

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

**SÉLECTION ET ÉVALUATION DE LA VIABILITÉ DE FIBROBLASTES
TRANSGÉNIQUES**
(40 points)

Des fibroblastes de souris transgéniques ont été préparés afin de produire une protéine : « Px » glycosylée secrétée.

On se propose ici :

- de tester par immunoprécipitation les surnageants de culture (S1, S2, S3 et S4) de quatre clones respectivement (1, 2, 3 et 4) de cellules transgéniques pour vérifier l'expression de cette protéine « Px »,
- d'estimer la viabilité des cellules d'un clone.

1 - Sélection des fibroblastes par immunoprécipitation. (20 points)

On désire tester quatre surnageants de culture, notés S1, S2, S3 et S4.

Pour cela, on dispose de la protéine « Px » purifiée en solution et d'anticorps de chèvre anti-Px.

1.1 - Principe.

On utilise la technique de l'électrosynérèse pour estimer la libération de la protéine « Px » dans le milieu de culture de ces cellules. Le pHi de la protéine « Px » est connu : 6,2.

1.2 - Matériel et réactifs :

- 2 lames de verres (dimensions approximatives : 7 cm x 5 cm) numérotées (avec le n° de poste).
- Pipettes automatiques P₁₀, P₂₀₀ et cônes.
- Papier Whatman prédécoupé à la dimension de la lame (2 carrés).
- 3 tubes à hémolyse vides sur un portoir.
- Fond noir.
- Tampon Véronal pH 8,6 : un tube à hémolyse contenant 2 mL et noté « tampon ».
- Solution d'agarose à 1 % en tampon Véronal pH 8,6 maintenu en surfusion : 2 tubes contenant 7 mL.
- Solution de la protéine « Px » à 0,1 g.L⁻¹ : 200 µL en tube étiqueté « Solution Px ».
- Solution d'anticorps anti-protéine « Px » : 100 µL en tube étiqueté « anti-Px ».
- Solution des quatre surnageants de culture des cellules transgéniques : 20 µL respectivement en tube ependord notés « S1 », « S2 », « S3 » et « S4 ».
- Systèmes emporte-pièce pour la perforation des puits.
- Cuves et générateurs d'électrophorèse.
- Pincettes.
- Tampon Véronal pH 8,6, pour les cuves d'électrophorèse.
- Gants.

1.3 - Protocole opératoire.

1.3.1 - Préparation du gel.

Couler le gel d'agarose (environ 7 mL par lame) sur une surface horizontale. Laisser prendre en masse (on peut éventuellement placer les lames à 4°C si nécessaire).

Perforer le gel à l'aide d'un emporte-pièce en utilisant le gabarit fourni en **Annexe 1a**.

1.3.2 - Dilutions de la solution protéique « Px ».

En tube à hémolyse, effectuer avec la solution « tampon », des dilutions au 1/2, 1/3 et 1/5 de la « solution Px ».

Effectuer une dilution en présence d'un examinateur.

1.3.3 - Dépôt des solutions.

On testera la solution « Px » pure ainsi que les trois dilutions préparées précédemment.

Les quatre surnageants de culture (S1, S2, S3 et S4) seront testés purs.

La solution d'anticorps anti-Px est également utilisée pure.

Choisir le contenu et la disposition des différents puits et indiquer ces choix en complétant le gabarit fourni (annexe 1a).

Appeler impérativement un examinateur pour présenter ce gabarit avant de procéder au remplissage des puits.

Déposer 5 μ L de chaque solution par puits.

1.3.4 - Migration.

En présence d'un examinateur :

Disposer la lame dans la cuve contenant le tampon de migration à pH 8,6 en respectant l'orientation choisie précédemment.

Appliquer les ponts de papier Whatman.

Laisser migrer environ 75 minutes sous une tension de 150 volts.

Laisser ensuite la lame au poste.

1.4 - Compte rendu.

Justifier la disposition des différentes solutions dans les puits.

Présenter sous forme de tableau les dilutions de la solution « Px » réalisées.

Observer la lame en utilisant le fond noir. Compléter le gabarit de résultats (en Annexe 1b), en représentant les résultats obtenus.

Interpréter les résultats.

Quel clone cellulaire serait-il pertinent de choisir pour des études ultérieures sur la protéine « Px » ?

2 - Estimation de la viabilité cellulaire. (20 points)

2.1 - Principe.

On dispose d'une suspension de cellules transgéniques candidates obtenues après trypsination du flacon de cultures. On désire effectuer un dénombrement des cellules viables de cette suspension pour calculer le volume d'inoculum à introduire dans un nouveau flacon de culture. Pour cela, on utilise la technique classique du dénombrement en hématimètre en présence du Bleu de méthylène de Funk.

2.2 - Matériel et réactifs :

- Suspension de cellules transgéniques : 500 μ L en tube à hémolyse noté « C ».
- Solution de Bleu de Funk : 500 μ L en tube à hémolyse noté « Bleu de Funk ».
- Hématimètre de Malassez avec lamelle (Annexe 2).
- Compteur de cellules.
- Pipette automatique P₂₀₀ avec cônes.
- 1 tube à hémolyse sur un portoir.
- Cristalliseur contenant du désinfectant.
- Gants.
- Microscope.

2.3 - Protocole opératoire.

Réaliser un mélange volume à volume de la suspension cellulaire bien homogénéisée avec la solution de Bleu de Funk.

Réaliser le montage en hématimètre devant un examinateur.

Effectuer la numération après un délai de 5 minutes maximum.

Présenter un champ microscopique à un examinateur et la numération de la première ligne.

2.4 - Compte rendu.

Présenter le résultat de la numération sous forme de tableau.

Indiquer la formule littérale permettant de calculer le volume de la suspension cellulaire dénombrée pour introduire $2 \cdot 10^4$ cellules viables dans un nouveau flacon de culture cellulaire de volume final de 5 mL.

Faire l'application numérique. Donner le protocole à réaliser (volumes, matériel et étapes).

Pourquoi estime-t-on la viabilité d'un clone de cellules candidates ?

DANS CE CADRE

NE RIEN ÉCRIRE

Académie : _____ Session : _____
Examen ou Concours _____ Série* : _____
Spécialité/option* : _____ Repère de l'épreuve : _____
Épreuve/sous-épreuve : _____
NOM : _____
(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)
Prénoms : _____ N° du candidat
Né(e) le : _____
(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

Repère : BAE5BCM/2

SESSION 2006

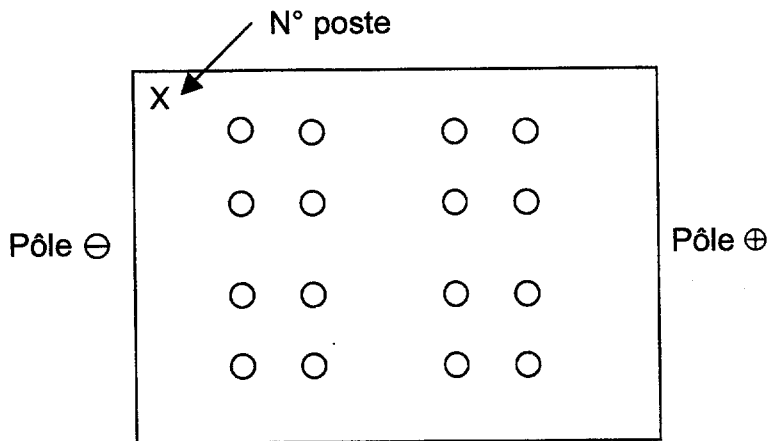
Durée : 2 H 30

Page : 3/4

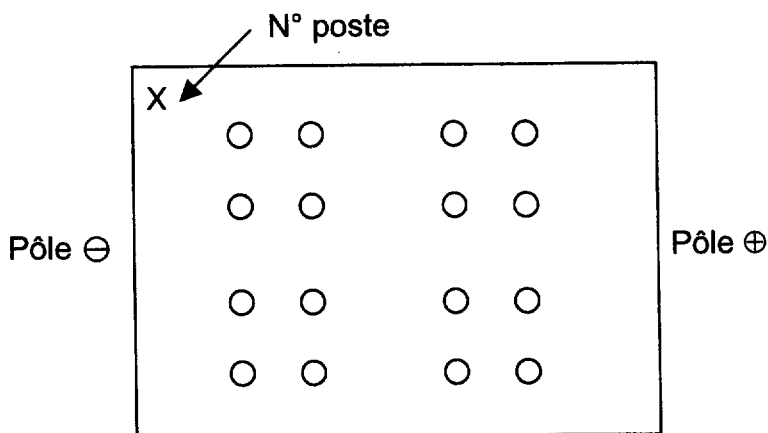
Coefficient : 2

Annexe 1
(à rendre avec la copie du compte rendu)

a) - **GABARIT DE DÉPÔTS** (à montrer à un examinateur avant de déposer) :



b) - **GABARIT DE RÉSULTATS** (pour schématiser les résultats obtenus) :



Annexe 2

SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ :

