

Épreuve écrite de Biotechnologie

L'épreuve est organisée en 2 parties indépendantes, la première portait cette année sur les parties 1 et 3 du programme, la seconde sur les parties 2 et 4. Les questions ont permis d'éprouver la solidité des connaissances scientifiques et technologiques des candidats, mais aussi de mettre en évidence leur capacité d'analyse, de synthèse et d'adaptation dans un contexte classique ou de découverte.

Une attention particulière est portée à la qualité générale de la copie, la clarté du propos et la précision du vocabulaire employé. Des efforts de rédaction sont constatés et très peu de copies ne respectent ni l'orthographe ni la grammaire française.

Les remarques des rapports des années précédentes restent d'actualité et le jury renvoie à leur lecture. Les écrits obscurs ou auto-contradictaires, les phrases sans verbe et la mauvaise utilisation des liens logiques sont tenus pour nuls. Cette année, les illustrations proposées sont souvent claires et bien annotées, ce qui contribue à la qualité générale de la copie.

Le jury encourage les candidats à rédiger des paragraphes concis en prenant soin de relire afin d'éviter des erreurs très dommageables, et facilement évitables. On peut citer par exemple des erreurs de calculs « $1/5 = 5$ » ou d'absence d'unité, ou encore des formulations erronées : «elle utilise la voie fermentaire pour respirer», «le milieu contient des minéraux donc la souche est lithotrophe», «EcoRI est une origine de réplication procaryote», «les barres d'erreur ne se recourent pas»...

Pour les questions formulées de façon à laisser apparaître la conclusion de la réponse attendue (Q23, Q15), des candidats se limitent à une paraphrase de la question alors qu'une démarche logique aboutissant à la conclusion proposée doit être conduite.

Pour bien réussir cette épreuve, il est nécessaire (mais non suffisant) :

- de s'appliquer à rédiger dans un français correct, concis et précis,
- d'organiser son temps de manière équilibrée. Dans le cadre de la structure de l'épreuve, chaque partie étant notée sur 10 points, 90 minutes doivent être consacrées à chaque partie. Pour la partie 1, une trentaine de minutes est dédiée à la question rédactionnelle et environ 60 minutes pour les autres questions.

La suite de ce rapport va maintenant s'attarder sur certains points particuliers. Certains propos paraîtront parfois négatifs, mais il s'agit d'aider à la préparation des futurs candidats.

Commentaires par question

Q1. Le document 1 légendé comme «électronographie de *Caldicellulosiruptor bescii*» n'est donc pas une coloration de Gram comme il a été trouvé dans certaines copies. On y voit la morphologie de la bactérie (bacille), la présence de flagelles répartis autour de la bactérie (bactérie mobile) et d'une paroi a priori épaisse (bactérie à Gram +). Cette question n'a pas posé de problème, il manquait parfois des justifications ou des finalisations dans les réponses.

Q2. Question classique sur l'organisation d'une paroi d'une bactérie à Gram+. La qualité et la précision des schémas sont très variables. Des erreurs sont observées dans certaines copies qui présentent un schéma de paroi Gram – ou des schémas minimalistes sans annotation (2 voire 3 lignes droites superposées). Les meilleures copies proposent des schémas précis, complets et annotés avec un argumentaire reliant les questions Q1 et Q2.

- Q3.** Question classique d'analyse de la composition d'un milieu de culture et de la détermination des types trophiques. Elle nécessite une analyse détaillée de chaque constituant en prenant la peine de bien vérifier les concentrations avant de conclure. Les premiers composants de la liste ne sont pas obligatoirement ceux définissant les types trophiques. L'analyse systématique a été très souvent menée, la déduction argumentée vers les types trophiques beaucoup moins.
- Q4.** La souche étudiée est anaérobie stricte. L'analyse de la composition du milieu en Q3 et les éléments apportés par le document 3 permettaient une conclusion sans ambiguïté. Les meilleures réponses relient les deux questions pour étayer leur analyse et conclusion.
- Q5.** L'analyse du document 3 conduit à définir la température optimale de croissance de la souche (environ 75 °C) : la souche est donc thermophile. Les deux courbes sont composées d'une phase croissante semblable à la courbe d'Arrhénius puis d'un maximum (détermination T optimale) et d'une phase de décroissance semblable à une courbe d'inactivation thermique des protéines.
- Q6.** Les étapes attendues sont : lyse bactérienne, extraction des protéines du lysat bactérien puis quantification des protéines. De bonnes copies ont illustré les étapes en présentant différentes méthodes utilisables et en précisant succinctement leur principe. Beaucoup de candidats n'ont cité comme méthode de dosage qu'une mesure spectrophotométrique à 280 nm.
- Q7.** Cette question a été globalement bien traitée, la seule difficulté rencontrée a été de préciser les fonctions des voies de fermentation.
- Q8.** Cette question n'a pas posé de problème. Les meilleures copies ont présenté avec précision la nouvelle voie et les différents cofacteurs impliqués dans chacune des étapes, sans oublier de supprimer la voie de fermentation de l'acide lactique.
- Q9.** L'analyse du document 5 nécessitait une lecture attentive de l'expérience présentée afin d'en comprendre les objectifs et d'en tirer les conclusions attendues. Ce travail d'appropriation n'a pas toujours été mené ce qui a conduit un certain nombre de candidats à des analyses, des conclusions fausses ou à ne traiter que certains points demandés.
La souche JWCB018 sert de témoin d'absence d'expression de l'enzyme AdhE afin de vérifier la qualité de la transformation. La souche JWCB032 transformée exprime l'enzyme AdhE à 60 °C et à 65 °C, mais pas à 70 °C ; cette expression étant plus intense à 60 °C. On choisit cette température pour la production, température proche de l'optimum de croissance de la bactérie (Q5).
On devait ensuite vérifier la taille de la protéine produite, sachant que l'insert génétique mesurait environ 2,4 kpb (codant une protéine d'environ 800 acides aminés) : la protéine produite avait donc une masse molaire d'environ 88 kDa. La distance de migration des bandes observées par Western blot confirmait la taille attendue par comparaison au marqueur de taille.
- Q10.** Le calcul d'un rendement « Y » a globalement été maîtrisé et détaillé.
- Q11.** L'analyse du document 6 n'a pas posé de problèmes aux candidats ayant bien intégré la logique des questions précédentes. Les réponses manquaient parfois de justifications en s'appuyant sur des données chiffrées fournies.
- Q12. Question rédactionnelle.** Cette partie nécessite d'y consacrer une durée suffisante. Près de 1/3 des candidats ne l'a pas abordée. La majorité des copies introduisait le sujet avec un rappel historique sur les méthodes de transfert (Southern Blot,...) et poursuivait sur les particularités du Western Blot appliqué aux protéines. La suite était parfois confuse et peu structurée : certains ont développé, en fait, le Southern Blot en remplaçant ADN par protéine. C'est bien dommage. Des points techniques récents ont été développés dans certaines copies sans que les fondamentaux ne soient exposés, ni expliqués.
La partie PAGE SDS ne nécessitait pas une présentation exhaustive, on attendait vraiment un développement détaillé à partir du transfert du gel sur membrane.

Les meilleurs candidats ont rédigé la réponse avec une introduction et un plan en plusieurs parties afin d'aborder les différents points demandés. Ils s'appuyaient sur des explications précises et rigoureuses et des schémas annotés explicites, gain de temps pour l'épreuve. Une conclusion et parfois des perspectives d'amélioration de la méthode finissaient leur propos.

- Q13.** Deux approches ont été appréciées, celle consistant à mettre en perspective dans le contexte proposé des connaissances précises du système de classification des enzymes et l'autre reposant sur l'analyse des réactions fournies pour en déduire un ensemble de propriétés communes.
- Q14.** De très nombreuses réponses se sont limitées à un seul critère, le plus souvent la longueur d'onde des photons émis. Certains candidats se sont cependant distingués en rédigeant une réponse structurée reposant sur la double sélectivité d'une part la nature des substrats (luciférine/ATP/O₂ et Coelentérazine /O₂) et des produits avec des propriétés de luminescence différenciables par la longueur d'onde (560 nm pour FLuc et 480 nm pour RLuc). De façon plus surprenante, le critère de MM différente des deux enzymes a été retenu pour doser les activités enzymatiques.
- Q15.** Cette question a été très diversement traitée. Si les candidats reconnaissent les différentes boîtes fonctionnelles portées par un vecteur, très peu d'entre eux se sont montrés capables de les affecter à une fonction précise. Certains candidats ayant décrit les documents 8A et 8B fournis, sans les mettre en perspective se sont pénalisés en perdant du temps d'épreuve. Il s'agissait d'exploiter les documents pour conclure logiquement à la réponse donnée dans la question. Par exemple, on pouvait commencer par proposer une définition fonctionnelle d'un vecteur navette, accepté par deux hôtes, l'un procaryote, *E. coli*, pour la phase de clonage et l'autre eucaryote pour la phase d'expression. On pouvait ensuite affecter les différentes boîtes du vecteur à ces tâches. Et enfin, mettre en relation la position du site multiple de clonage -en amont du gène rapporteur *luc*- et la position du promoteur rappelée dans le document 8A, pour conclure que le vecteur permet de tester des séquences promotrices potentielles.
- Q16.** Les étapes d'un clonage (par enzymes de restriction), et leurs objectifs sont connues pour une large majorité des candidats. Cependant, rares sont ceux qui ont profilé le clonage au contexte proposé :
- obtention de l'insert-promoteur par PCR, une réflexion sur les amorces était attendue (spécificité et adaptateur en 5' portant un site de restriction)
 - restriction de l'insert et du vecteur par les mêmes enzymes, puis inactivation des enzymes de restriction
 - ligation
 - transformation et sélection des transformants, par culture sur milieu sélectif (LB + Amp)
 - vérification du clonage : toutes les réponses proposées permettant de vérifier que le vecteur est recombiné ont été acceptées.
- Q17.** Il s'agissait de limiter le phénomène d'interférence à la fixation de facteurs de transcription sur des séquences autres que la séquence promotrice à étudier.
- Q18.** Deux aspects étaient attendus dans la réponse. Certaines modifications (Pro11 par exemple) compensent le biais d'utilisation des codons, alors que d'autres modifications (Asp3) ne permettent pas d'améliorer la traductibilité de l'ARNm produit. L'hypothèse logique est que ces dernières modifications conduisent à la réduction du nombre de sites de fixation des facteurs de transcription. Certains candidats, n'ont pas réussi à s'appropriier les données du document et concluent à tort que les mutations changent le cadre ouvert de lecture.
- Q19.** Les réponses proposées sont globalement conformes à l'attendu, cependant, peu de candidats distinguent transfection et transformation.
- Q20.** Rares sont les candidats qui rappellent que les enzymes exigent souvent un environnement physico-chimique pour une activité optimale. Cet environnement est naturellement fourni par le cytoplasme cellulaire et doit être reconstitué *in vitro*. Une réflexion sur la disponibilité des substrats D-luciférine, ATP et O₂ était aussi attendue.
- Q21.** Cette question classique a été diversement traitée par les candidats. Etait attendu, une justification des équations aux grandeurs utilisées pour le calcul de V_{max} et K_M , le résultat avec les unités appropriées, une comparaison des grandeurs, pour conclure à une meilleure efficacité *in vitro*. Les candidats qui ont traité l'ensemble de la question ont proposé, avec pertinence, que la capacité de diffusion membranaire du substrat D-luciférine expliquait les différences observées *in vivo*.

Q22. Les meilleures réponses ont décrit la très bonne corrélation entre les mesures *in vivo* et *in vitro* et un signal mesuré environ 70 fois plus élevé *in vitro*, pour en déduire que ces 2 approches «donnent les mêmes conclusions».

Q23. Le rôle d'étalon interne de la construction exprimant la R-luciférase sous le contrôle d'un promoteur (T) témoin constitutif, avec une initiation de transcription constante, a été bien vu par les candidats qui ont traité la question.

Q24. Cette question plus difficile a révélé les candidats capables de prendre du recul sur un document dense pour en tirer les avantages de la normalisation de résultats dans un contexte d'étude de séquences promotrices.

La plupart des candidats se sont limités à l'analyse de l'expérience B, en comparant l'effet de la normalisation sur les 2 critères renseignés (facteur de modification de l'activité et écart-type).

Bravo aux rares candidats qui ont réussi en temps limité à rédiger une synthèse du document mettant en avant les éléments clés, pour conclure que la normalisation permet une évaluation plus précise et plus juste du facteur de modification de l'activité promotrice en regard de l'écart-type.

Q25. Très peu de candidats ont insisté sur la nécessité d'un clonage en phase orienté, en s'appuyant sur l'élimination du codon stop de l'ORF *luc* montrée dans le document 12A.

Q26. Cette question n'a pas posé de problème aux candidats, cependant certains ont traité une seule des deux parties de la question, soit l'analyse du protocole expérimental, soit les mesures de demi-vies.

Les 4 dernières questions (**Q27, Q28, Q29 et Q30**) ont été globalement bien comprises et traitées par les candidats qui sont allés au bout de l'épreuve.