

SESSION 2017

---

**AGRÉGATION  
CONCOURS INTERNE  
ET CAER**

**Section : BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE**

**PREMIÈRE ÉPREUVE**

Durée : 6 heures

---

*Le dictionnaire bilingue 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.**

L'épreuve, qui prend appui sur un dossier technique relatif à un problème biotechnologique, s'organise en deux parties :

- la première permet d'évaluer les capacités du candidat à utiliser ses connaissances scientifiques et techniques pour expliciter ou valider les solutions retenues ;
- la seconde permet d'évaluer les capacités du candidat à utiliser le support proposé pour élaborer un exercice permettant l'évaluation des connaissances et méthodes acquises par les élèves à un niveau de formation déterminé.

Le candidat doit situer l'exercice dans un processus d'apprentissage et par rapport aux autres enseignements scientifiques ou techniques qui lui sont associés.

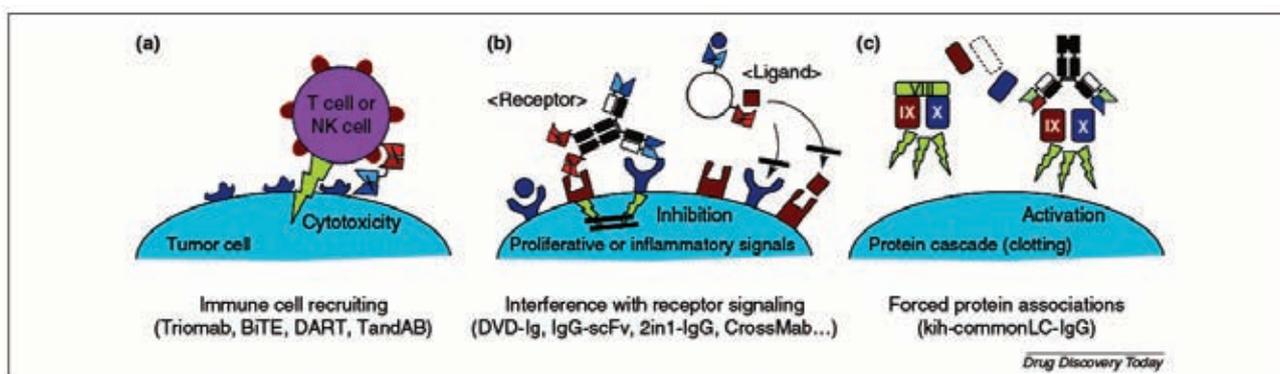
*Dans le sujet, la lettre **C** identifie les questions mobilisant les connaissances scientifiques et techniques, la lettre **P** identifie les questions d'ordre pédagogique.*

*Des extraits de référentiels et programmes des formations disciplinaires des sections STL, STS et CPGE – TB sont regroupés en annexe en fin de sujet.*

## Développement d'outils thérapeutiques dérivés des systèmes immunitaires

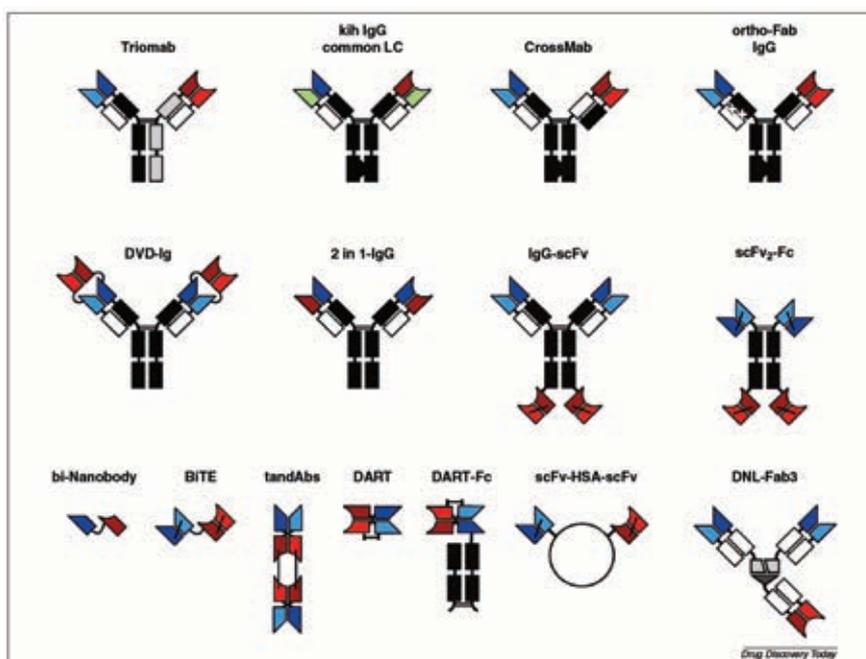
### 1. Production d'anticorps bispécifiques dans le cadre de thérapies anti-tumorales

Certaines thérapies anti-tumorales nécessitent l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui ciblent des protéines exprimées à la surface des cellules tumorales et impliquées dans leur survie et leur prolifération. Néanmoins, de nombreux phénomènes cellulaires compensatoires peuvent rendre caduque l'effet de l'anticorps monoclonal. Face à ce problème, des équipes ont commencé à développer des anticorps bispécifiques (bsAc). Comme illustré ci-dessous, d'autres applications de ces anticorps bispécifiques peuvent être envisagées telles la mise en contact entre une cellule cible et des cellules effectrices ou l'interaction forcée entre deux protéines.



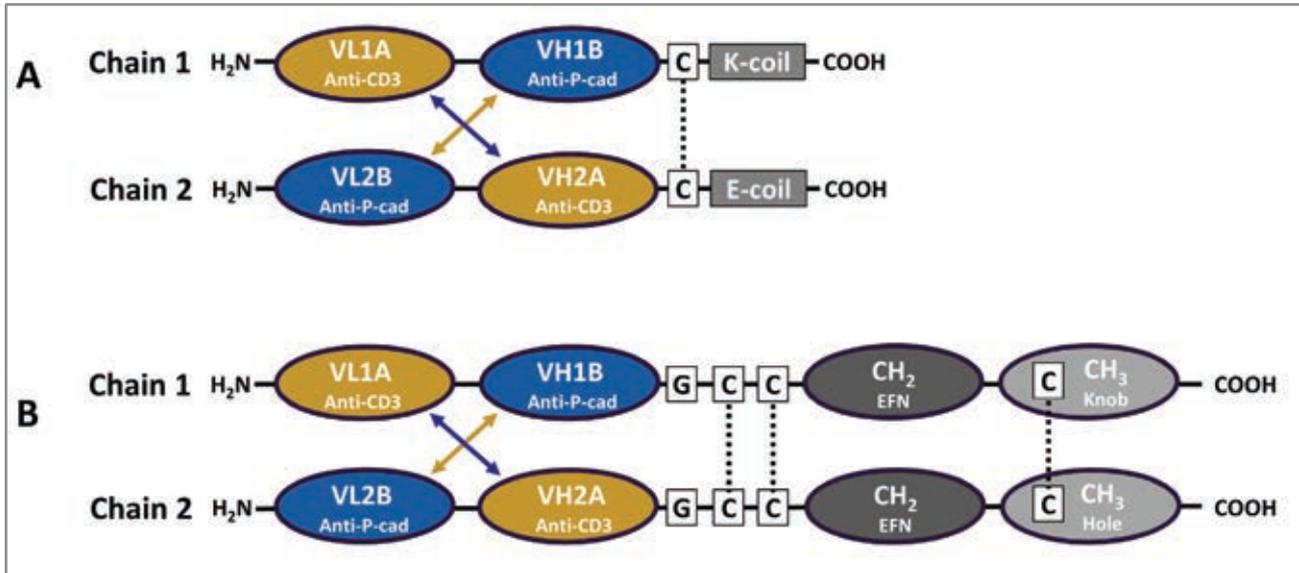
Kontermann RE et al., *Drug Discovery Today*, 2015, 20(7): 838-47

Il existe une très grande diversité d'anticorps bispécifiques dont les DART (*Dual Affinity ReTargeting molecules*) et les DART-Fc (DART fusionné avec un fragment Fc d'une IgG).



Kontermann RE et al., *Drug Discovery Today*, 2015, 20(7): 838-47

Ce type d'anticorps bispécifiques est utilisé dans le traitement de certaines tumeurs (leucémies myéloïdes aiguës et cancer colorectal) pour induire une lyse des cellules tumorales. La publication de *Root RA et al., Antibodies, 2016* présente une stratégie expérimentale visant à produire des DART (**A**) et des DART-Fc (**B**) spécifiques de la cadhérine P et de la protéine CD3.



Une version simplifiée de cette démarche est résumée dans le **document 1**.

La cadhérine P est une cible de choix pour la thérapie de certaines tumeurs solides. En effet, il s'agit d'une protéine d'adhérence cellulaire dont la surexpression dans les cellules tumorales est positivement corrélée à une augmentation de leur mobilité et de leur caractère invasif.

### 1.1. Production et sélection de fragments variables simple brin (scFv) par « phage display »

La structure détaillée du phage M13, support du « phage display », est représentée dans le **document 2**. La technique du « phage display », schématisée dans le **document 3**, repose sur l'expression d'un répertoire protéique à la surface d'un bactériophage, par exemple des banques de fragments d'anticorps (scFv). La sélection des phages recombinants repose sur leur capacité de liaison à l'antigène cible. Le processus de sélection nécessite plusieurs cycles répétitifs, comportant chacun des étapes de capture, lavage, élution et amplification. Les conditions expérimentales de l'étape de capture évoluent au cours des cycles.

Les phages sélectionnés sont ensuite testés individuellement pour l'activité recherchée.

Pour produire des fragments d'anticorps à la surface des particules phagiques, le « phage display » associe un phagemide à un phage auxiliaire (**document 3A**). Le génome du phage auxiliaire a été muté sur son origine de répllication, ce qui affecte sa répllication mais pas le niveau de synthèse des protéines.

- C1 *Rappeler les particularités du cycle de multiplication du phage M13.*
- C2 *Rédiger une synthèse des informations présentées dans le **document 3A** et replacer ce mécanisme dans le **document 3B**.*
- C3 *A partir du **document 3B**, présenter l'intérêt de faire varier les conditions expérimentales au cours de l'étape 1 de capture ; indiquer la nature des paramètres concernés. Préciser le mode opératoire de l'étape 4 d'amplification.*

Pour certaines applications, il est indispensable de disposer de suspensions de particules de phagemides affines, parfaitement purifiées.

La technique standard de double précipitation au PEG (polyéthylène glycol) des phages filamenteux est utilisée comme première étape de purification. La seconde étape comporte un traitement avec un détergent ionique suivi d'une ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium.

La chromatographie d'exclusion sur Sephacryl® S-500 est une alternative à la deuxième étape de purification. Les caractéristiques du gel employé figurent dans le **document 4**.

Le profil d'élution de la préparation phagique est présenté dans le **document 5.1**. Le suivi qualitatif de la purification par chromatographie d'exclusion est présenté dans le **document 5.2**.

- C4 *Expliquer le principe de l'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium.*
- C5 *Discuter de la pertinence du choix de la colonne Sephacryl® S-500.*
- P1** *Proposer un schéma du principe de la chromatographie d'exclusion. A l'aide du **document 4**, construire un exercice illustrant cette technique pour des élèves en cycle terminal STL biotechnologies.*
- C6 *Analyser et interpréter les résultats présentés dans le **document 5**. Dégager les avantages de la méthode alternative de purification.*

## 1.2. Détermination des paramètres physico-chimiques et physiologiques des anticorps bispécifiques produits et amélioration de l'affinité des bsAc sélectionnés

Les bsAc sont caractérisés après leur purification. Différents paramètres physico-chimiques sont déterminés : constante de dissociation vis-à-vis des deux épitopes, masse moléculaire, concentration efficace (EC<sub>50</sub>).

Le **document 6** présente certains résultats expérimentaux : une SDS PAGE, une HPLC d'exclusion (SE-HPLC), une HPLC d'interactions hydrophobes (HIC).

- C7 *Rappeler la formule semi-développée du SDS et préciser son ou ses rôle(s) dans une SDS-PAGE.*
- C8 *Expliquer le double intérêt de la SDS-PAGE dans ce contexte.*
- C9 *Les échantillons déposés dans les pistes 2 et 3 sont traités différemment. Citer un réactif potentiellement utilisable et préciser son mode d'action.*
- C10 *Analyser l'ensemble des résultats présentés dans le **document 6**.*

Les EC<sub>50</sub> sont déterminées à l'aide de tests de cytotoxicité. L'un de ces tests utilise le coffret de dosage cytotox96 de Proméga™ qui repose sur une mesure par spectrophotométrie de l'activité de la LDH libérée lors de la lyse des cellules. Ce test nécessite la réalisation de trois témoins présentés dans le tableau suivant.

	Cellules cibles tumorales (µL)	Tampon de dilution (µL)	Cellules immunitaires effectrices (µL)	Tampon de lyse (µL)	DART aux concentrations choisies en tampon de dilution (µL)
Témoin A	50	150	-	-	-
Témoin B	50	50	100	-	-
Témoin C	50	120	-	30	-
Essai	50	-	100	-	50

C11 Expliquer l'intérêt de chaque témoin et les résultats attendus.

C12 Etablir l'équation aux grandeurs permettant la détermination du pourcentage de cytotoxicité.

Les constantes de dissociation des complexes anticorps-antigène sont déterminées par SPR (*Surface Plasmon Resonance*) qui évalue les interactions protéines/protéines par réfractométrie.

P2 Proposer un document de synthèse présentant le principe d'une autre technique de détermination du  $K_D$ , à des étudiants de classe préparatoire TB.

L'ensemble des valeurs de  $EC_{50}$  et  $K_D$  obtenues est présenté dans le **document 7**.

C13 Proposer une hypothèse permettant d'expliquer le choix de DART 35 comme matrice de départ pour l'amélioration de l'affinité.

Deux nouveaux DART sont obtenus à partir du DART 35 : DART 153 et 154. Ils sont comparés au DART 35 ainsi qu'à des DART de référence : DART 20, 30 et DART-Fc.

Les résultats sont présentés dans le **document 8**.

C14 Préciser le domaine extracellulaire (ECD) de la P-cadhérine porteur de l'épitope reconnu pour chaque DART testé.

C15 Choisir le DART à retenir dans l'optique d'une utilisation médicale. Argumenter ce choix.

## **2 Les systèmes de défense immunitaire bactériens CRISPR**

L'existence de systèmes immunitaires adaptatifs a été mise en évidence chez de nombreuses bactéries. Ces systèmes reposent sur l'intervention de petits ARN permettant de guider l'élimination d'ADN étrangers auxquels les microorganismes ont déjà été exposés.

L'ensemble des gènes codant les différentes molécules impliquées sont regroupés au niveau de loci particuliers, les loci CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Différents types de systèmes ont été décrits. L'organisation du locus CRISPR de type II est présentée dans le **document 9**.

Des fragments d'ADN étrangers sont stockés au niveau du locus CRISPR au fil des infections chez les rares bactéries survivantes, permettant ainsi de constituer une véritable bibliothèque, mémoire transmissible des agressions virales subies. Ce stockage, qui s'effectue lors de la première exposition à l'ADN étranger, s'apparente à une phase d'immunisation (**document 10**).

Lors d'une nouvelle infection par une entité porteuse d'un fragment d'ADN étranger gardé en mémoire, les bactéries « vaccinées » activent le système CRISPR (**document 11**). La cellule produit alors de petits ARN (crRNA) dont la maturation dépend d'un ARN trans-activateur (tracrRNA).

Le complexe Cas9-crRNA-tracrRNA se fixe au niveau de l'ADN étranger grâce au crRNA. L'activité endonucléasique de Cas9 ne s'exprime qu'en présence d'un signal spécifique reconnu par l'enzyme, une courte séquence conservée nommée PAM (*Protospacer-Adjacent Motif*) composée de 2 à 7 nucléotides ; elle coupe alors l'ADN étranger au niveau des deux brins.

La publication de *JINEK M et al. ; Science 2012 ; 337 : 816-821* précise les modalités de certaines étapes du mécanisme de CRISPR-Cas9 type II et propose un outil permettant des modifications ciblées de l'ADN. Une étude de l'activité de Cas9 a été réalisée *in vitro* dans différentes conditions expérimentales (**document 12**).

P3 En s'appuyant sur ce document, construire un exercice à destination d'étudiants de STS permettant de dégager les notions suivantes afin de mener à bien l'analyse des résultats :

*propriétés migratoires des plasmides en fonction de leur forme, spécificité du test, importance des conditions opératoires. Proposer des éléments de corrigé.*

L'étude précédente est complétée par l'étude de l'activité de deux mutants de Cas9. Les résultats figurent dans le **document 13**.

*C16 Analyser et commenter les résultats présentés dans ce document.*

Deux molécules d'ARN chimère combinant les caractéristiques de crRNA et de tracrRNA sont testées (**document 14**).

*C17 Analyser et commenter les résultats présentés dans le **document 14**.*

*C18 Présenter deux autres approches utilisant des nucléases conçues pour modifier l'ADN de façon ciblée, en excluant les endonucléases de type II.*

La technologie CRISPR-Cas9 a été initialement utilisée pour invalider spécifiquement des gènes cibles au sein de différents types cellulaires et organismes. Néanmoins, depuis lors, des modifications de l'enzyme Cas9 ont considérablement élargi le champ d'application de cette technologie, permettant notamment d'activer ou de réprimer sélectivement l'expression de gènes cibles.

Dans cet objectif, une entreprise de biotechnologies commercialise un système utilisant trois vecteurs d'expression (**document 15 A**) qui, une fois transfectés et exprimés (**document 15 B**), permettent de stimuler spécifiquement l'expression d'un gène cible. Un exemple de stimulation de l'expression de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) au sein des cellules HEK293T grâce à ce système est présenté dans le **document 15 C**.

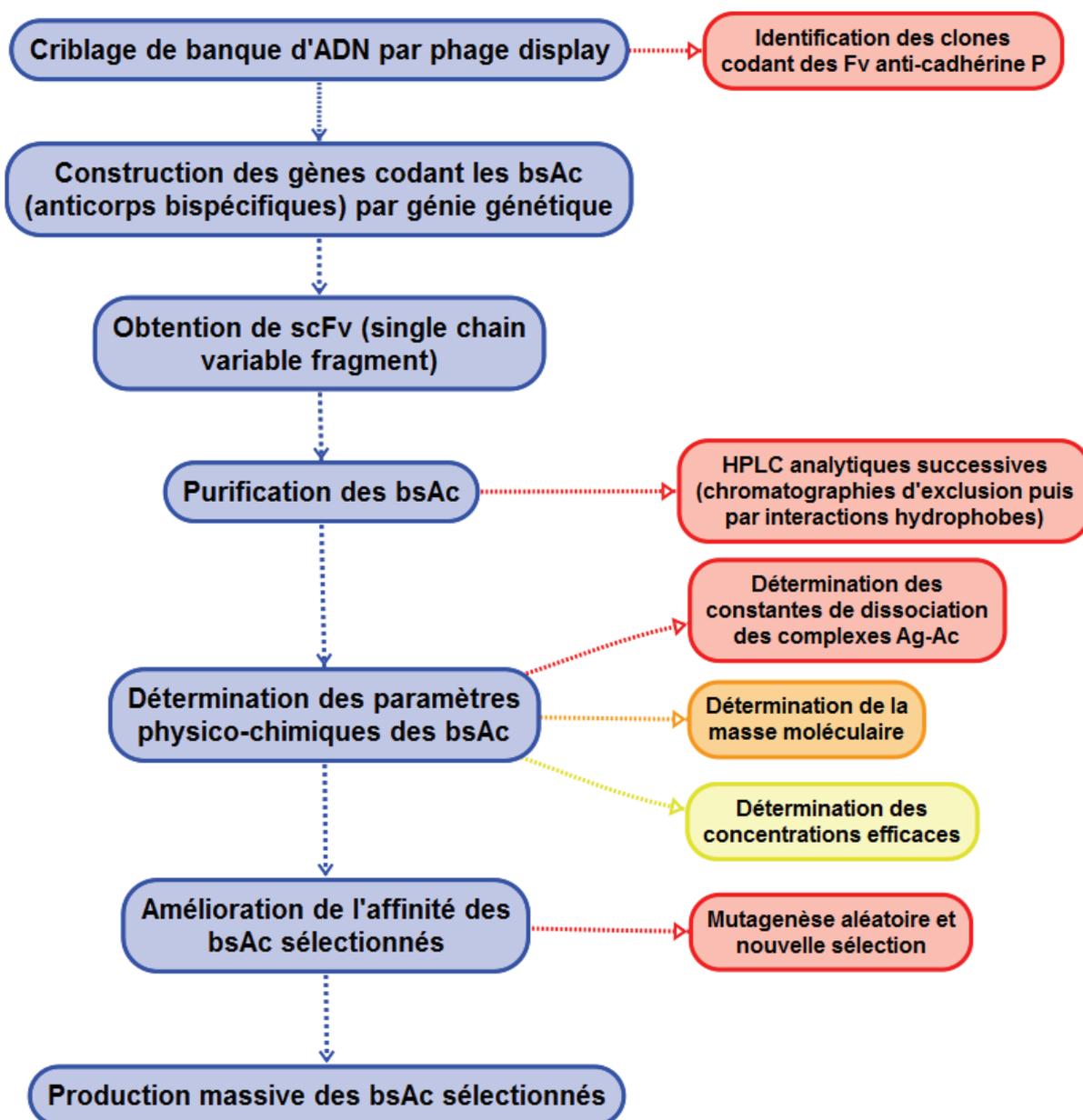
*C19 Expliquer l'intérêt de l'utilisation de l'enzyme dCas9 pour cette approche expérimentale.*

Cette démarche technologique est présentée dans le cadre d'une séance de TD en STS Biotechnologies.

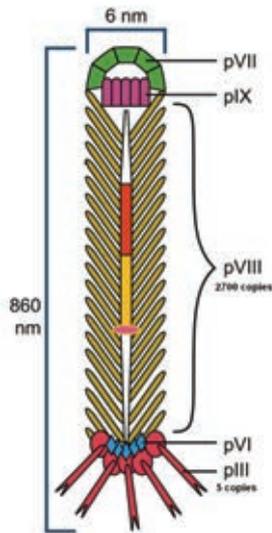
*P4 A partir du **document 15 A**, réaliser un document de synthèse présentant les éléments à expliquer à des étudiants afin qu'ils s'approprient le principe de cette technologie.*

*C20 Analyser et commenter les résultats présentés dans le **document 15 C**.*

Document 1 : stratégie expérimentale simplifiée  
(adapté de Root RA et al., *Antibodies*, 2016)



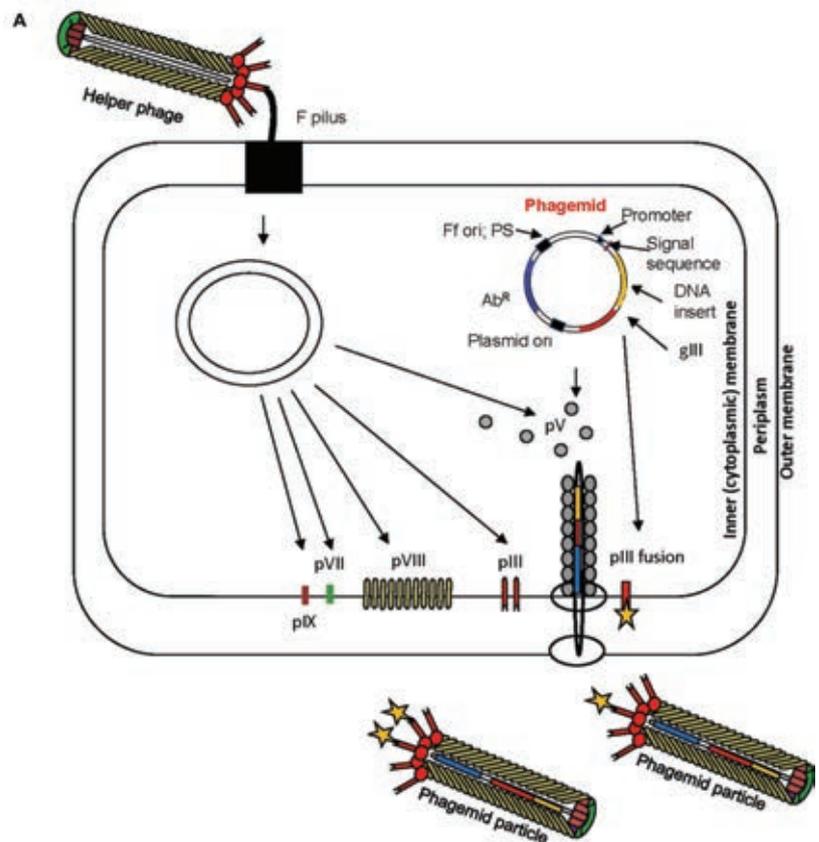
**Document 2 :** schéma du phage M13 (*Gagic D et al., Frontiers in Microbiology 2016*)

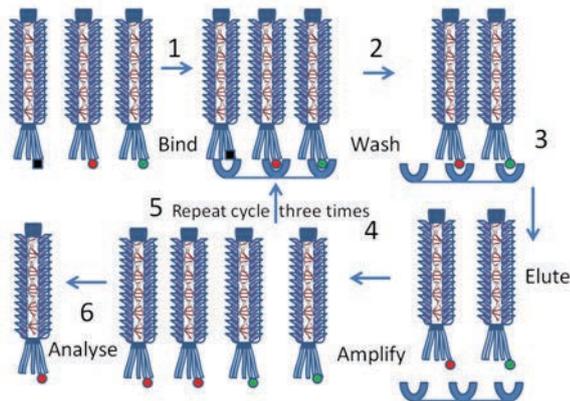


La masse moléculaire d'une particule phagique est voisine de  $17 \cdot 10^7$  Da. Son ADN est logé à l'intérieur d'un cylindre flexible composé d'environ 2 700 monomères de protéine pVIII. Une extrémité de la particule présente 5 copies des protéines pVII et pIX tandis que l'autre extrémité présente 5 copies des protéines pIII et pVI. Les protéines pIII exposées sur la tête du phage sont impliquées dans l'attachement aux pili de la bactérie hôte, généralement *E coli*. Les protéines pVIII composent le manteau du phage.

**Document 3 :** « phage display »

**3A :** production de particules de phagemides (*Gagic D et al., Frontiers in Microbiology 2016*)





**3B** : représentation schématique des étapes du « phage display » (illustration de *Wikipedia*)

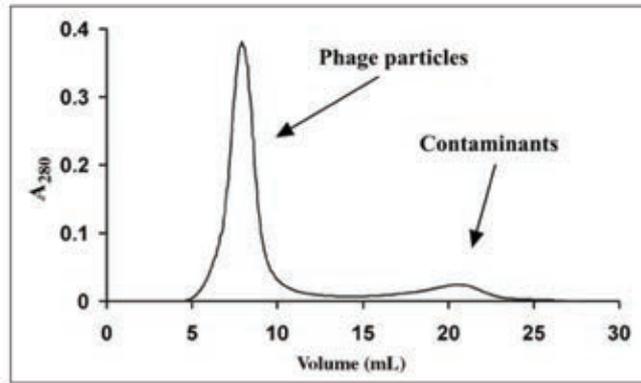
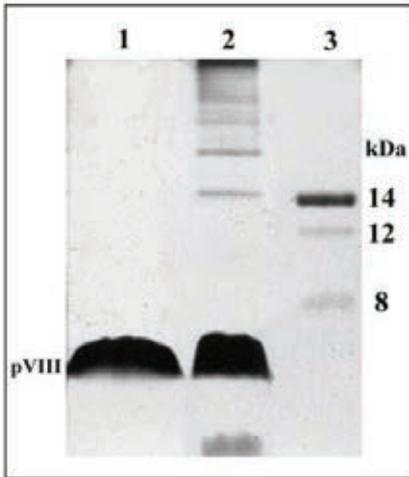
**Document 4 : chromatographie d'exclusion**  
(Extrait du catalogue SIGMA)

**Gel Filtration Media**

Medium	Fractionation Ranges (kDa, proteins)	Properties/Limitations	Potential Applications
<b>Sephacryl®</b>			
Matrix: acrylic (dextran/bisacrylamide copolymer)			
25-75 µm S-1000: 40-105 µm 0.2 MPa (2.6 x 30 cm column) pH range: 7-11	S-100 HR: 1-100 S-200 HR: 5-250 S-300 HR: 10-1500 S-400 HR: 20-8000 S-500 HR, S-1000: ND	Clean with 0.2 M NaOH, 0.1 M HCl, 1.0 M HOAc Compatible with detergents, chaotropic salts, dissociating agents Sterilize by autoclave Compatible with organic solvents Scaleable Good recoveries Stable bed volume	S-100 HR: peptides, small proteins S-200 HR: proteins, some small serum proteins (e.g., albumin) S-300 HR: membrane & serum proteins, monoclonal antibodies S-400 HR: large proteins & macromolecules with extended structures (e.g., proteoglycans, liposomes) S-500 HR: large macromolecules, small particles (e.g., plasmids)
<b>Sephadex®</b>			
Matrix: dextran (crosslinked with epichlorohydrin)			
C: 100-300 µm M: 50-150 µm F: 20-80 µm SF: 10-40 µm SF: 0.016-0.160 MPa (2.6 x 30 cm column) pH range: 2-13 (< G-25) 2-10 (> G-25)	G-10: <0.7 G-15: <1.5 G-25: 1-5 G-50: 1.5-30 G-75: 3-80 G-100: 4-150	Classic support Swelling 2-40x SF grade for best resolution, low flow rate F grade for prep lab work M grade for standard lab work C grade for very crude samples Can be autoclaved at 120 °C Compatible with detergents, chaotropic salts, dissociating agents Clean with 0.2 M NaOH Ideal for MW determinations Interact with aromatic compounds	G-10: very low MW substances; desalting; buffer exchange; peptides G-15: low MW compounds; interact with aromatic compounds; desalting; buffer exchange; peptides G-25: medium grade available in packed PG-10 columns for rapid, routine desalting; interact with aromatic compounds; small peptides & proteins; buffer exchange G-50: desalting; buffer exchange; standard for process scale; very low nonspecific interactions G-100: very low nonspecific interactions
<b>Sepharose®</b>			
Matrix: agarose			
6B: 45-165 µm 4B: 45-165 µm 2B: 60-200 µm 0.004-0.02 MPa (2.6 x 30 cm column) pH range: 4-9	6B: 10-4000 4B: 60-20,000 2B: 70-40,000	Clean with 0.5 M NaOH Good recoveries Broad fractionation range Temperature range: 4-40 °C Cannot be autoclaved Incompatible with oxidizing agents, chaotropic salts, dissociating agents	2B: DNA-protein complexes; viruses; asymmetric molecules; affinity support 4B: tRNAs; membrane proteins; polysaccharides; affinity support 6B: polio virus purification; proteins; polysaccharides

<b>Sephacryl®</b>	
Sephacryl 100-HR, pore size 1-100 kDa MW range (globular proteins)	S100HR
Sephacryl 200-HR, pore size 5-250 kDa MW range (globular proteins), pore size 1-80 kDa MW range (dextrans)	S200HR
Sephacryl 300-HR, pore size 10-1500 kDa MW range (globular proteins), pore size 1-400 kDa MW range (dextrans)	S300HR
Sephacryl 400-HR, pore size 20-8000 kDa MW range (globular proteins)	S400HR
Sephacryl 500-HR, pore size 40-20,000 kDa MW range (dextrans)	S500HR

**Document 5 : purification du phage M13**  
(d'après Yu M. et al., *BioTechniques*, 2005, 38 : 194-198)

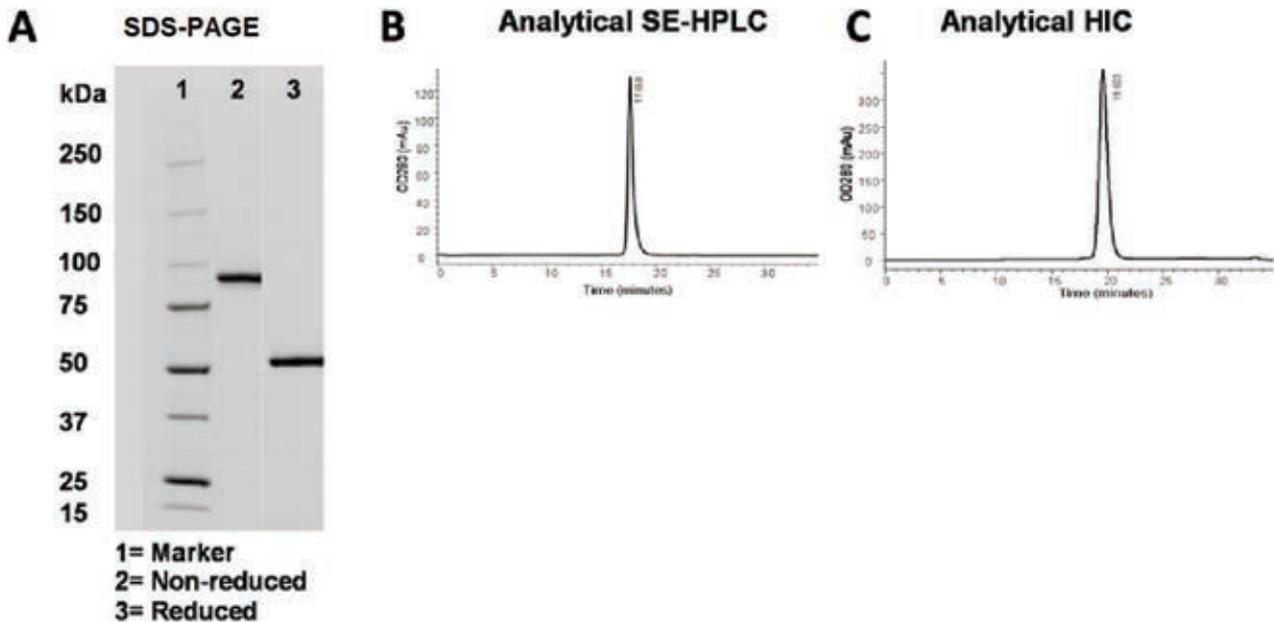


5.1. Elution profile of phage preparation subjected to the size-exclusion chromatography with Sephacryl S-500.

**5.2. Denaturing Tris-tricine electrophoresis of purified phage particles obtained after rescue of a phagemid displayed the single-chain variable fragment (scFv)-pIII fusion.**

Lane 1, phage preparation recovered after size-exclusion chromatography (SEC). The gel revealed single major band corresponding to the pVIII coat protein and faint bands possibly belonging to other phage proteins ; lane 2, same preparation but purified by double-polyethylene glycol (PEG) precipitation only; lane 3, low molecular weight (LMW) marker (Amersham Biosciences).

**Document 6 : détermination des paramètres physico-chimiques**  
(adapté de Root RA et al., *Antibodies*, 2016)



Résultats des analyses réalisées par :

- A SDS-PAGE,
- B SE-HPLC ou HPLC d'exclusion
- C HIC ou HPLC par interactions hydrophobes

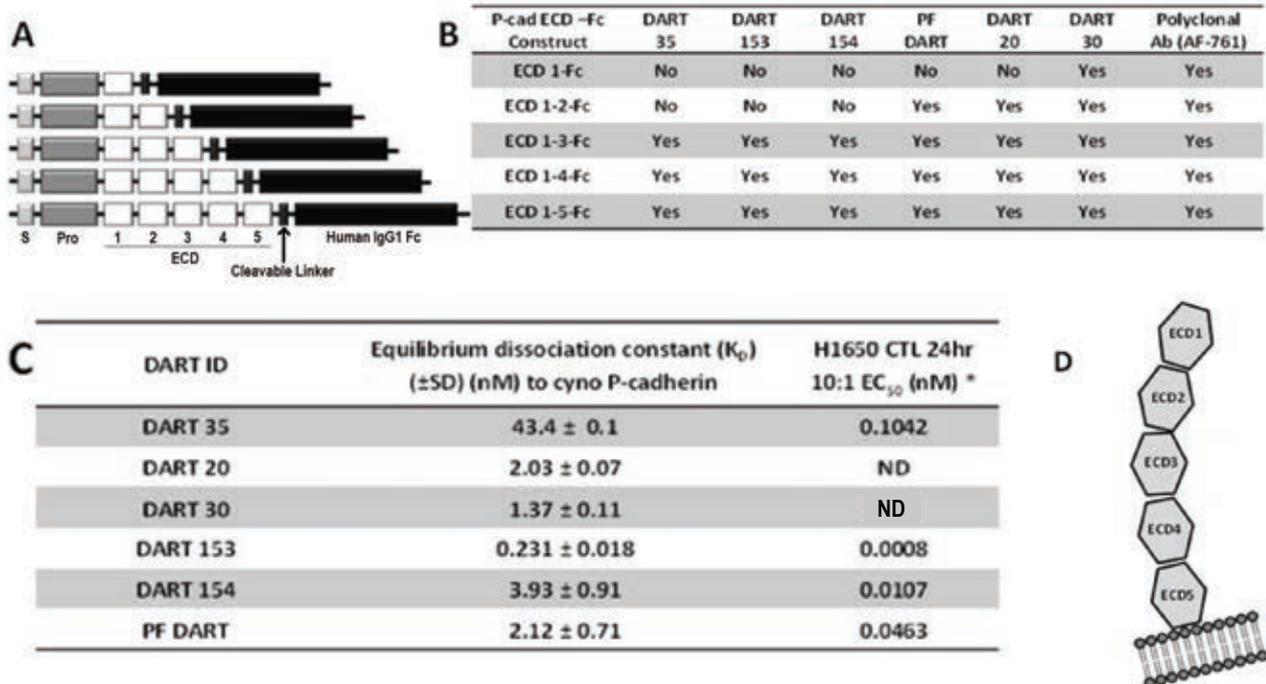
**Document 7 : résumé des  $K_D$  et  $EC_{50}$  pour différents DART**  
(adapté de *Root RA et al., Antibodies, 2016*)

DART ID	Equilibrium Dissociation Constant ( $K_D$ ) to Cyno P-cadherin ( $\pm$ SD) (nM)	Equilibrium Dissociation Constant ( $K_D$ ) to Human CD3 ( $\pm$ SD) (nM)	NCI-H1650 Cell Binding ELISA $EC_{50}$ (nM)	CHO Parental Cell Binding ELISA $EC_{50}$ (nM)	NCI-H1650 CTL Assay 48 h 10:1 $EC_{50}$ (nM)
33 DART	46.4 $\pm$ 4.1	18.25 $\pm$ 0.55	60.1	NB	1.246
34 DART	129.25 $\pm$ 31.75	21.85 $\pm$ 0.95	67.95	NB	1.888
35 DART	43.4 $\pm$ 0.1	23.15 $\pm$ 0.45	24.87	NB	0.1042
PF DART	2.12 $\pm$ 0.71	6.80 $\pm$ 2.81	19.69	NB	0.0463
20 DART	2.03 $\pm$ 0.07	5.19 $\pm$ 0.35	~114.7	NB	ND
30 DART	1.37 $\pm$ 0.11	13.6 $\pm$ 3.49	141.9	NB	ND

Summary table of DART equilibrium dissociation constants ( $K_D$ ) to cynomolgus monkey P-cadherin and human CD3, ELISA cell binding  $EC_{50}$  values to NCI-H1650 and control P-cadherin-negative cells, and CTL-directed of NCI-H1650 adenocarcinoma cells by anti-P-cadherin/anti-CD3 DART proteins.

NB = no binding detected; ND =  $EC_{50}$  not determined; NR = no response.

**Document 8 : Cartographie des sites de reconnaissance des DART et résultats des  $K_D$  et  $EC_{50}$  associés**  
(adapté de *Root RA et al., Antibodies, 2016*)

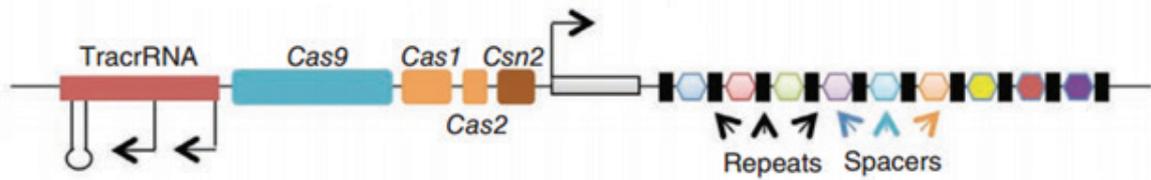


(A) Schematic representation of truncated human P-cadherin ECD constructs generated for epitope mapping studies. Gray shading represents the pro-peptide domain; White represents the P-cadherin ECD; Black shading represents the human IgG1 Fc with cleavable linker; (B) Summary of binding observed for P-cadherin DARTs to P-cadherin ECD-Fc constructs and the polyclonal anti-P-cadherin antibody (AF-761; R & D Systems); (C) CTL killing activity of DARTs tested in epitope mapping study; (D) Cartoon representation showing the presumed binding location of the various DARTs. \* = samples were tested on a separate dates with different donor effector cells. ND =  $EC_{50}$  not determined;

Remarques :

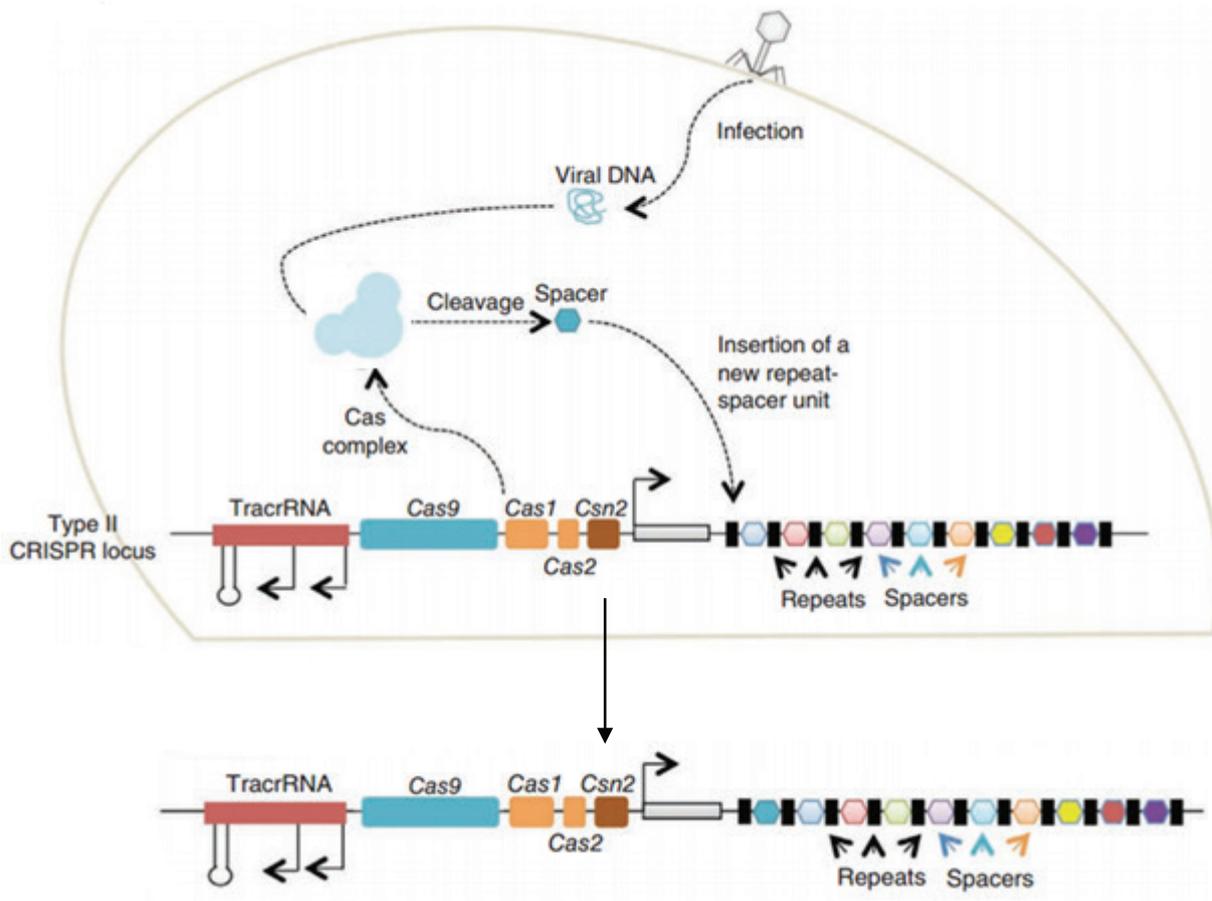
- ✓ ECD = ExtraCellular Domain. Les domaines ECD 1, 2, 3, 4 et 5 possèdent des structures primaires différentes.
- ✓ Les résultats de cartographie sont obtenus sur la base d'une technique ELISA après purification des différentes constructions exprimées transitoirement dans des cellules HEK293.

**Document 9**  
*Locus CRISPR de type II*  
 (adapté de IGEM 2014 SUSTC-Shenzhen)

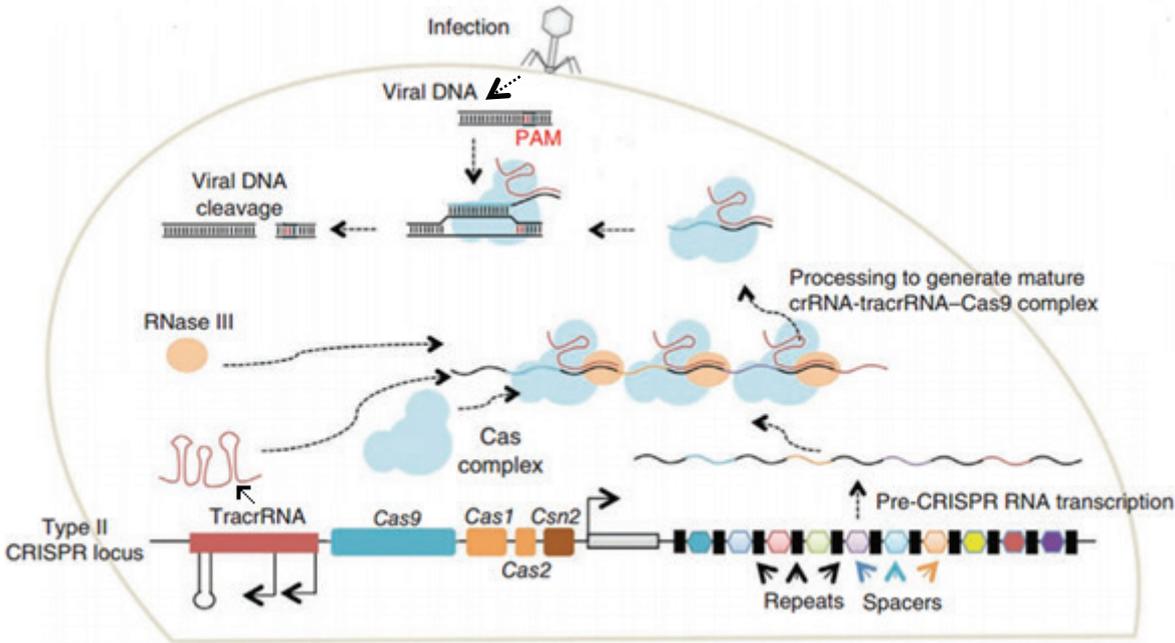


*TracrRNA* = gène codant l'ARN trans-activateur du système CRISPR  
*Cas* et *Csn* = gènes codant les protéines associées au système CRISPR  
*Repeats* = courtes séquences palindromiques du génome bactérien  
*Spacers* = séquences d'ADN étranger

**Document 10** : phase d'immunisation  
 (adapté de IGEM 2014 SUSTC-Shenzhen)



**Document 11 : réponse immunitaire**  
(adapté de IGEM 2014 SUSTC-Shenzhen)

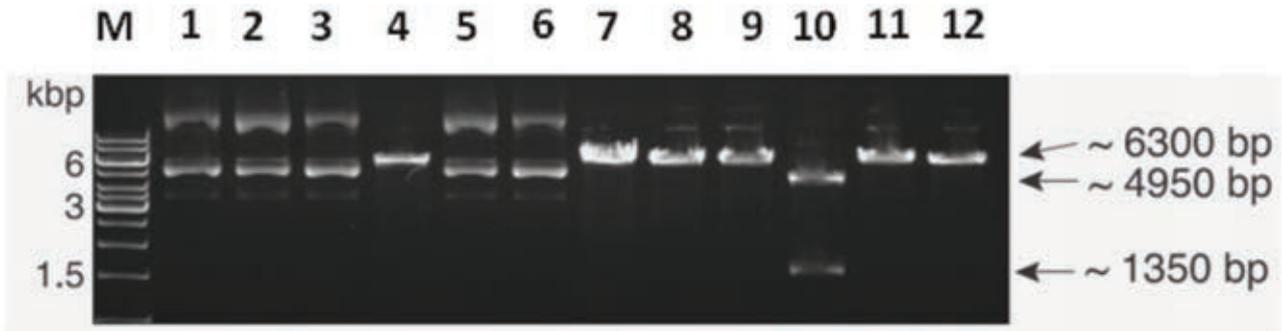


**Document 12**

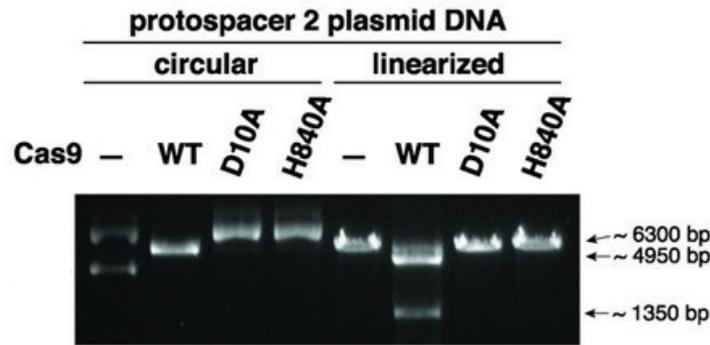
(adapté de *JINEK M et al. ; Science 2012 ; 337 : 816-821*)

		protospacer 2 plasmid DNA											
		circular						linearized					
protospacer 2 plasmid DNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cas9		-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
crRNA-sp2		-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
tracrRNA		-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
crRNA-sp1		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Mg <sup>2+</sup>		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Mix		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Cas9 was programmed with a 42-nucleotide crRNA-sp2, crRNA containing a spacer 2 sequence, in the presence or absence of 75-nucleotide tracrRNA. The complex was added to circular or XhoI-linearized plasmid DNA bearing a sequence complementary to spacer 2 and a functional PAM (protospacer 2 plasmid DNA). crRNA-sp1, crRNA containing a spacer 1 sequence; M, DNA marker; kbp, kilo-base pair



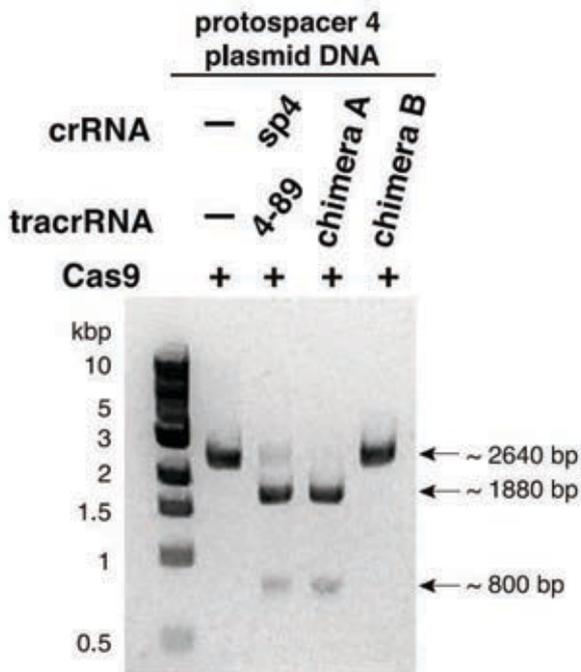
**Document 13**  
(JINEK M et al. ; Science 2012 ; 337 : 816-821)



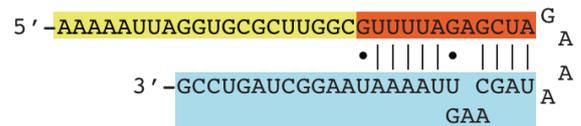
WT: wild type  
D10A, Asp<sup>10</sup>→Ala<sup>10</sup>  
H840A, His<sup>840</sup>→Ala<sup>840</sup>

Complexes of WT or nuclease mutant Cas9 proteins with tracrRNA:crRNA-sp2 were assayed for nuclease activity as in document 12

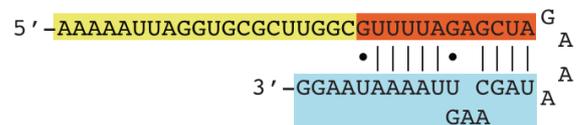
**Document 14**  
(JINEK M et al. ; Science 2012 ; 337 : 816-821)



**chimera A**



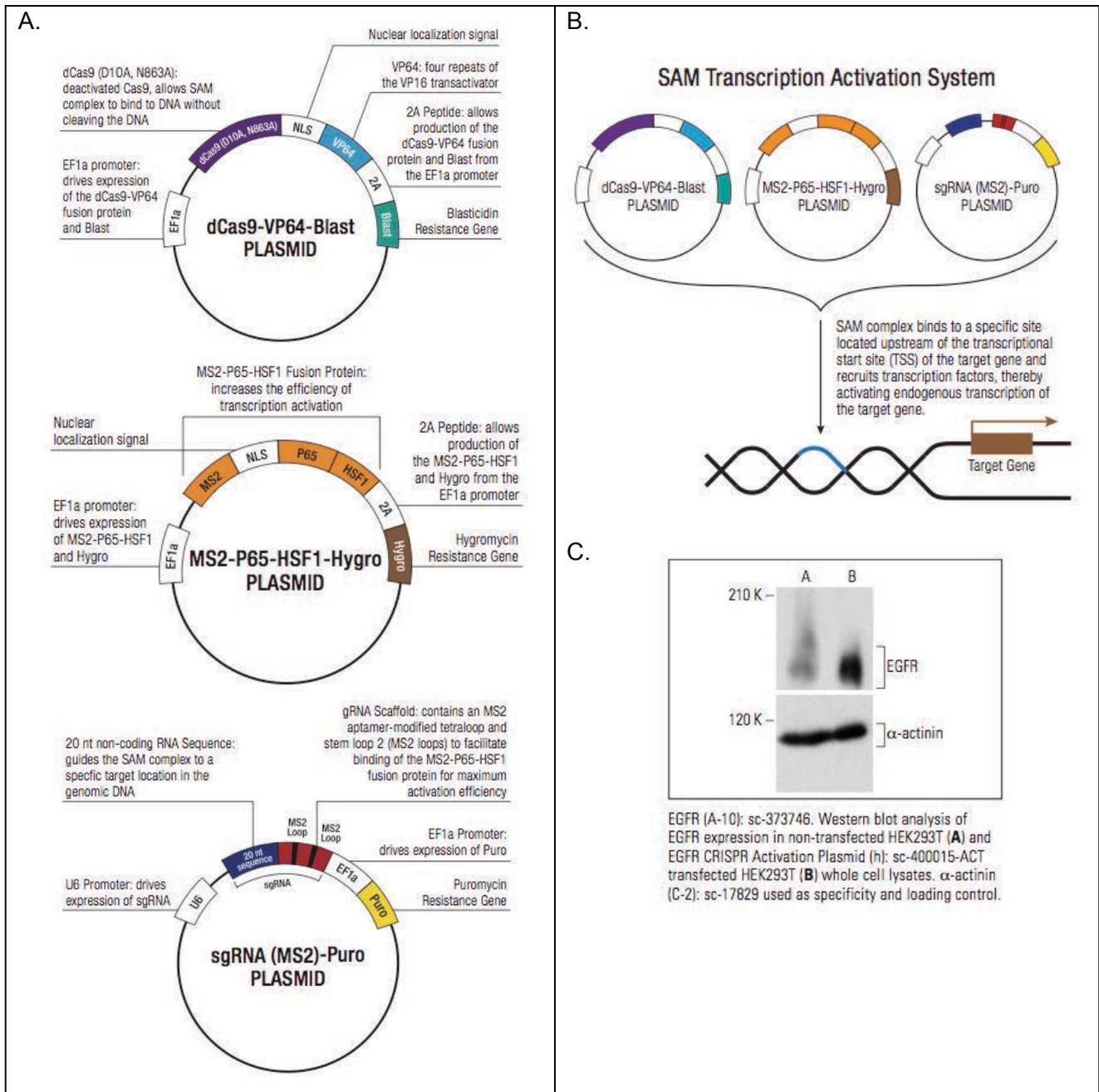
**chimera B**



A plasmid harboring protospacer 4 target sequence and a WT PAM was subjected to cleavage by Cas9 programmed with tracrRNA (4-89):crRNA-sp4 duplex or in vitro-transcribed chimeric RNAs constructed by joining the 3' end of crRNA to the 5' end of tracrRNA with a GAAA tetraloop. Cleavage reactions were analyzed by restriction mapping with XmnI. Sequences of chimeric RNAs A and B are shown with DNA-targeting (yellow), crRNA repeat-derived sequences (orange), and tracrRNA-derived (light blue) sequences.

Document 15

Invalidation et stimulation de l'expression des gènes par la technologie CRISPR-Cas9  
(Santa Cruz Biotechnology)



## ANNEXES

### A. Extrait du programme de biotechnologies de terminale STL

#### Préparation et analyse biochimique des produits biologiques

##### Méthodes de fractionnement

Objectifs de formation et supports théoriques	Compétences transversales et technologiques
<p>- Intérêt du fractionnement pour l'étude d'un produit biologique.</p> <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, échange d'ions, affinité,</li> <li>. solubilité différentielle,</li> <li>. dialyse,</li> <li>. distillation.</li> </ul> <p>- Technologies du fractionnement et de la détection associée, appareillages intégrés.</p> <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 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.</b></p> <p>Cette partie sera traitée en lien avec paragraphe 1.5 « Les molécules des organismes vivants présentent des structures et des propriétés spécifiques » de CBSV.</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>

### B. Extrait du programme du BTS biotechnologies

#### Section 2 : OUTILS, TECHNIQUES ET METHODES DU GENIE GENETIQUE

*Compte tenu de la vitesse et de l'importance d'évolution des techniques, il convient de bien distinguer les "fondamentaux", dont la connaissance doit être bien assise, et les connaissances "culturelles", pour lesquelles il convient de dégager les idées "force" sans rechercher l'exhaustivité. En cas d'utilisation de kits en Travaux Pratiques, on s'attachera à bien en dégager les principes.*

INITITULE DU PROGRAMME	COMMENTAIRES		COURS	TP
	COURS	TRAVAUX PRATIQUES		
<b>2-3- Les outils du clonage moléculaire chez <i>E.coli</i></b>				
Les vecteurs : - vecteurs plasmidiques de clonage - autres vecteurs : phagiques (dérivés des phages lambda et filamenteux), cosmides et phagemides, BACs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Notions simples sur les vecteurs non plasmidiques, incluant cependant les procédés de transfection associés (encapsulation in vitro ...)</li> <li>• Les vecteurs d'expression seront développés en Section 3</li> </ul>	Vérification d'une carte de restriction  Restrictions intégrées à d'autres manipulations telles que clonage...	X	X
Les endonucléases de restriction	Principalement celles de type II		X	X
Les autres enzymes usuelles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ADN ligase</li> <li>• Principaux outils de coupure, de polymérisation, de ligature, de modifications ...</li> </ul>		X	X
<b>2-4- Les méthodes du clonage moléculaire</b>				
L'insertion d'une séquence d'ADN dans un vecteur	Logique des principaux procédés de ligature d'un insert et d'un vecteur		X	X
La transformation d' <i>E.coli</i>	Principe et mise en oeuvre des méthodes chimique et électrique	Transformation bactérienne par méthode chimique	X	X
Sélection des transformés, repérage des recombinés, criblage éventuel du clone d'intérêt	Le système de l'alpha-complémentation sera détaillé.	Réalisation d'un clonage ou d'un sous-clonage avec mise en jeu d'un ensemble d'étapes : extraction , restriction, (purification), ligature, transformation, sélection et/ou identification des recombinés	X	X

C. Extrait du programme de biotechnologies de la CPGE TB

Connaissances clés à construire	Commentaires, capacités exigibles	
<b>1.1. Les protéines : de la structure à la fonction</b>		
<b>1.1.2. Structure primaire</b>  La liaison peptidique se crée entre un 1- carboxyle et un groupement alpha aminé	- Présenter la géométrie de la liaison peptidique et les propriétés associées.  L'effet mésomère est étudié en physique-chimie. <b>Limite</b> : <i>L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire n'est pas à traiter.</i>	S1
<b>1.1.3. Structure tridimensionnelle</b>  Les différents niveaux de structure (secondaire, tertiaire et quaternaire) des protéines sont déterminés par les propriétés des chaînes latérales des résidus d'acides aminés.  Il existe des conditions physico-chimiques qui provoquent la dénaturation des protéines.	- Mettre en relation les propriétés des chaînes latérales des acides aminés et la structure tridimensionnelle des protéines. - Caractériser les différents niveaux de structure en lien avec les liaisons stabilisatrices. - Repérer des motifs et domaines fonctionnels au sein d'une architecture moléculaire.  - Enoncer le mode d'action de quelques agents dénaturants.  Les interactions faibles stabilisatrices sont étudiées en physique-chimie.	S1
<b>1.1.4. Interactions protéine-ligand</b>  La structure tridimensionnelle des protéines et son ajustement induit par la liaison au ligand conditionnent leurs propriétés biologiques.  [.....]	- Relier l'affinité et la stéréospécificité.  - Démontrer la relation de Scatchard.  [.....]  La notion de constante d'équilibre est étudiée en physique-chimie. <b>Limite</b> : <i>Seul le cas de l'interaction non coopérative est traité.</i>	S3
<b>1.2. Méthodes d'étude des protéines: de la purification à la caractérisation</b>		