



**MINISTÈRE
DE L'ÉDUCATION
NATIONALE,
DE LA JEUNESSE
ET DES SPORTS**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Rapport du jury

Concours : CAPET interne et CAER-CAPET

Section : Biotechnologies

Option : Biochimie génie biologique

Session 2021

Rapport de jury présenté par : Pierre NARBONNE, inspecteur d'académie – Inspecteur pédagogique régional, président de jury

Sommaire

1. Renseignements statistiques	Page 3
2. Epreuve d'admissibilité	Page 5
3. Epreuve d'admission	Page 7
Conclusion générale	Page 10
Annexe : sujet d'admission	Page 11

1. RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Concours : CAPET

Nombre de candidats inscrits	119
Nombre de candidats présents et non éliminés	54
Nombre de candidats admissibles	12
Nombre de candidats présents à l'épreuve orale d'admission	12
Nombre de candidats proposés pour l'admission	5
Rappel : nombre de postes	5

Epreuve d'admissibilité

- Note la meilleure	16,00/20
- Moyenne des notes des candidats admissibles	13,96/20
- Barre d'admissibilité	12,50/20

Epreuve d'admission

- Note la meilleure	13,00/20
- Moyenne (épreuve admission) candidats admis	11,00/20
- Moyenne (épreuve admission) candidats non éliminés	08,58/20
- Moyenne (total admissibilité et admission) candidats admis	12,10/20

Concours : CAER

(Concours d'accès à l'échelle de rémunération des professeurs certifiés)

Nombre de candidats inscrits	45
Nombre de candidats présents et non éliminés	33
Nombre de candidats admissibles	14
Nombre de candidats présents à l'épreuve orale d'admission	12
Nombre de candidats proposés pour l'admission	7
Rappel : nombre de postes	7

Epreuve d'admissibilité

- Note la meilleure	16,50/20
- Moyenne des notes des candidats admissibles	13,61/20
- Barre d'admissibilité	11,50/20

Epreuve d'admission

- Note la meilleure	16,00/20
- Moyenne (épreuve admission) candidats admis	13,14/20
- Moyenne (épreuve admission) candidats non éliminés	11,00/20
Moyenne (total admissibilité et admission) candidats admis	13,50/20

2. ÉPREUVE D'ADMISSIBILITE : RAPPORT DE L'ÉPREUVE

2.1. Attendus de l'épreuve

Le jury rappelle que les épreuves du concours interne du CAPET ont été définies dans l'arrêté du 28 décembre 2009 fixant les sections et les modalités d'organisation des concours du certificat d'aptitude au professorat de l'enseignement technologique (paru au journal officiel du 6 janvier 2010) et complété par l'arrêté du 27 avril 2011.

Par ailleurs, afin de préciser aux candidats les limites de la maîtrise disciplinaire attendue à ce niveau, il est rappelé que le programme, identique à celui du CAPET externe, est consultable dans le Bulletin Officiel de l'Education nationale spécial n° 7 du 8 juillet 2010.

Les deux pages de présentation du parcours

La présentation doit donner une vision globale de la formation initiale du candidat et de son expérience professionnelle. Le candidat présente son parcours de manière synthétique avec les principales dates et durées de ses différentes expériences professionnelles en lien avec le concours présenté.

De plus, certains éléments choisis dans le parcours doivent montrer dans quelle mesure l'expérience acquise a permis le développement de compétences indispensables à l'exercice du métier d'enseignant en filière technologique (pré baccalauréat et post baccalauréat), pour les enseignements relevant de l'option biochimie génie biologique du concours.

Les six pages : « Construction / Réalisation / Analyse / Projection »

La séance de formation développée qui s'inscrit dans une progression cohérente doit être choisie dans une des matières enseignées par les titulaires du concours et doit obligatoirement inclure une dimension technologique.

Le choix de la situation d'enseignement est déterminant pour faire valoir des compétences didactiques et pédagogiques au travers d'une situation authentique, conduite par le candidat, allant jusqu'à l'évaluation. Elle doit permettre un exposé argumenté des intentions pédagogiques de l'enseignant. Les annexes, judicieusement exploitées, peuvent contenir des productions de l'enseignant ou des élèves afin d'étayer l'argumentation. Le candidat doit expliquer ses choix et ses démarches *a priori*, préciser les modalités mises en place pendant la séance, puis commenter leur pertinence par une analyse réflexive *a posteriori* et formuler des propositions d'amélioration.

2.2. Observations du jury

Le jury constate que de nombreux rapports sont de bonne qualité et répondent aux attentes du concours. Les rapports les plus pertinents traduisent l'engagement professionnel du candidat et présentent :

- une séance judicieusement choisie permettant de mettre en valeur la démarche technologique et les compétences professionnelles attendues ;
- une véritable réflexion didactique et pédagogique allant au-delà d'une description du déroulé de la séance ;
- une illustration argumentée de la prise en compte de l'hétérogénéité des élèves ;
- une situation d'apprentissage contextualisée permettant de développer les compétences visées et de les évaluer ;
- une analyse réflexive *a posteriori*, s'appuyant sur des observations concrètes de la séance.

Le jury regrette que certains rapports présentent une analyse réflexive trop généraliste, déconnectée de la séance proposée et que les annexes soient absentes ou insuffisamment exploitées.

Le jury attend une prise en compte des risques au laboratoire intégrant la formation à la démarche de prévention.

Le jury a apprécié la capacité de la majorité des candidats à construire un rapport structuré de manière claire et cohérente, permettant une lecture fluide.

Les futurs candidats sont invités à tenir compte des observations ci-dessus et à consulter les rapports de jury des sessions précédentes. Le jury encourage les candidats non admis à faire évoluer leur RAEP.

3. ÉPREUVE D'ADMISSION : RAPPORT DE L'ÉPREUVE

3.1. Caractéristiques de l'épreuve

Les candidats disposent, en plus d'une version imprimée du sujet, d'un poste informatique contenant le sujet et ses annexes, ainsi que différentes ressources numériques : les programmes des enseignements nécessaires, des fiches techniques, un aide-mémoire de métrologie, des fiches de données de sécurité, l'accès au site 2RB (réseau ressources risques biologiques : www.esst-inrs.fr/3rb/), des logiciels de bureautique (libre office®) nécessaires à l'exploitation des résultats et à la présentation de l'exposé.

Pour cette session, les candidats ont travaillé sur un même sujet qui avait pour contexte la production et l'utilisation d'une enzyme : la β -galactosidase. Le candidat devait mettre en œuvre deux des six procédures opératoires proposées et il choisissait :

- la série du baccalauréat ou la spécialité de section de technicien supérieur et le niveau d'enseignement,
- les objectifs pédagogiques de formation.

L'épreuve débute par cinq heures de préparation en laboratoire de biotechnologies.

Au cours des quatre premières heures, en vue de l'exposé à présenter au jury, les candidats s'approprient le sujet et choisissent deux des six manipulations proposées afin de préparer une séquence de formation comprenant une séance détaillée. La séance comprend entre autres, l'exploitation des procédures opératoires et des résultats obtenus. Les candidats mettent en œuvre les deux manipulations choisies en intégrant la démarche de prévention des risques.

Les candidats effectuent une démonstration technique commentée de leur choix devant les examinateurs, tel qu'ils le feraient en interaction avec des élèves.

La dernière heure de préparation permet de finaliser la présentation de l'exposé.

L'épreuve se poursuit par un exposé et un entretien.

La partie orale, d'une durée d'une heure face aux membres du jury, se déroule dans une salle équipée d'un tableau et d'un dispositif de vidéo-projection.

L'exposé de 30 minutes a pour objectifs de décrire une séquence de formation, de présenter de façon détaillée une des séances constitutives de la séquence en appui des investigations menées lors des manipulations réalisées au laboratoire, notamment l'exploitation de résultats quantitatifs prenant en compte la métrologie.

L'entretien avec le jury permet au candidat de préciser certains points de sa présentation et de mettre en avant ses qualités pédagogiques, didactiques et sa maîtrise des contenus, notamment les aspects technologiques.

Comme précisé dans l'arrêté du 27 avril 2011, un temps d'entretien maximum de 10 minutes est réservé à un échange sur le dossier de RAEP.

3.2. Observations du jury

Pour cette épreuve, le jury évalue les connaissances scientifiques et technologiques relatives aux techniques mises en œuvre, les qualités pédagogiques et didactiques ainsi que les savoir-faire et attitudes des candidats figurant dans le référentiel de compétences des métiers du professorat et de l'éducation (BO du 25 juillet 2013).

Préparation au laboratoire de biotechnologies

Le jury a apprécié pour les meilleurs candidats :

- la posture d'enseignant adoptée au laboratoire et lors de l'interaction avec les examinateurs,
- l'adaptabilité et l'autonomie dans l'environnement du laboratoire,
- la justification pertinente des gestes et points critiques exposés aux examinateurs,
- la bonne organisation dans le temps et l'espace,

- la réflexion menée et la prise en compte des risques,
- la bonne utilisation des outils informatiques.

Des difficultés demeurent pour certains candidats :

- la réalisation de manipulations usuelles : pipetage avec pipettes automatiques, coloration de Gram, isolement bactérien...
- la mise en œuvre de la démarche de prévention, l'utilisation des EPI, la gestion des déchets chimiques, le respect de l'asepsie.

Compte tenu de ces constats, les membres du jury conseillent aux futurs candidats de :

- se préparer à l'appropriation de documents techniques et à des manipulations pratiquées dans les séries STL, ST2S et STS de biologie appliquée, quitte à observer voire à mettre en œuvre ce type de manipulations au cours de séances réalisées par un collègue,
- se préparer à faire la preuve d'une maîtrise des calculs indispensables à l'exploitation des résultats, prenant en compte la dimension métrologique,
- consacrer un temps suffisant de lecture du sujet permettant d'établir un plan d'organisation tenant compte des temps d'attente pour optimiser la gestion des deux manipulations choisies. Lors de cette lecture, le candidat doit penser à la séance qui sera détaillée au cours de l'exposé et choisir judicieusement la démonstration à présenter.

Partie orale : exposé et entretien

Pour certains candidats, le jury a apprécié :

- la place des élèves, dans leur diversité, au centre des préoccupations du candidat-enseignant,
- la posture d'enseignant notamment dans la réactivité, la qualité d'écoute et le registre de langage,
- les capacités d'analyse réflexive et de questionnement de la pratique professionnelle,
- une cohérence entre les objectifs annoncés et le contenu de la séance,
- une présentation intégrant des éléments concrets répondant aux objectifs pédagogiques et didactiques de la séance,
- une contextualisation ancrée dans le réel et les questions de société,
- la solidité des connaissances scientifiques et technologiques dans les domaines du sujet,
- la prise de conscience des enjeux du développement professionnel.

Des difficultés demeurent cependant.

L'exposé n'est pas une exploitation des résultats désolidarisée de la présentation de la séquence ni une déclaration d'intentions. Une prise de recul et des choix sont nécessaires afin de dégager un sens pédagogique et didactique aux activités présentées, même si cette présentation est partiellement aboutie. Le lien avec les objectifs de formation des programmes est attendu pour identifier les compétences travaillées chez les élèves. Ces compétences et l'évaluation de leur maîtrise ont rarement été traitées de manière convaincante.

Les concepts liés à la métrologie dans l'exploitation et l'expression des résultats sont parfois peu maîtrisés.

La transposition de procédures opératoires en séquence et séance détaillée n'est pas simple. Aussi, le candidat doit se préparer à cet exercice, de façon à mettre en avant les nombreuses compétences professionnelles qu'il a acquises durant sa pratique d'enseignant. Cela ne signifie aucunement d'énoncer une sémantique pédagogique riche, mais surtout d'en maîtriser les intentions pédagogiques plus que les appellations, et surtout de les ancrer dans la séance proposée.

Même si cela est attendu, les candidats qui ont passé plus de la moitié de la présentation à rendre compte de leurs résultats expérimentaux, ne se sont pas suffisamment positionnés en tant qu'enseignant. La capacité à exploiter les résultats doit être intégrée dans l'une des étapes de la séance détaillée.

Peu de candidats ont proposé une séance relevant du programme de ST2S, alors que procédures opératoires proposées le permettaient.

L'insuffisance de préparation de certains candidats à ce type de concours ou la mauvaise gestion du stress font courir un risque d'abandon en cours d'épreuve.

Le jury conseille aux candidats :

- d'être attentifs à la posture adoptée qui doit être celle d'un enseignant,
- de s'approprier les programmes et référentiels des enseignements technologiques du domaine des biotechnologies génie biologique et d'en maîtriser les concepts et savoir-faire,
- d'intégrer les spécificités de l'enseignement technologique dans la démarche didactique présentée,
- d'être en capacité de montrer une certaine prise de recul ou analyse réflexive sur des éléments avancés pour donner du sens aux choix pédagogiques et didactiques,
- de maîtriser les démarches associées aux enseignements technologiques, notamment la démarche d'analyses de risques, l'exploitation et la validation de résultats conformément aux règles de métrologie,
- de relire les anciens sujets et rapports de jury pour optimiser la préparation à ce concours.

CONCLUSION GENERALE

La session 2021 du CAPET/CAER interne a permis de pourvoir tous les postes ouverts, et ce dans les deux concours, CAPET et CAER.

L'ensemble du jury tient à féliciter les lauréats. Leur succès au concours de recrutement d'enseignants conduit, dès la rentrée scolaire, à leur nomination en qualité de stagiaire.

Pour l'épreuve d'admissibilité, la plupart des dossiers de RAEP respectait la définition d'épreuve, notamment en termes de forme. Le jury a apprécié les dossiers de RAEP dont la structuration et les contenus personnalisés mettent en valeur les compétences professionnelles développées au cours des années d'exercice des candidats.

Lors de cette session, les candidats ont été accueillis la veille de l'épreuve d'admission par le président, la vice-présidente et la secrétaire générale. L'objectif était de préciser aux candidats, les caractéristiques de l'épreuve, son organisation dans le temps, la configuration des locaux mobilisés pendant l'épreuve.

Les candidats admis ont révélé des compétences attendues de la part d'un enseignant : analyse et exploitation efficace des documents, maîtrise des techniques de laboratoire, présentation synthétique, rigoureuse et convaincante des argumentations, maîtrise des contenus, analyse réflexive et enfin qualités d'écoute et de communication.

Ce concours n'est pas exclusivement réservé aux candidats ayant une expérience d'enseignement en biochimie génie biologique, Cependant, pour les candidats dans cette situation, il est indispensable qu'ils aient pris connaissance de la diversité des enseignements et niveaux de formation auxquels ils peuvent être confrontés en adéquation avec la définition des épreuves.

La diversité des parcours des lauréats montre que ce concours est accessible à des candidats qui savent mettre en valeur leurs acquis et qui ont su élargir leur champ de compétences pour répondre aux différentes dimensions, technologique, pédagogique et didactique attendues.

Pour répondre aux objectifs de l'épreuve d'admission, le candidat doit avoir une réelle maîtrise des notions fondamentales caractéristiques du champ disciplinaire visé par le concours du CAPET CAER de biotechnologies, option biochimie génie biologique. Les supports documentaires de l'épreuve d'admission peuvent aussi bien s'adosser aux programmes des sections technologiques préparant aux baccalauréats scientifiques et technologiques, qu'aux référentiels des sections de technicien supérieur de la filière.

L'expérience d'enseignement se doit d'être doublée d'une préparation sérieuse et rigoureuse pour conduire les candidats à la réussite. Les observations des jurys figurant dans ce rapport ainsi que les rapports précédents, ont vocation à guider les candidats en ce sens.

Le jury tient à remercier, monsieur le Proviseur, madame la directrice déléguée aux enseignements technologiques et l'ensemble des personnels du lycée de la Vallée de Chevreuse de Gif sur Yvette pour l'accueil et l'aide efficace apportés afin que ce concours se déroule dans de bonnes conditions.

CAPET INTERNE

ET CAER

Section : BIOTECHNOLOGIES
Option : BIOCHIMIE – GENIE BIOLOGIQUE

Épreuve pratique d'admission :
Leçon portant sur les programmes des lycées
et des classes post-baccalauréat

Durée : 6 heures

Coefficient : 2

Travaux pratiques : 4 heures
Préparation de l'exposé : 1 heure
Exposé : 30 minutes
Entretien : 30 minutes

Le 20 avril 2021

Le sujet comporte 19 pages.

Le candidat doit s'assurer de disposer d'un exemplaire complet dès le début de l'épreuve.

Extrait de la définition de l'épreuve : NOR : MENH1310121A

« Épreuve pratique d'admission

L'épreuve a pour but d'évaluer, dans l'option choisie, l'aptitude du candidat à concevoir et organiser une séquence de formation, pour un objectif pédagogique imposé et un niveau de classe donné. La séquence de formation s'inscrit dans les programmes de lycée ou de classes post-baccalauréat du lycée dans la discipline considérée.

L'épreuve prend appui sur les investigations et les analyses effectuées au préalable par le candidat au cours de travaux pratiques, mettant en œuvre un ou plusieurs protocoles et comporte un exposé suivi d'un entretien avec les membres du jury.

Au cours de sa présentation orale, le candidat est amené :

- à expliciter sa démarche méthodologique,*
- à mettre en évidence les informations, données et résultats, issus des investigations conduites durant les travaux pratiques, qui lui ont permis de construire sa séquence de formation,*
- à décrire la séquence de formation qu'il a élaborée,*
- à présenter de manière détaillée une des séances de formation constitutives de la séquence.*

Le contexte associé à la séance construite est choisi, soit en faisant référence à une ou plusieurs des fiches documentaires d'aide à la contextualisation, soit sans prendre appui sur ces fiches.

Le sujet propose 6 procédures opératoires, dont 3 longues et 3 courtes. Le candidat doit mettre en œuvre l'une des procédures opératoires courtes et l'une des procédures opératoires longues. Ces réalisations pratiques sont exploitées, en tout ou partie, dans la séance présentée à l'oral.

Au cours de l'entretien avec le jury, le candidat est conduit à préciser plus particulièrement certains points de sa présentation, ainsi qu'à expliquer et justifier les choix de nature didactique et pédagogique, opérés pour la construction de la séquence de formation présentée.

Table des matières

DOCUMENTS D'AIDE À LA CONTEXTUALISATION.....	14
Fiche documentaire 1 : caractéristiques de l'enzyme β -galactosidase (EC 3.2.1.23)	14
Fiche documentaire 2 : utilisation de l'enzyme β -galactosidase pour transformer le lactose du lait et du lactosérum (petit lait).....	16
Fiche documentaire 3 : β -galactosidase et intolérance au lactose	17
Fiche documentaire 4 : sélection de la souche bactérienne productrice et clonage du Gène de la β -galactosidase.....	18
Fiche documentaire 5 : expression du gène la β -galactosidase lac-LM et du gène des sous-unités L et M chez <i>E. coli</i>	19
Fiche documentaire 6 : étude de la stabilité thermique des sous-unités de l'enzyme β -galactosidase de <i>L. kefiranofaciens</i>	20
Fiche documentaire 7 : détermination des paramètres de purification d'une enzyme	21
PROCÉDURES OPÉRATOIRES « COURTES »	23
Procédure opératoire 1 (courte) : double digestion enzymatique du vecteur de clonage pUC18 ...	23
Procédure opératoire 2 (courte) : Étude du caractère « lactose » de souches bactériennes	25
Procédure opératoire 3 (courte) : Réalisation de la coloration de gram de deux souches bactériennes	27
PROCÉDURES OPÉRATOIRES « LONGUES »	28
Procédure opératoire 4 (longue) : détermination de la concentration d'activité catalytique « β -galactosidase ».....	28
Procédure opératoire 5 (longue) : Dosage des protéines par Folin-Lowry	29
Procédure opératoire 6 (longue) : croissance d'une souche microbienne	30
AIDE-MÉMOIRE DE MÉTROLOGIE	31
FICHES ET DOCUMENTS TECHNIQUES	32
Ressources sur support numérique	32
Extraits de fiches de données de sécurité concernant le risque chimique (FDS) Erreur ! Signet non défini.	

DOCUMENTS D'AIDE À LA CONTEXTUALISATION

Fiche documentaire 1 : caractéristiques de l'enzyme β -galactosidase (EC 3.2.1.23)

La β -galactosidase, parfois abrégée « bêta-gal » ou « β -gal », est une enzyme dont le rôle est d'hydrolyser des β -galactosides pour produire du galactose et une molécule portant une fonction alcool (ex : le glucose).

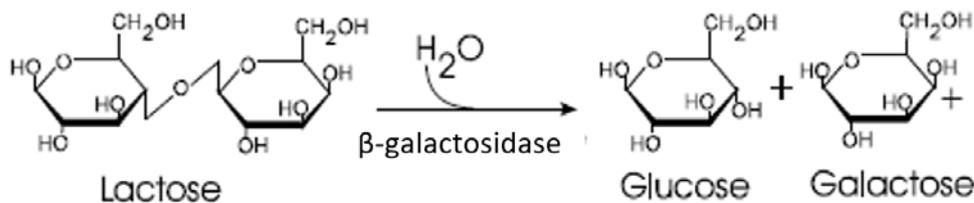
• Structure enzymatique de la β -galactosidase

La β -galactosidase, est largement répandue parmi les bactéries, les animaux et les plantes. Par exemple :

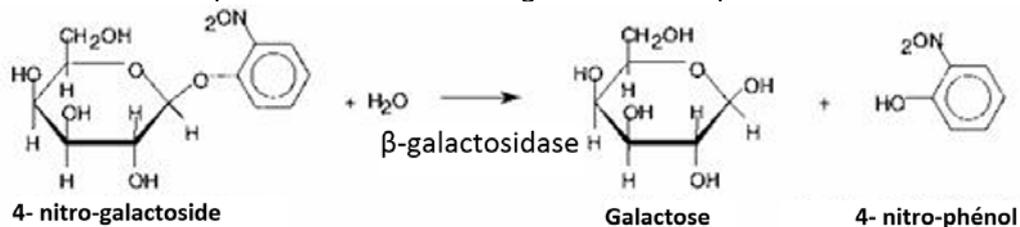
- chez l'Homme, sa structure est homodimérique, chaque sous-unité comportant 677 acides aminés.
- chez la bactérie *L. kefiranofaciens*, l'enzyme est hétérodimérique : la sous-unité LacM contient 320 acides aminés et la sous-unité LacL contient 628 acides aminés.

• Réaction enzymatique catalysée par la β -galactosidase et différents substrats

- La β -galactosidase catalyse, de façon naturelle, la réaction d'hydrolyse du lactose :



- Les substrats synthétiques, le 4-nitro galactoside, et le 2-nitro galactoside (= **ONPG**), sont utilisés pour suivre la réaction d'hydrolyse par la β -galactosidase, grâce à l'apparition d'un produit coloré jaune. Le 4-nitro phénol absorbe à la longueur d'onde optimale de 420 nm.



- Un autre substrat synthétique, le XGal, ou 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-B-D-galactoside, est hydrolysé par la β -galactosidase, pour donner un produit bleu, le 5, 5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo, qui absorbe à 615 nm.

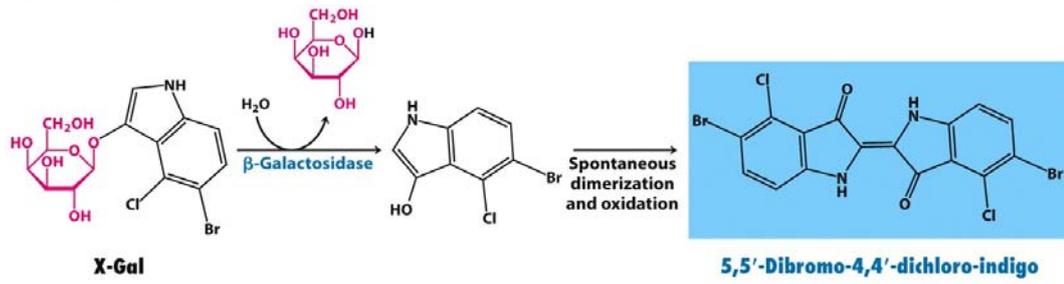


Figure 31.5
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Fiche documentaire 2 : utilisation de l'enzyme β -galactosidase pour transformer le lactose du lait et du lactosérum (petit lait)

<http://britta.cbb-developpement.com/fiches-juin-2012/15004.htm>

Comment réduire fortement la teneur en lactose des produits laitiers ? C'est l'objet d'une synthèse bibliographique proposée par des scientifiques de la coopérative finlandaise Valio.

La fabrication de lait et de produits laitiers appauvris ou exempts de lactose est, pour les scientifiques de la coopérative finlandaise Valio, une opportunité de gagner de nouveaux marchés. Selon les Finlandais, de tels produits permettraient de toucher de nouveaux consommateurs intolérants au lactose à la fois en Europe et dans des pays fortement concernés par sa « maldigestion » en Asie ou en Afrique. C'est la raison pour laquelle ils dressent, dans la revue *International Dairy Journal*, un état des lieux des voies technologiques adaptées à la fabrication de tels produits.

La mise en œuvre d'une lactase (EC 3.2.1.23) sous forme libre a été proposée dès les années soixante-dix, lorsque les premières bêta-galactosidases d'origine microbienne ont été mises sur le marché. Il s'agit classiquement d'enzymes issues de *Kluyveromyces lactis* ou de *K. fragilis*. De nombreuses autres enzymes ont également été proposées.

Pour limiter les développements microbiens intempestifs, les laits de consommation sont préférentiellement soumis à l'hydrolyse du lactose par la lactase, une douzaine d'heures à basse température. Une alternative pour les laits UHT consiste à injecter l'enzyme après le traitement thermique, sous forme d'une solution stérilisée par filtration. La lactase agissant alors sur une longue durée à température ambiante, la dose d'enzyme peut être réduite d'un facteur 100. [...]

Des techniques plus économiques peuvent être envisagées comme une hydrolyse chimique ou l'immobilisation de la bêta-galactosidase. La première option suppose une mise en œuvre dans un milieu exempt de protéines, comme de l'ultrafiltrat de lait ou de lactosérum. Il s'agit en effet d'une hydrolyse du lactose, à pH 1-1,5 et à haute température (100-150°C). La décoloration et la déminéralisation nécessaires du produit, ainsi que les conditions très corrosives du traitement sont des freins importants à l'utilisation industrielle de ce procédé.

Le développement de bioréacteurs enzymatiques à membranes a fait l'objet de travaux importants dans les années 2000. Les bons résultats techniques ne se sont cependant pas concrétisés en raison de l'abaissement du prix des enzymes. C'est également le cas pour les enzymes immobilisées ou, plus récemment proposées, la perméabilisation et l'immobilisation de cellules microbiennes possédant une bêta-galactosidase.

L'hydrolyse du lactose renforçant la saveur sucrée du produit, il peut être nécessaire de compléter le traitement enzymatique à l'aide de techniques séparatives telles que les techniques à membranes. La mise en œuvre de la diafiltration ou de l'ultrafiltration et de la nanofiltration en cascade permet d'appauvrir le lait en glucides.

Fiche documentaire 3 : β -galactosidase et intolérance au lactose

D'après

- le site ACCES (Actualisation Continue des Connaissances des Enseignants en Sciences)
<http://aces.ens-lyon.fr/evolution/evolution/mecanismes-de-levolution/comprendre/la-persistence-de-la-tolerance-au-lactose-chez-lhomme-adulte/la-tolerance-au-lactose-dans-les-societes-agropastorales/>
- l'article de wikipedia
https://fr.wikipedia.org/wiki/Intol%C3%A9rance_au_lactose

Le lactose est un dioside (galactose et glucose, reliés par une liaison béta 1-4) présent dans le lait. Une masse de 100 g de lait contient 4 à 5 g de lactose.

Le lactose est le principal nutriment énergétique des nourrissons. Il doit être hydrolysé par la lactase intestinale (ou béta galactosidase), qui est une enzyme ancrée dans la bordure en brosse des entérocytes. Le gène codant pour la lactase est exprimé chez le bébé. Son expression décline avec l'âge et les adultes ne l'expriment pratiquement plus. L'adulte devient donc intolérant au lactose.

La plupart des adultes tolèrent le lactose jusqu'à 7 g/jour. Cependant une consommation plus importante peut conduire à des problèmes digestifs gênants. Dans cette situation, le lactose est digéré par les bactéries intestinales qui produisent des gaz (H_2 et CO_2) provoquant ballonnements et borborygmes (gargouillements). Ces symptômes sont plus ou moins intenses suivant les individus. Chez certains adultes, la lactase peut garder une activité élevée, leur conférant la capacité de digérer le lactose : ce sont des individus tolérants au lactose.

Pour éviter ces symptômes, dus à l'intolérance au lactose il est conseillé de diminuer la consommation de laitages non fermentés. En règle générale, les yaourts et laits fermentés avec *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et *Lactobacillus acidophilus*, sont mieux tolérés, car le lactose y est déjà partiellement hydrolysé par les bactéries. Il en est de même pour les fromages, en particulier à pâte dure, car ils contiennent très peu de lactose.

L'intolérance au lactose peut découler d'une maladie cœliaque ou d'une gastro-entérite, en lien avec la destruction des villosités intestinales. Ce type d'intolérance temporaire peut également être causée par d'autres affections virales. Dans ces cas, elle peut durer parfois plusieurs semaines et ne s'estomper qu'une fois la muqueuse intestinale régénérée.

Répartition de l'intolérance au lactose dans le monde aujourd'hui

La baisse de la production de lactase est plus marquée dans les pays d'Asie de l'Est et d'Afrique, où la consommation de lait chez l'adulte est traditionnellement faible.

Pourcentages d'adultes intolérants au lactose dans les populations actuelles

Asiatiques 90 %	Hispaniques 53 %
Africains 80 %	Caucasiens 15 %
Autochtones d'Amérique 62-100 %	France : Nord 20 % ; Sud 50 %

Extrait de l'article « Cloning, Purification, and Characterization of a Heterodimeric β -galactosidase from *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 » Xi He^{1,2}, Ning Han², and Yan-Ping Wang¹

Lactobacillus kefiranofaciens ZW3 was obtained from kefir grains, which have high lactose hydrolytic activity. In this study, an heterodimeric LacLM-type β -galactosidase gene (*lacLM*) from ZW3 was isolated, which was composed of two overlapping genes*, *lacL* (1,884 bp) and *lacM* (960 bp) encoding large and small subunits with calculated molecular masses of 73,620 and 35,682 Da, respectively. LacLM, LacL, and LacM were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and these recombinant proteins were purified and characterized. [...]

*overlapping genes = gènes chevauchants

Materials and Methods

Bacterial Strains and Plasmid

L. kefiranofaciens ZW3 was obtained from kefir grains and identified by the China General Microbiological Culture Collection (CGMCC, Beijing, China). *E. coli* DH5 α strain was used for DNA manipulations and amplification. *E. coli* BL21(DE3) was used as the host for the recombinant plasmid harboring pET-30a (+) (Novagen, USA) and for protein expression. Recombinant DNA techniques, including plasmid extraction, restriction endonuclease digestion, and DNA ligation, were performed using standard methods.

Isolation of *lacLM* and Subunit Genes

The *L. kefiranofaciens* ZW3 strain was grown at 37 °C for 3 days in MRS broth containing peptone 10 g/l, dipotassium hydrogen phosphate 2 g/l, meat extract 8 g/l, diammonium hydrogen citrate 2 g/l, yeast extract 4 g/l, sodium acetate 5 g/l, magnesium sulfate 0.2 g/l, Tween-80 1 g/l, and manganese sulfate 0.04 g/l. Then, the genomic DNA was extracted from *L. kefiranofaciens* ZW3 using a Bacterial Gen DNA kit. Based on the sequence of *lacLM* in GenBank (GI: 333957179, 333957180), specific primers were designed and synthesized (Table 1). These genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the genomic DNA. The PCR conditions were as follows : a hot start at 94 °C for 5 min, 35 repeated cycles of 94 °C for 30 sec, 62 °C for 30 sec, and 72 °C for 2-3 min, followed by one cycle of 72 °C for 10 min. The PCR products were purified from agarose gels. The purified DNA fragments were ligated to pEASY-Blunt (Transgen Biotech. Co., China) and the plasmids were transformed into *E. coli* DH5 α cells. The resulting recombinant plasmids were isolated from a positive clone and sequenced.

Table 1. Primers used in this study.

Primer	Sequence (5'→ 3')
<i>lacL</i> F	<u>GGATCC</u> ATGCAAGCAAATATTTAAATGG
<i>lacL</i> R	CTCGAGTTATTTGTGTAATCCATAATAGT
<i>lacM</i> F	<u>GGATCC</u> ATGGATTACACAAATAAGCAATT
<i>lacM</i> R	CTCGAGTTAAACTGGTTTAAGATGAAGG

F denotes forward primers, R denotes reverse primers; forward primers carry the BamHI site (underlined), reverse primers carry the XhoI site (underlined).

Extrait de l'article « Cloning, Purification, and Characterization of a Heterodimeric β -galactosidase from *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 » Xi He^{1,2}, Ning Han², and Yan-Ping Wang¹

Expression of *lacLM* and Subunit Genes in *E. coli*

The genes were excised from the pEASY-Blunt recombinant plasmids using one pair of restriction enzymes, BamHI and XhoI, and ligated with the pET-30a(+) vector, which was digested with the same pair of restriction enzymes. The ligation of the DNA insert was conducted overnight at 16 °C using T4 DNA ligase. *E. coli* BL21(DE3) cells were transformed with the ligation mixture and plated on Luria–Bertani (LB) agar containing kanamycin (50 μ g/ml). Positive colonies were screened by direct colony PCR using vector-specific primers (T7 promoter and T7 terminator primers). *E. coli* BL21(DE3) cells, transformed with the recombinant plasmid pET-30a, were grown in LB medium containing 50 μ g/ml kanamycin on a rotary shaker at 200 rpm at 37 °C. When the absorbance at 600 nm reached 0.6, 0.1 mM IPTG was added to the culture medium, and the cultures were incubated further at 25 °C for 12 h.

Results and Discussion

Gene Cloning and Sequence Analysis

Three genes designated *lacLM*, *lacL*, and *lacM* were cloned from *L. kefiranofaciens* ZW3, which encode a putative heterodimeric LacLM-type β -galactosidase and its large and small subunits, respectively. *lacLM* (2,833 bp) encodes a protein of 948 amino acids with a calculated molecular mass of 110 kDa and is composed of two overlapping genes, *lacL* (1,884 bp) and *lacM* (960 bp), that encode large and small subunits with calculated molecular masses of 73,620 and 35,682 Da, respectively. Moreover, the *lacM* gene is found downstream of *lacL*, and the two genes overlap for 17 bp (Fig. 1).

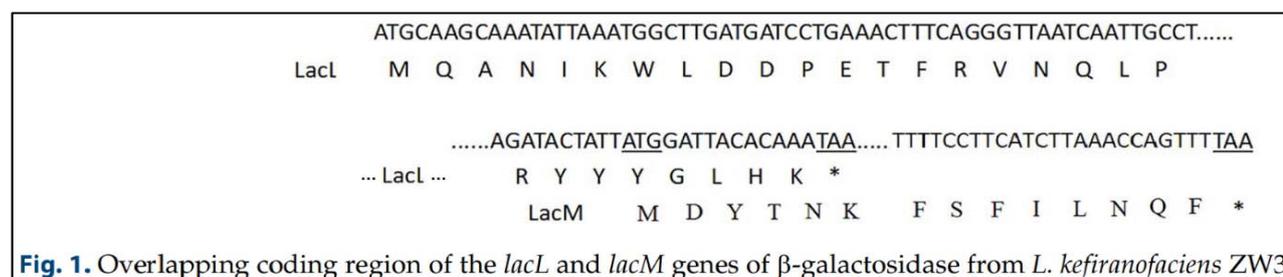
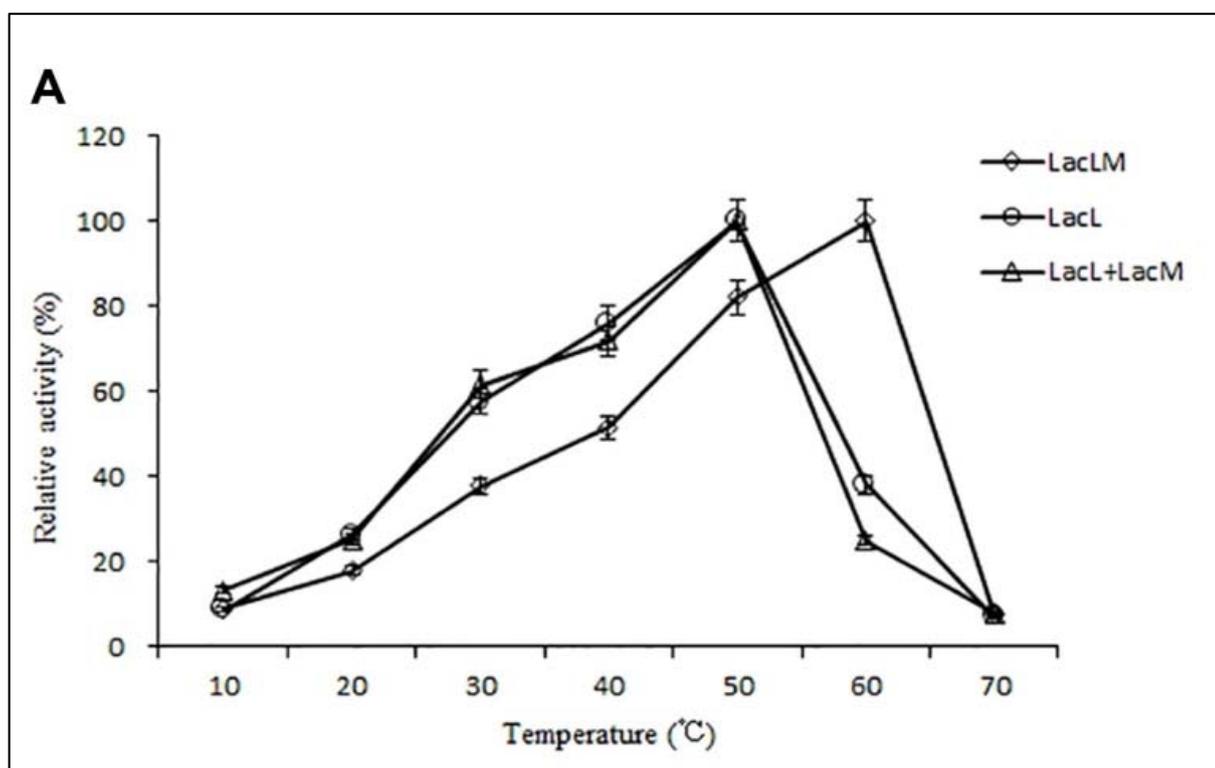


Fig. 1. Overlapping coding region of the *lacL* and *lacM* genes of β -galactosidase from *L. kefiranofaciens* ZW3.

Extrait de l'article « Cloning, Purification, and Characterization of a Heterodimeric β -galactosidase from *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 » Xi He^{1,2}, Ning Han², and Yan-Ping Wang¹

La sous unité LacL de la β -galactosidase est active même en absence de la sous-unité LacM, mais devient plus sensible à la température lorsqu'elle est isolée. La sous-unité LacM ne présente pas d'activité β -galactosidase.

L'activité catalytique de LacL est déterminée, par une méthode en deux points, en présence de substrat oPNG, solubilisé en tampon phosphate de sodium à pH 7. La réaction est menée à différentes températures comprises entre 10 et 70 °C. Elle est arrêtée au bout de 15 minutes en présence de carbonate de sodium (Na_2CO_3). Le document ci-dessous présente les résultats obtenus.



LacLM : enzyme complète directement formée dans la cellule productrice

LacL+ LacM : solution enzymatique contenant LacM et LacL purifiées séparément puis mélangées.

Étapes de purification d'une enzyme et suivi

L'obtention d'une solution enzymatique de pureté satisfaisante, produite à partir de cellules eucaryotes ou procaryotes, nécessite une première étape d'extraction, par lyse des cellules productrices, pour aboutir à l'**extrait brut**. Puis l'extrait brut est soumis à plusieurs étapes de purification, consistant à éliminer un maximum de contaminants, pour la plupart protéiques, tout en préservant l'intégrité fonctionnelle des molécules d'enzyme.

L'efficacité des étapes de la purification est estimée, en analysant les fractions enzymatiques récupérées à chaque étape d'extraction et de purification, par le calcul de différentes grandeurs :

- le **rendement** de purification permet d'estimer le pourcentage d'activité enzymatique conservée au fur et à mesure des étapes,
- l'**activité spécifique** permet d'estimer la pureté des fractions enzymatiques en se référant aux contaminants protéiques,
- le **facteur de purification** ou enrichissement, est un rapport d'activités spécifiques entre deux étapes de purification, donc il mesure l'évolution de la pureté de la solution enzymatique au cours de la purification.

Analyse des étapes de purification d'une enzyme à partir de l'exemple de la β -galactosidase

- Détermination de la **concentration d'activité catalytique** de la fraction enzymatique notée $b_{(beta\ gal ; sol\ fraction)}$ à l'aide d'une solution enzymatique étalon

La variation d'absorbance par unité de temps, notée $\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_i$, est déterminée à partir de la variation d'absorbance ΔA pendant une durée de réaction Δt , mesurée en période initiale.

Le rapport $\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_i$ est proportionnel à la concentration d'activité catalytique, notée $b_{(nom\ enzyme ; nom\ solution\ enzymatique)}$. Il est donc possible de déterminer la concentration d'activité catalytique d'une solution de β -galactosidase de manière relative, c'est-à-dire en référence à une solution étalon de β -galactosidase, de concentration d'activité catalytique connue exactement:

$$b_{(beta\ gal ; sol\ enz\ à\ doser)} = \frac{b_{(beta\ gal ; sol\ enz\ étalon)} \times \left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{i ; sol\ enz\ à\ doser}}{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{i ; sol\ enz\ étalon}}$$

- Détermination de la **activité catalytique totale** (notée z) pour la fraction enzymatique, récupérée à chaque étape de purification

$$z_{(beta\ gal ; V_{total\ fraction\ enzymatique})} = b_{(beta\ gal ; fraction\ enzymatique)} \times V_{total\ fraction\ enzymatique}$$

$$[U] = [U \cdot mL^{-1} \times mL]$$

- Détermination du rendement de purification entre les étapes 1 et n de purification :

Cette grandeur évalue la quantité d'enzyme conservée entre deux étapes

$$\text{Rendement entre étapes 1 et n} = \frac{Z(\text{beta gal}; V_{\text{total fraction enzymatique n}})}{Z(\text{beta gal}; V_{\text{total fraction enzymatique 1}})} \quad (\text{\`a exprimer en \%})$$

- Détermination de l'activité spécifique pour chaque fraction enzymatique :

Cette grandeur évalue le degré de pureté de la fraction enzymatique, en référence aux contaminants protéiques

$$Z_{sp}(\text{beta gal}; \text{fraction enzymatique 1}) = \frac{Z(\text{beta gal}; V_{\text{total fraction enzymatique 1}})}{m(\text{protéines}; V_{\text{total fraction enzymatique 1}})}$$

$$[U \cdot \text{mg}^{-1}] = \left[\frac{U}{\text{mg}} \right]$$

Avec $m(\text{protéines}; V_{\text{total fraction enzymatique 1}}) = \rho(\text{protéines}; \text{fraction enzymatique 1}) \times V_{\text{total fraction enzymatique 1}}$

- Détermination du facteur de purification entre les étapes 1 et n de purification :

$$\text{facteur purification entre étapes 1 et n} = \frac{Z_{sp}(\text{beta gal}; \text{fraction enzymatique n})}{Z_{sp}(\text{beta gal}; \text{fraction enzymatique 1})}$$

Exemple de tableau de suivi de purification de la Beta-galactosidase (selon Andy P. Chand, Taylor J. Clarke, and Jaymie E. Oentoro)

Purification step	En- zyme activity con- centra- tion (U/mL)	Protein con- centration (mg/mL)	Total Vo- lume (mL)	Yield (U)	Pro- tein total mass (mg)	Speci- fic acti- vity (U/mg)	Per- cent Yield (%)	Purification factor
Lysate	0,268	2,07	9,0	2,4	18,7	0,129	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipi- tation pellet	1,91	2,58	1,0	1,91	2,58	0,740	79,1	5,72
Size chromat- ography	0,619	0,787	3,0	1,86	2,36	0,787	76,9	6,08
Ion chromat- ography	0,00144	-	28,0	0,0403	-	-	1,67	-

« Yield » correspond à l'activité totale exprimée en U

PROCÉDURES OPÉRATOIRES « COURTES »

Procédure opératoire 1 (courte) : double digestion enzymatique du vecteur de clonage puc18

D'après le site le site : www.thermoscientific.com/doubledigest

Matériels spécifiques et réactifs

Solutions en microtubes :

- Solution d'ADN plasmidique pUC18 (2686 pb) à $0,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ notée **pUC**
- Solution d'enzyme Eco RI FastDigest notée « **E** »
- Solution d'enzyme Bam HI FastDigest notée « **B** »
- Solution tampon FastDigest 10X notée « **T** »
- Eau qualité BM notée « **Eau BM** »
- Solution de dépôt 6X pour électrophorèse notée « **D 6X** »

Matériel

- Bain thermostaté réglé à 37°C
- Microtubes,
- Pipettes à piston p10 et p20 et cônes adaptés
- Gel d'agarose à 1 % (m/V) déjà prêt dans un dispositif pour électrophorèse

Procédure opératoire

Toutes les étapes de restriction enzymatique sont effectuées, en maintenant l'ensemble des tubes dans la glace.

Digestion enzymatique

Dans un microtube de 200 μL déposer :

- 14 μL d'eau qualité BM
- 2 μL de tampon FastDigest 10X
- 2 μL de pUC18 à $0,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
- 1 μL d'EcoRI FastDigest
- 1 μL de BamHI FastDigest⁻¹

Homogénéiser.

Centrifuger quelques secondes.

Incuber à 37°C dans un bain thermostaté pendant 10 min.

Analyse de la restriction par électrophorèse en gel d'agarose

Dans un microtube de 200 μL , verser 4 μL de produit de digestion, 2 μL de solution de dépôt 6X et 6 μL d'eau qualité BM.

Déposer la totalité des 12 μL du mélange précédent dans un gel d'agarose à 1 % (m/V).

Un marqueur de taille « GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder » est déposé par un examinateur.

L'électrophorèse est déclenchée par un examinateur.

Exploitation des résultats

Exploiter les résultats d'électrophorèse obtenus.

Des résultats sont fournis, à la demande du candidat, si la manipulation est menée jusqu'au dépôt en gel d'électrophorèse.

Procédure opératoire 2 (courte) : Étude du caractère « lactose » de souches bactériennes

La recherche du caractère « lactose » (noté lac) d'une souche bactérienne peut être effectuée en utilisant un milieu, contenant du lactose et un indicateur de pH, par exemple, le milieu d'isolement lactosé au pourpre de Bromocrésol.

Le caractère « lactose » peut aussi être étudié en recherchant plus particulièrement, la β -galactosidase, par un test oNPG.

Matériels spécifiques et réactifs

- *E.coli* (classe 1) lac - sur gélose nutritive après 24 à 48 h à 37°C
- *E.coli* (classe 1) lac + sur gélose nutritive après 24 à 48 h à 37°C
- 2 géloses lactosées au pourpre de Bromocrésol en boîte de Petri
- 2 disques d'oNPG
- 1 pince
- 2 tubes d'eau distillée stérile de 2 mL
- 2 anses stériles (ou anse classique)
- 1 bain thermostaté réglé à 37 °C
- 1 étuve à 37 °C

Procédure opératoire

- Préparer, en eau distillée stérile, une suspension riche avec chaque souche bactérienne à tester.
- Réaliser les isollements sur gélose lactosée au pourpre de Bromocrésol en utilisant les suspensions bactériennes préparées, puis incuber dans une étuve à 37 °C.
- Déposer un disque d'oNPG dans chaque suspension et incuber au moins 2 à 3 h à 37 °C en bain thermostaté.

Des résultats des isollements peuvent être fournis, à la demande du candidat, si la manipulation est menée jusqu'à l'incubation.

Exploitation des résultats

Procéder à la lecture des résultats, selon la couleur du disque obtenue.

Procédure opératoire 3 (courte) : réalisation de la coloration de Gram de deux souches bactériennes

Matériels spécifiques et réactifs

- Microscope
- Lames
- 2 anses stériles (ou anse classique)
- Solution de Cristal violet (**voir données de sécurité**)
- Solution de Lugol (**voir données de sécurité**)
- Solution de Safranine (en remplacement de la Fuchsine) (**voir données de sécurité**)
- Ethanol (**Voir données de sécurité**)
- Huile à immersion
- Deux souches bactériennes :
 - *E coli* (lac+ ou lac -) aussi utilisables en procédure opératoire 2
 - *L kefiranofaciens* sur gélose MRS après 24 à 48 h à 37°C

Procédure opératoire

- Réaliser les deux frottis, sur une même lame, pour les deux souches bactériennes à analyser.
- Laisser sécher complètement la préparation.

- Recouvrir la lame d'alcool à 90° pendant 3 min.
- Rincez la lame délicatement à l'eau et l'égoutter.

- Immerger la lame dans la solution de cristal violet pendant environ 1minute.
- Égoutter la lame.

- Recouvrir la lame avec la solution de Lugol et laisser agir pendant environ 30 secondes.
- Égoutter la lame, la rincer délicatement à l'eau et l'égoutter à nouveau.

- Recouvrir la lame d'éthanol et laisser agir **exactement** 10 secondes.
- Rincez la lame délicatement à l'eau et l'égoutter.

- Immerger la lame dans la solution de Safranine, pendant environ 5 minutes.
- Égoutter la lame, la rincer délicatement à l'eau et l'égoutter à nouveau.

- Laisser la lame sécher à l'air. La lame doit être parfaitement sèche avant l'étape suivante.

- Observer à l'objectif x100, avec de l'huile à immersion.

PROCÉDURES OPÉRATOIRES « LONGUES »

Procédure opératoire 4 (longue) : Détermination de la concentration d'activité catalytique « β -galactosidase »

Matériels spécifiques et réactifs

- Solution de β -galactosidase **étalon** à $1,0 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ en tampon phosphate $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4 notée « **β G et** »
- Solutions d'enzyme β -galactosidase « **E1** » et « **E5** », récupérées respectivement après les étapes 1 et 5 d'une purification de β -galactosidase
Données : $b(\beta\text{-gal}; \text{E1}) \approx 0,3 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; $b(\beta\text{-gal}; \text{E5}) \approx 0,6 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; ces deux solutions **E1 et E5 sont également utilisables pour la procédure opératoire 5.**
- Solution de 4-nitro-galactoside à $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) en tampon phosphate pH 7,4 notée « **oNPG** »
- Tampon phosphate $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4 notée « **Tp pH** »
- Solution d'arrêt : Na_2CO_3 à $1,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + EDTA $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 12 notée « **Na_2CO_3** » (voir données de sécurité)
- Tubes coniques de 1,5 mL pour le déroulement des réactions enzymatiques
- Spectrophotomètre
- Centrifugeuse pour microtubes
- Microcuvettes de capacité 1,5 mL pour la lecture des absorbances

Préparation (en tubes coniques de 1,5 mL)

	Blanc	Solution Étalon	Solution E1		Solution E5	
			Essai E1-1	Essai E1-2	Essai E5-1	Essai E5-2
$V_{\text{solution 4-nitro-galactoside à } 1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}}$ (mL)	1	1	1	1	1	1
Incuber environ 3 min à 37 °C.						
$V_{\text{solution tampon phosphate pH 7,4}}$ (μL)	100	-	-	-	-	-
$V_{\text{solution étalon de } \beta\text{-galactosidase}}$ (μL)	-	100	-	-	-	-
$V_{\text{solution E1 à doser}}$ (μL)	-	-	100	100	-	-
$V_{\text{solution E5 à doser}}$ (μL)	-	-	-	-	100	100
<i>t (min) sur le chronomètre* lors de l'ajout 100 μL de l'enzyme ou du tampon</i>	0	1	3	4	5	6
Homogénéiser et incuber à 37 °C.						
$V_{\text{solution d'arrêt}}$ (μL)	400	400	400	400	400	400
<i>t (min) sur le chronomètre* lors de l'ajout de la solution d'arrêt</i>	12	13	15	16	17	18
Relever les absorbances à 420 nm contre le « blanc ».						

* Ces temps doivent être mesurés exactement au chronomètre.

Exploitation des résultats

Détermination de la concentration d'activité catalytique des solutions de β -galactosidase analysées

$$s_r = 0,015 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ et } u_c = 0,040 \text{ mL}$$

Procédure opératoire 5 (longue) : Dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry

Matériels spécifiques et réactifs

- Solutions d'enzyme β -galactosidase « **E1** » et « **E5** », récupérées respectivement après les étapes 1 et 5 d'une purification de β -galactosidase
 - Données : $\rho_{(\text{protéines ; E1})} \approx 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\rho_{(\text{protéines ; E5})} \approx 0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ces deux solutions **E1 et E2 sont également utilisables pour la procédure opératoire 4.**
- Solution contrôle de concentration à $0,500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ notée « **SAB Ct** »
- Solution de protéine étalon à $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ notée « **SAB ét** »
- Solution de Folin » (**voir données de sécurité**)
- Solution de Lowry en distributeur automatique réglé sur 1 mL » (**voir données de sécurité**)
- Tubes coniques de 1,5 mL
- Spectrophotomètre
- Microcuves de capacité 1,5 mL pour la lecture des absorbances

Préparation directement en cuves de 1,5 mL :

Cuves	0	1	2	3	4	5	Solution E1	Solution E2	Solution contrôle
$V_{\text{SAB ét à } 0,2 \text{ mg/mL}} (\mu\text{L})$	0	100	200	300	400	500	.	-	-
$V_{\text{solution à doser ou solution contrôle}}$	25 μL	60 μL	<i>V à calculer</i>
$V_{\text{eau distillée}} (\mu\text{L})$	500	400	300	200	100	0	475	440	<i>V à calculer</i>
$V_{\text{Lowry}} (\text{mL})$	1	1	1	1	1	1	1	1	1
$V_{\text{Folin}} (\mu\text{L})$	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Fermer les cuves de façon hermétique avec du papier Parafilm®.

Homogénéiser par retournements.

Laisser 30 min à l'obscurité.

Relever les absorbances à 700 nm.

La coloration est stable environ une heure.

Exploitation des résultats

Tracer la courbe d'étalonnage $A_{700 \text{ nm}} = f(\rho_{\text{protéines}})$.

Intervalle de d'acceptabilité pour la solution contrôle : $[0,475 ; 0,525] \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Procédure opératoire 6 (longue) : croissance d'une souche microbienne

Matériels spécifiques et réactifs

- 1 fiole d'Erlenmeyer avec 95 mL de LB (Luria Bertani) stérile (préchauffé à 37 °C)
- 1 pipette stérile de 5 mL, des pipettes stériles de 1 mL et un système d'aspiration
- 10 microcuves
- Papier Parafilm ®
- 1 tube de LB stérile (environ 10 mL)
- 1 tube de préculture d'*E.coli* (classe de risque 1) noté « **Ec** »
- 1 spectrophotomètre
- 1 bain thermostaté à agitation réglé à 37 °C

Procédure opératoire

- Ensemencer aseptiquement 95 mL de milieu LB à 5% (V/V) avec la préculture de la souche C'est le **temps zéro** de l'expérience. Mesurer immédiatement l'atténuation (D) à 600 nm.
- Incuber la culture à 37 °C sous agitation douce.
- Suivre la croissance, par mesure de l'atténuation à 600 nm toutes les 20 min pendant 1 h 30 à 2 h.

Données

- Les atténuances doivent être mesurées après avoir ajusté à zéro l'atténuation du spectrophotomètre avec une cuve contenant du milieu LB stérile.
- La limite de linéarité de la méthode est relevée pour *une* atténuation de 0,7.
- Les prélèvements doivent être interrompus dès l'obtention de la phase de ralentissement.
- Le temps de génération de *E.coli*, dans les conditions de cette croissance, est de 25 à 30 minutes.
- La grandeur D pour atténuation, est aussi appelée DO pour densité optique.

Exploitation des résultats

Tracer la courbe de croissance $\ln D_{600 \text{ nm}} = f(t)$.

AIDE-MÉMOIRE DE MÉTROLOGIE

On considère que les qualités de justesse et de fidélité des procédures de mesure utilisées ont été étudiées et reconnues.

1. Vérification de la bonne exécution de la procédure

Lorsqu'un mesurage est effectué, deux types de vérification sont possibles afin de pouvoir accepter les valeurs mesurées obtenues pour des échantillons inconnus.

On peut effectuer, dans la même série de mesurages :

- un essai sur un étalon de contrôle ; la valeur mesurée obtenue est notée y_{EC} .
- un ou deux essais sur chacun des échantillons à doser.

1.1 Vérification de l'exactitude de mesure à l'aide d'un étalon de contrôle

On dispose d'un étalon de contrôle avec sa valeur conventionnelle (y_{ref}) ainsi que ses limites d'acceptabilité (L_{inf} et L_{sup}). On recherche si la valeur mesurée (y_{EC}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit : $L_{inf} \leq y_{EC} \leq L_{sup}$

Si la valeur mesurée y_{EC} appartient à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée y_{EC} est **exacte**, donc **conforme** : l'exécution de la procédure de mesure est satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées obtenues pour les échantillons inconnus dans la même série sont **acceptées**.

Si la valeur mesurée y_{EC} n'appartient pas à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée n'est **pas exacte** donc **non conforme** : l'exécution de la procédure de mesure n'est pas satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées de toute la série **ne sont pas acceptées**; il faut rechercher l'origine de la mauvaise exactitude avant de recommencer la manipulation.

1.2 Vérification de la compatibilité métrologique dans le cas de deux essais effectués en répétabilité

Soient deux valeurs mesurées (y_1 et y_2) pour un même échantillon et l'écart-type de répétabilité (s_r) de la procédure de mesure correspondant à cet échantillon. Le logigramme de compatibilité à appliquer est le suivant :

Si les deux valeurs mesurées sont compatibles :
la valeur retenue est la moyenne.

Si les deux valeurs mesurées ne sont pas compatibles : il faut en rechercher la cause et recommencer la manipulation.

2 valeurs mesurées y_1 et y_2 s_r est l'écart-type de répétabilité

$|y_1 - y_2| \leq 2,8 s_r$

oui → 2 valeurs mesurées **compatibles** entre elles
Valeur retenue = $\frac{y_1 + y_2}{2}$

non → 2 valeurs mesurées **non compatibles** entre elles
Recommencer la manipulation

2. Guide pour l'expression du résultat de mesure

L'incertitude élargie (U) est directement donnée avec son niveau de confiance ou calculée en multipliant l'incertitude-type composée (u_c) par le facteur d'élargissement k , par exemple $k = 2$ pour un niveau de confiance de 95 %.

L'incertitude élargie 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.

La valeur retenue du résultat est arrondie de la façon suivante : 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 (analyte ; système) = (valeur retenue $\pm U$) unité

FICHES ET DOCUMENTS TECHNIQUES

Ressources sur support numérique

- **Fiches techniques de composition des milieux de culture**
 - Milieu LB -- Luria Bertani
 - Milieu BCP – Pourpre de Bromocrésol
 - Milieu MRS - Man Rogosa et Sharpe

- **Fiches techniques Thermofisher**
 - Thermofisher Fast-Digest restriction enzyme
 - Carte du vecteur pUC 18,
 - GeneRuler lkb DNA Ladder

- **Extraits de fiches de données de sécurité (FDS)**
 - **Na₂CO₃ à 1,5 mol.L⁻¹**
 - **oNPG (β-D-Galactopyranoside de 2-nitrophényle)**
 - **Réactif de Folin**
 - **Lugol**
 - **Safranine**
 - **Cristal violet**
 - **Ethanol**

- Logiciels : suite bureautique libre office

- Programmes du cycle terminal de STL biotechnologies :
 - Biotechnologie 1^{ère} STL,
 - Biochimie-Biologie 1^{ère} STL
 - Biochimie-Biologie-Biotechnologie Tle STL.

Site 3RB : site du réseau ressources risques biologiques