



Secrétariat Général

**Direction générale des
ressources humaines**

Sous-direction du recrutement

Concours du second degré – Rapport de jury

Session 2009

AGRÉGATION

Externe

Biochimie génie biologique

**Rapport de jury présenté par Monsieur François LASBENNES
Président de jury**

Sommaire

| | |
|--|------|
| Composition du jury..... | p 03 |
| Renseignements statistiques | p 04 |
| Epreuves d'admissibilité | |
| Composition de biochimie | p 06 |
| Composition de microbiologie | p 08 |
| Composition de biologie cellulaire et de physiologie | p 11 |
| Epreuves d'admission | |
| Epreuve pratique de chimie | p 14 |
| Rapport sur l'épreuve de chimie | p 39 |
| Epreuve pratique de microbiologie | p 45 |
| Rapport sur l'épreuve de microbiologie | p 61 |
| Epreuve pratique de biochimie – physiologie | p 65 |
| Rapport sur l'épreuve de biochimie-physiologie | p 74 |
| Epreuves orales | p 75 |
| Rapport sur les leçons de biochimie | p 76 |
| Rapport sur les leçons de microbiologie | p 77 |
| Rapport sur les leçons de biologie humaine | p 77 |
| Rapport sur les études critiques de dossiers | p 79 |
| Rapport concernant la chimie à l'oral | p 84 |
| Réflexions sur la session 2009..... | p 84 |
| Annexes | |
| Liste des ouvrages disponibles | p 86 |

COMPOSITION DU JURY

Président

M. François LASBENNES, professeur des Universités, Université de Strasbourg, STRASBOURG

Vice-président

M. Michel GAVRILOVIC, inspecteur général de l'Education Nationale, Groupe Sciences et Techniques Industrielles : Biotechnologies

Secrétaire général

Mme Florence RIVENET, professeur agrégée de BGB, TZR, ENCPB, PARIS

Membres

M. Xavier BATAILLE, professeur agrégé, ENCPB, PARIS

Mlle Christine BENAYOUN, professeur agrégée de BGB, ENCPB, PARIS

M. Erwan BEAUVINEAU, professeur agrégé, ENCPB, PARIS

M. Henri-Jean BOULOUIS, professeur des Universités à l'Ecole Vétérinaire de MAISON ALFORT

M. Patrice CAZAUBON, professeur agrégé de chaire supérieure, ENCPB, PARIS

M. Fabien CEZARD, professeur agrégé, ENCPB, PARIS

Mlle Jeanne-Laure DORMIEUX, professeur agrégée, Lycée d'Arsonval SAINT-MAUR-DES-FOSSES

M. Frédéric DUCANCEL, Ingénieur de recherche, CEA D'études des protéines GIF-SUR-YVETTE

M. Yvo GOMPERTS-BONECA, chercheur à l'Institut Pasteur de PARIS

M. Marc LANDRY, professeur des Universités à l'INSERM, BORDEAUX

M. Daniel LONCLE, professeur agrégé HC, ENCPB, PARIS

M. Alain MOREL, professeur des Universités, Université ANGERS

Mme Lucille TIGER YVERNAULT, professeur agrégée, ENCPB, PARIS

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

| | |
|--|----------|
| Candidats inscrits..... | 221 |
| Candidats présents aux épreuves d'admissibilité..... | 78 |
| Nombre de postes | 10 |
| Candidats admissibles..... | 25 |
| Candidats présents aux épreuves d'admission..... | 25 |
| Candidats proposés pour l'admission | 10 |
| Barre d'admissibilité | 06,83/20 |
| Barre d'admission | 09,62/20 |

Epreuves d'admissibilité

| | |
|---|----------|
| Moyenne générale des candidats présents..... | 05,58/20 |
| Moyenne générale des candidats admissibles..... | 08,95/20 |

Biochimie

| | |
|---|----------|
| Moyenne des candidats présents..... | 05,74/20 |
| Moyenne des candidats admissibles | 10,08/20 |
| Note maximale | 16,00/20 |

Microbiologie

| | |
|---|----------|
| Moyenne des candidats présents | 06,07/20 |
| Moyenne des candidats admissibles | 08,92/20 |
| Note maximale | 14,50/20 |

Biologie cellulaire et Physiologie

| | |
|---|----------|
| Moyenne des candidats présents | 04,27/20 |
| Moyenne des candidats admissibles | 07,86/20 |
| Note maximale | 13,50/20 |

Epreuves d'admission

| | |
|---|----------|
| Moyenne générale des candidats présents | 09,25/20 |
| Moyenne générale des candidats admis | 12,49/20 |

Travaux pratiques de biochimie-physiologie

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Moyenne des candidats présents..... | 09,68/20 |
| Moyenne des candidats admis | 12,20/20 |
| Note maximale | 17,00/20 |

Travaux pratiques de microbiologie

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Moyenne des candidats présents..... | 10,11/20 |
| Moyenne des candidats admis | 12,19/20 |
| Note maximale | 15,80/20 |

Travaux pratiques de chimie

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Moyenne des candidats présents..... | 09,92/20 |
| Moyenne des candidats admis | 11,82/20 |
| Note maximale | 15,40/20 |

Leçon

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Moyenne des candidats présents | 08,20/20 |
| Moyenne des candidats admis | 12,70/20 |
| Note maximale | 18,00/20 |

Epreuve critique de dossier

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Moyenne des candidats présents | 09,01/20 |
| Moyenne des candidats admis | 13,10/20 |
| Note maximale | 18,00/20 |

Ensemble du concours

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Moyenne des candidats présents | 09,15/20 |
| Moyenne des candidats admis | 11,57/20 |

Composition de Biochimie

Durée : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

Acquisition de la fonction des protéines et contrôles de qualité par la cellule eucaryote.

RAPPORT SUR LA COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Rapport établi par Messieurs A. MOREL et M. GAVRILOVIC

1. Résultats

Moyenne générale de l'épreuve : 5,74/20

Répartition des notes sur 78 copies corrigées

1 note > 14

4 notes ≥ 12 et ≤ 14

11 notes ≥ 10 et < 12

8 notes ≥ 8 et < 10

18 notes ≥ 5 et < 8

36 notes < 5

Pourcentage des notes supérieures ou égales à 10/20 : 20,5 %

Meilleure note : 16/20

2. Réflexions sur l'épreuve

La composition de biochimie proposait de disserter de l'acquisition de la fonction et des contrôles de qualité des protéines par la cellule eucaryote. Devant l'ampleur, du sujet les candidats devaient se limiter en proposant un plan détaillé qu'ils devaient impérativement justifier. Les limites proposées devaient en général être suffisamment importantes pour pouvoir développer de façon précise les éléments que le candidat souhaitait approfondir, ce qui permet d'évaluer la solidité et l'actualité de ses connaissances. En revanche, ces limitations ne doivent pas être trop importantes afin de donner une vision la plus générale et complète possible du sujet proposé. Sur ces bases et en fonction du temps disponible, il paraissait judicieux de rédiger une introduction générale permettant de mettre en perspective l'importance des notions biologiques nécessaires pour traiter le sujet. Cette introduction devait par ailleurs montrer l'importance incontournable de la structuration des protéines dans tous les processus biologiques connus. Chaque composition devait proposer un plan extrêmement structuré couvrant les deux aspects, structuration fonctionnelle et contrôle de qualité des protéines. Ainsi, afin de respecter l'équilibre entre traitement du sujet et démonstration des connaissances du candidat, une restriction du sujet au niveau de la traduction devait être prise en compte, en effet si l'émergence de la protéine en voie de synthèse est un élément de structuration faisant partie du sujet, la traduction *sensu-stricto* en est un peu éloignée. Par ailleurs, les devoirs n'ayant pas fait ce choix se sont traduits par un affaiblissement important des connaissances

transmises en raison des hors sujets trop importants. Globalement beaucoup de candidats ont correctement limité leur devoir de la manière souhaitée. Malheureusement les correcteurs ont remarqué que dans la grande majorité des cas, il y avait un déséquilibre trop important entre l'introduction, la justification du plan, le développement et les conclusions et perspectives du sujet. Concernant le plan il était nécessaire de faire un bref rappel sur les rapports structure/fonction et à ce titre, de préciser brièvement l'ensemble des considérations physico-chimiques qui sont impliquées dans la structuration protéique, c'est ainsi que les différentes liaisons et structures devaient être introduites. Les correcteurs ont été intrigués par le peu de copies qui introduisaient les expériences fondatrices d'Anfisen sur les rapports structure/fonction de la ribonucléase. La description de cette observation *in vitro* pouvait ainsi permettre simplement d'introduire la problématique *in vivo* et de dérouler l'ensemble des notions impliquées dans l'acquisition de la fonction comme les notions de domaine protéique, les protéines chaperonnes, les processus de translocation, la notion de clivage protéolytique et les modifications post-traductionnelles etc.. L'absence de structures protéiques altérées *in vivo* devait permettre ensuite de disserter sur les contrôles de qualité mis en place dans une cellule eucaryote qui permettent d'éliminer les structures inutiles mais aussi de réguler le temps de vie des protéines. L'ensemble de cette dissertation devait comme toujours s'appuyer sur des exemples clairs, bien documentés et si possible avec des croquis explicatifs comme cela est de règle pour une agrégation. Les correcteurs ont noté que la plupart des candidats avaient suivi à peu près cette architecture mais, avec plus ou moins de bonheur. En effet beaucoup de copies ont rendu un devoir déséquilibré par une introduction minimale ne rendant pas compte de l'importance du sujet, puis avec des parties très largement développées au détriment d'une harmonie et d'un équilibre des différents sujets abordés ainsi, par exemple, la partie structure des protéines à quelque fois complètement embolisé le devoir. D'autres candidats ont correctement structuré leur composition mais avec des informations apportées qui manquent souvent de notions scientifiques précises. Un point remarquable et une constante des devoirs à quelques exceptions près est l'absence de données expérimentales concernant les manières d'analyser les phénomènes décrits par les candidats, ce qui du point de vue des correcteurs est une faiblesse pédagogique pour de futurs enseignants. En revanche la présentation des compositions est correcte dans l'ensemble et un effort sur le français est à noter de sorte que la lecture des copies en a été facilitée. Les iconographies, quant elles, existent, sont d'assez bonne qualité et informatives pour les bonnes copies.

Pour terminer, dans la grande majorité des copies, la conclusion n'est le plus souvent qu'un résumé du devoir sans mise en perspective et très peu de compositions ont indiqué les conséquences physiologiques des défauts de structuration ou de contrôles de qualité des protéines.

En conclusion, les candidats ont dans leur majorité, restreint le sujet à bon escient et des efforts de présentation sont à noter. Les principales critiques sont surtout sur les développements trop descriptifs, peu de prise en compte des résultats fondateurs de la renaturation de la ribonucléase, peu de méthodes expérimentales supportant les affirmations et surtout un manque de recul sur les implications en biologie.

Composition de microbiologie

Durée : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

A l'aide d'exemples précis, vous illustrerez les principaux mécanismes d'adaptation des bactéries à leur environnement.

RAPPORT SUR LA COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Rapport établi par Messieurs D.LONCLE et H.-J. BOULOUIS

1- RÉSULTATS

Moyenne générale de l'épreuve : 6,07 / 20

Répartition des notes sur 73 copies corrigées :

1 note > 14

0 note ≥ 12 et ≤ 14

8 notes ≥ 10 et < 12

13 notes ≥ 8 et < 10

26 notes ≥ 5 et < 8

25 notes < 5

Pourcentage des notes supérieures ou égales à 10 : 12,3 %

Meilleure note : 14,5/20

2- RÉFLEXIONS SUR L'ÉPREUVE

Le sujet nécessitait de bien en définir les contours. En effet, il demandait moins d'exposer l'état connu de la diversité du monde bactérien, que de montrer comment un groupe bactérien donné réagit aux variations de son environnement physico-chimique et biologique, au niveau cellulaire et au niveau de la population. Ainsi le propos n'était pas de décrire les bactéries thermophiles et mésophiles, mais d'indiquer s'il existe une adaptation des cellules aux variations de température, ses mécanismes mais aussi ses limites. Faute de ce temps de réflexion initiale, certains candidats se sont donc contentés de décliner le monde bactérien dans (toute) sa variété, une tâche rassurante mais impossible à conduire dans son exhaustivité pendant le temps imparti. Cela s'est d'ailleurs vu dans les dernières pages de certaines copies.

Sans rechercher l'exhaustivité absolue, les exemples développés devaient être choisis pour illustrer les différentes facettes de cette adaptation, sans omettre de mécanisme fondamental.

Les conséquences et les applications de ces adaptations pouvaient aussi être évoquées, mais l'énoncé du sujet n'était pas impératif sur ce point.

L'introduction devait être l'occasion de délimiter le champ de la dissertation et de justifier la démarche et le plan adoptés. Le constat de la diversité des bactéries et de leur environnement pouvait être l'occasion d'une réflexion sur les nécessités d'une adaptation à court terme et à moyen terme, dans un environnement changeant, hostile ou compétitif. L'évocation d'une adaptation à moyen terme, fondée sur

des mécanismes génétiques permettait de souligner la difficulté de faire la part entre évolution et adaptation dans le contexte de ce sujet.

L'évocation du mécanisme général des systèmes à deux composants, comme moyen de perception de leur environnement par les bactéries pouvait trouver aussi sa place dans l'introduction.

Plusieurs plans étaient possibles et acceptés, à condition que leur logique soit cohérente et explicitée. La moindre des choses était d'annoncer le plan dans l'introduction, pratique qui tend à se perdre...

Pour illustrer l'adaptation du métabolisme, une place particulière devait être faite à la régulation des opérons cataboliques, par exemple l'opéron lactose, mais aussi anaboliques, par exemple l'opéron tryptophane, ainsi qu'à des régulations plus globales, telles que la répression catabolique. Montrer le mécanisme de basculement respiration / fermentation était plus pertinent que de décrire l'utilisation de l'Oxygène et sa tolérance ou décrire l'anaérobiose facultative. Les mécanismes mis en œuvre pour assurer la survie dans son nouvel environnement pouvaient être illustrés par la sécrétion de facteurs comme les sidérophores.

L'adaptation physiologique des bactéries à leur environnement était sans doute le chapitre le plus riche d'exemples. La sporulation a souvent été traitée. Elle était incontournable, mais peu de candidats ont décrit à la fois les conditions de son déclenchement, sa régulation par cascade de facteurs sigma et les conditions de la germination. La description de la formation des biofilms était aussi attendue. Les mécanismes d'établissement et de vie des biofilms, de l'intervention de mécanismes relevant du quorum sensing pour la régulation de l'expression de gènes ont rarement été développés.

Les mécanismes à l'origine du chimiotactisme étaient aussi un bon exemple illustrant cette adaptation physiologique à l'environnement.

Une place particulière pouvait être réservée à l'adaptation à un environnement hostile. Les biofilms, déjà évoqués, l'adaptation aux défenses de l'hôte et aux toxiques ou antibiotiques fournissaient de nombreux supports pour illustrer des mécanismes différents. Les exemples ne manquaient pas parmi les bactéries pathogènes spécifiques. Les mécanismes liés à la synthèse de bactériocines et à la résistance aux antibiotiques ou aux autres «toxiques» étaient aussi nombreux.

Concernant l'adaptation génétique, les mécanismes de transferts génétiques ont été longuement et, parfois, inutilement décrits, au détriment de la nature des gènes transférés. L'aspect facultatif des gènes plasmidiques a été peu évoqué. Pourtant, leur avantage sélectif, c'est à dire l'aptitude à l'adaptation qu'ils confèrent, est une notion essentielle. Dans ce chapitre, l'adaptation des populations par mutations dans lesquelles interviennent différents systèmes de réparation comme le système SOS et les hypermutants était aussi un bon exemple d'adaptation.

Des particularités structurales, comme la composition de la paroi/membrane cytoplasmique particulière des bactéries extrémophiles, ont été traitées assez souvent, montrant la difficulté à séparer ce qui relevait de l'évolution adaptative et ce qui relève d'une adaptation à un changement en cours.

La conclusion pouvait être le lieu d'évoquer un certain nombre de conséquences ou d'applications, bien que certains candidats en aient fait soit un chapitre à part soit les aient évoquées pour chacune de leurs parties.

Composition de biologie cellulaire et physiologie

Durée : 6 heures

Coefficient : 2

SUJET

A l'échelle de l'individu, la mort apparaît comme la rupture de la vie. Vous montrerez que, contrairement à cette conception manichéenne, la mort cellulaire est un élément important de la mise en place et du maintien des fonctions du système nerveux.

RAPPORT SUR LA COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Rapport établi par Messieurs M. LANDRY et F. LASBENNES

1- RÉSULTATS

Moyenne générale de l'épreuve : 4,27 / 20

Répartition des notes sur 72 copies corrigées :

3 notes ≥ 12 et ≤ 14

4 notes ≥ 10 et < 12

7 notes ≥ 8 et < 10

11 notes ≥ 5 et < 8

47 notes < 5

Pourcentage des notes supérieures ou égales à 10 : 9,7 %

Meilleure note : 13,5/20

2-REFLEXIONS SUR L'EPREUVE

Le sujet de biologie humaine proposé cette année traitait du rôle la mort cellulaire dans le fonctionnement du système nerveux central (SNC). Ce sujet a dérouté de nombreux candidats en raison, semble t'il, de faibles connaissances sur l'ontogenèse du SNC. Le jury rappelle à cet égard, que le chapitre dédié à la neurobiologie indique qu'ontogenèse et phylogenèse du système nerveux font partie du programme de l'agrégation. Il s'agit d'un très vaste domaine mais de nombreux ouvrages de neurobiologie consacrent un chapitre à ce sujet et définissent par-là, les connaissances que le jury est en droit d'attendre des candidats. Il est regrettable que près de 40% des copies fassent l'impasse totale sur le sujet et que 13% seulement des candidats montrent de bonnes connaissances. A l'évidence, cette partie sur l'ontogenèse devait aborder des aspects anatomiques et cellulaires. Les premiers sont les mieux connus et plusieurs copies font état du tube et des crêtes neurales. Quelques unes, plus rares, font état de la migration des neurones et des facteurs de guidage. Aucune en revanche, ne discute de la morphologie du cône de croissance. Cette question méritait d'être abordée car la différenciation dont il est l'objet lorsqu'il atteint sa cible permet d'introduire l'importance des relations neurone-cible.

Si peu de candidats se sont aventurés dans la description du développement du système nerveux, nombreux sont ceux qui ont largement évoqué sa structure définitive sous l'angle anatomique et de la diversité cellulaire. Le titre du sujet justifie une telle description puisqu'il précise que la mort cellulaire est un élément de la mise en place des fonctions du SNC, donc des circuits neuronaux et des structures qui les abritent. Il convenait toutefois de ramener cette partie à l'objet du sujet. De trop nombreuses copies oublient ce pré-requis et se contentent d'une description plus ou moins exhaustive. Le jury tient à rappeler que l'évaluation d'un devoir repose sur les connaissances du candidat mais aussi sur la manière dont il les met en valeur. Par exemple, il est justifié de décrire le système visuel si, comme l'on fait certains candidats, celui-ci est exploité pour montrer le rôle de la mort neuronale dans cette fonction. A contrario, une telle présentation devient inutile si elle n'est pas exploitée dans cet esprit. D'une manière générale, les candidats négligent la recherche d'une démarche logique dans la construction de leur devoir. Nombreux sont ceux qui pensent à présenter dans l'introduction les arguments justifiant le plan qu'ils comptent suivre mais oublient par la suite, de conserver cette façon de procéder. En conséquence, les différents chapitres sont trop souvent sans lien avec la question posée.

Le jury a souligné plus haut comment ces maladroites ont affaibli l'intérêt des chapitres consacrés à la description du SNC. Le chapitre consacré à la mort neuronale souffre souvent du même défaut. Le lien entre la mort neuronale et une fonction du SNC est souvent sous-entendu. Les mécanismes cellulaires de la mort neuronale et en particulier de l'apoptose sont souvent décrits en détails. Le jury exprime toutefois son étonnement devant certaines copies qui ne traitent absolument pas ce sujet. S'il est concevable que les connaissances sur l'ontogenèse du SNC se limitent à l'essentiel, il est en revanche inconcevable que l'apoptose soit ignorée. Des exemples du rôle de l'apoptose lors du développement, et en particulier son rôle dans l'élaboration des inter-digitalations de la main sont souvent cités. Plusieurs copies extrapolent toutefois abusivement ce phénomène en considérant qu'il est à l'origine de la forme du cerveau et de la présence de circonvolutions. S'il est vrai que l'apoptose sculpte le cerveau en développement, les mécanismes mis en jeu sont très différents. A cet égard plusieurs candidats se perdent dans des conclusions douteuses ou exprimées de manière maladroite en affirmant que la mort neuronale a pour but de « faire tenir » les neurones dans la boîte crânienne. S'il est juste d'affirmer que la taille du cortex cérébral est contrôlée, il est abusif de lier ce contrôle à des contraintes de place. C'est oublier l'adaptation permanente du contenu au contenant lors de l'évolution.

Les étapes conduisant à l'induction ou l'inhibition de l'apoptose sont nombreuses. Dans ce cadre, il est indispensable de mettre l'accent sur les différents facteurs, extrinsèques ou intrinsèques engageant le neurone ou toute cellule du système nerveux central dans une voie pro- ou anti-apoptotique. Une telle transition devait introduire le chapitre suivant consacré au rôle de l'apoptose dans la mise en place et le maintien des fonctions du SNC. La majorité des copies évoque le rôle de la voie extrinsèque dans la sélection des neurones fonctionnels. Plusieurs s'appuient sur des exemples liés au système visuel ou olfactif, plus rarement à l'innervation du muscle squelettique. Toutes insistent sur le rôle de la cible dans la sélection et plusieurs indiquent à cet égard ; le rôle des facteurs de croissance, et particulier de NGF mais, au grand étonnement du jury, aucun candidat ne s'est aventuré à décrire les voies de signalisation intracellulaires impliquées. Le nom d'une grande dame comme Rita Levi Montalcini n'est jamais cité, pas plus que ne l'est la nature des récepteurs impliqués. A l'évidence, cette omission déséquilibre le document. Il

n'est pas logique qu'une copie développe l'anatomie du SNC adulte en détails et par ailleurs néglige la description des mécanismes dépendants des facteurs de croissance alors que ces derniers sont directement impliqués dans la survie des neurones, comme cela a été démontré dans le système nerveux sympathique.

Plusieurs copies évoquent la balance entre prolifération et mort neuronale et soulignent l'importance des erreurs de la réplication de l'ADN dans l'induction de la voie proapoptotique intrinsèque. Il est regrettable que la description de cette voie intrinsèque et son rôle fonctionnel n'aient pas été l'objet d'un chapitre clairement individualisé. Les candidats attribuent à cette voie un rôle de protection contre la prolifération des cellules tumorales. En revanche, il n'est souvent qu'implicitement admis que la sélection neuronale chez *C. Elegans* ou le renouvellement cellulaire dans le bulbe olfactif procèdent par l'intermédiaire de cette voie. Il en est de même du rôle de l'apoptose lors de la prolifération des cellules neuroépithéliales ou lors de la neurogenèse. Ces deux étapes sont décrites dans plusieurs copies sans que pour autant, l'intervention de la mort neuronale ne soit clairement décrite. Une vague d'apoptose précoce a pourtant été démontrée.

Beaucoup de devoirs abordent les aspects pathologiques mais aucun ne présente ou même ne suggère l'existence de pathologies liées au développement du SNC. En revanche, de nombreuses copies évoquent un lien entre maladies de neurodégénérescence et apoptose. Cette approche se défend car elle démontre que l'apoptose est un phénomène latent qui peut être activé à tout moment au cours de la vie du neurone. Il convenait toutefois d'éviter des affirmations trop tranchées. Il n'existe pas de pathologie où tous les neurones meurent par nécrose ou par apoptose mais la plupart du temps, les deux modes ainsi que des modes intermédiaires sont observés. Le jury note à cet égard des contradictions puisqu'il est possible de lire dans la même copie que l'inflammation ne se produit que lors de la nécrose et que la maladie d'Alzheimer se caractérise à la fois par une inflammation et de l'apoptose.

En résumé, le jury tient à souligner la nécessité de lire attentivement le sujet et de construire le plan du devoir sur une base logique. Il est évident qu'un tel travail ne peut porter ses fruits sans un niveau de connaissances satisfaisant. Le jury tient également à souligner l'importance qu'il accorde aux figures. Elles doivent être assez nombreuses et soutenir le texte. Concernant la forme, il est rappelé que la multiplication des fautes d'orthographe est sanctionnée, ainsi qu'une écriture illisible, défauts inadmissibles dans un exercice reposant sur une communication écrite.

ÉPREUVE PRATIQUE DE CHIMIE

Quelques aspects des communautés bactériennes

Sujet proposé par Établi par

Jeanne-Laure Dormieux, Erwan Beauvineau et Xavier Bataille

Introduction

| | |
|--|----|
| A. Partie expérimentale | 15 |
| A.1. Dosage d'une solution de glucose par la méthode des ajouts dosés | 15 |
| A.2. Titration de l'EDTA du kit Glucose RTU TM | 16 |
| A.3. Titration acido-basique du kit Glucose RTU TM | 16 |
| A.4. Tests de spécificité du kit Glucose RTU TM | 16 |
| A.5. Etude expérimentale de l'étape de formation du chromogène | 16 |
| A.5.1. Test au peroxyde d'hydrogène | 16 |
| A.5.2. Test au peroxydisulfate | 16 |
| B. Exploitation des résultats | 16 |
| B.1. Dosage d'une solution de glucose par la méthode des ajouts dosés | 16 |
| B.2. Titration de l'EDTA du kit Glucose RTU TM | 17 |
| B.3. Titrations acido-basiques du kit Glucose RTU TM | 17 |
| B.4. Tests de spécificité du kit Glucose RTU TM | 18 |
| B.5. Etude expérimentale de l'étape de formation du chromogène | 18 |
| B.5.1. Test au peroxyde d'hydrogène | 18 |
| B.5.2. Test au peroxydisulfate | 18 |
| B.5.3. Analyses par CLHP | 18 |
| C. Etude du kit Glucose RTU TM | 19 |
| C.1. Chimie structurale | 19 |
| C.2. Thermodynamique | 20 |
| C.3. Cinétique enzymatique | 20 |
| C.3.1. Etude de la cinétique de la réaction | 20 |
| C.3.2. Application : dosage d'un des constituants du kit | 20 |
| C.4. Chimie organique | 21 |
| C.4.1. Etude de la glucose oxydase | 21 |
| C.4.2. Etude du chromogène | 25 |
| C.4.3. Etude de la peroxydase | 26 |
| Données | 27 |
| Annexe 1 – Balayage spectral (400-800 nm) du chromogène | 29 |
| Annexe 2 – Simulations à l'aide du logiciel Dozzaqueux© | 30 |
| Annexe 3 – Analyses par CLHP | 31 |
| Mélange glucose oxydase et peroxydase | 31 |
| Kit RTU TM | 31 |
| Kit RTU TM + glucose (après 20 minutes) | 32 |
| Analyse tridimensionnelle du chromatogramme Kit RTU TM + glucose après 20 minutes | 32 |
| Annexe 4 – Cinétique enzymatique I | 33 |
| Annexe 5 – Cinétique enzymatique II | 34 |
| Annexe 6 – Site actif de la glucose oxydase | 35 |
| Données de Sécurité sur les produits utilisés | 36 |
| Phrases R&S (risque et sécurité) | 37 |
| Feuille de résultats | 39 |

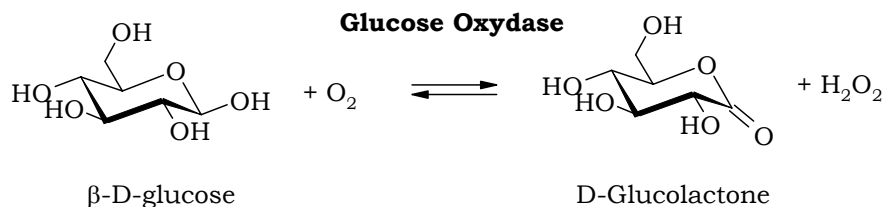
ANALYSE D'UN KIT DE DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLUCOSE

L'augmentation du nombre de personnes atteintes du diabète ainsi que la nécessité de doser le glucose dans les industries alimentaires ont banalisé l'utilisation des kits de dosage enzymatique. Nous allons nous intéresser à la composition de l'un de ces kits, le kit Glucose RTU™ bioMérieux® : le but de cette épreuve est donc de retrouver les teneurs des différents constituants du kit fournies par la notice et d'essayer, dans la mesure du possible, de justifier la composition choisie par le fabricant. Voici les indications fournies par la notice :

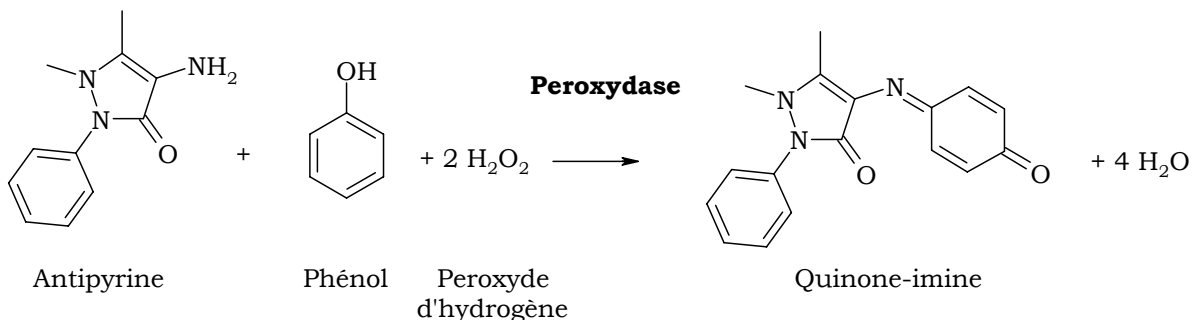
| | |
|-------------------|----------------------------|
| Tampon Phosphate | 225 mmol.L ⁻¹ |
| 4-aminoantipyrine | 0,3 mmol.L ⁻¹ |
| Phénol | 8,5 mmol.L ⁻¹ |
| EDTA | 5 mmol.L ⁻¹ |
| Peroxydase | > 300 U.L ⁻¹ |
| Glucose oxydase | > 10 000 U.L ⁻¹ |

La détermination de la concentration en glucose par le kit se fait par spectrophotométrie d'absorption moléculaire. En effet, lors de l'ajout du kit, deux réactions successives se produisent.

La première consiste à oxyder le glucose par l'oxygène dissous, réaction catalysée par la présence de glucose oxydase¹ :



La deuxième étape consiste à générer un chromogène. Le peroxyde d'hydrogène produit lors de la première étape réagit en présence de 4-aminoantipyrine (4-amino-1,5-diméthyl-2-phényl-4-pyrazolin-3-one) et de phénol pour donner une molécule colorant la solution, la quinone-imine :



L'attention des candidats est attirée sur la toxicité de certains des produits manipulés. Les phrases « Risque et Sécurité » des produits sont annexées au sujet et répertoriées dans les données. Les résultats expérimentaux seront consignés dans la feuille de résultats fournie en annexe.

A. Partie expérimentale

A.1. Dosage d'une solution de glucose par la méthode des ajouts dosés

Il s'agit ici de réaliser le dosage d'une solution de glucose (S) à environ 0,6 g.L⁻¹ sachant qu'est fournie une solution étalon de glucose notée (E) à exactement 1,000 g.L⁻¹. Contrairement aux protocoles traditionnels, la procédure adoptée ici sera la méthode des ajouts dosés. Préparer 5 cuves selon le tableau suivant :

| Cuve | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------------|----|----|----|----|----|
| V _(S) / μL | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |

¹ La glucose oxydase est un homodimère.

| | | | | | |
|-----------------------|------|------|------|------|------|
| $V_{(E)}/\mu\text{L}$ | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| V_{RTU}/mL | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |

$V_{(S)}$: volume de solution (S) ; $V_{(E)}$: volume de solution (E) ; V_{RTU} : volume de kit Glucose RTU™

Pour chaque cuve, recouvrir de parafilm®, agiter et laisser reposer pendant 20 minutes. Mesurer les absorbances à la longueur d'onde déterminée à partir du spectre d'absorption fourni en *annexe 1*. On préparera un blanc approprié.

A.2. Titrage de l'EDTA du kit Glucose RTU™

Prélever 5,00 mL du kit et ajouter 5 mL de tampon acétique pH = 5,5. Ajouter une pointe de spatule d'orangé de xylénol. Doser la solution obtenue par la solution de sulfate de zinc à 2,5 mmol.L⁻¹. Soit V_{Zn} le volume de solution titrante versé à l'équivalence. Réaliser deux dosages concordants.

A.3. Titrage acido-basique du kit Glucose RTU™

Prélever 5,00 mL du kit et réaliser le dosage pH-métrique de cette solution par une solution d'acide chlorhydrique à exactement 50 mmol.L⁻¹.

A.4. Tests de spécificité du kit Glucose RTU™

A partir de solutions de mannose et de galactose, toutes deux de concentrations environ égales à 1g.L⁻¹, réaliser des tests qualitatifs afin de conclure sur la spécificité du Glucose RTU™. Il est possible d'utiliser une cuve contenant du glucose comme témoin.

A.5. Etude expérimentale de l'étape de formation du chromogène

Afin d'explicitier le rôle des enzymes présentes dans le kit, quelques tests simples sont réalisés.

A.5.1. Test au peroxyde d'hydrogène

Préparer deux cuves : dans l'une, placer 30 μL de solution de glucose à 1 g.L⁻¹ (soit 5,6 mmol.L⁻¹) et dans l'autre 30 μL de peroxyde d'hydrogène à 5,6 mmol.L⁻¹. Ajouter alors dans chacune de ces cuves 1 mL de kit, en commençant par celle contenant le glucose. *Ces deux additions doivent être rapides et quasi-simultanées.*

A.5.2. Test au peroxodisulfate

Placer dans une cuve 30 μL de solution de peroxodisulfate ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) à 5,6 mmol.L⁻¹ puis ajouter 1 mL de kit.

Tout autre essai pouvant être réalisé à l'aide des produits dont vous disposez peut être envisagé. Ces essais supplémentaires, non obligatoires, ne seront réalisés qu'après validation par le jury.

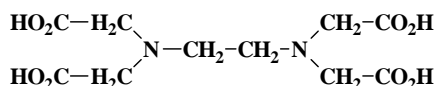
B. Exploitation des résultats

B.1. Dosage d'une solution de glucose par la méthode des ajouts dosés

29. Expliquer le principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-visible. Quelle précaution aurait-on dû respecter si le dosage avait été réalisé à 250 nm ?
30. Quels sont les avantages de la méthode des ajouts dosés comparé à la méthode de la gamme d'étalonnage traditionnelle ?
31. Justifier le choix de la composition de la cuve de référence (« blanc »).
32. Calculer la concentration massique en glucose provenant de la solution étalon (E) dans chacune des cuves (notée ρ_{Ei} pour la cuve i).
33. Montrer que la mesure de l'absorbance permet d'accéder à la concentration en glucose.
34. Exprimer la loi de Beer-Lambert en supposant qu'à la longueur d'onde de travail, seule la quinone-imine absorbe le rayonnement. Donner les unités de chacun des termes de cette expression ainsi que ses conditions de validité.
35. Montrer que cette expression peut se mettre sous la forme $A_i = a \cdot \rho_{Ei} + b$.
36. Tracer la courbe $A_i = f(\rho_{Ei})$ et en déduire la concentration en glucose dans la solution (S).

B.2. Titrage de l'EDTA du kit Glucose RTU™

37. En n'utilisant que les produits et matériels fournis et disposés sur la paillasse, proposer un mode opératoire permettant d'étalonner la solution de sulfate de zinc : réactifs, conditions opératoires (technique(s) employée(s), volume(s) prélevé(s) etc.), résultats attendus (volume(s) d'équivalence prévu(s) et exploitation (changement(s) de coloration, allure de la (des) courbe(s) etc.). **Ne pas réaliser la manipulation.**
38. L'EDTA (noté H_4Y) ou acide éthylènediaminetétraacétique dont la structure est donnée ci-dessous est un hexaacide.

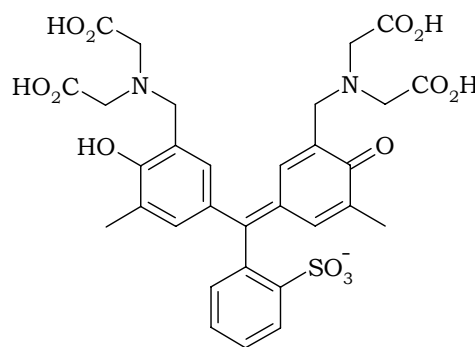


Tracer un diagramme indiquant les domaines de prédominance de l'EDTA (on utilisera les notations abrégées comme H_4Y).

39. Donner la structure de l'entité moléculaire présente majoritairement à $\text{pH} = 5,5$ (pH du dosage).
40. Ecrire l'équation de la réaction de titrage et calculer sa constante thermodynamique d'équilibre.

Conclure sur le rôle du tampon.

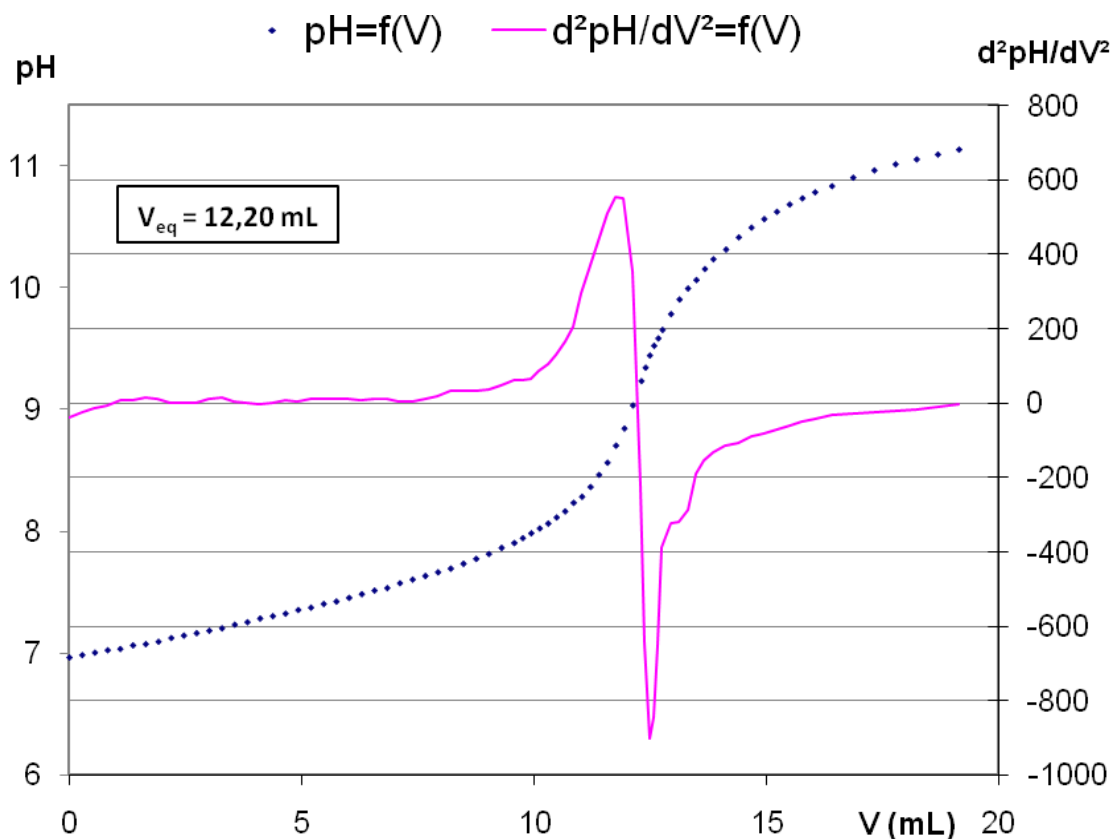
41. Expliquer le rôle de l'orangé de xylénol dont la formule est représentée ci-contre et justifier les conditions opératoires.
42. Calculer la concentration en EDTA dans le kit glucose RTU™ et conclure.



B.3. Titrages acido-basiques du kit Glucose RTU™

43. Quelles sont les espèces dosées lors de ce titrage ? Justifier l'allure de la courbe obtenue (l'annexe 2 fournit des courbes simulées du dosage pour aider à l'interprétation).
44. Déduire du pH initial la proportion d'hydrogénophosphate et de dihydrogénophosphate de la solution tampon.
45. Conclure sur le résultat expérimental obtenu en cherchant à interpréter la différence entre le volume d'équivalence obtenu et celui simulé (cf. annexe 2).

La même prise d'essai de kit a été dosée par une solution de soude (hydroxyde de sodium à 50 mmol.L^{-1}) La courbe obtenue a été reproduite ci-dessous :



46. Quelles sont les espèces dosées lors de ce titrage ?
47. Comparer ces résultats à ceux fournis dans l'annexe 2 et à ceux obtenus lors du dosage par l'acide chlorhydrique. Que peut-on en conclure ?

B.4. Tests de spécificité du kit Glucose RTU™

48. Analyser les observations et conclure.

B.5. Etude expérimentale de l'étape de formation du chromogène

B.5.1. Test au peroxyde d'hydrogène

49. La solution d'eau oxygénée à $5,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ a été réalisée à partir de la solution commerciale à 30% en masse ($d = 1,11$). Calculer la concentration de la solution commerciale et en déduire le volume à prélever pour préparer 250 mL de la solution à $5,6 \text{ mmol.L}^{-1}$.
50. Justifier le choix de cette concentration.

51. Que peut-on conclure sur les vitesses relatives des deux réactions mises en jeu lors de l'analyse par le kit ?

B.5.2. Test au peroxodisulfate

52. Que peut-on déduire des observations des manipulations A.5.1. et A.5.2. ?
53. Justifier l'excès de phénol.

B.5.3. Analyses par CLHP

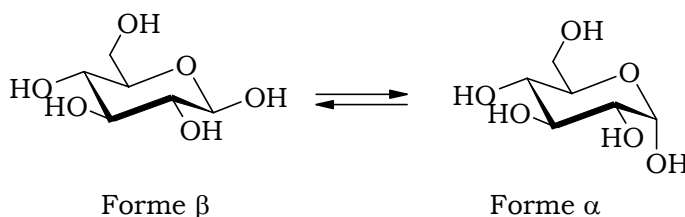
54. A l'aide de l'annexe 3, déterminer à partir des quatre chromatogrammes fournis quel est le temps de rétention du chromogène et justifier.

C. Etude du kit Glucose RTU™

C.1. Chimie structurale

L'effet anomère

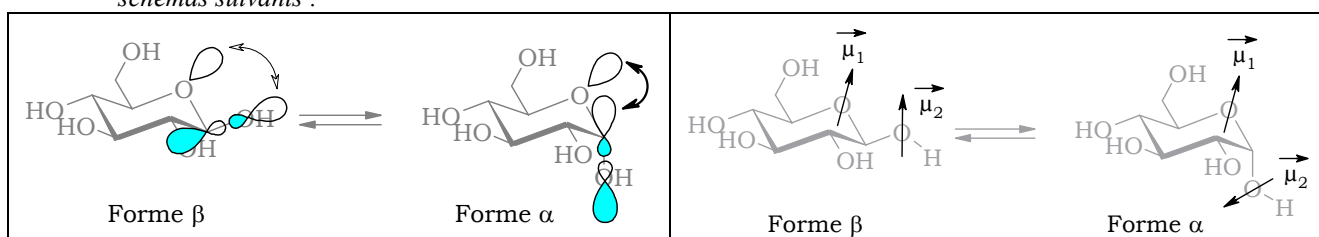
Le glucose existe sous deux formes cycliques et une forme linéaire. Les deux formes cycliques sont appelés α -D-glucopyranose et β -D-glucopyranose.



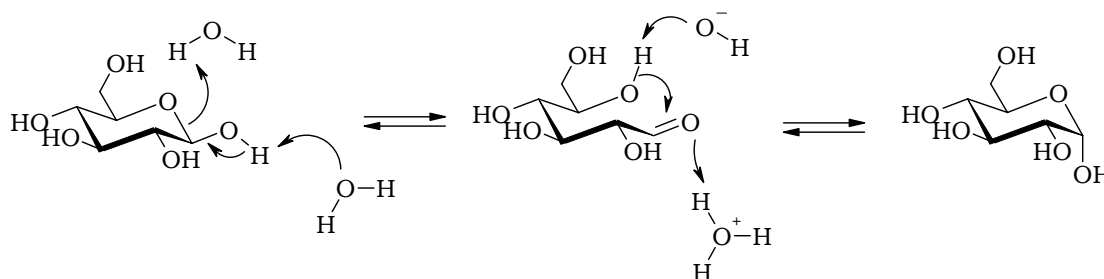
56. S'agit-il d'un équilibre conformationnel ou configurationnel ?

La proportion d' α -D-glucose est à 25°C de 36% et celle de β -D-glucose de 64%.

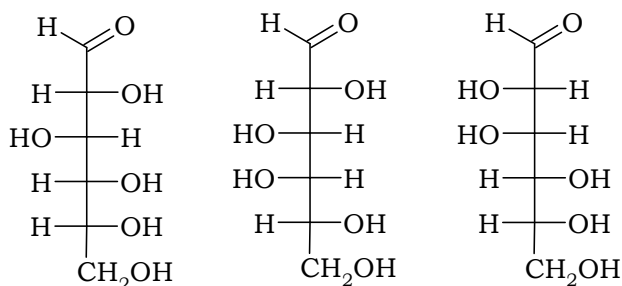
57. Expliquer ce qu'est l'effet anomère et justifier les proportions des deux épimères. On pourra s'aider des schémas suivants :



58. Le mécanisme de cet équilibre peut être décrit par le schéma ci-dessous, dans l'eau pure. Expliquer de quel type de réaction il s'agit. Proposer un catalyseur pour cette réaction en justifiant votre choix.



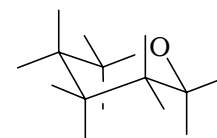
59. Les représentations de Fischer de trois sucres (D-glucose, D-galactose et D-mannose) sont données ci-dessous. Représenter sur la base du motif « chaise » ci-dessous, le α -D-galactopyranose et le β -L-mannopyranose.



D-glucose

D-galactose

D-mannose

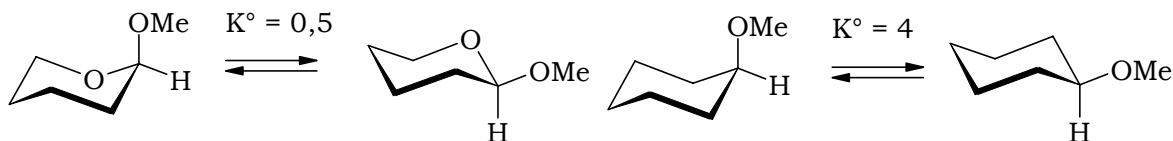


Représentation chaise

60. Dessiner en structure de Lewis les molécules de dioxygène et de peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle.

C.2. Thermodynamique

61. A partir des données fournies dans le schéma ci-dessous, déduire les proportions des deux formes axiales et équatoriales et interpréter.

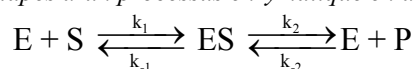


62. Les proportions en solution aqueuse à 25°C d' α -D-glucose et de β -D-glucose sont respectivement de 36% et de 64%. A l'aide des données suivantes : $\Delta_f H^\circ(\alpha\text{-D-glucose}, s) = -1274,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. $\Delta_f H^\circ(\beta\text{-D-glucose}, s) = -1268,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, calculer l'entropie libre standard de l'équilibre d'anomérisation du glucose et conclure. On supposera que les enthalpies standards de solvation sont les mêmes pour les deux anomères.

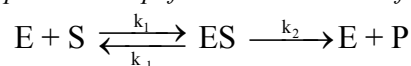
C.3. Cinétique enzymatique

C.3.1. Etude de la cinétique de la réaction

On peut modéliser de façon simple les étapes d'un processus enzymatique en deux étapes selon :



où E représente l'enzyme, S le substrat (ici, le glucose), ES le complexe intermédiaire enzyme-substrat, P le(s) produit(s) de la réaction et k_i les constantes de vitesse des réactions associées. D'après les travaux de L. Michaelis (1875-1949), M. Menten (1879-1960) en 1913 puis de G.E. Briggs (1893-1985) et J.B.S. Haldane (1892-1965) en 1925, le processus de la catalyse enzymatique peut être simplifié et modélisé de la façon suivante :



Cette simplification de l'étude repose sur deux hypothèses : la seconde réaction est irréversible, l'équilibre de la formation du complexe ES est très rapide devant la deuxième étape.

63. Pourquoi raisonne-t-on sur les vitesses initiales ?

64. En appliquant l'AEQS (Approximation des Etats Quasi-Stationnaires) à l'espèce ES , montrer que $\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$. On appelle cette grandeur la **constante de Michaelis** et on la notera K_M par la suite.

65. On appelle v_i , la vitesse initiale de formation du produit P et v_{\max} la vitesse initiale d'une réaction enzymatique pour un milieu saturé en substrat. Montrer que l'on peut écrire $v_i =$

$$\frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}, \text{ soit ici } v_i = \frac{v_{\max} C_{gluc}}{K_m + C_{gluc}}.$$

66. La vitesse initiale de la réaction a été mesurée pour différentes valeurs de concentration en glucose (cf. annexe 4). Donner une méthode permettant d'obtenir expérimentalement la vitesse initiale de la réaction.

67. Expliquer en quoi les courbes obtenues confirment une cinétique michaelienne.

68. Quel est l'ordre de la réaction pour des faibles concentrations en glucose ? Pour des valeurs élevées ?

69. Calculer K_m . Comparer aux valeurs trouvées dans la littérature (entre 3 et 35 mM).

C.3.2. Application : dosage d'un des constituants du kit

Les essais suivants ont été réalisés :

| Essai n° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|----|----|----|-----|-----|-----|
| V(glucose) à 1,0 g.L ⁻¹ / μL | 60 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| V(kit) / mL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Dans l'**annexe 5**, sont présentées les courbes représentant l'évolution de l'absorbance des différents essais en fonction du temps.

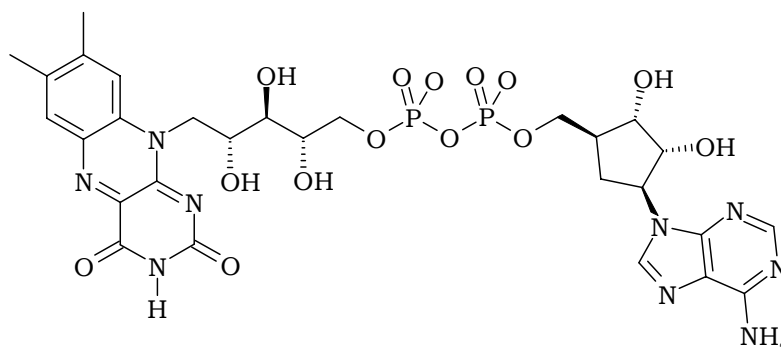
70. Quelle est l'influence de la concentration en glucose ?
71. Montrer en détaillant votre raisonnement que les courbes obtenues permettent d'obtenir un encadrement de la concentration de l'un des constituants du kit. Comparer à la valeur indiquée sur la notice.

C.4. Chimie organique

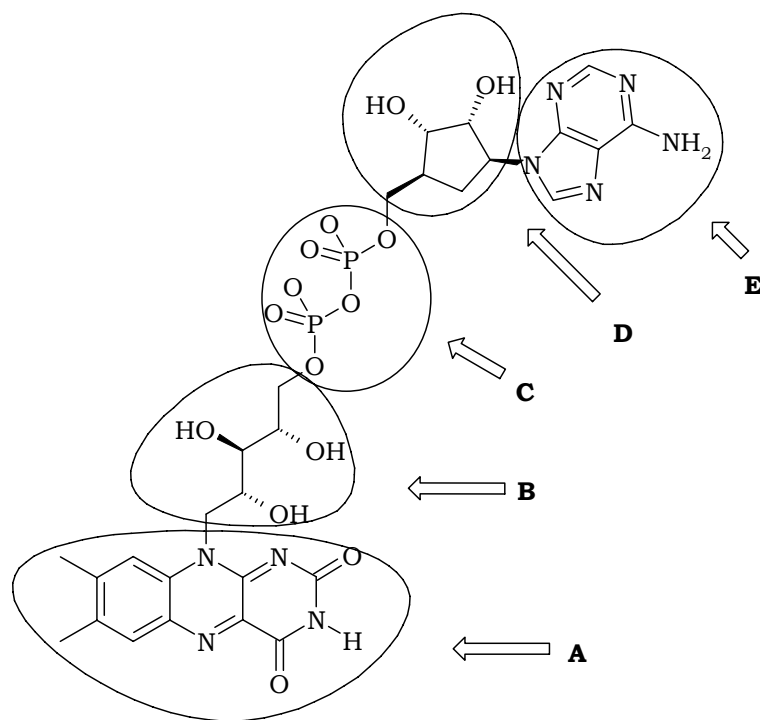
C.4.1. Etude de la glucose oxydase

72. La première étape enzymatique est cinétiquement déterminante. Proposer une explication sachant que la glucose oxydase est une enzyme spécifique de la forme β.
73. La D-glucolactone s'hydrolyse en gluconate en milieu basique. Ecrire l'équation et en proposer un mécanisme.

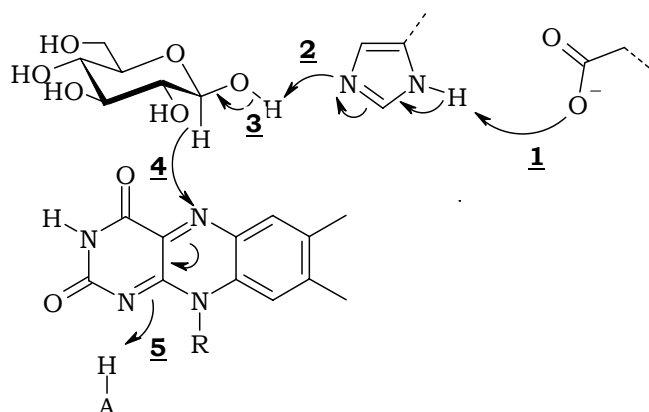
L'action oxydante de la glucose oxydase repose sur la présence à proximité du site actif de flavine adénine dinucléotide (FAD), dont la structure est représentée ci-contre.



74. Identifier la nature des 4 parties entourées **B**, **C**, **D** et **E** ci-dessous.

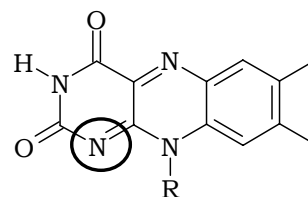


On notera désormais R, l'ensemble **BCDE**. Le mécanisme simplifié d'oxydation du glucose est le suivant :



75. Qualifier les différentes étapes (1, 2, 3, 4, et 5).

76. Sachant que le pK_A de l'atome d'azote entouré sur la figure-ci-contre est de 7, quelle doit être la valeur minimale ou maximale du pK_A du groupe A-H. Donner un exemple de ce que pourrait être le groupe A.



77. Donner les produits obtenus à l'issue des 5 étapes.

Une approche plus complète du mécanisme implique d'étudier le problème en trois dimensions. Vous trouverez en **annexe 6** une image tridimensionnelle de la poche du site actif. La référence du fichier utilisé est 1GAL, dont voici un extrait :

HEADER OXIDOREDUCTASE(FLAVOPROTEIN) 27-AUG-92 1GAL
 TITLE CRYSTAL STRUCTURE OF GLUCOSE OXIDASE FROM ASPERGILLUS
 TITLE 2 NIGER: REFINED AT 2.3 ANGSTROMS RESOLUTION
 COMPND 2 MOLECULE: GLUCOSE OXIDASE;
 KEYWDS OXIDOREDUCTASE(FLAVOPROTEIN)
 EXPDTA X-RAY DIFFRACTION
 AUTHOR H.J.HECHT,K.KALISZ,J.HENDLE,R.D.SCHMID,D.SCHOMBURG
 REVDAT 3 24-FEB-09 1GAL 1 VERSN
 REVDAT 2 01-APR-03 1GAL 1 JRNL

REVDAT 1 31-OCT-93 1GAL 0
 JRNL AUTH H.J.HECHT,H.M.KALISZ,J.HENDLE,R.D.SCHMID,
 JRNL AUTH 2 D.SCHOMBURG
 JRNL TITL CRYSTAL STRUCTURE OF GLUCOSE OXIDASE FROM
 JRNL TITL 2 ASPERGILLUS NIGER REFINED AT 2.3 A RESOLUTION.
 JRNL REF J.MOL.BIOL. V. 229 153 1993
 JRNL REFN ISSN 0022-2836
 JRNL DOI 10.1006/JMBI.1993.1015

DBREF 1GAL A 1 583 UNP P13006 GOX_ASPNG 23 605

```

SEQRES 1 A 583 SER ASN GLY ILE GLU ALA SER LEU LEU THR ASP PRO LYS
SEQRES 2 A 583 ASP VAL SER GLY ARG THR VAL ASP TYR ILE ILE ALA GLY
...
SEQRES 44 A 583 VAL MET THR VAL PHE TYR ALA MET ALA LEU LYS ILE SER
SEQRES 45 A 583 ASP ALA ILE LEU GLU ASP TYR ALA SER MET GLN
...
HETNAM NAG N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE
HETNAM BMA BETA-D-MANNOSE
HETNAM MAN ALPHA-D-MANNOSE
...
HETNAM FAD FLAVIN-ADENINE DINUCLEOTIDE
HETSYN NAG NAG
HELIX 1 H1 LEU A 29 LEU A 38 1 10
HELIX 2 H2 LYS A 116 THR A 124 1 9
...
HELIX 12 H12 LEU A 500 TYR A 506 1 7
HELIX 13 H13 MET A 561 SER A 581 1 21
SHEET 1 A 5 LEU A 242 LEU A 245 0

```

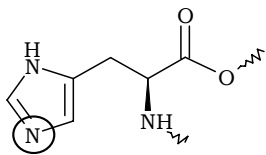
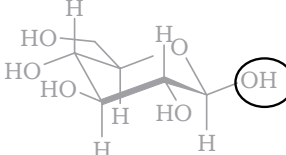
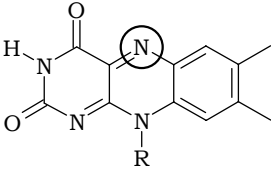
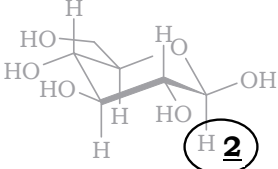
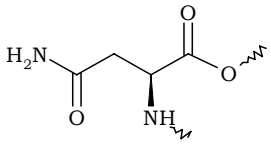
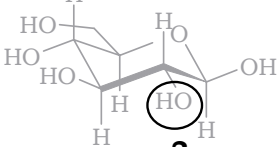
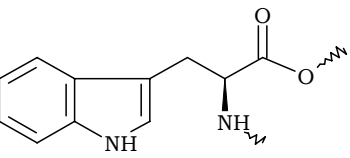
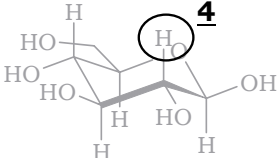
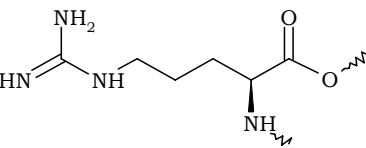
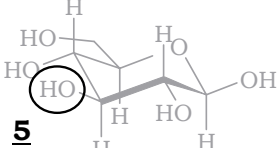
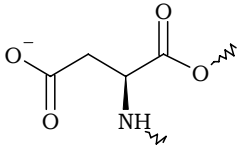
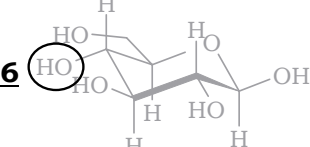
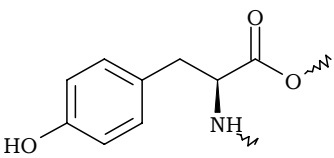
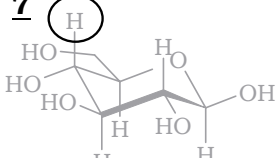
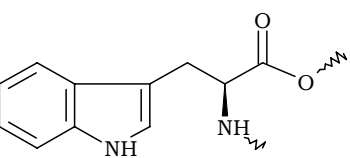
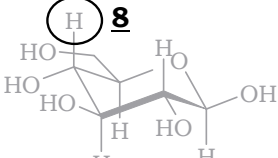
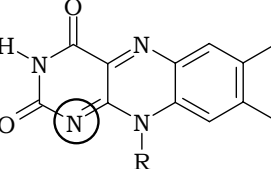
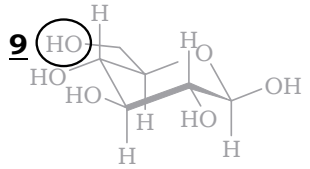
```

SHEET 2 A 5 VAL A 46 ILE A 49 1
...
SHEET 2 D 3 GLY A 434 ILE A 438 -1
SHEET 3 D 3 PHE A 448 ASP A 451 -1
SSBOND 1 CYS A 164 CYS A 206 1555 1555 2.00
ATOM 1 N GLY A 3 13.102 19.500 65.823 1.00 35.46 N
ATOM 2 CA GLY A 3 13.351 19.610 64.358 1.00 35.46 C
ATOM 3 C GLY A 3 13.672 18.235 63.779 1.00 35.46 C
...
ATOM 4450 OE1 GLN A 583 7.442 2.696 37.033 1.00 46.65 O
ATOM 4451 NE2 GLN A 583 9.225 1.750 37.945 1.00 46.65 N
ATOM 4452 OXT GLN A 583 8.472 -2.469 33.875 1.00 46.65 O
TER 4453 GLN A 583
HETATM 4454 C1 NAG A 601 54.665 -11.179 67.671 1.00 22.18 C
HETATM 4455 C2 NAG A 601 56.162 -10.925 67.435 1.00 22.18 C
...
HETATM 4774 O HOH A 854 25.305 8.570 67.444 1.00 18.73 O
HETATM 4775 O HOH A 855 51.233 28.502 64.810 1.00 30.78 O
END

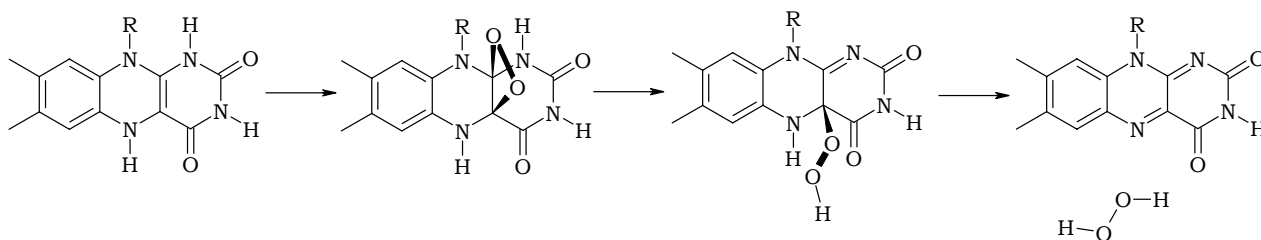
```

78. Qu'est-ce qu'un fichier pdb ? Avec quel logiciel le lit-on ? Sur quel site Internet peut-on en télécharger ?

79. Voici la liste des interactions observées entre le β -D-glucose et les acides aminés présents dans le site actif. Attribuer à chaque le type d'interaction mise en jeu :

| | Acides aminés ou coenzyme impliqué dans l'interaction | | Sites impliqués sur le glucose |
|----------|---|---|---|
| <u>1</u> | Histidines H516 et H559 |  |  |
| <u>2</u> | Atome d'azote du FAD |  |  |
| <u>3</u> | Asparagine N514 |  |  |
| <u>4</u> | Tryptophane W426 |  |  |
| <u>5</u> | Asparagine N514 et Arginine R512 |  |  |
| <u>6</u> | Aspartate D424 |  |  |
| <u>7</u> | Tyrosine Y68 |  |  |
| <u>8</u> | Tryptophane W426 |  |  |
| <u>9</u> | Atome d'azote du FAD |  |  |

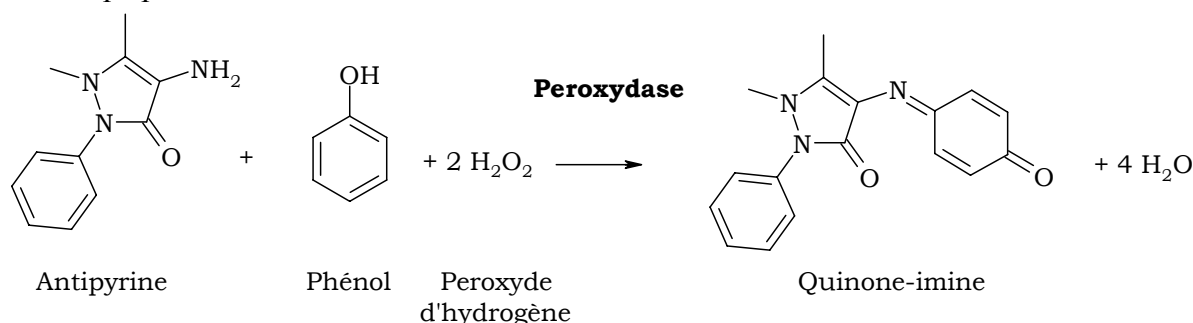
Suite à l'oxydation du glucose, la $FADH_2$ est régénérée en FAD en présence de dioxygène selon le mécanisme suivant :



80. Proposer un mécanisme réactionnel pour ces différentes étapes.

C.4.2. Etude du chromogène

La deuxième réaction consiste à réaliser la synthèse de la quinone-imine par couplage entre la 4-aminoantipyrine et le phénol en milieu oxydant, ici en présence du peroxyde d'hydrogène généré lors de l'étape précédente :

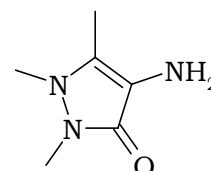


81. Quelle est l'étymologie d'antipyrine ?

82. Expliquer le nom de quinone-imine.

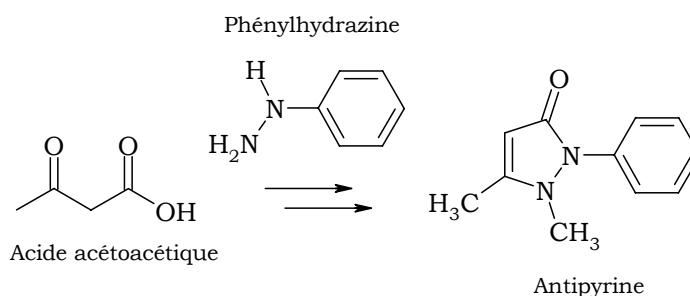
83. Expliquer pourquoi l'antipyrine est incolore alors que la quinone-imine est colorée.

84. La structure de l'antipyrine est basée sur le cycle ci-contre. Ce cycle est-il aromatique ?



La première synthèse du squelette « antipyrine » date de 1883 et est due au chimiste allemand Ludwig Knorr (1859-1921). Sa synthèse reposait sur la condensation de la phénylhydrazine et de l'acide acétoacétique. Knorr croyait avoir synthétisé un dérivé de la quinine car le produit, la phénazone avait des propriétés fébrifuges. La phénazone prit le nom commercial d'antipyrine et fut commercialisée par la Société Hoechst. Elle constituera dans les années 1885 le premier médicament de synthèse² à apporter de très substantiels bénéfices à l'entreprise qui la commercialisait.

85. Proposer des conditions de synthèse de la phénazone à partir de phénylhydrazine et de l'acide acétoacétique (on pourra commencer par une réaction d'estérification)



² L'aspirine ne fut commercialisée par Bayer qu'en 1899.

C.4.3. Etude de la peroxydase

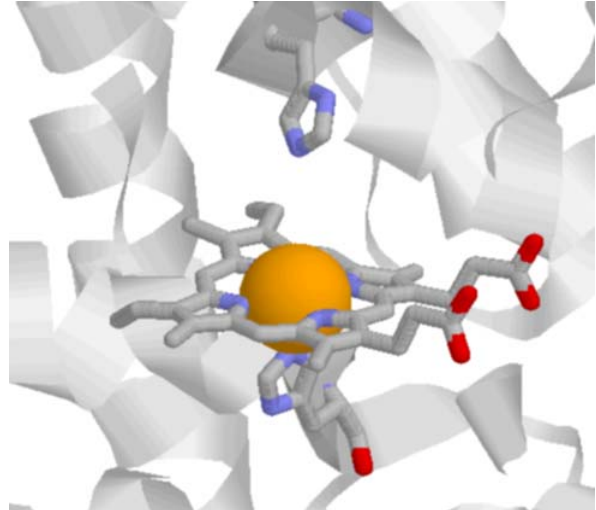
La peroxydase utilisée a une masse de 44174 Da.

86. Donner la définition du Dalton.

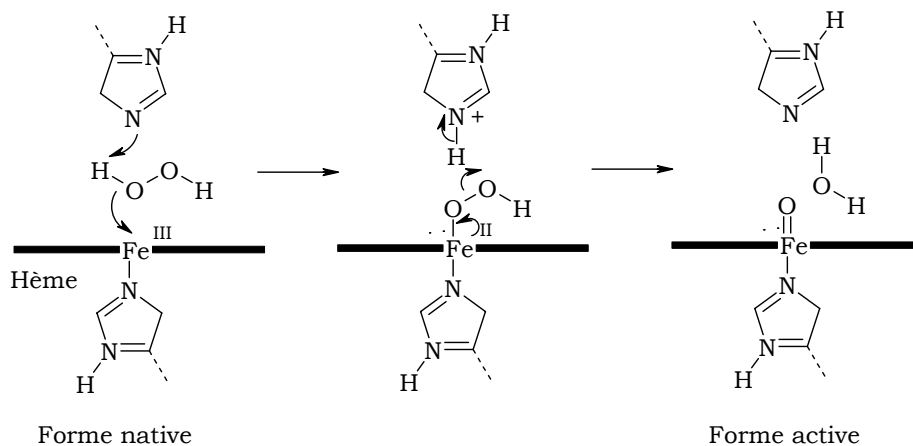
87. Sachant que la peroxydase présente en surface une moyenne de 17 sites protonables, quelle serait l'allure du spectre de masse de cette enzyme ionisée par Electro-nébulisation (Electrospray Ionization Mass Spectroscopy : ESI-MS)?

Le site actif de la peroxydase repose sur un hème ou porphyrine ou cycle tétrapyrrolique.

88. Citer des exemples de sites actifs impliquant des porphyrines. Préciser dans chaque cas la nature de l'ion métallique et du ligand.



Dans une première étape, l'ion fer(III) subit une attaque de la part du peroxyde d'hydrogène selon :



89. Quel est le nombre d'oxydation de l'atome de fer dans la forme active ?

Données

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

Masses molaires

Glucose : $180,0 \text{ g.mol}^{-1}$
 H_2O_2 : $34,0 \text{ g.mol}^{-1}$
Monomère de glucose oxydase : 80 kg.mol^{-1}

Constantes globales de formation à 298 K

Complexe ZnY^{2-} : $\log \beta_1 = 16,3$
Complexe Zinc-orangé de xylénol : $\log \beta_1 = 6,1$ (couleur pourpre)

Couleurs de l'orangé de xylénol libre en solution aqueuse

Jaune | Violet
—————→ pH
6

Potentiels standards

$E^\circ(\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = 1,7 \text{ V}$
 $E^\circ(\text{S}_2\text{O}_8^{2-}/\text{SO}_4^{2-}) = 2,0 \text{ V}$

Produits de solubilité à 298 K

$\text{pK}_s(\text{Zn}(\text{OH})_2) = 17,2$

Constantes d'acidité à 298 K

H_3PO_4 $\text{pK}_A : 2,2 ; 7,2 ; 12,1$
 $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ $\text{pK}_A : 4,8$
EDTA (H_4Y) $\text{pK}_A : 1 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,7 ; 6,4 ; 10,2$
Phénol $\text{pK}_A = 10,0$

Loi de Kohlrausch :

$$\sigma = \sum_i \lambda_i(1/|z_i|) C_i |z_i| \approx \sum_i \lambda_i^\circ(1/|z_i|) C_i |z_i|$$

Avec :

| | | |
|----------------------------|---|--|
| σ | : | conductivité ionique de l'électrolyte |
| $ z_i $ | : | valeur absolue du nombre de charge de l'ion i |
| C_i | : | concentration de l'ion i |
| $\lambda_i(1/ z_i)$ | : | conductivité molaire ionique par mole de charge |
| $\lambda_i^\circ(1/ z_i)$ | : | conductivité molaire ionique par mole de charge limite |

Conductivités molaires ioniques équivalentes (ou par mole de charge) limites à 298 K

| | Oxonium | Hydroxyde | Sodium | Zinc(II) | Sulfate |
|--|---------|-----------|--------|----------|---------|
| $\lambda^\circ(1/ z_i) / \text{mS.m}^2.\text{mol}^{-1}$ | 35,0 | 19,9 | 5,0 | 5,3 | 8,0 |

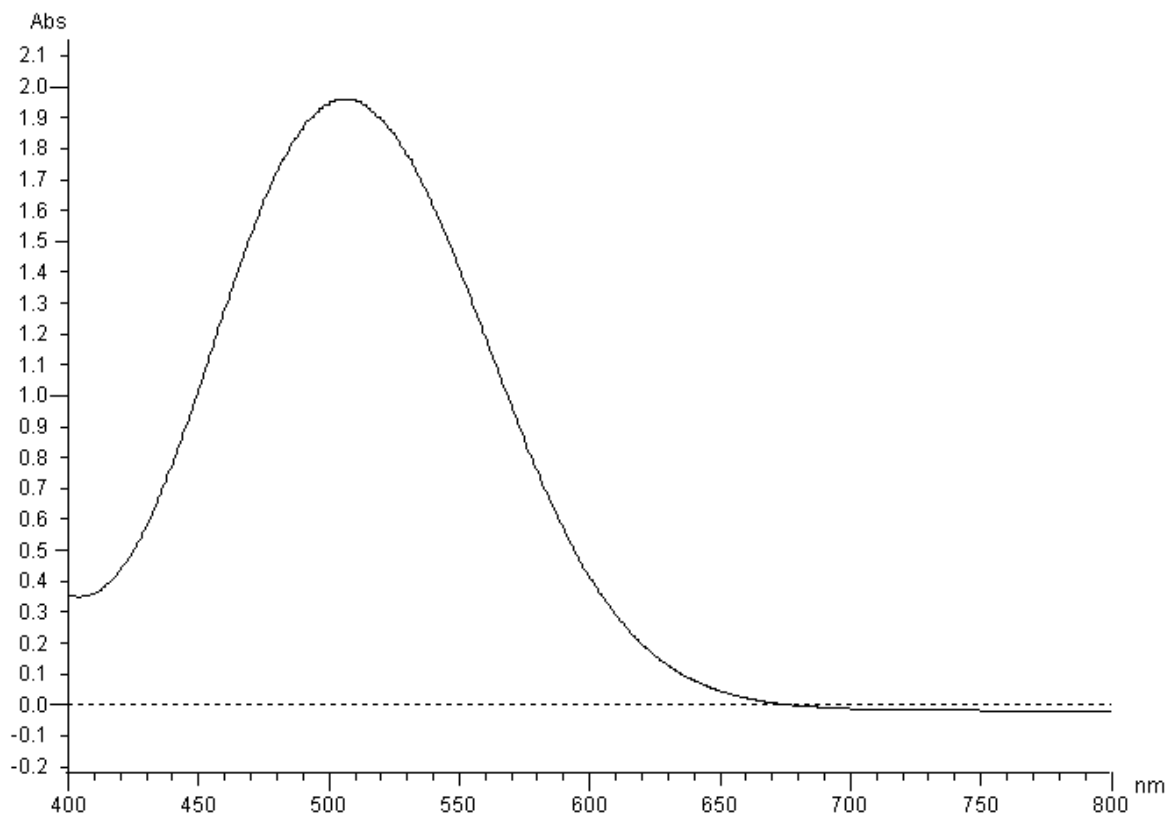
Constante des gaz parfaits :

$$R = 8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$$

Extrait de la classification périodique des éléments

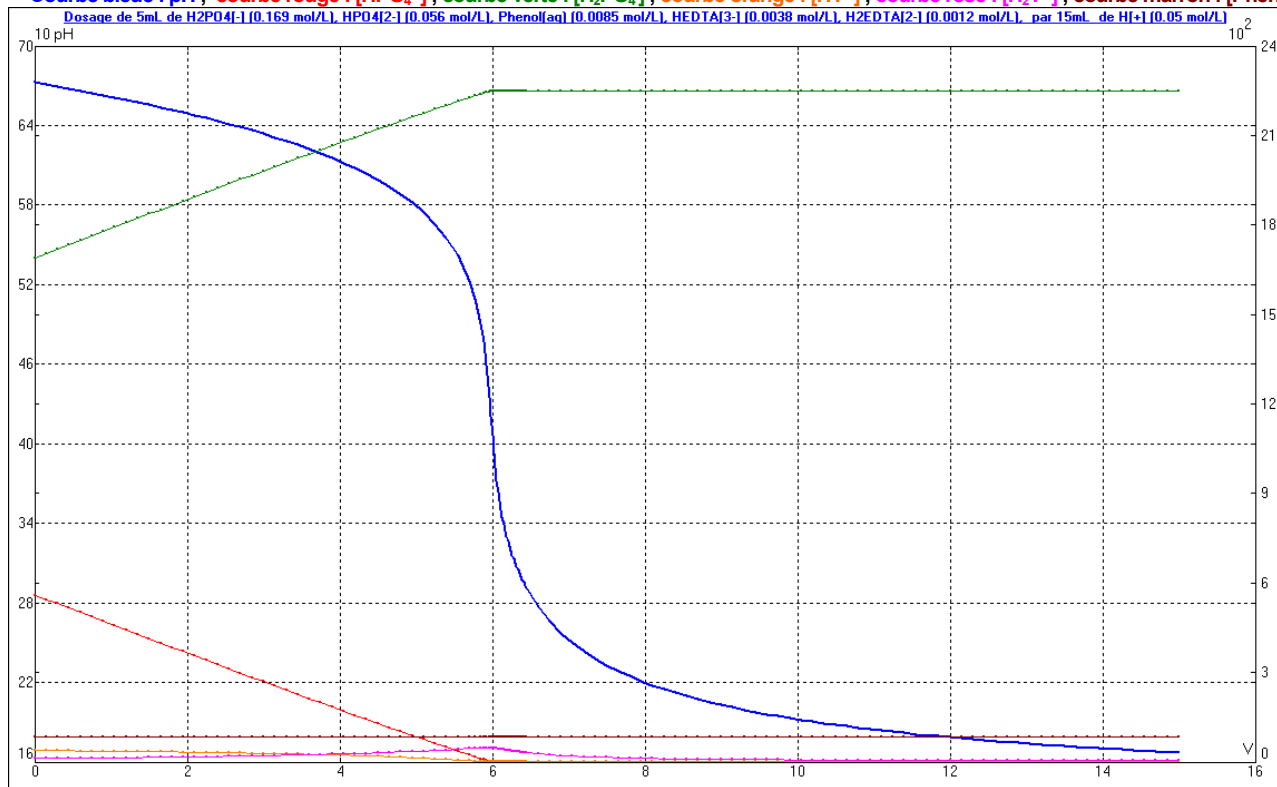
| | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | | | | | | |
| H | | | | He | | | | | | | |
| Li | Be | | | | | | | | | | |
| B | C | N | O | F | Ne | | | | | | |
| Na | Mg | |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

Annexe 1 – Balayage spectral (400-800 nm) du chromogène

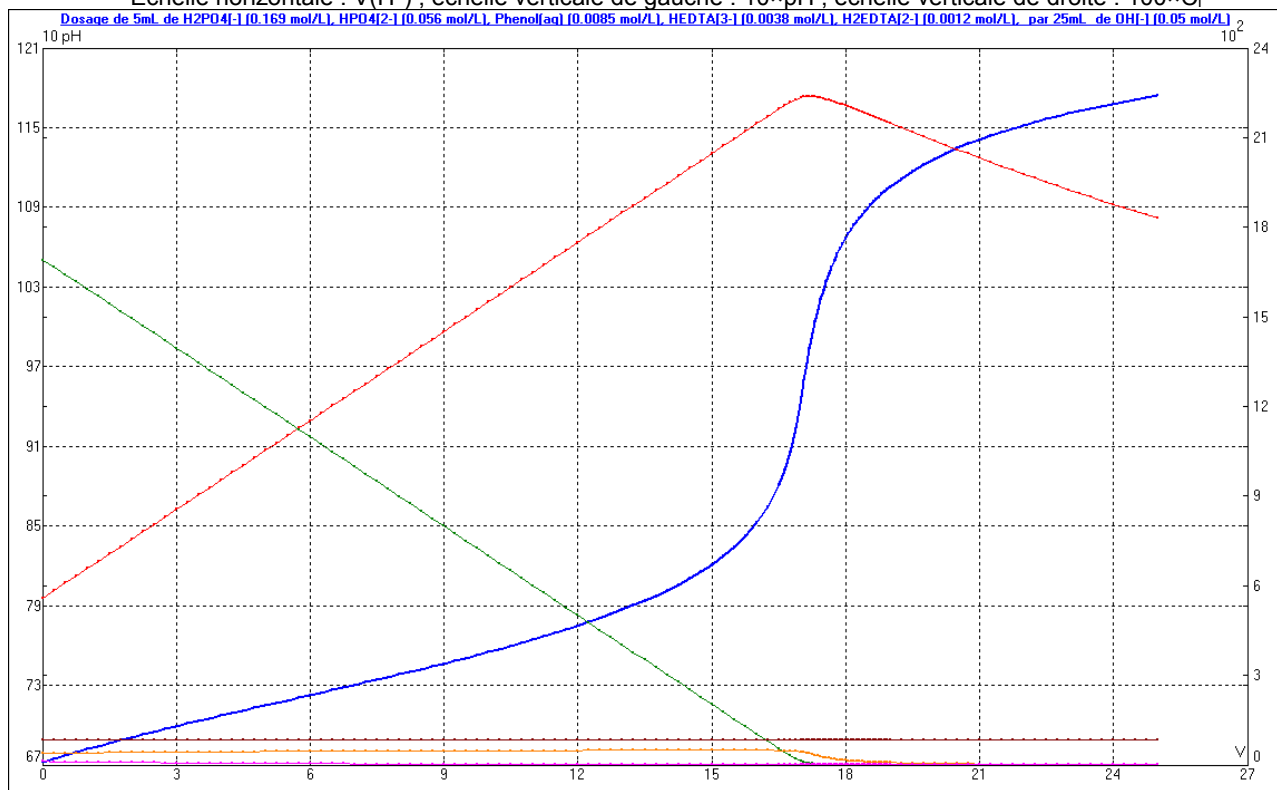


Annexe 2 – Simulations à l'aide du logiciel Dozzaqueux©

Courbe bleue : pH ; courbe rouge : $[HPO_4^{2-}]$; courbe verte : $[H_2PO_4^-]$; courbe orange : $[HY^3]$; courbe rose : $[H_2Y^{2-}]$; courbe marron : [Phénol]



Echelle horizontale : $V(H^+)$; échelle verticale de gauche : $10 \times pH$; échelle verticale de droite : $100 \times C_i$

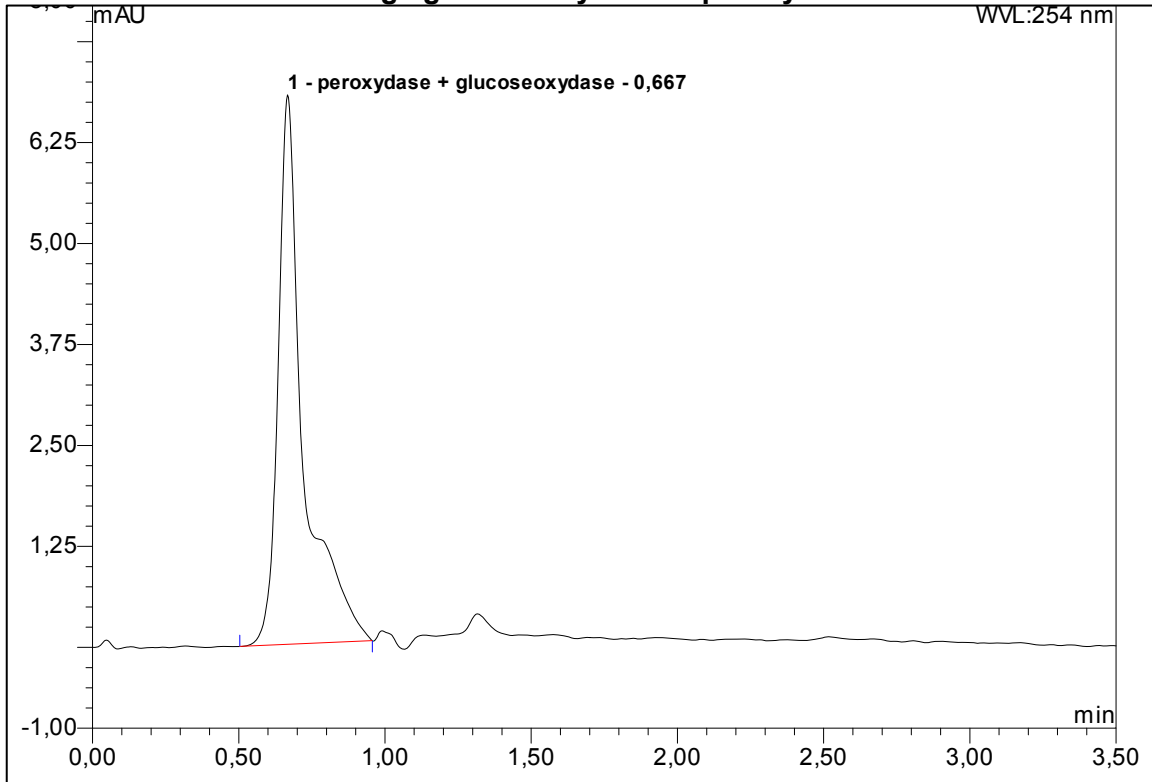


Echelle horizontale : $V(OH^-)$; échelle verticale de gauche : $10 \times pH$; échelle verticale de droite : $100 \times C_i$

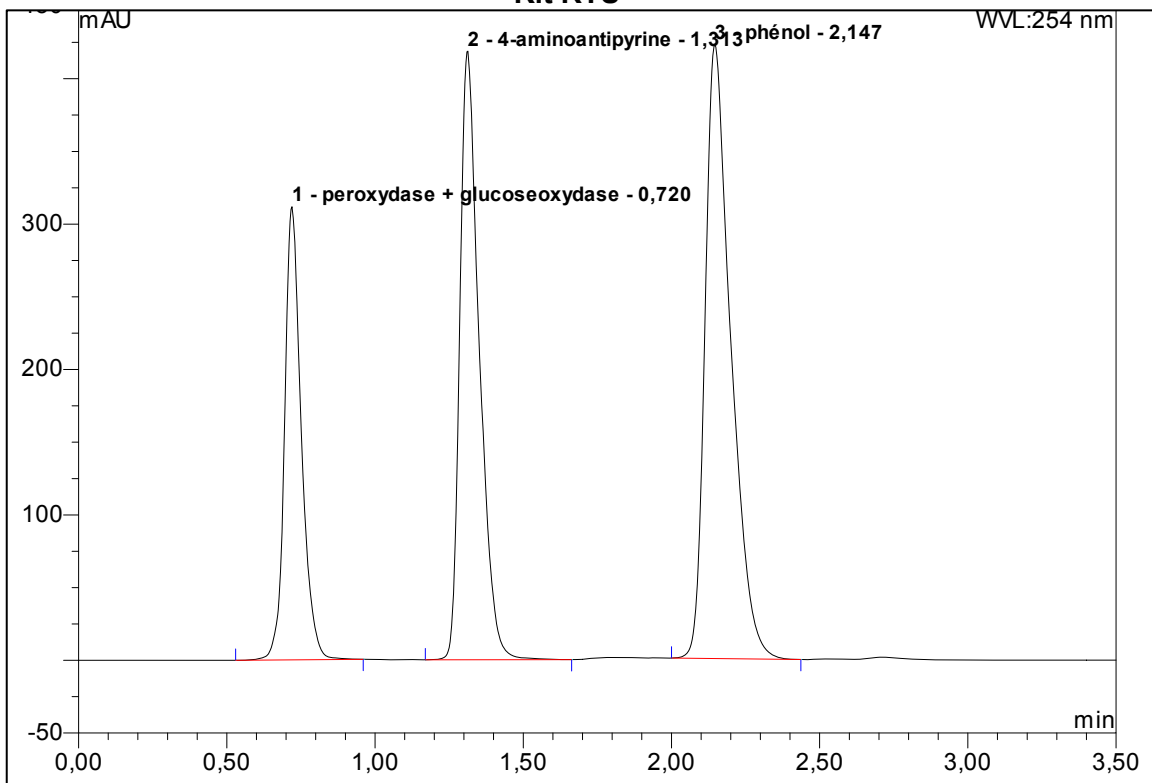
Annexe 3 – Analyses par CLHP

Conditions : colonne Gémini C18 ; 150×4,6 ; 5µm ; eau/CH₃CN 45/35 ; 2 mL.min⁻¹ ; P = 130 bar ; T = 30°C.

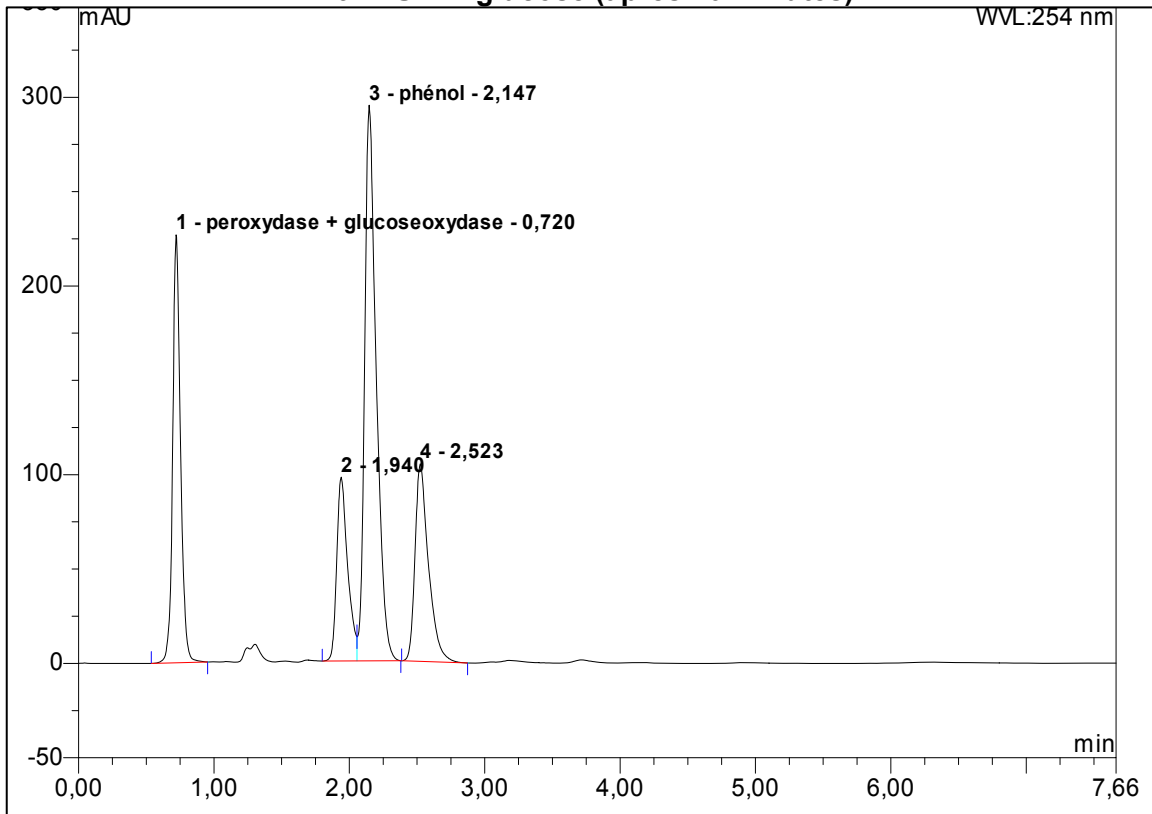
Mélange glucose oxydase et peroxydase



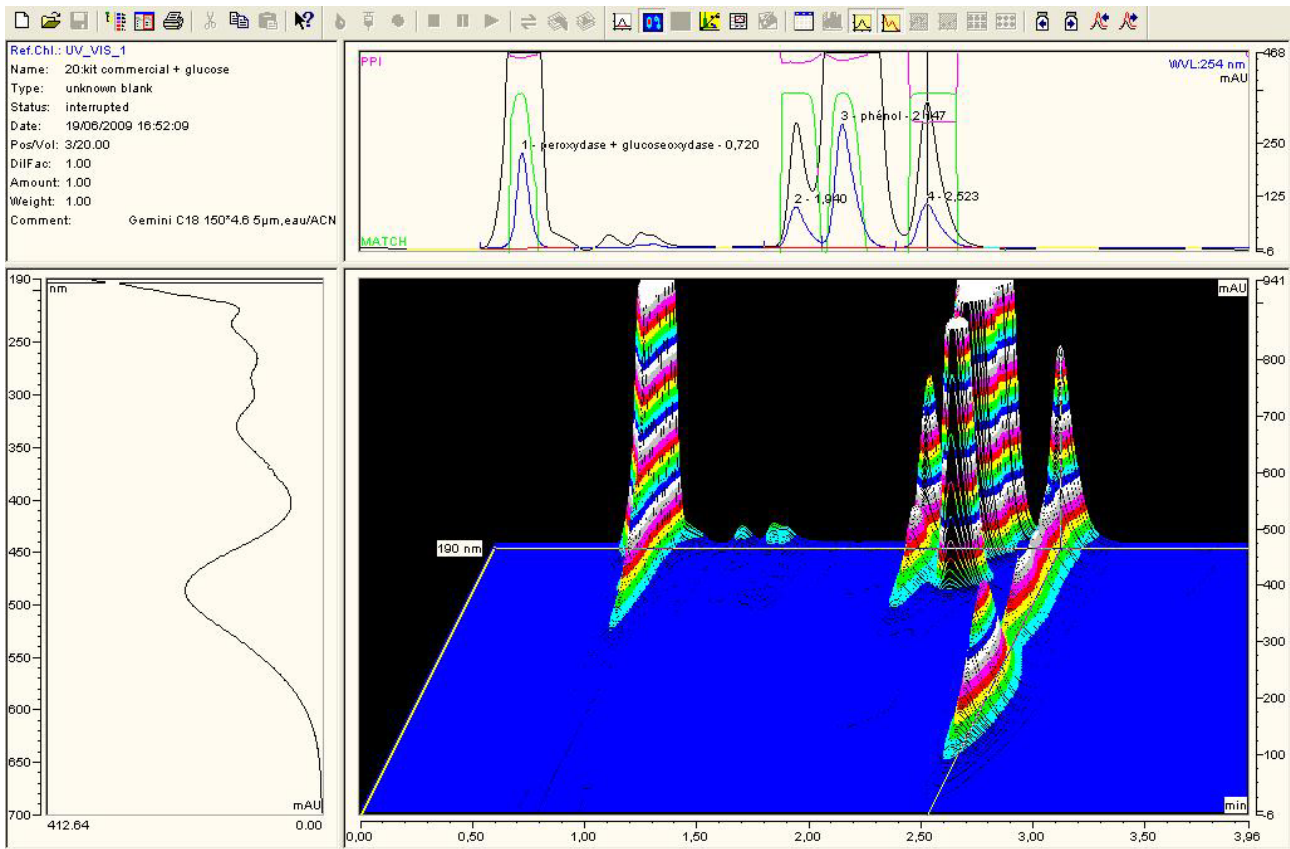
Kit RTU™



Kit RTU™ + glucose (après 20 minutes)



Analyse tridimensionnelle du chromatogramme Kit RTU™ + glucose après 20 minutes



Annexe 4 – Cinétique enzymatique I

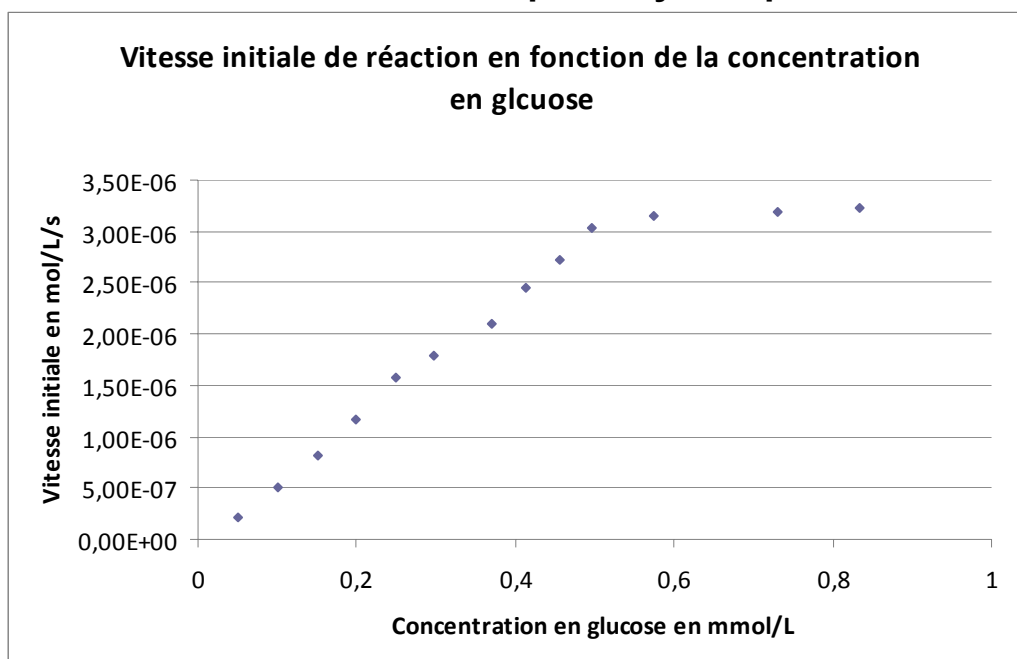


Figure 1 : Vitesse initiale en fonction de la concentration de glucose en mmol.L^{-1}

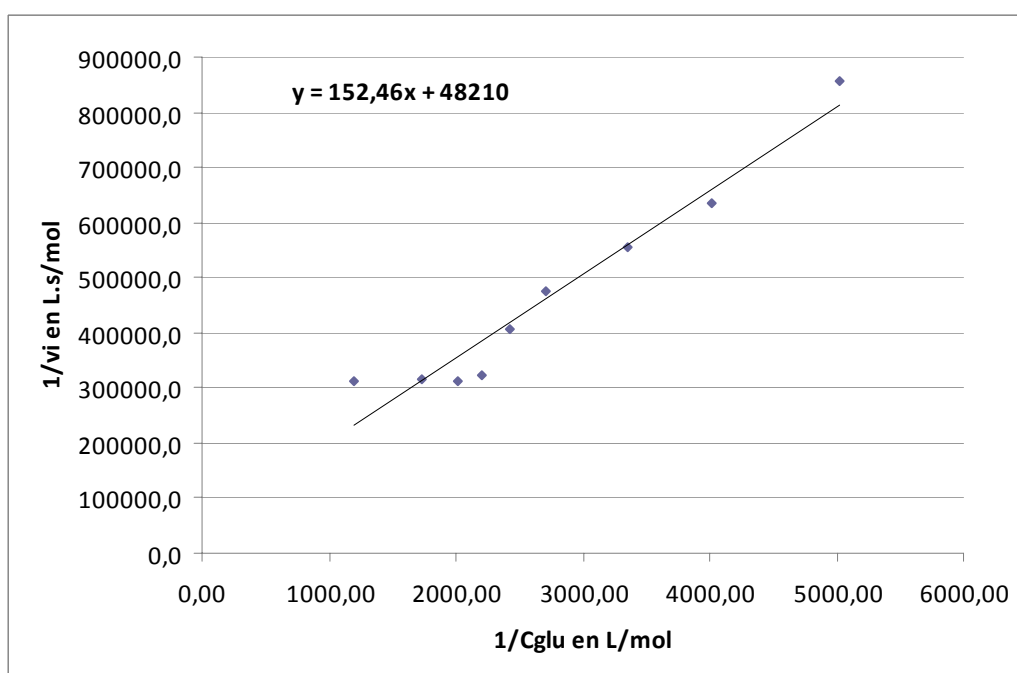
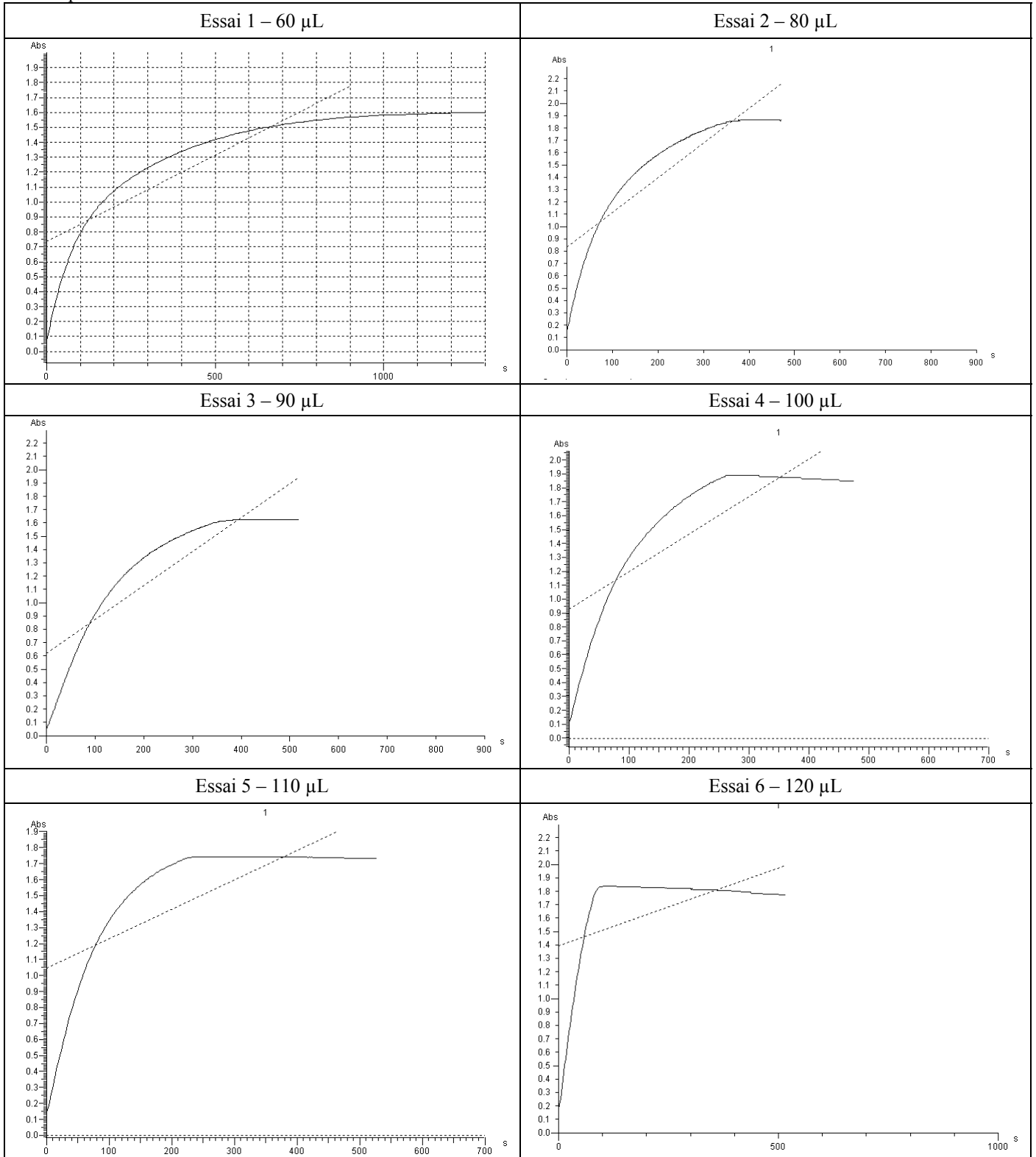


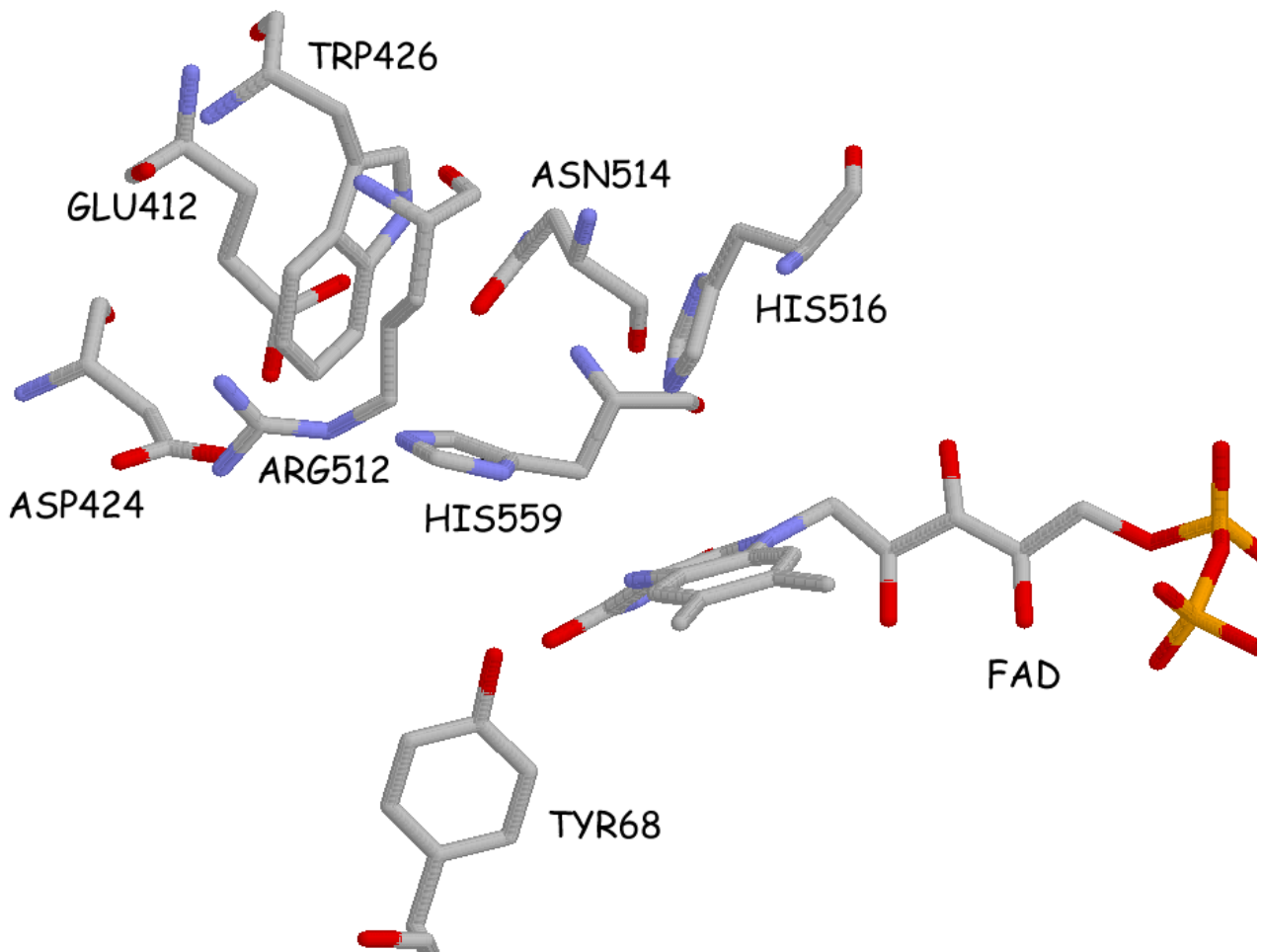
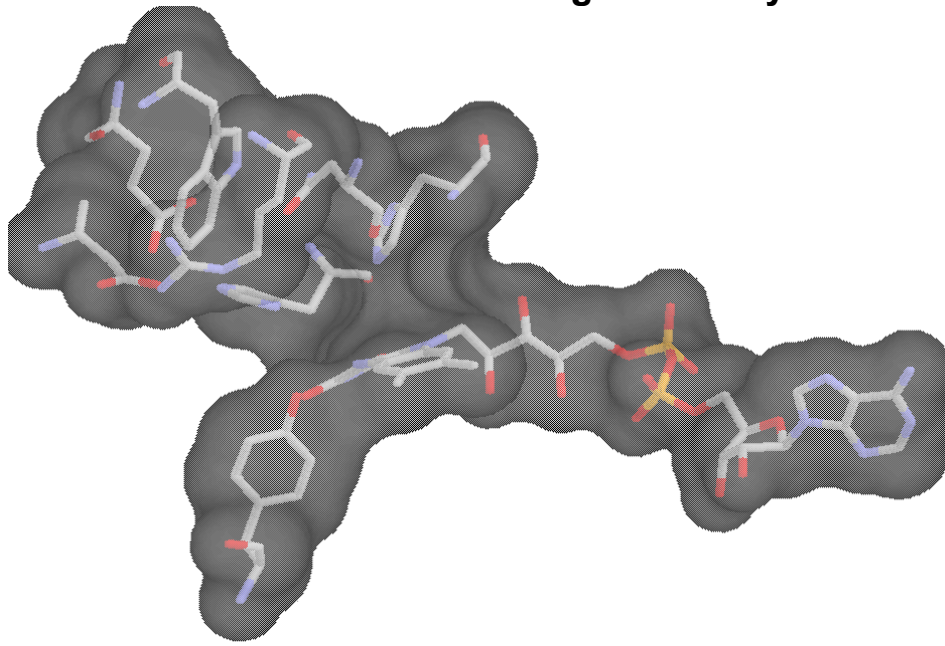
Figure 2 : $\frac{1}{v_i}$ en fonction de $\frac{1}{C_{gluc}}$

Annexe 5 – Cinétique enzymatique II










Les courbes suivantes représentent l'absorbance de cuves contenant : V_X μL de glucose + 1 mL de kit RTUTM en fonction du temps



Annexe 6 – Site actif de la glucose oxydase



Données de Sécurité sur les produits utilisés

| Produit | Sécurité | | |
|--|---|--------------------------------|--|
| Kit RTU Biomerieux™ |  | Nocif | |
| Solution de sulfate de zinc |  | Dangereux pour l'environnement | R:51/53 S:61 |
| Soude à 0,003 mol.L ⁻¹ et 0,05 mol.L ⁻¹ |  | Irritant | R:36/38 S:26-37/39 |
| Tampon pH = 5,5 |  | Irritant | - |
| Tampon ammoniacal pH= 10 |  | Irritant | S:23-24/25 |
| Orangé de xylénol |  | Nocif | S:26-37/39 |
| Solution de peroxodisulfate de sodium à 5,6 mmol.L ⁻¹ |  | Nocif Irritant | R:22-41 S:17-26-28(eau)-36/37/39-45 |
| Solution d'eau oxygénée à 5,6 mmol.L ⁻¹ |  | Nocif Irritant | R:22-41 S:17-26-28(eau)-36/37/39-45 |
| 4-aminoantipyrine |  | Nocif | R:22-36/37/38 S:26-36 |

Phrases R&S (risque et sécurité)

1. Phrases de risques R

| | |
|-----|---|
| R1 | Explosif à l'état sec |
| R2 | Risque d'explosion par le choc, la friction, le feu ou d'autres sources d'ignition. |
| R3 | Grand risque d'explosion par le choc, la friction, le feu ou d'autres sources d'ignition. |
| R4 | Forme des composés métalliques très sensibles. |
| R5 | Danger d'explosion sous l'action de la chaleur. |
| R6 | Danger d'explosion en contact ou sans contact avec l'air. |
| R7 | Peut provoquer un incendie. |
| R8 | Favorise l'inflammation des matières combustibles. |
| R9 | Peut exploser en mélange avec des matières combustibles. |
| R10 | Inflammable |
| R11 | Facilement inflammable |
| R12 | Extrêmement inflammable |
| R13 | Gaz liquéfié extrêmement inflammable |
| R14 | Réagit violemment au contact de l'eau |
| R15 | Au contact de l'eau dégage des gaz extrêmement inflammables |
| R16 | Peut exploser en mélange avec des substances comburantes |
| R17 | Spontanément inflammable à l'air |
| R18 | Lors de l'utilisation, formation possible de mélange va peur/air inflammable/explosif |
| R19 | Peut former des peroxydes explosifs |
| R20 | Nocif par inhalation |
| R21 | Nocif par contact avec la peau |
| R22 | Nocif en cas d'ingestion |
| R23 | Toxique par inhalation |
| R24 | Toxique par contact avec la peau |
| R25 | Toxique en cas d'ingestion |
| R26 | Très toxique par inhalation |
| R27 | Très toxique par contact avec la peau |
| R28 | Très toxique en cas d'ingestion |
| R29 | Au contact de l'eau dégage des gaz toxiques |
| R30 | Peur devenir facilement inflammable pendant l'utilisation |
| R31 | Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique |
| R32 | Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique |
| R33 | Danger d'effets cumulatifs |
| R34 | Provoque des brûlures |
| R35 | Provoque de graves brûlures |
| R36 | Irritant pour les yeux |
| R37 | Irritant pour les voies respiratoires |
| R38 | Irritant pour la peau |
| R39 | Danger d'effets irréversibles très graves |
| R40 | Effet cancérigène suspecté - preuves insuffisantes |
| R41 | Risque de lésions oculaires graves |
| R42 | Peut entraîner une sensibilisation par inhalation |
| R43 | Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau |
| R44 | Risque d'explosion si chauffé en ambiance confinée |
| R45 | Peut causer le cancer |
| R46 | Peut causer des altérations génétiques héréditaires |
| R47 | Peut causer des malformations congénitales |
| R48 | Risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée |
| R49 | Peut causer le cancer par inhalation |
| R50 | Très toxique pour les organismes aquatiques |
| R51 | Toxique pour les organismes aquatiques |
| R52 | Nocif pour les organismes aquatiques |
| R53 | Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique |
| R54 | Toxique pour la flore |
| R55 | Toxique pour la faune |
| R56 | Toxique pour les organismes du sol |
| R57 | Toxique pour les abeilles |
| R58 | Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement |
| R59 | Dangereux pour la couche d'ozone |
| R60 | Peut altérer la fertilité |
| R61 | Risques pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant |
| R62 | Risque possible d'altération de la fertilité |
| R63 | Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant |
| R64 | Risque possible pour les bébés nourris au lait maternel |
| R65 | Nocif, peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion. |
| R66 | L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau |
| R67 | L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges. |
| R68 | Possibilité d'effets irréversibles |

2. Conseils de prudence S

- S1 Conserver sous clé
- S2 Conserver hors de la portée des enfants
- S3 Conserver dans un endroit frais
- S4 Conserver à l'écart de tout local d'habitation
- S5 Conserver sous ... (liquide approprié à spécifier par le fabricant)
- S6 Conserver sous ... (gaz inerte à spécifier par le fabricant)
- S7 Conserver le récipient bien fermé
- S8 Conserver le récipient à l'abri de l'humidité
- S9 Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé
- S12 Ne pas fermer hermétiquement le récipient
- S13 Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux
- S14 Conserver à l'écart des ... (matières incompatibles à indiquer par le fabricant)
- S15 Conserver à l'écart de la chaleur
- S16 Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles - Ne pas fumer
- S17 Tenir à l'écart des matières combustibles
- S18 Manipuler et ouvrir le récipient avec prudence
- S20 Ne pas manger et ne pas boire pendant l'utilisation
- S21 Ne pas fumer pendant l'utilisation
- S22 Ne pas respirer les poussières
- S23 Ne pas respirer les gaz / vapeurs / fumées / aérosols (termes appropriés à indiquer par le fabricant)
- S24 Eviter le contact avec la peau
- S25 Eviter le contact avec les yeux
- S26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste
- S27 Enlever immédiatement tout vêtement souillé ou éclaboussé
- S28 Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec (produits appropriés à indiquer par le fabricant)
- S29 Ne pas jeter les résidus à l'égout
- S30 Ne jamais verser de l'eau dans ce produit
- S33 Eviter l'accumulation des charges électrostatiques
- S35 Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes précautions d'usage
- S36 Porter un vêtement de protection approprié
- S37 Porter des gants appropriés
- S38 En cas de ventilation insuffisante, porter un appareil respiratoire approprié
- S39 Porter un appareil de protection des yeux / du visage
- S40 Pour nettoyer le sol ou les objets souillés par ce produit, utiliser (à préciser par le fabricant)
- S41 En cas d'incendie et/ou d'explosion, ne pas respirer les fumées
- S42 Pendant les fumigations / pulvérisations, porter un appareil respiratoire approprié (termes appropriés à indiquer par le fabricant)
- S43 En cas d'incendie, utiliser ... (moyens d'extinction à préciser par le fabricant. Si l'eau augmente les risques, ajouter "Ne jamais utiliser d'eau")
- S45 En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)
- S46 En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette
- S47 Conserver à une température ne dépassant pas ... °C (à préciser par le fabricant)
- S48 Maintenir humide avec ... (moyen approprié à préciser par le fabricant)
- S49 Conserver uniquement dans le récipient d'origine
- S50 Ne pas mélanger avec ... (à préciser par le fabricant)
- S51 Utiliser seulement dans des zones bien ventilées
- S52 Ne pas utiliser sur de grandes surfaces dans les locaux habités
- S53 Eviter l'exposition - se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation
- S56 Eliminer ce produit et son récipient dans un centre de collecte de déchets dangereux ou spéciaux
- S57 Utiliser un récipient approprié pour éviter toute contamination du milieu ambiant
- S59 Consulter le fabricant / fournisseur pour des informations relatives à la récupération / au recyclage
- S60 Eliminer le produit et le récipient comme un déchet dangereux
- S61 Eviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales / la fiche de données de sécurité
- S62 En cas d'ingestion, ne pas faire vomir : consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette
- S63 En cas d'accident par inhalation, transporter la victime hors de la zone contaminée et la garder au repos
- S64 En cas d'ingestion, rincer la bouche avec de l'eau (seulement si la personne est consciente).

Feuille de résultats

Nom :

Prénom :

Numéro de poste :

A.1. Dosage d'une solution de glucose par la méthode des ajouts dosés

Coefficient de variation de la méthode : $CV = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{Valeur cible}} = 2\%$. Intervalle de validation : ± 2 écarts-types.

| Cuve | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------|---|---|---|---|---|
| A | | | | | |

Pente : $a =$

Ordonnée à l'origine : $b =$

$b/a =$

$C_{(S)} =$ \pm mmol.L⁻¹

A.2. Titrage de la l'EDTA du kit Glucose RTU™

Coefficient de variation de la méthode : $CV = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{Valeur cible}} = 0,8\%$. Intervalle de validation : ± 2 écarts-types.

$V_{Zn,1} =$ mL

$V_{Zn,2} =$ mL

$C_{EDTA} =$ \pm mmol.L⁻¹

A.3 Titration de l'acidité du kit Glucose RTU™

$V_{H^+} =$ mL

Rapport sur l'épreuve de travaux pratiques de chimie

Rapport établi par Jeanne-Laure Dormieux, Erwan Beauvineau et Xavier Bataille

Le thème retenu cette année était l'analyse d'un kit de dosage enzymatique du glucose. Dans le cadre de ce sujet, plusieurs dosages devaient être effectués :

1. la détermination d'une concentration en glucose en utilisant le kit, par spectrophotométrie d'absorption moléculaire (méthode des ajouts dosés),
2. un titrage acido-basique suivi par pH-métrie,
3. un titrage de l'EDTA du kit avec utilisation d'un indicateur coloré d'équivalence.

Quelques tests qualitatifs étaient également proposés. Les questions portaient sur l'analyse des expériences ainsi que sur la chimie des constituants du kit.

Partie expérimentale : A1 à A5

D'un point de vue général, le concours de l'agrégation visant à recruter des enseignants, il est demandé une certaine autonomie : il ne faut donc poser de questions au jury qu'en cas de réelle nécessité. De plus, il s'agit d'une épreuve **pratique** : les candidats doivent être capables de choisir le matériel à utiliser parmi celui proposé et une lecture correcte des énoncés est attendue.

D'un point de vue manipulation, l'utilisation de la pipette doit être mieux maîtrisée. La pipette doit être tenue verticalement, la pointe appuyée sur le bécher et les yeux doivent être en face du trait de jauge si l'on veut prélever correctement le volume indiqué. De même, il faut faire attention à l'utilisation de la burette : beaucoup de candidats maîtrisent mal le remplissage (bulle d'air) et lisent mal les volumes. De même, une erreur d'appréciation a fait penser à de nombreux candidats que les dispenseuses (distributeurs automatiques) pouvaient être utilisées pour des mesures de volumes précis (observé dans la partie spectrophotométrie).

En revanche, concernant le titrage volumétrique, le jury a apprécié que certains candidats, ne connaissant pas le changement de couleur attendu (malgré les données de l'énoncé), aient effectué un premier dosage rapide permettant de déterminer la couleur attendue en fin de dosage, le bécher étant ensuite utilisé comme témoin.

A propos du choix des cuves en spectrophotométrie, il est nécessaire de bien regarder le matériel présent avant de commencer à manipuler.

En ce qui concerne le dosage pH-métrique, il ne faut pas oublier d'étalonner le pH-mètre et de faire attention à la manipulation et l'utilisation des électrodes : l'agitation doit être modérée et les électrodes doivent plonger complètement.

On soulignera aussi l'aspect sécurité : les gants doivent être utilisés à bon escient. Les gants doivent donc être enlevés après la manipulation. Il faut éviter aussi de monter debout sur un tabouret. De même, toutes les solutions ne doivent pas être jetées dans les bidons de récupération.

Partie B1 : dosage d'une solution de glucose par la méthode des ajouts dosés

A propos des questions d'explication de principe, rappelons qu'il faut être clair et concis et ne pas oublier d'expliquer les termes utilisés.

Nous notons que la méthode des ajouts dosés ne semble pas maîtrisée.

La question sur la relation entre absorbance et concentration de glucose n'a pas été correctement traitée. La notion de réactif limitant n'a pas du tout été évoquée

Rappelons que la loi de Beer-Lambert n'est pas valable qu'aux faibles concentrations et que de nombreux autres paramètres doivent être respectés et/ou fixés.

La détermination de la concentration en glucose a été très peu traitée. La dilution de la solution de glucose dans la cuve n'a pas été prise en compte.

Partie B2 : titrage de l'EDTA du kit Glucose RTU™

La question sur l'étalonnage de la solution de sulfate de zinc a été assez mal traitée du fait de l'incompréhension du fonctionnement de l'orangé de xylénol.

Le diagramme de prédominance de l'EDTA n'a pas été correctement traité : les candidats ont omis les deux premières acidités, pourtant indiquées dans l'énoncé

Il faut savoir faire la distinction entre une notation et une structure : ainsi dans la question 11 il était demandé la structure et non la formule H_2Y^{2-} .

Beaucoup de candidats ont pensé que l'orangé de xylénol était un indicateur coloré acido-basique (incohérent dans un milieu tamponné) alors qu'il s'agit d'un indicateur coloré de complexation.

Partie B3 : titrages acido-basiques du kit Glucose RTUTM

Le titrage acido-basique a été traité plutôt superficiellement. Il fallait comprendre que plusieurs espèces étaient présentes en solution mais qu'en réalité certaines étaient en quantités négligeables ou que les réactions n'étaient pas quantitatives réduisant ainsi le dosage à celui d'une ou deux espèces.

Partie B4 et B5, tests qualitatifs : tests de spécificité du kit Glucose RTU™ et étude expérimentale de l'étape de formation du chromogène

Ces questions ont peu été traitées et il est regrettable que la relation entre observations et conclusions sur la cinétique n'ait pas été assez mise en valeur dans la rédaction de ces questions.

La CLHP a très peu été traitée.

Partie C1 : chimie structurale

Il existe une grande confusion entre un équilibre conformationnel et un équilibre configurationnel : ce sont des notions de bases et elles doivent être maîtrisées par de futurs enseignants.

L'effet anomérique semble être totalement inconnu : il est en effet confondu avec la notion de carbone anomérique.

Il ne faut pas confondre la réaction d'hémiacétalisation et la réaction de mutarotation : cette dernière semble être en effet inconnue des candidats.

Les représentations en formes chaises sont assez mal maîtrisées, malgré la présence d'un modèle donné dans l'énoncé.

Partie C2 : thermodynamique

L'utilisation des constantes thermodynamiques d'équilibre a permis à de nombreux candidats de retrouver les proportions des différents constituants. Malheureusement, aucun n'a su ensuite interpréter ces résultats (effet anomérique).

Les quelques candidats ayant essayé de calculer l'entropie libre standard de l'équilibre d'anomérisation du glucose l'ont globalement bien réussi. Certains ont même correctement analysé les différents résultats intermédiaires obtenus.

Partie C3 : cinétique enzymatique

La partie cinétique a été plutôt correctement traitée par les candidats qui se sont lancés dans sa résolution. Il est cependant regrettable que seul un candidat sur trois n'ait traité cette partie relevant pourtant du domaine de compétences de futurs enseignants de biochimie.

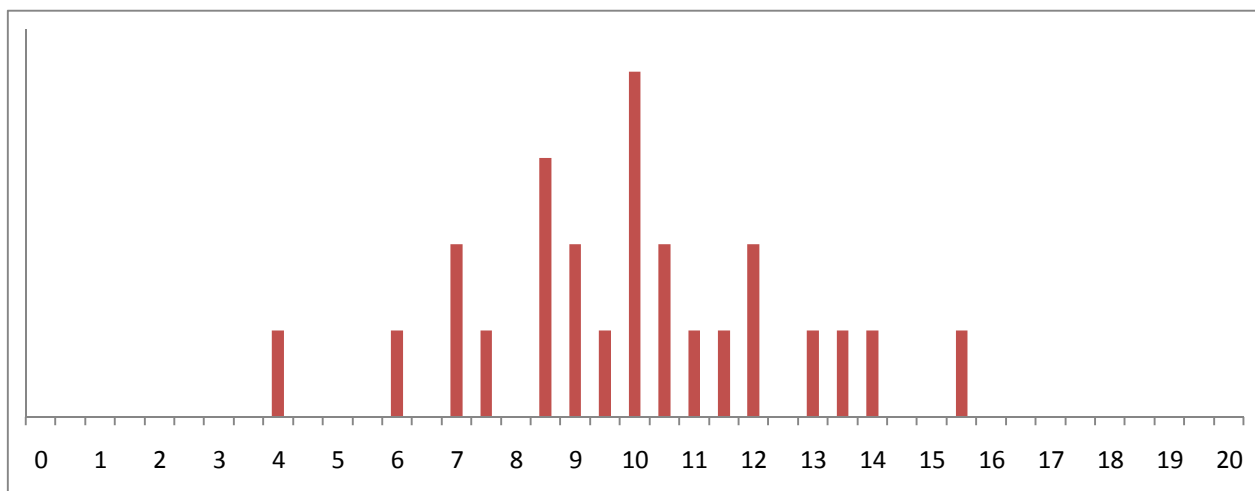
Partie C4 : Chimie organique : étude de la glucose oxydase, étude du chromogène, étude de la peroxydase

Dans l'ensemble, la partie chimie organique a été peu abordée mais les candidats l'ont assez bien traitée.

Il est à regretter que les interactions intermoléculaires entre le glucose et les entités présentes dans le site actif de la glucose oxydase de la question 50 n'aient été que trop peu abordées.

Bilan

La moyenne de l'épreuve est de 10. Les notes se répartissent entre 4 et 15,5 selon l'histogramme ci-dessous :



Bilan par question

Q = Question

R = Pourcentage de réponses

BR = Pourcentage de bonnes réponses

B.1.

| | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Q | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| R | 96 | 88 | 96 | 88 | 84 | 88 | 72 | 76 |
| BR | 59 | 33 | 67 | 63 | 3 | 58 | 66 | 10 |

B.2.

| | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|
| Q | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| R | 44 | 88 | 92 | 88 | 72 |
| BR | 24 | 41 | 4 | 29 | 32 |

B.3.

| | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|
| Q | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| R | 80 | 76 | 64 | 40 | 64 | 24 |
| BR | 65 | 24 | 50 | 21 | 22 | 18 |

B.4.

| | |
|----|----|
| Q | 20 |
| R | 36 |
| BR | 52 |

B.5.

| | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|
| Q | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
| R | 32 | 20 | 20 | 20 | 16 | 20 |
| BR | 38 | 32 | 60 | 60 | 30 | 0 |

C.1. Chimie structurale

| | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|
| Q | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 |
| R | 76 | 52 | 64 | 64 | 68 |
| BR | 37 | 13 | 30 | 29 | 68 |

C.2. Thermodynamique

| | | |
|----|----|----|
| Q | 32 | 33 |
| R | 36 | 16 |
| BR | 40 | 55 |

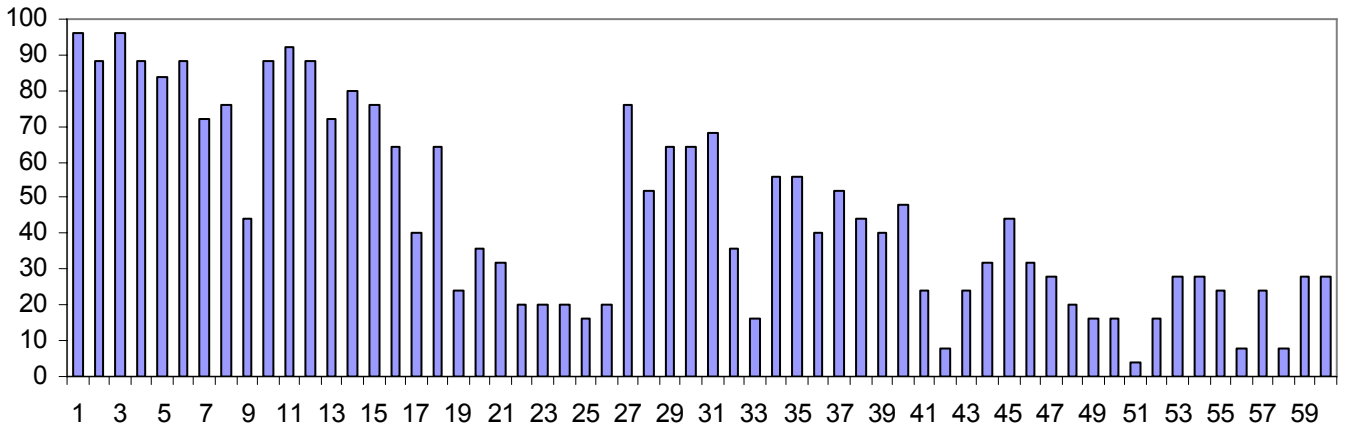
C.3. Cinétique enzymatique

| | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Q | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 |
| R | 56 | 56 | 40 | 52 | 44 | 40 | 48 | 24 | 8 |
| BR | 30 | 88 | 62 | 42 | 89 | 90 | 83 | 28 | 50 |

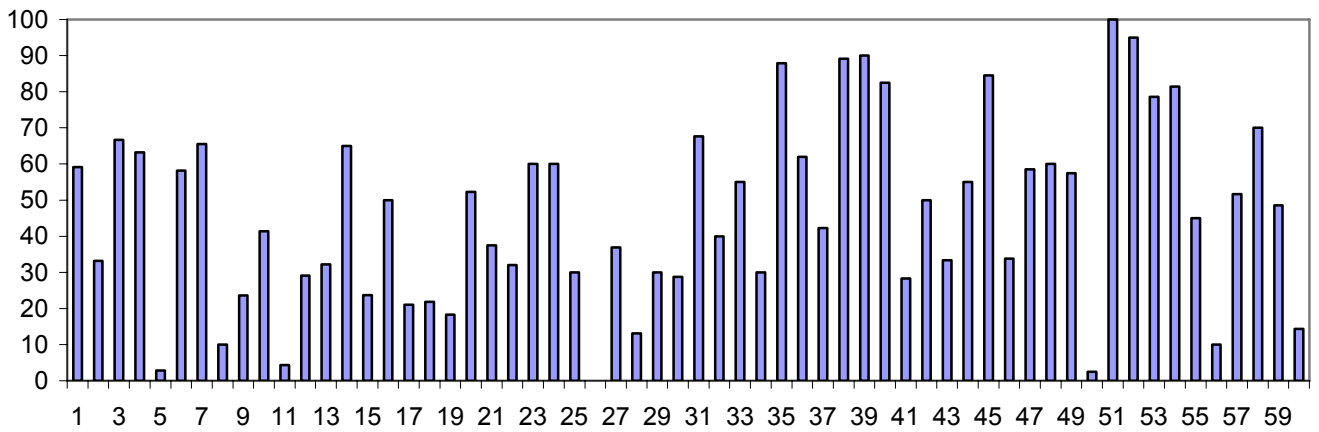
C.4. Chimie organique

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Q | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |
| R | 24 | 32 | 44 | 32 | 28 | 20 | 16 | 16 | 4 | 16 | 28 | 28 | 24 | 8 | 24 | 8 | 28 | 28 |
| BR | 33 | 55 | 85 | 34 | 59 | 60 | 58 | 3 | 100 | 95 | 79 | 81 | 45 | 10 | 52 | 70 | 49 | 14 |

Pourcentage de réponses



Pourcentage de bonnes réponses



ÉPREUVE PRATIQUE DE MICROBIOLOGIE

Quelques aspects des communautés bactériennes

Sujet proposé par Établi par

Lucile TIGER YVERNAULT, Fabien CÉZARD, Ivo GOMPERS BONECA, et Daniel LONCLE

Introduction

« Il est évident que la plupart des microorganismes ne vivent pas de façon planctonique, isolés les uns des autres, mais se développent en amas sur des surfaces humides. » (A. T. HENRICI, 1933).

Cette citation fait référence à certains modes de vie des bactéries vivant en communautés fixées, que l'on peut partager en deux grands types :

- les communautés monospécifiques, formées essentiellement de clones : les **colonies** ;
- les communautés hétérospécifiques, incluant souvent différents types de microorganismes : les **biofilms**.

Cette association communautaire physique est également fonctionnelle, les différentes espèces des colonies et des biofilms d'un écosystème participant souvent au même processus métabolique, en interaction entre elles et avec leur environnement.

On estime que 90 à 95 % des microorganismes sur la planète vivent sous cette forme, la forme planctonique étant alors considérée comme une phase transitoire, servant à aller coloniser une autre surface.

Au cours de cette épreuve, nous nous intéressons à différents aspects des colonies et des biofilms :

- La **partie A** permet d'étudier l'influence du mode de groupement des bactéries sur le nombre d'UFC formées (unités formant colonies).
- La **partie B** s'intéresse à un mode de vie particulier, celui des bactéries immobilisées dans leur milieu de culture.
- La **partie C** concerne la tolérance accrue des biofilms vis-à-vis des antibiotiques en comparaison de celle des bactéries planctoniques.
- La **partie D** a trait à la mise en évidence et à la caractérisation d'un composé produit par certaines souches bactériennes, qui inhibe la formation des biofilms.
- La **partie E** propose de vérifier la faisabilité de la mise en évidence et de la quantification par PCR en temps réel d'un gène de virulence spécifique d'une bactérie formant fréquemment des biofilms.

L'annexe 1, relative à la partie C, sera partiellement complétée le premier jour, et rendue avec la copie.

L'annexe 2, relative à la partie D, sera rendue avec le sujet, et complétée le deuxième jour.

Avertissements

- **Les manipulations des différentes parties sont indépendantes ; il convient d'en mener certaines en parallèle.**
- **Il est fortement suggéré de s'intéresser dès le début à la partie A et de prendre en compte la limite de temps imposée pour la partie E.**

TRAVAIL DU PREMIER JOUR

PARTIE A

Concept d'UFC (unités formant colonies)

Le dénombrement en milieu solide part du principe qu'une bactérie bien isolée formera une colonie clonale. Ainsi, compter les colonies revient à compter les bactéries présentes dans l'inoculum. Pourtant, le groupement des bactéries peut également avoir une influence sur leur séparation au cours de l'ensemencement : c'est pourquoi on préfère compter des « unités formant colonies » (UFC).

L'objectif ici est de montrer que le mode de groupement d'une souche mutée de *Lactococcus lactis* conditionne le nombre d'UFC obtenues après culture. Pour cela, un suivi de croissance de cette souche est réalisé, en présence et en absence de muramidase (lysozyme).

Culture

$\Delta acmA$ = culture de 18h de *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* MG1363 muté : 10 mL en bouillon M17 glucosé. Cette souche est délétée pour le gène *acmA* codant l'exoenzyme muramidase AcmA.

Milieus de culture

Bouillon **M17-20** glucosé (1% glucose) : 20 mL en flacon

Bouillon **M17-15** glucosé (1% glucose) : 2 fois 15 mL en erlenmeyer

Gélose **M17** : 10 boîtes de Pétri

Réactifs

Eau physiologique stérile (**$\phi 50$**) : 50 mL en flacon

Muramidase : 1 mL à 10 mg.mL⁻¹ en microtube

Bleu de méthylène : flacon compte-gouttes

Matériel

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Semi-microcuvettes pour spectrophotomètre sur un portoir et carrés de parafilm

Pipettes graduées stériles, pipettes automatiques et cônes stériles

Microtubes stériles, tubes à hémolyse

Lames

Billes de verre et pot de récupération

Données

La linéarité du spectrophotomètre à 600 nm est vérifiée pour une suspension bactérienne dans l'intervalle 0,020 - 0,700 de valeurs d'absorbance.

A1- Culture de la souche $\Delta acmA$ en présence et en absence de muramidase

Manipulations

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de la culture fournie sur une dilution au 1/20 en bouillon M17 glucosé.
- Ensemencer les deux erlenmeyers contenant 15 mL de bouillon M17 glucosé (**M17-15**) avec la souche **$\Delta acmA$** de manière à obtenir une absorbance à 600 nm égale à 0,100.
- Introduire dans l'un des deux erlenmeyers de la muramidase à la concentration finale de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
- Mesurer les absorbances initiales de chaque culture à 600 nm en prélevant 800 μL dans une semi-microcuvette.
- Incuber les erlenmeyers en bain thermostaté à 30°C sous agitation.
- Mesurer les absorbances à 600 nm des deux cultures toutes les 30 minutes pendant 4h, en prélevant à chaque fois 800 μL dans une semi-microcuvette.

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

- Maintenir les erlenmeyers en bain thermostaté à 30°C sous agitation pour une culture sur 24h.

Compte-rendu

1. Justifier le volume de préculture ajouté pour ensemencer les erlenmeyers au temps t_0 .

2. Justifier le volume de muramidase introduit dans l'erenmeyer.
3. Fournir un tableau des valeurs du suivi de la croissance pour les deux conditions de culture.
4. Tracer les deux courbes de croissance, sur une même feuille de papier millimétré.
5. Pour chacune des cultures, commenter les courbes obtenues et déterminer les paramètres de croissance suivants :
 - Temps de latence ;
 - Vitesse de croissance exponentielle Q_X^{expo} ;
 - Temps de génération G.

A2- Étude du mode de groupement de $\Delta acmA$ et quantification des UFC

Manipulations

A21- Observations microscopiques

- À partir de chacune des cultures, effectuer aux temps **t = 0h** et **t = 4h**, une observation microscopique après coloration au bleu de méthylène :
 - Prélever à la pipette automatique 10 μL de culture.
 - Sur une même lame, déposer **sans étaler**, à une extrémité 10 μL de la culture $\Delta acmA$ et à l'autre extrémité 10 μL de la culture $\Delta acmA + \text{muramidase}$.
 - Laisser sécher les gouttes non étalées au dessus du bec Hoffman.
 - Maintenir la lame au dessus du bec suffisamment longtemps pour bien fixer les dépôts à chaud.
 - Poser la lame sur le cavalier au-dessus du bac à coloration.
 - Recouvrir les dépôts fixés de bleu de méthylène. Laisser colorer pendant 1 minute.
 - Rincer à l'eau distillée.
 - Sécher la lame.
 - Observer à l'objectif « x100 » sous huile à immersion.

Montrer à un examinateur chaque observation microscopique avec son compte-rendu.

A22- Dénombrement

- Au bout de 4h de croissance, préparer des dilutions de chacune des cultures au 1/10 en série jusqu'à la dilution 10^{-7} : procéder en tubes à hémolyse sous un volume total de 1 mL en utilisant comme diluant de l'eau physiologique.
- A l'aide de billes stériles, ensemercer en surface des boîtes de gélose **M17**, 100 μL des dilutions 10^{-3} à 10^{-7} de chacune des cultures, selon le mode opératoire suivant :
 - Placer 5 à 10 billes par boîte.
 - Effectuer des translations brusques, alternées avec des rotations de la boîte.
 - Récupérer les billes dans le pot de récupération contenant de l'eau de Javel.
- Incuber 24h à l'étuve à 30°C.

Compte-rendu

6. Présenter les résultats des observations microscopiques. Les discuter en insistant sur les modes de groupement observables et la densité bactérienne par champ microscopique.
7. D'après ces observations, à quoi peut-on s'attendre pour les dénombrements des UFC en milieu solide ?

PARTIE B

Modélisation d'un mode de vie immobilisé

Dans l'industrie laitière, les lactocoques sont utilisés pour leurs propriétés fermentaires. Le lait peut être considéré comme un milieu de culture liquide dans lequel les bactéries vivent sous forme planctonique. Cependant, très rapidement les bactéries se retrouvent immobilisées dans le coagulum de lait.

Dans cette partie, on se propose de modéliser ces différentes conditions de culture et de comparer le comportement de *Lactococcus lactis* dans un milieu liquide *versus* un milieu semi-liquide contenant une faible concentration d'agar (0,1%) dont la viscosité coïncide avec celle d'un lait coagulé.

Pour chacune de ces conditions de culture, on étudie une souche sauvage de *Lactococcus* ainsi que la souche mutée pour le gène codant la muramidase.

Cultures

- **MG1363** = culture de 18h de *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* MG1363 sauvage : 10 mL en bouillon M17 glucosé
- **Δ acmA** = culture de 18h de *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* MG1363 muté : 10 mL en bouillon M17 glucosé, fournie en partie A. Cette souche est délétée pour le gène *acmA* codant l'exoenzyme muramidase AcmA.

Milieus de culture

Bouillon **M17-50** glucosé (1% glucose) : 3 fois 50 mL en flacon

Milieu **M17-SL** glucosé (1% glucose) semi-liquide (0,1% agar) : 3 fois 50 mL en flacon **en surfusion à 60°C**

Réactifs

Eau physiologique stérile ($\phi 9$) : 12 tubes de 9 mL

Muramidase : 1 mL à 10 mg.mL⁻¹ en microtube

Matériel

6 flacons de culture de 25 cm² stériles vides

Pipettes graduées stériles, pipettes automatiques et cônes stériles

Les flacons de culture de 25 cm² seront **maintenus en position verticale** pendant toute la durée de la manipulation, de l'incubation et de la lecture des résultats.

Données

La souche sauvage de *Lactococcus lactis* MG1363 cultivée sous forme de coques isolés.

Manipulations

B1- Préparation des *inocula*

- Réaliser des dilutions de chacune des souches (**MG1363** et **Δ acmA**) au 1/10 en série jusqu'à la dilution 10⁻⁶ : utiliser pour cela des tubes à vis contenant 9 mL d'eau physiologique stérile et des pipettes graduées stériles de 1 mL.

Réaliser une dilution devant un examinateur.

B2- Préparation des flacons de culture en milieu M17 glucosé liquide

- Préparer deux flacons de culture de 25 cm², **notés A et B**, contenant chacun 50 mL de bouillon M17 glucosé (**M17-50**).
- Préparer un troisième flacon, **noté C**, contenant 50 mL de bouillon M17 glucosé (**M17-50**) additionné de muramidase à la concentration finale de 20 µg.mL⁻¹.

B3- Préparation des flacons de culture en milieu M17 glucosé semi-liquide (0,1% agar)

- Préparer deux flacons de culture de 25 cm², **notés D et E**, contenant chacun 50 mL de milieu M17 glucosé semi-liquide (**M17-SL**).
- Préparer un troisième flacon, **noté F**, contenant 50 mL de bouillon M17 glucosé semi-liquide (**M17-SL**) additionné de muramidase à la concentration finale de 20 µg.mL⁻¹.

B4- Ensemencement des flacons

- Inoculer les flacons A à F selon la répartition proposée dans le tableau ci-dessous, en respectant les étapes suivantes :
 - Prélever 1 mL d'inoculum à la pipette automatique.
 - Plonger le cône 1 cm sous la surface du milieu de culture.
 - Expulser l'inoculum du cône **délicatement et en une seule fois**.
 - Ne pas homogénéiser le flacon après inoculation.
 - Préparer dans la glace un emplacement suffisamment large pour y déposer les flacons verticalement sans les agiter.
 - Placer les flacons 20 minutes dans la glace puis incuber 24h à l'étuve à 30°C, en position verticale. Veiller à ne pas agiter les flacons lors de l'introduction dans l'étuve.

| Souches à ensemencer | Bouillon M17 glucosé | | | Milieu M17 glucosé semi-liquide | | |
|---|----------------------|----------|----------|---------------------------------|----------|----------|
| | Flacon A | Flacon B | Flacon C | Flacon D | Flacon E | Flacon F |
| Dilution 10⁻⁶ de la souche MG1363 | X | | | X | | |
| Dilution 10⁻⁶ de la souche ΔacmA | | X | X | | X | X |

Compte-rendu

8. Justifier le volume de muramidase introduit dans les flacons C et F.

PARTIE C

Tolérance des biofilms aux antibiotiques

On sait facilement lutter contre les bactéries planctoniques par l'utilisation de biocides et d'antibiotiques. En revanche, la lutte contre les biofilms est plus complexe, car les bactéries fixées présentent des propriétés et des profils de sensibilité différents.

En particulier, on note une grande résistance aux agents antimicrobiens, ainsi qu'une tolérance à des doses d'antibiotiques jusqu'à 1000 fois plus importantes que pour les bactéries en suspension.

La détermination de la CI_{50} (concentration inhibitrice 50%) d'un biofilm bactérien vis-à-vis de deux antibiotiques de familles différentes permet de vérifier cette tolérance accrue.

Culture

Microplaque **TG1 F'** = biofilms de la souche d'*Escherichia coli* TG1 F' dans une microplaque en PVC de 96 puits à fonds ronds : les biofilms sont uniquement présents dans les cupules des lignes B à E

Milieu de culture

Bouillon **LB-70** : 70 mL en flacon

Réactifs

Ticarcilline à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: 1 mL en microtube

Ofloxacine à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: 1 mL en microtube

Matériel

Pipettes automatiques et cônes stériles

Microtubes stériles

Adhésif pour microplaque

Gants à usage unique

La microplaque en PVC est **flexible** et doit être manipulée avec précaution, notamment lors du retrait de l'adhésif, pour éviter les projections.

Manipulations

- Pour chaque antibiotique, ticarcilline et ofloxacin, réaliser une série géométrique de 11 dilutions au 1/2 en microtubes en bouillon LB stérile (de 1/2 à 1/2048).
- Mettre des gants à usage unique.
- Vider par retournement le contenu de la microplaque **TG1 F'** contenant les biofilms dans le bac à Javel.
- Tapoter la microplaque sur un papier absorbant en s'assurant qu'il ne reste aucune trace de liquide. Le papier absorbant sera jeté avec les déchets contaminés.
- Jeter les gants avec les déchets contaminés.
- Ajouter 125 μL des dilutions des antibiotiques ou de milieu LB stérile, selon l'**annexe 1** :
 - les lignes B et C constituent le duplicat pour l'ofloxacin, en présence de biofilm ;
 - les lignes D et E constituent le duplicat pour la ticarcilline, en présence de biofilm ;
 - les lignes F et G constituent les témoins ofloxacin et ticarcilline, en absence de biofilm ;
 - les lignes A et H sont vides.
- Recouvrir la microplaque d'un adhésif et incuber 24h à l'étuve à 37°C.

Compte-rendu

9. Compléter les lignes « p » du tableau de l'**annexe 1**.
10. Préciser les rôles des témoins réalisés, ainsi que les résultats attendus pour chacun d'eux.
11. Formuler deux hypothèses pouvant expliquer la tolérance accrue des biofilms aux antibiotiques.

PARTIE D

Mise en évidence et caractérisation d'un composé naturel anti-biofilm

La vie en communauté bactérienne n'implique pas forcément que tous les microorganismes vivent en parfaite harmonie. Il existe également des phénomènes de compétition ou d'antagonisme entre les différentes populations microbiennes d'une même niche écologique. Certaines souches peuvent sécréter des composés qui inhibent le développement des biofilms d'autres souches, et s'assurent ainsi la domination de l'écosystème bactérien.

On cherche ici à mettre en évidence l'activité anti-biofilm d'un EPS (*ExtraPolymeric Substance*) produit par une souche d'*Escherichia coli*, et à en préciser les caractéristiques.

Cultures

- **CFT073** = culture de 18h d'*E. coli* CFT073 sauvage excréant un EPS : erlenmeyer contenant 20 mL de culture en bouillon LB
- **CFT073** = culture de 18h d'*E. coli* CFT073 sauvage excréant un EPS : tube à vis contenant 10 mL de culture en bouillon LB
- **$\Delta kpsD$** = culture de 18h d'*E. coli* CFT073 déficiente en EPS : 10 mL en bouillon LB
- **TG1 F'** = culture de 18h d'*E. coli* TG1 F' : 10 mL en bouillon LB
- **PAK** = culture de 18h de *Pseudomonas aeruginosa* : 10 mL en bouillon LB
- **S. aureus** = culture de 18h de *Staphylococcus aureus* : 10 mL en bouillon TSB
- **Flis** = culture de 18h d'*Enterococcus faecalis* : 10 mL en bouillon TSB

Milieux de culture

Bouillon **LB-70** : 70 mL en flacon

Bouillon **TSB-50** (trypticase-soja + 0,5% glucose) : 50 mL en flacon

Réactifs

Eau physiologique stérile ($\phi 50$) : 50 mL en flacon

Acide trifluoroacétique **TFA** (pureté 99%) : 10 mL en flacon (poste dédié)

NaOH (30%) : 1 mL en tube à hémolyse

Papier pH (gamme 1-10)

Matériel

10 tubes plastiques de 15 mL à centrifuger stériles (bouchon à vis)

3 seringues stériles de 10 mL et 3 filtres (taille des pores : 0,45 μm)

Microplaque stérile 96 puits à fonds ronds et adhésif

Pipettes graduées stériles, pipettes automatiques et cônes stériles

Le **TFA** dégage des fumées irritantes, et doit être manipulé avec des gants. Il sera prélevé sous PSM.

Données

- La linéarité du spectrophotomètre à 600 nm est vérifiée pour une suspension bactérienne dans l'intervalle 0,020 - 0,700 de valeurs d'absorbance.
- La densité du **TFA** fourni est : $d = 1,480$.
- La masse molaire du **TFA** est : $M = 114,02 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Manipulations

D1- Préparation des surnageants de culture

- Introduire les cultures suivantes dans trois tubes plastiques de 15 mL à centrifuger :
 - **Tube CFT073** : 10 mL (environ) de la culture de **CFT073** en erlemeyer.
 - **Tube CFT073-2** : 10 mL (environ) de la culture de **CFT073** en erlemeyer.
 - **Tube $\Delta kpsD$** : 10 mL (environ) de la culture de **$\Delta kpsD$** .
- Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à 3000 rpm.
- Filtrer les trois surnageants indépendamment en respectant le mode opératoire suivant :
 - Sortir la seringue de 10 mL de son emballage et retirer le piston.

- Placer le filtre 0,45 µm à l'extrémité de la seringue.
 - Verser avec précaution le surnageant dans la seringue.
 - Replacer le piston et filtrer le contenu de la seringue dans un nouveau tube plastique de 15 mL.
 - Jeter filtre et seringue avec les déchets contaminés.
- Séparer le surnageant filtré du tube **CFT073-2** en deux fractions aliquotes de 5 mL dans deux tubes notés **CFT073-95** et **CFT073-TFA**.
 - Traiter ces tubes comme suit :
 - **Tube CFT073-95** :
 - Incuber en bain thermostaté à 95°C pendant 30 minutes.
 - Retirer l'échantillon du bain et laisser refroidir sur la paillasse.
 - **Tube CFT073-TFA** :
 - Ajouter le TFA de manière à obtenir une concentration finale de 0,067 mol.L⁻¹.
 - Incuber en bain thermostaté à 95°C pendant 30 minutes.
 - Retirer l'échantillon du bain et laisser refroidir sur la paillasse.
 - Ajouter du NaOH jusqu'à neutraliser le pH de l'échantillon (entre 20 et 25 µL). Contrôler au papier pH.

D2- Préparation des biofilms en microplaque

Utiliser le milieu LB pour les souches à Gram négatif, et le milieu TSB pour les souches à Gram positif.

- Mesurer l'absorbance à 600 nm des cultures suivantes sur une dilution au 1/4 : **CFT073**, **TG1 F'**, **PAK**, **S. aureus**, **Flis**.

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

- Préparer pour chaque souche une suspension ajustée à une absorbance à 600 nm égale à 0,200.
- Préparer la microplaque de 96 puits en répartissant 50 µL des différents surnageants ou milieux, suivant le plan de plaque fourni en **annexe 2**.
- Ajouter 50 µL de suspension ajustée, suivant le plan de plaque fourni en **annexe 2**. Le volume total dans chaque puits est alors de 100 µL.
- Recouvrir la microplaque d'un adhésif et incuber 24h à l'étuve à 37°C.

D3- Culture en milieu liquide

- Préparer trois tubes à essai avec :
 - **Tube A** : 5 mL de bouillon LB.
 - **Tube B** : 2,5 mL de bouillon LB + 2,5 mL de surnageant de culture **CFT073** filtré.
 - **Tube C** : 2,5 mL de bouillon LB + 2,5 mL de surnageant de culture $\Delta kpsD$ filtré.
- Inoculer les trois tubes avec 100 µL de la souche **TG1 F'** ajustée précédemment.
- Incuber 24h en bain thermostaté à 37°C avec agitation.

Compte-rendu

12. Préciser l'intérêt de la filtration des surnageants de culture.
13. Justifier le volume de TFA introduit dans le tube CFT073-TFA.
14. Préciser le rôle de chacun des traitements des surnageants de culture.
15. Indiquer le mode opératoire suivi pour l'ajustage des suspensions bactériennes (partie D2).
16. Quel est le but des cultures en milieu liquide (tubes A, B et C, partie D3) ?

PARTIE E

Mise en évidence et quantification d'un gène de virulence de *S. aureus*

Staphylococcus aureus est un germe couramment impliqué dans les infections nosocomiales. Cette bactérie s'organise en biofilm sur différentes surfaces inertes, notamment les cathéters et les prothèses.

Un des critères d'identification de *S. aureus* est la recherche de l'activité de sa thermonucléase (DNase thermostable) codée par le gène *nuc*. Outre la détection de cette activité par des méthodes de microbiologie classique, le gène *nuc* peut être mis en évidence spécifiquement par PCR en temps réel, et son nombre de copies quantifié.

Les amorces oligonucléotidiques spécifiques du gène *nuc* permettent d'amplifier une séquence de 270 pb.

| amorces | séquence (5' ⇒ 3') | Tm |
|---------|---------------------------------|------|
| NUC-G5 | GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT | 62°C |
| NUC-D3 | AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC | 66°C |

L'amplification est réalisée en présence de SybrGreen®, fluorochrome intercalant dans l'ADN bicaténaire. L'intensité de fluorescence mesurée à chaque cycle est alors proportionnelle à la concentration en amplicons formés dans le milieu réactionnel.

La spécificité de l'amplification est ensuite vérifiée par dénaturation thermique du produit d'amplification qui doit conduire à l'obtention d'une température de demi-dénaturation (Tm) unique.

On se propose de vérifier la faisabilité de cette mise en évidence et de cette quantification.

Culture

S. aureus = culture de 18h de *Staphylococcus aureus* : 10 mL en bouillon TSB, fournie en partie D

Réactifs

Tampon **TE** : 5 mL en flacon

Composition : Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹ ; EDTA 1 mmol.L⁻¹ ; pH 8

Eau PCR : 1 mL en microtube

Amorces : 10 µL en microtube, solution de travail contenant les 2 amorces à 5 µmol.L⁻¹ chacune

SuperMix 2X non spécifique : 50 µL en microtube contenant les dNTPs, le SybrGreen® et une ADN polymérase thermostable et thermoactivable (poste dédié)

Matériel

Microtubes stériles et 1 cavalier d'obturation

Microbarette PCR orientée et film optique

Pipettes automatiques et cônes stériles

Le tube de **SuperMix**, contenant du SybrGreen®, doit être manipulé avec des gants.

Les cônes et les tubes ayant contenu du SybrGreen® doivent être récupérés dans un récipient dédié.

Ces déchets solides « Intercalants mutagènes » seront gérés et traités selon une procédure définie.

Manipulations

E1- Préparation des ADN matrices

- Préparer l'ADN matrice par ébullition selon le mode opératoire suivant :
 - Centrifuger à vitesse maximale 1 mL de culture dans un microtube pendant 3 minutes.
 - Remettre le culot en suspension dans 1 mL de tampon TE stérile, en vortexant. (L'EDTA du tampon TE permet de limiter les cassures de l'ADN à chaud.)
 - Centrifuger 3 minutes à vitesse maximale.
 - Remettre le culot en suspension dans 1 mL de tampon TE stérile.
 - Placer ensuite cette suspension à 95°C pendant 10 minutes (tube cliqué, sur portoir flottant).
 - Centrifuger 3 minutes à vitesse maximale.
 - Récupérer dans un nouveau microtube le surnageant qui constitue l'ADN matrice. Stocker dans la glace jusqu'à utilisation.
- Préparer 200 µL de chacune des dilutions suivantes de l'ADN matrice, en tampon TE : 1/10, 1/20 et 1/100.

E2- Préparation des milieux réactionnels pour amplification

On testera **selon le même protocole**, les 3 dilutions de la solution d'ADN matrice.

Éviter tout marquage sur les parois des tubes de PCR et sur le film optique.

- Préparer 12,5 µL de mélange 2X spécifique directement dans un puits de la microbarette PCR, selon le protocole suivant :
 - Eau PCR : 5,5 µL
 - Amorces : 2,0 µL
 - ADN matrice : 5,0 µL

Réaliser un ajout d'amorces en présence d'un examinateur.

- Au poste dédié, ajouter 12,5 µL de SuperMix 2X non spécifique.
- Recouvrir le puits d'un film optique.
- Homogénéiser le milieu réactionnel par centrifugation brève.
- Placer les tubes dans le thermocycleur.

Le milieu réactionnel devra être prêt pour l'heure indiquée : 11h.

E3- Amplification et dénaturation thermique

Elles sont réalisées selon le programme suivant :

1. 95°C : 3 minutes
2. 94°C : 10 secondes
3. 58°C : 20 secondes
4. 72°C : 25 secondes
5. Lecture de fluorescence
6. Goto 2 : 30 fois
7. 55°C : 3 minutes
8. Courbe de fusion de 55°C à 95°C ; lecture à chaque incrément de 0,5°C après séjour de 2 secondes
9. 7°C forever.

***Les opérations en thermocycleur seront gérées par les examinateurs.
Les résultats seront fournis au deuxième jour.***

Compte-rendu

17. Calculer la concentration de chaque amorce dans le milieu réactionnel d'amplification.
18. Quel est l'intérêt d'utiliser une ADN polymérase thermoactivable ?
19. Justifier le programme mis en œuvre dans le thermocycleur.
20. Déterminer le nombre d'exemplaires du gène cible introduit dans le milieu réactionnel pour la dilution au 1/10 de la solution d'ADN matrice.
 - La valeur de l'absorbance à 600 nm a été mesurée en partie D2.
 - On considère qu'une unité d'absorbance à 600 nm correspond à une concentration de $5 \cdot 10^8$ cellules.mL⁻¹.

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

ANNEXE 1
Partie C : Tolérance des biofilms aux antibiotiques
Plan de la microplaque TG1 F'
(A RENDRE AVEC LA COPIE)

N° de poste :

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|----|
| A | | | | | | | | | | | | | |
| OFLOXACINE (OFLO) | d | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 | 1/1024 | 1/2048 | LB |
| | ρ (μg.mL⁻¹) | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| | B A_{brute} | | | | | | | | | | | | |
| | C A_{brute} | | | | | | | | | | | | |
| | A_{brute} moyenne | | | | | | | | | | | | |
| | A_{nette} | | | | | | | | | | | | |
| TICARCLLINE (TIC) | d | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 | 1/1024 | 1/2048 | LB |
| | ρ (μg.mL⁻¹) | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| | D A_{brute} | | | | | | | | | | | | |
| | E A_{brute} | | | | | | | | | | | | |
| | A_{brute} moyenne | | | | | | | | | | | | |
| | A_{nette} | | | | | | | | | | | | |
| Témoin OFLO | d | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 | 1/1024 | 1/2048 | LB |
| | F A_{brute} | | | | | | | | | | | | |
| Témoin TIC | d | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 | 1/1024 | 1/2048 | LB |
| | G A_{brute} | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | | |

d = dilution de l'antibiotique

ρ = concentration massique de l'antibiotique (respectivement ofloxacine et ticarcilline).

Les biofilms sont uniquement présents dans les lignes B à E. Les lignes A et H resteront vides.

ANNEXE 2

**Partie D : Mise en évidence et caractérisation d'un composé naturel anti-biofilm
Plan de la microplaque**

(A RENDRE AVEC LA COPIE LE DEUXIEME JOUR)

N° de poste :

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|------------------|-------------------------------------|-------------------|----------------------|---|---------------------|----------------------|--------------------------|---|----------------------|----|-----------------------|----|
| | | Eau ϕ | | Milieu de culture | | Surnageant CFT073 | | Surnageant $\Delta kpsD$ | | Surnageant CFT073-95 | | Surnageant CFT073-TFA | |
| <i>A</i> | | | | <i>Témoin LB</i> | | | | | | | | | |
| <i>B</i> | TG1 F' | | | | | | | | | | | | |
| <i>C</i> | CFT073 | | | | | | | | | | | | |
| <i>D</i> | PAK | | | | | | | | | | | | |
| <i>E</i> | <i>S. aureus</i> | | | | | | | | | | | | |
| <i>F</i> | Flis | | | | | | | | | | | | |
| <i>G</i> | Témoins | | | | | | | | | | | | |
| | | <i>Témoin eau ϕ</i> | <i>Témoin TSB</i> | <i>Témoin SN CFT</i> | <i>Témoin SN $\Delta kpsD$</i> | <i>Témoin SN-95</i> | <i>Témoin SN-TFA</i> | | | | | | |
| <i>H</i> | | | | | | | | | | | | | |

SN = surnageant de culture après filtration

*Les lignes A et H resteront vides (hormis les cupules A3 et A4)*Utiliser pour la lecture les **symboles** : « ++ », « + » et « - », en précisant la signification que vous leur attribuez.

++ :

+ :

- :

ÉPREUVE PRATIQUE DE MICROBIOLOGIE

TRAVAIL DU DEUXIÈME JOUR

*Le sujet du premier jour est restitué au poste de travail.
Le compte-rendu du premier jour peut être consulté.
Les annexes 1 et 2 complétées seront rendues avec la copie.*

PARTIE A

Concept d'UFC (unités formant colonies)

Milieu de culture

Bouillon **M17-10** glucosé (1% glucose) : 10 mL en flacon

Réactif

Bleu de méthylène : flacon compte-goutte

Matériel

Spectrophotomètre réglé à 600 nm

Semi-microcuvettes pour spectrophotomètre sur un portoir et carrés de parafilm

Pipettes automatiques et cônes stériles

Lames

Données

La linéarité du spectrophotomètre à 600 nm est vérifiée pour une suspension bactérienne dans l'intervalle 0,020 - 0,700 de valeurs d'absorbance.

Manipulations

A1- Culture de la souche $\Delta acmA$ en présence et en absence de muramidase

- Mesurer les absorbances à 600 nm des deux cultures de 24h à 30°C, sur une dilution au 1/10.

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

A2- Étude du mode de groupement de $\Delta acmA$ et quantification des UFC

A21- Observations microscopiques

- À partir de chacune des cultures, effectuer une observation microscopique après coloration au bleu de méthylène (mode opératoire du premier jour).

Montrer à un examinateur chaque observation microscopique avec son compte-rendu.

A22- Dénombrement

- Observer toutes les boîtes.
- Dénombrer les UFC sur les dilutions comptables.

Compte-rendu

1. Présenter les résultats spectrophométriques.
2. Présenter les résultats des observations microscopiques.
3. Comparer les densités relatives des UFC pour les dilutions non comptables dans les deux conditions de culture.
4. Déterminer la concentration en UFC après 4h de culture dans chaque condition.
5. Établir dans chaque cas le facteur de correspondance entre l'absorbance à 600 nm et la concentration en UFC.
6. Discuter l'ensemble de ces résultats.

PARTIE B

Modélisation d'un mode de vie immobilisé

Manipulations

- Observer les différents flacons de cultureensemencés (flacons A à F).

Compte-rendu

7. Présenter les résultats obtenus.
8. En utilisant les informations et observations du premier jour, analyser méthodiquement ces résultats et formuler des hypothèses explicatives.

PARTIE C

Tolérance des biofilms aux antibiotiques

L'action inhibitrice des antibiotiques sur les biofilms peut être quantifiée par un test de viabilité en XTT, permettant d'estimer la CI_{50} de ces antibiotiques.

Le XTT (sel de 2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulphényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide) incolore est réduit dans les cellules vivantes par l'activité d'une déshydrogénase en formazan de couleur saumon.

La quantité de formazan formé est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Réactifs

Tampon **PBS** : 20 mL en flacon

Solution 10 X de **XTT** ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) en PBS : 2 mL en tube à hémolyse

Solution 2000 X de **Ménadione** (10 mmol.L^{-1}) en acétone : 200 μL en microtube

Matériel

Tube à essai stérile vide

Gants à usage unique

Lecteur de microplaque réglé à 492 nm

Pipettes automatiques et cônes stériles

Adhésif pour microplaque

La ménadione préparée en acétone ne doit pas être manipulée trop près du bec.

À la fin de la manipulation, le bac à coloration ayant servi aux rinçages doit être décontaminé : verser un volume suffisant d'eau de Javel dans le bac et attendre 10 minutes avant de le vider.

Manipulations

- Dans le tube à essai stérile, préparer 15 mL de solution XTT 1X - Ménadione 1X en PBS.
- Mettre des gants à usage unique.
- Vider par retournement le contenu de la microplaque **TG1 F'** contenant les biofilms dans le bac à Javel.
- Tapoter la microplaque sur un papier absorbant en s'assurant qu'il ne reste aucune trace de liquide. Le papier absorbant sera jeté avec les déchets contaminés.
- Immerger doucement la microplaque sans la retourner, dans le bac à coloration rempli d'eau distillée.
- Sortir la microplaque du bac à coloration et la vider par retournement dans le bac à Javel.
- Tapoter la microplaque sur un papier absorbant pour enlever les traces d'eau. Le papier absorbant sera jeté avec les déchets contaminés.
- Jeter les gants avec les déchets contaminés.

- Ajouter 125 µL de solution XTT 1X - Ménadione 1X dans chaque puits utilisé.
- Incuber 1h30 à l'obscurité à l'étuve à 37°C.
- Lire la densité optique à 492 nm.

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

Compte-rendu

9. Compléter le tableau de l'**annexe 1**.

$$\text{Mode de calcul pour les « } A_{\text{nette}} \text{ » : } A_{\text{nette}} = A_{\text{brute}} \text{ moyenne} - \frac{A_{\text{brute}}(\text{F1}) + A_{\text{brute}}(\text{G1})}{2}$$

10. Exploiter les résultats des témoins.
11. Pour chaque antibiotique, tracer sur une feuille de papier millimétré la courbe $A_{\text{nette}} = f(\log \rho_{\text{antibiotique}})$.
12. Définir la CI_{50} . Estimer sa valeur pour chaque antibiotique vis-à-vis du biofilm de *E. coli* **TG1 F'**.
13. Le tableau suivant présente les CMI et CI_{50} de ces antibiotiques vis-à-vis de la souche *E. coli* **TG1 F'** planctonique. Comparer les valeurs de CI_{50} aux résultats obtenus et discuter.

| | OFLOXACINE | TICARCILLINE |
|-----------|----------------------------|--------------------------|
| CMI | 0,0625 µg.mL ⁻¹ | 1 µg.mL ⁻¹ |
| CI_{50} | 0,0156 µg.mL ⁻¹ | 0,25 µg.mL ⁻¹ |

14. À partir de cette manipulation, comment pourrait-on poursuivre l'expérimentation pour déterminer la CMI de ces antibiotiques vis-à-vis du biofilm ?

PARTIE D

Mise en évidence et caractérisation d'un composé naturel anti-biofilm

Réactifs

Violet Gentiane : 10 mL en flacon

Mélange **acétone-éthanol** (20%-80%) : 20 mL en flacon

Matériel

Gants à usage unique

Pipettes automatiques et cônes stériles

Le mélange acétone-éthanol ne doit pas être manipulé trop près du bec.

À la fin de la manipulation, le bac à coloration ayant servi aux rinçages doit être décontaminé : verser un volume suffisant d'eau de Javel dans le bac et attendre 10 minutes avant de le vider.

Manipulations

D2- Biofilms en microplaque

- Mettre des gants à usage unique.
- Vider le contenu de la plaque dans le récipient jaune de Javel, par retournement.
- Tapoter la microplaque sur un papier absorbant en s'assurant qu'il ne reste aucune trace de liquide. Le papier absorbant sera jeté avec les déchets contaminés.
- Immerger doucement la microplaque sans la retourner, dans le bac à coloration rempli d'eau distillée.
- Sortir la microplaque du bac à coloration et la vider par retournement dans le bac à Javel.
- Tapoter la microplaque sur un papier absorbant pour enlever les traces d'eau. Le papier absorbant sera jeté avec les déchets contaminés.
- Jeter les gants avec les déchets contaminés.

- Ajouter 125 μ L de Violet Gentiane dans chaque puits utilisé. Laisser colorer 1 minute.
- Remettre des gants.
- Jeter le contenu dans le récipient jaune de Javel, par retournement.
- Rincer la plaque dans le bac à coloration, comme précédemment.
- Verser le contenu de la microplaque dans le récipient jaune de Javel, par retournement.
- Tapoter la microplaque sur un papier absorbant pour enlever les traces d'eau. Le papier absorbant sera jeté avec les déchets contaminés.
- Renouveler les trois opérations précédentes.
- Jeter les gants avec les déchets contaminés.

- Laisser sécher la plaque 15 minutes à température ambiante.
- Observer la localisation des biofilms à ce stade.
- Ajouter 150 μ L d'acétone-éthanol dans chaque puits utilisé. Laisser dissoudre les biofilms 5 minutes.
- Observer.

D3- Culture en milieu liquide

- Observer les tubes A, B, et C.

Compte-rendu

15. Interpréter les résultats de la culture en milieu liquide.
16. Commenter la localisation des différents biofilms avant l'ajout d'acétone-éthanol.

17. Compléter l'**annexe 2** : consigner les résultats de l'observation de la microplaque après l'ajout d'acétone-éthanol, en utilisant et précisant la légende proposée.
18. Interpréter les résultats de la microplaque, et conclure sur les points suivants :
 - Effet de l'EPS de la souche CFT073 ;
 - Nature probable de ce composé.

PARTIE E

Mise en évidence et quantification d'un gène de virulence de *S. aureus*

En PCR quantitative en temps réel, on définit le C_T comme le nombre de cycles nécessaire pour atteindre un seuil d'intensité de fluorescence choisi en phase exponentielle d'amplification et supérieur au bruit de fond.

Pour les résultats obtenus, sont fournies, pour chacune des trois dilutions testées (1/10, 1/20 et 1/100) :

- les courbes « Intensité de fluorescence du milieu réactionnel en fonction du nombre de cycles », en coordonnées directes et semi-logarithmiques ;
- les courbes « Intensité de fluorescence du milieu réactionnel en fonction de la température de dénaturation », et leurs courbes dérivées.

Compte-rendu

19. Analyser ces courbes et conclure.
 20. Déterminer les écarts de C_T attendus avec les différentes dilutions en considérant que l'efficacité de l'amplification est de 100%, c'est-à-dire qu'il y a doublement des amplicons à chaque cycle.
 21. Les écarts de C_T obtenus sont-ils cohérents avec les écarts attendus ?
 22. Conclure quant au problème posé.
-

Bibliographie

- Effects of muramidase on a mixed bacterial community, Carine Mercier, Elena Domakova, Josselyne Tremblay and Saulius Kulakauskas. Fems Microbiology Letters (2000), p.47-52, n°187.
- Immobilisation des Lactocoques, Mariam Ibrahim, Romain Briandait, Michel-Yves Mitsou, Agnès Chrétien, Josselyne Tremblay et Saulius Kulakauskas. Revue Lait (2004), p. 103-114, n°84.
- Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide, Jaione Valle, Sandra Da Re, Nelly Henry, Thierry Fontaine, Damien Balestrino, Patricia Latour-Lambert and Jean-marc Ghigo. PNAS (oct 2006), p. 12558-12563, vol. 103, n°33.

Nos remerciements à

Jean-Marc GHIGO et Christophe BELOIN, unité « Génétique des Biofilms » (URA CNRS 2172), Institut Pasteur, Paris.

Saulius KULAKAUSKAS, unité « Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes », INRA, Jouy-en-Josas.

RAPPORT SUR L'ÉPREUVE DE TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Établi par **Lucile TIGER YVERNAULT, Fabien CÉZARD, Ivo GOMPERTS BONECA, et Daniel LONCLE**

Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : 10,1.

Meilleure note : 15,8 ; note la plus basse : 03.

15 notes sur 25 sont supérieures ou égales à 10.

Le sujet s'articulait autour de cinq parties, qui abordaient différents aspects des colonies et des biofilms.

Ces communautés fixées représentent le mode de vie majoritaire des bactéries.
Certaines manipulations proposées présentaient un caractère inhabituel.

Comme les années précédentes, il convenait de bien gérer les temps d'attente et le parallélisme de certaines opérations pour assurer des résultats fiables lors du deuxième jour.

Les candidats se sont montrés courageux pour mener à bien ces manipulations et leurs compte-rendus.

Le jury félicite les deux candidates qui ont su allier à la fois une bonne organisation, des manipulations soignées, et des comptes-rendus structurés, clairs, et réfléchis.

Le jury tient par contre à souligner qu'une certaine rigueur dans la tenue, dans la gestion de la paillasse, dans la présentation des comptes-rendus, dans la syntaxe et dans l'orthographe est attendue de tout futur professeur.

Les règles élémentaires de sécurité au laboratoire de microbiologie n'ont pas non plus toujours été respectées convenablement.

Rappelons enfin la nécessité de penser au préalable la manipulation à effectuer pour une bonne organisation de son poste de travail.

PARTIE A Concept d'UFC

L'objectif était de montrer que le mode de groupement des bactéries (longues chaînettes de coques vs coques isolés) avait une incidence non pas sur leur croissance ni sur la mesure du trouble bactérien, mais sur le nombre de colonies formées (UFC) à partir d'un même nombre de bactéries initiales.

L'ajout de muramidase dans l'une des cultures (à concentration non bactéricide) permettait de fragmenter les longues chaînettes, et ainsi de multiplier le nombre d'UFC par un facteur voisin de 5. Ce facteur se retrouvait également entre les nombres de coques par chaînettes lors des observations microscopiques. Cependant les colorations au bleu de méthylène n'ont pas eu beaucoup de succès, malgré leur rapidité d'exécution technique.

Ces résultats montrent combien il faut être prudent lorsqu'on établit une relation entre une absorbance et un nombre d'UFC par mL.

Il convenait, pour les suivis de croissance, d'anticiper les dilutions à réaliser pour une mesure au spectrophotomètre respectant la limite de linéarité imposée. Cependant, un facteur de dilution excessif introduit une erreur expérimentale supplémentaire : il n'était pas souhaitable de diluer au-delà du dixième.

Malgré la remarque du jury l'année précédente, trop de candidats ont encore omis de tracer leurs courbes en coordonnées semi-logarithmiques : ils n'ont alors pas pu constater l'absence de phase de latence. Par contre, certains ont à juste titre su déterminer le temps de doublement pendant la phase exponentielle à partir de ces courbes.

PARTIE B Modélisation d'un mode de vie immobilisé

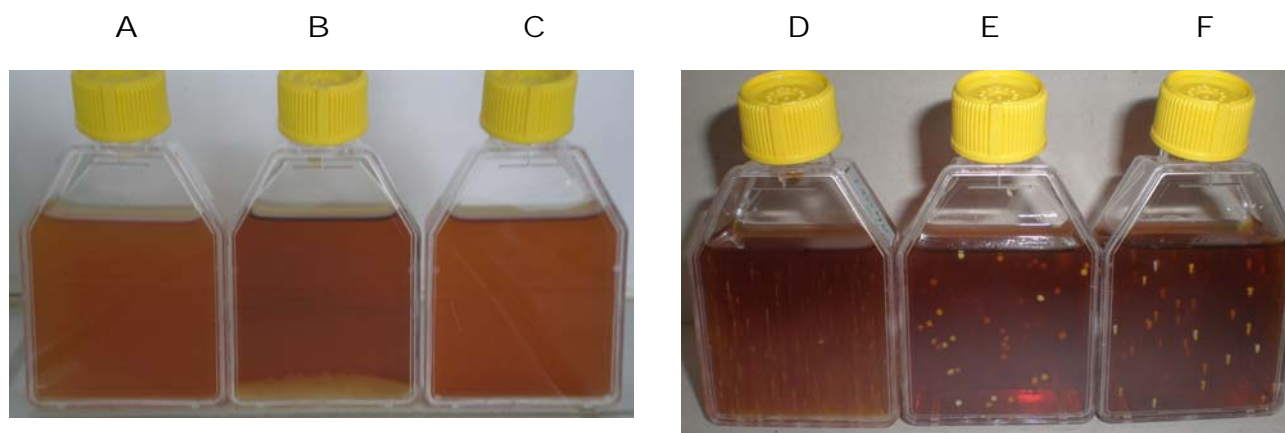
Cette partie inhabituelle mais simple a été particulièrement appréciée des candidats pour l'aspect très visuel de ses résultats, dont l'analyse reposait exclusivement sur des observations macroscopiques, souvent négligées.

En milieu liquide, le mutant, formant de longues chainettes en absence de muramidase (B), sédimente en 24 heures, ce qui n'est pas le cas dans les flacons A (sauvage) et C (mutant + muramidase).

En milieu semi-liquide :

- les longues chainettes du mutant sont immobilisées et on obtient des colonies isolées bien sphériques (D) ;
- la diffusion latérale des courtes chainettes de la souche sauvage n'est plus possible mais leur sédimentation (limitée) peut être visualisée par des trainées (E) ;

- le délai d'action de la muramidase ajoutée sur les chainettes du mutant conduit à des trainées plus courtes prenant leur source à partir de colonies sphériques (F), mais on retrouve bien le phénotype sauvage.



PARTIE C Tolérance des biofilms aux antibiotiques

Le travail en microplaque sur des biofilms impose une méthode d'investigation différente de celle utilisée avec les bactéries planctoniques : on ne peut se baser sur la présence ou non d'un trouble de croissance, c'est pourquoi on utilise comme critère la viabilité résiduelle des bactéries, mise en évidence par la réduction du XTT. On détermine donc une CI_{50} et non une CMI.

La manière de déterminer une CMI dans le cas d'un biofilm faisait l'objet d'une question ouverte qui a été souvent négligée.

D'une manière générale, l'analyse des résultats des essais doit être précédée de celle des témoins pour valider la technique et sa bonne exécution : cette démarche n'est pas acquise pour trop de candidats.

La formule fournie pour calculer l'absorbance nette a souvent été utilisée de manière incorrecte. Comme attendu, les courbes obtenues avaient une allure sigmoïde décroissante et les CI_{50} étaient très nettement supérieures à celles des bactéries planctoniques.

Certains candidats ont à juste titre proposé de relier le mode d'action des deux antibiotiques testés (l'un est une β -lactamine, l'autre une quinolone) à leur efficacité relative vis-à-vis du biofilm, celui-ci étant constitué pour une grande part de bactéries métaboliquement peu actives, et donc moins sensibles à la β -lactamine.

PARTIE D Mise en évidence et caractérisation d'un composé naturel anti-biofilm

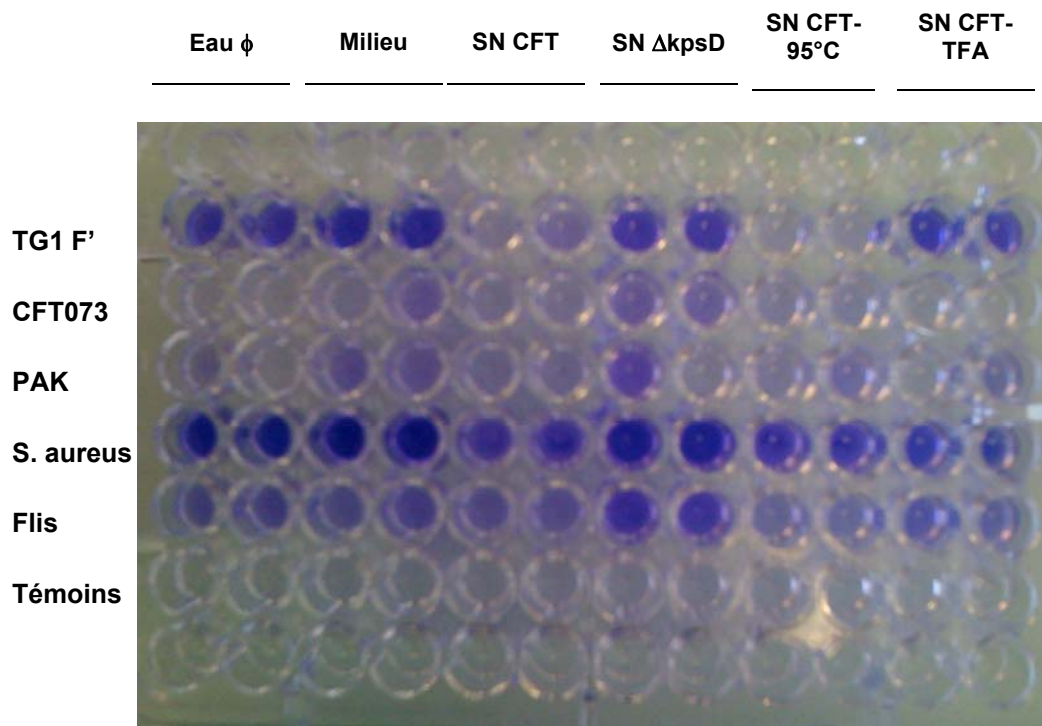
Les objectifs ici étaient de mettre en évidence l'action anti-biofilm d'un EPS excrété et de caractériser sa nature biochimique.

Après validation des témoins (additionnés comme les autres de violet de gentiane), il convenait de décrire les résultats de manière méthodique et synthétique, puis de les analyser avec rigueur et concision.

- En absence de surnageant de culture, toutes les souches testées formaient un biofilm, à l'exception de la souche productrice, qui n'est donc pas compétente pour la formation de biofilm.

- La comparaison des effets des surnageants de culture de la souche excrétrice et de la souche déficiente permettait de vérifier que l'effet anti-biofilm sur les souches Gram négatives et Gram positives testées est bien dû à l'EPS.

- Le traitement thermique de l'EPS ne supprime pas son action, ce qui permet d'exclure une nature protéique.
- Le traitement acide à chaud abolit son action, ce qui est compatible avec un polymère glucidique, hydrolysable dans ces conditions.



Les candidats ont eu l'occasion de montrer la rigueur de leur raisonnement et de leur vocabulaire, ou inversement. Ainsi, le terme « dégradation » d'une protéine ne précise pas s'il s'agit d'une dénaturation ou d'une hydrolyse.

Certains candidats ont avec pertinence justifié la nécessité de la neutralisation du surnageant après traitement acide à chaud.

Beaucoup de candidats ont mal exploité les résultats des cultures en milieu liquide qui permettent de s'assurer que l'action de l'EPS n'affecte pas la viabilité et la croissance de la souche testée et donc que l'action de ce composé est bien d'inhiber la formation de biofilm.

ÉPREUVE PRATIQUE DE BIOCHIMIE PHYSIOLOGIE

Modulation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase par un anticorps monoclonal murin

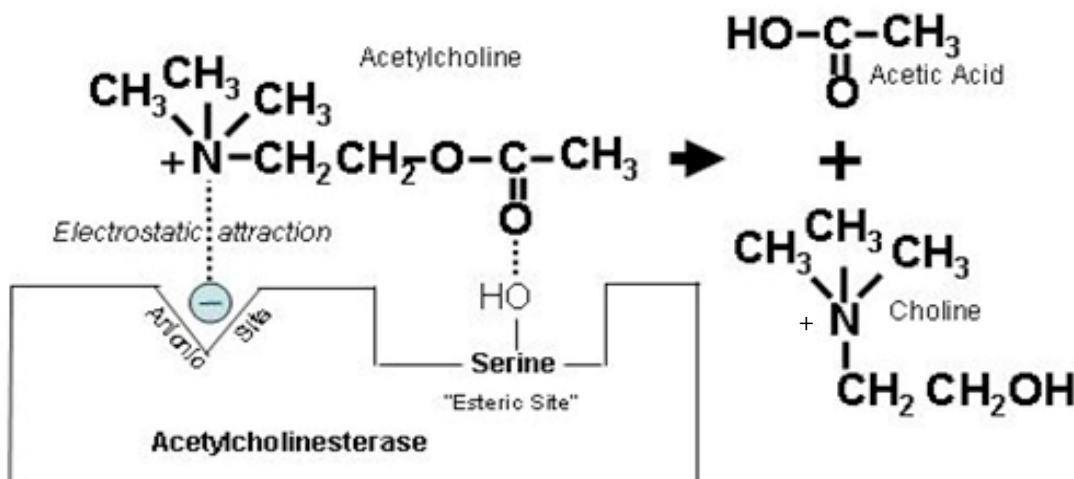
Sujet proposé par Établi par

Christine Benayoun, Patrice Cazaubon, Frédéric Ducancel et Florence Rivenet.

Introduction

Les cholinestérases sont des hydrolases à sérine active. Elles sont responsables, chez les vertébrés, de l'hydrolyse des esters de choline au niveau des synapses cholinergiques dans le système nerveux central et dans les jonctions neuromusculaires. Parmi les cholinestérases, l'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7) joue un rôle physiologique majeur [1].

Elle participe à la régulation de l'action de l'acétylcholine lors de la transmission de l'influx nerveux par dégradation de cette dernière, la choline générée étant recapturée par les extrémités présynaptiques.



Son inhibition entraîne une augmentation de la concentration en acétylcholine dans les synapses nicotiniques et muscariniques, allongeant le temps de stimulation des récepteurs.

Il existe des inhibiteurs réversibles et des inactivateurs irréversibles de l'acétylcholinestérase. Les premiers, parmi lesquels la tacrine (9-amino-1,2,3,4-tétra-hydroacridine), sont utilisés dans le traitement de différentes maladies ou troubles fonctionnels tels que la myasthénie, l'atonie intestinale, la maladie d'Alzheimer ou les troubles dyspeptiques.

Récemment, de nombreux anticorps polyclonaux et monoclonaux ont été préparés contre les AChE de différentes espèces animales. Certains d'entre eux inhibent l'activité de l'enzyme [2]. De telles molécules constituent pour les chercheurs des outils de choix pour étudier les caractéristiques structurales et fonctionnelles des AChE [3].

Le sujet propose d'étudier et d'établir la nature de l'activité inhibitrice d'un anticorps monoclonal murin sur l'acétylcholinestérase de gymnote (anguille électrique).

Le candidat dispose d'un tube contenant 1 mL de liquide d'ascite de souris. Ce liquide d'ascite a été obtenu par injection d'un hybridome murin produisant l'anticorps anti-AChE F410 (immunoglobuline de type G1).

I- Purification de l'anticorps

1.1- Réalisation de la chromatographie

- Diluer au demi, en tube à hémolyse, le liquide d'ascite dans du tampon de liaison.
- A l'aide d'une seringue de 2 mL équipée d'un filtre de 0,45 μm , procéder à la filtration du liquide d'ascite dilué.
- Rincer le tube, la seringue et le filtre avec 1 mL de tampon de liaison.
- Maintenir le tube de liquide d'ascite dilué et filtré dans la glace jusqu'à son utilisation.
- Rincer la colonne vide avec 5 mL de tampon de liaison.
- Introduire la totalité de la protéine G-sépharose (la hauteur de gel sédimenté doit être de 0,5 cm environ).
- Rincer le gel quatre fois avec 5 mL de tampon de liaison.

A partir de ce stade, ne jamais laisser le gel à sec.

- Laisser le niveau de tampon affleurer en surface du gel.
- Déposer les 3 mL de liquide d'ascite dilué.
- Récupérer la totalité de la fraction non retenue puis refermer la colonne.
- Déposer délicatement cette fraction sur la colonne et récupérer à nouveau l'effluent (NR) ; le stocker dans la glace.
- Laver le gel quatre fois avec 5 mL de tampon de liaison et récupérer les quatre fractions de lavage correspondantes (L1 à L4).
- Préparer huit microtubes de 1,5 mL contenant chacun 0,5 mL de tampon de neutralisation, ces tubes seront repérés : E1 à E8.
- Repérer sur chaque tube la hauteur correspondant à un volume de 1mL.
- Laisser le niveau de tampon de liaison affleurer en surface du gel puis éluer avec du tampon d'élution.
- Collecter huit fractions de 0,5 mL dans les tubes E1 à E8.

Réactifs

- tampon de liaison : phosphate de sodium 20 mmol.L^{-1} ; pH 7,0
- tampon de neutralisation : Tris-HCl 1 mol.L^{-1} ; pH 9,0
- tampon d'élution : glycine 0,1 mol.L^{-1} pH 3
- protéine G sépharose (annexe 1).

1.2- Suivi de la purification

1.2.1 Mode opératoire

- Mesurer les absorbances à 280 nm de l'effluent NR, des fractions de lavage L1 à L4 et des fractions d'élution E1 à E8.
- Réunir, si nécessaire, les fractions E_i dont l'absorbance à 280 nm est supérieure à 0,100.
- Réaliser un spectre d'absorption convenable des fractions réunies.
- Conserver l'anticorps purifié dans la glace.

1.2.2. Compte-rendu

- Expliquer, à l'aide d'un schéma, le principe de la séparation mise en œuvre.
- Commenter le spectre obtenu.
- Estimer la concentration massique finale en anticorps en g.L^{-1} .

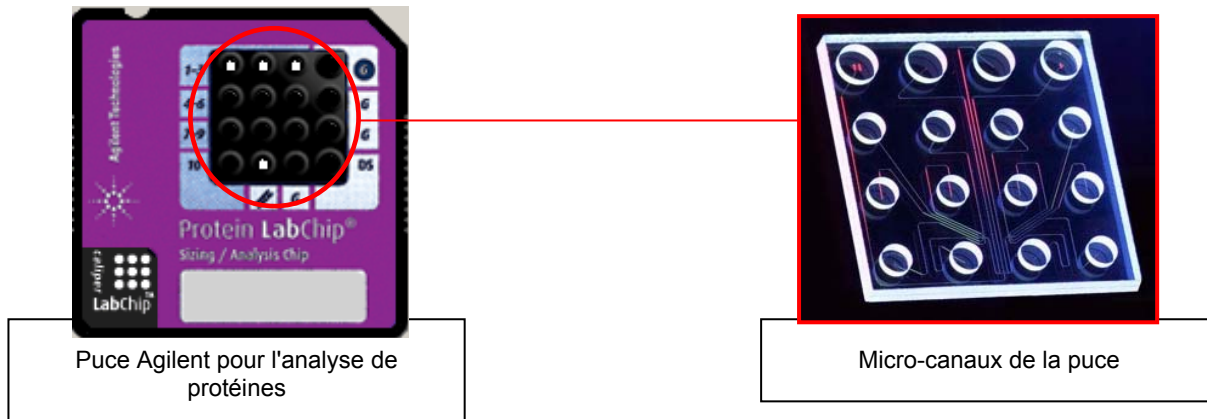
Données :

Coefficient d'absorption massique : $\varepsilon_{\text{Anticorps}}^{280 \text{ nm}} = 148 \text{ m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$

Trajet optique : $l = 10^{-2} \text{ m}$

1.3- Contrôle de la purification par la technologie « Lab-on-a-ship » (laboratoire-électrophorèse sur puce) via un Bioanalyser Agilent.

La technologie "Lab-on-a-ship" repose sur le principe d'une électrophorèse classique en conditions dénaturantes, transféré au format d'une puce, réduisant ainsi le temps de migration et la consommation d'échantillon (figures ci-dessous).



Une puce regroupe seize puits dont quatre pour le gel de migration, un pour la solution de lavage, un pour le standard externe et dix pour les échantillons. Les puits sont interconnectés *via* des micro-canaux formés dans la puce de verre. La puce Agilent protéine 80 qui sera utilisée pour contrôler la purification de l'anticorps monoclonal, couvre le domaine de fractionnement de 5 à 80 kDa.

1.3.1 Mode opératoire.

Le test de contrôle de la purification de l'anticorps sera effectué par un examinateur. En effet, une puce permet la migration de dix échantillons à la fois et l'électrophorèse doit impérativement être réalisée extemporanément après le dépôt de l'ensemble des dix échantillons. Les échantillons seront tous réduits et dénaturés en présence de 2-mercaptoéthanol, de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) et par traitement thermique (5 minutes à 95°C.).

Préparer l'échantillon comme indiqué ci-dessous :

- Transférer 5 μL de la solution d'anticorps purifié dans un microtube de 0,5 mL identifié avec le numéro de poste.
- Stocker le tube dans la glace.

1.3.2 Interprétation et compte-rendu.

Analyser et commenter les résultats.

II- Etude de l'effet de l'anticorps Mab F410 sur l'AChE de gymnote

2.1- Etude des paramètres cinétiques de l'AChE de gymnote

Selon les données de la littérature [1], la constante de Michaelis (K_M) de l'AChE de gymnote vis-à-vis de l'acétylthiocholine (ATC) est de l'ordre de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dans le standard expérimental défini ci-dessous.

2.1.1 Protocole.

- Déterminer, à température ambiante, les paramètres cinétiques de l'enzyme AChE de gymnote pour l'ATC, par méthode discontinue "deux points" avec un $\Delta t = 2$ minutes, selon le mode opératoire ci-dessous.
- Tester douze concentrations initiales en ATC variant de 0,5 K_M à 10 K_M .

- Mode opératoire :

- Introduire dans une cuve :
1 mL de DTNB

- x μL d'ATC
- 950 – x μL de tampon phosphate.
- Déclencher la réaction par ajout de 50 μL d'AChE 10 U.mL^{-1} .
- Stopper la réaction par ajout à la P_{1000} de 200 μL de tacrine.
- Lire l'absorbance à 405 nm en moins de 30 minutes.

Données :

- La durée de la période de vitesse initiale pour une concentration en ATC de 0,5 K_M est supérieure à 5 minutes.
- Une unité enzymatique (U) correspond à la quantité d'enzyme provoquant l'augmentation d'une unité d'absorbance par minute dans les conditions du standard expérimental précédemment défini.

Réactifs

- Tampon phosphate : phosphate de potassium 50 mmol.L^{-1} ; albumine sérique de bœuf 0,1% (m/v); pH 7,4.
- AChE de gymnote 20 U.mL^{-1} préparée en tampon phosphate de potassium 50 mmol.L^{-1} ; pH 7,4 ; albumine sérique de bœuf 0,1% (m/v).
- ATC 40 mmol.L^{-1} en tampon phosphate.
- DTNB (5,5'dithiobis(2-nitro-benzoic acid)) 16 mmol.L^{-1} en tampon phosphate.
- Tacrine $3.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ en tampon phosphate.

2.1.2. Compte-rendu

- Présenter, sous forme d'un tableau, le protocole expérimental mis en œuvre.
- Détailler la réalisation d'un protocole "deux points" pour l'une des concentrations testées.
- Exploiter les résultats obtenus.
- Commenter l'effet de la concentration en substrat sur l'activité de l'enzyme.
- Déterminer la valeur de K_M et V_{\max} .
- Exploiter les résultats expérimentaux aux fortes concentrations en substrat en utilisant une modélisation appropriée.

2.2. Etude de l'effet du Mab 410 sur l'activité de l'AChE de gymnote.

2.2.1 Mode opératoire.

- Mélanger 400 μL d'anticorps, ajusté à 3,5 mg.L^{-1} en tampon phosphate, avec 400 μL d'AChE à 20 U.mL^{-1} .
- Incuber à température ambiante pendant au moins 30 minutes.
- Déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme après action de l'anticorps en mettant en œuvre exactement le même protocole expérimental que précédemment.

2.2.2. Compte-rendu

- Exploiter les résultats obtenus.
- Commenter l'effet de la concentration en substrat sur l'activité de l'enzyme après action de l'anticorps.
- Déterminer la valeur de K'_M et V'_{\max} .
- Conclure.
- Interpréter les résultats expérimentaux obtenus à l'aide des informations structurales fournies en annexe 3.

ELIMINER LES DECHETS CONFORMEMENT AUX INDICATIONS DE L'ANNEXE 2.

Remerciements

Le jury remercie chaleureusement les membres du service de pharmacologie et d'immunoanalyse du CEA-Saclay pour leur contribution à la préparation de ce sujet (Stéphanie, Patricia, Marie-Claire, Hervé et Christophe), ainsi que Jacques Grassi pour ses commentaires éclairés sur la profondeur de la gorge catalytique de l'AChE.

Références bibliographiques

- 1] Simon Stéphanie, Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) « Structure fonctionnelle de l'acétylcholinestérase : mise en évidence d'un nouveau site régulateur, organisation des oligomères », 7 Mai 1999.

- 2] Rémy, M.H., Frobert, Y. and Grassi, J. (1995). Characterization of monoclonal antibodies that strongly inhibit *Electrophorus electricus* acetylcholinesterase. *Eur. J. Biochem.*, **231**, pp.651-658.
- 3] Simon, S., Le Goff, A., Frobert, Y., Grassi, J. and Massoulié, J. (1999). The binding sites of inhibitory monoclonal antibodies on acetylcholinesterase. *The J. Biol. Chem.*, **274 (39)**, pp. 27740-27746.
- 4] Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. and Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, **253**, pp. 872-879.

Annexe 1

Extrait catalogue GE-Health care

Native protein G and protein A differ in their binding strength to Immunoglobulins (Ig) from different species and subclasses.

The table below gives an overview of binding strengths of protein G and protein A to different Ig species and subclasses.

| Species | Ig Subclass | Protein A | Protein G |
|---------|--------------------|-----------|-----------|
| Human | Total Ig | +++ | +++ |
| | IgG1, IgG2, IgG4 | +++ | +++ |
| | IgG3 | + | +++ |
| | IgD | - | - |
| | IgD | + | - |
| | Fab | + | + |
| | ScF _v | + | - |
| Mouse | Total Ig | +++ | +++ |
| | IgG1 | + | ++ |
| | IgG2a, IgG2b, IgG3 | +++ | +++ |
| | IgM | - | - |

+++ : strong binding, ++ : medium binding, + : weak binding, - : no binding.

Annexe 2

Données de sécurité

ÉTIQUETAGE ET ELIMINATION DES PRÉPARATIONS AU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

D'après l'arrêté du 9 novembre 2004, transposant la directive 1999/45/CE du 31 mai 1999

L'étiquetage dépend des concentrations finales des produits dans la préparation

L'évaluation de la dangerosité des produits utilisés au laboratoire de biochimie est complexe, car il s'agit de mélanges de plusieurs produits chimiques. Il existe des règles, elles tiennent compte de la concentration des différents produits dans le réactif.

Les limites de concentration sont exprimées en pourcentage :

$$\frac{\text{Masse du produit}}{\text{Masse de la préparation}}$$

Comme les préparations sont souvent diluées et se réalisent généralement en solution aqueuse, ce pourcentage masse/masse peut être remplacé par un pourcentage en g/100 mL :

$$\frac{\text{Masse du produit}}{\text{Volume de la préparation}}$$

Lors de la manipulation d'un réactif contenant une substance à risque, il faut tenir compte de la concentration de cette substance dans le réactif, pour suivre les précautions d'usage.



Par la suite, il faut tenir compte de sa concentration dans le mélange réactionnel, pour savoir si les précautions sont toujours nécessaires.

Gestion des déchets




À la fin d'une manipulation, les mélanges réactionnels et les restes de réactif sont à considérer comme déchets chimiques. Pour savoir si une récupération est nécessaire, afin de les acheminer vers une usine de traitement, il suffit de connaître la concentration finale dans le mélange réactionnel des substances à risque et de suivre les recommandations.




Etiquetage des produits chimiques

Effets corrosifs et irritants

| | Phrases R et S associées | Concentrations limites (m/v) | Pictogramme | Phrases R | Concentration de la solution fournie |
|--|--------------------------|------------------------------|--|------------|---|
| DTNB  Xi | R 36/37/38 S 26-36 | $C \geq 20\%$ |  Xi | R 36/37/38 | 16 mmol.L ⁻¹ (MM = 396,3 g/mol) |
| | | $C < 20\%$ | - | - | |

Effets létaux aigus




| | Phrases R et S associées | Concentrations limites (m/v) | Pictogramme | Phrases R | Concentration de la solution fournie |
|---|------------------------------------|------------------------------|--|------------------|---|
| ATC  T | R 21-25-36/37/38 S 26-36 | $C \geq 25\%$ |  T | R 21-25-36/37/38 | 40 mmol.L ⁻¹ (MM = 289,2 g/mol) |
| | | $3\% \leq C < 25\%$ |  Xn | R 20, 21 | |
| | | $C < 3\%$ | - | - | |

| | Phrases R et S associées | Concentrations limites (m/v) | Pictogramme | Phrases R | Concentration de la solution fournie |
|--|------------------------------------|------------------------------|--|---------------|--|
| Tacrine  T | R 25-36/37/38 S 26-36-45 | $C \geq 25\%$ |  T | R 25-36/37/38 | 0,3 mmol.L ⁻¹ (MM = 234,7 g/mol) |
| | | $3\% \leq C < 25\%$ |  Xn | R 20, 21 | |
| | | $C < 3\%$ | - | - | |

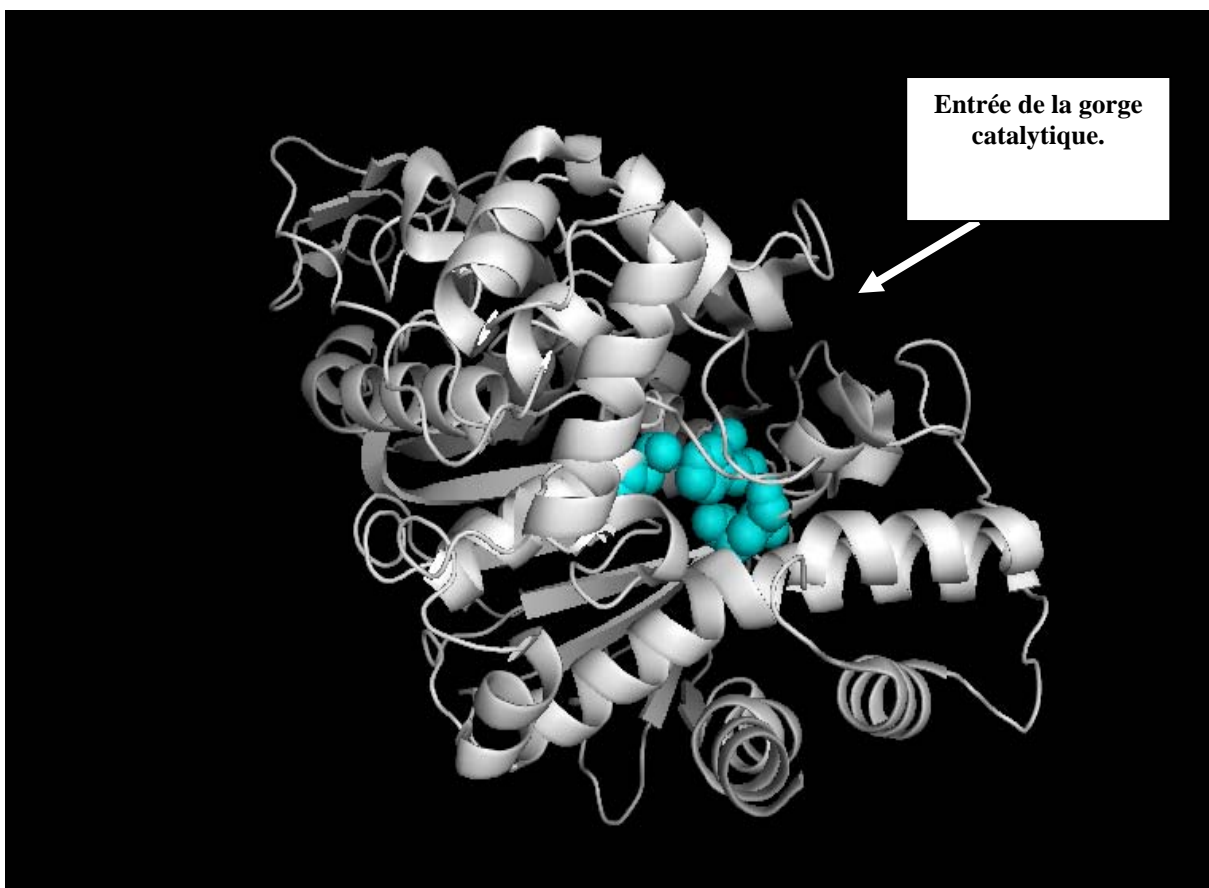
Gestion des déchets chimiques

D'après le décret N° 2002-540 du 18 avril 2002, les déchets chimiques sont considérés comme dangereux, lorsque :

- ils contiennent une ou plusieurs substances classées T, C, Xn, Xi ;
- la concentration totale est supérieure ou égale à certains seuils.

| Symbole | Signification | Seuil de concentration totale |
|--|---------------------------------------|-------------------------------|
|  T | Toxique R 48 R39 R 23, R24, R25 | $\geq 1\%$ $\geq 3\%$ |
|  Xi | Irritant R 36, 37, 38 R 41 | $\geq 20\%$ $\geq 5\%$ |
|  Xn | Nocif R 20, 21, 22 R 68,48 | $\geq 25\%$ $\geq 10\%$ |

Annexe 3 Données structurales (I)

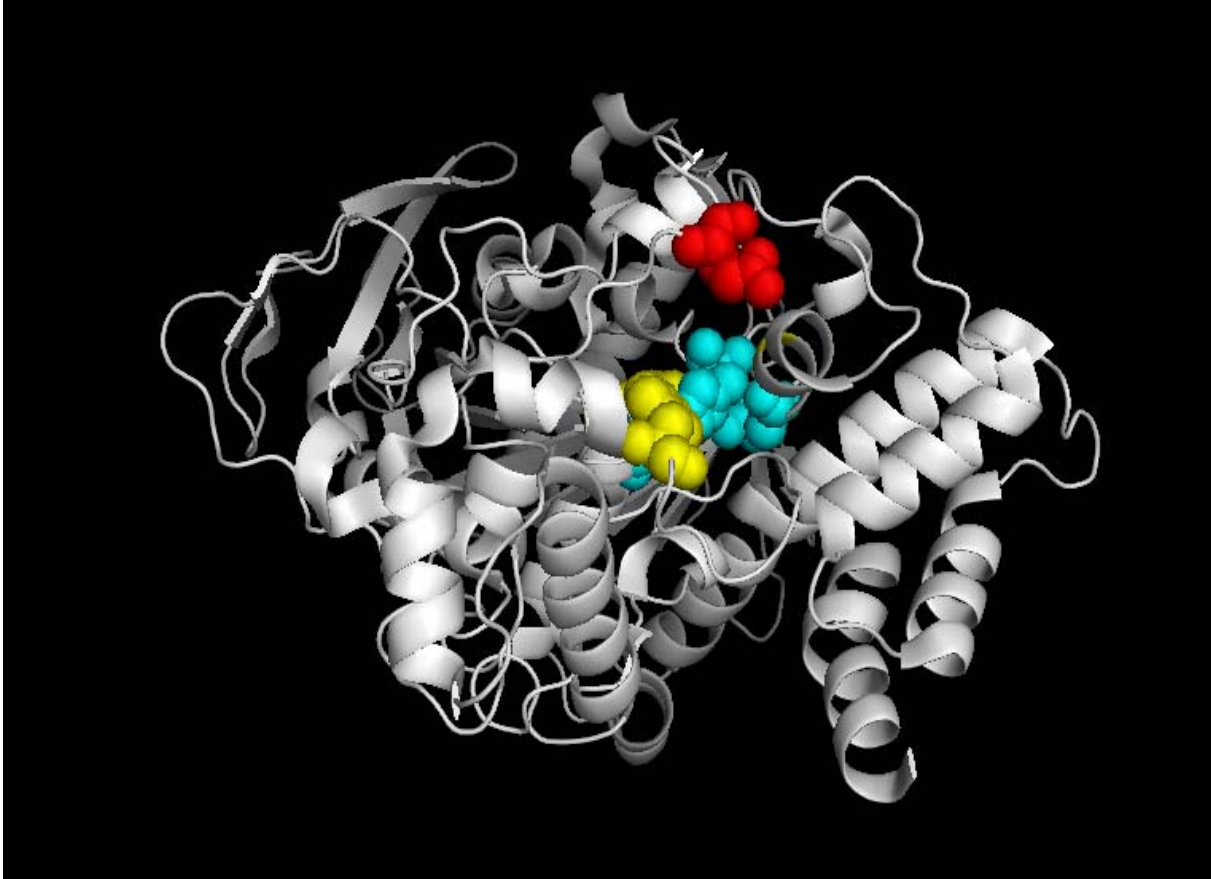


Structure tridimensionnelle de l'AChE de torpille [4].
Représentation latérale de l'AChE.

En bleu clair sont représentés les acides aminés de la triade catalytique au sein du site actif de l'AChE de torpille :
Ser 200, Glu 327 et His 440.

Le site catalytique se situe à 18-20 Å de la surface de l'enzyme.

Données structurales (II)



Structure tridimensionnelle de l'AChE de torpille [4]. Représentation de face de l'AChE.

En bleu clair sont représentés les acides aminés de la triade catalytique.
En rouge est indiqué l'acide aminé crucial au sein de l'épitope reconnu par
l'anti-AChE F410.
En jaune, deux acides aminés principaux du site périphérique.

PARTIE E Mise en évidence et quantification d'un gène de virulence de *S. aureus*

L'objectif était de vérifier la faisabilité de l'amplification et surtout de la quantification d'une séquence du gène *nuc* que l'on savait être présent chez la bactérie testée.

Le mode opératoire et les questions étaient rédigés avec le souci d'être abordables par des non spécialistes de la technique de PCR quantitative qui est maintenant cependant une technique classique, notamment en microbiologie.

Les cinétiques d'amplification présentent une phase exponentielle (comme les courbes de croissance bactériennes) durant laquelle l'efficacité d'amplification est maximale. C'est cette phase qui présente la meilleure reproductibilité et que l'on utilise pour les quantifications.

La dérivée de la courbe de dénaturation thermique présentait un pic unique qui montrait l'unicité de l'amplicon obtenu et donc la spécificité de cible de l'amplification.

Les différences de C_T attendues : 1 entre les dilutions au 1/10 et au 1/20, et 3,32 entre les dilutions au 1/10 et au 1/100 ont été obtenues et ont permis de conclure à la faisabilité de la quantification du gène *nuc* et donc des staphylocoques par cette méthode, dans la mesure où la spécificité taxonomique est vérifiée, ce qui n'était pas testé ici.

RAPPORT DE L'ÉPREUVE DE TP DE BIOCHIMIE PHYSIOLOGIE

Rapport établi par Christine BENAYOUN, Patrice CAZAUBON,
Frédéric DUCANCEL et Florence RIVENET

Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : 9,68.

Meilleure note : 17 ; note la plus basse : 1,8.

12 notes sur 25 sont supérieures ou égales à 10.

L'attitude de l'ensemble des candidats s'est révélée tout à fait satisfaisante.

La plupart d'entre eux ont conduit la manipulation jusqu'à son terme même si peu de candidats sont parvenus à réaliser l'exploitation finale.

Le sujet consistait à étudier le pouvoir inhibiteur d'un anticorps monoclonal murin vis-à-vis de l'acétylcholinestérase de gymnote.

Dans la première partie, la purification de l'anticorps était réalisée par chromatographie d'affinité, sur protéine G. Le jury déplore que la moitié des candidats n'ait pas su expliquer le principe de cette chromatographie sous forme d'un schéma explicite.

De plus, les gestes techniques essentiels permettant d'obtenir une bonne purification ont été mal maîtrisés.

Des lacunes concernant des connaissances de base pour la réalisation de la spectrophotométrie ont interpellé le jury (témoins absents ou fantaisistes, non dilution avec des absorbances en dehors de la limite de lecture du spectrophotomètre, difficulté dans la conduite de réalisation d'un spectre, méconnaissance surprenante du domaine spectral de l'UV...).

Le commentaire du spectre a souvent déçu les examinateurs.

L'unité internationale du coefficient d'absorption massique a dérouté de nombreux candidats.

Les erreurs de calcul à partir de la loi de Beer-Lambert sont inadmissibles à ce niveau de concours.

Concernant la visualisation de la purification sur « lab-on-ship », aucun candidat n'a analysé ni commenté le chromatogramme du marqueur de poids moléculaire.

L'analyse du chromatogramme de l'échantillon, devait conduire à l'identification des bandes protéiques correspondant aux chaînes lourdes et légères réduites de l'anticorps. Les examinateurs ont noté une méconnaissance regrettable de la structure des anticorps !

La seconde partie concernait une étude des paramètres cinétiques de l'AChE seule ou associée à l'anticorps F410.

Le jury regrette une méconnaissance importante de la technique des cinétiques discontinues deux points :

- réalisation des témoins de compensation propres à chaque milieu réactionnel,
- respect de l'intervalle de temps imposé,
- réalisation d'un planning convenable de gestion de l'ensemble des cinétiques à réaliser.

Des erreurs grossières dans la réalisation de la gamme des concentrations de substrat ont été constatées.

Trop peu de candidats ont exploité les courbes directes, et n'ont donc pas visualisé l'inhibition par excès de substrat. En revanche, les déterminations de K_m et V_m par la représentation de Lineweaver-Burk ont été bien effectuées par la majorité d'entre eux.

Enfin, en ce qui concerne, l'interprétation de l'effet de l'anticorps sur l'activité de l'AChE, trop peu de candidats ont su exploiter les données structurales fournies et proposer des hypothèses sur le mécanisme de l'inhibition.

Pour conclure, le jury rappelle que la maîtrise des risques chimiques et biologiques est indispensable à la bonne réalisation de toute expérimentation.

EPREUVES ORALES
LEÇONS

- 1 Biochimie
Les petits ARNs: rôle structure et régulation
- 2 Biologie humaine
Les maladies lysosomiales
- 3 Biologie humaine
Les vitamines
- 4 Biochimie
Les organismes eucaryotes, production et consommation de gaz
- 5 Microbiologie
Pathogénèse des virus à ARN chez les mammifères
- 6 Microbiologie
L'ordre des mycoplasmatales
- 7 Biologie humaine
Le métabolisme énergétique du système nerveux central et ses applications
- 8 Microbiologie
Les protozoaires hématropes
- 9 Biochimie
Création par l'homme de nouvelles activités enzymatiques
- 10 Biologie humaine
La voie classique d'activation du complément
- 11 Biochimie
La réparation de l'ADN
- 12 Microbiologie
La mobilité des bactéries
- 13 Biologie humaine
Régulation de l'absorption cellulaire du glucose
- 14 Biologie humaine
Les cytokines immuno-suppressives
- 15 Biochimie
Le catabolisme des protéines
- 16 Microbiologie
Les bactéries lactiques
- 17 Biochimie
L'interactome: méthodes et limites
- 18 Biologie humaine
La superfamille des kinésines et leurs fonctions
- 19 Microbiologie
Moyens de lutte contre les virus des mammifères
- 20 Biochimie
L'élimination cellulaire des toxiques
- 21 Biologie humaine
Le globule rouge
- 22 Biologie humaine
Immunité dans le système nerveux central
- 23 Microbiologie
Les adéno-viridae: structure, biologie et applications
- 24 Biochimie
Signalisation et lipides
- 25 Microbiologie
Sécrétion et excrétion chez les bactéries

RAPPORT SUR LES LECONS DE BIOCHIMIE

Etabli par Monsieur Alain MOREL et Monsieur Michel GAVRILOVIC

Notes : 1-1,5-2,5-3,5-4-8-18-11.

Moyenne : 6,19/20

Le but des leçons pour le candidat est de proposer un exposé structuré, clair et exhaustif sur un sujet de biochimie ou de biologie moléculaire. Ces exposés doivent être le résultat d'un vrai travail pédagogique et donc être plus précisément la somme ou la compilation d'éléments existant dans les différents manuels et des connaissances personnelles. En aucun cas ils ne doivent être une redite d'un seul manuel à disposition. L'originalité de la présentation par rapport aux documents disponibles, mais aussi l'aspect formateur que le candidat veut montrer sont des éléments très importants qui nécessitent une bonne connaissance personnelle du domaine et des documents à disposition. Dans une leçon on doit toujours garder à l'esprit ce qui nous paraît essentiel de transmettre à travers celle-ci. La leçon qui est nécessairement descriptive doit s'appuyer sur des méthodes expérimentales sans lesquelles aucune logique scientifique ne pourrait être développée. De la bonne compréhension par le candidat des principes, des méthodes et des mécanismes moléculaires adaptés au sujet dépend la bonne transmission de l'information. Une explication logique basée sur les fondamentaux de la biochimie permet à l'auditoire de mieux comprendre et donc de retenir des notions qui peuvent paraître complexe. On constate malgré cela que trop de candidats ont du mal à réellement synthétiser et à transmettre un message scientifique clair lors de cet exercice. Ce défaut est la plupart du temps dû à un manque de connaissance d'éléments de cours qui ainsi mal compris ne sont donc pas toujours utilisés correctement. La synthèse de plusieurs ouvrages peut être un piège pour les candidats soit par la méconnaissance des ouvrages utilisés ou encore par l'usage pléthorique de manuel pour construire la leçon. Enfin si dans beaucoup de cas l'exercice est plutôt réussi, l'exposé manque souvent d'attractivité et de vivacité. Les leçons nécessitent toujours un support sous forme de schéma et de figures simples et claires, il est souvent remarqué une imprécision concernant les titres, les unités et les indications qui doivent figurer sur ces illustrations. En revanche, dans la plupart des cas un effort sur la présentation est fait. En dernier lieu les candidats doivent utiliser l'ensemble du temps donné pour la leçon. Les réponses aux questions doivent être concises, claires et doivent permettre au jury d'évaluer les connaissances générales des candidats.

RAPPORT SUR LES LECONS DE MICROBIOLOGIE

Etabli par Monsieur Enri-Jean BOULOUIS

Notes : 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 18.

Moyenne : 9,78

Les leçons de microbiologie ont été, pour plus de la moitié, correctement traitées. Deux types de sujets étaient proposés : des sujets très classiques pour lesquels on attendait du/de la candidat(e) un choix parmi les nombreuses notions à exposer ; et des sujets plus originaux nécessitant une réflexion et une connaissance préalable du domaine. La virologie et la parasitologie restent les parentes pauvres de la microbiologie pour les candidats. Un minimum de connaissance permet d'avoir le recul suffisant pour éviter des longueurs ou passer à côté de notions importantes. Le manque de fonds se traduit très vite par une leçon confuse, difficile à suivre et qui résiste mal à l'épreuve des questions dont l'importance ne doit pas être minimisée par les candidat(e)s : la précision et la clarté de réponses sont essentielles. Enfin, la forme reste un élément essentiel de la leçon. Si la forme théâtrale ou journalistique peut aller jusqu'à indisposer le jury, son antithèse, dépourvue d'illustrations et d'énergie, aboutit au même effet.

RAPPORT SUR LES LECONS DE BIOLOGIE HUMAINE

Etabli par Monsieur François LASBENNES et Monsieur Marc LANDRY

Notes : 01, 2, 4, 9,5, 11, 11, 12, 14, 15.

Moyenne : 8,83

Les performances des candidats dans l'épreuve des leçons sont honorables puisque plus de la moitié d'entre eux obtiennent une note supérieure à la moyenne et seuls trois candidats obtiennent des résultats très décevants. Pour autant que le faible nombre permette de tirer des conclusions, aucun type de sujet de biologie humaine (intégrée, cellulaire, moléculaire, etc.) ne favorise les candidats. En revanche, la pertinence du choix de la documentation est souvent le reflet de la qualité de la présentation. Certains candidats se sont laissés surprendre par une documentation abondante les conduisant à traiter le sujet sans originalité. Les sujets proposés ne peuvent être trouvés « tout ficelés » dans les ouvrages. Il est donc nécessaire d'organiser les données collectées dans plusieurs chapitres et ouvrages de telle sorte qu'elles aboutissent à une construction originale et logique. Le jury tient à souligner que, contrairement à l'écrit où les développements hors sujet sont nombreux, les leçons se caractérisent souvent par des oublis ou du moins, des parties traitées de manière superficielle. D'autres candidats ont eu du mal à rassembler les données nécessaires. La méconnaissance du sujet explique les difficultés rencontrées pour rechercher les ouvrages pertinents. En effet, le jury a constaté que ces candidats n'avaient pas demandé les ouvrages attendus. Il ne faut pas espérer que les documents mis à disposition permettent de compenser les lacunes dans les connaissances ; le temps imparti pour la préparation de la leçon ne permet en aucun cas d'acquérir l'information nécessaire à l'élaboration du sujet. Il est indispensable que le candidat connaisse assez bien le sujet pour pouvoir consacrer la majeure partie de son temps à l'organisation de la leçon. Les ouvrages ne peuvent lui procurer le soutien recherché qu'au terme de cette réflexion.

Dans cet exercice, le temps imparti aux questions est relativement court. Les performances des candidats reflètent en général celles dont ils ont fait preuve au cours de la leçon.

En conclusion, je jury souligne que la leçon est avant tout un exercice de communication. Le fait qu'elle doive être présentée au plus haut niveau possible ne dispense pas de faire preuve de qualités dans ce domaine. Ces qualités doivent transparaître dans la clarté de l'exposé, dans l'élocution, la tenue du tableau et la qualité des supports visuels. Rappelons toutefois que l'exubérance et l'emphase ne sont pas des critères de communication. Il ne faut pas confondre communication et spectacle.

Métagénome et métabolomique

Documents joints:

Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. W.R. Wikoffa, A.T. Anforab, J. Liub, P. G. Schultz, S.A. Lesley, E.C. Peters, G. Siuzdaka. Proc Nat Acad USA 2009 vol 106 p 3698-3703.

Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. S.R. Gill, M. Pop, R.T. DeBoy, P. B. Eckburg, P.J. Turnbaugh, B.S. Samuel, J.I. Gordon, D.A. Relman, C.M. Fraser-Liggett, K.E. Nelson. Sciences 2006 vol 312 p1355-1359.

Polarité planaire des cellules

Documents joints:

Ubiquitin Connects with Planar Cell Polarity. M.Mlodzik. Cell 2009 vol 137 p 209-211.

Regulation of Planar Cell Polarity by Smurf Ubiquitin Ligases. M. Narimatsu, R. Bose, M. Pye, R. Xsang, B. Miller, P. Ching, R. Sakuma, V. Luga, L. Roncari, L. Attisano, J.L. Wrana. Cell 2009 vol 137 p 295-307.

Inactivation des protéines kinases de la famille SRC

Documents joints:

Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. R. Roskoki Jr. Biochem Biophys Research Comm. 2004 vol 324 p 1155-1164.

Direct and specific inactivation of protein tyrosine kinases in the Src and FGFR families by reversible cysteine oxidation. D.J. Kemble, G. Sun. Proc Nat Acad Sciences USA 2009 vol 106 p 5070-5075.

Les anticorps synthétiques

Documents joints :

Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: A dominant role for tyrosine in antigen recognition. F.A. Fellouse, C. Wiesmann, S.S. Sidhu. Proc Nat Acad Sciences USA 2004 vol 101 p 12467-12472.

Variants of the Antibody Herceptin That Interact with HER2 and VEGF at the Antigen Binding Site. J. Bostrom, S.F. Yu, D. Kan, B.A. Appleton, C.V. Lee, K. Billeci, W. Man, F. Peal, S. Ross, C. Wiesmann, G. Fuh. Science 2009 vol 323 p 1610-1614.

Le repliement des protéines dans le reticulum

Documents joints:

On the Mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. J.J. Credle, J.S. Finer-Moore, F.R. Papa, R.M. Stroud, P. Walter. Proc Nat Acad Sciences USA 2005 vol 102 p 18773-18784.

Comprehensive Characterization of Genes Required for Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. M.C. Jonikas, S.R. Collins, V. Denic, E. Oh, E.M. Quan, V. Schmid, J. Weibezahn, B. Schwappach, P. Walter, J.S. Weissman, M. Schuldiner. Science 2009 vol 323 p 1693- 1697.

L'uracile dans l'ADN : conséquences et réparation

Documents joints:

Uracil in DNA- occurrence, consequences and repair. H.E. Krokan, F. Drablos, G. Slupphaug. Oncogene 2002 vol 21 p 8935-8948.

Base Excision by Thimine DNA Glycolysylase Mediates DNA-Directed Cytotoxicity of 5-fluorouracil. C. Kunz, F. Focke, Y. Saito, D. Schuermann, T. Lettieri, J. Selfridge, P. Schär. PLoS Biology 2009 vol 7 p 967-979.

Palmitoylation des récepteurs

Documents joints :

Palmitoylation of Ligands, Receptors, and Intracellular Signaling Molecules. M.D. Resh. Sciencemag 2009 p 1-14.

Distinct Subcellular Localization for Constitutive and Agonist-modulated Palmitoylation of the Human δ Opioid Receptor. U.E. Petäjä-Repo, M. Hogue, T.T. Leskelä, P.M.H. Markkanen, J.T. Tuusa, M. Bouvier. J. Biol. Chem 2006 vol 281 p15780-15789.

Polymorphismes silencieux et spécificité de substrat

Documents joints:

The Epothilones: Translating from the Laboratory to the Clinic. James J. Lee and Sandra M. Swain
Clin. Cancer. Res. 2008;14(6) March 15, 2008 p1618-1624.

A "silent" Polymorphism in the MDR1 . H.E. Krokan, F. Drablos, G. slupphaug. Oncogene 2002 vol 21 p 8935-8948.

Gradient chlorure et désinhibition en conditions douloureuses

Documents joints :

Jeffrey A. M. Coull, Simon Beggs, Dominic Boudreau, Dominick Boivin, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Claude Gravel, Michael W. Salter & Yves De Koninck (2005) *BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain.* Nature, 438, 1017-1021.

Yves De Koninck (2007) *Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target.* Current Opinion in Pharmacology, 7:93–99.

Régulation de l'activité neuronale par des méthodes d'optogénétique

Documents joints:

Viviana Gradinaru, Kimberly R. Thompson, Feng Zhang, Murtaza Mogri, Kenneth Kay, M. Bret Schneider, and Karl Deisseroth (2007) *Targeting and Readout Strategies for Fast Optical Neural Control In Vitro and In Vivo.* The Journal of Neuroscience, 27(52):14231–14238.

Raag D. Airan, Kimberly R. Thompson, Lief E. Fenno, Hannah Bernstein, and Karl Deisseroth (2009) *Temporally precise in vivo control of intracellular signalling.* Nature, 458, 1025-1029.

David E. Moorman and Gary Aston-Jones (2009) *Optical control of reward* Nature, 458, 980-981.

Transplantation de cellules souches à visée thérapeutique dans la maladie de Parkinson

Documents joints :

A. Brederlau, A.S. Coreira, S.V. Anisimov, M. Elmi, G. Paul, L. Roybon, A. Morizane, F. Bergquist, I. Riebe, U. Nannmark, M. Carta, E. Hanse, J. Takahashi, Y. Sasai, K. Funahara, P. Brundin, P.S. Eriksson, J.Y. Li (2006) *Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells to a Rat Model of Parkinson's Disease: Effect of In Vitro Differentiation on Graft Survival and Teratoma Formation.* Stem Cells, 24,1433–1440

Jia-Yi Li, Nicolaj S. Christophersen, Vanessa Hall, Denis Soulet and Patrik Brundin (2007) *Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair.* Trends in Neurosciences, 31 (3), 146-153.

Sécrétion calcium-dépendante dans les cellules endocrines

Documents joints :

Guy A. Rutter, Takashi Tsuboi, Magalie A. Ravier. (2006) *Ca²⁺ microdomains and the control of insulin secretion.* Cell Calcium 40 539–551

V. Marigo, K. Courville, W.H. Hsu, J.M. Feng, H. Cheng. (2009) *TRPM4 impacts on Ca²⁺ signals during agonist-induced insulin secretion in pancreatic β -cells.* Molecular and Cellular Endocrinology 299 194–203.

Rein et plexus choroïdes: une même fonction?

Documents joints:

Scott M. Ocheltree, Hong Shen, Yongjun Hu, Richard F. Keep, and David E. Smith. (2005) *Role and Relevance of Peptide Transporter 2 (PEPT2) in the Kidney and Choroid Plexus: In Vivo Studies with Glycylsarcosine in Wild-Type and PEPT2 Knockout Mice.* J. Pharm. Exp. Ther. 315 : 240–247 ;

Mohamed A. Kamali, Richard F. Keep and David E. Smith. (2008) *Role and Relevance of PEPT2 in Drug Disposition, Dynamics, and Toxicity.* Drug Metab. Pharmacokinet. 23 (4) : 236–242.

La sélectivité des canaux ioniques

Documents joints:

Eric Gouaux and Roderick MacKinnon. (2005) *Principles of Selective Ion Transport in Channels and Pumps* Science 310 : 1461-1465.

Indira H. Shrivastava, D. Peter Tieleman, Philip C. Biggin, and Mark S. P. Sansom. (2002) *K⁺ versus Na⁺ Ions in a K Channel Selectivity Filter: A Simulation Study.* Biophysical Journal 83 : 633– 645.

La diversité des récepteurs olfactifs

Documents joints:

Elena V. Samsonova, Peter Krause, Thomas Bäck and Ad P. IJzerman. (2007) *Characteristic Amino Acid Combinations in Olfactory G Protein-Coupled Receptors*. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics* 67:154–166.

Zita Peterlin, Yadi Li, Guangxing Sun, Rohan Shah, Stuart Firestein, and Kevin Ryan. (2008) *The Importance of Odorant Conformation to the Binding and Activation of a Representative Olfactory Receptor*. *Chemistry & Biology* 15 : 1317–1327.

Les anticorps antiidiotypiques enzymes

Documents joints:

Michael A. Krasnorutskii, Valentina N. Buneva and Georgy A. Nevinsky. (2008) *Antibodies against pancreatic ribonuclease A hydrolyze RNA and DNA*. *International Immunology*. 20 (8) : 1031–1040.

Michael A. Krasnorutskii, Valentina N. Buneva and Georgy A. Nevinsky. (2008) *Antibodies against RNA hydrolyze RNA and DNA*. *J. Mol. Recognit.* 21: 337–346.

Le voyage moléculaire du virus herpes simplex

Documents joints :

Snyder A, Polcicova K, Johnson DC. *Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons*. *J. Virol.* 2008 Nov; 82(21): 10613-24.

Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Douglas MW, Cunningham AL. *Transport and egress of herpes simplex virus in neurons*. *Rev Med. Virol.* 2008 Jan-Feb; 18(1): 35-51.

Les virus des hépatites carcinogènes et co-carcinogènes

Documents joints:

Tan A, Yeh SH, Liu CJ, Cheung C, Chen PJ. *Viral hepatocarcinogenesis: from infection to cancer*. *Liver Int.* 2008 Feb; 28(2): 175-88.

Machida K, Tsukamoto H, Mkrtychyan H, Duan L, Dynnyk A, Liu HM, Asahina K, Govindarajan S, Ray R, Ou JH, Seki E, Deshaies R, Miyake K, Lai MM. *Toll-like receptor 4 mediates synergism between alcohol and HCV in hepatic oncogenesis involving stem cell marker Nanog*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb3; 106(5): 1548-53.

Virus et CMH

Documents joints :

Røder G, Geironsen L, Bressendorff I, Paulsson K. *Viral proteins interfering with antigen presentation target the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex*. *J Virol.* 2008 Sep; 82(17): 8246-52.

McSharry BP, Burgert HG, Owen DP, Stanton RJ, Prod'homme V, Sester M, Koebernick K, Groh V, Spies T, Cox S, Little AM, Wang EC, Tomasec P, Wilkinson GW. *Adenovirus E3/19K promotes evasion of NK cell recognition by intracellular sequestration of the NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related proteins A and B*. *J. Virol.* 2008 May; 82(9): 4585-94.

Bactériome digestif: gardez moi de mes amis, les ennemis, je m'en charge

Documents joints :

Zaborin A, Romanowski K, Gerdes S, Holbrook C, Lepine F, Long J, Poroyko V, Diggle SP, Wilke A, Righetti K, Morozova I, Babrowski T, Liu DC, Zaborina O, Alverdy JC. *Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 14; 106(15): 6327-32.

Canny GO, McCormick BA. *Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within?* *Infect Immun.* 2008 Aug;76(8):3360-73.

Bactéries mutantes: l'avantage d'être associatif?

Documents joints :

Köhler T, Buckling A, van Delden C. *Cooperation and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* populations*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 14; 106(15): 6339-44.

Van Delden C, Iglewski BH. *Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections*. *Emerg. Infect. Dis.* 1998 Oct-Dec; 4(4): 551-60.

Endocrinologie et bactéries: la réponse des bactéries aux hormones de stress

Documents joints:

Freestone PP, Sandrini SM, Haigh RD, Lyte M. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection.

Trends Microbiol. 2008 Feb;16(2):55-64.

Zaborina O, Lepine F, Xiao G, Valuckaite V, Chen Y, Li T, Ciancio M, Zaborin A, Petrof EO, Turner JR, Rahme LG, Chang E, Alverdy JC. Dynorphin activates quorum sensing quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog. 2007 Mar;3(3):e35.

Pour les bactéries aussi, il n'y a pas de look sans gène

Documents joints:

Shiomi D, Sakai M, Niki H. Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein.

EMBO J. 2008 Dec 3;27(23):3081-91.

Young KD. Bacterial shape. Mol Microbiol. 2003 Aug;49(3):571-80.

Le ferroutage chez les bactéries

Documents joints :

Cescau S, Cwerman H, Létouffé S, Delepelaire P, Wandersman C, Biville F. Heme acquisition by hemophores.

Biometals. 2007 Jun;20(3-4) 603-13.

Wu J, Lin X, Xie H. Regulation of heme binding proteins by a novel transcriptional activator in *Porphyromonas gingivalis*.

J Bacteriol. 2009 Jan;191(1):115-22.

Vaccination contre le Lupus

Documents joints :

Daniel Zagury, Hélène Le Buanec, Alexis Mathian, Patrick Larcier, Roger Burnett, Zahir Amoura, Dominique Emilie, Gabriel Peltre, Armand Bensussan, Bernard Bizzini, Robert C. Gallo, and Sophie Koutouzov. IFN α kinoid vaccine-induced neutralizing antibodies prevent clinical manifestations in a lupus flare murine model PNAS , March 31, 2009, vol. 106 , no. 13 (5294–5299)

Timothy A. Stewart Neutralizing interferon alpha as a therapeutic approach to autoimmune diseases. Cytokine & Growth Factor Reviews 14 (2003) 139–154.

RAPPORT SUR LES ETUDES CRITIQUES DE DOSSIERS

Rapport établi par Messieurs H-J. BOULOUIS , M. GAVRILOVICH, M. LANDRY,
F. LASBENNES, et A. MOREL.

1- RÉSULTATS

18 ; 17 ; 15 ; 15 ; 15 ; 14 ; 14 ; 13 ; 11 ; 11 ; 11 ; 8 ; 8 ; 7 ; 6 ; 6 ; 6 ; 6 ; 6 ; 6 ; 4 ; 3 ; 3 ; 2 ; 0,25

Moyenne générale de l'épreuve : 9,01 / 20

Les statistiques montrent trois groupes aux performances très différentes. Le groupe le plus vaste est formé de 11 candidats dont la note est supérieure à 11/20. La moyenne de ce groupe est de 14/20. Il se distingue très nettement du groupe suivant, presque aussi grand (9 candidats) dont les notes s'échelonnent entre 6 et 8/20 et dont la moyenne n'est que de 6,55/20. Enfin, 5 candidats dépassés par cet exercice, ne franchissent pas la barre de 5/20. En microbiologie, le couple article de synthèse et article de recherche n'a finalement réussi qu'à un seul candidat. Si certains titres de dossier ont pu étonner, ils ne recouvraient cependant que des approches nouvelles de notions classiques.

Les candidats des deux premiers groupes cités ont compris le sujet mais l'ont plus ou moins bien maîtrisé. Il est probable que le manque de pratique dans la lecture d'articles a lourdement pénalisé le groupe le plus faible. Une difficulté consiste dans le fait que les articles scientifiques sont en langue anglaise. Toutefois le langage scientifique est relativement simple et ne doit pas être une gêne majeure pour des étudiants en sciences pour lesquels l'analyse bibliographique est un élément majeur de la formation scientifique.

Il est rappelé que l'ECD est un exercice incontournable pour de futurs enseignants en sciences. En effet, un cours doit pouvoir être actualisé constamment et l'enseignant a en charge d'effectuer une veille des connaissances par la lecture des publications originales concernant l'ensemble des disciplines de la biologie. Cette veille est essentielle pour transmettre des données d'actualité. En effet, les manuels aussi bien soient-ils, présentent invariablement un retard par rapport à l'actualité scientifique qui dans les meilleurs des cas est de 4 à 5 années. Ces manuels sont cependant indispensables pour comprendre les bases. L'exercice consiste donc à l'aide de deux ou trois articles sur un même thème de transmettre une présentation cohérente, c'est à dire, une présentation du contexte scientifique, puis une discussion des résultats et conclusions proposées par les auteurs sur les bases expérimentales documentées dans les papiers. Dans beaucoup de cas, un seul article est analysé et présenté. Il est rappelé que le terme « critique » figurant dans le nom de l'épreuve indique que le jury attend une réflexion plus qu'une simple description des articles. Une étude critique doit mettre en évidence les limitations des arguments expérimentaux fournis ou permettre une mise en perspective des conclusions et de leur intérêt scientifique. Pour la clarté de l'exposé des schémas doivent illustrer les résultats expérimentaux majeurs. Une telle analyse ne s'improvise pas le jour de l'épreuve et ne peut être acquise sans pratique.

Les performances des candidats lors des questions confirment en général celles de l'exposé. Les difficultés apparaissent surtout lorsque le sujet abordé s'éloigne du cadre strict du sujet de l'ECD ou lorsqu'il s'y rapporte sur des questions de chimie. Certains candidats montrent à cet égard, une grande faiblesse. Les questions de microbiologie ont cette année été néfastes à la plupart des candidat(e)s, des lacunes dans les connaissances de base en virologie comme en bactériologie et l'incompréhension de l'objet des articles de recherche apparaissant clairement au fil de l'interrogatoire. Enfin, plusieurs candidat(e)s ont oublié qu'ils/elles avaient affaire à une épreuve pédagogique.

RAPPORT SUR LA CHIMIE A L'ORAL

Rapport établi par Mademoiselle Jeanne-Laure DORMIEUX

En chimie, le niveau des candidats était très hétérogène : la moitié environ possédait manifestement des bases solides mais pour l'autre moitié, les connaissances se révélaient très superficielles.

Pour ceux-ci, il est indispensable de prendre conscience de l'importance de connaître les principes fondamentaux de la chimie présentés dans le programme, sans lesquels il est difficile d'aborder correctement les processus biochimiques.

En particulier, nous soulignons l'importance d'une part de la nomenclature (dont l'ignorance se révèle problématique pour la compréhension des réactions) et de la stéréochimie d'autre part. En effet, trop de confusions persistent entre configuration et conformation, terme qui n'est pas, comme le croient certains candidats, réservé aux protéines.

Dans l'étude critique de dossier, il est fondamental de comprendre les techniques expérimentales et les notions physico-chimiques impliquées (nature des réactions, constante d'affinité, fluorescence) car il est difficile de porter un œil critique sur les résultats obtenus sans la connaissance des techniques expérimentales utilisées.

Réflexions sur la session 2009

Rapport établi par Monsieur François LASBENNES

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus à l'admissibilité et à l'admission montre qu'une vingtaine de candidats avait de sérieuses chances de succès, compromises quelquefois, par une seule défaillance. Ce résultat s'explique par le faible différentiel de points acquis lors des épreuves écrites. En effet, s'il est possible de dégager une tendance commune concernant le classement de chacune des trois épreuves écrites, le classement définitif est l'objet d'un remaniement entre les vingt premiers de l'écrit. Outre le fait que ce résultat justifie la sélection d'un nombre de candidats représentant 2,5 fois le nombre de postes mis au concours, il montre que rien n'est joué, ni dans un sens, ni dans l'autre pour la majorité des candidats admissibles. Il est remarquable à cet égard que le cinquième et le sixième à l'écrit échouent au concours. La plupart du temps, les candidats rétrogradent par suite de la conjonction de notes faibles en travaux pratiques et d'une défaillance dans l'une des deux épreuves orales ou même, les deux. Ainsi, alors que les candidats définitivement admis obtiennent une moyenne de 12,1/20 aux travaux pratiques, ceux qui rétrogradent obtiennent une moyenne de 8,3/20. Ces candidats ont donc perdu le potentiel de points acquis à l'écrit et il suffit alors qu'une difficulté apparaisse à l'oral pour que le succès soit définitivement compromis. Devant de tels résultats, il va de soi que le jury conseille fortement aux candidats de travailler toutes les épreuves du concours. Il souligne à cet égard, qu'un enseignant doit montrer des compétences correctes dans chacune d'entre elles.

De telles compétences exercées au plus haut niveau exigent une préparation et un entraînement intensifs, difficilement compatibles avec une activité professionnelle. Le jury comprend les difficultés rencontrées par les professeurs du secondaire qui, faute de concours interne, se présentent au concours externe. Il tient à les féliciter pour leurs efforts.

D'une manière générale, le jury se félicite de l'attitude des candidats. Il conçoit que des candidats aient flanché suite à la tension nerveuse engendrée par l'enjeu du concours. Il ne peut en revanche admettre une

attitude négative devant les exercices proposés et ose espérer qu'elle ne se justifie pas par le projet de se contenter de l'admissibilité qui, si elle est renouvelée, donne des avantages à un certifié.

Pour conclure, le jury est convaincu que, quelle que soit l'issue de cette longue et éprouvante épreuve, la grande majorité des candidats aura acquis un esprit de combativité qui leur sera utile à d'autres occasions de leur vie professionnelle.

LISTE DES OUVRAGES MIS A LA DISPOSITION DES CANDIDATS POUR LES EPREUVES ORALES

Biochimie

| AUTEURS | DOCUMENT | EDITEUR | COLLECTION | DATE | ISBN |
|--|---|---------------------------------------|---------------------------|------|---------------|
| Ameziane Lamoril | Principes de biologie moléculaire en biologie clinique | Elsevier | | | |
| Bhagavan, N.V. | Medical biochemistry (4e éd.) | Harcourt academic press | | 2001 | 0-12-095440-0 |
| Bogard, Marc / | Biologie moléculaire en biologie clinique. 1, Méthodes | Elsevier | OPTION BIO | 1998 | 2-84299-007-2 |
| Bogard, Marc / | Biologie moléculaire en biologie clinique. 2, Application en infectiologie et en cancérologie | Elsevier | OPTION BIO | 1999 | 2-84299-094-3 |
| Bogard, Marc / | Biologie moléculaire en biologie clinique. 3, Applications en génétique | Elsevier | OPTION BIO | 1999 | 2-84299-150-8 |
| Borel, Jacques-Paul/ Maquart, François-Xavier/ Le Peuch, Christian/ Randoux, A. | Biochimie dynamique | De Boeck | | 1997 | 2-8041-2453-3 |
| BRANDEN, C. / TOOZE, J. | Introduction à la structure des protéines | De Boeck | | 1996 | 2-8041-2109-7 |
| Cheftel, Jean-Claude / Cheftel, Henri / | Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Volume 1 | Technique et Documentation -Lavoisier | INGENIEURS PRATICIENS | 1992 | 2-85206-827-3 |
| Cheftel, Jean-Claude / Cheftel, Henri / | Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Volume 2 | Technique et Documentation | INGENIEURS PRATICIENS | 1977 | 2-85206-828-1 |
| Combarrous, Yves | Biochimie des communications cellulaires (hormones, neuromédiateurs, cytokines, facteurs de croissance) | Technique et Documentation | | 2004 | |
| Delattre, Durand, Jardillier | Biochimie pathologique | Flammarion Med Scien | | 2003 | |
| Durliat, Guy / | Biochimie structurale | Diderot | BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES | 1997 | 2-84352-002-9 |

| | | | | | |
|--|---|-----------------------------------|------------------------------|------|---------------|
| Etienne, Jacqueline | Biochimie génétique, biologie moléculaire (8e éd.) | Masson | Abrégés | 2004 | 2-225-85665-6 |
| GLICK, BERNARD R. / PASTERNAK, JACK J. | Molecular Biotechnology : Principles and Applications of Recombinant D.N.A. (3è ed) | American society for microbiology | | 2003 | 1-5581-224-4 |
| Griffiths, Anthony J.F. / Miller, Jeffrey H./ Suzuki, David T./ ... [et al.] | Introduction à l'analyse génétique (3e éd.) | De Boeck | | 2002 | 2-7445-0097-6 |
| HENNEN, GEORGES | Biochimie (1er cycle : DEUG SNV, PCEM, Pharmacie) | Dunod | | 1995 | 2-10-002620-8 |
| HERBOMEL, PHILIPPE | L'expression du génome, du noyau à l'organisme | ESTEM | | 1993 | 2-909455-14-9 |
| HORTON, R. / MORAN, L., / OCHS, R. / RAWN, J. | Principes de biochimie | De Boeck-Wesmaël | | 1994 | 2-8041-1578-X |
| Kamoun, Pierre | Biochimie et biologie moléculaire | Flammarion médecine-sciences | De la biologie à la clinique | 2003 | 2-257-10121-9 |
| LEHNINGER, A.L. | Lehninger Principles OF Biochemistry (4 th ed) | WH Freeman | | 2005 | 0-7167-4339-6 |
| LEHNINGER, A.L. | Principes de biochimie | Flammarion médecine-sciences | | 2000 | |
| LEWIN, B. | Gènes VIII | Prentice Hall | | 2004 | 0-13-123924-4 |
| LIPPARD, STEPHEN / BERG, JEREMY | Principes de biochimie minérale | De Boeck | | 1997 | 2-8041-2517-3 |
| Moussard | Biologie moléculaire : biochimie des communications cellulaires | De Boeck | | | 2-8041-3488-1 |
| Metzler, David | Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Vol. 1 | Harcourt academic press | | 2001 | 0-12-492540-5 |
| Metzler, David | Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Vol. 2 | Harcourt academic press | | 2003 | 0-12-492541-3 |

| | | | | | |
|--|---|--|--|------|-------------------|
| MURRAY, E.G.D. / GRANNER, D.K. / MAYES, P.A. / RODWELL, V.W. | Biochimie de Harper (2è ed) | DE BOECK/PRES SES DE LAVAL | | 2003 | 2-8041- 4118-7 |
| Pelmont, Jean | Enzymes : Catalyseurs du monde vivant | Presses Universitaires de Grenoble | Grenoble sciences | 1995 | 2-7061- 0655-7 |
| Pelmont, Jean | Enzymes : catalyseurs du monde vivant | EDP SCIENCES | Grenoble Sciences | 1995 | 2-86883- 453-1 |
| Price et Stevens | Fundamentals of enzymology | Oxford | | | 0-19- 850229-X |
| Primrose | Principes de génie génétique | De Boeck | | | |
| Ptashne, Mark / | A genetic switch : Phage lambda revisited (3rd ed.) | Blackwell Scientific Publications | | 2004 | 0-87969- 716-4 |
| Scriban, René | Biotechnologie | Tec et Doc | | 1999 | 2-7430- 0309-X |
| Shechter, Emmanuel | Biochimie et biophysique des membranes : aspects structuraux et fonctionnels (2è éd.) | Masson | ENSEIGNT DES SCIENCES DE LA VIE | 1997 | 2-225- 83009-6 |
| Stryer, Lubert | Biochimie (5e ed.) | Flammarion médecine- sciences | | 2003 | |
| TIXIER-VIDAL, ANDREE | Biologie cellulaire de la secrétion des protéines | PLAGE | Biologie : communication cell | 1997 | 2-84054- 051-7 |
| Voet, Donald / Voet, Judith G. | Biochimie | De Boeck | | 2005 | |
| Weil | Biochimie générale (9è ed) | Dunod | Sciences sup | 2001 | 1-10- 005573-9 |
| Zubay, Geoffrey | Biochemistry (4th ed.) | WCB | | 1998 | 0-697- 21900-3 |

Physiologie

| AUTEURS | DOCUMENT | EDITEUR | COLLECTION | DATE | ISBN |
|---|--|------------|---------------------------------|------|-----------------------|
| Alberts, Bruce / BRAY, D. / LEWIS, J. / RAFF, M. | Biologie moléculaire de la cellule (4è Ed) | Flammarion | | | 2-257- 16129-6 |
| Alberts, Bruce / BRAY, D. / LEWIS, J. / RAFF, M. | Biologie moléculaire de la cellule (4è Ed) | Flammarion | | 2004 | |
| Alberts, Bruce / BRAY, D. / LEWIS, J. / RAFF, M. | Molecular Biology of the Cell | | | 2002 | |
| BACH, JEAN- FRANCOIS | Immunologie | Flammarion | De la biologie à la clinique | 1999 | 2-257- 13590-3 |
| Bear, Mark F. / Connors, Barry W. / Paradiso, Michael A. | Neurosciences : A la découverte du cerveau | PRADEL | | 1998 | 2- 907516- 92-2 |
| Berne, Robert M. / Levy, Matthew N. | Physiology (4th ed.) | MOSBY | | 1998 | 0-8151- 0952-0 |
| Berne, Robert M. /Levy, Matthew N. / | Principles of physiology (2nd ed.) | MOSBY | | 1996 | 0-8151- 0523-1 |
| Boron, Boulpoep | Medical Physiology | SAUNDERS | | 2003 | 0-7216- 4360-1 |
| Breton-Gorius, Janine / Reyes, Felix / Rochant, Henri/ Rosa, Jean | L'Hématologie de Bernard Dreyfus | Flammarion | Médecine sciences | 1999 | 2-257- 13526-1 |
| Calas, André / Perrin, Jean- François/ Plas, Christian/ Vanneste, Patrick | Précis de Physiologie | Doin | Biosciences et techniques | 1997 | 2-7040- 0748-9 |
| Calvino, Bernard | Introduction à la physiologie | Belin | Belin-Sup sciences | 2003 | 2-7011- 3079-4 |
| Darnell, James /Lodish, Harvey /Arnold, Berk/ Baltimore, D. / | Molecular cell biology (5th ed.) | FREEMAN | | 2005 | |
| Darnell, James /Lodish, Harvey/Baltimore, D. /Arnold, Berk/ | Biologie moléculaire de la cellule (3e éd.) | De Boeck | | 1997 | 2-7445- 0001-1 |

| | | | | | |
|---|---|-----------------------|---|------|-----------------------|
| DREWS, ULRICH | Atlas de poche d'embryologie | Flammarion | | 1994 | 2-257- 10115-4 |
| Dupouy, Jean- Paul / | Hormones et grandes fonctions. Tome 1 | Ellipses-Marketing | | 1992 | 2-7298- 9282-6 |
| Dupouy, Jean- Paul / | Hormones et grandes fonctions. Tome 2 | Ellipses-Marketing | | 1993 | 2-7298- 9318-0 |
| Espinosa | Immunologie | Ellipses | | | 2-7298- 2433-2 |
| Ganong, William F. / | Physiologie médicale (19e ed.) | De Boeck Université | Sciences médicales. Série Claude Bernard | 2001 | 2-8041- 4016-4 |
| Gilbert, Scott F./Singer, Susan R./ | Biologie du développement (2e éd.) | DE BOECK & LARCIER | | 2004 | 2-8041- 4534-4 |
| Greenspan, Francis S. / Strewler, Gordon J./ | Basic & Clinical Endocrinology (5th ed.) | APPLETON & LANGE | | 1997 | 0-8385- 0588-0 |
| Greger, R. / Windhorst, U. | Comprehensive Human Physiology : From Cellular Mechanisms to Integration. Volume 1 | SPRINGER-VERLAG | | 1996 | 3-540- 58109-X |
| Greger, R. / Windhorst, U. | Comprehensive Human Physiology : From Cellular Mechanisms to Integration. Volume 2 | Springer | | 1996 | 3-540- 58109- |
| Guénard, Hervé | Physiologie humaine (3e éd.) | PRADEL | | 2002 | 2- 913996- 04-3 |
| Guyton, Arthur C. / Hall, John E. | Human physiology and mechanisms of disease (6th ed.) | SAUNDERS COMPANY | | 1997 | 0-7216- 3299-8 |
| Hammond, Constance | Cellular and Molecular Neurobiology | Academic Press | | 1996 | 0-12--8 |
| HERBERT, JOHN / WILKINSON, PETER/ STOTT, DAVID | The Dictionary of Immunology : Fourth edition | Academic Press | | 1995 | 0-12- 752025- 2 |
| Idelman, Simon/ Verdetti, Jean/ | Endocrinologie et communications cellulaires | EDP SCIENCES | Collection Grenoble Sciences | 2000 | 2-86883- 476-0 |
| JANEWAY, CHARLES / TRIVERS, PAUL / WALPORT, MARK | Immuno-Biology : The Immune System in Health and Disease | Elsevier | | 2003 | |
| Kandel, Eric R. /Schwartz, James H. /Jessel, Thomas M. | Principles of Neural Science (4th ed.) | McGraw-Hill | | 2000 | 0-07- 112000- 9 |

| | | | | | |
|---|--|------------------------|---------------------------|------|---------------|
| Goldsby, Richard ... | Immunologie : le cours de Janis Kuby | Dunod | Sciences sup, Cours | 2003 | 2-10-007396-6 |
| Levick, J. R. | An introduction to Cardiovascular Physiology (2nd ed.) | BUTTERWORTH-HEINEMANN | | 1995 | 0-7506-2167-2 |
| Marieb, Elaine N. | Anatomie et physiologie humaines | De Boeck Université | | 2005 | |
| Méi, Noël | La sensibilité viscérale | TEC & DOC LAVOISIER | | 1998 | 2-7430-0248-4 |
| Poirier, Jean / Ribadeau Dumas, J.-L. | Histologie (4e éd.) | Masson | Abrégés | 1997 | 2-225-84162-4 |
| Purves, Dales/ Augustine, George J./ Fitzpatrick, David/ | Neurosciences | De Boeck Université | Neurosciences & cognition | 2005 | |
| Revillard, Jean-Pierre/ASSIM / | Immunologie (4e éd.) | DE BOECK | | 2001 | 2-8041-3805-4 |
| Richard, Daniel | Neurophysiologie | Dunod | Sciences sup, Cours | 2001 | 2-10-005638-7 |
| Richard, Daniel / Orsal, Didier/ | Neurophysiologie. 1, Physiologie cellulaire et systèmes sensoriels | Nathan | FAC. SCIENCES | 1994 | 2-09-190834-7 |
| Richard, Daniel / Orsal, Didier/ | Neurophysiologie. 2, Motricité et grandes fonctions du système nerveux central | Nathan | FAC. SCIENCES | 1994 | 2-09-190835-5 |
| Roitt, Ivan Maurice/ Brostoff, Jonathan/ Male, David K. | Immunologie (3è Ed) | De Boeck | | 2002 | 2-8041-4057-1 |
| ROLAND, J.C. / SZOLLOSI, A. / SZOLLOSI, D. / CALLEN, J.C. | Biologie cellulaire (5è Ed) | Dunod | Sciences sup | 2002 | 2-10-005669-7 |
| Silbernagl, Stephan / Despopoulos, Agamemnon | Atlas de poche de physiologie (2e éd. fr.) | Flammarion | Médecine sciences | 2000 | 2-257-12439-1 |
| Tritsch, Danièle/ Chesnoy-Marchais, Dominique / Feltz, Anne | Physiologie du neurone | Doin | | 1999 | 2-7040-0872-8 |
| Vander, Arthur J. / Sherman, James H. / Luciano, Dorothy S. | Physiologie humaine | CHENELIERE/McGraw-Hill | | 2004 | |

| | | | | | |
|--------------------|--|----------------|--|------|---------------|
| Wolpert, Lewis | Biologie du développement : les grands principes | Dunod | Sciences sup. Sciences de la nature et de la vie | 1999 | 2-10-004189-4 |
| ZIGMOND Michael J. | Fundamental neuroscience | Academic Press | | 1999 | 0-12-780870-1 |

Microbiologie

| AUTEURS | DOCUMENT | EDITEUR | COLLECTION | DATE | ISBN |
|--|---|-----------------------------------|-----------------------------------|------|---------------|
| Avril, Jean-Louis/ Dabernat Henry/ Denis, F. | Bactériologie clinique (3e éd.) | Ellipses-Marketing | | 2000 | 2-7298-9908-1 |
| Balows, Albert / Hausler, William J. / Hermann, Kennett L. | Manual of Clinical Microbiology (5th ed.) | American society for microbiology | | 1991 | 1-55581-030-6 |
| BOTTON, B. / BRETON, A. / FEVRE, M. / GAUTHIER, S. | Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle (2è éd.) | Masson | BIOTECHNOLOGIES | 1990 | 2-225-81987-4 |
| BOURGEOIS, C.M. / MESCLE, J.F. / ZUCCA, J. | Microbiologie alimentaire, Tome 1 : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments | TEC & DOC LAVOISIER | SCIENCES ET TEC AGRO-ALIMENTAIRES | 1996 | 2-7430-0037-6 |
| BOURGEOIS, C.M. / LARPENT, J.P. | Microbiologie alimentaire, Tome 2 : aliments fermentés et fermentations alimentaires | TEC & DOC LAVOISIER | SCIENCES ET TEC AGRO-ALIMENTAIRES | 1996 | 2-7430-0080-5 |
| Madigan, Michael, T. /Martingo, John /Parker, | Brock biology of microorganisms (10è Ed) | PRENTICE-HALL | | 2003 | 0-13-066271-2 |
| Madigan, Michael, T. /Martingo, John /Parker, | Brock biology of microorganisms (11è Ed) | PRENTICE-HALL | | 2005 | 0-13-066271-2 |
| Brogden, Kim/ Roth, James | Virulence mechanisms of bacterial pathogens (3rd ed.) | American society for microbiology | | 2000 | 1-55581-174-4 |
| CRAINIC, RADU / NICOLAS, JEAN, CLAUDE | Virologie médicale | Technique et documentatio | BIOLOGIE MEDICALE | 1993 | 2-85206-909-1 |
| Dimmock | Introduction to modern virology | Blackwell Publ | | | |
| Fauquet et col | Classification et nomenclature des virus | ELSEVIER | | 2005 | 0-12-249951-4 |

| | | | | | |
|--|--|--|----------------------------------|------|-----------------------|
| FENNER, FRANCK / GIBBS, PAUL / MURPHY, FREDERICK / ROTT, RU | Veterinary Virology | Academic Press | | 1993 | 0-12- 253056 -X |
| FERRON, AZELE | Bactériologie médicale (15e éd.) | C et R | MICROBIOLOGIE | 1994 | 2- 85510- 038-0 |
| FLANDROIS, J.- P | Bactériologie médicale | PRESSES UNIVERSITAIRE S | AZAY | 1997 | 2-7297- 0567-8 |
| Flint, S. Jane/ Enquist, L.W./Krug, R.M./Racaniello, V.R./ | Principles of virology : Molecular biology, pathogenesis, and control. | American society for microbiology | | 2000 | 1- 55581- 127-2 |
| Freney, Jean / Renaud, François / Hansen, Willy | Précis de Bactériologie clinique | Eska | | 2000 | 2- 86911- 828-7 |
| Gournier- Chateau, Nathal/ Larpen, Jean- Paul / Larpen, Jean-Luc / | Les probiotiques en alimentation animale et humaine | Technique et documentation | | 1994 | 2- 85206- 967-9 |
| HASLAY, C. / LECLERC, HENRI | Microbiologie des eaux d'alimentation | Technique et Documentation | | 1993 | 2- 85206- 918-0 |
| Joffin, Jean-Noël/ Joffin, Christiane | Microbiologie alimentaire (5e éd.) | C.R.D.P. Bordeaux | | 1999 | 2 86617- 342-2 |
| Joffin, Leyral | Microbiologie technique: 1/ dictionnaire des techniques | C.R.D.P. Aquitaine | Biologie technique | 2001 | 2- 86617- 387-2 |
| Knipe, David Mahan /Howley, Peter M. / | Fields virology (5th ed .) | Lippincott Williams & Wilkins | | 2006 | 0-7817- 1833-3 |
| Knipe / Howley | Fields Fundamental Virology (5 th Ed)) | Lippincott, Williams et Wilkins | | 2004 | |
| Larpen, Jean- Paul / | Listeria (3e éd.) | Tec et Doc / Ed. médicales internationales | Monographies de microbiologie | 2004 | 2-7430- 0657-9 |
| LE MINOR, LEON / VERON, MICHEL | Bactériologie médicale (2è éd.) | Flammarion médecine- sciences | | 1990 | 2-257- 12418- 9 |
| LECLERC, HENRI / GAILLARD, J.-L. / SIMONET, M. | Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien | Doin | | 1995 | 2-7040- 0740-3 |
| Lengeler, Joseph/ Drews, Gerhart/Schlegel , Hans Günter/ | Biology of the prokaryotes | BLACKWELL SCIENCE | | 1999 | 0-632- 05357- 7 |

| | | | | | |
|---|---|--------------------------------|----------------------------------|------|---------------|
| LEVEAU, Jean-Yves / BOUIX, M. | Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel | Technique et Documentation | SCIENCES ET TECHNIQUES AGRO-ALIM | 1993 | 2-85206-850-8 |
| Leyral, Vierling | Microbiologie et toxicologie des aliments | Doin | | 1996 | |
| MAHY, BRIAN | A Dictionary of Virology (2è Ed) | Academic Press | | 1997 | 0-12-465326-X |
| Mammette, A. / | Virologie médicale | Presses Universitaires de Lyon | AZAY | 2002 | 2-7297-0663-1 |
| Mège, J.L. / Raoult, D./ Revillard, Jean-Pierre | Immunité et infection : Concepts immunopathologiques et perspectives thérapeutiques | Arnette Blackwell | | 1997 | 2-7184-0855-3 |
| Mims, Cedric A./ Nash, Anthony /Stephen, John/ | Mims' pathogenesis of infectious disease (5th ed.) | Academic Press | | 2002 | 0-12-498264-6 |
| PELMONT, JEAN | Bactéries et environnement : adaptations physiologiques | PRESSES UNIVERSITAIRES | Grenoble sciences | 1993 | 2-7061-0502-X |
| Perry, Staley, Lory | Microbiologie | DUNOD | | 2004 | 2-1000-7234 X |
| Prescott, Lansing /Harley, John / Klein, Donald | Microbiologie | De Boeck-Wesmaël | | 2003 | 2-8041-4256-6 |
| Regnault, Jean-Pierre | Eléments de microbiologie et d'immunologie | Décarie | | 2002 | 2-89137-098-8 |
| SALYERS, ABIGAIL, / WHITT, DIXIE | Bacterial Pathogenesis, a molecular approach | AM. SOC FOR MICROBIOLOGY | | 1994 | 1-55581-094-2 |
| SCHAECHTER | Microbiologie et pathologie infectieuse | De Boeck-Wesmaël | | 1999 | 2-8041-1592-5 |
| SEIGNEURIN, J.M. / MORAND, P. | Virologie moléculaire médicale | TEC & DOC LAVOISIER | GENIE GENETIQUE G2 | 1997 | 2-7430-0120-8 |
| SPECTER, STEVEN, / LANCZ, GERALD | Clinical Virology Manual (2nd ed.) | Elsevier | | 1992 | 0-8385-1257-7 |
| Strauss, James H./Strauss, Ellen G./ | Viruses and human disease | Academic Press | | 2002 | 0-12-673050-4 |
| Tortora, Gérard J. /Funke, Berdell R. /Case, Christine L. | Microbiology : An introduction (6th ed.) | BENJAMIN/CUMMINGS | | 1998 | 0-8053-8535-5 |

| | | | | | |
|---|---|-----------------------|--|------|---------------|
| Tortora | Introduction à la microbiologie | Renouveau Pédagogique | | 2004 | |
| Trun, Trempy | Fundamentals bacterial genetics | Blackwelle Publishing | | 2004 | 0-632-04448-9 |
| Van Regenmortel, M.H.V /Fauquet, C.M./Bishop, D.H.L | Virus taxonomy : Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses | Academic Press | | 2000 | 0-12-370200-3 |
| Voyles, Bruce A. | The biology of viruses | McGraw-Hill | | 2002 | 0-07-237031-9 |

Chimie

| AUTEURS | DOCUMENT | EDITEUR | COLLECTION | DATE | ISBN |
|--|---|--------------------|-------------|------|---------------|
| Allinger, Norman / Cava, Michaël P. / De Jongh, A. C./ Johnson, Carl R. [et al.] | Chimie organique. 1, Structure des molécules | McGraw-Hill France | | 1985 | 2-7042-0095-5 |
| Allinger, Norman / Cava, Michaël P. / De Jongh, A. C./ Johnson, Carl R. [et al.] | Chimie organique. 2, Réactions | McGraw-Hill France | | 1985 | 2-7042-0096-3 |
| Allinger, Norman / Cava, Michaël P. / De Jongh, A. C./ Johnson, Carl R. [et al.] | Chimie organique. 3, Applications | McGraw-Hill France | | 1984 | 2-7042-0097-1 |
| ARNAUD, CHRISTIAN | Chimie organique (3e éd.) | Masson | Mémo-guides | 1995 | 2-225-84686-3 |
| BRENON- AUDAT, FRANCOISE / RAFFLEGEAU, FABIENNE / PREVOTEAU, D. | Chimie inorganique et générale : travaux pratiques commentés : 34 thèmes et 70 expériences (2e éd.) | Dunod | | 1995 | 2-10-002499-X |
| BRENON- AUDAT, FRANCOISE / RAFFLEGEAU, FABIENNE / PREVOTEAU, D. | Chimie inorganique et générale : travaux pratiques commentés : 31 thèmes, 55 expériences | Dunod | J'INTEGRE | 1993 | 2-10-001546-X |
| Brenon-Audat, Françoise / Busquet, Catherine / Mesnil, Claude | Thermodynamique chimique : cours 1er cycle, classes préparatoires | Hachette | | 1993 | 2-01-017972-2 |

| | | | | | |
|--|---|--------------------|--|------|---------------|
| Chottard, Jean-Claude / Depezay, Jean-Claude / Leroux, Jean-Paul | Chimie fondamentale : Etudes biologiques et médicales. 1, Echanges d'énergie et équilibres | Hermann | METHODES | 1981 | 2-7056-5936-6 |
| Chottard, Jean-Claude / Depezay, Jean-Claude / Leroux, Jean-Paul | Chimie fondamentale : Etudes biologiques et médicales. 2, Structure moléculaire (2è éd.) | Hermann | METHODES | 1995 | 2-7056-6283-9 |
| Chottard, Jean-Claude / Depezay, Jean-Claude / Leroux, Jean-Paul | Chimie fondamentale : Etudes biologiques et médicales. 2, Structure moléculaire (2è éd.) | Hermann | METHODES | 1984 | 2-7056-5937-4 |
| Chottard, Jean-Claude / Depezay, Jean-Claude / Leroux, Jean-Paul | Chimie fondamentale : Etudes biologiques et médicales. 3, Réactions organiques et enzymatiques | Hermann | METHODES | 1982 | 2-7056-5938-2 |
| DUPONT, GERARD / DUTEIL, MICHEL / LEGUEUT, CHRISTINE | Cours de Chimie organique (classes préparatoires aux grandes écoles scientifiques, 1er cycle des Universités) | Ellipses-Marketing | | 1986 | 2-7298-8500-5 |
| DUPONT, GERARD / DUTEIL, MICHEL / LEGUEUT, CHRISTINE | Exercices de Chimie organique (Classes préparatoires, B.T.S., 1er cycle des Universités) | Ellipses-Marketing | | 1990 | 2-7298-9014-9 |
| Durupthy, André / Durupthy Odile Estienne Jacques | Chimie : 1ère année MPSI-PTSI | Hachette | H PREPA | 2004 | 2-01-145647-9 |
| Durupthy, André / Casalot, André / Estienne, Jacques/ | Chimie : 1ère année MPSI-PTSI | Hachette | H prépa exercices et problèmes corrigés | 1999 | 2-01-145224-4 |
| Durupthy, André / Durupthy Odile Estienne Jacques | Chimie I : 1ère année PCSI | Hachette | H PREPA | 2004 | 2-01-145648-7 |
| Durupthy, André / Casalot, André / Jaubert, Alain | Chimie : 2de année MP-MP*-PSI-PSI*-PT-PT* | Hachette | H PREPA | 1996 | 2-01-145170-1 |
| Gray, Harry B. / Haight, Gilbert P. | Principes de Chimie | Interéditions | | 1982 | 2-7296-0063-9 |
| Vollhardt, K. Peter C./Schore, Neil E. | Traité de Chimie organique (2è éd.) | De Boeck | | 1995 | 2-8041-2068-6 |
| Vollhardt, K. Peter C./Schore, Neil E. | Traité de chimie organique (3è éd.) | De Boeck | | 1999 | 2-8041-3153-X |