

# Université Victor Segalen Bordeaux 2 – UFR Science de la Vie

## Licence Professionnelle

### « Techniques et Applications en Biologie Cellulaire et Biologie Moléculaire »

Examen 2006-2007

#### UE1 : « Technologies en Biologie Cellulaire »

#### SUJET 1 : Hybridation Lymphocytaire : Mme Comeau

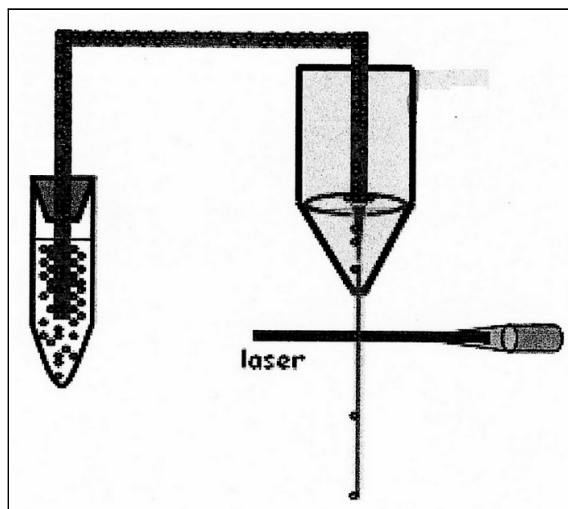
40 min de composition (coefficient 6)

1. Décrivez les principales étapes de l'hybridation lymphocytaire en expliquant le principe de sélection du milieu HAT. Vous pouvez vous aider de schémas. Vous préciserez également les principales caractéristiques des lymphocytes, des myélomes utilisés dans le cadre de vos travaux pratiques et des hybridomes obtenus.
2. Quel est le rôle des macrophages et du PEG dans la technique d'hybridation lymphocytaire ?
3. Quel milieu utilise-t-on au moment du lavage des myélomes ou des splénocytes, préalablement à la fusion lymphocytaire, et pourquoi ?
4. Sachant qu'un puits de culture renferme une concentration cellulaire de  $7,5 \times 10^5$  cellules/mL, réalisez un sous-clonage à une cellule par puits dans une plaque de culture à 96 puits. Sachant que vous disposez en final de 200 $\mu$ L par puits, donnez les calculs intermédiaires.

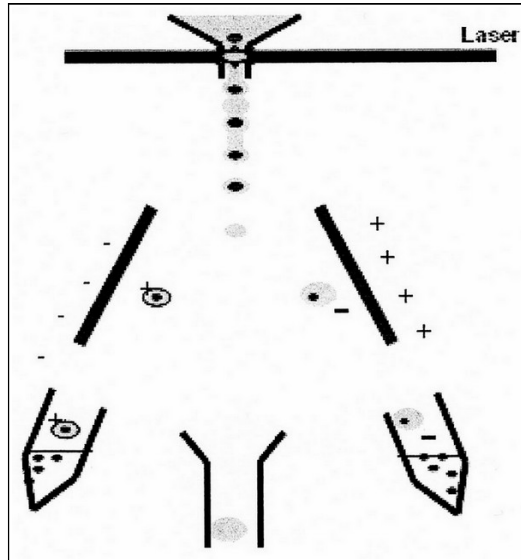
#### SUJET 2 : Cytométrie en flux : Mme Robert

20 min de composition (coefficient 4)

1. A l'aide du schéma suivant, expliquez en quelques phrases le principe de la cytométrie en flux.



2. A l'aide du schéma suivant, expliquez en quelques phrases le principe du tri cellulaire.



3. Qu'appelle-t-on la diffusion axiale? Sur quel phénomène physique repose cette mesure?

4. Qu'appelle-t-on la diffusion latérale? Sur quel phénomène physique repose cette mesure?

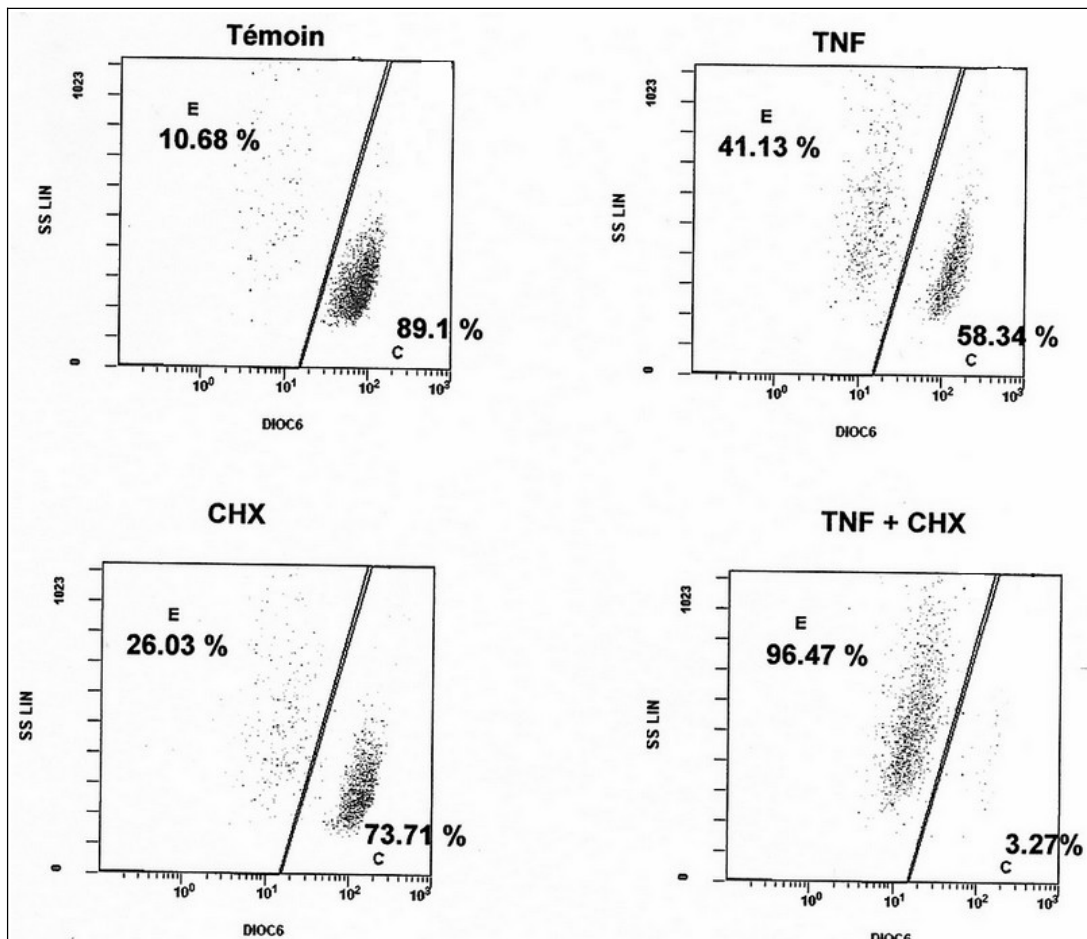
5. U937 est une lignée cellulaire qui sert de modèle cellulaire *in vitro* dans notre laboratoire. Dans ce cas, nous avons étudié l'apoptose induite par différents facteurs. Les cellules sont incubées pendant 24 Hrs à 37°C avec les molécules suivantes :

TNF : activateur de la voie des caspases conduisant ainsi à la mort cellulaire

CHX : molécule bloquant la synthèse des protéines Cycloheximide

En cytométrie en flux, l'étude de l'apoptose est réalisée après un marquage au DIOC6 qui fluoresce en vert. Le DIOC6 est un marqueur du potentiel de la membrane mitochondriale. Lorsque les cellules sont en apoptose, les mitochondries se dépolarisent et deviennent moins électronégatives que dans les cellules intactes. Ainsi, les cellules en apoptose ont une moyenne de fluorescence moins élevée que les cellules vivantes.

Interprétez les histogrammes suivants obtenus lors de l'étude de l'apoptose des U937 induite par le TNF et le CHX. Que peut-on déduire sur l'effet des molécules testées ?



**SUJET 3 : Cytogénétique : Mr. Saura**  
15 min de composition (coefficient 3)

Le caryotype: principes de sa réalisation et principales indications médicales pré et post-natales.

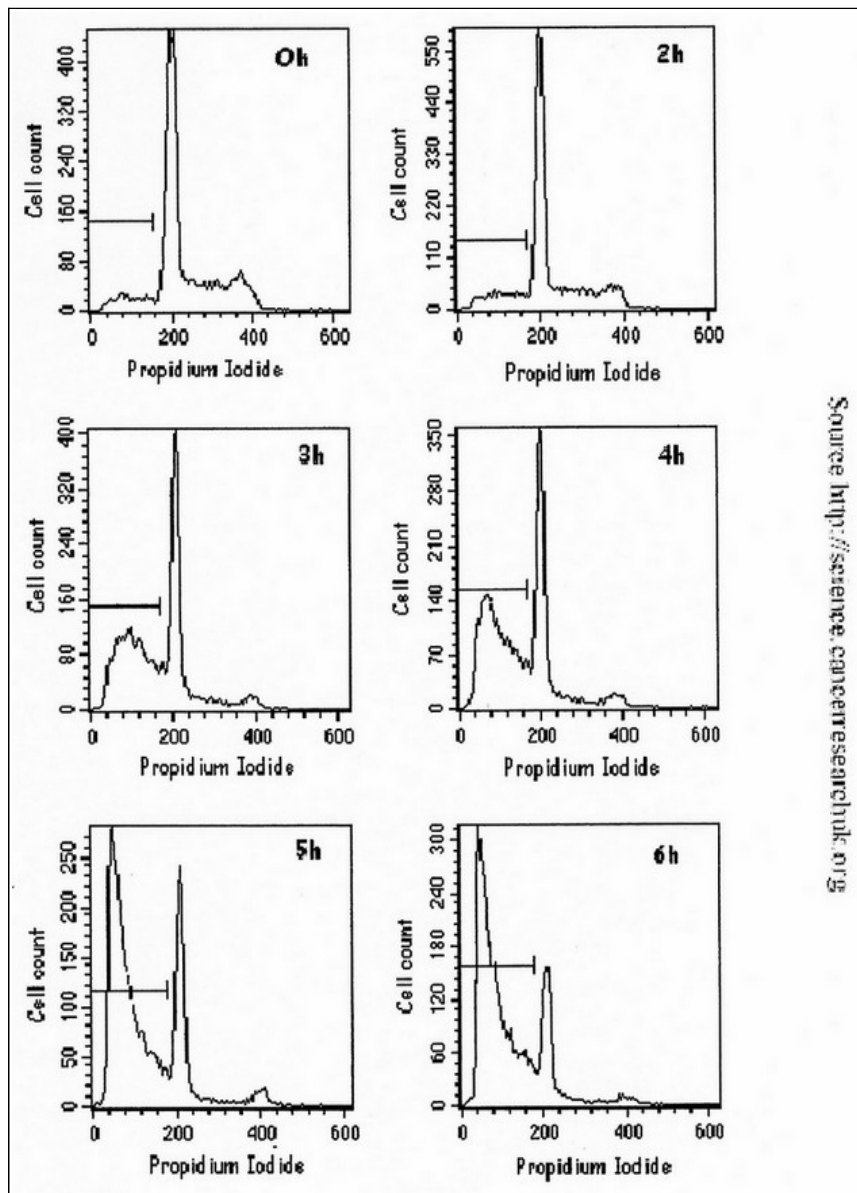
**SUJET 4 : Bases de la culture cellulaire: Mme Loustalot**  
45 min de composition (coefficient 7)

- Détailler les étapes du cycle cellulaire
- Donner les principaux constituants des milieux de culture indispensables pour la croissance cellulaire.

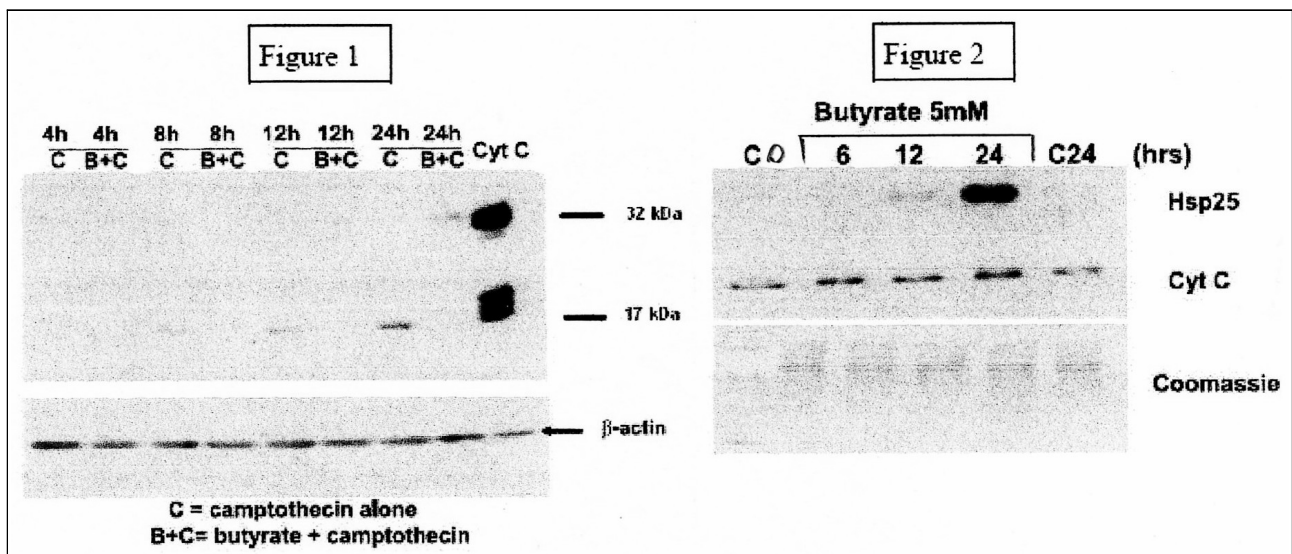
**SUJET 5 : Apoptose : Mr Pruvost et Mme Baudet**  
20 min de composition (coefficient 5)

**Première partie : Analyse par cytométrie en flux (6 points)**

- Que visualise-t-on en utilisant le iodure de propidium (propidium iodide en anglais) ?
- Interpréter la figure ci-dessous : 6 lignes maximum



**Seconde partie : Analyse du rôle du butyrate in vitro (lignée cellulaire en culture) (14 points)**



**Figure 1** : Détection de la CASPase 3 à l'aide d'anticorps polyclonaux sur la fraction cytosolique de lysats (en haut) et de l'actine (en bas). Les temps correspondent au temps d'incubation des différentes substances listées à la base de la figure. La ligne « Cyt C » correspond à une expérience de contrôle provoquant la libération de cytochrome C dans le cytoplasme des cellules. Les noms des molécules sont reportés au bas de la figure.

**Figure 2** : Détection de la protéine Hsp25 et du cytochrome C à l'aide d'anticorps sur la fraction mitochondriale de lysats à 6, 12 et 24 heures après mise en incubation. Les lignes « C » et « C24 » désignent des cultures non traitées à 0 et 24 heures, dans les mêmes conditions.

1. Quelle est la technique utilisée pour cette analyse ?
2. Quel est le rôle de la camptothécine ?
3. A votre avis, quelle lignée cellulaire a pu être utilisée lors de cette expérience ? Justifier votre choix.
4. D'après la figure 1, quel est l'effet du butyrate sur ces cultures cellulaires ? Justifier.
5. Quelle(s) information(s) supplémentaire(s) apporte la figure 2 ?

## **SUJET 6 : Transfection : Mme Benazzouz**

20 min de composition (coefficient 5)

1. Décrire le mode d'action du Jet PEI?
2. Quel est le but de transférer deux plasmides codant pour les sous-unités GABAB1 et GABAB2 du récepteur GABAB?
3. A quoi sert l'étiquette *myc* dans le plasmide GABAB1 ?
4. Que désigne-t-on par le mot GFP ? Comment peut-on la détecter dans la cellule et quel est l'intérêt de l'utiliser comme étiquette ?
5. Définir la transfection *ex vivo*. Quelles sont les précautions que l'expérimentateur doit prendre pour réussir cette expérience.
6. Quelle est la méthode de transfection **la plus efficace** que vous pouvez utiliser pour étudier :
  - a. L'expression d'une protéine membranaire dans une lignée tumorale.
  - b. L'effet thérapeutique d'un gène suicide dans une tumeur sous-cutanée chez la souris.
7. Présenter brièvement les deux modèles expérimentaux (rat, singe) de la maladie de Parkinson.

## **SUJET 7 : Analyse Morphofonctionnelle**

### **QUESTION 1**

**Les 3 figures de la question 1 sont en annexe 1**

a) Vous devez réaliser une immunocytofluorescence à partir de cellules pour identifier et localiser la présence :

- d'une protéine X à l'aide d'un anticorps primaire et d'un anticorps secondaire conjugué à la fluorescéine (FITC)
- et d'une protéine Y à l'aide d'un autre anticorps primaire et d'un autre anticorps secondaire conjugué à la rhodamine (Rho)

Les spectres de ces 2 fluorochromes (FITC et Rhô) sont indiqués sur la figure 1.

**Indiquez lequel des 2 spectres présentés pour chaque fluorochrome correspond aux spectres d'absorption et d'émission. Justifiez votre réponse (5 lignes maximum).**

b) Voici les spectres d'absorption et d'émission de 3 marqueurs nucléaires fluorescents (YOYO, DAPI et Iodure de propidium) (Figure 3).

**Indiquez quel(s) marqueur(s) choisir si vous voulez marquer les noyaux dans votre expérience ? Justifiez votre réponse en comparant les spectres et en vous aidant de la figure 2 (15 lignes maximum).**

c) **Quel est l'intérêt de marquer les noyaux dans cette expérience ? (5 lignes maximum)**

d) Le résultat obtenu présente du bruit de fond dû à la fixation non spécifique de l'anticorps secondaire sur votre échantillon.

**Indiquez ce que vous pouvez faire pour diminuer votre bruit de fond lors de votre expérience?**

### **QUESTION 2**

Vous voulez analyser la présence de lipides dans un échantillon de langue de Rat en utilisant la microscopie photonique. Pour cela vous avez besoin de prélever un morceau de langue et d'effectuer des coupes de tissu pour visualiser les lipides après une coloration histologique appropriée.

**a) Citez la méthode simple et rapide que vous pourriez utiliser pour fixer et inclure le tissu ?**

**b) Citez l'appareil que vous allez utiliser pour réaliser les coupes du tissu inclus ?**

Après avoir réalisé une coloration histologique sur vos coupes, vous voulez les monter entre lames et lamelles pour les observer au microscope photonique.

**c) Pouvez vous utiliser le milieu de montage EUKTTT ? Justifiez votre réponse (5 lignes maximum).**

### **QUESTION 3**

Faire le schéma des trajets des électrons qui vont heurter un échantillon d'une certaine épaisseur sous vide.

Indiquer quels types d'électrons vont être utilisés en :

- Microscopie Électronique à Transmission
- Microscopie Électronique à Balayage avec 2 types de détecteurs

### **QUESTION 4**

Quelles sont les contraintes techniques pour observer des échantillons biologiques en microscopie électronique à transmission 120kV conventionnelles.

### **QUESTION 5**

Les clichés indiqués dans la Question 5 sont en annexe 2 et 3

a) Donner le type de technique d'imagerie microscopique utilisée pour les clichés A et B

- Décrire les clichés A et B
- Donner la taille des objets sphériques blancs sur le cliché B sachant que ce cliché a été pris à un grandissement de X5000
- Dessiner dessous le cliché B une barre d'échelle correspondant à  $5\mu m$

b) Quel type de tissu est représenté :

- sur le cliché C
- sur le cliché D

S'agit-il du même tissu ?

Quelles sont alors les différences sachant que nous sommes au même grandissement ?

c) Quelle est la composante cellulaire commune aux clichés E, F, G et H ? et marquer la d'une croix bien visible sur chaque cliché.

- Décrire cette composante sur les 4 photos en indiquant en quoi elle diffère sur chacune d'entre elle
- Calculer sa taille sur le cliché E pris à un grandissement de 17100 et dessiner sous le cliché E une barre d'échelle correspondant à  $2\mu m$ .

### **QUESTION 6**

Quel est le risque chimique principal en Biologie Moléculaire ? Donner des exemples.

### **QUESTION 7**

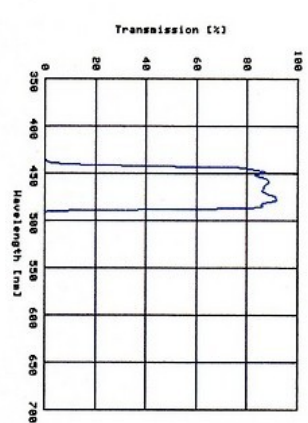
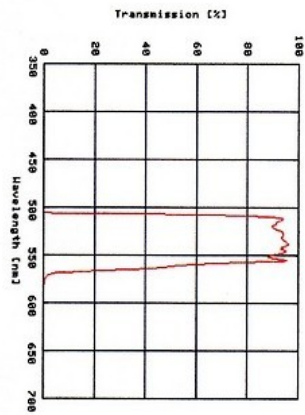
Quels sont les critères de validation d'une méthode analytique ?

Les questions 1 et 2 sont sur un total de 9 points.

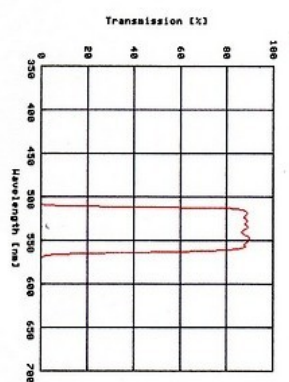
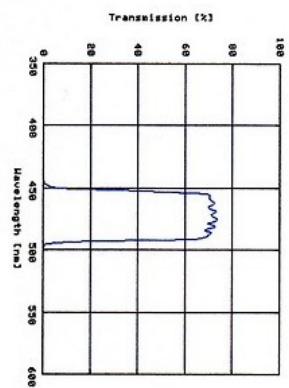
Les questions 3 à 5 sont sur un total de 9 points.

Les questions 6 et 7 sont sur un total de 2 points.

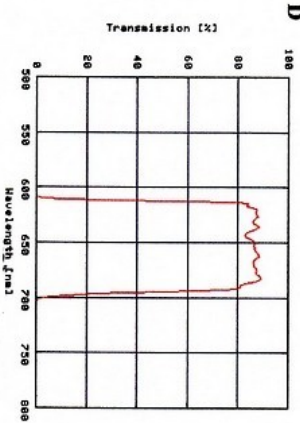
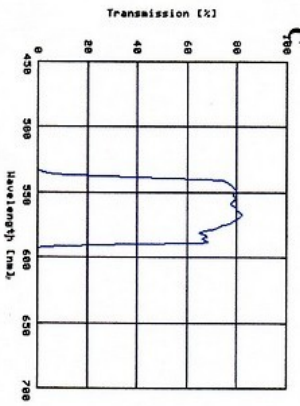
**Fluoresceïne**



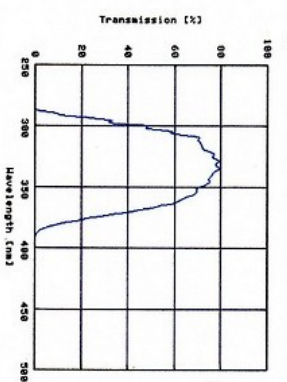
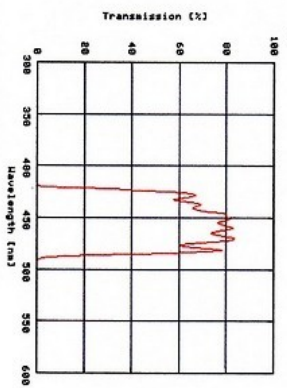
**YOYO-1**



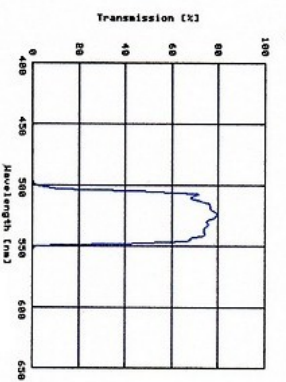
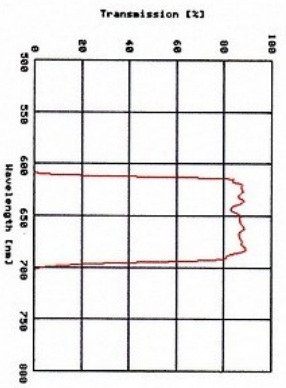
**Rhodamine**



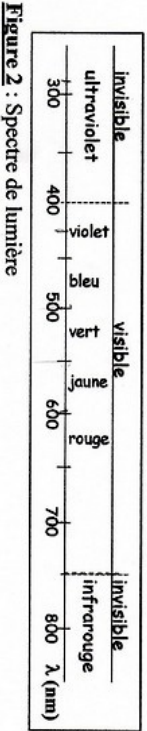
**DAPI**



**Iodure de Propidium (IP)**



**Figure 1 :** Spectres d'absorption et d'émission de la fluoresceïne (FTC) et de la rhodamine (Rho).



**Figure 2 :** Spectre de lumière

**Figure 3 :** Spectres d'absorption et d'émission de 3 marqueurs nucléaires fluorescents (YOYO-1, DAPI et Iodure de propidium).