

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE DES PROCARYOTES

ET DES EUCARYOTES

Sous-épreuve de Biologie Cellulaire

Durée de l'épreuve : 2 heures

Coefficient : 1

Le sujet comporte 5 pages numérotées de 1/5 à 5/5

L'utilisation d'un dictionnaire Anglais/Français est autorisée.

L'utilisation d'une calculatrice est interdite.

Remarque importante :

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** »
par la prise en compte d'une valeur d'un point sur vingt dans le barème.

Cellules sécrétrices d'insuline et perspective de thérapie cellulaire du diabète

L'insuline est une hormone protéique sécrétée par les cellules β , situées dans les îlots de Langerhans représentant le tissu endocrine du pancréas. La production de cette hormone est déficiente chez les diabétiques de type I. La thérapie cellulaire constitue une perspective pour soigner ces malades. Par conséquent, des équipes de recherche étudient le développement de lignées cellulaires qui conserveraient les caractéristiques des cellules β du pancréas et notamment un contrôle de la sécrétion d'insuline par la glycémie (l'hormone est sécrétée en cas d'hyperglycémie).

1. La sécrétion d'insuline (3 points)

Le contrôle de la sécrétion de l'insuline par la concentration en glucose sanguin implique une entrée du glucose dans les cellules β . Le processus mis en jeu est la diffusion facilitée.

- 1.1. Présenter les caractéristiques de la diffusion facilitée.
- 1.2. Expliquer les modalités de synthèse et de sécrétion d'une protéine destinée à l'exportation cellulaire en précisant les différentes étapes et les organites cellulaires impliqués.

2. Lignées cellulaires productrices d'insuline (13 points)

Parmi les cellules candidates pour la thérapie cellulaire, on trouve des cellules souches embryonnaires et des cellules souches adultes présentes dans le pancréas. Des conditions de culture contrôlées permettent de faire proliférer ces cellules *in vitro* et d'obtenir leur différenciation en cellules β productrices d'insuline. Les cellules seront ensuite transplantées chez les patients afin de pallier leur déficience en insuline.

- 2.1. Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes et de grande capacité proliférative, ce qui est un inconvénient car, quand elles sont implantées chez un animal, elles génèrent très souvent des tumeurs. On a donc cherché à les modifier génétiquement pour empêcher leur prolifération.
La modification génétique choisie consiste à incorporer dans les cellules une construction d'ADN chimérique codant d'une part un facteur inactivant un mitogène cellulaire et d'autre part la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein). Les cellules sont ensuite triées après analyse en cytomètre de flux (FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting).

- 2.1.1 Définir le terme « cellule pluripotente ».
- 2.1.2 Décrire succinctement deux méthodes permettant l'introduction d'un gène étranger dans une cellule eucaryote animale.
- 2.1.3 Expliquer le principe du tri cellulaire par FACS.
Données : longueur d'onde d'excitation du GFP = 345 nm
longueur d'onde d'émission du GFP = 455 nm

- 2.1.4 Le **document 1** montre les histogrammes obtenus avec des cellules non transfectées et des cellules transfectées.
- 2.1.4.1 Justifier l'intérêt de réaliser un témoin avec des cellules non traitées.
- 2.1.4.2 Repérer sur l'histogramme 2, le pic correspondant aux cellules transfectées. Justifier.
- 2.2. Les cellules souches adultes du pancréas auraient pour fonction le renouvellement des cellules de cet organe. Après prélèvement, on peut les faire évoluer *in vitro* en cellules sécrétrices d'insuline.

Afin de récupérer les cellules souches, des fragments de pancréas sont prélevés, les cellules sont dissociées puis mises en culture dans un milieu permettant leur prolifération puis leur différenciation. Ce milieu peut être un milieu de base usuel comme le milieu RPMI auquel on ajoute notamment des molécules comme le FGF, l'EGF.

- 2.2.1 Décrire succinctement une méthode permettant la dissociation des cellules.
- 2.2.2 À l'aide d'un tableau :
- citer les différentes catégories de molécules contenues dans un milieu de base,
 - indiquer leurs rôles,
 - donner un exemple de molécule pour chaque catégorie.
- 2.2.3 Après avoir rappelé la signification des lettres « GF » qui apparaissent dans les abréviations FGF et EGF, préciser le rôle de ces molécules.

Les cellules souches sont repérées par des marqueurs caractéristiques : elles sont notamment « nestine positive ». Celles qui évoluent en cellules β possèdent en plus le récepteur à une hormone peptidique, la GLP-1 (Glucagon like peptide), il sera noté GLP-1R.

- 2.2.4 La nestine est un des filaments intermédiaires du cytosquelette.
Citer et décrire les autres catégories de composants du cytosquelette.
- 2.2.5 Le récepteur du GLP-1 est un récepteur membranaire couplé à une protéine G activant l'adénylate cyclase.
- 2.2.5.1 Justifier l'importance d'un récepteur membranaire pour l'action du GLP-1.
- 2.2.5.2 Citer les différentes étapes de la transduction du signal, en précisant l'action de l'adénylate cyclase.
- 2.2.5.3 Citer un autre système de transduction du signal ne faisant pas intervenir l'adénylate cyclase

2.2.6 La mise en évidence des marqueurs tels que le GLP-1R à la surface de ces cellules repose sur des expériences d'immunocytochimie. Le **document 2** présente le protocole d'un double marquage, d'une part avec des anticorps anti-GLP-1R, d'autre part avec du DAPI. (4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole).

2.2.6.1 Rappeler la structure cellulaire marquée par le DAPI.

2.2.6.2 À partir du **document 2**, présenter les différentes étapes du protocole de détection des GLP-1R par immunocytochimie. Préciser le rôle de chacune de ces étapes.

3. Survie des cellules productrices d'insuline après transplantation (3 points)

3.1. La persistance des cellules productrices d'insuline chez le malade repose sur l'absence de rejet de ces cellules par le système immunitaire de l'hôte. Le rejet met en jeu notamment les lymphocytes T cytotoxiques.

Indiquer la signification des légendes a, b, c, d sur le **document 3**.

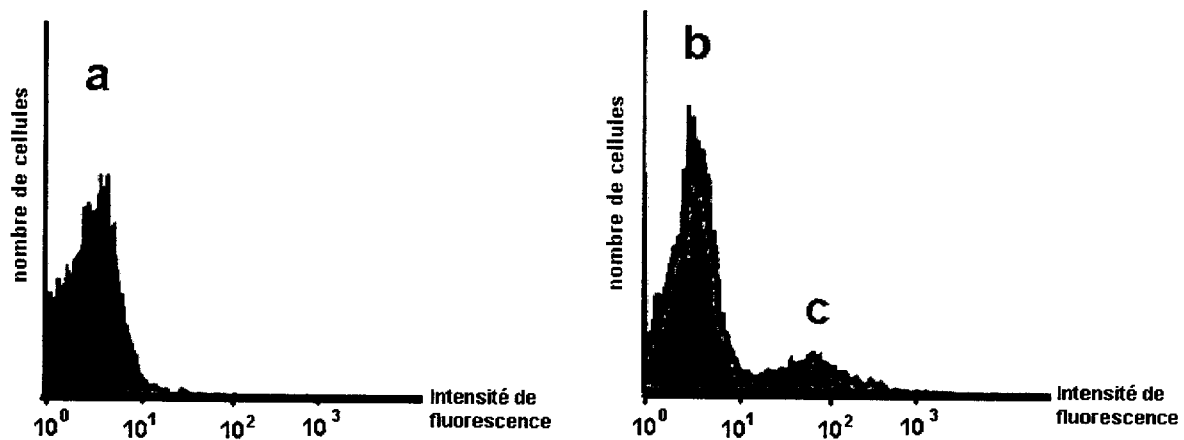
3.2. Afin de pallier ce problème de rejet, il est envisagé d'inclure, avant injection au malade, les cellules β , (sous forme de pseudo-ilôts correspondant à des cellules agrégées) dans des microcapsules.

3.2.1 Expliquer pourquoi l'encapsulation évitera le rejet par le système immunitaire.

3.2.2 Caractériser les propriétés concernant la perméabilité que devront posséder ces microcapsules.

Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition (1 point)

DOCUMENT 1 : The figure shows FACS-analysis of ES cells which were genetically modified to express GFP.



Histogram 1
non-treated control cells

Histogram 2
traited cells

DOCUMENT 2

Immunocytochemical identification of GLP-1R-positive human pancreatic stem cells.

Islets were washed and cultured in RPMI 1640 medium containing serum, 11.1 mM glucose, antibiotics, sodium pyruvate and growth factors. Within several days, nestin-positive cells (immunocytochemically identified) grew out from the islets. Later, these cells were cloned and expanded in medium containing β -FGF and EGF. Incubation with GLP-1 was performed in the absence of serum and fresh peptide was added every 48 hr without changing the medium.

Immunocytochemical detection of GLP-1R was performed using polyclonal antiserum. Cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature. After several rinses in PBS, normal donkey serum was added for 30 minutes and incubated with primary antiserum at 4°C. The following day, cells were rinsed with PBS and incubated with secondary antiserum labeled with fluorochromes Cy-3 or Cy-2 for 1 hour at room temperature. After several wash steps, coverslips were mounted onto slides in mounting medium containing DAPI. Fluorescence images were obtained using an epifluorescence microscope equipped with camera.

DOCUMENT 3

