



Secrétariat Général

Direction générale des
ressources humaines

MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE

Sous-direction du recrutement

Concours du second degré – Rapport de jury

Session 2013

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	11
Épreuves d'admission	
Épreuve pratique de biochimie – physiologie	13
Rapport sur l'épreuve de biochimie-physiologie	34
Épreuve pratique de microbiologie	39
Rapport sur l'épreuve de microbiologie	57
Épreuve pratique de chimie	64
Rapport sur l'épreuve de chimie	83
Épreuves orales	
Rapport sur les leçons	86
Rapport sur les études critiques de dossiers	100
 Conclusion générale	 102

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
Joelle BISSERY – Professeur Agrégé – Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS
Caroline BONNEFOY - IA IPR - Académie de VERSAILLES
Hélène CARRIE - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS
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
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-/YVETTE
Laurence DUPONT - Professeur Agrégé - Université de Versailles-Saint Quentin à VERSAILLES
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
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
Denis VIVARES – professeur agrégé – Lycée Ozenne TOULOUSE
Sophie WARIN - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Candidats inscrits	324
Candidats présents à l'épreuve d'admissibilité	97
Nombre de postes	20
Candidats admissibles	40
Candidats présents aux épreuves d'admission	40
Candidats proposés pour l'admission	20
Barre d'admissibilité	06.00
Barre d'admission	08.67

Epreuves d'admissibilité

Moyenne générale des candidats présents	05.73
Moyenne générale des candidats admissibles	09.17

Biochimie

Moyenne des candidats présents	05.31
Moyenne des candidats admissibles	08.81
Note maximale	19.00

Microbiologie

Moyenne des candidats présents	05.98
Moyenne des candidats admissibles	10.30
Note maximale	19.00

Biologie cellulaire et Physiologie

Moyenne des candidats présents	05.34
Moyenne des candidats admissibles	08.41
Note maximale	19.00

Partie 0 : ÉPREUVES D'ADMISSION

Moyenne générale des candidats présents 09.40

Moyenne générale des candidats admis 11.54

Travaux pratiques de biochimie-physiologie

Moyenne des candidats présents 10.07

Moyennes des candidats admis 12.10

Note maximale 18.30

Travaux pratiques de microbiologie

Moyenne des candidats présents 10.97

Moyennes des candidats admis 12.90

Note maximale 18.30

Travaux pratiques de chimie

Moyenne des candidats présents 08.78

Moyennes des candidats admis 10.35

Note maximale 17.00

Leçon

Moyenne des candidats présents 08.10

Moyennes des candidats admis 11.00

Note maximale 17.00

Epreuve critique de dossier

Moyenne des candidats présents 09.69

Moyennes des candidats admis 11.61

Note maximale 17.25

Ensemble du concours

Moyenne des candidats présents 09.30

Moyenne des candidats admis 11.15

Épreuves écrites d'admissibilité

BIOCHIMIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

SUJET

Echanges et circulation d'électrons dans les cellules animales : importances fonctionnelles

RAPPORT

Etabli par Alain MOREL, Benoît SCHNEIDER

Réflexions sur l'épreuve

Le sujet « Echanges et circulation d'électrons dans les cellules animales : importances fonctionnelles » est un sujet de biochimie et de biologie cellulaire classique, qu'il fallait aborder en faisant appel à des notions de chimie minérale et de thermochimie, les échanges et circulation d'électrons étant à la base de nombreuses réactions du métabolisme énergétique, mais également impliqués dans la structuration et activités des macromolécules biologiques. Il fallait faire preuve d'un esprit de synthèse notamment en biochimie 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 structure de l'atome pour décrire l'électron et dégager ses propriétés. La définition d'électron posée, cela permettait d'aborder les questions relatives au partage d'électrons pour l'établissement de la liaison chimique, à leurs échanges et leurs circulations entre espèces donneuses et receveuses dans les réactions du métabolisme énergétique ou au sein des molécules, les méthodes d'étude permettant d'observer les échanges d'électrons et les grandes fonctions biologiques associées à ces mouvements d'électrons. Toutefois, ces notions essentielles ne devaient pas donner lieu à un exposé exhaustif sur la nature particulière des atomes.

D'autant plus, qu'on ne peut que déplorer les connaissances très limitées de bon nombre de candidats quant à la structure de l'atome et la définition d'électron, notions pourtant enseignées depuis le lycée et véhiculées tout au long du premier cycle universitaire. Certains considérant qu'un électron peut être une entité tantôt chargée négativement, tantôt chargée positivement, voire neutre électriquement. De trop nombreux candidats confondent les définitions d'électron et d'ion.

Définir ce qu'est une espèce réductrice versus oxydante et la notion de réaction d'oxydoréduction a été fantaisiste dans bon nombre de devoirs. Il est à noter que beaucoup de candidats ne connaissent pas la notion de potentiel d'oxydoréduction (standard) ni les lois classiques de thermochimie qui permettent de prédire le sens de transfert des électrons entre deux couples d'oxydoréduction.

Trop peu de candidat ont aussi abordé les méthodes qui permettent d'observer les variations d'oxydoréduction à l'échelle d'une molécule : a minima, la spectrophotométrie d'absorption pour visualiser les modifications électroniques des nucléotides adényliques ou des groupements protoporphyriques appartenant aux différents cytochromes de la chaîne respiratoire mitochondriale devait être présentée.

Dans ce devoir, il fallait bien évidemment décrire les acteurs moléculaires qui participent aux échanges d'électrons dans les réactions d'oxydoréduction du métabolisme énergétique tels que les nucléotides adényliques (NAD/NADP, FAD), les cytochromes de la chaîne respiratoire ou les groupements fer/soufre, comme préambule à la présentation des réactions du métabolisme dans lesquelles ces molécules sont impliquées.

Pour bon nombre de candidats, les structures sont fantaisistes (noyau nicotinamide par exemple) et les sites de modification par échange d'électron, aléatoires. La présentation de ces structures permettait en outre de montrer que le transfert d'électron est le plus souvent accompagné d'un transfert de proton. Il fallait également indiquer que les échangeurs d'électrons de type NAD/NADP existent en quantité finie dans la cellule et qu'il est nécessaire d'assurer un recyclage de ces éléments pour assurer le fonctionnement permanent des voies cataboliques et anaboliques. Se posait aussi la question de savoir comment assurer l'oxydation du NADH, H^+ produit par la glycolyse au cours de la respiration cellulaire.

Les aspects métaboliques ont généralement été bien documentés par les candidats, notamment les réactions d'oxydoréduction de la glycolyse, de la β -oxydation, du cycle de Krebs et la réoxydation des coenzymes d'oxydoréduction par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. De façon beaucoup trop simpliste, les candidats ont évoqué la circulation des électrons jusqu'à l'oxygène au sein de la chaîne respiratoire sans évoquer le sens de transfert des électrons par rapport au potentiel d'oxydoréduction, les problèmes de stœchiométrie dans le transfert des électrons entre les différents complexes de la chaîne respiratoire (cycle de l'ubiquinone) ou stockage temporaire des électrons dans la cytochrome oxydase avant transfert sur l'oxygène. Le couplage circulation d'électron/transfert de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire en vue de l'établissement de la force protomotrice et de la synthèse d'ATP a été bien traité par la majorité des candidats. En revanche, le mécanisme moléculaire de l'ATP synthase a dans la plupart des copies été inexistant. De même, les réactions anaboliques ont été décrites par rapport à l'utilisation du NADPH, H^+ comme pouvoir réducteur pour la synthèse de matière organique (exemple de la synthèse des acides gras).

Le jury regrette que peu de candidats aient abordé le rôle de la circulation des électrons dans la structuration des macromolécules biologiques comme les échanges d'électrons entre les plateaux de base de l'ADN ce qui permet de stabiliser la molécule (force de « stacking » entre noyaux aromatiques). De même, l'importance fonctionnelle des échanges d'électrons dans les événements de signalisation cellulaire ou de défense de l'organisme a été trop souvent négligée par les candidats. Le transfert des électrons sur l'oxygène par différents systèmes enzymatiques permet de générer des dérivés réactifs de l'oxygène ou radicaux libres impliqués dans l'activation de cibles (tels que des facteurs de transcription) ou dans la lutte microbienne (macrophage et phagosome). Des connaissances sur le contrôle du stress oxydatif et de son importance dans la balance survie / mort cellulaire aurait été appréciées.

Pour l'ensemble des copies, les conclusions sont un pâle résumé de l'exposé. Quelques candidats ont élargi le sujet au monde végétal ou microbien en abordant respectivement la

circulation et les échanges d'électrons dans les membranes des thylakoïdes au cours de la photosynthèse ou dans la membrane plasmique des procaryotes. L'analyse comparative du transfert des électrons dans les thylakoïdes végétaux avec le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (notamment le sens de transfert des électrons par rapport aux potentiels d'oxydoréduction standard) était une ouverture intéressante pour illustrer les échanges d'énergie. D'autres candidats ont choisi d'évoquer les aspects pathologiques associés à des échanges anormaux d'électrons avec l'oxygène menant à la production toxique de dérivés réactifs de l'oxygène, ce qui a été apprécié par le jury.

Enfin, il faut souligner que la plupart des copies sont présentées convenablement et sont rédigées en langage très correct. Dans les meilleurs devoirs, les exemples choisis sont traités avec une maîtrise remarquable et les illustrations sont soignées, correctement légendées et accompagnées d'une explication appropriée. En conclusion, il semble que dans de nombreux cas les bases élémentaires de biochimie ne sont pas acquises ce qui nuit à la construction d'un devoir de qualité, que l'on est en droit d'attendre dans le cadre du concours de l'agrégation.

MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

SUJET

Le déplacement actif des bactéries : moyens, tropismes, conséquences et applications

RAPPORT

Etabli par Henri-Jean BOULOUIS, Philippe LEJEUNE

Le sujet proposé était limité aux déplacements bactériens nécessitant de l'énergie. Même si aucun plan n'a été privilégié, le sujet suggérait un plan que la plupart des candidats ont suivi en l'adaptant à leurs connaissances.

L'introduction devait être l'occasion de préciser le sujet tout en soulignant ses limites et d'annoncer le plan. Le sujet était suffisamment consistant pour ne pas se perdre dans de longues généralités sur le monde microbien ou la définition d'une bactérie et de leurs éléments constants et inconstants.

Si tous les candidats ont traité du flagelle, les autres moyens de déplacement tels que gliding, twitching, polymérisation des molécules d'actine ou déplacement des spirochètes ont été plus rarement retrouvés dans les copies.

Les correcteurs auraient aimé retrouver plus souvent des méthodes de mise en évidence des flagelles (coloration, microscopie électronique) ou de la mobilité. Les différents types de ciliature n'ont en revanche pas fait défaut...

Si l'on excepte les candidats qui ont confondu flagelle bactérien et flagelle eucaryote, la structure flagellaire a été relativement bien traitée. La notion de stator/rotor était bien présente dans les copies mais les illustrations de cette structure ont été très variables et parfois fantaisistes. Ce qui explique sans doute que pour ceux des candidats qui ont estimé devoir traiter de la rotation du flagelle -et ils ont eu raison- l'explication du mécanisme lui-même a été parfois hasardeux et que le nombre de molécule d'ATP impliqué dans une rotation a pu varier fortement d'une copie à l'autre.

Les rares copies qui ont traité des autres moyens de déplacement cités plus haut les ont développés de façon satisfaisante.

La deuxième partie du sujet, les tropismes, devait au moins en introduction faire état des tropismes positifs comme des tropismes négatifs, ces derniers étant souvent oubliés par les candidats de même que la nature des signaux : des molécules chimiques, bien sur, mais aussi la lumière

Le mécanisme moléculaire du tropisme devait être l'occasion de traiter la chaîne du signal, du gradient de la molécule trophique aux mécanismes expliquant le mouvement du flagelle, rotation horaire ou anti horaire. Finalement peu de candidats ont montré une connaissance correcte du système Che, de ses différents acteurs et de leur rôle dans le contrôle du chimiotactisme bactérien.

Enfin, le déplacement de bactéries en groupe fait intervenir le quorum sensing...

Evidemment la recherche de nutriment a été la principale des conséquences citées, bien que les particularités liées aux bactéries envahissantes soient moins bien connues (*Caulobacter*, *Proteus*,...) Il était aussi possible de développer le pouvoir invasif des bactéries pathogènes : le flagelle comme facteur de pouvoir pathogène, (exemple pour *Helicobacter*), la mobilité intracellulaire pour échapper au système immunitaire (*Listeria*, *Shigella*). Une conclusion de cette partie pouvait être la perte de flagelle lors de l'établissement de biofilm pour certain genres bactériens.

Les applications concernaient en premier lieu l'identification bactérienne (mise en évidence, sérotypage – Salmonella- inversion de phase,...). Accessoirement, le flagelle comme cible de fixation de bactériophage pouvait être cité ainsi que le déplacement bactérien comme modèle de chimiotactisme.

En conclusion, ce sujet relativement simple devait permettre aux candidats de faire état de leurs connaissances dans différents compartiments de la bactériologie, aussi bien en anatomie fonctionnelle qu'en physiologie bactérienne. Il a donc révélé les lacunes de bon nombre de candidats dans l'un et/ou l'autre des ces deux domaines. De nombreux hors sujets ont emporté des candidats vers la dégradation et la diffusion dans les tissus (capsule, enzymes,...), l'opéron lactose ou même des généralités sur les bactéries, la réponse immunitaire et le déplacement de molécule à l'intérieure des bactéries. Et finalement, peu d'exemples précis ont été retrouvés dans les copies. L'écart observé dans la notation traduit la grande variété de qualité des copies.

BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

SUJET

. Rôles des canaux ioniques dans les communications (les canaux voltage-dépendants ne seront pas traités)"

RAPPORT

Etabli par Marc LANDRY, Nicolas MEUNIER

Le sujet portait sur les canaux ioniques et leurs implications dans les communications. Une présentation des canaux ioniques était attendue et trop peu de candidat connaissent cette classe de transporteur.

Il y a eu beaucoup de confusion entre échangeurs ioniques, transports actifs primaires et les canaux ioniques qui sont des transporteurs facilités. Les forces mises en jeu lors de ces transports sont également très mal connues, le gradient électrique étant souvent mal traité si ce n'est pas traité du tout ! L'importance du potentiel de membrane étant très importante ici, il était attendu d'en donner les bases puisque reliées à des canaux ioniques particuliers. Il est étonnant de trouver à ce niveau autant de candidats qui estiment que le potentiel de membrane dépend directement de l'asymétrie du transport de K^+ et Na^+ par la pompe Na/K ATPase qui n'est responsable que des gradients de concentration ionique. Ces mêmes candidats considèrent également que cette pompe est directement responsable de la repolarisation membranaire suivant toutes modifications de ce dernier par rapport à sa valeur de repos; ignorant par la même le rôle des canaux ioniques de fuites.

Il fallait ensuite relier ces canaux à leurs rôles dans la communication. Là encore, une définition précise des communications permettait de faire un plan équilibré. Ces communications sont bien trop souvent limitées au milieu intérieur et à l'homéostasie, ignorant toutes les communications avec l'extérieur. Cette restriction se retrouve dans l'introduction de nombreux devoirs traitant en large la définition de l'homéostasie et des communications intercellulaires...pour ensuite traiter en développement les canaux ioniques couplés au GMPc impliqués dans la vision !

Il semble nécessaire de rappeler que l'homéostasie n'est pas le centre de toutes fonctions en physiologie et n'est donc pas à placer dans toutes les introductions de cette épreuve. Là encore ce manque de réflexion pénalise des étudiants qui peuvent avoir des lacunes dans des connaissances précises du sujet et se perdent de surcroît dans des aspects trop généraux. Ainsi, malgré l'intitulé, certains candidats ont traité les canaux ioniques voltage dépendant du potentiel d'action alors qu'un équilibre entre physiologie sensorielle, communications synaptiques (chimique et électrique) et effecteurs de cascade de transduction pour la sécrétion et l'effet de nombreux messagers intercellulaires suffisait à donner une vue d'ensemble du sujet. Les régulations de ces canaux, l'impact de leur dysfonctionnement et leur utilisation autant comme cible thérapeutique que comme outil de

recherche étaient également attendus dans le sujet. Les techniques d'études sont malheureusement très mal connues.

Cette année, les conclusions étaient plus nombreuses mais celles-ci n'ouvrent quasiment jamais le sujet, un résumé du devoir n'apportant rien à ce dernier.

Le jury souhaite insister sur le nombre croissant de hors sujets. Par exemple, si la structure des canaux ioniques entrainait tout à fait dans le sujet, le type de sous unités composant le canal ionique pouvant modifier ses propriétés (ouverture / sélectivité...), la structure générale d'une protéine était totalement hors sujet. Certains ont même détaillé la structure de la membrane plasmique ! Ce type de hors sujet pénalise le devoir par rapport à un devoir qui peut être limité en connaissance mais concis et réfléchi. La qualité du devoir est jugée dans son ensemble et pas seulement au niveau des connaissances apportées ; un devoir concis, s'il est suffisamment documenté, rigoureux dans sa présentation et son argumentation, est apprécié.

ÉPREUVES D'ADMISSION

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE ET OU DE PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

SUJET:

Étude d'un polymère biocompatible

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

INTRODUCTION

Les polymères naturels sont au centre de multiples applications, notamment alimentaires et pharmaceutiques, en raison de leur biocompatibilité, de leur biodégradabilité et de leur coût peu élevé. L'acide alginique ou alginate, polysaccharide extrait d'algues brunes, fait par exemple l'objet de recherches en pharmacie galénique. Un principe actif inclus dans des billes d'alginate peut, suivant sa taille, diffuser ou être libéré après désagrégation du polymère. L'enjeu pour le galéniste est donc de vérifier que l'alginate est un polymère pertinent pour stabiliser le principe actif dans certaines conditions et permettre sa libération dans l'organisme au plus près de son site d'action.

Afin d'explorer les différentes applications possibles de l'inclusion en alginate, deux principes actifs de taille différente, administrés par voie orale, seront testés :

- la riboflavine, vitamine hydrosoluble nécessaire à la synthèse des coenzymes flaviniques. Sa couleur jaune en fait un modèle de choix pour suivre sa diffusion au travers des billes d'alginate.
- la trypsine, protéase digestive déversée dans le duodénum via le canal pancréatique. Elle est administrée comme traitement des insuffisances pancréatiques.

Ces deux médicaments candidats administrés par voie orale suivent le chemin du bol alimentaire. Lors de la digestion, le pH de l'estomac varie de 1,2 à 5, puis le bol alimentaire passe dans le duodénum dont le pH est proche de 7. La stabilité des billes d'alginate contenant la riboflavine ou la trypsine sera testée après incubation à trois pH différents (2, 5 et 7,4) afin de mimer ces conditions physiologiques.

La première partie du sujet vise à étudier les conditions de diffusion de la riboflavine incluse dans des billes d'alginate aux différents pH. La seconde étudie dans un premier temps les conditions optimales de mesure de l'activité de la trypsine et dans un deuxième temps la stabilité et la libération de l'enzyme incluse en alginate lorsqu'elle est soumise successivement aux différents pH.

AVERTISSEMENT

Les **annexes 1** et **2** présentent les données de sécurité relatives aux produits chimiques utilisés.

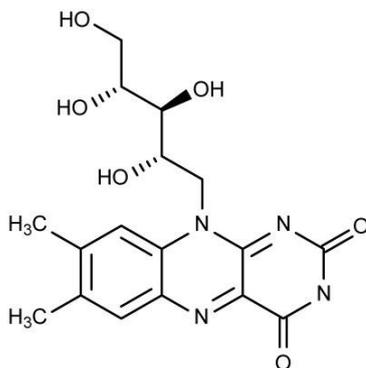
Q1. Procéder à l'évaluation des risques et indiquer le(s) produit(s) dangereux et les moyens de prévention adaptés.

PARTIE 1 : ÉTUDE DE LA DIFFUSION DE LA RIBOFLAVINE INCLUSE DANS DES BILLES D'ALGINATE

La manipulation comporte deux parties :

1. la préparation des billes d'alginate contenant la riboflavine ;
2. l'étude de la diffusion de la riboflavine incluse dans les billes incubées à différents pH.

La riboflavine est une molécule hydrosoluble. Sa structure est donnée ci-dessous.



Structure chimique de la **riboflavine**

Cette molécule est intéressante comme modèle d'étude de la diffusion car elle est colorée en jaune et peut être détectée par mesure d'absorbance dans le visible et dans l'ultraviolet. Pour une meilleure sensibilité, la longueur d'onde d'étude retenue est de 267 nm.

La riboflavine se dégrade rapidement à la lumière. Il faut donc la protéger lors des manipulations. Elle est en revanche stable à l'obscurité pendant au moins 1 h 30.

I- Préparation des billes contenant de la riboflavine

Réactifs et matériels

- Voir **annexe 3** ;
- Alginate + riboflavine : alginate de sodium à 2 % (*m/V*), riboflavine à 0,06 % (*m/V*) en tampon Tris-HCl à 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,4 ;
- Papier d'aluminium.

Mode opératoire

- Préparer des billes à partir de 4 mL du mélange « alginate + riboflavine » en suivant le protocole de l'**annexe 3**.
- Utiliser du papier d'aluminium pour protéger de la lumière les récipients contenant les billes.
- Noter le nombre de billes obtenues.
- Éliminer les billes non sphériques et les billes de taille différente.
- Présenter les billes obtenues à un examinateur.

II- Test de stabilité des billes à différents pH

L'objectif est de mesurer l'effet du pH sur la diffusion de la riboflavine incluse dans des billes d'alginate. Les billes sont incubées dans des solutions de pH différents et la diffusion est suivie pendant une heure.

Réactifs et matériels

- Solution à pH 2 : HCl 0,1 mol.L⁻¹ ;
- Solution à pH 5 : tampon acétate de sodium 0,1 mol.L⁻¹ ;
- Solution à pH 7,4 : tampon phosphate de potassium 0,05 mol.L⁻¹ ;
- Tubes coniques de 50 mL ;
- Flotteurs pour tubes coniques de 50 mL ;
- Éprouvette de 50 mL ou 100 mL ;
- Pince plastique ;
- Bain thermostatique réglé à 37 °C ;
- Vortex[®] ;
- Papier d'aluminium ;
- Microcuves UV.

Mode opératoire

Trois solutions de pH différents sont testées: pH 2, pH 5 et pH 7,4. Pour chacune des solutions, suivre le protocole suivant :

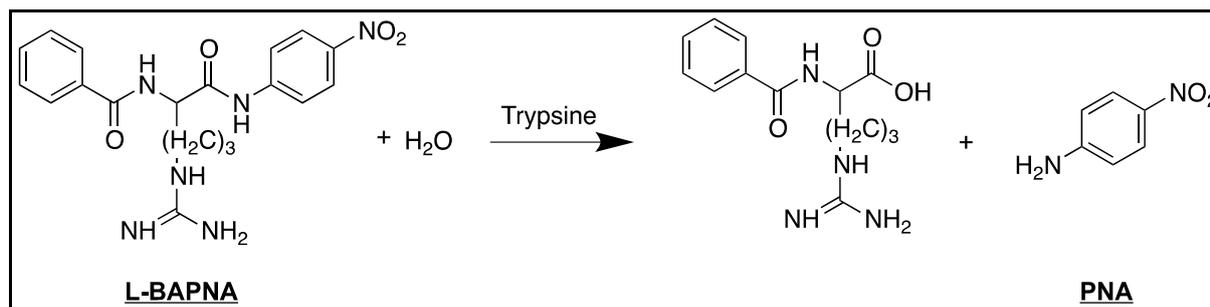
- Prélever 20 billes à l'aide de la pince plastique et les mettre dans un tube conique de 50 mL.
- Ajouter 40 mL de solution de pH défini.
- Entourer le tube de papier d'aluminium.
- Placer le tube à 37 °C.
- Agiter brièvement toutes les 5 minutes au Vortex[®].
- Prélever 0,5 mL de milieu d'incubation toutes les 10 minutes pendant 60 minutes et le transférer dans une microcuve.
- Lire les absorbances à 267 nm contre un témoin adapté.

III- Exploitation des résultats

- Q2.** Noter l'aspect des billes au bout de 60 minutes d'incubation pour chaque pH testé.
- Q3.** Corriger les absorbances mesurées pour tenir compte du prélèvement.
- Q4.** À l'aide de l'outil informatique, présenter les résultats dans un tableau et tracer la courbe $A_{267\text{nm}}^{\text{corrigée}} = f(t_{\text{incubation}})$ pour chaque pH testé.
- Q5.** Analyser et interpréter l'ensemble des résultats obtenus.

PARTIE 2 : ÉTUDE DE LA STABILITE ET DE LA LIBERATION DE LA TRYPSINE INCLUSE DANS DES BILLES D'ALGINATE

L'objectif est de mesurer l'effet du pH sur la libération des molécules de trypsine incluses dans des billes d'alginate. La trypsine catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques en C-terminal de la lysine ou de l'arginine. Son efficacité est maximale entre pH 7,5 et 8,5. Sa libération dans les milieux d'incubation des billes est détectée par mesure de l'activité de l'enzyme sur un substrat synthétique, la N-benzoyl-arginine-para-nitroanilide (L-BAPNA). La liaison amide est hydrolysée pour donner un produit de couleur jaune, la para-nitroaniline (PNA) :



La L-BAPNA est préparée dans un mélange de tampon aqueux et de diméthylsulfoxyde (DMSO, solvant organique polaire) car elle est insoluble dans les solvants purement aqueux.

La manipulation comporte deux sous-parties :

3. études préliminaires : validation des conditions de mesure de l'activité et détermination des paramètres cinétiques de la trypsine ;
4. étude de la stabilité et de la libération de la trypsine incluse dans l'alginate à différents pH.

I- Études préliminaires

I.1 Validation des conditions de mesure de l'activité trypsine

L'activité de la trypsine est mesurée par la méthode en deux points. Le protocole de référence est présenté dans l'**annexe 4**.

On se propose de valider deux paramètres préconisés dans ce protocole :

5. la longueur d'onde utilisée pour les mesures d'activité ;
6. la concentration en DMSO dans le milieu réactionnel.

Le coefficient d'absorption molaire de la PNA dans les conditions de l'expérience est également déterminé.

I.1.1) Choix de la longueur d'onde de détection de la PNA

Les spectres d'absorption de la L-BAPNA à deux concentrations différentes (0,15 et 7,5 mmol.L⁻¹) et de la PNA à 0,15 mmol.L⁻¹ sont fournis dans l'**annexe 6**.

- Q6.** Indiquer la composition de la solution à préparer pour réaliser le spectre d'absorption de la PNA dans le contexte de l'étude.
- Q7.** D'après les informations fournies dans les **annexes 4 et 6**, justifier le choix de la longueur d'onde retenue pour mesurer l'activité de la trypsine.

1.1.2) Détermination du coefficient d'absorption molaire de la PNA en présence de DMSO

Le calcul de la concentration d'activité catalytique en $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ nécessite de déterminer le coefficient d'absorption molaire du produit détecté dans les conditions de mesure.

Réactifs et matériels

- PNA à $0,15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ en Tris-HCl pH 7,4 / DMSO 75/25 (V/V) ;
- Diluant Tris-DMSO : tampon Tris-HCl pH 7,4 / DMSO 75/25 (V/V) ;
- Acide acétique à 30 % (V/V) ;
- Semi-microcuvettes visibles.

Mode opératoire

- Préparer une gamme de 5 solutions de PNA de $0,03$ à $0,15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans le mélange Tris-HCl pH 7,4 / DMSO 75/25 (V/V) sous un volume de 1 mL.
- Ajouter dans chaque cuve 100 μL d'acide acétique à 30 %.
- Lire l'absorbance des solutions à 410 nm contre un témoin adapté.

Exploitation des résultats

- Q8.** Donner le tableau de gamme et les résultats obtenus.
- Q9.** Déterminer le coefficient d'absorption molaire de la PNA dans les conditions testées.

1.1.3) Mesure de l'influence de la concentration en DMSO sur l'activité de la trypsine

La présence de DMSO dans le milieu réactionnel est indispensable pour solubiliser la L-BAPNA mais à trop forte concentration ce solvant inhibe la trypsine.

Afin de déterminer la concentration optimale de DMSO dans le milieu réactionnel, l'activité de la trypsine est mesurée en présence de concentrations décroissantes en DMSO. Le mode opératoire et les résultats sont fournis dans l'**annexe 7**. La concentration finale de L-BAPNA testée est celle utilisée pour les mesures d'activité : $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Il a été vérifié que le DMSO ne modifie pas l'absorbance à 410 nm de la PNA.

Exploitation des résultats

- Q10.** Déterminer la concentration finale optimale en DMSO à utiliser pour la mesure de l'activité de l'enzyme dans les conditions opératoires envisagées.
- Q11.** Proposer une hypothèse pour expliquer l'inhibition de la trypsine par le DMSO.

1.2 Détermination des paramètres cinétiques de la trypsine

La constante de Michaelis (K_M) et la vitesse initiale maximale ($v_{i \text{ max}}$) relatives à l'hydrolyse de la L-BAPNA catalysée par la trypsine sont déterminées selon le protocole de référence présenté en **annexe 4** en faisant varier la concentration de substrat dans le milieu réactionnel. La détermination du K_M permet de vérifier que la concentration en substrat retenue dans ce protocole de référence est optimale.

Réactifs et matériels

- voir **annexe 4** ;
- voir **annexe 5** ;
- Diluant Tris-DMSO : tampon Tris-HCl pH 7,4 + DMSO 75 / 25 (V/V) ;
- Trypsine à 2 g.L⁻¹ en tampon Tris-HCl pH 7,4.

Mode opératoire

- Préparer extemporanément la L-BAPNA à 7,5 mmol.L⁻¹ en suivant les instructions de l'**annexe 5**.
- Préparer sous un volume de 1 mL, en microtubes, deux gammes identiques de 8 tubes de concentrations croissantes en L-BAPNA. Le diluant Tris-DMSO utilisé permet de maintenir le même pourcentage de DMSO dans chaque dilution. Les concentrations retenues sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Microtubes	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration de L-BAPNA (mmol.L ⁻¹)	0,225	0,450	0,750	1,050	1,200	1,875	4,500	7,500

- Pour chaque microtube, suivre le protocole donné en **annexe 4**, en déclenchant la réaction par ajout de 20 µL de trypsine pour la première gamme et en remplaçant les 20 µL de trypsine par 20 µL de tampon, pour la seconde gamme.
- Lire l'absorbance à 410 nm contre un témoin contenant 1 mL de diluant.

Exploitation des résultats

- Q12.** Présenter le tableau du protocole expérimental complet pour la première gamme.
- Q13.** Utiliser les informations de l'**annexe 8** et l'outil informatique pour déterminer le K_M en mmole par litre de milieu réactionnel et la $v_{i\ max}$ en mmol.min⁻¹.L⁻¹ de milieu réactionnel.
- Q14.** Sachant qu'il faut au moins 30 % (V/V) de DMSO pour solubiliser 10 mmol.L⁻¹ de L-BAPNA et 25 % de DMSO pour une solution à 7,5 mmol.L⁻¹, justifier le choix de la concentration optimale de substrat retenue pour les mesures de l'activité trypsine.

II- Étude de la libération de trypsine dans des conditions mimant le trajet du médicament candidat dans l'organisme

Des billes d'alginate incluant de la trypsine commerciale sont préparées en présence d'un colorant alimentaire bleu pour faciliter leur visualisation. Des tests préalables ont établi que le colorant n'inhibe pas la trypsine à la concentration utilisée et qu'il n'absorbe pas à la longueur d'onde de mesure.

Les billes sont ensuite incubées à 37 °C et à différents pH pour mimer *in vitro* le transit digestif du médicament candidat. La libération de la trypsine est évaluée par mesure de l'activité enzymatique du milieu d'incubation des billes.

II.1 Préparation des billes d'alginate contenant la trypsine (« billes trypsine-alginate »)

Réactifs et matériels

- Voir **annexe 3** ;
- Alginate de sodium à 2 % (m/V) en tampon Tris-HCl à 0,05 mol.L⁻¹ à pH 7,4 ;
- Solution de trypsine à 200 g.L⁻¹ supplémentée avec du colorant alimentaire bleu à 5 % (V/V) ;
- mini-spatule en plastique ;
- tube à hémolyse de 5 mL.

Mode opératoire

Préparation du mélange trypsine-alginate

- Transférer 2,0 mL de solution d'alginate dans un tube à hémolyse.
- Ajouter 0,1 mL de la solution de trypsine.
- Mélanger délicatement l'alginate et la trypsine à l'aide d'une mini-spatule en plastique jusqu'à homogénéisation complète du colorant. Veiller à limiter au maximum la formation de bulles.

Préparation des billes trypsine-alginate

- Procéder à la préparation des billes trypsine-alginate en suivant le protocole de l'**annexe 3**.
- Noter le nombre de billes obtenues.
- Éliminer les billes non sphériques et les billes de taille différente.
- Présenter les billes obtenues à un examinateur.

II.2 Incubation des billes trypsine-alginate à différents pH

Les billes trypsine-alginate sont soumises successivement à différents pH. Afin de voir si la libération de la trypsine est optimale au niveau du duodénum (pH 7,4) et s'il y a une influence du moment de la prise du médicament, on compare deux séries de traitements :

7. un lot de billes est incubé successivement à pH 2, à pH 5 et à pH 7,4 afin de mimer les conditions d'une prise du médicament peu de temps avant le repas ;
8. un autre lot est incubé à pH 5 puis à pH 7,4 afin de mimer une prise en cours de repas.

Par commodité, les temps de traitement à chaque pH sont ramenés à 30 minutes. Il conviendrait de renouveler l'expérience avec des temps de traitement équivalents aux temps physiologiques de traversée du tube digestif supérieur.

Entre chaque traitement, le surnageant est prélevé puis les billes sont lavées avec la solution d'incubation suivante.

La stabilité de la trypsine à 37 °C durant le temps de la manipulation est vérifiée grâce aux témoins 1 h et 1 h 30.

Réactifs et matériels

- Solution à pH 2 : HCl 0,1 mol.L⁻¹ ;
- Solution à pH 5 : tampon acétate de sodium 0,1 mol.L⁻¹ ;
- Solution à pH 7,4 : tampon phosphate de potassium 0,05 mol.L⁻¹ ;
- Microtubes ;
- Pince plastique ;
- Bain thermostatique à 37 °C.

Mode opératoire

- Traiter 4 lots de billes en microtubes selon le protocole suivant :

Microtubes	Témoin 1 h	Témoin 1 h 30	3	4
Description du traitement	pH 7,4 → 1 h	pH 7,4 → 1 h 30	pH 5,0 → 30 min pH 7,4 → 30 min	pH 2,0 → 30 min pH 5,0 → 30 min pH 7,4 → 30 min
Nombre de billes trypsine-alginate	5	5	5	5
Volume de solution d'incubation	500 µL de pH 7,4	500 µL de pH 7,4	500 µL de pH 5,0	500 µL de pH 2,0
Incuber à 37 °C pendant	1 h	1 h 30	0 h 30	0 h 30

Homogénéiser régulièrement par agitation manuelle

Prélever 200 µL de chaque surnageant et le conserver dans la glace

Pour les tubes 3 et 4 :

- Éliminer le surnageant résiduel.
- Laver les billes avec respectivement 1 mL de tampon pH 7,4 et 1 mL de tampon pH 5.
- Éliminer les solutions de lavage.
- Rajouter dans chaque tube 500 µL du tampon utilisé pour le lavage.
- Incuber à 37 °C pendant 30 minutes.
- Homogénéiser régulièrement.
- Prélever 200 µL de chaque surnageant et le conserver dans la glace.

Pour le tube 4 :

- Éliminer le surnageant résiduel.
- Laver les billes avec 1 mL de tampon pH 7,4.
- Éliminer la solution de lavage.
- Rajouter 500 µL du même tampon.
- Incuber à 37 °C pendant 30 minutes.
- Homogénéiser régulièrement.
- Prélever 200 µL de surnageant et le conserver dans la glace.

II.3 Mesure de l'activité enzymatique des surnageants

L'activité enzymatique de chaque surnageant est testée par la méthode en deux points dans les conditions décrites dans l'**annexe 4**.

Réactifs et matériels

- Voir **annexe 4** ;
- Voir **annexe 5**.

Mode opératoire

- Préparer extemporanément la L-BAPNA à $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ en suivant les instructions de l'**annexe 5**.
- Mesurer l'activité enzymatique de chaque surnageant en suivant les instructions de l'**annexe 4**. Le déclenchement de la réaction dans un tube est réalisé par ajout de $20 \mu\text{L}$ de surnageant d'incubation.

Exploitation des résultats

- Q15.** Proposer des tests permettant de vérifier l'absence d'interférence entre le colorant et les mesures effectuées.
- Q16.** Présenter les résultats dans un tableau.
- Q17.** Calculer la concentration d'activité catalytique (en U.mL^{-1}) de chaque surnageant.
- Q18.** Interpréter l'ensemble des résultats obtenus.

Donnée : une unité U de trypsine catalyse l'hydrolyse de 1 micromole de L-BAPNA par minute dans les conditions du protocole de référence.

SYNTHESE

- Q19.** En tenant compte de l'ensemble des résultats, discuter des potentialités d'utilisation de l'alginate comme excipient de médicaments administrés par voie orale.

Références:

Stops F. et al. (2008). Floating dosage forms to prolong gastro-retention —The characterisation of calcium alginate beads. *International Journal of Pharmaceutics*, **350** pp. 301-311.

Correia L. C. et al. (2001). The Effect of Organic Solvents and Other W Parameters on Trypsin-Catalyzed Hydrolysis of N-Benzoyl-arginine-p-nitroanilide. *Journal of Chemical Education*, **Vol. 78** **No. 11** pp. 1535-1537.

Patil P et al. (2012) A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelispheres. *Int J Pharm Pharm Sci*, **Vol 4, Suppl 4**, pp. 27-32.

ANNEXE 1 : DONNEES DE SECURITE SUR LES REACTIFS UTILISES

- **Données de sécurité pour l'acide chlorhydrique 0,1 mol.L⁻¹ (solution tampon à pH 2)**

L'acide chlorhydrique à 0,1 mol.L⁻¹ n'est pas considéré comme dangereux.

- **Données de sécurité pour le DMSO**

Le produit pur n'est pas considéré comme dangereux.

- **Données de sécurité pour la L-BAPNA**

Le produit pur n'est pas considéré comme dangereux.

- **Données de sécurité pour la PNA (sous forme de substance pure)**

(Extrait de la FDS Sigma dernière révision 26.11.11)

Donnée : $M_{\text{PNA}} = 138,12 \text{ g.mol}^{-1}$

2. IDENTIFICATION DES DANGERS	
2.1 Classification de la substance ou du mélange	
Classification en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]	
Toxicité chronique pour le milieu aquatique (Catégorie 3)	
Toxicité aiguë, Inhalation (Catégorie 3)	
Toxicité aiguë, Dermale (Catégorie 3)	
Toxicité aiguë, Oral(e) (Catégorie 3)	
Toxicité spécifique pour certains organes cibles - exposition répétée (Catégorie 2)	
2.2 Contenu d'étiquette	
Étiquetage en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]	
Pictogramme	
Mention d'avertissement	Danger
Mention de danger	
H301	Toxique en cas d'ingestion.
H311	Toxique par contact cutané.
H331	Toxique par inhalation.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
H412	Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
Conseils de prudence	
P261	Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz/ brouillards/ vapeurs/ aérosols.
P273	Éviter le rejet dans l'environnement.
P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection.
P301 + P310	EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P311	Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

• **Données de sécurité pour l'acide acétique à 30 % (V/V)**

(Extrait de la FDS Merck dernière révision 13.11.12)

2.2 Éléments d'étiquetage

Etiquetage réduit (≤125 ml)

Pictogrammes de danger



Mention d'avertissement
Danger

Mentions de danger
H314 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.

Conseils de prudence
P280 Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.
P301 + P330 + P331 EN CAS D'INGESTION: rincer la bouche. NE PAS faire vomir.
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.
P309 + P310 EN CAS d'exposition ou d'un malaise: Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Remarque : compte tenu du matériel utilisé pour prélever l'acide acétique (pipette automatique), le contact cutané est peu probable, donc le port de gants n'est pas obligatoire.

• **Données de sécurité pour la trypsine à 10 g.L⁻¹**

Le produit pur n'est pas considéré comme dangereux.

• **Données de sécurité pour la trypsine à 200 g.L⁻¹**

(Extrait de la FDS Sigma dernière révision 08.05.12)

Étiquetage réduit (500 µL)

2. IDENTIFICATION DES DANGERS

2.1 Classification de la substance ou du mélange

Classification en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]
Irritation oculaire (Catégorie 2)
Irritation cutanée (Catégorie 2)

2.2 Contenu d'étiquette

Etiquetage en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]

Pictogramme



Mention d'avertissement Attention

Mention de danger

H315 Provoque une irritation cutanée.
H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

ANNEXE 2 : UTILISATION DES DONNEES DU SYSTEME GENERAL HARMONISE (SGH) POUR EVALUER LES RISQUES ASSOCIES A LA SOLUTION DE PNA A 0,15 MMOL.L-1

Définitions :

- Une **substance** correspond à une seule espèce chimique éventuellement associée à des impuretés ou un stabilisant.
- Un **mélange** est une solution composée de plusieurs substances (Par exemple, une solution de glucose à 1 g.L⁻¹ est un mélange).

• Extrait du nouveau règlement international SGH : classification des mélanges pour la classe « toxicité aiguë »

Voies d'exposition	Intervalles de valeurs expérimentales de toxicité aiguë (ou catégories de dangers)	ETA de la substance pure
Orale (mg/kg poids corporel)	0 < Catégorie 1 ≤ 5 5 < Catégorie 2 ≤ 50 50 < Catégorie 3 ≤ 300 300 < Catégorie 4 ≤ 2000 2000 < Catégorie 5 ≤ 5000	0,5 5 100 500 2500
Cutanée (mg/kg poids corporel)	0 < Catégorie 1 ≤ 50 50 < Catégorie 2 ≤ 200 200 < Catégorie 3 ≤ 1000 1000 < Catégorie 4 ≤ 2000 2000 < Catégorie 5 ≤ 5000	5 50 300 1100 2500
Gaz (ppmV)	0 < Catégorie 1 ≤ 100 100 < Catégorie 2 ≤ 500 500 < Catégorie 3 ≤ 2500 2500 < Catégorie 4 ≤ 20 000	10 100 700 4500

• Procédure à suivre pour étiqueter un mélange parmi les catégories de la classe « toxicité aiguë » à partir des données sur la substance pure

- 1- Utiliser la fiche de données de sécurité de la substance pure, pour relever la catégorie dans laquelle elle est classée.
- 2- Repérer la valeur ETA (Estimation de la Toxicité Aiguë) de la substance pure (colonne de droite du tableau ci-dessus) d'après sa catégorie.
- 3- Calculer la concentration de la substance dans le mélange en **g pour 100 mL** (c %).
- 4- Calculer l'ETA du mélange à l'aide de la formule suivante :

$$ETA_{mO\text{lange}} = \frac{100 \times ETA_{\text{substance pure}}}{C_{(\text{substance dans le } mO\text{lange})} \%}$$

Ceci est la formule simplifiée pour un mélange contenant une seule substance dangereuse.

5- D'après la valeur de son ETA, repérer la catégorie dans laquelle se situe le mélange en utilisant le tableau ci-dessus.

6- Déduire les éléments d'étiquetage du mélange d'après le tableau suivant :

	Catégorie 1	Catégorie 2	Catégorie 3	Catégorie 4	Catégorie 5
Symbole	Tête de mort sur deux tibias	Tête de mort sur deux tibias	Tête de mort sur deux tibias	Point d'exclamation	Pas
Mention d'avertissement	Danger	Danger	Danger	Attention	Attention
Mention de danger					
- Oral	Mortel en cas d'ingestion	Mortel en cas d'ingestion	Toxique en cas d'ingestion	Nocif en cas d'ingestion	Peut être nocif en cas d'ingestion
- Cutané	Mortel par contact cutané	Mortel par contact cutané	Toxique par contact cutané	Nocif par contact cutané	Peut être nocif par contact cutané
- Par inhalation	Mortel par inhalation	Mortel par inhalation	Toxique par inhalation	Nocif par inhalation	Peut être nocif par inhalation

• **Consultation du nouveau règlement international SGH : classification des mélanges pour la classe « toxicité pour l'environnement aquatique »**

La consultation des données montre que la PNA à $0,15 \text{ mmol.L}^{-1}$ ne présente pas de danger concernant cette classe.

• **Consultation du nouveau règlement international SGH : classification des mélanges pour la classe « toxicité spécifique pour certains organes cibles – exposition répétée »**

La consultation des données montre que la PNA à $0,15 \text{ mmol.L}^{-1}$ ne présente pas de danger concernant cette classe.

ANNEXE 3 : PREPARATION DES BILLES D'ALGINATE

Réactifs et matériels

- Solution d'alginate de sodium à 2 % (m/V) supplémentée en biomolécule ;
- Solution de CaCl_2 à 0,02 mol/L ;
- Pipette automatique P1000 + cônes ;
- Bécher de 200 mL ;
- Filtre en nylon + élastique ;
- Boîte de Petri ;
- Pince plastique.

Mode opératoire

Remarque :

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

- Introduire dans un bécher environ 100 mL de la solution de CaCl_2 .
- Prélever la solution d'alginate à la pipette automatique.
- Laisser tomber l'alginate goutte à goutte quelques cm au dessus de la solution de CaCl_2 .
L'expulsion des gouttes peut se faire en tournant lentement la molette de la pipette vers les volumes **inférieurs** ou par pression modérée sur le piston.
- Laisser reposer les billes 10 minutes dans la solution de CaCl_2 .
- Positionner, à l'aide de l'élastique, le filtre nylon sur le bécher contenant les billes.
- Filtrer les billes par renversement du contenu du bécher dans l'évier.
- Récupérer délicatement les billes et les déposer dans une boîte de Petri dont le fond est tapissé de papier filtre.
- Faire rouler les billes pour les sécher complètement.
- Conserver les billes en plaçant la boîte sur de la glace.

ANNEXE 4 : PROTOCOLE DE REFERENCE POUR LA MESURE DE LA VITESSE INITIALE D'HYDROLYSE DE LA L-BAPNA CATALYSEE PAR LA TRYPSINE

Solutions de substrat utilisées

Quelle que soit leur concentration, les solutions de L-BAPNA utilisées pour les mesures de vitesse initiale sont préparées dans 25 % de DMSO et 75 % de Tris-HCl pH 7,4.

La concentration de L-BAPNA retenue pour la mesure de l'activité enzymatique est de 7,5 mmol.L⁻¹.

Mesure de la vitesse initiale par la méthode en deux points

Réactifs et matériels

- L-BAPNA dans tampon Tris-HCl pH 7,4 + DMSO 75 / 25 (V/V)
- Acide acétique à 30 % (V/V) ;
- Bain thermostatique réglé à 37 °C ;
- Semi-microcuvettes visibles ;
- Microtubes ;
- Chronomètre.

Mode opératoire

- Introduire 1,0 mL de solution de substrat dans un microtube.
- Pré-incuber quelques minutes à 37 °C.
- Déclencher la réaction par ajout de 20 µL de solution enzymatique.
- Incuber à 37 °C pendant 5 minutes exactement.
- Arrêter la réaction par ajout de 100 µL d'acide acétique à 30 %.
- Mesurer l'absorbance à 410 nm contre un témoin adapté.

ANNEXE 5 : MODE OPERATOIRE DE PREPARATION DE LA L-BAPNA A 7,5 MMOL.L⁻¹

La solution de L-BAPNA à 7,5 mmol.L⁻¹ solubilisée dans un mélange de 25 % (V/V) de DMSO et de 75 % (V/V) de tampon Tris-HCl pH 7,4 est peu stable et doit être préparée extemporanément à partir d'une solution mère de L-BAPNA en DMSO.

Réactifs et matériels

- L-BAPNA à 75 mmol.L⁻¹ en DMSO ;
- DMSO ;
- Tampon Tris-HCl 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,4 ;
- Fiole jaugée de 20 mL ;
- Flacons de 25 mL.

Mode opératoire

- Introduire 2 mL de L-BAPNA à 75 mmol.L⁻¹ et 3 mL de DMSO dans une fiole jaugée de 20 mL.
- Compléter avec le tampon Tris-HCl 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,4.
- Conditionner la solution préparée dans le flacon de 25 mL.

ANNEXE 6 : SPECTRES D'ABSORPTION DE LA L-BAPNA ET DE LA PNA

Figure 1 : Spectre d'absorption de 280 à 480 nm de la L-BAPNA à $0,15 \text{ mmol.L}^{-1}$ en microcuvette UV

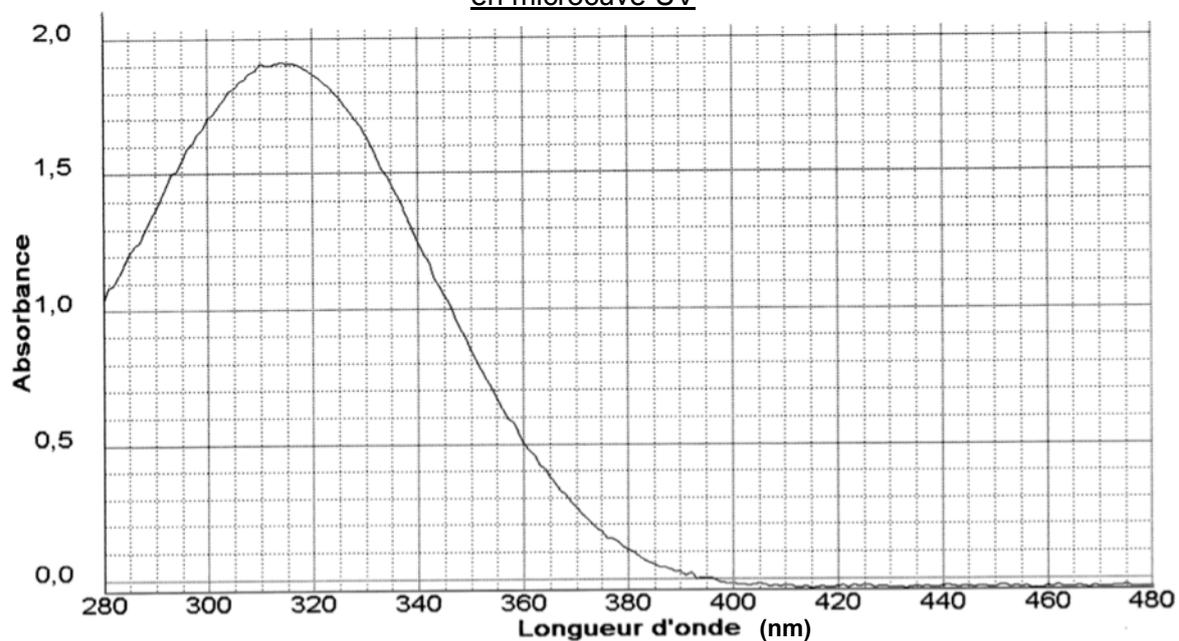


Figure 2 : Spectre d'absorption de 390 à 480 nm de la L-BAPNA à $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ en microcuvette UV

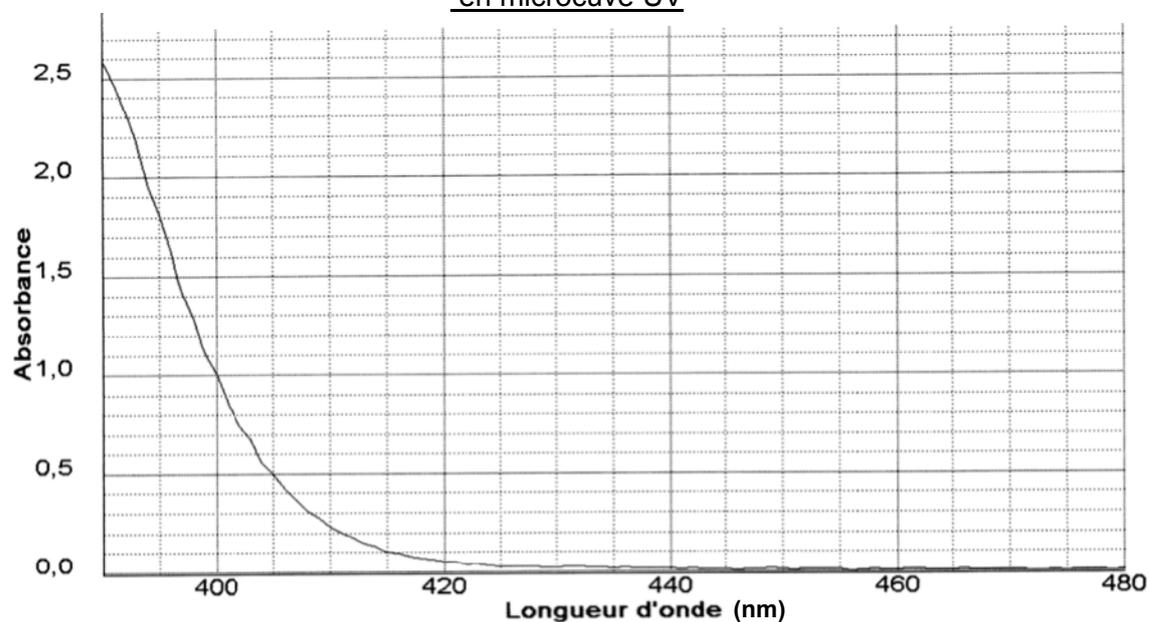
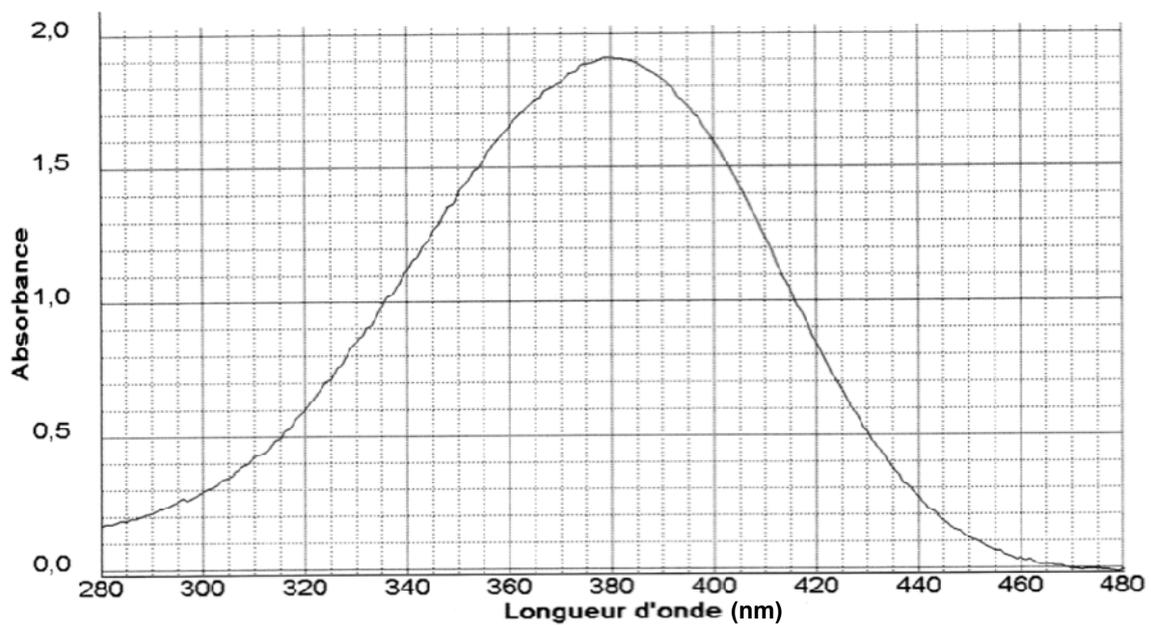


Figure 3 : Spectre d'absorption de 280 à 480 nm de la PNA à 0,15 mmol.L⁻¹ en microcuve UV



ANNEXE 7 : MESURE DE L'INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN DMSO SUR L'ACTIVITE DE LA TRYPSINE

Réactifs et matériels

- L-BAPNA à 75 mmol.L⁻¹ en DMSO ;
- DMSO ;
- Tampon Tris-HCl 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,4 ;
- Trypsine à 2 g.L⁻¹ en tampon Tris-HCl pH 7,4 ;
- Acide acétique à 30 % (V/V) ;
- Bain thermostatique réglé à 37 °C ;
- Semi-microcuvettes visibles ;
- Microtubes ;
- Chronomètre.

Mode opératoire

- Dans des microtubes, introduire les réactifs selon le tableau ci-dessous :

Microtubes	1	2	3	4	5	6	7	Témoin
Volume (µL) de L-BAPNA à 75 mmol.L ⁻¹ en DMSO	0	100	100	100	100	100	100	100
Volume (µL) de tampon Tris-HCl pH 7,4	1000	0	250	500	700	750	800	0
Volume (µL) de DMSO	0	900	650	400	200	150	100	900

- Pré-incuber à 37 °C pendant 10 à 15 minutes.
- Observer l'éventuelle formation d'un précipité.
- Suivre le protocole donné dans l'**annexe 4** en déclenchant la réaction par ajout de 20 µL de trypsine dans les tubes 1 à 7 qui ne présentent pas de précipité.
- Pour le tube témoin, suivre le protocole donné dans l'**annexe 4**, en remplaçant les 20 µL de trypsine par 20 µL de tampon Tris-HCl pH 7,4.
- Lire les absorbances des tubes 1 à 7 en utilisant le tube 1 comme référence.

Résultats

Microtubes	1	2	3	4	5	6	7	Témoin
Présence d'un précipité	-	-	-	-	-	-	+	-
A (410 nm)	0	0,262	0,271	0,298	0,397	0,612	-	0,239

ANNEXE 8 : DIFFERENTES REPRESENTATIONS UTILISABLES POUR DETERMINER LES CONSTANTES CINETIQUES (K_M ET $V_{I,MAX}$) D'UNE ENZYME

Extrait du livre « Physical Chemistry for the Biosciences » de Raymond Chang

370 Chapter 10: Enzyme Kinetics

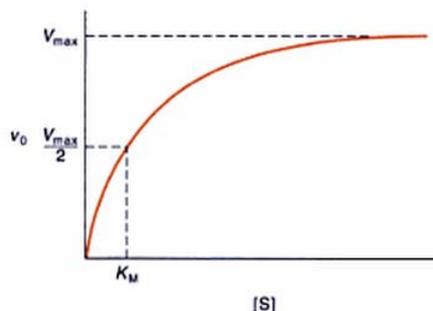


Figure 10.7
Graphical determination of V_{max} and K_M .

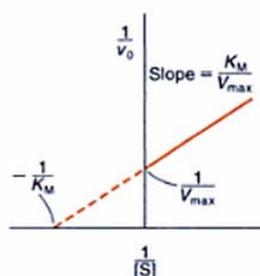


Figure 10.8
Lineweaver-Burk plot for an enzyme-catalyzed reaction obeying Michaelis-Menten kinetics.

Thus, both V_{max} and K_M can be determined, at least in principle, from a plot such as the one in Figure 10.7. In practice, however, we find that the plot of v_0 versus $[S]$ is not very useful in determining the value of V_{max} because locating the asymptotic value V_{max} at very high substrate concentrations is often difficult. A more satisfactory approach, suggested by the American chemists H. Lineweaver (1907–) and Dean Burk (1904–1988), is to employ the double-reciprocal plot of $1/v_0$ versus $1/[S]$. From Equation 10.10, we write

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (10.11)$$

As Figure 10.8 shows, both K_M and V_{max} can be obtained from the slope and intercepts of the straight line.

Although useful and widely employed in enzyme kinetic studies, the Lineweaver-Burk plot has the disadvantage of compressing the data points at high substrate concentrations into a small region and emphasizing the points at lower substrate concentrations, which are often the least accurate. Of the several other ways of plotting the kinetic data, we shall mention the **Eadie-Hofstee** plot. Multiplying both sides of Equation 10.11 by $v_0 V_{max}$, we obtain

$$V_{max} = v_0 + \frac{v_0 K_M}{[S]}$$

Rearrangement gives

$$v_0 = V_{max} - \frac{v_0 K_M}{[S]} \quad (10.12)$$

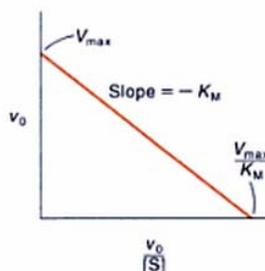


Figure 10.9
Eadie-Hofstee plot for the reaction graphed in Figure 10.7.

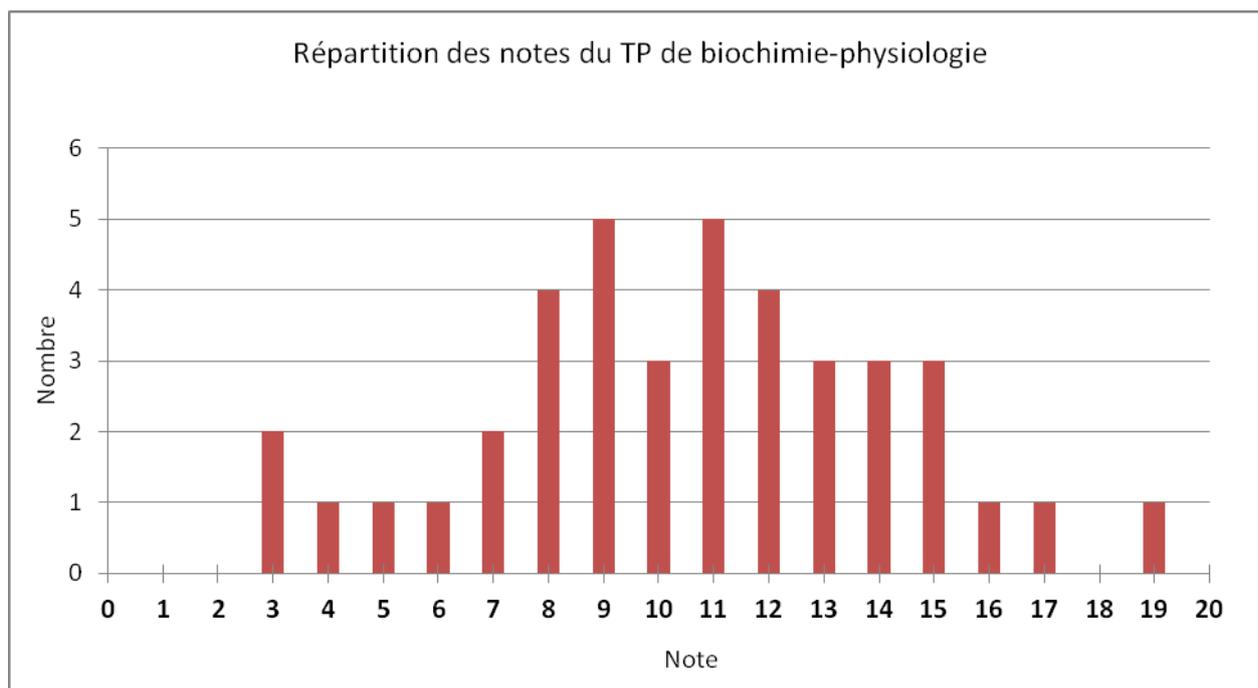
This equation shows that a plot of v_0 versus $v_0/[S]$, the so-called **Eadie-Hofstee** plot, gives a straight line with slope equal to $-K_M$ and intercepts V_{max} on the v_0 axis and V_{max}/K_M on the $v_0/[S]$ axis (Figure 10.9).

Rapport du TP biochimie-physiologie

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

Résultats :

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



Description de l'épreuve :

Le sujet porte sur des médicaments candidats destinés à une administration par voie orale dont le principe actif est inclus dans un polymère d'alginate. Ce type d'excipient doit permettre une libération progressive et ciblée du principe actif.

Deux molécules modèles de taille différente sont proposées : la riboflavine, détectable par spectrophotométrie d'absorption moléculaire, et la trypsine dont l'activité est mesurée par la disparition d'un substrat chromogène.

L'intérêt de ces choix est de pouvoir étudier certaines propriétés des médicaments candidats en utilisant des techniques de biochimie classique (mesures de diffusion par prélèvements en milieu liquide sous agitation, mesures d'activité enzymatique) nécessitant une bonne maîtrise des gestes de base mais avec des contraintes plus inhabituelles : sensibilité de la riboflavine à la lumière, imposant de protéger les récipients dès le début de la manipulation; travail en phase hétérogène, nécessitant des agitations manuelles régulières ; nombreux pré-traitements à différents pH, à planifier rigoureusement. Autant de consignes dont le respect conditionnait les résultats. La diversité des manipulations à réaliser imposait également des qualités d'organisation et d'anticipation. Là où certains candidats s'interrogeaient à la sortie sur la possibilité de finir les manipulations, d'autres n'avaient eu aucune difficulté à mener de front manipulation et rédaction du compte-rendu. De telles différences ne peuvent s'expliquer uniquement par la vitesse d'exécution.

L'autre intérêt du sujet réside dans son contexte thérapeutique : les résultats obtenus sont à resituer dans la perspective physiologique de la digestion et de l'organe cible du médicament candidat, les médicaments étant pris par voie orale.

Par ailleurs, pour la partie utilisant la trypsine comme principe actif, des manipulations préliminaires visant à valider les conditions de mesure du protocole de référence sont proposées (fixant notamment la composition du milieu réactionnel en solvant et sa concentration en substrat). Le problème de la solubilité du substrat utilisé pour mesurer une activité enzymatique crée une contrainte qui nécessite un minimum de tests et de réflexion. Là encore on part de notions de biochimie très classiques pour mettre au point les conditions de mesure optimales dans un contexte particulier. En effet, en théorie la concentration en substrat doit être saturante pour permettre la mesure de la concentration d'activité enzymatique mais le substrat doit être soluble ce qui impose l'utilisation d'un solvant organique polaire qui peut être un inhibiteur de l'enzyme selon les proportions. On attend donc que le candidat ne se contente pas de réciter sa leçon mais la dépasse pour s'adapter aux contraintes. L'enseignement, auquel l'agrégation prépare, se confronte couramment à ce type d'enjeux.

Notons enfin que le sujet doit être lu avec la plus grande attention, pour au moins deux raisons : pour chaque partie la liste des réactifs et du matériel est donnée. Le vocabulaire est choisi avec précision. L'ignorer expose à des confusions dans le choix du matériel : une microcuve n'est pas un microtube, une semi-microcuve pas une microcuve, etc. D'autre part il arrive que des résultats soient fournis en annexe pour certaines parties. C'est dans ce cas clairement indiqué dans le paragraphe correspondant (ex. : « le mode opératoire et les résultats sont fournis dans l'annexe 7 »). Cette mention, faut-il le préciser, signifie qu'il ne faut pas refaire la manipulation.

Commentaire sur le travail des candidats :

Remarques générales

Aucun ordre de passage n'était imposé : les réactifs et le petit matériel sont toujours individuels, les appareils de mesure suffisamment nombreux.

Chaque candidat disposait d'un ordinateur (netbook) équipé des suites Microsoft Office et OpenOffice, ce qui lui permettait de traiter les résultats au fur et à mesure et de les éditer en se connectant à une imprimante sur la paillasse latérale.

Avant toute manipulation, il est demandé de mener une analyse des risques chimiques pour mettre en œuvre les moyens de prévention adaptés.

Analyse des risques associés à la solution de PNA à 0,15 mmol.L⁻¹ :

elle doit être effectuée à partir de la fiche de données de sécurité de la PNA pure. Celle-ci y est répertoriée dans 5 classes de danger pour la santé. Les résultats de l'analyse pour la PNA à 0,15 mmol.L⁻¹ concernant les classes « toxicité chronique pour le milieu aquatique » et « toxicité spécifique pour certains organes cibles – exposition répétée » est directement fournie. Seule l'analyse concernant la classe « toxicité aiguë » selon 3 voies d'exposition était demandée. Un certain nombre de candidats a suivi correctement la procédure de l'annexe 2, pour calculer l'ETA de la solution de PNA diluée (appelée mélange). On devait par exemple trouver $ETA_{\text{mélange}}$ pour expo voie cutanée = $1,5 \cdot 10^7$. Certains n'ont pas su conclure sur la dangerosité de la PNA à partir de cette valeur numérique. Il fallait la comparer à la valeur limite supérieure de l'ETA pour la catégorie 5 (5000). Puisqu'elle est bien supérieure, l'ETA à 0,15 mmol.L⁻¹ n'est pas considérée comme dangereuse pour la classe « toxicité aiguë par voie cutanée ».

Analyse des risques associés à la solution d'acide acétique à 30 % et à la trypsine à 200 g.L⁻¹ :

elle a été correctement présentée mais parfois oubliée.

Partie 1 : Étude de la diffusion de la riboflavine incluse dans des billes d'alginate.

La préparation des billes d'alginate contenant de la riboflavine a été globalement réussie, les billes préparées étaient sphériques et de taille homogène. Il est précisé que la riboflavine se dégrade facilement à la lumière et pourtant seule une moitié des candidats l'a correctement protégée.

Les résultats obtenus étaient assez hétérogènes. Les mauvais résultats s'expliquent le plus souvent par un défaut de maîtrise des gestes de base de biochimie : pas d'homogénéisation avant un prélèvement ou en cours de manipulation comme indiqué, utilisation de cuves visibles non adaptées à une mesure dans l'UV.

Les résultats ont été bien présentés mais rarement mis en relation avec la diffusion de la riboflavine dans le contexte de la digestion. La libération de la riboflavine était plus progressive aux pH 2 et 5 qu'à pH 7,4. L'alginate semble donc permettre une libération retardée de petites molécules à pH acide.

Partie 2 : Étude de la stabilité et de la libération de la trypsine incluse dans des billes d'alginate

Études préliminaires

Dans une première partie, des manipulations ou analyses préliminaires sont proposées pour justifier les conditions opératoires retenues par la suite.

Pour choisir la longueur d'onde de détection, il faut se placer dans le cadre de la mesure de l'activité de la trypsine. La solution utilisée doit avoir la même composition que les milieux de lecture pour les mesures de vitesse. Le milieu réactionnel est composé, en plus du substrat, de Tris-HCl pH 7,4 - DMSO (75/25 V/V). La réaction est arrêtée par ajout de 100 µL d'acide acétique à 30 % à 1,02 mL de milieu réactionnel. Pour établir le spectre, la PNA doit donc être solubilisée en Tris-HCl pH 7,4 - DMSO (75/25 V/V) et contenant 10 % d'acide acétique à 30 %. Cette question a été généralement traitée mais de façon incomplète.

Pour mesurer l'activité de la trypsine, on détecte la quantité de produit (PNA) formée au bout de 5 min. La concentration en substrat (L-BAPNA) n'est alors pas négligeable. Il convient donc de choisir une longueur d'onde de détection de la PNA pour laquelle le substrat absorbe le moins possible. Bien que la longueur d'onde optimale de la PNA soit de 380 nm, il faut donc décaler la mesure d'absorbance à 410 nm : en effet, la L-BAPNA à 7,5 mmol.L⁻¹ absorbe de façon non négligeable à 380 nm et de façon moindre à 410 nm. Cette question a généralement été traitée mais avec des justifications maladroites ou incomplètes.

Pour la détermination du coefficient d'absorption molaire de la PNA en présence de DMSO, le tableau de gamme de PNA a en général été bien construit et les résultats obtenus satisfaisants. Les oublis d'unité ont été lourdement sanctionnés.

Dans la mesure où la méthode est imposée (gamme de 5 solutions de PNA), le calcul du coefficient d'absorption molaire passe forcément par la prise en compte de toutes les mesures validées (c'est-à-dire après élimination des éventuelles erreurs grossières). Raisonner sur un seul point pour appliquer de la loi de Beer Lambert n'est donc pas correct. Le calcul repose sur la détermination du coefficient directeur de la droite $A_{\text{PNA } 410 \text{ nm}} = f(C_{\text{PNA}})$ en mmol.L⁻¹). Une majorité de candidats a su effectuer correctement ce calcul, avec les bonnes unités (non imposées : L.mol⁻¹.cm⁻¹ ou mol⁻¹.m² (USI)).

Des ordinateurs individuels étant à disposition, la détermination de la pente par méthode graphique (en choisissant deux points qui paraissent sur la courbe) plutôt que par régression linéaire est non seulement moins précise mais constitue une perte de temps.

Pour l'étude de l'influence de la concentration en DMSO sur l'activité de la trypsine, l'annexe 7 présente le protocole et les résultats. Refaire la manipulation était inutile. La concentration en DMSO est à exprimer en %, unité utilisée dans le mode opératoire de mesure de l'activité de la trypsine (annexe 4). Il ne faut pas oublier de tenir compte à la fois du volume de DMSO et du volume de L-BAPNA, elle-même solubilisée en DMSO. Par exemple, dans le tube 3 : $V_{\text{DMSO total}} = 100 + 650 = 750 \mu\text{L}$ et $V_{\text{solvant Tris HCl}} = 250 \mu\text{L}$ donc $c_{\text{DMSO}} = 750 / (750 + 250) = 75 \%$. Très peu de candidats ont su calculer correctement les concentrations dans le tableau de gamme.

Peu de candidats également ont correctement exploité les résultats pour conclure sur une concentration optimale en DMSO. Pour une concentration en L-BAPNA de $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, les résultats montrent que plus la concentration en DMSO diminue, plus l'absorbance à 410 nm est élevée. L'enzyme est donc inhibée par le DMSO. Dans les conditions du test, l'activité maximale en trypsine est obtenue pour $A_{410 \text{ nm}} = 0,612 - 0,239 = 0,373$ c'est-à-dire pour une concentration de DMSO de 25 %. Il n'est pas possible de proposer une concentration de DMSO plus faible car on obtient un précipité de substrat pour une concentration de 20 %. La L-BAPNA à $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ n'est solubilisée qu'à une concentration en DMSO supérieure ou égale à 25 %.

Il est précisé dans le sujet que le DMSO est un solvant organique polaire. Il fallait évoquer cette caractéristique pour proposer une hypothèse sur le mode d'inhibition de la trypsine par le DMSO : par exemple, une perturbation de la conformation de l'enzyme, voire du site actif, par mise en place de liaisons hydrogène surnuméraires entre l'enzyme et le solvant.

La détermination des paramètres cinétiques de la trypsine dans les conditions du protocole de référence a été traitée par l'ensemble des candidats. Là encore, les résultats obtenus ont été très hétérogènes. Les mauvais résultats s'expliquent par le non respect du temps d'incubation de chaque tube, la mauvaise gestion du traitement des tubes en parallèle et par de mauvais pipetages de l'enzyme.

La détermination du K_M de la trypsine relative à la L-BAPNA permet de choisir la concentration optimale en substrat pour le protocole de référence. Avec une valeur de K_M de 2 mmol.L^{-1} environ, on devrait choisir une concentration en L-BAPNA de plus de 20 mmol.L^{-1} mais les données de solubilité du substrat et d'inhibition de l'enzyme par le DMSO imposent le choix d'une concentration optimale de $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Étude de la libération de trypsine dans des conditions mimant le trajet du médicament candidat dans l'organisme

La préparation des billes n'a pas non plus posé de problème dans cette partie.

Pour faciliter la préparation, un colorant alimentaire est ajouté à la solution de trypsine. Le colorant alimentaire bleu pourrait interférer sur les mesures en modifiant l'activité de la trypsine. Pour le vérifier, il faudrait comparer le résultat obtenu pour une solution de trypsine à 200 g.L^{-1} à 5 % (V/V) de colorant avec l'activité d'une solution de trypsine à 200 g.L^{-1} sans colorant après inclusion en alginate selon le même protocole. Il convient également de vérifier que le colorant n'absorbe pas à la longueur d'onde de l'étude en utilisant des billes préparées uniquement avec le colorant. Il faudrait enfin vérifier l'absence d'interférence du colorant sur la stabilité des billes dans les conditions opératoires utilisées. Par exemple, les tests d'incubation des billes trypsine-alginate à différents pH peuvent être repris en remplaçant le volume de colorant alimentaire par un même volume de tampon Tris-HCl à $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ à pH 7,4. L'observation de l'aspect des billes à ces différents pH permettrait de conclure sur l'influence éventuelle du colorant alimentaire sur la stabilité de l'alginate.

Les billes trypsine-alginate obtenues sont incubées à différents pH selon un protocole fourni. L'ensemble des candidats a effectué ces traitements. Seul quelques-uns n'ont pas eu le temps de mesurer l'activité de l'ensemble des surnageants. Si de mauvais résultats ont parfois été obtenus, cela s'expliquant encore une fois par des défauts d'homogénéisation, de pipetage et d'organisation.

L'activité de la trypsine est déterminée par la méthode en 2 points en détectant le produit formé (PNA) par mesure d'absorbance. Il faut donc utiliser le coefficient d'absorption molaire de la PNA à 410 nm dans les conditions opératoires, effectuer la conversion entre le volume de mesure (V milieu réactionnel + solution d'arrêt = 1,12 mL) et le volume de surnageant versé (20 μL) et convertir des mol.L^{-1} en $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Ce calcul a rarement été fait sans erreur d'unités (U.mL^{-1} de surnageant), et le plus souvent mal justifié. Certains candidats confondent les unités $\mu\text{mol/min}$ et U. La première doit être réservée à l'expression d'une vitesse de réaction, la seconde à l'activité. Ces deux unités se correspondent mais ne sont pas équivalentes. D'autre part, l'utilisation de la nouvelle notation pour l'activité (z) et la concentration d'activité catalytique (b) a été appréciée mais n'était pas exigée.

Pour interpréter les résultats, peu ont pensé à compléter l'ensemble des données collectées avec l'observation de l'état des billes de trypsine à l'issue de chaque traitement à un pH donné. Il est pourtant clairement expliqué que l'un des objectifs de l'utilisation des billes est de préserver la trypsine au niveau gastrique et de la libérer au niveau duodénal. On observait une rétraction des billes à pH 2 (choisi comme modèle du pH gastrique avant le repas), avec un bord extérieur légèrement décoloré, une apparence inchangée à pH 5 (pH gastrique en période postprandiale) et une détérioration à pH 7,4 (pH duodénal). L'alginate permet donc bien de libérer la trypsine à pH 7,4. Les résultats obtenus montraient également que le traitement à pH 5 puis 7,4 donnait la même activité qu'un traitement à pH 7,4 pendant la même durée. Le traitement à pH 5 ne semble donc pas modifier l'activité enzymatique. En revanche, le traitement à pH 2, pH 5 puis 7,4 donnait une activité inférieure (environ la moitié) à celle d'un traitement à pH 7,4 pendant le même temps. L'enzyme immobilisée en alginate est donc en partie dénaturée à pH 2. La trypsine est administrée dans le cas d'insuffisance pancréatique. Sa prise par voie orale associée à un excipient alginate devra donc être préconisée plutôt après ou au cours d'un repas.

Bilan

Le sujet permettait, à l'aide d'outils classiques de biochimie, d'explorer deux utilisations possibles de l'alginate en tant qu'excipient. Ce polymère d'origine naturelle semble permettre d'une part une libération progressive de petites molécules au niveau stomacal et d'autre part une libération uniquement duodénale de grosses molécules.

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

SUJET

Sujet proposé par : Christophe Beloin, Joelle Bissery, Fabien Cezard, Pascal Chillet, Mélanie Ferrières,

RAPPORT

Etabli par : Christophe Beloin, Joelle Bissery, Fabien Cezard, Pascal Chillet, Mélanie Ferrières,

Effets des conditions environnementales sur la physiologie
bactérienne

INTRODUCTION

Les microorganismes, encore plus que les organismes supérieurs, se doivent de répondre rapidement aux modifications de leur (micro-)environnement. Les différentes enzymes des voies métaboliques agissent très rarement indépendamment les unes des autres. Ainsi, le fonctionnement des gènes les codant n'est pas isolé. Les bactéries doivent répondre à une grande variété de changements de leurs conditions ambiantes (pénurie d'aliments, variations de température, modification de l'hygrométrie, compétition avec d'autres microorganismes...). Ces défis nécessitent des systèmes de régulation efficaces.

De nombreux systèmes de régulation sont ainsi connus chez les bactéries ; ils peuvent être :

- « locaux » : agissant sur une voie métabolique donnée, *via* un contrôle de(s) enzyme(s) responsable(s) (contrôle de la quantité ou de l'activité d'une enzyme) ;
- « globaux » : agissant sur plusieurs voies métaboliques à la fois, *via* des mécanismes de réponse intégrée généralement multigéniques. Ces mécanismes permettent donc à la bactérie de rapidement répondre aux variations environnementales, en activant ou en inhibant en même temps de nombreux gènes, voire de nombreux opérons.

Ces régulations « globales » impliquent donc des systèmes génétiques capables de répondre à des facteurs pléiotropes, dont les effets se feront sentir sur plusieurs gènes.

Le sujet aborde différentes réponses bactériennes à divers facteurs environnementaux en faisant appel à des souches de *Shigella flexneri* et d'*Escherichia coli*, dont les caractéristiques majeures sont présentées dans l'**annexe 1**.

- La **partie A** concerne l'effet de la température sur l'expression d'un gène de virulence.
- La **partie B** permet de mettre en évidence la réponse bactérienne à l'attachement sur une surface.
- La **partie C** s'intéresse à l'effet d'un stress oxydant sur la croissance bactérienne.
- La **partie D** s'intéresse à l'effet d'un choc osmotique sur la viabilité bactérienne.

-
- La **partie E** permet de caractériser l'effet du pH sur la mobilité bactérienne.

AVERTISSEMENTS

- Les **manipulations** des différentes parties sont **indépendantes** ; il convient d'en mener certaines en **parallèle**.
- Il est fortement suggéré de prendre en compte les nombreuses étapes et les temps d'incubation pour les **parties A, B et C**.
- Les souches utilisées sont toutes **non pathogènes**.

TRAVAIL DU PREMIER JOUR

DONNEES

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

MATERIEL UTILISABLE POUR TOUTES LES MANIPULATIONS

Milieu de culture

Bouillon **LB** stérile 200 mL en flacon

Matériel

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Semi-microcuvettes + morceaux de parafilm

Tubes à hémolyse stériles de 10 mL

Tubes à essai stériles à bouchon cellulose

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

Pipettes automatiques P1000, P200, P50 + cônes adaptés

Microtubes stériles de 2 mL

Microcentrifugeuse

Chronomètres

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

PARTIE A

Effet de la température sur l'expression d'un gène de virulence

La température est un facteur extérieur qui peut avoir une grande influence sur le métabolisme de certaines souches bactériennes. Dans cette partie, on se propose d'étudier l'influence de la température sur l'expression du gène *mxiC* (système T3SS), grâce à une construction génétique utilisant le gène *lacZ* comme rapporteur de l'activité du promoteur de *mxiC*. Ce promoteur est contrôlé par une protéine régulatrice pléiotrope **X**, dont l'activité dépend de la température.

Les deux souches utilisées dans cette étude (souche de référence, et souche délétée du gène codant la protéine régulatrice pléiotrope **X**) ont été modifiées afin de ne pas exprimer le gène *lacZ* endogène : la β -galactosidase ainsi produite est donc le reflet de l'activité du seul promoteur *mxiC* **[annexe 1]**.

Il s'agira d'observer le phénotype d'hydrolyse du lactose de ces deux souches à 30 et 37°C, puis d'effectuer une transformation de la souche mutante par un plasmide recombinant contenant le gène codant le facteur pléiotrope **X**, afin d'éventuellement compléter la délétion.

Cultures

Précultures de 18 h à 37°C en bouillon LB, en tubes à hémolyse contenant 3 mL :

Sf1

S. flexneri, souche de référence

Sf2

S. flexneri, souche délétée Δ facteurX

Réactifs

Solution stérile froide de CaCl₂	à 100 mmol·L ⁻¹	10 mL en flacon, en glace
Solution de plasmide pBR322	à 20 ng·μL ⁻¹ en eau	20 μL en microtube <u>vert</u> , en glace
Solution de plasmide pBR322-X	à 20 ng·μL ⁻¹ en eau	20 μL en microtube <u>bleu</u> , en glace

Milieux de culture

Bouillon **LB 50** stérile : 50 mL en Erlenmeyer de 150 mL, préchauffé à 37°C en bain thermostaté avec agitation

4 géloses **LA+Xgal** : géloses LA + X-gal 40 μg·mL⁻¹, coulées en boîtes de Petri

4 géloses **LA**, coulées en boîte de Petri

8 géloses **LA+Xgal+Ap** : géloses LA + X-gal 40 μg·mL⁻¹ + ampicilline 100 μg·mL⁻¹, coulées en boîtes de Petri

Matériel spécifique

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

Portoir flottant pour microtubes

Billes de verre stériles et récipient de récupération

Microplaque stérile à fond rond + couvercle (à conserver pour la **partie D**)

MANIPULATIONS

A1- Croissance de la souche Sf2

Le suivi de croissance est effectué par opacimétrie à 600 nm.

Lorsque la A_{600} atteint une valeur comprise entre 0,30 et 0,35, on effectue les prélèvements destinés à la préparation des cellules compétentes [**partie A2**].

A11- Ensemencement et première mesure

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de la préculture (**Sf2**) judicieusement diluée contre un blanc adapté.
- Ensemencer le milieu préchauffé (**LB 50**) avec un volume adéquat de la préculture, de manière à obtenir une A_{600} initiale égale à 0,08.
- Effectuer immédiatement un premier prélèvement de 1 mL à t_0 avec une pipette graduée stérile. *La pipette pourra être laissée dans l'Erlenmeyer pour les prélèvements ultérieurs.*
- Mesurer l'absorbance à 600 nm de ce prélèvement, contre un blanc adapté.

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

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

A12- Suivi opacimétrique de la croissance

- **Toutes les 30 minutes**, prélever 1 mL de culture et mesurer l'absorbance à 600 nm de chaque prélèvement. *On pourra utiliser pour les prélèvements la même pipette graduée restant dans l'Erlenmeyer.*

Un prélèvement sera réalisé en présence d'un examinateur.

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

- Effectuer si nécessaire des mesures supplémentaires pour localiser précisément le moment où l'absorbance est comprise entre 0,30 et 0,35 (*entre 1 h et 1 h 30 de culture*).
- Lorsque l'absorbance atteint cette valeur, placer l'Erlenmeyer de culture dans la glace, puis prélever et répartir 6 x 1,5 mL de culture en microtubes stériles (1,5 mL par microtube).

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

A2- Transformation d'une souche bactérienne

La transformation s'effectue à partir des cellules précédemment cultivées [**partie A1**]. Ces cellules seront rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium [**partie A22**] avant d'être transformées par les plasmides [**partie A23**].

A22- Préparation des cellules compétentes Sf2^{comp}

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

Deux microtubes (① **Essai** et ② **Témoin**) sont destinés aux transformations [**partie A23**], le troisième (③ **%Viab**) sert à la détermination du pourcentage de viabilité [**partie A32**].

A23- Transformation des cellules compétentes Sf2^{comp}

- Compléter les différents microtubes :
 - dans le microtube ① **Essai**, ajouter un volume de solution de plasmide **pBR322-X** équivalent à 200 ng de plasmide (obtention de cellules « **Sf2^{comp}-pBR322-X** ») ;
 - dans le microtube ② **Témoin**, ajouter un volume de solution de plasmide **pBR322** équivalent à 200 ng de plasmide (obtention de cellules « **Sf2^{comp}-pBR322** ») ;
 - aucun plasmide n'est ajouté dans le microtube ③ **%Viab**.
- Rincer à chaque fois le cône par aspirations-refoulements lents de la suspension.
- Placer les trois microtubes dans la glace pendant 30 minutes.
- Homogénéiser comme précédemment.
- Réaliser un choc thermique :
 - 1 min à 42°C sur flotteur en bain thermostaté ;
 - refroidir immédiatement dans la glace pendant 10 minutes.
- Ajouter 900 µL de milieu **LB** dans chaque microtube.
- Placer le microtube ③ **%Viab** dans la glace en attendant la réalisation de la **partie A32**.
- Incuber les deux autres microtubes en bain thermostaté à 37°C sur flotteur pendant 30 minutes.

Les microtubes peuvent ensuite être conservés dans la glace si la **partie A3** n'est pas réalisée tout de suite.

A3- Ensemencements

A31- Repiquage des souches Sf1 et Sf2

- Réaliser, pour chaque souche, deux isollements sur gélose **LA+Xgal**.
- Pour chaque souche, incubé une boîte à 30°C et l'autre à 37°C pendant 24 h.

A32- Test de viabilité des bactéries compétentes Sf2^{comp}

Le dénombrement des cellules du microtube ③ %Viab [préparé en **partie A23**] est réalisé en surface sur un volume de 50 µL.

- Préparer en microplaque et en milieu **LB** sous un volume total de 200 µL, des dilutions décimales en série allant jusqu'à 10⁻⁶ (par rapport à la suspension obtenue en **partie A23**).

Réaliser une dilution devant un examinateur.

- Étaler à l'aide de billes stériles, en surface de boîtes de gélose **LA**, 50 µL de la dilution 10⁻⁵ et de la dilution 10⁻⁶, en double essai, selon le mode opératoire suivant :
 - répartir 5 à 10 billes par boîte ;
 - effectuer des translations brusques, alternées avec des rotations de la boîte ;
 - récupérer les billes dans le récipient de récupération contenant de l'eau de Javel.

Étaler immédiatement après le dépôt de l'inoculum sur la gélose.
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h.

A33- Dénombrement des suspensions préparées

Pour chacune des deux suspensions bactériennes [préparées en **partie A23**] ① Essai (Sf2^{comp}-pBR322-X) et ② Témoin (Sf2^{comp}-pBR322) :

- Étaler à l'aide de billes stériles, en surface des quatre boîtes de gélose **LA+Xgal+Ap**, 100 µL de suspension non diluée, selon le même mode opératoire que le dénombrement en **partie A32**.
- Pour chaque suspension, incubé deux boîtes à 30°C et deux autres à 37°C pendant 24 h.

COMPTE-RENDU

1. Présenter l'ensemble des résultats des mesures au spectrophotomètre, les calculs, ainsi que le mode opératoire permettant l'ajustage de la souche pour la croissance dans la **partie A11**.
2. Présenter les résultats du suivi de croissance. Indiquer la valeur de A₆₀₀ et le temps correspondant à l'arrêt de cette croissance.
3. Préciser le volume de solution plasmidique ajoutée dans chaque tube de transformation. Justifier.
4. Justifier l'intérêt de réaliser une transformation avec pBR322 en parallèle de celle réalisée avec le plasmide recombinant pBR322-X.
5. Prévoir le nombre de colonies attendues pour le tube ③ %Viab, pour chaque dilution testée, si l'on estime que seules 10 % des bactéries traitées survivent à la préparation des cellules compétentes [**partie A22**].
6. Justifier le choix du milieu **LA+Xgal+Ap** utilisé pour les dénombrements des bactéries transformées.

PARTIE B

Réponse bactérienne à l'attachement sur une surface

Les bactéries sont capables de « sentir » si elles cultivent en suspension dans un liquide ou attachées à une surface. Pour se faire, elles utilisent des systèmes à deux composants (senseur / régulateur). Dans cette partie, on se propose d'étudier l'influence du mode de culture des bactéries sur l'expression du gène *manC* (acide colanique), grâce à une construction génétique utilisant le gène *lacZ* comme rapporteur de l'activité du promoteur de *manC*. Ce promoteur est contrôlé par le régulateur **Y** du système à deux composants.

Les deux souches utilisées dans cette étude (souche de référence, et souche délétée du gène codant le régulateur **Y**) ont été modifiées afin de ne pas exprimer le gène *lacZ* endogène : la β -galactosidase ainsi produite est donc le reflet de l'activité du seul promoteur *manC* [annexe 1].

L'activité β -galactosidase chez ces souches sera mesurée dans différentes conditions décrites ci-dessous. Les cellules seront lysées par addition de BCTMA (bromure de cétyle-triméthylammonium), détergent non dénaturant, et l'activité sera déterminée en méthode enzymatique « 2 points » en utilisant un substrat chromogène, l'oNPG (orthonitrophényl- β -D-galactoside).

Culture

Cultures de 18 h à 30°C en bouillon LB, en tubes à hémolyse contenant 3 mL :

Ec1	<i>E. coli</i> , souche de référence
Ec2	<i>E. coli</i> , souche délétée Δ régulateurY

Milieux de culture

Eau distillée stérile 100 mL en flacon [laboratoire dédié]
2 géloses **LA**, coulées en boîte de Petri, préchauffées à 30°C [laboratoire dédié]

Réactifs

Cm 0,1% : solution de chloramphénicol à 0,1 % (m/V)	2 mL en tube à hémolyse, en glace
PBS 1X	200 mL en flacon
BCTMA à 6 mg·mL ⁻¹	1 mL en microtube orange
oNPG [oNPG (10 mmol·L ⁻¹), MgCl ₂ (1,5 mmol·L ⁻¹), β -mercaptoéthanol (15 mmol·L ⁻¹) en tampon phosphate de sodium pH 7 (0,05 mol·L ⁻¹)]	15 mL en flacon brun, en glace
Na₂CO₃ 1 mol·L ⁻¹ + EDTA 4 mmol·L ⁻¹	15 mL en flacon, en glace

Matériel spécifique

2 membranes filtrantes 0,45 μ m et système de filtration [laboratoire dédié]
Étuve à 30°C
Bain thermostaté à 37°C sans agitation, équipé d'un portoir pour tubes à hémolyse
Spectrophotomètre réglé à 420 nm
2 flacons vides stériles à bouchon rouge

MANIPULATIONS

- Préparer au préalable quatre tubes à hémolyse contenant chacun 200 μ L de chloramphénicol à 0,1 %. Placer ces tubes en attente dans la glace.

Les procédures décrites ci-dessous [parties **B1**, **B21**, **B22**] pour une souche seront à effectuer de la même façon pour les deux souches **Ec1** et **Ec2**.

B1- Préparation des cultures en suspension et sur membrane filtrante

B11- Préparation des cellules

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de la culture judicieusement diluée contre un blanc adapté.

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

- Préparer, en double essai, un microtube contenant un volume de culture correspondant à environ $7,5 \cdot 10^8$ bactéries.
- Centrifuger les deux microtubes pendant 2 minutes à vitesse maximale. Éliminer soigneusement la totalité du surnageant.

B12- Filtration et incubation sur membrane filtrante

Pour l'un des deux microtubes :

- Ajouter 1 mL de **PBS 1X**. Remettre les cellules en suspension par aspirations-refoulements.
- Transférer le culot resuspendu dans un tube à essai contenant 9 mL de **PBS 1X**.

Laboratoire dédié : amener les échantillons à filtrer, le PBS 1X et la pince.

Demander à un examinateur avant de passer à la filtration.

- Réaliser la filtration selon le mode opératoire détaillé dans l'annexe 2.
- Après la filtration, incuber la gélose **LA** contenant la membrane filtrante à 30°C pendant 2 h 30.

B13- Culture en suspension

En parallèle, traiter l'autre microtube de la façon suivante :

- Ajouter 1 mL de **LB**. Remettre les cellules en suspension par aspirations-refoulements.
- Transférer le culot resuspendu dans un tube à hémolyse contenant 3 mL de **LB**.
- Incuber dans une étuve à 30°C pendant 2 h 30.

B2- Détermination des activités enzymatiques

Après les incubations de 2 h 30, récupérer les géloses **LA** contenant les membranes filtrantes, ainsi que les cultures en suspension.

B21- Traitement des cultures sur membrane filtrante

- Transférer la membrane filtrante dans un flacon à bouchon rouge, à l'aide d'une pince stérile.
La membrane filtrante sera plaquée contre la paroi du flacon, côté bactéries vers l'intérieur du flacon.

Une des membranes filtrantes sera transférée en flacon devant un examinateur.

- Ajouter 4 mL de **LB**.
- Vortexer et agiter manuellement pour resuspendre les bactéries présentes sur la membrane filtrante.
- Transférer les 4 mL dans deux microtubes (2 x 2 mL), puis centrifuger pendant 2 minutes à vitesse maximale.
- Éliminer soigneusement la totalité du surnageant.
- Ajouter 1 mL de **LB** dans chaque microtube. Remettre les cellules en suspension par aspirations-refoulements.

-
- Transférer chaque suspension (2 mL au total) dans un tube à hémolyse contenant 200 µL de chloramphénicol.
 - Vortexer.
 - Laisser dans la glace.

B22- Traitement des cultures en suspension

- Transférer 2 mL de culture dans un tube à hémolyse contenant 200 µL de chloramphénicol.
- Vortexer.
- Laisser dans la glace.

Les tubes contenant les échantillons ainsi traités [*partie B21* et *partie B22*] peuvent ensuite être conservés dans la glace si la *partie B23* n'est pas réalisée tout de suite.

B23- Lyse chimique des bactéries

Pour les quatre échantillons dans la glace :

- Préparer quatre semi-microcuves contenant chacune 900 µL de **LB**. Ajouter 100 µL des échantillons et mesurer l'absorbance à 600 nm contre un blanc **LB**.

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

- Introduire dans un microtube 500 µL d'échantillon et ajouter 50 µL de **BCTMA**.
- Vortexer pendant 15 secondes.
- Laisser 5 minutes dans la glace.
- Vortexer à nouveau pendant 15 secondes.

Les microtubes peuvent ensuite être conservés dans la glace si la *partie B24* n'est pas réalisée tout de suite.

B24- Détermination de l'activité enzymatique

Le blanc de mesure de la réaction enzymatique (1 mL d'**oNPG** préchauffé à 37°C, 200 µL de **LB**, 1 mL de **Na₂CO₃-EDTA**) doit être réalisé en parallèle des échantillons traités ci-dessous.

Pour chaque lysat obtenu précédemment :

- Préparer deux tubes à hémolyse contenant chacun 1 mL de solution d'**oNPG** (*ces deux tubes correspondent à un duplicat technique*).
- Préchauffer ces tubes dans un bain thermostaté à 37°C pendant 5 minutes environ.
- Déclencher la réaction par ajout de 200 µL de lysat.
- Incuber à 37°C pendant un temps Δt minutes.
- Arrêter la réaction par ajout de 1 mL de **Na₂CO₃-EDTA** dès l'apparition dans le milieu réactionnel d'une coloration nettement visible. Rester toutefois dans des limites de 15 minutes pour le temps d'incubation Δt à 37°C. Mesurer précisément ce temps d'incubation.
- Transférer dans une semi-microcuve.
- Laisser le contenu de la semi-microcuve reposer environ 5 minutes avant la lecture de l'absorbance.
- Mesurer l'absorbance à 420 nm contre le blanc.

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

COMPTE-RENDU

7. Préciser le volume de culture permettant d'obtenir $7,5 \cdot 10^8$ bactéries par microtube [**partie B11**]. Justifier.
8. Préciser le rôle du chloramphénicol utilisé en **parties B21** et **B22**.
9. Discuter la pertinence de la composition du « blanc » utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique.
10. Calculer pour chaque échantillon :
$$\text{« } \Delta A_{420} \text{ normalisé »} = \frac{A_{420} \times 1000}{\Delta t} \times \frac{1}{A_{600}}$$

La valeur de A_{420} utilisée sera la moyenne des duplicats techniques
Tous les résultats, bruts et issus d'un calcul, seront regroupés dans un seul tableau.
11. Comparer les valeurs de « ΔA_{420} normalisée », et calculer, pour chaque souche, le rapport entre le ΔA_{420} normalisé sur membrane filtrante et le ΔA_{420} normalisé en suspension.
12. Conclure sur l'effet de l'attachement sur l'expression de *manC* et sur le rôle du régulateur **Y**.

PARTIE C

Effet du stress oxydant sur la croissance bactérienne

Le stress oxydant peut être défini comme un excès d'espèces oxydantes au sein de la bactérie : ce sont essentiellement les espèces réactives à l'oxygène (ERO). Ces espèces peuvent endommager l'ADN, les protéines et les lipides. Cet excès est dû soit à une carence au niveau des systèmes de défense soit à une surproduction d'ERO. Le stress oxydant, à travers la production d'ERO, est une conséquence naturelle du métabolisme aérobie.

E. coli est capable de résister à de multiples stress environnementaux et plus précisément au stress oxydant. Dans le but d'identifier un régulateur de la réponse au stress oxydant, un mutant d'un régulateur transcriptionnel **Z** a été construit.

On se propose de suivre la croissance de la souche sauvage et du mutant en absence et en présence de peroxyde d'hydrogène afin de mettre en évidence si l'invalidation du régulateur **Z** provoque une hyper-sensibilité ou une hyper-résistance aux peroxydes.

Cultures

Cultures de 18 h à 37°C en bouillon LB, en tubes à hémolyse contenant 3 mL :

Ec3

E. coli, souche de référence

Ec4

E. coli, souche délétée Δ régulateurZ

Réactifs

H₂O₂ 30 % : solution de peroxyde d'hydrogène à 30 % (m/m) 1 mL en microtube jaune, en glace

Données :

- $M_{H_2O_2} = 34,01 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
- **Densité de la solution à 30 % (m/m) fournie : 1,11**

Matériel spécifique

Tubes à essai stériles à bouchon à vis

MANIPULATIONS

C1- Préparation des cultures ajustées

À partir de chaque souche (**Ec3**, **Ec4**), préparer une culture ajustée à $A_{600} \approx 0,1$ en bouillon **LB**. Pour cela :

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de la souche judicieusement diluée contre un blanc adapté.
- Préparer, dans un tube à essai à bouchon à vis, 15 mL de culture ajustée.
- Vérifier l'absorbance à 600 nm de chaque culture ajustée à t_0 .

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

C2- Suivi opacimétrique de la croissance

- Incuber les deux tubes à essai à 37°C sous agitation à 140 rpm.
- Mesurer l'absorbance à 600 nm de chaque culture à t_{1h} contre un blanc adapté.
- Pour chaque culture :
 - répartir 5 mL de culture dans deux tubes à hémolyse ;
 - dans un des deux tubes à hémolyse, ajouter le peroxyde d'hydrogène de manière à obtenir une concentration finale d'environ $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ en H_2O_2 dans le milieu de culture.
- Incuber les quatre tubes à hémolyse à 37°C sous agitation à 140 rpm.
- Mesurer l'absorbance à 600 nm de chaque culture à t_{2h} et t_{3h} contre un blanc **LB**.

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

COMPTE-RENDU

13. Présenter les calculs ainsi que le mode opératoire permettant la réalisation des cultures ajustées.
14. Préciser le volume de solution de peroxyde d'hydrogène ajoutée. Justifier.
15. Consigner les résultats des mesures au spectrophotomètre dans un tableau.
16. Interpréter les résultats obtenus.
17. Conclure sur l'effet du stress oxydant et sur le rôle du régulateur **Z**.

PARTIE D

Effet d'un choc osmotique sur la viabilité bactérienne

La protéine régulatrice pléiotrope **X** est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires [voir **partie A**] et affecte notamment l'expression de gènes régulés par des facteurs de l'environnement tels que le pH et l'osmolarité.

Dans cette étude, il s'agira de comparer la viabilité de deux souches dans deux conditions d'osmolarité : une souche de référence et une souche délétée du gène codant la protéine régulatrice pléiotrope **X**.

Cultures

Cultures de 18 h à 37°C en bouillon LB, en tubes à essai contenant 10 mL :

Ec5	<i>E. coli</i> , souche de référence
Ec6	<i>E. coli</i> , souche délétée $\Delta\text{facteurX}$

Milieux de culture

Eau physiologique stérile	50 mL en flacon
Milieu K5 + 0,4 % glucose	50 mL en flacon
Milieu K5 + 0,4 % glucose + 3 mol·L⁻¹ NaCl	50 mL en flacon
[Composition du milieu K5 : K ₂ HPO ₄ (2 mmol·L ⁻¹), KH ₂ PO ₄ (1 mmol·L ⁻¹), (NH ₄) ₂ SO ₄ (8 mmol·L ⁻¹) Citrates de sodium (1 mmol·L ⁻¹), MgSO ₄ (0,4 mmol·L ⁻¹), FeSO ₄ (6 μmol·L ⁻¹), vitamine B1 (3 μmol·L ⁻¹)]	
4 géloses PCA , coulées en boîte de Petri	

Matériel spécifique

Microplaque stérile à fond rond + couvercle (à conserver pour la **partie A**)

MANIPULATIONS

D1- Préparation des cultures

À partir de chaque souche (**Ec5, Ec6**), préparer deux cultures ajustées à $A_{600} \approx 0,05$. Pour cela :

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de chaque souche judicieusement diluée contre un blanc adapté.

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

- Préparer, dans un tube à essai, 10 mL de culture ajustée en milieu **K5 + 0,4% glucose**.
- Préparer, dans un tube à essai, 10 mL de culture ajustée en milieu **K5 + 0,4% glucose + 3 mol·L⁻¹ NaCl**.

Il est inutile de vérifier l'absorbance obtenue pour les suspensions ajustées.

D2- Test de survie au choc osmotique

- Incuber les tubes à essai à 37°C sous agitation à 140 rpm pendant 1 h.
- Placer les tubes dans la glace.

D3- Dénombrements

À partir de chaque culture à t_{1h} , réaliser les dénombrements :

- Préparer en microplaque et en eau physiologique sous un volume total de 200 μL, des dilutions décimales en série allant jusqu'à 10^{-6} .
- Selon le gabarit fourni en **annexe 3**, déposer 5 μL de chaque dilution (par pipetage inverse) sur une gélose **PCA**.

Réaliser un dépôt devant un examinateur.

- Laisser sécher les gouttes.
- Incuber à 30°C pendant 24 h.

COMPTE-RENDU

18. Présenter l'ensemble des résultats des mesures au spectrophotomètre, les calculs, ainsi que le mode opératoire permettant la réalisation des suspensions ajustées dans la **partie D1**.

PARTIE E

Effet du pH sur la mobilité bactérienne

L'objectif est ici de mettre en évidence la mobilité éventuelle de deux souches d'*E. coli* par une technique indirecte : une souche de référence et une souche délétée du gène codant la protéine régulatrice pléiotrope **X** (souches identiques à celles utilisées dans la **partie D**).

Cultures

Culture de 18 h à 30°C sur gélose inclinée de LA à **pH 7** :

Ec5 pH7

E. coli, souche de référence

Ec6 pH7

E. coli, souche délétée Δ *facteurX*

Milieux de culture

Gélose semi-solide **TS 0,3 % pH 7** en agar : 1 boîte carrée 120 x 120 (« boîte à nage »)
[Tryptone ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), NaCl ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), agar ($3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ajustée à pH 7]

Gélose semi-solide **TS 0,5 % pH 4,6** en agar : 1 boîte carrée 120 x 120 (« boîte à nage »)
[Tryptone ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), NaCl ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), agar ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ajustée à pH 4,6]

MANIPULATIONS

E1- Observation de la mobilité des souches sur « boîte à nage »

Chaque boîte à nage (géloses **TS 0,3% pH 7** et **TS 0,5% pH 4,6**), doit être ensemencée avec chacune des souches (**Ec5 pH7** et **Ec6 pH7**) selon le mode opératoire suivant :

- Piquer la culture avec l'extrémité boutonnée d'une pipette Pasteur.
- Inoculer la « boîte à nage » en piquant légèrement la surface de la gélose en un point.
- Incuber à 30°C pendant 18 h, en prenant soin de **ne pas retourner** les boîtes.

COMPTE-RENDU

19. Justifier la composition des milieux des « boîtes à nage » utilisés pour l'étude de la mobilité.

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

ANNEXE 1
Souches et plasmides utilisés dans le sujet

SOUCHES OU PLASMIDES		GENOTYPE / PHENOTYPE	COMMENTAIRE
Shigella flexneri	Sf1	$\Delta lacZ$ $mxuC::Mu d(Km^R lacZ)$	Souche de <i>Shigella flexneri</i> non pathogène. Dans cette souche, le gène <i>mxuC</i> est interrompu par un transposon Mu contenant le gène <i>lacZ</i> et le gène de résistance à la kanamycine. Souche résistante à la kanamycine. <i>mxuC</i> code une protéine du système de transport membranaire de type III (T3SS), intervenant dans la sécrétion de facteurs de virulence.
	Sf2	$\Delta lacZ$ $mxuC::Mu d(Km^R lacZ)$ $\Delta facteurX$ Tet^R	Sf1 délétée du gène codant la protéine régulatrice pléiotrope X . Souche résistante à la kanamycine et à la tétracycline.
Escherichia coli	Ec1	$\Delta lacZ$ $\lambda(P_{manC}::lacZ)$ Km^R	Souche d' <i>Escherichia coli</i> non pathogène. Dans cette souche, une construction <i>lacZ</i> sous le contrôle du promoteur du gène <i>manC</i> a été introduite. Souche résistante à la kanamycine. <i>manC</i> code une protéine impliquée dans la production d'acide colanique.
	Ec2	$\Delta lacZ$ $\lambda(P_{manC}::lacZ)$ $\Delta régulateurY$ Km^R	Ec1 délétée du gène codant le régulateur Y . Souche résistante à la kanamycine.
	Ec3	Sauvage	Souche d' <i>Escherichia coli</i> non pathogène.
	Ec4	$\Delta régulateurZ$ Cm^R	Ec3 délétée du gène codant le régulateur Z . Souche résistante au chloramphénicol.
	Ec5	Sauvage	Souche d' <i>Escherichia coli</i> non pathogène.
	Ec6	$\Delta facteurX$ Km^R	Ec5 délétée du gène codant la protéine régulatrice pléiotrope X . Souche résistante à la kanamycine.
PLASMIDES	pBR322	--	Vecteur de clonage conférant la résistance à l'ampicilline.
	pBR322-X	--	Vecteur pBR322 recombinant contenant le gène codant le régulateur pléiotrope X . Plasmide conférant la résistance à l'ampicilline.

ANNEXE 2

Mode opératoire de filtration (partie B12)

A – PRINCIPE

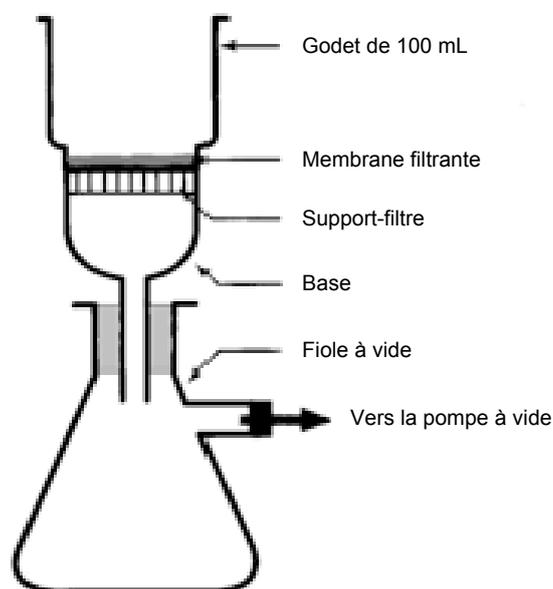
La membrane filtrante utilisée présente des pores de **0,45 µm** de diamètre, qui laissent passer le liquide, mais pas les bactéries. Toutes les bactéries initialement contenues dans le volume de liquide filtré se retrouvent donc sur la membrane filtrante, qui est ensuite reportée à la surface d'une gélose adaptée pour incubation.

B – APPAREILLAGE

Un appareil de filtration est un système de filtration sous pression réduite (trompe à vide), qui comprend :

- une **base** en inox, en forme d'entonnoir, qui plonge dans une **fiolle à vide** (reliée à une **pompe à vide**) ;
- un **support-filtre** en verre fritté, sur lequel on dépose la membrane filtrante ;
- un **godet** s'adaptant étanchement sur le support-filtre à l'aide d'une pince bleue, et destiné à recevoir l'échantillon à filtrer ;
- une **membrane filtrante** (ester de cellulose, pores 0,45 µm) quadrillée.

Le tout doit être stérilisable et placé en zone de stérilité (près d'un bec).



C – TECHNIQUE

1. METTRE EN PLACE LE SYSTEME DE FILTRATION

- Sortir stérilement le système de filtration (base, support et godet) du papier aluminium.
- Placer l'ensemble sur la fiole à vide.
- Enlever le godet et le poser sur un fond de boîte de Petri stérile placé dans la zone d'aseptie.
- Sortir une membrane 0,45 µm de son emballage à l'aide de la pince stérilisée.
- Placer la membrane (quadrillage vers le haut) sur le support-filtre, à l'aide de la pince stérile, en ayant pris soin d'enlever le papier de protection.
- Flamber le bas du godet et le laisser refroidir.
- Placer délicatement le godet sur la membrane sans la léser ni la déplacer.
- Fixer le godet sur le support-filtre avec la pince bleue.

2. HUMIDIFIER LA MEMBRANE

- Humidifier la membrane filtrante en versant un peu d'eau distillée stérile.
- Faire doucement le vide et vérifier que le système est étanche (pas de fuite) et fonctionne correctement (bonne filtration).

-
- Casser le vide (fermer le robinet et débrancher le tuyau d'aspiration)

3. FILTRER L'ECHANTILLON

- Verser doucement le premier échantillon de 10 mL de cellules resuspendues en **PBS 1X** [**partie B12**] à la surface de la membrane filtrante, dans le godet.
- Faire doucement le vide (ne pas briser la membrane filtrante) et filtrer.
- Verser environ 30 mL de **PBS 1X** pour rincer les parois internes du godet. Filtrer.
- Recommencer l'opération de lavage en **PBS 1X** (30 mL).
- Sécher la membrane en aspirant plusieurs fois.

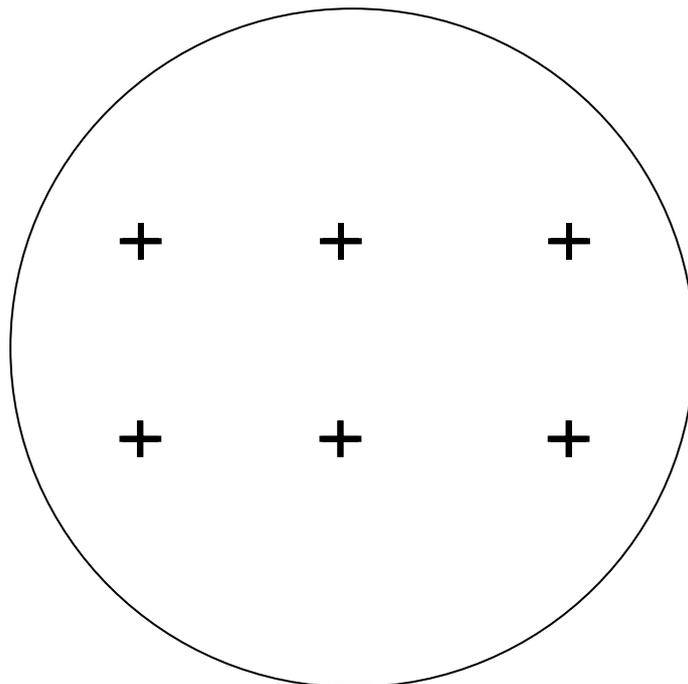
4. INCUBER LA MEMBRANE

- Débrancher le tuyau (casser le vide).
- Enlever le godet, le flamber et le poser sur un fond de boîte de Petri stérile.
- Retirer délicatement la membrane à l'aide de la pince stérile.
- La poser sur une gélose **LA** préchauffée à 30°C en BP90 (sans faire de bulles, et sans la retourner, la nutrition des bactéries se faisant au travers).
- Incuber ce milieu 2 h 30 à 30°C.

Recommencer les étapes **1** à **4** pour le deuxième échantillon.

ANNEXE 3

Gabarit pour les dépôts (partie D3)



TRAVAIL DU DEUXIÈME JOUR

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

PARTIE A

Effet de la température sur l'expression d'un gène de virulence

MANIPULATIONS

A31- Repiquage des souches Sf1 et Sf2

- Observer les cultures à 30 et 37°C pour chaque souche.

A32- Test de viabilité des bactéries compétentes Sf2^{comp}

- Dénombrer les colonies issues du tube ③ %Viab.

A33- Dénombrement des suspensions préparées

- Observer et dénombrer les colonies à 30 et 37°C, pour chaque transformation (④ **Essai** et ② **Témoin**).

COMPTE-RENDU

20. Calculer le nombre des bactéries compétentes survivantes sur milieu **LA**. Comparer au nombre de bactéries traitées au départ de la transformation. Conclure.
21. Présenter dans un tableau les résultats quantitatifs et qualitatifs des dénombrements des bactéries transformées sur milieu sélectif.
22. Calculer, pour chaque plasmide, la proportion de bactéries transformées par rapport aux bactéries survivantes après la compétence.
23. Calculer, pour chaque plasmide, le nombre de transformants par µg de plasmide.
24. Comparer les résultats qualitatifs obtenus après transformation aux résultats des observations macroscopiques des isollements sur **LA+Xgal** des souches fournies.
25. Conclure.

PARTIE D

Effet d'un choc osmotique sur la viabilité bactérienne

MANIPULATIONS

D3- Dénombrements

- Dénombrer les colonies obtenues dans chaque condition d'osmolarité.

COMPTE-RENDU

26. Présenter la lecture des résultats obtenus sous forme de tableau.
27. Calculer, pour chaque souche, le rapport entre la concentration bactérienne après culture en présence et la concentration bactérienne en absence de NaCl.
28. Conclure.

PARTIE E

Effet du pH sur la mobilité bactérienne

MANIPULATIONS

E1- Observation de la mobilité des souches sur « boîte à nage »

- Observer les halos de culture autour des points d'inoculation.

E2- Observation de la mobilité des souches à l'état frais

Cultures

Cultures de 18 h à 30°C sur gélose inclinée de LA à pH 7 et à pH 4,6 :

Ec5 pH 7

Ec5 pH 4,6

E. coli, souche de référence

Ec6 pH 7

Ec6 pH 4,6

E. coli, souche délétée Δ facteurX

- À partir des cultures sur gélose inclinée des souches fournies, réaliser quatre observations microscopiques à l'état frais **à partir de l'eau de condensation** au fond du tube.

Montrer à un examinateur les observations microscopiques avec leur compte-rendu.

COMPTE-RENDU

29. Présenter la lecture des résultats obtenus (boîtes à nage et état frais) sous forme de tableau.

30. Analyser et interpréter les résultats obtenus pour les **parties E1 et E2.**

BILAN DES PARTIES A, D ET E

COMPTE-RENDU

31. Discuter le rôle de la protéine régulatrice pléiotrope **X** chez les Entérobactéries.

Bibliographie

- The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. Lionel Ferrières, David J. Clarke. *Molecular Microbiology* (2003), volume 50(5), pp 1665-1682
- Enhancing *E. coli* Tolerance towards Oxidative Stress via Engineering Its Global Regulator cAMP Receptor Protein (CRP). Souvik Basak, Rongrong Jiang. *PLOS ONE* (2012), volume 7(12), e51179
- Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: the role of H-NS protein. Olga A. Soutourina & al. *Microbiology* (2002), 148, pp1543–1551
- Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. Florence Hommais & al. *Molecular Microbiology* (2001), 40(1), pp20-36

Les souches d'E. coli utilisées dans ce sujet sont issues de l'Institut Pasteur. Les souches de Shigella flexneri utilisées dans ce sujet sont issues de la collection du Trinity College (Dublin).

RAPPORT

**Établi par : Christophe Beloin, Joëlle Bissery, Fabien Cézard, Pascal Chillet,
Mélanie Ferrières**

Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : 11,0 / 20

Meilleure note : 18,3 / 20

Note la plus basse : 3,1 / 20

24 notes sur 40 (60 %) sont supérieures ou égales à 10 / 20

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

COMMENTAIRES GÉNÉRAUX SUR L'ÉPREUVE

Le sujet portait sur l'étude des effets des conditions environnementales sur la physiologie bactérienne.

Aspects techniques

Le sujet ne présentait pas de difficultés techniques particulières :

- ajustages de suspensions ;
- suivis de croissance par opacimétrie ;
- transformation d'une souche bactérienne ;
- dilutions en microplaque ;
- dénombrement en surface ;
- filtration sur membrane ;
- détermination d'activités enzymatiques par méthode en deux points ;
- ensemencements sur boîte à nage ;
- observations microscopiques à l'état frais.

Certains gestes techniques devaient être réalisés devant un examinateur afin d'être évalués : mesure au spectrophotomètre, prélèvement de croissance, réalisation d'une dilution, transfert de membrane filtrante, dépôt d'une dilution sur gélose PCA par pipetage inverse et observation microscopique à l'état frais. Il est regrettable que certains candidats oublient encore d'appeler le jury pour montrer des gestes qui sont pourtant indiqués dans le sujet. Cela est dommage car ces gestes sont généralement des gestes de microbiologie classique qui peuvent facilement rapporter des points.

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

- 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 ;
- les prélèvements du suivi de croissance doivent être réalisés à la pailleuse en zone stérile et non devant ou dans le bain thermostaté agité ;
- le matériel nécessaire à la rédaction du compte rendu (sujet, copies, trousse, stylos...) ne doit pas se trouver sur la pailleuse mais sur la tablette prévue à cet effet ;
- le port de bagues et bracelets n'est pas compatible avec la manipulation de souches bactériennes de classe 2.

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, les réactifs et la poubelle contenant de l'eau de Javel de telle sorte à ne pas croiser les bras.

Il est nécessaire à nouveau d'insister sur la nécessité **d'identifier et d'annoter très clairement** les boîtes incubées.

Quatre des cinq parties nécessitaient l'ajustage des cultures fournies. Cette manipulation est extrêmement classique et apparaît chaque année dans l'épreuve de travaux pratiques de microbiologie. Cette année, une majorité des candidats a réalisé ce travail préliminaire à chaque partie rapidement et efficacement.

Au vu de la densité des manipulations à réaliser, il semble évident que si, pour des raisons d'organisation, le candidat doit opérer un choix dans la priorité donnée aux différentes manipulations, ce choix se portera sur des manipulations incluant des ensemencements à lire au deuxième jour, sans pour autant négliger les autres dans la mesure du possible.

Aspects rédactionnels du compte-rendu

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

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

Beaucoup trop de candidats rédigent au brouillon leur compte-rendu au lieu d'écrire directement sur la copie. D'autres recopient de manière rédigée le protocole au brouillon ce qui ne présente aucun intérêt. C'est ainsi que certains d'entre eux ont rendu des copies presque blanches ou certaines parties non rédigées sur leurs copies alors que les éléments de réponse se trouvaient dans leurs brouillons.

Concernant l'ajustage des cultures fournies, il est préférable de présenter les résultats et les calculs sous forme d'un tableau. Il est plus judicieux de calculer directement ce volume sans passer par un calcul de facteur de dilution ou de concentration bactérienne. Certains n'ont pas expliqué leur raisonnement, d'autres ont expliqué leur démarche trop précisément dans le moindre détail sur plusieurs pages de copies alors qu'un seul calcul suffit pour déterminer le volume de culture à prélever afin d'obtenir une suspension ajustée à partir de l' A_{600} mesurée. Une explication trop détaillée est du temps perdu particulièrement préjudiciable pour arriver à mener à bien l'ensemble des manipulations.

Sur le fond, trop peu de candidats ont réussi à interpréter les expériences avec rigueur en utilisant les données fournies. Les interprétations et conclusions sont trop souvent succinctes voire absentes montrant des difficultés à s'approprier le sujet et la problématique avec suffisamment de recul.

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.

PARTIE A

Effet de la température sur l'expression d'un gène de virulence

Il était proposé de mettre en évidence l'effet de la température sur l'expression du gène *mxiC* (gène codant une protéine du système de transport membranaire de type III intervenant dans la sécrétion de facteurs de virulence) grâce à une construction génétique utilisant le gène *lacZ* comme rapporteur de l'activité du promoteur de *mxiC*, ce promoteur étant contrôlé par une protéine régulatrice pléiotrope **X**.

Dans une première étape, on réalisait une culture de la souche **Sf2** (souche délétée *DfacteurX*). Le suivi de croissance était effectué par opacimétrie et la croissance était stoppée lorsque l'absorbance à 600 nm était comprise entre 0,30 et 0,35.

L'inoculation de l'Erlenmeyer de culture impliquait de démarrer à la croissance à une A_{600} de 0,08 : selon la mesure initiale de la préculture fournie, il était parfois nécessaire d'inoculer avec un volume supérieur à celui dont on disposait. Il convenait alors d'inoculer l'Erlenmeyer avec l'ensemble de la

préculture : la A_{600} de départ était alors plus faible, mais la culture permettait quand même d'atteindre la valeur attendue. Trop peu de candidats ont discuté cet aspect.

Dans une deuxième étape, les bactéries **Sf2** étaient rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium puis transformées par choc thermique :

- soit par le plasmide **pBR322** (témoin) ;
- soit par le plasmide recombinant **pBR322-X** contenant le gène codant le facteur pléiotrope **X** (essai).

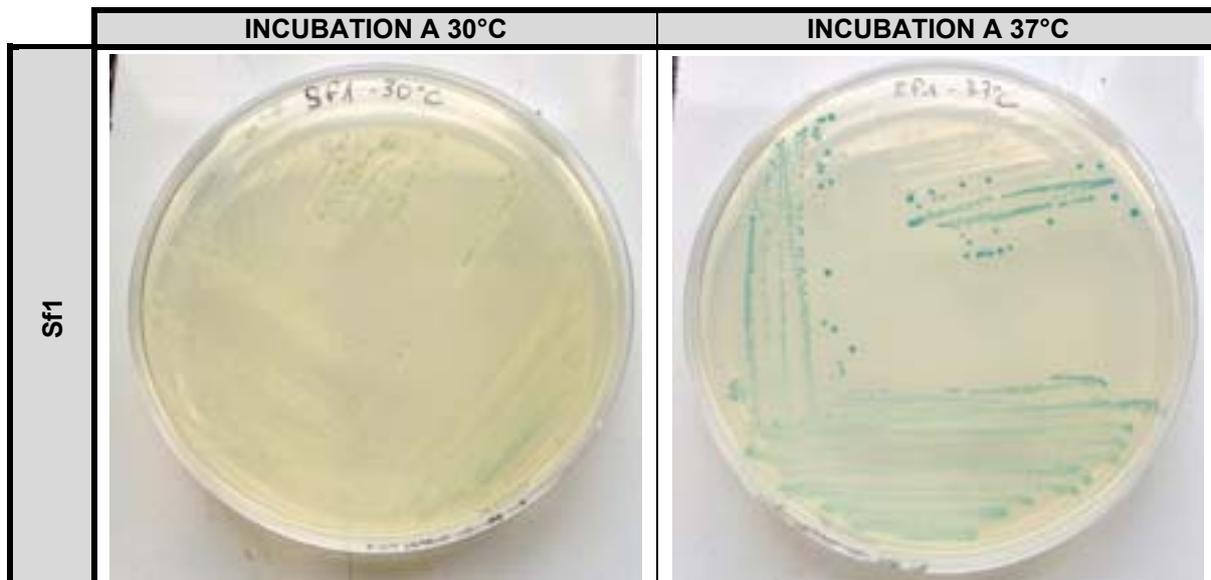
Cette étape ne présentait pas de difficulté technique, le protocole étant bien détaillé. En revanche, il fallait bien prendre en compte le volume (et donc le nombre) de bactéries traitées, car cette valeur servait pour des calculs ultérieurs (notamment pour prévoir le nombre de colonies sur les boîtes de dénombrement des bactéries survivantes après la compétence) : pour chaque transformation, on traitait $1,5 \times 2$ (par microtube) $\times 2$ (après regroupement des tubes deux à deux), soit 6 mL.

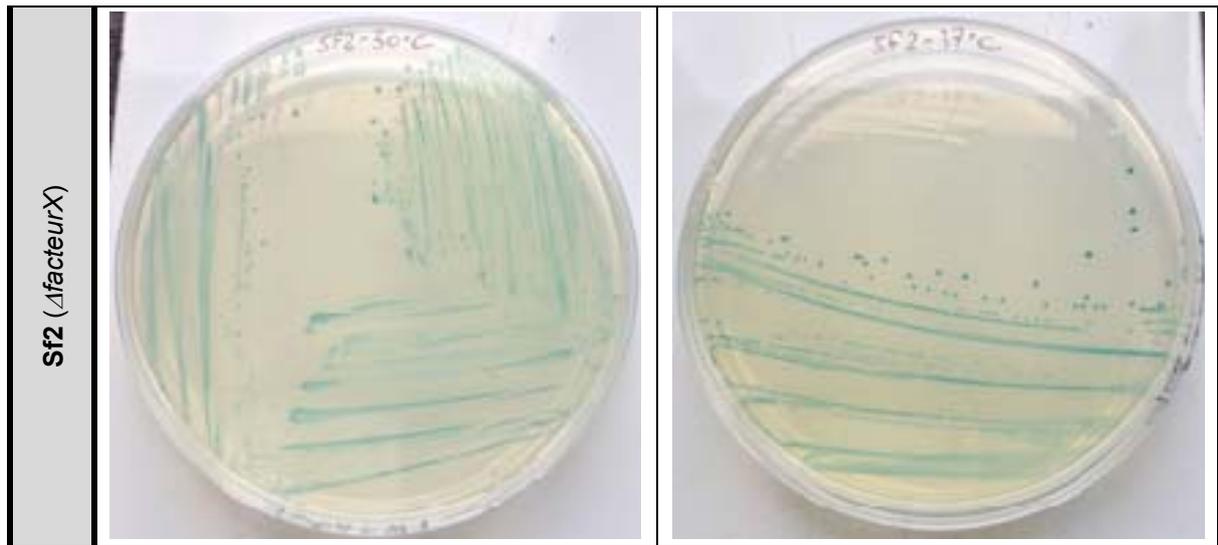
Dans une troisième étape, différents ensemencements étaient réalisés :

- des isoléments des souches **Sf1** (non délétée) et **Sf2** (délétée *DfacteurX*) sur LA+Xgal. Il convient de noter que certains candidats ne maîtrisent pas la technique d'isolement qui est une technique de base de microbiologie ;
- un test de viabilité des bactéries compétentes **Sf2^{comp}** par dénombrement en surface après dilutions ;
- un dénombrement en surface des bactéries transformées sur LA+Xgal+Ap.

Les phénotypes obtenus des quatre souches sur LA+Xgal et sur LA+Xgal+Ap étaient les suivants :

Souche	INCUBATION A 30°C	INCUBATION A 37°C
Sf1	Colonies blanches : lactose -	Colonies bleues : lactose +
Sf2 (ΔfacteurX)	Colonies bleues : lactose +	Colonies bleues : lactose +
Témoin : Sf2-pBR322	Colonies bleues : lactose +	Colonies bleues : lactose +
Essai : Sf2-pBR322-X	Colonies blanches : lactose -	Colonies bleues : lactose +





À 30°C, la souche **Sf2** délétée du gène codant le facteur **X** exprime le gène rapporteur de l'activité du promoteur de *mxiC* contrairement à la souche de référence **Sf1**. Donc, à 30°C, le facteur **X** réprime l'expression de *mxiC*. D'après les résultats obtenus à 37°C, on en déduit que le facteur **X** n'a pas d'effet à 37°C. La transformation de la souche **Sf2** (Δ facteurX) avec **pBR322-X** a permis de bien retrouver le phénotype de la souche de référence (**Sf1**) : le phénotype de dérégulation de l'expression du gène *mxiC* suite à la délétion de **X** était complété par l'apport de ce dernier grâce au plasmide **pBR322-X**.

Le deuxième jour, pour les calculs des rapports des bactéries transformées par rapport aux bactéries survivantes et des bactéries transformées par μ g de plasmide, il fallait prendre en compte le volume de bactéries ayant reçu le plasmide, ainsi que le volume de suspension étalée sur les boîtes.

Le jury a enfin relevé quelques erreurs dommageables à ce niveau d'épreuve : confusion entre transfection et transformation ; X-gal n'est pas un gène, ni un inducteur de gène...

PARTIE B

Réponse bactérienne à l'attachement sur une surface

Dans cette seconde partie, il était proposé d'étudier l'influence du mode de culture des bactéries (en suspension dans un liquide ou attachées à une surface d'une membrane) sur l'expression du gène *manC* (acide colanique) grâce à une construction génétique utilisant le gène *lacZ* comme rapporteur de l'activité du promoteur de *manC* lui-même contrôlé par le régulateur **Y** d'un système à deux composants. Deux souches d'*E. coli* étaient utilisées :

- une souche de référence (**Ec1**) ;
- une souche délétée Δ régulateurY (**Ec2**).

Dans un premier temps, il s'agissait de préparer les cultures en suspension et celles sur membrane filtrante. La réalisation de la filtration sur membrane a posé des problèmes à certains candidats. Certains d'entre eux avaient l'air de découvrir cette technique de filtration sur membrane filtrante, pourtant extrêmement classique en microbiologie.

Dans un second temps, il s'agissait, après traitement, de déterminer l'activité enzymatique des lysats bactériens par méthode enzymatique en deux points.

Les résultats des mesures spectrophotométriques permettaient de conclure que :

- l'attachement à une surface entraîne une induction de l'expression du gène *manC* ;
- cette induction est partiellement dépendante de la présence du régulateur **Y** ;
- le régulateur **Y** permet de percevoir l'attachement à une surface (système à deux composants), et, en réponse à cet attachement, stimule l'expression du promoteur du gène *manC*.

Cette manipulation nécessitant deux heures trente 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. Cette partie a été très peu traitée dans sa totalité, mais les résultats obtenus par ceux qui l'ont mis en œuvre jusqu'à son terme étaient satisfaisants.

PARTIE C

Effet du stress oxydant sur la croissance bactérienne

On se proposait dans cette partie de suivre la croissance d'une souche d'*E. coli* sauvage (**Ec3**) et d'un mutant d'un régulateur **Z** (**Ec4**) en absence et en présence de peroxyde d'hydrogène afin de mettre en évidence si l'invalidation du régulateur **Z** provoquait une hypersensibilité ou une hyper-résistance aux peroxydes.

Cette partie ne présentait aucune difficulté technique particulière.

Cependant, un trop grand nombre de candidats n'a pas réussi à déterminer le volume de peroxyde d'hydrogène (5 µL) à ajouter aux cultures pour obtenir une concentration finale à 10 mmol·L⁻¹ à partir des données fournies : masse molaire du peroxyde d'hydrogène, pourcentage (en *m/m*) et densité de la solution fournie. Un volume trop important provoquait rapidement la mort de la souche sauvage et de la souche mutante. Un volume trop faible n'entraînait aucun effet.

Avec un volume correct d'H₂O₂, les résultats d'opacimétrie montraient que :

- la souche sauvage cultivait correctement en absence ou non de peroxyde d'hydrogène ;
- la souche mutante cultivait correctement en absence de peroxyde d'hydrogène mais sa croissance était très affectée en présence de H₂O₂.

On pouvait donc conclure que :

- le peroxyde d'hydrogène crée un stress oxydant auquel le mutant est très sensible contrairement à la souche sauvage ;
- le régulateur **Z** permet de protéger la bactérie contre le stress oxydant induit par H₂O₂.

PARTIE D

Effet d'un choc osmotique sur la viabilité bactérienne

Il s'agissait ici de comparer - par dénombrements en surface par une technique en gouttes - la viabilité de deux souches d'*E. coli* dans deux conditions d'osmolarité (après culture pendant une heure en absence ou en présence de NaCl à 3 mol·L⁻¹) : une souche de référence (**Ec5**) et une souche délétée du gène codant le facteur pléiotrope **X** (**Ec6**).

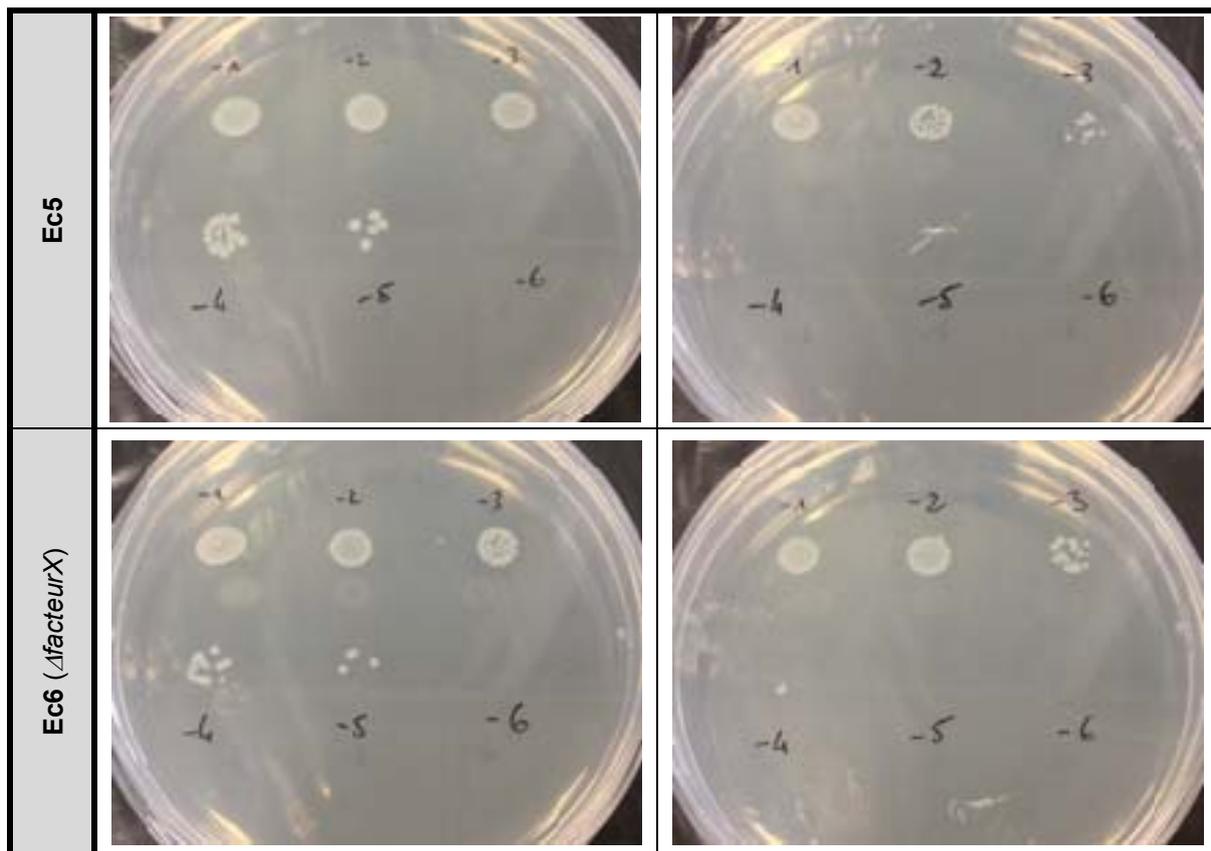
Le geste technique de la dilution en série en microplaque est correctement maîtrisé.

5 µL des dilutions de chaque culture étaient déposés par pipetage inverse sur deux géloses PCA. Ce mode de pipetage n'est pas maîtrisé encore cette année 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.

Les résultats montraient le second jour que :

- les deux souches sont moins viables en présence de NaCl ;
- la souche délétée du gène codant **X** résiste mieux à l'osmolarité que la souche de référence ;
- le facteur **X** augmente donc la sensibilité à l'osmolarité.

SANS NaCl	AVEC NaCl
-----------	-----------



Étant donné que cette méthode de dénombrement est semi-quantitative, le jury attendait des valeurs chiffrées pour montrer l'effet de X sur la résistance à l'osmolarité.

PARTIE E

Effet du pH sur la mobilité bactérienne

Dans cette dernière partie, il s'agissait de mettre en évidence l'effet du pH sur la mobilité bactérienne des deux souches d'*E. coli* utilisées dans la **partie D**. Deux techniques étaient mises en œuvre :

- le premier jour, la culture par piqûre légère à la surface de la gélose de boîtes à nage à pH 7 et à pH 4,6 ;
- le second jour, l'observation de la mobilité à l'état frais de cultures fournies des deux souches à pH 7 et à pH 4,6.

L'ensemencement des boîtes à nage ne présentait pas de difficultés techniques ; il a pourtant été parfois réalisé de façon peu soignée (inoculation inadaptée, boîtes retournées contrairement aux consignes données...).

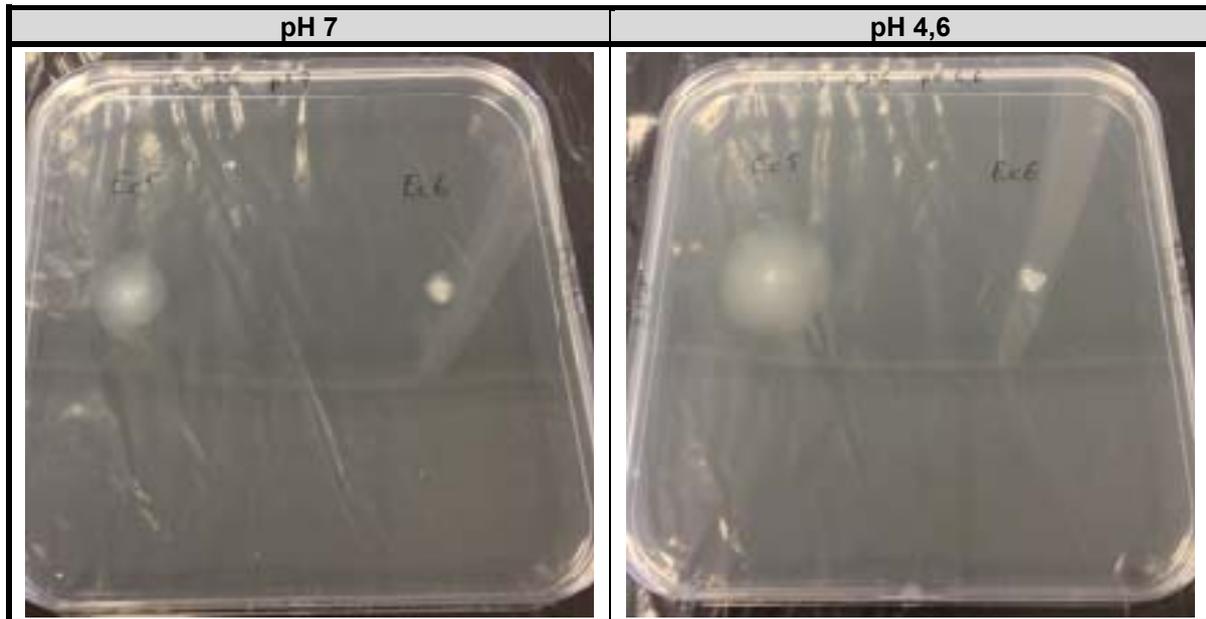
Certains candidats ont présenté des difficultés à réaliser des observations à l'état frais, technique pourtant de base en microbiologie. Un certain nombre d'erreurs ont été observées comme par exemple :

- état frais observé à l'objectif x100 sans lamelle ;
- lame inondée de culture sur laquelle baigne la lamelle ;
- réglage de la lumière inadaptée pour ce type d'examen microscopique.

Les résultats en boîte à nage et à l'état frais étaient concordants :

- la souche de référence (**Ec5**) est mobile contrairement à la souche délétée Δ facteurX (**Ec6**) ;
- la souche de référence est plus mobile à pH acide.

On pouvait donc en déduire un rôle de **X** dans le contrôle positif de la mobilité, et un effet positif sur la mobilité en conditions de pH acide.



BILAN DES PARTIES A, D ET E

Les résultats obtenus permettaient de conclure à un rôle pléiotropique du facteur **X** sur différentes voies physiologiques :

- expression de gènes de virulence en fonction de la température ;
- tolérance à l'osmolarité ;
- contrôle de la mobilité.

Cette épreuve de travaux pratiques permettait, au final, d'illustrer l'effet des conditions environnementales sur différentes voies physiologiques bactériennes, et le fait que ces effets étaient médiés par différents régulateurs.

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE GENERALE ET ANALYTIQUE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

SUJET

Sujet proposé par : Xavier Bataille, Romain Barbe, Hélène Carrie, Sophie Warin

Ce sujet a pour but d'étudier les constituants d'un bain de bouche utilisé notamment pour le traitement d'infections. Il est composé de plusieurs antiseptiques et excipients.

Il est proposé dans la partie expérimentale de déterminer la concentration de deux des excipients dans une solution (notée **A**) simulant le bain de bouche. Il est notamment demandé d'établir une démarche permettant d'accéder à la concentration du colorant E131.

Cette partie est suivie d'une étude théorique portant sur un excipient présent dans le bain de bouche et couramment rencontré dans les produits agroalimentaires et pharmaceutiques : le menthol.

<p>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 1). Les résultats expérimentaux seront consignés dans la feuille de résultats fournie en annexe.</p>
--

A. PARTIE EXPERIMENTALE

Notice du bain de bouche.

PA : Cétalpyridinium (5 mg/ 100g), Chlorbutanol (50 mg/ 100g), Eugénol (4 mg/ 100g).
Excipients : Ethanol (21°), Sodium hydroxyde (E524), Citrique acide (E330), Huile de ricin hydrogénée polyoxyéthylénée, Saccharine sodique (E954), Menthe, Eau purifiée, Bleu patenté V (E131).

1. Que signifie PA ? Quel est le rôle de chacun des excipients ?

Pour des raisons pratiques, ce bain de bouche a été remplacé par le flacon **A** constitué plus simplement de colorant (E131), d'acide citrique (E330) à $C_{\text{acide citrique}} \sim 4 \text{ mmol.L}^{-1}$.

A.1. Mise au point d'un protocole

L'objectif de cette première manipulation consiste à mettre au point puis rédiger un protocole expérimental en vue de déterminer, le plus précisément possible, la concentration en colorant E131 présent dans le flacon **A**. Le matériel mis à votre disposition se compose d'une série de 6 fioles jaugées de 25 mL, de deux éprouvettes (10 mL et 25 mL), de pipettes jaugées et graduées (1, 5, 10 et 15 mL), d'une burette de 25 mL, de 2 béchers de 100 mL, de 10 cuves de spectrophotométrie en PVC, de 100 mL d'une solution calibrée (**E**) de bleu patenté E131 à $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$. Les spectres d'absorption des solutions **E** et **A** sont donnés en annexe 2.

Après avoir réfléchi à un protocole et réalisé quelques tests, le mettre en application.

Appeler le jury une fois vos premiers résultats obtenus.

2. Rédiger une feuille de résultats compilant les valeurs (tableaux, concentrations, incertitudes éventuelles). La concentration en bleu patentée dans le flacon **A** devra être exprimée en mg.L^{-1} .
3. En termes d'incertitudes, quelle distinction faites-vous entre justesse et fidélité ? Le protocole que vous avez proposé est-il juste ? fidèle ? Discuter de la précision des résultats obtenus.
4. Rédiger un protocole à destination d'élèves de seconde.

A.2. Titrage d'un excipient

Réaliser le titrage par suivi pH-métrique d'une prise d'essai de 10 mL de la solution contenue dans le flacon **A** par une solution d'hydroxyde de sodium à la concentration $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. Placer dans le milieu réactionnel également quelques gouttes d'un indicateur coloré adapté à la détection du volume à l'équivalence.

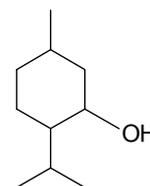
5. Justifier le choix de l'indicateur coloré par une estimation du calcul du pH à l'équivalence.
6. Consigner les résultats obtenus dans la feuille de résultat page 21/21. Ne pas oublier de restituer la courbe de titrage tracée, au choix, sur papier millimétré ou à l'aide d'un tableur-grapheur.
7. Proposer une interprétation de la différence constatée entre C_1 (concentration obtenue par pH-métrie) et C_2 (concentration obtenue par utilisation d'un indicateur de fin de réaction).
8. Le bain de bouche contient également un additif alimentaire codé E524. Interpréter la courbe de titrage d'une prise d'essai de 10 mL de bain de bouche commercial par de la soude à $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ représentée en annexe 3.

Peut-on envisager d'en déduire la concentration en E524 ?

B. LE MENTHOL

Le menthol a pour formule topologique :

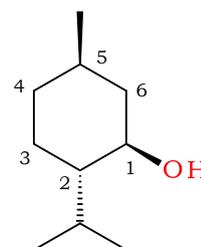
Le **menthol** est un des arômes les plus vendus dans le monde. La molécule représentée ci-dessus existe sous la forme de plusieurs stéréoisomères. Le (-)-menthol est l'espèce naturelle présentant le goût frais. En revanche, le (+)-menthol a également un goût mentholé mais cependant moins marqué.



B.1. Etude du menthol

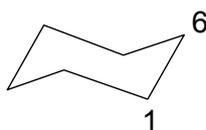
9. Donner le nom du menthol en nomenclature systématique. On rappelle que la groupe alkyle $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$ se nomme isopropyle en nomenclature courante (ou 1-méthyléthyle en nomenclature systématique).

10. Combien de stéréoisomères de configuration présente le menthol ? Justifier la réponse.
11. Quelle est la signification du signe (-) dans le (-)-menthol ?
12. Préciser le descripteur stéréochimique (ou configuration absolue) de chaque atome de carbone asymétrique du (-)-menthol. Justifier la réponse.



(-)-menthol

13. Représenter en perspective une conformation « chaise » du (-)-menthol. On utilisera la représentation ci-dessous :



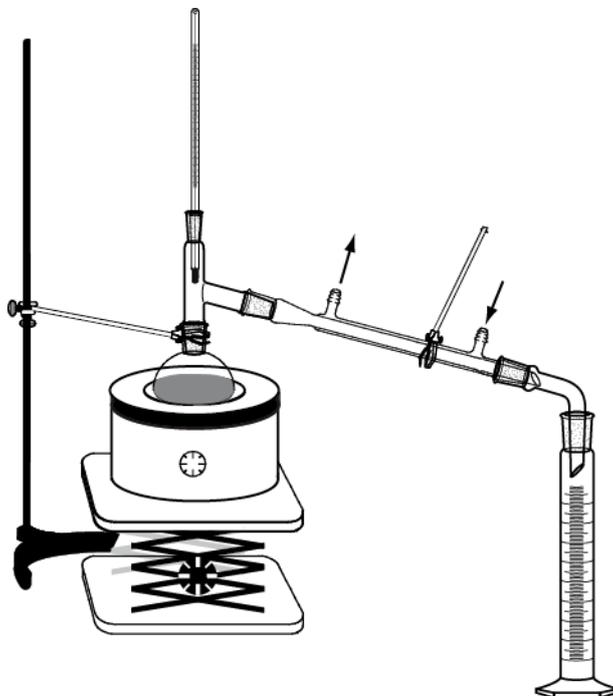
14. La conformation représentée à la question précédente est-elle la plus stable ?
15. Les configurations des atomes de carbone asymétriques sont-elles modifiées lors de l'interconversion du cycle ?

B.2. Production du menthol

Le menthol est utilisé dans de nombreux domaines qui vont de l'agroalimentaire aux produits pharmaceutiques en passant par les produits cosmétiques. La production mondiale annuelle de menthol dépasse aujourd'hui les 25000 tonnes et la demande ne cesse d'augmenter. Jusque dans les années 1980, le menthol était essentiellement produit par extraction. Aujourd'hui trois procédés de synthèse industriels permettent de compléter cette production.

B.2.1. Extraction du (-)-menthol

Il existe une grande variété d'espèces de menthe. La menthe des champs (essentiellement produite au Paraguay, Japon, Chine, Corée et Inde) et la menthe poivrée (essentiellement produite aux Etats-Unis, Chine et Europe) sont les deux espèces de menthe les plus riches en (-)-menthol. L'extraction de l'huile essentielle de menthe peut se faire par hydrodistillation de feuilles de menthe sèches. Le montage ci-dessous est utilisé. L'huile essentielle est récupérée puis refroidie pour faire cristalliser le (-)-menthol.



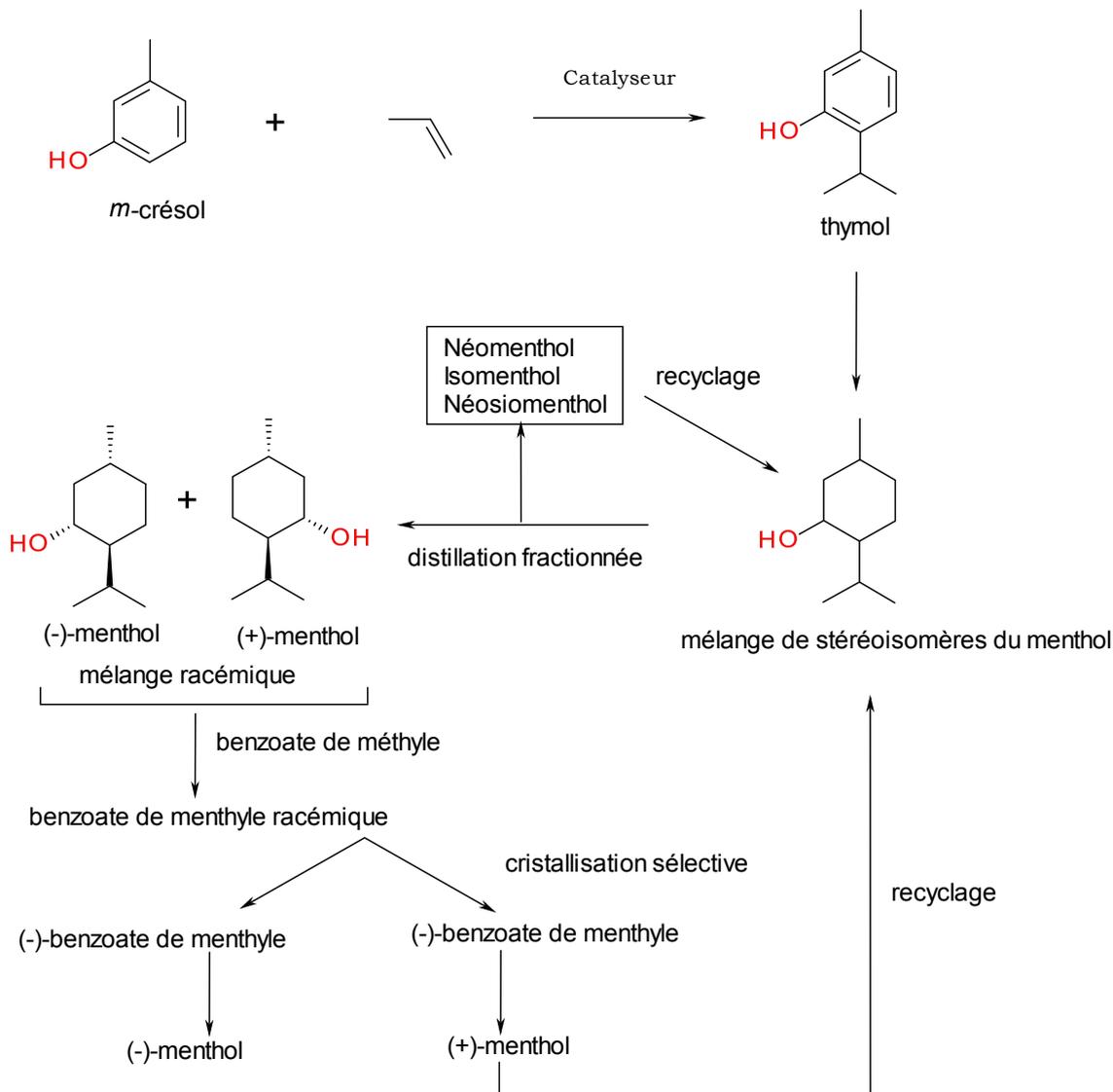
Montage d'hydrodistillation

16. Quel est le principe d'une hydrodistillation ?
17. Le mélange obtenu à la sortie du dispositif est biphasique. Justifier.

De nombreuses synthèses et héli-synthèses du (-)-menthol ont été développées au cours du XX^e siècle dans le but d'augmenter la production et de s'affranchir, entre autres, des aléas climatiques. La principale difficulté lors de la synthèse est l'obtention du (-)-menthol sous une forme énantiomériquement pure, la synthèse d'une molécule chirale effectuée sans précautions conduisant à un mélange racémique. Trois procédés industriels sont aujourd'hui utilisés, les procédés de la société Symrise (allemande), Takasago (japonaise) et BASF (allemande). Nous allons nous intéresser aux deux premiers procédés.

B.2.2. Procédé Symrise (1973)

Les principales étapes du procédé Symrise sont données ci-dessous :



Les deux premières étapes de ce procédé permettent la transformation du *m*-crésol en stéréoisomères du menthol.

Transformation du *m*-crésol en thymol

18. Quel est le nom de la réaction permettant de transformer le *m*-crésol en thymol ?
19. Proposer un mécanisme réactionnel pour cette réaction en utilisant comme catalyseur l'ion hydrogène, H^+ .
20. La réaction est-elle chimiosélective ? régiosélective ? Rappeler la définition de ces termes.

Transformation du thymol en menthol

21. Proposer un réactif et un catalyseur permettant de transformer le thymol en menthol.

A l'issue de ces deux étapes on obtient un mélange de stéréoisomères du menthol avec une majorité de (±)-menthol plus stables. Une distillation fractionnée permet de séparer les (±)-menthol des autres stéréoisomères, (±)-néomenthol, (±)-isomenthol et (±)-néoisomenthol.

22. Quelle relation stéréochimique existe entre les (±)-menthol et les stéréoisomères (±)-néomenthol, (±)-isomenthol et (±)-néoisomenthol séparés par distillation fractionnée ?

23. Citer les différentes parties du montage nécessaires à une distillation fractionnée.

A ce stade du procédé il faut encore séparer le (+)-menthol et le (-)-menthol.

24. Les techniques usuelles de séparation des constituants d'un mélange sont-elles applicables pour ce type de mélange ?

En vue de leur séparation, le (+)-menthol et le (-)-menthol sont transformés en benzoate de menthyle par une réaction de transestérification. Le procédé Symrise utilise alors une propriété remarquable et inattendue de l'ester benzoate de menthyle : l'introduction, dans un mélange racémique de benzoate de menthyle, d'un germe de l'énantiomère (-)-menthol induit la cristallisation de cet unique ester. Il ne reste alors plus qu'à retransformer le (-)-benzoate de menthyle en (-)-menthol.

25. Donner la formule du benzoate de méthyle utilisé lors de la transestérification.

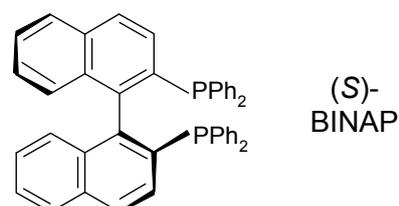
26. Quel réactif peut être utilisé pour transformer le benzoate de menthyle en menthol ?

B.2.3. Procédé Takasago (1984)

Le problème de l'obtention d'une molécule sous une forme énantiomériquement pure dépasse largement le cas du menthol. Ces dernières décennies, l'obtention de molécules chirales sous forme énantiomériquement pure est donc devenue un des principaux défis de la synthèse organique. Plusieurs types de méthodes ont été élaborés. Certaines, comme le procédé Symrise, reposent sur une séparation des énantiomères en fin de synthèse. D'autres permettent d'obtenir directement l'énantiomère désiré. Le procédé Takasago en est un exemple. Il met en jeu une réaction énantiosélective qui permet l'obtention unique du (-)-menthol. Ces synthèses énantiosélectives économiquement avantageuses sont très étudiées, elles mettent souvent en jeu un catalyseur chiral.

Les méthodes de **synthèse asymétrique** les plus efficaces en phase homogène font intervenir des catalyseurs chiraux, constitués de **ligands chiraux** complexés à un **métal de transition**, principalement le rhodium Rh et le ruthénium Ru. Ces ligands chiraux contrôlent le mode d'approche des réactifs dans la sphère de coordination du catalyseur ainsi que leur transformation énantiosélective grâce à des interactions stériques et électroniques spécifiques. Le choix du bon ligand et du bon précurseur métallique adaptés à la réaction étudiée sont déterminants dans la réussite du procédé de catalyse.

Dans le procédé Takasago de synthèse énantiosélective du (-)-menthol, la chiralité est introduite dans une étape qui utilise comme catalyseur un complexe de rhodium possédant un ligand diphosphine chiral noté (S)-BINAP de formule :



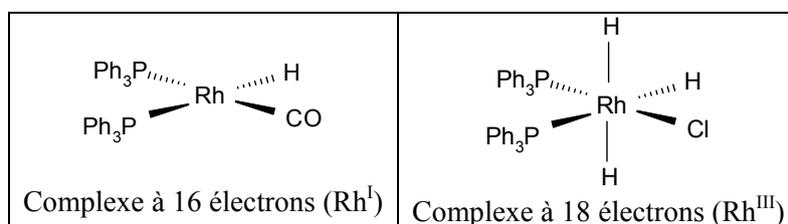
Ce catalyseur a été mis au point par une équipe menée par **Ryoji Noyori** (prix Nobel de chimie en 2001 pour ses travaux sur la chiralité des réactions d'hydrogénation catalysées).

27. Que veut dire synthèse asymétrique ?
28. Donner la configuration électronique de l'atome de $_{45}\text{Rh}$ dans son état fondamental.
29. Le rhodium est un métal de transition. Donner la définition d'un métal de transition.
30. Les métaux de transition tels que le rhodium Rh peuvent donner de nombreux complexes qui peuvent suivre la règle des 18 électrons. Expliciter cette règle.

Les complexes du rhodium sont utilisés comme catalyseurs organométalliques. De nombreux complexes du rhodium font intervenir des ligands tels que la triphénylphosphine $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ ou le monoxyde de carbone CO.

31. Donner la représentation de Lewis de la phosphine PH_3 et du monoxyde de carbone CO.
32. Justifier que la phosphine peut jouer le rôle de ligand.
33. Quelle est la géométrie de la phosphine PH_3 selon la méthode VSEPR ?
34. Une trialkylphosphine $\text{PR}^1\text{R}^2\text{R}^3$ pour laquelle $\text{R}^1 \neq \text{R}^2 \neq \text{R}^3$ est-elle chirale ?
35. Rappeler la définition d'un catalyseur.
36. Comparer les profils énergétiques (énergie potentielle en fonction de la coordonnée réactionnelle, $E_p = f(\text{CR})$) d'une réaction à un seul acte élémentaire selon qu'elle est réalisée avec ou sans catalyseur.
37. Qu'appelle-t-on catalyse homogène ?
38. Donner un exemple de catalyse homogène.

Voici deux exemples de catalyseurs organométalliques à base de rhodium :

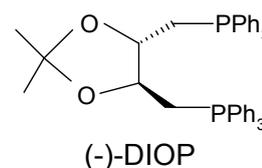


La notation Ph correspond au groupe phényle, $-\text{C}_6\text{H}_5$.

39. Quel nom donne-t-on à la géométrie de ces deux complexes ?

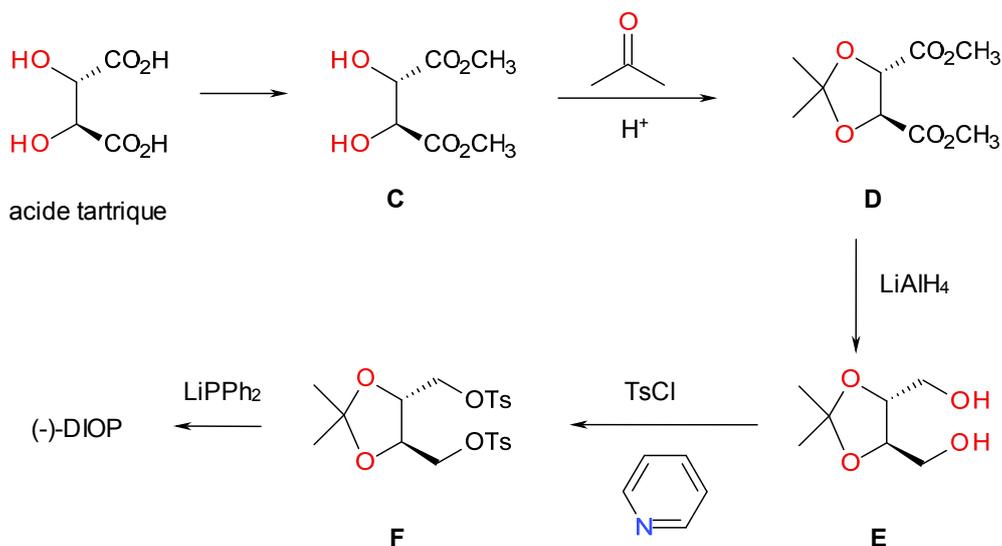
Etude de la synthèse d'un ligand diphosphine chiral : le (-)-DIOP

Lors des synthèses asymétriques utilisant le rhodium Rh comme métal, la partie chirale du complexe responsable de la stéréosélectivité de la réaction se trouve au niveau d'un ou plusieurs ligands. Le (-)-DIOP est un exemple de ligand chiral utilisé dans l'hydrogénation énantiosélective des alcènes.



40. Ce ligand est qualifié de bidente, justifier cette appellation.

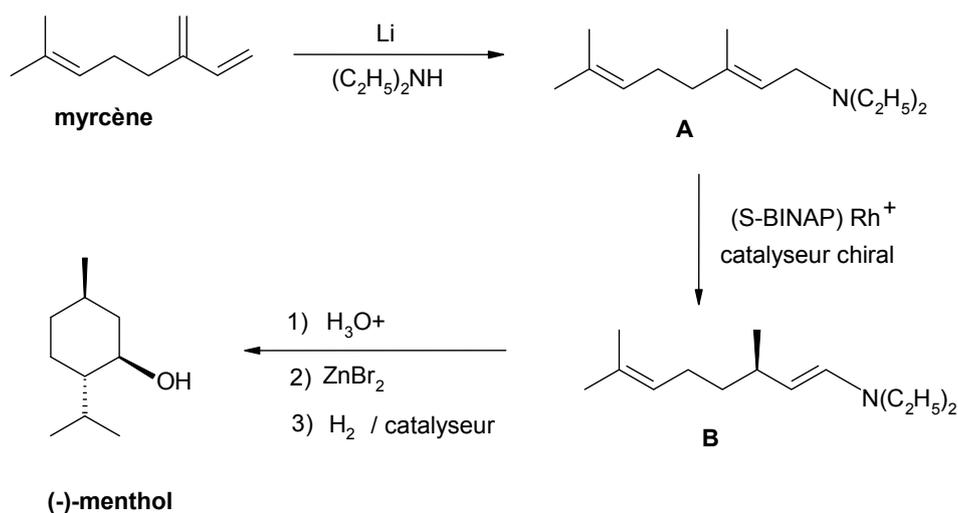
On donne ci-dessous les principales étapes de la synthèse du (-)-DIOP à partir de l'acide tartrique élaborée par H. Kagan en 1971.



41. Quel est le nom de la réaction permettant de transformer l'acide tartrique en composé **C**. Proposer des réactifs.
42. Proposer un mécanisme pour la réaction menant du composé **C** au composé **D**.
43. L'étape suivante met en jeu le réactif LiAlH_4 . Quelle est la propriété chimique de LiAlH_4 ? Pourquoi ne peut-il pas être utilisé dans l'eau?
44. L'action de LiPPh_2 , composé ionique, conduit dans une dernière étape au (-)-DIOP. A quelle famille appartient cette réaction?

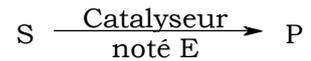
Etude cinétique de l'étape énantiosélective du (-) procédé Takasago

Les principales étapes du procédé Takasago sont données ci-dessous :

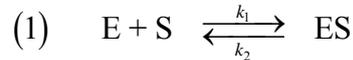


Dans le procédé Takasago, la chiralité est introduite dans la deuxième étape (**A** \rightarrow **B**) qui est l'étape clé de cette synthèse. Nous allons étudier la cinétique de l'étape énantiosélective du procédé Takasago mettant en jeu le catalyseur chiral.

L'étape-clé de cette synthèse est schématisée ci-contre :



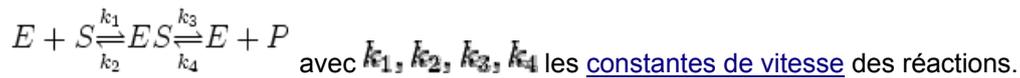
On suppose que la cinétique de cette réaction est analogue à celle d'une catalyse enzymatique dans lequel le substrat **S** représente le composé **A**, l'enzyme **E** représente le catalyseur et le produit **P** correspond au produit **B**. Le complexe formé entre le catalyseur **E** et le substrat **S** sera noté **ES**.



On rappelle que l'équation de Michaelis-Menten (1913) repose sur l'hypothèse du pré-équilibre (1) rapide tandis que celle de Briggs-Haldane (1925) repose sur l'hypothèse de l'approximation des états quasi-stationnaires appliquée au complexe **ES**.

Voici un extrait partiel de l'article Wikipédia (consulté le 27/05/2013) de l'article sur l'équation de Michaelis-Menten (http://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89quation_de_Michaelis-Menten)

Démonstration de l'équation de Michaelis-Menten

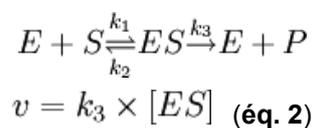


L'analyse de Michaelis-Menten se fait sous deux hypothèses simplificatrices :

Pas de réaction inverse. On se place dans des conditions initiales où il n'y a pas de produit *P* dans le test enzymatique. On analyse la vitesse initiale de la réaction, avant que le produit ait le temps de s'accumuler. La catalyse est alors très déplacée dans le sens de la synthèse des produits, la réaction inverse dont la vitesse est $k_4[E][P]$ est alors pratiquement inexistante, puisque $[P] \approx 0$.

Hypothèse dite du *pré-équilibre rapide*. On suppose que le premier équilibre dans l'équation ci-dessus, dépendant des constantes cinétiques k_1 et k_2 est très rapide devant l'étape de catalyse proprement dite, déterminée par k_3 , qui est en général limitante. Ceci revient à dire qu'à tout instant on a $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ (éq.1).

Le système se simplifie alors de la manière suivante :



La vitesse de formation du complexe **[ES]** est $v = k_1 \times [E] \times [S]$.

La vitesse d'élimination du complexe **[ES]** est $v = (k_2 + k_3) \times [ES]$ (éq. 3).

Pendant la phase stationnaire, la concentration du complexe enzyme-substrat **[ES]** est constante.

Donc la vitesse de formation de ce complexe **[ES]** doit être égale à celle de dissociation.

$$k_1 \times [E] \times [S] = (k_2 + k_3) \times [ES]$$

$$[ES] = \frac{k_1 \times [E] \times [S]}{(k_2 + k_3)}$$

Soit

On trouve (pose) une constante nommée constante de Michaelis :

$$K_M = \frac{[E] \times [S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

Comme $[ES]$ est difficile à déterminer expérimentalement, on cherche à s'en affranchir à l'aide d'une autre équation. La concentration en enzyme libre $[E]$ est donnée par la relation de la conservation de la quantité d'enzyme $[E] = [E_T] - [ES]$ avec $[E_T]$ la concentration totale en enzyme.

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES]) \times [S]}{K_M}$$

Soit

$$[ES] + \frac{[ES] \times [S]}{K_M} = \frac{[E_T] \times [S]}{K_M}$$

En mettant $[ES]$ en facteur dans le premier terme :

$$[ES] \times \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) = \frac{[E_T] \times [S]}{K_M}$$

En mettant au même dénominateur le premier terme :

$$\frac{[ES] \times (K_M + [S])}{K_M} = \frac{[E_T] \times [S]}{K_M}$$

Soit

$$[ES] = \frac{[E_T] \times [S]}{K_M} \times \frac{K_M}{K_M + [S]}$$

D'où

$$[ES] = \frac{[E_T] \times [S]}{K_M + [S]}$$

$$v = k_3 \times [ES] = k_3 \times \frac{[E_T] \times [S]}{K_M + [S]}$$

À v_{max} : $[ES] = [E_T]$ (éq. 4)

$$v_{max} = k_3 \times [E_T]$$

D'où

$$\frac{v}{v_{max}} = k_3 \times \frac{[E_T] \times [S]}{K_M + [S]} \times \frac{1}{k_3 \times [E_T]}$$

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

On trouve l'équation de Michaelis :

$$v = v_{max} \times \frac{v}{v_{max}} = v_{max} \times \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Cette équation est une expression de la vitesse initiale en fonction de deux constantes : la vitesse maximum, de la constante de Michaelis et de la concentration du substrat.

Dans l'introduction, le texte indique « [o]n suppose que le premier équilibre dans l'équation ci-dessus, dépendant des constantes cinétiques k_1 et k_2 est très rapide devant l'étape de catalyse proprement dite, déterminée par k_3 , qui est en général limitante. Ceci revient à dire qu'à tout instant on

a $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ ».

45. Que signifie : « l'étape est limitante » ?

46. La relation $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ traduit-elle l'hypothèse d'un pré-équilibre rapide ?

47. Quelle approximation permet d'écrire que $\frac{d[ES]}{dt} \approx 0$?

Quelles sont les conditions d'application de cette approximation ?

Cette équation signifie-t-elle que la vitesse d'apparition de ES est nulle ?

48. Justifier les équations **éq. 2**, **éq. 3** et **éq. 4** de l'article extrait de wikipédia.

B.3. Déshydratation du menthol

B.3.1. Notions de contrôle cinétique et thermodynamique

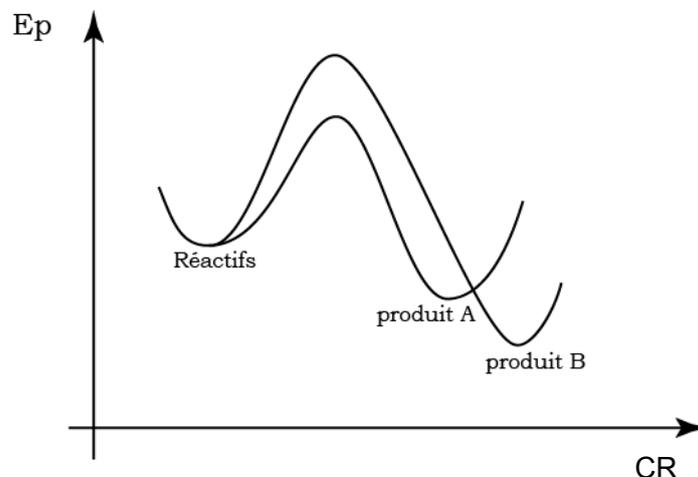


Diagramme énergétique hypothétique (énergie potentielle en fonction de la coordonnée réactionnelle) d'une réaction aboutissant à la formation d'un produit (A) et d'un produit (B)

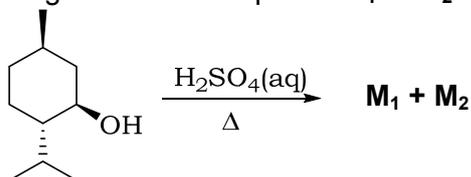
49. A partir du graphe précédent, proposer une définition des notions de contrôle cinétique et de contrôle thermodynamique.

50. Quelle condition, du point de vue énergétique, est nécessaire pour qu'une transformation soit renversable ?

51. Pour une réaction modélisable par le diagramme énergétique donné ci-dessus, quelle condition est nécessaire pour que le produit cinétique soit majoritaire ?

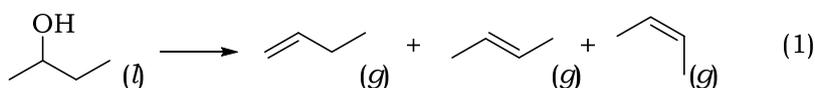
B.3.2. Etude de la déshydratation du menthol

Du (-)-menthol est mélangé à une solution aqueuse d'acide sulfurique ($C_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,4 \text{ mol.L}^{-1}$). Le mélange est chauffé à ébullition. On opère une distillation et le distillat est composé d'un mélange de deux composés M_1 et M_2 .



52. Donner les structures des produits M_1 et M_2 .

Nous étudions comme réaction modèle la déshydratation de butan-2-ol. Ce dernier est enfermé dans une enceinte fermée de volume constant, thermostatée à 25°C en présence d'une solution aqueuse d'acide sulfurique dilué et agité vivement pendant 24 h. L'ensemble est alors composé d'un liquide contenant des produits de dégradation et un gaz composé à 74 % de (*E*)-but-2-ène, 23 % de (*Z*)-but-2-ène et 3 % de but-1-ène.



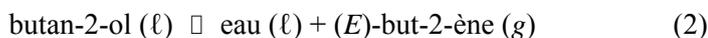
Les enthalpies standard de formation et entropies molaires standard des composés sont données dans le tableau suivant à 298 K :

	$\Delta_f H^\circ / \text{kJ.mol}^{-1}$	$S_m^\circ / \text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
eau (l)	- 285,8	69,81
butan-2-ol (l)	- 327,3	225,8
but-1-ène (g)	- 0,1	305,7
(<i>Z</i>)-but-2-ène (g)	- 7,0	300,9
(<i>E</i>)-but-2-ène (g)	- 11,2	296,6

53. Des produits M_1 et M_2 issus de la déshydratation du menthol, lequel est le produit majoritaire ? Lequel est le plus stable thermodynamiquement ?

54. La réaction est-elle sous contrôle thermodynamique ?

Considérons la réaction :



55. Quel est l'influence d'une augmentation de la pression sur l'avancement de la réaction (2) ?

56. Quel est l'influence d'une diminution de la température sur l'avancement de la réaction (2) ?

57. La réaction (2) est-elle endergonique ou exergonique ?

58. Une réaction pour laquelle $\Delta_r G > 0$ est-elle exergonique ?

59. Calculer la constante d'équilibre K_2° de la réaction (2) à 25°C .

DONNEES

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 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$: H : 1,01 ; C : 12,01 ; O : 16,00 ; N : 14,01 ; S : 32,06 ; Na : 22,99

Constante des gaz parfaits : $R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$; à 298 K : $\frac{RT}{F} \ln a = 0,059 \log a / V$

Volume molaire dans les CNTP (0°C et 1 atm) : $22,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$

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

1 atm = 1,013 bar = $1,013 \cdot 10^5 \text{ Pa}$

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															

Indicateurs colorés acido-basiques

		Zone de virage	
Bleu de bromothymol	Jaune	Vert : $6,0 < \text{pH} < 7,6$	Bleu
Hélianthine	Rouge orangé	orange $3,1 < \text{pH} < 4,4$	Jaune
Phénolphtaléine	Incolore	Rose pâle $8,2 < \text{pH} < 9$	Rose

Données physico-chimiques et phrases H et P

Produit	Propriétés	Sécurité	
Bleu patenté (V)	M = 582,7 g.mol ⁻¹ (pour les sels de sodium du bleu patenté)		H319 - H315 - H335 P261 P302+P352 P280 P305+P351+P338
(-)-menthol	M = 156,3 g.mol ⁻¹ θ _{fus} = 43°C Très soluble dans l'éthanol ; Légèrement soluble dans l'eau ; Solubilité dans l'eau : entre 420 et 500 mg.L ⁻¹ à 20°C	 	H315 - H318 - H335 P280 P305+P351+P338 P310 - P261 P302+352
Solution aqueuse d'acide citrique	M = 192,1 g.mol ⁻¹ pK _A (acide citrique) : 3,1 ; 4,8 ; 6,4		H319 P264 - P280 P305+P351+P338 P337+P313
Solution aqueuse d'hydroxyde de sodium	M = 40,0 g.mol ⁻¹		H314 -H290 P280 P301+P330+P331 P305+P351+P338 P302+P352 P234

ANNEXE 1. PHRASES H ET P

Mentions de danger

<p><u>H200</u> : Explosif instable.</p> <p><u>H201</u> : Explosif ; danger d'explosion en masse.</p> <p><u>H202</u> : Explosif ; danger sérieux de projection.</p> <p><u>H203</u> : Explosif ; danger d'incendie, d'effet de souffle ou de projection.</p> <p><u>H204</u> : Danger d'incendie ou de projection.</p> <p><u>H205</u> : Danger d'explosion en masse en cas d'incendie.</p> <p><u>H220</u> : Gaz extrêmement inflammable.</p> <p><u>H221</u> : Gaz inflammable.</p> <p><u>H222</u> : Aérosol extrêmement inflammable.</p> <p><u>H223</u> : Aérosol inflammable.</p> <p><u>H224</u> : Liquide et vapeurs extrêmement inflammables.</p> <p><u>H225</u> : Liquide et vapeurs très inflammables.</p> <p><u>H226</u> : Liquide et vapeurs inflammables.</p> <p><u>H228</u> : Matière solide inflammable.</p> <p><u>H240</u> : Peut exploser sous l'effet de la chaleur.</p> <p><u>H241</u> : Peut s'enflammer ou exploser sous l'effet de la chaleur.</p> <p><u>H242</u> : Peut s'enflammer sous l'effet de la chaleur.</p> <p><u>H250</u> : S'enflamme spontanément au contact de l'air.</p> <p><u>H251</u> : Matière auto-échauffante ; peut s'enflammer.</p> <p><u>H252</u> : Matière auto-échauffante en grandes quantités ; peut s'enflammer.</p> <p><u>H260</u> : Dégage au contact de l'eau des gaz inflammables qui peuvent s'enflammer spontanément.</p> <p><u>H261</u> : Dégage au contact de l'eau des gaz inflammables.</p> <p><u>H270</u> : Peut provoquer ou aggraver un incendie ; comburant.</p> <p><u>H271</u> : Peut provoquer un incendie ou une explosion ; comburant puissant.</p> <p><u>H272</u> : Peut aggraver un incendie ; comburant.</p> <p><u>H280</u> : Contient un gaz sous pression ; peut exploser sous l'effet de la chaleur.</p>	<p><u>H281</u> : Contient un gaz réfrigéré ; peut causer des brûlures ou blessures cryogéniques.</p> <p><u>H290</u> : Peut être corrosif pour les métaux.</p> <p><u>H300</u> : Mortel en cas d'ingestion.</p> <p><u>H301</u> : Toxique en cas d'ingestion.</p> <p><u>H302</u> : Nocif en cas d'ingestion.</p> <p><u>H304</u> : Peut être mortel en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires.</p> <p><u>H310</u> : Mortel par contact cutané.</p> <p><u>H311</u> : Toxique par contact cutané.</p> <p><u>H312</u> : Nocif par contact cutané.</p> <p><u>H314</u> : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.</p> <p><u>H315</u> : Provoque une irritation cutanée.</p> <p><u>H317</u> : Peut provoquer une allergie cutanée.</p> <p><u>H318</u> : Provoque des lésions oculaires graves.</p> <p><u>H319</u> : Provoque une sévère irritation des yeux.</p> <p><u>H330</u> : Mortel par inhalation.</p> <p><u>H331</u> : Toxique par inhalation.</p> <p><u>H332</u> : Nocif par inhalation.</p> <p><u>H334</u> : Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.</p> <p><u>H335</u> : Peut irriter les voies respiratoires.</p> <p><u>H336</u> : Peut provoquer somnolence ou vertiges.</p> <p><u>H340</u> : Peut induire des anomalies génétiques</p> <p><u>H341</u> : Susceptible d'induire des anomalies génétiques</p> <p><u>H350</u> : Peut provoquer le cancer</p> <p><u>H350i</u> : Peut provoquer le cancer par inhalation.</p> <p><u>H351</u> : Susceptible de provoquer le cancer</p>
---	---

H360 : Peut nuire à la fertilité ou au fœtus
H360E : Peut nuire à la fertilité.
H360D : Peut nuire au fœtus.
H360FD : Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
H360Fd : Peut nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.
H360Df : Peut nuire au fœtus. Susceptible de nuire à la fertilité.
H361 : Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus
H361f : Susceptible de nuire à la fertilité
H361d : Susceptible de nuire au fœtus
H361fd : Susceptible de nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.
H362 : Peut être nocif pour les bébés nourris au lait maternel.
H370 : Risque avéré d'effets graves pour les organes
H371 : Risque présumé d'effets graves pour les organes
H372 : Risque avéré d'effets graves pour les à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
H373 : Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
H300+H310 : Mortel par ingestion ou par contact cutané.
H300+H330 : Mortel par ingestion ou par inhalation.
H310+H330 : Mortel par contact cutané ou par inhalation.
H300+H310+H330 : Mortel par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.
H301+H311 : Toxique par ingestion ou par contact cutané.
H301+H331 : Toxique par ingestion ou par inhalation.
H311+H331 : Toxique par contact cutané ou par inhalation.
H301+H311+H331 : Toxique par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.
H302+H312 : Nocif en cas d'ingestion ou de contact cutané.
H302+H332 : Nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation.
H312+H332 : Nocif en cas de contact cutané ou d'inhalation.
H302+H312+H332 : Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation.
H400 : Très toxique pour les organismes aquatiques.
H410 : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
H411 : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
H413 : Peut être nocif à long terme pour les organismes aquatiques.
H420 : Nuit à la santé publique et à l'environnement en détruisant l'ozone dans la haute atmosphère.

Conseils de prudence

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

P102 : Tenir hors de portée des enfants.

P103 : Lire l'étiquette avant utilisation.

P201 : Se procurer les instructions avant l'utilisation.

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

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

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

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

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

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

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

P230 : Maintenir humidifié avec...

P231 : Manipuler sous gaz inerte.

P232 : Protéger de l'humidité.

P233 : Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

P234 : Conserver uniquement dans le récipient d'origine.

P235 : Tenir au frais.

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

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

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

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

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

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

P251 : Récipient sous pression : ne pas perforez, 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.

P4xx : conseils de prudence de stockage

P402 : Stocker dans un endroit sec.

P403 : Stocker dans un endroit bien ventilé.

P404 : Stocker dans un récipient fermé.

P405 : Garder sous clef.

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

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

P410 : Protéger du rayonnement solaire.

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

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

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

P420 : Stocker à l'écart des autres matières.

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

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

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

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

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

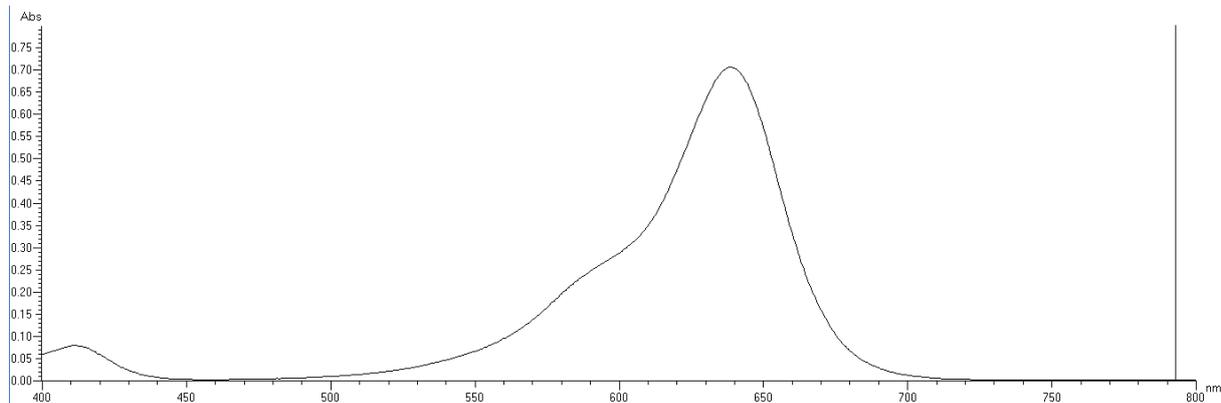
P411+P235 : Stocker à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F. Tenir au frais.

P501 : Éliminer le contenu/récipient dans ...

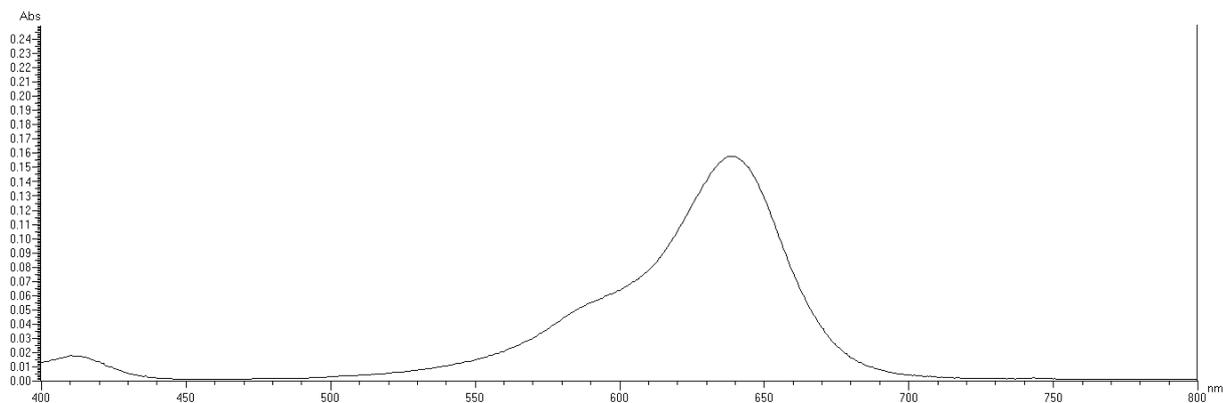
P502 : Se reporter au fabricant/fournisseur pour des informations concernant la récupération/le recyclage.

ANNEXE 2

Annexe 2.a. Spectre d'absorption ($A = f(\lambda/nm)$) de la solution E



Annexe 2.b. Spectre d'absorption ($A = f(\lambda/nm)$) de la solution A



ANNEXE 3. TITRAGE PAR SUIVI pH-METRIQUE D'UNE SOLUTION DE BAIN DE BOUCHE COMMERCIAL

Titration par suivi pH-métrique d'une prise d'essai de 10,0 mL d'une solution de bain de bouche commercial par de la soude à 10,0 mmol.L⁻¹.

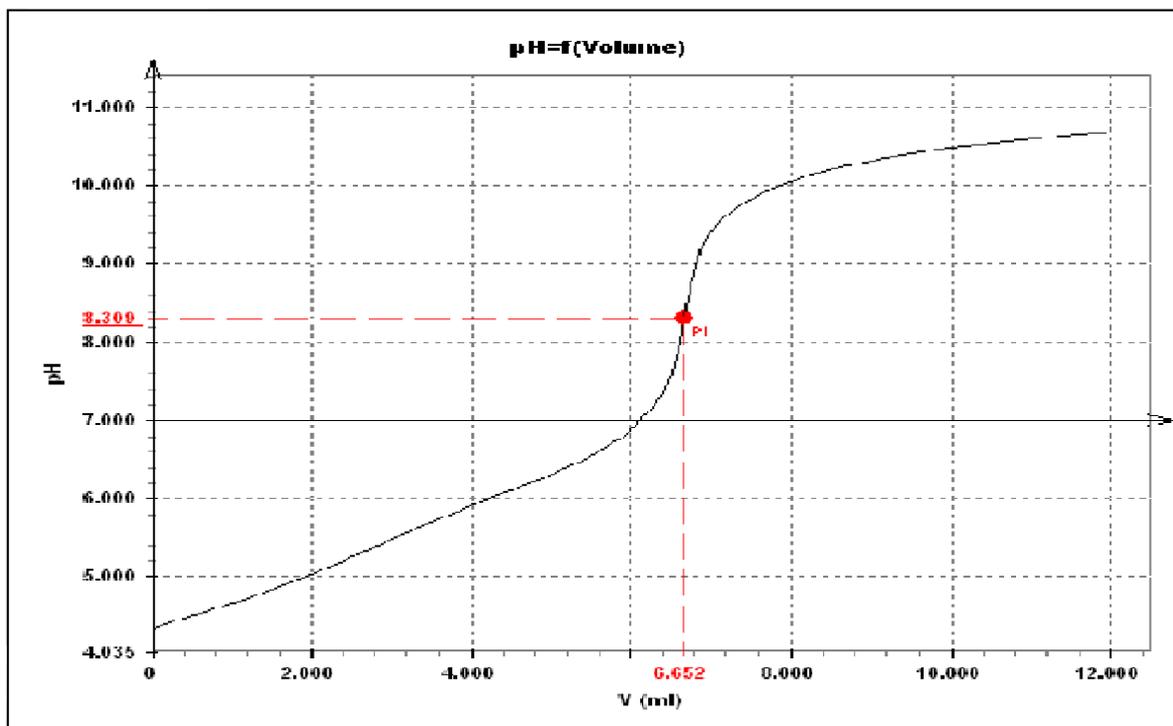
TitraMaster 85		Imprimé le	17/06/2013
Fiche d'analyse			11:26:41
		par	Supervisor

Opérateur	Supervisor	ID méthode	Dosage Alodont
Station	TIM865 688R097N005 V06.3	Type méthode	Titration
Méthode couplée	Non	Type titrage	IP continue
Date d'analyse	17/06/2013 10:41:04	ID Electrode	pHcomb
Etat	OK	Titrant	NaOH 0.01
		Essais recommandés	1

Echantillon

ID échantillon	Bécher 1	Quantité conseillée	10 ml
Type	Simple		
N° de lot	Aucun		

Courbes



Coordonnées du point à l'équivalence : pH_{éq} = 8,31 ; V_{éq} = 6,65 mL

FEUILLE DE RESULTATS

Nom :

Numéro de poste :

A.2. Titrage par suivi pH-métrique d'un excipient de la solution A

pH-métrie : $V_{\text{eq1}} =$ mL

Indicateur coloré : $V_{\text{eq2}} =$ mL

Concentration en acide citrique calculée par pH-métrie :

$C_1 =$ \pm mmol.L⁻¹

Concentration en acide citrique calculée par utilisation d'un indicateur de fin de réaction :

$C_2 =$ \pm mmol.L⁻¹

Rapport

établi par : Romain Barba, Xavier Bataille, Hélène Carrié et Sophie Warin

L'épreuve de travaux pratiques de chimie de cette année avait pour thème l'étude d'une formulation. La partie expérimentale consistait :

- à mettre au point un protocole de dosage d'une espèce absorbant dans le visible.
- à réaliser un titrage pH-métrique.

La partie théorique consistait en une étude du menthol.

A- Partie expérimentale

En ce qui concerne la sécurité, les règles élémentaires sont respectées par la plupart des candidats. Certains oublient néanmoins que le port des lunettes est obligatoire. Encore cette année, nous avons à déplorer un usage non modéré des gants par certains candidats. Nous rappelons également l'interdiction de porter des vêtements courts et des chaussures ouvertes.

A1 : mise au point d'un protocole

Cette partie du sujet présentait la particularité d'être une « mise au point de protocole », une première pour cette épreuve. Nous avons donc observé un nombre très varié de pratiques, mais nous faisons les constats suivants : il est important de faire des tests préalables, puis des préparations plus précises. La préparation des fioles s'imposait, en utilisant le matériel de précision mis à disposition (en évitant la pipette graduée, par exemple). La méthode la plus simple consistait à préparer une gamme d'étalonnage (avec la solution **E**, ce que n'ont pas compris tous les candidats) mais certains ont proposé et réalisé une méthode des ajouts dosés avec succès. Les résultats et protocoles ont été dans l'ensemble de bonne qualité. Les considérations sur les notions d'incertitude n'ont pas été forcément bien gérées bien qu'il soit à noter que beaucoup de candidats connaissent les définitions de justesse et de fidélité. La question 4, où était demandée la rédaction d'un protocole à destination d'élèves de seconde a été bien traitée dans l'ensemble. Deux approches ont été proposées : les protocoles très guidés (assimilable à une fiche) et les protocoles plus libres. Certains candidats ont listé les prérequis, ce qui a été apprécié.

A2 : titrage d'un excipient

Rappelons qu'un suivi pH-métrique s'effectue avec deux électrodes ou une électrode combinée 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). 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.

En ce qui concerne la réalisation du suivi, il est nécessaire de resserrer les mesures au voisinage de l'équivalence.

Enfin l'exploitation de la courbe de titrage pH-métrique 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 a déjà été précisé dans les rapports précédents qu'il ne faut pas utiliser un tableur de type Excel pour déterminer un volume à l'équivalence (il n'est pas programmé pour ça) mais un logiciel dédié tel Regressi. La méthode de la dérivée première ou seconde est conseillée. Nous regrettons également que de nombreux candidats aient utilisé un tableur pour imprimer la courbe puis tracé les tangentes sur la courbe imprimée, aboutissant à des résultats d'une bien piètre précision...

Notons que la question 5 relative à l'emploi de la phénolphtaléine demandait le calcul du pH d'une solution de base faible.

Pour la question 8, certains candidats ont proposé des protocoles permettant la détermination de la concentration en soude, ce qui a été apprécié.

B- Le Menthol

Nous rappelons avant tout qu'une copie d'examen se doit d'être proprement présentée et correctement rédigée et qu'une attention particulière doit être portée à la maîtrise de la langue française écrite.

L'étude d'un composé organique, le menthol, a été prétexte à des questions d'atomistique, de chimie organique, de cinétique et de thermodynamique.

B1- Etude du menthol

Dans cette partie la stéréochimie du menthol était étudiée. Tous les candidats ne maîtrisent pas les notions de stéréochimie. Certains ne connaissent pas les descripteurs stéréochimiques *R* ou *S* attribués à un atome de carbone asymétrique. La représentation de la conformation chaise du menthol a posé des difficultés.

B2- Production du menthol

Cette partie abordait divers mode de production du menthol.

B.2.1. Extraction du (-)-menthol

Concernant l'extraction, la majorité des candidats ne fait pas de distinction entre distillation et hydrodistillation.

B.2.2. Procédé Symrise (1973)

Le mécanisme d'alkylation de Friedel et Crafts dans le procédé Symrise a été traité de manière plutôt satisfaisante. En revanche, les termes chimiosélectivité et régiosélectivité ont dans l'ensemble été mal définis.

Les candidats connaissent bien les parties du montage nécessaires à une distillation fractionnée et savent que les techniques usuelles de séparation des constituants d'un mélange ne sont pas applicables pour la résolution d'un racémique.

B.2.3. Procédé Takasago (1984)

Il s'agissait ici de travailler sur la synthèse asymétrique et la catalyse par des métaux de transition. Les notions élémentaires d'atomistique ne sont pas globalement maîtrisées. La représentation de Lewis du monoxyde de carbone est rarement correcte et la géométrie selon la méthode VSEPR n'est pas toujours acquise (une géométrie AX_3E n'est pas tétraédrique).

On peut regretter un manque de précision dans le vocabulaire employé (atome, constituant, molécule, élément ne sont pas employés à bon escient) et des étourderies (par exemple dans le décompte des électrons pour déterminer une configuration électronique) ont conduit à des réponses non satisfaisantes.

La synthèse organique du (-)-DIOP a été peu et mal traitée. Il est étonnant que le mécanisme d'acétalisation d'une cétone pose de telles difficultés aux candidats. Un trop grand nombre de candidats ne savent pas reconnaître une réaction d'estérification.

Cette partie s'achève sur l'étude critique d'un article de wikipédia sur la théorie de MICHAELIS-MENTEN. Les définitions sont bien connues des candidats mais l'application des méthodes de détermination d'une cinétique pour un mécanisme réactionnel conduit trop rarement aux bonnes équations. La règle de van't Hoff pour un acte élémentaire est rarement énoncée.

B.3. Déshydratation du menthol

Cette dernière partie permettait de discuter des notions de contrôle cinétique et thermodynamique. Ces dernières ne sont maîtrisées que par un faible nombre de candidats. Concernant la thermodynamique, le calcul de la constante d'équilibre et de l'enthalpie

standard de réaction ont conduit à des résultats farfelus. Si l'application de la loi de LE CHATELIER permettait de répondre directement à la question 55, il n'en était pas de même pour la question 56 : on attendait l'énoncé et l'application de la loi de VAN'T HOFF pour laquelle il était nécessaire de calculer préalablement l'enthalpie standard de la réaction (la loi de LE CHATELIER pouvant aussi être utilisée). Enfin, rappelons que l'on doit distinguer en chimie ΔG de $\Delta_r G$ leurs unités et leur signification sont différentes.

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

	B1								B1						
N° de la question	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
%rép.	68	98	73	65	35	52	40	38	68	88	88	68	73	65	63
%bonnerép.	66	87	67	77	29	87	37	20	34	60	75	62	38	40	66

	B2.1		B2.2									
N° de la question	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
%rép.	88	73	73	40	40	43	35	45	48	50	30	
%bonnerép.	39	80	33	43	31	53	43	80	73	55	65	

	B2.3																					
N° de la question	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
%rép.	48	70	50	28	78	53	75	58	75	43	53	33	55	53	68	28	35	18	78	50	58	43
%bonnerép.	44	59	42	36	48	88	48	41	86	84	79	73	44	62	48	42	50	57	55	25	42	55

	B3.1			B3.2								
N° de la question	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	
%rép.	35	40	30	30	25	10	45	53	53	55	45	
%bonnerép.	20	31	33	54	48	25	61	29	50	0	49	

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

Durée de l'épreuve : 5 heures

Coefficient 3

Leçons

SUJETS DE MICROBIOLOGIE

ANTISEPSIE ET DESINFECTION

LES MEDICAMENTS ISSUS DU GENIE GENETIQUE

L'IMPACT SANITAIRE DES BIOFILMS MICROBIENS

VIRUS ET CANCER

LE GENOME BACTERIEN : STRUCTURE ET ORGANISATION

LES VIRUS DE LA GRIPPE

LES FLORES MICROBIENNES CHEZ L'HOMME

LA SPORE

LES RETROVIRUS, VECTEURS DE CLONAGE EN THERAPIE GENIQUE

LES VECTEURS DE CLONAGE MICROBIENS

THERAPEUTIQUE DES INFECTIONS VIRALES

TYPAGE BACTERIEN A DES FINS EPIDEMIOLOGIQUE, PHYLOGENIQUE, DIAGNOSTIQUE

MECANISMES BACTERIENS D'ÉCHAPPEMENT AU SYSTEME IMMUNITAIRE

SUJETS DE BIOCHIMIE

APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES PROTEINES FLUORESCENTES

LA REPARATION DE L'ADN

REGULATION DE L'EXPRESSION DE L'INFORMATION GENETIQUE PAR LES ARN NON CODANTS

DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE : DES SUBSTANCES TOXIQUES ?

LE TRAFIC VESICULAIRE

LES PETITES PROTEINES G

PROTEOLYSE CELLULAIRE

ACTEURS MOLECULAIRES DES JONCTIONS CELLULAIRES

LE PORE NUCLEAIRE

LES CONTROLES DE QUALITE DES PROTEINES NEOSYNTHESEES

LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE

RADEAUX LIPIDIQUES (LIPID RAFTS) ET SIGNALISATION

LES MOTEURS MOLECULAIRES

SUJETS DE BIOLOGIE HUMAINE

LES ROLES DE L'APOPTOSE

ADAPTATIONS DE L'ORGANISME A L'EXERCICE MUSCULAIRE

L'ACTIVITE ELECTRIQUE RYTHMIQUE

LES SECRETIONS EXOCRINES

LE FOIE

INTERACTIONS ENTRE LES VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE

LES BOUCLES DE RETROCONTROLE

PHOSPHORYLATION ET DEPHOSPHORYLATION DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL

L'ANGIOGENESE

REPONSES MIGRATOIRES LIEES A LA CHIMIOTAXIE DANS L'ORGANISME

SUJETS D'IMMUNOLOGIE

GROUPES SANGUINS ET TISSULAIRES

HYPERSENSIBILITE DE TYPE I

SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE

FACTEURS DE REGULATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE

RAPPORT

établi par : Henri Jean Boulouis, Laurence Dupont, Françoise Guillet, Marc Landry, Philippe Lejeune, Nicolas Meunier, Alain Morel, Benoit Schneider

Comme chaque année, la diversité des sujets permettait que soit exploré l'ensemble des 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 « Le foie, Hypersensibilité de type 1, Le génome bactérien : structure et organisation, Le reticulum endoplasmique, Les flores microbiennes chez l'homme... » ; et des intitulés moins traditionnels tels : « Typage bactérien à des fins épidémiologique, phylogénique, diagnostique, Réponses migratoires liées à la chimiotaxie dans l'organisme, Radeaux lipidiques (lipid rafts) et signalisation... ».

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.

Des connaissances sûres, à la fois précises et couvrant un large périmètre, une familiarité avec les documents et données accessibles, des capacités à présenter de façon claire et argumentée le développement construit, conduisent à un exposé de qualité.

Lorsque la méconnaissance du sujet n'a pas pu être compensée par la lecture des ouvrages mis à disposition, l'exposé a, soit abordé une partie très restreinte du sujet, soit été indigent non seulement sur le plan des savoirs mais aussi quant à l'élaboration d'une argumentation rigoureuse.

Lors de l'entretien, avec toujours l'exposé en appui, le jury cherche à explorer l'étendue des connaissances liées au sujet, demande des explicitations, suggère des pistes de réflexion, et ce quel que soit le caractère plus ou moins focalisé du sujet.

La réactivité du candidat, l'honnêteté de ses réponses, la qualité de la réflexion qu'il mène souvent avec le jury, sont des éléments qui participent de la qualité de l'entretien.

Le Jury déplore pour certains candidats le 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.

Rapport sur les leçons de biochimie

L'objectif, pour le candidat, est de dispenser un exposé structuré clair et exhaustif, sur un sujet de biochimie ou de biologie moléculaire, au plus haut niveau des connaissances actuelles. Ces exposés doivent être le résultat d'un vrai travail de synthèse, d'organisation pédagogique et donc ne pas être uniquement la somme ou la compilation d'éléments existant dans les différents manuels et de connaissances personnelles. En outre, la leçon doit être organisée d'un point de vue pédagogique permettant aux apprenants d'assimiler le ou les messages essentiels. En aucun cas la leçon ne doit être une redite d'un seul manuel à disposition qui n'est inévitablement qu'une présentation partielle et peut ne pas être dans l'actualité scientifique. L'originalité de la présentation par rapport aux documents disponibles, mais aussi l'aspect formateur, que le candidat veut mettre en avant, sont des éléments très importants qui nécessitent une bonne connaissance du domaine et des documents. Dans une leçon il faut toujours garder à l'esprit ce qui paraît essentiel de transmettre dans un temps limité. La leçon qui est nécessairement descriptive doit s'appuyer sur des fondements expérimentaux sans lesquels aucune formation pratique ne pourrait être effectuée. De la bonne compréhension par le candidat des principes, des méthodes et des mécanismes au niveau moléculaire, nécessaires au sujet développé, dépend la bonne transmission de l'information. Une explication logique basée sur les fondamentaux de la biochimie permet à l'auditoire de mieux comprendre et donc de retenir des notions qui peuvent paraître complexes. On constate malgré cela que trop de candidats ont du mal à réellement synthétiser et à transmettre un message scientifique clair lors de cet exercice. Ce défaut est la plupart du temps dû à un manque de recul et quelquefois de maîtrise des connaissances dans la présentation d'éléments de cours. La synthèse de plusieurs ouvrages peut être une difficulté voire un piège pour les candidats si ceux-ci n'ont pas déjà une expérience de leur utilisation. Enfin si dans beaucoup de cas l'exercice est plutôt réussi, l'exposé manque souvent d'attractivité et de vivacité. A l'heure où il y a une désaffection des jeunes élèves pour les sciences, ce point nous paraît important et il demande un effort important dans la présentation et la mise en perspective à travers l'actualité. Les leçons nécessitent toujours un support sous forme de schéma et de figures qui doivent aider à la compréhension. Concernant les illustrations, il est souvent remarqué une imprécision concernant les titres, les unités et les indications qui doivent figurer. On doit noter que dans la plupart des cas, un effort sur la présentation est fait. En dernier lieu le jury recommande aux candidats d'utiliser l'ensemble du temps donné pour la leçon. Les réponses aux questions doivent être concises et claires et doivent permettre au jury d'évaluer la maîtrise des éléments apportés dans la leçon et aussi les connaissances générales des candidats.

Rapport sur les leçons de microbiologie

Notes :

Bactériologie : 03, 03, 04, 04, 05, 07, 07, 15

Virologie : 04, 08, 08, 12

Immunologie : 04, 11, 12, 15.

Les leçons d'immunologie, ont dans leur ensemble été bien traitées, plus facilement que les leçons de microbiologie qui ont manifestement conduit à de moins bonnes prestations.

Cependant les sujets, dans les trois domaines, étaient des sujets classiques mis à part « spécificité de reconnaissance, groupes sanguins et tissulaires et typages bactériens » qui nécessitaient une approche plus synthétique des informations issues des ouvrages ou des connaissances des candidats.

La moitié des candidats n'ont pas utilisé tout le temps qui leur était alloué et deux candidats ont mal interprété l'énoncé, l'un d'entre eux allant jusqu'à le reformuler. Il est peut être bon de rappeler ici, même si ce sont des évidences, que les énoncés des titres sont intangibles et qu'ils doivent être lus attentivement avant que le candidat ne se lance dans la construction de sa leçon.

Sur le fond, soit les candidats n'ont pas su trier les informations et ont donné une leçon trop riche qui ne faisait pas ressortir l'essentiel soit les candidats manquaient de connaissances et ont laissé des pans entiers du sujet dans l'ombre voire ont fait des hors sujets.

Sur la forme, il s'agit d'une leçon. En disant cela on a tout dit, ou presque : il faut paraître enthousiaste, éviter les généralités et survols, agrémenter son propos par des illustrations appropriées, ne pas trop lire son texte...

Enfin, les réponses aux questions n'ont pas toujours été à l'avantage des candidats, dont on sent bien pour certains, que la présentation de leur leçon a épuisé toutes leurs réserves.

Rapport sur les leçons de biologie humaine

Les leçons ont été trop rarement traitées de manière satisfaisante. De nombreux candidats n'ont pas de vision globale des grandes fonctions en physiologie et se retrouvent trop souvent à détailler des aspects cellulaires et moléculaires au lieu de s'appuyer sur quelques exemples pertinents. Ainsi « les rôles de l'apoptose » sont réduits à présenter les cascades apoptotiques, « l'activité électrique rythmique » n'est pas appuyée sur les fonctions respiratoires ou sur le fonctionnement cardiaques mais se focalisent sur des aspects ioniques ou les organes deviennent absents. De même, la leçon sur les « Interactions entre les voies de signalisation intracellulaire » n'est pas resituée dans un contexte de réceptions de signaux antagonistes (Insuline / Glucagon sur un hépatocyte) ou synergique (Adrénaline / Glucagon toujours sur les hépatocytes). Comme pour les écrits, certains étudiants visent à remplir absolument les 45 min de leçon, même si cela implique, hors sujets, lenteurs et incohérences. Là encore, face à des lacunes dans les connaissances, il est préférable de limiter la présentation mais de garder sa cohérence.

Rapport sur les questions relatives à la chimie (Leçons et ECD)

Les questions de chimie sur les ECD et sur les leçons dérivent essentiellement du contenu des articles proposés au candidat et des points évoqués par le candidat au cours de sa présentation. Le but premier est de vérifier si le candidat maîtrise les notions de chimie qu'il évoque. Le niveau des questions posées est généralement en-deçà du programme de chimie officiel. L'écart entre les candidats est notable, certains n'ayant plus fait de chimie depuis plusieurs années.

En chimie structurale, de nombreux candidats ne peuvent donner la structure électronique fondamentale d'un élément, même d'un élément simple appartenant aux deux premières lignes de la classification périodique, comme l'oxygène ou le carbone. Le nom des familles d'éléments chimiques dans la classification périodique est également méconnu. Il est nécessaire aussi de savoir ensuite donner le nombre d'électrons de valence pour ces éléments. La notion d'isotopie est, par contre, généralement bien connue des candidats. Toujours en chimie structurale, peu de réponses correctes ont été obtenues lorsque le jury demandait l'écriture de Lewis (incluant doublets liant et non-liant) des composés inorganiques classiques en biochimie tel que, par exemple: O_2 , H_2O_2 , O_2^- ou encore NO. La plupart des candidats maîtrisent les différents types interactions inter(ou intra)moléculaires et leurs ordres de grandeurs énergétiques. Le jury apprécierait que le candidat puisse justifier ces interactions (hydrophobes, Van der Waals, liaisons H..) notamment à partir de la polarité des molécules. La notion d'aromaticité n'est pas maîtrisée par beaucoup de candidats.

En chimie organique, beaucoup de candidats identifient correctement les fonctions classiques (acide carboxylique, ester, amide, amine, etc..). La plupart sont aussi à l'aise lorsqu'il s'agit d'identifier les carbones asymétriques (et de donner leur configuration absolue), ou de discuter la configuration d'une double liaison. Des confusions ont cependant été notées lorsqu'il s'agissait de donner le lien stéréochimique existant entre deux molécules (énantiomères ou diastéréoisomères). Le jury attend des candidats qu'ils maîtrisent les représentations de Cram, Haworth ou Fischer, et surtout qu'ils puissent passer d'une représentation à l'autre. La connaissance de la structure chimique de molécules usuelles (bases azotées par exemple) est attendue. Trop peu de candidats sont capables de donner un schéma mécanistique en chimie organique. Le jury a cependant apprécié qu'une poignée de candidats puisse donner un mécanisme de transestérification cohérent.

En chimie inorganique, tout candidat doit pouvoir équilibrer rapidement un bilan d'oxydoréduction et de donner les nombres d'oxydation d'un élément au sein d'une espèce chimique. En acido-basicité, beaucoup de candidats sont capables de donner le diagramme de prédominance, et peuvent définir une solution tampon, mais très peu sont capables d'expliquer comment une telle solution peut être préparée. De même, les calculs de pH même simples (acide fort et faible, base forte et faible) sont souvent mal maîtrisés. Le respect des formes acido-basiques des molécules présentées suivant le pH du milieu biologique serait apprécié (forme protonée ou non). Le candidat doit pouvoir définir un complexe, proposer la structure de quelques ligands usuels (EDTA par exemple) et expliquer la notion de chélation. Le jury attend notamment une explication thermochimique de cette notion. En thermochimie, les notions de base doivent être connues, notamment les fonctions d'état classiques utilisées en biochimie.

Enfin, le jury attend que tout candidat puisse expliquer brièvement les techniques physiques expérimentales qu'il évoque comme la spectrométrie de masse, la microscopie de fluorescence, la Résonance Magnétique Nucléaire ou encore la cristallographie des rayons X. Le jury a notamment apprécié que beaucoup de candidats expliquent correctement la technique de fluorescence (à ne pas confondre avec la luminescence ou la phosphorescence).

ÉTUDE CRITIQUE D'UN DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE

Durée de l'épreuve : 1 heure 20

Coefficient 3

Première partie d'épreuve :
ECD

SUJETS

RELARGAGE ECTOPIQUE DES NEUROTRANSMETTEURS	<p>Thyssen, A., et al., Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. <i>Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(34): p. 15258-63</i></p> <p>Trueta, C. and F.F. De-Miguel, Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system. <i>Front Physiol, 2012. 3: p. 319</i></p>
LE MECANISME D'ENCAPSIDATION CHEZ LES BUNYAVIRIDAE VU AU TRAVERS DU VIRUS SCHMALLEMBERG.	<p>Walter CT, Barr JN. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. <i>J Gen Virol. 2011 Nov;92(Pt 11):2467-84</i></p> <p>Dong H, Li P, Elliott RM Structure of schmalleberg orthobunyavirus nucleoprotein suggests a novel mechanism of genome encapsidation <i>J. Virol. 2013 May;87(10):5593-601</i></p>
LES EPONGES A MICRO ARN	<p>Thomas B. Hansen et al Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges <i>NATURE , VOL 495 , 21 MARCH 2013</i></p> <p>Jeremy E WILUSZ et al. A circuitous route to noncoding RNA <i>SCIENCE, VOL 340, 26 APRIL 2013</i></p>

<p>LA PHOTO-INACTIVATION DES CONES</p>	<p>Nikonov, S.S., et al., Mouse cones require an arrestin for normal inactivation of phototransduction. <i>Neuron</i>, 2008. 59(3): p. 462-74.</p> <p>Arshavsky, V.Y. and M.E. Burns, Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities. <i>J Biol Chem</i>, 2012. 287(3): p. 1620-6</p>
<p>FRATRICINE ET COMPETENCE CHEZ LES STREPTOCOQUES</p>	<p>Kari Helene Berg, Truls Johan Biørnstad, Ola Johnsborg and Leiv Sigve Håvarstein Properties and Biological Role of Streptococcal Fratricins. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 2012, 78(10):3515</p> <p>Hua Wei and Leiv Sigve Håvarstein Fratricide Is Essential for Efficient Gene Transfer between Pneumococci in Biofilms. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 2012, 78(16):5897</p>
<p>VITESSE ET EFFICACITE DE STRUCTURATION DES PROTEINES</p>	<p>Harris D. Bernstein All clear for ribosome landing 13 DECEMBER 2012 VOL 492 NATURE 189</p> <p>Kuang Shen et al Activated GTPase movement on an RNA scaffold drives co-translational protein targeting 13 DECEMBER 2012 VOL 492 NATURE 271</p>
<p>LA MEMOIRE DES TAXIMEN LONDONIENS</p>	<p>Woollett, K. and E.A. Maguire, Acquiring "the Knowledge" of London's layout drives structural brain changes. <i>Curr Biol</i>, 2011. 21(24): p. 2109-14</p> <p>Woollett, K., H.J. Spiers, and E.A. Maguire, Talent in the taxi: a model system for exploring expertise. <i>Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci</i>, 2009. 364(1522): p. 1407-16</p>
<p>REGENERATION CARDIAQUE</p>	<p>Senyo, S.E., et al., Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. <i>Nature</i>, 2013. 493(7432): p. 433-6</p> <p>Laflamme, M.A. and C.E. Murry, Heart regeneration. <i>Nature</i>, 2011. 473 (7347): p. 326-35</p>

<p>CODELETION DE GENE ET VULNERABILITE CELLULAIRE</p>	<p>Ben Lehner et al Exploiting collateral damage <i>284 NATURE VOL 488 16 AUGUST 2012</i></p> <p>Florian L. Muller Passenger deletions generate therapeutic vulnerabilities in cancer <i>16 AUGUST 2012 VOL 488 NATURE 337</i></p>
<p>LE ROLE DES MICRO ARN DANS LE FONCTIONNEMENT DES CELLULES DENDRITIQUES</p>	<p>Turner ML, Schnorfeil FM, Brocker T MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function <i>J Immunol. 2011 Oct 15;187(8):3911-7</i></p> <p>Bai Y, Qian C, Qian L, Ma F, Hou J, Chen Y, Wang Q, Cao X Integrin CD11b negatively regulates TLR9-triggered dendritic cell cross-priming by upregulating microRNA-146a. <i>J Immunol. 2012 Jun 1;188(11):5293-302</i></p>
<p>UN ANNEAU PROTEIQUE SEPARANT LES BRINS D'ADN</p>	<p>Michael A Trakselis et al Molecular hurdles cleared with ease <i>13 DECEMBER 2012 VOL 492 NATURE 195</i></p> <p>Hasan Yardimci Bypass of a protein barrier by a replicative DNA helicase <i>13 DECEMBER 2012 VOL 492 NATURE 205</i></p>
<p>BASES NEUROENDOCRINES DE L'EFFET BRUCE</p>	<p>Serguera, C., et al., <i>Increased dopamine after mating impairs olfaction and prevents odor interference with pregnancy.</i> Nat Neurosci, 2008. 11(8): p. 949-56.</p> <p>Bruce, H.M., <i>Smell as an exteroceptive factor.</i> J Anim Sci, 1966. 25 Suppl: p. 83-9</p>
<p>MICROFABRICATION IN VITRO DE VAISSEAUX FONCTIONNELS</p>	<p>Claudio Franco et al. Blood vessels on a chip. <i>PNAS. June 12, 2012, vol.109, no. 24, 9342–9347</i></p> <p>Ying Zheng et al. In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis <i>PNAS. June 12, 2012, vol. 109, no. 24, 9342–9347</i></p>

<p>LES LEUCOCIDINES DE STAPHYLOCOCCUS</p>	<p>Vandenesch F, Lina G, Henry T Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? <i>Front Cell Infect Microbiol.</i> 2012;2:12</p> <p>Ashley L. DuMont, Pauline Yoong, Bas G. J. Surewaard , Meredith A. Benson, Reindert Nijland, Jos A. G. van Strijp, and Victor J. Torres Staphylococcus aureus Elaborates Leukocidin AB To Mediate Escape from within Human Neutrophils <i>Infect. Immun.</i> 2013, 81(5):1830.</p>
<p>METABOLISME , CROISSANCE ET DIFFERENTIATION CELLULAIRE</p>	<p>Alexandra Borodovsky et al Altered cancer cell metabolism in gliomas with mutant IDH1 or IDH2 <i>co-oncology.com Volume 24 ; Number 1 ; January 2012</i></p> <p>Dan Rohle et al An Inhibitor of Mutant IDH1 Delays Growth and Promotes Differentiation of Glioma Cells <i>4 April 2013 / Page 1/ 10.1126/science</i></p>
<p>UNE NOUVELLE VOIE DE DEFENSE INNEE</p>	<p>Holm, C.K., et al., Virus-cell fusion as a trigger of innate immunity dependent on the adaptor STING. <i>Nat Immunol</i>, 2012. 13(8): p. 737-43</p> <p>Randow, F., J.D. MacMicking, and L.C. James, Cellular self-defense: how cell-autonomous immunity protects against pathogens. <i>Science</i>, 2013. 340(6133): p. 701-6</p>
<p>LE PALUDISME : NOUVELLES VOIES DE TRAITEMENT ET DE PREVENTION.</p>	<p>Miller L. H., Ackerman H. C., Su X. Z. and Wellem's T. E Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. <i>Nature Medicine</i> 19, 156-167. 2013</p> <p>Thera M. A. and Plowe C. V. Vaccines for malaria: how close are we? <i>Annual Review of Medicine</i> 63, 345-357. 2012</p>
<p>LES BOITES PROTEIQUES</p>	<p>Bigna Wörsdörfer, et al. Directed Evolution of a Protein Container <i>Science</i> 331, 589 (2011)</p> <p>Fumihito Motojima Revisiting the contribution of negative charges on the chaperonin cage wall to the acceleration of protein folding <i>15740–15745 PNAS 2012 vol. 109 no. 39</i></p>

<p>USAGE DE CODON ET HORLOGE BIOLOGIQUE</p>	<p>Jennifer M. HURLEY A fable of too much too fast <i>7MARCH2013 VOL495 NATURE 57</i></p> <p>Mian Zhou Non-optimal codon usage affects expression, structure and function of clock protein FRQ <i>7 MARCH 2013 VOL 495 NATURE 111</i></p>
<p>LE CONTROLE DE LA MEMOIRE IMMUNOLOGIQUE : LE ROLE DE NOXA</p>	<p>Wensveen FM, van Gisbergen KP, Eldering E. The fourth dimension in immunological space: how the struggle for nutrients selects high-affinity lymphocytes <i>Immunol Rev. 2012 Sep;249(1):84-103</i></p> <p>Wensveen FM, Klarenbeek PL, van Gisbergen KP, Pascutti MF, Derks IA, van Schaik BD, Ten Brinke A, de Vries N, Cekinovic D, Jonjic S, van Lier RA Pro-apoptotic protein Noxa regulates memory T cell population size and protects against lethal immunopathology <i>J Immunol. 2013 Feb 1;190(3):1180-91</i></p>
<p>LE RAXIBACUMAB, LE PREMIER ANTICORPS MONOCLONAL THERAPEUTIQUE DIRIGE CONTRE UNE BACTERIE, BACILLUS ANTHRACIS</p>	<p>Corey A., Migone T. S., Bolmer S., Fiscella M., Ward C., Chen C. and Meister G Bacillus anthracis protective antigen kinetics in inhalation spore-challenged untreated or Levofloxin/Raxibacumab-treated New Zealand white rabbits <i>Toxins 5, 120-138. (2013)</i></p> <p>Mazumdar S Raxibacumab <i>mAbs 1, 531-538 (2009)</i></p>
<p>COMMENT UN VIRUS PEUT S'ADAPTER A SON ENVIRONNEMENT : L'EXEMPLE DES CORONAVIRUS</p>	<p>Graham RL Baric RS.Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission <i>J Virol. 2010 Apr;84(7):3134-46</i></p> <p>Borucki MK, Allen JE, Chen-Harris H, Zemla A, Vanier G, Mabery S, Torres C, Hullinger P, Slezak T The role of viral population diversity in adaptation of bovine coronavirus to new host environments <i>PLoS One. 2013;8(1):e52752. doi: 10.1371/journal.pone.0052752. Epub 2013 Jan 7</i></p>

<p>LES EFFETS NON GENOMIQUES DE L'ALDOSTERONE</p>	<p>McEneaney, V., B.J. Harvey, and W. Thomas, <i>Aldosterone regulates rapid trafficking of epithelial sodium channel subunits in renal cortical collecting duct cells via protein kinase D activation.</i> Mol Endocrinol, 2008. 22(4): p. 881-92</p> <p>Thomas, W., V. McEneaney, and B.J. Harvey, <i>Aldosterone-induced signalling and cation transport in the distal nephron.</i> Steroids, 2008. 73(9-10): p. 979-84</p>
<p>SYNAPSES ELECTRIQUES ET EXCITOTOXICITE</p>	<p>Wang, Y., et al., <i>Neuronal gap junction coupling is regulated by glutamate and plays critical role in cell death during neuronal injury.</i> J Neurosci, 2012. 32(2): p. 713-25</p> <p>Belousov, A.B., <i>Novel model for the mechanisms of glutamate-dependent excitotoxicity: role of neuronal gap junctions.</i> Brain Res, 2012. 1487: p. 123-30</p>
<p>L'ADALIMUMAB, UN EXEMPLE D'ANTICORPS MONOCLONAL THERAPEUTIQUE CONÇU PAR LA TECHNIQUE DE "PHAGE</p>	<p>Mease P. J. Adalimumab in the treatment of arthritis. <i>Therapeutics and Clinical Risk Management 3, 133-148. (2007)</i></p> <p>Frenzel A., Fröde D., Meyer T., Schirrmann T. and Hust M. Generating recombinant antibodies for research, diagnostics and therapy using phage display <i>Current Biotechnology 1, 33-41. (2012)</i></p>
<p>LES ARN LONGS NON CODANT</p>	<p>Amy Mawmen The genome's rising stars <i>4 APRIL 2013 VOL 496 NATURE 127</i></p> <p>Mohammad Ali Faghihi Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of b-secretase <i>NATURE MEDICINE VOLUME 14 [NUMBER 7 [JULY 2008</i></p>
<p>LE CONTROLE DE L'APOPTOSE DANS LA PERSISTANCE VIRALE</p>	<p>Kane M, Golovkina T Common threads in persistent viral infections <i>J Virol. 2010 May;84(9):4116-23</i></p> <p>Banerjee S, Lu J, Cai Q, Saha A, Jha HC, Dzung RK, Robertson ES The EBV Latent Antigen 3C Inhibits Apoptosis through Targeted Regulation of Interferon Regulatory Factors 4 and 8. <i>PLoS Pathog. 2013 May;9(5):e1003314. doi: 10.1371/journal.ppat.1003314. Epub 2013 May 2.</i></p>

<p>NOCTURNIN ET METABOLISME LIPIDIQUE</p>	<p>Douris, N., et al., <i>Nocturnin regulates circadian trafficking of dietary lipid in intestinal enterocytes</i>. <i>Curr Biol</i>, 2011. 21(16): p. 1347-55</p> <p>Stubblefield, J.J., J. Terrien, and C.B. Green, <i>Nocturnin: at the crossroads of clocks and metabolism</i>. <i>Trends Endocrinol Metab</i>, 2012. 23(7): p. 326-33</p>
<p>LE ROLE DES RADICAUX LIBRES DANS LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE</p>	<p>Sena, L.A. and N.S. Chandel, <i>Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species</i>. <i>Mol Cell</i>, 2012. 48(2): p. 158-67</p> <p>Lee, S.J., A.B. Hwang, and C. Kenyon, <i>Inhibition of respiration extends C. elegans life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity</i>. <i>Curr Biol</i>, 2010. 20(23): p. 2131-6</p>
<p>ROLE DES LYMPHOCYTES TH 17 DANS LES MALADIES AUTO IMMUNES</p>	<p>Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. Deciphering the role of Th17 cells in human disease <i>Trends Immunol. 2011 Dec;32(12):603-11</i></p> <p>Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, Kuchroo VK Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1 <i>Nature. 2013 Apr 25;496(7446):513-7</i></p>
<p>LES PSEUDOENZYMES</p>	<p>Mitch Leslie 'Dead' Enzymes Show Signs of Life <i>SCIENCE VOL 340 5 APRIL 2013 25</i></p> <p>Elton Zeqiraj et al. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 Complex Reveals an Allosteric Mechanism of Kinase Activation <i>Science 326, 1707 (2009)</i></p>
<p>LE ROLE SOCIAL DE LA COMPETITION DANS LES COMMUNAUTES BACTERIENNES</p>	<p>Hansen S. K., Rainey P. B., Haagensen J. A. J. and Molin S Evolution of species interactions in a biofilm community <i>Nature 445, 533-536. (2007)</i></p> <p>Cornforth D. M. and Foster K. R. Competition sensing: the social side of bacterial stress response <i>Nature Reviews Microbiology 11, 285-293 (2013)</i></p>

<p>L'ARTEMISININE : UN MEDICAMENT ANTI-PALUDISME ISSU DES BIOTECHNOLOGIES</p>	<p>Ro D. K. et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. <i>Nature 440, 940-943 (2006)</i></p> <p>Hale V., Keasling J. D., Renninger N. and Diagana T. Microbially derived artemisinin: a biotechnology solution to the global problem of access to affordable antimalarial drugs. <i>American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 77 (Suppl 6), 198-202. (2007)</i></p>
<p>UNE BIOLOGIE ALTERNATIVE</p>	<p>Gerald F. Joyce Toward an Alternative Biology <i>Science 336, 307 (2012)</i></p> <p>Vitor B. Pinheiro et al Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution <i>Science 336, 341 (2012)</i></p>
<p>PRODUCTION DE BIOCARBURANT PAR DES ORGANISMES SYNTHETIQUES.</p>	<p>David Berry. Engineering organisms for industrial fuel production <i>Bioengineered Bugs vol 5, 303-308, 2010</i></p> <p>Fumio Matsuda et al. Engineering strategy of yeast metabolism for higher alcohol production <i>Microbial Cell Factories vol 10, 2-10, 2011.</i></p>
<p>UN VACCIN CONTRE LE SIDA ?</p>	<p>Lu W., Chen S., Lai C., Guo W., Fu L. and Andrieu J. M. Induction of CD8+ regulatory T cells protects macaques against SIV challenge <i>Cell Reports 2, 1736-1746. (2012)</i></p> <p>Haase A. T. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions <i>Annual Review of Medicine 62, 127-139 (2011)</i></p>
<p>LA FLORE INTESTINALE HUMAINE PEUT-ELLE ETRE ETUDIEE A PARTIR DE MODELES IN-VITRO DE L'INTESTIN ?</p>	<p>Van den Abbeele P., et al. Butyrate-producing <i>Clostridium</i> cluster XIVa species specifically colonize mucins in an <i>in vitro</i> gut model. <i>The International Society for Microbial Ecology Journal 7, 949-961 (2013)</i></p> <p>Eckburg P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora <i>Science 308, 1635-1638</i></p>

<p>CORRIGER UN GENOME</p>	<p>EMMANUELLE CHARPENTIER Rewriting a genome <i>50 NATURE VOL495 7MARCH2013</i></p> <p>Le Cong <i>et al.</i> Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems <i>SCIENCE VOL 339 15 FEBRUARY 2013 819</i></p>
<p>DISPONIBILITE MEMBRANAIRE DES RECEPTEURS KAINATE</p>	<p>Rivera, R., J.L. Rozas, and J. Lerma, <i>PKC-dependent autoregulation of membrane kainate receptors</i>. <i>EMBO J</i>, 2007. 26(20): p. 4359-67</p> <p>Vincent, P. and C. Mulle, <i>Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity</i>. <i>Neuroscience</i>, 2009. 158(1): p. 309-23</p>
<p>FACTEUR DE POUVOIR PATHOGENE DE BURKHOLDERIA CENOCEPACIA : LE BIOFILM</p>	<p>Slade A. Loutet and Miguel A. Valvano A Decade of <i>Burkholderia cenocepacia</i> Virulence Determinant Research <i>Immun.</i> 2010, 78(10):4088</p> <p>Van Acker H <i>et al.</i> Biofilm-grown <i>Burkholderia cepacia</i> complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species <i>PLoS One.</i> 2013;8(3):e58943</p>

Rapport **établi par : Henri Jean Boulouis, Françoise Guillet, Philippe Lejeune, Nicolas Meunier, Alain Morel, Benoit Schneider, Denis Vivares**

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.

Le jury rappelle que l'objectif de l'exposé n'est pas de présenter l'ensemble des éléments contenus dans les deux documents mais de mettre en évidence d'une part, la problématique de la revue et 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 partiellement 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, la plupart du temps titre de l'ECD, 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 qui ont prévalu dans l'écriture des articles doivent être mis en avant dans l'exposé qui est fait par le candidat.

Concernant les articles, le jury a constaté, encore cette année que trop de candidats méconnaissent les méthodes et techniques cependant très largement utilisées en biotechnologies et en biologie ou du moins n'en avaient qu'entendu parler....

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 sans pour autant faire preuve de présomption et affirmer que ces articles, parus dans des journaux et revues de renommée internationale, sont de piètre qualité scientifique..

Pour ce qui est des ECD de biologie : la qualité a été meilleure que les leçons. Les quelques échecs sont souvent dus à un manque de maîtrise de l'anglais et des techniques modernes utilisées. Nous recommandons de lire régulièrement de la littérature scientifique. Certains journaux généralistes comme « PNAS » ou « Frontiers in... » sont en libre accès et permettront aux candidats, non seulement de s'améliorer pour cette épreuve mais aussi de moderniser leurs connaissances. Cela s'avérera payant également pour les écrits et la leçon (ou les connaissances techniques datent trop souvent des années 90...). Le jury rappelle également que cette épreuve présente deux articles, le premier article doit être la ligne directrice de la présentation et doit s'appuyer sur la revue ou deuxième article pour replacer l'étude dans un contexte plus large.

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.

Le Jury a apprécié cette année que les candidats aient veillé à leur tenue vestimentaire et rappelle que le respect attendu de la part des élèves pour leur professeur passe aussi par l'image qu'il leur fait voir.

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 mais, dans l'ensemble, l'approche du fonctionnement de l'établissement scolaire, des processus de décision dans les établissements, la connaissance des grandes orientations politiques et leur mise en œuvre traduisaient l'effort que les candidats avaient fait pour préparer cette épreuve.

Pendant l'entretien, 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.

Le jury rappelle que la lecture de revues ou de ressources spécialisées, la consultation de sites internet (www.education.gouv.fr, www.eduscol.fr) peuvent aider les candidats à construire ce socle de connaissances nécessaire à la prise en main de leur futur métier.

Le jury a apprécié les candidats qui ont répondu avec honnêteté et engagement.

CONCLUSION GENERALE

Cette année, le profil des candidats au concours était varié, traduisant l'intérêt qu'étudiants inscrits dans les différentes préparations à l'agrégation, étudiants ayant préparé le concours à l'ENS, enseignants du secondaire, du supérieur, ont eu pour ce concours garant de l'excellence de l'enseignement des biotechnologies.

La diversité de ces candidats se manifeste par des performances variées et particulières sur les épreuves d'admissibilité et d'admission. L'assemblage d'épreuves écrites, orales pratiques, s'il est particulièrement exigeant, révèle les compétences de chacun et reproduit bien ce qui est attendu du futur professeur agrégé de biochimie génie biologique

Si lors des épreuves d'admissibilité, on a pu constater, comme les années précédentes, certains devoirs traduisant la non maîtrise des questions à traiter, les prestations aux épreuves d'admission ont permis quant à elle 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, chimie, 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 la chef de travaux, l'ensemble des personnels en particulier des personnels de laboratoire qui ont, cette année encore, assuré une préparation remarquable des épreuves pratiques.