MINISTÈRE
DE L'ÉDUCATION
NATIONALE, DE
L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR ET DE
LA RECHERCHE

Concours du second degré

Rapport de jury

Concours : Agrégation interne

Section : Biochimie - Génie Biologique

Session 2015

Rapport de jury présenté par : Jean-Pascal Dumon

© www.education.gouv.fr

SOMMAIRE

Composition du jury…… Page 3

Renseignements statistiques……... Page 4

Avant propos du président…… Page 6

Epreuves d'admissibilité …….. Page 7

Première épreuve

Sujet…… Page 10

Rapport…….. Page 27

Deuxième épreuve

Sujet…… Page 33

Rapport…….. Page 35

Epreuves d'admission

Première épreuve

Rapport…….. Page 38

Deuxième épreuve

Sujet…… Page 41

Rapport…….. Page 59

Conclusion générale……... Page 62

COMPOSITION DU JURY

Président du jury
Monsieur Jean-Pascal DUMON — Inspecteur Général de l'Education Nationale

Vice-président
Monsieur Jean-Marc RICORT — Professeur des Universités

Secrétaire générale
Madame Isabelle ETIENNE — Professeure Agrégée

Membres

Madame Christine BENAYOUN	Professeure Agrégée
Monsieur Fabien CONCHONAUD	Professeur Agrégé
Monsieur Frédéric DUCANCEL	Ingénieur de Recherche au CEA
Madame Isabelle FALLER	Inspectrice d'Académie-Inspectrice Pédagogique Régionale
Madame Françoise GUYOMARCH	Professeure agrégée
Monsieur Patrick MEUNIER	Professeur Agrégé
Madame Claudine WALTHER	Professeure Agrégée

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Agrégation interne

Nombre de postes	**8**
Candidats inscrits	**146**
Candidats présents aux deux épreuves d'admissibilité	**86**
Candidats admissibles	**18**
Candidats présents aux épreuves d'admission	**18**
Candidats proposés pour l'admission	**8**
Epreuves d'admissibilité	
Moyenne des candidats présents	**6 ,77**
Moyenne des candidats admissibles	**10,31**
Moyenne du dernier candidat admissible	**9,11**
1ère épreuve	
Moyenne des candidats présents	**6,96**
Moyenne des candidats admissibles	**11,34**
Note maximale	**15,18**
2ème épreuve	
Moyenne des candidats présents	**6,70**
Moyenne des candidats admissibles	**9,27**
Note maximale	**10,96**
Epreuves d'admission	
Moyenne des candidats présents	**11,33**
Moyenne des candidats admis	**13,03**
1ère épreuve	
Moyenne des candidats présents	**12,22**
Moyenne des candidats admis	**14,38**
Note maximale	**17,00**
2ème épreuve	
Moyenne des candidats présents	**10,43**
Moyenne des candidats admis	**11,48**
Note maximale	**13,98**
Ensemble du concours	
Moyenne des candidats présents	**10,84**
Moyenne la plus élevée	**13,14**
Moyenne des candidats admis	**12,06**
Moyenne du dernier candidat admis	**11,30**

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Concours d'accès à l'échelle de rémunération des professeurs agrégés (CAER)

Nombre de postes	**1**
Candidats inscrits	**21**
Candidats présents aux deux épreuves d'admissibilité	**8**
Candidats admissibles	**2**
Candidats présents aux épreuves d'admission	**2**
Candidats proposés pour l'admission	**0**
Epreuves d'admissibilité	
Moyenne des candidats présents	**8,24**
Moyenne des candidats admissibles	**11,09**
Moyenne du dernier candidat admissible	**10,62**
1ère épreuve	
Moyenne des candidats présents	**8,64**
Moyenne des candidats admissibles	**12,74**
Note maximale	**13,46**
2ème épreuve	
Moyenne des candidats présents	**6,39**
Moyenne des candidats admissibles	**7,65**
Note maximale	**7,98**
Epreuves d'admission	
Moyenne des candidats présents	**8,39**
Moyenne des candidats admis	**Aucun admis**
1ère épreuve	
Moyenne des candidats présents	**8,00**
Moyenne des candidats admis	
Note maximale	
2ème épreuve	
Moyenne des candidats présents	**8,78**
Moyenne des candidats admis	
Note maximale	
Ensemble du concours	**9,29**
Moyenne des candidats présents	
Moyenne la plus élevée	
Moyenne des candidats admis	
Moyenne du dernier candidat admis	

Avant-propos

Le jury souhaite en tout premier lieu encourager l'ensemble des candidats qui se sont présentés à ce concours ou qui ambitionnent de le faire. Il s'agit d'un concours certes difficile, qui nécessite une préparation approfondie, tant dans l'approche des contenus scientifiques, que dans la prise en compte des attentes du jury pour chaque épreuve. Ce rapport est destiné à aider à cette préparation.
Je souhaite d'autre part féliciter tous les candidats admissibles de la session 2015, les lauréats bien sûr mais aussi, ceux qui n'ont pas été retenus. Tous les candidats ayant traversés l'admission de cette session 2015, y compris les collègues qui enseignent en section ST2S depuis plusieurs années, ont manifesté de remarquables qualités scientifiques et professionnelles.

L'agrégation interne et le CAER interne de biochimie génie biologique ont pour vocation de permettre à des enseignants en activité d'accéder au grade de Professeur Agrégé de biochimie génie biologique.
La session 2015 est la deuxième année d'ouverture de ce concours prestigieux après une longue interruption de 2007 à 2013. Cette année, tout comme l'an dernier de nombreux candidats, 166, se sont inscrits. 94 candidats se sont présentés à l'admissibilité soit 56,6% des inscrits.

Les domaines couverts par l'agrégation de biochimie génie biologique sont variés et vastes : biochimie, microbiologie, immunologie, biologie cellulaire, hématologie, biologie moléculaire, physiologie humaine…
Il importe donc pour espérer avoir quelques chances de réussite que les candidats se préparent sérieusement, non seulement pour mettre en valeur leurs compétences professionnelles, mais également pour intégrer les connaissances et les compétences scientifiques et technologiques attendues d'un professeur agrégé de biochimie-génie biologique. Ce rapport du jury a pour objectif d'indiquer aux futurs candidats les objectifs des différentes épreuves.

Les épreuves d'admissibilité conjuguent l'évaluation des connaissances scientifiques et technologiques, mais également les qualités attendues d'un enseignant. Le jury demande donc à ce que les candidats soient capables de construire un développement structuré, concis, scientifiquement à la pointe des connaissances, tout en faisant preuve, notamment, de qualités didactiques et pédagogiques.
La première épreuve s'inscrit dans la présentation de deux thèmes technologiques abordés dans leurs aspects technologiques et pédagogiques. A ce propos, le jury a souhaité favoriser l'identification du registre évalué en signalant les questions par des lettres « C » pour connaissance et « P » pour pédagogie. Le déterminisme de chaque question est donc ainsi sans ambiguïté.
La deuxième épreuve présente un caractère foncièrement scientifique. Elle place le candidat dans la construction d'une réponse disciplinaire à une question de synthèse portant sur un domaine couvert par les secteurs de la spécialité. Le jury a choisi cette année de limiter cette épreuve à deux questions. En effet, la correction de la session précédente a montré sans ambiguïté que les candidats n'avaient eu le temps de traiter correctement que deux questions sur les trois, la dernière ayant été largement survolée dans la majorité des cas. Les deux thématiques proposées ont permis d'aborder deux thèmes incontournables en biochimie-génie biologiques : les métabolismes des microorganismes vis-à-vis du dioxygène ainsi la structure et les flux des membranes biologiques. Si l'exercice se révèle moins contraint pour la gestion du temps avec deux questions au lieu de trois, il n'en demeure pas moins scientifiquement exigeant en termes du niveau de connaissances requis ; aussi, le jury encourage fortement les candidats à préparer très en amont cette épreuve par un maintien rigoureux et une actualisation permanente de leurs connaissances. Il s'agit notamment de cerner avec précision et justesse chaque sujet.

La première épreuve d'amission s'inscrit dans une démarche de projet qui se doit de combiner une étude scientifique et technologique afin de construire une ou plusieurs transpositions pédagogiques pour un niveau de classe donné. L'étude peut avantageusement être associée à des aspects économiques, sociaux et humains. Cette démarche préfigure la situation d'un enseignant qui prend appui sur la réalité professionnelle afin d'ancrer son enseignement en lien avec les procédés de

biotechnologies (production de biens et de services, recherche, R&D, analyse, contrôle qualité...) et l'évolution des activités dans les laboratoires. Dans cette perspective, l'enseignant s'emploie à approfondir ses savoirs fondamentaux, technologiques et techniques en empruntant aux entreprises ou aux laboratoires les activités effectivement réalisées dans leur contexte propre. Dans cette optique, la démarche peut faire l'objet d'un stage massé ou perlé en entreprise ou laboratoire. Elle peut aussi prendre appui sur des publications scientifiques, des données économiques, des problématiques sociétales associées à des procédés biotechnologiques. A terme, cette démarche s'inscrit dans un projet technologique et pédagogique dédié aux élèves pour un niveau donné.
Le candidat envisage donc le(es) réinvestissement(s) possible(s) de son étude technologique (projet) dans le cadre d'un programme dont il a la responsabilité.

Le dossier peut donc légitimement comporter deux parties :

- une étude scientifique et technologique que le candidat prendra soin de replacer dans son contexte, notamment en lien avec la problématique à l'origine du projet. Si la réalisation d'un stage en entreprise n'est en rien obligatoire, les dossiers construits à partir d'un stage, d'une visite voire un partenariat d'entreprise, portent une dimension factuelle, réaliste, actualisée dont on ne peut nier l'intérêt ;
- une mise en application pour un niveau de classe donné, un référentiel, une progression choisie et justifiée. La problématique du transfert des activités technologiques et techniques décrites sera abordée afin de prendre en compte les contraintes propres à un environnement enseignant (matériels disponibles, horaires, groupe classe, coût, sécurité...). Elle pourra décliner les modalités de mise en œuvre (opérationnalisation) en lien avec les objectifs de formations ambitionnés, les activités effectuées par les étudiants, les documents supports de ces activités, les évaluations. Des aspects interdisciplinaires peuvent également nourrir l'analyse des choix pédagogiques et opérationnels adoptés.

La deuxième épreuve place les candidats dans la réalisation d'activités technologiques. C'est une épreuve difficile et ce pour plusieurs raisons : tout d'abord, par sa durée, 8 heures, mais aussi par le fait qu'elle couvre des secteurs imposés et divers des biotechnologies. Ainsi, cette année, les candidats devaient mettre en œuvre des activités technologiques de biologie cellulaire, microbiologie, biologie moléculaire et enzymologie. Si les manipulations proposées se voulaient évaluer des compétences technologiques et techniques de base, elles obligeaient une polyvalence, une adaptabilité et une aptitude à intégrer rapidement des protocoles opératoires parfois totalement nouveaux pour certains candidats. Certains professeurs, en poste depuis de nombreuses années sur des responsabilités parfois identiques d'années en années, éprouvent des difficultés à aborder des domaines nouveaux ou oubliés du laboratoire. Il est donc conseillé aux futurs candidats de réinvestir des techniques non pratiquées depuis quelques années mais aussi de s'informer voire mettre en œuvre des méthodologies et techniques récentes. La réappropriation de certains gestes techniques en amont de l'épreuve pourrait ainsi s'avérer une aide dans l'appréhension de l'épreuve.

D'autre part, l'épreuve ne se limitait pas à la mise en œuvre de protocoles opératoires mais demandait aussi de se placer dans une dimension métier de l'enseignant à travers des mises en situation. Ces dernières amenaient le candidat à faire des choix dans la mise en œuvre de certains protocoles.

Les candidats ont disposé d'une heure, à prendre en une seule fois ou fractionnée, afin de prendre un repas et s'hydrater. L'ensemble couvrait donc 9 heures dont 8 heures d'activités technologiques. Cette année encore et malheureusement, trop de candidats ont fait le mauvais choix d'une activité à « marche forcée », durant plus de quatre heures consécutives, sans aucune respiration intellectuelle. Le phénomène dit de fringale ou d'épuisement intellectuel s'installe alors brutalement, occultant la lucidité indispensable pour mener à bien l'ensemble de l'épreuve.

Pour conclure cet avant-propos, le jury espère sincèrement que ce rapport sera très utile aux futurs candidats à l'agrégation interne de biochimie-génie biologique.

Jean-Pascal DUMON
Président du jury

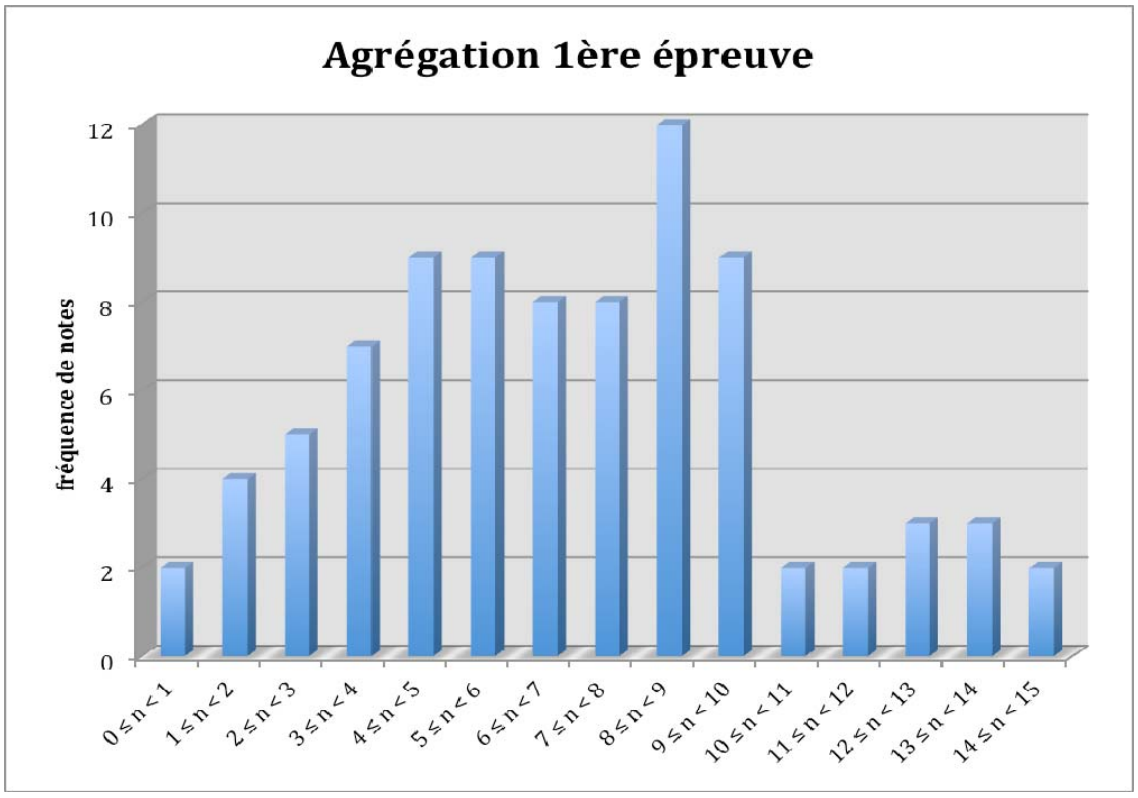
EPREUVES D'ADMISSIBILITE

Première épreuve

Durée : 6 heures
Coefficient : 1

Résultats :

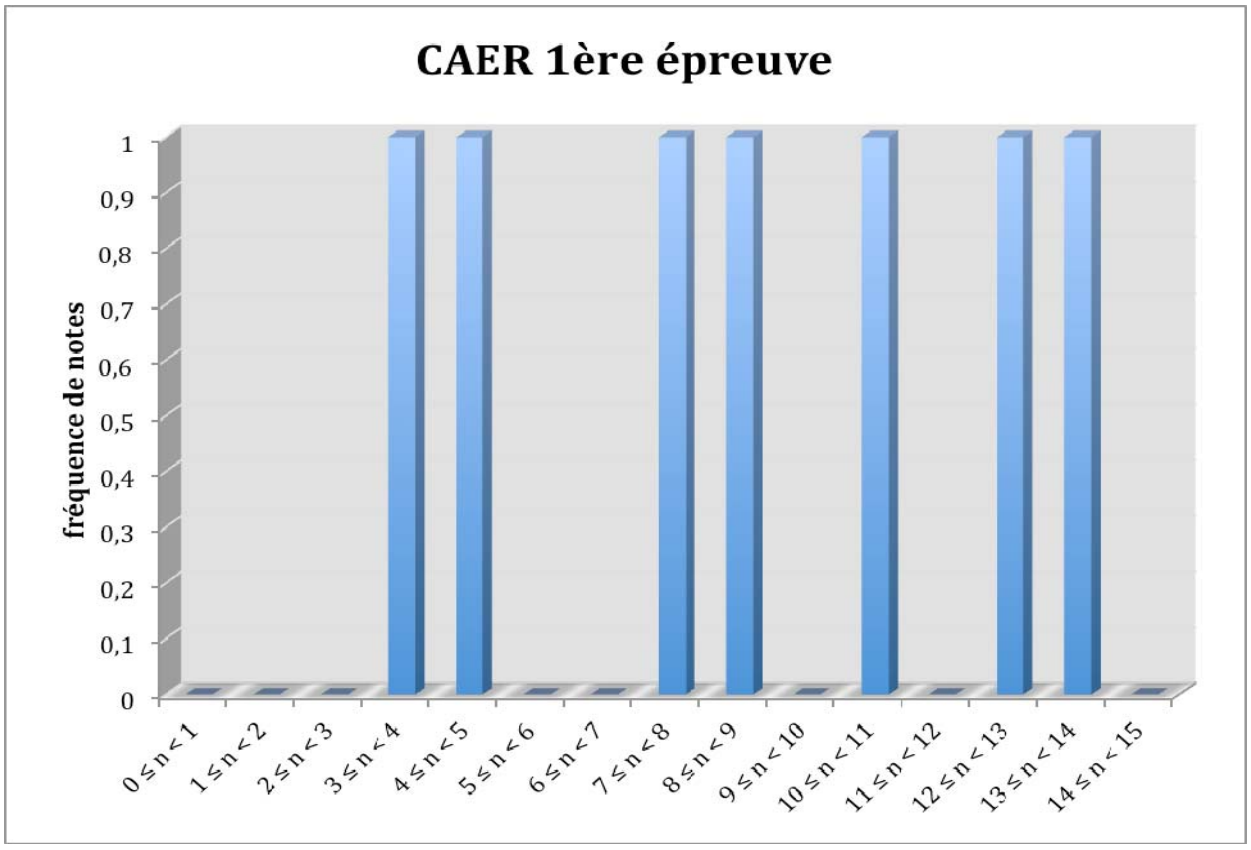
Agrégation interne			
0 ≤ n < 1	2	8 ≤ n < 9	12
1 ≤ n < 2	4	9 ≤ n < 10	9
2 ≤ n < 3	5	10 ≤ n < 11	2
3 ≤ n < 4	7	11 ≤ n < 12	2
4 ≤ n < 5	9	12 ≤ n < 13	3
5 ≤ n < 6	9	13 ≤ n < 14	3
6 ≤ n < 7	8	14 ≤ n < 15	2
7 ≤ n < 8	8	15 ≤ n < 16	1



Résultats :

CAER agrégation

0 ≤ n < 1	0	8 ≤ n < 9	1
1 ≤ n < 2	0	9 ≤ n < 10	0
2 ≤ n < 3	0	10 ≤ n < 11	1
3 ≤ n < 4	1	11 ≤ n < 12	0
4 ≤ n < 5	1	12 ≤ n < 13	1
5 ≤ n < 6	0	13 ≤ n < 14	1
6 ≤ n < 7	0	14 ≤ n < 15	0
7 ≤ n < 8	1	15 ≤ n < 16	0



Rapport du jury sur la première épreuve

Dossier technique relatif à un problème biotechnologique. Rapport du jury.

Rapport établi par mesdames Isabelle Faller, Claudine Walther, messieurs Fabien Conchonaud, Patrick Meunier.

Résultats de l'épreuve :
92 candidats ont composé :

- 12 ont obtenu une note supérieure ou égale à 12/20
- 5 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12,
- 22 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10,
- 17 ont obtenu une note supérieure ou égale à 6 et strictement inférieure à 8,
- 36 ont obtenu une note strictement inférieure à 6.

La moyenne générale de l'épreuve est de 6,96. La meilleure note est de 15,18/20.

Définition et structure de l'épreuve

L'épreuve, qui prend appui sur un dossier technique relatif à un problème biotechnologique, s'organise en deux parties :
- la première permet d'évaluer les capacités du candidat à utiliser ses connaissances scientifiques et techniques pour expliciter ou valider les solutions retenues ;
- la seconde permet d'évaluer les capacités du candidat à utiliser le support proposé pour élaborer un exercice permettant l'évaluation des connaissances et méthodes acquises par les élèves à un niveau de formation déterminé.
Le candidat doit situer l'exercice dans un processus d'apprentissage et par rapport aux autres enseignements scientifiques ou techniques qui lui sont associés.

Le sujet de 2015 était organisé en deux parties, comportant chacune des questions mobilisant des connaissances scientifiques et techniques et des questions pédagogiques. La première partie représentait les deux tiers du sujet.

Sujet 1ère épreuve

Le sujet de 2015 était organisé en deux parties, comportant chacune des questions mobilisant des
connaissances scientifiques et techniques et des questions pédagogiques.

Première partie

Le virus Ebola : multiplication, sérothérapie et dépistage

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, le virus Ebola se transmet à l'homme après un contact étroit avec du sang, des sécrétions ou des liquides biologiques d'animaux ou d'individus infectés. La période d'incubation dure de 2 à 21 jours. Il s'agit d'une virose aiguë sévère caractérisée par divers symptômes qui, dans certains cas, aboutissent à des hémorragies internes et externes.

Le virus Ebola appartient à la famille des Filoviridae (filovirus). Initialement classés parmi les rhabdovirus, les filovirus forment aujourd'hui une famille distincte et seraient en réalité plus proches des paramyxovirus. Le document 1 présente le cycle de multiplication du virus Ebola ainsi que des informations concernant son génome et les protéines exprimées.

P1 Il est demandé à des étudiants de BTS Analyses de Biologie Médicale de décrire, à l'appui de ce document, les différentes étapes du cycle du virus Ebola.
Rédiger une proposition de correction.

Si la transfusion de plasma de personnes guéries de l'infection par le virus Ebola a donné des résultats encourageants, des recherches ont également été menées pour développer la sérothérapie en utilisant des anticorps monoclonaux. Différents types d'anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine d'enveloppe GP du virus EBOLA ont été produits : des anticorps monoclonaux de souris (6D8, 6D3, 13C6), de singe (JP3K11) et des anticorps humanisés (KZ52). Leur efficacité pour la neutralisation du virus Ebola a été testée et leur mode d'action analysé.

L'efficacité des anticorps monoclonaux pour la neutralisation du virus Ebola a été étudiée par infection d'un tapis cellulaire, suite à leur incubation en présence de particules pseudovirales. Les conditions expérimentales et les résultats sont présentés dans le document 2.

C1 Le pourcentage d'infection est mesuré par rapport à un témoin. Indiquer la composition de ce témoin. Justifier la réponse.

C2 Analyser les résultats obtenus.

P2 Proposer une démarche pédagogique permettant d'expliquer la sérothérapie à des étudiants en STS, en intégrant l'exploitation du document 2.

L'étude du mode d'action des anticorps monoclonaux neutralisant le virus Ebola se fonde sur la structure et le rôle de la protéine GP présentés de façon détaillée dans le document 3.
Afin d'identifier la région reconnue par chaque anticorps monoclonal testé, différentes constructions permettant l'expression du gène sauvage de la protéine GP ou de mutants ont été réalisées comme présenté dans le document 4.
Des cellules rénales embryonnaires humaines (la lignée 293), n'exprimant pas la protéine GP en temps normal, ont été transfectées avec une des quatre constructions précédentes ou avec le vecteur vide.
Après 20 à 22 h d'incubation, les cellules ainsi transfectées ont été récoltées puis incubées avec les différents anticorps monoclonaux évoqués précédemment. Après l'ajout d'un réactif complémentaire, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (FACS). Les résultats sont présentés dans le document 5.

C3 Indiquer la nature du signal mesuré par le cytomètre en flux dans cette expérience. Préciser le(s) réactif(s) complémentaire(s) indispensable(s) pour effectuer ces mesures.

C4 Expliciter les contrôles réalisés (première colonne et courbes bleues), puis analyser l'ensemble des résultats obtenus et conclure.

P3 Proposer une courte évaluation (deux à trois questions) permettant de vérifier la compréhension du principe du FACS par des étudiants en STS biotechnologies. Rédiger un corrigé.

Le dépistage des patients est une préoccupation essentielle afin d'éviter la propagation du virus au sein des populations. Ainsi, disposer d'une technique rapide, spécifique, sensible et peu coûteuse s'avère pertinente.

La technique développée par Notomi et al. et dénommée RT-LAMP (Reverse Transcription–Loop-mediated isothermal AMPlification) peut être adaptée pour détecter le virus Ebola. Ce test est réalisé en tube unique, incubé 1 heure à 63 °C en bain thermostaté. Le milieu réactionnel contient entre autres, l'échantillon à tester, les enzymes nécessaires ainsi que les amorces spécifiques.

Comme le montre le document 6, le principe repose sur l'utilisation de 4 amorces distinctes spécifiquement dessinées pour reconnaitre 6 régions différentes de la séquence nucléotidique cible à amplifier :
Amorce BIP : portant la séquence B2 complémentaire de la séquence B2c du gène à amplifier et la séquence B1c identique à celle du gène à amplifier.
Amorce BOP (ou B3) : complémentaire de la séquence B3c du gène à amplifier
Amorce FIP : portant la séquence F2 complémentaire de la séquence F2c du gène à amplifier et la séquence F1c identique à celle du gène à amplifier.
Amorce FOP (ou F3) : complémentaire de la séquence F3c du gène à amplifier

Le document 7 schématise les premières étapes de ce test.

C5 Justifier la nécessité de réaliser une transcription inverse pour détecter le virus Ebola dans un prélèvement humain.

Le document 8 schématise les étapes de la formation d'un ADN « en haltère ». L'enzyme impliquée est la Bst ADN polymérase. Elle possède non seulement une activité polymérase mais également une activité de déplacement de brin.

C6 Expliquer les étapes (3) et (4) schématisées dans le document 8.

C7 Justifier le nombre d'amorces utilisées dans la RT-LAMP et préciser le rôle de chacune.

Au cours d'une séance de bio-informatique en STS Biotechnologies, la notion de spécificité de la technique de détection doit être illustrée.

P4 Proposer une application à mettre en œuvre pour permettre aux étudiants d'appréhender la notion de spécificité de détection du virus Ebola. Insister sur le ou les paramètres responsables de cette spécificité ; paramètres modifiables à l'aide de l'outil informatique.

Le document 9 explique les étapes d'amplification de l'ADN « en haltère » par LAMP.
A l'issue de ces étapes, un test positif par RT-LAMP repose sur l'apparition d'un trouble détectable après une heure d'incubation.

C8 Expliquer l'importance de l'obtention d'une structure en boucle dans le déroulement de la RT-LAMP.

C9 Identifier l'origine du trouble à l'issue de la RT-LAMP et justifier son apparition.

Le résultat visuel de l'amplification peut être validé par une électrophorèse en gel d'agarose (document 10).

C10 Analyser puis interpréter le résultat observé dans les puits 1 et 2 du gel d'agarose.

P5 Présenter, aux étudiants en STS, les techniques utilisables pour révéler une électrophorèse d'ADN en gel d'agarose en insistant sur les équipements de protection individuels et collectifs éventuellement nécessaires.

Les techniques de RT-LAMP et de RT-PCR présentent des caractéristiques proches mais sont pourtant bien différentes.

C11 Construire un tableau comparatif de ces deux techniques.

Deuxième partie

Développement et validation d'une méthode de dosage du tryptophane et de ses métabolites

L'axe cerveau intestin est une voie de communication bidirectionnelle entre le système nerveux central et le tractus gastro-intestinal. De nombreux métabolites, issus de la transformation du tryptophane, interviennent dans la régulation de cette voie.
Le tryptophane peut s'engager dans différentes voies métaboliques : la biosynthèse des protéines, la voie de la sérotonine ou celle de la kynurénine.

L'étude porte plus particulièrement sur la voie de la kynurénine, présentée de façon plus détaillée dans le document 11.

Un déséquilibre entre l'acide kynurénique (KYNA) et l'acide quinolinique (QUIN) ou une diminution de la disponibilité en sérotonine, peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies. Par ailleurs, différentes études ont mis en évidence l'impact de la composition de la flore intestinale sur le profil métabolique du tryptophane. Pour affiner la compréhension des phénomènes impliqués, il est important de disposer d'une méthode de dosage du tryptophane et de ses métabolites.

Une méthode de dosage permettant de quantifier le tryptophane ainsi que les dérivés métaboliques de la kynurénine a récemment été développée et validée (Marisa Müller, Jan L. Du Preez, Brian H. Harvey, Journal of Chromatography B,898 (2012) 121-129).
Elle utilise une pré-purification par extraction en phase solide suivie d'une séparation chromatographique (HPLC) et d'une détection par spectrométrie de masse. Différents aspects de son développement et de sa validation sont présentés dans l'étude qui suit.

Les réactifs utilisés répertoriés dans le document 12, incluent l'utilisation d'un étalon interne.

P6 Dans le cadre d'une séance de travaux dirigés, présenter une démarche pédagogique permettant d'introduire la notion d'étalon interne en BTS biotechnologies, en particulier les calculs associés à l'exploitation des résultats. Prendre appui sur un dosage utilisant un seul étalon externe.

La préparation des différents échantillons à doser est détaillée dans le document 13.

C12 Expliquer l'importance de l'utilisation de plasma prétraité.

Le système chromatographique et les phases mobiles mises en œuvre sont détaillés dans le document 14.

C13 Proposer un schéma du montage du système chromatographique utilisé.

C14 Dégager le principe sur lequel se fonde la séparation des molécules.

La validation de la méthode s'effectue dans le respect des prescriptions de la FDA (Food and Drug Administration). Plusieurs données caractéristiques de la performance de la technique sont présentées dans le document 15.

C15 Définir chacun des paramètres évoqués dans ce document.

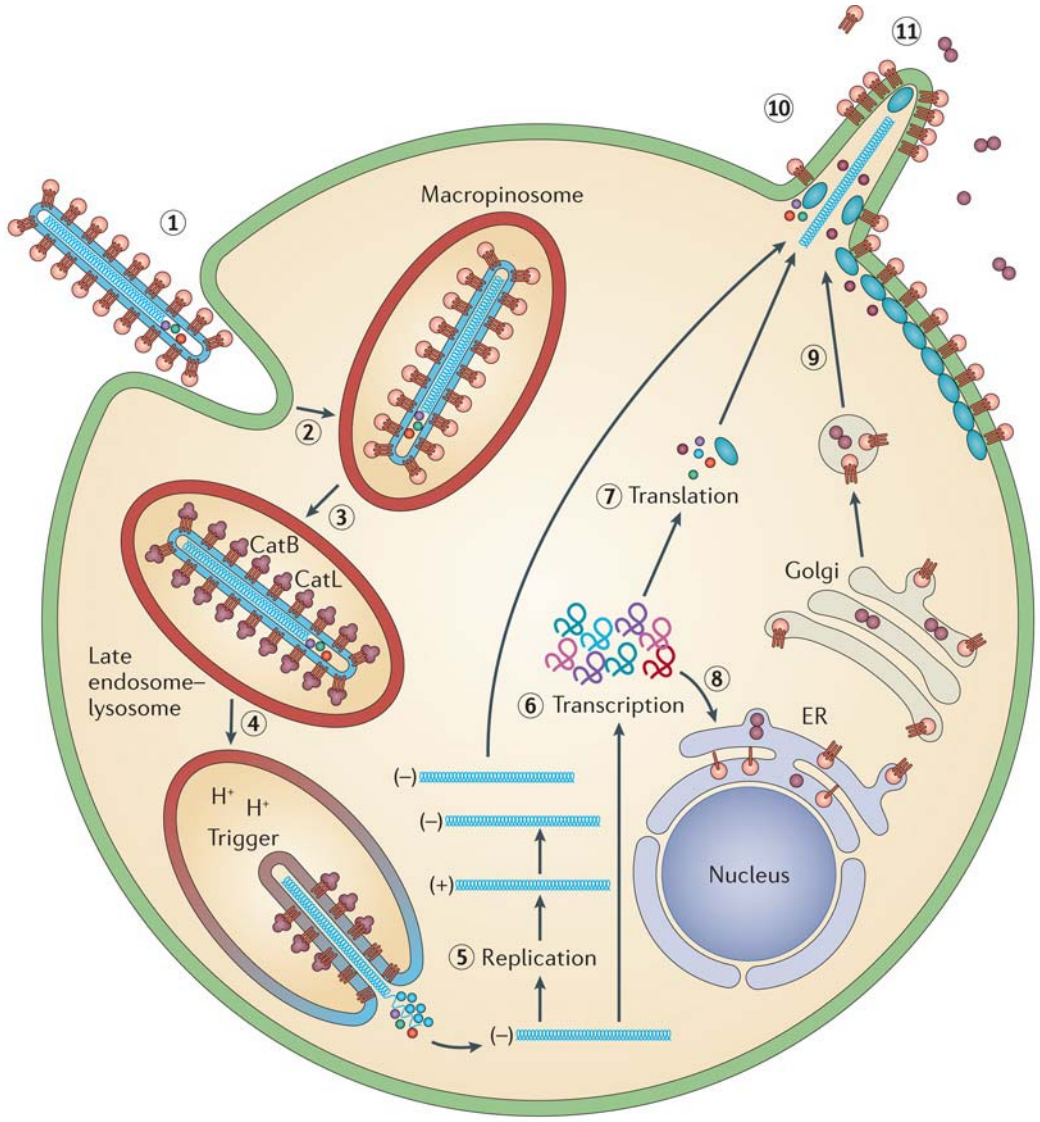
P7 Détailler les étapes d'une séance d'activité technologique introduisant l'une de ces

notions, dans le cadre du programme « mesure et instrumentation » en classe de 1ère STL.

Afin d'optimiser la méthode développée précédemment, il a été envisagé de mettre en œuvre une technique séparative plus performante que l'HPLC, la chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC) dont les caractéristiques sont décrites dans le document 16.

P8 Utiliser les documents présentés pour concevoir un exercice présentant les particularités et les atouts de l'UPLC par rapport à l'HPLC, en STS Biotechnologies. Indiquer les principaux éléments de corrigé.

Document 1 : cycle du virus Ebola (adapté de White JM. & Schornberg KL., Nature Reviews Microbiology, 2012)

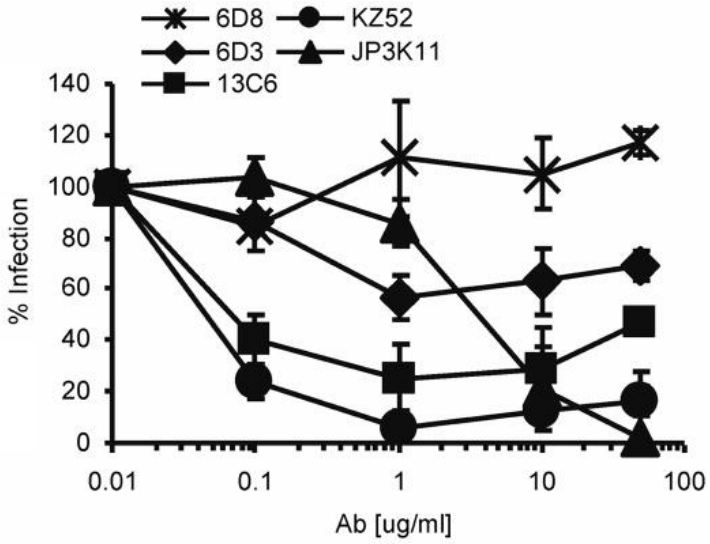


- FL GP trimer : glycoprotéine transmembranaire de l'enveloppe virale
- 19-kDa GP trimer : forme protéolysée de la glycoprotéine GP
- sGP : glycoprotéine GP sécrétée
- mRNA
- VP40
- RNA + NP
- NP : nucléoprotéine de la capside
- VP24 : protéine de la matrice, associée à l'enveloppe virale
- VP30 : nucléoprotéine mineure
- L : ARN polymérase ARN-dépendante
- VP35 : cofacteur de la polymérase virale

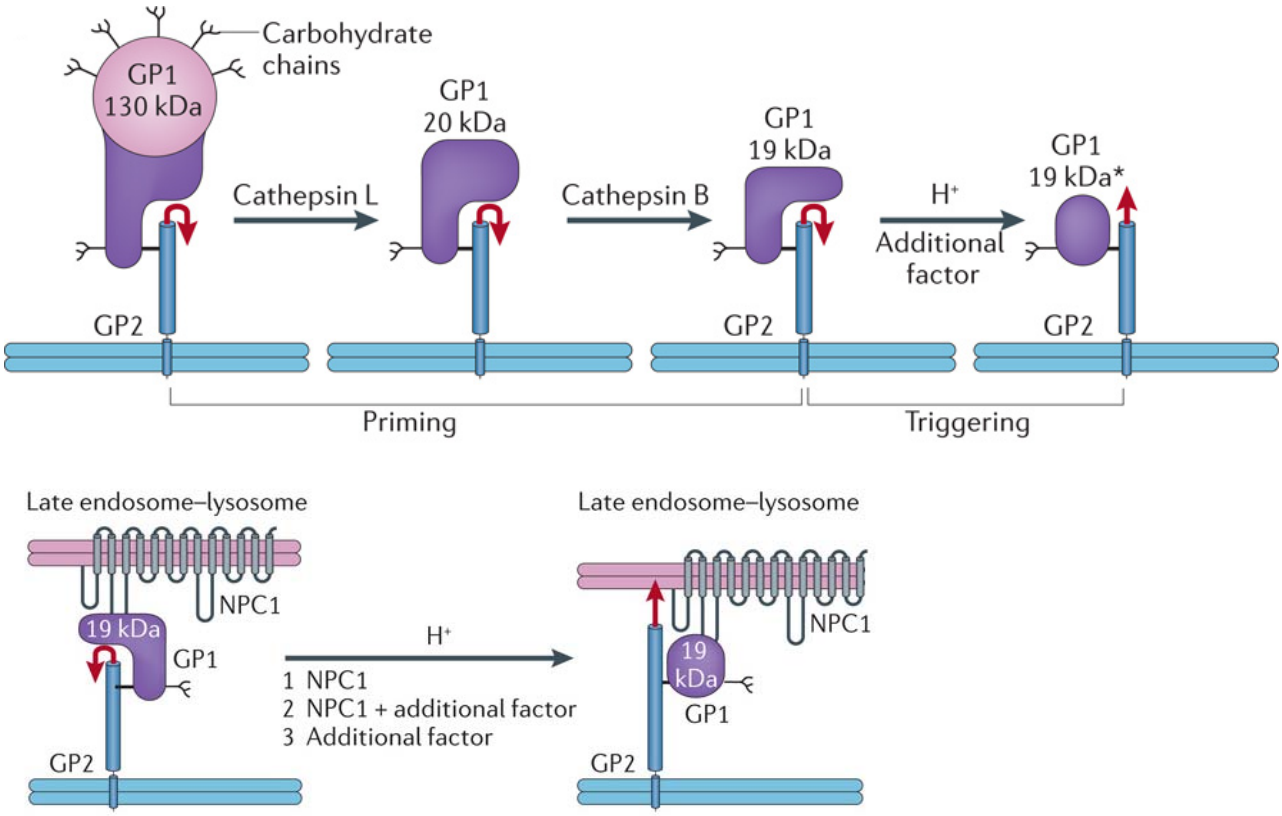
Document 2 : étude de l'efficacité des différents Ac monoclonaux neutralisant le virus Ebola

Des études utilisant ces anticorps sont réalisées afin d'en déterminer l'efficacité.
Des particules pseudovirales, exprimant la glycoprotéine d'enveloppe GP du virus Ebola et porteuses du gène rapporteur de la luciférase, sont produites. Elles sont ensuite incubées pendant 1 heure en présence de différentes concentrations des anticorps monoclonaux testés avant d'infecter un tapis de cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). L'activité luciférase est mesurée 72 heures après l'infection.

Le % d'infection en fonction de différentes concentrations en Ac pour chaque Ac neutralisant testé est représenté ci-dessous :



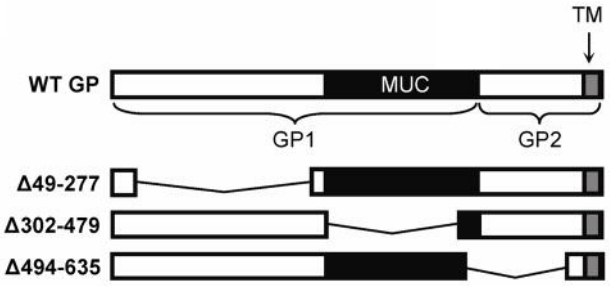
Document 3 : données structurales et fonctionnelles concernant la protéine d'enveloppe GP (adapté de White JM. & Schornberg KL., Nature Reviews Microbiology, 2012)



Certains auteurs suggèrent que le virus Ebola se lierait à un récepteur membranaire cellulaire par l'intermédiaire de la protéine GP. Mais tous s'accordent à dire que le virus pénètre dans la cellule par macropinocytose.
La glycoprotéine GP (N- et O-glycosylée) est constituée de deux sous unités, GP1 extracellulaire de 130 kDa (extrémité N-terminale) et GP2 transmembranaire de 26 kDa (extrémité C-terminale) liées par des ponts disulfures.
Le virus internalisé dans un macropinosome subit successivement deux protéolyses par les cathepsines L et B (protéases endosomales) et une activation pH-dépendante qui permettent la fusion entre la membrane endosomale et l'enveloppe virale. Ainsi le virus peut sortir de l'endosome tardif. Cette étape fait intervenir une protéine de la membrane lysosomale, NPC-1.

Document 4 : représentation des différents gènes clonés permettant l'expression de la protéine GP sauvage et des trois protéines mutées

Les portions de gènes codant la partie N-terminale de GP1, la région MUC de GP1 et la protéine GP2 ont été enlevées dans trois constructions différentes.

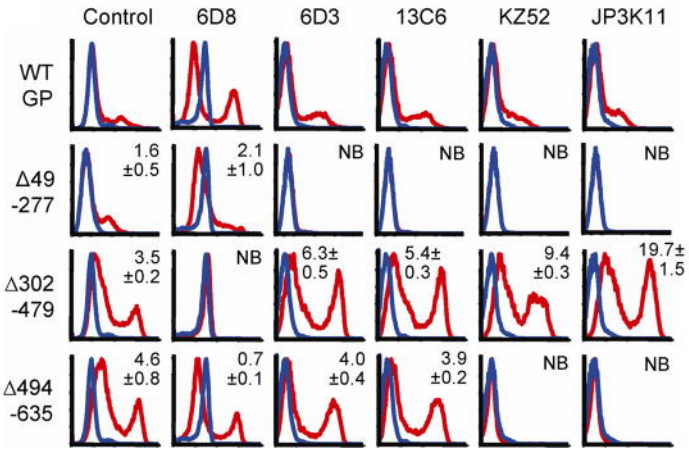


Document 5 : résultats obtenus en cytométrie en flux

« Control » indique l'utilisation d'un sérum contrôle contenant des anticorps polyclonaux anti-GP.

Les courbes bleues correspondent aux résultats obtenus avec les cellules de la lignée 293 transfectées par le vecteur vide.

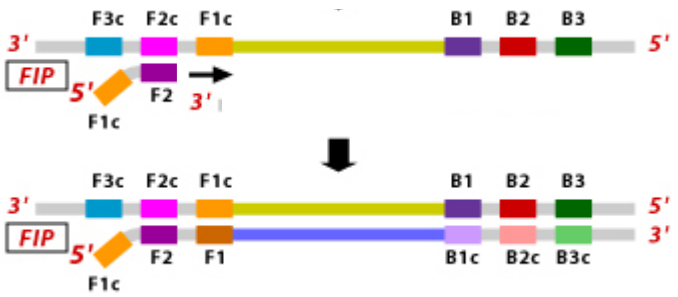
Les courbes rouges correspondent aux cellules de la lignée 293 transfectées par une des constructions présentées dans le document 4.



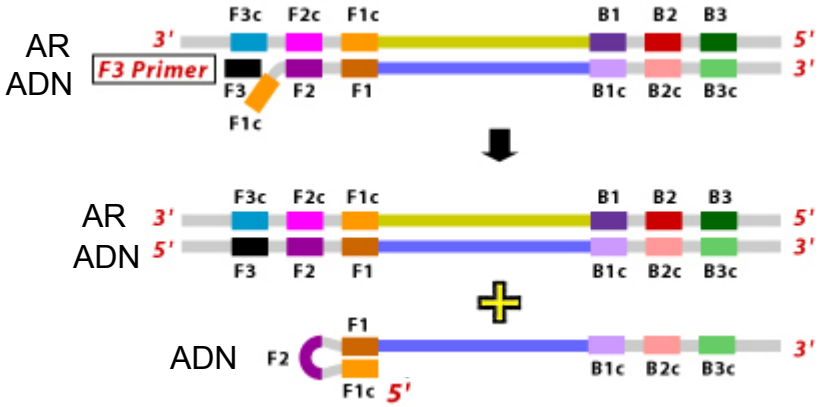
Document 6 : représentation schématique d'un gène cible à amplifier par RT-LAMP

Document 7 : transcription inverse
L'ARN, purifié à partir des échantillons à tester, est incubé pendant 1 heure à 63°C en présence des enzymes, amorces et substrats nécessaires.

(1) L'amorce FIP s'hybride avec la matrice d'ARN et, sous l'action de la transcriptase inverse, un ADNc est synthétisé formant une structure nucléotidique double-brin.

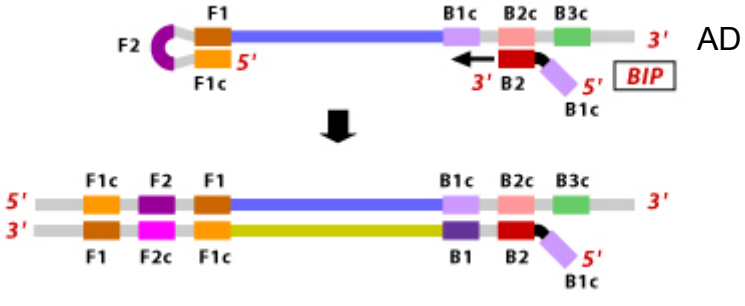


(2) L'amorce F3 s'hybride avec la matrice d'ARN à l'extérieur de l'amorce FIP. Sous l'action de la transcriptase inverse, un nouvel ADNc est synthétisé tout en libérant l'ADNc précédemment synthétisé grâce à FIP. Cet ADNc libéré s'auto-hybride en 5' grâce à ses domaines F1 et F1c complémentaires.

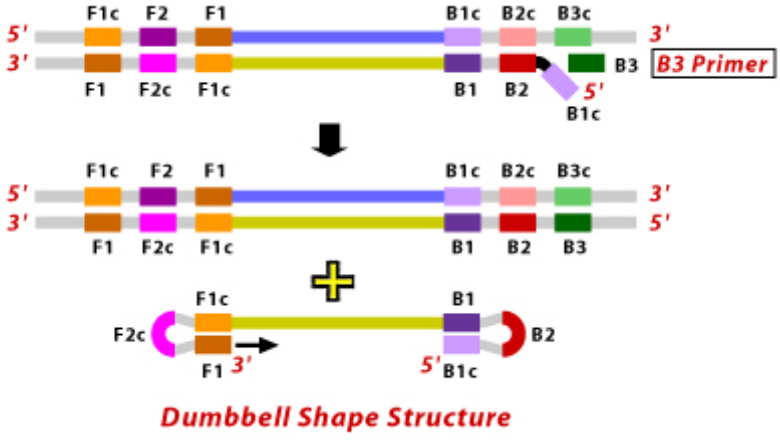


Document 8 : étapes de formation de la structure « en haltère »

(3)

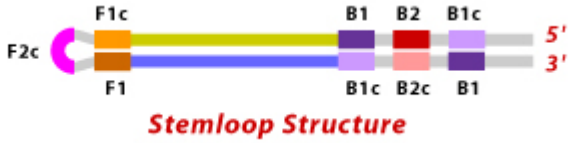


(4)

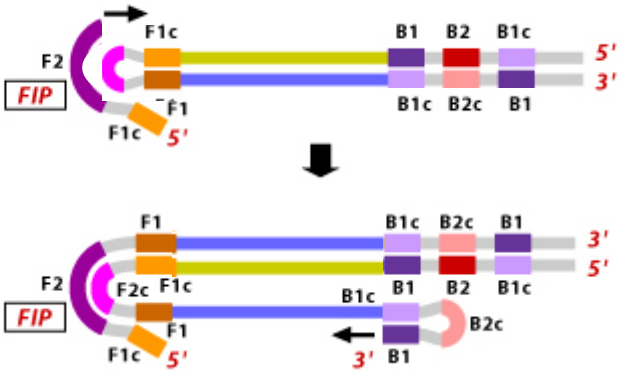


Document 9 : amplification de l'ADN « en haltère » par LAMP

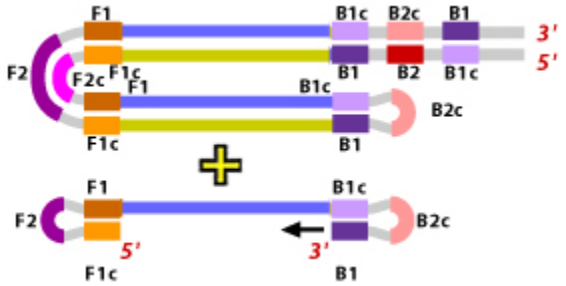
(5) A partir de la structure « en haltère », les nucléotides sont ajoutés à l'extrémité 3' du domaine F1 par l'ADN polymérase à activité de déplacement de brin qui allonge puis ouvre la structure en boucle de l'extrémité 5'. La structure « en haltère » devient alors une structure « tige-boucle » (Stemloop) qui servira de matrice pour la suite de la réaction LAMP.



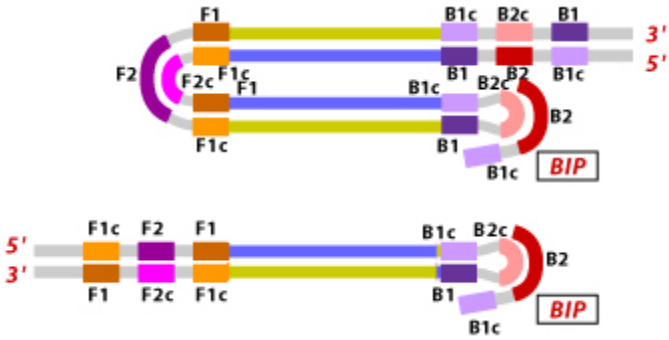
(6) Afin d'initier le cycle LAMP, l'amorce FIP s'hybride au niveau de la boucle de la structure « tige-boucle ». L'initiation de la synthèse du brin débutera à cet endroit. Au fur et à mesure de l'élongation, le brin F1 initialement polymérisé est déplacé et forme une nouvelle boucle à son extrémité 3'.



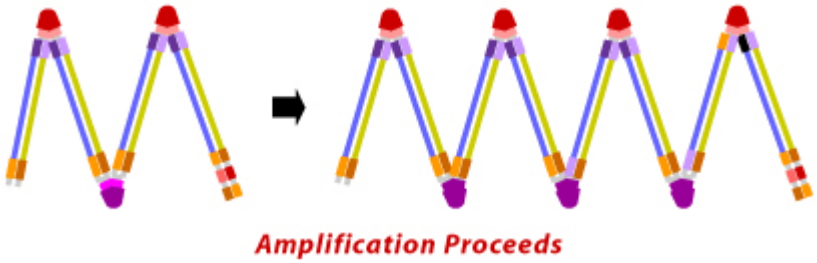
(7) De nouveaux nucléotides sont ajoutés à l'extrémité 3' du domaine B1. L'élongation a lieu tout en déplaçant le brin FIP nouvellement synthétisé qui forme, en se libérant, une structure « en haltère ». Une structure d'ADN double brin comportant une boucle (en B2c) est générée.



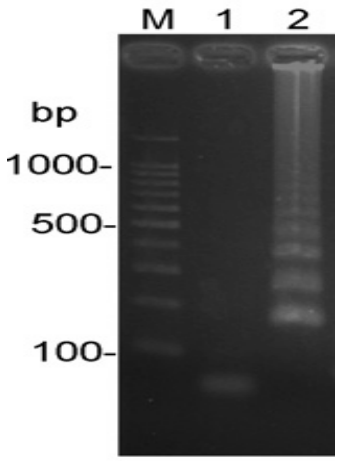
(8) Ces deux produits servent de matrice pour l'amorce BIP dans les cycles d'amplification suivants. Ainsi, une séquence cible LAMP est amplifiée.



(9) Les produits finaux obtenus constituent un mélange d'ADN « tige-boucle » de longueurs variables et de structures dites « en chou-fleur » comportant plusieurs boucles. Ces structures se forment par hybridation entre des répétitions alternativement inversées de la séquence cible au sein du même brin.

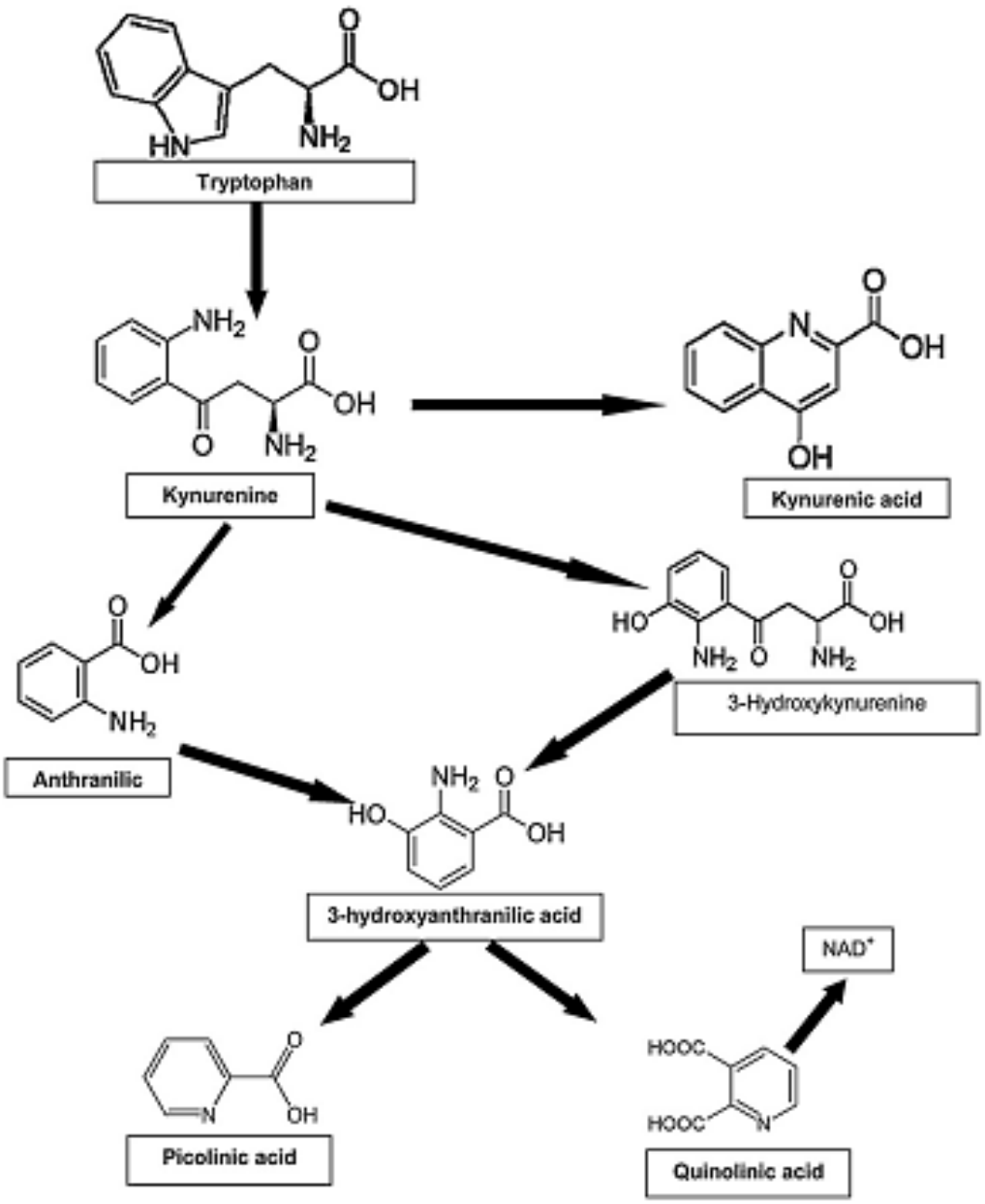


Document 10 : RT-LAMP assay using in vitro transcribed ZEBOV RNA



Electrophoretic analysis of RT-LAMP products on 3% agarose gel. RT-LAMP was carried out at 63◦C for 60 min.
M, 100-bp DNA ladder ,
Lane 1, RT-LAMP with distilled water (negative control) ,
Lane 2, RT-LAMP with in vitro transcribed ZEBOV RNA.

Document 11 : voie métabolique de la kynurénine



Document 12 : réactifs et produits chimiques utilisés en HPLC
tryptophane, kynurénine, acide kynurénique (KYNA), acide anthranilique, acide 3-hydroxyanthranilique (3-OHAA), acide quinolinique (QUIN), acide picolinique (PA), étalon interne (IS) éthyl-4-hydroxy-2-quinolinecarboxylate (éthyl-4-OH-2-quin), charbon de bois activé (DARCO ®) de chez Sigma-Aldrich
eau désionisée, méthanol de qualité HPLC (Burdick and Jackson Laboratory Co) ; acide formique (SAARCHEM) et formate d'ammonium (Agilent Technologies).

Document 13 : préparation des échantillons à injecter sur la colonne

Des fractions aliquotes de 800 µL de plasma de rat prétraité*1, de plasmas calibrants*2 ou de plasmas de contrôle qualité*2 ont été additionnées de 50 µL de solution stock d'étalon interne et homogénéisées pendant 10 s. Des extraits de ces différents mélanges ont alors été préparés par extraction en phase solide à l'aide de cartouches 3cc Waters HLB (Waters, Milford Partie Non. WAT094226) placées sur un collecteur d'élution à vide. Après avoir rincé les cartouches avec du méthanol (2 mL), puis de l'acide formique 1% (2 mL), les échantillons ont été chargés sur les cartouches d'extraction dans 800 µL d'acide formique 1 %. Les cartouches chargées ont ensuite été lavées avec de l'acide formique (2 mL) puis séchées pendant 5-10 minutes sous vide. Les analytes adsorbés ont été élués par une solution de NH4OH 1% en eau-méthanol (2 mL). Les éluats ont été évaporés sous un courant doux d'azote dans un bloc chauffant à 40°C. Les résidus secs ont été reconstitués dans 150 µL de la solution de NH4OH 1% en eau-méthanol, homogénéisés pendant 10 s, transférés dans des tubes d'échantillonnage automatique et 10 µL des fractions aliquotes ont été injectés dans le système LC-MS/MS.

*1 : Préparation du plasma prétraité
Le plasma prétraité a été obtenu par purification sur charbon activé d'un pool de plasmas de rats selon la méthode décrite par X.Xiang, Y.Han, M.Neuvonen, J.Laitila, P.J.Neuvonen, et M.Nieme (J.Chromatogr. B-878 (2010) 51) pour éliminer les métabolites endogènes du tryptophane.
Pour résumer, 5 mL de plasma ont été mis en contact avec 280 mg de charbon de bois activé et le mélange a été agité doucement sur un mélangeur orbital pendant environ 2 h à température ambiante. Après centrifugation à 14 000 g pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant correspondant au plasma purifié a été transféré dans des tubes propres et utilisé immédiatement.

*2 : Les plasmas calibrants et les plasmas de contrôle qualité ont été préparés en additionnant au plasma prétraité des volumes donnés des solutions stocks des différents métabolites étudiés.

Document 14 : caractéristiques du système chromatographique et des phases mobiles

Système chromatographique
Le système HPLC mis en œuvre est un système Agilent 1100 série HPLC avec pompe à gradient binaire, échantillonneur automatique et dégazeur sous vide couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle API 2000 et le logiciel d'acquisition et de traitement des données Analyst1.4 (AB Sciex SA (Pty) Ltd, Johannesburg).
L'analyse a été effectuée avec une colonne Restek C18 (Restek, Bellefonte, PA) 100 × 2,1 mm; 5 µm. La température de la colonne a été maintenue à 25°C. La détection a été réalisée avec le spectromètre de masse triple quadripôle API 2000 équipé d'une source d'Ions Turbo exploitée dans le mode ESI (electrospray ionization = ionisation par électronébulisation) positif et négatif.

Les phases mobiles
L'élution des analytes a été effectuée en gradient de phase mobile réalisé à l'aide des phases A et B, sous un débit de 0,2 mL.min-1.
La phase mobile A : formate d'ammonium dans l'eau (0,05 %, v/v, pH ajusté à 5,5 avec de l'acide acétique).
La phase mobile B : 100 % acétonitrile.
L'élution a débuté avec 5 % de B. Le % de B a été augmenté linéairement jusqu'à 80 % à 5 minutes, maintenu à 80 % jusqu'à 8 minutes puis ramené à 5 % à 8,2 minutes et laissé à ré-équilibrer jusqu'à 12 minutes. Les temps de rétention de l'étalon interne étaient de 8,11 minutes en mode positif et de 6,51 minutes en mode négatif.

Document 15 : method validation

- **Detection and quantification limits**

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were defined as the minimum concentration where the signal was at least 3 times and 10 times greater than the average background noise of an un-spiked blank (only containing IS), at the retention time of each analyte, respectively.

- **Linearity**

Calibrations were performed using five levels of concentration of each standard. Five replicates were used to establish the linear calibration equation ($y = mx + c$) and analyzed using the ratio of analyte peak area over IS peak area after quantitative integration by Analyst 1.4.2 software. Linearity was measured as the coefficient of determination (R2) measured from the 5 calibration replicates. The acceptance criteria for each back-calculated standard concentration were ± 15 % deviation from the nominal value except at LOQ, which was set at ± 20 %.

- **Precision and accuracy**

Each level of the calibration curve was measured daily before sample analysis. Precision was assessed from the relative standard deviation from the mean (RSD) and calculated separately for each concentration level of the calibration curve. Similar to precision, accuracy was calculated using each concentration level of the calibration curve and reported as a percentage of the actual known concentration. Five different calibration curves were analyzed each day and on different days to establish the intra- and inter-day precision and accuracy, respectively. The criteria for acceptability of the data included accuracy within ± 15 % deviation (SD) and the precision determined at each concentration level should not exceed 15 % of the coefficient of variation (CV).

Document 16 : la Chromatographie Liquide à Ultra haute Performance (UPLC)

16a : caractéristiques du système UPLC utilisé pour l'optimisation de la méthode

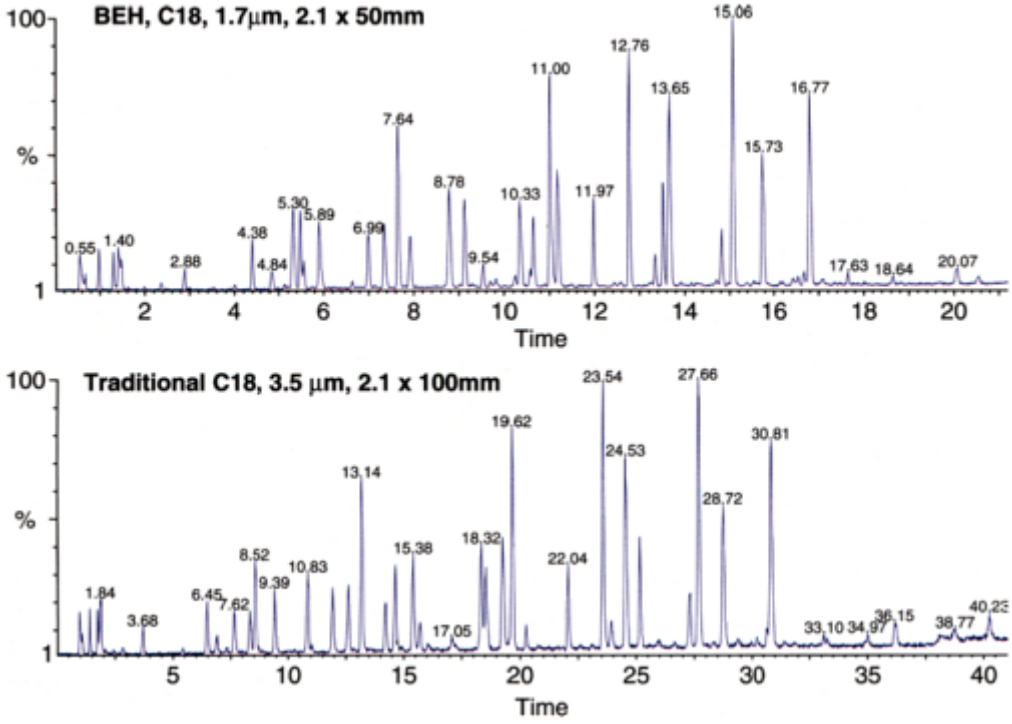
- Colonne : Acquity BEH (Ethylene Bridged Hybrid) C18 ; 2,1 x 30 mm ; 1,7 µm,
- Température : 30°C
- Débit de la phase mobile : 0,8 mL/min.

16b : détermination des paramètres de performance d'un système chromatographique

Calcul du nombre de plateaux théoriques N	**Calcul de la résolution R_S**
A partir des données du chromatogramme $N = 16 \times \left(\frac{t_X}{\omega_b}\right)^2$ ou $N = 5{,}545 \times \left(\frac{t_X}{\omega_h}\right)^2$ t_x = temps de rétention de la molécule X $\omega_{b,x}$ = largeur du pic à la base $\omega_{h,x}$ = largeur du pic à mi hauteur	*A partir des données du chromatogramme* $R_S = \frac{t_2 - t_1}{\left(\frac{\omega_{b1} + \omega_{b2}}{2}\right)}$
A partir des données de la colonne $N = 300 \times \frac{L}{d_P}$ L = longueur de la colonne en mm d_P = diamètre des particules en µm	*A partir de la relation de Purnell* $R_S = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'}{k'+1}\right)$ α = coefficient de sélectivité k' = coefficient de rétention

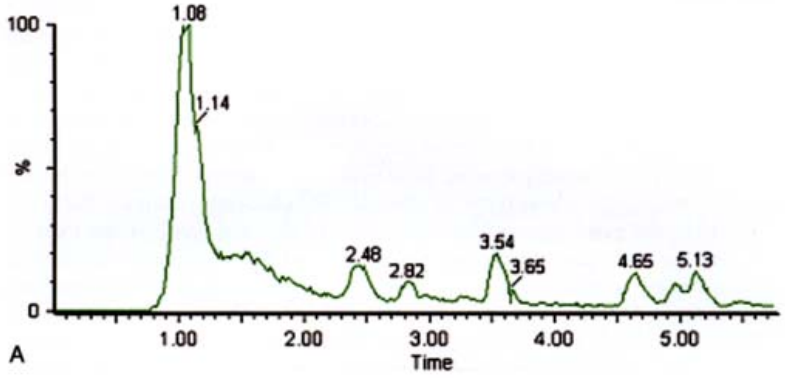
Document 16c : profils chromatographiques comparés en UPLC et HPLC
D'après HPLC Method Development for Pharmaceuticals Satinder Ahuja, Henrik Rasmussen, Academic Press, 21 sept. 2011

Exemple 1 : profils des produits de digestion d'un peptide par une énolase

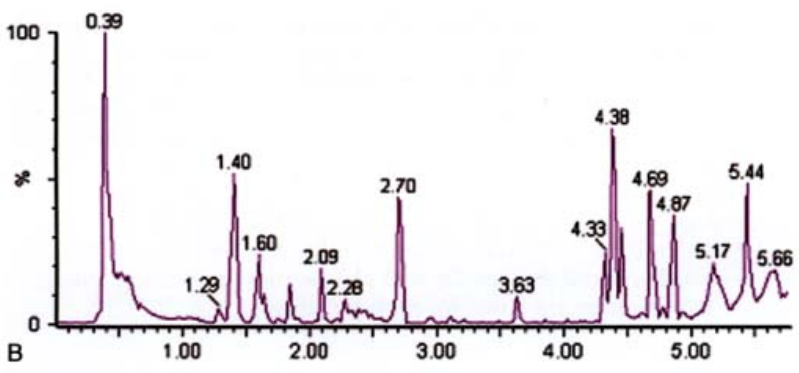


Exemple 2 : Profils du résultat de l'incubation de dextromethorphan en présence de microsomes de foie de rat. A en HPLC, B en UPLC.

A.



B



Annexe

Extraits de programme

Programme de mesure et instrumentation de la classe de 1ère STL

Mesure et instrumentation - classe de 1ère de la série STL

Notions et contenus	Compétences
Mesure et incertitudes de mesure	
Définitions	Utiliser le vocabulaire de base de la métrologie.
Notions d'erreurs.	Identifier les limites du mesurage (étendue de mesure, seuil de détection, seuil de quantification, etc.). Identifier les différentes sources d'erreur lors d'une mesure (mesurage).
Notion d'incertitude.	Évaluer les incertitudes associées à chaque source d'erreur. Comparer le poids des différentes sources d'erreur. Évaluer l'incertitude d'une mesure : - à partir de la documentation du constructeur ; - à l'aide d'une formule d'évaluation (fournie à l'élève) ; - donnée par un instrument analogique. Évaluer la valeur moyenne et l'écart-type expérimental d'une série de mesures effectuées dans des conditions de répétabilité. Évaluer l'incertitude de répétabilité à l'aide d'une formule d'évaluation (fournie à l'élève).
Expression et acceptabilité du résultat.	Exprimer le résultat d'un mesurage par une valeur mesurée et une incertitude de mesure associée à un niveau de confiance.
	Définir les mesurages à conserver en fonction d'un critère donné. Faire des propositions pour améliorer la démarche.
	Vérifier un résultat de mesurage à l'aide d'un étalon. Évaluer l'exactitude de la mesure (fidélité et justesse).

Extrait du référentiel du BTS Analyses Biologie Médicale

Module 5 : Virologie (enseignement théorique et activités technologiques)

Contenus	Commentaires
1.Généralités sur les virus : enseignement théorique	
1.1. Définition	
1.2. Structure	On insistera sur les caractéristiques structurales utilisées dans la classification ou permettant de comprendre le pouvoir pathogène ou le diagnostic viral.
1.3. Taxonomie	On se limitera aux principaux virus humains.
1.4. Multiplication virale	On décrira les différentes étapes de la multiplication et on insistera sur les modalités de la réplication selon qu'il s'agit de : - virus à ARN + ; - virus à ARN – ; - virus à ADN ; - rétrovirus (VIH). Pour chaque type, un seul exemple sera décrit. Les conséquences de la multiplication virale dans la cellule hôte seront précisées : cycle lytique, latence et transformation.

Extraits du référentiel du BTS Biotechnologies

Extrait 1

Section 4 : Bio-informatique utilisateur
Les portails, logiciels et banques de données en bio-informatique et en génomique
- Les portails dédiés (par exemple celui d'Infobiogen) et leurs ressources
- Les principales banques de séquences et leurs caractéristiques ; la structure des fichiers et les formats de séquences nucléiques et protéiques
- Exemples de logiciels d'aide en génie génétique (dessin d'amorces ou de sonde, cartographie de restriction, détermination de paramètres physicochimiques d'une protéine...)

Extrait 2 issu du programme de biochimie analytique

Intitulé du programme	Commentaires	
	Cours	Travaux pratiques
Étalons, matériaux de référence certifiés, matériaux de référence	Définitions	Il s'agit de les mettre en œuvre pour la vérification d'appareils de mesures et lors de dosages
Techniques d'étalonnage des méthodes d'analyse biochimique	Étalonnages linéaires et non linéaires Étalonnage par méthode des ajouts dosés Utilisation d'étalons internes	La méthode des ajouts dosés sera mise en œuvre lors d'un dosage où il y a un effet matrice important Les analyses chromatographiques seront l'occasion d'utiliser des étalons internes
Incertitude des mesures : justesse et fidélité des résultats et des méthodes de mesure	Définitions	Cette partie du programme sera appliquée lors de la mise en œuvre des techniques des sections 3 et 4 de ce module. Les étudiants devront savoir utiliser de façon simple les paramètres de justesse et de fidélité

Commentaire global

Le jury a apprécié les réponses synthétiques et concises, attestant de connaissances solides et d'une lecture attentive des documents du dossier technique.

A l'inverse, un manque de connaissances de la part des candidats s'est traduit par la reprise ou la reformulation du sujet sur la copie, des paraphrases ou traductions simple du document, des réponses peu ciblées donc trop vagues ou développées de façon trop large tant sur le plan scientifique que pédagogique.

Pour les deux tiers des candidats, la partie « multiplication/sérothérapie » représentait la moitié du contenu de la copie, ce qui laissait trop peu de temps pour traiter la deuxième moitié du sujet, en particulier l'étude de la technique chromatographique. Le barème du sujet étant globalement équilibré cette dérive s'est traduite par des notes peu élevées.

Pour guider les futurs candidats dans leur approche de l'épreuve, le jury propose quelques éléments de corrigé ainsi que des commentaires et critiques.

Rapport 1ère partie

Le virus Ebola : multiplication et sérothérapie

P1. Cette première question a très souvent été traitée de façon disproportionnée par rapport à la suite du sujet.
Alors que le jury attendait un corrigé détaillé faisant ressortir les grandes étapes du cycle ainsi que les caractéristiques du virus étudié, ici un virus à ARN –, de nombreux candidats se sont livrés à une description linéaire des différentes étapes numérotées sur le document 1.

C1. Cette question a été bien traitée dans l'ensemble. Néanmoins le jury déplore que certains candidats n'aient pas su faire preuve de concision.

C2. Une analyse synthétique était attendue. Elle pouvait faire ressortir les trois types d'effets des anticorps monoclonaux utilisés, ou les résultats obtenus en fonction de l'origine animale de l'anticorps.
Le jury a pu constater un défaut de lecture du sujet dans un nombre non négligeable de copies : lien entre l'absence d'effet neutralisant des anticorps et l'absence de spécificité de ces derniers pour la protéine GP.

P2. On demandait au candidat de présenter une démarche permettant d'expliquer la sérothérapie. Par conséquent, on attendait la définition du terme « sérothérapie » assortie d'une argumentation sommaire de la démarche pédagogique choisie. Même si certains candidats ont traité la vaccination de façon judicieuse en comparaison de la sérothérapie, il n'était pas indispensable de l'introduire dans la démarche. Le jury attendait une intégration de l'exploitation au-moins partielle du document 2.

C3. Le jury attendait une réponse succincte dans laquelle le candidat devait préciser l'origine de la fluorescence dans le cadre de l'expérience étudiée. Le développement du fonctionnement du cytomètre en flux était inapproprié dans cette partie.

C4. La question distinguait l'analyse des contrôles suivie de celle des résultats.
L'analyse des contrôles a été décevante et très souvent erronée du fait d'une méconnaissance du principe de la technique. L'analyse des résultats a souvent été partielle.
Le jury attendait que le candidat localise les épitopes reconnus par les différents anticorps.
Seuls quelques candidats ont réussi à mettre en évidence la présence d'épitopes linéaires ou conformationnels pour les différents anticorps.

P3. L'évaluation devait faire apparaître, un schéma de principe du cytomètre en flux, ainsi que les caractéristiques permettant de discriminer les cellules.
Les questions sans corrigé ne pouvaient pas être valorisées.

Dépistage du virus Ebola

L'ensemble des documents présentant le test RT-Lamp devait être analysé avant de traiter les questions de connaissance C5, C6, C7, C8, C9 et C10.

C5. La réponse à la question devait apporter une plus-value et non pas se limiter à une simple paraphrase. Dans le contexte du test RT Lamp, seul l'ADN pouvait être amplifié.

C6. Pour répondre à la question, il était nécessaire de s'intéresser à l'ensemble du document et non pas de se restreindre à une description « primaire » des étapes 3 et 4. L'intérêt de ces deux étapes devait clairement ressortir.

C7. Le rôle et l'intérêt de ces amorces était attendu. L'utilisation récurrente de certaines amorces était à souligner. Une description basique des amorces était insuffisante.

P4. Les éléments indispensables à présenter étaient la taille des amorces, le pourcentage GC et donc le Tm. Il fallait les replacer dans un contexte d'enseignement mettant en évidence l'impact de ces paramètres à travers l'utilisation de logiciels dédiés.

C8. La structure en boucle avait pour singularité de présenter une zone monobrin qui permettait l'hybridation d'une amorce sans avoir besoin de dénaturer l'ADN comme dans une PCR.

C9. La réponse reposait sur la fin du document n°9 que la majorité des candidats n'ont pas pris en compte.

C10. L'analyse du résultat d'électrophorèse devait conforter et faciliter la compréhension du mécanisme du test, et au final l'obtention de fragments d'ADN de taille de plus en plus important pour le témoin positif alors qu'à l'inverse seules les amorces étaient visibles sur le témoin négatif.

P5. Deux exemples étaient attendus au minimum. Le jury s'étonne que tous les candidats n'aient pas su traiter une question pourtant fondamentale en biotechnologie.

C11. Le jury attendait qu'apparaissent, dans le tableau, les critères : le principe comparé des techniques mais aussi le coût, la faisabilité et les compétences nécessaires.

Rapport 2ère partie

Développement et validation d'une méthode de dosage du tryptophane et de ses métabolites

P6. Le candidat devait avoir bien cerné tout l'intérêt d'un étalon interne pour pouvoir mettre en place une démarche pédagogique appropriée. On attendait dans un premier temps, la mise en évidence de la non répétabilité des résultats de chromatographie en HPLC ou en CPG, suivie d'une réflexion sur les origines de cette non répétabilité, et sur les moyens d'action pour s'en affranchir par l'introduction de l'étalon interne dont on dégageait alors les critères de choix.
Les calculs associés à l'utilisation interne devaient être développés en faisant apparaître l'intérêt de l'utilisation de l'étalon interne.
La notion d'étalon interne dans un contexte de purification plus général a été cependant également valorisée.

C12. Les candidats se sont essentiellement limités à justifier l'élimination des métabolites du tryptophane et n'ont pas mis en avant le rôle de matrice du plasma prétraité.

C13. Il fallait proposer un schéma du système présenté dans les documents. Dans de nombreuses copies, le schéma mettait en évidence une confusion entre CPG et HPLC. Des schémas trop simplistes ou inappropriés n'ont pas pu être valorisés.
A l'inverse, des schémas clairs et bien renseignés ont particulièrement appréciés.

C14. De nombreux candidats ont rédigé une réponse complète et argumentée.
Suite à une mauvaise lecture du sujet, certains candidats ont développé le principe général de la séparation des molécules par chromatographie.

C15. La traduction des informations présentées dans le document 15 ne répondait pas aux attentes. En revanche il était possible d'en tenir compte pour proposer une définition explicite de chacun des paramètres évoqués. Il est à remarquer que le terme « accuracy », s'il peut être traduit par exactitude ou justesse, dans ce contexte du document 15, correspond sans ambigüité à la notion de justesse. De même les informations concernant la détermination de la « precision » devaient permettre d'identifier la fidélité.

P7. Comme l'indiquait le libellé de la question, une seule notion choisie parmi les cinq précédemment définies, devait être illustrée dans la séance d'activité technologique à proposer.
L'expérimentation choisie devait non seulement être adaptée au paramètre choisi mais aussi au niveau de 1ère STL : limite de détection et spectrophotométrie, fidélité ou justesse par le contrôle de pipette ou n'importe quelle méthode volumétrique simple….
Il était souhaitable d'annoncer clairement la notion choisie avant développer le déroulement de la séance. Des indications assez détaillées sur l'exploitation des résultats avec les élèves étaient attendues.

P8. La majorité des candidats a traité cette dernière question de façon très incomplète, soit par un commentaire superficiel des profils d'élution, soit par des questions sans réponse.
Une appropriation préalable des documents était nécessaire pour concevoir un exercice cohérent et indiquer les principaux éléments de corrigé. La comparaison des deux techniques devait être guidée de façon à exploiter au maximum les documents fournis.

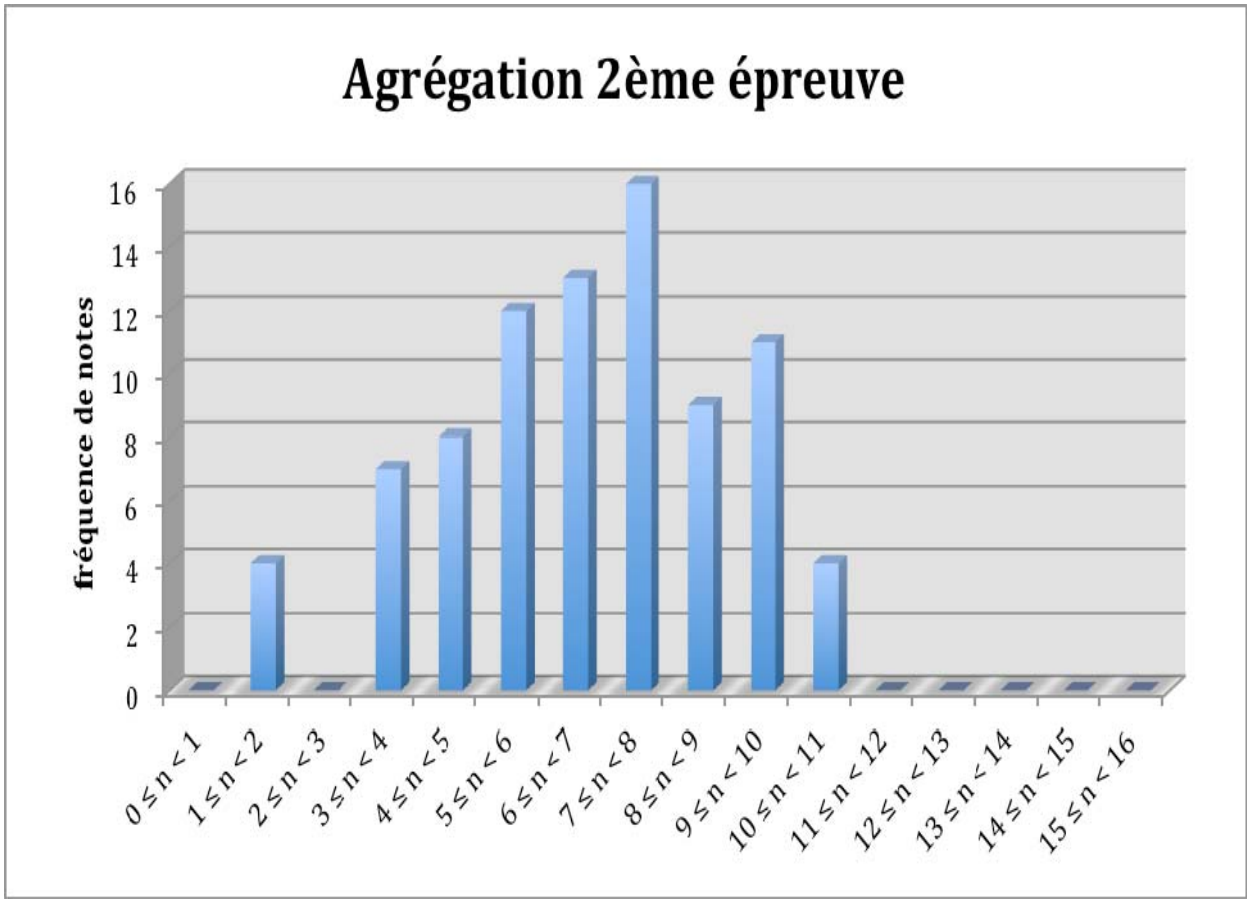
Deuxième épreuve

Durée : 8 heures
Coefficient : 1

Résultats

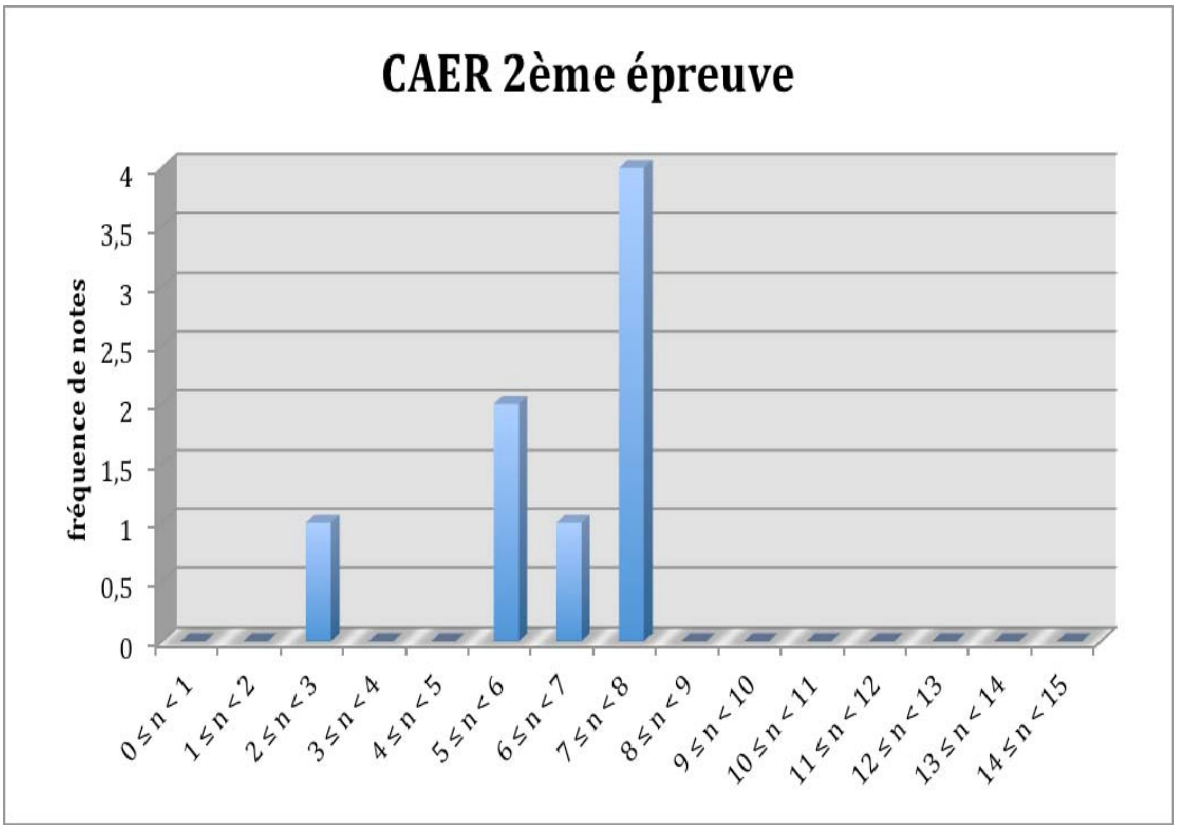
Agrégation interne

intervalle	fréquence	intervalle	fréquence
0 ≤ n < 1	0	8 ≤ n < 9	9
1 ≤ n < 2	4	9 ≤ n < 10	11
2 ≤ n < 3	0	10 ≤ n < 11	4
3 ≤ n < 4	7	11 ≤ n < 12	0
4 ≤ n < 5	8	12 ≤ n < 13	0
5 ≤ n < 6	12	13 ≤ n < 14	0
6 ≤ n < 7	13	14 ≤ n < 15	0
7 ≤ n < 8	16	15 ≤ n < 16	0



CAER
agrégation

0 ≤ n < 1	0	8 ≤ n < 9	0
1 ≤ n < 2	0	9 ≤ n < 10	0
2 ≤ n < 3	1	10 ≤ n < 11	0
3 ≤ n < 4	0	11 ≤ n < 12	0
4 ≤ n < 5	0	12 ≤ n < 13	0
5 ≤ n < 6	2	13 ≤ n < 14	0
6 ≤ n < 7	1	14 ≤ n < 15	0
7 ≤ n < 8	4	15 ≤ n < 16	0



Sujet 2ème épreuve

Première question

Exposer les aspects fondamentaux et appliqués des métabolismes des microorganismes vis-à-vis du dioxygène.

Deuxième question

Les cellules eucaryotes sont constituées de différents compartiments subcellulaires. Après avoir présenté la composition et la structure des membranes biologiques, exposer les avantages et contraintes que ces dernières imposent et exposer les différents mécanismes qui permettent les flux de membranes.

Rapport du jury sur la deuxième épreuve

Rapport établi par mesdames Christine Benayoun, Françoise Guyomarch, messieurs Jean-Pascal Dumon, Jean-Marc Ricort

Résultats de l'épreuve :

92 candidats ont composé :
- 4 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12,
- 20 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10,
- 34 ont obtenu une note supérieure ou égale à 6 et strictement inférieure à 8,
- 34 ont obtenu une note strictement inférieure à 6.

La moyenne générale de l'épreuve est de 6,99. La meilleure note est de 10,96/20.

L'épreuve était composée de deux parties totalement indépendantes et pondérées de manière identiques. A ce titre, une durée équivalente pour chacune pouvait leur être consacrée. Les sujets de synthèse proposés permettaient de couvrir les grands champs disciplinaires de notre spécialité et devaient solliciter de la part des candidats des connaissances dans de nombreux domaines de la biochimie métabolique, la microbiologie, les biotechnologies, la biologie cellulaire et moléculaire de la cellule. Ces domaines fondamentaux illustrent la richesse et la diversité des thématiques abordées dans nos enseignements.

Cette épreuve, de par sa nature, imposait aux candidats une gestion du temps ainsi qu'une mobilisation des connaissances. Le jury a conscience que de traiter deux questions ouvertes en huit heures est un exercice difficile. Le jury souligne cependant que le choix de limiter l'épreuve à deux questions permettaient aux candidats de davantage prendre le temps de cerner chaque question, mobiliser les connaissances appropriées et construire un plan logique et articulé à l'appui de courtes transitions. Malgré ces difficultés, le jury se réjouit de constater que certains candidats ont su se distinguer par une composition de qualité, associant une réflexion pertinente et intégrée des sujets proposés ainsi qu'une mise en exergue de connaissances actualisées.

Le jury regrette pourtant que de trop nombreuses prestations se soient aventurées sur des hors sujets et rappelle que de tels sujets, de par leur ampleur et leur richesse, ne pouvaient supporter des digressions hors sujet. Les candidats qui n'ont pas cerné, dès l'introduction, les attendus des questions posées et qui se sont souvent égarés dans des verbiages et étalages de connaissances déconnectés du contexte, se sont malheureusement lourdement auto-pénalisés.

De manière générale, le jury a véritablement pu apprécier la qualité de rédaction et de présentation de la majorité des copies. La syntaxe et l'orthographe, hormis quelques rares exceptions, sont bien respectées. Néanmoins, le jury déplore de nouveau le niveau de langage bien souvent trop faible et une certaine absence de rigueur scientifique dans les mots employés. A ce titre, il se plait à rappeler que l'utilisation de termes justes favorise la concision et évite bien souvent l'utilisation de périphrases lourdes et incorrectes.

Le jury rappelle qu'un devoir doit contenir une introduction de qualité qui se doit de positionner correctement le sujet et de présenter la construction logique du devoir. De même, une conclusion faisant un rapide bilan des notions essentielles abordées et proposant un (des) élargissement(s) en lien avec la thématique est attendue. Enfin, un plan apparent, détaillé, rigoureux et pertinent articulé de transitions apportant de la fluidité et de la légitimité au récit était également attendu.

1ère question

La première question proposait d'exposer les aspects fondamentaux et appliqués des métabolismes des microorganismes vis-à-vis du dioxygène.

De façon générale, le jury tient à rappeler l'importance à délimiter avec précision les sujets écrits de synthèse. Le candidat doit ainsi passer du temps à cerner le sujet avec précision, à s'interroger sur les formulations employées afin de ne pas oublier des points de développement importants et d'éviter le hors-sujet. Ceci lui permettra également de proposer un plan qui ait une vision intégrée de la problématique posée et qui ne limite pas à une présentation basique et juxtaposée de connaissances. En ce sens, le jury rappelle l'importance des liens et transitions entre les différentes parties du devoir et de ne pas limiter, lorsque le sujet s'y prête, son propos à une seule discipline. Ainsi, une approche uniquement biochimique de ce sujet réduisait considérablement les champs de développement et pénalisait fortement les candidats. Le jury souligne l'importance de rédiger un devoir à l'aide de formulations scientifiques rigoureuses et non farfelues. Par exemple, beaucoup de candidats confondent maladroitement les notions de cofacteur et de coenzyme et le jury a pu apprécier à sa juste

valeur une approche thérapeutique du tétanos ou de la gangrène gazeuse consistant en une ouverture de la plaie en vue de son oxygénation ou de son traitement par ajout d'eau oxygénée…
En ce qui concerne la forme, le jury a apprécié la qualité des copies des candidats à ce niveau de concours. Les schémas sont très souvent soignés et les plans apparents et structurés. Il serait néanmoins souhaitable d'éviter les proses parfois très (trop) poétiques et la vulgarisation scientifique très présente dans certaines copies pour revenir à un exposé scientifique plus synthétique, plus rigoureux et plus précis.

De par sa formulation, le sujet demandait à ce que soit redéfinie en introduction la notion de microorganismes. Bien trop peu de candidats ont répondu à cette exigence qui a eu pour conséquence de générer oublis et erreurs.
Une organisation didactique et originale de construction du devoir pouvait reposer sur une présentation chronologique de l'apparition des microorganismes en rappelant qu'il y a 3,5 milliards d'années l'atmosphère était dépourvue de dioxygène mais contenait du dioxyde de carbone et du méthane utilisés par les archaebactéries. Par la suite, les Cyanobactéries se sont développées et ont réalisé la photosynthèse oxygénique. Puis, l'accumulation de dioxygène dans l'atmosphère a conduit à une révolution écologique. Le problème ainsi posé devait conduire le candidat à définir les types respiratoires bactériens et à discuter les avantages et dangers du dioxygène. A ce titre, une telle organisation devait éviter au candidat de formuler des idées simplistes et erronées selon lesquelles les microorganismes se cachent au fond des océans pour échapper au dioxygène.
Malheureusement, le jury regrette que très peu de candidats aient abordé le sujet selon ce modèle ce qui les a presque inévitablement conduits à des oublis ou à des développements sans lien avec la thématique posée. A ce titre, le jury a trop souvent eu l'impression au cours de cette épreuve que les candidats voulaient à tout prix énoncer certaines de leurs connaissances même si celles-ci étaient sans lien direct avec le sujet.

De façon plus spécifique, le sujet demandait donc que soit développé le rôle essentiel des Cyanobactéries et des protistes photosynthétiques oxygéniques dans la production d'O_2, puis que soit envisagé la dégradation oxydative des substrats énergétiques et la respiration aérobie. Le jury regrette que bien trop peu de candidats aient abordé la photosynthèse oxygénique et que, parmi ceux qui l'ont évoquée, les connaissances sur ce point soient bien trop souvent confuses ou erronées.
Si, dans ce sujet centré sur le dioxygène, les fermentations pouvaient être citées comme une alternative, elles ne devaient néanmoins pas faire l'objet de développements détaillés inutiles. D'autre part, il suffisait de repositionner les grandes voies métaboliques (glycolyse, β-oxydation des acides gras, catabolisme des acides aminés, cycle de Krebs…) sans rentrer dans des détails inutiles.

Malgré le fait que ce point soit régulièrement évoqué sous différentes formes dans l'actualité, le jury s'étonne que très peu de candidats aient développé les effets potentiellement néfastes du dioxygène avec l'apparition des radicaux libres, du peroxyde d'hydrogène et la notion de stress oxydatif. Dans ce contexte, il était attendu que le candidat envisage alors les moyens employés par les microorganismes pour se protéger de ces effets (SOD, peroxydase, catalase).
Les aspects appliqués des métabolismes vis-à-vis du dioxygène devaient permettre au candidat de se pencher sur des techniques d'identification bactérienne classiques : milieu VF et type respiratoire, milieu Hugh et Leifson et voie d'attaque du glucose, tests oxydase et catalase. Le jury se réjouit de constater que ces techniques ont été correctement exposées par certains candidats.
La place industrielle du dioxygène permettait d'envisager l'épuration, le lagunage dans le cadre du traitement des eaux usées, mais aussi certains aspects des fermentations industrielles liés aux systèmes d'aération, d'agitation, de stress oxydatif. Le jury attendait aussi une présentation du KLa.

2ème question

La seconde question de l'épreuve faisait appel à des connaissances de biochimie et de biologie cellulaire. Bien que la construction du devoir fût largement suggérée dans l'intitulé du sujet, permettant ainsi aux candidats de se concentrer sur la mobilisation de leurs connaissances, il n'en demeurait pas moins qu'une lecture attentive en était attendue. A ce titre, le jury regrette que beaucoup trop de candidats aient interprété les « flux de membranes » comme étant « les flux transmembranaires » et se soient donc perdus dans des considérations, certes souvent très pertinentes et correctes, mais malheureusement totalement hors-sujet.
Remarques générales : le jury félicite une grande majorité des candidats quant à la qualité de rédaction et à l'effort de présentation des copies tant du point de vue de la mise en évidence d'un plan hiérarchisé et apparent que de la justesse de l'orthographe et la conception d'illustrations de qualité. A ce titre, il est rappelé qu'un schéma est souvent un outil de choix pour éviter un long verbiage inutile mais qu'il ne peut en aucun cas se substituer en totalité à du texte. Il se doit donc de comporter un titre ainsi qu'une légende rigoureuse et explicite qui permette d'en comprendre les symboles et les représentations

figurées. Le jury s'étonne néanmoins d'avoir vu apparaitre sur certaines copies des schémas très fantaisistes à vocation certainement humoristique mais qui, bien que sympathiques, présentaient un caractère quelque peu décalé par rapport à la rigueur scientifique exigée par l'épreuve.
D'autre part, le jury rappelle que l'exercice de la seconde épreuve impose, certes, une restitution de connaissances mais qu'il est également attendu que celles-ci soient replacées dans un contexte conceptualisé. Ainsi, le jury a regretté que la majorité des candidats n'ait pas fait preuve de suffisamment de recul par rapport à la question posée et que les connaissances soient livrées, « en vrac », sans lien et vision de synthèse associés. Ainsi, le jury invite les candidats à se poser les « bonnes » questions lors de la mise en place de leurs idées. Ce travail de réflexion préliminaire, loin de faire perdre du temps, est déterminant pour une approche pertinente et synthétique de la problématique. Ainsi, choisir plusieurs exemples qui illustrent la même idée ou le même concept n'apporte pas grand-chose en termes de valorisation de la copie.

La première partie du sujet devait donc présenter la composition et la structure des membranes biologiques. Comme clairement stipulé dans l'énoncé, il ne s'agissait pas de se limiter à la composition de la membrane plasmique (ce qui fut bien trop souvent le cas) mais, bien au contraire, de montrer non seulement les éléments communs des différentes membranes biologiques mais également les éléments qui font la spécificité de certaines d'entre elles. De même, bien trop peu de candidats ont abordé la notion de microdomaines, de fluidité membranaire et de variation de la composition membranaire dans le temps et dans l'espace, notions pourtant fondamentales dans la compréhension de nombreuses fonctions biologiques. Le jury a été très étonné du manque de connaissances des candidats dans la biochimie des constituants membranaires et souligne l'importance de la maiîrise de celles-ci. Ainsi, bien trop souvent, l'acide phosphatidique a été représenté en lieu et place d'un phospholipide membranaire. D'autre part, de nombreux schémas montrent une confusion certaine dans les relations qui existent entre le compartiment nucléaire et le réticulum et la simplification extrême de quelques-uns suggèrent l'existence d'une simple membrane nucléaire ou mitochondriale…
Dans la seconde partie, le jury attendait que soient présentés de façon constructive et cohérente les avantages et contraintes que peuvent apporter l'existence de nombreux compartiments membranaires au sein des cellules eucaryotes. Sans faire pour autant de finalisme, des notions simples, presque évidentes, pouvaient être formulées et le jury regrette l'absence de questionnement et de réflexion dans de nombreuses copies. Au-delà de la notion de compartimentation et de spécificité des réactions biochimiques survenant dans chaque compartiment, le jury attendait que soit évoqué, entres autres, les concepts de protection (matériel génétique, enzymes hydrolytiques...), de contrôle et de régulation de la perméabilité membranaire, de création de gradients électrochimiques et de concentration de substrats. L'évocation des différentes contraintes liées à cette organisation particulière permettait de faire un lien assez naturel avec la troisième partie du sujet par la nécessité de réaliser, via des mouvements vésiculaires, des échanges entre ces différents compartiments afin de maintenir l'homéostasie cellulaire.
La troisième partie du sujet pouvait donc alors aborder les mécanismes moléculaires mis en jeu lors des flux de membranes au sein des cellules eucaryotes. Le jury a fortement regretté l'absence de connaissances de la grande majorité des candidats dans ce domaine. Bien au-delà d'une description simpliste des processus d'endocytose et/ou d'exocytose, le jury souhaitait que soient explicités l'ensemble des processus mis en jeu lors de la formation, du déplacement et de la fusion d'une vésicule. Ainsi, il était attendu que soient présentés les processus de bourgeonnement d'une vésicule (formation d'un manteau, protéines mises en jeu, mécanismes de régulation, contraintes associées à la structure membranaire…), de déplacement d'une vésicule (cytosquelette, spécificité et signaux d'adressage…) et de fusion d'une vésicule (protéines d'ancrage, contraintes physico-chimiques associées…) ainsi que les systèmes de contrôle, de régulation et de correction d'adressage (transport rétrograde, transporteur KDEL…).

EPREUVES D'ADMISSION

Première épreuve

Rapport de la première épreuve

Rapport établi par messieurs Frédéric Ducancel, Jean-Pascal Dumon, Jean-Marc Ricort

Résultats de l'épreuve

Résultats de l'épreuve

20 candidats, agrégation et CAER confondus candidats ont composé :

- 2 ont obtenu une note supérieure ou égale à 16 ;
- 2 ont obtenu une note supérieure ou égale à 14 et strictement inférieure à 16
- 7 ont obtenu une note supérieure ou égale à 12 et strictement inférieure à 14,
- 4 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12
- 3 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10
- 2 ont obtenu une note strictement inférieure à 8
- ,

La moyenne générale de l'épreuve est de 12,22. La meilleure note est de 17/20.

Le jury tient très sincèrement à féliciter l'ensemble des candidats qui, pour leur très grande majorité, ont totalement respecté l'esprit de l'épreuve, que ce soit dans le cadre de la démarche de projet ou dans celui de la présentation et de l'entretien avec le jury.

Comme indiqué en préambule de ce rapport, le dossier pouvait légitimement comporter deux parties :

- Une étude scientifique et technologique que le candidat aurait pris soin de replacer dans son contexte, notamment en la positionnant en relation avec la problématique à l'origine du projet. Il aurait pu s'agir d'une étude fondamentale s'appuyant sur des données scientifiques actualisées et dont les prolongements technologiques, économiques, sociétaux auraient été abordés ;

- Une mise en application pour un niveau de classe donné, un référentiel, une progression choisie et justifiée. La problématique du transfert des activités technologiques et techniques décrites devait être abordée afin de prendre en compte les contraintes propres à un environnement enseignant (matériels disponibles, horaires, groupe classe, coût, sécurité,…). Elle pouvait décliner les modalités de mise en œuvre (opérationnalisation) en lien avec les objectifs de formations ambitionnés, les activités effectuées par les étudiants, les documents support de ces activités, les évaluations. Des aspects interdisciplinaires pouvaient également nourrir l'analyse des choix pédagogiques et opérationnels adoptés.

Remarques sur les dossiers

Le jury remarque une évolution très positive dans la qualité d'élaboration des dossiers tant dans leur présentation (figures, orthographe, syntaxe) que dans leurs contenus. En effet, ceux-ci comportaient dans leur ensemble une partie scientifique approfondie, construite à partir de données récentes de la littérature ainsi qu'une transposition pédagogique cohérente et circonstanciée en lien avec la première partie. Bien que le caractère novateur de l'application pédagogique ne soit absolument pas un prérequis indispensable, le jury a néanmoins été particulièrement sensible aux propositions réalistes et rigoureuses permettant l'introduction de nouvelles approches technologiques auprès des élèves/étudiants.

En ce sens, le jury précise que la transposition pédagogique doit présenter une mise en application ordonnée et hiérarchisée mettant clairement en évidence le déroulement de la (les) séquence(s) pédagogiques, les connaissances fondamentales et pratiques apportées ainsi que les notions de sécurité et de coût de réalisation.

Certains dossiers étaient par contre beaucoup trop longs. Le candidat doit être capable de concision, d'un esprit de synthèse et faire des choix tant dans la structuration que dans les contenus présentés. Ces dossiers comportaient le plus souvent des « copier-coller » de documentions prélevés sur internet et dont le jury a regretté l'absence, parfois, de sources référencées. Comme le précise la maquette du concours, *« L'épreuve consiste en la présentation et la soutenance par le candidat d'un* ***dossier original*** *relatif à un projet* ... ». Le jury rappelle donc que le dossier doit être construit et rédigé par le candidat et que toutes sources utilisées doivent être clairement citées et référencées. Ainsi, l'utilisation à l'identique, tout ou partie, d'un texte (ou copier-coller) ne répond pas aux exigences de l'épreuve et ne peut être admise dans le cadre de cet exercice.

Certes malgré une nette amélioration par rapport à la session précédente, le jury a encore regretté les rapports comportant de nombreuses fautes d'orthographe, de syntaxe, voire des approximations et/ou contrevérités scientifiques.

Remarques sur la forme des présentations orales:

Le jury a, de nouveau, particulièrement apprécié les présentations structurées à l'aide de diaporamas de très bonne qualité, illustrés et didactiques dont certains étaient opportunément complétés d'animations vidéo ou de photographies prises en entreprise ou en laboratoire. Il rappelle, d'une part, qu'il convient d'effectuer un choix pertinent parmi les notions présentées dans le dossier afin de ne pas surcharger dans le temps imparti l'exposé oral et, d'autre part, qu'une construction « allégée » en texte des diapositives possède bien souvent une valeur pédagogique ajoutée. A ce titre, le jury tient à féliciter la plupart des candidats pour les qualités didactiques de leurs présentations et a positivement apprécié celles réalisées sans support papier. En effet, ce dernier, bien que reconnu comme une « roue de secours » pour le candidat, génère bien trop souvent un propos peu fluide et décousu qui ne joue pas, *in fine*, en faveur du candidat-lecteur.
Comme lors de la précédente session, le jury tient donc à souligner l'importance qui doit être accordé au support de la présentation. En effet, de mauvais choix de documents, des images de piètre qualité, des constructions peu didactiques peuvent parfois irrémédiablement assombrir une prestation pour autant honorable.

L'ancrage du projet sur un secteur professionnel (recherche, R&D, bio-analyse et contrôle…) et sa contextualisation concrète apportent sans conteste de la consistance et du sens au projet et à la présentation. A ce titre, le développement de la séquence pédagogique en lien avec le contexte « régional », lorsqu'il était possible, a été apprécié.

Le jury tient à souligner la posture communicante de qualité de la plupart des candidats : voix audible mais pausée ; volonté de transmettre un message avec conviction ; vitesse d'élocution confortable. En effet, le jury rappelle que l'agrégation est certes un concours exigeant qui requiert une polyvalence et une mise à jour des savoirs mais qu'il est également un concours de recrutement d'enseignants dont les compétences en communication sont évidemment essentielles, tout comme l'est l'attitude générale devant un auditoire. Le jury se plait à féliciter la majorité des candidats qui se sont prêtés avec enthousiasme et dans un état d'esprit positif au jeu des questions-réponses voulu comme un exercice de réflexion constructive.

A de très rares exceptions près, les candidats ont scrupuleusement respecté la durée d'exposé de 30 minutes. En tout état de cause, dans un souci d'équité et en cas d'un possible dépassement du temps imparti, il était aimablement indiqué aux candidats l'impératif de conclure dans les plus brefs délais.

Remarques sur le fond

Le jury a particulièrement apprécié certains sujets ancrés sur une thématique intéressante, contextualisée et présentant des aspects technologiques novateurs en adéquation avec l'évolution actuelles des techniques. Il souligne de nouveau l'importance portée sur le fait que le candidat, porteur et acteur de son sujet, est censé l'avoir étudié en profondeur afin d'en dominer l'intégralité des aspects scientifiques et technologiques. Il est notamment attendu qu'il soit capable d'expliquer et justifier les méthodologies présentées, d'expliquer les techniques et les principes scientifiques associés, mais également d'assurer l'analyse approfondie des résultats présentés.

Le « projet original » est d'abord personnel et destiné à répondre à une problématique clairement identifiée. Ainsi, il ne convient pas de l'assimiler à l'exigence professionnelle commune à tous les enseignants : répondre aux attentes de l'institution en lien avec les responsabilités confiées. Il s'agit au contraire d'une démarche volontariste et originale, qui se doit de dépasser l'exécution d'un programme pour lui donner du sens, de l'épaisseur et de la hauteur. Certains candidats ont construit leur dossier à partir d'activités technologiques déjà mises en œuvre avec leurs élèves. L'étude scientifique s'en trouve alors artificielle, en général essentiellement livresque et manquant sensiblement de pertinence et de réalisme professionnel.
Certains dossiers prenant appui sur des activités liées à un stage de formation en laboratoire ou sur la préparation d'une thèse ont été d'un niveau scientifique très satisfaisant. Il convient cependant de ne pas oublier le fond de l'épreuve qui s'inscrit dans la mise en œuvre d'un projet pédagogique, le support scientifique étant au service du projet et non l'inverse. Il est crucial de veiller à respecter un équilibre *ad hoc* entre le contexte scientifique et technologique présenté et leur contextualisation pédagogique pertinente. Ainsi certaines études technologiques et techniques, impossibles à mettre en œuvre dans le contexte d'un établissement scolaire, ont donné lieu à des applications pédagogiques pour le moins peu opportunes.

Il est attendu d'un professeur agrégé qu'il soit capable de faire évoluer les pratiques au sein de son établissement. Cela implique la mise en œuvre de stratégies pédagogiques novatrices, pragmatiques et réalistes qui donnent sens aux apprentissages. Ces activités doivent être construites, certes en appui sur une réalité professionnelle, mais également économique pour l'établissement et transposables à un groupe d'élèves en lien avec des objectifs de formation et la réglementation en vigueur.
Bien que peu nombreuses, il était dommage que certaines présentations se soient révélées par trop descriptives et incapables de s'affranchir d'un effet catalogue déclinant une succession de séances associées aux processus d'évaluation. Le jury a néanmoins apprécié certaines présentations synthétiques et concises s'appuyant de façon pertinente sur un organigramme mettant en relief les objectifs, méthodologies, stratégies pédagogiques et démarches d'évaluation d'une séquence préalablement positionnée au sein d'une progression. Cette présentation synoptique laisse ensuite toute légitimité à une approche détaillée de l'opérationnalisation choisie. Le jury a également été sensible à la prise en compte des contributions des autres disciplines, dans une approche pédagogique moderne et interdisciplinaire.

Au cours de l'entretien, le jury a particulièrement apprécié le comportement remarquable des candidats, faisant preuve de motivation mais aussi d'une probité intellectuelle très appréciée.
Les réponses données aux questions posées ont permis, dans la très grande majorité des cas, d'éclairer le jury sur certains points du projet, notamment sur son déterminisme et les solutions techniques adoptées, mais aussi d'expliciter, de préciser certaines données scientifiques abordées ou décrites dans le dossier. Elles ont également favorisé l'appropriation des démarches pédagogiques choisies ou conçues. En effet, par ce questionnement large, le jury souhaite également apprécier la maîtrise didactique de la discipline ou la position du candidat sur des éléments non mentionnés dans le dossier mais directement associés à la problématique.

Bien évidemment, au cours de cette épreuve, les qualités d'expression et de communication, le sens de l'écoute positive, l'adéquation des réponses aux questions sont aussi des paramètres pris en compte dans la notation.

Deuxième épreuve

Sujet :

AGREGATION DE BIOCHIMIE – GENIE BIOLOGIQUE
Concours interne
Session 2015

EPREUVES D'ADMISSION
DEUXIEME EPREUVE

Durée : 8 heures
Coefficient : 1

Cette épreuve consiste à exploiter des documents techniques et pédagogiques relatifs à une séquence de « travaux pratiques » ou à une séquence à caractère expérimental, élément d'un processus d'apprentissage.

Elle permet d'évaluer les capacités du candidat à :
- proposer et justifier les principes, méthodes et modes opératoires à mettre en œuvre et à dégager les concepts auxquels ils se rattachent ;
- réaliser, pour tout ou partie, selon la durée impartie, l'activité prévue.

Le programme du concours est défini par référence aux programmes des BTS et DUT de la spécialité**.**

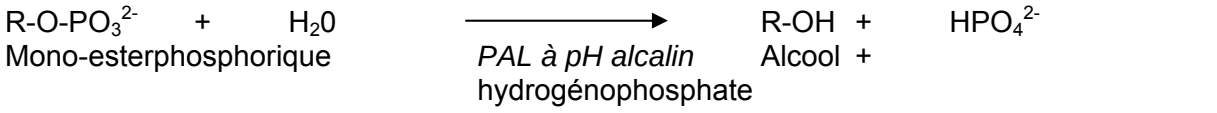
Le sujet comporte deux parties indépendantes :

1. **Purification de la phosphatase alcaline hépatique**
2. **Optimisation de la production d'un facteur de croissance leucocytaire à partir d'une souche *d'Escherichia coli* DE3 recombinante**

Une attention particulière sera accordée à la traçabilité et à la présentation de tous les résultats expérimentaux.

Purification de la phosphatase alcaline hépatique.

Dans le cadre d'une séquence d'activités technologiques dédiée à l'activité enzymatique, une première séance a pour objectif de purifier la phosphatase alcaline (PAL) hépatique dont la localisation est membranaire.
La phosphatase alcaline (E.C.3.1.3.1) est une enzyme à structure dimérique et de masse molaire égale à 170 000 $g.mol^{-1}$.
Son pH optimum est de 10. La réaction globale d'hydrolyse catalysée est la suivante :



L'extraction-purification se fait en deux étapes :

- extraction des protéines membranaires du foie par solubilisation au butanol des lipides membranaires ;
- précipitations fractionnées des protéines, basées sur leur solubilité différentielle en fonction des caractéristiques physicochimiques du milieu, suivies d'un dessalage.

Extraction et première étape de purification

L'extraction des protéines membranaires du foie **a déjà été réalisée** selon le protocole présenté dans le **document 1**.
Le **filtrat E_B** est fourni dans la glace (volume environ égal à 30 mL).
Toutes les manipulations doivent ensuite être réalisées dans la glace.

Deuxième étape de purification

Cette deuxième étape est menée en trois temps :

- une précipitation à l'acétone froide
- une précipitation à l'acétate de magnésium
- un dessalage par chromatographie d'exclusion diffusion.

Précipitations fractionnées

Après précipitation à l'acétone froide, quatre concentrations en acétate de magnésium sont testées afin de sélectionner les conditions opératoires optimales.
Mettre en œuvre le protocole présenté dans le **document 2.**

Choix des conditions opératoires optimales

Sur chaque surnageant obtenu à l'issue de l'étape précédente, tester l'importance de l'activité PAL par un spot test dont le mode opératoire est présenté dans le **document 3**.
Argumenter dans le compte rendu le choix du surnageant contenant la PAL potentiellement la mieux purifiée. Ce surnageant constitue la **fraction E_P** (considérer que le volume de E_p correspond au volume d'acétate de magnésium ajouté).

Dessalage par chromatographie d'exclusion diffusion

Dessaler 500 µL de la fraction E_P en suivant le mode opératoire du **document 4**.

ATTENTION : cette manipulation doit être terminée au plus tard à 15 h.

Recherche des fractions contenant la PAL.

- Réaliser un spot test sur chacune des dix fractions obtenues (protocole **document 3**). Laisser la réaction se développer 10 minutes et ***montrer le résultat obtenu à un examinateur.***
- Réunir les fractions positives après 10 minutes de développement de la réaction. La préparation ainsi obtenue est appelée $\mathbf{E_D}$; évaluer son volume.

Détermination des paramètres du suivi de la purification

Détermination de b, concentration d'activité catalytique de la PAL, par méthode cinétique en continu

Effectuer cette détermination pour E_B, E_P, E_D, à l'aide du protocole du **document 5**.

Donnée :
Coefficient d'absorption molaire du pNP à 405 nm et pH 9,8 : ε = 1800 $m^2.mol^{-1}$.

Dosage des protéines

- Evaluation préalable par la méthode de Christian Warburg

Effectuer cette estimation pour E_B, E_P, E_D, en utilisant la fiche technique du **document 6**.

- Dosage par la méthode de Bradford

En utilisant les résultats de l'évaluation précédente et la fiche technique du **document 7**, effectuer cette détermination pour E_B, E_P, E_D.
Présenter le protocole complet de réalisation du dosage avec toutes les justifications nécessaires.

Exploitation des résultats

Présenter un tableau complet de suivi de purification.

Optimisation de la production d'un facteur de croissance leucocytaire à partir d'une souche *d'Escherichia coli* DE3 recombinante.

Un laboratoire a produit une souche d'*E.coli* recombinante DE3 capable de synthétiser et d'excréter dans le milieu de culture un facteur de croissance leucocytaire « CL ».
La souche hôte possède le gène phagique de la T7 ARN polymérase sous contrôle du promoteur- opérateur lactose. Le gène de la protéine « CL » est cloné en aval du promoteur T7.
Les résultats obtenus en milieu LB, habituellement utilisé dans les tests de production en Erlenmeyer, correspondent à une concentration de 3 à 4 $g.L^{-1}$ de « CL » dans le surnageant de culture.
Avant de passer au stade de la production industrielle en fermenteur, ce laboratoire veut étudier l'impact du changement du milieu de culture. En effet, le milieu LBM sera utilisé en fermenteur.
La composition des milieux LB et LBM est fournie dans le **document 8**.

Production et dosage de la protéine « CL »

La production de la protéine « CL » est optimale en phase exponentielle de croissance. La souche *E.coli* recombinante DE3 est cultivée en milieu LBM à 37°C sous agitation pendant 2 h.
Le surnageant de culture est récupéré en vue du dosage de la protéine « CL » par méthode ELISA.

Production de la protéine « CL » par croissance d'E. coli

Une préculture de la souche *E.coli* recombinante DE3 est utilisée pour ensemencer une fiole d'Erlenmeyer de milieu LBM à une DO_{600nm} initiale de 0,2. La culture est réalisée dans un bain thermostaté agité à 37 °C pendant 2 heures. Le surnageant de la culture obtenue est récupéré par centrifugation.

Mettre en œuvre le mode opératoire présenté dans le **document 9.**

a) Présenter les mesures réalisées.

b) Déterminer les volumes de préculture et d'IPTG à introduire dans l'Erlenmeyer de culture.

c) Préciser l'intérêt d'ajouter l'IPTG au cours de la croissance.

Dosage de la protéine « CL » par technique ELISA

La protéine « CL » est dosée à partir du surnageant de culture préalablement dilué dans un diluant-neutralisant. En effet, la présence des différents constituants du milieu LBM peut masquer les sites antigéniques de la protéine « CL » et inhiber sa reconnaissance par un anticorps spécifique.

Mettre en œuvre le protocole du **document 10**.

a) A partir du mode opératoire, dégager le principe de la technique ELISA utilisée et schématiser chacune des étapes en mettant en parallèle le cas où la protéine « CL » est présente dans

l'échantillon et le cas où elle en est absente. Comparer l'absorbance attendue dans les deux cas.

b) Présenter le tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage en précisant les concentrations de la protéine « CL ».

c) Expliquer la réalisation de la dilution du surnageant de culture effectuée.

d) Indiquer l'intérêt des cupules A1 et B1.

e) Après avoir rappelé l'expression littérale donnant le pourcentage d'inhibition I, effectuer le calcul pour chaque cupule.

f) Représenter graphiquement $I = f(\log(C_{\text{protéine CL}} \text{ en } mg.L^{-1}))$.

g) Expliquer l'allure de la courbe d'étalonnage.

h) Déterminer la concentration de la solution de contrôle « CL » et commenter la valeur obtenue.

i) Déterminer la concentration de la protéine « CL » dans le surnageant de culture en $g.L^{-1}$.

j) Conclure.

Purification de la souche d'E.coli et identification du contaminant

Un laboratoire partenaire a fourni une autre souche recombinante d'*E.coli* produisant et sécrétant la protéine « CL » en quantité plus importante. Cette souche s'avère être contaminée.
L'objectif est double :

- récupérer la souche d'intérêt
- identifier le contaminant pour comprendre l'origine de la contamination.

a) Réaliser les différentes étapes du protocole proposé dans le **document 11**.

b) Décrire l'observation microscopique de la coloration de Gram de la préculture d'*E.coli* contaminée « E.coli 2 » et la commenter.

c) Analyser les résultats de l'isolement de la préculture d'*E.coli* contaminée sur GTS « E.coli 2 ».

d) Présenter l'ensemble des examens réalisés pour orienter l'identification de la souche contaminante.

e) Préparer un bon de commande de milieux ou de tests rapides permettant d'identifier la souche contaminante.

ATTENTION : bon de commande à rendre au plus tard à 16 h.

f) Réaliser l'identification de la souche.

Document 1
Protocole d'extraction de la PAL hépatique (déjà réalisé)

- Peser 5 g de foie.
- Découper le foie en morceaux à l'aide d'un scalpel.
- Dans un bécher de polyéthylène, introduire :
  - les morceaux de foie ;
  - 40 mL de solution d'acétate de sodium à 0,02 $mol.L^{-1}$;
  - 20 mL de butanol.
- Homogénéiser au broyeur à vitesse moyenne pendant 1 minute.
- Transvaser l'homogénat dans un tube à centrifuger.
- Laisser agir le butanol 10 minutes.
- Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm à 4 °C.
- Après centrifugation, l'homogénat présente 4 phases :
  - une phase supérieure contenant le butanol et des lipides dissous dans le butanol ;
  - une phase épaisse contenant les protéines précipitées par le butanol ;
  - une phase aqueuse opalescente contenant la PAL ;
  - un culot résiduel de débris cellulaires.
- Aspirer la phase opalescente contenant la PAL à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une poire d'aspiration.
- Filtrer à travers un papier filtre. Transvaser le filtrat recueilli dans une éprouvette graduée placée dans de la glace : **le filtrat obtenu correspond à l'extrait E_B.**

Document 2
Protocole des précipitations fractionnées

Réactifs

- Acétone
- Solution d'acétate de magnésium à 1 mol.L^{-1} en eau distillée

Mode opératoire

- Introduire 4 mL de filtrat E_B dans 4 tubes à centrifuger de 15 mL
- Ajouter un même volume d'acétone froide dans chacun des tubes
- Agiter et laisser agir 10 minutes dans la glace : observer l'apparition d'un précipité floconneux
- Centrifuger 5 minutes à 3000 rpm à 4 °C
- Eliminer le surnageant contenant de l'acétone dans un bidon de récupération
- Remettre chacun des culots en suspension dans 4 mL de solutions d'acétate de magnésium à 0,05 - 0,25 - 0,5 - 1 mol.L^{-1}
- Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm à 4 °C
- Récupérer les surnageants en tubes à hémolyse

Données de sécurité

<u>Acétone</u>

Danger
H225, H319, H336, EUH066,
H225 : Liquide et vapeurs très inflammables
H319 : Provoque une sévère irritation des yeux
H336 : Peut provoquer somnolence ou vertiges

Document 3
Spot test

Principe
La recherche des fractions d'intérêt est fondée sur la mise en évidence de l'activité de la PAL qui catalyse l'hydrolyse d'un substrat synthétique chromophore le pNPP (2-nitro phényl phosphate) en un produit jaune le pNP (2-nitrophénol).

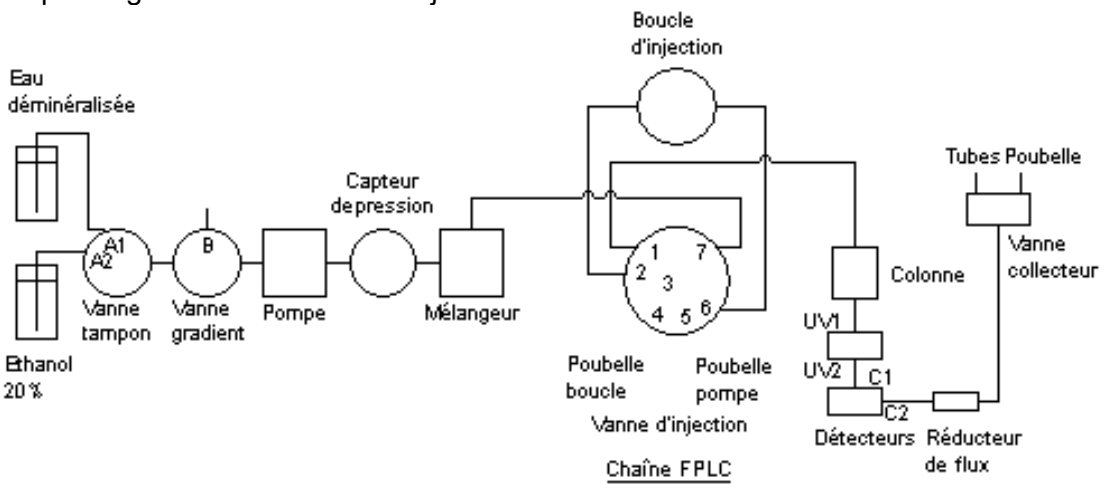
Réactifs
pNPP 30 mmol.L^{-1}

Mode opératoire
- Sur un morceau de parafilm,
  - déposer une goutte de pNPP
  - ajouter une goutte de solution à tester
- Surveiller l'apparition de la coloration jaune.

Document 4

Dessalage par chromatographie d'exclusion diffusion sur système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

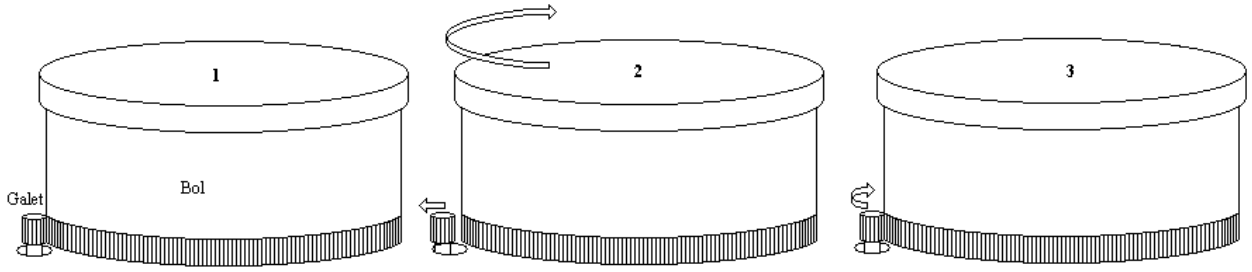
La manipulation est réalisée sur un appareil AKTA prime muni d'une colonne HiTrapDesalting. L'appareil est prêt à l'emploi : la purge du système, le rinçage et l'équilibrage de la colonne ont déjà été effectués



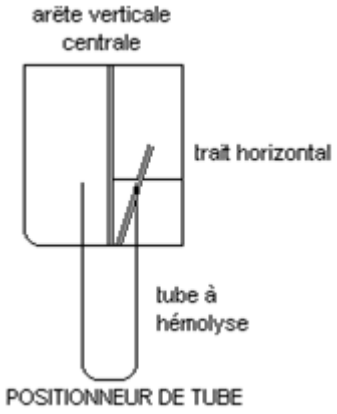
Mode opératoire

1. Réglages au niveau du collecteur de fractions

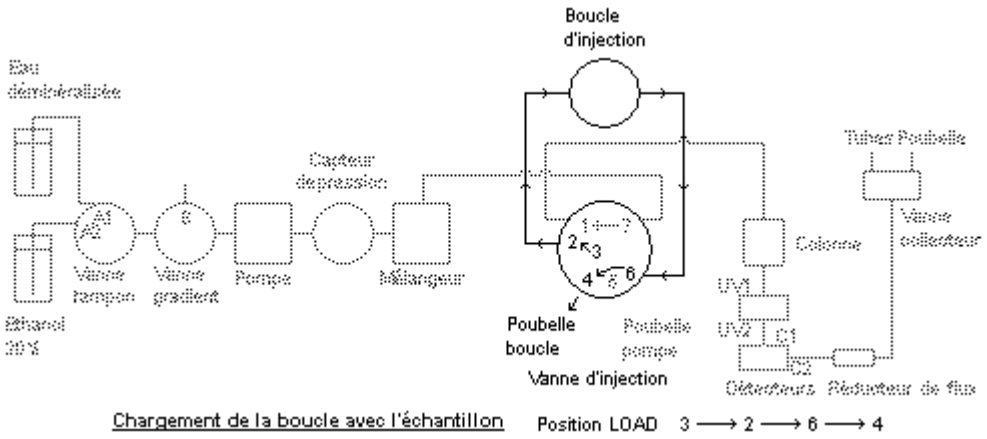
- Positionner le premier tube sur l'arête centrale verticale visible au niveau du détecteur du bras du collecteur. Pour cela libérer le galet entraînant le bol ② et, en même temps, tourner le bol dans le sens des aiguilles d'une montre.



- Vérifier l'entraînement du bol par le galet en tournant celui-ci à la main③.
- Les tubes à hémolyse utilisés ne doivent pas dépasser le trait horizontal.
- Le collecteur est muni d'un détecteur compte-goutte. Régler la position du bras collecteur comme représenté dans le schéma ci-dessous.

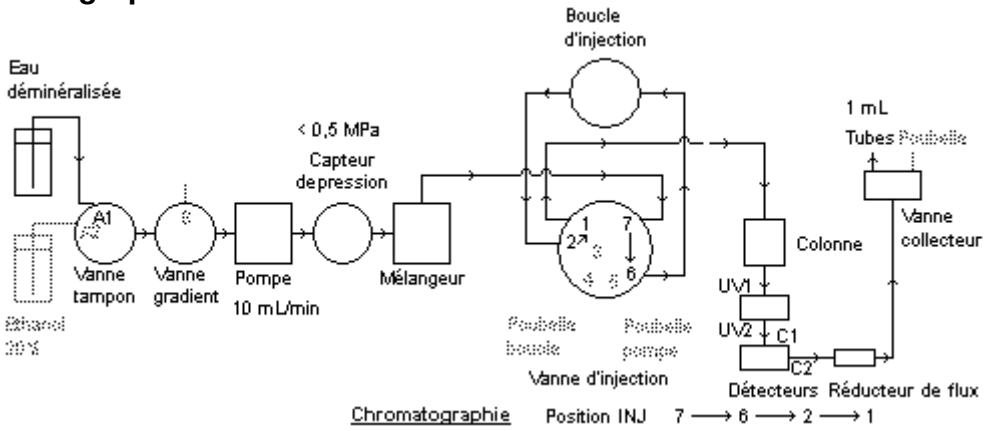


2. Chargement manuel de l'échantillon dans la boucle d'injection



- Filtrer l'échantillon sur un filtre 0,45 µm (filtre Millipore utilisé en microbiologie).
- Remplir le corps d'une seringue d'un volume au moins 3 fois supérieur au volume de la boucle d'injection (500 µL), éliminer les bulles d'air éventuellement présentes.
- Introduire l'échantillon dans la boucle par le port d'injection (position 3 de la vanne d'injection). Adapter le corps de la seringue sur le port d'injection. La vanne d'injection est réglée en position **"load"** par défaut. Le liquide passe par la boucle d'injection et est éliminé dans la poubelle de la boucle (à vérifier visuellement !). La boucle est ainsi rincée et chargée avec l'échantillon à traiter.
- Laisser la seringue en place pendant la manipulation (pour éviter la formation de bulles d'air)

3. Chromatographie



- Sélectionner avec le clavier de programmation **"Manual run"** (appuyer sur ∇) si ce programme n'est pas déjà sur l'écran.
- Entrer dans **"Manual run"** en appuyant sur OK. **"Set method base"** apparaît, pas de réglage à effectuer (l'axe des abscisses sera gradué en mL sur le profil d'élution).
- Appuyer sur ∇. **"Set concenration %B"** apparaît, n'intervient pas, donc pas de réglage à effectuer.
- Appuyer sur ∇. **"Set gradient"** apparaît, n'intervient pas, donc pas de réglage à effectuer.
- Appuyer sur ∇. **"Set flow rate"** apparaît. Appuyer sur OK pour régler le débit qui s'affiche par défaut à 0,1 mL/min. Pour augmenter le débit appuyer sur ∆ (pression courte : de 0,1 en 0,1 ; pression longue : de 1 en 1 mL/min puis de 10 en 10 mL/min). Appuyer sur OK pour valider le débit choisi soit **5 mL/min** dans la manipulation proposée.
- Appuyer sur ∇. **"Set fraction base"** apparaît. Les fractions sont exprimées en mL par défaut.
- Appuyer sur ∇. **"Set fraction size"** apparaît. Appuyer sur OK pour régler le volume des fractions.

Utiliser les touches ∇ et Δ pour afficher le volume souhaité, ici **1 mL**, puis appuyer sur OK pour valider.
- Appuyer sur ∇. **"Set pressure limit"** apparaît. Appuyer sur OK pour régler la pression qui s'affiche par défaut à 1,00 MPa. Utiliser les touches ∇ et Δ pour augmenter ou diminuer la pression. Choisir la pression limite indiquée dans la documentation soit **0,40 MPa** si l'on tient compte de la contre-pression exercée par le réducteur de flux. Appuyer sur OK pour valider la pression.
- Appuyer sur ∇. **"Set buffer valve position"** apparaît. La position 1 s'affiche par défaut ; elle convient si le tubage amène effectivement l'eau qui sert d'éluant au niveau de A1 sinon, sélectionner la position adéquate.
- Appuyer sur ∇. **"Set inject valve position"** apparaît. Appuyer sur OK pour régler la position de la vanne qui s'affiche par défaut en position **"load"**. Pour changer de position, appuyer sur Δ et sélectionner **"inj"**. Appuyer sur OK pour valider.
- Appuyer sur ∇. **"Start run"** apparaît. Appuyer 2 fois sur OK pour lancer la manipulation. Le volume délivré s'affiche sur l'écran.

Si l'alarme pression se déclenche en cours de manipulation appuyer sur **pause/cont.** et laisser la pression redescendre (suivre la valeur de la pression affichée à l'écran de l'appareil). Appuyer à nouveau sur **pause/cont.** pour relancer l'élution. Si le problème persiste, diminuer le débit.

- Arrêter la chromatographie en appuyant sur **"end"** lorsque 10 fractions de 1 mL ont été collectées.

Document 5

Détermination de l'activité catalytique par méthode cinétique en continu

Réactifs

- Tampon DEA : tampon diéthanolamine + $MgCl_2$ pH 9,8
- pNPP 30 mM en tampon DEA

Mode opératoire

- Introduire dans une microcuve
  - 1 mL de tampon DEA
  - 1 mL de solution de pNPP à 30 $mmol.L^{-1}$
- Préincuber à 37 °C
- Régler le zéro du spectrophotomètre et déclencher la réaction en ajoutant 200 µL d'extrait.
- Suivre la cinétique en relevant les valeurs d'absorbance à 405 nm toutes les 15 secondes pendant 3 minutes.

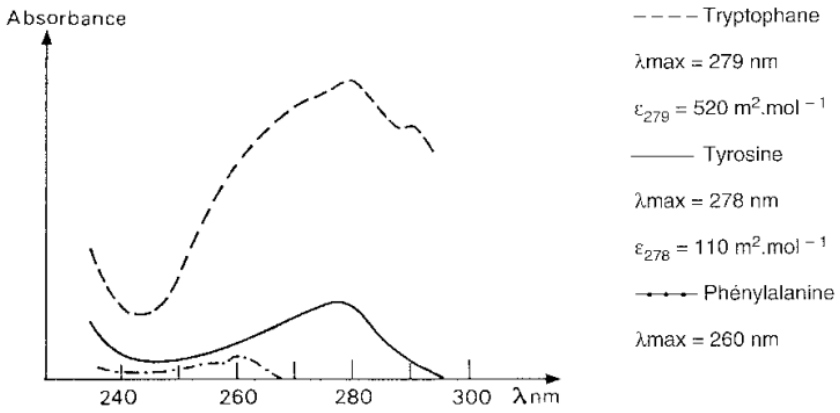
Une des cinétiques sera réalisée en présence d'un examinateur.

Document 6

Dosage des protéines par la méthode de Christian-Warburg (ou méthode UV)

Principe

Les chaînes latérales des acides aminés aromatiques absorbent la lumière dans le proche UV. La tyrosine et le tryptophane notamment, absorbent fortement vers 280 nm. La plupart des protéines renfermant ces acides aminés, la mesure de l'absorption à 280 nm constitue une méthode simple et rapide de la détermination de la concentration protéique d'une solution.



Remarques :

- L'absorption dépend de la teneur en acides aminés aromatiques des protéines de la solution étudiée. Pour réaliser un dosage fiable, il faudrait, en toute rigueur, disposer d'un étalon de même composition en acides aminés aromatiques que la solution à doser. Comme ce n'est généralement pas le cas, cette méthode ne permet qu'une estimation de la concentration en protéines.
- Les résultats sont satisfaisants sur des solutions protéiques ne contenant pas d'autres constituants à caractère aromatique marqué comme les acides nucléiques par exemple.

Protocole opératoire :

Lire l'absorbance en cuve Uvette à 280 nm contre le diluant.
Ce type de cuve permet une lecture sur un volume de 100 µL.

Paramètres de qualité de la méthode (résultats obtenus pour l'étalon SAB)

Limite de détection ($g.L^{-1}$)	Limite de quantification ($g.L^{-1}$)	Sensibilité ($g^{-1}.L$)	Limite de linéarité ($g.L^{-1}$)
0,009	0,03	0,6	> 2

Document 7

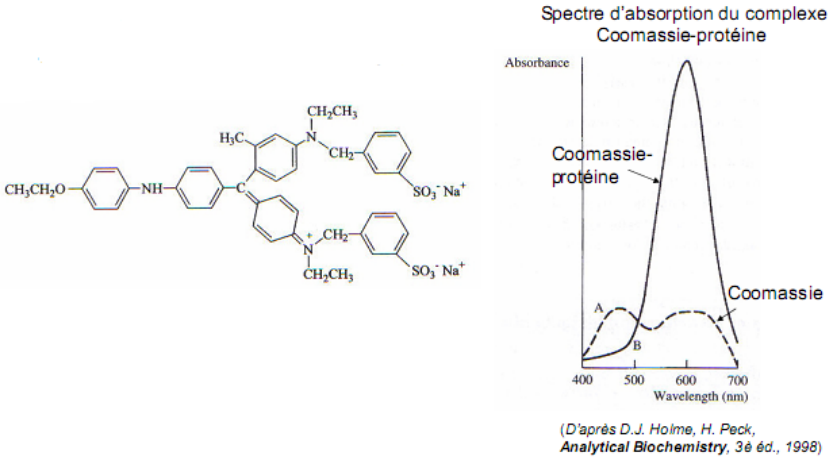
Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Réactifs

- Sérum albumine bovine SAB à 1 $g.L^{-1}$.
- Réactif de Bradford en distributeur :
  - Bleu de Coomassie G250 à 70% 0,1 g à dissoudre dans 50 mL d'éthanol à 95°
  - H_3PO_4 à 84 % : 100 mL
  - H_2O qsp 1 L

Principe

Dans des conditions de pH acide, le bleu de Coomassie G250 forme un complexe coloré avec les protéines. Il se fixe sur les groupements protonés des chaînes latérales des acides aminés basiques et sur le groupement α-aminé libre de la chaîne polypeptidique. Sa longueur d'onde d'absorption maximale augmente de 465 nm (bleu) à 595 nm (rouge).



Remarque :
L'intensité de la coloration peut varier selon les protéines. L'albumine, par exemple, se colore plus intensément que les autres protéines (à prendre en compte pour le choix de l'étalon).

Protocole opératoire

Introduire dans une cuve spectrophotométrique « visible » :
- 0,05 mL de solution protéique
- 2,5 mL de réactif de Bradford

Laisser la réaction se développer entre 15 et 30 minutes.
Lire les absorbances à 595 nm.

Paramètres de qualité de la méthode (résultats obtenus pour l'étalon SAB)

Limite de détection ($g.L^{-1}$)	Limite de quantification ($g.L^{-1}$)	Sensibilité ($g^{-1}.L$)	Limite de linéarité ($g.L^{-1}$)
0,005	0,017	0,95	0,35

Document 8
Composition des milieux de culture

Composition du milieu LB :

Base stérilisée 30 minutes à 121 °C :

- Extraits de levure 5 g
- Tryptone 10 g
- NaCl 10 g
- Eau distillée qsp 1 L
- Ajuster le pH à 7,0 + - 0,2

Composition du milieu LBM :

Base stérilisée 30 minutes à 121 °C :

- Extraits de levure 15 g
- Tryptone 20 g
- NaCl 3 g
- Eau pyrolysée qsp 900 mL
- Ajuster le pH à 7,2

Addition de solutions stériles à 500 mL de milieu de base :

- Solution de glycérol à 50 % 8 mL
- Solution tampon 10x 50 mL

Document 9
Production de la protéine « CL » par croissance d'*E. coli*

Matériel et réactifs

- Préculture d'*E.coli* recombinante DE3 en milieu LBM à 37 °C noté « E.coli 1 »
- Flacon de 10 mL de milieu LBM stérile
- Erlenmeyer contenant 50 mL de milieu LBM
- Tube de 4 mL d'IPTG à 50 $mmol.L^{-1}$
- Pipettes automatiques, cônes stériles
- Pipettes graduées stériles de 2, 5, 10 mL
- Microtubes à centrifuger (1,5 mL) stériles
- Semi-microcuves visibles avec portoir de cuves
- Chronomètre
- Spectrophotomètre
- Bain thermostaté à 37 °C avec agitation
- Centrifugeuse
- Bac à glace

Mode opératoire

- Déterminer la DO_{600nm} de la préculture « *E.coli 1*» (la limite de linéarité est : DO_{600nm} = 0,600)
- Ensemencer l'Erlenmeyer de milieu LBM avec la préculture « *E.coli 1* » pour obtenir une DO initiale de 0,2 +/– 10 %. Vérifier la valeur obtenue.
- Mettre l'Erlenmeyer sous agitation pendant 30 minutes à 37 °C
- Ajouter le volume nécessaire d'IPTG pour obtenir une concentration finale de 1 $mmol.L^{-1}$
- Mettre l'Erlenmeyer sous agitation pendant 1 h 30 à 37 °C
- Vérifier que la DO_{600nm} se situe au moins à 1,5
- Centrifuger deux fois 1 mL de la culture obtenue dans deux microtubes (1 minute à 13 000 rpm)
- Récupérer les surnageants dans des microtubes et les laisser en attente dans la glace.

Les mesures de DO_{600nm} seront réalisées en présence d'un examinateur.

Document 10
Dosage de la protéine « CL » par technique ELISA

Matériel et réactifs

- 1 barrette à fond plat présentée sur support et préparée selon le protocole de préparation de la barrette fournie
- Tubes à hémolyse
- Pipettes automatiques et cônes
- Ruban adhésif
- Flacon de 50 mL de tampon PBS-tween
- Flacon de 10 mL de tampon PBS
- Flacon de 10 mL de diluant-neutralisant
- Solution de conjugué (Ac anti « CL » couplé à la phosphatase alcaline au 1/1000)
- Solution de pNPP à 1 mmol.L^{-1}
- Solution de NaOH à 5 mol.L^{-1}
- 1 mL de solution étalon de « CL » à 50 mg.L^{-1}
- 0,2 mL de solution de contrôle de « CL » à 5 mg.L^{-1}

Mode opératoire

Protocole de préparation de la barrette fournie : ***Déjà réalisé***

- *Introduire 100 µL de protéine « CL » à 10 mg.L^{-1} dans les cupules A1 à H1 et A2 à H2*
- *Incuber 2h à 37 °C puis une nuit à 4 °C*
- *Laver 3 fois avec 200 µL de tampon PBS-tween*
- *Introduire 100 µL de solution de SAB à 3 % en tampon PBS*
- *Incuber 1 h à 37 °C*

Préparation de la gamme d'étalonnage

- Réaliser la gamme d'étalonnage par dilutions en série à partir de la solution étalon à 50 mg.L^{-1} en PBS. ***La gamme de dilution sera réalisée en présence d'un examinateur***

Dilution du surnageant de culture

- Réaliser la dilution du surnageant de culture dans le diluant-neutralisant

Protocole du dosage

- Laver 3 fois avec 200 µL de tampon PBS-tween
- Dans la cupule A1, introduire 100 µL de tampon PBS
- Dans la cupule B1, introduire 50 µL de tampon PBS
- Dans les cupules C1 et D1, introduire 50 µL de solution de contrôle « CL » à 5 mg.L^{-1}
- Dans les cupules E1 et F1, introduire 50 µL du surnageant de culture dilué
- Introduire 50 µL de chaque solution de la gamme d'étalonnage dans les cupules restantes
- Introduire 50 µL de conjugué dans toutes les cupules sauf la cupule A1
- Couvrir avec du ruban adhésif
- Homogénéiser sur agitateur rotatif pendant 1 minute
- Incuber 1 h à 37 °C
- Laver 3 fois avec 200 µL de tampon PBS-tween
- Dans chacune des cupules, ajouter 100 µL de pNPP
- Couvrir avec du ruban adhésif
- Incuber 5 minutes exactement à 37 °C
- Dans chacune des cupules, ajouter 50 µL de NaOH
- Mesurer les absorbances à 405 nm au lecteur de microplaque contre l'air.

Document 11
Purification de la souche d'*E.coli* et identification du contaminant

Matériel et réactifs

- Préculture d'*E. coli* contaminée notée « E.coli 2 »
- Isolement de la préculture d'*E.coli* contaminée sur GTS noté « E.coli 2 »
- 2 GTS
- Tubes à hémolyse stérile
- Tube de 5 mL d'eau physiologique stérile
- Eau oxygénée et disque oxydase
- Colorants de Gram

Mode opératoire

- Réaliser une coloration de Gram sur la préculture d'*E.coli* contaminée « E.coli 2 »
- Présenter un champ microscopique caractéristique avec la description et le commentaire correspondants

Présenter un champ microscopique à un examinateur

- A partir de la boîte d'isolement du prélèvement contaminé :
  - Repiquer chacune des souches identifiées sur GTS
  - Orienter l'identification de la souche contaminante.

Document 12
Fiche technique Pastorex™ Staph-plus
Test d'agglutination au latex pour l'identification de *Staphylococcus aureus*

A partir de colonies isolées sur la boîte notée « contaminant », réaliser le test Pastorex™ Staph-plus.

Conclure.

Éléments de correction de la deuxième épreuve

Rapport établi par mesdames Christine Benayoun, Isabelle Etienne, Isabelle Faller, Françoise Guyomarch, Claudine Walther et messieurs Fabien Conchonaud, Jean-Pascal Dumon, Patrick Meunier.

Résultats de l'épreuve

20 candidats ont composé (18 candidats agrégation, 2 candidats CAER - agrégation) :

- 8 ont obtenu une note supérieure ou égale à 12/20
- 5 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12,
- 7 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10,

La moyenne générale de l'épreuve est de 11,03. La meilleure note est de 13,87/20.

Observations générales du jury :

Le jury tient à féliciter les candidats pour leur attitude pausée et leur capacité à rester concentré tout au long de l'épreuve.
Une lecture rapide du sujet permettait d'organiser dans le temps l'ensemble des manipulations à effectuer et d'exploiter au maximum les temps d'attentes. Il était, par exemple, fortement conseillé de démarrer la croissance bactérienne en début d'épreuve.
Le sujet comportait plusieurs manipulations indépendantes explorant différentes facettes des activités technologiques au programme des enseignements de biotechnologie. L'ensemble des manipulations nécessitait de la rigueur, tant au niveau de leur préparation que pour leur mise en œuvre et l'exploitation des résultats. (traçabilité…).

Cette année, le jury a imposé que l'heure de pause, qui s'ajoute aux huit heures d'épreuves, devait nécessairement comporter une pause méridienne d'une demi-heure afin de prendre le déjeuner avant 14h. Quelques rares candidats n'ont pas respecté cette pause. Le jury rappelle aux futurs candidats l'importance d'une fine organisation du travail, qui inclue des périodes de pause afin de rester concentré sur toute la durée de l'épreuve.

Partie I : Purification de la phosphatase alcaline

La plupart des manipulations de cette partie, mis à part le dosage des protéines par la méthode de Bradford, ont été réalisées. Cependant, l'exploitation des résultats a été globalement décevante. Le jury a apprécié le soin que les candidats ont apporté à la rédaction du rapport d'analyse mais les longues digressions étaient inutiles et pénalisantes compte-tenu de la durée de l'épreuve et de la charge de travail.
L'extraction et la première étape de purification ayant déjà été réalisées, les candidats devaient poursuivre la purification sur l'extrait qui leur était fourni.
Il était rappelé dans le sujet de conserver les échantillons dans la glace du début jusqu'à la fin de la purification. Certains candidats n'ont pas respecté cet impératif.

Deuxième étape de purification

- Précipitation à l'acétone froide

Cette manipulation requérait l'utilisation de centrifugeuses, en nombre limité. Le jury a apprécié l'harmonie avec laquelle les différents passages se sont mis en place. Tous les candidats ont ainsi pu mener à bien leurs centrifugations avec un minimum de temps d'attente.

- Précipitation à l'acétate de magnésium

Il s'agissait de déterminer la concentration en acétate de magnésium la plus pertinente pour une purification optimale de la PAL.
Une présentation de la préparation des différentes solutions de $MgCl_2$ et des résultats du spot test sous forme synthétique était attendue. L'utilisation d'eau physiologique pour réaliser les dilutions n'était évidemment pas souhaitable.

Le choix de l'expérimentation la plus performante n'a pas été suffisamment argumenté. Peu de candidats se sont posé de réelles questions sur leurs résultats expérimentaux et pratiquement aucun candidat n'a fait référence à l'impact de la force ionique sur la solubilité des protéines.

- Dessalage par chromatographie d'exclusion diffusion.

Bien que la plupart des candidats n'aient jamais mis en œuvre la technique proposée, le jury a apprécié l'attitude positive dont ils ont fait preuve lors de leur passage. Certains avaient lu attentivement la fiche technique avant de se présenter au poste et se sont donc rapidement approprié l'appareil.
L'intérêt de la surverse de la boucle d'injection avec un volume trois fois supérieur à sa capacité, n'est pas apparu à certains candidats.

- Recherche des fractions contenant la PAL

La plupart des candidats ont présenté un spot test propre et renseigné mais trop peu ont pensé à réaliser un témoin négatif.

Détermination des paramètres du suivi de la purification

- **Détermination de b, concentration d'activité catalytique de la PAL, par méthode cinétique en continu**

La réalisation des cinétiques en continu représente un geste fondamental de la biochimie. L'homogénéisation du milieu réactionnel après ajout de l'enzyme a été globalement bien respectée à la différence de l'homogénéisation de l'enzyme.
Le calcul des concentrations d'activité catalytique dans les différentes fractions de purification a été très peu réalisé. Une formule littérale claire et bien posée était attendue. Le jury a été très surpris par le fait que plusieurs candidats rencontrent des difficultés dans les conversions d'unités.

- **Dosage des protéines**

L'estimation de la concentration en protéines par méthode UV a posé problème à de nombreux candidats. Aucun candidat n'a utilisé, comme il était attendu, la sensibilité de la méthode UV pourtant fournie pour la SAB dans le document 6. Cependant, certains ont utilisé l'étalon SAB mis à disposition pour la réalisation du dosage par la méthode de Bradford, contournant ainsi la difficulté.
Un seul candidat a dosé les protéines par la méthode de Bradford de façon satisfaisante.

- **Exploitation des résultats**

Le jury exprime sa déception, en effet, seuls cinq candidats ont proposé un tableau (ou une ébauche de tableau) de purification.

<u>Partie II</u> : Optimisation de la production d'un facteur de croissance leucocytaire à partir d'une souche *d'Escherichia coli* DE3 recombinante.

Production de la protéine « CL » par croissance d'E. coli

L'estimation opacimétrique de la biomasse bactérienne par mesure des DO_{600} de la culture au spectrophotomètre devait prendre en compte des informations apportées par le sujet. Il était nécessaire de se situer dans une limite maximale de 0,6. Un certain nombre de candidats ont effectué les dilutions en conséquence, y compris au niveau de la culture de départ. Par contre des mesures trop nombreuses et répétées de DO_{600} ont été préjudiciables et inutiles ; à la fin des 2 heures de croissance, il fallait d'emblée diluer l'échantillon.
Si le calcul de la quantité d'IPTG à introduire dans le milieu de culture pour induire l'induction a été réalisé par la totalité dans candidats, en revanche, seule une partie d'entre eux ont proposé une explication complète du mécanisme d'induction, incluant le levée de l'inhibition du promoteur de l'ARN polymérase.

Dosage de la protéine « CL » par technique ELISA

Cette partie a été rarement réalisée dans sa totalité ; l'organisation dans le temps en est probablement l'explication principale.
Cela étant, la majorité des candidats a effectué la dilution attendue de l'échantillon. La dilution en série de l'étalon a été présentée de façon satisfaisante à l'écrit par la moitié d'entre eux. En revanche, la réalisation technique a parfois manqué de rigueur ou d'efficacité.

La conception de la gamme d'étalonnage nécessitait de tenir compte de l'indication de concentration de la solution de contrôle. Certains candidats ont été déroutés par l'absence de consignes plus précises pour la réalisation de la gamme.
Les candidats ont tous déduit du protocole opératoire qu'il s'agissait d'une technique ELISA compétitive. Les jurys ont apprécié les schématisations complètes de chacune des étapes incluant la mise en parallèle du cas où la protéine « CL » est présente et du cas où la protéine est absente. L'allure de la courbe est souvent erronée, négligeant les phases précédant et suivant la zone linéaire. Enfin, seul un candidat a validé les témoins avant de poursuivre l'exploitation des résultats.

Purification de la souche d'E.coli et identification du contaminant

Technique de base de microbiologie, la réalisation de la coloration de Gram de la souche contaminée n'a pas posé de difficulté particulière ; il en est de même pour la réalisation du test d'agglutination, réalisé à partir des isolements et du kit distribué en dernière partie d'épreuve.
Les résultats obtenus suite aux isolements ont été assez souvent décevants, y compris au niveau de la traçabilité des boîtes ensemencées.
A l'écrit, les examens macroscopiques ont été parfois été présentés de façon superficielle. La démarche d'orientation / identification du contaminant plutôt bien menée par la majorité des candidats, avec pour certains, de très bons arguments (démarche d'identification rationnelle).

CONCLUSION GENERALE

Le jury félicite les 8 candidats admis à la session 2015 de l'agrégation interne de biochimie génie biologique.

Le jury encourage les candidats non admis à persévérer dans leur projet. Les moyennes générales, notamment aux épreuves d'admission attestent de la qualité de tous les candidats à ce concours d'excellence.

Comme cela a été indiqué tout au long de ce rapport, il est nécessaire que les candidats à ce concours se préparent aux épreuves et témoignent des compétences attendues d'un professeur agrégé de biochimie génie biologique.

Le jury tient à remercier Madame la proviseure du lycée Pierre Gilles de Gennes, ENCPB et son équipe : proviseurs adjoints, enseignants, techniciens, et personnel administratif, pour l'accueil et l'aide efficace apportés tout au long de l'organisation et du déroulement de ce concours qui s'est déroulé dans d'excellentes conditions.