



Ce document a été mis en ligne par l'organisme [FormaV](#)®

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :

[www.formav.co/explorer](http://www.formav.co/explorer)

# CORRIGE

**Ces éléments de correction n'ont qu'une valeur indicative. Ils ne peuvent en aucun cas engager la responsabilité des autorités académiques, chaque jury est souverain.**

**ÉPREUVE E5. UNITÉ U53**  
**Techniques de biologie cellulaire et moléculaire**  
**Éléments de corrigé**  
**Document pouvant être fourni au jury pour correction**

**CONTRÔLE D'UN LOT DE SÉRUM DE VEAU FŒTAL (40 points)**

**1 - Contrôle biologique : test de croissance cellulaire.**

**1.4 - Compte-rendu.**

Au microscope, les cellules sont rondes, réfringentes, et cultivent en suspension.

Les critères à respecter sont une bonne homogénéisation de la suspension, avoir moins de 30 cellules/rectangle, compter 200 cellules minimum et ne compter que 2 bords du rectangle sur les 4.

**C1** =  $10 \times 2 \times 100 \times 1000$  cellules viables/mL =  $2 \times 10^6$  cellules viables/mL (sérum de référence).

**C2** =  $5 \times 2 \times 100 \times 1000$  cellules viables/mL =  $1 \times 10^6$  cellules viables/mL (nouveau lot de sérum).

Même % de viabilité pour **C1** et **C2** les cellules ne meurent pas.

La croissance est ralentie en présence du nouveau lot de sérum (différence de concentration entre C1 et C2).

**2 - Contrôle toxicologique.**

**2.4 - Compte-rendu.**

Le LPS, à l'origine de la fièvre (effet pyrogène), fait partie de la paroi des bactéries. Celles-ci sont omniprésentes et par voie de conséquence, le LPS contamine tous les supports (matériel, mains ...). Il est donc indispensable de travailler avec du matériel apyrogène, c'est à dire dépourvu de LPS, pour réaliser le dosage du LPS.

Dilution du sérum au 1/10 : 20  $\mu$ L de sérum + 180  $\mu$ L d'eau apyrogène ou de tampon Phosphate

Concentration d enzyme (UE/ $\mu$ L)	0	1	0,5		0,25		0,12		0,065
LPS ou PAL à 1UE/mL ( $\mu$ L)		100	100	}→	100	}→	100	}→	100
H <sub>2</sub> O ou Tampon Phosphate	100		100		100		100		100

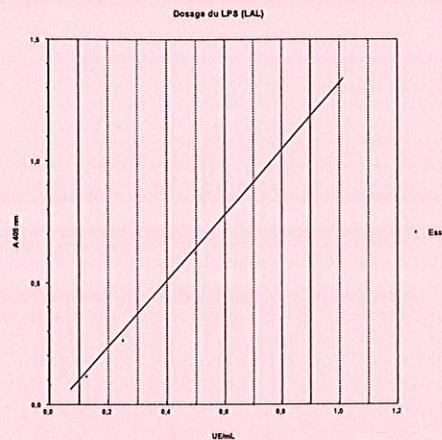
↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓

LPS ou PAL	50	50	50		50		50		50	
SVF-1 1/10 ( $\mu$ L) 3 essais										50
LAL ou Tampon Phosphate ( $\mu$ L)	50									
Substrat ou PNPP ( $\mu$ L)	100									
Solution d'arrêt ( $\mu$ L)	100									

Rôle du témoin : Blanc réactif

➤ **Proposition1 - Kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL)**

EU/mL	0 (Blanc)	1	0,5	0,25	0,12
A 405 nm	0,083	1,32	1,624	0,263	0,100



➤ **Proposition2 - Hydrolyse du PNPP par la PAL**

Tampon Phosphate, pH 9,8.

Solution de PNPP 30 mmol/L.

Phosphatase alcaline à 1 U/mL.

**Protocole n°1 : Résultats des essais**

Enzyme à 1 UE/mL : dilutions de 1/2 en 1/2 en Tp phosphate sous un volume final de 50  $\mu$ L.

Sérum pur non chauffé.

Sérum pur chauffé à 60°C pendant 30 minutes.

50  $\mu$ L d'échantillon (gamme ou sérum).

50  $\mu$ L de tampon phosphate.

100  $\mu$ L de PNPP à 30 mmol/L.

**6 minutes à température ambiante.**

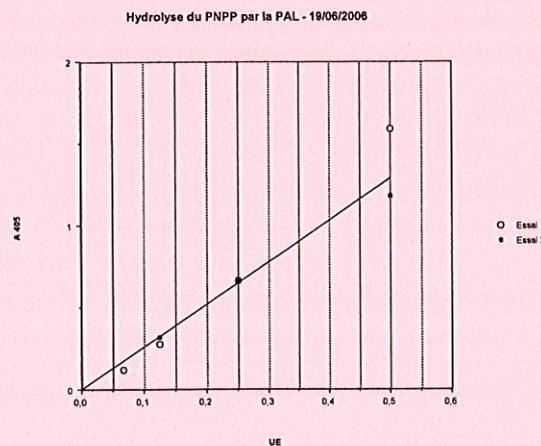
100  $\mu$ L de NaOH à 2 mol.L<sup>-1</sup>.

PAL UE/mL	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,0156
A <sub>405nm</sub> Essai 1	1,79	0,86	0,48	0,32	0,26	0,24
A <sub>405nm</sub> Essai 2	1,39	0,88	0,52	-	0,27	0,23

Blanc Tp + Substrat : Essai 1 : 0,184; Essai 2 : 0,206.

A<sub>405nm</sub> Sérum pur non chauffé : Essai 1 : 0,424 ; Essai 2 : 0,441.

A<sub>405nm</sub> Sérum pur chauffé à 60°C pendant 30 min : essai 1 : 0,336 ; essai 2 : 0,349.



**Protocole n°2 : Hydrolyse du PNPP par la PAL**

Enzyme à 1 UE/mL : dilutions de 1/2 en 1/2 en Tp phosphate sous un volume final de 50 µL.

Sérum non chauffé : dilution de 1/2 en 1/2 en Tp phosphate.

Sérum chauffé à 60°C pendant 30 min : dilution de 1/2 en 1/2 en Tp phosphate.

50 µL d'échantillon (gamme ou sérum).

50 µL de tampon phosphate.

100 µL de PNPP à 30 mmol/L.

**10 minutes à 37°C.**

100 µL de NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>.

PAL UE/mL	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
A <sub>405nm</sub> Essai 1	3,14	1,57	0,78	0,28	0,07
A <sub>405nm</sub> Essai 2	3,42	1,68	0,78	0,28	0,08

Sérum non chauffé	pur	1/2	1/4	1/8	1/16
A <sub>405nm</sub>	0,31	0,22	0,0,19	0,14	0,13
Sérum non chauffé	pur	1/2	1/4	1/8	1/16
A <sub>405nm</sub>	0,20	0,18	0,14	0,13	0,13

A<sub>405nm</sub> Blanc Tp + Substrat : Essai 1 : 0,20 ; Essai 2 : 0,21.

Dosage PAL 21-06-2006

