</u> : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
<u>H318</u> : Provoque des lésions oculaires graves.	<u>H413</u> : Peut être nocif à long terme pour les organismes aquatiques.
<u>H319</u> : Provoque une sévère irritation des yeux.	<u>H420</u> : Nuit à la santé publique et à l'environnement en détruisant l'ozone dans la haute atmosphère.
<u>H330</u> : Mortel par inhalation.	
<u>H331</u> : Toxique par inhalation.	
<u>H332</u> : Nocif par inhalation.	
<u>H334</u> : Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.	

Conseils de prudence

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

P102 : Tenir hors de portée des enfants.

P103 : Lire l'étiquette avant utilisation.

P201 : Se procurer les instructions avant l'utilisation.

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

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

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

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

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

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

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

P230 : Maintenir humidifié avec...

P231 : Manipuler sous gaz inerte.

P232 : Protéger de l'humidité.

P233 : Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

P234 : Conserver uniquement dans le récipient d'origine.

P235 : Tenir au frais.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

P264 : Se laver ... soigneusement après manipulation.

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

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

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

P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.

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

P281 : Utiliser l'équipement de protection individuel requis.

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

P283 : Porter des vêtements 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 ... 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.

P400 : 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 résistante à la corrosion.

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

P410 : Protéger du rayonnement solaire.

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

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

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

P420 : Stocker à l'écart des autres matières.

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

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

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

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

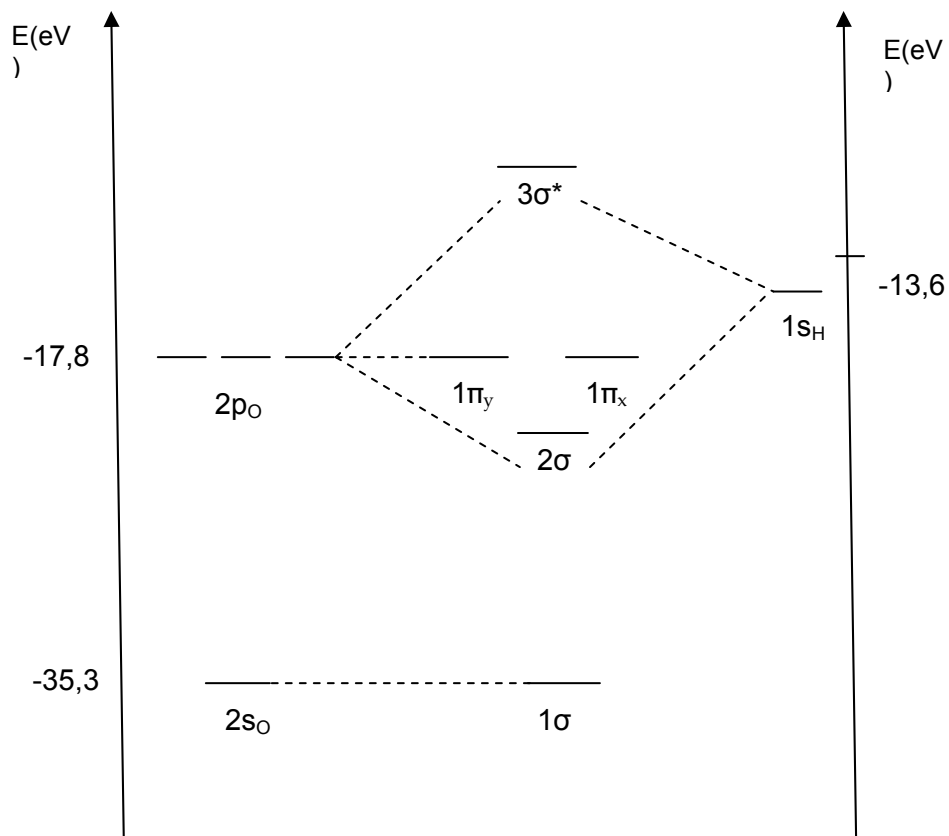
P410+P412 : Protéger du rayonnement solaire. Ne pas exposer à une température supérieure à 50 °C / 122 °F.

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

P501 : Éliminer le contenu/récipient dans ..

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

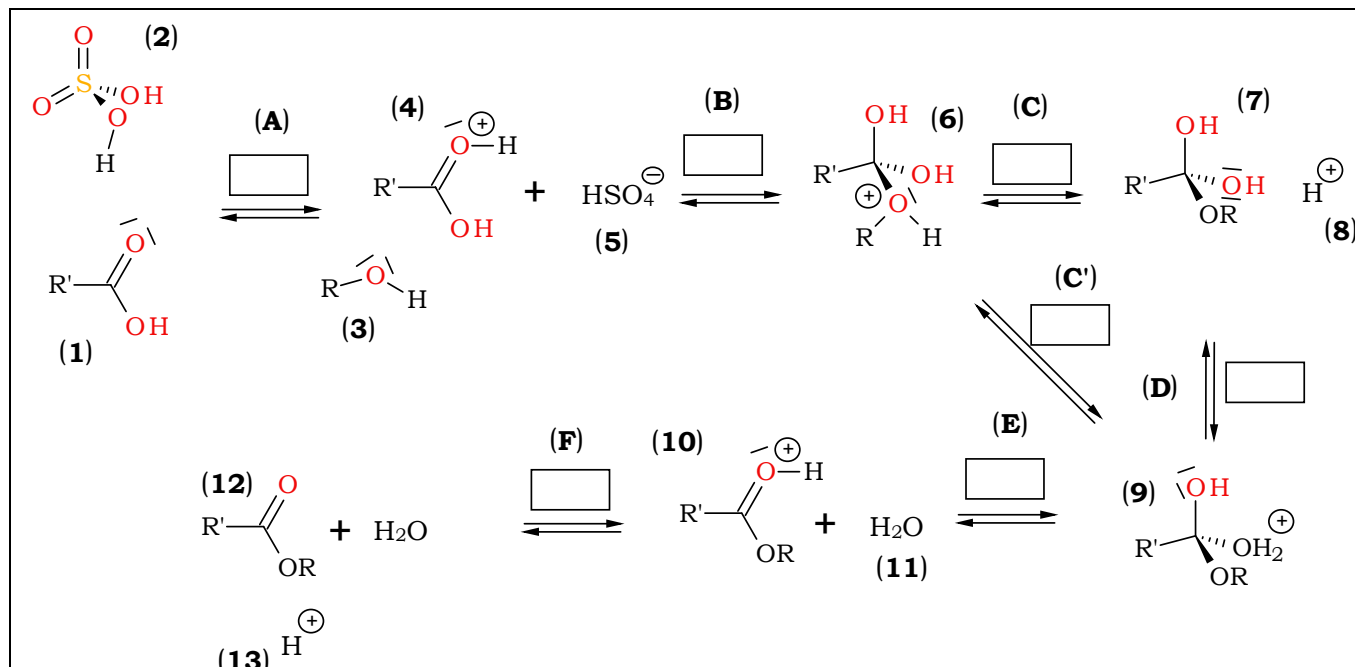
**Annexe 6 à rendre avec la copie :
diagramme d'OM du radical hydroxyle HO•**



Nom

Numéro de poste

**Annexe 7 à rendre avec la copie :
mécanisme réactionnel d'estérification**



Catégories de réaction :

- A/B : réaction acido-basique ;
- A_N : addition nucléophile ;
- A_E : addition électrophile ;
- E : élimination ;
- P : prototropie ;
- S_N : substitution nucléophile ;
- S_E : substitution électrophile.

Nom

Numéro de poste

Feuille de résultats

5.2 1. Recristallisation

Masse de brut recristallisé :	<input type="text"/>
Volume de solvant utilisé :	<input type="text"/>
Masse de produit purifié sec obtenu :	<input type="text"/>
Rendement de recristallisation :	<input type="text"/>
Rendement de réaction :	<input type="text"/>

CCM à rendre

5.3 2. Titrage de la solution de peroxyde d'hydrogène

Coefficient de variation de la méthode : 1%. Intervalle de validation : \pm 2 écarts-types

$V_{\text{éq}} =$ mL

C = \pm mmol.L⁻¹

RAPPORT DE L'ÉPREUVE PRATIQUE DE CHIMIE GÉNÉRALE ET ANALYTIQUE

Rapport établi par M. R. Barbe, M. X. Bataille, Mme J-L. Dormieux et Mme S. Warin

L'épreuve de travaux pratiques de chimie de cette année avait pour thème le peroxyde d'hydrogène. La partie expérimentale consistait :

- à réaliser la recristallisation de l'acide benzoïque issu de l'oxydation du benzaldéhyde par le peroxyde d'hydrogène, une chromatographie sur couche mince permettant de contrôler la qualité de la recristallisation.

- à titrer une solution de peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène réagit préalablement avec les ions iodure permettant la formation de diiode, qui est ensuite titré par une solution de thiosulfate de sodium. Le suivi était réalisé par potentiométrie à courant nul.

Le sujet proposait une partie manipulation plutôt rapide à mettre en œuvre mais nécessitant des connaissances élémentaires de chimie.

A- Partie expérimentale :

Il est nécessaire encore de souligner que cette épreuve est avant tout une épreuve de manipulation. Ainsi y est jugée la façon de se comporter face à du matériel de chimie qui peut être utilisé par les futurs enseignants au sein des lycées. Les candidats qui ne font pas l'effort de manipuler se voient donc fortement pénalisés.

En ce qui concerne la sécurité, les règles élémentaires sont respectées par la plupart des candidats. Il faut toutefois penser à enlever ses gants lorsque la manipulation est terminée et éviter de se toucher avec des gants sales. De plus, lors de la manipulation d'objets chauds, il est dangereux de porter des gants en latex.

Partie A1 : Recristallisation

Dans l'annexe 1, était décrit succinctement le principe de recristallisation afin qu'il ne soit pas préjudiciable à certains candidats de ne pas être familier de cette manipulation. La recristallisation consistait en trois grandes étapes : le montage en lui-même, la filtration du solide purifié, puis la CCM.

- Montage

Beaucoup de candidats ne savent pas comment débiter le montage. La première pièce de verrerie à considérer est le ballon : il faut le fixer au niveau du col par une pince et suffisamment haut pour permettre de placer le système de chauffage et le support élévateur. Ensuite, les autres éléments de verrerie sont placés, préalablement graissés, à savoir le réfrigérant (qui doit être guidé et non fixé) et une ampoule de coulée. Cette dernière n'a été que très peu utilisée : beaucoup de candidats ont versé l'eau dans le ballon sans réfléchir à la quantité d'eau introduite alors qu'il était souligné dans l'énoncé que le solide devait être dissous dans un minimum de solvant à ébullition (terme en gras) et que de plus le volume d'eau introduit faisait l'objet d'une question de l'énoncé. Ce volume d'eau ne devait cependant pas être mesuré avec précision, l'utilisation de la pipette jaugée ne se justifiait pas ici.

Les candidats disposaient de 2,2 g de produit brut à recristalliser. La masse « exacte » de produit brut utilisée par le candidat devait être précisée dans la feuille de résultats et était nécessaire pour calculer le rendement de recristallisation. Certains candidats n'ont pas transvasé la totalité du brut en oubliant de rincer à l'eau distillée le flacon.

La plupart des candidats, ne connaissent pas le terme « chauffer à reflux » et par conséquent, la dissolution du solide a été difficile, voire non atteinte. Trop de candidats ont laissé le montage plusieurs heures sans contrôler la température de la plaque chauffante. Certains ont cependant rajouté de l'eau ayant constaté la non dissolution du solide mais ceci n'a pas toujours été suffisant. D'un point de vue sécurité, certaines règles doivent être respectées comme ne pas ouvrir le système à chaud (ce qui est problématique dans le cas des solvants inflammables), ne couper l'alimentation en eau du réfrigérant qu'une fois le montage refroidi. De plus, un valet ne doit pas être posé sur une plaque chauffante chaude. Enfin, le choix des fixations est extrêmement important pour la mise en sécurité du montage : une pince plate doit être utilisée pour fixer le ballon et non une pince trois doigts qui n'assure pas une stabilité correcte.

- Filtration

Le jury a regretté le manque de sens pratique des candidats : il est difficile de transvaser quantitativement un solide contenu dans un ballon. Il aurait été bienvenu d'utiliser un bécher intermédiaire dans lequel le contenu du ballon encore tiède aurait été transvasé. La cristallisation s'effectue alors dans le bécher et le transvasement sur le Büchner s'en trouve plus aisé.

La fiole à vide doit être fixée lors de la filtration avec la pince trois doigts. Lors des lavages du solide, le vide doit être coupé pour que le solvant de rinçage puisse être suffisamment en contact avec le solide mais ce solvant ne doit pas être utilisé en trop grande quantité, ce qui provoque la solubilisation de l'espèce purifiée et donc une perte de masse.

- CCM

Les CCM sont réalisées avec beaucoup de soins en déposant plusieurs fois une très faible quantité de produit. Aucun candidat n'a pourtant vérifié, avant l'éluion et à l'aide de la lampe UV, que la quantité de produit déposé était suffisante ; ce qui conduit parfois à des plaques difficilement exploitables. De plus, il faut bien faire attention à la migration de l'éluant afin que le front de l'éluant ne dépasse pas le haut de la plaque, ce qui fausse les rapports frontaux.

Partie A2 : Titrage d'une solution de peroxyde d'hydrogène

- Verrerie

Les candidats se trompent encore régulièrement de verrerie quand il s'agit de mesurer un volume : pour ce titrage, seule la solution de peroxyde d'hydrogène nécessitait une mesure de volume précis et donc l'utilisation d'une pipette jaugée.

De plus, la manipulation nécessitait de transvaser quantitativement le contenu d'un erlenmeyer dans un bécher. Le transvasement n'a absolument pas été quantitatif pour la plupart des candidats. Des pertes conséquentes rendent le résultat du titrage entaché d'une erreur trop importante.

- Potentiométrie

Le jury souligne le fait qu'il est absolument nécessaire de maîtriser les méthodes fondamentales de titrage, que ce soit la pH-métrie ou la potentiométrie à courant nul.

Rappelons qu'un suivi potentiométrique s'effectue avec deux électrodes qu'il convient de choisir correctement et dont les capuchons de protection ont été retirés.

Certains candidats ne connaissaient manifestement pas les électrodes de référence (électrode au calomel saturé ou au chlorure d'argent) ni l'électrode de platine. De plus, la manipulation de ces électrodes était mal aisée : trop peu de candidats les fixent correctement. L'agitation au cours du titrage doit être contrôlée.

Il est également important de rappeler que l'étalonnage n'est nécessaire que pour les titrages pH-métriques et non pour les titrages potentiométriques.

En ce qui concerne la réalisation du suivi, il est nécessaire de resserrer les mesures au voisinage de l'équivalence. Ce qui était aisé pour ce titrage puisque l'approche de l'équivalence était perceptible par la diminution progressive de l'intensité de la couleur brune.

Enfin l'exploitation de la courbe n'a pas été satisfaisante dans l'ensemble : les titres ne sont pas complets (un titre doit être construit de façon à pouvoir comprendre la manipulation effectuée en lisant le titre) et le volume équivalent doit être déterminé correctement. En effet, il n'est pas précis de réaliser la courbe sur Excel et de procéder à la méthode des tangentes sur de telles courbes, l'échelle étant peu précise. Des logiciels comme Regressi peuvent être utilisés et les méthodes de la dérivée première ou seconde sont conseillées.

Pour conclure, il faut faire attention à l'expression des résultats avec leur incertitude. L'incertitude n'est exprimée qu'avec un seul chiffre significatif et limite le nombre de chiffres significatifs du résultat.

B- Exploitation des résultats :

Partie B1 : Recristallisation

Il était tout d'abord demandé l'équation de la réaction entre le benzaldéhyde et le peroxyde d'hydrogène. Certains candidats confondent équation de réaction et mécanisme réactionnel.

Le principe de la CCM est encore mal maîtrisé par certains : parler de différence de solubilité entre la phase solide et l'éluant n'est pas adéquate. De plus, les interactions entre l'espèce et la phase solide (en l'occurrence la silice dans le cadre de ce TP) sont trop souvent négligées dans les explications : seules les interactions avec l'éluant ont été mentionnées.

Le principe de la révélation sous UV (254 nm) a été problématique : la plupart des candidats ont expliqué que cela permettait de révéler la présence d'espèces aromatiques mais la justification n'a pas été satisfaisante. Contrairement à une réponse fréquemment rencontrée, ce n'est pas la fluorescence des espèces aromatiques à 254 nm qui est observée. En réalité, le gel de silice de la plaque contient une espèce qui fluoresce à 254 nm. Les composés aromatiques absorbent les rayonnements de cette longueur d'onde, ce qui empêche la fluorescence à l'endroit de la plaque où ils se trouvent d'où l'observation d'une tâche foncée.

Il était demandé de calculer le rendement total de la réaction. Il est décevant de voir qu'un grand nombre de candidats réalisent un rapport des masses du produit et du réactif. Il faut bien évidemment mettre en jeu les quantités de matière. Les notions d'avancement maximal et de masse théorique doivent donc être mieux maîtrisées.

Partie B2 : Titrage d'une solution de peroxyde d'hydrogène

Les équations des réactions redox mises en jeu ont été écrites de manière correcte mais il était ensuite demandé de montrer que les ions iodure étaient en excès devant le peroxyde d'hydrogène. Il est regrettable que certains candidats se trompent sur les calculs de quantité de matière car les relations élémentaires entre concentrations et quantités de matières sont mal maîtrisées. On constate aussi des erreurs sur les unités (mL ou L).

C- Le peroxyde d'hydrogène :

Partie C1 : cette partie abordait quelques généralités sur l'atome d'oxygène et sur la molécule de peroxyde d'hydrogène. La structure électronique de l'atome d'oxygène est fréquemment fautive car les candidats confondent numéro atomique et masse molaire. Dans l'état excité, l'atome d'oxygène ne change pas de numéro atomique, il ne gagne pas d'électrons comme cela a souvent été proposé.

La représentation de Lewis de H_2O_2 est en générale correcte, compte tenu de la facilité de cette question, même si parfois on trouve des réponses extravagantes avec des oxygènes tétravalents. La géométrie de H_2O_2 selon la méthode VSEPR n'est pas correctement maîtrisée par les candidats, bien que ce genre de question soit récurrente chaque année. La justification de la polarité de H_2O_2 n'est qu'à moitié satisfaisante car les candidats oublient de prendre en compte la géométrie de la molécule. Les énergies de liaisons permettent de constater la fragilité de la liaison O-O et sa facilité à se rompre de façon homolytique.

Partie C2 : la notion de nombre ou degré d'oxydation d'un atome n'est pas acquise par certains candidats. L'équation de la réaction de dismutation de H_2O_2 a été correctement traitée. En revanche le calcul de la constante d'équilibre n'est pas correcte et certains utilisent dans leur calcul la valeur du Faraday F alors que celui-ci n'était pas directement donnée dans l'énoncé. La détermination du titre en volume de la solution de peroxyde d'hydrogène a été peu traitée, il suffisait d'utiliser la loi des gaz parfaits.

Partie C3 : cette partie abordait l'aspect cinétique de la réaction d'oxydation des ions iodure par le peroxyde d'hydrogène étudiée dans la partie expérimentale. Très peu de candidats ont traité cette partie, en revanche ceux qui l'ont abordé l'ont correctement fait mais ne l'ont pas souvent menée à terme. Les conditions expérimentales de ce suivi cinétique correspondaient à une dégénérescence de l'ordre pour les ions oxonium et à un mélange stœchiométrique en H_2O_2 et iodure. Il est regrettable qu'un seul candidat soit arrivé jusqu'à la régression linéaire demandée. Le traitement

cinétique du mécanisme réactionnel proposé a très peu été abordé. Il était nécessaire de connaître la méthode de l'étape cinétiquement déterminante et de traduire l'égalité des vitesses pour le premier acte élémentaire qui était un équilibre instantané.

D- Le peroxyde d'hydrogène en biologie :

Partie D1 : Il s'agissait ici d'étudier le cycle catalytique de la ligninase et de repérer le caractère oxydant ou réducteur de chacune des étapes composant ce dernier. Cette partie était également l'occasion de réfléchir sur la structure des molécules et l'écriture de formules mésomères.

Un grand nombre d'erreurs auraient pu être évitées par une simple vérification de la règle de l'octet : de nombreux atomes d'oxygène trivalents et de carbone pentavalents ont été retrouvés dans les structures de l'anion superoxyde et de l'intermédiaire radicalaire AH[•]. L'évolution des états d'oxydation de complexe n'a globalement pas été comprise.

Partie D2 : Cette partie était axée sur le thème de la chimie organique plus « traditionnelle ». Le diagramme d'orbitales moléculaires n'a été que peu de fois correctement rempli. Nous attirons l'attention des candidats sur l'intérêt que constitue cet outil. Le mécanisme réactionnel à compléter l'a été en général en « tout ou rien » : soit les candidats savent le faire (avec de ce fait très peu d'erreurs), soit pas du tout.

Si l'interprétation du spectre RMN est souvent bien réalisée, celle du spectre IR est plus décevante ; les candidats essayant de trouver les groupes fonctionnels associés aux absorptions IR alors que ces dernières ne permettent que de conclure sur la présence (ou non) de liaisons chimiques sur la molécule. Concernant la thermochimie, les expressions littérales sont souvent justes, mais les applications numériques sont erronées du fait d'erreurs sur les unités. Enfin, le phénomène de fluorescence est bien compris.

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

	B1								B2		
% rép.	87	90	58	45	94	84	71	52	77	58	61
% bonne rép.	81	51	42	48	53	33	51	34	69	33	57

	C1					C2				C3				
% rép.	81	84	81	61	39	68	71	35	16	26	19	16	13	16
% bonne rép.	36	90	35	38	54	56	77	47	44	51	70	80	50	40

	D1					D2											
% rép.	58	29	29	42	6	52	65	58	48	52	29	29	45	35	42	26	23
% bonne rép.	29	8	17	92	0	41	48	66	90	41	43	65	61	66	58	66	57

ÉPREUVE DE LEÇON DE BIOCHIMIE OU MICROBIOLOGIE OU BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 5 heures

Coefficient 3

LEÇON

Durée de la préparation : 4 heures

Durée de l'exposé : 45 minutes

Durée de l'entretien avec le jury : 15 minutes

Intitulés des leçons

Physiologie	La régulation de la ventilation pulmonaire
Microbiologie	La construction et l'amélioration des souches de production industrielle
Biochimie	Cytosquellette et motilité cellulaire.
Physiologie	Les échanges sodium – potassium
Immunologie	Le système HLA
Microbiologie	les Bactéries intracellulaires obligatoires
Biochimie	Régulations des carrefours métaboliques.
Microbiologie	Virus à tropismes nerveux
Physiologie	Le cycle du fer
Biochimie	Les radicaux libres.
Physiologie	Adhérence et signalisation
Microbiologie	Les toxi infections alimentaires collectives
Physiologie	Les cellules sanguines
Immunologie	Biotechnologie de la production d'anticorps
Microbiologie	Mécanismes de résistance aux antibiotiques
Physiologie	Les hormones stéroïdiennes
Microbiologie	La paroi des procaryotes
Physiologie	La signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G
Biochimie	Rôles informationnels des matrices extracellulaires.
Microbiologie	La perception par les bactéries des paramètres physico-chimiques du milieu
Physiologie	La lactation
Biochimie	Les ARN non codant.
Microbiologie	Relations virus cellules animales
Biochimie	Les flux intracellulaires des macromolécules.
Microbiologie	La génération et la caractérisation des fragments d'ADN à cloner
Physiologie	Les neurotoxines
Biochimie	Mécanismes de détoxification des cellules eucaryotes.
Immunologie	Les médiateurs vasoactifs
Biochimie	L'information génétique des mitochondries.
Microbiologie	Mécanismes d'action des toxines protéiques
Biochimie	Amélioration des activités enzymatiques naturelles.

RAPPORT DE L'ÉPREUVE DE LEÇON

établi par : Henri Jean Boulouis, Jeanne-Laure Dormieux, Françoise Guillet, Marc Landry, Philippe Lejeune, Alain Morel, Benoît Schneider

Les sujets permettaient d'aborder des questions plus ou moins larges dans les domaines de la biochimie, de la microbiologie, de la physiologie, de l'immunologie et des biotechnologies. Les sujets proposés comprenaient à la fois des intitulés considérés comme « classiques » : tels « neurotoxines , cellules sanguines, régulation des carrefours métaboliques, les échanges sodium potassium, les hormones stéroïdiennes, les mécanismes de résistance aux antibiotiques » ; et des intitulés moins traditionnels tels : « la lactation, l'amélioration des activités enzymatiques naturelles, les virus à tropismes nerveux, les flux intracellulaires des macromolécules ». Qu'ils abordent des phénomènes au niveau de l'organisme entier ou qu'ils traitent de questions plus localisées au niveau cellulaire ou moléculaire, tous nécessitaient des capacités d'intégration de différents savoirs.

Certains candidats ont obtenu des résultats satisfaisants. Ils possèdent des connaissances suffisantes pour comprendre le sujet, trouver les documents pertinents et présenter une leçon globalement satisfaisante. A l'inverse, les performances très décevantes de plusieurs candidats sont surprenantes. A l'évidence, les résultats s'expliquent par une méconnaissance du sujet qui n'a pas pu être compensée par la lecture des ouvrages mis à disposition, et qui peut même être aggravée par le choix d'ouvrages inadaptés. Une part importante de la note dépend des réponses aux questions. Le jury souligne la difficulté de cette partie de l'exercice. Il ne semble pas qu'il y ait de lien entre les résultats et la nature plus ou moins "classique" du sujet.

La raison des échecs tient plutôt au caractère très fragmenté des savoirs en physiologie et en particulier à l'absence chez certains candidats des connaissances de base sur les grandes fonctions physiologiques.

Concernant les leçons de microbiologie :

D'une manière générale, les sujets de microbiologie n'ont pas été traités de façon satisfaisante. Les deux sujets de virologie tels qu'ils ont été abordés, ont démontré que les candidats n'avaient qu'une culture limitée dans ce domaine. Le choix des exemples devant illustrer le propos des deux sujets, relativement vastes et traités dans tous les ouvrages de virologie –parfois sous le même vocable que le titre- n'a que rarement été judicieux et plutôt commandé par les réminiscence des candidats que par une réelle logique. Les sujets de bactériologie étaient eux aussi très classiques. Le manque de culture en bactériologie systématique est un handicap certain pour traiter des sujets qui relèvent de ce domaine.

Bactéries intracellulaires obligatoires

Si ce titre est large, il n'en reste pas moins un sujet de bactériologie systématique. Une première partie de présentation des deux familles et des genres principaux (classification, habitat, particularité métabolique) était nécessaire avant d'en venir au pouvoir pathogène. Les méthodes de mise en évidence de l'infection, très classiques en bactériologie, ne peuvent pas se résumer à des noms de techniques...sans avoir des exemples de germes pour lesquels ces techniques sont appliquées.

Virus à tropismes nerveux

Le plan suivant pouvait être adopté : la présentation des virus concernés (nombreuses familles virales) puis la biologie d'un représentant emblématique (virus rabique, virus Herpes, virus encéphalitique, virus poliomyélitique,...) de chaque situation. L'accent pouvait être mis en troisième partie sur la mise en évidence de l'infection et éventuellement sur la thérapeutique.

Les toxi infections alimentaires collectives.

Ce sujet est traité en tant que tel dans de très nombreux ouvrages. Il suffit de choisir le bon pour traiter de ce sujet.

Relations virus-Cellules animales

Ce sujet très général, permettait d'aborder la virologie sous un angle soit théorique soit appliqué. Le cycle des grandes étapes de la multiplication virale pouvait être une bonne introduction, permettant de replacer les différentes situations caractérisant des relations : lyse induite par le virus, persistance intracellulaire, transformation cellulaire,... puis d'envisager les conséquences et applications permettait une ouverture.

La construction et l'amélioration des souches de production industrielle

Le sujet demandait une approche technologique basée à la fois sur le génie génétique et l'ingénierie métabolique. Il a été correctement traité en détaillant les méthodes de conception des molécules d'ADN à introduire dans les organismes hôtes puis celles de l'amélioration de ceux-ci par des techniques de mutagenèse et de sélection.

Mécanismes de la résistance aux antibiotiques

Ce sujet très classique ne pouvait se borner à la dégradation enzymatique des pénicillines, sans aborder les résistances par modification des cibles. Les mécanismes d'acquisition des résistances par génération d'éléments transposables et de plasmides conjugatifs auraient mérités un exposé détaillé.

La paroi des procaryotes

Ce sujet classique ne pouvait se limiter à la description des éléments constitutifs, sans entrer dans les processus dynamiques de transport, de synthèse et de mise en place. De plus, des poncifs comme le cantonnement des *Archae* aux milieux "extrêmes et hostiles" ou la présentation de la paroi comme une "barrière mécanique" ne peuvent que témoigner d'une faible culture microbiologique.

La perception par les bactéries des paramètres physico-chimiques du milieu

Le sujet demandait la description des senseurs moléculaires et des mécanismes de régulation de l'expression des gènes permettant aux bactéries de s'adapter aux fluctuations de leur environnement (tactismes, systèmes à deux composantes, sigmas et anti-sigmas, riboswitches, réponse stringente, quorum sensing). Des exemples comme le chimio- et le phototactisme étaient tout à fait pertinents.

La génération et la caractérisation des fragments d'ADN à cloner

Il était attendu une description des méthodes d'extraction des molécules d'ADN et d'ARN, de synthèse des fragments d'ADN (action des enzymes de restriction, transcriptase réverse, PCR et synthèse chimique), ainsi que de caractérisation de ces molécules (techniques d'électrophorèse, de séquençage classique et de pyroséquençage). Les technologies d'amplification par PCR et de puces à ADN devaient être explicitées.

ÉTUDE CRITIQUE D'UN DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE

Durée de l'épreuve : 1 heure 20

Coefficient 3

Première partie d'épreuve :
ECD

SUJETS

Titre de l'ECD	Articles fournis
Evolution à façon des propriétés des protéines	<ul style="list-style-type: none">• Dasa Lipovsek et al. IN-VITRO PROTEIN EVOLUTION BY RIBOSOME DISPLAY AND MRNA DISPLAY Journal of Immunological Methods. 290 : 51–67 (2004)• Lutz Jermutus et al. TAILORING IN VITRO EVOLUTION FOR PROTEIN AFFINITY OR STABILITY PNAS. vol. 98 no. 1 : 75–80 (2001)
Pas de tolérance zéro pour les lymphocytes B	<ul style="list-style-type: none">• Duong et al. NEGATIVE SELECTION BY IGM SUPERANTIGEN DEFINES A B CELL CENTRAL TOLERANCE COMPARTMENT AND REVEALS MUTATIONS ALLOWING ESCAPE J. Immunol. 187 : 5596-5605 (2011)• Goodnow CC et al. CELLULAR AND GENETIC MECHANISMS OF SELF TOLERANCE AND AUTOIMMUNITY Nature, Vol 435 : 590 (2005)
L'AMPK, un senseur d'énergie	<ul style="list-style-type: none">• Yasuhiko Minokoshi et al. AMP-KINASE REGULATES FOOD INTAKE BY RESPONDING TO HORMONAL AND NUTRIENT SIGNALS IN THE HYPOTHALAMUS Nature vol n°428 p569 (2004)• D. Grahame Hardie et al. AMPK: A NUTRIENT AND ENERGY SENSOR THAT MAINTAINS ENERGY HOMEOSTASIS Nature reviews molecular cell biology Vol n°13 : p251 (2012)
Le contournement des inhibiteurs de Raf	<ul style="list-style-type: none">• Deborah T. Leicht et al. RAF KINASES: FUNCTION, REGULATION AND ROLE IN HUMAN CANCER <i>Biochim Biophys Acta.</i> 2007 August ; 1773(8): 1196–1212.• Poulikos I. Poulikakos et al. RAF INHIBITOR RESISTANCE IS MEDIATED BY DIMERIZATION OF ABERRANTLY SPLICED BRAF(V600E) Letter research nature 2011

<p>Les bactériocines circulaires</p>	<p>• Van Belkum MJ, Martin-Visscher LA, Vederas JC. STRUCTURE AND GENETICS OF CIRCULAR BACTERIOCINS. Trends Microbiol. 19(8) : 411-8. (2011)</p> <p>• Gabrielsen C, Brede DA, Hernández PE, Nes IF, Diep DB. THE MALTOSE ABC TRANSPORTER IN LACTOCOCCUS LACTIS FACILITATES HIGH-LEVEL SENSITIVITY TO THE CIRCULAR BACTERIOCIN GARVICIN ML. Antimicrob Agents Chemother. 56(6) : 2908-15. (2012)</p>
<p>La microscopie corrélative</p>	<p>• Xiaokun Shu et al A GENETICALLY ENCODED TAG FOR CORRELATED LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPY OF INTACT CELLS, TISSUES, AND ORGANISMS Plos biology Volume 9 Issue 4 e1001041 (2011)</p> <p>• Jürgen M Plitzko et al CORRELATIVE CRYO-LIGHT MICROSCOPY AND CRYO-ELECTRON TOMOGRAPHY: FROM CELLULAR TERRITORIES TO MOLECULAR LANDSCAPES Current Opinion in Biotechnology. 20 : 83–89 (2009)</p>
<p>la vitamine D, un modulateur de l'immunité</p>	<p>• Campbell GR, Spector SA VITAMIN D INHIBITS HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 AND MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS INFECTION IN MACROPHAGES THROUGH THE INDUCTION OF AUTOPHAGY. PLoS Pathog 8(5): e1002689 (2012)</p> <p>• Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. VITAMIN D3: A HELPFUL IMMUNO-MODULATOR. Immunology. 134(2) :123-39 (2011)</p>
<p>La présence d'introns dans les ARN bactériens.</p>	<p>• Toro et al. BACTERIAL GROUP II INTRONS: NOT JUST SPLICING. FEMS Microbiology Review. 31 : 342-358. (2007)</p> <p>• Salman et al. MULTIPLE SELF-SPLICING INTRONS IN THE 16S RRNA GENES OF GIANT SULFUR BACTERIA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 109 : 4203-4208. (2012)</p>
<p>Douleur, inflammation et dépression</p>	<p>• Satoshi Imai et al. CHANGE IN MICRORNAs ASSOCIATED WITH NEURONAL ADAPTIVE RESPONSES IN THE NUCLEUS ACCUMBENS UNDER NEUROPATHIC PAIN The Journal of Neuroscience • 31(43) : 15294 –15299 (2011)</p> <p>• Michael Maes et al. ACTIVATION OF CELL-MEDIATED IMMUNITY IN DEPRESSION: ASSOCIATION WITH INFLAMMATION, MELANCHOLIA, CLINICAL STAGING AND THE FATIGUE AND SOMATIC SYMPTOM CLUSTER OF DEPRESSION Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. 36 : 169–175 (2012)</p>

Le côté subversif des virus	<p>• Marazzi I et al. SUPPRESSION OF THE ANTIVIRAL RESPONSE BY AN INFLUENZA HISTONE MIMIC Nature, Volume 483, (2012)</p> <p>• Walsh D. and Mohr I VIRAL SUBVERSION OF THE HOST PROTEIN SYNTHESIS MACHINERY. Nature, review Microbiology. Vol 9 : 861. (2011)</p>
Thérapies ciblées et médecine personnalisée	<p>• Miriam Martini et al. TARGETED THERAPIES: HOW PERSONAL SHOULD WE GO? Nat. Rev. Clin. Oncol. 9, 87–97 (2012)</p> <p>• Marco Gerlinger et al. INTRATUMOR HETEROGENEITY AND BRANCHED EVOLUTION REVEALED BY MULTIREGION SEQUENCING N. Engl. J. Med. 366 : 883-92 (2012)</p>
Construction de souches de micro-algues de production.	<p>• Larkum et al. SELECTION, BREEDING AND ENGINEERING OF MICROALGAE FOR BIOENERGY AND BIOFUEL PRODUCTION. Trends in Biotechnology. 30 : 198-205. (2012)</p> <p>• Atsumi et al. DIRECT PHOTOSYNTHETIC RECYCLING OF CARBON DIOXYDE TO ISOBUTYRALDEHYDE. Nature Biotechnology. 27 : 1177-1182. (2009)</p>
Oxyde nitrique et pathologies nerveuses	<p>• Jeremy D. Marks et al. MITOCHONDRIAL NITRIC OXIDE MEDIATES DECREASED VULNERABILITY OF HIPPOCAMPAL NEURONS FROM IMMATURE ANIMALS TO NMDA The Journal of Neuroscience • 25(28) : 6561– 6575 (2005)</p> <p>• Andrew B. Knott. NITRIC OXIDE IN HEALTH AND DISEASE OF THE NERVOUS SYSTEM ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING Volume 11, Number 3 (2009)</p>
Les limitations de vitesse de l'ADN polymérase	<p>• Jerrod J. Schwartz et al. SINGLE MOLECULE MEASUREMENT OF THE “SPEED LIMIT” OF DNA POLYMERASE PNAS. vol 106 n°. 48 : 20294-20299 (2009)</p> <p>• Thomas D. Christian et al. SINGLE-MOLECULE MEASUREMENTS OF SYNTHESIS BY DNA POLYMERASE WITH BASE-PAIR RESOLUTION PNAS. vol 106 n°. 50 : 21109–21114 (2009)</p>
Cannabinoïdes et remodelage cardiaque	<p>• Andriani Athanasiou et al CANNABINOID RECEPTOR AGONISTS ARE MITOCHONDRIAL INHIBITORS: A UNIFIED HYPOTHESIS OF HOW CANNABINOIDS MODULATE MITOCHONDRIAL FUNCTION AND INDUCE CELL DEATH Biochemical and Biophysical Research Communications. 364 : 131–137 (2007)</p> <p>• C. Robin Hiley ENDOCANNABINOIDS AND THE HEART J. Cardiovasc. Pharmacol. 53(4) : 267–276 (2009)</p>

<p>Virus Influenza A (H5N1) : la stabilité dans le changement</p>	<p>• Watanabe Y. THE CHANGING NATURE OF AVIAN INFLUENZA A VIRUS (H5N1) Trends in Microbiology . Vol. 20, N° 1 : 11. (2012)</p> <p>• DuBois RM, Zaraket H, Reddivari M, Heath RJ, White SW, et al. ACID STABILITY OF THE HEMAGGLUTININ PROTEIN REGULATES H5N1 INFLUENZA VIRUS PATHOGENICITY. PLoS Pathog 7(12): e1002398. doi:10.1371/journal.ppat.1002398 (2011)</p>
<p>La synapse immunologique</p>	<p>• Dustin ML et Depoil D : NEW INSIGHTS INTO THE T CELL SYNAPSE FROM SINGLE MOLECULE TECHNIQUES. Nature Review Immunology. vol 11 : 673 (2011)</p> <p>• Sanderson NSR et al : CYTOTOXIC IMMUNOLOGICAL SYNAPSES DO NOT RESTRICT THE ACTION OF INTERFERON-γ TO ANTIGENIC TARGET CELLS. PNAS. vol. 109 n°. 20 7835–7840 (2012)</p>
<p>La production d'anticorps monoclonaux par génie génétique et son optimisation.</p>	<p>• Blaas et al. BACTERIAL ARTIFICIAL CHROMOSOMES IMPROVE RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION IN MAMMALIAN CELLS. BMC Biotechnology. 9 : 3 (2009)</p> <p>• Costa et al. GUIDELINES TO CELL ENGINEERING FOR MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 74 : 127-138. (2010)</p>
<p>Nouvel aspect du divisome bactérien</p>	<p>• Ling Juan Wu and Jeff Errington. NUCLEOID OCCLUSION AND BACTERIAL CELL DIVISION. Nature. Vol 10 : 8 (2011)</p> <p>• Durand-Heredia J, Rivkin E, Fan G, Morales J, Janakiraman A. IDENTIFICATION OF ZAPD AS A CELL DIVISION FACTOR THAT PROMOTES THE ASSEMBLY OF FTSZ IN ESCHERICHIA COLI. J. Bacteriol. 194(12) : 3189-98. (2012)</p>
<p>miARN des prédicteurs de réponse au tamoxifène</p>	<p>• Tyler E. Miller et al. MICRORNA-221/222 CONFERS TAMOXIFEN RESISTANCE IN BREAST CANCER BY TARGETING P27KIP1 THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. VOL.283, N°44, pp. 29897–29903 (2008)</p> <p>• Thalia A. Farazi et al. MIRNAS IN HUMAN CANCER J. Pathol. 223(2): 102–115 (2011)</p>
<p>La biologie de synthèse : des outils d'amélioration des souches de production.</p>	<p>• Zhu et al. ENGINEERING THE ROBUSTNESS OF INDUSTRIAL MICROBES THROUGH SYNTHETIC BIOLOGY. Trends in Microbiology 20, 94-101. (2012)</p> <p>• Shen et al. DRIVING FORCES ENABLES HIGH-TITER ANAEROBIC 1-BUTANOL SYNTHESIS IN ESCHERICHIA COLI. Applied and Environmental Microbiology. 77 : 2905-2915.(2011)</p>

<p>Inhibition directe du facteur de transcription Notch vers un nouveau concept thérapeutique</p>	<p>• Ling Yin et al. NOTCH SIGNALING: EMERGING MOLECULAR TARGETS FOR CANCER THERAPY Biochemical Pharmacology. 80 : 690–701 (2010)</p> <p>• Raymond E. Moellering et al. DIRECT INHIBITION OF THE NOTCH TRANSCRIPTION FACTOR COMPLEX Nature, Vol 462 : 182-188 (2009)</p>
<p>Rythmes circadiens et cancers</p>	<p>• Michael W. Greene. CIRCADIAN RHYTHMS AND TUMOR GROWTH Cancer Letters 318 : 115–123 (2012)</p> <p>• R. Ben-Shlomo et al. LIGHT PULSES ADMINISTERED DURING THE CIRCADIAN DARK PHASE ALTER EXPRESSION OF CELL CYCLE ASSOCIATED TRANSCRIPTS IN MOUSE BRAIN Cancer Genetics and Cytogenetics 197 : 65-70 (2010)</p>
<p>Un peu de stress fortifie les bactéries !</p>	<p>• Poole K. STRESS RESPONSES AS DETERMINANTS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA. Trends in Microbiology. 20 : 227-234. (2012)</p> <p>• Boehm et al. SECOND MESSENGER SIGNALLING GOVERNS <i>ESCHERICHIA COLI</i> BIOFILM INDUCTION UPON RIBOSOMAL STRESS. Molecular Microbiology. 72 : 1500-1516. (2009)</p>
<p>Les cellules dendritiques et la présentation antigénique croisée</p>	<p>• Robson NC et al. PRESENTATION OF TUMOUR ANTIGENS BY DENDRITIC CELLS AND CHALLENGES FACED. Current Opinion in Immunology. 22 : 137–144 (2010)</p> <p>• Ghosh M. et al CD13 REGULATES DENDRITIC CELL CROSS-PRESENTATION AND T CELL RESPONSES BY INHIBITING RECEPTOR-MEDIATED ANTIGEN UPTAKE. J. Immunol. 188 : 5489-5499 (2012)</p>
<p>Activation de récepteur membranaire intracellulaire couplé aux protéines G : conséquence et intérêt</p>	<p>• E. L. Los et al. POTENTIAL OF NONPEPTIDE (ANT)AGONISTS TO RESCUE VASOPRESSIN V2 RECEPTOR MUTANTS FOR THE TREATMENT OF X-LINKED NEPHROGENIC DIABETES INSIPIDUS Journal of Neuroendocrinology 22 : 393–399</p> <p>• Joris H. Robben et al. INTRACELLULAR ACTIVATION OF VASOPRESSIN V2 RECEPTOR MUTANTS IN NEPHROGENIC DIABETES INSIPIDUS BY NONPEPTIDE AGONISTS PNAS vol. 106 n° 29 : 12195–12200 (2009)</p>
<p>Génome du HIV : un dimère ou deux monomères ?</p>	<p>• Michael D. Moore and Wei-Shau Hu HIV-1 RNA DIMERIZATION: IT TAKES TWO TO TANGO. AIDS Rev. 11(2) : 91–102. (2009)</p> <p>• Anne L'Hernault A et al. HIV-2 GENOME DIMERIZATION IS REQUIRED FOR THE CORRECT PROCESSING OF GAG: A SECOND-SSTE REVERSION IN MATRIX CAN RESTORE BOTH PROCESSES IN DIMERIZATION-IMPAIRED MUTANT VIRUSES J. Virol. 86(10) : 5867 (2012)</p>

<p>Un rôle de l'insuline dans la thermorégulation</p>	<p>• Manuel Sanchez-Alavez INSULIN CAUSES HYPERTHERMIA BY DIRECT INHIBITION OF WARM-SENSITIVE NEURONS DIABETES, VOL. 59 : 43 (2010)</p> <p>• Kazuhiro Nakam CENTRAL CIRCUITRIES FOR BODY TEMPERATURE REGULATION AND FEVER Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 301 : R1207-R1228 (2011)</p>
<p>Trafic des récepteurs et plasticité synaptique</p>	<p>• Marco B Rust et al. LEARNING, AMPA RECEPTOR MOBILITY AND SYNAPTIC PLASTICITY DEPEND ON N-COFILIN-MEDIATED ACTIN DYNAMICS The EMBO Journal n°29 : 1889–1902 (2010)</p> <p>• Peter van der Sluijs et al. NEW INSIGHTS IN ENDOSOMAL DYNAMICS AND AMPA RECEPTOR TRAFFICKING Seminars in Cell & Developmental Biology n° 22 : 499–505 (2011)</p>
<p>Nanocompartiments protéiques et ciblage de médicament</p>	<p>• Swati Choudhary et al. ENGINEERED PROTEIN NANO-COMPARTMENTS FOR TARGETED ENZYME LOCALIZATION Plos One March 2012 Volume 7 Issue 3 e33342</p> <p>• Bigna Wo rso d rfer et al. DIRECTED EVOLUTION OF A PROTEIN CONTAINER Science 331, 589 (2011)</p>
<p>AMPcyclique et adénylate cyclase chez les bactéries</p>	<p>• McDonough KA, Rodriguez A. THE MYRIAD ROLES OF CYCLIC AMP IN MICROBIAL PATHOGENS: FROM SIGNAL TO SWORD. Nat. Rev. Microbiol. 10(1) : 27-38. doi:10.1038/nrmicro2688. (2011)</p> <p>• Gray MC, Hewlett EL. CELL CYCLE ARREST INDUCED BY THE BACTERIAL ADENYLATE CYCLASE TOXINS FROM BACILLUS ANTHRACIS AND BORDETELLA PERTUSSIS. • Cell. Microbiol. 13(1) : 123-34. (2011)</p>

RAPPORT

établi par : Xavier Bataille, Henri Jean Boulouis, Françoise Guillet, Marc Landry, Philippe Lejeune, Alain Morel.

Chaque dossier comporte deux documents : une revue présentant l'état des connaissances sur un sujet et un article de recherche détaillant des résultats expérimentaux sur une des dimensions du sujet.

Les deux documents : revue et article de recherche ne peuvent être lus de façon exhaustive mais il est indispensable que les candidats aient pris connaissance des contenus des deux documents du dossier. Cette approche d'abord globale sera ensuite affinée.

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 compensée par la maîtrise de la technique.

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 les objectifs de l'article et d'autre part, d'expliquer le lien entre revue et article et de dire en quoi le sujet traité est intéressant !

Le jury doit être en mesure d'apprécier la compréhension générale du sujet et la pertinence de l'apport de l'article à cette problématique.

La lecture, même rapide et superficielle, des articles proposés est essentielle. Les articles scientifiques développent une argumentation dans le but de présenter une hypothèse au lecteur. Par ailleurs, ces hypothèses, et les mécanismes qui en découlent, se veulent novateurs, et s'avèrent souvent très différents des descriptions proposés dans les ouvrages de référence. Les candidats doivent faire l'effort d'identifier le thème général de l'étude, l'hypothèse avancée par les auteurs, et les innovations conceptuelles ou méthodologiques qu'ils proposent. La rigueur du raisonnement, et la construction de l'argumentaire sont deux points essentiels des articles scientifiques. Ils rejoignent en cela le travail qui est demandé aux candidats dans cet exercice. Il est rappelé que la quasi-totalité des publications scientifiques sont en Anglais. Une maîtrise suffisante de cette langue est donc indispensable

Concernant les articles, le jury a constaté que trop de candidats méconnaissaient des méthodes et techniques cependant très largement utilisées en biotechnologies et en biologie comme les techniques utilisant la fluorescence et en particulier la technique du **FRET (Förster ou fluorescence Resonance Energy Transfer)**, la spectrométrie de masse, l'IRM, le western blot ...

Les candidats doivent être en mesure d'expliquer les principes des principales méthodes et de justifier le choix de ces méthodes dans une analyse ou une expérimentation.

Enfin l'épreuve s'appelant Etude Critique de Dossier, il est attendu que le candidat puisse faire preuve, le cas échéant, d'esprit critique devant les protocoles proposés ou les résultats obtenus.

Si le jury a apprécié l'attitude des candidats, cherchant à répondre aux questions du jury, suivant celui ci sur les pistes qu'il proposait, il tient à conseiller aux candidats de toujours adopter une attitude qui ne puisse paraître désinvolte même si celle-ci peut témoigner de l'engagement total du candidat dans l'échange avec le jury.

Dans ce même ordre d'idée, le jury rappelle que l'agrégation est un concours de recrutement et que la tenue vestimentaire des candidats doit être respectueuse de l'enjeu.

On ne se rend pas à un oral de concours vêtu sans plus d'attention que si l'on se rendait au cinéma : tennis parfois non lacés, jean déchiré, chemise dépassant inégalement, ...

Si, bien sur, le futur enseignant sera avant tout « jaugé » par ses élèves sur ses compétences pédagogiques, sa maîtrise des champs disciplinaires, le respect qu'il doit attendre de ses élèves passe aussi par l'image qu'il leur donne.

Rapport concernant les notions de chimie abordées en ECD

Comme nous pouvons le constater depuis quelques années, les connaissances en chimie des candidats à l'agrégation de BGB sont globalement convenables. La nomenclature chimique officielle (souvent différente de la nomenclature historique utilisée en biologie), les connaissances de base en électrochimie, en chimie structurale, en interactions intermoléculaires sont dans

l'ensemble connues. Quelques difficultés demeurent lors des passages demandés entre modes de représentation en biochimie (Haworth, Fischer) et en chimie organique (Cram, Lewis, VSEPR). Il reste néanmoins à soulever quelques aspects posant encore problèmes. Le futur enseignant se doit d'avoir une culture générale en chimie la plus large possible (ce qui sous entend qu'il n'est pas nécessaire qu'il en soit au niveau de l'expertise), les liens entre chimie et les autres disciplines biologiques étant étroits. Ainsi nous déplorons le plus souvent l'absence de culture générale sur les principes actifs « classiques » du domaine médical, ainsi que leur mode d'action à l'échelle moléculaire.

Un manque certain existe aussi dans la partie instrumentation – lors des ECD. Les biotechnologies utilisent de très nombreuses techniques expérimentales et appareils et s'il n'est pas demandé de connaître de façon pointue les bases « physiques » sur lesquelles ils reposent, il est néanmoins exigible de connaître, même de façon vulgarisée, leur fonctionnement. Un effort doit donc être porté sur la spectrométrie de masse (SM) – appliquée notamment au séquençage –. Cette année, nombre de candidats nous ont décrit la SM en phase gazeuse par impact électronique, technique non utilisée en biologie, alors que nous attendions la LC-MS ou les technologies Maldi. De même, les principes de base de la fluorescence – et ses applications, comme le FRET, ou ses extensions, comme la phosphorescence –, bien qu'étant une technique utilisée très couramment, ne sont pas connus, ou de façon beaucoup trop approximative. Nous mentionnerons également la tomographie, la microscopie électronique, ainsi que la sonication.

Seconde partie d'épreuve

Agir en fonctionnaire de l'état de façon éthique et responsable

Les sujets étaient tous construits sur un schéma identique : un extrait de texte réglementaire (arrêté, circulaire,...) une mise en situation et une question relative à la situation proposée. Il n'était pas obligatoirement attendu de réponse univoque ou dogmatique mais au minimum un questionnement prenant en compte le contexte, les acteurs de la situation, le caractère toujours délicat des situations rencontrées en lycée.

Les exposés et les réponses aux questions posées ont montré des candidats inégalement préparés à cette épreuve dont certains étaient gênés par leur manque de connaissance dans les domaines suivants :

- fonctionnement de l'établissement scolaire (en particulier, rôles du chef d'établissement, de la vie scolaire),
- la hiérarchie des textes réglementaires,
- le processus de décision dans les établissements (différence entre instance consultatives et instance décisionnelle).

Certains candidats ont montré une certaine méconnaissance des grands textes qui explicitent les orientations et la mise en œuvre des politiques éducatives.

Cependant les candidats ont, le plus souvent, été capables de réagir de façon réaliste et adaptée à la situation proposée et ont souvent montré une attitude responsable lorsque le jury élargissait à d'autres contextes, la question posée.

S'il est évident que de futurs enseignants ne peuvent maîtriser intégralement ces éléments, la connaissance globale du positionnement des acteurs dans le fonctionnement des EPLE au sein du système éducatif semble nécessaire à la prise en main de leur futur métier.

La lecture de revues ou de ressources spécialisées, la consultation de sites internet (www.education.gouv.fr, www.eduscol.fr) aideront les candidats à construire ce socle de connaissances qui comprend en particulier :

- les dix compétences des professeurs
- les récentes évolutions du système éducatif (réforme du lycée, socle commun de connaissances et de compétences ...).

Le jury recommande aux candidats de ne pas se contenter d'un exposé théorique mais de se projeter dans la situation et répondre avec honnêteté et engagement.

CONCLUSION GENERALE

Cette année, le profil des candidats au concours a retrouvé un aspect plus habituel que celui de l'année précédente : des candidats actuellement enseignants du secondaire et des enseignants du supérieur, des étudiants inscrits dans les différentes préparations à l'agrégation, des candidats ayant préparé le concours à l'ENS.

Pour les enseignants, sans possibilité encore cette année de concourir à l'agrégation interne, la préparation du concours externe est leur seule voie de promotion. Le jury les encourage à se présenter à ce concours pour lequel, avec une préparation sérieuse sur l'ensemble des champs disciplinaires, ils peuvent mettre en œuvre leurs compétences d'analyse, de synthèse et les compétences technologiques acquises lors de leurs pratiques professionnelles.

Si lors des épreuves d'admissibilité, on a pu constater comme les années précédentes, certains devoirs traduisant la non maîtrise des questions à traiter, par contre les prestations aux épreuves d'admission ont permis de sélectionner des candidats conjuguant à la fois un niveau de connaissances satisfaisant et une capacité à extraire des informations, les analyser avec rigueur, les restituer dans un souci de clarté pédagogique.

Le concours de l'agrégation ne peut s'envisager sans des connaissances spécifiques de haut niveau mais aussi sans qu'une culture générale de l'ensemble des domaines, biochimie, biologie et biotechnologies ne soit présente. Ces deux aspects sont particulièrement mobilisés lors des épreuves orales

L'adaptabilité des candidats est éprouvée lors des travaux pratiques qui chaque année placent les candidats devant des sujets innovants pour lesquels ils doivent faire preuve d'organisation, de discernement mais aussi de maîtrise des techniques.

Ce sont toutes ces qualités qui sont requises tout au long de la carrière d'un enseignant agrégé, lui permettant de toujours suivre l'évolution des connaissances scientifiques et technologiques.

Le jury a apprécié l'attitude des candidats et espère que les nouveaux agrégés sauront conserver l'esprit qui les a animés lors du concours.

Le jury remercie Monsieur le Proviseur du lycée Pierre- Gilles de Gennes ENCPB pour la qualité de l'accueil que lui-même et ses équipes ont réservé à ce concours, qui s'est déroulé dans d'excellentes conditions. Le jury remercie également l'ensemble des personnels en particulier des personnels de laboratoire qui ont, cette année encore assuré une préparation remarquable des épreuves pratiques.