



**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
Éléments de corrigé
Document pouvant être fourni au jury pour correction

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

1 - Contrôle biologique : test de croissance cellulaire.

1.4 - Compte-rendu.

Au microscope, les cellules sont rondes, réfringentes, et cultivent en suspension.

Les critères à respecter sont une bonne homogénéisation de la suspension, avoir moins de 30 cellules/rectangle, compter 200 cellules minimum et ne compter que 2 bords du rectangle sur les 4.

C1 = $10 \times 2 \times 100 \times 1000$ cellules viables/mL = 2×10^6 cellules viables/mL (sérum de référence).

C2 = $5 \times 2 \times 100 \times 1000$ cellules viables/mL = 1×10^6 cellules viables/mL (nouveau lot de sérum).

Même % de viabilité pour **C1** et **C2** les cellules ne meurent pas.

La croissance est ralentie en présence du nouveau lot de sérum (différence de concentration entre C1 et C2).

2 - Contrôle toxicologique.

2.4 - Compte-rendu.

Le LPS, à l'origine de la fièvre (effet pyrogène), fait partie de la paroi des bactéries. Celles-ci sont omniprésentes et par voie de conséquence, le LPS contamine tous les supports (matériel, mains ...). Il est donc indispensable de travailler avec du matériel apyrogène, c'est à dire dépourvu de LPS, pour réaliser le dosage du LPS.

Dilution du sérum au 1/10 : 20 μ L de sérum + 180 μ L d'eau apyrogène ou de tampon Phosphate

Concentration d enzyme (UE/ μ L)	0	1	0,5		0,25		0,12		0,065
LPS ou PAL à 1UE/mL (μ L)		100	100	}→	100	}→	100	}→	100
H ₂ O ou Tampon Phosphate	100		100		100		100		100

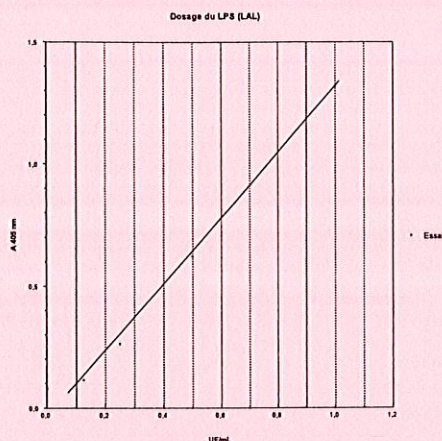
↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

LPS ou PAL	50	50	50		50		50		50	
SVF-1 1/10 (μ L) 3 essais										50
LAL ou Tampon Phosphate (μ L)	50									
Substrat ou PNPP (μ L)	100									
Solution d'arrêt (μ L)	100									

Rôle du témoin : Blanc réactif

➤ **Proposition1 - Kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL)**

EU/mL	0 (Blanc)	1	0,5	0,25	0,12
A 405 nm	0,083	1,32	1,624	0,263	0,100



➤ **Proposition2 - Hydrolyse du PNPP par la PAL**

Tampon Phosphate, pH 9,8.

Solution de PNPP 30 mmol/L.

Phosphatase alcaline à 1 U/mL.

Protocole n°1 : Résultats des essais

Enzyme à 1 UE/mL : dilutions de 1/2 en 1/2 en Tp phosphate sous un volume final de 50 μ L.

Sérum pur non chauffé.

Sérum pur chauffé à 60°C pendant 30 minutes.

50 μ L d'échantillon (gamme ou sérum).

50 μ L de tampon phosphate.

100 μ L de PNPP à 30 mmol/L.

6 minutes à température ambiante.

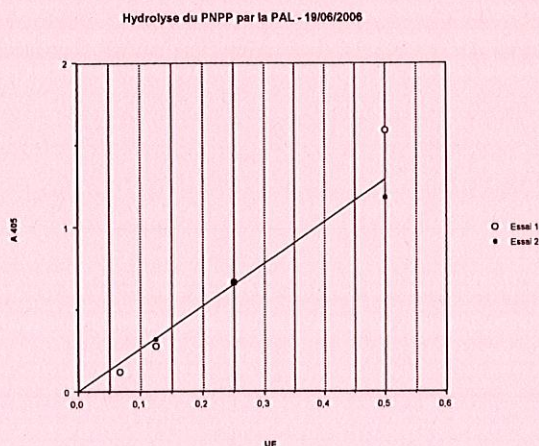
100 μ L de NaOH à 2 mol.L⁻¹.

PAL UE/mL	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,0156
A _{405nm} Essai 1	1,79	0,86	0,48	0,32	0,26	0,24
A _{405nm} Essai 2	1,39	0,88	0,52	-	0,27	0,23

Blanc Tp + Substrat : Essai 1 : 0,184; Essai 2 : 0,206.

A_{405nm} Sérum pur non chauffé : Essai 1 : 0,424 ; Essai 2 : 0,441.

A_{405nm} Sérum pur chauffé à 60°C pendant 30 min : essai 1 : 0,336 ; essai 2 : 0,349.



Protocole n°2 : Hydrolyse du PNPP par la PAL

Enzyme à 1 UE/mL : dilutions de 1/2 en 1/2 en Tp phosphate sous un volume final de 50 μ L.

Sérum non chauffé : dilution de 1/2 en 1/2 en Tp phosphate.

Sérum chauffé à 60°C pendant 30 min : dilution de 1/2 en 1/2 en Tp phosphate.

50 μ L d'échantillon (gamme ou sérum).

50 μ L de tampon phosphate.

100 μ L de PNPP à 30 mmol/L.

10 minutes à 37°C.

100 μ L de NaOH 2 mol.L⁻¹.

PAL UE/mL	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
A _{405nm} Essai 1	3,14	1,57	0,78	0,28	0,07
A _{405nm} Essai 2	3,42	1,68	0,78	0,28	0,08

Sérum non chauffé	pur	1/2	1/4	1/8	1/16
A _{405nm}		0,31	0,22	0,0,19	0,14
Sérum non chauffé	pur	1/2	1/4	1/8	1/16
A _{405nm}		0,20	0,18	0,14	0,13

A_{405nm} Blanc Tp + Substrat : Essai 1 : 0,20 ; Essai 2 : 0,21.

Dosage PAL 21-06-2006

