Secrétariat Général

Direction générale des
ressources humaines

Sous-direction du recrutement

MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE

Concours du second degré – Rapport de jury

Session 2011

AGRÉGATION

Externe

Biochimie génie biologique

Rapport de jury présenté par Madame Françoise GUILLET
Présidente du jury

Les rapports des jurys des concours sont établis sous la responsabilité des présidents de jury

En hommage à
Jean Figarella

Inspecteur Général

Agrégé de biochimie - physiologie

Octobre 1941-Juin 2011

Sommaire

Composition du jury ..... page 4

Renseignements statistiques ..... page 5

Epreuves d'admissibilité

- Composition de biochimie et rapport ..... page 7
- Composition de microbiologie et rapport ..... page 10
- Composition de biologie cellulaire et de physiologie et rapport ..... page 13

Epreuves d'admission

- Epreuve pratique de biochimie – physiologie ..... page 17
  - Rapport sur l'épreuve de biochimie-physiologie ..... page 34
- Epreuve pratique de microbiologie ..... page 36
  - Rapport sur l'épreuve de microbiologie ..... page 57
- Epreuve pratique de chimie ..... page 65
  - Rapport sur l'épreuve de chimie ..... page 89
- Epreuves orales
  - Rapport sur les leçons ..... page 94
  - Rapport sur les études critiques de dossiers ..... page 100
- Conclusion générale page 110

COMPOSITION DU JURY

Président

Mme Françoise GUILLET, Inspectrice générale de l'éducation nationale

Vice-président

M. Henri-Jean BOULOUIS Professeur des universités Ecole Nationale Vétérinaire Maison Alfort

Secrétaire général

Mme Florence RIVENET, professeur agrégée Lycée Pierre-Gilles de Gennes (ENCPB), PARIS

Membres

Christophe BELOIN - Personne à Compétences Particulières - Institut Pasteur de Paris à PARIS
Caroline BONNEFOY - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique Régional - Académie de VERSAILLES
Hélène CARRIE - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS
Fabien CEZARD - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS
Pascal CHILLET - Professeur Agrégé - Lycée Polyvalent Jean Mermoz à MONTPELLIER
Jeanne-Laure DORMIEUX - Professeur Agrégé - Lycée Général et Technologique D'Arsonval à ST MAUR DES FOSSES
Frédéric DUCANCEL - Ingénieur De Recherche - Commissariat à l'Energie Atomique CEA à GIF-SUR-YVETTE
Marc LANDRY - Professeur des Universités - Institut François Magendie à BORDEAUX
Françoise LATOURRE - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS
Philippe LEJEUNE - Professeur des Universités - Institut National des Sciences Appliquées à VILLEURBANNE
Nicolas MEUNIER - Maitre de Conférences des Universités - Int Nat de La Recherche Agronomique à JOUY-EN-JOSAS
Alain MOREL - Professeur des Universités - Université Angers à ANGERS
Sabine ORSONI - Professeur Agrégé - Lycée Général Et Technologique Vallee de Chevreuse à GIF-SUR-YVETTE
Benoît SCHNEIDER - Charge De Recherches Cnrs - dep Med Légale Et Droit Med Université Paris Descartes à PARIS
Sophie WARIN - Professeur Agrégé - Lycée Pierre-Gilles de Gennes (E.N.C.P.B) à PARIS

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Candidats inscrits	239
Candidats présents à l'épreuve d'admissibilité	74
Nombre de postes	12
Candidats admissibles	27
Candidats présents aux épreuves d'admission	24
Candidats proposés pour l'admission	12
Barre d'admissibilité	07,07
Barre d'admission	10,33

Epreuves d'admissibilité

Moyenne générale des candidats présents	06,17
Moyenne générale des candidats admissibles	09,28
Biochimie	
Moyenne des candidats présents	05,90
Moyenne des candidats admissibles	09,20
Note maximale	15,10
Microbiologie	
Moyenne des candidats présents	06,83
Moyenne des candidats admissibles	10,37
Note maximale	15,00
Biologie cellulaire et Physiologie	
Moyenne des candidats présents	05,71
Moyenne des candidats admissibles	08,27
Note maximale	16,30

Epreuves d'admission	
Moyenne générale des candidats présents	10,12
Moyenne générale des candidats admis	12,03
Travaux pratiques de biochimie-physiologie	
Moyenne des candidats présents	10,41
Moyennes des candidats admis	13,10
Note maximale	19,00
Travaux pratiques de microbiologie	
Moyenne des candidats présents	11,08
Moyennes des candidats admis	12,58
Note maximale	15,40
Travaux pratiques de chimie	
Moyenne des candidats présents	09,56
Moyennes des candidats admis	10,75
Note maximale	13,50
Leçon	
Moyenne des candidats présents	09,17
Moyennes des candidats admis	11,83
Note maximale	16,00
Epreuve critique de dossier	
Moyenne des candidats présents	07,47
Moyennes des candidats admis	08,56
Note maximale	15,00
Ensemble du concours	
Moyenne des candidats présents	09,87
Moyenne des candidats admis	11,35

Epreuve écrite d'admissibilité

BIOCHIMIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

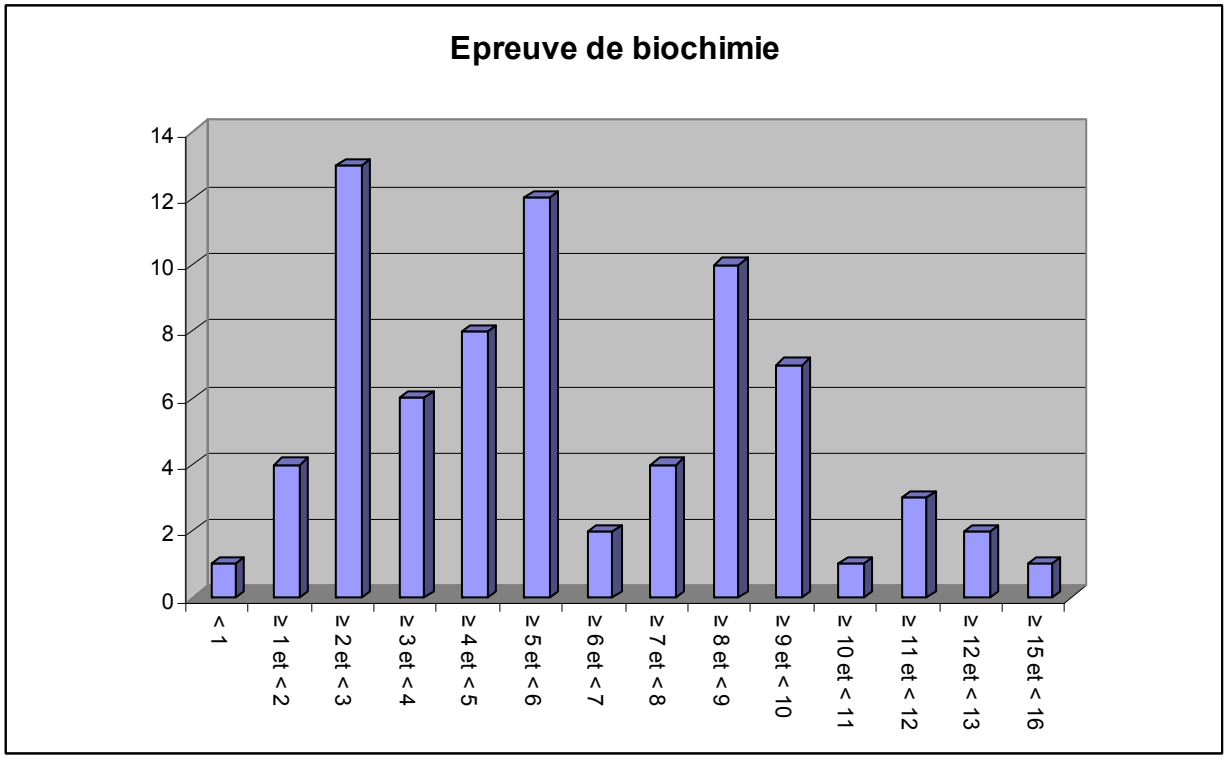
Coefficient 2

SUJET
Les nucléotides et leurs dérivés.

Rapport de l'épreuve de biochimie

Résultats :

< 1	1	≥ 5 et < 6	12	≥ 10 et < 11	1
≥ 1 et < 2	4	≥ 6 et < 7	2	≥ 11 et < 12	3
≥ 2 et < 3	13	≥ 7 et < 8	4	≥ 12 et < 13	2
≥ 3 et < 4	6	≥ 8 et < 9	10	≥ 15 et < 16	1
≥ 4 et < 5	8	≥ 9 et < 10	7		



Rapport établi par : Alain MOREL, Benoît SCHNEIDER

Le sujet « Les nucléotides et leurs dérivés » est un sujet classique de biochimie, qu'il était possible d'aborder sous l'angle de la biologie structurale, la biologie moléculaire, le métabolisme et les applications technologiques et médicales. Il fallait faire preuve d'un esprit de synthèse pour structurer un devoir au plus haut niveau de ses connaissances. Le plan du devoir n'étant pas indiqué, le candidat se devait de proposer et justifier un plan logique faisant apparaître, dans l'introduction, la problématique du sujet proposé et les objectifs à développer. Il était donc tout particulièrement important de rappeler, comme préliminaire incontournable, la structure de base d'un nucléotide. La présentation de cette structure permettait de poser les questions de l'origine métabolique des nucléotides et de leurs rôles dans la cellule et l'organisme. Bien évidemment, le motif nucléotidique servait de base pour appréhender la diversité des nucléotides et des dérivés et cerner les fonctions physiologiques ainsi que les enjeux technologiques et thérapeutiques associés à l'utilisation des dérivés nucléotidiques.

On ne peut que déplorer que bon nombre de candidats ne maîtrise pas la structure précise des nucléotides, pourtant enseignée depuis le premier cycle universitaire. De façon très fréquente, la structure des nucléotides est présentée sous la forme d'un schéma de formes géométriques nommées « sucre, phosphate, base ». L'identité du sucre est pour certains inconnue ; la structure

des bases fantaisiste et les liaisons du/des phosphates sur le nucléoside, aléatoires. Cette connaissance du motif de base d'un nucléotide, au niveau chimique et stéréochimique conformationel, était pourtant nécessaire pour appréhender l'origine, la réactivité et les fonctions de ces molécules. En ce qui concerne les dérivés des nucléotides, beaucoup de candidats se sont bornés à décrire les oligomères de nucléotides (ADN et ARN) ou les nucléotides cycliques de type AMPc et GMPc. Il était également nécessaire de présenter les dérivés nucléotidiques adényliques (NAD/NADP, FAD/FMN) qui jouent un rôle fondamental dans les activités bioénergétiques et biosynthétiques de la cellule. De nombreux candidats se sont hasardés à représenter la structure tridimensionnelle de la double hélice d'ADN, dont le bénéfice, eu égard de l'information qu'il en ressort, était faible. En effet, de très rares copies mettent en évidence de façon précise, au niveau structural, les interactions internucléotidiques : nombre et positionnement des liaisons hydrogènes entre les brins de la molécule d'ADN ou intracaténaires, forces de stacking, notion de grand/petit sillons de l'ADN, stabilité structurale… Enfin, il est à noter que les méthodes et expériences princeps qui permettaient de caractériser la structure et les propriétés physicochimiques des nucléotides et de leurs dérivés n'ont été abordées que par très peu de candidats.

Au niveau métabolique, force est de constater la très grande faiblesse des devoirs. De très rares candidats ont mentionné le fait que les nucléotides sont synthétisés par deux grandes voies métaboliques : la voie *de novo* et la voie de récupération des nucléotides. Les régulations de ces voies ne sont que trop rarement documentées. Les candidats pouvaient dans ce cadre évoquer l'utilisation de la connaissance de ces voies dans la mise en place de la production d'anticorps monoclonaux une application majeure en biotechnologie. Seules les grandes étapes de synthèse des polymères de nucléotides ou des nucléotides cycliques ont été développées par la plupart des candidats. Les expériences de Griffith, puis d'Avery, McLeod et McCarthy et enfin de Hershey et Chase fondamentales dans l'identification des acides nucléiques comme support de l'information génétique ne sont pratiquement jamais discutées. Les mécanismes de polymérisation de l'ADN ou de l'ARN devaient sous-tendre l'intérêt biotechnologique des dérivés didésoxynucléotidiques (ddNTP) pour le séquençage de l'ADN ou les stratégies thérapeutiques antivirales (AZT, acyclovir) ou anticancéreuses. C'est dans ce contexte précis que la méthode de séquençage de Sanger devait être présentée ainsi que les enjeux associés au séquençage des génomes de nombreux organismes modèles et humain.

Le volet illustrant les grandes fonctions associées aux nucléotides et leurs dérivés a été abordé de façon satisfaisante par la plupart des candidats, ce qui permettait de mettre en avant le rôle des nucléotides dans le codage de l'information génétique, dans l'activité biosynthétique et bioénergétique, dans la régulation de l'activité enzymatique, dans la signalisation… A un niveau supérieur, de nombreux devoirs ont illustré le rôle des nucléotides dans les grandes fonctions de l'organisme telles la contraction musculaire. Là encore, ce qui est dommageable, c'est l'absence d'expériences permettant d'illustrer les rôles variés des nucléotides et de leurs dérivés. Le rôle de l'AMPc dans la communication cellulaire et la différenciation d'un organisme aurait pu être développé à l'aide de l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum*. Enfin, les illustrations sont soit d'une qualité insuffisante soit excessivement schématisées, ce qui attestent le plus souvent d'un manque de maîtrise ou de connaissance.

Pour l'ensemble des copies, les conclusions sont au mieux un pâle résumé de l'exposé. Une ouverture avec une perspective scientifique d'envergure dans ce champ disciplinaire est très souvent absente. A titre d'exemple, les aspects évolutifs concernant les nucléotides et les acides nucléiques (monde « ARN ancestral ») auraient pu être mentionnés.

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

Epreuve écrite d'admissibilité

MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

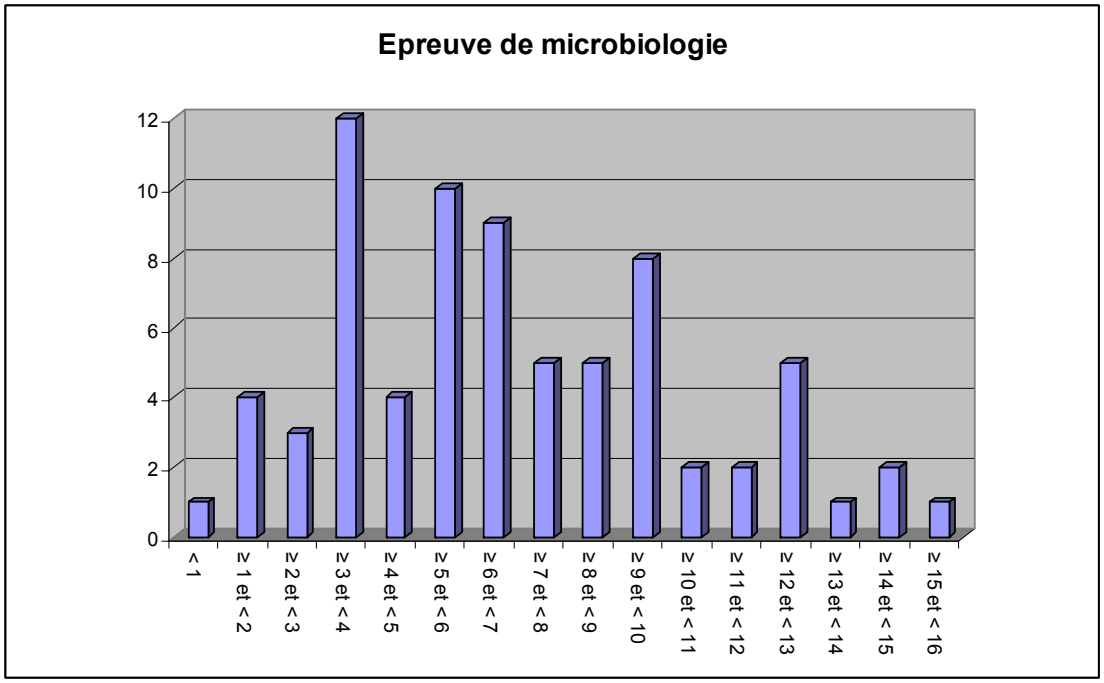
Le passage transmembranaire chez les bactéries :
mécanismes, contrôles, conséquences et applications.

Rapport de l'épreuve de microbiologie

Rapport établi par : Henri-Jean BOULOUIS, Philippe LEJEUNE

Résultats :

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



Meilleure note : 14/20

2- RÉFLEXIONS SUR L'ÉPREUVE

Le sujet, qui était déjà assez étendu lorsque l'on se retreignait au passage transmembranaire de molécules nécessaires à la vie des bactéries, ne concernait pas le passage transmembranaire des bactéries elle mêmes. Le développé du titre du sujet, qui pouvait être l'un des plans possibles de cette composition, ne laissait aucun doute sur le sens de l'intitulé. Une lecture trop superficielle à donc conduit quelques candidats à s'égarer dans un hors sujet préjudiciable.
L'introduction devait être l'occasion de délimiter le champ de la dissertation et de justifier la démarche et le plan adoptés. La structure membranaire générale ainsi que la problématique du passage de molécule compte tenu de la nature hydrophobe de la membrane pouvait s'accompagner d'une présentation de la problématique de la double membrane des bactéries Gram négatif (membranes interne et externe) sans toutefois aller jusqu'à exposer dans le détail la structure des composants de la paroi (peptidoglycane et LPS) ce que certains candidats n'ont pu résister de faire. Enfin indiquer que la traversée pouvait se faire dans les deux sens n'était pas dénué d'intérêt. Annoncer un plan dans l'introduction et s'y tenir était aussi profitable.
La plupart des candidats ont exposé en première partie les modalités de passage trans membranaire (passif, actif, porines,…) ainsi que la nature des molécules qui traversent. Si presque

tous les candidats ont évoqué les ions, l'eau, l'ADN, les protéines et les nutriments, peu d'entre eux ont traité en détail, comme on pouvait l'attendre, d'une part les molécules sortantes (toxines) et d'autre part le passage transmembranaire de messages par les systèmes à deux composants et autres systèmes. Parmi les mécanismes de passage transmembranaire, les systèmes de sécrétion bactériens ont fait figure de parents pauvres alors qu'il s'agit pour les bactéries de mécanismes important d'exportation. Très peu de candidat ont considéré que les mécanismes qui président à la transmission d'information par le biais d'HomoSérineLactones ou de petits peptides faisait partie du sujet et c'est dommage. Peu d'entre eux ont aussi traité du système Sec et Tat. Très rares ont été les développements sur le passage du fer (sidérophore, hème,…) et éventuellement le transfert des composant de la paroi. Enfin, plusieurs candidats, sans doute entrainés par leur exposé s'appuyant sur des connaissances concernant les membranes de cellules eucaryotes, ont traité de la phagocytose. Néanmoins, une première description d'une bactérie apte à ce type d'internalisation a été récemment publiée (voir l'ECD correspondant qui lui est consacré) et, si l'exemple en avait été donné, la notion aurait été prise en compte.

Le contrôle du passage transmembranaire a été très rarement évoqué, et le plus souvent de manière incomplète. Des exemples pouvaient être pris aussi bien pour évoquer les contrôles génétiques d'expression de récepteurs (certains ont bien développé le système de l'opéron lactose ; d'autres, moins complètement, se sont appuyé sur la compétence bactérienne ou les efflux de xénobiotiques, voire les systèmes à deux composants).

La troisième partie suggérée concernait les conséquences et applications. Une bonne partie des antibiotiques ont des cibles intra bactériennes qui nécessitent leur pénétration dans le cytoplasme. Certains d'entre eux pénètrent par le biais de porines. Ces dernières sont le support de mécanismes de résistances puisqu'elles peuvent aboutir à ne plus permettre le passage des antibiotiques. Par ailleurs certains mécanismes d'efflux de molécules sont aussi employés pour éliminer des xénobiotiques (certains candidats ont fait état des cyclines). A cette première conséquences ont pouvait ajouter le chimiotactisme et la perception des gradients.
Pour ce qui concerne les applications, une fois de plus, les mécanismes de transferts génétiques ont été longuement et, parfois, inutilement décrits. Le passage de l'ADN devait être restreint à la transformation. La conjugaison et la transduction ont été considérées comme hors sujet. Mais d'autres applications ou perspectives auraient pu trouver leur place ici : la conception de vaccins ayant pour cibles des porines ou des sidérophores, les agents anti quorum sensing par exemple.

La conclusion pouvait être l'occasion d'une synthèse et d'une ouverture. Rare sont les candidats ayant suivi ce conseil classique. Et ceux qui l'ont suivi ont généralement évoqué comme perspective de conclusion un des chapitres attendu dans le corps du sujet.

La qualité et la pertinence des schémas sont très variables selon les candidats. Cependant, pour les correcteurs, un bon schéma est le signe d'un esprit pédagogique et permet de faire passer beaucoup d'informations.

Epreuve écrite d'admissibilité

BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 6 heures

Coefficient 2

SUJET

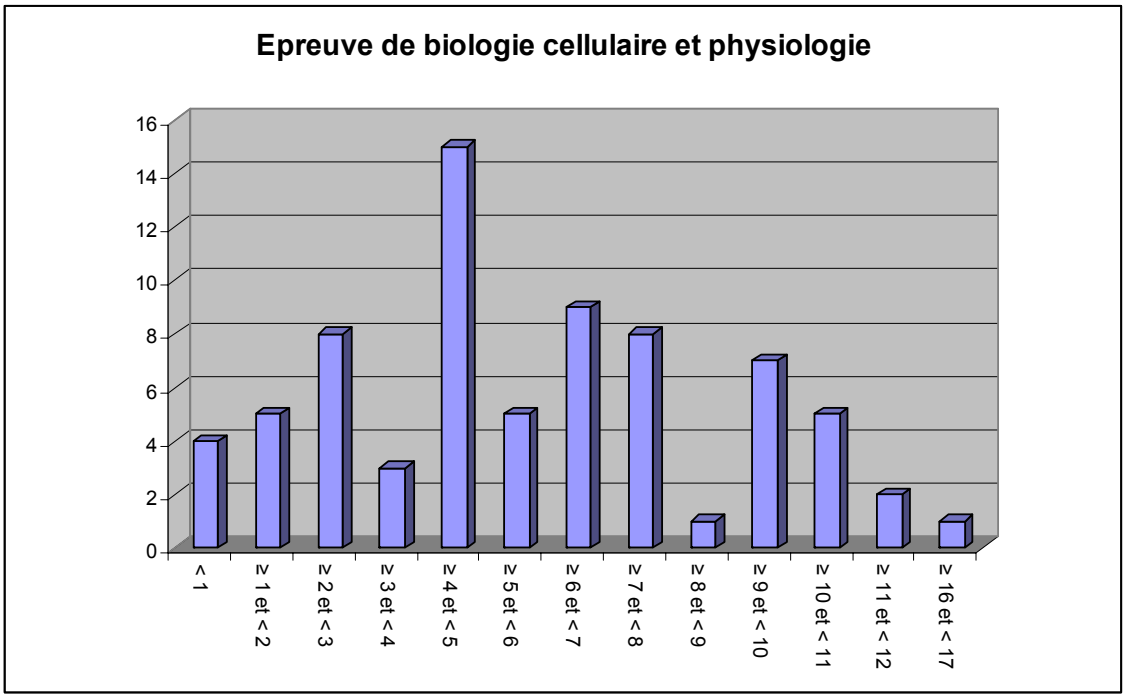
Les mémoires dans les adaptations de l'organisme à l'environnement

Rapport de l'épreuve de biologie cellulaire et physiologie

Rapport établi par : Marc LANDRY, Nicolas MEUNIER

Résultats :

< 1	4	≥ 5 et < 6	5	≥ 10 et < 11	5
≥ 1 et < 2	5	≥ 6 et < 7	9	≥ 11 et < 12	2
≥ 2 et < 3	8	≥ 7 et < 8	8	≥ 16 et < 17	1
≥ 3 et < 4	3	≥ 8 et < 9	1		
≥ 4 et < 5	15	≥ 9 et < 10	7		



Rapport établi par : Marc LANDRY, Nicolas MEUNIER

Le sujet portait sur les mémoires qu'il convenait de définir dans un premier temps. Le sujet demandait ensuite d'en étudier les conséquences pour l'organisme. Le libellé du sujet semble avoir déstabilisé certains candidats. Il suffisait pourtant d'en privilégier une interprétation simple. Les mémoires regroupent tout d'abord des mécanismes qui permettent à l'organisme de répondre de manière différente à deux stimulations similaires successives. Elles permettent ainsi de changer la réponse de l'organisme à un ensemble de stimuli provenant du milieu extérieur et de s'adapter à ses modifications. La mise en jeu des mécanismes de la mémoire concerne des individus et regroupe essentiellement les mémoires neuronales et immunitaires. Mais elle peut s'étendre à un groupe ou une espèce et englobe alors des mémoires génétiques et épigénétiques.
Il était souhaitable de détailler les types de mémoires concernées. Dans tous les cas, l'information initiale doit être stockée. C'est cette information qui modifie la réaction de l'individu, ou de l'espèce, après exposition à un deuxième stimulus semblable. Il fallait donc décrire les mécanismes cellulaires permettant l'encodage de cette information, et préciser les sites de ce stockage (aire cérébrale, type de cellules immunitaires). Le rappel de ces informations conduit à une réponse modifiée de l'organisme. Les conséquences physiologiques de ces processus sont nombreuses et concernent aussi bien l'apprentissage que la défense du soi. Toutefois, ces processus peuvent être altérés et conduire à des dysfonctionnements pathologiques (troubles de la mémoire, allergies). Par ailleurs, la connaissance des mécanismes impliqués a permis d'outils prophylactiques et thérapeutiques tels que les vaccins.

La majorité des candidats n'a pas traité à la fois les mémoires immunitaires et neuronales, ces dernières étant souvent négligées de manière incompréhensible. A l'inverse, nombre de candidats se sont perdus dans de longues digressions hors-sujets en détaillant les mécanismes d'homéostasie. De nombreux candidats ont principalement traité les adaptations de l'organisme à l'environnement en oubliant que le sujet portait avant tout sur les processus de mémorisation et leurs conséquences physiologiques ou pathologiques.
D'un point de vue de la forme, la plupart des candidats a proposé un plan cohérent même si certains soumettent encore une copie trop désorganisée. La quasi-absence de conclusion nuit également souvent aux copies. Un effort a été fait pour insérer des schémas, parfois intéressants pour expliquer les mécanismes cellulaires. Nous insistons bien sûr sur l'importance de ces schémas et l'attention qui doit être portée à leur réalisation. Comme souvent, les aspects expérimentaux sont délaissés et la démarche permettant d'aboutir aux conclusions est passée sous silence. Les aspects pathologiques doivent également trouver leur place dans la composition. De nombreux dysfonctionnements pouvaient ici être abordés. Il ne s'agit en aucun cas d'en faire un catalogue mais plutôt de s'appuyer sur quelques exemples choisis pour illustrer des altérations naturelles permettant d'élucider les mécanismes normaux, ou pour décrire la mise en œuvre de processus pathologiques.

EPREUVES D’ADMISSION

Epreuve d'admission

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE ET OU DE PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

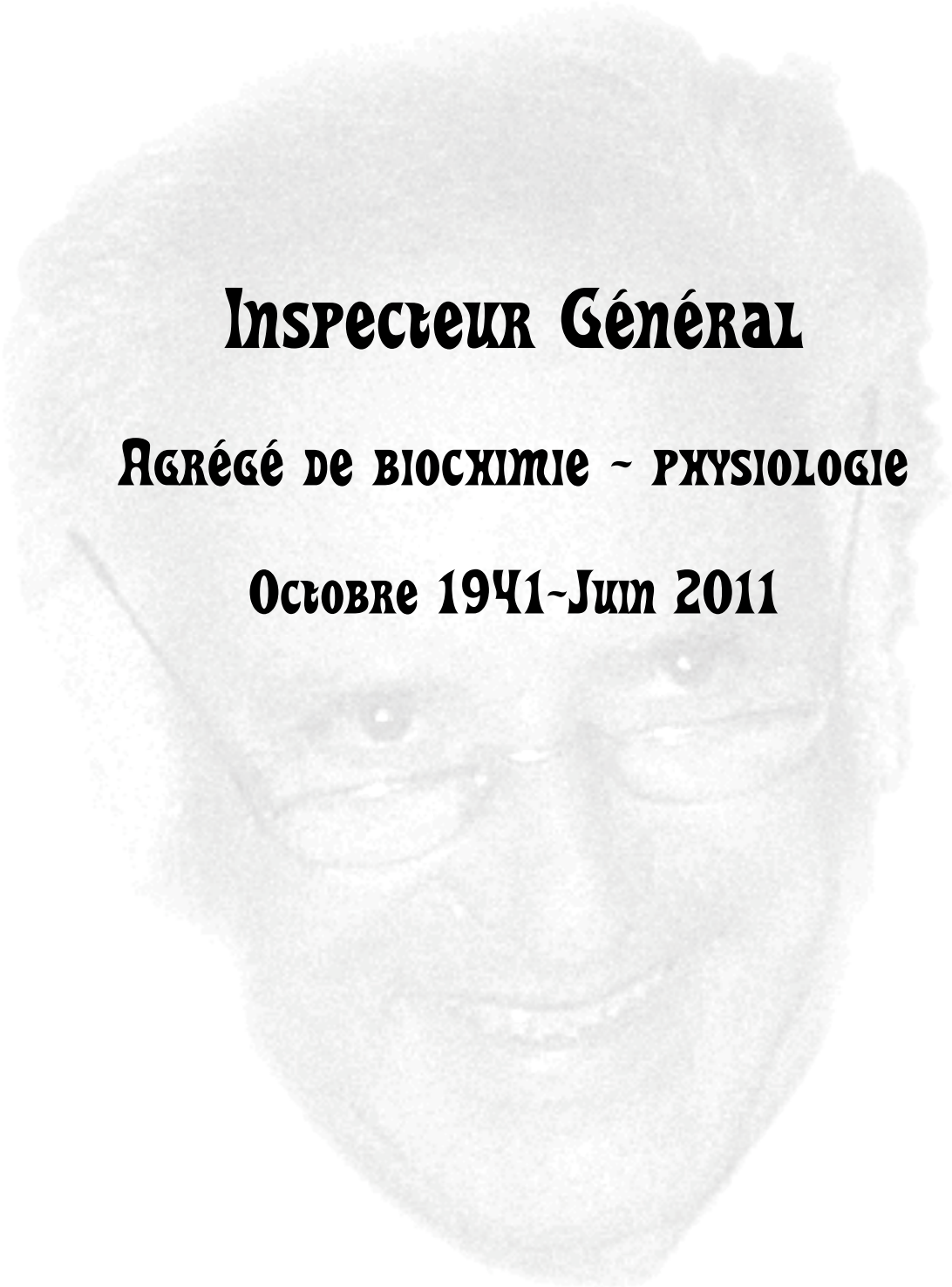
Coefficient 2

L'ARN polymérase du phage T7, un outil performant en biotechnologies »

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

En hommage à

Jean Figarella



Inspecteur Général

Agrégé de biochimie ~ physiologie

Octobre 1941~Juin 2011

SOMMAIRE

1EXTRACTION ET PURIFICATION DES ARN POLYMERASES SAUVAGE ET MUTEE 1

1.1 ..... PREPARATION D'UN EXTRAIT BRUT PAR LYSE CELLULAIRE 2

1.1.1 ..... PRINCIPE 2
1.1.2 ..... MODE OPERATOIRE 2
1.1.3 ..... COMPTE-RENDU 2

1.2 ..... PURIFICATION DES PROTEINES ETIQUETEES. 3

1.2.1 ..... PRINCIPE 3
1.2.2 ..... MODE OPERATOIRE 3
1.2.3 ..... COMPTE-RENDU 4

2 ..... ANALYSE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DE LA PURIFICATION 4

2.1 ..... DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE FOLIN-LOWRY 4

2.1.1 ..... PRINCIPE 4
2.1.2 ..... MODE OPERATOIRE 4
2.1.3 ..... COMPTE-RENDU 5

2.2 ..... ANALYSE DE LA COMPOSITION DES FRACTIONS ISSUES DES PURIFICATIONS PAR SDS-PAGE 5

2.2.1 ..... PRINCIPE 5
2.2.2 ..... MODE OPERATOIRE 5
2.2.3 ..... COMPTE-RENDU 6

3DESSALAGE ET CONCENTRATION DE LA FRACTION « E » SELECTIONNEE POUR L'ARN POLYMERASE DU PHAGE T7 SAUVAGE ET TETRAMUTEE .. 6

3.1 ..... METHODE VIVASPIN™ 6

3.1.1 ..... PRINCIPE 6
3.1.2 ..... MODE OPERATOIRE 6

3.2 ..... DOSAGE DES PROTEINES DANS LES FRACTIONS CONCENTREES ET DESSALEES 7

4ANALYSE DE LA STRUCTURE PROTEIQUE DES ENZYMES SAUVAGE ET TETRAMUTEE PAR TRYPSINOLYSE MENAGEE. 7

4.1 ..... PRINCIPE 7

4.2 ..... MODE OPERATOIRE 7

4.3 ..... COMPTE-RENDU 9

5 ... COMPARAISON DE LA THERMOSTABILITE DES ARN POLYMERASES SAUVAGE (WT) ET TETRAMUTEE (M4) DU PHAGE T7. 9

5.1 ..... PRINCIPE 9

5.2 ..... PROTOCOLE 9

5.2.1 .... MODE OPERATOIRE DU TRAITEMENT THERMIQUE D'UNE SOLUTION D'ENZYME 9
5.2.2TEST DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE L'ARN POLYMERASE DU PHAGE T7 SAUVAGE OU MUTEE 10

5.3 ..... COMPTE-RENDU 11

REMERCIEMENTS 12

ANNEXES 14

ANNEXE 1
Structures protéiques de l'ARN polymérase du phage T7 14
ANNEXE 2
La technologie NASBA 14
ANNEXE 3
Molécules de la chromatographie Ni-NTA 17
ANNEXE 4
Principe du dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry (Modified Lowry Protein Assay) 18
ANNEXE 5 :
Caractéristiques du système électrophorétique SDS-PAGE utilisé 20
ANNEXE 6
Marqueurs de poids moléculaire 22
ANNEXE 7
Extrait de « Technical Manual Riboprobe® in vitro transcription Systems » 24
ANNEXE 8
Fiche technique du pGEM® Express Positive Control Template 29
ANNEXE 9
Préparation d'un gel d'agarose à 2 % en tampon TAE 1x 31
ANNEXE 10
Représentations tridimensionnelles de l'ARN polymérase du phage T7 32

Le phénomène de transcription est un mécanisme biologique fondamental dans l'expression du génome, il est catalysé par une ARN polymérase ADN dépendante. L'enzyme ARN polymérase du phage T7 est une ARN polymérase ADN dépendante codée par un gène situé au locus 1 de l'ADN du bactériophage T7.
L'ARN polymérase du phage T7 est une protéine monomérique de 883 acides aminés (structure primaire en **ANNEXE 1a**) ayant un poids moléculaire de 98,6 kDa. L'enzyme du phage T7 reconnaît uniquement le promoteur de l'ADN du phage T7. Elle ne nécessite pas de facteurs auxiliaires pour initier la transcription (structure tridimensionnelle **ANNEXE 1b**).
Elle est particulièrement efficace et synthétise l'ARN_m cinq fois plus vite que l'ARN polymérase d'*Escherichia coli*.
La transcription *in vitro* à l'aide d'ARN polymérases d'origine phagique est devenue un procédé largement exploité en biologie moléculaire. La première application est la transcription *in vitro* seule en tant que procédé destiné à produire rapidement de large quantité de transcrits éventuellement marqués. Une deuxième application consiste en l'utilisation des ARN polymérases dans des mécanismes d'amplification des acides nucléiques à des fins diagnostiques, comme c'est le cas de la technologie NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) dont le principe est schématisé en **ANNEXES 2a et 2b**.
Au cours de cette épreuve, nous nous proposons d'étudier différents aspects de la stabilité de l'ARN polymérase du phage T7 sauvage ou mutée, produite par voie recombinante dans la bactérie *E. coli*.

Les principales étapes expérimentales à réaliser sont les suivantes :

- Extraction et purification des deux ARN polymérases étiquetées.
- Analyse quantitative et qualitative des protéines extraites et/ou purifiées :
  - dosage des protéines,
  - analyse de la composition des fractions d'extraction et de purification par SDS-PAGE.
- Analyse de la structure protéique des ARN polymérases sauvage et tétramutée par trypsinolyse ménagée (SDS-PAGE).
- Comparaison de la thermostabilité des ARN polymérases sauvage et tétramutée du phage T7.

Les gènes codant pour l'ARN polymérase du phage T7 sauvage (WT) et pour l'ARN polymérase du phage T7 tétramutée (M4) ont été clonés dans le plasmide pMR-7cas dans le but d'obtenir une production de protéines étiquetées en C-terminal par une chaîne de 6 histidines. Les plasmides pMR-7cas-WT et pMR-7cas-M4 ainsi obtenus, ont permis de transformer des bactéries compétentes de la souche *E. coli* BL21.
Le candidat dispose de deux culots congelés correspondant chacun à 50 mL d'une culture induite de « WT » et d'une culture induite de « M4 ».

Chaque production a été obtenue selon les étapes suivantes :

-Préculture de nuit en milieu LB (Luria Bertani) à 30°C additionné d'ampicilline à la concentration finale de 50 µg.mL^{-1}.
-Ensemencement de cette préculture dans 50 mL de milieu LB neuf additionné d'ampicilline à la concentration finale de 50 µg.mL^{-1} de façon à obtenir une densité optique à 600 nm de 0,1.
-Culture à 37°C pour obtenir une densité optique à 600 nm de 0,4.
-Induction de la synthèse cytoplasmique des deux enzymes WT et M4 par ajout d'IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) à la concentration finale de 0,4 mmol.L^{-1}.
-Culture à 37°C pendant 4 h sous agitation.
-Centrifugation de la culture pendant 20 minutes à 2500 g.
-Elimination du surnageant et congélation des culots à -80°C.

Extraction et purification des ARN polymérases sauvage et mutée

Les culots bactériens WT et M4 doivent être traités en parallèle.
Les modes opératoires fournis correspondent au traitement d'un culot bactérien.

Préparation d'un extrait brut par lyse cellulaire

Principe

La lyse cellulaire est assurée par action mécanique de billes de verre traitées à l'acide.

Mode opératoire

-Attendre la décongélation complète du culot en le plaçant sur la paillasse.

-Reprendre le culot décongelé dans 2 mL de tampon de lyse.

-Homogénéiser la suspension obtenue à l'aide du Vortex et/ou par aspirations-refoulements.

-Ajouter 1 g de billes de verre (masse contenue dans le microtube fourni).

-Procéder à 5 cycles de lyse mécanique en suivant les deux étapes suivantes :

- agiter au Vortex à température ambiante pendant 1 minute à la puissance maximale,
- placer le tube 1 minute dans la glace.

Remarque : ***le tube doit être placé au centre de l'embase en caoutchouc du Vortex avec un angle de 30 à 45°C. Il faut tenir légèrement le tube au niveau du bouchon et bien veiller à laisser le liquide monter et redescendre vigoureusement. Dans ce but, faire régulièrement varier la pression exercée sur le tube.***

-Centrifuger 5 minutes à 2000 g à 4°C.

-Homogénéiser délicatement le contenu du tube par aspirations-refoulements et transvaser équitablement l'ensemble de la suspension et des billes dans deux microtubes de 2 mL.

-Rincer le tube avec 1 mL de tampon de lyse et répartir le volume de rinçage dans les deux microtubes précédents.

-Centrifuger 15 minutes à 12 000 g à 4°C.

-Prélever délicatement la totalité du surnageant et le transférer dans une seringue équipée d'un filtre 0,2 µm.

-Filtrer le surnageant et récupérer le filtrat dans un tube à hémolyse.

-Prélever une fraction de 100 µL de l'extrait brut EB filtré et le stocker dans la glace.

-Estimer le volume d'extrait brut EB filtré restant et le stocker dans la glace.

Réactifs :

- *« Tampon de lyse » : Tris 50 mmol.L^{-1} pH8 NaCl 300 mmol.L^{-1}*
- *2 microtubes contenant 1 g de billes chacun*

Compte-rendu

Q 1- Noter le volume d'extrait brut filtré restant.

Q 2- Expliquer les avantages et les inconvénients de la technique de lyse choisie.

Q 3- Proposer le principe d'une autre technique de lyse qui aurait pu être utilisée.

Purification des protéines étiquetées.

Principe

Le système **QIAexpress Ni-NTA Agarose** (QIAGEN) est constitué d'un chélateur de nickel (l'acide NitriloAcétique) couplé à une résine support de type Sepharose CL-6B. L'ion Ni^{2+} de valence 6 est complexé par quatre liaisons à l'acide NitriloTriAcétique (NTA) ce qui permet d'éviter la désorption du nickel et assure à la résine, *via* les deux valences du nickel restantes, une capacité de fixation aux résidus histidine de protéines étiquetées. Les formules de la résine Ni-NTA, de l'histidine et de l'imidazole sont en **ANNEXES 3a, 3b et 4c**.

Mode opératoire

Précautions à prendre

L'ensemble des dépôts est effectué délicatement à la surface de la résine en évitant de la remettre en suspension. Par ailleurs il est important de ne pas laisser la résine s'assécher.

Mode opératoire de préparation d'une colonne

- Prélever un volume de 1 mL de résine Ni-NTA 50% préalablement remise délicatement en suspension et le transférer dans la colonne fermée.
- Laisser sédimenter puis laisser s'écouler le surnageant jusqu'à affleurement à la surface de la résine.
- Déposer successivement un volume de 5 mL d'eau distillée et un volume de 5 mL de tampon de lyse.
- Arrêter l'écoulement lorsque le tampon de lyse affleure à la surface de la résine.

Mode opératoire de purification d'un extrait brut filtré

-Déposer l'ensemble de l'extrait brut EB filtré restant sur la résine.

-Ouvrir la pince de Mohr et laisser s'écouler la phase mobile à un débit d'environ 6 gouttes par minute jusqu'à affleurement de la résine et recueillir cette fraction appelée « NR ». La stocker dans la glace.

-Déposer 5 mL de tampon de lyse, le laisser s'écouler à un débit d'environ 6 gouttes par minute et recueillir cette fraction appelée « L1 ». La stocker dans la glace.

-Déposer 5 mL de tampon de lavage, le laisser s'écouler à un débit d'environ 6 gouttes par minute et recueillir cette fraction appelée « L2 ». La stocker dans la glace.

-Arrêter l'écoulement de la phase mobile.

-Ajouter 5 mL de tampon d'élution et récupérer 5 fractions de 0,5 mL (notées « E1 » à « E5 ») en laissant s'écouler la phase mobile à un débit d'environ 6 gouttes par minute. Stocker les fractions dans la glace.

-Arrêter l'écoulement de la phase mobile.

Régénération de la colonne

-Ajouter 2 volumes de 10 mL de solution de NaOH de concentration 0,5 $mol.L^{-1}$ et les laisser s'écouler très lentement (débit d'environ 10 gouttes par minute).

-Ajouter un volume de 5 mL d'éthanol à 30 % et le laisser s'écouler comme précédemment.

-Ajouter un volume de 1 mL d'éthanol à 50% et laisser s'écouler environ 0,5 mL, puis arrêter l'écoulement de la phase mobile.

-Homogénéiser délicatement par aspirations-refoulements la résine dans la colonne puis la transférer dans un tube à hémolyse.

-La stocker dans la glace.

Réactifs :

- *« Résine Ni-NTA 50% »*
- *« Tampon de lyse » : Tris 50 mmol.L^{-1} pH8 NaCl 300 mmol.L^{-1}*
- *« Tampon de lavage » : Tris 50 mmol.L^{-1} pH8 NaCl 300 mmol.L^{-1} Imidazole 20 mmol.L^{-1}*
- *« Tampon d'élution » : Tris 50 mmol.L^{-1} pH8 NaCl 300 mmol.L^{-1} Imidazole 200 mmol.L^{-1}*
- *« NaOH » 0,5 mol.L^{-1}*
- *« Ethanol à 30% »*
- *« Ethanol à 50% ».*

Compte-rendu

Q4- A l'aide des informations fournies concernant la stratégie de production par voie recombinante des deux enzymes, représenter schématiquement la carte du plasmide d'expression pMR-cas-WT ou M4.

Q5- Réaliser un schéma présentant les liaisons mises en jeu lors des différentes étapes de la chromatographie sur colonne Ni-NTA (Nickel-NitryloTriAcetique).

Q6- Expliquer le rôle de chacune des étapes mises en œuvre lors de la purification.

Q7- Commenter la spécificité et l'intérêt de cette méthode de chromatographie.

Analyse quantitative et qualitative de la purification

Dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry

Principe

Les protéines totales seront dosées à l'aide de la méthode de Folin-Lowry dont le principe est présenté en **ANNEXE 4**. Le protocole d'extraction utilisé permet d'obtenir environ 1,5 g.L^{-1} de protéines totales dans l'extrait brut. Les protéines étiquetées contenues dans la fraction d'élution « E » la plus concentrée représentent environ 30% des protéines totales. Deux dosages doivent être effectués par la méthode de Folin-Lowry : un, en fin de purification pour identifier la fraction « E » la plus concentrée, et un second, après concentration de cette fraction « E » par Vivaspin^{TM} (partie 3). ***Le premier dosage doit être réalisé par comparaison à une gamme d'étalonnage, le second par comparaison à un étalon unique.***

Mode opératoire

-Réaliser en eau physiologique sous un volume de 200 µL, à partir de la solution étalon de sérum albumine bovine, une gamme d'étalonnage allant de 0 à 100 µg.

-Réaliser le dosage en introduisant un volume total de 200 µL de chaque extrait brut filtré et de chaque fraction obtenue lors de la purification : fractions de lavage non diluées et fractions EB, NR et E1 à E5 diluées.

-Ajouter 1 mL de solution réactive.

-Ajouter 100 µL de réactif de Folin.

-Incuber à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 minutes.

-Mesurer l'absorbance contre un/des témoin(s) de compensation adapté(s).

Pour chaque protéine purifiée, choisir la fraction « E » la plus concentrée qui sera utilisée pour les tests de trypsinolyse (partie 4) et de thermostabilité (partie 5).

Données : le réactif de Folin-Lowry interfère avec l'imidazole pour une concentration en imidazole supérieure à 8 mmol.L^{-1} dans le milieu final de coloration.

Réactifs :

- *Solution étalon de SAB (Sérum Albumine Bovine) à 0,5 g.L^{-1}.*
- *Solution réactive en distributeur.*
- *Réactif de Folin en tube à hémolyse.*
- *Eau physiologique.*

Compte-rendu

Q8- Justifier la composition du/des témoin(s) de compensation utilisé(s).

Q9- Commenter l'interférence de l'imidazole avec les réactifs de la coloration par la méthode de Folin-Lowry.

Q10- Calculer la concentration protéique de chaque extrait brut filtré et de chaque fraction de purification.

Q11- Justifier le choix de la fraction « E » retenue.

Q13- Calculer et commenter le rendement de récupération des protéines étiquetées pour la fraction « E » choisie.

Analyse de la composition des fractions issues des purifications par SDS-PAGE

Principe

L'analyse de la composition des fractions se fait à l'aide de la technique électrophorétique SDS-PAGE en conditions dénaturantes en présence de 2-mercapto-éthanol. Les caractéristiques du système électrophorétique utilisé sont en **ANNEXE 5**. La composition du marqueur de taille est en **ANNEXE 6**.

Mode opératoire

Remarque : le candidat dispose d'un gel SDS-PAGE doté de 15 puits pour le suivi des deux purifications (6 puits) et l'analyse de ses résultats de trypsinolyse (8 puits).
L'ensemble des échantillons, fractions de purification et de trypsinolyse, doit être déposé en une seule fois selon le plan de dépôts fourni avec le matériel d'électrophorèse.
Traitement avant dépôt des extraits bruts et des fractions « NR » et « E » :

-Dans un microtube, introduire 18 µL d'échantillon et 6 µL de tampon de charge 4x.

- Chauffer 5 minutes à 95°C.

-Placer dans la glace jusqu'au dépôt.

Dépôts

-Déposer 15 µL de chaque échantillon selon le plan de dépôt fourni.

-Déposer 10 µL de marqueur de taille.

Réactifs :

- *Tampon de charge 4x : « SB 4x ».*
- *Marqueur de taille Broad Range (près du poste de dépôt sur gel).*

Compte-rendu

Q14- Analyser et commenter les profils d'électrophorèse obtenus pour les suivis de purification.

Q15- Conclure sur la pertinence des conditions expérimentales de purification choisies. Proposer éventuellement des points d'amélioration.

Dessalage et concentration de la fraction « E » sélectionnée pour l'ARN polymérase du phage T7 sauvage et tétramutée

Méthode Vivaspin™

Principe

La méthode Vivaspin™ est une méthode fondée sur l'utilisation de microtubes pourvus d'une membrane de filtration caractérisée par un seuil de coupure pré-déterminé : les molécules dont le poids moléculaire est supérieur au seuil du filtre sont retenues par la membrane. La filtration est effectuée par centrifugation. La composition du milieu filtré peut également être modifiée par rechargement de l'unité de filtration Vivaspin™ avec un tampon différent, suivi d'une nouvelle étape de centrifugation.
Des unités de concentration Vivaspin™ 500 sont utilisées pour concentrer les fractions « E » sélectionnées d'ARN polymérase WT et M4 du phage T7. La qualité de la membrane permet d'atteindre des vitesses de centrifugation élevées. Les unités Vivaspin™ peuvent être utilisées dans une gamme de pH de 1 à 9. La vitesse de filtration est influencée par différents paramètres, dont le pH, la température, le seuil de coupure de la membrane, la concentration et la viscosité de l'échantillon.
Pour être certain de récupérer le maximum de protéine d'intérêt, il convient de choisir un seuil de coupure qui soit inférieur au minimum à 50 % de sa masse moléculaire.

Mode opératoire

Attention, il est impératif de ne pas laisser la membrane s'assécher.
Procéder par centrifugations successives de manière à obtenir un facteur de concentration/dessalage d'environ 4 fois par rapport au volume initial de la fraction « E » traitée.

Transférer la totalité de chacune des deux fractions « E » sélectionnées dans chacun des tubes Vivaspin™.

-Procéder à une première centrifugation de 3 minutes à vitesse maximale.

-Contrôler le niveau de volume restant dans le compartiment supérieur.

-Procéder à une seconde centrifugation en réduisant sa durée si nécessaire.

-Stopper le processus de concentration quand le volume résiduel dans le compartiment supérieur est compris entre 50 et 100 µL.

-Ajouter 500 µL de tampon de lyse.

-Renouveler l'étape de centrifugation autant que nécessaire.

-Homogénéiser le volume résiduel dans le compartiment supérieur par aspirations/refoulements.

-Transférer chaque volume concentré/dessalé dans un nouveau microtube.

-Stocker dans la glace.

Réactif :

- *« Tampon de lyse » : Tris 50 mmol.L^{-1} pH8 NaCl 300 mmol.L^{-1}*

Dosage des protéines dans les fractions concentrées et dessalées

Procéder à un nouveau dosage par la méthode Folin-Lowry, selon le protocole précédemment décrit (cf. 2.1.2) par comparaison à un étalon unique judicieusement choisi.

Q16- Calculer la concentration protéique de chacune des fractions concentrées.

Analyse de la structure protéique des enzymes sauvage et tetramutée par trypsinolyse ménagée.

Principe

On utilise la trypsine afin d'étudier et de comparer la structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase sauvage ou mutée du phage T7. Pour visualiser l'action ménagée de la trypsine sur gel SDS-PAGE, 36 µg de protéine WT ou M4 doivent être traitées par une quantité massique de trypsine correspondant au 1/1500 de la quantité massique des protéines à hydrolyser. Différentes durées de trypsinolyse seront étudiées.

Mode opératoire

Pour chaque fraction protéique purifiée, concentrée, dessalée et dosée (WT et M4), la trypsinolyse ménagée est réalisée dans un tube unique sous un volume de milieu réactionnel de 60 µL.
La réaction est arrêtée par prélèvement et transfert de 10 µL de milieu réactionnel aux temps 3, 7 et 15 minutes dans un microtube contenant 5 µL de solution inhibitrice de protéases (Pefabloc®) appelée solution d'arrêt.
Prévoir en parallèle un protocole adapté pour réaliser un essai au temps 0 (t_0).

Le milieu réactionnel nécessaire pour la réalisation des différents expériences de trypsinolyse est composé de :

- 36 µg de protéine purifiée et dosée WT ou M4.
- z µL d'EDTA 10 mmol.L^{-1} pour avoir 1 mmol.L^{-1} final.
- y µL d'eau (BM RNase free) pour compléter le volume de réaction à 60 µL

Les réactions de trypsinolyse ménagées sont réalisées comme suit :

- Déclencher la protéolyse par l'ajout dans le milieu réactionnel d'un volume z de trypsine adéquat.
- Incuber à 37°C aux différentes durées demandées.
- Arrêter la réaction par transfert de 10 µL de milieu réactionnel dans un tube contenant 5 µL de solution d'arrêt.
- Homogénéiser par aspirations-refoulements et placer dans la glace au moins 10 minutes.
- Ajouter 5 µL de tampon de charge 4x.
- Chauffer 5 minutes à 95°C.
- Maintenir dans la glace jusqu'au dépôt sur gel SDS-PAGE.
- Déposer 15 µL de chaque test dans les puits du gel SDS-PAGE fourni en suivant le plan de dépôts fourni. ***(A réaliser en même temps que le dépôt du 2.2.2.)***

La migration et la coloration du gel est réalisée comme suit :

- Appliquer un voltage de 200V et laisser migrer pendant 40 minutes.
- A la fin de la migration, récupérer le gel d'acrylamide en suivant les instructions fournies en **ANNEXE 5c**.
- Le déposer dans un grand volume d'eau distillée pendant 10 minutes.
- Le transférer dans la boîte de Petri carrée contenant la solution de coloration Bio-Safe™ Coomassie Stain.
- Laisser agir 30 minutes.
- Transférer le gel dans un grand volume d'eau distillée pendant 10 minutes.
- Renouveler le bain d'eau distillée et agiter régulièrement. Les bandes commencent à apparaître au bout de 40 minutes environ.

Réactifs :

- *EDTA 10 m mmol.L^{-1}.*
- *Trypsine : 20 ng.µL^{-1}.*
- *Solution d'arrêt : Pefabloc®12 mmol.L^{-1}.*
- *Tampon de charge 4x : « SB 4x ».*
- *Eau BM RNase free.*
- *Bio-Safe™ Coomassie Stain (ANNEXE 5b)*

Compte-rendu

Q17- Donner le principe général de la trypsinolyse ménagée.

Q18- A partir de la séquence primaire et de la structure tertiaire de l'ARN polymérase du phage T7 fournie en **ANNEXES 1a**, **1b**, et **10a** expliquer les profils de trypsinolyse obtenus pour WT et M4. Proposer une interprétation aux différences de résultats de trypsinolyse pour WT et M4.

Comparaison de la thermostabilité des ARN polymérases sauvage (WT) et tétramutée (M4) du phage T7.

Principe

L'activité de transcription de chaque enzyme extraite, purifiée, concentrée et dessalée WT et M4 est analysée après traitement thermique à trois températures différentes : 37°C, 44°C et 48°C.
L'activité transcriptionnelle est détectée à l'aide du kit « Riboprobe® *in vitro* Transcription Systems » dont un extrait de la fiche technique est en **ANNEXE 7**. Le plasmide pGEM (**ANNEXE 8**) inclus dans le kit, est utilisé comme substrat pour tester l'activité de la T7 ARN polymérase sauvage ou tétramutée de la fraction « E » choisie.
Le volume final de milieu réactionnel de la transcription est réduit à 11 µL au lieu de 20 µL.
Un contrôle positif est également réalisé à l'aide d'une ARN polymérase du phage T7 du commerce.
Il est indispensable de porter des gants, d'utiliser des microtubes stériles au cours de la manipulation afin d'éviter la contamination par des RNases.

Protocole

Le protocole présente les modes opératoires de traitement thermique des enzymes puis de transcription. L'ensemble de ces expériences fera appel à la réalisation d'un pré-mix (cf. 5.2.2.1).
Les solutions finales d'enzymes seront réalisées dans le tampon de transcription, alors que le reste des réactifs sera apporté par ajout de 7,5 µL du pré-mix (cf. 5.2.2.2).

Mode opératoire du traitement thermique d'une solution d'enzyme

Pour chaque réaction de traitement thermique, dans un microtube, introduire :

- 1,5 µL d'enzyme extraite et purifiée, de concentration ajustée à 0,10 µg/µL par dilution en eau « RNase free ».
- 2 µL de tampon de transcription.
- Mélanger par aspirations-refoulements.
- Placer les tubes pendant 5 min dans la glace.
- Incuber pendant 5 minutes soit à 37°C, soit à 44°C, soit à 48°C.
- Placer dans la glace pendant 5 minutes
- Centrifuger quelques secondes.
- Stocker dans la glace.

Pour le contrôle positif : remplacer l'enzyme extraite et purifiée par 20 unités de l'ARN polymérase du phage T7 du commerce et incuber uniquement à 37°C.

Test de l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase du phage T7 sauvage ou mutée

Le pré-mix contient le DTT, la RNasine, les quatre rNTPs et le plasmide pGEM. Un volume de 7,5 µL de ce pré-mix est ajouté à chaque volume de 3,5 µL d'enzyme traitée thermiquement.
De manière à avoir suffisamment de volume de pré-mix, il est conseillé de préparer un volume de pré-mix nécessaire à la réalisation de 8 réactions au lieu des 7 nécessaires.

Préparation du pré-mix

Préparer le pré-mix sachant que chaque réaction de transcription contient les réactifs suivants à ajouter en respectant l'ordre indiqué ci-dessous :

- Un volume de z µL d'eau « BM RNase-Free » nécessaire pour obtenir un volume final de 7,5 µL.
- 1 µL de DTT 100 $mmol.L^{-1}$.
- 10 unités de RNasin de concentration 40 $unités.\mu L^{1}$.
- 0,4 µg de plasmide pGEM de concentration 0,5 $\mu g.\mu L^{1}$.
- y1, y2, y3 et y4 µL de chaque rNTP 10 $mmol.L^{-1}$ de manière à avoir une concentration finale de 0,5 $mmol.L^{-1}$ de chaque ribonucléotide triphosphate dans les 11 µL de milieu de transcription.
- Agiter au Vortex puis centrifuger quelques secondes.
- Stocker dans la glace.

Mode opératoire de la réaction de transcription

Pour chaque microtube contenant les enzymes traitées thermiquement :

-Ajouter 7, 5 µL de pré-mix.

-Mélanger par aspirations-refoulements.

-Incuber immédiatement pendant 1 h à 37°C.

-Agiter au Vortex puis centrifuger quelques secondes.

-Conserver les produits de transcription dans la glace jusqu'à analyse sur gel d'agarose.

Analyse des produits de transcription par électrophorèse sur gel d'agarose

Le gel d'agarose est à préparer par le candidat en suivant les instructions de l'ANNEXE 9.

Pour chaque microtube contenant les produits de transcription :

-Homogénéiser brièvement au Vortex.

-Centrifuger quelques secondes.

-Ajouter 30 µL de tampon ARN.

-Agiter au Vortex.

-Incuber pendant 10 min à 69°C.

-Centrifuger quelques secondes.

-Ajouter 10 µL de tampon de charge ARN 4x.

-Agiter au Vortex.

-Centrifuger quelques secondes.

-Déposer 15 µL de chaque test de transcription par puits de gel d'agarose 2% en respectant le plan de dépôt fourni.

-Laisser migrer pendant 20 minutes en appliquant un voltage de 80V.

La photographie du gel est réalisée par un examinateur.

Réactifs :

- *Solution de plasmide pGEM à 0.5 µg.µL^{-1}*
- *Tampon de transcription 5x*
- *Eau BM RNase free*
- *DTT 100 mmol.L^{-1}*
- *RNasin 40 unités.µL^{1}*
- *rATP 10 mmol.L^{-1}*
- *rCTP 10 mmol.L^{-1}*
- *rGTP 10 mmol.L^{-1}*
- *rUTP 10 mmol.L^{-1}*
- *ARN polymérase du phage T7 commerciale 20 U.µL^{1}*
- *Tampon ARN*
- *Tampon de charge ARN 4x*
- *GelRed 10 000x*
- *TAE 20x*
- *Agarose en poudre (à côté des balances)*

Compte-rendu

Q19- Préciser l'intérêt du traitement à 69°C avant le dépôt sur gel.
Q20- A partir de la fiche technique du plasmide fournie en **ANNEXE 8**, expliquer la présence des deux bandes observées
Q21- A l'aide des **ANNEXES 10a** et **10b** fournies décrivant la structure tertiaire du tétramutant M4 de l'ARN polymérase du phage T7, ainsi que la position et la nature des quatre résidus d'acides aminés mutés :

Q21a- Émettre une/des hypothèse(s) permettant de relier les mutations à la thermostabilisation du tétramutant M4.

Q21a- Proposer une stratégie d'obtention du tétramutant.

Q22- A l'aide des **ANNEXES 2a** et **2b** fournies décrivant la technologie NASBA :

Q22a- Expliquer le principe général de cette technique de détection et le rôle des différentes enzymes.

Q22b- Justifier en quoi le fait d'utiliser un mutant plus stable à la dénaturation thermique constitue un avantage pour la technologie NASBA.

Q22c- Enoncer des avantages et inconvénients de cette technique par rapport à la RT-PCR.

REMERCIEMENTS

Le jury de l'épreuve de travaux pratiques de l'épreuve d'agrégation externe de Biochimie et Génie Biologique 2011, remercie vivement les membres du Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé (LIAS) à l'Institut de Biologie et Technologie du CEA de Saclay, qui ont contribué à la conception de ce sujet :

- Jean-Claude BOULAIN,
- Narciso COSTA, et
- Alexandra SAVATIER.

Il remercie également le personnel technique du lycée PGDG-ENCPB pour leur assistance technique au cours du TP.

ANNEXES

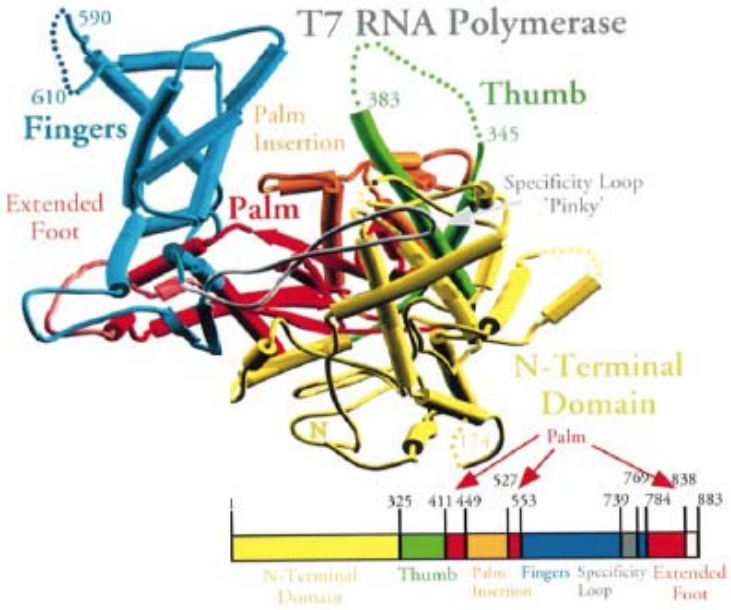
ANNEXE 1

Structures protéiques de l'ARN polymérase du phage T7

ANNEXE 1a : structure primaire de l'ARN polymérase du phage T7

```
1     mntiniaknd  fsdielaaip  fntladhyge  rlareqlale  hesyemgear  frkmferqlk
61    agevadnaaa  kplittllpk  miarindwfe  evkakrgkrp  tafqflqeik  peavayitik
121   ttlacltsad  nttvqavasa  igraiedear  fgrirdleak  hfkknveeql  nkrvghvykk
181   afmqvveadm  lskgllggea  wsswhkedsi  hvgvrcieml  iestgmvslh  rqnagvvgqd
241   setielapey  aeaiatraga  lagispmfqp  cvvppkpwtg  itgggywang  rrplalvrth
301   skkalmryed  vympevykai  niaqntawki  nkkvlavanv  itkwkhcpve  dipaiereel
361   pmkpedidmn  pealtawkra  aaavyrkdka  rksrrislef  mleqankfan  hkaiwfpynm
421   dwrgrvyavs  mfnpqgndmt  kglltlakgk  pigkegyywl  kihgancagv  dkvpfperik
481   fieenhenim  acaksplent  wwaeqdspfc  flafcfeyag  vqhhglsync  slplafdgsc
541   sgiqhfsaml  rdevggravn  llpsetvqdi  ygivakkvne  ilqadaingt  dnevvtvtde
601   ntgeisekvk  lgtkalagqw  laygvtrsvt  krsvmtlayg  skefgfrqqv  ledtiqpaid
661   sgkglmftqp  nqaagymakl  iwesvsvtvv  aaveamnwlk  saakllaaev  kdkktgeilr
721   krcavhwvtp  dgfpvwqeyk  kpiqtrlnlm  flgqfrlqpt  intnkdseid  ahkqesgiap
781   nfvhsqdgsh  lrktvvwahe  kygiesfali  hdsfgtipad  aanlfkavre  tmvdtyescd
841   vladfydqfa  dqlhesqldk  mpalpakgnl  nlrdilesdf  afa
```

ANNEXE 1b : structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase du phage T7



Spécifique à l'ensemble des ARN polymérases de bactériophages

➥ *4 domaines structuraux ≈ « Main droite »: N-terminal, doigts, pouce, and paume.*

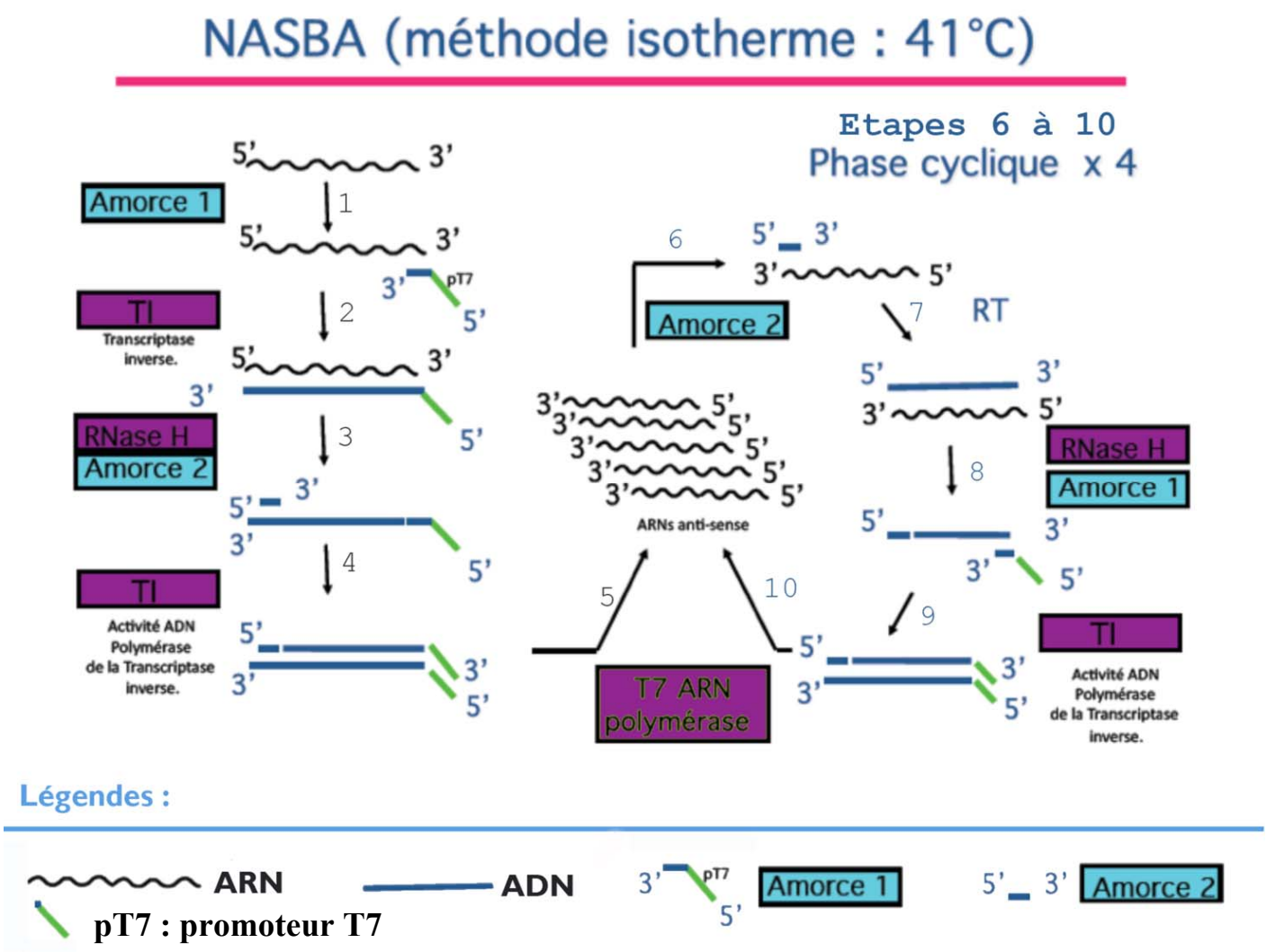
(D'après Jeruzalmi and Steitz EMBO 1998)

Identiques dans les ADN polymérases

ANNEXE 2

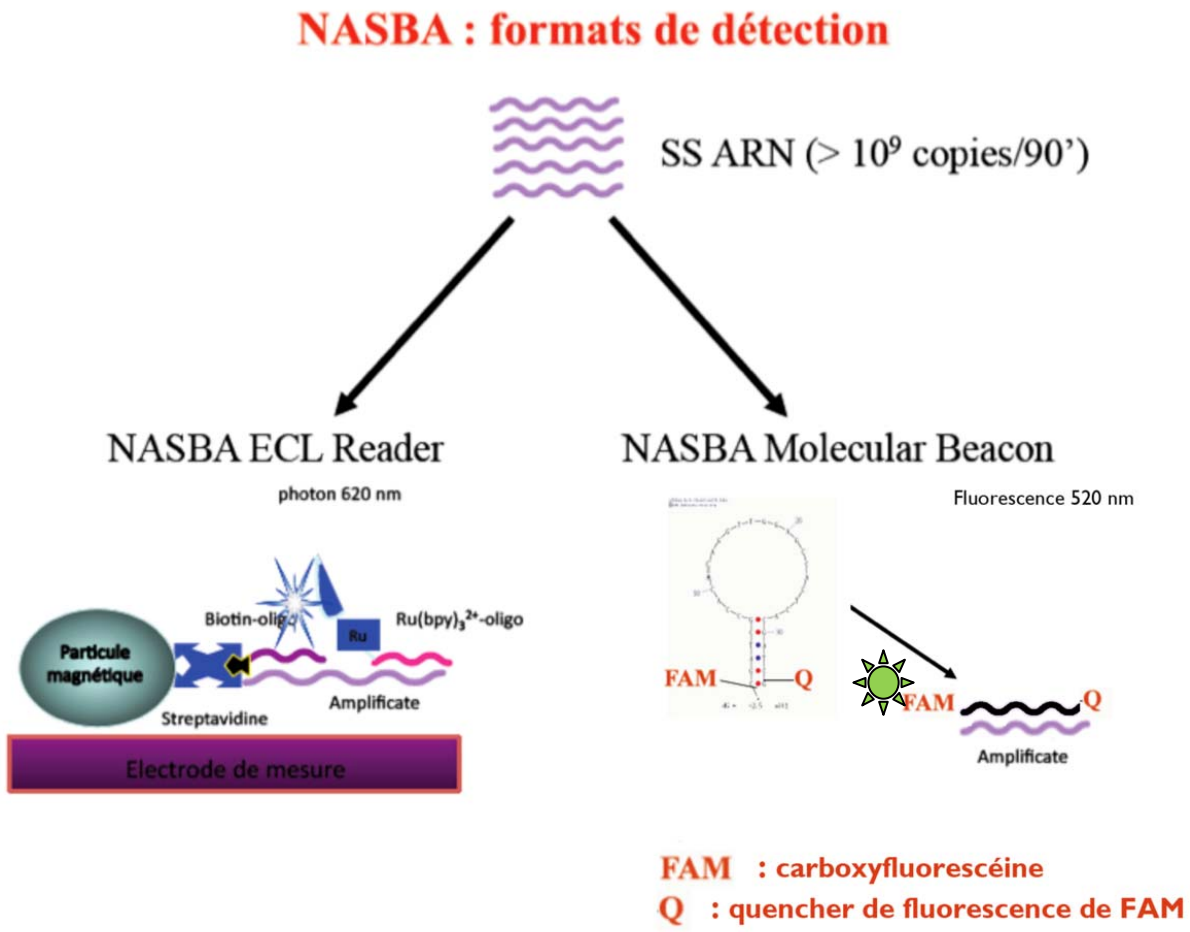
La technologie NASBA

ANNEXE 2a : principe général de la technologie NASBA



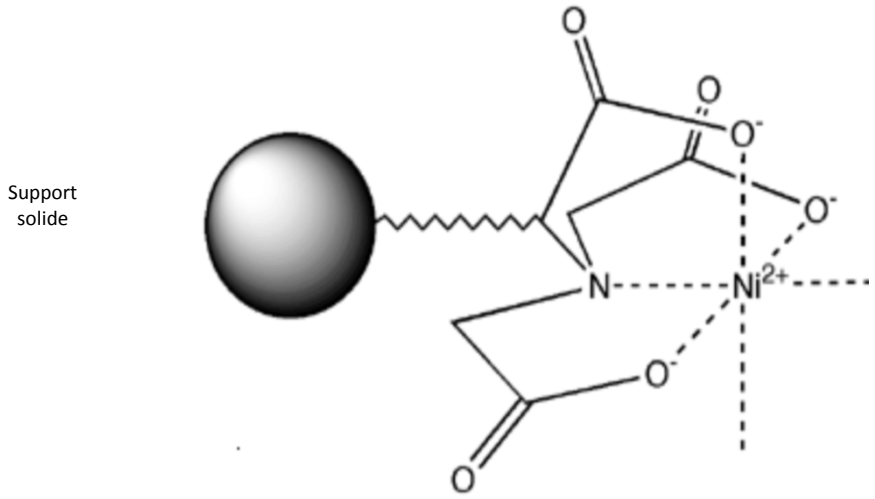
Remarque :
Des trois enzymes mises en jeu dans la technologie NASBA, l'ARN polymérase du phage T7 est celle qui est la moins thermostable. En effet, les deux autres enzymes restent actives jusqu'à des températures supérieures à 51°C.

ANNEXE 2b : stratégies de détection de la technologie NASBA.

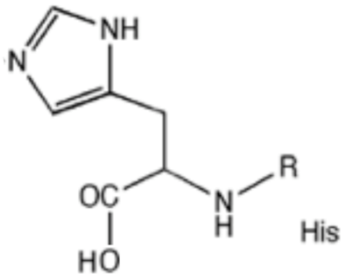


ANNEXE 3
Molécules de la chromatographie Ni-NTA

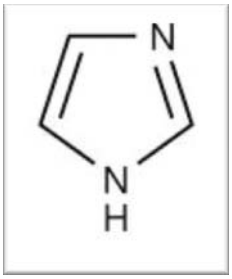
Annexe 3a : formule de la résine Ni-NTA.



Annexe 3b : formule de l'histidine.



Annexe 3c : formule de l'imidazole.



ANNEXE 4

Principe du dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry (Modified Lowry Protein Assay)

Extract from « Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook »

Modified Lowry Protein Assay

Although the mechanism of color formation for the Modified Lowry Protein Assay is similar to that of the BCA Protein Assay, there are several significant differences between the two.

In 1951 Oliver H. Lowry introduced this colorimetric total protein assay method. It offered a significant improvement over previous protein assays and his paper became one of the most cited references in the life science literature. The Modified Lowry Protein Assay uses a stable reagent that replaces two unstable reagents described by Dr. Lowry. The Modified Lowry assay is easy to perform because the incubations are done at room temperature and the assay is sensitive enough to allow the detection of total protein in the low microgram per milliliter range. Essentially, the Modified Lowry protein assay is an enhanced biuret assay involving copper chelation chemistry.

Chemistry of the Modified Lowry Protein Assay

Although the mechanism of color formation for the Modified Lowry Protein Assay is similar to that of the BCA Protein Assay, there are several significant differences between the two. The exact mechanism of color formation in the Modified Lowry Protein Assay remains poorly understood. It is known that the color-producing reaction with protein occurs in two distinct steps. As seen in Figure 1, protein is first reacted with alkaline cupric sulfate in the presence of tartrate during a 10-minute incubation at room temperature. During this incubation, a tetradentate copper complex forms from four peptide bonds and one atom of copper. The tetradentate copper complex is light blue in color (this is the "biuret reaction"). Following the incubation, Folin phenol reagent is added. It is believed that the color enhancement occurs when the tetradentate copper complex transfers electrons to the phosphomolybdic/phosphotungstic acid complex (the Folin phenol reagent).

The reduced phosphomolybdic/phosphotungstic acid complex produced by this reaction is intensely blue in color. The Folin phenol reagent loses its reactivity almost immediately upon addition to the alkaline working reagent/sample solution. The blue color continues to intensify during a 30-minute room temperature incubation. It has been suggested by Lowry, *et al.* and by Legler, *et al.* that during the 30-minute incubation, a rearrangement of the initial unstable blue complex leads to the stable final blue colored complex that has higher absorbance.

For small peptides, the amount of color increases with the size of the peptide. The presence of any of five amino acid residues (tyrosine, tryptophan, cysteine, histidine and asparagine) in the peptide or protein backbone further enhances the amount of color produced because they contribute additional reducing equivalents to further reduce the phosphomolybdic/phosphotungstic acid complex. With the exception of tyrosine and tryptophan, free amino acids will not produce a colored product with the Modified Lowry Reagent; however, most dipeptides can be detected. In the absence of any of the five amino acids listed above in the peptide backbone, proteins containing proline residues have a lower color response with the Modified Lowry Reagent due to the amino acid interfering with complex formation.

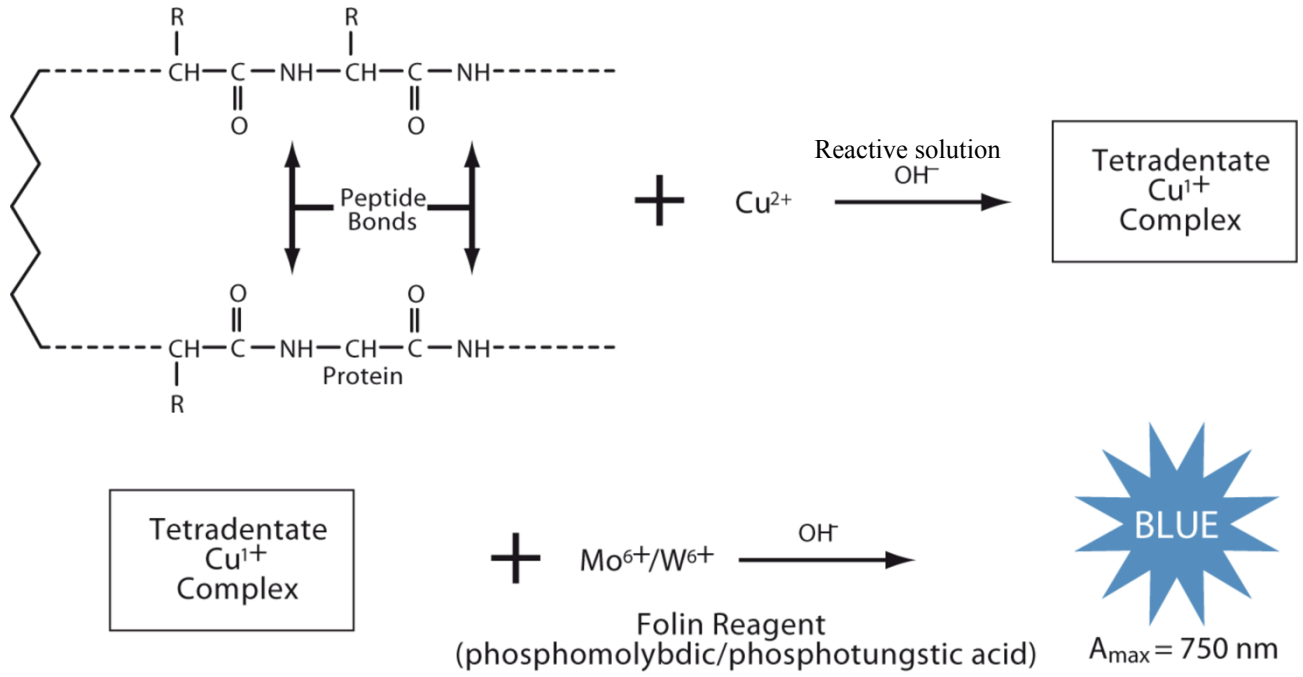


Schéma de la méthode modifiée de dosage des protéines selon Lowry.

Advantages of the Modified Lowry Protein Assay

The final blue color is optimally measured at 750nm, but it can be measured at any wavelength between 650nm and 750nm with little loss of color intensity. It is best to measure the color at 750nm because few other substances absorb light at that wavelength. The amount of light absorbed at 750nm is directly proportional to the amount of protein in the sample, but the color response curve produced is nonlinear. The sensitivity of the Modified Lowry Protein Assay is greatly enhanced over that of the biuret reagent. The working range of the method extends from 5 to 2,000mg/mL.

The Modified Lowry Protein Assay demonstrates less protein:protein variability than Coomassie-based assays. When comparing the standard curve responses between BSA and BGG, there is less than a 15% variation in the signal generated with these two standard proteins (Figure 2). The Coomassie Protein Assay demonstrates > 30% variation in the signal generated between BSA and BGG (Table 2, page 9).

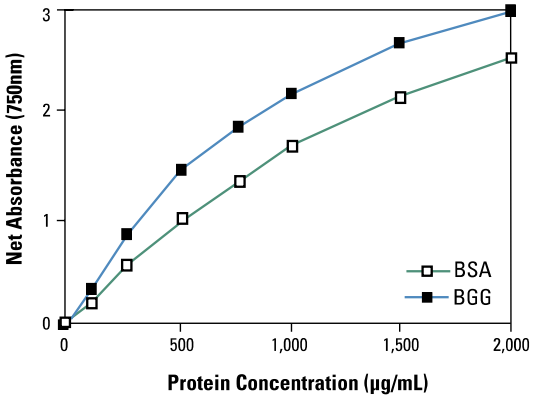


Figure 2. Color response curves obtained with the Thermo Scientific Pierce Modified Lowry Protein Assay Reagent using bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma globulin (BGG). The standard tube protocol was performed and the color was measured at 750nm.

Disadvantages of the Modified Lowry Protein Assay

The Modified Lowry Protein Assay will form precipitates in the presence of detergents or potassium ions. The problem of precipitation caused by the presence of potassium ions in the sample can sometimes be overcome by centrifuging the tube and measuring the color in the supernatant. Most surfactants will cause precipitation of the reagent even at very low concentrations. One exception is sodium dodecyl sulfate (SDS), which is compatible with the reagent at concentrations up to 1% in the sample. Chelating agents interfere by binding copper and preventing formation of the copper peptide bond complex. Reducing agents and free thiols also interfere by reducing the phosphotungstate-phosphomolybdate complex, immediately forming an intensely blue colored product upon their addition to the Modified Lowry Protein Assay Reagent.

ANNEXE 5 :

Caractéristiques du système électrophorétique SDS-PAGE utilisé

Extract from « Mini-PROTEAN ® Precast Gels Instruction Manual and Application Guide »

ANNEXE 5a : Principe du système électrophorétique

[...]

SDS-PAGE

3.1 Introduction

Mini-PROTEAN® TGX™ precast gels provide a versatile system for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), a gel electrophoretic technique that separates proteins according to their molecular weight.

SDS-PAGE relies on a discontinuous buffer system. Two ions of differing electrophoretic mobility (glycinate and chloride) form a moving boundary when voltage is applied. Proteins have an intermediate mobility, causing them to concentrate, or stack, into a narrow zone at the beginning of electrophoresis. As the boundary moves through the gel, the sieving effect of the polyacrylamide gel matrix causes different proteins to move at different rates. The stacking effect is responsible for the high resolving power of SDS-PAGE. The sample is loaded in a relatively broad zone, and the moving boundary concentrates the proteins into sharp bands prior to separation.

Protein samples for SDS-PAGE are prepared using SDS and a thiol reductant, usually 2-mercaptoethanol or dithiothreitol (DTT). SDS forms complexes with proteins giving them a rod like shape and similar charge to mass ratio. The reductant cleaves disulfide bonds between and within proteins allowing complete denaturation and dissociation. Heat treatment in the presence of SDS and reductant effectively eliminates the effects of 2° and 3° protein structure and native charge on electrophoretic mobility, so the migration distance depends primarily on molecular weight. Molecular mass is determined by plotting the logarithm of protein molecular mass vs. the relative mobility (R_f) of the protein (R_f = distance migrated by protein/distance relative to the dye front of the protein). Refer to tech notes 3133 and 3144.

Mini-PROTEAN TGX precast gels are prepared without SDS. Although gels for SDS-PAGE have historically been cast with SDS in the gel, high quality SDS-PAGE separations are obtained in gels lacking SDS, provided that the sample buffer and running buffer contain sufficient SDS to maintain SDS saturation during electrophoresis. The recommended concentrations of SDS are >1% in the sample buffer and 0.1% in the running buffer. The absence of SDS in the gel itself provides additional flexibility, as the gels may also be used for native electrophoresis (see Section 4).

Mini-PROTEAN TGX precast gels differ from the standard Laemmli system (Tris-HCl SDS-PAGE) gels due to a proprietary modification to their formulations that provides the gels with extended shelf life and improved separation characteristics. They are designed to be run using standard Laemmli sample and running buffers. No additional special buffers or reagents are required.

3.2 Mini-PROTEAN TGX Precast Gel Composition

Mini-PROTEAN TGX gels are comprised of polyacrylamide with a bisacrylamide cross linker. Each gel has a 4% polyacrylamide stacking layer extending approximately 5 mm from the bottom of the loading well to the top of the resolving gel. The proprietary gel formulation provides a shelf life of 12 months and improved separation characteristics.

The gel is packaged with storage buffer of the same composition with additional 0.02% sodium azide as a preservative.

[...]

3.4 SDS-PAGE Buffers

Name	Working Concentration	Notes	Pre-Mixed Alternative
SDS-Page running buffer	1X 25 mM Tris-base 192 mM glycine 0.1% (w/v) SDS	Running buffer should be ~ pH 8.3. Do not adjust the pH	10x Tris/Glycine/SDS, 1 L, 161-0732 10x Tris/Glycine/SDS, 5 L cube, 161-0772
SDS-PAGE sample buffer	2X 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 2% (w/v) SDS 25% (v/v) glycerol 0.01% (w/v) Bromophenol Blue 5% (v/v) 2-mercaptoethanol or 350 mM DTT (added fresh)	Dilute 1 part sample with 1 part sample buffer. More sample buffer can be added if necessary. 1 part sample to 2 parts sample buffer dilution also works. Dry samples can be dissolved directly into the sample buffer	Laemmli sample buffer, 30 ml, 161-0737

3.5 Sample Preparation

The appropriate concentration of sample depends on the load volume and the detection method used. (See Section 6 for approximate stain sensitivities). Add 50 µl 2-mercaptoethanol per 950 µl of sample buffer for a final concentration of 5% 2-mercaptoethanol, or 710 mM. As an alternative, DTT may be used at a final concentration of 350 mM (54 mg/ml). Dilute 1 part sample with at least 1 part sample buffer with added reductant. Heat the mixture at 95°C for 5 min.

3.6 Running Conditions

Run gels at 200 V constant voltage until the dye front reaches the line near the bottom edge of the gel cassette. Approximate run times will vary between 28 and 38 min depending on the gel type (see Section 3.3).

ANNEXE 5b : Caractéristiques du colorant utilisé pour révéler les bandes protéiques sur le

Total Protein Gel Stains for SDS-PAGE and Native PAGE Detection

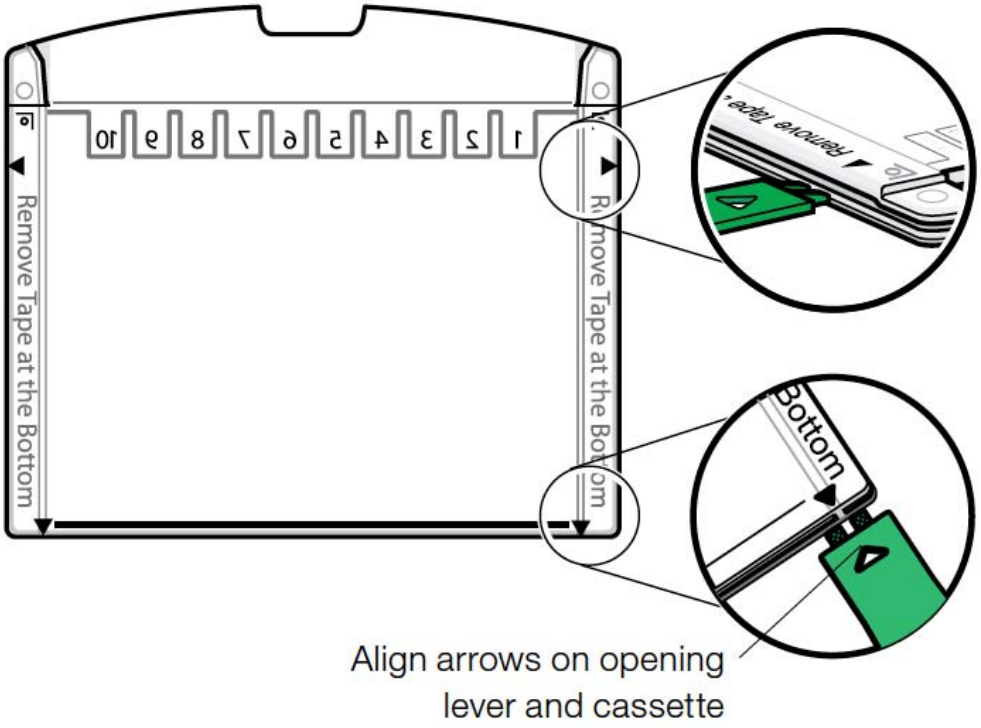
Method	Sensitivity	Optimal Protein Load	Advantages	Disadvantages	Imaging	Instruction Manual Number

Bio-Safe™ Coomassie stain	8–28 ng	~0.5 µg/band	Nonhazardous		Photography with white light or transmission densitometry (Gel Doc or GS-800)	4307051

gel

ANNEXE 5c : Démoulage du gel d'électrophorèse

Opening the Cassette



To open the cassette:

1. Align the arrows on the opening lever and on the cassette.
2. Insert the lever between the plates.
3. Apply downward pressure to break the seal.
4. Repeat the steps with the remaining three locations.

ANNEXE 6
Marqueurs de poids moléculaire

SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range

Specifications

Contents	Approximately 400 μg of each protein blended to give bands of equal intensity on SDS polyacrylamide gels run according to Laemmli[1] and stained with Coomassie Blue R-250
Storage buffer	50% glycerol, 300 mM NaCl, 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 3 mM NaN_3

Protein Molecular Weights (daltons)

Protein	Molecular Weight	Broad Range
Myosin	200,000	X
ß-galactosidase	116,250	X
Phosphorylase b	97,400	X
Serum albumin	66,200	X
Ovalbumin	45,000	X
Carbonic anhydrase	31,000	X
Trypsin inhibitor	21,500	X
Lysozyme	14,400	X
Aprotinin	6,500	X

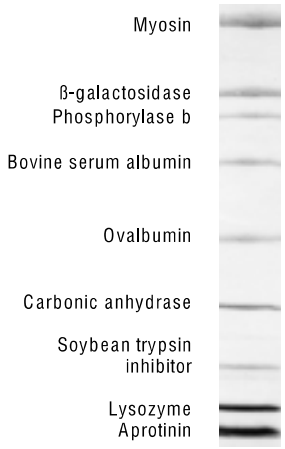


Fig. 1. SDS polyacrylamide gels run in the Mini-PROTEAN® II cell according to the method of Laemmli.[1] Broad molecular weight standards run on a 4-20% gradient gel, stained with Coomassie R-250.

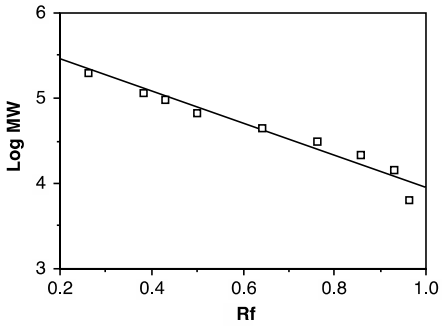


Fig. 3. Curve generated by plotting the log of the molecular weight of the broad range standards vs. the relative mobility (Rf).

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

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

ANNEXE 7

Extrait de « Technical Manual Riboprobe® in vitro transcription Systems »

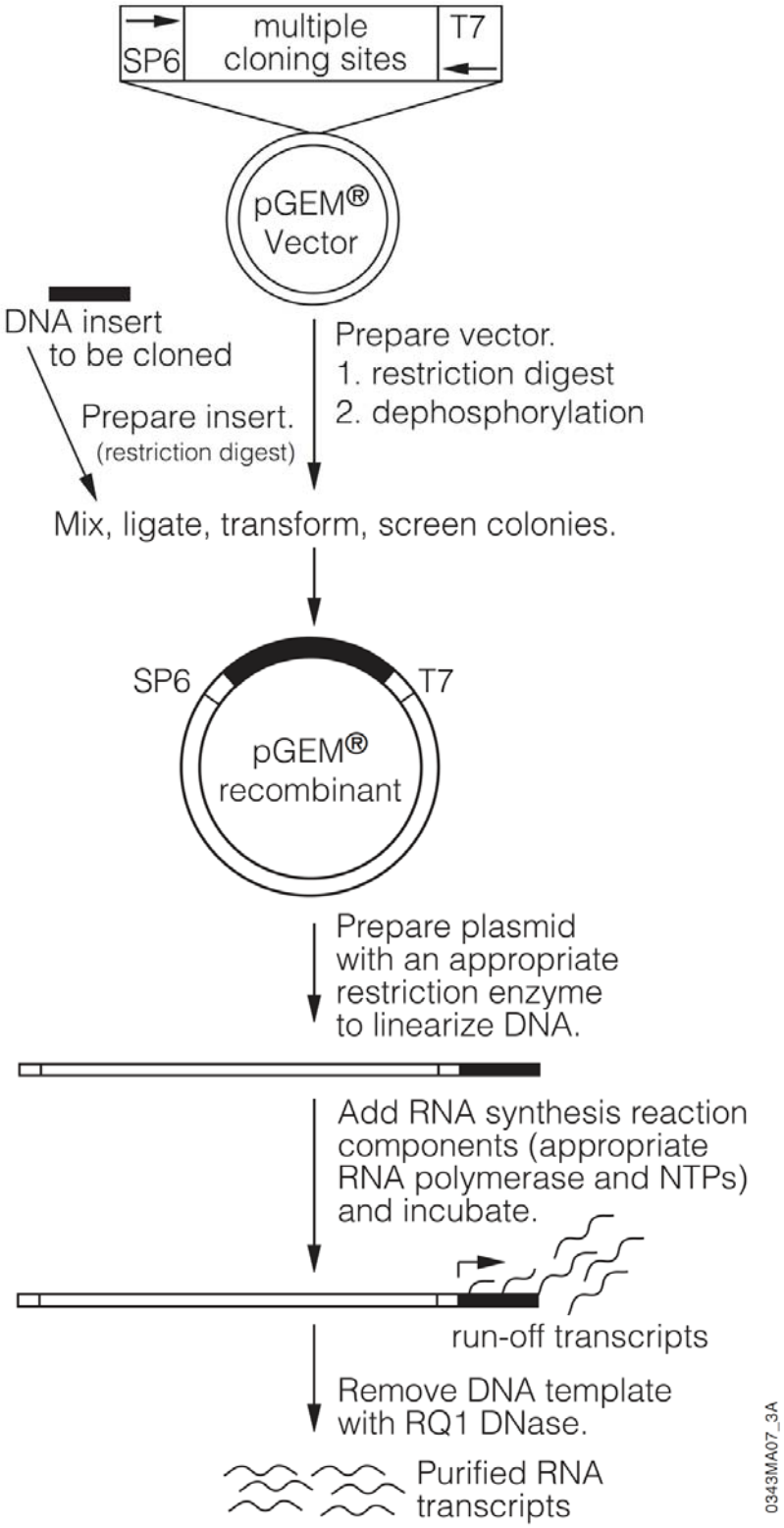


Figure 1. Schematic of the Riboprobe® in vitro Transcription Systems.

[...]

3. General Considerations

[...]

3.B. Applications of Promega Vectors

RNA Transcripts

Transcription of RNA is performed with the appropriate RNA polymerase (T3, T7 or SP6), depending on the RNA polymerase promoter sites present in the vector chosen. Because these polymerases are extremely promoter-specific (i.e., there is almost no transcriptional cross-talk), virtually homogeneous RNA can be obtained using plasmid DNA as the template in a transcription reaction (1). When it is desirable to copy only insert DNA sequences, the plasmid is linearized at an appropriate restriction site prior to the transcription reaction, and only discrete "run-off" transcripts are obtained, virtually free of vector sequences (see Figure 1). RNA transcripts may be used to generate probes for hybridization to Northern and Southern blots, plaque and colony lifts, tissue sections and chromosome spreads. RNA transcripts are also useful for S1 nuclease mapping, mRNA synthesis for translation in vitro, and generation of antisense RNAs to block translation.

Blue/White Color Screening

The pGEM®-Z Vectors were the first Promega SP6/T7 vectors to incorporate blue/white color screening for the identification of recombinants. These vectors contain a sequence coding for the *lac*Z α-peptide, interrupted by a multiple cloning region. Nonrecombinant plasmids produce a functional α-peptide that, by complementing the product of the host cell *lac*ZΔM15 gene, leads to production of functional β-galactosidase. Bacterial colonies harboring the *lac*ZΔM15 gene on an F′, and also containing a pGEM®-Z Vector, are blue in color when plated on indicator plates containing IPTG (Cat.# V3955) and X-Gal (Cat.# V3941). However, when the *lac*Z α-peptide is disrupted by cloning into the pGEM®-Z Vector multiple cloning region, complementation does not occur and no β-galactosidase activity is produced. Therefore, bacterial colonies harboring recombinant pGEM®-Z Vector constructs are white.

3.C. General Cloning Techniques

For information on general cloning techniques (e.g., ligation, transformation, isolation of recombinant plasmid DNA, Southern and Northern hybridizations), see references 2, 3 and 4. Please contact Promega to request specific information on any of the vectors described in Section 3.A and Table 1, or consult the appropriate Technical Bulletin or Technical Manual at: **www.promega.com/tbs**

4. RNA Transcription in vitro

4.A. DNA Template Preparation

When the presence of vector sequences on the probe will not interfere with subsequent applications, transcripts can be synthesized using an intact plasmid as the template. Alternatively, the plasmid can be linearized to produce "run-off" transcripts derived from the insert sequence only.

To prepare a plasmid for the production of "run-off" transcripts, linearize the vector with a suitable restriction endonuclease. After the restriction digestion, extract the linearized plasmid with phenol:chloroform:isoamyl alcohol, ethanol precipitate and suspend in TE or water before using the DNA for in vitro transcription reactions.

It is important that the restriction digestion be performed to completion. A small amount of undigested plasmid DNA can give rise to very long transcripts, which may incorporate a substantial fraction of the radiolabeled rNTP.

Extraneous transcripts have been reported to appear in addition to the expected transcript when templates contain 3´ overhangs (5). The extraneous transcripts can contain sequences complementary to the expected transcript as well as sequences corresponding to vector DNA. Therefore, we recommend that plasmids should not be linearized with any enzyme that leaves a 3´ overhang (see Table 2).

Table 2. Commonly Used Restriction Enzymes that Generate 3´ Overhangs.

Aat II	*Cfo* I	*Pvu* I
Apa I	*Hae* II	*Sac* I
Ban II	*Hgi*A I	*Sac* II
Bgl I	*Hha* I	*Sfi* I
*Bsp*1286 I	*Kpn* I	*Sph* I
*Bst*X I	*Pst* I	

Conversion of a 3´ Overhang to a Blunt End

If there is no alternative restriction site, the 3´ overhang should be converted to a blunt end using the 3´→5´ exonuclease activity of DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Cat.# M2201) as described below:

1. Set up a standard in vitro transcription reaction (Section 4.B, below) containing 33µM of each dNTP.
2. Add DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment at a concentration of 5u/µg and incubate the reaction for 15 minutes at 22°C.

   Note: Elevated temperatures, excessive amounts of enzyme, failure to add dNTPs or long reaction times may result in recessed ends due to the 3´→5´ exonuclease activity of the enzyme.
3. Proceed with the transcription reaction by adding the nucleotide mix and RNA polymerase.

Standard Transcription Protocol

1. Add the following components at room temperature in the order listed.

Transcription Optimized 5X Buffer	4µl
DTT, 100mM	2µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	20–40u
rATP, rGTP and rUTP (2.5mM each) (prepared by mixing 1 volume deionized water with 1 volume of each of the 10mM rATP, rGTP and rUTP stocks supplied)	4µl
100µM rCTP (diluted from stock)	2.4µl
Linearized template DNA (0.2–1.0mg/ml in water or TE buffer)	1µl
[α-^{32}P]rCTP (50µCi at 10µCi/µl)	5µl
SP6, T3 or T7 RNA Polymerase	15–20u
Final volume	**20µl**

Notes:

1. Synthesize non-radioactive transcripts in a reaction containing a final concentration of 0.5mM each of rATP, rGTP, rUTP and rCTP (Section 4.F).
2. The mixture should be kept at room temperature while each successive component is added, since DNA can precipitate in the presence of spermidine if kept at 4°C.
3. If full-length transcripts are not obtained and are critical to the success of you experiment, the incubation temperature can be lowered to 30°C (6).

2. Incubate for 1 hour at 37–40°C.
3. Remove 1µl from the reaction to determine the percent incorporation and specific activity of the probe (Section 4.C). A small aliquot can be analyzed by gel electrophoresis (Positive Control Protocol, Step 3).

Positive Control Protocol

1. Add the following components at room temperature in the order listed:

Transcription Optimized 5X Buffer	4µl
DTT, 100mM	2µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	20–40u
rATP, rCTP, rGTP and rUTP (2.5mM each) (prepared by mixing 1 volume of each of the 10mM rNTP stocks supplied)	4µl
pGEM® Express Positive Control Template	1µg
SP6, T3 or T7 RNA Polymerase	15–20u
Nuclease-Free Water to a final volume of	**20µl**

Note: The DNA template can be removed following the procedure in Section 4.D and prior to visualization of the transcripts on an agarose gel. If the DNA template is not removed, a high-molecular-weight band (~4kb for the pGEM® Express Positive Control Template) will be visible.

5. Troubleshooting

For questions not addressed here, please contact your local Promega Branch Office or Distributor. Contact information available at: **www.promega.com**. E-mail: **techserv@promega.com**

Symptoms	Causes and Comments
Low amounts of RNA synthesized using standard transcription protocol	Insufficient amount of template in solution. The DNA template may be precipitated by spermidine in the Transcription Optimized 5X Buffer. Make sure the components of the reaction are assembled at room temperature and in the stated order.
	NaCl concentration too high (>30mM). Residual NaCl used to precipitate the template DNA may inhibit the RNA polymerase activity by as much as 50%. The template DNA may be desalted by column chromatography, reprecipitating the template in the presence of another salt, and washing the resulting pellet 1–2 times with 70% ethanol.
	RNase contamination. The use of Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor is recommended for all in vitro transcription reactions. User-supplied transcription 5X buffer should be autoclaved. The other solutions used in the reaction (e.g., DTT and rNTPs) should be prepared with water that has been treated with 0.2% DEPC (Section 7.A). Individual transcription components may be purchased directly from Promega.
	Inactive RNA polymerase. The activity of the individual RNA polymerase may be evaluated by in vitro transcription of the control template or supercoiled plasmid containing the appropriate RNA polymerase promoter.

ANNEXE 8

Fiche technique du pGEM® Express Positive Control Template

Product Contents

pGEM® Express Positive Control Template:

Part No.	Size
P256A	10µg (2 × 5µg)

Description: The pGEM® Express Positive Control Template may be used to monitor the performance of the Riboprobe® Systems. The template was constructed by linearizing the pGEMEX®-1 Vector with *Sca* I.

DNA Concentration: 1.0mg/ml.

Storage Buffer: The pGEM® Express Positive Control Template is supplied in 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA.

Storage Conditions: See Product Information Label for storage recommendations. Avoid exposure to frequent temperature changes. See the expiration date on the product label.

Usage Note: Concentration gradients may form in frozen products and should be dispersed upon thawing. Mix well prior to use.

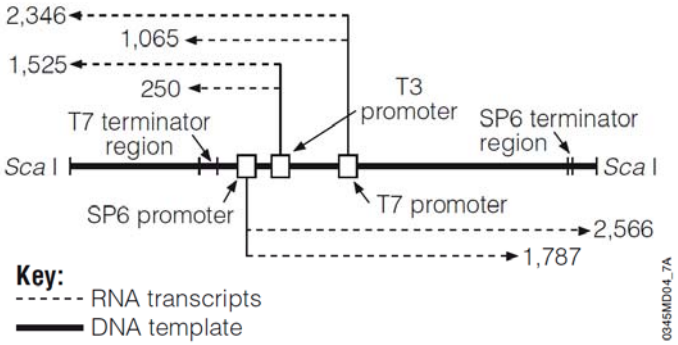


Figure 1. RNA transcripts (in bases) generated using the appropriate RNA polymerase and pGEM® Express Positive Control Template.

Quality Control Assays

Functional Assay: The pGEM® Express Positive Control Template is transcribed in vitro using SP6, T7 and T3 polymerases, and the resulting transcripts are analyzed by agarose gel electrophoresis. The transcript sizes (given in bases) are as follows:

RNA Polymerase	Transcript Sizes (in bases)
SP6	2566, 1787
T7	2346, 1065
T3	1525, 250

Promega

Usage Information

I. Description

Transcription with SP6 RNA Polymerase produces RNA transcripts of 1,787 bases and 2,566 bases. The shorter transcript (1,787 bases) is due to the presence of an SP6 terminator region within the template. The terminator is approximately 50% efficient. Transcription of the template with T7 RNA Polymerase results in transcripts of 1,065 bases and 2,346 bases. The shorter transcript (1,065 bases) is due to the presence of a T7 terminator region within the template. The terminator is approximately 70–80% efficient. Transcription with T3 RNA Polymerase results in transcripts of 250 bases and 1,525 bases. The shorter transcript (250 bases) is again due to the presence of the T7 terminator, which is recognized to some extent by T3 RNA Polymerase (Figure 1).

II. pGEM® Express Positive Control Protocol

Reagents to Be Supplied by the User

(Solution compositions are provided in Section III. Products denoted with an asterisk (*) are available from Promega.)

- Transcription Optimized 5X Buffer* (Cat.# P1181)
- DTT, 100mM* (Cat.# P1171)
- RNasin® Ribonuclease Inhibitor* (Cat.# N2111)
- rNTPs, 2.5mM each* (Cat.# P1221)
- SP6, T7 or T3 RNA Polymerase* (Cat.# P1085, P2075 or P2083)
- Nuclease-Free Water* (Cat.# P1193)
- RNA sample buffer
- TAE running buffer
- RNA loading buffer
- **Optional:** RQ1 RNase-Free DNase* (Cat.# M6101)

A. Transcription Reaction

We recommend setting up an unlabeled positive control reaction to monitor transcription reactions performed using the Riboprobe® Systems.

1. Assemble the following reaction components at room temperature in the order shown:

Transcription Optimized 5X Buffer	4µl
DTT, 100mM	2µl
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	20u
ATP, CTP, GTP and UTP (2.5mM each) (prepared by mixing equal volumes of 10mM rNTP stocks)	4µl
pGEM® Express Positive Control Template	1µg
SP6, T7 or T3 RNA Polymerase (at 15–20u/µl)	1µl
Nuclease-Free Water to final volume of	20µl

2. Incubate for 60 minutes at 37–40°C.
3. **Optional:** To remove the DNA template, add RQ1 RNase-Free DNase to a concentration of 1u/µg control DNA template. Incubate for 15 minutes at 37°C.

   Note: If the template is not removed, a high molecular weight band (approximately 4kb) will be present when visualizing the reaction products on a gel.

B. Gel Analysis

The reaction may be run on a 1% nondenaturing agarose gel using TAE 1X running buffer. To a 5µl aliquot of the transcription reaction, add 15µl of RNA sample buffer. Add 2–5µl of RNA loading buffer and heat the sample for 5–10 minutes at 65–70°C prior to loading. Run the gel under standard conditions used for analysis of DNA samples. A standard "minigel" may be run for 20 minutes at 60V. RNA Markers (Cat.# G3191), which are single-stranded, may be used to determine the sizes of the products. SP6 RNA Polymerase produces two transcripts of 1,787 bases and 2,566 bases. Two bands should be visible if T7 RNA Polymerase is used: 1,065 bases and 2,346 bases. T3 RNA Polymerase produces bands of 250 bases and 1,525 bases.

For a more thorough discussion of transcription, please request the *Riboprobe® in vitro Transcription Systems Technical Manual* #TM016.

III. Composition of Buffers and Solutions

RNA loading buffer

50%	glycerol
1mM	EDTA
0.4%	bromophenol blue
1mg/ml	ethidium bromide

Make up 20ml using a very-high-grade, RNase-free glycerol. Dispense into single-use aliquots and store at –20°C.

RNA sample buffer

10.0ml	deionized formamide
3.5ml	37% formaldehyde
2.0ml	MOPS buffer

Dispense into single-use aliquots and store at –20°C in tightly sealed screw-cap tubes. The buffer can be stored for up to 6 months. Do not freeze-thaw the buffer more than twice.

5X MOPS buffer

0.2M	MOPS (pH 7.0)
50mM	sodium acetate
5mM	EDTA (pH 8.0)

TAE running buffer (50X stock)

242g	Tris-base
57.1ml	glacial acetic acid
100ml	0.5M EDTA (pH 8.0)

Adjust to pH 7.9 and bring to a final volume of 1 liter with water.

Transcription Optimized 5X Buffer

200mM	Tris-HCl (pH 7.5)
30mM	$MgCl_2$
10mM	spermidine
50mM	NaCl

ANNEXE 9
Préparation d'un gel d'agarose à 2 % en tampon TAE 1x

- Préparation du support de coulage du gel :

1- Fermer les côtés du support de coulage par de l'adhésif papier. Prendre soin de faire déborder le scotch sur la face inférieure et sur les cotés plastifiés pour éviter les fuites de gel.
2- Poser le support sur une surface plane.

- Préparation de la solution d'agarose en tampon TAE x1 (Tris Acétate EDTA) :

1- Evaluer le volume de gel à préparer, compte tenu de la dimension du support de coulage du gel et de l'épaisseur de gel recommandée à 5 mm.
2- En déduire la masse d'agarose à peser pour réaliser un gel à 2%
3- Peser la masse d'agarose calculée (disponible à côte des balances).
4- Préparer du tampon TAE 1x (volume à prévoir aussi en fonction de la dimension de la cuve) en eau distillée, à partir de la solution stock TAE 20x.
5- Solubiliser l'agarose dans le volume prévu de tampon TAE 1x dans une fiole d'Erlenmeyer adaptée.
6- Faire chauffer la solution d'agarose dans le four à micro-onde, 1 minute maximum à puissance maximale.

   Attention : l'ébullition doit durer suffisamment longtemps pour que l'agarose soit solubilisé, mais il faut éviter une évaporation trop importante, ainsi qu'un débordement de la solution.

7- Agiter la solution par rotation de la fiole d'Erlenmeyer.
   Attention aux brûlures !

8- Poser la fiole d'Erlenmeyer contenant l'agarose chaud sur la paillasse et attendre son refroidissement, en procédant régulièrement à une homogénéisation par agitation douce à la main. Le gel doit être coulé encore chaud pour éviter sa prise en masse, mais une température trop élevée risque d'endommager le support de coulage et de dégrader le GelRed. Le gel est coulé lorsque la solution est encore chaude, mais ne brûle pas la main.
9- Ajouter v µL de Gelred 10 000x pour atteindre 1x final dans le gel.
10- Positionner le peigne au niveau des encoches du support de coulage. Vérifier qu'il n'y a pas de bulles au niveau des dents ni dans le reste du gel.

- Préparation de la cuve d'électrophorèse :

1- Lorsque le gel a pris en masse, retirer l'adhésif papier.
2- Placer le gel dans son support de coulage dans la cuve à électrophorèse.
3- Verser le tampon TAE1x dans la cuve, de manière à ce qu'il recouvre le gel sur une épaisseur d'environ 5 mm de hauteur.
4- Retirer le peigne en le tirant délicatement vers le haut, bien verticalement, et en maintenant le gel (se munir de gants en latex).

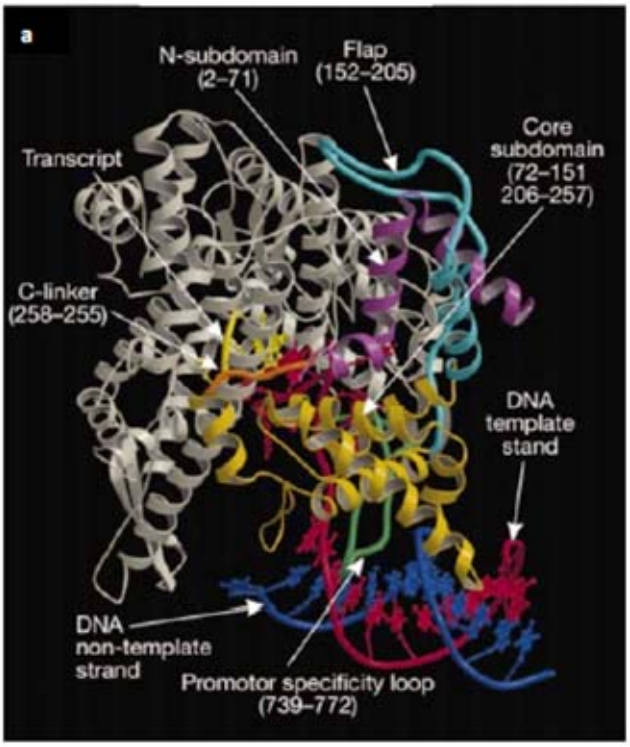
Migration électrophorétique :

1- Positionner le couvercle sur la cuve.
2- Brancher les électrodes au générateur en respectant le code couleur (électrode rouge = pôle +)
3- Allumer le générateur, en s'assurant qu'il affiche une tension de 80 Volts : appeler un examinateur avant de démarrer la migration (à l'aide de la touche RUN).

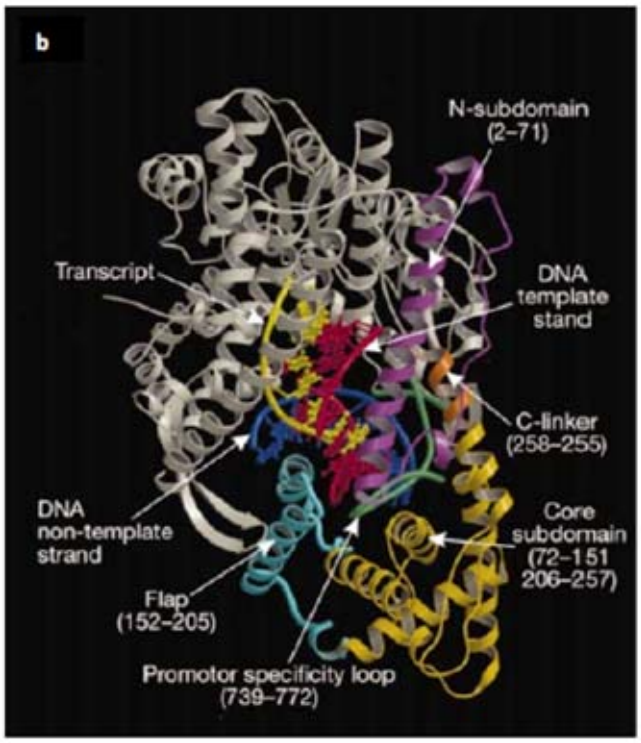
ANNEXE 10
Représentations tridimensionnelles de l'ARN polymérase du phage T7

ANNEXE 10a : comparaison de deux structures tridimensionnelles de l'ARN polymérase du phage T7, selon l'étape de transcription.

Complexe d'initiation



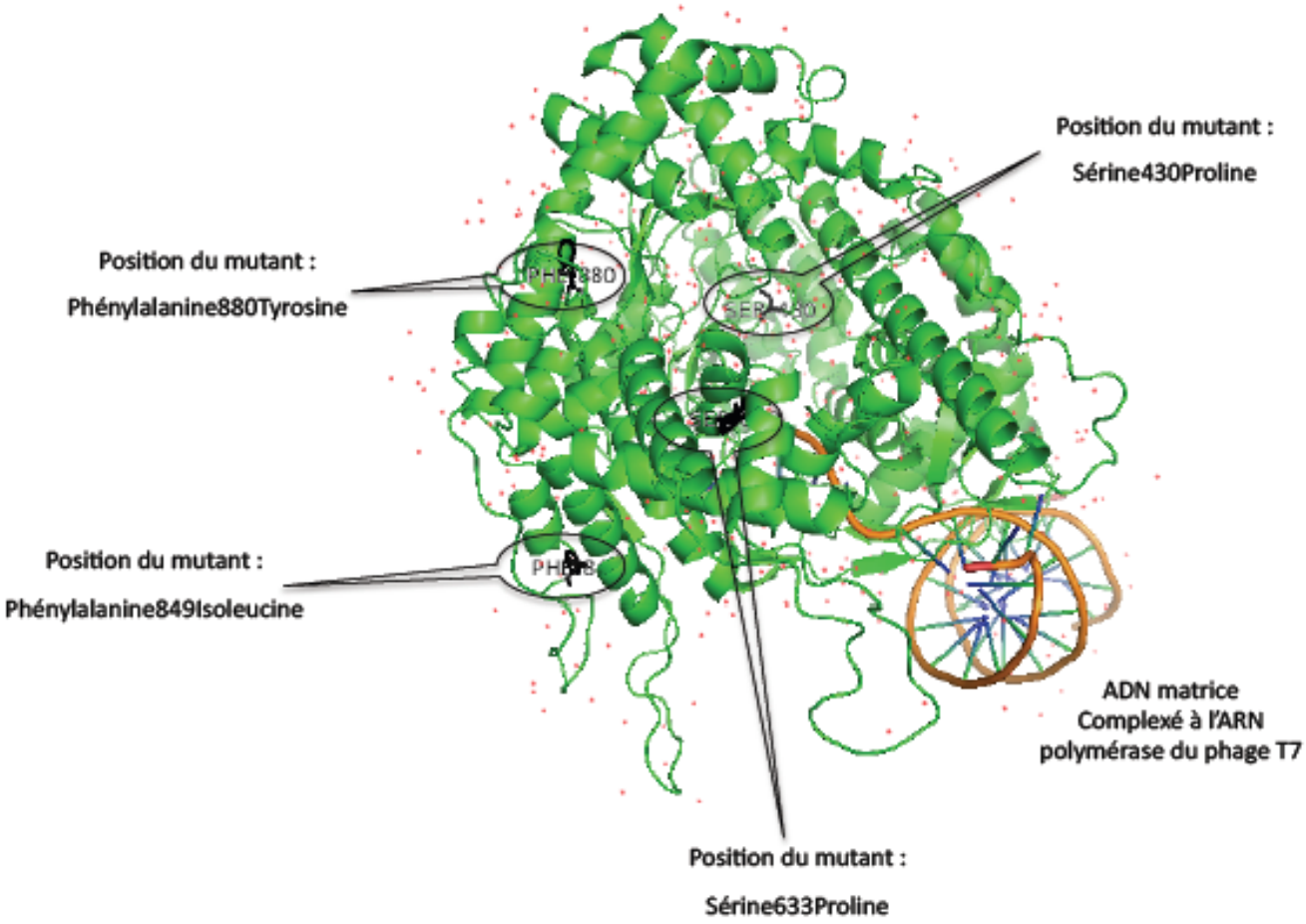
Complexe d'élongation



➥ **Les segments colorés présentent des changements structuraux.**

(D'après Tahirov et al. Nature 2002)

ANNEXE 10b : modélisation de la structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase du phage T7 tétramutée. Le modèle présenté a été réalisé à partir de structure cristalline expérimentale de l'ARN polymérase du phage T7.
La position ainsi que la nature des quatre acides aminés mutés sont indiqués. Les points rouges représentent des molécules d'eau. L'ADN matrice est indiqué en couleur orange.

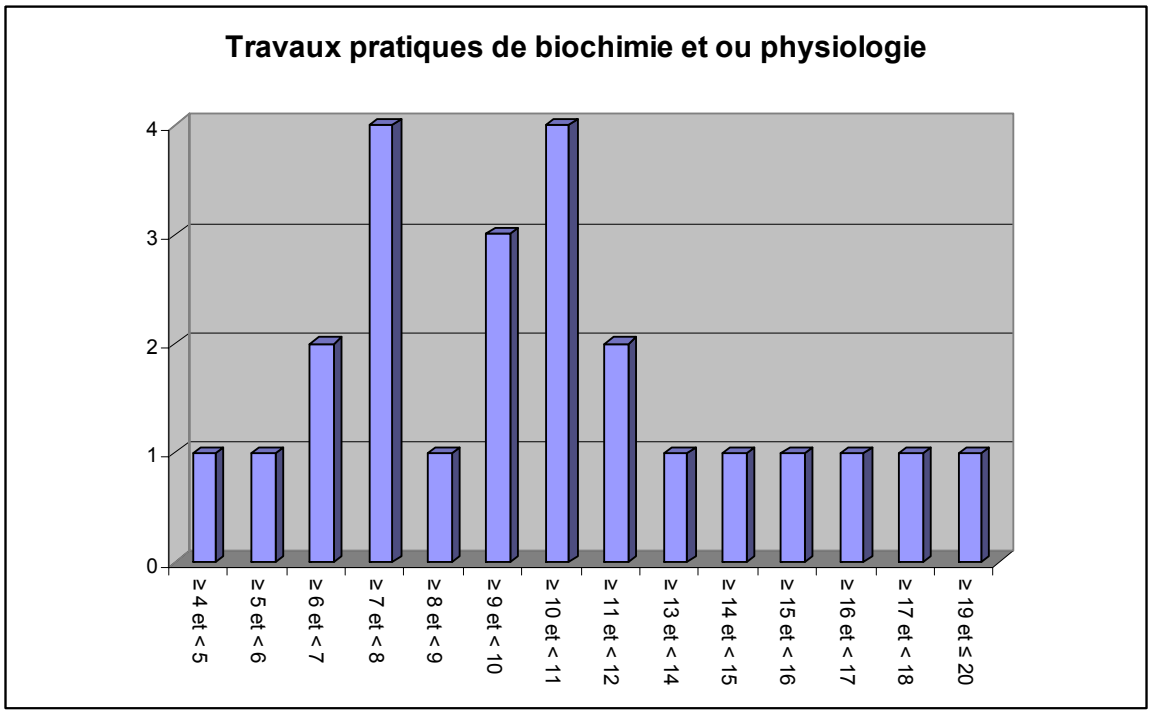


Rapport de l'épreuve de travaux pratiques de biochimie et ou de physiologie

Rapport établi par : Caroline BONNEFOY, Frédéric DUCANCEL, Sabine ORSONI, Florence RIVENET

Résultats :

≥ 4 et < 5	1	≥ 9 et < 10	3	≥ 15 et < 16	1
≥ 5 et < 6	1	≥ 10 et < 11	4	≥ 16 et < 17	1
≥ 6 et < 7	2	≥ 11 et < 12	2	≥ 17 et < 18	1
≥ 7 et < 8	4	≥ 13 et < 14	1	≥ 19 et ≤ 20	1
≥ 8 et < 9	1	≥ 14 et < 15	1		



L'objectif du sujet de l'épreuve de Travaux pratiques de Biochimie, Physiologie était de comparer les propriétés structurales et fonctionnelles de deux T7 ARN polymérases recombinantes, sauvage et mutée.

Les manipulations consistaient dans un premier temps à extraire mécaniquement de culots bactériens, puis à purifier par chromatographie sur résine de nickel, les deux protéines étiquetées par une extrémité poly-histidines. La concentration de chacune des fractions obtenues était ensuite déterminée afin de choisir la fraction utile, et d'optimiser l'activité transcriptionnelle ; celle-ci était mise en évidence par l'obtention de deux bandes d'ARN sur électrophorèse en gel d'agarose, observables aussi sur le contrôle positif fourni. Ces deux bandes résultaient de la reconnaissance partielle du terminateur de transcription utilisé, positionné dans la partie 3' du gène à transcrire au sein du plasmide utilisé (pGEM) : 70 % des transcrits obtenus avaient une taille de 1065 pb, alors que les 30 % restants avaient une taille de 2346 pb. De plus, la souche mutée permettait de révéler, après chauffage à 48 °C, une activité de transcription normale alors que la polymérase de la souche sauvage était complètement inactivée après un tel traitement.
Par ailleurs, certaines différences structurales qui existent et caractérisent les deux enzymes étudiées pouvaient être mises en évidence par une sensibilité différente à la trypsinolyse ménagée. Ainsi, une électrophorèse SDS-PAGE permettait d'une part de vérifier l'efficacité de la purification (en analysant et comparant différentes fractions obtenues lors de la chromatographie sur colonne de nickel) et d'autre part de comparer la cinétique de dégradation par trypsinolyse ménagée, de la protéine sauvage et de la protéine mutée. Pour les deux protéines, il était attendu une disparition progressive de la bande initiale à 100 kDa au

profit de deux bandes de taille inférieure de 80 et 20 kDA. L'analyse de la cinétique permettait de démontrer que la souche mutée était plus résistante à la trypsinolyse que la souche sauvage.

Concernant l'ensemble des manipulations, une mauvaise organisation temporelle a été préjudiciable aux candidats qui n'ont pas choisi les bonnes options d'organisation. Par exemple, il était nécessaire de traiter les deux purifications en parallèle, ainsi que de commencer la gamme colorimétrique pendant l'écoulement des colonnes. Les réponses aux questions du compte-rendu devaient être faites pendant les temps d'attente. Toutefois, et en dépit de la densité des manipulations proposées, les candidats ne se sont pas découragés et un certain nombre d'entre eux a ainsi pu mener à bien la quasi totalité des expériences. Par ailleurs, une majorité de candidats a été capable de réaliser les expériences de transcription, de préparation et d'analyse de l'électrophorégramme, démontrant ainsi leurs compétences en techniques de biologie moléculaire dans le cadre très délicat de la manipulation d'ADN et d'ARN.

La réalisation de l'extraction des enzymes étudiées était cruciale pour la suite des manipulations. En dépit de la démonstration de la gestuelle à suivre pour réaliser une extraction mécanique, peu de candidats ont su respecter rigoureusement les recommandations, ce qui était visible sur le dosage des protéines de l'extrait.
La qualité et l'interprétation de la purification demandait une compréhension préalable du rôle des différentes étapes présentées dans le protocole. L'efficacité de la purification pouvait être analysée par les résultats d'absorbance des différentes fractions protéiques, à condition de ne pas précipiter l'imidazole présent à forte concentration dans les dernières fractions ; ceci nécessitait de prévoir une dilution appropriée. Beaucoup de candidats n'ont pas réalisé cette dilution, et ce malgré les indications du protocole. Si l'annexe 4 a été correctement comprise, pour expliquer l'interférence entre l'imidazole et le réactif de Folin, l'interaction entre le nickel et les deux noyaux imidazole nécessitant d'exploiter et de synthétiser deux des documents annexes fournis, a été correctement expliquée par très peu de candidats, ce qui a surpris le jury à ce niveau de concours.
De la même manière, le jury a déploré un manque de rigueur de certains candidats pour effectuer des calculs simples, indispensables au bon déroulement de la manipulation en particulier le calcul des concentrations en protéines. La majorité des candidats n'a pas évoqué la notion de gradient d'imidazole pour expliquer les étapes d'élution. Cette notion était pourtant indispensable à la compréhension du principe de purification de la protéine étiquetée, celle-ci s'appuyant sur la spécificité de la fixation. Le calcul des rendements de purification a rarement été correctement effectué, alors qu'il s'agit d'une notion fondamentale de la technologie des protéines.
Dans l'ensemble, les candidats ont su concentrer correctement leur fraction protéique, par la technique de Vivaspin et ont obtenu le volume et l'absorbance attendus.
Après concentration, un nouveau dosage des protéines permettait d'adapter la prise d'essai d'enzyme à la quantité de plasmide substrat pour réaliser la transcription. Un certain nombre de candidats n'a pas obtenu de transcrits notamment à cause d'une erreur de calcul sur la prise d'essai d'enzyme à ajouter, calcul pourtant simple à réaliser. Il était important d'intégrer de manière précoce ce deuxième dosage protéique dans la chronologie des manipulations à réaliser. Beaucoup de candidats ont ainsi perdu beaucoup de temps par manque d'anticipation et d'organisation.
Après les sept réactions de transcription, quelques candidats ont obtenu de beaux résultats sur gel d'agarose. La photographie d'un résultat de gel fournie à tous les candidats leur permettait d'effectuer l'analyse des profils de transcription attendus pour le contrôle positif et les ARN polymérases sauvage et tétramutée du phage T7. De même, les résultats attendus pour l'électrophorèse en SDS-PAGE ont été présentés à tous les candidats afin de leur permettre de répondre aux questions posées.
Le jury a réalisé *a posteriori* les gels d'agarose et révélé les SDS-PAGE des candidats qui avaient initié les expériences sans toutefois pouvoir les mener à leur terme. Les résultats expérimentaux ainsi obtenus ont été pris en compte par le jury.
Cette année encore, le sujet ambitieux a fortement mobilisé les candidats jusqu'au terme de l'épreuve, et le jury a apprécié la détermination de l'ensemble des candidats pour avancer au maximum le travail demandé.

Epreuve d'admission

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

AGRÉGATION EXTERNE DE BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE
SESSION 2011

ÉPREUVE PRATIQUE DE MICROBIOLOGIE

Expression de quelques adhésines bactériennes
et conséquences sur l'adhésion

INTRODUCTION

La colonisation des surfaces par les bactéries est une des étapes clés qui mènent souvent, en situation clinique, au développement d'infections.

Chez les bactéries, l'adhésion aux surfaces se fait à l'aide d'appendices extracellulaires appelés **adhésines**, et dont les sous-unités constitutives sont synthétisées dans le cytoplasme puis transportés à l'extérieur.

Il existe un grand nombre d'adhésines chez les bactéries, dont :

- certaines favorisent l'attachement des bactéries sur les surfaces dites "abiotiques" telles que les plastiques, le métal…
- d'autres favorisent l'attachement des bactéries sur les cellules eucaryotes ;
- d'autres enfin favorisent l'attachement des bactéries entre elles.

Le sujet porte sur certaines de ces adhésines (**curli** et **antigène 43**, cf. **annexes 1 et 2**) dont l'expression entraîne des phénotypes spécifiques qui seront étudiés ici. Pour cela, différentes souches d'***Escherichia coli* K-12** seront utilisées ; elles sont présentées dans l'**annexe 3**.

- La **partie A** s'intéresse aux curli.
- La **partie B** propose d'étudier l'antigène 43.

Avertissements

- **Les** manipulations **des différentes parties sont** indépendantes **; il convient d'en mener certaines en** parallèle**.**
- **Il est fortement suggéré de s'intéresser** dès le début **à la** partie A1.
- **Dans le sujet, les souches d'*E. coli* sont désignées par une lettre ; une même lettre désigne toujours une même souche.**
  Cette désignation est indépendante de celle des parties.
- **Certaines souches ont été incubées à 30°C ou 37°C : le nombre suivant la lettre précise la température d'incubation (exemple :** F30 **et** F37**).**
  La souche D **a été incubée soit en absence d'anhydro-tétracycline (**D–aTC**) soit en présence d'anhydro-tétracycline à une concentration de 300 ng•mL^{-1} dans le milieu de culture (**D+aTC**).**

TRAVAIL DU PREMIER JOUR

DONNEE

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

PARTIE A
Les curli

A1- Agrégation des bactéries en tube

Les curli sont capables de faciliter les interactions entre bactéries entraînant des phénomènes d'agrégation cellulaire qui peuvent être visualisés par la sédimentation d'agrégats bactériens au fond d'un tube de culture.

Cultures
Cultures de 18 h en bouillon LB à 30°C, en tubes à hémolyse 10 mL :
E. coli, notées **A**, **B**, **D–aTC, D+aTC**, **E** et **F30**

Milieux de culture
Eau physiologique stérile : 50 mL en flacon

Matériel spécifique
Spectrophotomètre réglé à 600 nm
Tubes à hémolyse stériles de 10 mL
Semi-microcuves "visibles"

MANIPULATIONS

A11- Préparation des suspensions

À partir de chaque souche présentée en bouillon LB (**A**, **B**, **D–aTC**, **D+aTC**, **E**, **F30**), préparer une suspension ajustée à 3 (± 10%) unités d'absorbance à 600 nm. Pour cela :

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de chaque souche diluée au 1/20^{e} en eau physiologique, contre un blanc adapté.
- Préparer 3 mL de suspension ajustée dans un tube à hémolyse de 10 mL, et en eau physiologique.

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

A12- Suivi de l'agrégation

- Sur chaque tube, faire une marque à 1 cm en dessous de la surface de la suspension bactérienne. Cette marque servira de repère pour des prélèvements ultérieurs.
- À t_0, vortexer les tubes, puis, pour chaque tube, prélever 50 µL de suspension bactérienne, transférer dans une semi-microcuve et ajouter 950 µL d'eau physiologique. Mesurer l'absorbance à 600 nm contre un blanc adapté. L'absorbance corrigée à 600 nm doit être de 3 (± 10%).

  ATTENTION : à partir de ce moment et pendant quatre heures, veiller à ne pas agiter ni vortexer les tubes. Eviter de les laisser trop longtemps à proximité du bec électrique.

- Toutes les heures et pendant quatre heures, prélever 50 µL de suspension bactérienne au niveau du repère, transférer dans une semi-microcuve et ajouter 950 µL d'eau physiologique. Mesurer l'absorbance à 600 nm contre un blanc adapté.

Un prélèvement sera réalisé en présence d'un examinateur.

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

- En fin d'expérience, noter la présence éventuelle d'un culot au fond de chaque tube.

COMPTE-RENDU

1. Présenter l'ensemble des résultats des mesures spectrophotométriques, les calculs, ainsi que le mode opératoire permettant la réalisation des suspensions ajustées dans la **partie A11**.
2. Tracer **log A_{600} = f(t)** sur un même graphe pour l'ensemble des souches.
3. Conclure en comparant les résultats obtenus aux génotypes annoncés dans l'**annexe 3**. Discuter de l'effet de l'anhydro-tétracycline sur l'agrégation.

A2- Visualisation de l'expression des curli sur gélose au Rouge Congo

Les curli ont la propriété de pouvoir fixer un colorant, le Rouge Congo. Sur un milieu contenant ce colorant, les colonies de bactéries produisant des curli apparaissent rouges.

Cultures

Cultures de 18 h en bouillon LB à 30°C, en tubes à hémolyse 10 mL :
E. coli, notées **A**, **B**, **D–aTC**, **E** et **F30**

Milieux de culture

Milieu agar au **Rouge Congo** : 2 x 100 mL en flacon en surfusion à 60°C

Réactifs

aTC (anhydro-tétracycline) à 100 µg•mL^{-1} en mélange éthanol-eau (v/v) : 150 µL en microtube jaune

Matériel spécifique

2 boîtes de Pétri carrées 120x120
2 tubes stériles à fond conique de 50 mL
2 pipettes graduées stériles de 2 mL

MANIPULATIONS

A21- Préparation des géloses au Rouge Congo

Opérer rapidement pour éviter la prise en masse de la gélose.

- Après avoir ramené le milieu au Rouge Congo en surfusion à environ 45°C, supplémenter un flacon de 100 mL par de l'aTC à 100 ng•mL^{-1} final. Homogénéiser soigneusement.
- À l'aide d'un tube à fond conique de 50 mL, mesurer 50 mL de milieu supplémenté et les couler dans chaque boîte de Pétri carrée de 120x120.
- Afin que le milieu prenne en masse en pente, glisser rapidement une pipette de 2 mL sous l'un des bords de chaque boîte. Laisser prendre en masse.
- Enlever la pipette. Repérer le côté contenant le plus de milieu et y noter "+aTC".
  Noter "–aTC" sur le côté contenant le moins de milieu.
  Identifier les boîtes avec le numéro de poste en précisant sur une boîte 30°C et sur l'autre 37°C.
- À partir de l'autre flacon de 100 mL de milieu au Rouge Congo en surfusion, et à l'aide d'un autre tube à fond conique de 50 mL, répartir 50 mL de milieu ramené à environ 45°C et non supplémenté sur chacune des géloses préalablement prises en masse. Laisser prendre en masse à l'horizontale.
- Faire sécher les deux boîtes sous PSM pendant 15 min.

A22- Dépôts des cultures

- Selon le gabarit fourni en **annexe 4** et pour chaque boîte, déposer une série de gouttes de 5 µL dans le sens –aTC vers +aTC: travailler en pipetage inverse (**annexe 5**). Laisser les gouttes sécher.
- Incuber les boîtes aux températures adaptées.

COMPTE-RENDU

4. Préciser le volume d'anhydro-tétracycline utilisé pour supplémenter le milieu.
5. Indiquer l'intérêt d'avoir installé un tel système de coulage.

A3- Quantification de l'expression des curli

L'expresion des curli peut être mise en évidence indirectement par la mesure de l'activité enzymatique β-glucuronidase du produit du gène rapporteur *uidA*.

Cette construction génétique est présente dans les souches **F** et **G** (**annexe 3**).

Cultures

Cultures de 18 h en bouillon LB à 30°C, en tubes à hémolyse 10 mL :
E. coli, notées **F30** et **G30**

Cultures de 18 h en bouillon LB à 37°C, en tubes à hémolyse 10 mL :
E. coli, notées **F37** et **G37**

Milieux de culture

Bouillon **LB** stérile : 50 mL en flacon

Réactifs

Tampon Z : 10 mL en flacon
Composition : Na_2HPO_4 3,6 mM ; NaH_2PO_4 1,6 mM ; KCl 0,1 mM ; $MgSO_4$ 1 µM ; pH 7

BCTMA (bromure de cétyl-triméthyl-ammonium) à 6 mg•mL^{-1} en eau : 1 mL en microtube bleu

pNPU (paranitrophényl-β-D-glucuronide) à 10 mmol•L^{-1} en eau : 1,5 mL en microtube blanc

Na_2CO_3 à 1 mol•L^{-1} en eau : 10 mL en flacon

Matériel spécifique

Spectrophotomètre réglé à 600 nm
Spectrophotomètre réglé à 405 nm
Bain thermostaté à 37°C
Microtubes stériles de 2 mL
Semi-microcuves "visibles"
Centrifugeuse
Chronomètre

MANIPULATIONS

A31- Mesure de l'absorbance à 600 nm des souches

- Mesurer l'absorbance à 600 nm de chaque souche diluée au 1/20^{e} en LB, contre un blanc adapté.

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

A32- Mesure de l'activité β-glucuronidase

Pour chaque souche, effectuer la manipulation ci-dessous en double essai. Réaliser un témoin réactif en remplaçant les 50 µL de suspension bactérienne par 50 µL de LB.

- Distribuer 50 µL de suspension bactérienne dans un microtube.
- Ajouter : 675 µL de tampon Z
  70 µL de BCTMA
- Vortexer.
- Pré-incuber 5 minutes à 37°C le mélange préparé et le pNPU.

Les essais F30 seront réalisés en présence d'un examinateur

- Démarrer la réaction en ajoutant 100 µL de pNPU à 10 mmol•L^{-1}. Agiter par retournement. Noter précisément le temps.
- Incuber à 37°C jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune (couleur identique à celle du LB dans un microtube).

- Arrêter la réaction en ajoutant 375 µL de Na_2CO_3 à 1 mol•L^{-1}. Agiter par retournement. Noter précisément le temps. Au-delà de 15 minutes d'incubation, arrêter la réaction. La réaction dans le témoin réactif est arrêtée en dernier.
- Centrifuger 4 minutes à 13000 rpm (vitesse maximale).
- Transférer 1 mL dans une semi-microcuve et lire l'absorbance à 405 nm contre le témoin réactif.

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

COMPTE-RENDU

6. Pour chaque souche et pour chaque température de culture, présenter les résultats et calculer le taux de β-glucuronidase, exprimé en unité Miller selon la formule suivante :

$$\text{Unité Miller} = \frac{750 \cdot A_{405}}{t \cdot V \cdot A_{600\ \text{corrigé}}}$$

avec : t = temps de réaction (en min)
V = volume de suspension bactérienne utilisée (en mL)

7. Conclure en comparant les résultats obtenus aux génotypes annoncés dans l'**annexe 3**. Discuter de l'effet de la température sur l'expression des curli.

PARTIE B
L'antigène 43 (Ag43)

B1- Régulation de l'expression de l'Ag43

Afin d'étudier la régulation de l'expression de l'antigène 43, on dispose de la souche **H** (**annexe 3**) comportant une construction génétique particulière au locus *agn43*.

Culture
Isolement en boîte de Pétri sur milieu LB additionné de X-gal à 40 µg•mL^{-1} : *E. coli*, notée **H**

Milieux de culture
12 géloses LB additionnées de X-gal à 40 µg•mL^{-1}, coulées en boîtes de Pétri (**LB+Xgal**)
Bouillon **LB** stérile : 50 mL en flacon (*même flacon qu'en partie A3*)

Matériel spécifique
Microtubes stériles de 2 mL
Billes de verre stériles et récipient de récupération

MANIPULATIONS

B11- Dilutions

- Réaliser deux suspensions bactériennes dans 1 mL de bouillon LB : une à partir d'une seule colonie bleue bien isolée, et l'autre à partir d'une seule colonie blanche bien isolée.
- À partir de chaque suspension ainsi réalisée, préparer en microtubes et en bouillon LB cinq dilutions en série géométrique de raison 1/10 allant jusqu'à 10^{-5}.

B12- Ensemencements

- À l'aide de billes stériles, réaliser un dénombrement en surface de géloses LB+Xgal et en double-essai, selon le mode opératoire suivant :
    - répartir une dizaine de billes par boîte ;
    - déposer 100 µL de chacune des dilutions 10^{-3} à 10^{-5} ;
    - effectuer des translations brusques, alternées avec des rotations de la boîte ;
    - récupérer les billes dans le récipient de récupération contenant de l'eau de Javel.
- Incuber les douze boîtes à 37°C.

COMPTE-RENDU

8. Proposer une construction génétique possible de la souche **H**.
9. Indiquer à quoi correspondent les colonies blanches et les colonies bleues.
10. Préciser le phénomène observé grâce à cette construction génétique.
11. Donner la(les) couleur(s) des colonies qui vont se développer sur les boites LB+Xgal à partir de la colonie blanche, et à partir de la colonie bleue.

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

ANNEXE 1

Curli

Les curli sont des appendices de surface produits par les Entérobactéries. Leur nom vient de la forme qu'ils prennent après leur sécrétion puisqu'ils ressemblent à des boucles ou "*curl*" en Anglais. Les structures formées par les curli ont un diamètre de 6 à 12 nm et une longueur qui varie entre 0,5 et 1 µm (**fig 1.1.**).

Les curli sont produits grâce à l'expression de deux opérons positionnés tête-bêche (**fig 1.2.**) :

- l'opéron *csgBA* permet la production des protéines de structure des curli, appelées curlines ;
- l'opéron *csgDEFG* permet la production des protéines de transport des curli ainsi que de la protéine régulatrice CsgD. Cette dernière active les gènes codant les curlines (*csgBA)*.

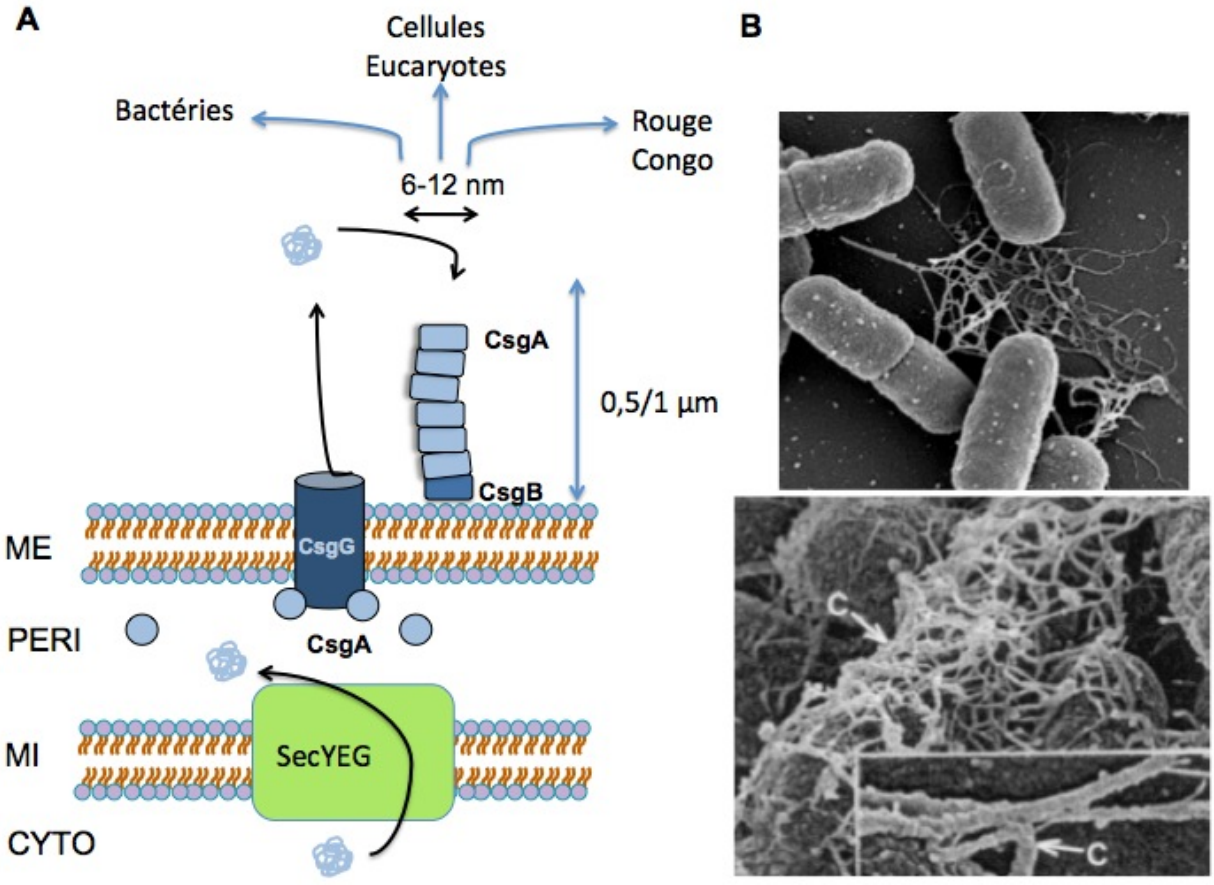
La régulation des curli est très complexe et fait intervenir de multiples régulateurs (**fig 1.2.**) :

- le régulateur majeur de ce système est la protéine activatrice OmpR, indispensable à la production des curli. OmpR est activé par une phosphorylation. Le variant *ompR234* est un mutant constitutivement actif de OmpR ;
- des signaux environnementaux sont également mis en jeu tels que l'oxygénation, l'osmolarité, la température ou le pH.

Les curli sont capables de faciliter les interactions entre bactéries entraînant des phénomènes d'agrégation cellulaire, qui ne s'observent que dans le cas où ces curli sont surexprimés (**partie A1**).

De plus, leur production peut être mise en évidence :

- directement sur un milieu au Rouge Congo (**partie A2**), dont la sensibilité est meilleure que l'agrégation ;
- indirectement par une construction utilisant un gène rapporteur (**partie A3**).



ME membrane externe **MI** membrane interne

PERI périplasme **CYTO** cytoplasme

Fig. 1.1. Système de sécrétion des curli (A) et observation de curli en microscopie électronique (B).

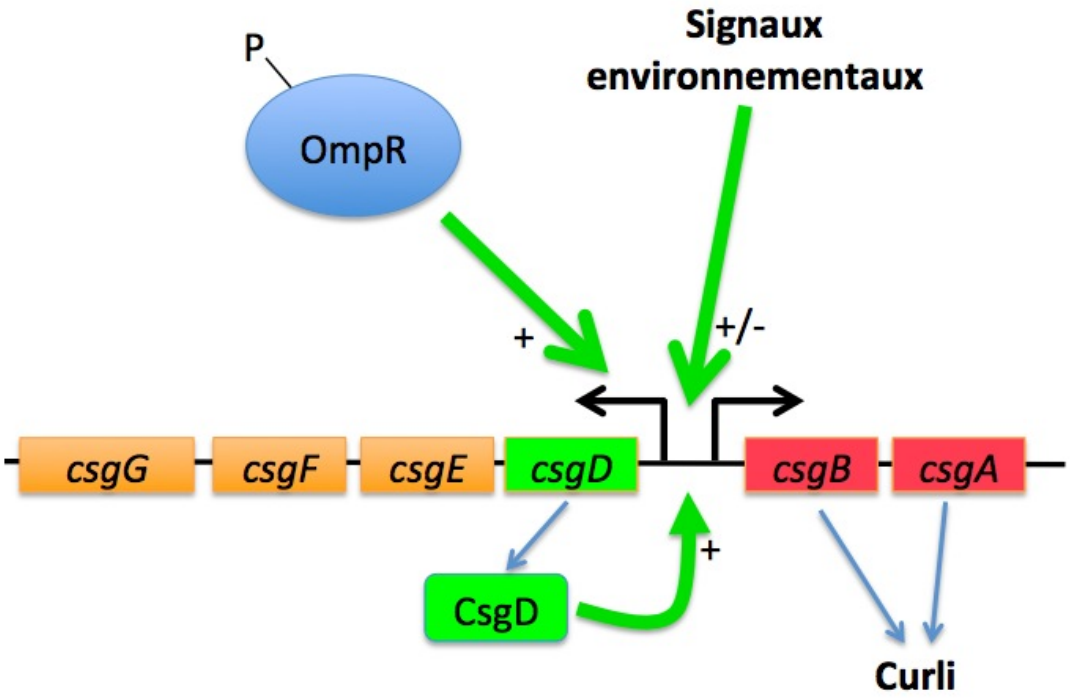


Fig. 1.2. Régulation des gènes permettant la production de curli.

ANNEXE 2

Antigène 43 (Ag43)

Le gène *agn43* est un gène codant une protéine majeure de la membrane externe chez *E. coli*. Découverte en 1980, cette protéine fait partie de la famille des autotransporteurs qui possèdent dans leur séquence primaire toute l'information leur permettant de se transporter à l'extérieur de la bactérie. Cette protéine est connue pour ses capacités d'auto-reconnaissance permettant ainsi aux bactéries qui la produisent d'interagir entre elles et de former des agrégats bactériens. La protéine Ag43 est monomérique et possède un domaine extracellulaire qui s'étend sur une courte distance de 10 nm (**fig. 2.1.**).

L'une des originalités de cette protéine est la régulation de sa production. L'expression du gène *agn43* est régit par un mécanisme original dit de "variation de phase" (**fig. 2.2.**). Deux régulateurs sont en compétition pour expliquer cette variation de phase :

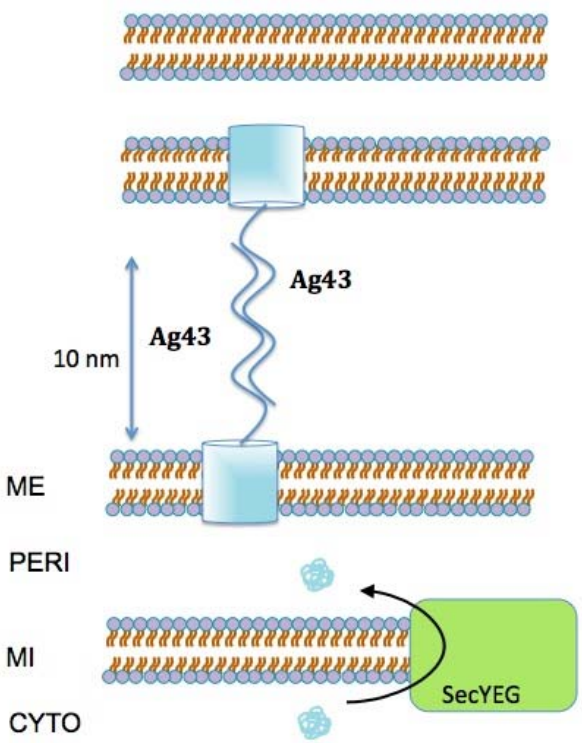
- Dam méthylase (activateur), capable de méthyler 3 sites GATC trouvés en aval du promoteur de *agn43*, ce qui empêche la fixation d'OxyR ;
- OxyR (répresseur) qui se fixe en aval du promoteur lorsque l'ADN n'est pas méthylé, et qui empêche la progression de l'ARN polymérase.

Ainsi, dans une situation de type sauvage, chaque bactérie est :

- soit dans une situation OFF pour l'Ag43 : après réplication de l'ADN, la protéine OxyR se lie à son site de fixation avant méthylation de l'ADN ;

- soit dans une situation ON pour l'Ag43 : la méthylation de l'ADN se produit avant que OxyR ne puisse se lier à l'ADN.

Cet état ON ou OFF de chaque bactérie se traduit par, respectivement, la présence ou l'absence de l'Ag43 à la surface cellulaire. De plus, chaque bactérie ON ou OFF peut générer des cellules filles ON ou OFF à une fréquence dite de "switching" qu'il est possible de calculer (**partie B1**).



ME	membrane externe	**MI**	membrane interne
PERI	périplasme	**CYTO**	cytoplasme

Fig. 2.1. La protéine Ag43, une "adhésine" favorisant l'interaction entre bactéries.

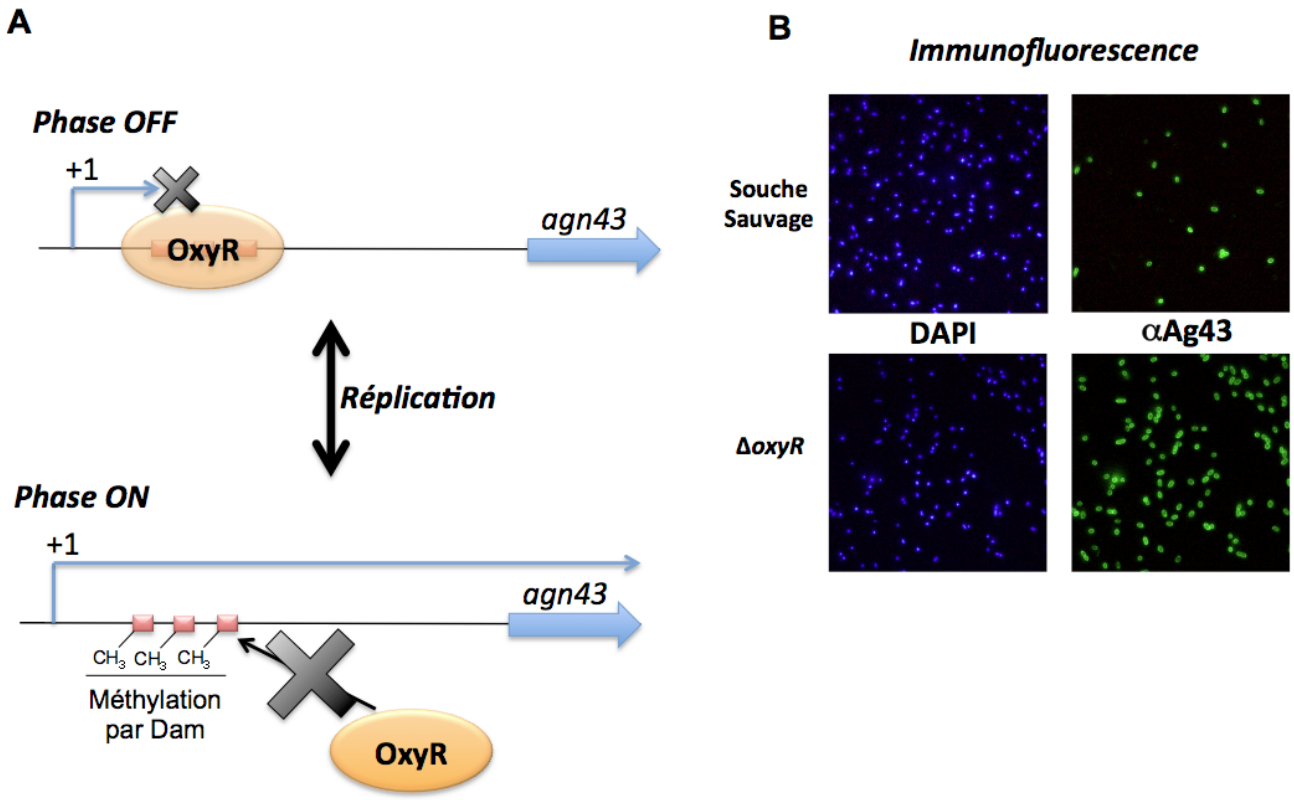


Fig. 2.2. Régulation de *agn43* par un mécanisme de variation de phase.
A. Compétition entre OxyR et Dam dans les souches OFF ou ON pour l'Ag43.
B. Chez une souche sauvage les bactéries sont soit en phase OFF, soit en phase ON comme visualisé par immunofluorescence en utilisant le DAPI qui colore l'ADN de toutes les bactéries et un anticorps anti-Ag43 qui marque seulement les bactéries produisant l'Ag43 à leur surface.
La délétion du gène *oxyR* abolit le mécanisme de variation de phase, toutes les bactéries sont en situation phase ON pour l'Ag43.

ANNEXE 3

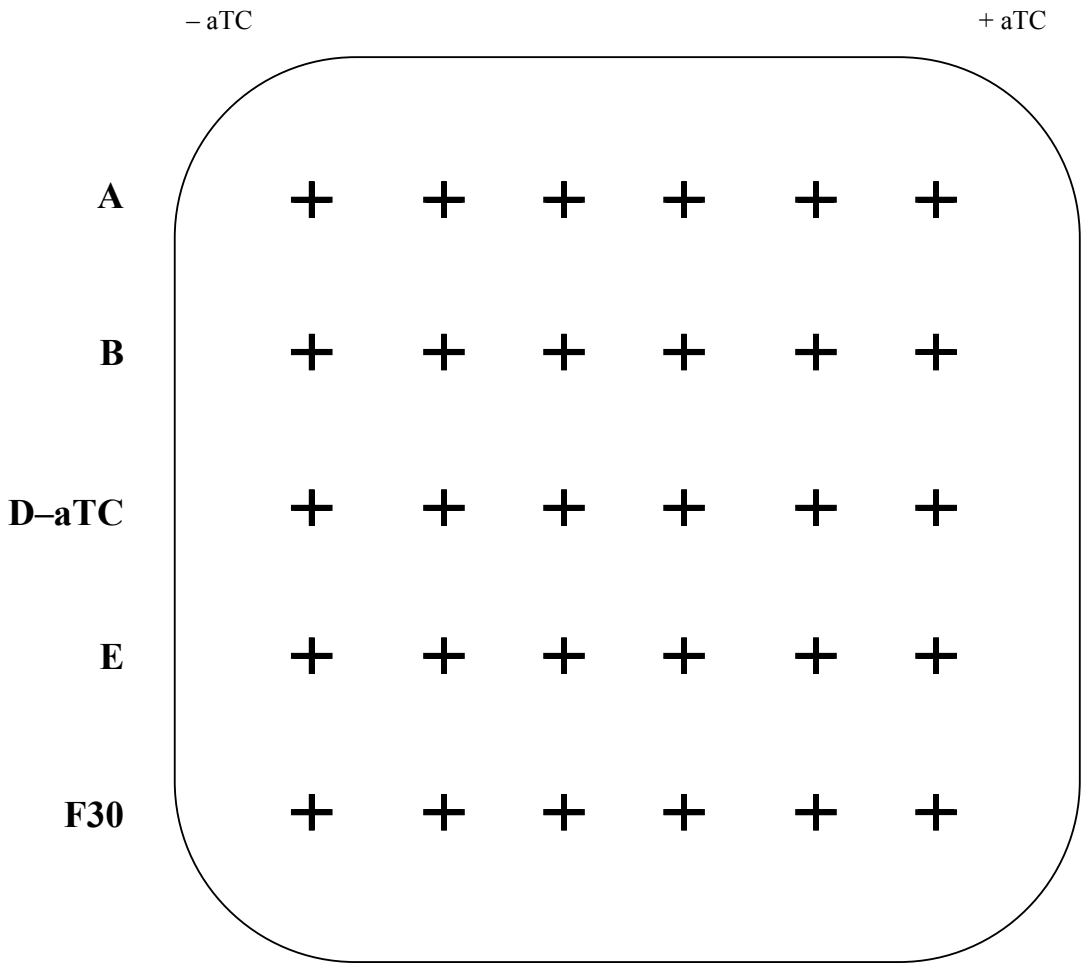
Souches J1

Toutes les souches sont des *E. coli* K-12.

SOUCHE	GENOTYPE	COMMENTAIRE
A	Sauvage	
B	Mutant *ompR234*	Régulateur OmpR constitutivement actif
D	Opéron *csgDEFG* sous contrôle d'un promoteur inductible par l'anhydro-tétracycline (aTC)	La présence de OmpR n'est plus nécessaire pour la production des curli.
E	Mutant Δ*ompR*	
F	Délétion du gène *csgA* (Δ*csgA*) et remplacement par un gène rapporteur *uidA* codant la β-glucuronidase	
G	Souche **F** possédant une mutation Δ*ompR*	
H	Construction génétique de type fusion-rapporteur au locus *agn43*	

ANNEXE 4

Gabarit pour le dépôt des souches sur les géloses au Rouge Congo (partie A2)



ANNEXE 5

Pipetage inverse

PRINCIPE

Le volume sélectionné plus un excédant sont aspirés dans la pointe. La distribution est faite sans la purge et le volume excédentaire est retenu dans la pointe.

MODE OPERATOIRE

1 Appuyer complètement sur le bouton-poussoir **jusqu'à la 2e butée**.

2 Immerger l'extrémité du cône dans le liquide (à 2-3 mm en dessous de la surface du liquide).
Laisser le bouton remonter lentement à sa position d'origine, **en l'accompagnant avec le pouce** (sans le lâcher) *: le liquide aspiré dans le cône correspond au volume à transférer et au volume excédentaire.*

3 Pour distribuer le liquide, appuyer sur le bouton-pressoir **jusqu'à la 1e butée**, et maintenir cette position : *le liquide restant dans la pointe ne doit pas être inclus au volume distribué.*

4 Jeter le liquide excédentaire, en appuyant **jusqu'à la 2e butée**.
Laisser ensuite remonter le bouton à sa position de repos.

AGRÉGATION EXTERNE DE BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE SESSION 2011

ÉPREUVE PRATIQUE DE MICROBIOLOGIE

TRAVAIL DU DEUXIÈME JOUR

Le sujet du premier jour est restitué au poste de travail.
Le compte-rendu du premier jour peut être consulté.
L'annexe 8 complétée sera rendue avec la copie.

INTRODUCTION

Outre les curli et l'antigène 43 (étudiés au premier jour), *E. coli* possède également d'autres adhésines, les **fimbriae de type 1** (**annexe 6**). Les souches étudiées ici sont présentées dans l'**annexe 7**.

- La **partie A** s'intéresse aux curli.
- La **partie B** propose d'étudier l'antigène 43.
- La **partie C** concerne les rôles des fimbriae de type 1.

PARTIE A
Les curli

A2- Visualisation de l'expression des curli sur gélose au Rouge Congo

MANIPULATIONS

- Observer le résultat de la croissance des souches.

COMPTE-RENDU

12. Présenter les résultats, puis conclure en comparant les résultats obtenus aux génotypes annoncés dans l'**annexe 7**. Discuter de l'effet de la température et de l'anhydro-tétracycline sur l'expression des curli.
13. Faire un bilan général de la **partie A** sous forme d'un tableau rassemblant le génotype et les phénotypes de chaque souche en terme d'expression des curli et d'agrégation. Commenter notamment le comportement d'une souche sauvage.

PARTIE B
L'antigène 43 (Ag43)

B1- Régulation de l'expression de l'Ag43

MANIPULATIONS

- Pour chaque boîte, compter les colonies bleues et les colonies blanches.

On retiendra comme comptable toute boîte ayant moins de 300 colonies au total.

COMPTE-RENDU

14. Présenter les résultats obtenus pour chaque dilution dans un tableau.
15. Pour chaque phénotype initial (colonie blanche (W) ou colonie bleue (B)), calculer la fréquence de variation de phase (*frequency of switching*) à l'aide de la formule suivante :

$$F = 1 - e^{\left(\frac{1}{n} \cdot \ln(1-x)\right)} \quad \text{avec } x = \frac{N_{B \leftrightarrow W}}{N_{total}}$$

F : fréquence de variation de phase n : nombre de générations = (log N_{total} / log 2)

$N_{B \leftrightarrow W}$: concentration bactérienne pour la population ayant changé de couleur, en UFC•mL^{-1}

N_{total} = concentration bactérienne totale en UFC•mL^{-1}

16. Comparer les fréquences de variation de phase pour chaque phénotype initial. Commenter.

B2- Agrégation médiée par l'Ag43

L'objectif est de déterminer la corrélation entre le phénotype d'agrégation et la couleur des colonies sur gélose LB+Xgal.

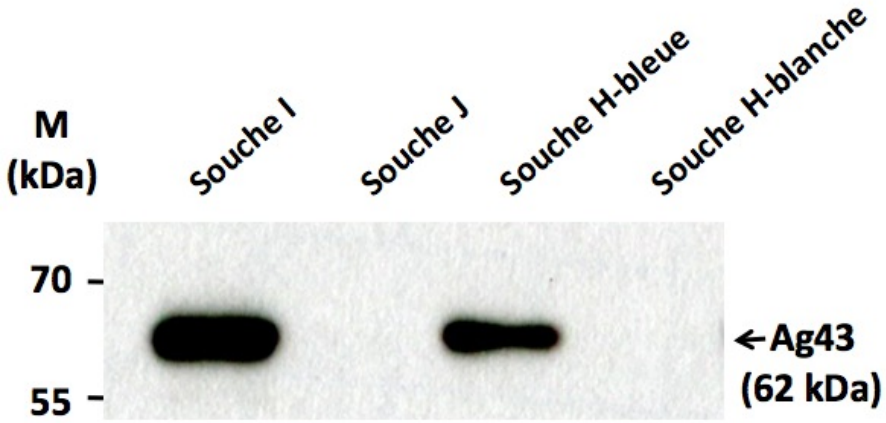
On dispose pour cela des souches **H-bleue** (culture de la souche H issue d'une colonie bleue), **H-blanche** (culture de la souche H issue d'une colonie blanche), **I** et **J** : elles possèdent toutes le gène rapporteur *lacZ*, ainsi que d'éventuelles autres mutations (**annexe 7**).

Cultures

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

E. coli, notées **H-bleue, H-blanche, I** et **J**

La figure ci-dessous représente le résultat d'une immunodétection d'Ag43 à partir d'extraits membranaires issus de cultures des souches **H-blanche**, **H-bleue**, **I** et **J**, après électrophorèse en SDS-PAGE.



NB : *L'Ag43 présente une masse moléculaire apparente sur SDS-PAGE de 62 kDa.*
La β-galactosidase présente une masse moléculaire apparente sur SDS-PAGE d'environ 120 kDa.

MANIPULATIONS

- Laisser reposer 2 heures les tubes à hémolyse fournis sans les agiter sur la paillasse.
- Observer la présence ou l'absence d'agrégation dans les tubes.

COMPTE-RENDU

17. Présenter les résultats.
18. Interpréter, notamment en identifiant le génotype des souches **I** et **J**.
19. Indiquer quelle aurait été la couleur des colonies de la souche **I** et de la souche **J** sur boîtes LB+Xgal. Justifier.
20. Au vu de ces résultats, préciser la construction génétique de la souche **H**.

PARTIE C
Influence des fimbriae de type 1 sur l'adhésion

C1- Adhésion aux cellules eucaryotes

Les fimbriae de type 1 (**annexe 6**) peuvent se lier aux protéines glycosylées présentes à la surface des levures, selon la nature de l'arborisation glucidique.

Cela se traduit par une agglutination observable directement à l'état frais (**partie C12**), et visualisable sous forme d'un voile de levures en microplaque (**partie C13**).

Cultures

Cultures de 18 h en bouillon LB à 37°C, en tubes à hémolyse 10 mL :
E. coli, notées **A**, **P** et **K**

Culture de 18 h en bouillon YPD à 28°C, en tubes à hémolyse 10 mL :
S. cerevisiae, notée **L**

Réactif

PBS 1X : 50 mL en flacon
αMM (α-méthyl-mannoside) à 1 mol•L^{-1} en eau : 150 µL en microtube vert
Glu (D-glucose) à 1 mol•L^{-1} en eau : 150 µL en microtube rouge

Matériel spécifique

Microtubes stériles de 2 mL
Tubes à hémolyse stériles de 10 mL
Microcentrifugeuse
Lames et lamelles
Plaque de microtitration à fonds ronds + couvercle
Agitateur de microplaques
Miroir
Chronomètre

MANIPULATIONS

C11- Préparation des cellules

- Répartir dans quatre microtubes 1,5 mL de chacune des souches suivantes : **A**, **P**, **K** et **L**.
- Centrifuger 10 min à 5000 rpm.
- Enlever le surnageant de culture.
- Resuspendre chaque culot dans 1,5 mL de PBS 1X.
- Diluer la souche **L** au demi en PBS 1X.

C12- Visualisation de l'agglutination à l'état frais

Dans quatre microtubes, préparer les mélanges suivants, à partir des souches préparées en **C11** :

	TUBE 1	TUBE 2	TUBE 3	TUBE 4
Souche P (µL)	50	50	50	
Souche K (µL)				50
Souche L (µL)	50	50	50	50
D-Glucose (µL)		50		
α-méthyl-mannoside (µL)			50	
PBS 1X (µL)	50			50

- Laisser incuber sur la paillasse pendant 5 min.
- Déposer 10 µL de chacun des mélanges sur une lame de microscope (deux dépôts par lame).
- Recouvrir chaque dépôt d'une lamelle et observer l'agglutination des levures au microscope à l'objectif x40.

Les observations microscopiques seront montrées à un examinateur.

COMPTE-RENDU

21. Présenter les résultats.
22. Conclure en comparant les résultats obtenus aux génotypes annoncés dans l'**annexe 7**. Discuter de l'effet des glucides étudiés.

MANIPULATIONS

C13- Inhibition de l'agglutination par un glucide

- En fonction des résultats de **C12**, choisir le glucide qui inhibe l'agglutination.
- À partir des souches préparées en **C11** et des solutions à disposition, préparer une plaque de microtitration selon le protocole suivant :
    - **Sur les lignes A et C** : douze dilutions en série en PBS du glucide choisi, selon une suite géométrique de raison 1/2. La première cupule contiendra le glucide dilué au 1/2.
      *Le volume dans chaque cupule doit être égal à **25 µL** avant l'ajout de l'inoculum bactérien.*
    - **Sur la ligne E** : remplir selon le plan proposé en **annexe 8**.
    - Ensemencer toutes les cupules de la ligne A avec 25 µL de la souche **A** préparée en **C11**.
    - Ensemencer toutes les cupules de la ligne C avec 25 µL de la souche **P** préparée en **C11**.
    - Couvrir la microplaque, et incuber sous agitation douce 10 minutes à température ambiante.
    - Ensemencer toutes les cupules des lignes A et C avec 50 µL de la souche **L** préparée en **C11**.
    - Couvrir la microplaque, et incuber sous agitation douce 5 minutes à température ambiante, puis laisser reposer sur la paillasse.
- Observer à partir de 30 min d'incubation, et sans toutefois dépasser une heure.

Appeler un examinateur après avoir lu les résultats et avoir rempli l'annexe 8.

COMPTE-RENDU

23. Préciser le glucide choisi pour cette manipulation.
24. Préciser les rôles des témoins réalisés dans la ligne E.
25. Compléter le tableau de l'**annexe 8**.
26. Interpréter.
27. Conclure sur la comparaison des souches **A** et **P**.

C2- Antigène 43 *versus* fimbriae de type 1

On se propose d'étudier l'influence de l'expression des fimbriae de type 1 sur le phénotype d'agrégation dépendant de l'Ag43.

Cultures

Cultures de 18 h en bouillon LB à 37°C, en tubes à hémolyse 10 mL :
E. coli, notées **M** et **N**

MANIPULATIONS

- Laisser reposer 2 heures les tubes à hémolyse fournis sans les agiter sur la paillasse.

- Observer la présence ou l'absence d'agrégation dans les tubes.

COMPTE-RENDU

28. Présenter les résultats.
29. Interpréter ces résultats à l'aide des informations sur la structure de l'Ag43 et des fimbriae de type 1 présentées en **annexes 2 et 6**.

Ce sujet a été proposé par Françoise LATOURRE, Christophe BELOIN, Fabien CÉZARD et Pascal CHILLET.

Bibliographie

- Isolation of an Escherichia coli K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. Vidal & al.
  Journal of Bacteriology (2008), volume 180, p. 2442-2449.
- Escherichia coli biofilms. Beloin & al.
  Current Topics in Microbiology and Immunology (2008), volume 322, p. 249
- A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. Beloin & al.
  Plos Biol (2008), volume 6 (7), p. e167
- Escherichia coli K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. Korea & al.
  Environ Microbiol (2010), volume 12 (7), p. 1957-77
- Regulation and Function of Ag43 (Flu). Van der Woude & Henderson.
  Annual Reviews (2008), volume 62, p.153-69
- Dam-and OxyR-dependent phase variation of agn43: essential elements and evidence for a new role of DNA methylation. Wallecha & al.
  Journal of Bacteriology (2002), volume 184 (12), p. 3338-3347
- Antigen 43 and type 1 fimbriae determine colony morphology of Escherichia coli K-12. Hasman & al.
  Journal of Bacteriology (2000), volume 182 (4), p. 1089-95

Les souches d'E. coli utilisées dans ce sujet sont issues de l'Unité de Génétique des Biofilms de l'Institut Pasteur.

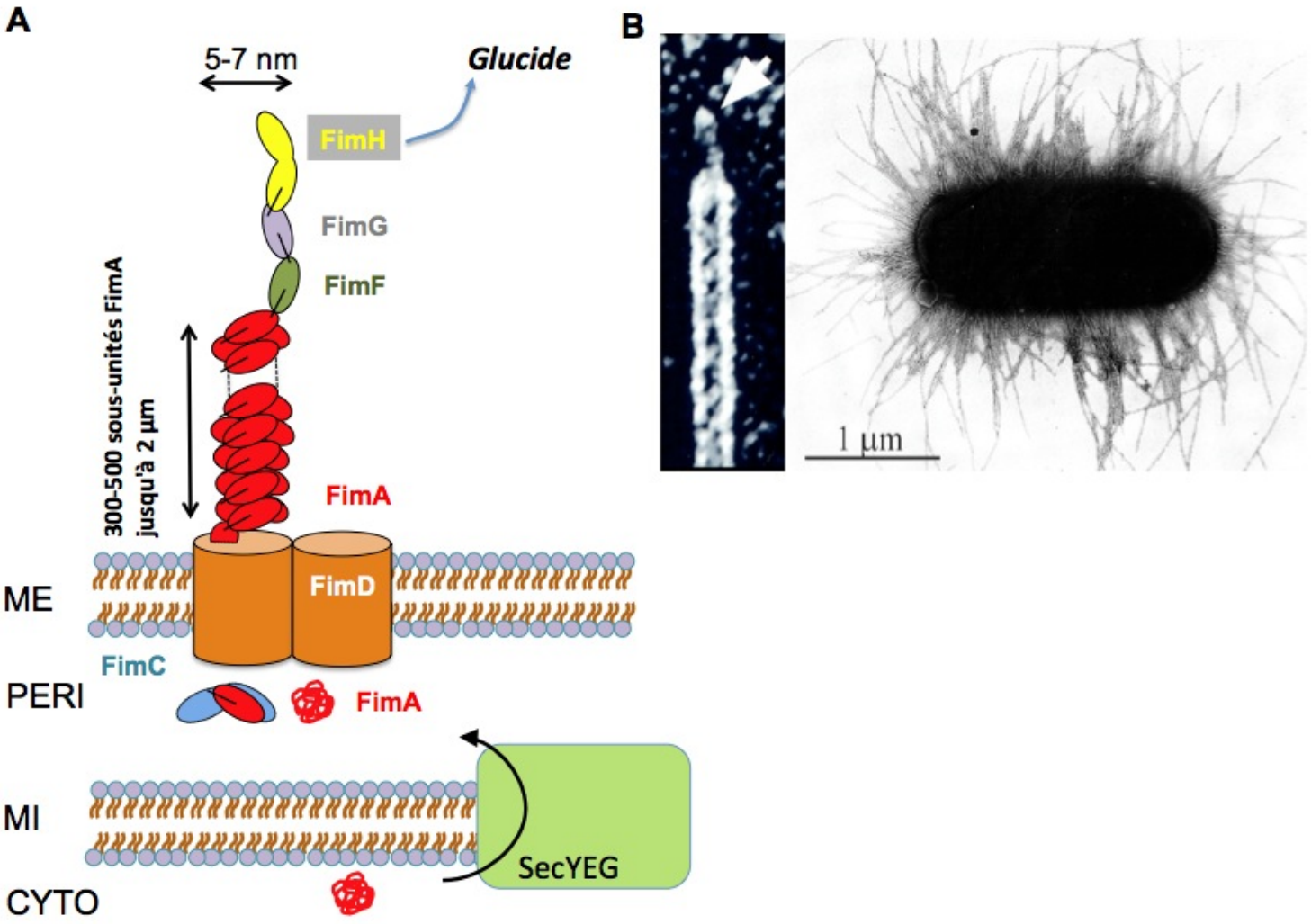
ANNEXE 6

Fimbriae de type 1

Les fimbriae ou pili de type 1 sont des appendices filamenteux de type protéique produits notamment par *E. coli* (**fig. 6.1.**). Les bactéries les exprimant en possèdent de 100 à 500 à leur surface.

Ces fimbriae, codés par l'opéron *fim*, ont une structure tubulaire de 5 à 7 nm de diamètre et de 0,2 à 2 µm de long.

Les fimbriae de type 1, contrairement aux curli ou à l'Ag43, ne permettent pas l'interaction entre bactéries. Ils permettent l'adhésion d'*E. coli* aux cellules eucaryotes grâce à la reconnaissance spécifique de protéines glycosylées par la lectine FimH, placée au bout du fimbriae. Ces protéines glycosylées sont, par exemple, présentes à la surface des levures, produisant un phénomène caractéristique dit d'agglutination des levures (**partie C1**).



ME	membrane externe	**MI**	membrane interne
PERI	périplasme	**CYTO**	cytoplasme

Fig. 6.1. Fimbriae de type 1.
A. Les fimbriae de type 1 ont une structure tubulaire qui permet d'exposer la lectine FimH qui reconnait un glucide présent sur les protéines glycosylées présentes à la surface de cellules eucaryotes comme les levures.
B. La lectine FimH peut être visualisée par microscopie électronique (flèche blanche). De 100 à 500 fimbriae couvrent la surface des bactéries exprimant les fimbriae de type 1.

ANNEXE 7

Souches J1 + J2

Toutes les souches sont des *E. coli* K-12 (sauf la souche **L**, qui est *Saccharomyces cerevisiae*)

SOUCHE	GENOTYPE	COMMENTAIRE
A	Sauvage	
B	Mutant *ompR234*	Régulateur OmpR constitutivement actif
D	Opéron *csgDEFG* sous contrôle d'un promoteur inductible par l'anhydro-tétracycline (aTC)	La présence de OmpR n'est plus nécessaire pour la production des curli.
E	Mutant Δ*ompR*	
F	Délétion du gène *csgA* (Δ*csgA*) et remplacement par un gène rapporteur *uidA* codant la β-glucuronidase	
G	Souche **F** possédant une mutation Δ*ompR*	
H	Construction génétique de type fusion-rapporteur au locus *agn43*	
I	Souche **H** possédant une mutation d'un des régulateurs de *agn43*	
J	Souche **H** possédant une mutation de l'autre régulateur de *agn43*	
K	Mutant Δ*fim*	
M	Mutant Δ*oxyR* Δ*fim*	
N	Mutant Δ*oxyR* Fim^+	Fim^+ = production massive des fimbriae de type 1
P	Mutant Fim^+	Fim^+ = production massive des fimbriae de type 1

ANNEXE 8

Schéma plaque de microtitration (partie C1)

– A RENDRE AVEC LA COPIE –

N° de poste :

cupules	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
PBS (µL)												
Glucide 1 mol•L^{-1} (µL)												
Redistribuer (µL)												
Souche A (µL)												
Souche L (µL)												
C_f (mol•L^{-1})												
Lecture												

cupules	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
PBS (µL)												
Glucide 1 mol•L^{-1} (µL)												
Redistribuer (µL)												
Souche P (µL)												
Souche L (µL)												
C_f (mol•L^{-1})												
Lecture												

cupules	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
PBS (µL)	25	25	25	50								

Souche K (µL)	25											
Souche A (µL)		25										
Souche P (µL)			25									
Souche L (µL)	50	50	50	50								
Lecture												

$\mathbf{C_f}$ = concentration molaire finale du glucide testé

Utiliser pour la lecture les **symboles** : « + », et « – », en précisant la signification que vous leur attribuez.

+ :

–

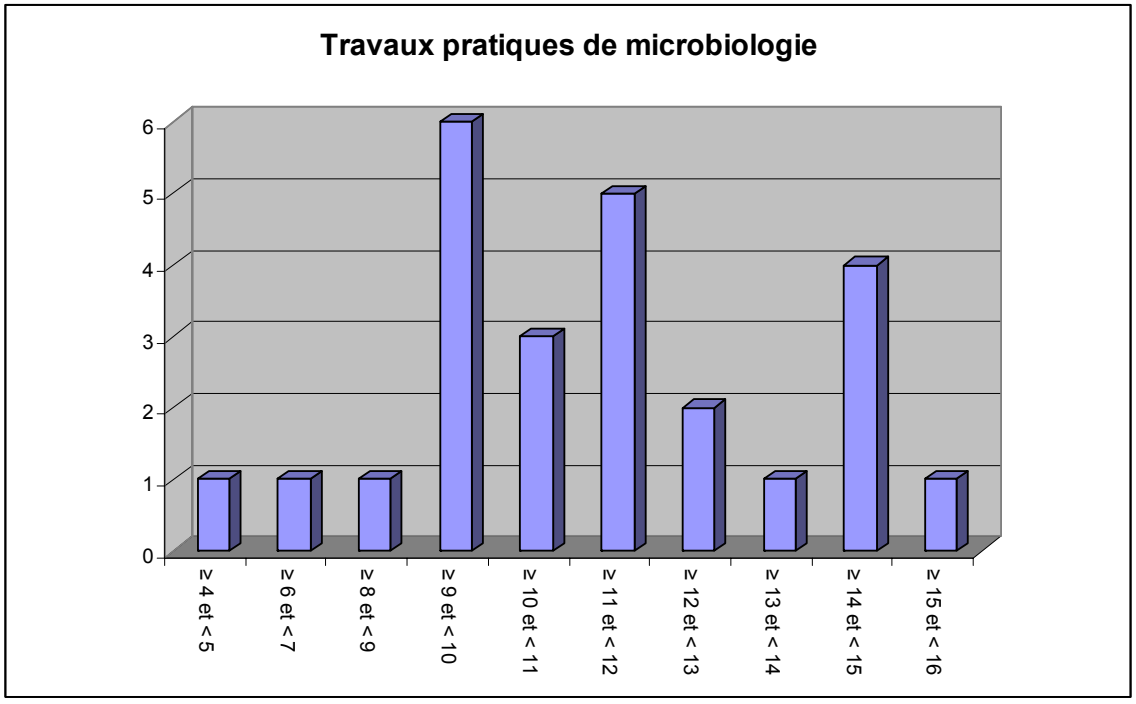
Rapport de l'épreuve de travaux pratiques de microbiologie

Rapport établi par : Christophe BELOIN, Fabien CEZARD, Pascal CHILLET, Françoise LATOURRE

Résultats :

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

Moyenne des notes obtenues à cette épreuve : 11,1.
Meilleure note : 15,4 ; note la plus basse : 04,2.



Le sujet de cette année portait sur l'étude de quelques adhésines bactériennes. Il comportait trois parties avec certains modes opératoires peu classiques, mais qui ne présentaient pas de difficultés techniques particulières. D'ailleurs, les candidats ont dans l'ensemble su s'organiser de façon efficace afin de réaliser l'ensemble des manipulations.

Bien qu'il ait été précisé que certaines opérations devaient être réalisées devant un examinateur, quelques candidats ont parfois oublié de se manifester.

Il a été constaté peu de fautes importantes de sécurité ; cependant, il convient de faire particulièrement attention à certains gestes :

- les cuves de spectrophotomètre doivent être correctement obturées par du parafilm, qu'il ne faut pas enlever avant la lecture ;
- le matériel personnel (crayons…) ne doit pas se trouver dans la zone de manipulation, ni être porté à la bouche ;
- les manipulations nécessitant une aseptie doivent être réalisées près du bec.

Il est rappelé que les candidats doivent organiser le poste de travail à leur convenance afin d'optimiser leurs manipulations et d'éviter les croisements de bras.

Bien que la réalisation technique a été globalement satisfaisante, la rédaction des comptes-rendus a été souvent décevante, en terme d'organisation (numérotation des réponses…) et de présentation (tableaux de résultats difficilement lisibles…). Néanmoins, le jury a apprécié les efforts rédactionnels de certains candidats (identification claire des parties, schémas, code couleur, graphique soigné…).
D'autre part, le jury note une méconnaissance de certaines notions de base (gène rapporteur, rôle de la □-galactosidase…), des confusions entre les adhésines étudiées dans les différentes parties, et des réponses souvent superficielles par manque de justification des résultats et d'exploitation des annexes.
Enfin, il semble peu approprié de relever les résultats expérimentaux sur des brouillons, puis de les recopier sur le compte-rendu, ce qui est source d'erreur et présente une perte de temps importante.

PARTIE A Les curli

Cette partie s'intéressait au rôle et à l'expression des curli, une adhésine favorisant, entre autres, les interactions entre bactéries. Ces curli ont été étudiés en trois étapes.

Dans une premier étape, on suivait indirectement la production des curli par l'observation de l'agrégation, en fonction du temps, de souches bactériennes possédant des constructions génétiques différentes. Puisque l'agrégation bactérienne est fonction de la concentration des bactéries, ce suivi nécessitait un ajustage préalable des souches, qui s'est avéré laborieux pour certains candidats.

La sédimentation des agrégats bactériens au fond du tube se traduisait par une diminution du trouble (et donc de l'absorbance à 600nm) dans la zone de prélèvement, mesurée au spectrophotomètre, ce qui impliquait de ne pas agiter les tubes.

Le jury a été surpris que ce suivi d'agrégation ait été interprété par certains comme une cinétique de croissance bactérienne.

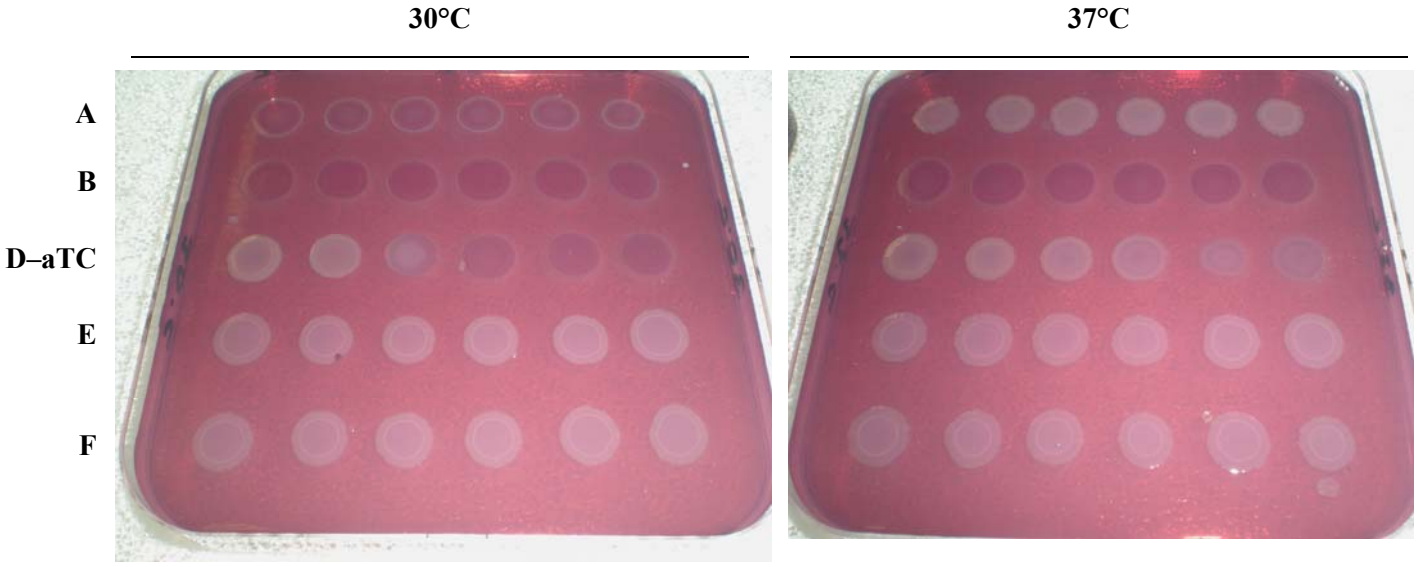
Dans une deuxième étape, on observait l'expression des curli directement par visualisation de l'attachement sur ces structures d'un colorant, le Rouge Congo. Les colonies bactériennes produisant des curli prenaient une coloration rouge sur un milieu contenant ce colorant.

Pour la souche **D**, l'effet de l'anhydro-tétracycline (aTC) sur cette expression était visualisé à l'aide d'un gradient d'aTC, dont la réalisation technique a été bien maîtrisée. De plus, cette partie permettait aussi d'aborder la régulation de l'expression des curli par la température (30 *vs* 37°C).

Le jury a apprécié la qualité technique de la majorité des dépôts (utilisation de la technique de pipetage inverse) et le respect du gabarit fourni. La présentation des résultats obtenus a, elle aussi, été la plupart du temps bien réalisée bien que certains candidats n'aient pas toujours su voir les effets de la température sur les intensités de

coloration, souvent par défaut d'une observation minutieuse ou adaptée (il convenait de regarder les boîtes à plat avec les couvercles enlevés et non pas à l'envers à travers la gélose).

L'intérêt du système de gradient d'aTC a, quant à lui, été bien compris ainsi que l'induction de la production des curli, de manière graduelle, présente dans la souche pour laquelle une partie des gènes codant les curli était sous contrôle d'un promoteur inductible à l'aTC (souche **D**).



Dans une troisième étape, on quantifiait directement l'expression des curli à l'aide d'un gène rapporteur codant la β-glucuronidase sous le contrôle du promoteur de l'opéron *csgBA*.

Bien qu'il s'agisse d'un sujet de Microbiologie, une détermination d'activité enzymatique nécessite de la rigueur technique (respect de la température de réaction, mesure précise des temps, observation de l'apparition de la coloration, anticipation de l'arrêt de la réaction…).

L'exploitation des résultats n'a été que partielle, et le jury déplore de nombreuses erreurs de calcul, malgré la formule qui était fournie.

Il convenait enfin de dresser un bilan des résultats obtenus pour cette partie, c'est-à-dire de relier le génotype de chaque souche aux différents phénotypes observés (annexe). Ce bilan a malheureusement souvent été négligé, et notamment la comparaison des phénotypes observés pour la souche sauvage **A** et la souche **D** (en présence et absence d'aTC) dans l'expérience d'agrégation en tube (A1) et de coloration des colonies sur gélose Rouge Congo (A2). Cette comparaison aurait dû amener les candidats à une discussion sur la sensibilité des techniques utilisées.

PARTIE B L'antigène 43 (Ag43)

Cette partie portait sur le rôle et la régulation de l'expression de l'Ag43, une autre adhésine de courte taille favorisant les interactions très proches entre bactéries, et dont l'expression entraînait un phénomène d'auto-agrégation des bactéries.

Dans un premier temps, on étudiait la régulation originale de l'expression de l'Ag43, en mettant en évidence le phénomène de variation de phase, et en calculant sa fréquence, à l'aide d'une souche **H** présentant une fusion du gène *agn43* avec un gène rapporteur *lacZ* codant la β-galactosidase.

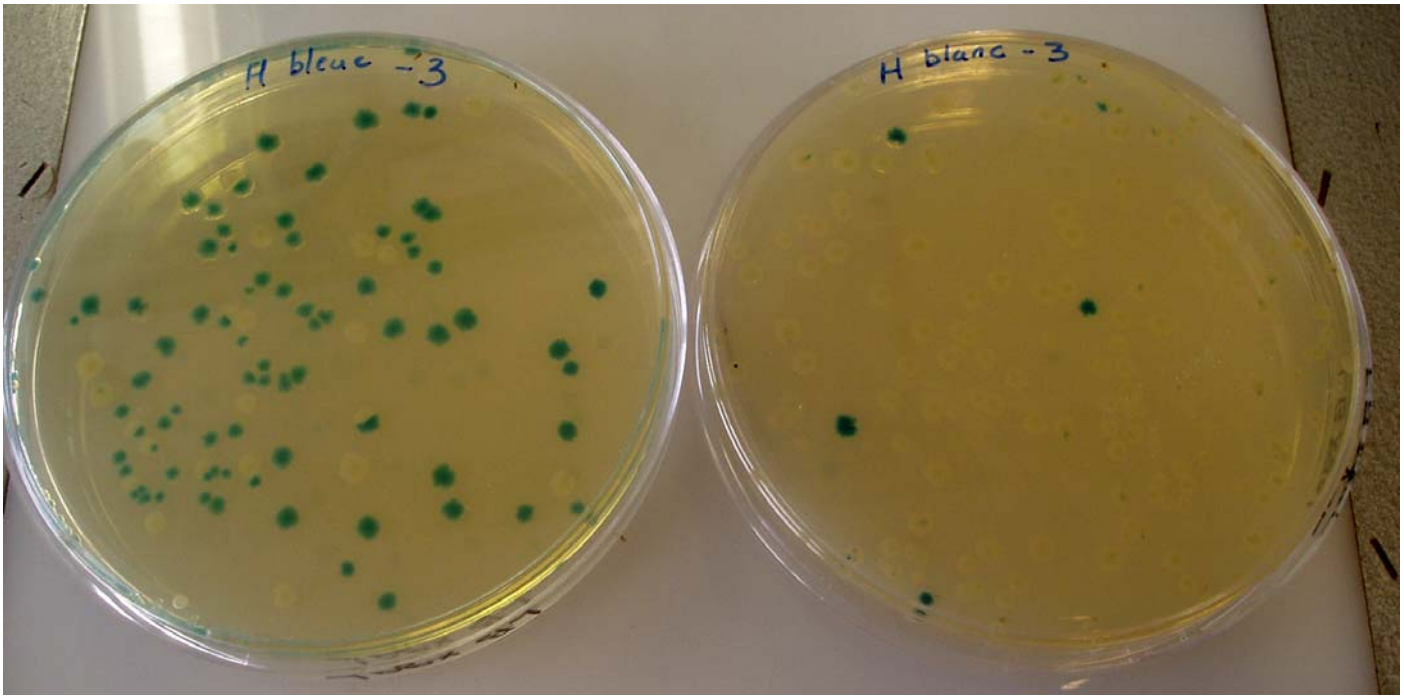
Cette variation de phase (état ON pour Ag43 ⇔ état OFF pour Ag43) est observée par le changement de couleur des colonies dénombrées sur milieu contenant du X-gal, suite à l'expression du gène rapporteur *lacZ* (bleues = ON ; blanches = OFF). Les fréquences indiquaient que les colonies ON changeaient de phase plus souvent que les colonies OFF.

Les dénombrements ont été réussis, mais il est regrettable que la présentation des résultats ait été peu claire, et qu'il y ait eu beaucoup d'erreurs dans les calculs, alors que la formule était fournie, et que des calculatrices et des ordinateurs étaient à disposition.

Certains candidats ont proposé, à la suite de cette analyse, des hypothèses pertinentes :

- sur la différence de fréquence de variation de phase observée, comme par exemple une différence de vitesse d'action des deux régulateurs en compétition (Dam méthylase et OxyR) ;
- sur la nature de la construction génétique de la souche **H** (à ce stade, plusieurs hypothèses étaient possibles).

10^{-3} à partir d'une colonie bleue (ON) 10^{-3} à partir d'une colonie blanche (OFF)



Dans un second temps, on cherchait à élucider précisément cette construction génétique, à l'aide des résultats fournis d'une immunodétection d'Ag43, dont l'exploitation a souvent été négligée. La souche **H** présentait une fusion de type opéron au locus natif de *agn43* sur le chromosome de *E. coli* (fusion transcriptionnelle *agn43* - *lacZ*).

Deux mutants de la souche **H** étaient aussi étudiés. Dans ces deux mutants, le mécanisme de variation de phase avait disparu : la souche **I** était « bloquée » dans une situation ON (délétion du gène codant le répresseur OxyR), et la souche **J** dans une situation OFF (délétion du gène codant l'activateur Dam méthylase).

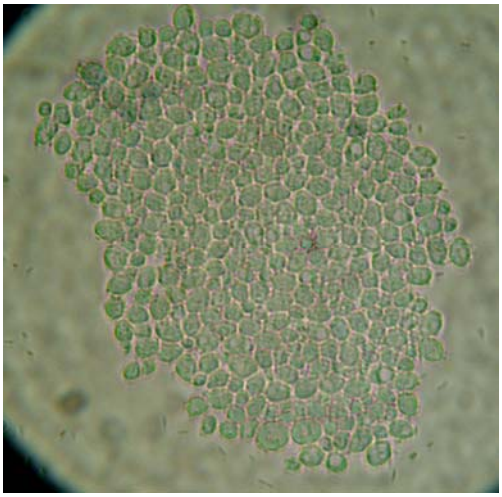
PARTIE C Influence des fimbriae de type 1 sur l'adhésion

Cette dernière partie traitait du rôle et de l'influence des fimbriae de type 1 sur l'adhésion.

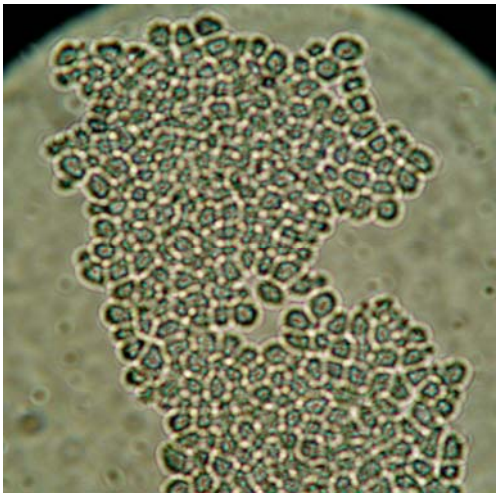
Tout d'abord, on étudiait l'adhésion aux cellules eucaryotes médiée par ces fimbriae : la lectine terminale des fimbriae de type 1 reconnait un motif glucidique porté par les levures, ce qui provoque leur agglutination. Afin de déterminer le glucide impliqué dans cette interaction, des états frais de mélanges bactéries-levures ont été réalisés, en présence de glucose ou d'□-méthyl-mannoside (□MM). L'□MM inhibe l'agglutination des levures dépendante des fimbriae de type 1 (pour une souche P surexprimant ces fimbriae), probablement en se fixant sur la lectine FimH l'empêchant ainsi de se fixer sur les protéines glycosylées des levures. Le glucose ne présentait pas d'effet inhibiteur, et la souche K (ne produisant pas de fimbriae) servait de témoin négatif d'agglutination.

Le jury a apprécié la qualité des préparations et des observations microscopiques. Malheureusement, l'effet de l'αMM n'a pas été interprété.

P + L + PBS



P + L + glucose



P + L + αMM

K + L + PBS

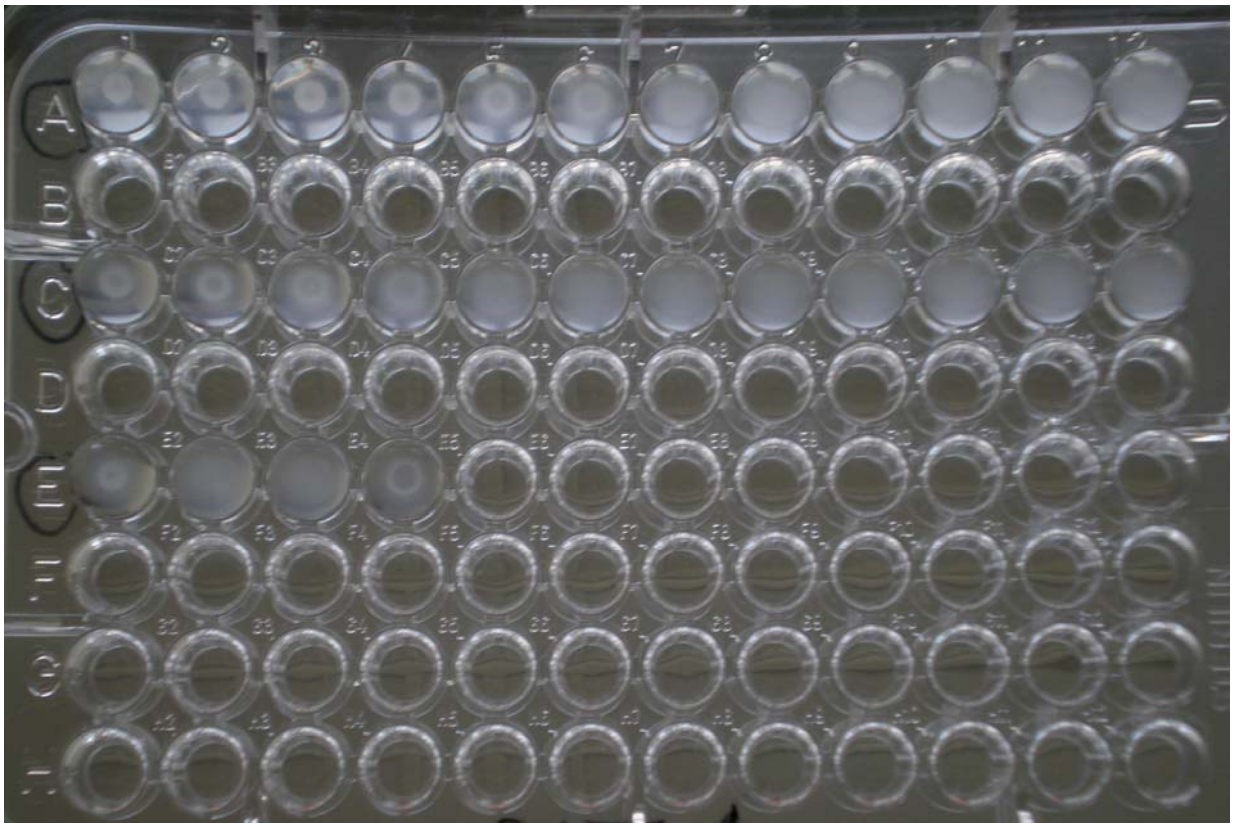
erminait sa « C
microplaque vis-à-vis de deux souches bactériennes, A et P. Cette manipulation a été bien menée par la grande majorité des candidats. Cependant :

- l'annexe 8 a été parfois remplie de manière partielle ou erronée (notamment les concentrations finales en glucide) ;
- l'interprétation de la lecture a été très souvent inversée : un voile de levures correspond à une agglutination, un bouton à une sédimentation ;
- les témoins ont rarement été confirmés avant de valider la technique et d'interpréter les essais.

Il est rappelé qu'une CMI correspond à la concentration en αMM de la dernière cupule où il y a encore inhibition de l'agglutination :

- pour la souche A, la CMI d'agglutination était : 1 mmol•L^{-1} < CMI ≤ 2 mmol•L^{-1} ;
- pour la souche P, la CMI d'agglutination était : 4 mmol•L^{-1} < CMI ≤ 8 mmol•L^{-1}.

L'agglutination des levures causée par la souche sauvage **A** est donc inhibée par des concentrations d'αMM inférieures à celles qui doivent être utilisées pour inhiber l'agglutination causée par la souche **P**. Au vu des informations fournies dans les annexes correspondantes sur les génotypes des souches, il s'agissait de faire l'hypothèse que la capacité d'agglutiner les levures est corrélée à la quantité de fimbriae de type 1 produits par les bactéries.



Enfin, on montrait que les fimbriae de type 1, bien que favorisant l'adhésion des bactéries les produisant aux cellules eucaryotes, empêchaient l'agrégation des bactéries médiée par l'Ag43. Trop peu de candidats ont interprété les résultats en utilisant les données sur la structure et la taille de l'Ag43 et des fimbriae de type 1. Au regard de ces informations, on peut supposer que la formation d'agrégats nécessite le rapprochement à courte distance (de l'ordre de 10 nm) des bactéries permettant les interactions bactérie/bactérie. Ainsi, de grandes structures pouvant aller jusqu'à 2 µm de long peuvent repousser les bactéries à plus grande distance empêchant ainsi les interactions entre molécules d'Ag43 et donc le phénomène d'agrégation qui en découle.

ANNEXE : CARACTERISATION DES DIFFERENTES SOUCHES PROPOSEES – PARTIE A

		SOUCHES												
EXPERIENCE	**TEST**	**A**	**B**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**P**	**M**	**N**
Agrégation Curli (partie A1)	Agrégation en tube	+/–	+++	+/– (± aTC)	–	-–								
Expression des curli (partie A2)	Coloration Rouge Congo	+ 30°C +/– 37°C	+++ 30 et 37°C	Gradient de couleur avec la [aTC] et coloration plus forte à 30°C	–	–								
Quantification de l'expression des curli (partie A3)	Mesure de l'activité β-glucuronidase d'une fusion *csgA*::*uidA*					+++ à 30°C et +/– à 37°C	+/– à 30 et 37°C							

Bilan Curli (partie A)

A : sauvage, production légère de curli à 30°C visible sur gélose Rouge Congo mais insuffisante pour entraîner une agrégation en tube.

B : *ompR*234, constitutive pour l'activateur des curli, forte production des curli indépendamment de la T°C, visible sur gélose Rouge Congo et forte agrégation en tube.

D : opéron *csgDEFG* sous contrôle d'un promoteur inductible à l'aTC, produit des curli de manière croissante avec l'augmentation de [aTC] et la baisse de T°C, visible sur gélose Rouge Congo mais insuffisant pour provoquer une agrégation en tube. Cette dernière n'est visible qu'en présence de gros agrégats et donc d'une concentration massive de curli.

E : Δ*ompR*, pas d'activateur des curli donc production basale quelque soit la T°C, non détectable sur gélose Rouge Congo et pas d'agrégation en tube.

F : fusion Δ*csgA*::*uidA*, souche rapporteur de l'expression de l'opéron *csgBA* et donc des curli. Induction à 30°C. *csgA* étant délété, cette souche ne produit pas de curli et donc est blanche sur gélose Rouge Congo.

G : Δ*csgA*::*uidA* et Δ*ompR*. L'activateur OmpR étant délété, l'expression de *csgBA* est faible quelque soit la T°C. *csgA* étant délété, cette souche ne produit pas de curli et donc est blanche sur gélose Rouge Congo.

ANNEXE : CARACTERISATION DES DIFFERENTES SOUCHES PROPOSEES – PARTIE B

		SOUCHES												
EXPERIENCE	**TEST**	**A**	**B**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**P**	**M**	**N**
Régulation de l'expression de *agn43* (partie B1)	Analyse de la variation de phase							ON et OFF B√W ~10^{-2} W√B ~10^{-3}						
Agrégation médiée par l'Ag43 (partie B2)	Agrégation en tube et immunodétection							H bleu= agreg + et Ag43 + (taille de Ag43) H blanche= agreg – et Ag43 –	Agreg ++ et Ag43 ++	Agreg – et Ag43 –				

Bilan Ag43 (partie B)

H : Fusion *agn43-lacZ*. Souche rapporteur du phénomène de variation de phase avec des colonies bleues (ON) et des colonies blanches (OFF) qui donneront après étalement des colonies ON et OFF à une fréquence qui a pu être calculée. La fréquence de "switching" de ON√OFF est supérieure à celle de OFF√ON. Cette souche produit un Ag43 d'une taille correspondant à la séquence primaire d'Ag43. Elle n'est pas délétée de *agn43* ni ne possède une fusion traductionnelle *agn43*::*lacZ*. Il s'agissait d'une fusion de type "opéron" (fusion transcriptionnelle mais permettant la synthèse de deux polypeptides distincts : Ag43 et β -galactosidase).

I : Agrégation forte en tube, Ag43 ++ en immunodétection et mutée pour un régulateur donc souche Δ*oxyR*.

J : Pas d'agrégation en tube, Ag43 – en immunodétection et mutée pour l'autre régulateur donc souche Δ*dam*.

ANNEXE : CARACTERISATION DES DIFFERENTES SOUCHES PROPOSEES – PARTIE C

		SOUCHES												
EXPERIENCE	**TEST**	**A**	**B**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**P**	**M**	**N**
Adhésion aux cellules eucaryotes médiée par les fimbriae de type 1 (partie C1)	Agglutination à l'état frais et en plaque	+ inhibition par αMM (CMI=1-2 mM)									–	++ inhibition par αMM (CMI=4-8 mM)		
Ag43 *versus* fimbriae de type 1 (partie C2)	Agrégation en tube												++	–

Bilan fimbriae type 1 (partie C)

K : Absence d'agglutination des levures. Souche Δ*fim*.

A : Souche sauvage. Agglutination des levures mais inhibition de cette agglutination à une [αMM] plus faible que **P** qui surproduit les fimbriae de type 1, donc faible expression des fimbriae de type 1.

P : Forte agglutination des levures et inhibition de cette agglutination à une [αMM] plus forte que **A**. Surproduction des fimbriae de type 1, qui sont constitutivement exprimés dans cette souche.

M : Δ*oxyR* et Δ*fim,* donc forte production de l'Ag43 d'où la forte agrégation de cette souche en tube. Pas de fimbriae de type 1.

N : Δ*oxyR* et expression constitutive des fimbriae de type 1. Masquage de l'Ag43 par les fimbriae de type 1 à la surface de *E. coli*. Plus d'interactions proches bactéries/bactéries Ag43 dépendantes possibles donc absence d'agglutination.

Epreuve d'admission

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE GENERALE ET ANALYTIQUE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient 2

Session 2011

Sommaire

A. PARTIE EXPERIMENTALE 68

A.1. HYDROLYSE DE L'ASPARTAME 68

A.2. IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES CONSTITUTIFS L'ASPARTAME68

A.3. DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE LA PHENYLALANINE CONTENUE DANS LA SOLUTION (S) 68

B. EXPLOITATION DES RESULTATS 5

B.1. HYDROLYSE DE L'ASPARTAME 5

B.2. IDENTIFICATION DES ACIDES A-AMINES CONSTITUTIFS L'ASPARTAME5

B.3. DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE LA PHENYLALANINE CONTENUE DANS LA SOLUTION (S) 6

B.4. TITRAGE DE LA SOLUTION (S) PAR UNE SOLUTION D'HYDROXYDE DE SODIUM 6

C. ETUDE DE L'ASPARTAME 7

C.1. CHIMIE ORGANIQUE 7

C.1.1. STEREOCHIMIE 71

C.1.2. SYNTHESE DE L'ACIDE ASPARTIQUE *72*

C.1.3. SYNTHESE PEPTIDIQUE *9*

C.1.4. METABOLISME ET STABILITE DE L'ASPARTAME *10*

C.2. CHIMIE STRUCTURALE 10

C.3. CINETIQUE 11

DONNEES ET LISTE DES INDICATEURS COLORES ..... 76 - 14

ANNEXE 1 - INGREDIENTS DES SUCRETTES 15

ANNEXE 2 - SPECTRE UV-VISIBLE DE LA PHENYLALANINE 15

ANNEXE 3 - COURBES TITRAGE PH-METRIQUE ET CONDUCTIMETRIQUE DE LA SOLUTION (S) 16

ANNEXE 4 - SYNTHESE DE L'ACIDE ASPARTIQUE 17

ANNEXE 5 - TABLE DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES RMN DU PROTON .18

ANNEXE 6 - DIAGRAMME DES ORBITALES MOLECULAIRES DE L'ION CYANURE 19

ANNEXE 7 - SIGNIFICATION DES CODES ALPHANUMERIQUES..... 20 - 21

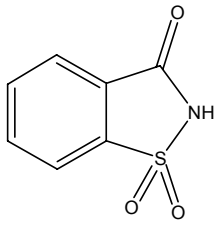
FEUILLE DE RESULTATS 88

L'ASPARTAME

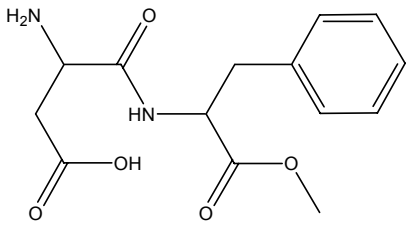
L'utilisation des édulcorants, du latin *dulcorare,* adoucir, s'est développée dans le but de réduire la consommation de saccharose présent dans l'alimentation. Le premier industrialisé, la saccharine, possède ainsi un pouvoir sucrant 300 fois plus élevé que le saccharose. Toutefois son arrière-goût amer a conduit à l'associer à d'autres composés.

C'est en 1965, lors de la synthèse d'un tétrapeptide devant être testé comme médicament anti-ulcère, que fut découvert de manière fortuite le goût particulièrement sucré de l'aspartame. En effet, le pouvoir sucrant de l'aspartame est 200 fois plus élevé que celui du saccharose tandis que son pouvoir calorifique est quasi-nul. Ces deux propriétés en ont fait un édulcorant de choix.

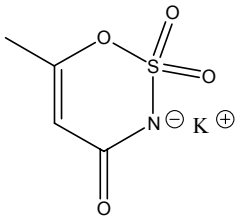
Ainsi la sensation sucrée ressentie lors de l'utilisation d'une sucrette provient de la combinaison de l'aspartame (17%) et de l'acésulfame K (17%).



saccharine



aspartame



acésulfame K

Il est proposé dans ce sujet de réaliser l'hydrolyse de sucrettes et de mettre en évidence les acides aminés constitutifs de l'aspartame puis de doser la phénylalanine par spectrophotométrie.

L'attention des candidats est attirée sur la toxicité de certains des produits manipulés. Les mentions de danger et les conseils de prudence associés aux produits utilisés sont annexés au sujet (annexe 7).
Les résultats expérimentaux seront consignés dans la feuille de résultats fournie en annexe.

A. Partie expérimentale

A.1. Hydrolyse de l'aspartame

Dans un ballon de 100 mL, introduire quatre sucrettes et 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,1mol.L^{-1}. Chauffer à reflux le mélange réactionnel pendant 30 min.

Refroidir le mélange à température ambiante.

Ajouter de l'hydrogénocarbonate de sodium solide jusqu'à ce que le pH de la solution soit aux environs de 7.

A.2. Identification des acides α-aminés constitutifs de l'aspartame

Réaliser une CCM sur gel de silice permettant de mettre en évidence le fait que l'aspartame est un peptide constitué de deux acides α-aminés.
L'éluant sera un mélange butan-1-ol / acide acétique glacial / eau (6/2/2).
Sécher la plaque et sous hotte, déposer à l'aide d'un pinceau un peu de solution de ninhydrine (à 2% dans l'acétone) sur la plaque. On attirera l'attention des candidats sur la toxicité de la ninhydrine. Chauffer la plaque au sèche-cheveux pour faire apparaître les taches colorées.

Compléter la feuille de résultats page 22

A.3. Dosage spectrophotométrique de la phénylalanine contenue dans la solution (S)

Une solution (S) contenant les mêmes acides aminés que ceux obtenus lors de l'hydrolyse de l'aspartame a été préalablement préparée de la façon suivante : dans une fiole de 100 mL, ont été dissous de l'acide aspartique et de la phénylalanine dans un volume V_{HCl} = 25 mL d'acide chlorhydrique de concentration $C_{HCl} = 1{,}00 \cdot 10^{-2}$ mol.L^{-1} puis complété avec de l'eau distillée. L'acide chlorhydrique est en excès.
On souhaite déterminer la concentration C_{phe} en phénylalanine de la solution (S).
Afin de réaliser le dosage spectrophotométrique de la phénylalanine contenue dans la solution (S), il est demandé de préparer 100 mL d'une solution étalon (E) de phénylalanine à 4,00 g.L^{-1}.
A partir de la solution (S) et de la solution étalon (E), préparer cinq solutions selon le mode opératoire résumé dans le tableau ci-dessous :

Solution	**S_0**	**S_1**	**S_2**	**S_3**	**S_4**
Volume de solution (E) /mL	0	5	10	15	20
Volume de solution (S) / mL	10	10	10	10	10
Volume d'eau distillée	quantité suffisante pour 50 mL				

Mesurer l'absorbance à la longueur d'onde choisie de chacune des solutions préparées.

Compléter la feuille de résultats page 22

B. Exploitation des résultats

B.1. Hydrolyse de l'aspartame

1. Ecrire l'équation de la réaction se déroulant lorsque l'aspartame est chauffé en présence d'une solution d'acide chlorhydrique.

2. Quel autre réactif aurait pu être utilisé pour réaliser l'hydrolyse de l'aspartame ?

3. Que signifie l'expression «chauffer à reflux » ?

4. Préciser les précautions à prendre lors de la réalisation du montage à reflux.

5. Quel règlement impose les nouveaux pictogrammes utilisés dans l'étiquetage des produits chimiques ?

Quelles sont les significations des pictogrammes suivants ?

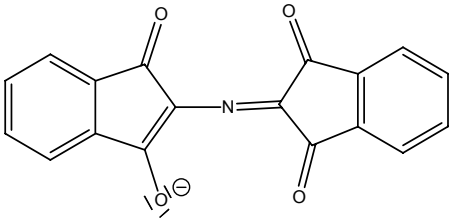
Pictogramme N°1	*Pictogramme N°2*	*Pictogramme N°3*

6. Quel est le rôle de l'ajout d'hydrogénocarbonate de sodium ? Écrire l'équation de la réaction responsable du dégagement gazeux.

B.2. Identification des acides α-aminés constitutifs de l'aspartame

7. Décrire le principe de la chromatographie sur couche mince.

8. La ninhydrine forme avec les acides aminés un composé appelé pourpre de Ruhemann dont la structure est la suivante :



Justifier que ce composé soit coloré.

9. Pour l'un des acides aminés, un autre moyen de révélation aurait été envisageable : lequel et pourquoi ?

B.3. Dosage spectrophotométrique de la solution (S)

10. Justifier la valeur de longueur d'onde choisie pour réaliser les mesures. Quelle précaution doit être respectée compte tenu de la longueur d'onde choisie ?

11. Quel type de méthode est utilisé lors de ce dosage ? Quel est l'avantage de cette méthode ?

12. Déterminer C_i la concentration molaire en phénylalanine provenant de la solution étalon (E) dans chacune des solutions préparées S_i . ***Compléter la feuille de résultats page 22***

13. Montrer que l'absorbance A peut se mettre sous la forme $\mathbf{A = a\, C_i + b}$.

14. Tracer le graphe représentant l'absorbance en fonction de la concentration C_i et déterminer la concentration C_{phe} en phénylalanine de la solution (S). ***Compléter la feuille de résultats page 22***

B.4. Titrage de la solution (S) par une solution d'hydroxyde de sodium

Le titrage de E = 10 mL de la solution (S) par de la soude à la concentration $C_b = 0{,}0415$ mol.L^{-1} est suivi par pH-métrie et par conductimétrie. Les courbes obtenues sont présentées dans **l'annexe 3**, V_b étant le volume de soude versé.

L'acide aspartique

15. *Justifier le fait que l'acide aspartique présente trois acidités et leur attribuer leur pKa respectif.*

16. Comment expliquer l'écart de pKa entre les deux fonctions acide carboxylique ?

La phénylalanine

17. Définir le point isoélectrique de la phénylalanine. Le calculer.

18. Tracer le diagramme de prédominance correspondant à la phénylalanine.

Le titrage

19. Écrire les équations des réactions se déroulant lors de la préparation de la solution (S).

20. Déterminer les espèces présentes à $V_b = 0$.

21. Écrire les équations des réactions possibles lors de l'ajout de soude. Calculer les constantes d'équilibre respectives et justifier le nombre de sauts de pH de la courbe $pH = f(V_b)$.

22. Quel indicateur coloré permettrait de déterminer le volume équivalent V_1 ? La réponse sera justifiée.

23. Déterminer l'expression de la concentration molaire en acide aspartique C_{asp} en fonction de E, V_1, V_{HCl}, C_{HCl} et C_b.

24. Déterminer l'expression de la concentration molaire en phénylalanine C'_{phen} en fonction de E, V_1, V_{HCl}, $C_{HCl'}$, V_2 et C_b.

25. Le résultat est-il cohérent avec la concentration en phénylalanine calculée en B.3 ?

26. Donner la signification de la grandeur « sigma » indiquée en ordonnée sur la courbe conductimétrique. Préciser l'unité de cette grandeur et rappeler la loi de Kohlrausch.

27. Justifier l'allure de la courbe conductimétrique pour $V_b > V_1$.

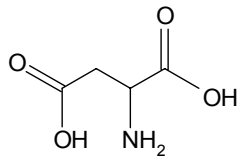
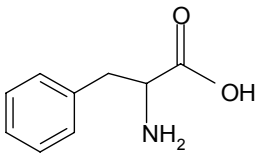
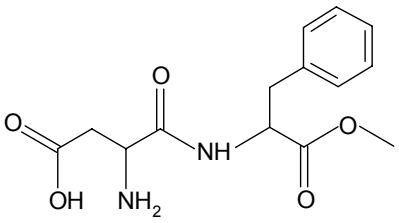
28. Le titrage pH-métrique des sucrettes hydrolysées en A.1 aurait-il conduit au même résultat ? Justifier.

C. Etude de l'aspartame

L'aspartame est synthétisé par couplage des deux acides α-aminés, l'acide aspartique et la phénylalanine, le dernier sous forme d'ester méthylique.

C.1. Chimie organique

C.1.1. Stéréochimie

		
Acide aspartique	***Phénylalanine***	***Aspartame***

29. Qu'est ce qu'un acide α-aminé ?

30. Selon le modèle VSEPR quelle serait la géométrie attendue autour de l'atome d'azote intervenant dans la liaison peptidique. En réalité, les atomes CONH de la liaison peptidique et les atomes de carbone adjacents sont dans un plan, justifier cette affirmation.

L'acide aspartique et la phénylalanine existent sous les deux formes L et D.

31. Donner la représentation de Fischer de la L-phénylalanine.

La phénylalanine, l'acide aspartique et l'aspartame sont des molécules chirales.

32. Donner la définition d'une molécule chirale.

33. Que signifie la donnée $[\alpha]_{25}^{D} = +5{,}0\ °.dm^{-1}.g^{-1}.cm^{3}$ figurant sur l'étiquette d'un flacon d'acide

L-aspartique ? Que signifie la notation D placée en exposant dans la donnée ?

34. Identifier et nommer les groupes fonctionnels présents dans l'aspartame.

35. Combien de stéréoisomères de configuration présente l'aspartame ? Les nommer dans la nomenclature (R, S) et préciser les relations de stéréoisomérie qui existent entre eux.

Parmi les différents stéréoisomères de l'aspartame, seul le stéréoisomère de configuration (S, S) à un goût sucré.

36. Donner une représentation de Cram de ce stéréoisomère.

C.1.2. Synthèse de l'acide aspartique

L'annexe 4 présente une voie de synthèse de l'acide aspartique qui couplé à l'ester méthylique de la phénylalanine permettra d'obtenir l'aspartame. Nous allons nous intéresser à certaines étapes de cette synthèse.

37. *Donner le nom de la molécule **A** et de l'acide aspartique selon la nomenclature IUPAC.*

38. *Donner la représentation de Lewis de l'ion cyanure CN^- et indiquer quelle est la nature de la réaction mettant en jeu cet ion lors de l'étape A → B. Identifier **B**.*

39. *Identifier **E.** Sous quelle forme sont les groupes carboxyliques dans un milieu où l'ammoniac est en excès ?*

40. *Identifier **F, G, I et J**.*

41. *L'étape **G → H** met en jeu l'ion éthanolate. Quel est l'ordre de grandeur du pK_A du couple acide-base alcool / alcoolate ?*

Pourquoi l'hydrogène en α des fonctions esters est-il susceptible d'être arraché par cette base ?

Proposer un mécanisme pour cette étape.

42. *Lors de l'étape **H → I,** l'action de l'ozone est suivie d'un traitement en milieu oxydant. Quel produit aurait-on obtenu si le traitement s'était fait en milieu réducteur ?*

43. *Pourquoi a-t-on réalisé une acylation de la fonction amine à l'étape **F → G** ?*

44. *Quel nom porte la réaction permettant de passer de **J** à l'acide aspartique ?*

L'acide aspartique synthétisé peut être identifié par RMN du proton. (Table des déplacements chimiques fournie en **annexe 5**).

Les signaux présents dans le spectre de l'acide aspartique sont donnés dans le tableau suivant :

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité du signal
11	2	Singulet large
3,8	1	Triplet
2,7	2	Doublet
2	2	Singulet large

45. *Attribuer les signaux observés aux protons de l'acide aspartique et interpréter la multiplicité des signaux.*

C.1.3. Synthèse peptidique

Dans cette partie, nous allons aborder le couplage de l'acide aspartique et de la phénylalanine.

A l'heure actuelle, il existe trois voies de synthèse de l'aspartame : la synthèse chimique, la synthèse enzymatique et la voie directe issue de génie génétique utilisant la méthode de l'ADN recombinant.

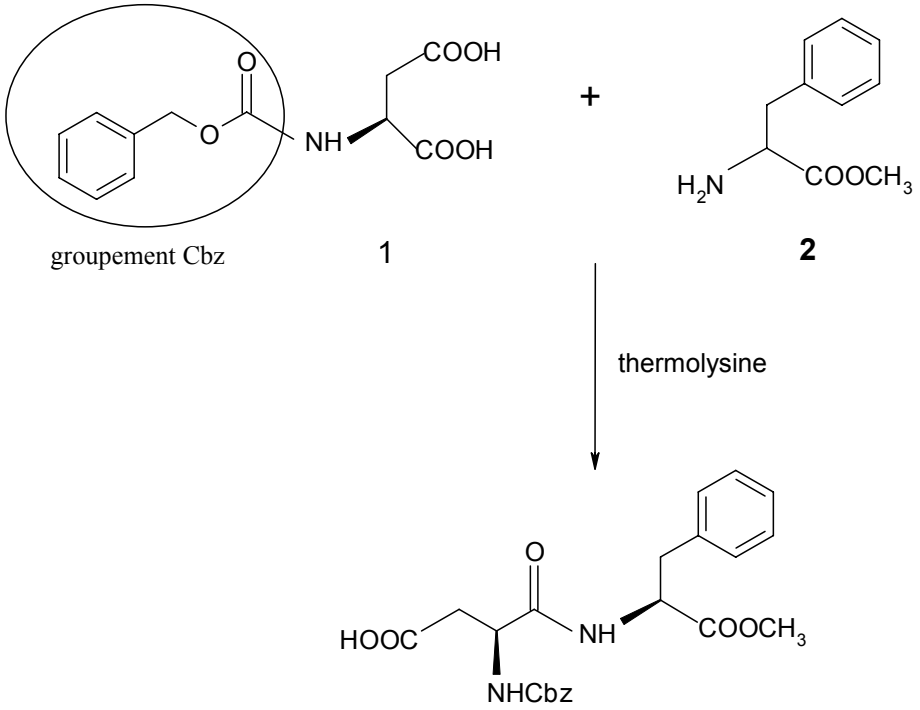
46. *Ecrire l'équation de réaction de formation d'un dipeptide à partir de deux acides α-aminés.*

47. *Pourquoi n'est-il pas envisageable d'obtenir l'aspartame avec de bons rendements par simple réaction entre l'acide aspartique et l'ester méthylique de la phénylalanine ?*

48. *Par conséquent quelle est la stratégie de synthèse employée lors d'un couplage peptidique par voie chimique ?*

49. *Quel est le nom du scientifique qui a reçu le prix Nobel de Chimie en 1984 pour ses travaux sur la synthèse peptidique en phase solide ?*

La préparation enzymatique de l'aspartame utilise une métallo-protéinase, la thermolysine. Cette enzyme catalyse la réaction de l'acide L-aspartique protégé sous forme de benzyloxycarbamate **1** avec le mélange racémique de l'ester méthylique de la phénylalanine **2** selon le schéma suivant :



50. *Quelles sont les propriétés de la thermolysine mises en évidence dans cette voie de synthèse ?*

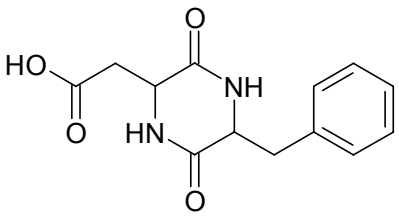
51. *Quelles sont les explications qui permettent de justifier ces propriétés ?*

C.1.4. Métabolisme et stabilité de l'aspartame

Les produits de dégradation de l'aspartame ont été particulièrement étudiés lors des études toxicologiques de cette molécule. Chez l'homme, l'aspartame est métabolisé selon une réaction donnant les mêmes produits que ceux de l'hydrolyse menée dans la partie expérimentale.

52. *Quel métabolite issu de l'aspartame est connu pour sa toxicité ?*

En milieu hydraté, mais aussi en phase solide lors d'un chauffage, l'aspartame peut conduire à la formation de dicétopipérazine ce qui rend inutilisable l'aspartame dans les produits destinés à la cuisson.



dicétopipérazine

53. *Quel type de réaction est mis en jeu lors de la formation de dicétopipérazine ?*

C.2. Chimie structurale

On se propose d'étudier ici la structure électronique de l'ion cyanure mis en jeu dans la partie C.1.2.

Dans le modèle de Lewis, la liaison covalente est décrite comme la mise en commun de deux électrons de valence. En mécanique quantique, les électrons de valence d'une molécule sont décrits par des orbitales moléculaires (OM) tout comme les électrons d'un atome isolé sont décrits par des orbitales atomiques (OA). Les OM résultent d'un recouvrement des OA des électrons de valence des atomes constituant la molécule. Les règles de remplissage des OM sont similaires à celles des OA. Le diagramme fourni en ***annexe 6*** *est le diagramme d'OM de l'ion cyanure. Il donne les niveaux d'énergie des OA des électrons de valence des atomes constituant la molécule et les niveaux d'énergie des OM (au centre).*

54. Rappeler les règles de remplissages des OA d'un atome dans son état fondamental.

55. Préciser la nature des orbitales atomiques des électrons de valence de C et N.

56. Sur le diagramme d'orbitales moléculaires donné en **annexe 6**, préciser quelles OA correspondent à l'atome de carbone et d'azote.

57. Remplir le diagramme d'OM.

58. D'après le diagramme, justifier que l'atome de carbone est responsable du caractère nucléophile de l'ion cyanure.

Rendre le diagramme avec la copie (annexe 6).

C.3. Cinétique

Plusieurs étapes de la synthèse de l'aspartame peuvent se faire à l'aide d'enzymes.

L'exemple de la thermolysine a été décrit précédemment. On peut également citer certaines enzymes permettant le dédoublement des mélanges racémiques de phénylalanine obtenus lors des synthèses « classiques » de cet acide aminé.

59. *Que signifie l'expression mélange racémique ?*

60. *Que signifie résoudre un mélange racémique ?*

61. *La distillation peut elle être utilisée pour la résolution d'un mélange racémique liquide ?*

On se propose ici d'étudier l'aspect cinétique de la catalyse enzymatique. Les études expérimentales de cinétique enzymatique sont généralement conduites en mesurant la vitesse de formation des produits dans une solution contenant l'enzyme E à très faibles concentrations.

Les principales caractéristiques de nombreuses réactions enzymatiques sont les suivantes :

- Pour une concentration initiale en substrat $[S]_0$, la vitesse initiale de formation des produits est proportionnelle à la concentration totale en enzyme $[E]_0$.
- Pour une concentration donnée $[E]_0$ et une faible valeur de $[S]_0$, la vitesse de formation des produits est proportionnelle à $[S]_0$.
- Pour une concentration donnée $[E]_0$ et une grande valeur de $[S]_0$, la vitesse de formation des produits devient indépendante de $[S]_0$ et atteint une valeur maximale notée V_{max}

Le modèle suivant a été proposé pour tenir compte de ces caractéristiques. Selon ce mécanisme, un complexe enzyme-substrat, noté ES, est formé dans une première étape. Ce complexe peut redonner les réactifs ou conduire à la formation du produit P selon le mécanisme suivant :

(1)	**E + S → ES**	de constante de vitesse k_1
(- 1)	**ES → E + S**	de constante de vitesse k_{-1}
(2)	**ES → P + E**	de constante de vitesse k_2

62. Quelle loi cinétique suit un processus élémentaire ?

63. Rappeler en quoi consiste l'approximation de l'état quasi-stationnaire (AEQS) et indiquer quelles sont ses conditions d'application.

En utilisant l'approximation de l'état quasi stationnaire montrer que :

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2}[E][S]$$

64. En déduire que la vitesse de formation des produits vérifie : $V = \dfrac{k_2[E]_0}{1 + \dfrac{K_M}{[S]}}$

où $K_M = \dfrac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ est une constante caractéristique d'une enzyme et d'un substrat.

On rappelle que dans les expériences la concentration introduite en enzyme est toujours très inférieure à celle introduite en substrat.

65. Donner l'expression de la vitesse maximale V_{max}.

66. Quel nom porte ce mécanisme modélisant l'action d'une enzyme ?

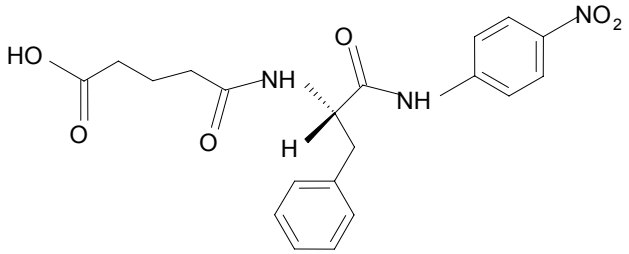
L'α-chymotrypsine est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé aromatique (Tyrosine, Tryptophane, Phénylalanine) engage sa fonction acide. On peut en première approche modéliser son action par le mécanisme évoqué précédemment.

On prépare plusieurs solutions contenant le peptide N-glutarique-L-phénylalanine-p-nitroanilide (la formule est donnée ci-dessous) à différentes concentrations et l'on ajoute une petite quantité d'enzyme α-chymotrypsine, identique dans chaque solution. Les vitesses initiales de formation des produits pour chaque solution sont regroupées dans le tableau suivant :

$[S]_0$ ($mmol.L^{-1}$)	0,334	0,450	0,667	1,00	1,33	1,67
V_0 ($mmol.L^{-1}.s^{-1}$)	0,152	0,201	0,269	0,417	0,505	0,667

67. *Déterminer la vitesse maximale V_{max} et la constante K_M définies précédemment.*

68. *Comment une enzyme peut elle permettre la résolution d'un racémique ?*

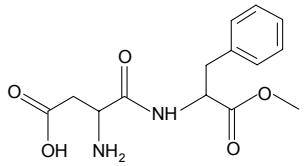


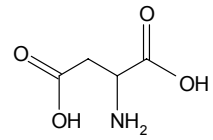
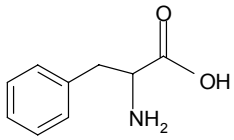
peptide N-glutarique-L-phénylalanine-p-nitroanilide

Données

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

Les grandeurs thermodynamiques sont données à 298K.

Produit	Propriétés	sécurité
Aspartame 	Décomposition à T = 248 - 250°C M = 294,30 $g.mol^{-1}$ pK_A : 3,1 - 7,9	

Acide aspartique 	T_{fus} > 300°C M = 133,10 g.mol^{-1} pK_A : 2,1 - 3,9 - 9,8		
Phénylalanine 	Décomposition à T = 266 °C M = 165,19 g.mol^{-1} pK_A : 2,2 - 9,2		
Hydrogénocarbonate de sodium	M = 84,01 g.mol^{-1} pK_A : 6,4 - 10,3		
Ninhydrine	Décomposition à T = 266 °C M = 178,14 g.mol^{-1}		H302 - H315 - H319 - H335 P261 - P305 + P351 + P338
Butan-1-ol	T_{eb} = 116 - 118°C d = 0,81 M = 74,12 g.mol^{-1}		H226-H302- H315 H318 - H335 - H336 P261 - P280 - P305 + P351 + P338
Acide acétique glacial	T_{eb} = 118°C d = 1,05 M = 60,05 g.mol^{-1}		H226 -H314 P280 - P305 + P351 + P338 - P310

Produit ionique de l'eau : $Ke = 10^{-14}$

Liste de quelques indicateurs colorés :

- **Rouge de méthyle**

Zone de virage : 4,2 - 6,2

Couleurs : rouge (forme acide)-jaune (forme basique)

- **Hélianthine**

Zone de virage : 3,1 - 4,4

Couleurs : rouge (forme acide) - jaune (forme basique)

- **Phénolphtaléine**

Zone de virage : 8,0 - 9,9

Couleurs : incolore (forme acide) - rose (forme basique)

- **Bleu de bromothymol**

Zone de virage : 6,0 - 7,6

Couleurs : jaune (forme acide) - bleu (forme basique)

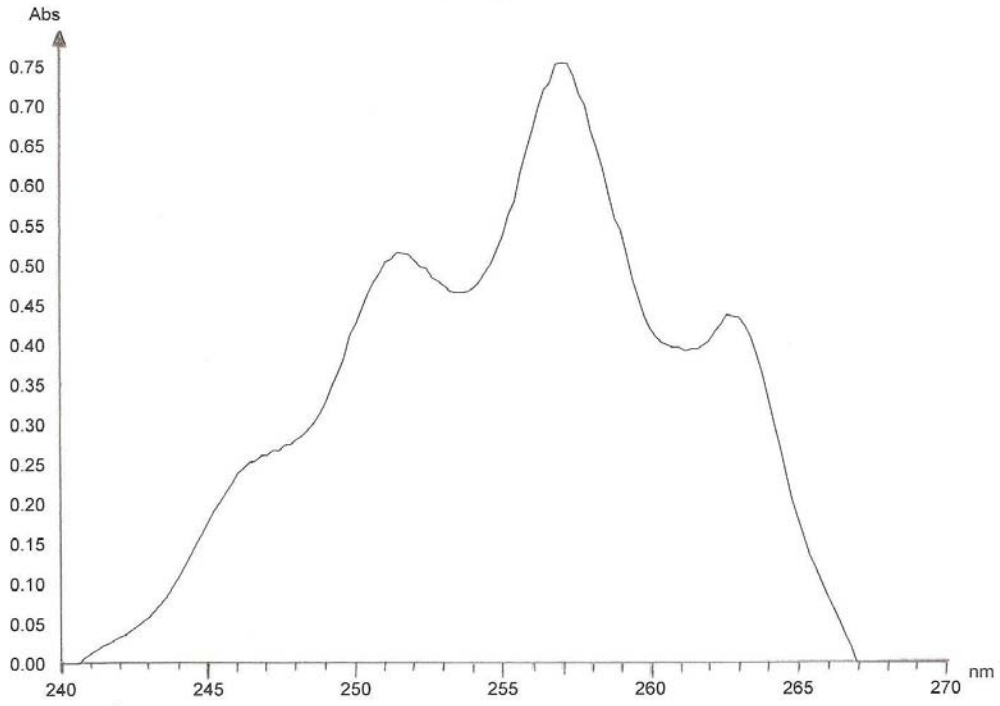
Extrait de la classification périodique des éléments

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

Annexe 1
Ingrédients des sucrettes

- Edulcorants : aspartame (17%), acésulfame K (17%)
- Lactose
- Antiagglomérant : carboxyméthylcellulose
- L - Leucine

Annexe 2
Spectre UV-visible de la phénylalanine

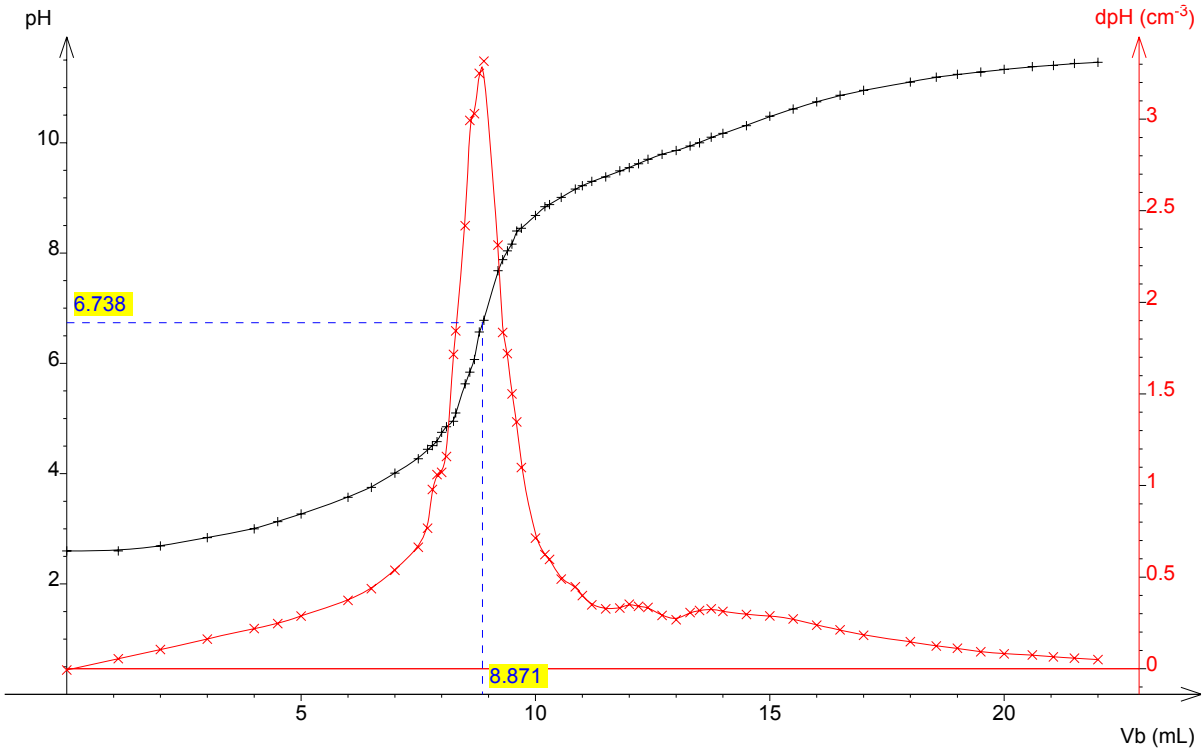


Apex (nm)	Absorbance
262,6	0,437
257,0	0,753
251,4	0,516

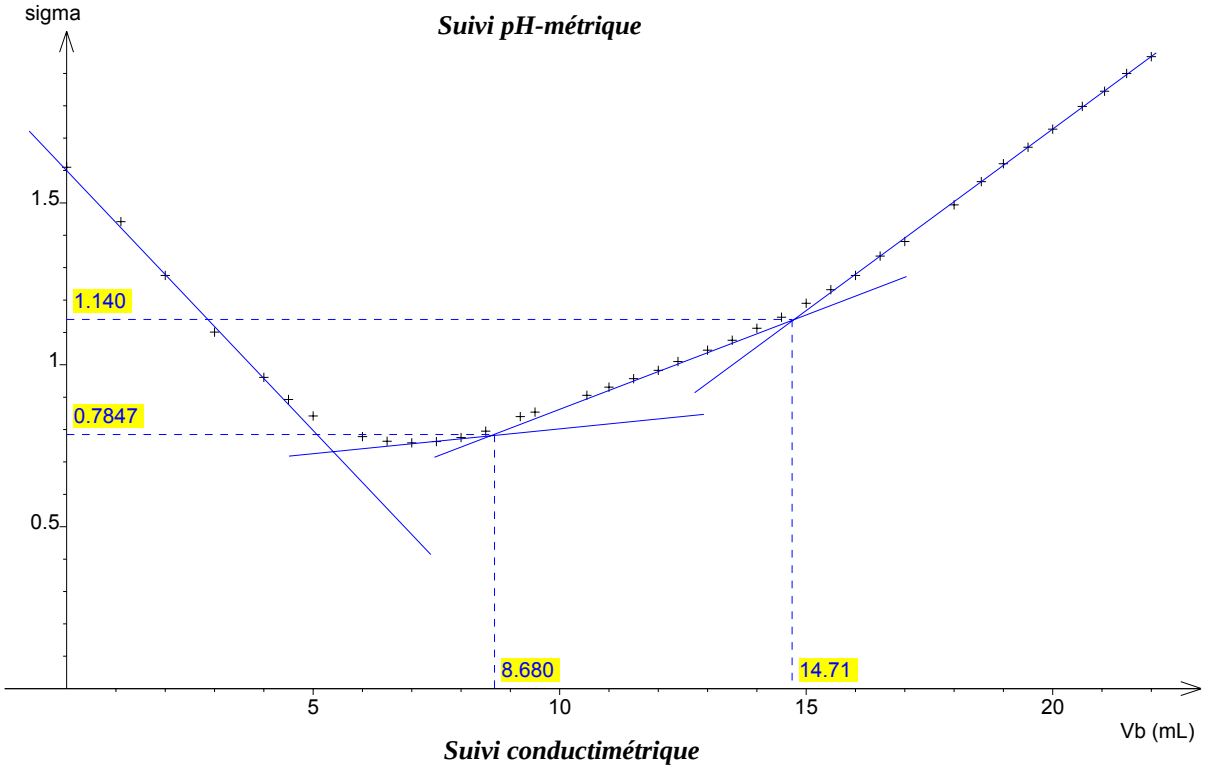
Annexe 3
Titrage pH-métrique et conductimétrique de la solution (S)

Titrage de E = 10 mL de la solution (S) par de la soude (C_b= 0,0415 mol.L^{-1})

V_1 = 8,87 mL ; V_2=14,7mL



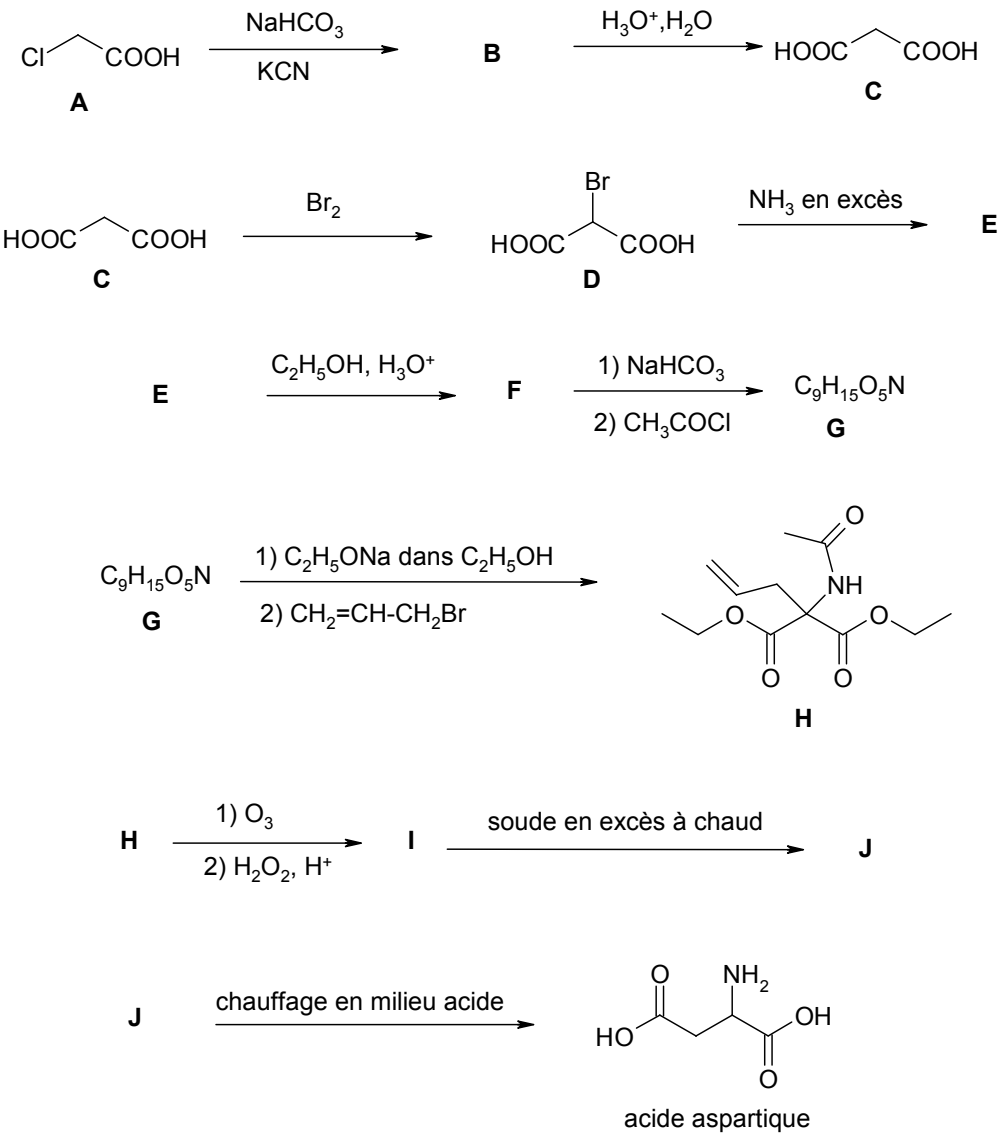
Suivi pH-métrique



Suivi conductimétrique

Annexe 4

Synthèse de l'acide aspartique



Annexe 5

SPECTROSCOPIE DE RMN DU PROTON

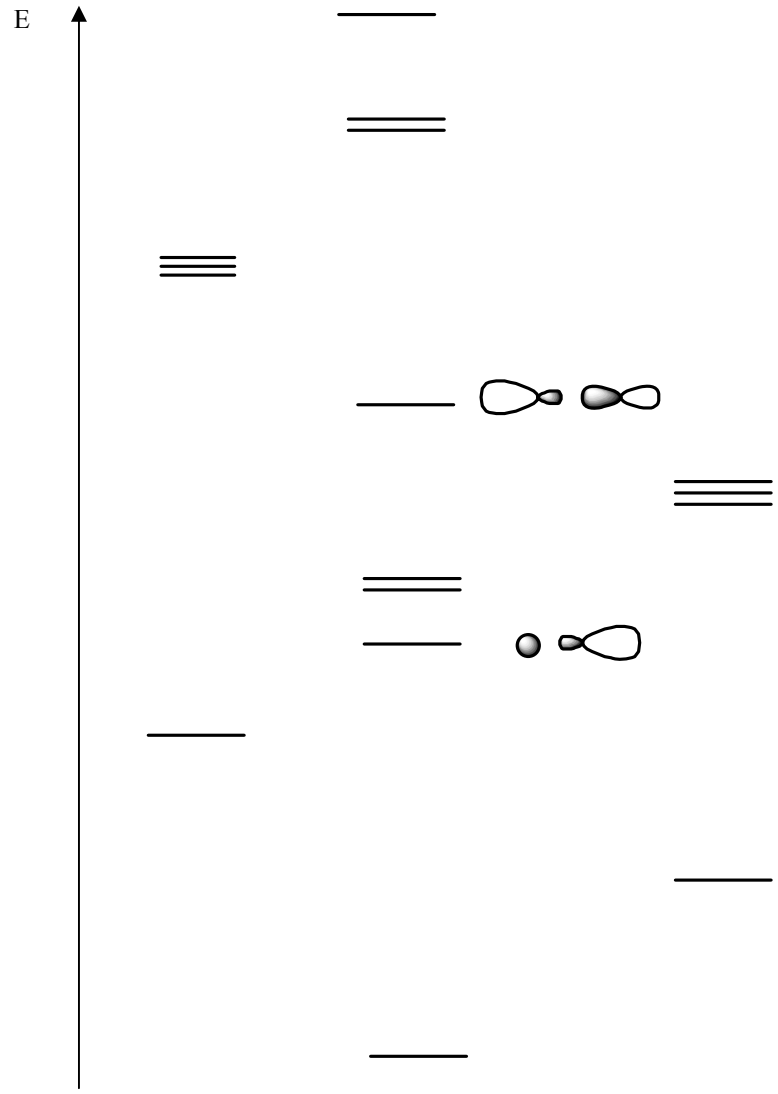
Domaines de déplacements chimiques des protons des groupes M (méthyle CH_3, méthylène CH_2 et méthyne CH) en α ou en β de groupes caractéristiques.

type de proton	δ en ppm	type de proton	δ en ppm
M-CH_2R	0,8-1,6	M-C-CH_2R	0,9-1,6
M-C=C	1,6-2,0	M-C-C=C	1,0-1,8
M-C≡C	1,7-2,8	M-C-C≡C	1,2-1,8
M-Ph	2,2-2,8	M-C-Ph	1,1-1,8
M-F	4,2-4,8	M-C-F	1,5-2,2
M-Cl	3,0-4,0	M-C-Cl	1,5-2,0
M-Br	3,4-4,1	M-C-Br	1,8-1,9
M-I	3,1-4,2	M-C-I	1,7-2,1
M-OH et M-OR	3,2-3,6	M-C-OH et M-C-OR	1,2-1,8
M-OPh	3,8-4,6	M-C-OPh	1,3-2,0
M-O-CO-R	3,6-5,0	M-C-O-CO-R	1,3-1,8
M-O-CO-Ph	3,8-5,0	M-C-O-CO-Ph	1,6-2,0
M-CHO et M-CO-R	2,1-2,6	M-C-CHO	1,1-1,7
M-CO-Ph	3,8-5,0	M-C-CO-R	1,1-1,8
M-CO-OH et M-CO-OR	1,8-2,6	M-C-CO-Ph	1,1-1,9
M-CO-NR_2	1,8-2,2	M-C-CO-OR	1,1-1,9
M-C≡N	2,2-3,0	M-C-CO-NR_2	1,1-1,8
M-NH_2 et M-NR_2	2,2-3,0	M-C-C≡N	1,2-2,0
M-N^+R_3	3,0-3,6	M-C-N^+R_3	1,4-2,0
M-NH-CO-R	3,0-3,8	M-C-NH-CO-R	1,1-1,9
M-NO_2	4,1-4,4	M-C-NO_2	1,6-2,5
M-SH et M-SR	2,1-5,1	M-C-SH et M-C-SR	1,3-1,9

Domaines de déplacements chimiques de divers protons.

type de proton	δ en ppm	type de proton	δ en ppm
>C(cycle)=CH_2	4,6	-CO-OH	8,5-13
>C=CH_2	5,3	>C=C-OH	11-17
-C=CH-	5,1	PhH	7,2
-C=CH- (cyclique)	5,3	R-OH	0,5-5,5
R-C≡C-H	3,1	Ar-OH	4,0-7,5
Ar-H	7,0-9,0	Ar-OH (avec liaison H intramoléculaire)	5,5-12,5
>C=CH-CO-	5,9		
-CH=C-CO-	6,8	R-NH-	0,5-3,0
R-CHO	9,9	Ar-NH	3,0-5,0
Ar-CHO	9,9	R-CO-NH-	5,0-8,5
H-CO-O-	8,0	$CHCl_3$	7,2
H-CO-N<	8,0	H_2O	≈5,0

Annexe 6
Diagramme d'OM de l'ion cyanure



Annexe 7
Significations codes alphanumérique

Mentions de danger

H200 : Explosif instable.

H201 : Explosif ; danger d'explosion en masse.

H202 : Explosif ; danger sérieux de projection.

H203 : Explosif ; danger d'incendie, d'effet de souffle ou de projection.

H204 : Danger d'incendie ou de projection.

H205 : Danger d'explosion en masse en cas d'incendie.

H220 : Gaz extrêmement inflammable.

H221 : Gaz inflammable.

H222 : Aérosol extrêmement inflammable.

H223 : Aérosol inflammable.

H224 : Liquide et vapeurs extrêmement inflammables.

H225 : Liquide et vapeurs très inflammables.

H226 : Liquide et vapeurs inflammables.

H228 : Matière solide inflammable.

H240 : Peut exploser sous l'effet de la chaleur.

H241 : Peut s'enflammer ou exploser sous l'effet de la chaleur.

H242 : Peut s'enflammer sous l'effet de la chaleur.

H250 : S'enflamme spontanément au contact de l'air.

H251 : Matière auto-échauffante ; peut s'enflammer.

H252 : Matière auto-échauffante en grandes quantités ; peut s'enflammer.

H260 : Dégage au contact de l'eau des gaz inflammables qui peuvent s'enflammer spontanément.

H261 : Dégage au contact de l'eau des gaz inflammables.

H270 : Peut provoquer ou aggraver un incendie ; comburant.

H271 : Peut provoquer un incendie ou une explosion ; comburant puissant.

H272 : Peut aggraver un incendie ; comburant.

H280 : Contient un gaz sous pression ; peut exploser sous l'effet de la chaleur.

H281 : Contient un gaz réfrigéré ; peut causer des brûlures ou blessures cryogéniques.

H290 : Peut être corrosif pour les métaux.

H300 : Mortel en cas d'ingestion.

H301 : Toxique en cas d'ingestion.

H302 : Nocif en cas d'ingestion.

H304 : Peut être mortel en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires.

H310 : Mortel par contact cutané.

H311 : Toxique par contact cutané.

H312 : Nocif par contact cutané.

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

H315 : Provoque une irritation cutanée.

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

H318 : Provoque des lésions oculaires graves.

H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.

H330 : Mortel par inhalation.

H331 : Toxique par inhalation.

H332 : Nocif par inhalation.

H334 : Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.

H335 : Peut irriter les voies respiratoires.

H336 : Peut provoquer somnolence ou vertiges.

H340 : Peut induire des anomalies génétiques

H341 : Susceptible d'induire des anomalies génétiques

H350 : Peut provoquer le cancer

H350i : Peut provoquer le cancer par inhalation.

H351 : Susceptible de provoquer le cancer

H360 : Peut nuire à la fertilité ou au fœtus

H360F : Peut nuire à la fertilité.

H360D : Peut nuire au fœtus.

H360FD : Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.

H360Fd : Peut nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.

H360Df : Peut nuire au fœtus. Susceptible de nuire à la fertilité.

H361 : Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus

H361f : Susceptible de nuire à la fertilité

H361d : Susceptible de nuire au fœtus

H361fd : Susceptible de nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus.

H362 : Peut être nocif pour les bébés nourris au lait maternel.

H370 : Risque avéré d'effets graves pour les organes

H371 : Risque présumé d'effets graves pour les organes

H372 : Risque avéré d'effets graves pour les .... à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée

H373 : Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée

H300+H310 : Mortel par ingestion ou par contact cutané.

H300+H330 : Mortel par ingestion ou par inhalation.

H310+H330 : Mortel par contact cutané ou par inhalation.

H300+H310+H330 : Mortel par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.

H301+H311 : Toxique par ingestion ou par contact cutané.

H301+H331 : Toxique par ingestion ou par inhalation.

H311+H331 : Toxique par contact cutané ou par inhalation.

H301+H311+H331 : Toxique par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.

H302+H312 : Nocif en cas d'ingestion ou de contact cutané.

H302+H332 : Nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation.

H312+H332 : Nocif en cas de contact cutané ou d'inhalation.

H302+H312+H332 : Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation.

H400 : Très toxique pour les organismes aquatiques.

H410 : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

H411 : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

H413 : Peut être nocif à long terme pour les organismes aquatiques.

H420 : Nuit à la santé publique et à l'environnement en détruisant l'ozone dans la haute atmosphère.

Conseils de prudence

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

P102 : Tenir hors de portée des enfants.

P103 : Lire l'étiquette avant utilisation.

P201 : Se procurer les instructions avant l'utilisation.

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

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

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

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

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

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

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

P230 : Maintenir humidifié avec...

P231 : Manipuler sous gaz inerte.

P232 : Protéger de l'humidité.

P233 : Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

P234 : Conserver uniquement dans le récipient d'origine.

P235 : Tenir au frais.

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

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

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

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

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

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

P251 : Récipient sous pression : ne pas perforer, ni brûler, même après usage.

P260 : Ne pas respirer lespoussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aéros

P262 : Éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements.

P263 : Éviter tout contact avec la substance au cours de la grossesse/pendant l'allaitement.

P264 : Se laver ... soigneusement après manipulation.

P270 : Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant le produit.

P271 : Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventile.

P272 : Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.

P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P281 : Utiliser l'équipement de protection individuel requis.

P282 : Porter des gants isolants contre le froid/un équipement de protection des yeux/du visage.

P283 : Porter des vêtements résistant au feu/aux flammes/ignifuges.

P284 : Porter un équipement de protection respiratoire.

P285 : Lorsque la ventilation du local est insuffisante, porter un équipement de protection respiratoire.

P231+P232 : Manipuler sous gaz inerte. Protéger de l'humidité.

P235+P410 : Tenir au frais. Protéger du rayonnement solaire.

P310 : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P311 : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P312 : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

P313 : Consulter un médecin.

P314 : Consulter un médecin en cas de malaise.

P315 : Consulter immédiatement un médecin.

P320 : Un traitement spécifique est urgent (voir ... sur cette étiquette).

P321 : Traitement spécifique (voir ... sur cette étiquette).

P322 : Mesures spécifiques (voir ... sur cette étiquette).

P330 : Rincer la bouche.

P331 : NE PAS faire vomir.

P332 : En cas d'irritation cutanée :

P333 : En cas d'irritation/éruption cutanée :

P334 : Rincer à l'eau fraîche/poser une compresse humide.

P335 : Enlever avec précaution les particules déposées sur la peau.

P336 : Dégeler les parties gelées avec de l'eau tiède. Ne pas frotter les zones touchées.

P337 : Si l'irritation oculaire persiste :

P338 : Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P340 : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

P341 : S'il y a difficulté à respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

P342 : En cas de symptômes respiratoires :

P350 : Laver avec précaution et abondamment à l'eau et au savon.

P351 : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes.

P352 : Laver abondamment à l'eau et au savon.

P353 : Rincer la peau à l'eau/se doucher.

P360 : Rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau les vêtements contaminés et la peau avant de les enlever.

P361 : Enlever immédiatement les vêtements contaminés.

P362 : Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

P363 : Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.

P370 : En cas d'incendie :

P371 : En cas d'incendie important et s'il s'agit de grandes quantités :

P372 : Risque d'explosion en cas d'incendie.

P373 : NE PAS combattre l'incendie lorsque le feu atteint les explosifs.

P374 : Combattre l'incendie à distance en prenant les précautions normales.

P375 : Combattre l'incendie à distance à cause du risque d'explosion.

P376 : Obturer la fuite si cela peut se faire sans danger.

P377 : Fuite de gaz enflammé: Ne pas éteindre si la fuite ne peut pas être arrêtée sans danger.

P378 : Utiliser ... pour l'extinction.

P380 : Évacuer la zone.

P381 : Éliminer toutes les sources d'ignition si cela est faisable sans danger.

P390 : Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants.

P391 : Recueillir le produit répandu.

P301+P310 : EN CAS D'INGESTION : appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P301+P312 : EN CAS D'INGESTION : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

P301+P330+P331 : EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. NE PAS faire vomir.

P302+P334 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : rincer à l'eau fraîche/poser une compresse humide.

P302+P350 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver avec précaution et abondamment à l'eau et au savon.

P302+P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon.

P303+P361+P353 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher.

P304+P340 : EN CAS D'INHALATION : transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

P304+P341 : EN CAS D'INHALATION : s'il y a difficulté à respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

P305+P351+P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P306+P360 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES VÊTEMENTS : rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau les vêtements contaminés et la peau avant de les enlever.

P307+P311 : EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P308+P313 : EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.

P309+P311 : EN CAS d'exposition ou de malaise : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P332+P313 : En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin.

P333+P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.

P335+P334 : Enlever avec précaution les particules déposées sur la peau. Rincer à l'eau fraîche/poser une compresse humide.

P337+P313 : Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin.

P342+P311 : En cas de symptômes respiratoires : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P370+P376 : En cas d'incendie : obturer la fuite si cela peut se faire sans danger.

P370+P378 : En cas d'incendie : utiliser ... pour l'extinction.

P370+P380 : En cas d'incendie : évacuer la zone.

P370+P380+P375 : En cas d'incendie : évacuer la zone. Combattre l'incendie à distance à cause du risque d'explosion.

P371+P380+P375 : En cas d'incendie important et s'il s'agit de grandes quantités : évacuer la zone. Combattre l'incendie à distance à cause du risque d'explosion.

P4xx : conseils de prudence de stockage

P402 : Stocker dans un endroit sec.

P403 : Stocker dans un endroit bien ventilé.

P404 : Stocker dans un récipient fermé.

P405 : Garder sous clef.

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

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

P410 : Protéger du rayonnement solaire.

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

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

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

P420 : Stocker à l'écart des autres matières.

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

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

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

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

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

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

P501 : Éliminer le contenu/récipient dans ...

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

Feuille de résultats

Nom : **Prénom :**

Numéro de poste :

A.2. Identification des acides aminés constitutifs de l'aspartame

Schéma de la plaque CCM après révélation :

Conclusion :

A.3. Dosage spectrophotométrique de la phénylalanine

Longueur d'onde choisie pour réaliser les mesures :

Concentration C_i en phénylalanine provenant de la solution étalon (E) dans les solutions S_i préparées :

Solution	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4
C_i (mol.L^{-1})					

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

Solution	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4
A					

Concentration C_{phe} en phénylalanine de la solution (S) :

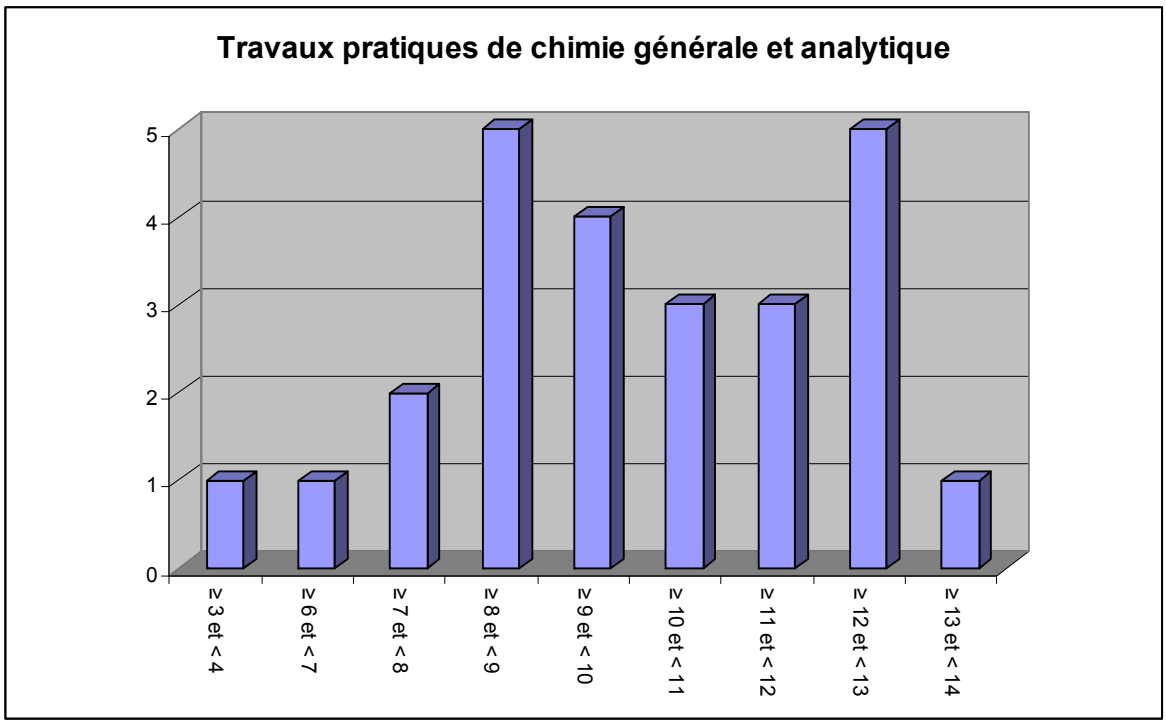
$C_{phén}$ = ± (mol.L^{-1})

Rapport de l'épreuve de travaux pratiques de chimie générale et analytique

Rapport établi par : Hélène CARRIE, Jeanne-Laure DORMIEUX, Sophie WARIN

Résultats :

≥ 3 et < 4	1	≥ 10 et < 11	3
≥ 6 et < 7	1	≥ 11 et < 12	3
≥ 7 et < 8	2	≥ 12 et < 13	5
≥ 8 et < 9	5	≥ 13 et < 14	1
≥ 9 et < 10	4		



Rapport sur l'épreuve de travaux pratiques de chimie

Rapport établi par Mlle H. Carrié, Mme J-L. Dormieux et Mme S. Warin

L'épreuve de travaux pratique de chimie de cette année avait pour thème l'aspartame. La partie expérimentale consistait :

- à hydrolyser l'aspartame contenu dans des sucrettes par une solution d'acide chlorhydrique. Cette étape nécessitait un chauffage à reflux.
- à identifier par CCM les acides aminés constitutifs de l'aspartame.
- à doser la phénylalanine d'une solution (S) par spectrophotométrie UV.

Le sujet proposait une partie manipulation plutôt rapide nécessitant des connaissances élémentaires de chimie et une partie théorique constituée de questions de chimie organique, structurale et de cinétique chimique.

Comme chaque année quelques rares candidats ont préféré se focaliser sur la partie théorique de l'épreuve et ont très peu manipulé, il en a été tenu compte dans la notation. Le jury apprécie le fait que les candidats manipulent et exploitent leurs manipulations, ce commentaire a déjà été mentionné les années précédentes.

Depuis de nombreuses années, le nombre de questions théoriques est important, afin de couvrir plusieurs domaines de la chimie et permettre ainsi aux candidats d'aborder les thèmes qui sont le plus connus.

A- Partie expérimentale :

Les manipulations de base (pipetage, utilisation d'une burette) sont maîtrisées par la majorité des candidats, ce qui confirme les commentaires de l'année précédente, concernant l'amélioration de la manipulation.

Il est toutefois dommage de devoir **encore** rappeler qu'il est dangereux pour un candidat de ne pas porter de lunettes dès lors qu'une manipulation est en cours dans le laboratoire. De plus, un futur professeur se doit de sensibiliser les élèves aux dangers encourus lors de la pratique dans un laboratoire. Il est également attendu d'un candidat qu'il manipule debout et qu'il enlève ses gants lorsqu'il ne manipule pas.

Partie A1 : Hydrolyse de l'aspartame

Le chauffage à reflux est une méthode classique de synthèse organique : il est regrettable que la nécessité d'un support élévateur dans de tels montages ne soit pas connue de la plupart des candidats, ce ci étant un point de sécurité important. Afin d'assurer la stabilité du montage, il faut également fixer le ballon au niveau du rodage. La pince au niveau du réfrigérant ne doit pas être trop serrée afin de ne pas provoquer de contraintes mécaniques sur le réfrigérant et il faut s'assurer que le réfrigérant est correctement emboité dans le ballon. Les rodages doivent par ailleurs être graissés. D'autre part, certains ne connaissent pas le sens de circulation de l'eau dans un réfrigérant, méthode maîtrisée par les élèves en lycée et il est rappelé qu'il ne faut pas couper la circulation d'eau du réfrigérant tant que le montage n'est pas revenu à température ambiante. Enfin, lors d'un chauffage à reflux, le solvant doit être porté à ébullition « modérée », certains candidats ont mis en œuvre un chauffage excessif ou insuffisant. L'hydrolyse réalisée, il était demandé d'ajouter de l'hydrogénocarbonate de sodium afin de neutraliser le mélange, cette opération a été oubliée par certains candidats. Lors du contrôle de pH d'une solution, il faut utiliser avec parcimonie le papier pH : des bandes de 1 cm environ doivent être utilisées et non des bandes de 6 cm comme il a été observé. De même, le papier pH ne doit pas plonger dans la solution : cette erreur a provoqué la coloration de mélanges réactionnels.

Partie A2 : Identification des acides aminés constitutifs de l'aspartame

Cette partie a été bien traitée par l'ensemble des candidats qui l'ont réalisée. La saturation de la cuve, sa manipulation et la réalisation des dépôts est bien contrôlée. Toutefois, quelques élèves ont oublié la plaque CCM dans la cuve et par conséquent n'ont pu identifier le front du solvant.

Partie A3 : dosage spectrophotométrique de la phénylalanine

Pour réaliser le dosage spectrophotométrique, les candidats devaient préparer 100mL d'une solution étalon de phénylalanine à 4,00 g.L-1 nécessaire à la méthode des ajouts dosés. Il est évident qu'il était demandé aux candidats de peser une masse précise de l'ordre de 400mg et non exactement, ce qui est quasi-impossible. La quasi-totalité des

candidats n'ont pas tenu compte de la précision de leur pesée et ont par conséquent fait les calculs demandés en prenant comme masse de phénylalanine 400mg ce qui ne correspondait pas à leur pesée réelle.

Un certain nombre de candidats n'utilisent pas d'entonnoir à solide lors du transfert d'un solide dans une fiole jaugée ce qui rend la manipulation particulièrement délicate. Pour l'utilisation de la fiole, les étapes à réaliser successivement sont : la dissolution complète du solide, l'ajustement au trait de jauge puis l'homogénéisation de la solution, la fiole étant fermée avec un parafilm. Il a été remarqué que quelques candidats introduisent un barreau aimanté dans la fiole jaugée avant de réaliser l'ajustement au trait de jauge.

Enfin, lors des mesures d'absorbance, de nombreux candidats n'ont pas choisi de manière pertinente leur solution pour faire le « zéro ».

Pour le traitement des mesures expérimentales, des ordinateurs sont à la disposition des candidats. Le jury regrette le fait que trop peu de candidats utilisent aisément les logiciels disponibles (Excel®, Regressi®). En effet, une régression linéaire est bienvenue dans ce type de dosage mais a été trop peu réalisée par les candidats.

Le jury rappelle également que, quelle que soit la manière dont le graphique ait été réalisé, il doit contenir un titre.

B- <u>Exploitation des résultats</u> :

<u>Partie B1</u> : Hydrolyse de l'aspartame

Les questions concernant l'intérêt du chauffage à reflux et la nature des pictogrammes ont été bien traitées par l'ensemble des candidats.

Les équations de réaction n'ont pas été correctement écrite : il fallait prendre en considération l'hydrolyse de la fonction amide mais aussi celle de la fonction ester. Ce type d'équation nécessite d'écrire la formule semi-développée complète de la molécule et non une écriture simplifiée, origine de nombreuses erreurs.

<u>Partie B2</u> : Identification des acides aminés constitutifs de l'aspartame

L'énoncé du principe de la chromatographie sur couche mince est parfois confus. Une réponse courte mais claire est suffisante pour ce type de question.

<u>Partie B3</u> : dosage spectrophotométrique de la solution (S)

De nombreux candidats se sont trompés sur la longueur d'onde choisie pour réaliser les mesures spectrophotométriques car ils ont occulté l'annexe 2 donnant le spectre UV-visible de la phénylalanine. Le jury attire l'attention des candidats sur la nécessité de lire le sommaire.

De plus, aucun candidat n'a réussi à calculer correctement la concentration en phénylalanine de la solution (S), ce qui est assez surprenant, la méthode des ajouts dosés étant une méthode classiquement utilisée en TP de biochimie. Beaucoup de candidats ont fait la confusion entre concentration massique et concentration molaire.

<u>Partie B4</u> : Titrage de la solution (S) par une solution d'hydroxyde de sodium

Cette partie traitait du dosage par de la soude d'un mél ange d'acides aminés. Il est dommage que le diagramme de prédominance d'un acide aminé ne soit pas maîtrisé par l'ensemble des candidats.

De même, le point isoélectronique n'est pas un « point » comme l'ont défini certains candidats : le point isoélectronique est le pH pour lequel la conductivité de la solution est minimale.

C- <u>Etude de l'aspartame</u>

<u>Partie C1</u> : chimie organique

La chimie organique, bien que primordiale en biochimie, semble poser des difficultés aux candidats.

Les définitions et notions de base de stéréochimie, comme par exemple molécule chirale et modèle VSEPR, ne sont pas correctement acquises. Le jury a été surpris de constater que les représentations de Fischer et de Cram ne sont pas maitrisées. Il apparait de façon récurrente des réponses fausses comme par exemple la confusion entre groupe fonctionnel et liaison peptidique.

La synthèse de l'acide aspartique a été peu abordée. Quelques rares candidats ont traité la RMN qui est une nouveauté cette année.

La synthèse peptidique, abordée de façon très succincte dans les questions, ne donnent pas plus satisfaction bien que ce thème soit à la frontière avec la biochimie.

<u>Partie C2</u> : chimie structurale

Les règles de remplissage permettant d'établir la structure électronique d'un atome sont insuffisamment connues. Les candidats proposent des énoncés très incomplets voir faux.

Les électrons de valence des atomes sont souvent mal identifiés.

Le diagramme d'orbitales moléculaires a été peu exploité.

<u>Partie C3</u> : Cinétique

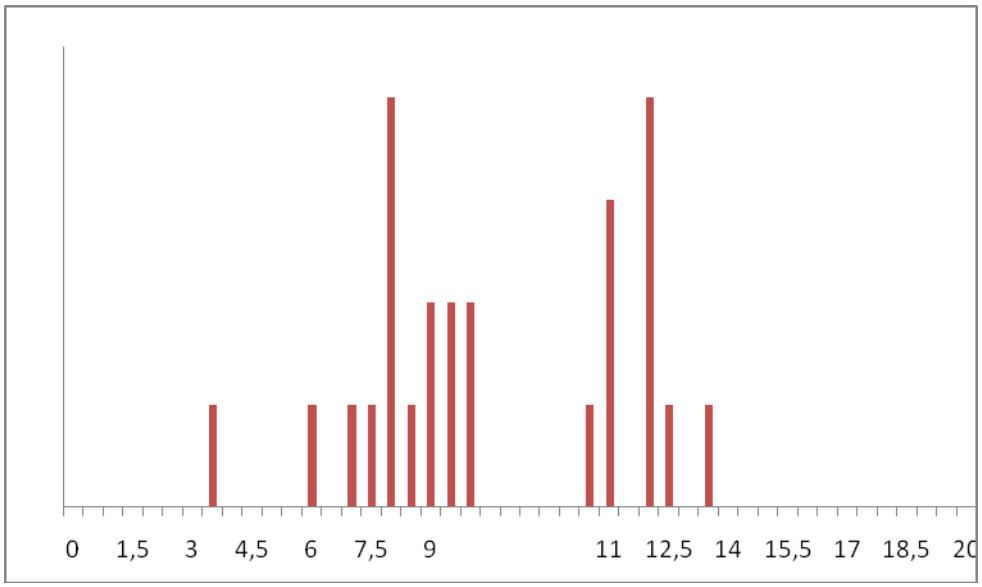
Cette dernière partie commençait par quelques questions concernant les mélanges racémiques puis continuait sur des questions de cinétique en particulier l'étude d'un mécanisme de type Michaelis-Menten.

Il a été constaté que la notion de mélange racémique est floue pour la plupart des candidats. La grande majorité des candidats définisse un mélange racémique comme un mélange de deux stéréoisomères D et L ce qui est un cas très particulier.

L'approximation de l'état quasi stationnaire et la loi de Van't Hoff qui constituent la base de l'étude des mécanismes réactionnels ne sont pas énoncées de manière correcte.

Bilan

La moyenne de l'épreuve est de 9,6. Les notes se répartissent entre 3,5 et 13,5 selon l'histogramme ci-dessous :



Statistiques

Q = Question
R = Pourcentage de réponses
BR = Pourcentage de bonnes réponses

B.1.

Q	1	2	3	4	5	6
R	100	88	100	100	100	92
BR	30	91	77	75	74	61

B.2.

Q	7	8	9
R	100	88	88
BR	68	35	58

B.3.

Q	10	11	12	13	14
R	100	88	80	68	52
BR	60	55	67	29	12

B.4.

Q	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
R	92	76	80	76	56	48	44	40	20	8	4	28	12	12
BR	80	34	47	82	44	67	38	52	12	0	0	46	43	0

C.1.

Q	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
R	76	64	72	72	72	60	48	12	32	44	32	8	12	0	8	12	20	44	24	20	16	24	16	8
BR	68	41	33	19	32	55	35	0	26	39	56	38	8	0	50	0	60	77	33	35	38	17	50	0

C.2.

Q	54	55	56	57	58
R	56	44	48	32	20
BR	24	36	75	50	0

C.3.

Q	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
R	52	24	12	28	28	12	24	32	36	20
BR	50	42	33	14	29	10	50	75	43	100

Epreuve d'admission

EPREUVE DE LECON DE BIOCHIMIE OU MICROBIOLOGIE OU BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE

Durée de l'épreuve : 5 heures

Coefficient 3

LEÇON
Durée de la préparation : 4 heures
Durée de l'exposé : 45 minutes
Durée de l'entretien avec le jury : 15 minutes

SUJET DE BIOCHIMIE:

Les pentoses chez l'animal

SUJET DE MICROBIOLOGIE:

La famille des *Retroviridae*

SUJET DE BIOLOGIE HUMAINE:

L'azote dans l'organisme

SUJET D'IMMUNOLOGIE:

Immunité innée

SUJET DE BIOLOGIE HUMAINE:

Cellules endocrines

SUJET DE MICROBIOLOGIE:

Les mycoplasmes

SUJET DE BIOLOGIE HUMAINE:

Surfaces d'échanges dans l'organisme

SUJET DE BIOCHIMIE:

Le génome mitochondrial

SUJET DE MICROBIOLOGIE:

La spore bactérienne

SUJET DE BIOCHIMIE:

Diffusion latérale membranaire et impacts sur les fonctions cellulaires

SUJET D'IMMUNOLOGIE:

Les récepteurs de l'antigène

SUJET DE BIOCHIMIE:

Interactions protéines -protéines : mise en évidence, rôles et intérêts

SUJET DE BIOLOGIE HUMAINE:

Facteurs de croissance et signalisation intracellulaire

SUJET DE BIOCHIMIE:

Les séquences non codantes du génome

SUJET DE MICROBIOLOGIE:

Utilisation industrielle de bactéries génétiquement modifiées

SUJET DE MICROBIOLOGIE:

Mobilité chez les bactéries

SUJET DE BIOLOGIE HUMAINE:

Neurotransmission inhibitrice

SUJET DE MICROBIOLOGIE:

Les biofilms

SUJET DE BIOCHIMIE:

Matrice extracellulaire et microenvironnement cellulaire : quelle importance en thérapeutique ?

SUJET DE BIOLOGIE HUMAINE:

Typologie et fonctions des cellules gliales

SUJET D'IMMUNOLOGIE:

Phagocytose

SUJET DE MICROBIOLOGIE:

Les extrêmophiles

SUJET D'IMMUNOLOGIE :

Cytokines

SUJET DE BIOCHIMIE:

Contrôles de la structuration des protéines *in vivo*

SUJET DE BIOCHIMIE:

Les fusions membranaires

SUJET DE BIOLOGIE HUMAINE:

GTPases monomériques, leurs rôles dans le trafic vésiculaire

SUJET DE MICROBIOLOGIE:

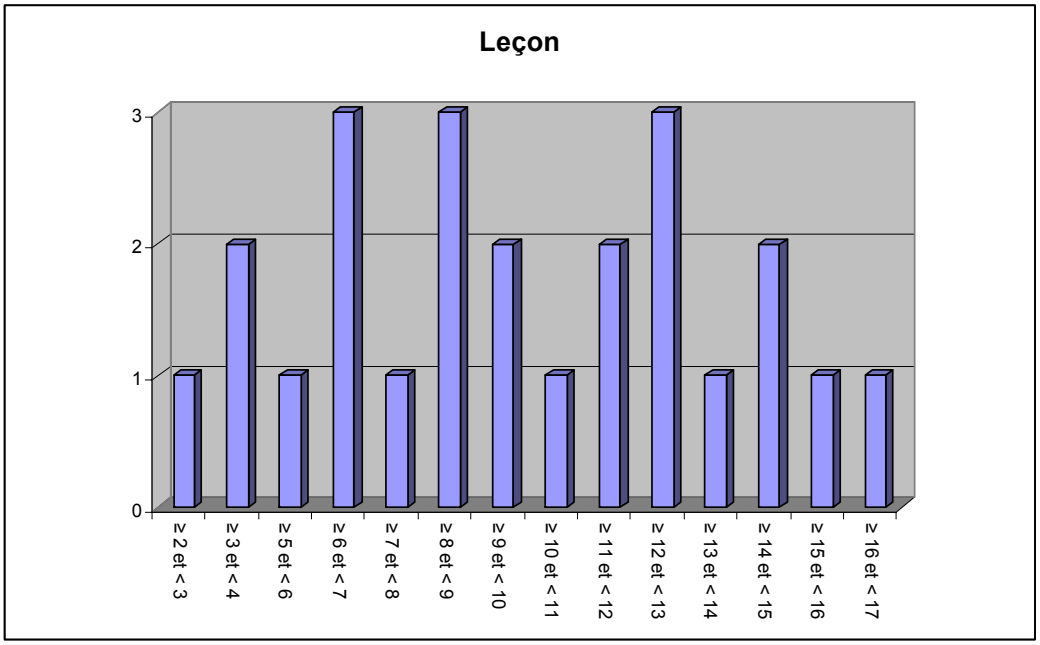
La thérapie génique

Rapport de l'épreuve de leçon de biochimie, de microbiologie ou biologie cellulaire et physiologie

Rapport établi par : Henri-Jean BOULOUIS, Jeanne-laure DORMIEUX, Françoise GUILLET, Marc LANDRY, Philippe LEJEUNE ; Alain MOREL

Résultats :

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



Le but des leçons pour le candidat est de dispenser un exposé structuré clair et exhaustif sur un sujet de biochimie ou de biologie moléculaire. Ces exposés doivent être le résultat d'un vrai travail d'organisation pédagogique et donc de ne pas être uniquement la somme ou la compilation d'éléments existant dans les différents manuels et des connaissances personnelles. En aucun cas ils ne doivent être une redite d'un seul manuel à disposition. L'originalité de la présentation par rapport aux documents disponibles, mais aussi l'aspect formateur que le candidat veut mettre en avant, sont des éléments très importants qui nécessitent une bonne connaissance personnelle du domaine et des documents. Dans une leçon ont doit toujours garder à l'esprit ce qui paraît essentiel de transmettre dans un temps limité. La leçon qui est nécessairement descriptive doit s'appuyer sur des méthodes expérimentales sans lesquelles aucune formation pratique ne pourrait être effectuée.

On constate malgré cela que trop de candidat ont du mal à réellement synthétiser et à transmettre un message scientifique clair lors de cet exercice. Ce défaut est la plupart du temps du à un manque de recul et quelquefois de maîtrise des connaissances dans la présentation d'éléments de cours qui mal compris, ne sont donc pas toujours utilisés correctement. La synthèse de plusieurs ouvrages peut être un piège pour les candidats soit par la méconnaissance des ouvrages utilisés ou encore par l'usage pléthorique de manuel pour construire la leçon. Enfin si

dans beaucoup de cas l'exercice est plutôt réussi, l'exposé manque souvent d'attractivité et de vivacité. A l'heure où il y a une désaffection des jeunes élèves pour les sciences, ce point nous paraît important et il demande un effort important dans la présentation. Les leçons nécessitent toujours un support sous forme de schéma et de figures simples et claires, il est souvent remarqué une imprécision concernant les titres, les unités et les indications qui doivent figurer sur ces illustrations. En revanche dans la plupart des cas un effort sur la présentation est fait. En dernier lieu les candidats doivent utiliser l'ensemble du temps donné pour la leçon ce qui est souvent le cas. Les réponses aux questions doivent être concises et claires et doivent permettre au jury d'évaluer les connaissances générales des candidats.

Leçons de biochimie

De la bonne compréhension par le candidat des principes, des méthodes et des mécanismes au niveau moléculaire nécessaires au sujet développé, dépend la bonne transmission de l'information. Une explication logique basée sur les fondamentaux de la biochimie permet à l'auditoire de mieux comprendre et donc de retenir des notions qui peuvent paraître complexe.

Les leçons ont été pour l'essentiel traitées de manière correcte. Toutefois, le manque de connaissance conduit trop souvent à des présentations superficielles. Les lacunes ne peuvent en effet être compensées par la bibliographie mise à disposition. Celle-ci ne doit servir qu'à préciser et organiser les données et à illustrer les leçons par des exemples expérimentaux précis. Les candidats doivent en outre porter une attention particulière aux questions qui exigent des réponses nettes et précises.

Leçons de microbiologie

La famille des *Retroviridae*.

Il était attendu du candidat la définition des *Retroviridae*, une présentation des virus appartenant à cette famille, une description de la particule virale et l'analyse du cycle viral en termes moléculaires (interaction avec la cellule cible, réverse transcription, intégration dans le génome de l'hôte, production et assemblage des protéines virales). Ces sujets n'ont été que partiellement traités. Des lacunes dans la connaissance des méthodes de dépistage et de thérapie des infections par le HIV ainsi que de l'utilisation des rétrovirus en thérapie génique ont également été constatées.

Utilisation industrielle de bactéries génétiquement modifiées.

Ce sujet concernait à la fois le génie génétique et la microbiologie industrielle. Plutôt qu'un exposé classique des différents systèmes de clonage de gènes, il était attendu du candidat la description de cas concrets de construction de souches microbiennes permettant la production de molécules mises sur le marché (insuline, hormone de croissance, enzymes, vitamines, ...). Le sujet a révélé des lacunes dans la connaissance des techniques de génération des fragments d'ADN d'intérêt (PCR, synthèse d'ADN), des méthodes de conservation des souches et des problèmes quotidiens de la microbiologie industrielle (dérive des souches, contaminations).

Les biofilms.

Ce sujet désormais classique a été relativement bien traité. Les étapes de la formation d'un biofilm ont été correctement exposées et quelques problèmes posés par ce type de prolifération microbienne ont été abordés. Des applications en biotechnologies de cellules fixées ont également été présentées. Une méconnaissance des processus de régulation de l'expression des gènes au cours de la colonisation des surfaces a été constatée.

La thérapie génique.

Ce sujet d'application médicale du génie génétique a été correctement traité dans ses aspects théoriques mais des cas concrets de succès d'utilisation de ces méthodes auraient été les bienvenus. Des problèmes comme la réaction inflammatoire ou la recombinaison de gènes ont été abordés. Des lacunes dans la connaissance du cycle viral des rétrovirus ont été constatées.

Les bactéries de l'ordre des Mycoplasmatales

Ce sujet en forme de monographie (le domaine est vaste, couvrant de nombreux médicaux humains et vétérinaires) permet au candidat d'exprimer différentes qualités : esprit de synthèse et de concision, actualisation des connaissances sur le sujet, capacité pédagogique. Cela n'a pas toujours été le cas.

La spore bactérienne
Ce sujet très classique et relativement facile a été relativement mal traité. On attendait un plan au tableau et pour lequel la mise en évidence, la structure, le cycle et les conséquences et applications auraient été clairement séparées et suffisamment développés. Un manque de culture bactériologique sur le sujet explique sans doute que le temps imparti n'a pas été complètement utilisé.

La mobilité des bactéries
La mobilité des bactéries est un sujet de cours classique dont le traitement est simple. On attendait dans cet exposé toutes les formes de mobilité, aussi bien flagellaire que non flagellaire. Le candidat devait exposer les moyens, leur contrôle et les différents rôles de la mobilité. Une partie un peu plus consistante sur le rôle de la mobilité chez les bactéries pathogènes aurait été appréciée.

La chimie dans les leçons : voir rapport sur les ECD

Epreuve d'admission

ETUDE CRITIQUE D'UN DOSSIER SCIENTIFIQUE ET OU TECHNIQUE

Durée de l'épreuve : 1 heure 20

Coefficient 3
Première partie d'épreuve
ECD

Les planctomycètes : des bactéries qui ressemblent aux eucaryotes.

Lonhienne *et al*. 2010. Endocytosis-like protein uptake in the bacterium *Gemnata obscuriglobus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 107, 12883-12888.

Fuerst and Sagulenko. 2011. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. Nature Reviews Microbiology 9, 403-413.

La persistance virale

Melissa Kane et al. Common Threads in Persistent Viral Infections. JOURNAL OF VIROLOGY, May 2010, p. 4116–4123

Brian M. Sullivan et al. Point mutation in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is necessary for receptor binding dendritic cell infection, and long-term persistence. PNAS | February 15, 2011 | vol. 108 | no. 7 | 2969–2974

Biosynthèse du 22 ème acide aminé

STEPHEN W. RAGSDALE. How two amino acids become one. 31 MARCH 2011 | VOL 471 | NATURE | 583

Marsha A. Gaston et al. The complete biosynthesis of the genetically encoded amino acid pyrrolysine from lysine. 31 MARCH 2011 | VOL 471 | NATURE | 647

2 Echafaudage moléculaire et signalisation protéine RAF

*DamianF. Brenna*n et al. 2011. A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. NATURE | VOL 472 p366

Fumin Shi and Mark A. Lemmon. 2011. KSR Plays CRAF-ty. SCIENCE VOL 332 p1043

Bactérie pathogène et complément : l'exemple de Haemophilus influenzae.

Teresia Hallstro et al. 2010. *Haemophilus influenzae a*nd the complement system . Trends in Microbiology 18 (2010) 258–265

Birendra Singh et al.2011. Haemophilus influenzae protein E recognizes theC-terminal domain of vitronectin and modulates themembrane attack complex. Molecular Microbiology

Mécanismes de la fatigue chronique

Mellar P. Davis et al. Mechanisms of Fatigue. J Support Oncol 2010;8:164–174

Stefania Fulle et al. Modification of the functional capacity of sarcoplasmic reticulum membranes in patients suffering from chronic fatigue syndrome. Neuromuscular Disorders 13 (2003) 479–484

Production de nouvelles protéines par évolution moléculaire continue « in vitro »

Molecular evolution picks up the PACE
Adam J Meyer & Andrew Dellington
nature biotechnology volume 29 number 6 june 2011 p502

A system for the continuous directed evolution of biomolecules
Kevin M. Esvelt1, Jacob C. Carlson2 & David R. Liu2,3
2 8 A P R I L 2 0 1 1 | VO L 4 7 2 | N AT U R E | 4 9 9

La dynamique de la reconstitution de la flore intestinale après un traitement aux antibiotiques.

Reid *et al*. 2011. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. Nature Reviews Microbiology 9, 27-38.

Antonopoulos *et al*. 2009. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. Infection and Immunity 77, 2367-2375**.**

A deux c'est mieux : système à deux composants et virulence bactérienne.

Nikhilesh S. Chand et al. The Sensor Kinase KinB Regulates Virulence in Acute *Pseudomonas aeruginosa* Infection. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, June 2011, p. 2989–2999

Patricia Casino et al. The mechanism of signal transduction by two-component Systems. Current Opinion in Structural Biology 2010, 20:763–771

Complexité de la dynéine, le troisième moteur moléculaire

Molecular Motors, Beauty in Complexity
James A. Spudich
SCIENCE VOL 331 4 MARCH 2011. p1143

Crystal Structure of the Dynein Motor Domain
Andrew P. Carter*, et al*
SCIENCE VOL 331 4 MARCH 2011 p1159

Dynamique et fonction de l'actine

Pirta Hotulainen et al. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. JCB • VOLUME 189 • NUMBER 4 • 2010. P619

Violaine Delorme et al. Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks. Dev Cell. 2007 November ; 13(5): 646–662**.**

Programmation et déprogrammation cellulaire par méthylation de l'ADN

Methylation matters Dirk Schübeler
NATURE|Vol 462|19 November 2009 p 296

Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences
Ryan Lister et al
NATURE| Vol 462| 19 November 2009 p315

Asthme ? Dites IL-33

Akiko Yagami et al. IL-33 Mediates Inflammatory Responses in Human Lung Tissue Cells. 2010;185;5743-5750; J Immunol

Clare M Lloyd et al. IL-33 family members and asthma – bridging innate and adaptive immune responses. Current Opinion in Immunology 2010, 22:800–806

Renaissance des Polyomavirus

Nelly Scuda et al. A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus. JOURNAL OF VIROLOGY, May 2011, p. 4586–4590

Edward M. Johnson. Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. Trends in Microbiology Vol.18 No.5. p215

Micro ARN et traduction locale

Sourav Banerjee et al . A Coordinated Local Translational Control Point at the Synapse Involving Relief from Silencing and MOV10 Degradation Neuron 64, 871–884, December 24, 2009

Ngan K Vo et al; MicroRNA pathways in neural development and plasticity. Current Opinion in Neurobiology 2010, 20:457–465

Chimiotactisme : le role de la molécule CheV.

*Roger P. Alexander et al. C*heV: CheW-like coupling proteins at the core of the chemotaxis signalin network. Trends in Microbiology Vol.18 No.11. p494.

KangWu et al. Attractant Binding Induces Distinct Structural Changes to the Polar and Lateral Signaling Clusters in Bacillus subtilis Chemotaxis. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 4, pp. 2587–2

1Place des basophiles dans les maladies allergiques.

F. H. Falcone et al. The role of basophils in the pathogenesis of allergic disease. Clinical & Experimental Allergy, 1–9. 2011

Katherine Arias et al. Distinct immune effector pathways contribute to the full expression of peanut-induced anaphylactic reactions in mice. J ALLERGY CLIN IMMUNOL VOLUME 127, NUMBER 6 p1552

Les motifs répétés de type ankyrine chez les bactéries

Christopher T.D. Price et al. Exploitation of conserved eukaryotic host cell farnesylation machinery by an F-box effector of Legionella pneumophila. J. Exp. Med. Vol. 207 No. 8 1713-1726

Souhaila Al-Khodor et al. Functional diversity of ankyrin repeats in microbial proteins. Trends in Microbiology Vol.18 No.3 p133

Rôles de la voie PD-1 dans l'autoimmunité.

Dimitrios Iliopoulos et al. The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance viamiR-21. Eur. J. Immunol. 2011. 41: 1754–1763

Brian T. Fife et al. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. Ann. N.Y. Acad. Sci. ISSN 0077-8923

Amélioration de la chimiothérapie anticancéreuse par ciblage de la flore intestinale

Targeting Bacteria to Improve Cancer Therapy

Anand G. Patel*, et al.*

SCIENCE VOL 330 5 NOVEMBER 2010 p766

Alleviating Cancer Drug Toxicity by Inhibiting a Bacterial Enzyme

Bret D. Wallace*, et al.*

SCIENCE VOL 330 5 NOVEMBER 2010 p831

Diffusion membranaire des récepteurs et trafic latéral

Renato Frischknecht et al. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. Nature neuroscience. Mai 2009.

Antoine Triller. Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! TRENDS in Neurosciences Vol.28 No.3 March 2005

Interaction protéine/protéine à l'échelle unimoléculaire

Pull-down for single molecules

Philip Tinnefeld

|N AT U R E | VO L 4 7 3| 2 6 M AY 2 0 1 1 p4 6 1

Probing cellular protein complexes using single-molecule pull-down

Ankur Jain et al

NATURE | VOL 473 | 26 MAY 2011 p 484

Les bactériocines chez les bactéries gram positif

Kaoutar et al. Isolation and purification of two bacteriocins 3D produced by *Enterococcus faecium* with inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*. Curr Microbiolo (2011) 62:479-485

Igolf F.Nes et al. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus.* Journal of bacteriology Feb 2007. P1189-1198

Structure du récepteur B2 adrénergique activé lié à un nanobody

Binding the receptor at both ends

Stephen R. Sprang

1 3 JA N UA RY 2 0 1 1 | VO L 4 6 9 | N AT U R E | 1 7 3

Structure of a nanobody-stabilized active state of the b2 adrenoceptor

Søren G. F. Rasmussen et al

1 3 J A N U A RY 2 0 1 1 | VO L 4 6 9 | N AT U R E | 1 7 5

Rapport de l'épreuve d'étude critique d'un dossier scientifique et ou technique

Rapport établi par : Henri-Jean BOULOUIS, Jeanne-laure DORMIEUX, Françoise GUILLET, Marc LANDRY, Philippe LEJEUNE ; Alain MOREL

Résultats : globaux ?

Voici ce que j'ai en différenciant les deux parties

Epreuve critique de dossier

Première partie

Moyenne des candidats présents 09,96/20

Moyennes des candidats admis 11,41/20

Note maximale 14,00/20

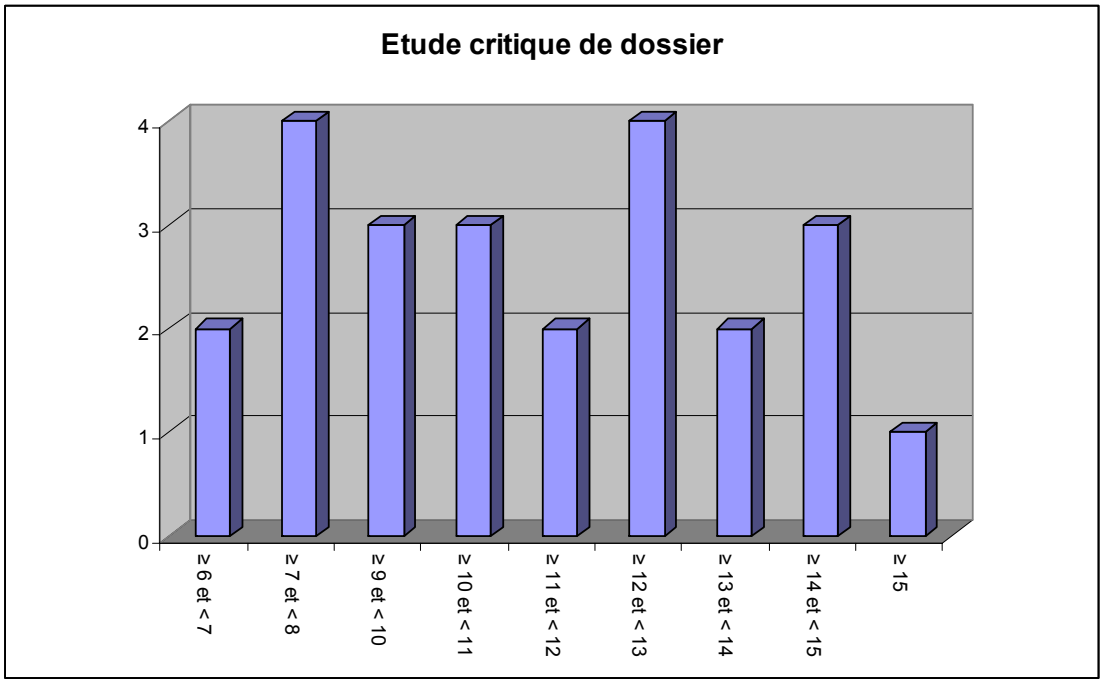
Seconde partie

Moyenne des candidats présents 12,76/20

Moyennes des candidats admis 13,68/20

Note maximale 18,00/20

≥ 6 et < 7	2	≥ 12 et < 13	4
≥ 7 et < 8	4	≥ 13 et < 14	2
≥ 9 et < 10	3	≥ 14 et < 15	3
≥ 10 et < 11	3	≥ 15	1
≥ 11 et < 12	2		



En ce qui concerne les ECD, la nouveauté d'un sujet ne doit pas rebuter les candidats. Dans ce cas en effet, de tels sujets sont appuyés par les données expérimentales et éventuellement les synthèses sur le thème proposées dans les articles. Il est essentiel d'avoir une vision, même globale, des approches méthodologiques utilisées dans les articles proposés. Les candidats ne doivent pas chercher à lire *in extenso* ces articles, ce qui aboutit souvent à négliger l'un deux. Ils devraient au contraire chercher à dégager une idée directrice sur laquelle bâtir la présentation.

Tous les dossiers nécessitaient une culture générale dans les différents champs disciplinaires, qui n'est pas apparue chez tous les candidats. Dans la plupart des cas, un seul des deux articles proposés a été lu correctement. La conséquence étant, au mieux, un survol soit de l'article de recherche soit de la revue au pire l'impasse sur l'un des deux. Il était alors difficile de faire le lien entre els deux et d'exploiter l'un pour éclairer l'autre. Dans certain cas, le manque de connaissance était flagrant, aussi bien dans le domaine scientifique concerné par le sujet de l'ECD que dans les notions de techniques. Enfin, même si l'ECD n'est pas une leçon, le côté pédagogique n'est pas à négliger.

Les épreuves orales, leçon ou ECD, font appel à des notions de chimie qui sont très diverses, de la chimie-physique à la chimie organique.
Le programme de cette année intégrait les méthodes spectroscopiques, notamment la RMN. Pour comprendre l'intérêt de la RMN, il faut appréhender les notions de spin nucléaire et de déplacement chimique.
De même, la chimie structurale (représentation de Lewis) est trop peu maîtrisée : la représentation de Lewis du monoxyde d'azote a ainsi posé quelques problèmes.
La nomenclature en chimie organique est également à connaître pour déterminer correctement les réactions impliquées : ainsi un groupe amine est différent d'un groupe amide.
Les notions fondamentales de cinétique ont également posé problème : la notion d'ordre et de vitesse de réaction apparaissent dans certains ECD et doivent donc être sues pour comprendre les enjeux des articles.
En ce qui concerne les techniques expérimentales, les phénomènes mis en jeu comme la fluorescence sont mieux appréhendés et compris. Les efforts des candidats sont donc très appréciés.

Seconde partie d'épreuve

Sujet 1

Texte de Référence : Extrait du texte relatif au programme d'éducation à l'orientation

Principes de base de l'éducation à l'orientation

" Les élèves élaborent leur projet d'orientation scolaire et professionnelle en fonction de leurs aspirations et de leurs capacités avec l'aide des parents, des enseignants, des personnels d'orientation et des professionnels compétents. […]". Loi d'orientation sur l'éducation du 10 juillet 1989

L'éducation à l'orientation est une démarche éducative à l'orientation qui présente un double enjeu : contribuer au développement de la personnalité et de l'autonomie de tous les élèves, et améliorer la réussite de leurs parcours de formation et de leur insertion professionnelle.

L'éducation à l'orientation doit permettre à chaque élève :

- *de développer des connaissances et des compétences dans les domaines des formations et de l'environnement économique et professionnel ;*
- *d'enrichir et diversifier ses représentations ;*
- *de développer son autonomie par une attitude active, d'être capable d'identifier les obstacles qui pourraient s'opposer à la réalisation de ses projets, les analyser et envisager les moyens de les surmonter avec l'aide de l'équipe éducative et des dispositifs mis en œuvre dans l'établissement.*

Cette démarche, portée par toute l'équipe éducative, et confortée par les partenaires, appréhende l'élève dans sa globalité, dans le cadre de son développement personnel, qui ne peut se concevoir en dehors des relations aux autres, aux groupes. Elle ne peut non plus ignorer les contraintes et opportunités des procédures d'orientation et d'affectation, dont les mécanismes sont à identifier, à analyser et à prendre en compte dans toute élaboration de projet.

L'éducation à l'orientation est une démarche :

- ***continue** pour aider le jeune à développer une compétence à s'orienter et à faire des choix.*

- ***cohérente****: dans le cadre de la politique académique d'orientation, et au sein de l'établissement, toutes les activités d'aide au projet de l'élève doivent être organisées dans le temps et articulées entre elles. L'éducation à l'orientation s'inscrit dans le volet " information - orientation " du projet d'établissement.*
- ***collective*** *qui repose sur la mobilisation des membres de l'équipe éducative et de ses partenaires, en fonction des spécificités de chacun.*
- **concertée** conçue et organisée avec l'ensemble des partenaires, dans et hors l'École, pour permettre à tous les jeunes de s'ouvrir sur leur environnement, à différents niveaux : académie, département, collectivités locales, bassin de formation, établissement, centre d'information et d'orientation, entreprises, associations de parents d'élèves...

Présentation de la situation :

Madame Le Proviseur soumet aux membres du CA (conseil d'administration) le programme d'éducation à l'orientation pour l'année scolaire 2011/2012 qui est adopté à l'unanimité.

Question :

- Comment allez-vous contribuer à ce programme d'éducation à l'orientation dans le cadre de votre mission d'enseignant ?

Sujet 2

Texte de Référence

LE RÈGLEMENT INTÉRIEUR DANS LES EPLE (établissement public local d'enseignement) (extrait : C. n° 2000-106 du 11-7-2000).

II - LE CONTENU DU RÈGLEMENT INTÉRIEUR

Normatif, le règlement intérieur est aussi éducatif et informatif : document de référence pour l'action éducative, il participe également à la formation à la citoyenneté des élèves et facilite les rapports entre les acteurs de la communauté éducative. ……

2.2 Les règles de vie dans l'établissement

Le règlement intérieur doit permettre de réguler la vie dans l'établissement et les rapports entre les différents membres de la communauté scolaire par des dispositions précises. La liste ci-dessous, qui concerne les règles de fonctionnement de l'établissement, d'organisation des études et celles qui régissent la vie quotidienne, peut être complétée utilement par d'autres points en fonction de la situation locale et de la spécificité de l'établissement.

L'organisation et le fonctionnement de l'établissement

- horaires,
- usage des locaux et conditions d'accès,
- espaces communs, - usage des matériels mis à disposition,
- modalités de surveillance des élèves, - mouvement de circulation des élèves,
- modalités de déplacement vers les installations extérieures,
- récréations et inter-classes,
- régime des sorties pour les internes, les demi-pensionnaires et les externes,
- régime de la demi-pension et de l'internat,
- organisation des soins et des urgences.

La sécurité

- tenues incompatibles avec certains enseignements, susceptibles de mettre en cause la sécurité des personnes ou les règles d'hygiène ou encore d'entraîner des troubles de fonctionnement dans l'établissement. Il faut rappeler en outre que toute introduction, tout port d'armes ou d'objets dangereux, quelle qu'en soit la nature, doivent être strictement prohibés. De même, l'introduction et la consommation dans l'établissement de produits stupéfiants sont expressément interdites. Il doit en être de même pour la consommation d'alcool, excepté, pour les personnels, dans les lieux de restauration. Il est rappelé qu'il est interdit de faire usage du tabac dans les établissements scolaires.

Présentation de la situation

Vous êtes enseignant dans un lycée d'enseignement général, technologique et professionnel, vous intervenez régulièrement dans une salle spécialisée : laboratoire. Un élève se présente sans sa blouse à une séance d'activités technologiques.

Question

Quels éléments utilisez-vous pour expliquer la nécessité du port de la blouse ?

Sujet 3

Texte de référence ***Extraits de la Fiche 34*** *(Source ESEN Ecole Supérieure de l'Education Nationale)*

I - FONDEMENTS JURIDIQUES DE L'OBLIGATION DE SURVEILLANCE

L'obligation de surveillance des élèves, pendant le temps où ils sont confiés à l'institution scolaire, s'impose aux personnels de l'établissement public local d'enseignement (E.P.L.E.), sous l'autorité du chef d'établissement. […]

II - CHAMP DE LA SURVEILLANCE

La surveillance doit être assurée pendant la totalité du temps scolaire, c'est-à-dire pendant toute la durée au cours de laquelle l'élève est confié à l'établissement. Cette durée est déterminée par l'emploi du temps de l'élève., […]

Ce temps scolaire n'est pas sécable. La surveillance qu'il appelle doit donc garder un caractère continu, que les activités assurées dans ce cadre soient obligatoires ou facultatives, qu'elles se déroulent à l'intérieur ou à l'extérieur de l'établissement et quel qu'en soit le contenu. Cette exigence de continuité vaut donc pour les enseignements obligatoires, les enseignements facultatifs auxquels l'élève est inscrit, […], les séances d'atelier et de travaux pratiques, […]

III - CONTENU DE L'OBLIGATION DE SURVEILLANCE

III-1 Consistance

L'obligation de surveillance vise à faire assurer par les élèves le respect d'autrui et d'eux-mêmes, celui des biens individuels et collectifs et celui des principes de discipline sans lesquels la communauté pédagogique ne serait pas viable.

Elle comporte non seulement la vigilance immédiate à laquelle est astreint le personnel de l'établissement, mais aussi les mesures de prévention requises pour la rendre générale et efficace.

Il résulte de la jurisprudence que la surveillance est à graduer, dans sa forme et dans son étendue, en fonction de l'âge des élèves et de leurs activités. […]

Toujours selon la jurisprudence, les séquences à risques du temps scolaire […] appellent un renforcement de la surveillance. À ce titre, a été jugé fautif le comportement d'un enseignant laissant s'installer le désordre à l'occasion d'un changement de classe.

Le même renforcement est demandé, par le juge, dans le cas des enseignements technologiques ou pratiques dispensés en ateliers […]appelant des précautions particulières individuellement applicables aux élèves.

III-2 PRÉCISIONS APPORTÉES PAR LE RÈGLEMENT INTÉRIEUR

C'est au règlement intérieur, comme le précise la circulaire n° 2000-106 du 11 juillet 2000 relative au règlement intérieur dans les E.P.L.E., qu'il revient de préciser les modalités de la surveillance. Il doit le faire avec le souci de permettre aux élèves de prendre progressivement en charge certaines de leurs activités, à mesure qu'ils progressent en âge et dans leur scolarité, comme le prévoit l'article R. 421-5 du code de l'éducation.

Dans la même logique, c'est au règlement intérieur qu'il appartient de tracer les limites marquant le début et la fin de l'obligation de surveillance, notamment d'ouvrir la possibilité d'accorder des autorisations dérogeant au régime des sorties et à celui des déplacements. […]

IV - PERSONNELS CHARGÉS DE LA SURVEILLANCE

La surveillance est, comme le rappelle la circulaire n° 96-248 du 25 octobre 1996 modifiée par la circulaire n° 2004-054 du 23 mars 2004, l'affaire de tous les personnels de l'E.P.L.E.

La responsabilité première en incombe au chef d'établissement, au titre des pouvoirs qui lui sont reconnus par l'article R. 421-10 du code de l'éducation pour assurer le bon ordre, la sécurité des personnes et des biens et l'application du règlement intérieur, ainsi que pour répartir le service des personnels.

Sous son autorité, un rôle éminent revient au conseiller principal d'éducation, qui a pour mission d'organiser le service des personnels de surveillance et de veiller, avec eux, au respect de la discipline et des dispositions du règlement intérieur par les élèves pendant tout le temps où ceux-ci sont confiés à l'établissement, hormis les séquences, notamment les heures de classe, au cours desquelles les élèves sont directement encadrés par les personnels enseignants.

Les enseignants ont eux-mêmes à assurer la surveillance des élèves dont ils sont chargés, durant les horaires d'enseignement et les autres activités qu'ils encadrent, telles que sorties, déplacements ou loisirs périscolaires. […]

Présentation de la situation

En début d'année scolaire, chargé de l'enseignement en laboratoire de microbiologie, d'un groupe d'élèves, vous constatez dans le laboratoire voisin, en l'absence du professeur, des comportements indisciplinés d'élèves. Vous intervenez.

Question :

Comment justifiez-vous votre intervention, auprès des élèves, auprès de votre collègue ?

Sujet 4

Texte de Référence : Article 34 de la Loi n°2005-380 du 23 avril 2005

Titre préliminaire : Dispositions communes.

Article L401-1 Créé par Loi n°2005-380 du 23 avril 2005 - art. 34 JORF 24 avril 2005

Dans chaque école et établissement d'enseignement scolaire public, un projet d'école ou d'établissement est élaboré avec les représentants de la communauté éducative. Le projet est adopté, pour une durée comprise entre trois et cinq ans, par le conseil d'école ou le conseil d'administration, sur proposition de l'équipe pédagogique de l'école ou du conseil pédagogique de l'établissement pour ce qui concerne sa partie pédagogique.

Le projet d'école ou d'établissement définit les modalités particulières de mise en œuvre des objectifs et des programmes nationaux et précise les activités scolaires et périscolaires qui y concourent. Il précise les voies et moyens qui sont mis en œuvre pour assurer la réussite de tous les élèves et pour associer les parents à cette fin. Il détermine également les modalités d'évaluation des résultats atteints.

Sous réserve de l'autorisation préalable des autorités académiques, le projet d'école ou d'établissement peut prévoir la réalisation d'expérimentations, pour une durée maximum de cinq ans, portant sur l'enseignement des disciplines, l'interdisciplinarité, l'organisation pédagogique de la classe, de l'école ou de l'établissement, la coopération avec les partenaires du système éducatif, les échanges ou le jumelage avec des établissements étrangers d'enseignement scolaire. Ces expérimentations font l'objet d'une évaluation annuelle.

Le Haut Conseil de l'éducation établit chaque année un bilan des expérimentations menées en application du présent article.

Présentation de la situation :

Dans le cadre d'une action du projet d'établissement vous êtes amené(e) à proposer une expérimentation pédagogique .

Question : Quels seront le cadre et les limites de votre action ?

Sujet 5

Texte de Référence : EXTRAITS DE LA CIRCULAIRE N°2006-197 DU 30-11-2006 MEN DGESCO B3-1

La loi d'orientation et de programme pour l'avenir de l'école réaffirme le rôle fondamental de l'école dans l'acquisition des savoirs et des compétences indispensables, ainsi que dans la transmission des valeurs de la République. Elle renforce le pilotage de l'établissement scolaire, notamment en :
- redéfinissant les objectifs et le contenu du projet d'établissement (code de l'éducation, art L.401-1) ;
- permettant au conseil d'administration de déléguer certaines de ses compétences à la commission permanente, afin de pouvoir se recentrer sur ses missions essentielles (code de l'éduc., art L.421-4) ;
- favorisant la mise en place d'une politique partenariale au niveau des bassins de formation (code de l'éducation, article L. 421-7).[…]

1 - Les missions

L'évolution de la société, la volonté de mieux faire partager les valeurs de solidarité, de respect mutuel et de laïcité nécessitent que soit résolument mise en place, poursuivie, ou renforcée une véritable éducation à la citoyenneté de tous les élèves, mobilisant l'ensemble des acteurs de la communauté scolaire. Cette exigence se traduit clairement dans les quatre missions définies à l'article 30-4 du décret du 30 août 1985 modifié. Ainsi le CESC (comité d'éducation à la santé et à la citoyenneté) :
- contribue à l'éducation à la citoyenneté ;
- prépare le plan de prévention de la violence ;
- propose des actions pour aider les parents en difficultés et lutter contre l'exclusion ;
- définit un programme d'éducation à la santé et à la sexualité et de prévention des comportements à risques.

Le CESC constitue pour ces missions une instance de réflexion, d'observation et de veille qui conçoit, met en œuvre et évalue un projet éducatif en matière de prévention, d'éducation à la citoyenneté et à la santé, intégré au projet d'établissement. Cette démarche globale et fédératrice permet de donner plus de cohérence et de lisibilité à la politique de l'établissement. […]

2.3. *Éducation à la santé et à la sexualité, et prévention des conduites à risques*

Dans chaque établissement scolaire, le CESC définit un programme d'éducation à la santé (14), à la sexualité (15) et de prévention des conduites à risques (16), notamment des conduites addictives.

Les activités éducatives définies par le CESC doivent être adaptées en premier lieu aux attentes et aux besoins des élèves et plus largement aux enjeux actuels de santé publique et aux enjeux de société. Elles ont pour objectifs communs, la prévention, la responsabilité, le respect mutuel et la formation des jeunes à la vie sociale, qui rejoignent les objectifs de l'éducation à la citoyenneté. Elles visent à développer le plus tôt possible chez les élèves une réflexion destinée à favoriser l'adoption de comportements responsables au plan individuel et collectif.

Extrait d'un projet d'établissement

Axe 2 : La réconciliation de l'élève avec lui-même et avec l'école	
Mettre en place un CESC pour : Développer les valeurs citoyennes	Mise en place d'actions favorisant : • la solidarité : participation aux campagnes nationales ELA, Téléthon, SIDA • l'altruisme : spectacle de Noël à la maison de retraite • le sens des responsabilités : ✓ formation au secourisme (STT) ✓ prévention des risques liés à l'activité professionnelle (ergonomie, respect des consignes de sécurité) ✓ respect de l'environnement (collecte des déchets, sensibilisation au développement durable)
Promouvoir la santé	Mise en place de projets transdisciplinaires avec des partenariats extérieurs sur des thèmes comme l'hygiène de vie (nutrition, sommeil, hygiène…) ou la prévention des conduites à risques (tabac, alcool, sexualité, toxicomanies…) Développement d'activités en adéquation avec les besoins et envies des élèves pour favoriser leur bien-être : atelier de relaxation (gestion du stress), activités sportives, de loisirs (UNSS, clubs hip hop, danse orientale, atelier cirque…) et artistiques (chant, dessin, photo, vidéo…) Collaboration avec des ressources extérieures : centre social (participation à des manifestations, forums…), BPDJ (prévention des conduites à risques), associations (Émergence, Espace ressources, AIEM, Planning familial)

Présentation de la situation :

A l'issue de votre cours, un élève à qui vous avez fait une remontrance sur son attitude, vous confie qu'il s'alcoolise régulièrement.

Question : Quelle(s) action(s) allez-vous mettre en œuvre ?

Sujet 6

TEXTE de REFERENCE : *Indicateurs pour le pilotage des établissements du second degré* (IPES)

Présentation de la situation

Parmi les *indicateurs pour le pilotage des établissements du second degré* (IPES) d'un lycée, on trouve à la rubrique « Devenir des élèves de seconde » de l'année 2009 le tableau suivant.

	Établissement			
année 2009	effectif	pourcentage	Académie	FRANCE
1re S	64	20,6%	31,5%	30,7%
1re L	38	12,2%	10,5%	9,2%
1re ES	71	22,8%	19,1%	18,7%
1re STG TER	62	19,9%	13,6%	15,0%
1re STI	4	1,3%	7,3%	6,7%
BEP CAP	2	0,6%	0,7%	0,8%
Redoublants	47	15,1%	10,5%	11,2%
Bac pro	2	0,6%	2,6%	2,4%
Sorties du système	21	6,8%	3,6%	4,8%

Ces indicateurs révèlent par ailleurs que 7,3 % des élèves de Seconde de ce lycée appartiennent à une catégorie socioprofessionnelle défavorisée (académie : 20,8 %, France : 24,6 %).

Question

Après avoir analysé les données de ce tableau, indiquez les propositions que pourrait faire le conseil pédagogique afin de faire évoluer certaines caractéristiques de l'orientation des élèves de ce lycée.

Rapport établi par : Henri-Jean BOULOUIS, Jeanne-laure DORMIEUX, Françoise GUILLET, Marc LANDRY, Philippe LEJEUNE ; Alain MOREL

Dans l'ensemble, les candidats se sont bien appropriés les situations et ont, de façon générale, replacé convenablement les sujets proposés dans le contexte des compétences de l'enseignant. Certains exposés ont été enrichis par des références à des ouvrages des sciences de l'éducation.
Le jury a apprécié :
- une proposition d'actions complémentaires aux informations données dans les annexes,
- la capacité du candidat à :
  - se positionner dans son champ de compétences en tant qu'enseignant
  - se situer dans la hiérarchie au sein du système scolaire
  - participer à la vie de l'établissement
  - identifier les partenaires internes et externes à l'institution
- la qualité de l'expression orale.

Le jury a déploré
- des développements trop théoriques et non contextualisés et quelquefois hors sujets.
- des jugements de valeur sur le système éducatif et/ou ses acteurs.
- une lecture incomplète du sujet avec souvent des interprétations erronées des données.
- des exposés peu structurés sans introduction et/ou conclusion.
- une méconnaissance du terrain, du système éducatif et de ses acteurs.

Le candidat doit s'informer sur les obligations réglementaires et les textes officiels en relation avec le métier de professeur. Il doit aussi mener une réflexion et un positionnement par rapport aux évolutions actuelles du système éducatif, faire preuve d'analyse et de recul.

CONCLUSION GENERALE

Cette année, en raison des modifications des conditions d'inscription au concours de l'agrégation, une assez forte diminution du nombre d'inscrits puis de présents a été constatée.
L'évolution de la population, constatée l'an passé s'est confirmée : d'une part l'augmentation du nombre de candidats actuellement professeurs du secondaire et cette année l'absence de candidats ayant préparé le concours à l'ENS en 2010 2011.
Pour les enseignants, sans possibilité encore cette année de concourir à l'agrégation interne, la préparation du concours externe est leur seule voie de promotion.

Il est à noter que l'évolution des profils et origines des candidats ne se traduit pas par un niveau plus faible du concours.
Si lors des épreuves d'admissibilité, on a pu constater certains devoirs traduisant la non maîtrise des questions à traiter, par contre les prestations aux épreuves d'admission ont permis de sélectionner des candidats conjuguant à la fois un niveau de connaissances satisfaisant et une capacité à extraire des informations, les analyser avec rigueur, les restituer dans un souci de clarté pédagogique.
Le concours de l'agrégation ne peut s'envisager sans des connaissances spécifiques de haut niveau mais aussi sans qu'une culture générale de l'ensemble des domaines, biochimie, biologie et biotechnologies ne soit présente. Ces deux aspects sont particulièrement mobilisés lors des épreuves orales
L'adaptabilité des candidats est éprouvée lors des travaux pratiques qui chaque année placent les candidats devant des sujets innovants pour lesquels ils doivent faire preuve d'organisation, de discernement mais aussi de maîtrise des techniques.
Ce sont toutes ces qualités qui sont requises tout au long de la carrière d'un enseignant agrégé, lui permettant de toujours suivre l'évolution des connaissances scientifiques et technologiques.

Le jury a apprécié l'attitude des candidats et espère que les nouveaux agrégés sauront conserver l'esprit qui les a animés lors du concours.

Le jury remercie Monsieur le Proviseur du lycée Pierre- Gilles de Gennes ENCPB pour la qualité de l'accueil que lui-même et ses équipes ont réservé à ce concours, qui s'est déroulé dans d'excellentes conditions. Le jury remercie également l'ensemble des personnels en particulier des personnels de laboratoire qui ont, cette année encore assuré une préparation remarquable des épreuves pratiques.