



Secrétariat Général

Direction générale des  
ressources humaines

MINISTÈRE  
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE

Sous-direction du recrutement

---

## **Concours du second degré – Rapport de jury**

**Session 2013**

### **CERTIFICAT D'APTITUDE AU PROFESSORAT DE L'ENSEIGNEMENT TECHNIQUE (CAPET)**

**CONCOURS EXTERNE ET CAFEP**

**SECTION : BIOTECHNOLOGIES**

**Option : BIOCHIMIE GENIE BIOLOGIQUE**

**Rapport de jury présenté par Jean-Pascal DUMON  
Président de jury**

**Les rapports des jurys des concours sont établis sous la responsabilité des présidents  
de jury**

---

## SOMMAIRE

<b>Composition du jury.....</b>	<b>Page 2</b>
<b>Renseignements statistiques.....</b>	<b>Page 3</b>
<b>Avant propos du président.....</b>	<b>Page 5</b>
<b>Epreuves d'admissibilité .....</b>	<b>Page 7</b>
<b>Composition d'Epreuve de synthèse</b>	
<b>Eléments de correction.....</b>	<b>Page 9</b>
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 32</b>
<b>Composition d'Etude d'un système, d'un procédé ou d'une organisation</b>	
<b>Eléments de correction.....</b>	<b>Page 35</b>
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 47</b>
<b>Epreuves d'admission</b>	
<b>Leçon portant sur les programmes des lycées et des classes post-baccalauréat</b>	
<b>Exemple de sujet.....</b>	<b>Page 51</b>
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 68</b>
<b>Epreuve sur dossier</b>	
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 72</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>Page 78</b>

# COMPOSITION DU JURY

## Président du jury

Mr Jean-Pascal DUMON, Inspecteur général de l'éducation nationale

## Vice-présidents

Mme Caroline BONNEFOY, Inspecteur d'académie /inspecteur pédagogique régional, Rectorat Académie de Versailles

M. David DUBAYLE, Maître de conférences des universités, UFR biomédicale des st pères Université Paris Descartes – Paris 6

## Secrétaire général

Mme Catherine MILLET, Professeur Agrégée

## Membres

BEAUMESNIL Olivier - Professeur certifié - LGT Léopold Sedar Senghor Evreux Rouen  
BIGOT Armelle - Professeur agrégé - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris  
BOCHARD Valérie – Professeur agrégé - LGT Jean Macé, Rennes  
BOUQUET Raphael - Professeur certifié - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris  
BOYS Sophie - Professeur agrégé - LPO Lycée des métiers Marguerite Yourcenar Beuvry Lille  
BRUN Frédérique - Professeur agrégé - LGT Sidoine Appolinaire, Clermont-Ferrand  
CAZALOT Anne - Professeur certifié - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris  
CHAFFAUT Pascal - Professeur agrégé - LGT Lycée des métiers Hugues Libergier Reims  
CHANIAUD Elisabeth - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Paris  
CHAVANEL Muriel - Professeur agrégé - LT St Louis Bordeaux  
CHIES Carole - Professeur certifié - LGT Marie Curie Versailles, Lycée Pergaud, Besançon  
CNOKAERT Joël - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie d'Aix-Marseille  
COLOMB Nathalie - Professeur agrégé - LGT Léopold Sedar Senghor Evreux Rouen  
COMBES Anne - Professeur certifié - LGT Marie Curie Versailles  
DENDALETCHÉ Joel - Professeur agrégé - LGT La Découverte Decazeville Toulouse  
DEVAUX Christian - Professeur agrégé - LGT Lycée des métiers Hugues Libergier Reims  
DOUCET Sandrine - Professeur agrégé - LT St Louis Bordeaux  
DUBRAC Claire - Professeur certifié - LGT Les Lombards Troyes Reims  
DUVET Sandrine – Maître de conférence – Université des sciences et techniques de Lille  
ETANCELIN Catherine - EC.R Professeur certifié - LGT Pr Lycée Gen.Et Technol.Prive Gre Vincennes  
FALLER Isabelle - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Strasbourg  
FAUTREZ Véronique - Professeur certifié - LGT Valentine Labbe La Madeleine Lille  
FOURCY GIRAUD Sigolène - Professeur agrégé - LPO Lycée des métiers Louise Michel Grenoble  
FREMY Gilles - Professeur certifié - LPO Lyc métiers Lycée Des métiers De La Platu Marmande  
GARNIER Philippe - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Poitiers  
GERON LANDRE Bénédicte - Professeur agrégé - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris  
GOMEL Frédéric - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Caen  
GRIMAL Emmanuelle - Professeur agrégé - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris  
HAEBERLE MULLER Susanne - Professeur certifié - LPO Lavoisier Mulhouse Strasbourg  
LEONETTI Brigitte - Professeur certifié – ESTBA Paris  
LESTRA Jean-Luc - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Grenoble  
MALLET Catherine - Professeur certifié - LGT Bourdelle Montauban Toulouse  
MATRINGE François - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Toulouse  
MEUNIER Patrick - Professeur agrégé - LPO Julien Wittmer Charolles  
MORIN Olivier - Professeur certifié - LPO Lycée Mariette, Boulogne-sur mer  
PRAT Michel - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Créteil  
RAMI Guillaume - Professeur agrégé - LT Marie Curie Aix-Marseille  
VANLEEFDAEL Cécile - Professeur agrégé - LPO Jean-Baptiste Poquelin St Germain-en-Laye Versailles  
WURTEISEN Marie – Professeur agrégé - LT Jean Rostand de Caen

## RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

### CAPET

<b>Nombre de postes</b>	<b>35</b>
<b>Candidats inscrits</b>	<b>364</b>
<b>Candidats présents aux deux épreuves d'admissibilité</b>	<b>139</b>
<b>Candidats admissibles</b>	<b>80</b>
<b>Candidats présents aux épreuves d'admission</b>	<b>69</b>
<b>Candidats proposés pour l'admission</b>	<b>34</b>
<b><u>Epreuves d'admissibilité</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>7,06</b>
<b>Moyenne des candidats admissibles</b>	<b>9,03</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admissible</b>	<b>5,95</b>
<b><u>Epreuve de synthèse</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>6,05</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>8,13</b>
Note maximale	<b>17,00</b>
<b><u>Etude d'un système, d'un procédé ou d'une organisation</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>7,91</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>9,93</b>
Note maximale	<b>18,75</b>
<b><u>Epreuves d'admission</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>9,43</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>12,40</b>
<b><u>Leçon portant sur les programmes des lycées et des classes post-baccalauréat</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>8,4</b>
Moyenne des candidats admis	<b>11,4</b>
Note maximale	<b>19,8</b>
<b><u>Epreuve sur dossier</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>10.1</b>
Moyenne des candidats admis	<b>13,5</b>
Note maximale	<b>18.5</b>
<b><u>Ensemble du concours</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>09.99</b>
<b>Moyenne la plus élevée</b>	<b>16.77</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>11.63</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admis</b>	<b>8,68</b>

## RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

### Concours d'accès aux fonctions d'enseignement dans les établissements privés sous contrat (CAFEP)

<b>Nombre de postes</b>	<b>6</b>
<b>Candidats inscrits</b>	<b>80</b>
<b>Candidats présents aux deux épreuves d'admissibilité</b>	<b>21</b>
<b>Candidats admissibles</b>	<b>7</b>
<b>Candidats présents aux épreuves d'admission</b>	
<b>Candidats proposés pour l'admission</b>	
<b><u>Epreuves d'admissibilité</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>6,58</b>
<b>Moyenne des candidats admissibles</b>	<b>8,80</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admissible</b>	<b>5,82</b>
<b><u>Epreuve de synthèse</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>6,45</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>8,64</b>
Note maximale	<b>15,00</b>
<b><u>Etude d'un système, d'un procédé ou d'une organisation</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>6,71</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>8,80</b>
Note maximale	<b>17,5</b>
<b><u>Epreuves d'admission</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>08,46</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>12,67</b>
<b><u>Leçon portant sur les programmes des lycées et des classes post-baccalauréat</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>6,62</b>
Moyenne des candidats admis	<b>10,40</b>
Note maximale	<b>14,50</b>
<b><u>Epreuve sur dossier</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>10,31</b>
Moyenne des candidats admis	<b>14,94</b>
Note maximale	<b>18,50</b>
<b><u>Ensemble du concours</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>8,71</b>
<b>Moyenne la plus élevée</b>	<b>15,75</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>11,48</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admis</b>	<b>8,55</b>

## Avant-propos

Le CAPET et le CAFEP externes BGB ont pour vocation d'assurer le recrutement des professeurs de biotechnologie génie biologique dont les responsabilités s'inscrivent certes dans des enseignements théoriques modernes mais également pour la mise en œuvre d'activités technologiques en laboratoire dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire et la prévention des risques biologiques, physiques et chimiques inhérents aux manipulations mises en œuvre.

Après les épreuves d'admissibilité, qui s'appuient sur des compétences scientifiques de niveau M2, 80 candidats ont été déclarés admissibles au CAPET pour 35 postes, et 13 au CAFEP pour 6 postes.

Le jury a été fort déçu de constater que 14 candidats ne se sont pas présentés à la session d'admission : 11 pour le CAPET et 3 pour le CAFEP, un candidat ayant choisi de quitter le concours après la première épreuve d'admission. Le jury a été aussi très surpris que parmi ces absences, certaines n'ont même pas été annoncées. Ce qui est pour le moins surprenant alors qu'une partie d'épreuve porte sur la compétence « Agir en fonctionnaire de l'État et de façon éthique et responsable ».

Les domaines couverts par le CAPET BGB sont variés et vastes – biochimie, microbiologie, immunologie, biologie cellulaire, hématologie, biologie moléculaire, physiologie humaine... - il importe donc que les candidats se préparent sérieusement, non seulement pour l'acquisition de compétences professionnelles, mais également dans l'intégration des connaissances et compétences scientifiques et technologiques, pour espérer avoir quelques chances de réussite. Ce rapport du jury a pour objectif d'indiquer clairement aux futurs candidats ce qui est attendu d'eux dans les différentes épreuves.

L'épreuve de dossier mérite toute l'attention des futurs candidats. Le dossier présenté par le candidat doit être relatif à une organisation ou à une situation authentique et d'actualité. Le dossier doit être conçu comme un transfert d'informations d'entreprises ou d'organismes vers l'Éducation Nationale. Il préfigure la situation d'un enseignant qui, non confiné dans l'espace de son établissement a à cœur de garder le contact avec la réalité professionnelle, notamment de l'évolution des activités en laboratoires de biotechnologies. L'épreuve sur dossier ne s'inscrit uniquement pas dans l'évaluation des connaissances scientifiques ; cependant, le candidat se doit, sur un thème scientifique qu'il a choisi, de dominer les notions abordées.

Le cadre d'une exploitation pédagogique doit être proposé de manière plus détaillée. Elle doit être structurée à partir des compétences à faire acquérir aux élèves.

Le candidat doit donc :

- présenter les objectifs, le principe de déroulement et les moyens didactiques à mobiliser pour une séquence de formation correspondant à un objectif pédagogique d'un programme et d'un niveau de classe précisé ;
- indiquer, selon son point de vue, les points clefs, les difficultés prévisibles et les scénarios alternatifs pouvant permettre de les contourner.

Cette épreuve inclut l'évaluation de la compétence « agir en fonctionnaire de l'état et de façon éthique et responsable ». Il ne s'agit pas ici d'attendre des candidats une expertise associée aux situations proposées par les sujets mais d'apprécier les capacités d'analyse, de prise de recul, de positionnement en lien avec les valeurs attendues d'un futur enseignant.

Dans le cadre de l'épreuve de Leçon portant sur les programmes des lycées et des classes post-baccalauréat, le candidat est placé dans la configuration d'un enseignant qui prépare une activité en conformité avec le programme d'une section. Il s'agit donc d'effectuer des activités en laboratoire dans la perspective d'un transfert d'activités technologiques en présence des élèves. Le candidat doit se préparer non seulement dans la réalisation d'activités technologiques mais également se positionner dans leur mise en œuvre, en pleine

responsabilité, technique et sécuritaire, de ces activités par un groupe d'élèves en phase initiale d'apprentissage.

Là encore, le jury est sensible au niveau scientifique et aux compétences didactiques et pédagogiques des candidats.

Lors de cette session, les candidats ont été placés dans l'utilisation des outils modernes de communication, notamment un ordinateur portable à chaque étape de leurs activités et d'un vidéoprojecteur pour la présentation au jury. Deux clichés photographiques pouvaient (épreuve de TP-leçon), au choix du candidat apporter une illustration voire un point d'appui analytique, critique, pédagogique au jury. Si ces moyens de communication sont légitimement mis à disposition, il convient de préciser que l'évaluation des candidats a gardé une focale sur le fond didactique, pédagogique, scientifique de la présentation. Si la qualité d'une présentation numérique peut être appréciée, il serait illusoire de miser la réussite aux épreuves d'admission sur la seule esthétique de diaporamas. Le tableau de classe reste disponible pour chaque épreuve.

Le CAPET est un concours prestigieux qui impose de la part des candidats un comportement et une présentation irréprochables. Le jury reste vigilant sur ce dernier aspect et invite les candidats à avoir une tenue adaptée aux circonstances particulières d'un concours de recrutement de cadres A de la fonction publique.

Pour conclure cet avant-propos, j'espère sincèrement que ce rapport sera très utile aux futurs candidats au CAPET – CAFEP BGB.

Jean-Pascal DUMON  
Président du jury

# EPREUVES D'ADMISSIBILITE

## Epreuve de synthèse

Durée : 5 heures  
Coefficient : 3

## Etude d'un système, d'un procédé ou d'une organisation

Durée : 5 heures  
Coefficient : 3

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>



# Éléments de correction de l'épreuve d'admissibilité « épreuve de synthèse »

*Remarque liminaire : le texte ci-dessous n'est ni un corrigé, ni la « copie modèle ». Il apporte des « éléments de correction par un éclairage sur les principales notions scientifiques associées au sujet. Le style volontairement non rédigé montre l'unique choix d'exposer les principales notions et concepts qui pouvaient être abordés dans le cadre de l'épreuve de synthèse de la présente session.*

## Le foie : de la biochimie des fonctions hépatiques à l'exploration fonctionnelle

### Introduction

Le foie :

- plus grosse glande du corps (1,4 kg)
- remplit de nombreuses fonctions métaboliques et régulatrices.
- situé sous le diaphragme, occupe la majeure partie de l'hypochondre droit, masque une partie de l'estomac.
- divisé en lobes (4)
- richement vascularisé :
  - o reçoit du sang hématosé par l'artère hépatique commune (1/3)
  - o reçoit du sang non hématosé provenant du TD riche en nutriments par la veine porte hépatique.
  - o sang quitte le foie par les veines sus hépatiques.
- traversé par :
  - o nutriments issus de la digestion et de l'absorption : foie gère les flux de nutriments (utilisation, stockage et libération de nutriments dans la circulation générale selon les situations physiologiques et les besoins de l'organisme.)
  - o déchets, toxiques et xénobiotiques à traiter et à éliminer.
  - o agents infectieux qui franchissent la barrière intestinale : rôle de filtre et d'élimination.
- rôle direct dans la digestion des lipides via la sécrétion biliaire.
- rôle à la fois endocrine et exocrine.

Annonce du plan

- o Les grandes fonctions hépatiques
- o Régulation des fonctions métaboliques en période de jeûne et en période postprandiale (nécessité d'un fonctionnement coordonné et adapté aux besoins de l'organisme en fonction des situations physiologiques)
- o Dysfonctionnement des fonctions hépatiques  $\Rightarrow$  pathologies que l'on peut diagnostiquer lors d'un bilan hépatique (exploration fonctionnelle hépatique)

### I. Les grandes fonctions hépatiques.

#### 1.1. La fonction digestive : synthèse et excrétion de la bile.

##### 1.1.1. Composition et rôles de la bile.

###### a. Composition de la bile.

- Foie fabrique de façon continue 0.5 à 0.7 L de bile/jour. Liquide jaune-verdâtre, limpide.
- pH compris entre 7.6 et 8.6.
- Bile formée de :
  - o 97% d'eau
  - o Sels minéraux :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , Phosphates, Mg et  $\text{HCO}_3^-$
  - o Protéines :
    - Plasmatiques : albumine
    - Non plasmatiques :
      - Bilirubine (dégradation des hématies)
      - IgA (immunité locale)
  - o Acides (sels) biliaires
  - o Phospholipides notamment des lécithines (phosphatidylcholine)
  - o Cholestérol

*De tous les composés, seuls les sels biliaires et les lécithines participent aux processus digestifs. Les autres constituants jouent un rôle dans les fonctions d'excrétion du foie et sont éliminés de l'organisme avec les selles.*

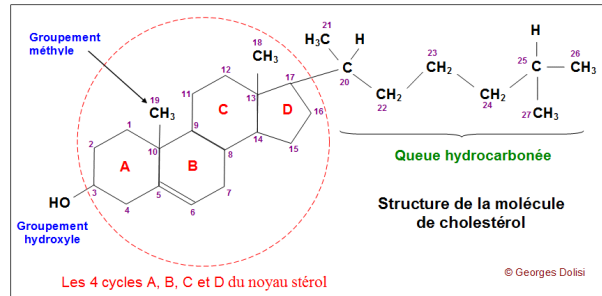
**b. Rôles de la bile.**

- Favorise digestion et absorption des lipides alimentaires.
- Maintien de l'hydratation des selles.
- Antiseptique vis-à-vis des bactéries Gram+
- Bile alcaline facilite la neutralisation du chyme duodéal.

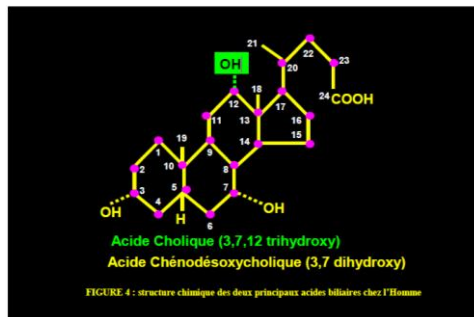
**1.1.2. Production, rôles et élimination des acides (sels) biliaires.**

**a. Synthèse des acides (sels) biliaires.**

- Synthétisés exclusivement dans les hépatocytes à partir du cholestérol.



**Formation des acides biliaires :**



\*Différent du cholestérol par :

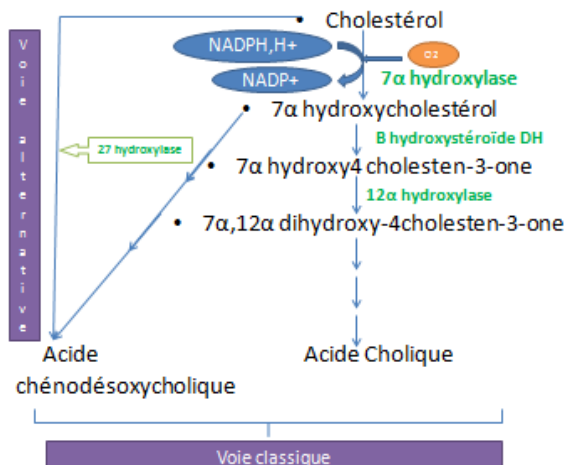
- o Une chaîne latérale raccourcie de 3 atomes de C + une fonction COOH
- o Un cycle B saturé (double liaison C5-C6)
- o La ou les présences de fonction OH

\*Les différents acides biliaires : acide cholique (60%) tri-hydroxylé (3,7,12), acide désoxycholique (40%) di-hydroxylé (3,7)

- o Voie de biosynthèse des acides biliaires

\*A partir du CST il y a plusieurs étapes enzymatiques.

\*Etape limitante catalysée par la 7α hydroxylase (Monoxygénase à Cyt P450, utilise le NADPH comme cofacteur)



- **Formation des sels biliaires primaires : conjugaison**

\* Conjugaison dans les hépatocytes avec des acides aminés (glycine et taurine) → acides biliaires conjugués ou sels biliaires primaires.

\* Sels biliaires primaires : acide glycocholique, acide chénodésoxycholique, acide taurocholique, acide taurochénodésoxycholique.

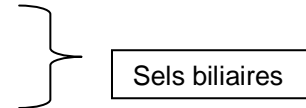
\* Sels biliaires primaires excrétés dans la bile au pôle canaliculaire hépatocytaire par transport actif (Bile salts export pump).

- **Formation des sels biliaires secondaires dans le tube digestif**

\* Dans l'iléon : déshydroxylation en C7 et déconjugaison sous l'action d'enzymes bactériennes du tube digestif (côlon).

\* Acide cholique → Acide désoxycholique (3α, 12α, dihydroxy)

\* Acide chénodésoxycholique → Acide lithocholique (3α, hydroxy)



**b. Rôles des sels biliaires.**

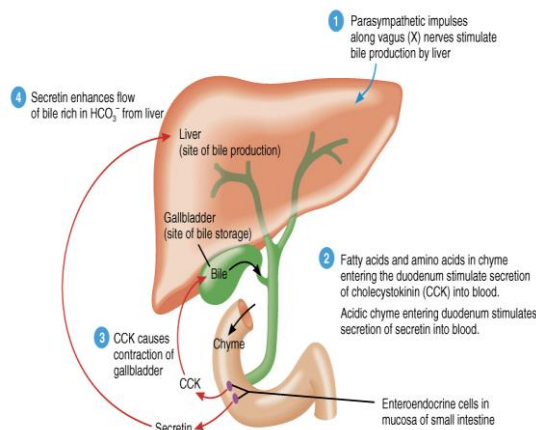
- Molécules amphiphiles car possèdent des groupements polaires (OH, AA) et des groupements apolaires.
- Propriétés de détergents qui émulsionnent les lipides en formant des micelles :
  - o Mise en solution des lipides alimentaires : participent à la digestion des lipides.
  - o Maintien en solution du cholestérol dans la bile, préviennent la cristallisation du cholestérol. La bile est un équilibre entre les sels biliaires (70%), le cholestérol (10%) et les phospholipides (20%). Pour qu'il y ait solubilisation, les proportions doivent correspondre au diagramme de Small.

**c. Elimination des sels biliaires**

- Cycle entéro-hépatique :
  - o 95% des sels biliaires réabsorbés au niveau de l'iléon grâce à un transport actif secondaire (symport actif secondaire dépendant du Na<sup>+</sup>) et déversés dans la veine porte hépatique.
  - o Recaptés par les hépatocytes.
  - o Pool des sels biliaires : 3 à 5 g recirculent 6 à 10 x/jour.
- Elimination dans les selles
  - o 5% sont excrétés dans les selles
  - o Participent à l'hydratation des matières fécales
  - o Remplacés par la synthèse de nouveaux sels biliaires hépatocytaires à partir du cholestérol.

**1.1.3. Excrétion de la bile**

- Bile est une sécrétion exocrine du foie.
- Sécrétion biliaire est un phénomène continu : entre les repas la bile s'écoule dans les voies biliaires (canal hépatique et canal cystique) et est stockée dans la vésicule biliaire, sphincter d'Oddi est fermé.
- Phase hormonale déclenchant l'excrétion biliaire : arrivée d'un chyme riche en lipides et en protéines dans le duodénum → stimulation des cellules I de la paroi du duodénum → libération de CCK contraction de la vésicule biliaire → relâchement du sphincter d'Oddi → écoulement de la bile dans le duodénum via le canal cholédoque.
- Phase nerveuse : stimulation du nerf X augmente la sécrétion et l'excrétion biliaire.

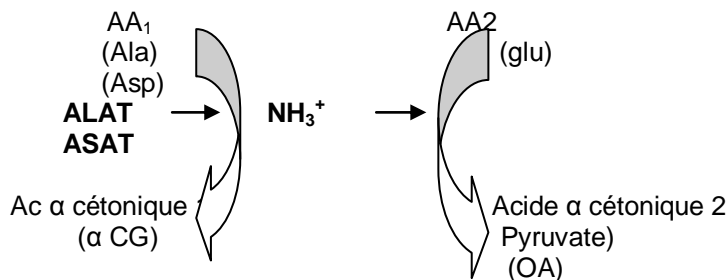


## 1.2. Les fonctions d'épuration et de détoxification.

Foie joue un rôle majeur dans la détoxification et l'élimination des déchets d'origine endogènes (produits du métabolisme cellulaire) ou exogènes (médicaments, toxiques).

### 1.2.1. Elimination de l'ammoniac : l'uréogénèse.

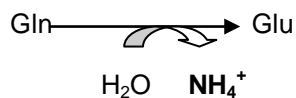
- Dégradation des acides aminés produit du  $\text{NH}_3$  toxique (liposoluble, perturbe le fonctionnement du SNC).
- 3 formes de transport non toxique de l'ammoniac puis élimination par voie urinaire :
  - o Sous forme de glutamine (tissulaire)
  - o Sous forme d'alanine (muscles)
  - o Sous forme d'urée (foie)
- Origine des  $\text{NH}_3$  :
  - o Les réactions de transamination : réaction d'échange entre une fonction cétone d'un acide  $\alpha$  cétonique et la fonction amine d'un acide aminé.



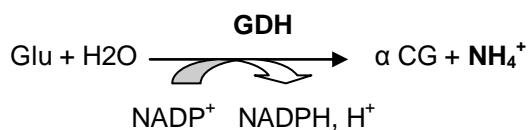
La plupart des transaminases comportent un co-substrat qui est soit l'acide glutamique soit l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique (ou 2 oxo-glutamique).

Transaminase hépatiques : ALAT/ ASAT

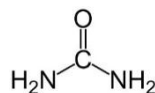
- o Les réactions de désamination :
  - Glutaminase



\*Glutamate DH : désamination oxydative

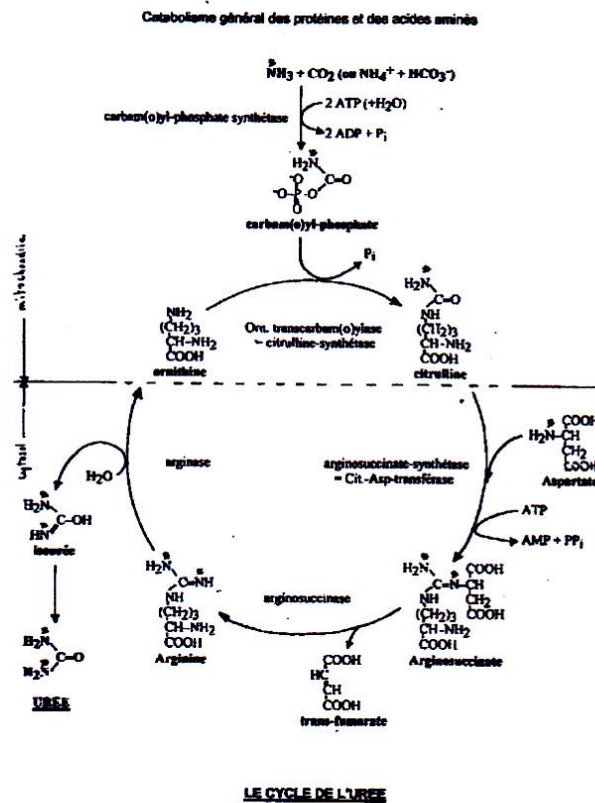


- Uréogénèse : les groupements  $\text{NH}_4^+$  libérés dans le foie entrent dans le cycle de l'urée.
  - o Exclusivement dans le foie
  - o Urée : petite molécule, neutre, non toxique et non chargée. Très soluble dans le sang, facilement transportée et éliminée dans l'urine.



- o Production d'urée implique **5 réactions enzymatiques**.
- o 2 étapes dans les mitochondries et 3 étapes cytosoliques.

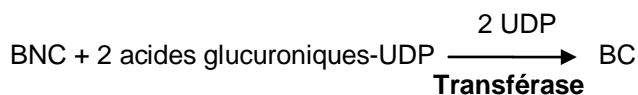
# Cycle de l'urée



## 1.2.2. Métabolisme de la bilirubine.

- Principal produit de dégradation de l'hème (90% venant du catabolisme de l'hémoglobine et 10% d'autres hémoprotéines)
- Principal site de production de la bilirubine est la rate, petite production hépatique sous l'action des cellules de Kupffer.
- Dans **les macrophages** : hème oxygénase catalyse la libération de fer, de CO, de biliverdine (pigment vert). La biliverdine est transformée en bilirubine par une réductase.
- Bilirubine non conjuguée insoluble est sécrétée dans le plasma et se fixe sur l'albumine. Bilirubine transportée vers le foie.
- Au niveau **du foie** :

- o Captation du complexe bilirubine albumine  $\longrightarrow$  pénétration de l'albumine dans l'hépatocyte.
- o Conjugaison qui rend la bilirubine plus soluble dans l'eau :



- o Excrétion de la bilirubine conjuguée au niveau de la membrane canaliculaire dans le canalicule biliaire par l'intermédiaire d'un transporteur.

### - Dans l'intestin :

- o Déconjugaison sous l'action d'enzymes bactériennes.
- o Dégradation en stercobilinogène, puis remaniement en stercobiline sous l'influence de la flore intestinale et élimination dans les selles.
- o Une partie de l'urobilinogène est réabsorbé et retourne soit au foie soit au rein pour être éliminé dans l'urine sous forme d'urobiline.

### 1.2.3. Métabolisme des xénobiotiques et de l'alcool.

#### a. Métabolisation des xénobiotiques.

- Définition xénobiotiques : substances étrangères naturelles ou artificielles (médicaments, toxiques, polluants...) généralement hydrophobes. Doivent être transformés pour diminuer leur activité pharmacologique et pouvoir être éliminés. Site principal de transformation = foie.
- Réactions enzymatiques : il existe dans le foie un ensemble d'enzymes du métabolisme et du transport des xénobiotiques (EMTX).
  - o **Phase I** : réactions d'oxydo réduction catalysées surtout par des cytochromes P450 (mono oxygénases) localisées à la surface du REL. Favorisent l'insertion d'un atome d'oxygène au sein de la molécule. Produit des substrats plus polaires.
  - o **Phase II** : réactions de conjugaison catalysées par des transférases (Glutathion S transférases (GST), UDPglucuronosyl transférases (UGT), sulfotransférases (SULT)). Augmente l'hydrosolubilité et diminue l'activité pharmacologique des médicaments.
  - o **Phase III** : transport actif des dérivés conjugués vers le tube digestif ou les urines
- Expression des EMTX est variable par exemple pour certains médicaments. Les patients peuvent les métaboliser plus ou moins rapidement (risque de surdosage). Cela peut également dépendre de l'état du foie.

Variation de cette métabolisation :

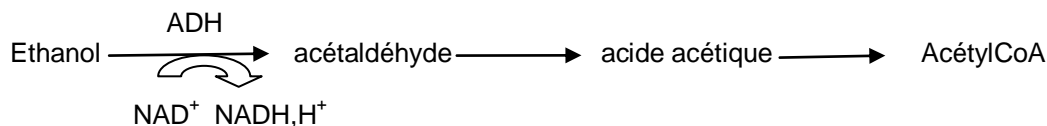
\***Physiopathologique** : foie malade sera moins efficace.

\***Environnementale** : diminution de l'activité des cytP450 avec l'âge.

\***Génétique** : variation entre les individus de l'activité des cytP450 (individus qui métabolisent plus ou moins efficacement les xénobiotiques). Polymorphisme génétique.

#### b. Métabolisation de l'alcool

- 95% de l'alcool métabolisé par le foie et 5% éliminé par les voies aériennes et urinaires.
- 3 réactions d'oxydations :



- 1<sup>ère</sup> réaction d'oxydation : 3 systèmes possibles
  - o ADH avec production de NADH,H+
  - o Catalase :  $\text{éthanol} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{acétaldéhyde} + 2 \text{H}_2\text{O}$
  - o MEOS (microsomal éthanol oxyding system) dans des cas d'alcoolisme chronique.
- Devenir de l'acétylCoA :
  - o Oxydé par le cycle de Krebs.
  - o Biosynthèse d'AG  $\longrightarrow$  TAG
  - o Biosynthèse de corps cétoniques.

### 1.2.4. Activité phagocytaire

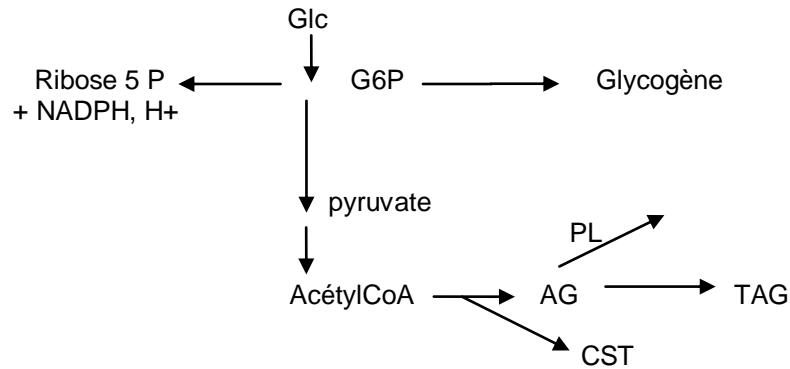
- Foie constitue le relai entre le TD, sa flore et le reste de l'organisme  $\rightleftarrows$  possède une fonction de filtre pour bloquer et éliminer les microorganismes via les cellules de Kupffer  $\rightleftarrows$  protection de l'organisme vis-à-vis des infections.
- Cellules de Kupffer = macrophages résidents. Attachés aux cellules endothéliales des sinusoides. Phagocytose d'agents biologiques ayant franchis la barrière intestinale.

## 1.3. Les fonctions métaboliques.

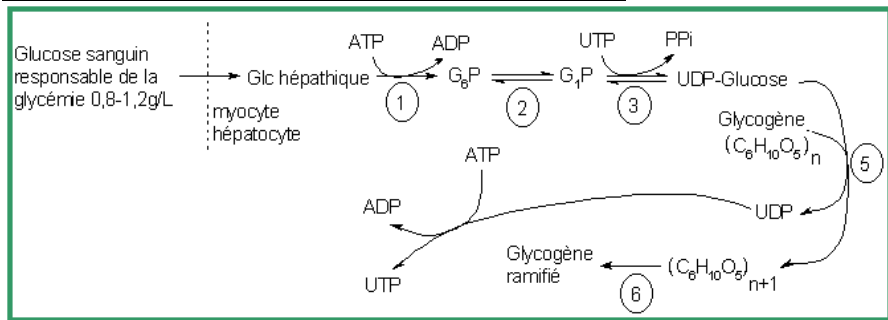
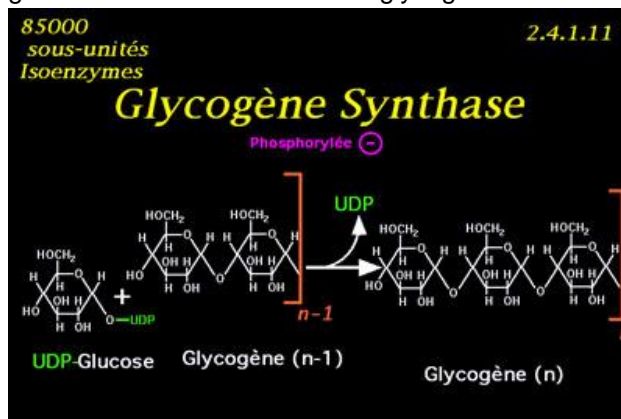
### 1.3.1. Métabolisme des glucides.

- **Période post prandiale : utilisation et stockage des glucides en excès.**
  - o Glycolyse ↗
    - Cytosolique
    - Apporter de l'énergie sous forme d'ATP.

- Fournir des intermédiaires métaboliques permettant de s'orienter vers le stockage des glucides en excès sous forme de glycogène, de lipides et vers la voie des pentoses phosphates.

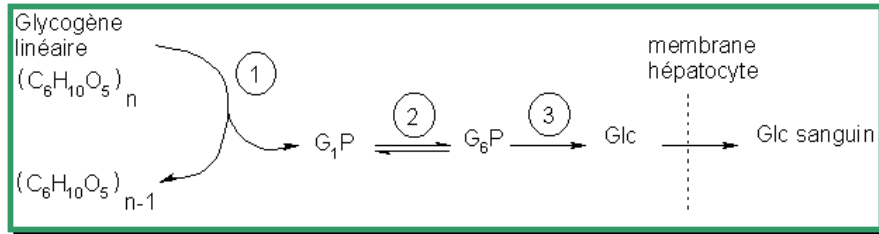


- Schéma bilan synthétique de la glycolyse :
- Glycogénogenèse : ↗ stockage du glucose en excès sous forme de glycogène.
  - cytosolique
  - Glycogène : forme de mise en réserve du glucose dans les cellules hépatiques. Polymère ramifié de glucoses reliés par des liaisons  $\alpha$ 1-4 et ramifications en  $\alpha$  1-6. Possède une seule extrémité réductrice.
  - Enzyme clef : la glycogène synthase additionne des résidus glycosyle à partir de l'UDP glc sur amorce de molécule de glycogène.

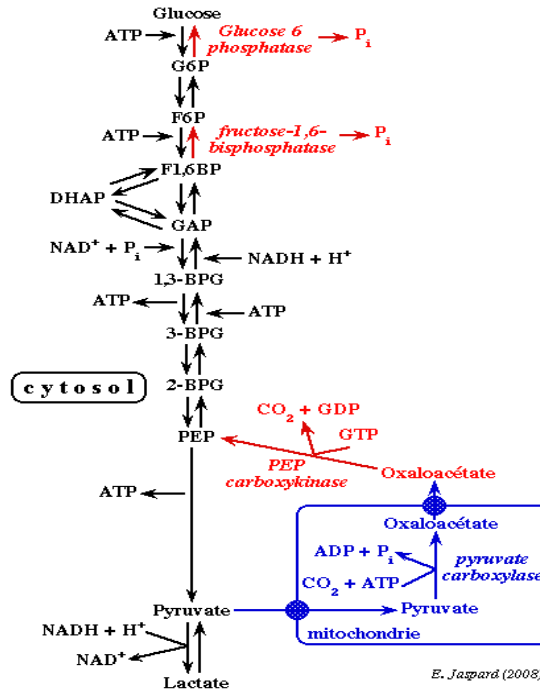


1. glucokinase, 2. Phosphoglucose mutase, 3. UDP glucose phosphorylase, 5. Glycogène synthase, 6. Enzyme branchante.

- **Période de stress (jeûne)** : production hépatique de glucose et diminution de son utilisation dans un contexte général d'épargne du glucose.
  - Glycolyse ↘
  - Glycogénolyse ↗ mobilisation des réserves de glycogène.
    - Structure ramifiée du glycogène permet de libérer très rapidement des molécules de glucose.
    - cytosolique
    - Dégradation du glycogène catalysée par la glycogène phosphorylase, la phosphoglucose mutase et l'enzyme débranchante.

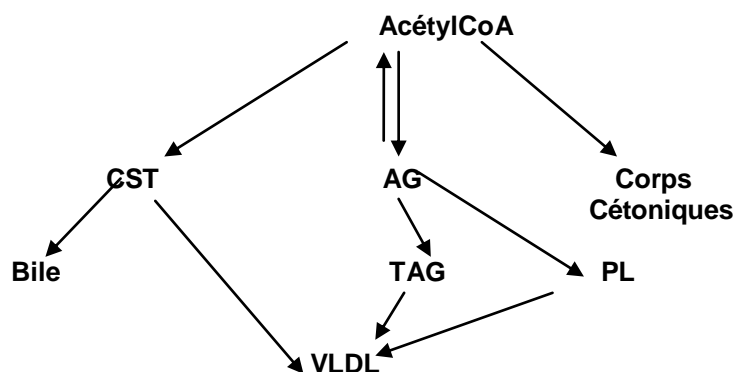


- Hydrolyse du G<sub>6</sub>P en Glc par **G<sub>6</sub> phosphatase** (existe exclusivement dans le foie)
- Sortie du glc par GluT2
- Néoglucogenèse ↗ synthèse de glucose à partir de substrats non glucidiques (acides aminés glucoformateurs, lactate, glycérol).
  - Cytosolique et mitochondriale



- Utilise une grande partie les enzymes de la voie de la glycolyse.
- 3 réactions irréversibles sont contournées (pyruvate carboxylase, PEPC, F-1,6-BPase, G-6-Pase)

### 1.3.2. Métabolisme des lipides

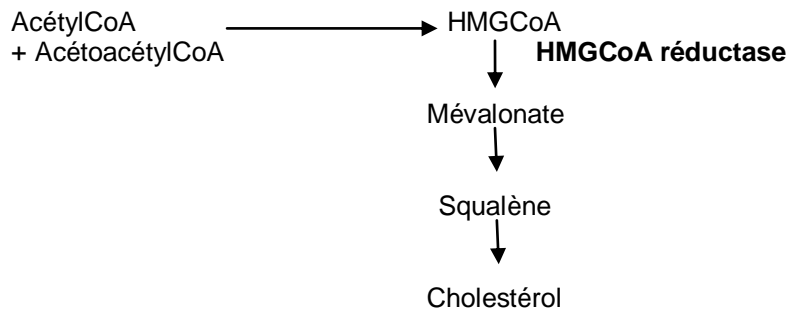


#### - Période postprandiale

- Biosynthèse d'acides gras à partir d'acétylCoA (origine : glucose en excès dans l'alimentation) sous l'action de l'**acétylCoA carboxylase** et du **complexe de l'AG synthase**. Cytosolique.
- Biosynthèse de TAG et de phospholipides à partir des AG néosynthétisés.



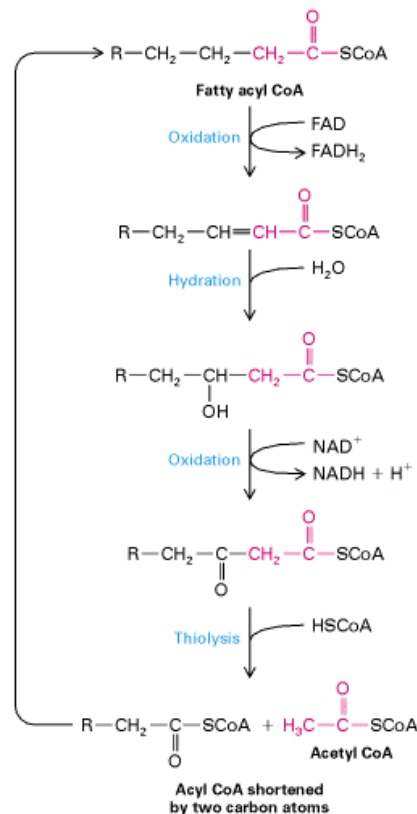
- Intégration des TAG et des phospholipides dans les lipoprotéines hépatiques.(VLDL) $\beta$
- Biosynthèse de cholestérol (foie = principal site de biosynthèse) : 30<sup>aine</sup> d'étapes enzymatiques.  
L'enzyme clef = HMGCoA réductase.  
Intégration de cholestérol dans les VLDL.



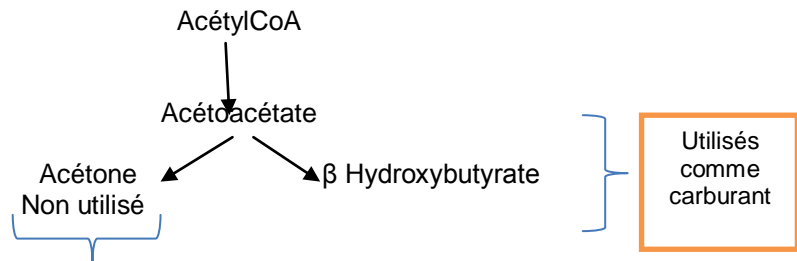
- CST est intégré dans les membranes plasmiques
- CST est estérifié.
- CST est utilisé pour la biosynthèse des sels biliaires
- CST en excès est éliminé dans la bile.
- CST est incorporé dans les lipoprotéines hépatiques (HDL natifs et VLDL)
- Biosynthèse endogène de vitD.

#### - Période de stress

- B oxydation : dégradation des AG en acétylCoA dans le but de produire de l'énergie en épargnant le glucose. **Mitochondrial**.



- Biosynthèse des corps cétoniques (jeûne prolongé) : production des corps cétoniques à partir de l'acétylCoA en excès qui ne peut pas entrer dans les réactions du cycle de Krebs (exclusivement hépatique). Participe au mécanisme général d'épargne du glucose au profit des cellules gluco-dépendantes. Cytosolique



### 1.3.3. Métabolisme protides.

- **Synthèse protéique** : protéines synthétisées par le foie constituent essentiellement des protéines plasmatiques.
    - o Albumine :
      - Quantitativement la plus importante des protéines plasmatiques.
      - Impliquée dans les transports non spécifiques de molécules liposolubles.
      - Responsable de la pression oncotique.
    - o  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  globulines (sauf immunoglobulines) : transport de substances liposolubles (hormones stéroïdiennes).
    - o Facteurs de coagulation (protéine pro et anti coagulantes)
    - o Protéines de transport spécifiques :
      - Transferrine : transport du Fer
      - Céruloplasmine : transport du Cuivre
    - o CRP : protéine de l'inflammation
    - o Angiotensinogène : régulation de la pression artérielle.
    - o Facteurs de croissance : capacité au foie de se régénérer.
    - o Hepsidine : métabolisme du Fer.
- Synthèse des apolipoprotéines.

- **Métabolisme des AA** : interconversion entre AA

### 1.3.4. Métabolisme du fer.

- 2<sup>ème</sup> réserve de Fer en importance après l'hémoglobine.
- Emmagasiné sous forme liée à des protéines (ferritine).
- Fonction de régulation et de stockage.
- Niveau d'**hepcidine** régit la libération ou le stockage du Fer :
  - o Interaction avec ferroportine membranaire  $\longrightarrow$  internalisation et dégradation de la ferroportine  $\longrightarrow$  limite la sortie de Fer dans le plasma.
  - o Bas niveau d'hepcidine  $\longrightarrow$  expression de la ferroportine à la membrane  $\longrightarrow$  favorise la sortie de Fer dans le plasma

### 1.3.5. Métabolisme des vitamines.

- Mise en réserve des vitamines A, E, B9, B12, B8
- Activation de la vitamine D : hydroxylation du cholécalférol sur le C-25 (deuxième hydroxylation rénale)

## II. Les régulations métaboliques au cours des périodes post prandiale et de jeûne.

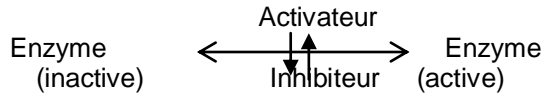
### 2.1. Mécanismes généraux des régulations métaboliques

- **Flux** à travers une voie métabolique **dépend** de l'**activité des enzymes** de cette voie.
- Certaines enzymes = **valves métaboliques** : augmentent ou diminuent le flux global au travers de la voie sous l'influence de **facteurs régulateurs**.
- Existe dans chaque voie métabolique, une ou des réactions dont la vitesse n'est pas limitée par le substrat mais par l'activité de l'enzyme : réaction limitée par l'enzyme.
- Activité de ces enzymes soumise à trois types de régulations.

#### 2.1.1. Régulation allostérique de l'activité des enzymes.

- Mode de régulation à court terme, immédiat (ms, sec), peu durable.
- Mode de contrôle intracellulaire.

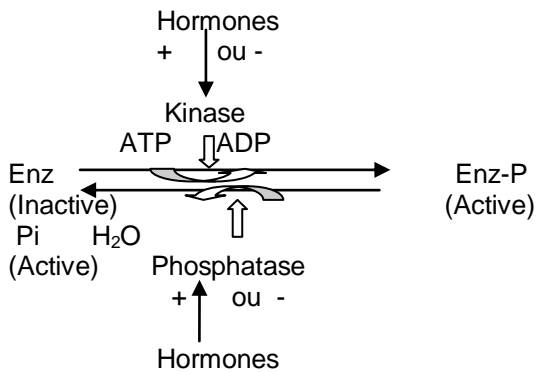
- Allostérie : changement de conformation de l'enzyme en présence d'effecteurs intracellulaires.
- Changement de conformation modifie l'activité de l'enzyme.
- **Métabolisme qui s'adapte quasi instantanément aux besoins cellulaires.**



## MODIFICATION DE LA CONFORMATION

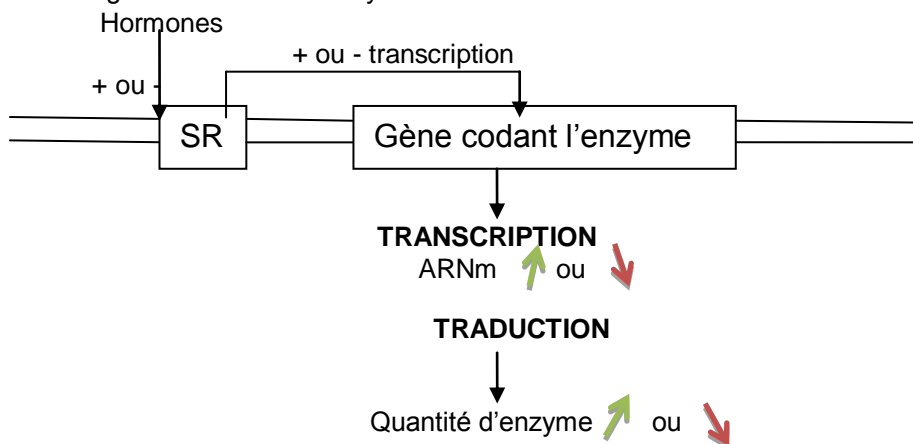
### 2.1.2. Régulation de l'activité des enzymes par modification covalente de l'enzyme.

- Mode de régulation de l'activité des enzymes à moyen terme (sec min).
- Mode de régulation extracellulaire. Adapte la vitesse de la réaction en fonction des besoins de l'organisme via des hormones.
- Changement de conformation de l'enzyme par addition ou suppression d'un groupement phosphate sur l'enzyme.
- Ces réactions de phosphorylation/déphosphorylation sont médiées par des hormones. Permet l'amplification du signal apporté par les hormones.
- Plus long à se mettre en place mais plus durable que l'allostérie.



### 2.1.3. Régulation du nombre d'enzymes clefs par régulation du niveau d'expression des gènes cibles.

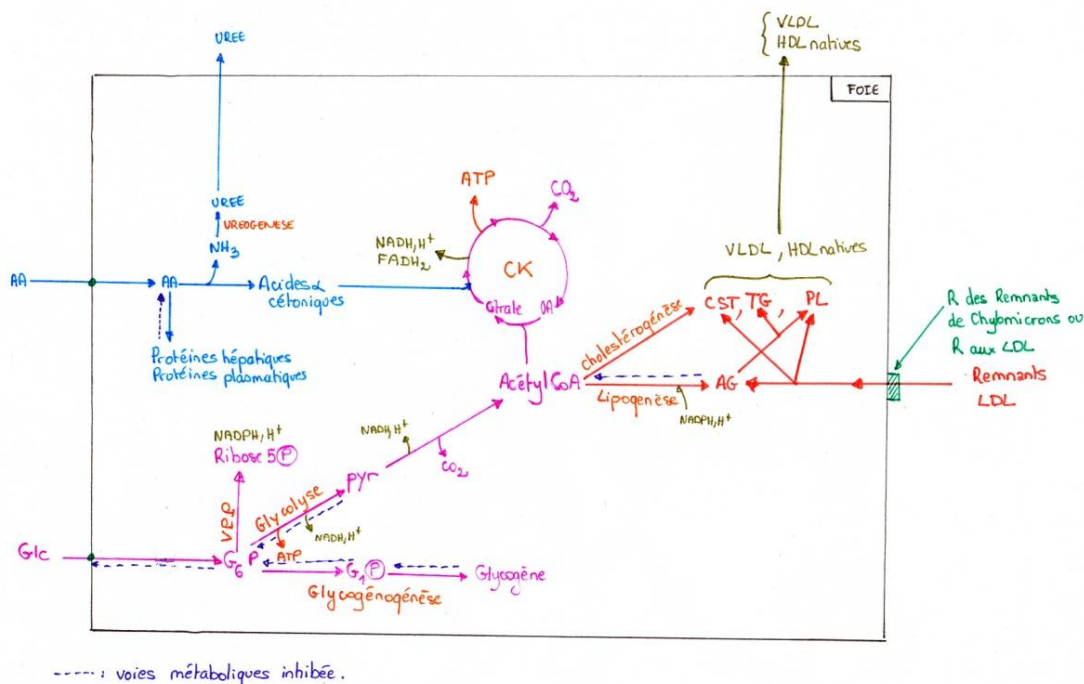
- Mode de régulation à long terme, durable lorsque l'organisme est soumis à des **modifications durables de son environnement.**
- Joue sur la quantité d'enzymes clefs disponibles des voies métaboliques. Modification du niveau d'expression des gènes codant ces enzymes.



- Les trois modes de régulation peuvent se superposer pour potentialiser l'effet régulateur.

## 2.2. Les régulations métaboliques en période post prandiale. : mise en réserve de l'énergie et biosynthèse.

## 2.2.1. Vue d'ensemble du métabolisme hépatique en période post prandiale.



- régulation réciproque et coordonnée des voies métaboliques pour éviter les cycles futiles et adapter la vitesse de fonctionnement des voies aux besoins de l'organisme.

## 2.2.2. Régulation du métabolisme glucidique.

- Objectif : augmenter l'utilisation hépatique du glucose pour produire de l'énergie, mettre en réserve l'excès de glucose sous forme de glycogène, réduire la production hépatique du glucose.
- Hormone majeure de la période post prandiale = Insuline (seule hormone hypoglycémiante).
- $\nearrow$  Glycolyse,  $\searrow$  NGG,  $\nearrow$  glycogénogénèse,  $\searrow$  glycogénolyse.

### a. Régulation de la glycolyse.

- Régulation de l'activité **glucokinase**.  
Enzyme qui catalyse l'entrée du glucose dans la glycolyse.
  - o Régulation du nombre d'enzymes disponibles.
    - Insuline induit l'expression du gène codant la glucokinase.
    - Permet d'utiliser plus de glucose en cas d'hyperglycémie.
- Régulation de l'activité de la **PFK1**  
Point critique de régulation
  - o **Régulation par allostérie.**
    - **Inhibiteurs allostériques** : ATP, Citrate  $\longrightarrow$  signe d'une production trop importante d'énergie par la cellule.  
Réduire le flux de glucose à travers la glycolyse.
    - **Activateurs allostériques** : ADP, AMP, F<sub>2,6</sub> BP.  
F<sub>2,6</sub> BP est un puissant activateur de l'activité PFK1.  
Quantité de F<sub>2,6</sub> BP augmente dans le foie sous l'influence de l'insuline  
 $\nearrow$ activité PFK1  $\longrightarrow$   $\nearrow$ glycolyse.  
F<sub>2,6</sub> BP produit à partir du F6 P : réaction catalysée par la PFK2.  
PFK2 existe sous 2 formes : une forme non phosphorylée à activité phosphofructokinase, une forme phosphorylée à activité F<sub>2,6</sub> biphosphatase.  
La phosphorylation de la PFK2 est sous la dépendance d'une PKA.  
Insuline **stimule** l'activité de l'AMPC phosphodiesterase et des phosphatases déphosphorylation et activation de la PFK2  $\longrightarrow$  Augmentation de la production de F<sub>2,6</sub> BP. Augmente la vitesse de la glycolyse.

- **Régulation du nombre d'enzymes disponibles.**
  - Insuline induit l'expression du gène de la PFK1.
- Régulation de l'activité pyruvate kinase.
  - Régulation par **allostérie**.
    - **F1,6 BP** : activateur allostérique de l'activité de l'enzyme.
  - Régulation de l'activité par **modification covalente** de la pyruvate kinase.
    - Médiée par l'insuline en période post prandiale.
    - **But : augmenter la glycolyse hépatique pour augmenter l'utilisation du glucose.**
    - Pyruvate kinase existe sous deux formes : une forme active déphosphorylée, une forme inactive phosphorylée.
    - Phosphorylation de la pyruvate kinase est sous la dépendance d'une PKA.
    - Insuline se lie à un R membranaire à activité tyrosine kinase.
    - Insuline  $\longrightarrow$   $\uparrow$  activité de l'AMPc phosphodiesterase. et des phosphatases déphosphorylation de la pyruvate kinase  $\longrightarrow$  glycolyse.  $\longrightarrow$   $\uparrow$

### b. Régulation de la NGG.

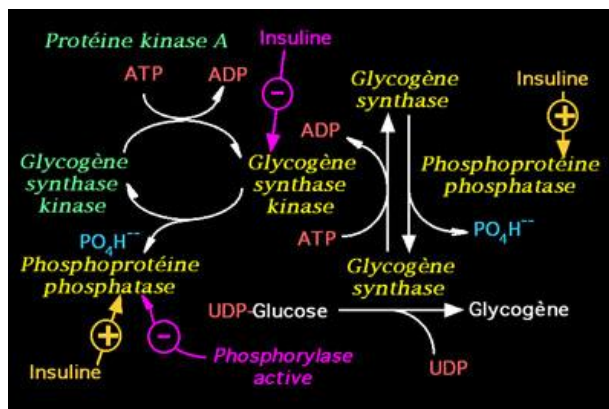
- **But : ralentir le fonctionnement de la voie pour limiter la production hépatique de glucose.** Eviter la création d'un cycle futile entre la glycolyse qui utilise le glucose et la NGG qui produit du glucose. Le **fonctionnement des deux voies est coordonné** : glycolyse (active), NGG (inactive).
- Régulation du niveau de transcription de la PEPCK
  - Promoteur du gène de la PEPCK pour des facteurs de transcription liés à l'homéostasie du glc dans la cellule.
  - **Fortes concentrations en glucose diminuent la transcription.**
  - Insuline réprime la synthèse de PEPCK.
- Régulation de l'activité de la F1,6 BPase.
  - Régulation allostérique de l'activité de la F1,6 BPase.  
En période post prandiale la PFK2 est déphosphorylée  $\longrightarrow$  activité phosphofructokinase F2,6 BP  $\longrightarrow$  inhibition de la F1,6 BPase.

### c. Régulation de la glycogénogenèse.

Régulation de l'activité de la glycogène synthase.

**But : stocker l'excès de glucide sous forme de glycogène** (pression osmotique <, peu soluble).

- **Régulation par allostérie.**
  - Glucose : activateur allostérique. Induit le passage de la glycogène synthase de la forme b (peu active) à la forme a (active).
- **Régulation de l'activité par modification covalente de l'enzyme.**
  - Médiée par l'insuline.
  - Glycogène synthase existe sous deux formes : une forme active déphosphorylée, une forme inactive phosphorylée.
  - En période post prandiale l'insuline augmente l'activité de la glycogène synthase par déphosphorylation de l'enzyme. Permet d'augmenter le stockage du glucose sous forme de glycogène.
  - Mode d'action de l'insuline :



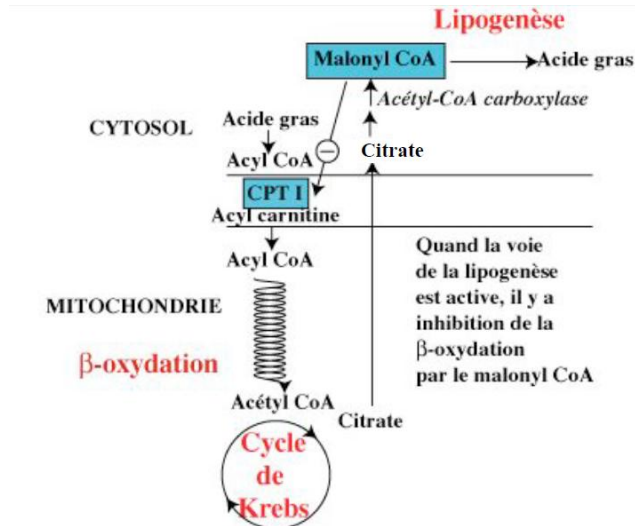
#### d. Régulation de la glycogénolyse.

- En période post prandiale l'offre digestive en glucose freine la glycogénolyse.
- Régulation coordonnée de la glycogénogenèse (active) et de la glycogénolyse (inactive)
- Enzyme clef de la glycogénolyse : la glycogène phosphorylase.
- La glycogène phosphorylase existe sous deux forme : une **forme a (active)** et une **forme b** (peu active).
- Le passage d'une forme à l'autre se fait soit par régulation allostérique ; soit par modification covalente de l'enzyme (phosphorylation/déphosphorylation).
- **Régulation de l'activité de la glycogène phosphorylase par allostérie.**
  - o Le glucose est un inhibiteur allostérique : se lie à la forme a (active) favorisant le passage à la forme b (peu active).
- **Régulation de l'activité de la glycogène phosphorylase par modification covalente.**
  - o La phosphorylation/ déphosphorylation de l'enzyme modifie son activité :
    - Forme a phosphorylée : active
    - Forme b déphosphorylée inactive.
  - o La **liaison de l'insuline à son R** :
    - Active protéine phosphatase 1 (PP1) : déphosphorylation de la glycogène phosphorylase qui passe sous la forme b inactive.
    - Active la phosphodiesterase  $\longrightarrow$   $\searrow$  AMPc  $\longrightarrow$  Inactivation de la PKA pas de phosphorylation de la glycogène phosphorylase.

#### 2.2.3. Régulation du métabolisme lipidique.

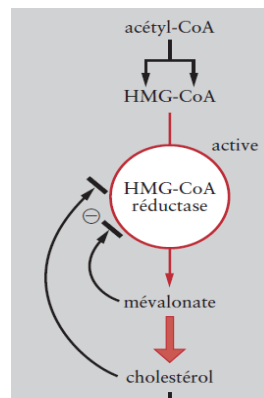
- **Objectif :**
  - o **augmenter l'utilisation hépatique du glucose, convertir l'excès de glucose en AG, stocker les AG sous forme de TAG, biosynthétiser des phospholipides et du cholestérol. Former les lipoprotéines hépatiques.**
  - o **Diminuer l'utilisation des acides gras.**
- **a. Régulation de la biosynthèse des acides gras.**
  - Régulation de la biosynthèse des acides gras repose à la fois sur la disponibilité en substrat d'origine glucidique, sur l'activité de l'acétylCoA carboxylase et du nombre d'AG synthase.
  - Disponibilité en substrats d'origine glucidique
    - o acétylCoA provenant du pyruvate issu de la glycolyse.
    - o ATP : produit par l'oxydation de l'acétylCoA dans le cycle de l'acide citrique.
    - o NADPH, H<sup>+</sup> : provenant de la voie des pentoses phosphates.
- **Régulation de l'activité de l'acétylCoA carboxylase par allostérie.**
  - o acétylCoA carboxylase catalyse la première étape de synthèse des acides gras.
  - o Existe sous deux formes :
    - Protomère inactif.
    - Polymère actif.
  - o Citrate induit la polymérisation du protomère.
  - o Quantité de citrate dépend :
    - Disponibilité en OA et en acétylCoA
    - Activité de l'isocitrate DH : enzyme inactive en présence d'une concentration élevée en ATP  $\rightleftharpoons$  signe d'un excédant d'énergie d'origine glucidique à mettre en réserve sous forme de lipides.
  - o Concentration élevée en ATP  $\rightleftharpoons$  citrate s'accumule  $\rightleftharpoons$  polymérisation de la protomère active l'acétylCoA carboxylase  $\rightleftharpoons$  la biosynthèse des acides gras.
  - o PalmitoylCoA est un inhibiteur allostérique de l'activité de l'enzyme : induit la dépolymérisation (rétrocontrôle négatif).
- **Régulation de l'activité de l'acétylCoA carboxylase par modification covalente.**
  - o Enzyme existe sous deux formes :
    - Une forme déphosphorylée active
    - Une forme phosphorylée inactive.
  - o Insuline induit le passage de l'enzyme sous sa forme active (déphosphorylée) : activation phosphatase et phosphodiesterase.

- **Régulation du nombre d'acétylCoA carboxylase.**
    - o Insuline induit l'expression du gène de l'acétylCoA carboxylase.
  - **Régulation du nombre d'AG synthase**
    - o Insuline induit l'expression des gènes des enzymes du complexe de l'AG synthase.
- b. Régulation de la  $\beta$  oxydation.**
- Régulation coordonnée pour éviter la formation d'un cycle futile (production des AG qui coexiste avec leur utilisation)



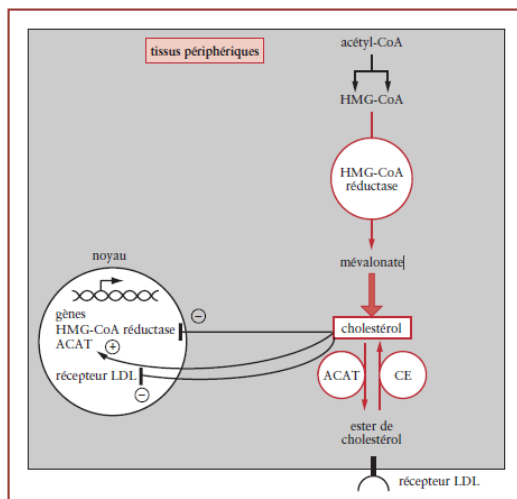
**c. Régulation de la biosynthèse du cholestérol.**

- Voie destinée à ne produire que le complément nécessaire au cholestérol d'origine exogène.
- **Régulation de l'activité de l'HMGCoA réductase.**
  - o Régulation de l'activité HMGCoA réductase est complexe et fait appel à tous les moyens dont la cellule dispose pour adapter la vitesse de la voie métabolique.
  - o Durée de vie courte (3/4 jours) et quantité variable (1 à 200 x).
  - o **Régulation de l'activité de l'HMGCoA réductase par allostérie.**
    - Mévalonate (produit direct) et cholestérol (produit final) sont des inhibiteurs allostériques



- o **Régulation de l'activité HMGCoA réductase par modification covalente.**
  - HMGCoA réductase existe sous deux formes :
    - Une forme déphosphorylée active
    - Une forme phosphorylée inactive.
    - Le passage de la forme phosphorylée à la forme déphosphorylée se fait sous l'influence de l'insuline : activation d'une phosphatase.
- o **Régulation du nombre d'HMGCoA réductase (régulation transcriptionnelle).**
  - Une augmentation du cholestérol intracellulaire  $\Rightarrow$   $\searrow$  niveau d'expression du gène de l'HMGCoA réductase,  $\searrow$  expression du gène codant les R LDL.

- Une diminution du cholestérol intracellulaire  $\Rightarrow$   $\nearrow$  niveau de transcription du gène de l'HMGCoA réductase.

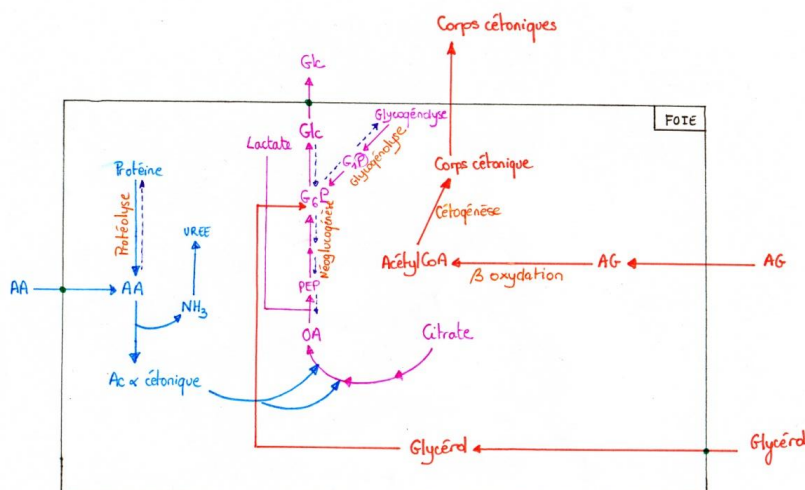


### 2.2.4. Régulation du métabolisme des protéides.

- **Objectif : assurer le renouvellement protéique.**
- Augmentation de la synthèse des protéines en période post prandiale.
- Augmentation de l'entrée des AA.
- Augmentation de l'utilisation des AA pour produire de l'énergie en cas d'alimentation excédentaire en AA
- augmentation de l'uréogénèse.
- L'insuline stimule l'entrée des AA dans les cellules et leur utilisation.

### 2.3. Les régulations métaboliques en période de jeûne : épargne générale du glucose.

#### 2.3.1. Vue d'ensemble du métabolisme hépatique en période de jeûne.



-----: voies métaboliques inhibées

- **But :**
  - Maintenir un apport constant en glucose aux cellules glucodépendantes et dont l'activité est continue (neurones, globules rouges).
  - Mettre en place un système général d'épargne générale d'utilisation du glucose au profit d'autres sources d'énergie (AG, AA, corps cétoniques).
  - Orienter, adapter et coordonner le fonctionnement des voies métaboliques pour répondre aux besoins de l'organisme.

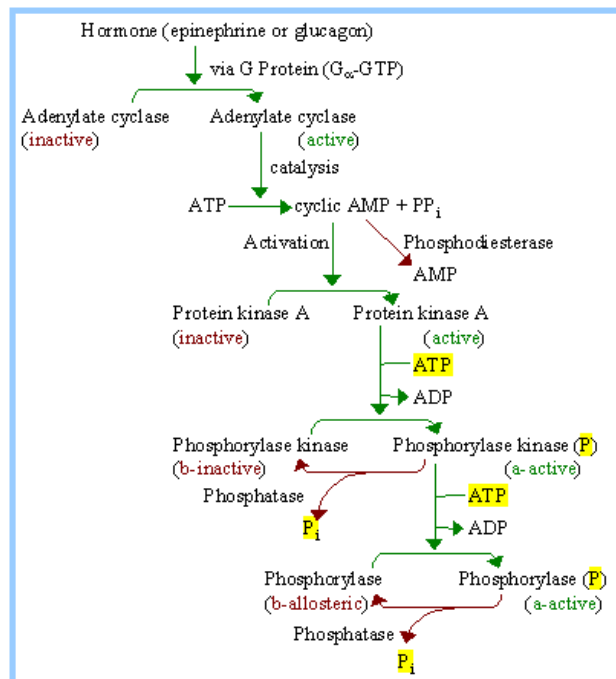


### 2.3.2. Régulation du métabolisme des glucides.

- Mobiliser les réserves de glycogène, augmenter la production hépatique de glucose, diminuer son utilisation au profit d'autres sources d'énergie.
- Hormones majeures de la période de jeûne : **glucagon**, adrénaline, cortisol.
- ↗ **Glycogénolyse**, ↘ **glycogénogénèse**, ↗ **NGG**, ↘ **glycolyse**.

#### a. Régulation de la glycogénolyse.

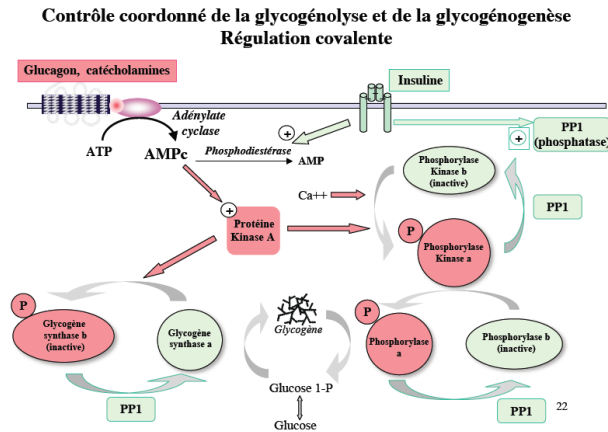
- Mobilisation des réserves hépatiques de glucose et sécrétion de glucose dans le sang pour maintenir la glycémie.
- Enzyme clef : glycogène phosphorylase.
- ↘ concentration intracellulaire en glucose lève l'inhibition allostérique: passage de la forme b à la forme a.
- **Régulation de l'activité de la glycogène phosphorylase par modification covalente.**
  - o Médiée par le glucagon et l'adrénaline.
  - o Liaison de l'hormone à son R → active protGs (membranaire) → active adénylate cyclase (membranaire) → production AMPc (2<sup>nd</sup> messenger) → activation de la PKA → phosphorylation de la phosphorylase kinase → phosphorylation de la glycogène phosphorylase → passe sous la forme a (active) → glycogénolyse.
  - o Liaison hormone-R → inactivation de la protéine phosphatase-1 (PP1).



#### b. Régulation de la glycogénogénèse.

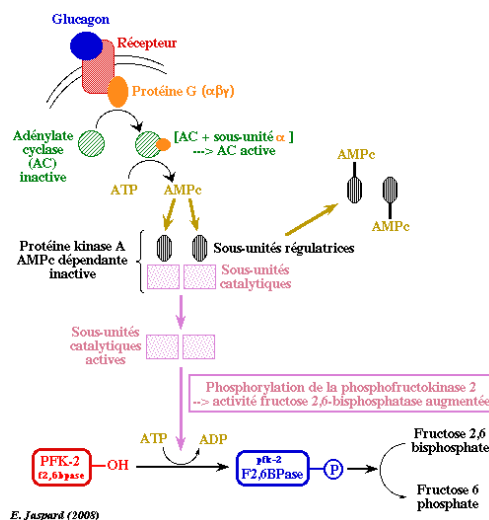
- Liaison du glucagon, adrénaline sur son R → active PKA → phosphorylation de la glycogène synthase qui passe sous forme inactive → freine la glycogénogénèse.
- Liaison hormone-R inactive la PP-1.

### c. Régulation coordonnée de la glycogénolyse et de la glycogénogenèse



### d. Régulation de la NGG.

- **But : produire du glucose à partir de précurseurs non glucidiques. Fournir du glucose aux cellules glucodépendantes quand le jeûne se prolonge.**
- **Régulation de l'activité pyruvate carboxylase.**
  - o Régulation de l'activité de la pyruvate carboxylase par allostérie : acétylCoA activateur allostérique.
  - o En période de jeûne l'OA est utilisé pour la production hépatique du glucose.
  - o Diminution de la disponibilité en OA limite l'entrée de l'acétylCoA dans le cycle de l'acide citrique concentration en acétylCoA  $\Rightarrow$  activation de la pyruvate carboxylase  $\Rightarrow$  accélération de la NGG.
- **Régulation de l'activité de la F1,6 Bi Phosphatase.**
  - o Régulation de l'activité de l'enzyme par allostérie.
    - Le citrate est un activateur allostérique.
    - L'AMP est inhibiteur allostérique.
    - Le F2,6 BP est un inhibiteur allostérique dont la production varie en fonction des situations PP et de jeûne. Cette production est sous dépendance hormonale : insuline et glucagon (2.2.2.a).
    - Liaison glucagon sur son R  $\rightarrow$  activation protéine Gs  $\rightarrow$  activation de l'AC  
 l'AMPc  $\rightarrow$  activation de la PKA  $\rightarrow$  phosphorylation de la PFK2 qui a une activité F2,6 BPase  $\rightarrow$  F2,6 BP  $\rightarrow$  levée de l'inhibition de la F1,6BPase  $\downarrow$  accélération de la NGG.



### e. Régulation de la glycolyse.

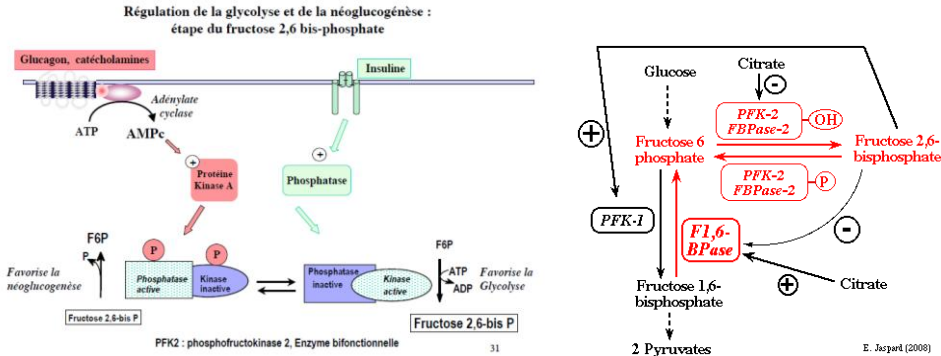
- Pour éviter la production d'un cycle futile la glycolyse est ralentie quand la NGG est accélérée : régulation réciproque et coordonnée des deux voies.

**Régulation de l'activité glucokinase.**

- Pas de régulation allostérique.
- A distance des repas la glucokinase est « piégée » par une protéine nucléaire la GKRP (glucose kinase regulatory protein) → ralentissement de la glycolyse.

**Régulation de l'activité de la PFK1 par allostérie.**

- Activation via le glucagon de l'activité F2,6 Biphosphatase → ↓ F2,6BP → inhibition de l'activité PFK1 → ralentissement de la glycolyse.

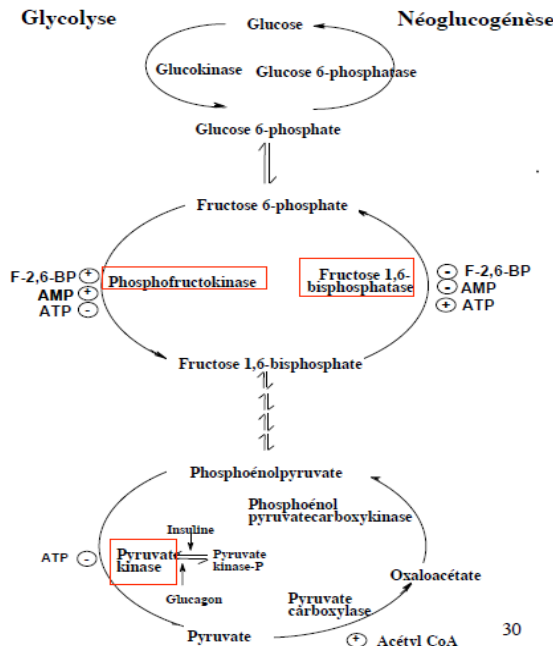


**Régulation de l'activité pyruvate kinase par modification covalente.**

- Glucagon induit le passage de la forme déphosphorylée active à la forme phosphorylée inactive (2.2.2a) → ralentissement de la glycolyse.

**f. Régulation coordonnée de la glycolyse et de la NGG.**

- Les deux voies ont lieu dans le cytosol : l'une est inhibée quand l'autre est activée et réciproquement.



**2.3.3. Régulation du métabolisme des lipides.**

- **But :** mise en place d'un système général d'épargne du glucose. Utilisation par les cellules hépatiques des AG comme source d'énergie. Biosynthèse des corps cétoniques source d'énergie pour les tissus extra hépatiques.
- B oxydation, ↓ biosynthèse des acides gras, ↓ biosynthèse du cholestérol, cétogénèse. ↗

**a. Régulation de la biosynthèse des acides gras.**

- Régulation de l'activité acétylCoA carboxylase
  - Régulation de l'activité de l'enzyme par modification covalente.

- Glucagon  $\Rightarrow$   $\uparrow$ AMPc  $\rightarrow$  active PKA  $\rightarrow$  phosphorylation de l'acétylCoA carboxylase qui passe sous forme inactive (2.2.3 a) ralentissement de la biosynthèse des AG.
- **Régulation du nombre d'enzymes disponibles (jeûne prolongé)**
  - Glucagon réprime l'expression du gène codant l'enzyme  $\Rightarrow$  ralentissement de la biosynthèse des AG
- **Régulation du nombre d'AG synthase.**
  - Le jeûne entraîne une diminution de l'expression des gènes du complexe enzymatique sous l'influence du glucagon et du cortisol.

#### b. Régulation de la $\beta$ oxydation.

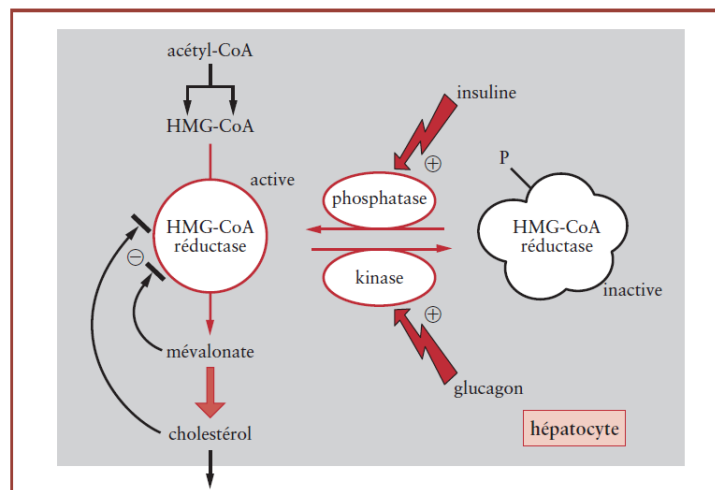
- Le glucagon inhibe l'activité de l'acétylCoA carboxylase  $\Rightarrow$   $\downarrow$  malonylCoA qui est un inhibiteur de l'acyl carnitine transférase I  $\Rightarrow$  levée de l'inhibition  $\Rightarrow$  entrée des AG dans la mitochondrie  $\Rightarrow$   $\uparrow$   $\beta$  oxydation (2.2.3.b).
- Glucagon induit l'expression du gène de l'acyl carnitine transférase I

#### c. Régulation de la biosynthèse des corps cétoniques.

- En période de jeûne  $\Rightarrow$  augmentation de la  $\beta$  oxydation  $\Rightarrow$  augmentation de l'acétylCoA.
- En période de jeûne OA utilisé par la NGG pour produire du glucose  $\Rightarrow$  l'acétyl CoA issu de la  $\beta$  oxydation s'accumule  $\Rightarrow$  active la cétogénèse.

#### d. Régulation de la biosynthèse du cholestérol.

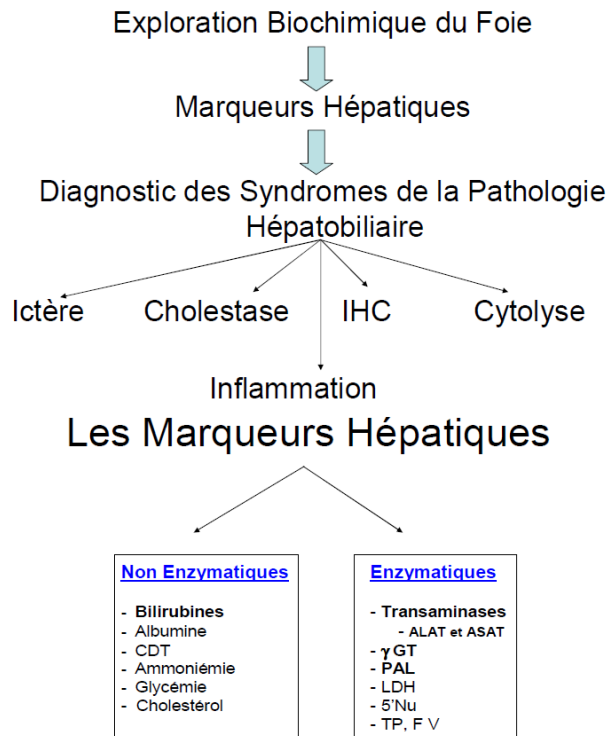
- Régulation par modification covalente de l'HMGCoA réductase.
  - Glucagon  $\Rightarrow$  active un inhibiteur de phosphatase  $\Rightarrow$  passage à la forme phosphorylée inactive diminution de la biosynthèse du cholestérol en période de jeûne.
  - Régulation coordonnée de la biosynthèse du cholestérol en fonction des PPP et de jeûne.



### 2.3.4. Régulation du métabolisme des protéides.

- Jeûne court
  - De multiples modifications hormonales (diminution de l'insulinémie) et des métabolismes (augmentation de la néoglucogenèse, de la lipolyse puis de la cétogénèse) vont survenir. Lors du jeûne court, le bilan azoté est initialement fortement négatif avec des pertes azotées importantes. À cette phase, la protéolyse est élevée, le muscle fournissant des acides aminés pour la néoglucogenèse et la synthèse protéique diminue lentement.
- Jeûne long
  - Les glucocorticoïdes sont catabolisants.
  - La protéolyse reste bien sûr supérieure à la synthèse (d'où le bilan négatif) mais, globalement le renouvellement protéique tend à diminuer avec des valeurs de protéolyse qui sont rapidement inférieures à ce qu'elles sont à l'état post absorptif. Cette **épargne azotée relative**, permettant de minimiser la réduction de la masse protéique, est un **mécanisme essentiel de défense** au cours du jeûne chez l'homme et les mammifères. Il permet une survie prolongée de 40 à 60 jours, le décès survenant lorsque la masse protéique descend en dessous d'une valeur que l'on peut estimer à 50 %- 60 % de la masse initiale

### III. Exploration fonctionnelle des fonctions hépatiques.



#### 3.1. Les marqueurs non enzymatiques.

##### 3.1.1. La bilirubine.

###### a. Principe de la détection.

- dosage par colorimétrie après diazotation (principe d'un dosage colorimétrique)
- **bilirubine directe** (conjuguée) + diazo +H<sup>+</sup> → azobilirubine (bleue) mesure absorbance à 560 nm.
- **bilirubine totale** (libre + conjuguée) + diazo +H<sup>+</sup> → azobilirubine (bleue) mesure absorbance à 520 nm
- **bilirubine indirecte** (libre) = bilirubine totale – bilirubine directe

###### b. Intérêt du dosage dans le cadre d'un bilan hépatique.

- Augmentation de la bilirubine conjuguée dans le plasma témoigne d'une **atteinte des fonctions d'excrétion biliaire** = syndrome de **cholestase hépatique**.
- Les fonctions de captation et de conjugaison de la bilirubine ne sont pas touchées.
- Accumulation de bilirubine conjuguée dans l'hépatocyte et reflux vers le sang.
- Augmentation mixte de la bilirubine (BC et BNC) = **insuffisance hépatocellulaire (atteinte des fonctions de synthèse hépatique)** et **cytolyse des cellules hépatiques**.
- Hyperbilirubinémie → ictère
- Etat physio : seule bilirubine libre retrouvée dans le sang. En absence d'obstacle post-hépatique, il n'existe pas de bilirubine conjuguée dans le sang

##### 3.1.2. Les protéines sériques (albumine)

###### a. Principe de leur détection.

- Electrophorèse des protéines sériques (principe électrophorèse)
- Dosage par immunoprécipitation.  
Dosage basé sur la mesure du trouble causé par la réaction entre l'Ag à titrer et l'Ac correspondant. La concentration étant constante en Ac, la teneur du complexe Ag-Ac ne dépend que de la concentration de la protéine antigénique.  
Mesure du trouble par néphélométrie à laser.  
On peut opérer en méthode point final (intensité maximale du trouble) ou en méthode cinétique (vitesse d'apparition du trouble).

Précision, rapidité, efficacité.

###### b. Intérêt du dosage dans le cadre d'un bilan hépatique.

- Synthétisée uniquement par le foie.

- Durée de ½ longue : 21 jours
  - o ↓ modérée au cours d'une maladie hépatique aigüe.
  - o ↓ dans la maladie hépatique chronique grave : indicateur de sévérité d'une IHC (insuffisance hépatocellulaire).
- Préalbumine : marqueur plus sensible car ½ vie plus courte.
- Hypoalbuminémie ne signifie pas obligatoirement une IHC : peut être due à un déficit d'apport ou malabsorption des protéines ou maladie inflammatoire chroniques ou pathologie rénale.

### 3.1.3. Ammoniémie.

#### • Principe de la détection.

- Prélèvement :
  - o Plasma veineux hépariné
  - o Non hémolysé (les globules rouges contiennent du NH<sub>3</sub>)
  - o Conservé dans la glace, traité sans délai.
- Colorimétrique : réaction de Berthelot.  
Ammoniac en milieu basique réagit avec l'hypochlorite pour former une monochloramine, puis successivement avec deux molécules de phénol pour former le bleu d'indophénol.  
Absorption à 630 nm.
- Dosage enzymatique  

$$\text{NH}_3 + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{Glutamate DH}} \text{NAD}^+ + \text{glutamate}$$
 Mesure de la ↓ d'absorbance à 340 nm (disparition du NADH,H<sup>+</sup>)

#### • Intérêt du dosage dans le cadre d'un bilan hépatique.

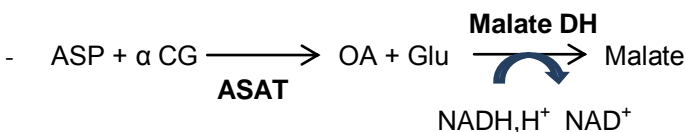
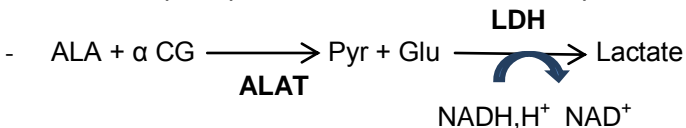
- Augmentation de l'ammoniémie : IHC sévère (foie seul organe à pouvoir éliminer le NH<sub>3</sub>).
- Acidose.
- Déficit congénital en OTC

## 3.2. Les marqueurs enzymatiques.

### 3.2.1. ALAT/ASAT

#### a. Principe de leur détection.

- Mesure de la disparition du NADH à 340 nm par spectrophotométrie UV
- Réaction principale + réaction indicatrice couplée aux coenzymes nicotiniques.



#### b. Intérêt du dosage dans le cadre d'un bilan hépatique.

- Dans le foie : plus d'ALAT que d'ASAT
- ALAT : ↑ marqueur prédominant d'une cytolysse du foie.
- Rapport ASAT/ALAT >1 : cirrhose hépatique

### 3.2.2. LDH (lactate déshydrogénase)

#### a. Principe de la détection.

- Mesure de l'activité enzymatique.
- Mesure de la ↓ de l'absorbance à 340nm (disparition du NADH,H<sup>+</sup>) par spectrophotométrie UV.

#### b. Intérêt du dosage dans le cadre d'un bilan hépatique.

- ↑ LDH : signe de cytolysse hépatique peu spécifique.

### 3.2.3. $\gamma$ GT

#### a. Principe de la détection.

- Détermination de l'activité enzymatique : méthode colorimétrique
- Glutamyl-4-nitranilide + glycyglycine  $\longrightarrow$  glu-glycyglycine + 4-nitraniline
- Vitesse de formation de la 4 nitraniline (jaune) proportionnelle à l'activité de la  $\gamma$  GT
- Mesure de l'augmentation de l'absorbance à 405nm

#### b. Intérêt du dosage dans le cadre d'un bilan hépatique.

- ↗ dans toutes les affections hépatiques.
- ↗ Ethylisme, normalisation rapide après sevrage
- Signe de cholestase
- Intoxication médicamenteuse.

### 3.2.4. PAL

#### a. Principe de la détection.

- Détermination de l'activité enzymatique : méthode colorimétrique.
- PNPP + H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  PNP (jaune) + phosphate (PAL)
- ↗ Absorbance à 405nm
- Séparation des enzymes de la PAL par électrophorèse.

#### b. Intérêt du dosage

- localisation membranaire (canaux biliaires)
- ↗ En cas de cholestase : principal marqueur.

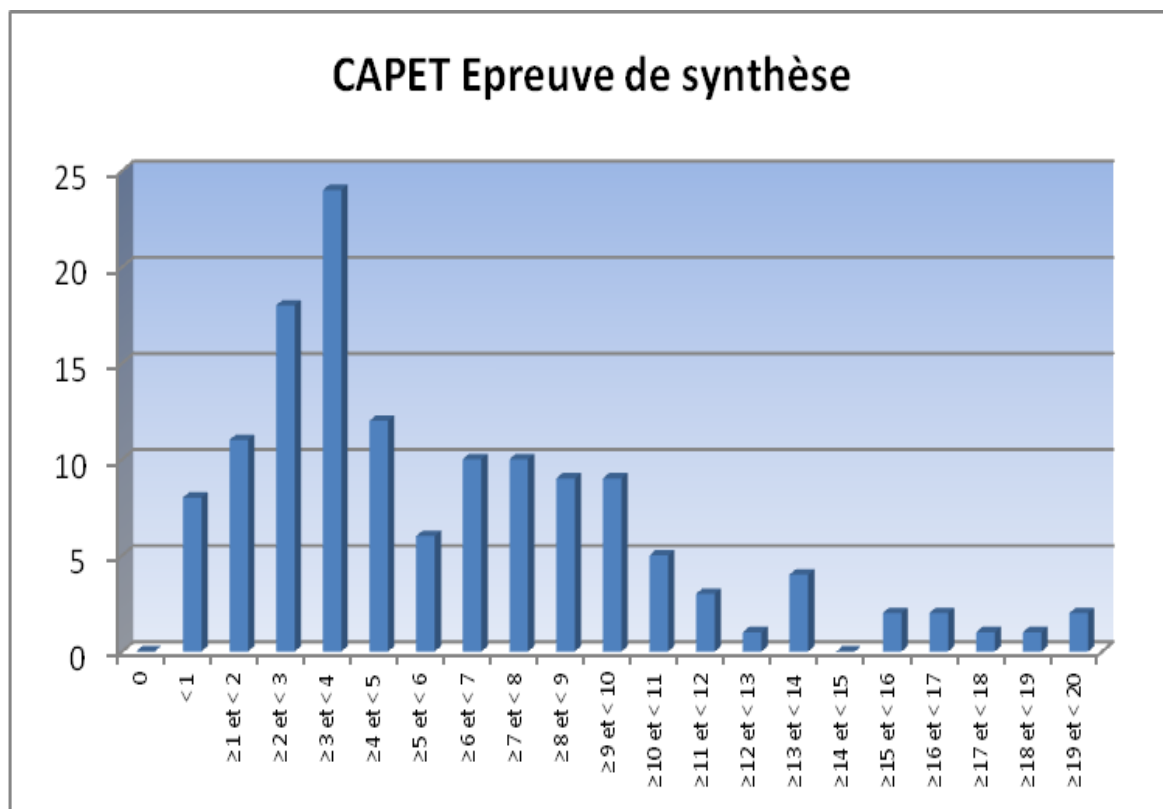
# Rapport du jury de l'épreuve d'admissibilité « épreuve de synthèse »

*Rapport établi par* : Mr Olivier Beaumesnil, Mme Armelle BIGOT, Mme Valérie BOCHARD, Mme Sophie BOYS, Mme Anne CAZALOT, M. Pascal CHAFFAUT, M. Christian DEVAUX, Mme Claire DUBRAC, Mme Sandrine DUVET, Mme Véronique FAUTREZ, M. Gilles FREMY, Mme Susanne HAEBERLE-MULLER, Mme Catherine MALLET, Mr Gilles FREMY

Résultats :

## CAPET

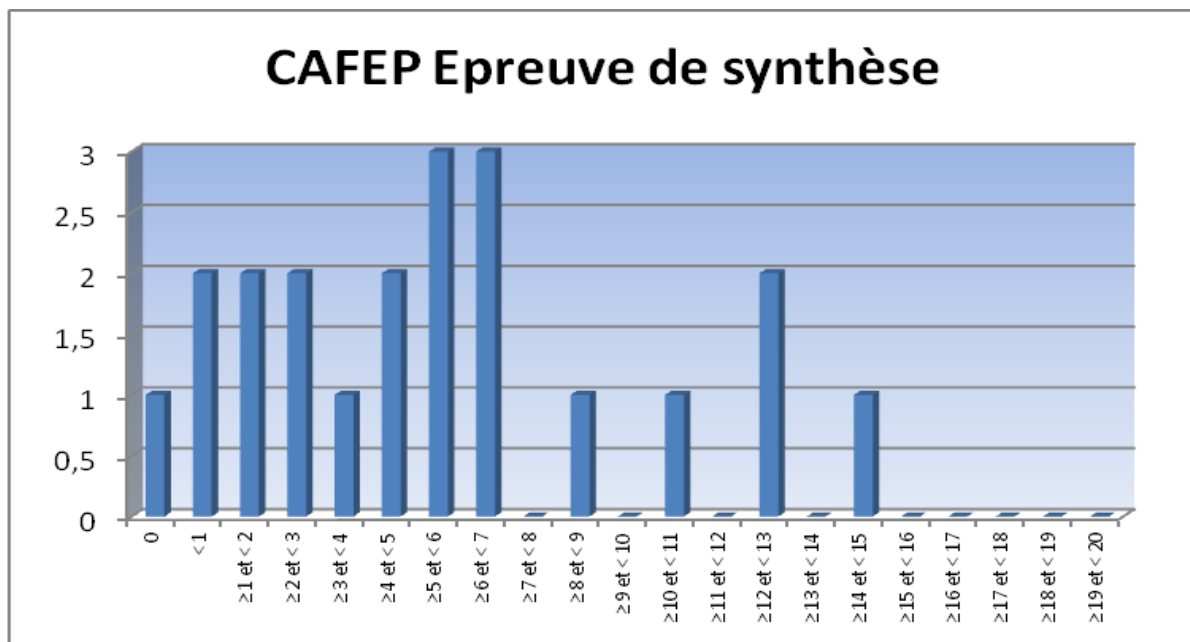
< 1	8	≥ 10 et < 11	5
≥ 1 et < 2	11	≥ 11 et < 12	3
≥ 2 et < 3	18	≥ 12 et < 13	1
≥ 3 et < 4	24	≥ 13 et < 14	4
≥ 4 et < 5	12	≥ 14 et < 15	0
≥ 5 et < 6	6	≥ 15 et < 16	2
≥ 6 et < 7	10	≥ 16 et < 17	2
≥ 7 et < 8	10	≥ 17 et < 18	1
≥ 8 et < 9	9	≥ 18 et < 19	1
≥ 9 et < 10	9	≥ 19 et < 20	2





## CAFEP

< 1	1	≥ 10 et < 11	1
≥ 1 et < 2	2	≥ 11 et < 12	0
≥ 2 et < 3	2	≥ 12 et < 13	2
≥ 3 et < 4	1	≥ 13 et < 14	0
≥ 4 et < 5	2	≥ 14 et < 15	1
≥ 5 et < 6	3	≥ 15 et < 16	0
≥ 6 et < 7	3	≥ 16 et < 17	0
≥ 7 et < 8	0	≥ 17 et < 18	0
≥ 8 et < 9	1	≥ 18 et < 19	0
≥ 9 et < 10	0	≥ 19 et < 20	0



### Commentaires :

Le sujet de synthèse portait sur « le foie : de la biochimie des fonctions hépatiques à l'exploration fonctionnelle. »

L'énoncé comportait un tableau présentant différents marqueurs hépatiques et leurs valeurs physiologiques. Ces indications orientaient les candidats vers quelques fonctions hépatiques à développer. Une vision synthétique et un raisonnement construit devaient être mis en place en s'appuyant sur des connaissances biochimiques, physiologiques et technologiques solides.

### **Commentaires sur la forme :**

Le jury a apprécié les efforts de rédaction fournis par les candidats et rappelle que la syntaxe, la grammaire et l'orthographe sont pris en compte dans l'évaluation de l'épreuve.

La présence d'illustrations et de schémas de synthèse soignés et correctement légendés est également un élément d'appréciation des qualités pédagogiques des candidats.

La présence d'un plan apparent, cohérent avec des sous-parties est attendue par le jury afin d'évaluer la capacité du candidat à structurer ses connaissances.

## **Commentaires sur le fond :**

Une introduction, permettant de présenter le foie et sa vascularisation, de contextualiser la problématique et d'annoncer le plan, était attendue.

Entre chaque partie, des transitions devaient permettre d'extraire et d'organiser les éléments essentiels développés précédemment puis d'amener logiquement le développement de la partie suivante par une argumentation rigoureuse.

Une conclusion, même courte, devait synthétiser les notions fondamentales exposées dans la copie et permettre d'élargir la problématique engageant de possibles prolongements ou perspectives scientifiques

Les candidats devaient montrer leur capacité à structurer leurs connaissances pour parvenir à une vision synthétique mais intégrée du rôle central du foie.

Si toute approche cohérente était acceptée, il était toutefois plus aisé de traiter l'intégralité du sujet en s'appuyant sur le plan suggéré dans l'énoncé.

Dans la partie portant sur les grandes fonctions hépatiques, le jury attendait une étude du rôle digestif (synthèse et excrétion de la bile), de la fonction d'épuration et de détoxification puis des rôles métaboliques (métabolisme des glucides, lipides, protéides, fer et vitamines). Les voies métaboliques devaient être développées pour permettre ensuite une approche plus aisée des différents mécanismes de régulation.

La deuxième partie devait traiter la régulation métabolique dans deux situations physiologiques : la période postprandiale et le jeûne. Après avoir présenté les mécanismes généraux des régulations enzymatiques, il était indispensable de les intégrer aux différentes voies métaboliques. Il était pertinent d'illustrer chaque situation par un schéma de synthèse montrant les régulations hormonales et enzymatiques.

La dernière partie nécessitait de posséder des connaissances en biotechnologies, discipline enseignée dès le lycée en section STL spécialité biotechnologies. Le choix des techniques devait être pertinent. Les candidats devaient préciser le principe et l'intérêt des techniques de dosage des marqueurs hépatiques dans un but de diagnostic médical (dosage enzymatique, colorimétrique, électrophorèse,...).

Le jury a constaté de profondes lacunes en termes de connaissances scientifiques et technologiques de base, qui sont pourtant impératives pour enseigner dans les domaines de spécialités des biotechnologies au lycée.

# Éléments de correction de l'épreuve d'admissibilité

## « étude d'un système, d'un procédé ou d'une organisation »

Remarque liminaire : le texte ci-dessous n'est ni un corrigé, ni la « copie modèle ». Il apporte des « éléments de correction par un éclairage sur les principales notions scientifiques associées au sujet. Le style volontairement non rédigé montre l'unique choix d'exposer les principales notions et concepts pouvant être abordés dans le cadre de l'étude du système, du procédé ou de l'organisation proposé lors de la présente session.

### Anticorps (Ac) monoclonaux (Acm) humains comme molécules thérapeutiques

- 1
    - Méthode d'obtention d'Acm, par Kohler et Milstein (1975)
      - permet de disposer d'Ac bien caractérisés et spécifiques d'un épitope donné et en quantité illimitée, car produit par une cellule immortalisée.
      - Idée utilisation des Acm comme outil de recherche, diagnostic et comme molécule médicament, dans le cas de pathologies impliquant le système immunitaire et de pathologies chroniques.
        - 1<sup>er</sup> Acm thérapeutique OKT3 utilisé dans le traitement de rejet de greffe
- Mais Acm sont des Ig de souris et donc des xénoantigènes pour l'homme induisant une réponse immunitaire adaptative d'où une perte d'efficacité du traitement dès la 2<sup>ème</sup> utilisation.
- Amélioration de la technologie de production d'anticorps monoclonaux pour répondre à l'exigence thérapeutique (notamment les traitements anticancéreux et pour les maladies auto-immunes).
- Par stratégie d'humanisation des Acm jusqu'à produire des anticorps complètement humains
  - Annonce du plan

### Obtention et caractérisation de nouveaux Anticorps monoclonaux humains

#### Stratégie d'humanisation des Acm

L'humanisation consiste en la diminution de la proportion de séquences murine dans l'immunoglobuline produite finale.

- 1
  - 2A **Obtention d'anticorps mosaïques souris/humain (8)**

Les 2 premières stratégies utilisent les gènes des Ig recombinés d'un hybridome de souris classique, pour construire des anticorps portant les séquences de reconnaissance de l'Ag de souris (gènes recombinés de l'hybridome) et les parties constantes humaines

    - 1<sup>ère</sup> étape : Anticorps chimériques : (vers 1997/98)
  - 2B obtenus par la fusion du domaine variable (VL et VH) des chaînes légère et lourde d'un anticorps monoclonal de souris avec les domaines constants humains correspondants (CL et CH). (maîtrise de la structure de l'Ig)
    - choix de 1 exp parmi

3	Rituximab	Rituxan	CD20; chimeric IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma
	Cetuximab	Erbitux	EGFR; chimeric IgG1	Colorectal cancer
	Basiliximab	Simulect	IL2R; chimeric IgG1	Prevention of kidney transplant rejection
	Infliximab	Remicade	TNF; chimeric IgG1	Crohn disease

- 1
  - 2<sup>ème</sup> étape : Anticorps humanisés : (vers 2000)
- 2B créés en greffant les régions déterminants la complémentarité (CDRs) d'anticorps monoclonal de souris (seule la partie hypervariable des régions VL et VH est d'origine murine) dans une IgG humaine. (maîtrise de la structure de l'Ig)

Choix parmi

	Alemtuzumab	Campath-1H	CD52; humanized IgG1	Chronic myeloid leukemia	2001
	Bevacizumab	Avastin	VEGF; humanized IgG1	Colorectal cancer	2004
	Tocilizumab	Actemra	IL6R; humanized IgG1	Rheumatoid arthritis	2010
	Omalizumab	Xolair	IgE; humanized IgG1	Asthma	2003
	Natalizumab	Tysabri	$\alpha$ 4 integrin; humanized IgG4	Multiple sclerosis	2004

#### Obtention d'anticorps monoclonaux humains (6)

3<sup>ème</sup> étape : Anticorps humains : sont obtenus par 3 stratégies différentes (vers 2010)

- 1 Par criblage d'une banque de fragments variables d'anticorps humains [single-chain variable fragments (scFvs)] correspondant au paratope et reconstruction par génie génétique d'une immunoglobuline humaine complète → obtention d'anticorps polyclonaux
- 2B Par l'immortalisation d'un lymphocyte B mémoire humain du sang périphérique, par infection par EBV (Epstein Barr Virus). La difficulté est d'obtenir le LB mémoire produisant l'Ac spécifique de l'Ag recherché.

2B Par la méthode classique de production d'hybridomes, mais par immunisation d'une souris humanisée pour les gènes d'immunoglobuline (décrit en détail dans le paragraphe suivant 1.2)

Choix de 1 exp parmi :

3	Ofatumumab	Arzerra	CD20; human IgG1	Chronic lymphocytic leukemia	2009
	Panitumumab	Vectibix	EGFR; human IgG2	Colorectal cancer	2006
	Ustekinumab	Stelara	IL12/23; human IgG1	Plaque psoriasis	2009
	Golimumab	Simponi	TNF; human IgG1	Rheumatoid and psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis	2009
	Adalimumab	Humira	TNF; human IgG1	Rheumatoid arthritis	2002

1 **Bilan** : Intérêts de l'humanisation des Anticorps monoclonaux

2A Les AcM ainsi obtenus ont une proportion de séquences murines de plus en plus réduite et sont donc de moins en moins immunogènes et donc utilisables de façon récurrente en thérapeutique.

Avec tous les avantages des AcM de souris : spécificité et production en quantité illimitée.

Les Ac thérapeutiques sont tous utilisés en thérapeutique humaine, montrant le champ d'application thérapeutique des AcM humains.

Approfondissement de la technologie fidèle à la méthode originale, production d'hybridome grâce à des souris humanisées

2A **Adaptation de la méthode originale de Kolher et Miltsein**

5

4

### Utilisation de souris transgéniques humanisées

L'humanisation pour le locus des immunoglobulines de souris implique différentes étapes.

- Knock-out ou invalidation des gènes des chaînes lourdes et légères (kappa) d'immunoglobulines de souris → les souris sont alors incapables de produire des immunoglobulines murines.
- Knock-in, introduction des transgènes humains codant les chaînes lourdes et légères (K) des immunoglobulines humaines.

### (organisation génétique pour info correcteur)

Analyse du doc :

- Le gène de la chaîne légère n'est pas modifié, en effet, lors de l'activation des LB, le gène de la chaîne est remanié en 1<sup>er</sup> et conduit le plus souvent à l'obtention d'un réarrangement fonctionnel, dans 80% des cas, il suffit de vérifier que la chaîne légère est K, sinon, il s'agit de la chaîne murine

- Pour les chaînes lourdes et légères tous les segments conduisant à la diversité du répertoire B sont introduits (V et J pour la chaîne légère K et V/D/J pour la chaîne lourde, en plus des domaines constants C<sub>K</sub> et C<sub>μ</sub>-C<sub>δ</sub> humain et au moins un segment C<sub>V</sub> humain.

- Donc les souris transgéniques humanisées produisent des AcM humains dont la chaîne légère est forcément la chaîne K.

5

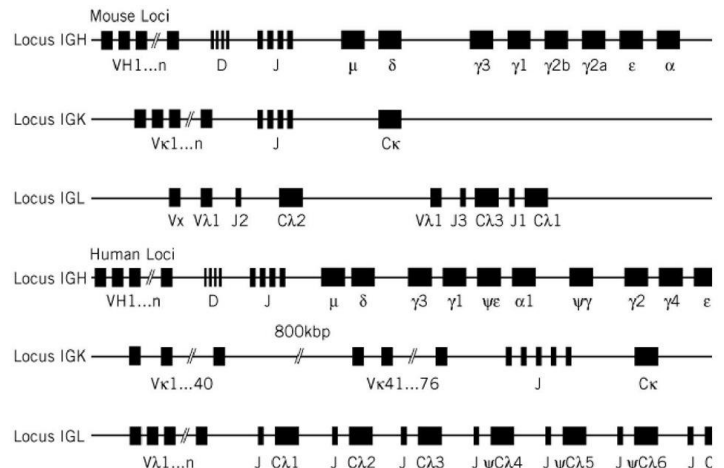
### Etapes techniques de l'obtention d'hybridomes

Avec schéma

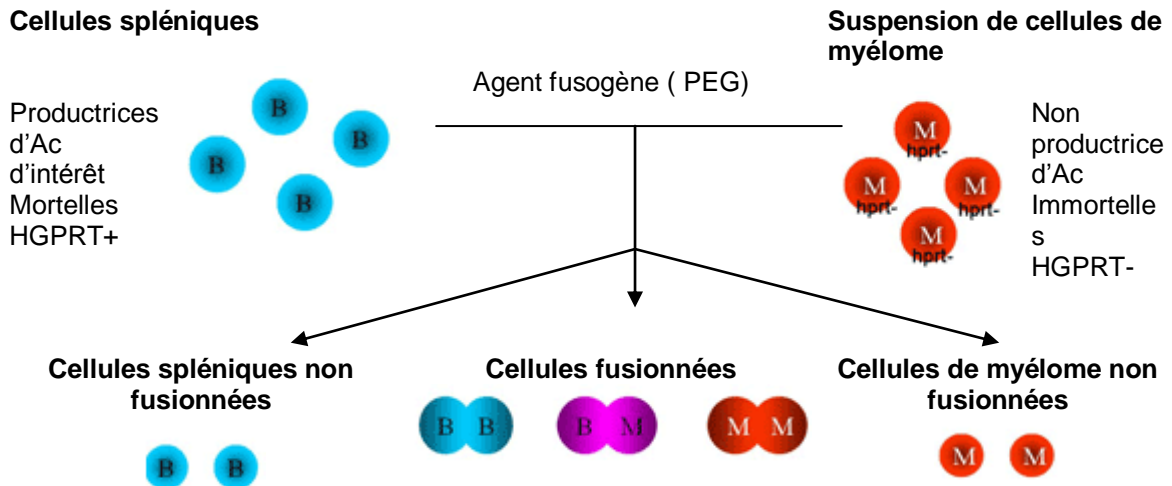
1. Préparation de l'Ag d'intérêt, en général on utilise un antigène purifié pour obtenir une réponse immunitaire plus ciblée. Mais dans ce cas particulier, comme il s'agit d'une protéine membranaire, l'Ag n'est pas purifié et est fourni associé à la membrane de la cellule transfectée qui la surexprime.
2. Hyper-immunisation de souris avec l'Ag d'intérêt →

Immunisation par Ag incapable de se multiplier dans l'hôte, l'emploi d'adjuvant est indispensable, (Adjuvant préparation qui permet d'augmenter l'immunogénicité des molécules qui lui sont mélangées, en favorisant la réaction inflammatoire et en ralentissant le relargage des Ag vaccinaux.)

- 1<sup>ère</sup> immunisation en présence d'adjuvant complet de Freund (émulsion d'huile minérale et mycobactérie tuées avec la préparation antigénique 10<sup>7</sup> cellules transfectées) → forte stimulation antigénique, car adjuvant très fort.



- 2<sup>ème</sup> immunisation (2-3 semaines plus tard) en présence d'adjuvant incomplet de Freund (émulsion d'huile minérale avec la préparation antigénique 10<sup>7</sup> cellules transfectées) → réponse secondaire pour la RIMH, commutation de classe vers IgG dans le cas de la méthode historique, mais ici souris transgénique ne produisant que des IgM, donc pour forcer la réponse immunitaire et obtenir une grande quantité de LB armés.
- 3<sup>ème</sup> et dernière immunisation (2 semaines après la 2<sup>ème</sup> immunisation) par voie intraveineuse → ciblage de la rate comme organe lymphoïde secondaire.
- 3. Euthanasie des souris (après 3j) et récupération de la rate contenant les LB armés ici spécifiques des cellules et de l'Ag CD69.
- 4. Fusion des LB armés (mortels et producteurs d'Ac) de la rate avec des cellules myéloïdes (HGPRT-, immortelles et non productrices d'Ac) → obtention d'une population hétérogène.



Seules les cellules fusionnées entre un LB producteur d'anticorps et une cellule de myélome appelées **HYBRIDOMES** intéresse → étape nécessaire de sélection.

5

### Sélection des hybridomes par culture sur milieu HAT

Le Milieu de sélection est le milieu HAT : Hypoxanthine, aminoptérine et Thymine

- Hypoxanthine est le précurseur des nucléotides puriques par la voie de synthèse dite de recyclage grâce aux réactions suivantes catalysées par HGPRT.

Hypoxanthine + PRPP (phosphoribose pyrophosphate) → IMP (Inosinate mono phosphate) + PPi

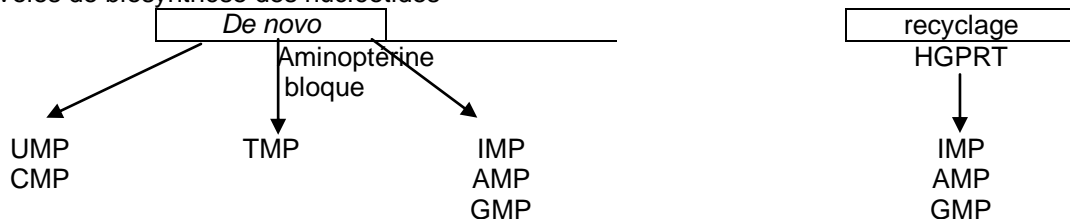
Guanine + PRPP (phosphoribose pyrophosphate) → IMP (Inosinate mono phosphate) + PPi

IMP est le précurseur des nucléotides triphosphate puriques : GMP et AMP.

- L'aminoptérine bloque la voie de biosynthèse *de novo* des nucléotides puriques et de la thymine

L'aminoptérine ( ou méthothréxate) est une molécule anti-cancéreuse qui inhibe la dihydrofolate réductase , enzyme permettant de recycler le coenzyme folique impliqué dans la méthylation des bases azotées.

Les 2 voies de biosynthèse des nucléotides



### Principe de la sélection par le milieu HAT

La suspension est mise à cultiver dans un milieu de culture particulier = milieu HAT + SVF (sérum de veau fœtal).

La sélection repose sur le fait que les cellules en culture doivent synthétiser des bases azotées pour pouvoir répliquer leur ADN et que l'on peut prédire quelles cellules seront capables de cette synthèse indispensable à la division cellulaire.

### Comportement des 3 populations cellulaires en milieu HAT

	LB fusionnés entre eux ou non fusionnés	Fusion LB/myélome	Cellules de myélomes fusionnées entre elles ou non fusionnées
Capacité à survivre	mortelles	immortelles	immortelles
phénotype	HGPRT <sup>+</sup>	HGPRT <sup>+</sup>	HGPRT <sup>-</sup>
Capacité de recyclage des nucléotides synthèse des nt <i>de novo</i>	+ -	+ -	- -
Résultats	Sélectionnés mais éliminés par apoptose	SELECTIONNEES	NON SELECTIONNEES

Donc le milieu HAT permet de sélectionner exclusivement les cellules hybrides issues de la fusion entre un LB HGPRT<sup>+</sup> et une cellule de myélome (HGPRT<sup>-</sup>, mais immortelle).

Reste à vérifier que les modifications génétiques engendrées par la fusion maintiennent aussi la capacité à synthétiser des Ac d'intérêt

#### 5 Criblage et dilutions limites

La suspension est cultivée en plaque 24 puits et le surnageant de culture des puits montrant une culture sont testés pour la production d'anticorps spécifiques ici anti CD69 en FACS

Principe général du FACS (fluorescence activating cell sorter)

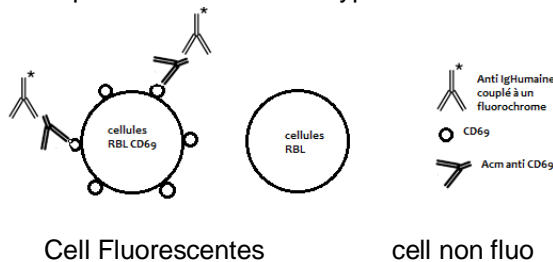
Méthode permettant de tester une à une des cellules d'une suspension pour différents paramètres : taille, forme, présence d'un marqueur protéique...ici CD69 reconnu par l'Acm spécifique si présent dans le surnageant de culture d'hybridome

Suspension cellulaire diluée et cellules alignées par vibreur et passent une à une devant un faisceau laser qui teste leur fluo

Rôle des étapes du Test en FACS, en schémas

1. Incubation suspensions cellulaires RBL transfectées ou non + surnageant de culture d'hybridomes
2. Lavages
3. Incubation avec un anticorps anti-isotypique anti- $\mu$  (anti chaîne lourde humaine ou anti IgM, ici humaine couplé à un fluorochrome et lavages

Exemple obtenu avec les 2 types cellulaires et un surnageant contenant des Acm antiCD69



4. Différents résultats possibles			
test	Puits 1	Puits 2	Puits 3
RBL	-	+	-
RBL – CD69	-	+	+
Analyse	Pas de production d'Ac	Prod d'Ac anti antigène cellulaires	Prod d'Ac anti CD69

5. Sélection des surnageants + pour RBL CD69 et négatif pour RBL, en effet les surnageants positifs pour les 2 produisent des Ac dirigés contre les protéines cellulaires et non contre la protéine CD69.

**Dilution limite** : Chaque puits positif est redilué et retesté par la méthode précédente, et ce 3 fois de suite → dilution limite de façon à être certains que chaque puits ne contient qu'un type de cellule → un clone

**Donc** un hybridome correspond à un clone de cellules identiques ne produisant qu'un seul type d'Ac, qu'il reste à caractériser.

#### Contrôle et caractérisation des Ac

Contrôle par ELISA, pour vérifier qu'ils produisent encore des Ac spécifiques

Caractérisation des Acm par recherche de l'épitope reconnu et détermination du  $K_D$

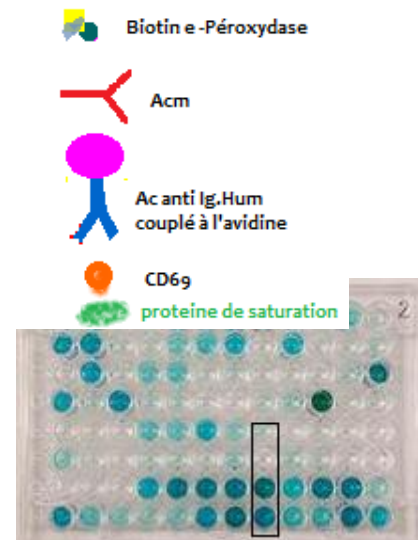
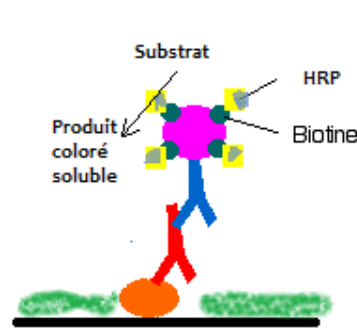
#### 5 Vérification de la spécificité par ELISA

Après dilution limite, chaque surnageant de culture pure est testé pour vérifier la spécificité des anticorps produits, par ELISA.

Etapas expliquées

- Adhésion de l'Ag purifié (CD69) au fond des cupules (2  $\mu$ g of rCD69/puits)
- Saturation par protéines du sérum (SAB), (solution PBS+ FCS)
- Lavages
- Incubation avec le surnageant d'hybridome
- Lavages, élimination du non lié
- Incubation avec un anticorps anti-Hu-IgM biotinylé
- Lavages, élimination réactif en excès

- Incubation avec le conjugué : streptavidin-HRP
- Lavages : élimination réactifs en excès
- Addition du substrat chromogène ortho-phénylène-diamine → produit coloré soluble, et arrêt de la réaction par acide sulfurique 4M.
- Mesure de l'absorbance à 450 nm.



#### Exp d'Aspect de résultats

→ Dans le cadre : 2x2 témoins : 2 cupules + et 2 cupules - (pas d'anticorps spécifiques de l'Ag introduits dans la cupule)

Donc témoin Conforme

→ Test de clones : Cupule incolore : pas de production d'Ac par l'hybridome

→ Test de clones : Cupule colorée : production d'Ac spécifique

**Donc :** obtention de clones produisant les Ac souhaités dirigés contre CD69.

#### Epitope mapping

6

Cette détermination permet de connaître précisément la séquence de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal. Les épitopes peuvent être soit linéaires soit conformationnels. La méthode permet de déterminer la nature des épitopes linéaires, c'est-à-dire codés par la structure primaire.

#### Méthode :

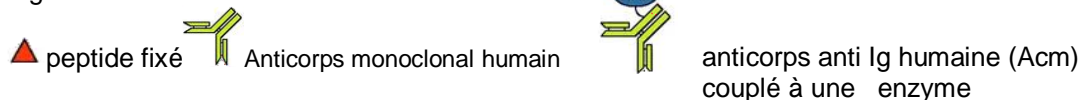
- Délimitation du domaine de liaison de l'anticorps sur la protéine en testant leur liaison à des fragments de la protéine totale.

- Synthèse de 3 séries de peptides chevauchants correspondant à la totalité de la structure primaire du domaine antigénique sélectionné. Taille des peptides environ 15 acides aminés (aa), la taille d'un épitope protéique est d'environ 10 aa.

- Fixation de peptides sur une membrane de nitrocellulose et la révélation de type dot blot est réalisée selon le schéma ci-contre.



Légende :



- Schéma montrant la révélation. La mise en évidence de la liaison peptide Acm est permise par l'addition d'un substrat chimioluminescent de la peroxydase de raifort (HRP, horseradish peroxidase), → émission de lumière → impression d'un film photographique.
- Résultats : spots noirs : peptide lié à l'Ac monoclonal

Résultats : peptides 4, 12 et 8 reconnus par l'anticorps monoclonal testé.

Donc séquence reconnue par l'Ac aa entre **67-75 : aqkkiiek**

Les aa entre 67 et 70 sont importants du fait de la faible intensité de la tache pour le peptide 4 par rapport aux peptides 9 et 10.

6

#### Mesure du KD, par détermination de Scatchard

Définition :  $1/K_D = K_a = \frac{[H.Ac]}{[H][Ac]}$  Avec [H.Ac] concentration en paratopes liés ou en ligand (haptène) lié (B), [H] concentration en haptène libre (F) [Ac] concentration en paratopes libres

#### Méthode de mesure

- Choix d'une méthode permettant de séparer et doser indépendamment la fraction libre de la fraction liée à l'Ac

Expériences de dialyse à l'équilibre avec quantité fixée d'Ac et quantité variables d'Ag, Réaction antigène/ anticorps, et dialyse pour que l'Ag diffuse dans le liquide interne et externe au boudin de dialyse (équilibre)

Donc dosage de la quantité d'Ag à l'extérieur. du boudin = fraction libre

Dosage de la quantité d'Ag à l'intérieur du boudin correspondant à la fraction libre + fraction liée à l'Ac

#### Exploitation des données

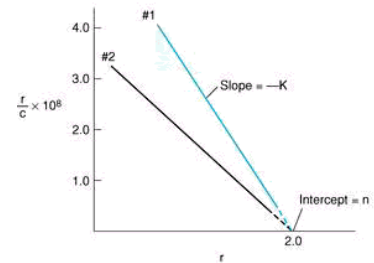
- Tracer alors Fraction lié/libre en fonction lié → graphe de Scatchard
- Pente = -KD et l'abscisse à l'origine = n le nombre de sites de fixation

Avec un peptide on mesure l'affinité intrinsèque ;

Avec l'Ag entier polyvalent on mesure l'affinité fonctionnelle (plusieurs paratopes liés au même antigène)



Rq Autres méthodes : résonance plasmonique de surface.



L'obtention d'Acm humains injectables nécessite encore 2 étapes majeures une étape de production et une étape de purification pour obtenir un produit conforme à la pharmacopée.

Les Acm humains étant produits par des cellules de mammifères, la production implique une mise en culture des cellules pour récupérer les surnageants de culture contenant les anticorps monoclonaux.

La production de liquide d'ascite n'est pas possible pour la production de protéines médicament.

### **Production industrielle à grande échelle.**

#### ***Choix d'une production en cellules CHO***

2 stratégies pour la production :

- 7
- choix simple : rester en hybridome issu de cellules NS0, mais problème de glycosylation des protéines sécrétées par un acide sialique immunogène pour l'homme, l'acide N-glycolylneuraminique. Or les Ac sont des glycoprotéines sécrétées et la stratégie d'humanisation des Acm basé sur un souhait de diminution d'immunogénicité des Ac thérapeutiques, donc autre choix ;
  - choix d'utiliser une production par une lignée cellulaire très bien connue et utilisées pour 70% des productions de protéines à usage thérapeutique, la lignée CHO (cellules d'ovaire de hamster chinois).

Avantages du choix de la lignée CHO :

- 8A
- Lignée très documentée
  - Glycosylation bien connue, et influence sur la stabilité des protéines injectées bien étudiée
  - Lignée optimisée pour la production de protéines thérapeutiques,
  - Lignée immortelle, capacité de multiplication infinie
  - Adaptée à la culture en suspension → facilité de culture en réacteur, en fermenteur
  - Adaptée à la culture sans sérum, indispensable pour l'AMM de protéines thérapeutiques : pas de composés d'origine animale dans le process de production
  - Productivité très élevée 20pg/jour et par cellule
  - Densité très élevée  $20 \cdot 10^6$  cellules /mL de milieu de culture, en fed batch.

Les cellules CHO, pour produire l'Acm humain, sont génétiquement modifiées et transfectées par les gènes codant la chaîne légère et la chaîne lourde issus de l'hybridome, les expériences suivantes montrent des résultats concernant des rCHO, CHO recombinées permettant la production d'Acm humains.

Données culturelles « classiques » de CHO : en suspension, à 37°C, sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Mais nécessité d'optimisation pour répondre aux exigences de la pharmacopée.

### 8 ***Optimisation du milieu de culture***

#### **Milieu de culture des cellules de mammifères et adaptation réglementaire à la production de protéines thérapeutiques, vers un milieu de culture sans sérum**

8A Analyse de la composition du milieu de culture IDMM utilisé comme milieu de base

- Sels minéraux : microéléments ( Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), oligo-éléments (sélénium)  
Système tampon : phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Carbonate (NaHCO<sub>3</sub>), Hépes
- Métabolites préformés :
  - Les 20 aa (source d'azote) → tous les aa entrant dans la composition des protéines, pas de facteur limitant la production de protéines
  - Vitamines : cofacteurs de nombreuses réactions enzymatiques
  - Source de carbone et d'énergie: glucose, pyruvate, glutamine
  - Précurseur de nucléotide : glutamine permet la synthèse *de novo* des nucléotides
- Indicateur pH : rouge de phénol

8A Importance du SVF : Ajout obligatoire pour permettre la division cellulaire : SVF sérum de veau fœtal, apportant des éléments nutritifs, mais aussi des facteurs de croissance (favorisant la mitose), des facteurs d'adhésion et l'albumine, protéine impliquée dans le transport de molécules liposolubles  
Or, la réglementation implique que les protéines thérapeutiques soient obtenues à partir de sources non issues d'un animal accentué après les contaminations humaines liées à la crise sanitaire de la vache folle. Or le sérum de veau fœtal ne peut présenter les garanties de sécurité exigées vis-à-vis de la non contamination par les protéines prion pathogènes ( prpSc)



→ Optimisation du milieu pour obtenir une multiplication cellulaire en l'absence de sérum.

8B

### **Exemple d'optimisation du milieu de culture sans sérum**

Les différents tests ont été réalisés en ajoutant des composés chimiques ou d'origine exclusivement végétale dans le milieu de culture et la capacité de prolifération des cellules CHO dans le milieu a été évaluée. Le but est ici de remplacer le SVF par l'addition de composants chimiques ou d'hydrolysats végétaux.

- Témoin de comparaison positif = témoin de prolifération : en milieu IDMM+ SVF, le milieu habituel permettant la croissance des cellules CHO. (exp.B)

- Essais de remplacement du sérum (d'origine animale)

ExpA : Pas de prolifération des CHO dans le milieu IMDM sans SVF avec uniquement addition de sels minéraux + pluronic (agent anti-mousse)

Exp C : faible prolifération des CHO en présence d'IGF (insulin like growth factor, facteur de croissance) et des précurseurs de lipides membranaires (Ethanolamine et Phosphatidylcholine) et de sels minéraux (Fer)

Exp D, E, F → amélioration de la croissance des CHO avec le milieu C par addition de lysat de levures (condition F), de soja (D) et de blé (E).

- + extrait de blé → inhibition du milieu C, pas de prolifération
- Les 2 autres (extrait de soja et extrait de levures) favorisent la division cellulaire,
- et la condition F (extrait de levure) montre des qualités équivalentes aux conditions Témoin en présence de sérum

Donc le milieu optimisé pour les cellules CHO est le milieu F : permet la croissance la division cellulaire des CHO en culture

### **Optimisation des conditions de culture**

8C

### **Importance de l'adaptation au milieu de culture optimisé**

Différents tests ont été réalisés pour vérifier que les cellules CHO productrices d'Ac (rCHO), sont capables de se diviser dans le milieu optimisé et de produire les Ac souhaités.

#### **Plan de l'expérience réalisé**

Différents paramètres liés à la croissance sont suivis :

- la biomasse, par exemple par numération à la cellule de Malassez (●)
- la viabilité, par un test au bleu de trypan qui permet de distinguer au microscope les cellules viables des cellules mortes (membrane perméable au BT), ou test MTT (■)
- la consommation de glucose, par kit enzymatique (ex GOD) (◆) et production d'acide lactique, issu de la fermentation du glucose par les cellules en culture (▲), par kit LDH
- le dosage des Ac spécifiques, par exp par la méthode ELISA, décrite plus haut (○)

Les courbes de croissance en milieu non renouvelé avec suivi des paramètres sont réalisées, dans le milieu non optimisé et sans sérum, puis dans le milieu optimisé après une phase d'adaptation de 300 h ou 3600 h de la lignée rCHO. La lignée a donc été pré-cultivée 300 h ou 3600 h dans le milieu optimisé, puis pour la manipulation présentée inoculée à raison de 200 000 cellules/mL dans le même milieu pour tester les paramètres de croissance et de production.

8C

#### **Présentation des résultats**

**Milieu A (milieu non optimisé sans sérum)**(courbes a) :

- Viabilité baisse de façon régulière → absence de cellules viables après 200 h de culture
- Biomasse : augmentation très légère du nombre de cellules pendant 75 h 100 h puis diminution lente de la biomasse → 175 h
- Consommation du glucose complète à 150 h
- Production d'anticorps: après 50-75 h de culture et avec max de 200 mg/L après 250 h de culture

**Milieu optimisé, et 300h adaptation dans le milieu optimisé** (courbes b)

- Viabilité à 100% pendant 100 h, puis baisse rapide → absence de cellules viables après 175 h de culture
- Biomasse : croissance pendant 100 h puis diminution très rapide de la biomasse entre 150 à ~175 h
- Consommation du glucose régulière jusqu'à épuisement vers 175 h
- Production d'anticorps: après 100 h de culture et avec max de 125 mg/L à 200 h de culture

**Milieu optimisé, et 3600h adaptation dans le milieu optimisé** (courbes c)

- Viabilité baissant lentement et régulièrement : encore 70% de viab après 200 h → cellules maintenues en vie plus longtemps
- Biomasse : croissance pendant 75 h puis diminution lente environ diminution de la moitié de la biomasse en 200 h
- Consommation du glucose régulière jusqu'à épuisement vers 275 h
- Production d'anticorps : après 100 h de culture (140 mg/L à 200 h) et avec max de 400 mg/L à 375 h de culture, quand toutes les cellules sont mortes.

## 8C Interprétation et choix de la condition optimale de culture

### Milieu A (milieu non optimisé sans sérum) (courbes a) :

- Aucun facteur de croissance donc les cellules ne vont survivre que tant que du glucose sera présent, donc viabilité baisse régulièrement

Augmentation initiale de biomasse due à la fin des cycles cellulaires des cellules ensemencées

- Production d'anticorps: quand les cellules meurent et max quand elles sont toutes lysées !!!

### Milieu optimisé, et 300 h adaptation dans le milieu optimisé (courbes b)

- 100% Viabilité/ croissance rapide pendant 100h, due à la présence d'IGF, mais quantité d'IGF très faible par rapport au SVF + épuisement du glucose → mortalité cellulaire
- Production d'anticorps: quand les cellules meurent mais très faible par rapport au milieu non optimisé,

→ ces conditions permettent d'obtenir de la biomasse mais peu de production d'Ac.

### Milieu optimisé, et 3600h adaptation dans le milieu optimisé (courbes c)

Condition permettant de dissocier la croissance ou obtention de biomasse et la production d'Ac

- de 0-100 h : croissance, division cellulaire et consommation du glucose
- de 100-175 h : début de phase de déclin avec mortalité cellulaire et Production d'anticorps
- de 175-250 h : forte production d'Ac, ↓ viabilité, ↓ glucose jusqu'à zéro
- après 250-300 h : mortalité cellulaire très élevée, donc les Ac intra cellulaires sont relargués, avec les autres protéines cellulaires

Donc Les Ac sont produits après la phase de croissance et pendant la phase de déclin, ils se comportent comme des métabolites secondaires

Donc l'adaptation des cellules productrices pendant 3600 h dans le milieu optimisé permet d'affiner les conditions de culture permettant la production optimale :

- arrêt et récupération du surnageant de culture après 250-300 h ce qui correspond à une production d'Ac d'environ 300 mg/L, avant la contamination par les protéines cellulaires

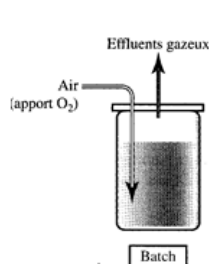
### **Culture en fermenteur et changement d'échelle**

9

Production industrielle d'Ac monoclonaux → Utilisation de fermenteurs.

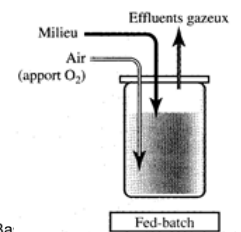
Régulation fine des conditions de culture, rendements de production élevés

#### **Présentation des 2 modes de culture batch et fed batch**



**Batch** : inoculum ajouté à t=0, en dehors de l'homogénéisation rien n'est modifié, ni enlevé, ni ajouté. le procédé batch dans lequel un même volume de milieu sert à la croissance (augmentation de la population cellulaire), à la production et à l'accumulation du produit recherché.

**Fed Batch** : procédé similaire mais certains composants du milieu ou des précurseurs du produit sont ajoutés de façon contrôlée ;



#### **Dans le doc 9** Fermenteur de 5 litres

Solution nutritive: glucose 200 mM (source de C et d'énergie) and glutamine 90 mM, cocktail d'acides amines fortement consommés (lysine, thréonine, valine, leucine, isoleucine, phénylalanine and méthionine) pour faciliter la synthèse protéique des Acm.

9

Aération à la demande: injection d'O<sub>2</sub> pour obtenir une saturation à 60% de l'air dans le fermenteur.

Agitation 40 rev./min, Température 37 °C. pH maintenu à 7.2 par addition of CO<sub>2</sub>.

**Bilan.** En fed-batch le milieu est amendé à la demande en solution nutritive concentrée, permettant de maintenir les cellules en vie avec quantité optimale d'Ac monoclonaux (métabolites secondaires), en effet on a vu que la disparition du glucose dans le milieu est synchrone avec une viabilité à 0% et une production optimale d'Ac monoclonaux (doc 8C)

#### **Comparaison de la production d'Acm en batch et Fed-batch**

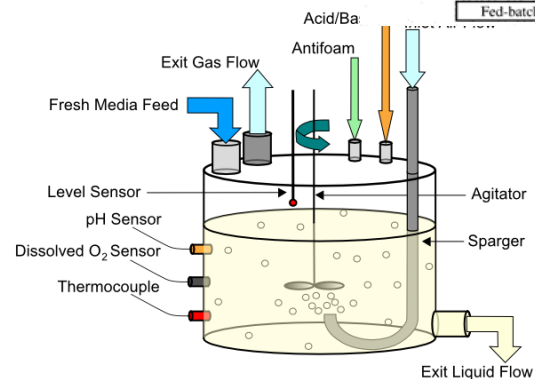
En batch : la culture cellulaire (courbe en trait plein) est arrêtée après 8j du fait de l'épuisement du milieu. Production d'Ac à partir du jour 5 et constante (histogramme noir), → arrêt de synthèse d'Ac, du fait probable de l'épuisement des aa présents dans le milieu.

En fed-batch :

Biomasse 2x plus élevée qu'en batch et plateau maintenu pendant 12 jours (courbe en trait pointillé)

Production d'Ac (histogramme gris), jusqu'à 2 mg par L, donc 4 à 5 fois plus élevée que pour la culture en batch pendant 12 jours.

Donc meilleur rendement du à la biomasse plus élevée et au maintien en vie plus longtemps, car les cellules



produisent l'Ac pendant la phase de déclin de la courbe de croissance.

### Bilan ( synthèse de toute l'optimisation) + transition

Le fed-batch permet d'obtenir de bien meilleurs rendements de production d'Ac que le batch.

Donc association des différents aspects de l'optimisation industrielle :

- Composition du milieu de culture
- Adaptation 3600 h des cellules productrices dans le milieu avant la campagne de production
- Culture en fed batch
- Obtention de surnageant de culture très concentré en Ac d'intérêt

La culture est optimisée pour obtenir le meilleur rendement de production d'Ac. Mais ce surnageant contient en plus des Ac monoclonaux d'intérêt :

- des débris cellulaires, en particulier des protéines des cellules mortes (car Ac produits en phase de déclin) Host Cell Protein
- des contaminants issus du milieu de culture.

### Purification des Acm humain

Pour une utilisation thérapeutique, les anticorps monoclonaux ont besoin d'être purifiés. Le surnageant de culture = mélange complexe d'Acm/ composants cellulaires/ protéines cellulaires voire même virus.

Différentes étapes de purification sont nécessaires pour purifier les anticorps monoclonaux.

\* Utilisation de différentes techniques biochimiques de séparation moléculaire, le plus souvent la chromatographie d'affinité ;

\* obtention d'une solution pure d'Acm, l'Acm est la seule protéine en solution

Préparation d'Acm est concentrée et conditionnée.

#### Process général

Chronologie des étapes

Culture → centrifugation → Chromatographie 1 → Inactivation → chromatographie 2 → filtration →  
d'affinité d'éch d'ions

Ultrafiltration de rCHO

10  
A

### Obtention du surnageant de culture par centrifugation/filtration

But : séparer la fraction soluble contenant les Acm et la fraction insoluble ( les cellules...)

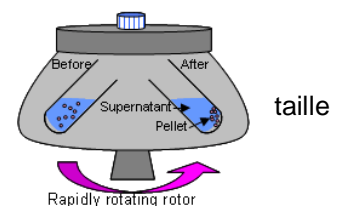
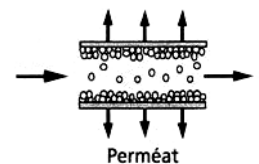
#### Filtration

**Filtration** : méthode de séparation de mélanges liquide-particules solides par passage au travers d'une barrière poreuse. La force requise est créée par surpression ou par le vide.

Deux méthodes : filtration conventionnelle (classique) ou filtration tangentielle

La filtration ou microfiltration tangentielle : faire circuler le liquide à filtrer parallèlement à une membrane poreuse. Sous l'action d'un gradient de pression, le liquide passe au travers de la membrane et se clarifie. Le flux tangential crée des turbulences, des contraintes de cisaillement qui limitent l'accumulation de particules à la surface de la membrane, et retarde son colmatage.

La filtration classique sur membrane par passage à travers un filtre poreux  
Pores du filtre de diamètre inférieur au diamètre des cellules et supérieur à la des protéines.



#### Centrifugation

Séparation des composants d'un mélange selon leur densité

Schéma simple, montrant séparation culot cellulaire et SN →

**Donc** : Obtention d'une solution contenant uniquement des molécules solubles donc les Acm.

Etape de clarification permet la séparation des cellules et des débris cellulaires par rapport aux molécules dissoutes dans le surnageant (Ac solubles)

10  
A  
10  
B

### 1<sup>ère</sup> chromatographie : chromatographie d'affinité

Etape très sélective reposant sur la reconnaissance stéréospécifique de la molécule à purifier

Choix de la phase stationnaire : support macromoléculaire hydrophile et poreux (séphadex, agarose; séphacryl... ) sur lequel est greffé (liaison covalent) le ligand spécifique

- Soit le Ligand = Ag correspondant à l'Acm
- Soit ligand = protéine A (ici), protéine de *Staph. aureus* liant de façon spécifique le Fc des Ig

Rq : Intérêt de du choix protA : support chromatographique utilisable pour toutes les purifs d'Acm de spécificité différentes

Importance du milieu de culture sans sérum, sinon on purifie aussi les Ac du sérum

## Étapes :

**Charge de la colonne :** adsorption de la molécule à séparer sur le ligand fixé à la résine est effectuée dans des conditions physico-chimiques (pH, force ionique, concentration de la molécule à adsorber...) favorables à la liaison molécule - ligand.

## Lavages

Élimination des molécules du mélange à séparer qui ont peu ou pas d'affinité pour la phase stationnaire

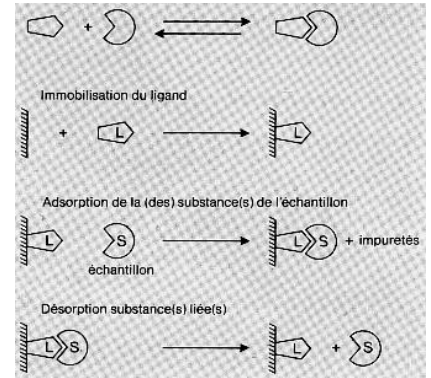
Donc sont éluées en 1<sup>er</sup> = fraction non retenue (FT= flow through)

## Elution de la fraction retenue

Par changement de phase mobile, en jouant sur

- Le pH → changement de l'état d'ionisation des protéines liées → désorption → élution
- la force ionique → changement de la conformation des protéines liées ou modifs des liaisons faibles en jeu en particulier ioniques
- l'ajout d'un compétiteur (ici protéine A libre).

En d'autres termes, on déplace l'équilibre de liaison molécule - [ligand greffé] en faveur de l'équilibre molécule - [tierce molécule].



10  
A

## Inactivation des virus

Par exposition à un pH acide, très efficace pour les virus enveloppés → virus inactivés donc non infectieux

## Chromatographie de finition par échanges d'ions

**Choix de la phase stationnaire :** support macromoléculaire hydrophile inerte et poreux (séphadex, agarose; séphacryl... ) sur lequel sont greffés (liaison covalente) des groupements ionisés ou isonisables

10  
B

Ici « Captopadhère », groupement greffé chargé positivement donc échangeur d'anion.

## Principe général de l'échange d'anion par les

### étapes :

**Etat initial :** support équilibré en tampon de charge 0,025 M TRIS sodium chloride à pH 7,5, contre ion mobile initial = Cl<sup>-</sup>

**Charge de la colonne en boucle :** échange de Cl<sup>-</sup>, contre protéines chargées moins → Protéines neutres et chargées +, non retenues

## Lavages

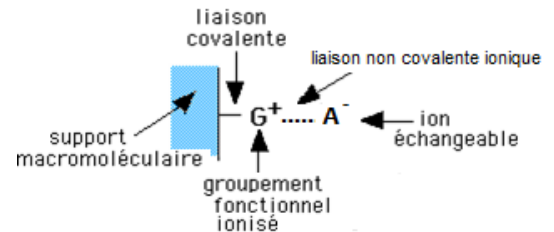
Élimination des molécules non retenues

Donc sont éluées en 1<sup>er</sup> = fraction non retenue (FT= flow through)

**Elution de la fraction retenue, par modification du pH.** Eluant à pH=3

Groupement greffé reste +, car ammonium quaternaire

Changement de la charge des protéines retenues (deviennent +) → Elution

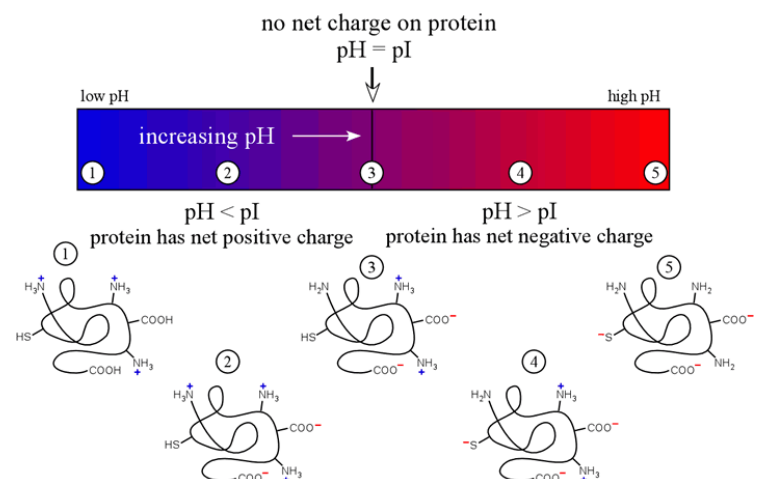


## Charge des protéines selon le pH du tampon de charge et du tampon d'élution.

Dépend du point isoélectrique (pI),

Charge nette des protéines représentée →

Lié à l'état d'ionisation des groupements ionisables des chaînes latérales des aa.



2 Méthodes d'élution :

- En modifiant le pH pour inverser la charge des protéines liées → perte des liaisons électrostatiques faibles molécules sont éluées.
- En apportant un contre-ion plus fort (plus concentré) donc par gradient de sels

10  
A

## Étape de filtration et d'ultrafiltration

**Filtration :** élimination des particules présentes dans la solution purifiée d'Acm, par exp des agrégats de protéines dénaturées par l'élution... → restent les protéines solubles qui ont passé le filtre

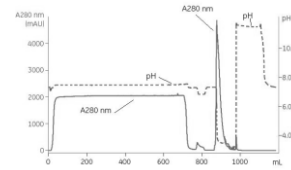
**Ultrafiltration** (filtre de porosité très petite, les Acm ne passent pas) → concentration de la solution d'Acm Près pour la formulation

## Analyse des résultats du process de purification

10  
B

### Chromatographie d'affinité « Mab select sure ».

Profil d'élution,  $A_{280\text{ nm}}$  en sortie de colonne en fonction du volume d'élution. Abs à 280 nm, correspondant au max d'abs des aa aromatiques ( trp, tyr et en moindre mesure Phe)



#### Conduite de chromatographie

Phase mobile 1 : Tampon de charge = tampon phosphate pH7.4, isotonique ( 0,15 M NaCl)

Phase mobile 2 : Tampon d'élution = tampon citrate de sodium pH 3.4

#### Analyse des résultats ( $V_e$ = volume d'élution)

##### - Phase mobile 1 : tp de charge

- $V_e$  de 0-20 mL,  $A_{280\text{ nm}} = 0$ , pas de protéine éluée, et phase mobile n'absorbe pas
- $V_e$  de 20-env 700 mL,  $A_{280} = \text{cte} = 2$ , sortie de colonne des protéines non retenues, c'est-à-dire pas les Ac
- $V_e$  de 700-850 mL, stabilisation de  $A_{280\text{ nm}}$  à 0, plus d'élution de protéines

##### - Phase mobile 2 : tp d'élution

- $V_e$  de 850-1000 mL, pic d'abs jusqu'à  $A_{280\text{ nm}} = 4.5 \rightarrow$  élution des protéines retenues = Acm
- Neutralisation du support chromatographique
- $V_e$  au delà de 1000 mL, permet de régénérer le support, pas d'autres protéines relarguées

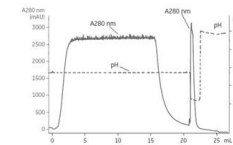
**Donc** récupération des fractions contenant les Acm, correspondant au  $V_e$  compris entre 850 et 1000 mL

10  
B

### Chromatographie de polishing , échange d'anions

Profil d'élution,  $A_{280\text{ nm}}$  en sortie de colonne en fonction du volume

Abs à 280nm, correspondant au max d'abs des aa aromatiques ( trp, tyr moindre mesure Phe)



d'élution.  
et en

#### Conduite de chromatographie

Phase mobile 1: Tampon de charge = pH7.5

Phase mobile 2: Tampon d'élution = pH3

#### Analyse des résultats ( $V_e$ = volume d'élution)

##### - Phase mobile 1 : tp de charge (pH 7.5)

- $V_e$  de 0-1 mL,  $A_{280\text{ nm}} = 0$ , pas de protéine éluée, et phase mobile n'absorbe pas
- $V_e$  de 2-env 17 mL,  $A_{280} = \text{cte} = 2.5$ , sortie de colonne des protéines non retenues ,

Pic large= contient plus de protéines correspond au Acm

Donc Acm, chargés négativement ou neutre à pH7.5, donc  $pI(\text{Acm}) >$  ou égal à 7.5

- $V_e$  de 17-21 mL, stabilisation de  $A_{280\text{ nm}}$  à 0, plus d'élution de protéines

##### - Phase mobile 2 : tp d'élution

- $V_e$  de 21-23 mL, pic d'abs jusqu'à  $A_{280\text{ nm}} = 3 \rightarrow$  élution des protéines retenues

Protéines contaminantes, chargées – à pH7.5, donc de  $pI < 7.5$  et deviennent chargées +, quand  $pH = 3$ .

##### - Neutralisation du support chromatographique

- $V_e$  au delà de 23 mL, permet de régénérer le support, pas d'autres protéines relarguées

**Donc** récupération des fractions contenant les Acm, correspondant au  $V_e$  compris entre 2 et 16 mL

10  
C

### Contrôle de qualité des Acm préparés

#### Par dosage des protéines totales et des Acm d'intérêt

Méthode de dosage des protéines totales : bradford... Dosage spécifique des Ac, par ELISA toujours

Dosage de la protéine A, comme protéine pouvant être relarguées lors de l'élution de la chromatographie d'affinité

Le surnageant de culture contient en plus de l'Acm, les protéines cellulaires libérées lors de la phase de déclin avec lyse cellulaire. Donc l'enjeu majeur de la purification est de séparer l'Acm d'intérêt des protéines des CHO. Le **Doc 10C**, montre

- peu de perte d'Ac lors des étapes de purification : 10% au total des Acm présents dans le Surnageant
- Très forte élimination des protéines de l'hôte, reste 0.02% des protéines initiales (20 ng/mL)
- Très faible contamination par la protéine A, lors de l'étape de chromatographie d'affinité.

10  
C

#### Vérification de pureté par chromatographie d'exclusion – diffusion

Principe : Chromatographie d'exclusion ou chromatographie par filtration sur gel

$\rightarrow$  la séparation des molécules à travers un gel poreux en fonction de leur MM ou de la taille des molécules.

Phase stationnaire : billes (type "Sephadex™" ou "Sephacrose™") présentant des pores de diamètre calibré

- molécules de diamètre supérieur à celui des billes sont exclues et éluées en 1<sup>er</sup>



- molécules de diamètre inférieur à celui des billes y pénètrent et y subissent des frottements qui les retardent, diffusent à l'intérieur des billes

La phase mobile entraîne les molécules du mélange.

Donc **séparation des molécules selon leur MM**

## **2 Profils :**

préparation d'Ac (---) pure, 1 seul pic ( $V_e = 15 \text{ mL}$ ) = Acm

autre fraction : Acm + protéines contaminantes de MM inférieure aux Ac,

des agrégats.= protéines dénaturées

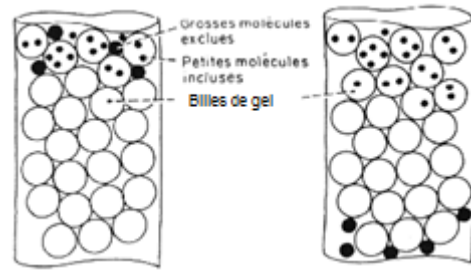
Le pic ( $V_e = 22.5 \text{ mL}$ ) correspond probablement à la protéine A.

Donc pas de contaminants visibles, sur preparation d'Ac

Cette étape permet de contrôler l'étape de chromatographie d'échanges d'ions.

## Bilan

Vérifier la pureté ET Permet de calculer les rendements de purification et le facteur d'enrichissement



## **CONCLUSION :** Différents points

1. complexité des étapes de la productions d'Ac humain à usage thérapeutique
  - obtention de souris transgénique humanisée
  - obtention et caractérisation des hybridomes
  - transfert en cellule CHO
  - production
  - purification

On voit que cette production demande beaucoup de temps et nécessite des contrôles qualité à chacune de ces étapes pour obtenir des AC monoclonaux pouvant être utilisés notamment en thérapeutique.

2. Technologie certes complexe mais permettant de résoudre de le pb d'utilisation des Acm en thérapeutique répétitive, obtention d'Ac humain considéré comme du soi, Amélioré encore en produisant une souris transgénique par patient donc compensation la variabilité inter individus.

3. Ouverture

Acm permettent le ciblage spécifique d'une cellule cancéreuse, d'une molécule défectueuse ....

Mode d'action :

- soit effet agoniste ou antagoniste, comme ligand ;
- soit action via les propriétés naturelles des Ac ( complexe d'attaque membranaire et complément, ou ADCC (pour antibody-dependant cell cytotoxicity), utilisation du récepteur de Fc des cellules killer ;
- possibilité de couplage de Acm humain avec des molécules effectrices : des radioisotopes, des toxines ou des molécules chimiques tels que des cytokines .

Ouverture sur une médecine de plus en plus personnalisée (mais très coûteuse)

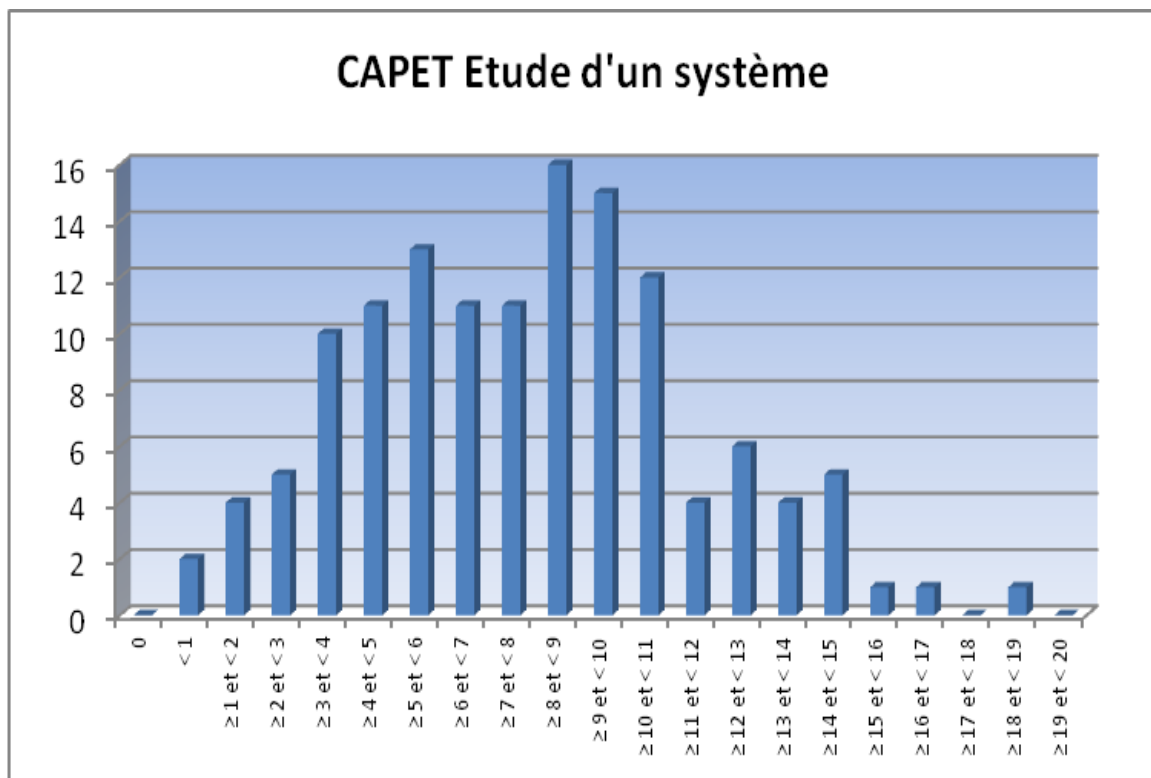
# Rapport du jury de l'épreuve d'admissibilité « étude d'un système, d'un procédé ou d'une organisation »

*Rapport établi par* : Mr Raphaël BOUQUET, Mme Muriel CHAVANEL, Sophie BOYS, Mme Nathalie COLOMB, Mme Anne COMBES, Mr Joël DENDALETCHÉ, Mme Sandrine DOUCET, Mme Catherine ETANCELIN, Mme Sigolène FOURCY-GIRAUD, Mme Bénédicte GERON-LANDRE, Mme Emmanuelle GRIMAL, Mr Franck MEUNIER, Mme Cécile VANLEEFDAEL, Mr Olivier MORIN, Mme Marie WURTEISEN

Résultats :

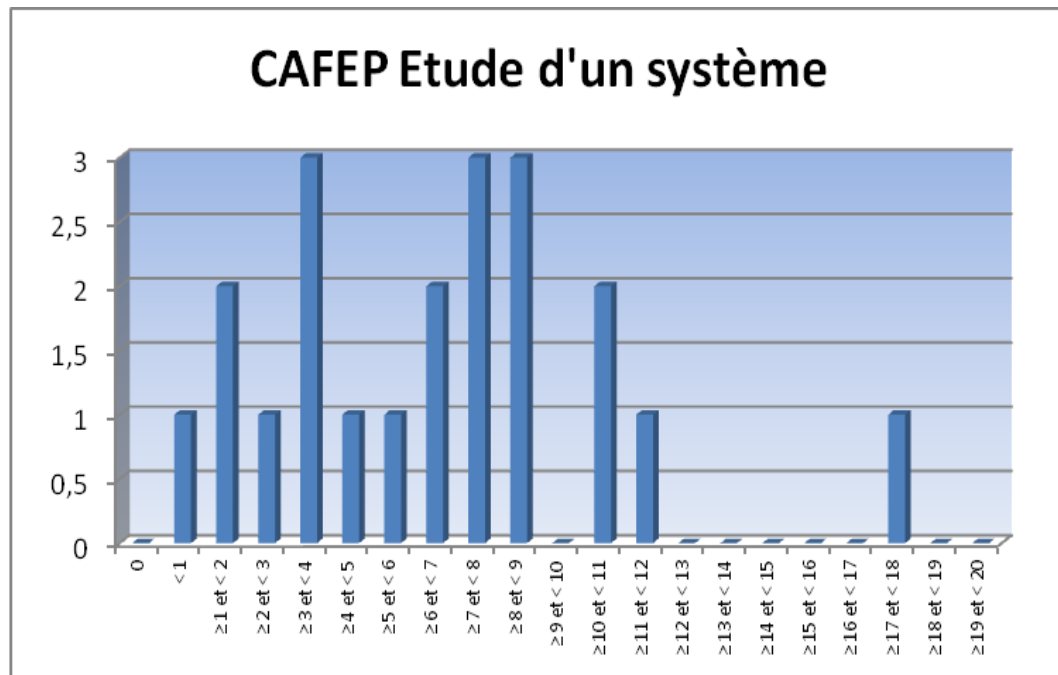
## CAPET

< 1	2	≥ 10 et < 11	16
≥ 1 et < 2	4	≥ 11 et < 12	4
≥ 2 et < 3	5	≥ 12 et < 13	6
≥ 3 et < 4	10	≥ 13 et < 14	4
≥ 4 et < 5	11	≥ 14 et < 15	5
≥ 5 et < 6	13	≥ 15 et < 16	1
≥ 6 et < 7	11	≥ 16 et < 17	1
≥ 7 et < 8	11	≥ 17 et < 18	0
≥ 8 et < 9	16	≥ 18 et < 19	1
≥ 9 et < 10	15	≥ 19 et < 20	0



## CAFEP

< 1	0	≥ 10 et < 11	0
≥ 1 et < 2	1	≥ 11 et < 12	2
≥ 2 et < 3	2	≥ 12 et < 13	1
≥ 3 et < 4	1	≥ 13 et < 14	0
≥ 4 et < 5	3	≥ 14 et < 15	0
≥ 5 et < 6	1	≥ 15 et < 16	0
≥ 6 et < 7	1	≥ 16 et < 17	0
≥ 7 et < 8	2	≥ 17 et < 18	1
≥ 8 et < 9	3	≥ 18 et < 19	0
≥ 9 et < 10	3	≥ 19 et < 20	0



### Commentaires :

Cette épreuve doit permettre d'exposer et de répondre à la problématique du sujet par l'étude et l'analyse de l'ensemble des documents fournis.

Bien que basée sur une étude de documents, elle doit faire l'objet d'une rédaction impliquant une introduction, un développement avec un plan structuré apparent et une conclusion. Les différents points à traiter mentionnés dans le sujet, ne constituent pas nécessairement le plan à suivre mais un guide pour traiter la problématique.

Cette épreuve nécessite la mobilisation de connaissances technologiques adaptées au contexte du sujet.

L'exploitation doit faire apparaître les capacités d'analyse, c'est à dire le fil de la réflexion (observation, description, compréhension et interprétation) et de synthèse.

Le candidat doit savoir gérer son temps de façon à répondre au sujet dans son ensemble sans négliger aucune des parties.



## **Observations du jury :**

### **- Sur la forme :**

La qualité de l'expression écrite et de la présentation de la copie est en général satisfaisante. Cependant la rédaction d'un certain nombre de copies reste inacceptable sur le plan de l'orthographe et de la syntaxe pour de futurs enseignants.

Il est attendu plus de rigueur dans l'utilisation du vocabulaire scientifique.

Le jury regrette également l'absence trop fréquente de schémas apportant une vraie plus-value à la présentation. Il rappelle que la conception de schémas soignés et pertinents est nécessaire à ce niveau d'exigences.

Le numéro de chaque document doit être rappelé lors de son exploitation dans la copie.

### **- Sur le fond :**

Certains candidats n'ont pas ciblé correctement la problématique du sujet. En particulier, il ne s'agissait pas de traiter des utilisations des anticorps monoclonaux autres qu'en thérapeutique ou de développer les mécanismes de l'immunité dans l'organisme et la structure des immunoglobulines.

Certains candidats ne maîtrisent pas des notions essentielles comme la différence entre anticorps monoclonaux et anticorps polyclonaux ou les termes affinité, spécificité et efficacité d'un anticorps.

Trop de documents, en particulier techniques, sont peu, mal voire pas exploités, trop souvent uniquement paraphrasés sans appropriation personnelle.

Trop peu de candidats semblent maîtriser les principes technologiques de base comme la technique des hybridomes, l'ELISA, la cytométrie de flux, la distinction batch/fed-batch, les techniques de fractionnement et de purification...

## **Conseils aux candidats :**

Les données des documents doivent être enrichies par les connaissances scientifiques et technologiques du candidat, avec notamment la présentation illustrée du principe des techniques utilisées.

Tous les documents doivent être exploités :

- certains documents permettent d'illustrer l'utilisation de techniques avec des exemples concrets d'applications ;
- certains documents impliquent la présentation d'une technique et son principe dans le contexte du sujet ;
- d'autres documents présentent des résultats expérimentaux devant faire l'objet d'une analyse complète (Observation, interprétation et conclusion).

**Exemple** de l'exploitation d'un document technique avec résultats (document 6) : Caractérisation d'anticorps monoclonaux : identification de l'épitope reconnu par cartographie d'épitopes

Le jury attendait du candidat qu'il :

- Identifie le but de cette étude à savoir caractériser la séquence peptidique correspondant à l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal sélectionné

- Extrait le principe de la méthode de DOT BLOT appliqué au cas étudié et éventuellement illustré par un schéma légendé
- Mette en évidence les étapes techniques essentielles de cette méthode et les justifie
- Analyse les résultats expérimentaux c'est-à-dire qu'il les décrit, les interprète, et conclut sur la séquence de l'épitope.

**EPREUVES PRATIQUES ET  
EPREUVES ORALES D'ADMISSION**

**LECON PORTANT SUR LES PROGRAMMES DES LYCEES  
ET DES CLASSES POST-BACCALAUREAT**

**EPREUVE SUR DOSSIER**

**Les épreuves pratiques et orales se sont déroulées au Lycée Pierre-Gilles de Gennes  
(E.N.C.P.B) à PARIS**

# LECON PORTANT SUR LES PROGRAMMES DES LYCEES ET DES CLASSES POST-BACCALAUREAT

Exemple de sujet proposé lors de la session 2013 :

<b>Séquence</b>	<b>Diagnostic médical des infections bactériennes</b>
<b>Séance</b>	<b>Analyses de biologie médicale dans le cadre d'une infection urinaire</b>
<b>Niveau d'enseignement</b>	<b>Terminale STL Biotechnologies</b>
<b>Manipulations proposées</b>	<b>Matière d'œuvre</b>
<b>Identification d'une souche bactérienne</b> Réalisation de la coloration de Gram ( <b>Protocole 1</b> ) Réalisation des tests enzymatiques ( <b>Protocole 2</b> ) Lecture des milieux fournis et de la galerie API20E ( <b>Protocole 3</b> )	Une gélose CLEDensemencée avec une urine A et incubée 24h à 37°C en aérobiose notée « UA » Colorants de Gram, lames Réactifs pour la recherche de l'oxydase et de la catalase Gélose nutritive notée « UA »et galerie API20E notée « UA 24h 37°C»ensemencées avec la souche isolée sur la gélose CLED et incubées 24h à 37°C
Recherche d'une albuminurie ( <b>Protocole 4</b> )	Echantillon d'urine A Bandelettes de détection
Dosage des protéines urinaires par la méthode de Biuret ( <b>Protocole 5</b> )	Echantillon d'urine A « UA » Réactif de Gornall Solution étalon d'ovalbumine « Etalon » Solution de contrôle en ovalbumine « C »
<b>Ressources documentaires fournies</b>	
<b>Protocole 1 à 3</b> Identification d'une souche bactérienne <b>Protocole 4</b> Recherche d'une albuminurie <b>Protocole 5</b> Dosage des protéines urinaires par la méthode de Biuret <b>Annexe 1</b> Extrait du REMIC : L'examen cyto bactériologique des urines <b>Annexe 3</b> Conduite à tenir devant une protéinurie(Extrait) <b>Annexe 4</b> Fiche technique : le milieu CLED <b>Annexe 5</b> Fiche sécurité des réactifs <b>Annexe 6</b> Acceptabilité des résultats et expression des résultats <b>Annexes au poste de travail :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fiche technique de la galerie API 20E</li> <li>• Fiche technique de la bandelette Albustix® de Bayer™</li> <li>• Mode d'emploi du spectrophotomètre</li> </ul>	
<b>Protocoles et résultats expérimentaux (manipulations non réalisables)</b>	
<b>Annexe 2 : Dénombrement des germes urinaires, technique à l'anse calibrée</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protocole du dénombrement des germes urinaires</li> <li>• Résultat expérimental : boîte de gélose CLEDensemencée avec l'urine A et incubée 24h à 37°C en aérobiose, notée « UA ».</li> </ul> <b>Annexe 7 : Dénombrement des leucocytes urinaires</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protocole de la détermination de la leucocyturie en cellule de Malassez.</li> <li>• Résultat obtenu avec l'urine A.</li> </ul>	

## **Protocoles 1 à 3**

### ***Identification de la souche bactérienne urinaire isolée sur la gélose CLED***

#### **Objectif**

Identifier la souche isolée et dénombrée de l'urine A sur la gélose CLED.

#### **Produit, matériel et réactifs**

- gélose CLED ensemencée avec 10 µL d'urine A et incubée 24h à 37°C en aérobiose « UA »
- Matériel courant de bactériologie
- Tube d'eau physiologique stérile
- Alcool et colorants de Gram
- Bac à coloration
- Conteneurs DASRI
- Réactifs catalase, oxydase

#### **Protocole 1**

##### **Réalisation d'un frottis coloré par la méthode de Gram**

###### Préparation du frottis

Déposer une goutte d'une suspension bactérienne ou d'une culture en bouillon à la surface d'une lame propre et l'étaler sur une surface de 3cm<sup>2</sup>.

Laisser sécher

Fixer le frottis en le recouvrant d'alcool et laisser agir 3 minutes.

Rincer délicatement le frottis à l'eau.

###### Coloration du frottis

Recouvrir le frottis de violet de gentiane pendant 1 minute

Rincer délicatement le frottis à l'eau

Recouvrir d'une solution de Lugol pendant 1 minute

Rincer délicatement le frottis à l'eau

Décolorer à l'alcool (éthanol) durant une dizaine de secondes (cela dépendra de l'épaisseur du frottis)

Rincer délicatement à l'eau

Contre colorer à la fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute

Rincer le frottis à l'eau et le sécher délicatement.

#### **Protocole 2**

##### **Réalisation des tests enzymatiques**

###### Technique de recherche de la catalase

Déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame propre

A partir d'une culture sur milieu gélosé, prélever une colonie isolée et la déposer dans la goutte d'eau oxygénée

Rechercher l'apparition d'un dégagement gazeux (bulles). Un dégagement gazeux indique la présence d'une activité catalasique.

###### Technique de la recherche de l'oxydase

A partir d'une culture sur milieu gélosé, prélever une colonie isolée et la déposer sur un disque, imprégné de réactif pour la recherche de l'oxydase (chlorhydrate ou oxalate de diméthyl- ou tétraméthyl-para-phénylène diamine)

Le prélèvement des colonies ne doit pas être réalisé avec un instrument pouvant oxyder le réactif. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une tache violette le plus souvent en moins de trente secondes, au niveau de la zone de dépôt.

### **Protocole 3**

#### **Identification de la souche bactérienne à l'aide d'une microgalerie API 20E**

##### 1. MATÉRIEL

- Galerie API 20 E (réf. 20 100) + boîte + couvercle notée « UA 24h 37°C »
- Une gélose nutritive notée « UA » pour le contrôle de pureté et donc la validation de la lecture de la galerie
- eau distillée stérile 5 mL, pipette molle, huile de paraffine,

##### 2. PRÉPARATION DE LA GALERIE API

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 mL d'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide (eau du robinet dans les alvéoles).

Inscrire les références de la souche bactérienne sur la languette latérale de la boîte (+ date et nom de l'opérateur).

Déposer la galerie dans la boîte d'incubation.

##### 3. PRÉPARATION DE L' INOCULUM

Avec l'oese, prélever **une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.**

Réaliser une suspension bactérienne dans le tube contenant 5 mL d'eau distillée stérile en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

La densité de la suspension doit être équivalente à celle de la suspension Mac Farland 0.5.

##### 4. INOCULATION DE LA GALERIE API 20 E

A l'aide de la pipette molle, pour les tests



**remplir tubes et cupules** des tests avec la suspension bactérienne

Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.

Créer une anaérobiose dans les tests **ADH**, **LCD**, **ODC**, **URE**, **H<sub>2</sub>S** en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37° C pendant 24 heures.

##### 5. LECTURE ET DÉTERMINATION

Elle se fait avec le tableau API 20 E( voir fiche technique de la galerie API 20E ).

## **Protocole 4**

### **Recherche d'une albuminurie**

#### **Objectif**

Au cours des infections urinaires, l'urine peut contenir des protéines et surtout de l'albumine. Il est donc important de détecter la présence d'albumine urinaire pour tout prélèvement d'urine chez un patient présentant une infection urinaire.

#### **Principe**

Les bandelettes de papier imprégnées de bleu de tétrabromophénol et de tampon ajusté à un pH = 3 qui, trempées dans l'urine, restent jaunes en l'absence de protéines et prennent une teinte allant du vert au bleu selon la quantité de protéines présentes. Cette technique permet d'estimer la concentration urinaire en albumine.

Ce procédé a l'inconvénient de déceler aussi bien les protéines vraies que les mucoprotéines. Il est de plus faussement positif lorsque l'urine est alcaline (par médication alcalinisante, fermentation ou trop longue conservation).

#### **Matériel**

- Flacon contenant l'urine A noté « UA »
- Bandelettes Albustix® de Bayer™

#### **Caractéristiques des bandelettes Albustix® de Bayer™**

Propriétés : les bandelettes Albustix® permettent à domicile de détecter dans l'urine la présence de protéines. Normalement, aucune protéine n'est détectable dans l'urine par une méthode conventionnelle, bien qu'une quantité minimum soit excrétée par un rein sain.

Mode d'emploi : recueillir l'urine dans un récipient propre et sec. Tremper la bandelette et la retirer immédiatement. Lire les résultats au bout de 60 secondes.

Précautions d'emploi : un résultat négatif n'exclut pas la présence de protéines autres que l'albumine. Des faux positifs peuvent être obtenus avec des urines fortement alcalines. D'autre part, les désinfectants (ammoniums quaternaires ou autres détergents) ou des produits nettoyants pour la peau à base de chlorhexidine peuvent aussi entraîner des faux positifs.

Composition : 0.3 % p/p bleu de tétrabromophénol, 97.3 % p/p tampon, 2.4 % p/p excipients.

Présentation : boîte de 50 bandelettes.

#### **Lecture**

Comparer la couleur obtenue après 60 secondes avec l'échelle sur le tube de bandelettes.

## **Protocole 5 Dosage des protéines urinaires**

### **Objectif**

Après détection d'une albuminurie, on procède au dosage quantitatif des protéines dans l'urine.

### **Matériel et réactifs**

- Urine (recueil de 24h  $V_{24h} = 1500\text{mL}$ )      flacon noté « UA »      10 mL
- Solution étalon d'ovalbumine notée « Etalon »      10 mL
- Solution de contrôle d'ovalbumine notée « C »      10 mL
- Réactif de Gornall      50 mL
- Solution de NaCl à  $9\text{ g.L}^{-1}$       50mL
- Tubes à essai
- Fioles jaugée/pipettes jaugées
- Pipettes graduées/pipettes automatiques et cônes adaptés
- Pastettes
- Cuves de colorimétrie
- Spectrophotomètre

### **Mode opératoire:**

Introduire dans un tube à essai:

Solution à doser      1 mL

Réactif de Gornall      4 mL

Homogénéiser et laisser reposer 30 minutes à température ambiante

Lire les absorbances contre le témoin réactif à 540 nm.

### **Etalons et échantillons à doser**

A partir d'une solution étalon « Etalon » en ovalbumine à  $50\text{ g.L}^{-1}$ , préparer une solution étalon en ovalbumine à  $5\text{ g.L}^{-1}$ .

Préparer une gamme d'étalonnage allant de 0 mg à 5 mg d'ovalbumine par tube.

Réaliser deux essais avec l'urine A et un essai avec la solution de contrôle « C ».

### **Donnée**

La concentration massique en protéines du contrôle « C » est de  $2,50 \pm 0,20\text{ g.L}^{-1}$

### **Données d'acceptabilité des résultats**

$s_r = 0,06\text{ g.L}^{-1}\text{urine}$

$u_c = 0,13\text{ g.L}^{-1}\text{urine}$



## Annexe 1 Extrait du REMIC Edition 2004

### Examen cytbactériologique des urines

L'infection du tractus urinaire est une des infections les plus fréquentes. Cela explique que l'examen cytbactériologique des urines (ECBU) soit une des analyses microbiologiques les plus demandées. Son apparente simplicité d'exécution ne doit pas faire oublier qu'il convient de respecter en toutes circonstances une méthodologie rigoureuse.

#### 1. Contexte

Les principales circonstances amenant le clinicien à demander un ECBU sont consignées dans le tableau ci-dessous.

<b>Circonstances amenant à demander un ECBU</b>	
<b>Symptomatologie urinaire présente</b>	<b>Symptomatologie urinaire absente</b>
<b>Patente</b> Dysurie Pollakiurie Pesanteur vésicale Hématurie macroscopique	<b>Trompeuse</b> Protéinurie Hyperthermie isolée Personne âgée Diabétique
<b>Evocatrice</b> Incontinence urinaire Douleurs lombaires Hyperthermie associée à un autre signe d'infection urinaire	<b>Systématique</b> Femme enceinte Pré-opératoire urologique ou gynécologique Contrôle post- thérapeutique

#### 2. Objectifs

La réalisation correcte de l'ECBU nécessite de répondre aux cinq objectifs suivants :

- Connaître les différentes circonstances anatomocliniques présidant à la réalisation d'un ECBU et influant sur la conduite méthodologique.
- Connaître les principales espèces microbiennes responsables d'infections du tractus urinaire afin de mieux les identifier ;
- Procéder en toutes circonstances au recueil des urines et garantir leur acheminement correct vers le laboratoire ;
- Savoir réaliser un ECBU dans ses différentes étapes ;
- Etre capable d'interpréter les résultats de l'ECBU en toutes circonstances.

##### 2.1. Connaître les différentes circonstances anatomocliniques influant sur la conduite méthodologique.

Certaines circonstances influent sur le recueil et/ou les instructions techniques et/ou l'interprétation des résultats microbiologiques. Autour du cas général habituel (ou par défaut en présence de données cliniques insuffisantes), ces circonstances sont les suivantes :

- Patient sondé à demeure
- Nourrisson
- Urétérostomie
- Immunodéprimé
- Recherche de Mycobactéries
- Circonstances particulières.

## 2.2. Connaître les principales espèces microbiennes responsables d'infections du tractus urinaire

Les bactéries urinaires ont été classées en quatre groupes selon les recommandations des **European Urinalysis Guidelines, 2001**.

Cette connaissance a un impact sur l'interprétation de l'uroculture.

- **Les uropathogènes reconnus (bactéries du Groupe I)** sont des bactéries reconnues comme pathogènes, même en faible quantité ( $\geq 10^3$  UFC/mL) :

*Escherichia coli* (dont les souches CO<sub>2</sub> dépendantes); *Saphylococcus saprophyticus* (essentiellement chez la femme jeune); *Salmonella* (rare); Mycobactéries (rare).

- **Les bactéries moins fréquemment responsables d'infections urinaires (bactéries du Groupe II)**. Ces bactéries sont le plus souvent d'origine nosocomiale lorsqu'il existe des facteurs anatomiques ou iatrogènes favorisants. Ces bactéries sont :

les autres Entérobactéries (*Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp.); *Enterococcus* spp.; *Pseudomonas aeruginosa*; *S aureus*; *Corynebacterium urealyticum*; *Haemophilus* spp. (rare); *Streptococcus pneumoniae* (rare).

- **Les bactéries qu'il ne faut considérer comme pathogènes qu'avec circonspection (bactéries du Groupe III)**. Leur implication en pathologie exige un niveau de bactériurie élevée ( $\geq 10^5$  UFC/mL), une répétition de leur isolement sur au moins deux échantillons d'urine et, si possible, des critères cliniques ou d'inflammation. Les staphylocoques coagulase négative sont le plus souvent le témoin d'une contamination plutôt que responsables de réelles infections. Les bactéries de Groupe III ne doivent pas être prises en compte que si elles sont détectées par aspiration vésicale sus pubienne. Ces bactéries sont :

*S. agalactiae*; *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, surtout); Les staphylocoques à coagulase négative (autre que *S. saprophyticus*); *Acinetobacter baumannii*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Burkholderia cepacia*; *Oligella urethralis*; *Aerococcus urinae*.

- **Les bactéries de la flore urétrale ou génitale de proximité (bactéries du Groupe IV)** pour les quelles l'identification et l'antibiogramme ne doivent pas être réalisés en routine. Ces bactéries sont :

Streptocoques alpha hémolytiques; *Gardnerella vaginalis*; *Lactobacillus* spp.; Bacilles corynéformes (à l'exception de *Corynebacterium urealyticum*).

## 3. Prélèvement et transport

Il convient de savoir procéder en toute circonstance au recueil des urines et garantir leur acheminement au laboratoire.

Cas habituel (recueil à « la volée » ou du « milieu de jet »).

Le patient réalise le prélèvement lui-même. Il est nécessaire de lui expliquer comment le faire. Après lavage hygiénique des mains et toilette soignée au savon de la région vulvaire chez la femme et du méat urinaire chez l'homme suivi d'un rinçage :

- Éliminer le premier jet (20 mL) d'urines pour ne recueillir dans un flacon stérile que les 20-30 mL suivants au minimum, en prenant soin de ne pas toucher le bord supérieur du récipient.
- Fermer hermétiquement le flacon, l'identifier très précisément et le porter immédiatement au laboratoire accompagné de sa prescription et de l'heure de prélèvement.

## 4. Examen cytot bactériologique

### 4.1. Examen cytologique

- Aspect quantitatif

A l'aide d'un dispositif à numération (de type cellule de Malassez et de préférence à usage unique) on dénombre les différents éléments figurés contenus dans un volume donné d'urine à étudier. Leur nombre est rapporté au millilitre. A l'état physiologique, l'urine contient moins de  $10^3$  leucocytes ou hématies par mL.

En cas d'infection urinaire, le processus inflammatoire se traduit par la présence de :

- $\geq 10^4$  leucocytes par mL parfois en amas ;
- $\geq 10^4$  hématies par mL témoins de microhémorragies ;
- Cellules de revêtement urothélial.

Si la présence de cylindres s'avère importante à prendre en compte, la notion d'altération des leucocytes n'amène pas d'élément sémiologique supplémentaire.

- Aspect qualitatif

L'examen possible du frottis réalisé à partir de l'échantillon et coloré au Gram conforte les données précédentes, permet d'observer les éventuels microorganismes présents et oriente éventuellement le choix des milieux de culture selon la morphologie des bactéries observées et leur affinité tinctoriale.

#### 4.2. Mise en culture

- Dénombrement des microorganismes

L'évaluation quantitative de la bactériurie peut s'opérer par dilution des urines ou par technique de l'anse calibrée (généralement 10  $\mu$ L) ou par la méthode de la lame immergée.

- Ensemencement : choix des géloses

Le milieu de type cystine-lactose-électrolyte-déficient (CLED) se prête bien à la culture des urines. Certains milieux incorporant des chromogènes directs peuvent s'avérer utiles au repérage des colonies

Après 24h d'incubation, voire 48h si nécessaire, la poursuite de l'analyse microbiologique dépend de l'interprétation cyto bactériologique, des renseignements cliniques d'accompagnement et d'éventuels examens antérieurs.

#### 4.3. Identification

Pour l'identification, la technique à utiliser découle de la morphologie des colonies, complétées si besoin d'une coloration de Gram et de contrôle de l'oxydase ou de la catalase. Le nombre limité d'espèces microbiennes impliquées simplifie le choix de la galerie commerciale à employer.

### 5. Interprétation

Il convient dans tous les cas de figure d'être capable d'interpréter les résultats de l'ECBU en fonction d'un minimum de renseignements concernant la clinique, le prélèvement et le transport selon le GBEA (Arrêté du 26 novembre 1999).

Les recommandations de Stamm complétant celles de Kass, ont été établies exclusivement pour les pyélonéphrites aiguës et les bactériuries asymptomatiques de la femme. L'interprétation des cultures s'effectue de la manière suivante :

- Bactériurie
  - $< 10^3$  UFC/mL : absence d'infection
  - $\geq 10^5$  UFC/mL : infection probable
  - Entre  $10^3$  et  $10^5$  UFC/mL : zone d'incertitude selon l'espèce bactérienne (le seuil est abaissé pour les pathogènes urinaires reconnus), selon l'expression de signes cliniques d'infection urinaire et selon le fait que le patient soit sondé ou non. Eventuellement, ces valeurs peuvent être reconstruées sur un autre échantillon d'urine.

Certaines conditions de prélèvement des urines permettent d'abaisser encore ces seuils.

- Leucocyturie : ce critère n'est pas toujours pris en compte voir tableau ci-dessous
  - $\leq 10^4$  /mL : pas de processus inflammatoire
  - $> 10^4$  /mL : présence d'un processus inflammatoire.

En théorie, l'interprétation s'effectue en prenant en compte la combinaison des quatre paramètres : bactériurie quantitative, leucocyturie quantitative, symptômes urinaires et pathogénicité reconnue de la souche isolée.

En pratique, ces critères (nécessaires mais non obligatoirement suffisants) doivent être complétés face à chaque cas particulier en y intégrant les paramètres complémentaires suivants :

- Symptômes évocateurs d'infection urinaire : dysurie, pollakiurie, hématurie macroscopique, incontinence urinaire, douleurs lombaires, hyperthermie ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) associée à un autre signe d'infection urinaire,
- Caractère mono ou pluri microbien des cultures
- Résultats d'ECBU précédents
- Conditions de prélèvement et de transport.

<b>Cas général habituel ou par défaut</b>					
<b>Urines prélevées en milieu de jet chez un patient non sondé</b>					
Symptômes	Leucocytes ( $\geq 10^4$ / mL)	Numération bactérienne/mL	Nombre d'espèces	Groupe bactérien	Réalisation d'un antibiogramme
+	+	$10^3$	1	I	Oui*
		$10^4$	1	I, II	Oui*
			2	I, II, III	Oui si groupe I Non *, si bactéries des groupes II ou III, refaire l'ECBU
	-	$\geq 10^5$	1 ou 2	I, II, III	Oui
		$\leq 10^4$		I, II, III	Non
		$\geq 10^5$	1 ou 2	I, II, III	Patient immunocompétent : Non refaire l'ECBU (suspicion d'une infection urinaire débutante) Immunodépression, chimiothérapie, greffe : Oui
Asymptomatique ou sans renseignements cliniques	+/-	$\leq 10^4$	1	I, II, III	Non
		$\geq 10^5$	1	I, II, III	oui
			2	I, II, III	Non, refaire l'ECBU
<p>Groupe I : <i>Escherichia coli</i>; <i>Saphylococcus saprophyticus</i>; <i>Salmonella</i>; Mycobactéries</p> <p>Groupe II : autres Entérobactéries (<i>Klebsiella</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Morganella</i> spp.); <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Pseudomonas aeruginosa</i>; <i>S aureus</i>; <i>Corynebacterium urealyticum</i>; <i>Haemophilus</i> spp.; <i>Streptococcus pneumoniae</i></p> <p>Groupe III : <i>S. agalactiae</i>; <i>Candida</i> spp. (<i>C. albicans</i>, <i>C. glabrata</i>,); Les staphylocoques à coagulase négative (autre que <i>S. saprophyticus</i>); <i>Acinetobacter baumannii</i>; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>; <i>Burkholderia cepacia</i>; <i>Oligella urethralis</i>; <i>Aerococcus urinae</i>.</p> <p>* : l'emploi d'un milieu chromogène facilite l'utilisation du tableau</p>					

## 6. Conclusion

L'examen cytot bactériologique des urines est un examen aujourd'hui bien codifié dont les deux temps critiques sont :

- Le prélèvement trop souvent victime de son apparente simplicité
- L'interprétation microbiologique qui doit s'appuyer sur des arguments décisionnels irréprochables.

Cette analyse peut bénéficier en amont d'une méthode de criblage rapide par bandelettes consistant à rechercher « au lit du malade » simultanément une bactériurie (nitrate réductase) et une leucocyturie (leucocyte-estérase). Correctement effectué, le dépistage par bandelettes a une valeur prédictive négative de 95% chez le patient sondé.

Cette méthode de dépistage n'est pas utilisable chez les patients sondés du fait de la présence habituelle de leucocytes et de l'absence de nitrate réductase de certaines bactéries nosocomiales (*Pseudomonas* spp., *Candida* spp., *Enterococcus* spp., *Acinetobacter* spp.).

## Annexe 2 (Protocole non réalisable, résultat fourni)

### Protocole et lecture d'un dénombrement des germes urinaires: technique à l'anse calibrée

#### Objectif

Estimation de la bactériurie à partir d'un échantillon d'urine.

#### Principe

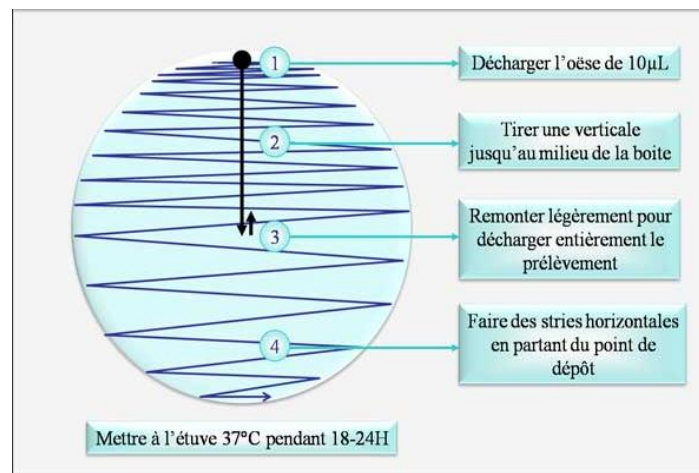
L'étalement à l'anse calibrée 10  $\mu$ L de l'urine à la surface d'une gélose CLED permet le dénombrement des germes urinaires par comparaison de la culture après incubation 24h à 37°C en aérobiose avec des abaques de lecture.

#### Matériel

- Matériel courant de microbiologie
- Urine A
- anse calibrée de 10  $\mu$ L
- une gélose CLED

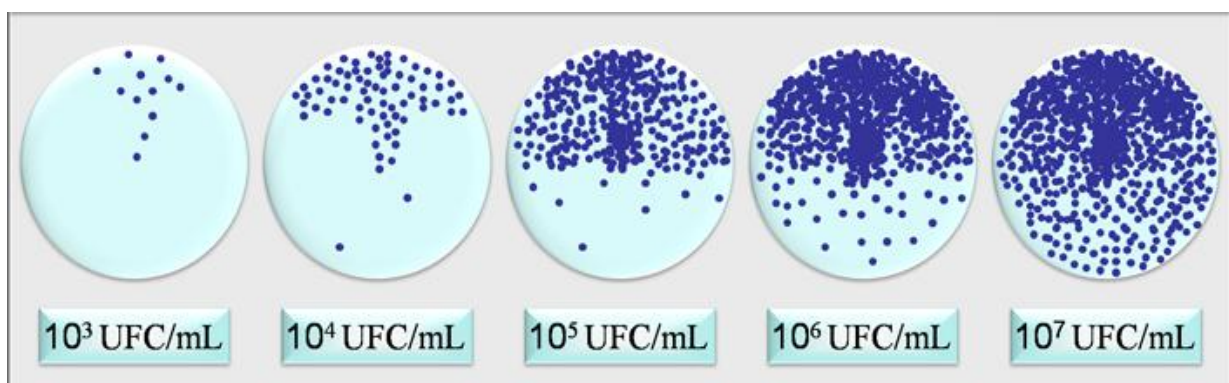
#### Mode opératoire

Technique d'ensemencement de la Gélose CLED avec une anse calibrée de 10 $\mu$ L:



#### Lecture

On compare la densité des colonies sur la gélose CLED aux abaques de lecture ci-dessous pour évaluer la bactériurie exprimée en UFC/mL :



## Annexe 3

### Extrait de l'article « Conduite à tenir devant une protéinurie »

Par Véronique Hentgen Pédiatre, CHI de Créteil, France.

#### 1. La fonction rénale : rappels

Les reins exercent deux fonctions au plan métabolique, en excréant une urine de volume et de composition très variables :

- Fonction d'épuration sélective qui permet :
    - l'élimination de déchets du métabolisme,
    - la récupération de métabolites utiles (glucose ...).
  - Fonction de régulation du volume d'eau de l'organisme.
- L'urine normale contient en quantités variables des électrolytes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ...) et certains constituants organiques (urée, acide urique, créatinine ...).  
La présence d'une protéinurie traduit une pathologie qu'il faudra rechercher.

#### 2. Définition

Une protéinurie est définie comme l'élimination pathologique dans les urines d'une quantité de protéines supérieure à 150 mg (soit 0,15 g) par 24 heures.

#### 3. Circonstances de découverte

- au cours d'un dépistage systématique par un examen avec une bandelette urinaire,
- au cours de l'exploration d'un syndrome œdémateux,
- au cours de la surveillance d'une grossesse,
- au cours d'un bilan d'une hypertension artérielle ou d'une maladie générale.

#### 4. L'affirmation d'une protéinurie

##### 4.1. Examen par test des bandelettes (bandelette urinaire)

- basé sur la modification de coloration;
- la lecture se fait par comparaison, sur une échelle colorimétrique;
- l'examen doit être fait sur des urines fraîchement émises, recueillies après toilette génitale, dans un récipient soigneusement rincé, afin d'éviter la contamination par un détergent;
- les bandelettes doivent être conservées dans un récipient hermétiquement clos, à température ambiante ;
  - les bandelettes détectent des protéinuries supérieures à 50 mg/L (0,05 g/L)
  - les bandelettes peuvent réagir faussement (faux positifs) en cas de :
    - urines alcalines,
    - sels d'ammonium dans le récipient (désinfectant type Cétavlon®, Biocidan®).

##### 4.2. Dosage de la protéinurie des 24 heures

Toute protéinurie dépistée lors d'un examen par bandelette urinaire devrait être confirmée par un dosage de la protéinurie des 24 heures.

1- Le dosage de la protéinurie doit être fait sur les urines des 24 heures.

- La technique du recueil des urines des 24 heures doit être expliquée au patient :
  - vider la vessie le matin au lever, aux toilettes.
  - A partir de ce moment, recueillir les urines de toutes les mictions dans un récipient propre, soigneusement rincé.
  - Le lendemain matin, au lever, vider la vessie dans le récipient.
  - Apporter le récipient au laboratoire pour dosage de la protéinurie des 24 heures (résultat exprimé en mg ou g/24 heures). Il existe une protéinurie pathologique, si le dosage des protéines est **supérieur à 150 mg (ou 0,15 g) par 24 heures.**

##### 4.3. Après affirmation de la présence d'une protéinurie, il est nécessaire de :

- examiner le patient ;
- mesurer la pression artérielle

- examiner le sédiment urinaire (présence de leucocytes et/ou d'hématies dans les urines) ;
- pratiquer un examen cyto bactériologique des urines (ECBU) ;
- mesurer dans le sang, le sodium, le potassium, les protides, la créatinine et l'urée.

## 5. Orientation diagnostique

### 5.1. Protéinurie intermittente :

- affections fébriles de l'enfant,
- protéinurie d'effort,
- protéinurie de l'insuffisance cardiaque,
- protéinurie associée à une hématurie macroscopique le plus souvent d'origine urologique (**bilharziose**, lithiase urinaire, tumeur de la vessie ou des voies urinaires excrétrices ...).

Ces protéinuries disparaissent spontanément ou après le traitement de leur cause.

### 5.2. Protéinurie contemporaine d'une infection urinaire :

- infection urinaire basse (cystite) ou haute (pyélonéphrite) : l'ECBU retrouve des leucocytes et des germes. Il faudra s'assurer de la disparition de la protéinurie après le traitement de l'infection urinaire.
- Cas particulier de la **tuberculose urinaire** :

présence d'une protéinurie et surtout d'une leucocyturie sans germes retrouvée à l'ECBU.

## 6. Conclusion

La découverte d'une protéinurie doit conduire à une enquête étiologique dont le but est de déterminer si cette protéinurie est en relation avec une affection qui peut être prise en charge au centre de santé ou s'il s'agit d'une protéinurie qui s'intègre dans le cadre d'une maladie plus générale, nécessitant une prise en charge dans un centre spécialisé. Un examen clinique soigneux et quelques examens complémentaires faciles à réaliser, permettent dans la majorité des cas d'orienter le diagnostic et de mettre en place le traitement adapté.

*Développement et Santé, n°161, octobre 2002*

<http://www.ledamed.org/IMG/html/doc-10611.html>



## Annexe 4 La gélose CLED

**REF 43 331 / 43 339**

11719 C - fr - 2009/06

### Gélose CLED (CLED)

IVD

Isolément des micro-organismes urinaires

#### INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

La gélose CLED (Cystine Lactose Electrolyte Deficient) est recommandée pour l'isolement des micro-organismes urinaires (1).

Elle permet également de différencier les germes fermentant le lactose des germes non fermentatifs.

#### PRINCIPE

Les germes lactose (+) donnent des colonies jaune-pâle à jaunes par acidification du milieu.

Les germes non fermentatifs donnent des colonies vertes, bleues ou incolores.

La composition du milieu permet de limiter l'envahissement de la gélose par les *Proteus* (2).

#### PRÉSENTATION

Milieux prêts à l'emploi	
REF 43 331	Coffret de 2x10 boîtes (90 mm)
REF 43 339	Coffret de 10x10 boîtes (90 mm) CLED *

\* imprimé sur chaque boîte

#### COMPOSITION

Formule théorique.

Ce milieu peut être ajusté et/ou complété en fonction des critères de performances imposés:

Peptone de gélatine (bovin ou porcine).....	4 g
Peptone de caséine (bovin).....	4 g
Extrait de viande (bovin ou porcine).....	3 g
Lactose (bovin).....	10 g
L. cystine.....	0,128 g
Bleu de bromothymol.....	0,02 g
Agar.....	15 g
Eau purifiée.....	1 l

pH 7,3

#### MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Etuve bactériologique.

#### PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).

- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation; se référer à "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers From occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* – Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CDC/NIH, Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Les milieux de culture ne doivent pas être utilisés comme matériau ou composant de fabrication.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas utiliser les réactifs dont l'emballage est détérioré.
- Ne pas utiliser des boîtes contaminées ou exsudées.
- Les performances présentées ont été obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut modifier les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique, des aspects macro et microscopiques et éventuellement des résultats d'autres tests.

#### CONDITIONS DE STOCKAGE

- Les boîtes se conservent entre 2°C et 8°C dans leur coffret jusqu'à la date de péremption.
- Les boîtes peuvent être conservées 4 semaines à 15-25°C dans leurs coffrets.
- La durée de conservation des boîtes hors du coffret, en sachet cellophane, est de 2 semaines à 2-8°C.

#### ECHANTILLONS

Le milieu est ensemencé directement à partir d'urine. Il convient de respecter les bonnes pratiques en terme de prélèvements et de transport.

#### MODE OPERATOIRE

1. Laisser les boîtes revenir à température ambiante.
2. Ensemencer le prélèvement dès son arrivée au laboratoire.
3. Incuber à l'étuve, couvercle en bas, à 37°C. Le choix de la température d'incubation est de la responsabilité de l'utilisateur en fonction de l'application et des normes en vigueur. Les cultures sont examinées à 24 heures d'incubation.



**LECTURE ET INTERPRETATION**

- Après incubation, observer la croissance bactérienne et l'aspect des colonies :
  - colonies lactoses (+) : jaune-pâle à jaunes.
  - colonies lactose (-) : vertes, bleues ou incolores.
- L'identification du ou des micro-organismes isolés doit être réalisée par des tests biochimiques voire immunologiques.

**CONTROLE DE QUALITE****Protocole :**

La fertilité du milieu peut être testée vis-à-vis de la souche suivante :

- *Escherichia coli* ATCC® 25922

**Résultats attendus :**

Souche	Résultats à 33-37°C	
	Croissance en 24 heures	Colonies jaunes
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922		

**Remarque :**

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de prendre en compte la nature de l'application et la législation locale en vigueur pour la mise en oeuvre du contrôle de qualité (fréquence, nombre de souches, température d'incubation...).

**LIMITES DU TEST**

- Une durée d'incubation supérieure à 24 heures peut entraîner une réalcalinisation du milieu qui modifie la coloration des colonies.
- Le développement est fonction des exigences propres à chaque micro-organisme. Il est donc possible que certaines souches ayant des exigences spécifiques ne se développent pas.

**PERFORMANCES**

Les performances ont été validées sur 100 prélèvements urinaires positifs.

La totalité des prélèvements ont été détectés positifs avec la gélose.

132 des 136 souches présentes dans les échantillons (enterobactéries, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, entérocoques, staphylocoques, autres bactéries Gram (+) et levures) se sont développées sur le milieu.

78 souches ont présenté des colonies jaunes par acidification du milieu.

2 des 8 souches de *Proteus* ont montré un début d'envahissement.

**ELIMINATION DES DECHETS**

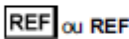







Eliminer les réactifs utilisés et non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**


- BENNER E.J. – "Simple disposable method for quantitative cultures of urine" - *Applied Microbiol.*, 1970, vol. 19, p. 409-412.
- SANDYS J.P. – "A new method of preventing swarming of *Proteus* sp. with a description of a new medium suitable for use in routine laboratory practice" - *J. Med. Lab. Technol.*, 1960, vol. 17, p. 224-233.

**TABLE DES SYMBOLES**

Symbole	Signification
 REF ou REF	Référence du catalogue
 IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Limites de température
	Utiliser jusque
 LOT	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests

bioMérieux, le logo bleu et chromID sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.  
ATCC est une marque utilisée, déposée et/ou enregistrée appartenant à American Type Culture Collection.  
Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.





 **bioMérieux SA**  
au capital de 12 029 370 €  
RCS LYON 673 620 399

69280 Marcy-l'Étoile / France  
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00  
Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
<http://www.biomerieux.com>



## Annexe 5

### Fiche de données de sécurité : prévention des risques

Produit	Mention	Pictogramme(s)	Phrase(s) de danger	Phrase(s) de prévention
sulfate de cuivre pentahydraté	Attention		H302 H315 H319 H410	P102 P280 P273 P302 + P352 P305+P351+P338+P337+P313 P301+P312+P330 P501
Tartrate de sodium et de potassium	La substance n'est pas classifiée selon le règlement CLP.			P102 : Tenir hors de portée des enfants.
Hydroxyde de sodium	Danger		H290 H314	P260 P264 P280 P301 + P330 + P331 P303+P361+P353 P305+P351+P338 P310
Iodure de potassium	La substance n'est pas classifiée selon le règlement CLP.			

## Annexe 6

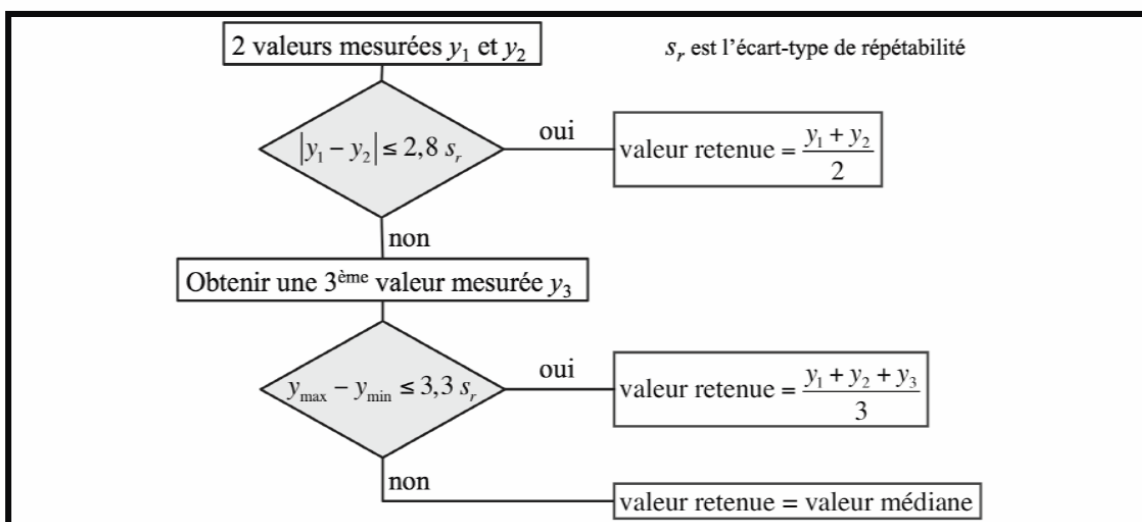
### Acceptabilité des résultats expérimentaux et expression des résultats

DOCUMENT	AIDE MEMOIRE DE METROLOGIE
----------	----------------------------

D'après le document « Vocabulaire International de Métrologie » (VIM) :

- Le **mesurande** est la grandeur que l'on veut mesurer.
- Le **mesurage** est un processus consistant à obtenir expérimentalement une ou plusieurs valeurs pouvant être raisonnablement attribuées à une grandeur.
- Les **indications** sont les valeurs numériques rendues par des appareils de mesure.
- Le **résultat de mesure** est exprimé par la valeur retenue et l'incertitude de mesure associée, complétées par toutes les autres informations pertinentes disponibles.
- Les **conditions de répétabilité** sont des conditions de mesurage qui comprennent des mesurages répétés, par le même opérateur, sur le même objet, avec la même procédure de mesure, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement, dans le même lieu, pendant une courte période de temps.

#### Logigramme de compatibilité en répétabilité à deux ou trois valeurs



#### Expression du résultat de mesure

L'incertitude élargie  $U$  est calculée en multipliant l'incertitude-type composée  $u_c$  par le facteur d'élargissement  $k$  associé à un niveau de confiance donné. La valeur de  $k$  généralement utilisée est de 2, ce qui correspond à un niveau de confiance d'environ 95 %.

L'incertitude élargie  $U$  est ensuite arrondie selon les cas :

- si le premier chiffre significatif est 1, 2 ou 3 : garder deux chiffres significatifs ;
- si le premier chiffre significatif est 4 ou plus : garder un chiffre significatif.

Dans certains cas, l'incertitude élargie  $U$  est directement donnée avec son niveau de confiance.

Pour l'arrondissement du résultat, le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

Expression du résultat de mesure :

**Grandeur mesurée = (valeur retenue ±  $U$ ) unité**  
autres informations pertinentes disponibles.

## **Annexe 7**

### **Détermination de la leucocyturie (protocole non réalisable)**

#### **Objectif**

Dénombrer les leucocytes urinaires. La leucocyturie est le nombre de leucocytes présents dans un millilitre d'urine entière.

#### **Matériel et réactifs**

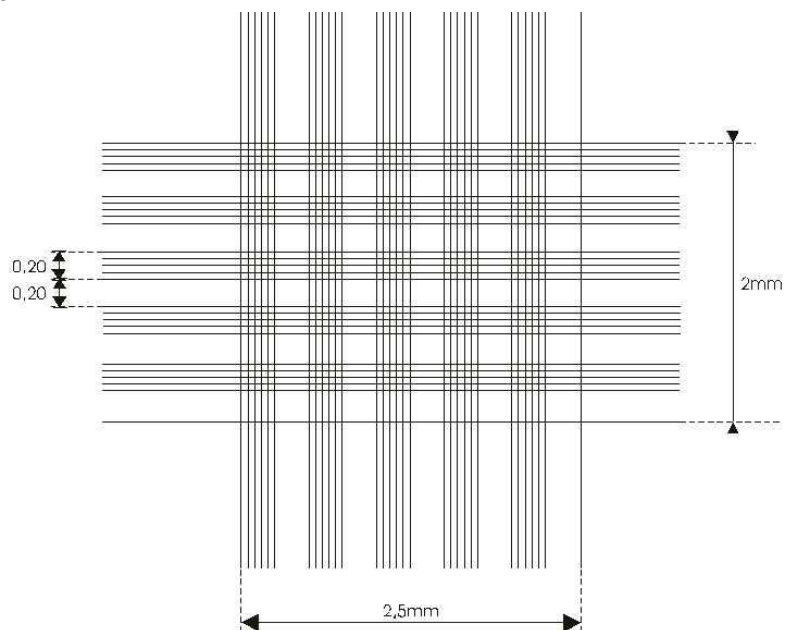
- Urine A présentée en flacon noté « UA »
- 1 tube à hémolyse stérile
- Pipettes automatiques et cônes adaptés
- Pastettes
- Hématimètre de Malassez et lamelle planée
- Compteur de cellules
- Cuvette pour nettoyage-désinfection de l'hématimètre
- Jeu de pissettes : eau distillée, détergent, eau de Javel à 0,4% de chlore actif et alcool

#### **Protocole**

A partir de l'urine entière homogénéisée, on dénombre les leucocytes dans une cellule de Malassez. En fonction du nombre de leucocytes on dénombre les leucocytes dans toute la cellule ou dans 10 rectangles.

#### **Données :**

La cellule de Malassez est une cellule quadrillée (de profondeur 0.2 mm) comportant 100 rectangles (10 bandes horizontales et 10 bandes verticales).  
Son volume est de  $1 \text{ mm}^3$ .



#### **Résultat de l'urine A:**

On compte 250 leucocytes dans 10 rectangles pour l'urine A.

# LECON PORTANT SUR LES PROGRAMMES DES LYCEES ET DES CLASSES POST-BACCALAUREAT

## Rapport de l'épreuve de leçon portant sur les programmes des lycées et des classes post-baccalauréat

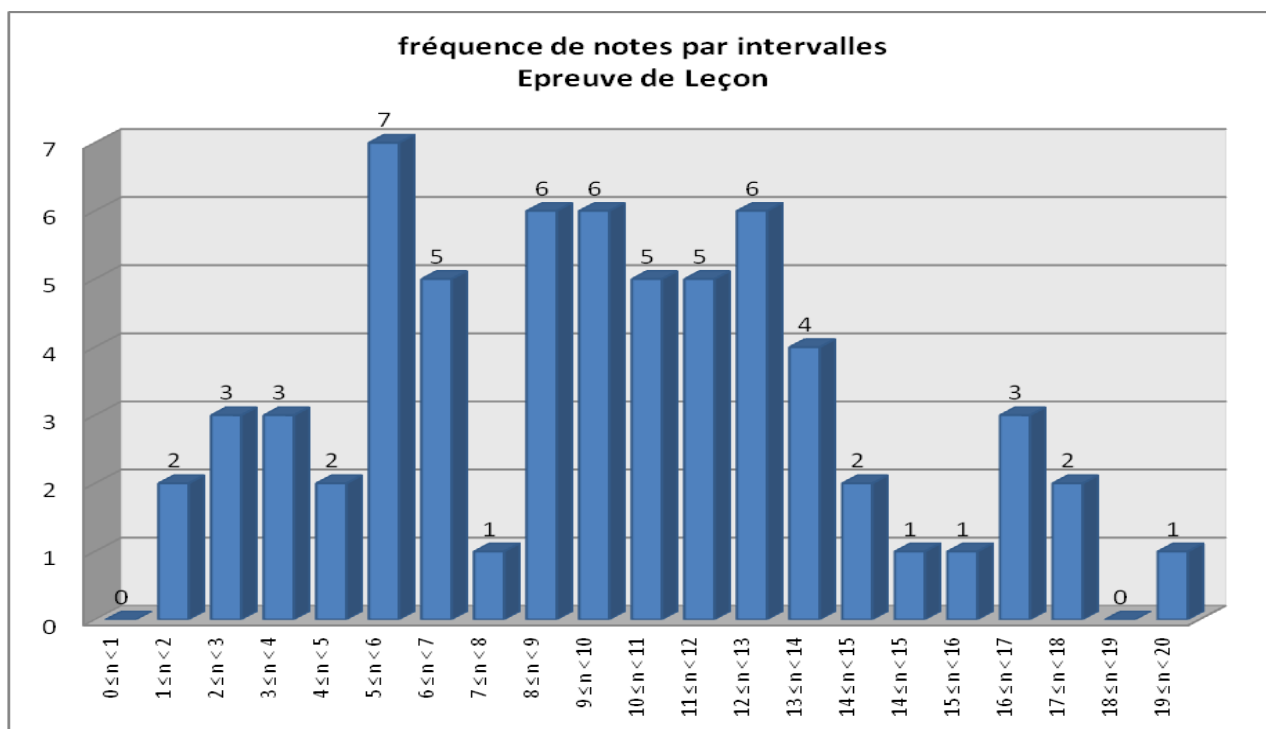
### Rapport établi par :

Mesdames Sylvie BARDES, Armelle BIGOT, Anne CAZALOT, Anne COMBES, Isabelle FALLER, Sigolène FOURCY, Emmanuelle GRIMAL, Susanne HAEBERLE, Brigitte LEONETTI, Messieurs, Olivier BEAUMESNIL, Raphael BOUQUET, Joël CNOKAERT, Gilles FREMY, Philippe GARNIER, François MATRINGE, Pierre NARBONNE.

### Résultats :

CAPET

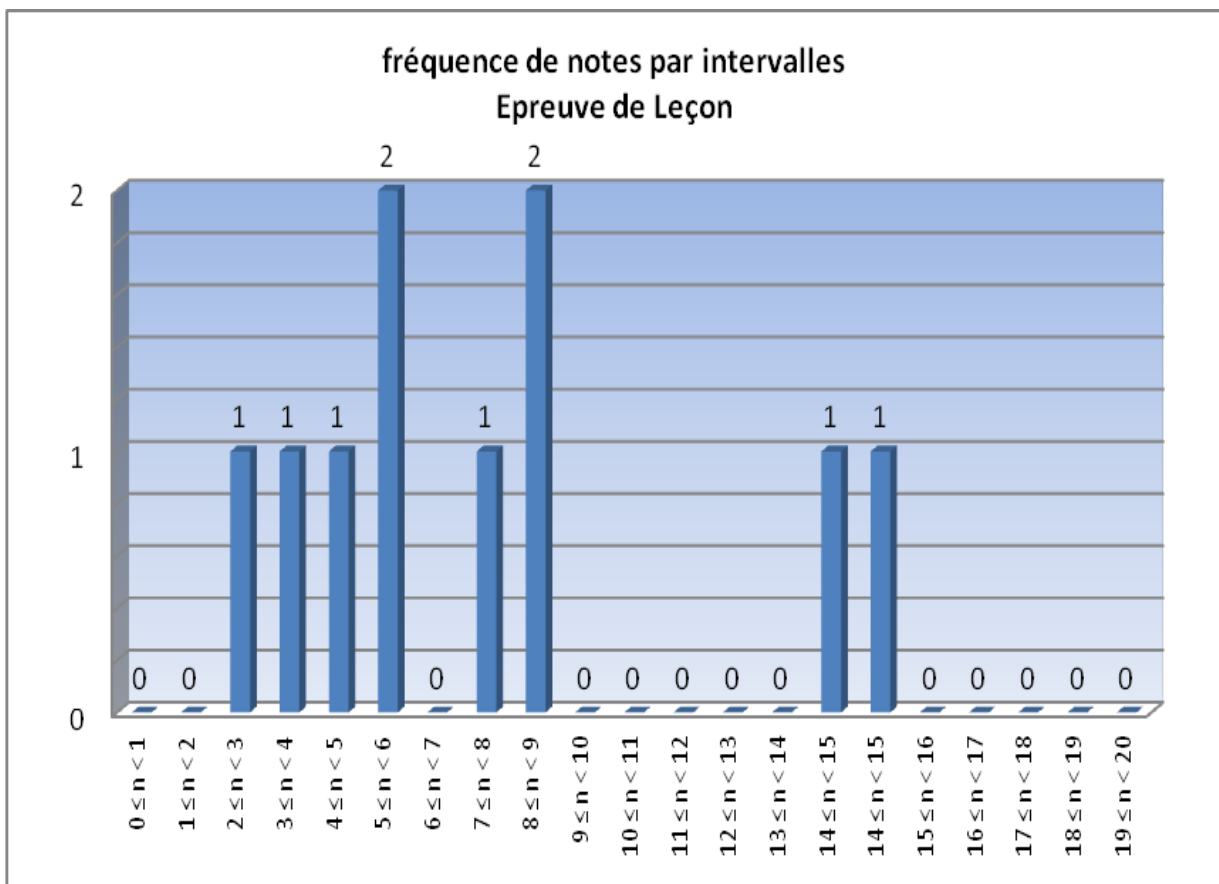
$0 \leq n < 1$	0	$10 \leq n < 11$	5
$1 \leq n < 2$	2	$11 \leq n < 12$	5
$2 \leq n < 3$	3	$12 \leq n < 13$	6
$3 \leq n < 4$	3	$13 \leq n < 14$	4
$4 \leq n < 5$	2	$14 \leq n < 15$	2
$5 \leq n < 6$	7	$15 \leq n < 16$	1
$6 \leq n < 7$	5	$16 \leq n < 17$	3
$7 \leq n < 8$	1	$17 \leq n < 18$	2
$8 \leq n < 9$	6	$18 \leq n < 19$	0
$9 \leq n < 10$	6	$19 \leq n < 20$	1



## Résultats :

### CAFEP

$0 \leq n < 1$	0	$10 \leq n < 11$	0
$1 \leq n < 2$	0	$11 \leq n < 12$	0
$2 \leq n < 3$	1	$12 \leq n < 13$	0
$3 \leq n < 4$	1	$13 \leq n < 14$	0
$4 \leq n < 5$	1	$14 \leq n < 15$	1
$5 \leq n < 6$	2	$15 \leq n < 16$	0
$6 \leq n < 7$	0	$16 \leq n < 17$	0
$7 \leq n < 8$	1	$17 \leq n < 18$	0
$8 \leq n < 9$	2	$18 \leq n < 19$	0
$9 \leq n < 10$	0	$19 \leq n < 20$	0



### Déroulement de l'épreuve :

La définition de l'épreuve est donnée en page de garde des sujets de l'épreuve : « Pendant les quatre premières heures, le candidat prend connaissance du sujet, il conçoit la séquence et la séance qu'il va proposer au jury lors de la leçon. Il prépare et réalise les activités technologiques sur lesquelles il s'appuiera pour l'élaboration de la séance et/ou séquence. Pendant ces 4 heures, le jury sera amené à observer la mise en œuvre des protocoles expérimentaux, ainsi que les résultats obtenus par le candidat.

Ensuite, pendant une heure, le candidat ne manipule plus et finalise la préparation de sa leçon dans une salle équipée de postes informatiques.

Enfin, la présentation orale suivie de l'entretien se déroule dans une salle de cours, en présence du jury, pendant la dernière heure. »

Il convient de préciser que la séquence pédagogique est un ensemble continu ou discontinu de séances articulées entre elles dans le temps, incluant une progression qui vise à développer des compétences.

Les compétences technologiques sont évaluées sur l'ensemble des manipulations réalisées.

Les sujets étaient structurés de la façon suivante :

- intitulés de la séquence et de la séance,
- niveau d'enseignement,
- manipulations réalisables (protocoles opératoires et matière d'œuvre),
- protocoles opératoires complémentaires et non réalisables, parfois accompagnés de résultats,
- ressources documentaires diverses : éléments de contexte, supports théoriques, documents d'interprétation, ...

Les sujets ainsi que les référentiels des programmes étaient fournis sous format papier et numérique. Chaque candidat disposait ainsi d'une clé USB sur laquelle ils pouvaient enregistrer un diaporama ou d'autres productions numériques. Les candidats avaient aussi la possibilité de réaliser jusqu'à deux photographies pour enrichir leur présentation

Sujet	Séquence	Séance	Niveau d'enseignement	Manipulations proposées
<b>A</b>	Analyses biologiques chez la femme enceinte	Prévention du risque infectieux au cours de la grossesse : exemples de diagnostic d'infections	Terminale STL biotechnologies	Dépistage d'un portage de <i>Streptococcus agalacticae</i> : identification d'une souche isolée d'un prélèvement vaginal. - réalisation d'un frottis coloré à la méthode de Gram - technique de recherche de la catalase - recherche de <i>Streptococcus</i> du groupe B à l'aide du kit Slidex Strepto B (BIOMERIEUX) Sérodiagnostic de la Syphilis par une réaction d'hémagglutination passive.
<b>B</b>	Contrôle qualité dans une boulangerie industrielle	Vérification d'un levain et d'un extrait de malt	Terminale STL biotechnologies	Estimation de la concentration en levures par cytométrie directe sur lame de Malassez Dosage des protéines dans un extrait de malt par méthode colorimétrique Détermination de l'activité amylasique d'un extrait de malt par méthode cinétique.
<b>C</b>	Optimisation de la production d'acide lactique en fermenteur	Etude de la quantité d'acide lactique et de la biomasse en fonction de différentes conditions de culture : pH et température.	Terminale STL biotechnologies	Dosage de l'acide lactique par méthode volumétrique par une solution de soude préalablement étalonnée. Chromatographie sur couche mince des glucides du lactosérum avant et après traitement Etude de la souche utilisée lors de la fermentation : coloration de Gram et test à la catalase.
<b>D</b>	Diagnostic médical des infections bactériennes	Analyses de biologie médicale dans le cadre d'une infection urinaire	Terminale STL biotechnologies	Identification d'une souche bactérienne. - réalisation de la coloration de Gram - réalisation des tests enzymatiques - lecture des milieux fournis et de la galerie API20E Recherche d'une albuminurie Dosage des protéines urinaires par la méthode du Biuret

Il serait souhaitable que les candidats prennent connaissance des rapports de jury antérieurs.

Les biotechnologies reposent sur un ensemble de disciplines intégrées : microbiologie, biochimie, biologie cellulaire et moléculaire... Les connaissances de base de ces disciplines sont indispensables (structure des biomolécules, chimie minérale et organique, anatomie et physiologie humaine...)

Par exemple, la méconnaissance de la structure des acides aminés les plus simples ou encore de la structure bactérienne est inacceptable à ce niveau d'exigence.

Des connaissances théoriques en biologie, même de niveau acceptable, non ancrées dans une culture technologique, ne permettent pas de satisfaire aux exigences de ce concours.

Les candidats ayant obtenu les moins bonnes notes n'ont montré aucune maîtrise des compétences technologiques et techniques fondamentales (coloration de Gram, pipetages, tests d'orientation, réalisation de dilutions ou de gammes de colorimétrie basiques...). Certains candidats n'ont pas pris la mesure des aspects liés à l'enseignement technologique : organisation de la classe, prise en compte du référentiel, organisation matérielle...

Concernant le respect des règles d'hygiène, de sécurité et de gestion des déchets, certains comportements inappropriés ont été observés. Il est inquiétant que quelques candidats à un concours de recrutement de professeurs n'aient pas encore intégré cette dimension indispensable au travail de laboratoire. Le jury attend des candidats une analyse pertinente des risques biologiques, chimiques... Par exemple le port ou non des gants doit être raisonné. De plus, le jury rappelle que les germes non classés sont sans danger et ne nécessitent aucune protection particulière du manipulateur et de son environnement, telles les microorganismes entrant dans la composition du yaourt !

Le jury attend que les candidats fassent preuve d'une posture, une tenue et d'une attitude adaptées au métier qu'ils envisagent.



# EPREUVE SUR DOSSIER

## Rapport de l'épreuve sur dossier

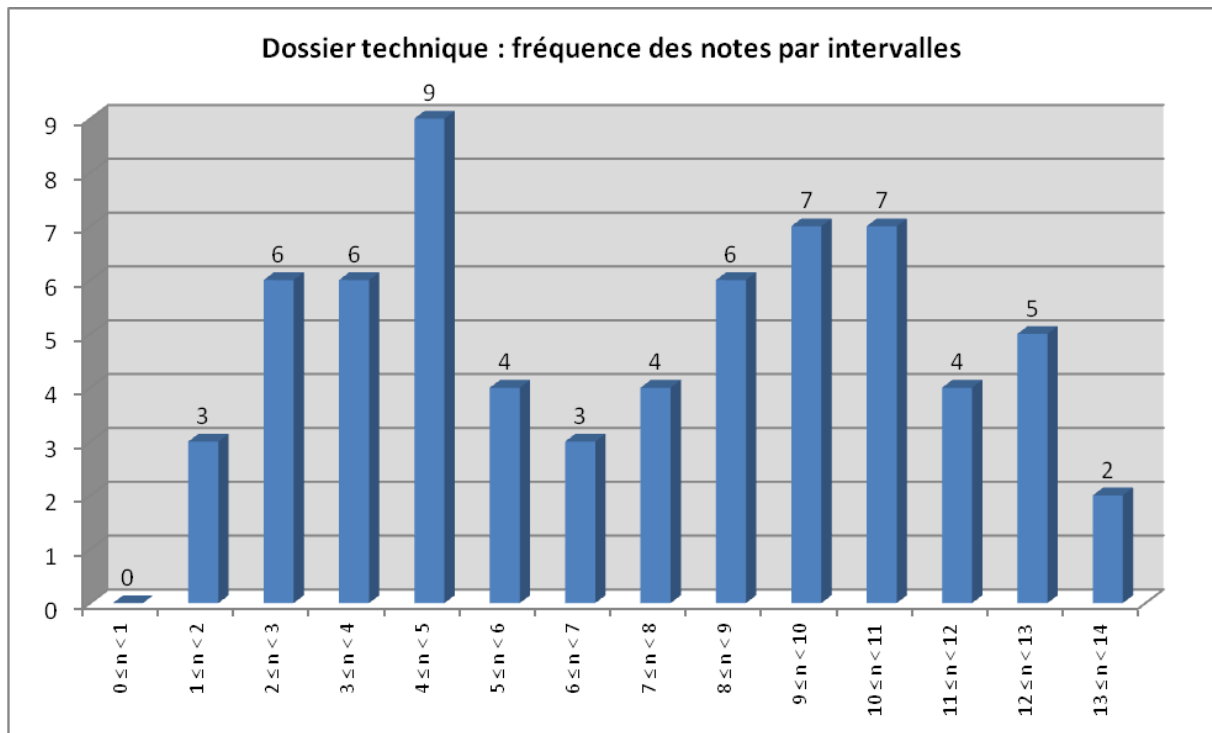
Rapport établi par : Mme Sophie BOYS, Mme Valérie BOCHARD, Mme Elisabeth CHANIAUD, Mme Muriel CHAVANEL, Mme Carole CHIES, M. Joël DENDALETCHÉ, Mme Sandrine DOUCET, Mme Claire DUBRAC, Mme Sandrine DUVET, M. Jean-Luc LESTRA, Mme Catherine MALLET, M. Patrick MEUNIER, M. Michel PRAT, M. Guillaume RAMI, Mme Frédérique TRINIAC.

## 1<sup>ère</sup> partie : Soutenance de dossier technique :

Résultats :

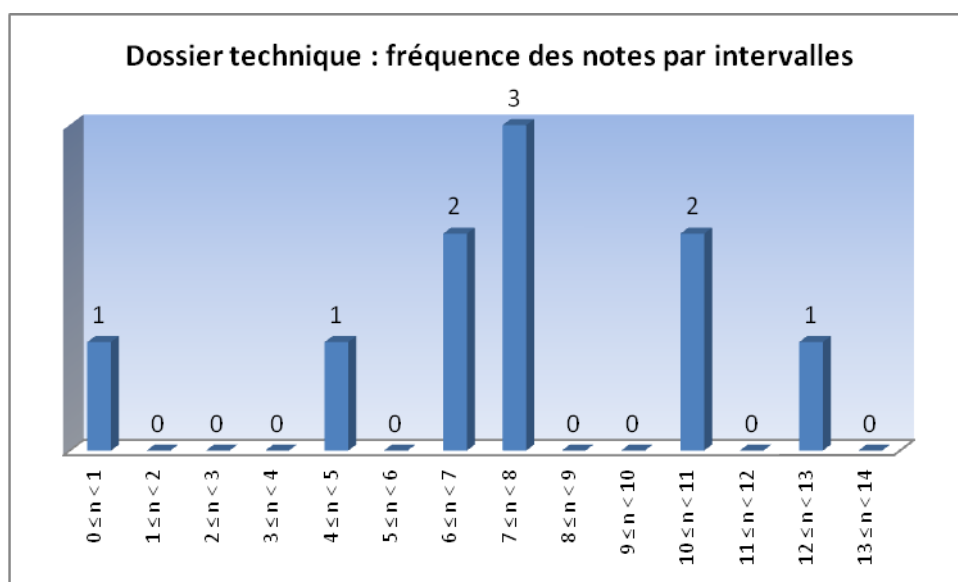
CAPET

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



## CAFEP

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



Commentaires : Soutenance de dossier technique

### **Dossier**

Le jury a apprécié la qualité des prestations des candidats qui se sont adaptés à la définition de l'épreuve en tenant compte des rapports du jury antérieurs.

Le sujet du dossier doit être contextualisé dans un environnement professionnel défini et doit porter sur une problématique dont le jury apprécie « *l'authenticité et l'actualité* ». Les thématiques choisies par les candidats doivent présenter un potentiel scientifique et technologique devant servir de support à une transposition pédagogique dans un des enseignements des différents champs possibles de compétence d'un professeur de biochimie génie biologique : enseignements d'exploration de seconde, enseignement de biologie et physiopathologie humaines de la série ST2S, enseignements technologiques de la série STL Biotechnologies, enseignements des différentes sections de technicien supérieur de biologie appliquée.

Les travaux universitaires ou les expériences de stage peuvent être utilisés comme support de l'épreuve; ils doivent alors être travaillés et adaptés afin de répondre aux exigences du concours dans l'objectif de la transposition pédagogique. Il s'agit notamment de faire des choix pour la partie technique dans leurs contenus, de présenter les manipulations réalisées, d'en maîtriser les principes, de les illustrer et de présenter des résultats expérimentaux, exploités et interprétés.

Le jury recommande aux candidats d'inclure à ce dossier la description d'une séance pédagogique construite. Celle-ci doit permettre de démontrer que le candidat s'inscrit dans une démarche d'enseignement technologique avec la prise en compte :

- des objectifs de formation,
- de la nécessaire approche expérimentale,
- de l'organisation des activités,
- des contraintes et exigences de mise en œuvre des activités technologiques,
- de la gestion du groupe, des modalités d'évaluation....

Concernant la forme, le jury rappelle qu'il convient de :

- donner au dossier un titre concis, explicite, et reflétant la problématique choisie par le candidat,
- rédiger le dossier de façon claire et synthétique, en prenant en compte les finalités de l'épreuve,
- relire le dossier pour éviter les fautes d'orthographe et de syntaxe, ainsi que les erreurs de pagination,
- illustrer les propos à l'aide de supports didactiques pertinents,
- prévoir un sommaire détaillé et une bibliographie.

Le droit de la propriété intellectuelle doit être respecté, et les sources des documents cités (textes, photos, schéma) doivent être précisées.

### **Exposé :**

*«L'exposé et l'entretien permettent d'apprécier l'authenticité et l'actualité du problème choisi par le candidat, sa capacité à en faire une présentation construite et claire, à mettre en évidence les questionnements qu'il suscite et à en dégager les points remarquables et caractéristiques de la discipline. »*

La qualité du support de présentation orale est un élément d'appréciation des compétences pédagogiques et des qualités de communication du candidat. Le jury souhaite que l'exposé apporte les éléments du dossier technique essentiels à la compréhension et présente une exploitation pédagogique en adéquation.

### **Exploitation pédagogique**

L'exploitation est le fruit d'une réflexion en amont conforme aux programmes et référentiels des formations en lycée technologique. Il convient de présenter une séance pédagogique construite, réaliste et contextualisée.

La séance présentée, inscrite dans une progression pédagogique, doit mettre en évidence les objectifs pédagogiques et les compétences visées.

Certains candidats ont réussi à « se projeter dans leur future classe » pour imaginer la mise en œuvre pratique de la séance, avec prévention raisonnée des risques, répartition du travail et accompagnement des élèves, évaluation...

Ces aspects impliquent de connaître les spécificités des enseignements technologiques (connaissance des principes des techniques, gestion des risques, faisabilité en terme de coût et d'équipement, organisation pédagogique...).

### **Entretien**

Lors de l'entretien le jury s'attache à vérifier la maîtrise des concepts scientifiques et technologiques abordés dans le dossier.

Certains candidats ont montré de profondes lacunes sur les fondamentaux scientifiques et technologiques en lien avec la thématique choisie, lacunes incompatibles avec un enseignement relevant du champ de compétence d'un professeur de biochimie génie biologique.

Pour la préparation de cette épreuve, les candidats doivent mener des recherches approfondies et élargies pour maîtriser les champs scientifiques et technologiques de leur dossier.

Le jury évalue aussi bien les capacités d'analyse du candidat que ses qualités d'écoute et d'adaptabilité ainsi que sa posture, qui doit être celle d'un futur professionnel. Toutes les attitudes inappropriées doivent être évitées (désinvolture, arrogance, défaitisme...).

### **Conclusion**

Le jury a apprécié les prestations de candidats qui ont réussi à présenter de façon claire et fluide leur thématique, faisant preuve de réelles qualités pédagogiques.

Le jury a également apprécié, les efforts des candidats à positionner au centre de leur travail les aspects scientifiques et technologiques inhérents à l'enseignement de biochimie génie biologique.

La pertinence des exploitations pédagogiques nécessite que soient connus les sections, les niveaux d'exigence, les grandes lignes du programme du niveau dans lequel est proposée l'exploitation pédagogique et les relations entre les disciplines d'une classe.

Les candidats présentant de façon didactique un sujet scientifique contextualisé, proposant une transposition pédagogique pertinente, et faisant preuve de qualités de communication avec une posture compatible avec le métier ont montré au jury leur aptitude à enseigner.

## Seconde partie : « Agir en fonctionnaire de l'état et de façon éthique et responsable »

Chaque sujet comprend :

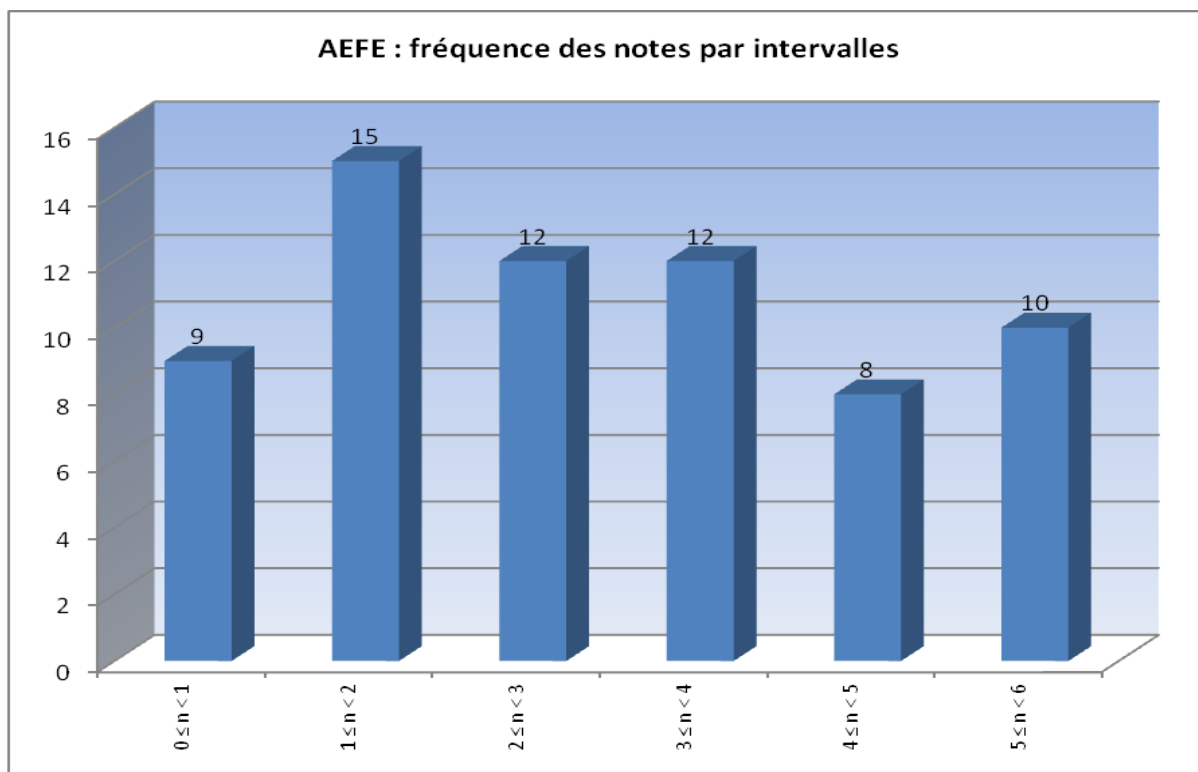
- un texte de référence : extrait de loi, de décret, d'arrêté, de circulaire, de note de service, extraits de document interne à un EPLE...),
- une mise en situation décrivant très brièvement le contexte dans lequel l'enseignant peut se trouver
- une question demandant l'attitude à avoir face à cette situation.

Les sujets de cette session ont porté sur des thématiques variées : l'accompagnement personnalisé, la communication avec les familles, le rôle du professeur principal, l'intégration des élèves avec un handicap, les indicateurs IPES.

*Résultats :*

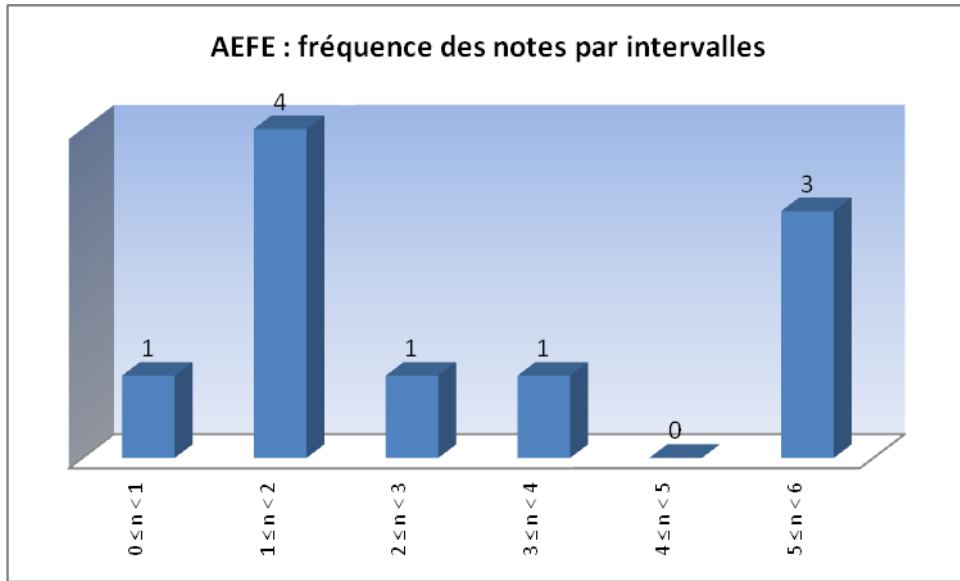
CAPET

$0 \leq n < 1$	9	$3 \leq n < 4$	12
$1 \leq n < 2$	15	$4 \leq n < 5$	8
$2 \leq n < 3$	12	$5 \leq n < 6$	10



CAFEP

$0 \leq n < 1$	1	$3 \leq n < 4$	1
$1 \leq n < 2$	4	$4 \leq n < 5$	0
$2 \leq n < 3$	1	$5 \leq n < 6$	3



**Commentaires : Agir en fonctionnaire de l'état et de façon éthique et responsable**

Le jury attend que les candidats réalisent une analyse objective et pragmatique de la situation professionnelle présentée afin d'en retirer un comportement et une démarche professionnelle adaptée à la réalité du métier et des missions de l'enseignant.

Le Jury est parfaitement conscient que les candidats, pour leur majorité sous statut étudiant, ne peuvent prévaloir d'une longue expérience en tant qu'enseignant. Il est donc en attente de bon sens et d'un positionnement emprunt d'éthique et d'un sens des responsabilités.

Si les attentes ont parfois été profondément déçues, le jury a parfois été séduit voire surpris de façon très positive par les propositions de certains candidats. Les réponses à certaines problématiques ne sont pas univoques, elles s'inscrivent davantage dans le souci de trouver un regard objectif et constructif sur le futur métier qu'ambitionnement d'exercer les candidats au concours

•

## CONCLUSION GENERALE

Le jury félicite les candidates admis au CAPET et au CAFEP.

Comme cela avait été indiqué lors des précédentes sessions, il est nécessaire que les candidats à ce concours se préparent aux épreuves et aient acquis les connaissances scientifiques et technologiques indispensables. Trop de candidats ont encore cette année formulés des contre vérités scientifiques inacceptables d'un futur enseignant et d'un étudiant de niveau master. Ces contre vérités sont d'autant plus inacceptables qu'elles portent sur des connaissances de base.

L'enseignement ne peut se concevoir sans la maîtrise des savoirs enseignés, et celle de l'expression alliant une présentation claire des éléments de réponse et une argumentation des idées développées.

Ces qualités qui ont été recherchées aussi bien dans le cadre des épreuves d'admissibilité que des épreuves d'admission.

La première épreuve d'admission a permis d'apprécier à la fois de l'attitude professionnelle des candidates et de leur maîtrise des techniques mais surtout de leur capacité à construire une démarche pédagogique utilisant avec pertinence les données techniques et technologiques apportées par le sujet. Cette épreuve est difficile car elle nécessite une connaissance des niveaux d'enseignement et des contenus de ces enseignements. Cette épreuve est difficile car elle ne demande pas aux candidats de simplement savoir exécuter des gestes techniques, mais surtout de savoir les enseigner à un groupe classe, à un moment de l'année, inscrit au sein d'une thématique et d'une progression pédagogique. Cette aptitude doit s'appuyer sur un fond culturel scientifique et technologique indispensable pour expliquer, analyser, justifier des choix...

Concernant la seconde épreuve d'admission, le jury a, comme l'an passé, globalement apprécié la qualité des dossiers présentés. Cependant trop de dossiers se confinent aux domaines scientifiques sans en prolonger l'utilisation dans un contexte d'enseignement. Cette démarche est cependant au cœur d'une pédagogie moderne résolument déterminer à placer l'élève au cœur de problématiques qui donnent sens aux apprentissages.

La réflexion des candidats face à la compétence agir en fonctionnaire de l'état et de façon éthique et responsable a révélé pour beaucoup d'entre eux un positionnement convenable et une certaine connaissance du système éducatif. Le jury n'attend pas une expertise approfondie des situations supports de l'épreuve mais apprécie l'aptitude du candidat à analyser objectivement la situation, prendre de la hauteur par rapport à celle-ci et dans une démarche raisonnée faire des propositions conformes à l'éthique et à la déontologie attendue d'une futur enseignant.

Le jury a apprécié les prestations des candidats reçus. Il se réjouit de les compter bientôt comme futurs collègues.

**Le jury tient à remercier Monsieur le proviseur du lycée Pierre Gilles de Gennes, ENCPB et son équipe : proviseur adjoint, 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.**