

EPREUVE ORALE DE TRAVAUX PRATIQUES DE BIOLOGIE

ENS : PARIS LYON CACHAN

Durée : 4 h Coefficients : PARIS 12 LYON 4
CACHAN 8

**MEMBRES DE JURYS : Y. BASSAGLIA, S. HEUSSER, M.-A POUL, J.-M. RICORT
M. ROUX, J.-C. THOMAS, R. THOMAS**

Les travaux pratiques se sont déroulés les 16, 17 et 18 juin dans les locaux du Département de Biochimie l'ENS Cachan, avec le concours du personnel technique du Département de Biochimie.

Objectifs

Le jury souhaite concevoir des épreuves pratiques très concrètes permettant d'utiliser les outils du biologiste et d'évaluer diverses compétences :

- qualités d'observation et d'analyse d'objets biologiques
- aptitude à rendre compte des observations et analyses par des représentations graphiques correctes
- habileté à manipuler dans le respect des protocoles fournis
- capacité à rédiger un commentaire scientifique précis, logique, méthodique et concis.

A côté de manipulations « classiques » (détermination florale, observation de coupes histologiques, dissections, réalisation de montages, de colorations) où l'on demande au candidat des dessins ou croquis soignés, orientés, légendés, titrés, munis d'une échelle), le jury propose des manipulations plus originales faisant appel à des notions théoriques connues des candidats même si les manipulations proprement dites sont nouvelles.

Organisation des sujets

La gestion du temps était laissée à l'appréciation des candidats en dehors de contraintes techniques telles que l'utilisation des spectrophotomètres ou de loupes binoculaires qui ont été précisées au début de l'épreuve. Quinze minutes ont été laissées aux candidats pour lire le sujet et se familiariser avec le matériel disponible avant le début de l'épreuve de quatre heures.

L'épreuve comportait deux parties, l'une à dominante biologie animale, l'autre à dominante biologie végétale. Selon le jour, l'une ou l'autre des parties développait une sous partie basée sur des expériences de biochimie.

Commentaires

1- Dominante animale

Exercice 1

L'exercice consistait en l'étude d'un organisme animal appartenant au groupe des Insectes. Trois échantillons du genre *Pieris* étaient fournis, correspondant aux stades larvaire, nymphal et imaginal. Après avoir déterminé la position systématique à partir de l'étude morphologique de l'adulte, les candidats devaient réaliser un croquis de chaque échantillon, reconstituer le cycle de développement de l'animal et indiquer les caractéristiques majeures de ce dernier. Une comparaison des pièces buccales de l'adulte et de la larve était alors demandée, accompagnée de croquis et le cas échéant d'une extraction.

Deux micrographies électroniques d'œil de drosophile étaient fournies, l'une étant une vue globale de l'œil composé obtenue par balayage, l'autre une coupe frontale d'ommatidies obtenue en transmission. Les candidats devaient indiquer les techniques utilisées pour obtenir ces documents, puis légèrer la coupe frontale, en indiquant les contours des cellules formant l'une des ommatidies, et en soulignant les liens des différents éléments observés et la vision.

De manière générale, la diagnose a été correctement menée mais dans quelques cas, elle manque de rigueur. Rappelons qu'il s'agit d'exposer les arguments avant d'énoncer les conclusions qui peuvent en être tirées. Des erreurs de fond apparaissent également, qui méritent d'être éliminées (la notion d'invertébré n'a pas de valeur systématique, l'absence de squelette interne ne permet pas de conclure que l'animal est un invertébré, l'animal n'est pas un Hyménoptère...).

Pour ce qui concerne l'étude des différents stades de développement, il est regrettable que les candidats apportent si peu de soin à l'observation et aux croquis qui en rendent compte. Ainsi, le nombre de segments des animaux était le plus souvent aléatoire, la chenille présentait parfois des yeux de grande taille, elle possédait quelquefois un nombre de pattes hasardeux, l'habillage des représentations manquait de précision (titre, échelle, orientation, légendes...). Le cycle de développement a néanmoins été convenablement reconstitué, mais malheureusement trop peu de candidats ont conclu quant au caractère holométabole de l'animal étudié.

L'analyse des pièces buccales et du régime alimentaire associé est sans doute la partie de l'exercice qui a posé le plus de problèmes. Elle était pourtant l'occasion d'exploiter les connaissances acquises pour les appliquer au modèle proposé. Dans de nombreux cas, les pièces buccales de l'adulte ont été

extraites (palpes et trompe, le labre restant en place) et celles de la larve étudiées en place, alors que l'inverse était peut être plus facile à réaliser. Les croquis produits à partir de l'observation, outre les défauts cités précédemment, présentaient de multiples erreurs d'interprétation, en particulier des confusions entre les différentes pièces buccales (trompe correspondant à des mandibules, palpes à des maxillules...). Visiblement cet aspect de la biologie des Insectes est encore assez mal maîtrisé. Pour autant, rares sont les candidats ayant représenté des pièces buccales théoriques, ce qui constitue un élément positif. Quant au régime alimentaire du papillon et de la chenille, que dire lorsque le premier est qualifié de piqueur et le second de carnivore !

Enfin, il est apparu que l'orthographe et les règles de grammaire sont trop souvent ignorées. Parmi les multiples versions fantaisistes relevées, citons « chrysalide », « crysalide », « crysallide », et signalons que des accords doivent être faits entre noms et adjectifs, en respectant les genres et les pluriels !

Les deux techniques de microscopie électronique ont été très souvent indiquées. Il était demandé de s'aider du calque pour réaliser le dessin : il suffisait de faire le dessin sur le calque, et non de le décalquer ensuite comme l'ont fait de nombreux candidats, ce qui était une perte de temps. La qualité des légendes était faible, le titre absent et les constituants de base de la cellule (noyau, mitochondries, réticulum) en général négligés. Les contours des cellules constituant une ommatidie n'ont été que rarement dessinés, en se limitant aux photorécepteurs, les cellules pigmentaires étant ignorées (ce qui n'a pas été pris en compte au niveau de la correction). L'espace inter-rhabdomères a souvent été considéré comme un élément nerveux (axone ou faisceau d'axones) malgré l'absence d'éléments cellulaires. Les erreurs les plus fréquentes étaient de considérer que l'ommatidie était constituée d'une seule cellule (malgré les nombreux noyaux visibles), ou que les rhabdomères étaient les photorécepteurs (ce qui est moins grave).

Exercice 2

L'exercice consistait en l'étude d'une cellule animale (hépatocyte, myocyte), aux différentes échelles et à l'aide de diverses techniques (microscopie photonique, microscopie électronique, biochimie).

1) Etude cytologique

Dans un premier temps, une coupe histologique était proposée aux candidats, accompagnée d'un croquis. Il s'agissait, grâce à l'observation, de légender le croquis puis de sélectionner une plage de la coupe et de réaliser un dessin de détail de quelques cellules d'intérêt. Après avoir défini le grossissement du microscope et évalué le diamètre du champ de ce dernier, il était demandé de calculer l'agrandissement du dessin, de le représenter sous forme de barre d'échelle, ainsi que d'estimer la taille moyenne des cellules étudiées et de leurs noyaux. Dans un second temps, les candidats devaient légender et commenter brièvement une micrographie électronique, en y ajoutant une barre d'échelle (le grossissement était donné), puis en tirer les dimensions de certains éléments cellulaires (noyau, mitochondries, sarcomère). Un commentaire sur d'éventuelles différences avec les valeurs obtenues à partir de l'observation en microscopie optique était demandé.

Comme précédemment, les représentations graphiques se sont révélées décevantes : les proportions sont souvent mal respectées, le trait peu soigné, les détails (granulations cytoplasmiques et contenus nucléaires par exemple) non dessinés, les légendes vagues et disposées sans hiérarchie. L'interprétation des structures observées est trop souvent erronée, ainsi le tissu conjonctif est-il légendé comme lame basale, le tissu musculaire strié comme tissu musculaire lisse, les glandes de la trachée comme glandes endocrines, un noyau confondu avec une mitochondrie, une myofibrille

avec une cellule musculaire... Ici encore, l'attention doit être attirée sur l'orthographe et la grammaire trop souvent défailtantes, avec par exemple des légendes comme « oeuophage », « périmyrium » ou des titres comme « coupe transversal ».

Le travail portant sur les échelles a quant à lui donné lieu à des résultats pour le moins surprenants. Alors qu'une définition simple du grossissement du microscope était attendue, certains candidats se sont lancés dans des explications d'optique complexes, parfois avec des formules variant au gré de leurs besoins. Si l'évaluation du diamètre du champ du microscope aux différents grossissements a été correctement menée, les calculs d'agrandissement et les barres d'échelle ont pour leur part abouti à des valeurs étonnantes (le grossissement est de 2000 donc $1\text{ cm} = 8\text{ }\mu\text{m}$, le grossissement est de 10^6 !) ou des unités surprenantes (10^{-4} cm , au lieu de μm ou 10^{-6} m). Il en va de même pour l'estimation de la taille des cellules et des noyaux : outre le fait que la majorité des candidats a omis de donner une valeur moyenne, calculée d'après plusieurs cellules, certains obtiennent des résultats de l'ordre du nanomètre sans que cela ne les étonne. Les dimensions des noyaux pouvaient être inférieures à celles des mitochondries, étonnamment petites (6 nm) ou grandes (jusqu'à $580\text{ }\mu\text{m}$!) sans que cela suscite une remise en question. La comparaison entre les valeurs obtenues en optique et en électronique s'est le plus souvent limitée à dire que la microscopie électronique était plus précise que la microscopie optique – sans qu'il soit mentionné que le niveau de coupe dans le noyau pouvait fortement influencer le résultat.

Dès lors, on comprend que sur les croquis apparaissent des légendes comme « hépatocyte », « capillaire » et sur les dessins des représentations de mitochondries et de myofilaments. Au final, il semblerait que de nombreux candidats aient été surpris d'avoir à effectuer des calculs, pourtant simples, dans le cadre d'observations au microscope et qu'ils n'ont qu'une idée très vague des dimensions des différentes structures biologiques.

De même, le lien entre structure et fonction est trop peu souligné. Il était par exemple souhaité de mettre en parallèle la forte teneur en mitochondries et en grains de glycogène observée avec le rôle du foie dans le contrôle de la glycémie, ou bien avec les besoins énergétiques de la contraction musculaire. En sens inverse, se souvenir de ces rôles aurait dû aider à identifier les grains de glycogène.

2) Etude biochimique

On se proposait d'évaluer un protocole de purification de mitochondries à partir de foie de volaille ou de muscle de boeuf. Des fractions réalisées par des centrifugations différentielles à partir d'un extrait brut obtenu par homogénéisation mécanique étaient fournies. Le protocole du fractionnement était donné sous forme d'un schéma indiquant le temps et la vitesse de centrifugation ainsi que les volumes de chaque fraction. Il s'agissait, pour chaque fraction et pour l'extrait brut, d'une part de réaliser un frottis et une coloration des acides nucléiques au colorant de Giemsa et d'autre part, de doser l'activité de la succinate déshydrogénase, enzyme liée à la membrane mitochondriale interne, à l'aide d'une méthode spectrophotométrique. L'exploitation des résultats des deux expériences devait permettre de valider la méthode et d'aborder des notions comme le rendement d'une purification, la pureté d'une préparation, l'enrichissement.

Les candidats passent un temps variable à l'élaboration des frottis colorés, certains sont très à l'aise, d'autres passent près d'une heure à la réalisation et à la coloration. Alors que trois frottis sont demandés, on s'interroge quant au caractère masochiste de certains élèves qui s'évertuent à en réaliser quatre au détriment du reste de l'épreuve. Les étapes de coloration de frottis ont souvent été menées successivement alors qu'un traitement en parallèle des trois fractions aurait fait gagner un temps précieux. Malgré l'indication écrite (et re-énoncée oralement), certains candidats ont perdu un temps précieux en montant les frottis entre lame et lamelle. Nous rappelons que le respect des étapes du protocole expérimental est fondamental. Le choix de l'objectif pour l'observation, laissé à

l'appréciation du candidat, est souvent malheureux. L'observation de la fraction mitochondriale au grossissement X10 (voire X5) laisse rêveur sur les interprétations qui en sont ensuite tirées.

Certains ne prennent pas le temps de montrer leurs frottis aux examinateurs alors que cela est spécifié dans l'énoncé. L'interprétation des frottis est souvent très approximative (grosses structures, petits éléments) alors qu'une lecture attentive du sujet indiquait clairement l'objectif du fractionnement : purification de mitochondries. Comme dans la partie précédente, l'évaluation de la taille des constituants cellulaires relève parfois de calculs surprenants conduisant à des résultats mystiques.

Pour le dosage spectrophotométrique de l'activité SDH, la réalisation des tubes réactionnels ne posait généralement pas de problèmes. Les candidats étaient guidés pour la réalisation de témoins nécessaires (Blanc réactif, blanc échantillon, utilisation d'un inhibiteur compétitif du substrat pour vérifier la spécificité de la mesure effectuée). Le fonctionnement des pipettes automatiques était montré en début de séance et rappelé à la demande (ne pas hésiter à demander en cas de doute !). Il est maîtrisé par la plupart des candidats. L'estimation visuelle des volumes prélevés n'est cependant pas évidente pour certains qui se retrouvent avec un volume réactionnel final de 100 μ L au lieu de 1 mL sans pour autant s'en inquiéter. Il est également dommage de ne pas avoir le réflexe élémentaire de contrôler l'égalité des volumes dans tous les tubes avant de passer à l'étape d'incubation puis de mesure. Les temps morts d'incubation sont rarement mis à profit pour la rédaction ou la préparation des étapes ultérieures. On s'étonne de voir des candidats démarrer une incubation de 10 minutes à 5 minutes de la fin de l'épreuve, incubation qui ne pourra visiblement pas être exploitée. Pour la mesure, la plupart des candidats fait preuve d'aisance dans la manipulation du spectrophotomètre (dont on explique le principe et le fonctionnement et en particulier la trajectoire du faisceau lumineux). Certains placent malheureusement les cuves aléatoirement. Ceux qui ont effectué la manipulation obtiennent dans la plupart du temps des mesures correctes et exploitables. Malheureusement, l'interprétation n'a été que très rarement menée jusqu'au bout. Le caractère novateur de l'épreuve semble avoir perturbé les candidats alors qu'ils étaient guidés et avaient toutes les connaissances nécessaires pour mener à bien leur réflexion. Les notions de blanc réactif et blanc échantillon sont généralement connues mais mal formulées. Seuls quelques candidats parviennent à calculer l'activité SDH totale de chaque fraction et peuvent conclure à l'enrichissement en mitochondrie de l'une des fractions. Le jury s'étonne parfois du manque de connaissances manifeste concernant les différentes étapes de la chaîne mitochondriale et de la notion d'inhibiteur enzymatique.

2-Dominante végétale

Exercice 1

L'épreuve comportait 5 parties intégrées : une analyse florale de plante fraîche (on demandait seulement une formule florale, un diagramme une coupe longitudinale) un schéma d'ensemble d'une coupe histologique de bouton floral d'une autre plante, un calque d'une photographie en MET d'un grain de pollen tricellulaire issu du bouton floral, une détermination avec la flore, une comparaison d'une classification classique et phylogénétique des Angiospermes (documents originaux à l'appui).

Si certains candidats ont très correctement traité l'ensemble, somme toute très accessible, beaucoup de copies médiocres nous amènent à repreciser quelques points incontournables.

-la formule florale complète comporte, en plus de l'indication des S,P,E,C,
la symétrie florale et la sexualité de la fleur.

-le diagramme floral ne se borne pas à coller les diverses pièces sur la feuille mais à réaliser un

schéma traduisant une projection de plusieurs coupe transversales intéressant tous les verticilles.

-la coupe longitudinale passe par l'axe ou le plan de symétrie de la plante et doit être en accord complet avec le diagramme.

-une étude comparée comporte 2 volets : les analogies / les différences.

- le calque fourni n'est pas destiné à décalquer la photo MET, mais à réaliser un schéma forcément très précis, mettant en évidence par des figurés appropriés les structures remarquables.

Un dernier point qui est un leit motiv de nos rapports successifs : bien lire le sujet (les candidats disposent de 1/4 d'heure avant l'épreuve pour le faire) le lire en entier avant de commencer, ne répondre qu'aux questions posées et à elles seules.

Exercice 2

Dans cette épreuve, on proposait l'étude des composants des cellules du parenchyme de tubercule de pomme de terre en deux parties : étude cytologique (microscopie optique, et microscopie électronique grâce aux documents fournis) et étude biochimique (évaluation d'un protocole de purification de mitochondries).

1) Etude cytologique.

a) Microscopie optique

On rappelle que le dessin de détail résulte de l'observation d'une préparation. Il doit donc rendre compte de la forme des cellules, et doit permettre la localisation d'un certain nombre d'éléments figurés. La confusion grain d'amidon-amyloplaste est fréquente. Le noyau, représenté sur certaines copies, n'était pas observable. La paroi est souvent oubliée.

b) Microscopie électronique

On précisait qu'il s'agissait d'un type cellulaire analogue à celui observé plus haut. L'estimation des tailles des organites est approximative, voire fantaisiste (le grandissement était indiqué...). Un pourcentage trop élevé d'étudiants a mal identifié la mitochondrie...On retrouve également les confusions amidon-amyloplast. Certains candidats ont bien noté la présence de membranes intraplastidiales. La taille des grains d'amidon (de 1 à 4 micromètres) était très inférieure à ce qui pouvait être observé au cours de l'étude biochimique. Cette remarque parfaitement justifiée a été trouvée dans plusieurs copies. En revanche, on déplore que la colorabilité au lugol ait pu être évoquée à propos du document de microscopie électronique.

Ces observations auraient pu permettre de s'interroger sur les difficultés du fractionnement des constituants cellulaires dans ce type de tissu. Cela n'a pas été mentionné.

2) Etude biochimique

Le protocole de préparations des fractions était décrit dans le sujet.

a) L'observation microscopique préalable des fractions après coloration au lugol avait pour but de décrire la répartition des grains d'amidon au cours du fractionnement. Quelques candidats ont cru bon attribuer à la fraction « C2 » un contenu élevé en amidon, en contradiction avec leurs observations.....

b) Mesure d'une activité de transfert d'électrons mettant en jeu les composants de la membrane interne des mitochondries. Les spectres d'absorption obtenus sur le cytochrome c (réduit et oxydé), ainsi que le spectre de différence, ont donné lieu à des commentaires sommaires (existence d'une absorption très importante vers 410 nm pour les deux formes, rarement mentionnée, mais variation beaucoup plus facile à apprécier à 550 nm, zone dans laquelle l'absorption de la forme oxydée est

très faible - ce qui justifie les mesures dans cette zone). Le calcul du coefficient d'absorption spécifique ne posait pas de difficultés. Il était toutefois indispensable de préciser les unités. En ce qui concerne la partie expérimentale proprement dite, les commentaires généraux concernant les manipulations rejoignent tout à fait ceux exprimés à propos des expériences similaires sur le matériel animal (temps d'incubation variable et homogénéisation sommaire des échantillons sont à l'origine du caractère erratique de beaucoup de mesures...). Le commentaire de l'activité de transfert d'électrons grâce au document fourni avait pour but de "recadrer" l'ensemble des manipulations effectuées. Une réflexion sur ces données n'était donc pas inutile...On pouvait préciser par exemple les composants intramembranaires et les autres (solubilité du cytochrome c?). En ce qui concerne les mesures demandées, peu de candidats ont compris l'intérêt des réactions des tubes 1 et 2 - absence de variation spectrale au cours du temps dans les tubes ne renfermant qu'une solution de cytochrome c, sous une forme oxydée ou réduite. L'étude du tube 2 permettait de dire que la réduction du cytochrome c par l'ascorbate était instantanée. Avec les échantillons biologiques, les activités de réduction du cytochrome c en présence d'azoture, étaient, pour une même durée, significativement plus importantes. Seuls deux candidats ont mis cette propriété en relation avec la possibilité d'une réoxydation du cytochrome c par la cytochrome oxydase, réoxydation que l'on bloque à dessein en ajoutant de l'azoture. Plusieurs types de contrôles étaient envisageables (par exemple les mesures des activités en l'absence de succinate, ou de cytochrome c, ou bien le test de la stabilité du cytochrome c réduit ou oxydé en présence du tampon P). Compte tenu des approximations expérimentales dans les manipulations, la partie consacrée à l'évaluation de la méthode n'a que rarement donné lieu à des appréciations plausibles. De plus, certains candidats n'ont pas tenu compte des volumes des fractions.....

Résultats

La note moyenne obtenue par les 79 candidats ayant suivi cette épreuve de la session 2004 est de 10,03 sur 20. Les notes maximale et minimale sont respectivement de 3 et 18,5 sur 20, témoignant de compétences et qualités très diversifiées.

Conclusion

Les candidats auront compris que ce ne sont pas tant les connaissances théoriques que la capacité à observer, utiliser divers outils, traduire, rédiger... qui est jugée dans cette épreuve. Une gestion efficace du temps imparti, une observation et une réflexion plus approfondies, ainsi qu'une meilleure mobilisation des connaissances acquises lors des deux années de classes préparatoires devraient permettre aux candidats d'améliorer leurs performances. Bon nombre d'entre eux pourraient également améliorer leur prestation en lisant attentivement le sujet et en réfléchissant à la cohérence interne de celui-ci.