



**MINISTÈRES  
ÉDUCATION  
JEUNESSE  
SPORTS  
ENSEIGNEMENT  
SUPÉRIEUR  
RECHERCHE**

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*

**Direction générale des ressources humaines**

## **RAPPORT DU JURY**

**SESSION 2025**

**Concours : Agrégation externe**

**Option : Biochimie génie biologique**

**Rapport de jury présenté par :**

Caroline MOREAU FAUVARQUE

Inspectrice générale de l'éducation, du sport et de la recherche

Présidente du jury

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>3</b>
<b>RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES .....</b>	<b>4</b>
<b>ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ.....</b>	<b>6</b>
<b>COMPOSITION DE BIOCHIMIE .....</b>	<b>6</b>
SUJET .....	6
RAPPORT DU JURY DE BIOCHIMIE .....	6
<b>COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE.....</b>	<b>9</b>
SUJET .....	9
RAPPORT DU JURY DE MICROBIOLOGIE.....	9
<b>COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE .....</b>	<b>12</b>
SUJET .....	12
RAPPORT DU JURY DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE .....	12
<b>ÉPREUVES D'ADMISSION .....</b>	<b>15</b>
<b>TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE .....</b>	<b>15</b>
SUJET .....	15
RAPPORT DU JURY DE TP DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE .....	34
SUJET .....	38
RAPPORT DU JURY DE TP DE MICROBIOLOGIE.....	59
<b>TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE.....</b>	<b>67</b>
SUJET .....	67
RAPPORT DU JURY DE TP DE CHIMIE .....	83
<b>ÉPREUVE ORALE DE LEÇON .....</b>	<b>87</b>
SUJETS .....	87
RAPPORT DU JURY DE LEÇONS .....	88
<b>ÉPREUVE ORALE D'ÉTUDE CRITIQUE DE DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE.....</b>	<b>92</b>
SUJETS .....	92
RAPPORT DU JURY D'ECD .....	96
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>100</b>

# INTRODUCTION

Le jury souhaite tout d'abord féliciter les lauréats de la session 2025. Les candidats admis ont fait preuve de connaissances de très haut niveau, mais aussi de compétences remarquables pour analyser, exploiter et mettre en œuvre des résultats, des données issues de la recherche, et ce dans l'ensemble des domaines de la biologie et des biotechnologies.

Ce concours, qui prépare à l'enseignement et à la recherche exige des candidats un socle de connaissances pointues dans tous les domaines de la biochimie, de la biologie et des biotechnologies dont les principes scientifiques et technologiques doivent être maîtrisés. En conséquence, le niveau d'exigence des épreuves est à l'image de l'exigence de la capacité d'adaptation à l'évolution très rapide des connaissances en biologie et en biotechnologies.

De plus, la diversité des formalismes de ce concours (compositions écrites, travaux pratiques et épreuves orales) permet d'évaluer les qualités didactiques et de synthèse des candidats, d'apprécier leurs capacités pédagogiques à structurer et expliciter des concepts scientifiques, biotechnologiques, mais aussi de juger la pertinence des modes de représentation et des outils utilisés pour étayer, démontrer et illustrer les notions et concepts présentés.

Au cours des épreuves pratiques, l'approche expérimentale fait partie des compétences majeures attendues dans ses différentes dimensions :

- calculs préliminaires en vue de la conception de protocoles,
- mise en œuvre expérimentale,
- analyse critique des résultats expérimentaux obtenus,
- interprétation de ces résultats au regard des hypothèses posées.

Enfin les qualités pédagogiques nécessaires pour présenter en vue de transmettre les nombreux concepts scientifiques et technologiques, expliquer l'environnement technologique du laboratoire et contextualiser la pertinence et le principe des méthodes mises en œuvre expérimentalement, sont également évaluées lors des épreuves écrites et orales.

Au cours de cette session, les candidats admissibles ont montré un engagement et une ténacité remarquables, et ce jusqu'à la fin des épreuves pratiques et orales. Le jury encourage les candidats non admissibles ou non admis à se présenter à la session 2025. L'attractivité de ce concours ne se dément pas au cours des années, avec un vivier d'étudiants normaliens et universitaires formés à l'ensemble des compétences visées par le concours qui permet de maintenir un recrutement de très haut niveau. Le jury reconnaît et apprécie également le mérite des candidats enseignants, certifiés ou contractuels qui préparent et présentent avec persévérance ce concours et se félicite de la réussite obtenue chaque année par plusieurs d'entre eux.

Le jury remercie également le personnel administratif de l'ENCPB, ainsi que les personnels d'accueil et d'entretien, pour le travail efficace concernant l'organisation et l'implication nécessaires au bon déroulement de ce concours.

Enfin, je tiens à remercier en particulier Madame la Provisseure de l'ENCPB et son équipe : proviseurs-adjoints, DDFPT, professeurs agrégés de « biochimie - génie biologique » concepteurs de sujet et préparateurs des épreuves pratiques, qui ont évalué les prestations des candidats, conçu, et préparé les Travaux Pratiques avec l'aide des personnels de laboratoire de chimie, de biochimie, de microbiologie, de biologie cellulaire et moléculaire, indispensables au bon déroulement des épreuves pratiques. Grâce à l'engagement de chacun des acteurs impliqués dans sa préparation et son organisation, la session 2025 de l'agrégation de biochimie-génie biologique a pu avoir lieu dans des conditions très satisfaisantes.

## RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Candidats inscrits	180
Candidats présents aux trois épreuves écrites d'admissibilité	68
Nombre de postes	10
Candidats admissibles	24
Candidats présents aux épreuves d'admission	22
Candidats proposés pour l'admission	10
Barre d'admissibilité (sur 20)	10,60
Barre d'admission (sur 20)	11,32

### ÉPREUVES ECRITES D'ADMISSIBILITE

Moyenne générale des candidats présents (sur 20)	09,16
Moyenne générale des candidats admissibles (sur 20)	12,91

#### COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Moyenne des candidats présents (sur 20)	08,02
Moyenne des candidats admissibles (sur 20)	11,75
Note maximale (sur 20)	16,00

#### COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Moyenne des candidats présents (sur 20)	10,90
Moyenne des candidats admissibles (sur 20)	14,31
Note maximale (sur 20)	17,80

#### COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Moyenne des candidats présents (sur 20)	08,55
Moyenne des candidats admissibles (sur 20)	12,66
Note maximale (sur 20)	17,60

## ÉPREUVES D'ADMISSION

Moyenne générale des candidats présents (sur 20) 10,97

Moyenne générale des candidats admis (sur 20) 13,83

### TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

Moyenne des candidats présents (sur 20) 10,04

Moyennes des candidats admis (sur 20) 11,72

Note maximale (sur 20) 17,20

### TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Moyenne des candidats présents (sur 20) 11,62

Moyennes des candidats admis (sur 20) 13,62

Note maximale (sur 20) 15,00

### TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

Moyenne des candidats présents (sur 20) 10,85

Moyennes des candidats admis (sur 20) 14,18

Note maximale (sur 20) 19,00

### LEÇON

Moyenne des candidats présents (sur 20) 10,67

Moyennes des candidats admis (sur 20) 13,29

Note maximale (sur 20) 18,50

### ÉTUDE CRITIQUE DE DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE

Moyenne des candidats présents (sur 20) 11,52

Moyennes des candidats admis (sur 20) 15,70

Note maximale (sur 20) 20,00

## ENSEMBLE DU CONCOURS

Moyenne générale des candidats présents admissibles (sur 20) 11,67

Moyenne générale des candidats admis (sur 20) 14,21

# ÉPREUVES ÉCRITES D'ADMISSIBILITÉ

## COMPOSITION DE BIOCHIMIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

### SUJET

## Les protéines recombinantes

Initialement envisagées en réponse aux limites des « protéines médicaments » d'origine humaine ou animale, les protéines recombinantes produites par des organismes génétiquement modifiés (OGM) occupent aujourd'hui une place prépondérante dans le domaine des biotechnologies. Ce domaine technologique a atteint aujourd'hui une maturité telle qu'il est possible de maîtriser leur production à grande échelle pour diverses applications médicales et industrielles. En particulier, la bioproduction de protéines recombinantes peut être davantage contrôlée que l'obtention de protéines issues de sources naturelles. Ainsi 59% des molécules thérapeutiques actuellement en développement au niveau mondial sont des biomédicaments.

L'obtention de protéines recombinantes implique plusieurs étapes clés, incluant la conception de vecteurs d'expression par les technologies de biologie moléculaire adaptées, la purification, la caractérisation et le contrôle-qualité des protéines produites.

Après avoir présenté les principaux éléments génétiques qui caractérisent un vecteur d'expression recombinant, vous décrierez les caractéristiques spécifiques des bactéries, des levures, des cellules végétales et des cellules animales utilisées pour la bioproduction de protéines recombinantes.

Vous justifierez l'intérêt de produire par voie recombinante l'insuline humaine d'une part, et un anticorps monoclonal d'autre part, puis vous présenterez les techniques possibles pour leur production sous une forme biologiquement active. Vous intégrerez à votre propos un exemple de stratégie pour extraire, purifier et caractériser chacune de ces deux molécules recombinantes.

### RAPPORT DU JURY DE BIOCHIMIE

#### Statistiques des résultats de l'épreuve

- |  |            |
|--|------------|
| • Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : | 08,02 / 20 |
| • Meilleure note :                             | 16,00 / 20 |
| • Note la plus basse :                         | 07,10 / 20 |
| • Moyenne des candidats admissibles :          | 11,75 / 20 |
| • Moyenne des candidats admis :                | 13,88 / 20 |

Le jury tient tout d'abord à insister sur le fait que les candidats se doivent d'annoncer un plan clair et détaillé et de ne pas se contenter de quelques lignes faisant état de quelques idées jetées à l'emporte-pièce du style : « *nous définirons dans un premier temps les protéines recombinantes, puis passerons en revue les principaux vecteurs utilisés, développerons la production de l'insuline et des anticorps monoclonaux, et terminerons par une conclusion et une ouverture* ». Un plan se doit d'être précis et permettre au correcteur de se faire une première opinion de ce que contiendra la composition et d'anticiper la construction et le déroulé des connaissances du candidat.

Concernant la composition, dans une partie introductive, après avoir défini ce qu'est une protéine recombinante, les candidats pouvaient expliquer l'intérêt de développer ce type de protéine dans les domaines des biotechnologies, non seulement en recherche mais également en pharmacutique et en médecine. La question devait être posée quant à la diversité des organisations structurales des protéines que l'on souhaite produire par voie recombinante, une synthèse sur les différents niveaux de structuration des protéines semblait indispensable : de la structure primaire (enchaînement des acides aminés par des liaisons peptidiques) à la structure quaternaire qui nécessite l'interaction de plusieurs protéines (de même nature ou différentes) entre elles. Avant de développer les différentes stratégies possibles de production, il est nécessaire de se poser quelques questions essentielles : la protéine recombinante à produire est-elle constituée d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques, y a-t-il présence ou non de ponts disulfures, des modifications post-traductionnelles sont-elles à prévoir ?

Les candidats pouvaient alors se poser la question du pourquoi une telle diversité des systèmes d'expression des protéines recombinantes : pour répondre à la diversité, à la complexité structurale et aux multiples caractéristiques des protéines (et peptides) à synthétiser. Plusieurs systèmes de production s'offrent au scientifique pour produire une même protéine, le choix du système de production tient notamment en premier lieu de la rapidité de mise en œuvre et du coût de production. Une liste des différents systèmes de production sous forme d'un tableau s'avérait utile à ce niveau de la composition en insistant sur les avantages de chacun des systèmes et de ses limites : expression en système procaryote, bactéries en particulier, ou eucaryote qui offre une large diversité d'organismes parmi lesquels figurent levures, cellules d'insectes, cellules animales (COS, CHO), cellules végétales, plantes ou encore animaux transgéniques.

Le choix de la stratégie et donc du système de production influera sur la localisation de la protéine recombinante (intracellulaire, périplasmique, sécrétée...). Autres questions que doivent se poser le scientifique : y a-t-il besoin que la protéine recombinante soit fusionnée à une autre protéine (protéine fluorescente type GFP ou mCherry pour en faciliter le traçage intracellulaire et la détection par exemple), présence d'étiquettes de type Flag, c-myc, polyhistidine pour faciliter la purification et/ou la détection, site de coupure enzymatique par l'entérokinase par exemple, coupure chimique par le bromure de cyanogène (CNBr)...

La partie suivante pouvait porter sur les vecteurs d'expression employés en détaillant la nature et le rôle des différents éléments génétiques qui composent ces vecteurs : origines de réplication, promoteurs constitutifs *versus* inductibles (thermique, carence nutritionnelle), terminateurs de transcription, sites d'initiation et de terminaison de la traduction (séquence Shine-Dalgarno chez les bactéries, séquence Kozak chez les eucaryotes), codons stop, éléments de régulation (*enhancers*), séquence signal, marqueurs de sélection, site multiple de clonage, sites de coupure enzymatique, codons optimisés selon le système d'expression utilisé (augmentation du rendement et moindre dégradation)...

Il pouvait ensuite être passé en revue les différentes stratégies d'extraction et de purification par chromatographie d'exclusion stérique (gel-filtration), d'affinité, sur billes couplées au nickel pour la purification de protéines étiquetées polyhistidine... Quels sont les outils de caractérisation structurale des protéines recombinantes (contrôle qualité) : gels d'électrophorèse du type SDS-PAGE, dichroïsme circulaire, diffraction des rayons X, RMN, spectrométrie de masse, séquençage protéique...

La composition devait se poursuivre sur deux exemples concrets, la production de l'insuline et des anticorps monoclonaux à usage médical en particulier mais également en recherche pour les anticorps (test ELISA, cytométrie en flux, Western blot, microscopie directe et indirecte par

fluorescence...). Les candidats devaient tout d'abord rappeler leurs caractéristiques structurales. L'insuline est constituée de deux chaînes, A et B, reliées par des ponts disulfures avec excision du peptide C : possibilité chez la bactérie de produire indépendamment les deux chaînes matures, avec une extraction intracytoplasmique et la nécessité d'oxyder pour former les ponts disulfures, ou co-expression périplasmique ; expression en cellule eucaryote possible mais forts rendements et coûts faibles en bactérie ; caractérisation de l'activité biologique. Concernant la production d'anticorps, la question pouvait se poser sur le format désiré : anticorps dans son intégrité (2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères), ou sous forme de fragment (Fab sans Fc, Fv, scFv, minibody, nanobody...). La production d'anticorps nécessite un système capable de les glycosyler correctement. Si besoin de produire un anticorps entier, les systèmes eucaryotes de type CHO peuvent être envisagés avec des rendements de production intéressants mais avec des coûts élevés. La purification des anticorps est relativement simplifiée par la chromatographie d'affinité.

En conclusion, plusieurs ouvertures étaient possibles : adapter les systèmes de production aux formats souhaités et demandés (anticorps bi-spécifiques, immunotoxines, nano-anticorps...), baisser les coûts *via* l'augmentation des rendements (nouvelles souches de bactéries, de levures, de cellules, développements de nouveaux milieux de culture moins onéreux), développement de systèmes à usage unique, système de production et de purification en continu...), réduire les temps d'obtention des clones recombinants (transfection transitoire *versus* stable), stabiliser les clones d'intérêt. Soulever le problème des droits de brevets et de propriété intellectuelle : formes biosimilaires (équivalent des génériques du chimique pour les molécules biologiques). Il pouvait être fait allusion aux systèmes de transcription/traduction *in vitro* en présence d'extraits de bactéries, de levures, de cellules CHO, d'utilisation de co-facteurs, d'organites intracellulaires, de membranes pour favoriser les structurations complexes, et la possibilité d'incorporer des acides aminés non-naturels (stratégie de la suppression d'Ambre - extension du code génétique) qui peuvent améliorer la demi-vie des molécules (acides aminés en configuration D (moins de dégradation), ou acides aminés qui favorisent des couplages chimiques postérieurs.

Un certain nombre de points non négligeable étaient attribués à la qualité de la copie, en tenant compte de la qualité rédactionnelle (syntaxe, orthographe, accords...), qualité des schémas et propreté de la copie.

# COMPOSITION DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

## SUJET

### Les modes de vie des bactéries.

Depuis les profondeurs des océans jusqu'au sein des tubes digestifs des animaux à sang chaud, les bactéries colonisent la majorité des environnements terrestres. Qu'elles adoptent un cycle de vie infectieux ou commensal, qu'elles soient présentes de manière isolée ou en communauté, leur succès dans ces écosystèmes repose en grande partie sur leur capacité à diversifier leurs modes de vie et leur activité métabolique.

En premier lieu, vous décrirez les principaux modes de vie bactériens d'un point de vue écologique et moléculaire. Vous discuterez les avantages évolutifs associés à ces différents modes de vie. Votre analyse s'appuiera sur des exemples d'interactions microbiennes, tant au sein de communautés mono-espèces qu'au sein de communautés pluri-espèces, en mettant en lumière leur importance dans les domaines médical, environnemental et industriel. Enfin, vous présenterez plusieurs méthodes d'identification et de caractérisation des bactéries et de leurs modes de vie, en soulignant les informations spécifiques apportées par chaque technique.

## RAPPORT DU JURY DE MICROBIOLOGIE

### Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : 10,90 / 20
- Meilleure note : 17,80 / 20
- Note la plus basse : 10,70 / 20
- Moyenne des candidats admissibles : 14,31 / 20
- Moyenne des candidats admis : 15,63 / 20

### NOTIONS ATTENDUES DANS LA COMPOSITION

En suivant le plan proposé dans l'énoncé du sujet, il convenait, dans l'introduction, de présenter les bactéries et de leur omniprésence et importance dans les écosystèmes. Une définition des notions de mode de vie, de diversification métabolique et d'adaptation écologique était également attendue.

**La première partie** devait décrire la diversité des modes de vie bactériens en s'appuyant à la fois sur des critères écologiques (bactéries libres, symbiotiques, communitaires) et sur les déterminants moléculaires qui conditionnent cette diversité. Il convenait de montrer que les bactéries peuvent adopter des stratégies adaptées à leur environnement, qu'elles vivent de façon isolée ou au sein de structures communitaires comme les biofilms, et que cette plasticité repose sur des mécanismes de régulation génétique, tels que le quorum sensing, les systèmes de régulation à deux composants, ou encore sur l'adaptation physiologique et métabolique aux conditions extrêmes. Cette analyse devait être illustrée par des exemples tirés de différents milieux, tels que les océans profonds, les sols, ou les microbiotes animaux.

**Dans une seconde partie**, une discussion des bénéfices évolutifs associés à ces stratégies était attendue, ainsi que l'analyse de comment la diversification des modes de vie confère aux bactéries une meilleure capacité d'adaptation face à différentes pressions de sélection. Les interactions microbiennes, qu'elles se produisent au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes, devaient être abordées en intégrant à la fois des mécanismes de coopération (par exemple la mise en commun de ressources ou la spécialisation fonctionnelle) et de compétition (production d'antibiotiques, exclusion spatiale...). Ces interactions devaient être replacées dans des contextes concrets, notamment en santé humaine (rôle du microbiote, résistance aux antibiotiques...), en environnement (dégradation des polluants, cycles biogéochimiques...) et en industrie (applications biotechnologiques des bactéries).

**La troisième partie** devait présenter les principales méthodes permettant d'identifier et de caractériser les bactéries et leurs modes de vie. Il s'agissait d'expliquer les apports respectifs des approches classiques de culture et d'analyse phénotypique, des outils moléculaires tels que la PCR ou le séquençage des gènes codant l'ARN de la sous-unité 16S ribosomique, et des méthodes à haut débit comme la métagénomique ou la transcriptomique. Il convenait de montrer comment chaque méthode, en fonction de ses spécificités, permet de renseigner la diversité taxonomique, métabolique et, plus généralement, fonctionnelle de communautés bactériennes. L'intégration de techniques d'imagerie ou de cytométrie en flux pouvait compléter utilement cette partie.

**La conclusion** devait brièvement récapituler les messages clés de la composition et ouvrir le sujet.

### **COMMENTAIRES SUR L'ÉPREUVE**

Les correcteurs ont apprécié la lecture de certaines copies structurées en paragraphes précédés d'un titre informatif, claires, sans erreur de syntaxe et à l'écriture agréable. Ils souhaitent donc encore une fois, mettre l'accent sur l'importance du respect de la syntaxe, de la grammaire, de l'orthographe et de la ponctuation. Les correcteurs ont également apprécié les schémas variés, légendés et munis d'un titre qui venaient étayer les argumentations. L'utilisation de couleurs à la fois pour les schémas et les titres facilite toujours la lecture et est également appréciée. De nombreux candidats n'ont cependant pas pensé à mentionner dans leur texte, à quel moment ces schémas ou tableaux devaient être observés : il est impératif de mentionner dans le texte du devoir, le moment où le correcteur doit regarder un schéma ou un tableau et le numéro du schéma ou de la figure. Sans cela, la figure ne peut pas être considérée.

#### **Remarques des correcteurs :**

- De trop nombreuses copies mentionnaient des organites eucaryotes, tels que les mitochondries ou l'appareil de Golgi. Les correcteurs considèrent ce type d'erreur comme grave et inquiétant.

- La microbiologie dite « pasteurienne » constitue un prérequis essentiel. Néanmoins, la microbiologie actuelle repose sur de nombreuses méthodes récentes, notamment à haut débit, qui doivent être connues. Au vu de l'ensemble des copies, la méconnaissance de ces méthodes est préoccupante.
- Les correcteurs attendaient un minimum de recul quant à la caractérisation phénotypique dichotomique. Que signifie concrètement un phénotype [Lactose]+ pour le mode de vie de la bactérie ?
- L'évolution peut être simplement définie comme la variation de la fréquence d'un allèle au cours du temps. La sélection naturelle n'est qu'une des forces évolutives influençant cette variation. La résistance aux antibiotiques est un caractère phénotypique encodé génétiquement, dont la fréquence varie en raison de la pression de sélection exercée par le mauvais usage des antibiotiques.
- Une bonne connaissance des grands mécanismes de régulation moléculaire est attendue. Qu'est-ce qu'un promoteur, un opérateur, un opéron, un régulon ?
- Les microbiotes ne sont pas exclusivement intestinaux et sont composés de nombreux micro-organismes, bactériens et non bactériens.
- Tous les plasmides ne portent pas de gènes de résistance aux antibiotiques.
- Les mots d'origine latine doivent être employés au singulier ou au pluriel selon les besoins de la phrase (un *pilus* : singulier, des *pili* : pluriel).

# COMPOSITION DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient : 2

## SUJET

### La respiration animale.

La respiration chez les animaux supérieurs est une des fonctions essentielles permettant l'utilisation de substrats énergétiques carbonés.

Vous décrirez cette fonction au niveau physiologique : le principe de la ventilation pulmonaire, les organes impliqués et le transport des gaz. Vous présenterez également la respiration au niveau cellulaire avec les principes des diffusions impliqués, l'utilisation des métabolites obtenus, le rôle des organelles et l'adaptation des apports gazeux au niveau vasculaire. La respiration étant également à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène, vous explicitez ce phénomène et les méthodes de détoxification.

Une attention particulière sera portée au plan du devoir, à son caractère didactique, aux illustrations proposées et à l'utilisation d'expériences historiques emblématiques du domaine.

## RAPPORT DU JURY DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

### Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : 08,55 / 20
- Meilleure note : 17,60 / 20
- Note la plus basse : 05,40 / 20
- Moyenne des candidats admissibles : 12,66 / 20
- Moyenne des candidats admis : 15,37 / 20

La respiration est une fonction essentielle chez les animaux supérieurs, permettant l'approvisionnement en oxygène des cellules et l'élimination du dioxyde de carbone. Elle repose sur des processus physiologiques et cellulaires qui assurent le transport des gaz, leur diffusion et leur utilisation à des fins énergétiques. Par ailleurs, la respiration produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO), dont l'accumulation peut être toxique.

### NOTIONS ATTENDUES DANS LA COMPOSITION

Le sujet nécessitait de décrire de façon générale les différents aspects de la respiration en abordant la ventilation pulmonaire, le transport des gaz, la respiration cellulaire et les mécanismes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Ainsi, le principe de la ventilation pulmonaire, mouvements d'air entre l'environnement et les poumons qui repose sur deux phases principales, l'inspiration, phase active faisant intervenir la contraction du diaphragme et des muscles intercostaux, augmentant le volume thoracique et diminuant la pression intra-alvéolaire et l'expiration : phase passive au repos, résultant du relâchement des muscles inspiratoires et du retour élastique des poumons pouvant devenir active en cas d'effort, était attendu dans la composition.

De même, les structures principales participant à la respiration devaient être présentées, les voies respiratoires (cavités nasales, pharynx, larynx, trachée, bronches, bronchioles) qui assurent le transport et le filtrage de l'air, les poumons, contenant les alvéoles où ont lieu les échanges gazeux, le diaphragme et les muscles intercostaux, jouant un rôle clé dans la ventilation. Les notions de diffusion passive des gaz à travers la barrière alvéolo-capillaire, en fonction de leurs gradients de pression partielle étaient attendues. La description des types cellulaires pulmonaires et leurs rôles respectifs étaient attendus accompagnée si possible d'un dessin histologique représentant ces cellules.

Une partie sur le transport des gaz, l'oxygène et le dioxyde de carbone était également attendue. De façon succincte, l'oxygène inhalé diffuse à travers la membrane alvéolo-capillaire et se fixe principalement à l'hémoglobine des globules rouges sous forme d'oxyhémoglobine ( $HbO_2$ ). Une petite fraction reste dissoute dans le plasma. Le  $CO_2$  est transporté selon trois modalités, dissous dans le plasma, fixé à l'hémoglobine sous forme de carbaminohémoglobine et transformé en ions bicarbonates ( $HCO_3^-$ ) dans les globules rouges sous l'action de l'anhydrase carbonique.

Une partie documentée et détaillée sur la respiration cellulaire et les principes de diffusion impliqués en fonction des gradients de concentration, l'utilisation des substrats et le rôle des organelles en se concentrant sur les mitochondries, était demandée. Ainsi, en présentant la chaîne respiratoire mitochondriale, la transition pour présenter les ERO et leurs impacts était évidente. Enfin, les cellules disposent de systèmes enzymatiques et non enzymatiques pour neutraliser ces ERO, superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase, mais aussi des antioxydants non enzymatiques.

Une attention particulière était donnée sur le plan de la composition, les illustrations et schémas des connaissances présentées.

## **COMMENTAIRES SUR L'ÉPREUVE**

Le jury rappelle que, quelle que soit leur qualité, les concepts et notions hors-sujet ne sont pas valorisés dans la notation de la copie, il est donc primordial de bien cerner le sujet avant de rédiger. Trop peu de devoirs prennent le temps de bien définir les termes du sujet dans l'introduction et ainsi justifier leur choix de développement et d'articulation entre les différentes parties.

Dans le cadre de ce sujet, il fallait traiter, la respiration chez les animaux supérieurs, un processus complexe impliquant la ventilation pulmonaire, le transport des gaz et la respiration cellulaire pour assurer la production d'énergie nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Toutefois, cette fonction vitale engendre la production d'espèces réactives de l'oxygène, qui doivent être neutralisées par des systèmes de détoxification pour prévenir les dommages cellulaires. Cette interaction entre production d'énergie et contrôle du stress oxydatif est essentielle au maintien de l'homéostasie.

A chaque fois que cela est possible, une approche expérimentale, voire historique, des concepts et notions est préférable à leur exposition dogmatique. Cette approche a été valorisée dans le barème de notation.

La conclusion du devoir n'est pas non plus à négliger, au-delà d'une synthèse des concepts clés

développés dans le sujet, il est important d'offrir une perspective pertinente en ouverture.

Sur la forme, un plan apparent, construit à partir de parties titrées et numérotées, est attendu. Les schémas sont indispensables et doivent être mis au service de la démarche explicative et argumentative ; illustrer sa copie par des schémas hors sujet n'est pas valorisé dans la notation et conduit souvent à un effet de dilution des notions.

L'orthographe, la syntaxe et la qualité de l'expression sont prises en compte dans la notation de la copie. Plusieurs très bonnes copies, bien construites, argumentées et illustrées ont été appréciées par le jury. A l'inverse, de nombreuses copies témoignent de connaissances parcellaires en biologie cellulaire et physiologie ou d'une faible compréhension de mécanismes clés.

# ÉPREUVES D'ADMISSION

## TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE- PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures Coefficient : 2

### SUJET

## PRODUCTION D'UN INTERFERON RECOMBINANT

### Introduction

Principalement produits par les cellules immunitaires, les interférons sont des protéines sécrétées à activité autocrine et paracrine qui jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée. Intervenant dans la régulation de nombreuses voies biochimiques, ils possèdent des activités antivirales, immunomodulatrices et anti-inflammatoires. Ils ont donc un spectre d'efficacité clinique très large et peuvent être utilisés dans le cadre d'infections virales ou bactériennes, de cancers ou de scléroses. Ainsi, leur utilité thérapeutique a entraîné le développement de nombreuses stratégies utilisant une multitude de modèles cellulaires, procédés de production, méthodes de purification ainsi que de formulation.

Cependant, un défi technique majeur pour ce type de protéines thérapeutiques reste leur stabilité et leur délivrance au site d'action. En effet, les temps de demi-vies circulantes peuvent être courts en raison d'une solubilité aqueuse faible, d'une clairance rénale importante et d'une dégradation *in vivo* qui peut survenir dès le site d'administration ou lors du transfert de la protéine vers le site d'action. Pour pallier ces difficultés, de nombreuses formulations et modes d'administration sont testés et diverses stratégies ont été développées pour améliorer propriétés pharmacocinétiques et utilité clinique.

L'objectif de ce travail est de développer une protéine bi-fonctionnelle recombinante constituée d'un interféron fusionné à la phosphatase alcaline destinée à être administrée *in vivo*. Cette construction rendrait possible le marquage direct de coupes histologiques permettant - par simple détection colorimétrique - de vérifier la présence et la localisation de l'interféron dans différents tissus cibles *in vivo*, facilitant ainsi l'étude d'efficacité des différentes stratégies testées.

### Consignes Générales

- Tous les résultats seront indiqués ou joints à la copie avec référencement.
- Les fichiers informatiques réalisés pour traiter les données seront enregistrés dans le dossier candidat.

- Par ailleurs, pour chaque série de calculs, il faudra systématiquement présenter les équations aux grandeurs et aux unités ainsi qu'un exemple d'équation aux valeurs numériques.
- La mise en œuvre de la prévention des risques sera évaluée dans l'ensemble des manipulations.

## PARTIE 1 : Analyse du vecteur d'expression

Afin de produire l'interféron recombinant dans un modèle bactérien, un vecteur d'expression pA1 qui comporte la construction suivante, a été conçu.

ptac – SD – SS –6His – EK – PhoA - Interferon

Avec :

- ptac : promoteur hybride, composé de la région –35 du promoteur pTrp (promoteur fort), associé à la région –10 du promoteur pLacUV5 (inductible par l'IPTG et insensible à la répression catabolique).
- SD : séquence Shine Dalgarno
- SS : séquence signal d'exportation dans le périplasma
- 6His : séquence codant une étiquette six histidines
- EK : séquence codant une chaîne peptidique reconnue par l'entérokinase
- PhoA : séquence codant la phosphatase alcaline.
- Interferon : séquence codant l'interféron

**Q1. Expliquer le rôle et l'intérêt de chacune des séquences présentes sur la construction présentée.**

**Q2. Proposer un schéma de la protéine obtenue après induction.**

Le plasmide pA1 est issu de l'insertion de la séquence codant l'interféron dans un plasmide pLip6v par clonage par PCR et restriction. La carte du plasmide pLip6v et la séquence codant l'interféron ainsi qu'un tutoriel pour l'utilisation du logiciel SnapGene© sont fournis dans le dossier candidat.

**Q3. Schématiser le principe de ce type de clonage.**

**Q4. À partir des séquences disponibles et à l'aide du logiciel SnapGene©, proposer la ou les enzymes de restriction qui pourrai(en)t être utilisée(s) pour réaliser ce clonage. Détailler les critères de sélection.**

**Q5. Expliciter à l'aide d'un schéma la conception des amorces nécessaires à la réalisation du clonage.**

**Q6. Donner les critères de conception retenus.**

**Q7. A l'aide du logiciel SnapGene© proposer des séquences d'amorces. Enregistrer individuellement les amorces dans le dossier candidat, il n'est pas nécessaire de les reporter sur la copie. Les séquences doivent être présentées dans le sens conventionnel 5'-3'.**

## PARTIE 2 : Extraction et purification de l'interféron recombinant

La souche « pA1 » est une souche XL1Blue d'*E.coli* hébergeant le plasmide pA1. On souhaite comparer deux méthodes d'extraction : choc osmotique ménagé et sonication, puis quantifier les résultats de production dans les extraits bruts et les extraits purifiés par chromatographie d'affinité par chélation avec

des ions métalliques (IMAC - *Immobilized Metal Affinity Chromatography*).

### **Partie 2.1 : Extraction**

La fiche technique 1 présente le protocole à mettre en œuvre pour une extraction par choc osmotique. Une autre extraction à partir de la culture pA1 - dont l'extrait brut est fourni - a été réalisée par sonication (fiche technique 2).

**Q8. A l'aide des fiches techniques 1 et 2, présenter le principe des deux méthodes d'extraction. Comparer leurs intérêts respectifs.**

**Q9. Expliciter le calcul du volume d'imidazole à  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  à ajouter à l'extrait brut à l'étape 5 du mode opératoire de la fiche technique 1.**

### **Partie 2.2 : Purification par IMAC**

On souhaite purifier le traceur recombinant à l'aide d'une colonne à usage unique His Spin Trap™. Le mode opératoire à mettre en œuvre est présenté dans la fiche technique 3.

Il est attendu que la purification soit réalisée sur l'extrait brut obtenu dans la partie 2.1 et sur l'extrait brut fourni, obtenu par sonication de la même culture.

**Q10. Expliquer à l'aide d'un schéma le principe de la purification par chromatographie IMAC, en détaillant le rôle de l'imidazole dans chaque solution.**

**Q11. Présenter les calculs de préparation des tampons de lavage et d'élution.**

**Q12. A partir des informations techniques de la colonne utilisée, argumenter la liste des constituants à éviter dans les tampons.**

## **PARTIE 3 : Caractérisation des extraits produits**

Le suivi de purification des extraits bruts sera effectué quantitativement par mesure d'activité enzymatique et dosages des protéines puis qualitativement par détections sur membranes.

### **Partie 3.1 : Choix de la méthode de dosage protéique**

La question du choix d'une méthode de dosage colorimétrique des protéines est importante dans le contexte de suivi de purification des protéines. En effet de nombreux composés impliqués dans l'extraction ou la purification peuvent interférer avec la méthode de dosage.

Les fiches techniques 4 et 5 présentent respectivement le protocole de dosage en microméthode des protéines totales par la méthode de Bradford et de BCA. Ces fiches techniques présentent également les spectres et courbes d'étalonnage des deux dosages.

Le lecteur de microplaque est équipé de filtres permettant la lecture à 405 nm, 450 nm, 492 nm, 540 nm, 595 nm et 630 nm.

- Q13. A l'aide des fiches techniques 4 et 5 choisir la longueur d'onde à utiliser pour chaque dosage sur le lecteur de microplaque.**
- Q14. Proposer un protocole simple, ne requérant pas la réalisation d'une gamme de dosage, permettant de mettre en évidence, pour chaque méthode, d'éventuelles interférences liées à la présence d'imidazole dans les extraits bruts et les fractions d'élution.**
- Q15. Mettre en œuvre le protocole proposé en Q14. A l'aide des résultats obtenus et des informations des fiches techniques 4 et 5, justifier le choix de la méthode de dosage des protéines retenue pour la suite des manipulations.**

### **Partie 3.2 : Dosage protéique des extraits**

La concentration en masse de protéines totales sera déterminée dans les extraits bruts et les fractions d'élution à l'aide de la fiche technique 4 ou 5 selon la méthode choisie en Partie 3-1.

#### **Données :**

Concentration usuelle en protéines d'un extrait brut obtenu par sonication : de 3 à 5 g.L<sup>-1</sup>.

Concentration usuelle en protéines d'un extrait brut obtenu par choc osmotique dans les conditions expérimentales de l'épreuve : de 1 à 3 g.L<sup>-1</sup>.

Concentration usuelle en protéines d'une fraction d'élution : inférieure à 0,5 g.L<sup>-1</sup>.

- Q16. Présenter la préparation des échantillons à doser.**
- Q17. Exploiter les résultats.**
- Q18. Discuter les résultats obtenus au regard de la capacité de fixation de la colonne His SpinTrap™.**

### **Partie 3.3 : Détection de la protéine d'intérêt sur membrane**

La fiche technique 6 à mettre en œuvre présente un protocole de détection sur membrane de protéines par différentes approches.

- Q19. Présenter le plan des dépôts réalisés sur les membranes de nitrocellulose. Justifier le choix des échantillons déposés.**
- Q20. Discuter l'apport de chacune des méthodes de révélation.**
- Q21. Analyser les résultats et conclure.**

### **Partie 3.4 : Détermination de l'activité enzymatique**

La fiche technique 7 présente le protocole de détermination de l'activité enzymatique à mettre en œuvre sur les différents extraits bruts et fractions d'élution.

- Q22. Citer le type de méthode choisie et justifier le critère de choix du  $\Delta t$ .**

- Q23. Justifier la composition du(des) blanc(s) choisi(s).**
- Q24. Justifier la composition de la solution d'arrêt.**
- Q25. Calculer les activités enzymatiques et concentrations d'activités catalytiques à partir des résultats obtenus.**

## **PARTIE 4 : Bilan de l'étude**

- Q26. Calculer l'enrichissement et le rendement des deux méthodes d'extraction et de purification.**
- Q27. Rédiger une courte synthèse de l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus au regard des objectifs de l'étude.**

### **Références :**

Castro LS, Lobo GS, Pereira P, Freire MG, Neves MC, Pedro AQ. Interferon-Based Biopharmaceuticals: Overview on the Production, Purification, and Formulation. *Vaccines*. 1 avr 2021;9(4):328.

Raghuvanshi V, Yadav P, Ali S. Interferon production by Viral, Bacterial & Yeast system: A comparative overview in 2023. *Int Immunopharmacol*. 2023 Jul;120:110340. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110340. Epub 2023 May 23. PMID: 37230033.

# DOSSIER TECHNIQUE

Le dossier technique est distribué à côté du sujet.

ANNEXE 1

DONNÉES DE SÉCURITÉ

<p><b>Imidazole pur</b></p>	<p><b>Réactif de Bradford</b></p>
 <p><b>Danger</b>  <b>H302</b> Nocif en cas d'ingestion.  <b>H314</b> Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.  <b>H360D</b> Peut nuire au fœtus.</p>	 <p><b>Attention</b>  <b>H315</b> Provoque une irritation cutanée.  <b>H319</b> Provoque une sévère irritation des yeux.</p>

<p><b>Réactif A du dosage au BCA : Acide Bicinchoninique</b></p>	<p><b>Réactif B du dosage au BCA : Sulfate de cuivre (II) à 4 %</b></p>
 <p><b>Danger</b>  <b>H290</b> Peut être corrosif pour les métaux.  <b>H318</b> Provoque de graves lésions des yeux.  <b>H410</b> Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.</p>	 <p><b>Danger</b>  <b>H318</b> Provoque de graves lésions des yeux.  <b>H410</b> Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.</p>

<p><b>Paranitrophénol &gt; 99%</b></p>	<p><b>NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup></b></p>
 <p><b>Attention</b>  <b>H301</b> Toxique en cas d'ingestion.  <b>H312+H332</b> Nocif en cas de contact cutané ou d'inhalation.  <b>H373</b> Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.</p>	<p>1.</p>  <p><b>Danger</b>  <b>H314</b> Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.  <b>H290</b> Peut être corrosif pour les métaux.</p>

## RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
pA1	Culture agitée de la nuit en milieu LB de la souche pA1 induite par de l'IPTG	50 mL en Erlen
TSE	Tris-HCl 0,1M pH 8,2 + saccharose à 200 g.L <sup>-1</sup> + EDTA 2mM	2 mL en microtube
Imidazole	Imidazole à 2 mol.L <sup>-1</sup>	1 mL
Lysozyme	Lysozyme à 10 mg.mL <sup>-1</sup>	50 µL
dH2O	Eau déminéralisée	50 mL

- Tubes coniques à centrifuger de 50 mL
- Microtubes de 2 mL
- Tube à hémolyse en plastique à bouchon
- Papier pH
- Centrifugeuse sur pied et microcentrifugeuse réfrigérée.

## MODE OPÉRATOIRE

1. **Donner les tubes aux examinateurs** pour centrifuger deux fois 20 mL de culture pendant 10 minutes à 4 000 rpm à 7°C dans la centrifugeuse sur pied. Éliminer au maximum le surnageant dans l'Erlen de culture par retournement.
2. Remettre chaque culot en suspension dans 650 µL de tampon TSE et transférer quantitativement cette suspension en microtubes de 2 mL. Incuber les deux suspensions pendant 15 minutes dans la glace.
3. Ajouter à chaque suspension 750 µL d'eau déminéralisée froide additionnée de lysozyme pour obtenir une concentration finale de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Homogénéiser immédiatement par inversions et incuber les deux suspensions diluées pendant 15 minutes dans la glace.
4. **Donner les tubes aux examinateurs** pour centrifuger à 20 000 g à 7°C pendant 20 minutes. Récupérer et regrouper les deux surnageants dans un tube à hémolyse en plastique à bouchon jaune.
5. Mesurer le volume total d'extrait brut obtenu et ajouter le volume nécessaire d'imidazole à 2 mol.L<sup>-1</sup> pour obtenir une concentration finale de 40 mmol.L<sup>-1</sup>.

Conserver l'extrait brut en glace.

---

## RÉACTIFS ET MATÉRIEL

---

Néant.

Cette manipulation n'est pas à réaliser (le sonicat est fourni).

## MODE OPÉRATOIRE

---

1. Centrifuger 2 fois 20 mL de culture à 3500 rpm pendant 10 minutes.
2. Reprendre chaque culot dans 4 mL de Buffer S.  
Buffer S = Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8.0, EDTA 0.1 mmol.L<sup>-1</sup>, DTT 1 mmol.L<sup>-1</sup>
3. Regrouper les deux suspensions.
4. Soniquer (Power = 50% ; Pulser = 70%) au moins 5 fois 2 minutes en glace, avec une pause de 1 minute entre chaque période.
5. Centrifuger à 12000 g à 4°C pendant 10 minutes.
6. Mesurer le volume total d'extrait brut obtenu et ajouter le volume nécessaire d'imidazole à 2 mol.L<sup>-1</sup> pour obtenir une concentration finale de 40 mmol.L<sup>-1</sup>.
7. Conserver le surnageant à 4°C.

## RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Extrait brut choc osmotique	Extrait brut obtenu par choc osmotique selon le mode opératoire de la fiche technique 1	-
Sonicateur	Extrait brut obtenu par sonication de la culture pA1 selon le mode opératoire de la fiche technique 2	2 mL en microtube
Imidazole	Imidazole à 2 mol.L <sup>-1</sup>	1 mL en microtube
BB	<i>Binding Buffer</i> Tampon phosphate de sodium 50 mmol.L <sup>-1</sup> , pH8 + NaCl 300 mmol.L <sup>-1</sup>	10 mL en flacon

- 2 mini colonnes His Spin Trap™ chargée en ions nickel d'une capacité de 750 µg de protéines étiquetées 6-histidines
- Microtubes de 2 mL
- Tube à centrifuger de 15 mL
- Centrifugeuse de paillasse

## MODE OPÉRATOIRE

**Préparation des tampons**

A partir de la solution stock d'imidazole à 2 mol.L<sup>-1</sup>,

1. Dans un tube à centrifuger de 15 mL, préparer 5 mL de tampon de lavage = tampon BB + imidazole à 40 mmol.L<sup>-1</sup> final.
2. Dans un microtube de 2 mL, préparer 1 mL de tampon d'éluion = tampon BB + imidazole 500 mmol.L<sup>-1</sup> final.

**Préparation de la résine – Minicolonne His Spin Trap™**

3. Remettre la résine en suspension par inversions et agitations manuelles. Dévisser le capuchon d'un quart de tour et retirer en le cassant l'obturateur en plastique en bas de la colonne.
4. Placer la colonne dans un microtube de 2 mL, et centrifuger 10s, capuchon du tube eppendorf vers le centre de la centrifugeuse. Dévisser et jeter le capuchon, éliminer le perméat.
5. Ajouter 600 µL de tampon de lavage et centrifuger 10s. Éliminer le perméat.

### **Purification des extraits bruts**

6. Ajouter 600 µL de l'extrait à purifier sur la résine, incubé 30s puis centrifuger 10s. Éliminer le perméat.
7. Répéter deux fois supplémentaires l'étape 6.
8. Ajouter 600 µL de tampon de lavage, incubé 30s puis centrifuger 10s et éliminer le perméat. Répéter l'opération.
9. Changer le tube collecteur. Ajouter 200 µL de tampon d'éluat, incubé 2 min puis centrifuger 10s.
10. Reprendre les 200 µL d'éluat, les ajouter sur la résine, incubé 2 min puis centrifuger 10s et conserver le perméat (extrait purifié) en glace.

### **Données : caractéristiques techniques de la colonne His SpinTrap™**

Milieu	Ni Sepharose Haute Performance
Volume de milieu	100 µL
Taille moyenne des billes	34 µm
Capacité de fixation des protéines	Environ 750 µg de protéine avec étiquette 6-His/colonne
Compatibilité	Stable dans tous les tampons usuels, agents réducteurs, dénaturants et détergents
A éviter dans les tampons	Agents chélateurs ex : EDTA, EGTA, citrate
Température de stockage	4°C à 30°C

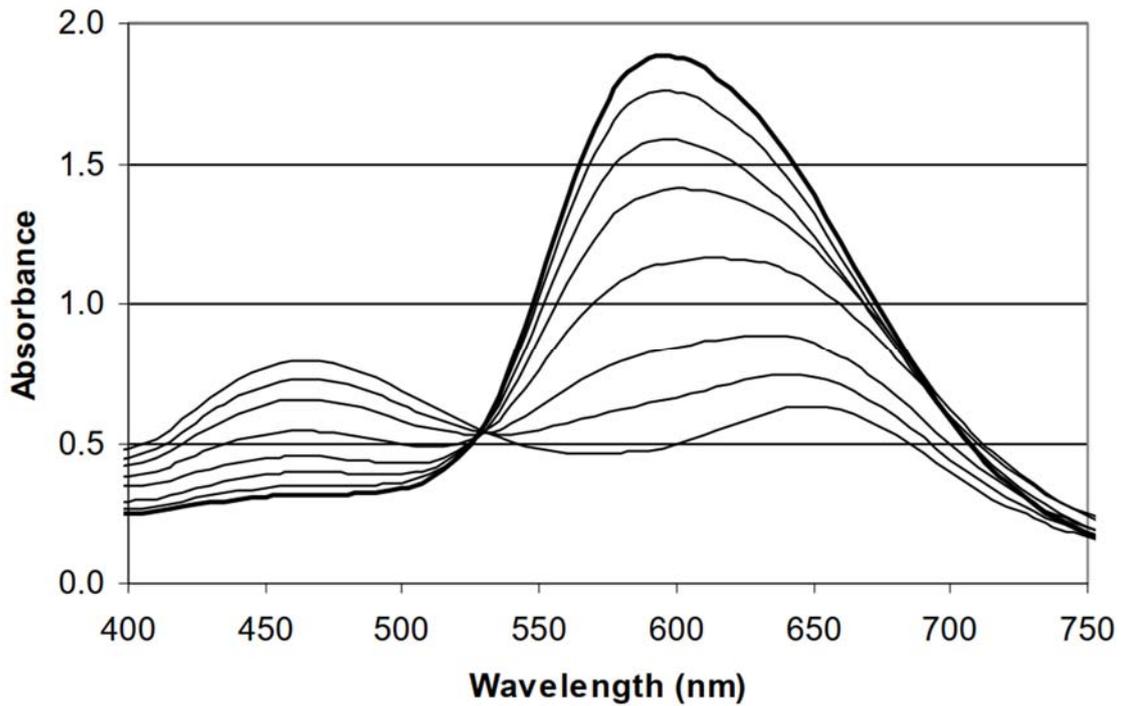
## RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
BB	<i>Binding Buffer</i> Tampon phosphate de sodium 50 mmol.L <sup>-1</sup> , pH8 + NaCl 300 mmol.L <sup>-1</sup>	10 mL en flacon
Imidazole	Imidazole à 2 mol.L <sup>-1</sup>	1 mL en microtube
SAB 0,5 g.L <sup>-1</sup>	Solution étalon de sérum albumine bovine diluée à 0,5 g.L <sup>-1</sup>	1 mL en microtube
PBS	Tampon phosphate	5 mL en flacon
Réactif de Bradford	Solution de bleu de Coomassie	8 mL en flacon
Echantillons à tester	Extraits bruts et fractions d'élution obtenus	-

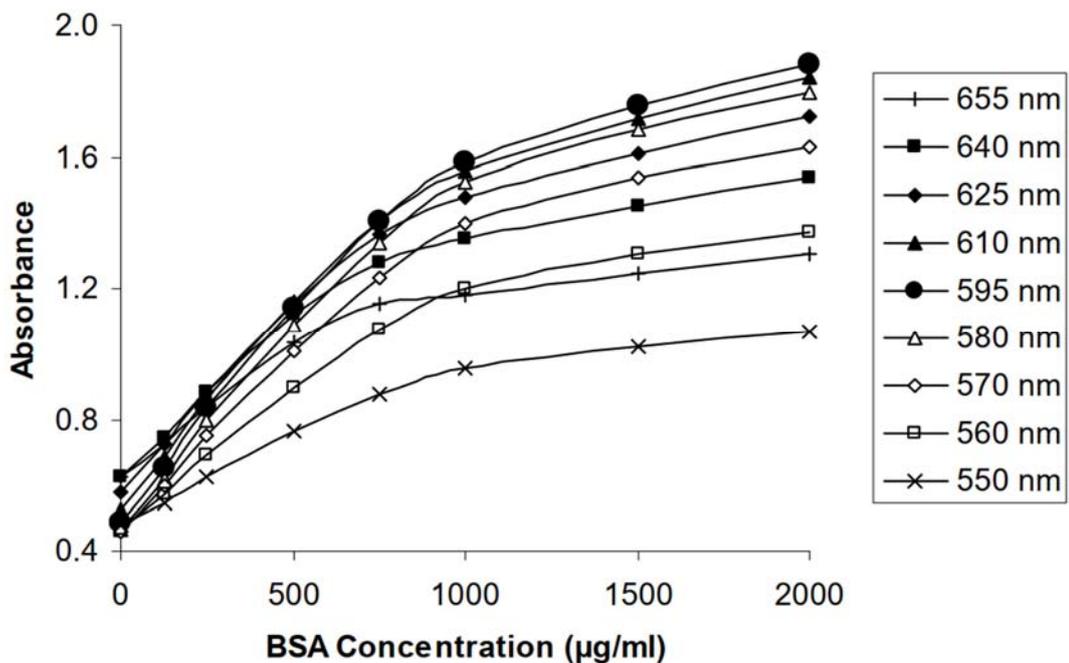
- Microplaque de 96 puits à fond plat
- Lecteur de microplaque relié à une imprimante
- Tubes Eppendorf

## MODE OPÉRATOIRE

1. Réaliser une gamme de SAB allant de 0 à 10 µg de sérum albumine par cupule, pour un volume final de 20 µL.
2. Prévoir les dilutions des échantillons à tester.
3. Ajouter 200 µL de réactif de Bradford dans les cupules. Homogénéiser et incuber 5 minutes.
4. **Appeler l'examineur** qui réalisera la lecture d'absorbance au lecteur de microplaque



**Figure 1. Spectres d'absorbance d'une gamme de SAB lors d'un dosage Bradford de protéines.** Les points de la gamme de BSA sont respectivement 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Le trait épais correspond à 2000  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .



**Figure 2. Courbe d'étalonnage d'une gamme de SAB (BSA en anglais) lors d'un dosage Bradford de protéines mesurée à différentes longueurs d'onde.**

## RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
BB	<i>Binding Buffer</i> Tampon phosphate de sodium 50 mmol.L <sup>-1</sup> , pH8 + NaCl 300 mmol.L <sup>-1</sup>	10 mL en flacon
Imidazole	Imidazole à 2 mol.L <sup>-1</sup>	1 mL en microtube
SAB 0,5 g.L <sup>-1</sup>	Solution étalon de sérum albumine bovine diluée à 0,5 g.L <sup>-1</sup>	1 mL en microtube
PBS	Tampon phosphate	5 mL en flacon
Réactif A	Acide bicinchoninique	8 mL en flacon
Réactif B	Sulfate de cuivre (II) pentahydraté à 4 %	500 µL en microtube
Echantillons à tester	Extraits bruts et fractions d'éluion obtenus à doser en partie 3-2	-

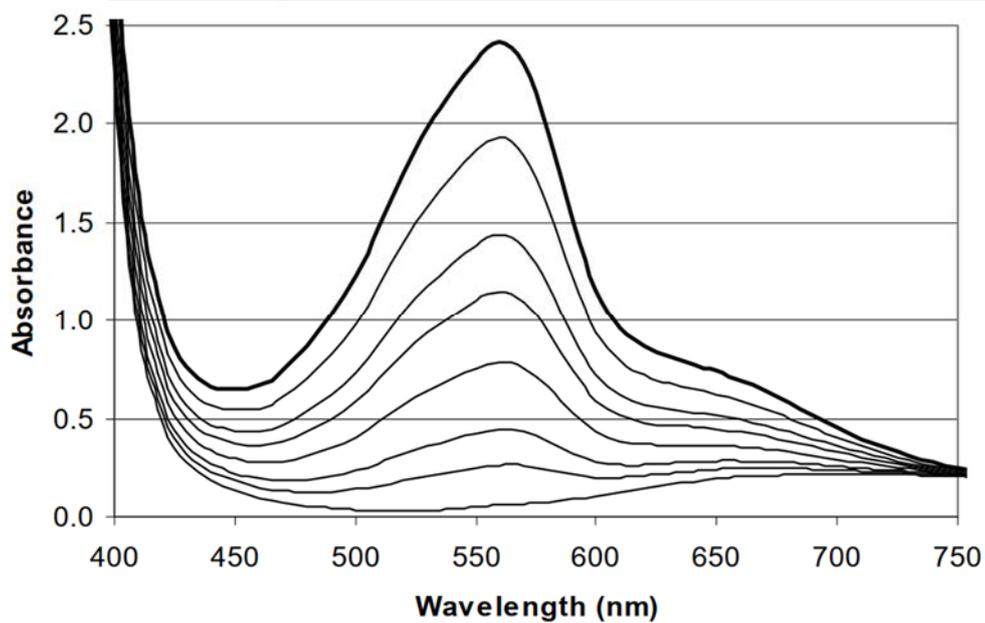
- Microplaque de 96 puits à fond plat
- Lecteur de microplaque relié à une imprimante
- Tube à hémolyse et Eppendorf

## MODE OPÉRATOIRE

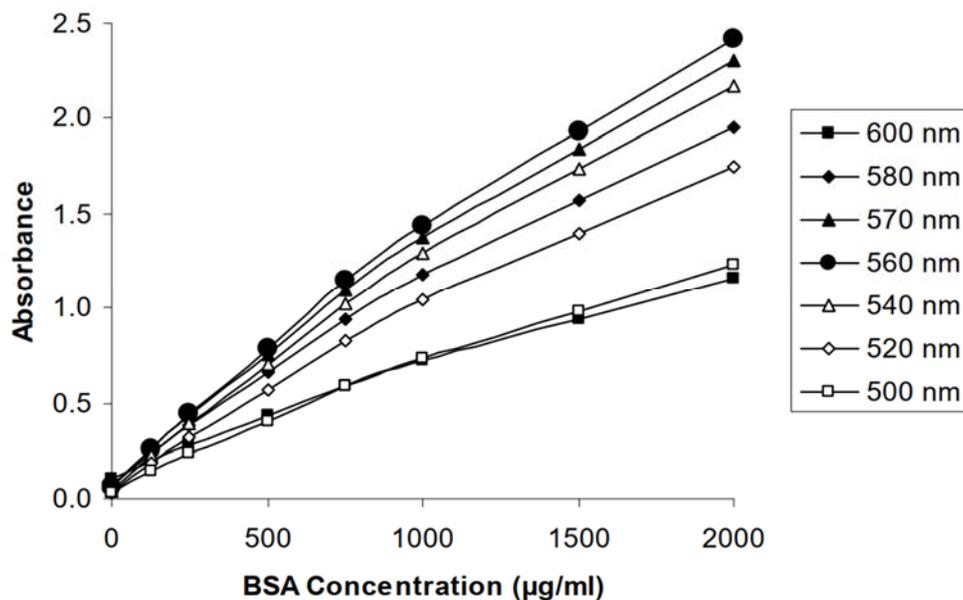
**Préparation extemporanée du réactif BCA :**

Diluer au 1/20 le réactif B en réactif A. Homogénéiser vigoureusement.

1. Réaliser une gamme de SAB allant de 0 à 10 µg de sérum albumine par cupule, pour un volume final de 20 µL.
2. Prévoir les dilutions des échantillons à tester.
3. Ajouter 200 µL de réactif BCA dans les cupules. Couvrir et incuber 30 min à température ambiante.
4. **Appeler l'examineur** qui réalisera la lecture d'absorbance au lecteur de microplaque



**Figure 1. Spectres d'absorbance d'une gamme de SAB lors d'un dosage BCA de protéines.** Les points de la gamme de BSA sont respectivement 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Le trait épais correspond à 2000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



**Figure 2. Courbe d'étalonnage d'une gamme de SAB (BSA en anglais) lors d'un dosage BCA de protéines mesurée à différentes longueurs d'onde.**

## RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Echantillons à tester	Extraits bruts et fractions d'éluion obtenus	-
Eau physiologique	NaCl 0,9%	30 mL
TBST	Tris-HCl pH 7,5 50mM, NaCl 150 mM, Tween 20 à 0,05%	10 mL
TBST-Lait	TBST, lait écrémé à 4%	10 mL
TBS	Tris-HCl pH 7,5 50mM, NaCl 150 mM,	15 mL
Ac anti-6His HRP	Anticorps anti-étiquette 6His conjugué à la peroxydase HRP	Sur demande
6His-GFP	GFP étiquetée 6 histidines à $2\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	Sur demande
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	50 $\mu\text{L}$
Chloro-naphtol	4-Chloro <sup>1</sup> -naphtol, 5 mg.mL <sup>-1</sup> en éthanol absolu	0,5 mL
NBT	NBT à 100 mg.mL <sup>-1</sup> en DMF	100 $\mu\text{L}$
BCIP	BCIP à 50 mg.mL <sup>-1</sup> en DMF	100 $\mu\text{L}$
TDEA	Tampon DEA	10 mL
Ponceau	Solution de rouge ponceau à 0,5 g.L <sup>-1</sup>	1,5 mL

- 1 petite boîte de Pétri contenant 3 membranes carrées de nitrocellulose
- 3 fioles Coulter
- Aluminium
- Agitateur de microplaque
- Tube conique de 15 mL

**Remarque :**

Il est possible d'annoter les membranes au crayon de papier.

### **Dépôts sur membranes**

1. Sur une membrane de nitrocellulose, déposer 1  $\mu$ L des solutions protéiques à tester. 6 dépôts maximum par membrane. Laisser sécher 10 minutes.
2. Répéter les dépôts de manière identique sur deux autres membranes de nitrocellulose.
3. Introduire chaque membrane au fond d'une fiole Coulter.

### **Révélation des protéines totales au rouge ponceau**

4. Recouvrir la membrane par 1 mL de rouge ponceau, incubé 5 min.
5. Rincer à l'eau déminéralisée et sécher sur une feuille de papier absorbant.

### **Révélation par substrat chromogène de la phosphatase alcaline**

4. Préparer extemporanément le réactif chromogène de révélation de l'activité phosphatase alcaline en ajoutant 35  $\mu$ L de BCIP et 45  $\mu$ L de NBT dans le flacon de TDEA. Homogénéiser et conserver à l'abri de la lumière.
5. Recouvrir la membrane par 1 mL de réactif de révélation et surveiller l'apparition du signal.
6. Après 15 minutes maximum, rincer à l'eau déminéralisée et sécher sur une feuille de papier absorbant.

### **Immunodétection par anticorps anti-étiquette 6His**

4. Déposer 1 mL de TBST-Lait sur la membrane. Fermer la fiole et incubé sous agitation 5 minutes à température ambiante.
5. **Appeler l'examineur** pour l'ajout de 1  $\mu$ L de solution d'anticorps anti-6His conjugué à la HRP directement dans le TBST-Lait de la fiole coulter. Incuber sous agitation 30 minutes à température ambiante.
6. Réaliser un lavage rapide avec 2 mL de TBS.
7. Réaliser un lavage en TBST : déposer sur la membrane 2 mL de TBST, fermer la fiole et incubé sous agitation 10 minutes à température ambiante.
8. Réaliser un lavage rapide avec 2 mL de TBS.
9. Préparer extemporanément 10 mL de réactif de révélation de la peroxydase : 1 mL de Chloro-naphtol qsp 10 mL de TBS additionné de 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
10. Recouvrir la membrane avec 1 mL de réactif de révélation peroxydase, et surveiller l'apparition du signal.
11. Après 15 minutes maximum, arrêter la coloration de la membrane par rinçage à l'eau. La sécher sur papier absorbant.

## RÉACTIFS ET MATÉRIEL

NOM	COMPOSITION	CONDITIONNEMENT
Échantillons à tester	Extraits bruts et fractions d'élution obtenus	-
Tampon TMZ	Tris-Mg-Zn = Tris-HCl à 200 mmol.L <sup>-1</sup> pH 8,2 + MgCl <sub>2</sub> à 1 mmol.L <sup>-1</sup> + ZnCl <sub>2</sub> à 0,1 mmol.L <sup>-1</sup>	12 mL en flacon
pNPP 0,25M	para-nitrophénylphosphate à 0,25 mol.L <sup>-1</sup> en tampon TMZ	0,25 mL en tube à hémolyse
Solution d'arrêt	Hydroxyde de sodium à 1M	12 mL en flacon

- Chronomètre
- Tubes à hémolyse et Eppendorf
- Bain thermostaté à 37°C avec thermomètre
- Semi-microcuves visibles
- Parafilm
- Spectrophotomètre

## MODE OPÉRATOIRE

Pour chacun des échantillons, l'activité enzymatique sera déterminée à 37°C comme suit :

**1.** Introduire dans un tube à hémolyse :

- 20 µL de pNPP 0,25M
- 930 µL de tampon TMZ pré-incubé à 37°C pendant 5 min.

**2.** Introduire 50 µL d'extrait enzymatique dilué pour déclencher la réaction.

Dilutions conseillées en PBS au 1/100 pour les extraits bruts et au 1/5 pour les fractions d'élution, à adapter si besoin.

**3.** Après  $\Delta t = 2,5$  minutes, arrêter la réaction par 1 mL de solution d'arrêt.

**4.** Mesurer l'absorbance à 405 nm contre un blanc judicieux.

**Appeler l'examineur au moment du lancement d'une réaction.**

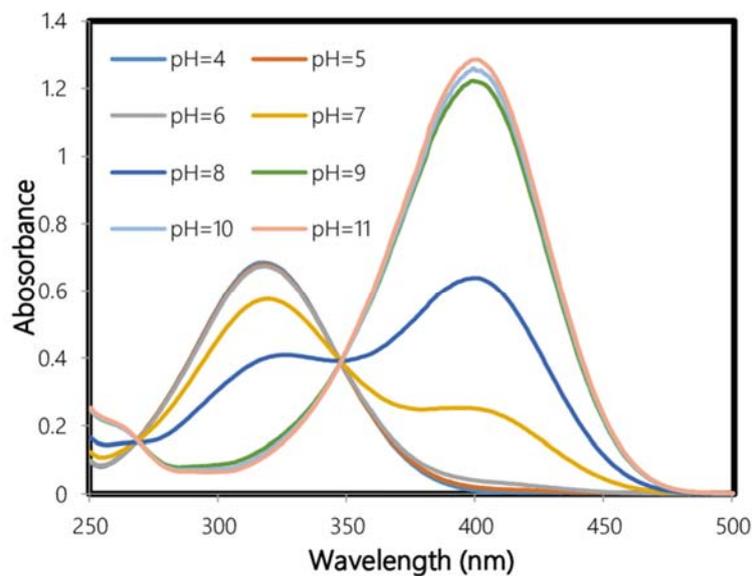
**Données :**

- Une unité de phosphatase alcaline est définie comme la quantité d'enzyme hydrolysant une micromole de pNPP par minute dans les conditions opératoires.

Coefficient d'extinction linéique molaire du pNP à pH  $\geq 9,8$  :  $\epsilon_{\text{pNP } 405 \text{ nm}} = 18000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Limite de linéarité pour le dosage du pNP :  $1,8 \text{ uA}_{405 \text{ nm}}$ .

- Le substrat utilisé est le 4-nitrophénylphosphate (aussi appelé paranitrophénylphosphate ou pNPP) composé incolore en solution. L'hydrolyse de ce substrat par une phosphatase aboutit à la production de 4-nitrophénol (ou paranitrophénol) dont le spectre d'absorbance est le suivant :

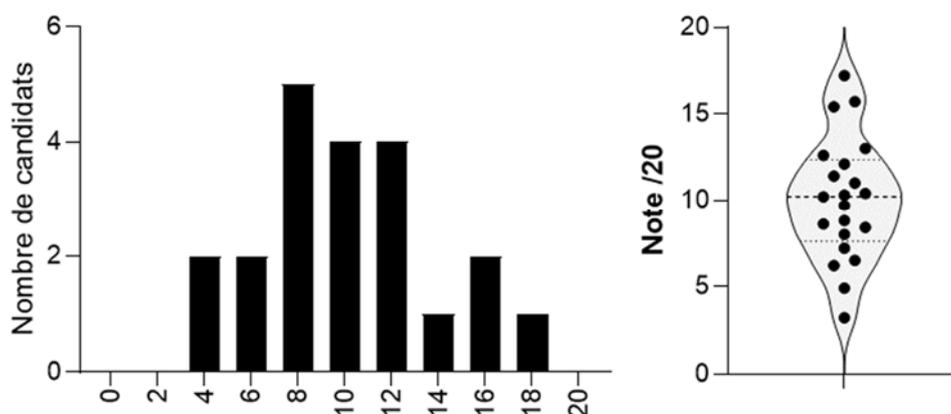


Peng, Y., Fu, S., Liu, H., and Lucia, L. A. (2016). Accurately determining esterase activity via the isosbestic point of p-nitrophenol, *BioRes.* 11(4), 10099-10111.

## RAPPORT DU JURY DE TP DE BIOCHIMIE-PHYSIOLOGIE

### Statistiques des résultats de l'épreuve

- 
- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,04 / 20**
- Meilleure note : **17,20 / 20**
- Note la plus basse : **03,20 / 20**
- Moyenne des candidats admis : **11,72 / 20**



*Répartition des notes obtenues au TP de biochimie-physiologie 2025*

## COMMENTAIRES GÉNÉRAUX SUR L'ÉPREUVE

Le sujet portait sur la production d'une protéine bi-fonctionnelle recombinante étiquetée constituée d'un interféron fusionné à la phosphatase alcaline. Il comprenait une étude du clonage par PCR et restriction afin d'obtenir le vecteur d'intérêt. Après l'extraction et la purification de la protéine en chromatographie de chélation avec les métaux, il s'agissait de caractériser la fraction d'éluion obtenue : quantitativement par mesure d'activité enzymatique et dosages des protéines puis qualitativement par détections sur membranes. Le bilan permettait de comparer deux protocoles d'extraction et de réaliser le bilan quantitatif de purification.

Le sujet proposait des manipulations classiques de biochimie et d'enzymologie ainsi que l'utilisation d'un logiciel de bioinformatique. La première partie du sujet concernant l'analyse du vecteur d'expression n'a quasiment pas été traitées par les candidats. La majorité des candidats a en revanche réalisé les manipulations de la partie 2 (extraction et purification de protéines). La partie 3 a été partiellement abordée. De façon à traiter le sujet proposé dans de bonnes conditions, il était important comme d'accoutumé d'organiser le temps de manipulation de manière optimale, en prenant en compte notamment la durée des manipulations individuelles ainsi que les temps d'attente des différents protocoles. Le jury rappelle qu'il est par ailleurs nécessaire de respecter l'appel des examinateurs afin d'être évalué sur certains gestes techniques au cours de l'épreuve.

Le matériel nécessaire pour réaliser l'ensemble des manipulations du sujet est conséquent et vient encombrer les paillasse. Une majorité des candidats a cependant réussi à organiser un espace de travail organisé pour réaliser les manipulations en utilisant la tablette au-dessus de la paillasse. La liste de matériel à utiliser pour les manipulations est indiquée dans chaque fiche technique, permettant ainsi de s'organiser au mieux. Les candidats qui rencontrent des difficultés techniques (problème de pipette

automatique, manque de réactif...) ne doivent pas hésiter à en faire part aux examinateurs.

L'identification des dangers et la mise en œuvre des moyens de prévention doivent être pris en compte du début à la fin de l'épreuve pratique. Les candidats devaient porter des lunettes de protection lors de l'arrêt de la réaction enzymatique. Celles-ci ont souvent été oubliées. De plus, les expériences réalisées nécessitaient souvent le port de gants. De rares candidats ont malheureusement conservé ces derniers du début à la fin de l'épreuve, notamment pour rédiger, manipuler le clavier des ordinateurs... De plus, le jury rappelle que le passage aux sanitaires nécessite d'ôter la blouse et de se laver les mains avant de sortir du laboratoire.

Il est rappelé aux candidats la nécessité de numéroter les questions auxquelles ils répondent et de respecter une certaine forme d'organisation dans la structure des copies. Le sujet comportait un certain nombre de choix à justifier cependant les justifications ont souvent fait défaut. Rappelons qu'il est possible lorsqu'une manipulation n'a pas pu être réalisée, par manque de temps ou à la suite d'une erreur, d'engager une réflexion sur un résultat théorique ou un calcul à produire. Il n'est cependant pas recommandé d'inventer des résultats expérimentaux afin de présenter des calculs finaux.

Par ailleurs, tous les résultats bruts (valeurs d'absorbance, membranes, ...) doivent être référencés, et correctement annotés (titre et légendes), soit directement dans la copie, soit dans les fichiers informatiques du dossier candidat. La maîtrise des outils informatiques type tableur est indispensable pour l'analyse et la présentation des résultats, cependant les formules littérales utilisées doivent être présentées dans la copie et l'emploi d'un fichier informatique doit y être signalé.

Pour de nombreux candidats, l'exploitation des résultats est trop parcellaire. La rigueur dans la rédaction des calculs est indispensable pour le métier d'enseignant en biotechnologies mais aussi pour rédiger une suite de calculs sans erreur. La présentation des résultats de mesure et des calculs nécessite de ne jamais omettre les unités. Les équations aux grandeurs doivent être exposées dans la copie, il est ensuite possible de présenter les résultats dans une feuille de calcul correctement présentée, légendée et citée dans la copie. Lorsque plusieurs échantillons sont étudiés, il est conseillé d'expliquer une fois le calcul permettant l'exploitation des indications de mesure, puis de présenter l'ensemble des résultats dans un tableau récapitulatif, plutôt que de rédiger plusieurs fois les mêmes calculs ou de présenter des résultats à la suite les uns des autres. Cependant dans le cadre de calculs classiques de dilutions (facteur 2, 10...), il n'est pas nécessaire de justifier tous les calculs. De nombreux candidats ont passé beaucoup de temps à détailler des calculs qui n'étaient pas demandés au détriment de l'avancée des manipulations.

Le jury invite également les candidats à ne pas négliger les formes de communication que sont les tableaux et schémas (avec titre) qui peuvent faire gagner du temps et sont l'occasion pour les candidats de faire preuve d'un esprit de synthèse.

## **PARTIE 1 : Analyse du vecteur d'expression**

Cette première partie d'épreuve a été très peu abordée par les candidats en dehors des deux premières questions théoriques concernant la structure de la construction d'intérêt. Le jury s'étonne qu'une partie des candidats n'inclue pas le peptide signal dans le cadre de lecture de la protéine exprimée, et n'orientent pas un schéma protéique.

Les questions suivantes portaient sur le principe du clonage réalisé et le choix d'amorces appropriées. De manière surprenante, aucun candidat n'a pu citer les critères de choix d'une amorce pour une PCR. En revanche, trois candidats ont pensé à proposer un clonage directionnel. Six candidats seulement ont utilisé le logiciel proposé pour choisir des enzymes de restriction. La notion du respect du cadre de lecture lors du clonage afin d'obtenir une protéine de fusion n'a pas été évoquée.

## **PARTIE 2 : Extraction et purification de l'interféron recombinant**

De nombreux candidats ont fait une confusion en proposant un choc osmotique en milieu hypertonique. Le rôle du lysozyme était à analyser au regard de l'expression périplasmique de la construction chez la bactérie.

La réalisation technique de la chromatographie d'affinité avec les cations métalliques n'a pas posé de difficultés cependant la moitié des candidats méconnaît le principe de cette technique couramment utilisée pour la purification des protéines à étiquettes poly-histidine. Tous les calculs simples de dilution ont été bien maîtrisés.

## **PARTIE 3 : Caractérisation des extraits produits**

### **PARTIE 3.1 : CHOIX DE LA METHODE DE DOSAGE PROTEIQUE**

La proposition d'un protocole permettant de tester les interférences liées à l'imidazole afin de choisir une méthode de dosage des protéines a déstabilisé un grand nombre de candidats. Un nombre non négligeable de candidats a proposé la réalisation d'un spectre d'absorbance dans le visible sur une solution incolore et semble méconnaître la notion d'interférence lors d'un dosage colorimétrique. L'absence de choix de méthode a conduit certains candidats à réaliser en parallèle le dosage des protéines par méthode au BCA et celui de Bradford engendrant une perte de temps.

### **PARTIE 3.2 : DOSAGE PROTEIQUE DES EXTRAITS**

Lors de l'exploitation des résultats de la gamme d'étalonnage du dosage colorimétrique, un tiers des candidats a oublié de soustraire l'absorbance du blanc réactif aux valeurs d'absorbance brute données par le lecteur de microplaque. La conception et de la réalisation d'une gamme d'étalonnage simple ne sont pas maîtrisées par la moitié des candidats. Seul six candidats ont pu exploiter le dosage des protéines des extraits bruts et des fractions purifiées.

### **Partie 3.3 : Détection de la protéine d'intérêt sur membrane**

La détection de la protéine d'intérêt sur membrane a été réalisé par la moitié des candidats. Le choix des échantillons déposés n'a que rarement été justifié, et le témoin 6His-GFP proposé peu utilisé. L'analyse indépendante des trois membranes permettant la révélation des protéines au rouge ponceau, de l'activité enzymatique phosphatase et de l'étiquette poly-histidine par dot-blot a été réalisée. Cependant seule la mise en relation des trois permettait une conclusion pertinente.

### **Partie 3.4 : Détermination de l'activité enzymatique**

Cette partie abordait des mesures d'activité enzymatique en 2 points. Certains réflexes font défaut aux candidats : préincubation du substrat avant le déclenchement par ajout de l'enzyme, anticipation de l'homogénéisation avec présence de parafilm sur les cuves, déclenchement du chronomètre au préalable, respect de la température de réaction. Le jury a été surpris du nombre important de réactions réalisées en dehors des bains-marie et d'échantillons enzymatiques non conservés en glace.

Le calcul de la concentration d'activité catalytique nécessitait de prendre en compte la dilution liée à l'ajout du réactif d'arrêt. Il est regrettable que la majorité des candidats n'ait pas su déterminer le volume de milieu réactionnel.

## **PARTIE 4 : Bilan de l'étude**

Moins de la moitié des candidats a réalisé la synthèse de l'étude et ces derniers n'ont pas réussi à mettre en relation les différents résultats obtenus afin de conclure sur l'efficacité des différentes stratégies testées.

# TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

## SUJET

### Rôle du gène *mams* dans l'infection d'*Escherichia coli* au phage T4

#### Introduction

La résistance bactérienne aux antibiotiques représente aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale. La phagothérapie est étudiée comme une alternative à l'antibiothérapie. Il s'agit d'un traitement utilisant des bactériophages, des virus capables d'infecter et de détruire spécifiquement les bactéries pathogènes.

Nous vous proposons ici d'étudier le rôle du gène *mams* dans l'infection phagique d'*Escherichia coli* par le phage T4.

Le sujet est organisé en cinq parties :

Note :  $\Delta mams$  signifie délété du gène *mams*

**Partie A : Construction d'un mutant  $\Delta mams$  d'*E.coli* par la technique de *CrispR Cas9***

**Partie B : Construction d'un mutant  $\Delta mams$  d'*E.coli* par la technique de recombinaison**

**Partie C : Vérification par PCR d'un mutant  $\Delta mams$  et visualisation sur gel d'agarose**

**Partie D : Caractérisation de l'effet d'un phage T4 sur la croissance bactérienne d'une souche d'*E.coli* sauvage et d'une souche d'*E.coli* mutante  $\Delta mams$**

**Partie E : Suivi de la production de phages T4 au cours de l'infection**

**!/ \ La partie E ne peut pas être exécutée indépendamment de la partie D.**

**Des annexes sont proposées en fin de sujet.**

**Tous les choix techniques (dilutions, calculs...) doivent être justifiés dans la copie, même ceux qui ne sont pas directement concernés par des questions (les brouillons ne seront pas évalués). La clarté de la présentation des explications et des calculs sera évaluée.**

**Les boîtes devront être identifiées clairement ; elles seront évaluées par le jury en l'absence des candidats.**

## **Données**

Coefficient de correspondance :

1  $D_{600}$  (atténuation à 600nm)  $\leftrightarrow$   $1,0 \cdot 10^8$  bactéries  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, dans la limite d'une  $D_{600}$  de 0,8.

4 solutions d'antibiotiques sont disponibles (100  $\mu$ L par tube) :

- Ampicilline à 100 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> notée AMP100
- Rifampicine à 100 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> notée RIF100
- Acide nalidixique à 100 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> notée NAL100.
- Tétracycline à 10 % notée TET10.

## **Matériel général à disposition**

Agitateur-secoueur mécanique (« vortex »)  
Bac à glace  
Bec électrique  
Billes de verre stériles et pot de récupération des billes  
Boîtes de Petri stériles  
Bouillon LB stérile (2 flacons de 20 mL par poste – voir annexe 1)  
Calculatrice basique  
Carton blanc pour incubateur à 37 °C  
Centrifugeuse de paillasse pour microtubes de PCR (1 par salle)  
Centrifugeuses de paillasse pour microtubes (2 par salle)  
Centrifugeuse pour tubes coniques 50 mL (1 par salle)  
Chronomètres (2 par poste)  
Eau physiologique stérile (tubes de 9 mL, pour la salle)  
Microcuves « visible » pour spectrophotomètre, avec portoir  
Microtubes de 2 mL stériles  
Ordinateur avec logiciel tableur  
Parafilm prédécoupé  
Pincés  
Pipettes à piston P1000, P200, P20, P10 et cônes adaptés  
Pipettes graduées stériles de 1, 2, 5 et 10 mL, systèmes d'aspiration à roulette et propipettes  
Pipettes Pasteur  
Pissettes d'eau distillée et d'éthanol  
Spectrophotomètres (réglés à 600 nm, 2 par salle)  
Tubes à essais 20 mL stériles et portoirs adaptés  
Tubes à hémolyse 10 mL stériles et portoirs adaptés  
Tubes coniques 50 mL stériles et portoirs adaptés

# A) Construction d'un mutant $\Delta mams$ d'*E.coli* par la technique de *Crispr Cas9*

## Objectif

Réaliser la construction d'un mutant  $\Delta mams$  par la technique de *Crispr Cas9*.

## Matériel spécifique à disposition

2 mL d'arabinose 20 % (microtube noté ARA20)  
10 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,05 mol · L<sup>-1</sup> (flacon noté  $\text{CaCl}_2$  conservé dans la glace)  
Bain à sec à 42 °C pour microtubes (1 par salle)  
Bain thermostaté agité à 37 °C (3 par salle), avec flotteurs en polystyrène pour microtubes  
2 boîtes de Pétri vides stériles  
1 fiole d'erlenmeyer de 50 mL de milieu LB stérile (voir annexe 1)  
2 tubes de 20 mL de milieu LA 1,5 % (en surfusion dans l'étuve à 60 °C – voir annexe 1)  
1 microtube de 15 µL de cassette notée « MUT » (voir annexe 2), dans la glace  
*E.coli COUP* (5 mL de culture de nuit en LB) porteuse des plasmides Cas9 et ARN guide (voir annexe 3)

## A-1 Préparation des cellules compétentes

### Procédure

- Diluer au 1/25<sup>ème</sup> la culture d'*E.coli COUP* fournie, dans l'erlenmeyer de 50 mL de LB.
- Ajouter de l'arabinose ARA20 à la concentration finale de 0,2 %.
- Ajouter la tétracycline TET10 à la concentration finale de 0,1 %.
- Incuber à 37 °C pendant 1 heure, au bain d'eau agité.
- Après 1 heure, transférer les 50 mL de culture dans un tube conique de 50 mL, et centrifuger à 3000 tours · min<sup>-1</sup> pendant 5 minutes.
- Éliminer le surnageant ; reprendre le culot dans 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,05 mol · L<sup>-1</sup> froid, et transférer dans un microtube de 2 mL.
- Centrifuger de nouveau à vitesse maximum pendant 5 minutes et reprendre le culot dans 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,05 mol · L<sup>-1</sup> froid.
- Les cellules compétentes ainsi obtenues doivent être conservées dans la glace.

## A-2 Mutation à l'aide de *Crispr Cas9*

Les recombinants seront sélectionnés avec un antibiotique approprié, utilisé à 100 µg · mL<sup>-1</sup>. Un témoin adéquat doit être réalisé.

### Procédure

- Ajouter 5 µL de cassette « MUT » à 100 µL de cellules compétentes.
- Placer dans la glace pendant 15 minutes.
- Incuber 2 minutes à 42 °C.
- Replacer dans la glace pendant 5 minutes.
- Ajouter 1 mL de LB, et incuber à 37 °C pendant 45 minutes au bain d'eau agité.
- Centrifuger 5 minutes à vitesse maximum et reprendre le culot dans 100 µL de LB.
- ensemencer 100 µL sur les boîtes LA adéquates, préparées par le/la candidat(e).
- Incuber à 37°C toute la nuit.

### Questions

1. Expliquer le rôle de chacun des plasmides.
2. Argumenter l'intérêt d'utiliser deux plasmides au lieu d'un seul.
3. Préciser la composition et l'intérêt du témoin réalisé.

## B) Construction d'un mutant $\Delta mams$ d'*E.coli* par la technique de recombinaison

### Objectif

Réaliser la construction d'un mutant  $\Delta mams$  par recombinaison.

### Matériel spécifique à disposition

2 mL d'arabinose 20 % (microtube noté ARA20 de la partie A)  
10 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,05 mol · L<sup>-1</sup> (flacon noté  $\text{CaCl}_2$  de la partie A, conservé dans la glace)  
Bain à sec à 42 °C pour microtubes (1 par salle)  
Bain thermostaté agité à 37 °C (3 par salle), avec flotteurs en polystyrène pour microtubes  
2 boîtes de Pétri vides stériles  
1 fiole d'erlenmeyer de 50 mL de milieu LB stérile (voir annexe 1)  
2 tubes de 20 mL de milieu LA 1,5 % (en surfusion dans l'étuve à 60 °C – voir annexe 1)  
1 tube de 15 µL de cassette notée « MUT » de la partie A (voir annexe 2), dans la glace  
*E.coli* CROSS (5 mL de culture de nuit en milieu LB) porteuse du plasmide pKD46  
(voir annexe 4)

### B-1 Préparation des cellules compétentes

#### Procédure

- Diluer au 1/25<sup>ème</sup> la culture d'*E.coli* CROSS fournie, dans l'erlenmeyer de 50 mL de LB.
- Ajouter de l'arabinose ARA20 à la concentration finale de 0,2 %.
- Incuber à 37 °C pendant 1 heure, au bain d'eau agité.
- Après 1 heure, transférer les 50 mL de culture dans un tube conique de 50 mL et centrifuger à 3000 tours · min<sup>-1</sup> pendant 5 minutes.
- Éliminer le surnageant ; reprendre le culot dans 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,05 mol · L<sup>-1</sup> froid et transférer dans un microtube de 2 mL.
- Centrifuger de nouveau à vitesse maximum pendant 5 minutes et reprendre le culot dans 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,05 mol · L<sup>-1</sup> froid.
- Les cellules compétentes ainsi obtenues doivent être conservées dans la glace.

### B-2 Transformation par recombinaison

Les recombinants seront sélectionnés avec un antibiotique approprié, utilisé à 100 µg · mL<sup>-1</sup>. Un témoin adéquat doit être réalisé.

#### Procédure

- Ajouter 5 µL de cassette « MUT » à 100 µL de cellules compétentes.
- Placer dans la glace pendant 15 minutes.
- Incuber 2 minutes à 42 °C.
- Replacer dans la glace pendant 5 minutes.
- Ajouter 1 mL de LB, et incuber à 37 °C pendant 45 minutes au bain d'eau agité.
- Centrifuger 5 minutes à vitesse maximum et reprendre le culot dans 100 µL de LB.
- Ensemencer 100 µL sur les boîtes LA adéquates préparées par le/la candidat(e).
- Incuber à 37°C toute la nuit.

### Questions

4. Justifier le choix de l'antibiotique utilisé dans le milieu LA.

## C) Vérification par PCR d'un mutant $\Delta mams$ et visualisation sur gel d'agarose

### Objectif

Contrôler le génotype d'un mutant  $\Delta mams$  d'*E.coli* par comparaison avec la souche sauvage.

### Matériel spécifique à disposition

Réactifs pour PCR (voir annexe 5.1, à compléter et à rendre en fin d'épreuve)  
1 pot de tubes stériles pour PCR de 200  $\mu$ L  
1 pot de cure-dents stériles  
Bain sec à 80 °C (1 par salle)  
Thermocycleur (géré par le jury)  
Gel fourni (tampon TAE 1X, 2 % d'agarose, gelRed 1X) – 1 gel pour 2 candidat(e)s  
Matériel d'électrophorèse, 1 cuve pour 2 candidat(e)s  
Marqueur de taille de 100 pb (déposé par le jury)  
*E.coli* WT isolée sur milieu LA  
*E.coli*  $\Delta mams$  isolée sur milieu LA

### C-1 Amplification par PCR

Un témoin approprié doit être réalisé.

#### Procédure

- Prélever une colonie à l'aide d'un cure-dent et homogénéiser dans un microtube contenant 50  $\mu$ L d'eau « milliQ ».
- Mettre à chauffer à 80 °C au bain sec pendant 5 minutes.
- Réaliser le mélange PCR d'après la procédure fournie en annexe 5.1, à compléter et à rendre en fin d'épreuve.
- Déposer les microtubes PCR sur le portoir du jury **avant 15h30**.
- Le programme utilisé pour le thermocycleur est fourni en annexe 5.2.

#### Questions

5. Fournir et justifier la composition du témoin réalisé.

### C-2 Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose

#### Procédure

- **Entre 17h30 et 17h45**, déposer 10  $\mu$ L de chaque échantillon par puits (6 puits disponibles au maximum par candidat). Prévoir le plan de dépôt en complétant l'annexe 6 fournie séparément de la liasse du sujet (le marqueur de taille de 100 pb est déposé par le jury en pistes 1, 8 et 15).
- La migration et la révélation seront effectuées par les membres du jury. Les résultats seront proposés le deuxième jour.

## D) Caractérisation de l'effet d'un phage T4 sur la croissance bactérienne d'une souche d'*E.coli* sauvage et d'une souche d'*E.coli* mutante $\Delta mams$

Pour caractériser l'importance du gène *mams* au cours d'une infection phagique, un suivi de la croissance est effectué : la comparaison de croissance en l'absence et en présence d'un phage T4 sera effectuée. Ces croissances concerneront deux souches d'*Escherichia coli* (souche *E.coli* WT et *E.coli*  $\Delta mams$ ).

Note : la souche *E.coli*  $\Delta mams$  présentant les mêmes caractéristiques de croissance que la souche *E.coli* WT, on n'étudiera pas la croissance de la souche *E.coli*  $\Delta mams$  seule.

### Objectif

Déterminer l'effet de la délétion du gène *mams* sur les paramètres de croissance, avec et sans phage à MOI = 1 (MOI = *multiplicity of infection*).

### Matériel spécifique à disposition

Bains thermostatés agités à 37 °C (3 par salle)  
3 fioles d'erlenmeyer de 50 mL de milieu LB stérile  
*E.coli* WT (10 mL de culture de nuit en LB)  
*E.coli*  $\Delta mams$  (10 mL de culture de nuit en LB)  
50  $\mu$ L de phage T4 à  $10^{10}$  UFP  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> (microtube noté T4)

### Conditions de croissance

- 50 mL de LB en fiole d'erlenmeyer
- Concentration bactérienne initiale (à t = 0) :  $[1,5 - 2,5] \cdot 10^6$  bactéries  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>
- Culture en bain d'eau à 37 °C sous agitation (120 tours  $\cdot$  min<sup>-1</sup>)

### Mesures à effectuer

- Mesurer les atténuances à 600 nm toutes les 30 minutes environ, pendant au moins 2 heures.
- A t = 30 minutes, ajouter le phage de façon à obtenir une MOI proche de 1.
- A t = 1 heure, et t = 2 heures, effectuer un prélèvement de 5 mL, à filtrer rapidement (voir partie E).

Montrer la mesure d'atténuation à t = 0 au jury.

Montrer un prélèvement au jury.

### Questions

6. Justifier les volumes de suspension phagique ajoutés dans les cultures.
7. Répondre à l'objectif de la partie.

## E) Suivi de la production de phages T4 au cours de l'infection

### Objectifs

Quantifier la production de phages à 2 temps, au cours de l'infection de la souche *E.coli WT* par le phage T4.

### Matériel spécifique à disposition

1 tube de 15 mL de LA mou (0,75 % en agar), en surfusion  
1 grande boîte carrée de LA (1,5 % en agar) déjà coulée  
2 pots de prélèvement, stériles (pot rond à couvercle rouge)  
2 seringues  
2 filtres micropores (0,22 µm)  
10 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mmol · L<sup>-1</sup> (flacon noté MgSO<sub>4</sub> conservé dans la glace)  
*E.coli WT* (10 mL de culture de nuit en LB de la partie D)

### Procédure pour préparer la boîte

- Déposer 500 µL d'*E.coli WT* dans 15 mL de LA mou en surfusion.
- Retourner délicatement le tube 2-3 fois pour homogénéiser.
- Couler rapidement en surcouche le contenu du tube sur la boîte LA carrée.
- Laisser sécher 15 min.

### Procédure pour préparer la suspension phagique

- Déposer les 5 mL prélevés à t = 1 heure ou t = 2 heures dans un pot de prélèvement stérile.
- Aspirer tout le contenu dans une seringue stérile.
- Filtrer au moins 1 mL au travers du filtre micropore, dans un microtube stérile.
- Conserver dans la glace.

### Procédure de dénombrement

- Diluer les filtrats dans du MgSO<sub>4</sub> 10 mmol · L<sup>-1</sup>, en cascade au 1/10<sup>ème</sup> jusqu'à la dilution 10<sup>-7</sup>.
- Déposer 5 µL de chaque dilution sur la boîte carrée préparée (maximum 6 dépôts par ligne) – le plan des dépôts doit être indiqué en annexe 7.
- Laisser sécher les gouttes 15-20 minutes.
- Incuber la boîte à 37°C pour la nuit sans la retourner.

### Questions

8. Indiquer l'intérêt d'inclure la souche *E.coli WT* dans la surcouche.
9. Prévoir la dilution exploitable.

### Données :

- 1 bactérie infectée produit 100 phages en 30 minutes.
- Il est possible de dénombrer entre 5 et 50 plages de lyse par dépôt.

## Annexe 1 – Composition des milieux de cultures

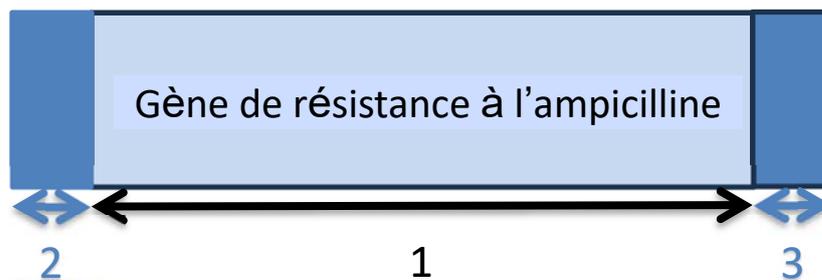
### Milieu Luria Bertani (LB) selon Miller (1 L)

Tryptone	10,0 g
Extrait de levure	5,0 g
NaCl	10,0 g
Eau distillée	qsp 1 L
pH du milieu prêt à l'emploi à 25 °C :	7,0 ± 0,2

Milieu « LA » 1,5 % = milieu LB gélosé : LB avec agar 15 g · L<sup>-1</sup>

Milieu « LA » 0,75 % = milieu LB gélosé : LB avec agar 7,5 g · L<sup>-1</sup>

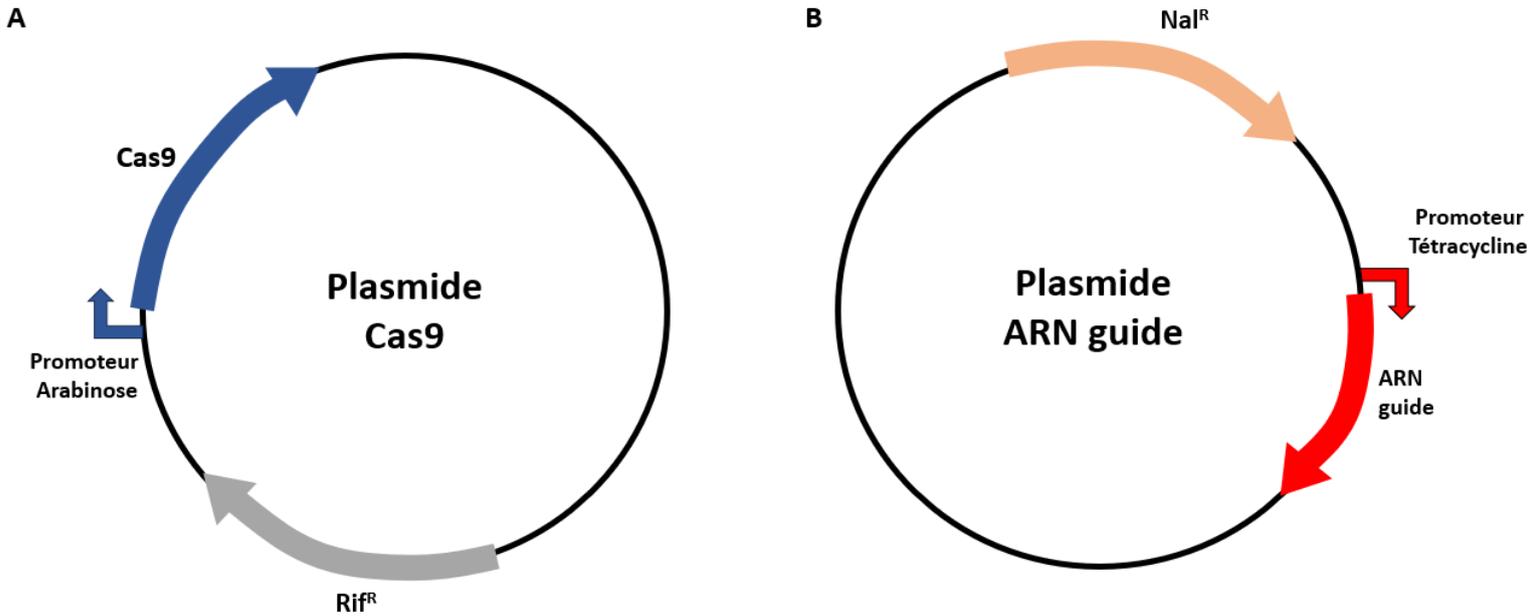
## Annexe 2 – Cassette « MUT » utilisée pour les mutations



Cassette génétique permettant la mutation du gène *mams* :

- gène de résistance à l'ampicilline (400 pb)
- début du gène *mams* (20 pb)
- fin du gène *mams* (20 pb)

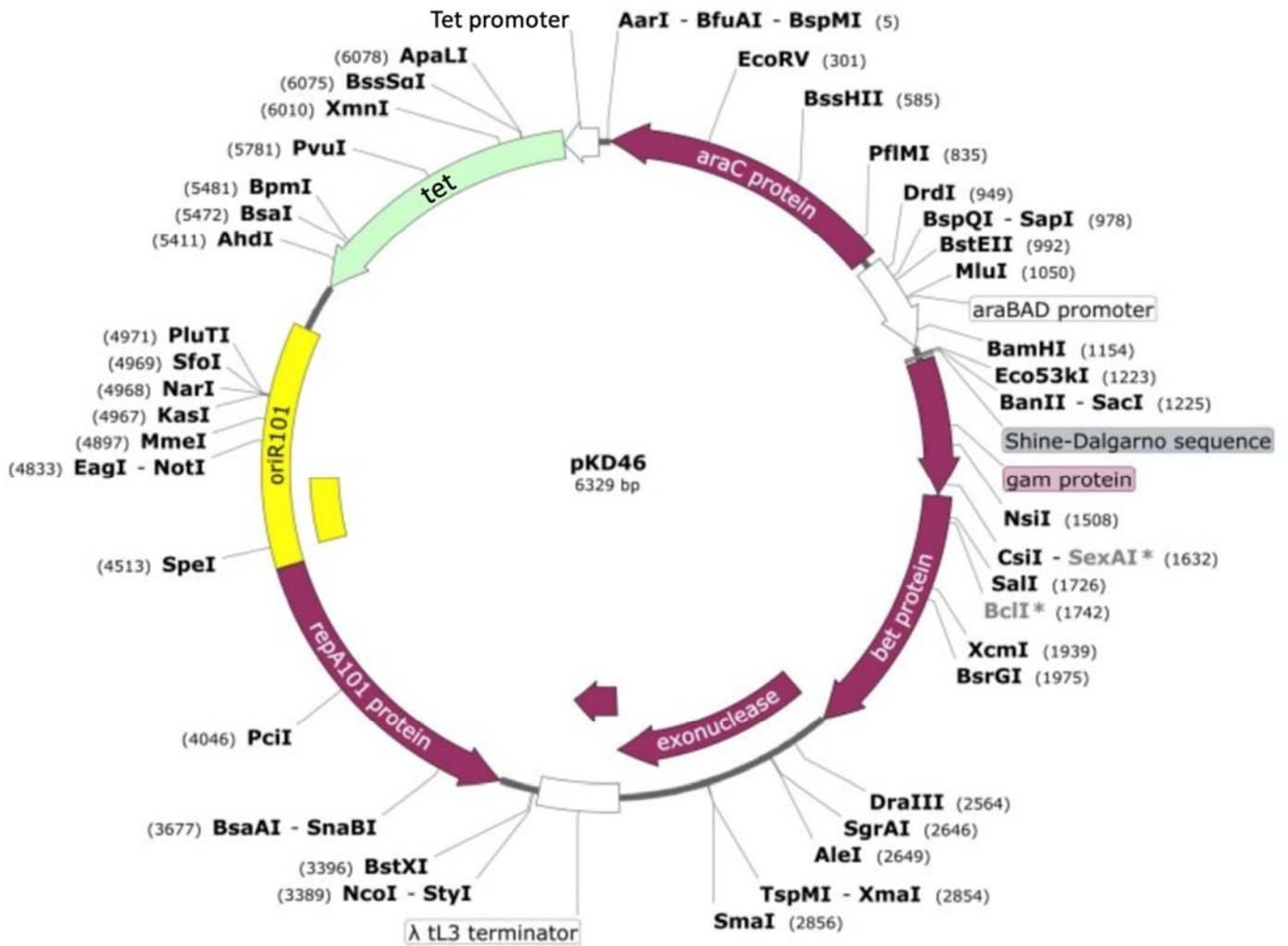
Annexe 3 – Carte des plasmides pour la méthode de *CrispR Cas9*



**A** : Carte du plasmide *Cas9*. L'induction de *Cas9* est sous contrôle du promoteur inducible par l'arabinose. Le plasmide possède un gène de résistance à la rifampicine (Rif<sup>R</sup>).

**B** : Carte du plasmide « ARN guide ». L'induction de l'ARN guide complémentaire d'une partie de la séquence du gène *mams* est sous contrôle du promoteur inducible à la tétracycline. Le plasmide possède un gène de résistance à l'acide nalidixique (Nal<sup>R</sup>).

## Annexe 4 – Carte du plasmide pKD46



Carte du plasmide pKD46 – recombinaison homologue

(Temperature sensitive replication (*repA101ts*); encode *lambda Red* genes for recombinaison (*exo*, *bet*, *gam*); native terminator (*tL3*) after *exo* gene; arabinose-inducible promoter for expression (*araBAD* promoter); encode *araC* for repression of *ParaB* promoter; Tetracycline resistant (*tet*))

## Annexe 5.1 – Mélange réactionnel de PCR

Annexe à compléter

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale	Volume dans le tube
Tampon <i>green</i> * (Tp)	10 X	1X	
dNTP	2,5 mmol · L <sup>-1</sup>	0,25 mmol · L <sup>-1</sup>	
Amorce Reverse (R)	-	-	2 µL
Amorce Forward (F)	-	-	2 µL
Taq pol (TAQ)	1 U · µL <sup>-1</sup>	2 U par tube	
ADN**	-	-	1 µL
H <sub>2</sub> O « milliQ » qsp 50 µL	-	-	

\* contient le tampon de charge

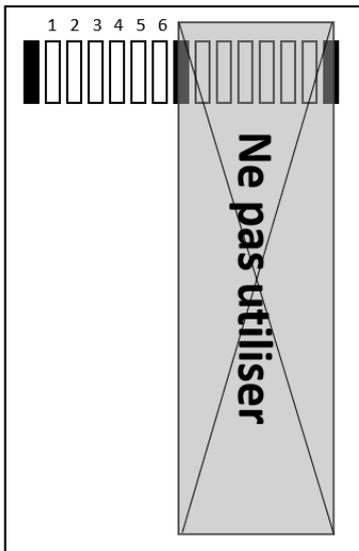
\*\* issu de la préparation en partie C.1

## Annexe 5.2 – Programme du thermocycleur

Géré par le jury

Durée	Température	Répétition(s)
5 minutes	90 °C	1 fois
30 secondes	90 °C	25 fois
30 secondes	55 °C	
1 minute	72 °C	
5 minutes	72 °C	1 fois
Attente	4 °C	1 fois

## Annexe 6 – Plan de dépôt du gel (partie C)



Le gel est utilisé par deux candidat(e)s. Vous disposez de la moitié **gauche** du gel, 6 puits maximum. En noir, **marqueur de taille**.

Légende de vos dépôts :

1 :

2 :

3 :

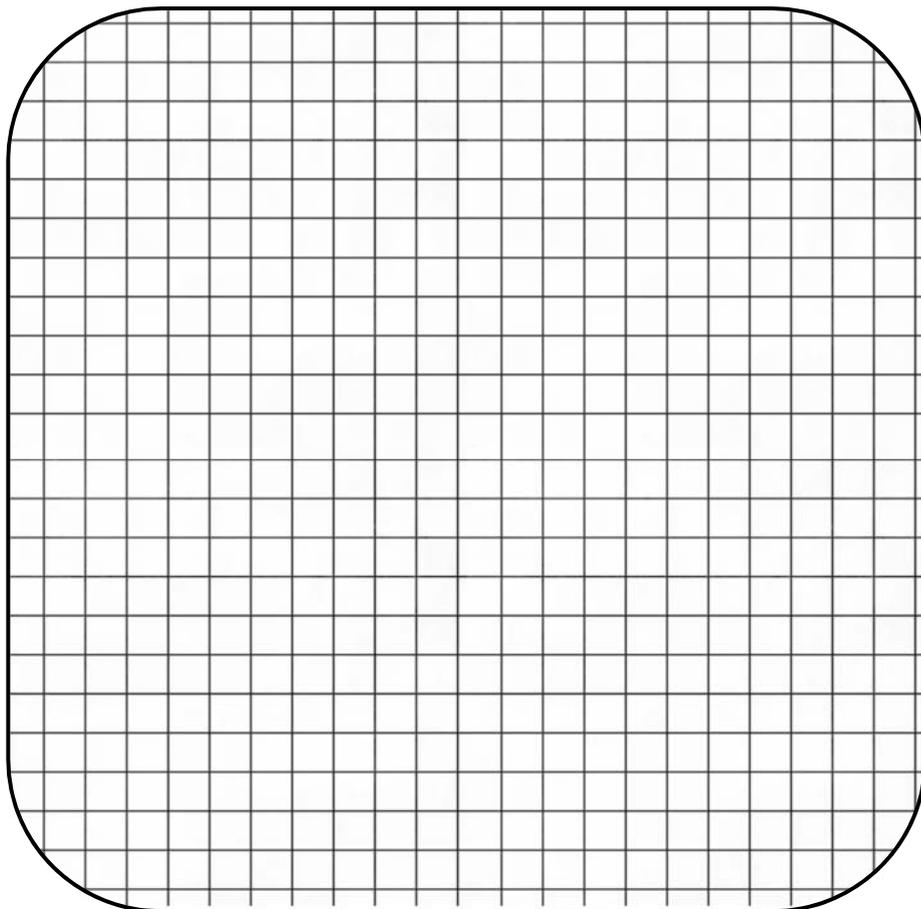
4 :

5 :

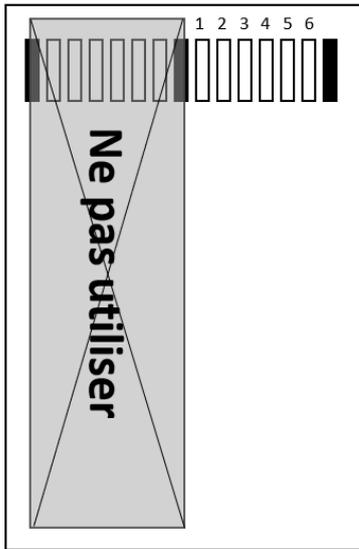
6 :

## Annexe 7 – Gabarit pour le dépôt sur la boîte carrée (partie

E)



## Annexe 6 – Plan de dépôt du gel (partie C)



Le gel est utilisé par deux candidat(e)s. Vous disposez de la moitié **droite** du gel, 6 puits maximum. En noir, **marqueur de taille**.

Légende de vos dépôts :

1 :

2 :

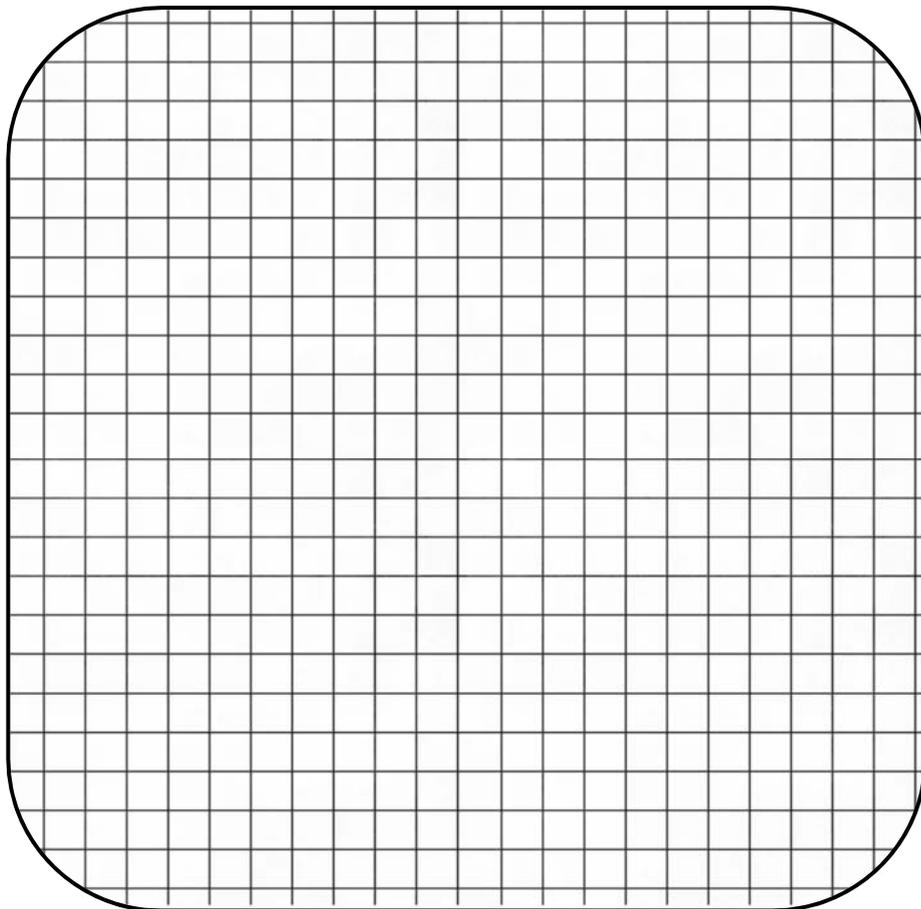
3 :

4 :

5 :

6 :

## Annexe 7 – Gabarit pour le dépôt sur la boîte carrée (partie E)



## TRAVAIL DU SECOND JOUR

Les résultats du premier jour sont relevés par les candidats et ramassés avant la remise du sujet du second jour.

Les interprétations ne porteront que sur les données proposées, et non sur les résultats obtenus par les candidats.

### **A) Construction d'un mutant $\Delta mams$ d'*E.coli* par la technique de *CrispR Cas9***

#### **Rappel de l'objectif**

Réaliser la construction d'un mutant  $\Delta mams$  par la technique de *CrispR Cas9*.

### **B) Construction d'un mutant $\Delta mams$ d'*E.coli* par la technique de recombinaison**

#### **Rappel de l'objectif**

Réaliser la construction d'un mutant  $\Delta mams$  par recombinaison.

Les résultats proposés à l'interprétation pour les parties A et B sont présentés en annexes 8 et 9.

#### **Questions**

1. Interpréter les résultats proposés.
2. Discuter la possibilité de comparer les deux méthodes.
3. Discuter du choix de la méthode à utiliser pour produire un mutant d'*E.coli* à l'aide des annexes 8, 9 et 10.

## C) Vérification par PCR d'un mutant $\Delta mams$ et visualisation sur gel d'agarose

### Rappel de l'objectif

Contrôler le génotype d'un mutant  $\Delta mams$  d'*E.coli* par comparaison avec la souche sauvage.

Les résultats et supports documentaires sont présentés en annexes 11, 12 et 13.

### Questions

4. Indiquer, en justifiant la réponse, le profil attendu de l'amplification pour les souches *E.coli* WT et *E.coli*  $\Delta mams$ .
5. Interpréter les résultats proposés.

## E) Suivi de la production de phages T4 au cours de l'infection

### Rappel de l'objectif

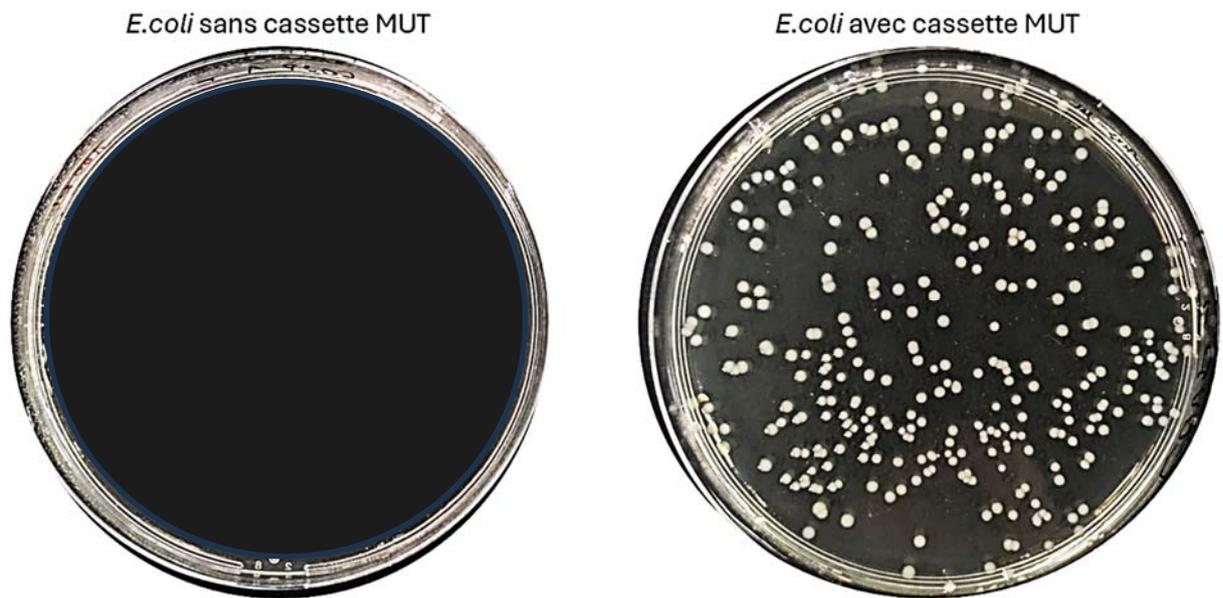
Quantifier la production de phages à 2 temps, au cours de l'infection des souches *E.coli* WT et *E.coli*  $\Delta mams$  par le phage T4.

Les résultats et supports documentaires sont présentés en annexes 14 et 15.

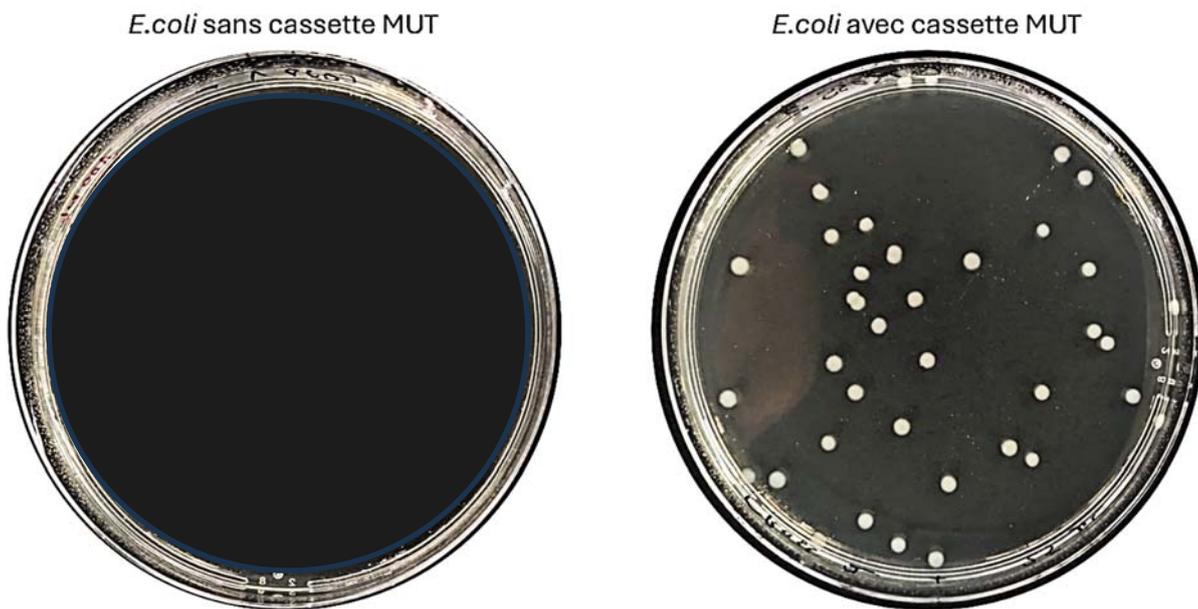
### Questions

6. Interpréter les résultats proposés pour la souche *E.coli* WT.
7. Interpréter les résultats proposés pour la souche *E.coli*  $\Delta mams$ .
8. Proposer des hypothèses sur la fonction du gène *mams* dans le cadre d'une infection phagique.

Annexe 8 – Résultats de la culture de 24h à 37 °C des bactéries sur LB + ampicilline à 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  après mise en œuvre de la technique de *CrispR Cas9*



Annexe 9 – Résultats de la culture de 24h à 37 °C des bactéries sur LB + ampicilline à 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  après mise en œuvre de la technique de recombinaison



## Annexe 10 – Comparaison de deux méthodes utilisées pour la construction de mutants chez les bactéries

Advantages and disadvantages of most commonly used genome-editing methodologies in bacteria.

Method	Advantages	Disadvantages
“Recombineering” (Lambda Red, RecE/T)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low cost</li> <li>- Highly efficient, particularly for small-scale edits</li> <li>- Utilizes DNA templates with only short regions of homology (50 bp) to promote gene edition by homologous recombination</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Requires development of specialized strains with controlled foreign recombinase expression.</li> <li>- Usually requires counter-selection steps to eliminate antibiotic resistance markers from the genome</li> </ul>
CRISPR-Cas (plasmid-encoded)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low cost</li> <li>- Can be combined with recombineering for an enhanced efficiency</li> <li>- Highly customizable</li> <li>- Double strand breaks induce cell death in non-edited cells diminishing background (false positive colonies)</li> <li>- Highly versatile genome editing from large genome deletions/insertions to single base mutations.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High cytotoxicity of Cas9 expression can alter morphology and survival even when devoid of nuclease activity due to steric hindrance posed by Cas9 PAM binding and subsequent DNA unwinding activity along the genome.</li> <li>- Induction of off-target effects (undesired genome edits) due to non-specific DNA cleaving, particularly after prolonged Cas9/gRNA expression</li> </ul>

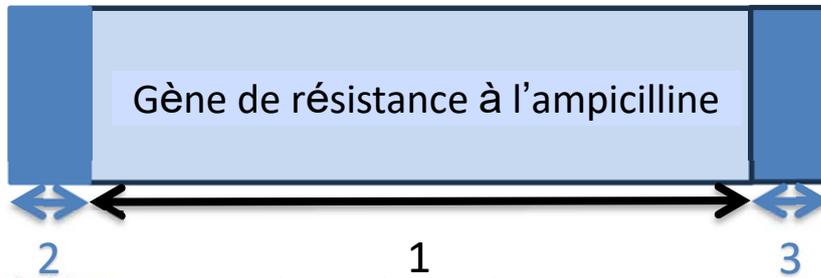
**Remarque :** la technique « Lambda Red » correspond à l'utilisation du plasmide pKD46.

**D'après *Genome Editing in Bacteria: CRISPR-Cas and Beyond***

Ruben D Arroyo-Olarte, Ricardo Bravo Rodríguez, Edgar Morales-Ríos  
*Microorganisms*. 2021 Apr 15;9(4):844

Annexe 11 – Cassette « MUT » utilisée pour les mutations et séquence du gène *mams*

**A :** reprise de l'annexe 2 du sujet du premier jour



Cassette génétique permettant la mutation du gène *mams* :

- gène de résistance à l'ampicilline (400 pb)
- début du gène *mams* (20 pb)
- fin du gène *mams* (20 pb)

---

**B :** Séquence du gène *mams* (700pb)

```
AGTGATCGATCGATCGATCGATCGATTGAGTGCATAGTTGAGTATCGATCACATGTTGCGTTTTGTCCAATATTACTGTTTATTT  
ATACAGTAAACTTCTATAATATCACTGTACGCAATGTGTTATGCGGGGGCCGCATCGTTACCCGGCGCACTAAGTCCTGGCTGAAACG  
GGTGGTGCCGTCAGCGCCTTAACCCCGCGTGAGCACACTGTGTTATGTCAACAAGCACAAACGTTTCTCCTTGAGATACCGCGTGAC  
AACAGCTGGCAACAGGCAGCGGAAAGGTACGTCAGCTGGCAGTGCTCCTGAACCACAGGAGACGCGTATTAACCTGGTGGATATC  
GCCATTCTTATCCTCAAACCTATTGTTGCAGCACTGCAACTGCTTGATGCTGTTCTGAAATACCTGAAGTAATTCAGATTCAAGTCGCA  
CCAAAGGGGAGCGGGAAACCGCTCCCCTATATGCGCGTGCGTGCGTGCGTTCGTTTTATATTTAGCGTGCGGGTTGGTGTCGGATGCG  
ATGCTGACGCATCTTATCCGCCCTACCATCTCTCCGGCAACATTTATTGCCGCTTTTGTTTACATATTCTGCCGCTAAACAATCCCCAT  
TCCTGGCGTATATCTGGCTAACATTCATCAATGTGATAGATTCTCTCCCGCATTATGGGAATGCGTAGTGACTTATTCTAATTATTTTA  
TATAAGCATCCGTGATAATGAAAAGGCA AAGAAACGTC
```

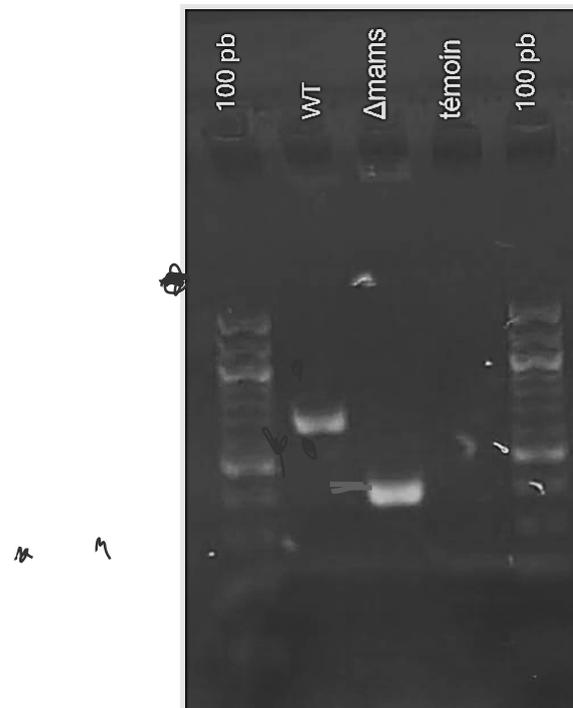
Soulignés : codon d'initiation (ATG) et codon stop (TAA)

En **rouge** : séquences des amorces utilisées pour la PCR (*Forward* et *Reverse*)

En **bleu** : séquences correspondantes aux séquences flanquantes 2 et 3 décrites ci-dessus (annexe 11.A)

## Annexe 12 – Contrôle du résultat de la PCR par électrophorèse

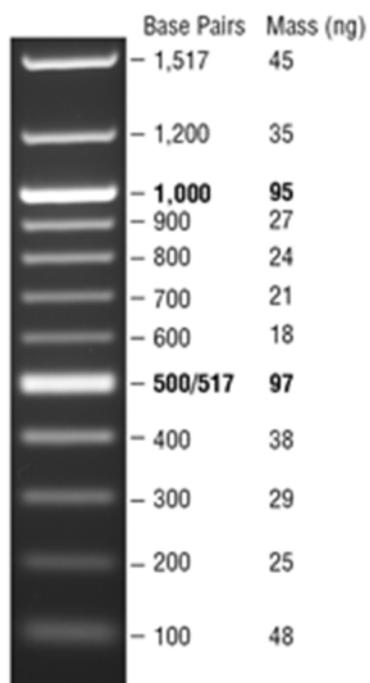
Gel d'agarose 2%, révélation gelRed 1X



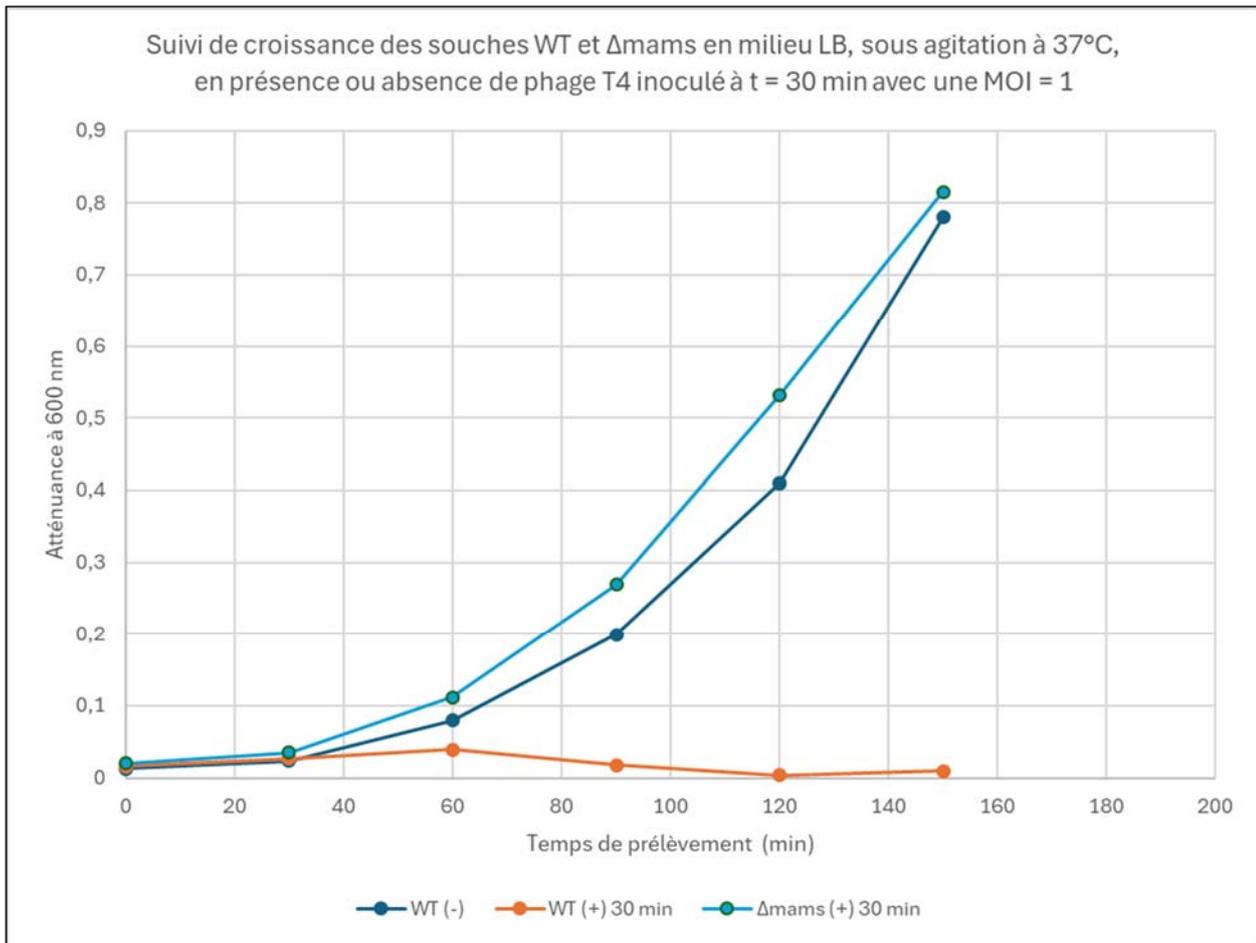
### Légende

- 100 pb : marqueur de taille 100 pb (voir Annexe 13)
- WT : produit d'amplification à partir de la souche *E.coli* WT
- $\Delta mams$  : produit d'amplification à partir de la souche *E.coli*  $\Delta mams$
- Témoin : produit d'amplification à partir d'eau

## Annexe 13 – Cartographie du marqueur de taille 100 pb (Biolabs)



## Annexe 14 – Résultats de la croissance à J1



	<i>E.coli WT</i>	<i>E.coli <math>\Delta</math>mams</i>
Atténuation à 600 nm à t = 30 minutes, au moment de l'ajout du phage T4	0,027	0,035

### Données :

-  $1 D_{600} \leftrightarrow 1,0 \cdot 10^8$  bactéries  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, dans la limite d'une  $D_{600}$  de 0,8

( $D_{600}$  : atténuation à 600nm)

- MOI = 1

Annexe 15 – Résultats du dénombrement des plages de lyse (en UFP), à 1 heure et 2 heures de croissance

Dilution de la culture filtrée	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
<i>E.coli</i> WT + T4 1 h	ND	ND	33	2	0
<i>E.coli</i> $\Delta$ mams + T4 1h	12	2	0	0	0
<i>E.coli</i> WT + T4 2 h	ND	ND	ND	10	2
<i>E.coli</i> $\Delta$ mams + T4 2 h	16	1	0	0	0

ND : non dénombrable

# RAPPORT DU JURY DE TP DE MICROBIOLOGIE

## Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **11,362 / 20**
- Meilleure note : **15,00 / 20**
- Note la plus basse : **04,40 / 20**
- Moyenne des candidats admis : **13,62 / 20**

## Rôle du gène *mams* dans l'infection d'*Escherichia coli* au phage T4

Le sujet proposait d'étudier le rôle du gène *mams* dans la résistance d'*Escherichia coli* à l'infection par le phage T4.

Le sujet était organisé en cinq parties :

**Partie A : Construction d'un mutant  $\Delta mams$  d'*E.coli* par la technique de *CrispR Cas9*.** Technique en jour 1, résultats et interprétations en jour 2.

**Partie B : Construction d'un mutant  $\Delta mams$  d'*E.coli* par la technique de recombinaison.** Technique en jour 1, résultats et interprétations en jour 2.

**Partie C : Vérification par PCR d'un mutant  $\Delta mams$  et visualisation sur gel d'agarose.** Technique en jour 1, résultats et interprétations en jour 2.

**Partie D : Caractérisation de l'effet d'un phage T4 sur la croissance bactérienne d'une souche d'*E.coli* sauvage et d'une souche d'*E.coli* mutante  $\Delta mams$ .** Technique, résultats et interprétations en jour 1.

**Partie E : Suivi de la production de phages T4 au cours de l'infection.** Technique en jour 1, résultats et interprétations en jour 2.

Il était mentionné explicitement que la partie E ne pouvait pas être exécutée indépendamment de la partie D, et cela a été rappelé à l'oral.

## COMMENTAIRES GENERAUX

### À PROPOS DU FONCTIONNEMENT DU JURY

Pour l'évaluation, comme l'année dernière, le jury a utilisé les compétences suivantes :

- Organiser son travail.
- Concevoir des procédures de travail.
- Réaliser des procédures de travail.
- Présenter le rapport.
- Analyser des données et exploiter des résultats.
- Calculer.
- Réinvestir des savoirs.

Cette approche a permis de classer finement les candidats entre eux grâce à des descripteurs variés couvrant l'ensemble de ces compétences essentielles. Si le travail au poste est évidemment évalué par l'examineur en charge de la salle, les résultats obtenus ensuite ont été évalués et les copies ont été corrigées en collégialité dans un souci constant d'équité entre les candidats.

Dans un souci d'équité également et de manière à pouvoir évaluer les capacités d'analyse de tous les candidats, la réflexion du jour 2 était à faire sur des résultats fournis. Les candidats devaient tout de même relever leurs propres résultats mais sans les interpréter, et la qualité du compte-rendu a été évaluée avec un accent mis sur la forme proposée pour le rendu des résultats. Ensuite, ce sont des résultats types qui ont été exploités. De cette manière, les erreurs du premier jour, déjà sanctionnées, n'ont pas eu de répercussion sur l'évaluation du deuxième jour.

En fin d'épreuve, en jour 1 comme en jour 2, la totalité des documents des candidats (copies, mais aussi sujet et brouillons) sont ramassés ; il est cependant très important de rappeler que **seules les copies sont évaluées** (le sujet l'indiquait, et cela a été rappelé oralement), et les candidats ont donc cette année bien rédigé directement sur leur copie. En jour 2, les candidats disposaient, en plus des sujets, de l'ensemble de leurs documents du jour 1, lesquels avaient déjà été évalués et n'étaient donc plus relus en jour 2 : il était donc inutile de reprendre des éléments de raisonnement ou de réponse du jour 1 à ce moment.

Le sujet indiquait clairement, en amont de toutes les questions, que tous les choix et raisonnements faits (composition d'un témoin, dilution pour ajuster une suspension microbienne, calculs de volumes de réactifs pour préparer un milieu...) devaient être clairement présentés même s'ils n'étaient pas l'objet d'une question explicite. En dehors de toutes ces explications et calculs qui devaient être justifiés « au fil de l'eau », la réponse aux questions numérotées devait être à chaque fois clairement identifiée, ce qui n'a pas toujours été le cas. Le jury tient à rappeler enfin que même si le rapport d'activité doit être précis et complet, il est inutile, voire délétère, pour la gestion du temps de réécrire ou de dessiner les protocoles ou de rédiger de longues parties introductives.

Cette année un plus grand nombre de candidats a montré de grandes difficultés d'organisation, de réalisation et d'exploitation des résultats, ce qui a surpris le jury au regard des attentes du concours.

### **À PROPOS DES CANDIDATS**

S'agissant d'un concours sélectif, le sujet était dense et long, et nécessitait donc une bonne organisation. La capacité de planification d'un travail technique et de priorisation des tâches est un élément que le jury cherche à évaluer. Le sujet présentait cinq parties. Les parties A et B comportaient plusieurs temps d'incubations successifs d'un total de plus de deux heures. La partie C était contrainte dans le temps avec des heures imposées pour la remise ou le dépôt des échantillons. La partie D était une croissance en milieu liquide avec un suivi sur au moins deux heures. La partie E quant à elle dépendait intégralement de la partie D, ce qui avait été signalé explicitement dans le sujet. Une lecture attentive du sujet et une planification des manipulations avant de lancer celles-ci étaient donc essentielles. Plusieurs candidats se sont lancés directement

dans le travail technique sans établir de plan et n'ont ainsi pas pu aller au bout des manipulations de plusieurs parties.

La plupart des candidats organisent et gèrent correctement leur poste de travail ; les bonnes pratiques sont majoritairement respectées, et le bec électrique convenablement utilisé. Quelques erreurs de sécurité ont été observées : utilisation des gants à côté du bec, déplacement avec une pipette à piston équipée de son cône, etc.

Les candidats disposent de deux paillasse, l'une pour les manipulations, l'autre pour la rédaction. Le candidat doit s'installer assis avec les jambes sous la paillasse lorsqu'il manipule en face du bec électrique. Des candidats travaillent debout ce qui n'est pas la forme scolaire mais n'est pas nécessairement rédhibitoire.

Cette année, le jury n'a pas relevé d'erreur technique récurrente majeure. Il est néanmoins rappelé que le pipetage de volumes précis nécessite une position verticale de la pipette. Les candidats organisent globalement bien leur travail et utilisent correctement les équipements, même si des erreurs de base d'utilisation du spectrophotomètre ont été constatées. Le jury a constaté certaines autres erreurs (oublis d'homogénéisation lors des prélèvements...) qui souvent suffisent à pénaliser le candidat par lui-même.

Des gestes devaient être montrés aux examinateurs : le sujet l'indiquait clairement et cela a été rappelé à l'oral. Pourtant, trop de candidats oublient encore d'appeler l'examineur le moment venu.

Lors du passage au spectrophotomètre, il convient d'homogénéiser les suspensions bactériennes tout en respectant les conditions d'hygiène et de sécurité : il faut impérativement effectuer plusieurs retournements successifs de la cuve correctement scellée à l'aide de Parafilm. Il convient également de nettoyer soigneusement les cuves avec un papier Joseph. Attention aussi à ce que la cuve soit correctement enfoncée. Il est rappelé qu'un volume minimal dans les cuves est nécessaire pour permettre une lecture juste.

Des candidats se perdent et intervertissent leurs cuves qui ne sont pas individuellement identifiées. Une identification correcte de tous les contenants fait partie des bonnes pratiques. De même, l'annotation des boîtes de Pétri préalablement à l'incubation doit être correctement effectuée (surtout pas sur le couvercle) et être complète, afin de garantir la traçabilité des expériences et de permettre une lecture facile et rapide des résultats par le jury.

En jour 1, les candidats devaient utiliser l'outil informatique. Il fallait nommer des fichiers et les laisser sur le bureau de l'ordinateur. Le jury s'attend à ce que les fichiers créés soient nommés comme demandé (précisé au tableau).

Dans l'ensemble, les raisonnements et les calculs ont été mieux présentés que les années précédentes ; les remarques à ce sujet faites dans les rapports de jury semblent avoir été prises en compte. Il faut soigner la présentation des calculs complexes : une formule littérale est souvent utile pour la compréhension du lecteur. Cette clarté était évaluée et le sujet l'avait annoncé.

Cependant, des candidats continuent de présenter des raisonnements tortueux et font des erreurs grossières même sur des calculs simples (erreurs dans la manipulation des puissances de 10, erreurs d'unité ou de conversion...).

## **PARTIE A (jour 1)**

### **Construction d'un mutant $\Delta mams$ d'*E.coli* par la technique de *CrispR Cas9***

Cette partie consistait en la construction d'un mutant délété du gène *mams* par la technique de *CrispR Cas9*. La souche d'*Escherichia coli* WT fournie contenait les plasmides *Cas9* et *ARN guide*. Le premier plasmide porte un gène de résistance à la rifampicine et le gène codant pour Cas9, une endonucléase guidée par ARN permettant la coupure d'un fragment spécifique d'ADN, sous la dépendance d'un promoteur sensible à la présence d'arabinose. Le second plasmide porte un gène de résistance à l'acide nalidixique, et la séquence codant pour l'ARN guide de la séquence à exciser (ici une partie de la séquence du gène *mams*) sous la dépendance d'un promoteur sensible à la présence de tétracycline.

La cassette MUT contenant le gène de la résistance à l'ampicilline flanqué des 20 premières et des 20 dernières paires de bases du gène *mams* était ajoutée comme matrice de réparation de l'ADN ainsi excisé.

Les candidats devaient :

- Préparer des cellules compétentes par la méthode au  $\text{CaCl}_2$ .
- Réaliser une transformation par choc thermique à l'aide de la cassette fournie.
- Concevoir et réaliser un témoin de la manipulation.
- Prévoir l'antibiotique permettant de sélectionner les transformants.

### **COMMENTAIRES :**

La technique ne présentait pas de difficulté particulière et était présentée dans le sujet. La plupart des candidats ont démarré cette partie rapidement puisqu'elle comportait deux temps longs d'incubation (1 h puis 45 min). Cette partie nécessitait la préparation de milieux additionnés de différents réactifs. Il fallait également anticiper la préparation des milieux gélosés contenant l'antibiotique sur lesquels réaliser les étalements en fin de manipulation.

Les causes les plus fréquentes d'échec de candidats pour cette partie ont été identifiées par le jury :

- une absence de réalisation du témoin,
- le choix du bon antibiotique pour sélectionner les mutants,
- le calcul du volume d'antibiotique à ajouter dans les géloses en surfusion,
- une anticipation insuffisante de la manipulation ne permettant pas d'aller jusqu'à l'étalement des transformants sur le milieu gélosé supplémenté en ampicilline,
- un manque de maîtrise théorique de la technique de *CrispR Cas9*.

## **PARTIE B (jour 1)**

### **Construction d'un mutant $\Delta mams$ d'*E.coli* par la technique de recombinaison**

Cette partie consistait en la construction d'un mutant délété du gène *mams* par recombinaison homologue. La souche d'*Escherichia coli* WT fournie contenait le plasmide pKD46. Ce plasmide porte un gène de résistance à la tétracycline, des gènes codant des protéines permettant la recombinaison homologue sous la dépendance d'un promoteur sensible à la présence d'arabinose. La délétion du gène consistait à introduire la cassette MUT, commune à la partie A.

Les candidats devaient :

- Préparer des cellules compétentes par la méthode au  $\text{CaCl}_2$ .
- Réaliser une transformation par choc thermique à l'aide de la cassette fournie.
- Concevoir et réaliser un témoin de la manipulation.
- Prévoir l'antibiotique permettant de sélectionner les transformants.

### **COMMENTAIRES :**

La technique ne présentait pas de difficulté particulière et était présentée dans le sujet. La plupart des candidats ont démarré cette partie rapidement puisqu'elle comportait deux temps longs d'incubation (1 h puis 45 min).

Cette partie nécessitait la préparation de milieux additionnés de différents réactifs. Il fallait également anticiper la préparation des milieux gélosés contenant l'antibiotique sur lesquels réaliser les étalements en fin de manipulation.

Il était intéressant de réaliser en parallèle les manipulations des parties A et B car même si elles n'utilisaient pas la même technique de mutagenèse, les différentes étapes étaient similaires.

Les causes les plus fréquentes d'échec de candidats pour cette partie ont été identifiées par le jury :

- une absence de réalisation du témoin,
- le choix du bon antibiotique pour sélectionner les mutants,
- le calcul du volume d'antibiotique à ajouter dans les géloses en surfusion,
- une anticipation insuffisante de la manipulation ne permettant pas d'aller jusqu'à l'étalement des transformants sur le milieu gélosé supplémenté en ampicilline.

## **PARTIE A et B (jour 2)**

### **A - Construction d'un mutant $\Delta mams$ d'*E.coli* par la technique de *CrispR Cas9***

### **B - Construction d'un mutant $\Delta mams$ d'*E.coli* par la technique de recombinaison**

Lors du jour 2, l'analyse des résultats des parties A et B devait mener à une comparaison critique des techniques mises en œuvre.

Les difficultés les plus fréquemment rencontrées ont été les suivantes :

- une mauvaise interprétation des résultats des témoins,

- un manque de recul sur l'objectif des manipulations conduisant à l'utilisation inadaptée de la norme ISO 7218 pour le dénombrement des colonies,
- une absence de regard critique sur les procédures et des conditions nécessaires pour comparer les résultats,
- une absence de comparaison des résultats des deux méthodes,
- une exploitation insuffisante ou une paraphrase du document fourni pour compléter la comparaison et conclure.

## **PARTIE C (jours 1 et 2)**

### **Vérification par PCR d'un mutant $\Delta mams$ et visualisation sur gel d'agarose**

Cette partie consistait en la vérification de la délétion effective du gène *mams* et de son remplacement par la cassette MUT, en comparaison avec la souche sauvage.

Les candidats devaient :

- Libérer l'ADN des souches à tester.
- Concevoir et préparer les mélanges réactionnels de la PCR.
- Concevoir et réaliser un témoin de la manipulation.
- Prévoir un plan de dépôt des échantillons amplifiés et déposer les produits d'amplification.

### **COMMENTAIRES :**

Cette partie ne présentait pas de difficulté technique particulière, mais nécessitait une planification rigoureuse pour être en mesure de déposer les mélanges PCR à l'heure imposée pour l'étape d'amplification au thermocycleur, puis pour déposer les produits d'amplification dans le gel d'électrophorèse avant le lancement de la migration par le jury à l'heure imposée.

Les causes les plus fréquentes d'échec de candidats pour cette partie ont été identifiées par le jury :

- des erreurs de manipulation lors de la préparation des échantillons réactionnels malgré des volumes de réactifs prévus correctement calculés,
- une anticipation insuffisante de la manipulation ne permettant pas d'aller jusqu'au dépôt des échantillons pour l'électrophorèse,
- une absence de l'analyse du témoin avant l'analyse des profils de migrations des souches testées,
- des erreurs de raisonnement dans le calcul de la taille des produits d'amplification.

## **PARTIE D (jour 1)**

### **Caractérisation de l'effet d'un phage T4 sur la croissance bactérienne d'une souche d'*E.coli* sauvage et d'une souche d'*E.coli* mutante $\Delta mams$**

Cette partie consistait en l'étude de la croissance de la souche d'*E.coli* WT et celle de la souche d'*E.coli*  $\Delta mams$ , en absence et en présence de phage T4 introduit dans le milieu 30 minutes après le début de la croissance. Le sujet demandait un suivi toutes les 30 minutes sur au moins deux heures, avec des prélèvements à 1 h et 2 h pour mettre en œuvre la partie E. La durée et l'enchaînement avec la partie E constituaient donc un nœud du sujet quant à la capacité à planifier et organiser le travail. Hormis ce point, il n'y avait pas de difficulté particulière.

Cette partie a été dans l'ensemble convenablement traitée par les candidats, en tout cas par ceux qui ont su gérer cette contrainte temporelle. L'exploitation graphique, attendue, est plus ou moins convenablement traitée lorsque les candidats ont réussi à gérer leur temps ; les remarques du jury sur la présentation (titre, axes) ont été prises en compte. Des confusions sur l'exploitation d'une croissance demeurent encore : absence de graphique en logarithme népérien, erreurs dans les calculs de  $\mu$  et de  $G$  ou méconnaissance de la notion de phase exponentielle de croissance. Ces notions devraient pourtant être maîtrisées à ce niveau de concours. L'infection d'*E.coli* WT par le phage T4 entraînait l'arrêt de la croissance voire l'effondrement de la population bactérienne : l'hypothèse d'une lyse par le phage, évidente dans le cas présent, ne devait pas poser de problème. Les termes y afférents (lyse/lysogénie) ne sont pas maîtrisés par quelques candidats.

Le mutant  $\Delta mams$  d'*E.coli* présentait après infection par le phage T4 une phase de croissance exponentielle tout-à-fait similaire à celles obtenues en absence d'infection phagique T4, chez la souche d'*E.coli* WT comme chez la souche d'*E.coli*  $\Delta mams$ . La résistance à la lyse était alors l'hypothèse la plus simple. Des candidats ont fait des contresens en mélangeant les concepts de « mutant  $\Delta mams$  » et « gène *mams* », faisant du gène *mams* un facteur de résistance à l'infection phagique.

La partie D alimentait la partie E mais ne faisait pas l'objet d'une analyse en J2.

## **PARTIE E (jour 1 et jour 2)**

### **Suivi de la production de phages T4 au cours de l'infection**

Cette partie consistait en la quantification de la production de phages T4 au cours de l'infection de la souche d'*E.coli* WT, suivie par opacimétrie au cours de la partie D. A noter qu'au jour 2, les résultats de la production de phages T4 au cours de l'infection de la souche d'*E.coli*  $\Delta mams$  étaient également proposés à l'interprétation même si la manipulation n'avait pas été réalisée lors du jour 1.

Les candidats devaient :

- Filtrer les prélèvements de la partie D pour la condition *E.coli* WT + phages T4, à  $t = 1$  h et  $t = 2$  h afin de ne récolter que les phages produits au cours de l'infection.
- Diluer en série au 1/10<sup>ème</sup> jusqu'à la dilution  $10^{-7}$  les deux suspensions phagiques ainsi filtrées.
- Préparer la boîte de dépôt des dilutions des suspensions phagiques par ajout d'une surcouche d'agar inoculée avec la souche *E.coli* WT.
- Prévoir un plan de dépôt des échantillons et déposer les dilutions de suspension phagique sur la boîte préalablement préparée.

Les difficultés les plus fréquemment rencontrées ont été les suivantes :

- des difficultés dans la mise en œuvre de la dilution en série des suspensions phagiques (consigne non comprise ou choix de volumes finaux peu pertinent pour effectuer la dilution...),
- l'oubli de la surcouche d'agar inoculée avec la souche *E.coli* WT,
- des dépôts en duplicat voire triplicat qui n'étaient pas demandés et particulièrement chronophages,
- une annotation des boîtes très insuffisante (écriture sur le couvercle, pas d'orientation de la boîte...)
- la confusion à J2 entre plages de lyse et colonies.

L'analyse des résultats impliquait deux types de calculs :

- L'estimation des populations phagiques mesurées lors des prélèvements à 1 h et 2 h : ces calculs sont assez classiques, et pourtant ne sont pas maîtrisés par tous les candidats. Des erreurs grossières sur les puissances de 10, peu acceptables à ce niveau de concours, ont pu être faites. Une absence de recul critique sur la signification des résultats calculés est regrettable.
- L'estimation de la population phagique initiale, à partir des atténuances mesurées lors de l'infection, et de la MOI indiquée : ce calcul pourtant simple, et réalisé en J1 par la plupart des candidats, n'a été que très rarement effectué avec les résultats proposés en J2.

Ces deux calculs permettaient de montrer que la population phagique augmente nettement lors de l'infection de la souche *E.coli WT*, mais n'évolue pas significativement chez la souche d'*E.coli Δmams*. Ces données permettent de montrer que la souche d'*E.coli WT* est bien sensible au phage T4 (le phage se multiplie, la population bactérienne s'effondre), et que la souche d'*E.coli Δmam* est bien rendue résistante par la suppression du gène *mams* (la population bactérienne connaît une croissance exponentielle et la population phagique stagne).

Le sujet demandait ensuite de proposer des hypothèses expliquant ces résultats : il fallait montrer l'implication du gène *mams* dans le cycle viral sans qu'il ne joue un rôle crucial dans la croissance bactérienne (puisque la souche d'*E.coli Δmams* non infectée connaît une croissance exponentielle analogue à celle de la souche sauvage). Parmi les hypothèses possibles, on peut envisager que *mams* est impliqué dans l'ancrage du phage en surface de la bactérie, et/ou dans l'injection du génome phagique, et/ou dans la réplication de celui-ci (mais alors sans jouer de rôle crucial dans le développement de la bactérie).

# TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE

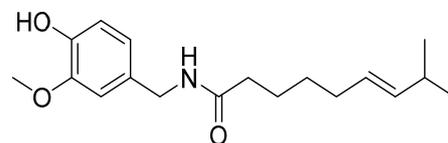
Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 2

## SUJET

### ÉTUDE DE LA CAPSAÏCINE

La capsaïcine est un alcaloïde dont la formule topologique est donnée ci-contre. Ce composant actif de la famille des piments produit une sensation de brûlure dans la bouche.



La pharmacochimie des substances naturelles à propriétés

« brûlantes » a été mise à l'honneur par l'attribution du prix Nobel de médecine et de physiologie à David Julius et Ardem Patapoutian en 2021, pour leur découverte des « récepteurs à la température et au toucher » dans les années 1990.

La capsaïcine est le principal représentant d'un groupe de substances de structures voisines, les capsaïcinoïdes. Ils sont très utilisés dans le domaine culinaire, mais également dans le milieu médical. En effet, la capsaïcine est utilisée dans le traitement des douleurs liées à l'arthrite. Elle est également utilisée par voie locale (notamment en dispositifs transdermiques) dans le traitement de douleurs neuropathiques périphériques chez l'adulte. Enfin, les capsaïcinoïdes sont les substances actives des gaz poivre, utilisés pour l'auto-défense.

Ce sujet se compose de parties expérimentales (I et III) et théoriques (II, IV et V) en lien avec les capsaïcinoïdes. La partie I est un dosage spectrophotométrique de la capsaïcine dans une solution issue d'un piment rouge. La partie II traite de la synthèse organique de la capsaïcine à partir de la vanilline, dont un échantillon comportant une impureté sera caractérisé qualitativement par chromatographie sur couche mince et quantitativement par titrage conductimétrique dans la partie III. La partie IV est une étude bibliographique de données spectroscopiques concernant les capsaïcinoïdes. Enfin, des données cinétiques de dégradation de la capsaïcine sont étudiées dans la partie V.

L'énoncé comporte dix-huit pages dont une page de garde, sept pages d'annexes en fin de sujet, et un **document-réponse page 18, à rendre avec la copie.**

## I. Dosage spectrophotométrique de la capsaïcine

Dans cette partie, on souhaite déterminer la quantité de capsaïcine contenue dans un piment rouge.

### Protocole 1 : dosage spectrophotométrique de la capsaïcine

Découper précisément environ 5 g de piment rouge, et les écraser au pilon dans un mortier. Introduire les morceaux dans un bécher de 100 mL, y rajouter environ 15 mL d'éthanol, et laisser sous agitation à température ambiante pendant 10 minutes. Filtrer le mélange, transférer le filtrat dans une fiole jaugée de 20,0 mL, et compléter au trait de jauge avec de l'éthanol. Cela constitue la **solution S<sub>0</sub>**, la concentration en capsaïcine dans cette solution étant notée C<sub>0</sub>.

Dans une cuve, introduire un volume  $V = 1000 \mu\text{L}$  d'éthanol, et y rajouter un volume  $V_0$  de **solution  $S_0$** . Répéter le processus pour tous les volumes  $V_0$  donnés en annexe. Mesurer l'absorbance des solutions présentes dans toutes les cuves à la longueur d'onde  $\lambda_0 = 271 \text{ nm}$ . On admettra qu'à cette longueur d'onde, la capsaïcine est le seul composé présent susceptible d'absorber le rayonnement.

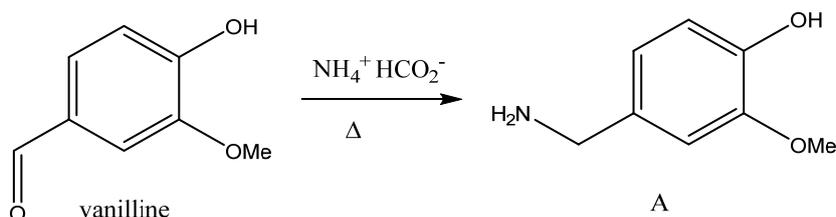
- Justifier en quoi la structure de la capsaïcine est cohérente avec le fait qu'une solution de ce composé absorbe dans le domaine UV-visible.
- Proposer puis réaliser une manipulation simple permettant de justifier la valeur de la longueur d'onde choisie pour effectuer les mesures d'absorbance.
- Compléter le tableau fourni sur le document-réponse p. 18 avec les valeurs d'absorbance.
- Sachant qu'à la longueur d'onde choisie, seule la capsaïcine absorbe, rappeler la relation qui donne l'expression de l'absorbance  $A_0$  de la **solution  $S_0$**  en fonction de  $C_0$ , en précisant le nom de la loi et son domaine de validité, ainsi que le nom des différentes grandeurs y apparaissant et leurs unités.
- En déduire, parmi les quatre propositions suivantes, la variable en fonction de laquelle il convient de tracer les absorbances mesurées afin que la courbe obtenue soit théoriquement une droite :

$$V_0 ; V + V_0 ; \frac{V_0}{V+V_0} ; \frac{V+V_0}{V_0}$$

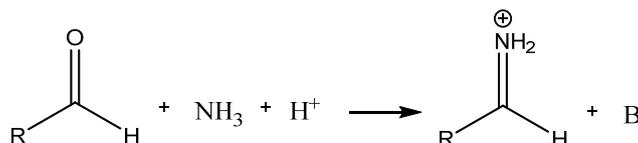
- Faire le tracé correspondant en utilisant le logiciel de votre choix. *On sauvegardera le fichier sur le bureau de l'ordinateur, en le nommant « spectro\_N » où N est le numéro de poste.*
- Vérifier la validité de la loi mentionnée précédemment dans le cadre de l'expérience effectuée.
- En utilisant la valeur du coefficient d'absorption molaire de la capsaïcine donnée en annexe, déterminer la valeur de  $C_0$ .
- En déduire la masse de capsaïcine contenue dans l'échantillon de piment rouge étudié.

## II. Étude de la synthèse de la capsaïcine

Une voie de synthèse possible de la capsaïcine à partir de la vanilline a été proposée par Harumi Kaga, Masakatsu Miura et Kazuhiko Orito<sup>1</sup>. Le synthon A est tout d'abord obtenu par la réaction d'amination réductrice ci-dessous :



Dans cette réaction, appelée réaction de Leuckart, la vanilline est traitée par le formate d'ammonium  $\text{NH}_4^+, \text{HCOO}^-$  pour former l'amine A. Le mécanisme de cette réaction commence par l'addition en milieu acide de l'ammoniac  $\text{NH}_3$  sur un aldéhyde pour former un ion iminium et un produit secondaire noté B :



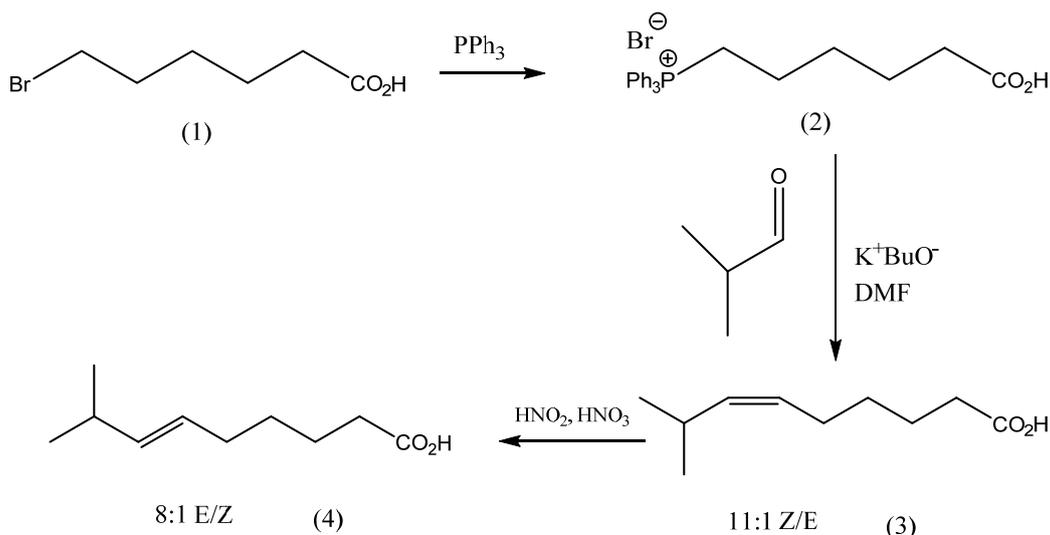
- En écrivant l'équation de la réaction entre l'ion ammonium et l'ion formate, expliquer la présence d'ammoniac dans la réaction de Leuckart.

11. Identifier quel est le produit secondaire B formé lors de cette première étape.  
 12. Proposer un mécanisme pour cette étape.

L'ion iminium formé réagit ensuite avec l'ion formate pour donner l'amine A, ainsi que du dioxyde de carbone.

13. En considérant que l'ion formate est un donneur d'hydrure  $H^-$ , proposer un mécanisme pour cette deuxième étape.

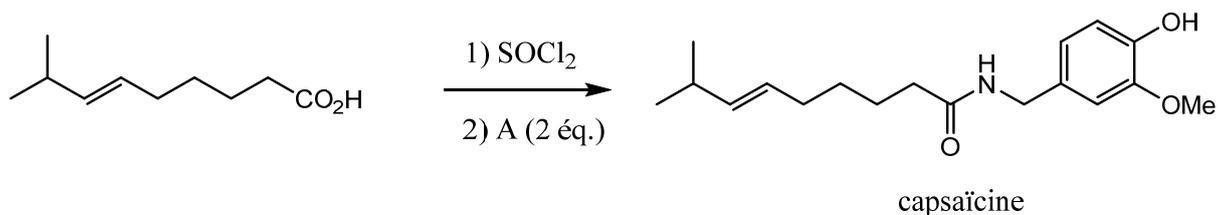
L'autre synthon, noté (4), est obtenu à partir de l'acide 6-bromohexanoïque par la synthèse suivante :



Un échantillon d'acide 6-bromohexanoïque (1) est transformé par réaction de Wittig en un mélange d'alcènes en deux étapes. Le mélange obtenu subit ensuite une réaction d'isomérisation, ce qui fournit majoritairement l'alcène (E).

14. À quel type de réaction correspond le passage (1) → (2) ? Quel est le mécanisme le plus probable pour cette réaction ? Le dessiner.  
 15. Préciser le lien de stéréoisomérisation qui existe entre les isomères (E) et (Z) du mélange obtenu.  
 16. Proposer un mécanisme pour la réaction d'isomérisation. On précise que les réactifs jouent le rôle d'acide de Brønsted.  
 17. Pourquoi obtient-on majoritairement l'alcène (E) lors de l'isomérisation ?

Le traitement du synthon (4) obtenu précédemment par le chlorure de thionyle  $\text{SOCl}_2$ , suivi de l'addition de la molécule A, permet enfin d'obtenir la capsaïcine :



On précise que le chlorure de thionyle est un réactif permettant de transformer un acide carboxylique en chlorure d'acyle.

18. Donner la formule de Lewis du chlorure de thionyle ainsi que sa géométrie, en justifiant.  
 19. Donner la structure du composé obtenu après traitement de l'alcène (E) par le chlorure de thionyle. Ce composé sera noté (5).

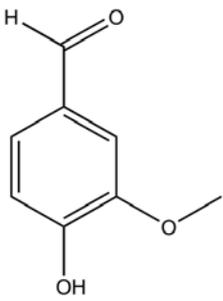
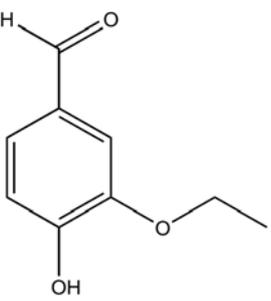
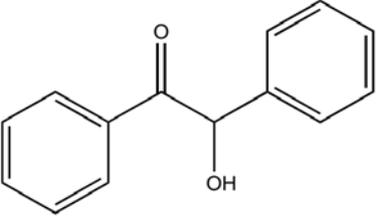
20. Proposer un mécanisme pour expliquer la formation de la capsaïcine à partir de (5) et de la molécule A.
21. Comparer la réactivité de (4) et de (5) vis-à-vis de la molécule A.

### III. Étude de deux échantillons de vanilline

Dans la perspective de la mise en œuvre de la synthèse précédente, on désire étudier la pureté de deux échantillons de vanilline disponibles au laboratoire.

#### Partie A : Étude de l'échantillon A

L'échantillon de vanilline A fourni est susceptible de contenir les impuretés suivantes : l'éthylvanilline et/ou la benzoïne.

vanilline	éthylvanilline	benzoïne
		

On cherche à identifier la nature de la (ou des) impureté(s) présente(s) dans l'échantillon A à l'aide d'une chromatographie sur couche mince (CCM). Sur votre paillasse, vous disposez entre autres des produits suivants :

- 100 mg d'échantillon A
- une solution de vanilline pure
- une solution d'éthylvanilline pure
- une solution de benzoïne pure
- un éluant (mélange cyclohexane/éthanoate d'éthyle (50/50 en volume))

Du matériel placé sous la sorbonne commune peut également être employé au besoin. En outre, des informations concernant la solubilité de la vanilline, de l'éthylvanilline et de la benzoïne dans différents solvants sont fournies dans le tableau ci-dessous.

information \ espèce chimique	vanilline	éthylvanilline	benzoïne
solubilité dans l'eau	faible	très faible	très faible
solubilité dans l'éthanol	élevée	élevée	faible
solubilité dans l'éthanoate d'éthyle	élevée	élevée	élevée

22. Proposer puis mettre en œuvre un protocole expérimental simple permettant d'identifier la nature de l'impureté présente dans l'échantillon A. Conclure en explicitant précisément le raisonnement suivi. *On complètera le document-réponse p.18 en y recopiant le chromatogramme obtenu.*

## **Partie B : Étude de l'échantillon B**

L'échantillon de vanilline B fourni est lui aussi impur. Cet échantillon comporte une seule impureté qui ne possède pas de propriétés acido-basiques. On souhaite alors déterminer le pourcentage massique en vanilline de l'échantillon B grâce à un titrage suivi par conductimétrie, dont le protocole est donné ci-dessous :

### **Protocole 2 : titrage conductimétrique de la vanilline**

Dans une fiole jaugée de 100,0 mL, introduire précisément environ 1 g de l'échantillon **B**. Compléter au trait de jauge avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à  $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ , et mettre sous agitation pendant quelques minutes de façon à assurer la solubilité de l'échantillon. La solution obtenue est notée **solution S<sub>1</sub>**.

Mesurer le pH de la solution d'acide chlorhydrique fournie (de concentration  $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ ).

Prélever 20,0 mL de la **solution S<sub>1</sub>**, l'introduire dans un bécher de 250 mL, puis la diluer avec de l'eau distillée afin d'obtenir un volume total de l'ordre de 100 mL. Titrer ensuite la **solution S<sub>1</sub>** par la solution d'acide chlorhydrique, en effectuant un suivi conductimétrique jusqu'à un volume versé à la burette de 25 mL.

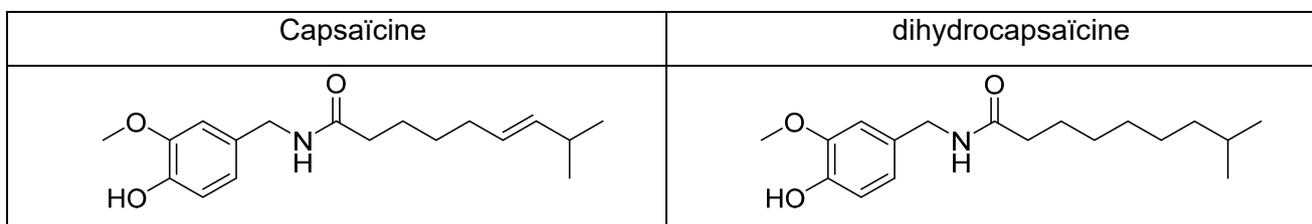
23. Écrire l'équation de la réaction chimique se produisant entre la vanilline (notée AH) et les ions hydroxyde. Calculer sa constante thermodynamique et conclure quant à son aspect quantitatif ou limité.
24. En calculant les quantités de matière de vanilline et d'hydroxyde de sodium apportées lors de la réalisation de la **solution S<sub>1</sub>**, montrer que les ions hydroxyde sont introduits en excès. *Pour ce calcul, on imaginera que l'échantillon B est de la vanilline pure.*
25. En déduire quelles sont les espèces majoritaires présentes à l'équilibre dans la **solution S<sub>1</sub>** avant le début du titrage.
26. Écrire la formule topologique de la base conjuguée de la vanilline et justifier pourquoi elle est particulièrement stable.
27. Expliquer pourquoi la base conjuguée de la vanilline est plus soluble dans l'eau que la vanilline.
28. À partir de la mesure de pH effectuée, vérifier l'ordre de grandeur de la concentration molaire de la solution d'acide chlorhydrique fournie.
29. Écrire les équations chimiques de la (des) réaction(s) ayant lieu lors du titrage, et calculer la (les) constante(s) thermodynamique(s) associée(s). Conclure quant à son (leur) caractère quantitatif ou limité, successif ou simultané le cas échéant.
30. Expliquer pourquoi il n'est pas nécessaire d'étalonner le conductimètre pour réaliser ce titrage.
31. Grâce au logiciel de votre choix, tracer la courbe représentant l'évolution de la conductivité de la solution titrée en fonction du volume de solution titrante versé. *On sauvegardera le fichier sur le bureau de l'ordinateur, en le nommant « titrage\_N » où N est le numéro de poste.*
32. Exploiter la courbe obtenue pour déterminer le(s) volume(s) équivalent(s) du titrage.
33. Expliquer l'intérêt de diluer la solution titrée avant le titrage, et expliquer pourquoi le volume d'eau rajouté n'a pas besoin d'être mesuré précisément.
34. À partir des résultats expérimentaux obtenus, déterminer le pourcentage massique en vanilline de l'échantillon **B**.
35. Justifier le signe du coefficient directeur du premier segment de droite de la courbe de suivi conductimétrique.
36. En utilisant un segment de droite à préciser, déterminer si la conductivité molaire ionique de la base conjuguée de la vanilline est inférieure, supérieure ou égale à celle de l'ion chlorure.

## IV. Étude spectroscopique de la capsaïcine

### 1. Étude spectroscopique d'un mélange de deux capsaïcinoïdes

Afin de déterminer les proportions relatives de capsaïcine et de dihydrocapsaïcine dans du piment habanero, des étudiants du département Mathématiques et Sciences Naturelles de l'université de l'Arizona ont suivi le protocole suivant <sup>2</sup> :

- extraction à partir de piments séchés par du toluène,
- purification des capsaïcinoïdes sur colonne de silice et identification par CCM des fractions,
- isolation des capsaïcinoïdes (capsaïcine et dihydrocapsaïcine) par évaporation du solvant d'élution,
- caractérisation par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du mélange de capsaïcinoïdes.



Les spectres RMN du proton de la capsaïcine, de la dihydrocapsaïcine, ainsi que du mélange des deux capsaïcinoïdes sont donnés en annexe 5, pages 16 et 17. Les intégrations relatives des signaux figurent sous les axes des abscisses. Le signal à 7,3 ppm correspond au proton du chloroforme résiduel présent dans le solvant dans lequel les spectres ont été réalisés.

37. Proposer une attribution des signaux suivants des spectres RMN du proton de la capsaïcine et de la dihydrocapsaïcine :

- les signaux dont le déplacement chimique se situe entre 6,5 et 7,0 ppm ;
- le signal de plus faible déplacement chimique. Pour ce signal, expliquer la multiplicité observée.

38. En comparant les deux spectres, attribuer le signal situé à 5,3-5,4 ppm du spectre RMN du proton de la capsaïcine.

39. En utilisant les valeurs des intégrations relatives et le signal de plus faible déplacement chimique, déterminer les proportions relatives de capsaïcine et de dihydrocapsaïcine dans le mélange obtenu par les étudiants.

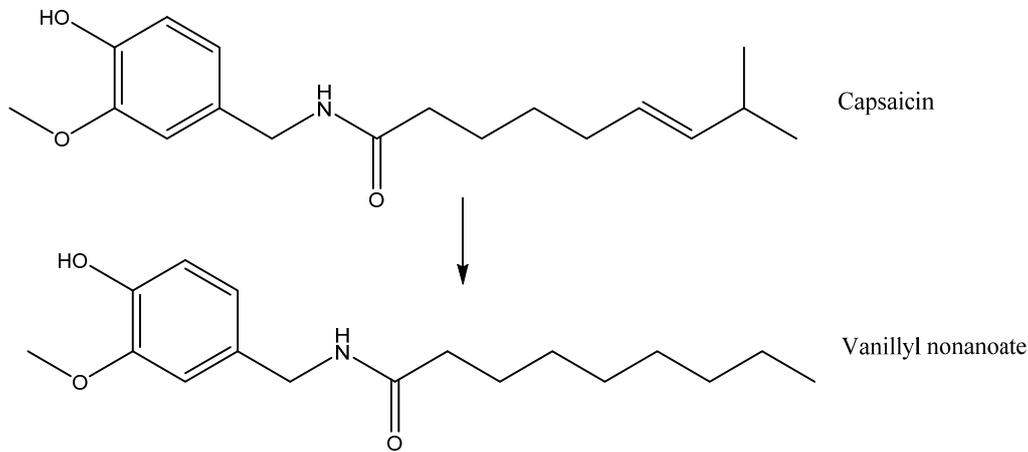
### 2. Spectroscopie infra-rouge (IR) de la capsaïcine

40. Le nom de la capsaïcine en nomenclature systématique est le suivant : (*E*)-*N*-(4-hydroxy-3-méthoxybenzyl)-8-méthylnon-6-énamide. Expliquer ce nom le plus précisément possible.

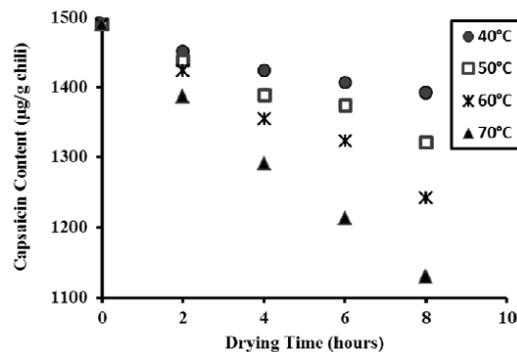
41. Les principales bandes du spectre IR de la capsaïcine sont obtenues pour les nombres d'onde suivants (valeurs en  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3541, 3445, 3016, 2958, 1660. Proposer une attribution.

## V. Suivi cinétique de la dégradation de la capsaïcine<sup>3</sup>

Lors du séchage des piments, la capsaïcine est susceptible de se dégrader spontanément. Uma Fadzilia Arifin et Mohamad Djaeni ont étudié les aspects cinétiques de la dégradation de la capsaïcine en tentant de déterminer l'ordre de cette réaction, ainsi que son énergie d'activation. Le changement de structure proposé lors de la dégradation est le suivant :

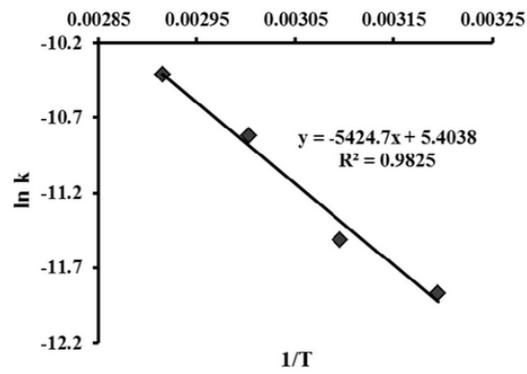


Le graphique suivant présente la masse de capsaïcine présente par gramme de piment en fonction de la durée de séchage, pour différentes températures de l'air utilisé pour sécher les piments :



42. Préciser l'effet de la température sur la dégradation de la capsaïcine.
43. En faisant l'hypothèse que la réaction de dégradation est d'ordre 2, déterminer l'expression théorique de la concentration en capsaïcine d'un échantillon au cours du temps en fonction de la concentration initiale en capsaïcine et de la constante de vitesse  $k$  de la réaction.
44. L'exploitation du graphique ci-dessus peut-elle permettre de valider l'hypothèse d'une réaction de dégradation d'ordre 2 ? Si ce n'est pas le cas, préciser alors quel graphique il aurait fallu tracer pour la vérifier.
45. Déterminer l'expression théorique du temps de demi-réaction associé à l'hypothèse d'ordre 2 en fonction de  $k$  et de la concentration initiale en capsaïcine.
46. Quelles expériences aurait-il fallu mener pour valider l'hypothèse d'une réaction de dégradation d'ordre 2 à l'aide du temps de demi-réaction ?

Le graphique ci-dessous présente les valeurs de  $\ln(k)$  obtenues dans le cas d'une hypothèse d'ordre 2, en fonction de l'inverse de la température de l'air utilisé pour le séchage (température en kelvin).



47. En rappelant le nom de la loi utilisée, exploiter le graphe ci-dessus afin de déterminer une estimation de la valeur de l'énergie d'activation molaire de la réaction de dégradation de la capsaïcine.

## ANNEXE 1 : Données de sécurité

Réactif	Phrases H
Capsaïcine	Mortel en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque de graves lésions des yeux. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires.
Éthanol	Liquide et vapeurs très inflammables. Provoque une sévère irritation des yeux.
Vanilline	Provoque une sévère irritation des yeux.
Éthylvanilline	Provoque une sévère irritation des yeux.
Benzoïne	Néant
Cyclohexane	Liquide et vapeurs très inflammables. Peut être mortel en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer somnolence ou vertiges. Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
Éthanoate d'éthyle	Liquide et vapeurs très inflammables. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer somnolence ou vertiges.
Solution d'acide chlorhydrique	Peut être corrosif pour les métaux. Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Provoque une irritation cutanée.
Solution d'hydroxyde de sodium	Peut être corrosif pour les métaux. Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Provoque une irritation cutanée.
Tampon pH = 7 pour étalonnage	Pas de danger
Tampon pH = 4 pour étalonnage	Pas de danger

**On rappelle que le port des lunettes de sécurité est obligatoire.**

**Il est impératif de ne pas porter à la bouche ou aux yeux des mains souillées par du piment.**

## ANNEXE 2 : Masses molaires et données physico-chimiques à 25°C

Espèce chimique	Masse molaire (en g.mol <sup>-1</sup> )
Capsaïcine	305,41
Vanilline	152,15

**Coefficient d'absorption molaire de la capsaïcine dans l'éthanol à  $\lambda_0$  :**  $\varepsilon = 4,3.10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

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

**Valeurs des pK<sub>A</sub> de quelques couples acide-base :**

$pK_A(\text{vanilline/ion vanillinate}) = 7,4$

$pK_A(\text{acide formique/ion formate}) = 3,75$

$pK_A(\text{ion ammonium/ammoniac}) = 9,25$

Produit ionique de l'eau à 25°C :  $K_e = 10^{-14}$

### Conductivités molaires ioniques

Ion	$H_3O^+$	$HO^-$	$Na^+$	$Cl^-$
Conductivité molaire ionique $\lambda \text{ (mS.m}^2.\text{mol}^{-1}\text{)}$	350	350	50	70



## ANNEXE 4 : tables de données spectroscopiques

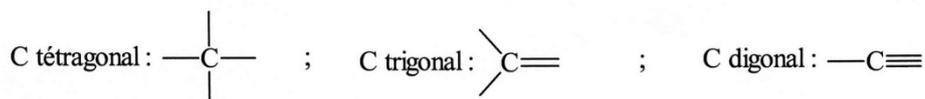
### Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H

Protons CH <sub>3</sub>	δ	Protons CH <sub>2</sub>	δ	Protons CH	δ
Lié à un C AX <sub>3</sub> :		Lié à un C AX <sub>3</sub> :		Lié à un C AX <sub>3</sub> :	
CH <sub>3</sub> -C	0,9	CH <sub>2</sub> -C	1,3	CH-C	1,5
CH <sub>3</sub> -C-NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	1,15	CH <sub>2</sub> -C-NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	1,3	CH-C-OH(ou OR)	1,6-2
CH <sub>3</sub> -C-Ar	1,25	CH <sub>2</sub> -C-Ar	1,6	CH-C-Cl	1,6
CH <sub>3</sub> -C-OH(ou OR)	1,15-1,3	CH <sub>2</sub> -C-OH(ou OR)	1,8		
En α d'une insaturation:		En α d'une insaturation:		En α d'une insaturation:	
CH <sub>3</sub> -C=C	1,6	CH <sub>2</sub> -C=C	2,1-2,3	CH-C=C	2,5
CH <sub>3</sub> -CO-OR	2,0	CH <sub>2</sub> -C≡C	2,6	CH-C≡N	2,7
CH <sub>3</sub> -CO-OH	2,1	CH <sub>2</sub> -CO-OR	2,2	CH-CO-OH	2,6
CH <sub>3</sub> -CO-NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	2-2,1	CH <sub>2</sub> -CO-OH	2,35	CH-CO-R	2,5-2,7
CH <sub>3</sub> -C=C-C=O		CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	2,1-2,2	CH-Ar	3,0
CH <sub>3</sub> -CO-R	2,0	CH <sub>2</sub> -C=C-C=O		CH-CO-Ar	3,3
CH <sub>3</sub> -Ar	2,1-2,2	CH <sub>2</sub> -CO-R	2,4		
CH <sub>3</sub> -CO-Ar	2,3-2,4	CH <sub>2</sub> -Ar	2,4		
	2,6	CH <sub>2</sub> -CO-Ar	2,7		
			2,9		
Lié à un hétéroatome		Lié à un hétéroatome		Lié à un hétéroatome	
CH <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	2,1-2,3	CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	2,5	CH-NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	2,9
CH <sub>3</sub> -NH-COR	2,8-2,9	CH <sub>2</sub> -NH-COR	3,3	CH-NH-COR	3,8-4,1
CH <sub>3</sub> -OR	3,3	CH <sub>2</sub> -OR	3,4	CH-OR	3,7
CH <sub>3</sub> -OH	3,4	CH <sub>2</sub> -OH	3,6	CH-OH	3,9
CH <sub>3</sub> -OCOR	3,7	CH <sub>2</sub> -OCOR	4,2	CH-OCOR	4,8-5,1
CH <sub>3</sub> -OAr	3,8	CH <sub>2</sub> -OAr	4,0	CH-OAr	4,0
CH <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	4,3	CH <sub>2</sub> -NO <sub>2</sub>	4,4	CH-NO <sub>2</sub>	4,5-4,7
Protons liés à un C insaturé:	δ	Protons portés par un hétéroatome. Leur position dépend considérablement du solvant et de la concentration.			
-C≡CH	1,8-3,1	OH	NH		
-C=CH-	4,5-6,0	Alcool (ROH) : 0,7-5,5	Amine dialiphatique (RNH <sub>2</sub> , RNH-) : 0,6-5,0		
ArH	6,5-8,2	Phénol (ArOH) : 4,5-7,1	Amine aromatique (ArNH <sub>2</sub> , ArNH-) : 2,9-4,7		
	(benzène : 7,27)	Amides (-CO-NH <sub>2</sub> , CO-NH-) : 6,0-8,5			
RCH=O	9,5-10,0	Acide (R-CO-OH) : 10,5-12,5			
ArCH=O	9,7-10,5				

## Nombres d'onde en spectroscopie infrarouge

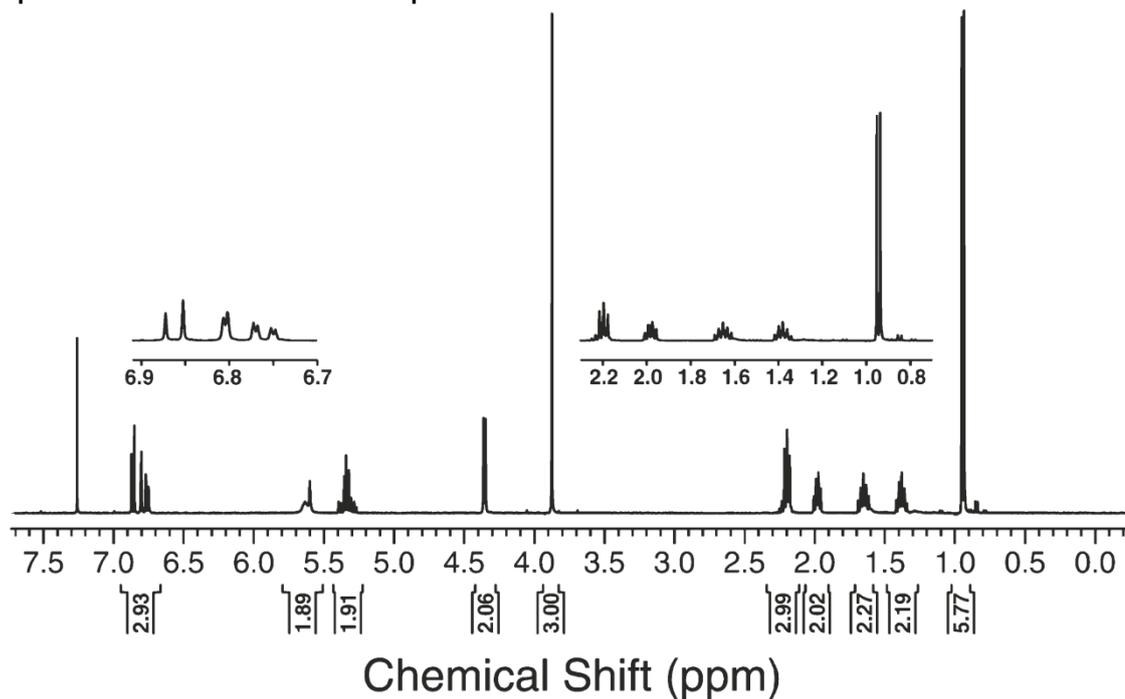
Liaison	Nature	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Intensité
O-H alcool libre	Valence	3590-3650	F ; fine
O-H alcool lié	Valence	3200-3600	F ; large
N-H amine primaire : 2 bandes secondaire: 1 bande	Valence	3300-3500	m
N-H amide	Valence	3100-3500	F
C <sub>di</sub> -H	Valence	≈ 3300	m ou f
C <sub>tri</sub>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

F : fort ; m : moyen ;  
f : faible

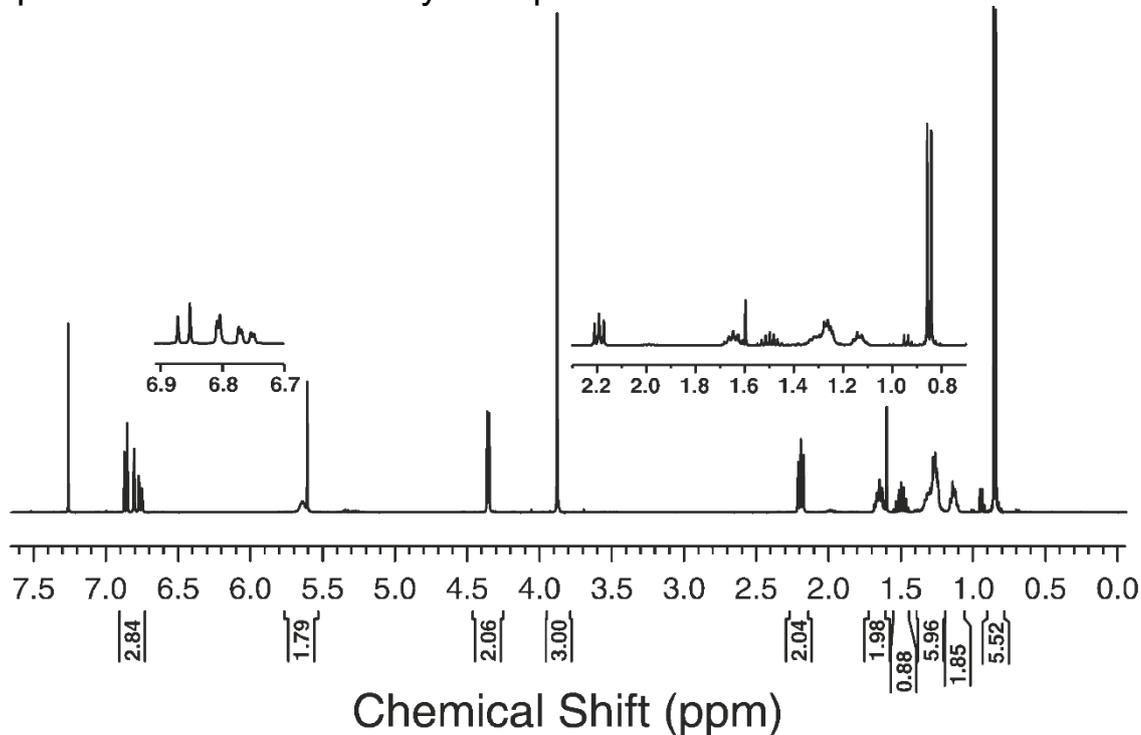


## ANNEXE 5 : spectres RMN $^1\text{H}$ de différents composés

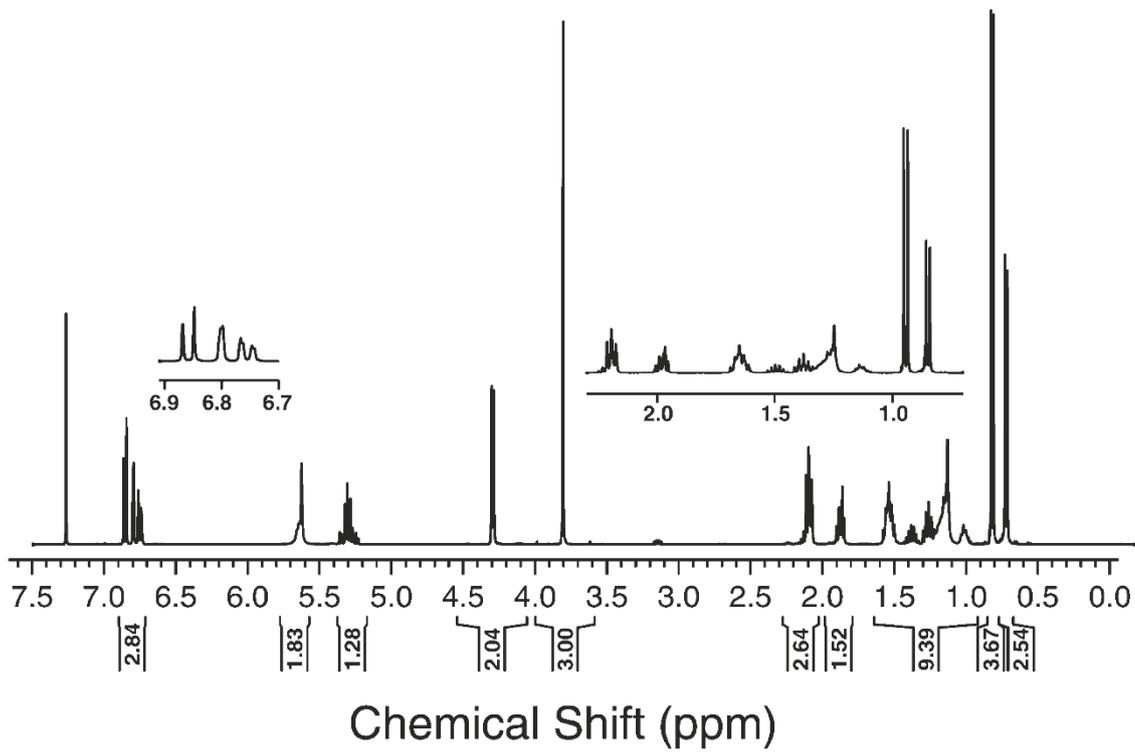
Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la capsaïcine :



Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la dihydrocapsaïcine :



Spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange des deux capsaïcinoïdes



## I. Dosage spectrophotométrique de la capsaïcine

Question 3. Mesure de l'absorbance :

$V_0$ ( $\mu L$ )	1 0	2 0	3 0	4 0	5 0	6 0	7 0
Absorbance							

## III. Étude de deux échantillons de vanilline

### Partie A : Étude de l'échantillon A

Question 22. Chromatogramme révélé :

## RAPPORT DU JURY DE TP DE CHIMIE

### Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,57 / 20**
- Meilleure note : **19,00 / 20**
- Note la plus basse : **04,00 / 20**
- Moyenne des candidats admis : **14,18 / 20**

L'épreuve de travaux pratiques de chimie de cette année s'intéresse à la capsaïcine et aux capsaïcinoïdes. Le sujet se compose de deux parties expérimentales (parties I et III du sujet) et de trois parties théoriques (parties II, IV et V).

La partie I s'attache à la détermination expérimentale par spectrophotométrie de la quantité de capsaïcine présente dans un échantillon de piment rouge. La partie III propose l'étude de la pureté d'un échantillon de vanilline, précurseur d'une synthèse organique de la capsaïcine. La pureté de l'échantillon est caractérisée qualitativement par chromatographie sur couche mince (CCM) et quantitativement par titrage acido-basique suivi par conductimétrie.

Les compétences expérimentales apparaissant dans ces parties I et III sont :

- Partie I. dosage spectrophotométrique de la capsaïcine : pesée, extraction d'un composé organique par macération d'un échantillon de piment dans l'éthanol, filtration par gravité, réalisation d'une gamme de solutions par dilution, mesures d'absorbance à longueur d'onde donnée à l'aide d'un spectrophotomètre, réalisation d'un spectre UV-visible à l'aide d'un spectrophotomètre à balayage.
- Partie III. A) Étude de l'échantillon A : dissolution d'un échantillon solide dans un solvant approprié, réalisation de dépôts sur plaque de silice, réalisation d'une CCM, révélation de la plaque obtenue grâce à une lampe UV.
- Partie III. B) Étude de l'échantillon B : pesée, dissolution d'un solide, étalonnage d'un pH-mètre, mesure du pH d'une solution, réalisation d'un montage pour titrage par suivi conductimétrique, mesure de la conductivité d'une solution grâce à un conductimètre.

Ces questions à caractère expérimental sont précédées ou suivies de questions dont le but est l'analyse, la modélisation, l'exploitation et l'interprétation des données obtenues (par exemple, les questions 4 à 9 et 23 à 36).

Les autres parties du sujet s'intéressent à une synthèse organique de la capsaïcine à partir de la vanilline, ainsi qu'à la structure, aux propriétés spectroscopiques et à la réactivité de la capsaïcine :

- synthèse organique de la capsaïcine à partir de la vanilline : acido-basicité en chimie organique, stéréochimie, mécanismes réactionnels, réactivité comparée, structures de Lewis et théorie VSEPR.
- étude spectroscopique de la capsaïcine : spectroscopie IR et RMN du proton, nomenclature.
- suivi cinétique de la dégradation de la capsaïcine :

loi cinétique pour une réaction d'ordre 2, temps de demi-réaction, loi d'Arrhenius.

Le jury rappelle que la note finale prend en compte les compétences expérimentales (manipulations et exploitations des résultats expérimentaux) et les réponses aux questions concernant les notions théoriques.

Le jury rappelle également que les protocoles sont à réaliser en entier et en suivant précisément les consignes, et qu'il convient de mener les raisonnements jusqu'à leur conclusion lors de réponses à des questions théoriques. Il est également important que l'expression soit claire, et que le vocabulaire employé soit scientifique et précis. En revanche, il est superflu de répondre à des questions non posées (comme rappeler le principe général des techniques expérimentales utilisées), de recopier l'énoncé, les titres, les questions posées ou les protocoles expérimentaux. En effet, l'épreuve est longue et demande une bonne gestion du temps.

Enfin, le jury tient à insister sur l'importance de bien écouter les conseils et indications générales données à l'ensemble des candidats et candidates en début d'épreuve.

### *Remarques concernant les compétences expérimentales*

Le port des lunettes de sécurité est requis **pendant toute la durée de l'épreuve** et les candidats et candidates doivent manipuler debout. La manipulation sous sorbonne commune est possible et laissée à la libre appréciation des candidats et candidates. Le port des gants doit être raisonné, et il n'est pas normal de voir des candidates et candidats rédiger leur copie ou utiliser l'ordinateur en portant des gants.

De manière générale, les pipettes et burettes utilisées doivent être conditionnées (rincées avec la solution à prélever). De même, l'utilisation de la verrerie (précise ou non) doit être raisonnée.

- Partie I. dosage spectrophotométrique de la capsaïcine :  
Pesée : lorsqu'il est demandé de peser préciser environ une certaine masse d'un échantillon, il est inutile de passer du temps à obtenir exactement la masse demandée au dixième de milligramme près. En revanche la masse obtenue doit être notée.  
Filtration : la filtration ne doit pas être réalisée directement dans la fiole jaugée.  
Mesures d'absorbance : il n'est pas nécessaire de boucher les cuves, mais il est nécessaire que la solution qu'elles contiennent soit homogénéisée. De plus, pour la vérification de la longueur d'onde de travail, un balayage était attendu.
- Partie III. A) Étude de l'échantillon A :  
Dissolution d'un échantillon solide : il n'est pas pertinent d'essayer de dissoudre tout l'échantillon fourni, ni de faire la dissolution dans le pilulier fourni ou dans le vial contenant le solvant.  
Réalisation de dépôts sur plaque de silice : la silice doit être grattée le moins possible, en particulier au niveau de la ligne de base.
- Partie III. B) Étude de l'échantillon B :  
Étalonnage et utilisation d'un pH-mètre : l'électrode doit être rincée à l'eau distillée, puis séchée délicatement avant et après utilisation. Elle ne doit pas être laissée à tremper dans une solution ou à l'air libre trop longtemps après manipulation.

Malgré de nombreuses imprécisions de manipulations, le jury se réjouit du fait que cette année les compétences expérimentales des candidats et candidates ont été dans l'ensemble réalisées de manière assez satisfaisante, en particulier dans la partie I. Cependant, le jury s'inquiète du fait que des candidats et candidates, n'ayant pas réussi leurs manipulations, semblent inventer des valeurs pour leurs mesures expérimentales sans même le préciser sur leur copie.

### *Remarques concernant les compétences numériques et de modélisation*

Le tracé de courbes expérimentales n'a pas posé de problèmes en général. Cependant, l'exploitation de ces courbes par modélisation par des fonctions mathématiques n'est pas toujours maîtrisée.

#### Réponses aux questions posées :

Le jury indique les précisions suivantes :

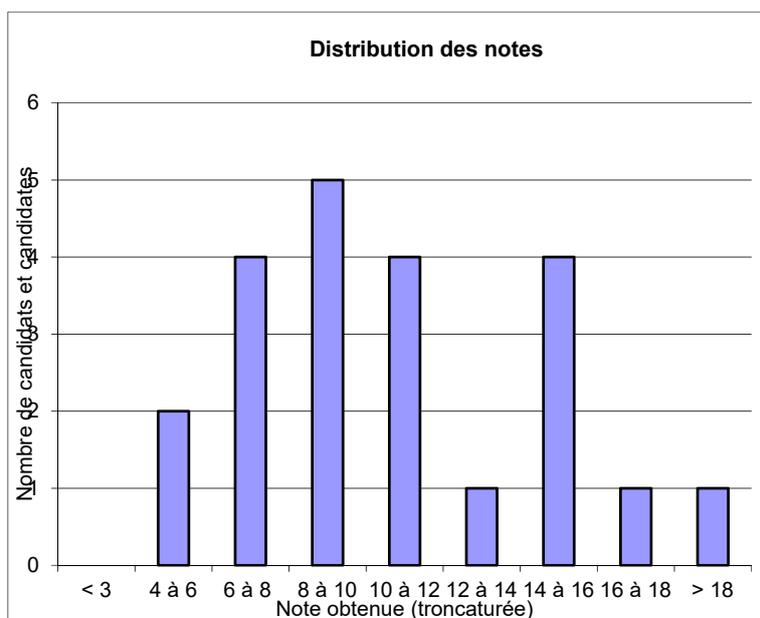
- Q8 : la façon dont il fallait exploiter la courbe obtenue n'a pas été comprise.
- Q12 : l'écriture des mécanismes réactionnels nécessite de dessiner des flèches courbes précises et de s'assurer que les actes élémentaires sont équilibrés.
- Q16 et Q36 : ces questions n'étaient pas particulièrement difficiles mais demandaient aux candidats et candidates d'avoir du recul. Elles n'ont quasiment jamais été traitées.
- Q18 : la méthode pour établir une structure de Lewis doit être mieux maîtrisée, afin que les connaissances en théorie VSEPR soient exploitables.
- Q23 et Q29 : peu de candidats et candidates sont capables de calculer la constante thermodynamique d'une réaction acido-basique à partir de valeurs de  $pK_A$ . En outre, dans le cas où les constantes thermodynamiques des réactions de titrage ont été effectivement calculées, un commentaire sur leurs valeurs était attendu.
- Q37-39 : ces questions ont été peu traitées.
- Q41 : l'exploitation des données de spectroscopie IR a manqué de précision.
- Q43 et Q45 : connaître par cœur l'expression de résultats cinétiques en fonction des données apporte peu de points. Il était demandé de déterminer ces expressions, non de les donner.

## Distribution des notes :

Moyenne : 10,6/20

Médiane : 09,9/20

Écart type : 4,1



## Répartition des taux de réponses et des pourcentages de bonnes réponses :

<b>N° question</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
% réponses	100	100	100	100	100	95	95	82	55	41
% bonnes réponses	94	63	71	82	52	63	63	33	42	78
<b>N° question</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
% réponses	55	50	32	36	41	5	36	50	36	36
% bonnes réponses	92	49	16	52	67	0	100	36	79	38
<b>N° question</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>
% réponses	27	95	82	73	59	59	41	50	41	23
% bonnes réponses	38	65	47	44	73	62	14	69	45	55
<b>N° question</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>
% réponses	73	55	45	23	41	5	45	23	9	36
% bonnes réponses	83	22	15	8	11	0	23	75	0	41

<b>N° question</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>
% réponses	32	41	36	32	32	14	27
% bonnes réponses	47	39	45	86	35	42	43

# ÉPREUVE ORALE DE LEÇON

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

## SUJETS

BIOCHIMIE	BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE	MICROBIOLOGIE
Les phosphorylations des protéines.	Le rein, histologie et fonction	Les déterminants de la forme bactérienne
Les électrophorèses : principes et applications.	Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires	Les antigènes de surface et la réponse immunitaire
Relation structure-fonction des protéines.	Os et cartilage	La virulence : des modes d'action des déterminants moléculaires à l'épidémiologie
Les adaptations du métabolisme énergétique à la disponibilité du dioxygène.	La thyroïde, histologie et fonction	Les défenses contre la prédation chez les procaryotes
La fluidité membranaire.	Rôles du calcium dans les fonctions cellulaires	Évolution de la résistance aux traitements antimicrobiens
La régulation épigénétique de l'expression des gènes.	Régulation de la prise alimentaire	Les cibles moléculaires de l'antibiothérapie
Le transcriptome : intérêt et méthodes d'étude.	Les vésicules extracellulaires	Variabilité génétique et adaptation à l'environnement chez les procaryotes.

## RAPPORT DU JURY DE LEÇONS

### Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **10,67 / 20**
- Meilleure note : **18,50 / 20**
- Note la plus basse : **05,00 / 20**
- Moyenne des candidats admis : **13,29/ 20**

### Commentaires généraux

L'épreuve de leçon pour la session 2025 consiste à analyser et traiter un sujet court, portant aléatoirement sur une des trois disciplines parmi « microbiologie », « biochimie », « biologie cellulaire et physiologie ». La préparation dure quatre heures et l'exposé dure 40 minutes, suivi de 20 minutes de questions.

Comme signalé les années précédentes, il s'agit d'une épreuve de synthèse. Les candidats sont amenés à faire la preuve de leurs ressources internes – leur culture et leurs connaissances, issues notamment de la préparation au concours – et de l'utilisation judicieuses de ressources externes – les ouvrages de référence. Le jury attend également des candidats qu'ils montrent leurs qualités didactiques, par un discours soutenu, un support vidéoprojeté clair et lisible, et un usage judicieux du tableau.

Le temps d'entretien permet au jury d'explorer par ses questions les dimensions du sujet que le candidat n'aurait pas traité, mais également d'élargir à des questions connexes, dans les trois champs disciplinaires et éventuellement dans le champ de la pédagogie.

### Remarques sur la préparation.

Les candidats ont pu préparer, pour la plupart, dans des conditions qu'ils ont jugées satisfaisantes. La réalisation du support directement sur l'ordinateur utilisé pour présenter, et la mise à disposition d'un appareil photo et d'un scanner à main pour les illustrations leur ont permis de concevoir leur support avec une certaine sérénité.

Les candidats ont accès à une bibliothèque qu'ils ont pu consulter au cours des journées précédant l'épreuve. La composition de cette bibliothèque a pu évoluer au fil des années, et a été adressée par la DGRH aux candidats admissibles en amont de la période des épreuves. Chaque candidat a la possibilité, pendant son temps de préparation, d'emprunter jusqu'à cinq ouvrages, et il est possible de changer tout ou partie de ces ouvrages en cours d'épreuves si besoin. Le jury a pu constater la préférence d'un grand nombre de candidats pour des ouvrages originaux ou traduits en langue française. Pour certains sujets, les éditions en anglais disponibles étaient toutefois bien plus actuelles, ce qui devrait permettre un exposé plus pertinent au regard de l'évolution rapide des sciences biologiques et des technologies associées. Toutefois, La consultation de certains livres de référence plus anciens permettait d'inclure dans la leçon des expériences historiques et ainsi d'inclure un aspect didactique replaçant la leçon dans l'histoire des sciences et des découvertes.

La réalisation du support n'est pas le seul enjeu du temps de préparation : la détermination par les candidats du périmètre du sujet est essentielle à la réussite de l'épreuve. Pour certains sujets, les candidats ont rencontré des difficultés à définir des termes dont ils n'étaient pas familiers, et auraient pu mobiliser davantage de temps pour s'acculturer à l'aide d'ouvrages bien choisis. La décomposition du sujet, la réflexion sur le choix des termes et l'intention des examinateurs est une étape cruciale pour réussir la leçon. Il est recommandé aux candidats de ne pas substituer, de leur propre chef, un terme pour un autre : ainsi, le terme « antimicrobien » n'est pas équivalent au terme

« antibiotique », et une leçon qui traiterait le second en lieu et place du premier passerait nécessairement à côté d'une partie des concepts attendus.

### Remarques sur la leçon.

La quasi-totalité des candidats a su faire preuve, lors de l'exposé, d'une posture professionnelle adaptée à un concours de l'enseignement : le jury a apprécié le langage soutenu et précis, l'énonciation claire et la structuration du propos. Seuls quelques candidats, en difficulté du fait d'une maîtrise insuffisante des concepts liés à leur sujet, sont parfois sortis du cadre de l'épreuve. Le jury rappelle qu'il n'est ni utile ni souhaitable que les candidats commentent leur propre prestation : conscients de la difficulté de l'épreuve et de la diversité des sujets possibles, les examinateurs sont en mesure d'évaluer la réussite de l'épreuve dans le respect des parcours et des spécificités de tous les candidats.

Le jury a apprécié, chez la plupart des candidats, la capacité à préparer un exposé d'une durée proche de la durée attendue : une leçon d'une durée de 35 à 40 minutes permettait de traiter de façon approfondie le sujet attribué. En revanche, les leçons de moins de 30 minutes n'ont souvent permis qu'un traitement trop superficiel du sujet.

Les meilleures présentations comportaient, dès l'introduction, une réflexion sur la signification des termes du sujet et sur leur contextualisation. La formulation d'une problématique issue du sujet, bien que ne semblant pas indispensable au jury, a parfois permis d'enclencher un propos pertinent. La structuration sous forme d'un plan en trois parties est la structure la plus traditionnelle mais d'autres plans sont envisageables, dans la mesure où ils sont réfléchis et argumentés. Le plan proposé dans les meilleures leçons ne constituait pas une juxtaposition de parties sans lien, mais constituait un cheminement logique du début à la fin de la leçon.

Dans le développement, il était attendu des candidats qu'ils intègrent des notions et concepts scientifiques de haut niveau, et pour cela qu'ils n'hésitent pas à prendre le risque de présenter des figures ou des notions présentes dans des ouvrages, même si elles leur semblent plus difficile à présenter que des notions plus anciennes. Les expériences et concepts historiques présentent un intérêt certain pour mettre en perspective les concepts, mais des notions actualisées en termes de faits scientifiques, de technologies ou d'applications sont également attendues. Il est regrettable que certains candidats se soient limités à des concepts ou applications déjà en place au 20<sup>e</sup> siècle, alors que leur formation et la documentation accessible en bibliothèque leur permettait de rechercher des faits plus actuels. De façon générale, presque tous les sujets se prêtaient à un développement sur des technologies utilisées en laboratoire de biochimie, de microbiologie ou de biologie cellulaire et physiologie. Le jury rappelle qu'une dimension technologique fait partie intégrante du programme et des objectifs de ce concours. Ainsi, une leçon sur les méthodes électrophorétiques qui n'évoque que marginalement l'électrophorèse capillaire présente nécessairement des manques.

D'autre part, le jury attire l'attention sur le caractère dynamique des équilibres biologiques évoqués en microbiologie, biochimie, ou biologie cellulaire et physiologie. Une description statique d'un mécanisme, qu'il s'agisse d'une voie métabolique, d'une relation trophique entre microorganisme ou d'une fonction endocrine, ne peut suffire à sa compréhension au niveau attendu. Par exemple, plusieurs sujets ont conduit à des développements sur la résistance aux antibiotiques – une réflexion sur l'origine, le transfert ou la perte de ces résistances était indispensable à un traitement pertinent au niveau attendu. Il est en outre pertinent que les concepts mobilisés au cours de l'épreuve soient déclinés aux différentes échelles : moléculaire, cellulaire et de l'organisme, voire de la population pour les microorganismes.

Le temps de conclusion a parfois été réduit, pour quelques candidats qui arrivaient à la fin du temps réglementaire ou pour d'autres qui ont eu du mal à intégrer à leur préparation tous les concepts qu'ils souhaitaient aborder. Lorsqu'il était préparé, il a pu être l'occasion d'évoquer des notions

intéressantes allant au-delà du périmètre défini par le sujet. Certains candidats ont également montré une réflexion plus personnelle, voire des marques d'enthousiasme pour certaines pistes de réflexion scientifique, ce qui a été apprécié.

### Remarques sur les questions.

Le temps de questions, plus réduit que le temps de leçon, était de plus consacré environ à moitié à un élargissement au-delà du sujet, pour éprouver la culture scientifique du candidat. Lorsque le sujet s'y prêtait, une question d'application pédagogique a pu également être posée.

En réponse aux questions portant directement sur le sujet de la leçon, certains candidats ont su réagir positivement et élargir le champ de leur réflexion. Malgré la fatigue compréhensible à ce stade de l'épreuve, des réponses rapides et dynamiques, y compris en intégrant un usage pertinent du tableau ou un retour sur le support projeté ont été appréciées par le jury. À l'inverse, lorsqu'un candidat n'est pas sûr de sa réponse il est peu opportun de se lancer dans une représentation hasardeuse au tableau, ce qui peut apparaître comme une stratégie pour gagner du temps. Les candidats qui ont su avec sincérité avouer lorsqu'ils ne savaient pas répondre ou lorsqu'ils tentaient une hypothèse rapide ont pu par la suite répondre à d'autres questions les mettant davantage en valeur.

Lors des questions d'élargissement à d'autres champs disciplinaires, le jury interroge les candidats aussi clairement que possible pour évaluer ses connaissances et compétences. L'objectif des questions n'est généralement pas de piéger, et leur formulation n'est pas pensée pour pousser à l'erreur. Les candidats peuvent donc en confiance s'appuyer sur la formulation des questions pour élaborer des réponses aussi claires que possible, qu'elles s'appuient sur des connaissances établies ou sur un raisonnement mis en œuvre sur le moment.

Enfin, certaines questions ont pu placer les candidats dans un contexte soit d'application en biotechnologies, soit d'enseignement, afin d'évaluer leur positionnement et leur préparation.

### Conclusion.

L'épreuve de leçon est un exercice difficile et assez académique, et la phase d'analyse et de compréhension du sujet est essentielle pour permettre un travail de préparation efficace à l'aide d'ouvrages judicieusement choisis. Le jury est conscient que l'utilisation d'une bibliothèque d'ouvrages « papier » peut être éloigné des pratiques les plus actuelles des étudiants et enseignants, mais cette modalité permet toujours un équilibre intéressant entre les ressources internes et externes que les candidats peuvent mettre en œuvre pour traiter le sujet.

Le terme de « leçon » illustre l'importance accordée aux qualités didactiques de l'exposé : s'il n'est pas attendu que le candidat « joue » une situation d'enseignement en considérant le jury comme des étudiants, une grande attention est cependant portée à la clarté du discours, au choix pertinent des exemples et des illustrations, mais aussi à l'aptitude à l'écoute et au dialogue lors des questions.

La biologie, et plus particulièrement la biochimie et le génie biologique – dont le nom actualisé pourrait être les biotechnologies – sont des disciplines en constante évolution, et cette épreuve permet d'apprécier l'actualité de la culture scientifique des candidats. La dimension technologique ne doit pas être négligée et reste indissociable de tous les progrès récents dans ce domaine scientifique. Les candidats qui ont su combiner actualité des connaissances, utilisation judicieuse des ouvrages et articulation pertinente des faits scientifiques théoriques et des outils technologiques associés ont livré des leçons d'une grande qualité.

À titre indicatif figure ci-dessous une liste des ouvrages les plus empruntés lors de la session 2025.

Biochimie :

Auteur	Titre	Éditeur	Année	emprunts
Berg / Tymoczko / Stryer	Biochimie (7e éd.)	Lavoisier	2013	5
Berg / Tymoczko / Stryer	Biochemistry (8 <sup>th</sup> ed.)	VH Freeman & Co	2015	1
Ducancel / Schneider	La révolution biotechnologique et la médecine de demain	Doin	2021	2
Harper (Kennelly / Botham / McGuinness / Rodwell / Weil)	Harper's illustrated biochemistry (32 <sup>th</sup> éd.)	McGraw Hill / Medical	2022	2
Schechter	Biochimie et biophysique des membranes : aspects structuraux et fonctionnels	Dunod	2004	2

Microbiologie :

Auteur	Titre	Éditeur	Année	emprunts
Brock / Madigan / Martingo / Stahl / Clark	Brock biology of microorganisms (16 <sup>th</sup> ed)	Pearson	2021	3
Paolozzi / Liébart	Microbiologie : biologie des procaryotes et de leurs virus (2 <sup>e</sup> éd.)	Dunod	2021	7
Prescott	Microbiologie (3 <sup>e</sup> éd.)	De Boeck	2010	5
Prescott (Wiley / Sandman / Wood)	Prescott's Microbiology (12 <sup>th</sup> ed.)	McGraw Hill Education	2022	3
Schaechter	Microbiologie et pathologie infectieuse	De Boeck-Wesmaël	1999	2
Slonczewski / Foster	Microbiology : an evolving science	WW Norton & Co	2010	2
Tortora	Microbiology, an introduction (13 <sup>th</sup> ed)	Pearson	2021	2
Tortora	Introduction à la microbiologie	Erpi	2003	3

Biologie cellulaire et physiologie :

Auteur	Titre	Éditeur	Année	emprunts
Alberts / Johnson / Lewis	Molecular Biology of the cell	WW Norton & Co	2022	1
Alberts / Johnson / Lewis	Biologie moléculaire de la cellule (6 <sup>e</sup> éd.)	Lavoisier	2017	3
Boron	Medical Physiology (3 <sup>e</sup> ed)	Saunders Elsevier	2012	2
Cadet	L'invention de la physiologie : 100 expériences historiques	Belin	2008	2
Calvino	Introduction à la physiologie	Belin	2003	2
Chanson	Traité d'endocrinologie	Médecine/sciences	2018	2
Ganong	Physiologie médicale (3 <sup>e</sup> ed)	De Boeck	2012	2
Holt / Hanley	Essential Endocrinology and diabetes	Wiley-Blackwell	2021	2
Karp	Biologie cellulaire et moléculaire (3 <sup>e</sup> éd.)	De Boeck	2010	2
Tortora	Principes d'anatomie et de physiologie (4 <sup>e</sup> éd.)	De Boeck	2007	2

# ÉPREUVE ORALE D'ÉTUDE CRITIQUE DE DOSSIER SCIENTIFIQUE ET/OU TECHNIQUE

Durée de l'épreuve : 4 heures + 1 heure

Coefficient : 3

## SUJETS

<p><b><i>Candida auris</i> : la résistance antifongique a un coût</b></p>	<p>Hans Carolus <i>et al</i>  <b>Collateral sensitivity counteracts the evolution of antifungal drug resistance in <i>Candida auris</i></b>  <i>Nature Microbiology</i>, 2024, vol.9, p.2954–2969</p>
	<p>Jeffrey M Rybak, Christina A Cuomo and P David Rogers  <b>The molecular and genetic basis of antifungal resistance in the emerging fungal pathogen <i>Candida auris</i></b>  <i>Current Opinion in Microbiology</i>, 2023, vol.70, art.102208, p.1-8</p>
<p><b>Le peptidoglycane comme signal d'alerte : les bactéries passent en mode biofilm</b></p>	<p>Sanika Vaidya <i>et al.</i>  <b>Bacteria use exogenous peptidoglycan as a danger signal to trigger biofilm formation</b>  <i>Nature Microbiology</i>, 2025, vol.10, p.144–157</p>
	<p>Susan Gottesman  <b>Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria</b>  <i>Journal of Biological Chemistry</i>, 2019, vol.294(31), p.11685–11700</p>
<p><b><i>Escherichia coli</i> : des codons d'initiation atypiques pour mieux croquer les sucres dans l'intestin</b></p>	<p>Yassine Cherrak <i>et al.</i>  <b>Non-canonical start codons confer context-dependent advantages in carbohydrate utilization for commensal <i>E.coli</i> in the murine gut</b>  <i>Nature Microbiology</i>, 2024, vol.9, p.2696–2709</p>
	<p>Matthew T. Sorbara and Eric G. Pamer  <b>Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them</b>  <i>Society for Mucosal Immunology</i>, 2018, vol.12, p.1–9</p>
<p><b>Entre fer et phage, une guerre bactérienne !</b></p>	<p>Zhiyu Zang <i>et al.</i>  <b><i>Streptomyces</i> secretes a siderophore that sensitizes competitor bacteria to phage infection</b>  <i>Nature Microbiology</i>, 2025, vol 10, p.362–373</p>
	<p>Michael E. Hibbing <i>et al</i>  <b>Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial Jungle</b>  <i>Nature Review Microbiology</i>, 2010, vol.8(1), p.15–25, p1-22 <i>ici</i></p>

<b>Fibres vs cancer : quand le menu affaiblit la menace d'<i>Escherichia coli</i></b>	Bhupesh Kumar Thakur <i>et al</i> <b>Dietary fibre counters the oncogenic potential of colibactin-producing <i>Escherichia coli</i> in colorectal cancer.</b> <i>Nature Microbiology</i> , 2025, vol.10, p.855-870
	Herbert Tilg, Timon E. Adolph, Romana R. Gerner, and Alexander R. Moschen <b>The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer</b> <i>Cancer Cell</i> , 2018, vol.33, p.954-964
<b><i>Salmonella</i> espionnée pendant l'infection des macrophages : on a tout entendu</b>	Taylor H. Nguyen <i>et al.</i> <b>Profiling <i>Salmonella</i> transcriptional dynamics during macrophage infection using a comprehensive reporter library</b> <i>Nature Microbiology</i> , 2025, vol.10, p.1006–1023
	Benjamin X Wang, Daniel SC Butler, Meagan Hamblin and Denise M Monack <b>One species, different diseases: the unique molecular mechanisms that underlie the pathogenesis of typhoidal <i>Salmonella</i> infections</b> <i>Current Opinion in Microbiology</i> 2023, vol.72, art.102262, p1-12 <a href="#">ici</a>
<b>Quand le café réveille aussi le microbiote</b>	Paolo Manghi <i>et al.</i> <b>Coffee consumption is associated with intestinal <i>Lawsonibacter asaccharolyticus</i> abundance and prevalence across multiple cohorts</b> <i>Nature Microbiology</i> , 2024, vol.9, p.3120–3134
	Sena Saygili, Shrilakshmi Hegde and Xuan-Zheng Shi <b>Effects of Coffee on Gut Microbiota and Bowel Functions in Health and Diseases: A Literature Review</b> <i>Nutrients</i> , 2024, vol.16, art.3155, p1-15
<b>Attaque des plantes en équipe signée <i>Pseudomonas syringae</i></b>	Nieves López-Pagán <i>et al.</i> <i>Nature Microbiology</i> , 2025, vol.10, p.958–972 <b><i>Pseudomonas syringae</i> subpopulations cooperate by coordinating flagellar and type III secretion spatiotemporal dynamics to facilitate plant infection</b>
	Madison R. Spratt, Keara Lane <b>Navigating Environmental Transitions: the Role of Phenotypic Variation in Bacterial Responses</b> <i>The American society for microbiology Journal mBio</i> , 2022, vol 13, e02212-22, p. 1-16 <a href="#">ici</a>
<b>L'autre face sombre du cholestérol !</b>	Bo Wang <i>et al</i> <b>Phospholipid Remodeling and Cholesterol Availability Regulate Intestinal Stemness and Tumorigenesis</b> <i>Cell Stem Cell</i> , 2018, vol.22, p 206–220
	Mingming Xiao <i>et al</i> <b>Functional significance of cholesterol metabolism in cancer: from threat to treatment</b> <i>Experimental &amp; Molecular Medicine</i> , 2023, vol.55, p 1982-1995
<b>Chaperonne contre co-chaperonne sur le ring</b>	Tomoya Okamoto <i>et al.</i> <b>Functional structure and physiological functions of mammalian wild-type HSP60</b> <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i> , 2015, vol.586, p.10-19
	Emile Dupuy and Jean-François Collet <b>Entering deeper into the mysteries of the GroEL–GroES nanomachine</b> <i>Current Opinion in Microbiology</i> , 2024, vol.79:102480, p.1-6 <a href="#">ici</a>

<b>Les ciseaux du nouveau souffle</b>	Sriram Vaidyanathan <i>et al.</i> <b>Targeted replacement of full-length CFTR in human airway stem cells by CRISPR-Cas9 for pan-mutation correction in the endogenous locus</b> <i>Molecular Therapy</i> , 2022, vol.30, p.223-237
	Guoshun Wang <b>Genome Editing for Cystic Fibrosis</b> <i>Cells</i> , 2023, vol.12, art.1555, p.1-15 ici
<b>La momie végétale</b>	Shundai Li, Lei Lei, Chris R. Somerville and Ying Gu. <b>Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) links microtubules and cellulose synthase complexes</b> <i>PNAS</i> , 2012, vol. 109, p 185–190
	Joanna K. Polko and Joseph J. Kieber <b>The Regulation of Cellulose Biosynthesis in Plants</b> <i>The Plant Cell</i> , 2019, vol. 31, p 282–296
<b>Le cheval de Troie de Tau</b>	Zhi Ruan <i>et al.</i> <b>Alzheimer’s disease brain-derived extracellular vesicles spread tau pathology in interneurons</b> <i>BRAIN</i> , 2021, vol 144; p.288–309
	Mar Pérez, Jesús Avila and Félix Hernández <b>Propagation of Tau via Extracellular Vesicles</b> <i>Frontiers in Neuroscience</i> , 2019, vol.3, art.698, p.1-7 ici
<b>On casse du sucre et on se prend la tête sur les histones</b>	Rachel Deplus <i>et al.</i> <b>TET2 and TET3 regulate GlcNacylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS</b> <i>The EMBO Journal</i> , 2013, vol.32, p 645–655
	Daniel Mariappa, Shalini Pathak and Daan MF van Aalten <b>A sweet TET-à-tête-synergy of TET proteins and O-GlcNAc transferase in transcription</b> <i>The EMBO Journal</i> , 2013, vol 32, p 612–613
<b>Comment se faire de la bile ?</b>	Yuchen Liu <i>et al.</i> <b>Disrupting bile acid metabolism by suppressing Fxr causes hepatocellular carcinoma induced by YAP activation</b> <i>Nature Communications</i> , 2025, vol.16, art.3583, p.1-19 ici
	John Y.L. Chiang and Jessica M. Ferrell <b>Bile acids as metabolic regulators and nutrient sensors</b> <i>Annual review of nutrition</i> , 2019, vol.39, p.175-200
<b>Comment la dégradation régule-t-elle une pathologie ?</b>	Feng Li <i>et al.</i> <b>F-box protein FBXO32 ubiquitinates and stabilizes D-type cyclins to drive cancer progression</b> <i>Nature Communications</i> , 2025, vol.16, art.4060, p.1-19 ici

	<p>Elizabeth A. Musgrove <i>et al.</i>  <b>Cyclin D as a therapeutic target in cancer</b>  <i>Nature reviews Cancer</i>, 2011, vol.11, p.558-572</p>
Développement sexuel	<p>Martín Andrés Estermann <i>et al.</i>  <b>NR2F2 regulation of interstitial cell fate in the embryonic mouse testis and its impact on differences of sex development</b>  <i>Nature Communications</i>, 2025, vol.16, art.3987, p.1-19</p>
	<p>Dagmar Wilhem <i>et al.</i>  <b>Gonadal sex determination in vertebrates: rethinking established mechanisms</b>  <i>Development</i>, 2025, vol.152, p.1–13</p>
Dommage et signalisation	<p>Anoop S. Chauhan <i>et al.</i>  <b>PIN1-SUMO2/3 motif suppresses excessive RNF168 chromatin accumulation and ubiquitin signaling to promote IR resistance</b>  <i>Nature Communications</i>, 2025, vol.16, art.3399, p.1-18</p>
	<p>Francesca Mattioli and Lorenza Penengo  <b>Histone Ubiquitination: An Integrative Signaling Platform in Genome Stability</b>  <i>Trends in Genetics</i>, 2021, vol.37, art.6, p.566-581</p>
Immunité anti tumorale	<p>Yi-Yu Wang <i>et al.</i>  <b>Inhibition of MBTPS1 enhances antitumor immunity and potentiates anti-PD-1 immunotherapy</b>  <i>Nature Communications</i>, 2025, vol.16, art.4047, p.1-21</p>
	<p>Mai F. Tolba  <b>Revolutionizing the landscape of colorectal cancer treatment: The potential role of immune checkpoint inhibitors</b>  <i>International Journal of Cancer</i>, 2020, vol.147, p.2996–3006</p>
Un modèle végétal pour comprendre l'instabilité génomique	<p>Wenxin Yuan <i>et al.</i>  <b>H3.1K27M-induced misregulation of the TONSOKU-H3.1 pathway causes genomic instability</b>  <i>Nature Communications</i>, 2025, vol.16, art.3547, p.1-16</p>
	<p>Yi-Chun Huang, Wenxin Yuan and Yannick Jacob  <b>The Role of the TSK/TONSL-H3.1 Pathway in Maintaining Genome Stability in Multicellular Eukaryotes</b>  <i>International Journal of Molecular Sciences</i>, 2022, vol.23, art.9029, p.1-18</p>
Une piste thérapeutique pour le cancer colorectal	<p>Tao Yuan <i>et al.</i>  <b>Josephin Domain Containing 2 (JOSD2) inhibition as Pan-KRAS-mutation-targeting strategy for colorectal cancer</b>  <i>Nature Communications</i>, 2025, vol.16, art.3623, p.1-19</p>
	<p>Wei-hua Wang <i>et al.</i>  <b>Post-translational modification of KRAS: potential targets for cancer therapy</b>  <i>Acta Pharmacologica Sinica</i>, 2021, vol.42, p.1201–1211</p>

## RAPPORT DU JURY D'ECD

### Statistiques des résultats de l'épreuve

- Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : **11,52 / 20**
- Meilleure note : **20,00 / 20**
- Note la plus basse : **04,00 / 20**
- Moyenne des candidats admis : **15,70 / 20**

### Rapport sur l'épreuve d'ECD

Chaque dossier comporte un article de recherche associé à une revue. La présentation de 30 minutes, doit être centrée sur l'article de recherche, la revue fournissant des éléments de contexte utiles pour l'introduction en particulier, des illustrations supplémentaires pourront être trouvées sur des ouvrages disponibles à la bibliothèque ou sur internet. Cet exercice doit permettre à l'ensemble du jury de comprendre la problématique posée, la chronologie et la logique expérimentale, et les éléments de réponse apportés par la publication scientifique. L'exposé doit présenter la ou les hypothèse(s) et question(s) scientifique(s) posée(s) ainsi que la démarche scientifique et technologique adoptée pour répondre à la problématique. Il est donc préférable d'éviter de donner la conclusion de l'article de recherche en introduction. La structure de la présentation ne nécessite pas forcément un plan différent de celui de l'article, structure qui est présentée à la fois dans le résumé (*abstract*), l'introduction et la discussion/conclusion. Les résultats et technologies présentés doivent être cohérents et suffisants afin de bien comprendre la logique et la progression expérimentale mises en place pour répondre à la/les question(s) posée(s). La structure de la présentation peut donc être basée sur celle de l'article qui est généralement constitué d'une introduction, de matériels et méthodes, de résultats présentés et analysés et d'une conclusion associée à des perspectives. Le choix de ne pas présenter certaines figures/tableaux/résultats/données, bien que judicieux et même nécessaire pour les articles très longs, est susceptible d'être questionné par les membres du jury.

Dans l'introduction de votre présentation, il est important de resituer l'étude dans un contexte plus large, scientifique voire sociétal si le sujet s'y prête, ce qui n'a pas toujours été fait par les candidats. Cependant, la question scientifique à laquelle l'article de recherche répond doit être clairement posée, ainsi que les connaissances scientifiques préalables à l'étude. Ces connaissances et informations sont présentes et fournies dans la revue et/ou dans l'introduction de l'article de recherche. Enfin, l'accès à Internet (bloqué pour certains sites faisant appel à l'intelligence artificielle notamment) constitue d'autres sources d'informations tant que celles-ci sont mentionnées.

La présentation doit s'appuyer sur la description, l'analyse des expériences de recherche et ne pas présenter uniquement une série de conclusions. Elle ne doit pas forcément être un exposé linéaire et exhaustif des différentes expériences mais correspondre à un choix justifié pour expliciter la démarche scientifique suivie par les auteurs de l'article afin de répondre à la/aux question(s) posée(s) en début d'article. Les efforts des candidats pour illustrer leurs propos par des documents issus des articles ou de sites Internet et retravaillés sont appréciés par le jury. La présentation doit être aboutie avec des figures et données lisibles par le jury. Chaque diapositive doit étayer une idée ou illustrer une technologie en s'appuyant sur un choix pertinent de figures, de données et de textes associés. Nous rappelons aux candidats qu'au cours de leur présentation, ils doivent s'appuyer sur des figures, des tableaux pour étayer leur propos. Le lien et les transitions entre les différentes expériences qui jalonnent l'article de recherche, ainsi que les conclusions intermédiaires sont attendus. En cas de techniques centrales ou originales dans

l'article, ou d'approches expérimentales complexes, une description du principe de l'expérience est attendue (l'accès à Internet permet de trouver des représentations synthétiques de ces techniques). Les nouvelles technologies, notamment de séquençage à haut débit (NGS) et de méta-séquençage ainsi que l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP, ChIP-seq), et les principes de leur analyse, doivent être maîtrisées, et font, quand elles sont utilisées par les auteurs de l'article de recherche, systématiquement l'objet de questions de la part du jury. Il peut parfois être pertinent, au fil de l'exposé, quand cela s'y prête, de proposer des expériences ou des points complémentaires qui auraient apporté à la démarche scientifique plus de robustesse (contrôles supplémentaires, taille de l'échantillon, analyse statistique...), et de proposer une ouverture aux données présentées. Une conclusion reprenant les résultats majeurs (certains de ces éléments conclusifs seront trouvés dans la Discussion et la Conclusion de l'article de recherche), éventuellement sous forme de schéma récapitulatif, est attendue. Le jury apprécie également des perspectives réalistes et une analyse critique globale de l'étude présentée.

Le jury encourage les candidats à utiliser pleinement les 30 minutes qui leur sont allouées pour présenter l'article. L'utilisation du tableau en plus de la vidéo projection peut être un atout pédagogique, sauf quand il s'agit de répéter les plans déjà projetés ou les informations présentes sur la diapositive.

Enfin, les questions du jury comptent pour 50 % du temps de l'épreuve. Cet aspect qui fait partie intégrante de l'épreuve n'est donc pas à négliger, car prise en compte dans la note finale. Pour rappel, le temps de questionnement du jury suite à l'exposé oral est invariablement de 30 minutes, dont 15 minutes par le membre du jury qui a proposé l'ECD, les 15 minutes restantes étant réparties entre les autres membres du jury (Biochimie, Microbiologie, Biologie Cellulaire et Physiologie et Chimie). Remarque : en cas d'exposé oral inférieur à 30 minutes, le temps de questionnement reste de 30 minutes. Ces questions sont l'occasion pour le jury de sonder le candidat sur la pleine compréhension de l'article de recherche, sur l'étendue et la solidité de ses connaissances (technologiques et théoriques), et sur sa capacité à répondre, le cas échéant, à des questions en marge du domaine traité dans le dossier. La capacité d'écoute, la précision/pertinence du vocabulaire utilisé, ainsi que la qualité et la concision des réponses sont des qualités très appréciées et évaluées par le jury.

Afin de se préparer au mieux à cette épreuve d'ECD, le jury invite les futurs candidats à tenir à jour sa littérature scientifique, notamment certains journaux généralistes comme « Cell, Nature, Nature Communications, Sciences, *PNAS*... ». Ces journaux permettront aux candidats de mieux appréhender cette épreuve mais aussi de réactualiser leurs connaissances scientifiques et techniques.

Enfin, le jury rappelle qu'il faut être attentif à l'orthographe, la syntaxe et la grammaire sur les diapositives.

### Rapport sur les questions relatives à la Chimie

Pour la session 2025, l'entretien avec le jury s'est terminé par cinq minutes de questions de chimie.

La discussion a été initiée sur la base d'un ou plusieurs éléments contenus dans la présentation du candidat ou dans les réponses aux questions. Cette discussion a porté en partie sur les principes physico-chimiques ou chimiques des technologies présentées, mais également sur l'analyse structurale d'un composé, l'étude d'un phénomène, d'un concept ou d'un modèle.

L'objectif de ces questions n'est pas de mettre en difficulté le candidat, mais de prendre du recul sur les

notions de chimie évoquées. Les candidats ne doivent pas être déstabilisés par une question « simple », qui permet généralement de poser les bases d'un raisonnement plus complexe.

Cette année, les questions ont globalement porté sur les thèmes suivants (cette liste n'est pas exhaustive et a vocation à évoluer d'une session à l'autre) :

## **Architecture de la matière**

### *Atomistique*

- Établir la configuration électronique d'un élément dans son état fondamental (le numéro atomique est fourni).
- Positionner un des vingt premiers éléments dans le tableau périodique.
- Justifier la formation d'un ion par analyse de sa configuration électronique (métaux alcalins et alcalino-terreux, halogènes, éléments du bloc *d*).

### *Structure moléculaire*

- Connaître les liaisons interatomiques classiques (covalente, covalente polarisée, ionique) et les analyser à l'aide d'une différence d'électronégativité. Savoir donner un ordre de grandeur de l'énergie et de la longueur de la liaison covalente.
- Donner la représentation de Lewis d'une molécule. Pour rappel, la représentation de Lewis doit faire apparaître l'ensemble des doublets liants et non liants de la molécule. De plus, le modèle de Lewis ne sert pas à décrire la géométrie d'une molécule.
- Prévoir ou interpréter la géométrie des molécules à l'aide du modèle VSEPR.
- Représenter les structures des molécules essentielles en biochimie (acides aminés, sucres simples, sucres phosphatés, triglycérides, bases nucléiques, ...).
- Connaître la formule, le nom et la structure des ions classiques de la chimie (chlorure, phosphate, nitrate, ...).
- Prévoir la polarité d'une molécule à l'aide de sa structure tridimensionnelle.

### *Aspect sociomoléculaire*

- Connaître les interactions/liaisons intermoléculaires classiques (hydrogène, van der Waals – Keesom, Debye, London –, ion-dipôle). Savoir donner un ordre de grandeur de l'énergie de ces liaisons.

## **Chimie des solutions/chimie inorganique**

- Établir les équations des réactions acido-basique ou d'oxydoréduction des transformations chimiques étudiées.
- Estimer un *pH* sans calculatrice à partir d'une concentration simple en  $H_3O^+$ .
- Citer les propriétés d'une solution tampon.
- Connaître la structure générale d'un complexe (métal-ligand).
- Reconnaître le site d'un ligand simple (eau -aqua-, chlorure -chloro-, ...) ou classique de la biochimie (porphyrine) pouvant se complexer à un centre métallique dans un complexe.

## **Thermodynamique**

- Connaître les définitions des grandeurs *G*, *H* et *S*, ainsi que les relations qui les lient.
- Utiliser rigoureusement les grandeurs thermodynamiques *X*,  $\Delta X$ ,  $\Delta X^\circ$ ,  $\Delta_r X$ ,  $\Delta_r X^\circ$ .

## **Cinétique**

- Exprimer une loi cinétique, notamment dans le cadre d'un acte élémentaire.
- Expliquer les notions de catalyse et de catalyse enzymatique.
- Redémontrer le modèle de catalyse enzymatique de Michaelis-Menten.

### **Chimie organique**

- Connaître ou analyser la réactivité des fonctions classiques en chimie.

### **Techniques d'analyse**

- Connaître les principes physico-chimiques des techniques de séparation/d'analyse par chromatographie (CCM et HPLC). Analyser l'impact de la phase stationnaire et/ou de la phase mobile.
- Connaître les principes physiques des techniques d'analyse spectrophotométriques (IR, UV, fluorescence). Savoir citer la relation de Planck-Einstein.
- Connaître l'intérêt d'une spectrométrie de masse et d'un tandem de spectrométries de masse. Décrire le fonctionnement d'une spectrométrie de masse.

Le jury conseille aux futurs candidats :

- de se servir du temps de préparation pour réfléchir aux structures des molécules (y compris les solvants et les tampons) évoquées lors de leur présentation. Il en est de même pour les principes physico-chimiques sous-jacents aux techniques d'analyse (chimique, biochimique, microbiologique, ...) présentées.
- De représenter dans sa présentation la structure d'une molécule simple lorsque cette dernière est l'objet d'étude de l'article (oses, acides aminés, dérivés du cholestérol, molécules de synthèse,...). A défaut, il est essentiel de savoir dessiner rapidement cette structure au tableau.
- De garder leur concentration durant la totalité de l'épreuve, y compris lors de la transition avec les questions de chimie.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les candidats présents aux épreuves d'admissibilité et d'admission venaient, comme chaque année, d'horizons assez différents, y compris de doctorats en sciences d'une des disciplines biologiques incluses dans le programme du concours, l'agrégation externe spéciale docteurs n'étant pas ouverte cette année.

Les résultats aux épreuves d'admissibilité et d'admission confirment que ce concours de recrutement d'enseignants pour une discipline scientifique et technologique de ce niveau scientifique nécessite de consolider ses connaissances et d'actualiser ses savoirs dans chaque champ mentionné dans le programme, la biochimie, la microbiologie, l'immunologie, la biologie cellulaire, l'hématologie, la biologie moléculaire ou la physiologie humaine. Ce n'est qu'à ce prix que les candidats peuvent construire une expertise disciplinaire suffisamment large pour enseigner en série technologique STL biotechnologie et ST2S en BPH, ainsi que dans l'ensemble des BTS de biologie appliquée.

Cette année encore, le jury des épreuves d'admission s'est réparti en deux commissions travaillant en parallèle pour le passage des épreuves orales, une par épreuve. Cette organisation permet d'une part l'évaluation équitable des prestations des candidats lors de l'étude critique de dossier et lors de la leçon, car chaque commission voit chaque candidat une fois. Cela permet d'autre part le déroulement des épreuves sur deux jours consécutifs pour chaque candidat et limite pour eux les frais engagés.

Évaluer la capacité des candidats à assurer une mise à niveau de leurs connaissances des nouveaux concepts est un des objectifs assignés à ce concours parce que l'évolution continue des techniques et des connaissances dans les champs disciplinaires couverts par le programme nécessite une remise en question permanente de la part des futur(e)s agrégé(e)s qui doivent s'approprier avant le concours les nouveaux concepts pour être en mesure de les expliquer, comme ils pourraient le faire à des élèves, des étudiants, des techniciens, des ingénieurs ou des chercheurs. Chaque épreuve nécessite d'autre part, comme cela a été précisé dans chacun des rapports spécifiques, d'aborder le sujet par un temps de réflexion pour cerner le sujet et la problématique, faire preuve de bon sens, avoir présent à l'esprit la volonté de transmettre un message qui aidera, par la structuration d'une composition écrite ou d'une présentation orale, à distinguer et rendre compréhensible l'essentiel. Il convient de ne pas oublier que l'agrégation est un concours d'enseignement qui évalue également l'aptitude des candidats à organiser, structurer, présenter un propos et de le faire avec une didactique efficace. L'esprit de synthèse et les choix qui en découlent sont des qualités essentielles pour un professeur et cela plus encore lorsque le corpus de connaissances attendues est très important.

Les travaux pratiques s'appuyant sur des technologies devant être maîtrisées, qui constituent une des originalités de ce concours ont pu, remplir leur rôle, emblématique de cette agrégation, préfigurant une part non négligeable des enseignements auxquels sera confronté le futur agrégé de « biochimie génie biologique ». L'évaluation des compétences technologiques et expérimentales qui se déploient en lycée général et technologique, ou à l'IUT, dans les laboratoires de biochimie, de microbiologie de biologie humaine, de biologie moléculaire, de biologie cellulaire. Ces compétences sont indispensables pour assurer la formation en STL biotechnologies, en BPH en ST2S, dans les 7 sections de BTS de « Biologie Appliquée », en CPGE Technologie Biologie ou en BUT de génie biologique, dans lesquelles enseignent les professeurs agrégés de BGB. Ces compétences

sont également indispensables pour la mise en œuvre, l'analyse et l'exploitation de manipulations en laboratoire de recherche en biologie pour ceux qui choisiront de poursuivre par un doctorat pour devenir chercheur.

Pour l'épreuve d'étude critique de dossier, l'accès à Internet représente incontestablement une aide lors de l'épreuve, aussi bien en matière de traduction des articles écrits en anglais scientifique, que pour découvrir certains concepts du dossier scientifique. Cependant, cette perspective faussement rassurante ne doit pas abuser les futurs candidats car elle ne peut en aucun cas pallier l'absence de maîtrise des concepts de biologie et de biotechnologie, *a priori*. Cette épreuve nécessite également de développer une pratique de la lecture et de l'analyse d'articles scientifiques nombreux et variés, et ce afin de se familiariser avec cette démarche et approche bibliographique de la recherche pour bien se préparer à l'épreuve.

Certains candidats ont impressionné le jury par leur maîtrise de l'analyse des articles ou du sujet, et par la clarté et la concision de la présentation de concepts, scientifiques ou technologiques complexes. Le jury encourage les candidats non reçus à persévérer dans leur projet, d'autant que tous ont fait preuve de qualités remarquables dans certaines épreuves.

La mise en œuvre d'un tel concours nécessite un travail collectif important. Le directeur remercie pour leur engagement l'ensemble des membres du jury pour les différentes épreuves, ainsi que les surveillants et les personnels de l'établissement d'accueil, le lycée Pierre-Gilles de Gennes – ENCPB, qui ont participé au déroulement de la session dans de bonnes conditions.