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

ÉPREUVE E5. UNITÉ U53
Techniques de biologie cellulaire et moléculaire

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ HÉMOLYTIQUE D'UN PEPTIDE DE GRENOUILLE (40 points)

En 2002, une nouvelle espèce de grenouille a été découverte au Brésil par un biologiste chercheur à l'université de Brasilia. Cette espèce baptisée *Phyllomedusa oreades* est connue pour sécréter des dermaseptines, peptides à forte activité antimicrobienne, qui se révèle plus efficace que des antibiotiques tels l'ampicilline ou la gentamicine.

À la concentration systémique de 8 $mg.mL^{-1}$ le peptide sécrété par *P.oreades*est est capable d'éliminer les protozoaires présents en milieu sanguin.

On se propose de vérifier l'inocuité hémolytique de la dermaseptine à la concentration thérapeutique.

1 - Test d'hémolyse de globules rouges de souris (22 points)

Ce test est réalisé en vue d'une utilisation thérapeutique de la dermaseptine pour traiter les malades atteints de la maladie de Chagas (maladie hémolytique infectieuse due au protozoaire *Trypanosoma cruzi*).

1.1 - Principe

Des globules rouges de souris sont placés en présence de concentrations variables de dermaseptine. L'action hémolytique de la dermaseptine est évaluée par comparaison à une galerie d'hémolyse et par numération en cellule de Malassez d'autre part.

1.2 - Matériel et réactifs

- 1 flacon contenant 15 mL d'eau physiologique (solution à 0,9 % NaCl (m/V).
- 1 flacon contenant 15 mL d'eau distillée.
- 1 flacon contenant 0,8 mL de suspension de globules rouges de souris à 50 % v/v notée **« GRS 50 % v/v »**.
- 1 flacon contenant 2 mL de solution purifiée de dermaseptine de concentration 32 $mg\text{-}mL^{-1}$ en eau physiologique notée **« sol dermaseptine 32 $mg.mL^{-1}$ »**.
- 13 tubes à hémolyse bouchés.
- 2 cellules de Malassez et lamelles planées **(description en annexe 1)** ou 1 lame à double chambre.
- Pipettes automatiques P_{100} et P_{1000} et embouts jetables.
- Dispositif de transfert de volumes.

1.3 - Protocole opératoire

1.3.1 - Galerie d'hémolyse

Préparer en eau physiologique, 6 tubes de solution de dermaseptine de concentrations respectives : 32, 16, 8, 4, 2 et 1 $mg.mL^{-1}$, sous un volume final de 0,8 mL.

Remarque : effectuer des dilutions indépendantes les unes des autres.

➥ **Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution.**

Dans chaque tube, ajouter 40 µL de suspension de GRS à 50 % v/v.

Homogénéiser soigneusement sans retournement des tubes.

Préparer en parallèle :

- Un témoin absence d'hémolyse (AH).
- Un témoin hémolyse totale (HT).
- Un témoin hémolyse initiale (HI) en utilisant une solution de NaCl à 0,70 % m/v.
- Un témoin hémolyse franche (HF) en utilisant une solution de NaCl à 0,54 % m/v.

Boucher les tubes. Incuber 15 minutes à 37°C, puis les centrifuger 5 minutes à 300 g.

Noter l'aspect des tubes à l'œil.

Remplir le tableau de résultats **(annexe 2 à rendre avec la copie)** en considérant le culot et le surnageant.

➥ **Soumettre la galerie d'hémolyse à un examinateur.**

1.3.2 - Numération des globules rouges

La numération est effectuée sur le témoin absence d'hémolyse et 1 tube de la gamme judicieusement choisi, sachant que l'objectif est de vérifier l'inocuité de la dermaseptine sur les globules rouges.

Proposer le choix du tube à numérer **(annexe 2 à rendre avec la copie).**

Pour chaque numération, procéder comme suit :
- Diluer au 1/40 les 2 suspensions cellulaires à numérer en eau physiologique.
- Introduire la suspension diluée en cellule de Malassez.
- Compter les globules rouges sur un nombre significatif de rectangles.

➥ Présenter un champ microscopique pour une des 2 numérations à un examinateur

1.4 - Compte-rendu

Présenter le tableau de réalisation des dilutions de la solution de dermaseptine.

Dresser un tableau de la composition qualitative et quantitative des différents témoins.

Justifier les résultats obtenus pour chaque tube témoin.

Analyser les résultats obtenus pour la gamme de concentrations en dermaseptine. Conclure.

Rendre compte des résultats des numérations (Tableau en **annexe 3 à rendre avec la copie**) :

Calculer la concentration cellulaire de chacune des suspensions quantifiées.

En déduire le pourcentage de cellules survivantes des suspensions numérées.

Analyser les résultats des pourcentages de survie en terme de pourcentage d'hémolyse.

Conclure sur la concentration active en dermaseptine en considérant que le pourcentage d'hémolyse doit être inférieure à 10 %.

2 - Test d'hémolyse sur une suspension ajustée de globules rouges de mouton (18 points)

Ce test est réalisé en vue de l'utilisation de la dermaseptine pour traiter les poches de sang, la transfusion étant la principale source de diffusion du parasite *Trypanosoma cruzi*.

On dispose pour cela de 2 échantillons X et Y correspondant à une solution de dermaseptine obtenue respectivement par deux procédés différents d'extraction/purification :
- l'échantillon X préparé par méthode chromatographique.
- l'échantillon Y préparé par macération rapide de la peau de l'amphibien.

2.1 - Principe

Différentes dilutions en série des échantillons X et Y sont mises en présence d'un volume donné d'une suspension de GRM à 2% v/v dans une microplaque et incubées à 37°C. Après centrifugation, on quantifie le taux d'hémolyse de chaque puits.

On peut alors évaluer la méthode de préparation permettant d'obtenir la solution la plus concentrée en dermaseptine.

2.2 - Matériel et réactifs

- 1 flacon contenant 0,15 mL de suspension, préalablement lavée, de GRM à 50 % en solution tampon phosphate notée « **GRM 50 % v/v** ».
- Échantillon X de dermaseptine noté « **X** » (0,5 mL).
- Echantillon Y de dermaseptine noté « **Y** » (0,5 mL).
- Tampon phosphate noté « **PBS** » (4 mL).
- Microplaque 96 puits à fonds ronds et son couvercle.
- 1 tube à hémolyse.
- 2 microtubes.
- 1 pipette en verre de 5 mL.

En commun avec la partie 1 :
- Eau distillée : 1 tube à essai de 15 mL.
- Pipettes automatiques P_{100}, P_{1000} et embouts jetables.

2.3 - Protocole opératoire

En tubes à hémolyse, préparer dans la solution tampon phosphate, un volume suffisant d'une suspension de GRM à 2% v/v.

Prédiluer un volume suffisant de chacun des échantillons X et Y au 1/3 dans un microtube.
Réaliser les dilutions en série de l'échantillon X selon le tableau suivant :

Numéro de cupule	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	
Tampon (µL)		100	100	100	100	100	100	
Échantillon X (µL)	100	100						
Volume transféré (µL)			100	100	100	100		Jeter 100µL

Numéro de cupule	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	
Tampon (µL)		100	100	100	100	
Échantillon X/3 (µL)	100	100				
Volume transféré (µL)			100	100	100	Jeter 100µL

➥ **Appeler un examinateur lors de la réalisation d'une série de dilution.**

- Procéder de la même manière pour l'échantillon Y dans les cupules des lignes D et E.
- Prévoir dans les cupules G_1, G_3 et G_5 les trois témoins suivants : 0, 50 et 100% d'hémolyse, le témoin « 50% d'hémolyse » sera réalisé à partir de GRM et de solution tampon phosphate.
- Déposer 50 µL de suspension de GRM à 2% v/v dans chaque puits réactionnel (essais échantillons et témoins).
- Couvrir la plaque.
- Agiter 2 minutes sur agitateur horizontal pour microplaque.
- Incuber 15 minutes à 37°C.
- Centrifuger la plaque 5 minutes à 200 g.

2.4 - Lecture des résultats

À l'aide des résultats des témoins, évaluer l'hémolyse dans chaque puits utilisé pour les échantillons.

L'hémolyse sera exprimée selon les critères suivants :

0 % : absence d'hémolyse,
25 % : hémolyse comprise entre 0 et 50%,
50 % : aspect du témoin 50% d'hémolyse,
75 % : hémolyse comprise entre 50 et 100%.
100 % : aspect du témoin 100% d'hémolyse,

2.5 - Exploitation des résultats et compte-rendu

Indiquer la préparation de la suspension de GRM à 2% v/v et justifier le choix du volume final.

Compléter le tableau de résultats **(annexe 4 à rendre avec la copie)** en incluant les facteurs de dilution des échantillons dans chaque cupule. Justifier la réponse.

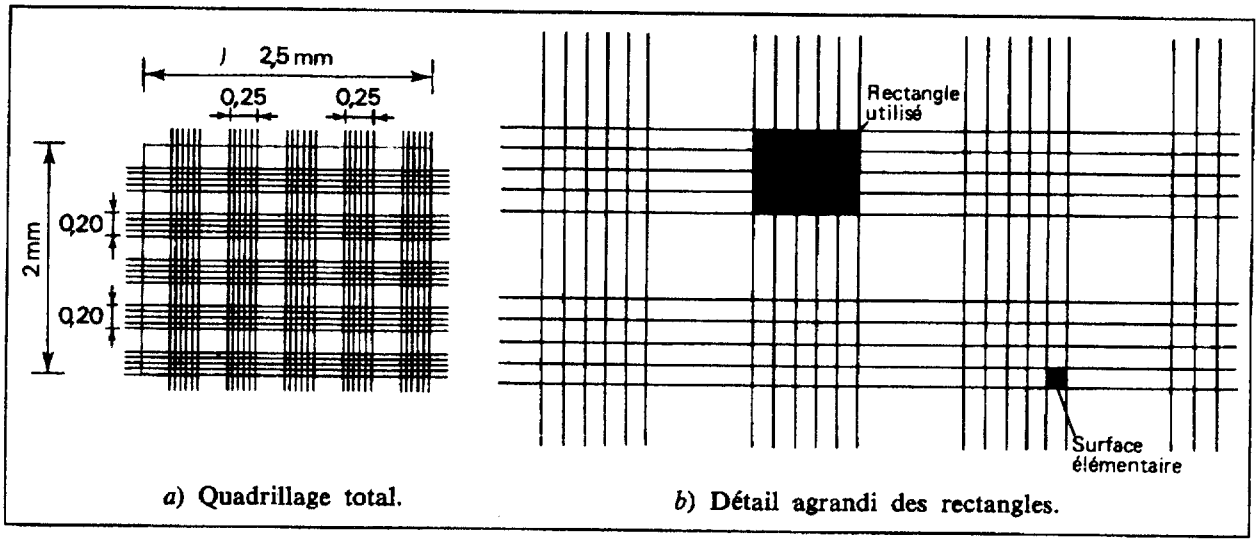
Sous forme de tableau, indiquer la réalisation quantitative des témoins. Préciser le rôle de ces témoins et expliquer pourquoi le témoin « 50% d'hémolyse » n'est pas entièrement satisfaisant.

Déterminer la plus faible dilution de chaque échantillon montrant une absence totale d'hémolyse.

Comparer les effets obtenus, proposer une explication.

ANNEXE 1

SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ



a) Quadrillage total. *b*) Détail agrandi des rectangles.

FIG. 77 — Quadrillage de Malassez utilisé pour la numération.

Caractéristiques de la cellule de Malassez

Profondeur	0,2 mm ± 0,002 mm
Surface totale du quadrillage	5 mm^2
Volume total	1 mm^3
Surface des rectangles quadrillés	1/20^e de mm^2
Volume correspondant aux rectangles quadrillés	1/100^e de mm^3 soit 1/100^e du volume

b) Quadrillage de Thoma (fig. 78)

DANS CE CADRE

Académie : Session :

Examen ou Concours Série* :

Spécialité/option* : Repère de l'épreuve :

Épreuve/sous-épreuve :

NOM :
(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms :

Né(e) le :

N° du candidat

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

* Uniquement s'il sagit d'un examen.

NE RIEN ÉCRIRE

ANNEXE 2

(à rendre avec la copie)

TABLEAU DE LECTURE DES TUBES APRÈS LA CENTRIFUGATION

Gamme de dilution en dermaseptine	**32 mg.mL^{-1}**	**16 mg.mL^{-1}**	**8 mg.mL^{-1}**	**4 mg.mL^{-1}**	**2 mg.mL^{-1}**	**1 mg.mL^{-1}**
Observation						
Interprétation (AH, HT, HI, HF)						

Témoins				
Observation				
Interprétation (AH, HT, HI, HF)				

DANS CE CADRE

Académie : Session :

Examen ou Concours Série* :

Spécialité/option* : Repère de l'épreuve :

Épreuve/sous-épreuve :

NOM :
(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms :

Né(e) le :

N° du candidat

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

* Uniquement s'il sagit d'un examen.

NE RIEN ÉCRIRE

Repère : BAE5BCM/3 **SESSION 2008** **Durée : 2 H 30**

Coefficient : 2

POSTE N° :

ANNEXE 3

(à rendre avec la copie)

RÉSULTATS DES NUMÉRATIONS

	Témoin AH	Tube choisi
Nombre de cellules comptées		
Nombre d'unités de comptage		
Concentration en cellules (N/mL)		
Pourcentage de cellules survivantes		
Pourcentage d'hémolyse		

Justification du calcul de la concentration en cellules :

Justification du calcul du pourcentage de cellules survivantes :

DANS CE CADRE

Académie : Session :

Examen ou Concours Série* :

Spécialité/option* : Repère de l'épreuve :

Épreuve/sous-épreuve :

NOM :
(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms :

Né(e) le :

N° du candidat

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

* Uniquement s'il sagit d'un examen.

NE RIEN ÉCRIRE

Repère : BAE5BCM/3 **SESSION 2008** **Durée : 2 H 30**

Page : 7/7 **Coefficient : 2**

POSTE N° :

ANNEXE 4

(à rendre avec la copie)

TABLEAU DE RÉSULTATS

Numéro de cupule	A_1	A_2	B_1	A_3	B_2	A_4	B_3	A_5	B_4	A_6	B_5	A_7
Dilution de l'échantillon X												
Échantillon X (% d'hémolyse)												

Numéro de cupule	D_1	D_2	E_1	D_3	E_2	D_4	E_3	D_5	E_4	D_6	E_5	D_7
Dilution de l'échantillon Y												
Échantillon Y (% d'hémolyse)												

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES

Épreuve E5 - Unité U53

Techniques de biologie cellulaire et moléculaire

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

Documents interdits - Calculatrice autorisée

ÉPREUVE E5. UNITÉ U53
Techniques de biologie cellulaire et moléculaire

ÉVALUATION DU POTENTIEL IRRITANT D'UN PRODUIT COSMÉTIQUE (40 points)

Les cultures cellulaires sont une alternative à l'expérimentation animale afin d'évaluer le potentiel irritant des produits cosmétiques.

1 - Évaluation de la cytotoxicité d'un shampoing sur les fibroblastes de cornée de lapin (17,5 points)

1.1 - Principe

L'évaluation de la cytotoxicité du produit testé est obtenue par la détermination de la concentration entraînant 50 % de mortalité (CI 50) à l'aide de la méthode de relargage du rouge neutre.

1.2 - Matériel et réactifs

- Échantillon de cosmétique (shampoing) noté **« Sh »** (1 mL).
- Fibroblastes de cornée de lapin, de lignée SIRC cat n° 2-552 (ATTC-CCL60 American Type Culture Collection) cultivés dans une microplaque 12 puits en milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal ; d'antibiotiques et de L glutamine. Les cellules sont maintenues en atmosphère humide contrôlée (37°C-5% CO2).
- Hotte à flux laminaire vertical.
- Microscope inversé.
- Incubateur à CO2 37°C Hygrométrie 90 %.
- Cellule de Malassez (schéma en **annexe 1**).
- Lecteur de microplaques.
- Micro-pipettes et embouts.
- Microplaque 96 puits non stériles ou barrette 8 puits.
- Chronomètre.
- Agitateur pour microplaque.
- Solution colorante (rouge neutre à 0,4 % dans de l'eau distillée stérile dilué au 1/80 dans le milieu de culture) (15 mL).
- Milieu de culture nutritif DMEM liquide + sérum de veau fœtal (SVF) (15 mL).
- Diluant hydrophile chlorure de sodium à 0,9 % (20 mL).
- Solution aqueuse de dodécyl sulfate de sodium à 0,2 % (m/m) (SDS) (2 mL).
- 5 tubes à hémolyse.
- Tampon phosphate PBS (100 mL).
- Solution de révélation (acide acétique glacial à 1 % dans de l'éthanol à 90°) 15 mL.

1.3 - Protocole opératoire

1.3.1 - Préparation des dilutions du produit à tester

Dans des tubes à hémolyse, préparer des dilutions à 5, 15, 25, 35 et 50 % (V/V) du shampoing testé **« Sh »**.

Diluant = chlorure de sodium à 0,9 %.

Volume final = 2 mL.

➥ **Effectuer la gamme de dilution en présence d'un examinateur.**

1.3.2 - Coloration cellulaire

Effectuer une observation macroscopique et microscopique de la culture cellulaire en microplaque fournie.

Éliminer le milieu de culture à l'aide d'une pipette automatique.

Dans chaque puits introduire 1 mL de solution de rouge neutre.

Laisser agir 1 heure à 37°C.

Éliminer l'excès de solution colorante à l'aide d'une pipette automatique.

Déposer 1 mL de milieu de culture complet et laisser 30 minutes à température ambiante.

1.3.3 - Contact avec le produit

Éliminer le milieu de culture à l'aide d'une pipette automatique.

Rincer chaque puits avec 2 mL de PBS.

Déposer 0,5 mL des dilutions du shampoing à tester selon le plan de plaque donné en **annexe 2**. Le temps de contact est de 30 secondes (déclancher le chronomètre au moment du dépôt et agiter la microplaque manuellement pendant toute la durée du traitement ; compte tenu du temps de contact très court, il est conseillé d'effectuer cette opération puits par puits.

Après 30 secondes de contact, aspirer la dilution testée.

Effectuer 5 rinçages successifs avec 2 mL de PBS.

Réaliser deux témoins :
- un témoin négatif : diluant (chlorure de sodium) temps de contact 30 secondes,
- un témoin positif : solution de SDS à 0,2 % temps de contact 30 secondes.

Après traitement complet de la microplaque, déposer 1 mL par puits de la solution de révélation (acide acétique dans éthanol). Agiter la microplaque modérément pendant 15 minutes.

1.3.4 - Lecture

Transférer 0,2 mL à partir de chaque puits de la microplaque de 12 puits dans une plaque de microtitration (96 puits ou barrette 8 puits).

Mesurer l'absorbance de chaque puits à 540 nm contre l'air.

1.4 - Compte-rendu

Compléter les tableaux de résultats donnés en **annexe 3** (à rendre avec la copie).

Tracer la courbe du % de mortalité cellulaire en fonction de la concentration du produit testé, en déduire la CI 50.

2 - Préparation de la suspension de cellules de cornée de lapin (22,5 points)

Afin de conserver les fibroblastes pour une utilisation ultérieure, une numération de cellules est réalisée.

2.1 - Matériel et réactifs

Sous la hotte à flux laminaire :

- Pipettes graduées stériles de 10 mL.
- Pipettes graduées stériles de 2 mL.
- Tubes à hémolyse stériles.
- 1 flacon de PBS stérile (30 mL).
- 1 flacon de trypsine (2,5 mL).
- 1 flacon de DMEN + SVF (12 mL).

Sur le poste de travail dans le laboratoire de biologie :

- 1 hématimètre de Malassez et une lamelle.
- Bleu de Funck.
- Pipettes automatiques P_{1000} et P_{100} et embouts.
- Suspension cellulaire « C » à dénombrer (0,5 mL) à demander par le candidat.

Dans la salle de culture cellulaire:

- 1 flacon de culture de fibroblastes de cornées de lapin en monocouche dans du DMEM + SVF.

2.2 - Protocole opératoire

2.2.1 - Travail sous la hotte

➥ L'ordre de passage sous la hotte sera indiqué au candidat en début d'épreuve (20 minutes maximum).

Éliminer le surnageant.

Réaliser un lavage du tapis cellulaire avec 10 mL de PBS stérile.

Introduire 2 mL de trypsine. Laisser agir à température ambiante, surveiller le décollement.

Ajouter 10 mL de DMEM avec 10 % de SVF.

Transférer 1 mL de la suspension dans un tube à hémolyse stérile.

2.2.2 - Numération de la suspension cellulaire et calcul de la prise d'essai nécessaire

À partir de la suspension fournie dans le tube à hémolyse, réaliser la numération des cellules viables en cellule de Malassez après dilution au ½ dans le bleu de Funck.

➥ Présenter un champ microscopique à un examinateur.

2.3 - Compte-rendu

Présenter les résultats de la numération sous forme de tableau.

Calculer la concentration en cellules vivantes.

Calculer le volume de suspension cellulaire apportant X cellules viables (la valeur X sera donnée en début d'épreuve).

ANNEXE 1

SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ

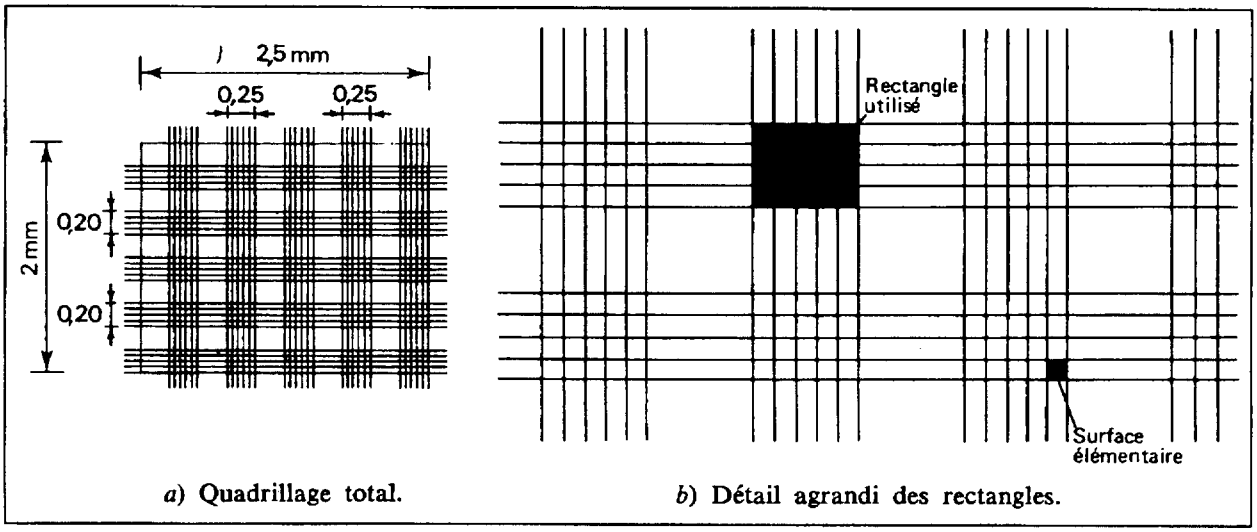


FIG. 77 — Quadrillage de Malassez utilisé pour la numération.

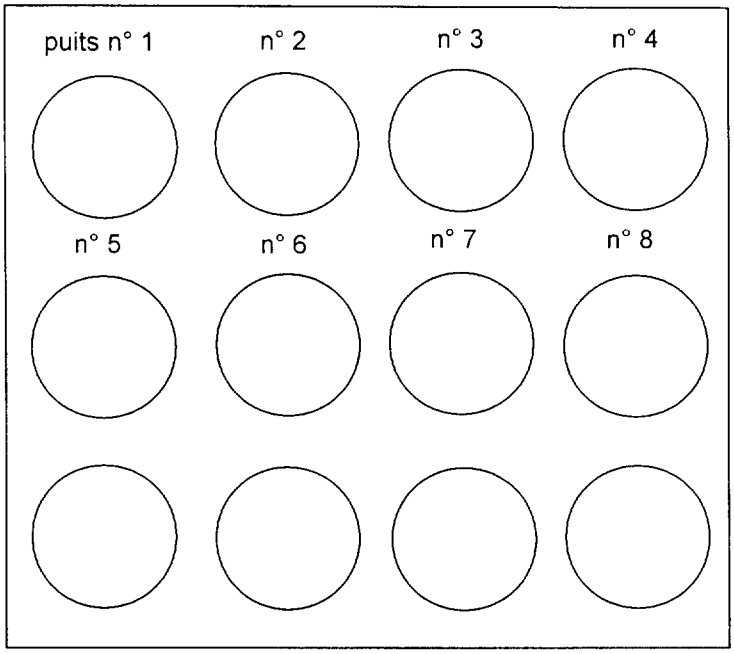
Caractéristiques de la cellule de Malassez

Profondeur	0,2 mm ± 0,002 mm
Surface totale du quadrillage	5 mm^2
Volume total	1 mm^3
Surface des rectangles quadrillés	1/20^e de mm^2
Volume correspondant aux rectangles quadrillés	1/100^e de mm^3 soit 1/100^e du volume

b) Quadrillage de Thoma (fig. 78)

ANNEXE 2

PLAN DE PLAQUE



Puits n° 1	Témoin négatif
Puits n° 2	Témoin positif
Puits n° 3	« **Sh** » 5 %
Puits n° 4	« **Sh** » 15 %
Puits n° 5	« **Sh** » 25 %
Puits n° 6	« **Sh** » 35 %
Puits n° 7	« **Sh** » 50 %
Puits n° 8	« **Sh** » 50 %

DANS CE CADRE

Académie : Session :

Examen ou Concours Série* :

Spécialité/option* : Repère de l'épreuve :

Épreuve/sous-épreuve :

NOM :
(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms :

N° du candidat

Né(e) le :

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

* Uniquement s'il sagit d'un examen.

NE RIEN ÉCRIRE

ANNEXE 3
Feuille de résultat

(à rendre avec la copie)

Poste n° .....

1- Gamme de dilution du shampoing

Tubes	S1	S2	S3	S4	S5
Dilution du shampoing en %	5	15	25	35	50
Volume de shampoing (mL)					
Volume de diluant (mL)					

2- Résultats du test de cytotoxicité

Cupule	1 Témoin négatif	2 Témoin positif	3 5 %	4 15 %	5 25 %	6 35 %	7 50 %	8 50 %
Absorbance à 540 nm								
% mortalité								

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.