



MINISTÈRE
DE L'ÉDUCATION
NATIONALE, DE
L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR ET DE
LA RECHERCHE

EAI BIO 1

SESSION 2015

AGRÉGATION CONCOURS INTERNE ET CAER

Section : BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE

PREMIÈRE ÉPREUVE

Durée : 6 heures

Le dictionnaire bilingue anglais-français est autorisé.

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout autre dictionnaire et de tout matériel électronique (y compris la calculatrice) est rigoureusement interdit.

Dans le cas où un(e) candidat(e) repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il (elle) le signale très lisiblement sur sa copie, propose la correction et poursuit l'épreuve en conséquence.

De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, il vous est demandé de la (ou les) mentionner explicitement.

NB : *La copie que vous rendrez ne devra, conformément au principe d'anonymat, comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé comporte notamment la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de signer ou de l'identifier.*

Tournez la page S.V.P.

A

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.

*Dans le sujet, la lettre **C** identifie les questions mobilisant les connaissances scientifiques et techniques, la lettre **P** identifie les questions d'ordre pédagogique.*

Des extraits de programmes des filières STL et STS sont regroupés en annexe en fin de sujet.

Première partie

Le virus Ebola : multiplication, sérothérapie et dépistage

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, le virus Ebola se transmet à l'homme après un contact étroit avec du sang, des sécrétions ou des liquides biologiques d'animaux ou d'individus infectés. La période d'incubation dure de 2 à 21 jours. Il s'agit d'une virose aiguë sévère caractérisée par divers symptômes qui, dans certains cas, aboutissent à des hémorragies internes et externes.

Le virus Ebola appartient à la famille des *Filoviridae* (filovirus). Initialement classés parmi les rhabdovirus, les filovirus forment aujourd'hui une famille distincte et seraient en réalité plus proches des paramyxovirus. Le **document 1** présente le **cycle de multiplication du virus Ebola** ainsi que des informations concernant son génome et les protéines exprimées.

- P1** *Il est demandé à des étudiants de BTS Analyses de Biologie Médicale de décrire, à l'appui de ce document, les différentes étapes du cycle du virus Ebola. Rédiger une proposition de correction.*

Si la transfusion de plasma de personnes guéries de l'infection par le virus Ebola a donné des résultats encourageants, des recherches ont également été menées pour **développer la sérothérapie** en utilisant des anticorps monoclonaux. Différents types d'anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine d'enveloppe GP du virus EBOLA ont été produits : des anticorps monoclonaux de souris (6D8, 6D3, 13C6), de singe (JP3K11) et des anticorps humanisés (KZ52). Leur efficacité pour la neutralisation du virus Ebola a été testée et leur mode d'action analysé.

L'efficacité des anticorps monoclonaux pour la neutralisation du virus Ebola a été étudiée par infection d'un tapis cellulaire, suite à leur incubation en présence de particules pseudovirales. Les conditions expérimentales et les résultats sont présentés dans le **document 2**.

- C1** *Le pourcentage d'infection est mesuré par rapport à un témoin. Indiquer la composition de ce témoin. Justifier la réponse.*
- C2** *Analyser les résultats obtenus.*
- P2** *Proposer une démarche pédagogique permettant d'expliquer la sérothérapie à des étudiants de STS, en intégrant l'exploitation du **document 2**.*

L'étude du mode d'action des anticorps monoclonaux neutralisant le virus Ebola se fonde sur la structure et le rôle de la protéine GP présentés de façon détaillée dans le **document 3**.

Afin d'identifier la région reconnue par chaque anticorps monoclonal testé, différentes constructions permettant l'expression du gène sauvage de la protéine GP ou de mutants ont été réalisées comme présenté dans le **document 4**.

Des cellules rénales embryonnaires humaines (la lignée 293), n'exprimant pas la protéine GP en temps normal, ont été transfectées avec une des quatre constructions précédentes ou avec le vecteur vide.

Après 20 à 22 h d'incubation, les cellules ainsi transfectées ont été récoltées puis incubées avec les différents anticorps monoclonaux évoqués précédemment. Après l'ajout d'un réactif complémentaire, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (FACS). Les résultats sont présentés dans le **document 5**.

- C3** *Indiquer la nature du signal mesuré par le cytomètre en flux dans cette expérience. Préciser le(s) réactif(s) complémentaire(s) indispensable(s) pour effectuer ces mesures.*
- C4** *Expliciter les contrôles réalisés (première colonne et courbes bleues), puis analyser l'ensemble des résultats obtenus et conclure.*
- P3** *Proposer une courte évaluation (deux à trois questions) permettant de vérifier la compréhension du principe du FACS par des étudiants en STS biotechnologies. Rédiger un corrigé.*

Le **dépistage** des patients est une préoccupation essentielle afin d'éviter la propagation du virus au sein des populations. Ainsi, disposer d'une technique rapide, spécifique, sensible et peu coûteuse s'avère pertinente.

La technique développée par *Notomi et al.* et dénommée RT-LAMP (Reverse Transcription–Loop-mediated isothermal AMPlification) peut être adaptée pour détecter le virus Ebola. Ce test est réalisé en tube unique, incubé 1 heure à 63°C en bain thermostaté. Le milieu réactionnel contient entre autres, l'échantillon à tester, les enzymes nécessaires ainsi que les amorces spécifiques.

Comme le montre le **document 6**, le principe repose sur l'utilisation de **4 amorces** distinctes spécifiquement dessinées pour reconnaître **6 régions différentes** de la séquence nucléotidique cible à amplifier :

- **Amorce BIP** : portant la séquence **B2** complémentaire de la séquence B2c du gène à amplifier et la séquence **B1c** identique à celle du gène à amplifier.
- **Amorce BOP (ou B3)** : complémentaire de la séquence B3c du gène à amplifier
- **Amorce FIP** : portant la séquence **F2** complémentaire de la séquence F2c du gène à amplifier et la séquence **F1c** identique à celle du gène à amplifier.
- **Amorce FOP (ou F3)** : complémentaire de la séquence F3c du gène à amplifier

Le **document 7** schématise les premières étapes de ce test.

- C5** *Justifier la nécessité de réaliser une transcription inverse pour détecter le virus Ebola dans un prélèvement humain.*

Le **document 8** schématise les étapes de la formation d'un ADN « en haltère ». L'enzyme impliquée est la *Bst* ADN polymérase. Elle possède non seulement une activité polymérase mais également une activité de déplacement de brin.

- C6** *Expliquer les étapes (3) et (4) schématisées dans le document 8.*

- C7** *Justifier le nombre d'amorces utilisées dans la RT-LAMP et préciser le rôle de chacune.*

Au cours d'une séance de bio-informatique en STS Biotechnologies, la notion de spécificité de la technique de détection doit être illustrée.

- P4** *Proposer une application à mettre en œuvre pour permettre aux étudiants d'appréhender la notion de spécificité de détection du virus Ebola. Insister sur le ou les paramètres responsables de cette spécificité ; paramètres modifiables à l'aide de l'outil informatique.*

Le **document 9** explique les étapes d'amplification de l'ADN « en haltère » par LAMP.

A l'issue de ces étapes, un test positif par RT-LAMP repose sur l'apparition d'un trouble détectable après une heure d'incubation.

- C8** *Expliquer l'importance de l'obtention d'une structure en boucle dans le déroulement de la RT-LAMP.*

- C9** *Identifier l'origine du trouble à l'issue de la RT-LAMP et justifier son apparition.*

Le résultat visuel de l'amplification peut être validé par une électrophorèse en gel d'agarose (**document 10**).

- C10** *Analyser puis interpréter le résultat observé dans les puits 1 et 2 du gel d'agarose.*

- P5** *Présenter, aux étudiants en STS, les techniques utilisables pour révéler une électrophorèse d'ADN en gel d'agarose en insistant sur les équipements de protection individuels et collectifs éventuellement nécessaires.*

Les techniques de RT-LAMP et de RT-PCR présentent des caractéristiques proches mais sont pourtant bien différentes.

- C11** *Construire un tableau comparatif de ces deux techniques.*

Deuxième partie

Développement et validation d'une méthode de dosage du tryptophane et de ses métabolites

L'axe cerveau intestin est une voie de communication bidirectionnelle entre le système nerveux central et le tractus gastro-intestinal. De nombreux métabolites, issus de la transformation du tryptophane, interviennent dans la régulation de cette voie.

Le tryptophane peut s'engager dans différentes voies métaboliques : la biosynthèse des protéines, la voie de la sérotonine ou celle de la kynurénine.

L'étude porte plus particulièrement sur la voie de la kynurénine, présentée de façon plus détaillée dans le **document 11**.

Un déséquilibre entre l'acide kynurénique (KYNA) et l'acide quinolinique (QUIN) ou une diminution de la disponibilité en sérotonine, peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies.

Par ailleurs, différentes études ont mis en évidence l'impact de la composition de la flore intestinale sur le profil métabolique du tryptophane. Pour affiner la compréhension des phénomènes impliqués, il est important de disposer d'une méthode de dosage du tryptophane et de ses métabolites.

Une méthode de dosage permettant de quantifier le tryptophane ainsi que les dérivés métaboliques de la kynurénine a récemment été développée et validée (*Marisa Müller, Jan L. Du Preez, Brian H. Harvey, Journal of Chromatography B, 898 (2012) 121-129*).

Elle utilise une pré-purification par extraction en phase solide suivie d'une séparation chromatographique (HPLC) et d'une détection par spectrométrie de masse. Différents aspects de son développement et de sa validation sont présentés dans l'étude qui suit.

Les réactifs utilisés répertoriés dans le **document 12**, incluent l'utilisation d'un étalon interne.

P6 *Dans le cadre d'une séance de travaux dirigés, présenter une démarche pédagogique permettant d'introduire la notion d'étalon interne en BTS biotechnologies, en particulier les calculs associés à l'exploitation des résultats. Prendre appui sur un dosage utilisant un seul étalon externe.*

La préparation des différents échantillons à doser est détaillée dans le **document 13**.

C12 *Expliquer l'importance de l'utilisation de plasma prétraité.*

Le système chromatographique et les phases mobiles mises en œuvre sont détaillés dans le **document 14**.

C13 *Proposer un schéma du montage du système chromatographique utilisé.*

C14 *Dégager le principe sur lequel se fonde la séparation des molécules.*

La validation de la méthode s'effectue dans le respect des prescriptions de la FDA (Food and Drug Administration). Plusieurs données caractéristiques de la performance de la technique sont présentées dans le **document 15**.

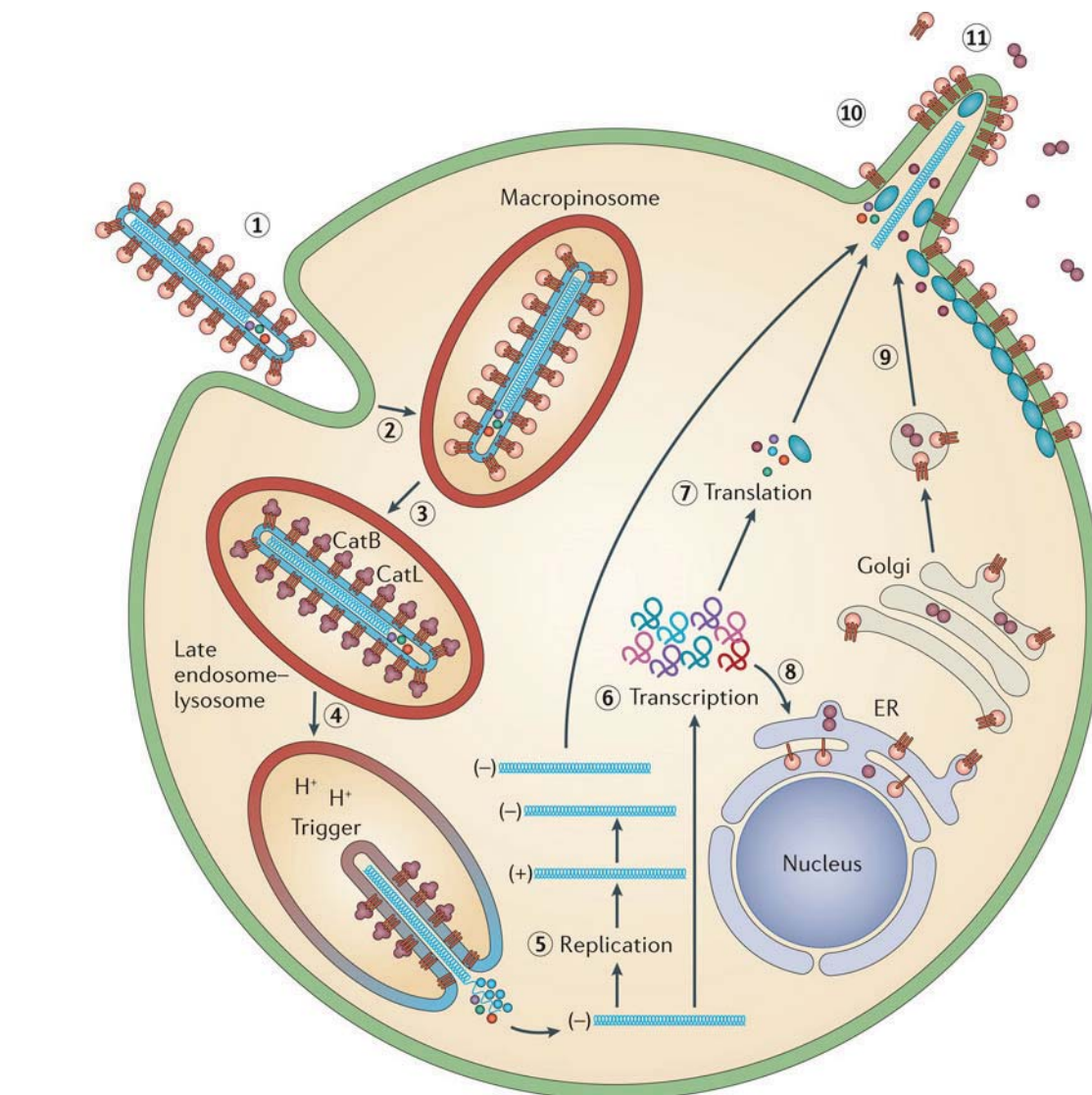
C15 *Définir chacun des paramètres évoqués dans ce document.*

P7 *Détailler les étapes d'une séance d'activité technologique introduisant l'une de ces notions, dans le cadre du programme « mesure et instrumentation » en classe de 1^{ère} STL.*

Afin d'optimiser la méthode développée précédemment, il a été envisagé de mettre en œuvre une technique séparative plus performante que l'HPLC, la chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC) dont les caractéristiques sont décrites dans le **document 16**.

P8 *Utiliser les documents présentés pour concevoir un exercice présentant les particularités et les atouts de l'UPLC par rapport à l'HPLC, en STS Biotechnologies. Indiquer les principaux éléments de corrigé.*

Document 1 : cycle du virus Ebola (adapté de White JM. & Schornberg KL., Nature Reviews Microbiology, 2012)



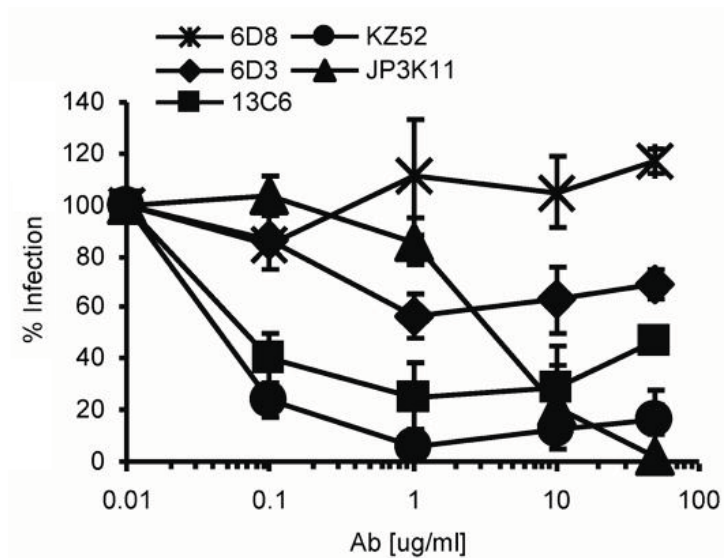
-  FL GP trimer : glycoprotéine transmembranaire de l'enveloppe virale
-  19-kDa GP trimer : forme protéolysée de la glycoprotéine GP
-  sGP : glycoprotéine GP sécrétée
-  mRNA
-  VP40
-  RNA + NP
 -  NP : nucléoprotéine de la capside
 -  VP24 : protéine de la matrice, associée à l'enveloppe virale
 -  VP30 : nucléoprotéine mineure
 -  L : ARN polymérase ARN-dépendante
 -  VP35 : cofacteur de la polymérase virale

Document 2 : étude de l'efficacité des différents Ac monoclonaux neutralisant le virus Ebola

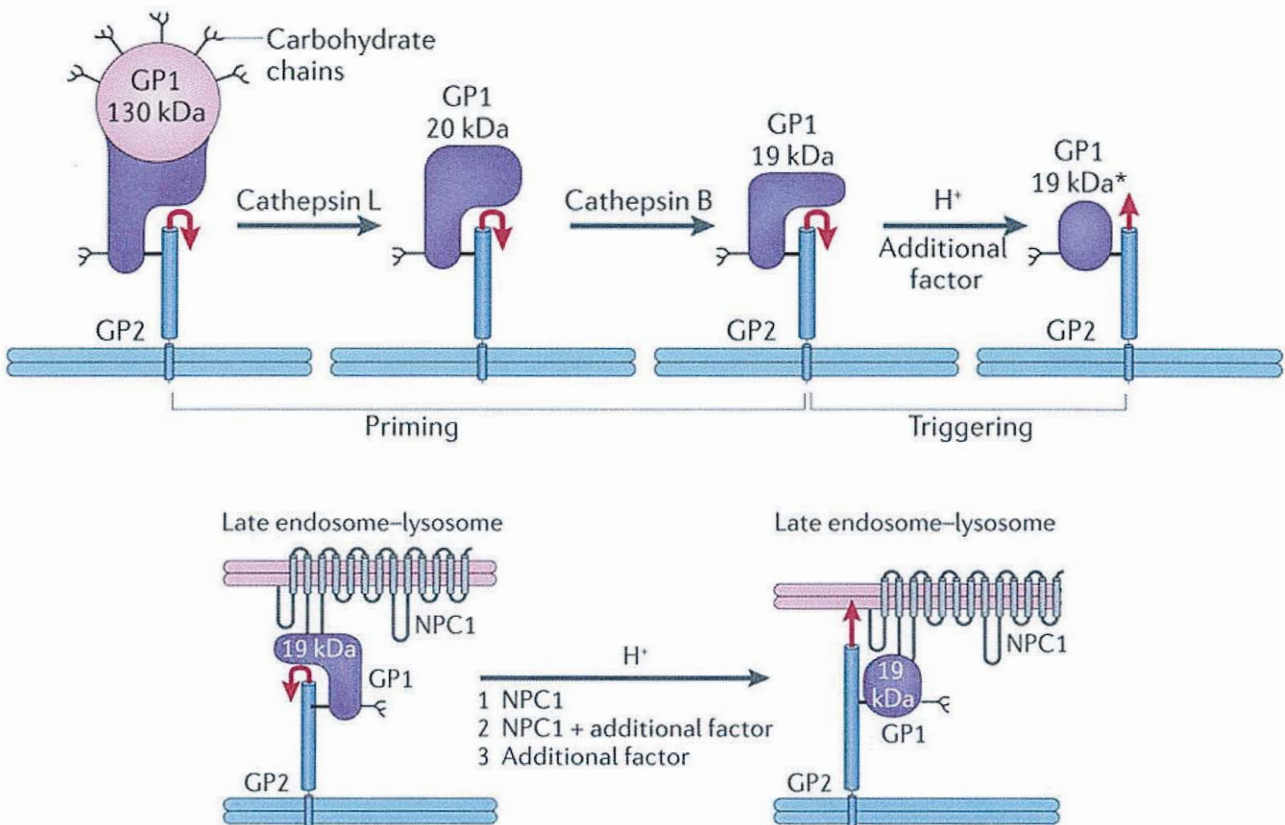
Des études utilisant ces anticorps sont réalisées afin d'en déterminer l'efficacité.

Des particules pseudovirales, exprimant la glycoprotéine d'enveloppe GP du virus Ebola et porteuses du gène rapporteur de la luciférase, sont produites. Elles sont ensuite incubées pendant 1 heure en présence de différentes concentrations des anticorps monoclonaux testés avant d'infecter un tapis de cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). L'activité luciférase est mesurée 72 heures après l'infection.

Le % d'infection en fonction de différentes concentrations en Ac pour chaque Ac neutralisant testé est représenté ci-dessous :



Document 3 : données structurales et fonctionnelles concernant la protéine d'enveloppe GP (adapté de White JM. & Schornberg KL., Nature Reviews Microbiology, 2012)



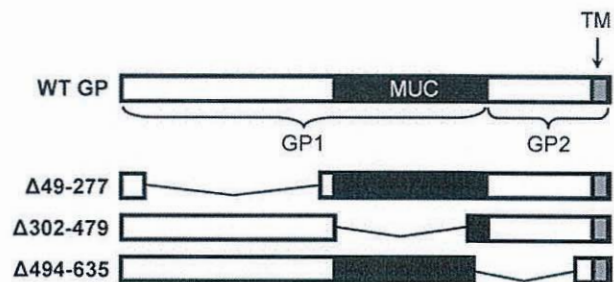
Certains auteurs suggèrent que le virus Ebola se lierait à un récepteur membranaire cellulaire par l'intermédiaire de la protéine GP. Mais tous s'accordent à dire que le virus pénètre dans la cellule par macropinocytose.

La glycoprotéine GP (N- et O-glycosylée) est constituée de deux sous unités, GP1 extracellulaire de 130 kDa (extrémité N-terminale) et GP2 transmembranaire de 26 kDa (extrémité C-terminale) liées par des ponts disulfures.

Le virus internalisé dans un macropinosome subit successivement deux protéolyses en présence des cathepsines L et B (protéases endosomales) et une activation pH-dépendante qui permettent la fusion entre la membrane endosomale et l'enveloppe virale. Ainsi le virus peut sortir de l'endosome tardif. Cette étape fait intervenir une protéine de la membrane lysosomale, la NPC1.

Document 4 : représentation des différents gènes clonés permettant l'expression de la protéine GP sauvage et des trois protéines mutées

Les portions de gènes codant la partie N-terminale de GP1, la région MUC de GP1 et la protéine GP2, ont été enlevées dans trois constructions différentes.

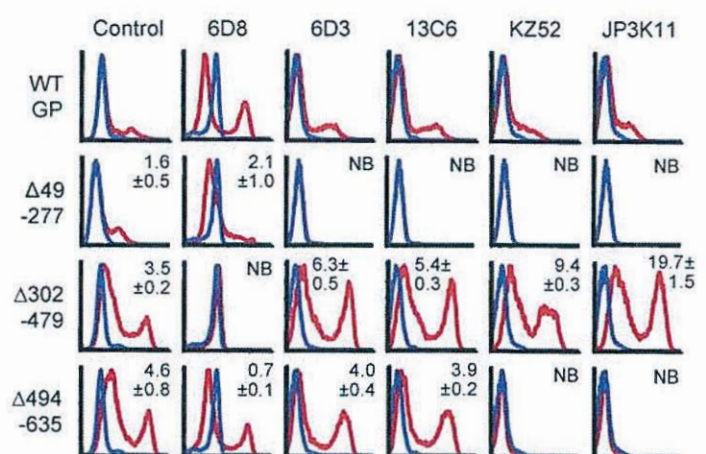


Document 5 : résultats obtenus en cytométrie en flux

« Control » indique l'utilisation d'un sérum contrôle contenant des anticorps polyclonaux anti-GP.

Les courbes bleues correspondent aux résultats obtenus avec les cellules de la lignée 293 transfectées par le vecteur vide.

Les courbes rouges correspondent aux cellules de la lignée 293 transfectées par une des constructions présentées dans le document 4.



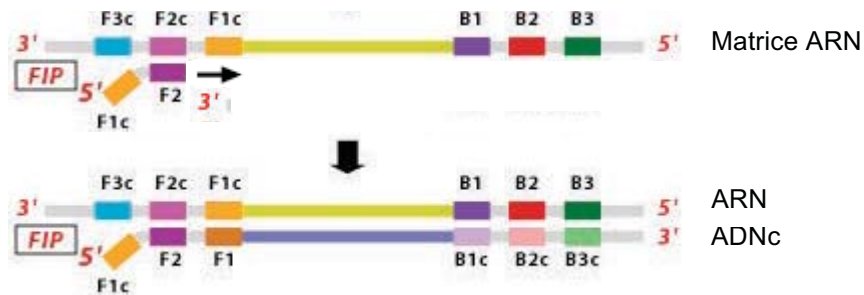
Document 6 : représentation schématique d'un gène cible à amplifier par RT-LAMP



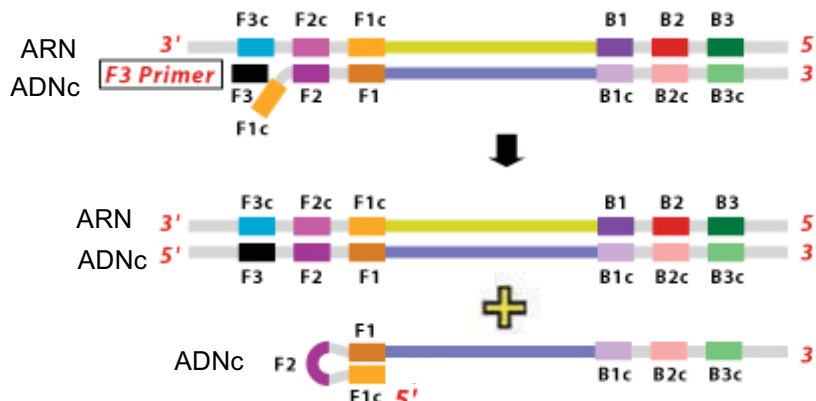
Document 7 : transcription inverse

L'ARN, purifié à partir des échantillons à tester, est incubé pendant 1 heure à 63°C en présence des enzymes, amorces et substrats nécessaires.

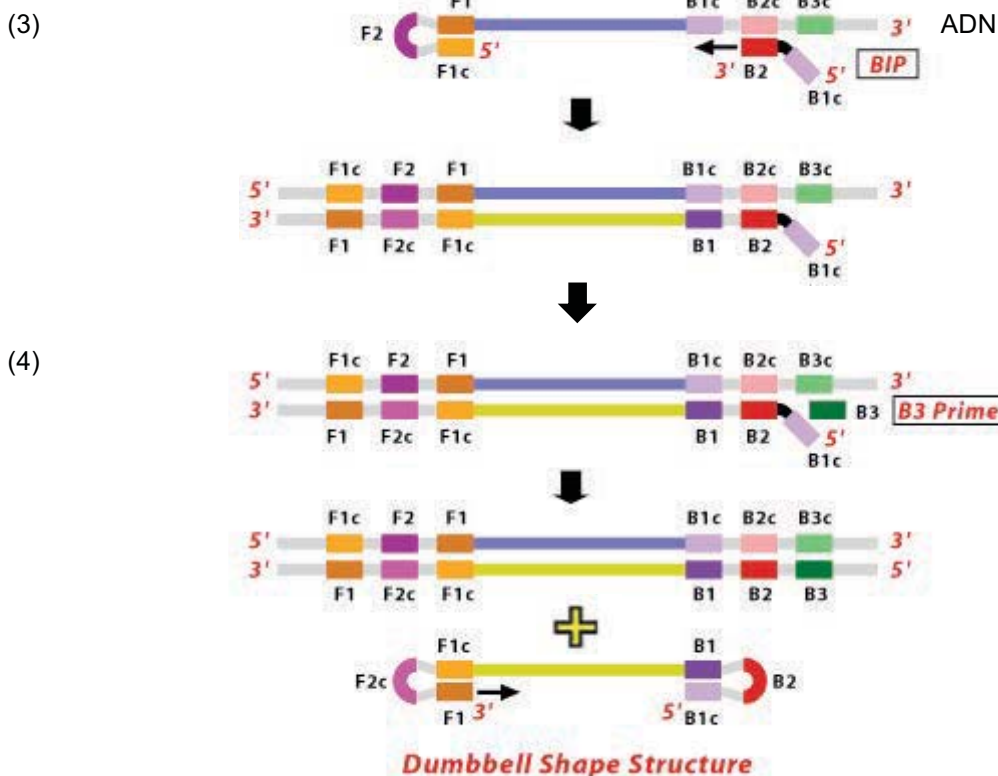
(1) L'amorce FIP s'hybride avec la matrice d'ARN et, sous l'action de la transcriptase inverse, un ADNc est synthétisé formant une structure nucléotidique double-brin.



(2) L'amorce F3 s'hybride avec la matrice d'ARN à l'extérieur de l'amorce FIP. Sous l'action de la transcriptase inverse, un nouvel ADNc est synthétisé tout en libérant l'ADNc précédemment synthétisé grâce à FIP. Cet ADNc libéré s'auto-hybride en 5' grâce à ses domaines F1 et F1c complémentaires.



Document 8 : étapes de formation de la structure « en haltère »

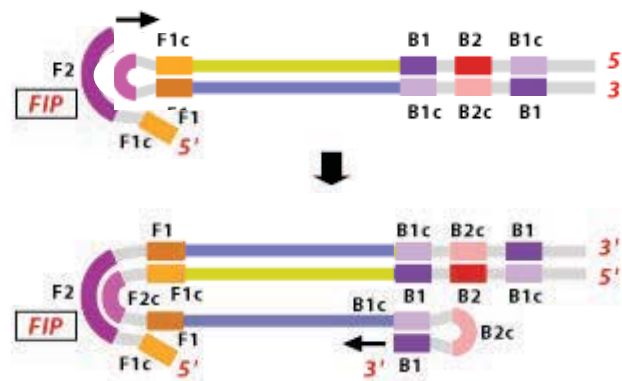


Document 9 : amplification de l'ADN « en haltère » par LAMP

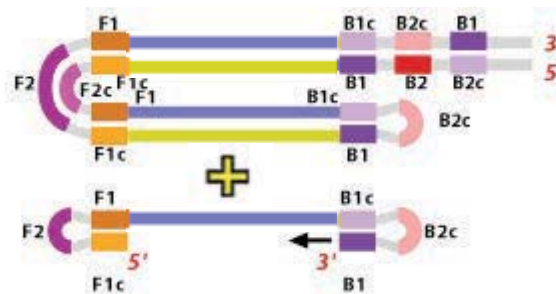
(5) A partir de la structure « en haltère », les nucléotides sont ajoutés à l'extrémité 3' du domaine F1 par l'ADN polymérase à activité de déplacement de brin qui allonge puis ouvre la structure en boucle de l'extrémité 5'. La structure « en haltère » devient alors une structure « tige-boucle » (Stemloop) qui servira de matrice pour la suite de la réaction LAMP.



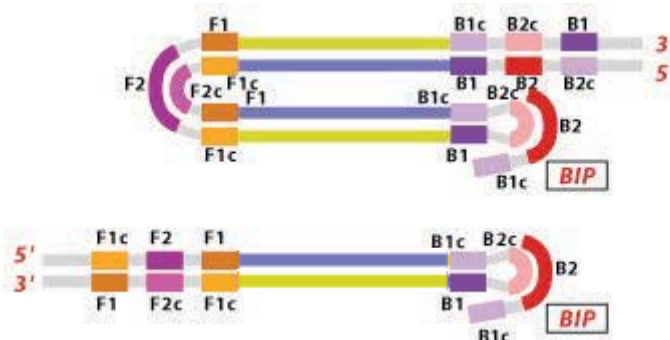
(6) Afin d'initier le cycle LAMP, l'amorce FIP s'hybride au niveau de la boucle de la structure « tige-boucle ». L'initiation de la synthèse du brin débutera à cet endroit. Au fur et à mesure de l'élongation, le brin F1 initialement polymérisé est déplacé et forme une nouvelle boucle à son extrémité 3'.



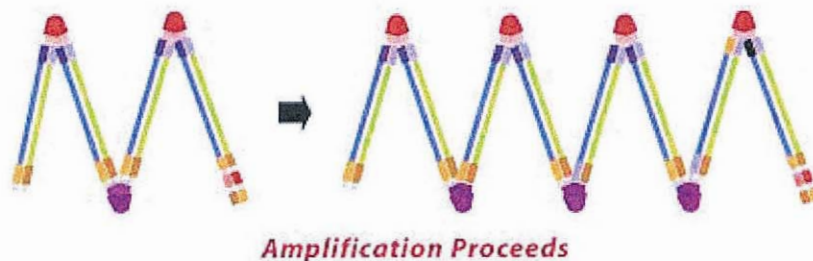
(7) De nouveaux nucléotides sont ajoutés à l'extrémité 3' du domaine B1. L'élongation a lieu tout en déplaçant le brin FIP nouvellement synthétisé qui forme, en se libérant, une structure « en haltère ». Une structure d'ADN double brin comportant une boucle (en B2c) est générée.



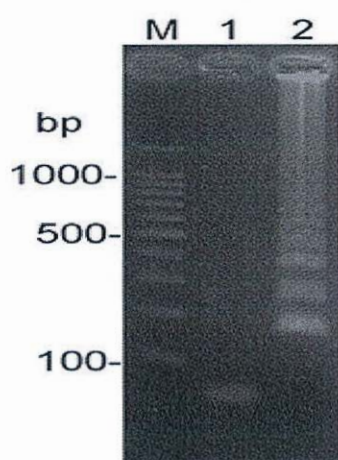
(8) Ces deux produits servent de matrice pour l'amorce BIP dans les cycles d'amplification suivants. Ainsi, une séquence cible LAMP est amplifiée.



(9) Les produits finaux obtenus constituent un mélange d'ADN « tige-boucle » de longueurs variables et de structures dites « en chou-fleur » comportant plusieurs boucles. Ces structures se forment par hybridation entre des répétitions alternativement inversées de la séquence cible au sein du même brin.



Document 10 : RT-LAMP assay using *in vitro* transcribed ZEBOV RNA



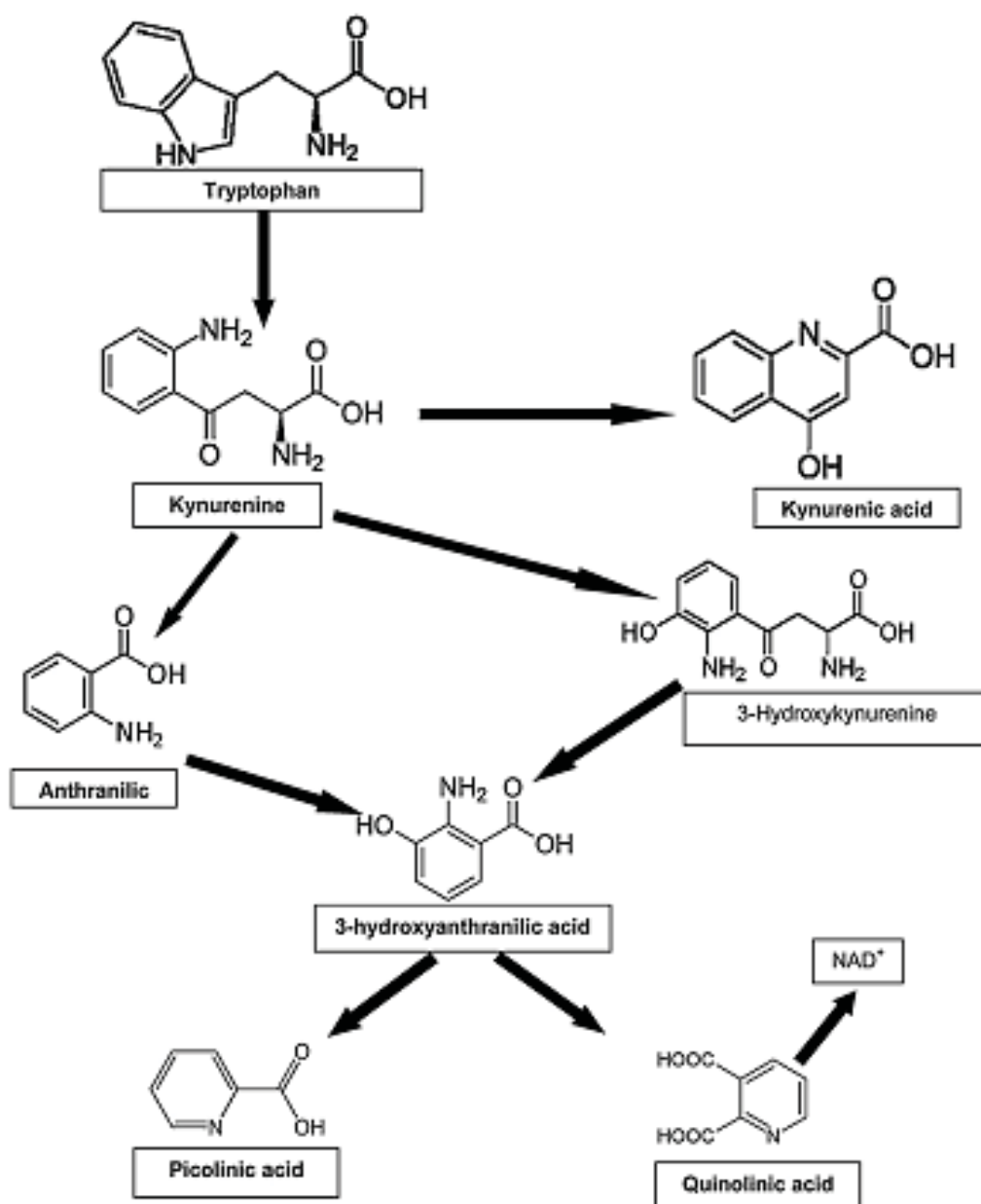
Electrophoretic analysis of RT-LAMP products on 3% agarose gel. RT-LAMP was carried out at 63°C for 60 min.

M, 100-bp DNA ladder ,

Lane 1, RT-LAMP with distilled water (negative control) ,

Lane 2, RT-LAMP with *in vitro* transcribed ZEBOV RNA.

Document 11 : voie métabolique de la kynurénine



Document 12 : réactifs et produits chimiques utilisés en HPLC

- tryptophane, kynurénine, acide kynurénique (KYNA), acide anthranilique, acide 3-hydroxyanthranilique (3-OHAA), acide quinolinique (QUIN), acide picolinique (PA), étalon interne (IS) éthyl-4-hydroxy-2-quinolinecarboxylate (éthyl-4-OH-2-quin), charbon de bois activé (DARCO ®) de chez Sigma-Aldrich
- eau désionisée, méthanol de qualité HPLC (Burdick and Jackson Laboratory Co) ; acide formique (SAARCHEM) et formate d'ammonium (Agilent Technologies).

Document 13 : préparation des échantillons à injecter sur la colonne

Des fractions aliquotes de 800 µL de plasma de rat prétraité^{*1}, de plasmas calibrants^{*2} ou de plasmas de contrôle qualité^{*2} ont été additionnées de 50 µL de solution stock d'étalon interne et homogénéisées pendant 10 s. Des extraits de ces différents mélanges ont alors été préparés par extraction en phase solide à l'aide de cartouches 3cc Waters HLB (Waters, Milford Partie Non. WAT094226) placées sur un collecteur d'élution à vide. Après avoir rincé les cartouches avec du méthanol (2 mL), puis de l'acide formique 1% (2 mL), les échantillons ont été chargés sur les cartouches d'extraction dans 800 µL d'acide formique 1%. Les cartouches chargées ont ensuite été lavées avec de l'acide formique (2 mL) puis séchées pendant 5 à 10 minutes sous vide. Les analytes adsorbés ont été élués par une solution de NH₄OH 1% en eau-méthanol (2 mL). Les éluats ont été évaporés sous un courant doux d'azote dans un bloc chauffant à 40°C. Les résidus secs ont été reconstitués dans 150 µL de la solution de NH₄OH 1% en eau-méthanol, homogénéisés pendant 10 s, transférés dans des tubes d'échantillonnage automatique et 10 µL des fractions aliquotes ont été injectés dans le système LC-MS/MS.

^{*1} : Préparation du plasma prétraité

Le plasma prétraité a été obtenu par purification sur charbon activé d'un pool de plasmas de rats selon la méthode décrite par X.Xiang, Y.Han, M.Neuvonen, J.Laitila, P.J.Neuvonen, et M.Nieme (J.Chromatogr. B-878 (2010) 51) pour éliminer les métabolites endogènes du tryptophane.

Pour résumer, 5 mL de plasma ont été mis en contact avec 280 mg de charbon de bois activé et le mélange a été agité doucement sur un mélangeur orbital pendant environ 2 h à température ambiante. Après centrifugation à 14 000 g pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant correspondant au plasma purifié a été transféré dans des tubes propres et utilisé immédiatement.

^{*2} : Les plasmas calibrants et les plasmas de contrôle qualité ont été préparés en additionnant au plasma prétraité des volumes donnés des solutions stocks des différents métabolites étudiés.

Document 14 : caractéristiques du système chromatographique et des phases mobiles

Système chromatographique

Le système HPLC mis en œuvre est un système Agilent 1100 série HPLC avec pompe à gradient binaire, échantillonneur automatique et dégazeur sous vide couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle API 2000 et le logiciel d'acquisition et de traitement des données Analyst1.4 (AB Sciex SA (Pty) Ltd, Johannesburg).

L'analyse a été effectuée avec une colonne Restek C18 (Restek, Bellefonte, PA) 100 × 2,1 mm; 5 µm. La température de la colonne a été maintenue à 25°C. La détection a été réalisée avec le spectromètre de masse triple quadripôle API 2000 équipé d'une source d'ions Turbo exploitée dans le mode ESI (electrospray ionization = ionisation par électronébulisation) positif et négatif.

Les phases mobiles

L'élution des analytes a été effectuée en gradient de phase mobile réalisé à l'aide des phases A et B, sous un débit de 0,2 mL.min⁻¹.

La phase mobile A : formate d'ammonium dans l'eau (0,05 %, v/v, pH ajusté à 5,5 avec de l'acide acétique).

La phase mobile B : 100 % acétonitrile.

L'élution a débuté avec 5 % de B. Le % de B a été augmenté linéairement jusqu'à 80 % à 5 minutes, maintenu à 80 % jusqu'à 8 minutes puis ramené à 5 % à 8,2 minutes et laissé à ré-équilibrer jusqu'à 12 minutes. Les temps de rétention de l'étalon interne étaient de 8,11 minutes en mode positif et de 6,51 minutes en mode négatif.

Document 15 : method validation

- Detection and quantification limits

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were defined as the minimum concentration where the signal was at least 3 times and 10 times greater than the average background noise of an un-spiked blank (only containing IS), at the retention time of each analyte, respectively.

- Linearity

Calibrations were performed using five levels of concentration of each standard. Five replicates were used to establish the linear calibration equation ($y = mx + c$) and analyzed using the ratio of analyte peak area over IS peak area after quantitative integration by Analyst 1.4.2 software. Linearity was measured as the coefficient of determination (R^2) measured from the 5 calibration replicates. The acceptance criteria for each back-calculated standard concentration were $\pm 15\%$ deviation from the nominal value except at LOQ, which was set at $\pm 20\%$.

- Precision and accuracy

Each level of the calibration curve was measured daily before sample analysis. Precision was assessed from the relative standard deviation from the mean (RSD) and calculated separately for each concentration level of the calibration curve. Similar to precision, accuracy was calculated using each concentration level of the calibration curve and reported as a percentage of the actual known concentration. Five different calibration curves were analyzed each day and on different days to establish the intra- and inter-day precision and accuracy, respectively. The criteria for acceptability of the data included accuracy within $\pm 15\%$ deviation (SD) and the precision determined at each concentration level should not exceed 15 % of the coefficient of variation (CV).

Document 16 : la Chromatographie Liquide à Ultra haute Performance (UPLC)

16a : caractéristiques du système UPLC utilisé pour l'optimisation de la méthode

- Colonne : Acquity BEH (Ethylene Bridged Hybrid) C18 ; 2,1 x 30 mm ; 1,7 μm ,
- Température : 30°C
- Débit de la phase mobile : 0,8 mL/min.

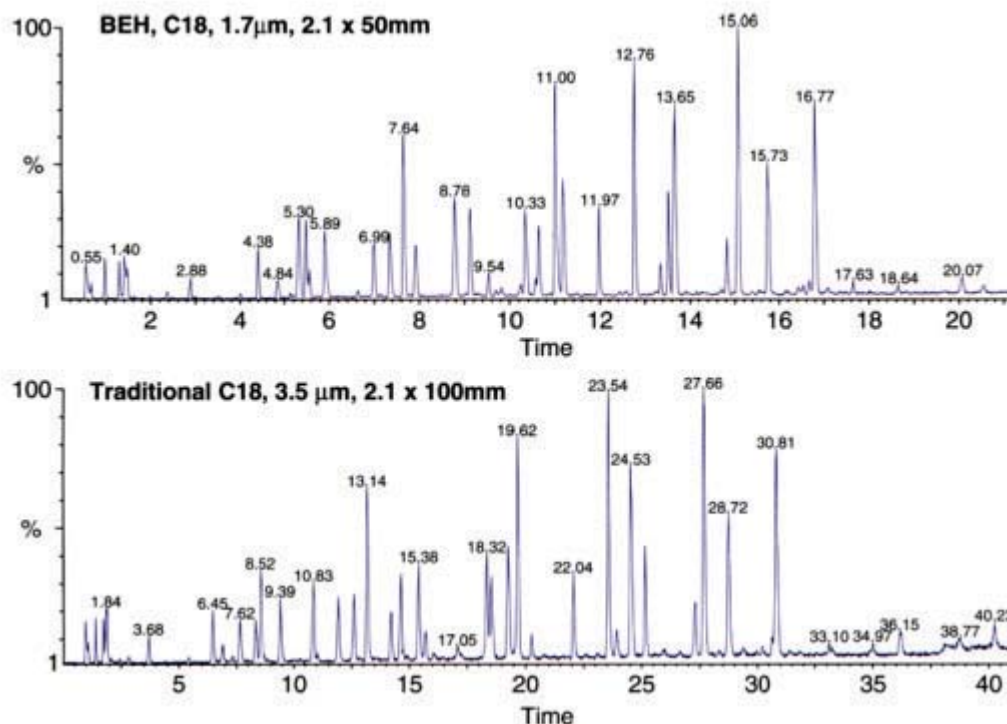
16b : détermination des paramètres de performance d'un système chromatographique

Calcul du nombre de plateaux théoriques N	Calcul de la résolution R_s
<i>A partir des données du chromatogramme</i> $N = 16 \times \left(\frac{t_x}{\omega_b} \right)^2 \text{ ou } N = 5,545 \times \left(\frac{t_x}{\omega_h} \right)^2$ t_x = temps de rétention de la molécule X $\omega_{b,x}$ = largeur du pic à la base $\omega_{h,x}$ = largeur du pic à mi hauteur	<i>A partir des données du chromatogramme</i> $R_s = \frac{t_2 - t_1}{\left(\frac{\omega_{b1} + \omega_{b2}}{2} \right)}$
<i>A partir des données de la colonne</i> $N = 300 \times \frac{L}{d_p}$ L = longueur de la colonne en mm d_p = diamètre des particules en μm	<i>A partir de la relation de Purnell</i> $R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{k' + 1} \right)$ α = coefficient de sélectivité k' = coefficient de rétention

Document 16c : profils chromatographiques comparés en UPLC et HPLC

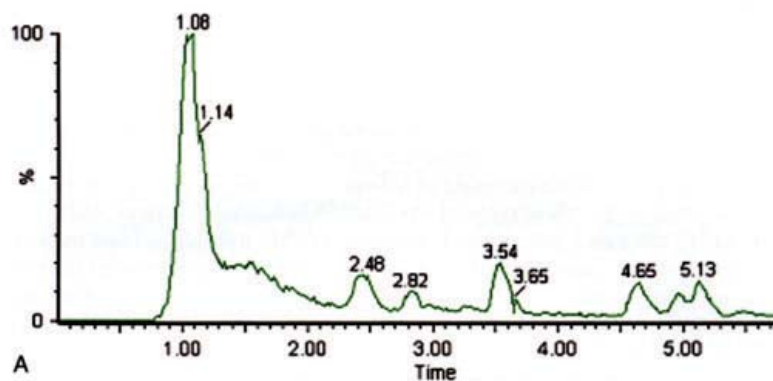
D'après HPLC Method Development for Pharmaceuticals Satinder Ahuja, Henrik Rasmussen, Academic Press, 21 sept. 2011

Exemple 1 : profils des produits de digestion d'un peptide par une éolase

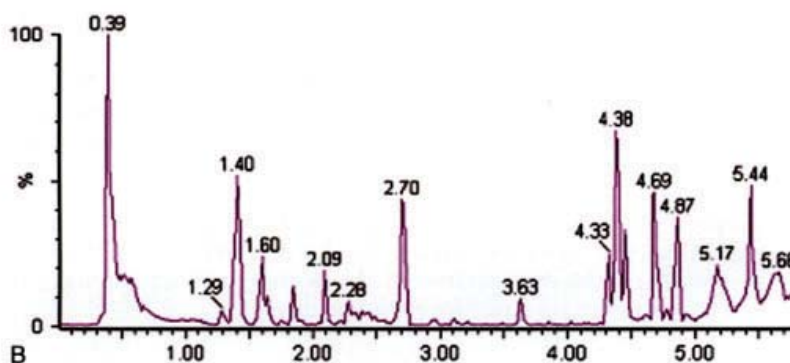


Exemple 2 : Profils du résultat de l'incubation de dextromethorphan en présence de microsomes de foie de rat. A en HPLC, B en UPLC.

A.



B.



Annexe

Extraits de programme

Programme de mesure et instrumentation de la classe de 1^{ère} STL

Mesure et instrumentation - classe de 1^{ère} de la série STL

Notions et contenus	Compétences
Mesure et incertitudes de mesure	
Définitions	Utiliser le vocabulaire de base de la métrologie.
Notions d'erreurs.	Identifier les limites du mesurage (étendue de mesure, seuil de détection, seuil de quantification, etc.). Identifier les différentes sources d'erreur lors d'une mesure (mesurage).
Notion d'incertitude.	Évaluer les incertitudes associées à chaque source d'erreur. Comparer le poids des différentes sources d'erreur. Évaluer l'incertitude d'une mesure : - à partir de la documentation du constructeur ; - à l'aide d'une formule d'évaluation (fournie à l'élève) ; - donnée par un instrument analogique. Évaluer la valeur moyenne et l'écart-type expérimental d'une série de mesures effectuées dans des conditions de répétabilité. Évaluer l'incertitude de répétabilité à l'aide d'une formule d'évaluation (fournie à l'élève).
Expression et acceptabilité du résultat.	Exprimer le résultat d'un mesurage par une valeur mesurée et une incertitude de mesure associée à un niveau de confiance.
	Définir les mesurages à conserver en fonction d'un critère donné.
	Faire des propositions pour améliorer la démarche.
	Vérifier un résultat de mesurage à l'aide d'un étalon. Évaluer l'exactitude de la mesure (fidélité et justesse).

Extrait du référentiel du BTS Analyses Biologie Médicale

Module 5 : Virologie (enseignement théorique et activités technologiques)

Contenus	Commentaires
1. Généralités sur les virus : enseignement théorique 1.1. Définition 1.2. Structure 1.3. Taxonomie 1.4. Multiplication virale	On insistera sur les caractéristiques structurales utilisées dans la classification ou permettant de comprendre le pouvoir pathogène ou le diagnostic viral. On se limitera aux principaux virus humains. On décrira les différentes étapes de la multiplication et on insistera sur les modalités de la réplication selon qu'il s'agit de : - virus à ARN + ; - virus à ARN - ; - virus à ADN ; - rétrovirus (VIH). Pour chaque type, un seul exemple sera décrit. Les conséquences de la multiplication virale dans la cellule hôte seront précisées : cycle lytique, latence et transformation.

Extraits du référentiel du BTS Biotechnologies

Extrait 1

Section 4 : Bio-informatique utilisateur

Les portails, logiciels et banques de données en bio-informatique et en génomique

- Les portails dédiés (par exemple celui d'Infobiogen) et leurs ressources
- Les principales banques de séquences et leurs caractéristiques ; la structure des fichiers et les formats de séquences nucléiques et protéiques
- Exemples de logiciels d'aide en génie génétique (dessin d'amorces ou de sonde, cartographie de restriction, détermination de paramètres physicochimiques d'une protéine...)

Extrait 2 issu du programme de biochimie analytique

Intitulé du programme	Commentaires	
	Cours	Travaux pratiques
Étalons, matériaux de référence certifiés, matériaux de référence	Définitions	Il s'agit de les mettre en œuvre pour la vérification d'appareils de mesures et lors de dosages
Techniques d'étalonnage des méthodes d'analyse biochimique	Étalonnages linéaires et non linéaires Étalonnage par méthode des ajouts dosés Utilisation d'étalons internes	La méthode des ajouts dosés sera mise en œuvre lors d'un dosage où il y a un effet matrice important Les analyses chromatographiques seront l'occasion d'utiliser des étalons internes
Incertitude des mesures : justesse et fidélité des résultats et des méthodes de mesure	Définitions	Cette partie du programme sera appliquée lors de la mise en œuvre des techniques des sections 3 et 4 de ce module. Les étudiants devront savoir utiliser de façon simple les paramètres de justesse et de fidélité