



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche,
Ministère de l'Écologie, du Développement durable, des Transports et du Logement

MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
DRH – BUREAU DES CONCOURS
57, Rue Cuvier
75231 PARIS CEDEX 05

Concours externe de Technicien de Recherche et de Formation – Session 2012
Technicien en sciences de la Vie et de la Terre, et biotechnologies

Jeudi 10 mai 2012
Epreuve écrite – Durée 3h00 – Coefficient 3

NOM DE NAISSANCE : _____

PRENOM : _____ NOM MARITAL : _____

NE(E) LE : _____ ACADEMIE : _____

N° d'anonymat
(réservé à l'Administration)

Le dossier qui vous a été remis comporte 19 pages au total.

Assurez-vous que cet exemplaire est complet.

Si tel n'est pas le cas, demandez-en un autre aux surveillants de l'épreuve.

Hormis la partie ci-dessus qu'il vous appartient de compléter, le présent dossier ne devra comporter aucun signe distinctif, conformément au principe d'anonymat.

Toute annotation distinctive conduira à l'annulation de votre copie.

**La manipulation d'appareils électroniques est strictement interdite
(téléphone, calculatrice ...)
et aucune documentation n'est autorisée.**

L'épreuve est constituée de 5 parties pour un total de 100 points.

La 5^{ème} partie est divisée en 3 thèmes. Vous devrez traiter l'un de ces 3 thèmes au choix.

Répondez directement sur le document.

Ne pas répondre au crayon à papier sur la copie.

7. Cocher 3 moyens de récupération de cellules adhérentes (**1,5 points**) :

- a. Grattoir
- b. Trypsine
- c. PBS
- d. EDTA
- e. CaCl_2

8. Le colorant qui permet de déterminer la viabilité d'une population cellulaire est (**1 point**) :

- a. le Bleu Trypan
- b. le Rouge de Phénol
- c. le Bleu de Coomassie

9. Cocher les caractères communs aux cellules procaryotes et eucaryotes (**1 point**) :

- a. Information génétique portée par l'ADN
- b. Division des cellules avec séparation des chromosomes
- c. Présence d'un noyau
- d. Energie sous forme d'ATP

10. Quel(s) composé(s) ne trouve-t-on jamais dans l'ARN (**1 point**) :

- a. Désoxyribose
- b. Adénine
- c. Guanine
- d. Cytosine
- e. Thymine

QUESTIONS COURTES :

Répondre dans l'espace prévu à cet effet

1. Qui est chargé de la mise en œuvre des règles d'Hygiène et de Sécurité dans un laboratoire (**1 point**) ?

2. Citer quelques exemples d'agents antimicrobiens couramment utilisés en culture cellulaire (**1 point**) :

3. Attribuer leur nom (Thréonine, Tryptophane, Asparagine) aux 3 acides aminés suivants (1,5 points) :

$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	
$ \begin{array}{c} \text{COOH} \quad \text{O} \\ \quad \quad \parallel \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	
$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	

4. Qu'est-ce qu'un M2 dans l'enseignement supérieur français (1 point) ?

5. Qu'est-ce qu'un laboratoire L2 (1 point) ?

6. Citer 2 exemples d'antibiotiques couramment utilisés pour la sélection de plasmides en bactériologie (1 point) :

7. Replacer le type d'eau adapté à chacune de ces opérations (ultra pure, désionisée, déminéralisée) (**1 point**) :

OPERATION	EAU
HPLC	
Tampon Tris-HCl pour électrophorèse	
Rinçage de la verrerie de laboratoire	
Culture cellulaire	

8. Quels sont les 3 principaux paramètres que l'on doit surveiller sur un incubateur pour y cultiver des cellules de mammifère (**1,5 points**) ?

9. Que signifient les termes (**1 point**) ?

PSM :

EPI :

10. Définir ce qu'est une (**1,5 points**) :

Transfection

Transformation

Infection

11. Citer 2 techniques de "transfection" de cellules eucaryotes (**1 point**) :

12. Citer 2 techniques pour stériliser des solutions tampons destinées à la culture de cellules eucaryotes ou procaryotes (**1 point**) :

13. Pourquoi utilise-t-on un indicateur coloré dans la plupart des milieux de culture (**1 point**) ?

14. Qu'est-ce qui distingue un virus d'une bactérie (**1 point**) ?

15. Que signifient les initiales (**1,5 points**) ?

PCR :

qPCR :

RT-PCR :

16. Vous avez une solution d'HCl à 10 N. Vous voulez obtenir 200 ml d'une solution à 0,1 N.
Quel est le volume d'acide nécessaire (**1 point**) ?

Sachant que vous disposez d'une éprouvette de 5ml, d'une fiole jaugée de 200ml et d'eau, comment vous y prenez-vous (**1 point**) ?

17. Au cours de votre expérience, vous avez utilisé plusieurs produits chimiques liquides dangereux :

- Méthanol
- Bromure d'Ethidium
- Acétone
- Acrylamide
- Hydroxyde de Potassium

Dans quels bidons les jetez-vous pour pouvoir les faire évacuer (**2,5 points**) ?

SOLVANTS	BASES	CMR

18. Quelles sont les obligations réglementaires à satisfaire pour pouvoir utiliser un autoclave (**1 point**) ?

19. Quelles informations doivent figurer sur l'étiquette d'un réactif que vous venez de préparer (**1,5 points**) ?

TEXTE 2 : *Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors.*
Robert H Kutner, 2009, Nature Protocols.

TITRATION OF LENTIVIRAL VECTORS USING FLOW CYTOMETRY

This protocol describes a method to titrate EGFP-encoding lentiviral vector stocks using flow cytometry.

Additional Materials

- Human osteosarcoma (HOS) cells (ATCC Cat. No. CRL-1543) Biosafety Level: 1
- 8 mg/ml polybrene (Sigma, cat. no. H9268) dissolved in H₂O
- Lentiviral vector samples to be titrated, Biosafety Level: 2
- Phosphate-buffered saline, calcium- and magnesium-free (CMF-PBS; Invitrogen, cat. no. 14190)
- Formaldehyde solution (Mallinckrodt, cat. no. 5016)
- 0.25% trypsin/EDTA (Invitrogen, cat. no. 25200)
- Hemacytometer
- 5-ml polystyrene round-bottom tubes (12 × 75 mm) for FACS (BD Falcon, cat. no. 352052)
- FACS machine

Plate HOS cells for transduction

1. Plate HOS cells at a density of 5×10^4 cells per well in a 6-well plate one day before transduction using 2 ml of DMEM high-glucose medium supplemented with 1% FBS, 1% glutamine, and 1% penicillin/streptomycin per well.
2. Determine the cell numbers in two of the wells 24 hr after seeding using a hemacytometer. Remove the medium from the other wells and replace with 0.5 ml DMEM high-glucose medium supplemented with 1% FBS, 1% glutamine, and 1% penicillin/streptomycin containing 8 µg/ml of polybrene.

Transduce the HOS cells

3. Transduce the cells by adding 0.5-, 5-, and 50-µl aliquots of an unconcentrated lentiviral vector stock per well, respectively. Tilt the plates to distribute the vectors and return the plates to the tissue culture incubator.
4. Twenty hr after initiating the transduction, replace the medium with 2 ml DMEM high-glucose medium supplemented with 1% FBS, 1% glutamine, and 1% penicillin/streptomycin and continue to incubate the cells.

Collect the cells for FACS

5. Two days later, remove the medium and wash the cells with 1 ml CMF-PBS. Add 0.5 ml of trypsin/EDTA per well and incubate 2 min at 37°C.
6. Add 0.5 ml DMEM high-glucose medium supplemented with 1% FBS, 1% glutamine, and 1% penicillin/streptomycin to each well, mix the contents, and transfer the cell suspension from each well into a 5-ml polystyrene round-bottom tube and centrifuge 5 min at $500 \times g$, 4°C, to pellet the cells.
7. Remove the medium by aspiration and resuspend the cells in 2 ml CMF-PBS and centrifuge 5 min at $500 \times g$, 4°C, to pellet the cells.
8. Remove the PBS solution by aspiration and resuspend the cell pellet in 300 µl of CMF-PBS + 2% FBS containing 0.5% formaldehyde solution.

Analyze the cells by FACS

9. Calculate vector titers

Questions (11 points) :

5- Lister l'ensemble des étapes nécessaires à la titration d'un lentivirus par cytométrie en flux (**3 points**)

6- Quelles étapes nécessitent d'être sous un PSM II (**2 points**) ?

7- Quelles étapes nécessitent obligatoirement de travailler en L2 (**1 point**) ?

8- Pourquoi le détachement des cellules par la trypsin/EDTA se fait-elle en milieu CMF-PBS et non pas par du PBS avec Ca^{++} et Mg^{++} (**1 point**)?

9- A quoi servent le FBS et le formaldéhyde lors de la reprise du culot cellulaire (**2 points**) ?

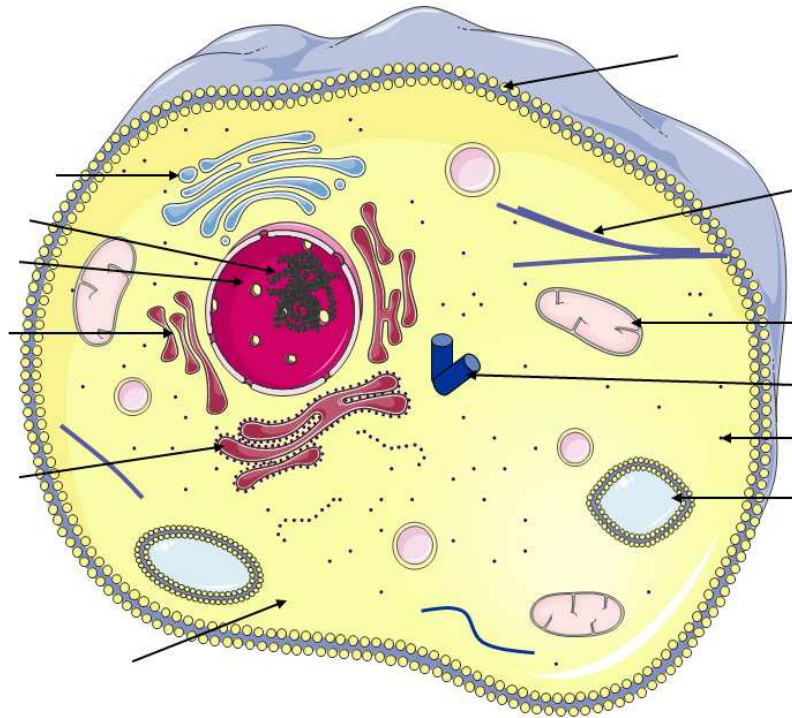
10- Quels types de risques sont associés à la titration d'un lentivirus par cytométrie en flux (**1 point**)?

11- Indiquer le(s) élément(s) impliqué(s) pour chaque type de risque (**1 point**)

3EME PARTIE - EXERCICES (20 POINTS)

1. Légender ce dessin de cellule (6 points).

Ecrire les noms en majuscules, les abréviations ne sont pas autorisées.



2. Expliquer la préparation d'une solution de bicarbonate de sodium (84g/mol) à $1,4\%$ (m/V) à partir d'une solution à $0,5\text{ M}$ (2 points).

3. Expliquer la procédure pour préparer $0,5\%$ (m/V) de DTNB (masse molaire en gramme/mole = 396) dans 50% (V/V) d'éthanol (1 point).

4. A partir d'une T25 archiconfluente, vous obtenez une suspension homogène de 6 mL. Vous réalisez un comptage à l'aide d'une cellule de Malassez, vous obtenez 2 comptages sur 10 rectangles : comptage 1 = 54 cellules et comptage 2 = 50 cellules.

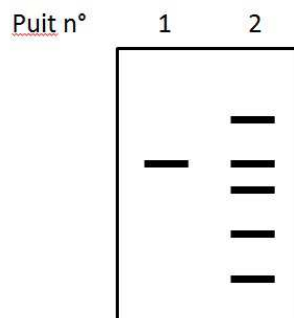
Question - Calculer la concentration cellulaire dans la suspension (**1 point**).

Question - Indiquer les différentes étapes pour obtenir le plus rapidement possible 1 plaque 24 puits (volume dans chaque puits = 1 mL) contenant environ 50 000 cellules/puits (**3 points**).

5. Calculer la masse molaire du sulfate de zinc heptahydraté (O_4SZn) (**1 point**).

Masses molaires en g/mole : Zinc = 65 ; S = 32 ; H = 1 ; O = 16

6. Une fraction protéique contenant une seule protéine est analysée par électrophorèse pour déterminer sa masse moléculaire. La fraction protéique est mise en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) et de β -mercaptoéthanol. L'ensemble est porté à ébullition pendant 4 minutes avant d'être déposé dans un puit d'un gel de polyacrylamide à 8% (puits n°1). Un mélange contenant des protéines de masse moléculaire connue est également déposé dans les mêmes conditions dans un deuxième puits du gel (puits n°2).



Puits n°1 : protéine masse moléculaire inconnue

Puits n°2 : mélange de protéines de masse moléculaire connue : myosine = 200 kDa ; protéine F= 155 kDa ; phosphorylase b = 97 kDa ; BSA = 66 kDa ; ovalbumine = 45 kDa.

Question - Déterminer la masse moléculaire de la protéine déposée dans le puits n°1 (**1 point**).

Une chromatographie d'exclusion (gel filtration) donne une masse moléculaire de 470 kDa.

Question - Donner une explication quant à la nature de la protéine en comparant avec le résultat obtenu par électrophorèse (**2 points**).

7. Vous devez gérer le stock de milieux de culture de votre service. Chaque mois, il est consommé 4,5 L de milieu de culture. Les bouteilles sont vendues par 500 mL au prix de 5 € l'unité, ou 4 € l'unité si vous les achetez par 10 bouteilles. Les produits ont 6 mois de délai d'utilisation.

Décrire votre procédure d'achats des milieux de culture pour une année civile en mentionnant le coût annuel (**3 points**)

4^{EME} PARTIE - TEXTE (15 POINTS)

Résumer par une centaine de mots ce texte paru dans Chimie Pharma Hebdo en 2011 (12 points) et proposer un titre (3 points).

Sil les charlatans font avaler des couleuvres, les industriels de la pharma, quant à eux, pourraient utiliser leurs toxines. Des molécules thérapeutiques sont parfois synthétisées à partir de toxines issues du venin des serpents. Elles proviennent quasiment toutes des serpents munis de crochets, les plus dangereux pour l'homme, comme les cobras, les vipères ou les crotales. « Ces serpents représentent environ 600 espèces alors qu'il y a plus de 2 700 serpents avancés différents », précise Nicolas Vidal, maître de conférences rattaché au département « Systématique et Évolution » de l'unité Systématique, Adaptation, Évolution du Muséum National d'Histoire Naturelle. En passant en revue les dernières avancées sur le sujet, l'équipe de Nicolas Vidal a mis en évidence l'énorme potentiel thérapeutique des venins des espèces restantes, regroupées sous la dénomination de couleuvres ou colubridés.

Ces espèces ont longtemps été considérées - à tort - comme sans danger et ne possédant pas d'appareil venimeux. « La plupart de ces espèces se nourrissent de petits vertébrés (amphibiens, lézards) et non pas de mammifères. Elles sont donc très peu responsables d'envenimations, notamment chez l'homme », explique le maître de conférences. Ce n'est que très récemment que les scientifiques ont com-

mencé à s'intéresser aux colubridés. « Depuis 2000, des travaux ont été effectués sur la systématique des serpents et la structure de leurs glandes venimeuses », souligne Nicolas Vidal. Et le constat fut surprenant : même si elles ne sont pas munies de crochets, les couleuvres possèdent des glandes supralabiales produisant du venin. « Sur les 2 100 espèces de colubridés, pratiquement toutes sont venimeuses. Seuls les serpents dont le régime alimentaire est composé essentiellement de mollusques ou d'œufs ne possèdent pas d'appareil venimeux », explique Nicolas Vidal.

Un réservoir potentiel de molécules thérapeutiques

Les venins provenant des couleuvres possèdent une grande variabilité dans leur composition, parfois même au sein d'individus d'une même portée. « Le venin de ces espèces semble évoluer en fonction de plusieurs facteurs, comme l'alimentation, l'origine géographique ou encore l'âge du serpent », détaille le maître de conférences. En outre, les couleuvres sont capables de produire certaines familles de toxines particulières comme les véficollines (issues de l'espèce *Cerberus rynchops*) ou encore les métalloprotéinases 2. Comme chez les espèces à crochets, les toxines des colubridés ont pour

fonction principale d'interférer avec les fonctions vitales, ce qui en fait d'excellentes molécules candidates pour différents types de médicaments : pro- et anticoagulants, hypotenseurs, analgésiques, molécules anti-cancer, antibactériens, ou encore antiviraux. Et ce type de propriétés ne serait pas seulement l'apanage des serpents, comme l'indique Nicolas Vidal : « Des travaux montrent que d'autres reptiles comme les iguanes et les varans possèdent eux aussi des glandes venimeuses dont le venin est peu exploité ». Avant d'ajouter : « Des chercheurs américains ont découvert que le venin de certains types de lézards avait des propriétés antidiabétiques ». D'ailleurs, plusieurs sociétés pharmaceutiques américaines sont en train de chercher un moyen d'exploiter ces substances à l'échelle industrielle.

L'un des obstacles majeurs de l'exploitation des venins réside dans la faible quantité extraite des glandes des serpents. « La reproduction des molécules d'intérêt à grande échelle est possible grâce à des opérations de synthèse biochimique à partir de banques d'ADN complémentaires des toxines », précise Nicolas Vidal. Des techniques permettant d'identifier de manière rapide et efficace les molécules d'intérêt ont été mises en évidence. Par exemple, le criblage à haut débit permet de tester de manière automatique des dizaines ou même des centaines de milliers de molécules candidates avec des cibles pharmacologiques. « Par la suite, l'élaboration de médicaments prend généralement quelques années, à partir du moment où les toxines sont isolées », estime Nicolas Vidal. Le venin des couleuvres semble déjà susciter un grand intérêt auprès des laboratoires et des industries pharmaceutiques. Plusieurs projets de recherche sont prévus pour dévoiler les potentialités de ces toxines. À titre d'illustration, l'équipe de Nicolas Vidal a d'ores et déjà reçu une proposition de collaboration pour des recherches en toxicologie sur les toxines de colubridés de la part du technopole Sophia-Antipolis. Tout laisse donc penser que les venins de couleuvres ont de beaux jours devant eux dans l'industrie pharmaceutique... ■ **Dinhill On**

Les colubridés fournissent d'excellentes molécules candidates pour différents types de médicaments.



Imagob Lombardo

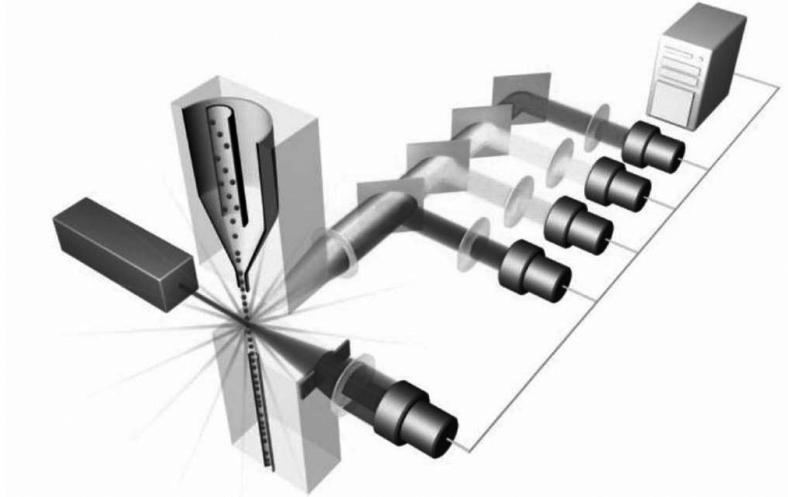
Résumé (12 points) :

Titre (3 points) :

5EME PARTIE – QUESTION SPECIFIQUE (15 POINTS)
3 THEMES AU CHOIX – N'EN TRAITER QU'UN SEUL

THEME 1 – CYTOMETRIE EN FLUX (15 points)

En vous aidant du schéma ci-dessous, décrivez le principe de la cytométrie en flux (**10 points**)



Citez et décrivez deux applications (**5 points**)

THEME 2 – CHROMATOGRAPHIE (15 points)

Une enzyme intervenant dans la coagulation sanguine a été purifiée à partir d'un litre de plasma bovin traité au citrate de sodium comme anticoagulant. La purification a été réalisée en trois étapes de chromatographie en phase liquide sur une chaîne FPLC (fast protein liquid chromatography). Un litre de plasma bovin contient 50 g de protéine totale et 50 000 unités enzymatiques (UE) de l'enzyme d'intérêt.

Questions :

1- Avant de commencer votre expérience, évaluez le ou les risque(s) qu'elle représente et indiquez les précautions à prendre pour prévenir ce(s) risque(s) **(2 points)**

2- Citer un exemple de méthode permettant de mesurer la concentration en protéine totale dans un extrait brut tel que du plasma **(2 points)**

3- Compléter le tableau ci-dessous **(4 points)**

	protéine (g) :	activité (UE) :	activité enzymatique spécifique	taux de purification (x fois) :	rendement (%) :
Extrait brut	50	50000		 	
1ere étape de chromatographie	10	40000			
2ème étape de chromatographie	1	20000			
3ème étape de chromatographie	0,1	20000			

4- Quel est le taux global de purification **(0,5 point) :**

5- Quel est le rendement total **(0,5 point) :**

6- Citer 3 des principales techniques de séparation des protéines par chromatographie en phase liquide (3 points)

7- Lors de chaque étape de purification, l'extrait protéique est chargé sur la colonne de chromatographie à l'aide d'une valve d'injection à laquelle sont connectées une seringue et une boucle de chargement. Cette valve d'injection comporte deux positions permettant de relier la pompe à la colonne selon deux trajets différents. En vous aidant du schéma ci-dessous, indiquer quelle doit être la position de la valve d'injection (« inject » ou « load ») lors des trois étapes suivante (3 points) :

a- Lorsque l'expérimentateur injecte l'extrait protéique dans la boucle de chargement à l'aide de la seringue connectée sur la valve d'injection :

b- Lorsque l'extrait protéique doit être chargé sur la colonne :

c- Lorsque la colonne doit être lavée et éluée pour purifier l'enzyme d'intérêt :

Schéma de connexion de la pompe, de la colonne, de la boucle de chargement et de la seringue sur la valve d'injection

