Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV©

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :
www.formav.co/explorer

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR

BIOTECHNOLOGIES

U42 Biologie Cellulaire

SESSION 2018

DUREE DE L'EPREUVE : 2 h 00

COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

Dictionnaire anglais/francais, tout autre matériel est interdit.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 7 pages numérotées de 1/7 à 7/7.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Une nouvelle technologie en culture cellulaire

L'essor des cultures cellulaires animales implique une grande diversité des milieux, des contenants et des supports de culture. La culture de cellules adhérentes a généralement pour objectif de mimer les conditions physiologiques de vie des cellules. Le support doit reproduire les structures moléculaires avec lesquelles les cellules interagissent dans l'organisme, mais ces structures diffèrent selon les tissus et les types cellulaires. La plupart des cellules adhérentes sont capables de se fixer sur de nombreux supports, mais certaines lignées cellulaires nécessitent des conditions particulières pour adhérer aux supports.

1. Culture des cellules adhérentes (10 points)

Les cellules adhérentes, lorsqu'elles sont jointives, forment entre elles des jonctions membranaires. L'une d'entre elles est présentée sur l'électronographie du document 1.

1.1 Réaliser un schéma de l'ultrastructure de la membrane plasmique incluant les principaux constituants. Identifier sur ce schéma les molécules membranaires responsables de l'adhérence.

1.2 Exposer le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission.

1.3 Identifier la jonction observée sur le document 1. Annoter ce document, en reportant les lettres A, B, C et D sur la copie. Nommer la protéine transmembranaire impliquée dans cette jonction.

Le document 2 présente un protocole de culture de cellules nerveuses de souris.

1.4 Identifier les numéros des étapes correspondant à la dissection, à la dissociation et à la mise en culture des neurones.

1.5 La culture cellulaire préparée est une culture primaire. Justifier cette affirmation. Préciser les rôles respectifs de la collagénase, de la trypsine et de l'EDTA.

1.6 Analyser l'étape 5 du protocole opératoire pour identifier la méthode de culture cellulaire mise en œuvre. Proposer une explication à la nécessité d'ajouter la D,L-polyornithine et la laminine sur le support.

L'incubation des cellules nerveuses est réalisée à 37°C sous 5 % de CO_2 pendant quelques jours. Après une phase active de multiplication cellulaire, lorsque le tapis cellulaire est arrivé à confluence, la croissance s'arrête. Il existe donc une régulation du cycle cellulaire.

1.7 Réaliser un schéma du cycle cellulaire présentant l'enchaînement des différentes phases. Nommer chacune des phases. Localiser sur le schéma effectué les points de contrôle du cycle cellulaire.

Le document 3 présente une cellule hybride résultant de la fusion d'une cellule en phase S avec une cellule en phase G1.

1.8 Analyser et proposer une interprétation à l'expérience présentée.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

2. Etude d'un nouveau support de culture cellulaire (8 points)

La culture de cellules peut se faire directement sur du verre ou du polystyrène. Elle peut nécessiter un traitement préalable des supports. Ces traitements peuvent utiliser des molécules de synthèse ou des extraits de matrices extracellulaires physiologiques. Ils visent généralement à améliorer l'adhérence des cellules.

Le document 4 présente un extrait du catalogue d'un fournisseur en matériel de culture cellulaire.

2.1 Argumenter le choix des supports adaptés pour chacune des cultures cellulaires suivantes :

- des cellules normalement adhérentes ;
- des cellules peu adhérentes, utilisant un support de synthèse ;
- des cellules peu adhérentes, utilisant un support physiologique.

Le poly-N-isopropylacrylamide ou PNIPAM est un polymère thermosensible qui, en milieu aqueux, subit un changement de conformation autour d'une température critique de 32°C. En dessous de cette température, il est hydrophile et se déploie en solution. Au dessus, il est modérément hydrophobe et possède une structure compacte qui permet aux cellules d'adhérer au support. A 37 °C, le PNIPAM est donc un revêtement possible pour la culture des cellules de mammifère et son changement de conformation lui confère des propriétés intéressantes pour la récolte des cellules.

Le document 5 présente trois protocoles de récolte des cellules adhérentes et les résultats obtenus.

2.2 Dégager le principe de chacun des protocoles de décollement des cellules.

2.3 A partir de l'analyse des résultats présentés, conclure sur l'intérêt de la culture sur PNIPAM.

Les cellules récoltées sont analysées par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps marqués par un fluorochrome.

Le document 6 présente les protocoles et les résultats obtenus de cette analyse.

2.4 Indiquer les propriétés spectrales d'un fluorochrome.

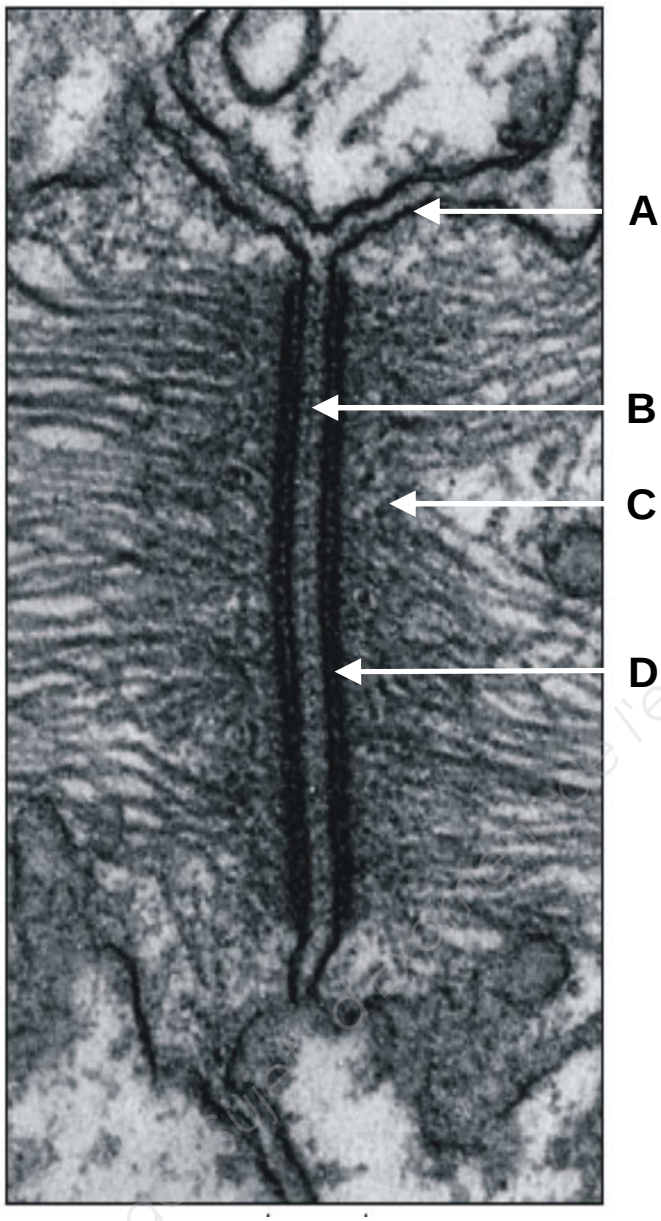
2.5 Présenter le principe du cytomètre en flux analyseur.

2.6 Préciser le rôle du contrôle négatif. Analyser les résultats de la cytométrie de flux et en déduire l'intérêt du PNIPAM par rapport à la trypsine.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)
Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 1 : Electronographie d'une jonction membranaire



Disponible sur : http://www.snv.jussieu.fr (consulté le 18 novembre 2016).

Base Nationale de ressources de l'enseignement professionnel

Document 2 : Protocole de préparation d'une culture de neurones

1. Adult female Swiss mice were sacrificed by cervical dislocation. Lumbar dorsal root ganglia were collected in sterile conditions.

2. Ganglia were successively treated by two incubations with collagenase A (1 mg/ml, Roche Diagnostic) for 45 minutes each (37 °C) and then with trypsin-EDTA (0.25 %, Sigma) for 30 minutes.

3. They were mechanically dissociated by passing 8 to 10 times through the tip of a fire-polished Pasteur pipette in neurobasal (Life Technologies) culture medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS).

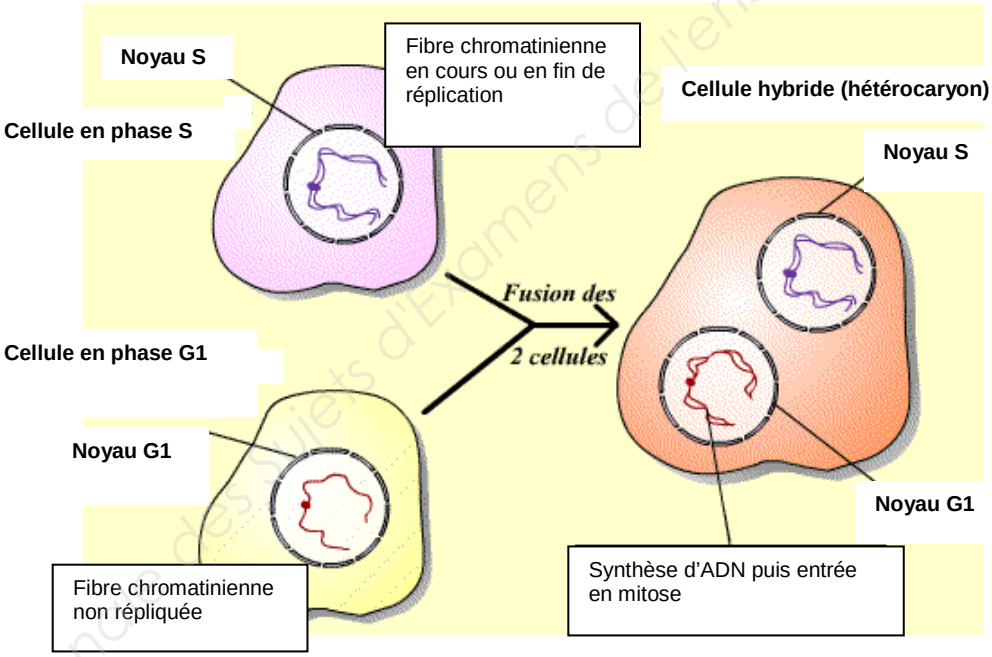
4. Isolated cells were collected by centrifugation and suspended in neurobasal culture medium not supplemented with FBS.

5. Dissociated neurons were counted with a Malassez cell and plated on D,L-polyornithine (0.5 mg/ml)-laminin (5 µg/ml)-coated glass coverslips at a density of 2500 neurons per coverslip, in 4-wells culture-treated polystyrene plates with neurobasal culture medium not supplemented with FBS, 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin (20 U/ml, 0.2 mg/ml).

6. Plates were incubated in an incubator with a humidified 95 % air/ 5 % CO_2 atmosphere.

J Neurophysiol. 2003 Dec ; 90(6):3764-73.

Document 3 : Étude expérimentale de la régulation du cycle cellulaire



Disponible sur : http://xarquon.jcu.cz (consulté le 18 novembre 2016).

Document 4 : Différents supports de culture

6-well Flat-bottom culture plates		
SURFACE	QTY./CASE	CAT. NO.
Standard	50	143
Poly-D-Lysine	30	470
Collagen	10	500
Fibronectin	10	501
Laminin	10	502

Extrait du catalogue BDbiosciences culture tools.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 5 : Méthodes de récolte des cellules adhérentes

5a : Protocoles

Mouse peritoneal macrophages in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) were seeded in one dish with PNIPAM Surface and two traditional cultureware dishes at 2.4 x 10^5 cells/cm^2.

The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO_2 in air.

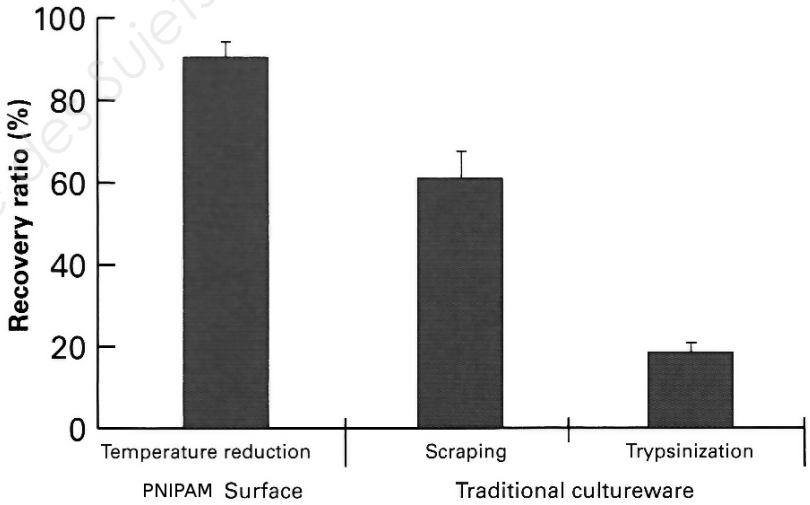
Cells were then cultured for 2 days in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS and harvested using one of the following procedures:

Protocol 1 : temperature reduction on PNIPAM surface	**Protocol 2 : trypsinization**	**Protocol 3 : scraping***
1. Cells were washed with Ca^{2+}– and Mg^{2+}–free PBS 2. 4.0 mL RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS was added and the dish was incubated at 20 °C for 30 min. 3. Detached cells were harvested	1. Cells were washed with Ca^{2+}– and Mg^{2+}–free PBS 2. 1.0 ml of 0.25% trypsin/EDTA was added, and the dish was incubated at 37 °C for 5 min. 3. 3.0 ml RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS was added 4. Detached cells were harvested	1. Cells were washed with Ca^{2+}– and Mg^{2+}–free PBS 2. 4.0 ml of 2.5 mM EDTA/PBS was added and the dish was incubated on ice for 20 min 3. The cells were detached by scraping and harvested

The harvested cells were counted and the recovery ratio ((detached cells / total cells) x 100) was calculated.

* *to scrap* : gratter

5b : Résultats



D'après la brochure
« *Cell Harvesting by Temperature Reduction* », THERMOscientific.

Base Nationale des sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 6 : Analyse des protéines membranaires par cytométrie en flux

6a : Protocoles

Des cellules de moelle osseuse humaines sont distribuées à une densité de 6,8 x 10^3 cellules/cm^2 dans une boîte de Pétri de 6 cm traitée au PNIPAM ainsi que dans une boîte de Pétri de 6 cm standard.

Les cellules sont incubées 24 heures à 37 °C sous 5 % CO_2, puis récoltées suivant un des protocoles indiqués :

Protocole 1 : réduction de température sur la surface traitée au PNIPAM	**Protocole 2 : trypsination**

Les cellules récoltées sont lavées, centrifugées et des aliquots de 5,0 x 10^5 cellules sont incubés avec :

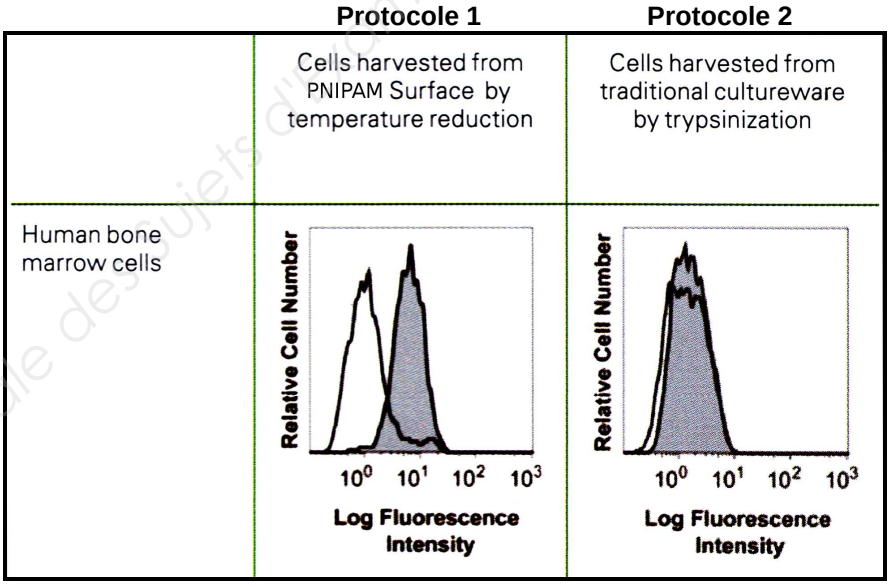
- soit des anticorps monoclonaux murins marqués à la PE*, dirigés contre l'antigène de surface CD140a, présent à la surface des cellules de moelle osseuse humaines

- soit des anticorps murins de contrôle négatif marqués à la PE.

Après 60 min d'incubation à 4 °C, les cellules sont lavées au PBS et analysées par cytométrie en flux. Les résultats de ces deux incubations sont superposés dans le document 6b.

* : PE : phycoérythrine, un fluorochrome

6b : Résultats



Grey : anti-CD140a
White : isotype control for non-specific binding (background)

D'après la brochure
« *Cell Harvesting by Temperature Reduction* », THERMOscientific.

Base Nationale des sujets d'examens de l'enseignement professionnel