



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

**Campagne 2010**

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

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR  
BIOTECHNOLOGIES**

*ÉPREUVE E5 :  
Travaux pratiques de biotechnologies*

Durée de l'épreuve : 8 heures  
Coefficient : 4

**SOUS-ÉPREUVE U.54**  
**TRAVAUX PRATIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE**  
*Durée de la sous-épreuve : 2 H 00*  
*Coefficient : 1*

**Le sujet comporte 3 pages numérotées de 1/3 à 3/3**

**L'utilisation de la calculatrice est autorisée.**

## **Evaluation de la toxicité de la protéine LYC sur des cellules en culture *in vitro***

Un laboratoire cherche à connaître les effets d'une protéine d'intérêt LYC sur des cellules animales. Pour cela, il doit d'abord entretenir des cultures cellulaires (cellules animales adhérentes cultivant en monocouche dans du milieu DMEM additionné de 10 % v/v de sérum de veau fœtal), en réalisant un repiquage des cellules et une numération de la suspension cellulaire.

Afin de tester l'effet toxique éventuel de la protéine LYC, les cellules sont cultivées sur des lamelles déposées dans des puits, en absence et en présence de la protéine LYC. Elles sont ensuite fixées, colorées au DAPI, et observées au microscope à fluorescence.

### **1. Matériel et réactifs**

En plus du matériel courant de laboratoire et de culture cellulaire sont fournis :

- 1 flacon de la culture cellulaire de 25 cm<sup>2</sup>
- 1 tube de bleu de Funk à 0,4 % « **BF** »
- 1 tube de tampon PBS sans calcium stérile « **PBS** » : 6 mL
- 1 tube de trypsine stérile « **trypsine** » : 2,5 mL
- 1 flacon de milieu DMEM stérile additionné de glutamine de 10% v/v de SVF et d'antibiotiques « **DMEM+** » : 12 mL
- 1 flacon de culture stérile de 25 cm<sup>2</sup>
- 1 hématimètre (Malassez ou Neubauer)
- 1 tube à hémolyse
- 1 lame comportant une lamelle recouverte de cellules cultivées « **avec LYC** » et colorées au DAPI
- 1 lame comportant une lamelle recouverte de cellules cultivées « **sans LYC** » et colorées au DAPI
- 1 microscope à fluorescence

### **2. Protocole**

#### **2.1. Observation de la culture cellulaire à repiquer**

Réaliser un examen macroscopique et un examen microscopique de la culture cellulaire.

*Un champ microscopique sera présenté à un examinateur.*

#### **2.2. Repiquage des cellules**

*Cette partie est réalisée sous PSM en présence d'un examinateur.*

À partir du flacon de culture :

- éliminer le milieu de culture
- laver le tapis cellulaire avec 5 mL de « PBS »
- introduire 2 mL de solution de trypsine et laisser agir à température ambiante en surveillant attentivement l'action de la trypsine
- introduire 5 mL de milieu DMEM+ et homogénéiser
- prélever un aliquot de la suspension en tube à hémolyse
- transférer 1,5 mL de suspension dans un nouveau flacon stérile. Compléter à 5 mL avec le milieu DMEM+
- placer le flacon à l'étuve à 37°C en atmosphère air + 5 % CO<sub>2</sub>.

### **2.3. Numération des cellules viables de la suspension cellulaire**

À partir de l'aliquot prélevé :

- diluer la suspension au 9/10<sup>ème</sup> dans du bleu de Funk
- compter au cytomètre les cellules viables (2 essais).

*Le remplissage du cytomètre sera réalisé devant un examinateur.*

*La numération sera contrôlée par un examinateur (sur une unité de comptage).*

### **2.4. Évaluation de la toxicité de la protéine LYC sur les cellules**

Observer au microscope à fluorescence les deux préparations « avec LYC » et « sans LYC ».

*Un champ microscopique correspondant à chacune des deux préparations sera présenté à un examinateur.*

## **3. Compte rendu**

- Justifier l'étape d'observation macroscopique et microscopique de la culture cellulaire.
- Présenter le résultat de ces observations.
- Calculer le nombre de cellules viables par mL de suspension cellulaire et le pourcentage de viabilité.
- En déduire le nombre de cellules viables introduites dans le nouveau flacon de culture.
- Décrire et interpréter les observations réalisées au microscope à fluorescence.