

Épreuve écrite de Biotechnologie

L'épreuve est organisée en 2 parties indépendantes, la première portait cette année sur les parties 1 et 2 du programme, la seconde sur les parties 3 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 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. Les remarques des rapports des années précédentes restent d'actualité et le jury renvoie à leur lecture. Les écrits obscurs ou auto-contradictoires, les phrases sans verbe et la mauvaise utilisation des liens logiques sont tenus pour nuls. Et rappelons que tout schéma doit être clairement annoté : symboles, abréviations et représentations diverses explicités.

Le jury encourage les candidats à rédiger les paragraphes concis en prenant soin de relire afin d'éviter des erreurs très dommageables, du type « la structure primaire des protéines est l'ordre d'enchaînement des nucléotides », « la souche a besoin de NaCl pour se développer, elle est donc mésophile », ou encore méthode « cinématique » au lieu de cinétique.

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. Les propos paraîtront souvent négatifs, mais il s'agit d'aider à la préparation des futurs candidats.

Concernant la partie 1

Q1. Cette question rédactionnelle pourtant classique n'a que rarement été traitée de façon optimale. Les candidats semblent n'avoir pas dédié suffisamment de temps pour la traiter dans sa globalité.

Concernant son principe général, on lit trop souvent que la chromatographie est « **une** technique ». Bravo aux rares candidats qui décrivent les forces mises en jeu pour conclure à la séparation différentielle des molécules.

Tous les exemples de chromatographie d'affinité proposés ont été validés, cependant certains candidats, qui ont choisi une résine greffée par un anticorps spécifique, se sont laissés emporter par une révélation de type ELISA.

Les étapes d'une chromatographie d'affinité - équilibration, charge, lavage ou élution 1 en tampon de charge, élution, collecte des fractions- sont bien maîtrisées par les candidats qui traitent cet aspect. Certaines réponses particulièrement abouties ont exploité avec à propos un profil d'élution en lien avec les étapes de la chromatographie d'affinité choisie.

Le vocabulaire spécifique à la chromatographie est parfois mal employé et conduit à des approximations qui obscurcissent le propos. Par exemple, colonne et support chromatographique (résine) sont souvent confondus.

Les intérêts majeurs de la chromatographie d'affinité dans un contexte de production industrielle ont été proposés par de nombreux candidats : rapidité, purification à

l'homogénéité, coût lié à la particularité de la phase stationnaire...

- Q2.** La démonstration mathématique de la relation de Scatchard a été conduite avec aisance pour une large majorité de candidats, les meilleures réponses ont précisé que l'écriture des équations (K_A , conservation de la matière) montrent les concentrations des espèces en jeu quand l'équilibre est atteint.
- Q3.** Cette question visait à vérifier que les candidats comprennent les différentes étapes d'une procédure expérimentale mise en œuvre (FEBS Journal 273 (2006) 3248–3260) pour doser de façon indépendante les fractions libres et liées.
Les points critiques du protocole, relevés dans les copies sont les suivants :
- importance d'utiliser une protéine G purifiée et non liée à un nucléotide,
 - importance de choisir un GTP non hydrolysable pour évaluer le K_D du GTP (et pas du GDP),
 - importance de choisir un nucléotide marqué pour un dosage spécifique facile,
 - importance de l'environnement physico-chimique (tampon, force ionique, Mg^{2+}),
 - importance de la durée d'incubation pour que l'équilibre soit atteint, et l'utilisation d'une solution d'arrêt qui empêche tout déplacement d'équilibre,
 - effet de la filtration pour la séparation des fractions liées, retenues par le filtre et libres dans le filtrat.
- Q4.** Cette question n'a pas présenté de difficulté particulière pour les candidats qui identifient le coefficient directeur dans l'équation d'une droite. Le jury déplore un manque de relecture qui a conduit certains candidats à proposer une valeur de K_A négative, signant une confusion mathématique entre « inverse » et « opposé », ou encore à donner la même unité pour K_A et K_D .
- Q5.** Les meilleures réponses ont proposé une analyse globale, avec une formulation précise. L'expérience montre que la septine porte un seul site de liaison pour le GTP ou le GDP. La concentration en Mg^{2+} n'a que peu d'effet sur le K_D septine/GDP, en revanche le K_D pour le GTP baisse d'un facteur 3 quand la concentration en Mg^{2+} augmente d'un facteur 50. Quelques candidats ont pensé à l'interaction Mg^{2+} et phosphates des nucléotides triphosphate, bravo à eux !
- Q6.** Les très rares candidats qui obtiennent le bon intervalle (1-75), pensent à calculer le rapport S/E, avec les deux grandeurs dans la même unité (de concentration ou quantité de matière), et savent que $1 \text{ pmol} = 1 \cdot 10^{-12} \text{ mol}$ (et pas 10^{-9}).
- Q7.** Quelques candidats ont identifié que le pH de la chromatographie devait être responsable de la dissociation protéine G/nucléotide, et ont proposé que cette valeur de pH induisait une dénaturation protéique.
- Q8.** Cette question de cours simple a été bien traitée par de nombreux candidats. Il s'agissait de montrer comment on obtient les vitesses initiales pour construire le graphe secondaire $V_i=f(S)$, par la mise en œuvre d'expériences cinétiques avec différentes concentrations en substrat.
- Q9.** Trop de candidats se sont contentés de comparer les valeurs proposées. Les meilleures copies ont précisé l'importance d'évaluer ces 3 grandeurs en donnant leur sens. Les

Rapport sur les concours A TB

réponses du type « K_M est l'affinité de l'enzyme pour son substrat », ou « k_{cat} (en s^{-1}) est le temps que met une molécule d'enzyme pour convertir une molécule de substrat » ne peuvent être tenues pour juste.

En définitive, on attendait : l'enzyme septine montre une affinité correcte pour son substrat le GTP, en revanche son activité catalytique est très faible.

Q10. Très peu de candidats ont traité cette question. Les candidats qui s'y sont essayés (se comptant sur les doigts de 2 mains), ont réussi à mettre en relation des données précédentes pour conclure à la nécessité d'effecteurs pour activer ou inactiver la septine. Les différents éléments à mettre en perspective sont que les complexes septine/GTP et septine/GDP sont stables (K_D proche), l'hydrolyse du GTP par la septine est très faible, le passage d'une forme à l'autre de la septine ne se fait donc pas spontanément. Il est indispensable qu'un effecteur augmente l'activité d'hydrolyse du GTP de la septine pour qu'elle s'inactive et qu'un autre effecteur active la septine en échangeant le GDP contre un GTP.

Q11. Cette question a été bien traitée par une large majorité de candidats.

Q12. Cette question n'a pas posé de problème, certains candidats ont cependant confondu hétérotrimère et hétéroprotéine.

Q13. Cette question a été diversement traitée. Des réponses fantaisistes ont été données... par exemple on a pu lire que « les hélices α étaient stabilisées par des interactions hydrophobes », ou encore que « des feuilletts β reposent sur des liaisons hydrogène impliquant le radical des acides aminés » ! Par ailleurs, d'excellentes réponses ont été formulées avec clarté.

Q14. Cette notion semble maîtrisée par les candidats, mais la restitution n'est pas toujours claire.

Q15. Cette question a permis aux candidats de sélectionner quelques chaînes latérales d'acides aminés potentiellement engagées dans des interactions de faible énergie avec certains groupes caractéristiques du GTP.

Concernant la partie 2

Q16. Il était attendu un schéma précis et annoté des enveloppes d'une bactérie à Gram négatif. De bonnes représentations ont été réalisées. Cependant, trop de candidats ne soignent pas les schémas, ne les annotent pas suffisamment ou simplifient à l'extrême les structures. Quelques erreurs relevées: des acides lipoteichoïques dans les structures des Gram -, les phospholipides membranaires orientés à l'envers, le LPS au niveau de la membrane cytoplasmique.

Q17. Les candidats ont majoritairement commencé leur réponse en définissant les termes chimio-organotrophes et hétérotrophes, ce qui était une bonne idée. Ces définitions sont globalement maîtrisées. Quelques confusions ont été notées entre hétérotrophie et auxotrophie, les deux termes étant pris l'un pour l'autre. L'analyse des milieux proposés a souvent été très succincte, voire trop globale sans apporter d'éléments de réponses précis et argumentés ni mis en relation avec les types trophiques de la souche bactérienne.

- Q18.** Les trois milieux contenaient de fortes concentrations en NaCl ce qui conduisait à conclure que la souche était halophile ou halo-tolérante. Près de la moitié des candidats n'ont pas répondu correctement à cette question. Des conclusions fantaisistes ont été proposées comme l'auxotrophie, l'hétérotrophie et même la mésophilie de la souche vis à vis du NaCl.
- Q19.** La définition d'un opéron est bien maîtrisée par une grande majorité des candidats, les meilleures réponses ayant bien expliqué l'intérêt d'une telle organisation.
- Q20.** Il était demandé un bilan de la réaction de bioluminescence. Les réponses nécessitaient plus de précision ; manquaient le nom des enzymes en relation avec les produits des gènes de l'opéron et les réactions de recyclages des cofacteurs d'oxydo-réduction.
- Q21.** Des réponses convenables ont été fournies. Parmi lesquelles, on peut citer : la glycolyse, la voie des pentoses phosphate, le cycle de Krebs,... Quelques candidats confondent les voies métaboliques de production de pouvoir réducteur et les voies de réoxydation des cofacteurs d'oxydo-réduction que sont les fermentations.
- Q22.** Cette question a été traitée dans les meilleures copies qui ont détaillé l'étape clef d'une voie métabolique productrice de pouvoir réducteur.
Parmi les bonnes réponses, on peut citer la synthèse de l'acétyl CoA à partir du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase, ou l'étape de la glycolyse catalysée par la Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase.
On pourrait attendre des candidats une meilleure maîtrise du métabolisme, en particulier des étapes clefs d'une voie métabolique.
- Q23.** Cette question abordait la notion de réactions de maintenance cellulaire. La bioluminescence conduit à une consommation massive de O₂ et de pouvoir réducteur. Ce qui génère une anaérobiose locale et un ralentissement de la croissance voire son arrêt.
De nombreux candidats n'ont pas tenu compte du contexte et des questions précédemment abordées pour rédiger une réponse convenable.
- Q24.** Les candidats ont globalement compris les résultats présentés et bien relié les courbes de croissance (graphe A) et les graphes secondaires (graphes B et C). Il est attendu une description et une analyse plus systématique des documents fournis, avant de conclure.
L'opéron *lux* semble moduler la croissance de la bactérie : léger infléchissement de la courbe de croissance et augmentation de G lorsque la souche est soumise à l'inducteur de l'opéron.
Les meilleures copies ont nuancé le propos car l'opéron *lux* de la souche sauvage est toujours sous l'influence des régulateurs LuxR LuxI qui peuvent perturber la réponse.
- Q25.** La majorité des réponses a été rédigée hors contexte de l'étude fournie. On souhaitait ici vérifier que les candidats peuvent adapter et transposer leurs connaissances sur la conception d'une souche mutante à une problématique donnée.
Les bonnes réponses ont présenté la délétion des gènes régulateurs *luxR luxI* et l'insertion du promoteur *lac* pour contrôler l'opéron *lux*. Cependant aucune réponse n'a proposé l'insertion du gène *lacI* pourtant indispensable à l'induction par l'IPTG.
- Q26.** Les schémas réalisés étaient clairs et en accord avec les légendes proposées. Le gène

lacI a été systématiquement (et donc logiquement, cf. Q25) oublié.

Q27. Une réponse convenable a été obtenue dans moins de la moitié des copies. On attendait deux graphes correctement annotés (titre, grandeurs des axes, unités et identification des courbes obtenues avec ou sans IPTG).

Quelques candidats se sont contentés de recopier les graphes fournis au document 8, et ont perdu du temps inutilement.

Q28. On attendait ici encore une analyse méthodique et argumentée de l'expérience et des résultats présentés. Peu de copies décrivent l'expérience, identifient la souche ES114 comme témoin de référence et exploitent les résultats obtenus avec les deux souches mutantes. Le lien entre « présence de l'opéron *lux* complet » et « capacité de coloniser » n'est pas explicitement développé.

Dans les meilleures copies, la démarche est bien structurée et progressive avec même des remarques pertinentes exploitant les barres d'incertitude présentes.

Q29. Peu de copies ont abordé cette question qui nécessitait d'y consacrer un peu de temps.

On arrive à la fin du sujet et le temps consacré à chacune des parties est déterminant (cf. remarques introductives du rapport)

On pouvait envisager un dénombrement discriminant par culture sur milieu solide (par exemple SWTO) en présence de l'inducteur de l'opéron *lux* (3-oxo-C6-HSL). Les clones de la souche sauvage ES114 sont bioluminescents, alors que ceux de la souche mutante ES102 ne le sont pas.

D'autres propositions, trouvées dans les copies, répondaient correctement: hybridation de sondes fluorescentes pour détecter *luxA* et *luxR*, PCR quantitative avec des couples d'amorces spécifiques de *lux A* et *luxR*,...

Seules les meilleures copies sont arrivées à la fin du sujet et ont répondu correctement à ces trois dernières questions

Q30. L'expérience confirmait l'importance de l'opéron *lux* dans la colonisation des juvéniles.

Q31. On souhaitait que les candidats réfléchissent à des hypothèses dans un contexte donné de la symbiose bactérie - calmar. Des réponses très correctes ont été rédigées et argumentées par des candidats qui sont allés jusqu'à la fin du devoir.

Q32. La lecture du graphe B du document 9 montrait qu'à partir de « DO » = 1 (t = 6h), l'émission de lumière était proche du maximum.