

SESSION 2014

**AGRÉGATION
CONCOURS INTERNE
ET CAER**

Section : BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE

PREMIÈRE ÉPREUVE

Durée : 6 heures

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout 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.

Les questions « C » évaluent des connaissances scientifiques et techniques.

Les questions « P » évaluent des compétences pédagogiques.

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 α -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 correspondant 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 par 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 en classe 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 terminale. Comme précédemment, préciser le déroulement de son exploitation (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**, est 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 lors de l'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 de 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 œuvre des techniques de génie cellulaire)

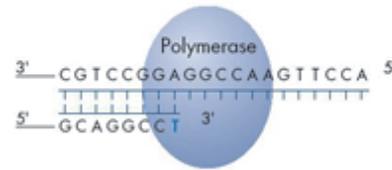
- P4** *Construire une évaluation écrite destinée à vérifier le « savoir faire » technique associé à la culture cellulaire.
Les questions posées devront s'appuyer sur la fiche technique du kit, et pour une durée qu'il conviendra de préciser.
Indiquer les éléments de corrigé attendus.*

Document 1

Principe du pyroséquençage

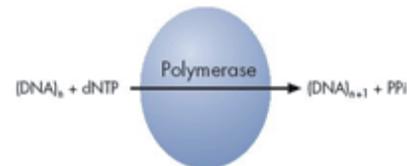
Etape 1

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.



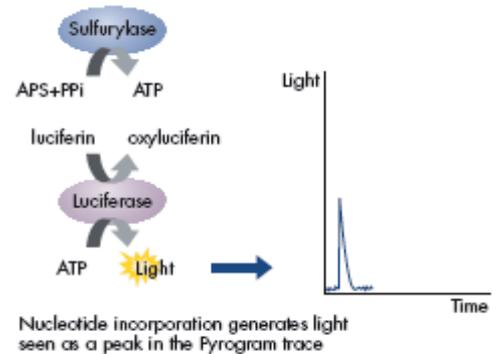
Etape 2

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).



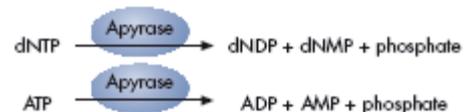
Etape 3

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.



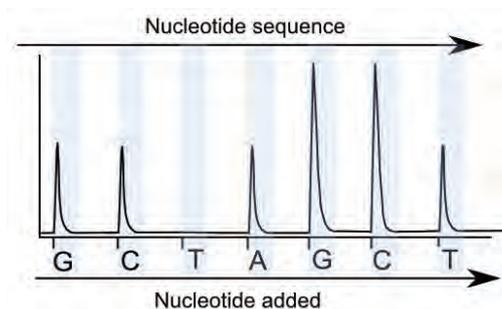
Etape 4

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 (μM) |
|-----------------------|---------------------------------|----------------------|
| 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.

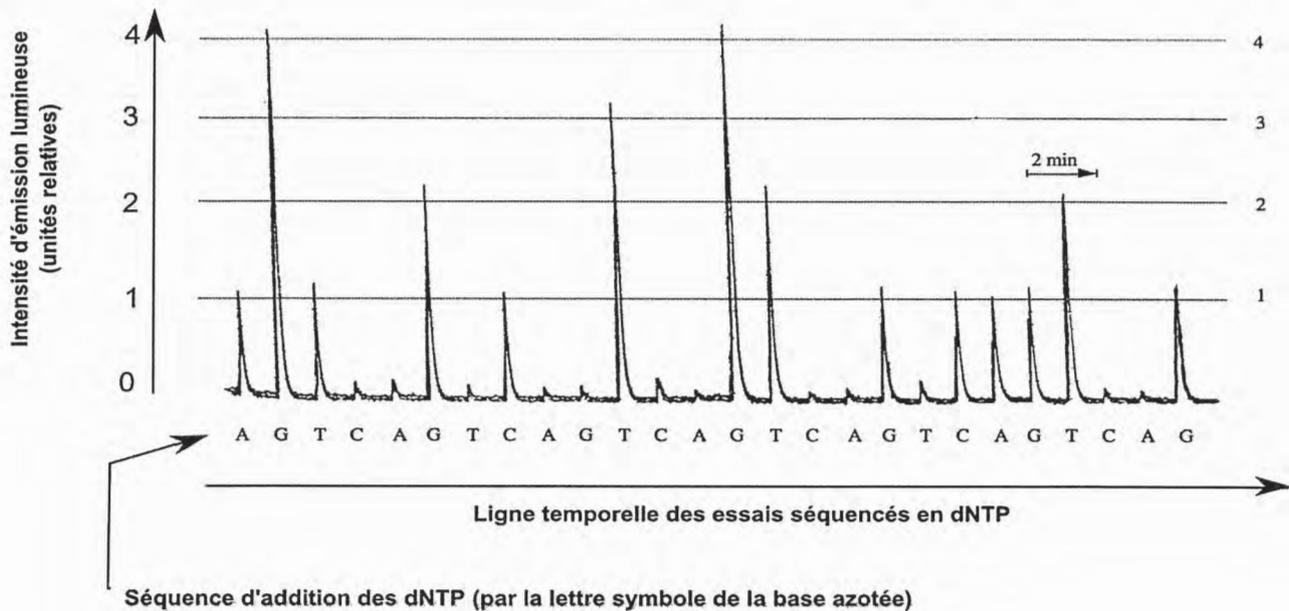
- Milieu réactionnel de pyroséquençage :

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 résultats 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

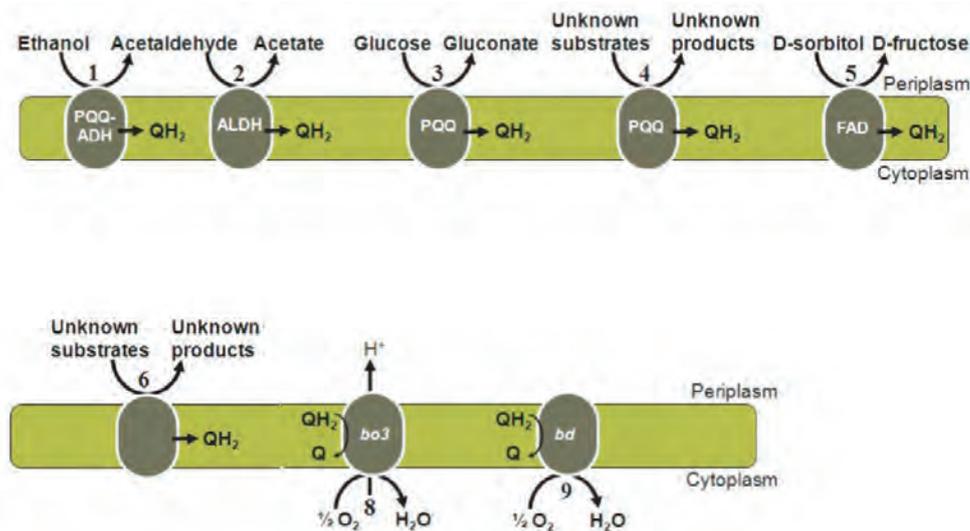
[...] le chromosome circulaire d'une taille de 2 818 679 paires de base et les sept plasmides dont la taille varie de 3 851 à 194 780 paires de base [...]. La recherche de gènes et l'annotation du génome de *A. pasteurianus* 386 B à l'aide de l'application GenDB a permis d'identifier 2595 séquences codant 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 éliminés 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 *bo*₃ 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 (QH₂) 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 QH₂. 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 transformation chimique en solution, un système fermé évolue vers un état d'équilibre chimique.</p> <p>Cet état d'équilibre dépend de l'état initial et de la constante d'équilibre $K(T)$, caractéristique de la réaction.</p> <p>Une réaction est favorisée quand la valeur de la constante d'équilibre $K(T)$ est élevée, c'est-à-dire quand l'enthalpie libre standard de réaction $\Delta_r G^0(T)$ est négative.</p> <p>Le déplacement 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>Mettre en œuvre des activités expérimentales et exploiter des ressources documentaires pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> - reconnaître le type de système étudié : isolé, fermé, ouvert, stationnaire ; - déterminer l'état final d'un système, dans le cas d'une réaction acide-base ou d'une réaction d'estérification-hydrolyse ; - exprimer le quotient réactionnel Q_r et le comparer à la constante d'équilibre $K(T)$, par exemple K_A pour la réaction de dissociation d'un acide dans l'eau ; - mettre en relation l'état final avec le caractère total ou limité d'une transformation ; - identifier les facteurs d'influence d'un état d'équilibre ; - proposer un protocole pour déplacer un état d'équilibre. |
| <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"> - soit avec une transformation chimique comportant une oxydoréduction (couplage chimio-chimique) ; - soit avec un transport de protons dans le sens du gradient de concentration transmembranaire (couplage osmo-chimique). | <p>Exploiter des ressources documentaires pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> - identifier la nature du couplage énergétique mis en jeu lors d'une synthèse d'ATP ; - schématiser une synthèse d'ATP par couplage osmo-chimique. |
| <p>Le métabolisme cellulaire 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 catabolisme.</p> <p>L'ensemble des voies conduisant à la synthèse de molécules constitutives de l'organisme est appelé anabolisme.</p> | <p>Exploiter des ressources documentaires pour</p> <ul style="list-style-type: none"> - localiser au sein de la cellule quelques voies cataboliques : glycolyse, cycle de Krebs, chaîne respiratoire ; - 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 ; - établir les bilans d'énergie et de matière de l'utilisation du glucose par respiration et par fermentation ; - calculer un rendement énergétique en ATP ; - identifier une voie anabolique par la consommation d'ATP associée à l'utilisation de coenzymes réduits. |
| <p>La source d'énergie permet de distinguer les phototrophes et les chimiotrophes.</p> <p>La nature du donneur d'électrons permet de distinguer les organotrophes et les lithotrophes.</p> <p>Les animaux et de nombreuses bactéries sont des organismes chimio-organotrophes.</p> | <p>Mettre en œuvre un protocole expérimental (EXAO), exploiter des ressources documentaires pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> - identifier le type trophique énergétique d'un organisme par l'étude des conditions permettant sa croissance ; - repérer, sur un schéma simple de la phase claire de la photosynthèse, les rôles du donneur d'électrons H_2O et de la lumière ainsi que la production d'ATP et de coenzyme réduit. |

Document 7

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 β -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 étaient des Bergen (2,4%), 1 était un Reading (2,4%), 2 étaient des Tel-el-kebir (4,8%), 1 étaient 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 μ 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⁻¹ 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

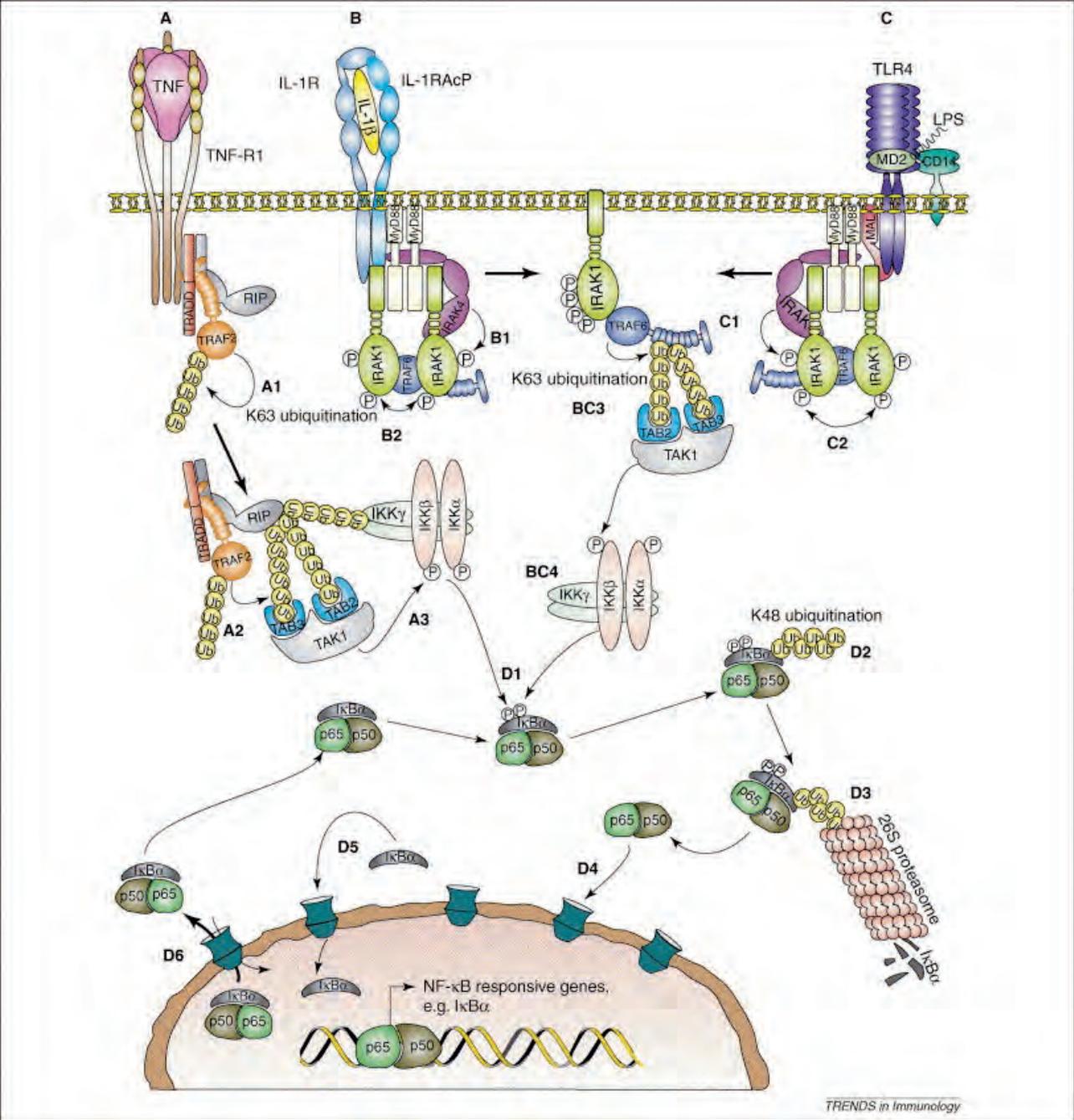
Extrait du référentiel du BTS Analyses de Biologie Médicales

| CAPACITE : C3 – RÉALISER | | |
|---|--|--|
| COMPÉTENCE : 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"> - Echantillons biologiques. - Contexte clinique - Urgence du résultat - Matériel de laboratoire, produits et réactifs - Modes opératoires y compris modes opératoires de détection par des techniques immunologiques, et des techniques de marquage de gènes - Equipements de protection individuelle et collective | <ul style="list-style-type: none"> - Respect des procédures de sécurité - Pertinence du choix méthodologique - Gestion du temps en fonction de l'urgence du diagnostic - Qualité de l'exécution du mode opératoire - Présentation et exploitation correctes des résultats |
| C3.4.2. Réaliser les examens macroscopiques et microscopiques sur l'échantillon biologique avant subi ou non un traitement préalable - Interpréter les observations réalisées | <ul style="list-style-type: none"> - Echantillon biologique - Matériel et réactifs - Documents et modes opératoires relatifs à l'étude de l'échantillon - Equipements de protection individuelle et collective | <ul style="list-style-type: none"> - Respect des procédures de sécurité - Qualité des préparations - Pertinence des observations et de leur interprétation - Présentation correcte des résultats |
| 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"> - Echantillons trachéobronchiques, urines, liquides de ponction - Matériel de laboratoire, milieux de culture et réactifs - Documents et modes opératoires relatifs à l'étude de l'échantillon - Equipements de protection individuelle et collective | <ul style="list-style-type: none"> - Respect des procédures de sécurité - Qualité de l'exécution technique - Obtention de résultats exacts - Pertinence des interprétations et des conclusions - Présentation et exploitation correctes des résultats |

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

Document 9

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



HEK-Blue™ LPS Detection Kit

Detection Method based on the activation of Toll-Like Receptor 4

For the detection of lipopolysaccharide from gram-negative bacteria in biological reagents

Catalog # rep-lps
(Version # 07C09-MIT)

This package insert must be read in its entirety before using this product

FOR RESEARCH USE ONLY

Product covered by a Limited Use License

Corporate Headquarters

In vivoGen
3950 Sorrento Valley Blvd, Suite A
San Diego, CA 92121 USA
Toll Free (US): 888.457.5873
Outside US: (+1) 858.457.5873
Email: info@invivogen.com
Website: www.invivogen.com

European Headquarters

Cayla
5, rue Jean Rodier
F-31400 Toulouse FRANCE
Tel: +33 (0)5.62.71.69.39
Fax: +33 (0)5.62.71.69.30
Email: info@invivogen.fr



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- κ B and the production of proinflammatory cytokines¹.

In vivo, this response can cause fever, septic shock and eventually death of the animal².

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', does not only affect inflammatory responses but also other essential functions including antigen presentation by monocytes³. 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- κ B. Using HEK-Blue™ Detection, a specific detection medium, NF- κ 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 ≥ 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 (2.5x 10⁶ cells) of the cell suspension to each well.
6. Incubate the plate(s) 18-24H at 37°C in 5% CO₂.
7. Assess the blue color by the naked eye or the OD at 620-655 nm

Purple or blue color
=
Presence of LPS

Pink color
=
No LPS

KIT INFORMATION

Contents

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

- 1 vial of HEK-Blue™ cells (3-5x 10⁶ 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 (#DE14-801F).

- 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
 - CO₂ incubator
 - Sterile cell culture plasticware: tubes, pipettes, 25 cm² and 175 cm² 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/bmb14/bmb14toc.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 cm² 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 CO2 incubator for at least 15 minutes prior to the addition of the cells.

- Place the flask at 37°C in a CO2 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 cm² 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 x10⁷ 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% CO₂.

- 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 cm² 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 cm² tissue culture flask. If necessary incubate the cells few minutes at 37°C in a CO₂ 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 10⁶ cells/ml.
- Mix the cell suspension by gentle pipetting.

Note: Do not use a cell suspension containing more than 1.25 x 10⁶ 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 CO₂ incubator for 18-24 h.

Reading and Interpretation

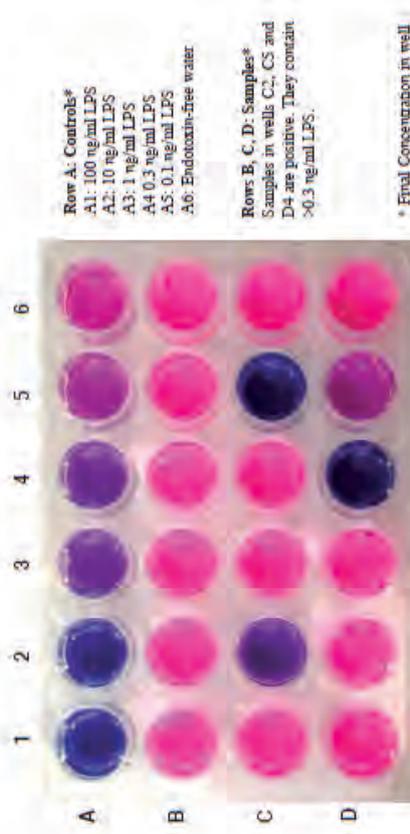
Presence of LPS in a given sample can be observed with the naked eye or quantified spectrophotometrically. After 18-24 h incubation read the plate with the naked eye :

- 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.

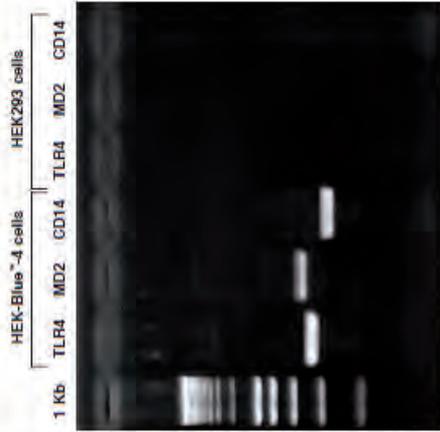
Note: InvivoGen's HEK-Blue™ LPS Detection Kit can be performed in 48- or 24-well plates as well. Scale up by adding 40 µl of sample or control per well and 400 µl HEK-Blue™-4 cell suspension per well.



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 (triacetylated) - 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

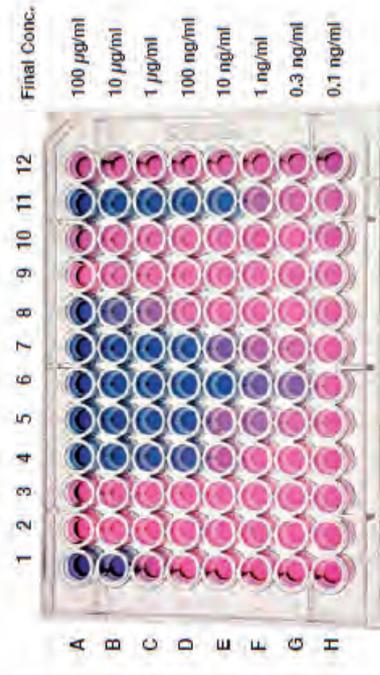
Presence of LPS has been detected only in *E. coli* DNA with endotoxin using the HEK-Blue™ LPS Detection Kit (see picture next page).

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 mimosina*
- *Porphyromonas gingivalis*



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

- 1 - TNF- α
- 2 - Pam3CSK4
- 3 - FSL-1
- 4 - Monophosphoryl lipid A
- 5 - LPS (*E. coli* O111:B4)
- 6 - LPS (*E. coli* K12)
- 7 - LPS (*S. mimosina*)
- 8 - LPS (*P. gingivalis*)
- 9 - Loxoribine
- 10 - ODN 2006
- 11 - *E. coli* DNA w/ (with endotoxin)
- 12 - *E. coli* DNA w/ (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- κ B is 100 pg/ml. E1 to H1 wells contain endotoxin-free water as negative control.