



# **Concours du second degré**

## **Rapport de jury**

---

### **Concours : Agrégation interne**

#### **Section : Biochimie-Génie Biologique**

**Session 2014**

Rapport de jury présenté par : Jean-Pascal Dumon

## SOMMAIRE

Composition du jury.....	Page 3
Renseignements statistiques.....	Page 4
Avant propos du président.....	Page 6
Epreuves d'admissibilité .....	Page 7
Première épreuve	
Sujet.....	Page 10
Rapport.....	Page 27
Deuxième épreuve	
Sujet.....	Page 33
Rapport.....	Page 35
Epreuves d'admission	
Première épreuve	
Rapport.....	Page 38
Deuxième épreuve	
Sujet.....	Page 41
Rapport.....	Page 59
Conclusion générale.....	Page 62

## COMPOSITION DU JURY

### **Président du jury**

Monsieur Jean-Pascal DUMON

Inspecteur Général de l'Education Nationale

### **Vice-président**

Monsieur Jean-Marc RICORT

Professeur des Universités

### **Secrétaire générale**

Madame Isabelle ETIENNE

Professeure Agrégée

### **Membres**

Madame Christine BENAYOUN

Professeure Agrégée

Monsieur Jean-Paul BRUNET

Professeur Agrégé

Monsieur Frédéric DUCANCEL

Ingénieur de Recherche

Madame Isabelle FALLER

Inspectrice d'Académie-Inspectrice Pédagogique Régionale

Monsieur Jean-François PERRIN

Professeur Agrégé

Madame Claudine WALTHER

Professeure Agrégée

## RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

### Agrégation interne

<b>Nombre de postes</b>	<b>7</b>
<b>Candidats inscrits</b>	<b>153</b>
<b>Candidats présents aux deux épreuves d'admissibilité</b>	<b>116</b>
<b>Candidats admissibles</b>	<b>17</b>
<b>Candidats présents aux épreuves d'admission</b>	<b>17</b>
<b>Candidats proposés pour l'admission</b>	<b>7</b>
<b><u>Epreuves d'admissibilité</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>7,47</b>
<b>Moyenne des candidats admissibles</b>	<b>12,00</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admissible</b>	<b>10,05</b>
<b><u>1<sup>ère</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>8,16</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>12,04</b>
Note maximale	<b>16,00</b>
<b><u>2<sup>ème</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>6,78</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>11,96</b>
Note maximale	<b>15,30</b>
<b><u>Epreuves d'admission</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>10,39</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>11,62</b>
<b><u>1<sup>ère</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>10,73</b>
Moyenne des candidats admis	<b>12,17</b>
Note maximale	<b>18,00</b>
<b><u>2<sup>ème</sup> épreuve</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>10,06</b>
Moyenne des candidats admis	<b>11,07</b>
Note maximale	<b>13,80</b>
<b><u>Ensemble du concours</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>10,39</b>
<b>Moyenne la plus élevée</b>	<b>13,18</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>12,38</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admis</b>	<b>11,85</b>

## RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

### Concours d'accès à l'échelle de rémunération des professeurs agrégés (CAER)

<b>Nombre de postes</b>	<b>1</b>	
<b>Candidats inscrits</b>	<b>33</b>	
<b>Candidats présents aux deux épreuves d'admissibilité</b>	<b>14</b>	
<b>Candidats admissibles</b>	<b>1</b>	
<b>Candidats présents aux épreuves d'admission</b>	<b>1</b>	
<b>Candidats proposés pour l'admission</b>	<b>0</b>	
<b><u>Epreuves d'admissibilité</u></b>		
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>5,70</b>	
<b>Moyenne des candidats admissibles</b>	<b>10,17</b>	
<b>Moyenne du dernier candidat admissible</b>	<b>10,17</b>	
<b><u>1<sup>ère</sup> épreuve</u></b>		
Moyenne des candidats présents	<b>6,34</b>	
Moyenne des candidats admissibles	<b>13,40</b>	
Note maximale	<b>13,40</b>	
<b><u>2<sup>ème</sup> épreuve</u></b>		
Moyenne des candidats présents	<b>5,09</b>	
Moyenne des candidats admissibles	<b>6,94</b>	
Note maximale	<b>6,94</b>	
<b><u>Epreuves d'admission</u></b>		
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>Résultats statistiquement non significatifs</b>	
<b>Moyenne des candidats admis</b>		
<b><u>1<sup>ère</sup> épreuve</u></b>		
Moyenne des candidats présents		
Moyenne des candidats admis		
Note maximale		
<b><u>2<sup>ème</sup> épreuve</u></b>		
Moyenne des candidats présents		
Moyenne des candidats admis		
Note maximale		
<b><u>Ensemble du concours</u></b>		
<b>Moyenne des candidats présents</b>		
<b>Moyenne la plus élevée</b>		
<b>Moyenne des candidats admis</b>		
<b>Moyenne du dernier candidat admis</b>		

## Avant-propos

L'agrégation interne et le CAER interne de biochimie génie biologique ont pour vocation de permettre à des enseignants en activité d'accéder au grade de Professeur Agrégé de biochimie génie biologique.

Après six années d'interruption (dernière session en 2007), le concours a été de nouveau ouvert offrant aux enseignants cette opportunité de progresser dans leur carrière.

Malgré l'annonce tardive de l'effectivité de l'ouverture du concours pour la session 2014, de très nombreux enseignants se sont mobilisés. En effet, 186 candidats se sont inscrits dont 61% ont composé à l'admissibilité.

Les domaines couverts par l'agrégation de biochimie génie biologique sont variés et vastes – : biochimie, microbiologie, immunologie, biologie cellulaire, hématologie, biologie moléculaire, physiologie humaine...

Il importe donc pour espérer avoir quelques chances de réussite que les candidats se préparent sérieusement, non seulement pour mettre en valeur leurs compétences professionnelles, mais également pour intégrer les connaissances et les compétences scientifiques et technologiques. Ce rapport du jury a pour objectif d'indiquer aux futurs candidats les objectifs des différentes épreuves.

Les épreuves d'admissibilité conjuguent l'évaluation des connaissances scientifiques et technologiques, mais également les qualités attendues d'un enseignant. Le jury demande donc à ce que les candidats soient capables de construire un développement structuré, concis, scientifiquement à la pointe des connaissances, tout en faisant preuve, notamment, de qualités didactiques et pédagogiques.

La première épreuve s'inscrit dans la présentation de deux thèmes technologiques abordés dans leurs aspects technologiques et pédagogiques. A ce propos, le jury a souhaité favoriser l'identification du registre évalué en signalant les questions par des lettres « C » pour connaissance et « P » pour pédagogie. Le déterminisme de chaque question est donc ainsi sans ambiguïté.

La deuxième épreuve présente un caractère foncièrement scientifique. Elle place le candidat dans la construction d'une réponse disciplinaire à une question de synthèse portant sur un domaine couvert par les secteurs de la spécialité. Trois questions ont permis d'investir des thématiques très différentes : les biotechnologies, la physiologie, l'immunologie moléculaire. L'exercice consistant à aborder en temps limité trois sujets ouverts sur des champs disciplinaires différents est redoutable, aussi, le jury encourage les candidats à préparer cette épreuve par un maintien et une mise à jour de leurs connaissances. Même si la physiologie semble être moins présente dans les programmes des sections confiées aux enseignants de biotechnologies, elle est cependant omniprésente en filigrane et doit donc absolument faire partie de la culture scientifique des professeurs agrégés de biochimie-génie biologique.

La première épreuve d'admission s'inscrit dans une démarche de projet qui se doit de combiner une étude scientifique et technologique afin de construire une ou plusieurs transpositions pédagogiques pour un niveau de classe donné et dont le candidat a la responsabilité. L'étude peut avantageusement être associée à des aspects économiques, sociaux et humains. Cette démarche préfigure le cas d'un enseignant qui prend appui sur la réalité professionnelle afin d'ancrer son enseignement en lien avec les procédés de biotechnologies (production de biens et de services, recherche, R&D, analyse, contrôle qualité...) et l'évolution des activités dans les laboratoires. Dans cette perspective, l'enseignant s'emploie à approfondir ses savoirs fondamentaux, technologiques et techniques en empruntant aux entreprises ou aux laboratoires les activités effectivement réalisées dans leur contexte propre. Dans cette optique, la démarche peut faire l'objet d'un stage massé ou perlé en entreprise ou laboratoire ou prendre appui sur des publications scientifiques, des données économiques, des problématiques sociétales associées à des procédés biotechnologiques. A terme, cette démarche s'inscrit dans un projet technologique et pédagogique dédié aux élèves pour un niveau donné.

Le candidat envisage donc le(es) réinvestissement(s) possible(s) de son étude technologique (projet) dans le cadre d'un programme dont il a la responsabilité.

Le dossier peut donc légitimement comporter deux parties :

- Une étude scientifique et technologique que le candidat prendra soin de replacer dans son contexte, notamment en lien avec la problématique à l'origine du projet. Il pourra s'agir d'une étude fondamentale en appui sur des données scientifiques actualisées et dont les prolongements technologiques, économiques, sociétaux seront abordés ;
- Une mise en application pour un niveau de classe donné, un référentiel, une progression choisie et justifiée. La problématique du transfert des activités technologiques et techniques décrites sera abordée afin de prendre en compte les contraintes propres à un environnement enseignant (matériels disponibles, horaires, groupe classe, coût, sécurité,...). Elle pourra décliner les modalités de mise en œuvre (opérationnalisation) en lien avec les objectifs de formations ambitionnés, les activités effectuées par les étudiants, les documents supports de ces activités, les évaluations. Des aspects interdisciplinaires peuvent également nourrir l'analyse des choix pédagogiques et opérationnels adoptés.

La deuxième épreuve place les candidats dans la réalisation d'activités technologiques. Elle est redoutable pour plusieurs raisons : tout d'abord, par sa durée, 8 heures, mais aussi par le fait qu'elle couvre des secteurs imposés et divers des biotechnologies. Ainsi, cette année, les candidats devaient mettre en œuvre des activités technologiques en biologie cellulaire, microbiologie, biologie moléculaire et enzymologie. Si les manipulations proposées se voulaient évaluer des compétences technologiques et techniques de base, elles obligeaient une polyvalence, une adaptabilité et une aptitude à intégrer rapidement des protocoles opératoires parfois totalement nouveaux pour certains candidats. En effet, certains professeurs, en poste depuis de nombreuses années sur des responsabilités parfois identiques d'années en années, éprouvent des difficultés à aborder des domaines nouveaux ou oubliés du laboratoire. Il est donc conseillé aux futurs candidats de réinvestir des techniques non pratiquées depuis quelques années mais aussi de s'informer, voire mettre en œuvre, des méthodologies et techniques récentes. Ainsi, le sujet de la présente session plaçait notamment les candidats dans la réalisation d'une PCR et d'un travail de biologie cellulaire au PSM, techniques maintenant exécutées en routine dans les laboratoires mais pouvant être déstabilisantes pour un candidat ne les ayant jamais réalisées.

D'autre part, l'épreuve ne se limitait pas à la mise en œuvre de protocoles opératoires mais demandait aussi de se placer dans une dimension métier de l'enseignant à travers des mises en situation. Ces dernières positionnaient le candidat dans la conception partielle d'un protocole ou la restitution de concepts technologiques en lien avec les manipulations effectuées.

Les candidats ont disposé d'une heure, à prendre en une seule fois ou fractionnée, afin de prendre un repas et de s'hydrater. L'ensemble couvrait donc 9 heures dont 8 heures d'activités technologiques.

Pour conclure cet avant-propos, j'espère sincèrement que ce rapport sera très utile aux futurs candidats à l'agrégation interne de biochimie-génie biologique.

Jean-Pascal DUMON  
Président du jury

# EPREUVES D'ADMISSIBILITE

## Première épreuve

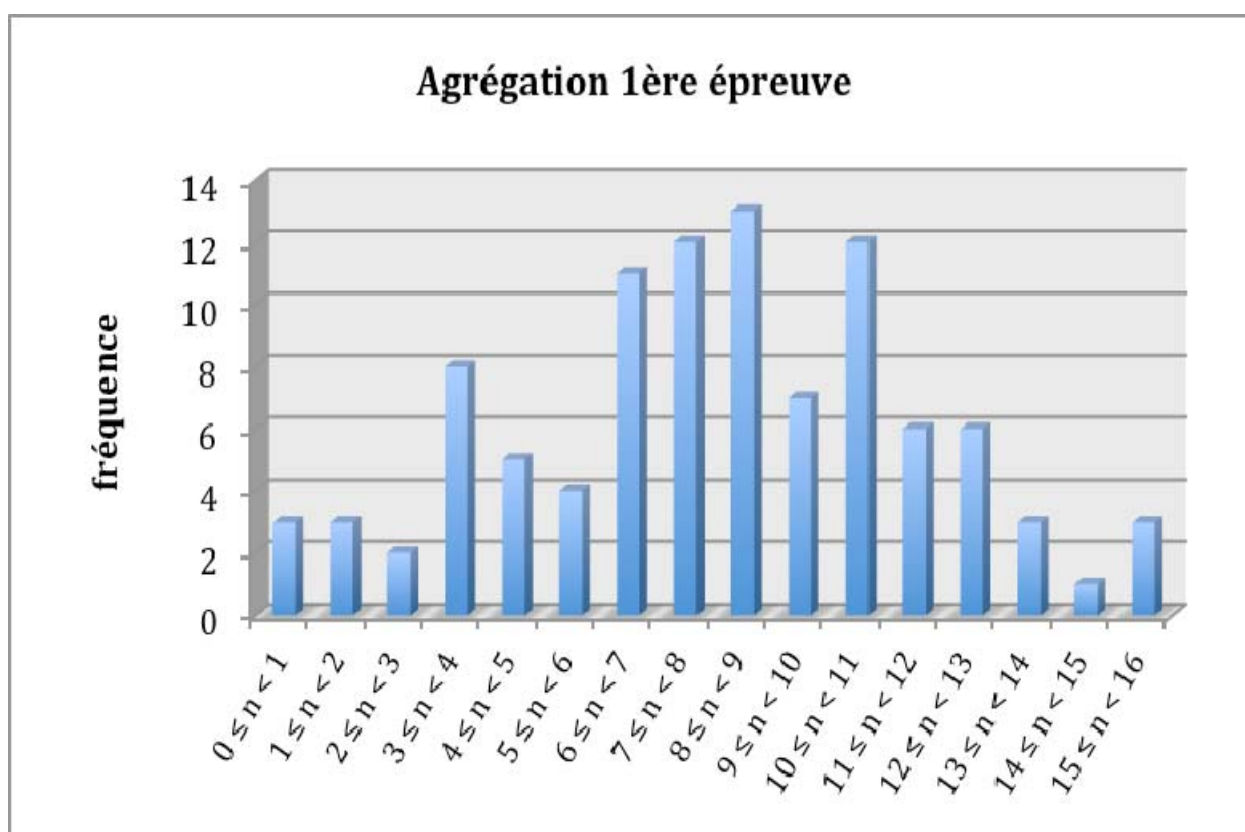
Durée : 6 heures

Coefficient : 1

Résultats :

Agrégation  
interne

intervalle	fréquence	intervalle	fréquence
$0 \leq n < 1$	3	$8 \leq n < 9$	13
$1 \leq n < 2$	3	$9 \leq n < 10$	7
$2 \leq n < 3$	2	$10 \leq n < 11$	12
$3 \leq n < 4$	8	$11 \leq n < 12$	6
$4 \leq n < 5$	5	$12 \leq n < 13$	6
$5 \leq n < 6$	4	$13 \leq n < 14$	3
$6 \leq n < 7$	11	$14 \leq n < 15$	1
$7 \leq n < 8$	12	$15 \leq n < 16$	3

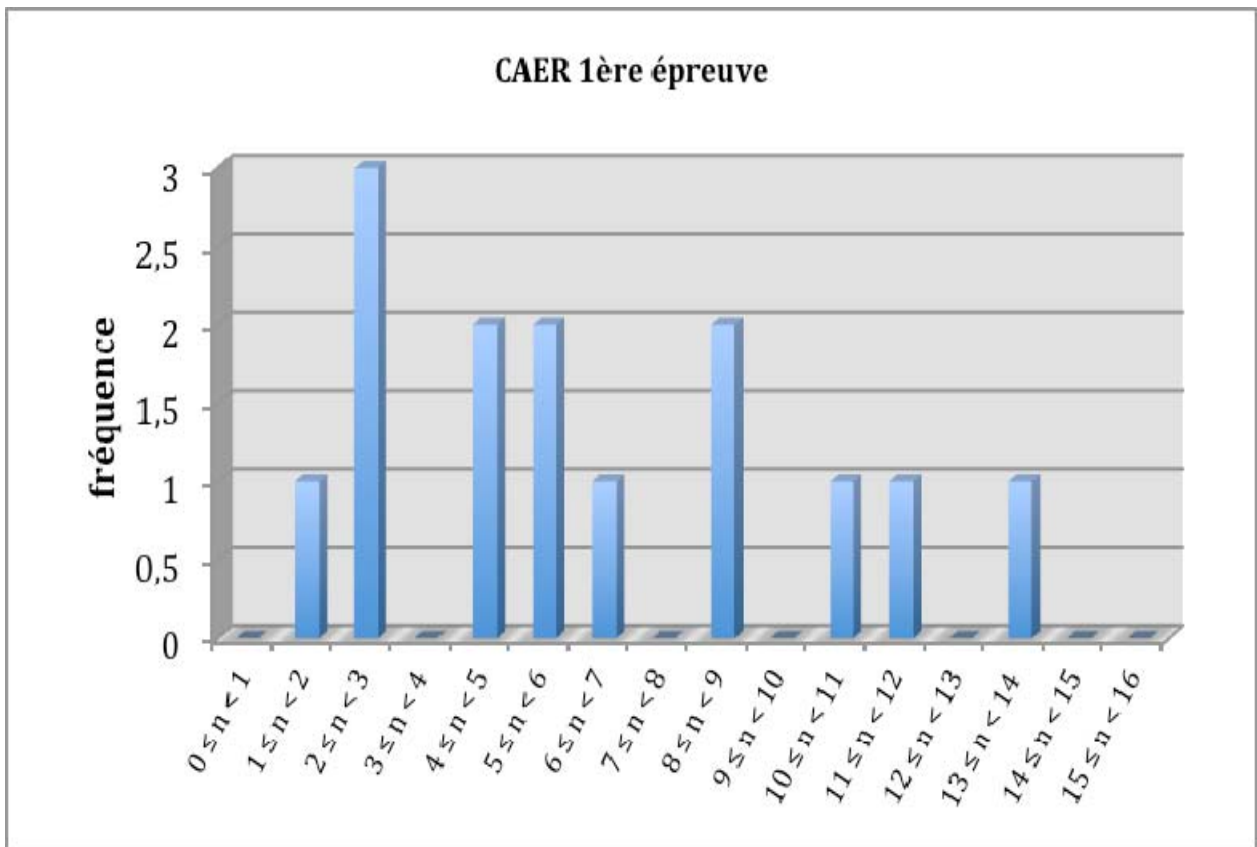




Résultats :

CAER  
agrégation

intervalle	fréquence	intervalle	fréquence
$0 \leq n < 1$	0	$8 \leq n < 9$	2
$1 \leq n < 2$	1	$9 \leq n < 10$	0
$2 \leq n < 3$	3	$10 \leq n < 11$	1
$3 \leq n < 4$	0	$11 \leq n < 12$	1
$4 \leq n < 5$	2	$12 \leq n < 13$	0
$5 \leq n < 6$	2	$13 \leq n < 14$	1
$6 \leq n < 7$	1	$14 \leq n < 15$	0
$7 \leq n < 8$	0	$15 \leq n < 16$	0



## Sujet

### Première partie

Respiration acétique sur substrat éthanol chez *Acetobacter pasteurianus*.

Les bactéries acétiques sont des bactéries aérobies, exploitées notamment pour la fabrication du vinaigre. Le séquençage du génome complet d'une souche d'*Acetobacter pasteurianus* a permis d'établir un schéma métabolique complet, dont celui des chaînes respiratoires.

Les **documents 1, 2 et 3** présentent différentes informations relatives au pyroséquençage, technique utilisée pour effectuer un séquençage à haut débit.

- C1** *Justifier l'utilisation du désoxy adénosine  $\alpha$ -thio triphosphate (dATP-S) à la place du dATP pour la réaction de polymérisation.*
- C2** *Etablir le lien entre les paramètres cinétiques des enzymes utilisées et les différents temps réactionnels. Proposer éventuellement des données complémentaires à celles du document 2 qu'il aurait été intéressant d'avoir.*
- C3** *Ecrire la séquence correspond au pyrogramme du document 3.*

La prédiction automatique des gènes impliquée dans la respiration acétique chez *A pasteurianus* a donné lieu à une publication, dont deux extraits sont présentés sur le **document 4**.

- C4** *A l'aide des éléments figurant sur le document 4, expliciter les étapes de l'analyse génétique conduite. .*

A l'issue d'une leçon en STS bioanalyses et contrôles, exposant la phosphorylation oxydative, une évaluation vise à vérifier que les élèves sont capables d'adapter les notions acquises à un contexte atypique.

L'exercice support de l'évaluation est construit à partir des informations apportées par le **document 5**.

- P1** *Proposer un exemple d'exercice, préciser le déroulement de son exploitation en classe (support, nature des questions, organisation du travail, durée prévisionnelle) et justifier les choix pédagogiques.*

Les élèves des classes de terminale STL abordent également la régénération de l'ATP, mais à un niveau adapté aux attendus du programme officiel présenté sur le **document 6**.

- P2** *Utiliser les éléments documentaires précédents pour élaborer un exercice adapté aux exigences du programme de la classe de terminale. Comme précédemment, préciser le déroulement de son exploitation en classe (support, nature des questions, organisation du travail, durée prévisionnelle ....) et justifier les choix pédagogiques.*

## Deuxième partie

### Le lipopolysaccharide (LPS) au laboratoire

#### Identification et sérotypage des Salmonelles

Si le typage par méthode MLST (Multi Locus Sequence Typing) s'impose comme méthode universelle à l'heure actuelle, le sérotypage reste encore la méthode de référence pour l'identification des Salmonelles.

Le sérotypage met en œuvre une réaction d'agglutination entre les anticorps spécifiques et les motifs antigéniques de surface, dont l'antigène O du LPS.

Le **document 7**, sera utilisé pour contextualiser une situation d'évaluation proposée aux étudiants de BTS Analyses de Biologie Médicale (U52 : sous-épreuve d'Analyses de Microbiologie Médicale, contrôle en cours de formation).

L'évaluation vise à vérifier les acquis technologiques relatifs à la compétence C34 (**document 8**)

- P3** *Proposer un exemple de document support de l'évaluation à destination des étudiants (contexte et informations utiles à la sous-épreuve de CCF).  
Présenter les grandes lignes de la structure de la situation d'évaluation  
Indiquer de façon précise les points critiques à prendre en compte pour leur évaluation.*

#### Etude d'un kit de détection du LPS

Composant majeur de la paroi des bactéries à Gram négatif, le LPS est impliqué dans des processus inflammatoires. Le **document 9** illustre cette action.

On se propose d'étudier **un kit de détection du LPS**, basée sur l'activation de son récepteur « **Toll-Like Receptor 4** », TLR4. La fiche technique de ce kit est fournie dans le **document 10**.

- C5** *A partir des informations fournies par la fiche technique, schématiser le principe du test de détection du LPS .*

Le kit étudié pour la détection du LPS met en œuvre des cellules HEK recombinées, ce qui nécessite de respecter le niveau de biosécurité 2.

- C6** *Présenter les principales précautions et contraintes liées au « niveau de biosécurité 2 ».*

La performance du kit a fait l'objet de plusieurs études dont les conditions et les résultats sont présentés dans le **document 10**.

- C7** *Analyser les résultats présentés en page 15. Discuter en particulier les résultats obtenus avec le TNF  $\alpha$ .*

- C8** *Proposer des exemples possibles de résultats faussement positifs et faussement négatifs*

La fiche technique du kit étudié peut servir de support pour évaluer les aspects technologiques de la culture cellulaire en BTS biotechnologies. (Compétence 1-9 : mettre en oeuvre des techniques de génie cellulaire)

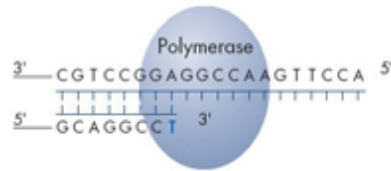
- P4** *Construire une évaluation écrite destinée à vérifier le « savoir faire » technique associé à la culture cellulaire.  
Les questions posées devront s'appuyer sur la fiche technique du kit, et pour une durée qu'il conviendra de préciser.  
Indiquer les éléments de corrigé attendus.*

## Document 1

### Principe du pyroséquençage

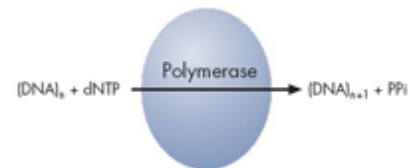
#### Etape 1

Une amorce de séquençage est hybridée à la matrice d'ADN simple brin obtenue par PCR, et incubée en présence d'ADN polymérase, d'ATP sulfurylase, de luciférase, d'apyrase ainsi que d'adénosine 5' phosphosulfate (APS) et de luciférine.



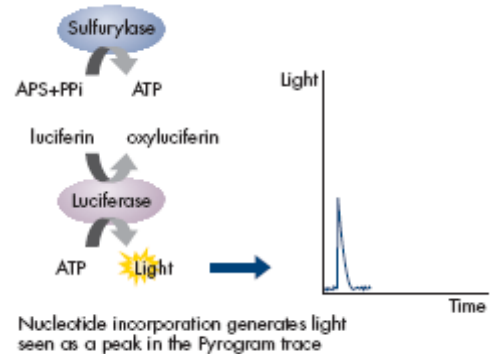
#### Etape 2

Un premier désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP) est ajouté. S'il correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse. Son incorporation s'accompagne de la libération quantitative de pyrophosphate (PPi).



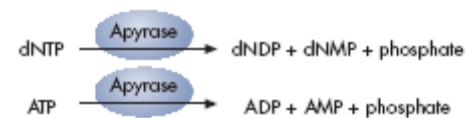
#### Etape 3

L'ATP sulfurylase catalyse la formation d'ATP à partir du PPi libéré et d'APS. L'ATP permet alors la transformation de la luciférine en oxyluciférine en présence de la luciférase ce qui génère un signal lumineux dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ATP mise en jeu. Sur le pyrogramme, ce signal lumineux se traduit par un pic dont la hauteur est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés.



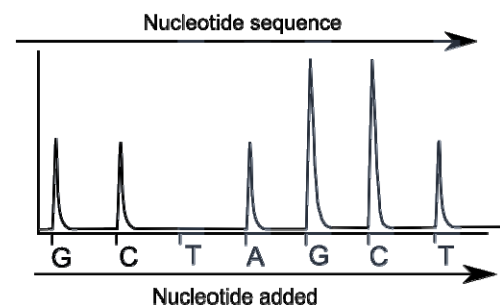
#### Etape 4

L'apyrase, une nucléase, catalyse la dégradation, en continu, des nucléotides qui ne se sont pas incorporés et de l'ATP. Une fois ceux-ci éliminés, un nouveau nucléotide est ajouté.



#### Etape 5

Les nucléotides sont ajoutés les uns après les autres. Il faut noter qu'à la place du dATP, on utilise le désoxyadénosine alpha-thio triphosphate (dATP-S) qui est également un substrat de l'ADN polymérase mais n'est pas reconnu par la luciférase. Au fil des différents ajouts, le brin complémentaire s'allonge et la séquence est déterminée par la lecture du pyrogramme.



## Document 2

Données relatives aux enzymes utilisées pour le pyroséquençage

Enzyme	Substrats	Km ( $\mu\text{M}$ )
Klenow polymerase [1]	dCTP, dGTP, dTTP, dATP-S	3
ATP sulfurylase	PPi	7
Firefly luciferase	ATP	3
Apyrase	dCTP, dGTP, dTTP, dATP-S ATP	50 120

### [1] Remarques :

- Km :

Perte de fidélité de la Klenow polymérase avec l'augmentation de la concentration, en substrat, en particulier aux concentrations trop supérieures à Km.

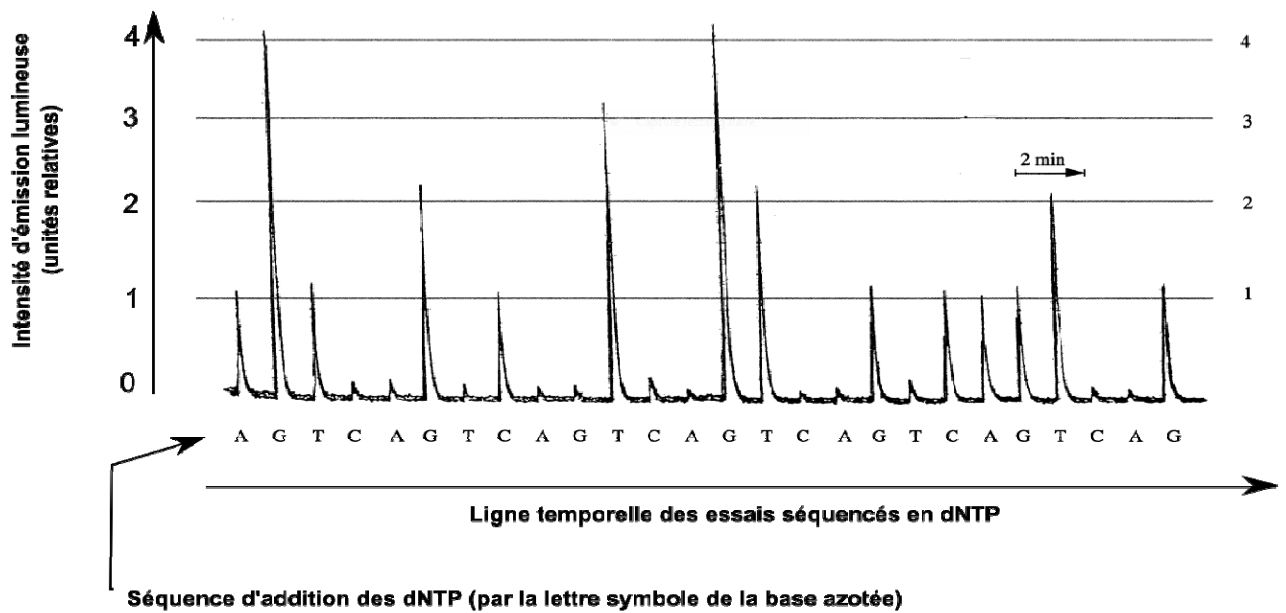
- Milieu réactionnel de pyroséquençage :

A chaque itération, le dNTP testé est ajouté à une concentration voisine du Km de la polymérase.

*D'après A. Agah, M. Aghajan, F. Mashayekhi, S. Amini, R. W. Davis, J. D. Plummer, M. Ronaghi and P. B. Griffin ; A multi-enzyme model for pyrosequencing Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 21 et les données de la base BRENDA, entrée EC 3.6.1.5 Apyrase, Solanum tuberosum.*

## Document 3

Pyroséquençage, exemple de résultat en temps réel



## Document 4

Constituants de chaîne respiratoire chez *Acetobacter pasteurianus* 386B obtenus après le séquençage du génome complet et son analyse

### A) Analyse du génome complet et annotation

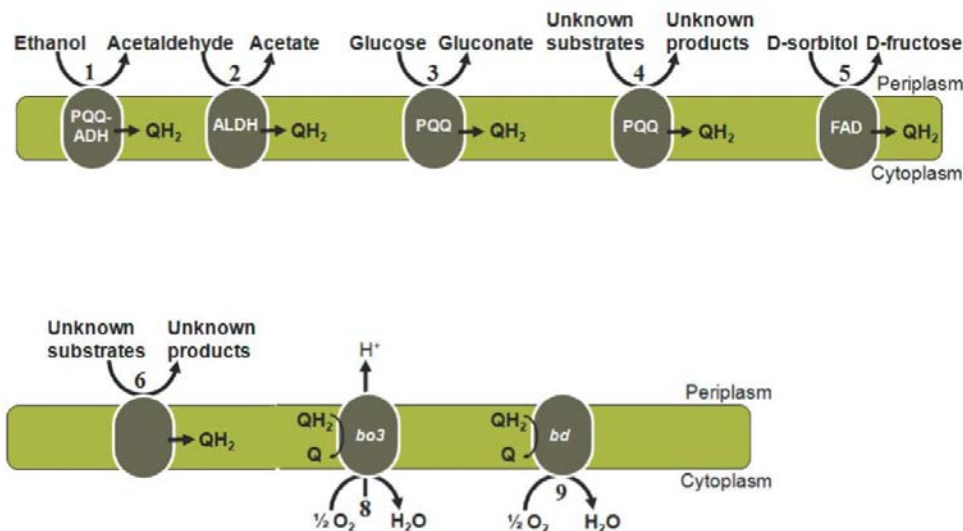
[...] le chromosome circulaire d'une taille de 2 818 679 paires de base et les sept plasmides dont la taille varie de 3 851 à 194 780 paires de base [...]. La recherche de gènes et l'annotation du génome de *A. pasteurianus* 386 B à l'aide de l'application GenDB a permis d'identifier 2595 séquences codant pour des protéines (CDS) pour le chromosome et 280 pour les plasmides. De plus, 5 opérons d'ARN ribosomiaux (*rm*) ont été détectés et 57 gènes codant pour des ARNt ont été prédits. Aucune séquence répétée de type CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) n'a été détectée [...]

La prédiction automatique de gènes et l'annotation de la séquence complète du génome ont été effectuées en utilisant une version du système d'annotation du génome bactérien GenDB v2.2. Une stratégie de prédiction de gènes combinant l'utilisation des programmes GLIMMER 2.1 et CRITICA a été adoptée. Les sites potentiels de liaison des ribosomes et les gènes codant pour les ARNt ont été identifiés avec les outils RBSfinder et tRNAscan -SE. Les protéines déduites ont été caractérisées d'un point de vue fonctionnel grâce à l'application REGANOR qui effectue des recherches automatisées dans les bases de données publiques, y compris SWISS-PROT et TrEMBL, Pfam, KEGG et TIGRFAM. En outre, les applications SignalP (détection de « peptide signal »), helix- turn-helix (identification des motifs de liaison à l'ADN en structure hélice-tour-hélice) et TMHMM (détection de domaines transmembranaires) ont été utilisées. Chaque gène a été classé selon sa fonction en lui attribuant un numéro de cluster de groupes orthologues (COG) et un numéro d'ontologie de gène (GO). Les résultats obtenus pour la prédiction des gènes et l'annotation de la séquence ont été ensuite vérifiés manuellement. Pour corriger les annotations excessives, les CDS courtes ne présentant pas d'annotation fonctionnelle, ayant des scores de confiance faibles déduits par la plate-forme GenDB et présentant des chevauchements avec d'autres CDS ont été éliminées de l'annotation finale. Une cartographie du génome de *A. pasteurianus* 386B a été générée avec l'outil DNAPlotter. L'origine de réplication du chromosome de *A. pasteurianus* 386B a été prédite à l'aide de l'outil Ori-Finder. Les séquences répétées CRISPRs ont été recherchées avec l'outil CRISPRFinder ... ]

### B) Constituants de chaîne respiratoire chez *Acetobacter pasteurianus* 386B.

L'analyse du génome a permis de prédire et d'annoter des constituants de chaîne respiratoire chez *Acetobacter pasteurianus* 386B.

Quelques uns des constituants sont présentés dans la figure ci-dessous.



Membrane-bound PQQ- and FAD-dependent dehydrogenases: : (1) PQQ-dependent alcohol dehydrogenase ; (2) membrane-bound acetaldehyde dehydrogenase; (3) PQQ-dependent glucose dehydrogenase ; (4) uncharacterized PQQ-containing oxidoreductases; (5) FAD-dependent sorbitol dehydrogenase. (B) Membrane-bound oxidoreductases and terminal oxidases: (6) uncharacterized oxidoreductases ; (8) cytochrome *bo3* ubiquinol oxidase; (9) cytochrome *bd* ubiquinol oxidase.

Adapté de K. Illegheems, L. De Vuyst, S. Weckx ; Complete genome sequence and comparative analysis of *Acetobacter pasteurianus* 386B, a strain well-adapted to the cocoa bean fermentation ecosystem ; BMC Genomics. 2013; 14: 526

## Documents 5

### 5 a Extrait du référentiel du BTS bioanalyses et contrôles

#### Module 3 Bioénergétique

Contenus	Commentaires
1. Variation d'enthalpie d'une réaction	
2. Réactions exergoniques et endergoniques	
3. Cas des réactions d'oxydo-réduction	On donnera la loi de Nernst et la relation $\Delta G'_0 = -n F \Delta E'_0$
4. Couplage énergétique, composés riches en énergie	On définira l'énergie de liaison et la notion de "liaison riche en énergie". On montrera la diversité des composés à vocation énergétique.
5. Formation d'ATP dans les mitochondries, les chloroplastes et les bactéries	
5.1. Phosphorylation oxydative mitochondriale	Le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale sera exposé en envisageant la nature, le rôle et la localisation membranaire des constituants. On montrera l'obtention d'un gradient protomoteur au niveau des complexes et le rôle de l'ATP synthase.  <i>En liaison avec le cours de microbiologie.</i> On montrera que le site des réactions diffère chez les procaryotes (au sein de la membrane plasmique) et chez les eucaryotes (thylakoïdes des chloroplastes, mitochondries). On notera que la chaîne respiratoire est également le site privilégié de la régénération de l'ATP chez les bactéries.
5.2. Photophosphorylation et photosynthèse	
5.3. Phosphorylation oxydative bactérienne	

### 5 b Texte proposé aux étudiants

Dans la respiration acétique, l'alcool déshydrogénase (ALDH) et l'acétaldéhyde déshydrogénase (ADH) sont deux complexes respiratoires impliqués dans l'oxydation de l'éthanol en acide acétique. Les deux complexes ont été caractérisés et l'on a constaté que l'éthanol et l'acétaldéhyde (éthanal) étaient oxydés au niveau de la surface externe de la membrane cytoplasmique. L'ubiquinone (Q), soluble dans la membrane, est réduite en ubiquinol (QH<sub>2</sub>) en présence de l'ALDH et de l'ADH. Le dernier complexe de la chaîne respiratoire est l'ubiquinol oxydase qui catalyse l'oxydation du QH<sub>2</sub>. Le dioxygène est l'accepteur final d'électrons de l'ubiquinol oxydase.

## Document 6

Extraits du programme de Chimie Biochimie Sciences du vivant de la classe de terminale STL

### Thème 2 - Les systèmes vivants échangent de la matière et de l'énergie

Le maintien de l'intégrité biologique des systèmes vivants nécessite qu'ils entretiennent avec le milieu les échanges indispensables à la couverture de leurs besoins en nutriments et en énergie. La thermodynamique permet de rendre compte des aspects énergétiques des transformations chimiques intervenant lors du métabolisme (hydrolyse, oxydoréduction, synthèse de biomolécules) et du rôle qui y est joué par l'ATP. La spécificité des réactions mises en œuvre dans le métabolisme est assurée grâce aux enzymes, les catalyseurs biologiques.

#### 2.5 Les systèmes vivants assurent leur activité et maintiennent leur intégrité en utilisant des voies métaboliques variées

Connaissances	Capacités
<p>Une voie métabolique est une suite de transformations chimiques catalysées par des enzymes.</p> <p>Lors d'une <b>transformation chimique</b> en solution, un <b>système fermé</b> évolue vers un état d'équilibre chimique.</p> <p>Cet <b>état d'équilibre</b> dépend de l'état initial et de la constante d'équilibre <math>K(T)</math>, caractéristique de la réaction.</p> <p>Une réaction est favorisée quand la valeur de la constante d'équilibre <math>K(T)</math> est élevée, c'est-à-dire quand l'<b>enthalpie libre standard de réaction</b> <math>\Delta_r G^0(T)</math> est négative.</p> <p>Le <b>déplacement</b> de l'état d'équilibre d'un système peut être provoqué en faisant varier les conditions opératoires : température, excès d'un réactif ou élimination d'un produit.</p>	<p><b>Mettre en œuvre des activités expérimentales</b> et exploiter des ressources documentaires pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- reconnaître le type de système étudié : isolé, fermé, ouvert, stationnaire ;</li> <li>- <b>déterminer l'état final d'un système</b>, dans le cas d'une réaction acide-base ou d'une réaction d'estérification-hydrolyse ;</li> <li>- exprimer le quotient réactionnel <math>Q_r</math> et le comparer à la constante d'équilibre <math>K(T)</math>, par exemple <math>K_A</math> pour la réaction de dissociation d'un acide dans l'eau ;</li> <li>- mettre en relation l'état final avec le caractère total ou limité d'une transformation ;</li> <li>- identifier les facteurs d'influence d'un état d'équilibre ;</li> <li>- proposer un protocole pour déplacer un état d'équilibre.</li> </ul>

## Document 7

<p>Dans la cellule, les réactions d'oxydation des substrats conduisent à la synthèse d'ATP.</p> <p>La réaction endergonique de phosphorylation de l'ADP en ATP nécessite un couplage :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- soit avec une transformation chimique comportant une oxydoréduction (couplage chimio-chimique) ;</li> <li>- soit avec un <b>transport de protons</b> dans le sens du gradient de concentration transmembranaire (couplage osmo-chimique).</li> </ul>	<p>Exploiter des ressources documentaires pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- identifier la nature du couplage énergétique mis en jeu lors d'une synthèse d'ATP ;</li> <li>- schématiser une synthèse d'ATP par couplage osmo-chimique.</li> </ul>
<p>Le <b>métabolisme cellulaire</b> est constitué par l'ensemble des voies métaboliques d'une cellule.</p> <p>L'ensemble des voies conduisant à la dégradation de substrats et à la production d'ATP est appelé le <b>catabolisme</b>.</p> <p>L'ensemble des voies conduisant à la synthèse de molécules constitutives de l'organisme est appelé <b>anabolisme</b>.</p>	<p>Exploiter des ressources documentaires pour</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- localiser au sein de la cellule quelques voies cataboliques : glycolyse, cycle de Krebs, chaîne respiratoire ;</li> <li>- repérer et annoter les étapes d'oxydoréduction et de synthèse d'ATP des voies cataboliques : la glycolyse, le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire aérobie, la fermentation lactique ou alcoolique ;</li> <li>- établir les bilans d'énergie et de matière de l'utilisation du glucose par respiration et par fermentation ;</li> <li>- calculer un rendement énergétique en ATP ;</li> <li>- identifier une voie anabolique par la consommation d'ATP associée à l'utilisation de coenzymes réduits.</li> </ul>
<p>La <b>source d'énergie</b> permet de distinguer les phototrophes et les chimiotrophes.</p> <p>La <b>nature du donneur d'électrons</b> permet de distinguer les organotrophes et les lithotrophes.</p> <p>Les animaux et de nombreuses bactéries sont des organismes chimio-organotrophes.</p>	<p><b>Mettre en œuvre un protocole expérimental (EXAO)</b>, exploiter des ressources documentaires pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- identifier le type trophique énergétique d'un organisme par l'étude des conditions permettant sa croissance ;</li> <li>- repérer, sur un schéma simple de la phase claire de la photosynthèse, les rôles du donneur d'électrons <math>H_2O</math> et de la lumière ainsi que la production d'ATP et de coenzyme réduit.</li> </ul>



Extraits d'une étude relative au portage de *Salmonella* par des enfants en adoption internationale depuis Bamako vers la France, sur une période de 84 mois.

*Salmonella* est très fréquemment rencontrée chez les enfants du Mali.

[...]

#### **Matériel et méthodes**

**Des échantillons de selles d'enfants adoptés en provenance d'un orphelinat de Bamako (Mali) et de tous les membres de leurs familles adoptives ont été prélevés lors de leur première visite chez le médecin puis tous les mois en vue d'un dépistage de *Salmonella*. Les bactéries ont été caractérisées par des méthodes biochimiques classiques, des sérotypages, des antibiogrammes et des PFGE. Les gènes de la  $\beta$ -Lactamase ont été recherchés par PCR.**

#### **Résultats**

[...] 55 familles ayant adopté 61 enfants de l'orphelinat d'état de Bamako ont été suivies (6 familles ont adopté 2 enfants). Parmi 30 familles, un total de 92 isollements de *Salmonella* provenant de 29 enfants adoptés et de 3 mères ont été récupérés; l'enfant adopté d'une des 3 mères n'a pas été colonisé par *Salmonella* [...] Parmi ces 92 salmonelles identifiées, 41 n'étaient pas des doublons, 17 étaient des Balbelsberg (41,4%), 14 étaient des Enteritidis (34,1%), 2 étaient des Havana (4,8%), 2 étaient des Senftenberg (4,8%), 1 était des Bergen (2,4%), 1 était un Reading (2,4%), 2 étaient des Tel-el-kebir (4,8%), 1 était un Colindale (2,4%) et 1 était un Waycross (2,4%) [...]. Pour quatre enfants adoptés, deux sérovars ont été trouvés. Treize porteurs sur 32 (40,6%) étaient symptomatiques à leur arrivée : 10 avaient une diarrhée fébrile, 1 une pyélonéphrite, 1 une ostéite et 1 une méningite ayant entraîné la mort de l'enfant.

[...]

#### **- Plan d'étude, souches bactériennes et typage sérologique**

[...] Des échantillons de selles de tous les enfants adoptés et des membres de leur famille ont été prélevés à la première visite puis tous les mois. Les échantillons ont été envoyés au laboratoire de microbiologie pour être analysés. Deux écouvillons de culture (Cultureswab™ EZ ; BD Diagnostic Systems, Le Pont de Claix, France) ont été utilisés pour chaque échantillon de selles. L'un a permis d'ensemencer un milieu de Drigalski (AES, Bruz, France). Le deuxième a été plongé dans 10 mL de bouillon de tétrathionate de Muller-Kauffmann pour l'enrichissement en *Salmonella* (Bio-Rad, Marnes-La-coquette, France). Après une nuit d'incubation, un volume de 100  $\mu$ L a été étalé sur un milieu chromogène spécifique de *Salmonella* (ASAP ; AES) et sur un milieu de Drigalski (AES) additionné de 1 mg.L<sup>-1</sup> de ceftazidime. Après une nuit de culture, cinq colonies présentant des morphologies de *Salmonella* ont été systématiquement identifiées à l'aide de tests classiques dont la coloration de Gram, l'utilisation de galerie API20E (bioMérieux, Carponne, France) et les tests d'agglutination avec des particules de latex selon la procédure de Kauffman-White. Certains isollements pour lesquels l'identification était incertaine ont été soumis au Centre de Référence National Français pour *Salmonella* (CRNF-salmonella), Institut Pasteur, Paris, France. Des isollements d'un même patient sont considérés comme doublons s'ils possèdent les mêmes sérotype/profil PFGE et phénotype de résistance. Le suivi a cessé dès lors que les échantillons de selles sont devenus négatifs lors de trois criblages consécutifs. Cette étude a été approuvée par le Comité d'Éthique de l'Hôpital Universitaire de Brest et un consentement écrit éclairé a été obtenu de toutes les familles.

*Note : PFGE = typage par "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (Electrophorèse en champ pulsé)*

*D'après Salmonella carriage in adopted children from Mali: 2001–08 , Sylvie Boisramé-Gastrin, Didier Tandé, Marie-Reine Münck,Stéphanie Gouriou, Patrice Nordmann and Thierry Naas ; Journal of Antimicrobial Chemotherapy,(2011) 66(10):2271-2272 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803770>*

## Document 8

Extrait du référentiel du BTS Analyses de Biologie Médicales

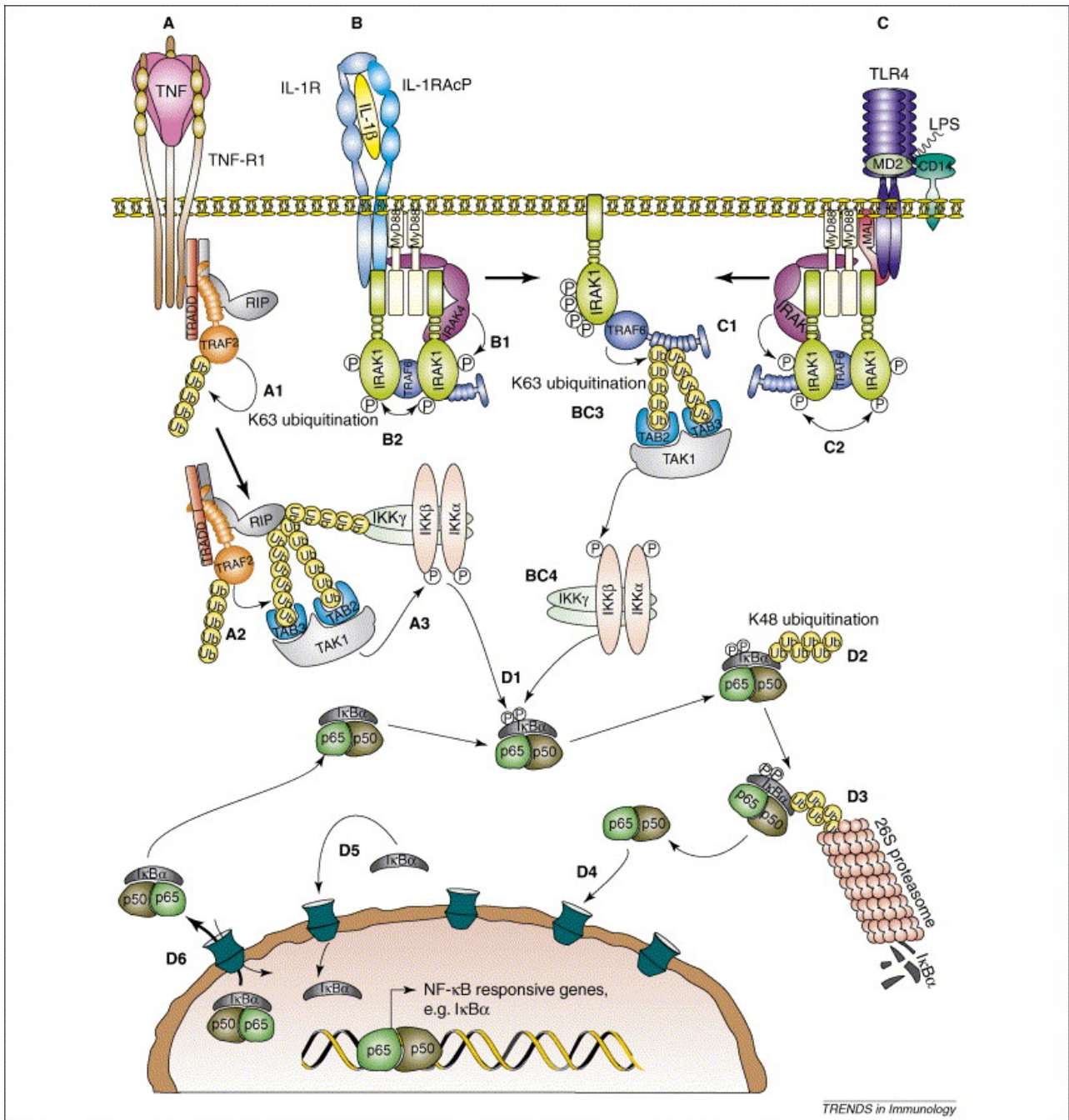
CAPACITE : C3 – REALISER
COMPETENCE : C3.4. Réaliser des analyses microbiologiques sur des échantillons

Compétence détaillée	Données	Indicateurs d'évaluation
C3.4.1. Mettre en œuvre un mode opératoire en fonction de l'urgence des résultats	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Echantillons biologiques</li> <li>- Contexte clinique</li> <li>- Urgence du résultat</li> <li>- Matériel de laboratoire, produits et réactifs</li> <li>- Modes opératoires y compris modes opératoires de détection par des techniques immunologiques, et des techniques de marquage de gènes</li> <li>- Equipements de protection individuelle et collective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respect des procédures de sécurité</li> <li>- Pertinence du choix méthodologique</li> <li>- Gestion du temps en fonction de l'urgence du diagnostic</li> <li>- Qualité de l'exécution du mode opératoire</li> <li>- Présentation et exploitation correctes des résultats</li> </ul>
C3.4.2. - Réaliser les examens macroscopiques et microscopiques sur l'échantillon biologique ayant subi ou non un traitement préalable - Interpréter les observations réalisées	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Echantillon biologique</li> <li>- Matériel et réactifs</li> <li>- Documents et modes opératoires relatifs à l'étude de l'échantillon</li> <li>- Equipements de protection individuelle et collective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respect des procédures de sécurité</li> <li>- Qualité des préparations</li> <li>- Pertinence des observations et de leur interprétation</li> <li>- Présentation correcte des résultats</li> </ul>
C3.4.3. - Estimer quantitativement la population bactérienne - Quantifier et identifier si nécessaire les cellules accompagnatrices - Interpréter les résultats	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Echantillons trachéobronchiques, urines, liquides de ponction</li> <li>- Matériel de laboratoire, milieux de culture et réactifs</li> <li>- Documents et modes opératoires relatifs à l'étude de l'échantillon</li> <li>- Equipements de protection individuelle et collective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respect des procédures de sécurité</li> <li>- Qualité de l'exécution technique</li> <li>- Obtention de résultats exacts</li> <li>- Pertinence des interprétations et des conclusions</li> <li>- Présentation et exploitation correctes des résultats</li> </ul>

C3.4.4. Réaliser l'isolement	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Echantillons biologiques</li> <li>- Résultats des examens macroscopiques et microscopiques</li> <li>- Documents relatifs aux milieux de culture et aux caractères cultureux des microorganismes</li> <li>- Milieux de culture</li> <li>- Matériels et équipements nécessaires</li> <li>- Equipements de protection individuelle et collective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respect des procédures de sécurité</li> <li>- Choix pertinent et justifié des milieux et des conditions d'incubation</li> <li>- Qualité de la réalisation technique des isolements.</li> <li>- Respect des conditions d'incubation</li> </ul>
C3.4.5. Mettre en œuvre une démarche d'identification	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résultats des examens macroscopiques et microscopiques</li> <li>- Isolements effectués à partir des échantillons</li> <li>- Réactifs pour tests d'orientation</li> <li>- Galeries ou dispositifs d'identification</li> <li>- Documents relatifs à l'identification</li> <li>- Matériels et réactifs nécessaires</li> <li>- Fiches de données de sécurité</li> <li>- Equipements de protection individuelle et collective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respect des procédures de sécurité</li> <li>- Qualité de l'étude effectuée sur les colonies isolées</li> <li>- Qualité de la réalisation des tests d'orientation</li> <li>- Pertinence de l'orientation du diagnostic et de son argumentation</li> <li>- Pertinence des choix méthodologiques mis en œuvre pour l'identification</li> <li>- Qualité de la réalisation technique de l'identification</li> <li>- Exactitude de la lecture des résultats</li> <li>- Pertinence des critères retenus pour leur validation</li> <li>- Présentation et exploitation correctes des résultats</li> </ul>
C3.4.6. Mettre en œuvre des examens complémentaires d'identification phénotypique et/ou génotypique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résultats des examens préalablement effectués</li> <li>- Milieux de culture, réactifs matériels,</li> <li>- Documents utiles à la réalisation et à l'interprétation des tests</li> <li>- Equipements de protection individuelle et collective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respect des procédures de sécurité</li> <li>- Justification de la mise en œuvre de l'examen complémentaire</li> <li>- Qualité de la réalisation technique et de l'interprétation des résultats.</li> </ul>

## Document 9

Voies de signalisation intracellulaires induites par le TNF, l'IL-1 et le LPS.



## TABLE OF CONTENTS

Introduction .....	3
Kit Description .....	3
Procedures summary .....	5
Kit Information	
- Contents .....	6
- Storage and stability .....	6
Additional Materials Required	
- Reagents required .....	6
- Supplies required .....	7
Safety Consideration .....	7
Preparation and Storage of Reagents .....	8
Handling Procedures of HEK-Blue™-4 Cells	
- Frozen cells .....	9
- Cell maintenance .....	10
- Storage of cells .....	10
LPS Detection Procedure	
- Reagents required .....	11
- Sample preparation .....	11
- Cell handling procedure .....	11
- Reading and interpretation .....	13
Specificity and Sensitivity .....	14
Troubleshooting Guide .....	16
Use Restrictions .....	18
References .....	18
Related Products .....	19

## INTRODUCTION

Lipopolysaccharide (LPS), the major cell wall component of gram-negative bacteria, induces the activation of NF- $\kappa$ B and the production of proinflammatory cytokines<sup>1</sup>.

*In vivo*, this response can cause fever, septic shock and eventually death of the animal<sup>2</sup>.

*In vitro*, it can introduce a bias in experiments involving cells sensitive to low levels of LPS such as monocytes. In addition, repeated passages of cell lines in a medium containing LPS might render these cells unresponsive to further stimulation by LPS. This desensitization of the cells, termed LPS tolerance<sup>3</sup>, does not only affect inflammatory responses but also other essential functions including antigen presentation by monocytes<sup>4</sup>. Thus, monitoring the presence of LPS in biological reagents is crucial. InvivoGen provides the HEK-Blue™ LPS Detection Kit, a simple, rapid and reliable system to detect the presence of lipopolysaccharides in your samples.

## KIT DESCRIPTION

The HEK-Blue™ LPS Detection kit is based on the ability of TLR4 to recognize structurally different LPS from gram-negative bacteria and in particular lipid A, their toxic moiety. Proprietary cells engineered to become extremely sensitive to LPS, called HEK-Blue™-4 cells, are the main feature of the HEK-Blue™ LPS detection kit. The presence of very low concentrations of LPS, starting as low as 0.3 ng/ml, is detected by the HEK-Blue™-4 cells leading to the activation of NF- $\kappa$ B. Using HEK-Blue™ Detection, a specific detection medium, NF- $\kappa$ B activation can be observed with the naked eye or quantified spectrophotometrically.

This simple detection test requires only basic cell culture knowledge and may be easily established as a routine procedure in the lab.

### HEK-Blue™-4 Cells

HEK-Blue™-4 cells are engineered HEK293 cells stably transfected with multiple genes involved in TLR4 recognition that include TLR4 and the co-receptors MD2 and CD14 (see "Specificity and Sensitivity", pages 15-16). In addition, HEK-Blue™-4 cells stably express an optimized alkaline phosphatase gene engineered to be secreted (sAP), placed under the control of a promoter inducible by several transcription factors such as NF-κB and AP-1.

This reporter gene allows the monitoring of the signaling through TLR4, based predominantly on the activation of NF-κB which reflects the presence of LPS in the sample to be tested. The phosphatase activity is detected by the use of HEK-Blue™ Detection medium.

### HEK-Blue™ Selection Mix

HEK-Blue™ Selection is a solution that combines several selective antibiotics. These antibiotics guarantee the persistent expression of the various transgenes introduced in HEK-Blue™-4 cells. Furthermore, Normocin™ is included in the kit to protect HEK-Blue™-4 cells from any potential microbial contamination, whether caused by mycoplasma, bacteria or fungi.

### HEK-Blue™ Detection

HEK-Blue™ Detection is a medium specifically designed for the detection of NF-κB activation in HEK-Blue™ cells. This medium turns into a blue color in the presence of phosphatase activity. The product of the reaction with the substrate is cytotoxic and results in the death of the cells.

HEK-Blue™ Detection is a powdered medium provided in individually sealed pouches. Each pouch allows the preparation of 50 ml of detection medium.

### E. coli K12 LPS

The sensitivity of the kit can be assessed by using serial dilutions of *E. coli* K12 LPS prepared in endotoxin-free water. A positive response should be obtained for a final concentration  $\geq 0.3$  ng/ml.

## PROCEDURES SUMMARY

### Handling procedure of HEK-Blue™-4 cells

1. Thaw HEK-Blue™-4 cells
- ↓
2. Expand HEK-Blue™-4 cells in the presence of HEK-Blue™ Selection
- ↓
3. Make your frozen stock of HEK-Blue™-4 cells

### LPS detection procedure

1. Grow HEK-Blue™-4 cells up to 60-80% confluence in growth medium supplemented with HEK-Blue™ Selection
  - ↓
  2. Prepared reagents following instructions (HEK-Blue™ Detection medium, diluted Trypsin-EDTA solution, positive controls).
  - ↓
  3. Warm up samples and controls at 37°C. Mix vigorously by vortexing. Add 20 µl of sample or control per well of a 96-well plate.
  - ↓
  4. Harvest cells and resuspend gently in HEK-Blue™ Detection medium.
  - ↓
  5. Add 200 µl ( $2.5 \times 10^4$  cells) of the cell suspension to each well.
  - ↓
  6. Incubate the plate(s) 18-24H at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.
  - ↓
  7. Assess the blue color by the naked eye or the OD at 620-655 nm.
- ↙ ↘
- |  |                           |
|--|---------------------------|
| Purple or blue color<br>=<br>Presence of LPS | Pink color<br>=<br>No LPS |
|--|---------------------------|

## KIT INFORMATION

### Contents

The HEK-Blue™ LPS Detection Kit contains the following components:

- 1 vial of HEK-Blue™ cells (3-5x 10<sup>6</sup> cells)
- 4 tubes of 250X HEK-Blue™ Selection (2 ml)
- 4 tubes of 500X Normocin™ (1 ml for 500 ml of culture medium)
- 2 pouches of HEK-Blue™ Detection
- 1 tube of *E. coli* K12 LPS (100 µg) as a positive control
- 1 tube of endotoxin-free water (1.5 ml) as a negative control

*Note:* Most components of the HEK-Blue™ LPS Detection kit can be purchased separately (see “Related Products” page 19).

### Storage and stability

- The HEK-Blue™ LPS Detection Kit is shipped on dry ice.
- Upon receipt HEK-Blue™ cells must be thawed **immediately** and grown according to handling procedures described on page 9.
- Store unopened HEK-Blue™-4 Selection, Normocin™ and *E. coli* K12 LPS at -20°C for up to 12 months.
- Store unopened HEK-Blue™ Detection and Endotoxin-free water at room temperature for up to 6 months.
- Resuspended and filtered HEK-Blue™ Detection is stable 2 weeks at 4°C and at least 2 months at -20°C when properly stored. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

## ADDITIONAL MATERIALS REQUIRED

### Reagents required

- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), high glucose (4.5 g/L)

*Note:* If using DMEM without glutamine, add 2 mM glutamine.

- Penicillin-Streptomycin solution
- Fetal Bovine Serum (FBS) without endotoxin

*Note:* For better results, we recommend using FBS from Hyclone (#SH30071-03) or Cambrex (#DE14-S01F).

- Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin, EDTA.4Na)
- Endotoxin-free water

*Note:* Most commercial spring waters are endotoxin-free.

- Phosphate buffered saline (PBS)
- Dimethylsulfoxide (DMSO)

### Supplies required

- Laminar flow hood
- Centrifuge
- Water bath (37°C)
- Inverted microscope
- CO<sub>2</sub> incubator
- Sterile cell culture plasticware: tubes, pipettes, 25 cm<sup>2</sup> and 175 cm<sup>2</sup> flasks, flat-bottom 96-well plates, tips.
- Cryotubes
- 250 ml sterile bottles
- 0.2 µm filters
- Counting cell (e.g. Malassez)

### Optional:

- Multichannel pipettes (200 µl or 300 µl) and autoclavable reagent reservoirs
- Freezing container
- Microplate reader with 655 nm filter

## SAFETY CONSIDERATION

The HEK-Blue™ LPS Detection Kit contains antibiotics and products of biological and bacterial origins that must be handled observing the usual safety precautions (wear appropriate protective equipment, do not ingest, do not inhale).

HEK-Blue™-4 cells require Biosafety Level 2.

Handle as a potentially biohazardous material under at least Biosafety Level 2 containment. This cell line is known to contain an agent associated with human disease. This cell line is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling and use. InvivoGen is not liable for damages or injuries resulting from receipt and/or use of an InvivoGen culture. Detailed discussions of laboratory safety procedures are provided in Laboratory Safety: Principles and Practices (Fleming et al., 1995), the ATCC manual on quality control (Hay et al., 1992), the Journal of Tissue Culture Methods (Caputo, 1988), and the U.S. Government Publication, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th ed. HHS publication No. (CDC) 93-8395. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Washington DC: U.S. Government Printing Office; 1999. The entire text is available online at [www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bml4/bml4toc.htm](http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bml4/bml4toc.htm).

*Note:* InvivoGen highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full mask always be worn when handling frozen vials.

## PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

All reagents should be prepared under sterile conditions according to good laboratory practices.

### Cell culture medium for HEK-Blue™ -4 Cells

- for thawing and recovery of the frozen cell line:

DMEM high glucose supplemented with 10% FBS, Penicillin-Streptomycin and 1X Normocin™ (Growth Medium). Warm at 37°C before use and store at 4°C.

*Note: The use of some FBS might affect the functionality of HEK-Blue™ -4 Cells, we recommend the use of FBS from Hyclone (# SH30071.03) or Cambrex (#DE14-801F).*

- for cell culture maintenance:

Growth medium supplemented with 1X HEK-Blue™ Selection. Warm at 37°C before use and store at 4°C.

- for freezing

Growth Medium supplemented with 10% sterile DMSO. Prepare extemporaneously, no storage.

### HEK-Blue™ Detection Medium

- Pour the contents of one pouch of HEK-Blue™ Detection in a 250 ml sterile bottle.
- Solubilize the powder with 50 ml of endotoxin-free water.
- Filter the medium on a 0.2 µm membrane in a 250 ml sterile bottle.
- Warm the HEK-Blue™ Detection medium at 37°C before use.

Reconstituted HEK-Blue™ Detection medium is stable 2 weeks at 4°C.

*Note: Alkalinization of HEK-Blue™ Detection medium observed during storage at 4°C does not alter its properties.*

### Preparation of diluted Trypsin-EDTA solution

- Mix 10 ml of Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin, EDTA.4Na) with 20 ml of PBS.
- Warm at 37°C before use and store at 4°C.

The solution is stable 3 days at 4°C and 6 months at -20°C.

*Note: HEK-Blue™ -4 cells functions are altered by the action of trypsin unless the solution is diluted. We strongly recommend the use of diluted trypsin for the preparation of HEK-Blue™ -4 cells before the LPS detection test.*

### Preparation of E. coli K12 LPS

- Prepare a 100 µg/ml solution of E. coli K12 LPS by adding 1 ml of endotoxin-free water to the content of the tube.

- Mix vigorously by vortexing as LPS may stick to the tube wall.

- Prepare serial dilutions of E. coli K12 LPS (10, 30, 100 ng/ml) in endotoxin-free water as positive controls.

- Warm at 37°C and mix vigorously before use.

Stock solution and dilutions are stable 6 months at 4°C.

## HANDLING PROCEDURES OF HEK-Blue™ -4 cells

HEK-Blue™ -4 cells are shipped on dry ice. Upon receipt the cells must be thawed immediately and grown according to the procedure described below.

*Note: Do not freeze the cells upon receipt as it may result in irreversible damages to the cell line.*

### Thawing of frozen HEK-Blue™ -4 cells

- Thaw the HEK-Blue™ -4 cells vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
- Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol.

All of the operations from this point should be carried out under strict aseptic conditions.

- Gently transfer the contents of the vial in a sterile tube containing 15 ml of growth medium and spin at 1500 rpm for 5 minutes.

- Remove the supernatant containing the cryoprotective agent and resuspend the cells with 1 ml of growth medium.

- Transfer the contents of the vial to a 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flask containing 5 ml of growth medium.

*Note: To avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells, place the tissue culture flask containing the growth medium into a CO<sub>2</sub> incubator for at least 15 minutes prior to the addition of the cells.*

- Place the flask at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator overnight.

- Follow the growth of the cells by daily observation of the culture with an inverted microscope. When 50-80% confluency is reached, trypsinize the cells and grow them in growth medium supplemented with 1X HEK-Blue™ Selection.

### Cell maintenance

- Maintain and subculture the cells in growth medium supplemented with 1X HEK-Blue™ Selection.
- Renew growth medium 2 to 3 times a week.
- Cells should be passaged when a 60-80% confluency is reached. Do not let the cell grow to 100% confluency.

*Note: The HEK-Blue™-4 cell line should not be passaged more than 30 times to remain fully efficient.*

### Storage of cells

After the recovery of the frozen cells we strongly recommend to expand the HEK-Blue™ -4 cells in 175 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks containing growth medium supplemented with 1X HEK-Blue™ Selection. Those cells can be frozen according to the following procedure to make your own frozen stock.

- Harvest the cells by trypsinization when the culture has reached 80% confluency.
- Resuspend the cells in growth medium and estimate the cell concentration by using a counting cell.
- Centrifuge the cells 5 min at 1500 rpm.
- Resuspend the cells in growth medium supplemented with 10% sterile DMSO at a concentration of  $0.5-1 \times 10^7$  cells/ml.
- Dispense 1 ml of cell suspension per cryotube.
- Freeze the cells using a freezing container or by placing them successively at -20°C for 3 h and at -70°C overnight.
- Store the vials in a liquid nitrogen tank.

*Note: To ensure a maximal efficiency of the HEK-Blue™-4 cell line, thaw a new tube when the cultured cell line has reached 30 passages.*

### LPS DETECTION PROCEDURE

#### Reagents required

- HEK-Blue™ Detection (see preparation page 8)
- Diluted Trypsin-EDTA Solution (0.05% Trypsin, EDTA.4Na; see preparation page 8)
- *E. coli* K12 LPS (see preparation page 9)
- PBS

Warm up all the reagents at 37°C before use.

#### Sample preparation (for a 96-well plate)

All powdered samples should be resuspended in endotoxin-free water.

*Note: Avoid testing of pure samples soluble only in ethanol or DMSO. These solutions are toxic to the cell line and can result in false negative results.*

We recommend to ensure the absence of cytotoxicity of the sample on HEK-Blue™ -4 cells before running the LPS detection test. If a cytotoxic effect is observed, the samples should be diluted in endotoxin-free water before testing.

*Note: Samples containing a phosphatase activity cannot be tested as they can result in false positive results.*

- Warm the samples at 37°C.
- Mix vigorously by vortexing as LPS may stick to the tube wall.
- Add 20 µl of each sample per well of a flat-bottom 96-well plate.
- Add 20 µl of endotoxin-free water in one well as a negative control.
- Add 20 µl of *E. coli* K12 LPS in one well at 100 µg/ml or use serial dilutions of the stock solution (see details in "Preparation and storage of reagents" on page 9).

#### Cell handling procedure

To ensure the best results of the test:

- Use HEK-Blue™ -4 cells that have been passaged less than 30 times.
- Use a culture showing 50-80% confluency and that has been passaged at least 48 h before the test.



Notes:

- All cell cultures showing signs of suffering, characterized by the presence of adherent or floating round cells should not be used for the test. The cells should be flat, adherent and healthy.
- Preparation of the cells should be as short as possible to prevent any damage resulting from the prolonged stay at room temperature without 5% CO<sub>2</sub>.

- Remove the medium by aspiration.
- Carefully rinse the cell monolayer with PBS prewarmed at 37°C. This step is intended to remove round cells and all trace of culture medium. Use 5 ml of PBS for a 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flask.
- Remove PBS by aspiration.
- Detach the cells by the use of diluted trypsin-EDTA solution (1/3 in PBS) prewarmed at 37°C. Use 1.5 ml of diluted trypsin-EDTA solution for a 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flask. If necessary incubate the cells few minutes at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator.

Note: To reduce background activation of HEK-Blue™-4 cells, detach cells from the flask by using a cell scraper in the presence of PBS instead of the diluted trypsin-EDTA solution.

- Carefully homogenize the cell suspension by gentle pipetting. Avoid the formation of air bubbles.
- Estimate the cell concentration by using a counting cell.
- Dilute the cells with prewarmed HEK-Blue™ detection medium at a concentration 1-1.25 x 10<sup>6</sup> cells/ml.
- Mix the cell suspension by gentle pipetting.

Note: Do not use a cell suspension containing more than 1.25 x 10<sup>6</sup> cells/ml as it may result in a loss of sensitivity of the kit.

- Transfer the cell suspension into a sterile reagent reservoir if using a multichannel pipette.
- Add 200 µl (25,000 cells max.) of cell suspension to the wells of a 96 well-plate containing the samples by using a multichannel pipette. Use new tips for each well to avoid cross-contamination.
- Incubate the plate at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator for 18-24 h.

Reading and Interpretation

Presence of LPS in a given sample can be observed with the naked eye or quantified spectrophotometrically.

After 18-24 h incubation read the plate with the naked eye :

- the positive control should appear in blue.
- the negative control should be pink or light purple.

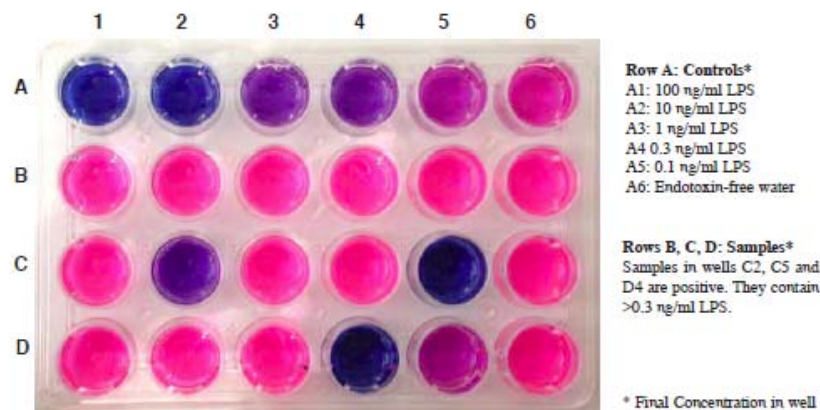
All samples resulting in a purple or blue color should be considered as positive and containing ≥ 3 ng/ml LPS.

Test results can be validated only if the positive and negative controls give the expected results.

The negative control might appear as a light purple color without altering the interpretation of the test. However, if the negative control results in a deep purple color, the test cannot be validated and should be repeated.

For a more precise and semi-quantitative reading use a spectrophotometer set on 620-655 nm.

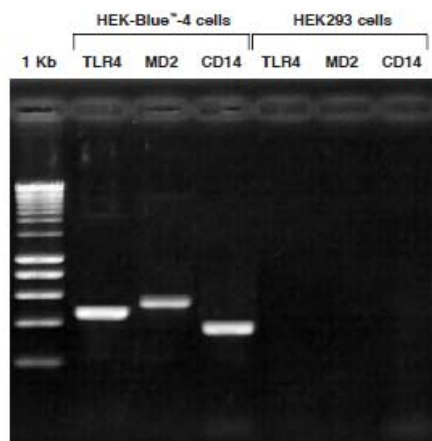
Note: InvivoGen's HEK-Blue™ LPS Detection Kit can be performed in 48- or 24-well plates as well. Scale up by adding 40 µl of sample or control per well and 400 µl HEK-Blue™-4 cell suspension per well.



## SPECIFICITY AND SENSITIVITY

### Specificity

Expression of human TLR4, MD2, and CD14 genes in HEK-Blue™-4 cells has been tested by RT-PCR.



The specificity of the HEK-Blue™ LPS Detection Kit has been determined by testing various TLR ligands:

- Pam3CSK4, synthetic lipoprotein (triacylated) - TLR2 ligand
- FSL-1, synthetic lipoprotein (diacylated) - TLR2 ligand
- Loxoribine, guanine analog - TLR7 analog
- ODN 2006, stimulatory CpG-ODN type B - TLR9 ligand
- *E. coli* DNA with endotoxin and endotoxin-free - TLR9 ligands

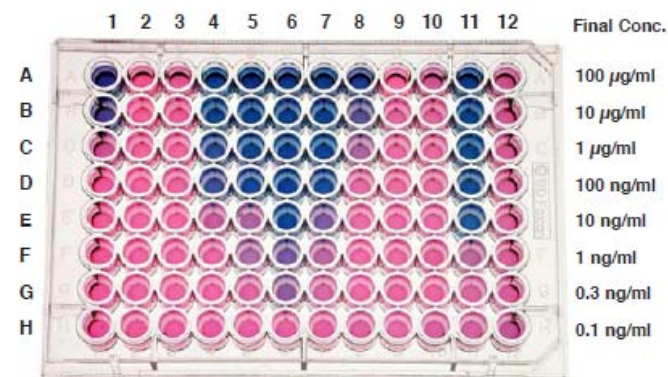
Presence of LPS has been detected only in *E. coli* DNA with endotoxin using the HEK-Blue™ LPS Detection Kit (see picture next page).

*Note: HEK293 cells express low levels of TLR3 mRNA. Samples with TLR3 activity will react positively to the HEK-Blue™ LPS Detection Kit.*

### Sensitivity

The sensitivity of the HEK-Blue™ LPS Detection Kit has been evaluated by testing LPS from various gram-negative bacteria:

- *E. coli* O111:B4
- *E. coli* K12
- *Salmonella minnesota*
- *Porphyromonas gingivalis*



Detection of LPS in various samples using the HEK-Blue™ LPS Detection Kit

- |                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| 1 - TNF-α*                        | 7 - LPS ( <i>S. minnesota</i> )             |
| 2 - Pam3CSK4                      | 8 - LPS ( <i>P. gingivalis</i> )            |
| 3 - FSL-1                         | 9 - Loxoribine                              |
| 4 - Monophosphoryl lipid A        | 10 - ODN 2006                               |
| 5 - LPS ( <i>E. coli</i> O111:B4) | 11 - <i>E. coli</i> DNA we (with endotoxin) |
| 6 - LPS ( <i>E. coli</i> K12)     | 12 - <i>E. coli</i> DNA ef (endotoxin-free) |

\* TNF-α was used at concentrations ranging from 1 ng/ml (A1) to 1 pg/ml (D1). The lowest concentration of TNF-α that activates NF-κB is 100 pg/ml. E1 to H1 wells contain endotoxin-free water as negative control.

# Rapport du jury sur la première épreuve

Dossier technique relatif à un problème biotechnologique.

Rapport du jury.

*Rapport établi par mesdames Isabelle Faller, Claudine Walther, messieurs Jean-Paul Brunet, Jean-François Perrin.*

## Résultats de l'épreuve :

116 candidats ont composé :

- 17 ont obtenu une note supérieure ou égale à 12/20
- 17 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12,
- 24 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10,
- 23 ont obtenu une note supérieure ou égale à 6 et strictement inférieure à 8,
- 35 ont obtenu une note strictement inférieure à 6.

La moyenne générale de l'épreuve est de 7,94. La meilleure note est de 16/20.

## Définition et structure de l'épreuve

*L'épreuve, qui prend appui sur un dossier technique relatif à un problème biotechnologique, s'organise en deux parties :*

- *la première permet d'évaluer les capacités du candidat à utiliser ses connaissances scientifiques et techniques pour expliciter ou valider les solutions retenues ;*
- *la seconde permet d'évaluer les capacités du candidat à utiliser le support proposé pour élaborer un exercice permettant l'évaluation des connaissances et méthodes acquises par les élèves à un niveau de formation déterminé.*

*Le candidat doit situer l'exercice dans un processus d'apprentissage et par rapport aux autres enseignements scientifiques ou techniques qui lui sont associés.*

Le sujet de 2014 était organisé en deux parties, comportant chacune des questions mobilisant des connaissances scientifiques et techniques et des questions pédagogiques.

## Commentaire global

Le jury a pu apprécier les réponses concises et rigoureuses.

Il était important d'analyser les questions posées pour y répondre de façon ciblée et éviter les réponses « hors sujet » ou peu structurées. Le jury ne tient compte que des propos clairs et refuse absolument de se livrer à l'exégèse des écrits obscurs : phrases sans verbes, mauvaise utilisation des liens logiques, contradictions, ...

Le jury rappelle aux candidats que les documents fournissent des informations et constituent également une aide à la mobilisation des connaissances. Sans connaissances scientifiques, il est impossible de répondre aux questions de façon satisfaisante.

Pour guider les futurs candidats dans leur approche de l'épreuve, le jury propose quelques éléments de corrigé ainsi que des commentaires et critiques.

## C1

D'après le texte commentant l'étape 5 du document 1 présentant le principe du pyroséquençage, le dATP est reconnu par la luciférase. Ainsi, si on ajoute du dATP dans le milieu réactionnel, qu'il soit ou non incorporé dans le brin en cours d'élongation, on obtient un signal lumineux. L'interprétation de ce signal est alors impossible.

Le dATP S, analogue du dATP, substrat de la polymérase mais non de la luciférase permet d'éviter ce problème. En effet, dans ce cas, un signal lumineux ne peut être généré que si le nucléotide est incorporé dans le brin en élongation.

Certains candidats n'ont pas du tout compris le principe puisque, pour eux, le dATP S, comme les ddNTP, bloque l'élongation du brin en cours de synthèse. Les longs développements sur le séquençage par la méthode de Sanger étaient hors sujet. De nombreux candidats ont perdu du temps en paraphrasant les commentaires accompagnant toutes les étapes présentées dans le document 1.

En revanche, certains candidats ont expliqué que si introduire du dATP dans le milieu réactionnel pose problème, c'est parce qu'il est substrat de la luciférase, même si ce n'est pas explicitement mentionné.

## C2

La réponse n'était pas facile à rédiger dans la mesure où l'on ne disposait pas de toutes les données pour raisonner. Or la tentation était grande d'exploiter directement le seul paramètre fourni, à savoir la valeur de la constante de Michaelis pour les différentes enzymes intervenant dans le milieu réactionnel. Les longs développements sur l'équation de Michaelis et Menten étaient hors sujet.

Les enzymes intervenant dans le pyroséquençage sont toutes les quatre présentes en permanence dans le milieu réactionnel. Il y a donc compétition entre les enzymes agissant sur des substrats identiques. Celles-ci doivent impérativement travailler à des vitesses différentes pour que le séquençage soit effectif. Ainsi, il est nécessaire que la polymérase puisse incorporer chaque nucléotide avant qu'il ne soit dégradé par l'apyrase. De même, la luciférase doit utiliser l'ATP avant qu'il ne soit dégradé par l'apyrase.

La vitesse d'une réaction enzymatique dépend de la concentration molaire en enzyme dans le milieu réactionnel, de sa constante d'activité catalytique et de son affinité pour le substrat dans les conditions de température, pH et force ionique du milieu réactionnel. Seule la donnée relative à l'affinité est fournie. Il n'est donc pas possible de vérifier la validité du système mis en place. Le Km reflète l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. On peut ainsi constater que la polymérase a beaucoup plus d'affinité pour les dNTP que l'apyrase et que la luciférase a beaucoup plus d'affinité pour l'ATP que l'apyrase. A concentrations d'activités égales des différentes enzymes dans le milieu réactionnel, les différences d'affinité permettraient donc une bonne chronologie des réactions.

## C3

Séquence du brin néosynthétisé : 5' AGGGGTGGCTTTGGGGTTGCAGTTG 3'  
Séquence du brin matrice : 5 CAACTGCAACCCCAAAGCCACCCCT 3'

## C4

La question demandait une explication, mais pas une paraphrase ni une liste de logiciels.

La prédiction et l'annotation proposées utilisent les résultats combinés de trois approches :

- la recherche à l'aide de calculs statistiques qui distinguent « ab initio », ici dans le contexte Bacteria, les régions codantes et non codantes à partir de la recherche des cadres ouverts de lecture (ORF) dans les différentes phases. Le jury a apprécié les rares réponses précisant que la prédiction est réalisée par des calculs statistiques intégrant les longueurs standards des ORF, le fait que les codons synonymes ne sont pas utilisés de façon aléatoire et que tous les acides aminés n'ont pas la même fréquence (trp plus rare que leu)... Le logiciel Glimmer cité dans l'article réalise ce type de travail ;
- les résultats de l'identification de séquences ADN de type signal, ici dans le contexte Bacteria, Acetobacter. L'article cité fait ainsi référence à RBSfinder (signaux de liaison du ribosome), tRNAscanSE ;
- la recherche de similarités. Il s'agit, à l'aide de logiciels, d'analyser les similarités des banques de séquences connues. Deux approches très classiques étaient présentées dans l'article : homologues chez les gènes orthologues et similarités structurales. L'article faisait ainsi référence aux bases SWISS-PROT et TrEMBL, à signalP (détection des peptides signaux) et TMHMM (détection des régions transmembranaires).

**P1**

La question indiquait clairement « à l'issue d'une leçon [...] exposant la phosphorylation oxydative ».

La proposition ne devait se fixer, a priori, que sur cette seule notion. Les meilleures réponses trouvées proposaient un exercice de comparaisons. Le support utilisé pouvait être un schéma de chaîne respiratoire (CR) mitochondriale (l'exemple de « modèle » pour l'étudiant) et/ou de CR chez une bactérie chimioorganotrophe classique associé au texte du document 5b.

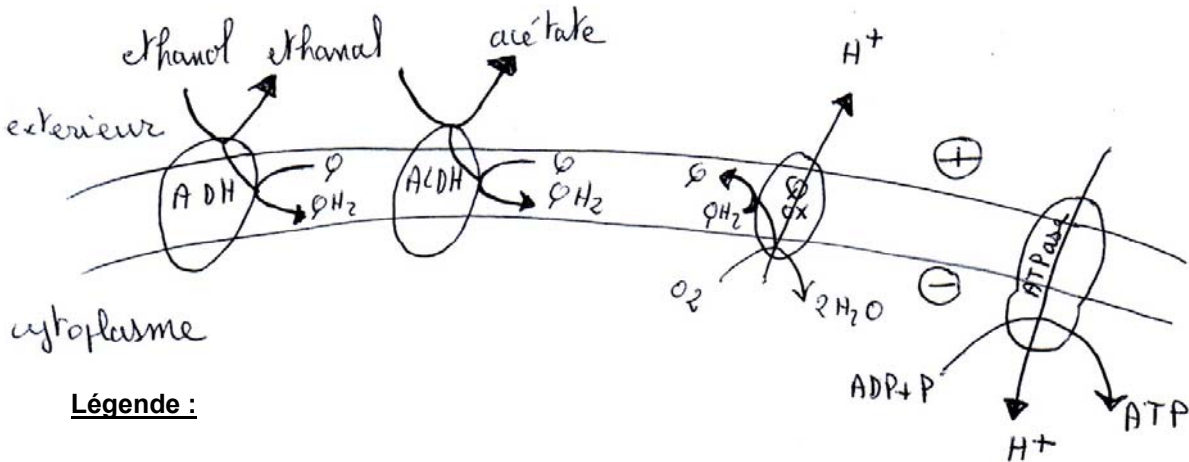
Ainsi on pouvait montrer que *Acetobater pasteurianus* régène bien son ATP à partir d'ADP+P selon le processus de phosphorylation oxydative expliqué dans la leçon :

- i) des molécules donneuses d'électrons (éthanol, éthanal) sont oxydées au niveau des complexes membranaires réduisant finalement un accepteur terminal d'électrons ( $O_2$ ). (lecture directe du document 5b) ;
- ii) l'enthalpie libre négative associée à au moins une de ses réactions redox, doit être couplée à la création d'un gradient protonmoteur et des ATPsynthases membranaires doivent pouvoir exploiter ce gradient pour la régénération d'ATP.

Par comparaison au modèle mitochondrial et aux bactéries respiratoires chimioorganotrophes classiques *Acetobater pasteurianus* est remarquable : les deux nutriments éthanol et éthanal ne pénètrent pas dans la cellule pour subir un processus d'oxydation convergeant vers les donneurs NADH et succinate ( $FADH_2$ ) à la CR mais sont directement oxydés par la CR sur la face externe.

**P2**

De nombreux candidats ont proposé de construire un document support type :



**Légende :**

ADH = éthanol déshydrogénase,

Ils ont aussi proposé de travailler avec les potentiels redox. C'étaient de bonnes idées.

Il fallait ensuite concentrer les objectifs sur l'oxydation de l'éthanol et de l'éthanal, la présence d'un accepteur terminal, le caractère membranaire, le couplage de l'énergie dégagée par le système redox à la genèse d'un gradient protonmoteur, l'exploitation de ce gradient protonmoteur pour la régénération d'ATP à partir d'ADP et de phosphate par les ATP synthases.

### **P3**

Le jury a apprécié les réponses structurées, intégrant les informations extraites des documents et les acquis des candidats sur la démarche d'identification des Salmonelles au laboratoire d'analyses médicales. Certains candidats ont su extraire des informations pertinentes des documents fournis pour contextualiser la situation d'évaluation. Ils ont également présenté de façon intégrée, à l'aide d'un tableau, la structuration de la situation d'évaluation, les conditions matérielles et temporelles de réalisation et les points critiques de l'évaluation, en tenant compte des compétences du référentiel et du niveau exigé en BTS.

### **C5**

Un schéma de principe simple du test était attendu : il devait être présenté en utilisant les données du fabricant (document 10) et en s'inspirant du schéma du document 9 (voies de signalisation). Il ne s'agissait pas de faire un récapitulatif du mode opératoire comme l'ont fait par erreur de trop nombreux candidats.

### **C6**

Il fallait envisager, comme indiqué dans la question, les précautions et contraintes propres au niveau de biosécurité 2. Il était inadapté de reprendre de manière exhaustive les bonnes pratiques de laboratoire.

### **C7**

L'analyse des résultats fournis dans le document 10 devait permettre d'évaluer la spécificité et la sensibilité du test mais aussi de comparer les seuils de détection des différents LPS testés en fonction de leur origine. Il fallait également justifier l'interférence du TNF en exploitant le document 9. Il était intéressant de mentionner le seuil de détection de cette molécule et de le comparer à ceux des LPS.

### **C8**

Parmi les causes de faux positifs et de faux négatifs, il fallait choisir des exemples originaux et ne pas se limiter, pour les faux positifs, à l'interférence du TNF déjà évoquée. Un faux positif pouvait être dû, par exemple, à une contamination par une phosphatase alcaline étrangère ou à une hydrolyse chimique du substrat de l'enzyme. Des cas de faux négatifs étaient mentionnés parmi les remarques de la fiche technique : altération des cellules, traitement inadapté des échantillons.

### **P4**

De nombreux candidats ont abordé la question comme une évaluation purement théorique sur des connaissances de culture cellulaire : nature et composition des milieux...Il était pourtant bien précisé que l'évaluation à proposer devait permettre de vérifier par écrit un «savoir faire» technique. Il fallait extraire du mode opératoire décrit dans la fiche technique du document 10, des étapes permettant de poser des questions aux étudiants : description des étapes du passage lors de l'entretien d'une lignée cellulaire, précautions pour la décongélation des cellules .....

# Deuxième épreuve

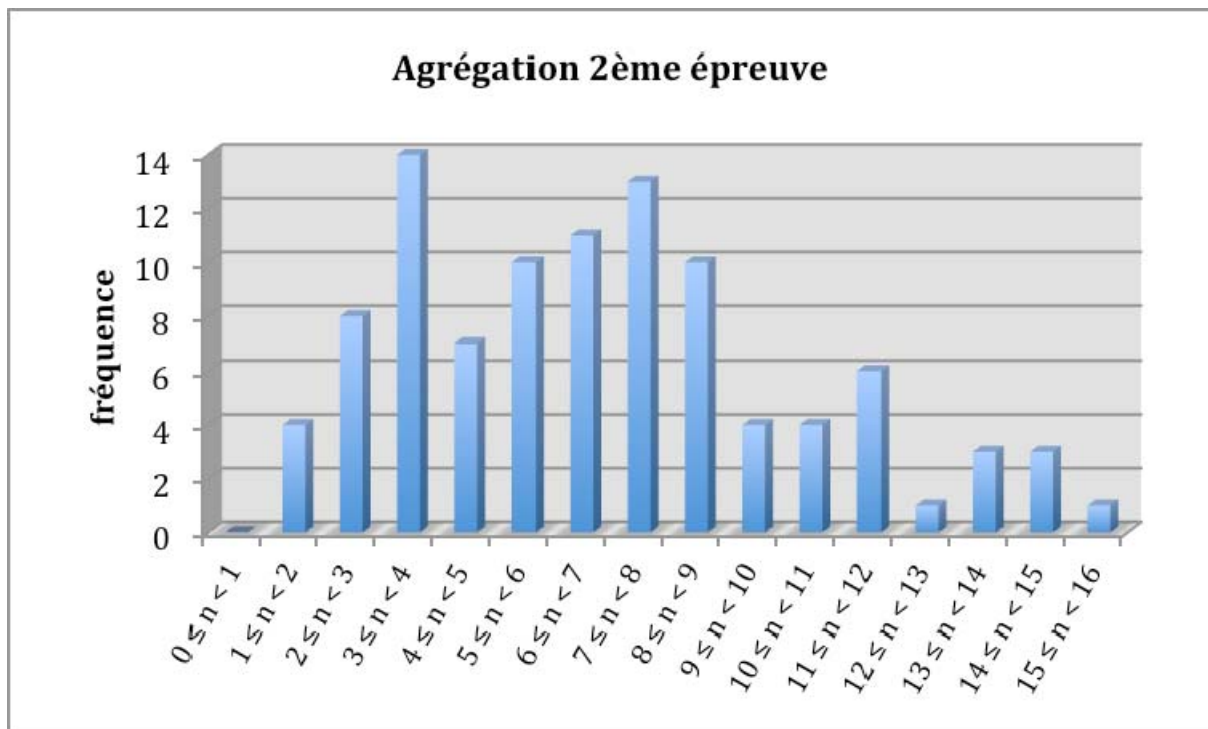
Durée : 8 heures

Coefficient : 1

## Résultats

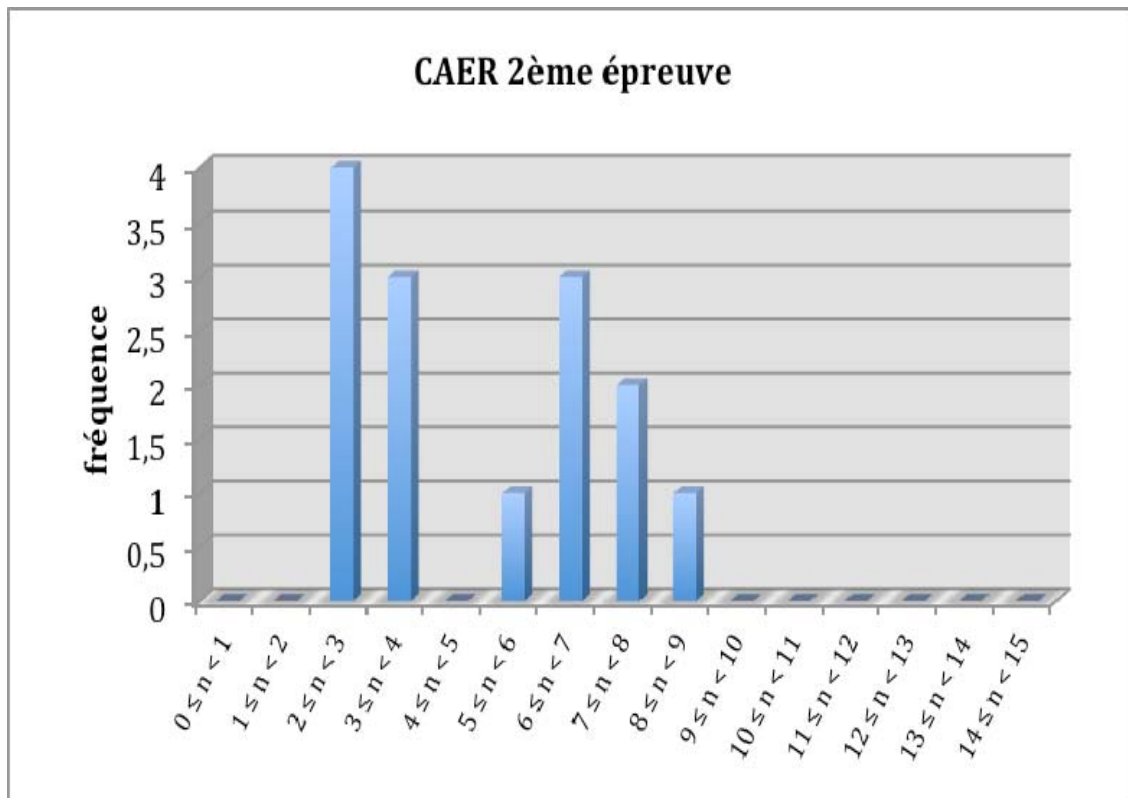
Agrégation  
interne

intervalle	fréquence	intervalle	fréquence
$0 \leq n < 1$	0	$8 \leq n < 9$	10
$1 \leq n < 2$	4	$9 \leq n < 10$	4
$2 \leq n < 3$	8	$10 \leq n < 11$	4
$3 \leq n < 4$	14	$11 \leq n < 12$	6
$4 \leq n < 5$	7	$12 \leq n < 13$	1
$5 \leq n < 6$	10	$13 \leq n < 14$	3
$6 \leq n < 7$	11	$14 \leq n < 15$	3
$7 \leq n < 8$	13	$15 \leq n < 16$	1



CAER  
agrégation

intervalle	fréquence	intervalle	fréquence
$0 \leq n < 1$	0	$8 \leq n < 9$	1
$1 \leq n < 2$	0	$9 \leq n < 10$	0
$2 \leq n < 3$	4	$10 \leq n < 11$	0
$3 \leq n < 4$	3	$11 \leq n < 12$	0
$4 \leq n < 5$	0	$12 \leq n < 13$	0
$5 \leq n < 6$	1	$13 \leq n < 14$	0
$6 \leq n < 7$	3	$14 \leq n < 15$	0
$7 \leq n < 8$	2	$15 \leq n < 16$	0





### Première question

La valorisation biotechnologique des microorganismes pour la production de biens et de Services. Présenter les différents champs d'application et illustrer chacun d'eux par un exemple représentatif explicité.

### Deuxième question

Le foie. Montrer en quoi sa structure, ses liens anatomiques, ses diverses activités en font un carrefour métabolique.

*Le document joint apporte quelques éléments relatifs aux organisations anatomique et structurale du foie.*

### Troisième question

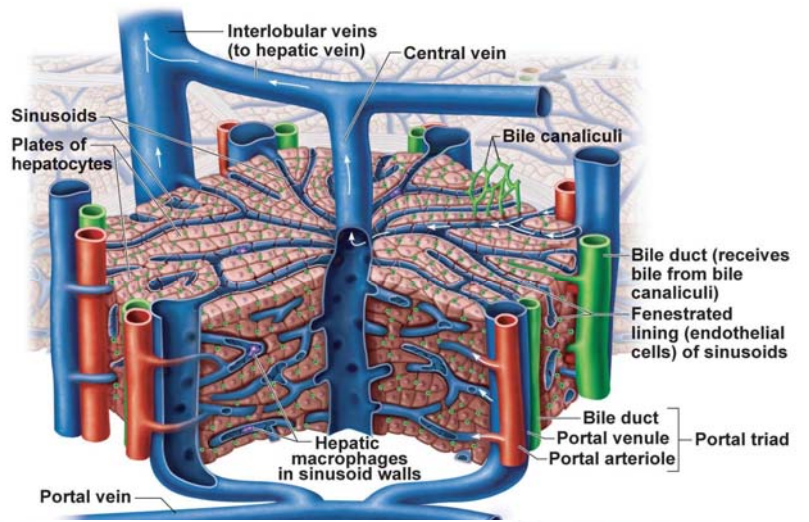
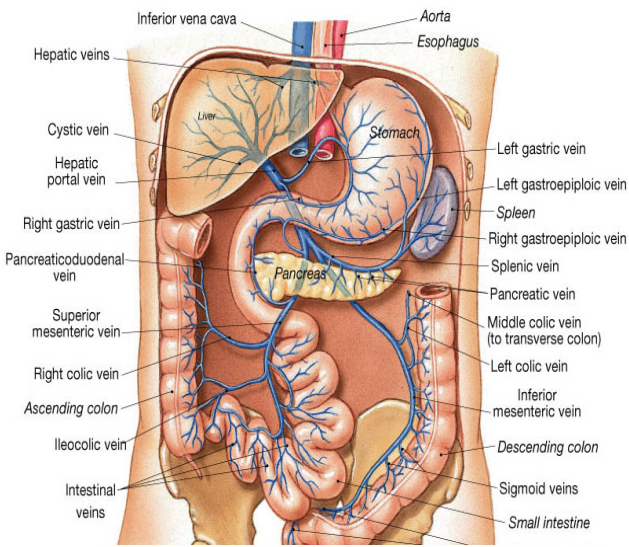
Les anticorps. Présenter comment leur structure biochimique et l'origine génétique de leur diversité participent à leur fonction de reconnaissance de l'antigène.

#### Anatomie abdominale de l'appareil digestif et organisation structurale du tissu hépatique



**COPYRIGHT 2011 plasticboy ANATOMY  
MODELS**





©1984, 2000 Anatomical Chart Company, Skokie, Illinois. Medical illustrations by Lena Lyons, M.A., in consultation with Harry Molsen, Ph.D. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS

Les sujets des épreuves d'admissibilité sont en ligne sur le site du Ministère : [www.education.gouv.fr](http://www.education.gouv.fr)

Ils sont accessibles depuis la page « SIAC2 » : <http://www.education.gouv.fr/pid63/siac2.html>

# Rapport du jury sur la deuxième épreuve

*Rapport établi par mesdames Christine Benayoun, Françoise Guyomarch, messieurs Jean-Pascal Dumon, Jean-Marc Ricort*

## Résultats de l'épreuve :

113 candidats ont composé :

- 4 ont obtenu une note supérieure ou égale à 12/20
- 12 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12,
- 25 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10,
- 29 ont obtenu une note supérieure ou égale à 6 et strictement inférieure à 8,
- 43 ont obtenu une note strictement inférieure à 6.

La moyenne générale de l'épreuve est de 6,57. La meilleure note est de 15,30/20.

L'épreuve était composée de trois parties totalement indépendantes et pondérées de manière identiques. A ce titre, une durée équivalente pouvait leur être consacrée. Les sujets de synthèse proposés permettaient de couvrir les grands champs disciplinaires de notre spécialité et devaient solliciter de la part des candidats des connaissances dans de nombreux domaines illustrant, par là même, la richesse et la diversité des thématiques abordées dans nos enseignements. Cette épreuve, de par sa nature, imposait aux candidats une gestion du temps ainsi qu'une mobilisation des connaissances. Le jury a conscience qu'il s'agissait d'un exercice difficile tant dans le fond que dans la forme notamment dans le traitement des deux premières questions plus ouvertes. Malgré ces difficultés, le jury se réjouit de constater que certains candidats ont su se distinguer en proposant des travaux de qualité associant une réflexion pertinente et intégrée des sujets proposés ainsi qu'une mise en exergue de leurs connaissances. A ce propos, le jury rappelle que de tels sujets, de par leur ampleur et leur richesse, ne pouvaient supporter des digressions hors sujet. Les candidats qui n'ont pas cerné, dès l'introduction, les attendus des questions posées et qui se sont souvent égarés dans des verbiages et étalages de connaissances déconnectés du contexte, se sont malheureusement lourdement auto-pénalisés.

De manière générale, le jury a particulièrement apprécié la qualité rédactionnelle de nombreuses copies. La syntaxe et l'orthographe, hormis quelques exceptions parfois caricaturales, sont bien respectées. Néanmoins, le jury a pu déplorer, par trop souvent, le niveau de langage bien trop faible et l'absence de rigueur scientifique dans les mots employés. A ce titre, il se plaît à rappeler que l'utilisation de termes justes favorise la concision et évite bien souvent l'utilisation de périphrases lourdes et incorrectes.

Le jury rappelle qu'un devoir doit contenir une introduction de qualité qui se doit de positionner correctement le sujet et de présenter la construction logique du devoir. De même, une conclusion faisant un rapide bilan des notions essentielles abordées et proposant un (des) élargissement(s) en lien avec la thématique est attendue. Enfin, un plan détaillé, rigoureux et pertinent articulé de transitions apportant de la fluidité au récit et de la légitimité était également attendu.

## 1<sup>ère</sup> question

Elle portait sur la valorisation biotechnologique des microorganismes pour la production de biens et de services. Il était indispensable de bien cerner le sujet afin d'éviter le hors sujet, les développements inutiles et de bien dégager les différents champs d'application. Le jury a apprécié les candidats qui ont fait le choix de réaliser, dès l'introduction, un tableau ou un diagramme pour présenter, d'une manière relativement exhaustive les différents domaines d'exploitation biotechnologiques des microorganismes. Cette démarche permettait de faire l'économie d'un effet catalogue dans le corps du développement, de justifier judicieusement les exemples représentatifs et de disposer du temps nécessaire pour expliciter chacun des exemples choisis (comme demandé dans l'énoncé).

Certains candidats ont, avec pertinence, abordé cette question à l'aide d'une classification récente faisant référence à un code de couleurs en lien avec une dominante sectorielle :

\* biotechnologie verte (agroalimentaire) : technologies utilisant les plantes et leurs cellules pour produire et transformer des produits alimentaires, des biomatériaux et de l'énergie.

\* biotechnologie bleue : technologies développant des produits en liaison avec la biodiversité marine (santé, cosmétique, aquaculture, agro-alimentaire).

\* biotechnologie rouge : technologies touchant le domaine de la santé, de l'industrie pharmaceutique.

\* biotechnologie jaune : technologies ayant pour objectif la protection de l'environnement, le traitement et l'élimination des pollutions dans les sols, les eaux.....

\* biotechnologie blanche : technologies regroupant les applications industrielles, l'emploi des systèmes biologiques pour remplacer les productions chimiques peu respectueuses de l'environnement.

En revanche, le jury déplore que certaines copies évoquent des phénomènes biotechnologiques sans faire référence au moindre nom de microorganismes. Les microorganismes en tant qu'outils d'analyse ont été peu présentés et les méthodologies du génie génétique et de la biologie moléculaire ont été parfois réduites à des notions simplistes à peine survolées. Malgré l'actualité, le domaine judiciaire, la fraude, les contrôles agro-alimentaires, l'utilisation diagnostique des microorganismes ont rarement été abordés. De même, des techniques de base telles que la PCR, le séquençage, les banques génomiques n'ont été que rarement citées. Les notions d'amélioration des souches, de criblage, essentielles en biotechnologie, ont souvent été oubliées

## 2<sup>ème</sup> question

Dans cette partie, qui faisait essentiellement appel à des connaissances de physiologie et biochimie, le jury attendait que le foie soit replacé dans un contexte de physiologie intégrée. Ainsi, devaient être évoqués ses rôles majeurs dans les métabolismes glucidique (glycogénogenèse, glycogénolyse, néoglucogenèse, cycle de Cori...), lipidique (cycle des lipoprotéines, synthèse et élimination du cholestérol...), protéique (synthèse des protéines plasmatiques, élimination de la fonction NH<sub>3</sub>, cycle de l'urée...) ainsi que ses rôles dans la digestion des lipides (sels biliaires) et dans la détoxification. Le jury regrette que bien trop souvent les connaissances élémentaires ne semblent pas, ou fort mal, maîtrisées. Par exemple, les principes de base de la régulation de la glycogénolyse et de la glycogénogenèse n'apparaissent pas toujours connus et de nombreuses erreurs majeures ont été commises. D'autre part, dans le cas d'un exercice de physiologie intégrée, le jury attendait que les candidats aillent vers la fonctionnalité des données présentées. Ainsi, formuler une liste « catalogue » sans préciser l'intérêt physiologique de chacun des éléments évoqués ne pouvait valoriser la copie.

A ce titre, le jury a particulièrement apprécié les prestations des candidats qui ne se sont pas limités à une présentation simpliste de l'anatomie mais qui ont systématiquement fait un lien entre celle-ci et la fonction intégrée du métabolisme. Les documents joints à l'énoncé se voulaient être une aide pour replacer le foie dans un contexte anatomo-physiologique afin que les candidats pensent à toutes les fonctions de cet organe. Ils avaient également vocation et mettre en évidence, par exemple, le positionnement stratégique du foie, notamment par ses liens directs avec le pancréas et l'intestin. Il est dommage qu'ils aient parfois été détournés dans un exercice de style semblable à une description de documents.

Bien que le jury soit conscient de l'origine diverse des candidats, le sujet proposé ne devait pas aboutir à l'obtention d'un déséquilibre rédactionnel se limitant à un catalogue des voies métaboliques ou à un cours d'hématologie. De même, beaucoup de candidats ont perdu un temps précieux dans des parties hors sujet souvent très longues. Ainsi, une présentation non contextuelle et intégrée de l'anatomie hépatique était totalement inutile. Le jury conseille, compte tenu du temps imparti, de construire un devoir « efficace » allant aux notions essentielles.

Parmi les points plus spécifiques, le jury s'étonne de constater que de très nombreux candidats assurent que la glycémie est normalisée après le passage du glucose du sang dans le foie en période postprandiale. De même, il rappelle que les protéines assurant l'entrée de glucose dans un hépatocyte sont des transporteurs et non des récepteurs et que leur localisation membranaire n'est pas régulée par l'insuline. Ces notions de base du métabolisme glucidique, incontournables, sont trop souvent mal maîtrisées. Le rôle du foie dans la digestion semble peu connu. Ainsi, des interprétations parfois fort fantaisistes ont été données quant à son lien anatomique avec la vésicule biliaire et quant au rôle et à la composition de la bile. La fonction de détoxification, qui fait partie intégrante du métabolisme hépatique, ne fut que très rarement évoquée ainsi que le rôle essentiel que joue cet organe dans la synthèse de protéines. A ce titre, mentionner que le foie synthétise et sécrète des protéines sans expliquer leurs rôles au sein de l'organisme n'apportait pas grand-chose au propos.

En conclusion, le jury conseille ardemment aux candidats d'approfondir leurs connaissances en physiologie humaine de façon à en dégager une vision intégrée au sein de l'organisme.

## 3<sup>ème</sup> question

Ce sujet, qui portait sur la structure biochimique et l'origine génétique de la diversité des anticorps participant à leur fonction de reconnaissance de l'antigène, ne devait absolument pas amener le développement des mécanismes de la réaction immunitaire spécifique. L'introduction pouvait présenter l'interaction anticorps-antigène comme un cas particulier de liaison récepteur-ligand faisant ainsi apparaître les notions de spécificité et d'affinité de reconnaissance. Elle devait aussi aborder la notion de répertoire afin de présenter les bases de la diversité des anticorps. Au vu de l'intitulé de la question, il était judicieux de construire son devoir en deux parties : biochimie structurale des anticorps centrée sur la reconnaissance de l'épitope ; présentation des différents mécanismes responsables de la

diversité des anticorps (réarrangement génétique de l'ADN, diversité combinatoire, diversité jonctionnelle, hypermutation somatique ...).

Le jury déplore que beaucoup de candidats aient confondu l'épissage de l'ARN avec le réarrangement génétique de l'ADN dont les mécanismes semblent malheureusement obscurs pour la majorité d'entre eux.

Si la structure des anticorps semble maîtrisée, il est dommage de constater que beaucoup trop de candidats n'ont pas répondu aux attentes du sujet et ont délayé leurs connaissances en faisant de très longs développements hors de propos (fonctions effectrices telles que transfert placentaire et activation du complément, allergies...). D'ailleurs, il est remarquable de constater que les copies de qualité ont su appréhender l'essentiel du sujet de façon efficace et concise.

# EPREUVES D'ADMISSION

## Première épreuve

### Éléments de correction de la première épreuve

*Rapport établi par messieurs Frédéric Ducancel, Jean-Pascal Dumon, Jean-Marc Ricort*

#### Résultats de l'épreuve

- 18 candidats ont composé :
- 5 ont obtenu une note supérieure ou égale à 12/20
  - 5 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12,
  - 4 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10,
  - 3 ont obtenu une note supérieure ou égale à 6 et strictement inférieure à 8,
  - 1 a obtenu une note strictement inférieure à 6.

La moyenne générale de l'épreuve est de 10,68. La meilleure note est de 18/20.

Le jury tient en préalable à féliciter l'ensemble des candidats qui, pour leur très grande majorité, ont respecté l'esprit de l'épreuve, que ce soit dans le cadre de la démarche de projet ou dans celui de la présentation et de l'entretien avec le jury.

Comme indiqué en préambule de ce rapport, le dossier pouvait comporter légitimement deux parties :

- Une étude scientifique et technologique que le candidat aura pris soin de replacer dans son contexte, notamment en la positionnant en relation avec la problématique à l'origine du projet. Il aurait pu s'agir d'une étude fondamentale s'appuyant sur des données scientifiques actualisées et dont les prolongements technologiques, économiques, sociétaux auraient été abordés ;

- Une mise en application pour un niveau de classe donné, un référentiel, une progression choisie et justifiée. La problématique du transfert des activités technologiques et techniques décrites devait être abordée afin de prendre en compte les contraintes propres à un environnement enseignant (matériels disponibles, horaires, groupe classe, coût, sécurité,...). Elle pouvait décliner les modalités de mise en œuvre (opérationnalisation) en lien avec les objectifs de formations ambitionnés, les activités effectuées par les étudiants, les documents support de ces activités, les évaluations. Des aspects interdisciplinaires pouvaient également nourrir l'analyse des choix pédagogiques et opérationnels adoptés.

#### Remarques sur les dossiers

Les dossiers remis au jury étaient très hétérogènes que ce soit dans leur présentation ou dans leurs contenus.

En effet, si certains dossiers faisaient état d'une étude scientifique approfondie et actualisée, il était regrettable de constater que d'autres ne comportaient pratiquement aucune approche fondamentale ou alors réduite à quelques notions basiques fort peu explicites.

Le jury a particulièrement regretté les nombreuses fautes d'orthographe, de syntaxe, voire les contrevérités scientifiques émaillant certains rapports.

## **Remarques sur la forme des présentations orales:**

Le jury a apprécié les présentations structurées à l'aide de diaporamas illustrés et didactiques dont certains étaient opportunément complétés d'animations vidéo ou de photographies prises en entreprise ou en laboratoire. Si la majorité des supports de présentation étaient de très bonne qualité, le jury a néanmoins noté que certains d'entre eux péchaient par un nombre beaucoup trop important de clichés qui nécessitaient, au vu de la durée de l'épreuve, un passage trop furtif se révélant à terme contre-productif. D'autres, beaucoup trop fournis en texte, n'avaient pas valeur de support didactique, sauf de lecture par le candidat. Le jury tient donc à souligner l'importance qui doit être accordée au support de la présentation. En effet, de mauvais choix de documents, des images de piètre qualité, des constructions peu didactiques peuvent parfois irrémédiablement assombrir une prestation pour autant honorable.

L'ancrage du projet sur un secteur professionnel et sa contextualisation concrète apportent sans conteste de la consistance et du sens au projet et à la présentation.

Le jury a favorablement noté que beaucoup de candidats ont adopté une posture communicante de qualité :

- voix audible mais pausée ;
- soucis de transmettre un message avec conviction ;
- vitesse d'élocution confortable.

Le jury déplore toutefois quelques présentations plus ternes et sans relief énoncées sur un ton monocorde. Ce genre de prestations n'avait guère de chance de convaincre, encore même que le contenu ait été intéressant.

En effet, si l'agrégation est certes un concours exigeant qui requiert une polyvalence et une mise à jour des savoirs, c'est également un concours de recrutement d'enseignants dont les compétences en communication sont évidemment essentielles.

Dans l'ensemble, les candidats ont scrupuleusement respecté de la durée d'exposé de 30 minutes.

## **Remarques sur le fond**

Certains sujets ancrés sur une thématique intéressante et pertinente ont suscité l'admiration du jury. Par contre, ce dernier a regretté des présentations dans lesquelles les études scientifiques et technologiques demeuraient trop superficielles, voire quasiment absentes de la démarche de projet. Il est à noter que le candidat à l'agrégation, à l'origine du choix de son sujet, est sensé en avoir étudié les contours et en dominer l'intégralité des aspects scientifiques. Il est attendu, notamment, qu'il soit capable d'expliquer et justifier les méthodologies présentées, d'expliquer les techniques mais également d'assurer l'analyse approfondie des résultats présentés.

Le « projet original » est d'abord personnel et destiné à répondre à une problématique clairement identifiée. Ainsi, il ne convient pas de l'assimiler à l'exigence professionnelle commune à tous les enseignants : répondre aux attentes de l'institution en lien avec les responsabilités confiées. Il s'agit au contraire d'une démarche volontariste et originale, qui se doit de dépasser l'exécution d'un programme pour lui donner du sens, de l'épaisseur et de la hauteur. Certains candidats ont construit leur dossier à partir d'activités technologiques déjà mises en œuvre avec leurs élèves. L'étude scientifique s'en trouve alors artificielle, en général essentiellement livresque et manquant sensiblement de pertinence et de réalisme professionnel.

Il est attendu d'un professeur agrégé qu'il soit capable de faire évoluer les pratiques au sein de son établissement. Cela implique la mise en œuvre de stratégies pédagogiques novatrices, pragmatiques et réalistes qui donnent sens aux apprentissages. Ces activités doivent être construites, certes en appui sur une réalité professionnelle, mais également économique pour l'établissement et transposables à un groupe d'élèves en lien avec des objectifs de formation et la réglementation en vigueur.

Il est ainsi dommage que beaucoup de présentations se soient révélées par trop descriptives et incapables de s'affranchir d'un effet catalogue déclinant une succession de séances associées aux processus d'évaluation. Le jury a néanmoins apprécié certaines présentations synthétiques et

concises s'appuyant sur un organigramme mettant en relief les objectifs, méthodologies, stratégies pédagogiques et démarches d'évaluation d'une séquence préalablement positionnée au sein d'une progression. Cette présentation synoptique laisse ensuite toute légitimité à une approche détaillée de l'opérationnalisation choisie. Le jury a également été sensible à la prise en compte des contributions des autres disciplines, dans une approche pédagogique moderne et interdisciplinaire.

Au cours de l'entretien, le jury a particulièrement apprécié le comportement remarquable des candidats, faisant preuve de motivation mais aussi d'une probité intellectuelle très appréciée. Les questions posées ont permis d'éclairer le jury sur certains points du projet, notamment sur son déterminisme et les solutions techniques adoptées, mais aussi d'explicitier certaines données scientifiques abordées ou décrites dans le dossier. Elles ont également favorisé l'appropriation des démarches pédagogiques choisies ou conçues. En effet, par ce questionnement large, le jury souhaite également apprécier la maîtrise didactique de la discipline ou la position du candidat sur des éléments non mentionnés dans le dossier mais directement associés à la problématique.

Bien évidemment, au cours de cette épreuve, les qualités d'expression et de communication, le sens de l'écoute, l'adéquation des réponses aux questions sont aussi des paramètres pris en compte dans la notation.



# Deuxième épreuve

Sujet :

## AGREGATION DE BIOCHIMIE – GENIE BIOLOGIQUE Concours interne Session 2014

### EPREUVES D'ADMISSION

### DEUXIEME EPREUVE

**Durée : 8 heures**

**Coefficient : 1**

-----

Cette épreuve consiste à exploiter des documents techniques et pédagogiques relatifs à une séquence de «travaux pratiques » ou à une séquence à caractère expérimental, élément d'un processus d'apprentissage. Elle permet d'évaluer les capacités du candidat à :

- proposer et justifier les principes, méthodes et modes opératoires à mettre en œuvre et à dégager les concepts auxquels ils se rattachent ;
- réaliser, pour tout ou partie, selon la durée impartie, l'activité prévue.

Le programme du concours est défini par référence aux programmes des BTS et DUT de la spécialité.

-----

Le sujet comporte quatre parties indépendantes :

1. Titrage du virus de la rougeole d'un vaccin commercial
2. Identification d'une souche isolée d'une urine
3. Étude des caractéristiques cinétiques de la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli*
4. Détection d'*Escherichia coli* par PCR sur colonie

## 1- Titrage du virus de la rougeole d'un vaccin commercial

On se propose de titrer le vaccin « ROUVAX », une suspension du virus atténué de la rougeole (lot **5412** annoncé à 300 000 particules infectieuses.mL<sup>-1</sup>).

Les cellules VERO sensibles au virus de la rougeole, sont mises en culture en plaque 6 puits et infectées par des dilutions du vaccin à titrer. Après incubation, on observe pour chaque dilution la présence d'un tapis cellulaire complet (absence de lyse), partiel (plages de lyse dénombrables) ou totalement absent (lyse cellulaire totale).

La présence d'une particule virale infectieuse dans un puits suffit, par sa multiplication, à provoquer la formation d'une « plage de lyse ». Les résultats sont comparés à un témoin.

Les étapes mises en jeu sont les suivantes :

- 1 - préparation d'une suspension cellulaire ajustée en cellules vivantes
- 2 - mise en culture des cellules vivantes
- 3 - réalisation des dilutions de la suspension virale et de l'infection, incubation
- 4 - coloration
- 5 - lecture.

**Seules les manipulations des étapes 1, 2 et 5 seront mises en œuvre.**

### 1.1 Matériel et réactifs

- 1 flacon de 25 cm<sup>2</sup> de culture de cellules VERO
- 1 flacon de « **PBS** »
- 2 mL de solution de trypsine 0,25% - EDTA 0,2% : "**trypsine-EDTA**"
- 20 mL de milieu DMEM supplémenté avec du sérum de veau fœtal (10%) : "**DMEM complet**"
- 1 tube de solution de « **bleu de Trypan** »
- Flacon stérile de 15 mL
- Tubes à hémolyse stériles
- Cellule de comptage de Malassez
- Compteur de cellules
- Plaque stérile de culture 6 puits
- microscope inversé
- Etuve à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>

### 1.2 Mode opératoire

#### 1.2.1 Préparation d'une suspension cellulaire ajustée en cellules vivantes

Observer le tapis cellulaire au microscope inversé avant préparation de la suspension.

➤ **Décollement du tapis cellulaire : sous P.S.M.**

- Eliminer le milieu :
  - équiper d'un pipeteur électrique une pipette graduée stérile
  - tenir le flacon de cellules verticalement et aspirer le milieu sans toucher au tapis cellulaire
  - rejeter le liquide aspiré dans un bac contenant de l'eau de Javel.
- Laver le tapis cellulaire :
  - laver le tapis cellulaire avec environ 5 mL de « **PBS** »
  - aspirer le liquide de lavage
  - rejeter le liquide aspiré dans le bac contenant de l'eau de Javel.

- Décoller les cellules :
  - déposer 0,5 mL de "trypsine-EDTA" sur le tapis cellulaire
  - fermer le flacon et le placer quelques minutes à l'étuve à 37°C
  - bien surveiller l'action de la trypsine au microscope inversé ; tapoter légèrement le flacon : les cellules s'arrondissent puis se dissocient.
- Arrêter l'action de la trypsine en ajoutant 4,5 mL de milieu « **DMEM complet** ».
- Homogénéiser soigneusement par aspirations et refoulements, afin de dissocier les amas cellulaires. On obtient alors la suspension cellulaire nommée « **S1** ».
- Prélever un volume suffisant de suspension « **S1** » pour la numération.
- Maintenir le flacon de suspension « **S1** » à la verticale.

#### ➤ **Numération et test de viabilité**

- Réaliser, dans un tube à hémolyse, une dilution volume à volume de 100 µL de la suspension cellulaire « **S1** » dans le « **bleu de Trypan** ».
- Utiliser cette dilution pour remplir la chambre de la cellule de comptage de Malassez.
- Réaliser la numération des cellules viables et non viables.

***Montrer à l'examineur un champ microscopique représentatif de la préparation.***

#### ➤ **Préparation d'une suspension cellulaire ajustée : sous P.S.M.**

A partir de S1, préparer un volume adéquat de suspension fille « **S2** » ajustée en milieu « **DMEM complet** » de manière à mettre en culture  $2 \cdot 10^5$  cellules vivantes par puits dans un volume de 2 mL dans chacun des 6 puits de la plaque de culture.

### **1.2.2 Mise en culture des cellules**

- Distribuer 2 mL de la suspension « **S2** » dans les 6 puits de la plaque.
- Incuber 1 h à 37°C sous CO<sub>2</sub> pour permettre l'adhérence des cellules.

### **1.2.3 Dilution de la suspension virale, infection et incubation (étape non réalisée par le candidat)**

- Réaliser 5 dilutions successives de raison 1/10 de la suspension virale de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  en milieu de culture sans sérum dans des tubes à hémolyse stériles sous un volume final de 0,45 mL.
- Sortir la plaque de l'étuve puis retirer le milieu des puits.
- Rincer doucement les cellules avec 2 mL de PBS stérile préchauffé à 37°C.
- Retirer le PBS et infecter les cellules avec 0,2 mL de chaque dilution de la suspension virale.
- Le 6<sup>ème</sup> puits servira de témoin.
- Incuber 30 minutes à 37°C sous agitation douce.
- Recouvrir délicatement de 2 mL de milieu de culture complet et incuber 72 heures minimum à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>.
- Observer l'état des cellules témoins et infectées quotidiennement.

### **1.2.4 Coloration (étape non réalisée par le candidat)**

- Laver les cellules avec 1 mL d'eau physiologique.
- Fixer les cellules avec du paraformaldéhyde pendant 5 minutes.
- Rincer avec 1 mL d'eau physiologique puis colorer avec du cristal violet à 0,5% pendant 5 minutes avant de rincer trois fois avec de l'eau physiologique.

### 1.2.5 Lecture (plaque fournie)

- Observer chaque puits de la plaque fournie ;
- Présenter le type de lyse : lyse totale, lyse partielle avec plages de lyse dénombrables, absence de lyse.

## 1.3 Compte rendu

### Exploitation des résultats

- 1.3.1 Consigner tous les résultats bruts de la numération de la suspension « **S1** » dans un tableau.
- 1.3.2 Déterminer la valeur de la concentration en cellules VERO viables de la suspension « **S1** ».
- 1.3.3 Déterminer le pourcentage de viabilité de la suspension cellulaire « **S1** ».
- 1.3.4 Expliquer le protocole de préparation de la suspension « **S2** ».
- 1.3.5 Etablir le tableau de la réalisation de la gamme de dilution de la suspension virale.
- 1.3.6 Préciser la composition et le rôle du témoin du puits n°6.
- 1.3.7 Construire un tableau regroupant les résultats de la lecture de la plaque fournie.
- 1.3.8 Analyser le résultat obtenu pour le puits n°6 de la plaque fournie.
- 1.3.9 Calculer le titre de la suspension virale du vaccin « ROUVAX » et conclure.

### Mise en situation

Ce protocole de titrage du virus de la rougeole est proposé à des étudiants de 2<sup>ème</sup> année de BTS Bioanalyses et Contrôles. Le **document 1** est fourni en accompagnement du protocole.

- 1.3.10 Indiquer les prérequis indispensables à la réalisation de cette manipulation avec des étudiants.
- 1.3.11 Commenter le document 1 aux étudiants en recherchant avec eux les différents rôles du sérum de veau foetal.
- 1.3.12 Préciser les consignes techniques et les justifications associées à indiquer aux étudiants pour l'obtention d'un résultat de dénombrement acceptable.

Un étudiant dit avoir suivi le protocole de la préparation de la suspension « **S1** ». A l'issue de plusieurs minutes d'incubation avec la trypsine, l'observation au microscope révèle un tapis cellulaire adhérent.

- 1.3.13 Quelle(s) erreur(s) a (ont) pu être commise(s) par l'étudiant ? En expliquer les conséquences.
- 1.3.14 Comment faudrait-il guider l'étudiant pour qu'il puisse reprendre la préparation de la suspension « **S1** » à partir de son flacon ?

**Document 1**  
**Composition du sérum de veau fœtal (« fetal bovine serum » : FBS)**

**Composition of FBS**

Component	Average	Range
Endotoxins (ng/ml)	0.35	0.01 - 10.0
Glucose (mg/ml)	1.25	0.85 - 1.81
Protein (mg/ml)	38	32 - 70
Albumin (mg/ml)	23	20 - 36
Hemoglobine (µg/ml)	113	24 - 181
Bilirubin, total (µg/ml)	4	3 - 11
Bilirubin, direct (µg/ml)	2	0 - 5
Urea (µg/ml)	160	140 - 200
Urate (µg/ml)	29	13 - 41
Creatinin (µg/ml)	31	16 - 43
Insulin (µU/ml)	10	6 - 14
Cortisol (ng/ml)	0.5	0.1 - 23
Growth hormone (ng/ml)	39.0	18.7 - 51.6
Parathormone, PTH (ng/ml)	1.72	0.085 - 6.18
Triiodothyronine, T3 (ng/ml)	1.2	0.56 - 2.23
Thyroxine, T4 (ng/ml)	0.12	0.08 - 0.16
Thyroid-stimulating hormone, TSH (ng/ml)	1.22	0.2 - 4.5
Follicle-stimulating hormone, FSH (pg/ml)	95	20 - 338
Testosterone (pg/ml)	400	210 - 990
Progesterone, P4 (pg/ml)	80	3 - 360
Prolactin = Luteotropic hormone, LTH (pg/ml)	176	20 - 500
Luteinizing hormone, LH ?? (pg/ml)	8	1,2 - 18
Prostaglandin E (ng/ml)	5.9	0.5 - 30.5
Prostaglandin F (ng/ml)	12.3	3.8 - 42.0
Vitamine A (ng/ml)	90	10 - 350
Vitamine E (ng/ml)	1.1	1 - 4.2
Cholesterol (µg/ml)	310	120 - 630
Lactate-dehydrogenase, LDH (mU/ml)	864	260 - 1,215
Alkaline Phosphatase (mU/ml)	255	110 - 352
Aspartate-Aminotransferase, ASAT (mU/ml)	130	20 - 200

## 2- Identification d'une souche isolée d'une urine

Un médecin prescrit à une patiente souffrant de douleurs à la miction de façon récidivante, un examen cytbactériologique des urines (ECBU). Une souche a été isolée sur gélose trypticase soja. Il s'agit d'identifier cette souche à l'aide de techniques classiques d'identifications microbiennes.

### 2.1 Matériel et réactifs

- Souche pure isolée sur gélose trypticase soja notée « S+n° »
- Matériel et réactifs pour réaliser une coloration de Gram
- Réactif oxydase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Une gélose trypticase-soja.

### 2.2 Travail à réaliser

- Réaliser le(s) examen(s) microscopique(s) de la souche.

***Le(s) montrer à un examinateur après rédaction du compte-rendu.***

- Effectuer le(s) test(s) d'orientation nécessaire(s) à l'identification de cette souche.

***Le(s) montrer à un examinateur après rédaction du compte-rendu.***

- Proposer une galerie d'identification en microméthode en justifiant ce choix (utilisation possible du document fourni par le centre)

***Rendre la demande par écrit à un examinateur.***

- Réaliser un isolement de la souche sur une gélose trypticase-soja.
- Une galerie a étéensemencée et incubée avec la même souche. Procéder à la lecture de cette galerie.

***Faire valider la lecture par un examinateur.***

- Identifier la souche à l'aide du catalogue mis à disposition ou du logiciel informatique exploitant la base de données des profils des espèces identifiables par la galerie.
- Conclure.

## **2.3 Mise en situation**

Cette séquence pratique peut être envisagée en BTS ABM (Analyses de Biologie Médicale). Les étudiants découvrent la galerie miniaturisée au cours de cette séance.

2.3.1 Présenter les étapes critiques permettant d'ensemencer cette galerie en respectant la fiche technique du fournisseur.

Les tableaux d'identification des galeries miniaturisées indiquent des chiffres compris entre 0 et 100 pour chaque caractère étudié.

2.3.2 Expliquer aux étudiants la signification de ces chiffres.

Pour un étudiant du groupe, l'identification à l'aide du logiciel informatique indique une « mauvaise identification ».

2.3.3 Expliquer comment guider cet étudiant pour parvenir à une identification satisfaisante.

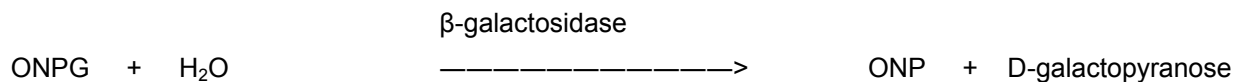
2.3.4 Proposer une ou plusieurs alternative(s) à l'identification bactérienne à l'aide de galeries miniaturisées dans le contexte proposé.

La séquence pratique réalisée constitue une des étapes de l'ECBU.

2.3.5 Préciser les différentes étapes d'un ECBU.

### 3- Étude des caractéristiques cinétiques d'une enzyme michaelienne : la $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli* (EC 3.2.1.23).

L'objectif des manipulations est de déterminer la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) et la constante de Michaelis ( $K_M$ ) vis à vis du substrat synthétique : le 2-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) lors de la réaction catalysée par l'enzyme :



A cet effet, deux études seront réalisées :

- l'une classique utilisant plusieurs cinétiques réalisées avec des concentrations variables en substrat ;
- l'autre adaptée d'une méthode fondée sur l'intégration mathématique d'une cinétique unique présentée dans le **document 2**.

#### 3.1 Méthode classique

Conception d'un mode opératoire à l'aide des informations apportées par le **document 3** et le **document 4**.

- 3.1.1 Calculer les vitesses initiales attendues pour des concentrations en ONPG respectivement de  $10 K_M$  et  $K_M/2$ . Exprimer ces vitesses en variations d'absorbance par minute.
- 3.1.2 Préciser si les variations d'absorbance calculées paraissent compatibles avec les performances d'un spectrophotomètre classique.
- 3.1.3 Proposer, en justifiant la réponse, une durée de catalyse assurant une mesure en conditions de vitesse initiale.
- 3.1.4 Construire un tableau récapitulatif d'un mode opératoire, par méthode cinétique deux points, permettant la détermination de  $K_M$  et  $V_{max}$  (tester des concentrations en substrat comprises entre  $K_M/2$  et  $10 K_M$ ).

Détermination expérimentale de  $K_M$  et  $V_{max}$

- Mettre en œuvre le mode opératoire conçu précédemment.

#### 3.1.5 Exploiter les résultats



### 3.2 Méthode fondée sur l'intégration mathématique d'une cinétique unique

#### Suivi d'une cinétique en continu.

- Introduire dans une cuve pour photométrie :
  - Tampon réactionnel 2810  $\mu\text{L}$
  - ONPG 4  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans le tampon réactionnel 90  $\mu\text{L}$
- Équilibrer à 37°C.
- Régler le « zéro » du spectrophotomètre.
- Déclencher la réaction par ajout de 100  $\mu\text{L}$  de préparation enzymatique, homogénéiser le plus rapidement possible tout en déclenchant le temps et noter les absorbances toutes les 20 secondes pendant 6 minutes.

A disposition : spectrophotomètre thermostaté programmable avec sa notice.

#### Exploitation des résultats

**Saisir les valeurs expérimentales obtenues, dans la feuille de calcul informatique proposée, au poste dédié en présence d'un membre du jury.**

3.2.1 Justifier le calcul de la colonne  $[\text{P}]_t$  expérimentaux.

#### Donnée :

Coefficient d'absorbance linéique molaire de l'ONP dans le milieu réactionnel : 260  $\text{m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$  à 415 nm.

3.2.2 Vérifier la valeur de  $[\text{S}]_0$  qui a été paramétrée.

Le carré de l'écart de chaque point théorique à chaque point expérimental est calculé. La somme de ces carrés est calculée.

3.2.3 Analyser  $K_M$  et  $V_{\text{max}}$  en ajustant la courbe théorique calculée à la courbe expérimentale, soit à l'aide d'un calcul itératif minimisant la somme des carrés des écarts entre les valeurs expérimentales recueillies et les valeurs théoriques calculées soit par réglage à l'aide de données de la littérature et/ou des valeurs précédemment établies.

3.2.4 Conclure sur les caractéristiques cinétiques de la  $\beta$ -galactosidase mises en évidence dans les conditions expérimentales utilisées.

3.2.5 Proposer une exploitation pédagogique de la méthode fondée sur l'intégration mathématique d'une cinétique unique.

## Document 2

### Ajustement des données d'une cinétique unique à un modèle théorique et évaluation de $K_M$ et $V_{max}$

Dans la suite,  $t$  : temps,  $[S]_t$  concentration en S au temps  $t$ ,  $[P]_t$  concentration en P au temps  $t$ ,  $V_{max}$  vitesse initiale maximale à saturation,  $K_M$  constante de Michaelis pour le substrat S.

L'idée est d'utiliser des résultats mathématiques basés sur l'intégration de l'équation de Michaelis-Menten et qui débouchent sur une relation du type  $[P]_t=f(t)$  avec  $K_M$ ,  $V_{max}$  et  $[S]_0$  comme paramètres. L'ajustement d'une unique courbe expérimentale  $[P]_t=f(t)$  à la relation calculée  $[P]_t=f(t)$  convenablement paramétrée peut ainsi permettre d'accéder à une évaluation de  $K_M$  et  $V_{max}$ . Voir encadré intitulé « Relation calculée  $[P]_t=f(t)$  pour une réaction Michaelienne irréversible » ci-dessous.

L'analyse proposée se déroule ainsi en 3 temps :

- 1) Une cinétique d'hydrolyse à  $[S]_0$  connu est suivie et une dizaine de points expérimentaux ( $t, [P]_t$ ) recueillis.  $[S]_0$  est choisi proche du  $K_M$  attendu et  $[S]_t$  demeure très grand devant la concentration en enzyme sur la période étudiée.
- 2) Pour les différents temps  $t$  retenus, des valeurs théoriques de  $[P]_t$  sont calculées à l'aide d'une feuille de calcul préprogrammée avec la relation mathématique  $[P]_t=f(t)$ . Le paramètre  $[S]_0$  est réglé à la valeur expérimentale retenue.  $K_M$  et  $V_{max}$  sont arbitrairement réglés à 1.
- 3)  $K_M$  et  $V_{max}$  sont finalement analysés en ajustant la courbe théorique calculée à la courbe expérimentale, soit à l'aide d'un calcul itératif minimisant la somme des carrés des écarts entre les valeurs expérimentales recueillies et les valeurs théoriques calculées soit par réglage à l'aide de données de la littérature et/ou des valeurs précédemment établies.

#### Relation calculée $[P]_t=f(t)$ pour une réaction michaelienne irréversible

Soit une enzyme parfaitement stable catalysant la transformation d'un substrat S en produit P selon une réaction parfaitement irréversible et sans effet d'inhibition par le produit P et selon un comportement michaelien. Soit des conditions de suivi cinétique pour lesquelles la concentration en substrat à chaque instant reste très grande devant la concentration en enzyme.

Il y a état quasi-stationnaire à chaque instant  $t$  et on peut écrire :

$$\frac{d[P]_t}{dt} = \frac{-d[S]_t}{dt} = \frac{V_m [S]_t}{K_M + [S]_t} = \frac{V_m ([S]_0 - [P]_t)}{K_M + ([S]_0 - [P]_t)} \quad \text{équation (1)}$$

L'idée est d'obtenir une relation explicite du type  $[P]_t=f(t)$  à l'aide de la relation (1). Ainsi l'analyse d'une unique expérience pratique  $[P]_t=f(t)$  devrait permettre d'analyser  $K_M$  et  $V_m$ .

L'équation (1) s'intègre facilement sous la forme :

$$K_M t = K_M \ln([S]_0 - [P]_t) + [P]_t - K_M \ln([S]_0) \quad \text{équation (2)}$$

La résolution mathématique de l'équation (2) sous la forme d'une fonction  $[P]_t=f(t)$  ne connaît pas de forme explicite simple et on montre qu'elle est de la forme :

$$[P]_t = [S]_0 - K_M W \left( \frac{[S]_0}{K_M} e^{-\frac{[S]_0 - K_M t}{K_M}} \right) \quad \text{équation (3)}$$

Dans cette équation (3),  $W(\ )$  désigne une fonction mathématique appelée fonction de Lambert et définie par la propriété  $W(x)e^{W(x)} = x$ . Les valeurs de  $W(x)$  pour les réels  $x > 0$  ne peuvent pas être connues exactement mais peuvent être approximées à l'aide de formules aujourd'hui aisément gérables avec un logiciel tableur. Dans le travail proposé, les  $W(x)$  sont calculés à l'aide d'une feuille de calcul programmée avec une approximation de Barry conduisant à une erreur relative inférieure à 0,2%.

### Document 3

#### Données pour la réalisation des cinétiques deux points

##### Réactifs

- Tampon réactionnel : tampon phosphate de sodium  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,3 ; 2-mercaptoéthanol à  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  et  $\text{MgCl}_2$  à  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  ;
- Substrat : solution d'ONPG à  $4 \text{ mmol.L}^{-1}$  en tampon réactionnel ;
- Préparation de  $\beta$ -galactosidase fournie : dilution au 1/500 d'une préparation commerciale à  $1000 \text{ U.mL}^{-1}$
- Solution d'arrêt : solution  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  et EDTA à  $4 \text{ mmol.L}^{-1}$

##### Conditions opératoires de mise en œuvre des cinétiques deux points

- Température d'incubation :  $37^\circ\text{C}$
- Composition du milieu réactionnel :
  - 2,95 mL d'un mélange de solution substrat et de tampon
  - 50  $\mu\text{L}$  de préparation enzymatique.
- Arrêt de la réaction par ajout de 1 mL de solution d'arrêt.

##### Données

- Une unité d'enzyme catalyse la transformation de  $1 \mu\text{mol}$  d'ONPG par minute dans le standard de mesure qui correspond aux conditions opératoires proposées.
- $K_M$  pour l'ONPG =  $0,12 \text{ mmol.L}^{-1}$  (d'après la littérature).
- Coefficient d'absorbance linéique molaire de l'ONP au pH d'arrêt :  $460 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1}$  à 415 nm ; linéarité au moins jusqu'à une absorbance de 2.

##### Remarques

Le substrat ONPG n'absorbe pas à 415 nm dans les conditions proposées.  
L'hydrolyse de l'ONPG est nulle à pH 7,3 et négligeable au pH d'arrêt pendant plus de 30 minutes.

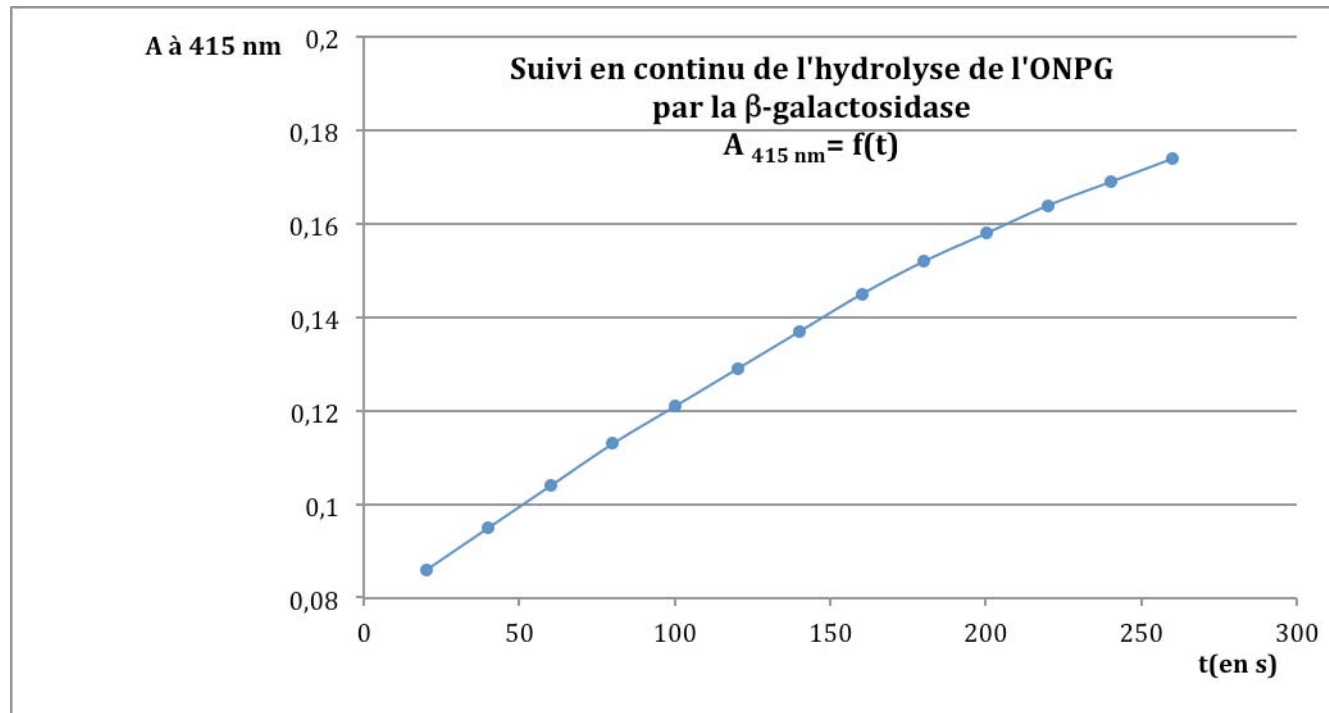
**Document 4**  
**Suivi en continu de l'hydrolyse de l'ONPG par la  $\beta$ -galactosidase.**

**Conditions opératoires :**

- Température d'incubation : 37°C
- Composition du milieu réactionnel :
  - 45  $\mu$ L de la solution de substrat : solution d'ONPG à 4 mmol.L<sup>-1</sup> en tampon réactionnel
  - 2905  $\mu$ L de tampon réactionnel
  - 50  $\mu$ L de préparation enzymatique.

**Résultats :**

t	A
(en s)	à 415 nm
20	0,086
40	0,095
60	0,104
80	0,113
100	0,121
120	0,129
140	0,137
160	0,145
180	0,152
200	0,158
220	0,164
240	0,169
260	0,174



#### **4- Détection d'*Escherichia coli* par PCR sur colonies**

L'identification moléculaire des bactéries repose sur l'étude des gènes codant les ARN ribosomiques et notamment le gène codant l'ARNr 16S dont la séquence est très conservée au sein d'une espèce. On considère que deux bactéries appartiennent à des espèces différentes dès lors que le degré d'homologie des séquences du gène codant l'ARNr 16S est inférieur à 97%.

Des milliers de séquences sont disponibles dans les banques de données.

La séquence du gène codant l'ARNr 16S d'*E. coli* O157:H7 est présentée dans le **document 5**.

Il s'agit ici de vérifier la spécificité d'un couple d'amorces pour la détection d'*E. coli* par PCR sur colonies. Cette technique permet d'amplifier de façon simple et rapide l'ADN de microorganismes en inoculant directement les colonies dans le milieu réactionnel de la PCR. Les cellules microbiennes sont lysées et l'ADN libéré dans le milieu réactionnel lors de la première étape de dénaturation.

Des isolements sur gélose trypticase soja d'une souche d'*E. coli* et d'une souche de *Bacillus subtilis*, germe ubiquitaire de l'environnement, sont disponibles.

##### **4.1 Vérification de la spécificité du couple d'amorces**

- Réaliser les PCR nécessaires en utilisant les données du document 6.
- Effectuer un contrôle électrophorétique des résultats des PCR en gel d'agarose en utilisant les données du **document 7**.

##### **4.2 Exploitation**

- 4.2.1 Justifier le choix du marqueur de taille choisi pour le contrôle électrophorétique à l'aide du document 8.
- 4.2.2 Analyser les résultats obtenus.
- 4.2.3 Conclure.

**Document 5**  
**Séquence du gène codant l'ARNr 16S d'*E. coli* O157 :H7**

>gij47118301:227102-228643 Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA, complete genome

**Présentée par blocs de 54 nucléotides par ligne**

AAATTGAAGAGTTTGGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTA□ACA  
CATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACG□AGTGG  
CGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGAGGGAT□AACTACT  
GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAG□GGGGACCTT  
CGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA□GTAGGTGGGGT  
AACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA□GGATGACCAGCCA  
CACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG□GCAGCAGTGGGGAAAT  
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGC□CGCGTGTATGAAGAAGG  
CCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGG□AAGGGAGTAAAGTTAATACC  
TTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAG□CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA  
GCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCG□TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG  
CGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCA□GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG  
GAACTGCATCTGATACTGGCAAG□CTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTC  
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCG□TAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG  
CGGCCCCCTGGACGAAGAC□TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA  
CAGGATTAGATAACCCTGG□TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTT  
GTGCCCTTGAGGCGT□GGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGG  
GAGTACGGCCGCA□AGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG  
CGGTGGAGCAT□GTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTT  
GACATCCA□CAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTGTGAGAC  
AGGTG□CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC  
GC□AACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCA  
□AAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC□A  
TCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACA□AAG  
AGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAG□TCCGG  
ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAA□TCGTGGAT  
CAGAAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC□GCCCGTCA  
CCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCT□TCGGGAGGGCGC  
TTACCACCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAA□CAAGGTAACCGTAGG  
GGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTA

## Document 6 PCR sur colonie.

### 5- Conditions d'amplification.

#### 1.1. Amorces.

Les oligonucléotides utilisés comme amorces sont spécifiques d'une partie du gène codant pour l'ARNr 16 S d'*Escherichia coli*.

- Amorce forward (Ecol 1) de 19 NT.

135 5'

CTGATGGAGGGGGATAACT

3' 153

- Amorce reverse (Ecol2) de 19 NT

702 5'

CTACGCATTTACCGCTAC

3' 684

#### 1.2. Cycles d'amplification.

Les caractéristiques des cycles de cette PCR sont les suivantes :

- Première étape du premier cycle 4 min 30 s à 94°C (lyse bactérienne et hot start).  
➤ 30 cycles correspondant aux étapes suivantes :

ETAPE	TEMPERATURE (en °C)	DUREE (en min)
Dénaturation	94	1
Hybridation	50	0,5
Extension des amorces	72	1

- Dernier cycle: étape d'extension des amorces allongée à 5 minutes à 72°C.  
➤ Abaissement de la température à 4°C.

### 6- Réalisation des PCR

#### 1.3. Matériel et réactifs à disposition.

- Tubes coniques de 0,2 mL
- GTS avec un isolement d'*E.coli*
- GTS avec un isolement de *Bacillus subtilis*
- Tampon d'amplification 10X
- Mélange des 4 dNTP à la concentration finale 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> pour chacun
- Amorce Ecol 1 à 1,25 nmol.mL<sup>-1</sup>
- Amorce Ecol 2 à 1,25 nmol.mL<sup>-1</sup>
- Taq polymérase à 0,5 U.μL<sup>-1</sup>
- H<sub>2</sub>O qualité BM

#### **1.4. Préparation du tube PCR (Mix PCR)**

- Introduire dans un tube conique de 0,2 mL placé dans la glace, les réactifs suivants dans l'ordre :
  - Tampon d'amplification 10X
  - Mélange des 4 dNTP afin d'obtenir une concentration finale de  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$
  - 6,25 pmol de l'amorce Ecol 1
  - 6,25 pmol de l'amorce Ecol 2
  - Un fragment de colonie prélevé stérilement à l'aide de la pointe d'un cône jaune stérile
  - H<sub>2</sub>O qualité BM qsp 50 µL
  - 1,5 U de Taq polymérase
  
- Homogénéiser par centrifugation, à l'aide d'un tube de 1,5 mL support.
- Bien fermer le tube et placer ce dernier dans le thermocycleur.
- Lancer les amplifications selon les cycles convenus.



**Document 7**  
**Contrôle des résultats de PCR par électrophorèse horizontale**  
**en gel d'agarose à 1,3% (m/v) immergé**

**Réactifs :**

- TE 1X = Tris/HCl 10 mmol/L pH 8, EDTA 1 mM, pH 8
- Tampon de charge (= loading dye= Solution de dépôt 6X) = saccharose 40 % (m/v), Bleu de Bromophénol 0.25 % (m/v) en eau distillée.

**Donnée :**

Le Bleu de Bromophénol migre comme un fragment de 500 pb.

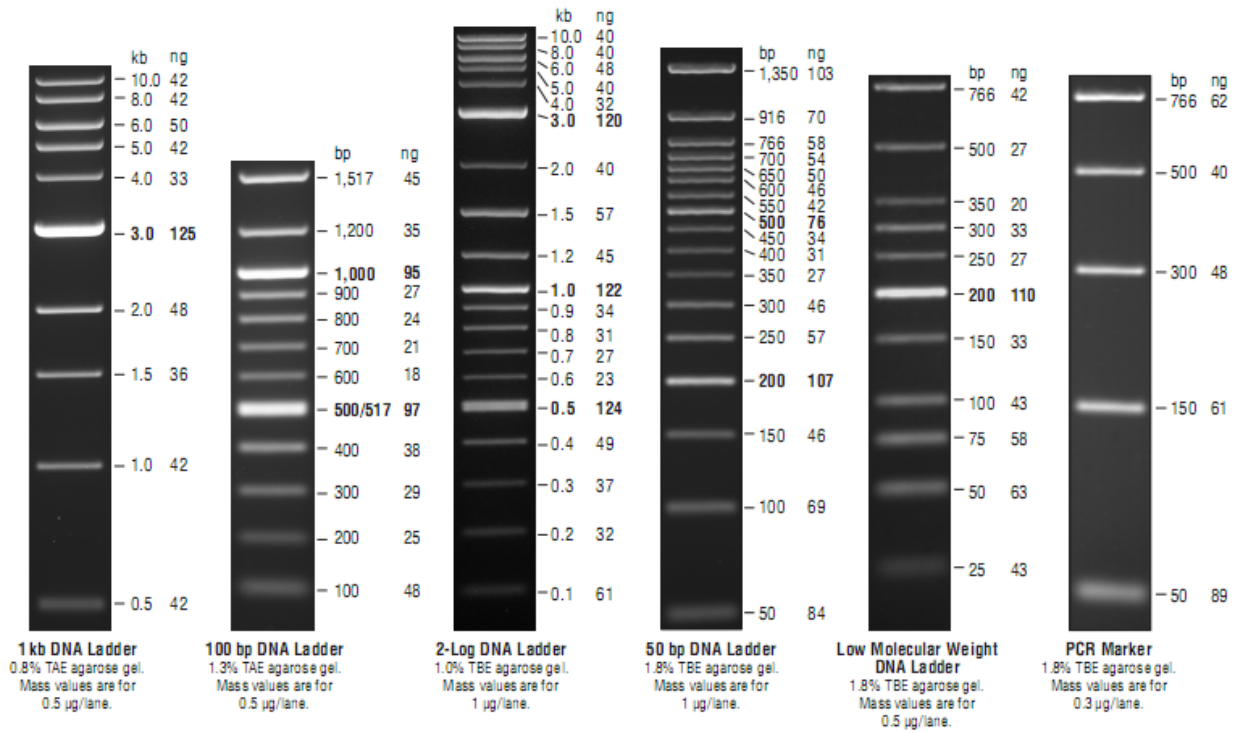
**Préparation des dépôts.**

- Prélever 10  $\mu$ L du produit de PCR.
- Ajouter à cette aliquote 2  $\mu$ L de loading dye
- Homogénéiser.
  
- Déposer 10  $\mu$ L des préparations précédentes.
- Déposer également 10  $\mu$ L de la solution de marqueur Biolabs 100 pb ladder déjà additionné de tampon de charge.

***La migration et révélation de l'électrophorèse seront réalisées par les examinateurs  
et une photographie des résultats sera fournie aux candidats.***

## Document 8

### Marqueurs de taille Biolabs.



# Éléments de correction de la deuxième épreuve

*Rapport établi par mesdames Christine Benayoun, Isabelle Etienne, Isabelle Faller, Françoise Guyomarch, Claudine Walther et messieurs Jean-Paul Brunet, Jean-Pascal Dumon, Jean-François Perrin*

## Résultats de l'épreuve

18 candidats ont composé :

- 3 ont obtenu une note supérieure ou égale à 12/20
- 7 ont obtenu une note supérieure ou égale à 10 et strictement inférieure à 12,
- 4 ont obtenu une note supérieure ou égale à 8 et strictement inférieure à 10,
- 4 ont obtenu une note supérieure ou égale à 6 et strictement inférieure à 8,
- aucun candidat n'a obtenu une note strictement inférieure à 6.

La moyenne générale de l'épreuve est de 10,06. La meilleure note est de 13,80/20.

## Observations générales du jury :

Le jury félicite les candidats pour leur attitude positive. Le sujet proposait des manipulations touchant à des domaines variés des biotechnologies Il était réalisable dans le temps imparti avec la possibilité de consacrer un temps suffisant à la rédaction. La plupart des candidats a d'ailleurs bien exploité ses résultats.

Le sujet comportait 4 manipulations indépendantes, pour certaines avec des contraintes de déplacement et une durée importante. Les candidats ont bien géré cette difficulté

Le jury a apprécié la combativité des candidats, ceux-ci ont été volontaires, du début à la fin avec un excellent esprit et une éthique remarquable dans leur comportement. Des contres performances, ont été relevés chez les candidats peu ou mal préparés.

Les plans de travail ont été particulièrement bien organisées ce qui est très appréciable.

Au niveau de l'organisation, les candidats disposaient d'une heure à utiliser en une ou plusieurs fois afin de se restaurer. Si certains candidats ont utilisés l'ensemble de ce temps de repos, notamment pour se nourrir et d'hydrater, trop de candidats ont mal gérés ce temps, certains n'ayant pris que 30 minutes de repos à l'issue du temps réglementaire. Cette pause est indispensable, elle permet de récupérer de l'énergie et de recentrer sa réflexion.

Quel que que soit l'espace de repos utilisé, chaque candidat n'a effectivement composé que durant les 8 heures réglementaires de l'épreuve.

Certains candidats ont perdu trop de temps : rédaction détaillée de brouillons ; voire parfois par du verbiage dans les copies. Globalement les candidats ne sont pas allés suffisamment à l'essentiel.

Au cours de l'épreuve, une heure totale de pause était imposée au candidat qui doit la gérer à sa guise.

## Partie I

Visiblement, les candidats ne maîtrisent pas tous les techniques de culture cellulaire mais chacun a joué le jeu. Même ceux et celles qui n'étaient pas à l'aise se sont efforcés de réaliser les différentes étapes du mode opératoire ; le protocole était suffisamment détaillé pour pouvoir faire l'ensemble de la manipulation demandée . Tous les candidats ont obtenu des résultats exploitables permettant de réaliser un dénombrement des cellules de la culture fournie et de réaliser leur mise en culture.

Plusieurs candidats, pratiquant sans doute de manière fréquente la culture de cellules animales, ont été particulièrement efficaces sur cette partie, avec une organisation remarquable et une gestion bien menée des étapes successives du mode opératoire ; le temps consacré à cette première partie a été très inégal selon l'expérience de la culture cellulaire : de 30 minutes pour les plus meilleurs à 2h pour

ceux qui visiblement découvraient des techniques pourtant importantes du domaine des biotechnologies

Il faut signaler que de nombreux candidats n'ont pas respecté les règles d'asepsie requises pour les manipulations stériles sous PSM. La gestuelle n'intègre pas les particularités du PSM car elle reste trop souvent calquée sur la gestuelle de microbiologie, dans un espace restreint (comme la zone d'asepsie relative à proximité d'un bec bunsen): d'où une mauvaise gestion des bouchons, un non respect de la veine de garde, ...Il est nécessaire pour tout enseignant de biotechnologies de se familiariser avec les techniques de culture cellulaire qui sont pratiquées en routine dans un grand nombre de laboratoires et dans des domaines très variés. La culture cellulaire fait partie des enseignements de la plupart des BTS (Bioanalyses et contrôles, biotechnologies, analyses de biologie médicale en particulier).

Le jury a été surpris et déçu par des réponses proposées aux questions concernant la « mise en situation » qui devait être proposée à des étudiants de BTS « Bioanalyses et contrôles ». Pour cette partie également, on doit souligner pour plusieurs d'entre eux, le manque de connaissances théoriques sur la culture cellulaire. Parmi les erreurs fréquemment rencontrées, on trouve, en particulier des réponses inadaptées concernant le rôle du sérum de veau fœtal : il était inintéressant de faire un inventaire des constituants du SVF, à partir du document de composition fourni : il fallait se limiter aux constituants caractéristiques absents du milieu de base (DMEM ici) et qui ne peuvent être apportés que par le sérum : protéines (intervenant dans la culture comme facteurs de croissance : EGF..., comme facteurs d'adhésion : fibronectine...). Les hormones devaient être citées : telle que l'hormone de croissance pour son action mitogène ou l'insuline nécessaire à la pénétration du glucose dans les cellules en culture (mais il n'y avait pas lieu d'évoquer les autres hormones du milieu sans lien direct avec les cellules cultivées). Il a été considéré comme une erreur de citer le glucose comme source de carbone (le glucose étant apporté par le milieu de base); mais d'autres erreurs plus graves ont été remarquées plusieurs fois : les « facteurs de croissance » ont été évoqués mais avec la définition de ceux utilisés en microbiologie.... ; la LDH ou la PAL enzymes endocellulaires présentes dans le SVF ou encore des déchets métaboliques (urée ou bilirubine ) ont même été cités comme ayant un rôle dans le sérum ajouté au milieu.

## Partie II

**Identification d'une souche isolée d'une urine** Il s'agissait d'une méthodologie classique de Microbiologie. La majorité des candidats a bien réussi cette épreuve qui ne présentait pas de difficulté particulière tant pour les aspects techniques que pour le compte-rendu.

Malgré cela, beaucoup de candidats ont consommé un temps souvent trop important à cette partie. Des maladresses techniques, notamment dans le cadre de la révélation et l'exploitation de la galerie API ont contribué à cette perte de temps.

## Partie III

**Etude des caractéristiques cinétiques d'une enzyme michaelienne : la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli* (EC 3.2.1.23)**

### Étude par méthode classique

Il s'agissait donc d'établir une courbe vitesse initiale ( $v_i$ ) en fonction de la concentration en substrat ([S]). Les calculs préalables à la conception du mode opératoire (en cinétiques deux points) nécessitaient de bien maîtriser les fondamentaux de l'enzymologie et d'exploiter de façon judicieuse les documents. Certains candidats ont bien tiré leur épingle du jeu, d'autres ont exposé leur raisonnement de façon plus confuse. On pouvait exposer les calculs en quelques lignes en posant des équations aux grandeurs.

Presque tous les candidats ont proposé et décrit un mode opératoire pour la détermination des paramètres cinétiques par méthode deux points. Il fallait tester un minimum de concentrations en substrat pour espérer un résultat interprétable (au moins 6), en resserrant les points de mesure dans la zone des concentrations correspondant à la courbure de la représentation  $v_i = f(S)$ . Certains candidats n'en ont testé que trois ce qui était évidemment nettement insuffisant.

Un peu plus de la moitié des candidats ont conduit les manipulations à leur terme et seulement un tiers ont exploité leurs résultats. Parmi ceux-ci, seuls quelques uns ont utilisé la représentation de Lineweaver et Burk et un candidat celle d'Eadie-Hofstee, les autres - par manque de temps ? - ont utilisé l'allure directe de la représentation  $v_i = f(S)$  ce qui n'était pas judicieux.

Aucun candidat n'a évoqué les qualités respectives des différentes façons classiques d'exploiter les

résultats ou la possibilité de réaliser une régression hyperbolique (l'outil était disponible).

### **Étude par méthode fondée sur l'intégration mathématique d'une cinétique unique concentration en produit en fonction du temps**

#### Cinétique en continu :

Trois candidats n'ont pas mis en œuvre la cinétique en continu dont le mode opératoire était pourtant détaillé dans le sujet.

Un tiers des candidats ayant réalisé la cinétique ne se sont pas présentés au poste informatique pour l'exploitation des résultats, soit par manque de temps, soit en raison d'une certaine appréhension. Il est à noter que tous ceux qui se sont présentés ont manifesté une vive curiosité et ont eu une attitude très positive ce qui a permis de bons échanges avec les examinateurs.

### **Partie IV**

#### **Détection d'*Escherichia coli* par PCR sur colonies**

Seul un candidat n'a pas réalisé cette partie. Le jury a été surpris par le fait que les calculs de préparation du mix PCR aient posé des difficultés à plusieurs candidats. Il déplore également que des problèmes de traçabilité des échantillons en cours de manipulation aient empêché certains d'exploiter pleinement leurs résultats. Enfin, il fallait mettre en œuvre, en plus des PCR sur colonies d'*Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis*, un témoin négatif trop souvent oublié.

Il était absolument inutile d'utiliser la représentation donnant le logarithme de la taille du marqueur en fonction de la distance de migration des fragments pour déterminer la taille de l'amplicon.

Parmi les candidats ayant obtenu des résultats exploitables, certains ont mené une réflexion très pertinente en préconisant de tester, en lieu et place de *Bacillus subtilis*, une souche plus proche d'*Escherichia coli*

## CONCLUSION GENERALE

Le jury félicite les 7 candidats admis à la session 2014 de l'agrégation interne de biochimie génie biologique.

Le jury encourage les candidats non admis à persévérer dans leur projet. Les moyennes générales, notamment aux épreuves d'admission attestent de la qualité de tous les candidats à ce concours d'excellence.

Comme cela a été indiqué tout au long de ce rapport, il est nécessaire que les candidats à ce concours se préparent aux épreuves et témoignent des compétences attendues d'un professeur agrégé de biochimie génie biologique.

**Le jury tient à remercier Monsieur le proviseur du lycée Pierre Gilles de Gennes, ENCPB et son équipe : proviseurs adjoints, enseignants, techniciens, et personnel administratif, pour l'accueil et l'aide efficace apportés tout au long de l'organisation et du déroulement de ce concours qui a eu lieu dans d'excellentes conditions.**