

SESSION 2020

**AGRÉGATION
CONCOURS INTERNE
ET CAER**

Section : BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE

PREMIÈRE ÉPREUVE

Durée : 6 heures

Le dictionnaire bilingue anglais français est autorisé.

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout autre dictionnaire et de tout matériel électronique (y compris la calculatrice) est rigoureusement interdit.

Si vous repérez ce qui vous semble être une erreur d'énoncé, vous devez le signaler très lisiblement sur votre copie, en proposer la correction et poursuivre l'épreuve en conséquence. De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, vous devez la (ou les) mentionner explicitement.

NB : Conformément au principe d'anonymat, votre copie ne doit comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé consiste notamment en la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de la signer ou de l'identifier.

INFORMATION AUX CANDIDATS

Vous trouverez ci-après les codes nécessaires vous permettant de compléter les rubriques figurant en en-tête de votre copie.

Ces codes doivent être reportés sur chacune des copies que vous remettrez.

► **Concours interne de l'Agrégation de l'enseignement public :**

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EAI	7100A	101	0809

► **Concours interne du CAER / Agrégation de l'enseignement privé :**

EAH	7100A	101	0809
------------	--------------	------------	-------------

Cette épreuve prend appui sur un dossier technique relatif à un problème biotechnologique. Elle permet d'évaluer les capacités du candidat à :

- mobiliser ses connaissances scientifiques et technologiques pour expliciter ou valider les solutions retenues ;
- utiliser une ressource proposée pour élaborer un support pédagogique permettant la transmission ou l'évaluation de connaissances et méthodes par les élèves à un niveau de formation déterminé.

Le candidat doit situer l'exercice dans un processus d'apprentissage et par rapport aux autres enseignements scientifiques ou technologiques qui lui sont associés.

Dans le sujet, les lettres **ST** identifient les questions mobilisant les compétences et connaissances scientifiques et technologiques, la lettre **P** identifie les questions d'ordre pédagogique.

Des extraits de référentiels et programmes des formations disciplinaires des filières S2TS et STS sont regroupés en annexe en fin de sujet (pages **20-21**).

Les sphéroïdes : vecteurs *in vivo* et modèles d'étude *in vitro*

Les sphéroïdes sont des structures pluricellulaires tridimensionnelles (3D) en suspension au sein desquelles se développent des interactions complexes entre les cellules. Du fait de leur architecture, la biodisponibilité en gaz respiratoires, nutriments et facteurs de croissance n'est pas la même pour toutes les cellules d'un sphéroïde. Des travaux suggèrent que les sphéroïdes pourraient constituer *in vivo* des vecteurs de dissémination de certains cancers ovariens. Sur un autre plan, ils sont utilisés comme modèle d'étude de tumeurs solides *in vitro*. En effet, les tumeurs solides sont des masses cellulaires complexes formées de cellules tumorales et de cellules stromales dont le micro-environnement ne peut pas être intégralement reproduit à l'aide de méthodes de culture conventionnelles. Les sphéroïdes tumoraux peuvent être ainsi utilisés pour la caractérisation de nouveaux traitements.

Le sujet comporte trois parties indépendantes. La première partie étudie certaines caractéristiques des cancers ovariens, la deuxième partie étudie certains facteurs qui participent à la formation de sphéroïdes *in vivo* et la troisième partie s'intéresse à différentes technologies d'obtention de sphéroïdes *in vitro* et à leur utilisation en pharmacologie.

1. Les cancers ovariens

La cancérogenèse correspond à l'ensemble des étapes qui conduisent, à partir de cellules saines, au développement puis à la dissémination de cellules cancéreuses. Dans certains cancers ovariens, il a été montré que les sphéroïdes interviennent lors des étapes de dissémination tumorale conduisant à la formation de métastases (**document 1**).

ST1 A l'aide du **document 1**, présenter sous forme d'un tableau les principales caractéristiques qui permettent de différencier des cellules ovariennes saines, tumorales et à potentiel métastatique.

P1 Proposer des activités permettant d'aborder la description des différentes étapes de la cancérogenèse ainsi que de définir les notions et termes médicaux pertinents, lors d'une séance de deux heures de cours de Biologie et Physiopathologie Humaines en Terminale ST2S. Expliquer le choix des activités et des documents utilisés en lien avec ces objectifs ainsi que les prérequis.

Il existe différents types de cancer de l'ovaire. Une des classifications repose sur le type cellulaire à l'origine de la tumeur. Parmi les cancers d'origine épithéliale, plusieurs sous-types ont été caractérisés. Le **document 2** présente quelques caractéristiques de deux sous-types de cancers épithéliaux ovariens, en particulier l'expression de biomarqueurs détectés par immunohistochimie sur des biopsies issues de patientes.

ST2 Présenter les caractéristiques d'un biomarqueur et argumenter l'intérêt de rechercher ces biomarqueurs dans des tumeurs.

Le **document 2** présente également certaines altérations génétiques de ces deux sous-types de cancers épithéliaux ovariens. Dans le cas des carcinomes séreux, une des altérations génétiques caractéristiques est la mutation du gène *TP53* qui code la protéine suppresseur de tumeur TP53 (ou p53).

Une technique de détection de mutations au sein d'un gène est la PCR-SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) présentée dans le **document 3A**.

ST3 Dégager le principe de la PCR-SSCP et argumenter le choix d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition non dénaturante.

ST4 Analyser les résultats de PCR-SSCP présentés dans le **document 3B**.

Le **document 3C** présente les résultats du séquençage réalisé sur un des échantillons.

ST5 Commenter les résultats présentés dans les **documents 3B et 3C** puis indiquer les avantages et les inconvénients des deux techniques utilisées pour détecter des mutations de gènes.

ST6 Présenter succinctement le principe d'une méthode plus récente qui permettrait d'obtenir le même type de résultats que ceux présentés dans le **document 3C**.

2. Mécanismes de formation des sphéroïdes *in vivo*

Un modèle murin syngénique a été mis au point afin d'étudier le développement de métastases et évaluer l'efficacité de thérapies antitumorales ovariennes.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de formation des sphéroïdes et leur structure, différentes expériences ont été réalisées. Des cellules ID8, issues d'un cancer épithélial ovarien et exprimant constitutivement la protéine fluorescente mCherry, ont été injectées dans la cavité péritonéale de souris femelles C57BL/6 dont la lignée myéloïde exprime constitutivement la GFP. Cette injection entraîne la formation de sphéroïdes au niveau du péritoine.

Dans un premier temps, des observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope à fluorescence (**document 4**).

ST7 Analyser les résultats présentés dans le **document 4** afin de préciser le déroulement des différentes étapes et les acteurs impliqués dans la formation des sphéroïdes.

Dans le cadre d'un projet mené en partenariat avec un laboratoire de recherche, un enseignant désire faire observer par ses étudiants des expériences similaires à celles

présentées dans le **document 4**. Il dispose au sein de son établissement scolaire d'un microscope à fluorescence dont les caractéristiques sont consignées dans le **document 5A**. Les spectres d'excitation et d'émission de différents fluorochromes sont présentés dans le **document 5B**.

ST8 Parmi les expériences réalisées par le laboratoire de recherche, expliquer les observations potentiellement réalisables avec le microscope de l'établissement.

Dans les cancers ovariens, des macrophages associés aux tumeurs (TAM, *Tumor Associated Macrophage*) ont été identifiés comme pouvant avoir une influence sur l'évolution de la tumeur. Néanmoins, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent à préciser. L'importance des macrophages dans le développement de tumeurs est étudiée dans le **document 6**.

ST9 Indiquer le (ou les) témoin(s) à réaliser afin de pouvoir valider les résultats de l'expérience présentés dans le **document 6**.

ST10 Montrer en quoi les résultats du **document 6** sont en cohérence avec ceux obtenus dans les expériences présentées dans le **document 4**.

Les **documents 7 et 8** portent sur l'étude des mécanismes de formation des sphéroïdes dans ce modèle murin syngénique.

Un taux élevé d'EGF (*Epidermal Growth Factor*) a été mesuré dans les ascites des souris qui ont développé des sphéroïdes. Afin de comprendre l'origine et le rôle de cet EGF, des expériences utilisant notamment la technique des siRNA (*small interfering RNA*) ont été réalisées. Les résultats sont présentés dans le **document 7**.

ST11 Présenter le principe général de la technique utilisant des siRNA en précisant les acteurs moléculaires mis en jeu. Comparer cette technique à une technique de votre choix permettant l'inactivation d'un gène.

ST12 Discuter de l'intérêt d'utiliser l'erlotinib lors des expériences réalisées.

ST13 Préciser l'intérêt de la détection de la GAPDH dans l'expérience présentée dans le **document 7C**.

ST14 Indiquer les conclusions qui peuvent être tirées de l'ensemble des expériences présentées dans le **document 7**.

La protéine ICAM-1 est une protéine d'adhérence capable de se lier aux intégrines $\alpha_M\beta_2$ exprimées à la surface des macrophages. Elle intervient dans les interactions cellule-cellule. Son expression dans les cellules ID8 a été étudiée. Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 8**.

ST15 Interpréter les résultats présentés dans le **document 8**.

ST16 A partir des résultats mis en évidence dans les expériences présentées dans les **documents 4, 6, 7 et 8**, construire un schéma de synthèse reprenant les événements moléculaires et cellulaires mis en jeu lors de la formation de sphéroïdes dans le cas d'un cancer ovarien.

P2 Elaborer un document, destiné à des étudiants en STS, comparant les techniques immunologiques mises en œuvre au cours de cette étude (ELISA, immunofluorescence, Western Blot).

3. Utilisation de sphéroïdes obtenus *in vitro*

La formation de sphéroïdes *in vitro* est une méthode de culture 3D reconnue et développée pour tenter de mieux appréhender la complexité structurale et l'hétérogénéité des tissus tumoraux. Les sphéroïdes ainsi formés *in vitro* peuvent alors servir d'outils pour la caractérisation et l'évaluation de l'efficacité de nouveaux traitements antitumoraux.

Le **document 9** présente l'organisation structurale d'un sphéroïde formé à partir de la culture de cellules en 3D.

ST17 Montrer en quoi le sphéroïde représente un modèle pertinent pour l'étude de l'action d'agents antitumoraux.

ST18 Présenter les conditions nécessaires à la culture de cellules animales *in vitro* (matériel, facteurs nutritionnels et physico-chimiques). Puis, à l'aide du **document 10**, préciser le principe général des techniques de culture 3D.

Le **document 11** contient un extrait du cahier de prévention du CNRS qui présente les critères d'évaluation des risques liés aux cultures cellulaires.

P3 Argumenter la faisabilité en STS d'une culture 3D après avoir identifié les critères d'évaluation des risques. Proposer une application pédagogique permettant d'illustrer l'intérêt d'utiliser des cultures 3D.

Le **document 12** présente l'étude de la viabilité cellulaire de deux lignées cellulaires (LK0902 et LK0917) cultivées en monocouche (2D) ou sous forme de sphéroïdes (3D) en présence de deux agents antitumoraux (cisplatine et cetuximab).

ST19 Analyser les résultats présentés et discuter la pertinence du modèle sphéroïde dans l'étude de l'efficacité de traitements antitumoraux.

Document 1 : cancers de l'ovaire et sphéroïdes

Adapté de Larsen C.-J., Sphéroïdes : le modèle de référence pour la culture *in vitro* des tumeurs solides ? *Bulletin du cancer*. 2018; 105(1): 25-34.

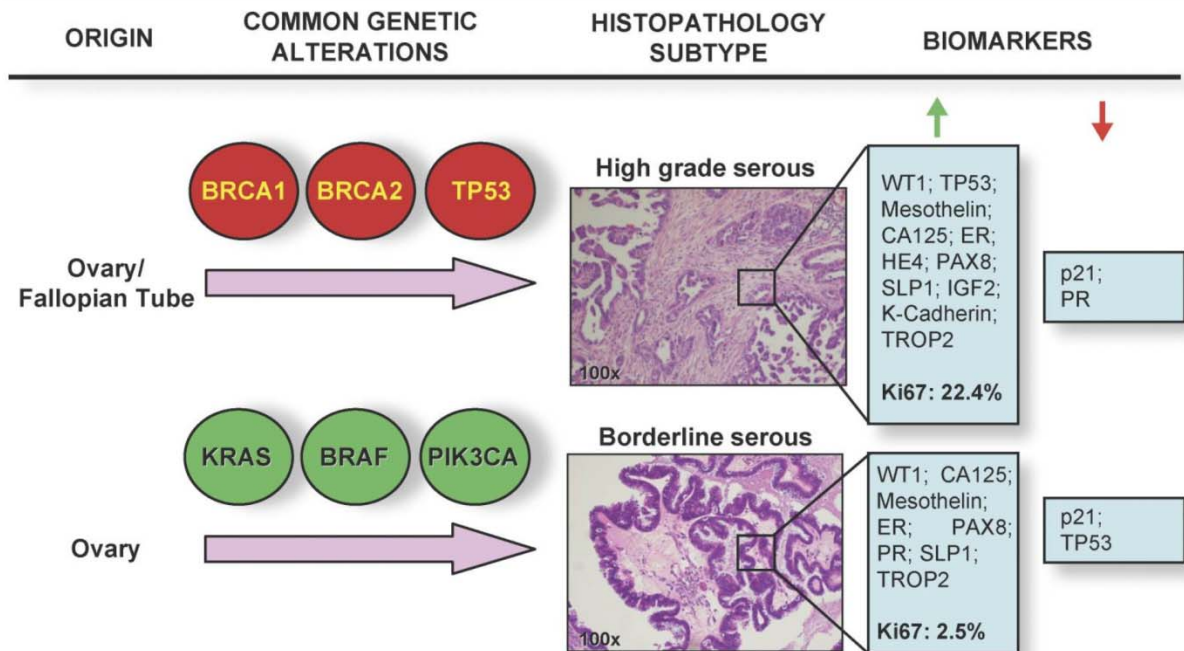
Les cancers ovariens font partie des tumeurs humaines de sombre pronostic car le diagnostic est assez rarement effectué au cours des premiers stades de la tumeur (stades I et II) lorsque celle-ci, encore peu développée, offre une survie à cinq ans supérieure à 92 %. En revanche, le pourcentage de survie tombe à moins de 10 % pour les stades III et IV et, selon des études récentes, cette valeur n'a guère progressé de plus de 2 % au cours des dix dernières années. L'explication la plus souvent évoquée pour rendre compte de ce pronostic sombre est principalement la dissémination intrapéritonéale (ou carcinose péritonéale) et pelvienne consécutive, entre autres raisons, à une impossibilité de la chirurgie à éliminer la totalité des cellules cancéreuses potentiellement amenées à se disséminer. Cette situation justifie donc amplement la réalisation d'études complémentaires visant à caractériser les différentes étapes de la dissémination tumorale et de la formation de métastases afin de pouvoir éliminer les cellules tumorales avant qu'elles n'envahissent ces organes (péritoine, pelvis) et n'aillent ensuite former, dans d'autres tissus, des métastases.

Ces différentes étapes ont été subdivisées ainsi :

- des cellules tumorales se détachent de leur site de développement initial et acquièrent une résistance à l'anoïkis. On rappelle que l'anoïkis est une forme de mort cellulaire programmée qui se déclenche lorsque des cellules normalement adhérentes (ex : cellules épithéliales) perdent tout contact avec leurs cellules voisines et la matrice extracellulaire. Cette mort permet ainsi de limiter la colonisation de sites inappropriés ;
- elles échappent à la surveillance immunitaire et subissent une transition épithélio-mésenchymateuse au terme de laquelle elles génèrent des structures multicellulaires sphéroïdes ;
- une ascite se forme qui accueille les sphéroïdes et les véhicule sur différents sites potentiels de formation de métastases.

Document 2 : diversité histologique et moléculaire des cancers de l'ovaire

Extrait de Lawrenson K. et al., Ovarian cancer: a clinical challenge that needs some basic answers. *PLoS Medicine*. 2009; 6(2): e1000025.



Ce document présente des caractéristiques histologiques et moléculaires de deux tumeurs épithéliales ovariennes : les tumeurs séreuses de haut grade et les tumeurs séreuses « *borderline* ».

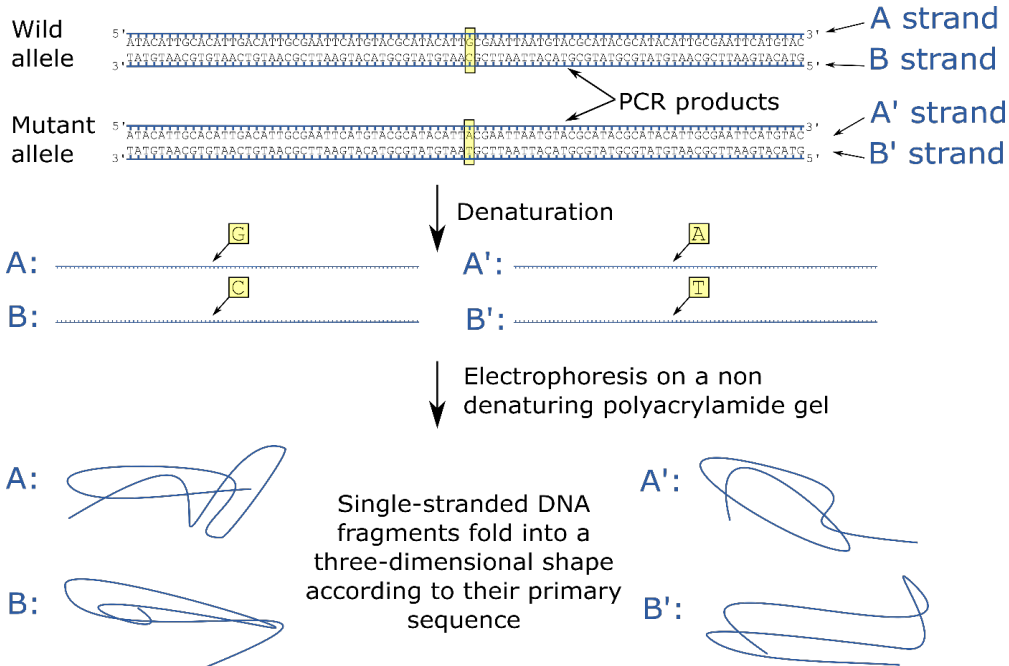
Selon le sous-type de cancer épithélial ovarien, les altérations génétiques varient. Les pastilles rouges indiquent des mutations inactivatrices et les pastilles vertes des mutations activatrices.

L'aspect histologique est également montré à l'aide de coupes marquées à l'hématoxyline et à l'éosine. Enfin, une liste de biomarqueurs surexprimés (tests positifs dans 60 % des tumeurs, flèche verte) ou sous-exprimés (flèche rouge) dans ces sous-types est indiquée. L'indice Ki67, qui indique la proportion de cellules prolifératives, est précisé pour les deux sous-types.

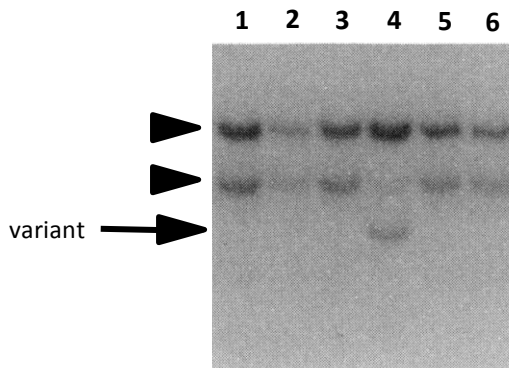
Document 3 : détection de mutations impliquées dans des cancers de l'ovaire par la technique de PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism)

Extrait de Kupryjańczyk J. et al., p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90(11): 4961-5.

A. Principales étapes de la PCR-SSCP

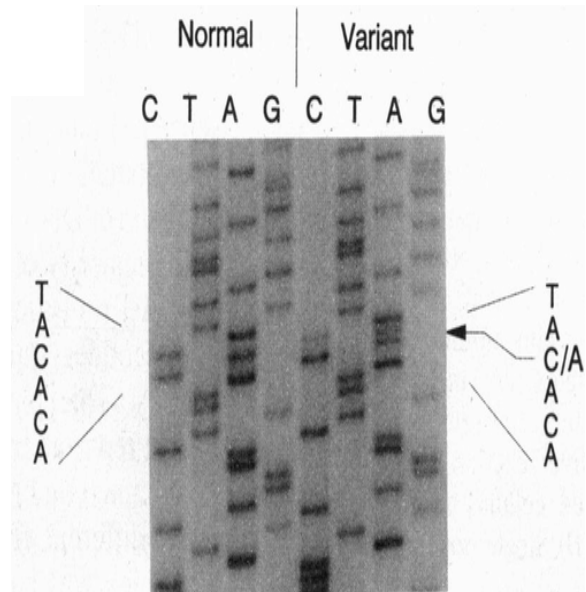


B. Analyse par PCR-SSCP de l'exon 8 du gène TP53 dans 6 biopsies de tumeurs ovariennes humaines



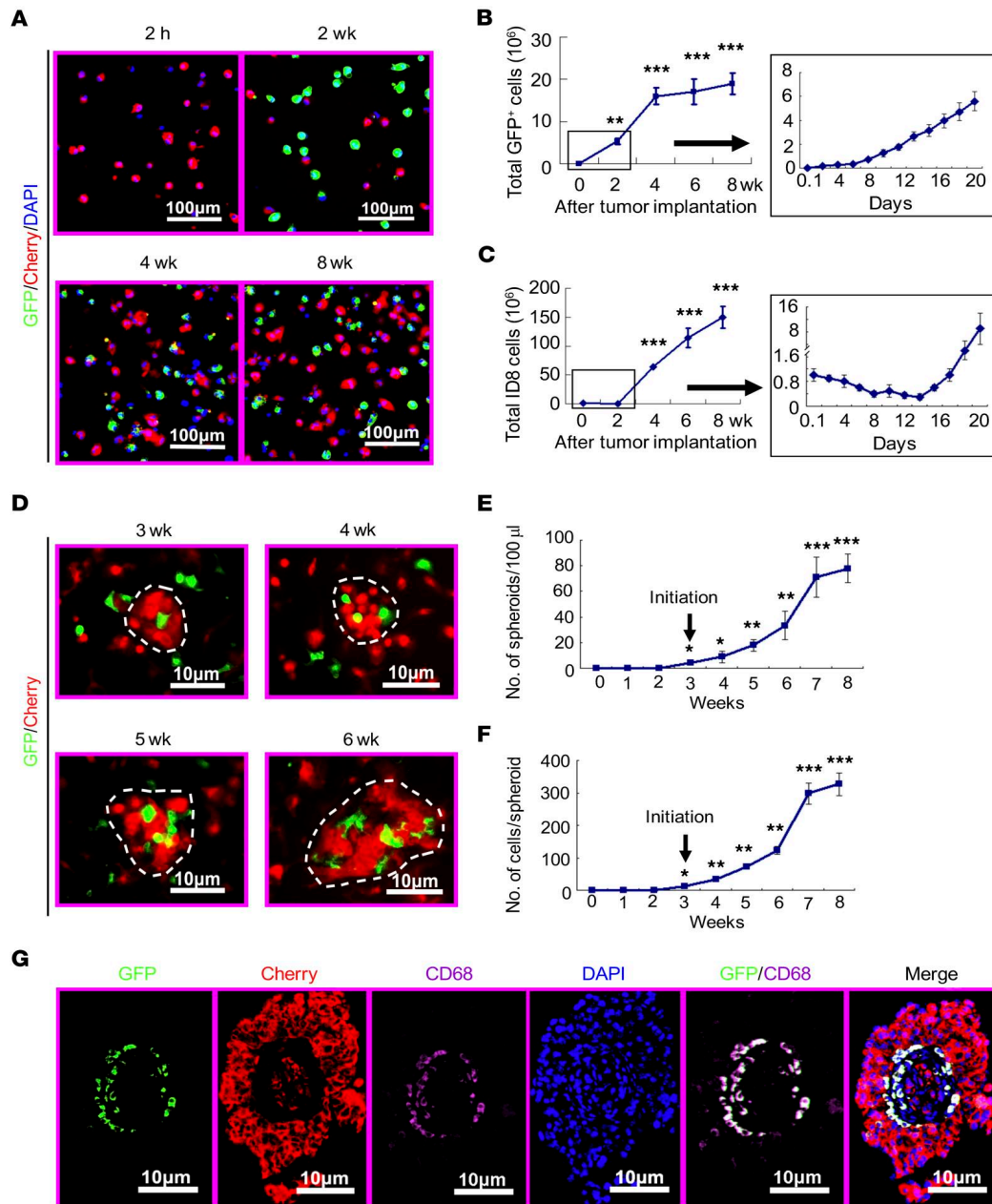
L'exon 8 du gène TP53 a été amplifié par PCR. Les produits de PCR ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 6 % non dénaturant. Les bandes correspondant aux fragments de PCR de l'exon non muté sont indiquées par une pointe de flèche ; l'allèle muté (piste 4) est indiqué par une flèche.

C. Gel de séquençage d'un fragment d'ADN non muté (normal) et du variant mis en évidence dans le document 3B.



Document 4 : cinétique de formation des sphéroïdes et partenaires impliqués

D'après Yin M. et al., Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(11): 4157–73.



ID8 stably expressing mCherry fluorescent protein were implanted into mice. Cherry⁺ (tumor cells) and GFP⁺ (myeloid cells including macrophages) cells infiltrated into the peritoneal cavity were detected at 2, 4, 6, and 8 weeks after tumor cell implantation.

(A) Peritoneal cells were smeared on slides and were observed under a fluorescence microscope.

(B) The total number of GFP⁺ cells was quantified. Inset shows cell counting between days 0–20.

(C) The total number of Cherry⁺ tumor cells was quantified.

(D–G) Macrophage and spheroid formation.

Total number of spheroids (spheroids/100 µL ascites) (E) and size of spheroids (number of cells/spheroid) (F) were quantified. Initiation of spheroid formation at week 3 is indicated by an arrow.

(G) Spheroids collected at week 8 were subjected to immunostaining with APC-conjugated (647 nm) anti-CD68 and DAPI, followed by confocal imaging. GFP⁺ and CD68⁺ macrophages, Cherry⁺ tumor cells, and DAPI for nuclear staining are shown.

Document 5

A. Caractéristiques techniques du microscope à fluorescence de l'établissement considéré

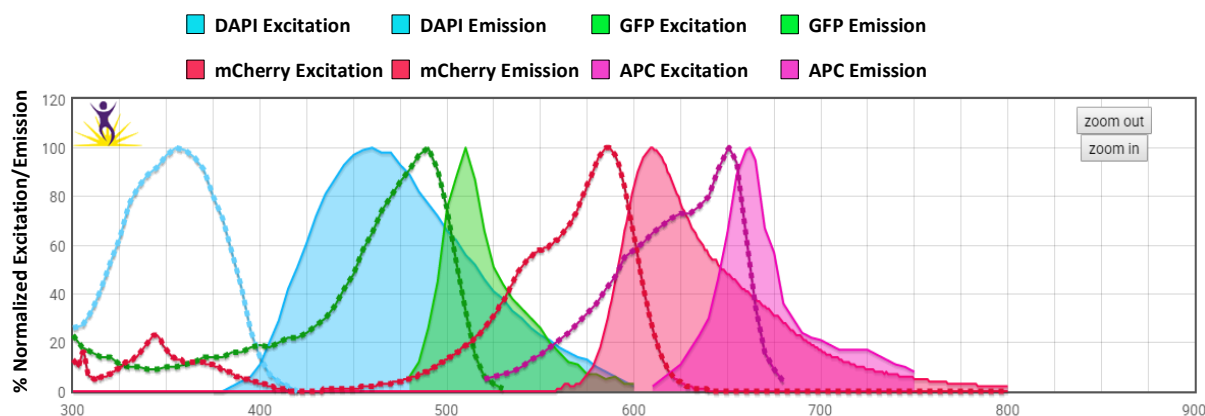
Partie	Description
Système optique	Longueur mécanique du tube: IOS - Système optique corrigée à l'infini ; distance parafocale de 45 mm.
Tête	Trinoculaire, inclinée à 30°, rotative sur 360°. Réglage diotrique ; distance interpupillaire réglable de 55-75 mm.
Oculaires	Grand Champ WF10x/20 mm.
Révolver	5-positions, inversé. Par roulements de billes linéaires.
Objectifs	IOS Plan achromatique 4x/0.1, 10x/0.25, 20x/0.40, 40x/0.65 and 50x/0.75 (sans couvre lame).
Platine	Double niveau avec sur-platine mécanique, 160x142 mm ; rang de mouvement de 76x52 mm.
Système de mise au point	Mécanisme à crémaillère et pignon, avec boutons de mise au point macrométrique et micrométrique coaxial. Mise au point fine graduée 0.002 mm. Rang de mouvement vertical: 20 mm. Contrôle de tension sur le côté droit ; arrêt de la platine supérieure sur le côté gauche
Condenseur	De type Abbe, centrable avec double lentille. O.N 1.25. Equipé d'un diaphragme à iris, d'un filtre bleu et d'un support de filtre. Réglable en haute par un mécanisme à crémaillère et pignon.
Illumination	X-LED™ pour éclairage transmis. LED blanc de grande puissance pour l'épi-fluorescence (pour utilisation standard des filtres B & G).

Kit de filtres standards

Nom	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Coupure du miroir dichroïque (nm)	Filtre d'émission (nm)
B (Bleu)	450 – 480	500	515
G (Vert)	510 – 550	570	590

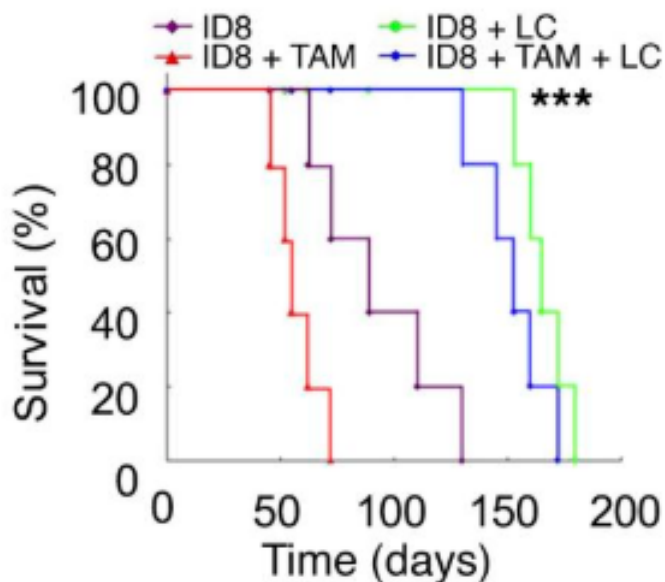
B. Spectres d'excitation et d'émission de différents fluorochromes

D'après le « *Fluorescence Spectra Analyzer* » de BioLegend®



Document 6 : rôle des TAM dans la progression tumorale

D'après Yin M. et al., Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(11): 4157–73.



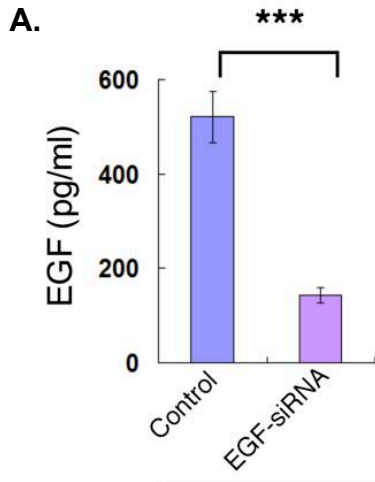
Des cellules ID8 ont été injectées dans la cavité péritonéale de souris femelles C57BL/6 ayant été traitées ou non avec le réactif LC¹ (groupes ID8 ou ID8+LC) et ayant reçu ou non des TAM² provenant de sphéroïdes (ID8+TAM ou ID8+TAM+LC). Le suivi de la survie des animaux a été effectué sur une durée de 180 jours.

¹ LC : Liposome Clodronate. Les liposomes sont phagocytés par les macrophages et permettent la délivrance du clodronate à l'intérieur des cellules. L'accumulation de clodronate induit l'apoptose des macrophages.

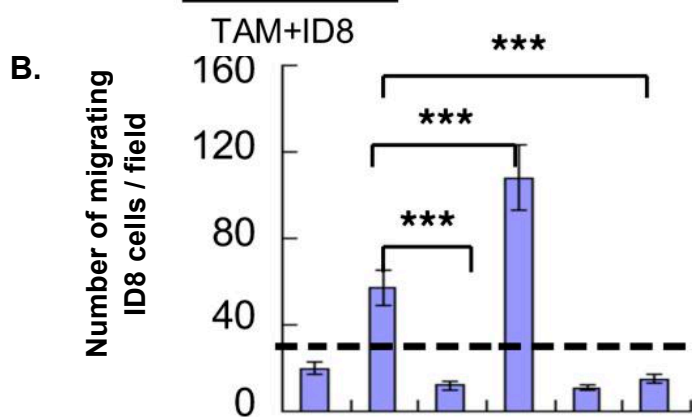
² TAM : Tumor-Associated Macrophages

Document 7 : rôle de l'EGF dans la formation des sphéroïdes

D'après Yin M. et al., Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(11): 4157–73.



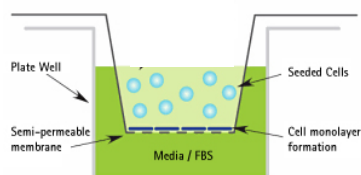
A. Des TAM, transfectés avec un siRNA contrôle ou dirigé contre l'EGF, ont été co-cultivés avec des cellules ID8. La concentration en EGF sécrété dans le milieu de culture est alors analysée par ELISA.



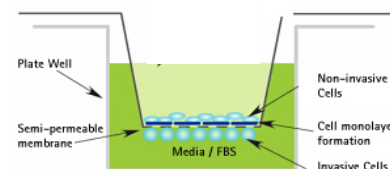
B. Test de migration de cellules ID8. Des cellules ID8 ont été mises en culture dans la partie supérieure d'une chambre de migration. Des TAM (transfectés au préalable avec un siRNA contrôle ou dirigé contre l'EGF) ou de l'EGF (20 ng.mL⁻¹) ou un inhibiteur de l'EGFR (erlotinib à 20 µM) ont été ajoutés ou non dans la partie inférieure de la chambre de migration. Après 12 heures de culture, les cellules ID8 ayant migré dans la partie inférieure sont fixées, colorées et dénombrées.

TAM (control siRNA)	-	+	-	-	-	+
TAM (EGF-siRNA)	-	-	+	+	-	-
EGF	-	-	-	+	-	-
erlotinib	-	-	-	-	+	+

1. Load cell suspension into plate well insert.

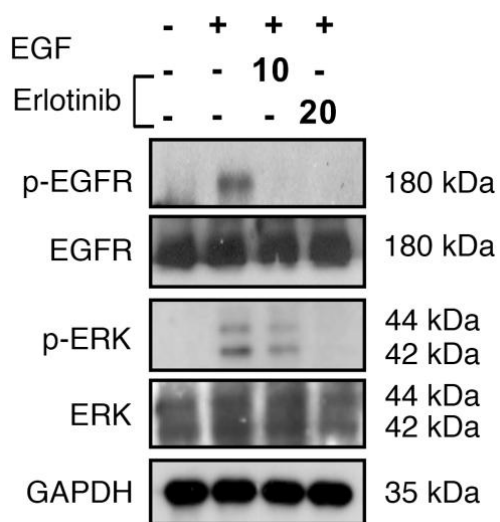


2. Invading cells migrate and attach to bottom membrane. Non-invading cells remain above.



Principe de la chambre de migration : celle-ci est suspendue dans un puits plus large contenant du milieu de culture et/ou des molécules chemo-attractantes et/ou des agents pharmacologiques et/ou d'autres cellules en culture. Elle possède sur sa face inférieure une membrane poreuse. Les cellules dont on veut étudier la migration sontensemencées dans la chambre et ont la capacité de migrer, au travers de pores, vers l'autre côté de la membrane poreuse. Les cellules ayant migré sont alors colorées et dénombrées.

C.



C. Des cellules ID8 ont été incubées en présence ou en absence d'EGF (20 ng.mL⁻¹) ou d'erlotinib (10 ou 20 μM) pendant 12 heures. Les cellules ont été lysées, leurs protéines séparées par électrophorèse et analysées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la GAPDH ¹, ainsi que les formes phosphorylées (i.e. activées) ou non de l'EGFR et d'ERK ².

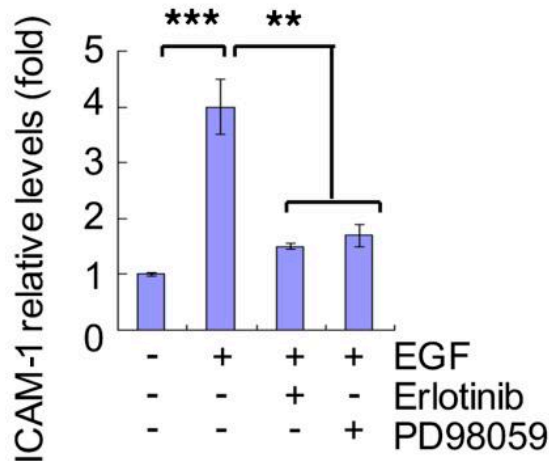
¹ GAPDH : Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

² ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase* (protéine de la famille des MAP kinases)

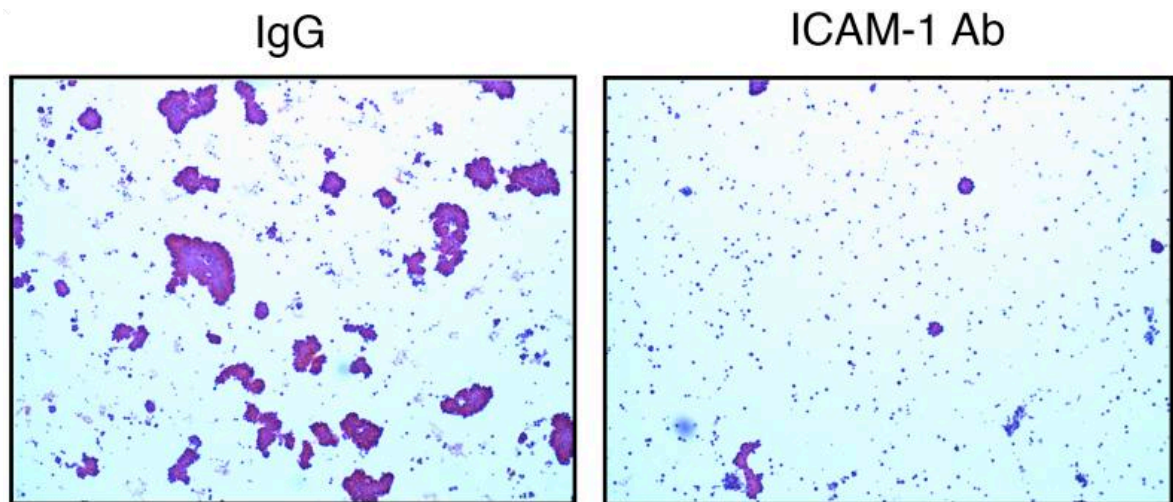
Document 8 : étude du rôle de ICAM-1 dans la formation de sphéroïdes

D'après Yin M. et al., Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(11): 4157–73.

A.



B.



A. Des cellules ID8 ont été incubées pendant 24 heures en présence ou non d'EGF ($20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), d'erlotinib ¹ ($20 \mu\text{M}$) ou de PD98059 ² (10 nM). Les cellules ont été lysées et les quantités relatives de la protéine ICAM-1 ont été analysées par Western Blot.

B. Des cellules ID8 ont été injectées par voie intrapéritonéale dans des souris C57BL/6A. Par la suite, des anticorps témoins (IgG) ou des anticorps neutralisants dirigés contre la molécule ICAM-1 murine (ICAM-1 Ab) ont été injectés dans la cavité péritonéale des souris. La présence de sphéroïdes est déterminée par une coloration H&E (hématoxyline et éosine).

¹ erlotinib : inhibiteur de l'EGFR

² PD98059 : inhibiteur de la voie ERK ³

³ ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase* (protéine de la famille des MAP kinases)

Document 9 : structure d'un sphéroïde *in vitro*

D'après Cui X. et al. Advances in multicellular spheroids formation. *J. R. Soc. Interface.* 2017;14(127). pii: 20160877.

Les sphéroïdes multicellulaires (MCS) peuvent avoir, au terme de leur formation *in vitro*, plusieurs structures. Les plus classiques ont une structure en trois couches dans lesquelles les cellules sont asynchrones et sont soit prolifératives, soit quiescentes, soit nécrotiques (voir figure ci-dessous). Les cellules prolifératives, localisées dans la bordure externe et exposées aux nutriments, au dioxygène et aux facteurs de croissance, ont un métabolisme actif. Les cellules localisées dans la zone médiane présentent un noyau condensé, des membranes déformées et sont dans un état quiescent caractérisé par un métabolisme réduit. Toutefois, elles peuvent redevenir actives en cas d'exposition à des nutriments. Enfin, les cellules de la zone centrale, correspondant au noyau nécrotique, ont des noyaux et des membranes fortement altérés. Elles ont perdu toute activité du fait de leur pénurie en nutriments et dioxygène et de l'accumulation de déchets métaboliques.



Morphologie d'un sphéroïde multicellulaire

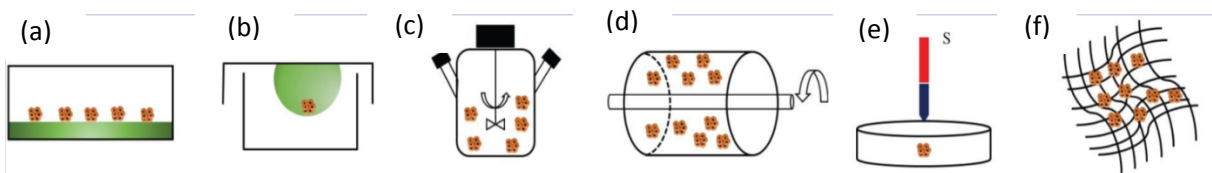
Les cellules colorées en vert sont prolifératives alors que les cellules colorées en rouge sont dans un état quiescent ou mortes. La structure 3D affecte la sensibilité aux agents pharmacologiques (« *drugs* »).

Document 10 : techniques d'obtention de sphéroïdes *in vitro*

A. Méthodes conventionnelles d'obtention de sphéroïdes à partir de cellules dispersées

D'après Cui X. et al. *Advances in multicellular spheroids formation. J. R. Soc. Interface.* 2017;14(127). pii: 20160877.

(a) Utilisation de supports non adhérents, (b) absence de support (goutte pendante), (c et d) cultures liquides agitées, (e) aimantation de cellules imprégnées d'oxyde de fer, (f) imprégnation dans des matrices naturelles (acide hyaluronique, collagène, chitosan...) ou synthétiques (PEG...).



B. Principales techniques de culture cellulaire en 3D

D'après Tostivint V. et al., *Progress in prostate cancer study: 3D cell culture enables the ex vivo reproduction of tumor characteristics. Presse médicale.* 2017; 46(10):954-65.

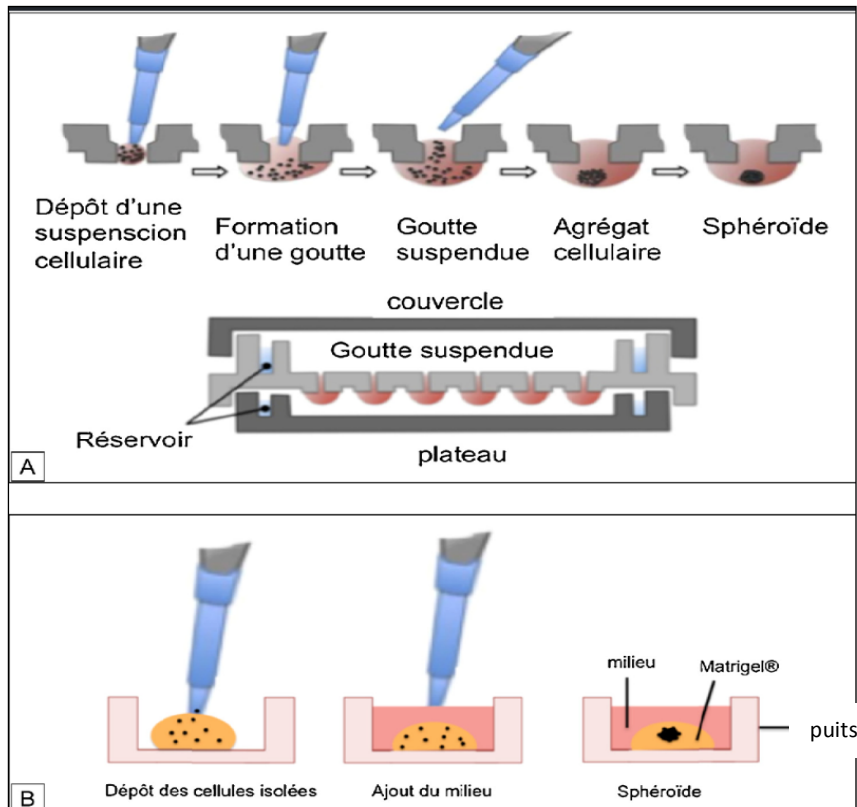


Figure A : Culture 3D sans support, par la méthode de la goutte suspendue, dans laquelle les cellules épithéliales isolées s'agrègent les unes aux autres dans leur milieu de culture.

Figure B : Le support le plus courant est une matrice d'hydrogel dérivé de l'animal. Au sein de cette matrice, les cellules isolées vont proliférer sous forme de sphère.

Document 11

D'après CNRS. Cahiers de prévention : risques biologiques. 2017, 4^{ème} édition

A. Risques liés aux cultures cellulaires

Le risque peut provenir des cellules mais également des techniques liées à leur culture (milieu, immortalisation, quantités utilisées, ...). Le risque présenté par les cultures primaires est très comparable à celui des échantillons biologiques : un exemple est le risque lié à la présence de micro-organismes pathogènes contaminants.

Le tableau ci-dessous présente les recommandations de niveau de sécurité biologique selon l'origine des cellules. Le risque des lignées est celui d'une réimplantation accidentelle chez le manipulateur induisant ainsi le développement d'une tumeur. Pour certaines lignées cellulaires, l'ATCC (American Type Culture Collection), par exemple, recommande un niveau de sécurité biologique associé (par exemple : niveau 2 pour HeLa, COS-1, HEK 293T, ...).

Origine des cellules		Niveau de sécurité biologique
Petits animaux de laboratoire (non infectés expérimentalement)		L1
Animaux sauvages (selon l'espèce et l'origine géographique)		L2 minimum
Bovins	tissus nerveux ou lymphoïdes, si statut sanitaire reconnu sans danger	L2
	autres tissus, si statut sanitaire reconnu sans danger	L1
	si soupçon d'encéphalopathie spongiforme	L3
Singes	si contrôles négatifs SIV, Herpès B, hépatites et tuberculose	L2
	si contrôles non faits ou positifs	L3
Hommes	absence de soupçon d'infection par un agent biologique des groupes 3 ou 4	L2
	soupçon d'infection par un agent biologique des groupes 3 ou 4	L3 ou L4

Tableau Niveau de sécurité biologique recommandé selon l'origine des cellules en culture (d'après l'Inserm)

B. Critères d'évaluation des risques

- **L'origine des cellules :**
Végétale, animale ou humaine.
- **La nature :**
 - cellules libres ou circulantes (cellules sanguines),
 - cellules provenant d'un tissu, d'un organe,
 - cellules saines ou tumorales ou infectées ou transformées ou transfectées.
- **Le type de culture cellulaire :**
 - culture primaire (nombre réduit de divisions) : le risque majeur est celui associé à l'existence d'agents infectieux,
 - culture de lignées cellulaires (durée de vie indéfinie) : elles proviennent de tumeurs spontanées ou de cellules transformées par immortalisation,
 - culture de cellules transfectées.
- **Le mode d'immortalisation (cas des cellules transformées) :**
 - par un oncogène,
 - par un virus (polyome, SV40, virus du sarcome de Rous, virus d'Epstein-Barr...),
 - par un produit chimique tel qu'un agent mutagène (nitrosoguanidine, méthanesulfonate d'éthyl...)

Le risque lié à la culture de cellules immortalisées est donc lié à l'agent utilisé pour l'immortalisation ainsi qu'à la possibilité d'une éventuelle production de cet agent (s'il est biologique) par les cellules.

- **Les milieux de culture :**
 - facteurs de croissance,
 - facteurs d'attachement,
 - autres additifs : vitamines, ions, hormones, protéines de transport, sérum d'origine humaine ou animale, sang, liquide amniotique, ...
 - agents promoteurs de tumeurs,
 - antibiotiques, antifongiques,
 - produits génotoxiques : thioguanine, aminoptérine.
- **La production par les cellules de :**
 - protéines, virus, parasites, bactéries.
 - la probabilité de pénétration, d'intégration et de division de cellules en culture suite à un accident est un risque difficile à évaluer. Pour cette raison, les cellules d'origine humaine, mais également simienne, devront toujours être traitées comme un échantillon biologique à risque.

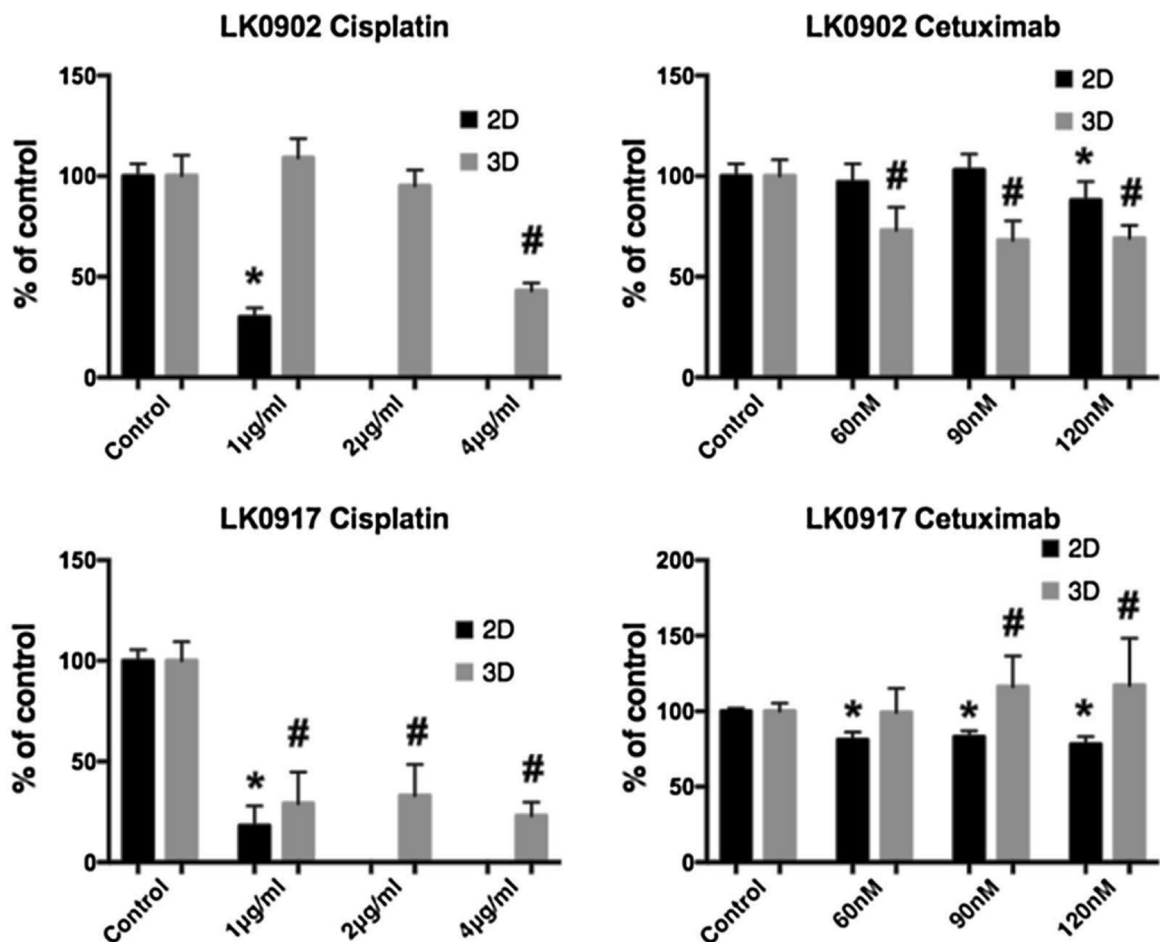
Document 12 : impact des conditions de culture sur la sensibilité de deux lignées cellulaires à deux agents antitumoraux

D'après Melissaridou S. et al. The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int.* 2019; 19:16.

Deux lignées de cellules de carcinomes humains (LK0902 et LK0917) ont été cultivées soit en monocouche bidimensionnelle (2D, culture en flacon, barres noires), soit sous forme de sphéroïdes (culture 3D, barres grises). Les cellules ont ensuite été traitées avec différentes concentrations de cisplatine ou de cetuximab. Le cisplatine est une molécule antitumorale qui bloque la division cellulaire en se liant à l'ADN. Le cetuximab est un anticorps monoclonal de souris bloquant le récepteur de l'EGF (*Epithelial Growth Factor*) surexprimé ou constitutivement activé dans certaines cellules cancéreuses.

La viabilité cellulaire, mesurée par essai colorimétrique au MTS, est exprimée en pourcentage du contrôle correspondant aux cellules non traitées. Les résultats pour chaque type de condition de culture (2D, 3D) sont représentés sous forme d'histogrammes.

Toutes les mesures ont été réalisées en triplicat et les données représentent la moyenne +/- l'écart-type. * $p < 0,05$ (2D) et # $p < 0,05$ (3D) selon le test de Student.



ANNEXES

Extrait du programme de Terminale ST2S en cours de Biologie et Physiopathologie Humaines

Terminologie :

Dans chaque pôle, la terminologie liée à l'étude des organes, de leurs fonctions et des pathologies associées est présentée. Elle comprend des racines et des termes médicaux.

Sont cités ci-dessous les principaux préfixes et suffixes qui doivent être connus à la fin du cycle terminal.

- **Préfixes** : a, anti, brady, dys, en, endo, eu, exo, hémi, hyper, hypo, macro, micro, oligo, ortho, poly, tachy.
- **Suffixes** : algie, centèse, cide, cyte, ectasie, ectomie, émie, gène, gramme, graphie, ite, logie, lyse, mégalie, ome, ose, pathie, pénie, plastie, plégie, ragie, rrhée, scopie, stomie, thérapie, tomie, trope, trophie, urie.

7.4 - Processus tumoral et cancer		
Tumeur bénigne et tumeur maligne	Définir une tumeur. Comparer tumeurs maligne et bénigne. Donner les propriétés des cellules cancéreuses. À l'aide de documents, décrire les différents stades de la cancérogenèse.	
Cancérogenèse ou oncogénèse Le cancer : une maladie plurifactorielle Prévention primaire	Relier l'apparition d'un cancer à la mutation de gènes impliqués dans le contrôle de la division cellulaire. Citer les principaux agents mutagènes et les relier aux actions de prévention primaire.	
Dépistage et diagnostic :		
Examens anatomopathologiques	Définir les examens anatomopathologiques et dégager leur intérêt médical.	
Contenus	Objectifs et indications complémentaires	
Dosage de marqueurs tumoraux et exploration par imagerie médicale	À partir d'exemples, montrer l'intérêt des méthodes d'investigation (dosage de marqueurs tumoraux, scintigraphie, radiographie, IRM, scanographie) en lien avec la prévention (dépistage et suivi).	
Principaux traitements : chimiothérapie anticancéreuse, radiothérapie, chirurgie	Donner le principe de la chimiothérapie et de la radiothérapie anticancéreuse et préciser leurs effets secondaires. Donner l'intérêt respectif de la chimiothérapie, de la radiothérapie et de la chirurgie anticancéreuses.	
Autres traitements	À partir de documents, énoncer l'existence d'autres traitements (immunothérapie, inhibiteur de la néoangiogenèse, hormonothérapie, greffe de moelle osseuse, etc.).	
Axes et notions centrales : ADN, allèle, cancer, chimiothérapie, code génétique, chromosome, cycle cellulaire, dosage de marqueurs tumoraux, examen anatomopathologique, gène, hérédité, IRM, maladie génétique, métastase, mutation, radiothérapie, scanographie, scintigraphie, tumeur		
Racines : adén(o), cancer(o), carcin(o), cary(o), chimi(o), nuclé(o), onc(o), radi(o), sarc(o)		
Termes médicaux : adénomégalie, allogreffe, alopécie, aplasie, biopsie, dysplasie, fibrome, frottis cervico-vaginal, hyperplasie, iatrogène, lymphome, métastase, monosomie, oncogène, néoplasie, polype, trisomie, tumeur, tumorectomie		

Extrait du référentiel du BTS Biotechnologie

<p>Utiliser des cellules eucaryotes supérieures comme support d'expérimentation ou de production</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Cytoculteur - Microscopes - Hotte à flux laminaire - Incubateur - Protocoles - Fiches techniques - Fiches de données de sécurité - Équipements individuel et collectif de sécurité 	<ul style="list-style-type: none"> - Exécution correcte de gestes techniques adaptés : dénombrement de cellules, ajustage d'une concentration cellulaire, préparation et observation microscopiques... - Utilisation correcte du matériel - Bonne gestion des consommables - Respect des conditions d'asepsie - Respect des procédures de sécurité - Absence de contamination - Analyse critique de l'observation et des résultats - Suivi de la culture et de la production en cytotuteur: prélèvement, contrôles macroscopique et microscopique, dosage, caractérisation... - Réponse technique adaptée aux aléas de mise en œuvre
--	---	---