

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE

ETUDE D'OPERATIONS TECHNIQUES

P R E M I E R E P A R T I E

REMARQUES PRELIMINAIRES

- 1 - L'usage d'un dictionnaire "Anglais - Français" est autorisé.
- 2 - La lecture préalable de l'ensemble des documents n'est pas nécessaire avant d'aborder le sujet. Des précisions, quant à leur utilisation, sont fournies dans les questions.
- 3 - Les trois parties du sujet sont indépendantes.

L'utilisation des cultures cellulaires permet d'étudier les actions physiologiques de nombreuses molécules :

- hormones
- seconds messagers.

I - REALISATION D'UNE CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES THYROIDIENNES DE PORC EN VUE D'UNE ETUDE DE L'ACTION DE LA THYREOSTIMULINE (T.S.H.) (22 points)

1.1 - Préparation des solutions :

Les différentes solutions nécessaires à la culture figurent sur le document 1.

1.1.1. - Calculer la masse de trypsine à peser pour réaliser un litre de solution de trypsiné à $17,4 \mu\text{kat.l}^{-1}$.

1.1.2. - Calculer l'activité de la solution mère d'hormone TSH en UI.ml^{-1} .

Déterminer le volume de solution mère à introduire par boîte de 10 ml pour avoir une concentration finale de $0,1 \text{ mUI.ml}^{-1}$.

1.1.3. - Donner les techniques utilisables pour la stérilisation des solutions 1 à 3.

1.2 - Primo-explantation et cultures des cellules thyroïdiennes

Les glandes thyroïdes fraîchement prélevées sont placées dans la solution S. Les tissus adipeux et mésenchymateux entourant la glande sont retirés. Le tissu thyroïdien est séparé des autres tissus, haché et pesé.

1.2.1. - Traitement du tissu par la trypsine

La technique et les principaux réactifs figurent sur les documents 2, 3, 4.

- a) Quelle action a la trypsine sur le tissu ?
- b) Quelle autre technique pourrait-on utiliser ?
- c) Justifier l'utilisation du milieu S.E. lors de la trypsinisation.

1.2.2. - Préparation des suspensions cellulaires

Le filtrat précédent est centrifugé 7 min à 200 g. Le culot est repris par la solution S froide.

Les cellules sont lavées ensuite plusieurs fois, puis rassemblées dans 2 tubes contenant un mélange de milieu de Eagle, de sérum de veau foetal (10 %), d'antibiotiques et de fongizone, le volume étant ajusté à 100 ml.

Cette suspension est soumise à deux contrôles :

- un contrôle quantitatif : détermination du nombre de cellules.
- un contrôle qualitatif : détermination du nombre de cellules vivantes.

a) Pourquoi est-il préférable de caractériser la centrifugation par le nombre de g plutôt que par le nombre de tours par minute ?

b) Pour chaque type de contrôle, donner le principe d'une technique utilisable.

c) Quels sont les rôles du sérum de veau foetal ajouté au milieu de culture ?

d) La suspension cellulaire est diluée pour obtenir une suspension à $2 \cdot 10^6$ cellules par ml.

Préciser les précautions à prendre lors de ce type de manipulation.

II - PROBLEMES POSES PAR LA CONTAMINATION DES CULTURES CELLULAIRES : (22 points)

2.1 - Contamination par un mycoplasme (bactérie dépourvue de paroi et cultivant difficilement).

Une culture cellulaire est contaminée par un mycoplasme, suite à une faute d'asepsie. Ce mycoplasme est isolé et cultivé en milieu convenable.

On désire tester la sensibilité de la souche à différents antibiotiques :

- doxycycline DOX
- minocycline MIN
- érythromycine ERY

2.1.1 - Les solutions-mères d'antibiotiques sont à la concentration de 2 mg.ml^{-1} . Elles sont utilisées après dilution, à trois concentrations différentes notées :

DOX 1, DOX 2, DOX 3
MIN 1, MIN 2, MIN 3
ERY 1, ERY 2, ERY 3

Expliquer la préparation de ces trois dilutions pour la doxycycline :

DOX 1 solution à $80 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$; volume final 2 ml.
DOX 2 solution à $8 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$; volume final 1 ml.
DOX 3 solution à $0,8 \mu\text{g.ml}^{-1}$; volume final 1 ml.

2.1.2 - On réalise la microplaque schématisée sur le document 5.

2.1.2.1 - Les cupules des lignes A, B, C reçoivent :

- 50 μl de suspension de mycoplasme
- 100 μl de milieu pour antibiogramme
- 50 μl de solution d'antibiotique.

.../...

Calculer les concentrations finales en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de doxycycline dans les cupules A₁ à A₆.

2.1.2.2 - Parmi les témoins réalisés :

- la cupule E reçoit 150 μl de milieu pour antibiogramme et 50 μl de suspension de mycoplasme
- la cupule F reçoit 50 μl de DOX à 2 mg.ml^{-1} , 100 μl de milieu pour antibiogramme et 50 μl de suspension de mycoplasme.

Discuter la nécessité de ces témoins dans les cupules E₁ et F₁.

2.1.3. - La microplaque est observée chaque jour.

La lecture est possible lorsque le changement de couleur du milieu est stabilisé pendant deux jours consécutifs. La valeur de la C.M.I. (concentration minimale inhibitrice) correspond à la dernière dilution pour laquelle un changement de couleur est observé :

- présence de mycoplasme : coloration jaune
- absence de mycoplasme : coloration rouge.

Proposer un aspect de la microplaque pour une souche dont la C.M.I. vis à vis de la doxycycline est de $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Justifier la réponse.

2.2 - Contamination bactérienne :

On veut déterminer la C.M.I., vis à vis de la streptomycine, d'une souche bactérienne Z trouvée dans le filtre de la hotte à flux laminaire.

Proposer un plan de travail pour la détermination de la C.M.I. (méthode en milieu liquide) de cette souche Z.

Faire apparaître le matériel, les milieux, l'inoculum, les réactifs et les différentes étapes.

III - ETUDE STRUCTURALE D'UNE MOLECULE INFORMATIVE X INTERVENANT DANS UNE VOIE DE COMMUNICATION INTRACELLULAIRE : (36 points)

Extraction du constituant X :

On traite le tissu par un mélange de chloroforme, méthanol, acide chlorhydrique à $0,45 \text{ mol.l}^{-1}$ (20 V : 40 V : 13 V).

On homogénéise.

On extrait par du chloroforme.

On recueille la phase organique que l'on concentre sous azote.

.../...

Le concentrat est traité par chromatographie sur colonne. On regroupe les fractions contenant X. Après hydrolyse enzymatique de ces fractions par une phospholipase C, on isole deux molécules X1 et X2.

Donnée : La phospholipase C est une hydrolase qui scinde les phosphoglycérolipides en diacylglycérol et ester phosphorique.

3.1 - Analyse de X1 :

3.1.1 - On soumet une solution organique de X1 à une transestérification (document 6).

Les esters d'acides gras de la phase surnageante sont étudiés par chromatographie en phase gazeuse.

- Donner brièvement le principe de cette analyse chromatographique.
- Expliquer l'importance de la méthylation des acides gras pour la chromatographie en phase gazeuse.

3.1.2 - Le document 7 regroupe différents résultats. Faire une étude critique des enregistrements (a), (b) et (c). Quels facteurs a-t-on pu modifier pour passer de (a) à (b) et de (b) à (c) ?

3.1.3 - Identification des pics :

Le document 8 est un enregistrement obtenu à l'aide d'un mélange étalon.

L'analyse du mélange provenant de X1 permet d'identifier deux pics dont les temps de rétention sont respectivement de 7,50 min et 9,25 min. Sachant que la vitesse de défilement du papier est de $1,2 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$, identifier les deux pics.

3.1.4 - Dosage du glycérol dans la phase inférieure neutralisée obtenue après la transestérification.

On dispose de la fiche technique correspondante (document 9)

- Dégager les caractéristiques de ce type de dosage du substrat.

- Lorsqu'on utilise une formule permettant d'exprimer la concentration à partir d'une variation d'absorbance, quel contrôle de qualité important doit-on faire subir régulièrement au spectrophotomètre ? Comment procède-t-on ?

- Les résultats obtenus avec un spectrophotomètre à spectre continu donnent une variation d'absorbance de 0,790 à partir de 4,4 mg de X1 dans un volume de 2 ml de phase inférieure.

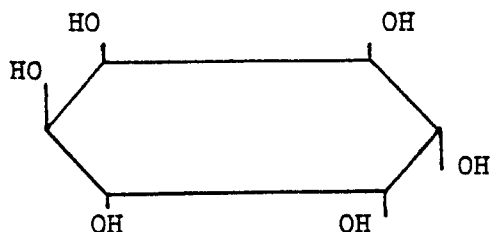
- La cuve utilisée a un trajet optique de 1 cm.

En déduire la masse molaire de X1. Ces résultats sont-ils concordants avec ceux obtenus en 3.1.3 ?

.../...

3.2 - Analyse de X2

Une analyse par chromatographie sur couche mince a permis de montrer que X2 contient de l'inositol.

Formule de l'inositol

La masse molaire de X2 est égale à 420 g.mol^{-1}

Un dosage colorimétrique de phosphore sur un minéralisé de X2 a donné les résultats suivants : $183 \mu\text{g}$ de X2 renferment $41 \mu\text{g}$ de phosphore.

Faire une synthèse de tous les résultats expérimentaux et proposer un schéma structural possible pour X.

Données : $\text{C} = 12 \text{ g.mol}^{-1}$ $\text{H} = 1 \text{ g.mol}^{-1}$ $\text{O} = 16 \text{ g.mol}^{-1}$ $\text{P} = 31 \text{ g.mol}^{-1}$

DOCUMENT 1

1 - Solution de Earle : Solution S

Sels	masse pour 1 litre
NaCl	6,8 g
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	1,58 g
KCl	0,4 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,3 g
Glucose	1,5 g
NaHCO ₃	1,8 g
Rouge de phénol	0,01 g

Dissoudre, ajuster à pH 7 avec NaOH 1 mol.l⁻¹.
Compléter à 1 litre avec de l'eau.

2 - Solution de trypsine : Solution S.T.

trypsine à 5,8 nkat.mg⁻¹
Dissoudre dans la solution S.
Ajuster à pH 7.

3 - Solution d'EGTA : Solution S.E.

2,28 g d'EGTA par litre de solution S.
Ajuster à pH 7 avec NaOH 1 mol.l⁻¹

4 - Solution de Eagle :

Un lyophilisat de milieu de Eagle et 2,2 g de NaHCO₃ sont mis en solution. Le pH est 7,4 - 7,5.
Compléter à 1 litre avec de l'eau.

5 - Solution d'hormone :

Dissoudre 1 mg de thyroestimuline bovine (TSH) à 30 UI.mg⁻¹
dans 2 ml de milieu de Eagle - sérum.
Filtrer stérilement.
Prélever 1 ml, ajouter 29 ml de milieu de Eagle-sérum pour réaliser une solution mère de TSH.

DOCUMENT 2

Introduire le tissu thyroïdien haché dans une fiole de 1 litre et ajouter la solution S préalablement chauffée à 37°C.

Laver le tissu avec 2 litres de S chaud : 250 ml par lavage.

Bien agiter la fiole manuellement et laisser décanter.
Enlever le surnageant qui contient les corps gras.

Après les lavages, introduire le tissu dans une deuxième fiole cylindroconique de 1 litre.

Ajouter 100 ml de S.E.

100 ml de S.T.

1 ml de solution d'antibiotique chauffé à 37°C

1 barreau magnétique stérile

Agiter 30 minutes à 37°C

Passer l'ensemble des phases sur une grosse passoire métallique.

Rincer le tissu avec du S chaud et le placer dans un bécher de 250 ml

Jeter le premier filtrat.

Hacher finement le tissu dans le bécher et le réintroduire dans la fiole cylindroconique de 1 litre.

Ajouter 100 ml de S.E.

100 ml de S.T.

Agiter 30 minutes à 37°C

Recommencer 4 fois depuis le passage dans la passoire mais en récupérant le filtrat dans 4 à 5 tubes de 100 ml que l'on place dans la glace. Compléter les tubes avec du S froid.

DOCUMENT 3

Trypsin (from bovine pancreas) EC 3.4.21.4Catalysed reaction :

Hydrolyses proteins, peptides, amides and esters specifically at the carboxyl groups of the basic amino acids L -arginine and L- lysine.

Characteristics :

Molecular weight : ca. 23 000

Isoelectric point : 10.5

pH-optimum : 8.0

Inhibitors : Natural inhibitors from pancreas, soybean, limabean and egg with ; organophosphorus compounds such as diisopropyl fluorophosphate ; several amines and amidines ; calcium.

Stability :

Store dry at 4°C ; no considerable loss of activity over a period of 12 months.

DOCUMENT 4

E G T A

Ethylene glycol-bis (β -aminoethylether) N, N, N', N' -tetra acetic acid.
A chelating agent useful for the determination of calcium in the presence of magnesium.

DOCUMENT 5

	1	2	3	4	5	6
A	DOX1	DOX1	DOX2	DOX2	DOX3	DOX3
B	MIN1	MIN1	MIN2	MIN2	MIN3	MIN3
C	ERY1	ERY1	ERY2	ERY2	ERY3	ERY3
D						
E	///	///	///	///	///	///
F	///	///	///	///	///	///

témoins

Schéma de la microplaque

DOCUMENT 6

PREPARATION D'ESTERS METHyliQUES

A PARTIR D'UN CORPS GRAS NEUTRE (TRANSESTERIFICATION)

PREPARATION

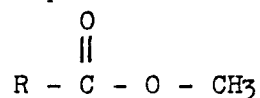
- 1) Dans un tube de verre, introduire :
2 gouttes (environ 40 mg) de corps gras,
ajouter 1 ml d'hexane,
agiter 2 s environ.
- 2) Introduire ensuite à l'aide d'une pipette :
0,2 ml d'hydroxyde de sodium à 2 mol.l^{-1} dans du méthanol,
boucher le tube,
agiter 10 s environ,
porter 20 s au bain-marie à 50°C ,
agiter encore 10 s.
- 3) Ajouter :
0,2 ml d'acide chlorhydrique à 2 mol.l^{-1} dans du méthanol.
Agiter et laisser décanter.

Le prélèvement pour injection dans le chromatographe se fera dans la phase surnageante.

RESULTAT :

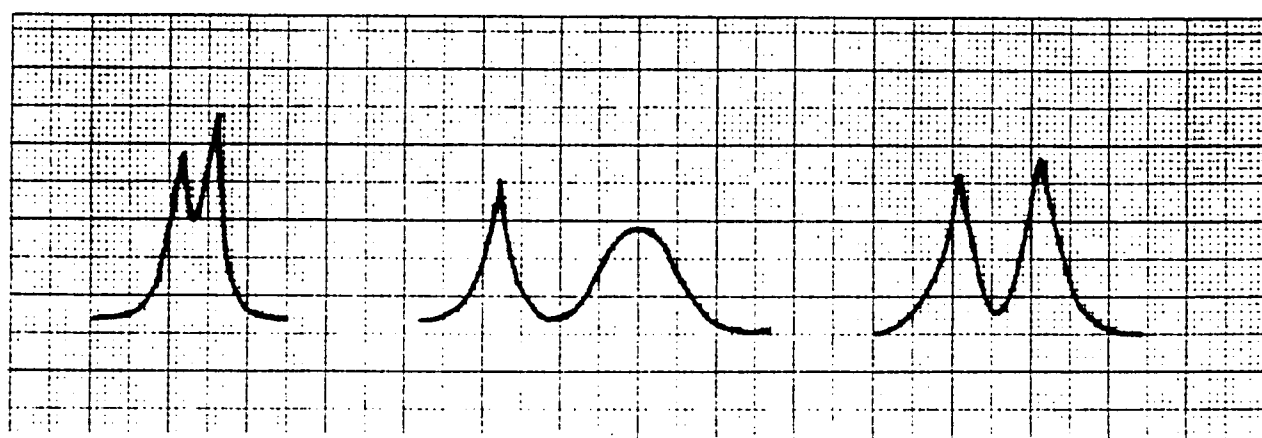
Les glycérides sont hydrolysés.

Les acides gras passent sous la forme :



DOCUMENT 7

Enregistrements obtenus en chromatographie phase gazeuse.



(a)

(b)

(c)

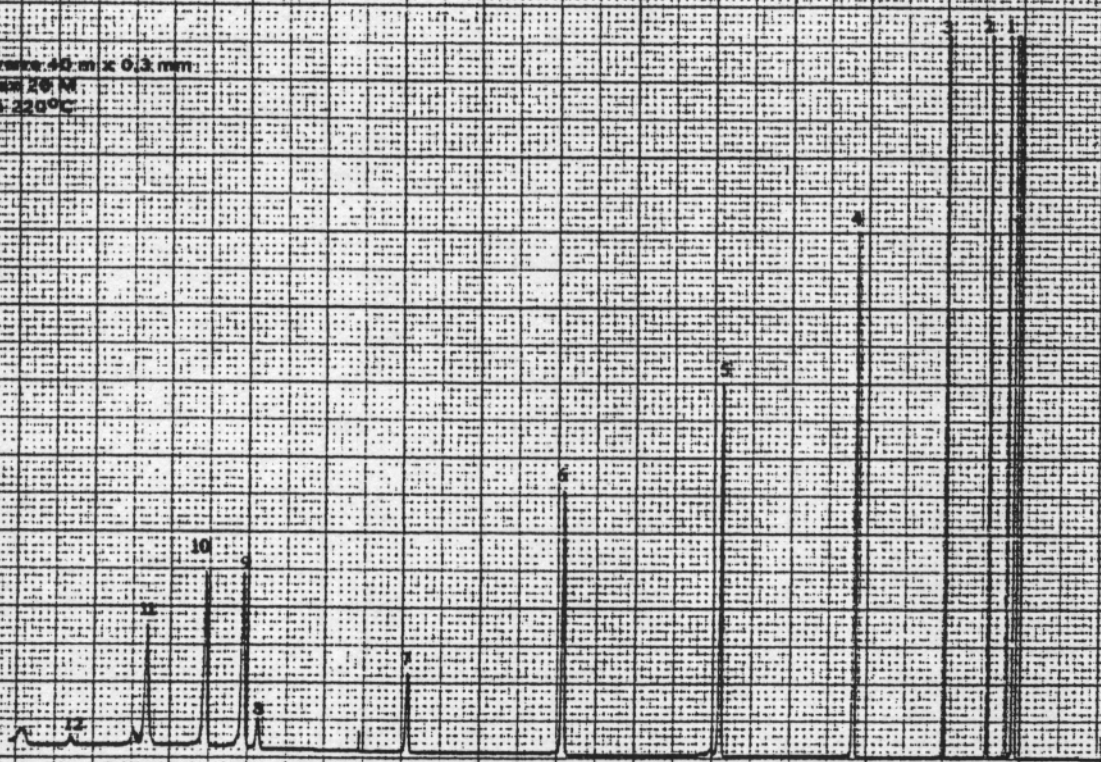
DOCUMENT 8

SEPARATION D'UN MELANGE ETALON D'ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS

ACIDES GRAS

Colonne : WSCF, verre 40 m x 0.3 mm
Préparation : Carbowax 20 M
Température : 120°C à 220°C

- 1 C4
- 2 C6
- 3 C8
- 4 C10
- 5 C12
- 6 C14
- 7 C16
- 8 C18
- 9 C18 : 1
- 10 C18 : 2
- 11 C18 : 3
- 12 C20



DOCUMENT 9

Glycerol

UV-method

for the determination of glycerol in foodstuffs and other materials

Cat.No. 148270

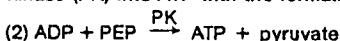
Test-Combination
for 3 x 10 determinations

Principle

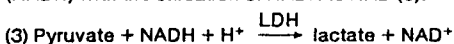
In the reaction catalyzed by glycerokinase (GK), glycerol is phosphorylated by adenosine-5'-triphosphate (ATP) to glycerol-3-phosphate (1).



The adenosine-5'-diphosphate (ADP) formed in the above reaction is reconverted by phosphoenolpyruvate (PEP) with the aid of pyruvate kinase (PK) into ATP with the formation of pyruvate (2).



In the presence of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) pyruvate is reduced to lactate by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH) with the oxidation of NADH to NAD (3).



The amount of NADH consumed in the above reaction is stoichiometric with the amount of glycerol. NADH is determined by means of its absorption at 334, 340 or 365 nm.

Each Test-Combination Contains

- Three bottles 1 with 2 g coenzyme/buffer mixture each, consisting of
glycylglycine buffer — pH 7.4
NADH — 7 mg
ATP — 22 mg
PEP — 11 mg
magnesium sulphate
stabilizers
- Bottle 2 with 0.4 ml enzyme suspension, consisting of
pyruvate kinase — ca. 240 U
lactate dehydrogenase — ca. 220 U
- Bottle 3 with 0.4 ml enzyme suspension
glycerokinase — ca. 34 U

Preparation of Solutions for 10 Determinations

- Dissolve contents of one bottle 1 with 11 ml redist. water. Before use let the solution stand for about 10 min at room temperature.
- Use contents of bottle 2 undiluted.
- Use contents of bottle 3 undiluted.

Stability of Solutions

Solution 1 is stable for 4 days at +4°C.

Suspensions of bottles 2 and 3 are stable for 1 year at +4°C.

Procedure

Wavelength¹: 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm

Glass cuvette²: 1 cm light path

Temperature: 20–25°C

Final volume: 3.02 ml

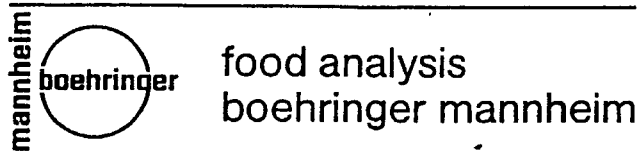
Read against air (without cuvette in the light path) or against water.

Sample solution: 3–50 µg glycerol/cuvette³ (in 0.1–2.0 ml sample volume).

¹ The absorption maximum of NADH is at 340 nm. With spectrophotometers, measurements are made at the absorption maximum; when employing spectrum line photometers equipped with a mercury vapour lamp, measurements are made at a wavelength of 365 nm or 334 nm.

² Disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes, if desired.

³ See instructions for performance of assay and sample preparation.



Recommendations to methods and standardized procedures see references.

pipette into cuvettes	blank	sample
solution 1	1.00 ml	1.00 ml
redist. water	2.00 ml	1.90 ml
sample solution	—	0.10 ml
suspension 2	0.01 ml	0.01 ml
mix, after completion of the reaction (ca. 5–7 min) read absorbances of the solutions (A ₁). Start reaction by addition of		
suspension 3	0.01 ml	0.01 ml
Mix, wait for the completion of the reaction (ca. 5–10 min) and read the absorbances of the solutions (A ₂). If the reaction has not stopped after 15 min, continue to read the absorbances at 2 min intervals until the absorbance decreases constantly.		

If the absorbance at A₂ decreases constantly, extrapolate the absorbances to the time of the addition of suspension 3.

Calculate the absorbance differences (A₁–A₂) for the blank and the sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample.

$$\Delta A = \Delta A_S - \Delta A_B$$

Calculation

According to the general formula for calculating the concentration the equation is:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}$$

where V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed

d = light path [cm]

ε = absorption coefficient of NADH at:

$$340 \text{ nm} = 6.3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3.4 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6.18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

It follows for glycerol

$$c = \frac{3.02 \times 92}{\epsilon \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta A = 2.781 \times \frac{\Delta A}{\epsilon} \text{ [g glycerol/l sample solution]}$$

If the sample was diluted during preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.