



**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.

CORRIGE

Ces éléments de correction n'ont qu'une valeur indicative. Ils ne peuvent en aucun cas engager la responsabilité des autorités académiques, chaque jury est souverain.

ÉPREUVE E5. UNITÉ U53
Techniques de biologie cellulaire et moléculaire
Matière d'œuvre

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

Prévoir éventuellement un ordre de passage en fonction des contraintes matérielles.

1 - Contrôle biologique : test de croissance cellulaire.

Par candidat :

- 1 tube contenant la suspension cellulaire « C1 » à 2×10^6 cellules/mL (1 mL).
- 1 tube contenant la suspension cellulaire « C2 » à 1×10^6 cellules/mL (1 mL).
- 500 μ L de bleu de méthylène de Funk « BM ».
- 3 tubes à hémolyse.
- 1 hématimètre de Malassez et lamelle.
- Micropipettes P₂₀₀.
- Cônes pour pipettes automatiques de 200 μ L.

En commun :

- 1 microscope + alcool + papier nettoyage.
- 1 microscope inversé.
- 1 flacon contenant la suspension cellulaire « C1 » à 2×10^6 cellules/mL.
- 1 flacon contenant la suspension cellulaire « C2 » à 1×10^6 cellules/mL.

Réactifs :

- Cellules en suspension
Fournisseur ECACC ; nom de la lignée cellulaire : 45.6.TG1.7 ou toute autre lignée cellulaire en suspension non adhérentes.
Prix cellules congelées : environ 250-300 €.
Adapter le milieu de culture à la lignée cellulaire utilisée.
- Milieu de culture
Sérum de Veau Fœtal ; 100 mL.
Fournisseur VWR, référence 6081001 : 172,94 €.
Milieu Essentiel Minimum modifié par Dulbecco (DMEM) 500 mL.
Fournisseur VWR, référence BWSTL0103/500 : 5,55 €.
L-Glutamine, 200mM 100 mL.
Fournisseur VWR, Référence 5606901, 100 mL : 8,00 €.
Pénicilline-streptomycine ; 100 mL.
Fournisseur Référence BWSTL0018/100 ; 100 mL : 21,32 €.
Les cellules de la lignée 45.6.TG1.7 sont cultivées en DMEM additionné de 2 mM glutamine, de 1% Pénicilline-Strepto et 10% SVF, sous 5% de CO₂ à 37°C. Il faut les repiquer à 4×10^5 cellules/mL. La concentration saturante est à 2×10^6 cellules/mL.
Pour le TP
C1 : 2×10^6 cellules/mL.
C2 : 1×10^6 cellules/mL, c'est à dire C1 dilué au 1/2.

Matériel :

- Flacons de culture cellulaire
25 cm² ; 50 mL ; Incliné ; Standard.
Fournisseur VWR ; Référence 734-0009.
200 flacons : 165,00 €.
1 paquet pour 100 étudiants.
- Pointes pour micropipettes 2-200 μ L.
Fournisseur VWR Code 612-5724 ; 1000 pièces : 16,96 €.
1 paquet pour 100 étudiants.
- Tubes à hémolyse
Fournisseur VWR Code 211 0057 ; 1000 pièces : 39,46 €.

2 - Contrôle toxicologique : recherche d'endotoxines.

Le kit pour effectuer le dosage du LPS est onéreux. Éventuellement, il peut être remplacé par l'hydrolyse du PNPP en présence de PAL, le PNP obtenu étant de couleur jaune comme le p-nitroaniline (pNA) du test LAL. Il faudra communiquer la valeur du Sr et de l'Uc au candidat selon la méthode utilisée.

Kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL). (ne sera pas utilisé pour ce sujet)**Par candidat :**

Tout le matériel utilisé doit être apyrogène.

- 1 tube contenant 250 μL de solution étalon d'endotoxines d'*E. coli* à 1 UE/mL « LPS ».
- 1 tube contenant 450 μL de lysat Limulus « LAL ».
- 1 tube contenant 850 μL de solution de substrat chromogène « S ».
- 1 tube contenant 1 mL d'eau apyrogène « diluant ».
- 1 tube contenant 100 μL de nouveau lot de sérum « SVF-1 ».
- 1 tube contenant 1 mL de solution d'arrêt : acide éthanoïque à 25%.
- 1 microplaque à fond plat stérile + couvercle.
- Micropipettes P₂₀ et P₂₀₀.
- 10 à 15 cônes pour pipettes automatiques de 0,5 à 200 μL .
- Gants en vinyle.

En commun :

- Lecteur de microplaques.
- Étuve à 37°C ou plaque chauffante à 37°C.
- Ordinateurs.

Réactifs :

- Kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ; QCL-1000
Fournisseur Cambrex ; Référence : 50-647U ; 1 kit pour 120 tests : 475 €.

Le kit permet de réaliser 140 tests, il faut donc 1 kit pour 20 étudiants. Pour cela, il faut :

- Reprendre les 5 flacons contenant le lysat lyophilisé dans 1,8 mL d'eau apyrogène et non 1,4 mL, comme indiqué sur la fiche technique du fabricant, à protéger de la lumière et à congeler éventuellement, après reconstitution.
- Reprendre les 2 flacons de substrat lyophilisé dans 9 mL d'eau apyrogène et non 6,5 mL comme indiqué sur la fiche technique du fabricant. Le substrat se conserve pendant un mois à 4°C.
- Ajuster la concentration de l'endotoxine d'*E. coli* à 1 UE.mL⁻¹ en suivant les recommandations du fabricant. Vortexer le flacon vigoureusement pendant 15 minutes. Se conserve pendant un mois à 4°C.

Matériel :

- Cônes à filtre apyrogènes pour pipettes automatiques de 0,5 à 200 μL .
Fournisseur VWR Code 732-065 ; 1 boîte de 960 cônes : 94,50 €.
1 boîte pour 60 étudiants.
- Microtubes apyrogènes Bjo-cert, Brand de 1,5 mL.
Fournisseur VWR Code 211-3251 ; 450 pièces : 81,83 €.
1 paquet pour 60 étudiants
- Microplaques à fond plat stériles avec couvercle apyrogènes 96 puits.
Fournisseur VWR code 391-0092 ; 100 plaques : 190,90 €.
- Gants en vinyle
Fournisseur VWR Code 112-2392, Taille M ; 100 gants : 7,17 €.
Fournisseur VWR Code 112-2333, Taille L ; 100 gants : 7,17 €.

Hydrolyse du PNPP par le PAL. (en remplacement du kit)**Par candidat :**

- 1 tube contenant 250 μL de solution de PAL à 1 UI.mL⁻¹ « LPS ».
- 1 tube contenant 450 μL tampon phosphate, pH 9,8, noté « LAL ».
- 1 tube contenant 850 μL de PNPP 30 mmol.mL⁻¹ « S ».
- 1 tube contenant 1 mL tampon phosphate, pH 9,8 « diluant ».
- 1 tube contenant 300 μL de sérum chauffé 30 min à 60°C + PAL à 3 UI.mL⁻¹ « SVF-1 ».
- 1 tube contenant 1 mL de solution « Arrêt » : NaOH 2 mol.L⁻¹.
- 1 microplaque à fond plat stérile + couvercle.
- 10 cônes pour pipettes automatiques de 100 μL .

En commun :

- Lecteur de microplaques.
- Étuve à 37°C ou bain marie à 37°C ou plaque chauffante à 37°C.

Réactifs :• PNPP

Fournisseur Fluka, code 71-768, pot de 5 g : 29,30 €.

Solution de PNPP 30 mmol/L

- Peser 1,1134 g.
 - Dissoudre dans 100 mL de tampon Phosphate.
- À préparer extemporanément.

Tampon Phosphate, pH 9,8

- NaHCO_3 1 mol/L : 26 g/L.
- Na_2CO_3 1 mol/L : 27,64 g/L.
- Ajuster pH : 9,8 avec NaOH.
- H_2O QSP 1 L.

• PAL

Fournisseur Fluka, code P 1146, 200 Unités : 31,50 €.

Phosphatase alcaline à 10 UE/mL

- Peser 23 mg de PAL à 13 U/mg : solution mère à 10 UE.mL⁻¹.
- Dissoudre les 23 mg dans 30 mL de tampon Phosphate.

Pour préparer la gamme de PAL à partir d'une solution à 1 UE/mL : diluer la solution mère de PAL (10 U/mL) au 1/10 dans le tampon Phosphate.

Pour préparer l'échantillon de sérum de veau fœtal à 3 UE/mL : 1 mL de solution mère de PAL (10 U/mL) + 2,3 mL de sérum de veau fœtal chauffé à 60°C pendant 30 minutes.

• Hydroxyde de soude, 2 mol.L⁻¹

Fournisseur VWR Prolabo, code 98 108.290, 1 L : 27 €.

R : 35.

S : 26-36/37/39-45.

1 flacon pour 1000 étudiants.

Matériel :

- Pointes pour micropipettes 2-200 μL .
Fournisseur VWR, Code 612-5724 ; 1000 pièces : 16,96 €.
1 paquet pour 100 étudiants.
- Microtubes 2,0 mL.
Fournisseur VWR Code 211-0034 ; 500 pièces : 14,20 €.
1 paquet pour 70 étudiants.
- Microplaques à fond plat + film adhésif 96 puits.
Fournisseur VWR code 391-0038 ; 100 plaques : 54,59 €.
Fournisseur VWR code 732-0588 ; 1200 films : 69,30 €.
1 conditionnement pour 100 étudiants.