

SESSION 2024

**CAPET ET CAFEP**  
CONCOURS EXTERNE

Section  
**BIOTECHNOLOGIES**

Option  
**BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIQUE**

**Épreuve écrite disciplinaire appliquée**

*L'épreuve place le candidat en situation de produire une analyse critique de documents puis de construire une séquence pédagogique à partir d'un sujet donné par le jury.*

*Elle permet de vérifier l'aptitude du candidat, à partir d'un dossier documentaire scientifique et technique, à conduire une analyse et à proposer une séquence pédagogique en lien avec un cahier des charges donné spécifiant le cadre de mise en œuvre et qui pourra faire appel à une réflexion sur les enjeux éducatifs, économiques, éthiques, écologiques, sociétaux, etc.*

*La séquence pédagogique s'inscrit dans les programmes des enseignements technologiques du lycée d'enseignement général et technologique et, le cas échéant, dans les référentiels des sections de techniciens supérieurs.*

*Le sujet est spécifique à l'option choisie.*

**Durée : 5 heures**

Calculatrice autorisée selon les modalités de la circulaire du 17 juin 2021 publiée au BOEN du 29 juillet 2021.

L'utilisation du dictionnaire français-anglais est autorisée.

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout autre dictionnaire et de tout autre matériel électronique est rigoureusement interdit.

Il appartient au candidat de vérifier qu'il a reçu un sujet complet et correspondant à l'épreuve à laquelle il se présente.

Si vous repérez ce qui vous semble être une erreur d'énoncé, vous devez le signaler très lisiblement sur votre copie, en proposer la correction et poursuivre l'épreuve en conséquence. De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, vous devez la (ou les) mentionner explicitement.

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

**Le fait de rendre une copie blanche est éliminatoire.**

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

### INFORMATION AUX CANDIDATS

Vous trouverez ci-après les codes nécessaires vous permettant de compléter les rubriques figurant en en-tête de votre copie. Ces codes doivent être reportés sur chacune des copies que vous remettrez.

### **CAPET EXTERNE - BIOTECHNOLOGIES**

Option : BIOCHIMIE-GÉNIE BIOLOGIQUE

► Concours externe du CAPET de l'enseignement public :

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EDE	7100E	102	9312

► Concours externe du CAPET de l'enseignement privé :

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EDF	7100E	102	9312





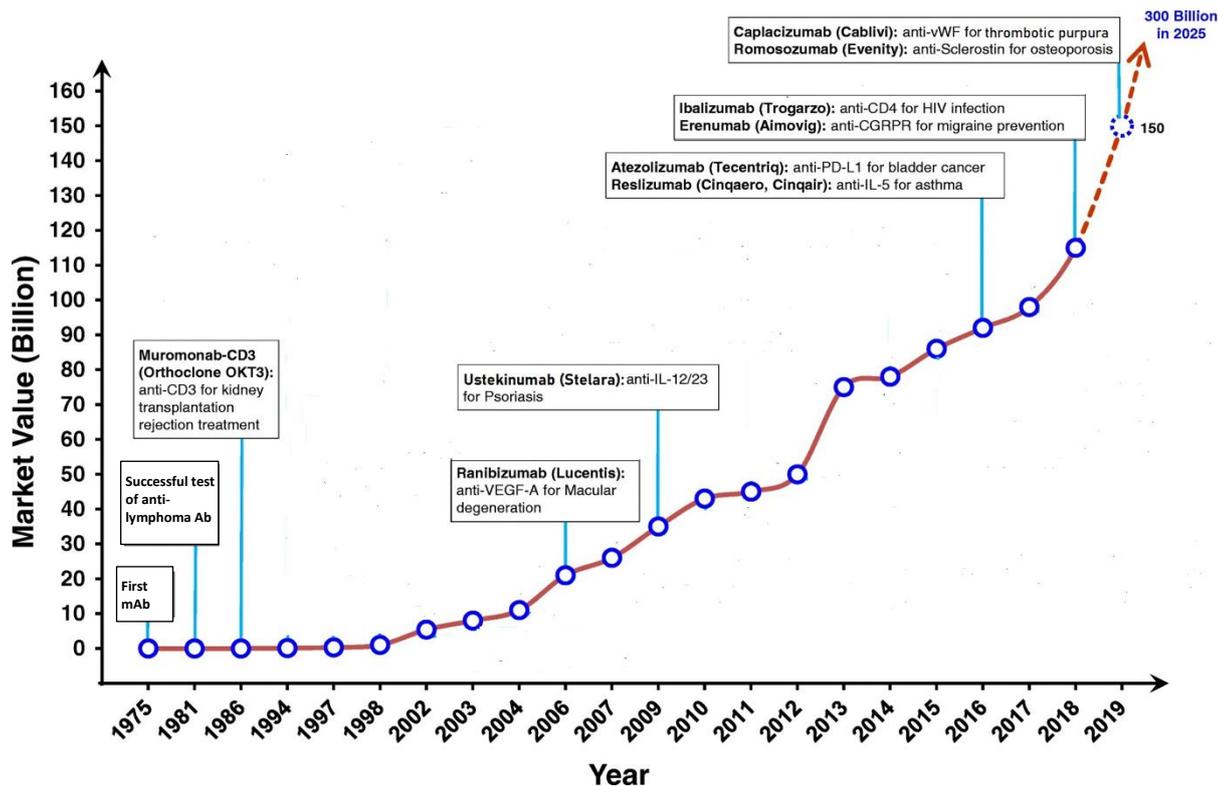
# LES ANTICORPS MONOCLONAUX, DES OUTILS BIOTECHNOLOGIQUES AUX MULTIPLES FACETTES

## De leur conception à leurs applications

En 1975, une publication de G. Köhler et C. Milstein dans *Nature* décrit pour la première fois une technique de production d'anticorps monoclonaux (AcM ou mAb pour monoclonal antibodies) qui a valu à ses deux auteurs le Prix Nobel de médecine en 1984. Les anticorps monoclonaux ont rapidement été utilisés en tant qu'outils de laboratoire aussi bien en diagnostic qu'en recherche. Depuis une vingtaine d'années, les progrès des biotechnologies ont permis d'élargir leurs applications au domaine médical : les anticorps monoclonaux sont maintenant utilisés comme vecteurs de thérapies ciblées. En 2018, J.P. Allison et T. Honjo ont obtenu le Prix Nobel de médecine pour la découverte d'une thérapie anticancéreuse par des anticorps monoclonaux. En 2022, la taille du marché mondial des anticorps monoclonaux était évaluée à 210 milliards de dollars US. Ce marché devrait afficher un taux de croissance annuel d'environ 11 % de 2023 à 2030, pour atteindre 480 milliards de dollars US (source : *Grand View Research, juin 2022*).

### Timeline from 1975 showing the successful development of therapeutic antibodies and their applications

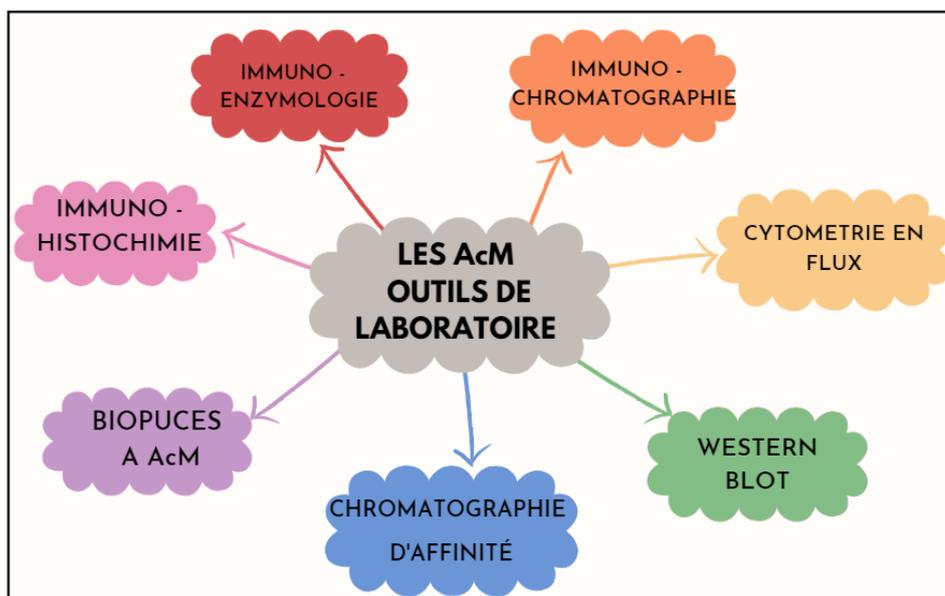
D'après l'article "Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases." Lu, RM., Hwang, YC., Liu, IJ. et al. *J Biomed Sci.* 2020 ; 27, 1.



## Première partie :

Vous explicitez le principe historique d'obtention des anticorps monoclonaux, puis vous discuterez des différents moyens de production et de purification des anticorps monoclonaux à grande échelle.

Vous présenterez ensuite, à l'aide de schémas légendés, deux méthodes parmi celles citées dans le schéma ci-après en vous appuyant pour chaque méthode sur un exemple d'application.



Enfin, vous montrerez l'apport de la biologie moléculaire dans la production d'anticorps monoclonaux devenus outils thérapeutiques prometteurs et socio-économiquement impactants, en précisant les limites de ces nouvelles voies thérapeutiques.

*Un développement structuré et argumenté s'appuyant sur les documents est attendu. Parmi les documents étudiés, vous ferez une analyse détaillée des documents 3, 4b et 7b.*

## Deuxième partie :

Dans le cadre des enseignements technologiques en STS Bioanalyses et contrôles, vous proposerez une séquence pédagogique ayant pour thématique les analyses en vue du contrôle qualité des anticorps monoclonaux aux étapes clé de la production.

Votre démarche didactique et pédagogique s'appuiera sur les extraits du référentiel du BTS présentés dans le document 10.

Vous proposerez une progression pédagogique sur quelques séances, en précisant les objectifs à atteindre, les activités technologiques à mettre en œuvre, en particulier au laboratoire, et les supports adaptés aux étudiants.

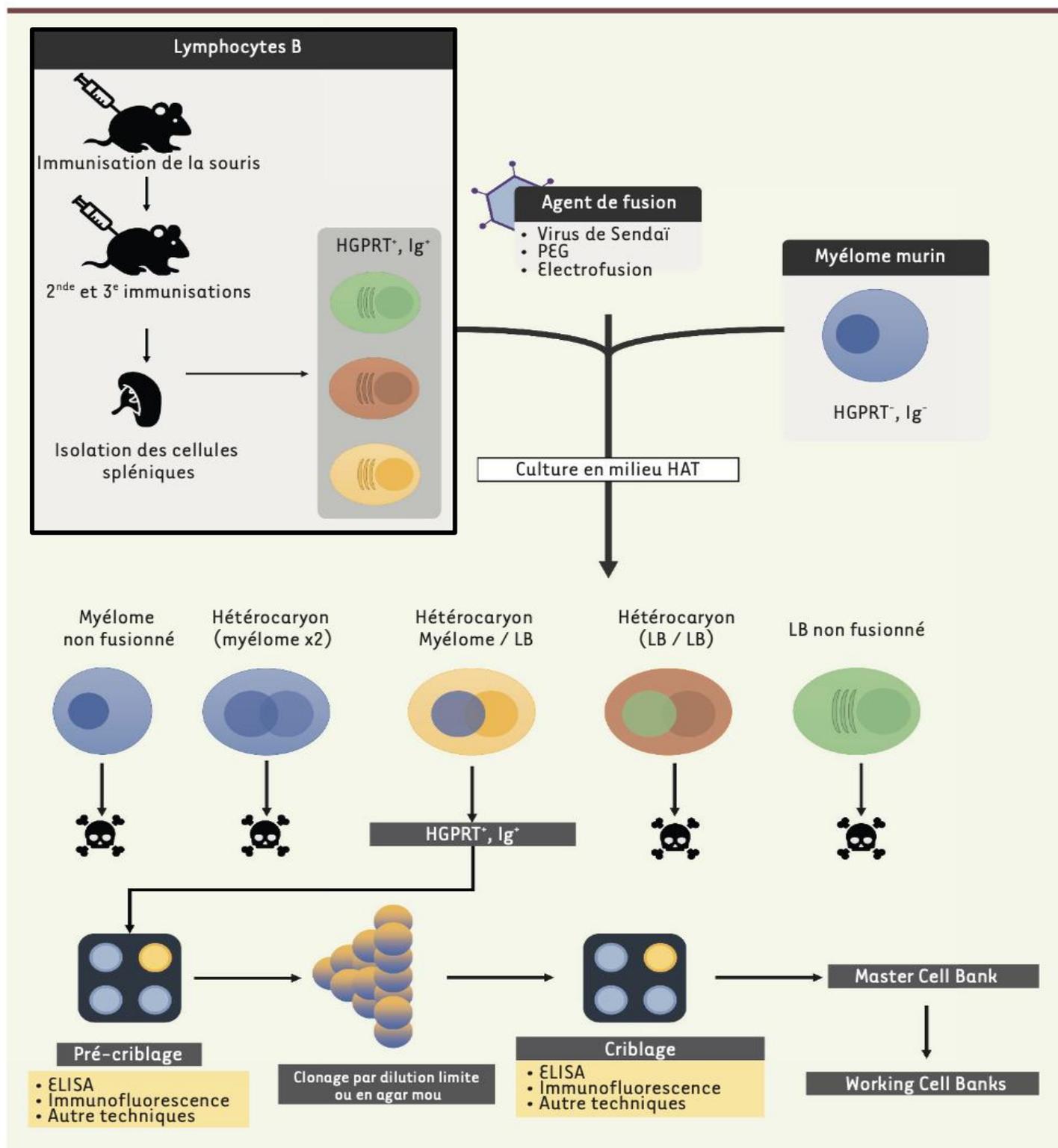
Vous décrirez les modalités d'organisation d'un travail de groupe en vue de la réalisation par les étudiants d'une synthèse de la séquence.

## SOMMAIRE DES DOCUMENTS

DOCUMENT 1 : Méthode de production historique des anticorps monoclonaux chez la Souris .....	4
DOCUMENT 2 : Évolution de l'ingénierie de production des anticorps monoclonaux.....	5
DOCUMENT 3 : Méthodes de production industrielle des anticorps monoclonaux en bioréacteurs .....	6
DOCUMENT 4 : Technique classique de purification des anticorps monoclonaux par chromatographies successives .....	6
4 a : Principe général.....	6
4 b : Zoom sur l'étape de chromatographie sur protéine A.....	7
DOCUMENT 5 : Technique innovante de purification des anticorps monoclonaux par précipitation et ultrafiltration.....	7
5 a : Optimisation de la précipitation des anticorps monoclonaux par augmentation des concentrations en PEG et ZnCl <sub>2</sub> (à pH 7).....	8
5 b : Procédé de purification des anticorps monoclonaux.....	8
DOCUMENT 6 : Applications des anticorps monoclonaux thérapeutiques en 2022 .....	9
DOCUMENT 7 : Test d'efficacité d'un nouvel anticorps monoclonal dans le traitement du cancer.....	9
7 a : Identification de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal DS-5573a .....	10
7 b : Évaluation <i>in vitro</i> de l'ADCC médiée par DS-5573a sur des lignées cellulaires cancéreuses exprimant B7-H3 .....	11
7 c : Évaluation <i>in vivo</i> .....	11
DOCUMENT 8 : Anticorps anti-médicament (Anti-drug Antibodies (ADA)).....	12
DOCUMENT 9 : Exemples d'utilisation d'anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	13
DOCUMENT 10 : Extraits du référentiel du BTS Bioanalyses et Contrôles.....	13

## DOCUMENT 1 : Méthode de production historique des anticorps monoclonaux chez la Souris

D'après l'article : « Les anticorps monoclonaux - L'histoire d'une recherche fondamentale ou la curiosité comme source de richesse. » Diallo BK, Riffard C, Le Gouge K, Teillaud JL. Med Sci (Paris). 2019 ; 35(12):926-936.



### Signification des acronymes

**HGPRT<sup>-</sup>** : Hypoxanthine – Guanine – PhosphoRibosyl – Transférèse absente

**HAT** : Hypoxanthine – Aminoptérine – Thymidine

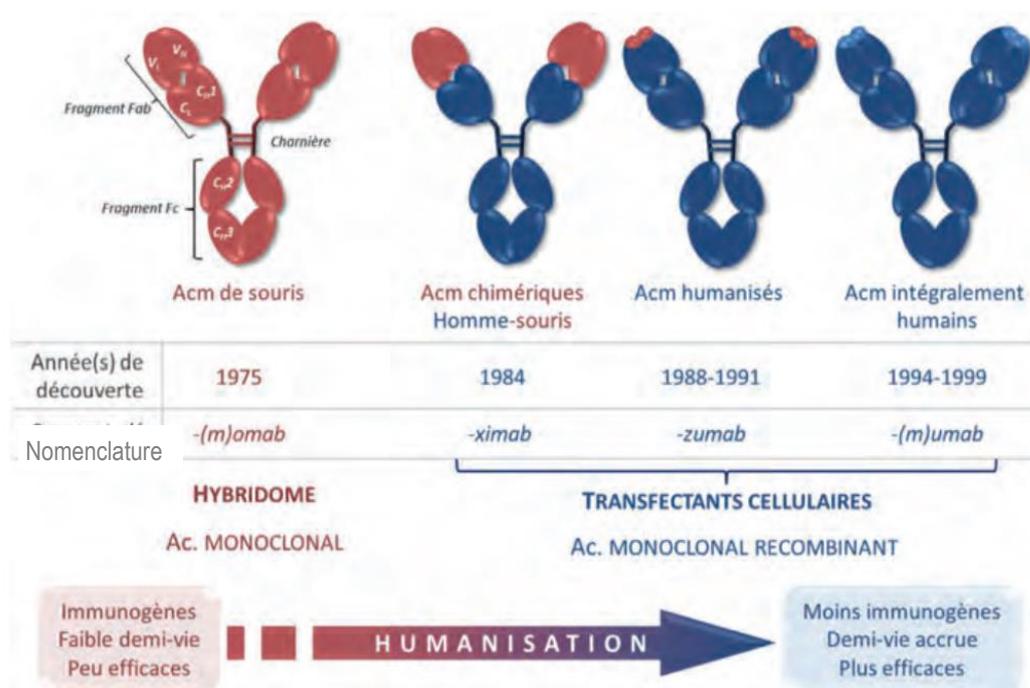
**PEG** : PolyEthylène Glycol

## DOCUMENT 2 : Évolution de l'ingénierie de production des anticorps monoclonaux

D'après l'article : « Les biomédicaments 2<sup>ème</sup> partie : les anticorps thérapeutiques. » Broutin M., Watier H. *apbg Biologie Géologie* 2016 ; 2.

Les avancées en biologie moléculaire ont permis de construire des anticorps chimériques plus « humains », en greffant les domaines variables d'anticorps murins aux domaines constants d'anticorps humains.

L'utilisation de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) a été un tournant pour la biofabrication de diverses protéines thérapeutiques dont le premier anticorps monoclonal recombinant chimérique abciximab (ReoPro) en 1994, suivi du premier anticorps monoclonal humanisé, le daclizumab (Zenapax) en 1997. Depuis, le mode d'expression en cellules CHO domine, même si des systèmes d'expression alternatifs existent.



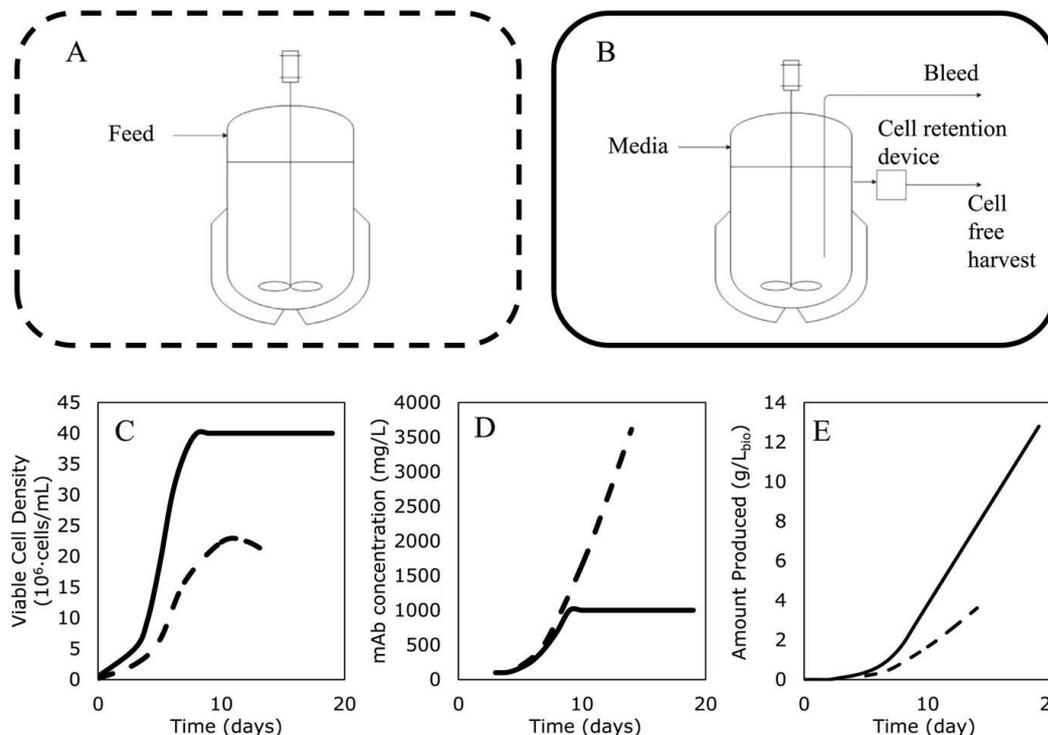
Les anticorps monoclonaux intégralement humains peuvent aussi être produits par des souris transgéniques dont la totalité des gènes des immunoglobulines a été remplacée par des gènes d'immunoglobulines humaines.

## DOCUMENT 3 : Méthodes de production industrielle des anticorps monoclonaux en bioréacteurs

D'après l'article « Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing – A critical review. »  
Bielser J.M., Wolf M., Souquet J., Broly H., Morbidelli M. *Biotechnology Advances*. 2018, Vol.36, N°4 : 1328-40

### Légende :

----- méthode Fed-batch  
———— méthode en continu



Schematic of fed-batch (A) and perfusion (B) process of a cell line producing a mAb. Capacity of bioreactors : 20000 L max.

Cell density (C), protein concentration inside the bioreactor (D) and total productivity (E); broken line represents fed-batch and solid line perfusion.

## DOCUMENT 4 : Technique classique de purification des anticorps monoclonaux par chromatographies successives

### 4 a : Principe général

Après culture des cellules productrices dans des bioréacteurs, le surnageant est récupéré par centrifugation, puis les anticorps monoclonaux sont séparés par chromatographie sur protéine A. D'autres chromatographies basées sur des principes différents puis une inactivation virale complètent la purification. Les anticorps monoclonaux sont concentrés par ultrafiltration.

L'objectif de pureté s'accompagne d'un objectif de rendement optimal. Selon les choix faits et en fonction des caractéristiques intrinsèques des anticorps monoclonaux à purifier, les rendements avec la technique classique de purification sont généralement de 60 à 70 %.

#### 4 b : Zoom sur l'étape de chromatographie sur protéine A

D'après Interchim, *Analyse et purification des protéines*, Interchim.com [en ligne], avril 2020 [consulté le 23/06/23]. Disponible sur : [https://blog\\_fr.interchim.com/analyse-purification-protéines-chromatographie-affinite/](https://blog_fr.interchim.com/analyse-purification-protéines-chromatographie-affinite/)

➤ **Conditions chromatographiques :**

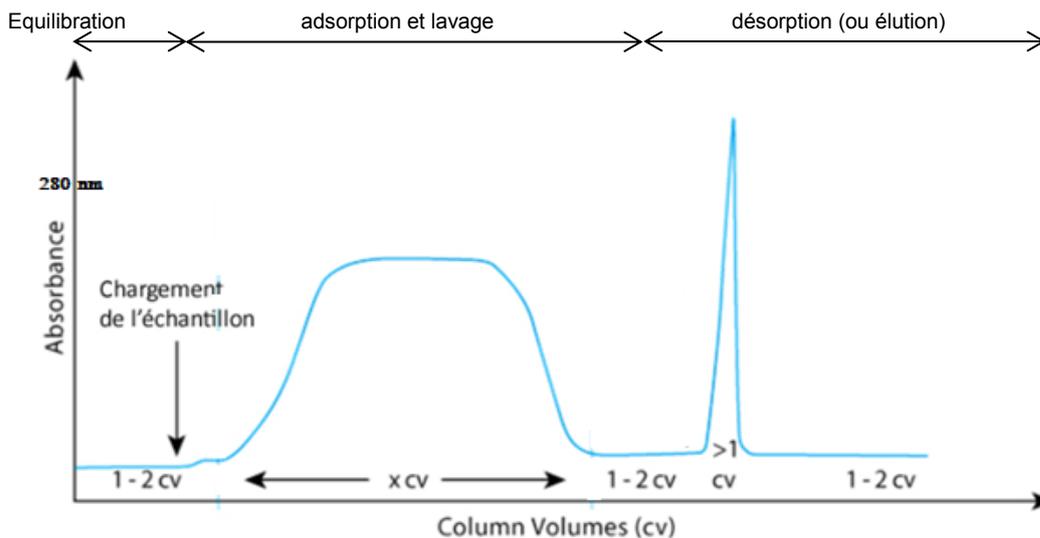
La phase stationnaire est greffée avec la protéine A.

Les phases mobiles utilisées sont :

- Pour l'équilibration de la colonne, l'adsorption et le lavage : tampon  $\text{NaHPO}_3$ , 20 mmol/L, pH 7.
- Pour la désorption : tampon citrate 0,1 mol/L, pH 3.

➤ **Échantillon :** Surnageant de culture récolté, centrifugé comme décrit dans le document 4a

➤ **Allure du chromatogramme attendu :**



#### DOCUMENT 5 : Technique innovante de purification des anticorps monoclonaux par précipitation et ultrafiltration

D'après la traduction de l'article « Continuous integrated antibody precipitation with two-stage tangential flow microfiltration enables constant mass flow. » Burgstaller D, Jungbauer A, Satzer P. *Biotechnol Bioeng.* 2019 May ; 116(5):1053-1065.

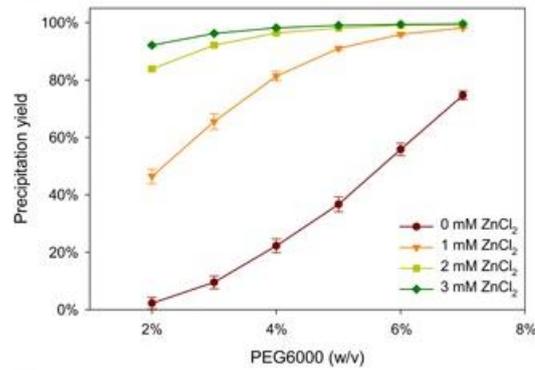
Des méthodes employant la précipitation des anticorps monoclonaux par des polymères de polyéthylène glycol (PEG) et du  $\text{ZnCl}_2$  directement dans le milieu de culture récolté sont actuellement en développement. Elles sont potentiellement bien plus économiques que les billes de résine ou d'agarose couplées à la protéine A.

Dans la présente étude, l'étape de « capture » des anticorps monoclonaux contenus dans le milieu de culture (HCCB) repose sur la précipitation par le PEG. Des études antérieures ont montré que le PEG d'une masse moléculaire de 6 000 Da, à une concentration de l'ordre de 14 %, offre un bon compromis entre rendement et viscosité. Cependant si l'étape de capture par précipitation est suivie d'opérations unitaires telles que la filtration sur membrane, la viscosité du PEG 6000 à 14% est problématique. En effet, la vitesse d'écoulement transversal des fluides hautement visqueux est faible, par conséquent, le taux de transfert de masse à travers une membrane filtrante est faible. La réduction de la viscosité est donc un objectif critique pour un procédé de filtration efficace.

C'est pourquoi des essais d'optimisation ont été réalisés en présence de  $\text{ZnCl}_2$  sachant qu'il a été démontré que le  $\text{Zn}^{2+}$  est capable de relier les molécules protéiques et d'entraîner leur floculation.

Il est à noter que pour obtenir des rendements élevés, les conditions exactes de précipitation et de resolubilisation doivent être adaptées à chaque type d'anticorps monoclonal.

**5 a : Optimisation de la précipitation des anticorps monoclonaux par augmentation des concentrations en PEG et ZnCl<sub>2</sub> (à pH 7)**



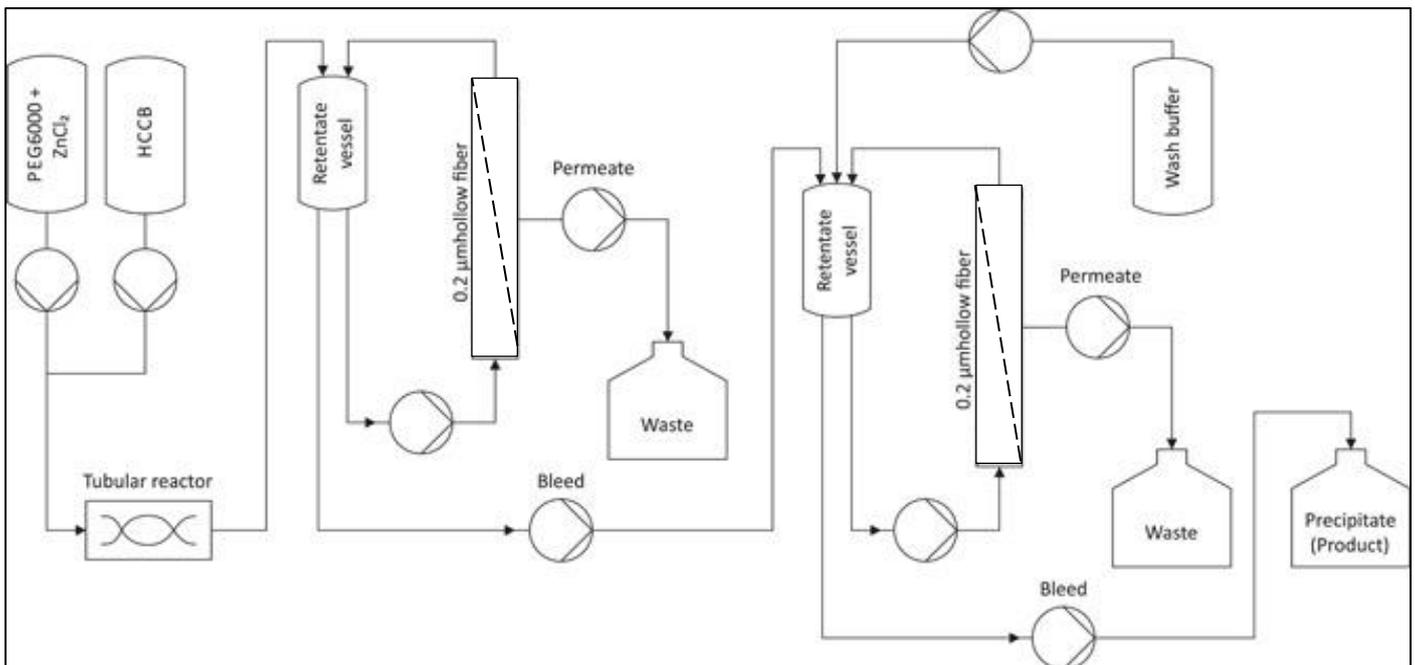
**5 b : Procédé de purification des anticorps monoclonaux**

Ce procédé fait appel à une succession de précipitations des anticorps monoclonaux en continu.

Légende : HCCB = Host cell Culture Broth

 Pompe

Bleed = purge



Précipitation continue d'anticorps monoclonaux dans un réacteur tubulaire

« L'étape de capture est basée sur une précipitation continue avec PEG6000 et Zn<sup>2+</sup> dans un réacteur tubulaire intégré à une unité de filtration tangentielle continue à deux étages (fibre creuse 0,2 µm). Le précipité est séparé (première purge) puis lavé (deuxième purge) dans un processus continu.

La solution d'anticorps obtenue est pure à 97 % et le rendement de purification pour ce procédé en fonctionnement continu est de 95 %.

## DOCUMENT 6 : Applications des anticorps monoclonaux thérapeutiques en 2022

D'après l'article « Antibodies to watch in 2022 » Kaplon H., Chenoweth A., Crescioli S., Reichert J. *mAbs*. 2022 ; 14. 10.1080/19420862.2021.2014296.

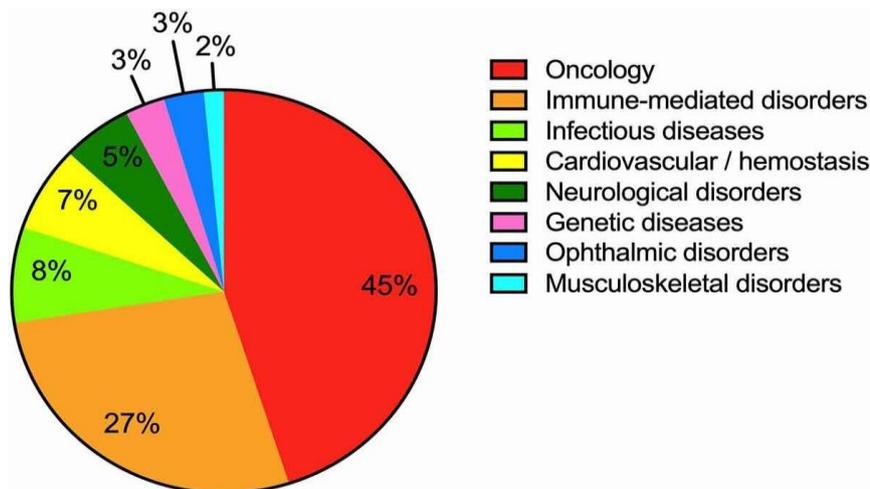


Figure based on data publicly available as of November 15, 2021.

## DOCUMENT 7 : Test d'efficacité d'un nouvel anticorps monoclonal dans le traitement du cancer

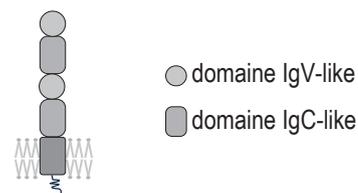
D'après l'article (partiellement traduit) « Development of DS-5573a : A novel afucosylated mAb directed at B7-H3 with potent antitumor activity. » Nagase-Zembutsu A., Hirotsu K., Yamato M., Yamaguchi J., Takata T., Yoshida M., Fukuchi K., Yazawa M., Takahashi S., Agatsuma T. *Cancer Sci* 2016; 107.674– 681

Dans cette étude, les auteurs ont cherché à développer de nouveaux anticorps monoclonaux antitumoraux en immunisant des souris par des cellules cancéreuses exprimant des marqueurs caractéristiques.

La cible choisie est la protéine B7-H3, molécule récemment découverte de la famille B7, qui est fortement surexprimée dans plusieurs tumeurs humaines, et dont l'expression est significativement associée à de mauvais pronostics.

Les membres de la famille B7 sont des protéines transmembranaires de la superfamille des immunoglobulines.

B7-H3 humain possède un ectodomaine composé de deux paires identiques de domaines IgV-like et IgC-like.



Structure de B7-H3

Les auteurs ont réussi à générer un anticorps de souris anti B7-H3 humain (M30) qui présente une activité antitumorale. Cet anticorps monoclonal a été humanisé (Hu-M30) puis afucosylé, pour obtenir l'anticorps monoclonal d'intérêt appelé DS-5573a.

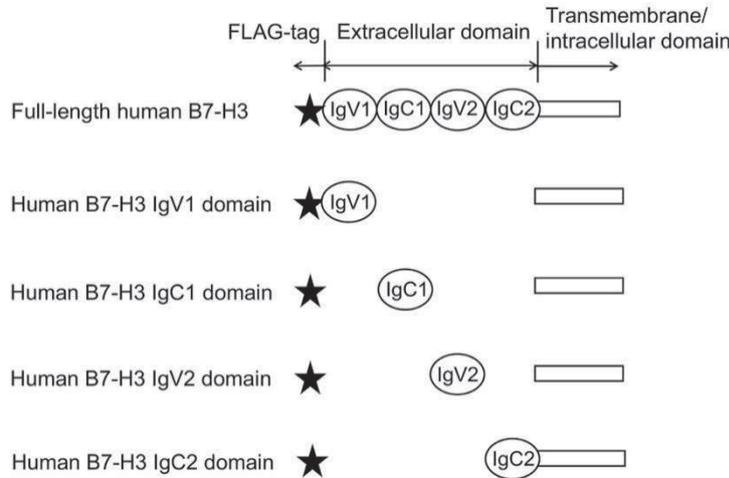
L'article présente la caractérisation de l'anticorps monoclonal DS-5573a puis l'évaluation de son activité antitumorale *in vitro* et *in vivo*.

## 7 a : Identification de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal DS-5573a

### Principe

Des vecteurs d'expression de B7-H3 humain total ou de chaque domaine Ig (domaines IgV1, IgC1, IgV2 ou IgC2), chacun avec la région transmembranaire et intracellulaire, ont été utilisés pour transfecter des cellules CHO-K1.

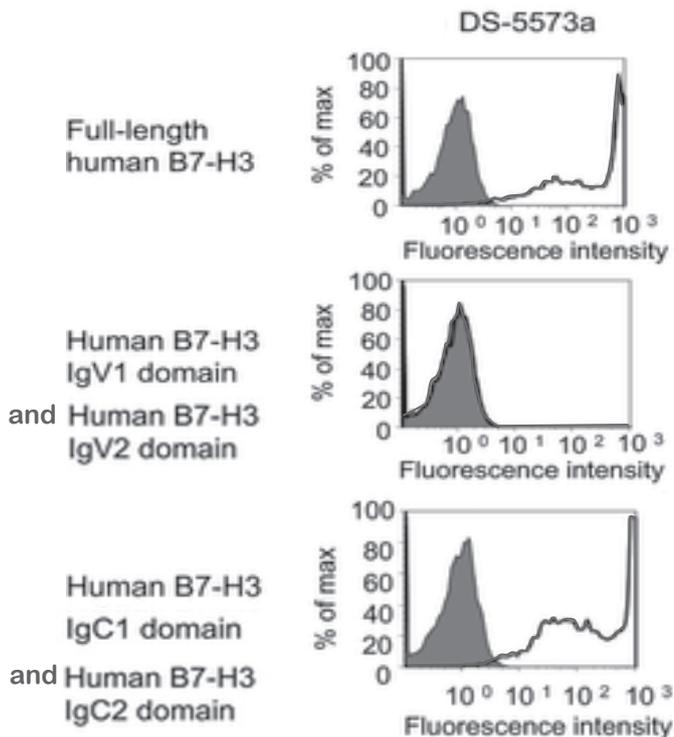
Chaque vecteur possède une étiquette à l'extrémité N-terminale (FLAG-tag), comme le montre la **figure 1**.



**Figure 1 : Vecteurs d'expression**

### Résultats:

Les cellules CHO-K1 transfectées ont été analysées par cytométrie en flux.



**Figure 2 :** Les cellules CHO-K1 transfectées par chaque vecteur d'expression ont été traitées avec DS-5573a (histogramme avec ligne bleue) ou avec un contrôle isotypique humain (histogramme gris), puis marquées avec un anticorps anti-humain conjugué au FITC.

L'expression de chaque protéine B7-H3 a été vérifiée avec un anticorps anti-FLAG (non montré ici).

## 7 b : Évaluation *in vitro* de l'ADCC médiée par DS-5573a sur des lignées cellulaires cancéreuses exprimant B7-H3

Before testing and comparing the effects of Hu-M30 and DS-5573a to enhanced ADCC activity, we have to investigate whether B7-H3 proteins are expressed not only in the clinical tumors but also on the surface of cancer cell lines. 3 cancer cell lines : NCI-H322 (lung), MDA-MB-231 (breast), COLO205 (colon) are tested with quantitative flow cytometry analysis using M30 was carried out in various cancer cell lines. CCRF-CEM cell line was used as negative control.

### Results :

Cell line	B7-H3 expression
NCI-H322	$> 1 \times 10^5$ per cell
MDA-MB-231	approximately $5 \times 10^4$ per cell
COLO205	approximately $1 \times 10^4$ per cell
CCRF-CEM	$\approx 0$ per cell

To realize ADCC assay, Chromium-51 ( $^{51}\text{Cr}$ ) labeled target cells ( $1 \times 10^4$  cells) were treated with serial dilutions of antibodies and added to PMBCs ( $3 \times 10^5$  Peripheral Mononuclear Blood Cells) obtained from the donors. After 4 h of incubation at  $37^\circ\text{C}$ , radioactivity in the supernatant was measured. Maximum  $^{51}\text{Cr}$  release was obtained after incubation of the cells in 1% Triton-X solution.

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = (S - B) / (M - B) \times 100$$

where  $S$ ,  $M$ , and  $B$  represent  $^{51}\text{Cr}$  release of each sample, maximum  $^{51}\text{Cr}$  release, and background  $^{51}\text{Cr}$  release, respectively. Obtained results : **figure 3**.

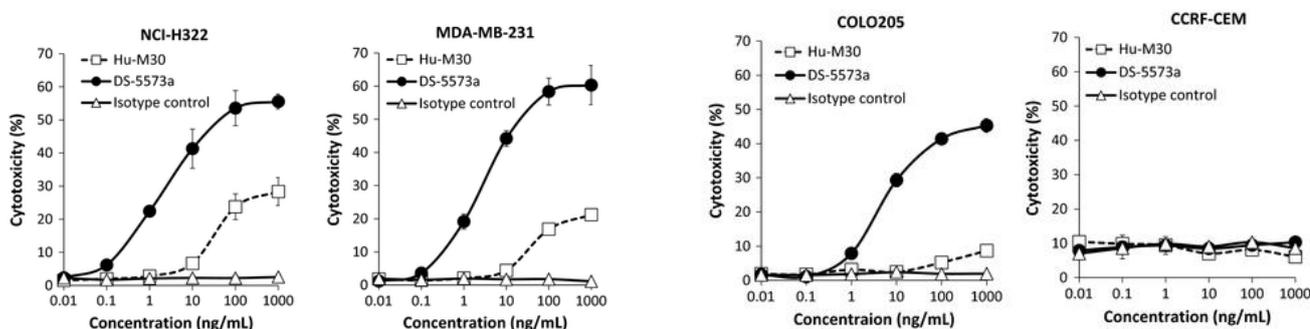


Figure 3 : Human PBMC-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity of DS-5573a and Hu-M30 against cancer cell lines with various levels of B7-H3 expression.

## 7 c : Évaluation *in vivo*

- Pour confirmer l'efficacité du DS-5573a *in vivo*,  $5.10^6$  cellules MDA-MB-231 en suspension ont été inoculées par voie sous-cutanée dans le flanc droit de souris SCID femelles [avec déficit immunitaire combiné sévère]. L'anticorps monoclonal DS-5573a ou le diluant (PBS) ont été injectés par voie intrapéritonéale une fois par semaine pendant 5 semaines, 35 jours après l'inoculation de la tumeur.

**Résultats (non montrés) :** une efficacité antitumorale statistiquement significative du DS-5573a (diminution du volume tumoral) a été observée par rapport au groupe traité par le diluant.

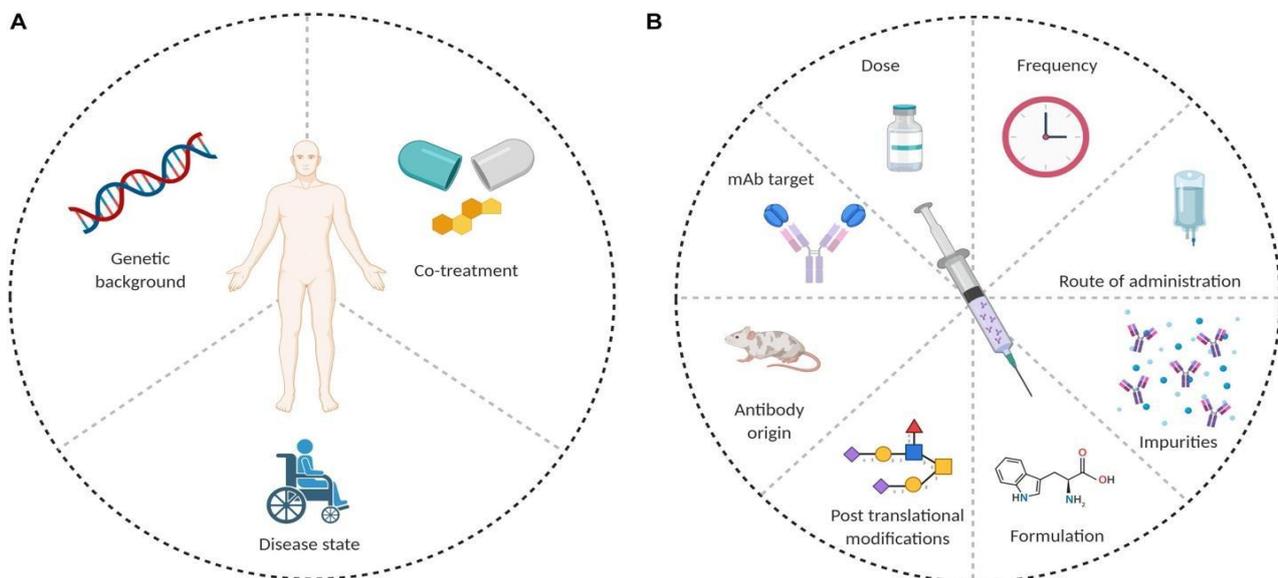
- Pour vérifier que l'efficacité du DS-5573a est médiée par des cellules effectrices non seulement *in vitro* mais aussi *in vivo*, ses effets ont été comparés chez des souris SCID porteuses de MDA-MB-231 (qui ont des cellules NK et des macrophages fonctionnels) et des souris NOG (qui n'ont pas de cellules NK et ont une fonction macrophagique réduite). Le DS-5573a, le contrôle isotypique IgG1 humain (tous deux à 3 mg/kg) ou le diluant (PBS) ont été injectés par voie intrapéritonéale une fois par semaine pendant 5 semaines (souris SCID, n = 10 ; souris NOG, n = 6). Comme contrôle positif, l'irinotécan (60 mg/kg), qui est un agent chimiothérapeutique standard pour le cancer du sein métastatique, a été injecté par voie intraveineuse deux fois par semaine pendant 2 semaines.

**Résultats (non montrés) :** une suppression statistiquement significative de la croissance tumorale a été observée dans le groupe traité à l'irinotécan dans les deux modèles de souris. Chez les souris SCID, le traitement par injection de l'anticorps monoclonal DS-5573a a entraîné une réduction significative du volume tumoral, similaire à l'effet obtenu avec le traitement chimiothérapeutique. Chez les souris NOG, le traitement par l'anticorps monoclonal DS-5573a n'a pas eu d'effet significatif sur le volume de la tumeur.

## DOCUMENT 8 : Anticorps anti-médicament (Anti-drug Antibodies (ADA))

D'après l'article « The molecular mechanisms that underlie the immune biology of anti-drug antibody formation following treatment with monoclonal antibodies » Vaisman-Mentesh A., Gutierrez-Gonzalez M., DeKosky BJ., Wine Y. *Frontiers in Immunology*. 2020 ; 11.

Malgré les avancées des technologies de conception et de production des Anticorps monoclonaux thérapeutiques, la production d'anticorps anti-médicament peut s'observer chez certains patients. Les anticorps anti-médicament peuvent modifier les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du médicament, réduisant ainsi son efficacité et sa demi-vie et permettant d'expliquer un certain nombre de situations cliniques (échappement, réactions d'intolérance...)



Possible causes of ADA formation.

(A) Patient related and (B) drug related.

## DOCUMENT 9 : Exemples d'utilisation d'anticorps monoclonaux thérapeutiques

D'après la communication scientifique de Bull. Acad. Natle Méd., 2018, 202, nos 3-4, 707-735, séance du 3 avril 2018.

Principes actifs (noms commerciaux)	Cibles cellulaires	Indications	Effets secondaires graves
Atezolizumab (Tecentriq)	PD-L1 ( <i>programmed death - ligand 1</i> )	Carcinomes urothéliaux Carcinomes hépatiques	Hépatite, néphrite, pneumonie, hypothyroïdie...
Caplacizumab (Cablivi)	vWF (Facteur von Willebrandt)	Purpura thrombotique thrombocytopénique acquis	Hémorragie oculaire, épistaxis, hémorragie gastro-intestinale, myalgie, hématurie, ménorragie
Erenumab (Aimovig)	Récepteur du CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide)	Migraines réfractaires aux traitements conventionnels	Constipation, spasmes, réaction allergique, démangeaisons, lésion buccale, perte de cheveux
Trastuzumab (Herceptin)	HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2)	Carcinomes mammaires positifs à HER2	Insuffisance cardiaque, hépatotoxicité, arrêt respiratoire
Ustekinumab (Stelara)	IL12 - IL23 (Interleukines proinflammatoires)	Psoriasis Maladie de Crohn	Vertiges, maux de tête, nausées, démangeaisons, douleurs musculaires ou articulaires, fatigue...

## DOCUMENT 10 : Extraits du référentiel du BTS Bioanalyses et contrôles

### Horaires de formation

Enseignements	1 <sup>ère</sup> année				2 <sup>ème</sup> année		
	Cours	TD	Activités technologiques	Mise à niveau	Cours	TD	Activités technologiques
Biochimie et technologie d'analyse	2	1	0		2	1	0
Biochimie et Biologie cellulaire et moléculaire	0	0	6(b)	1(a)	0	0	6
Microbiologie et technologie d'analyse	2	0	0		2	0	0
Microbiologie et Biologie cellulaire et moléculaire	0	0	5		0	0	8(b)
Biologie cellulaire et moléculaire	2	0	0(b)	1(a)	2	0	0

(a) Pour les étudiants titulaires d'un baccalauréat autre que STL

(b) Les activités technologiques de biologie cellulaire et moléculaire sont rattachées  
 – en 1<sup>ère</sup> année, aux activités technologiques de biochimie,  
 – en 2<sup>ème</sup> année, aux activités technologiques de microbiologie

**Module 3 : Les anticorps et la réaction antigène-anticorps in vitro**

<i>Contenus</i>	<b>Commentaires</b>
<p><b>1. Structure et rôle des anticorps</b></p>	<p>On étudiera la structure et le rôle des Ig G, Ig M et Ig E. On mettra en relation les structures avec les spécificités des différents anticorps. La connaissance de l'idiotypie ne sera pas exigée.</p>
<p><b>2. Obtention du réactif anticorps</b>                      2.1. Anticorps polyclonaux                      2.2. Anticorps monoclonaux</p>	<p>On développera les différentes étapes de l'obtention des anticorps polyclonaux (protocoles d'immunisation ; réponses primaire ou secondaire) et des anticorps monoclonaux (obtention, culture et sélection des hybridomes ; production des anticorps).</p>
<p><b>3. La réaction antigène - anticorps in vitro</b>                      3.1. Caractères thermodynamiques : affinité, zone d'équivalence , ...                      3.2. Réactions d'agglutination                      3.3. Réactions de précipitation                      3.4. Réactions utilisant des anticorps marqués : marques radioactive, fluorescente et enzymatique</p>	<p>On envisagera uniquement les réactions utilisées dans les méthodes d'analyse concernant les produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.</p>

ACTIVITES TECHNOLOGIQUES EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

**Module 1 : Techniques de culture des cellules eucaryotes**

<p><b>3. Conservation et entretien d'une lignée cellulaire</b>                      3.1. Préparation des milieux de culture et du matériel                      3.2. Décongélation et ensemencement                      3.3. Repiquage d'une culture (observation du tapis cellulaire, conduite de la trypsination, dénombrement cellulaire et ajustage, ensemencement)                      3.4 Préparation des suspensions à conserver, quantification et congélation dans l'azote liquide</p>	<p>On réalisera ce travail sur une lignée cellulaire animale éloignée de l'homme.                       On effectuera la validation des milieux de culture.</p>
<p><b>4. Mise en évidence et quantification d'un effet cytotoxique sur des cellules en culture</b>                      4.1. Effet cytotoxique d'une molécule ou d'une substance par une méthode spectrophotométrique                      4.2. Effet cytopathogène d'une souche virale ou vaccinale</p>	<p>Ces techniques nécessitent la maîtrise des cultures cellulaires et des quantifications.</p>

## Module 2 : Méthodes d'analyse utilisant des anticorps

Les différentes techniques de caractérisation et d'identification utilisant les anticorps seront mises en œuvre sur les produits les plus variés relevant du domaine des bio-industries (analyse de produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques).

Contenus	Commentaires
<p><b>1. Analyses fondées sur une réaction d'immunoagglutination ou d'immunoprécipitation</b></p> <p>1.1. Recherche et caractérisation, par réaction d'immunoagglutination, de molécules et de microorganismes ou de virus</p> <p>1.2. Recherche et caractérisation de molécules par réaction d'immunoprécipitation</p> <p>    1.2.1. Double diffusion en gélose</p> <p>    1.2.2. Electrosynérèse</p> <p>1.3. Dosage de molécules par réaction d'immunoprécipitation</p> <p>    1.3.1. Immunodiffusion radiale</p> <p>    1.3.2. Electroimmunodiffusion</p>	<p>Les exemples présentés pourront être pris dans les domaines suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- contrôle d'un réactif anticorps (pureté, spécificité) ;</li><li>- analyse de solutions ;</li><li>- caractérisation de l'origine animale d'un produit alimentaire.</li></ul>
<p><b>2. Analyses faisant intervenir des anticorps marqués</b></p> <p>2.1. Recherche et caractérisation d'une molécule, d'un microorganisme ou d'un virus par réaction d'immunofluorescence</p> <p>2.2 . Détection de molécules, de microorganismes par réaction immunoenzymatique, par immunocapture</p> <p>2.3. Dosage de molécules par réaction immunoenzymatique</p> <p>2.4. Etablissement ou adaptation d'un protocole de dosage d'une molécule par une réaction immunoenzymatique</p>	<p>On réalisera une réaction d'immunofluorescence directe ou indirecte.</p> <p>Les applications seront choisies dans les domaines suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- détection de fraudes ;</li><li>- détection de microorganismes ;</li><li>- détection de mycotoxines, de pesticides ou produits phytosanitaires.</li></ul> <p>On réalisera une méthode de type sandwich et une méthode de type compétitif.</p> <p>A partir d'une documentation théorique fournie ou recherchée, on concevra le principe du dosage ou de ses adaptations.</p> <p>A partir de catalogues de fournisseurs, on établira la commande des réactifs et matériels nécessaires.</p> <p>On rédigera un document synthétique et on en effectuera une présentation orale.</p>
<p><b>3. Purification d'une molécule par une méthode faisant intervenir des anticorps fixés : chromatographie d'affinité</b></p>	<p>On tiendra compte des techniques chromatographiques abordées en biochimie.</p> <p>On pourra choisir comme exemple d'application un produit pharmaceutique ( facteurs plasmatiques, ...).</p>

## ACTIVITES TECHNOLOGIQUES EN ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

### Module 6 : Opérations unitaires de microbiologie

Contenus	Commentaires
<b>1. Réalisation d'une production en fermenteur pilote</b>	<p>Il s'agira de mettre en œuvre l'ensemble des opérations indispensables à la production :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- vérification de la pureté de la souche productrice ;</li> <li>- vérification de ses caractères intéressant la production ;</li> <li>- préparation des milieux de culture, stérilisation et vérification de leur stérilité,</li> <li>- réalisation de la préculture ;</li> <li>- ensemencement du fermenteur ;</li> <li>- conduite de la fermentation avec réglage des points de consigne ;</li> <li>- suivi de la production par enregistrement et traitement des données intervenant dans la régulation ;</li> <li>- récupération, caractérisation et /ou dosage du produit formé ;</li> <li>- arrêt de la fermentation et désinfection ou stérilisation du milieu de production avant élimination.</li> </ul>

## ACTIVITES TECHNOLOGIQUES EN ANALYSES BIOCHIMIQUES

<p><b>5. Analyses mettant en œuvre des techniques chromatographiques</b></p> <p>5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).</p> <p>5.2. Chromatographie en phase liquide basse pression</p> <p>5.2.1. Partage</p> <p>5.2.2. Adsorption</p> <p>5.2.3. Affinité</p> <p>5.2.4. Gel filtration</p> <p>5.2.5. Échange d'ions</p> <p>5.2.6. Hydrophobie</p> <p>5.3. Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) isocratique, à gradient et détecteurs associés</p> <p>5.4. Chromatographie en phase gazeuse (CPG), détecteurs associés</p>	<p>Il sera fait mention de l'utilisation préparative de cette technique.</p> <p><i>Technique à étudier en relation avec le programme d'activités technologiques en biologie cellulaire et moléculaire.</i></p> <p>Il sera fait mention de l'utilisation préparative de cette technique. On présentera les principes des différents détecteurs utilisables y compris le détecteur à spectrométrie de masse.</p>
<b>9. Réalisation d'opérations unitaires mettant en œuvre des techniques biochimiques</b>	<i>Voir le programme d'activités technologiques d'opérations unitaires.</i>
9.1. Ultrafiltration ou échange d'ions	<p>Une de ces deux opérations unitaires devra être mise en œuvre au cours de la formation.</p> <p>Ultrafiltration : application au domaine alimentaire ou pharmaceutique pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- purification ;</li> <li>- concentration de protéines ;</li> <li>- séparation de molécules.</li> </ul> <p>Échange d'ions : application au domaine alimentaire pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- déminéralisation ;</li> <li>- décoloration ;</li> <li>- séparation de molécules.</li> </ul>