

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

Épreuve E5 - Unité U53

Techniques de biologie cellulaire et moléculaire

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

Documents interdits - Calculatrice autorisée

ÉPREUVE E5. UNITÉ U53 Techniques de biologie cellulaire et moléculaire

LA BRUCELLOSE EN MILIEU VÉTÉRINAIRE (40 points)

Le genre *Brucella* est responsable de diverses pathologies vétérinaires comme des avortements pouvant gravement compromettre un élevage. Les manipulations suivantes concernent deux aspects de l'étude de ces bactéries :

- Comparaison de deux méthodes de détection d'anticorps anti-brucelles,
- Évaluation de la cytotoxicité d'une fraction protéique purifiée de *Brucella* sur une culture de cellules placentaires de bovins.

1 - Comparaison de deux méthodes de détection d'anticorps anti-Brucelles. (20 points)

1.1 – Principes.

Dans un premier temps, l'agglutination est réalisée en tube à partir d'une gamme de dilutions du sérum testé. On utilise dans ce cas une suspension de bactéries tuées qui gardent leur pouvoir antigénique (méthode de wright).

Dans un second temps, une transposition sur lame est envisagée avec deux dilutions seulement. On utilise cette fois une suspension de bactéries tuées associées à un colorant facilitant la lecture de l'agglutination sur lame (méthode EAT rose bengale).

1.2 – Matériel :

- un tube contenant 5 mL d'eau physiologique « Φ ».
- 450 μ L de sérum de référence « S+ ».
- un tube contenant 5 mL de *Brucella* tuées « B ».
- 200 μ L de *Brucella* rose Bengale « BRB ».
- pipettes automatiques P1000, P200, P50 + cônes, P5000 ou pipette 2 mL.
- portoirs tubes à hémolyse.
- 11 tubes hémolyse.
- parafilm.
- un miroir concave.
- lames fond blanc et 4 agitateurs manuels.
- centrifugeuse.

1.3 - Protocole opératoire.

1.3.1 - Aspect quantitatif : détermination de la dilution limite en anticorps par l'observation de l'agglutination en tubes (méthode de Wright).

- Préparer 1,5 mL d'une dilution au 1/5 du sérum de référence « S+ » en eau physiologique « Φ ». On obtient la solution « Sd ».
- Réaliser une gamme de concentration de 7 tubes par dilution en cascade de raison $\frac{1}{2}$ du sérum de référence. Le premier tube contient la solution « Sd ». Le volume final de chaque tube est de 0,5 mL.
- Ajouter dans chaque tube 0,5 mL de la suspension bactérienne tuée « B ».
- Dans les mêmes conditions expérimentales, réaliser un témoin négatif dans le tube numéro 8.

Appeler un examinateur pour la réalisation des dilutions.

- Recouvrir les tubes de parafilm, puis centrifuger 5 min à 300 g.
- En tenant fermement le tube, observer précisément la remise en suspension du culot en réalisant progressivement des secousses franches du tube.
- Lire les résultats obtenus.

1.3.2 - Aspect qualitatif : validation de la dilution utile en anticorps pour la méthode d'agglutination sur lame (méthode EAT rose bengale).

Réaliser deux agglutinations sur lame à partir des 2 solutions de sérum suivantes :

→ le sérum de référence « S+ »

→ la plus forte dilution du sérum déterminée précédemment permettant encore d'observer une agglutination en tubes.

Sur une lame à fond blanc, ajouter 30 μL de suspension de Brucella rose Bengale à 30 μL de sérum de référence « S⁺ ».

- Homogénéiser à l'aide d'un agitateur manuel.

- Observer s'il y a agglutination.

- Préparer la dilution du sérum correspondant au titre déterminé en 1.3.1. (aspect quantitatif) en eau physiologique et réaliser l'agglutination sur lame selon le même protocole.

Présenter les 2 essais à un examinateur.

1.4 - Compte rendu.

1.4.1 - Aspect quantitatif.

- Expliquer la dilution du sérum de référence au 1/5.

- Indiquer la composition et l'intérêt du tube numéro 8.

- Présenter le tableau récapitulatif des réactifs et volumes, des dilutions du sérum en eau physiologique, des dilutions finales et des observations de l'agglutination.

- Calculer le titre du sérum de référence étudié, sachant que pour un sérum ayant une limite d'agglutination finale au 1/10, on annonce 30 UI.mL⁻¹.

- Expliquer le résultat du tube 1.

- En tenant compte de ce résultat, indiquer et justifier la dilution préalable du sérum en vue de l'agglutination sur lame.

1.4.2 - Aspect qualitatif.

- Expliquer la dilution effectuée.

- Présenter les résultats des agglutinations.

- Comparer les résultats obtenus selon les 2 approches qualitatives et quantitatives. Conclure.

2 - Evaluation de la cytotoxicité d'une fraction protéique de *Brucella*. (20 points)

2.1 - Principe.

La détermination de la cytotoxicité de la fraction protéique se fait par estimation de la viabilité cellulaire de 2 suspensions de cellules amniotiques :

C1, sans ajout de protéines brucelliques, obtenue après trypsination d'une culture de cellules confluentes fournie.

C2, avec ajout de protéines brucelliques, suspension préparée par le laboratoire.

La numération des cellules s'effectue en présence de bleu de méthylène de Funk qui colore les cellules mortes en bleu.

2.2 - Matériel :

Au poste de travail

- 1 mL de la suspension cellulaire « C2 ».
- 500 μL bleu de méthylène de Funk « BM ».
- pipettes automatiques P1000, P200, P50 + cônes.
- tubes à Eppendorf.
- 1 cellule de Malassez + lamelle.
- 1 microscope + alcool + papier nettoyage.
- poste de décontamination - lavage - séchage des cellules de Malassez pour 2 candidats.

Au poste de culture cellulaire :

- 1 boîte de culture de cellules confluentes pour préparer la suspension cellulaire « C1 »
- pipettes stériles 1 mL, 2 mL, 5 mL + système d'aspiration.
- 1 flacon de 10 mL de tampon PBS sans calcium (au bain Marie à 37 °C).
- 1 tube de 2 mL de trypsine EDTA (au bain Marie à 37 °C).
- 1 flacon de 10 mL de milieu DMEM + 10 % SVF (au bain Marie à 37 °C).
- un tube à hémolyse.
- microscope inversé.

2.3 - Protocole opératoire.

2.3.1 - Trypsination d'une culture cellulaire non traitée par la fraction de protéine brucellique.

L'ordre de passage sous hotte sera indiqué en début de séance.

- Observer au microscope inversé la culture cellulaire.
- Vider le milieu de culture.
- Rincer les cellules avec 5 mL de tampon PBS sans calcium. Puis éliminer le tampon.
- Ajouter 1,5 mL de trypsine.
- Suivre l'effet de la trypsine sur la culture de cellules.
- Stopper l'action de la trypsine en ajoutant 5 mL de milieu DMEM + 10 % SVF.
- Homogénéiser la suspension cellulaire.

On obtient la suspension C1.

- Prélever une partie aliquote en tube à hémolyse pour la numération.

2.3.2 - Numération des suspensions cellulaires C1 et C2.

- Réaliser une dilution volume à volume des 2 suspensions cellulaires C1 et C2 dans le bleu de méthylène de Funk.
- Compter les cellules en hématimètre de Malassez (caractéristiques fournies en annexe 1).

Présenter à un examinateur un champ microscopique avec la suspension C2

2.4 - Compte rendu.

- Indiquer les critères importants à respecter pour réaliser un comptage fiable.
- Donner les résultats obtenus sous forme d'un tableau récapitulatif : concentration de cellules vivantes, de cellules mortes et pourcentage de viabilité.
- Conclure sur l'effet de la fraction protéique testée.

Annexe 1

SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ :

