



SERVICES CULTURE ÉDITIONS  
RESSOURCES POUR  
L'ÉDUCATION NATIONALE

**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la  
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel**

**Campagne 2009**

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

# **BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

## **Épreuve E3 - Unité U33**

### **Biologie cellulaire et moléculaire et technologie d'analyse**

**CALCULATRICE INTERDITE**

**ÉPREUVE E3. UNITÉ U33****Biologie cellulaire et moléculaire et technologie d'analyse****CONTRÔLE EN INDUSTRIES PHARMACEUTIQUE ET  
COSMÉTIQUE****Calculatrice non autorisée**

Les industries pharmaceutique et cosmétique mobilisent, entre autres, l'emploi de techniques de biologie moléculaire, de culture cellulaire et de techniques immunologiques.

On se propose d'aborder l'utilisation de ces techniques à travers quelques étapes de contrôles :

- recherche et développement d'un principe actif,
- étude du pouvoir irritant d'un cosmétique,
- contrôle d'un médicament mis sur le marché.

**1 - Développement d'un principe actif et techniques de biologie moléculaire. (25 points)**

De nombreuses protéines sont utilisées à des fins thérapeutiques : des cytokines pour traiter certaines viroses et certains cancers, des hormones gonadotropes pour traiter certaines hypofertilités.

Depuis environ quinze ans, ces protéines sont très majoritairement produites par l'industrie pharmaceutique grâce au génie génétique : on les qualifie de protéines recombinantes.

Comme pour tout principe actif de médicament, la phase de recherche et développement implique des contrôles analytiques.

Les premières étapes de la mise au point d'une protéine recombinante nécessitent l'emploi de vecteurs qui permettent l'amplification par clonage d'un insert.

**1.1** - Définir les termes vecteur, insert et clonage.

**1.2** - Le **document 1** donne la carte de restriction - **figure 1a** - d'un vecteur de clonage simple, le plasmide pUC18/19 et - **figure 1b** - la séquence de son Site de Clonage Multiple (*Multiple Cloning Site* = MCS).

**1.2.1** - Expliquer ce que sont les molécules désignées par *HindIII*, *XbaI*, *BamHI*...

**1.2.2** - Quel est le rôle de la séquence « MCS » ?

**1.2.3** - Décrire la conséquence structurale sur pUC18/19 de l'insertion/ligation d'une séquence de 457 paires de bases.

**1.2.4** - Après avoir réalisé cette insertion *in vitro*, on contrôle son succès grâce aux manipulations successives suivantes :

- digestion(s) partielle(s) spécifiques(s) du plasmide ;
- analyse des produits de digestion par électrophorèse sur gel d'agarose.

**1.2.4.1** - Pour chacune de ces manipulations : donner le principe en précisant les réactifs et le matériel utilisés.

**1.2.4.2** - Expliquer la lecture de l'électrophorégramme.

**1.2.4.3** - On réalise pour pUC18/19 avec ou sans insert une digestion par *PstI* (site unique dans Puc18/19 avec ou sans insert) suivie d'une électrophorèse.

Le **document 2** représente le schéma partiel de l'électrophorégramme.

Sur le **document 2**, orienter l'électrophorégramme et situer les bandes obtenues.

**1.3** - Le clonage est réalisé dans une souche d'*Escherichia coli* qui ne possède pas le gène *bla* responsable de la résistance à l'ampicilline. De plus, cette souche porte la mutation *lacDMZ15* qui inactive son gène chromosomique *lac Z*, codant pour la bêta-galactosidase.

**1.3.1** - Représenter l'opéron lactose et les séquences nécessaires à son contrôle.

**1.3.2** - Schématiser le mécanisme moléculaire d'induction de la transcription de l'opéron lactose en présence de lactose.

**1.4** - Le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galactopyranoside) est un substrat chromogène artificiel de la bêta-galactosidase.

L'IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) est un inducteur artificiel de l'opéron lactose.

Après transformation par le vecteur (avec insert correct) on sélectionne les bactéries sur un milieu contenant : ampicilline, X-Gal et IPTG.

**1.4.1** - Des colonies blanches et des colonies bleues apparaissent après incubation : préciser le phénotype de ces bactéries.

**1.4.2** - En déduire les clones d'intérêt. Justifier.

**1.4.3** - Pour valider cette manipulation, on a ensemencé, dans une autre boîte de Pétri, la souche non transformée. Le milieu employé est le même que celui employé pour l'essai. On constate l'apparition de colonies bleues.

Conclure sur la validité de cette souche. Justifier.

## **2 - Études toxicologiques et techniques de culture cellulaire. (27 points)**

**2.1** - La détermination de la Dose Létale à 50 % (DL50) participe à l'évaluation de la toxicité des xénobiotiques. Les principes actifs des médicaments sont souvent des xénobiotiques : l'évaluation de leur toxicité est indispensable à leur mise au point.

**2.1.1** - Définir la DL50 ; comparer avec la CL50 (Concentration Létale à 50 %).

**2.1.2** - Expliquer la démarche expérimentale classique permettant de déterminer la DL50.

**2.1.3** - Décrire les mécanismes impliqués dans l'élimination des xénobiotiques métabolisés par le foie en précisant :

- les cellules responsables,
- les noms des deux grands groupes de réactions biochimiques impliquées (citer un exemple de réactions pour chaque groupe),
- le(s) caractère(s) physico-chimique(s) des produits finaux,
- le devenir de ces produits finaux dans l'organisme.

**2.1.4** - Comparer le devenir (depuis son administration jusqu'à son élimination) d'un même xénobiotique administré par voie intra-veineuse ou administré par voie orale.

**2.2** - Dans le cadre du contrôle des cosmétiques, il est utile de déterminer leur pouvoir irritant oculaire. Le **document 3** présente des extraits du protocole officiel de cette détermination.

**2.2.1** - Expliquer le rôle des composés suivants :

- milieu (D) MEM,
- sérum de veau fœtal,
- antibiotiques,
- L-glutamine,
- CO<sub>2</sub>.

**2.2.2** - Après trypsination, on dispose de 40 mL de suspension cellulaire à 10<sup>5</sup> cellules/mL. Présenter la démarche pratique permettant de l'ajuster à 2.10<sup>5</sup> cellules/mL.

**2.2.3** - D'après le **document 3**, déterminer le volume de suspension ajustée nécessaire à la réalisation de la première étape du protocole pour quatre produits cosmétiques.

**2.2.4** - Si on dispose de 20 mL de suspension cellulaire ajustée, est-il possible de réaliser la première étape pour ces quatre produits.

## **3 - Contrôle par une technique immunologique d'un médicament vendu via un circuit parallèle (8 points)**

La mélatonine est une hormone dont l'usage pharmaceutique s'est répandu ces dernières années. Des techniques immunologiques permettent de doser cette hormone.

Le **document 4** présente les réactifs et le protocole simplifié d'une de ces techniques.

**3.1** - Caractériser cette technique de dosage : justifier à l'aide d'un schéma légendé.

**3.2** - Expliquer pourquoi la courbe d'étalonnage de ce dosage est décroissante.

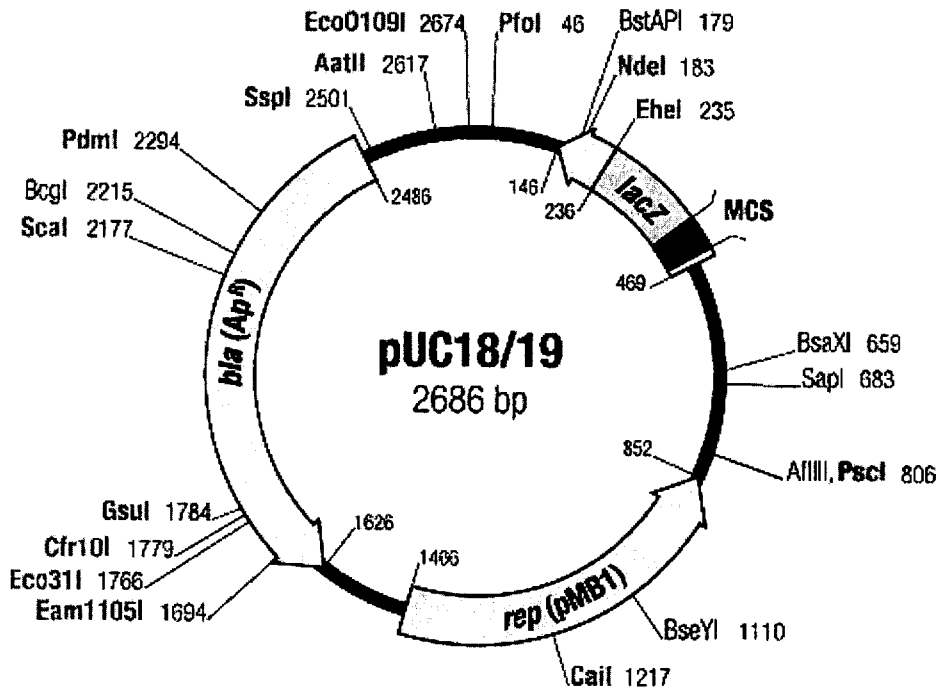
**3.3** - L'antisérum de Lapin utilisé dans ce dosage contient des Anticorps polyclonaux anti-mélatonine : décrire les conditions pratiques qui favorisent leur production chez l'animal.

**3.4** - Les anticorps de Chèvre employés fixent les anticorps de Lapin au niveau d'épitopes particuliers, définir ce qu'est un épitope.

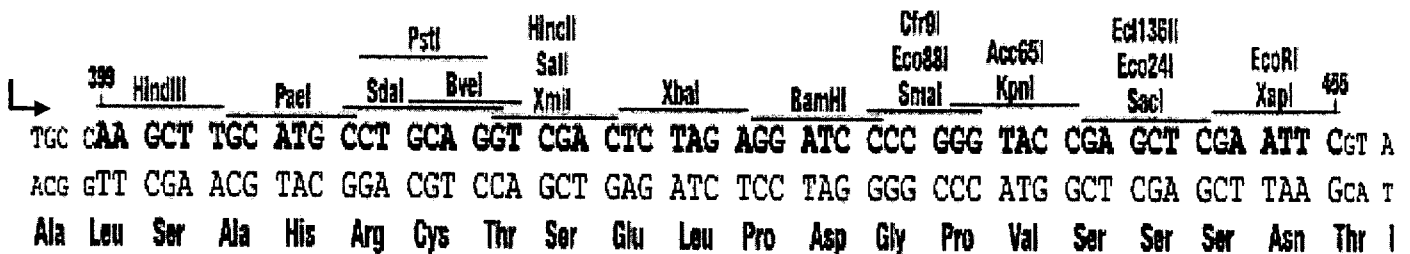
**DOCUMENT 1 :  
LE PLASMIDE pUC18/19**

Extrait de la documentation en ligne de la société Fermentas :  
[http://www.fermentas.com/catalog/nucleicacids/dna\\_sd0061.htm](http://www.fermentas.com/catalog/nucleicacids/dna_sd0061.htm)

**Figure 1a** : carte de restriction du plasmide pUC18/19



**Figure 1b** : extrait de la carte du MCS de pUC18



**Remarque** : les plasmides pUC18 et pUC19 ne diffèrent que par la structure de leur MCS.

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 : BAE3BC

SESSION 2009

Durée : 2 H

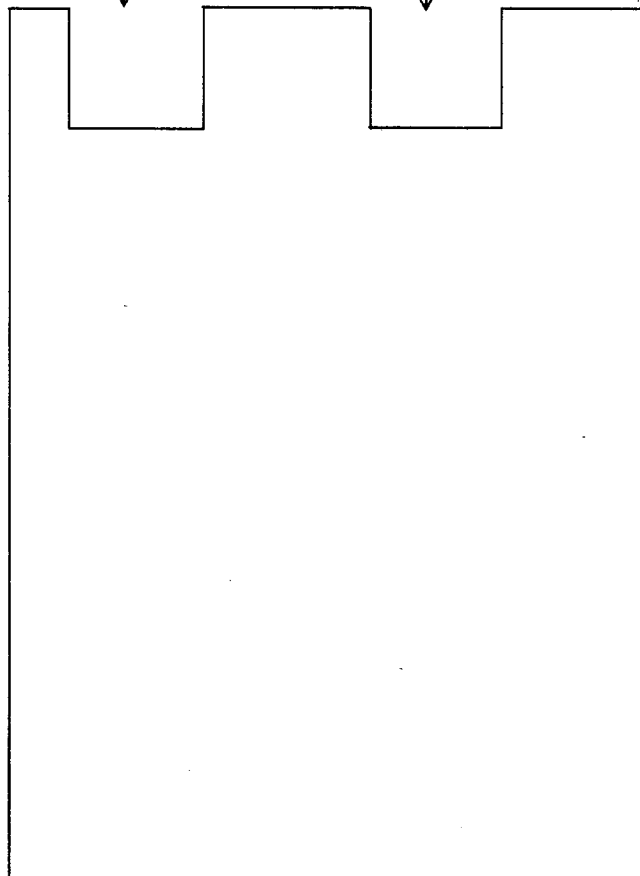
Page : 4/6

Coefficient : 3

**DOCUMENT 2 :**  
**(à rendre avec la copie)**

pUC 18/19  
sans insert

pUC 18/19  
avec insert



**DOCUMENT 3 :****EXTRAITS DE LA MÉTHODE OFFICIELLE D'ÉVALUATION DU POTENTIEL IRRITANT PAR APPLICATION DIRECTE SUR MONOCOUCHE DE FIBROBLASTES DE CORNÉE DE LAPIN PAR LA MÉTHODE DE RELARGAGE DU ROUGE NEUTRE**

(adapté du J.O. n° 302, 30/12/1999-Annexe VI)

**Objectif et principe**

Cette méthode est une alternative à l'expérimentation animale entrant dans une batterie de tests qui concourent à l'évaluation du potentiel irritant oculaire des produits cosmétiques.

Le principe est basé sur l'évaluation de la cytotoxicité du produit testé, par détermination de la concentration entraînant 50 % de mortalité (CL50), à l'aide de la technique de relargage du rouge neutre.

**Système réactif**

Fibroblastes de cornée de lapin, de lignée SIRC cat n° 2-552 (ATCC - CCL 60 - American Type Culture Collection - Rockville, Maryland, USA) cultivés en milieu (D) MEM, additionné de 10 % de sérum de veau foetal (décomplémenté à 56 °C pendant 30 minutes), d'antibiotiques et de L-glutamine. Les cellules sont maintenues en atmosphère humide contrôlée (37 °C - 5 % CO<sub>2</sub>).

[...]

**Protocole**

Deux étapes sont nécessaires à la classification du produit. La première permet d'estimer la valeur de la CL50 et la seconde de la préciser. [Chaque étape est réalisée suivant (a), (b), (c) et (d)]

*Première étape (estimation de la CL50) :*

Le produit est dilué à : 5, 15, 25, 35 et 50 %. Les dilutions 5, 15, 25 et 35 % sont testées une fois et la dilution 50 % deux fois.

*Deuxième étape (détermination de la CL50) :*

Le choix des dilutions à tester deux fois dans cette étape dépend de l'estimation faite à l'étape précédente.

**La veille de l'essai****(a) Préparation des cellules**

Les cellules sont trypsinées et comptées conformément aux procédures internes au laboratoire d'essais. Les cellules sont ensuite ensemencées en microplaque de 24 puits, à raison de 200 000 cellules par puits sous un volume de 1 mL de milieu (D) MEM complet, sans agitation. La plaque est placée au moins 24 heures à l'incubateur (37 °C - 5 % CO<sub>2</sub>).

**(b) Préparation de la solution colorante**

Une solution mère de rouge neutre à 0,4 % dans de l'eau distillée stérile est préparée et diluée au 1/80 dans du milieu de culture complet puis mise à l'incubateur dix-huit à vingt-quatre heures (37°C - 5 % CO<sub>2</sub>).

**(c) Préparation de la solution de révélation**

Une solution à 1 % d'acide acétique glacial dans l'éthanol à 50 % est préparée. Cette solution se conserve plusieurs semaines.

**Le jour de l'essai****(d) Coloration cellulaire**

Vingt-quatre heures après l'ensemencement, le milieu de culture de chaque puits est éliminé. La solution colorante de rouge neutre, après centrifugation à 3 000 g pendant dix minutes, est déposée à raison de 1 mL par puits. La plaque est placée trois heures à l'incubateur (37 °C - 5 % CO<sub>2</sub>).

Après ce temps de contact, la solution colorante est éliminée et remplacée par 1 mL de milieu de culture complet, par puits. La microplaque est maintenue à température ambiante pendant 30 minutes avant de mettre en contact avec le produit à l'essai [...]

**C.R.D.P.**

75, cours Alsace et Lorraine

33075 BORDEAUX CEDEX

Tél. : 05 56 01 56 70

**B.T.S. BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

**DOCUMENT 4 :**  
**DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE LA MELATONINE (MT)**

**Liste des réactifs**

- **Microplaque**  
Pré-coatée avec un Ac de chèvre anti-lapin
- **Adhésif pour microplaque**
- **Concentré de tampon de lavage (10x) =**  
Avec conservateurs
- **Tampon d'incubation,**  
Avec conservateurs
- **Calibrateurs A à F =**  
MT (tampon)  
Avec conservateurs
- **Antisérum =**  
AC lapin anti-MT (tampon)  
Avec conservateurs
- **Conjugué Biotine =**  
MT conjuguée à la biotine (tampon)  
Avec conservateurs
- **Marqueur enzymatique =**  
Streptavidine-HRP (tampon protéiné)  
Avec conservateurs
- **Substrat TMB,**  
Dans un tampon citrate
- **Solution Stop =**  
acide sulfurique 0,25 mol/L

**Protocole simplifié**

- **microplaque pré-coatée**  
*lavage 2 x*
- **ajout 50 µL Calibrateurs, Contrôles ou échantillons**
- **ajout 50 µL conjugué MT-Biotine**
- **ajout 50 µL Antiserum**  
*incuber 3 heures ± 5 min à 2-8°C*  
*lavage 4 x*
- **ajout 100 µL marqueur enzymatique**  
*incuber 30 ± 5 min à 2-8°C*  
*lavage 4 x*
- **ajout 100 µL substrat TMB**  
*incuber 15 ± 2 min à 18-28°C sur un agitateur rotatif*
- **ajout 100 µL Solution Stop**
- **lire absorbance à 450 nm (dans les 30 minutes)**