

SESSION 2016

---

**CAPET  
CONCOURS EXTERNE**

**Section : BIOTECHNOLOGIES  
Option : BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIQUE**

**SECONDE ÉPREUVE**

Durée : 5 heures

---

*Le dictionnaire anglais-français est autorisé.*

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

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

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

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

**Tournez la page S.V.P.**

A

## Lait maternel versus lait maternisé : comment répondre à un problème d'allergie alimentaire chez les nourrissons ?

*La bêta lactoglobuline ( $\beta$ -LG) serait le facteur déclenchant de la plupart des allergies alimentaires chez les enfants nourris au lait maternisé. Cette protéine est en effet présente dans le lait de vache utilisé pour la fabrication de laits maternisés, mais absente dans le lait maternel. Actuellement les industriels travaillent sur des alternatives pour l'alimentation des nourrissons allergiques à la  $\beta$ -LG.*

En vous appuyant sur les caractéristiques structurales de la protéine bovine, décrivez les techniques permettant de purifier et d'identifier cette molécule. Discutez ensuite des alternatives pouvant être proposées pour l'alimentation des enfants allergiques.

À partir du dossier documentaire fourni et dans la perspective d'un enseignement de biotechnologies ou de CBSV (chimie biochimie sciences du vivant) en classe de terminale STL, présentez, dans une deuxième partie, une démarche pédagogique permettant d'aborder les techniques d'étude qualitative des protéines. Votre démarche pédagogique s'inscrit dans l'extrait de programme suivant :

### Extraits du programme de Biotechnologie (Terminale STL)

#### Préparation et analyse biochimique des produits biologiques

##### Méthodes de fractionnement

Objectifs de formation et supports théoriques	Compétences transversales et technologiques
<p>- Principe du suivi d'une purification d'une molécule au sein d'un produit complexe.</p> <p>- Méthodes de fractionnement, préparatives ou analytiques, en lien avec les propriétés des biomolécules :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. centrifugation,</li> <li>. électrophorèse,</li> <li>. chromatographie par adsorption, partage, exclusion-diffusion, échanges d'ion, affinité</li> <li>. solubilité différentielle,</li> <li>. dialyse,</li> <li>. distillation.</li> </ul> <p><b>Les techniques de fractionnement ont été abordées en classe de première. En classe terminale, l'analyse sera approfondie et complétée en s'appuyant sur la diversité des principes et des technologies dans le cadre de</b></p>	<p>- Choisir et mettre en œuvre une méthode de fractionnement en fonction des propriétés des biomolécules à séparer.</p> <p>- Associer des techniques unitaires pour extraire ou purifier des biomolécules.</p> <p><b>Le nombre de techniques approfondies en classe terminale sera limité ; les techniques ne seront pas étudiées pour elles-mêmes, mais dans l'objectif d'en comprendre les principales caractéristiques permettant à terme aux élèves de justifier le choix d'une méthode de fractionnement.</b></p>

**l'étude d'un produit biologique complexe. La démarche de suivi de purification pourra être conduite en lien avec le suivi de purification d'une enzyme par son activité enzymatique.**

### **Analyse immunologique des échantillons biologiques**

<b>Objectifs de formation</b>	<b>Compétences travaillées</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spécificité de la réaction antigène-anticorps</li> <li>- Validation des techniques.</li> <li>- Principes des techniques immunologiques :               <ul style="list-style-type: none"> <li>. approche qualitative (détection ou dépistage),</li> <li>. approche quantitative (dosage ou titrage).</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caractériser la spécificité de la réaction.</li> <li>- Réaliser une réaction antigène-anticorps en tenant des paramètres d'influence</li> <li>- Réaliser une réaction antigène-anticorps pour mettre en évidence un antigène ou un anticorps.</li> <li>- Réaliser une méthode immunologique de quantification : mettre en œuvre une gamme de dilution géométrique.</li> <li>- Choisir les témoins pour valider la technique : témoin de spécificité, témoin d'efficacité.</li> <li>- Contrôler la technique.</li> </ul> <p><b>Deux techniques de principes différents seront réalisées au minimum.</b></p>

### **Extraits du programme de CBSV (Terminale STL)**

**Le maintien de l'intégrité de l'organisme par les mécanismes immuns nécessite la reconnaissance du soi et une coopération entre cellules immunocompétentes**

<b>Connaissances</b>	<b>Capacités</b>
<p>Les anticorps peuvent être utilisés :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vivo</i> pour des <b>applications thérapeutiques</b> ;</li> <li>- <i>in vitro</i> pour des <b>applications diagnostiques</b>.</li> </ul>	<p>Exploiter des ressources documentaires pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- caractériser la sérothérapie ;</li> <li>- identifier la molécule recherchée dans une méthode diagnostique : anticorps ou antigène</li> </ul>

## Liste des documents :

**Document 1** : Compositions comparées des laits

**Document 2** : Structure de la  $\beta$ -lactoglobuline

**Document 2A** : séquence en acide aminés du variant A

**Document 2B** : structure 3D de la  $\beta$ -lactoglobuline

**Document 3** : Caractéristiques des protéines majoritaires du lactosérum bovin, d'après Maria João Santos, *fractionation of the major whey proteins and isolation of  $\beta$ -lactoglobulin variants by anion exchange chromatography*, Separation and Purification Technology 90 (2012) 133–139 (Elsevier)

**Document 4** : Purification de la  $\beta$ -lactoglobuline, d'après Maria João Santos, *fractionation of the major whey proteins and isolation of  $\beta$ -lactoglobulin variants by anion exchange chromatography*, Separation and Purification Technology 90 (2012) 133–139 (Elsevier)

**Document 4A** : Organigramme de purification des protéines majoritaires du lait de vache

**Document 4B** : Résultats de la chromatographie échangeuse d'anions

**Document 5** : Test immuno-enzymatique pour le dosage de la  $\beta$ -lactoglobuline, d'après la fiche technique de « RIDASCREEN®  $\beta$ -Lactoglobulin »

**Documents 6** : Diagramme de production de formules infantiles

**Document 7** : Production de lait sans  $\beta$ -lactoglobuline

**Document 7A** : Extrait d'un article de Médecine science du 22/02/2013 de Dominique Labie

**Document 7B** : miRNA-mediated depletion of BLG in bovine milk, d'après « Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of  $\beta$ -lactoglobulin-free, high-casein milk » by Anower Jabeda, Stefan Wagner, Judi McCrackena, David N. Wellsa, and Goetz Laible - PNAS | October 16, 2012 | vol. 109 | no. 42 | 16811–16816

**Document 7C** : ARN interférence, d'après « RNAi and EPIGENETICS », Sourcebook, Ambions, Invitrogen (Life Technologies) et site internet [www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/epigenetics-learning-center/mirna/mirna-biogenesis.html](http://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/epigenetics-learning-center/mirna/mirna-biogenesis.html) (consulté le 16 octobre 2015)

\*  $\beta$ -lactoglobuline : repéré, suivant les documents, par : BLG,  $\beta$ -LG,  $\beta$ -Lg



## Document 1 : Compositions comparées des laits

En g/L	Lait humain	Lait de vache	Formules laits maternisés
Glucides	70 (dont 10 g/L de gynolactose)	50 g/L de lactose	47 à 73,5 (+ malto-dextrines)
Lipides	45	35 à 38	36 à 50
Protéines dont :	10	35	15-21
- caséines	40 %	80 %	40 à 80%
- Protéines solubles	60 % (absence de bêta-lactoglobuline)	20%	20 à 60%
Sels minéraux	2	6	4
Vitamines	présence	présence	présence

D'après Isabelle BINCE, *Lactarium et lait maternel*, L'Opéron n° 14 p2-15

## Document 2 : Structure de la $\beta$ -lactoglobuline

Il existe deux variants ( $\beta$ -LGA et  $\beta$ -LGB) de la  $\beta$ -lactoglobuline.

**Document 2A : séquence en acides aminés** du variant A. Les acides aminés encadrés correspondent à ceux qui sont modifiés dans le variant B. Les astérisques désignent les résidus impliqués dans des ponts di-sulfure.

```

          10                               50
LIVTQTMKGL DIQKVAGTWY SLAMAASDIS LLDAQSAPLR VYVEELKPTP
          60                               100
EGDLEILLQK WENDECAQKK IIAEKTIPA VFKIDALNEN KVLVLDTDYK
          110                              150
KYL*LF*CMENS AEPEQSI*VCQ CLVRTPEVDD EALEKFDKAL KALPMHIRLS
          160
FNPTQLEEQC HI
          A
    
```

## Document 2B : structure 3D de la $\beta$ -lactoglobuline



### Document 3 : Caractéristiques des protéines majoritaires du lactosérum bovin

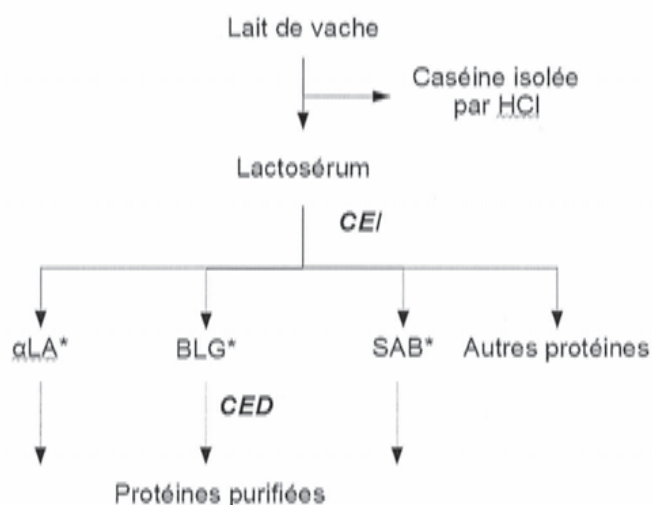
d'après Maria João Santos, *fractionation of the major whey proteins and isolation of  $\beta$ -lactoglobulin variants by anion exchange chromatography*, Separation and Purification Technology 90 (2012) 133–139 (Elsevier)

Protéine	Masse moléculaire (kDa)	Point isoélectrique	Proportion dans le lactosérum	Fonctions
$\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -Lg) variant A $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -Lg) variant B	18,3	<6,3	50 %	Binding and transport of retinol, vitamin D and palmitic acid Enzymic synthesis of prostaglandins
$\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -La)	14,2	<6,3	20 %	Binding of calcium, absorption Lactose synthesis Tumor cells apoptosis
Sérumalbumine (BSA)	66,4	<6,3	10 %	Transport, metabolism and distribution of ligands Protection from free radicals Contribution to osmotic pressure of blood
Immunoglobulines (Ig)	<150	<6,3	10 %	Immunological protection against microbial pathogens and toxins Protect mammary gland against infections
Autres protéines		> 6,3	<5%	

### Document 4 : Purification de la $\beta$ -lactoglobuline

d'après Maria João Santos, *fractionation of the major whey proteins and isolation of  $\beta$ -lactoglobulin variants by anion exchange chromatography*, Separation and Purification Technology 90 (2012) 133–139 (Elsevier)

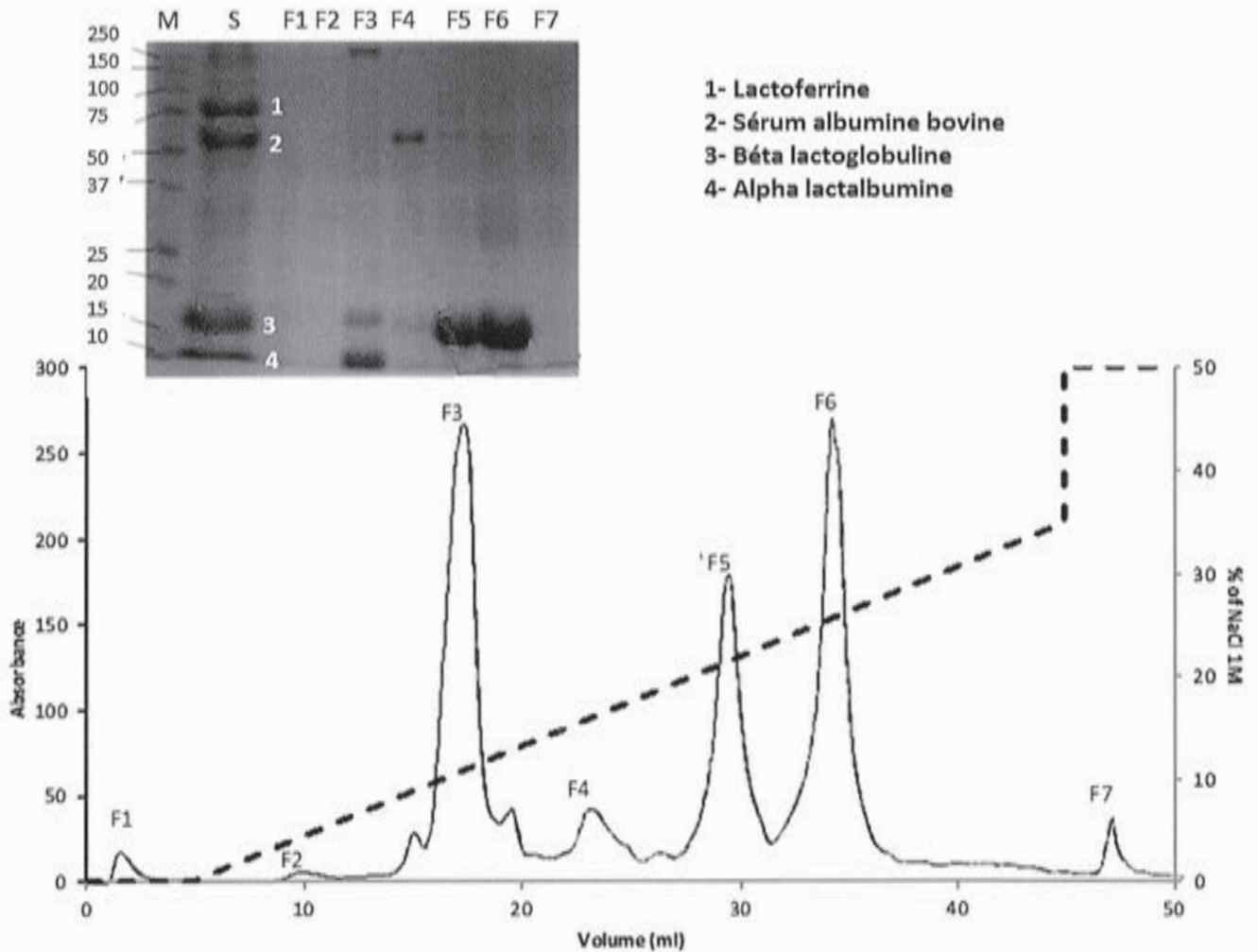
#### Document 4A : Organigramme de purification des protéines majoritaires du lait de vache



\* possibilité de présence de contaminants  
.....► Étape facultative

CEI : chromatographie échangeuse d'ions  
CED : chromatographie exclusion\_diffusion

**Document 4B : Résultats de la chromatographie échangeuse d'anions (pH 6,3)**



Elution profile of lactoserum eluted with a salt gradient ranging from 0 to 0.5 M NaCl (black dashed line) in Tris-HCl pH 6,3 and SDS-PAGE gel of the fractions collected during elution. The column used for the fractionation and recovery of proteins was a Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Detection of proteins was conducted at 280 nm using an UV detector. M – Bio-Rad marker (molecular weights in kDa); S – sample of four proteins; F1–F7 – fractions collected during elution.

## Document 5 : Test immuno-enzymatique pour le dosage de la $\beta$ -lactoglobuline

d'après la fiche technique de « RIDASCREEN®  $\beta$ -Lactoglobulin »

**Application du test :** Le RIDASCREEN®  $\beta$ -Lactoglobulin test est un test immuno-enzymatique en format compétition, pour l'analyse quantitative de la  $\beta$ -lactoglobuline native et transformée (la  $\beta$ -lactoglobuline est en partie dénaturée pendant les opérations de chauffage du lait) dans les produits à base de lait hydrolysé incluant les aliments infantiles hypoallergéniques.

**Généralités :** Le lait de vache contient approximativement 3,2 % de protéines (2,6 % de caséine et 0,6 % de petit-lait). Environ 50% de la fraction petit-lait correspond à la  $\beta$ -lactoglobuline. Le lait peut être présent à titre d'ingrédient ou recherché comme contaminant des produits crus ou transformés. Selon la Directive EU 2003/89/EG du 10 Novembre 2003, la présence de lait doit être déclarée sur l'étiquette des produits du fait des réactions allergiques qu'il peut provoquer.

**Principe du test :** Le test est basé sur une réaction antigène-anticorps. Les puits de la plaque de microtitration sont sensibilisés à l'aide de  $\beta$ -lactoglobuline (BLG). Les anticorps anti- $\beta$ -lactoglobuline, les solutions étalons ou les échantillons sont ajoutés. La BLG libre et celle qui est immobilisée entrent en compétition pour les sites de liaison des anticorps. Après lavage, des anticorps secondaires couplés à la peroxydase sont ajoutés. Ces anticorps vont se fixer aux complexes anticorps- $\beta$ -lactoglobuline déjà formés. Tout conjugué non fixé sera alors éliminé par des lavages. Le substrat de l'enzyme (péroxyde d'urée) et le chromogène (tétraméthylbenzidine) sont ensuite distribués et l'ensemble est laissé à incuber. Le conjugué fixé transforme le chromogène incolore en un produit bleu. L'addition de solution stop conduit à un changement de coloration du bleu au jaune. L'absorbance est mesurée à 450 nm.

Seuil de détection :  $0,115 \mu\text{g.mL}^{-1}$

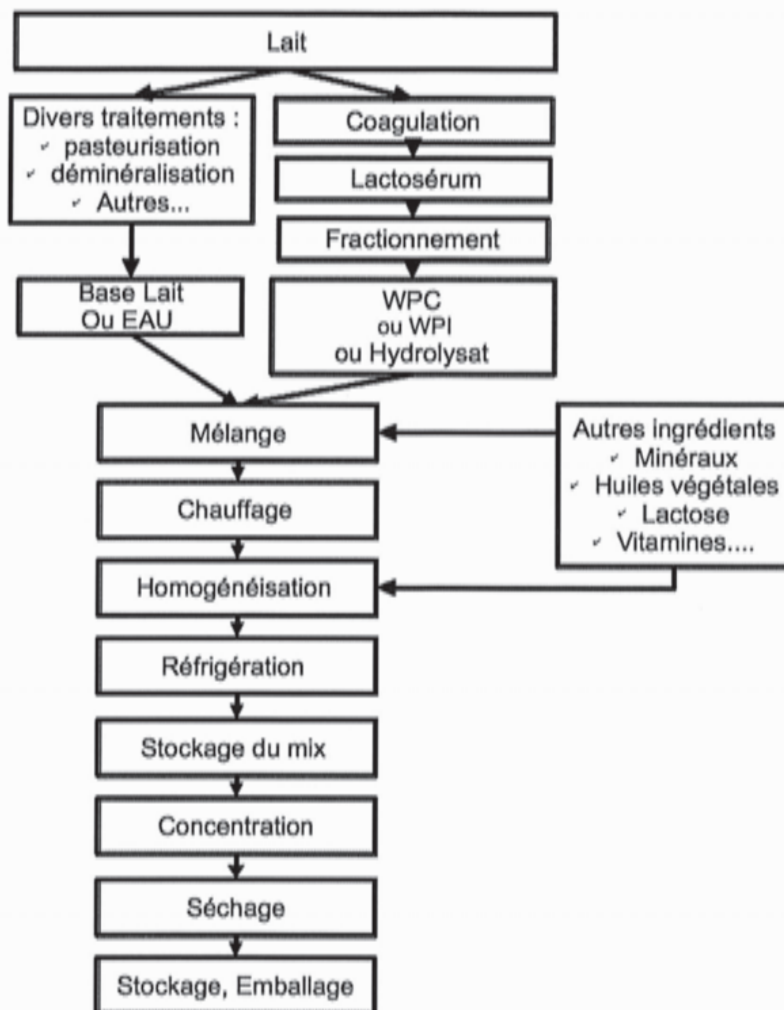
Limite de quantification :  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Spécificité : a été déterminée par l'analyse des réactions croisées entre les constituants suivants

- $\beta$ -lactoglobuline ..... 100 %
- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ , caséine..... < 1 %
- $\alpha$  lactalbumine ..... < 1 %
- bovine sérum albumine ..... < 1 %



## Documents 6 : Diagramme de production de formules infantiles



WPC : Whey Protein Concentrate  
 WPI : Whey Protein Isolate  
 Whey = lactosérum

Remarque : Dans le cadre de la préparation de lait infantile pour enfant allergique, plusieurs solutions existent :

- Les laits hypoallergéniques (HA) dont la finalité est d'éviter l'écllosion d'une maladie allergique chez un enfant à risque. Le lait HA est un lait partiellement hydrolysé pour rendre les protéines, fractionnées, moins allergisantes.
- Les préparations HE (« Hydrolyse extensive »), prescrits pour les enfants souffrant d'allergie vraie aux protéines de lait de vache (APLV).

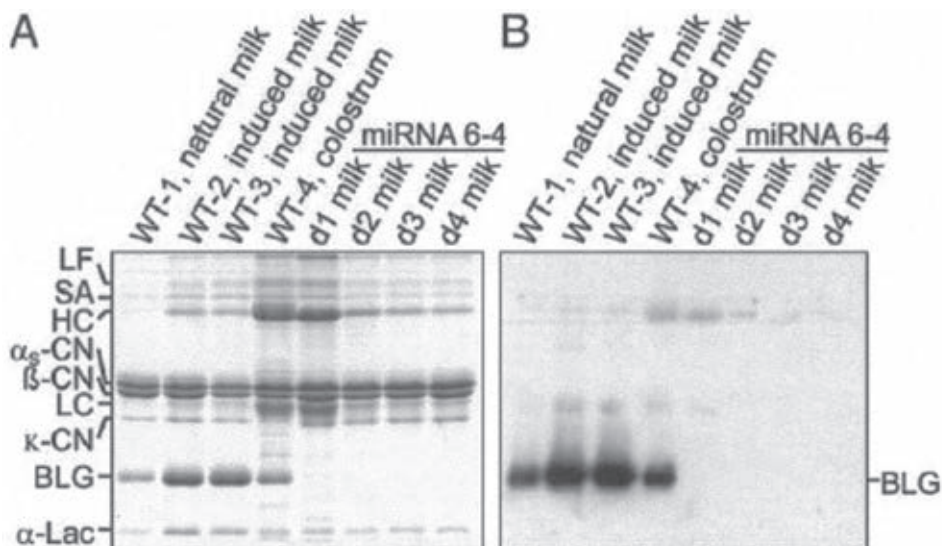
## Document 7 : Production de lait sans $\beta$ -lactoglobuline

**Document 7A : Extrait d'un article de Médecine science du 22/02/2013 de Dominique Labie**

[...]Les hydrolyses enzymatiques qui ont été tentées pour la production de lait de type HE sont imparfaites : elles donnent au lait un goût amer et n'éliminent pas totalement l'allergène. La Nouvelle Zélande, grand pays d'élevage, est aussi active dans la recherche de stratégies de modifications de la composition du lait. L'inactivation d'un gène par recombinaison homologue étant encore difficile chez le bétail, les auteurs ont envisagé une approche d'ARN interférence [...]. Les auteurs ont [...] sélectionné un tandem miARN actif sur les BLG ovine et bovine. [...] Ils ont ensuite tenté d'obtenir des vaches transgéniques par une approche de transfert nucléaire (comme pour Dolly en 1997) utilisant le noyau de fibroblastes transduits avec l'ADNc codant le tandem miARN. Une vachette vivante - Daisy - a été obtenue. Elle est née sans queue, phénotype rare mais déjà observé chez d'autres animaux obtenus par transfert nucléaire (et attribué à des mutations du génome du noyau transféré). Le lait de Daisy (la lactation a été induite par un traitement hormonal) ne contient pas de BLG, preuve que les miARN sont efficaces. Il contient en revanche des taux élevés de caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et surtout  $\kappa$ , indiquant un processus compensatoire. Non seulement le lait sans BLG n'est plus allergisant, mais les petites micelles de caséine en augmentent la valeur nutritive et facilitent l'assimilation du calcium qu'il contient. [...]

### Document 7B : miRNA-mediated depletion of BLG in bovine milk

D'après « Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of  $\beta$ -lactoglobulin-free, high-casein milk » by Anower Jabeda, Stefan Wagner, Judi McCrackena, David N. Wellsa, and Goetz Laible - *PNAS* | October 16, 2012 | vol. 109 | no. 42 | 16811–16816



Levels of BLG in the milk of a transgenic calf expressing miRNA 6–4 were assessed by (A) Coomassie blue staining and (B) Western analysis following SDS/PAGE separation of milk samples. Equal amounts of total milk protein were loaded onto each lane of the gel.

Lanes 1 - 4 : WT (wild-type) 1–4, four different WT cow samples of natural and induced milk and colostrum;

Lanes 5 - 8 : « miRNA 6–4 », induced milk samples produced by the transgenic miRNA 6–4 calf at four consecutive days (days 1–4);

Positions of main milk proteins are indicated :  $\alpha$ -Lac,  $\alpha$ -lactoglobulin;  $\alpha$ s-CN,  $\alpha$ s-casein;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -casein; HC, IgG heavy chain;  $\kappa$ -CN,  $\kappa$ -casein; LC, IgG light chain; LF, lactoferrin; SA, serum albumin.



## Document 7C : ARN interférence

D'après « *RNAi and EPIGENETICS* », Sourcebook, Ambions, Invitrogen (Life Technologies) et site internet [www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/epigenetics-learning-center/mirna/mirna-biogenesis.html](http://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/epigenetics-learning-center/mirna/mirna-biogenesis.html) (consulté le 16 octobre 2015)

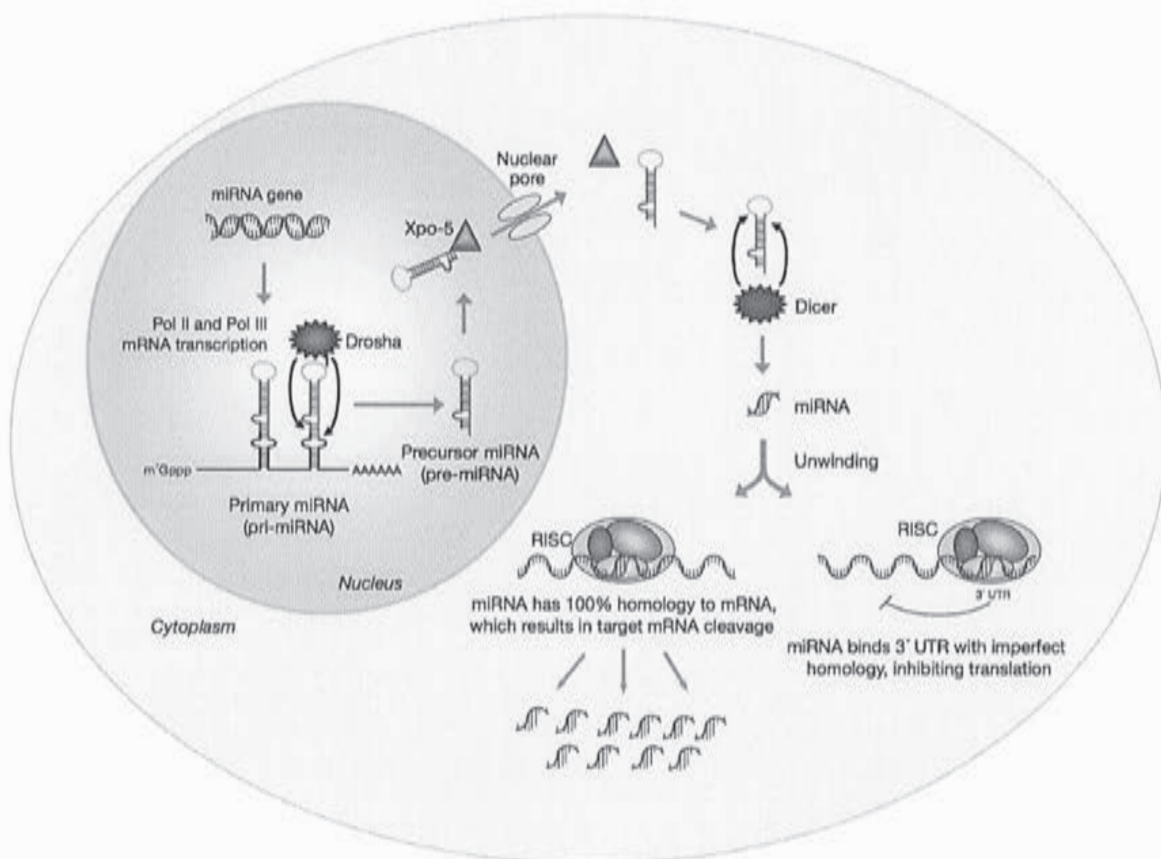
### Comment le phénomène d'ARN interférence fonctionne-t-il ?

Il existe plusieurs voies d'interférence ARN, dont les 2 principales sont :

- la voie des petits ARN (siRNA), exogènes
- la voie des micro ARN (miRNA), codés par la cellule elle-même

Dans les 2 cas, elles conduisent à la formation d'un petit ARN interférent double brin, dont l'un des brins (anti-sens) s'associe à un complexe multi-protéique RISC (pour RNA-induced silencing complex) et reconnaît un ARNm cible, aboutissant à la diminution de l'expression de la protéine correspondante.

*Xpo5 est une protéine d'export*



**Biogenesis and function of miRNA.** MicroRNA transcripts, generated by RNA polymerases II and III, are processed by the RNase III enzymes Drosha (nuclear) and Dicer (cytoplasmic), yielding 19–22 nucleotide miRNA duplexes. One of the two strands of the duplex is incorporated into the RISC complex, which regulates protein expression, by degradation of the mRNA through direct cleavage (if there is exact complementary base-pairing) or by inhibiting protein synthesis (in case of imperfect homology).

### Comment l'interférence médiée par des vecteurs fonctionne-t-elle ?

L'interférence médiée par des vecteurs utilise les avantages de la voie endogènes des miARN.

Ces vecteurs comprennent :

- la séquence complémentaire de la cible ARNm (100 % d'homologie)
- des séquences flanquantes et des séquences boucles, provenant de miRNA endogènes, qui permettent le process de clivage depuis le pri-miRNA jusqu'au miRNA
- un promoteur tissu-spécifique, inductible
- éventuellement un gène rapporteur (GFP)