

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE CELLULAIRE

Durée de l'épreuve : 2 heures
Coefficient : 1

Le sujet comporte 5 pages numérotées de 1/5 à 5/5
L'usage de la calculatrice est interdit

Sujets zéros du BTS biotechnologies : avertissement.

Les sujets zéros ont été conçus par des professeurs enseignant en BTS et finalisés en commission de choix et d'élaboration de sujets. Contrairement aux sujets d'examens, ils n'ont pas été testés. Leur faisabilité pendant le temps imparti par un élève moyen n'a donc pas été vérifiée.

Il s'agit ici de montrer l'orientation et l'esprit dans lequel les sujets peuvent valider les connaissances et savoir-faire acquis lors de la formation des étudiants se préparant au BTS biotechnologies. Ces sujets ne constituent pas des « modèles » ; ils donnent l'orientation des sujets d'évaluation respectant les **définitions de l'épreuve**, et suivent les **préconisations** qui ont guidé leur élaboration. (cf Avertissement)

Ces sujets sont à porter à la connaissance des étudiants en formation et à travailler avec eux à titre d'entraînement pour les épreuves terminales. Ils nécessitent que soient conjointement mobilisées les connaissances des élèves et leurs capacités à exploiter les documents associés.

Séparation et étude comparée de populations cellulaires de Mammifères.

L'homogénéité des populations cellulaires est un problème constant en recherche, notamment pour étudier les propriétés physiologiques des cellules. Dans un tissu nerveux tel que l'hippocampe, une structure du cerveau impliquée dans les mécanismes de la mémoire, on trouve différents types cellulaires : les cellules gliales jouant un rôle de soutien et de nutrition, les neurones qui traitent l'influx nerveux et les cellules souches neurales, précurseurs intervenant dans la régénération des deux premières populations.

1. Obtention de cultures primaires à partir de tissu nerveux (6,5 pts)

1.1 Notions de culture cellulaire

1.1.1 Définir culture primaire, culture secondaire.

1.1.2 Le **document 1** indique la composition d'un milieu de culture adapté aux cellules de Mammifères.

1.1.2.1 Indiquer sur la copie le titre de chacune des catégories de constituants (1) (2) et (3).

1.1.2.2 Les cultures cellulaires nécessitent la présence d'un système tampon dans le milieu de culture et l'incubation des cellules à 37°C dans une étuve avec 5 % de CO₂. Expliquer pourquoi.

1.1.2.3 Ce milieu n'est pas utilisable tel quel. Indiquer trois substances à ajouter extemporanément en précisant leur rôle.

1.2 Suspension cellulaire et séparation des différentes populations.

Lors de la mise en culture d'une suspension cellulaire issue du cerveau, il est possible d'utiliser deux méthodes pour obtenir une suspension de neurones non envahie par les cellules gliales. Ces deux méthodes sont présentées dans le **document 2**.

1.2.1 Expliquer le principe de la première méthode.

1.2.2 La deuxième méthode repose sur l'utilisation du FUDR.

1.2.2.1 La préparation de FUDR contient du 5-fluor-2 déoxyuridine et de l'uridine. Donner le rôle de ces deux composants.

1.2.2.2 Expliquer la raison pour laquelle la 5-fluor-2 déoxyuridine n'a pas d'effet sur les neurones.

2. Analyse des populations cellulaires du tissu nerveux par cytométrie en flux (6,5 pts)

De découverte récente, les cellules souches neurales sont impossibles à distinguer des neurones et des cellules gliales en suspension. Certaines protéines spécifiques, détectables grâce à des anticorps, peuvent constituer des marqueurs utilisables.

2.1. À l'aide d'un schéma précis, présenter le principe de fonctionnement du cytofluorimètre de flux.

2.2. Le **document 3** présente un résultat d'analyse au cytofluorimètre de flux.

2.2.1. Citer le réactif utilisé permettant de détecter spécifiquement chaque population de cellules.

2.2.2. Le **document 3a**, révèle 28,8% de neurones.

➤ Justifier la position du nuage de points correspondant à ce pourcentage.

➤ Indiquer, le pourcentage de cellules gliales, justifier cette valeur.

2.2.3. Reproduire schématiquement le **document 3b** et identifier la zone correspondant aux cellules souches neurales. Justifier.

2.3. À l'aide d'un cytofluorimètre de flux doté d'un système de tri cellulaire, on souhaite préparer une suspension homogène de cellules souches neurales. Indiquer comment procéder.

3. Populations et prolifération cellulaire (5 pts)

Après avoir réalisé un tri cellulaire complet et mis les cellules des différentes populations en culture, on constate que ces différentes populations ne prolifèrent pas de la même façon : les cellules gliales de type astrocytes peuvent se multiplier jusqu'à recouvrir la surface disponible, alors que les neurones ne prolifèrent pas.

3.1. Cycle cellulaire des astrocytes

3.1.1. Représenter l'enchaînement des différentes phases du cycle cellulaire sur un graphique. Indiquer brièvement les principaux événements de chaque phase.

3.1.2. Indiquer le stade dans lequel se trouvent les neurones qui ne prolifèrent pas, bien qu'ils survivent en culture.

3.2. Conditions de culture, survie et prolifération

On met en culture des astrocytes dans un milieu minimum (voir **document 1**) sans ajouter de sérum : les cellules survivent et adhèrent au support, mais ne prolifèrent pas. En revanche lorsqu'on les met en culture dans un milieu enrichi en sérum de veau fœtal, les astrocytes prolifèrent.

3.2.1. Indiquer les composants apportés dans le milieu par le sérum.

3.2.2. Préciser l'étape du cycle cellulaire où les astrocytes requièrent cet apport.

Les neurones cultivés en milieu minimum meurent en quelques jours. En revanche, cultivés en présence de sérum ils survivent plusieurs semaines et produisent des prolongements cytoplasmiques qui envahissent le support. D'autre part, si on réalise une culture mixte d'astrocytes et de neurones que l'on prive de sérum, les neurones survivent et produisent des prolongements.

3.2.3. En déduire le rôle des cellules gliales vis-à-vis des neurones.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)
--

DOCUMENT 1

Composition d'un milieu de culture MEM (Sigma)

	B 1522
COMPONENT	g/L
(1)	
Calcium Chloride•2H ₂ O	0.265
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767
Potassium Chloride	0.4
Potassium Phosphate Monobasic (anhydrous)	—
Sodium Bicarbonate	2.2
Sodium Chloride	6.8
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.122
Sodium Phosphate Dibasic (anhydrous)	—
(2)	
L-Arginine•HCl	0.021
L-Cystine•2HCl	0.01565
L-Glutamine	—
L-Histidine (free base)	0.008
L-Isoleucine	0.026
L-Leucine	0.026
L-Lysine•HCl	0.03647
L-Methionine	0.0075
L-Phenylalanine	0.0165
L-Threonine	0.024
L-Tryptophan	0.004
L-Tyrosine•2Na•2H ₂ O	0.02595
L-Valine	0.0235
(3)	
D-Biotin	0.001
Choline Chloride	0.001
Folic Acid	0.001
myo-Inositol	0.002
Niacinamide	0.001
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.001
Pyridoxal•HCl	0.001
Riboflavin	0.0001
Thiamine•HCl	0.001
OTHER	
D-Glucose	1.0
Phenol Red•Na	0.011

DOCUMENT 2

Méthodes de culture neuronale limitant l'envahissement par les cellules gliales.

● First method

- incubate the cell suspension for 4-6 hours on uncoated culture dishes.
- Remove and keep the culture medium containing floating neurons, only.
- Transfer the neurons to new, poly-D-Lysin coated culture dishes.
- Incubate for 24 hours before any further medium change.

● Second method

- Incubate the cell suspension on uncoated culture dishes.
- Three days after culturing, add FUDR (10µM) to culture medium.

FUDR preparation :

- 5-FLUORO-2-DEOXYURIDINE (F-0503, 100mg, SIGMA) 10mM 25mg
- URIDINE (U-3003, 5g, SIGMA) 10mM 24mg
- H₂O
- Final Volume: 10ml
- Sterile filtration 0.2µm

DOCUMENT 3

Analyse d'une suspension cellulaire par cytofluorimétrie de flux.

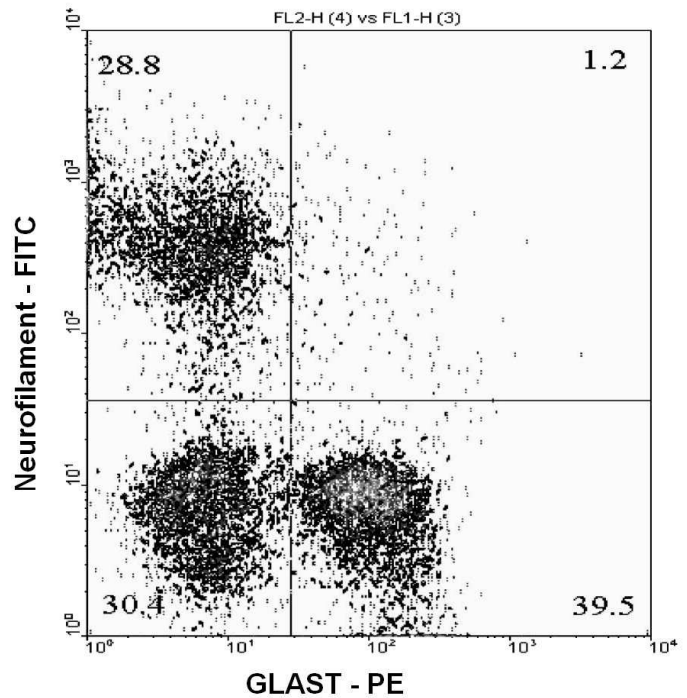
3a : Analyse quantitative de fluorescence, dot-plot

Neurofilament : protéine du cytosquelette spécifique des neurones.

GLAST : protéine spécifique des cellules gliales de type astrocyte.

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

PE : phycoérythrine



3b : Analyse de fluorescence, dot-plot

A2B5 : protéine spécifique des cellules de la lignée neuronale

Nestin : protéine spécifique des cellules souches neurales

L'intensité de la fluorescence est significative pour les valeurs supérieures à 10^2 (unités arbitraires)

