

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

ANALYSE D'UNE NOUVELLE LIGNÉE DE TOMATE HYBRIDE (40 points)

Une nouvelle lignée de tomate hybride F_1 a été obtenue par croisement :

- d'un cultivar produisant une grande quantité de vitamine B permettant la réduction des carences nutritionnelles en folates ;
- et d'une lignée transgénique résistante aux insectes permettant de réduire l'utilisation de pesticides sur les cultures en plein champ.

À partir des jeunes plants hybrides F_1 , on se propose :

- d'assurer la multiplication de la ligne *in vitro* ;
- de contrôler les caractères des tomates obtenues par dosage d'une enzyme intervenant dans la voie de synthèse des folates et par détection d'une protéine insecticide.

1 - Multiplication de la lignée de tomate par culture *in vitro* (10 points)

1.1 - Principe

Une feuille prélevée sur un jeune plant de tomate hybride F_1 a été désinfectée et rincée. L'explant est mis en culture *in vitro* dans un milieu minéral MURASHIDE & SKOOG additionné de saccharose, de thiamine, de phytohormones et d'agar.

1.2 - Matériel et réactifs

Au poste de culture cellulaire :

- 1 flacon contenant une feuille dans de l'eau distillée stérile notée « **Hybride F_1** » ; La feuille a été préalablement désinfectée à l'éthanol à 70 %, à l'hypochlorite de Sodium à 4 % puis rincée trois fois à l'eau distillée stérile.
- 1 flacon contenant le milieu de culture stérile.
- 1 boîte de Pétri stérile.
- Pincettes et scalpel stériles.
- Pot à alcool pour la désinfection des instruments.

1.3 - Protocole opératoire

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

Temps limité à 10 minutes par candidat.

Dans la boîte de Pétri et à l'aide d'un scalpel, découper un carré de 1 cm de côté environ à la base de la feuille.

Introduire l'explant dans le flacon de culture en le posant sur le milieu avec une légère pression sur ce dernier pour le stabiliser.

Placer l'explant face inférieure de la feuille contre le milieu.

Incuber la culture à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ avec une photopériode de 16 heures.

1.4 - Compte-rendu

Nommer la technique de culture végétale mise en jeu.

Sachant que le milieu de culture contient une auxine à $0,175 \text{ mg.L}^{-1}$ et cytokinine à $2,25 \text{ mg.L}^{-1}$, en déduire le type de morphogenèse favorisée par ces conditions de culture. Justifier.

2 - Titration de la GTP cyclohydrolase par réaction d'hémagglutination passive inversée (18 points)

2.1 - Principe

Afin d'évaluer la capacité du plant de tomate hybride F_1 à produire en quantité des folates, on dose une enzyme de la voie métabolique du folate - la GTP cyclohydrolase - qui devrait être surexprimée dans cet hybride. On met en présence des dilutions de l'extrait de tomate prétraité et des globules rouges sensibilisés avec des anticorps anti-cyclohydrolase. La lecture d'une hémagglutination permet de déterminer le titre en enzyme dans l'extrait testé.

2.2 - Matériel et réactifs

- 1 tube contenant 250 μL de surnageant d'extrait « prétraité » de tomate témoin noté « **Surnageant témoin** ».
- 1 tube contenant 250 μL de surnageant d'extrait « prétraité » de tomate hybride noté « **Surnageant hybride F₁** ».
- 1 tube contenant 150 μL de solution de GTP cyclohydrolase noté « **Cyclohydrolase** ».
- 1 tube contenant 3 mL de PBS noté « **PBS** ».
- 1 tube contenant 3 mL d'hématies de mouton sensibilisées avec des anticorps anti-cyclohydrolase noté « **GR sensibilisés** ».
- Microplaque 96 puits à fonds ronds et son couvercle.
- Pipette automatique P₁₀₀ + cônes.

2.3 - Protocole opératoire

2.3.1 - Prétraitement des extraits de tomate (déjà réalisé)

Pour chaque extrait, introduire dans un tube à hémolyse :

- 50 μL d'extrait de tomate (tomate témoin ou tomate hybride) F₁,
- 450 μL d'hématies de mouton à 0,5 % (v/v) en PBS.

Incuber 12 heures à 4°C puis centrifuger 15 minutes à 500 g.

Récupérer les surnageants d'extraits de tomate.

2.3.2 - Réaction immunologique

On dispose de deux surnageants.

Sur trois lignes d'une microplaque 96 puits à fond rond, effectuer la réaction immunologique :

- la ligne A concerne le dosage réalisé sur le surnageant d'extrait de tomate témoin exprimant un taux normal de GTP cyclohydrolase noté « **Surnageant témoin** » ;
- la ligne B concerne le dosage réalisé sur le surnageant d'extrait de tomate hybride F₁ noté « **Surnageant hybride F₁** » ;
- la ligne C est réservée à la réalisation des deux témoins.

Prévoir les deux témoins dans les cupules C1 et C2.

Sous un volume final de 100 μL , réaliser, en tampon PBS, une série de 12 dilutions en cascade de raison $\frac{1}{2}$ à partir de chaque surnageant pur.

↳ **Effectuer une gamme de dilution en présence d'un examinateur.**

Répartir 100 μL de suspension d'hématies sensibilisées dans chacune des cupules.

Couvrir la plaque.

Incuber à l'abri de toute vibration à température ambiante pendant au minimum 1 heures 30.

Procéder à la lecture des résultats :

- agglutination + : présence d'un tapis d'hématies couvrant le fond de la cupule ou d'un tapis d'hématies rétracté avec un bouton résiduel ;
- agglutination - : présence d'un bouton de sédimentation au fond de la cupule.

2.4 - Compte-rendu

Quel est le rôle du prétraitement des extraits de tomate (paragraphe 2.3.1) ?

Présenter dans un tableau la composition des différentes cupules, les dilutions des surnageants dosés (avant addition des hématies sensibilisées) et les résultats obtenus.

Préciser les compositions et les rôles des deux témoins réalisés. Valider la technique utilisée.

Déterminer les titres des surnageants testés ; en déduire les titres des deux extraits. Le titre est donné par l'inverse de la dilution limite provoquant encore une hémagglutination.

Calculer le facteur de surexpression « **F** » de la cyclohydrolase dans la tomate hybride F₁ par rapport à la tomate témoin.

Conclure.

3 - Détection de la protéine insecticide Cry1Ac par immunoprécipitation (12 points)

3.1 - Principe

Si la protéine insecticide Cry1Ac est produite par le plant hybride F₁, alors le plant résistera aux insectes parasites (lépidoptères). Par la technique d'électrosynérèse réalisée à pH 8,6, la protéine Cry1Ac éventuellement présente dans l'extrait de tomate sera mise en évidence à l'aide d'anticorps anti-Cry1Ac.

La protéine Cry1Ac présente un pHi inférieur à 8,6.

3.2 - Matériel et réactifs

- 2 tubes de 10 mL d'agarose à 1 % (mv) en tampon véronal pH 8,6 maintenus à 55°C.
- 1 tube contenant 50 µL d'anticorps anti-Cry1Ac noté « **Ac anti-Cry1Ac** ».
- 1 tube contenant 50 µL d'extrait de tomate hybride F₁ noté « **Extrait hybride F₁** ».
- 1 tube contenant 50 µL d'extrait de tomate témoin non transgénique sensible aux insectes noté « **Extrait témoin** ».
- 1 tube contenant 50 µL de solution de protéine Cry1Ac noté « **Cry1Ac** ».
- 2 lames de verre numérotées (une pour s'entraîner à couler et à perforer le gel, une pour réaliser le test).
- 2 bandes de papier Whatman n° 1.
- Pipette automatique P₂₀ + cônes.
- Système pour creuser les puits dans le gel.
- Cuve à électrophorèse avec du tampon de migration à pH 8,6 dans chaque compartiment.
- Générateur.

3.3 - Protocole opératoire

Couler le gel d'agarose sur les lames.

Laisser prendre en masse.

Perforer le gel à l'aide d'un emporte pièce selon le modèle de gabarit de l'**annexe 1**.

Compléter le schéma 1 de l'**annexe 1** (à rendre avec la copie).

Prévoir deux essais pour l'hybride F₁ et deux témoins.

↳ **Soumettre le plan d'organisation des dépôts à un examinateur.**

Déposer 10 µL de l'extrait de tomate hybride F₁ « **Extrait hybride F₁** » (2 essais), 10 µL de l'extrait de tomate témoin « **Extrait témoin** » et 10 µL de solution de Cry1Ac « **Cry1Ac** ».

Déposer la solution d'anticorps anti-Cry1Ac (10 µL par puits).

↳ **En présence d'un examinateur.**

Disposer la lame dans la cuve.

Appliquer les points de papier Whatman.

Laisser migrer 30 minutes sous une tension de 150 volts (**migration effectuée par les examinateurs**).

Observer la lame sur un fond noir.

3.4 - Compte-rendu

Justifier la disposition du contenu des puits.

Schématiser les résultats obtenus en complétant le schéma 2 de l'**annexe 1** (à rendre avec la copie).

Préciser les rôles des deux témoins réalisés. Valider la technique utilisée.

Interpréter les résultats et conclure.

DANS CE CADRE

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.

NE RIEN ÉCRIRE

Repère : BAE5BCM/1

SESSION 2008

Durée : 3 H

Page : 4/4

Coefficient : 2

POSTE N° :

ANNEXE 1

(à rendre avec la copie)

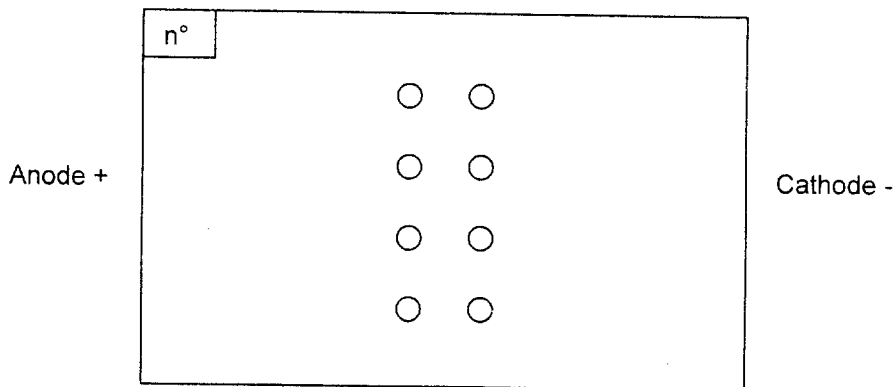


Schéma 1 : organisation des dépôts

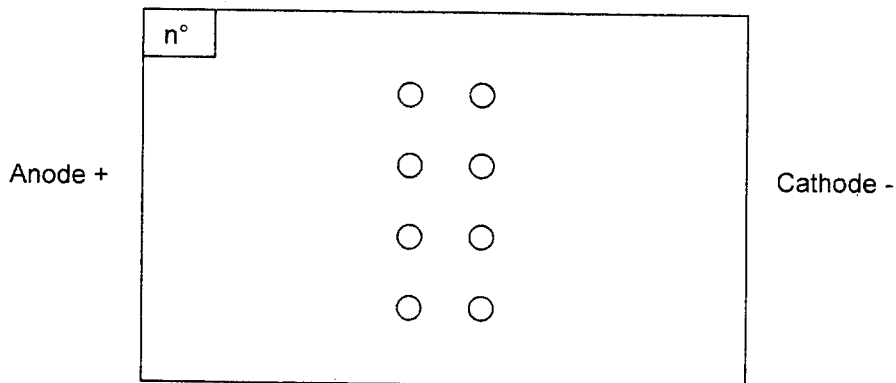


Schéma 2 : résultats obtenus

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**PRÉPARATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX (40 points)**

Les anticorps monoclonaux sont devenus des outils couramment utilisés à des fins analytiques.

La procédure suivie pour préparer des anticorps monoclonaux contre une protéine d'enveloppe « Penv » d'un virus est présentée dans l'**annexe 1**. Elle est basée sur la sélection et le clonage d'hybridomes obtenus par fusion cellulaire entre des lymphocytes B d'une souris immunisée contre la protéine « Penv » et des cellules du myélome de phénotype HGPRT- et non producteur d'immunoglobuline.

Les manipulations proposées ont pour objectifs :

- de rechercher des hybridomes d'intérêt (**annexe 1**, étape 4),
- de réaliser le clonage d'une suspension d'hybridomes préparée à partir d'un puits positif.

1 - Recherche d'hybridomes producteurs d'anticorps anti « Penv » par une méthode immunoenzymatique (23,5 points)**1.1 - Matériel et réactifs**

- Double barrette sensibilisée et saturée (les cupules D1 et D2 ne sont pas utilisées).
- 1 tube à hémolyse + portoir.
- Papier absorbant.
- Pipettes automatiques P₂₀₀ et P₁₀₀ + cônes.
- Film autocollant.
- Agitateur de microplaques + notice au poste.
- Dispositif de lavage de microplaques et solution de lavage étiquetée « **PBS-Tween** ».
- Étuve à 37° C.
- Lecteur de microplaques.
- 1 tube hémolyse contenant 1 mL de tampon de dilution étiqueté « **Td** ».
- 1 tube Eppendorf contenant 300 µL d'un sérum de souris anti - Penv étiqueté « **Contrôle** ».
- 1 tube hémolyse contenant 2 mL anticorps anti immunoglobuline de souris couplé à la phosphatase alcaline étiqueté « **Conjugué** ».
- 8 tubes Eppendorf contenant 300 µL des 8 surnageants de milieu de culture à tester pour la présence éventuelle d'anticorps anti - Penv, étiquetés « **S1** » à « **S8** ».
- 1 tube Eppendorf contenant 300 µL d'un mélange équivolume des 8 surnageants de milieu de culture à tester étiqueté « **pool** ».
- 1 tube hémolyse contenant 2 mL de substrat, solution de paranitrophénylphosphate à 2 mg.mL⁻¹ étiqueté « **PNPP** ».
- 1 tube hémolyse contenant 1 mL de solution de NaOH à 1 mol/L étiqueté « **NaOH** ».
- Bac de désinfectant.
- Gants.

1.2 - Protocole opératoireSensibilisation de la barrette (déjà réalisée) :

Distribuer 100 µL de solution d'antigène « Penv » purifié dans les cupules de E1 à H1 et de A2 à H2. Les cupules D1 et D2 sont non utilisées.

Incuber 2 heures à 37°C.

Laver avec du « **PBS-Tween** ».

Saturation des colonnes 1 et 2 de la barrette avec une solution de SAB (déjà réalisée) :

Déposer 200 µL de « **PBS - SAB** » dans chaque cupule.

Incuber 30 minutes à 37°C.

Réactions immunologiques :

Effectuer trois lavages successifs de chaque cupule de la double barrette avec au minimum 200 µL de « **PBS-Tween** ».

Distribuer ensuite :

- 100 µL de tampon « Td » dans la cupule A1,
- 100 µL du sérum « contrôle » non dilué dans les cupules B1, A2 et B2,
- 100 µL de la solution « pool » dans les cupules C1 et C2,
- 100 µL des différents surnageants dans les cupules de E1 à H2.

Recouvrir la barrette d'un film autocollant.

Incuber 30 minutes à 37° C.

Procéder à trois lavages successifs des cupules par le « PBS-Tween », comme précédemment.

Dans chaque cupule sauf A1, ajouter 100 µL de « conjugué ».

Dans la cupule A1 ajouter 100 µL de tampon « Td ».

Recouvrir la barrette d'un film autocollant.

Incuber 30 minutes à 37° C.

Procéder à trois lavages successifs des cupules par le PBS-Tween, comme précédemment.

Révélation de l'activité enzymatique liée :

Ajouter 100 µL de solution de substrat « PNPP » dans toutes les cupules utilisées.

Incuber 30 minutes à 37°C.

Ajouter 50 µL de solution de NaOH à 1 mol.L⁻¹.

Lire les absorbances contre l'air à 405 nm.

1.3 - Compte-rendu

Dresser le plan de dépôt de la double barrette.

Réaliser un schéma de principe de la technique utilisée et en donner les caractéristiques.

Donner le rôle des cupules A1, A2, B1 et B2, C1 et C2 en justifiant votre réponse. Interpréter les résultats obtenus pour ces cupules.

Remplir le tableau fourni en **annexe 2 (à rendre avec la copie)**. Corriger les absorbances obtenues par la valeur du résultat du « blanc réactif ».

Exprimer les résultats obtenus pour les surnageants en pourcentage suivant la formule :

$$\frac{(A_{\text{surnageant}} - A_{T2}) \times 200}{(A_{A2} - A_{Tb}) + (A_{B2} - A_{Td})}$$

Conclure.

Préciser le rôle de la solution « pool ».

2 - Clonage d'une suspension d'hybridomes (16,5 points)

2.1 - Principe

La technique de "la dilution limite" consiste à distribuer en microplaque une suspension cellulaire à raison de 37 cellules au maximum pour 100 puits. En effet, en respectant cette condition, la probabilité d'introduire 2 cellules ou plus d'hybridomes dans un même puits est très faible. Un puits présentant un développement cellulaire a une très forte probabilité de correspondre à un clone d'hybridomes.

Afin que la viabilité des hybridomes ne soit pas affectée par cette dilution très élevée, des cellules de thymus de souris sont ajoutées à la suspension d'hybridomes lors de l'ensemencement de la microplaque.

2.2 - Matériel et réactifs

Au poste de travail :

- 1 tube à hémolyse + portoir.
- 500 µL de bleu méthylène de Funk étiqueté « BF ».
- 500 µL en tube hémolyse de suspension de cellules étiquetée « Ha » (**fournie à la demande du candidat**).
- Pipette automatique P₂₀₀ + cônes.
- 1 tube hémolyse.
- 1 cellule de Malassez + lamelle (caractéristiques fournies en **annexe 3**).
- 1 microscope + alcool + papier nettoyage.
- Poste de décontamination pour cellules de Malassez.

Au poste de culture cellulaire :

- 1 plaque de 96 puits pour culture.
- 1 tube stérile de 50 mL.
- 1 flacon de 20 mL de milieu de culture prêt à l'emploi étiqueté « **MEM** ».
- système d'aspiration.
- pipettes stériles de 2 mL et 10 mL.
- 1 pipette automatique P₁₀₀₀ + cônes stériles.
- 1 pipette automatique multicanaux + cônes stériles + réservoir stérile.
- 1 tube de 3 mL de suspension de thymocytes à 10⁷ cellules / mL.
- 1 tube de 1 mL de suspension d'hybridomes « **Ha** » ajustée à 100 cellules / mL.

2.3 - Protocole opératoire

2.3.1 - Numération de la suspension d'hybridomes « Ha »

Réaliser en tube à hémolyse une dilution volume à volume de la suspension cellulaire « **Ha** » dans le bleu de méthylène de Funk.

↳ **Remplir l'hématimètre de Malassez devant un examinateur.**

Compter les cellules

↳ **Présenter un champ microscopique à un examinateur.**

2.3.2 - Ensemencement d'une microplaque

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

Au moment du passage au poste de culture cellulaire, soumettre aux examinateurs les différents volumes à prélever pour préparer la suspension.

Dans un tube stérile de 50 mL, introduire :

- les thymocytes afin d'obtenir une concentration finale de 10⁶ cellules/mL,
- 30 à 37 cellules d'hybridomes à partir de la suspension « **Ha** »,
- le milieu de culture complet « **MEM** » de façon à compléter à 20 mL.

Transvaser la suspension dans le réservoir stérile et, à l'aide de la pipette multicanaux, distribuer la suspension obtenue dans la plaque de 96 puits à raison de 200 µL / puits.

2.4 - Compte-rendu

Rassembler les résultats de la numération sous forme d'un tableau.

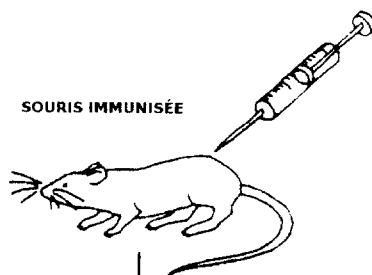
Calculer la concentration en cellules vivantes.

Proposer un protocole opératoire de dilution de la suspension « **Ha** » dans le milieu de culture de façon à obtenir 50 mL d'une suspension ajustée à 100 cellules par mL.

Donner la réalisation de la suspension cellulaire à distribuer dans la microplaque de 96 puits.

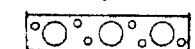
ANNEXE 1**SCHÉMA DE LA DÉMARCHE GÉNÉRALE D'ISOLEMENT D'HYBRIDOMES ET DE PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX**

ÉTAPE 1 : Immunisation de souris contre l'antigène Penv.



SOURIS IMMUNISÉE

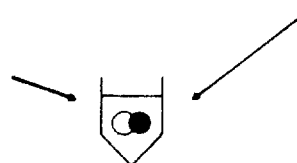
ÉTAPE 2 : Fusion cellulaire entre les cellules de la rate et des cellules de myélome en présence de polyéthylène glycol.



CELLULES SPLÉNIQUES



MYÉLOME HGPRT-



FUSION CELLULAIRE

ÉTAPE 3 : Culture des hybridomes sur milieu sélectif HAT (hypoxanthine, aminoptérine et thymidine).



MILIEU SÉLECTIF

ÉTAPE 4 : Recherche parmi les puits présentant une croissance cellulaire, la présence d'anticorps anti Penv dans le milieu de culture.

RECHERCHE DES HYBRIDOMES SÉCRÉTEURS D'ANTICORPS DE SPÉCIFICITÉ RECHERCHÉE

ÉTAPE 5 : Clonage des hybridomes par la technique de la dilution limite.



CLONAGE

ÉTAPE 6 : Recherche de clones sécréteurs d'anticorps anti Penv, développement des clones positifs, caractérisation des anticorps produits, congélation des clones à conserver.

RECHERCHE DES MEILLEURS CLONES (CARACTÉRISATION DES ANTICORPS)

CONGÉLATION

PRODUCTION DE MASSE

DANS CE CADRE

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 2008

Durée : 3 H

Page : 5/6

Coefficient : 2

Poste n°

ANNEXE 2**Feuille de résultats à rendre avec la copie**

puits	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
dépôt	Td	contrôle	pool					
A à 405 nm								
A corrigée								
pourcentage								

puits	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
dépôt	contrôle	contrôle	pool					
A à 405 nm								
A corrigée								
pourcentage								

NE RIEN ÉCRIRE

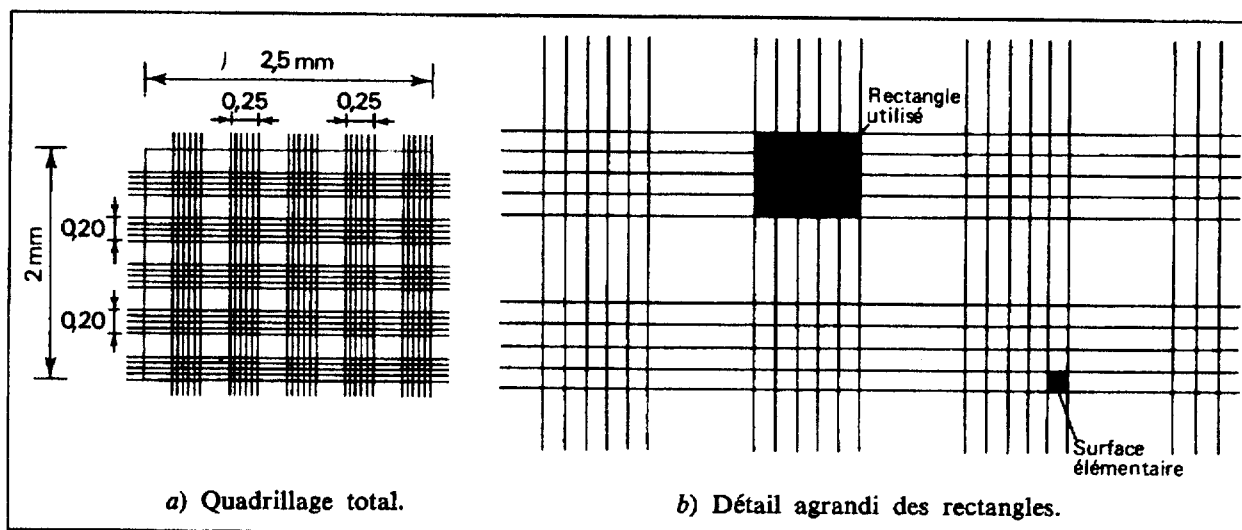
ANNEXE 3**SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ**

FIG. 77 — Quadrillage de Malassez utilisé pour la numération.

Caractéristiques de la cellule de Malassez

Profondeur	0,2 mm \pm 0,002 mm
Surface totale du quadrillage	5 mm ²
Volume total	1 mm ³
Surface des rectangles quadrillés	1/20 ^e de mm ²
Volume correspondant aux rectangles quadrillés	1/100 ^e de mm ³ soit 1/100 ^e du volume

b) Quadrillage de Thoma (fig. 78)