

Cadre réservé à
l'administration

Corps : Assistant ingénieur de Recherche et de Formation
BAP : A
Nature du concours : Externe
Emploi type : Assistant·e ingénieur·e en expérimentation et instrumentation
biologiques
Centre organisateur : Université Grenoble Alpes
NOM :
Prénoms :
Né(e) le :

Corps : Assistant ingénieur de Recherche et de Formation
BAP : A
Nature du concours : Externe
Emploi type : Assistant·e ingénieur·e en expérimentation et instrumentation
biologiques
Centre organisateur : Université Grenoble Alpes



**CONCOURS EXTERNE
ASSISTANT INGENIEUR DE
RECHERCHE ET FORMATION
BAP A**

Emploi-type : « Assistant·e ingénieur·e en expérimentation et instrumentation biologiques »

SESSION 2022

Épreuve écrite d'admissibilité

Durée : 3 heures

Coefficient : 4

Le sujet comporte **19 pages** (incluant la page de garde).
Assurez-vous que cet exemplaire est complet.

Vous devez composer sur le présent document, aucun document complémentaire ne sera accepté ni corrigé. Il ne doit pas être dégrafé et devra être remis aux surveillants à l'issue de la composition.
Les questions peuvent être traitées de façon indépendante.

L'usage de la calculatrice scientifique non programmable autorisé.
Tout autre document (autres que ceux remis lors de l'épreuve) et l'utilisation de tout matériels électroniques ne sont pas autorisés.
Les téléphones portables doivent être rangés et éteints. Ils ne devront pas être sortis ou consultés durant toute l'épreuve, même pour regarder l'heure.
Il vous est rappelé que votre identité ne doit figurer que dans la partie supérieure de la 1^{ère} page du sujet. Aucun signe distinctif ne doit être noté sur la copie sous peine d'annulation de la copie (les copies seront anonymées par l'administration avant d'être transmises au jury).

PARTIE 1 : CONNAISSANCES GENERALES

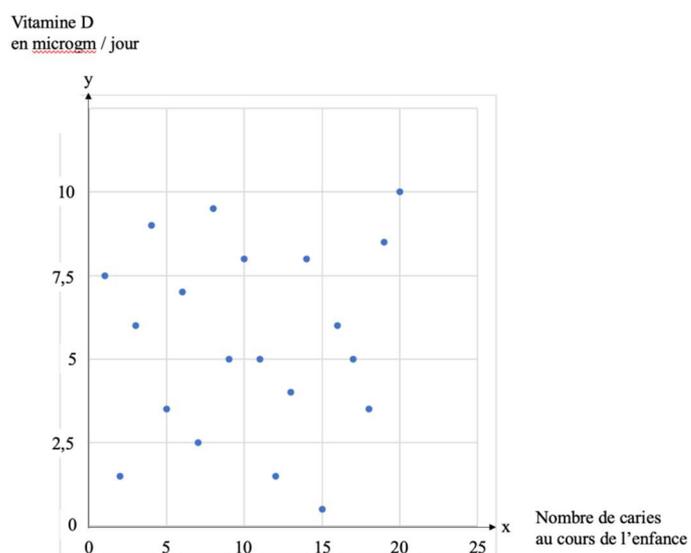
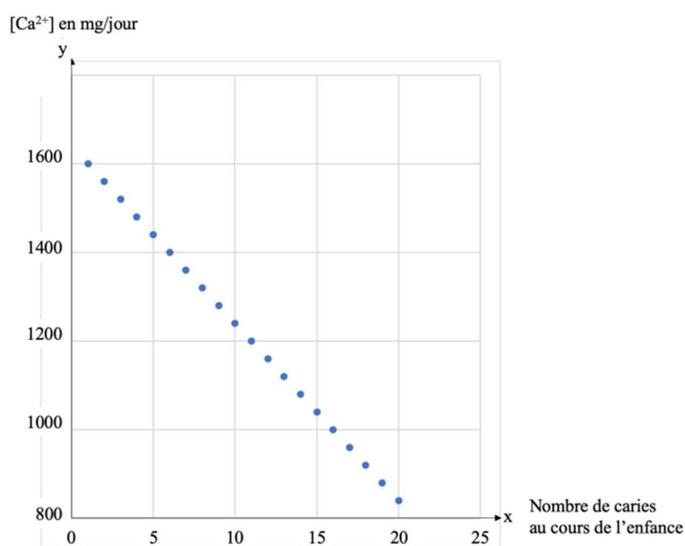
1. Le laboratoire « Arc-en-ciel » a mené une étude cherchant à comprendre l'impact de différents nutriments (axe des ordonnées) sur le nombre de caries au cours de l'enfance (axe des abscisses).

Sur les graphes suivants, on mesure l'impact sur le nombre de caries des facteurs suivants :

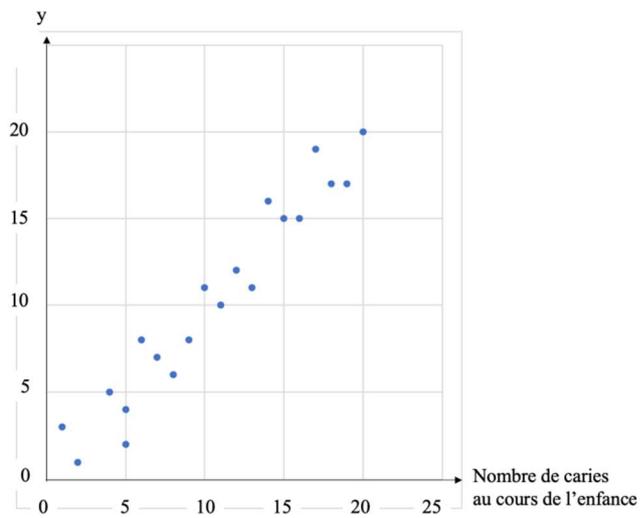
-l'ingestion quotidienne de calcium,

-l'ingestion quotidienne de vitamine D

-l'ingestion hebdomadaire de sucreries industrielles.



Nombre de bonbons/sucreries
industrielles hebdomadaires



Comment qualifieriez-vous la relation entre chaque nutriment et le nombre de caries au cours de l'enfance ?

à gauche :

au milieu :

à droite :

2. Donnez la moyenne ainsi que la médiane, sans détaillez vos calculs, de la série suivante :

42 – 6 –127 – 45 -30

3. Comment désigne t'on le fait d'introduire un plasmide dans une cellule procaryote ?

Citez une technique pour y parvenir.

4. Vous devez préparer 1 Litre d'une solution de TGS10X, dont la composition est la suivante

Tris 250 mM

GLYCINE 1.9 M

SDS 1%

Compléter le tableau puis décrivez brièvement vos calculs, ainsi que le matériel utilisé.

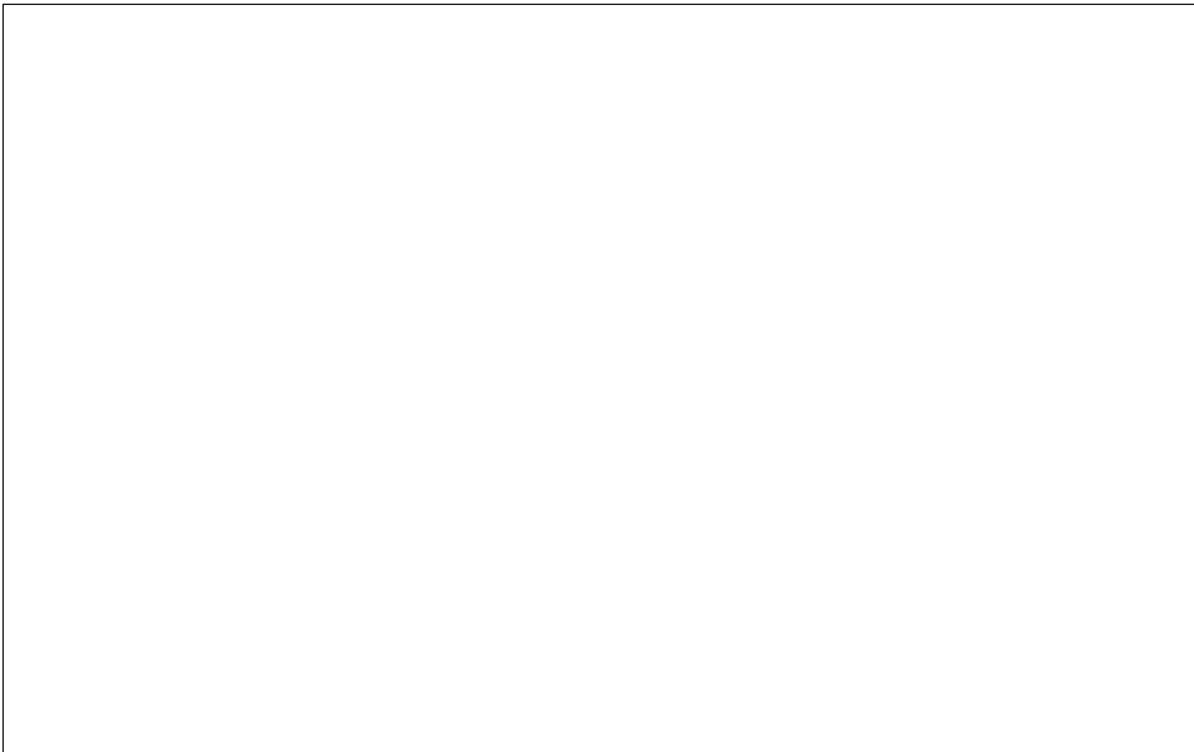
Produit à votre disposition	Quantité à peser ou volume à prélever
Tris base (poudre): MM 121.2 g/mol	
Glycine (poudre): MM 75 g/mol	
SDS (solution) 20 %	
H2O	

5. Vous avez réalisé une miniprep d'ADN plasmidique et effectué des mesures d'absorbance à différentes longueurs d'ondes. La loi de Beer-Lambert nous permet de calculer la concentration selon l'absorbance. Dans les bonnes conditions, on peut assumer qu'une DO mesurée à 260 nm égale à 1 correspond à une concentration d'ADN double-brin de 50µg/mL. En vous servant des mesures ci-dessous, commentez la quantité et la qualité de l'échantillon.

$A_{260\text{nm}}$: 4,86

$A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$: 1,85

$A_{260\text{nm}} / A_{230\text{nm}}$: 2,19



6. Quel sont les 2 principaux dangers de l'utilisation d'azote liquide ? Pourquoi ?



7. Citer les EPI nécessaires pour manipuler l'azote liquide.

8. Quelle méthode est utilisée pour stériliser / décontaminer :

- De la verrerie :

-Un plan de travail PSM type II :

-Une solution de PBS 0.5 %BSA :

PARTIE 2 : BIOCHIMIE

En vous aidant du texte ci-dessous et de vos connaissances, répondez aux questions suivantes. Une attention particulière sera donnée à la qualité de la rédaction des réponses.

Extrait de "Co-immunoprecipitation from Transfected Cells, Takahashi, Y. Protein-Protein Interactions (2015) 381-389"

Protein-protein interactions regulate many biological processes both within and between cells [1, 2]. Co-immunoprecipitation (Co-IP) is a simple, yet effective method to determine complex formation between proteins of interest [3-5]. In this assay, proteins that directly or indirectly interact with a protein of interest can be co-purified using specific antibodies. The results of Co-IP are highly reproducible, and the assay is relatively inexpensive.

The first step of the co-IP procedure is to prepare lysate from cells or tissue samples that express (either endogenously or exogenously) the protein of interest. In order to ensure that protein-protein interactions will remain intact, cells need to be lysed using a proper lysis buffer. In general, non-ionic detergents (e.g., NP-40, Triton X-100) disrupt lipid-protein but not protein-protein interactions, while ionic detergents (e.g., Chaps) affect both. Therefore, lysis buffers containing non-ionic detergents tend to preserve protein-protein interactions more than those containing ionic detergents.

Proteins of interest are then captured by incubating total cell/tissue lysate with specific antibodies. The resultant immunocomplexes (composed of antibody, protein of interest (antigen), and antigen-associated proteins) can be precipitated using a resin (e.g., agarose, sepharose, or magnetic beads) that is conjugated with IgG-binding Protein A/G.

Following a series of washes to remove irrelevant, non-binding proteins, antigens and any proteins that are bound are eluted by boiling the precipitated resins in denaturing Laemmli buffer or by incubating with large amounts of peptides containing

the epitope of the immunoprecipitation antibody. The eluted proteins are then analyzed by SDS-PAGE/immunoblotting and/or mass spectrometry.

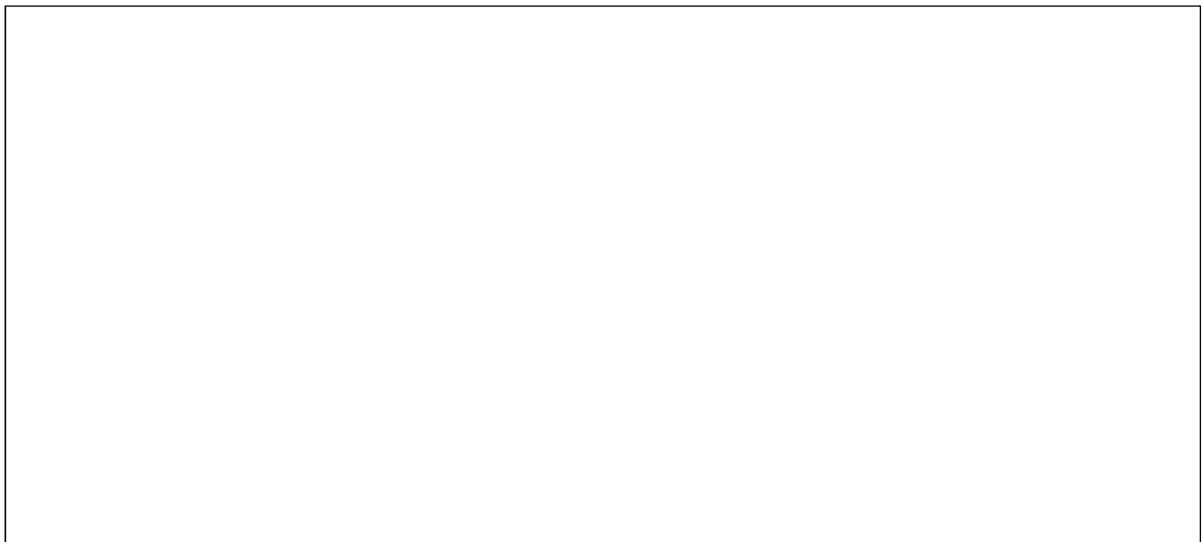
As mentioned above, proper experimental conditions must be determined for each protein-protein interaction. Selection of an optimal lysis buffer and immunoprecipitation antibody are the two most important aspects for the success of a co-IP experiment. However, the requirement of antibodies that specifically recognize the antigen without interfering with its interaction with binding partners limits the application of co-IP for detection of complexes between many endogenously expressed proteins. To overcome this hurdle, the protein of interest (and in some cases associating proteins of interest) is frequently fused with a small peptide sequence (~15aa), known as an epitope tag (e.g., flag, myc, HA, his, V5), or a fluorescence protein (e.g., GFP, DsRed) at the amino- or carboxy-terminus, and ectopically expressed in cells.

Antibodies for these "tags" that are compatible with IP/co-IP have been well developed and are commercially available from multiple manufacturers. In this chapter, a protocol for transient transfection of 293 T cells using the calcium-phosphate method, the most frequently used and least expensive strategy to express proteins of interest, in addition to standard procedures for co-IP, is described.

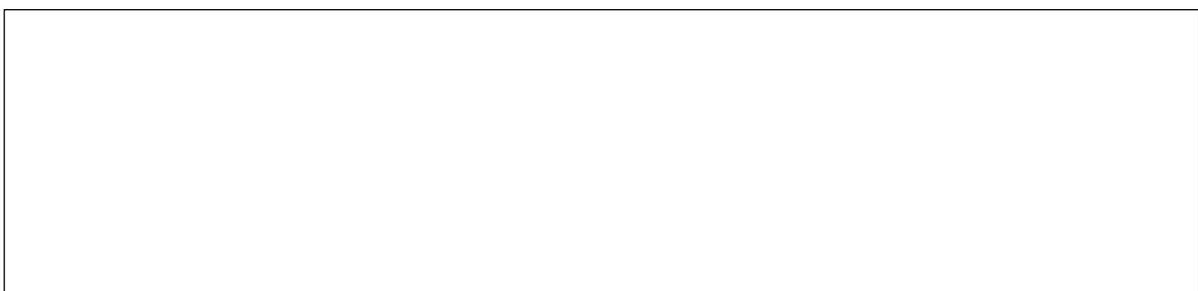
1. Traduire le premier paragraphe en français.



2. Décrire le principe de la technique de co-immunoprécipitation exposée.



3. Donner les principales étapes de cette technique.

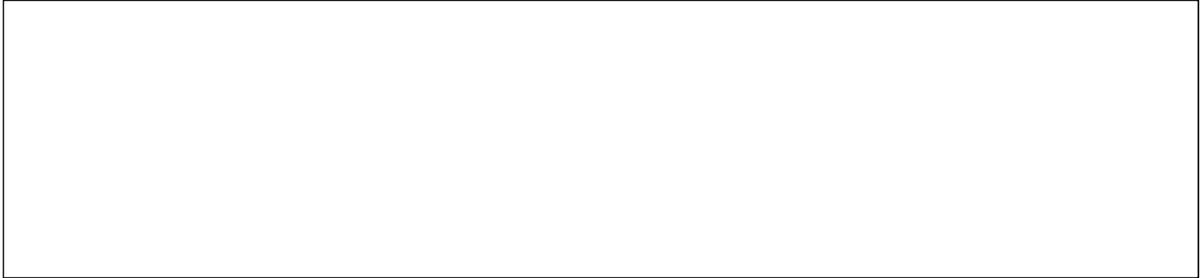


4. Quels types de détergents peuvent être utilisés dans les tampons de lyse d'une co-immunoprécipitation ?

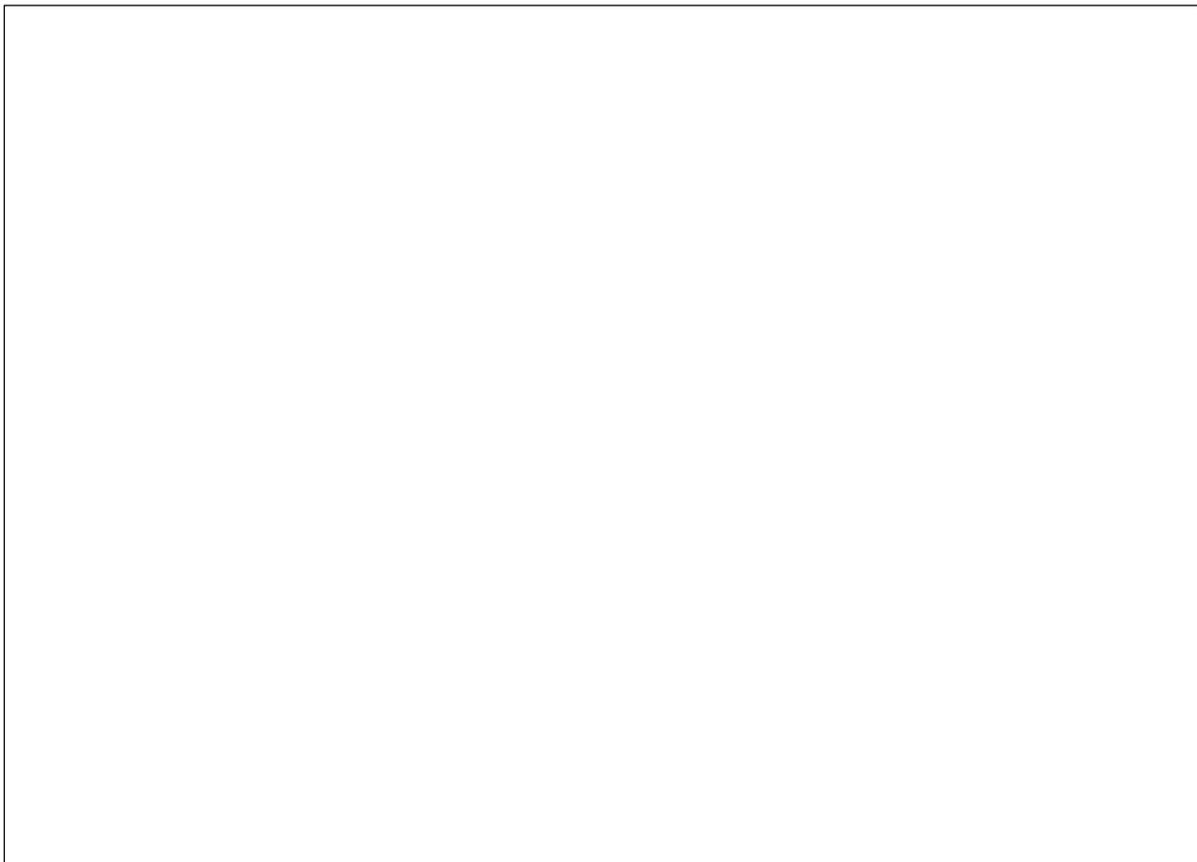
5. Pourquoi un détergent comme le Chaps peut affecter les interactions protéine-protéine ?

6. Quel est le rôle de la résine dans une expérience de co-immunoprécipitation ?

7. Quel est le rôle des protéines de type A ou G ?



8. Quelles techniques citées dans le texte peuvent être utilisées pour caractériser la protéine éluée ? Décrivez brièvement leurs principes.



9. Expliquer le terme « épitope »

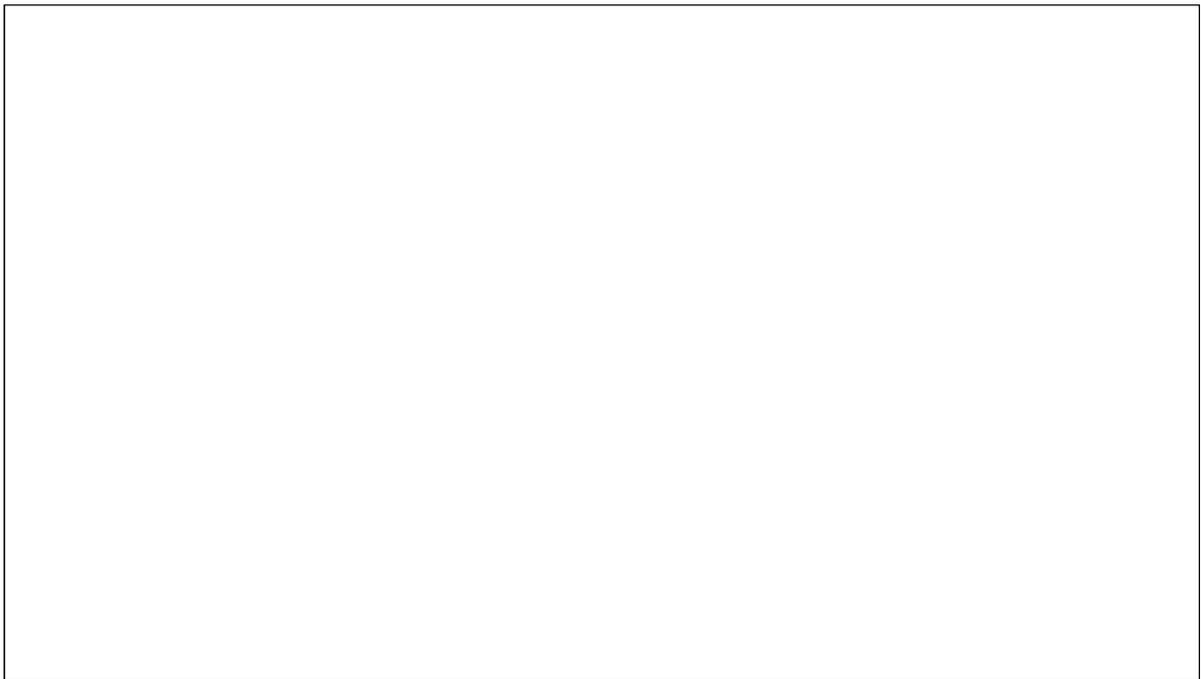
10. Quelles sont les deux conditions expérimentales essentielles à prendre en compte dans une expérience de co-immunoprécipitation. Expliquer brièvement les raisons.

11. Sur quelles parties de la protéine d'intérêt est-il possible de greffer une séquence peptidique connue pour faciliter sa détection ?

12. Donner une autre technique qui pourrait être utilisée pour caractériser l'interaction entre deux protéines. Décrivez brièvement son principe.

PARTIE 3 : BIOLOGIE CELLULAIRE

1. Que signifie l'acronyme PSM (nous considérons le PSM de Classe II). En quelques phrases décrivez son utilité et son fonctionnement.



2. Citez 2 pictogrammes d'hygiène et sécurité susceptibles d'être affichés à l'entrée d'une salle de culture cellulaire.



3. Proposez 2 mesures de protection individuelles supplémentaires.



4. Vous avez la responsabilité d'entretenir une culture de cellules adhérentes. Votre culture de cellules arrive à confluence. Il est nécessaire de réaliser un passage cellulaire. Ci-dessous vous avez le protocole utilisé dans votre laboratoire d'accueil.

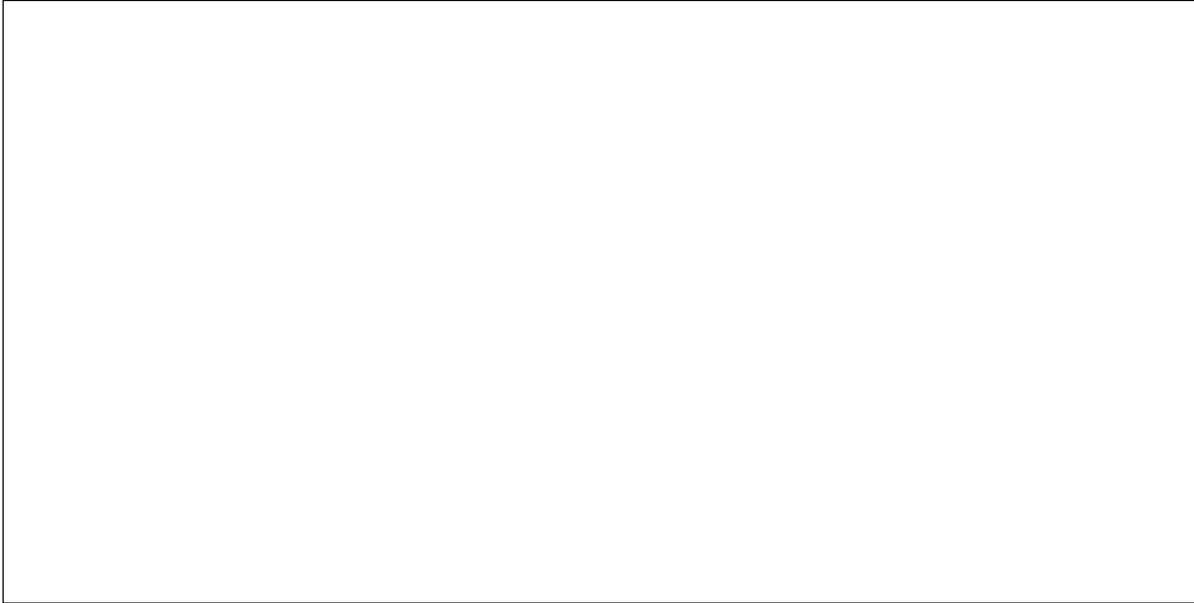
- Enlever le milieu de culture complet
- Rajouter 5 ml de PBS 1X sans Ca^{2+} sans Mg^{2+} et rincer les cellules avec puis enlever le PBS.
- Rajouter 2,5 ml de trypsine 0,25% EDTA 0,02% puis incubé les cellules 7 à 10 minutes à 37°C
- Neutraliser la trypsine avec 8 ml de milieu complet, aspirer refouler 3 fois pour dissocier les cellules et récupérer l'ensemble dans un tube stérile de 15mL.
- Prélever un échantillon (0,5 mL) pour la numération
- Centrifuger 10mL à 1400 rpm (300g) pendant 5 minutes
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 10 mL de milieu frais puis ensemercer 3 nouvelles flasques de culture T25 avec 300 000 cellules dans 10 ml de milieu frais.

Questions :

Pourquoi rincer les cellules avec une solution de PBS dépourvue de Ca^{2+} et de Mg^{2+} ?

Qu'est-ce que la trypsine ? Quelle est son action ? Pourquoi rajouter de l'EDTA ?

Le comptage vous donne 0.2 million de cellules / mL. Expliquez votre démarche pour ensemercer vos 3 nouvelles flasques T25. Avez-vous assez de cellules pour faire vos 3 flasques ?



5. Vous devez effectuer une expérience d'immunocytochimie pour révéler la localisation intracellulaire de deux protéines d'intérêt nommées X et Y. Vous avez à votre disposition un microscope confocal équipé des lasers 488nm, 546 nm et 633nm. Vous avez également à votre disposition un anticorps de souris dirigé contre la protéine X et un anticorps de lapin dirigé contre la protéine Y. Pour révéler les anticorps primaires vous avez à votre disposition plusieurs anticorps secondaires :

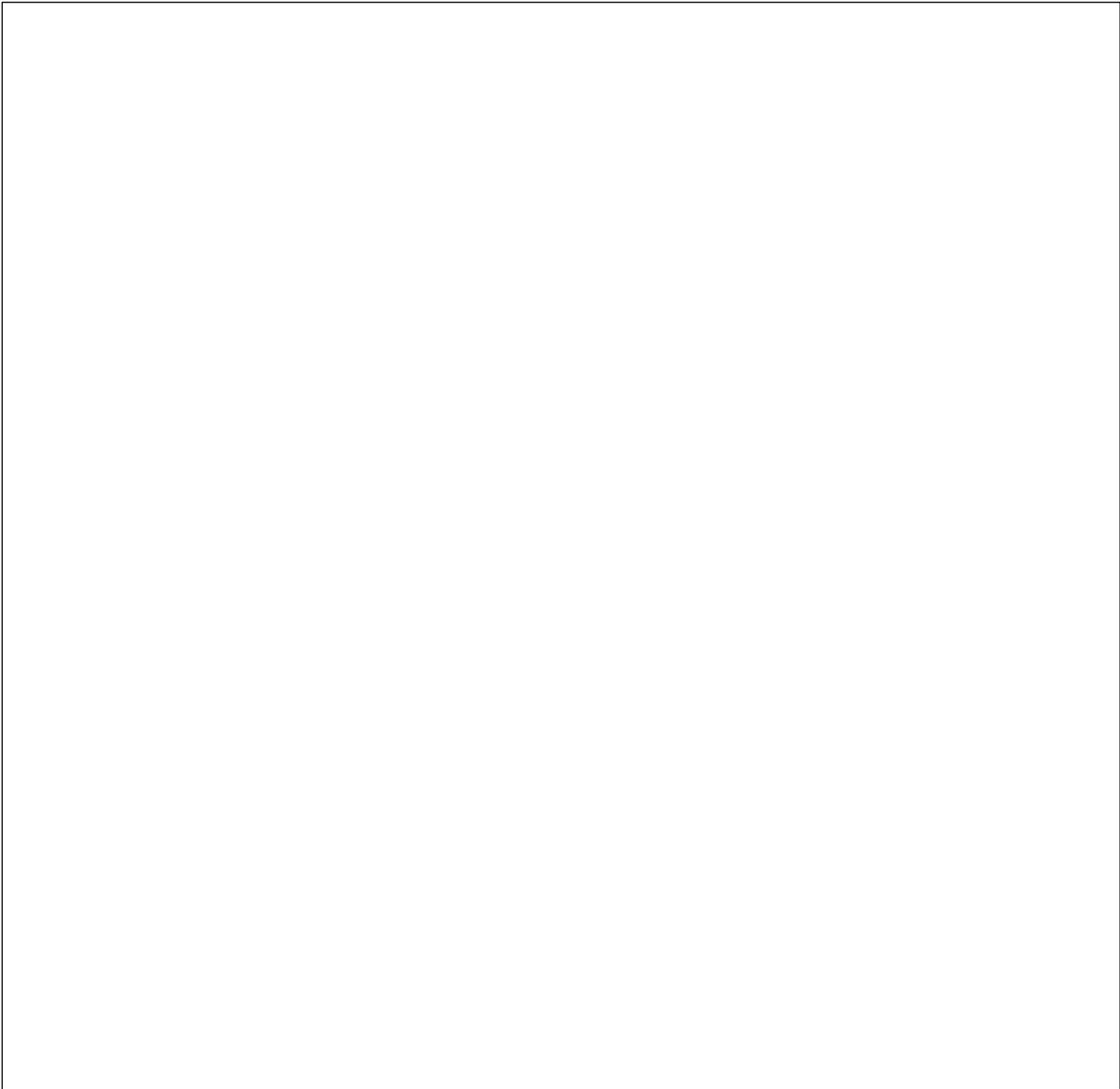
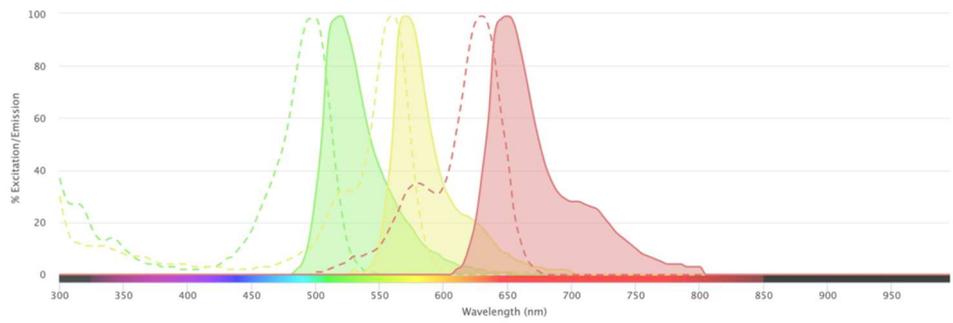
Anticorps secondaire anti-anticorps de souris couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488

Anticorps secondaire anti- anticorps de souris couplé au fluorochrome Alexa Fluor 633

Anticorps secondaire anti- anticorps de lapin couplé au fluorochrome Alexa Fluor 546

Anticorps secondaire anti- anticorps de lapin couplé au fluorochrome Alexa Fluor 633

En vous aidant du schéma ci-dessous vous montrant les spectres d'excitation (traits pointillés) et les spectres d'émission (trait plein) des fluorochromes Alexa Fluor 488 (vert), Alexa Fluor 546 (jaune) et Alexa Fluor 633 (rouge) justifiez en quelques lignes votre choix d'anticorps secondaires pour révéler vos anticorps primaires.



PARTIE 4 : BIOLOGIE MOLECULAIRE

Vous devez réaliser l'amplification par PCR de l'ORF suivante, afin de l'insérer ensuite dans un vecteur contenant le gène codant pour GFP (peGFP-C2). Cette stratégie permet d'avoir une séquence permettant l'expression de la protéine taggée avec la GFP (prot-GFP).

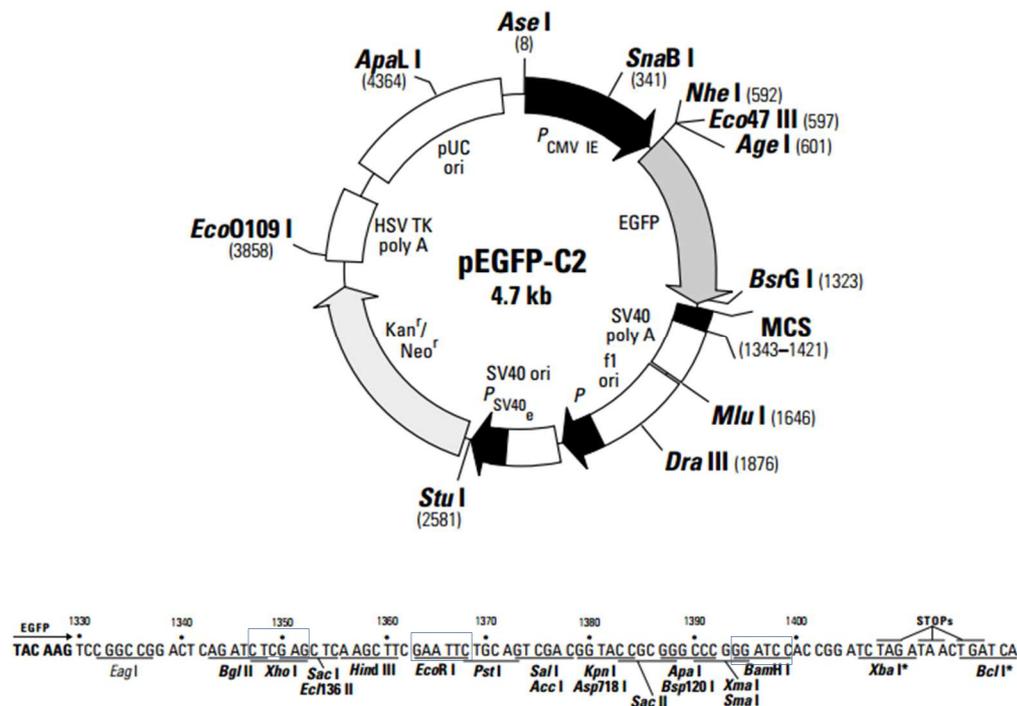
Vous disposez des informations suivantes :

ORF à amplifier (grisée et en gras) :

```

1 agaccagacc aacagtaaca ccaagggcag gtgggcaggc ctccgcctc ctcccctact
61 ccagggccca ctgcagcctc agcccaggag ccaccagatc tcccaacacc atggtccgat
121 accgctgtag gaggctgagc gaacgctcgc acgaggtgta caggcagcag ttgcatgggc
181 aagagcaagg acaccacggc caagaggagc aagggctgag cccggagcac gtcgaggtct
241 acgagaggac ccatggccag tctcaactata ggcgcagaca ctgctctcga aggaggctgc
301 accggtacca caggcggcag catcgctcct gcagaaggcg caaaagacgc tcctgcaggc
361 accggaggag gcatcgcaga gagtccctag gtgacccct caaccagaac tttctttccc
421 aaaaggctgc agaaccagga agagaacatg cagaaggcac taagcttct gggcccctca
481 cccccagctg gaaattaaga aaaagtgcgc cgaaacacca agtgaggcca tagcaattcc
541 cctacatcaa atgctcaagc ccccagctgg aagttaagag aaagtcacct gccaagaaa
601 caccgagtga ggccatag
  
```

Vecteur peGFP-C2 :



Enzymes à votre disposition au laboratoire : XhoI – EcoRI – BamHI

Questions :

1. Quelles seraient les amorces que vous utiliseriez ? Les écrire dans le sens 5'-3'

2. Calculer le T_m de vos amorces, et écrivez votre formule de calcul.

3. A quoi correspond la valeur de T_m ?

4. Quel est la taille attendue de l'amplicon?

5. De quoi faut-il s'assurer, lors du design de ces primers, pour que la protéine Prot-GFP obtenue soit bien fluorescente ?

6. Décrivez le principe d'une PCR et les principales étapes.

7. Vous devez effectuer la réaction de PCR à partir des réactifs listés dans le tableau. Indiquez les volumes que vous pipetez et les dilutions éventuellement nécessaires avant le pipetage pour constituer le mélange réactionnel.

Concentration initiale des réactifs	Concentration finale dans le mélange réactionnel	Volume à pipeter / Dilution éventuelle
Amorce Sens 100 μ M	1 μ M	
Amorce AntiSens 100 μ M	1 μ M	
Tampon PCR 10X	1 X	
MgCl ₂ 15 mM	1.5 mM	
dNTPs 10 mM	0.2 mM	
ADN Polymerase 1U/ μ l	1 U	
Matrice ADN 1 μ g/ μ l	200 ng	
H ₂ O		
	Volume final 50 μ l	

8. A quoi peut servir un tag GFP ? Citez deux exemples utilisés en laboratoire.

