



**MINISTÈRE  
DE L'ÉDUCATION  
NATIONALE,  
DE LA JEUNESSE  
ET DES SPORTS**

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*

# **CONCOURS GÉNÉRAL DES LYCÉES**

## **Section : Biotechnologie**

### **Session 2021**

**Rapport de jury présenté par :**

**Madame Caroline BONNEFOY**

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

**Présidente de jury**

## Table des matières

<b>1. Présentation générale du concours .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Epreuve écrite d'admissibilité : 5 heures - Bioluminescence .....</b>	<b>5</b>
2.1. <i>Présentation de l'épreuve écrite et des attendus .....</i>	5
<b>La troisième partie portait sur l'utilisation de la bioluminescence dans les domaines variés de la santé. ....</b>	<b>6</b>
2.2. <i>Conseils généraux du jury pour préparer l'épreuve écrite .....</i>	7
<b>3. Les épreuves d'admission : surveillance des micropolluants dans les milieux aquatiques .....</b>	<b>8</b>
3.1 <i>L'épreuve orale : 1 heure de préparation et 30 minutes de présentation .....</i>	8
3.1.1. Organisation matérielle .....	8
3.1.2. Présentation de l'épreuves orale.....	8
3.1.3. Conseils du jury pour réussir l'épreuve orale .....	9
3.2. <i>L'épreuve pratique : 4,5 heures .....</i>	9
3.2.1. Organisation matérielle .....	9
3.2.2. Présentation de l'épreuve pratique.....	10
3.2.3. <i>Eviter le dessèchement des puits de la microplaque entre les lavages et l'ajout du réactif. .</i>	13
3.2.4. Les conseils du jury pour réussir cette épreuve .....	16
<b>4. Quelques repères pour le concours. ....</b>	<b>16</b>
4.1. <i>Épreuve d'admissibilité.....</i>	16
4.2. <i>Épreuve d'admission.....</i>	16
4.3. <i>Palmarès.....</i>	16

# Composition du jury

## **Présidente**

Caroline BONNEFOY, Inspectrice générale de l'Education, du sport et de la recherche.

## **Vice-président**

Sylvain André, Inspecteur d'Académie – Inspecteur Pédagogique Régional, académie d'Orléans-Tours.

## **Membres du jury - lycée Jacques Cœur - Bourges**

Agnès BOCCARD, professeur certifié de biotechnologies - biochimie génie biologique

Christine COGNOT, professeure agrégée de biochimie génie biologique

Silvère DAUGERON, professeur agrégé de biochimie génie biologique

Katia DELANOUE CASTEROT, professeur certifié de biotechnologies - biochimie génie biologique

Hélène LERIQUE, professeure agrégée de biochimie génie biologique

Julien ROGER, professeure certifiée de biotechnologies - biochimie génie biologique

# Remerciements

Nous tenons, à remercier l'ensemble des acteurs, qui ont permis que le concours se déroule dans d'excellentes conditions et tout particulièrement :

- L'équipe des professeurs de biotechnologie du lycée Jacques Cœur à Bourges qui ont élaboré des sujets écrit, pratique et oral de grande qualité répondant à l'ambition d'un tel concours ;
- Le Directeur délégué aux formations professionnelles et technologiques du lycée Jacques Cœur à Bourges, qui a supervisé l'organisation du concours ;
- La proviseure du lycée Jacques Cœur, madame Anne-Marie MOREAU pour son accueil,
- Les personnels techniques du lycée, qui se sont engagés dans la préparation et le déroulement de la partie pratique de l'épreuve d'admission.

# 1. Présentation générale du concours

Le concours général de Biotechnologies est organisé comme suit :

- Une épreuve écrite pour l'obtention de l'admissibilité d'une durée de 5 h ;
- Deux épreuves pour l'admission qui permet de définir le palmarès :
  - o Une épreuve orale préparée par les candidats pendant une heure et présentée devant les jurys pendant 30 minutes ;
  - o Une épreuve de travaux pratiques de 4 h 30.

Il est de tradition dans ce concours que l'ensemble des trois épreuves aient une cohérence. **Cette année le jury a fait le choix de proposer un sujet portant sur la bioluminescence**

Epreuve, durée et remarques sur les modalités	
Écrit	5 heures
Épreuve orale	1 heure de préparation 30 minutes d'oral (20 minutes de présentation par le candidat au maximum puis 10 minutes d'échanges avec le jury)
Épreuve pratique	4 heures 30

Le classement final établi par le jury tient compte de l'ensemble de ces trois épreuves.

## 2. Epreuve écrite d'admissibilité : 5 heures - Bioluminescence

### 2.1. Présentation de l'épreuve écrite et des attendus

Cette année, le sujet d'écrit permettait d'étudier le phénomène de bioluminescence produit par différents organismes vivants et d'en étudier certaines applications. Il était structuré en 3 parties qui sont résumées ci-dessous.

Le sujet proposait une partie « questionnement » et une partie « documentaire » pour faciliter le l'appropriation par les candidats d'un corpus documentaire très riche et très actuel. En effet 30 documents leur étaient proposés dont ils devaient faire une analyse poussée pour interpréter les phénomènes et proposer des hypothèses, des applications, des arguments. La partie questionnement permettait une analyse progressive de ces documents complexes.

**La première partie abordait la bioluminescence, comme un phénomène biochimique valorisable.** Elle portait sur le phénomène moléculaire de la bioluminescence à travers l'organisation génétique et la diversité des systèmes catalytiques bioluminescents. Cette partie amenait à analyser des réactions enzymatiques impliquant la luciférase chez différents organismes afin d'en appréhender leur multiplicité, ainsi qu'à comprendre l'organisation des gènes inductibles sous forme d'opéron et la notion de « quorum sensing ». Les phénomènes biochimiques précisément présentés ici appelaient des réponses précises aux questions posées. Cette partie permettait également d'aborder la technique d'ATPmétrie en lien avec l'une des réactions faisant intervenir la luciférase. Des applications biotechnologiques de cette bioluminescence illustraient cette fin de première partie à travers des projets novateurs développés

en Europe. : « Éclairer avec du vivant » : l'étude de l'utilisation de système biologique naturels ou transformés pour l'éclairage urbain potentiel nécessitait ensuite d'identifier pour chaque système l'organisme vivant mis en jeu, de repérer les modifications effectuées par rapport aux propriétés naturelles de l'organisme vivant utilisé en biotechnologies. Enfin le candidat devait faire appel à son esprit critique pour en proposer les Avantages économique, écologique, esthétique

**La deuxième partie proposait** une application environnementale de l'utilisation de la bioluminescence pour mettre en évidence l'activité oestrogéniques dans des milieux aquatiques. Après avoir rappelé les modes d'action des perturbateurs endocriniens il était attendu d'expliquer comment leur présence pouvait être détectée en présence de luciférase dans le milieu aquatique : elle permet de produire l'émission de lumière en présence de luciférine, substrat ajouté dans le milieu testé. Quelques connaissances fondamentales concernant les hormones stéroïdes et leurs particularités, étaient nécessaires à mobiliser pour répondre aux questions de biochimie et de biologie humaine de cette partie. Le test permettait une réflexion sur le mode d'action de cette hormone liposoluble en lien avec sa structure et sa fixation sur son récepteur. Cette partie permettait d'aborder la notion de perturbateurs endocriniens et de faire réfléchir le candidat sur les rejets de composés oestrogéniques dans l'environnement et de proposer une ouverture sur des enjeux sociétaux.

**La troisième partie** portait sur l'utilisation de la bioluminescence dans les domaines variés de la santé.

Elle permettait d'aborder la bioluminescence en tant qu'outil diagnostique à travers des techniques immunologiques (test ELISA comparé au test LuLiSA) pour la détection d'allergènes ainsi que l'utilisation de marqueurs bioluminescents dans des thérapies anticancéreuses. Cette technologie diagnostique par immuno-détection, la technique LUSILA utilise des « nanocorps » ou « nanobodies » dont la très petite structure correspondant au domaine variable de la chaîne lourde comprend le paratope de l'anticorps classique. Ce test d'immunoabsorption détecte les IgE de patients allergiques grâce à des conjugués : nanocorps anti IgE liés à la luciférase qui reconnaissent la région constante C3 du domaine Fc l'IgE humaine. Il fallait ici transposer les connaissances d'un ELISA classique, connu des candidats à une technologie plus sensible et plus spécifique en analysant les éléments du principe présentés dans les documents.

Les candidats devaient apporter les arguments pour expliquer l'intérêt d'utiliser des nanocorps plutôt que des anticorps monoclonaux en tant que molécules thérapeutiques. En effet, le nanocorps a accès à tous les sites, même difficiles : il pourra transporter une molécule thérapeutique sur des sites cibles dans des petites cavités ou difficiles d'accès, et pourra accéder aux tissus, ainsi la molécule thérapeutique agira au sein de la cellule

Enfin l'utilisation de la bioluminescence *in vivo* pour la mise au point de bactéries « tueuses de tumeurs » était étudiée pour finir ce sujet. En effet, les bactéries possèdent la capacité naturelle de se multiplier préférentiellement à côté des tumeurs après une administration dans la circulation systémique, ce qui en fait des outils novateurs dans la stratégie anti-tumorale. Or, suite à l'insertion de plasmides recombinants, ces bactéries peuvent coloniser des tumeurs et exprimer localement des protéines thérapeutiques. La technologie BLI (bioluminescence imaging *in vivo*) permet d'observer la colonisation des tumeurs par des bactéries bioluminescentes chez des souris préalablement inoculées avec des cellules cancéreuses. L'emplacement et la concentration bactérienne dans les tumeurs au cours du temps peuvent être facilement appréciés grâce au phénomène de bioluminescence pour vérifier ce phénomène.

Il suffit ensuite de remplacer dans leur génome le gène de la luciférase par un gène provoquant la production d'une molécule cytotoxique. Des questions classiques d'analyses de protocoles de biotechnologies de laboratoire étaient ici posées, ainsi que des observations d'imagerie originales mais faciles à comprendre. Il fallait encore une fois transposer ses connaissances et savoir-faire pour répondre correctement aux questions.

Cette partie aboutissait à une réflexion du candidat sur la dimension éthique liée à l'utilisation de souris de laboratoire à des fins thérapeutiques.

## 2.2. Conseils généraux du jury pour préparer l'épreuve écrite

Dans les trois parties, le questionnement permettait d'apprécier le niveau scientifique des candidats et d'évaluer leurs compétences d'analyse et de synthèse à partir de l'exploitation pertinente de documents complexes et riche d'informations scientifiques et technologiques.

Comme pour les sessions précédentes, toutes ces thématiques étaient nouvelles pour les candidats mais faisaient appel à des concepts scientifiques et technologiques que les candidats pouvaient s'approprier par la présentation des principes des méthodes utilisées. La transposition de leurs connaissances à de nouvelles techniques, est le meilleur garant de la construction de ces compétences d'analyses de documents de biotechnologies complexes. De plus leur capacité à reformuler et à expliquer les phénomènes, aussi bien biologiques, biochimiques que biotechnologiques, a permis de valoriser les candidats ayant à la fois un esprit de synthèse affirmé et une capacité à mobiliser un vocabulaire scientifique et technique précis et spécifique. Les candidats doivent maîtriser les connaissances fondamentales, et le jury a été parfois surpris du manque de connaissances fondamentales de ces candidats ayant présenté l'épreuve d'admissibilité. En effet, de trop nombreux candidats ne disposaient pas des bases de biochimie, d'immunologie et de biologie moléculaire requises pour comprendre et analyser les documents présentés dans le sujet (notion de liaisons covalentes - faible énergie, notion de site actif de l'enzyme, réactions d'oxydo-réduction, structure d'une immunoglobuline ...) *A contrario*, certains candidats ont répondu de manière efficace et exacte aux questions mobilisant les connaissances fondamentales : cette maîtrise des fondamentaux des biotechnologies et de la biologie leur a permis d'aborder les analyses plus complexes des documents, demandées dans le sujet.

Cette analyse des documents proposés manquait cependant parfois de rigueur dans l'interprétation des observations, ce qui rendait l'analyse erronée. De plus, de nombreux candidats ne sont pas parvenus à réaliser l'équation aux grandeurs de la concentration en cellules totales à partir d'un dénombrement en cellules de Malassez qui est un classique de la section.

Il est attendu des candidats une lecture attentive des consignes avec attention et en particulier être vigilants sur la forme de la réponse attendue et sur les verbes d'action employés. Par exemple, l'une des questions du sujet demandait de présenter un organigramme ou de compléter un schéma ; beaucoup de candidats n'ont pas respecté ces consignes. Des textes ont été produits en lieu et place de ce qui était demandé. Lorsque la consigne demande de produire un schéma, une analyse, il est indispensable de veiller à une présentation organisée, claire et concise de la réponse.

Enfin, **la gestion du temps** est un facteur déterminant dans la réussite de ce concours. Le sujet est volontairement dense et les documents à exploiter nombreux. Il est donc important de s'imposer un rythme et de s'entraîner à la pratique d'épreuves longues. La réalisation des sujets des années antérieures, dans un temps limité, est un bon exercice pour acquérir cette compétence.

**En conclusion**, les candidats qui réussissent le mieux, tout d'abord possèdent une culture scientifique et technologique solide, et par ailleurs articulent avec efficacité la saisie d'informations, la mise en relation, l'analyse et l'apport des connaissances. Les meilleurs candidats parviennent à la fois à mobiliser les compétences attendues et à produire des écrits et des illustrations de qualité. On relève la qualité de l'expression écrite et de l'argumentation.

Le jury a pu distinguer les candidats rigoureux et précis dans leurs réponses et notamment les schémas soignés. Certaines copies sont de très bonne qualité, malgré les conditions de préparation du concours et de présentation des programmes encore difficiles cette année.

Le jury encourage les professeurs de Biochimie Génie Biologique de terminale STL biotechnologies à donner cette chance de réfléchir sur un sujet d'actualité à ceux de leurs élèves qui montrent une aptitude à l'analyse, à la synthèse avec une maîtrise suffisante des concepts fondamentaux. Il est dommage que certains établissements ne présentent encore aucun candidat à ce concours qui est très valorisant et permet aux élèves qui le souhaitent, avec l'aide de leur professeur de biotechnologies, de se confronter à un sujet de biologie d'actualité souvent innovant.

### 3. Les épreuves d'admission : surveillance des micropolluants dans les milieux aquatiques

Les épreuves d'admission se sont déroulées les jeudi 27 et vendredi 28 mai au lycée Jacques Cœur de Bourges ; lycée organisateur. Les candidats qui le souhaitaient, ont été hébergés à l'internat de l'établissement pour la nuit du 27 au 28 mai. Les candidats ont été accueillis le jeudi 27 mai à 14 heures par Madame Bonnefoy, Monsieur André respectivement présidente et vice-président du jury ainsi que Monsieur Torchon, DDFPT de l'établissement.

Après une présentation du déroulé des épreuves et des membres de jury, les candidats ont été invités à tirer au sort un badge portant un numéro déterminant les ordres de passage pour l'épreuve orale et les postes de travail pour l'épreuve pratique.

Pour des raisons organisationnelles, les candidats ont été répartis en 4 groupes. Une visite du lycée et en particulier des laboratoires a été organisée pour chaque groupe à des moments différents de l'après-midi, afin de présenter aux candidats le laboratoire de biotechnologies dans lesquels devaient se dérouler l'épreuve de travaux pratiques le lendemain.

#### 3.1 L'épreuve orale : 1 heure de préparation et 30 minutes de présentation

Elle a eu lieu le jeudi 27 mai. Les candidats disposaient de 1h30 répartie en 1h de préparation et 30 min de présentation puis d'échange avec le jury.

##### 3.1.1. Organisation matérielle

Trois jurys ont été constitués. Chaque jury était composé de 2 enseignants ; une rotation des enseignants au sein des différents jurys a été mise en œuvre.

Les candidats ont été répartis en 4 groupes qui se sont enchainés comme suit :

Groupe	Numéro des candidats	Temps de préparation	Temps d'échange avec le jury
1	1 et 2	14 h 30 à 15 h 30	15 h 30 à 16 h 00
2	3, 4 et 5	15 h 15 à 16 h 15	16 h 15 à 16 h 45
3	6,7 et 8	16 h 00 à 17 h 00	17 h 00 à 17 h 30
4	9 et 10	16 h 45 à 17 h 45	17h45 à 18 h 15

Dans la salle de préparation, les élèves ont pu disposer d'un ordinateur avec les outils de bureautique classique mais sans connexion à l'Internet ainsi qu'une clé USB.

Le sujet leur a été fourni au format papier. La vidéo référencée dans le sujet était ouverte sur chaque poste informatique, prête à démarrer par le candidat. Les candidats disposaient de casques individuels pour écouter les commentaires de la vidéo.

Lors de l'échange avec le jury, les candidats disposaient d'un tableau blanc avec des marqueurs de différentes couleurs, ordinateur relié à vidéo projecteur pouvant être utilisé à leur guise.

##### 3.1.2. Présentation de l'épreuves orale

Au cours de la préparation des épreuves orales, les candidats étaient conduits à étudier des documents et une vidéo concernant la surveillance des micropolluants dans les milieux aquatiques. Vidéo : Pollution de l'eau, quels défis – Universcience-lemonde <https://www.dailymotion.com/video/x2693jd>



Dans la salle de présentation, les élèves ont pu projeter au jury un diaporama qu'ils avaient éventuellement préparé, ou utiliser le tableau pour soutenir leur présentation.

Deux questions de réflexion ont été proposées aux candidats. Pour construire leur argumentaire, ils disposaient d'une part, d'une vidéo de 8 min présentant les polluants émergents des eaux, leurs conséquences environnementales et les limites actuelles dans leur détection, et d'autre part, une série de documents fournie avec le sujet papier.

Pour la première question, le candidat devait proposer en s'appuyant sur les documents écrits, un schéma illustrant la notion de biocapteur qu'il commentait pendant sa présentation puis devait présenter la diversité des systèmes de détection possibles. Des dispositifs permettent ainsi depuis plusieurs décennies de surveiller et d'évaluer la qualité des écosystèmes afin d'orienter les actions à mener pour les préserver

Dans un second temps, le candidat était invité à discuter sur les polluants émergents : origines, risques environnementaux et pistes pour diminuer leur présence dans les eaux environnementales. Dans cette partie, était attendu un positionnement citoyen et argumenté du candidat.

Lors des questionnements, le jury a cherché à éclaircir des aspects mal expliqués ou mal exploités par le candidat notamment sur le fonctionnement des biocapteurs. Le jury a ensuite souhaité tester le recul des candidats sur les enjeux environnementaux, point généralement peu argumenté. Ainsi, dans la continuité du sujet d'écrit, les candidats devaient montrer l'intérêt de suivre l'évolution de substances produites par les activités humaines, dont certaines doivent être particulièrement surveillées du fait de leur dispersion dans l'environnement et de leurs potentiels effets sur les organismes vivants :.

### 3.1.3. Conseils du jury pour réussir l'épreuve orale

Pour réussir cette épreuve, il faut être capable d'exploiter rapidement et de façon minutieuse l'ensemble des documents proposés dans le dossier documentaire, voire de les interconnecter pour présenter une réflexion complète.

Les meilleurs candidats ont fait preuve d'aisance à l'oral. Leurs présentations ont été structurées et argumentées en s'appuyant sur l'ensemble des documents fournis. L'introduction de leur prestation par la présentation d'un plan a été appréciée.

Lors de l'entretien, le jury cherche à éclaircir des points insuffisamment expliqués ou exploités, à mesurer le recul pris par le candidat. Les candidats disposaient toujours du sujet papier et pouvaient s'y référer. Un travail méthodique sur ces documents pendant le temps de préparation (annotation, surlignage.....) permettait une meilleure réactivité pendant ces échanges.

Il convient aussi, par l'exploitation des ressources mises à disposition, de faire la preuve d'un esprit de synthèse, de l'usage d'un vocabulaire précis et rigoureux pour restituer une analyse des documents proposés. Les candidats devaient montrer leur capacité d'appropriation de technologies nouvelles autant que de certains enjeux.

La thématique qui porte l'épreuve l'orale est dans la continuité traditionnellement du sujet de l'épreuve écrite.

Le jury s'efforce aussi de recentrer les réponses du candidat sur la ou les questions posées par le sujet. Comme à l'écrit, certains candidats ont impressionné le jury par la qualité de leur réflexion et leur capacité à convaincre le jury par une argumentation riche et subtile à propos d'un sujet complexe et délicat, dont l'enjeu est essentiel.

## 3.2. L'épreuve pratique : 4,5 heures

### 3.2.1. Organisation matérielle

Selon leur numéro, les candidats ont été répartis dans 2 salles de travaux pratiques. Les solutions et le matériel nécessaires aux différentes manipulations étaient au poste. Du matériel supplémentaire était à disposition dans la salle.

Un ordre de passage a été imposé aux candidats pour la réalisation de la manipulation d'HPLC.

### 3.2.2. Présentation de l'épreuve pratique

Les activités pratiques portées sur le dosage des hormones stéroïdiennes dans les eaux usées arrivant à la station d'épuration, aspect abordé dans la deuxième partie du sujet d'admissibilité..

Les candidats disposaient d'un unique échantillon d'eau à analyser par quatre méthodes différentes de dosage. L'objectif final était qu'ils concluent, à partir de leurs résultats expérimentaux, sur l'intervalle de mesure des différentes méthodes (limites de quantification) et donc leurs potentielles utilisations dans le dosage de micropolluants présents à l'état de trace dans les échantillons.

Parmi les 4 manipulations à réaliser, deux mobilisaient des savoir-faire couramment développés en STL biotechnologies (dosage spectrophotométrique avec réalisation d'une gamme d'étalonnage, dénombrement d'une culture de levure par méthode directe en cellule de Malassez). Les deux autres techniques peu, voire pas abordées et permettaient d'évaluer les capacités d'adaptation du candidat.

Le jury souhaite mentionner la qualité technique des candidats pendant les épreuves pratiques concernées mais regrette le fait que les candidats n'ont pas compris la problématique de départ portant sur la comparaison des différentes méthodes.

Les candidats disposaient d'un échantillon d'eau, dont le contexte indiquait comme « prélevé en amont d'une station d'épuration » et suspecté de contenir ce micropolluant. Ils devaient mettre en œuvre différentes méthodes afin de déterminer les plus adaptées à la recherche du 17  $\beta$ -œstradiol dans ce type de matrice.

Chaque méthode faisait l'objet d'une partie du sujet : elles étaient toutes à réaliser.

- partie 1 : étude d'une méthode spectrophotométrique UV
- partie 2 : détection du 17 $\beta$ -œstradiol par technique ELISA
- partie 3 : dosage du 17 $\beta$ -œstradiol par HPLC
- partie 4 : dénombrement d'une préculture de levures transformées utilisées pour le test de YES.

#### Traitement de l'échantillon préliminaire aux mesures : protocole d'extraction du 17 $\beta$ -œstradiol

Du fait de leur présence à l'état de traces dans les eaux, il est nécessaire d'extraire et de concentrer les œstrogènes avant leur dosage.

La procédure présentée correspond à une extraction en phase solide (SPE). Il s'agit d'une technique utilisée pour isoler ou concentrer des analytes spécifiques d'une matrice complexe et ainsi améliorer les limites de détection des éléments.

Volume de prise d'essai : **250 mL d'échantillon d'eau**

#### • **Extraction solide – liquide**

SPE sur colonne autotrace Zymark® sur cartouche (Waters®) HLB 6 mL, 200 mg

- conditionnement de la colonne par 6 mL de méthanol et 6 mL d'eau milliQ®
- percolation de l'échantillon (250 mL)
- rinçage de la colonne par 6 mL d'eau milliQ®
- séchage sous azote pendant 30 minutes
- élution par 4 mL d'acétate d'éthyle/méthanol 70/30 v/v
- évaporation sous azote et reprise dans **1 mL** d'un mélange heptane/dichlorométhane 50/50 v/v

#### • **Purification sur phase solide**

Phase solide SPE sur manifold sur Florisil (Supelco®) 6 mL, 1 g

- conditionnement de la phase par 2 mL d'heptane/dichlorométhane 50/50 v/v
- percolation des **1 mL** issu de l'extraction
- rinçage par 2 mL d'heptane/dichlorométhane
- séchage sous vide
- élution par 5,5 mL d'acétone/heptane 75/25 v/v
- évaporation sous azote

- reprise dans 200  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acétonitrile/eau 60/40 v/v soit l'extrait « E » obtenu.

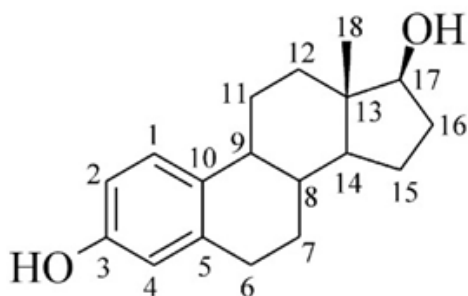
Q1. Calculer le facteur de concentration des œstrogènes suite à ce traitement préliminaire.

## Partie 1 : Etude d'une méthode spectrophotométrique UV

### Principe

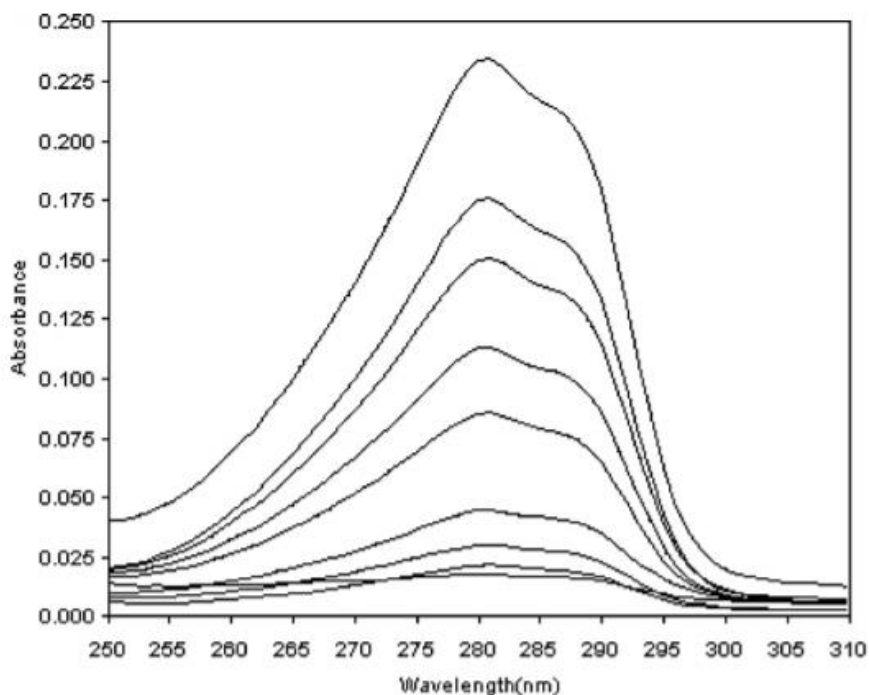
La présence du cycle aromatique phénolique de l'œstradiol permet à cette molécule d'absorber les radiations comprises entre 250 et 300 nm.

**Document 1** : La structure chimique du 17  $\beta$ -œstradiol



**Document 2** : spectre d'absorption UV du 17  $\beta$ -œstradiol à différentes concentrations

(0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 et 12  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) en solution aqueuse



### Matériels et réactifs

- Microcuvettes
- Spectrophotomètre
- P1000
- Solution étalon d'œstradiol à 12  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$
- Solution contrôle d'œstradiol à 6  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$
- Extrait « E – spectro »
- Solvant éthanol-eau

### Mode opératoire

- Gamme d'étalonnage

Réaliser une gamme d'étalonnage de 6 cuvettes de 0 à 12  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  d'œstradiol à partir de la solution étalon d'œstradiol à 12  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  dans le solvant éthanol-eau, sous un volume final de 1 mL.

- Dosage

Il sera réalisé sur :

- la solution contrôle à 6 mg.L<sup>-1</sup> (cuve C)
- l'extrait « **E-spectro** » (cuve E)

Réaliser la lecture des absorbances contre un blanc, correctement choisi, à la longueur d'onde que vous déterminerez à l'aide du document 1.

Données :

- intervalle d'acceptabilité pour la solution contrôle : [5,80 à 6,20] mg.L<sup>-1</sup>

### Résultats et discussion

**Q2.** Réaliser un tableau de la gamme et des essais (contrôle et extrait « E-spectro ») dans lequel figureront les volumes des solutions introduites. **Le montrer à l'examineur avant de débiter le travail pratique.**

**Q3.** Justifier le choix de la longueur d'onde de lecture

**Q4.** Compléter le tableau présent en annexe 3 avec les valeurs mesurées.

**Q5.** Tracer la courbe  $A = f(\rho_{(\text{oestradiol, solution étalon})})$  à l'aide du logiciel tableur.

**Q6.** Exprimer la concentration en masse en œstradiol dans la solution contrôle en mg.L<sup>-1</sup> puis discuter la valeur obtenue.

**Q7.** Déterminer, si possible, la concentration en œstradiol dans l'échantillon d'eau de départ.

## Partie 2 : Détection du 17β-œstradiol par technique ELISA

Le test est basé sur la reconnaissance du 17β-œstradiol par des anticorps monoclonaux spécifiques.

### Principe

Les puits de la microplaque sont sensibilisés par les anticorps anti 17β-œstradiol. L'échantillon et les contrôles sont déposés dans les puits respectifs. Si les œstrogènes sont présents, il se forme un immuncomplexe. Un conjugué 17β-œstradiol - POD (peroxydase) est introduit dans les puits et se fixe sur les anticorps restés libres formant un complexe anticorps - conjugué.



Après élimination de l'excès du conjugué, le complexe est révélé par l'ajout du substrat TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine).

La coloration qui en résulte est liée à la quantité 17β-œstradiol présents dans l'échantillon :

- en présence 17β-œstradiol, aucune coloration n'apparaît.
- en l'absence 17β-œstradiol, une coloration bleue apparaît puis jaune après arrêt de la réaction enzymatique.

### Matériels et réactifs

- Micropipettes
- Agitateur de microplaque
- Cristallisateur pour rejet des déchets potentiellement contaminants et des produits biologiques
- Parafilm
- Incubateur à 37°C
- Lecteur de microplaque
- Barrette de 8 puits sensibilisés avec des anticorps anti œstradiol.
- Tampon de dilution 500 µL / microtube
- Solution de lavage PBS (phosphate buffer saline) -Tween 6 mL / flacon
- Echantillon (extrait E –ELISA) 15 µL / microtube
- Contrôle positif **CP** 25 µL / microtube
- Contrôle négatif **CN** 25 µL / microtube
- Conjugué : œstradiol couplé à la peroxydase **CJG** 550 µL / microtube
- Substrat TMB **TMB** 550 µL / microtube
- Réactif d'arrêt, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 0,5 mol/L **RA** 550 µL / microtube

<b>Réactif d'arrêt RA</b>	 	<b>H290, H314</b>
---------------------------	--	-------------------

### Mode opératoire

**Remarque :** Des résultats optimaux seront obtenus en s'appliquant pour le pipetage, le minutage et les lavages au cours de la procédure.

Utiliser un cône différent pour la micropipette pour l'échantillon et chaque contrôle.

Éliminer les contenus selon les règles du laboratoire.

1. Distribuer :

- 90 µL de tampon de dilution dans 5 puits (A1 à E1),
- 10 µL de solution contrôle positif dans les puits A1 et B1,
- 10 µL de solution contrôle négatif dans les puits C1 et D1,
- 10 µL d'extrait « E-ELISA » dans le puits E1.

Veiller à déposer la solution contre la paroi des cupules, sans toucher le fond.

2. Couvrir les puits avec un adhésif puis homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques.

Incuber 45 minutes ( $\pm 5$  min) à 37°C ( $\pm 3$  °C).

3. Éliminer le contenu des puits et réaliser 3 lavages successifs avec 300 µL de lavage PBS-Tween en suivant la procédure suivante :

- éliminer l'excès de réactif en renversant la plaque au-dessus d'un bac désinfectant,
- taper la plaque sur du papier absorbant afin d'éliminer au mieux le résidu,
- remplir les cupules de solution de lavage.

- répéter 2 fois ces opérations.

- vider ensuite énergiquement l'excès de liquide et taper la plaque sur du papier absorbant afin d'éliminer au mieux le résidu,

### **3.2.3. Éviter le dessèchement des puits de la microplaque entre les lavages et l'ajout du réactif.**

4. Délivrer 100 µL de conjugué dans chaque puits.

5. Couvrir la microplaque et incuber 30 min ( $\pm 3$  min) à 21°C ( $\pm 5$ °C).

6. Vider et réaliser 3 lavages successifs avec 300 µL de solution de lavage PBS-Tween.

7. Déposer 100 µL de substrat TMB par puits.

8. Couvrir et incuber 15 min ( $\pm 2$  min) à 21 °C ( $\pm 5$ °C) à l'obscurité.

9. Distribuer 100 µL de solution d'arrêt par puits en commençant par le même ordre qu'à l'étape 7.

10. Lire les absorbances au lecteur de microplaque réglé à 450 nm, le "zéro" étant fait contre l'air (cupule vide).

### VALIDATION

Le test est validé si :

- la moyenne des absorbances pour le contrôle négatif (CN)  $\geq 0,700$

-  $\frac{\text{Moyenne des absorbances du contrôle positif CP}}{\text{Moyenne des absorbances du CN}} < 0,3$

résultat %	statut
S/N $\leq 40$	positif
40 < S/N $\leq 50$	douteux

## INTERPRETATION

S/N > 50

négatif

pour l'échantillon, calculer le pourcentage S/N :

$$S/N \% = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Moyenne des absorbances du CN}} \times 100$$

### Résultats et discussion

Q8. Expliquer à partir du principe, pourquoi la coloration est faible quand la concentration en 17  $\beta$ -œstradiol dans l'échantillon est élevée.

Q9. Compléter le tableau de résultat en annexe 3.

Q10. Valider le résultat.

Q11. Calculer le pourcentage S/N et conclure sur la présence de 17  $\beta$ -œstradiol dans l'échantillon d'eau de départ.

## Partie 3 : Dosage du 17 $\beta$ -œstradiol par HPLC

### Principe

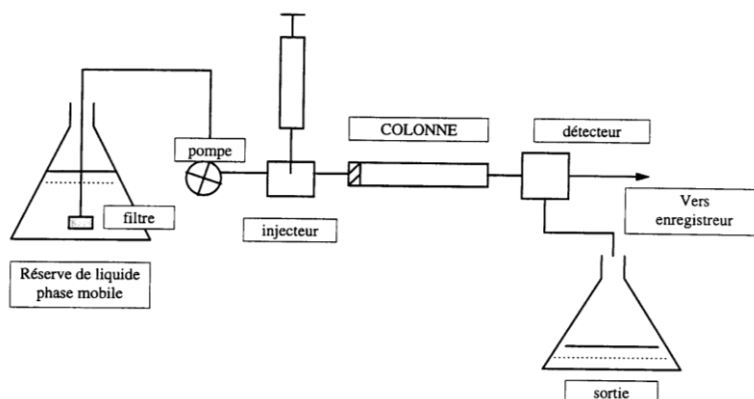
Pour un système chromatographique donné (type de colonne, températures et pressions choisies), une substance est caractérisée par son temps de rétention, c'est à dire le temps nécessaire pour que cette substance aille de la chambre d'injection au détecteur. Au bout du temps considéré, apparaît un pic sur le graphe d'enregistrement. L'aire du pic est proportionnelle à la quantité de soluté injectée.

Lorsque le chromatographe dispose d'une boucle d'injection permettant de délivrer un volume constant, répétable et reproductible, **l'aire du pic est proportionnelle à la concentration de la molécule à doser.**

### Présentation des modules chromatographiques

Le système chromatographique HPLC se compose de différents modules :

- le réservoir de phase mobile contenant le mélange de solvants à la composition désirée,
- la pompe qui délivre la phase mobile dégazée et filtrée en continu en direction de la colonne,
- l'injecteur permettant l'entrée des solutés dans le circuit,
- la colonne contenant la phase stationnaire permettant la séparation des composés,
- le détecteur permettant la détection des composés en sortie de colonne,
- l'enregistreur permettant de collecter les informations sous forme d'un signal.



### Conditions c


- Chromatographe HPLC constitué de :

- o phase stationnaire = Apolaire (Lichrosorb RP18, 100  $\times$  4,6 mm)
- o phase mobile dégazée : Acétonitrile/eau 60/40 v/v

- La composition et de débit de phase mobile sont constants tout au long de l'analyse.
- Boucle d'injection
- Détecteur spectrophotométrique UV :  $\lambda = 280$  nm

## Matériels et réactifs

- Solution étalon de 17 $\beta$ -œstradiol à 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  dans la phase mobile déjà injectée (voir chromatogramme étalon fourni lors de votre passage au chromatographe).
- Echantillon : extrait « **E -HPLC** » : 2 mL
- Phase mobile dégazée (Acétonitrile/eau : 60/40)

Acétonitrile		H225, H302, H332, H319	P210, P280
--------------	---	------------------------	------------

- 1 seringue avec un filtre
- Papier d'essuyage
- Gants
- Sac à déchets

## Mode opératoire

- prélever délicatement la solution échantillon à l'aide de la seringue.
- chasser les bulles d'air présentes en maintenant la seringue verticalement le long d'un papier d'essuyage.
- ajuster le filtre sur la seringue
- chasser l'air du filtre à l'aide du papier d'essuyage
- adapter la seringue sur l'injecteur du chromatographe
- remplir la boucle d'injection en injectant environ 0,6 mL d'échantillon
- maintenir la seringue en place et basculer l'injecteur en mode « *inject* »
- après 30 secondes, repositionner l'injecteur en mode « *load* » et retirer la seringue avec son filtre
- rincer la boucle d'injection avec de la phase mobile en respectant la même procédure que pour l'échantillon
- récupérer, auprès de l'examineur, les chromatogrammes échantillon et étalon.

## Résultats et discussion

- Q12. Lors de votre passage et en vous appuyant sur le schéma de présentation des modules chromatographiques, présenter à l'examineur les différents modules du chromatographe.
- Q13. En vous appuyant sur la structure chimique du 17  $\beta$ -œstradiol présentée dans le document 1, argumenter le choix d'une phase stationnaire apolaire
- Q14. A l'aide du chromatogramme étalon, repérer la molécule d'intérêt dans l'échantillon
- Q15. Compléter la fiche de traçabilité en annexe 3.
- Q16. Calculer la concentration en masse en œstradiol de l'extrait « **E-HPLC** » en appliquant l'équation aux grandeurs suivantes :

$$\rho_{(\text{oestradiol};\text{extraitE})} = \frac{\text{Aire}_{\text{échantillon}}}{\text{Aire}_{\text{étalon}}} \times \rho_{(\text{oestradiol};\text{étalon})}$$

- Q17. Calculer la concentration en masse en 17  $\beta$ -œstradiol dans l'échantillon d'eau de départ.

## Partie 4 : Ajustement d'une préculture de levures génétiquement modifiées pour la réalisation du test de YES

Le test de YES« Yeast Estrogen Screen » est un biotest qui permet la détection d'une activité œstrogénique dans le milieu aquatique.

L'objectif de la manipulation est de dénombrer une culture de 18H en bouillon Sabouraud, de levures transformées en cellule de Malassez et d'ajuster la concentration à  $1.10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup> dans le but de réaliser un test de YES.

### Matériels et réactifs :

- Cellule de Malassez/lamelle
- Pipette automatique P20
- Pipette graduée 5 mL
- Microscope optique

- Suspension de levures à dénombrer
- Tube à essai stérile
- Eau physiologique stérile
- Alcool à 70°
- Détergeant/boîte de Pétri en verre
- Eau distillée
- Gants

### Réalisation pratique :

#### A) Dénombrement de la suspension de levures transformées (LT).

- Monter la chambre de l'hématimètre
- Transférer la suspension dans l'hématimètre (annexe 1).
- Dénombrer les cellules.

#### B) Réalisation d'une suspension de levures transformées optimale (LTO)

- A partir de la suspension LT, réaliser la suspension LTO en eau physiologique à une concentration de  $1.10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup> dans un tube à essai pour un volume final de 5 mL.

### Résultats et discussion

*(Pour chaque calcul, les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques sont attendues)*

**Q18.** Calculer la concentration en cellules de la suspension LT (en cellules.mL<sup>-1</sup>). en vous aidant de l'annexe 1

**Q19.** Calculer le volume de suspension LT (en mL) à prélever pour préparer la suspension LTO.

**Q20. Bilan :** A l'aide de l'ensemble des résultats obtenus et en vous aidant de l'annexe 2, conclure sur la ou les méthode(s) de mesure adaptée(s) au dosage des œstrogènes dans le prélèvement d'eau. Justifier votre réponse.

#### 3.2.4. Les conseils du jury pour réussir cette épreuve

La lecture préalable de l'ensemble du sujet est un atout pour organiser son travail sur le temps de l'épreuve : certaines expérimentations nécessitaient un temps assez long.

Une bonne organisation du poste de travail est indispensable pour la réussite des activités pratiques à conduire. Le jury a été particulièrement attentif à l'adaptation aux nouveaux équipements comme l'HPLC, à la gestion des déchets.

Les équipements de protection individuelle doivent être utilisés de façon raisonnée. Il s'agit d'un questionnement à mener lors de la lecture préalable du sujet. Il en est de même pour la gestion des déchets.

Enfin, il est important de garder en mémoire l'objectif de la manipulation pour proposer une conclusion, un bilan complet et argumenté.

L'ensemble du jury tient à remercier les candidats qui se sont montrés impliqués et qui ont engagé toutes leurs compétences pour mener au mieux ces épreuves.

**Le jury tient à féliciter tous les candidats admissibles de leur engagement dans l'épreuve quel que soit le niveau de réussite des manipulations.**

## 4. Quelques repères pour le concours.

### 4.1. Épreuve d'admissibilité

Nombre de candidats présents lors de l'épreuve écrite : 117

Nombre de candidats admissibles aux épreuves pratique et orale : 10

### 4.2. Épreuve d'admission

Nombre de candidats présents : 10

### 4.3. Palmarès

Le jury a décerné cette année 3 prix, 5 accessits et 2 mentions.