



Secrétariat Général

Direction générale des
ressources humaines

Sous-direction du recrutement

MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE

Concours du second degré – Rapport de jury

Session 2014

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
Epreuves d'admissibilité	
Epreuve 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	
Epreuve pratique de biochimie – physiologie Rapport sur l'épreuve de biochimie-physiologie	13
Epreuve pratique de microbiologie Rapport sur l'épreuve de microbiologie	52
Epreuve pratique de chimie Rapport sur l'épreuve de chimie	81
Epreuves orales Rapport sur les leçons	103
Rapport sur les études critiques de dossiers	108
Conclusion générale	113

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

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

Membres

Romain BARBE - Professeur Agrégé - Lycée Victor Hugo à BESANCON

Christophe BELOIN - Personne à Compétences Particulières - Institut Pasteur de Paris PARIS

Jean Michel BETTON - Personne à Compétences Particulières - Institut Pasteur de Paris PARIS

Joelle BISSERY – Professeur Agrégé – Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS

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

Jeanne- Laure DORMIEUX – Professeur Agrégé lycée d'Arsonval St Maur des Fossés

Olivier DOUMEIX - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS

Laurence DUPONT - Professeur Agrégé - Université de Versailles-Saint Quentin à VERSAILLES

Mélanie FERRIERES ROUX - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS

Philippe LEJEUNE - Professeur des Universités - Institut National des Sciences Appliquées à VILLEURBANNE

Nicolas MEUNIER - Maître 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

Christian SALIGAUT – Professeur des Universités de Rennes 1 à RENNES

Benoît SCHNEIDER - Charge de Recherches CNRS - dep Med Légale Et Droit Med Université Paris Descartes à PARIS

Jérôme VINCENT – Professeur agrégé - Lycée Albert Camus NIMES

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	359
Candidats présents à l'épreuve d'admissibilité	102
Nombre de postes	13
Candidats admissibles	28
Candidats présents aux épreuves d'admission	28
Candidats proposés pour l'admission	13
Barre d'admissibilité	06.33
Barre d'admission	09.83

Epreuves d'admissibilité

Moyenne générale des candidats présents	04.91
Moyenne générale des candidats admissibles	09.11

Biochimie

Moyenne des candidats présents	04.44
Moyenne des candidats admissibles	08.50
Note maximale	15.50

Microbiologie

Moyenne des candidats présents	03.45
Moyenne des candidats admissibles	07.88
Note maximale	16.00

Biologie cellulaire et Physiologie

Moyenne des candidats présents	06.16
Moyenne des candidats admissibles	10.96
Note maximale	15.00

Partie 0 : ÉPREUVES D'ADMISSION

Moyenne générale des candidats présents 09,82

Moyenne générale des candidats admis 12,06

Travaux pratiques de biochimie-physiologie

Moyenne des candidats présents 10,30

Moyennes des candidats admis 11,82

Note maximale 16.10

Travaux pratiques de microbiologie

Moyenne des candidats présents 10,14

Moyennes des candidats admis 12,38

Note maximale 15.40

Travaux pratiques de chimie

Moyenne des candidats présents 9,59

Moyennes des candidats admis 11,96

Note maximale 18.00

Leçon

Moyenne des candidats présents 08,21

Moyennes des candidats admis 10,85

Note maximale 17.00

Epreuve critique de dossier

Moyenne des candidats présents 11,03

Moyennes des candidats admis 13,29

Note maximale 16,25

Ensemble du concours

Moyenne des candidats présents 9,58

Moyenne des candidats admis 11,53

Épreuves écrites d'admissibilité

BIOCHIMIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

SUJET

Les assemblages nucléoprotéiques dans les cellules animales

RAPPORT

Etabli par Alain Morel et Benoît Schneider

Le sujet de biochimie de l'agrégation Biochimie-Génie Biologique portait cette année sur un large domaine de connaissances concernant « les assemblages nucléoprotéiques dans la cellule animale ». L'objectif était de produire un devoir structuré et synthétique écrit avec une formulation claire et pédagogique permettant de montrer l'étendue de ses connaissances sur le sujet proposé.

Il est nécessaire de rappeler qu'un tel devoir commence toujours par une introduction qui se doit de préciser les termes du sujet, de poser la problématique globale et de proposer un plan complet et logique. Dans cette introduction, des notions de base sur la structure des acides nucléiques et des protéines devaient être abordées de façon simple et focalisée afin d'introduire le concept de surface d'interaction entre acides nucléiques et protéines. Le problème de la durée des interactions (transitoire vs. chronique) et de la dynamique de ces interactions (réversibilité, modulation) pouvait être discuté. Enfin les rôles fonctionnels de ces interactions devaient être présentés à la lumière d'exemples bien documentés.

Dans une première partie, les assemblages nucléoprotéiques pouvaient être décrits à l'échelle moléculaire et structurale en précisant la nature et les propriétés physico-chimiques des interactions faibles mis en jeu entre les deux macromolécules biologiques. Une fois posée, cette notion conduisait à aborder la dynamique de l'interaction, la durée de l'interaction et les forces mises en jeu. En appui de cette première partie, il était utile d'évoquer les motifs structuraux d'interaction des facteurs protéiques de transcription, des modulations des interactions protéines /ADN par les modifications chimiques, soit de l'ADN par méthylation, soit des histones par acétylation. La notion d'adduits comme par exemple la liaison de la topoisomérase I avec l'ADN aurait été appréciée. Enfin la description des méthodologies classiques permettant d'étudier ces interactions structurales était importante comme les techniques de retard sur gel, de « footprint », mais aussi d'immunoprécipitation de la chromatine, de double hybride, voir les approches cristallographiques.

Un deuxième chapitre sur les assemblages nucléoprotéiques dans la structuration de l'ADN avec une attention particulière pendant la division cellulaire était nécessaire. Celui-ci permettait de détailler les structurations de l'ADN allant du nucléosome au chromosome métaphasique, et de discuter des systèmes de réparation de l'information génétique dans des conditions de stress. Les complexes de réplication, les mécanismes de séparation des chromosomes et la prise en charge par les protéines du cytosquelette ainsi que les enzymes modulant la topologie de l'ADN étaient des exemples tout à fait pertinents.

Il était incontournable dans un troisième chapitre de dissenter sur ces assemblages et de leurs importances dans l'expression, au sens large, de l'information génétique. En particulier, il était attendu des éléments précis autour de la notion de « promoteur » notamment sur la nature et le fonctionnement des complexes de transcription, les ARN polymérases et leurs régulations prenant en compte les modifications épigénétiques. Les transports bidirectionnels d'acides nucléiques entre le noyau et le cytoplasme étaient aussi un bon exemple de la fonction des assemblages nucléoprotéiques tout comme la traduction et la sécrétion des protéines. Enfin, il était difficile de ne pas évoquer de manière précise les assemblages nucléoprotéiques dans la maturation des ARNm mais aussi des petits ARN dont les rôles régulateurs de l'expression génétique ne cessent de prendre de l'importance depuis ces dernières années. Les exemples évoqués ne sont bien sûr ni exhaustifs, ni limitatifs, mais sont cités pour leurs importances biologiques au sein de la cellule.

Comme tout devoir, il était nécessaire de rédiger une conclusion. Celle-ci ne devait pas seulement être un résumé des chapitres précédents mais devait proposer une ouverture sur la base des notions et connaissances présentées précédemment. Ainsi, il était par exemple très important de mettre en exergue les intérêts biotechnologiques de la connaissance biochimiques de ces assemblages, l'une des applications les plus communes étant la PCR. Il pouvait aussi être discuté de l'utilisation de structures hybrides dans le développement de la méthode double hybride mais aussi des hybrides protéiques avec une structure en doigt de zinc et une enzyme de restriction pour modifier, de manière précise, le génome d'une cellule et des applications possibles de ces structures en thérapie génique. Il pouvait être souligné l'intérêt de molécules chimiques capables de moduler les marques épigénétiques pour altérer la signalisation et la prolifération cellulaire incontrôlée. Quelques lignes sur l'usage des ARN interférentiels et de leurs potentiels thérapeutiques n'étaient pas hors sujet. Une discussion sur les assemblages protéines virales/acides nucléiques dans les cellules permettait d'ouvrir sur l'intérêt thérapeutique potentiel de ces structures.

A la lecture de l'ensemble des copies, les correcteurs ont noté le plus souvent un grand déséquilibre dans la construction des devoirs.

L'introduction est largement négligée : elle ne présente que le plan qui est la plupart du temps non justifié. Il en est de même pour la conclusion qui était un résumé des chapitres précédents avec, rarement, des perspectives, ce qui montre un manque de connaissances ou de culture sur les nouvelles applications en biotechnologie.

Concernant le corps du devoir, dans de nombreuses copies, une part trop importante a été donnée à la structure des acides nucléiques et des protéines souvent, malheureusement, avec un niveau de maîtrise scientifique assez faible. Les correcteurs ont été étonnés de ne voir que quelques copies rapportant les structures classiques des facteurs de transcription, qui sont pourtant depuis longtemps très véhiculées en biochimie. Par ailleurs, il est surprenant de noter un nombre conséquent de copies où les exemples sont décrits de façon très superficielle ou présentent des erreurs grossières. Ceci illustre soit un défaut de connaissances, soit une relecture imparfaite des copies.

Les candidats, à de rares exceptions, ont toujours beaucoup de mal à organiser leurs connaissances de façon synthétique avec une structuration logique. Les correcteurs ne peuvent que conseiller aux futurs candidats, avant d'entamer la rédaction de leur copie, de réfléchir davantage sur les connaissances qu'ils souhaitent présenter, de l'intérêt de certaines notions ou descriptions par rapport à la problématique du sujet, et l'organisation

judicieuse de ces connaissances. Il est à noter que la rédaction est souvent correcte à l'exception de quelques rares copies où l'orthographe est aléatoire. Dans leur ensemble, les candidats font l'effort d'une présentation correcte. Les schémas étaient quelques fois de très bonne qualité et pour certains devoirs les connaissances scientifiques de très bon niveau.

MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

SUJET

Les virus bactériophages : applications en génie génétique

RAPPORT

établi par messieurs Henri-Jean Boulouis et Philippe Lejeune

Le sujet proposé était un sujet à la frontière entre la virologie, la bactériologie et le génie biologique.

Le plan était suggéré par l'énoncé, mais tous les plans étaient acceptables du moment qu'ils ne déséquilibraient pas la composition. Il était attendu du candidat des connaissances exactes sur les bactériophages (en particulier les phages Lambda, T et M13), virus des bactéries, en terme de structure et de cycle en insistant plus particulièrement sur les notions pertinentes utiles pour la partie consacrée aux applications en génie génétique. Les deux cycles, lytique et lysogénique, pouvaient être évoqués sans faire l'objet d'un développement en soi ni d'être le cœur du devoir et les mécanismes de transfert de matériel génétique étaient évidemment hors sujet. Le recours à des schémas de structure a été apprécié. Les données de classifications ne pouvaient être que limitées au strict nécessaire et tout développement concernant les virus des cellules eucaryotes étaient hors sujet, de même que les éléments de structure bactériens.

Parmi les applications, nombreuses, trois pouvaient avoir une place centrale dans cette deuxième partie du sujet du fait de leur actualité et leur utilisation fréquente et être développées de façon plus conséquente : les bactériophages en tant que vecteur d'expression, les cosmides et la technique de « phage display ». Pour chacun de ces points, outre la description de l'outil génétique, sur le plan de la structure et du mécanisme moléculaire de son fonctionnement (la phrase « on insère un fragment d'ADN/le gène », très souvent retrouvée dans les copies, n'était pas suffisant pour expliquer la façon d'utiliser l'outil), il était attendu un exposé des avantages et limites de chaque outils, en particulier les limites de taille des inserts, qui pouvaient expliquer la plage de leur domaine d'utilisation. Les produits dérivés des bactériophages (en particulier les enzymes telles que T4 ligase ou T7 polymérase, les promoteurs), leur domaine d'emploi et leur intérêt, la constitution de banque génomique, le système Cre Lox, faisaient aussi partie du sujet et ont aussi été bien sur appréciés.

L'évocation des bactériophages en thérapeutique anti bactérienne pouvait faire l'objet d'une ouverture en conclusion, mais ne pouvait faire partie du sujet.

Il est manifeste que ce sujet, bien que faisant partie du programme, sortait quelque peu des sentiers battus des sujets des années précédentes et que nombre de candidats n'étaient pas en mesure de le traiter de façon correcte. Néanmoins, le nombre de copie ayant obtenu une note basse est suffisamment important pour qu'il nous semble nécessaire de rappeler ce qui est attendu d'un(e) candidat(e) à un concours d'agrégation tel que celui ci : un nombre raisonnable de connaissances actualisées sur les domaines listés dans le programme, une capacité d'organisation de ces connaissances selon un plan logique, des notions si possible précises exposées de façon claire avec recours, quand s'est possible, à des schémas et une capacité certaine d'analyse du sujet.

BIOLOGIE CELLULAIRE PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

SUJET

Une partie des épithéliums de l'organisme participe aux relations entre milieu intérieur et extérieur : en ne détaillant qu'un nombre limité d'exemples, vous montrerez comment ces épithéliums peuvent assurer différents rôles parmi les grandes fonctions physiologiques.

RAPPORT

Etabli par Christian SALIGAUT, Nicolas MEUNIER

Le sujet portait sur les différentes fonctions physiologiques assurées par les épithéliums.

L'introduction est apparue trop souvent négligée. Ainsi certaines compositions ont abordées directement des exemples, sans que le cadre du sujet ait été même partiellement défini. Le sujet précisait clairement que seule une partie des épithéliums devait être prise en considération, à savoir celle délimitant le milieu intérieur du milieu extérieur. Il était donc important de redéfinir au préalable, outre la notion d'épithélium, ce que sont milieux intérieur et extérieur. Le rappel de ces notions permettait par la suite de justifier les rôles abordés et les exemples choisis. La différence entre épithéliums en contact avec milieux aqueux et aériens n'a jamais été abordée.

Parmi les différentes notions attendues, il était indispensable d'aborder les caractéristiques anatomiques des épithéliums, de même que les principales particularités des cellules qui les composent. Cette partie devait permettre de cerner le sujet, en précisant les différentes fonctions physiologiques qui seraient développées : Il apparaissait ainsi nécessaire de revenir sur les caractéristiques morphologiques des cellules (classiquement polarisées avec membrane apicale et basale) et les différents types d'arrangements cellulaires trouvés (épithéliums simples, stratifiés, pseudo-stratifiés). Ces considérations devaient aboutir à la classification fonctionnelle, classiquement admise dans la littérature, en épithéliums de revêtement et d'épithéliums glandulaires. Pour les épithéliums glandulaires, la distinction entre sécrétion exocrine et endocrine devait être abordée, le sujet dans son intitulé devant se limiter aux épithéliums glandulaires à fonction exocrine. Trop peu de devoirs ont vraiment cherché à mettre en évidence les différents rôles assurés par les épithéliums passant ainsi à côté du sujet en se limitant aux épithéliums classiquement étudiés (peau / épithéliums pulmonaires, intestinaux et rénaux). Ceci est d'autant plus regrettable qu'outre montrer les capacités de synthèse du rédacteur, cette réflexion est nécessaire pour permettre la planification d'ensemble du devoir, associant à des fonctions physiologiques des exemples ciblés.

Il était donc nécessaire de traiter les fonctions de protection (protection mécanique, chimique), les fonctions d'échanges trans-épithéliaux, de sécrétion (impliqué non seulement dans la digestion mais aussi la nutrition et la reproduction), de thermorégulation et de communications. Il fallait éviter de faire un catalogue exhaustif d'exemples, certains

redondants pour une fonction donnée et nuisible à la qualité synthétique de la composition. Le cas le plus classique étant la présentation à la fois des épithéliums rénaux et digestifs en détail.

Concernant les échanges, de nombreux devoirs ont fait référence aux épithéliums pulmonaires (alvéoles), rénaux, intestinaux. Si les notions de jonctions serrées, villosités, microvillosités, transports passif, actifs ou par diffusion facilitée ont été retrouvés au niveau des différents exemples, on notera des lacunes et de graves erreurs avec toujours des confusions entre canaux et transporteurs.

Concernant la protection, la notion de barrière mécanique a souvent été évoquée. La protection chimique n'a été, dans plusieurs compositions, que peu ou prou développée. Les muqueuses et leurs sécrétions étaient attendues. L'intervention du système immunitaire n'a été, quant à elle, que très peu abordée dans la majorité des copies. Le rôle des cils vibratiles méritait lui aussi un développement, les exemples associés pouvant être ceux des épithéliums bronchiques ou des trompes de Fallope. Enfin si l'épiderme a été évoqué dans de nombreuses compositions pour son rôle protecteur, les connaissances sont apparues très superficielles et les produits de sécrétion (sueur, sébum) trop rarement évoqués.

Les épithéliums glandulaires se devaient d'être évoqués, associés à des exemples variés telles les glandes exocrines du système digestif (assez bien traité) ou les glandes mammaires (trop peu abordé).

La communication n'a quasiment jamais été abordée de manière satisfaisante aussi bien pour recueillir des informations externes de par les épithéliums sensoriels (la somesthésie étant hors sujet dans ce cadre car les récepteurs sont localisés dans la *lamina propria*) que dans le cadre de l'homéostasie, en lien avec d'autres tissus/organes (régulations nerveuses et hormonales des fonctions des épithéliums).

D'un point de vue de la forme, les plans étaient généralement cohérents, à partir du moment où la première partie définissait bien les contours du sujet. Les schémas ont été nombreux, mais les légendes et annotations parfois insuffisantes. Il y avait matière à relier nombre des exemples physiologiques à la pathologie et ce point est à encourager. Nombre de compositions ont pris en compte cet aspect, parfois malheureusement de façon très superficielle.

Il faut aussi noter le nombre toujours croissant de hors sujets ce qui reflète un manque de réflexion vis-à-vis du sujet mais probablement aussi un manque de connaissances générales en physiologie. Nous invitons donc les candidats à ne pas limiter leurs connaissances à quelques exemples dans l'étude des grandes fonctions.

Il semble aussi nécessaire de rappeler que cette épreuve se limite à la physiologie humaine et les exemples pris chez des espèces de vertébrés doivent se limiter aux organismes modèles et non aborder la biodiversité.

En bilan, un grand nombre de candidats ont des connaissances bien trop superficielles, 60% des copies ont obtenu moins de 6/20 et seulement 20% ont obtenu la moyenne.

ÉPREUVES D'ADMISSION

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE ET OU DE PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

Sujet proposé par : Jean Michel Betton, Fabien Cezard, Olivier Doumeix, Sabine Orsoni, Jérôme Vincent,

Optimisation de la production de protéines recombinantes chez <i>E. coli</i>
--

INTRODUCTION

Depuis l'obtention des premières protéines recombinantes il y a une quarantaine d'années, des stratégies d'optimisation de la production ont été développées. Elles visent à obtenir des taux importants de protéines fonctionnelles faciles à purifier.

Les choix portent notamment sur :

- la **cellule hôte** : culture facile, taux de croissance élevé ;
- le **vecteur d'expression** : présence de marqueur(s) de sélection, d'un promoteur fort, réplication à grand nombre de copies ;
- la **construction de l'insert** : gène(s) d'intérêt associé(s) à une séquence d'adressage et/ou une étiquette (« tag ») facilitant la purification ;
- les **conditions de culture**.

La protéine recombinante modèle utilisée dans cette étude, choisie pour sa facilité de détection, est la phosphatase alcaline (PhoA), enzyme d'*E. coli* à destination périplasmique. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur comportant un peptide signal N-terminal responsable de l'adressage périplasmique. Le peptide signal est clivé lors de la translocation.

La cellule retenue pour l'expression des gènes recombinants est *E. coli* DH5 α , souche non pathogène déletée en *phoA* ($\Delta phoA$) conçue pour le génie génétique.

Le vecteur d'expression choisi est le plasmide pKTN dont la carte figure dans le **DOCUMENT 2**. Le promoteur *trc* permet un fort taux d'expression des gènes placés sous sa dépendance.

L'hyperproduction associée à ce système d'expression présente le risque d'aboutir à la formation de corps d'inclusion correspondant à l'agrégation cytoplasmique de protéines mal repliées n'ayant pas pu être correctement exportées. En effet, pour une protéine à destination périplasmique, une compétition cinétique se met en place entre la translocation de la protéine à travers la membrane plasmique, son agrégation dans le cytoplasme et sa dégradation.

Différentes souches transformées (**A à E**) sont utilisées lors de l'étude. Les cartes correspondantes figurent également dans le **DOCUMENT 2**.

Dans la **PREMIÈRE PARTIE**, on compare la production de 2 protéines recombinantes distinctes par leur peptide signal :

- PhoA associée à son peptide signal sauvage, produite par la **souche B** ;
- PhoA fusionnée au peptide signal de MalE, produite par la **souche C**.

Dans la **DEUXIÈME PARTIE**, on compare la production de 2 protéines recombinantes associées à la séquence signal de MalE et comportant une étiquette moléculaire (« tag ») poly-histidine facilitant la purification :

- PhoA-His₆, produite par la **souche D** ;
- une protéine de fusion PhoA-Bla-His₆, produite dans la **souche E**.

Les protéines d'intérêt des 2 fractions périplasmiques sont purifiées sur mini-colonne.

Dans les 2 parties, la production des protéines recombinantes est analysée par 2 méthodes :

- électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ;
- mesure de l'activité PhoA.

Une étude placée en **ANNEXE** du sujet permet de valider le protocole de mesure de l'activité enzymatique.

AVERTISSEMENTS

- 1) Certains des produits utilisés présentent des risques chimiques ou biologiques. Le **DOCUMENT 1** présente les données de sécurité correspondantes.
Veiller à respecter les consignes de sécurité lors de la manipulation de ces produits.
- 2) Les préparations des fractions dans les **PARTIES 1** et **2** peuvent être menées en parallèle, les étapes initiales étant identiques.

PARTIE 1

OPTIMISATION DE L'EXPORTATION PERIPLASMIQUE DE PHOA

Les souches **B** et **C** expriment chacune le gène *phoA* fusionné à une séquence signal différente (séquence signal sauvage de *phoA* ou séquence signal de *malE*, voir **DOCUMENT 2**). Pour comparer l'efficacité de l'exportation périplasmique, trois fractions cellulaires (périplasme, cytoplasme, membrane) sont préparées. Une souche témoin **A** est traitée en parallèle.

Toutes les fractions ainsi obtenues sont analysées par 2 méthodes :

- électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ;
- mesure de l'activité PhoA ;

I- PREPARATION DE FRACTIONS CELLULAIRES D'*E. COLI* PAR LYSE ENZYMATIQUE

Les souches **A**, **B** et **C** sont fournies en bouillon LB. Elles ont été cultivées 1 heure en présence d'IPTG ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ final) afin d'induire la synthèse des protéines d'intérêt. Pour normaliser les résultats sur l'ensemble des souches étudiées, la préparation des fractions est réalisée à partir du même nombre de cellules, quelle que soit la souche ($8\cdot 10^9$ cellules).

Le mode opératoire de la préparation des fractions cellulaires est présenté dans la **FICHE TECHNIQUE 1**.

Les différents échantillons sont nommés comme suit :

Souche A			Souche B			Souche C		
Fraction périplasmique	Fraction cytoplasmique	Fraction membranaire	Fraction périplasmique	Fraction cytoplasmique	Fraction membranaire	Fraction périplasmique	Fraction cytoplasmique	Fraction membranaire
Ap	Ac	Am	Bp	Bc	Bm	Cp	Cc	Cm

- Q1.** Présenter l'ensemble des mesures au spectrophotomètre, les calculs, ainsi que le mode opératoire permettant la normalisation des souches **A**, **B** et **C**.
- Q2.** Préciser le rôle du saccharose à l'**étape 6**, ainsi que le rôle du lysozyme et de l'EDTA à l'**étape 7**.

II- ANALYSE DES FRACTIONS CELLULAIRES PAR ELECTROPHORESE (SDS-PAGE)

L'analyse des 9 fractions obtenues est effectuée par électrophorèse en conditions dénaturantes selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 4**.

- Q3.** Présenter la photographie du gel.
- Q4.** Comparer le niveau de production et la localisation cellulaire de la protéine d'intérêt des différentes souches étudiées. Conclure.
- Q5.** Interpréter la présence de la protéine d'intérêt dans la fraction membranaire.
- Q6.** Interpréter la présence d'une double bande sur les pistes B et C de l'électrophorégramme du **DOCUMENT 4**.

III- MESURE DE L'ACTIVITE PHOA DES FRACTIONS CELLULAIRES

Déterminer l'activité enzymatique PhoA des 9 fractions obtenues selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 5**.

- Q7.** Présenter sous forme de tableau le planning suivi pour le déclenchement et l'arrêt des réactions.
- Q8.** Déterminer l'activité totale (**z** en U) dans chacune des 9 fractions analysées.
- Q9.** Calculer le pourcentage d'activité contenu dans chaque fraction par rapport à l'activité totale obtenue dans l'ensemble des fractions.
- Q10.** Conclure sur l'ensemble des résultats obtenus.
- Q11.** Comparer ces résultats avec ceux de l'électrophorèse.

PARTIE 2

PRODUCTION PERIPLASMIQUE ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES

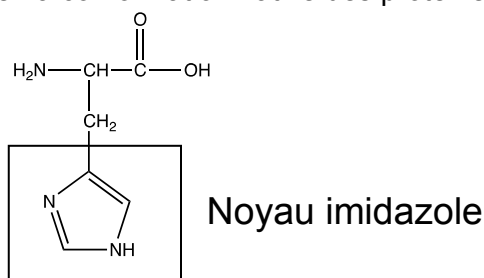
Deux constructions ont été préparées (voir **DOCUMENTS 2** et **3**) :

- PhoA-His₆ (**souche D**) ;
- PhoA-Bla-His₆ (**souche E**).

L'ajout d'une étiquette poly-histidine doit faciliter la purification des protéines à partir des périplasmes.

Il faut vérifier que les protéines sont fonctionnelles : en effet l'ajout d'une étiquette poly-histidine ou la fusion PhoA-Bla peut perturber la conformation native des protéines.

Rappel de la structure de l'histidine :



Après avoir récupéré le périplasme des 2 souches, les manipulations suivantes sont mises en œuvre :

- purification des protéines recombinantes sur colonne de nickel ;
- analyse de la purification par électrophorèse ;
- mesure de l'activité PhoA des périplasmes et des fractions purifiées ;
- dosage des protéines totales des périplasmes et des fractions purifiées ;
- dosage immuno-enzymatique (ELISA) des protéines recombinantes dans le périplasme ;
- test rapide pour vérifier que Bla est active dans la protéine de fusion.

Les différents échantillons sont nommés comme suit :

Souche D			Souche E		
Périplasme	Purification sur colonne		Périplasme	Purification sur colonne	
	Fraction non retenue	Éluat		Fraction non retenue	Éluat
D₁	D₂	D₃	E₁	E₂	E₃

I- PREPARATION DES FRACTIONS PERIPLASMIQUES PAR CHOC OSMOTIQUE

Les souches **D** et **E** sont fournies en bouillon LB. Elles ont été cultivées 1 heure en bouillon LB en présence d'IPTG ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ final) afin d'induire la synthèse des protéines d'intérêt. Pour normaliser les résultats sur l'ensemble des souches étudiées, la préparation des fractions est réalisée à partir du même nombre de cellules, quelle que soit la souche ($8\cdot 10^9$ cellules).

Le mode opératoire de la préparation des fractions périsplasmiques est présenté sur la **FICHE TECHNIQUE 2**.

Q12. Présenter l'ensemble des mesures au spectrophotomètre, les calculs, ainsi que le mode opératoire permettant la normalisation des souches **D** et **E**.

Q13. Dans ce protocole, le périplasme est obtenu sans rupture de la paroi. Formuler une hypothèse sur le mécanisme mis en jeu, en analysant la composition des réactifs.

II- PURIFICATION SUR COLONNE DE NICKEL

Les protéines d'intérêt contenues dans les fractions **D₁** et **E₁** sont purifiées sur colonne de nickel selon le mode opératoire présenté dans la **FICHE TECHNIQUE 3**.

Mettre en œuvre cette purification à partir des fractions périsplasmiques **D₁** et **E₁**.

Q14. Justifier la mise en garde mentionnée dans la **FICHE TECHNIQUE 3** : « *Avoid in buffers : Chelating agents, e.g. EDTA, EGTA (...)* ».

Q15. Expliquer la présence d'imidazole dans le tampon de fixation et dans le tampon d'élution.

III- ANALYSE DES FRACTIONS PAR ELECTROPHORESE SDS-PAGE

Les fractions **D₁**, **D₃**, **E₁** et **E₃** sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 4**.

Q16. Analyser le résultat de l'électrophorèse.

Q17. Estimer la production et la qualité de la purification des deux protéines, en se référant éventuellement au **DOCUMENT 4**.

IV- MESURE DE L'ACTIVITE PHOA DES DIFFERENTES FRACTIONS

Déterminer l'activité enzymatique PhoA des 6 fractions obtenues selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 5**.

Q18. Déterminer les concentrations d'activité catalytique (**b** en $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) des 6 fractions.

Q19. Déterminer le rendement de purification des deux protéines étudiées.

Q20. Calculer la concentration massique et la concentration molaire en PhoA des fractions **D₁**, et **E₁** en se référant aux résultats obtenus avec l'étalon PhoA (voir **ANNEXE**).

V- DOSAGE DES PROTEINES DES DIFFERENTES FRACTIONS PAR LA METHODE DE BRADFORD

La **FICHE TECHNIQUE 6** présente les données techniques permettant le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

Déterminer la concentration en protéines dans les 6 fractions obtenues (**D₁**, **D₂**, **D₃**, **E₁**, **E₂**, **E₃**).

Traiter les fractions à doser comme les tubes de gamme, sans dilution préalable.

Q21. Présenter le protocole réalisé ainsi que les résultats obtenus.

Q22. Déterminer le taux de purification (enrichissement) des 2 protéines (PhoA et PhoA-Bla) sur colonne de nickel.

Q23. Comparer les résultats obtenus dans cette partie aux observations obtenues sur SDS-PAGE.

Q24. Indiquer si la saturation de la colonne par la protéine d'intérêt est souhaitable dans une perspective d'optimisation de l'enrichissement. Justifier.

VI- DOSAGE DE PHOA-HIS₆ DANS LES FRACTIONS PERIPLASMIQUES PAR ELISA

Le dosage immunologique permet une détection spécifique de PhoA-His₆ dans le périplasme alternative à la mesure d'activité enzymatique.

Le dosage est effectué sur les fractions **D₁** et **E₁** selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 7**.

Q25. Schématiser l'édifice moléculaire obtenu en fin de manipulation.

Q26. Présenter les calculs et le mode opératoire de pré-dilution de la fraction **D₁**.

Q27. Présenter le protocole de préparation de l'anticorps de sensibilisation (**étape 1.1**), du conjugué (**étape 4.1**) et de la solution de révélation (**étape 5.1**).

Q28. Indiquer l'intérêt des témoins « non sensibilisés ».

Q29. Présenter les autres témoins réalisés : composition, rôle.

Q30. Calculer la concentration massique en PhoA (g·L⁻¹) des fractions **D₁** et **E₁**.

Q31. Comparer la concentration massique en PhoA des fractions **D₁** et **E₁** avec la concentration massique obtenue par mesure d'activité enzymatique. Conclure.

VII- MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE β-LACTAMASE DE LA PROTEINE DE FUSION

Tester l'activité β-lactamase de la fraction **E₁** selon le protocole de la **FICHE TECHNIQUE 8**.

Q32. Expliquer l'intérêt des 2 témoins réalisés.

Q33. Présenter et interpréter les résultats obtenus.

SYNTHESE

Q34. Proposer une synthèse de l'ensemble des résultats et dégager des perspectives.

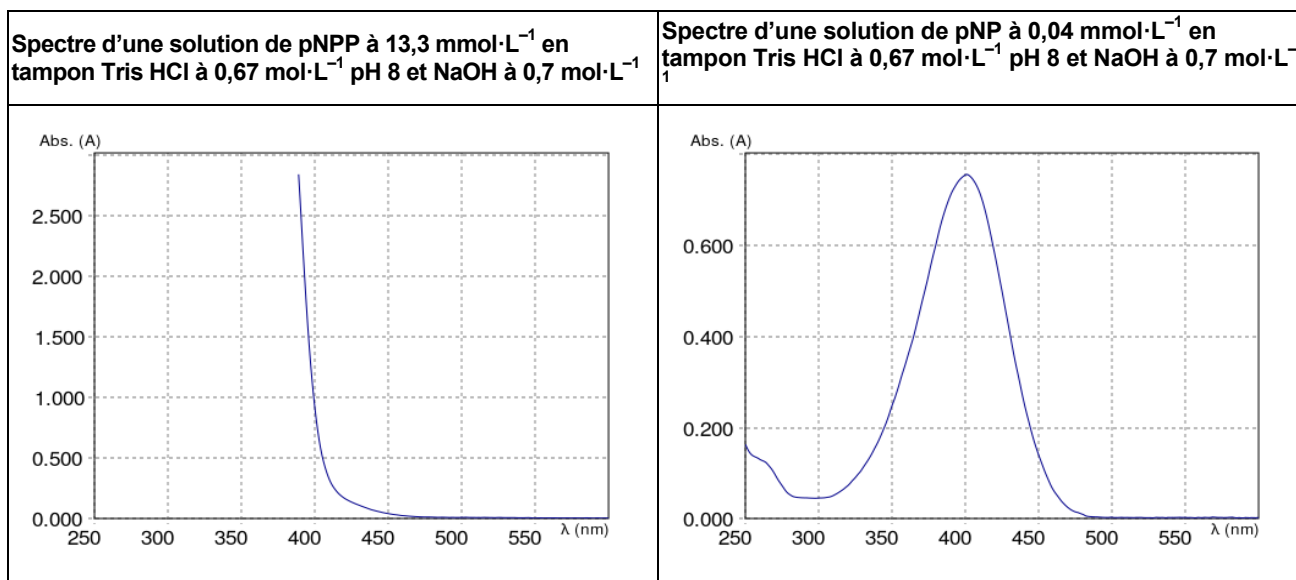
Cette étude a 2 objectifs :

- valider le mode opératoire de la méthode en 2 points utilisée dans les **PARTIES 1 et 2** pour mesurer l'activité enzymatique des fractions (voir **FICHE TECHNIQUE 5**) ;
- déterminer l'activité PhoA de l'étalon.

I- VALIDATION DE LA METHODE EN 2 POINTS DE LA FICHE TECHNIQUE 5

I.1. Détermination de la longueur d'onde optimale de détection

Q35. À l'aide des données ci-dessous déterminer la longueur d'onde optimale de mesure de l'activité PhoA par la méthode en 2 points.



I.2. Détermination du coefficient d'absorption molaire du pNP

Q36. Calculer le coefficient d'absorption molaire du pNP pour la méthode en 2 points à partir des données suivantes, mesurées dans les conditions de la réaction arrêtée.

c_{pNP} en $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	0	0,014	0,027	0,040	0,100
Absorbances à λ optimale	0	0,241	0,472	0,717	1,708

I.3. Détermination des conditions de validité de la méthode en 2 points

Afin de déterminer la valeur d'absorbance à ne pas dépasser lors des mesures d'activité par la méthode en 2 points, effectuer une cinétique en continu avec l'étalon PhoA à température ambiante selon le protocole ci-dessous :

- diluer l'étalon PhoA au 1/10 en tampon de travail (à conserver pour la partie II de l'annexe) ;
- régler le zéro du spectrophotomètre avec un témoin adapté ;
- introduire dans une cuve 1 mL de pNPP + 10 μ L d'étalon PhoA dilué ;
- mesurer l'absorbance à la longueur d'onde optimale pendant 5 minutes.

Q37. Tracer la courbe $A = f(t)$. Commenter.

Q38. Déterminer la variation d'absorbance en 3 minutes. En déduire la variation d'absorbance à ne pas dépasser pour valider la méthode en 2 points.

Donnée :

Le coefficient d'absorption molaire du pNP dans les conditions de mesure en continu est de $16\,212\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$.

II- DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE L'ETALON PHOA

Mesurer l'activité de l'étalon PhoA dilué au 1/10 selon la **FICHE TECHNIQUE 5**.

Q39. Calculer la concentration d'activité catalytique (b en $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) de l'étalon PhoA.

Q40. Calculer la constante catalytique ou turnover (k_{cat} en s^{-1}) de l'enzyme.

DOSSIER TECHNIQUE

RISQUES BIOLOGIQUES

**Souches d'*E. coli* DH5 α transformées
(A, B, C, D, E)**

Risque biologique classique, équivalent à une souche *E. coli* courante (de classe 2).

Anticorps utilisés pour le dosage ELISA :

- Ac ☐ ☐ PhoA

- Conjugué

Risque biologique négligeable.

RISQUES CHIMIQUES

Tampon d'élution (pour colonne de nickel)**Danger**

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

**Instant Blue
(Réactif de coloration du gel SDS PAGE)****Danger**

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

NaOH 2 mol·L⁻¹ (activité de PhoA)**Danger**

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

Réactif de Bradford (dosage des protéines)**Attention**

Provoque une irritation cutanée.
Provoque une sévère irritation des yeux.
Risque présumé d'effets graves pour les organes

H₂O₂ à 30 % (V/V) (ELISA)**Danger**

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

H₂SO₄ à 2 mol·L⁻¹ (ELISA)**Danger**

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

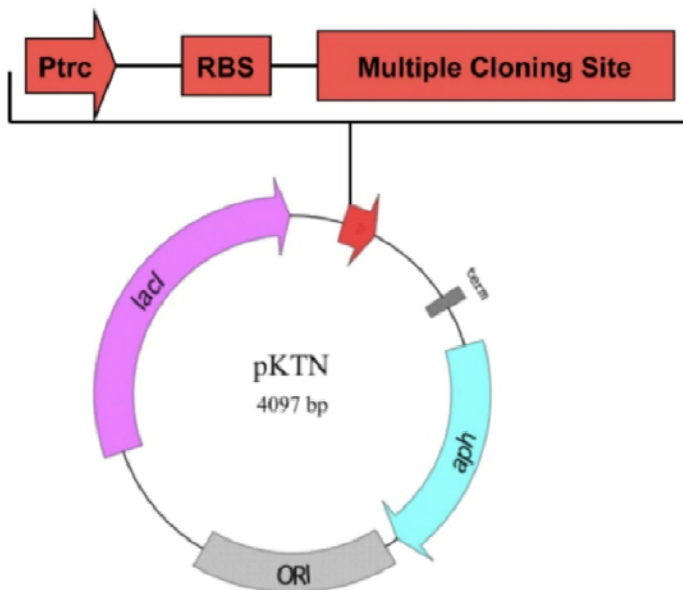
Substrat CENTA (de la β -lactamase), en méthanol**Danger**

Liquide et vapeurs très inflammables.
Toxique en cas d'ingestion.
Toxique par contact cutané.
Toxique par inhalation (négligeable petit volume).

DOCUMENT 2

CARTE DES PLASMIDES UTILISES

CARTE DU PLASMIDE PKTN



<i>lacI</i>	Gène régulateur de l'opéron lactose
<i>Ptrc</i>	Promoteur inductible, hybride entre les promoteurs <i>trp</i> et <i>lacUV5</i>
RBS	Ribosome Binding Site
term	Terminateur de transcription
<i>aph</i>	Gène de résistance à la kanamycine
ORI	Origine de réplication de pBR322

CARTE DES CONSTRUCTIONS UTILISÉES

SOUCHE	PLASMIDE	INSERT DANS LE SITE DE CLONAGE MULTIPLE
A	pKTN	<i>Sans insert</i>
B	pKTP	<i>phoASS</i> <i>phoA</i>
C	pKTMP	<i>malESS</i> <i>phoA</i>
D	pKTMP-His	<i>malESS</i> <i>phoA</i> His ₆
E	pKTMPB-His	<i>malESS</i> <i>phoA</i> <i>bla</i>

Légende

-
- *phoA* gène de la phosphatase alcaline sans séquence signal
 - *phoASS* séquence signal de PhoA
 - *malESS* séquence signal de MalE
 - *bla* gène de la β -lactamase TEM-1, en fusion traductionnelle avec *phoA* sans séquence signal
 - His₆ séquence codant une étiquette moléculaire de 6 histidines

DOCUMENT 3	CARACTÉRISTIQUES DES PROTÉINES RECOMBINANTES PhoA-His₆ ET PhoA-Bla- His₆
------------	---

Séquence PhoA-His :	Séquence PhoA-Bla-His :
MKIKTGARILALSALTMMFSASALAKIEEGST PEMPVLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALR DSLSDKPAKNIILLIGDGMGDSEITAARNYAEG AGGFFKGIDALPLTGQYTHYALNKKTKGPDYVT DSAASATAWSTGVKTYNGALGVDIHEKDHPTIL EMAKAAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSR KCYGPSATSEKCPGNALEKGGKGSITEQLLNAR ADVTLGGGAKTFAETATAGEWQGKTLREQAQR GYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLLGLFADGNMP VRWLGPKATYHGNIDKPAVTCTPNPQRNDSVPT LAQMTDKAIELLSKNEKGFFLQVEGASIDKQDH AANPCGQIGETVDLDEAVQRALEFAKKEGNTLV IVTADHAHASQIVAPDTKAPGLTQALNTKDGA VMMSYGNSEEDSQEHTGSQLRIAAYGPHAANVV GLTDQTDLFYTMKAALGLKSGGTSKSGSHHHH HHSSK	MKIKTGARILALSALTMMFSASALAKIEEGSTPEMP VLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALRDSLSDKPA KNIILLIGDGMGDSEITAARNYAEGAGGFFKGIDALP LTGQYTHYALNKKTKGPDYVTDASAATAWSTGVKTY NGALGVDIHEKDHPTILEMAKAAGLATGNVSTAELQD ATPAALVAHVTSRKYGPSATSEKCPGNALEKGGKGS ITEQLLNARADVTLGGGAKTFAETATAGEWQGKTLRE QAQARGYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLLGLFADGNM PVRWLGPKATYHGNIDKPAVTCTPNPQRNDSVPTLAQ MTDKAIELLSKNEKGFFLQVEGASIDKQDHAANPCGQ IGETVDLDEAVQRALEFAKKEGNTLVIVTADHAHASQ IVAPDTKAPGLTQALNTKDGA VMMSYGNSEEDSQEH TGSQRLIAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMKAALGLK GSGGTSKHPEPTLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGK ILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLG RRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITM SDNTAANLLLTIGGPKELTAFLHNMGDHVTSLDRWE PELNEAIPNDRDRTMPAAMATTLRKLTLGELLTLAS RQQLIDWMEADKVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGER GSRGI AALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQI AEIGASLIKHWSGSHHHHHHSSK

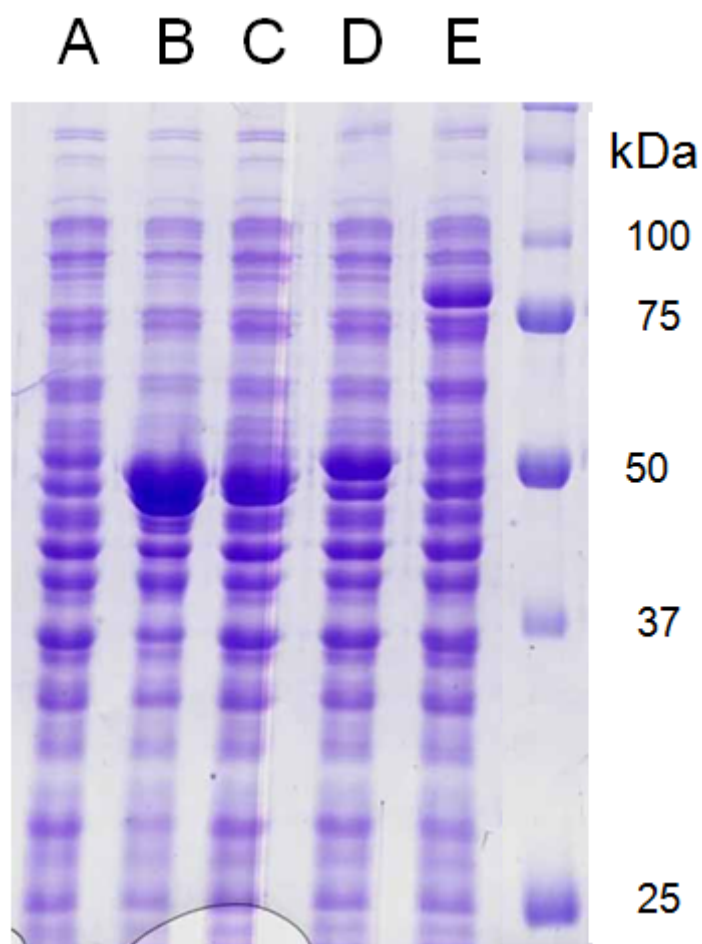
Les caractéristiques des protéines recombinantes ci-dessus sont calculées par les outils du site *ExPASy*.

Données PhoA-His	Données PhoA-Bla-His
- Number of amino acids: 474 - Molecular weigh (subunit) : 49618.2 Da - Theoretical pl: 5.90 - Extinction coefficients : Extinction coefficients are in units of $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, at 280 nm measured in water. - Ext. coefficient 33140 Abs 0.1% (=1 g/L) 0.668, assuming all pairs of Cys residues form cystines - Ext. coefficient 32890 Abs 0.1% (=1 g/ L) 0.663, assuming all Cys residues are reduced - Instability index : The instability index (II) is computed to be 31.33 This classifies the protein as stable. - Quaternary structure information : Homodimer	- Number of amino acids: 737 - Molecular weight (subunit): 78507.2 Da - Theoretical pl: 5.74 - Extinction coefficients: Extinction coefficients are in units of $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, at 280 nm measured in water. - Ext. coefficient 61225 Abs 0.1% (=1 g/ L) 0.780, assuming all pairs of Cys residues form cystines - Ext. coefficient 60850 Abs 0.1% (=1 g/ L) 0.775, assuming all Cys residues are reduced - Instability index : The instability index (II) is computed to be 34.31 This classifies the protein as stable. - Quaternary structure information : Homodimer

DOCUMENT 4**ÉLECTROPHOREGRAMME DES EXTRAITS
TOTAUX DES DIFFÉRENTES SOUCHES****PRÉPARATION DES EXTRAITS TOTAUX**

Les extraits totaux sont obtenus par lyse des suspensions bactériennes :

- mélange de 15 μL de suspension bactérienne avec 5 μL de tampon de charge 4X ;
- chauffage à 95 °C.

RÉSULTATS OBTENUS

FICHE TECHNIQUE 1

PREPARATION DE FRACTIONS
CELLULAIRES PAR LYSE
ENZYMATIQUE

RÉACTIFS ET MATÉRIELS

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Bouillon LB	Bouillon LB	Flacon 30 mL
Tris-HCl	Tris-HCl à 20 mmol·L ⁻¹ pH 8	Flacon 10 mL
TS	Tris-HCl à 20 mmol·L ⁻¹ pH 8 + saccharose à 0,5 mol·L ⁻¹	Flacon 10 mL (glace)
Lysozyme-EDTA	Lysozyme à 2 mg·mL ⁻¹ en EDTA à 0,1 mol·L ⁻¹	Microtube 700 µL (glace)
ED	Eau distillée froide	Flacon de 10 mL (glace)

- Tubes Falcon de 15 mL ; microtubes Eppendorf de 1,5 mL
- Centrifugeuse pour tubes Falcon ; microcentrifugeuse pour microtubes Eppendorf
- Boîte de Pétri carrée + papier absorbant ; poubelles pour déchets à risque biologique (liquides, solides)

MODE OPÉRATOIRE

Toutes les étapes ci-dessous sont à réaliser à 4 °C, sauf les centrifugations en microcentrifugeuses, et l'étape 7.

1. Mesurer l'absorbance à 600 nm de chaque culture fournie (**A, B, C**) diluée au 1/5 en bouillon LB, contre un blanc adapté.
2. Dans des tubes Falcon de 15 mL, transférer un volume de culture contenant $8 \cdot 10^9$ bactéries. Compléter éventuellement les tubes avec du milieu LB stérile afin d'égaliser les volumes à 13 mL.
3. Centrifuger 10 min à 3500 rpm à 4 °C.
4. Éliminer chaque surnageant dans le conteneur adapté.
5. Retourner les tubes sur un papier absorbant disposé dans une boîte de Pétri carrée. Jeter la boîte (avec le papier) dans le conteneur adapté.
6. Reprendre chaque culot délicatement avec 1 mL de tampon TS **froid**.
7. Transférer 0,9 mL dans un microtube Eppendorf contenant 100 µL de lysozyme-EDTA **froid**. Vortexer et incuber 10 min à **température ambiante**.
8. Centrifuger 10 min à 10 000 rpm.
9. Transférer **SANS ATTENDRE** chaque surnageant dans un nouveau microtube Eppendorf : il s'agit des fractions « **périplasme** » (notées **Ap, Bp, Cp**), à conserver dans la glace.
10. Décoller chaque culot (sphéroplastés) dans 1 mL d'eau distillée **froide**, sans chercher à le reprendre.
11. Soniquer chaque microtube de sphéroplastés au moins 5 secondes pour compléter la lyse et obtenir une suspension homogène. Stocker les échantillons en attente dans la glace.
NB : chaque candidat pourra effectuer au préalable un essai de sonication sur un microtube Eppendorf contenant de l'eau.
12. Centrifuger 10 min à 13 400 rpm.
13. Transférer **délicatement** chaque surnageant dans un nouveau microtube Eppendorf : il s'agit des fractions « **cytoplasme** » (notées **Ac, Bc, Cc**), à conserver dans la glace.

-
- 14.** Reprendre chaque culot avec 1 mL de tampon Tris-HCl : il s'agit des fractions « **membranes** » (notées **Am**, **Bm**, **Cm**), à conserver dans la glace.
Cette fraction est constituée de vésicules lipidiques contenant les protéines de la membrane plasmique et de la membrane externe, et les éventuels corps d'inclusion formés dans le cytoplasme.

DONNÉES

- Pour une suspension bactérienne la linéarité du spectrophotomètre à 600 nm est vérifiée dans l'intervalle $0,020 < A_{600} < 0,700$.
- $A_{600} = 1 \Leftrightarrow 5,0 \cdot 10^8 \text{ bactéries} \cdot \text{mL}^{-1}$.

FICHE TECHNIQUE 2

PRÉPARATION DE FRACTIONS
PÉRIPLASMIQUES PAR CHOC
OSMOTIQUE

RÉACTIFS ET MATÉRIELS

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
LB	Bouillon LB	Flacon 30 mL
TSE	Tris-HCl à 20 mmol·L ⁻¹ pH 8 + saccharose à 0,5 mol·L ⁻¹ + EDTA à 1 mmol·L ⁻¹	Flacon 10 mL (glace)
ED	Eau distillée froide	Flacon 10 mL (glace)

- Tubes Falcon de 15 mL ; microtubes Eppendorf de 1,5 mL
- Centrifugeuse pour tubes Falcon ; microcentrifugeuse pour microtubes Eppendorf
- Boîte de Pétri carrée + papier absorbant ; poubelles pour déchets à risque biologique (liquides, solides)

MODE OPÉRATOIRE

Toutes les étapes ci-dessous sont à réaliser à 4 °C, sauf les centrifugations en microcentrifugeuses, et l'étape 8.

1. Mesurer l'absorbance à 600 nm de chaque culture fournie (**D**, **E**) diluée au 1/5 en bouillon LB, contre un blanc adapté.
2. Dans des tubes Falcon de 15 mL, transférer un volume de culture contenant $8 \cdot 10^9$ bactéries. Compléter éventuellement les tubes avec du milieu LB stérile afin d'égaliser les volumes à 13 mL.
3. Centrifuger 10 min à 3500 rpm à 4 °C.
4. Éliminer chaque surnageant dans le conteneur adapté.
5. Retourner les tubes sur un papier absorbant disposé dans une boîte de Pétri carrée. Jeter la boîte (avec le papier) dans le conteneur adapté.
6. Reprendre chaque culot dans 1 mL de tampon TSE **froid**.
7. Transférer 0,9 mL dans un microtube Eppendorf.
8. Vortexer et incuber 10 min à **température ambiante**.
9. Centrifuger 10 min à 10 000 rpm.
10. Éliminer chaque surnageant dans le conteneur adapté.
11. Reprendre **SANS ATTENDRE** chaque culot dans 1 mL d'eau distillée **froide**.
12. Centrifuger 10 min à 13 400 rpm.
13. Transférer **délicatement** chaque surnageant dans un nouveau microtube Eppendorf : il s'agit des fractions « **périplasma** » (notées **D₁**, **E₁**), à conserver dans la glace.

DONNÉES

- Pour une suspension bactérienne la linéarité du spectrophotomètre à 600 nm est vérifiée dans l'intervalle $0,020 < A_{600} < 0,700$.
- $A_{600} = 1 \Leftrightarrow 5,0 \cdot 10^8$ bactéries·mL⁻¹.

FICHE TECHNIQUE 3

PURIFICATION SUR COLONNE DE NICKEL

RÉACTIFS ET MATÉRIELS

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Tampon de fixation	Phosphate de sodium à 20 mmol·L ⁻¹ pH 7,4 + NaCl à 500 mmol·L ⁻¹ + imidazole à 20 mmol·L ⁻¹	Flacon 10 mL
Tampon d'élution	Phosphate de sodium 20 mmol·L ⁻¹ pH 7,4 + NaCl à 500 mmol·L ⁻¹ + imidazole à 500 mmol·L ⁻¹	Flacon 5 mL

- Microcolonnes de nickel « *His SpinTrap* » (GE Healthcare)
- Microtubes Eppendorf **de 2 mL**
- Microcentrifugeuse pour microtubes Eppendorf

MODE OPÉRATOIRE

Bien vérifier que la colonne est vide après chaque centrifugation, sinon renouveler l'étape de centrifugation.

1. Éliminer le tampon de stockage contenu dans la colonne :

- Resuspendre correctement le milieu par retournement.
- Dévisser le bouchon à vis du haut d'un quart de tour.
- Casser le bouchon du bas.
- Placer la colonne dans un tube Eppendorf de **2 mL**.
- Centrifuger 1 min à 800 rpm.
- Retirer la colonne.
- Vider le contenu du tube Eppendorf.



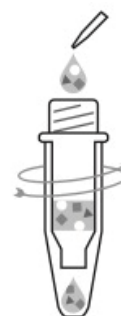
2. Équilibrer la colonne avec le tampon de fixation :

- Réinstaller la colonne dans le tube Eppendorf.
- Ajouter 600 µL du tampon de fixation.
- Centrifuger 1 min à 800 rpm.
- Jeter le tube Eppendorf.



3. Charger l'échantillon à purifier :

- Réinstaller la colonne dans un nouveau tube Eppendorf.
- Ajouter 600 µL de fraction périplasmique (**D₁** ou **E₁**) .
- Centrifuger 1 min à 800 rpm.
- Récupérer la fraction non retenue (notée **D₂** ou **E₂**).
- Réinstaller la colonne dans un nouveau tube Eppendorf.



4. Laver (à réaliser deux fois) :

- Ajouter 600 µL du tampon de fixation.
- Centrifuger 1 min à 800 rpm.
- Vider le contenu du tube Eppendorf.



5. Éluer :

- Réinstaller la colonne dans un nouveau tube Eppendorf.
- Ajouter 300 µL du tampon d'élution.
- Centrifuger 1 min à 800 rpm.
- Récupérer l'éluat (noté **D₃** ou **E₃**).

DONNÉES

EXTRAIT DE LA DOCUMENTATION TECHNIQUE SUR LA COLONNE DE NICKEL HIS-SPIN TRAP

4. Principe

Le principe de la purification des protéines par chromatographie d'affinité est basé sur la spécificité de la reconnaissance moléculaire. Cette technique permet de purifier une protéine d'intérêt à partir d'un mélange complexe de protéines, en utilisant une colonne de chromatographie d'affinité.

Tableau 1 : Principes de la chromatographie d'affinité

Principe de la chromatographie d'affinité	La colonne de chromatographie d'affinité est constituée d'une matrice solide supportant un ligand spécifique qui interagit avec la protéine d'intérêt.
Matrice	Le support solide est généralement constitué de billes de verre ou de polymère.
Ligand	Le ligand est une molécule qui se lie spécifiquement à la protéine d'intérêt.
Protéine d'intérêt	La protéine d'intérêt est la protéine que l'on souhaite purifier.
Protéines de contamination	Les protéines de contamination sont les autres protéines présentes dans le mélange initial.
Protéine de liaison	La protéine de liaison est la protéine qui se lie au ligand.
Protéine de non-liaison	La protéine de non-liaison est la protéine qui ne se lie pas au ligand.
Protéine de liaison	La protéine de liaison est la protéine qui se lie au ligand.
Protéine de non-liaison	La protéine de non-liaison est la protéine qui ne se lie pas au ligand.
Protéine de liaison	La protéine de liaison est la protéine qui se lie au ligand.
Protéine de non-liaison	La protéine de non-liaison est la protéine qui ne se lie pas au ligand.

Source : [référence]

FICHE TECHNIQUE 4

ÉLECTROPHORÈSE SDS-PAGE

Tous les échantillons doivent être déposés sur le gel dans un bref délai.

RÉACTIFS ET MATÉRIELS

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Tampon de charge 4X	Tris-HCl à 250 mmol·L ⁻¹ pH 6,8 + glycérol 40 % + SDS 8 % + bleu de bromophénol 0,01 % + Dithiothréitol (DTT) à 160 mmol·L ⁻¹	Microtube 200 µL
Marqueur de taille	Marqueur de taille <i>Broad range</i> de Bio-Rad prêt à l'emploi	Microtube 15 µL (glace)
Réactif de coloration	Réactif commercial <i>Instant Blue</i> ® pour révélation rapide de gels	Flacon 30 mL (glace)

- 1 gel SDS-PAGE à 15 puits déjà monté dans une cuve (paillasse latérale) ;
- **POSTE ÉLECTROPHORÈSE (PAILLASSE LATÉRALE)** : pipette automatique et cônes cristal ; cuve (2 ou 4 gels) contenant du tampon de migration ; générateur
- Microtubes Eppendorf de 1,5 mL ;
- Bain-marie à 95 °C ; flotteur en polystyrène pour microtubes Eppendorf
- Spatule pour l'ouverture de la cassette ; boîte de Pétri carrée pour la révélation du gel.

MODE OPÉRATOIRE

1. Traiter les fractions à analyser et le marqueur de taille avant dépôt

- Dans un microtube Eppendorf de 1,5 mL, introduire 15 µL d'échantillon et 5 µL de tampon de charge 4X.
- Chauffer 5 minutes à 95 °C.
- Chauffer également 5 minutes à 95 °C le tube contenant le marqueur de taille prêt à l'emploi.
- Placer les échantillons dans la glace jusqu'au dépôt.

2. Déposer sur le gel : à l'aide d'une pipette automatique à cônes cristal

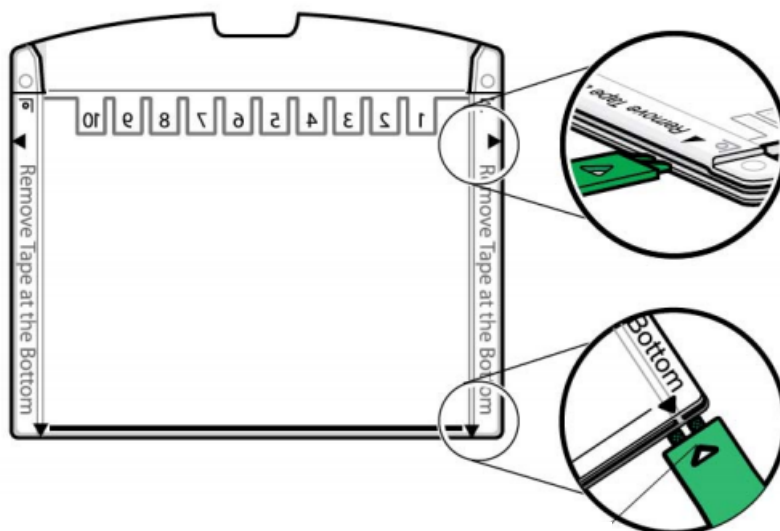
- 15 µL de chaque échantillon à analyser (valeur pour un gel à 15 puits).
- 10 µL du marqueur de taille.

3. Faire migrer environ 30 minutes à 200 V : cette étape est réalisée par les examinateurs.

4. Récupérer la cassette et l'ouvrir (voir schéma ci-contre)

- Casser la fixation en insérant la spatule entre les deux plaques au niveau d'une flèche.
- Répéter l'opération au niveau des trois autres fixations.

**Wear gloves
when handling
the cassette**



5. Colorer le gel

- Transférer délicatement le gel dans une boîte de Pétri carrée. Indiquer le numéro de poste sur la boîte.
- Recouvrir le gel avec la totalité du réactif de coloration.
- Agiter manuellement de temps en temps. S'assurer que le gel bouge librement dans le colorant pour faciliter la diffusion. Laisser la coloration se développer au moins 15 minutes.
- Quand la coloration est jugée satisfaisante, donner le gel à un examinateur.

6. Photographier le gel : cette étape est réalisée par les examinateurs.

DONNÉES	CARACTÉRISTIQUES DU MARQUEUR DE TAILLE MOLÉCULAIRE : BIO-RAD BROAD RANGE 261-0317
---------	---

Specifications

Contents	Approximately 400 µg of each protein blended to give bands of equal intensity on SDS polyacrylamide gels run according to Laemmli ¹ and stained with Coomassie Blue R-250		
Storage buffer	50% glycerol, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 3 mM NaN ₃		
Volume	200 µl concentrated solution		
Storage	-20 °C		
Shipping conditions	Room temperature,		
Shelf life	1 year at -20 °C		
Applications per vial	400 with Coomassie R-250		
Recommended gel percentage*	Low range	12.5%	
	High range	7.5%	
	Broad range	4-20 % gradient gels	

Protein Molecular Weights (daltons)

Protein	Molecular Weight	Broad Range	Low Range	High Range
Myosin	200,000	X		X
β-galactosidase	116,250	X		X
Phosphorylase b	97,400	X	X	X
Serum albumin	66,200	X	X	X
Ovalbumin	45,000	X	X	X
Carbonic anhydrase	31,000	X	X	
Trypsin inhibitor	21,500	X	X	
α-amylase	14,400	X	X	
α-protein	6,500	X		

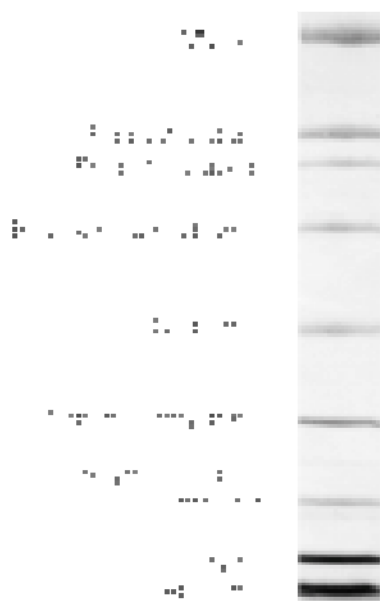


Fig. 1. SDS polyacrylamide gels run in the Mini-PROTEAN® II cell according to the method of Laemmli. The gel shows the separation of protein subunits.

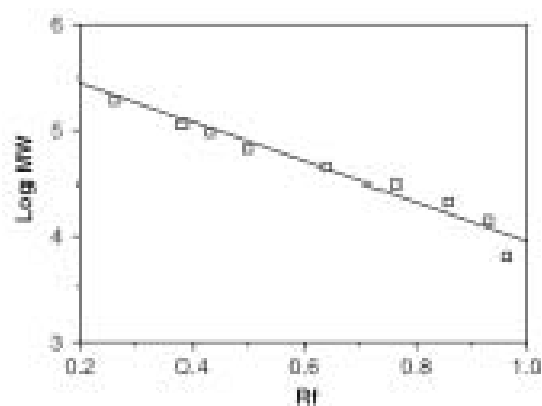


Fig. 3. Curve generated by plotting the log of the molecular weight of the broad range standards vs. the relative mobility (Rf).

$$Rf = \frac{\text{distance migrated by protein}}{\text{distance migrated by dye}}$$

The curve can be used to determine molecular weights of unknown proteins.²

FICHE TECHNIQUE 5

MESURE DE L'ACTIVITÉ PHoA PAR LA
METHODE EN 2 POINTS

RÉACTIFS ET MATÉRIELS

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Tampon de travail	Tris-HCl à $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8 + SAB 2 % + MgCl_2 à $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + ZnCl_2 à $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Flacon 10 mL
pNPP	Solution de pNPP à $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ en tampon de travail	Flacon 30 mL (glace)
NaOH	Solution de NaOH à $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Flacon 50 mL

- Semi-microcuvettes ; papier Parafilm
- Spectrophotomètre
- Chronomètre

MODE OPÉRATOIRE

Composition du milieu réactionnel : 1 mL de pNPP + 10 μL d'échantillon, éventuellement dilué.

Température de travail : température ambiante (20 à 25 °C).

Arrêt de la réaction : ajout de 0,5 mL de NaOH au bout de 3 min.

- Mesurer l'absorbance à la longueur d'onde choisie contre un témoin adapté.
- Si la variation d'absorbance lue dépasse la valeur limite déterminée lors de l'étude préliminaire (voir **ANNEXE** du sujet), refaire une mesure sur l'échantillon diluée.

DONNÉE DÉFINITION DE L'UNITÉ D'ACTIVITÉ PHOA

- 1 U = quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une micromole de pNPP par minute dans les conditions du dosage.

FICHE TECHNIQUE 6

DOSAGE DES PROTÉINES PAR LA MÉTHODE DE BRADFORD

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
SAB	Solution étalon de sérumalbumine à $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Flacon 5 mL
Bradford	Réactif de Bradford	Flacon 20 mL
Tris-HCl	Tris-HCl à $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8	Flacon 10 mL

- Semi-microcuvettes ; papier Parafilm
- Spectrophotomètre

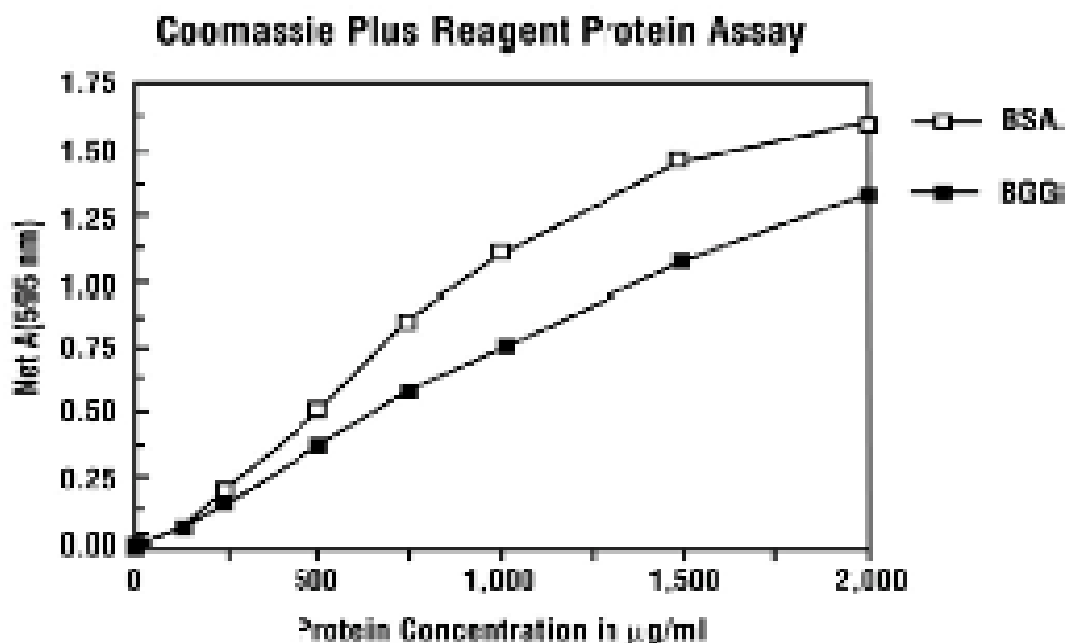
TEST TUBE PROCEDURES

« STANDARD TEST TUBE PROTOCOL »

Working range: 100-1000 mg/mL

1. Pipette 0.02 mL (20 μL) of each standard or unknown sample into appropriately labeled test tubes.
2. Add 1 mL of the Coomassie Reagent (Bradford) to each tube and mix well.
3. For the most consistent results, incubate samples for 10 minutes at room temperature (RT).
4. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 595 nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in $\mu\text{g/mL}$. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.
5. Coloration stability: one hour at room temperature.

DONNÉES



**Typical color response curves for BSA and BGG
using the Standard Test Tube Protocol.**

FICHE TECHNIQUE 7

DOSAGE DE PhoA-His₆ PAR ELISA

RÉACTIFS ET MATÉRIELS

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Tampon de sensibilisation	Carbonate / bicarbonate à 100 mmol·L ⁻¹ pH 9,6	Pot 10 mL
Ac α PhoA	Anticorps polyclonal de lapin anti-PhoA à 10 mg·mL ⁻¹	Microtube 10 µL (glace)
Solution de lavage	PBS Tween 20 à 0,1 % (V/V)	2 pots 100 mL
Solution de blocage	PBS + SAB à 1% (m/V)	Pot 25 mL
Étalon PhoA	PhoA-His ₆ pure à 1,2 g·L ⁻¹ en tampon Tris-HCl	Microtube 50 µL (glace)
Conjugué	Anticorps monoclonal de souris anti-His ₆ couplé à la peroxydase, à 50 U·mL ⁻¹	Microtube 15 µL (glace)
TMB 1 %	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine à 10 mg·mL ⁻¹ en DMSO	Microtube 200 µL
Tampon de révélation	Acétate de sodium à 0,1 mol·L ⁻¹ pH 5,5	Pot 10 mL
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène à 30 % (V/V)	Microtube 10 µL (glace)
Solution d'arrêt	H ₂ SO ₄ à 2 mol·L ⁻¹	Tube 2 mL

- Microplaque MaxiSorp™ 96 puits ; papier autocollant ; fond noir
- Bassine bleue ; papier absorbant ; compte-gouttes
- 3 tubes Falcon de 15 mL
- Pipettes jetables de 5 mL
- Étuve à 30 °C ; agitateur de microplaques (dans l'étuve à 30 °C)
- Lecteur de microplaques

MODE OPÉRATOIRE

PLAN DE MICROPLAQUE

Chaque dosage (étalon ou fraction) est réalisé sur une colonne de la plaque selon le plan suivant :

- **Colonne 1 :** étalon PhoA ;
- **Colonne 2 :** fraction D₁ ;
- **Colonne 3 :** fraction E₁.

TEMOINS ET VALIDATION DE LA METHODE

Prévoir de réaliser pour chaque solution traitée (étalon PhoA, D₁, E₁) un **témoin « non sensibilisé »** (puits sans anticorps de sensibilisation).

Prévoir de réaliser également d'autres témoins, *dans la limite des volumes des fractions disponibles*.

La validation du dosage ne peut s'effectuer que si valeur obtenue pour les témoins ne dépasse pas de trois fois la valeur de la ligne de base de l'étalonnage.

1. SENSIBILISATION DU SUPPORT

1.1. Préparation de l'anticorps de sensibilisation

Diluer extemporanément l'anticorps de sensibilisation au 1/2500 en tampon de sensibilisation (volume final : 5 mL, en tube Falcon).

1.2. Dépôts

- Déposer 100 µL d'anticorps de sensibilisation dilué dans chaque puits des colonnes **1, 2 et 3**.
- Recouvrir la plaque avec le film autocollant.
- Incuber au moins 1 h à 30°C, sans agitation.

1.3. Lavages

- Vider les puits par retournement au-dessus de la bassine bleue.
- Remplir les puits au compte-gouttes avec du tampon de lavage.
- Vider par retournement. Sécher en tapotant sur plusieurs couches de papier absorbant.
- Répéter 2 fois.

2. SATURATION

- Déposer 150 µL de solution de blocage dans tous les puits tests.
- Incuber 30 minutes à 30°C.
- Effectuer 3 lavages (*voir étape 1.3.*).

3. FIXATION DES ANTIGENES

3.1. Pré-dilutions

Pré-diluer l'étalon PhoA et les fractions **D₁** et **E₁** selon les données suivantes :

- o Diluant : solution de blocage ;
- o Étalon PhoA : pré-dilution au 1/10 000 ;
- o **D₁** : pré-dilution à prévoir sachant que la concentration en PhoA dans la fraction périplasmique de **D** est estimée à environ 0,06 mg·mL⁻¹ ;
- o **E₁** : pas de pré-dilution.

3.2. Dilutions successives en microplaque

Effectuer des dilutions successives de raison 1/2 des échantillons, directement dans les colonnes **1, 2 et 3**, sous un volume final de 100 µL, en solution de blocage.

3.3. Incubation : 30 minutes à 30 °C.

3.4. Lavages : effectuer 3 lavages (*voir étape 1.3.*).

4. AJOUT DU CONJUGUE

4.1. Préparation du conjugué

Diluer extemporanément le conjugué au 1/500 en solution de blocage (volume final : 5 mL, en tube Falcon).

4.2. Ajout du conjugué

-
- Ajouter 100 μL de conjugué dilué au 1/500 dans les puits tests.
 - Incuber 15 minutes à 30 °C.

4.3. Lavages : effectuer 3 lavages (*voir étape 1.3.*).

5. REVELATION

5.1. Préparation de la solution de révélation

Préparer extemporanément la solution de révélation : TMB à $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + H_2O_2 0,006 % en tampon de révélation (volume final : 5 mL, en tube Falcon).

5.2. Ajout de la solution de révélation

- Ajouter dans chaque puits 100 μL de solution de révélation équilibrée à température ambiante.
- Incuber 15 à 20 minutes à 30 °C, sous agitation.

5.3. Arrêt de la réaction et lecture

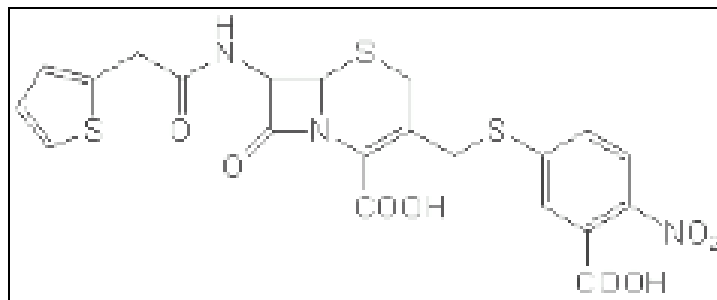
- Ajouter dans chaque puits 50 μL de solution d'arrêt.
- Lire à 450 nm, en réglant le zéro du lecteur de microplaques sur l'air (cupule vide).

FICHE TECHNIQUE 8

SPOT-TEST POUR LA MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE β -LACTAMASE

PRINCIPE

L'activité β -lactamase est mise en évidence par hydrolyse du CENTA :



L'hydrolyse de la fonction β -lactame entraîne la libération d'un produit coloré en jaune.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
CENTA	CENTA à 25 mmol·L ⁻¹ dans du méthanol pur	Microtube 20 μ L (glace)
Tris-HCl	Tris-HCl à 20 mmol·L ⁻¹ pH 8,0	Flacon 10 mL
Étalon PhoA	PhoA-His ₆ pure à 1,2 g·L ⁻¹ en tampon Tris-HCl	Microtube 50 μ L (glace)

- Papier filtre
- Papier Parafilm

MODE OPÉRATOIRE

L'ensemble des opérations est effectué à température ambiante.

1. Placer un morceau de papier Parafilm sur un papier filtre blanc.
2. Déposer sur le papier Parafilm 20 μ L de tampon Tris-HCl.
3. Ajouter 2 μ L de CENTA dans la goutte précédente.
4. Ajouter 20 μ L de la fraction à tester dans la goutte précédente.
5. Homogénéiser par aspiration-refoulement à la pipette automatique.
6. Observer et analyser la coloration apparue au bout de 15 min.

TEMOINS :

Réaliser en parallèle 2 témoins :

- fraction testée remplacée par de l'eau distillée ;
- fraction testée remplacée par l'étalon PhoA.

RAPPORT DU JURY DE TP DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

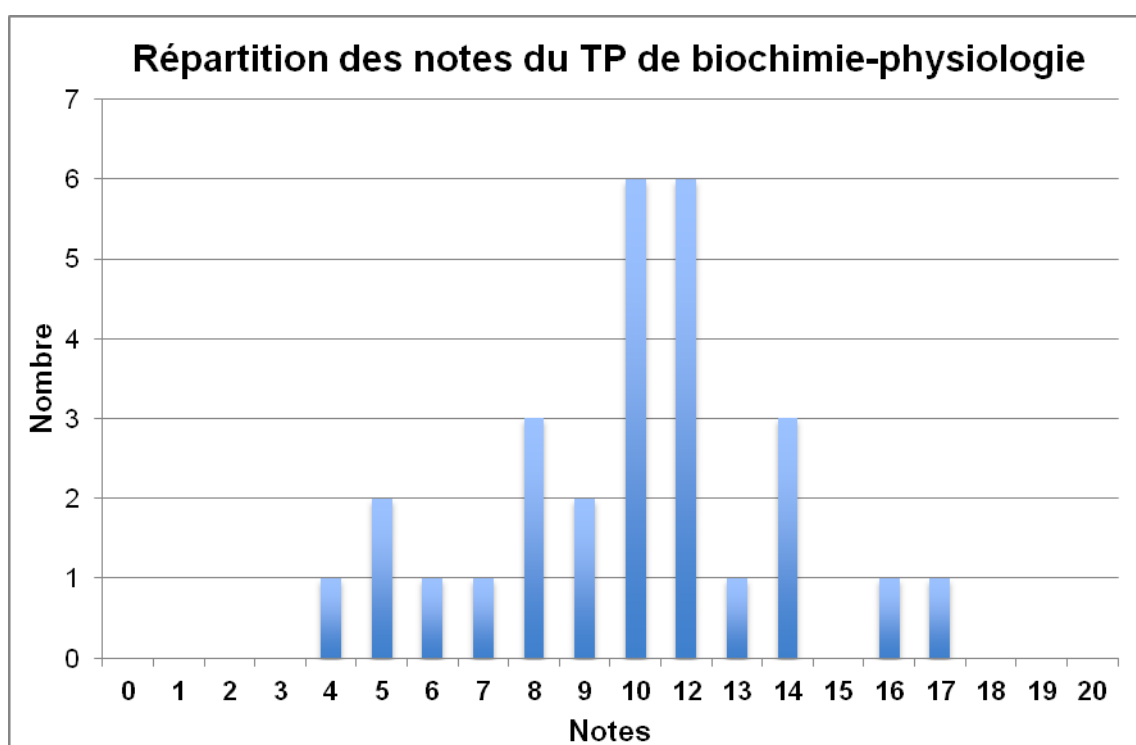
Rapport établi par : Jean-Michel BETTON, Fabien CÉZARD, Olivier DOUMEIX, Sabine ORSONI, Jérôme VINCENT.

Optimisation de la production de protéines recombinantes chez *E. coli*

Résultats

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,3 / 20**
- Meilleure note : **16,1 / 20**
- Note la plus basse : **04,3 / 20**
- 18 notes sur 28 (**64 %**) sont supérieures ou égales à 10 / 20

Histogramme de répartition



COMMENTAIRES GENERAUX SUR L'EPREUVE

Description de l'épreuve

Le sujet portait cette année sur l'optimisation de la production de protéines recombinantes dans un hôte bactérien (*E. coli*). Il s'agissait principalement de quantifier la récupération et la purification d'une protéine à destination périplasmique.

Le travail était centré sur deux aspects :

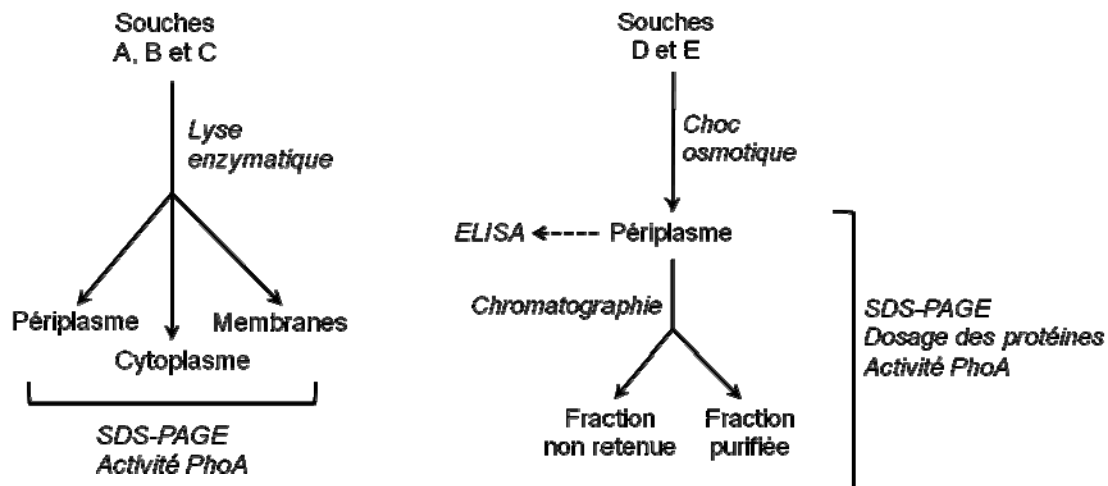
- efficacité de deux séquences signal d'adressage périplasmique ;
- efficacité de l'adjonction d'une queue polyhistidine pour la purification de protéines recombinantes.

La base des différentes constructions était la phosphatase alcaline (PhoA). Des souches transformées par les plasmides recombinants étaient fournies :

souches B et C : PhoA associée à 2 séquences signal différentes d'exportation périplasmique ;
souches D et E : PhoA seule ou fusion PhoA-Bla, avec étiquette polyhistidine.

Une **souche témoin A**, non transformée, était également à disposition.

À partir de ces 5 souches, les préparations et analyses suivantes étaient prévues :



Aspects techniques

La difficulté de l'épreuve tenait principalement au nombre d'échantillons à préparer et à traiter, donc à des questions d'organisation. Les méthodes d'analyse ne présentaient pas de problèmes techniques particuliers pour des candidats préparés à ce type d'épreuve, avec des manipulations très classiques comme le dosage colorimétrique des protéines totales, les dosages enzymatiques, le dosage immuno-enzymatique et l'électrophorèse.

Pour optimiser l'organisation, on ne peut qu'inciter les candidats à bien lire l'ensemble du sujet afin de repérer les temps et étapes importantes.

En particulier pour ce sujet :

- les préparations des fractions cellulaires pour la PARTIE 1 et la PARTIE 2 devaient être menées en parallèle, la plupart des étapes initiales étant les mêmes ;
- les candidats ne disposant que d'un seul gel, tous les échantillons devaient être préparés et déposés en une seule fois ;
- en raison des temps d'attente importants, le dosage de PhoA par ELISA devait être mis en œuvre très tôt.

Aspects rédactionnels

Les différentes parties doivent être clairement identifiables et les réponses précisément numérotées. L'utilisation de couleurs pour les schémas et de tableaux récapitulatifs (lorsque des calculs identiques se répètent) est toujours valorisée.

PARTIE 1

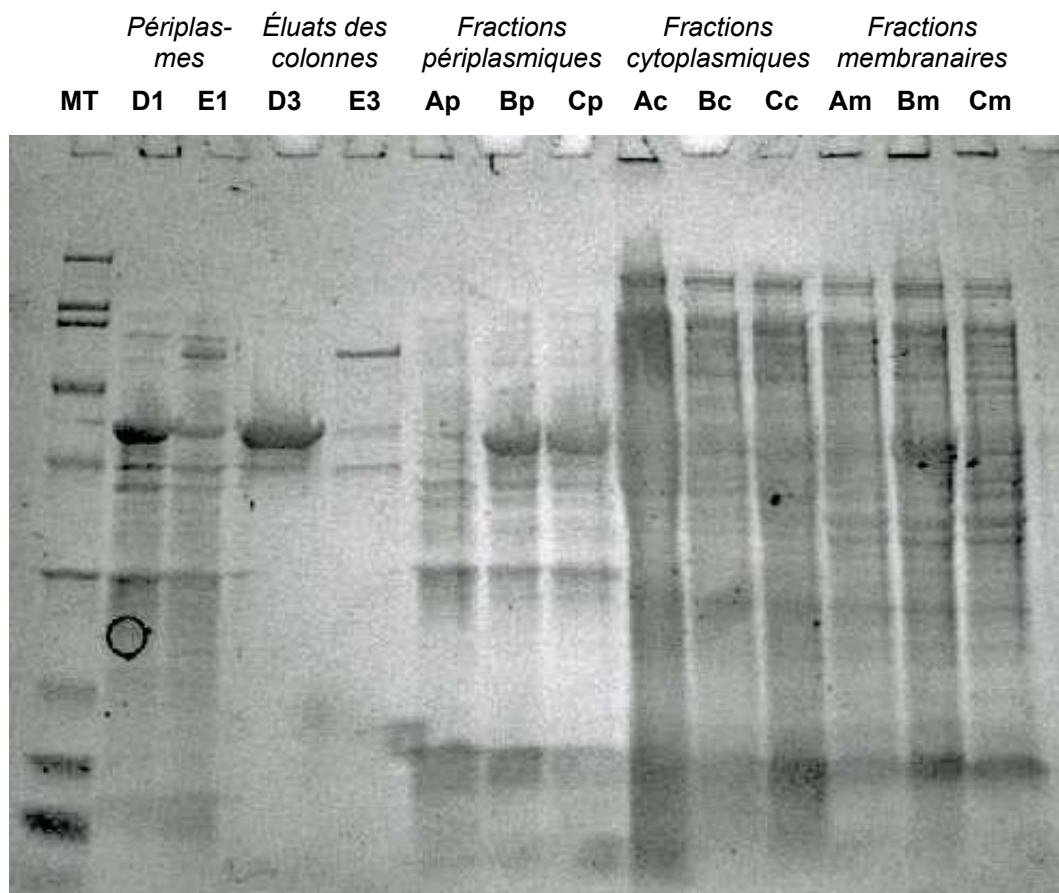
OPTIMISATION DE L'EXPORTATION PERIPLASMIQUE DE PHO A

Préparation des fractions

La préparation des fractions n'a pas posé de problèmes à la majorité des candidats. Elle nécessitait une calibration des suspensions bactériennes productrices, à partir d'une mesure d'opacité. Rappelons qu'il est nécessaire d'homogénéiser les suspensions bactériennes avant tout prélèvement et passage au spectrophotomètre.

Analyse des fractions par SDS-PAGE

Presque tous les candidats ont déposé leurs échantillons sur gel SDS-PAGE et ont pu les analyser après coloration et photographie du gel.



Dans cette partie, il s'agissait d'analyser les fractions issues des souches **A**, **B**, **C**.

Peu de candidats ont compris l'intérêt de la souche **A**. Elle était délétée en PhoA et servait donc de témoin négatif pour la détection de PhoA dans les souches transformées. Les bandes de 50 kDa apparaissant sur les pistes **Ap**, **Am** ou **Ac** ne correspondent pas obligatoirement à PhoA. En revanche, la présence d'une bande épaisse à environ 50 kDa pour les fractions **Bp** et **Cp** correspond à PhoA puisque ces deux souches la surexpriment.

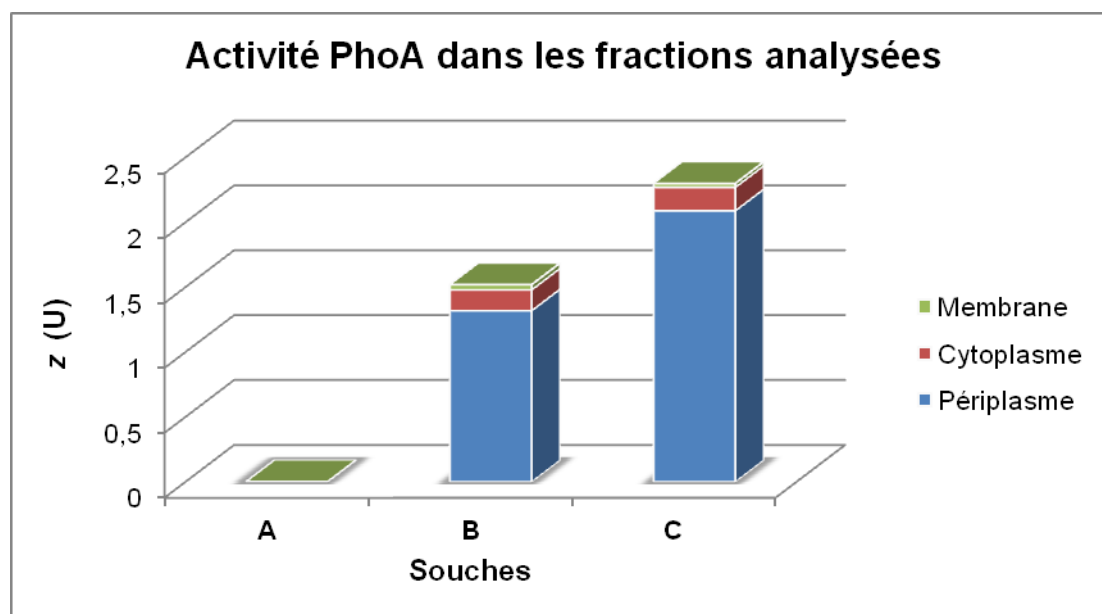
Dans la fraction **Bm**, on retrouve une bande similaire. Certains candidats ont à juste titre évoqué la présence de corps d'inclusion cytoplasmiques récupérés dans la fraction membranaire du fait de leur insolubilité. Cette bande est moins intense dans la fraction **Cm**. La séquence signal de MalE semble plus efficace pour assurer l'exportation périplasmique de la protéine surproduite évitant ainsi la formation des corps d'inclusion.

La double bande présente au niveau des extraits totaux (DOCUMENT 4) des souches **B** et **C** correspond au précurseur PhoA avec sa séquence signal et à la protéine mature après clivage de cette séquence.

Mesure de l'activité PhoA des fractions cellulaires

La FICHE TECHNIQUE 5 imposait une durée d'incubation de trois minutes exactement. Le déclenchement et l'arrêt de la réaction des différents tubes imposaient donc un décalage régulier dans le temps.

Peu de candidats ont mené ces manipulations et leur exploitation jusqu'au bout. L'analyse des résultats pouvait être réalisée même sans avoir effectué l'ensemble des calculs. Par exemple, le pourcentage d'activité dans chaque fraction pouvait être calculé directement à partir des absorbances.



L'activité PhoA des fractions analysées pour les souches **A, B, C** :

- confirme l'absence d'activité PhoA pour la souche **A** ;
- montre que la souche **C** exprime plus fortement PhoA et l'exporte mieux.

***Remarque :** la protéine n'étant active que dans le périplasma, où la conformation native est acquise, l'activité mesurée dans le cytoplasme correspond à une contamination de cette fraction par le périplasma au cours du processus de fractionnement.*

Les résultats obtenus lors de l'analyse par électrophorèse et par mesure de l'activité PhoA étaient concordants pour la majorité des candidats.

PARTIE 2

PRODUCTION PERIPLASMIQUE ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES

Préparation des fractions

Dans cette partie, les fractions étaient obtenues par choc osmotique.

L'analyse de la composition des réactifs ajoutés dans le milieu extracellulaire permet de distinguer l'étape de plasmolyse (concentration en saccharose de $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de celle de turgescence (eau uniquement) avec expulsion brutale du périplasme.

Toute réflexion cohérente sur l'influence de l'osmolarité du milieu extracellulaire sur la turgescence ou la plasmolyse des cellules a été valorisée.

Purification sur colonne nickel

L'action de l'EDTA ne doit pas être réduite à la fixation des ions calcium et magnésium. Il chélate tous les cations divalents, donc aussi les ions nickel (Ni^{2+}). L'EDTA ne doit donc pas être en contact avec la colonne car il piègerait le nickel, responsable de la rétention des étiquettes His₆.

De nombreux candidats ont su distinguer le rôle de l'imidazole dans les 2 étapes de purification sur colonne de nickel :

- à faible concentration dans le tampon de fixation ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), il limite les interactions non spécifiques entre des protéines contaminantes et le nickel ;
- à forte concentration ($500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), il entre en compétition avec les protéines d'intérêt fortement associées au nickel, et donc entraîne leur élution.

Analyse des fractions par SDS-PAGE

Dans cette partie, il s'agissait d'analyser les dépôts des fractions issues des souches **D** et **E**. La purification des protéines PhoA-His₆ et PhoA-Bla-His₆ a été correctement menée par la majorité des candidats.

L'analyse du gel permettait de faire ressortir différents aspects :

- détection d'une bande très intense dans l'extrait périplasmique de la souche **D** et d'une bande intense dans l'extrait de la souche **E**, correspondant respectivement aux tailles moléculaires attendues des protéines recombinantes (49,6 kDa et 78,9 kDa). Cette observation signifie que les protéines PhoA-His₆ et PhoA-Bla-His₆ ont bien été produites ;
- visualisation d'une bande dans les éluats après colonne de nickel, très intense pour la souche **D** (PhoA-His₆), et fine pour la souche **E** (PhoA-Bla-His₆), montrant que la protéine PhoA-His₆ a été mieux retenue par le nickel que la protéine PhoA-Bla-His₆. L'étiquette His₆ est beaucoup moins accessible au nickel dans la protéine PhoA-Bla-His₆ que dans la protéine PhoA-His₆, certainement par encombrement stérique en présence du domaine Bla ;
- analyse de la qualité de la purification des protéines PhoA-His₆ et PhoA-Bla-His₆ :
 - o pour **D**₃, une bande de forte intensité apparaît à une hauteur cohérente avec sa taille (49,6 kDa). Une bande de plus faible intensité (taille proche de 45 kDa) est visible. La qualité de la purification n'est donc pas parfaite ;
 - o pour **E**₃, une seule bande apparaît à une hauteur cohérente avec sa taille (78,9 kDa). Pour certains candidats, deux autres bandes d'intensité

équivalente sont décelables à environ 45 kDa et 55 kDa. L'hypothèse selon laquelle ces 2 bandes correspondraient respectivement à PhoA et Bla suite à une protéolyse n'est pas recevable puisque d'une part la masse moléculaire de Bla (environ 30 kDa) ne correspond pas, d'autre part l'hydrolyse de la protéine PhoA-Bla-His₆ libérerait la protéine PhoA sans étiquette His₆ donc non retenue sur la colonne. L'explication la plus probable est que la colonne retient aussi des protéines périsplasmiques non recombinantes ayant de l'affinité pour la colonne parce qu'elles possèdent plusieurs histidines.

Mesure de l'activité PhoA et dosage des protéines des différentes fractions

	D₁	D₃	E₁	E₃
z_(PhoA) en U dans 600 µL de fraction déposée	0,6848		0,2142	
z_(PhoA) en U dans 300 µL de fraction récupérée		0,4635		0,0342
Rendement	68 %		16 %	
b_(PhoA) en U·mL ⁻¹	1,1413	1,5451	0,357	0,1141
ρ_(protéine) en g·L ⁻¹	0,35	0,065	0,36	0,03329
z_{sp} en U·mg ⁻¹	3,26	23,77	0,99	3,46
Enrichissement	7,3		3,5	

- Les calculs des rendements et d'enrichissements de purification ont été peu abordés et ont montré des confusions entre ces deux notions :

$$\text{Rendement}_{\text{PhoA-His6}} = \frac{z_{(\text{PhoA}; V_{D3 \text{ r\"{e}cup\"{e}r\'{e}})}}}{z_{(\text{PhoA}; V_{D1 \text{ d\'{e}pos\'{e}})}}} \times 100 = \frac{b_{(\text{PhoA}; D3)} \times V_{D3 \text{ r\"{e}cup\"{e}r\'{e}}}}{b_{(\text{PhoA}; D1)} \times V_{D1 \text{ d\'{e}pos\'{e}}}} \times 100$$

$$\text{Enrichissement} = \frac{z_{sp(D3)}}{z_{sp(D1)}} \quad \text{avec} \quad z_{sp(Dn)} = \frac{b_{(\text{PhoA}; Dn)}}{\rho_{(\text{prot\'{e}ines}; Dn)}}$$

Un candidat qui n'avait pas pu calculer les concentrations d'activité catalytique des fractions **D₁**, **D₃**, **E₁** et **E₃**, a judicieusement posé ce calcul en utilisant les absorbances mesurées :

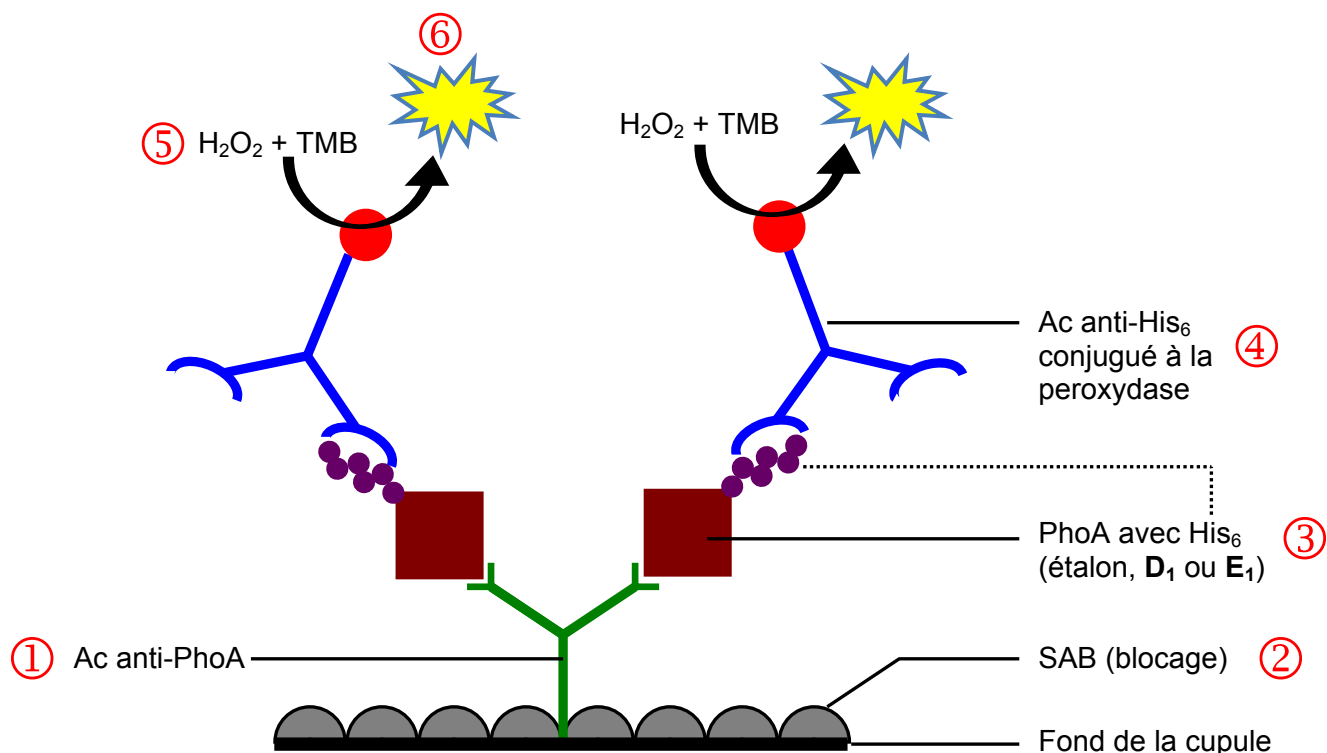
$$\text{Rendement}_{\text{PhoA-His6}} = \frac{A_{(D3)} \times V_{D3 \text{ r\"{e}cup\"{e}r\'{e}}}}{A_{(D1)} \times V_{D1 \text{ d\'{e}pos\'{e}}}} \times 100$$

- D'après la FICHE TECHNIQUE 6, l'absorbance à 595 nm est proportionnelle à la concentration en SAB pour une gamme comprise entre 100 et 750 µg·mL⁻¹. La faiblesse des volumes de solution protéique imposaient de préparer une pré-gamme de SAB.
Seul un quart des candidats a traité cette partie, pourtant classique.
- Les résultats retrouvés par mesure de l'activité étaient concordants avec ceux obtenus sur le SDS-PAGE :
 - la protéine PhoA-Bla-His₆ est extraite en plus faible quantité que PhoA-His₆ ;
 - lors de la purification, une part importante de la protéine PhoA-Bla-His₆ est perdue, le rendement n'étant que de 16 % ;
 - l'enrichissement est plus faible pour PhoA-Bla-His₆ du fait d'une perte importante de protéine dans la colonne.

- Si on veut augmenter la pureté de l'extrait, il est conseillé de saturer la résine de nickel avec la protéine d'intérêt. La rétention de protéines contaminantes, retenues par des interactions peu spécifiques, est ainsi limitée. On gagne donc en pureté ce qu'on perd en rendement.

Dosage de PhoA-His6 dans les fractions périplasmiques par ELISA

La schématisation de l'édifice moléculaire obtenu en fin de dosage pouvait être faite indépendamment de la manipulation, ce que de nombreux candidats ont compris. Un schéma précis, mettant en évidence les reconnaissances spécifiques (notamment l'étiquette His₆ par l'anticorps conjugué) devait être assorti d'une légende complète.



- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1 Ac anti-PhoA de sensibilisation | 4 Ac conjugué anti-His ₆ |
| 2 Solution de blocage (SAB) | 5 Solution de substrat de la peroxydase |
| 3 Solution à doser | 6 Solution d'arrêt – révélation |

Dilution de la solution D1

D₁ est environ 20 fois moins concentré que la solution étalon PhoA, celle-ci devant être diluée au 1/10000, il est nécessaire de diluer D₁ au 1/500.

Préparation des solutions pour l'ELISA

	Fd	V final	V versé
Anticorps de sensibilisation (1.1)	2500	5 mL	2 µL
Conjugué (4.1)	500	5 mL	10 µL

Solution de révélation (5.1) V_{tot} = 5 mL	$\rho_{\text{TMB initial}} = 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	% H ₂ O ₂ initial = 30 %
	$\rho_{\text{TMB final}} = 0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	% H ₂ O ₂ final = 0,006 %
	V_{TMB initial prélevé} = 50 μL	V_{H2O2 initial prélevé} = 1 μL

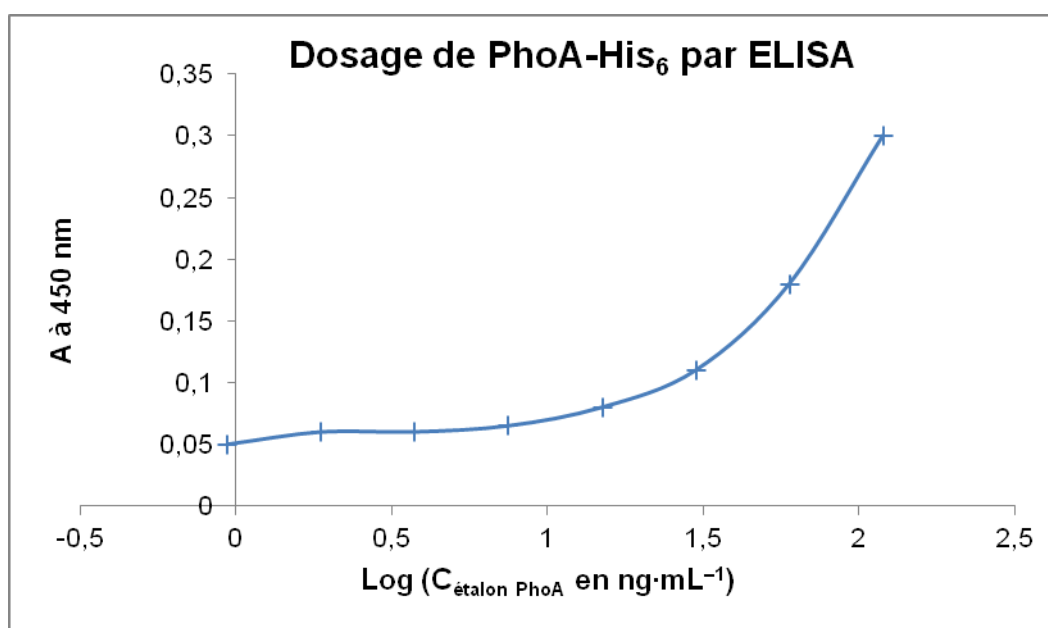
Les anticorps anti-PhoA et conjugué étant disponibles en faible volume, il était impératif d'effectuer les dilutions (au 1/2500 et 1/500) en une seule fois. Pour limiter l'erreur de prélèvement sur les micro-volumes, le pipetage inverse avait été recommandé.

Pour la préparation de la solution de révélation, certains candidats n'ont pas vu que la solution de H₂O₂ initiale était à 30 % et non à 100 %.

Le témoin non sensibilisé permet d'évaluer les interactions non spécifiques entre le support et chacune des molécules participant à l'édifice moléculaire mis en jeu, sauf l'anticorps anti-PhoA.

D'autres témoins étaient envisageables. Par exemple :

- témoin sans PhoA : il permettait d'évaluer la fixation non spécifique du conjugué au support ;
- témoin sans conjugué : il permettait d'évaluer l'oxydation spontanée du substrat (absence de l'enzyme POD).



Pour la fraction **D₁** (PhoA-His₆), la concentration trouvée était de l'ordre de 200 mg·L⁻¹.

Pour la fraction **E₁** (PhoA-Bla-His₆), les signaux mesurés sont très faibles. Ceci peut s'interpréter non pas comme une absence de la protéine dans cet extrait (une activité phosphatasique significative a été mise en évidence) mais par la faible reconnaissance de de l'étiquette His₆ par le conjugué.

Cette hypothèse de faible accessibilité de l'étiquette His₆ dans PhoA-Bla-His₆ a déjà été évoquée pour la purification sur résine de nickel.

Les candidats pris par le temps pouvaient estimer grossièrement la concentration en PhoA en utilisant une valeur d'absorbance de **D₁** encadrée par 2 valeurs d'absorbance exploitables de l'étalon.

Mise en évidence de l'activité β -lactamase dans la fraction E_1

Cet ultime test permettait de vérifier que la β -lactamase est toujours active au sein de la fusion PhoA-Bla.

Témoin 1 : remplacement de E_1 par de l'eau distillée. Il permet de vérifier l'hydrolyse non enzymatique du substrat.

Témoin 2 : remplacement de E_1 par de l'étalon PhoA. Il permettait de vérifier que le domaine PhoA de la protéine de fusion n'a pas d'activité sur le substrat.

Très peu de candidats ont réalisé ce test, très rapide, alors que tous disposaient de la fraction E_1 . Un candidat ayant perdu la totalité de sa fraction E_1 a judicieusement demandé s'il pouvait tester cette activité sur la fraction E_3 , qui s'est révélée positive.

Résultats des tests :

Une goutte transparente pour les témoins et très colorée pour la fraction E_1 (ou E_3) montrait une activité β -lactamase bien présente dans la protéine PhoA-Bla-His₆.



ANNEXE

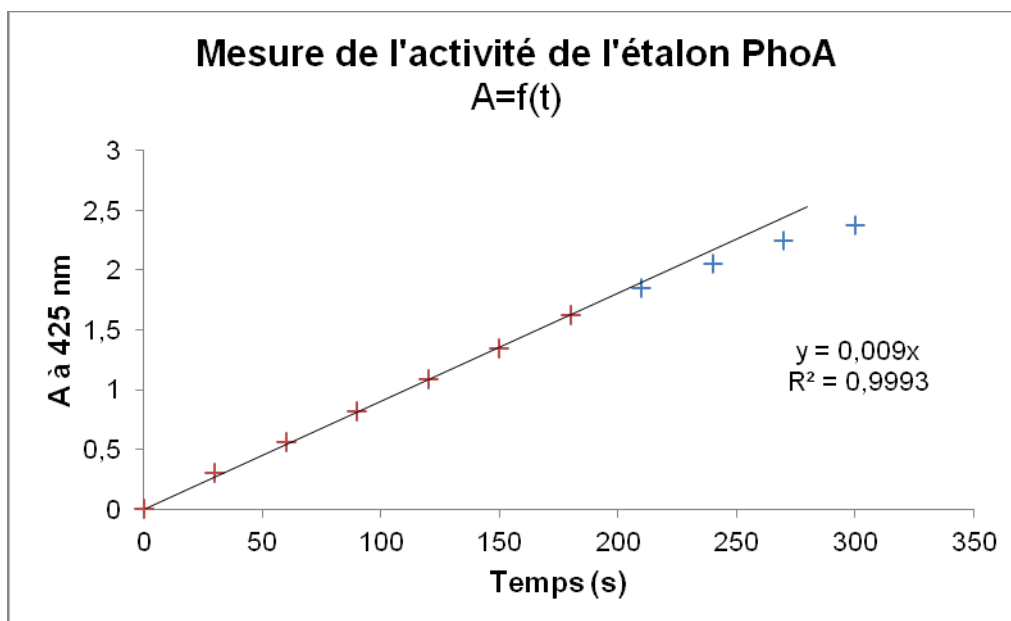
Détermination de la longueur d'onde optimale de détection

La longueur d'onde de détection doit être choisie de manière à ce que le produit absorbe fortement et que le substrat absorbe peu. Une valeur comprise entre 420 et 440 nm est un choix judicieux.

Détermination du coefficient d'absorption molaire du pNP

Par régression linéaire.

Détermination des conditions de validité de la méthode 2 points



Dans les conditions de l'expérience la période linéaire (phase de vitesse initiale) est de trois minutes. Dans ces conditions, la variation d'absorbance à ne pas dépasser est de 1,6 en méthode cinétique en continu. Il s'agit ensuite de tenir compte des volumes et des coefficients d'absorption molaire différents afin de transposer cette valeur pour la méthode en deux points.

$$\Delta A_{\text{en 2 points}} = \frac{\Delta A_{\text{en continu}} \times V_{\text{en continu}} \times \epsilon_{\text{en 2 points}}}{V_{\text{en 2 points}} \times \epsilon_{\text{en continu}}}$$

Avec

$\Delta A_{\text{en 2 points}}$	la variation d'absorbance à ne pas dépasser lors des mesures par la méthode en 2 points
$\Delta A_{\text{en continu}}$	la variation d'absorbance mesurée lors des mesures par la méthode en continu
$\epsilon_{\text{en 2 points}}$	Coefficient d'absorption molaire du pNP dans les conditions de mesure en deux points (soit $17212 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
$\epsilon_{\text{en continu}}$	Coefficient d'absorption molaire du pNP dans les conditions de mesure en continu (soit $16212 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
$V_{\text{en 2 points}}$	Volume de la cuve dans les conditions de mesure en 2 points (soit 1,51 mL)
$V_{\text{en continu}}$	Volume de la cuve dans les conditions de mesure en continu (soit 1,01 mL)

La variation d'absorbance à ne pas dépasser lors des mesures effectuées en 2 points était de 1,1 à 425 nm.

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

SUJET

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

ÉPREUVE PRATIQUE DE MICROBIOLOGIE

L'ammoniac et son effet sur les populations bactériennes

INTRODUCTION

Les bactéries produisent et captent une large gamme de petites molécules signal qui leur permettent de s'adapter à des modifications environnementales et de proliférer dans des milieux polymicrobiens. L'étude de la communication bactérienne a conduit à examiner les fonctions des métabolites secondaires que l'on considérait jusqu'alors comme des sous-produits non essentiels des voies métaboliques. Certains de ces métabolites interviennent dans les interactions entre populations bactériennes.

Ce sujet propose d'étudier les effets d'un métabolite secondaire produit par des souches d'*Escherichia coli* (souches donneuses) sur :

- le profil de résistance de souches receveuses à un antibiotique : la tétracycline ;
- la capacité à produire des biofilms d'autres souches qui pourraient éventuellement partager la même niche écologique que la souche d'*E. coli* donneuse.

Des éléments du mécanisme de la modification du profil de résistance seront abordés grâce à l'utilisation de deux souches receveuses génétiquement modifiées.

La souche donneuse est désignée par la lettre D, les souches receveuses par la lettre R. Les souches utilisées sont non pathogènes.

TRAVAIL DU PREMIER JOUR

DONNÉES

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

MATÉRIEL UTILISABLE POUR TOUTES LES MANIPULATIONS

Milieu de culture

Bouillon LB stérile	100 mL en flacon
Eau Δ (eau distillée) stérile	100 mL en flacon
Eau ϕ (eau physiologique) stérile	100 mL en flacon

Matériel

Boîtes de Petri de 90 mm de diamètre (**BP90**)
Boîtes de Petri de 35 mm de diamètre (**BP35**)
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, 25 mL
Pipettes automatiques P1000, P200, P50 + cônes adaptés
Microtubes stériles de 2 mL
Microcentrifugeuse
Chronomètre
Pince
Poire d'aspiration

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

PARTIE A

Préparation des surnageants bactériens

La mise en œuvre du sujet nécessite la préparation de surnageants bactériens de la souche *E. coli* donneuse de référence en phases exponentielle et stationnaire de croissance. La culture de nuit est fournie : elle permet de préparer le surnageant de la culture en phase stationnaire et la culture en phase exponentielle. Le suivi de croissance de la souche est effectué par opacimétrie à 600 nm et la culture est arrêtée lorsque la souche atteint la phase exponentielle (A_{600} comprise entre 0,5 et 1,0). Cette dernière permet alors de préparer le surnageant stérile de la culture en phase exponentielle.

Culture

Culture de 18 h à 37°C en bouillon LB, en Erlenmeyer contenant 50 mL :

D : *E. coli*, souche donneuse de référence

Milieu de culture

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

avec agitation

Matériel spécifique

Bain thermostaté à 37°C avec agitation

Flacon stérile vide de 30 mL

Seringue stérile de 5 mL

Filtre stérile de porosité 0,45 µm

MANIPULATIONS

A1- Croissance de la souche D jusqu'en phase exponentielle

A11- Ensemencement et première mesure

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de la culture de la souche **D** 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 environ à 0,1.
- 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.

-
- Lorsque l'absorbance atteint une valeur comprise entre 0,5 et 1,0, placer l'Erlenmeyer de culture dans la glace, puis procéder à la préparation du surnageant de culture stérile [**partie A2**].

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

A2- Préparation des surnageants de culture

A21- Préparation du surnageant de la souche D en phase stationnaire

- Transférer 10 fois 2 mL de culture de nuit de la souche **D** dans 10 microtubes.
- Centrifuger les microtubes pendant 3 minutes à vitesse maximale.
- Prélever les surnageants et les introduire dans un flacon vide stérile de 30 mL.

A22- Préparation du surnageant de la souche D en phase exponentielle

- Transférer 3 fois 2 mL de culture en phase exponentielle préparée en **partie A12** dans 3 microtubes.
- Centrifuger les microtubes pendant 3 minutes à vitesse maximale.
- Prélever les surnageants de la culture, les filtrer à l'aide d'un filtre de porosité 0,45 µm et d'une seringue de 5 mL. Récupérer le filtrat dans un tube à hémolyse stérile.

La filtration sera réalisée en présence d'un examinateur.

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 A_{600} et le temps correspondant à l'arrêt de cette croissance.

PARTIE B

Modification du profil de résistance à la tétracycline

Dans cette étude, il s'agira de comparer la capacité de croissance de souches sur un milieu contenant la tétracycline coulé en boîte de Petri de 90 mm de diamètre (**BP90**) en fonction de la solution présente dans la boîte de Petri de 35 mm de diamètre (**BP35**).

Cultures

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

R1 : *E. coli*, souche receveuse de référence

R2 : *E. coli*, souche receveuse mutante

R3 : *E. coli*, **R1** possédant une construction génétique supplémentaire

Milieu de culture

Gélose **LA** en surfusion (60°C) 2 flacons de 125 mL

Réactifs

Tet : solution de tétracycline à 7,5 mg·mL⁻¹ en éthanol à 50 % (V/V) 1 mL en microtube, en glace

NH₃ : solution d'ammoniac à 50 mmol·L⁻¹ 15 mL en flacon, en glace

Solution d'éthanol à 50 % (V/V) 10 mL en tube, en glace

Matériel spécifique

Bande de parafilm 1 dans une boîte de Petri

Blocs de 4 cupules stériles à fond rond 3 dans une boîte de Petri

MANIPULATIONS

B1- Préparation des systèmes de culture « two-Petri-dish assay »

Le système de culture « two-Petri-dish assay » permet d'évaluer l'effet d'un composé sur la culture d'une souche bactérienne.

- *L'**annexe 1** précise, pour chaque système, le milieu de culture à couler, la solution placée dans la boîte de Petri de 35 mm de diamètre (BP35), l'éventuel scellage de la BP35 et la nature de la suspension bactérienne qui seraensemencée sur la gélose contenue dans la boîte de Petri de 90 mm de diamètre (BP90) ou la nature du contenu des cupules.*
 - *L'incorporation de la tétracycline doit être réalisée extemporanément dans la gélose à 45°C environ. La tétracycline étant thermosensible, il est impératif que son incorporation ne soit pas réalisée dans une gélose dont la température serait supérieure à 45°C.*
- Préparer 5 mL d'une solution fille de tétracycline à 75 µg·mL⁻¹ en éthanol 50 %. Cette solution doit être conservée dans la glace.
 - Numéroter les BP90 comme indiqué dans l'**annexe 1**.
 - A l'aide d'une pince stérile, placer les BP35 au centre de chaque BP90.
 - Incorporer la tétracycline dans un flacon de gélose à température de 45°C environ afin d'obtenir une concentration finale en tétracycline dans la gélose LA de 0,75 µg·mL⁻¹.
 - Couler immédiatement dans chaque BP90 15 mL de gélose LA additionnée de tétracycline. Entrouvrir le couvercle de chaque BP90 pendant la solidification du milieu gélifié.
 - Il est fortement recommandé de ne pas laisser les BP90 trop longtemps à proximité du bec électrique. En effet, la chaleur pourrait dégrader la tétracycline contenue dans le milieu de culture.

-
- Pour les systèmes de culture n°6, 7 et 8, avant solidification totale de la gélose :
 - placer à l'aide d'une pince stérile un bloc de 4 cupules à fond rond stérile dans la gélose ;
 - introduire 200 µL d'eau distillée stérile dans les cupules;
 - refermer la BP90 avec son couvercle.

Le placement des cupules dans la gélose sera réalisé en présence d'un examinateur.

B2- Préparation des cultures

- À partir de chaque culture **R1**, **R2** et **R3** fournies, préparer des suspensions ajustées à $A_{600} = 1$.

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

- A partir de chaque suspension ajustée, préparer en microtube et en eau physiologique sous un volume total de 1 mL :
 - des dilutions en série géométrique de raison 1/10 allant jusqu'à 10^{-5} pour les souches **R1** et **R2** ;
 - des dilutions en série géométrique de raison 1/10 allant jusqu'à 10^{-3} pour la souche **R3**.

B3- Dépôt des suspensions bactériennes

- Selon le gabarit fourni en **annexe 2** pour les souches **R1** et **R2** et en **annexe 3** pour la souche **R3**, déposer 10 µL de la suspension mère ajustée et de chaque dilution sur le milieu de culture adéquat solidifié. Travailler en pipetage inverse.

Réaliser un dépôt devant un examinateur.

- Laisser sécher les gouttes.
- Rappel : il est fortement recommandé de ne pas laisser les BP90 trop longtemps à proximité du bec électrique ; en effet, la chaleur pourrait dégrader la tétracycline contenue dans le milieu de culture.

B4- Dépôt des solutions dans les BP35

- Pour le système de culture n°3 :
 - retirer à l'aide d'une pince stérile la BP35 de la BP90 ;
 - placer la BP35 sur une surface stérile (couvercle de la BP90) ;
 - ajouter 3 mL de solution adéquate dans la BP35 ;
 - refermer la BP35 avec son couvercle et le sceller avec la bande de parafilm ;
 - replacer la BP35 à son emplacement initial dans la BP90.

Réaliser cette manipulation sur le système de culture n°3 (5 étapes ci-dessus) devant un examinateur.

- Pour les systèmes de culture 1, 2 et 4 à 12 :
 - introduire 3 mL de solution adéquate dans chaque BP35 ;
 - **attention, ne pas refermer la BP35 à l'aide de son couvercle ;**
 - fermer la BP90 avec son couvercle.
- Incuber 24 h à 37°C.

COMPTE-RENDU

3. Expliquer le mode opératoire de préparation de la solution fille de tétracycline.
4. Préciser le volume de solution de tétracycline fille incorporé dans le flacon de gélose. Justifier.
5. Présenter les calculs réalisés pour préparer les suspensions de **R1**, **R2** et **R3** ajustées à $A_{600} = 1$

PARTIE C

Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la tétracycline vis-à-vis de la souche d'*E. coli* de référence

Dans cette étude, il s'agira de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la tétracycline vis-à-vis de la souche d'*E. coli* de référence par une technique en milieu liquide et en microplaque.

Culture

Culture de 18 h à 37°C en bouillon LB, en tube à hémolyse contenant 3 mL

R1 : *E. coli*, souche receveuse de référence

Réactifs

Tet : solution de tétracycline à $7,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en éthanol à 50 % (V/V) 1 mL en microtube, en glace

Matériel spécifique

Microplaque stérile à fond rond + couvercle

MANIPULATIONS

C1- Préparation de l'inoculum

- A partir de la culture fournie de la souche **R1**, préparer 5 mL de suspension de densité voisine de $1,0 \cdot 10^6$ bactéries.mL⁻¹ en bouillon LB.

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

- Conserver cet inoculum dans la glace.

C2- Préparation d'une solution diluée de tétracycline

- Préparer, en tube à hémolyse, 2 mL de solution de tétracycline à $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en milieu LB.
- Cette solution doit être conservée dans la glace.

C3- Préparation de la microplaque

- Réaliser en microplaque et en LB sous un volume total de 100 μL , une série de dilutions de raison $\frac{1}{2}$ de la solution de tétracycline à $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (puits n°1 à n°10).

Réaliser cette série de dilution devant un examinateur.

- Les puits n°11 et 12 servent à la réalisation de témoins.
- Répartir 100 μL de l'inoculum dans les puits adéquats.

- Incuber 24 h à 37°C.

COMPTE-RENDU

6. Présenter les calculs ainsi que le mode opératoire permettant la réalisation de l'inoculum.
7. Expliquer le mode opératoire de préparation de la solution diluée de tétracycline.
8. Compléter le tableau de l'**annexe 4**.
9. Indiquer le rôle de chaque témoin réalisé.

PARTIE D

Modification de l'aptitude à produire des biofilms

Culture

Culture de 18 h à 37°C en bouillon TSB, en tube à hémolyse contenant 3 mL

R4 : *Staphylococcus aureus*

Réactifs

NH₃ : solution d'ammoniac à 25 mmol·L⁻¹ 10 mL en flacon, en glace

PBS 1X 5 mL en tube à hémolyse

Milieux de culture

Bouillon **TSB** stérile 15 mL en flacon

Systèmes de culture fournis n°13 et 14

MANIPULATIONS

- Eliminer le contenu des cupules.
- Laver chaque cupule avec 200 µL de **PBS 1X**.
- À partir de la culture **R4** fournie, préparer une suspension ajustée à $A_{600} = 0,01$ en milieu TSB sous un volume de 1 mL.

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

- Introduire 100 µL de la suspension ajustée à $A_{600} = 0,01$ de la souche **R4** dans deux cupules du système n°13 et dans deux cupules du système de culture n°14. Bien identifier ces cupules.
- Introduire 100 µL de **TSB** stérile dans deux cupules du système n°13 et dans deux cupules du système de culture n°14.
- Pour les systèmes de culture 13 et 14 :
 - introduire 3 mL de solution adéquate dans chaque BP35 ;
 - **attention, ne pas refermer la BP35 à l'aide de son couvercle ;**
 - fermer la BP90 avec son couvercle.
- Incuber à 37°C pendant 24 h.

COMPTE-RENDU

10. Présenter les calculs ainsi que le mode opératoire permettant la réalisation de l'inoculum.

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

ANNEXE 1

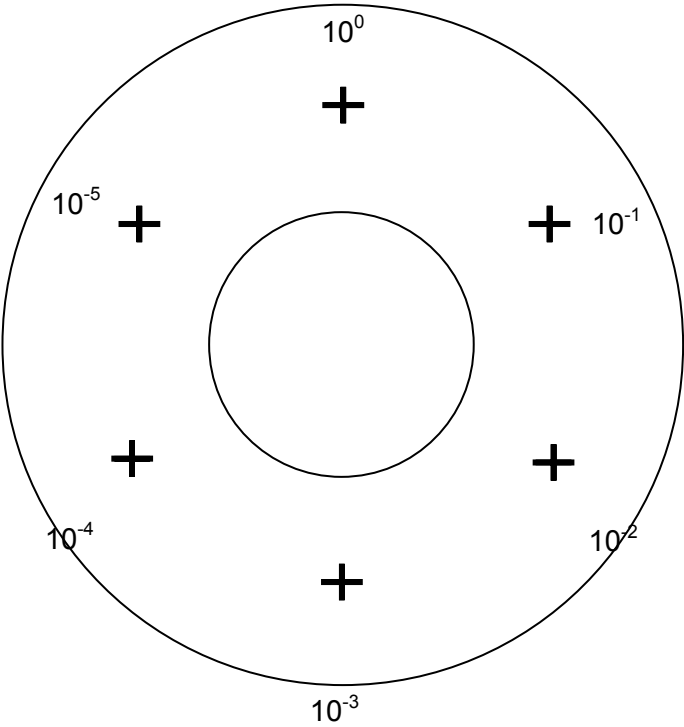
Préparation des systèmes de culture « two-Petri-dish assay »

SYSTÈME DE CULTURE (BP90 N°)	GÉLOSE	SOLUTION INTRODUITE DANS LA BP35	SOUCHE ENSEMENCÉE SUR OU CUPULES DANS LA GÉLOSE DE LA BP90
1	LA+Tet	LB	Souche R1
2	LA+Tet	Surnageant de la souche D en phase stationnaire	Souche R1
3	LA+Tet	Surnageant de la souche D en phase stationnaire. Couvercle de la BP35 scellé	Souche R1
4	LA+Tet	Surnageant de la souche D en phase exponentielle	Souche R1
5	LA+Tet	Solution d'ammoniac à 50 mmol·L ⁻¹	Souche R1
6	LA+Tet	Solution d'ammoniac à 50 mmol·L ⁻¹	4 cupules d'eau distillée stérile
7	LA+Tet	Surnageant de la souche D en phase stationnaire	4 cupules d'eau distillée stérile
8	LA+Tet	Eau distillée	4 cupules d'eau distillée stérile
9	LA+Tet	Surnageant de la souche D en phase stationnaire	Souche R2
10	LA+Tet	LB	Souche R3
11	LA+Tet	Surnageant de la souche D en phase stationnaire	Souche R3
12	LA+Tet	Solution d'ammoniac à 50 mmol·L ⁻¹	Souche R3
13*	LA	Solution d'ammoniac à 25 mmol·L ⁻¹	2 cupules de TSB 2 cupules de culture de la souche R4
14*	LA	Eau distillée	2 cupules de TSB 2 cupules de culture de la souche R4

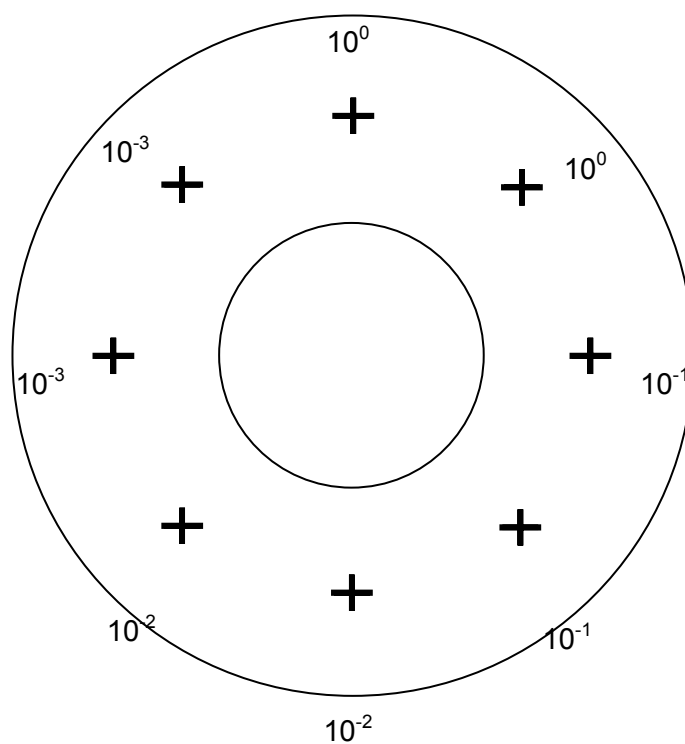
* Les systèmes de culture n°13 et 14 sont prêts à l'emploi selon le mode opératoire décrit dans la **partie D**.

ANNEXE 2

Gabarit pour les dépôts des souches R1 et R2 (partie B3)



ANNEXE 3
Gabarit pour les dépôts de la souche R3 (partie B3)



ANNEXE 4
Protocole de détermination de la CMI

N° puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volume de Solution de tétracycline à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en milieu LB												
Volume de redistribution (μL)												
Volume de diluant (μL)												
Volume d'inoculum (μL)												
Concentration de tétracycline ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)												

TRAVAIL DU SECOND JOUR

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

La liste des souches utilisées est présentée en **annexe 5**.

PARTIE A

Dosage de l'ammoniac

Le dosage de l'ammoniac ($M(\text{NH}_3) = 17,03 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) dissous dans les cupules d'eau distillée des systèmes de culture n°6, 7 et 8 est réalisé par méthode enzymatique. En présence de glutamate déshydrogénase (GIDH) et de nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite (NADPH), l'ammoniac réagit avec le 2-oxoglutarate pour former de l'acide glutamique et du NADP^+ . La quantité de NADP^+ formée est proportionnelle à la quantité d'ammoniac présente initialement. La consommation de NADPH est mesurée par diminution de l'absorbance à 340 nm.

Réactifs

Eau Δ (eau distillée) stérile 100 mL en flacon

Réactif 1 : 3 mL de tampon TEA pH 8,0, 2-oxoglutarate et azide de sodium en tube à hémolyse, en glace

Réactif 2 : comprimés de NADPH, à demander aux examinateurs, en glace

Réactif 3 : GIDH en microtube, en glace

Réactif 4 : **étalon** d'ammoniac à $0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans l'azide de sodium en microtube, en glace

Matériel spécifique

Spectrophotomètre réglé à 340 nm

5 macrocuvettes spectrophotométriques pour UV

MANIPULATIONS

- Conditions opératoires :
 - longueur d'onde : 340 nm
 - cuve spectrophotométrique : 1 cm
 - température ambiante
 - volume final : 2,52 mL
 - lecture contre l'air (sans cuve spectrophotométrique dans le porte-cuve du spectrophotomètre)
- Protocole :
 - Dans le tube à hémolyse contenant le **réactif 1**, introduire 6 comprimés de **réactif 2**.
 - Homogénéiser par retournement jusqu'à dissolution complète des comprimés. On obtient le réactif NADPH/TEA.
 - Procéder à la réaction enzymatique directement dans des macrocuvettes UV :

MACROCUVE	BLANC	ÉTALON	ÉCHANTILLO N
Eau distillée (mL)	2,00	1,90	1,90
Etalon : réactif 4 (mL)		0,10	
Echantillon* (mL)			0,10
Réactif NADPH/TEA (mL)	0,50	0,50	0,50
Mélanger, lire les absorbances (A_1) après environ 2 min et démarrer les réactions par addition de :			
Réactif 3 : GIDH (mL)	0,02	0,02	0,02
Mélanger, lire les absorbances (A_2) à la fin des réactions (≈ 5 min).			

* solution contenue dans une cupule de chaque système de culture n°6 ou 7 ou 8.

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

- Calcul :
 - déterminer la différence d'absorbance ($A_1 - A_2$) du blanc, de l'étalon et de l'échantillon ;
 - soustraire la différence d'absorbance du blanc de la différence d'absorbance de l'étalon : $\Delta A_{\text{étalon}}$;
 - soustraire la différence d'absorbance du blanc de la différence d'absorbance de l'échantillon : $\Delta A_{\text{échantillon}}$;
 - déterminer la concentration c en ammoniac dans l'échantillon (en $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) :

$$c = 2,35 \times \frac{\Delta A_{\text{échantillon}}}{\Delta A_{\text{étalon}}}$$

COMPTE-RENDU

11. Consigner les résultats des mesures au spectrophotomètre dans un tableau.
12. Justifier la formule de calcul de détermination de c .
13. Calculer la concentration en ammoniac dans les différents échantillons (en $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$).
14. Conclure.

PARTIE B

Modification du profil de résistance à la tétracycline

B1- Modification du profil de résistance à la tétracycline des souches de référence et mutante

MANIPULATIONS

- Comparer la croissance des souches **R1** et **R2** pour chaque système de culture (systèmes n°1, 2, 3, 4, 5 et 9).
- On ne cherchera pas à dénombrer les colonies obtenues.

COMPTE-RENDU

15. Reporter les résultats des observations.

16. Interpréter les résultats obtenus.

B2- Evaluation de l'entrée de tétracycline dans les bactéries

L'activité β -galactosidase chez cette souche 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).

Réactifs

Bouillon LB stérile	100 mL en flacon
Cm 0,1% : solution de chloramphénicol à 0,1 % (m/V)	1 mL en microtube, en glace
BCTMA à 6 mg·mL ⁻¹	1 mL en microtube
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)]	10 mL en flacon brun, en glace
Na₂CO₃ 1 mol·L ⁻¹ + EDTA 4 mmol·L ⁻¹	10 mL en flacon
Etalon 3,0 de McFarland	

Matériel spécifique

Pipette Pasteur

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

Spectrophotomètre réglé à 420 nm

MANIPULATIONS

- Pré-incuber le microtube contenant le BCTMA à 37°C.

B21- Préparation de suspensions bactériennes

Pour chaque système de culture n°10, 11 et 12 :

- dans un tube à hémolyse, préparer une solution contenant 900 μ L de **LB** et 100 μ L de chloramphénicol à 0,1 % ;
- dans cette solution de 1000 μ L, préparer une suspension bactérienne d'opacité égale à **l'étalon 3,0 de McFarland** (en prélevant la culture si possible à partir des dilutions les plus fortes) ;
- mesurer l'absorbance à 600 nm d'une dilution au 1/10 de cette suspension ajustée.

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

B22- Lyse chimique des bactéries

Pour chaque suspension ajustée :

- introduire dans un microtube 300 μ L de suspension ajustée et ajouter 30 μ L de **BCTMA** pré-incubé ;
- 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 B23** n'est pas réalisée tout de suite.

B23- Détermination de l'activité enzymatique

Le blanc de mesure de la réaction enzymatique (700 µL d'**oNPG** préchauffé à 37°C, 100 µL de **LB**, 375 µL de **Na₂CO₃-EDTA**) doit être réalisé en parallèle des échantillons traités ci-dessous.

Pour chaque lysat obtenu précédemment :

- préparer un microtube contenant chacun 700 µL de solution d'**oNPG** ;
- pré-incuber ce tube dans un bain thermostaté à 37°C pendant 5 minutes environ ;
- déclencher la réaction par ajout de 100 µL de lysat ;
- incuber à 37°C pendant un temps Δt minutes ;
- arrêter la réaction par ajout de 375 µL de **Na₂CO₃-EDTA** dès l'apparition dans le milieu réactionnel d'une coloration nettement visible. Rester toutefois dans des limites de 5 minutes pour le temps d'incubation Δt à 37°C. Mesurer précisément ce temps d'incubation ;
- centrifuger chaque microtube à vitesse maximum pendant 2 min ;
- transférer 1 mL de chaque surnageant dans une semi-microcuve ;
- mesurer l'absorbance à 420 nm contre le blanc.

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

COMPTE-RENDU

17. Préciser le rôle du chloramphénicol utilisé en **partie B1**.

18. Discuter la pertinence de la composition du « blanc » utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique.

19. Calculer pour chaque échantillon :

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

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

20. Comparer les valeurs de « ΔA_{420} normalisée ».

21. A l'aide de la description de la construction génétique de la souche **R3**, indiquer l'intérêt d'utiliser une telle construction dans le cadre de cette étude.

22. Conclure sur les effets potentiels observés.

PARTIE C

Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la tétracycline vis-à-vis de la souche d'*E. coli* de référence

MANIPULATIONS

- Observer le résultat de la croissance de la souche **R1** dans les différentes cupules.
- Les CMI de la tétracycline des souches **R1**, **R2** et **R3** sont identiques.

COMPTE-RENDU

23. Lire la microplaque après incubation et présenter les résultats dans un tableau.
24. Déterminer la CMI de la tétracycline vis-à-vis de la souche **R1**.
25. Comparer la valeur de la CMI obtenue par rapport à la concentration de tétracycline utilisée dans les systèmes de culture.
26. Que peut-on en conclure sur la modification éventuelle du profil de résistance à la tétracycline ?

PARTIE D

Modification de l'aptitude à produire des biofilms

Réactifs

Eau Δ (eau distillée) stérile	100 mL en flacon
Cristal violet 0,1% (m/V)	1,5 mL en microtube
Solvant acétone éthanol 20:80 (V/V)	10 mL en flacon, en glace

Matériel spécifique

Lecteur de plaque de microtitration réglé à 570 nm
Plaque de microtitration à fond plat + bande adhésive
Gants et lunettes de protection

MANIPULATIONS

A partir des systèmes de culture n°13 et 14 :

- **Lavage**
 - Eliminer le contenu de chaque cupule.
 - Laver les cupules avec 175 µL d'eau stérile en prenant soin de ne pas racler le fond de la cupule avec le cône de la pipette.
 - Réaspirer immédiatement le liquide de lavage.
 - Répéter ces opérations une fois.
- **Coloration**
 - La manipulation du **cristal violet** nécessite de porter des gants et un équipement de protection des yeux.
 - Ajouter dans chaque cupule 125 µL de **cristal violet à 0,1% (m/v)**. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante.
 - Eliminer le **cristal violet** dans un tube à hémolyse vide.
- **Lavage**
 - Laver les cupules à nouveau une fois selon le protocole ci-dessus.

- **Quantification (Poste dédié)**

- Ajouter 150 µL de mélange acétone-éthanol (20:80) dans chaque cupule.
- Attendre 5 min.
- Resuspendre le cristal violet par plusieurs aspirations/refoulements.
- Transvaser 50 µL de chaque resuspension dans les puits de la plaque de microtitration à fond plat.
- Ajouter 50 µL de mélange acétone-éthanol (20:80) dans chaque puits.
- Lire les absorbances des puits à 570 nm contre l'air avec le lecteur de plaque de microtitration.

Les mesures au lecteur de plaque de microtitration seront réalisées en présence d'un examinateur.

COMPTE-RENDU

27. Joindre à la copie la feuille de résultats des absorbances mesurées.

28. Interpréter les résultats de la quantification. Conclure.

BILAN

COMPTE-RENDU

29. Réaliser une synthèse des résultats obtenus et discuter les mécanismes moléculaires qui peuvent être à l'origine de la modification du profil de résistance à la tétracycline.

30. A l'aide du schéma présenté en **annexe 6**, proposer des expériences qui auraient permis d'identifier l'ammoniac comme responsable des effets observés.

Ce sujet a été proposé par Christophe BELOIN, Joëlle BISSERY, Pascal CHILLET et Mélanie FERRIÈRES ROUX.

Bibliographie

- Aerial exposure to the bacterial volatile compound trimethylamine modifies antibiotic resistance of physically separated bacteria by raising culture medium pH. Sylvie Létoffé & al.
mBio (2014), volume 5(1), e00944-13
- Biogenic ammonia modifies antibiotic resistance at a distance in physically separated bacteria. Steve P. Bernier & al.
Molecular Microbiology (2011), 81(3), pp705–716

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

ANNEXE 5
Souches utilisées dans le sujet

SOUCHES		GÉNOTYPE / PHÉNOTYPE	COMMENTAIRE
Donneuse	D	Souche de référence BW25113 d' <i>Escherichia coli</i>	
Receveuses	R1	Souche de référence MG1655 d' <i>Escherichia coli</i>	
	R2	Souche R1 $\Delta amtB$	Le gène <i>amtB</i> code un transporteur membranaire d'ammoniac
	R3	Souche R1 <i>tetR-ptetO-lacZ</i>	Dans cette souche, le gène <i>lacZ</i> est sous le contrôle du promoteur <i>ptetO</i> inducible par la tétracycline
	R4	Souche de référence de <i>Staphylococcus aureus</i>	

RAPPORT DE L'ÉPREUVE PRATIQUE DE MICROBIOLOGIE

Rapport établi par : Christophe Beloin, Joëlle Bissery, Pascal Chillet, Mélanie Ferrières

Commentaires généraux sur l'épreuve

Le sujet portait sur l'étude des effets d'un métabolite secondaire – l'ammoniac – produit par des souches d'*Escherichia coli* (souches donneuses) sur le profil de résistance de souches receveuses à la tétracycline et la capacité à produire des biofilms d'autres souches qui pourraient éventuellement partager la même niche écologique que la souche d'*E. coli* donneuse.

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

Aspects techniques

Les manipulations proposées ne présentaient pas de difficultés d'un point de vue technique. Elles ont été réalisées par une très grande majorité des candidats dans le strict respect des règles de sécurité liées aux risques biologique et chimique. Cependant, quelques candidats n'ont pas respecté les règles de base : poste de travail désordonné, tubes ou fiole d'Erlenmeyer laissés ouverts en dehors de la zone de stérilité, rédaction du compte-rendu en gardant les mains gantées. Il convient à nouveau de rappeler que les candidats doivent organiser leur poste de travail afin de manipuler dans des conditions optimales d'asepsie (placer judicieusement dès le début de l'épreuve portoirs, agitateur vortex et poubelle à DASRI afin d'éviter de croiser les bras lors des manipulations).

La mise en œuvre du sujet nécessitait la préparation de surnageants bactériens de la souche *E. coli* donneuse de référence en phases exponentielle et stationnaire de croissance. Le suivi de croissance a été réalisé de manière satisfaisante dans l'ensemble ; cependant, certains candidats ont obtenu des résultats aberrants lors des mesures opacimétriques au cours de la cinétique suite à un manque d'homogénéisation efficace de la culture lors du prélèvement. D'autre part, la filtration du surnageant de culture en phase exponentielle à l'aide d'une seringue et d'un filtre 0,45 μ m a révélé à nouveau cette année quelques problèmes de dextérité chez certains candidats.

Un certain nombre de candidats ont porté peu d'attention au marquage et à l'identification des boîtes incubées en fin de jour 1. Il paraît donc à nouveau indispensable d'insister sur la nécessité d'identifier très précisément et clairement les boîtes incubées (« Poste n°X » « SC n°1 » etc.).

À plusieurs reprises, le candidat devait montrer des gestes techniques qui étaient évalués. Malheureusement, certains candidats ont oublié d'appeler le jury pour réaliser leurs démonstrations ce qui est regrettable car le barème prévoit toujours un nombre de points conséquent pour l'exécution des gestes techniques.

Enfin, certains candidats, débordés par la densité des manipulations, n'ont pas eu le temps de réaliser les systèmes de culture à incuber et n'ont de ce fait pu effectuer aucune lecture ni aucune manipulation en J2.

Le second jour, plusieurs spectrophotomètres préréglés à différentes longueurs d'onde étaient à disposition. Il est à noter que certains candidats ont fait des erreurs grossières :

mauvais choix de spectrophotomètre (et donc de longueur d'onde), cuve spectrophotométrique placée dans le porte-cuve dans le mauvais sens...

Aspects rédactionnels du compte-rendu

Le jury constate une amélioration dans la rédaction des comptes-rendus et apprécie en effet les copies rédigées avec soin comportant des tableaux clairs, une numérotation précise des réponses, l'utilisation d'un code couleur, la réalisation de schéma bilan de synthèse...

Concernant les questions de calcul, il convient d'expliquer la démarche utilisée de manière concise en évitant des explications trop détaillées. Il n'est pas judicieux de poser tous les calculs effectués lorsqu'ils reposent sur la même formule littérale ou le même raisonnement : un seul exemple de calcul suffit et l'ensemble des résultats des calculs peut être compilé dans un tableau récapitulatif.

Concernant les questions d'interprétation et de bilan, il convient de soigner la rédaction tout en raisonnant de manière rigoureuse à partir des résultats trouvés et de l'ensemble des données fournies. Trop de candidats ont montré des difficultés à s'approprier la problématique soulevée avec suffisamment de recul.

Cette année, à nouveau, un trop grand nombre de candidats rédige au brouillon le compte-rendu au lieu d'écrire directement sur la copie. Certaines parties n'étaient ainsi pas rédigées alors que les éléments de réponse se trouvaient dans leurs brouillons. Seules les informations notées sur la copie sont prises en compte dans les comptes-rendus.

Dosage de l'ammoniac

Il était proposé de mettre en évidence à l'aide de trois systèmes de culture « two-Petri-dish assay » l'émission d'ammoniac volatil du surnageant de culture de la souche de référence donneuse en phase stationnaire. Le dosage de l'ammoniac dissous dans les cupules d'eau distillée était réalisé par méthode enzymatique dans chacun des systèmes de culture.

Ce dosage biochimique ne présentait pas de difficulté technique. Cependant, il était nécessaire de comprendre le principe du dosage pour ne pas être étonné de constater, après avoir réalisé le blanc contre l'air, une diminution de l'absorbance liée à la consommation de NADPH.

Gélose	Solution introduite dans la BP35	Cupules dans la gélose de la BP90	Résultat du dosage de l'ammoniac
LA+Tet	Solution d'ammoniac à 50 mmol·L ⁻¹	Cupules d'eau distillée stérile	1,47 mmol·L ⁻¹
LA+Tet	Surnageant de la souche donneuse de référence BW25113 d' <i>Escherichia coli</i> en phase stationnaire	Cupules d'eau distillée stérile	1,10 mmol·L ⁻¹
LA+Tet	Eau distillée	Cupules d'eau distillée stérile	0,05 mmol·L ⁻¹

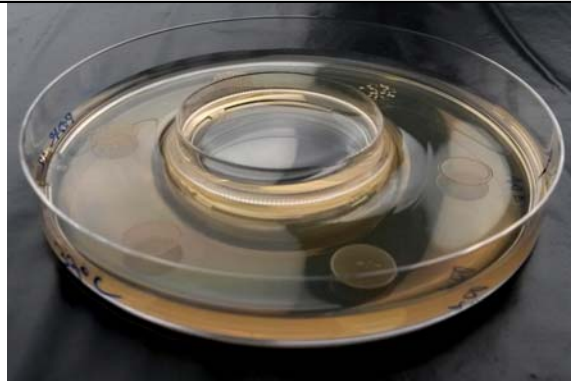
Les résultats des trois dosages permettaient, de conclure sur le fait que le surnageant de culture contenait de l'ammoniac volatil qui s'était dissous dans l'eau stérile présente dans la cupule. Il était donc possible de conclure que la souche de référence BW25113 d'*Escherichia coli* en phase stationnaire produit de l'ammoniac.

Modification du profil de résistance à la tétracycline des souches de référence et mutante

Cette étude permettait de comparer la capacité de croissance des souches receveuses de référence et mutante sur le milieu LA contenant la tétracycline en fonction de la solution présente dans la BP35.

La technique de dépôt des dilutions de suspension bactérienne (10^0 à 10^{-5}) n'a pas été maîtrisée par une majorité de candidats. Cette technique nécessite de déposer soigneusement chaque dilution par pipetage inverse sur gélose sèche. La photographie ci-dessous montre, après incubation, des dépôts parfaitement réalisés autour de la BP35. Il était mentionné dans le sujet que les BP35 ne devaient pas être refermées (sauf une qui était scellée) ce qui devait être logique pour les candidats puisque ces derniers étudiaient l'influence d'un composé volatil déposé dans la BP35. Il est regrettable de constater que certains candidats ont réalisé l'ensemble de cette partie puis ont refermé les BP35 juste avant l'incubation. Il est donc extrêmement important lors de la lecture du sujet de comprendre sa finalité.

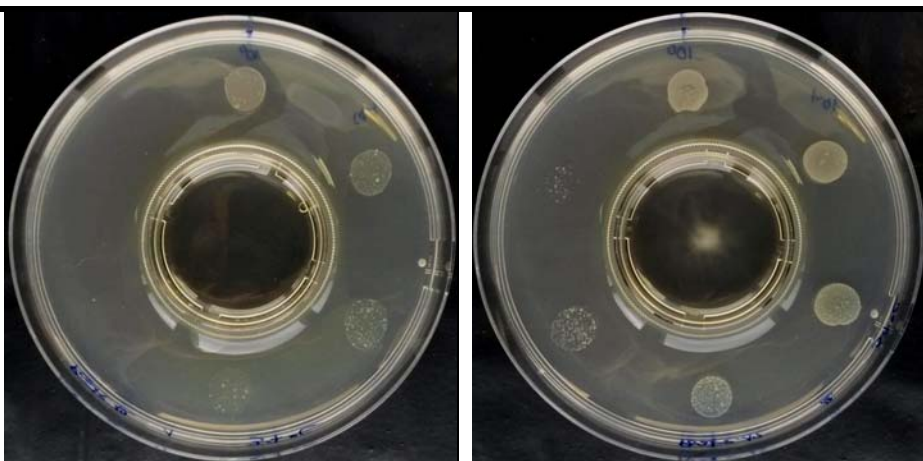
Vue de profil d'un système de culture après incubation

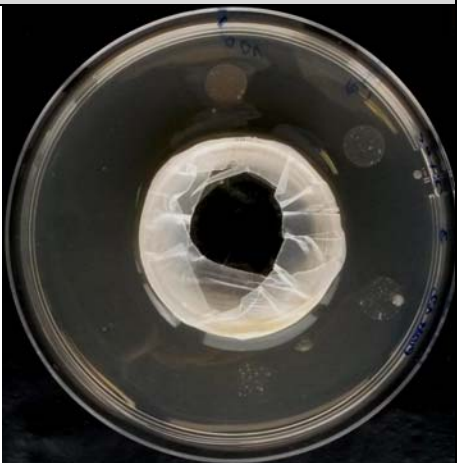
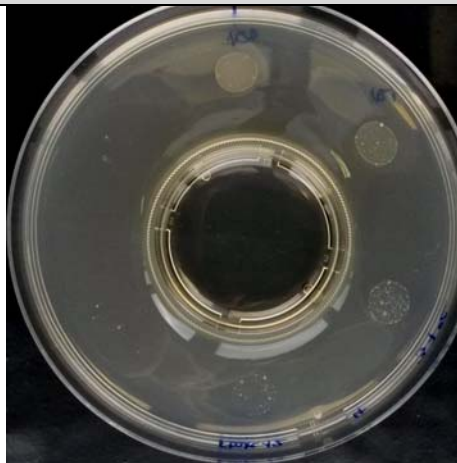


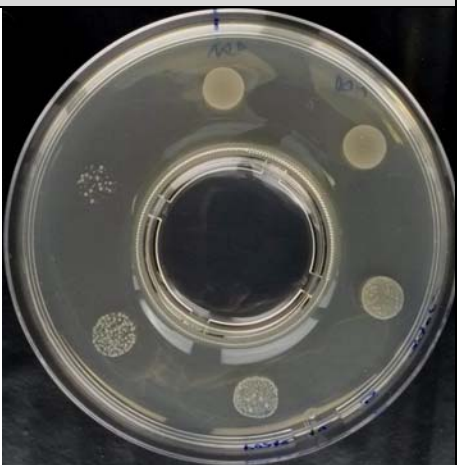
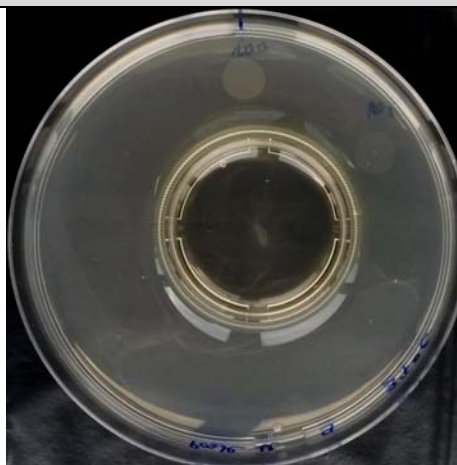
Gélose	Solution introduite dans la BP35	Souche ensemencée sur la gélose de la BP90	Résultat après incubation
LA+Tet	LB	Souche receveuse de référence MG1655 d' <i>Escherichia coli</i>	Colonies jusqu'à $d = 10^{-3}$
LA+Tet	Surnageant de la souche donneuse de référence BW25113 d' <i>Escherichia coli</i> en phase stationnaire		Colonies jusqu'à $d = 10^{-5}$
LA+Tet	Surnageant de la souche donneuse de référence BW25113 d' <i>Escherichia coli</i> en phase stationnaire. Couvercle de la BP35 scellée		Colonies jusqu'à $d = 10^{-3}$
LA+Tet	Surnageant de la souche donneuse de référence BW25113 d' <i>Escherichia coli</i> en phase exponentielle		Colonies jusqu'à $d = 10^{-3}$
LA+Tet	Solution d'ammoniac à $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$		Colonies jusqu'à $d = 10^{-5}$
LA+Tet	Surnageant de la souche donneuse de référence BW25113 d' <i>Escherichia coli</i> en phase stationnaire	Souche receveuse MG1655 $\Delta amtB$	Colonies jusqu'à $d = 10^{-2}$

BP35	LB	Surnageant BW25113 phase stationnaire
BP90	MG1655	MG1655

Résultats après incubation



BP35	Surnageant BW25113 phase stationnaire boîte scellée	Surnageant BW25113 phase exponentielle
BP90	MG1655	MG1655
Résultats après incubation		

BP35	Solution d'ammoniac à 50 mmol·L ⁻¹	Surnageant BW25113 phase stationnaire
BP90	MG1655	MG1655 $\Delta amtB$
Résultats après incubation		

Résultats obtenus avec la souche receveuse de référence :

- en présence de surnageant de la souche donneuse en phase stationnaire, on observait par rapport à la solution de LB (témoin négatif) une augmentation de la tolérance de la souche receveuse à la tétracycline ;
- en présence de surnageant de la souche donneuse en phase exponentielle, on constatait que la résistance à la tétracycline était la même que dans les conditions du témoin négatif. Il y a donc nécessité d'avoir une concentration bactérienne importante ou des conditions physiologiques différentes ;
- la solution d'ammoniac à 50 mmol·L⁻¹ donnait un effet équivalent du surnageant de la souche donneuse en phase stationnaire.

Résultat obtenu avec la souche receveuse mutante :

- il n'y avait pas d'effet de l'ammoniac sur la souche receveuse mutante. Cette dernière ne possédant pas de transporteur membranaire d'ammoniac, on pouvait donc en déduire que l'entrée de NH_3 à l'intérieur de la cellule est indispensable pour augmenter la tolérance de la souche receveuse à la tétracycline.

En conclusion, la souche donneuse BW25113 produit de l'ammoniac en phase stationnaire qui augmente la résistance de la souche receveuse MG1655 à la tétracycline.

Évaluation de l'entrée de tétracycline dans les bactéries

Cette partie était réalisée au moyen de la souche MG1655 *tetR-ptetO-lacZ* dont le gène *lacZ* est sous le contrôle du promoteur *ptetO* inducible par la tétracycline. Cette construction génétique permettait d'évaluer l'entrée de la tétracycline dans les bactéries, la concentration interne en tétracycline étant proportionnelle à l'activité β -galactosidase mesurée. Il était alors possible d'évaluer l'impact de l'ammoniac volatil sur l'entrée de tétracycline.

Cette manipulation n'a pas présenté de difficulté majeure pour les candidats qui l'ont entreprise. Le tableau ci-dessous regroupe les valeurs de l'activité β -galactosidase obtenues pour les trois systèmes de culture réalisés.

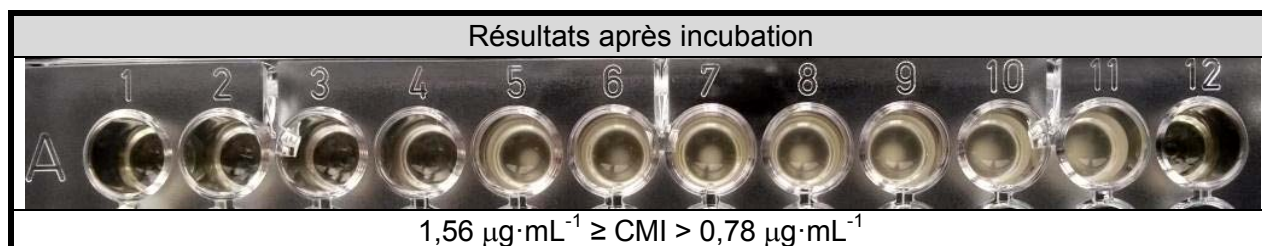
Gélose	Solution introduite dans la BP35	Souche ensemencée sur la gélose de la BP90	Activité β -galactosidase (ΔA_{420} normalisée)
LA+Tet	LB	Souche receveuse MG1655 <i>tetR-ptetO-lacZ</i> d' <i>Escherichia coli</i>	84
LA+Tet	Surnageant de la souche donneuse de référence BW25113 d' <i>Escherichia coli</i> en phase stationnaire		60
LA+Tet	Solution d'ammoniac à 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$		40

Les résultats montraient une activité β -galactosidase de la souche receveuse légèrement plus faible en présence de la souche donneuse ou en présence d'ammoniac à 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ par rapport au témoin (LB). L'ammoniac entraîne donc une très faible diminution de l'entrée de la tétracycline dans la souche receveuse. Cependant, l'entrée de tétracycline subsistait même en présence d'ammoniac ; la résistance accrue à la tétracycline ne peut donc être expliquée majoritairement par une légère diminution de l'entrée de l'antibiotique dans la souche receveuse.

Détermination de la CMI de la tétracycline vis-à-vis de la souche d'*E. coli* de référence

Dans cette étude, il s'agissait de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la tétracycline vis-à-vis de la souche d'*E. coli* de référence par une technique en milieu liquide et en microplaque.

Le sujet ne précisait pas la nature des deux témoins à réaliser : témoin culture (puits n°11) et témoin stérilité du milieu (puits n°12). Certains candidats ont réalisé des témoins inappropriés. Les résultats après incubation et validation des témoins sont présentés ci-dessous (puits n°1 [Tet] = 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ à puits n°10 [Tet] = 0,024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)



La valeur de la CMI devait être comparée à la valeur de la concentration en antibiotique dans la gélose LA ($0,75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Le phénomène analysé dans les parties précédentes est donc observé pour des concentrations en tétracycline égales ou sub-optimales à la CMI.

Modification de l'aptitude à produire des biofilms

L'objectif de cette partie était d'étudier l'effet de l'ammoniac volatil sur la capacité de *Staphylococcus aureus* (souche pouvant éventuellement partager la même niche écologique que la souche donneuse) à produire des biofilms. Les résultats de la méthode au cristal violet sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Gélose	Solution introduite dans la BP35	Cupule	A ₅₇₀
LA	Solution d'ammoniac à $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TSB	0,088
		Souche de référence de <i>Staphylococcus aureus</i>	2,358
LA	Eau distillée	TSB	0,062
		Souche de référence de <i>Staphylococcus aureus</i>	1,010

L'expérience montrait que la présence d'un composé volatil de type ammoniac pouvait aussi favoriser la formation de biofilm par *Staphylococcus aureus*.

Bilan

L'ensemble de ces expériences permettait de montrer que :

- la culture de la souche donneuse suffisamment concentrée en phase stationnaire augmente la résistance de la souche receveuse à la tétracycline et stimulait la production de biofilm ;
- l'augmentation de la résistance à la tétracycline dépend de la production d'ammoniac par la souche donneuse ;
- l'augmentation de la résistance à la tétracycline dépend de la présence d'un transporteur membranaire de l'ammoniac au niveau de la souche réceptrice codé par le gène *amtB* ;
- la résistance à la tétracycline de la souche receveuse ne peut pas s'expliquer par une inhibition de l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie.

Une réflexion était demandée sur la base de certaines voies métaboliques fournies en annexe 6 afin d'identifier des expériences permettant de confirmer le rôle de l'ammoniac dans l'augmentation de résistance à la tétracycline et éventuellement de proposer des hypothèses sur les mécanismes permettant cette augmentation.

Certains candidats ont proposé, à juste titre, d'évaluer la capacité de souches donneuses mutantes pour les gènes *aspC*, *aspA* ou *purA* qui, d'après les voies métaboliques fournies, sont affectées pour la production de L-aspartate (*aspC* ou *purA*) précurseur d'ammoniac, ou pour la transformation de L-aspartate en fumarate et ammoniac (*aspA*). Une expérience supplémentaire utilisant une souche donneuse $\Delta aspC$ mais dont la croissance se faisait avec un supplément en L-aspartate aurait pu être proposée, permettant de montrer que l'ajout d'aspartate contourne la mutation *aspC* et favorise la production d'ammoniac par une réaction catalysée par la protéine AspA.

Enfin, la démonstration qu'une souche receveuse mutante pour le gène codant le transporteur d'ammoniac AmtB laissait supposer que l'ammoniac devait entrer dans la souche receveuse pour exercer son action sur la résistance aux antibiotiques. Une des hypothèses intéressantes proposées par certains candidats était que l'incorporation de celui-ci dans certaines voies métaboliques comme la production de molécules du quorum-sensing pouvait affecter des phénotypes tels que la tolérance aux antibiotiques et la formation de biofilm. Cependant, aucun candidat n'a pensé à la capacité de l'ammoniac d'être incorporé, via la synthèse d'acides aminés comme la glutamine, dans la production des polyamines. Celles-ci sont produites en quantité accrue en présence d'ammoniac volatil et augmentent la résistance à la tétracycline par leur action protectrice de l'ADN qui est moins sensible aux attaques des radicaux libres d'oxygène produit par la tétracycline.

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE GENERALE ET ANALYTIQUE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

SUJET

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

Ce sujet a pour but d'étudier des réactions dans lesquelles intervient la propanone. Il est proposé dans la partie expérimentale d'étudier la cinétique de la réaction acido-catalysée de l'iodation de la propanone afin d'en déterminer les ordres partiels. Il est notamment demandé de proposer et mettre en œuvre un protocole permettant d'accéder à l'ordre partiel par rapport aux ions oxonium.

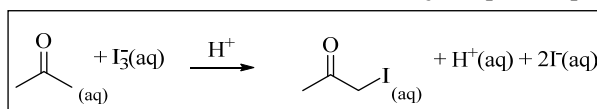
Cette partie est suivie d'une étude théorique portant sur l'utilisation de la propanone dans la réaction d'acétalisation puis dans l'époxydation des alcènes.

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 2).
--

A. PARTIE EXPERIMENTALE

ETUDE CINETIQUE DE LA REACTION ACIDO-CATALYSEE ENTRE L'ACETONE ET UNE SOLUTION AQUEUSE D'IONS TRIIODURE

On souhaite étudier la réaction de l'iodation de l'acétone catalysée par les protons H^+ .



Il a été démontré que cette réaction admet un ordre ; c'est-à-dire que :

$$v = -\frac{d[I_3^-]}{dt} = -\frac{d[CH_3COCH_3]}{dt} = k[CH_3COCH_3]^a [I_3^-]^b [H^+]^c$$

Le but de cette partie est de déterminer les trois ordres partiels a , b et c qu'on considérera être des entiers. Des expériences préliminaires ont été menées.

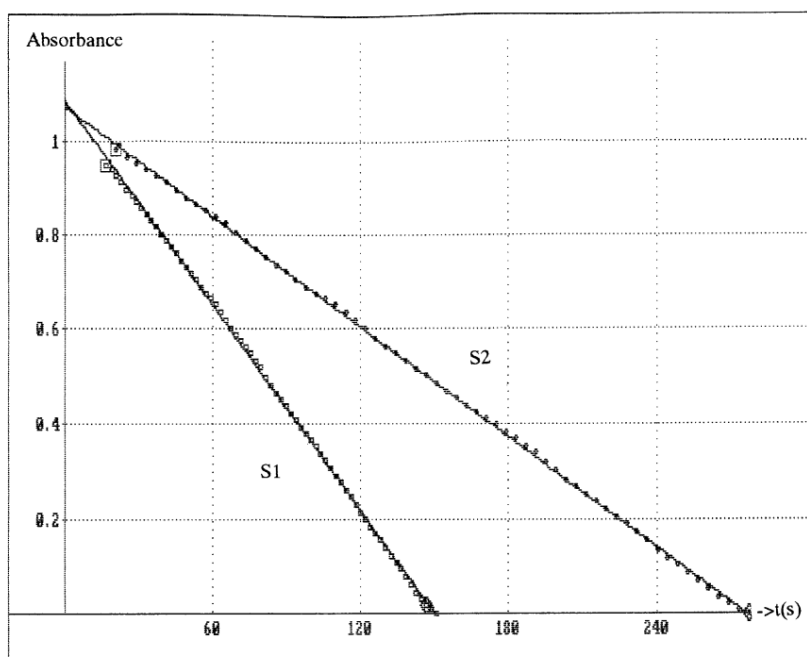
0.1 A.1. Détermination des ordres partiels a et b

Expérience 1 : l'évolution de l'absorbance à la longueur d'onde $\lambda = 350 \text{ nm}$ est mesurée pour les mélanges suivants¹ :

Solution	Propanone	Solution d'ions H_3O^+	Solution d'ions I_3^-
S_1	20 mL à 2 mol.L^{-1}	10 mL à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$	20 mL à $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$
S_2	20 mL à 1 mol.L^{-1}	10 mL à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$	20 mL à $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

¹ D'après C. BAILLET et M. HANAUER ; **BUP n°762** ; mars 1994 ; p447

Résultats :



1. Les mesures se placent-elles dans les conditions d'application de la loi de BEER-LAMBERT ? La réponse sera précisément justifiée.
2. Justifier le choix de la longueur d'onde pour le suivi spectrophotométrique de la réaction.
3. En se basant sur le spectre d'absorption donné en annexe, interpréter la couleur des deux solutions.
4. De quel(s) facteur(s) dépend le coefficient d'absorption molaire d'une molécule ?
5. Quel(s) avantage(s) présente la spectrophotométrie pour le suivi cinétique d'une réaction en comparaison d'un suivi par titrage ?
6. Discuter les concentrations choisies pour les solutions **S1** et **S2**.
7. Dédire des données ici présentées que les ordres partiels par rapport à la propanone et à l'ion I_3^- sont respectivement égaux à 1 et 0.

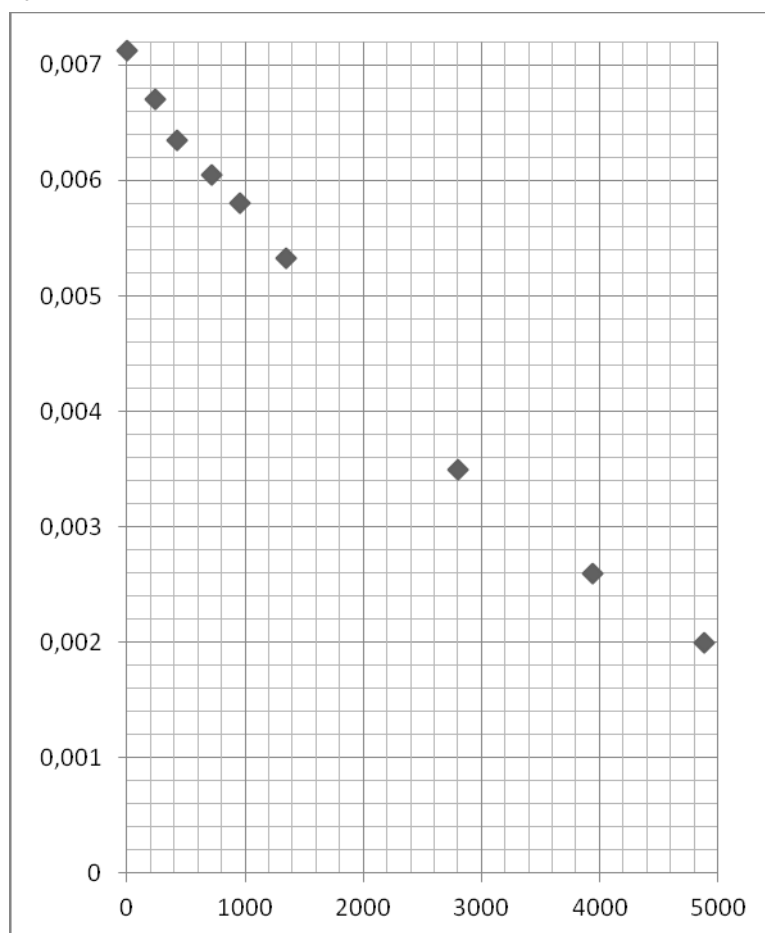
0.2 A.2. Détermination d'une vitesse initiale

Une seconde expérience a été menée afin de déterminer une vitesse initiale.

Expérience 2 :

- Dans un bécher, ont été introduits 5 mL d'eau, 5 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à la concentration $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et 5 mL d'une solution aqueuse d'acétone à 50% en volume.
- A la date $t = 0$, un volume de 5 mL d'une solution d'ions triiodure à la concentration $C_{\text{triiodure}} = 2,85 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ a été ajouté au milieu réactionnel.
- A la date t , la réaction a été bloquée cinétiquement par addition consécutive de 10 mL d'une solution aqueuse d'acétate de sodium (CH_3COONa) à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ et 20 mL d'eau.

Le titrage des ions I_3^- présents à l'instant t permet de tracer la courbe suivante :



Tracé de la concentration en ions I_3^- (mol.L^{-1}) en fonction du temps (s)

8. Expliquer pourquoi l'addition d'une solution d'acétate de sodium permet de bloquer cinétiquement la réaction.
9. Calculer le pH d'une solution obtenue par addition de 10 mL d'une solution d'acétate de sodium à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ à 5 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à la concentration $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.
10. Déterminer graphiquement la vitesse initiale de la réaction menée à l'expérience 2.

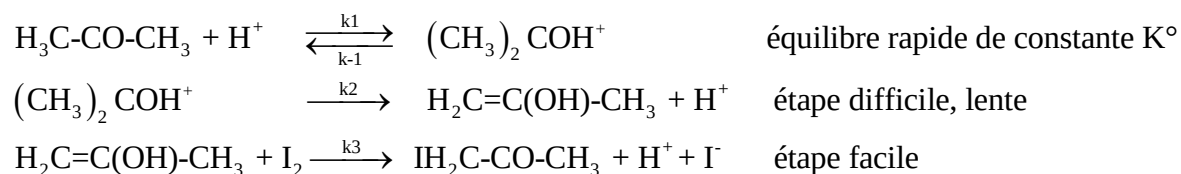
0.3 A.3. Détermination de l'ordre partiel c par rapport à H^+

Vous avez à votre disposition :

- une solution aqueuse de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$; $C_1 = 2,00 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$)
- une solution aqueuse **S** préparée par dissolution de 50,8 g de diiode et 200 g d'iodure de potassium dans une fiole jaugée de 2 L.
- une solution aqueuse d'acide chlorhydrique ($C_2 = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$)
- une solution aqueuse d'acétone (50% en volume)
- une solution aqueuse d'éthanoate de sodium (CH_3COONa ; $C_3 = 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$)
- du thiodène équivalent à l'empois d'amidon.

11. En présence d'ions iodure, le diiode aqueux est complexé sous la forme d'ions triiodure. Cette réaction de complexation favorise la solubilisation du diiode. Justifier.
12. Calculer la concentration en ions triiodure I_3^- dans la solution **S**.
13. Préparer 100 mL d'une solution aqueuse d'ions triiodure I_3^- à $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. La verrerie utilisée sera précisée.
14. Proposer et mettre en œuvre un protocole permettant de connaître précisément la concentration en ions triiodure de la solution que vous avez précédemment préparée.
15. Evaluer l'incertitude portant sur la concentration déterminée.
16. Pourquoi est-il nécessaire de titrer les solutions d'ions triiodure préparées à partir d'une pesée de diiode solide ?
17. Proposer et mettre en œuvre le protocole d'une **troisième expérience** permettant de déterminer une vitesse initiale dans des conditions conduisant à la détermination de l'ordre partiel par rapport à H^+ . Les concentrations seront judicieusement choisies de façon à pouvoir croiser vos résultats avec ceux de l'**expérience 2**.
18. Dédurre des expériences 2 et 3 l'ordre partiel c par rapport à H^+ .

Le mécanisme de la réaction d'iodation de l'acétone est proposé ci-dessous :

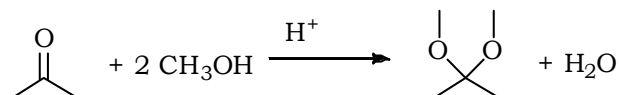


19. A l'aide d'approximations classiques, déterminer la loi de vitesse de la réaction.
Retrouve-t-on les ordres précédemment mesurés ?

B. LA PROPANONE

0.4 B.1. La réaction d'acétalisation

La réaction d'acétalisation est étudiée à partir de la réaction modèle suivante :



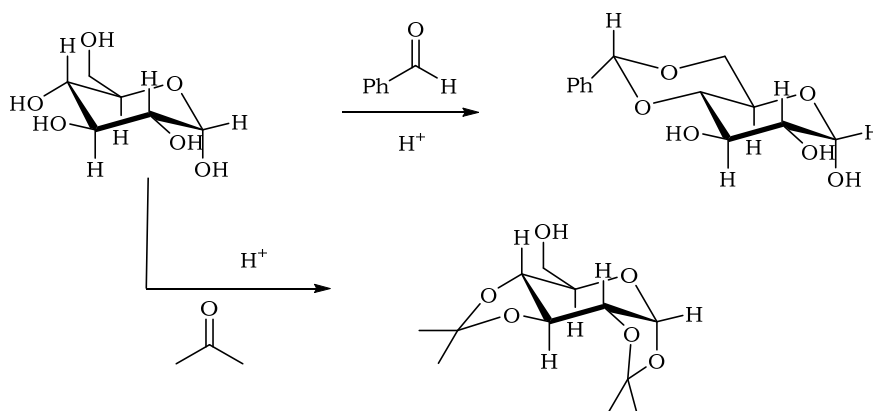
Réaction 1 : formation du 2,2 - diméthoxypropane

20. Donner le mécanisme de la réaction acido-catalysée **1**.
21. Définir l'enthalpie standard de formation d'un composé chimique.
22. Calculer l'enthalpie standard à 298 K de la **réaction 1** à l'aide des enthalpies standard de formation données ci-dessous.

Quelle information peut-on tirer du signe de cette grandeur ?

	acétone	méthanol	2,2 - diméthoxypropane	eau
$\Delta_f H^\circ$ à 298 K (kJ.mol ⁻¹)	- 248,4	- 239,2	- 459,4	- 285,8

23. En considérant le bilan de la réaction, interpréter le fait que l'entropie de réaction soit négative.
24. La réaction étant à l'équilibre thermodynamique, donner deux méthodes permettant de déplacer l'équilibre dans le sens de la formation du 2,2 - diméthoxypropane.
25. Définir et interpréter la régiosélectivité des deux réactions suivantes :



0.5 B.2. Méthodes d'époxydation des alcènes mettant en jeu la propanone

a) B.2.1. L'oxone®

L'hydrogénopersulfate de potassium connu sous le nom de marque oxone® est le sel de potassium de l'acide persulfique de formule brute KHSO_5 . Ce sel est très utilisé comme agent d'oxydation dans des domaines variés (formulation des lessives, traitement des eaux usées ou de piscine...) et en particulier, en chimie organique.

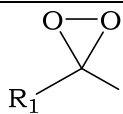
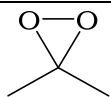
26. Donner une représentation de LEWIS de l'ion hydrogénopersulfate HSO_5^- sachant que l'atome central est le soufre et que ce dernier n'est lié qu'à quatre atomes d'oxygène.

27. Quelle particularité présente l'atome de soufre dans cette structure ?

28. Quelle est la géométrie de cet ion ?

b) B.2.2 Formation d'époxydes à partir de DMDO (diméthyldioxirane)

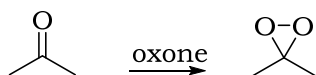
Les dioxiranes sont les composés organiques présentant un hétérocycle à trois atomes dont deux d'oxygène et un de carbone.

	
dioxirane	Diméthyldioxirane (DMDO)

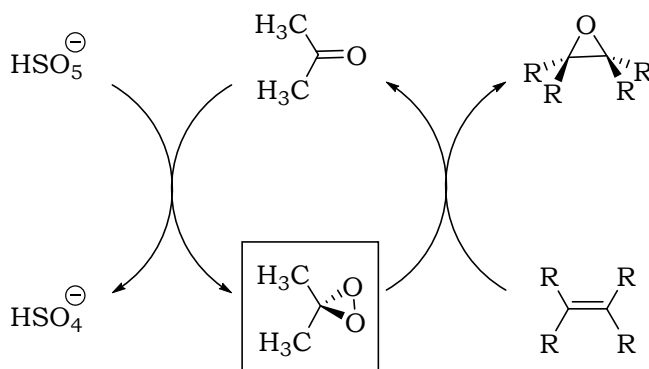
29. Les dioxiranes sont des composés instables. Préciser la raison de cette instabilité.

Les dioxiranes et en particulier le diméthyldioxirane (DMDO) sont utilisés depuis une vingtaine d'années comme agent d'époxydation des alcènes.

Le DMDO est préparé à partir de la propanone et de l'oxone selon la réaction d'équation :

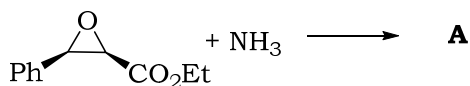


A l'issue de cette réaction, le DMDO peut être isolé ou réagir directement « in situ » sur l'alcène selon le schéma suivant :



30. Proposer d'autres agents d'époxydation des alcènes.

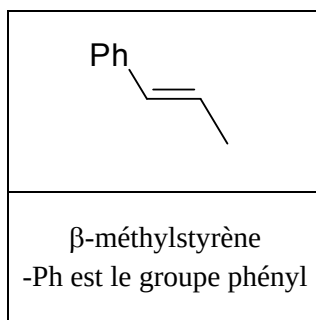
L'ouverture des époxydes par un nucléophile permet d'avoir accès à de nombreuses fonctions chimiques. Cette réaction est ainsi l'une des premières étapes de synthèse de la chaîne latérale du paclitaxel (Taxol®) utilisé comme anticancéreux :



31. Ecrire le mécanisme permettant d'accéder à **A**. L'étape cinétiquement déterminante de cette réaction est bimoléculaire.

32. Proposer deux réactions permettant de convertir la fonction alcool en un autre groupe fonctionnel.

On s'intéresse maintenant à l'époxydation du 1-phénylprop-1-ène aussi appelé β -méthylstyrène par le DMDO.



33. Quel centre stéréogène présente cette molécule ? Préciser le descripteur stéréochimique associé pour la configuration représentée.

34. Donner la formule topologique de l'époxyde obtenu après traitement au DMDO.

35. Combien de stéréoisomères présente cet époxyde indépendamment de la façon dont il est obtenu ?

36. En pratique, on obtient les deux époxydes de configuration (R, R) et (S, S).

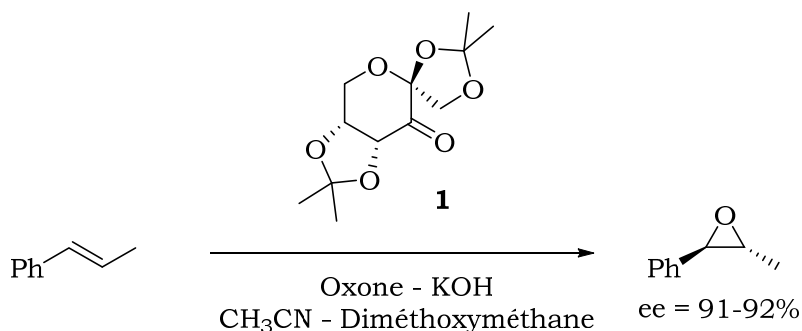
Donner une représentation de Cram de ces deux époxydes.

Quelle relation de stéréoisomérisie existe-t-il entre eux ?

c) B.2.3. Epoxydation chirale

On peut rendre cette méthode d'époxydation énantiosélective en utilisant un dioxirane chiral, le dioxirane chiral étant lui-même préparé à partir d'oxone et d'une cétone chirale.

Un exemple de réaction et de protocole sont donnés ci-dessous :



Protocole :³

Un tricol de 2 L équipé d'un barreau aimanté et de deux ampoules de coulée est refroidi dans un bain de glace. Sont ensuite introduits dans le tricol : 5,91 g (50,0 mmol) de *trans*- β -méthylstyrène, 500 mL d'un mélange (2/1) de diméthoxyméthane et d'acétonitrile (CH₃CN), 300 mL d'une solution tampon acide acétique/carbonate de potassium, 0,375 g (1,1 mmol) d'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium et 4,52 g (17,5 mmol) de la cétone chirale **1**.

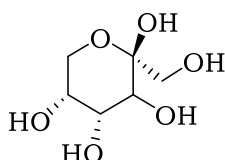
Dans l'une des ampoules de coulée est introduit une solution d'oxone (46,1 g, 75,0 mmol) dans 170 mL d'une solution aqueuse à $4 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de sel disodique de l'éthylènediaminetétracétique (Na₂EDTA), dans l'autre est introduit 170 mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1,47 mol.L⁻¹.

Ces deux solutions sont ajoutées, goutte à goutte, à la même vitesse, durant 2,5 h, au mélange réactionnel vigoureusement agité et maintenu à 0°C. La suspension obtenue est agitée une heure supplémentaire à 0°C. Ensuite, 250 mL de pentane sont ajoutés.

La phase aqueuse est séparée et extraite deux fois avec 250 mL de pentane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis concentrées à l'évaporateur rotatif à 0°C.

Après chromatographie sur gel de silice, en utilisant un éluant hexane / diéthyléther (10 / 1), on obtient 6,02 g (44,9 mmol) d'oxyde de *trans*- β -méthylstyrène.

37. Proposer une synthèse de la cétone chirale **1** à partir de l'alcool ci-dessous :



38. Représenter le dioxirane généré in situ.

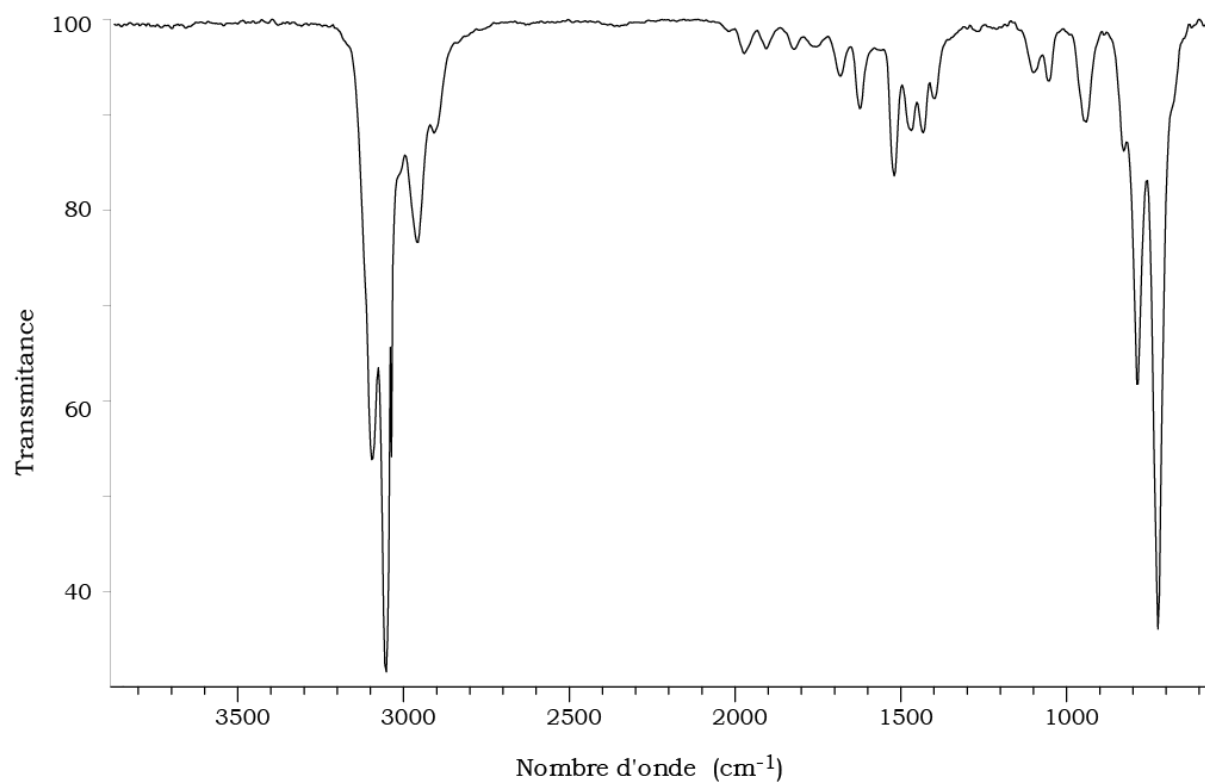
39. Le produit présente un excès énantiomérique ee = 91 – 92 %. Que cela signifie-t-il ?

³OrganicSyntheses, Vol.80, p9-17 (2003) ; Coll.Vol.11, p183-188 (2009)

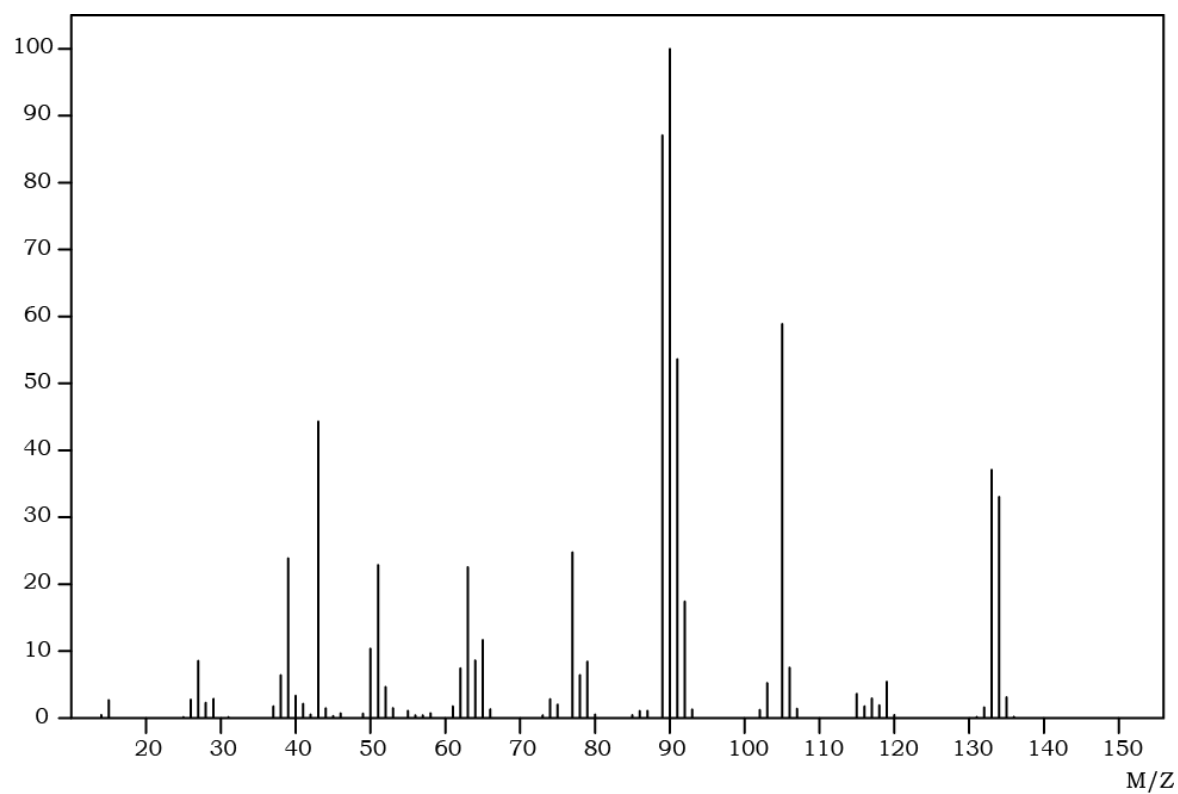
-
40. Le mélange réactionnel présente deux phases. Pouvez-vous préciser leur nature ?
41. L'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium est un catalyseur par transfert de phase c'est-à-dire un catalyseur servant à transférer une espèce chimique d'une phase à une autre.
- Pourquoi ce catalyseur est-il nécessaire ?
- Pourquoi l'ion tétrabutylammonium peut-il aller dans les deux phases ?
42. Que signifie la phase aqueuse est extraite avec deux fois 250 mL de pentane ?
- Peut-on remplacer ces deux extractions par une extraction unique avec 500 mL de pentane ?
43. Donner le principe de purification d'un brut réactionnel liquide par chromatographie sur gel de silice.
44. Entre le *trans*- β -méthylstyrène et l'oxyde de *trans*- β -méthylstyrène, quel est le produit qui est élué en premier ?
- Cet ordre change-t-il si on augmente les proportions de diéther ?
45. Citer une autre technique de purification d'un liquide organique.
46. Calculer le rendement de la réaction.

TOURNER LA PAGE

Spectre IR du *trans*- β -méthylstyrène



Spectre de masse de l'oxyde de *trans*- β -méthylstyrène (ionisation électronique)



-
- **Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de l'oxyde de *trans*- β -méthylstyrène**
 - δ : 1,45 (d, 3H, $J = 5,1$), 3,03 (qd, 1H, $J = 5,1 ; 2,1$), 3,57 (d, 1H, $J = 2,1$), 7,20 - 7,40 (m, 5H).
47. Interpréter les absorptions caractéristiques du spectre IR du *trans*- β -méthylstyrène.
48. Identifier le pic moléculaire du spectre de masse de l'oxyde de *trans*- β -méthylstyrène.
49. Proposer une structure pour le fragment en $M/Z = 90$.
50. Expliquer le principe de l'ionisation électronique.
51. Pourquoi cette méthode d'ionisation est difficilement compatible avec l'analyse de biomolécules ?
- Proposer une autre méthode d'ionisation et la décrire succinctement.
52. Interpréter le spectre RMN de l'oxyde de *trans*- β -méthylstyrène en justifiant la multiplicité des signaux.

La publication donne également pour l'oxyde de *trans*- β -méthylstyrène obtenu $[\alpha]_D^{25} = + 45,3$.

53. Indiquer la signification de la notation $[\alpha]_D^{25}$.
54. Quelle information apporte cette indication $[\alpha]_D^{25} = + 45,3$?
55. A quel autre stéréoisomère de configuration peut-on attribuer la valeur $[\alpha]_D^{25} = - 45,3$?

DONNEES

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

$$E^\circ(I_3^-/I^-) = 0,54 \text{ V}$$

$$E^\circ(S_4O_6^{2-}/S_2O_3^{2-}) = 0,08 \text{ V}$$

Constante d'acidité à 298 K :



Produit ionique de l'eau à 298 K : $pK_E = 14$

Masses molaires (g.mol⁻¹) : I_2 : 253,8 KI : 166,0

Données physicochimiques :

	diiode (solide)		propanone (liquide)		KI (solide)	
Sécurité		H332 H312 H302 H315 H319 H335 H372 H400 P280 P302 + P352 P273 P304 + P340 P312 P305 + P351 + P338		H336 H319 H225 P261 P280 P305 + P351 + P338 P210 P240		H302 H315 H319 P264 P270 P280 P301 + P312 P302 + P352 P305 + P351 + P338 P321 P330 P332 + P313 P337 + P313 P362

	Acide chlorhydrique	
Sécurité		H314 H335 H290 P310 P280 P305 + P351 + P338 P234 P390

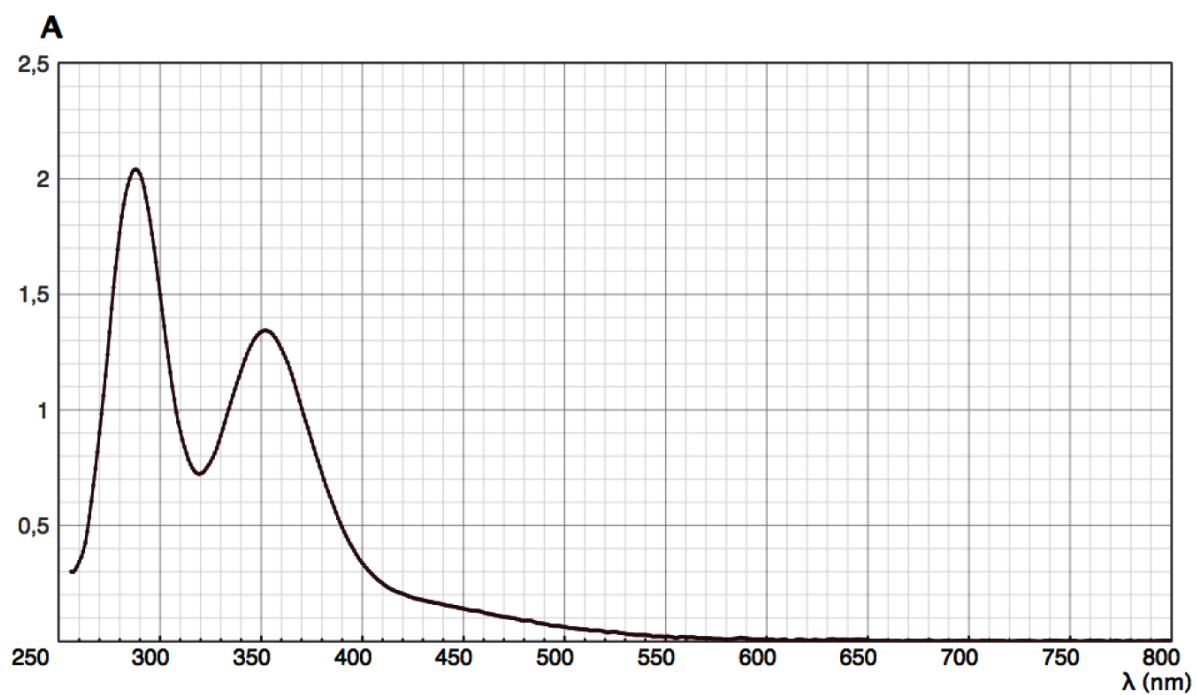
Masses atomiques

Isotope	Masse (u)	Abondance (%)
¹ H	1.00782503207	99.9885
² H	2.0141017778	0.0115
¹² C	12.0000000	98.93
¹³ C	13.0033548378	1.07
¹⁶ O	15.99491461956	99.757
¹⁷ O	16.99913170	0.038
¹⁸ O	17.9991610	0.205

Extrait de la classification périodique des éléments

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

ANNEXE 1 : SPECTRE D'ABSORPTION $A = f(\lambda/\text{nm})$
D'UNE SOLUTION AQUEUSE D'IONS TRIIODURE



ANNEXE 2 : PHRASES H ET P

Mentions de danger

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

Conseils de prudence

P101 : En cas de consultation d'un médecin, garder à disposition le récipient ou l'étiquette
P102 : Tenir hors de portée des enfants.
P103 : Lire l'étiquette avant utilisation.
P201 : Se procurer les instructions avant l'utilisation.
P202 : Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P210 : Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes – Ne pas fumer.
P211 : Ne pas vaporiser sur une flamme nue ou sur toute autre source d'ignition.
P220 : Tenir/stocker à l'écart des vêtements/.../matières combustibles.
P221 : Prendre toutes précautions pour éviter de mélanger avec des matières combustibles/...
P222 : Ne pas laisser au contact de l'air.
P223 : Éviter tout contact avec l'eau, à cause du risque de réaction violente et d'inflammation spontanée.
P230 : Maintenir humidifié avec...
P231 : Manipuler sous gaz inerte.
P232 : Protéger de l'humidité.
P233 : Maintenir le récipient fermé de manière étanche.
P234 : Conserver uniquement dans le récipient d'origine.
P235 : Tenir au frais.
P240 : Mise à la terre/liaison équipotentielle du récipient et du matériel de réception.
P241 : Utiliser du matériel électrique/de ventilation/d'éclairage/.../ antidéflagrant.
P242 : Ne pas utiliser d'outils produisant des étincelles.
P243 : Prendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques.
P244 : S'assurer de l'absence de graisse ou d'huile sur les soupapes de réduction.
P250 : Éviter les abrasions/les chocs/.../les frottements.
P251 : Récipient sous pression : ne pas perforer, ni brûler, même après usage.
P260 : Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols
P262 : Éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements.
P263 : Éviter tout contact avec la substance au cours de la grossesse/pendant l'allaitement.
P264 : Se laver ... soigneusement après manipulation.
P270 : Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant le produit.
P271 : Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé.
P272 : Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.
P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P281 : Utiliser l'équipement de protection individuel requis.
P282 : Porter des gants isolants contre le froid/un équipement de protection des yeux/du visage.
P283 : Porter des vêtements résistants 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 : obtenir 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 résistante à la corrosion.
P407 : Maintenir un intervalle d'air entre les piles/palettes.
P410 : Protéger du rayonnement solaire.
P411 : Stocker à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F.
P412 : Ne pas exposer à une température supérieure à 50 °C / 122 °F.
P413 : Stocker les quantités en vrac de plus de ... kg / ... lb à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F.
P420 : Stocker à l'écart des autres matières.
P402+P404 : Stocker dans un endroit sec. Stocker dans un récipient fermé.
P403+P233 : Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche.
P403+P235 : Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais.
P410+P403 : Protéger du rayonnement solaire. Stocker dans un endroit bien ventilé.
P410+P412 : Protéger du rayonnement solaire. Ne pas exposer à une température supérieure à 50 °C / 122 °F.
P411+P235 : Stocker à une température ne dépassant pas ... °C / ... °F. Tenir au frais.
P501 : Éliminer le contenu/récipient dans ...
P502 : Se reporter au fabricant/fournisseur pour des informations concernant la récupération/le recyclage.

**ANNEXE 3 : TABLE DES DEPLACEMENTS
CHIMIQUES RMN DU PROTON**

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

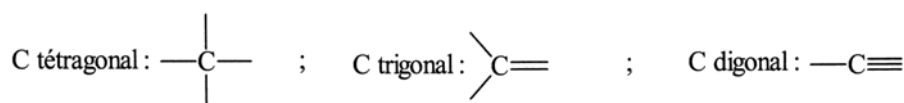
type de proton	δ en ppm	type de proton	δ en ppm
M-CH ₂ R	0,8-1,6	M-C-CH ₂ R	0,9-1,6
M-C=C	1,6-2,0	M-C-C=C	1,0-1,8
M-C≡C	1,7-2,8	M-C-C≡C	1,2-1,8
M-Ph	2,2-2,8	M-C-Ph	1,1-1,8
M-F	4,2-4,8	M-C-F	1,5-2,2
M-Cl	3,0-4,0	M-C-Cl	1,5-2,0
M-Br	3,4-4,1	M-C-Br	1,8-1,9
M-I	3,1-4,2	M-C-I	1,7-2,1
M-OH et M-OR	3,2-3,6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

Domaines de déplacements chimiques de divers protons.

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

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

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



RAPPORT
Rapport sur l'épreuve de travaux pratiques
de chimie 2014
Rapport établi par : Romain Barbe, Hélène Carrie, Sophie Warin

L'épreuve de travaux pratiques de chimie de cette année s'intéressait à diverses réactions impliquant la propanone.

La partie expérimentale s'appuyait sur des titrages iodométriques avec indicateur coloré dans le but de déterminer les ordres partiels de la réaction acido-catalysée d'iodation de la propanone.

La partie théorique s'intéressait à la mise en œuvre de la propanone en synthèse organique en tant que groupe protecteur ou d'agent oxydant *via* la synthèse d'un dioxirane.

A- Partie expérimentale

Cette partie, peu ambitieuse en termes de capacités expérimentales, laissait une place importante à l'initiative des candidats et permettait d'évaluer certaines de leurs compétences, notamment celles mises en œuvre pour la compréhension et l'intégration des documents de l'énoncé dans le but de concevoir une expérience en cinétique chimique.

Les règles élémentaires de sécurité sont respectées par la plupart des candidats mais la pratique du laboratoire reste très inégale d'un candidat à l'autre. Le jury rappelle donc que :

- le port des lunettes au laboratoire est indispensable ;
- il ne faut pas pipeter directement dans les flacons et que l'usage d'un bécher de prélèvement est nécessaire (même si chaque candidat dispose de ses propres solutions) ;
- le matériel mis à disposition doit être choisi à bon escient ; utiliser indifféremment la pipette jaugée ou l'éprouvette sans se préoccuper du niveau de précision nécessaire est fortement pénalisé ;
- pour la préparation d'une solution dans une fiole jaugée, il est préférable de compléter jusqu'au trait de jauge à l'aide d'une pipette pasteur.

Le titrage iodométrique nécessitait l'utilisation d'un indicateur coloré, le thiodène. Ce dernier a été très fréquemment oublié par les candidats, ceux-ci ayant repéré l'équivalence du titrage par la disparition de la couleur du diiode, ce qui n'est pas suffisamment précis. En général, il est préférable de faire deux essais de titrage afin de vérifier leur concordance et le repérage de l'équivalence doit se faire à la goutte près. L'introduction du diiode à titrer dans la burette affaiblit la précision du titrage : l'apparition de la couleur à l'équivalence et la valeur du volume de diiode ajouté sont alors plus difficiles à repérer.

A1 -Détermination des ordres partiels a et b

Pour l'expérience N°1, la justification de la longueur d'onde du suivi spectrophotométrique de la disparition du diiode ne se limitait pas à constater, à l'aide du spectre d'absorption donné en annexe, que le diiode présentait un pic d'absorption à 350 nm.

Certains candidats utilisent la loi de BEER-LAMBERT pour indiquer les facteurs dont dépendent le coefficient d'absorption molaire d'une molécule, ce qui est une erreur classique.

La dégénérescence de l'ordre proposée dans l'expérience N°1 est relativement bien comprise par l'ensemble des candidats.

A2 -Détermination d'une vitesse initiale

Il est regrettable de constater qu'un trop grand nombre de candidats ne sait pas réaliser un tableau d'avancement molaire correct pour un calcul de pH.

La méthode des vitesses initiales est quant à elle bien maîtrisée.

A3 - Détermination de l'ordre partiel c par rapport à H^+

Quelques candidats se sont trompés dans le calcul de la concentration en ions triiodure dans la solution S ; l'erreur constatée provient de la confusion entre la masse molaire du diiode donnée et la masse molaire de l'iode.

Le jury s'est étonné des difficultés de nombreux candidats à mettre en œuvre le titrage classique des ions triiodure par les ions thiosulfate. Chaque titrage doit être précédé d'un travail préparatoire minimal : écriture de l'équation de la réaction de titrage et calcul, si possible, de la valeur du volume équivalent attendu.

Il était ensuite demandé de proposer et de réaliser une troisième expérience afin de déterminer l'ordre partiel par rapport à H^+ . De nombreux protocoles étaient envisageables, le plus simple consistant à ne pas ajouter d'eau et à doubler le volume de la solution d'acide chlorhydrique afin de doubler la concentration en acide sans modifier celles en propanone et en ion triiodure. L'arrêt de la réaction après une durée courte (entre 5 et 10 minutes) puis le titrage des ions triiodure restant, permettaient d'avoir accès à la vitesse initiale dans des conditions réactionnelles proches des résultats décrits dans le sujet, ce qui facilitait la recherche de l'ordre partiel manquant. Le suivi de l'avancement de la réaction au cours du temps n'était pas nécessaire.

Si la conception de l'expérience a été réalisée, de façon parfois partielle, par de nombreux candidats, rares sont ceux qui ont achevé sa mise en œuvre et son exploitation. Le jury félicite ces derniers.

B- La propanone

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.

Les questions abordaient de nombreux thèmes : atomistique, thermodynamique, spectroscopies et chimie organique.

B1- Réaction d'acétalisation

Le mécanisme de la réaction d'acétalisation n'est pas maîtrisé par tous les candidats.

Le calcul d'une enthalpie standard de réaction à partir des enthalpies standard de formation est inégalement traité : la plupart des candidats savent qu'il faut faire une combinaison linéaire mais les coefficients ne sont pas toujours les bons. Très peu de candidats ont donné une définition correcte d'une enthalpie standard de formation.

B2- Méthode d'époxydation des alcènes mettant en jeu la propanone

B.2.1. L'oxone ®

Les questions d'atomistique autour de l'oxone ont dans l'ensemble été bien traitées. Des représentations de Lewis très fantaisistes ont tout de même été proposées.

B.2.2. Formation d'époxydes à partir de DMDO

Les questions plus générales concernant les réactifs ou les réactions permettant de procéder à des interconversions de fonctions sont traitées de manière peu précise.

Les questions relatives à la stéréochimie sont quant à elles bien traitées dans l'ensemble, sauf la représentation de CRAM d'une molécule avec une stéréochimie donnée.

B.2.3. Epoxydation chirale

Le sujet s'achevait sur l'étude d'un protocole permettant de réaliser une époxydation chirale.

Le mode d'action d'un catalyseur par transfert de phase a posé de réelles difficultés de compréhension.

Les données spectroscopiques sont rarement analysées de façon précise et exhaustive. En spectroscopie IR, les bandes d'absorption doivent être désignées précisément et associées à des liaisons chimiques et non des groupes caractéristiques. Il est donc impropre, pour le spectre proposé, de dire que « la bande à 1650 cm^{-1} correspond à un alcène ». Les bandes d'absorption à 1650 et 3100 cm^{-1} correspondent aux absorptions respectivement des liaisons $C=C$ et $C_{\text{tri}}-H$ ce qui confirme la présence d'une fonction alcène. Le même discours

pourrait être tenu sur les spectres RMN pour lesquels les signaux sont à associer à des protons et non à des fonctions chimiques.

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

	A1							A2			A3								
N° question	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
% réponses	96	96	79	93	96	89	86	100	93	93	93	96	96	96	75	75	68	43	46
% bonnes réponses	92	30	55	46	70	66	61	83	56	71	38	74	79	64	9,8	13	54	29	68

	B1						B2.1			B2.2							
N° question	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
% réponses	79	89	86	79	96	54	89	71	89	82	50	50	79	86	54	82	86
% bonnes réponses	56	7	56	59	55	7	68	58	62	30	57	45	54	65	93	82	48

	B2.3																			
N° question	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	
% réponses	32	25	68	61	43	36	57	36	50	14	43	11	7,1	25	29	29	46	43	43	
% bonnes réponses	78	75	33	90	59	68	91	57	61	100	49	67	0	39	48	42	70	71	79	

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

Durée de l'épreuve : 5 heures

Coefficient 3

Leçons

SUJETS DE MICROBIOLOGIE

La résistance bactérienne aux antibiotiques
Le traitement microbiologique des eaux usées en station d'épuration
Le paludisme: pathogénie, traitement et prévention
Les médicaments issus du génie génétique
Les membranes des bactéries: composition et construction
La mobilité des bactéries
Les entérotoxines bactériennes
La réplication des virus à ARN
Les mécanismes viraux d'échappement au système immunitaire

SUJETS DE BIOCHIMIE

Coopérativité et allostérie
Le cytosquelette
Vieillesse et élimination des protéines
Altérations et réparations de l'ADN
Les éléments génétiques mobiles dans les cellules animales
Récepteurs membranaires et signalisation cellulaire
Les cellules souches: aspects génétiques de la différenciation et utilisation biotechnologique
Les anomalies métaboliques
Oncogènes et anti-oncogènes

SUJETS DE BIOLOGIE HUMAINE

Régulation du pH sanguin
Les régulations mises en place suite à un jeûne prolongé
Le foie
ATPases ioniques: de la localisation subcellulaire à la fonction
Rôles extra génitaux des hormones sexuelles
La thermorégulation
Mécanismes et rôles des désensibilisations des récepteurs
Complexe hypothalamo-hypophysaire et contrôle de la synthèse et maturation des hormones peptidiques

SUJETS D'IMMUNOLOGIE

L'immunité anti-cancéreuse
Les cytokines pro-inflammatoires

RAPPORT

établi par : Henri Jean Boulouis, Jeanne-Laure Dormieux, Laurence Dupont, Françoise Guillet, Philippe Lejeune, Nicolas Meunier, Alain Morel, Christiane Saligaut, Benoît 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 proposaient cette année d'aborder différents thèmes considérés comme essentiels soit par leur dimension très large soit par leur intérêt dans l'évolution des savoirs. Certains des intitulés étaient très « classiques » tels : le foie, la régulation du pH sanguin, la résistance bactérienne aux antibiotiques, le cytosquelette..., d'autres étaient plus inhabituels tels : vieillissement et élimination des protéines, les anomalies métaboliques, l'immunité anti-cancéreuse..., tous ne pouvaient être traités sans une culture scientifique et technique solide qui devait aussi s'enrichir de données actuelles.

Certains sujets très classiques ne pouvant être ignorés des candidats admissibles à l'agrégation ont cependant donné lieu à des exposés d'un niveau très insuffisant sur le plan des savoirs indispensables au traitement du sujet.

Lorsque la méconnaissance du sujet n'a pas pu être compensée par la lecture des ouvrages mis à disposition, ou que l'ampleur de celui-ci n'a pas conduit le candidat à concevoir un plan permettant d'en traiter les principaux éléments, l'exposé a été pauvre sur le plan des savoirs mais aussi quant à l'élaboration d'une argumentation rigoureuse.

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.

Le jury a apprécié les efforts des candidats pour présenter un exposé attrayant de par les connaissances exposées mais aussi de par la qualité des documents supports choisis pour leur présentation. Le jury rappelle que cette leçon se doit, à un niveau d'exigence élevé, d'être placée dans un objectif pédagogique.

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, l'analyse qu'il a faite de la problématique proposée, la qualité de la réflexion qu'il mène souvent avec le jury, sont des éléments qui participent de la qualité de l'entretien.

Rapport sur les leçons de biochimie

Comme rapporté lors des précédentes sessions, 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.. Les leçons nécessitent toujours un support sous forme de schéma et de figures qui doivent aider à la compréhension et pour cela être traitées avec soin et précision.. 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

Comme les années précédentes les prestations des candidats ont été de qualité diverse ; la diversité étant peu liée au thème abordé mais essentiellement à la capacité du candidat à synthétiser un propos précis rigoureux et intéressant.

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...

Certains candidats n'ont pas utilisé tout le temps qui leur était alloué et ainsi n'ont pu envisager la totalité des éléments du sujet. Il est peut-être bon de rappeler ici, même si ce sont des évidences, que les énoncés des titres doivent être lus attentivement avant que le candidat ne se lance dans la construction de sa leçon.

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. Le manque de connaissance générale en physiologie déjà pointé à l'écrit se retrouve à l'oral. Ainsi de nombreux candidats se retrouvent à découvrir le sujet aux travers des documents disponibles et manquent alors complètement de recul pour bien traiter la leçon mais aussi permettre une discussion avec les membres du jury. Il faut donc lors de la préparation à cette épreuve que les candidats ne limitent pas leur connaissance à quelques fonctions limitées mais s'intéressent plus généralement aux différents aspects de la physiologie.

Les sujets posés invitent bien souvent le candidat à faire un effort de réflexion et de synthèse afin de proposer un discours structuré et il faut donc prendre le soin d'éviter de faire des catalogues énumérant différents rôles ou fonctions en rapport avec la leçon.

On note une amélioration des étudiants qui visent moins à remplir absolument les 45 min de leçon. Il est en effet moins pénalisant de faire une leçon plus courte mais cohérente par rapport à une leçon lente et parsemée de redites ou hors sujet.

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. Il serait, à ce titre judicieux de reporter sur les transparents et/ou diapositives les structures chimiques des molécules essentielles à la compréhension des phénomènes mis en jeu (oestradiol, tamoxifène ... par exemple).

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. Les notions de sous-couches électroniques, leur ordre de remplissage et le nombre d'électrons les saturant sont souvent très lointains. 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, justifiée par le critère de Hückel, 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...). Identifier des carbones asymétriques (et donner leur configuration absolue), ou discuter la configuration d'une double liaison fait partie des exigences du jury. Des confusions ont aussi été fréquemment notées lorsqu'il s'agissait de donner le lien stéréochimique existant entre deux molécules (énantiomères ou diastéréoisomères). 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 cohérent en chimie organique.

En chimie inorganique, tout candidat doit être capable d'équilibrer rapidement un bilan d'oxydoréduction et de donner les nombres d'oxydation d'un élément au sein d'une espèce chimique. L'identification de l'espèce oxydante et de l'espèce réductrice est également requise. Cette année, des erreurs sur ces notions clé en biochimie ont été fréquemment observées.

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 protonnée 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 (même de manière vulgarisée) les techniques physiques expérimentales qu'il évoque comme la spectrométrie de masse, la microscopie de fluorescence, la Résonance Magnétique Nucléaire, la cristallographie des rayons X ou encore la microscopie à force atomique. 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) en employant un vocabulaire rigoureux (niveaux d'énergie électronique, phénomènes de relaxation radiatifs et non radiatifs ...).

Enfin, nous souhaitons féliciter les candidats qui se sont appliqués à répondre de manière réfléchie et constructive aux questions de chimie sans se décourager d'emblée.

ÉTUDE CRITIQUE D'UN DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE

Durée de l'épreuve : 1 heure 20

Coefficient 3

Première partie d'épreuve : SUJETS

Pathologie de Parkinson et mutations	Domanskyi A. & al. Pten Ablation in Adult Dopaminergic Neurons is Neuroprotective in Parkinson's Disease Models <i>The FASEB Journal</i> , 2011, vol. 25, p. 2898-2910 Matenia D & Mandelkow EM Emerging Modes of PINK1 Signaling: Another Task for MARK2 <i>Frontiers in Molecular Neuroscience</i> , 2014, vol. 7(art. 37), p. 1-6
Inflammasome et pyroptose	Meunier E & al. Caspase-11 Activation Requires Lysis of Pathogen-Containing Vacuoles by IFN-Induced GTPases <i>Nature</i> , 2014, vol. 509, p. 366-370 Cunha LD & Zamboni DS Subversion of Inflammasome Activation and Pyroptosis by Pathogenic Bacteria <i>Frontiers in Cellular and Infection Microbiology</i> , 2013, vol. 3, article 76, p. 1-14
Nouvelles astuces pour un vieux dimère	Wells JA, Kossiakoff AA New Tricks for an Old Dimer <i>Science</i> , 2014, vol. 344, p. 703-704 Brooks AJ & al. Mechanism of Activation of Protein Kinase JAK2 by the Growth Hormone Receptor <i>Science</i> , 2014, vol. 344, p. 1249783-1 à 1249783-12
Biologie des Hantavirus	Vaheri A, Strandin T, Hepojoki J, Sironen T, Henttonen H, Makela S, Mustonen J Uncovering the Mysteries of Hantavirus Infections <i>Nature Reviews Microbiology</i> , 2013, vol. 11, p. 539-550 Cheng E, Wang Z, Mir MA Interaction between Hantavirus Nucleocapsid Protein (N) and RNA-dependant Polymerase (RdRp) Mutant Reveals the Requirement of N-RdRp Interaction for Viral RNA Synthesis <i>Journal of Virology</i> , 2014, online publication
L'ADN polymérase de <i>Pyrococcus furiosus</i> : un détecteur d'uracile	Connolly BA Recognition of Deaminated Bases by Archaeal Family-B DNA Polymerases <i>Biochemical Society Transaction</i> , 2009, vol. 37(part 1), p. 65-68 Firbank SJ, Wardle J, Heslop P, Lewis RJ, Connolly BA Uracil Recognition in Archaeal DNA Polymerases Captured by X-ray Crystallography <i>Journal of Molecular Biology</i> , 2008, vol. 381, p. 529-539
Action des œstrogènes sur des RCPG	Lebesgue D, Chevalere V, Zukin RS, Etgen AM Estradiol Rescues Neurons from Global Ischemia-Induced Cell Death: Multiple Cellular Pathways of Neuroprotection <i>Steroids</i> , 2009, vol. 74, p. 555-561 Langer G, Bader B, Meoli L, Isensee J, Delbeck M, Noppinger PR, Otto C A Critical Review of Fundamental Controversies in the Field of GPR30 Research <i>Steroids</i> , 2010, vol. 75, p. 603-610
Mode d'action des antibiotiques de la famille des aminoglycosides	Ezraty B & al. Fe-S Cluster Biosynthesis Controls Uptake of Aminoglycosides in a ROS-Less Death Pathway <i>Science</i> , 2013, vol. 340, p. 1583-1587 Roche B, Aussel L, Ezraty B, Mandin P, Py B, Barras F Iron/Sulfur Proteins Biogenesis in Prokaryotes: Formation, Regulation and Diversity <i>Biochimica and Biophysica Acta</i> , 2013, vol. 1827, p. 455-469
La prévention ciblée des altérations de l'ADN	Dominissini D, He C Damage Prevention Targeted <i>Nature</i> , 2014, vol. 508, p. 191-192 Huber KV & al. Stereospecific Targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an Anticancer Strategy <i>Nature</i> , 2014, vol. 508, p. 222-227

Croissance tumorale et œstrogènes	Pequeux C, Raymond-Letron I, Blacher S, & al. Stromal Estrogen Receptor-α Promotes Tumor Growth by Normalizing an Increased Angiogenesis <i>Cancer Research</i>, 2012, vol. 72(12), p. 3010-3019 Li WW, Li VW, Hutnik M, Chiou AS Tumor Angiogenesis as a Target for Dietary Cancer Prevention <i>Journal of Oncology</i>, 2011, vol. 2012, article ID 879623, p. 1-23
L'expansion artificielle du code génétique	Thyer R, Ellefson J New Letters for Life's Alphabet <i>Nature</i>, 2014, vol. 509, p. 291-292 Malyshev DA, Dhami K, Lavergne T, Chen T, Dai N, Foster JM, Corrêa IR Jr, Romesberg FE A Semi-synthetic Organism with an Expanded Genetic Alphabet <i>Nature</i>, 2014, vol. 509, p. 385-388
Le renouveau des Polyomavirus	DeCaprio JA & Garcea RL A Cornucopia of Human Polyomaviruses <i>Nature Reviews Microbiology</i>, 2013, vol. 11, p. 264-276 Tsang SH Wang, X, Li J, Buck CB, You J Host DNA Damage Response Factors Localize to Merkel Cell Polyomavirus DNA Replication Sites to Support Efficient Viral Replication <i>Journal of Virology</i>, 2014, vol. 88(6), p. 3285-3297
Production de bio-carburants (sous forme d'acides gras libres) par <i>Escherichia coli</i>	Xiao Y, Ruan Z, Liu Z, Wu SG, Varman AM, Liu Y, Tang YJ Engineering <i>Escherichia coli</i> to Convert Acetic Acid to free Fatty Acids <i>Biochemical Engineering Journal</i>, 2013, vol. 76, p. 60-69. Lennen RM & Pfleger BF Engineering <i>Escherichia coli</i> to Synthesize Free Fatty Acids <i>Trends in Biotechnology</i>, 2012, vol. 30(12), p. 659-667
Calpaïne et activation des mastocytes	Wu Z et al. Calpain-1 Contributes to Ig E-Mediated Mast Cell Activation <i>Journal of Immunology</i>, 2014, vol. 192, p. 5130-5139 (& 1-4 supplements) Croall DE & Ersfeld K The Calpains: Modula Designs and Functionnal Diversity <i>Genome biology</i>, 2007, vol. 8(6), article 218, p. 218-1 à 218-11
Une protéine qui garde le cerveau en bonne santé	McKinnon PJ TDP2 Keeps the Brain Healthy <i>Nature Genetics</i>, 2014, vol. 46(5), p. 419-421 Gómez-Herreros F & al. TDP2 Protects Transcription from Abortive Topoisomerase Activity and is Required for Normal Neural Function <i>Nature Genetics</i>, 2014, vol. 46(5), p. 516-521
Régulation nerveuse de l'axe gonadotrope	Murata K, Tamogami S, Itou M, Ohkubo Y, Wakabayashi Y, Watanabe H, Okamura H, Takeuchi Y, Mori Y Identification of an Olfactory Signal Molecule that Activates the Central Regulator of Reproduction in Goats <i>Current Biology</i>, 2014, vol. 24(6), p. 681-686 Okamura H, Murata K, Sakamoto K, Wakabayashi Y, Ohkura S, Takeuchi Y, Mori Y Male Effect Pheromone Ticks the Gonadotrophin-Releasing Hormone Pulse Generator <i>Journal of Neuroendocrinology</i>, 2010, vol. 22, p. 825-832
Des bactéries conçues pour garder la mémoire d'événements particuliers	Kotula JW, Kerns SJ, Shakel LA, Siraj L, Collins JJ, Way JC, Silver PA Programmable Bacteria Detect and Record an Environmental Signal in the Mammalian Gut <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2014, vol. 111(13), p. 4838-4843. Cheng AA & Lu TK Synthetic Biology: An Emerging Engineering Discipline <i>Annual Review of Biomedical Engineering</i>, 2012, vol. 14, p. 155-178
Transmission paternelle d'une expérience olfactive	Dias BG, Ressler KJ Parental Olfactory Experience Influences Behavior and Neural Structure in Subsequent Generations <i>Nature Neuroscience</i>, 2013, p. 1-8 (advance online publication) Szyf M Lamarck Revisited: Epigenetic Inheritance of Ancestral Odor Fear Conditioning <i>Nature Neuroscience</i>, 2014, vol. 17(1), p. 2-4
L'activité antibactérienne des métaux	Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ Antimicrobial Activity of Metals: Mechanisms, Molecular Targets and Applications <i>Nature Reviews Microbiology</i>, 2013, vol. 11, p. 371-384 Anas A, Jiya J, Rameez MJ, Anand PB, Anantharaman MR, Nair S Sequential Interactions of Silver-Silica Nanocomposite (Ag-SiO₂NC) with Cell Wall, Metabolism, and genetic Stability of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, a Multiple Antibiotic-Resistant Bacterium <i>Letters in Applied Microbiology</i>, 2012, vol. 56, p. 57-62

Microbiote et régulation de la pression artérielle	Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, Brunet I, Wan LX, Rey F, Wang T & al. Olfactory Receptor Responding to Gut Microbiota-Derived Signals Plays a Role in Renin Secretion and Blood Pressure Regulation <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2013, vol. 110(11), p. 4410-4415 Pluznick JL Renal and Cardiovascular Sensory Receptors and Blood Pressure Regulation <i>American Journal of Physiology – Renal physiology</i>, 2013, vol. 305, p. 439-444
La réparation des trous de la membrane plasmique	Chen CT, Hehnl H, Doxsey SJ Orchestrating Vesicle Transport, ESCRTs and Kinase Surveillance during Abcission <i>Nature Reviews Molecular Cell Biology</i>, 2012, vol. 13, p. 483-488 Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F ESCRT Machinery is Required for Plasma Membrane Repair <i>Science</i>, 2014, vol. 343, p. 1247136-1 à 1247136-7
Régulation de la valeur hédonique des aliments	Domingos AI, Sordillo A, Dietrich MO, Liu ZW, Tellez LA, Vaynshteyn J, Ferreira JG, Ekstrand MI, Horvath TL, de Araujo IE & al. Hypothalamic Melanin Concentrating Hormone Neurons Communicate the Nutrient Value of Sugar <i>eLife</i>, 2013, vol. 2, e01462, p. 1-15 Garcia-Caceres C, Tschoep MH The Emerging Neurobiology of Calorie Addiction <i>eLife</i>, 2014, vol. 3, e01928, p. 1-3
Un code caché de l'évolution des protéines	Weatheritt RJ, Babu MM The Hidden Codes that Shape Protein Evolution <i>Science</i>, 2013, vol. 342, p. 1325-1326 Stergachis AB, Haugen E, Shafer A, Fu W, Vernot B, Reynolds A, Raubitschek A, Ziegler S, LeProust EM, Akey JM, Stamatoyannopoulos JA Exonic Transcription Factor Binding Directs Codon Choice and Affects Protein Evolution <i>Science</i>, 2013, vol. 342, p. 1367-1372
La chlorhexidine: mécanisme de résistance des bactéries	McDonnell G & Russel AD Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance <i>Clinical Microbiology Reviews</i>, 1999, vol. 12(1), p. 147-179 (& 227 erratum) Hassan KA, Jackson SM, Penesyan A, Patching SG, Tetu SG, Eijkelkamp BA, Brown MH, Henderson PJF, Paulsen IT Transcriptomic and Biochemical Analyses Identify a Family of Chlorhexidine Efflux Proteins <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)</i>, 2013, vol. 110(50), p. 20254-20259 (& 1-9 supporting information)
La transcription d'un ARN par un ARN	Yarus M Climbing in 190 Dimensions <i>Science</i>, 2011, vol. 332, p. 181-182 Wochner A, Attwater J, Coulson A, Holliger P Ribozyme-catalyzed Transcription of an Active Ribozyme <i>Science</i>, 2011, vol. 332, p. 209-212
Les cellules T invariantes associées aux muqueuses	Le Bourhis L et al MAIT Cells Detect and Efficiently Lyse Bacterially-Infected Epithelial Cells <i>Public Library of Science (PLoS) Pathogens</i>, 2013, vol. 9(10), e1003681, p. 1-12 Le Bourhis L, Mburu YK, Lantz O MAIT Cells, Surveyors of a New Class of Antigen: Development and Functions <i>Current Opinion in Immunology</i>, 2013, vol. 25, p. 174-180
Édition « à la carte » des génomes	Horvath P, Barrangou R RNA-guided Genome Editing à la carte <i>Cell Research</i>, 2013, vol. 23, p. 733-734 Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, Cheng AW, Trevino AE, Konermann S, Chen S, Jaenisch R, Zhang F, Sharp PA Genome-wide Binding of the CRISPR Endonuclease Cas9 in Mammalian Cells <i>Nature Biotechnology</i>, 2014, p. 1-7 (advance online publication)
Sécrétion de granules de polyesters par <i>Escherichia coli</i>	Rahman A, Linton E, Hatch AD, Sims RC, Miller CD Secretion of Polyhydroxybutyrate in <i>Escherichia coli</i> Using a Synthetic Biological Engineering Approach <i>Journal of Biological Engineering</i>, 2013, vol. 7(24), p. 1-9 Grage K, Jahns AC, Parlange N, Palanisamy R, Rasiah IA, Atwood JA, Rehm BHA Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications <i>Biomacromolecules</i>, 2009, vol. 10, p. 660-669
Une protéine comme élixir de jeunesse ?	Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, Miller CM, Loffredo FS, Wojtkiewicz GR, Chen JW, Lee RT, Wagers AJ, Rubin LL Vascular and Neurogenic Rejuvenation of the Aging Mouse Brain by Young Systemic Factors <i>Science</i>, 2014, vol. 344, p. 630-634 Sinha M, Jang YC, Oh J, Khong D, Wu EY, Manohar R, Miller C, Regalado SG, Loffredo FS, Pancoast JR & al. Restoring Systemic GDF11 Levels Reverses Age-Related Dysfunction in Mouse Skeletal Muscle <i>Science</i>, 2014, vol. 344, p. 649-652

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

Chaque dossier comporte deux documents en anglais : 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 est essentielle : d'abord globale, elle 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.

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

Comme chaque année, le jury rappelle que l'objectif de l'exposé n'est pas de présenter l'ensemble des éléments contenus dans les deux documents mais de mettre en évidence d'une part, la problématique de la revue et 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 !

Les candidats doivent donc 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.

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. Il est donc essentiel que l'étude cadre le sujet de l'article dans un environnement plus large permettant de percevoir l'intérêt, le pourquoi du sujet. Il s'agit ensuite de montrer en quoi les expériences décrites ont permis de confirmer ou infirmer l'hypothèse proposée. Il est alors possible de développer spécifiquement telle ou telle expérience, technique, d'en expliciter les résultats, d'exercer son sens critique éventuellement, sur les méthodes mentionnées, sur l'interprétation des résultats proposée.

Cette année encore, le jury a constaté que certains candidats n'étaient pas en mesure d'expliquer les principes des méthodes et de justifier le choix de ces méthodes dans une analyse ou une expérimentation.

Le jury a apprécié les efforts des candidats à illustrer leurs propos par les documents issus des articles et retravaillés afin qu'ils soient des appuis aux explications.

Le jury, en particulier lors des échanges, a apprécié l'attitude des candidats, cherchant à répondre aux questions du jury, suivant celui ci sur les pistes qu'il proposait.

En ce qui concerne les ECD de Biologie, la qualité a été comme l'année dernière meilleure que les leçons. Les quelques échecs sont encore dus à un manque de connaissances aussi bien générales (fondamentales, applications sociétales) que des méthodes d'investigation. Nous vous recommandons encore de lire régulièrement 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 réactualiser leurs connaissances. Cela s'avérera pertinent également pour les écrits et la leçon (où les connaissances datent encore trop souvent des années 90...).

Seconde partie d'épreuve

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

Les sujets étaient, comme les années précédentes, tous construits sur un schéma identique : un extrait de texte réglementaire (extraits de code, décret, arrêté, circulaire,...) une mise en situation et une question relative à la situation proposée.

Les thèmes ayant donné lieu, cette année ou les années précédentes, aux principales évolutions du système éducatif et ayant conduit à des mises en place de dispositifs en lycée ont été particulièrement explorés.

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 : élèves ou étudiants, équipe pédagogique, équipe de direction, vie scolaire, partenaires .. ;

Les exposés et les réponses aux questions posées ont été inégaux tant dans la connaissance de l'actualité de l'Education nationale que dans l'appropriation de la position de l'enseignant au sein de la communauté éducative.

Pour certains candidats, 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 ces candidats avaient fait pour préparer cette épreuve. Cela leur a permis un discours réaliste, argumenté autrement que par la répétition de phrases « officielles ».

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

Le jury a apprécié les candidats qui ont répondu avec honnêteté et engagement, traduisant ainsi la conscience qu'ils avaient de l'importance de cette dimension dans leur futur métier.

CONCLUSION GENERALE

Cette année, le profil des candidats inscrits au concours et présents aux épreuves d'admissibilité 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 sur les trois épreuves d'admissibilité. On ne peut que rappeler que l'inscription à l'agrégation de biochimie génie biologique nécessite une préparation sur l'ensemble des champs couverts par ce concours sans en négliger aucun ! C'est à la fois une culture générale de l'ensemble des domaines : chimie, biochimie, biologie et biotechnologies qui est requise mais aussi des connaissances spécifiques de haut niveau.

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.

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

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 être en mesure d'apprécier et d'expliquer aux élèves et étudiants, 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 qui a été réservé à ce concours et les excellentes conditions dans lesquelles il s'est déroulé.

Le jury remercie les personnels du ministère et du S.I.E.C qui ont contribué très efficacement à l'organisation de cette session et tout particulièrement Madame la gestionnaire de l'agrégation externe de BGB pour son efficacité et son dévouement.

Enfin il remercie Madame la chef de travaux, l'ensemble des personnels en particulier les personnels de maintenance informatique, les personnels de laboratoire qui ont, cette année encore, assuré une préparation remarquable des épreuves pratiques et orales.