

Rapport sur l'épreuve de Biotechnologie

L'épreuve est organisée en 2 parties indépendantes, la première portait cette année sur les parties 2 et 4 du programme, la seconde sur les parties 1 et 3. Les questions ont cette année encore éprouvé la solidité des connaissances scientifiques et technologiques des candidats et mis 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 dans le respect des règles de grammaire et de syntaxe. Ces aspects sont pris en compte dans l'évaluation de l'épreuve. Cette année, plus de 20% des copies offraient une rédaction très approximative entachée de trop nombreuses fautes d'orthographe et de français. Le jury conseille aux candidats de relire la copie en fin d'épreuve.

Les illustrations proposées sont souvent claires, précises et bien annotées, ce qui contribue à la qualité générale de la copie.

Le jury souhaite rappeler que les deux parties sont indépendantes. L'ordre dans lequel les parties sont abordées est laissé à l'appréciation du candidat. Les conseils prodigués dans les rapports des précédentes années restent valables. Dans le cadre de la structure de l'épreuve, chaque partie étant notée sur 10 points, 90 minutes doivent être consacrées à chacune. Pour la partie 1, une trentaine de minutes est dédiée à la question rédactionnelle et environ 60 minutes pour les autres questions. Chacune des parties propose des questions classiques, et le jury recommande de consacrer 90 minutes à la partie 2.

Certains ont passé trop de temps à traiter les questions classiques de la première partie notamment la question 3 pour schématiser toutes les étapes de la méthode immuno-enzymatique alors que seul un schéma bilan était attendu.

Une bonne gestion du temps de composition a permis aux meilleurs candidats de traiter l'ensemble du sujet de façon synthétique.

De nombreux candidats ont fait preuve d'une bonne maîtrise des contenus du référentiel abordés dans le sujet. Le jury a cependant noté une tendance au transfert direct de contenu de cours (généralement bien appris) en dehors du contexte proposé. L'épreuve a pour but aussi de vérifier la capacité d'adaptation des candidats, futurs ingénieurs et à mobiliser leurs connaissances dans un contexte imposé en s'appuyant sur les documents fournis.

Par exemple, les caractéristiques des amorces, le rôle des étapes du dosage immuno-enzymatique, la chromatographie IMAC, l'analyse du milieu P...

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. Les caractéristiques générales des amorces dans un contexte d'approche multiplex : une longueur suffisante des amorces pour assurer la spécificité d'amplification de chaque couple, des T_m proches pour tous les couples de façon à choisir une T_{hyb} optimale, absence de structures secondaires (inter et intra) entre toutes les amorces de tous les couples, mais aussi des amplicons de tailles différentes pour pouvoir identifier les produits obtenus en gel. Cette question a révélé des difficultés de construction de phrases pour exprimer clairement les idées des candidats.

Q2. Question rédactionnelle. Cette question classique a été traitée par une grande majorité des candidats, cependant environ 20% d'entre eux n'ont pas abordé la partie quantification. Le jury a déploré que cette partie se soit limitée à une « récitation » du cours travaillé en « éliminant » certaines parties pour cadrer avec la durée de l'épreuve. Ces choix ont souvent montré un manque d'appropriation des notions par le candidat. Pour la première partie de cette question rédactionnelle, des erreurs majeures ont été notées qu'il convient d'éviter. Ci-après les principales : 1 seul cycle, matrice ARN ou ADN (sans autre précision), amorces non ou mal orientées après hybridation, synthèse du brin par activité $exo\ 5' \rightarrow 3'$, ADN pol thermophile, *Thermus aquaticus* est une archée... De façon générale, les candidats ont perdu trop de temps à schématiser les étapes d'un seul cycle de PCR souvent imprécis (position et orientation des amorces, sens et arrêt de l'élongation).

Pour la partie quantification, la plupart des candidats ont choisi de traiter la quantification absolue. La quantification de l'ADN à chaque cycle d'amplification repose sur la mesure d'un signal fluorescent en phase homogène. Le choix d'un système de révélation laissé à l'appréciation du candidat, employant un colorant fluorescent de l'ADNdb dont la fluorescence intrinsèque est largement augmentée quand lié à l'ADN (SybrGreen®, EvaGreen®), ou de couples fluorochrome / quencher portés par une ou 2 sondes (sondes TaqMan™), ou encore de sondes FRET... La courbe d'amplification permet de définir I_q , l'intensité de quantification (intensité de fluorescence, pour laquelle le signal mesuré est significatif et corrélé à la quantité d'ADN présent dans le tube), pour évaluer graphiquement C_q (ou C_T , cycle seuil si l'intensité de fluorescence de quantification est l'intensité seuil). Enfin comment la courbe étalon, $\ln Q_0 = f(C_q)$ permet de quantifier de façon absolue l'ADN matrice présent dans un échantillon inconnu. Les rares candidats qui ont donné l'équation mathématique de modélisation de la quantification d'ADN amplifié à chaque cycle et en ont déduit l'équation de la courbe étalon ont été naturellement valorisés.

Q3. Les meilleures réponses ont indiqué de façon synthétique et pour chaque étape notée de 1 à 6, le type de réactif, le rôle de l'étape et l'effet du lavage lors de la mise en œuvre d'une technique immuno-enzymatique sandwich par extraction. Par exemple, étape 1 : adsorption de l'Ac de capture en excès et lavage pour éliminer l'excès d'Ac spécifique, étape 3 : capture de tout l'Ag à doser (gamme de dilution) et lavage pour éliminer ce qui n'est pas lié donc non spécifique... Un seul schéma de synthèse de la révélation était attendu. Certains candidats ont, de façon dommageable, calqué sur le mode opératoire proposé celui de la technique

E.L.I.S.A. qu'ils connaissaient ou avaient pratiqué lors de la formation sans adapter leurs connaissances à ce contexte.

- Q4.** Cette question a été souvent traitée de façon satisfaisante par les candidats.
- Q5.** Question mal comprise par les candidats. Il s'agissait de montrer que l'absorbance mesurée est corrélée à la quantité d'Ag capturé par le support. La plupart des candidats ont décrit avec justesse la corrélation entre la quantité Ag captée par le support et la quantité d'enzyme liée au support, peu d'entre eux ont amené leur raisonnement jusqu'au signal mesuré. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration en produit apparu en 15 minutes de réaction dans la cupule. La concentration en produit doit être proportionnelle à la concentration enzyme liée au support : il faut donc faire travailler l'enzyme en condition de vitesse initiale maximale pendant toute la durée du test. Un calcul simple réalisé par quelques candidats, montre qu'après 15 minutes de réaction le substrat restant est encore très largement saturant.
- Q6.** Cette question a été diversement traitée par les candidats, l'erreur la plus fréquente est l'amalgame entre conditions physico-chimiques de travail de l'enzyme et celles de mesure du produit obtenu. Le fonctionnement multiplex impose de faire travailler plusieurs enzymes simultanément dans un même mélange réactionnel, donc dans des conditions physico-chimiques de travail compatibles, avec des substrats différents, des produits quantifiables sans interférence.
- Q7.** La variation des propriétés spectrales des colorants liés au graphène a été bien analysée par l'ensemble des candidats, cependant, la cinétique de libération a été souvent perçue comme une cinétique enzymatique (allostérique). Trop de candidats n'ont pas conclu aux conditions de révélation : mesure du signal A_{620nm} , 250 s après ajout d'eau acide.
- Q8.** Cette question a été globalement bien traitée. Quelques écueils ont été notés notamment, une confusion entre pg et ng et dans le vocabulaire : sensibilité, seuil de détection, méthode plus résolutive...
- Q9.** La révélation du test A.L.I.S.A. multiplex repose sur des modifications de pH pour lire successivement les absorbances aux λ caractéristiques de chaque colorant. On peut proposer un passage en environnement acide pour la lecture du RM seul, puis un passage en environnement alcalin, pour lire la PP et TP qui ne devraient pas interférer entre elles ni avec le RM. L'absence d'interférence entre les mesures des absorbances dues à chaque colorant est vérifiée par un spectre d'absorption. Pour cette question, trop de candidats ont indiqué que l'étape de liaison Ag/Ac devait avoir lieu en environnement soit acide soit basique.
- Q10.** Les meilleures réponses ont indiqué qu'aucun des marqueurs utilisés n'avait valeur d'absolu. En effet pour 2 des 3 marqueurs un patient sain peut obtenir un résultat positif, et aucun marqueur ne permet d'identifier un type de cancer. Une recherche de plusieurs biomarqueurs, associée à une analyse statistique pourrait conduire à un diagnostic non ambigu.

- Q11.** La connaissance et la description des propriétés physico-chimiques des acides aminés étaient nécessaires afin d'aborder la comparaison des deux séquences protéiques proposées. L'analyse des propriétés des AA notés (+) et le raisonnement n'a pas été bien conduit, ni argumenté. Cependant la conclusion a été facilement trouvée.
- Q12.** Question classique qui a été bien traitée. Les différences ont porté sur la précision et la qualité de la réponse proposée.
- Q13.** La méthode de chromatographie est connue. De nombreuses copies présentent une réponse très théorique sans s'aider de la documentation fournie. Par contre la représentation du chromatogramme manque de rigueur: pas de légende des grandeurs pour les axes, des représentations trop simplistes sans tenir compte du protocole, pas d'identification rigoureuse des pics ni de localisation des protéines d'intérêt.
- Q14.** Le rôle d'une dialyse et le seuil de coupure sont bien définis. Les calculs afin de comparer ce dernier à la taille des deux protéines étudiées sont bien menés et justifiés dans la grande majorité des copies.
- Q15.** Il était attendu une analyse complète des conditions nutritionnelles et physico-chimiques de culture. Les meilleures copies ont analysé la composition du milieu LB, les conditions de température et d'agitation en relation avec leur connaissance sur la bactérie *E. coli* afin de les justifier. Il fallait aussi expliquer l'ajout de kanamycine dans le milieu de culture, l'ajout de glucose (témoin sans induction) et d'arabinose (induction de la protéine hétérologue codée par le plasmide recombiné). Quelques confusions ont été notées entre la notion de « source de carbone » et la notion « d'inducteur ». Un temps de réflexion sur cette question permettait une analyse rigoureuse et synthétique des expériences de la question Q18.
- Q16.** Cette question devait permettre aux candidats de se remémorer les activités pratiques du référentiel. Les réponses ont souvent été très théoriques et peu complètes.
- Q17.** La définition du temps de génération G est assez bien maîtrisée, ainsi que les conditions de mesure et de calcul. Le contexte de l'expérience indique que la culture est en phase exponentielle de croissance, ce que peu de candidats ont posé comme pré-requis.
La détermination de G a été diversement réussie : les points expérimentaux pour son calcul sont souvent mal choisis. On attendait $G_{\text{condition glucose}} \approx 20 \text{ min}$ et $G_{\text{induction arabinose}} > 240 \text{ min}$. Cette exploitation ne nécessitait pas obligatoirement de passer par le calcul de la vitesse spécifique de croissance.
- Q18.** L'exploitation des résultats expérimentaux nécessite, ici, d'y consacrer un peu de temps afin de mener une analyse structurée et rigoureuse. Il fallait d'abord valider le témoin (Courbe pFUS2) avant d'aborder les 2 autres expériences avec (arabinose) et sans induction (glucose), puis décrire les 2 courbes (Courbe pFUS2-Tox et Courbe pFUS2-TA) sous les deux conditions de manipulation avant de conclure. Les barres d'erreur permettaient de

valider les mesures présentées.

La démarche d'analyse est prise en compte dans l'évaluation, un candidat ne peut se limiter à la seule conclusion pour répondre à la question.

Q19. Cette question a posé problème. Les candidats, qui l'ont abordée, ont voulu réaliser une analyse complète du milieu P hors contexte. Il était demandé « discuter sa composition » et donc de mettre en évidence les éléments nécessaires au maintien en vie des protoplastes avant leur transformation : milieu tamponné et hyper saccharosé. Il ne s'agissait pas d'un milieu de culture de protoplastes comme certains candidats l'ont signalé.

L'intérêt de manipuler les protoplastes pour le processus de transformation génétique a été bien justifié.

Q20. Les réponses ont été peu nombreuses du fait de la gestion du temps de composition. On montrait, dans un premier temps, que le niveau d'expression de la protéine Amy était identique dans l'ancien (avec ATB) et le nouveau système de production (avec AT), la souche sauvage ne présentant pas d'expression endogène de la protéine d'intérêt.

Dans un second temps, on ajustait les conditions de production en testant différentes conditions :

- la durée de la croissance de la souche recombinée (durée optimale pour une production optimale ?),
- les structures bactériennes préalablement congelées (quelles formes bactériennes de stockage afin de préserver la productivité ?),
- la stabilité de la souche transformée (le plasmide est-il maintenu ou non après une série de dilutions ?)

Enfin, on pouvait conclure à la validation de la nouvelle plateforme dans le cadre de la production de la protéine Amy.