



**LE RÉSEAU DE CRÉATION
ET D'ACCOMPAGNEMENT PÉDAGOGIQUES**

**Ce document a été mis en ligne par le Canopé de l'académie de Bordeaux
pour la Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

Ce fichier numérique ne peut être reproduit, représenté, adapté ou traduit sans autorisation.

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

CONTRÔLE D'UN LOT DE SÉRUM DE VEAU FŒTAL (40 points)

Suite à un accident de fabrication, la présence d'endotoxines a été détectée sur un lot de sérum de veau fœtal, (lot corrompu).

Le laboratoire de contrôle souhaite quantifier les endotoxines présentes et évaluer l'incidence de cette contamination sur la croissance cellulaire.

1 - Contrôle biologique : test de croissance cellulaire. (21 points)

1.1 - Principe.

On utilise une lignée de cellules non adhérentes, sélectionnées pour sa sensibilité à des carences nutritionnelles et pour sa représentativité.

Ces cellules sont ensemencées à une densité de 1×10^5 cellules par mL dans le milieu DMEM additionné de 10 % du sérum de veau fœtal de **référence** (suspension **C1**) et dans le milieu DMEM additionné de 10 % du sérum de veau fœtal **corrompu** (suspension **C2**), puis incubées à 37° C pendant 48 heures sous atmosphère enrichie en 5 % de CO₂.

La capacité du lot corrompu à promouvoir la croissance cellulaire est estimée après numération des cellules viables de chaque suspension C1 et C2.

1.2 - Matériel et réactifs.

- 1 tube contenant la suspension cellulaire « **C1** » (1 mL).
- 1 tube contenant la suspension cellulaire « **C2** » (1 mL).
- Flacons de cultures **C1** et **C2**.
- 500 µL de bleu de méthylène de Funk « **BM** ».
- Tubes à hémolyse.
- Hématimètre de Malassez et lamelle.
- Micropipettes P₂₀₀ et cônes.

1.3 - Protocole opératoire.

Observer les cultures au microscope inversé.

Réaliser une dilution au 1/2 de chacune des suspensions cellulaires **C1** et **C2** dans le bleu de méthylène de Funk.

Introduire chacune des deux suspensions cellulaires en hématimètre de Malassez.

Réaliser le montage en hématimètre devant un examinateur.

Effectuer la numération des cellules après un délai de 5 minutes maximum.

Présenter à un examinateur un champ microscopique avec la suspension « C1 » et la numération du champ.

Données : Caractéristiques de la cellule de Malassez

Longueur du quadrillage : 2,5 mm

Profondeur : 0,2 mm

Largeur du quadrillage : 2 mm

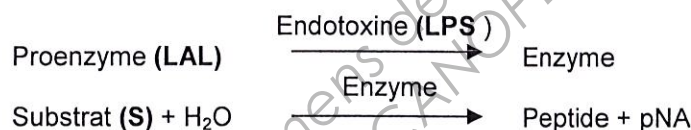
Nombre de rectangles : 100

1.4 - Compte-rendu.

- Décrire l'observation microscopique des cultures.
- Indiquer les critères importants à respecter pour réaliser un comptage fiable.
- Calculer la concentration en cellules viables pour **C1** et **C2**.
- Comparer le pourcentage de viabilité pour chacune des suspensions sachant qu'on admet une différence de 5% de viabilité entre le sérum de référence et le sérum à tester.
- Conclure quant à la capacité du lot de sérum corrompu à promouvoir la croissance des cellules.
- La culture des cellules a nécessité la préparation de 500 mL de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal.
 - Calculer le volume de sérum de veau fœtal à ajouter au milieu DMEM.
 - Préciser le rôle du sérum de veau fœtal.
 - Citer un inconvénient dans l'utilisation du sérum de veau fœtal.

2 - Contrôle toxicologique : dosage d'endotoxines. (19 points)**2.1 - Principe.**

La quantification des endotoxines (lipopolysaccharides) produites par les bactéries Gram négatif est réalisée au moyen d'un lysat d'amœbocytes de limule (LAL), cellules sanguines du crabe *Limulus polyphemus*. En présence d'endotoxine, les composants du LAL sont activés au cours d'une réaction qui aboutit au clivage d'un substrat chromogène synthétique incolore. Après dissociation du substrat, il y a libération de p-nitroaniline (pNA) de couleur jaune qui absorbe à 405 nm.



La teneur en endotoxines est exprimée en Unité d'Endotoxine (UE).

2.2 - Matériel et réactifs.

- Solution étalon d'endotoxines d'*E. coli* à 1 UE/mL « LPS » : 1 tube de 250 µL.
- Lysat Limulus « LAL » : 1 tube de 450 µL.
- Solution de substrat chromogène « S » : 1 tube de 850 µL.
- Eau apyrogène « diluant » : 1 tube de 1 mL.
- Solution d'arrêt : 1 tube de 1 mL.
- 1 tube contenant 100 µL de nouveau lot de sérum corrompu « SVF-1 ».
- 1 microplaque à fond plat stérile + couvercle ou film adhésif.
- Micropipettes P₂₀ et P₂₀₀.
- Cônes pour micropipettes de 20 µL et 200 µL.
- Gants.
- Lecteur de microplaques.
- Étuve à 37° C.
- Ordinateur.

2.3 - Protocole opératoire.

- **Préparation de la gamme d'endotoxine**

À partir de la solution étalon d'endotoxine « LPS » à 1 UE/mL, préparer dans les cupules de la **ligne A** de la microplaque, une gamme de dilution d'endotoxine de raison 1/2 allant de : 1 à 0,125 UE/mL en eau apyrogène notée « diluant ». Prévoir un volume final de 100 µL.

Réaliser la gamme en présence d'un examinateur.

- **Préparation du « sérum à tester »**

Effectuer, dans les cupules de la **ligne B** de la même microplaque, une dilution au 1/10 du « sérum à tester » en eau apyrogène notée « diluant ».

- **Réalisation du dosage (3 essais)**

Dans les cupules de la **ligne C**, déposer :

- 50 µL de la solution étalon de LPS (cupule **C1**)
- 50 µL de chacune des dilutions de l'étalon de LPS (cupules **C2 à C4**)
- 50 µL de chaque dilution du sérum corrompu (cupules **C5 à C7**)

Réaliser un témoin et le déposer dans la cupule **C12**.

Ajouter 50 µL de lysat Limulus « LAL » dans chaque puits.

Incuber 10 min à 37° C.

Ajouter 100 µL de substrat chromogène « S » dans chaque puits.

Incuber 6 min à 37° C.

Arrêter la réaction avec 100 µL de solution d'arrêt.

Lire la plaque à 405 nm.

2.4 - Compte-rendu.

- Présenter la préparation de la gamme et les résultats sous forme de tableau.
- Indiquer la composition et le rôle du témoin.
- À l'aide de l'outil informatique, tracer la droite $A = f$ (concentration de LPS en UE/mL).
- Préciser l'équation de la droite de régression et le coefficient de détermination.
- Rendre un graphique renseigné.
- Exprimer les résultats en conformité aux instructions de l'**annexe 1**.
- Déterminer la concentration en LPS du sérum de veau fœtal à tester en UE/mL.
- Conclure

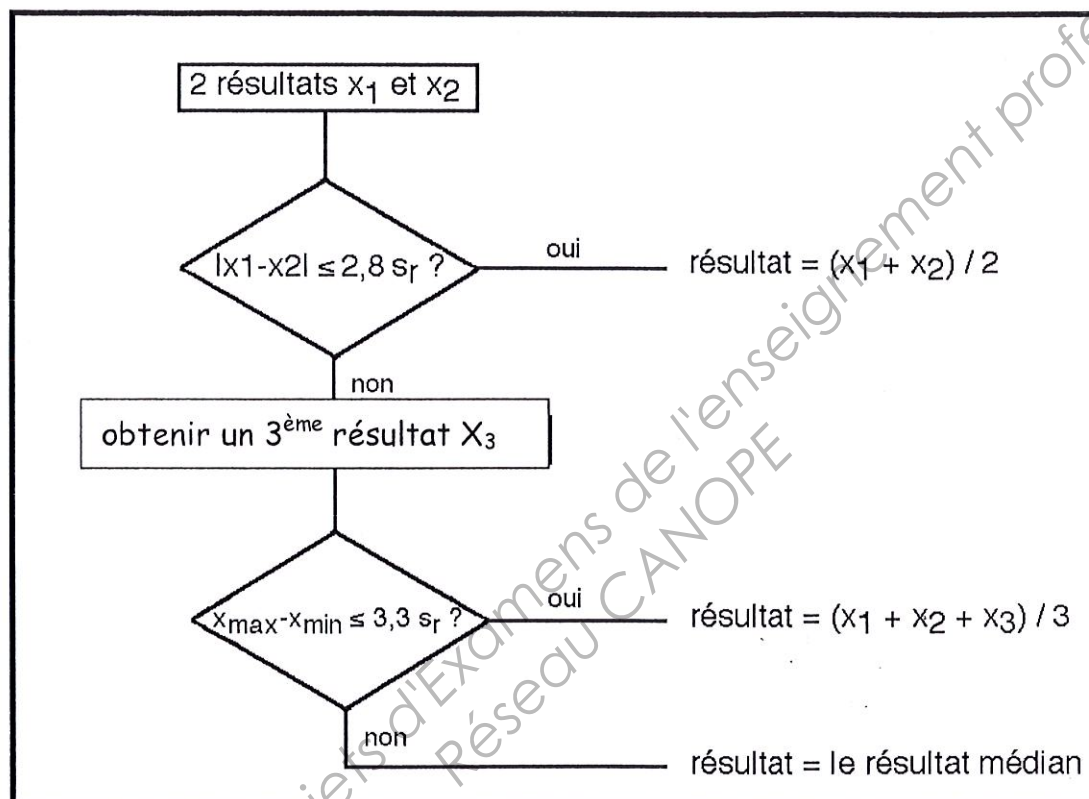
Données :

- Sur le plan toxicologique, la fiche de contrôle de qualité d'un sérum de veau fœtal comporte : LPS (endotoxines) < 4,3 UE/mL
- Limite de linéarité du lecteur de microplaque fournie par le centre d'examen.
- S_r et U_c communiqués par le centre d'examen.

ANNEXE 1

EXPRESSION DES RÉSULTATS NUMÉRIQUES

- Logigramme de traitement des données expérimentales



- Expression du résultat

Le nombre de chiffres significatifs pour exprimer le résultat final établi sera en adéquation avec l'expression numérique de l'incertitude élargie.

Dans l'expression du résultat comporte :

- La valeur de s_r ;
- le nombre de résultats expérimentaux utilisés pour le calcul du résultat final établi ;
- le traitement mathématique à l'origine du résultat (moyenne arithmétique ou médiane) ;
- l'incertitude élargie calculée à l'aide de l'incertitude composée (u_c) et d'un facteur d'élargissement 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 % ;
- le résultat final encadré : $X \pm$ incertitude élargie (unité précisée).