

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE CELLULAIRE

Durée de l'épreuve : 2 heures
Coefficient : 1

Le sujet comporte 7 pages numérotées de 1/7 à 7/7

L'usage d'un dictionnaire anglais/français et d'une calculatrice est autorisé
Papier millimétré nécessaire

Remarque importante :

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** » par une bonification maximale de deux points.

Étude d'une lignée cellulaire productrice de protéines recombinées

Les anticorps monoclonaux représentent une part importante des médicaments issus des biotechnologies. Ils sont produits dans des lignées cellulaires, principalement la lignée de hamster CHO « Chinese Hamster Ovary » qui est devenue un standard de production de protéines recombinées. La lignée CHO est une lignée adhérente.

1. Étude des conditions de culture des cellules CHO (5 points)

Le milieu Ham F12 mis au point par RG Ham (composition dans le **document 1**), satisfait les exigences nutritionnelles des cellules CHO.

Il est nécessaire de supplémenter le milieu avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) pour assurer la culture des cellules.

- 1.1 Justifier la composition qualitative du milieu en précisant le rôle des familles de constituants et les molécules soulignées dans le tableau.
- 1.2 Expliquer l'intérêt de l'addition de SVF pour la culture des cellules.
- 1.3 Préciser les conditions nécessaires pour obtenir une asepsie rigoureuse lors de la pratique des cultures cellulaires animales concernant le laboratoire, le matériel, les milieux de culture et les manipulateurs.

2. Étude des caractéristiques de la croissance des cellules CHO (7 points)

Les cellules CHO sont cultivées dans les conditions standards : atmosphère contrôlée (température : 37°C, mélange de 5 % CO₂ et 95 % d'air humidifié), dans du milieu Ham F12 supplémenté avec 10 % de SVF, 1 % d'un mélange pénicilline/streptomycine et 1 % de L-glutamine.

Le **document 2** représente l'évolution de la densité surfacique des cellules CHO en fonction du temps.

- 2.1 A $t_0 + 144\text{h}$, le milieu de culture n'est pas épuisé. Expliquer alors l'arrêt de la croissance cellulaire à $t_0 + 144\text{h}$.
- 2.2 Déterminer graphiquement le taux exponentiel de croissance des cellules CHO après avoir tracé la courbe permettant sa détermination.
- 2.3 En déduire la durée d'un cycle cellulaire pendant la phase exponentielle de croissance.

Afin de déterminer la durée des différentes phases du cycle, des cellules CHO en phase exponentielle de croissance sont prélevées et leur ADN est rendu fluorescent par un fluorochrome. Dans les conditions utilisées, la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN contenu dans chaque noyau. On détecte ensuite l'intensité de la fluorescence cellulaire dans la population étudiée avec un cytomètre de flux.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 3**.

BOE 4 BC

- 2.4 A partir du graphique du **document 3**, établir la correspondance entre les phases du cycle et les trois zones a, b, c du graphe.
- 2.5 Calculer la durée de chaque phase du cycle cellulaire.
Données : - 100 % des cellules sont dans le cycle cellulaire,
- 57 % des cellules correspondent au pic a,
- 25 % des cellules correspondent au pic c,
- la durée de la mitose est de deux heures.
Représenter l'enchaînement des différentes phases du cycle cellulaire des cellules CHO sur un schéma en indiquant la durée de chaque phase.

3. Production d'anticorps monoclonaux (8 points)

La production d'anticorps monoclonaux par la lignée CHO, nécessite plusieurs étapes préliminaires.

- production et sélection d'hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux contre l'antigène d'intérêt (**documents 4 et 5**),
- extraction des ARN totaux des hybridomes, purification des ARNm,
- RT PCR : synthèse des ADNc des chaînes lourdes et légères des anticorps,
- construction de vecteurs d'expression recombinants contenant les ADNc d'intérêt **document 6**,
- transfection stable des cellules CHO,
- sélection des clones transformés.

- 3.1 En utilisant les informations du **document 4**, préciser la chronologie des grandes étapes de la production d'hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux chez la souris.
- 3.2 À partir du **document 5**, expliquer le principe de la sélection des hybridomes en milieu supplémenté par du HAT.
(H = hypoxanthine, A = aminoptérine, T = thymidine).
- 3.3 Citer et comparer deux méthodes de transfection adaptées aux cellules eucaryotes.
- 3.4 À partir du **document 6**, expliquer le principe de la sélection des clones de cellules CHO ayant intégré l'ADN des chaînes H et L de façon stable dans leur génome.

Les cellules de mammifères sont particulièrement adaptées à la production des protéines eucaryotes : elles synthétisent et sécrètent les protéines recombinées de façon constitutive dans le surnageant de culture.

Une protéine sécrétée par la cellule CHO va subir différentes étapes de maturation, depuis sa synthèse jusqu'à sa sécrétion dans le surnageant de culture.

- 3.5 Légender le **document 7** après avoir reporté les numéros sur la copie.
- 3.6 Indiquer les organites où s'effectue cette maturation, préciser pour chacun les signaux moléculaires permettant l'adressage correct de cette protéine jusqu'à sa sécrétion.

Document 1 : composition d'un milieu de culture

	Composants en mg/L	HAMF12
<u>IONS MINÉRAUX</u>	NaCl	7599
	KCl	223,6
	NaH ₂ PO ₄ , 7 H ₂ O	268
	NaHCO ₃	1176
	MgCl ₂ , 6 H ₂ O	122
	CaCl ₂	44
	Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	0,00249
	Fe SO ₄ , 7 H ₂ O	0,834
	Zn SO ₄ , 7 H ₂ O	0,863
<u>ACIDES AMINÉS ESSENTIELS</u>	L-Arginine chlorhydrate	211
	L-Cystine chl. H ₂ O	35,12
	L-Glutamine	145
	L-Histidine chl. H ₂ O	20,96
	L-Isoleucine	3,94
	L-Leucine	13,1
	L-Lysine chlorhydrate	36,5
	L-Méthionine	4,48
	L-Phénylalanine	4,96
	L-Thréonine	11,9
	L-Tryptophane	2,04
L-Tyrosine (Na)	5,4	
L-Valine	11,7	
<u>ACIDES AMINÉS NON ESSENTIELS</u>	L-Alanine	8,9
	L-Asparagine H ₂ O	15,01
	L-Acide Aspartique	13,3
	L-Acide Glutamique	14,7
	L-Glycocolle	7,5
	L-Proline	34,5
	L-Sérine	10,5
<u>VITAMINES</u>	Biotine	0,0073
	D-Panhoténate de Ca	0,48
	Choline chlorhydrate	13,96
	Acide folique	1,3
	Inositol	18
	Nicotinamide	0,04
	Pyridoxal chlorhydrate	0,062
	Riboflavine	0,038
	Thiamine chlorhydrate	0,34
	Cobalamine	1,36
Pyridoxine chlorhydrate	0,062	
<u>AUTRES MOLECULES</u>	<u>D-Glucose</u>	1802
	Acide lipoïque	0,21
	<u>Pyruvate de Na</u>	110
	<u>Hypoxanthine</u>	4,1
	<u>Thymidine</u>	0,084
	Putrescine chlorhydrate	0,161
	Acide linoléique	0,73

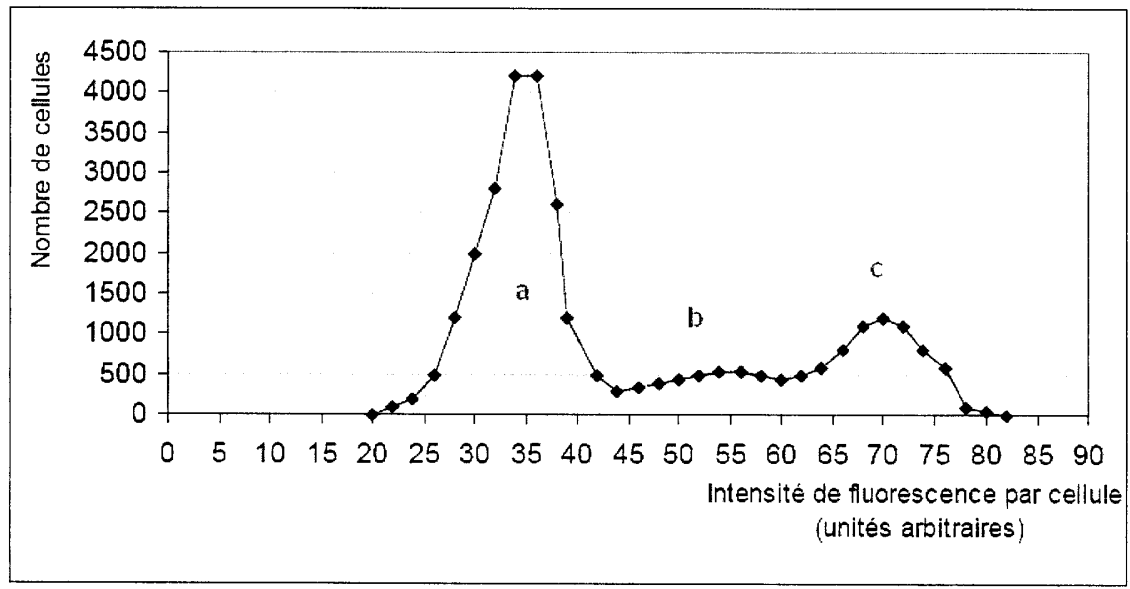
Document 2 : évolution de la densité surfacique des cellules CHO en fonction du temps

T	0	24	48	72	96	120	144
DS	10000	14300	34000	78000	164000	347000	348000

T : Temps en heures

DS : Densité Surfacique en nombre de cellules/cm².

Document 3 : variation du nombre de cellules en fonction de l'intensité de la fluorescence



BOE 4 BC

Document 4 : procedure for producing monoclonal antibodies specific for a given antigen developed by G. Kohler and C. Milstein.

Spleen cells from an antigen-primed mouse are fused with mouse myeloma cells (HGPRT- and Ig-)

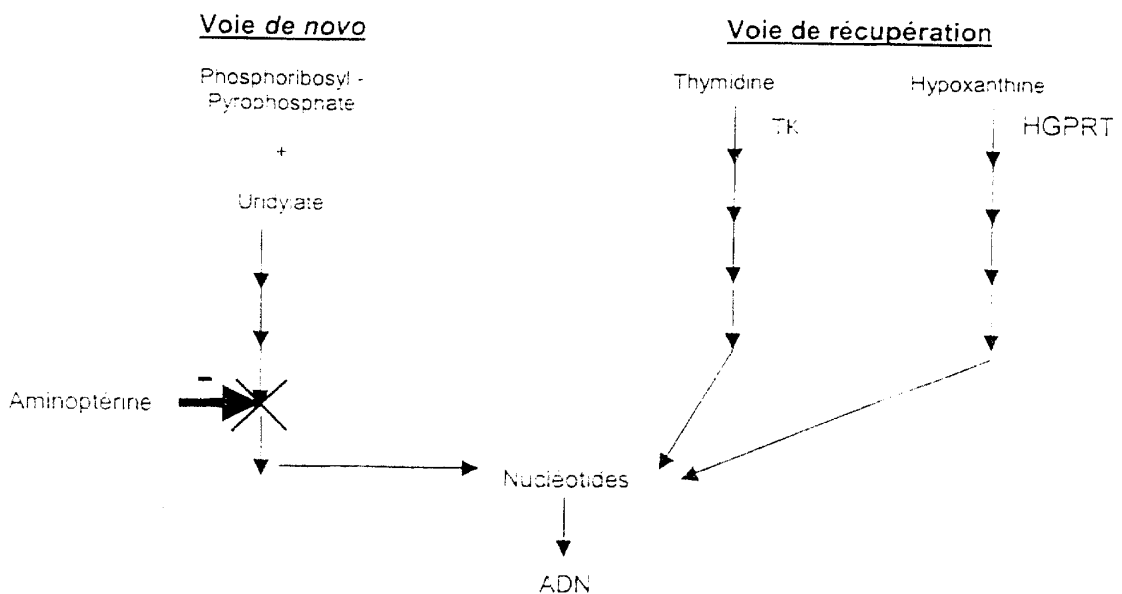
The spleen cells provides the necessary enzymes for growth on HAT medium, while the myeloma provides immortal-growth properties. Unfused myeloma cells or myeloma-myeloma fusions fail to grow due of lack of HGPRT. Unfused spleen cells have limited growth in vitro and therefore do not need an enzyme deficiency for elimination with the HAT selection procedure.

After 7-10 days of culture in the HAT medium, most of the wells contain dead cells, but a few wells contain small clusters of viable cells, which could be visualized by using an inverted phase contrast microscope. Each cluster represents clonal expansion of a hybridoma.

Once pure clones of antibody secreting hybridomas are obtained, they must be screened for the desired antibody specificity.

Document 5 : sélection des hybridomes

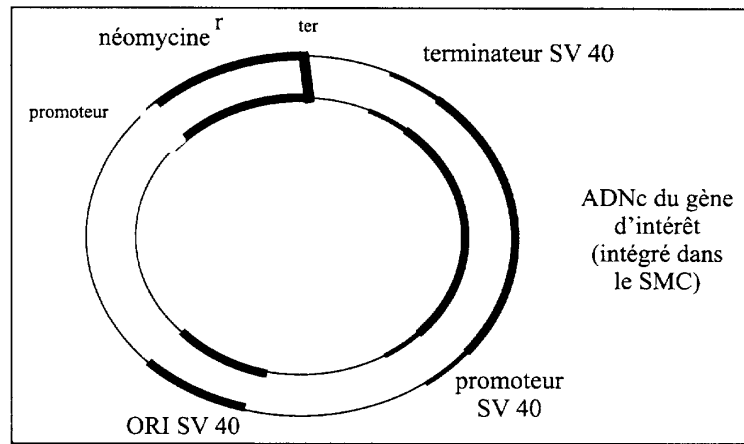
- Il existe deux voies de synthèse des nucléotides chez les mammifères :
 - la voie de synthèse *de novo*
 - la voie de récupération qui se met en place lorsque la voie *de novo* est bloquée.



TK = Thymidine Kinase
HGPRT = Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase

- Milieu HAT = Milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine

Document 6 : vecteur d'expression recombiné



Document 7 : représentation d'une cellule animale observée en microscopie électronique

