



MINISTÈRE
DE L'ÉDUCATION
NATIONALE

EAI BIO 1

SESSION 2018

AGRÉGATION CONCOURS INTERNE

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.

A

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

Le sujet comporte **12 documents**.

Des extraits de référentiels et programmes des formations disciplinaires de la série STL-Biotechnologies et des STS de biologie appliquée sont regroupés en annexes.

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.

► **Concours interne de l'Agrégation de l'enseignement public :**

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EAI	7100A	101	0809

Les microbiotes

1. Etude du microbiote nasal par métagénomique

L'approche métagénomique consiste en un séquençage massif de l'ADN contenu dans un échantillon complexe puis de l'analyse des séquences obtenues.

Elle comporte plusieurs étapes dont les principales sont :

- ✓ le recueil des bactéries et l'extraction des ADN ;
- ✓ l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN par PCR ;
- ✓ le séquençage des amplicons par la technologie Illumina® NGS ;
- ✓ l'analyse par bio-informatique des séquences obtenues.

1.1. Recueil et extraction des ADN bactériens

L'ADN des échantillons, obtenus par écouvillonnage nasal de 28 627 patients, a été extrait selon le protocole décrit dans le **document 1**.

- C1 Rappeler la signification du sigle EDTA, écrire sa formule semi-développée et préciser son rôle.
- C2 Préciser le rôle du NP40 utilisé dans le tampon de lyse.
- C3 Indiquer le rôle de l'étape du *bead beating* et proposer une technique de substitution.
- C4 Expliquer le rôle de l'éthanol présent dans le tampon de lavage.

1.2. Amplification par PCR

Les échantillons d'ADN extraits subissent une amplification par PCR.

- C5 Justifier le choix du gène de l'ARNr 16S comme cible de la PCR.
- P1 A partir du **document 2**, proposer une séance pédagogique permettant aux étudiants de BTS Biotechnologies de déterminer le couple d'amorces à utiliser pour amplifier la région d'ADN d'intérêt.

1.3. Séquençage des amplicons

Le séquençage par la technologie Illumina® NGS (*Next Generation Sequencing*) est représentée dans le **document 3**. Cette technique consiste en une amplification par ponts, ou PCR en phase solide, suivie d'un séquençage.

- C6 Préciser le rôle des adaptateurs 1 et 2.
- C7 Expliquer la formation des ponts d'amplification et préciser leur intérêt.

- C8 Proposer une stratégie pour s'assurer que chaque *cluster* ne contienne qu'une seule séquence.
- C9 Présenter les caractéristiques et l'intérêt des *clusters* obtenus.
- P2** Proposer un tableau de synthèse comparant le système d'amplification par ponts de la technologie Illumina® NGS à la technique de PCR classique. Ce document sera élaboré dans le cadre d'une séance abordant les nouvelles techniques en biologie moléculaire.
- C10 Exposer le principe de fonctionnement du séquençage utilisé dans le **document 3**.
- C11 Discuter les caractères qualitatif et semi-quantitatif de cette technologie Illumina® NGS.
- P3** Décrire le déroulement d'une ou plusieurs séances de travaux dirigés de bio-informatique utilisant les informations obtenues à l'issue de la technologie Illumina® NGS, dans le contexte de l'étude présentée.

2. Influence de la composition du microbiote sur la colonisation par des pathogènes

Le microbiote nasal de patients hospitalisés a été étudié afin de comprendre si sa composition affecte sa colonisation persistante par *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM).

L'utilisation du milieu « *Brilliance MRSA 2 AGAR* » a permis de déterminer si les prélèvements effectués sur les patients sont positifs à un SARM (**document 4**).

- P4** Exploiter le **document 4** dans le cadre d'une séance de travaux pratiques pour des étudiants en STS Analyses de Biologie Médicale. Vous préciserez en particulier comment ce milieu permet de sélectionner et de repérer un SARM après culture.

Vingt-six patients ont été déclarés porteurs persistants de SARM. En parallèle, 26 patients témoins ont été sélectionnés. Une analyse métagénomique du microbiote nasal de chacun de ces patients a été réalisée. Le bilan des résultats est présenté dans le **document 5**.

- C12 Analyser les résultats présentés dans le **document 5** sachant que, selon les auteurs, le gène de l'ARNr 16S de *S. aureus* a été détecté chez les 26 patients porteurs persistants de SARM.

Des études de biostatistique complémentaires ont permis d'identifier plus précisément des différences dans la composition du microbiote des deux groupes de patients. Une association négative forte a été constatée entre la colonisation des cavités nasales par les SARM et les streptocoques, en particulier *Streptococcus mitis*.

Pour confirmer ces études, des cocultures ont été réalisées *in vitro* sur chacune des souches de SARM isolées à partir des 26 patients porteurs persistants de SARM. Le **document 6** présente les conditions opératoires et les résultats obtenus pour deux des SARM testés.

Des travaux antérieurs, résumés dans le **document 7**, ont permis d'expliquer l'action inhibitrice et bactéricide de *Streptococcus pneumoniae* vis-à-vis d'autres souches commensales des voies aériennes supérieures.

C13 A partir des données du **document 7**, présenter l'intérêt de l'utilisation de *S. pneumoniae* au niveau de la coculture.

C14 Exploiter les résultats présentés sur le **document 6**. Préciser la composition du témoin réalisé ainsi que son intérêt.

C15 Conclure quant à l'association négative forte observée entre les SARM et les streptocoques.

3. Influence du microbiote intestinal sur le système nerveux central de l'hôte

Des études récentes ont mis en évidence qu'il existerait des relations entre certains troubles neurologiques et psychiatriques et le microbiote intestinal et que ce dernier pourrait jouer un rôle protecteur ou aggravant vis-à-vis de ces pathologies.

3.1. Relation microbiote et réponse comportementale à la cocaïne

Dans une étude parue en 2016 dans *Scientific Reports*, Kiraly *et al.* ont démontré qu'une altération du microbiote intestinal de la souris modifie ses réponses comportementales à la cocaïne.

La cocaïne (**document 8**) agit sur le système dopaminergique en renforçant l'effet de la dopamine, en particulier dans le *nucleus accumbens*.

C16 A l'aide d'un schéma, présenter le mécanisme de la transmission dopaminergique et proposer les mécanismes d'action possibles de la cocaïne.

L'analyse du microbiote intestinal peut s'appuyer sur l'utilisation de souris axéniques. Néanmoins, afin d'étudier les relations entre microbiote intestinal et réponse comportementale à la cocaïne, les auteurs ont utilisé une autre approche expérimentale qui consiste à réaliser une réduction (*knockdown*) du microbiote intestinal par administration d'antibiotiques à large spectre. Pour cela, un groupe de souris a reçu pendant deux semaines un cocktail de néomycine, de bacitracine et de vancomycine dans l'eau de boisson (administration *per os*) et a été comparé à un groupe de souris témoin. Une analyse du microbiote par PCR quantitative démontre que les souris traitées par le cocktail d'antibiotiques présentent une réduction de 72 % de leur microbiote intestinal par rapport au groupe témoin.

La réponse comportementale des souris a été évaluée selon la démarche expérimentale présentée dans le **document 9**.

C17 Préciser les avantages et les inconvénients de la stratégie de *knockdown* du microbiote par rapport à l'utilisation de souris axéniques.

Le conditionnement de préférence de place et l'activité locomotrice ont été évalués chez des souris témoins et des souris ayant subi un *knockdown* (**document 10**).

C18 Analyser les résultats présentés dans le **document 10**.

Les auteurs ont reproduit le test de conditionnement de préférence de place sur un groupe de souris ayant reçu, cette fois-ci, les mêmes antibiotiques par voie parentérale. Le **document 11** présente les résultats obtenus.

C19 Expliquer l'apport de cette expérience par rapport à la précédente.

3.2. Rôle putatif des acides gras à chaîne courte dans la relation microbiote intestinal - cerveau

Les acides gras à chaîne courte (AGCC) sont des médiateurs envisagés pour expliquer l'action à distance du microbiote intestinal sur le cerveau. Produits par le microbiote, les AGCC traversent l'épithélium intestinal, sont transportés par la circulation sanguine et franchissent la barrière hémato-encéphalique.

C20 Ecrire la formule semi-développée des AGCC suivants : l'acétate (éthanoate), le butyrate (butanoate) et le propionate (propanoate).

P5 Choisir un AGCC comme exemple pour présenter, à des élèves de 1^{ère} STL, la définition du pK_a et l'influence du pH sur l'état d'ionisation d'une molécule. Discuter la faculté d'un AGCC à traverser la membrane plasmique des entérocytes au pH intestinal en phase post-prandiale.

Données : Table des pK_a à 25 °C

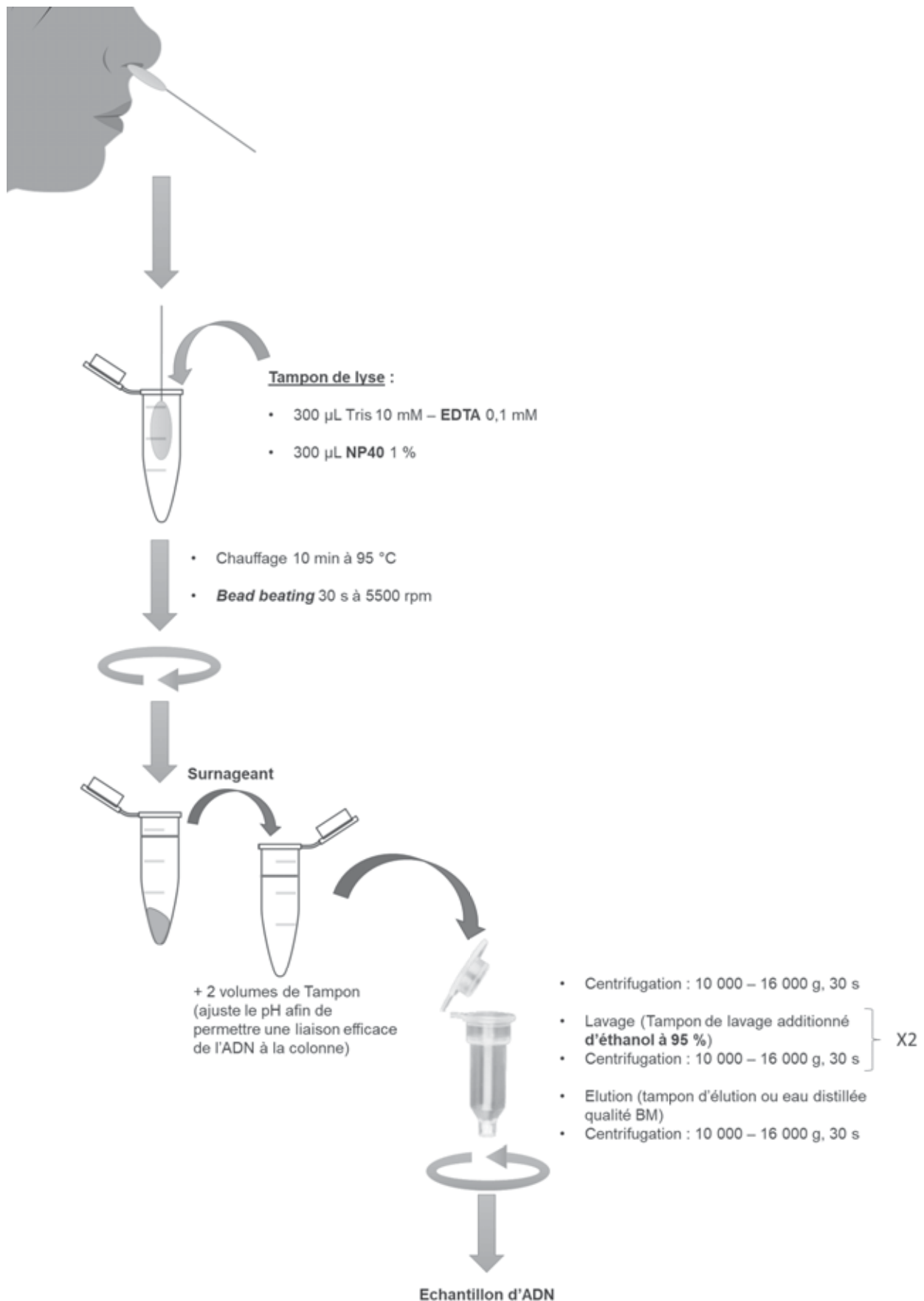
	pK_a
acide acétique / acétate	4,76
acide butyrique / butyrate	4,82
acide propionique / propionate	4,87

Les AGCC peuvent exercer un effet physiologique par activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou par inhibition de certaines histones désacétylases (HDAC). Leur effet sur le conditionnement de place est présenté dans le **document 12**.

C21 Analyser les résultats présentés dans le **document 12**.

C22 Proposer un schéma de synthèse illustrant, dans ce contexte expérimental, le rôle putatif des AGCC.

Document 1 : protocole d'extraction de l'ADN (adapté de Bessesen MT. *et al.*, *Journal of Infection*, 2015)



Document 2 : couples d'amorces et extrait de la région d'ADN à amplifier

Note : Les T_m sont calculées à l'aide d'un logiciel tenant compte de la concentration en ions monovalents.

- **Couple 1 :**

Amorce sens : AGAGTTTGATGCTGGCTCAG	$T_m = 47\text{ °C}$
Amorce antisens : TGCTGCCTCCCGTAGGAGT	$T_m = 50\text{ °C}$

- **Couple 2 :**

Amorce sens : AGAGTTTGATGCTGGCTCAG	$T_m = 47\text{ °C}$
Amorce antisens : TGCTGCGTCCGGTAGGAGT	$T_m = 50\text{ °C}$

Extrait de la région d'ADN à amplifier :

.....TAGCTAAGAGTTTGATGCTGGCTCAGATCGACGTACAAGGTCCATGGTCATGAA
TGCCAACACCAGTAGACAGTAGTAGTACGTAGGACCTATATGACCCAGTATAGCGGTG
ATCACCAGTGACCCAGTAGCATTGTGCCATGCCCAGGGTCACGTAGATGAGTACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTCACGTACA.....

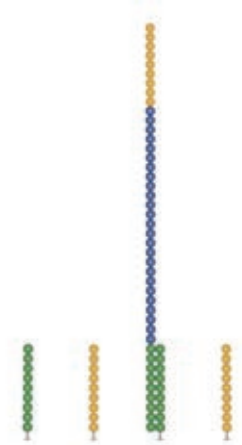
↓
↑

Document 3 : séquençage par la technologie Illumina® NGS

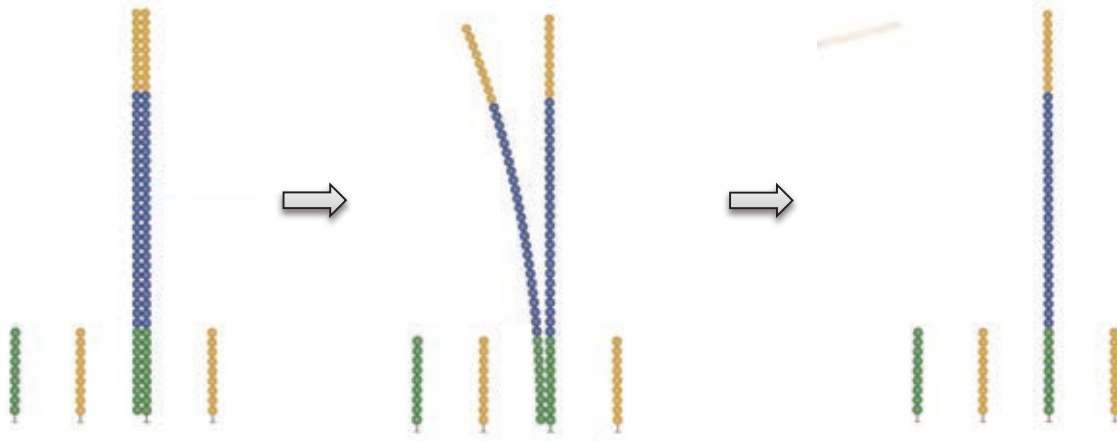
1. Amplicons obtenus



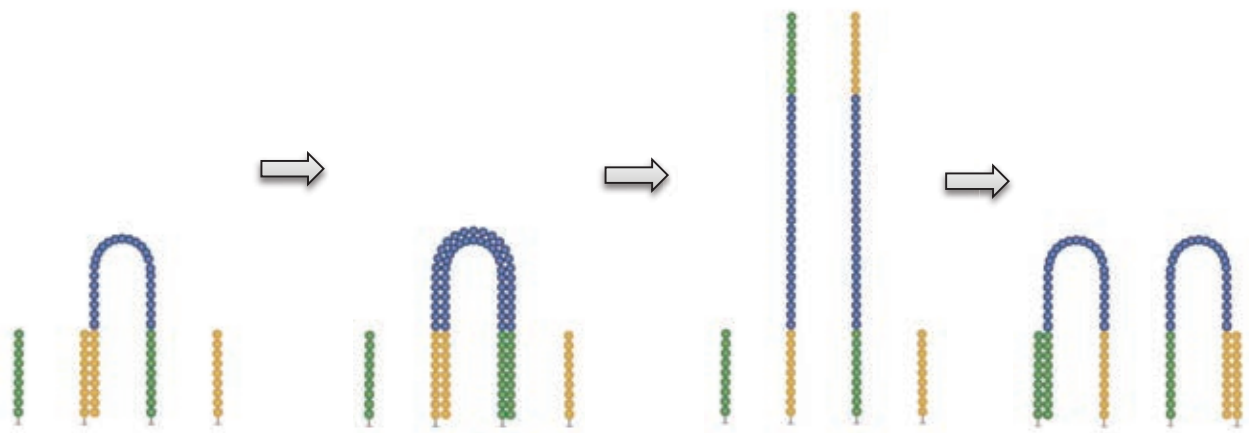
2. Dénaturation et hybridation sur cellule microfluidique, après quantification et normalisation des échantillons



3. Copie isothermique du brin à partir d'un oligonucléotide fixé et départ du brin non fixé



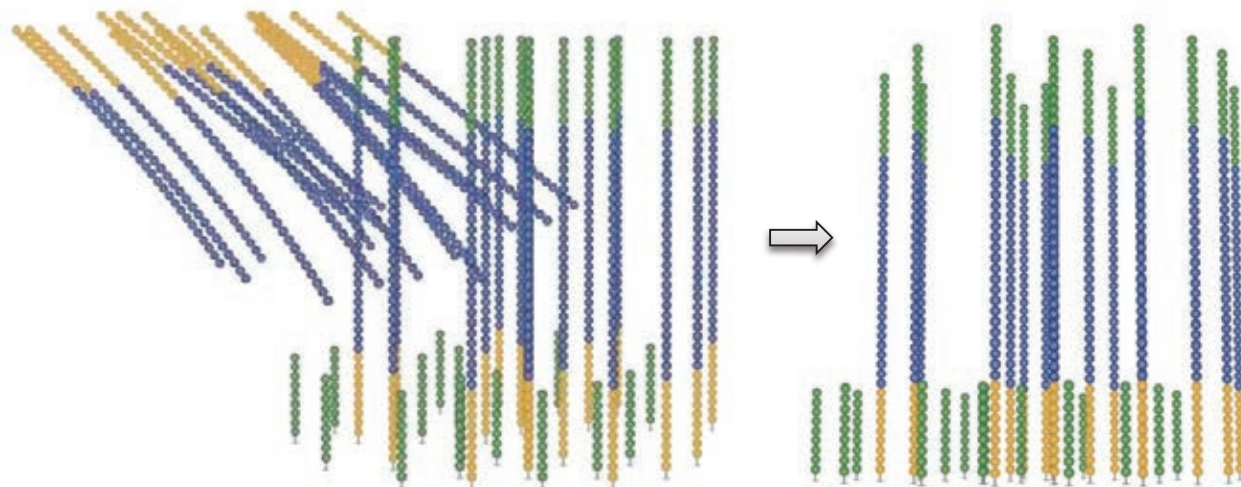
4. Amplification isothermique par formation de structures en ponts (PCR en phase solide) → obtention de *clusters*



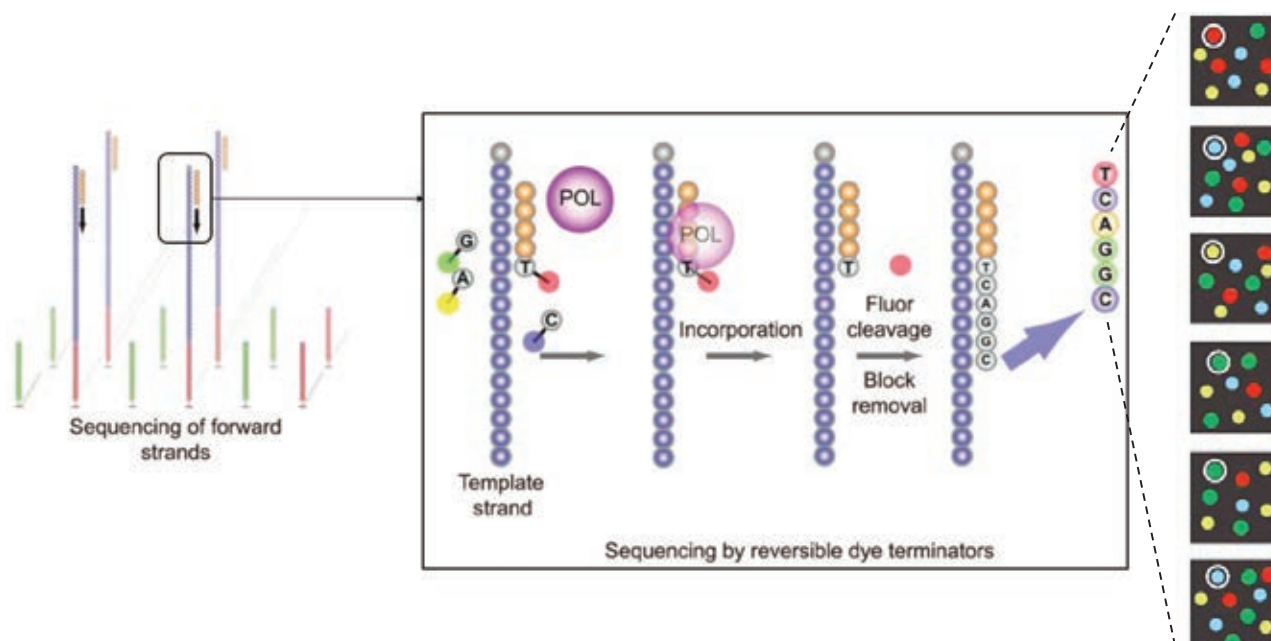
Suite de
l'étape 4



5. Elimination de l'un des deux brins par coupure spécifique



6. Séquençage des *clusters*



Document 4 : extraits de la fiche technique descriptive du milieu « *Brilliance* MRSA 2 AGAR »

Typical Formula*	g/L†
Peptone mix	20.0
Carbohydrate	4.0
Kaolin	15.0
Salts	5.0
Agar	13.0
Chromogenic mix	0.2
Antibiotic cocktail	20 ml
pH 7.3 ± 0.2 @ 25 °C	

Description

The importance of screening as part of an effective infection control programme to limit the spread of MRSA is well recognized. Speed and accuracy of results are critical aspects of this. Colonized patients must be targeted for isolation and appropriate treatment as early as possible. While negative patients need to be given the all clear to ensuring that valuable infection control resource is not wasted on patients who are not colonized.

Over recent years, the performance of media for MRSA screening has improved dramatically. As part of continuous improvement policy, the work of our team of research and development scientist has led resulted in the development of *Brilliance* MRSA 2 Agar, which reliably recovers MRSA strains in just 18 hr. The enhanced formulation has greater accuracy than previous formulations¹, giving more reliable results. It produces large MRSA colonies than previous formulations, making it easier to work with¹. A new chromogenic provides more consistent colony colour, with better differential, so aiding interpretation².

Brilliance MRSA 2 Agar can be inoculated from a screening swab taken from hospital patient or staff, from an isolated colony or from a liquid suspension. MRSA grows as blue colonies which are very easy to read against the light coloured, opaque background. Plates are incubated at 37°C, and provide high sensitivity and specificity, with results available in just 18 hours. This allows a rapid response, so enabling the patient to receive the most appropriate treatment as early as possible reducing the risk of onward transmission of infection. Accuracy minimizes costs, by helping to ensure that only those in need receive what can be costly treatment.

For more information visit <http://www.oxoidhai.com/>

Technique

Brilliance MRSA 2 Agar can be inoculated from screening swabs taken from hospital patients or staff, an isolated colony or from liquid suspension, according to local guidelines. The medium should be allowed to warm to room temperature before inoculation. Incubate for 18–24 hr. at 37°C. There is no need to incubate beyond 24 hr. Denim blue colonies are presumptive positive for MRSA. Identifications as *S. aureus* can be confirmed with Staphytest Plus (DR0850) or Dryspot Staphytest Plus (DR0100), and PBP2' (DR0900) can be used to confirm MRSA.

For further instructions on the use and interpretation of *Brilliance* MRSA 2 Agar, simply [download the data sheet \(698KB\)](#) in PDF format.

(suite page suivante)

Storage conditions and shelf life

Brilliance MRSA 2 Agar plates should be stored in the original packaging at the temperature stated on the pack or product specification, and protected from direct light. When stored as directed, the unopened product will remain stable until the expiry date on the label.

Appearance

Prepared medium: Pale, off-white, opaque gel medium in Petri dishes

Quality Control

Positive Controls:	Expected results
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®33591	Blue colonies
Negative Controls:	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC®12228	Inhibited
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®27853	Inhibited
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923	Inhibited
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC®10975	Inhibited
<i>Bacillus licheniformis</i>	Pink colonies

Precautions

Brilliance MRSA 2 Agar is for in vitro diagnostic use only, by trained individuals. Do not use beyond the expiry date given on the label, or if the product shows any sign of deterioration.

Sterilize specimens, equipment and media properly after use.

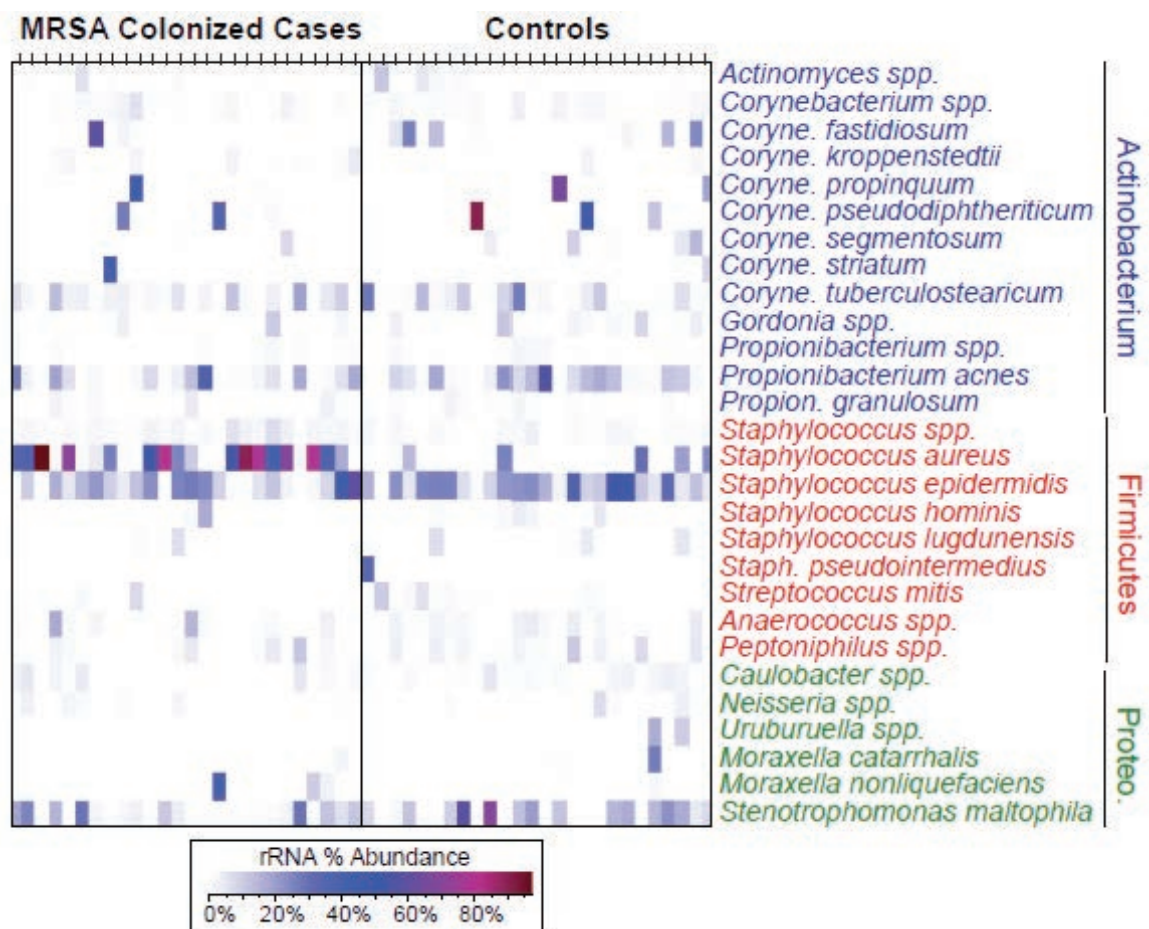
Limitations

Organisms with atypical resistance or enzyme expression patterns may give anomalous results.

References

1. Reynolds, C. (2010), Oxoid white paper, LT1415.
2. Sanders, C., Kalka-Moll, W., Scopes, E. (2011), Poster presented at ECCMID 201, LT1432

ATCC® is a registered trademark of American Type Culture Collection



Heat map comparing the relative abundances of species-level OTUs across groups. Color coding denotes the percentage of relative abundances of OTUs within each subject. Individual subjects are designated by tick marks along the top x-axis. Species are categorized by phylum (Proteo = Proteobacterium).

Note : dans l'approche OTU (ou UTO pour Unité Taxonomique Opérationnelle), les séquences d'ADN sont regroupées en fonction de leur similarité. Un phylotype constitue un regroupement de séquences d'ADN à partir d'une séquence d'ADN de référence.

Document 6 : conditions opératoires et résultats obtenus pour deux des SARM testés en coculture (d'après Bessesen MT. et al., Journal of Infection, 2015)

Matériel et réactifs :

- Milieu : Trypticase Soja Agar (TSA) coulé en boîtes de Petri, avec ou sans catalase à 200 U.mL⁻¹
- Souches (préculture de 5 mL en bouillon Cœur Cerveau, à 37 °C, pendant 18 h) :
 - ✓ *S. aureus* 2013 108a et *S. aureus* 2013 128a (souches de SARM isolées à partir de patients porteurs persistants de SARM)
 - ✓ *Souches testées en coculture* :
 - *Streptococcus mitis* ATCC souche 49456
 - *Streptococcus anginosus* (isolat clinique)
 - *Streptococcus pneumoniae* (transmis par Ed. Janoff)
 - *Enterococcus* spp (isolats cliniques 1b et 2a)

Note : Les streptocoques sont incubés sous 5 % de CO₂. Les autres souches sont cultivées sous agitation à 180 rpm.

Mode opératoire :

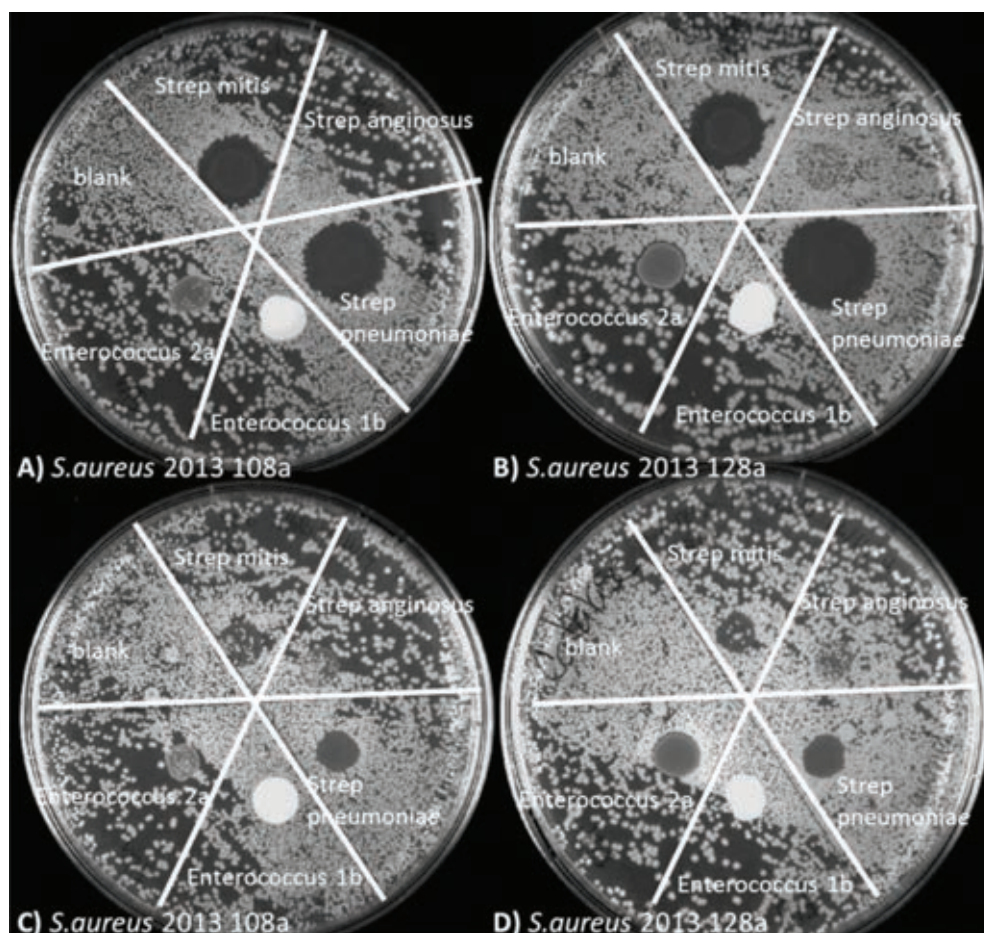
- Chaque souche de SARM est étalée sur boîte TSA à raison de 10⁴ UFC et séchée pendant 10 min.
- 10 µL de chaque souche à tester en coculture sont déposés sous forme de spots sur chaque boîte inoculée par un SARM.

Les boîtes sont mises à sécher pendant 10 min puis incubées à 37 °C sous 5 % de CO₂.

Résultats :

A) et B) gélose TSA

C) et D) gélose TSA additionnée de catalase à 200 U.mL⁻¹



**Document 7 : résumé d'une publication démontrant l'action inhibitrice et bactéricide de
*Streptococcus pneumoniae***

Infect Immun, 2000 Jul;68(7):3990-7.

Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract.

Pericone CD¹, Overweg K, Hermans PW, Weiser JN.

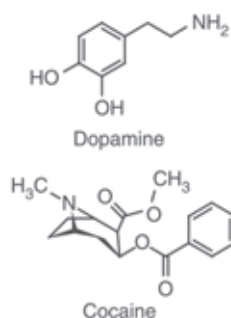
Ⓢ Author information

Abstract

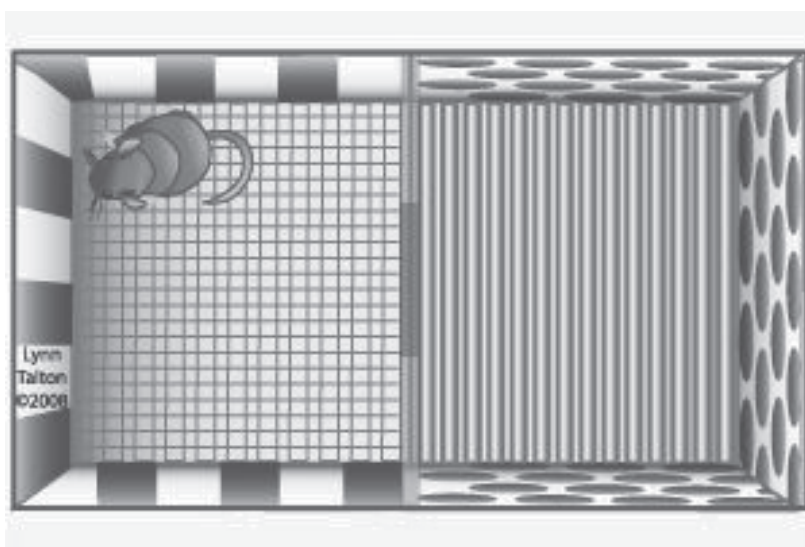
An inverse correlation between colonization of the human nasopharynx by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, both common upper respiratory pathogens, has been reported. Studies were undertaken to determine if either of these organisms produces substances which inhibit growth of the other. Culture supernatants from *S. pneumoniae* inhibited growth of *H. influenzae*, whereas culture supernatants from *H. influenzae* had no effect on the growth of *S. pneumoniae*. Moreover, coculture of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* led to a rapid decrease in viable counts of *H. influenzae*. The addition of purified catalase prevented killing of *H. influenzae* in coculture experiments, suggesting that hydrogen peroxide may be responsible for this bactericidal activity. *H. influenzae* was killed by concentrations of hydrogen peroxide similar to that produced by *S. pneumoniae*. Hydrogen peroxide is produced by the pneumococcus through the action of pyruvate oxidase (SpxB) under conditions of aerobic growth. Both an spxB mutant and a naturally occurring variant of *S. pneumoniae*, which is downregulated in SpxB expression, were unable to kill *H. influenzae*. A catalase-reversible inhibitory effect of *S. pneumoniae* on the growth of the respiratory tract pathogens *Moraxella catarrhalis* and *Neisseria meningitidis* was also observed. Elevated hydrogen peroxide production, therefore, may be a means by which *S. pneumoniae* is able to inhibit a variety of competing organisms in the aerobic environment of the upper respiratory tract.

PMID: 10858213 PMCID: [PMC101678](#)

Document 8 : formules topologiques de la dopamine et de la cocaïne



Document 9 : test de conditionnement de préférence de place



Deux compartiments sont séparés par une porte. La texture du sol et les motifs des parois permettent à la souris de différencier ces deux compartiments. Une caméra enregistre les déplacements de la souris.

Phase d'habituation :

Pendant le premier jour, la souris explore librement les deux compartiments (porte ouverte).

Phase de conditionnement :

Le matin, la souris reçoit une injection intrapéritonéale (i.p.) de solution saline dans l'un des deux compartiments (porte fermée). L'après-midi, la souris reçoit une injection i.p. de cocaïne et est placée dans l'autre compartiment (porte fermée). Cette opération est répétée pendant deux jours.

L'animal associe l'exposition à la cocaïne (stimulus inconditionnel) à un des deux compartiments (stimulus conditionnel).

Phase de test :

La souris explore librement les deux compartiments (porte ouverte) pendant 20 minutes.

L'exploitation de la vidéo permet de calculer le **score de préférence de place** : ce score correspond à la différence (en secondes) entre le temps passé dans le compartiment associé à la cocaïne et le temps passé dans l'autre compartiment.

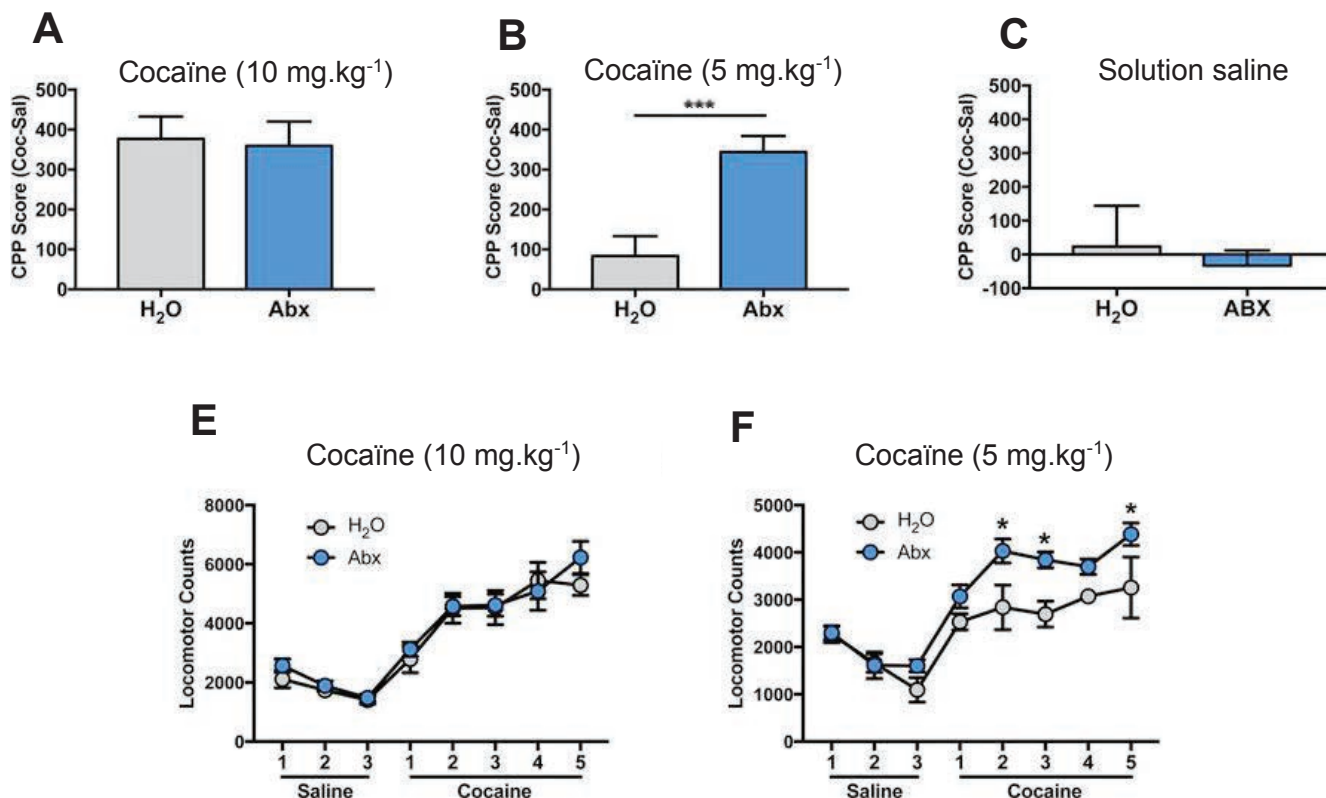
Document 10 : effet d'une réduction du microbiote sur la réponse comportementale à la cocaïne

CPP Score (Coc-Sal) = score de conditionnement de préférence de place (CPP = *conditioned place-preference*).

Abx : souris ayant reçu un cocktail d'antibiotiques *per os* pendant 7 à 10 jours

H₂O : souris témoin

Locomotor Counts = score de locomotion obtenu en suivant les déplacements à l'aide d'une caméra. Ce score est déterminé pendant 3 jours consécutifs après administration de solution saline puis pendant 5 jours consécutifs après administration de cocaïne.

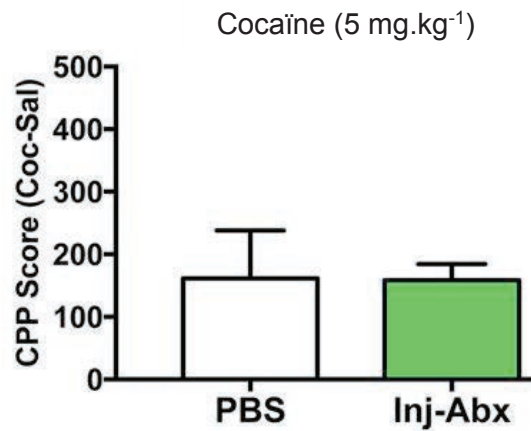


*** : différence significative dans un test de Student (t-test) ($p < 0,0001$; $n = 11$ H₂O, $n = 22$ Abx)

* : différence significative ANOVA et Holm-Sidak post-hoc test ($p < 0,05$; $n = 5$ /groupe)

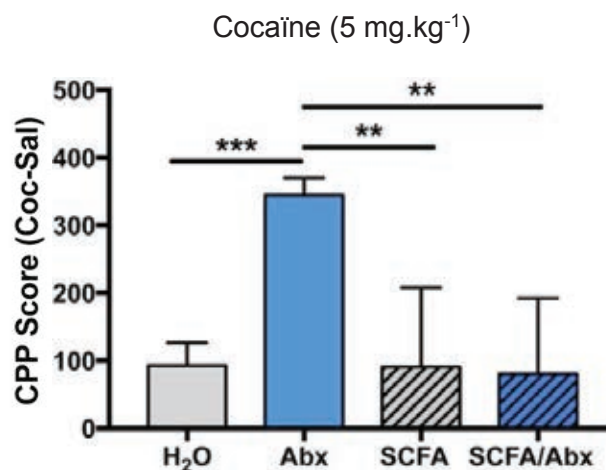
Document 11 : effet d'une injection parentérale d'antibiotiques sur la réponse comportementale à la cocaïne

Inj-Abx : injection du cocktail d'antibiotiques
PBS : souris témoin



Document 12 : effet des acides gras à chaîne courte sur la réponse comportementale à la cocaïne

Les SCFA (*short chain fatty acids*), qui désignent les acides gras à chaîne courte, et les antibiotiques ont été additionnés à l'eau de boisson.



*** : différence significative à $p < 0,0001$

** : différence significative à $p < 0,001$

ANNEXES

A. Extrait du programme de Chimie Biochimie Sciences du Vivant de 1^{ère} STL

B.O.

Bulletin officiel spécial n° 3 du 17 mars 2011

Chimie-biochimie - Science du vivant - classe de 1^{ère} de la série STL

Thème 1 - Les systèmes vivants présentent une organisation particulière de la matière

1.5 Les molécules des organismes vivants présentent des structures et des propriétés spécifiques	
Les cellules sont composées majoritairement d'eau et de molécules organiques .	Exploiter des ressources documentaires ou une activité expérimentale pour : - déterminer le pourcentage en eau et en matière organique de différents organismes vivants ; - mettre en évidence la variabilité de la teneur en eau des organismes vivants.
L'eau constitue l' environnement des systèmes biologiques. La solubilité des espèces chimiques dans l'eau dépend de leur squelette, de leur(s) groupe(s) caractéristique(s) et de leur charge. L'eau est un solvant polaire, dissociant et formant des interactions hydrogène.	Mettre en œuvre des activités expérimentales et exploiter des ressources documentaires pour : - justifier à l'aide d'une échelle d'électronégativité le caractère polaire d'une liaison et de la molécule d'eau ; - différencier les interactions intermoléculaires : interactions électrostatiques, interactions hydrogène ; - tester et interpréter la solubilité ou non d'une espèce chimique dans l'eau ; - définir les termes : hydrophile, hydrophobe, lipophile, lipophobe, amphiphile ; - prévoir qualitativement la solubilité ou non d'une espèce simple dans l'eau.
Le caractère amphiphile de certaines molécules est à l'origine de la structure en double couche des membranes biologiques.	Analyser la structure de quelques phosphoglycérides pour : - repérer la chaîne carbonée hydrophobe et la partie hydrophile ; - interpréter les associations de phospholipides en micelles et en bicouches ; - schématiser un liposome.
Les molécules biologiques comportent certains groupes caractéristiques présentant des propriétés acides ou basiques. En fonction du pH du milieu et du pK _A du couple, une espèce d'un couple acide/base prédomine. Des groupes caractéristiques chargés apparaissent ou disparaissent en fonction du pH. Les milieux biologiques sont des milieux tamponnés .	Mettre en œuvre des activités expérimentales et exploiter des ressources documentaires pour : - reconnaître l'acide ou la base dans un couple acide/base conjugué ; - écrire quelques couples acide/base usuels relatifs à l'acide éthanoïque, l'acide carbonique, l'acide phosphorique, l'ion ammonium et ceux relatifs à l'eau ; - écrire l'équation d'une réaction acide-base à partir des deux couples acide/base mis en jeu ; - utiliser la relation $\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$; - mesurer le pH d'une solution ou d'un milieu d'intérêt biologique à l'aide d'un pH mètre ; - effectuer une analyse spectrophotométrique pour illustrer expérimentalement la prédominance de la forme acide ou basique d'un indicateur coloré en fonction du pH ; - identifier l'espèce prédominante d'un couple acide/base en fonction du pH du milieu et du pK _A du couple ; - préparer un mélange tampon ; - mettre en évidence expérimentalement l'effet tampon et ses limites .

Méthodes d'analyses en bactériologie

Activités technologiques

Les modalités du contrôle qualité en bactériologie sont intégrées dans ces activités. Les méthodes d'identification par galerie biochimique (macrométhode ou microméthode) gardent principalement un intérêt dans un contexte de formation à la bactériologie : elles peuvent donc être utilisées dans ce sens.

Contenus	Commentaires
1. Analyses au laboratoire de microbiologie : - organisation des laboratoires et du poste de travail ; - manipulation stérile ; - techniques manuelles et techniques automatisées - notions de nettoyage, désinfection, stérilisation ; - gestion des déchets.	On s'attachera à construire une démarche de prévention du risque biologique fondée sur la connaissance : - des agents biologiques (le classement en quatre groupes et ses critères) ; - des réservoirs - des voies de contamination ; - des mesures de prévention ; - des bonnes pratiques de laboratoire.
2. Études morphologiques des bactéries et examens microscopiques	L'étude de la morphologie bactérienne, des groupements, sera conduite à partir d'examens microscopiques tels l'état frais et la coloration de Gram ou au bleu de méthylène. L'acidorésistance des mycobactéries sera démontrée.
3. Isolement et étude macroscopique des colonies bactériennes	La technique d'isolement, l'observation, la description des colonies, pourront être effectuées à partir de souches pures et de mélanges mais également à partir de différents prélèvements.
4. Milieux de culture 4.1. Nutrition et milieux de culture 4.2. Milieux pour l'isolement et l'identification des bactéries : - principes ; - critères de choix ; - techniques d'utilisation ; - modes de lecture et causes d'erreurs.	On présentera les notions de nutriment et de milieu minimum, de besoins élémentaires, de besoins énergétiques, de besoins carbonés et non carbonés. Présenter les différentes catégories de milieux (sélectifs ou, non sélectifs, isolement ou identification, chromogènes...) : cette présentation ne doit pas se ramener à une étude exhaustive. On insistera sur le rôle des principaux constituants et on mènera une analyse de la lecture et de l'utilisation de ces milieux. La justification de leur utilisation sera développée au cours de l'étude des produits pathologiques.

5 Identification bactérienne	Présenter les différents types de méthodes d'identification : biochimique, antigénique, par spectrométrie de masse, par biologie moléculaire. On mettra l'accent sur les techniques actuelles utilisées en laboratoire. L'utilisation des galeries biochimiques d'identification (macrométhode comme microméthode) ne sera pas systématique.
6 Antibiotogramme	Plusieurs techniques seront envisagées : - par diffusion en milieu gélosé (en référence aux règles établies par l'EUCAST auquel la Société Française de Microbiologie appartient ou par un autre organisme équivalent) ; - en milieu liquide ou semi-liquide, - par technique automatisée

Module 3

Bactériologie systématique

Enseignement théorique

L'étude abordera exclusivement :

- les caractères d'identification (phénotypique et génotypique) ;
- les facteurs de virulence et du pouvoir pathogène ;
- la sensibilité aux antibiotiques et mécanismes de résistance.

Largement associée aux activités technologiques correspondantes, cette étude sera contextualisée, en prenant appui sur le module de bactériologie médicale.

Contenus	Commentaires
1. Enterobacteriaceae	
2. Vibrio, Aeromonas	
3 Pseudomonas, Stenotrophomonas	
4. Acinetobacter	
5. Staphylococcus	
6. Streptococcus, Enterococcus	
7. Neisseria, Moraxella	
8. Haemophilus, Bordetella, Legionella	
9. Corynebacterium, Listeria	
10. Campylobacter	
11. Bactéries anaérobies strictes	Présentation générale de la diversité des bactéries anaérobies. Etude systématique des <i>Clostridium</i> et de <i>Bacteroides fragilis</i>.

C. Extraits du référentiel du BTS Biotechnologies

Section 2 : Outils, techniques et méthodes du génie génétique

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.

Intitulé du programme	Commentaires		Cours	TP
	Cours	Travaux pratiques		
2.5 – Les technologies d’amplification d’ADN in vitro (PCR)				
La PCR classique (en point final) – principe – mise en œuvre	On insistera sur l’optimisation de la mise en œuvre.	Réalisation d’une PCR Optimisation d’un paramètre de PCR		
La PCR en temps réel (en cinétique)	Notions simples sur les matériels et les chimies de détection			
La PCR quantitative	Notions simples sur les quantifications relative et absolue Notion de cycle-seuil			
Exemples d’applications analytiques et préparatives de la PCR	<i>Il est inutile de dresser un catalogue exhaustif des applications de la PCR. Il convient au contraire, à partir de quelques exemples, de montrer les apports et le caractère irremplaçable de cette technologie</i> Exemples possibles : – clonage direct d’un gène – mutagenèse dirigée ou aléatoire ciblée – diagnostic : typage ou autre	Mise en œuvre de PCR intégrées à d’autres manipulations : un exemple analytique et/ou un exemple préparatif		

Section 4 : Bioinformatique utilisateur

La bioinformatique se définit comme l'analyse de l'information biologique, notamment à l'aide d'outils informatiques.

L'objectif est de former des utilisateurs avertis des principaux outils, dont on fera ressortir de manière simple le principe de fonctionnement.

L'enseignement des savoir et savoir-faire de cette section se fera en liaison étroite avec les modules 1 et 3.

On insistera sur la relativité des réponses apportées par la bioinformatique, la plupart du temps statistiques et fondées sur des modèles perfectibles et évolutifs. Lors des recherches et traitements des informations, on privilégiera la problématique biologique, en analysant la pertinence des requêtes effectuées et la validité des résultats obtenus.

Les portails, logiciels et banques de données en bioinformatique et en génomique	– Les portails dédiés (par exemple celui d'Infobiogen) et leurs ressources – Les principales banques de séquences et leurs caractéristiques; la structure des fichiers et les formats de séquences nucléiques et protéiques – Exemples de logiciels d'aide en génie génétique (dessin d'amorces ou de sonde, cartographie de restriction, détermination de paramètres physicochimiques d'une protéine...)
Comparaison d'une séquence nucléique ou protéique avec une banque de séquences	– On utilisera un logiciel de type <i>BLAST</i> – Principe sommaire de l'alignement global avec insertions – Critères permettant de valider l'analyse – Exemple d'une comparaison dans un contexte de recherche par homologies de la fonction d'un gène
Multi-alignements de séquences nucléiques ou protéiques	– On utilisera un logiciel d'alignement global – Principe d'une matrice de substitution d'acides aminés – L'alignement multiple pourra déboucher sur la construction d'un arbre phylogénétique
Recherche de gènes et de séquences consensus	– Recherche de phases de lecture ouvertes (ORF) – Recherche de signaux d'expression ; on montrera la difficulté de localiser les gènes – Recherche de motifs structuraux, pouvant déboucher sur la constitution d'une famille protéique
Analyse tridimensionnelle de biomolécules	– Il s'agit avant tout d'une visualisation 3D, à l'aide d'un logiciel simple tel qu'un dérivé de <i>RasMol</i> – L'objectif essentiel est l'illustration et l'approfondissement des structures tridimensionnelles des protéines et des acides nucléiques, ainsi que de leurs interactions