

Tous les sujets des annales BioAC ont été collectés par Christine Benayoun et Christine Schneider, puis mis en page par Isabelle Livet.

Nous tenons à remercier les nombreux professeurs d'enseignement général et technologique qui nous ont fait parvenir les sujets et ont participé aux propositions des corrigés et à leur relecture : Mireille Chamoux, Monique Eldin, Michel Cherki, Michel Peyrot, Claudine Walther, Catherine Abada, Lucile Tiger, Fabien Cézard, Emmanuelle Grimal, André LeTexier, Françoise Latourre et Pascal Michaux

Table des Matières

TABLE DES MATIÈRES.....	1
RÈGLEMENT D'EXAMEN	4
SUJETS 2006.....	5
E1-U10 : ÉPREUVE D'ANGLAIS 2006.....	5
E2-U21 : MATHÉMATIQUES 2006.....	7
E2-U22 : SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES 2006.....	10
E3-U31 : BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006.....	14
E3-U32 : MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006.....	27
E3-U33 : BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006	33
E4-U40 : SCIENCES ET TECHNOLOGIES BIOINDUSTRIELLES 2006	39
E5-U51 : TP TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 2006.....	43
SUJET 1.....	43
SUJET 2.....	49
SUJET 3.....	53
SUJET 4.....	58
E5-U52 : TP TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 2006.....	63
SUJET 1.....	63
SUJET 2.....	68
SUJET 3.....	76
SUJET 4.....	80
E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2006 SUJET 1....	92
E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2006 SUJET 2.....	96
E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2006 SUJET 3 ...	100
E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2006 SUJET 4	105

SUJETS 2007	108
E1-U10 : ÉPREUVE D'ANGLAIS 2007	108
E2-U21 : MATHÉMATIQUES 2007.....	110
E2-U22 : SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES 2007.....	113
E3-U31 : BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007.....	118
E3-U32 : MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007	129
E3-U33 : BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007	137
E4-U40 : SCIENCES ET TECHNOLOGIES BIOINDUSTRIELLES 2007	144
E5-U51 : TP TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 2007 - SUJET 1	151
SUJET 2	157
SUJET 3	163
SUJET 4	171
E5-U52 : TP TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 2007	178
SUJET 1	178
SUJET 2	183
SUJET 3	192
SUJET 4	198
E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2007 SUJET 1	202
E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2007 SUJET 2.....	206
E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2007 SUJET 3.....	211
E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2007 SUJET 4.....	217
ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ - SUJETS 2006	222
ANGLAIS 2006	222
MATHÉMATIQUES 2006.....	223
SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES 2006.....	225
BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006	231
MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006	235
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006	239
SCIENCES ET TECHNOLOGIES BIOINDUSTRIELLES 2006	244

ÉLÉMENTS DE CORRIGÉ - SUJETS 2007	246
ANGLAIS 2007	246
MATHÉMATIQUES 2007	247
SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES 2007	250
BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007	257
BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007	261
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007	266
SCIENCES ET TECHNOLOGIES BIOINDUSTRIELLES 2007	269

Règlement d'examen

			Voie scolaire, apprentissage, formation professionnelle continue dans les établissements publics ou privés non habilités, enseignement à distance et candidats justifiant de 3 ans d'expérience professionnelle	Formation professionnelle continue dans les établissements publics habilités	
Epreuves	Unités	Coef	Forme	Durée	Forme
E1 Anglais	U10	2	ponctuelle écrite	2h	2 situations d'évaluation
E2 Mathématiques et sciences physiques et chimiques		5	ponctuelle écrite	4h	
Sous-épreuve de mathématiques	U21	2	ponctuelle écrite	2h	2 situations d'évaluation
Sous-épreuve de sciences physiques et chimiques	U22	3	ponctuelle écrite	2h	2 situations d'évaluation
E3 Biochimie, biologie et technologies d'analyse		9	ponctuelle écrite	8h	
Sous-épreuve de biochimie et technologies d'analyse	U31	3	ponctuelle écrite	3h	2 situations d'évaluation
Sous-épreuve de microbiologie et technologies d'analyse	U32	3	ponctuelle écrite	3h	2 situations d'évaluation
Sous-épreuve de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	U33	3	ponctuelle écrite	2h	2 situations d'évaluation
E4 Sciences et technologies bioindustrielles	U40	3	ponctuelle écrite	2h	2 situations d'évaluation
E5 Techniques d'analyses et de contrôles et opérations unitaires		10	Ponctuelle pratique	12h maxi	
Sous-épreuve : techniques de biochimie	U51	4	ponctuelle pratique	4h maxi	ponctuelle pratique
Sous-épreuve : techniques de microbiologie	U52	4	ponctuelle pratique	6h maxi	ponctuelle pratique
Sous-épreuve : techniques de biologie cellulaire et moléculaire	U53	2	ponctuelle pratique	3h maxi	ponctuelle pratique
E6 Soutenance de projet	U60	4	ponctuelle orale	45 min	1 situation d'évaluation
Epreuve facultative : langue vivante étrangère	UF1	1*	ponctuelle orale	20 min	ponctuelle orale

* Seuls les points au dessus de la moyenne sont pris en compte.

Sujets 2006

E1-U10 : ÉPREUVE D'ANGLAIS 2006	
Durée : 2 heures	Coefficient : 2

L'usage de la calculatrice est interdit. L'usage d'un dictionnaire bilingue est autorisé.

Children teach their parents a lesson in hygiene

It is 11 am, and the students of Marachipatti elementary school are queuing up in their courtyard. Girls and boys in two neat lines stand outside the school's white-pointed latrine block. They disappear inside. There is some vigorous hand washing. One by one they emerge into the sunlight before filing back to the classroom.

This is, of course, the toilet break. On the face of it there is nothing remarkable here – until you remember that this is rural India where there are few facilities of any kind, let alone toilets. The lack of proper sanitation is one of many obstacles Indian children face in their struggle for an education. Other factors include too few books, teachers who fail to turn up, and the requirement for children to work – like their parents – in the fields.

Until recently Marachipatti primary didn't have a latrine – nearly 85% of Indian schools are in the same dismal situation. Instead, the pupils would dash across the road and squat down in the thorn bushes. It could be a scary experience: "Sometimes snakes would come and disturb us. I would run away as quickly as possible", one 10-year-old girl, Vasanthi, explained.

The lack of sanitation brought other problems too. Pupils frequently suffered from diarrhoea. They also got hookworm. "In the past as many as 10 - 15 children would be absent because of illness," the school's assistant headteacher Mr Krishnan recalls.

This lamentable situation ended three years ago when the British charity WaterAid came up with an ingenious solution: it built a sanitation block for the school's 104 pupils – at the cost of \$410. More importantly, it asked the 5-to-10-year-old pupils to manage the block themselves.

The students organised themselves into different committees responsible for keeping the toilets clean, fetching water from the hand-pump outside and ensuring all pupils washed their hands with soap. Other students on the "tidy committee" looked after the school's modest grounds.

And it worked. "I tell the students to cut their nails, make sure their clothes are clean and to brush their teeth and comb their hair," Vasanthi, a member of the personal hygiene committee, explains.

The initiative brought striking results: pupils became healthier and suffered from fewer illnesses.

But, crucially, the pupils of Marachipatti primary took the message of hygiene awareness back into their homes. WaterAid's local health workers discovered it was far quicker, and more effective, to teach adults good hygiene practices via their children than to target them directly. "I told my mother and now she washes her hands with soap before cooking vegetables," Vasanthi pointed out.

It will take a long time before every Indian school enjoys the facilities that the children of Marachipatti now use during their twice-a-day breaks. In many other rural areas of India the government education system has virtually collapsed. School buildings are falling apart, teachers are absent or do not exist, and the dropout rates, especially among girls, are depressingly high. And yet the success of the WaterAid scheme points the way forward to a better future in which there is not just education for some of the world's poorest children, but sanitation too.

Adapted from *The Guardian Weekly*, Luke Harding

PREMIÈRE PARTIE : COMPRÉHENSION (10 points)

1. Faire un compte-rendu de l'article en français en mettant en évidence les idées essentielles. (environ 120 mots \pm 10%)
2. Traduire en français le texte de la ligne 36 ("It will take ...") à la ligne 42 ("... but sanitation too.")

DEUXIÈME PARTIE : EXPRESSION EN LANGUE ANGLAISE (10 points)

1. According to the article, teaching hygiene to the young is more effective than to adults. Why? Use your own words to answer the question. (60-80 words)
2. What should our priorities be for helping the world's poorest children? Give your opinion. (130 words \pm 10%).

E2-U21 : MATHÉMATIQUES 2006	
Durée : 2 heures	Coefficient : 2

La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

EXERCICE 1 : (12 points)

Les quatre parties de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

Une usine produit de l'eau minérale en bouteilles. Lorsque le taux de calcium dans une bouteille dépasse 6,5 mg par litre, on dit que l'eau de cette bouteille est calcaire.

Dans cet exercice, les résultats approchés sont, sauf indication contraire, à arrondir à 10^{-3} .

1- Loi binomiale et loi de Poisson

Dans un stock important de bouteilles, 7,5 % des bouteilles contiennent de l'eau calcaire.

On prélève au hasard 40 bouteilles dans le stock pour vérification du taux de calcium. Le stock est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 40 bouteilles.

On considère la variable aléatoire X qui, à tout prélèvement de 40 bouteilles, associe le nombre de bouteilles de ce prélèvement qui contiennent de l'eau calcaire.

1.1- Justifier que la variable aléatoire X suit une loi binomiale dont on déterminera les paramètres.

1.2- On considère que la loi suivie par X peut être approchée par une loi de Poisson. Déterminer le paramètre λ de cette loi de Poisson.

1.3- On désigne par X_I une variable aléatoire suivant la loi de Poisson de paramètre λ , où λ est la valeur obtenue au **1.2-**.

Calculer $P(X_I \leq 4)$.

Traduire le résultat obtenu à l'aide d'une phrase.

2- Loi normale

L'eau minérale provient de deux sources, notées "source 1" et "source 2". On rappelle que lorsque le taux de calcium dépasse 6,5 mg par litre dans une bouteille, l'eau de cette bouteille est dite calcaire.

On note Y la variable aléatoire qui, à chaque bouteille prélevée au hasard dans la production de la source 1, associe le taux de calcium de l'eau qu'elle contient. On suppose que la variable aléatoire Y suit la loi normale de moyenne 5 et d'écart type 1,5.

2.1- Calculer $P(Y \leq 6,5)$.

2.2- En déduire la probabilité que l'eau d'une bouteille prélevée au hasard dans la production de la source 1 soit calcaire.

3- Probabilités conditionnelles

On suppose que la probabilité qu'une bouteille prélevée au hasard dans la production d'une journée de la source 1 contienne de l'eau calcaire est $p_1 = 0,16$ et que la probabilité qu'une bouteille prélevée au hasard dans la production de cette journée de la source 2 contienne de l'eau calcaire est $p_2 = 0,10$.

La source 1 fournit 70 % de la production totale des bouteilles d'eau et la source 2 le reste de cette production.

On prélève au hasard une bouteille d'eau parmi la production totale de la journée. Toutes les bouteilles d'eau ont la même probabilité d'être tirées.

On définit les événements suivants :

A : "la bouteille d'eau provient de la source 1" ;

B : "la bouteille d'eau provient de la source 2" ;

C : "l'eau contenue dans la bouteille est calcaire".

3.1- Déduire des informations figurant dans l'énoncé :

$P(A)$, $P(B)$, $P(C/A)$, $P(C/B)$.

(On rappelle que $P(C/A) = P_A(C)$ est la probabilité de l'événement C sachant que l'événement A est réalisé.)

3.2- Calculer $P(C \cap A)$ et $P(C \cap B)$.

3.3- Déduire de ce qui précède $P(C)$.

3.4- Calculer la probabilité que l'eau contenue dans une bouteille provienne de la source 1 sachant qu'elle est calcaire.

4- Intervalle de confiance

Dans cette question, on s'intéresse au taux de calcium de l'eau d'une grande quantité de bouteilles devant être livrées à une chaîne d'hypermarchés.

On prélève au hasard et avec remise un échantillon de 100 bouteilles dans cette livraison.

Soit \bar{Z} la variable aléatoire qui, à tout échantillon de 100 bouteilles prélevées au hasard et avec remise dans la livraison, associe la moyenne des taux de calcium de l'eau contenue dans chacune des bouteilles de cet échantillon.

On suppose que \bar{Z} suit la loi normale de moyenne inconnue μ et d'écart type $\frac{\sigma}{10}$ avec $\sigma = 0,99$.

Pour l'échantillon prélevé, la moyenne obtenue, arrondie à 10^{-2} , est $\bar{x} = 5,37$.

4.1- A partir des informations portant sur cet échantillon, donner une estimation ponctuelle de la moyenne μ des taux de calcium de l'eau contenue dans chacune des bouteilles de la livraison.

4.2- Déterminer un intervalle de confiance centré sur \bar{x} de la moyenne μ des taux de calcium de l'eau contenue dans chacune des bouteilles de la livraison, avec le coefficient de confiance 95%. Arrondir les bornes à 10^{-2} .

EXERCICE 2 : (8 points)

Les parties 1 et 2 de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

1- Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) : $y' + 0,01y = 24$,

où y est une fonction de la variable réelle t , définie et dérivable sur $[0, +\infty[$ et y' sa fonction dérivée.

1.1- Déterminer les solutions sur $[0, +\infty[$ de l'équation différentielle (E₀) : $y' + 0,01y = 0$.

1.2- Déterminer la constante réelle a pour que la fonction g définie sur $[0, +\infty[$ par : $g(t) = a$ soit une solution particulière de l'équation différentielle (E).

1.3- En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E).

1.4- Déterminer la solution v de l'équation différentielle (E) qui vérifie la condition initiale $v(0) = 0$.

2- Etude d'une fonction et calcul intégral

Soit v la fonction définie sur $[0, +\infty[$ par $v(t) = 2400(1 - e^{-0,01t})$

2.1- Déterminer $\lim_{t \rightarrow +\infty} v(t)$.

2.2- On désigne par v' la fonction dérivée de la fonction v .
Calculer $v'(t)$ pour tout t de $[0, +\infty[$.

2.3- Déduire de ce qui précède le sens de variation de la fonction v sur $[0, +\infty[$.

2.4- Résoudre sur $[0, +\infty[$ l'équation $v(t) = 1200$.

Donner la valeur exacte de la solution, puis une valeur approchée arrondie à 10^{-1} .

3- Application des résultats de la partie 2

Un réservoir contient 60 m^3 d'eau destinée à abreuver du bétail.

Dans ce qui suit, t est le temps exprimé en heures.

A l'instant $t = 0$, se déverse dans le réservoir une eau polluée par une substance M .

Un système de trop plein permet de conserver à tout instant à partir de l'instant $t = 0$ un volume de 60 m^3 dans le réservoir.

On admet, qu'à l'instant t (exprimé en heures), le volume, **exprimé en litres**, de substance polluante M présente dans le réservoir est $v(t)$, où v est la fonction définie dans la partie 2.

3.1- La santé du bétail est menacée lorsque le volume de substance M dans le réservoir atteint 2 % du volume total du réservoir. Déduire d'un résultat obtenu à la partie 2 la valeur de t à partir de laquelle la santé du bétail est menacée par la présence dans le réservoir de substance M .

3.2- Le volume de substance M dans le réservoir peut-il dépasser 4% du volume du réservoir ? Justifier la réponse à l'aide d'un résultat de la partie 2.

E2-U22 : SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES 2006

Durée : 2 heures

Coefficient : 3

A : MICROSCOPIE (15 points / 60)

Un microscope optique comporte un oculaire de grossissement $\times 10$ et un objectif de grossissement $\times 40$. L'ouverture numérique ($n \sin U$) de l'objectif vaut 0,65 et l'intervalle optique (Δ) est de 16 cm. Ce microscope est modélisé par l'association de 2 lentilles convergentes, de même axe optique, et il est réglé pour donner une image $A'B'$ à l'infini d'un objet AB réel, perpendiculaire à l'axe optique.

- 1- Faire un schéma soigné du dispositif, sans respect d'échelle, montrant l'obtention de l'image intermédiaire A_1B_1 fournie par l'objectif et de l'image finale $A'B'$.
- 2- Définir le grandissement γ de l'objectif.
- 3- Calculer le grossissement commercial du microscope et sa puissance intrinsèque.
- 4- À l'aide du schéma de la question 1, démontrer la relation $|\gamma| = \Delta / f_1'$, avec f_1' distance focale image de l'objectif. En déduire la valeur de f_1' , puis calculer la valeur de f_2' , distance focale de l'oculaire.
- 5- À quelle distance du centre optique O_1 de l'objectif faut-il placer AB pour avoir l'image finale $A'B'$ à l'infini ?
- 6- Le pouvoir séparateur du microscope est donné par $\varepsilon = 0,6 \lambda / n \sin U$.
Si la longueur d'onde de la lumière est de 500 nm, est-il possible d'observer un staphylocoque de $1 \mu\text{m}$ à travers ce microscope ?

B : PRODUCTION D'ÉNERGIE NUCLÉAIRE PAR FUSION (15 points / 60)

Depuis 1985, un projet de coopération internationale pour la production d'énergie par fusion nucléaire est né. C'est le projet ITER (International Thermonuclear Experimental Reactor). L'objectif du projet ITER est de démontrer la possibilité scientifique et technologique de la production d'énergie par fusion des atomes. Le site choisi pour la mise en œuvre de ITER est le centre de recherche de Cadarache en France.

Parmi les réactions de fusion envisageables, se produit la réaction suivante : ${}^3_1X + {}^2_1Y \rightarrow {}^b_aZ + {}^1_0n$.

- 1- Déterminer les symboles chimiques X, Y, Z ainsi que les valeurs de a et b.
- 2- Où ont lieu les réactions de fusion dans l'univers ?
- 3- Le deutérium (2_1Y) peut être extrait de l'eau. (Environ 0,015 % de l'hydrogène dans l'eau existe sous forme de deutérium). Le tritium (3_1X) doit être fabriqué, car il n'existe pas en quantité suffisante dans la nature. Le tritium est radioactif bêta moins. Écrire l'équation de sa désintégration. Qu'est-ce qu'une particule bêta moins ?

4- La période radioactive du tritium est de 12,3 ans.

4.1- Déterminer la constante de radioactivité λ de ce nucléide.

4.2- On prépare 0,10 g de tritium en vue de réactions de fusion.

Calculer le nombre de noyaux contenus dans cet échantillon.

4.3- L'échantillon reste inutilisé pendant 30,0 ans.

4.3.1- Combien aura-t-on de noyaux au bout de cette durée ?

4.3.2- Quelle sera alors l'activité de cet échantillon ?

5- Déterminer l'énergie libérée, en MeV et en joules, par la fusion d'un noyau X avec un noyau Y suivant la réaction donnée ci-dessus.

On donne les masses des nucléides suivants :

$m_X = 3,0155 \text{ u}$; $m_Y = 2,0136 \text{ u}$; $m_Z = 4,0026 \text{ u}$; $m_n = 1,0087 \text{ u}$.

6- Quelle est l'énergie libérée par la production de 10 g de l'élément Z ? Comparer cette énergie avec celle libérée par la combustion d'une tonne de pétrole ($4,2 \cdot 10^{10} \text{ J}$).

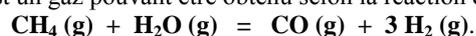
Données : $1 \text{ u} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$; $1 \text{ u} = 931,5 \text{ MeV} \cdot c^{-2}$; $M_Z = 4,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$;
 $M_X = 3,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; $c = 3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$; $1 \text{ eV} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$; $N_A = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

Extrait du tableau périodique :

${}_1\text{H}$							${}_2\text{He}$
${}_3\text{Li}$	${}_4\text{Be}$	${}_5\text{B}$	${}_6\text{C}$	${}_7\text{N}$	${}_8\text{O}$	${}_9\text{F}$	${}_{10}\text{Ne}$

C : THERMODYNAMIQUE (15 points / 60)

Le dihydrogène H_2 est un gaz pouvant être obtenu selon la réaction d'équation :



Données thermodynamiques, à 298 K :

Espèce chimique	$\Delta_f H^\circ (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$S_m^\circ (\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$
$\text{CH}_4(\text{g})$	-74,85	186,2
$\text{H}_2\text{O}(\text{g})$	-241,83	188,7
$\text{CO}(\text{g})$	-110,52	197,9
$\text{H}_2(\text{g})$	0	130,6

1-

1.1- Calculer l'enthalpie de réaction, notée $\Delta_r H^\circ$, de la réaction de synthèse du dihydrogène gazeux à 298 K.

1.2- Calculer l'entropie de réaction, notée $\Delta_r S^\circ$, de la réaction de synthèse du dihydrogène gazeux à 298 K.

2-

2.1- La réaction est-elle endothermique ou exothermique à cette température ? Justifier la réponse.

2.2- À partir de la stoechiométrie de la réaction, expliquer pourquoi le signe de $\Delta_r S^\circ$ était prévisible.

3-

3.1- Calculer la valeur de l'enthalpie libre de réaction, notée $\Delta_r G^\circ$, de la réaction de synthèse du dihydrogène gazeux à 298 K.

3.2- En déduire la valeur de la constante d'équilibre K à 298 K.

3.3- Que peut-on en conclure sur la position de l'équilibre à 298 K ? Justifier la réponse.

4-

4.1- Faut-il élever ou abaisser la température (à pression constante) pour favoriser la réaction dans le sens direct (\rightarrow) ? Justifier la réponse.

4.2- Que produirait une augmentation de pression (à température constante) sur l'équilibre ? Justifier la réponse.

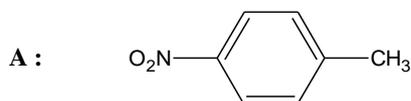
5- En supposant $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ indépendants de T, calculer la "température d'inversion" de cette réaction, température pour laquelle $\Delta_r G^\circ$ change de signe.

Donnée : $R = 8,31 \text{ S.I.}$

D : CHIMIE ORGANIQUE (15 points / 60)

La procaine est le nom usuel d'un composé organique utilisé dans la préparation d'anesthésiques locaux. Sa synthèse peut être réalisée selon la séquence suivante :

1- La nitration du toluène (ou méthylbenzène) de formule $C_6H_5-CH_3$ permet d'obtenir majoritairement le composé A de formule semi-développée :



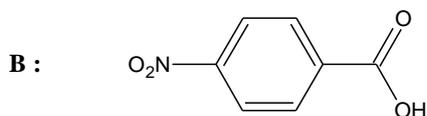
1.1- Nommer le composé A.

1.2- Donner le(s) réactif(s) nécessaire(s) à la réaction de nitration du toluène.

1.3- Préciser les conditions expérimentales.

1.4- Au cours de cette réaction, il se forme également un composé A' minoritaire. Donner sa formule semi-développée.

2- L'oxydation par les ions permanganate en milieu acide, à chaud, du composé A conduit à l'acide 4-nitrobenzoïque B de formule semi-développée :



2.1- Écrire les demi-équations redox sachant que l'ion permanganate MnO_4^- appartient au couple redox $\text{MnO}_4^-/\text{Mn}^{2+}$.

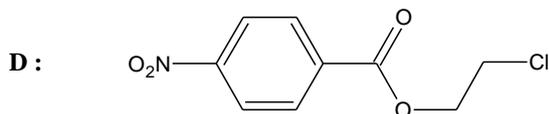
2.2- En déduire l'équation de la réaction d'oxydoréduction mise en jeu.

3- La fonction acide carboxylique de B est activée par le chlorure de thionyle SOCl_2 selon l'équation :



Donner la formule semi-développée de C.

4- L'action de C sur le composé de formule semi-développée $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$ conduit à la formation d'un composé D et de chlorure d'hydrogène selon l'équation :



4.1- De quel type de réaction s'agit-il ?

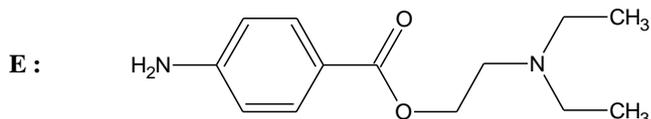
4.2- Donner le nom systématique du composé de formule $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$.

5- D est traité par $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}$ pour donner le composé E de formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$.

5.1- Écrire l'équation de la réaction mise en jeu en utilisant les formules semi-développées.

5.2- De quel type de réaction s'agit-il ?

6- La réduction de E, par le fer en milieu acide, conduit à la procaine, de formule semi-développée :



Entourer et nommer les différentes fonctions organiques présentes dans la molécule de procaine en précisant leur classe lorsque cela se justifie.

E3-U31 : BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006

Durée : 3 heures

Coefficient : 3

BIOANALYSES EN PANIFICATION

Le pain représente une part importante de l'apport glucidique dans la plupart des pays européens.

La composition de la farine et la panification font l'objet d'analyses et de contrôles de façon à obtenir un pain de qualité.

La panification correspond à l'ensemble des processus **mécaniques** (pétrissage), **thermiques** (cuisson et refroidissement), **biochimiques** et **microbiologiques** (notamment hydrolyse de l'amidon, fermentations) mis en jeu.

D'autre part, l'urgence des problèmes sanitaires liés à l'alimentation conduit l'industrie pharmaceutique à mettre au point des médicaments visant à réguler l'absorption des glucides, en particulier pour les diabétiques.

1- Analyse de la farine (26 points)

L'élaboration des farines occupe aujourd'hui une place importante dans l'industrie céréalière. Le choix d'une farine repose sur des analyses quantitatives et qualitatives de sa composition.

1.1- Détermination du taux de cendres (3 points)

La classification des farines repose sur leur taux de cendres (**document 1a**). Le protocole de détermination de ce taux est présenté dans le **document 1b**.

1.1.1- A quoi correspondent les cendres ?

1.1.2- Sachant que $m_0 = 3,150$ g et $m_1 = 0,014$ g, déterminer le taux de cendre de la farine analysée.

Cette farine est-elle utilisable pour la fabrication de pains ordinaires ?

Donnée : Humidité de la farine $H = 15,5$ % (m/m).

1.2- Détermination de la teneur en protéines (5,5 points)

La teneur en protéines des farines est évaluée par dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl. Le protocole est résumé dans le **document 2**.

1.2.1- Calculer la masse approximative de farine à peser.

Effectuer le calcul en fixant une masse d'azote présente dans la prise d'essai répondant aux exigences du protocole.

1.2.2- Écrire les équations des réactions mises en jeu.

1.2.3- Établir la formule littérale donnant la masse m_N d'azote en grammes contenu dans m grammes de farine en fonction de V_0 et V_1 .

1.2.4- En déduire la formule littérale donnant la teneur en protéines de la farine analysée en g pour 100 g de matière sèche en fonction de m (g), V_0 (mL), V_1 (mL) et H (humidité, % m/m).

Données : $M_N = 14$ g.mol⁻¹

Le taux de protéines de la farine analysée est d'environ 10 % (en masse de l'extrait sec).

Humidité de la farine $H = 15,5$ % (m/m).

La teneur en azote des protéines de la farine est de 17,5 % (m/m).

1.3 – Analyse des protéines de la farine (17,5 points)

La méthode de référence permettant séparer les protéines de la farine après extraction est l'électrophorèse bidimensionnelle en gel polyacrylamide. Elle combine une isoélectrofocalisation et une électrophorèse en présence de sodium dodecylsulfate, SDS (**document 3**) Un électrophorégramme est présenté dans le **document 4**.

1.3.1 – Isoélectrofocalisation (IEF)

1.3.1.1 – Indiquer la propriété physico-chimique des ampholites ainsi que leur rôle?

1.3.1.2 – Quel est le critère de séparation des protéines par cette méthode?

1.3.1.3 – Expliquer brièvement le principe.

1.3.2 – Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS P.A.G.E.)

La composition du tampon d'équilibration préparant le gel d'IEF à la séparation en SDS P.A.G.E est décrite dans le **document 3**. Le dithiothréitol peut être remplacé par le β -mercaptoéthanol.

1.3.2.1 – Indiquer le rôle de l'urée et du dithiothréitol en précisant leur mode d'action respectif.

1.3.2.2 – Quels sont les rôles du SDS dans cette étape de l'expérience ? Justifier en indiquant les propriétés physico-chimiques de la molécule et son mode d'action.

Préciser le critère de séparation des protéines lors de cette seconde migration.

1.3.2.3 – Identifier les électrodes 1 et 2 (**document 4**). Justifier.

1.3.2.4 – La composition de plusieurs gels de polyacrylamide (1 à 4) est décrite dans le **document 3**.

Préciser le rôle respectif de l'acrylamide et du bis-acrylamide

1.3.2.5 – Un premier essai avec le gel 3 indique une migration verticale insuffisante des protéines. Quel(s) autre(s) gel(s) doit-on tester pour améliorer la séparation ? Justifier.

1.3.3 – Analyse des résultats.

Trois groupes de protéines A, B, C ont été identifiés comme correspondant à des sous-unités de la gluténine (**document 4**).

Une gluténine fonctionnelle est constituée d'un assemblage de sous-unités de haut poids moléculaire (HMW glutenin subunits ou HMW-GS). Et de sous-unités de faible poids moléculaire (LMW glutenin subunits ou LMW-GS).

1.3.3.1 – Identifier le groupe des HMW-GS. Justifier.

1.3.3.2 – Caractériser les deux autres groupes à partir de leur situation sur l'électrophoré-gramme.

1.3.4 – Structure d'une LMW-GS .

Le **document 5** représente une partie d'une "LMW glutenin subunit".

1.3.4.1 – Quel motif structural secondaire paraît sur cette molécule ? Indiquez les liaisons qui le stabilisent et les groupements impliqués.

1.3.4.2 – Avec les gliadines, les gluténines forment dans la pâte à pain un **réseau visco-élastique** appelé gluten. Lors du pétrissage de la farine, on ajoute parfois des agents réducteurs afin de diminuer l'élasticité de la pâte.

Interpréter cette démarche en indiquant la cible de ces agents réducteurs.

2- Dégradation de l'amidon et fermentation paninaire (34 points)

2.1- Structure de l'amidon et de ses produits d'hydrolyse (4,5 points)

L'amidon est formé de 2 constituants : l'amylose (5 à 30 %) et l'amylopectine (70 à 95 %).

L'amylose est un polymère non ramifié de résidus de D-glucose unis par des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$.

L'amylopectine correspond à de l'amylose ramifié. Les ramifications correspondent à des résidus d'isomaltose : α -D glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)D glucopyranose.

2.1.1- Écrire la structure de l'amylopectine en représentant un branchement.

Lors de la panification l'amidon est dégradé en présence d'amylases ou diastases : α -amylases et β -amylases.

Les α -amylases catalysent l'hydrolyse au hasard les liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$.

Les β -amylases catalysent l'hydrolyse des chaînes d'amidon à partir de leur extrémité non réductrice et libèrent du β -maltose (α -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4) β -D-glucopyranose).

2.1.2- Écrire la réaction catalysée par les β -amylases (formules chimiques exigées).

2.1.3- L'hydrolyse de l'amidon peut être quantifiée par mesure du pouvoir réducteur. Interpréter cette observation.

2.2- Dosage de l' α -amylase d'une farine (6 points)

2.2.1- Analyse du protocole (document 6)

2.2.1.1- Quel est le principe de la méthode de dosage proposée ?

2.2.1.2- Quel est le rôle du Trizma® Base ?

2.2.1.3- Indiquer avec précision la préparation du "blanc α -amylase".

2.2.2- Résultats

2.2.2.1- Sachant que l'absorbance mesurée à 410 nm est de 0,748, calculer la concentration catalytique du surnageant (U.mL^{-1})

2.2.2.2- Sachant que le volume de surnageant obtenu après extraction est de 4,9 mL, calculer l'activité α -amylasique de la farine analysée en U.g^{-1} de farine.

Données : Une unité d' α -amylase (U) provoque la libération d'une micromole de nitro-4-phénol par minute dans les conditions de l'expérience.

Absorbance linéique molaire du 4-nitrophénol dans les conditions de lecture $\epsilon = 17,8.10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.3- Caractérisation d'un inhibiteur des α -amylases (7,5 points)

L'acarbose est un inhibiteur de l' α -amylase conçu en vue d'une régulation de l'absorption intestinale du glucose.

Afin de préciser l'influence de l'acarbose sur l' α -amylase, une série d'études cinétiques a été réalisée. Pour faciliter les mesures, on a utilisé le substrat synthétique rDP18 (**document7**).

2.3.1- Détermination du type d'inhibition (document 7a)

2.3.1.1- Comment évoluent les paramètres cinétiques de l'enzyme K_m et V_{max} en présence d'inhibiteur ? A quel type d'inhibition assiste-t-on ?

2.3.1.2- Sur quelle(s) forme(s) de l'enzyme se fixe-t-il ? Proposer un schéma montrant ce type d'inhibition .

2.3.2- Détermination de la constante d'inhibition K_i (document 7b)

La représentation secondaire des ordonnées à l'origine ($1/V_{\max}$ apparents ou $1/V_{\max}$ app.) en fonction des concentrations en inhibiteur est une droite.

2.3.2.1- Établir la relation entre $1/V_{\max}$ app et $[I]$.

Donnée : On appelle F_i le facteur d'inhibition. C'est le facteur par lequel $1/V_{\max}$ est multiplié pour obtenir $1/V_{\max}$ app.

$$F_i = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

2.3.2.2- Déterminer graphiquement la valeur de la constante d'inhibition K_i de l' α -amylase par l'acarbose. Justifier.

2.4- La fermentation panair (16 points)

La levure *Saccharomyces cerevisiae* fermente d'abord les glucides libres de la farine (glucose et saccharose) pendant que la β -amylase libère notamment du maltose, lui même substrat pour la fermentation.

2.4.1- La fermentation alcoolique

2.4.1.1- Compléter le document 8.

2.4.1.2- Donner le nom et la formule semi-développée des composés A, B et C.

Identifier les composés D, E et F.

Quel est le composé produit lors de la fermentation alcoolique à l'origine de la levée de la pâte à pain ?

2.4.1.3- Ecrire la réaction bilan du catabolisme du glucose par fermentation alcoolique.

La variation d'enthalpie libre standard ($\Delta G_0'$) de la réaction de fermentation alcoolique à partir du glucose est de $-166 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

2.4.1.4- Calculer le rendement énergétique de la fermentation du glucose en éthanol.

Donnée : Variation d'enthalpie libre standard d'hydrolyse de l'ATP $\Delta G_0' = -30,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

2.4.2- Oxydation aérobie du glucose

La production industrielle de *S. cerevisiae* se fait en atmosphère aérobie.

2.4.2.1- A l'aide du **document 9**, établir le bilan moléculaire de l'oxydation aérobie du glucose.

2.4.2.2- Faire le bilan énergétique de l'oxydation aérobie du glucose.

2.4.2.3- Comparer avec le bilan énergétique de la fermentation alcoolique.

Conclure sur l'intérêt de produire *Saccharomyces cerevisiae* en conditions aérobies.

Document 1 :**Document 1a : Classification des farines par types**

Les grands types de farine sont définis en fonction du taux de cendres contenu dans 100 g de matière sèche.

Le taux d'extraction mesure la quantité de farine obtenue à partir du blé (kg de farine pour 100 kg de blé).

Types	Taux de cendres (% massique)*	Taux moyen d'extraction	Utilisation
45	Moyen : 0,50	67	Pâtisserie
55	de 0,50 à 0,60	75	Pain ordinaire
65	de 0,62 à 0,75	78	Pains spéciaux
80	de 0,75 à 0,90	80-85	Pains spéciaux
110	de 1,00 à 1,20	85-90	Pain bis
150	plus de 1,40	90-98	Pain complet

*** par rapport à la matière sèche.**

Document 1b : Protocole de détermination du taux de cendres (d'après la norme AFNOR v03-720)

Définition du taux de cendres : Résidu obtenu après incinération à 900°C dans les conditions ci-dessous et exprimés en % en masse par rapport à la matière sèche.

Protocole :

- 1) Dans une nacelle à incinération préalablement chauffée à 900°C, refroidie en dessiccateur et tarée, peser à 10 mg près une masse m_0 de 2 à 6 g de l'échantillon selon le taux de cendres présumé.
- 2) Effectuer l'incinération dans le four à 900°C ± 25°C.
- 3) Quand l'incinération est terminée, retirer la nacelle du four. Après refroidissement au dessiccateur, peser le résidu d'incinération. Soit m_1 la masse pesée.

Document 2 : Dosage de l'azote total de la farine par la méthode de Kjeldahl (d'après la norme AFNOR v03-750)

Protocole

Prise d'essai

Peser à 0,001 g près une masse m (g) de farine choisie en fonction de la teneur présumée en azote, de façon que la prise d'essai contienne entre 0,005 et 0,02 g d'azote.

Minéralisation

Dans le matras de Kjeldahl contenant la prise d'essai, introduire :

- 10 mL d'acide sulfurique concentré ;
- une pointe de spatule de catalyseur ;

Chauffer jusqu'à décoloration puis transvaser quantitativement le contenu du matras dans un ballon à distiller.

Distillation et dosage

En présence de phénolphthaléine, ajouter de la lessive de soude jusqu'au virage de l'indicateur. Distiller et recueillir le distillat dans 20 mL d'acide borique contenant un indicateur de fin de réaction.

Doser par une solution d'acide sulfurique titrée à $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. Soit V_1 le volume (mL) d'acide sulfurique versé.

Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions. Soit V_0 le volume (mL) d'acide sulfurique versé.

Document 3 : Extraction et séparation des protéines de la farine par électrophorèse en 2 dimensions

Étape 1 : Extraction des protéines de la farine

- 1) Peser 50 mg de farine dans un tube à centrifuger de 1,5 mL.
- 2) Ajouter 1 mL de tampon d'extraction au borate de sodium.
- 3) Incuber à 37°C sous agitation pendant au moins 2 heures.
- 4) Centrifuger à température ambiante pendant 15 minutes.
- 5) Transférer le surnageant dans un nouveau tube. Cette solution peut être utilisée directement pour une analyse des protéines totales de la farine.

Étape 2 : isoélectrofocalisation (IEF, première dimension)

Composition du gel d'IEF

- 9,7 mL d'eau distillée ;
- 2,0 mL de solution acylamide/bisacrylamide ;
- 300 μL de solution d'ampholytes pH 3,5 – 9 ;
- 50 μL de persulfate d'ammonium (APS) à 1 % ;
- 20 μL de TEMED.

Migration

- Durée : 3 heures
- Puissance constante : 5 watts
- Température ambiante

Une bande du gel est découpée pour effectuer l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Étape 3 : électrophorèse (PAGE) en présence de SDS (seconde dimension)

1) Équilibration du gel d'IEF pour l'électrophorèse en présence de SDS

La bande du gel d'IEF est placée dans le tampon d'équilibration sous agitation lente pendant 10 minutes.

Composition du tampon d'équilibration :

- Urée à 6 mol.L⁻¹ ;
- Tris pH 8,8 à 0,375 mol.L⁻¹ ;
- SDS à 2 % ;
- Glycérol à 20 % ;
- Dithiothréitol (DTT) à 2 % .

2) Préparation du gel de polyacrylamide**Tampon de migration (utilisé pour la préparation des gels et pour la migration)**

- 18,17 g Tris-base ;
- 2 mL SDS 20 % ;
- Ajuster le pH à 8,8 avec du HCl 12 mol.L⁻¹
- Compléter le volume à 100mL

Composition du gel de polyacrylamide

Les gels sont préparés à partir d'une solution mère d'acrylamide 30%/bis-acrylamide 0,8% afin de limiter les manipulations de ces produits neurotoxiques.

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4
H ₂ O	8,5 mL	7,3 mL	6,2 mL	5 mL
Acrylamide 30%/bis-acrylamide 0,8%	2,5 mL	3,7 mL	4,8 mL	6 mL
Tampon de migration	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL
Persulfate d'ammonium 10%	224 µL	224 µL	224 µL	224 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

3) Migration

Tampon de migration : voir 2) : préparation du gel

Durée : 1 h

Puissance : 50 watts

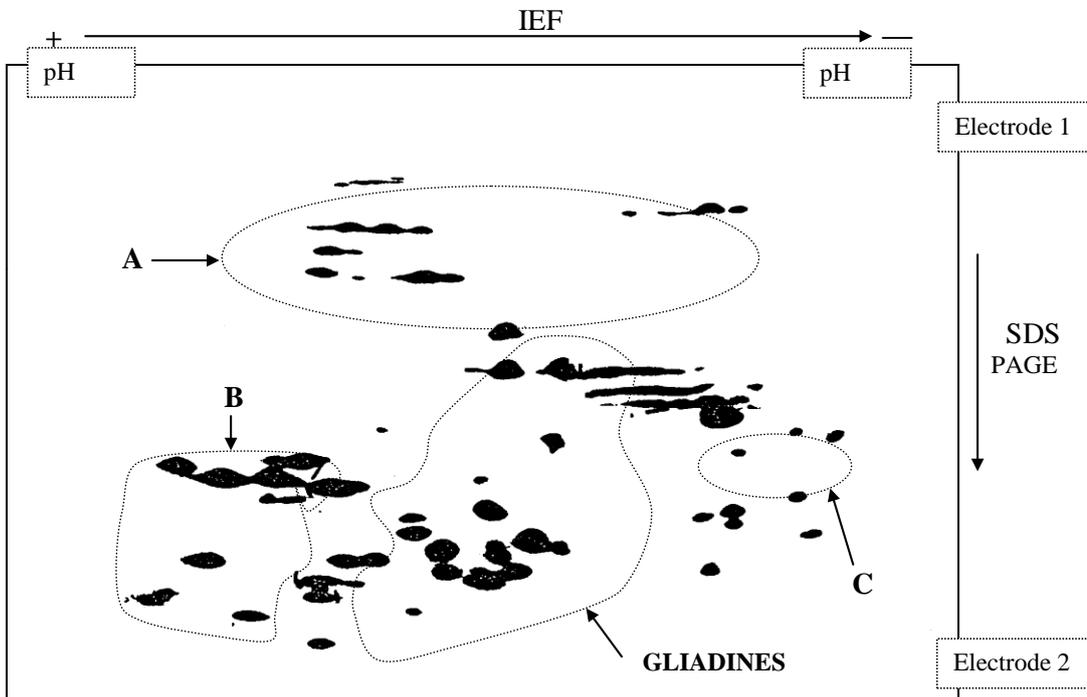
Étape 4 : Révélation

Coloration

Le gel est coloré dans un mélange méthanol/acide acétique/eau (40:10:50) à 0,1 % de bleu de Coomassie Brillant R-250.

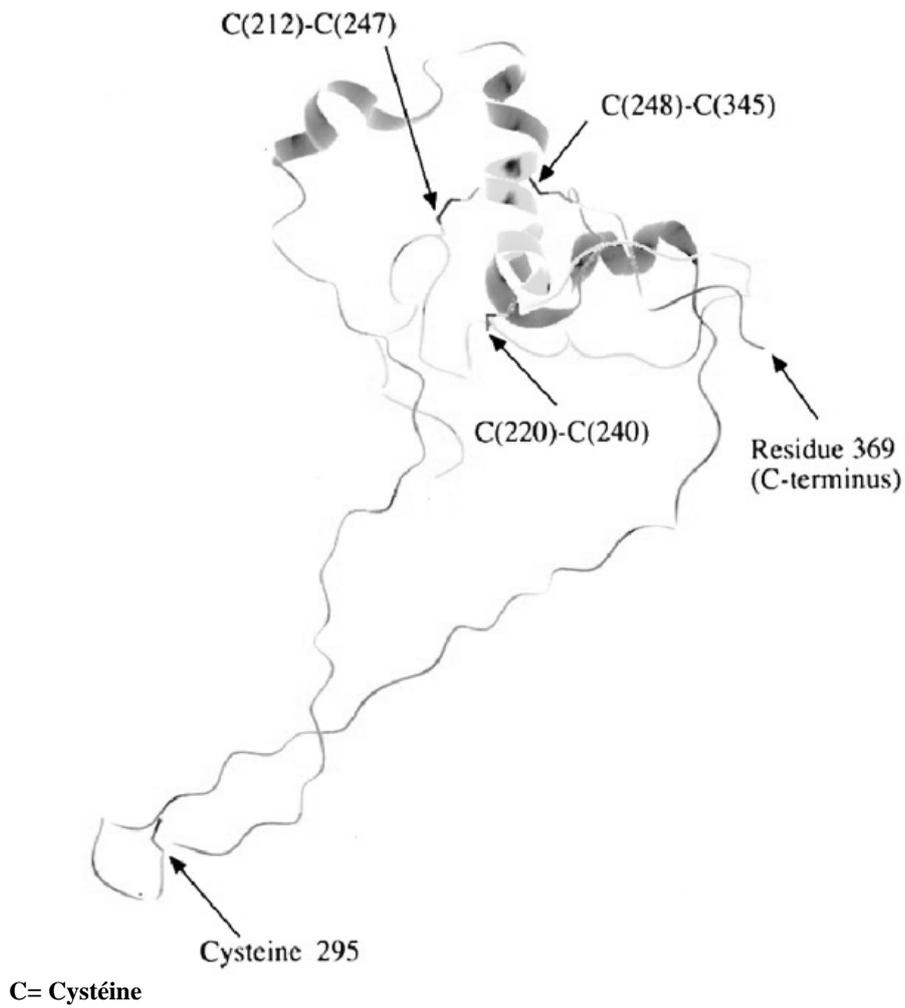
Décoloration

Le gel est lavé à l'acide acétique à 15 % pour éliminer le colorant non lié.

Document 4: Résultat de l'électrophorégramme

Document 5 : Structure tridimensionnelle d'une sous-unité légère d'une gluténine (LMW-GS)

(d'après S. Masci et coll., Plant Physiol., 1991; 118 (4), 1147-1158.)



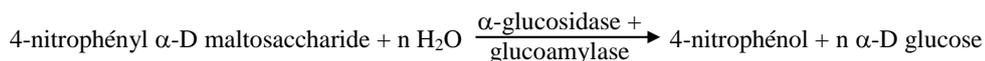
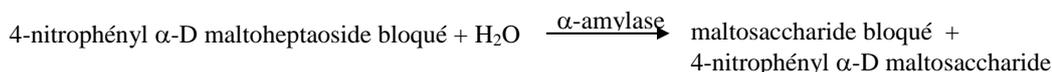
Document 6 : Détermination de l'activité α -amylasique d'une farine

Principe

Substrat

Le substrat synthétique utilisé est le nitro-4-phényl α -D maltoheptaoside 4,6 O-éthylidène.

Réactions mises en jeu



Protocole opératoire

Extraction de l' α -amylase de la farine :

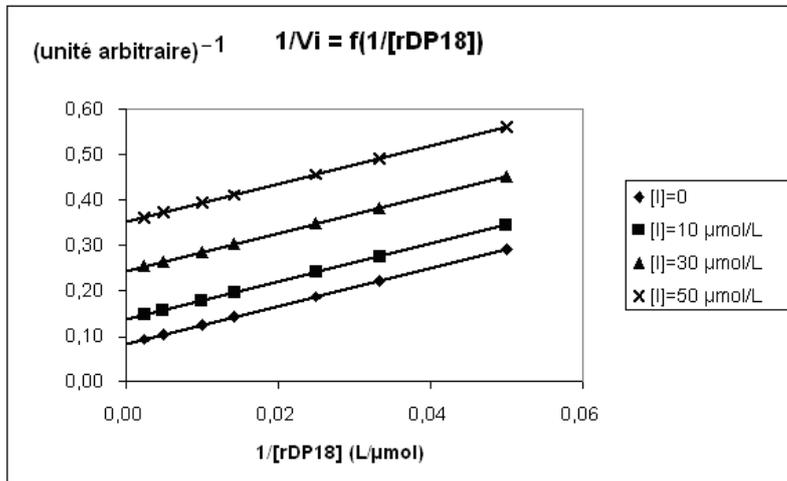
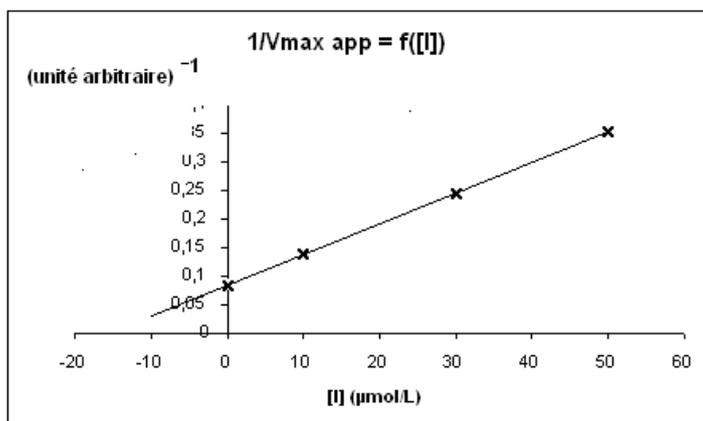
- Peser précisément $m = 500$ mg de farine dans un tube à centrifuger.
- Ajoutez 5 mL de tampon d'extraction.
- Extraire pendant 2 h à température ambiante en agitant périodiquement. Centrifuger à 3000 tours/min durant 10 min. Récupérer le surnageant. Mesurer son volume (V_s).

Dosage de l' α -amylase :

- Prélever 0,2 mL de mélange "substrat + α -glucosidase + amyloglucosidase" dans un tube à essai.
- Préincuber ce tube ainsi que le surnageant à 40°C environ 2 min.
- Dans le tube contenant le mélange "substrat + α -glucosidase + amyloglucosidase", ajouter $E = 0,2$ mL du surnageant incubé.
- Incuber à 40°C pendant exactement 10 min.
- Ajouter 3 mL de Trizma® Base. Agiter vigoureusement.
- Diluer la solution au 1/10 avant le passage au spectrophotomètre. Lire l'absorbance à 410 nm contre un "**blanc α -amylase**".

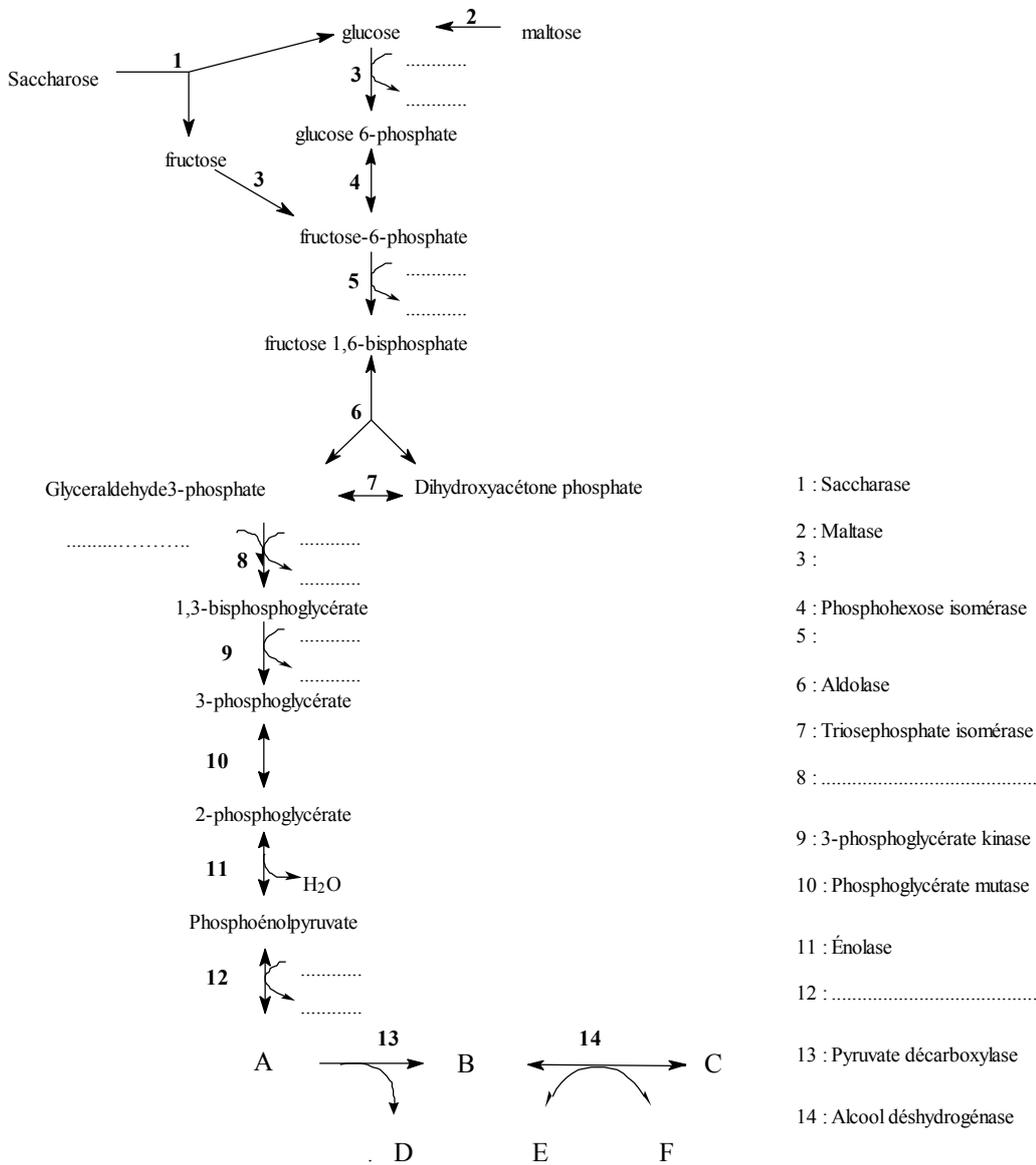
Document 7

Document 7a : inhibition de l'activité amylasique par l'acarbose

**Document 7b**

Document 8 (A compléter et à rendre avec la copie)

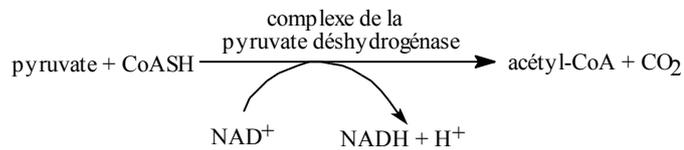
Fermentation alcoolique de *Saccharomyces cerevisiae*



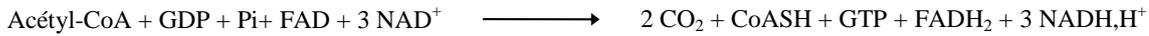
Document 9 : Étapes de l'oxydation aérobie du glucose par *Saccharomyces cerevisiae*

1) Glycolyse

2) Décarboxylation oxydative du pyruvate



3) Cycle de Krebs



4) Réoxydation des coenzymes réduits via la chaîne respiratoire mitochondriale

- Rapport P/O pour l'oxydation du NADH = 3
- Rapport P/O pour l'oxydation du FADH₂ = 2

E3-U32 : MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006**Durée : 3 heures****Coefficient : 3**

Dictionnaire français-anglais autorisé

Calculatrice non autorisée

SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

Un rapport «Morbidity et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France», réalisé par l'Institut de veille sanitaire et l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) a pour objectif de préciser la nature et l'importance des pathologies infectieuses liées à l'alimentation en France.

La répartition des infections d'origine alimentaire, pour les cas hospitalisés est la suivante :

- infections bactériennes 87 % ;
- infections virales 7 % ;
- infections dues à des parasites 6 %.

1- Toxi-infections bactériennes d'origine alimentaire. (54 points)

Le rapport établi permet d'observer que les trois principales bactéries responsables d'infections d'origine alimentaire sont : *Salmonella* (59,2 %), *Campylobacter* (22,8 %) et *Staphylococcus aureus* (9,3 %).

1.1- Le pouvoir pathogène bactérien. (6 points)

1.1.1- L'adhésion des bactéries aux tissus de l'hôte est une étape fondamentale de l'infection. Différentes structures peuvent être impliquées. Citer ces structures, préciser leur nature chimique, leur localisation et leurs propriétés.

1.1.2- Le pouvoir pathogène d'une bactérie peut se manifester selon deux grands processus parfois associés.

Les citer et les définir.

1.2- Prévention des salmonelloses. (27 points)

Les *Salmonella spp* apparaissent comme les premiers cas d'infections bactériennes d'origine alimentaire en France où la surveillance est réalisée par le CNR (Centre National de Recherche) de l'Institut Pasteur à Paris.

1.2.1- La lyse de certaines souches au niveau des ganglions mésentériques entraîne la libération d'un de leurs constituants, responsable de leur fort pouvoir pathogène.

Donner le nom exact de ce composé.

Schématiser sa structure et préciser, pour chaque partie constitutive :

- le nom,
- la nature biochimique,
- la localisation,
- la (les) propriété(s).

1.2.2- La recherche des *Salmonella* dans les denrées alimentaires fait l'objet d'une procédure normalisée tant au niveau international (EN ISO 6579) qu'au niveau national (NF/EN 12824) où elle est complétée par une norme de routine (NF V 08-052). Nous assistons actuellement à l'émergence de méthodes alternatives.

1.2.2.1- Citer et différencier les deux types de méthodes normalisées.

1.2.2.2- Présenter les avantages des méthodes dites alternatives.

1.2.3- La recherche des *Salmonella* par la procédure normalisée commence par les quatre étapes

décrites dans le **document n°1**.

1.2.3.1- Qualifier et justifier les deux premières étapes du protocole de recherche des *Salmonella*.

1.2.3.2- En utilisant les données du **document n° 2**, dégager l'intérêt du milieu de Rambach par rapport au milieu VB-RP pour la différenciation de *Salmonella*.

Différencier les colonies de *Salmonella* et de coliformes sur le milieu Rambach.

1.2.4- L'identification peut se faire par ensemencement d'une galerie API 20 E. Le nom du micro-organisme est obtenu par une méthode probabiliste.

En utilisant l'extrait de la base de données API 20 E, **document n° 3**, calculer, pour les deux taxons proposés, la probabilité d'observer le profil biochimique obtenu expérimentalement (**document n° 4**). Les calculs seront posés mais non effectués.

Conclure.

1.2.5- Entre 1995 et 1997, 16104 *Salmonella* non typhiques ont été signalées au CNR. Les sérotypes *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium représentent 70 % des souches isolées. Et il est intéressant de constater que, parmi les souches de *Salmonella* Typhimurium lysotypées, un lysotype (DT 104) représente 70 % des souches.

Définir les termes sérotype et lysotype.

1.2.6- Divers auteurs se sont intéressés à l'état physiologique des bactéries d'intérêt sanitaire présentes en milieu aquatique. Ils ont utilisé deux techniques pour effectuer le dénombrement de *Salmonella* incubées en conditions stressantes : un dénombrement sur milieux solides et une numération par la DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique).

Le **document n° 5** présente les résultats obtenus.

1.2.6.1- Analyser l'allure générale des courbes représentées.

Proposer une conclusion quant à l'état physiologique des bactéries en fin d'expérience.

1.2.6.2- Présenter les étapes principales de la DEFT.

1.2.6.3- Une variante de la DEFT est présentée dans le **document n° 6**.

Donner l'intérêt de ce test.

Préciser le principe.

Citer les avantages.

1.3- Toxi-infections alimentaires (TIA) à *Staphylococcus aureus*. (21 points)

1.3.1- Le genre *Staphylococcus* forme un groupe bactérien cohérent selon les critères de la taxonomie moléculaire. Il partage des caractères morphologiques avec le genre *Micrococcus*, mais il est cependant phylogénétiquement plus proche de l'ensemble *Bacillus* - *Lactobacillus* - *Streptococcus* qui regroupe les bactéries Gram positives à faible pourcentage en GC.

1.3.1.1- Définir le GC %.

1.3.1.2- On peut évaluer le GC % en déterminant la Tm.

À quoi correspond la Tm ?

1.3.1.3- Préciser la relation existant entre ces deux données. Justifier.

1.3.2- En France, *Staphylococcus aureus* est le deuxième agent responsable de TIA après les *Salmonella*.

1.3.2.1- Comment expliquer l'incidence élevée des intoxications dues à un biotype humain ?

1.3.2.2- Les toxines bactériennes sont classées en deux groupes, sur la base de leur nature chimique.

Nommer ces deux groupes de toxines.

Comparer les propriétés respectives des deux types de toxines.

1.3.2.3- Afin de déterminer les conditions de la toxinogénèse, la croissance de *Staphylococcus aureus* a été étudiée. Une pré-culture de la souche utilisée pour cette étude, *Staphylococcus aureus* SA2, est ensemencée dans une fiole d'Erlenmeyer contenant 50 mL de milieu Trypcase Soja (TS) et incubée dans

un bain thermostaté à 37°C sous agitation. La croissance est suivie par méthode turbidimétrique. La courbe de croissance est présentée dans le **document n° 7**.

Le milieu TS est un milieu empirique.

Différencier un milieu empirique et un milieu synthétique.

Donner le principe du suivi de croissance par opacimétrie.

Définir les paramètres de la croissance et les estimer.

Donnée : $\ln 2 = 0,7$.

1.3.3- Les *Staphylococcus aureus* sont dénombrés dans les aliments à l'aide d'une méthode normalisée NF EN ISO 6888-1 qui préconise l'isolement sur milieu de Baird-Parker puis la confirmation par la recherche de la coagulase. Ce dénombrement permet de répondre à l'un des critères établis par l'arrêté du 30 mars 1994 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation sous forme de poudre de lait :

Staphylococcus aureus : $m = 10$, $M = 100$, $n = 5$, $c = 2$.

1.3.3.1- Donner la signification de m , M , n , c .

1.3.3.2- Rappeler le(s) rôle(s) des composants suivants du milieu de Baird-Parker : pyruvate de sodium, émulsion de jaune d'oeuf, tellurite de potassium.

1.3.3.3- Décrire l'aspect caractéristique des colonies de *Staphylococcus aureus* sur ce milieu, en justifiant tous les éléments de la réponse.

1.3.3.4- La confirmation se réalise par mise en évidence d'un caractère spécifique des *Staphylococcus aureus* : la présence d'une coagulase.

Préciser le rôle de cette enzyme dans le mécanisme des infections provoquées par *Staphylococcus aureus*.

Donner le principe de mise en évidence de cette activité enzymatique.

1.3.4- La méthode normalisée NF EN ISO 6888-2 propose un isolement sur milieu de Baird-Parker au plasma de lapin et au fibrinogène.

Quel avantage présente cette méthode par rapport à la précédente ? Justifier.

2- Parasitoses d'origine alimentaire. (6 points)

Les aliments peuvent être le véhicule de formes infestantes de parasites. Sous nos climats sont particulièrement concernés les plathelminthes ainsi que certains protozoaires : toxoplasmes, amibes.

2.1- L'amibiase.

C'est une parasitose due à l'amibe dysentérique *Entamoeba histolytica*, protozoaire strictement humain et électif du côlon.

2.1.1- Préciser à quel règne appartient ce parasite.

2.1.2- Citer les principales caractéristiques permettant de différencier une cellule procaryote et une cellule eucaryote.

2.1.3- Indiquer la famille de parasites à laquelle appartient *Entamoeba histolytica* en précisant son mode de déplacement.

2.2- La toxoplasmose.

Une étude de 1995 a permis de déterminer la prévalence (séroprévalence) en France à 54 % et l'incidence par grossesse à 0,66 pour 100 grossesses.

2.2.1- Définir incidence et prévalence.

2.2.2- Citer les principaux aliments sources de contamination.

2.2.3- Donner les moyens de prévention contre ce parasite.

2.2.4- Présenter les manifestations cliniques de la toxoplasmose chez l'adulte. Préciser pourquoi ce problème sanitaire est très important chez la femme enceinte.

DOCUMENT N°1 : RECHERCHE DES SALMONELLA

- 1) On broie 25 g d'aliment solide dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée, puis on incube le broyat pendant 18 H. à 37 °C.
- 2) On introduit 10 mL de broyat dans 100 mL de bouillon sélénite-cystine et 0,1 mL de broyat dans 10 mL de bouillon Rappaport-Vassiliadis (RV) au vert de malachite et chlorure de magnésium. Ces bouillons sont alors incubés 24 H. à 37 °C (bouillon au sélénite) ou 42 °C (bouillon RV).
- 3) On isole chacun de ces bouillons sur deux géloses sélectives : une gélose VB-RP (vert brillant et rouge de phénol) et une autre gélose sélective choisie librement par le laboratoire (par exemple le milieu Rambach)
- 4) Après 24 H. d'incubation, on recherche des colonies suspectes sur ces géloses. Celles-ci sont ensuite identifiées.

DOCUMENT N°2 : COMPOSITION DES MILIEUX D'ISOLEMENT

Composition du milieu VB-RP
(en g par L)

Peptone	10
Extrait de levure	3
Lactose	10
Saccharose	10
Vert brillant	0,005
Rouge de phénol	0,09
K ₂ HPO ₄	1
NaH ₂ P0 ₄	0,6
Agar	12

Composition du milieu Rambach
(en g par L)

Propylène glycol	10
Peptone	5
Extrait de levure	3
Désoxycholate de sodium	1
Rouge neutre	0,03
Xgal (5-bromo-4-chloro 3-indoyl-b-D-galactopyranoside)	1,5
Agar	15

Rq : le catabolisme du propylène Glycol conduit à une acidification.

Rq : le Xgal est un chromogène dont le produit d'hydrolyse est bleu.

CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DE DIFFÉRENTES BACTÉRIES

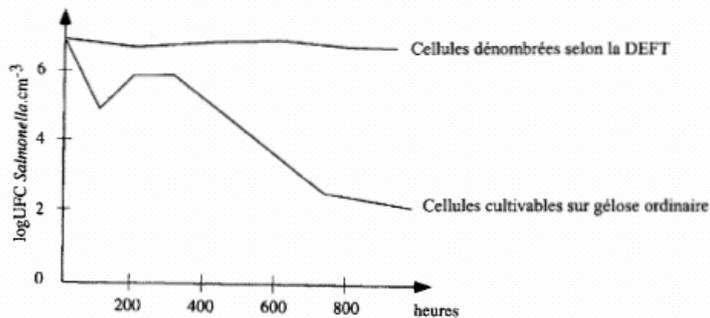
	Saccharose	Lactose	β-galactosidase	Propylène Glycol
<i>Salmonella spp</i>	-	-	-	+
<i>Escherichia</i>	+/-	+	+	-
<i>Proteus</i>	+/-	-	-	-
<i>Morganella</i>	-	-	-	-
<i>Shigella</i>	-	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	-	+/-	+	-/+

DOCUMENT N°3 : EXTRAIT DE LA BASE DE DONNEES API 20 E

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S
<i>Salmonella Paratyphi A</i>	0	1	0	99	0	5
<i>Salmonella spp</i>	3	69	96	95	75	85

DOCUMENT N°4 : PROFIL BIOCHIMIQUE EXPERIMENTAL

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S
-	+	+	+	+	+

DOCUMENT N°5 :

Salmonella incubées en eau de mer, à l'obscurité, à 10°C.

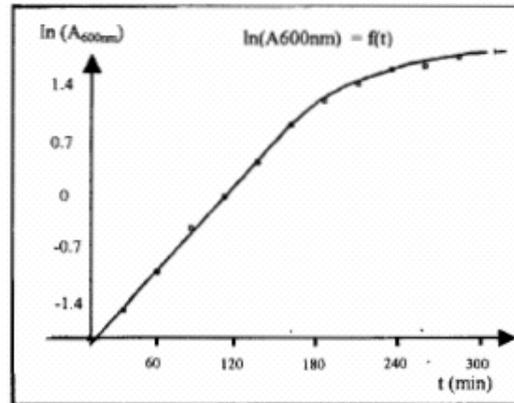
DOCUMENT N°6

This kit provides sensitive, single-step, fluorescence-based assays for bacterial cell viability. The assays can be completed in minutes, do not require wash steps and can be applied to bacterial suspensions or bacteria trapped on filters. This kit may be used with a fluorescence microscope or flow cytometer.

The kit utilizes two nucleic acid stains - the green-fluorescent stain and the red-fluorescent stain. These stains differ in their ability to penetrate healthy bacterial cells. When used alone, the green-fluorescent stain labels both live and dead bacteria. In contrast, the red-fluorescent stain penetrates only bacteria with damaged membranes, reducing green fluorescence when both dyes are present. Thus, live bacteria with intact membranes fluoresce green, while dead bacteria with damaged membranes fluoresce red.

**DOCUMENT N°7 : COURBE DE CROISSANCE DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SA2 EN MILIEU TS**

t en minutes	Ln A600nm
0	-1.83
30	-1.45
60	-0.99
90	-0.443
120	-0.04
150	0.41
180	0.871
210	1.19
240	1.40
270	1.60
300	1.63
330	1.74
360	1.81



Conditions de culture :

- température = 37°C
- bain thermostaté agité (180 translations par minute)
- 50 mL de milieu TS en erlen de 150 mL

E3-U33 : BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006
Durée : 3 heures Coefficient : 3

LA LUTTE CONTRE LES VIRUS PATHOGÈNES DE LA VIGNE

L'élaboration du vin, produit de consommation voué à l'exportation, fait l'objet de contrôles extrêmement rigoureux. Ils interviennent notamment pour :

- le choix des cépages cultivés,
- la lutte contre les agents phytopathogènes,
- la sélection des souches de microorganismes impliquées dans le processus de vinification.

Nous nous intéresserons aux infections virales de la vigne et aux techniques de lutte contre les virus impliqués.

1- Étude microscopique de la cellule végétale (8 points)

L'inoculation d'un virus dans une plante saine, qu'elle se fasse par voie directe ou par le biais d'un vecteur animal, nécessite toujours une blessure préalable de la paroi de la cellule végétale.

Le **document 1** présente deux micrographies de cellule végétale.

1.1- Nommer et exposer le principe de la technique microscopique ayant permis d'obtenir cette image (la préparation de l'échantillon n'est pas demandée).

1.2- Légender le document 1.

2- Création de plantes génétiquement modifiées (13 points)

Les virus pathogènes de la vigne sont à l'origine de diminutions considérables de la quantité et de la qualité des récoltes. De plus, au contraire des champignons ou des bactéries, ils échappent à la lutte chimique.

Il est possible d'induire chez une espèce végétale, une résistance à un virus en introduisant dans le génome de la plante des gènes de ce virus.

Cette technique est une voie à l'étude pour la protection contre la maladie du court-noué de la vigne, due au grapevine fanleaf virus (GFLV), transmis à la plante par un ver nématode.

2.1- Le GFLV appartient au genre *Nepovirus* de la famille des *Comoviridae*. Il s'agit d'une particule virale à symétrie icosaédrique, non enveloppée. Le génome est constitué de deux brins d'ARN(+) linéaires, chacun associé par leur extrémité 5' à une protéine VPg, intervenant dans le cycle de multiplication du virus.

2.1.1- Que signifie l'expression ARN(+) ? Justifier la réponse.

2.1.2- Réaliser un schéma légendé de la structure d'une particule de GFLV.

2.2- Un gène codant une protéine structurale du virus a été isolé, puis inséré dans un plasmide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Après co-culture de la bactérie en présence de cellules permettant la régénération de pieds de vigne entiers, il est possible d'obtenir des plantes transformées dont on teste ensuite la résistance au virus.

- 2.2.1- Définir un plasmide. Expliquer pourquoi il constitue un bon vecteur de clonage.
- 2.2.2- Détailler les étapes suivantes du clonage du gène viral :
- construction du plasmide recombinant,
 - introduction du plasmide dans la bactérie,
 - sélection des clones transformés.

3- Détection d'une infection d'un plant de vigne par le GFLV (39 points)

La détection d'une virose dans les plants de vigne est extrêmement importante en particulier lors de la sélection des cépages utilisés.

Deux méthodes peuvent être mises en oeuvre :

- Test immunologique : ELISA.
- Test moléculaire : RT-PCR.

3.1- Test immunologique de détection du GFLV (18 points)

Les tests immunologiques de mise en évidence du GFLV nécessitent l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre certains antigènes de surface du virus. Le **document 2** présente un protocole d'obtention des anticorps monoclonaux.

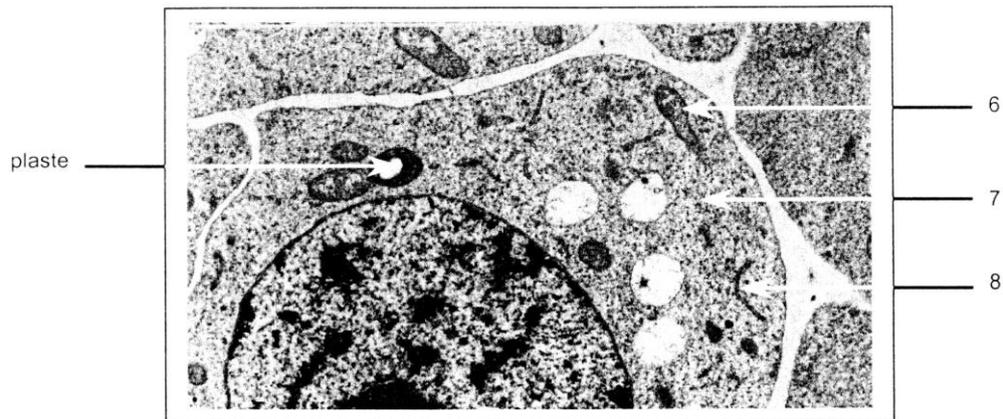
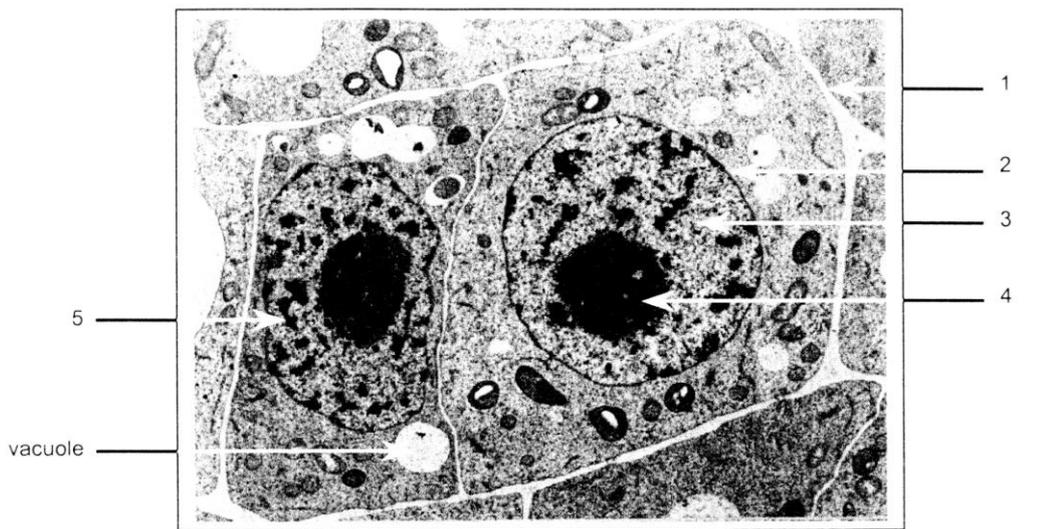
- 3.1.1- Réaliser un schéma légendé de la structure d'un anticorps. Localiser et nommer le site de fixation de l'antigène.
- 3.1.2- Quelles sont les caractéristiques des lymphocytes B et des cellules myéломateuses utilisées dans l'étape 2 du **document 2** ?
- 3.1.3- Compléter le **document 2** et commenter l'étape 3 à l'aide des données du **document 3**.
- 3.1.4- On utilise un test de détection ELISA de type sandwich.
Schématiser les étapes du principe de cette méthode appliquée à la détection du GFLV dans un broyat de feuille de vigne, sans extraction complémentaire.

3.2- Test moléculaire de détection : RT-PCR. (17 points)

- 3.2.1- Donner la signification du sigle RT-PCR. Exposer le principe général de cette méthode.
- 3.2.2- Le **document 4** représente le protocole de réalisation technique.
- 3.2.2.1- Expliquer le rôle des étapes 1, 2 et 3 en précisant notamment les actions respectives de l'EDTA et du SDS.
- 3.2.2.2- Préciser le rôle des hexamères introduits dans le milieu réactionnel lors de l'étape 9 du **document 4**.
- 3.2.3- Pour détecter le GFLV dans un plant de vigne, on procède à l'amplification du gène codant la polymérase virale (position 4629-5345). La séquence partielle de ce gène est présentée dans le **document 5**.
- 3.2.3.1- Compléter le **document 5** en écrivant la séquence du brin d'ADN complémentaire.
- 3.2.3.2- Le choix du couple d'amorces est essentiel pour l'amplification. Le **document 6** propose deux couples d'amorces. Choisir celui permettant d'effectuer l'amplification de la séquence cible. Positionner chacune des amorces choisies sur le **document 5**.
- 3.2.4- Schématiser le déroulement d'un cycle de PCR.

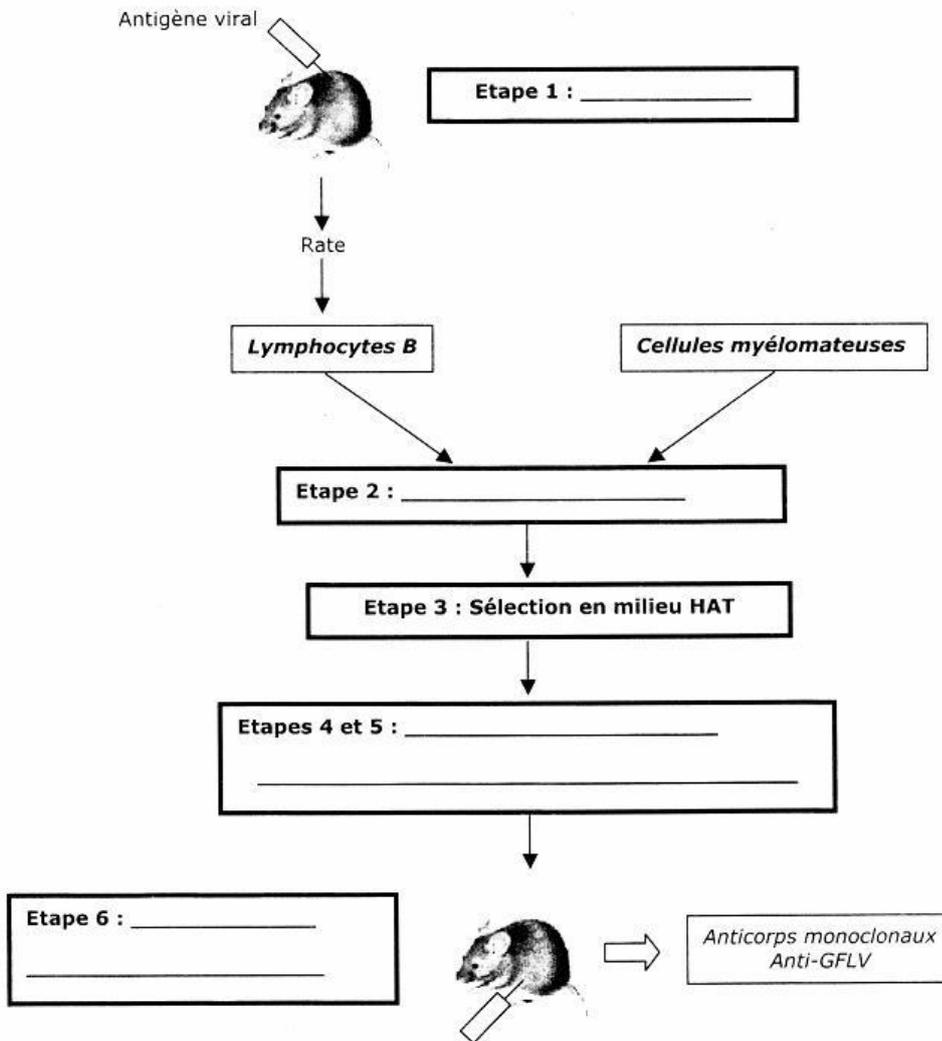
3.3- Comparaison des deux méthodes. (4 points)

Donner les principaux avantages et inconvénients des deux méthodes utilisées.
DOCUMENT 1 : MICROGRAPHIES DE CELLULE
VÉGÉTALE (A: x8000 et B:x14000)



A RENDRE AVEC LA COPIE

DOCUMENT 2 : PROTOCOLE D'OBTENTION D'ANTICORPS
MONOCLONAUX

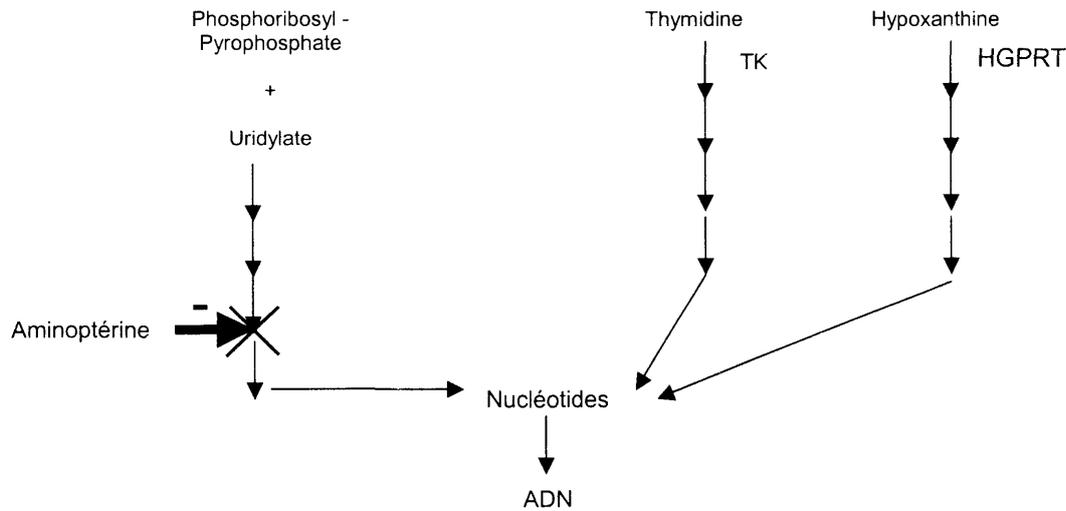


DOCUMENT 3 : VOIES DE SYNTHÈSE DES NUCLÉOTIDES CHEZ LES MAMMIFÈRES

- Il existe deux voies de synthèse des nucléotides chez les mammifères :
 - la voie de synthèse *de novo*
 - la voie de récupération qui se met en place lorsque la voie *de novo* est bloquée.

Voie de novo

Voie de récupération



TK = Thymidine Kinase

HGPRT = Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase

- Milieu HAT = Milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine

DOCUMENT 4 : PROTOCOLE DE DÉTECTION DU GFLV PAR RT-PCR

Échantillon : Feuille de vigne

EXTRACTION DE L'ARN VIRAL

Étape 1 : Broyage dans un mortier des feuilles congelées dans l'azote liquide

Étape 2 : Action d'un tampon d'extraction
(Tris 100 mmol.L⁻¹, LiCl 0,1 mol.L⁻¹, EDTA 100 mmol.L⁻¹, SDS 35 mmol.L⁻¹ pH 8)

Étape 3 : Action d'un mélange phénol - chloroforme - alcool isoamylique (25-24-1)

Étape 4 : Précipitation par LiCl (2 mmol.L⁻¹) (2 h à 4°C)

Étape 5 : Centrifugation (16000 g à 4°C)

Étape 6 : Lavage du culot par l'éthanol à 70 %

Étape 7 : Mise en suspension de l'ARN dans de l'eau déminéralisée stérile

RT-PCR

Étape 8 : Dénaturation de l'ARN (10 min à 65°C)

Étape 9 : Ajout au mélange réactionnel de la rétrotranscriptase (RT)
et d'un mélange d'hexamères (45 min à 42°C).

Étape 10 : Ajout au mélange réactionnel de :

E4-U40 : SCIENCES ET TECHNOLOGIES BIOINDUSTRIELLES 2006

Durée : 2 heures

Coefficient : 3

Calculatrice interdite

LE COMTÉ

Le comté est un fromage fabriqué dans l'Est de la France. Plus de 3000 exploitations fournissent le lait à 192 laiteries, appelées fruitières, pour produire toute l'année ce fromage.

1- La matière première : le lait (20 points)

1.1- Citer les principaux éléments constitutifs du lait et préciser un ordre de grandeur de leur concentration massique.

1.2- Pour standardiser le lait, celui-ci est écrémé puis reconstitué avec des quantités de matières grasses précises.

1.2.1- L'écémage du lait est réalisé par centrifugation.

La loi de Stokes définissant la vitesse de sédimentation d'une particule pour un régime laminaire s'exprime ainsi :

$$V = \frac{D^2}{18.\eta} \times (\rho_p - \rho_f) \times \omega^2 \times R$$

avec :

D : diamètre de la particule

η : viscosité de la phase dispersante

ρ_p : masse volumique de la particule

ρ_f : masse volumique de la phase dispersante

ω : vitesse angulaire

R : rayon de centrifugation

1.2.1.1- Donner le principe général de la centrifugation.

1.2.1.2- Quelle est la condition pour séparer par sédimentation les éléments dispersés d'une phase dispersante ?

1.2.1.3- Sur quels paramètres peut-on agir, d'après la loi de Stokes, pour séparer plus rapidement deux constituants ?

1.2.2- La crème est séparée du lait à l'aide d'une centrifugeuse à assiettes (document 1) (à rendre avec la copie).

1.2.2.1- Légender le document 1.

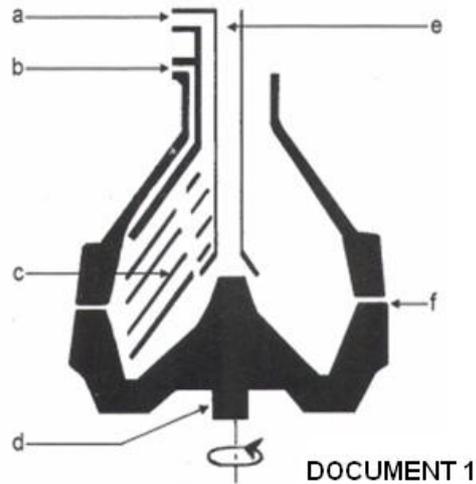
1.2.2.2- Indiquer, sur le schéma, le sens de progression du lait et de chaque phase séparée.

1.2.2.3- Justifier, à partir des propriétés de ces phases, leur comportement dans cette centrifugeuse.

1.2.3- Après reconstitution du lait celui-ci est homogénéisé.

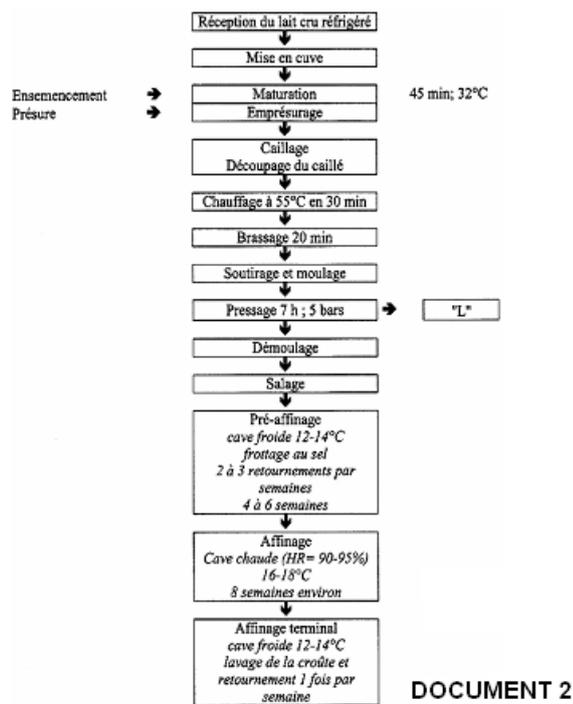
1.2.3.1- Que se passe-t-il lors de l'homogénéisation ?

1.2.3.2- Quel intérêt présente l'homogénéisation dans le cadre de la conservation du lait ?



2- Étude des étapes de la fabrication du comté (17 points)

Le diagramme de fabrication du Comté est schématisé sur le document 2.



2.1- Le caillage

2.1.1- Présenter les différentes étapes du caillage par la présure.

2.1.2- Préciser un autre mode de caillage utilisé dans la fabrication de certains fromages, ainsi qu'un moyen pour le mettre en œuvre.

2.2- Le moulage et le pressage

Ces étapes de moulage et de pressage font apparaître un sous-produit liquide noté "L" sur le diagramme de fabrication du Comté.

2.2.1- Donner le nom de ce sous-produit "L".

2.2.2- Préciser sa composition qualitative.

2.2.3- Dans le cadre de la valorisation des sous-produits de l'industrie laitière, indiquer trois utilisations possibles de "L".

2.3- Le salage

2.3.1- Préciser les actions du sel dans la fabrication des fromages.

2.3.2- Indiquer deux techniques de salage utilisées dans la fabrication des fromages.

2.4- L'affinage

2.4.1- Indiquer les modifications biochimiques apportées au caillé lors de l'étape d'affinage.

2.4.2- En quoi les variations de température de cave peuvent-elles intervenir dans l'affinage du Comté ?

3- L'A.O.C. (23 points)

Le Comté est titulaire d'une appellation d'origine contrôlée (A.O.C.).

3.1- Que définit une A.O.C ?

3.2- Par qui est attribuée une A.O.C ?

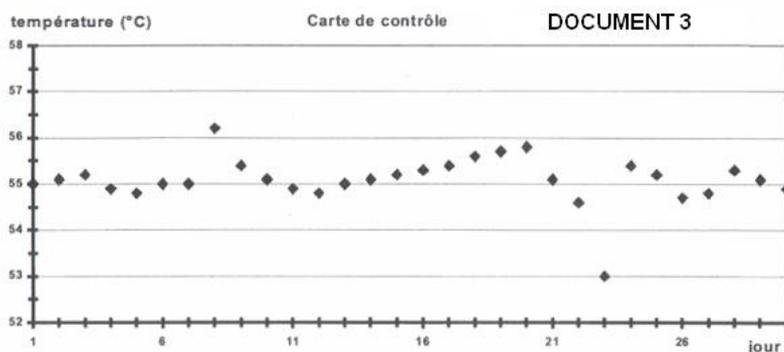
3.3- Les contrôles

Pour permettre une amélioration régulière de la qualité, la filière Comté a mis en place un service technique de contrôle.

3.3.1- De façon générale, quels sont les types de contrôles à effectuer sur le lait ? Citer deux exemples pour chaque type.

3.3.2- A l'aide du diagramme de fabrication du Comté (document 2), indiquer les paramètres physiques à contrôler. Préciser les étapes concernées.

3.3.3- Une carte de contrôle (document 3) est établie pour suivre la température lors du brassage.



3.3.3.1- Compléter la carte de contrôle (document 3), en plaçant la valeur cible, les limites.

3.3.3.2- Analyser et interpréter les résultats sur la période étudiée.

Données : valeur cible $t_c = 55,0$ °C et écart-type $\sigma = 0,5$ °C

3.4- L'assurance qualité

Une démarche d'hygiène est mise en place selon une méthode H.A.C.C.P.

Donner les principes de base de la mise en place de cette méthode.

3.5- La commercialisation

3.5.1- Les laboratoires de la D.G.C.C.R.F ont pour mission de contrôler et de sanctionner les fraudes pour "non conformité" sur les produits alimentaires.

3.5.1.1- Donner la signification du sigle D.G.C.C.R.F.

3.5.1.2- Le décret n° 88-1206 du 30 décembre 1988 et les décrets spécifiques aux appellations d'origine contrôlée fixent la teneur minimale en matière grasse.

Un Comté affiche un taux de matières grasses de 45 % sur extrait sec.

Préciser la signification de l'unité utilisée pour exprimer ce taux de matières grasses.

Indiquer une autre expression du taux de matières grasses d'un fromage.

3.5.2- Le Comté est commercialisé au rayon des fromages.

Quelles sont les mentions qui devront figurer sur l'étiquette de vente ?

E5-U51 : TP TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 2006**SUJET 1****Durée : 4 heures****Coefficient : 4****ANALYSES EN AMYLO-GLUCOSERIE**

L'hydrolyse enzymatique totale de l'amidon permet d'obtenir des sirops de glucose. Des dosages chimiques fondés sur les propriétés réductrices des sucres libérés par hydrolyse de l'amidon restent d'actualité dans les bioindustries de l'amidon. L'activité catalytique des préparations amylasiques est mesurable à l'aide de l'utilisation de substrats synthétiques libérant un chromogène après hydrolyse.

Le sujet proposé comprend deux parties :

- Recherche d'effets de matrice lors du dosage des sucres réducteurs par la méthode au 3,5-dinitrosalicylate.
- Dosage de l'activité d'une préparation d'amylase.

Première partie : RECHERCHE D'EFFETS DE MATRICE. (53 points)

L'étude proposée est une recherche d'effets de matrice. Il faut démontrer que les effets de matrices sont non significatifs pour le type d'échantillons à mesurer. Il s'agit ainsi de retrouver de façon significative le glucose ajouté sur des échantillons analysés avant et après ajout.

On appelle matrice l'ensemble des constituants présents dans un échantillon autres que la substance dosée appelée "analyte".

La méthode étudiée est un dosage des sucres réducteurs au 3,5-dinitrosalicylate (3,5-DNS). Elle est utilisée pour mesurer la concentration en équivalent glucose dans des hydrolysats enzymatiques d'amidon (en toute rigueur, on mesure un pouvoir réducteur exprimé en équivalent glucose).

1- Réaction colorée.**1.1- Principe.**

Le 3,5-DNS réagit avec les sucres réducteurs en donnant un produit coloré quantifiable par photométrie à 530 nm.

1.2- Protocole opératoire.Conditions opératoires

La réaction de la méthode au 3,5-DNS est complexe. Pour que les résultats soient reproductibles, le candidat veillera :

- à placer ses tubes dans un bain marie à ébullition soutenue, avec un niveau d'eau dépassant le niveau de liquide dans les tubes ;
- à mesurer le temps avec précision et respecter une température d'incubation de 100°C ;
- à refroidir immédiatement les tubes réactionnels après leur sortie du bain marie, dans un bain d'eau à 0-4°C.

Lorsque ces conditions sont respectées, les tubes de gamme et les essais peuvent être réalisés indépendamment. La coloration est stable une heure.

Réalisation du dosage

Dans chaque tube à essais, introduire :

- 1,000 mL de solution glucosée (étalons ou solutions E).
- Ajouter 1,5 mL de réactif au 3,5-DNS dans chaque tube.

- Boucher les tubes avec du papier d'aluminium et les porter **à 100°C** (bain d'eau en ébullition) pendant **5 minutes exactement**. Refroidir dans un bain d'eau à 0-4°C.
 - Après refroidissement, ajouter 7,5 mL d'eau déminéralisée.
 - Lire l'absorbance à 530 nm **contre de l'eau**.
- Relever les absorbances en présence d'un examinateur.**

2- Étalonnage. (26 points)

2.1- Réactifs et matériel :

- Glucose pur anhydre (près des balances).
- Réactif au 3,5-DNS en distributeur réglé à 1,5 mL.
- Eau déminéralisée en distributeur réglé à 7,5 mL
- 6 tubes à essais.
- 1 fiole jaugée de 200 mL.
- 7 cuves pour photométrie visible.
- 1 chronomètre

2.2- Protocole opératoire.

Préparation de la solution étalon

Préparer par pesée exacte de glucose pur et anhydre (balance au 1/10 de mg) 200 mL (en fiole jaugée) de solution étalon de glucose à 1 g/L exactement (précision 0,1 %).

Réaliser la pesée en présence d'un examinateur.

Étalonnage

Dans une série de 6 tubes à essai, introduire: 0 ; 0,200 ; 0,400 ; 0,600 ; 0,800 et 1,000 mL respectivement de solution de glucose à 1 g.L⁻¹.

Compléter à 1,000 mL avec de l'eau déminéralisée.

Réaliser l'étalonnage selon le **protocole opératoire présenté en 1.2.**

2.3- Compte rendu.

Rassembler les résultats en complétant le tableau étalonnage de l'annexe 1.

À l'aide d'un logiciel informatique, tracer le graphique de la fonction d'étalonnage $\Delta A = f(Q)$ en utilisant un modèle linéaire et donner les paramètres de cette fonction (coefficient directeur et ordonnée à l'origine).

3- Étude d'effets de matrice. (27 points)

3.1- Réactifs et matériel :

- 10 solutions E_{1,0} à E_{5,1}.
- réactif au 3,5-DNS en distributeur réglé à 1,5 mL.
- Eau déminéralisée en distributeur réglé à 7,5 mL.
- 10 tubes à essai.
- 11 cuves pour photométrie visible.

3.2- Principe de l'étude.

On dose l'équivalent glucose de chaque échantillon par la méthode au 3,5-DNS sur 1,000 mL d'échantillon dans exactement les mêmes conditions que l'étalonnage.

Pour l'étude d'effets de matrice, il faut effectuer des ajouts dosés de glucose à des échantillons E_i. Chaque échantillon est analysé sans ajout (solution E_{i,0}) et avec ajout (solution E_{i,1}).

10 solutions, dont la composition est donnée dans le tableau ci-dessous, sont ainsi disponibles.

Composition

Solution E _{1,0}	Échantillon E1 brut (pas d'ajout réalisé)
Solution E _{1,1}	Échantillon E ₁ auquel on a ajouté 0,15 mg/mL de glucose exactement
Solution E _{2,0}	Échantillon E ₂ brut (pas d'ajout réalisé)
Solution E _{2,1}	Échantillon E ₂ auquel on a ajouté 0,20 mg/mL de glucose exactement
Solution E _{3,0}	Échantillon E ₃ brut (pas d'ajout réalisé)
Solution E _{3,1}	Échantillon E ₃ auquel on a ajouté 0,30 mg/mL de glucose exactement
Solution E _{4,0}	Échantillon E ₄ brut (pas d'ajout réalisé)
Solution E _{4,1}	Échantillon E ₄ auquel on a ajouté 0,40 mg/mL de glucose exactement
Solution E _{5,0}	Échantillon E ₅ brut (pas d'ajout réalisé)
Solution E _{5,1}	Échantillon E ₅ auquel on a ajouté 0,50 mg/mL de glucose exactement

3. 3 – Protocole opératoire.

Dans une série de 10 tubes à essai, introduire 1,000 mL de chacune des 10 solutions E_{1,0} à E_{5,1}. Dosier les sucres réducteurs par la méthode au 3,5-DNS selon le **protocole opératoire présenté en 1.2.**

3. 4 – Résultats et analyse graphique.

Rassembler les résultats expérimentaux dans le tableau 1 (étude d'effets de matrice) de l'annexe 1.

En dosant les solutions E_{i,0} on obtient la quantité d'équivalent glucose dans 1 mL de chaque échantillon E_i sans ajout. Soit x_i ces valeurs.

En dosant les solutions E_{i,1} on obtient la quantité d'équivalent glucose dans 1 mL de chaque échantillon E_i après l'ajout de glucose. Soit w_i ces dernières valeurs.

Soit r_i = w_i - x_i quantité ajoutée retrouvée expérimentalement.

Pour chaque échantillon, on connaît v_i, la quantité de glucose ajoutée par pesée à chaque fraction de 1 mL d'échantillon E_i pour réaliser les solutions E_{i,1} (voir tableau page 2/6).

Compléter le tableau 2 de l'annexe 1.

Soit l'ensemble des points de coordonnées (v_i ; r_i). On peut construire la droite de régression, appelée "droite de recouvrement", d'équation $r = C_0 + C_1 v$ qui passe parmi les points.

Si la pente C₁ de cette droite est statistiquement équivalente à 1 et son ordonnée à l'origine C₀ statistiquement équivalente à 0, on peut conclure à l'absence d'effets de matrice.

À l'aide d'un logiciel informatique :

- tracer la droite de recouvrement ;
- déterminer la pente C₁ de cette droite et son ordonnée à l'origine C₀.

Commenter les résultats obtenus.

Deuxième partie : DOSAGE DE L'AMYLASE. (27 points)**1 – Principe.**

L'hydrolyse de l'amidon peut être catalysée par des amylases. L'activité d'un lot d'amylase est mesurée par son action sur un substrat synthétique : l'éthylidène-4,6(G₇)-p-nitrophényl(G₁)-αD-maltoheptaose.

Cet oligoside est dégradé sous l'action catalytique de l'amylase :



Les fragments G₂PNP, G₃PNP et G₄PNP qui en résultent sont complètement hydrolysés par l' α -glucosidase en p-nitrophénol et glucose.



(PNP = p-nitrophénol ; G = glucose)

L'intensité de la coloration développée, liée à l'apparition du PNP, est directement proportionnelle à l'activité de l'amylase et est mesurée par photométrie à 405 nm.

2- Réactifs et matériels :

- Réactif R1 : tampon/enzyme. 4 mL
Tampon HEPES 52,5 mmol/L, pH 7,15 ; chlorure de sodium: 87 mmol/L ; chlorure de magnésium : 12,6 mmol/L ; chlorure de calcium : 0,075 mmol/L ; α -glucosidase 4 kU/L ; conservateur
- Réactif R2 : tampon/substrat. 4 mL. À conserver à + 4° C.
Tampon HEPES 52,5 mmol/L, pH 7,15 ; éthylidène-4,6(G₇)-p-nitrophényl(G₁)- α D-maltoheptaose 22 mmol/L ; conservateur.
- Réactif d'arrêt alcalin : NaOH 2 mol/L. 4 mL (CORROSIF).
- Eau physiologique : 15 mL.
- Solution d'amylase à diluer extemporanément au 1/20 en eau physiologique. 0,8 mL. À conserver à + 4° C.
- 3 cuves pour photométrie visible
- 1 fiole jaugée de 10 mL.
- 1 chronomètre.

3- Protocole opératoire. (2 essais)

Dans un tube à hémolyse verser :

Réactif R1 : 1 mL

Réactif R2 : 0,9 mL

Homogénéiser ; préincuber à 30 °C environ 5 minutes.

Ajouter 0,1 mL d'amylase diluée ; après 3 min arrêter la réaction par ajout de 1 mL de réactif d'arrêt alcalin.

Réaliser les manipulations en présence d'un examinateur.

Lire les absorbances à 405 nm contre un blanc, la coloration est stable 15 minutes.

4- Compte rendu et résultats.

Compléter le tableau de résultats fourni. Décrire la réalisation du blanc.

Établir l'expression littérale du calcul de la concentration catalytique en U par mL d'enzyme non diluée.

Déterminer pour chaque essai, la concentration d'activité catalytique de la préparation d'amylase en U par mL d'enzyme non diluée sachant que 1 unité d'amylase est définie comme la quantité d'enzyme catalysant la libération d'une micromole de PNP par minute dans les conditions opératoires.

$$\epsilon_{\text{PNP}} = 17\,500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ à } \lambda = 405 \text{ nm}$$

Valider le dosage selon le plan d'acceptabilité des résultats fourni dans l'annexe 2. Ainsi, après avoir dosé l'échantillon amylase deux fois (en conditions de répétabilité), appliquer le protocole de validation fourni en annexe 2 puis, en fonction de l'écart entre les 2 résultats, conclure sur le résultat final ou la nécessité de réaliser un essai supplémentaire.

Donnée :

l'écart-type de répétabilité est constant sur le domaine des mesures et est égal, à 0,2 U. mL⁻¹ d'enzyme non diluée. **Annexe 1** **poste n°**

Relevé de valeurs expérimentales et calculs intermédiaires**I - Recherche d'effets de matrice.****Étalonnage**

Tubes	Témoin réactif	1	2	3	4	5
volume d'étalon glucose à 1 g/L en mL	0	0,200	0,400	0,600	0,800	1,000
Q = Quantité de glucose en mg	0					
Absorbance contre l'eau ($\lambda = 530$ nm)						
ΔA = Absorbance diminuée de l'absorbance du témoin réactifs	0					

Étude d'effets de matrice**Tableau 1**

	Absorbance contre l'eau ($\lambda = 530$ nm)	Absorbance diminuée de l'absorbance du témoin réactif (ΔA)	Quantité de glucose, en mg, mesurée dans 1 mL (*)
Solution E _{1,0}			x ₁ =
Solution E _{1,1}			w ₁ =
Solution E _{2,0}			x ₂ =
Solution E _{2,1}			w ₂ =
Solution E _{3,0}			x ₃ =
Solution E _{3,1}			w ₃ =
Solution E _{4,0}			x ₄ =
Solution E _{4,1}			w ₄ =
Solution E _{5,0}			x ₅ =
Solution E _{5,1}			w ₅ =

Tableau 2

	x _i (*) en mg dans 1 mL d'échantillon	v _i (*) en mg dans 1 mL d'échantillon	w _i (*) en mg dans 1 mL d'échantillon	r _i = w _i -x _i (*) en mg dans 1 mL d'échantillon
Echantillon E ₁		0,15		
Echantillon E ₂		0,20		
Echantillon E ₃		0,30		
Echantillon E ₄		0,40		
Echantillon E ₅		0,50		

Notes (*):

Les résultats de x_i, v_i, w_i, r_i seront donnés avec 4 chiffres significatifs dans le tableau ci-dessus.

II - Dosage de l'amylase.

	Essai 1	Essai 2
Abs à 405 nm à t = 3 min		

Annexe 2

Acceptabilité des résultats d'essais
D'après la norme ISO 5725-6 :1994(F)

Plan à 2 résultats obtenus pour débiter et troisième résultat supplémentaire éventuellement déterminé (en conditions de répétabilité).

$CR_{(2)}$ = conditions de répétabilité pour 2 essais.

$CR_{(3)}$ = conditions de répétabilité pour 3 essais.

La différence absolue entre les deux résultats doit être comparée à la limite $CR_{(2)} = 2,8 \sigma_r$.

Où σ_r est l'écart type de répétabilité.

En effet, pour une distribution normale, l'étendue critique au niveau de probabilité 95% de la différence entre deux résultats est de 2,8 fois l'écart-type.

Si la différence absolue entre les deux résultats ne dépasse pas $CR_{(2)}$ alors les deux résultats sont considérés acceptables, il convient de donner comme résultat final établi la moyenne arithmétique des deux résultats.

Si la différence absolue entre les deux résultats dépasse $CR_{(2)}$ il convient d'obtenir un troisième résultat.

L'étendue des trois résultats ($X_{\max} - X_{\min}$) doit être comparée à la limite $CR_{(3)} = 3,3 \sigma_r$. Où σ_r est l'écart type de répétabilité, X_{\max} et X_{\min} le plus grand et le plus petit des résultats respectivement.

En effet, pour une distribution normale, l'étendue critique au niveau de probabilité 95% de la différence entre le plus grand et le plus petit parmi trois résultats est de 3,3 fois l'écart-type.

Si l'étendue des 3 résultats ne dépasse pas $CR_{(3)}$ il convient de donner comme résultat final établi la moyenne arithmétique des trois résultats.

Si l'étendue des trois résultats est supérieure à la limite $CR_{(3)}$ il convient de donner comme résultat final établi la médiane des trois résultats soit le résultat médian.

E5-U51 : TP TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 2006

SUJET 2

Durée : 3 heures

Coefficient : 4

CONTRÔLE D'UN "MIX" DESTINÉ À LA FABRICATION DE PAIN

Le pain est essentiellement constitué de farine de froment, de sel, de levure et d'eau. Cependant l'addition de certains composés est autorisée afin de pallier les déficiences des farines ou d'améliorer la panification. Parmi les auxiliaires de fabrication utilisés, on trouve notamment l'acide ascorbique ou vitamine C et des amylases.

On se propose de réaliser des contrôles dans un "mix" destiné à la fabrication de pain, mélange composé de farine de froment, d'auxiliaires de fabrication et d'additifs :

- extraction et dosage des gliadines,
- détermination de la teneur en acide ascorbique (E 300),
- détermination de l'activité d'une enzyme : l' α -amylase.

1- Extraction et dosage des gliadines (37 points)

Les gliadines, protéines du froment, présentent un polymorphisme variétal important, ce qui permet l'identification ou la vérification de la pureté d'une matière première.

La première étape de l'analyse intègre l'extraction et le dosage.

1.1- Premier temps d'extraction (déjà réalisé) :

Le premier temps d'extraction a été mené de la façon suivante :

Pesée exacte de 1,50 g de mix dans un tube à centrifuger.

Ajout de 10 mL de solution aqueuse d'éthanol à 40 % (v/v).

Homogénéisation 4 fois 30 secondes au vortex.

Centrifugation 10 minutes à 3 000 g .

Une fraction du surnageant a été prélevée et transférée dans un microtube à centrifuger.

Ce surnageant S est fourni pour réaliser la suite de l'extraction.

1.2- Deuxième temps d'extraction des gliadines :

1.2.1- Objectif

Une deuxième extraction est nécessaire afin de purifier la phase éthanolique.

La concentration finale de 70 % en éthanol permet le dosage des protéines par la méthode du biuret.

1.2.2- Matériel et réactifs

- Surnageant noté "S" en microtube à centrifuger (1 mL).
- Éthanol à 95 % (v/v) en microtube (1 mL).
- Microtubes type Eppendorf.

1.2.3- Protocole opératoire

Transférer 0,500 mL du surnageant S fourni dans un microtube.

Ajouter 0,600 mL d'éthanol à 95 % (v/v), volume nécessaire pour amener la concentration à 70 % (v/v) en éthanol.

Homogénéiser au vortex.

Laisser 15 minutes à température ambiante.

Centrifuger 5 minutes en microcentrifugeuse à 9 000 g.
Prélever le surnageant S_P pour le dosage des protéines.

1.3- Dosage des protéines : méthode du biuret

1.3.1- Matériel et réactifs

- solution étalon de SAB à 5 mg.mL^{-1} en eau physiologique (1 mL),
- solution contrôle à exactement $2,00 \text{ g.L}^{-1}$ notée "P_{cont}" (0,5 mL),
- eau physiologique (2 mL),
- réactif de Gornall (en distributeur),
- 8 microcuves.

1.3.2- Protocole opératoire

A partir d'une solution étalon de sérumalbumine bovine (SAB) à 5 mg.mL^{-1} , réaliser en microcuves une gamme d'étalonnage de 0,25 à 1 mg par cuve, en eau physiologique, sous un volume de 200 μL .

Ajouter 1 mL de réactif cuproalcalin de Gornall. Homogénéiser.

Laisser développer la coloration 20 minutes à l'obscurité puis mesurer l'absorbance à 540 nm contre un témoin convenable.

Réaliser 2 essais sur 100 μL du surnageant S_P .

Effectuer un contrôle du dosage à l'aide de la solution P_{cont} à exactement $2,00 \text{ g.L}^{-1}$.

Relever les absorbances en présence d'un examinateur.

1.4- Compte-rendu :

Justifier le volume d'éthanol à 95% ajouté.

Expliquer pourquoi dans les protocoles de centrifugation, il est préférable d'exprimer la vitesse en nombre de g plutôt qu'en nombre de tours par minute.

Exploitation des résultats :

- Compléter la feuille de résultats.
- Présenter un tableau complet du dosage des protéines.
- Exploiter les résultats à l'aide de l'outil informatique.
- Analyser le résultat du contrôle.
- Calculer la concentration en protéines du surnageant S_P .

Donnée : coefficient de variation du dosage = 1,5 %.

2- Dosage de l'acide ascorbique sur un extrait "C" purifié (21 points)

L'extraction de la vitamine C a été menée de la façon suivante :

Broyage de 200 g de "mix" dans 50 mL d'acide métaphosphorique à 0,4 %.

Filtration sur membrane d'acétate de cellulose (0,2 μm).

Chromatographie préparative sur cartouche SEP PAK C 18.

L'extrait C obtenu a été recueilli en fiole jaugée et ajusté à 50 mL pour l'analyse.

Cet extrait C est fourni pour réaliser le dosage.

2.1- Réactifs :

- "Extrait C" (20 mL),
- Solution de DCPIP à $1,50 \text{ mmol.L}^{-1}$ (60 mL),
- Eau distillée bouillie refroidie (50 mL).

2.2- Principe du dosage :

Le principe du dosage est basé sur les propriétés réductrices de l'acide ascorbique.

L'oxydant utilisé est le 2,6 dichlorophénol-indophénol (DCPIP) fourni à $1,50 \text{ mmol.L}^{-1}$.
1 mole de DCPIP oxyde 1 mole d'acide ascorbique.

2.3- Protocole opératoire (2 essais) :

Introduire dans une fiole d'Erlenmeyer :

- E = 5,00 mL de l'extrait C,
- 15 mL d'eau distillée bouillie et refroidie.

Verser la solution de DCPIP jusqu'à l'apparition d'une couleur rosé pâle persistant pendant 30 secondes.

Appeler un examinateur pour relever chaque chute de burette.

2.4- Compte rendu :

Compléter la feuille de résultats.

Calculer la concentration massique en vitamine C de l'extrait C.

Calculer la teneur du mix en acide ascorbique en mg pour 100 g.

On admettra que le rendement de l'extraction est de 100 %.

Conclure.

Données : $M_{\text{vitamine C}} = 176,13 \text{ g. mol}^{-1}$.

Le coefficient de variation du dosage = 0,5 %.

La teneur maximale de vitamine C conseillée dans le mix est de 300 mg.kg^{-1} .

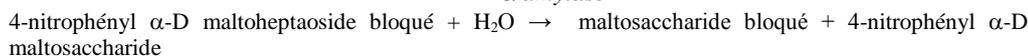
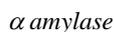
3- Dosage de l' α -amylase sur un extrait "A" purifié (22 points)

3.1- Principe :

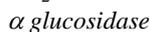
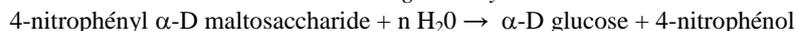
Le substrat utilisé est le 4-nitrophényl α -D maltoheptaoside 4,6 o-éthylidène dérivé du maltoheptaoside, sur lequel sont branchés :

- une molécule de 4-nitrophénol,
- un réactif bloquant les fonctions hydroxyles libres en position 4 et 6.

La réaction principale catalysée par l' α -amylase est la suivante:



Puis le 4-nitrophényl α -D maltosaccharide est hydrolysé en présence de la glucoamylase et de l' α -glucosidase selon la réaction globale suivante:



L'ensemble du processus réactionnel est bloqué par addition de trizmabase.

On mesure le 4-nitrophénol formé par spectrophotométrie à 410 nm.

3.2- Réactifs :

- "mélange pré réactionnel" (8 mL) ;
- extrait amylosique noté "A" (100 μ L) à conserver dans la glace ;
- trizmabase (3 mL).

3.3- Protocole opératoire (2 essais) :

Réaliser l'ensemble de la manipulation en présence d'un examinateur.

Préincuber en tube à hémolyse 2 mL de mélange pré réactionnel (substrat + α -glucosidase + glucoamylase).

Déclencher la réaction par ajout de 0,020 mL de "A".

Après 10 minutes exactement à 40°C arrêter la réaction par addition de 0,7 mL de trizmabase.

Mesurer l'absorbance à 410 nm contre un témoin adéquat.

3. 4- Compte rendu :

Quelle est la méthode enzymatique utilisée pour cette détermination ?

Compléter la feuille de résultats.

Donner la composition quantitative du témoin.

Établir la formule littérale permettant de calculer la concentration d'activité catalytique de l'extrait α -amylase en U.mL⁻¹.

Effectuer l'application numérique.

Données : - $\epsilon_{410\text{nm}}^{4\text{-nitrophénol}} = 1800 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

- 1 U correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 μmol de 4-nitrophénol par minute.

- Le coefficient de variation du dosage = 2,5 %.

Feuille de résultat

poste n°

I- Extraction et dosage des gliadines.

Résultats du dosage des protéines par la méthode du biuret :

	Gamme d'étalonnage	essais	contrôle
Masse de protéine / cuve en mg			
A _{540 nm}			

II- Dosage de l'acide ascorbique sur un extrait "C" purifié.

Essai	1	2
V _{éq} en mL		

III- Dosage de l' α -amylase sur un extrait "A" purifié.

Essai	1	2
$\Delta A_{410\text{nm}}$ en 10 minutes		

E5-U51 : TP TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 2006**SUJET 3****Durée : 4 heures****Coefficient : 4****QUELQUES ASPECTS DES CONTRÔLES DE QUALITE SUR UN MIEL**

La qualité d'un miel peut être étudiée par différentes approches : sensorielle, organoleptique, pollinique, physicochimique, biochimique.

On se propose d'effectuer quelques analyses relatives au contrôle de la qualité d'un miel d'acacia liquide :

- teneur en eau par mesure réfractométrique,
- composition en glucides par chromatographie sur couche mince,
- activité diastase par une technique enzymatique,
- teneur en proline par une méthode colorimétrique.

On dispose de miel d'acacia liquide pur et de deux échantillons "M" et "P" obtenus selon le protocole suivant :

Homogénéiser le miel d'acacia à l'aide d'une baguette de verre. Peser à 0,01 g près 10 g de miel dans un bécher de 50 mL, les dissoudre dans 25 à 30 mL d'eau distillée, transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 100 mL et compléter jusqu'au trait de jauge.

On obtient l'échantillon "M". L'échantillon "P" a la même concentration massique en miel mais a été préparé de manière à stabiliser la proline contenue.

1- Teneur en eau. (14 points)

La teneur en eau (W) est un paramètre légal. Seuls les produits qui contiennent au maximum 20 % d'eau peuvent prétendre à l'appellation "miel".

1.1- Principe.

La teneur en eau d'un miel est déterminée à partir de l'indice de réfraction du miel à 20°C. L'indice est corrélé à la teneur en eau par l'expression suivante (arrêté du 15/02/1977) :

$$W = \frac{-0,26810 - \log(IR-1)}{0,002243}$$

Avec: - W en g d'eau pour 100 g de miel.

- IR : indice de réfraction à 20°C.

Si la mesure de l'indice se fait à une température différente de 20°C, une correction de l'indice de réfraction est nécessaire :

- Pour une mesure de l'indice réfraction réalisée à une température supérieure à 20°C, corriger l'indice mesuré par soustraction de $2,3 \cdot 10^{-4}$ par °C supérieur.

- Pour une mesure de l'indice réfraction réalisée à une température inférieure à 20°C, corriger l'indice mesuré par addition de $2,3 \cdot 10^{-4}$ par °C inférieur.

1.2- Matériel et réactifs :

- Réfractomètre du type ABBE non numérique étalonné par de l'eau distillée à la température ambiante avec fiche de procédure d'utilisation.
- Thermomètre.
- Chronomètre.
- Bâtonnet de prélèvement.
- Miel d'acacia liquide à température ambiante noté "Miel".

1. 3- Protocole opératoire.

Vérifier l'étalonnage de l'appareil.

S'assurer que le prisme du réfractomètre est propre et sec.

A l'aide d'une spatule, recouvrir la surface du prisme avec l'échantillon.

Après 2 min d'attente, lire l'indice de réfraction.

Nettoyer le prisme.

Recommencer l'opération avec une nouvelle prise d'essai de miel.

Effectuer les mesures en présence d'un examinateur.

1. 4- Compte-rendu.

Compléter la feuille de résultats.

À partir de l'indice de réfraction mesuré, calculer la teneur en eau du miel à 20°C (en g d'eau pour 100 g de miel).

Conclure.

Justifier les 2 minutes d'attente avant lecture de l'indice de réfraction.

Préciser les précautions à prendre lors du nettoyage du prisme.

2- Composition qualitative en glucides. (18 points)**2. 1- Principe.**

Les glucides représentent 80 % de la masse des miels. Leur identification et leur dosage sont des éléments clé du contrôle des appellations florales et de la recherche de certaines fraudes.

Les glucides en concentration suffisante peuvent être aisément identifiés par chromatographie sur couche mince.

2. 2- Matériel et réactifs :

- **Phase stationnaire** : 2 plaques de gel de silice activées (dimensions : 5 x 10 cm).

- **Phase mobile** : n-butanol, acide acétique, eau distillée en 4V/2V/1V (NOCIF ; CORROSIF).

- Solutions aqueuses de glucides témoins : fructose, glucose, maltose, mélibiose, raffinose, saccharose.

- Solution "M" de miel notée "M" à 100 g.L⁻¹ (3 mL).

- Réactif et dispositif de révélation.

2. 3- Protocole opératoire.

Dans un tube à hémolyse, diluer la solution "M" au 1/20.

Saturer la cuve de chromatographie par la phase mobile.

Utiliser judicieusement les deux plaques pour réaliser les dépôts des témoins et de la solution "M" diluée. Réaliser les dépôts.

Placer les plaques dans la cuve de chromatographie et laisser migrer.

Laisser sécher les plaques.

Appliquer le réactif de révélation.

Placer quelques minutes à l'étuve à 110°C.

2. 4- Compte rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Identifier les glucides présents dans le miel. Justifier.

Conclure.

Préciser l'intérêt de l'activation des plaques de silice.

Laisser les chromatogrammes sur le poste de travail.

3- Activité diastase (amylase). (21 points)

La transformation par l'abeille des nectars et miellats en miel se fait par l'adjonction d'enzymes. L'activité diastase (amylase) dépend de l'origine florale du miel et du traitement que ce dernier subit. Un chauffage du miel détruit les enzymes.

L'activité diastase du miel s'exprime en unités "Schade" ; elle doit être au minimum égale à 8 unités.

1 unité "Schade" correspond à la quantité d'enzyme contenue dans 1 g de miel, capable d'hydrolyser 0,01 g d'amidon en 1 heure à 40°C.

3.1- Principe.

Le substrat est un polymère d'amidon insoluble couplé à un chromophore bleu. Lorsqu'il est hydrolysé, le substrat libère des fragments solubles colorés. L'absorbance à 620 nm de la solution est proportionnelle à l'activité diastase.

3.2- Matériel et réactifs :

- Substrat : Tablettes Phadebas ® (amylase test) noté "Phadebas" (3 tablettes).
- Solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol.L⁻¹ noté "NaOH 0,5 mol.L⁻¹" (CORROSIF) (5 mL).
- Tampon acétate 0,1 mol.L⁻¹, pH = 5,2 noté "Tampon acétate" (50 mL).
- Solution "M" de miel notée "M" à 100 g.L⁻¹ (3 mL).
- Filtres.

3.3- Protocole opératoire.

Essais (2)

À partir de la solution "M", préparer une solution à 10 g.L⁻¹ de miel en tampon acétate.

Dans un tube à essais, introduire 5 mL de solution de miel à 10 g.L⁻¹.

Préincuber à 40°C.

Démarrer la réaction enzymatique par addition d'une tablette de Phadebas ® (temps = 0).

Agiter au vortex jusqu'à désintégration complète du substrat (environ 10 secondes).

Incuber 15 min exactement dans un bain thermostaté à 40°C.

Arrêter la réaction enzymatique par addition de 1 mL de solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol.L⁻¹.

Agiter au vortex.

Filtrer rapidement la solution obtenue,

Mesurer l'absorbance du filtrat à 620 nm contre de l'eau distillée.

Témoin

Réaliser exactement dans les mêmes conditions opératoires que les essais, un témoin permettant d'estimer l'autolyse du substrat.

3.4- Compte-rendu.

Dans les conditions du dosage, l'activité diastase (DN = "diastase number"), exprimée en unités "Schade", est donnée par l'expression suivante :

$$DN = 28,2 \times \Delta A_{620 \text{ nm}} + 2,64$$

Donner la composition du témoin réalisé.

Calculer l'activité diastase du miel analysé.

Conclure.

Préciser le mode d'action de la solution d'hydroxyde de sodium.

Donnée : le coefficient de variation de la méthode est de 5 %.

4- Teneur en proline. (27 points)

La teneur en proline est une indication pour apprécier la qualité et déceler d'éventuelles fraudes. En effet, la norme exige une teneur en proline supérieure à 200 mg de proline par kg de miel. La teneur en proline est déterminée au moyen du dosage colorimétrique à la ninhydrine. Elle est exprimée en mg de proline par kg de miel.

4.1- Principe : méthode dérivée de la méthode de COUGH.

La proline et la ninhydrine forment un complexe coloré dont le maximum d'absorbance se situe à 510 nm.

4.2- Réactifs :

- Réactif à la ninhydrine en distributeur noté "Ninhydrine" : mélange volume à volume de :
 - Acide formique (HCOOH) à 98-100% (CORROSIF).
 - Solution de ninhydrine à 3 % dans du méthylcellosolve (TOXIQUE).
- Mélange propanol-2 / eau (V/V) noté "Propanol-2/eau" (INFLAMMATOIRE et IRRITANT).
- Solution étalon mère de proline notée "Étalon proline" à 80 mg.L⁻¹ (3 mL).
- Solution "P" notée "P" à 100 g miel.L⁻¹ (3 mL).

4.3- Protocole opératoire.

Gamme étalon : Réaliser une gamme étalon de 6 tubes selon le protocole suivant :

0 à 500 µL de la solution étalon mère.

Compléter à 500 µL avec de l'eau distillée.

Ajouter 2 mL du réactif à la ninhydrine.

Mélanger, boucher les tubes avec du coton cardé.

Incuber 20 minutes au bain thermostaté à 100°C., refroidir dans un bain d'eau froide.

Ajouter 5 mL de la solution propanol-2/eau dans chaque tube et boucher immédiatement.

Après 20 minutes, lire les absorbances à 510 nm. La coloration est stable pendant 1 heure.

Essais

Réaliser dans les mêmes conditions que la gamme étalon, deux essais avec 500 µL de solution "P".

4.4- Compte-rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Exploiter les résultats expérimentaux à l'aide de l'outil informatique.

Calculer la teneur en proline du miel en mg.kg⁻¹.

Conclusion.

Préciser pourquoi les tubes de colorimétrie sont bouchés immédiatement après ajout du mélange

propanol-2/eau.

Indiquer combien de temps on peut conserver les tubes après ajout du mélange propanol-2/eau.

Donnée : le coefficient de variation de la méthode est de 5 %.**Feuille de résultats**
poste n°

1 - Teneur en eau.

Température de mesure en °C	4.1- Indices mesurés	Indice de réfraction moyen	Indice de réfraction corrigé
--------------------------------	-----------------------------	-------------------------------	---------------------------------

2 - Composition en glucides.

	Fructose	Glucose	Maltose	Mélibiose	Raffinose	Saccharose
Couleur						
Rf						

4.1.1- iel

Couleur
Rf

3 - Activité diastase (amylase).

	Témoins		Essais			
A 620 nm						
ΔA 620 nm						

4 -Teneur en proline.

N° Tube	1	2	4	5	6	E1	E2
Volume solution étalon à 80 mg.L ⁻¹ en mL							
Quantité de proline en µg/tube							
A 510 nm							

E5-U51 : TP TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 2006**SUJET 4****Durée : 3 heures 30****Coefficient : 4****CONTRÔLES QUALITÉ AU SEIN D'UNE CHAÎNE DE PRODUCTION EN BRASSERIE**

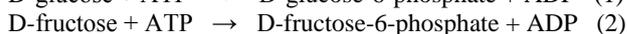
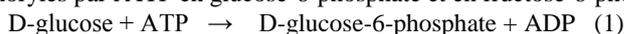
La bière est une boisson obtenue par fermentation d'un moût fabriqué avec du malt d'orge et du houblon.

On se propose d'effectuer un contrôle qualité à différents points de la chaîne de production :

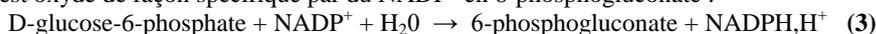
- Analyse de la qualité de l'amidon de maïs ajouté dans la cuve à trempé lors de l'empatage. En effet, une dégradation prématurée de l'amidon peut être provoquée par certains microorganismes. Elle se traduit, en final, par la bioconversion du glucose en fructose. Le dosage sera réalisé par méthode enzymatique en point final.
- Analyse par chromatographie sur couche mince de l'évolution de la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae*.
- Vérification du titre alcoolique volumique de la bière par méthode volumétrique. Il est fixé à 6,0 degrés Gay Lussac.

1- Détermination du pourcentage de bioconversion de l'amidon de maïs par méthode en point final (test UV à 340 nm). (33 points)**1.1- Principe.**

A pH = 7,60 et en présence d'hexokinase (HK), le D-glucose et le D-fructose sont phosphorylés par l'ATP en glucose-6-phosphate et en fructose-6-phosphate :



En présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH), le D-glucose-6-phosphate formé est oxydé de façon spécifique par du NADP⁺ en 6-phosphogluconate :



Le NADPH, H⁺ formé est mesuré par augmentation de l'absorbance à 340 nm.

Le dosage du D-fructose-6-phosphate est réalisé après transformation en D-glucose-6-phosphate par le phosphoglucose-isomérase (PGI) :



Le D-glucose-6-phosphate formé est oxydé selon la réaction (3) en 6-phosphogluconate, la quantité de NADPH, H⁺ formé est proportionnelle à la quantité de fructose.

1.2- Réactifs et solution à doser :

- Solution 1 notée «S1» : tampon pH = 7,60 ; NADP⁺ ; ATP ; sulfate de magnésium (4 mL).
- Suspension 2 notée «S2» : HK ; G6P-DH. A conserver dans la glace avant utilisation (80 µL).
- Suspension 3 notée «S3» : PGI. A conserver dans la glace avant utilisation (80 µL).
- Echantillon à doser : solution d'amidon de maïs notée «M» (3 mL).

1.3 – Protocole opératoire.

Dilution préalable :

Diluer l'échantillon "M" au 1/20 dans l'eau distillée.

Effectuer la dilution en présence d'un examinateur.

Conditions opératoires du dosage :

Température : 20-25°C (température ambiante).

Longueur d'onde : 340 nm.

Trajet optique : 1 cm.

Lire contre l'air.

Dosage :

Réaliser deux essais sur la solution "M" diluée.

Introduire directement dans les cuves à spectrophotomètre :

Cuve	témoin	Essai
Solution 1 (mL)	1	1
Solution "M" (mL)	0	0,10
Eau distillée (mL)	2	1,90
Mélanger. Après 3 minutes, lire l'absorbance A_1 . Déclencher la réaction par addition de :		
Suspension 2 (mL)	0,02	0,02
Mélanger. Après 15 minutes, lire l'absorbance A_2 . Ajouter :		
Suspension 3 (mL)	0,02	0,02
Mélanger. Après 15 minutes, lire l'absorbance A_3 .		

1.4 – Exploitation des résultats.

Compléter la feuille de résultats.

Calculer les différences ($A_2 - A_1$) du témoin et de l'essai.

En déduire ΔA (glucose) = ($A_2 - A_1$) essai - ($A_2 - A_1$) témoin.

Calculer les différences ($A_3 - A_2$) du témoin et de l'essai.

En déduire ΔA (fructose) = ($A_3 - A_2$) essai - ($A_3 - A_2$) témoin.

Établir les expressions littérales donnant les concentrations massiques (g.L^{-1}) en glucose et fructose dans la solution "M". Réaliser les applications numériques.

En déduire la qualité de l'amidon :

- a-t-il subi une dégradation prématurée ?

- si oui, calculer le pourcentage de bioconversion de glucose en fructose.

Quel est le rôle du sulfate de magnésium ?

Pourquoi les enzymes sont-elles conservées dans la glace avant utilisation ?

Données : $\epsilon_{\text{NADPH.H}^+} = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ et $M_{(\text{glucose})} = M_{(\text{fructose})} = 180 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Le coefficient de variation de la méthode est évalué à 5 %.

2- Étude des glucides fermentés par chromatographie sur couche mince. (24 points)

La chromatographie nécessite, dans un premier temps, de réaliser un choix judicieux d'une phase mobile. Cette dernière sera utilisée, dans un second temps, pour l'analyse des glucides fermentés.

2.1- Choix de la phase mobile :

2.1.1- Réactifs et matériel :

- Phase mobile 1 : méthyléthylacétone 3V/acide acétique 1 V/méthanol 1V. Notée «PM1».
- Phase mobile 2 : méthyléthylacétone 1V/acide acétique 2V/méthanol 1V. Notée «PM2».
- Phase mobile 3 : méthyléthylacétone 1V/acide acétique 1 V/méthanol 3V. Notée «PM3».
- Mélange de témoins noté "T" : glucose, maltose, maltotriose.
- 3 bandelettes de gel de silice réactivé 1 x 10 cm (boîte de Petri).
- Pince Brucelle.
- Capillaires.
- Réactif de révélation au naphthorésorcinol.

Les différentes phases mobiles sont fournies en tubes à fond plat sur un portoir numéroté.

2.1.2- Protocole opératoire.

Sur la bandelette de silice, déposer 2 gouttes du mélange T à 2 cm du bord. Sécher entre les 2 dépôts.

Déposer la bandelette dans le tube contenant la phase mobile. Laisser migrer.

Sécher puis révéler avec le réactif au naphthorésorcinol.

Placer les bandelettes à l'étuve à 100°C pendant environ 10 minutes.

Effectuer la manipulation pour chacune des trois phases mobiles testées.

Laisser les bandelettes référencées dans la boîte de Petri.

2.1.3- Exploitation des résultats.

Analyser les résultats obtenus pour chaque phase mobile.

Choisir la phase mobile la plus intéressante pour réaliser l'analyse chromatographique sur couche mince des glucides fermentés. Justifier.

2.2- Analyse des glucides fermentés par CCM.

2.2.1- Réactifs et matériel :

- Plaque de silice (5 x 10 cm).
- Cuve à chromatographie.
- Solvant de migration (à demander à un examinateur selon votre choix).
- Solutions témoins (en Eppendorff) : glucose ("Glc"), maltose ("Mal"), maltotriose ("Malto").
- Echantillon à analyser : moût après brassage noté "B" et moût après fermentation noté "F".
- Réactif de révélation au naphthorésorcinol.
- Capillaires.
- 1 boîte de Petri.

2.2.2- Protocole opératoire.

Réactiver la plaque de silice à l'étuve à 100 °C pendant 10 minutes.

Introduire le solvant dans la cuve et laisser saturer pendant environ 15 minutes.

Réaliser les différents dépôts (2 gouttes). Placer la plaque dans la cuve. Laisser migrer.

A l'issue de la migration :

- sécher la plaque à l'étuve ;
- la révéler avec le réactif au naphtorésorcinol ;
- la placer à l'étuve à 100°C environ 10 minutes.

2.2.3- Exploitation des résultats.

Quel est l'intérêt de réactiver la plaque de silice ? Celui de saturer la cuve ?

Exploiter le chromatogramme. Conclure.

Laisser le chromatogramme dans une boîte de Petri au poste de travail.

3- Détermination du titre alcoolique volumique de la bière par oxydation sulfochromique. (23 points)

Une distillation simple a été réalisée sous pression atmosphérique. Cette étape a entraîné une dilution au 1/5 de la bière.

3.1- Principe.

Le dosage de l'éthanol contenu dans le distillat est réalisé par méthode volumétrique indirecte :

En milieu acide, l'éthanol est oxydé en acide éthanoïque par un excès de dichromate de potassium. L'excédent de dichromate de potassium est dosé par une solution de sels de Mohr de concentration connue.

3.2- Réactifs :

- Solution de dichromate de potassium "TOXIQUE". La concentration sera donnée en début de l'épreuve (50 mL).
- Solution de sels de Mohr. La concentration sera donnée en début de l'épreuve (60 mL).
- Solution d'acide sulfurique concentré (en distributeur) "CORROSIF".
- Acide phosphorique pur (en distributeur) "CORROSIF".
- Diphénylaminosulfonate de baryum.
- Échantillon noté "P" : distillat de la bière (30 mL).

3.3- Protocole opératoire (2 essais).

Dans une fiole bouchant émeri, introduire :

- 10 mL de solution de dichromate de potassium.
- 5 mL d'acide sulfurique concentré ; verser lentement, en agitant doucement et en laissant refroidir.

Une fois, le mélange refroidi, ajouter :

- 5 mL de distillat.

Boucher, agiter doucement et attendre 20 minutes pour que l'oxydation soit totale.

Ajouter :

- environ 100 mL d'eau distillée.
- 15 mL d'acide phosphorique pur.
- 20 gouttes de diphénylaminosulfonate de baryum.

En homogénéisant, verser la solution de sels de Mohr jusqu'à virage au vert émeraude.

Présenter les chutes de burette à un examinateur.

3.4 – Exploitation des résultats.

Compléter la feuille de résultats.

Elaborer la formule littérale exprimant la concentration massique volumique en éthanol de la bière (g.L^{-1}).

En déduire le titre alcoolique volumique de la bière (en degré Gay Lussac).

Conclure.

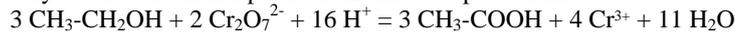
Données :

Le coefficient de variation de la méthode est de 1 %.

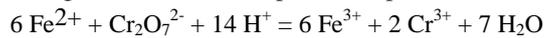
1 degré Gay Lussac correspond à 1 mL d'éthanol pour 100 mL de bière.

$M_{\text{éthanol}} = 46 \text{ g.mol}^{-1}$ Masse volumique de l'éthanol (μ) = $0,7936 \text{ g.mL}^{-1}$.

Oxydation de l'éthanol par le dichromate de potassium :



Dosage du dichromate de potassium par les sels de Mohr

**Feuille de résultats**

poste n°.....

1. Détermination du pourcentage de bioconversion de l'amidon de maïs par méthode cinétique en point final.

	témoin	Essai 1	Essai 2
Absorbance A_1			
Absorbance A_2			
Absorbance A_3			

3. Détermination du titre alcoolique volumique de la bière par oxydation sulfochromique.

	Essai 1	Essai 2
Volume de sels de Mohr (mL)		

E5-U52 : TP TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 2006**SUJET 1****Coefficient : 4****UTILISATION DES LACTOBACILLUS POUR LA
BIOPRÉSERVATION ALIMENTAIRE****1^{ER} JOUR : Durée 3 heures 30**

L'addition volontaire de certains *Lactobacillus* dans un bioproduit alimentaire protège ce dernier en inhibant la croissance voire en provoquant une diminution de la population de certains micro-organismes pathogènes tels que, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ou *Salmonella*. La biopréservation repose sur la compétition nutritionnelle et/ou sur la production de métabolites comme les bactériocines (peptides antimicrobiens de faible masse moléculaire et à forte activité antimicrobienne).

La caractérisation d'une nouvelle souche de *Lactobacillus* et des conditions de son utilisation en agro-alimentaire sont de la responsabilité des laboratoires R & D (Recherche et Développement).

Une des démarches suivies est de déterminer l'influence d'une souche de *Lactobacillus acidophilus* sur le développement d'une souche pathogène "test" du genre *Salmonella*.

1- Vérification succincte de l'appartenance de la "souche test" au genre Salmonella. (27 points)**1.1- Protocole opératoire.**

A partir de la souche de *Salmonella* présentée sur gélose nutritive inclinée "S" ainsi qu'en bouillon nutritif ordinaire "S" :

Vérifier les caractères morphologiques.

Présenter les examens microscopiques à un examinateur accompagnés du compte rendu des observations.

Réaliser le test enzymatique approprié.

Présenter la réalisation du test à un examinateur.

Vérifier les caractères biochimiques fondamentaux de genre suivants :

- Recherche de la fermentation du lactose.
- Recherche du type de fermentation du glucose (voie du butane-diol ou voie des acides mixtes).
- Recherche d'une uréase.
- Recherche de la production d'indole.
- Recherche de la tryptophane désaminase.
- Recherche de la lysine décarboxylase.

Proposer, dans le compte rendu, la liste des milieux nécessaires à ces recherches.

Faire viser la liste par un examinateur.

Ensemencer les milieux distribués.

Incuber à 37°C.

1.2- Compte rendu.

Présenter les résultats de la vérification des caractères morphologiques ainsi que celui du test enzymatique.

Commenter.

2- Mise en évidence du pouvoir inhibiteur d'une nouvelle souche de *Lactobacillus* par la méthode des "tests à l'encontre". (23 points)

2.1- Présentation de la méthode des "tests à l'encontre".

Une souche de *Lactobacillus* à tester est déposée dans des puits pratiqués dans l'épaisseur d'une gélose Mueller-Hinton.

Une seconde couche de gélose Mueller-Hinton, préalablement inoculée avec une souche pathogène, est ensuite déposée à la surface de cette préparation.

La présence d'une éventuelle activité inhibitrice se caractérise par l'apparition d'un halo d'inhibition autour des puits.

2.2- Matériel :

- 1 gélose Mueller-Hinton de 4 mm d'épaisseur.
- 1 tube à hémolyse à utiliser comme emporte-pièce.
- 2 pointes de bois stériles.
- 1 culture de 24 heures de *Lactobacillus acidophilus* ("La") en bouillon MRS.
- 1 pipette automatique P 1000 + cônes.
- 2 tubes à hémolyse contenant 1 mL de gélose MRS en surfusion.
- 1 tube contenant 10 mL de bouillon nutritif noté "BNO".
- 1 culture de *Salmonella* ("S_r").
- 1 tube contenant 5 mL de bouillon MRS stérile.
- 1 tube contenant 8 mL de gélose Mueller-Hinton en surfusion à 46°C.
- cuves de spectrophotomètre.
- 1 tube à essai stérile.

2.3- Préparation de la "boîte test".

Dans une gélose Mueller-Hinton de 4 mm d'épaisseur, pratiquer 3 puits à l'aide d'un tube à hémolyse utilisé comme emporte pièce.

Evider les puits en utilisant une pointe de bois stérile piquée obliquement dans la gélose.

Dans de la gélose MRS conservée en surfusion dans un bain thermostaté à 46°C, diluer au demi, la culture de *Lactobacillus acidophilus* notée "La" (volume final = 2 mL).

Placer cette dilution en attente dans le bain thermostaté à 46°C.

Remplir deux puits avec 250 µL de cette même dilution.

Prévoir un témoin négatif dans le troisième puits.

Laisser prédiffuser environ 20 minutes à la température du laboratoire.

2.4- Réalisation de la double couche inoculée par *Salmonella*.

À partir de la culture en bouillon nutritif de *Salmonella* "S" fournie, préparer une suspension étalonée à environ 0,12 unité de densité optique à $\lambda = 550$ nm.

On obtient "T".

Présenter la mesure opacimétrique de "T" à un examinateur.

Incorporer 300 µL de "T" à 8 mL de gélose Mueller Hinton conservée en surfusion au bain thermostaté à 46°C.

Homogénéiser manuellement en limitant la formation de bulles.

Verser **IMMEDIATEMENT** à la surface de la gélose Mueller Hinton.

Laisser solidifier.

Incuber 24 heures, sous 20 % de CO₂ et à 43°C.

2.5- Compte rendu.

Justifier le choix de la solution choisie pour réaliser le “zéro” de l'opacimètre. Justifier le choix du diluant nécessaire à la confection de “T”.

Justifier la composition du témoin négatif.

3- Evaluation de l'efficacité de la biopréservation dans le temps : réalisation d'un “challenge test”. (27 points)

Afin de vérifier si l'activité inhibitrice des *Lactobacillus* est conservée dans un produit alimentaire, des saucissons expérimentaux, préalablementensemencés avec une souche de *Lactobacillus*, ont été contaminés par un inoculum de *Salmonella* quantitativement connu.

La quantité de *Salmonella* est alors suivie au cours du temps dans le cadre d'un “challenge test”.

3.1- Matériel :

- Echantillon “E”.
- 3 tubes contenant 9 mL d'eau physiologique stérile.
- 4 pipettes stériles de 1 mL.
- 6 boîtes de Pétri stériles.
- 6 tubes contenant 15 mL de gélose lactosée au désoxycholate (gélose DL).

3.2- Dénombrement de la population de Salmonella dans un saucisson expérimental, 28 jours après la contamination initiale.

Un saucisson expérimental de 100 g, préalablementensemencé avec un ferment de biopréservation, a été contaminé par environ 10^6 UFC de *Salmonella*.

Ce saucisson contaminé est conservé 28 jours.

Au 28^{ème} jour, une masse de 10 g de ce saucisson expérimental a été déposée et broyée dans 90 mL d'eau peptonée, on obtient l'échantillon “E” fourni.

Réaliser un dénombrement des *Salmonella* présentes dans “E”, 28 jours après l'inoculation.

Présenter la réalisation d'une dilution.

Procéder par inclusion dans la masse d'une gélose lactosée au désoxycholate, en testant en double, trois dilutions correctement choisies.

Incuber 24 h à 37°C.

3.3- Compte rendu.

Choisir, en la justifiant, la gamme de dilutions permettant la réalisation du dénombrement. Pour cela, poser comme hypothèse que, dans le saucisson expérimental, la multiplication des *Salmonella* est peu probable du fait de la présence du ferment de biopréservation.

4- Conclusion générale. (3 points)

Conclusion à envisager lors du deuxième jour après obtention des résultats.

2ème JOUR : Durée 1 heures 30

1- Vérification succincte de l'appartenance de la “souche test” au genre Salmonella. (27 points)

1.1- Matériel :

- Disque imprégné d'orthonitrophényl p galactoside (ONPG).
- Solution de rouge de méthyl.
- Solution d'hydroxyde de sodium à 16 %.
- Solution d'a-naphtol.
- Solution d'Erlich Kovacs.
- Solution de perchlorure de fer.

1.2- Compte rendu.

Lire la galerie réduite ensemencée au 1^{er} jour.

Compléter la vérification du genre de la souche “test” et interpréter les résultats en utilisant le tableau suivant :

Caractères	<i>Salmonella</i>
Fermentation du lactose	-
β galactosidase	-
RM	+
VP	-
Indole	-
Uréase	-
TDA	-
LDC	+

Conclure.

2- Mise en évidence du pouvoir inhibiteur d'une nouvelle souche de Lactobacillus par la méthode des “tests à l'encontre”. (23 points)

Lactobacillus sakei est une souche déjà utilisée pour la biopréservation de produits de charcuterie. Dans ces mêmes conditions opératoires, *L sakei* donne un diamètre moyen d'inhibition de 12 mm.

Mesurer les diamètres de chacun des “halos tests”.

Calculer le diamètre moyen.

Conclure quant à la possibilité d'utiliser *L.acidophilus* à la place de *L.sakei* pour la biopréservation des produits de charcuterie.

3- Evaluation de l'efficacité de la biopréservation dans le temps : réalisation d'un "challenge test". (27 points)

Dans le cadre du "challenge test", les dénombrements à JO, J7, J14 et J21 ont été réalisés. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Etape du "challenge test"	Résultat du dénombrement de "E"
JO	1.1 10^3
J7	0.9 10^3
J14	0.8 10^3
J21	0.5 10^3

Donner le résultat du dénombrement à J28 en utilisant la formule normalisée AFNOR suivante :

$$N = \frac{\sum C}{v (n_1 + 0,1 \times n_2) d}$$

- N : nombre d'UFC par mL,
- $\sum C$: somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.
- n_1 : nombre des boîtes retenues à la première dilution,
- n_2 : nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution,
- d : taux de dilution de la première dilution.
- v : volume de l'inoculum.

Évaluer, en l'explicitant, le nombre de réductions décimales observées par rapport à l'inoculum initial.

4- Conclusion générale. (3 points)

Conclure sur l'activité inhibitrice de *Lactobacillus acidophilus* vis-à-vis de la souche de *Salmonella* "test". Justifier.

E5-U52 : TP TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 2006**SUJET 2**

Coefficients : 4

**CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ BACTÉRICIDE D'UN DÉSINFECTANT
PAR MÉTHODE DE DILUTION-NEUTRALISATION.****1^{ER} JOUR : Durée 3 heures 30**

Le service contrôle-qualité d'une coopérative laitière doit tester "activité bactéricide du désinfectant employé pour décontaminer les sols dans la salle de fabrication des yaourts. Ce test doit se faire en respectant les conditions définies dans la norme AFNOR: NF EN 1276.

Cette norme préconise de contrôler l'activité bactéricide du produit suivant la méthode par dilution neutralisation, en présence de substance interférente, pour 4 souches différentes:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 *Escherichia coli* ATCC 10536 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 *Enterococcus hirae* ATCC 10541.

Substance interférente : résidus de matières organiques issus du lait pouvant gêner l'activité bactéricide du désinfectant.

Avant de tester l'activité du désinfectant sur une souche, un certain nombre de contrôles sont à effectuer:

- contrôler l'identité de la souche de référence fournie (étape 1),
- contrôler la concentration de la suspension calibrée (étape 2),
- tester l'activité du désinfectant sur la souche de référence (étape 3),
- contrôler l'absence d'inhibition du neutralisant sur la souche test (étape 4),
- valider l'action du neutralisant sur le produit désinfectant (étape 5),

1- Contrôle de l'identité de la souche de référence. (21 points)**1.1- Matériel et réactifs :**

- Culture pure d'une des quatre souches de référence mentionnées ci-dessus, notée "Réf".
- 1 tube d'eau distillée stérile 10 mL.
- 1 tube à hémolyse.
- Colorants de Gram.
- Disque "oxydase" et peroxyde d'hydrogène.

1.2- Mode opératoire et compte rendu.

- Contrôler l'identité de la souche de référence "Réf" en réalisant une coloration de Gram et un test enzymatique.
- **Présenter à un examinateur un champ microscopique, accompagné du compte rendu de l'observation.**
- **Réaliser le test enzymatique en présence d'un examinateur.**
- Proposer une orientation pour la souche "Réf" et suggérer une micro-galerie et milieux associés permettant de confirmer le genre et l'espèce de cette souche. La proposition de micro-galerie est à présenter à un examinateur 30 minutes au moins avant la fin de l'épreuve.
- Ensemencer la galerie et les milieux distribués.

2- Contrôle de la suspension bactérienne d'essai-dénombrement. (27 points)

2.1- Matériel et réactifs :

- Suspension pure, notée “**Réf**”.
- 2 tubes de tryptone-sel 10 mL, notés “**diluant 10 mL**”.
- 1 tube à essai stérile.
- 7 tubes de tryptone-sel 9 mL, notés “**diluant 9 mL**”.
- 8 pipettes 1 mL et dispositif d'aspiration.
- 1 vortex.
- 3 microcuvettes de spectrophotomètre.
- 1 spectrophotomètre réglé à 600 nm.
- 4 boîtes de Pétri stériles.
- 60 ml de gélose TSA (tryptone Soja Agar) en surfusion en bain thermostaté à 45°C.

2.2- Mode opératoire.

- Une suspension initiale, réalisée en eau physiologique, notée “Réf” est fournie à une concentration proche de $2 \cdot 10^8$ bactéries/mL.

Mesurer la densité optique de cette suspension et calculer sa concentration, en tenant compte des données fournies par le centre d'examen (correspondance $DO_{600\text{ nm}}$ / concentration bactérienne, limite de linéarité).

- Ajuster, si nécessaire, la suspension bactérienne à une concentration comprise entre $1,5 \cdot 10^8$ et $2 \cdot 10^8$ bactéries / mL.

La suspension ainsi préparée est nommée par la suite “**suspension d'essai**”.

- Préparer en tryptone-sel une gamme de dilution de raison 1/10 de la **suspension d'essai** allant jusqu'à 10^{-7} .

- Prélever un échantillon de 1,0 mL des dilutions 10^{-6} et 10^{-7} , en double. Transférer chaque échantillon de 1,0 mL dans des boîtes de Pétri distinctes et ajouter 12 mL à 15 mL de gélose TSA en surfusion, refroidie à 45°C.

Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h.

Effectuer une dilution en présence d'un examinateur

2.3- Compte rendu.

Expliquer les différentes étapes de la réalisation de la suspension d'essai (justifier les calculs).

3- Test de l'activité du désinfectant sur la souche de référence (13 points)

3.1- Matériel et réactifs:

- 10 ml de lait écrémé dilué à 10 %, noté “**substance interférente**”.
- 30 ml de neutralisant en flacon, noté “**neutralisant**”.
- 20 ml de désinfectant pour le sol à 1,25 fois sa concentration d'utilisation, noté “**désinfectant**”.
- 1 tube eau stérile 15 ml, noté “**eau stérile**”.
- 2 tubes à essai stériles.
- 5 pipettes 1 ml et dispositif d'aspiration.
- 2 pipettes 10 mL.
- 1 vortex.
- 1 chronomètre.
- 2 boîtes de Pétri stériles.
- 30 ml de gélose TSA en surfusion en bain thermostaté à 45°C.

3.2 – Mode opératoire.

Réaliser, au préalable, un organigramme qui sera présenté dans le compte rendu.

Utiliser la **suspension d'essai** préparée en 2.2 (suspension ajustée entre $1,5 \cdot 10^8$ et $2,0 \cdot 10^8$ bactéries par ml).

Dans un tube à essai stérile, placer 1,0 mL de substance interférente, 1,0 mL de suspension d'essai. Homogénéiser et laisser en contact pendant 2 minutes.

A la fin du temps de contact, ajouter 8,0 mL de désinfectant. Déclencher immédiatement le chronomètre, mélanger et laisser en contact pendant 5 minutes.

Juste avant la fin du temps de contact, mélanger, puis transférer ensuite 1,0 mL du mélange dans un tube à essai contenant 8,0 ml de neutralisant et 1 ml d'eau.

Mélanger et laisser au contact pendant 5 minutes.

À la fin du temps de contact, mélanger et prélever en double un échantillon de 1,0 mL du mélange, Transférer chaque échantillon de 1,0 mL dans des boîtes de Pétri distinctes et ajouter 12 à 15 mL de gélose TSA en surfusion refroidie à 45°C.

Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h.

3.3 – Compte rendu.

Représenter l'organigramme de la manipulation en faisant apparaître les différents réactifs employés, les volumes prélevés ainsi que les temps d'attente.

4 – Contrôle de l'Innocuité de la substance neutralisante. (8 points)**4.1 – Matériel et réactifs :**

- Neutralisant en flacon noté “**neutralisant**» (déjà utilisé en 3).
- 1 tube eau stérile 5 ml, noté “**eau stérile**”.
- 1 tube à essai stérile.
- 4 pipettes 1 ml et dispositif d'aspiration.
- 2 pipettes 10 mL.
- 1 vortex.
- 1 chronomètre.
- 2 boîtes de Pétri stériles.
- 30 ml de gélose TSA en surfusion en bain-marie à 45°C.

4.2 – Mode opératoire.

Il est conseillé de réaliser au préalable un organigramme.

On appellera “**suspension bactérienne choisie**” la dilution 10^{-5} de la gamme préparée en 2.2.

Dans un tube à essai stérile, placer 8,0 mL de neutralisant, 1 mL d'eau stérile et 1,0 mL de la “suspension bactérienne choisie”.

Mélanger pendant quelques secondes et laisser agir pendant 5 minutes.

À la fin du temps de contact, mélanger et prélever en double un échantillon de 1,0 mL du mélange, transférer chaque échantillon de 1,0 mL dans des boîtes de Pétri distinctes et ajouter 12 à 15 mL de gélose TSA en surfusion refroidie à 45°C.

Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h.

4.3 – Compte rendu.

Estimer la concentration bactérienne dans la “**suspension bactérienne choisie**”.

5- Validation de l'action du neutralisant sur le désinfectant. (10 points)

5.1- Matériel et réactifs :

- Lait écrémé dilué à 10 %, noté “**substance interférente**» (déjà utilisée en 3).
- Neutralisant en flacon, noté “**neutralisant**» (déjà utilisé en 3 et 4).
- Désinfectant pour le sol à 1,25 fois sa concentration d'utilisation, noté “**désinfectant**» (déjà utilisé en 3).
- 1 tube tryptone-sel 10 ml, notés “**diluant 10 mL**”.
- 2 tubes à essai stériles.
- 6 pipettes 1 ml et dispositif d'aspiration.
- 2 pipettes 10 mL.
- 1 vortex.
- 1 chronomètre.
- 2 boîtes de Pétri stériles.
- 30 ml de gélose TSA en surfusion en bain-marie à 45°C.

5.2- Mode opératoire.

Il est conseillé de réaliser au préalable un organigramme.

Utiliser la “**suspension bactérienne choisie**”, définie en 4.2.

Dans un tube à essai stérile, placer 1,0 mL de substance interférente, 1,0 mL de diluant puis, en déclenchant le chronomètre, ajouter 8,0 mL de désinfectant. Homogénéiser et laisser en contact pendant 5 minutes.

Transférer ensuite 1,0 mL du mélange dans un tube à essai contenant 8,0 ml de neutralisant.

Mélanger et laisser au contact pendant 5 minutes.

A la fin de ce temps, ajouter 1,0 mL de la “suspension bactérienne choisie”.

Déclencher le chronomètre au début de l'addition et mélanger pendant quelques secondes. laisser agir 30 minutes.

A la fin du temps de contact, mélanger et prélever en double un échantillon de 1,0 mL du mélange, transférer chaque échantillon de 1,0 mL dans des boîtes de Pétri distinctes et ajouter 12 à 15 mL de gélose TSA en surfusion refroidie à 45°C.

Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h.

5.3- Compte rendu.

La norme préconise de tester le produit désinfectant à 1,25 fois sa concentration d'utilisation.

Justifier cette valeur à partir du protocole.

En s'appuyant sur les informations données dans l'annexe 1, déterminer la concentration à laquelle il faut tester le produit (exprimée en %).

ANNEXE 1 :

Étiquette du flacon de désinfectant

Le concept PHS
Hébergement

Fraîcheur printemps



Le Vert Sol

Indications :
Nettoyant, désinfectant, désodorisant pour sols et surfaces.

Mode d'emploi :
Utilisation en dilution à 0,25%, soit une dose de bouchon verseur (20 ml) pour 8 l d'eau froide ou chaude (< à 60°C). Appliquer en lavage à plat.

Propriétés microbiologiques :
Conforme aux normes AFNOR et européennes d'efficacité anti-microbienne :
Bactéricide : NF EN 1040, NF T 72-170, NF T 72-190, T 72-300, actif sur BK.
Fongicide : NF EN 1275 (Candida albicans), T 72-300.
Actif sur les virus HIV-1 et Hépatite B.

Précautions d'emploi :
Produit d'usage externe. Ne pas avaler. Irritant pour les yeux et la peau. Conserver hors de portée des enfants. Éviter le contact avec les yeux et la peau. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Porter des gants appropriés.



Xi - IRRITANT


PRO INGENIERIE SERVICE

111, rue du Puit Dixme -
Senia 524 - 94577 ORLY
Tél. : 01 41 76 22 67 - Fax : 01 41 76 22 39
<http://www.phs.fr> - e-mail : info@phs.fr

Hygiène des surfaces

2^{ème} JOUR : Durée 2 heures**1- Contrôle de l'identité de la souche de référence. (21 points)**

À l'aide des documents fournis, faire la lecture de la micro-galerieensemencée en J1. Confirmer l'identité de la souche "Réf" avec le pourcentage d'identification, en précisant l'indice de typicité.

2- Contrôle de la suspension bactérienne d'essai· dénombrement. (27 points)

À l'aide de l'annexe 2 :

- Écarter toutes les boîtes sur lesquelles il n'est pas possible de compter les colonies.
- Déterminer le nombre de colonies sur chaque boîte comptable.
- Déterminer la concentration de la suspension bactérienne d'essai (N).

En déduire la concentration (N_c) de la suspension bactérienne choisie, utilisée lors des tests de validation 4 et 5.

Justifier l'emploi de cette dilution.

3- Test de l'activité du désinfectant sur la souche de référence. (13 points)

Déterminer le nombre moyen d'UFC (A) sur les 2 boîtes.

À l'aide de l'annexe 3, estimer la réduction décimale obtenue grâce à l'activité du désinfectant. Conclure sur l'activité du désinfectant, sachant que son activité bactéricide à la dilution testée est validée si une réduction de viabilité d'au moins 10^5 est démontrée.

4- Contrôle de l'innocuité du neutralisant. (8 points)

Déterminer le nombre moyen d'UFC (B) sur les 2 boîtes.

Conclure, sachant que B doit être supérieur ou égal à 0,05 fois la concentration dans la suspension utilisée lors de ce test (N_c).

Justifier ce facteur 0,05 toléré (ce facteur tient compte de l'incertitude de la méthode).

5- Validation de l'action du neutralisant sur le désinfectant. (10 points)

Déterminer le nombre moyen d'UFC (C) sur les 2 boîtes.

Analyser les résultats. Proposer une conclusion.

Conclure, sachant que C doit être supérieur ou égale à 0,5 fois B.

Justifier, à l'aide de l'annexe 3, la nécessité de comparer C à B.

6- Conclusion générale. (1 point)

Conclure sur l'activité du dispositif désinfectant.

ANNEXE 2 :**Extrait de la norme NF EN 1276
(p15)****5.6 Calculs et expression des résultats****5.6.1 Calcul du nombre de cellules viables (UFC/ 1 mL)****5.6.1.1 Suspension bactérienne d'essai**

a) ... Il convient de n'utiliser que des dénombrements donnant moins de 300 colonies par boîte. Pour qu'un résultat puisse être pris en compte, il faut qu'une boîte au moins contienne 15 colonies ou plus; il convient de calculer le nombre de cellules viables en utilisant au moins une paire de boîtes dans le cas où une des 2 boîtes ou les 2 contiennent plus de 15 colonies et les 2 boîtes contiennent moins de 300 colonies. Si des boîtes provenant de 2 dilutions remplissent ces conditions, calculer le nombre d'UFC/mL comme étant la moyenne pondérée. Si des boîtes provenant d'une seule dilution remplissent ces conditions, calculer la moyenne arithmétique.

Pour calculer la moyenne pondérée exprimée en UFC/mL, utiliser la formule suivante:

$$\frac{c}{(n_1 + 0,1 n_2).d}$$

où:

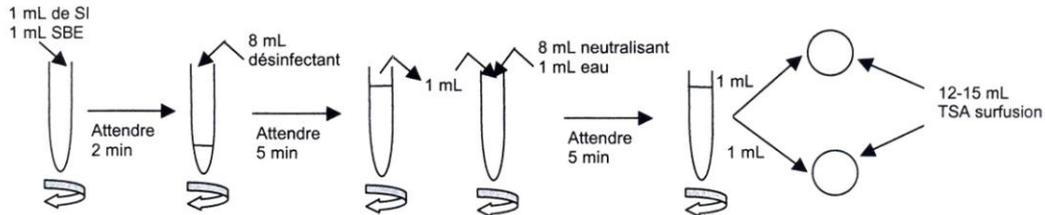
- c est la somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées;
- n_1 est le nombre de boîtes prises en compte à la première dilution;
- n_2 est le nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution;
- d est le facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte.

Arrondir les résultats à deux chiffres significatifs. (...) Si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent est augmenté d'une unité. (...)

b) En conséquence le nombre d'UFC/mL est exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9, multiplié par la puissance appropriée de 10.

ANNEXE 3 : Organigramme des manipulations

3 - Test de l'activité du désinfectant sur la souche de référence.

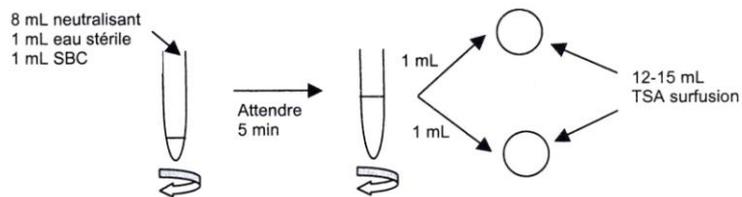


SBE : Suspension Bactérienne d'Essai

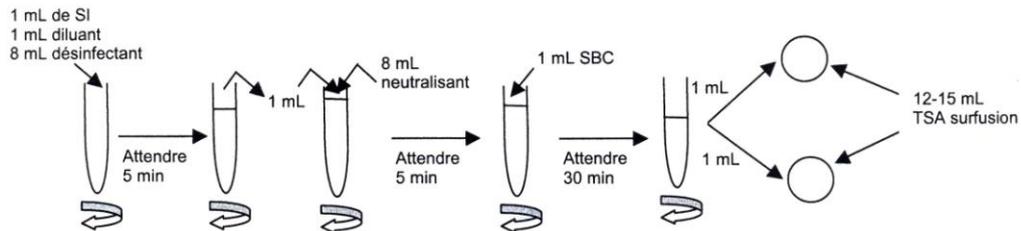
SI : Substance Interférente (lait)

SBC : Suspension Bactérienne Choisie (= dilution 10^{-5} de la suspension)

4 - Contrôle de l'innocuité du neutralisant.



5 - Validation de l'action du neutralisant sur le désinfectant.



E5-U52 : TP TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 2006**SUJET 3****Coefficient : 4****CONTRÔLE AU COURS D'UNE PRODUCTION EN FERMENTEUR****1^{ER} JOUR : Durée 3 heures**

Une protéine d'intérêt est produite par une souche de *Saccharomyces cerevisiae* transformée. La souche productrice est conservée par congélation à - 20°C en présence de glycérol. L'ensemencement de la cuve de production est réalisé à partir d'une pré-culture obtenue en plusieurs étapes.

1- Contrôle de pureté, stabilité et viabilité de la souche de levure. (26 points)**1.1- Matériel :**

- 1 tube contenant une suspension décongelée de la souche notée "S",
- un isolement sur gélose Sabouraud en boîte de la souche S notée "Sab",
- un hématimètre de Malassez.
- 1 tube contenant 1 ml de bleu de Funk (bleu de méthylène tamponné à pH 4).
- 3 pipettes stériles de 1 mL.
- 1 tube à hémolyse stérile.
- 1 tube de 9 ml d'eau physiologique stérile.
- 1 gélose Sabouraud coulée en boîte de Pétri.
- 1 API 20 CAUX + ampoule API AUX Médium.
- Bleu de méthylène.
- 1 tube à hémolyse de 2 ml d'eau physiologique stérile.
- 1 fiche technique cellule de Malassez.
- 1 fiche technique Jour 1 et Jour 2 API 20 C AUX (à laisser en fin d'épreuve).

1.2- Contrôle de viabilité.

Le test de viabilité est réalisé sur la suspension de levure décongelée «S», en cellule de Malassez, en présence de bleu de Funk.

Le bleu de Funk colore en bleu très foncé les cellules mortes. Les cellules vivantes sont peu ou pas colorées.

Le pourcentage de viabilité doit être supérieur ou égal à 80 %.

Effectuer la dilution 10^{-1} de la suspension "S".

Introduire dans un tube à hémolyse stérile 0,5 ml de la dilution précédente et 0,5 ml de bleu de Funk.

Monter la préparation en cellule de Malassez.

Expliquer, à l'aide d'un schéma, la technique de comptage des cellules dans un rectangle.

Quelle autre unité de comptage peut être utilisée? Justifier son intérêt.

Effectuer le dénombrement.

Déterminer le pourcentage de viabilité. Conclure.

Montrer à un examinateur la mise en cellule de Malassez et un champ microscopique accompagné du comptage associé.

1.3- Contrôle de la pureté microbiologique et de la stabilité des caractères d'identification de la souche de *Saccharomyces cerevisiae*.

La vérification de la pureté et des caractères biochimiques de la souche de *Saccharomyces cerevisiae* décongelée est effectuée à partir d'un isolement de 24 heures sur gélose Sabouraud notée "Sab".

Contrôler:

- les caractères morphologiques de la souche,
- la pureté par un isolement sur gélose Sabouraud en boîte de Pétri,
- les caractères biochimiques par ensemencement d'une galerie API 20 CAUX.

Présenter l'examen microscopique réalisé accompagné du compte rendu de l'observation.

2- Contrôle des paramètres cinétiques de la souche de levure. (26 points)

Un fermenteur 10 L a été ensemencé par la souche de *Saccharomyces cerevisiae* en milieu "M". On souhaite déterminer la vitesse spécifique de croissance de cette souche afin de vérifier sa productivité.

2.1- Matériel :

- un prélèvement en tube noté "P".
- 4 semi-microcuvettes pour spectrophotomètre. parafilm.
- 1 flacon de 20 ml de milieu de culture "M".
- 7 tubes de 9 ml de tryptone-sel stérile.
- 8 pipettes stériles de 1 mL.
- 6 géloses OGA coulées en boîte de pétri (Oxytétracycline Glucose Agar).
- 1 flacon contenant des billes stériles + pot de récupération avec javel.

2.2- Détermination de la vitesse spécifique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.

Au temps t_0 , l'inoculum bactérien introduit dans le fermenteur était d'environ 3.10^5 levures/mL.

Le prélèvement "P" a été effectué après 4 heures d'incubation.

Remarque:

Dans les conditions de l'expérience, on considère que la phase de latence est négligeable.

Mesurer la densité optique à 620 nm du prélèvement "P" afin d'évaluer sa concentration en tenant compte de la relation donnée en début d'épreuve par les examinateurs.

Appeler un examinateur pour la mesure spectrophotométrique.

A partir du prélèvement "P", réaliser le dénombrement en surface en encadrant la dilution comptable (3 dilutions en double exemplaire).

Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution.

Incuber à 30°C.

Justifier sur le compte rendu le choix des dilutions testées, du milieu OGA et de la technique d'ensemencement en surface.

3- Elimination d'un contaminant bactérien. (28 points)

La culture en bioréacteur est régulièrement contaminée par une souche de *Staphylococcus aureus*. Afin de lutter contre ce contaminant, il a été décidé d'ajouter un antibiotique efficace dans le milieu de culture. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'ampicilline vis-à-vis de cette souche est ainsi déterminée pour optimiser le traitement.

3.1- Matériel :

- 1 tube de bouillon Mueller-Hinton de 18 heures de *Staphylococcus aureus* noté "S. aureus".
- 4 tubes de 9 ml de bouillon Mueller-Hinton.
- 8 pipettes stériles de 1 mL.
- 1 tube contenant 4 ml de solution d'ampicilline à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ noté "Amp".
- 8 tubes à hémolyse vides et stériles.
- 1 flacon contenant 20 ml de bouillon Mueller-Hinton.

3.2- Détermination de la CMI de l'ampicilline vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Diluer une culture de 18 heures de *Staphylococcus aureus* en bouillon Mueller-Hinton afin de réaliser un inoculum de 10^5 UFC/mL.

On rappelle que la densité d'une culture de 18 heures de *Staphylococcus aureus* est d'environ 1.10^8 UFC.mL⁻¹.

A partir d'une solution d'ampicilline à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, réaliser 8 dilutions successives de raison 1/2 de l'antibiotique en bouillon Mueller-Hinton (volume final: 1 ml).

Ajouter 1 ml de l'inoculum réalisé à chaque dilution d'ampicilline et réaliser un témoin pour valider la méthode.

Incuber la gamme et le témoin à 37°C.

3.3- Compte rendu.

Justifier la concentration de l'inoculum utilisé. Expliquer sa préparation.

Présenter sous forme de tableau la gamme de dilutions de l'antibiotique en précisant les volumes de solution mère d'ampicilline, de diluant et de suspension bactérienne.

Les concentrations finales d'ampicilline pour chaque tube seront indiquées.

Justifier le rôle et la réalisation du tube témoin.

2^{ème} JOUR : Durée 1 heures 30

1- Contrôle de pureté, stabilité et viabilité de la souche de levure. (26 points)

Vérifier la pureté de la souche.
Effectuer la lecture de la galerie d'identification biochimique.
Conclure sur la pureté et sur la stabilité des caractères morphologiques et biochimiques.

2- Contrôle des paramètres cinétiques de la souche de levure. (26 points)

Exploiter les résultats du dénombrement.
Calculer μ expo (vitesse spécifique de croissance) et G (temps de génération).

Rappel :

Au temps t_0 , l'inoculum bactérien introduit dans le fermenteur était d'environ 3.10^5 levures/mL.

Remarque :

Des études précédentes ont montré une phase exponentielle de croissance largement supérieure à 4 heures.

3- Élimination d'un contaminant bactérien. (28 points)

Exprimer les résultats de la CMI pour le couple ampicilline - *Staphylococcus aureus*.
Déterminer la concentration à laquelle l'ampicilline doit être introduite dans le milieu de production.

E5-U52 : TP TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 2006**SUJET 4****Durée totale : 5 heures 30****Coefficient : 4****ANALYSES ET CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES DE LAITS****1^{ER} JOUR**

Le lait est un produit biologique d'origine animale dont la composition et les qualités nutritives en font un aliment presque complet et qui constitue une des premières sources nutritives de l'Homme.

Chez certains enfants en bas-âge cependant, on note une intolérance au lactose, ou une allergie aux protéines de lait de vache. Il est alors nécessaire d'avoir recours à des produits de substitution, à base de soja.

Dans l'industrie laitière, la maîtrise de qualité microbiologique est intégrée à la production, et se doit de répondre à des normes précises en termes de sécurité du consommateur et de prévention de l'altération des produits laitiers (Directive Européenne 93/43/CEE relative à «l'hygiène des denrées alimentaires» pour l'industrie agroalimentaire).

Au cours de cette étude, on se propose de :

- vérifier la qualité microbiologique, en fin de chaîne de production, de laits pasteurisés conditionnés.
- procéder à un contrôle microbiologique d'un produit de substitution du lait, suite à des cas d'intoxications alimentaires chez des enfants en bas-âge.

PARTIE 1 - ANALYSE D'UN LAIT PASTEURISÉ CONDITIONNÉ (52 points)

Au cours des différents procédés de transformation du lait, des contaminations peuvent survenir et être à l'origine d'intoxications alimentaires ou d'altérations du produit. Afin de limiter ces risques, on peut procéder à une pasteurisation du lait, dont l'efficacité doit être contrôlée. Par ailleurs, le lait contenant des antibiotiques ou des antiseptiques est impropre à la consommation humaine. C'est pourquoi, la réglementation européenne impose de contrôler l'absence de ces agents antimicrobiens dans le lait destiné à la vente.

Dans cette partie, trois lots différents de lait pasteurisé conditionné seront analysés:

- lait **LP1** pour la recherche et le dénombrement d'une flore d'altération,
- lait **LP2**, pour le contrôle de l'efficacité de la pasteurisation,
- laits **LP3 et LP4** pour la recherche de pénicilline.

1- Recherche et dénombrement de la flore d'altération. (28 points)**1.1- Matériel et réactifs :**

- lait pasteurisé référencé "LP1" en tube à essai (dilution 1 00).
- 3 tubes à essai contenant 9 ml de milieu Tryptone-sel stérile.
- 8 tubes de 15 ml de gélose PCA + 1 % de lait écrémé, en surfusion.
- 12 tubes de BLBVB simple concentration + cloche.
- 8 boîtes de Pétri stériles vides de 90 mm.
- 5 pipettes graduées stériles de 1 mL.

1.2 – Protocole opératoire.

1.2.1 – Préparation des dilutions du lait Pasteurisé

Réaliser les dilutions décimales du lait LP1 jusqu'à 10^{-3} , en tryptone-sel.

➔ **Réaliser une des dilutions décimales devant l'examineur.**

1.2.2 – Recherche et dénombrement de la flore aérobique mésophile (EN ISO 6610)

Ensemencer les dilutions 10^0 à 10^{-3} en masse dans la gélose «PCA + lait écrémé» (simple couche), en double essai.

Incuber à la température adéquate.

1.2.3 – Recherche et dénombrement des coliformes totaux (EN ISO 5541-2)

Cette technique ne sera pas réalisée par le candidat.

Les résultats correspondants seront présentés au jour 2.

1.2.4 – Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (NF V-08-016)

Ensemencer 1 ml des dilutions 10^0 à 10^{-3} en milieu BLBVB, en triple essai.

Incuber à la température adéquate.

➔ **Préciser lisiblement sur les milieux, les températures d'incubation souhaitées.**

1.3 – Compte rendu.

Justifier le choix des températures d'incubation des différents milieux : pour les recherches de la flore mésophile totale, des coliformes totaux et des coliformes thermotolérants.

2 – Contrôles de pasteurisation. (11 points)

Le lait **LP2** a été pasteurisé à 75°C pendant 15 secondes (pasteurisation haute).

2.1 – Épreuve de la phosphatase alcaline:

2.1.1 – Matériel et réactifs :

- Lait pasteurisé référencé «**LP2**» en tube à essai.
- Lait bouilli référencé «**Bouilli**» en tube à essai.
- Réactif noté «**R**» de composition:
 - 4-nitrophényl-phosphate disodique : 0,15 g ;
 - tampon pH = 10,6 :
 - carbonate de sodium : 3,5 g,
 - hydrogénocarbonate de sodium: 1,5 g,
 - eau distillée stérile qsp 1 L.
- 2 tubes à essai stériles.
- 1 pipette graduée stérile de 5 ml.
- 2 pipettes graduées stériles de 1 mL.
- Bain thermostaté à 37°C et chronomètre.

2.1.2 – Protocole opératoire.

Introduire dans 2 tubes à hémolyse notés **A** et **B**, 5 ml de réactif **R**.

Boucher les tubes et les porter 2 minutes à 37°C pour les préchauffer.

Dans **A** : ajouter 1 ml du lait à étudier (**LP2**).

Dans **B** : ajouter 1 ml de lait bouilli (**Bouilli**).

Mélanger et porter à 37°C.

Effectuer une lecture à 30 min et à 2 h. le principe et le mode de lecture du test sont rappelés dans **l'annexe 1**.

2.1.3 – Compte rendu.

Quel est le rôle du tube B ?

Présenter les résultats.

Conclure sur la présence de la phosphatase alcaline.

2.2- Épreuve de la peroxydase :

2.2.1- Matériel:

- lait pasteurisé référencé “**LP2**” en tube à essai.
- lait cru référencé “**LC**” en tube à essai.
- lait stérilisé **UHT** référencé “**UHT**” en tube à essai.
- Solution saturée de gaïacol, notée “**Gaïacol**”.
- Solution de H₂O₂ à 900 mmol/l (10 volumes) présentée en compte-gouttes.
- 3 tubes à essai stériles.
- 4 pipettes graduées stériles de 2 mL.

2.2.2- Protocole opératoire.

Introduire dans 3 tubes à essai notés C, D, E :

- dans **C** : 2 ml de lait **LP2** ;
- dans **D** : 2 ml de lait **LC** ;
- dans **E** : 2 ml de lait **UHT**.

Introduire dans les 3 tubes:

- 2 ml de solution saturée de gaïacol (**Gaïacol**) ;
- 1 goutte de H₂O₂ à 900 mmol/L.

Agiter et garder les tubes dans la main (20-30°C) pendant 1 min.

Observer la coloration. le principe et le mode de lecture du test sont rappelés dans

l'annexe 1.

2.2.3- Compte rendu.

Quel est le rôle des tubes D et E ?

Présenter les résultats.

Conclure sur la présence de la peroxydase dans le lait **LP2**.

D'après les résultats obtenus en **2.1.** et **2.2.**, et l'analyse de la courbe présentée en **annexe 2**, établir une conclusion générale sur la pasteurisation du lait **LP2**.

3- Recherche de pénicilline dans du lait par la méthode de confirmation sur milieu gélosé. (13 points)

L'analyse est prévue en deux étapes:

1. Détection sommaire par la technique d'acidification en lait.
2. Méthode de confirmation selon la norme NF V-21-012, pour les échantillons positifs ou douteux au premier test.

Seule l'étape 2 sera réalisée.

3.1- Matériel et réactifs :

- laits référencés “**LP3**” et “**LP4**” en tube à essai.
- Culture jeune de *Bacillus stearothermophilus calidolactis*,ensemencée en Bouillon •
- Nutritif (bactérie test sensible à la pénicilline), référencée “**BSC**”.
- 5 ml de gélose Mueller-Hinton en surfusion.
- Solution de pénicillinase à 1000UI.cm⁻³, notée “**P-ase**”.
- Disque de pénicilline à 10 UI (6 µg).
- 4 disques de papier-filtre stérile (diamètre 9 mm).

- 1 boîte de Pétri stérile vide de 90 mm.
- 1 pipette graduée stérile de 1 mL.
- lames de verre.
- 3 pipettes Pasteur stériles.

3.2 – Protocole opératoire.

3.2.1 – Ensemencement de la souche test.

Introduire 1 ml de culture jeune de la bactérie test dans 5 ml de gélose Mueller-Hinton en surfusion. Homogénéiser.

Couler dans une boîte de Pétri stérile.

Laisser prendre en masse.

3.2.2 – Préparation des disques.

Déposer les 4 disques de papier-filtre sur les lames stériles.

Imbiber chaque disque en respectant le protocole suivant:

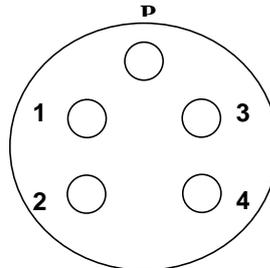
	Disque 1	Disque 2	Disque 3	Disque 4
Lait à étudier LP3	1 goutte	1 goutte	-	-
Lait à étudier LP4	-	-	1 goutte	1 goutte
Solution de pénicillinase P-ase	-	1 goutte	-	1 goutte

Egoutter

3.2.3 – Réalisation du test.

Déposer les 4 disques imbibés et le disque de pénicilline selon le schéma suivant:

1	Disque 1
2	Disque 2
3	Disque 3
4	Disque 4
P	Disque de Pénicilline



Incuber à 55°C pendant 24 h en chambre humide.

3.3 – Compte rendu.

Justifier les conditions d'incubation.

PARTIE 2 - CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE D'UNE PRÉPARATION POUR L'ALIMENTATION DES ENFANTS EN BAS-ÂGE (28 points)

La Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) a mis en évidence, chez des enfants en bas-âge, une origine commune entre différents cas d'intoxication alimentaire, suite à la consommation d'un produit de substitution du lait à base de soja. Un contaminant bactérien a été isolé, à partir d'un prélèvement effectué au niveau des tours d'atomisation de la chaîne de production.

On se propose de réaliser une des étapes du protocole officiel de la recherche d'un contaminant dans une poudre déshydratée.

IDENTIFICATION D'UN CONTAMINANT DANS UNE POUDRE DÉSHYDRATÉE À BASE DE SOJA :

1- Matériel et réactifs :

- Souche présumée contaminante, isolée sur TSA, référencée "S".
- 1 tube d'eau distillée stérile.
- Réactifs pour tests enzymatiques.
- Matériel pour coloration de frottis.
- Milieux à ensemercer **distribués 1 h avant la fin de l'épreuve.**
- 1 tube à hémolyse stérile.
- Pipettes Pasteur stériles
- Lames de verre et lamelles.

2- Protocole opératoire.

2.1- Réaliser un examen microscopique et le test enzymatique nécessaire pour l'orientation de l'identification.

- ➔ Présenter l'observation microscopique à l'examineur accompagné du compte rendu de l'observation.
- ➔ Effectuer le test enzymatique en présence de l'examineur.

2.2- Proposer par écrit dans l'annexe 3, le choix de la microgalerie et des milieux complémentaires à ensemercer pour identifier la souche.

- ➔ Le choix de la galerie écrit doit être rendu au plus tard 1 h avant la fin de l'épreuve, heure à laquelle les milieux seront distribués.

2.3- Ensemercer les milieux fournis.

3- Méthodologie.

Ce contaminant peut être dénombré sur gélose VRBG.

Rappeler les caractères principaux de la famille suspectée après ces analyses.

Analyser la composition du milieu VRBG.

VRBG

- Peptone 5g
- Extraits de viande 5g
- Glucose 5g
- Désoxycholate de sodium 1,5g
- Cristal violet 2 mg
- Rouge neutre 5g
- Chlorure de sodium 5g
- Agar 15g

pH = 6,8

Préciser l'allure des colonies suspectes sur ce milieu, et le justifier.

ANNEXE 1 : CONTROLES DE PASTEURISATION

1- Épreuve de la phosphatase alcaline: technique d'Aschaffensurg et Muellen.

1.1- Principe.

La présence de l'activité phosphatase alcaline est révélée par l'utilisation d'un substrat incolore, qui après action de l'enzyme, donne un produit coloré.

Le substrat utilisé est le 4-nitro-phényl-phosphate disodique (incolore) qui est hydrolysé en présence de la phosphatase alcaline en 4-nitro-phénol (jaune) et hydrogénophosphate selon la réaction suivante:



1.2- Lecture et Interprétation.

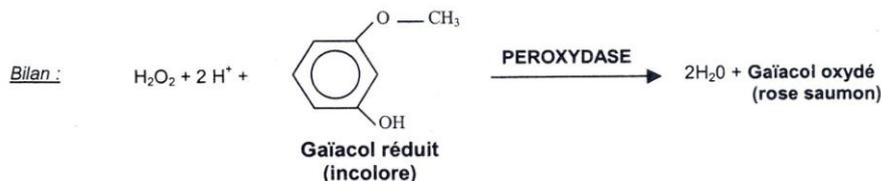
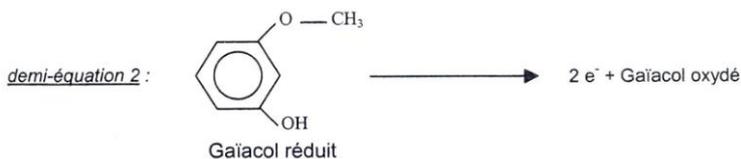
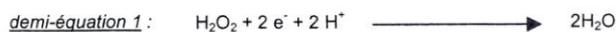
Une coloration jaune traduit la présence de l'activité phosphatase alcaline (réaction positive).

2- Epreuve de la peroxydase : réaction de Dupouy.

2.1- Principe.

La présence de la peroxydase est révélée par l'utilisation d'un réducteur organique incolore qui, après action de l'enzyme, donne un composé oxydé coloré.

La réaction catalysée est le transfert d'électrons du gaïacol réduit (réducteur organique incolore) sur le peroxyde d'hydrogène, aboutissant à la formation du gaïacol oxydé (rose saumon) selon la réaction suivante:



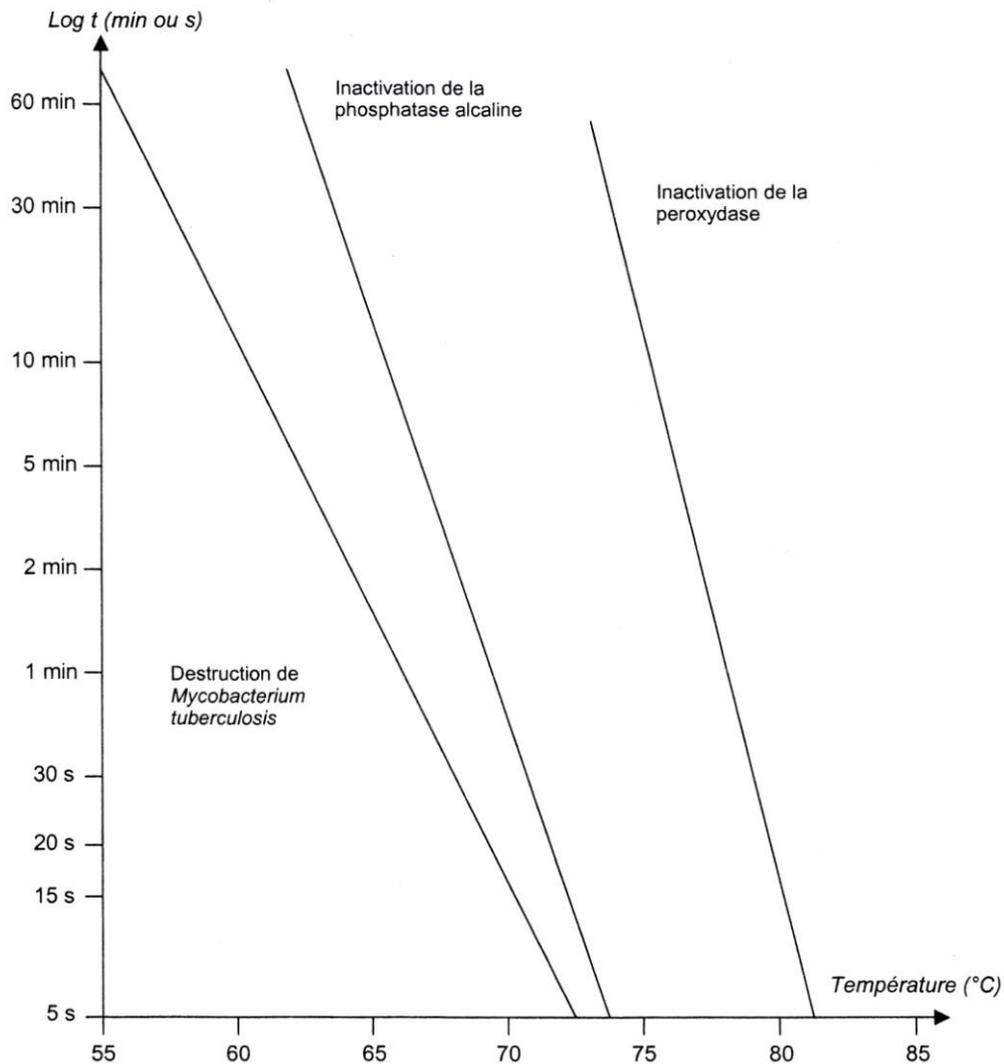
2.2- Lecture et interprétation.

Une coloration rose saumon traduit la présence de l'activité peroxydase (réaction positive).

ANNEXE 2 : CONTRÔLES DE PASTEURISATION

Diagramme de Pasteurisation, représentant les couples de valeur « température - durée de chauffage » pour lesquels il y a :

- destruction de *Mycobacterium tuberculosis*
- inactivation de la phosphatase alcaline
- inactivation de la peroxydase



Adapté du livre : « Contrôles du Lait et des Produits Laitiers – Bactéries Lactiques », CRDP Dijon

2^{ème} JOUR

PARTIE 1 - ANALYSE D'UN LAIT PASTEURISÉ CONDITIONNÉ (52 points)**1- Recherche et dénombrement de la flore d'altération. (28 points)****1.1- Milieuxensemencés au Jour 1 :**

- **Flore aérobie mésophile:** 8 géloses PCA + 1 % lait (4 dilutions, chacune en double essai), ensemencées avec les dilutions 10^0 à 10^{-3} , et incubées à 30°C.
- **Coliformes totaux:** les résultats du dénombrement sont fournis: NPP = 200 coliformes/mL.
- **Coliformes thermotolérants:** 12 BLBVB + cloche (4 dilutions, chacune en triple essai), ensemencés avec les dilutions 10^0 à 10^{-3} , et incubées à 44°C.

1.2- Critères de référence.

Arrêté «Lait pasteurisé» du 21/06/82, fixant les normes d'hygiène et de salubrité auxquelles doit répondre le lait pasteurisé conditionné (JO du 11/07/82).

Le lait pasteurisé conditionné doit être exempt de microorganismes ou de toxines dangereuses pour la santé publique et satisfaire aux critères suivants 4 jours après son conditionnement :

Germes totaux à 30 °C	Coliformes totaux à 30 °C	Coliformes thermotolérants	Salmonella	S. aureus
3.10 ⁴ /mL	10/mL	Absence dans 1 mL	Absence dans 250 mL	1/mL

1.3- Compte rendu.**1.3.1- Procéder au dénombrement de la flore aérobie mésophile.**

Présenter les résultats sous forme de tableau.

Effectuer le calcul en utilisant la formule normalisée AFNOR figurant **en annexe 1.**

1.3.2- Procéder au dénombrement des coliformes thermotolérants.

Quel doit-être l'aspect d'un BLBVB positif? Justifier.

Présenter les résultats sous forme de tableau.

Effectuer le calcul en utilisant la table de Mc Grady figurant en **annexe 2.**

1.3.3- Pour chaque dénombrement, compléter les schémas des plans à 2 et 3 classes utilisés représentés en annexe 3.

Préciser notamment les valeurs des grandeurs seuils, calculées à partir des critères données par le JO (tableau ci-dessus) pour chacun des dénombrements.

1.3.4- Conclure quant à la conformité microbiologique de l'échantillon de lait pasteurisé, LP1.**2- Contrôle de pasteurisation. (11 points)**

Partie traitée en J 1.

3- Recherche de pénicilline dans du lait par la méthode de confirmation sur milieu gélosé.(13 points)

A partir de la boîteensemencée au jour 1 :

Schématiser les résultats obtenus.

Interpréter ces résultats.

Conclure quant à la conformité des laits testés.

PARTIE 2 - CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE D'UNE PRÉPARATION POUR L'ALIMENTATION DES ENFANTS EN BAS-ÂGE (28 points)

IDENTIFICATION D'UN CONTAMINANT DANS UNE POUDRE DÉSHYDRATÉE À BASE DE SOJA

1- Milieuxensemencés au Jour 1 :

- Microgalerie : API 20E, incubée à 37°C.
- Milieux complémentaires: GTS en boîte, gélose VF.

2- Compte rendu.

Réaliser et présenter la lecture des milieuxensemencés, à l'aide du document API fourni.

Procéder à une identification du contaminant bactérien à l'aide d'un logiciel d'identification adapté.

Conclure par rapport au contexte.

ANNEXE 1 : FORMULE NORMALISÉE AFNOR

$$N = \frac{\sum C}{v (n_1 + 0,1 \times n_2) d}$$

- **N** : nombre d'UFC par mL,
- $\sum C$: somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.
- n_1 : nombre des boîtes retenues à la première dilution,
- n_2 : nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution,
- **d** : taux de dilution de la première dilution.
- **v** : volume de l'inoculum.

ANNEXE 2 : TABLE DE MAC GRADY

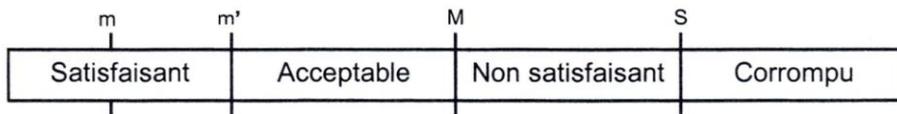
Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilution retenus			NPP	<u>Limites de confiance</u>				Catégories*	
3 tubes 1 mL	3 tubes 0,1 mL	3 tubes 0,01 mL		à 95 %		à 99 %		1	2
0	0	0	< 0,3						
0	0	1	0,3	< 0,1	1,7	< 0,1	2,3		
0	1	0	0,3	< 0,1	1,7	< 0,1	2,3		x
0	2	0	0,6	0,2	2,3	0,1	2,9		
1	0	0	0,4	0,1	2,1	< 0,1	2,8	x	
1	0	1	0,7	0,2	2,7	0,1	3,5		x
1	1	0	0,7	0,2	2,8	0,1	3,6	x	
1	1	1	1,1	0,4	3,4	0,2	4,3		
1	2	0	1,1	0,4	3,5	0,2	4,4		x
1	2	1	1,5	0,6	4,1	0,4	5,1		
1	3	0	1,6	0,6	4,2	0,4	5,2		
2	0	0	0,9	0,2	3,8	0,1	5,0	x	
2	0	1	1,4	0,5	4,8	0,3	6,2		x
2	1	0	1,5	0,5	5,0	0,3	6,5	x	
2	1	1	2,0	0,8	6,1	0,5	7,7		x
2	2	0	2,1	0,8	6,3	0,5	8,0	x	
2	2	1	2,8	1,1	7,5	0,7	9,3		
2	3	0	2,9	1,2	7,8	0,8	9,7		
3	0	0	2,3	0,7	12,9	0,4	17,7	x	
3	0	1	4	1	18	1	23	x	
3	0	2	6	2	23	1	29		
3	1	0	4	2	21	1	29	x	
3	1	1	7	2	28	2	37	x	
3	1	2	12	4	35	2	45		
3	2	0	9	3	39	2	52	x	
3	2	1	15	5	51	3	65	x	
3	2	2	21	8	64	5	82		x
3	2	3	29	12	80	8	99		
3	3	0	20	10	140	<10	190	x	
3	3	1	50	20	240	10	320	x	
3	3	2	110	30	480	20	640	x	
3	3	3	>110						

J.C. de Man European J Appl. Microbiol. 1,67 - 78 (1975)

(*) catégorie 1 : combinaisons de tubes les plus fréquentes correspondant à 95% des cas.
catégorie 2 : combinaisons de tubes moins fréquentes que la catégorie 1 et correspondent à seulement 4% des cas.
L'obtention de combinaisons hors catégorie doit inciter à considérer le résultat avec circonspection.

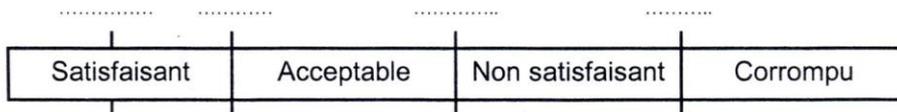
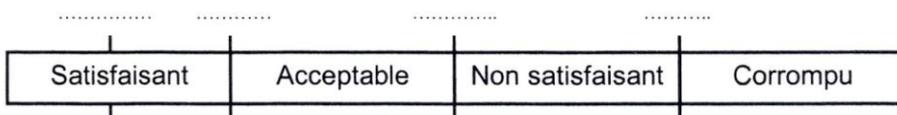
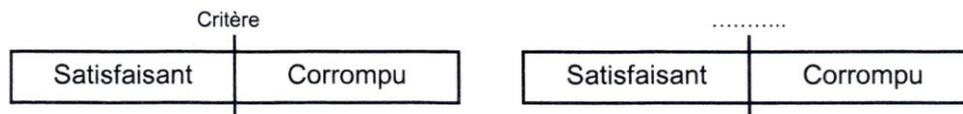
ANNEXE 3 : SCHÉMAS DES PLANS D'ÉTUDES À 2 ET 3 CLASSES

Référence du Candidat (numéro de poste) :

Plan à 3 classes :**Rappels :**

On définit plusieurs grandeurs seuils (voir ci-dessus), tenant compte des incertitudes des méthodes à partir du « critère » donné au JORF :

- $m' = 3$ m (milieux solides) ou 10 m (milieux liquides).
- $M = 10$ m (milieux solides) ou 30 m (milieux liquides).
- $S = 10^3$ m.

Germes aérobies mésophiles :**Coliformes totaux :**Plan à 2 classes :**Coliformes thermotolérants :**

E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2006	SUJET 1
Durée : 3 heures	Coefficient : 2

LA BRUCELLOSE EN MILIEU VÉTÉRINAIRE (40 points)

Le genre *Brucella* est responsable de diverses pathologies vétérinaires comme des avortements pouvant gravement compromettre un élevage. Les manipulations suivantes concernent deux aspects de l'étude de ces bactéries :

- Comparaison de deux méthodes de détection d'anticorps anti-brucelles,
- Évaluation de la cytotoxicité d'une fraction protéique purifiée de *Brucella* sur une culture de cellules placentaires de bovins.

1- Comparaison de deux méthodes de détection d'anticorps anti-Brucelles. (20 points)

1.1- Principes.

Dans un premier temps, l'agglutination est réalisée en tube à partir d'une gamme de dilutions du sérum testé. On utilise dans ce cas une suspension de bactéries tuées qui gardent leur pouvoir antigénique (méthode de Wright).

Dans un second temps, une transposition sur lame est envisagée avec deux dilutions seulement. On utilise cette fois une suspension de bactéries tuées associées à un colorant facilitant la lecture de l'agglutination sur lame (méthode EAT rose Bengale).

1.2- Matériel :

- un tube contenant 5 mL d'eau physiologique "F".
- 450 µL de sérum de référence "S+".
- un tube contenant 5 mL de *Brucella* tuées "B".
- 200 µL de *Brucella* rosé Bengale "BRB".
- pipettes automatiques P1000, P200, P50 + cônes, P5000 ou pipette 2 mL.
- portoirs tubes à hémolyse.
- 11 tubes hémolyse.
- parafilm.
- un miroir concave.
- lames fond blanc et 4 agitateurs manuels.
- centrifugeuse.

1.3- Protocole opératoire.

1.3.1- Aspect quantitatif: détermination de la dilution limite en anticorps par l'observation de l'agglutination en tubes (méthode de Wright).

- Préparer 1,5 mL d'une dilution au 1/5 du sérum de référence "S+" en eau physiologique "F". On obtient la solution "Sd".
- Réaliser une gamme de concentration de 7 tubes par dilution en cascade de raison 1/2 du sérum de référence. Le premier tube contient la solution "Sd". Le volume final de chaque tube est de 0,5 mL.
- Ajouter dans chaque tube 0,5 mL de la suspension bactérienne tuée "B".
- Dans les mêmes conditions expérimentales, réaliser un témoin négatif dans le tube numéro 8.

Appeler un examinateur pour la réalisation des dilutions.

- Recouvrir les tubes de parafilm, puis centrifuger 5 min à 300 g.

- En tenant fermement le tube, observer précisément la remise en suspension du culot en réalisant progressivement des secousses franches du tube.
- Lire les résultats obtenus.

1.3.2- Aspect qualitatif: validation de la dilution utile en anticorps pour la méthode d'agglutination sur lame (méthode EAT rose Bengale).

Réaliser deux agglutinations sur lame à partir des 2 solutions de sérum suivantes :

→ le sérum de référence "S+"

→ la plus forte dilution du sérum déterminée précédemment permettant encore d'observer une agglutination en tubes.

- Sur une lame à fond blanc, ajouter 30 µL de suspension de Brucella rose Bengale à 30 µL de sérum de référence "S+".
- Homogénéiser à l'aide d'un agitateur manuel.
- Observer s'il y a agglutination.

- Préparer la dilution du sérum correspondant au titre déterminé en 1.3.1. (aspect quantitatif) en eau physiologique et réaliser l'agglutination sur lame selon le même protocole.

Présenter les 2 essais à un examinateur.

1.4- Compte rendu.

1.4.1- Aspect quantitatif.

- Expliquer la dilution du sérum de référence au 1/5.
- Indiquer la composition et l'intérêt du tube numéro 8.
- Présenter le tableau récapitulatif des réactifs et volumes, des dilutions du sérum en eau physiologique, des dilutions finales et des observations de l'agglutination.
- Calculer le titre du sérum de référence étudié, sachant que pour un sérum ayant une limite d'agglutination finale au 1/10, on annonce 30 UI.mL-1.
- Expliquer le résultat du tube 1.
- En tenant compte de ce résultat, indiquer et justifier la dilution préalable du sérum en vue de l'agglutination sur lame.

1.4.2- Aspect qualitatif.

- Expliquer la dilution effectuée.
- Présenter les résultats des agglutinations.
- Comparer les résultats obtenus selon les 2 approches qualitatives et quantitatives. Conclure.

2- Évaluation de la cytotoxicité d'une fraction protéique de *Brucella*. (20 points)

2.1- Principe.

La détermination de la cytotoxicité de la fraction protéique se fait par estimation de la viabilité cellulaire de 2 suspensions de cellules amniotiques :

- C1, sans ajout de protéines brucelliques, obtenue après trypsination d'une culture de cellules confluentes fournie.
- C2, avec ajout de protéines brucelliques, suspension préparée par le laboratoire.

La numération des cellules s'effectue en présence de bleu de méthylène de Funk qui colore les cellules mortes en bleu.

2.2- Matériel :

Au poste de travail :

- 1 mL de la suspension cellulaire "C2".
- 500 µL bleu de méthylène de Funk "BM".
- pipettes automatiques P1000, P200, P50 + cônes.
- tubes à Eppendorf.
- 1 cellule de Malassez + lamelle.
- 1 microscope + alcool + papier nettoyage.
- poste de décontamination - lavage - séchage des cellules de Malassez pour 2 candidats.

Au poste de culture cellulaire :

- 1 boîte de culture de cellules confluentes pour préparer la suspension cellulaire "C1"
- pipettes stériles 1mL, 2 mL, 5 mL + système d'aspiration.
- 1 flacon de 10 mL de tampon PBS sans calcium (au bain Marie à 37 °C).
- 1 tube de 2 mL de trypsine EDTA (au bain Marie à 37 °C).
- 1 flacon de 10 mL de milieu DMEM + 10 % SVF (au bain Marie à 37 °C).
- un tube à hémolyse.
- microscope inversé.

2.3- Protocole opératoire.**2.3.1- Trypsination d'une culture cellulaire non traitée par la fraction de protéine brucellique.**

L'ordre de passage sous hotte sera indiqué en début de séance.

- Observer au microscope inversé la culture cellulaire.
 - Vider le milieu de culture.
 - Rincer les cellules avec 5 mL de tampon PBS sans calcium. Puis éliminer le tampon.
 - Ajouter 1,5 mL de trypsine.
 - Suivre l'effet de la trypsine sur la culture de cellules.
 - Stopper l'action de la trypsine en ajoutant 5 mL de milieu DMEM + 10 % SVF.
 - Homogénéiser la suspension cellulaire.
- On obtient la suspension C1.
- Prélever une partie aliquote en tube à hémolyse pour la numération.

2.3.2- Numération des suspensions cellulaires C1 et C2.

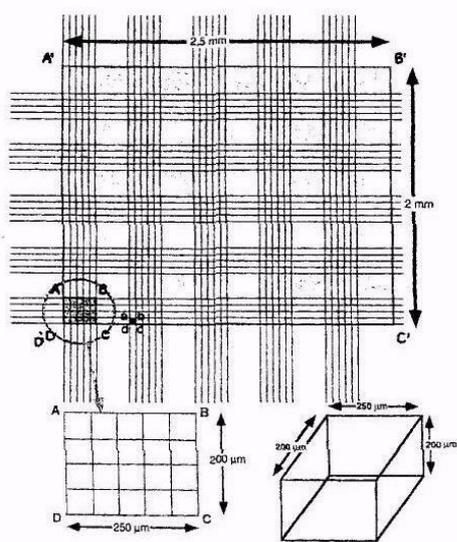
- Réaliser une dilution volume à volume des 2 suspensions cellulaires C1 et C2 dans le bleu de méthylène de Funk.
- Compter les cellules en hématimètre de Malassez (caractéristiques fournies en annexe 1).

Présenter à un examinateur un champ microscopique avec la suspension C2

2.4- Compte rendu.

- Indiquer les critères importants à respecter pour réaliser un comptage fiable.
- Donner les résultats obtenus sous forme d'un tableau récapitulatif : concentration de cellules vivantes, de cellules mortes et pourcentage de viabilité.
- Conclure sur l'effet de la fraction protéique testée.

Annexe 1**SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ :**



E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2006	SUJET 2
Durée : 3 heures	Coefficient : 2

SÉLECTION ET ÉVALUATION DE LA VIABILITÉ DE FIBROBLASTES TRANSGÉNIQUES (40 points)

Des fibroblastes de souris transgéniques ont été préparés afin de produire une protéine : "Px" glycosylée sécrétée.

On se propose ici :

- de tester par immunoprécipitation les surnageants de culture (S1, S2, S3 et S4) de quatre clones respectivement (1, 2, 3 et 4) de cellules transgéniques pour vérifier l'expression de cette protéine "Px",
- d'estimer la viabilité des cellules d'un clone.

1- Sélection des fibroblastes par immunoprécipitation. (20 points)

On désire tester quatre surnageants de culture, notés S1, S2, S3 et S4.

Pour cela, on dispose de la protéine "Px" purifiée en solution et d'anticorps de chèvre anti-Px.

1.1- Principe.

On utilise la technique de l'électrosynérèse pour estimer la libération de la protéine "Px" dans le milieu de culture de ces cellules. Le pHi de la protéine "Px" est connu : 6,2.

1.2- Matériel et réactifs :

- 2 lames de verres (dimensions approximatives : 7 cm x 5 cm) numérotées (avec le n° de poste).
- Pipettes automatiques P10, P200 et cônes.
- Papier Whatman prédécoupé à la dimension de la lame (2 carrés).
- 3 tubes à hémolyse vides sur un portoir.
- Fond noir.
- Tampon Véronal pH 8,6 : un tube à hémolyse contenant 2 mL et noté "**tampon**".
- Solution d'agarose à 1 % en tampon Véronal pH 8,6 maintenu en surfusion : 2 tubes contenant 7 mL.
- Solution de la protéine "Px" à 0,1 g.L⁻¹ : 200 µL en tube étiqueté "**Solution Px**".
- Solution d'anticorps anti-protéine "Px" : 100µL en tube étiqueté "**anti-Px**".
- Solution des quatre surnageants de culture des cellules transgéniques : 20 µL respectivement en tube eppendorf notés "**S1**", "**S2**", "**S3**" et "**S4**".
- Systèmes emporte-pièce pour la perforation des puits.
- Cuves et générateurs d'électrophorèse.
- Pincettes.
- Tampon Véronal pH 8,6, pour les cuves d'électrophorèse.
- Gants.

1.3- Protocole opératoire.

1.3.1- Préparation du gel.

Couler le gel d'agarose (environ 7 mL par lame) sur une surface horizontale. Laisser prendre en masse (on peut éventuellement placer les lames à 4°C si nécessaire).

Perforer le gel à l'aide d'un emporte-pièce en utilisant le gabarit fourni en **Annexe 1a**.

1.3.2- Dilutions de la solution protéique "Px".

En tube à hémolyse, effectuer avec la solution "tampon", des dilutions au 1/2, 1/3 et 1/5 de la "solution Px".

Effectuer une dilution en présence d'un examinateur.

1.3.3- Dépôt des solutions.

On testera la solution "Px" pure ainsi que les trois dilutions préparées précédemment.

Les quatre surnageants de culture (S1, S2, S3 et 84) seront testés purs.

La solution d'anticorps anti-Px est également utilisée pure.

Choisir le contenu et la disposition des différents puits et indiquer ces choix en complétant le gabarit fourni (annexe 1a).

Appeler impérativement un examinateur pour présenter ce gabarit avant de procéder au remplissage des puits.

Déposer 5 µL de chaque solution par puits.

1.3.4- Migration.

En présence d'un examinateur :

Disposer la lame dans la cuve contenant le tampon de migration à pH 8,6 en respectant l'orientation choisie précédemment.

Appliquer les ponts de papier Whatman.

Laisser migrer environ 75 minutes sous une tension de 150 volts.

Laisser ensuite la lame au poste.

1.4- Compte rendu.

Justifier la disposition des différentes solutions dans les puits.

Présenter sous forme de tableau les dilutions de la solution "Px" réalisées.

Observer la lame en utilisant le fond noir. Compléter le gabarit de résultats (en **Annexe 1b**), en représentant les résultats obtenus.

Interpréter les résultats.

Quel clone cellulaire serait-il pertinent de choisir pour des études ultérieures sur la protéine "Px" ?

2- Estimation de la viabilité cellulaire. (20 points)**2.1- Principe.**

On dispose d'une suspension de cellules transgéniques candidates obtenues après trypsination du flacon de cultures. On désire effectuer un dénombrement des cellules viables de cette suspension pour calculer le volume d'inoculum à introduire dans un nouveau flacon de culture. Pour cela, on utilise la technique classique du dénombrement en hématimètre en présence du Bleu de méthylène de Funk.

2.2- Matériel et réactifs :

- Suspension de cellules transgéniques : 500 µL en tube à hémolyse noté "C".
- Solution de Bleu de Funk : 500 µL en tube à hémolyse noté "Bleu de Funk".
- Hématimètre de Malassez avec lamelle (**Annexe 2**).
- Compteur de cellules.
- Pipette automatique P200 avec cônes.
- 1 tube à hémolyse sur un portoir.
- Cristalliseur contenant du désinfectant.
- Gants.
- Microscope.

2.3 – Protocole opératoire.

- Réaliser un mélange volume à volume de la suspension cellulaire bien homogénéisée avec la solution de Bleu de Funk.

Réaliser le montage en hématimètre devant un examinateur.

- Effectuer la numération après un délai de 5 minutes maximum.

Présenter un champ microscopique à un examinateur et la numération de la première ligne.

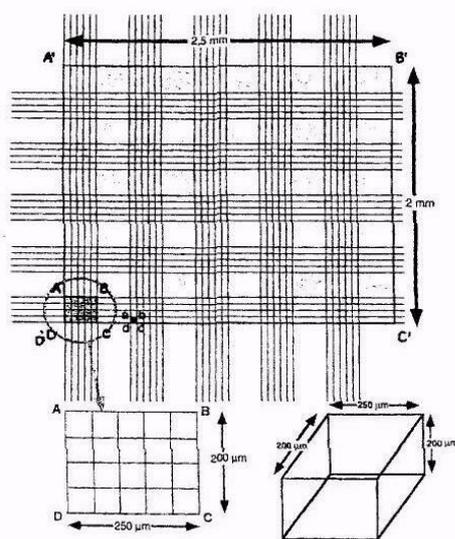
2.4 – Compte rendu.

Présenter le résultat de la numération sous forme de tableau.

Indiquer la formule littérale permettant de calculer le volume de la suspension cellulaire dénombrée pour introduire 2.10^4 cellules viables dans un nouveau flacon de culture cellulaire de volume final de 5 mL.

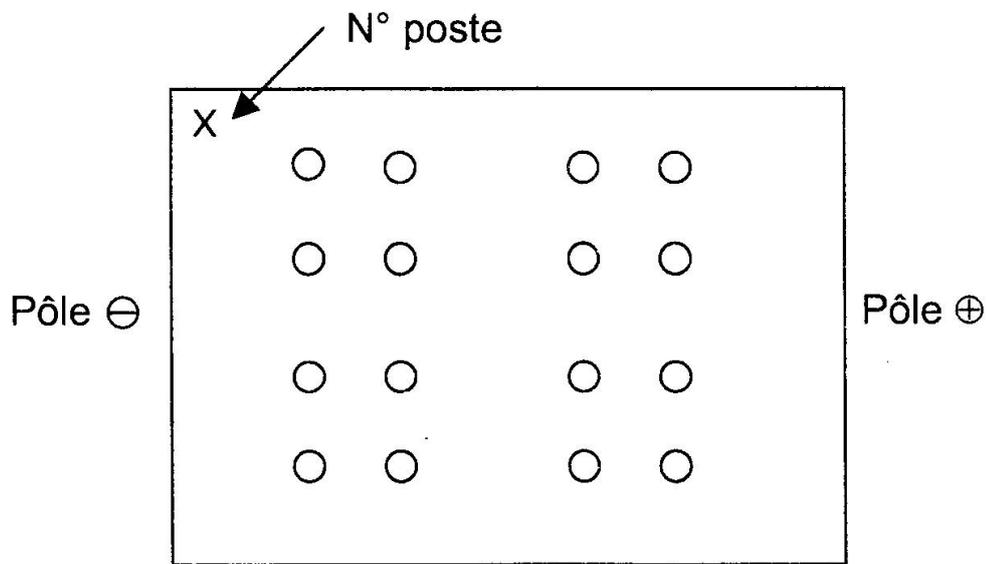
Faire l'application numérique. Donner le protocole à réaliser (volumes, matériel et étapes).

Pourquoi estime-t-on la viabilité d'un clone de cellules candidates ?

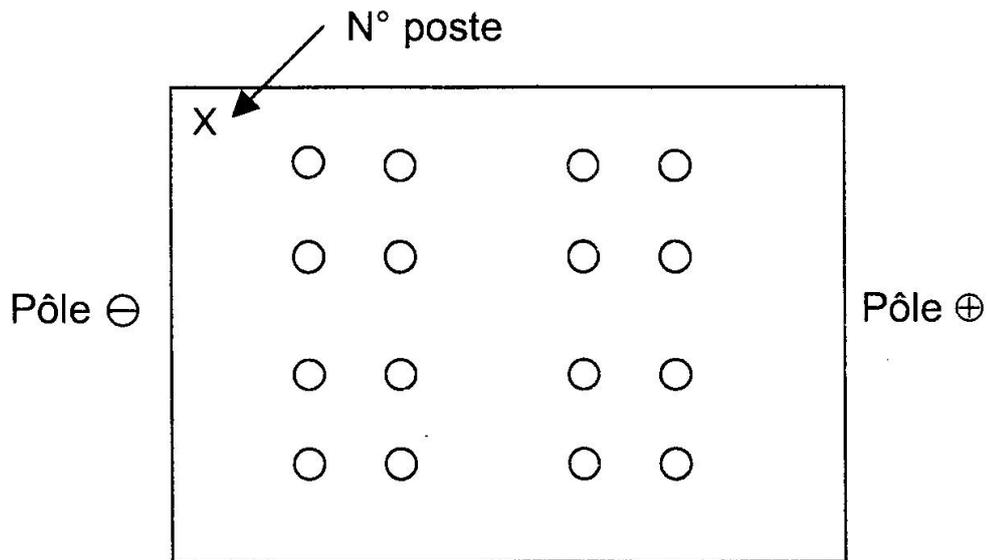
Annexe 2**SCHEMA DU QUADRILLAGE DE L'HEMATIMETRE DE MALASSEZ :****Annexe 1**

(à rendre avec la copie du compte rendu)

a) - GABARIT DE DÉPÔTS (à montrer à un examinateur avant de déposer) :



b) - GABARIT DE RÉSULTATS (pour schématiser les résultats obtenus) :



E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2006	SUJET 3
Durée : 3 heures	Coefficient : 2

**DOSAGE D'ENTÉROTOXINES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
(40 points)**

Les *Staphylococcus aureus* peuvent produire 8 types d'entérotoxines répertoriés : A, B, C1, C2, C3, D, E, F.

L'entérotoxine A est responsable de plus de 70 % des cas d'intoxication alimentaire en France. Les aliments en cause dans les intoxications staphylococciques renferment souvent moins de 10 ng de toxine par gramme d'aliment. Seuls les dosages par la méthode ELISA et les agglutinations passives inversées sont suffisamment sensibles pour détecter de si faibles quantités de toxines sans qu'il soit nécessaire d'avoir recours à des étapes complexes de concentration.

1- L'extraction des entérotoxines. (déjà réalisée)

Elle est réalisée de la manière suivante :

20 mL de tampon d'extraction ont été ajoutés à 20 g d'aliment à tester. L'échantillon a été mélangé pour obtenir une suspension homogène.

La suspension a été laissée au repos pendant environ 20 minutes afin de laisser diffuser la toxine éventuellement présente dans l'échantillon.

La suspension a été filtrée sur papier Whatman et centrifugée pour éliminer les particules alimentaires.

La phase aqueuse a été récupérée.

Le pH de l'extrait a été contrôlé et ramené dans l'intervalle 7,0 - 7,5.

Les dosages seront réalisés sur ce surnageant.

Deux surnageants sont fournis : "S 1" pour le dosage par agglutination et "S 2" pour le dosage ELISA.

2- Dosage des entérotoxines de *Staphylococcus aureus* par une agglutination passive inversée. (18 points)

2.1- Principe.

Des globules rouges sensibilisés avec des anticorps antitoxine sont mis en présence de l'aliment. On recherche 2 toxines : A et B.

2.2- Matériel et réactifs :

- Gants.
- Microplaque à fond conique.
- Film autocollant.
- pipettes automatiques P50 + cônes.
- Tube contenant 200 µL d'échantillon à tester : "S1".
- Tube contenant 250 µL de GR sensibilisés par des Ac anti-entérotoxine A : "GR anti-A".
- Tube contenant 250 µL de GR sensibilisés par des Ac anti-entérotoxine B : "GR anti-B".
- Tube contenant 250 µL de GR témoins : "GR T".
- Tube contenant 2 mL de diluant : "D".
- Bac de désinfectant.

2.3 – Protocole opératoire.

Tester le surnageant “S1” dans une plaque de microtitration à fond conique sur 3 lignes de 8 puits de la façon suivante :

Répartir 25 µL de diluant “D” dans les 8 premiers puits des 3 lignes utilisées.

Ajouter 25 µL de surnageant “S1” dans le premier puits des 3 lignes, effectuer des dilutions successives de raison ½ dans chaque ligne à l'exception du dernier puits de chaque ligne qui ne doit contenir que 25 µL de diluant “D”.

Ajouter ensuite :

Dans tous les puits de la première ligne (ligne A), 25µL de “GR anti A”.

Dans tous les puits de la deuxième ligne (ligne B), 25 µL de “GR anti B”.

Dans tous les puits de la troisième ligne (ligne C), 25µL de “GR T”.

Mélanger le contenu de chaque puits par rotation (éviter le débordement des puits).

Recouvrir la plaque d'un film autocollant et incuber 1 heure à température ambiante à l'abri de tout vibration.

Effectuer la lecture.

2.4 – Compte rendu.

Préciser la nature des globules rouges témoins “GR T”.

Schématiser le principe de la réaction ayant lieu dans le cas de la recherche de l'entérotoxine A.

Expliquer et justifier le terme “d'agglutination passive inversée”.

Valider la technique utilisée.

Schématiser les résultats obtenus dans le tableau de la feuille de résultats.

Conclure sur la présence des différentes entérotoxines.

Déterminer le titre de(s) entérotoxine(s) présente(s).

Donnée : le titre est le facteur de dilution le plus élevé donnant encore une agglutination.

Différentes solutions étalons d'entérotoxines à une concentration de 10 ng/mL ont été testées dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites précédemment. On a obtenu les résultats suivants :

	Puits 1	Puits 2	Puits 3	Puits 4	Puits 5	Puits 6	Puits 7	Puits 8
Solution étalon toxine A + GR antiA	+	+	+	+	+/-	-	-	-
Solution étalon toxine B+ GR antiB	+	+	+	+	-	-	-	-
Solution étalon toxine A + GRT	-	-	-	-	-	-	-	-
Solution étalon toxine B + GRT	-	-	-	-	-	-	-	-

- : absence d'agglutination, + : agglutination totale, +/- : agglutination partielle

Utiliser ces résultats pour en déduire la concentration de la ou des entérotoxines présentes dans "S1" en ng/mL.

3- Dosage immunoenzymatique des entérotoxines de *Staphylococcus aureus*. (22 points)

Un surnageant "S2" a été testé selon la technique d'agglutination passive inversée. On a mis en évidence la présence d'entérotoxine A à une concentration de 2,5 ng/g d'aliment. On souhaite vérifier le titre par une technique ELISA.

3.1- Matériel et réactifs :

- Gants.
- 8 tubes à hémolyse + portoir.
- Pipettes automatiques P200 et P1000 + cônes,
- Film autocollant.
- Agitateur de microplaques.
- Étuve à 37°C.
- Lecteur de microplaques.
- Flacon contenant 50 mL de tampon de lavage : "PBS-Tween".
- Tube contenant 2,5 mL de tampon de dilution pH = 7,2 : "Tp".
- Tube contenant 1 mL de solution étalon d'entérotoxine A à 10 ng/mL : "Étalon".
- Tube contenant 3,5 mL de conjugué = anticorps anti-entérotoxine A couplé à la phosphatase alcaline : "Conjugué".
- Tube contenant 500 µL de surnageant à doser : "S2".
- Tube contenant 3,5 mL de substrat : solution de paranitrophénylphosphate (PNPP) à 1 mg/mL en tampon Tris-HCl à 1 mol/L, pH = 9,8 : "PNPP".
- Tube contenant 1 mL de "NaOH" : solution de NaOH à 3 mol/L.
- Bac de désinfectant.
- Barrette sensibilisée.

3.2- Protocole opératoire.

- Sensibilisation de la barrette (déjà réalisée)

Toutes les cupules des colonnes 1 et 2, sauf A1, ont été sensibilisées de la manière suivante:

- Dépôt de 200 µL d'anticorps anti-entérotoxine A.
- Incubation de 2 heures à 37°C.
- Lavage avec du PBS-Tween.

- Saturation avec de la Séralbumine bovine (SAB) (déjà réalisée).

Toutes les cupules ont été saturées de la manière suivante :

- Dépôt de 200 µL de PBS-Tween-SAB.
- Incubation de 2 heures à 37 °C.

- Préparation des étalons.

En tubes à hémolyse, préparer, en tampon de dilution "Tp", une gamme de 7 solutions étalon filles d'entérotoxine A à partir de la solution "Étalon", par des dilutions successives de raison 1/2.

Le volume final est 200 µL.

- Dilution de l'échantillon "S2".

En tube à hémolyse, préparer, en tampon "Tp", une dilution, au 1/2 du surnageant "S2".

- Dosage de l'entérotoxine A.

Les essais, étalons et témoins, seront distribués selon le protocole ci-dessous :

	1	2
A	Témoin	Etalon 10 ng/mL
B	Témoin	
C	Témoin	Gamme
D	Témoin	de
E	Surnageant S 2	dilutions
F	Surnageant S 2	de
G	S 2 au 1/2	l'étalon
H	S 2 au 1/2	

- Réaliser les étapes suivantes :

Vider les cupules de la barrette.

Réaliser trois lavages en PBS-Tween.

Dans la cupule A2, introduire 100 µL d' "Étalon" entérotoxine A.

Dans les cupules B2 à H2, introduire respectivement chacune des solutions étalons filles.

Dans les cupules témoins A1, C1 et D1, répartir 100 µL de la solution d'entérotoxine "Étalon" et dans la cupule B1, distribuer 100 µL de tampon de dilution "Tp".

Dans les cupules essais E1 et F1, distribuer 100 µL de la solution "S2".

Dans les cupules essais G1 et H1, introduire 100 µL de la solution "S2" au 1/2.

Couvrir la plaque avec un film autocollant et incuber 30 minutes à 37°C.

Réaliser 3 lavages successifs en PBS-Tween dans chaque cupule.

Dans toutes les cupules sauf C1, ajouter 200 µL de "Conjugué".

Dans la cupule C1, distribuer 200 µL de tampon de dilution "Tp".

Couvrir d'un film autocollant et incuber 30 minutes à environ 37°C.

Réaliser 3 lavages successifs en PBS-Tween dans chaque cupule.

Dans toutes les cupules sauf D1, ajouter 200 µL de substrat "PNPP".

Dans la cupule D1, distribuer 200 µL de tampon de dilution "Tp".

Couvrir d'un film autocollant et incuber environ 5 minutes à environ 37°C en surveillant l'apparition de la coloration.

Arrêter la réaction en ajoutant dans toutes les cupules 50 µL de solution "NaOH".

Agiter.

Lire les absorbances à 405 nm contre l'air.

3. 3- Compte rendu.

À quel type de réaction ELISA appartient la technique mise en œuvre dans ce dosage ?

Justifier par un schéma.

Préciser le rôle des témoins. Interpréter.

Compléter le tableau de résultats.

À l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe $A_{405nm} = f(\text{concentration entérotoxine A})$.

Déterminer la concentration en entérotoxine A dans le surnageant "S2". En déduire la teneur en entérotoxine A dans l'aliment en ng par g d'aliment.

Donnée : incertitude relative = $2 CV = 10 \%$.

Comparer le résultat obtenu dans l'échantillon d'aliment par rapport à la concentration mesure selon la technique d'agglutination passive inversée (2,5 ng/g).

Conclure.FEUILLE DE RÉSULTATS

À RENDRE AVEC LA COPIE

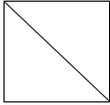
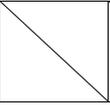
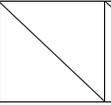
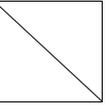
POSTE N°

Tableau de lecture du dosage par agglutination

	1	2	3	4	5	6	7	8
Facteur de dilution initiale								
A								
B								
C								

Légende :

Tableau de résultat du dosage immunoenzymatique

	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
A_{405nm}								
Centérottoxine A (ng/mL)								
	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2

A_{405nm}

Centérottoxine A (ng/mL)

E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2006	SUJET 4
Durée : 3 heures	Coefficient : 2

DÉTECTION ET DOSAGE DES GLIADINES DANS UN ALIMENT POUR BÉBÉ (40 points)

Les grains de blé sont constitués d'un sucre, l'amidon, et d'un mélange complexe de protéines. Le gluten est obtenu après extraction de l'amidon de la farine de blé par lixiviation. Il contient un mélange de protéines insolubles dans l'eau : les gliadines et les gluténines. Les gliadines correspondent à la fraction protéique du gluten soluble dans l'éthanol à 70%. Elles représentent environ 50% des protéines de l'albumen du grain de blé. Certaines personnes présentent une intolérance alimentaire aux gliadines. On parle alors de maladie cœliaque. Un régime alimentaire est alors indispensable. La commission du Codex Alimentarius appartenant à l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et la FAO (Food and Agricultural Organisation of United Nations) indiquent que les aliments contenant un taux de gluten supérieur à 0,04% doivent être exclus de l'alimentation des personnes atteintes de maladie cœliaque. On se propose de doser les gliadines d'un aliment pour bébé par une méthode immunoenzymatique en phase hétérogène basée sur une réaction de compétition. Le dosage des gliadines dans les aliments nécessite leur extraction préalable. L'échantillon de gliadines "G" a été obtenu à partir d'1 g d'aliment aux céréales pour bébé par extraction dans 10 mL d'éthanol à 70%.

1- Matériel et réactifs :

- Un support pour barrettes.
- Une barrette de 2 x 8 cupules sensibilisées par les gliadines, en position 1 et 2 sur le support.
- Une barrette de 2 x 8 cupules vides, en position 11 et 12 sur le support.
- Un film autocollant.
- Une pipette automatique P200 + cônes.
- Une pipette automatique P1000 + cônes.
- Agitateur de microplaques (400 tours/min).
- Lecteur de microplaques réglé à 405 nm.
- Étuve à 37°C.
- Un tube Eppendorf étiqueté "**Étalon**" contenant 300 µL d'une solution étalon de gliadine 1 mg.mL⁻¹
- Un tube Eppendorf étiqueté "**Echantillon G**" contenant 250 µL d'échantillon à tester.
- Un flacon étiqueté "**PBS-Tween**" contenant 30 mL de tampon PBS-Tween 20 à 0,05%.
- Un flacon étiqueté "**Tampon PBS pH 7,2**" contenant 10 mL de tampon PBS.
- Un tube à hémolyse étiqueté "**Conjugué anti-gliadines**" contenant 1,5 mL de solution d'anticorps anti-gliadines conjugués à la phosphatase alcaline.
- Un tube à hémolyse étiqueté "**Substrat**" contenant 2 mL de PNPP à 1 g.L⁻¹ en tampon glycine MgCl₂.
- Un tube à hémolyse contenant 1,5 mL de "**NaOH**" à 5 mol.L⁻¹ (produit corrosif).

2- Protocole opératoire.

La barrette en position 1 et 2 est utilisée pour le dosage des gliadines.
Elle a été préalablement sensibilisée de la manière suivante :

Dans toutes les cupules sauf A1 et B1 :

Dépôt de 100 µL de gliadines à 100 µg.mL⁻¹.

Incubation 2 heures à 37°C de la barrette recouverte d'un film autoadhésif puis lavage avec du tampon PBS-Tween et rinçage avec du tampon PBS.

Dans toutes les cupules sauf A1 :

Dépôt de 200 µL de sérumbumine bovine (SAB) à 3% en tampon PBS.

Incubation 60 minutes à 37°C de la barrette recouverte d'un film autoadhésif puis lavage avec du tampon PBS-Tween et rinçage avec du tampon PBS.

La barrette vide installée en position 11 et 12 du support est utilisée pour la réalisation des dilutions suivantes :

À partir de la solution étalon de gliadines à 1 mg.mL⁻¹, réaliser une gamme de 11 dilutions en série de progression géométrique de raison 1/2, en utilisant comme diluant du “**tampon PBS pH 7,2**”. Commencer par la dilution au 1/2, dans la cupule A11.

Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution

Dans la barrette sensibilisée installée en position 1 et 2 du support, distribuer :

- 50 µL de chacune de ces dilutions dans les cupules D1 à F2.
- 50 µL de diluant “**Tampon PBS pH 7,2**” dans les cupules B1 et C1.
- 50 µL d’“**échantillon G**” dans les cupules G2 et H2.

Déposer ensuite dans chacune des cupules, à l'exception de A1, 50 µL de “**Conjugué anti-gliadines**”. Recouvrir la barrette d'un film autoadhésif et agiter 5 minutes à température ambiante, à environ 400 tours.min⁻¹.

Incuber 45 minutes dans l'étuve à 37°C.

Effectuer 3 lavages successifs avec du tampon “**PBS-Tween**” et 1 rinçage avec du “**tampon PBS pH 7,2**” dans chaque cupule.

Pour chaque lavage ou rinçage :

Remplir chacune des cupules. Laisser agir 10 secondes. Vider ensuite par retournement brusque. À la fin du rinçage, égoutter les cupules par tapotement de la barrette sur papier absorbant.

Ajouter ensuite 100 µL de “**Substrat**” dans toutes les cupules

Recouvrir d'un film autoadhésif et incuber 15 minutes à l'étuve à 37°C.

Arrêter la réaction enzymatique par addition de 50 µL de solution de “**NaOH**” dans chaque cupule. Mélanger en appliquant un léger mouvement de rotation.

Lire les absorbances de chaque cupule à 405 nm contre la cupule A1 dans un lecteur de microplaque.

3- Compte-rendu.

3.1- Méthodologie.

Présenter, sous forme d'un schéma légendé, les étapes de la méthode mise en œuvre pour ce dosage.

Quel est le rôle de l'ajout de la SAB à 3% ?

Préciser le rôle des lavages. Indiquer la composition et le rôle des différents témoins (cupules A1, B1 et C1).

Conclure sur les résultats obtenus pour chacun d'eux.

3.2 – Expression et analyse des résultats.

Présenter un tableau de préparation de la gamme d'étalonnage. Indiquer, sous forme d'un tableau récapitulatif :

- les concentrations en gliadines ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) pour les cupules D1 à F2.
- Le logarithme des concentrations en gliadines.
- le résultat des absorbances brutes de toutes les cupules.
- le résultat des absorbances nettes en tenant compte des témoins.

Calculer, pour chaque cupule sauf B1 et C1, le pourcentage d'inhibition selon la formule ci-dessous et regrouper vos résultats dans votre tableau récapitulatif.

$$I = \frac{A_{\text{max imale}} - A_{\text{cupule}}}{A_{\text{max imale}}}$$

À l'aide de l'outil informatique, représenter graphiquement la fonction :

Pourcentage d'inhibition = f (log concentration en gliadines), avec la concentration exprimée en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Valider les résultats expérimentaux de l'étalonnage. Établir les paramètres de l'équation de la représentation graphique.

Déterminer la concentration en gliadines de l'échantillon G fourni.

En déduire la teneur en gluten de cet aliment.

Conclure sur la qualité de l'aliment pour les bébés atteints de maladie cœliaque.

Sujets 2007

E1-U10 : ÉPREUVE D'ANGLAIS 2007	
Durée : 2 heures	Coefficient : 1

L'usage de la calculatrice est interdit. L'usage d'un dictionnaire bilingue est autorisé.

People must make lifestyle changes, says Blair

Tony Blair urged the public today to take more responsibility for their own health as he warned the NHS¹ was under increasing pressure from the results of excessive drinking, eating and smoking.

The government could not make choices for people to improve their own well-being, Mr Blair said as he signalled a move away from the stereotypical image of a "nanny-state".

But Mr Blair warned the "junk food" industry that if the voluntary code on limiting the advertising of unhealthy food to children didn't work the government would legislate next year to enforce the restrictions.

Mr Blair said: "In the future, healthcare cannot be just about treating the sick but must be about helping us to live healthily. This requires more from all of us, individuals, companies and government. And for government, it has to encourage, it has to inform, but, if necessary, in a tougher way than ever before, it has to be prepared to act."

Today's public health problems are "not, strictly speaking, public health problems at all", according to the prime minister.

"They are questions of individual lifestyle - obesity, smoking, alcohol abuse, diabetes, sexually transmitted disease. These are not epidemics in the epidemiological sense. They are the result of millions of individual decisions, at millions of points in time."

Mr Blair said obesity was rising rapidly, and the social effects of alcohol abuse were "widespread and worsening." Smoking may account for half of the "health gap" between social classes, he added.

"These individual actions lead to collective costs. The economic burden of chronic disease, including lost work, the early drawing down of pension entitlements and the need for palliative care, could be vast."

Mr Blair said a more "robust" approach to health was needed because everyone would pay the price for failure.

"That doesn't mean you stop treating people in the NHS who smoke, or force people to do what they don't choose to do," he said.

"But it does mean that government should play an active role by empowering people to choose responsibly."

Mr Blair said the government was acting by insisting school meals become healthier, and pledged that if voluntary initiatives limiting advertising of junk food to children have not worked by 2007, legislation would be brought in.

But providing good information so people can make the right choices is often as important as legislation.

He said: "In 10 years' time, and if possible long before, I want the health debate in Britain not to be confined to the excellent NHS that treats people when they are sick, but to the broader national health service that is about prevention as much as cure, about personal responsibility as much as collective responsibility, about the quality of living as much as life expectancy."

Adapted from *The Guardian*, July 26, 2006

¹NHS (abbreviation of National Health Service) = équivalent britannique de notre 'Sécurité Sociale'

PREMIÈRE PARTIE : COMPRÉHENSION (10 points)

1. Faire un compte rendu de l'article en français en mettant en évidence les idées essentielles (environ 120 mots ± 10%).
2. Traduire en français le texte de la ligne 9 ('In the future ... ') à la ligne 12 ('...be prepared to act.').

DEUXIÈME PARTIE : EXPRESSION EN LANGUE ANGLAISE (10 points)

Answer the following questions in English.

1. Mr Blair says that excessive drinking, eating and smoking is a question of individual decision that generates a heavy cost for the rest of the population. Explain this statement (70 words ± 10%).
2. What is your opinion about the ban on smoking in all public places? (130 words 10%).

E2-U21 : MATHÉMATIQUES 2007**Durée : 2 heures****Coefficient : 2**

La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

La calculatrice (conforme à la circulaire n° 99-186 du 16-11-99) est autorisée.

Le formulaire de mathématiques est joint au sujet.

Une feuille de papier millimétré est fournie.

EXERCICE 1 (10 points)

Dans cet exercice on s'intéresse à un flotteur réalisé en plastique allégé.

Les deux parties de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

1- Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) : $y' - y = -e^x$,

où y est une fonction de la variable réelle x , définie et dérivable sur \mathbb{R} et y' la fonction dérivée de y .

1.1- Déterminer les solutions sur \mathbb{R} de l'équation différentielle (E) : $y' - y = 0$

1.2- Soit h la fonction définie sur \mathbb{R} par $h(x) = -x e^x$.

Démontrer que la fonction h est une solution particulière de l'équation différentielle (E).

1.3- En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E).

1.4- Déterminer la solution de l'équation différentielle (E) qui vérifie la condition initiale $f(0) = 2$.

2- Étude d'une fonction et calcul intégral

Soit f la fonction définie sur $[-2, 2]$ par $f(x) = (2 - x) e^x$.

On désigne par C la courbe représentative de f dans un repère orthonormal $(O; \vec{i}; \vec{j})$ où l'unité graphique est 2 centimètres.

2.1-

2.1.1- Calculer $f'(x)$ pour tout x de $[-2, 2]$.

2.1.2- Étudier le signe de $f'(x)$ lorsque x varie dans $[-2, 2]$.

2.1.3- Établir le tableau de variation de f sur $[-2, 2]$.

2.2- Construire la courbe C sur une feuille de papier millimétré.

2.3-

2.3.1- Résoudre algébriquement dans $[-2, 2]$ l'inéquation $f(x) \geq 2 - x$.

2.3.2- Retrouver graphiquement le résultat du **2.3.1**. On fera apparaître sur la figure du 2° les constructions utiles.

2.4-

2.4.1- Démontrer que la fonction F définie sur $[-2, 2]$ par $F(x) = \left(\frac{1}{2}x^2 - \frac{5}{2}x + \frac{13}{4}\right) e^{2x}$ est une primitive sur $[-2, 2]$ de la fonction $x \rightarrow [f(x)]^2$.

2.4.2- Application :

On considère le solide S engendré par la rotation autour de l'axe des abscisses de la partie du plan limitée par la courbe C , l'axe des abscisses et la droite d'équation $x = -2$.

Le solide obtenu est utilisé pour réaliser un modèle de flotteur en plastique allégé.

On admet que le volume V , en unités de volume, du solide S est : $V = \pi \int_{-2}^2 [f(x)]^2 dx$

Établir que $V = \frac{\pi}{4} (e^4 - 41 e^{-4})$.

2.4.3- Donner la valeur approchée de V en cm^3 arrondie à 10^{-3} .

EXERCICE 2 (10 points)

Les trois parties de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

Dans cet exercice, on s'intéresse au contrôle de la qualité de la fabrication du modèle de flotteur décrit dans l'exercice 1.

1- Loi binomiale

On considère un stock important de flotteurs.

Dans cette partie, les résultats approchés sont à arrondir à 10^{-2} près.

On dit qu'un flotteur est acceptable si sa masse, exprimée en grammes, appartient à l'intervalle $[24,5 ; 25,5]$.

On prélève au hasard un flotteur dans le stock.

On note E l'événement : "le flotteur prélevé dans le stock est acceptable".

On suppose que $P(E) = 0,26$.

On prélève au hasard n flotteurs dans le stock pour vérification. Le stock est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement de n flotteurs à un tirage avec remise. On considère la variable aléatoire X qui, à tout prélèvement ainsi défini, associe le nombre de flotteurs acceptables dans le prélèvement.

1.1- Justifier que la variable aléatoire X suit une loi binomiale dont on donnera les paramètres.

1.2- Dans cette question, on suppose $n = 6$.

1.2.1- Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement, deux flotteurs exactement soient acceptables.

1.2.2- Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement, au plus deux flotteurs soient acceptables.

1.3- Dans cette question, on considère un prélèvement de n flotteurs.

1.3.1- Donner, en fonction de n l'expression de $P(X=0)$.

1.3.2- Soit F l'événement : "dans le prélèvement, au moins un flotteur est acceptable". Calculer la valeur minimale n_0 de n telle que $P(F) \geq 0,95$.

2- Loi normale

Dans cette partie les résultats sont à arrondir à 10^{-2} près.

On désigne par Y la variable aléatoire qui, à chaque flotteur prélevé au hasard dans la production d'une journée, associe sa masse exprimée en grammes.

On suppose que la variable aléatoire Y suit la loi normale de moyenne 25 et d'écart type 1,58.

2.1- Calculer la probabilité qu'un flotteur prélevé au hasard dans la production de la journée ait une masse inférieure ou égale à 27 grammes.

2.2- Calculer la probabilité qu'un flotteur prélevé au hasard dans la production de la journée ait une masse inférieure ou égale à 24,5 grammes.

3- Probabilités conditionnelles

Dans cette partie, les résultats sont à arrondir à 10^{-4} près.

Les flotteurs sont fabriqués par deux machines notées M_1 et M_2 .

60 % des flotteurs proviennent de la machine M_1 et 40 % proviennent de la machine M_2 .

On admet que 1,3 % des flotteurs provenant de la machine M_1 sont défectueux et que 1,8 % des flotteurs provenant de la machine M_2 sont défectueux.

On prélève au hasard un flotteur dans la production d'un mois.

On considère les événements suivants :

A_1 : "le flotteur provient de la machine M_1 "

A_2 : "le flotteur provient de la machine M_2 "

D : "le flotteur est défectueux".

3.1- Déterminer $P(A_1)$, $P(A_2)$, $P(D/A_1)$ et $P(D/A_2)$.

On rappelle que $P(D/A_1) = P_{A_1}(D)$ est la probabilité de l'événement D sachant que l'événement A_1 est réalisé.

3.2-

3.2.1- Calculer les valeurs exactes des probabilités $P(A_1 \cap D)$ et $P(A_2 \cap D)$.

3.2.2- En déduire la valeur exacte de la probabilité qu'un flotteur prélevé au hasard dans la production du mois soit défectueux.

3.3- Calculer la probabilité qu'un flotteur provienne de la machine M_1 sachant qu'il est défectueux.

E2-U22 : SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES 2007

Durée : 2 heures

Coefficient : 3

**A : SÉDIMENTATION : DÉCANTATION ET CENTRIFUGATION
(16 points / 60)**

L'hémoglobine est un pigment de coloration rouge contenu dans les globules rouges (hématies) qui permet le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus. C'est une protéine géante. Elle peut être modélisée par une sphère de diamètre d'environ 10 nm.

On se propose d'étudier la sédimentation de l'hémoglobine contenue dans le sang par décantation

(figure 1), puis par centrifugation (figure 2).

Dans les deux cas, les molécules d'hémoglobine sont considérées comme sphériques et elles migrent dans les sens indiqués par les vecteurs vitesses \vec{v}_1 et \vec{v}_2 .

Dans l'expression de ces vitesses, on notera r le rayon d'une molécule d'hémoglobine, ρ sa masse volumique, ρ_L celle du liquide, g l'accélération de la pesanteur et a l'accélération due à la rotation.

Données :

- Masse volumique du sang à la température de travail : $\rho_L = 1,05.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$;
- Masse volumique de l'hémoglobine à la température de travail : $\rho = 1,35.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$;
- Viscosité du sang à la température de travail : $\eta = 4,00.10^{-3} \text{ Pa.s}$;
- Accélération de la pesanteur : $g = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$;
- Volume d'une sphère de rayon r : $V = \frac{4}{3} \pi r^3$;
- Rayon de la molécule d'hémoglobine : $r = 5,00.10^{-9} \text{ m}$;
- Loi de Stokes : La force de frottement visqueux sur une particule sphérique, de rayon r , en mouvement dans un liquide de viscosité η , s'écrit $\vec{F} = -k\vec{v}$ avec $k = 6\pi\eta r$;
- Valeur de la poussée d'Archimède : Elle correspond au poids du volume de liquide déplacé (égal au volume de la particule entièrement immergée).

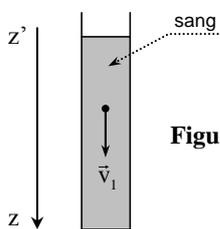


Figure 1

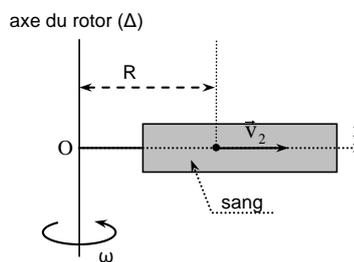


Figure 2

1- Séparation de l'hémoglobine du sang par décantation (sédimentation sous l'action de la pesanteur) :

1.1- Donner l'expression de l'intensité des forces qui s'exercent sur cette molécule en fonction des données. Les représenter sur un schéma.

1.2- Le mouvement de sédimentation de la molécule devient rapidement rectiligne uniforme.

Appliquer le principe d'inertie en projection sur l'axe vertical descendant $z'z$ et retrouver l'expression de la vitesse de migration v_1 de la molécule donnée par la relation :

$$v_1 = \frac{2r^2(\rho - \rho_L)}{9\eta} g.$$

1.3- Calculer v_1 .

1.4- Quelle serait la durée t_1 (en secondes puis en années) nécessaire pour que la molécule sédimente sur une distance de 1 mm ?

2- Séparation de l'hémoglobine du sang par centrifugation :

La molécule est soumise à l'accélération $a = \omega^2 R$ due au mouvement de rotation imprimé au tube par le rotor de la centrifugeuse (ω étant la vitesse angulaire du rotor en rad.s^{-1} et R la distance entre la molécule et l'axe du rotor).

Les calculs seront faits dans le cas où la molécule se trouve à une distance $R = 6$ cm de l'axe du rotor, le système tournant à $15\,000 \text{ tr.min}^{-1}$ soit $1,57 \cdot 10^3 \text{ rad.s}^{-1}$.

2.1- Calculer l'accélération a en m.s^{-2} puis la valeur du rapport a/g .

2.2- La vitesse de migration de la molécule vers le fond du tube atteint rapidement une valeur constante v_2 dont l'expression est donnée : $v_2 = \frac{2r^2(\rho - \rho_L)}{9\eta} a$.

Calculer v_2 .

2.3- Quelle est la nouvelle durée t_2 (en secondes puis en heures) nécessaire pour que la molécule sédimente sur une distance de 1 mm ?

2.4- Comparer t_1 et t_2 . En déduire l'intérêt de la centrifugation.

B : SPECTROPHOTOMÈTRE D'ABSORPTION ET RÉSEAU (14 points / 60)

Pour doser l'élément fer contenu dans le vin blanc, on transforme tous les ions fer en ions Fe^{2+} . Ces ions sont ensuite complexés par de l'orthophénantroline et on obtient ainsi une solution colorée en rouge.

Au préalable, on prépare des solutions de concentrations connues en ions Fe^{2+} , notées C, que l'on traite, toujours de la même façon, par de l'orthophénantroline. On mesure l'absorbance des solutions ainsi obtenues :

C en mg.L^{-1}	0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
Absorbance A	0	0,35	0,72	1,10	1,46	1,88

1- On utilise une longueur d'onde de travail de 510 nm (vert-bleu). Justifier ce choix.

2-

2.1- La loi de Beer-Lambert est-elle vérifiée ? Justifier en précisant la méthode utilisée.

2.2- Quelle est la concentration d'une solution d'absorbance $A = 0,57$?

3- Ce spectrophotomètre utilise des radiations de longueurs d'onde comprises entre 190 et 800 nm.

Il comporte un réseau comportant 1250 traits par mm.

On étudie le principe du fonctionnement de ce réseau pour une longueur d'onde émergente de 510 nm.

On retrouve dans un manuel la formule du réseau : $\sin i' - \sin i = k.n.\lambda$.

3.1- Donner le schéma du réseau.

3.2- Expliciter les termes de cette formule, en rappelant la convention de signe choisie.

3.3- On travaille en transmission sous incidence normale. Quel est pour l'ordre 1, l'angle d'émergence de la radiation choisie ?

C : OXYDORÉDUCTION ET COMPLEXATION (15 points / 60)

1- Une pile est constituée des deux demi-piles suivantes :

- Demi-pile (1) : lame de plomb plongée dans un volume $V_1 = 100$ mL d'une solution aqueuse de nitrate de plomb ($\text{Pb}^{2+} + 2 \text{NO}_3^-$) de concentration molaire $C_1 = 0,100$ mol.L⁻¹.
- Demi-pile (2) : lame d'argent plongée dans un volume $V_2 = 100$ mL d'une solution aqueuse de nitrate d'argent ($\text{Ag}^+ + \text{NO}_3^-$) de concentration molaire $C_2 = 0,050$ mol.L⁻¹.

Données :

Potentiels standard des couples redox à 25°C :

- $E_1^\circ (\text{Pb}^{2+}/\text{Pb}) = -0,13$ V ;
- $E_2^\circ (\text{Ag}^+/\text{Ag}) = 0,80$ V ;
- $\frac{RT}{F} \ln(x) = 0,06 \log(x)$ à 25°C.

1.1- Donner l'expression littérale du potentiel d'oxydoréduction, noté E_1 , de la demi-pile (1) et calculer sa valeur.

1.2- Donner l'expression littérale du potentiel d'oxydoréduction, noté E_2 , de la demi-pile (2) et calculer sa valeur.

1.3- À quelle demi-pile appartient l'électrode constituant le pôle positif de la pile ? Justifier la réponse.

1.4- Faire le schéma de la pile en précisant les polarités des électrodes et le sens de circulation du courant électrique dans le circuit extérieur.

1.5- Écrire l'équation de la réaction globale qui s'effectue dans la pile lorsque celle-ci est en fonctionnement.

1.6- Calculer la force électromotrice E (f.é.m.) de la pile en début de fonctionnement.

2- On ajoute, dans la demi-pile (2), sans modification de volume, une quantité de matière $n_0 = 15 \cdot 10^{-3}$ mol d'ammoniac NH_3 en solution aqueuse ; il se forme le complexe diammine argent (I) de formule $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$. La demi-pile (2) adopte alors un nouveau potentiel d'oxydoréduction, noté E_2' , tel que $E_2' = 0,45$ V.

2.1- Écrire l'équation de formation de l'ion complexe $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$.

2.2- Calculer la nouvelle concentration, notée C_2' en ions argent Ag^+ dans la demi-pile (2) à l'équilibre. Détailler le calcul.

2.3- Comparer les valeurs de C_2 et de C_2' . Que peut-on en déduire concernant la réaction de formation de l'ion complexe $Ag(NH_3)_2^+$?

2.4- Établir à l'aide d'un tableau d'évolution le bilan molaire de la réaction de formation de l'ion complexe.

2.5- Donner l'expression littérale de la constante de formation β de l'ion complexe diammine argent (I).

2.6- Calculer la valeur de β .

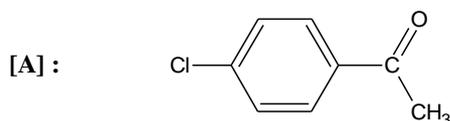
D : CHIMIE ORGANIQUE (15 points / 60)

Le phénaglycodol est le nom usuel d'un médicament utilisé notamment contre l'épilepsie. Sa synthèse peut se faire selon la séquence ci-dessous :

Données :

Numéros atomiques : $Z(H) = 1$; $Z(C) = 6$; $Z(N) = 7$; $Z(O) = 8$; $Z(Cl) = 17$.

1- Le chlorobenzène réagit avec le chlorure d'éthanoyle de formule CH_3-COCl pour donner du chlorure d'hydrogène et un produit [A] de formule :



1.1- Écrire l'équation de la réaction.

1.2- De quel type de réaction s'agit-il ?

1.3- Quel est le catalyseur usuellement employé ?

1.4- Quels sont les isomères de position du produit [A] que l'on aurait pu obtenir ?

2- [A] est traité par l'acide cyanhydrique HCN ; on obtient un composé [B] de formule brute C_9H_8NOCl .

2.1- Écrire l'équation de la réaction en faisant apparaître les formules semi-développées des molécules organiques mises en jeu.

2.2- Quelles sont les fonctions organiques présentes dans la molécule [B] ?

2.3- De quel type de réaction s'agit-il ?

3- L'hydrolyse du composé [B] conduit à la formation d'un acide carboxylique [C], dont la formule brute est $C_9H_9O_3Cl$.

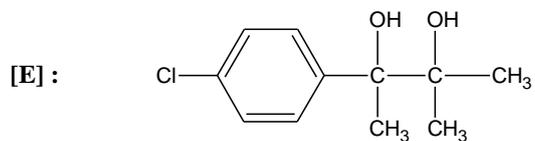
Donner la formule semi-développée de [C].

4- Le composé [C] réagit avec l'éthanol pour donner le composé [D].

4.1- Écrire l'équation de la réaction sous forme semi-développée.

4.2- Quel est le nom de cette réaction ?

5- Le composé [D] est traité par un large excès de CH_3MgBr . Après hydrolyse, on obtient le phénaglycodol [E] de formule :



5.1- À quelle famille de composés appartient CH_3MgBr ?

5.2- Combien peut-il exister de stéréoisomères du phénaglycodol [E] ? Justifier la réponse.

5.3- Donner la représentation de Cram d'un des stéréoisomères du phénaglycodol en précisant la configuration absolue du (ou des) atome(s) de carbone asymétrique(s). Justifier la réponse.

E3-U31 : BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007**Durée : 3 heures****Coefficient : 3****BIOCHIMIE D'UN MEDICAMENT**

Le Sildénafil est une molécule d'intérêt thérapeutique utilisée pour ses propriétés vasodilatatrices liées à une potentialisation du relâchement des muscles lisses de certaines artérielles. On l'utilise pour le traitement de certaines formes d'hypertension artérielle. Ce médicament est vendu sous forme de comprimés contenant le principe actif *sildénafil citrate* associé à des excipients dont le *lactose α monohydraté*.

1- Mode d'action du principe actif, le citrate de sildénafil. (33 points)

1.1- D'après le **document 1**, les phosphodiesterases PDE₅ catalysent l'hydrolyse du Guanosyl monophosphate cyclique (GMP_c) produisant un nucléotide 5'- phosphate.

1.1.1- Écrire la formule du GMP_c.

1.1.2- Ecrire l'équation de la réaction (formules chimiques non exigées).

1.1.3- Indiquer la classe d'enzyme des PDE₅, préciser le numéro d'ordre qui correspond à cette classe.

1.1.4- La réaction d'hydrolyse du GMP_c est fortement exergonique *in vivo*. Quelles en sont les conséquences aux niveaux de la réaction et de la séquence métabolique décrite dans le **document1**.

1.2- Une étude *in vitro* de l'effet du Sildénafil sur les activités des PDE₅ montre que l'enzyme a un comportement Michaelien. Les résultats sont présentés dans le **document 2**, les vitesses initiales des réactions sont exprimées en unités arbitraires (UA.)

1.2.1- Démontrer l'équation de Lineweaver-Burk

1.2.2- À l'aide de la calculatrice, déterminer les paramètres de régression en absence et en présence d'effecteur. En déduire dans chaque cas la vitesse initiale maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis de PDE₅ pour le GMP_c.

1.2.3- En déduire le type d'action du Sildénafil. Justifier votre réponse.

À l'aide du **document 1**, en déduire les conséquences physiologiques de la prise de ce médicament.

1.2.4- Une représentation graphique pratique (**document 3**) permet de déterminer une constante caractéristique, K'_M, la constante de Michaelis apparente de l'enzyme inhibée soit :

$$K_M' = K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

Indiquer à quoi correspondent, sur ce document, l'ordonnée A et l'abscisse B. Justifier.

Déterminer la constante d'inhibition du Sildénafil.

1.3- Le Sildénaphil agit de façon spécifique sur les phosphodiesterases de type 5 dont on connaît 11 formes isoenzymatiques

1.3.1- Définir les caractéristiques des isoenzymes.

1.3.2- Indiquer une technique d'analyse permettant de séparer les différentes formes isoenzymatiques d'une même enzyme.. Rappeler son principe.

1.3.3- La PDE₅ est une protéine dimérique spécifique du GMPc. On considère que cette enzyme est une enzyme allostérique qui présente deux domaines identiques de liaison au GMPc, ce domaine est appelé GAFdomain (**document 4**).

- 1.3.3.1- Donner toutes les caractéristiques d'une enzyme allostérique.
- 1.3.3.2- Proposer une définition de la notion de domaine.
- 1.3.3.3- La comparaison des séquences entre le domaine GAFa du PDE₅ humain et du domaine GAFb de la souris montre une homologie de séquence de 48% (**document 5**).
- 1.3.3.4- - A quoi correspond le terme α associé à la portion de séquence des résidus 88 à 96 ? Préciser l'ensemble des caractéristiques structurales de cette portion de séquence.
- 1.3.3.5- - Comparer les séquences entre les deux molécules au niveau de cette portion de séquence. Observe-t-on une incidence sur la structure tridimensionnelle ? Justifier votre réponse.

2- Le lactose excipient de choix en pharmacie galénique(40 points).

Le lactose est un excipient couramment utilisé en pharmacie galénique.

En effet, le lactose regroupe diverses qualités, faible coût, saveur agréable, excellente stabilité physique et chimique, solubilité dans l'eau, bonne aptitude à la compression.

2.1- Le lactose, structure et propriétés (7 points)

- 2.1.1- Écrire la formule développée du lactose ainsi que son nom systématique.
- 2.1.2- Le lactose possède-t-il un pouvoir réducteur ? Justifier votre réponse.
- 2.1.3- Une méthode de dosage du lactose est basée sur l'utilisation du 3,5-dinitrosalicylate (ou 3,5-DNS).
Indiquer le principe de ce dosage et préciser le nom de l'appareillage de mesure nécessaire (équations de réactions non demandées)

2.2- Les étapes de purification du lactose. (16 points)

Le lactose utilisé en pharmaceutique (lactose codex) est issu du lactosérum. Le procédé utilisé en lactoserie est indiqué **document 5**.

2.2.1- Étape d'ultrafiltration

L'ultrafiltration est un procédé de séparation par membranes semi-perméables.

- 2.2.1.1- Préciser les compositions qualitatives respectives du perméat et du rétentat sachant que la zone de coupure des membranes utilisées se situe entre 8 et 10 kDa . Justifier votre réponse.
- 2.2.1.2- Pour les molécules dont la masse appartient à la zone de coupure, on définit un *taux de rétention R*.

$$R = \frac{Cl - Cp}{Cl}$$

Cl = Concentration de la molécule dans le lactosérum

Cp = Concentration de la molécule dans le perméat.

Parmi les trois membranes suivantes, laquelle faut-il utiliser pour limiter au maximum le passage de ces deux molécules dans le perméat ? Justifier votre réponse.

Membrane 1	Membrane 2	Membrane 3
$R = 0$	$R = 0,5$	$R = 0,8$

2.2.2- Étape de déminéralisation par chromatographie d'échange d'ions

Le perméat est introduit dans un premier temps sur un échangeur de cations. Le pH du perméat va ainsi s'acidifier.

Dans un deuxième temps, le rétentat "décationné" est passé dans une seconde résine échangeuse d'anions.

2.2.2.1- Le document 6 présente différents types de résines échangeuses d'ions utilisées couramment. Choisir une résine échangeuse de cations et écrire les réactions d'échanges ioniques entre les électrolytes du perméat et la résine cationique. Justifier la diminution du pH dans le perméat élué.

2.2.2.2- La capacité d'échange est une constante correspondant au nombre de groupements ionisables contenus dans l'échangeur. Elle peut être exprimée en millimoles d'ion monovalent actif par unité de masse (g de résine sèche) ou par unité de volume (mL de résine humide tassée dans la colonne).

2.2.2.3- A partir des informations du **document 7**, calculer la capacité de rétention de la résine en millimoles d'ions par g de résine sèche sachant que le volume versé de NaOH est de 11,50 mL

2.2.3- Étape de cristallisation

La réfractométrie est utilisée pour suivre l'étape de cristallisation par la mesure des variations de la concentration en lactose restant en solution pendant la cristallisation d'une solution saturée.

2.2.3.1- Comment varie la valeur lue au réfractomètre au cours des cristallisations successives ? Justifier.

2.2.3.2- La détermination rapide de la concentration de solutions de lactose utilise un réfractomètre d'Abbe, qui repose sur la détermination de l'angle limite entre deux milieux. Citer deux facteurs dont dépend l'indice de réfraction.

2.2.3.3- La solution saturée est constituée de lactose en équilibre principalement sous les formes lactose α et lactose β . Au cours de la cristallisation, le phénomène de mutarotation se produit, le lactose β se transforme en lactose α qui cristallise.

2.2.3.4- Quelle est la différence structurale entre ces deux formes ?

2.2.3.5- Par quel type de mesure peut-on distinguer ces formes ?

2.3- Mise au point du dosage du lactose par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (17 points)

Une méthode de dosage du lactose met en oeuvre une HPLC couplée à un détecteur particulier (ELSD : Détecteur de dispersion de la lumière par évaporation).

2.3.1- À l'aide du **document 8a**, dégager les caractéristiques du système chromatographique.

2.3.2- Faire le schéma de principe de l'appareillage utilisé. Indiquer deux autres détecteurs utilisés classiquement.

2.3.3- Citer le type d'étalonnage utilisé. Proposer un protocole pour la préparation de la gamme étalon de lactose.

2.3.4- Lors de la mise au point de la méthode, le détecteur peut être utilisé sous position "nébuliseur Off" ou "nébuliseur On", le résultat est donné dans le **document 8b**.

2.3.4.1- Dans quelle position doit-on régler le détecteur pour obtenir la meilleure sensibilité ? Justifier votre réponse en donnant une définition de la sensibilité.

2.3.4.2- Définir et déterminer le temps de rétention du lactose.

2.3.5- D'après le **document 8a**, quel est le paramètre de qualité étudié? Indiquer la réalisation pratique et expliquer le calcul nécessaire à son évaluation.

Quel autre paramètre de qualité pourrait-on étudier ?

3- Effets secondaires du médicament (7points).

Lors de la prise de médicament, de nombreux effets indésirables peuvent survenir. La plupart d'entre eux sont directement liés au composé actif, d'autres sont imputés aux excipients.

3.1- Le principe actif peut provoquer de nombreux troubles métaboliques notamment une variation de la glycémie.

3.1.1- Le **document 9** représente un mécanisme réactionnel impliqué dans la régulation de la glycémie. Nommer cette voie.

Compléter le **document 9**

3.1.2- Rappeler succinctement le mécanisme de régulation de l'enzyme catalysant la première réaction de la voie métabolique présenté dans le **document 9**.

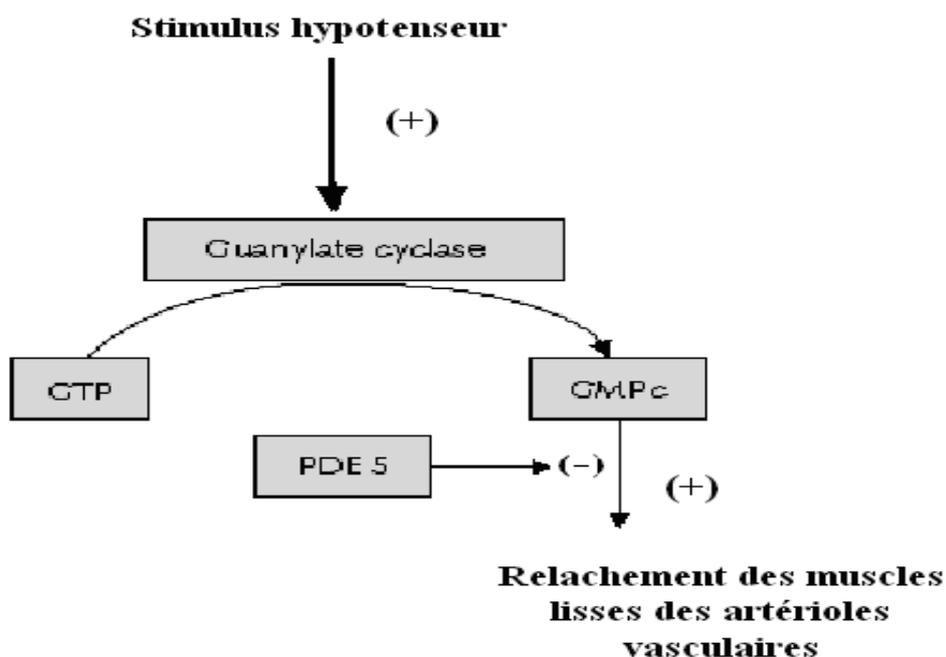
3.2- Certains sujets sensibles présentent une intolérance au lactose même si les doses utilisées sont faibles. Ces individus présentent une déficience en lactase intestinale.

Écrire la réaction catalysée par cette enzyme (formules des produits exigées).

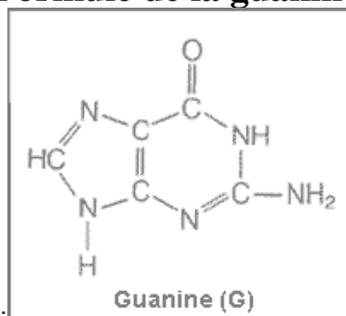
Document 1 : Voie métabolique cible du Sildénafil

Un stimulus hypotenseur entraîne l'activation d'une *guanylate cyclase* des muscles lisses des artérioles ; ce qui se traduit par une augmentation de la concentration de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), qui provoque le relâchement des muscles lisses vasculaires.

La concentration de GMPc dépend certes de sa production mais aussi de son catabolisme, lui-même régulé par l'activité des **phosphodiesterases nucléotidiques cycliques** (PDE) qui catalysent son hydrolyse enzymatique.



Formule de la guanine



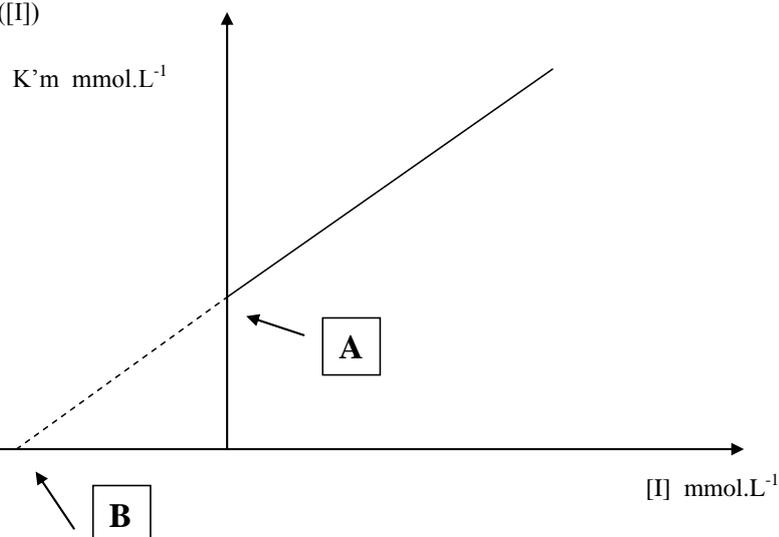
Document 2 : Étude in vitro de l'effet du sildénafil sur l'activité des PDE5

[GMPc] mmol.L ⁻¹	25	50	100	200	400
Vi (UA) [Sildénafil] =0	0,03	0,038	0,044	0,048	0,05
Vi (UA) [Sildénafil] =0,5 mmol.L ⁻¹	0,02	0,029	0,0375	0,044	0,048

UA : unité arbitraire

Document 3 : Représentation graphique secondaire pour la détermination de la constante d'inhibition

Courbe $K'm = f([I])$

**Document 4 : Comparaison des séquences protéiques du domaine GAF de la phosphodiesterase PDE₅ de la souris et de l'homme entre les résidus 60 à 100.**

extrait de l'article "Modeling and mutational analysis of the GAF domain of the cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase, PDE5."

FEBS Lett. 2003 Sopory S, Balaji S, Srinivasan N, Visweswariah SS.

Alignment of a portion of GAF_a domain of human PDE5A with the GAF_b domain of mouse PDE2"

60 70 80 90 100
 Mouse: L-V-A-K-F-D-G-G-V-V-D-D-E-S-V...E-I-L-I-P-A-D-Q-G-I-A-G-H-V-A-I-I-G-Q-I-L
 Human: L-I-S-R-L-F-D-V-A-E-G-S-T-L-E-E...C-I-R-L-E-W-N-K-G-I-V-G-H-V-A-A-L-G-E-P-L

$\beta \beta \beta \beta \beta \quad \beta \beta$

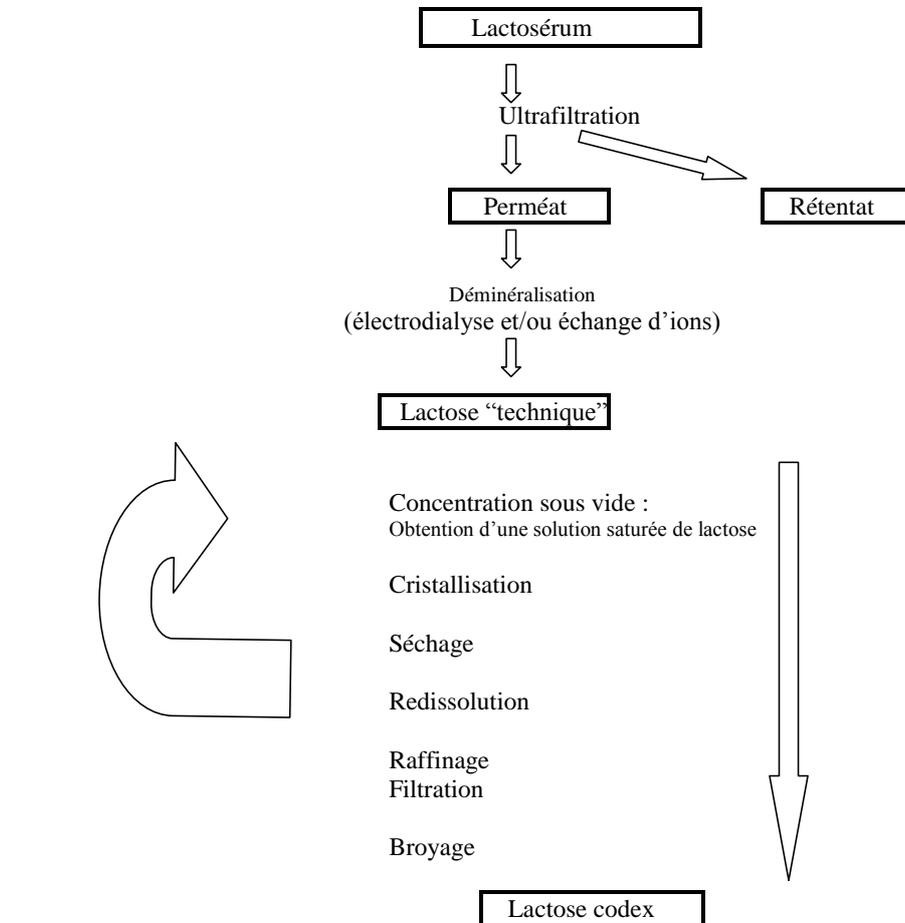
$\beta \beta$

$\alpha \alpha \alpha \alpha \alpha \alpha \alpha \alpha$

Rappel : Code à une lettre des acides aminés

A	Ala	Alanine	L	Leu	Leucine	W	Trp	Tryptophane
C	Cys	Cystéine	M	Met	Méthionine	Y	Tyr	Tyrosine
D	Asp	Acide aspartique	N	Asn	Asparagine			
E	Glu	Acide glutamique	P	Pro	Proline			
F	Phe	Phénylalanine	Q	Gln	Glutamine			
G	Gly	Glycine	R	Arg	Arginine			
H	His	Histidine	S	Ser	Sérine			
I	Ile	Isoleucine	T	Thr	Thréonine			
K	Lys	Lysine	V	Val	Valine			

Document 5 : Schéma de fabrication classique du lactose



Lactosérum : Phase aqueuse qui se sépare du caillé lors de la fabrication du fromage.

Composition du lactosérum :

- Matière sèche totale : 50 à 65 g.L⁻¹
- Lactose : 39 à 48 g.L⁻¹
- Acide lactique : 1 à 8 g.L⁻¹
- Matière grasse : 0,5 à 3 g.L⁻¹
- Sels minéraux : 3 à 6 g.L⁻¹
- Matières azotées : 6 à 8 g.L⁻¹

Document 6 : Quelques groupements fonctionnels de résines échangeuses d'ions

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - groupement sulfonique | Re-SO ₃ ⁻ |
| - groupement carboxyle | Re-CH ₂ -COO ⁻ |
| - groupement ammonium quaternaire | Re-NH ⁺ (CH ₃) ₃ |
| - DEAE | Re-(CH ₂) ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ |

Document 7 : Étapes techniques en vue de la détermination de la capacité d'échange d'une résine cationique

- Peser de 5,00 g de résine sèche. Activation en "batch" avec une solution d'HCl.
- Introduire la résine activée en colonne. Rincer la colonne avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité.
- Déposer en tête de colonne, une solution saturée de NaCl à 2 mol.L⁻¹.
- Recueillir le filtrat et doser par une solution de NaOH à 1,05 mol.L⁻¹.

Document 8a :

High-performance liquid chromatography of lactose with evaporative light scattering detection, applied to determine fine particle dose of carrier in dry powder inhalation products.

Bianca Beilmann and all - Journal of chromatographyA

1) Preparations of solution

The lactose stock solution (1 mg/mL) was prepared in 0.01M HCl, ethanol/water (50/50, v/v) and deionized water, respectively. The following lactose concentrations were prepared by diluting the stock solution: 100, 80, 60, 40, 20 and 10 µg/mL. Samples of drug substance (2.1 mg/mL), excipients (Brij 35), as well as a mixture of all components in ethanol/water (50/50, v/v) were prepared for testing the specificity of the analytical procedure

2) HPLC conditions

HPLC analysis was performed using a Shimadzu LC-10AT pump and a Gilson 233XL Dilutor. Detection was done using an ELSD 2000ES (Alltech) with nitrogen as nebulizer gas (nitrogen cylinder). An APS-2 Hypersil column, 100mm x 3mm i.d., 5 µm particles were used (In reversed phase mode, Hypersil APS-2 columns are ideal for carbohydrate analysis). The

mobile phase was acetonitrile/water (80/20, v/v), which was degassed by ultrasonic bath prior to use. Each run was completed within 5 min. The flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 10 μL .

3) Method validation

Specificity of the analytical procedure is demonstrated by separating lactose from the other components (e.g. drug substance and excipients) of an analytical mixture.

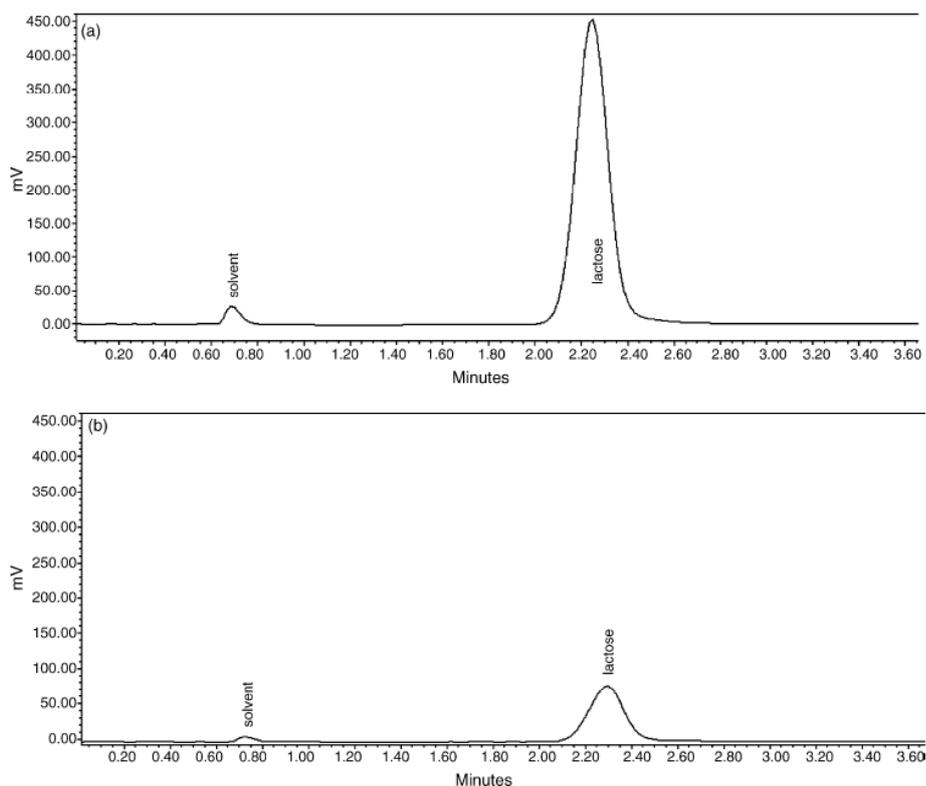
Accuracy of the method was determined by analyzing two lactose samples (mixture of lactose, ipratropium bromide, Brij 35) at two different concentration levels (100 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

The recovery was between 100 and 102% (N= 6). Linearity of the method was determined by preparing and analyzing six standard solutions in the range of 10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Regression analysis of the peak area versus concentration data yielded a $R^2 > 0.99$ for lactose only in the range of 10–80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

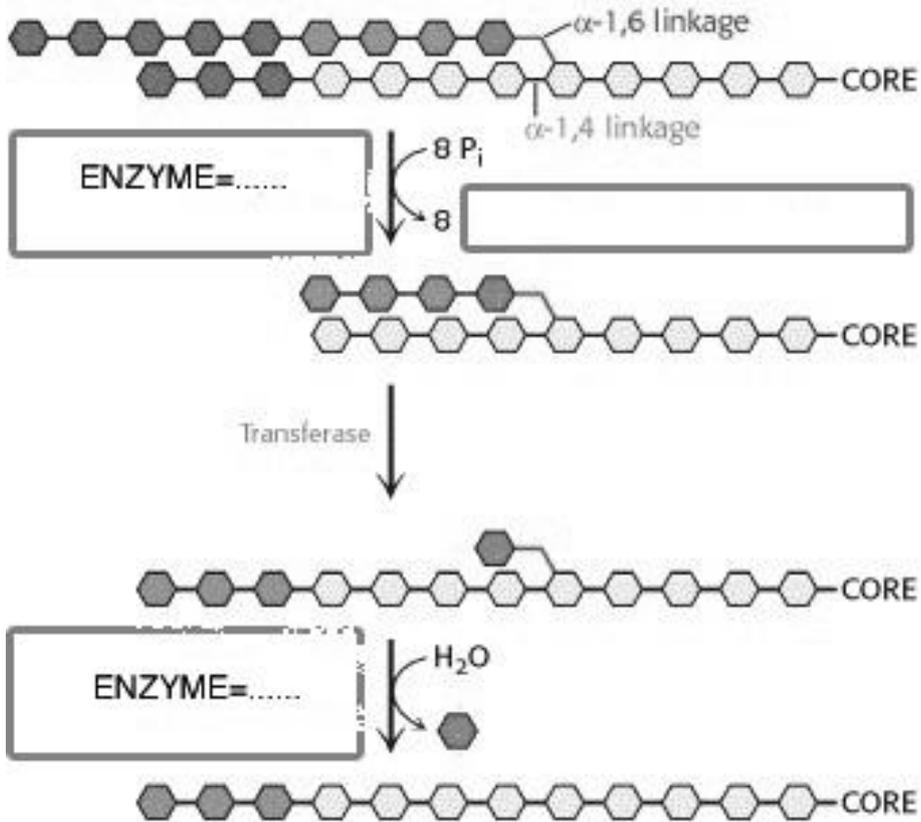
The system repeatability was assessed by multiple injection of a standard solution (80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). For six injections of the solution, the relative standard deviation (RSD) was 0.5%. The limit of quantification, defined as the lowest concentration that can be determined with acceptable precision (RSD < 10%), was 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Document 8b : Results



Effect of impactor setting on sensitivity. Chromatograms of lactose (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) using (a)

impactor “off” and (b) impactor “on” (optimized conditions 90°C and 3 L.min⁻¹).

Document 9

Molécule de glucose : 

E3-U32 : MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007**Durée : 3 heures****Coefficient : 3****Calculatrice non autorisée****LES PROBIOTIQUES**

On appelle probiotique (de “pro”, en faveur et “bios”, vie) une préparation microbienne administrée par voie orale et qui a une action bénéfique sur l'hôte (amélioration de la digestion et de l'hygiène intestinale).

Par extension, les aliments fermentés sont souvent aussi considérés comme vecteurs de probiotiques.

Ces préparations sont utilisées préventivement comme additifs dans l'alimentation animale et humaine et également en thérapeutique comme traitement symptomatique d'appoint des diarrhées.

1- Caractéristiques des souches de probiotiques. (26 points)**1.1- Aspects morphologiques et physiologiques. (11,5 points)**

1.1.1- Beaucoup de probiotiques appartiennent au genre *Lactobacillus*. Les principaux caractères du genre sont listés dans le **document 1**.

1.1.1.1- Représenter sous forme d'un schéma légendé les enveloppes d'un *Lactobacillus* en

mettant en évidence les structures moléculaires et en respectant les proportions.

1.1.1.2- Préciser et justifier les types trophiques énergétique et carboné de ces bactéries.

1.1.1.3- Expliquer le terme polyauxotrophe.

1.1.2- Beaucoup de *Lactobacillus* utilisés comme probiotiques ont un métabolisme strictement homofermentaire.

1.1.2.1- Indiquer ce que signifie cette expression et encadrer sur le **document 2 (à rendre avec la copie)** la ou les voie(s) catabolique(s) utilisée(s) par ces probiotiques.

1.1.2.2- Quel est le comportement des souches de *Lactobacillus* vis-à-vis de l'oxygène ? Peut-on établir un lien entre ce caractère et le déficit en catalase ?

1.2- Propriétés spécifiques des probiotiques. (14,5 points)

1.2.1- Un bon probiotique doit résister aux conditions hostiles du transit digestif. Préciser, en passant en revue le trajet d'un probiotique depuis son absorption orale jusque dans l'intestin, les différentes molécules ou conditions hostiles qu'une telle souche va rencontrer.

1.2.2- Au niveau intestinal l'idéal pour une souche probiotique serait d'adhérer à l'épithélium intestinal et de s'y multiplier au même titre que la flore autochtone.

Présenter les différentes populations microbiennes de la flore intestinale de l'homme adulte en précisant notamment les aspects quantitatifs et les genres ou familles représentatives.

1.2.3- L'adhérence effective des probiotiques aux cellules intestinales est encore discutée. En effet, il est possible que les probiotiques ne se développent que dans le mucus intestinal ou bien ne puissent exister que dans la lumière intestinale, leur présence étant alors liée à une ingestion très régulière d'inoculum de la souche.

Le **document 3** décrit une expérience de “colonisation” in vivo de l'intestin humain réalisée à l'aide d'une souche de *Lactobacillus casei* résistant à la rifampicine.

1.2.3.1- Évaluer la concentration du lait en *Lactobacillus casei* en UFC.g-1.

1.2.3.2- Analyser les résultats de l'expérience. Permet-elle de trancher entre les différentes hypothèses concernant le devenir des souches probiotiques dans l'intestin d'un hôte ?

1.2.3.3- Quel est l'intérêt d'utiliser des spores comme témoin

1.2.4- Les variants résistants de l'expérience décrite dans le **document 3** ne sont pas détruits même en cas de traitement de l'hôte par la rifampicine. Cet antibiotique agit sur la transcription de l'ADN.

1.2.4.1- En utilisant la structure de la rifampicine donnée dans le **document 4**, proposer son mode de pénétration dans la cellule.

1.2.4.2- Préciser son mode d'action.

1.2.4.3- Citer les différents mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.

2- Avantage de l'utilisation de souches probiotiques sur l'hôte. (14 points)

Les additifs alimentaires sont depuis longtemps utilisés dans l'alimentation animale pour améliorer les rendements de production et maintenir les animaux en bonne santé.

2.1- Inhibition du développement des bactéries entéro-pathogènes. (8 points)

2.1.1- L'intestin est la porte d'entrée potentielle de bactéries transmises par les aliments et à l'origine de toxi-infections alimentaires.

Définir le terme toxi-infection alimentaire ou TIA.

2.1.2- Des études ont montré que les bactéries telles que *Lactobacillus casei var rhamnosus* exercent un pouvoir inhibiteur sur l'adhésion de plusieurs bactéries entéro-pathogènes notamment des *Escherichia coli* entérotoxinogènes.

Ces derniers sont responsables de la diarrhée du voyageur également appelée “Tourista” qui se traduit par des diarrhées très liquides non purulentes, sans fièvre.

2.1.2.1- Décrire le mode d'adhésion des *Escherichia coli* entérotoxinogènes aux entérocytes et expliquer comment ils expriment leur pouvoir pathogène. Détailler le mode d'action de l'entérotoxine.

2.1.2.2- Préciser le réservoir de la bactérie ainsi que son mode de transmission.

2.1.2.3- Quels mécanismes ou biosynthèses peuvent expliquer une action inhibitrice des souches de probiotiques sur la survie ou le développement de bactéries entéro-pathogènes dans l'intestin ?

2.2- Amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire. (6 points)

2.2.1- La digestion du lait est parfois rendue difficile par l'absence ou de la synthèse insuffisante de bêta-galactosidase par les entérocytes.

Indiquer le rôle de la bêta-galactosidase. En déduire l'action favorable que peuvent jouer les souches de probiotiques dans la digestion du lait.

2.2.2- La mise en évidence d'une bêta-galactosidase est classiquement utilisée au cours des identifications de bactéries Gram négatif.

2.2.2.1- Expliquer le principe et la réalisation de ce test en macrométhode.

2.2.2.2- On effectue souvent ce test dans le cas de bactéries ne métabolisant pas le lactose sur les milieux classiques d'isolement ou d'identification. Justifier cette pratique.

3- Production de souches probiotiques au niveau pilote. (20 points)

3.1- Processus de culture. (4,5 points)

3.1.1- Les bactéries lactiques utilisées industriellement comme probiotiques sont traditionnellement propagées en cuve fermée par fermentation discontinue.

Quel autre terme peut-on utiliser pour désigner une fermentation discontinue ? Préciser quelle est la limite d'un tel système dans le cas particulier de souches lactiques.

3.1.2- Au cours de leur fabrication, les souches lactiques peuvent être contaminées par des bactériophages.

Schématiser les différentes étapes permettant le dénombrement des bactériophages dans une suspension de bactéries lactiques par la méthode des micro-gouttes ou spots

3.2- Étude des conditions de production de *Bifidobacterium longum*. (14,5 points)

On souhaite produire une culture mixte de probiotiques constituée d'une souche de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium longum*. *B.longum* est une souche peu compétitive, donc on envisage de la produire dans un premier temps en culture pure avant de la mélanger au *Lactobacillus*. L'étude de sa culture est expérimentée au stade du pilote de laboratoire.

3.2.1- La souche utilisée est *B.longum* ATCC15707.

Donner la signification des initiales ATCC. Que veut dire ce sigle placé à côté d'un nom de microorganisme ?

3.2.2- La culture est entretenue à 37°C sur gélose MRS supplémentée (m/v) avec 0,02 % Na₂CO₃, 0,05 % de cystéine et 2,5 % de perméat de lactosérum (MRS-WP).

3.2.2.1- Préciser à quoi correspond le perméat de lactosérum.

3.2.2.2- En utilisant la composition de la gélose MRS de base donnée dans le **document 5** :

1.1.1.1- - indiquer les quantités en g.L⁻¹ de Na₂CO₃, cystéine et perméat de lactosérum du milieu complet ;

1.1.1.2- - donner le rôle des composants du milieu MRS-WP.

3.2.3- Le fermenteur utilisé contient 3,3 L de milieu MRS-WP cultivé en présence de CO₂ à 37°C pendant 12 heures. Il estensemencé par un inoculum de la souche à raison de 2 % (v/v). L'inoculum proprement dit est reconstitué en MRS-WP à partir d'une suspension-stock congelée à -80°C.

3.2.3.1- Indiquer la principale précaution à prendre pour conserver une souche microbienne à -80°C.

3.2.3.2- Calculer le volume d'inoculum à ajouter au milieu de fermentation.

3.2.4- Trois fermentations sont réalisées à pH 5,5 (pH optimal) en MRS-WP, 3 autres à pH 5,5 en MRS. Des échantillons sont prélevés toutes les 2 heures pour mesurer la densité de cellules revivifiables, les taux de glucose, lactose, galactose, acide lactique et acide acétique.

3.2.4.1- Préciser l'intérêt de réaliser les cultures en trois exemplaires.

3.2.4.2- Expliquer comment on peut déterminer la densité de bactéries viables pour chacun des prélèvements (méthode, milieu, conditions d'incubation).

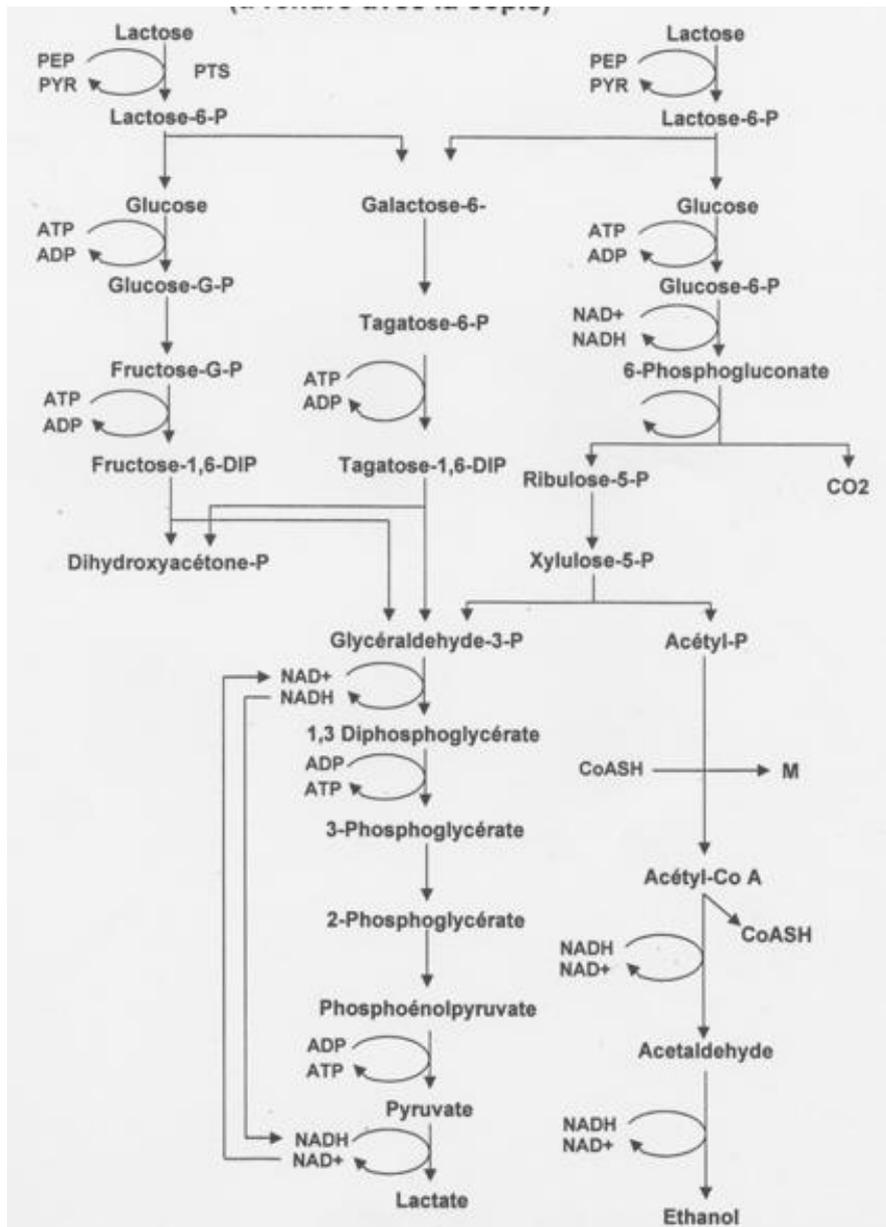
3.2.5- L'évolution des taux de glucides et d'acides au cours du temps est présentée sur le document 6.

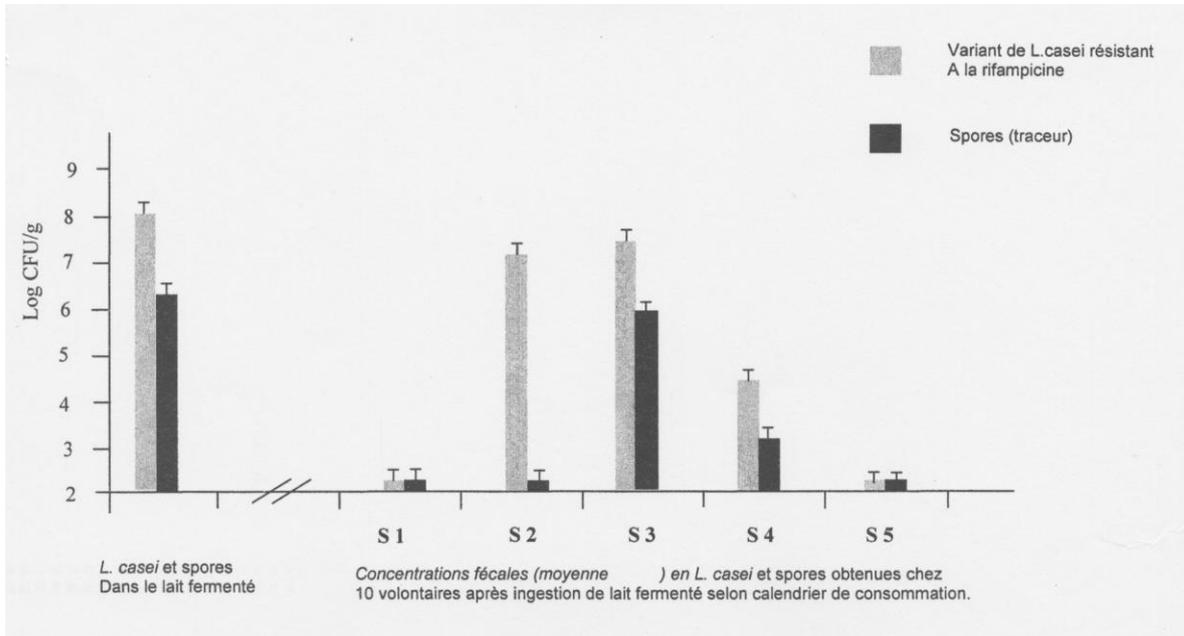
3.2.5.1- Expliquer pourquoi les glucides sont différents entre les graphiques a et b.

3.2.5.2- Analyser les résultats et conclure quant au choix du milieu le plus adapté pour la culture de *B.Longum*.

DOCUMENT 1 : CARACTÈRES DU GENRE *LACTOBACILLUS*

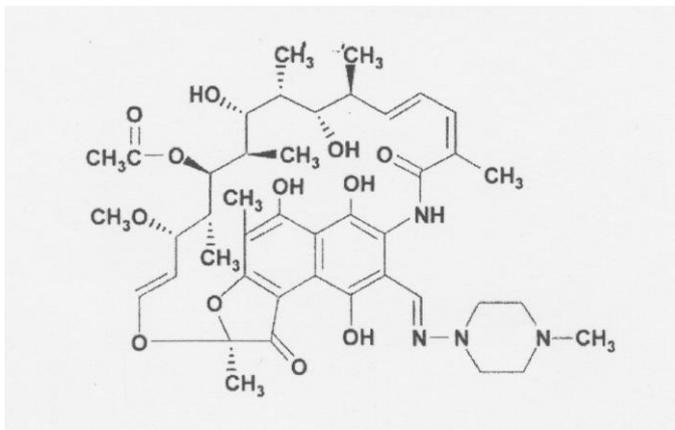
Les *Lactobacillus* sont des bâtonnets droits ou incurvés, isolés ou en chaînettes, très saccharolytiques, ils libèrent de l'acide lactique D, L ou DL. Ils ne réduisent pas les nitrates. Ils sont gélatinase, caséine, indole et H₂S-. Ils ne possèdent pas de catalase ni de cytochrome oxydase. Les colonies sont parfois pigmentées en rouge brique, le CO₂ à la concentration de 5 à 10 % stimule souvent leur croissance. Ils sont souvent polyauxotrophes.

DOCUMENT 2 :
(à rendre avec la copie)

DOCUMENT 3 :

Dans cette étude, les volontaires consomment par jour 300 mL de lait fermenté avec un variant résistant à la rifampicine de *Lb. casei* (et une suspension de spores qui sert de témoin) pendant 8 jours.

Pour mesurer la survie de la souche dans les fécès, celles-ci sont recueillies avant la première consommation de produit (S1), 4 jours plus tard (S2), à la fin de la période de consommation (S3) et 3 puis 7 jours après l'arrêt de la consommation (S4 et S5).

DOCUMENT 4 :
FORMULE DE RIFAMPICINE

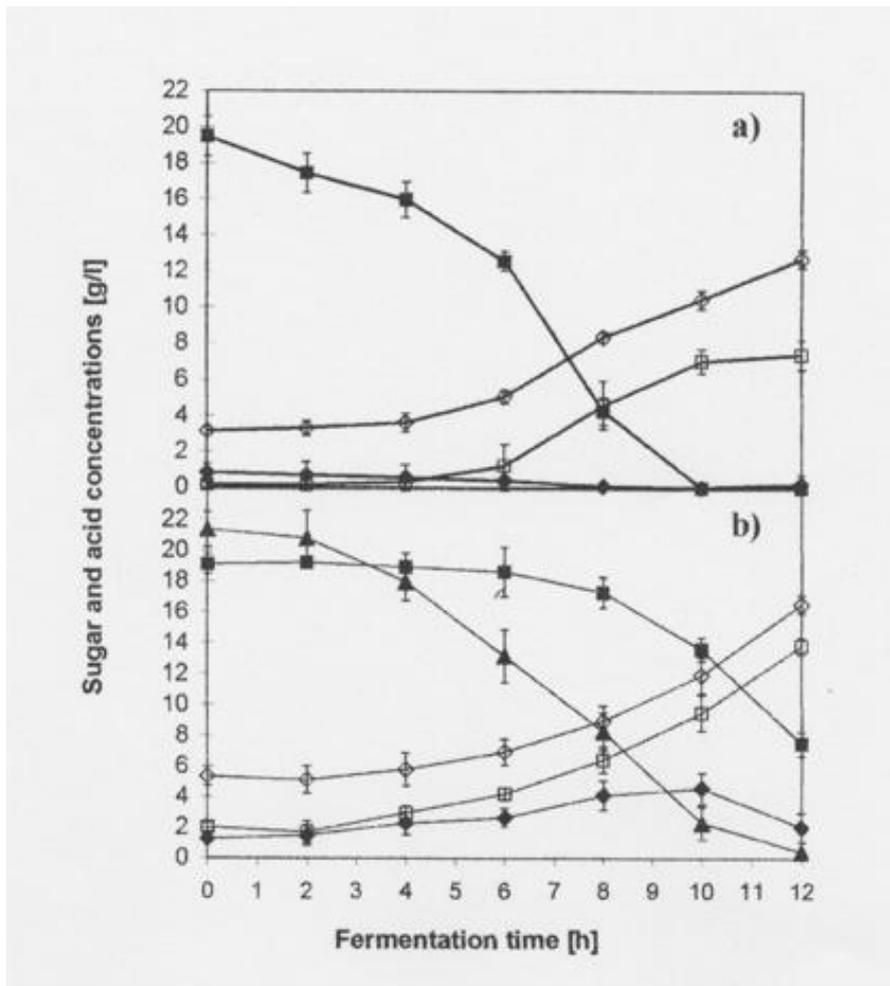
DOCUMENT 5 :
COMPOSITION DE LA GÉLOSE MRS

MRS (GELOSE) (De Man, Rogosa, Sharpe) (grammes/litre)

Peptone	10,0
Extrait de viande de boeuf	8,0
Extrait de levure	4,0
Glucose	20,0
Tween 80	1,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2,0
Acétate de sodium 3 H ₂ O	5,0
Citrate d'ammonium	2,0
Sulfate de magnésium 7 H ₂ O	0,2
Sulfate de manganèse 4 H ₂ O	0,05
Agar	10,0
pH 6,2 ± 0,2	

DOCUMENT 6 :

Lactose (▲), glucose (■), galactose (◆), lactic (□) and acetic (◇) acid concentrations determined by HPLC analysis during free-cell pH-controlled (pH = 5,5) batch fermentations of *B. longum* ATCC 15707 in MRS medium (a) or in MRS-WP (b).



E3-U33 : BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007
Durée : 3 heures Coefficient : 3

Calculatrice non autorisée

LES VIRUS DE LA GRIPPE AVIAIRE ET LES TESTS DE DÉPISTAGE SEROLOGIQUES

Les virus *influenza* de type A responsables de la grippe aviaire font l'objet d'une surveillance active depuis quelques années. En effet, ces virus dont le H5N1, ont provoqué le décès de quelques dizaines de personnes dans le monde. Ces personnes avaient eu des contacts étroits et répétés avec les volailles contaminées.

On se propose d'aborder le cycle du virus dans les cellules animales, ainsi que les tests permettant un sérodiagnostic et un suivi de la vaccination entreprise dans certains pays.

1- Le virus *influenza* de la grippe aviaire. (32 points)

1.1- Morphologie du virus *influenza*.

Le virus *influenza* est un grand virus animal à ARN (-) simple brin dont la capsid protéique est elle-même incluse dans une enveloppe.

1.1.1- Que signifie l'expression ARN (-) ?

1.1.2- Le **document 1 (à rendre avec la copie)** présente une électrographie d'un virus *influenza* et son interprétation schématique. Légèder le schéma.

1.2- Phase de pénétration du virus dans une cellule animale.

Les virus pénètrent dans la cellule hôte après adsorption grâce à un mécanisme d'endocytose par l'intermédiaire de récepteurs.

1.2.1- Légèder le document 2 (à rendre avec la copie).

1.2.2- Expliquer les différentes étapes de l'endocytose.

1.2.3- Préciser le rôle des éléments 5 du document 1, dans la phase de pénétration du virus.

1.3- Phase de décapsidation.

Une fois dans la cellule, le virus doit être décapsidé afin de libérer l'acide nucléique. Cela fait intervenir des organites cellulaires riches en enzymes.

1.3.1- Quels sont ces organites ?

1.3.2- Quel est le principal facteur déclenchant la libération de la ribonucléocapside dans le cytosol ?

1.4- Phases précoce et tardive.

L'information génétique du virus *influenza* est constituée de 8 segments codant entre autres pour deux enzymes :

- une ARN polymérase ARN dépendante encore appelée transcriptase ;
- une ARN polymérase ARN dépendante encore appelée réplécase.

1.4.1- Définir le rôle de chacune de ces deux enzymes.

1.4.2- Définir les phases précoce et tardive.

1.4.3- Certains des gènes tardifs codent pour les deux protéines de l'enveloppe virale. Ces protéines à destinée membranaire proviennent de la traduction d'ARNm au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique.

Donner les différentes étapes de la translocation de ces protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique.

1.5- Maturation des protéines virales.

Les protéines virales subissent une maturation dans un organite cellulaire (élément A) présenté **document 3**.

1.5.1- Titrer et légender le document 3 (à rendre avec la copie).

1.5.2- Quels types de modifications se réalisent dans cet organite ?

1.6- L'exocytose des particules virales.

La voie d'exocytose constitutive permet d'acheminer les protéines de l'enveloppe jusqu'à la membrane plasmique de la cellule hôte.

1.6.1- Préciser l'origine des vésicules d'exocytose.

Indiquer la caractéristique structurale qui permet l'intégration des protéines virales dans la membrane.

1.6.2- Schématiser la phase de libération du virus dans le milieu extracellulaire en précisant la localisation des protéines virales. Légender.

2- Sérodiagnostic de la grippe aviaire par précipitation. (15 points)

Dans le cadre des enquêtes épidémiologiques annuelles, un plan d'échantillonnage a été élaboré afin de suivre la présence des virus dans 1 300 élevages en France. Des prélèvements sont réalisés sur les poulets et les canards par 8 laboratoires départementaux.

Dans un premier temps, des tests sérologiques sont réalisés. S'ils s'avèrent positifs, la recherche des virus est effectuée par culture sur œufs embryonnés et PCR (Polymerase Chain Reaction).

La recherche qualitative des anticorps anti-influenza aviaire de type A (H7N1 et H7N3) est réalisée par double immuno-diffusion en gélose.

2.1- Donner le principe de cette méthode.

2.2- L'analyse se réalise en deux étapes :

Étape 1 : criblage (screening) pour rechercher les sérums positifs (+) vis-à-vis de l'antigène viral de type A (A+).

Étape 2 : confirmation des sérums + par confrontation aux réactifs de référence (antigène A + et antigène viral non pathogène (A-), sérum + et sérum de contrôle -) pour évaluer la spécificité de la réaction.

Douze sérums subissent le criblage. Les sérums + et douteux au criblage (étape 1) sont repris dans une étape de confirmation.

Les résultats sont présentés dans le **document 4**.

2.2.1- Interpréter les résultats du criblage.

Le résultat est rendu sous forme qualitative : négatif, positif ou douteux.

Conclure pour les sérums S1 à S12.

2.2.2- Après observation des résultats des tests de confirmation, interpréter et conclure pour les sérums testés.

**3- Contrôle de la vaccination contre la grippe aviaire par méthode ELISA.
(13 points)**

On peut utiliser la méthode ELISA pour contrôler l'évolution du taux protecteur des anticorps chez les animaux vaccinés.

3.1- Que signifie ELISA ?

3.2- Une étude a été conduite pour évaluer la limite de détection de 3 méthodes : l'inhibition de l'hémagglutination, la précipitation en gel d'agarose et le test ELISA.

Les modalités de l'étude ainsi que les résultats sont mentionnés dans le tableau du **document 5**.

En exploitant les résultats du tableau, déterminer les deux méthodes présentant la limite de détection de la plus basse. Justifier.

3.3- Pour mettre en œuvre le test ELISA, on utilise les réactifs présentés dans le **document 6**.

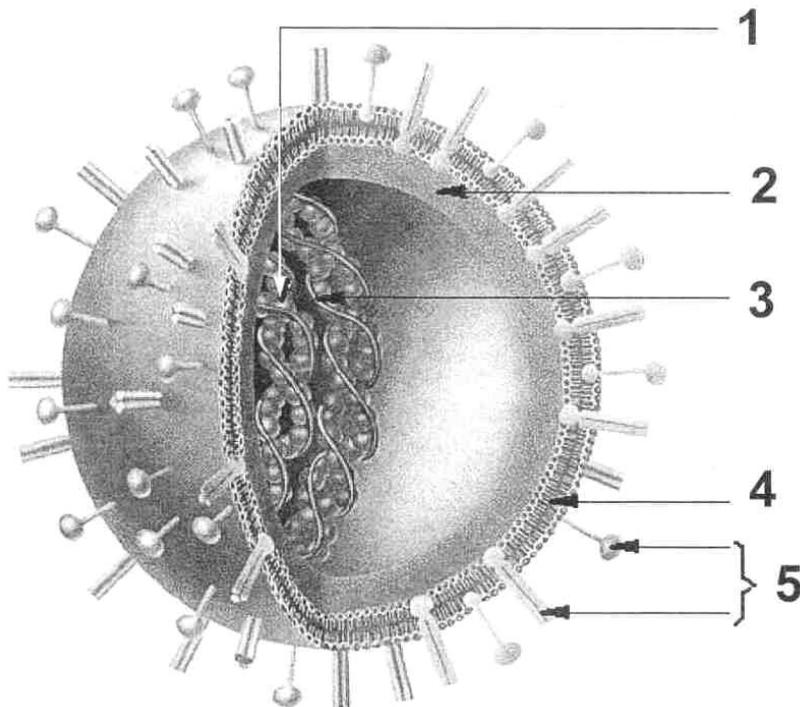
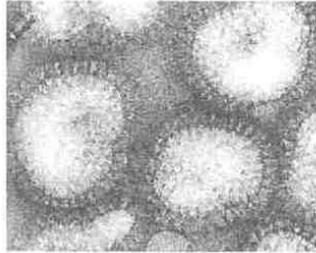
3.3.1- Réaliser un schéma légendé de l'édifice moléculaire présent dans la cupule du contrôle positif. Donner la composition qualitative de deux témoins négatifs. Quel est le rôle de ces 3 contrôles ?

3.3.2- Caractériser la réaction.

Donner deux avantages de cette méthode ELISA. Justifier la réponse.

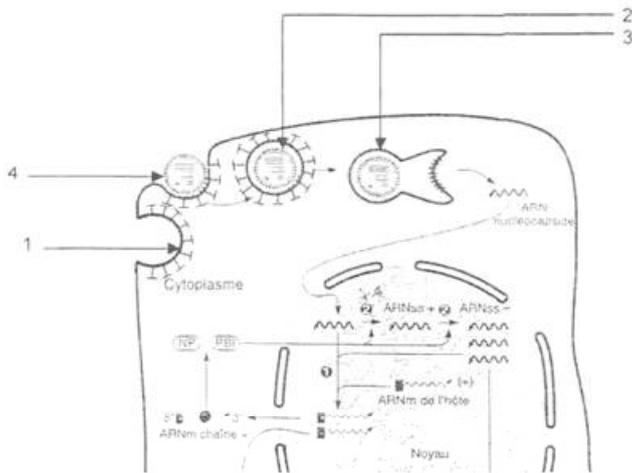
DOCUMENT 1 : MICROGRAPHIE DU VIRUS *INFLUENZA* (X 150 000)

(à rendre avec la copie)



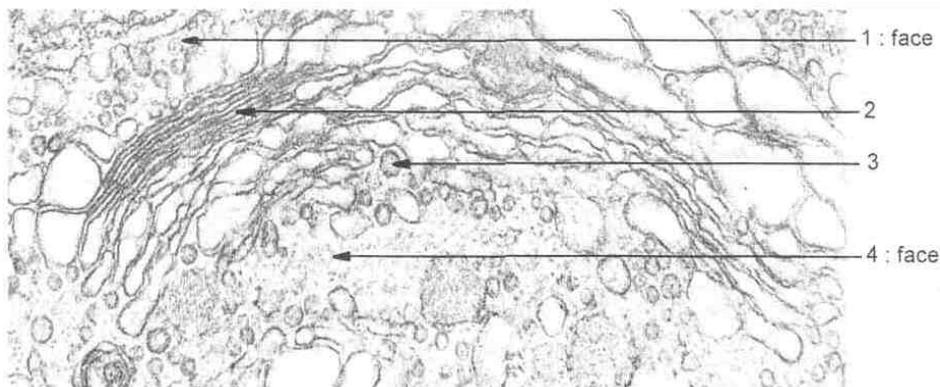
DOCUMENT 2 : REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE DE MULTIPLICATION DU VIRUS *INFLUENZA*

(à rendre avec la copie)



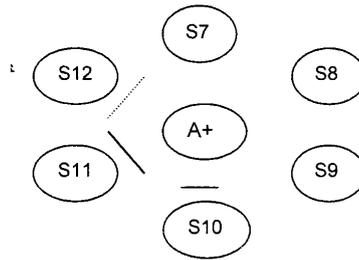
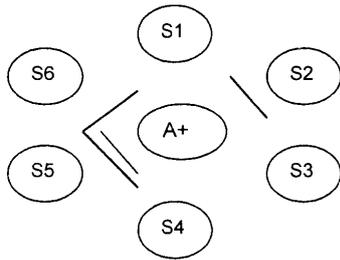
DOCUMENT 3 : MICROGRAPHIE DE L'ÉLÉMENT A (X 100 000)

(à rendre avec la copie)

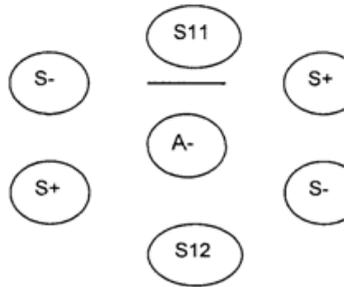
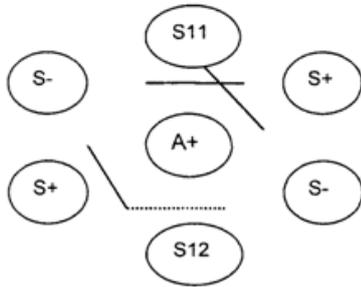
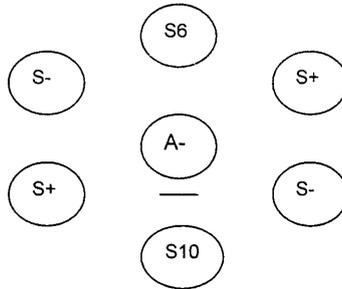
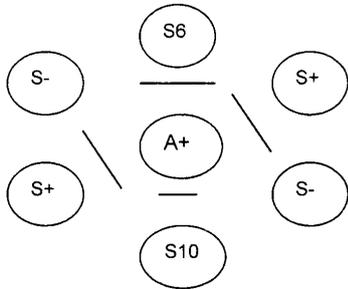
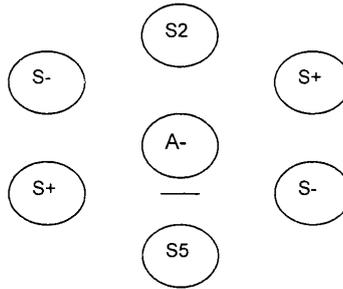
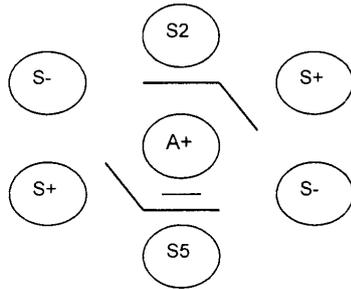


DOCUMENT 4 : RÉSULTATS DU TEST DE PRÉCIPITATION

Étape 1 : Criblage.



Étape 2 : Test de confirmation.



DOCUMENT 5 : TEST DE SENSIBILITÉ

A study was conducted to compare the relative sensitivity of the ELISA, hemagglutination inhibition (HI) and agar gel precipitin (AGP) tests. Four-week-old specific pathogen free

(SPF) birds were divided into 4 groups. Group 1 was vaccinated with allantoic fluid (control), group 2 was vaccinated with a live H5N2 strain, and groups 3 and 4 were vaccinated with killed H5N2 AIV (Avian Influenza Virus). All birds were bled weekly and challenged at 21 days post-vaccination with a highly pathogenic H5N2 AIV strain. The relative agreement between the test methods is shown in the table below.

Percent positive results obtained by three serological methods

Days post challenge	Days post vaccination	Group 1 (Control)			Group 2 (Live vaccine)			Group 3 (Killed vaccine)			Group 4 (Killed vaccine)		
		Elisa a	HI	AG P	Elisa	HI	AGP	Elisa	HI	AGP	Elisa	HI	AGP
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	100	100	100	22	0	55	44	0	77
0	21	0	0	0	100	100	100	44	0	55	77	33	77
7	28	70	100	100	100	100	100	88	100	100	88	88	100
14	35	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

DOCUMENT 6 : RÉACTIFS DU TEST ELISA

Reagents required to perform 90 tests :

- a) 1 AIV antigen coated plate
- b) 10 µL AIV Positive Control Serum
- c) 10 µL Normal Control Serum
- d) 100 µL Goat anti-Chicken IgG (H + L) Peroxidase Conjugate Solution
- e) 40 mL Dilution Buffer
- f) 10 mL ABTS-Hydrogen Peroxide Substrate Solution
- g) 2,5 mL 5X Stop Solution, 5% SDS (dilute [1:5] with laboratory grade water)
- h) 20 mL 20X Wash Solution (dilute [1:20] with laboratory grade water)

E4-U40 : SCIENCES ET TECHNOLOGIES BIOINDUSTRIELLES 2007

Durée : 2 heures

Coefficient : 3

Calculatrice interdite

**FABRICATION ET CONTRÔLES DE DEUX FORMES DE
PRESENTATION DE L'ACIDE NIFLUMIQUE**

L'acide niflumique est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) dérivé de l'acide nicotinique. L'administration de ce principe actif peut se faire par la voie orale ou la voie transcutanée. Pour cela, un laboratoire pharmaceutique produit des gélules et une pommade. Dans ces deux cas, l'efficacité du médicament implique une maîtrise absolue de la qualité de la conception à la mise sur le marché en passant par la fabrication.

A – PREPARATION DES GELULES**1- Matières premières destinées à la fabrication des gélules (19 points)**

Le **document 1** présente un extrait de la composition des gélules. Certains de ces composants sont des coproduits de filières agro-alimentaires.

1.1- Au regard de leur composition, les gélules sont qualifiées de monopréparation car elles contiennent un seul principe actif. Définir le terme de principe actif.

1.2- Préciser le rôle du lactose dans cette formule.

1.3- Citer les filières agroalimentaires susceptibles de fournir l'industrie pharmaceutique en lactose et en gélatine.

1.4- Obtention de gélatine pharmaceutique

Le **document 2** présente le diagramme d'obtention de la gélatine destinée à la fabrication des gélules.

1.4.1- Indiquer le risque biologique qui amène les industriels à valoriser la gélatine d'origine porcine plutôt que celle d'origine bovine.

1.4.2- Justifier l'étape "découpe mécanique" en préalable à l'étape "acidification" en cuve et indiquer le rôle chimique de l'HCl.

1.4.3- Quel est le rôle de l'eau dans l'étape suivant l'acidification ? Pourquoi est-elle chauffée ?

1.4.4- Certaines opérations unitaires du diagramme participent à la qualité microbiologique de la gélatine : citer ces opérations, et, pour chacune d'elles, indiquer le ou les facteurs physico-chimiques mis en jeu.

1.4.5- Le dernier traitement que subit la gélatine est une atomisation.

1.4.5.1- Donner le principe général de cette opération unitaire.

1.4.5.2- Annoter le **document 3**.

1.4.5.3- Indiquer les avantages de la dessiccation d'un produit.

2- Qualités des gélules (produits finis) (17 points)

Le laboratoire interne est accrédité par le COFRAC pour l'ensemble de ses activités d'analyses et de contrôles.

2.1- Schématiser la démarche à suivre en vue d'une accréditation et préciser un exemple courant de référentiel auquel elle se rapporte.

2.2- Préciser la signification du sigle COFRAC.

2.3- La qualité de fabrication d'un lot de gélules se contrôle notamment en vérifiant l'homogénéité du mélange pulvérulent qu'elles contiennent.

Présenter le principe d'une méthode permettant de contrôler l'homogénéité d'un tel mélange.

2.4- En fin de ligne de fabrication, le laboratoire interne poursuit le contrôle de qualité en effectuant un contrôle de masse des gélules. Ce dernier est réalisé sur des lots de production comportant 5 000 gélules. La valeur du NQA est fixée à 0,065 %.

2.4.1- Que veut dire NQA ? Expliciter sa signification.

2.4.2- A l'aide des tableaux fournis dans le **document 4**, établir les paramètres d'échantillonnage : "n" = effectif d'échantillonnage, "A" = critère d'acceptation et "R" = critère de refus, en expliquant les valeurs données.

2.5- Le laboratoire réalise la vérification de la conformité de la masse des gélules. La masse unitaire de chacune d'elles doit être de $150 \pm 0,3$ mg.

Les résultats obtenus lors d'un échantillonnage d'effectif convenable sont présentés par l'histogramme du **document 5**.

L'histogramme comporte 8 classes de gélules notées de C1 à C8. Une classe regroupe toutes les gélules dont la masse unitaire est comprise dans un intervalle de pesée définis ci-dessous.

	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5	Classe 6	Classe 7	Classe 8
Intervalle de pesée (mg)	$m < 149,7$	$149,7 \leq m < 149,8$	$149,8 \leq m < 149,9$	$149,9 \leq m < 150,0$	$150,0 \leq m < 150,1$	$150,1 \leq m < 150,2$	$150,2 \leq m < 150,3$	$150,3 \leq m$

2.5.1- Indiquer la loi statistique que semblent suivre ces résultats. Justifier.

2.5.2- Analyser l'histogramme des fréquences des masses mesurées. Conclure par rapport aux valeurs de A et R.

B – CONTROLE DE QUALITE EN COURS DE FABRICATION D'UNE FORME GALENIQUE ALTERNATIVE : UNE POMMADE

3- Caractéristiques de l'émulsion (15 points)

Pour des raisons pharmaco-cinétiques, l'acide niflumique peut être administré par voie transcutanée au moyen d'une pommade.

3.1- Définir le terme pharmaco-cinétique.

3.2- Définir et illustrer par deux exemples différents de ceux proposés dans le sujet, ce qu'est une forme galénique.

3.3- Une des étapes qui conditionne la qualité d'une pommade est celle qui permet l'obtention d'une émulsion stable. Le **document 6** présente un résumé de la composition de la pommade.

3.3.1- Donner une définition du terme émulsion.

3.3.2- A partir de la composition présentée dans le **document 6**, déterminer, en le justifiant, le type d'émulsion (H/L ou L/H) attendu.

3.3.3- Indiquer pourquoi la préparation d'une émulsion se fait généralement à chaud.

3.3.4- Grâce à un schéma titré et annoté, présenter le type de molécule susceptible de stabiliser l'émulsion et expliquer comment il agit.

3.4- On réalise un contrôle en cours de fabrication. Une des manières de vérifier le type d'émulsion repose sur la "méthode des colorants".

Le principe du contrôle est d'observer, à l'aide d'une préparation microscopique, la capacité des colorants à teinter l'une ou l'autre phases de d'émulsion. Pour réaliser ce contrôle, le laboratoire dispose de l'érythrosine, du noir Soudan III et d'un microscope à fond clair.

3.4.1- Justifier le choix des colorants utilisés. Schématiser le champ microscopique attendu pour l'émulsion.

3.4.2- Une coloration simple au noir Soudan III a été réalisée sur l'émulsion en cours de fabrication. Le résultat est présenté dans le **document 7**.

Commenter et conclure sur le contrôle réalisé.

4- Qualité informative de l'article de conditionnement de la pommade (9 points)

Outre leur fonction protectrice, les articles de conditionnement sont sources d'informations essentielles pour le bon usage du médicament.

Le **document 8** présente le fac-similé de l'emballage d'un tube de pommade.

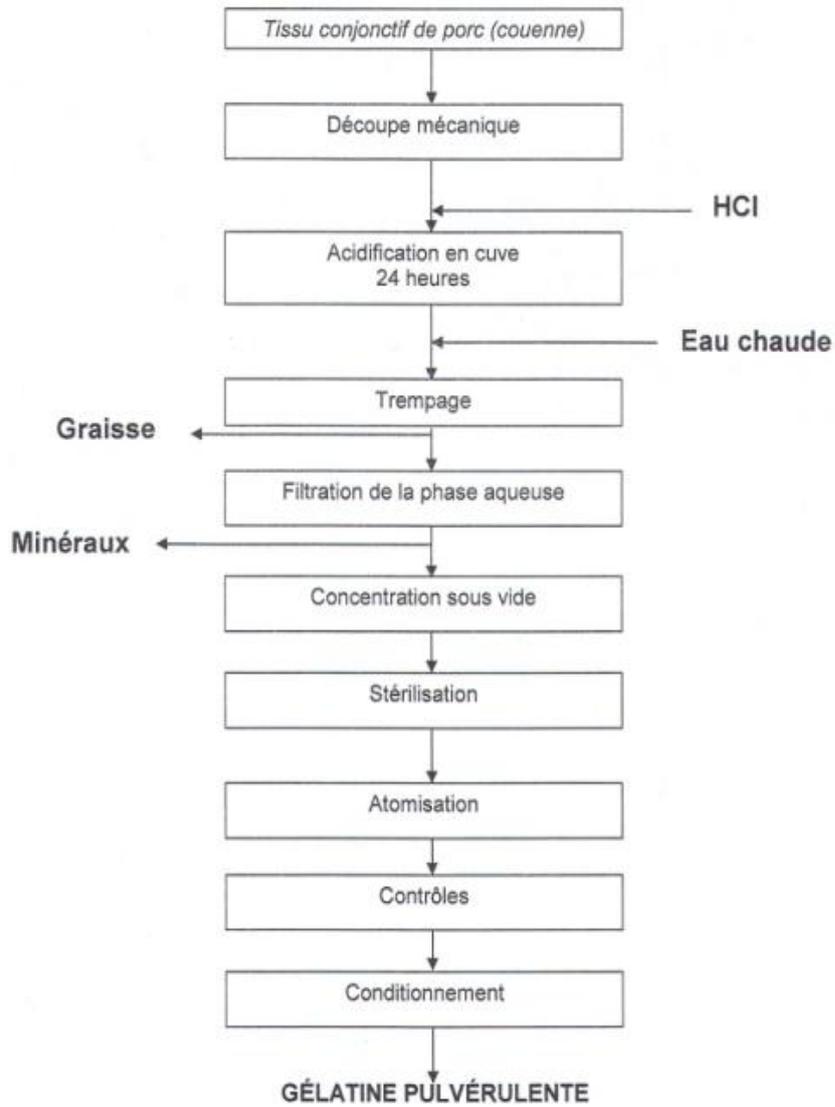
4.1- Annoter, sur la copie, les éléments repérés de 1 à 8.

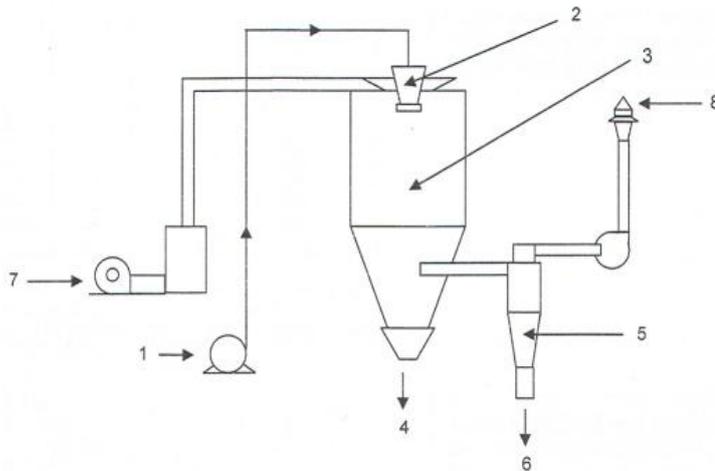
4.2- L'élément n°2 est incontournable pour la commercialisation du médicament. Donner la signification du sigle AMM et préciser le nom de l'organisme officiel habilité à délivrer cette référence.

4.3- Quel est le rôle de la pharmacovigilance ? Expliquer en quoi l'élément n° 7 du **document 8** peut participer à la pharmacovigilance.

DOCUMENT 1 : COMPOSITION RESUMEE DES GELULES

Composition	
Matières premières	Acide niflumique (poudre blanche, granulométrie : 115 µm) Lactose pulvérulent (poudre blanche, granulométrie : 120 µm) Gélatine pharmaceutique (pour gélule)
Formule pour 100 g	Acide niflumique : 15 g ± 0,10 g Lactose pulvérulent : 60 g ± 0,10 g Gélatine pulvérulente (qualité pharmaceutique) : 25 g ± 0,10 g

DOCUMENT 2 : DIAGRAMME DE FABRICATION DE LA GELATINE

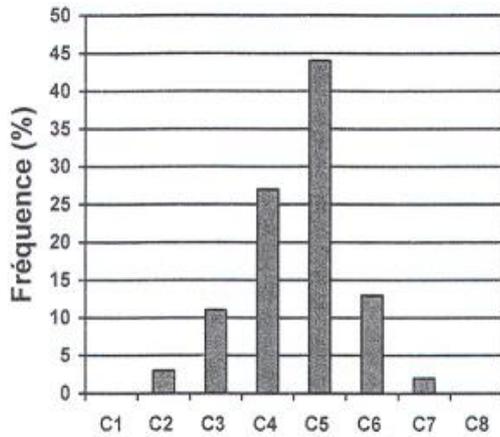
DOCUMENT 3**DOCUMENT 4 : TABLES STANDARDS**

Effectif des lots	Lettre code	Effectif des échantillonnages
2 à 8	A	2
9 à 15	B	3
16 à 25	C	5
26 à 50	D	8
51 à 90	E	13
91 à 150	F	20
151 à 280	G	32
281 à 500	H	50
501 à 1200	J	80
1201 à 3200	K	125
3201 à 10000	L	200
10001 à 35000	M	315
35001 à 150000	N	500
150001 à 500000	P	800
> à 500001	Q	1250

Table standard n°1 permettant d'établir l'effectif (n) d'un échantillon en fonction de l'effectif d'un lot de produits finis

Lettre code	n	A=0	A=1	A=2	A=3	A=5	A=7	A=10	A=14	A=21
		R=1	R=2	R=3	R=4	R=6	R=8	R=11	R=15	R=22
A	2	6,5								
B	3	4								
C	5	2,5	10							
D	8	1,5	6,5	10						
E	13	1	4	6,5	10					
F	20	0,65	2,5	4	6,5	10				
G	32	0,4	1,5	2,5	4	6,5	10			
H	50	0,25	1	1,5	2,5	4	6,5	10		
J	80	0,15	0,65	1	1,5	2,5	4	6,5	10	
K	125	0,1	0,4	0,65	1	1,5	2,5	4	6,5	10
L	200	0,065	0,25	0,4	0,65	1	1,5	2,5	4	6,5
M	315	0,04	0,15	0,25	0,4	0,65	1	1,5	2,5	4
N	500	0,025	0,1	0,15	0,25	0,4	0,65	1	1,5	2,5
P	800	0,015	0,065	0,1	0,15	0,25	0,4	0,65	1	1,5
Q	1250		0,025	0,04	0,065	0,1	0,15	0,25	0,4	0,65

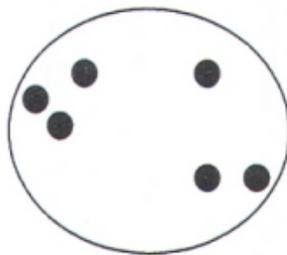
Table standard n°2 permettant d'établir les critères d'acceptation (A) et de refus (R) en fonction de la valeur du NQA

DOCUMENT 5 : HISTOGRAMME

Fréquences pour les masses des gélules
C : classe

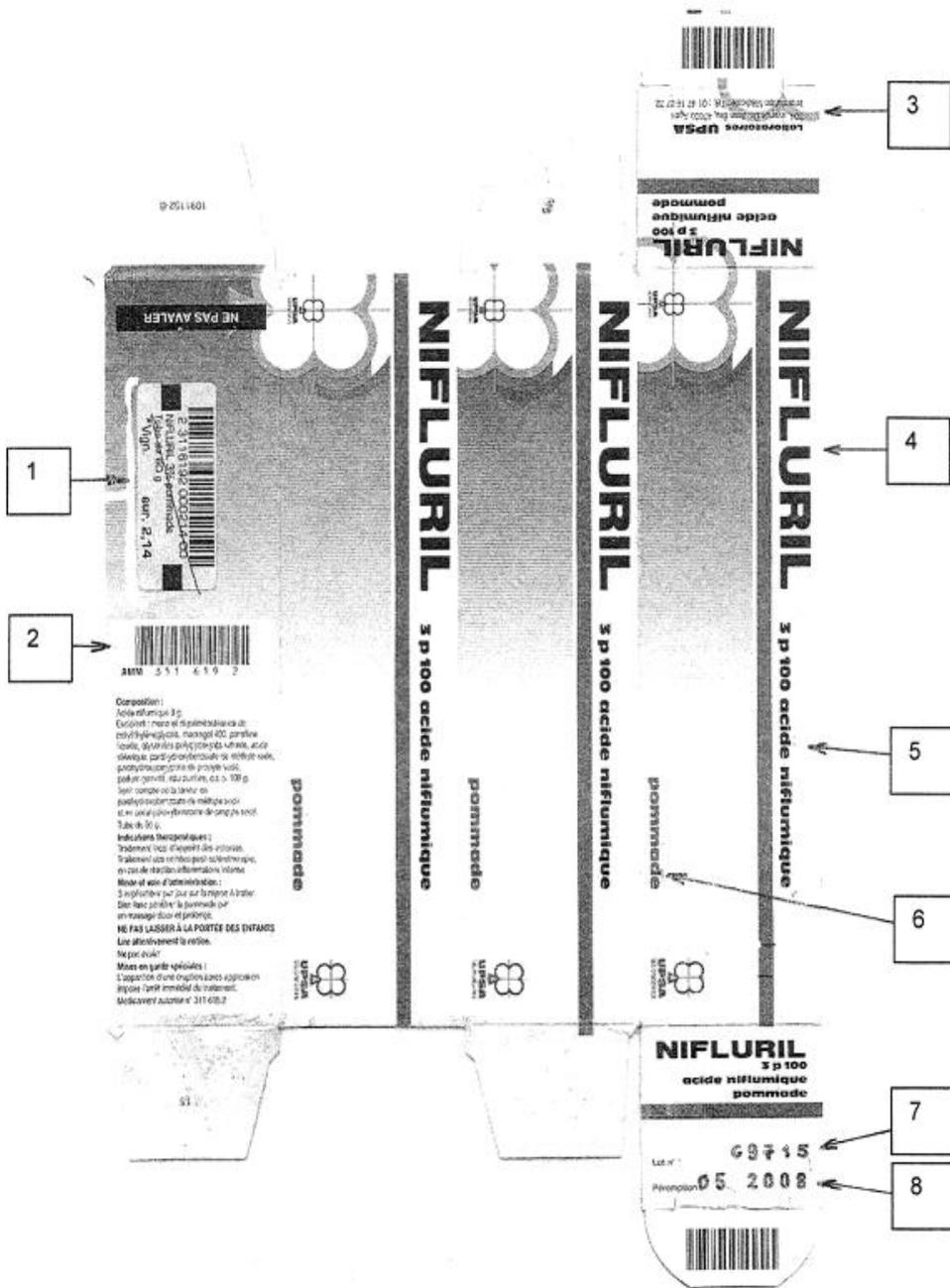
DOCUMENT 6 : COMPOSITION RESUMEE DE LA POMMADE

Ingrédients	% (g/100 g)	Rôle
Dérivés d'acides gras, glycérides, paraffine liquide	72	Base lipophile de l'émulsion
Eau	16	Base hydrophile de l'émulsion
Acide niflumique	3	Principe actif
Dérivés du palmitostéarate	3	Emulsifiant
Parfum gamma	2	Parfum
Parabens	2	Conservateurs
Mélange d'alcools	2	Agents de consistance

DOCUMENT 7

Résultat réellement obtenu après coloration au Soudan III

DOCUMENT 8 : FAC-SIMILE DE LA BOITE CONTENANT LE TUBE DE POMMADE



E5-U51 : TP TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 2007 - SUJET 1**Durée : 3 heures 30****Coefficient : 4****CONTRÔLE QUALITÉ LORS DE LA FABRICATION D'UNE BOISSON GAZEUSE**

Une boisson gazeuse S est fabriquée à partir des ingrédients suivants :

- eau gazéifiée,
- quinine,
- acide citrique,
- sucre (saccharose ou glucose+fructose),
- arôme naturels.

On se propose d'effectuer différents contrôles qualité sur des échantillons de cette boisson S :

- contrôle de la concentration en quinine par méthode spectrophotométrique,
- contrôle des glucides utilisés lors de la fabrication :
 - nature des sucres utilisés par analyse chromatographique,
 - dosage des sucres utilisés par méthode enzymatique en point final.

1- Contrôle de la concentration en quinine par méthode spectrophotométrique (38 points)

Un lot de fabrication de 50 fûts est contrôlé selon un plan d'échantillonnage simple avec un niveau de qualité acceptable (NQA) de 1,5.

Dans ce cadre, 8 échantillons (E1 à E8) sont prélevés parmi les 50 fûts.

Le critère d'acceptation et de refus sont :

$$A=0$$

$$R= 1$$

1.1- Principe

La quinine absorbe naturellement la lumière à 336 nm. La boisson S ne contenant pas de molécules susceptibles d'interférer à cette longueur d'onde, le dosage spectrophotométrique direct est donc possible.

1.2- Matériels et réactifs.

- Solution étalon "Q" de quinine à 10 mmol.L⁻¹ (5mL)
- Échantillon dégazés à doser E1, E2, E3, E4, E5, E6 , E7, E8 (8mL sauf E1 : 10 mL)
- Spectrophotomètre.
- Cuves pour spectrophotomètre.
- Tubes à essai.

1.3- Gamme d'étalonnage

À partir d'une dilution au 1/50^{ème} de la solution Q de quinine, préparer une gamme d'étalonnage de 5 tubes de concentration comprise entre 0,040 mmol.L⁻¹ et 0,200 mmol.L⁻¹.

Réaliser les solutions en eau distillée sous un volume final de 5 mL.

Mesurer les absorbances à 336 nm contre de l'eau distillée.

1.4- Dosage des échantillons Ei (i= 1 à 8).

Diluer chaque échantillon Ei au 1/2 sous un volume maximum de 10 mL.

Mesurer l'absorbance de chaque échantillon à 336 nm contre de l'eau distillée.

1. 5- Compte-rendu

Etablir un tableau de préparation de la gamme d'étalonnage.

Compléter le tableau d'étalonnage sur la feuille de résultats.

À l'aide d'un logiciel informatique, tracer la courbe d'étalonnage, valider les mesures et donner les paramètres de la droite de régression.

Rassembler les résultats des échantillons **E1** sur la feuille de résultats, et déterminer la concentration massique en quinine de chaque échantillon.

Conclure sur la validité du lot analysé.

Données : M quinine = 324,42 g.mol⁻¹

Un échantillon est déclaré conforme si la concentration en quinine appartient à l'intervalle (72 mg.L⁻¹ ; 82 mg.L⁻¹)

2- Contrôle qualitatif des glucides (20 points)

Selon l'unité de fabrication, la boisson S est fabriquée à partir de saccharose ou à partir d'un mélange glucose + fructose. Une lettre apposée sur l'étiquette du produit indique la nature des glucides (A : saccharose ; B : glucose + fructose).

Les glucides en concentration suffisante peuvent être identifiés par chromatographie sur couche mince.

2. 1- Matériels et réactifs.

- Phase stationnaire : une plaque de gel de silice (5 cm x 10 cm).
- Phase mobile : n-butanol, acide éthanoïque, eau distillée (4V/2V/1V).
- Solution témoins de glucides à 5 g L⁻¹ : glucose, fructose, saccharose.
- Réactif et dispositif de révélation au thymol.
- Échantillon à tester : E1.

2. 2- Protocole.

Réactiver la plaque 10 minutes à 110°C.

Saturer la cuve de chromatographie avec la phase mobile.

Diluer **E1** au 1/250^{ème} en eau distillée.

Effectuer la dilution en présence d'un examinateur

Réaliser les dépôts (une application pour les témoins et deux applications pour l'échantillon).

Développer le chromatogramme.

Sécher et appliquer le révélateur.

Placer quelques minutes à l'étuve à 110°C.

Récupérer la phase mobile dans un flacon approprié.

2. 3- Compte-rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Identifier le ou les glucides présents dans l'échantillon **E1**.

L'échantillon **E1** porte la lettre B sur son étiquette commerciale. Conclure.

Joindre le chromatogramme à la copie.

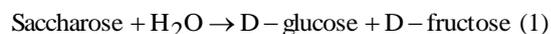
Pourquoi faut-il réactiver la plaque 10 minutes à 110°C avant utilisation ?

Justifier le fait que cette technique est adaptée au contrôle mis en œuvre.

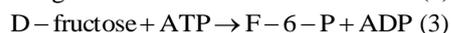
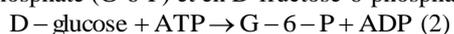
3- Contrôle quantitatif des glucides par méthode en point final (test UV à 340 nm). (22 points)

3.1- Principe

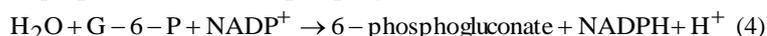
A pH = 4,60 et en présence de β -fructosidase, le saccharose est hydrolysé en D-glucose et D-fructose.



A pH = 7,60 et en présence d'hexokinase, le D-glucose et D-fructose sont phosphorylés par l'ATP en D-glucose-6-phosphate (G-6-P) et en D-fructose-6-phosphate (F-6-P) :

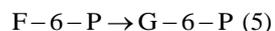


En présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase, le D-glucose-6-phosphate est oxydé de façon spécifique par du NADP^+ en 6-phosphogluconate :



Le NADPH formé est mesuré par augmentation de l'absorbance à 340 nm.

Le D-fructose-6-phosphate est dosé après isomérisation en D-glucose-6-phosphate par la phosphoglucose-isomérase :



Le D-glucose-6-phosphate formé est oxydé selon la réaction (4). La quantité de NADPH formé est proportionnelle à la quantité de fructose.

3.2- Matériels et réactifs.

Réactif	Composition	Volume mis à disposition (mL)
R1	Tampon citrate pH 4,6 + β -fructosidase	0,30
R2	Tampon triéthanolamine pH 7,6, NADP, ATP, sulfate de magnésium	2,20
R3	Hexokinase, Glucose-6-phosphate déshydrogénase	0,060
R4	Phosphoglucose-isomérase	0,040

Échantillon à doser : échantillon **E1**.

3.3- Mode opératoire.

Conditions opératoires :

- Longueur d'onde 340 nm
- Trajet d'optique 1 cm
- Température : 20 à 25°C
- Mesure contre l'air ou contre l'eau

Échantillon à doser :

E1 est dilué au 1/250^{ème} (partie 2.2)

Protocole du dosage :

Introduire directement dans les cuves UV volume réduit.

Réactif et solution	Témoin Saccharose	Essai Saccharose	Témoin Glucose-Fructose	Essai Glucose-Fructose
R1 (mL)	0,100	0,100	-	-
Échantillon E1 au 1/250 ^{ème}	-	0,050	-	0,050
<i>Mélanger, incuber 15 min à 20-25°C. Ajouter :</i>				
R2 (mL)	0,500	0,500	0,500	0,500
Eau distillée (mL)	0,900	0,850	1,000	0,950
<i>Mélanger. Après 3 minutes, lire les absorbances A1 à 340 nm. Déclencher la réaction par addition de :</i>				
R3 (mL)	0,010	0,010	0,010	0,010
<i>Mélanger, attendre que la réaction soit complète (15 minutes). Lire les absorbances A2.</i>				
R4 (mL)	-	-	0,010	0,010
<i>Mélanger, attendre 15 minutes. Lire les absorbances A3.</i>				

3.4 - Exploitation des résultats

Compléter la feuille de résultats.

Calculer :

- ΔA glucose = (A2-A1) essai glu-fru - (A2-A1) témoin glu-fru
- ΔA fructose = (A3-A2) essai glu-fru - (A3-A2) témoin glu-fru
- ΔA saccharose = [(A2-A1) essai saccharose - (A2-A1) témoin saccharose] - [(A2-A1) essai glu-fru - (A2-A1) témoin glu-fru]

Établir les expressions littérales donnant les concentrations massiques (g.L⁻¹) en glucose, fructose et saccharose dans l'essai E1.

Réaliser les applications numériques.

Comparer les résultats obtenus par la méthode qualitative et la méthode quantitative.

Données :

$$M \text{ glucose} = 180,16 \text{ g.mol}^{-1},$$

$$M \text{ fructose} = 180,16 \text{ g.mol}^{-1},$$

$$M \text{ saccharose} = 342,3 \text{ g.mol}^{-1},$$

$$\epsilon_{\text{NADPH}} \text{ à } 340 \text{ nm} = 630 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1},$$

le coefficient de variation de la méthode est de 5%

FEUILLE DE RESULTATS à RENDRE AVEC LA COPIE**1- Contrôle de la concentration en quinine par méthode spectrophotométrique**

Gamme d'étalonnage :

C (mmol.L⁻¹)	0						
A₃₃₆							

Dosage des échantillons :

Echantillon	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
A₃₃₆								

2- Contrôle qualitatif des glucides

Témoin ou échantillon	Rf	Observations éventuelles
Glucose		
Fructose		
Saccharose		
E1		

3- Contrôle quantitatif des glucides par méthode en point final (test UV à 340 nm).

Absorbances	Témoin Saccharose	Essai Saccharose	Témoin Glucose-Fructose	Essai Glucose-Fructose
A1				
A2				
A3				

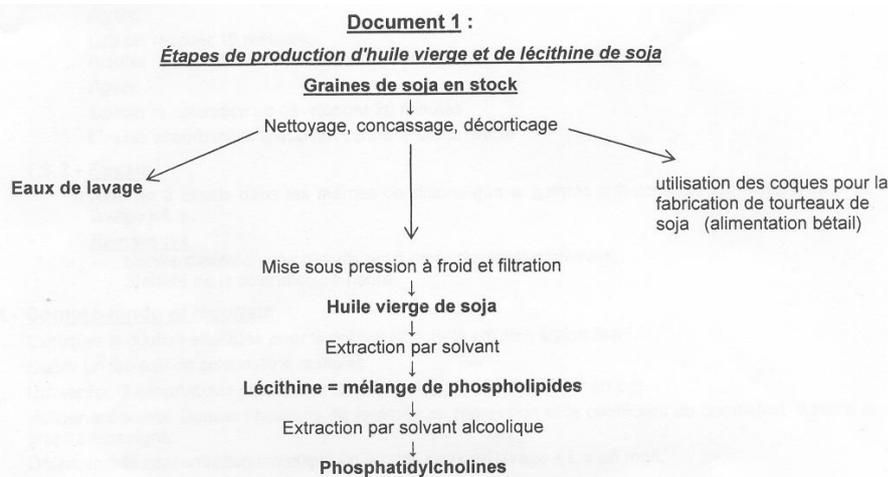
FICHE SECURITE

Phase mobile - butanol - acide éthanoïque		
	R	10 23
	S	23 37
Réactif au thymol		  <small>G - Corrosif</small>
	R	20 21 38
	S	26 28 36 37 39

E5-U51 : TP TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 2007**SUJET 2****Durée : 4 heures****Coefficient : 4****CONTRÔLES DANS LA PRODUCTION D'HUILE VIERGE DE SOJA**

L'huile de soja est préparée à partir des graines de soja. Les étapes de traitement des graines aboutissent à des huiles de qualités différentes ; les premières étapes permettent d'obtenir l'huile vierge de première pression à froid, riche en acides gras insaturés, et en lécithine, additif alimentaire largement utilisé pour ses propriétés émulsifiantes.

(document 1 ci-dessous)



Les problèmes liés au stockage des graines et aux techniques de fabrication des huiles constituent une réelle préoccupation pour les huileries industrielles.

Il faut éviter en particulier l'oxydation des acides gras insaturés et l'hydrolyse des phospholipides qui libèrent des acides gras.

On se propose de :

- Déterminer la concentration en fer, catalyseur d'oxydation des acides gras, dans l'eau de lavage des graines.
- Contrôler l'indice d'acide de l'huile vierge après stockage prolongé des graines.
- Déterminer la concentration en phosphatidylcholines obtenues par extraction d'une huile vierge.

1- Dosage du fer dans l'eau de lavage des graines (34 points)

On suspecte des traces de rouille dans la cuve de nettoyage des graines de soja d'une chaîne de fabrication. La concentration en fer des eaux de lavage maximale admise à la sortie de la cuve a été fixée à 2 mg.L^{-1} .

On dose le fer par méthode colorimétrique à l'orthophénanthroline.

1.1- Principe

L'orthophénanthroline forme avec les ions Fe^{2+} un complexe rouge stable et soluble dont le maximum d'absorption se situe à 490 nm.

Les ions Fe^{3+} sont également dosés par cette méthode après réduction par l'hydroquinone.

1.2- Réactifs

- Solution mère étalon de fer à $0,1 \text{ g. L}^{-1}$ étiquetée “**étalon de fer**” : 10 mL
- Eaux de lavage à doser, étiquetées “**L**” : 15 mL
- Solution tamponnée d'hydroquinone à $\text{pH} = 3,5$: en distributeur réglé sur 1 mL.
- Solution d'orthophénanthroline : en distributeur réglé sur 2 mL.

1.3- Protocole opératoire.

1.3.1- Gamme d'étalonnage

Préparer une solution étalon fille de fer à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à partir de la solution étalon mère à $0,1 \text{ g. L}^{-1}$.

À l'aide de cette solution fille réaliser une gamme d'étalonnage contenant de 0 à 50 μg de fer par tube.

Dans chaque tube, introduire dans l'ordre :

- x mL de solution étalon de fer,
- compléter à 5 mL avec de l'eau distillée,
- 1 mL de solution d'hydroquinone.

Agiter.

Laisser reposer 10 minutes.

Ajouter : 2 mL de réactif à l'orthophénanthroline.

Agiter.

Laisser la coloration se développer 20 minutes.

Lire les absorbances à 490 nm contre le blanc réactif.

1.3.2- Essais.

Réaliser 2 essais dans les mêmes conditions que la gamme d'étalonnage sur 5 mL d'eaux de lavage “**L**”.

Remarques :

- L'ordre d'addition des réactifs est à respecter impérativement.
- Stabilité de la coloration : 1 heure.

1.4- Compte rendu et résultats.

Expliquer la dilution effectuée pour la préparation de la solution étalon fille.

Établir un tableau de colorimétrie complet.

Utiliser l'outil informatique pour tracer le graphe $A_{490} = f(\text{masse de fer en } \mu\text{g})$

Valider les points. Donner l'équation de la droite de régression et le coefficient de corrélation.

Rendre le graphe renseigné.

Déterminer la concentration massique en fer des eaux de lavage “**L**” en mg.L^{-1}

Conclure.

Donnée : Coefficient de variation de la méthode : 3%.

2- Contrôle de l'indice d'acide de l'huile vierge (25 points)

La valeur de l'indice d'acide d'une huile vierge provenant d'un lot de graines de soja récemment réceptionné est inférieure ou égale à 4.

On détermine l'indice d'acide de l'huile vierge provenant d'un lot de graines, stocké 3 mois en atmosphère contrôlée (humidité, température, teneur en oxygène).

2.1- Réactifs

- Huile vierge de soja étiquetée “**H**” : 15 g.
- Solvant mélange éthanol/isobutanol (v/v) : sous la hotte, en distributeur réglé sur 20 mL.
- hydroxyde de potassium en solution alcoolique de concentration voisine de 0,2 mol. L⁻¹, étiqueté “**KOH**” : 60 mL.
- Solution d'acide chlorhydrique de concentration voisine de 0,1 mol.L⁻¹, donnée précisément en début d'épreuve, étiquetée “**HCl**” : 100 mL.
- Indicateur coloré : phénolphtaléine.

2.2- Protocole opératoire

Réaliser 2 essais.

Peser environ exactement 5 g d'huile vierge de soja dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 mL.

Réaliser la pesée en présence d'un examinateur.

Ajouter 20 mL de solvant éthanol/isobutanol.

Ajouter 10 mL de KOH éthanolique à environ 0,2 mol.L⁻¹.

Fermer.

Ajouter 3 gouttes de phénolphtaléine.

Titre par la solution d'acide chlorhydrique.

Réaliser un témoin.

Faire relever les chutes de burettes par un examinateur

Vider le contenu des fioles d'Erlenmeyer dans un flacon de récupération.

2.3- Résultats et compte rendu

Compléter la feuille de résultats jointe.

Donner la composition du témoin effectué.

Justifier la présence d'éthanol dans la solution de potasse.

Justifier l'emploi d'un bouchon.

Justifier l'utilisation d'un flacon de récupération.

Calculer l'indice d'acide de l'huile vierge de soja.

Conclure sur le temps de stockage des graines de soja en atmosphère contrôlée.

Données :

L'indice d'acide correspond à la masse de KOH en mg nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenue dans un gramme de corps gras.

$M_{\text{KOH}} = 56,1 \text{ g.mol}^{-1}$.

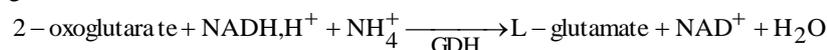
3- Détermination de la concentration en phosphatidylcholines (21 points).

Un extrait de phosphatidylcholines a été obtenu selon les étapes du **document 1** à partir d'un lot de graines récemment réceptionné.

Après minéralisation acide de l'extrait, l'azote contenu dans les phosphatidylcholines se trouve sous forme d'ions ammonium NH₄⁺. On dose les ions ammonium de l'extrait minéralisé “**E**” par méthode enzymatique en point final.

3.1- Principe.

En présence de la glutamate déshydrogénase (GDH), de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH, H^+), les ions NH_4^+ réagissent avec les 2-oxoglutarate pour former du L-glutamate et NAD^+ .



3.2- Réactifs et matériels.

- **R1** = tampon triéthanolamine pH 8,0 + 2-oxoglutarate : 4 mL.
- **R2** = pastilles de NADH, H^+ : 3.
- **R3** = GDH : 80 μL dans la glace en tube Eppendorf.
- **R4** = eau distillée : 8 mL.
- Extrait minéralisé étiqueté "**E**" : 1 mL.
- 4 cuves U.V

3.3- Protocole opératoire.

Réaliser 1 témoin réactif et 2 essais :

- Longueur d'onde : 340 nm,
- Cuve de 1 cm de trajet optique,
- Réglage du zéro du spectrophotomètre sur l'air.

Remarque : Les pastilles R2 seront distribuées par un examinateur dans les cuves à la demande du candidat.

Cuve	Témoin	Essai
R2	1 pastille	1 pastille
R1	1,00 mL	1,00 mL

Dissoudre la pastille

Extrait minéralisé "E"	-	0,10 mL
R4	2,00 mL	1,90 mL

Mélanger, attendre 5 minutes environ à la température du laboratoire.

Lire les absorbances A1.

R3	0,02 mL	0,02 mL
-----------	---------	---------

Mélanger, attendre 60 minutes environ à la température du laboratoire.

Lire les absorbances A2.

3.4- Compte-rendu et résultats.

Compléter la feuille de résultats jointe.

Expliquer l'avantage d'utiliser NADH, H^+ sous forme de pastilles par rapport à une solution préparée à l'avance.

Calculer la concentration massique en NH_4^+ de "**E**" en g.L^{-1} .

En déduire la concentration massique en phosphatidylcholines de "**E**" (on suppose que la totalité de l'azote de "**E**" provient des phosphatidylcholines).

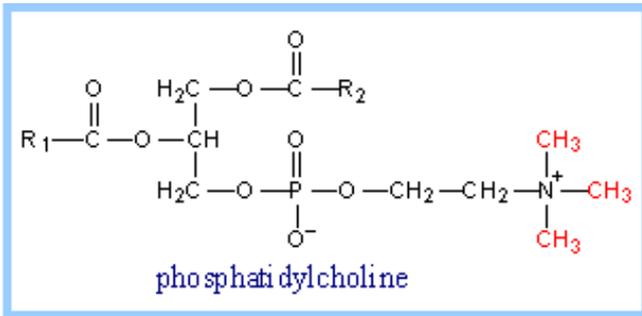
Données :

Coefficient de variation de la méthode 5%.

$N = 14 \text{ g.mol}^{-1}$ $H = 1 \text{ g.mol}^{-1}$ $M_{\text{phosphatidylcholine}} = 778 \text{ g.mol}^{-1}$ (M de la phosphatidylcholine la plus représentée dans l'huile vierge de soja).

$\epsilon_{\text{NADH}, \text{H}^+} = 6300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

Formule générale d'une phosphatidylcholine :



R1 et R2 = acides gras

Les étapes d'obtention de l'extrait "E" de phosphatidylcholines à partir d'huile vierge ont entraîné une dilution au 1/5^{ème}. Les phosphatidylcholines représentent 35% en moyenne des phospholipides du soja.

- Calculer la teneur en phospholipides de l'huile en g pour 100 g d'huile vierge de soja.
- Sachant que la teneur en phospholipides de l'huile de soja vierge est normalement comprise entre 2 et 3%, comparer le résultat obtenu avec la valeur attendue.

Donnée : Densité de l'huile vierge de soja = 0,91

Feuille de résultats à rendre avec la copie

1- Dosage du fer dans l'eau de lavage des graines

N° du tube								
A à 490 nm								

2- Détermination de l'indice d'acide de l'huile vierge

	Essai 1	Essai 2	Témoin
Masse d'huile pesée (g)			
Volume de HCl (mL)			

3- Détermination de la concentration en phosphatidylcholines

Cuve	3.5- Témoin	3.6- Essai 1	Essai 2
A ₁ à 340 nm			
A ₂ à 340 nm			
A ₁ - A ₂			
$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{essai}} - (A_1 - A_2)_{\text{témoin}}$			

CONTRÔLES DANS LA PRODUCTION D'HUILE VIERGE DE SOJA

DÉMARCHE SÉCURITAIRE

Les candidats doivent pouvoir consulter les listes de phrases "R" et "S" lors de l'épreuve.

Nom du produit	Pictogramme	Phrases R et S	Limites
Potasse alcoolique à 0,2 mol/L		R : 11-36/38 S : 7-16-26	
Isobutanol		R : 10-37/38-41-67 S : 7/9-13-26-37/39-46	
Ethanol		R : 11 S : 7-16	
Hydroquinone		R : 22-40-41-43-50-68 S : 26-36/37/39-61	L _{Xn} : 1 % L _N : 25 %
Chlorhydrate d'orthophénanthroline	 	R : 50/53 S : 61	L _N : 25 % L _T : 3 %

Mélange de solvants à laisser sous la hotte en distributeur loin d'une source de chaleur.
A la paillasse les flacons devront être bouchés.
Port de lunettes éventuellement.

E5-U51 : TP TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 2007**SUJET 3****Durée : 4 heures****Coefficient : 4****ANALYSES DE PÂTES ALIMENTAIRES**

Produit alimentaire traditionnel, les pâtes alimentaires ont conservé une place de choix dans l'alimentation des français parce qu'elles répondent aux attentes d'équilibre nutritionnel et que leur consommation s'adapte à tous les modes de vie. De nos jours les distributeurs proposent une large palette de produits parmi lesquels les nouilles aux œufs.

Un échantillon est analysé afin de vérifier la composition annoncée (semoule de blé tendre 50 %, semoule de blé dur 21 %, jaune d'œuf 15 %, eau, sel voisin de 5 %) et l'absence de colorant.

1- Dosage du cholestérol dans les nouilles. (28 points)

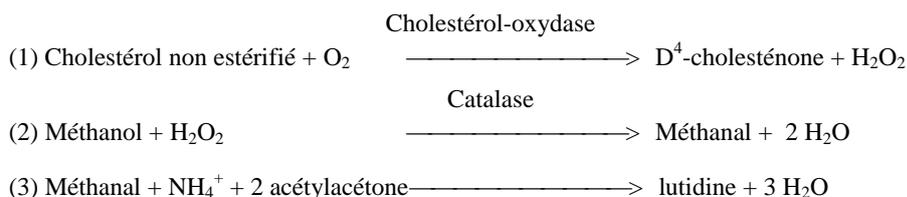
Le cholestérol contenu dans les nouilles est apporté par le jaune d'œuf ajouté au cours de la fabrication. Par conséquent, une des techniques de détermination de la teneur en jaune d'œuf consiste à doser le cholestérol.

1.1- Principe.

Le cholestérol non estérifié est oxydé en cholesténone par la cholestérol-oxydase (1).

Le peroxyde d'hydrogène formé au cours de cette réaction oxyde le méthanol en méthanal en présence de catalase (2).

L'aldéhyde réagit avec l'acétylacétone et les ions ammonium pour former un composé jaune, la lutidine (3).



L'intensité de la coloration mesurée dans le visible à 405 nm est proportionnelle à la concentration en cholestérol non estérifié.

1.2- Réactifs et matériels.

- Mélange réactionnel : 2 fois 3 mL en tubes à hémolyse notés T.
- Échantillon **E₁** : 0,50 mL.
- Échantillon **E₂** = échantillon **E₁** + ajout de cholestérol : 0,50 mL.
- Suspension A de cholestérol-oxydase: 100 µL à conserver dans la glace, notée "**Susp A Ch.ox**".
- 4 tubes à hémolyse.
- 6 microcuvettes pour photométrie visible.
- 1 bain thermostaté à 37 - 40°C.

1.3- Préparation des échantillons, (déjà réalisée)**1.3.1- Dosage du cholestérol dans les nouilles : échantillon **E₁**.**

Peser 2,00 g de nouilles finement broyées et tamisées.
 Ajouter 10 mL de potasse méthanolique à 1,0 mol.L⁻¹.
 Ajouter 1 g de sable et chauffer à reflux 25 minutes en agitant.
 Pipeter le surnageant, le transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 25 mL,
 et ajuster à 25 mL avec de l'isopropanol.
 Filtrer et récupérer le filtrat.
 L'échantillon E₁ est un extrait de ce filtrat.

1.3.2- Détermination du rendement d'extraction du cholestérol : Échantillon E₂.

Peser 2,00 g de nouilles finement broyées et tamisées.
 Ajouter 1,25 mg de cholestérol. Bien mélanger.
 Ajouter 10 mL de potasse méthanolique à 1,0 mol.L⁻¹ et poursuivre comme au 1.3.1.
 L'échantillon E₂ est un extrait de ce deuxième filtrat.

1.4- Protocole opératoire. (2 essais par échantillon)

Longueur d'onde : 405 nm
 Trajet optique : 1 cm
 Température d'incubation: 37 - 40°C
 Mesurer contre le témoin correspondant
 Les 2 tubes témoins contiennent déjà les 3 mL de mélange réactionnel.
 Compléter les témoins. Dans des tubes à hémolyse, propres et secs, réaliser les essais
 comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

	Témoin	Essai à réaliser en double
Mélange réactionnel	3,00 mL	-
Échantillon E ₁ ou E ₂	0,25 mL	-
Bien mélanger		
Prélever de chaque tube témoin	-	1,00 mL
Suspension A	-	0,02 mL

Bien mélanger, boucher les tubes et incuber 60 min au bain thermostaté à 37 - 40°C.

Laisser refroidir à la température ambiante et transvaser dans des microcuvettes.

Réaliser le "zéro" du spectrophotomètre sur le témoin et mesurer l'absorbance de l'essai correspondant : A_{essai}

1.5- Résultats et compte rendu.

Compléter le tableau de la feuille de résultats.

Calculer la concentration massique en cholestérol de chaque échantillon. L'exprimer en g.L⁻¹.

CV = 6%.

À partir des résultats précédents, calculer la masse de cholestérol ajoutée aux 2,00 g de nouilles. En déduire le rendement d'extraction du cholestérol.

Tenir compte de ce rendement pour calculer la teneur en cholestérol des nouilles. L'exprimer en % (m/m).

En déduire la teneur en jaune d'œuf des nouilles. L'exprimer en % (m/m).

Quels sont les rôles de la potasse méthanolique ajoutée pour la préparation des échantillons ?

Données :

- $\rho_{\square} = 0,693 \times DA_{\text{essai}}$ (g de cholestérol par L d'échantillon).
- $M_{\text{cholestérol}} = 386,64 \text{ g.mol}^{-1}$.
- La teneur moyenne du cholestérol contenu dans le jaune d'œuf est de 2,50 % (m/m).

2- Dosage de la tartrazine dans les nouilles. (24 points)

Les consommateurs accordent une grande importance à la couleur des nouilles. Les industriels peuvent être tentés, à défaut de jaune d'œuf, d'ajouter au cours de la fabrication un colorant alimentaire jaune, de synthèse, la tartrazine.

Si avec la révision de l'ordonnance sur les additifs en 2002, la tartrazine a été autorisée pour certaines denrées alimentaires, son utilisation reste interdite dans certains produits de base, par exemple les pâtes alimentaires.

2.1- Préparation de l'échantillon, (déjà réalisée)

100 g de nouilles ont été cuites dans de l'eau déminéralisée. L'eau de cuisson a été ajustée à 2 L exactement.

L'échantillon est un extrait de l'eau de cuisson.

2.2- Réactifs et matériels.

- solution étalon de tartrazine à $0,02 \text{ g.L}^{-1}$: 30 mL.
- diluant = eau déminéralisée,
- échantillon E_T : 10 mL.
- 8 macrocuvettes pour photométrie visible.
- 6 tubes à hémolyse.

2.3- Protocole opératoire.

2.3.1- Réalisation de la gamme d'étalonnage du spectrophotomètre.

Dans six tubes à hémolyse propres et secs, réaliser à partir de la solution étalon fournie une gamme d'étalonnage du spectrophotomètre contenant de 0 à 100 μg de tartrazine par tube sous un volume final de 5 mL.

Préparer un étalon en présence d'un examinateur.

2.3.2- Détermination de la longueur d'onde maximale d'absorption de la tartrazine.

Tracer, entre 380 et 530 nm, le spectre d'absorption de la solution étalon la plus concentrée. En déduire la longueur d'onde d'absorption maximale de la tartrazine.

La fiche de programmation (annexe 1) du spectrophotomètre devra être complétée et rendue à l'examinateur juste avant le passage pour la réalisation du spectre à l'appareil.

2.3.3- Dosage de la tartrazine dans l'eau de cuisson des pâtes.

Lire les absorbances des étalons et de l'échantillon (2 mesures) à 450 nm.

Relever les absorbances en présence d'un examinateur.

2.4- Résultats et compte rendu.

Présenter un tableau complet de colorimétrie.

Compléter le tableau de la feuille de résultats.

Tracer, à l'aide de l'outil informatique, la courbe d'étalonnage du spectrophotomètre. Valider les points expérimentaux.

Calculer la teneur en tartrazine des nouilles. L'exprimer en % (m/m).

3- Dosage du sel par conductimétrie. (26 points)

Il est courant d'ajouter à la farine, pendant le malaxage, divers ingrédients dissous dans de l'eau. Ainsi les nouilles sont constituées de 1 à 5 % de sel (NaCl). On se propose de vérifier cette teneur.

3.1 – Réactifs et matériels.

- Pâtes broyées et tamisées : 3 g.
- Solvant d'extraction : 300 mL.
- Solution de nitrate d'argent à exactement $2.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$: 100 mL,
- Une cellule conductimétrique.
- Un conductimètre.
- Une centrifugeuse.
- Un chronomètre.

3.2 – Préparation de l'échantillon.

Peser précisément, dans un bécher de 100 mL, une masse de pâtes broyées et tamisées, voisine de 2,00g.

Réaliser la pesée en présence d'un examinateur.

Ajouter environ 50 mL de solvant d'extraction. Mettre sous agitation magnétique pendant 5 minutes.

Laisser reposer 5 minutes puis transvaser délicatement le surnageant dans une fiole jaugée de 200 mL.

Recommencer cette opération 2 fois de suite.

Compléter la fiole au trait de jauge avec le solvant d'extraction.

Centrifuger 50 mL de cet extrait 5 min à 3000 rpm. Le surnageant constitue l'échantillon à analyser.

3.3 – Dosage des chlorures par conductimétrie. (1 essai)

Procéder à la calibration du conductimètre (voir la notice jointe à l'appareil).

Dans un bécher haut de 200 mL, introduire :

- 25,00 mL d'échantillon,
- 50,00 mL d'eau déminéralisée (prélevée de façon très précise),
- un barreau aimanté.

Plonger la cellule conductimétrique.

Doser par la solution de nitrate d'argent : noter la conductivité g ou la conductance G en fonction du volume de nitrate d'argent ajouté.

En fin de manipulation, vider le contenu du bécher dans le flacon de récupération.

3.4 – Résultats et compte rendu.

Compléter les tableaux de la feuille de résultats.

Tracer, sur papier millimétré, la courbe conductivité corrigée (g') ou conductance corrigée (G') en fonction du volume de nitrate d'argent ajouté.

Donner l'équation de chaque droite constituant la courbe.

Déterminer le volume équivalent.

Calculer la concentration en sel du surnageant. CV = 5%.

En déduire la teneur en sel des nouilles (on négligera le volume des grains de nouilles entraînés).

Justifier l'utilisation du flacon de récupération.

Données :

$$M_{\text{Cl}} = 35,45 \text{ g.mol}^{-1} \quad M_{\text{Na}} = 23,00 \text{ g.mol}^{-1} \quad f = 1 + \frac{V(\text{Ag}^+, \text{NO}_3^-)}{75} \quad \gamma' = f \times \gamma \quad G' = f \times G$$

4 – Conclusion générale. (2 points)

Conclure sur l'ensemble des résultats.

Feuille de résultats à rendre avec la copie

Poste n°.....

1- Dosage du cholestérol dans les nouilles

	Échantillon E ₁		Échantillon E ₂	
	Essai 1	Essai 2	Essai 1	Essai 2
A _{essai} à 450 nm				

2- Dosage de la tartrazine dans l'eau de cuisson

Tubes	1	2	3	4	5	6	E _{T1}	E _{T2}
A à 450 nm								

3- Dosage du sel des nouilles**3.1- Dosage des chlorures par conductimétrie**

V _{Ag⁺,NO₃⁻} (mL)	Facteur correctif f	γ ou G	γ' ou G'	V _{Ag⁺,NO₃⁻} (mL)	Facteur correctif f	γ ou G	γ' ou G'

Poste n°.....

ANNEXE 1

Fiche de programmation à compléter et à remettre à l'examinateur

Choix du programme adapté

Réglage des longueurs
d'onde

Réglage du zéro de l'appareil

Détermination de λ max

**LISTE DES RÉACTIFS CHIMIQUES UTILISÉS AU COURS DES MANIPULATIONS
ET NÉCESSITANT ÉVENTUELLEMENT DES PRÉCAUTIONS PARTICULIÈRES D'UTILISATIONS**

Produits	Pictogramme	Phrases R et S	Limites		Concentration de travail	
AgNO ₃		R 34-50/53 S 26-45-60-61	R34 R 50/53	conc ≥ 10% Conc =10% 5% ≤ conc < 10% conc ≥ 25 %	R34 R41 R 36/38	≈ 0,34 %
Méthanol		R 11-23/24/25-39/23/24/25 S 7-16-36/37-45	R 23/24/25 R39/23/24/25	conc ≥ 10% 23/24/25 conc ≥ 10% R39/23/24/25 1% ≤ conc < 10%	R R 68/23/24/25	≈ 5,4 %
Acétylacétone		R 10-22 S 21-23.2-24/25	R 22	conc ≥ 25 %	R 22	≈ 0,2%
Isopropanol		R11-36-67 S 7-16-24/25-26	R 36	conc ≥ 20 %	R 36	≈ 100%
Tartrazine		R 42/43 S 22-36/37-45	R 42/43	conc ≥ 1 %	R 42/43	≈ 0,002 %

E5-U51 : TP TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 2007

SUJET 4

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

MISE EN PLACE D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DU GLUCOSE EN AGROALIMENTAIRE.

Une entreprise de l'industrie sucrière désire utiliser le réactif Glucose RTU[®] pour le dosage de sirops contenant du glucose et du saccharose. Il lui faut donc vérifier que ce réactif utilisé en analyse clinique est aussi applicable aux produits de l'industrie sucrière.

Pour réduire encore les coûts, l'entreprise envisage dans un second temps, de fabriquer un réactif proche du réactif Glucose RTU[®].

La démarche comprend deux étapes :

- validation du réactif Glucose RTU[®] pour le dosage du glucose d'une solution industrielle de glucose et de saccharose ;
- détermination de l'activité de la solution de peroxydase utilisée pour la préparation du réactif de substitution.

1- Validation du réactif glucose RTU[®] pour le dosage du glucose. (53 points)

L'entreprise sucrière obtient comme sous produit de production un sirop dont la teneur en glucose est voisine de 25 % et celle en saccharose de 75 %. Avant de généraliser la méthode de dosage du glucose par le réactif Glucose RTU[®] au sirop, l'entreprise désire vérifier :

- la linéarité de la méthode dans les conditions d'utilisation du réactif,
- sa spécificité vis-à-vis du glucose, et principalement l'absence d'interférence en présence de fructose,
- la justesse des résultats obtenus lors du dosage d'un sirop mixte glucose/saccharose similaire à celui qui sera dosé en routine si le test est validé.

Les caractéristiques du réactif RTU[®], les conditions d'analyse et le protocole opératoire sont détaillés en **annexe 1**.

1.1- Matériel et réactifs.

- Glucose pur et anhydre en poudre : 0,3 g.
- Solution "G" de contrôle de glucose à 2,00 mmol.L⁻¹ : 1 mL.
- Solution "GF" de contrôle de glucose à 2,00 mmol/L⁻¹ + fructose à 2,00 mmol.L⁻¹ : 1 mL.
- Sirop "S" : 5 mL.
- Réactif glucose RTU[®] noté "réactif RTU" : 15 mL.
- Tampon acétate acétique 0,1 mmol.L⁻¹- pH = 4,5 noté "Tp 4,5" : 5 mL.
- Solution d'invertase notée "invertase" à 1 U.mL⁻¹ : 0,5 mL.
- 13 tubes à hémolyse.
- 12 microcuvettes.
- fioles jaugées : 200 mL, 10 mL, 25 mL.

1.2- Étalonnage.

1.2.1- Préparation de la solution étalon "Et" de glucose.

Pour préparer 200 mL d'une solution à 4,00 mmol.L⁻¹ de glucose, peser exactement 144 mg de glucose pur et anhydre.

On obtient la solution "Et".

Données : la fidélité de la pesée est de 0,5%.

La pesée sera réalisée devant un examinateur.

1.2.2- Préparation de la gamme.

Réaliser une gamme de 6 tubes étalons contenant de 0 à 100 μL de solution "Et". Effectuer la coloration en complétant les tubes selon le protocole donné en **annexe 1**.

1.2.3- Compte rendu.

Justifier la masse de glucose pesée.

Présenter le calcul de la quantité de glucose en μmol par tube.

Compléter la feuille de résultats.

À l'aide de l'outil informatique, tracer, en utilisant un modèle linéaire, le graphique de la fonction d'étalonnage $A_{505\text{nm}} = f(\text{quantité de glucose en } \mu\text{mol})$ et préciser les paramètres de cette fonction et le coefficient de corrélation.

Valider la linéarité de la méthode.

Justifier la quantité de glucose oxydase dans le réactif.

Donnée : $M_{\text{glucose}} = 180 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

1.3- Contrôle.

1.3.1- Protocole opératoire.

Réaliser, selon le protocole de l'**annexe 1** :

- un contrôle à partir d'une prise d'essai de $x = 100 \mu\text{L}$ de solution "G".
- un contrôle à partir d'une prise d'essai de $x = 100 \mu\text{L}$ de solution "GF".

1.3.2- Compte-rendu.

Compléter la feuille de résultats

Déterminer la concentration molaire expérimentale en glucose ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) des solutions "G" et "GF".

Évaluer l'interférence due à la présence de fructose.

Discuter l'application de cette méthode au dosage du glucose après hydrolyse totale d'une solution de saccharose.

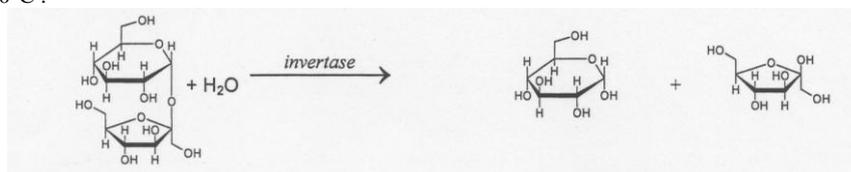
1.4- Dosage des glucides du sirop S.

1.4.1- Démarche d'analyse.

Le **sirop S** analysé correspond à une dilution au 1/20 d'une solution mixte de glucose/saccharose dans des proportions similaires à celles rencontrées dans le produit industriel : sa teneur est **exactement de 25 % de glucose et de 75 % de saccharose** (les teneurs sont exprimées en masse (en g) de glucides pour 100 g de glucides totaux).

Le glucose libre est dosé selon le protocole de l'**annexe 1** après dilution de la solution "S".

La concentration en saccharose est déterminée à partir de la concentration en glucose libéré lors de l'hydrolyse du saccharose en présence d'une enzyme, l'invertase (b-fructosidase de levure de boulangerie) à $\text{pH} = 4,5$ et à 50°C :



1.4.2- Dosage du "glucose libre". (2 essais)

Diluer au 1/10 le sirop "S" dans l'eau distillée ; on obtient la solution **S1**.

Réaliser 2 essais selon le protocole de l'**annexe 1** à partir de $x = 100 \mu\text{L}$ de la solution **S1**.

1.4.3- Hydrolyse du saccharose.

Dans un tube à hémolyse bouché, introduire :

- 100 μL de sirop "S",

- 1 mL de tampon pH = 4,5 “**Tp 4,5**”,
- 100 μ L de suspension d'**invertase**.

Boucher le tube. Incuber 15 minutes à 50 °C.

Transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 25 mL après retour à température ambiante. Ajuster à 25 mL avec de l'eau distillée.

La solution ainsi préparée est la solution **S2**.

1.4.4- Dosage du “glucose total”. (2 essais)

Réaliser 2 essais selon le protocole de l'**annexe 1** à partir de $x = 100 \mu\text{L}$ de la solution **S2**.

1.4.5- Compte rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Calculer la concentration molaire puis massique en “glucose libre” du sirop “**S**”. Calculer la concentration molaire en “glucose total” du sirop “**S**”.

En déduire la concentration massique en saccharose du sirop “**S**”.

En déduire la teneur en glucose (en g de glucose pour 100 g de glucides totaux) du sirop “**S**”.

Conclure quant à la validité du mode opératoire choisi.

Données :

$M_{\text{glucose}} : 180 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

$M_{\text{saccharose}} : 342 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

2- Détermination de l'activité peroxydase. (27 points)

On se propose de déterminer la concentration d'activité peroxydase du réactif glucose RTU et d'un lot **P** de peroxydase par méthode cinétique spectrophotométrique à 505 nm.

2.1- Principe.

La réaction mise en jeu est la même que celle utilisée comme réaction révélatrice du réactif glucose RTU[®].

L'ensemble de la manipulation sera réalisé devant un examinateur.

2.2- Matériel et réactifs.

- Suspension de peroxydase notée “**suspension P**” : 0,3 mL.
- Réactif Glucose RTU[®] noté “**réactif RTU**” (déjà utilisé au cours de la partie 1).
- Solution de 4-amino antipyrine à $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: 4 mL, notée “**amino-4-antipyrine**”.
- Solution de phénol à $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: 4 mL, notée “**phénol**” (fiche toxicologique fournie en **annexe 2**).
- Solution de peroxyde d'hydrogène à $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: 2 mL, notée “**H₂O₂**”.
- Tampon phosphate $0,225 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH=6,6 : 10 mL, noté “**Tp 6,6**”.
- 4 tubes à hémolyse.
- 1 fiole jaugée de 10 mL.
- 4 cuves.

2.3- Protocole opératoire.

La lecture au spectrophotomètre sera réalisée contre un témoin approprié.

2.3.1- Préparation de la solution réactionnelle “SR”.

La solution réactionnelle est à préparer extemporanément.

Dans une fiole jaugée de 10 mL, introduire :

- 2,0 mL de solution de phénol,
- 2,0 mL de solution de 4-amino antipyrine,
- 1,0 mL de solution de peroxyde d'hydrogène.

Ajuster avec du tampon “**Tp 6,6**” : on obtient la **solution réactionnelle “SR”**.

2.3.2- Détermination de l'activité peroxydase du "réactif RTU". (1 essai)

Dans un tube à hémolyse, introduire 2,0 mL de "SR".

Préincuber 5 minutes à 37°C.

Déclencher la réaction par addition de 100 µL de "réactif RTU".

Suivre l'absorbance à 505 nm toutes les 15 secondes pendant 2 minutes au spectrophotomètre thermostaté à 37°C.

2.3.3- Détermination de l'activité peroxydase de la "suspension P". (2 essais)

Dans un tube à hémolyse, introduire 2,0 mL de "SR".

Préincuber 5 minutes à 37°C.

Déclencher la réaction par addition de 100 µL de "suspension P".

Suivre l'absorbance à 505 nm toutes les 15 secondes pendant 2 minutes au spectrophotomètre thermostaté à 37°C.

2.4- Compte rendu.

Évaluer la toxicité de la solution de phénol utilisée au cours de la manipulation (**annexe 2**). En déduire les mesures à prendre.

Compléter la feuille de résultats.

Éditer un tracé informatique des courbes $A_{505} = f(\text{temps en minutes})$ et donner les paramètres de ces fonctions.

En déduire dans chaque cas le coefficient directeur $\Delta A/\text{min}$.

Calculer la concentration d'activité catalytique peroxydase du "réactif RTU" et de la "suspension P", sachant que la concentration d'activité catalytique (C_{cat}) peut être calculée par la formule :

$$C_{\text{cat}} = \Delta A/\text{min} \times 1680 \text{ en U.L}^{-1}$$

Sachant que, dans les conditions opératoires, le coefficient d'extinction molaire de la quinonéimine est de $12500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, retrouver la formule de calcul précédente.

La suspension P a été préparée par dilution au 1/50 d'une solution mère **Pm**.

À partir des solutions à votre disposition et de la solution **Pm**, expliquer le mode de préparation de 200 mL de réactif de remplacement du "réactif RTU".

Donnée :

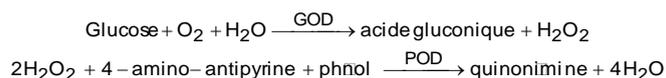
1 U peroxydase correspond à la quantité d'enzyme catalysant la production d'1 µmol de quinonéimine par minute dans les conditions opératoires choisies (37°C et pH = 6,6).

ANNEXE 1: PRINCIPE D'UTILISATION DU RÉACTIF GLUCOSE RTU® - APPLICATION AU DOSAGE EN INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE

PRINCIPE

Le glucose est oxydé en présence de glucose oxydase (GOD).

La réaction indicatrice utilise l'action de la peroxydase (POD) sur le peroxyde d'hydrogène libéré par oxydation du glucose en présence d'un chromogène (phénol + amino-4-antipyrine) qui produit quantitativement un chromophore (quinonéimine) absorbant à 505 nm.



COMPOSITION DU RÉACTIF RTU®

- glucose oxydase $\geq 10000 \text{ U.L}^{-1}$
- peroxydase $\geq 300 \text{ U.L}^{-1}$
- 4-aminoantipyrine : $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$
- phénol : $8,5 \text{ mmol.L}^{-1}$
- tampon phosphate à 225 mmol.L^{-1} pH = 6,6
- EDTA 5 mmol.L^{-1}

CONDITIONS D'UTILISATION

- zéro sur un blanc réactif (solution réactionnelle)
- limite de linéarité $40 \mu\text{g}$ de glucose / cuve
- lecture à 505 nm
- stabilité de la coloration : 1h30
- stabilité du réactif : plusieurs semaines à 2-8°C
- coefficient d'extinction molaire de la quinonéimine : $12500 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

MODE OPÉRATOIRE

Introduire dans un tube à hémolyse :

- x μL de solution glucosée (x compris entre 10 et 500 μL),
- (500-x) μL d'eau physiologique,
- 1000 μL de **réactif RTU**.

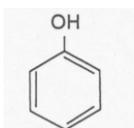
Incuber 10 minutes à 37°C.

Lire l'absorbance contre le blanc réactif à 505 nm. CV de la méthode : 2,5%.

ANNEXE 2 - EXTRAIT DE LA FICHE TOXICOLOGIQUE DU PHENOL**IDENTIFICATION DU PRODUIT**

Numéro CAS : 108-95-2
Pureté : 95 %

Formule chimique :

**PROPRIÉTÉS PHYSIQUES**

Couleur : incolore
Odeur : odeur âcre) odeur douceuse
Tension de vapeur : 0,4 mbar à 20° C
Point d'ébullition : 182° C à 760 mmHg
Point de congélation / fusion : 39 – 41° C
Température d'auto-inflammation : 605 ° C
Point d'éclair : 79° C
Limites d'explosion : minimum : 1,3 vol %
Limites d'explosion : maximum : 9,5 vol %
Solubilité dans l'eau : 8 g/100mL
Densité : 1,070
Formule moléculaire : C₆H₆O
Poids moléculaire : 94,11

DONNÉES DE SÉCURITÉ

Symbole de danger :



Énoncés de risque : 23/24/25 34 48/20/21/22 68

Énoncés de sécurité : 24/25 26 28A 36/37/39 45

Limites de toxicité :

Toxique R 23/24/25 : concentration ≥ 25 % (m/v) : T
 3 % (m/v) ≤ concentration ≤ 25 % (m/v) : Xn
Irritant R 34 : concentration ≥ 10 % (m/v) : C
 5 % (m/v) ≤ concentration ≤ 10 % (m/v) : Xi

Feuille de résultats (à rendre avec la copie)**1- Validation du réactif Glucose RTU® pour le dosage du glucose****Étalonnage**

masse de glucose pesée	g
------------------------	----------

Tubes	1	2	3	4	5	6
Volume de solution Et (µL)						
Volume d'eau physiologique (µL)						
Quantité de glucose par tube (µmol)						
Absorbance à 505 nm						

Contrôles et dosages

Solution dosée	G	GF	S1		S2	
Absorbance 505 nm						

2- Détermination de l'activité peroxydase**Activité peroxydase du réactif RTU**

Temps en minutes								
Absorbance 505 nm								

Activité peroxydase de la suspension P

Temps en minutes								
Absorbance 505 nm								

E5-U52 : TP TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 2007**SUJET 1****Coefficient : 4****1^{ER} JOUR : Durée 2 heures 30****CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUES DANS UNE INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE**

Dans une industrie pharmaceutique chargée du conditionnement d'antibiotiques en atmosphère stérile, le laboratoire de l'entreprise contrôle le bon respect du cahier des charges de l'assurance qualité.

les analyses portent notamment sur :

- le contrôle des zones de conditionnement des antibiotiques: sur ce site industriel, les zones où les β lactamines sont traitées et les zones dites "non β lactamines" cohabitent. Le risque de contaminations croisées est important et justifie un contrôle quotidien;
- la fertilité des milieux de culture utilisés au laboratoire;
- la vérification des caractères biochimiques des souches test utilisées.

1- Recherche et dosage de β -lactamines dans les zones de travail. (35 points)

On recherche la présence éventuelle de benzyl-pénicilline par une méthode microbiologique avec une souche sensible de référence *Staphylococcus aureus* CIP 7225.

1.1- Matériel et réactifs.

- 1 souche test: culture de 24 heures en bouillon nutritif de *Staphylococcus aureus* CIP 7225 et notée "*S. aureus*".
- 10 mL de bouillon nutritif stérile.
- 2 tubes à hémolyse stériles.
- 3 micro-cuves de spectrophotométrie.
- Spectrophotomètre réglé à 600 nm.
- 2 flacons notés "**milieu ATB**" contenant chacun 60 mL de milieu 11 pour antibiotiques en surfusion à 50°C.
- 2 boîtes de Pétri carrées (12 x 12 cm).
- 1 tube à hémolyse contenant 1 ml de solution mère de benzyl-pénicilline à 2 mg/mL. et noté "pénicilline".
- 1 tube contenant 10 ml de tampon à pH = 6,0 et noté "**tampon**".
- 5 tubes Eppendorf stériles.
- 1 tube Eppendorf contenant 500 μ L de l'échantillon et noté "**E**".
- 1 tube Eppendorf contenant 100 μ L de solution de pénicillinase noté "**Pase**" à 1000 U/mL.
- 1 boîte de Pétri contenant 12 disques vierges stériles de diamètre 6 mm.
- 1 pipette automatique 10 - 100 μ L
- 1 pipette automatique 100 - 1000 μ L.
- Cônes stériles.

1.2 – Préparation des échantillons.

1.2.1 – Prélèvement (déjà réalisé)

- A l'aide d'un swab (chiffonnette) imbibé par 0,5 mL de solution tampon à pH = 6,0, effectuer un prélèvement sur une surface de 10 cm².
- Placer le swab dans un bêcher stérile contenant 20 mL de solution tamponnée à pH = 6,0.
- Homogénéiser.

On obtient l'échantillon "E" à analyser, présenté en tube Eppendorf.

1.2.2 – Traitement à la pénicillinase

- Dans un tube Eppendorf verser 200 µL de l'échantillon "E".
- Ajouter 50 µL de solution de pénicillinase à 1000 UI.mL⁻¹.
- Mettre au bain thermostaté à 27°C pendant 30 minutes.

1.3 – Préparation d'une gamme de concentrations de la solution mère de benzyl-pénicilline.

A partir de la solution mère à 2 mg/mL, et notée «Pénicilline», réaliser une gamme de dilution selon le tableau joint en annexe 1.

1.4 – Préparation des boîtes de culture.

A partir de la culture fournie en bouillon et notée «*S. aureus*», préparer en tampon pH = 6 une suspension ajustée à 10 % près à 0,1 unité de DO à 600 nm.

➔ **Effectuer les mesures en présence d'un examinateur.**

Introduire 0,2 mL de cette suspension dans chacun des deux flacons de "milieu ATB". Homogénéiser et couler dans les boîtes de Pétri fournies.

1.5 – Dépôt des disques.

Imprégner les 2 séries de disques fournis avec 10 µL des différentes solutions :

- Les 4 solutions étalons préparées ci-dessus,
- l'échantillon "E",
- l'échantillon traité avec la pénicillinase (Cf. 1.2.2).

Déposer les disques à la surface du milieu selon le gabarit fourni en annexe 2.

Attendre 30 minutes et placer à l'étuve à 37°C.

1.6 – Compte-rendu.

Compléter le tableau fourni en annexe 1.

Expliquer l'intérêt de l'échantillon traité avec la pénicillinase.

Quel est l'intérêt d'utiliser une souche CIP ?

Pourquoi doit-on observer un temps d'attente de 30 minutes avant de mettre à l'étuve?

2 – Préparation de «Quanti-cult» en vue du test de fertilité des milieux de culture. (22 points)

Les tests de fertilité permettent sur chaque lot de milieu qui arrive au laboratoire, de vérifier leur aptitude à assurer une croissance correcte des micro-organismes concernés.

La méthode «quanti-cult» consiste à inoculer les milieux à tester avec 0,1 mL d'une suspension microbienne de densité telle qu'on obtienne après incubation entre 10 et 100 colonies si le milieu est satisfaisant.

On se propose de préparer des «quanti-cults» à partir d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* afin de tester un lot de gélose au cétrimide.

2.1- Matériel et réactifs.

- 1 tube de culture pure de *Pseudomonas aeruginosa* en bouillon nutritif noté “Pseudo”.
- 6 tubes contenant chacun 9 ml de Tryptone-sel et notés “diluant”.
- Dispositif d'ensemencement en surface.
- 6 boîtes de gélose au cétrimide.
- 9 pipettes de 1 ml stériles.
- Pipette automatique P100 + cônes stériles.

2.2- Protocole.

Sachant que la population est estimée à environ 10^8 UFC/ml dans la culture fournie, réaliser une gamme de dilutions décimales en tryptone-sel.

→ **Faire une dilution devant un examinateur.**

Ensemencer par étalement en surface avec 3 dilutions en double essai.

Incuber à 42°C pendant 24 heures

2.3- Compte-rendu.

- 2.3.1- Justifier le choix des dilutions retenues.
- 2.3.2- Pourquoi ensemence-t-on par étalement en surface?

3- Vérification des caractères phénotypiques de la souche test *Pseudomonas aeruginosa*. (23 points)**3.1- Matériel et réactifs.**

- 1 souche test cultivée sur GTS en pente notée “souche test”.
- 1 tube contenant 10 mL d'eau distillée stérile.
- tube à hémolyse vide stérile
- Colorants de Gram.

3.2- Protocole.

Vérifier les caractères morphologiques.

→ **Montrer l'observation microscopique à un examinateur.**

Proposer l'ensemencement d'une galerie.

→ **La proposition de la galerie miniaturisée doit être présentée à un examinateur au moins 1 heure avant la fin de l'épreuve.**

Ensemencer la galerie fournie par le centre.

3.3- Compte-rendu.

Décrire l'observation microscopique et justifier le choix de la galerie.

Analyser le milieu fourni avec la galerie. Justifier sa nécessité pour ensemencer la seconde partie de la galerie.

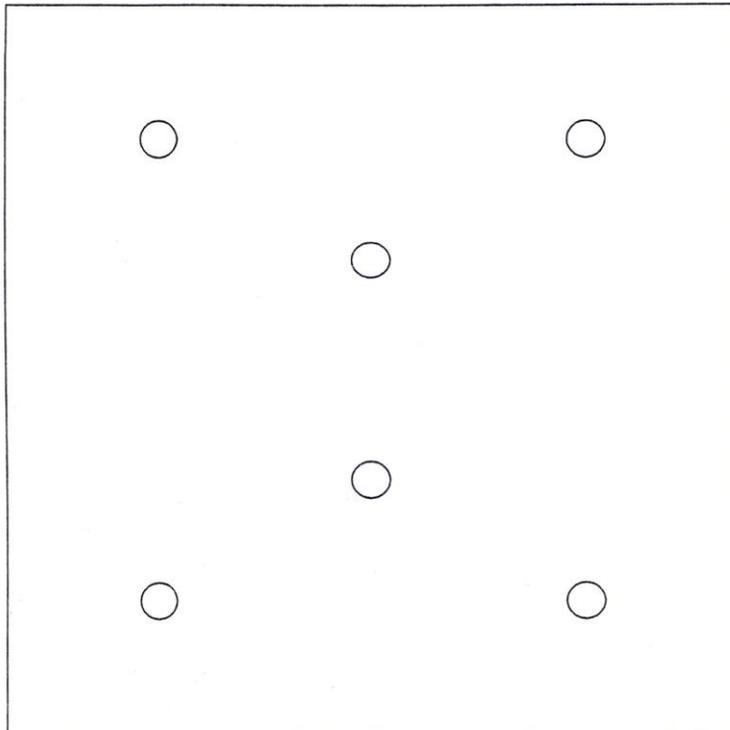
Préciser la température d'incubation.

ANNEXE 1 : TABLEAU A COMPLETER

(à rendre avec la copie)

Volume final dans chaque tube Eppendorf= 200 μL

N° des tubes	1	2	3	4
V _{solution mère} en μL				
V _{solution tampon} en μL				
Concentrations finales en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,2	0,4	0,6	0,8

ANNEXE 2 : GABARIT POUR LE DEPÔT DES DISQUES

2ème JOUR : Durée 2 heures

CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE D'UN LAIT COSMÉTIQUE

1- Recherche et dosage de b-Iactamines dans les zones de travail. (35 points)

Rappel:

Surface de prélèvement = 10 cm².

Mise en suspension dans 20 mL de tampon = échantillon "E".

- 1.1- Effectuer la lecture des boîtes et consigner les résultats dans un tableau.
- 1.2- Interpréter les résultats obtenus.
- 1.3- Tracer avec l'outil informatique la courbe étalon (en coordonnées semi-Iogarithmique).
- 1.4- Déterminer graphiquement la concentration de l'échantillon "E".
- 1.5- Calculer la quantité de benzyl-pénicilline par cm² de surface testée.

2- Préparation de "quanti-cult" en vue du test de fertilité des milieux de culture. (22 points)

Rappel:

La méthode «quanti-cult» consiste à inoculer les milieux à tester avec 0,1 mL d'une suspension microbienne de densité telle que nous obtiendrons après incubation entre 10 et 100 colonies si le milieu est satisfaisant.

- 2.1- Effectuer la lecture des boîtesensemencées. Présenter les résultats dans un tableau.
- 2.2- Calculer la concentration bactérienne dans la culture initiale.
- 2.3- En déduire le mode de préparation des "quanti-cult".

3- Vérification des caractères phénotypiques de la souche test *Pseudomonas aeruginosa*. (23 points)

- 3.1- Lire la galerieensemencée.
- 3.2- Consigner les résultats sur la fiche de galerie distribuée.
- 3.3- Identifier la souche.
- 3.4- Conclure.

E5-U52 : TP TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 2007**SUJET 2****Coefficient : 4****LES CRITÈRES MICROBIOLOGIQUES APPLICABLES AUX
DENRÉES ALIMENTAIRES****1^{ER} JOUR : Durée 3 heures 30**

Les denrées alimentaires ne doivent pas contenir de micro-organismes ni leurs toxines ou métabolites dans des quantités qui présentent un risque pour la santé.

Le règlement (CE) n° 2073/2005 du 15 novembre 2005 établit des prescriptions générales relatives à la sécurité des denrées alimentaires, prévoyant qu'aucune denrée alimentaire n'est mise sur le marché si elle est dangereuse.

Pour contribuer à la protection de la santé publique et éviter les interprétations différentes, il convient de définir des critères de sécurité harmonisés relatifs à l'acceptabilité des denrées alimentaires, notamment en ce qui concerne la présence de certains micro-organismes pathogènes.

On se propose:

- d'étudier un critère de sécurité alimentaire (recherche de *Listeria*),
- de vérifier une bonne pratique de fabrication (recherche de mycobactéries),
- de valider un procédé de désinfection.

1- Critère de sécurité alimentaire: recherche et identification de *Listeria monocytogenes* dans un lait maternisé. (34 points)

La contamination par *Listeria monocytogenes* est essentiellement liée à l'ingestion d'aliments contaminés (produits laitiers, produits carnés, volailles et ovoproduits). La recherche de ces bactéries dans les produits alimentaires nécessite les quatre phases suivantes : enrichissements primaire et secondaire en milieu liquide sélectif, isolement et identification présomptive, puis confirmation de l'identification.

L'enrichissement a été réalisé selon le schéma du mode opératoire de **l'annexe 1**.

On dispose d'un isolement effectué sur gélose non sélective TSAYE.

La composition de cette gélose est fournie dans **l'annexe 2**.

1.1- Matériel et réactifs.

- 1 gélose TSAYE ensemencée à partir d'une colonie caractéristique prélevée sur gélose sélective ALOA.
- 1 tube contenant 5 ml d'eau physiologique.
- 1 VF en surfusion.
- 1 gélose au sang de cheval.
- 1 gélose au sang de mouton.
- 1 gélose TSAYE.
- 1 gélose TSAYE en pente ensemencée avec une souche positive dite "T+».
- 1 gélose TSAYE en pente ensemencée avec une souche négative dite "T-».
- 1 gélose TSAYE en pente ensemencée avec *Rhodococcus equi*.
- 1 galerie Api Listeria.

1.2- Identification du genre *Listeria*.

Examiner la gélose non sélective TSAYE et conclure.

Réaliser une coloration de Gram à partir des colonies isolées sur la gélose non sélective TSAYE.

Effectuer le test enzymatique approprié.

➔ **Présenter l'examen microscopique et le test enzymatique à un examinateur.**

Ensemencer une gélose VF.

1.3- Identification de l'espèce *Listeria monocytogenes*.

Isoler la souche sur la gélose au sang de cheval. Incuber 24 heures à 37°C.

Test de CAMP:

Ensemencer la culture de *Rhodococcus equi* par une strie simple centrale sur gélose au sang de mouton.

Ensemencer perpendiculairement à cette culture la souche à tester et les souches témoin positif "T+" et témoin négatif "T-", selon le schéma proposé dans **l'annexe 3**.

Incuber la boîte à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Ensemencer la galerie miniaturisée "Api *Listeria*" en respectant scrupuleusement le mode opératoire de la fiche technique.

Effectuer un contrôle de pureté sur gélose TSAYE.

1.4- Compte-rendu.

Décrire les colonies sur la gélose TSAYE.

Confirmer l'appartenance des bactéries au genre *Listeria*.

A partir des **annexes 1 et 2**, préciser l'intérêt des différentes étapes et justifier l'emploi du bouillon de Frazer au 1/2.

2- Vérification de conformité microbiologique : recherche de *Mycobacterium*. (10 points)**2.1- Norme.**

Le lait cru destiné à la consommation ou à la fabrication de fromage doit présenter les critères microbiologiques suivants (selon l'arrêté du 6 août 1985) :

- Absence de *Salmonella* dans 25 mL.

- Absence de *Mycobacterium*.

- < 10² coliformes totaux / mL.

- < 10² *Staphylococcus aureus* / mL.

- < 5.10⁴ germes aérobies mésophiles / mL.

Une analyse précédemment réalisée sur un lait cru "L" a donné les résultats suivants :

- Absence de *Salmonella* dans 25 g.

- 50 *Staphylococcus aureus* / mL.

- < 10³ germes aérobies mésophiles / mL.

- < 10² coliformes totaux / mL.

2.2- Matériel et réactifs.

• Réactif de Kinyoun, selon **l'annexe 4**.

• Culot de centrifugation du lait cru, noté "L".

2.3- Protocole opératoire.

Effectuer la coloration selon l'annexe 4 sur le lait cru.

➔ **Présenter l'examen microscopique à un examinateur.**

2.4- Compte-rendu.

Décrire le champ microscopique.

En tenant compte de l'ensemble des résultats, conclure sur la conformité du lait cru.

3- Procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne selon la norme NF 72-281. (36 points)

La norme NF 72-281 décrit une méthode destinée à déterminer l'activité désinfectante des procédés utilisés dans le cadre de la prévention et de la désinfection des surfaces dans tous les milieux industriels.

Le produit testé est destiné à être diffusé sous forme de molécules gazeuses, de microparticules solides ou de liquides (dispersats).

3.1- Activité de désinfection des surfaces par voie aérienne.

On cherche à mesurer l'activité bactéricide d'un procédé capable de réduire le nombre de bactéries appartenant à des souches de référence fixées sur un support inerte et lisse. Il s'agit d'un verre de montre de 40 mm de diamètre, de 58 mm de rayon de courbure et de 3,5 mm de hauteur.

Le protocole opératoire est schématisé dans l'annexe 6.

L'essai a été réalisé avec une souche de référence *d'Escherichia coli* CIP 54 127 contenant environ 10^9 bactéries par mL.

A 5 ml de cette suspension ont été ajoutés 5 ml d'un bouillon de revivification. Cette dilution constitue la "suspension du travail".

Deux supports stérilisés et placés dans des boîtes de Pétri vides ont été contaminés par un dépôt de 50 µL de la "suspension travail".

Après séchage des supports dans les boîtes de Pétri vides, couvercle enlevé (45 minutes à 37°C), seulement un des deux supports a été mis en contact avec le produit désinfectant à tester dans les conditions suivantes : température 37°C et durée d'action (variable selon les essais) inférieure à 12 heures.

Les supports ont été retirés des boîtes et transférés dans 100 mL de liquide de récupération.

On obtient respectivement les suspensions "A" et "B".

3.2- Matériel et réactifs.

- 12 géloses neutralisantes pour dénombrement (composition fournie en annexe 5).
- 1 tube contenant 10 mL de liquide de récupération «A» provenant du support contaminé non désinfecté et notée "suspension A".
- 1 tube contenant 10 mL de liquide de récupération «B» provenant du support contaminé, désinfecté et noté "suspension B".
- 7 tubes contenant 9 mL d'eau physiologique.
- 9 pipettes de 1 mL.

3.3- Protocole opératoire.

On considère que la désinfection est efficace lorsque la population microbienne, exposée à son action, est réduite à 0,001 %.

En tenant compte des étapes opératoires:

- Choisir les dilutions à préparer en vue du dénombrement.
- ➔ **Soumettre les valeurs retenues pour ces dilutions à un examinateur.**
- Réaliser à partir des suspensions «A» et «B» les dilutions en eau physiologique.
- ➔ **Présenter la réalisation d'une dilution à un examinateur.**
- Ensemencer en surface les 3 dilutions successives en double essai.

3.4 – Compte-rendu.

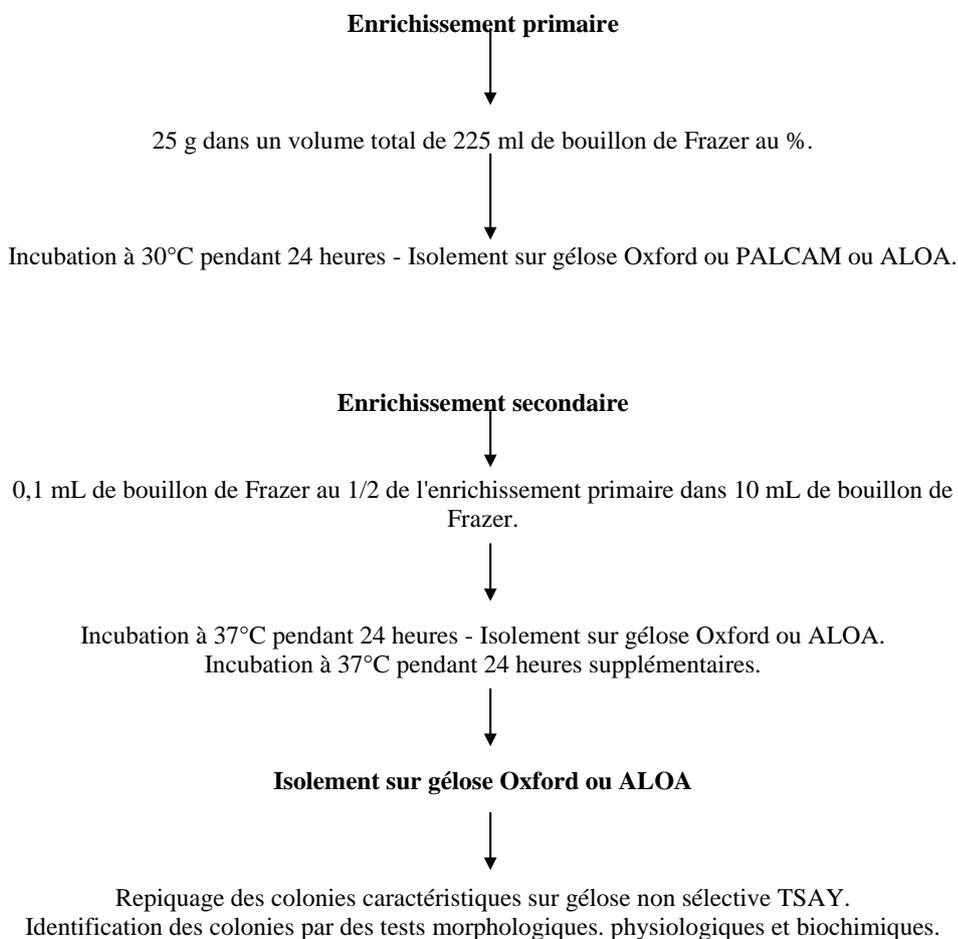
Justifier le choix des dilutions testées sur le compte-rendu.

Pourquoi utilise-t-on une gélose neutralisante dans ce cas de dénombrement?

Pour chaque manipulation, les supports «A» et «B» débarrassés de leurs dépôts sont récupérés, déposés dans une boîte de Pétri et recouverts de 18 mL de gélose pour dénombrement (voir annexe 6).

Quel est l'intérêt de ce contrôle et quels sont les résultats attendus après incubation ?

ANNEXE 1 : SCHÉMA DU MODE OPÉRATOIRE



ANNEXE 2 : MILIEUX DE CULTURE

Milieu d'enrichissement .

- **Bouillon de Frazer au ½**

Polypeptone	10g
Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodium	20g
Phosphate dissodique dihydraté	12g
Phosphate monopotassique	1,3g
Esculine	1g
Citrate de fer ammoniacal	0,5g
Chlorure de lithium	3g
Acide nalidixique	10mg
Acriflavine	12,5mg

Eau qsp 1 L

Le chlorure de sodium à une concentration assez élevée, le chlorure de lithium, l'acide nalidixique et l'acriflavine interviennent comme inhibiteurs.

Dans le bouillon de Frazer 1/1, les concentrations de chlorure de lithium, d'acide nalidixique et d'acriflavine sont doublées.

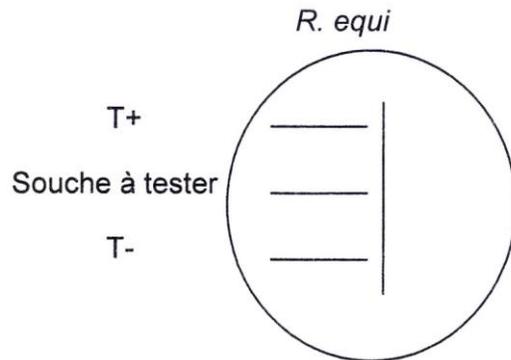
Milieu d'identification

- **Gélose Tryptone Soja Agar Extrait de levure TSAYE**

Tryptone	17g
Peptone de Soja	3g
Chlorure de sodium	5g
Extrait de levure	6g
Phosphate dissodique	2,5g
Glucose	2,5g
Agar	15g

Eau qsp 1 L

Les colonies sont petites sur gélose ordinaire, translucides, à bords réguliers, prenant une coloration bleutée en transillumination oblique.

ANNEXE 3 : CAMP test**ANNEXE 4: COLORATION À FROID DE KINYOUN**

Après fixation du frottis à l'alcool à froid:

Recouvrir la lame de Fuchsine phéniquée de Kinyoun 10 minutes

Rincer à l'eau

Plonger la lame dans le décolorant (HCl+éthanol)

Rincer à l'eau

Recouvrir de bleu de méthylène phéniqué.....5 minutes

Rincer et sécher

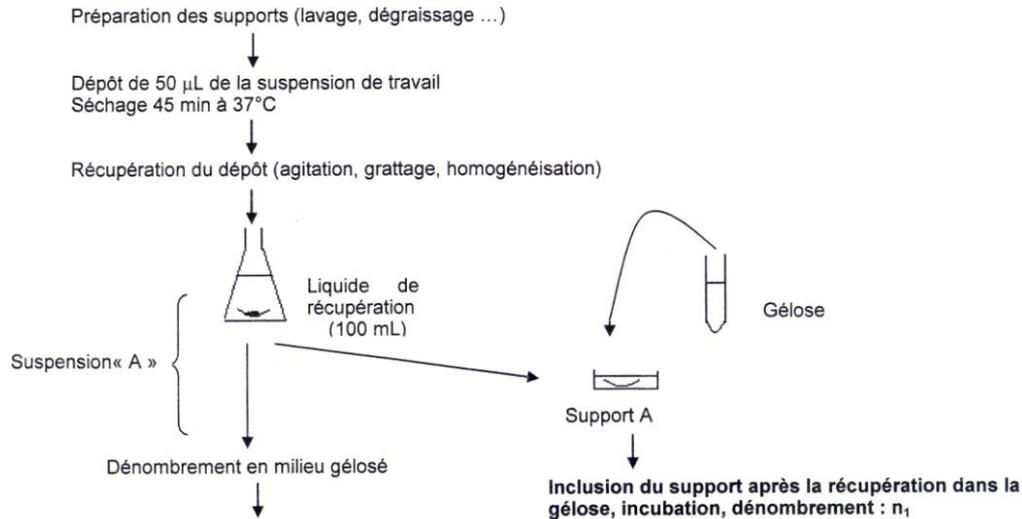
Observer au microscope à l'objectif 100 sous immersion

ANNEXE 5 : GÉLOSE NEUTRALISANTE POUR DÉNOMBREMENT

Extrait de viande de bœuf		3g
Peptone tryptique de caséine	5g	
Glucose		1g
Lécithine		1g
Polysorbate 80 (Tween 80)		7g
Agar		15g
Eau distillée qsp		1 L

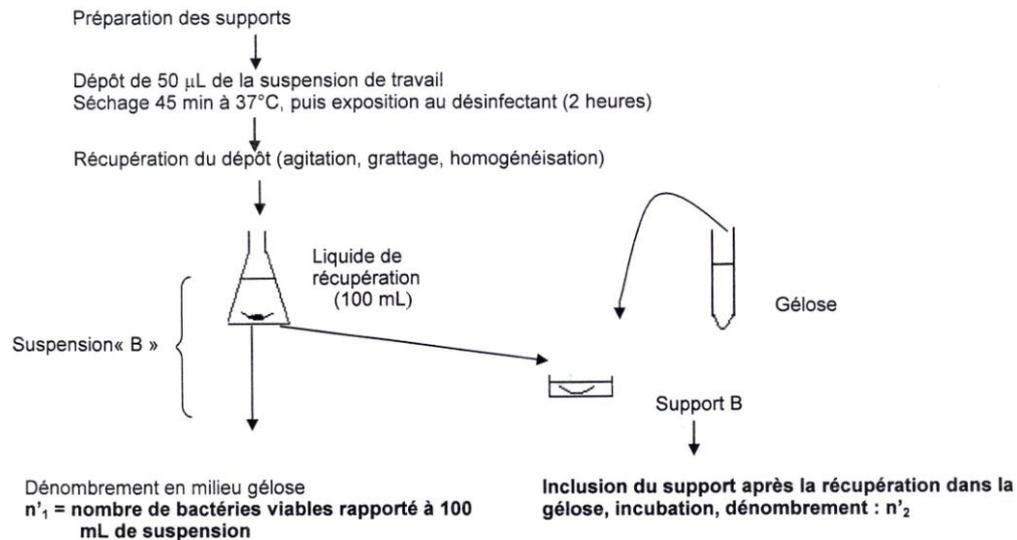
ANNEXE 6 : PROCÉDÉ DE DÉSINFECTION

Témoïn « T »



T = nombre de bactéries récupérées sur le support témoin ramené à 100 mL de suspension

Essai



n'_1 = nombre de bactéries viables rapporté à 100 mL de suspension

2^{ème} JOUR : Durée 1 heure 30

1- Recherche et identification de *Listeria monocytogenes* dans un lait maternisé. (34 points)

La réglementation européenne du 15 novembre 2005 impose l'absence de *Listeria monocytogenes* dans 25 g de produit destiné à l'alimentation des nourrissons.

Effectuer la lecture des milieux ensemencés.

Rappel: le test de CAMP est considéré comme positif si la zone d'hémolyse est augmentée et apparaît en forme de "pelle", comme dans la zone de proximité entre *Rhodococcus equi* et la souche positive "T +".

Exploiter les informations de l'**annexe 1**. Conclure.

Exploiter la galerie "Api *Listeria*".

- Conclure sur l'identité de la souche.
- Conclure sur la conformité du produit.

2- Procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne. (36 points)

2.1- Expression des résultats.

Dénombrer les colonies obtenues sur les différentes boîtes ensemencées.

Rechercher pour la souche de référence et pour la suspension B, le taux de réduction exprimé en logarithme décimal.

Pour obtenir cette valeur on effectue le calcul suivant:

$$\text{Taux de réduction} \quad d = \log T - \log \left(\frac{n'_1 + n'_2}{T} \right)$$

$$d = \log \left(\frac{T}{n'_1 + n'_2} \right)$$

Donnée: $n'_2 = 3$

T = nombre de bactéries récupérées sur le support non désinfecté (suspension "A").

n'_1 = nombre de bactéries retrouvées viables rapporté à 100 mL (suspension "B").

n'_2 = nombre de colonies retrouvées sur le support "B", incorporé dans la gélose.

n_1 = nombre de colonies retrouvées sur le support "A", incorporé dans la gélose (valeur significative mais non utilisée dans le calcul du taux de réduction).

2.2- Compte-rendu.

Récapituler les résultats des dénombrements dans un tableau.

Déterminer l'activité bactéricide du désinfectant utilisé en calculant le taux de réduction.

Conclure, sachant que pour répondre à la norme NF T 72-281, le taux de réduction "d" minimum exigé pour une activité bactéricide doit être supérieur ou égal à 5, soit 0,001 %.

ANNEXE 1

Espèce	Hémolyse	Camp test <i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	+	+
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	+	+
<i>L. seeligeri</i>	+	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-

ANNEXE 2 : FORMULE NORMALISÉE AFNOR

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

- N : nombre d'UFC par mL
- $\sum C$: somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues
- n_1 : nombre des boîtes retenues à la première dilution
- n_2 : nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution
- d : taux de dilution de la première dilution
- v : volume d'inoculum

E5-U52 : TP TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 2007**SUJET 3****Coefficient : 4****ÉTUDE DE L'UTILISATION DE CONSERVATEURS CHIMIQUES
INHIBITEURS DE MICROORGANISMES DANS L'INDUSTRIE
AGROALIMENTAIRE****1^{ER} JOUR : Durée 3 heures 30**

Le risque sanitaire est une préoccupation constante des industries agroalimentaires :

- Les industriels doivent procéder à un contrôle microbiologique pour s'assurer de la conformité de leur production vis-à-vis de la présence de bactéries, d'organismes fongiques ou de toxines.
- Ils doivent s'assurer de la stérilité du matériel, des locaux et des matières premières.
- Ils peuvent incorporer dans le produit des conservateurs ayant des propriétés inhibitrices pour limiter la croissance des microorganismes.

1- Détermination de la concentration efficace d'un inhibiteur chimique, le sulfite. (60 points)

Le sulfitage est l'addition d'anhydride sulfureux (SO₂) Il est pratiqué dans les moûts de fermentation alcoolique.

L'anhydride sulfureux est une substance bactéricide qui ne tue pas les levures permettant la fermentation. On se propose de déterminer les concentrations minimales inhibitrices de "anhydride sulfureux afin d'éviter la prolifération d'une souche bactérienne de «P» sans affecter la croissance d'une levure «S» (*Saccharomyces*) .

1.1- Contrôles préalables sur la souche de levure. (37 points)**1.1.1- Matériel et réactifs.**

Au poste de travail :

- 1 tube de culture de *Saccharomyces* "S1" en bouillon Sabouraud, conservé dans la glace.
- 1 tube à hémolyse avec 0,5 mL de bleu de Funk (BF).
- 2 tubes contenant 10 mL de bouillon Sabouraud stérile (conservés à 0°C).
- 5 tubes contenant 9 mL d'eau physiologique stérile.
- 2 tubes stériles vides.
- 1 pipette de 10 mL stérile + une propipette adaptée.
- 9 pipettes de 1 mL stérile + une propipette adaptée.
- 1 cellule de Malassez + 1 lamelle hématimétrique.
- 1 compteur de cellules.
- 6 géloses Sabouraud coulées dans 6 grandes boîtes de Pétri.
- 3 étaleurs stériles (ou un flacon de billes de verre stériles).

Dans la salle :

- Vortex (1 pour 2 postes).
- 1 bac de décontamination pour cellules de Malassez.

1.1.2- Protocole opératoire - Compte-rendu.**1.1.2.1- Numération de la suspension de levure:**

Diluer au 1/2 de la suspension "S1" dans le bleu de Funk (BF).

Procéder au comptage des cellules mortes et vivantes grâce à la cellule de Malassez.

→ **Présenter un champ microscopique à un examinateur.**

Données:

La cellule de Malassez est divisée en 10 bandes de 10 rectangles. Le volume total est de 1 μ L. Quand une levure bourgeonne, le bourgeon est compté si sa taille (diamètre) est égale à la moitié au moins de celle de la cellule-mère.

Calculer la concentration cellulaire de "S1".

Reporter le volume obtenu en **annexe**.

1.1.2.2- Vérification de la viabilité par dénombrement:

Le nombre de levures est vérifié par étalement de 0,1 mL de suspensions diluées sur des géloses Sabouraud.

En fonction de la numération effectuée dans la cellule de Malassez, réaliser les dilutions décimales de "S1" en eau physiologique stérile.

→ **Montrer la réalisation d'une dilution à un examinateur.**

Ensemencer en double essai les 3 dilutions décimales choisies.

Incuber à 30°C pendant 48 heures.

Justifier le choix des dilutions effectuées et le choix des suspensions ensemencées.

1.1.2.3- Préparation de la suspension inoculum de levure:

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) exige une suspension cellules de densité voisine de 1.10^5 cellules/mL.

En fonction du résultat du comptage sur cellule de Malassez, calculer la dilution approximative de "S1" nécessaire pour obtenir cette densité.

Réaliser la dilution dans du bouillon Sabouraud froid.

→ **Présenter la dilution à un examinateur.**

On obtient la suspension "S2" que l'on conserve dans la glace.

1.2- Réalisation de la suspension bactérienne. (8 points)**1.2.1- Matériel et réactifs.**

Au poste de travail :

- 1 tube contenant culture de "P1" en bouillon trypticase-soja (conservé dans la glace).
- 3 cuves spectrophotométriques de 1 cm + 4 carrés de Parafilm.
- 1 tube contenant 5 ml de bouillon trypticase-soja.
- 4 tubes contenant 9 ml de bouillon trypticase-soja (conservé dans la glace).
- 4 pipettes de 1 ml stérile.

Dans la salle:

- 1 spectrophotomètre.

1.2.2- Protocole opératoire.**1.2.2.1- Mesure opacimétrique :**

Mesurer la densité optique (DO) à 640 nm contre un témoin adapté.

→ **Réaliser une mesure devant un examinateur.**

Réaliser une dilution (si nécessaire) pour avoir une densité optique comprise entre 0,100 et 0,600.

On obtient la suspension "P2", placée dans la glace.

Estimer la densité de la suspension "P2" sachant qu'une unité de DO correspond à 4.10^8 UFC/mL.

1.2.2.2- Préparation de l'inoculum :

A partir de la suspension "P2», préparer au moins 5 ml de suspension "P3" de densité voisine de $1,5.10^3$ UFC/mL.

Conserver "P3" dans la glace.

1.2.2.3- Compte-rendu :

Justifier votre démarche pour la préparation de "P3".

1.3- Détermination des CMI en microplaque. (15 points)

1.3.1- Matériel.

- 1 microplaque à fond rond + 1 couvercle (ou un film autocollant).
- 1 tube contenant 2 ml de solution d'anhydride sulfureux à 10 % (100 g/L de SO₂)
- 1 pipette automatique P₁₀₀.
- 1 tube contenant 5 ml de bouillon Sabouraud stérile.
- 1 tube contenant 5 ml de bouillon trypticase-soja stérile.
- 10 cônes stériles (dans une boîte de Pétri).
- la suspension "S2" préparée en 1.1.2.3.
- la suspension "P3» de densité voisine de $1,5.10^5$ UFC/mL.

1.3.2- Protocole opératoire: utilisation de la microplaque.

- Sur une première ligne, réaliser une gamme de concentrations en SO₂ comprise entre 100 g/L et 0,78 g/L (puits 1 à 8), par une suite de dilutions de raison 1/2 de la solution-mère de sulfite. Les dilutions sont faites en bouillon Sabouraud, sous un volume final de 100 µL. Le puits n° 10 sert à la réalisation d'un témoin positif de culture, le puits n° 12 sert à la réalisation d'un témoin de stérilité du bouillon.

- Sur une deuxième ligne, réaliser une gamme de concentrations en SO₂ comprise entre 100 g/L et 0,78 g/L (puits 1 à 8), par une suite de dilutions de raison 1/2 de la solution-mère de sulfite. Les dilutions sont faites en bouillon trypticase-soja, sous un volume final de 100 µL. Le puits n° 10 sert à la réalisation d'un témoin positif de culture, le puits n° 12 sert à la réalisation d'un témoin de stérilité.

- Répartir 100 µL de suspension "S2» de saccharomyces dans les puits 1 à 8 et 10 de la première ligne.

- Répartir 100 µL de suspension "P3" dans les puits 1 à 8 et 10 de la deuxième ligne.

- Placer le couvercle (ou le film autocollant) sur la microplaque et incubé 48 heures à 30°C.

1.3.3- Compte-rendu.

Compléter le tableau en **annexe**.

2- Identification de la souche bactérienne P. (20 points)

La souche bactérienne “P” a été isolée sur gélose nutritive inclinée à partir du liquide de rinçage d'une cuve de fermentation. On procède à son identification.

2.1- Protocole opératoire et compte-rendu.

Réaliser les examens macroscopique, microscopique et enzymatique.

➔ Appeler un examinateur pour les examens microscopique et enzymatique.

Proposer par écrit (à rendre une heure avant la fin de la séance) une galerie pour identifier la souche.

Ensemencer la galerie distribuée.

2.2- Compte-rendu.

Décrire l'aspect macroscopique et microscopique de la souche “P”.

Justifier l'orientation.

Récapituler les résultats de l'orientation en annexe.

ANNEXE :

Numération de la suspension de levure “S1”

PREPARATION DE LA MICROPLAQUE

Tableau des dilutions

(A compléter et à rendre avec la copie)

N° des puits	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12
Solution de sulfite 100g/L (µL)										
Reprise (µL)										
Bouillon Sabouraud ou Trypticase-soja (µL)										
Dilution										
Concentration en SO ₂ (g/L)										
Inoculum “S2” ou “P3” (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Dilution finale										
Concentration finale SO ₂ (g/L)										

Identification de la souche “P”

Récapitulatif des résultats d'orientation

N° des puits	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12
Saccharomyces										
Pseudomonas										

Identification de la souche “P” : récapitulatif des résultats d'orientation

2^{ème} JOUR : Durée 1 heures 30**1 - Détermination de la concentration efficace d'un inhibiteur chimique, le sulfite. (60 points)****1.1 - Vérification de la viabilité par dénombrement.**

Procéder au dénombrement des colonies sur les géloses Sabouraud.

Présenter les résultats sous forme d'un tableau.

Calculer le nombre d'UFC/mL dans la suspension "S1" en se référant à l'annexe.

Comparer le résultat à celui obtenu par utilisation de la cellule de Malassez.

Conclure.

1.2 - Détermination des CMI du sulfite en microplaque.

Lire la microplaque.

Présenter les résultats obtenus sous forme d'un tableau.

Déterminer les concentrations minimales inhibitrices du sulfite (SO₂) vis-à-vis de la souche de *Saccharomyces* et de la souche bactérienne.

Indiquer si le sulfite est utilisable pour inhiber la prolifération de la souche bactérienne dans un produit où doit se multiplier *Saccharomyces*?

En cas de réponse positive, quelle concentration de sulfite doit-on incorporer?

2 - Identification de la souche bactérienne "P". (20 points)

Lecture et identification:

Lire les milieux ensemencés le premier jour et réaliser les tests complémentaires nécessaires (la fiche technique API est disponible).

Rendre compte des observations.

En utilisant les résultats des deux jours, identifier la souche "P". Justifier.

ANNEXE 1 : FORMULE NORMALISÉE AFNOR

$$N = \frac{\sum C}{v (n_1 + 0,1 \times n_2) d}$$

- **N** : nombre d'UFC par mL,
- **∑C** : somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.
- **n₁** : nombre des boîtes retenues à la première dilution,
- **n₂** : nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution,
- **d** : taux de dilution de la première dilution.
- **v** : volume de l'inoculum.

E5-U52 : TP TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 2007

SUJET 4

Coefficient : 4

CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE D'UN LAIT COSMÉTIQUE**1^{ER} JOUR : 3 heures**

La contamination par des microorganismes d'un produit cosmétique peut avoir des conséquences néfastes sur l'écologie cutanée du consommateur, notamment sur une peau lésée ou chez des individus affaiblis.

Afin de limiter la prolifération microbienne, des conservateurs entrent dans la formulation de la majorité des produits cosmétiques.

Le contrôle microbiologique d'un produit cosmétique inclut:

- l'estimation de la qualité d'hygiène générale par dénombrement de la flore aérobie viable totale, après neutralisation des conservateurs,
- la validation du dénombrement par vérification de l'efficacité du neutralisant,
- la recherche de microorganismes spécifiés, dont la présence n'est pas acceptable du fait de leur pouvoir pathogène.

Ces analyses seront menées sur un échantillon de lait pour le corps prélevé en fin de chaîne de fabrication, avant conditionnement.

1- Préparation de l'échantillon. (4 points)**1.1- Matériel et réactifs.**

- 1 flacon contenant environ 20 g de lait cosmétique à analyser, noté "**lait cosmétique**".
- 1 flacon contenant 90 mL de neutralisant, noté "**N**".
- 1 flacon contenant des billes de verre stériles.

1.2- Mode opératoire.

Peser, directement dans le flacon de neutralisant, 10 g de lait cosmétique à analyser.

Ajouter une vingtaine de billes stériles et homogénéiser soigneusement.

La suspension obtenue sera appelée suspension mère (SM) pour la suite de l'analyse.

➔ **Réaliser cette manipulation sous poste de sécurité microbiologique ou hotte à flux laminaire, sous le contrôle d'un examinateur.**

2- Dénombrement de la flore aérobie viable totale et validation. (47 points)**2.1- Dénombrement de la flore aérobie viable totale.****2.1.1- Matériel et réactifs.**

- 3 tubes contenant 9 mL de neutralisant, notés "**N**".
- 5 pipettes graduées stériles de 1 mL ou pipettes paille.
- 8 boîtes de Pétri stériles.
- 1 flacon contenant 160 mL de gélose TSA pour dénombrement, en surfusion à 46°C.

2.1.2- Mode opératoire.

À partir de SM, réaliser 3 dilutions successives de raison 1/10 dans du neutralisant.

➔ **Effectuer une dilution en présence d'un examinateur.**

Réaliser, en double exemplaire, un ensemencement dans la masse avec double couche, de chacune des dilutions ainsi que de la suspension mère.
Incuber les milieux pendant 48 heures à 30°C.

2.2- Validation de la neutralisation des conservateurs.

La validation du dénombrement de la flore aérobie viable totale se fait par vérification de l'efficacité du neutralisant utilisé pour inhiber l'activité des conservateurs.

Cette validation nécessite donc l'utilisation d'une souche sensible aux conservateurs, par exemple *Micrococcus luteus*.

2.2.1- Matériel et réactifs.

- Une culture de *Micrococcus luteus* en bouillon Trypto-Caséine Soja (TCS), notée "*M.luteus*".
- 1 spectrophotomètre réglé à 620 nm.
- 2 microcuves.
- Parafilm.
- 1 tube contenant 5 mL de bouillon TCS stérile, notés "TCS".
- 1 flacon contenant 50 mL d'eau physiologique stérile, noté "eau physiologique".
- 6 tubes à essai stériles.
- 2 pipettes graduées stériles de 10 mL.
- 2 pipettes graduées stériles de 5 mL.
- Pipettes graduées stériles de 1 ml ou pipettes paille.
- 1 tube contenant 7 mL de neutralisant, noté "T".
- 8 gélules pour dénombrement coulées en boîte de Pétri.
- Système d'étalement.

2.2.2- Préparation d'une suspension ajustée de *Micrococcus luteus*.

Estimer, par mesure spectrophotométrique à 620 nm, la densité de la population bactérienne de la suspension de *M.luteus* fournie.

➔ Une mesure au spectrophotomètre sera réalisée devant un examinateur.

D'après la relation et la limite de linéarité données en début d'épreuve, préparer environ 10 mL d'une suspension de *M.luteus* contenant entre $4,0 \cdot 10^3$ et $5,0 \cdot 10^3$ UFC/mL. Les dilutions nécessaires seront réalisées en eau physiologique stérile.

2.2.3- Vérification de l'efficacité du neutralisant.

Reprendre les dilutions réalisées au 2.1.2 et les ajuster à 7 mL si besoin.

Ajouter, à chacun des tubes suivants: dilutions utilisées pour le dénombrement tube, "T", 1 mL de la suspension ajustée de *M.luteus*.

Réaliser à partir de chaque tube contaminé, un ensemencement en surface sur gélose pour dénombrement, en double essai.

Incuber les milieux pendant 48 heures à 30°C.

2.2.4- Compte-rendu.

Présenter, en justifiant, la démarche utilisée pour la préparation de la suspension ajustée de *M.luteus*.

Évaluer la concentration bactérienne de *M.luteus* dans les tubes préparés en 2.2.3.

Calculer le nombre de colonies attendu sur les boîtes témoin.

3- Recherche de microorganismes spécifiques. (29 points)

Un enrichissement du lait cosmétique a été réalisé pendant 24 heures en bouillon TCS puis des isolations ont été effectuées sur milieux sélectifs.

Seule la gélose à la cétrimide, incubée à 41°C pendant 24 heures, présente des colonies.

3.1 – Matériel et réactifs.

- Isolement sur gélose cétrimide, noté “C”.
- 1 tube à hémolyse stérile.
- 1 tube d'eau physiologique stérile.
- Colorants de Gram.
- 1 disque «oxydase» et solution de peroxyde d'hydrogène.

3.2 – Mode opératoire et compte-rendu.

Procéder à la lecture de l'isolement “C” et orienter l'identification.

Vérifier cette orientation par un examen microscopique et la réalisation d'un test enzymatique.

➔ **Présenter à un examinateur l'observation microscopique accompagnée du compte-rendu correspondant.**

➔ **Réaliser le test enzymatique en présence d'un examinateur.**

Proposer l'ensemencement d'une galerie permettant l'identification de la souche.

Préciser la température choisie pour l'incubation.

➔ **La proposition de la galerie doit être présentée à un examinateur au moins 1 h30 avant la fin de l'épreuve.**

Ensemencer la galerie distribuée.

2^{ème} JOUR : 1 heure 30
1 – Préparation de l'échantillon du lait pour le corps. (4 points)

Réalisée le premier jour

2 – Dénombrement de la flore aérobie viable totale et validation. (47 points)**2.1 – Dénombrement de la flore aérobie viable totale.**

Rassembler, sous forme d'un tableau, les résultats du dénombrement.

Déterminer la concentration de la flore aérobie viable totale dans le lait cosmétique, en utilisant la formule normalisée AFNOR.

Selon la CTFA (*Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association*), l'interprétation du résultat du dénombrement de la flore aérobie viable totale (N) d'un produit cosmétique non sensible (catégorie 1) se fait selon les critères suivants:

- si N est strictement inférieur à 10^2 UFC/g alors le produit est dit satisfaisant,
- si N est compris entre 10^2 UFC/g et 10^3 UFC/g alors le produit est dit acceptable,
- si N est supérieur ou égal à 10^3 UFC/g alors le produit est dit non satisfaisant.

Conclure.

2.2 – Validation de la neutralisation des conservateurs.

Les colonies de *Micrococcus luteus* apparaissent pigmentées jaune citron.

Hormis la propriété de cette souche d'être sensible aux conservateurs, quel est l'autre intérêt justifiant son utilisation pour la validation de la neutralisation des conservateurs ?

Justifier la nécessité de réaliser les dénombrements en surface.

Sur chacune des boîtes, observer et compter le ou les types de colonies présentes. Regrouper les résultats sous forme d'un tableau.

Conclure, sachant que pour pouvoir valider la neutralisation des conservateurs, le nombre de colonies de *M.luteus* présentes sur les différents essais exploitables doit être supérieur ou égal à 80 % du nombre moyen de colonies présentes sur les témoins.

Conclure sur la validité du dénombrement de la flore aérobie viable totale.

3- Recherche de microorganismes spécifiés. (29 points)

Vérifier la pureté de la souche.

Procéder, à l'aide de la fiche technique fournie, à la lecture de la microgalerie et identifier la souche en utilisant le logiciel fourni.

Conclure sur la qualité d'hygiène générale et la qualité sanitaire du lit cosmétique analysé.

ANNEXE 1 : FORMULE NORMALISÉE AFNOR

$$N = \frac{\sum C}{v (n_1 + 0,1 \times n_2) d}$$

- **N** : nombre d'UFC par mL,
- **∑C** : somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.
- **n₁** : nombre des boîtes retenues à la première dilution,
- **n₂** : nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution,
- **d** : taux de dilution de la première dilution.
- **v** : volume de l'inoculum.

E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2007	SUJET 1
Durée : 3 heures	Coefficient : 2

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ APOPTOTIQUE D'UN MÉDICAMENT (40 points)

L'apoptose ou mort cellulaire programmée se caractérise par différents phénomènes : modifications morphologiques cellulaires, fragmentation du matériel génétique, production d'enzymes particuliers (caspases)...

Des médicaments stimulant l'apoptose peuvent être utilisés dans le traitement de certains cancers.

On se propose d'évaluer l'activité apoptotique d'un médicament, sur une lignée cellulaire cultivée en microplaques, par une approche cellulaire puis moléculaire.

Parallèlement un témoin est réalisé (culture des cellules en l'absence du médicament).

1- Mise en évidence des modifications cellulaires liées à l'apoptose (22 points)

1.1- Principe.

On détermine la viabilité cellulaire en présence du Bleu de méthylène de Funk après trypsination des cellules (première rangée de la microplaque) puis on réalise la coloration des cellules fixées sur une lamelle (seconde rangée de la microplaque) afin de mettre en évidence les modifications morphologiques.

1.2- Matériel et réactifs.

- Microplaque (de 6 puits) avec culture de cellules adhérentes.
- Pipettes graduées stériles (2 mL, 5 mL).
- Système d'aspiration.
- Pipette automatique (P200) + cônes.
- Tubes à hémolyse
- Hématimètre de Malassez (**Annexe**).
- Lamelle planée.
- Bain thermostaté à 37° C.
- Milieu RPMI complet (10 mL).
- Solution de trypsine EDTA (0,5 mL).
- Bleu de Funk à 0,1 % en tampon PBS (0,5 mL).
- Méthanol (10 mL)
- Eau neutre (50 mL).
- Giemsa R (3 mL).
- Éprouvette graduée de 20 mL.
- Boîtes pour décontaminer le matériel de numération.
- Compte-gouttes à usage unique.
- Lames microscopiques.
- Pincettes fines.
- Microscope.

1.3- Protocole opératoire (en salle).

Seules les cupules 1 et 2 des rangées A et B sont utilisées.

Pour la rangée A, dans la première cupule de la microplaque, les cellules ont été cultivées en l'absence du médicament (cupule témoin) ; la seconde cupule de cette rangée correspond aux cellules qui ont été mises en contact avec le médicament (cupule essai).

Pour la rangée B les cellules ont été cultivées sur une lamelle de verre en vue de leur coloration ; la première cupule de cette rangée correspond au témoin ; la seconde cupule correspond aux cellules mises en contact avec le médicament.

1.3.1- Trypsination des cellules et détermination des viabilités cellulaires.

Cette étape est effectuée sur les cupules 1 et 2 de la rangée A :

Aspirer le milieu et l'éliminer dans un bac à déchet.

Ajouter 0,2 mL de trypsine et placer la microplaque quelques minutes à 37° C

Ajouter du milieu RPMI (qsp volume final de 3 mL).

Transférer la totalité de la suspension dans un tube à hémolyse.

Réaliser, en tube à hémolyse, un mélange volume à volume de la suspension cellulaire bien homogénéisée avec la solution de Bleu de Funk.

Effectuer le remplissage de l'hématimètre devant un examinateur pour une des suspensions.

Compter les cellules après un délai de 5 minutes maximum.

Présenter un champ microscopique à un examinateur et la numération de la première ligne pour la viabilité des cellules de la cupule 2.

1.3.2- Coloration des cellules adhérentes (cupules 1 et 2 de la rangée B).

Pour cette coloration utiliser des compte-gouttes à usage unique :

- Aspirer le milieu de culture.
- Recouvrir de méthanol et laisser agir 3 minutes.
- Préparer extemporanément le Giemsa dilué.
- 1,5 mL de Giemsa dans 20 mL d'eau neutre.
- Enlever le méthanol et recouvrir par la solution de Giemsa dilué

Laisser agir 10 minutes.

Éliminer le colorant et rincer deux fois avec l'eau neutre.

Ne pas laisser sécher la lamelle.

À l'aide d'une pince fine, prélever les lamelles et les retourner sur une lame de microscope (les cellules doivent se situer entre lame et lamelle).

Luter avec du vernis à ongle : « coller » la lamelle sur la lame en passant le vernis en périphérie de la lamelle.

Observer les cellules au microscope à l'objectif X 100.

1.4- Compte-rendu.

Déterminer le nombre de cellules viables par mL et le taux de viabilité pour la cupule témoin et la cupule essai. Calculer le nombre de cellules viables /cm² dans la cupule témoin.

Donnée : surface cupule = 9,6 cm².

Schématiser l'aspect des cellules colorées de la cupule 1 après observation au grossissement x 100. Préciser les modifications morphologiques observables pour les cellules colorées de la cupule 2

2- Mise en évidence des modifications moléculaires liées à l'apoptose (16 points)

Afin de mettre en évidence les altérations du matériel génétique, on extrait l'ADN des cellules. Celles-ci sont lysées à l'aide d'une solution contenant du laurylsarcosinate de sodium, de la protéinase K et de l'EDTA

Le lysat est ensuite traité par la RNase A puis l'ADN est extrait de ce lysat.

2.1- Principe.

Deux extraits d'ADN sont fournis : l'extrait E₁ provient des cellules de la cupule témoin ; l'extrait E₂ est issu des cellules de la cupule essai.

L'extrait E₁ est analysé par spectrophotométrie UV ; une électrophorèse en gel d'agarose permet l'analyse des extraits E₁ et E₂.

2.2- Matériel et réactifs.

- Microcuves UV
- Eau bidistillée, ultrafiltrée, stérile (2 mL).
- **Extrait ADN E₁** (70 µL).
- **Extrait ADN E₂** (10 µL).
- Tampon de charge (10 µL).
- Microtubes.
- Parafilms.
- Pipettes automatiques P20, P200, P1000
- Gel agarose 1% en tampon TBE 0,5 X.
- Tampon TBE 0,5 X
- Cuve à électrophorèse + générateur.
- Révélateur ADN (BET).
- Centrifugeuses pour microtubes.
- Spectrophotomètre UV/visible.

2.3- Protocole.

2.3.1- Dosage de l'ADN présent dans l'extrait témoin « E₁ » et estimation de la pureté.

Préparer dans une microcuve, 400 µL d'une dilution au 1/8 de l'extrait E₁.

Mesurer l'absorbance à 260 nm et à 280 nm contre de l'eau bidistillée stérile.

Effectuer la dilution et la mesure d'une absorbance en présence d'un examinateur.

2.3.2- Electrophorèse de l'ADN.

- Préparation des échantillons en microtubes.

Échantillon E₁ : 3 µL d'extrait E₁ + 7 µL d'eau stérile + 2 µL de tampon de charge.

Échantillon E₂ : 3 µL d'extrait E₂ + 7 µL d'eau stérile + 2 µL de tampon de charge.

Centrifuger les tubes.

- Dépôt des échantillons.

Déposer 10 µL de chaque échantillon dans les puits du gel d'agarose.

Un dépôt sera réalisé devant un examinateur.

- Migration de l'ADN (effectuée par les examinateurs).

La migration sera réalisée pendant 1 heure 15 sous une tension de 80 volts.

- Révélation des gels (effectuée par les examinateurs).

Plonger les gels dans du BET pendant 15 minutes puis les rincer dans de l'eau distillée.

- Observation des gels.

Placer le gel sous un éclairage UV et observer.

2.4- Compte-rendu.

Présenter le tableau de résultats.

Déterminer la concentration en ADN de l'extrait E₁ (µg.mL⁻¹).

Estimer la pureté de l'extrait E₁ et conclure.

Données :

- **1 unité d'absorbance correspond à 50 µg.mL⁻¹ pour un ADN bicaténaire.**

• **Rapport A260 / A280 compris entre 1,8 et 2 : pureté convenable CV = 5 %.**

Élaborer un schéma de l'électrophorégramme et le légender.

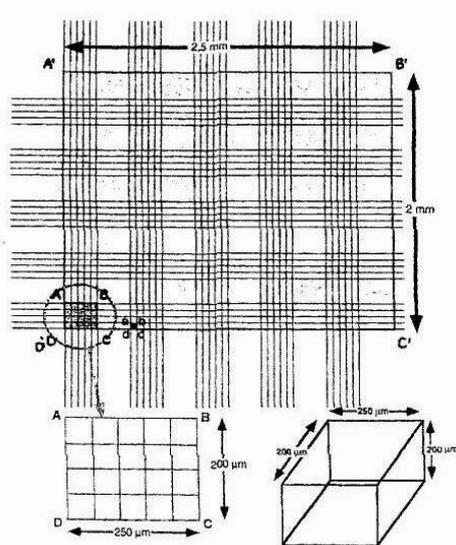
Analyser les résultats obtenus et conclure.

3- Conclusion générale (2 points)

Présenter, sous forme d'un tableau récapitulatif, tous les résultats obtenus permettant de conclure à un effet apoptotique du médicament sur les cellules utilisées.

(Mettre en évidence les liens entre ces résultats expérimentaux en les justifiant).

Annexe : SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ :



E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2007	SUJET 2
Durée : 3 heures	Coefficient : 2

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

Le sérum de veau foetal (SVF) est utilisé couramment comme complément aux milieux de cultures cellulaires. Le SVF présente certains risques liés à la présence d'agents pathogènes non conventionnels, de bactéries, d'endotoxines ou de virus. Les laboratoires commercialisant ce produit effectuent donc un ensemble de contrôles sur chacun des échantillons de sérums avant de les mélanger et de produire un lot. Seuls les sérums conformes peuvent entrer dans la fabrication d'un lot fini.

L'objet des manipulations est :

- de vérifier l'absence ou la présence du virus IBR (Rhinotrachéite Infectieuse Bovine) de manière indirecte par la recherche d'AC dans le sérum par une technique immunoenzymatique,
- d'estimer la viabilité d'une culture dont le milieu de culture contient du SVF issu d'un lot conforme.

1- Contrôle de l'absence de contamination virale par dosage immunoenzymatique (25 points)

1.1- Principe.

Deux échantillons de sérum brut E1 et E2 sont testés pour détecter d'éventuels anticorps dirigés contre la protéine « gB » du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) par une technique ELISA.

1.2- Matériel et réactifs.

- Barrette sensibilisée.
- 8 tubes à hémolyse + bouchons + portoir.
- Papier absorbant.
- Pipettes automatiques P200 et P100 ou P50 + cônes.
- Film autocollant.
- Agitateur de microplaques.
- Étuve à 37° C.
- Lecteur de microplaques.
- 1 flacon contenant 30 mL de PBS - tween étiqueté « **PBS-Tween** ».
- 1 tube hémolyse contenant 2 mL de tampon de dilution étiqueté « **Tampon dilution** ».
- 1 tube hémolyse contenant 1 mL de solution étalon d'anticorps anti - gB étiqueté « **Solution étalon** » à 300 U.mL⁻¹.
- 1 tube hémolyse contenant 1 mL anticorps anti-gB couplé à la phosphatase alcaline étiqueté « **Conjugué** ».
- 1 tube Eppendorf contenant 200 µL de sérum étiqueté « **Contrôle négatif** ».
- Tubes Eppendorf contenant 200 µL d'échantillon E1 et d'échantillon E2 à analyser pour la présence éventuelle d'anticorps anti - IBR, étiquetés « **E1** » et « **E2** ».
- 1 tube hémolyse contenant 2 mL de substrat, solution de paranitrophénylphosphate (P.N.P.P.) à 1mg/mL étiqueté « **Substrat** ».
- 1 tube hémolyse contenant 1 mL de solution de NaOH à 1 mol/L étiqueté « **NaOH** ».
- Bac de désinfectant.
- Gants.

Les sérums sont à manipuler avec les précautions relatives aux produits à risque biologique.

1.3- Protocole opératoire.

Sensibilisation des colonnes 1 et 2 de la barrette (déjà réalisée) :

Distribuer 100 µL de solution de lysat d'IBR dans les cupules de A1 à H1 et de A2 à H2.

Incuber 2 heures à 37° C.

Laver avec du PBS-Tween.

Saturation des colonnes 1 et 2 de la barrette avec la Sérumalbumine bovine (SAB) (déjà réalisée) :

Déposer 200 µL de « PBS - gélatine » dans chaque cupule.

Incuber 30 minutes à 37° C.

Préparation de la gamme étalon d'anticorps anti - qB en tubes à hémolyse :

À partir de la solution étalon d'anticorps anti - gB à 300 U.mL⁻¹, préparer une gamme de 9 solutions étalons dans le tampon de dilution selon une progression géométrique de raison 1/2, sous un volume final de 200 µL (la première solution étalon sera non diluée).

Réaction immunologique.

La cupule H2 est une cupule de secours en cas d'erreur.

Effectuer trois lavages successifs de la double barrette avec 200 µL de PBS-Tween dans chaque cupule.

Distribuer ensuite :

50 µL de chacune des solutions étalons, respectivement dans les cupules B1 à H1 et B2 et C2,

50 µL de « tampon de dilution » dans la cupule A1,

50 µL du sérum « **contrôle négatif** » dans la cupule A2,

50 µL de l'échantillon « **E1** » à analyser dans les cupules D2 et E2,

50 µL de l'échantillon « **E2** » à analyser dans les cupules F2 et G2.

Ajouter aussitôt 50 µL de « conjugué » dans chacune des cupules, sauf dans la cupule A1.

Ajouter dans la cupule A1 50 µL de « tampon de dilution ».

Recouvrir la barrette d'un film autocollant.

Agiter 5 minutes à température ambiante.

Incuber 25 minutes à 37° C.

Procéder à trois lavages successifs des cupules par le PBS-Tween, comme précédemment.

Révélation de l'activité enzymatique liée.

Ajouter 100 µL de solution de substrat dans toutes les cupules.

Incuber 30 minutes à 37° C.

Arrêter la réaction enzymatique par addition de 50 µL de solution de NaOH à 1 mol.L⁻¹.

Lire les absorbances contre la cupule A1 à 405 nm.

1.4- Compte-rendu.

Donner les caractéristiques de la technique utilisée.

Présenter, dans un tableau, la réalisation des dilutions du sérum étalon (réactifs - volumes).

Préciser la composition et le rôle de la cupule A2.

Calculer pour chaque cupule le pourcentage "d'inhibition" comme suit :

$$I\% = \frac{A_{\text{cupule}}}{A_{\text{contrôle négatif}}} \times 100$$

Regrouper les résultats dans le tableau fourni en **annexe 1**.

A l'aide de l'outil informatique, représenter graphiquement la fonction :

Pourcentage d'inhibition = $f \log(\text{titre en anticorps : } T_{AC} \text{ en U.mL}^{-1})$.

À l'aide de l'**annexe 1**, conclure sur la conformité de chaque échantillon. Compléter la feuille de suivi jointe.

Donner pour le(s) lot(s) non-conforme(s) le titre en anticorps du sérum : T_{AC} en U.mL^{-1} .

Donnée : incertitude relative : $2 \text{ CV} = 10 \%$.

2- Contrôle biologique du sérum de veau fœtal. (15 points)

2.1- Principe.

La capacité d'un lot de sérum de veau fœtal à promouvoir la croissance cellulaire est testée avant sa commercialisation. Les cellules sont cultivées en présence de milieu de culture complétement par 10 % de SVF du lot à tester : leur concentration et leur viabilité sont évaluées après numération en cellule de Malassez. Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus avec un sérum de veau fœtal de référence.

2.2- Matériel.

Au poste de culture cellulaire :

- 1 boîte de culture de cellules confluentes pour préparer la suspension cellulaire « C' »,
- Pipettes stériles 2 mL, 5 mL + système d'aspiration,
- 1 flacon de 10 mL de tampon PBS sans calcium étiqueté « **PBS** » (au bain thermostaté à 37° C),
- 1 tube de 2 mL de trypsine EDTA (au bain thermostaté à 37° C),
- 1 flacon de 7 mL de milieu + 10 % SVF étiqueté « **Milieu** » (au bain thermostaté à 37° C),
- microscope inversé.

Au poste de travail :

- 500 µL de bleu méthylène de Funk étiqueté « **BF** »,
- 500 µL en tube hémolyse de suspension de cellules étiquetée « **C** » (**fournie à la demande du candidat**).
- Pipette automatique P200 + cônes,
- 1 tube à hémolyse,
- 1 cellule de Malassez + lamelle,
- 1 microscope + alcool + papier nettoyage,
- Poste de décontamination pour cellules de Malassez.

2.3- Protocole opératoire.

2.3.1- Trypsination d'une culture cellulaire de référence.

L'ordre de passage sous hotte sera indiqué en début de séance.

Observer au microscope inversé la culture cellulaire.

Éliminer le milieu de culture.

Rincer les cellules avec 2 x 4 mL de tampon PBS sans calcium. Puis éliminer le tampon.

Ajouter 1,5 mL de trypsine.

Suivre l'effet de la trypsine sur la culture de cellules.

Stopper l'action de la trypsine en ajoutant 5 mL de milieu + 10 % SVF de référence.

Homogénéiser la suspension cellulaire : on obtient la suspension **C'**.

2.3.2- Numération de la suspension cellulaire C.

Cette suspension a été obtenue dans les mêmes conditions de trypsination. On considère qu'elle est identique à la suspension C'.

Réaliser une dilution volume à volume de la suspension cellulaire « C » dans le bleu de méthylène de Funk.

Compter les cellules en hématimètre de Malassez (caractéristiques fournies en **annexe 2**).

2.4- Compte-rendu.

Rassembler les résultats obtenus sous forme d'un tableau.

Calculer la concentration de cellules vivantes et le pourcentage de viabilité. Donner l'expression littérale et l'application numérique pour chaque calcul.

Conclure sur la capacité du lot de SVF testé à promouvoir la croissance cellulaire sachant que le sérum de référence a donné les résultats suivants :

- concentration cellulaire 2.10^5 cellules. mL^{-1} ,
- viabilité 80 %.

ANNEXE 1 : FEUILLE DE RÉSULTATS

À RENDRE AVEC LA COPIE

Tableau de résultats du dosage immunoenzymatique

cupule A1 A2 B1 C1 D1 E1 F1 G1 H1 B2 C2 D2 E2 F2 G2

T_{AC} U.mL⁻¹

Log (T_{AC})

$A_{405 \text{ nm}}$

% I

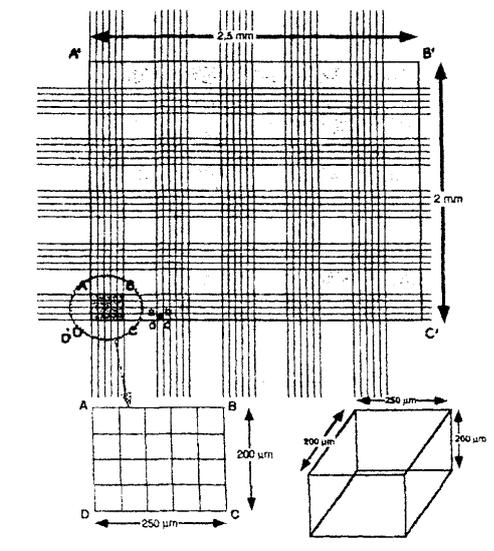
Interprétation : analyse des sérums

- Les sérums dont le pourcentage d'inhibition est supérieur ou égal à 90 % sont considérés comme issus de bovins n'étant pas porteurs d'anticorps spécifiques de la protéine gB d'IBR.
- Les sérums dont le pourcentage d'inhibition est compris entre 80 et 90 % sont considérés comme douteux.
- Les sérums dont le pourcentage d'inhibition est inférieur ou égal à 80 % sont considérés comme issus de bovins porteurs d'anticorps spécifiques de la protéine gB d'IBR.

Note : *Il est conseillé, pour les sérums individuels présentant un pourcentage d'inhibition situé dans la zone douteuse, de reconfirmer leur statut par un autre prélèvement ou une autre méthode.*

Feuille de suivi du contrôle qualité des deux échantillons de sérum de veau fœtal

Paramètres contrôlés	Sérum de référence	Échantillon E1	Échantillon E2
Phosphates	2.3 à 2.5 mmol/L	2.4 mmol/L	2.4 mmol/L
ASAT	47 à 51 U.mL ⁻¹	50 U.mL ⁻¹	51 U.mL ⁻¹
LPS (Endotoxines)	< 10 U.mL ⁻¹	< 10 U.mL ⁻¹	< 10 U.mL ⁻¹
Stérilité	Stérile	Stérile	Stérile
Phages	Absence	Absence	Absence
Fertilité sur souche de référence	Culture	Culture	Culture faible
Anticorps anti - virus syncytial bovin	Absence	Absence	Absence
Anticorps anti - virus diarrée bovine	Absence	Absence	Absence
Anticorps anti - parainfluenza 3	Absence	Absence	Absence
Anticorps anti - adenovirus 3	Absence	Absence	Absence
Anticorps anti - gB (IBR)	Absence
Conformité de l'échantillon	Conforme

ANNEXE 2 : SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ

E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2007	SUJET 3
------------------------------------------------------------------------------	----------------

Durée : 3 heures

Coefficient : 2

**UTILISATION DE CELLULES ANIMALES POUR L'ÉVALUATION DE
LA QUALITÉ DE PRODUITS INDUSTRIELS D'USAGE
PHARMACEUTIQUE (40 points)**

L'utilisation de cellules animales pour contrôler l'innocuité et la qualité de certains produits proposés sur le marché par l'industrie pharmaceutique, médicale, alimentaire ou cosmétique a connu un essor considérable ces dernières décennies.

Deux applications de ces techniques utilisant des cellules sont ici successivement envisagées :

- titration d'une suspension virale vaccinale,
- test d'hémolyse de globules rouges de lapin.

1- Titration d'une suspension virale vaccinale. (17 points)

1.1- Principe.

Dans le cadre du contrôle de qualité d'un vaccin à virus vivants atténués commercialisés pour l'usage vétérinaire, on met en oeuvre la titration d'une suspension virale vaccinale. Le virus étudié a un effet cytopathogène et cytolitique marqué sur les cellules choisies ; le titre est exprimé en UFP/mL (UFP = Unités Formant Plages de lyse).

La plaque de culture est ici récupérée après adsorption virale, les cellules en culture fournies ont déjà été infectées par quatre dilutions successives de suspension virale vaccinale selon les modalités décrites dans le document de l'**annexe 1**.

Il s'agit donc de poursuivre la manipulation par la préparation et la répartition du milieu de culture gélose ; ces phases finales se déroulent sous PSM.

L'ordre de passage au PSM sera indiqué en début d'épreuve.

1.2- Matériel et réactifs.

- 1 plaque de culture (référéncée « C » avec le numéro du poste), dont 12 puits ont été ensemencés par une culture confluyente de cellules (ces cellules ayant été préalablement infectées par le virus à titrer de la manière indiquée en **annexe 1**) : les puits sont repérés de la manière suivante : **I** à **IV** pour les essais (en double), et **T** pour les 4 témoins.
- 1 flacon contenant 12 mL de milieu MEM complet concentré 2 fois à 4 % de SVF, dépourvu de rouge de phénol, et préchauffé à 45° C (« **Milieu 2X** »).
- 1 flacon contenant 10 mL de solution stérile d'agarose à 0,8 % en eau distillée, conservé à 55°C (« **agarose** »).
- 1 pipette graduée stérile de 10 mL, préchauffée à l'étuve à 45°C.
- 1 auxiliaire de pipetage automatique (1 par PSM).
- 1 pipette automatique P₁₀₀₀ et cônes stériles adaptés.

Dans la salle :

- Microscope inversé.
- Bain thermostaté ou étuve à 55° C (avec flacons de solution d'agarose).
- Bain thermostaté ou étuve à 45° C (avec flacons de milieu).
- PSM.

1.3- Protocole opératoire.

1.3.1- Examen de la culture cellulaire en plaque.

Le virus étudié ne provoquant pas d'effet cytologique sur les cellules avant 24 heures de contact, l'aspect de la culture peut être observé même après adsorption virale.

Contrôler la culture par un examen macroscopique, puis par un examen microscopique au microscope inversé.

Présenter un champ microscopique à un examinateur.

1.3.2- Addition du milieu gélose.

Le temps de ce passage sous la hotte est limité à minutes.

Opérer rapidement pour les étapes qui suivent.

Se munir :

- d'un flacon de milieu de culture préchauffé à 45°C,
- et d'un flacon de solution d'agarose en surfusion.

Sous PSM, pipeter 10 mL de milieu MEM et l'ajouter dans le flacon d'agarose.

Mélanger très vigoureusement (ne pas hésiter à bien homogénéiser, et de manière la plus rapide possible),

Éliminer 1 mL de liquide surnageant de tous les puits de la plaque de culture, en commençant par les 4 puits témoins T puis en « remontant » des puits IV (plus forte dilution virale) aux puits I (moins forte dilution virale).

Déposer 1 mL du milieu gélose dans les 12 puits, en veillant à ne pas perturber la couche cellulaire.

Couvrir et laisser durcir 15 minutes à température ambiante au poste de travail (hors du PSM).

Laisser la plaque au poste de travail.

1.4- Compte-rendu.

Rendre compte des observations macroscopique et microscopique de la culture.

À l'aide des indications fournies en **annexe 1**, calculer les dilutions réalisées sur la suspension virale vaccinale.

Justifier la composition des puits témoins. Expliquer leur rôle.

Calculer la concentration en agarose du milieu.

Au cours du quatrième jour de culture, on ajoute dans les puits une solution faiblement gélosée de rouge neutre : préciser le rôle de ce colorant et son intérêt à ce stade.

Dans ce laboratoire, une suspension vaccinale satisfaisante doit présenter un titre compris entre 10^8 et 10^{10} UFP/mL pour pouvoir être commercialisée. Calculer le nombre minimal et maximal moyen de plages de lyse que l'on doit obtenir pour chaque dilution pour que la suspension vaccinale testée soit commercialisable.

2- Test d'hémolyse. (23 points)

2.1- Principe.

Deux substances A et B sont issues de la dégradation naturelle par les tissus de deux biomatériaux étudiés en vue de leur utilisation en dentisterie.

On se propose de mesurer l'hémolyse de globules rouges de lapin provoquée par ces deux substances à différentes concentrations.

L'annexe 2 à remettre complétée avec la copie comporte les tableaux 2.1, 2.2, et 2.3.

2.2 – Matériel et réactifs.

- Suspension de globules rouges de lapin du commerce à 50 % : 750 μ L, notée « **GRL 50 %** ».
- Eau physiologique : 12 mL, notée « **eau phy** ».
- 1 flacon vide pour réaliser la suspension diluée de globules rouges, étiqueté : « **GRL 3 %** ».
- Solution tampon isotonique aux hématies (pH 7,3) : 15 mL, notée « **Tampon** ».
- Solution A à 0,1 mg/mL : 3 mL, notée « **A** ».
- Solution B à 0,1 mg/mL : 3 mL, notée « **B** ».
- Eau distillée : 3 mL, notée « **Eau dist.** ».
- 15 microcuvettes de spectrophotométrie.
- Pipette P₁₀₀₀ + cônes.
- 1 pipette graduée de 10 mL.
- Récipient pour élimination des déchets.
- 14 tubes à hémolyse.
- Parafilm.

Dans la salle :

- Étuve à 37° C.
- Spectrophotomètre.
- Centrifugeuse pourvue de portoirs pour tubes à hémolyse.

2.3 – Protocole opératoire.

L'ordre de passage au spectrophotomètre sera indiqué en début de séance.

Diluer la suspension de globules rouges de lapin à 50 % en eau physiologique de manière à obtenir une suspension à 3 %. Prévoir une quantité suffisante pour la manipulation.

Numéroter deux séries de 6 tubes à hémolyse, respectivement :

- A1 à A6 (pour la première série et la solution A).
- B1 à B6 (pour la seconde série et la solution B).

Dans chaque série de 6 tubes, réaliser, en présence d'un examinateur, des dilutions successives de raison $\frac{1}{2}$ en tampon pH 7,3 en respectant les consignes ci-dessous :

- le premier tube de chaque série contient la solution à tester A ou B non diluée,
- le volume final de chaque dilution est de 1 mL.

Homogénéiser.

Dans chaque tube ajouter 500 μ L de suspension de globules rouges de lapin à 3 % (procéder devant un examinateur). Homogénéiser.

Réaliser les deux témoins suivants :

- un témoin T₀ (0 % d'hémolyse),
- un témoin T₁₀₀ (100 % d'hémolyse).

Couvrir tous les tubes avec du parafilm.

Incuber 30 minutes à 37° C.

Centrifuger tous les tubes (A1 à A6, B1 à B6, et T0 et T100) 5 minutes à 2500 g.

Mesurer les absorbances brutes Ab des surnageants à 560 nm contre une solution appropriée.

Effectuer la lecture au spectrophotomètre en présence d'un examinateur

2. 4- Compte-rendu.

Indiquer le mode de préparation de la suspension de globules rouges de lapin à 3 % à partir de la suspension commerciale à 50 %.

Compléter en **annexe 2** le **tableau 2.1** de préparation des deux séries de 6 tubes essais en faisant apparaître les dilutions réalisées sur A et B avant addition des hématies animales.

Indiquer la composition des deux témoins T0 et T100. Justifier leur rôle respectif.

Noter (**tableau 2.3**), l'aspect observé des tubes essais après centrifugation.

Compléter les **tableaux 2.2 et 2.3** avec les valeurs des absorbances à 560 nm (**tableau 2.2** pour les témoins, **tableau 2.3** pour les essais).

Élaborer la formule littérale permettant le calcul des absorbances nettes A_n des tubes, justifier cette formule puis calculer ces absorbances nettes dans le cas des tubes essais et de T₁₀₀.

Reporter les valeurs de ces absorbances nettes dans les **tableaux 2.2. et 2.3.**

Calculer à 0,1 % près le pourcentage d'hémolyse observé dans chaque cas et le noter dans le **tableau de résultats 2.3.** La formule littérale de calcul est exigée.

Comparer les résultats obtenus quant à l'effet hémolytique des deux solutions A et B dans les conditions expérimentales choisies. Dans le cadre de ce type d'étude, on admet qu'une hémolyse inférieure ou égale à 5 % est peu significative. Conclure.**ANNEXE 1 : Titration d'une suspension virale.**

Étapes préliminaires déjà réalisées :

«... Dilutions de la suspension virale vaccinale :

Préparer 4 tubes à hémolyse I, II, III, et IV.

Distribuer 2 mL de tampon PBS dans ces 4 tubes.

Dans le premier tube, ajouter 20 µL de suspension virale homogénéisée (dilution I).

Réaliser ensuite des dilutions en série en prélevant 20 µL de cette première dilution que l'on dépose dans le deuxième tube, et ainsi de suite jusqu'au dernier tube.

On obtient ainsi 4 dilutions I, II, III, et IV.

Infection de la culture :

On opère en plaque de culture dont les 12 puits ont étéensemencés par une culture confluyente de cellules animales adhérentes.

Les tests sont réalisés en double.

Dans tous les puits de la plaque, éliminer à la pipette automatique 1 mL seulement de milieu de culture (il doit rester 1 mL résiduel à chaque fois).

Distribuer 100 µL de chaque dilution dans les 4 premiers puits successifs d'une rangée (puits I à IV) ; réaliser ces dépôts en double en faisant de même pour la deuxième rangée.

Dans les 4 puits de la dernière rangée (puits témoins T), ajouter 100 µL de tampon PBS.

Laisser le virus s'adsorber pendant 2 heures à 37° C à l'étuve à 5 % de CO₂.... ».

ANNEXE 2 : Test d'hémolyse

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

Tableau 2.1 : Tableau de préparation

Tubes : A1 ou B1 A2 ou B2 A3 ou B3 A4 ou B4 A5 ou B5 A6 ou B6

Tampon (mL) :

Solution A ou B
à tester (mL) :

Redistribuer
(mL):

Dilution réalisée
dans chaque tube

Concentration
finale de A ou de
B (mg/mL) :

Addition de 500 μ L de globules rouges de lapin à 3 % puis incubation 30 minutes à 37° C

Tableau 2.2 : Témoins

	To	T ₁₀₀
A brute à 560 nm :		
A nette à 560 nm :		
% d'hémolyse :	0	100

Tableau 2.3 : Résultats

Tubes : **A1** **A2** **A3** **A4** **A5** **A6**

Aspect après
centrifugation :

A_b à 560 nm

A_n:

% d'hémolyse
pour ce tube:

Tubes : **B1** **B2** **B3** **B4** **B5** **B6**

Aspect après
centrifugation :

A_b à 560 nm

A_n :

% d'hémolyse
pour ce tube:

E5-U53 : TP TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 2007	SUJET 4
Durée : 3 heures	Coefficient : 2

**LA PRÉVENTION DES AVORTEMENTS DÛS À *TOXOPLASMA gondii*
CHEZ LA CHÈVRE (40 points)**

La toxoplasmose à *Toxoplasma gondii* représente la seconde cause d'avortement chez la chèvre laitière en France. Un vaccin vivant (souche S48, Ovilis Toxovax®) approuvé chez la brebis a été testé chez la chèvre en conditions expérimentales. Ce vaccin, constitué de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* incapables d'accomplir leur cycle de reproduction chez les moutons ou les chèvres, peut être obtenu par culture dans la cavité péritonéale des souris ou par culture dans des cellules Vero.

Les manipulations suivantes ont pour objectifs :

- la comparaison de la protection vaccinale apportée par la souche S48 en fonction de la méthode de production utilisée,
- l'entretien de cellules de lignée Vero.

1- Comparaison du taux de protection vaccinale en fonction de la méthode de production de la souche S48. (20 points)

1.1- Principes.

Deux lots (A et B) de chèvres ont été vaccinés par injection intramusculaire :

- lot A : immunisation à l'aide d'une souche S48 produite par culture dans la cavité péritonéale de souris,
- lot B : immunisation à l'aide d'une souche S48 produite par culture dans des cellules Vero.

Les prélèvements sanguins réalisés sur ces animaux un mois après l'injection ont permis l'obtention des sérums : S_A (sérum d'une chèvre représentative de la réponse du lot A) et S_B (sérum d'une chèvre représentative de la réponse du lot B).

La titration des anticorps anti *Toxoplasma gondii* est réalisée en microplaque à l'aide de globules rouges sensibilisés par un antigène toxoplasmique total mixte. Cet antigène comprend à la fois les constituants endogènes et les constituants membranaires du toxoplasme.

1.2- Matériel et réactifs.

- Gants.
- Microplaque à fond rond + couvercle.
- Pipettes automatiques P1000, P50 + cônes.
- Deux tubes à hémolyse.
- Tube contenant 3,5 mL de tampon phosphate pH 7,2 : « **tampon** ».
- Tube contenant 40 µL de sérum à tester ; « **S_A** ».
- Tube contenant 40 µL de sérum à tester : « **S_B** ».
- Tube contenant 130 µL de sérum de contrôle positif : « **S+** ».
- Tube contenant 130 µL de sérum de contrôle négatif : « **S-** ».
- Tube contenant 300 µL de globules rouges sensibilisés : « **GR S** ».
- Tube contenant 120 µL de globules rouges non sensibilisés : « **GR NS** ».
- Bac de désinfectant

1.3- Protocole opératoire.

1.3.1- Dilution des sérums.

Introduire dans deux tubes à hémolyse :

	Tube1	Tube 2
Sérum S _A	25 µL	
Sérum S _B		25 µL
Tampon pH 7,2	975 µL	975 µL

1.3.2- Réaction.

Titrer les sérums S_A et S_B dilués dans une plaque de microtitration à fond rond sur 2 lignes de 7 cupules de la façon suivante :

- ligne A : titrage du sérum S_A
- ligne C : titrage du sérum S_B

Cupule N°	1	2	3	4	5	6	7
Tampon pH 7,2 (µL)	50	50	50	50	50	50	50
Sérum S _A ou S _B dilué (µL)	50	50					
Report (µL)			50	50	50	50	50
GR S (µL)		17	17	17	17	17	17
GR NS (µL)	17						

Appeler un examinateur pour la réalisation d'une série de dilutions.

Dans les 6 premières cupules de la ligne E réaliser les témoins suivants :

Cupule N°	1	2	3	4	5	6
Tampon pH 7,2 (µL)	50	50	50	50	50	50
Sérum S + (µL)						
Sérum S - (µL)			50	50		
GRS(µL)		17		17		17
GRNS(µL)	17		17		17	

Couvrir la plaque et homogénéiser soigneusement le contenu des cupules.

Laisser la microplaque immobile, à l'abri de toute vibration pendant 1h 30.

Lire les résultats.

Présenter la plaque à un examinateur.

1.4- Compte-rendu.

Schématiser le principe de la réaction utilisée au cours de cette titration. Envisager le cas d'un résultat positif et d'un résultat négatif.

Présenter sous forme d'un tableau récapitulatif comportant les références des cupules, les dilutions des sérums réalisées et les résultats observés.

Indiquer le rôle de chacun des témoins.

Valider la technique utilisée. Justifier.

Données : - le titre est le facteur de dilution le plus élevé donnant encore une réaction positive
- le seuil de sensibilité du réactif est fourni par le centre d'examen :
Comparer les résultats obtenus pour chaque sérum testé. Conclure.

2- Entretien d'une lignée cellulaire (cellules Vero) (20 points)

2.1- Principe.

On dispose d'une culture confluente de cellules Vero utilisées pour la production de la souche S48. On désire effectuer un repiquage des cellules viables de cette culture.

Après trypsination et mise en culture, on vérifie la viabilité des cellules en utilisant la technique du dénombrement en hématimètre en présence de Bleu de méthylène de Funk.

2.2- Matériel.

Au poste de travail :

- 500 µL de bleu de méthylène de Funk « **BM** ».
- pipette automatique P₂₀₀ + cônes.
- 1 tube à hémolyse.
- 1 cellule de Malassez + lamelle (caractéristiques fournies en **annexe**).
- 1 microscope + alcool + papier nettoyage.
- 1 compteur de cellules.
- poste de décontamination - lavage - séchage des cellules de Malassez.

Au poste de culture cellulaire :

- 1 boîte de culture de cellules confluentes « **Vero** » (25 cm²).
- pipettes stériles 1 mL, 2 mL, 5 mL + système d'aspiration.
- 1 flacon de 7 mL de tampon PBS sans calcium (au bain thermostaté à 37°C) « **tampon PBS** ».
- 1 tube de 3 mL de trypsine EDTA (au bain thermostaté à 37°C) « **trypsine EDTA** ».
- 1 flacon de 7 mL de milieu DMEM + 10 % SVF (au bain thermostaté à 37°C) « **DMEM + 10 % SVF** ».
- 1 boîte de culture contenant 5 mL de milieu DMEM + 10 % SVF + antibiotiques (25 cm²) « **Repiquage** ».
- un tube à hémolyse bouché.
- microscope inversé.

2.3- Protocole opératoire.

2.3.1- Trypsination de la culture cellulaire. (Temps limité à minutes)

L'ordre de passage sous hotte sera indiqué en début de séance

Prévoir au préalable le volume d'inoculum respectant le taux de croissance des cellules Vero.

Donnée : le taux de croissance des cellules Vero est de 10, il correspond au nombre de boîtes de culture pouvant être obtenu à partir des cellules d'une boîte de culture (de même surface).

Observer la culture cellulaire au microscope inversé.

Éliminer par retournement le milieu de culture usagé.

Rincer les cellules avec 5 mL de tampon PBS sans calcium.

Rincer la surface du tapis cellulaire avec 2 mL de trypsine-EDTA. Éliminer par retournement.

Inonder la surface du tapis cellulaire avec 0,5 mL de trypsine-EDTA.

Incuber à 37° C pendant 5 minutes environ. Surveiller le décollement complet des cellules.

Arrêter l'action de la trypsine-EDTA avec 5 mL de milieu DMEM complet.

Homogénéiser la suspension cellulaire.

Ensemencer la boîte de culture « Repiquage » fournie avec un volume d'inoculum respectant le taux de croissance des cellules Vero.

Prélever une partie aliquote en tube à hémolyse pour la numération.

2.3.2- Numération de la suspension cellulaire obtenue.

Réaliser une dilution volume à volume de la suspension cellulaire dans le bleu de méthylène de Funk.

Réaliser le montage en hématimètre devant un examinateur

Compter les cellules en hématimètre de Malassez, effectuer la numération après une sédimentation d'environ 3 minutes.

Présenter un champ microscopique avec la suspension à un examinateur

2.4- Compte-rendu.

Préciser le type cellulaire des cellules Vero.

Indiquer le volume d'inoculum utilisé pour assurer le repiquage des cellules après trypsination. Justifier.

Présenter le résultat de la numération sous forme d'un tableau.

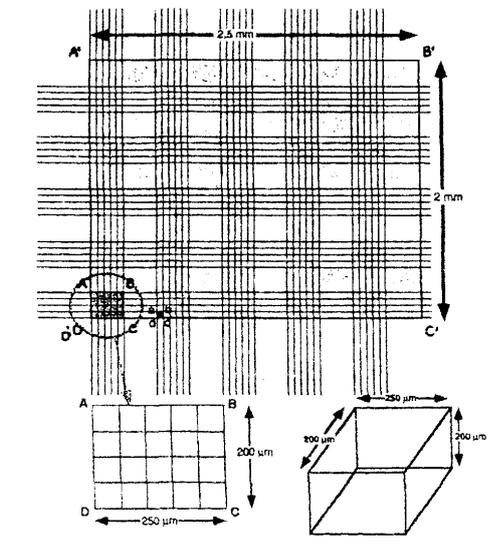
Indiquer la formule littérale permettant de calculer le nombre de cellules viables par mL de suspension.

Réaliser l'application numérique.

Indiquer la formule littérale permettant de calculer le pourcentage de viabilité des cellules en suspension.

Réaliser l'application numérique.

ANNEXE : SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ



Éléments de corrigé - sujets 2006

Supprimé: 6

Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

ANGLAIS 2006

PREMIÈRE PARTIE : COMPRÉHENSION (10 points)

1. L'association caritative britannique WaterAid a récemment construit un bloc sanitaire dans une école primaire située dans une région rurale de l'Inde afin d'initier les jeunes élèves aux règles essentielles d'hygiène. Les enfants sont ensuite chargés de veiller à la bonne utilisation du bloc par tous et à la propreté dans l'enceinte de l'école.

Grâce à ce projet, les enfants sont en meilleure santé. De plus, ils arrivent à faire comprendre à leurs parents combien l'hygiène est importante dans la vie quotidienne. Il reste encore beaucoup à faire dans ces régions où l'accès à la scolarité reste difficile, mais ce projet montre combien l'hygiène doit faire partie de l'éducation des plus pauvres. (111 mots).

2. Il faudra beaucoup de temps pour que chaque école en Inde possède les équipements qu'utilisent les élèves de Marachipatti lors de leurs deux récréations quotidiennes. Ailleurs, dans de nombreuses zones rurales de l'Inde, le système public d'éducation s'est pratiquement effondré. Les bâtiments tombent en ruine, les professeurs sont absents ou inexistantes et le nombre d'élèves qui abandonnent leurs études, surtout parmi les filles, est désespérément élevé. Pourtant le succès du projet WaterAid montre comment progresser vers un avenir meilleur dans lequel les enfants les plus démunis n'auraient pas seulement accès à la scolarité, mais aussi aux installations sanitaires.

DEUXIÈME PARTIE : EXPRESSION EN LANGUE ANGLAISE (10 points)

1. At school, children learn hygiene practices that they will use for the rest of their lives. Back home, they will convince their parents and the villagers to adopt these practices and require sanitation of them. Later, when they have children of their own, they will teach them hygiene awareness and remember that better sanitation means fewer illnesses. (55 words)

2. The candidate may consider the following aspects related to this question:

- Educating children and training them for jobs are top priorities, the goal being to encourage them to develop the resources of their own countries;
- Teaching children health care & sanitation is just as essential: they must be taught basic hygiene practices to suffer fewer illnesses;
- Enforcing vaccination is one way to fight endemic diseases;
- Giving poor nations access to cheap generic drugs.

The candidate may also mention the specific problem of child labour in developing countries and related issues (appalling working conditions, small salaries, schooling, etc.).

MATHÉMATIQUES 2006**EXERCICE 1****1- Loi binomiale et loi de Poisson****1.1-**

- Chaque prélèvement est constitué par 40 épreuves élémentaires indépendantes puisque le prélèvement est assimilé à un tirage avec remise.

- Chaque épreuve élémentaire peut déboucher sur deux résultats et deux seulement : la bouteille contient de l'eau calcaire, événement de probabilité $p = 0,075$ et la bouteille ne contient pas de l'eau calcaire, événement de probabilité $q = 1 - p = 0,925$.

La variable aléatoire X associée à ces tirages le nombre total de bouteilles d'eau contenant de l'eau calcaire.

Donc X suit la loi binomiale de paramètre 40 et 0,075.

1.2- $\lambda = E(X) = 40 \times 0,075 = 3$

1.3- $P(X_1 \leq 4) = P(X_1 = 0) + \dots + P(X_1 = 4) \approx 0,815$ (A l'aide de la table de la loi de Poisson ou de la formule).

La probabilité de l'événement : « dans un prélèvement de 40 bouteilles il y a au plus quatre bouteilles qui contiennent de l'eau calcaire » est proche de 0,815.

2- Loi normale

Dans cette partie, on fait les calculs à l'aide du changement de variable $T = \frac{Y-5}{1,5}$; T suivant

la loi normale centrée réduite.

2.1- $P(Y \leq 6,5) \approx 0,841$.

2.2- $P(Y > 6,5) \approx 0,159$.

3- Probabilités conditionnelles

3.1- $P(A) = 0,7$; $P(B) = 0,3$; $P(C/A) = 0,16$; $P(C/B) = 0,10$

3.2- $P(C \cap A) = P(A) \cdot P(C/A) = 0,112$ et $P(C \cap B) = P(B) \cdot P(C/B) = 0,03$

3.3- $P(C) = P(C \cap A) + P(C \cap B)$, $P(C) = 0,142$.

3.4- $P(A/C) = P(C \cap A) / P(C) \approx 0,789$.

4- Intervalle de confiance

On choisit pour estimation ponctuelle de la moyenne inconnue $\hat{\mu} = \bar{x} = 5,37$. $I \approx [5,18 ; 5,56]$.

EXERCICE 2**1- Résolution d'une équation différentielle**

1.1- La solution générale de (E0) est définie sur $[0 ; +\infty[$, par $y(t) = ke^{-0,01t}$

1.2- $g(t) = 2400$.

1.3- Les solutions de (E) sont définies sur $[0 ; +\infty[$ par $y(t) = ke^{-0,01t} + 2400$.

1.4- $v(t) = 2400e^{-0,01t} + 2400$.

2- Etude d'une fonction et calcul intégral

2.1- De $\lim_{t \rightarrow +\infty} (-0,01 t) = -\infty$ et $\lim_{x \rightarrow -\infty} ex = 0$,

$t \rightarrow +\infty$ $x \rightarrow -\infty$

on déduit que $\lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-0,01 t} = 0$, $\lim_{t \rightarrow +\infty} v(t) = 2400$,

2.2- $v'(t) = 24 e^{-0,01t}$

2.3-

t	0	$+\infty$
$v'(t)$	+	
$v(t)$	0	2400

2.4- $t = \frac{-1}{0,01} \cdot \ln 0,5$ ou $t = 100 \ln 2$ $t \approx 69,3$

3- Application des résultats de la partie 2

3.1- La santé du bétail est menacée lorsque le volume de substance M dans le réservoir est supérieur à $(2/100) \times 60000 \text{ L} = 1200 \text{ L}$, donc lorsque $v(t) \geq 1200$; d'après 2.4), la santé du bétail est menacée au bout de 69,3 heures après le début de la pollution.

3.2- 4 % du volume du réservoir représente 2400 litres.
 v est strictement croissante sur $[0, +\infty[$ et $\lim_{t \rightarrow +\infty} v(t) = 2400$.

Donc $v(t)$ ne peut pas dépasser 2400.

Le volume de substance M ne peut pas dépasser 4 % du volume du réservoir.

SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES 2006

A : MICROSCOPE (15 points / 60)

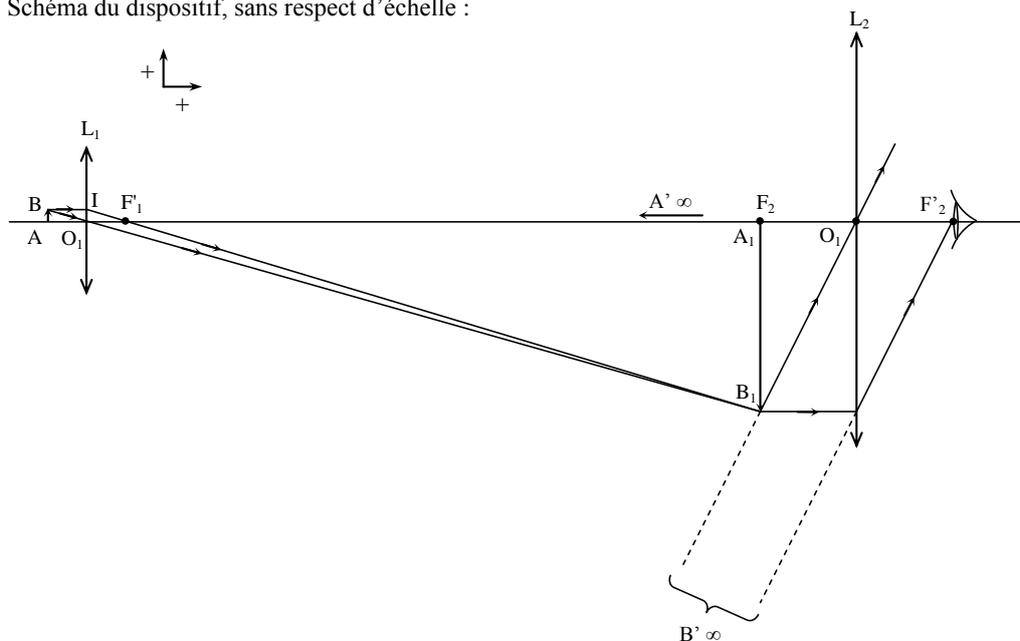
Microscope optique : un oculaire (lentille L_2) de grossissement $G_{2c} = 10$ et un objectif (lentille L_1) de grandissement $\gamma_1 = -40$. Ouverture numérique de l'objectif : $n \sin U = 0,65$.

Intervalle optique : $\Delta = \overline{F_1'F_2} = 16 \text{ cm}$.

Image $A'B'$ à l'infini.

1 – L'image finale $A'B'$ étant située à l'infini, l'image intermédiaire A_1B_1 est forcément placée dans le plan focal objet de l'oculaire (A_1 sur F_2).

Schéma du dispositif, sans respect d'échelle :



2 – Grandissement de l'objectif : $\gamma_1 = \frac{\overline{A_1B_1}}{\overline{AB}}$ (grandeur algébrique négative puisque A_1B_1 est renversée).

3 – Grossissement commercial du microscope : $G_c = |\gamma_1| \cdot G_{2c} = 40 \times 10$ soit $G_c = 400$.

Puissance intrinsèque du microscope : $P_i = 4 G_c = 4 \times 400$ soit $P_i = 1600 \delta$.

4 – Sur le schéma de la question 1, on remarque les deux triangles O_1IF_1' et $F_1'A_1B_1$ sont des triangles semblables. On peut donc appliquer le théorème de Thalès :

$$\frac{\overline{A_1B_1}}{\overline{O_1I}} = \frac{\overline{F_1'F_2}}{\overline{O_1F_1'}} \quad \text{avec} \quad O_1I = AB \quad ; \quad F_1'F_2 = \Delta \quad \text{et} \quad O_1F_1' = f_1'$$

On en déduit : $|\gamma_1| = \frac{\overline{A_1B_1}}{\overline{AB}} = \frac{\Delta}{f_1'}$

Sachant que $|\gamma_1| = 40$, on peut calculer la distance focale : $f_1' = \frac{\Delta}{|\gamma_1|} = \frac{160}{40}$ (mm)

soit $f_1' = 4$ mm.

Sachant que le grossissement commercial de l'oculaire est égal à sa vergence, on peut écrire :

$$G_{2c} = 10 = V_2 = \frac{1}{f_2'} \quad \text{d'où} \quad f_2' = \frac{1}{G_{2c}} = \frac{1}{10} = 0,1 \text{ m} \quad \text{soit} \quad f_2' = 10 \text{ cm.}$$

5 – L'image finale A'B' est à l'infini, donc l'image intermédiaire A₁B₁ se trouve dans le plan focal objet de l'oculaire, soit $\overline{O_2A_1} = \overline{O_2F_2} = -f_2'$, soit $\overline{F_2A_1} = 0$.

Utilisons la formule de conjugaison de Descartes pour déterminer la position de l'objet AB, sachant que l'objectif (lentille L₁) en donne une image A₁B₁ :

$$-\frac{1}{\overline{O_1A}} + \frac{1}{\overline{O_1A_1}} = \frac{1}{f_1'} \quad \text{avec} \quad \overline{O_1A_1} = \overline{O_1F_1'} + \overline{F_1'F_2} + \overline{F_2A_1} = f_1' + \Delta.$$

$$\text{Soit : } \frac{1}{\overline{O_1A}} = \frac{1}{\overline{O_1A_1}} - \frac{1}{f_1'} \quad \text{d'où} \quad \frac{1}{\overline{O_1A}} = \frac{1}{f_1' + \Delta} - \frac{1}{f_1'} = \frac{1}{4 + 160} - \frac{1}{4}$$

$$\text{soit : } \overline{O_1A} = -4,1 \text{ mm.}$$

Il faut placer l'objet à 4,1 mm de l'objectif.

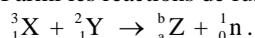
6 – Pouvoir séparateur du microscope :

$$AB_{\min} = \varepsilon = \frac{0,6\lambda}{n \sin U} = \frac{0,6 \times 500 \cdot 10^{-9}}{0,65} = 4,6 \cdot 10^{-7} \text{ m} = 0,46 \text{ } \mu\text{m.}$$

La longueur du staphylocoque AB = 1 μm est supérieure à ε donc on peut l'observer à l'aide de ce microscope.

B : PRODUCTION D'ÉNERGIE NUCLÉAIRE PAR FUSION (15 points / 60)

Parmi les réactions de fusion envisageables, se produit la réaction suivante :



1 – Réaction de fusion :

Conservation de la charge électrique : $1 + 1 = a + 0$ d'où $a = 2$

Conservation du nombre de nucléons : $3 + 2 = b + 1$ d'où $b = 4$

On en déduit l'équation de la réaction : ${}^3_1\text{H} + {}^2_1\text{H} \rightarrow {}^4_2\text{He} + {}^1_0\text{n}$

avec ${}^3_1\text{X} = {}^3_1\text{H}$ (tritium) ; ${}^2_1\text{Y} = {}^2_1\text{H}$ (deutérium) ; ${}^a_Z = {}^4_2\text{He}$ (hélium) ; ${}^1_0\text{n}$ (neutron).

2 – Les réactions de fusion dans l'univers ont lieu dans les étoiles (elles nécessitent des températures de l'ordre de millions de degrés).

3 – Le tritium est radioactif β⁻. Une particule β⁻ est un électron ${}^0_{-1}\text{e}$.

Équation de la désintégration du tritium : ${}^3_1\text{H} \rightarrow {}^3_2\text{He} + {}^0_{-1}\text{e}$.

4 – La période radioactive du tritium est T = 12,3 ans.

4.1 – Constante radioactive du tritium : $\lambda = \frac{\ln 2}{T} = \frac{\ln 2}{12,3} = 5,64 \cdot 10^{-2} \text{ an}^{-1}$.

4.2 – Nombre de noyaux contenus dans $m = 0,10 \text{ g}$ de tritium, de masse molaire $M = 3,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$:

$$N = \frac{m}{M} \times N_A = \frac{0,10}{3,0} \times 6,02 \cdot 10^{23} = 2,01 \cdot 10^{22} \text{ noyaux} \approx \mathbf{2,0 \cdot 10^{22} \text{ noyaux de tritium.}}$$

4.3 – L'échantillon contient au départ $N_0 = 2,01 \cdot 10^{22}$ noyaux et reste inutilisé pendant une durée $t = 30,0 \text{ ans}$.

4.3.1 – Loi de décroissance radioactive du radionucléide : $N_t = N_0 e^{-\lambda t}$.

On en déduit le nombre de noyaux restant au bout de la durée t :

$$N_t = 2,01 \cdot 10^{22} \times e^{-5,64 \cdot 10^{-2} \times 30} = \mathbf{3,71 \cdot 10^{21} \text{ noyaux de tritium.}}$$

4.3.2 – Activité de cet échantillon à la date t :

$$A_t = \lambda N_t = 5,64 \cdot 10^{-2} \times 3,71 \cdot 10^{21} = \mathbf{2,10 \cdot 10^{20} \text{ désintégrations par an.}}$$

Ce qui donne, en unités S.I. :

$$A_t = \frac{2,1 \cdot 10^{20}}{365 \times 24 \times 3600} = \mathbf{6,63 \cdot 10^{12} \text{ Bq (désintégrations par seconde).}}$$

5 – Énergie libérée par la fusion d'un noyau X (${}^3_1\text{H}$) avec un noyau Y (${}^2_1\text{H}$) au cours de la réaction de fusion ${}^3_1\text{X} + {}^2_1\text{Y} \rightarrow {}^4_2\text{Z} + {}^1_0\text{n}$ soit ${}^3_1\text{H} + {}^2_1\text{H} \rightarrow {}^4_2\text{He} + {}^1_0\text{n}$

$$E = (m_X + m_Y - m_Z - m_n) \cdot c^2$$

$$E = (3,0155 + 2,0136 - 4,0026 - 1,0087) \text{ u} \cdot c^2 \text{ et } 1 \text{ u} = 931,5 \text{ MeV} \cdot c^{-2} \text{ soit } 1 \text{ u} \cdot c^2 = 931,5 \text{ MeV}$$

$$E = (3,0155 + 2,0136 - 4,0026 - 1,0087) \times 931,5 = 0,0178 \times 931,5 = 16,581 \text{ MeV.}$$

$$\mathbf{E \approx 16,58 \text{ MeV.}}$$

$$E = 16,581 \times 1,6 \cdot 10^{-19} = 2,6529 \cdot 10^{-12} \text{ J} \approx \mathbf{2,653 \cdot 10^{-12} \text{ J.}}$$

6 – La production de 10 g de l'élément Z (${}^4_2\text{He}$) correspond à un nombre de noyaux d'hélium créé de :

$$N = \frac{m}{M} \times N_A = \frac{10}{4,0} \times 6,02 \cdot 10^{23} = \mathbf{1,505 \cdot 10^{24} \text{ noyaux d'hélium.}}$$

L'énergie totale libérée est égale à N fois l'énergie libérée par la création d'un noyau d'hélium :

$$E_{\text{totale}} = N \times E = 1,505 \cdot 10^{24} \times 2,6529 \cdot 10^{-12} = 3,993 \cdot 10^{12} \text{ J} \approx \mathbf{4 \cdot 10^{12} \text{ J.}}$$

Cette énergie représente **95 fois** celle libérée par la combustion d'une tonne de pétrole ($4,2 \cdot 10^{10} \text{ J}$).

C : THERMODYNAMIQUE (15 points / 60)

Réaction de synthèse du dihydrogène gazeux : $\text{CH}_4(\text{g}) + \text{H}_2\text{O}(\text{g}) = \text{CO}(\text{g}) + 3 \text{H}_2(\text{g})$.

Données thermodynamiques, à 298 K :

Espèce chimique	$\Delta_f H^\circ$ (kJ.mol ⁻¹)	S° (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)
CH ₄ (g)	- 74,85	186,2
H ₂ O (g)	- 241,83	188,7
CO (g)	- 110,52	197,9
H ₂ (g)	0	130,6

1 –

1.1 – Calcul de l'enthalpie de réaction $\Delta_r H^\circ$ de la réaction à 298 K :

$$\Delta_r H^\circ = \Delta_f H^\circ (\text{CO, g}) + 3 \Delta_f H^\circ (\text{H}_2, \text{g}) - \Delta_f H^\circ (\text{CH}_4, \text{g}) - \Delta_f H^\circ (\text{H}_2\text{O, g})$$

$$\Delta_r H^\circ = - 110,52 - (- 74,85) - (- 241,83)$$

$$\Delta_r H^\circ = \mathbf{206,16 \text{ kJ.mol}^{-1}}$$

1.2 – Calcul de l'entropie de réaction $\Delta_r S^\circ$ de la réaction à 298 K :

$$\Delta_r S^\circ = S_m^\circ (\text{CO, g}) + 3 S_m^\circ (\text{H}_2, \text{g}) - S_m^\circ (\text{CH}_4, \text{g}) - S_m^\circ (\text{H}_2\text{O, g})$$

$$\Delta_r S^\circ = 197,9 + (3 \times 130,6) - 186,2 - 188,7$$

$$\Delta_r S^\circ = \mathbf{214,8 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}}$$

2 –

2.1 – La réaction est endothermique à 298 K puisque $\Delta_r H_{298\text{K}}^\circ > 0$.

Le système en cours de réaction reçoit de l'énergie du milieu extérieur.

2.2 – La quantité de gaz du milieu réactionnel augmente de 2 moles par mole d'avancement de la réaction donc le désordre augmente et l'entropie aussi, ce qui explique que $\Delta_r S_{298\text{K}}^\circ > 0$.

3 –

3.1 – Calcul de la valeur de l'enthalpie libre de réaction $\Delta_r G^\circ$ à 298 K :

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T \Delta_r S^\circ$$

$$\Delta_r G^\circ = 206,16 - 298 \times 214,8 \cdot 10^{-3}$$

$$\Delta_r G^\circ = \mathbf{142,15 \text{ kJ.mol}^{-1}}$$

3.2 – Constante d'équilibre K° à 298 K :

$$K^\circ = e^{-\frac{\Delta_r G^\circ}{RT}} = e^{-\frac{142150}{8,31 \times 298}}$$

$$K^\circ = \mathbf{1,18 \cdot 10^{-25}} \quad \text{à } 298 \text{ K.}$$

3.3 – K° étant très faible, on peut en conclure que la réaction est très limitée et qu'elle se fait naturellement dans le sens inverse (sens de disparition du dihydrogène) à cette température.

4 –

4.1 – Pour favoriser la réaction dans le sens direct, qui correspond à une **réaction endothermique**, il faut **élever la température** du milieu réactionnel.

4.2 – Une augmentation de pression (à température constante) entraînerait un déplacement de l'équilibre dans le sens réduisant le nombre de mol de gaz, soit le sens inverse (loi de Le Châtelier).

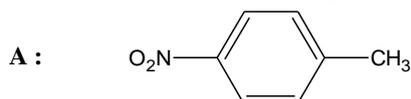
5 – On suppose $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ indépendants de T. Cherchons la température pour laquelle $\Delta_r G^\circ$ change de signe, c'est-à-dire la température T_i pour laquelle : $\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T_i \Delta_r S^\circ = 0$.

$$\text{Température d'inversion : } T_i = \frac{\Delta_r H^\circ}{\Delta_r S^\circ} = \frac{216160}{214,8} = \mathbf{959,78 \text{ K}} \quad (\text{soit } 686,78 \text{ }^\circ\text{C})$$

Au dessus de cette température (pour $T > T_i$), l'enthalpie libre standard de réaction devient négative et la réaction devient spontanée dans le sens direct.

D : CHIMIE ORGANIQUE (15 points / 60)

1 – La nitration du toluène (ou méthylbenzène) de formule $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$ permet d'obtenir majoritairement le composé **A** de formule semi-développée :

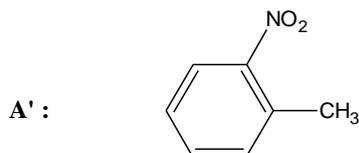


1.1 – Nom du composé **A** : **4-nitrométhylbenzène** ou para nitrométhylbenzène ou para nitrotoluène.

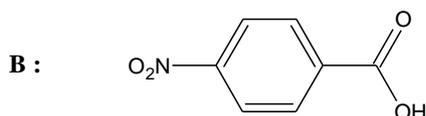
1.2 – La nitration du toluène nécessite l'utilisation de l'acide nitrique fumant (HNO_3) ou du mélange sulfonitrique (mélange d'acide nitrique et d'acide sulfurique H_2SO_4 concentré).

1.3 – Conditions expérimentales : dans un bain de glace (température 0°C) pour éviter la formation de composés polynitrés qui sont des explosifs (TNT : trinitrotoluène), sous la hotte (les gaz formés sont toxiques et inflammables : NO_2 , NO , ...), avec des gants (utilisation d'acides concentrés) et des lunettes de protection.

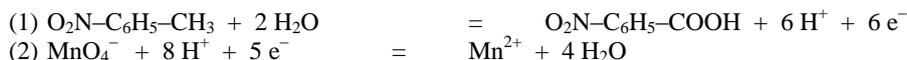
1.4 – Au cours de cette réaction, il se forme également un composé **A'** minoritaire : l'ortho nitrotoluène ou 2-nitrométhylbenzène. En effet, le groupement méthyle du toluène ayant un effet inductif donneur, désactive le cycle et l'oriente en positions ortho et para pour la substitution électrophile. Le composé ortho est minoritaire pour des raisons de gêne stérique.



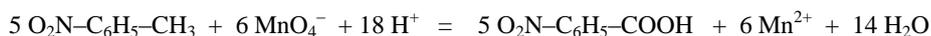
2 – L'oxydation par les ions permanganate en milieu acide, à chaud, du composé **A** conduit à l'acide 4-nitrobenzoïque **B** de formule semi-développée :



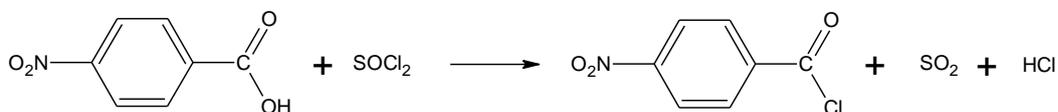
2.1 – Demi-équations redox : (1) oxydation de **A** et (2) réduction de MnO_4^- .



2.2 – Équation de la réaction d'oxydation par les ions permanganate en milieu acide, à chaud, du composé **A** : on ajoute 5 fois (1) à 6 fois (2).



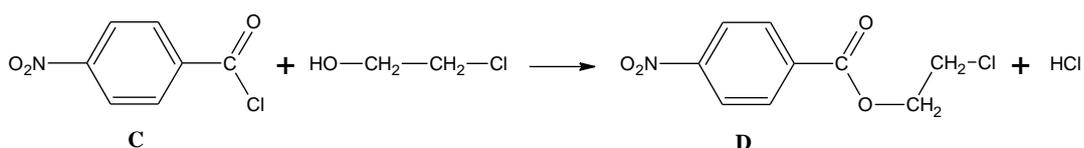
3 – La fonction acide carboxylique de **B** est activée par le chlorure de thionyle SOCl_2 selon l'équation :



B : acide 4-nitrobenzoïque

C : chlorure de 4-nitrobenzoyle

4 – L'action de **C** sur le composé de formule semi-développée $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl}$ conduit à la formation d'un composé **D** et de chlorure d'hydrogène selon l'équation :



C

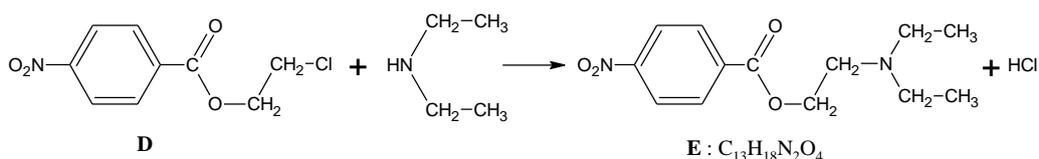
D

4.1 – Il s'agit d'une réaction d'**estérification** entre un alcool et un dérivé d'acide carboxylique.

4.2 – Nom systématique du composé $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl}$: **2-chloroéthan-1-ol**.

5 – **D** est traité par $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}$ pour donner le composé **E** de formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$.

5.1 – Équation de la réaction mise en jeu :



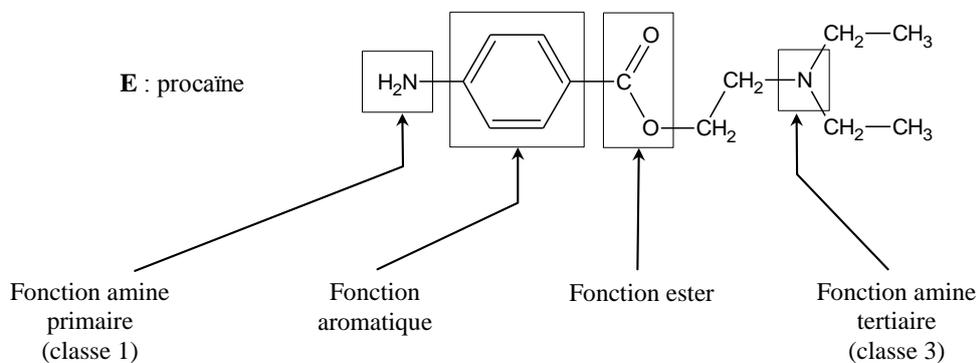
D

E : $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$

5.2 – Type de réaction : alkylation de la fonction amine.

C'est une **substitution nucléophile** sur le dérivé halogéné, dont l'amine est le nucléophile

6 – La réduction de **E**, par le fer en milieu acide, conduit à la procaine, de formule semi-développée :



BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006
1- Analyse de la farine
1.1 - Détermination du taux de cendres
1.1.1. sels minéraux

1.1.2. 0,014 g de cendres $\rightarrow 3,150 \times (100 - 15,5) / 100 = 2,662$ g de farine sèche.

Donc taux de cendres = $0,014 \times 100 / 2,662 = 0,53$ %

Utilisable pour la fabrication de pain ordinaire d'après le **document 1a** puisque $0,5 < \text{taux} < 0,6$

1.2 - Détermination de la teneur en protéines

1.2.1. soit m_N la quantité d'azote dans la masse de farine pesée ($m(\text{farine})$) ; soit m_{prot} la masse de protéine dans $m(\text{farine})$

$$m_N = m_{\text{prot}} \times 17,5 / 100 \quad \text{et} \quad m_{\text{prot}} = m(\text{farine sèche}) \times 10 / 100$$

$$\text{de plus, } m(\text{farine sèche}) = m(\text{farine}) \times (100 - H) / 100 = m(\text{farine}) \times 84,5 / 100$$

$$\text{donc } m_N = m(\text{farine}) \times ((84,5 / 100) \times (10 / 100)) \times (17,5 / 100)$$

$$\text{soit, } m(\text{farine}) = m_N \times (10^5 / (17,5 \times 84,5))$$

$$\text{si on choisit } m_N = 0,01 \text{g} \quad \text{alors } m(\text{farine}) = 0,676 \text{g}$$

1.2.2. Minéralisation : $(N)_{\text{org}} \rightarrow (NH_4)_2SO_4$

Alcalinisation (et distillation) : $NH_4^+ + OH^- \rightarrow NH_3$

Distillat + acide borique : $H_3BO_3 + NH_3 \rightarrow NH_4^+ + H_2BO_3^-$

Dosage : $H_2SO_4 + 2 H_2BO_3^- \rightarrow SO_4^{2-} + 2 H_3BO_3$

1.2.3. $n_{H^+ \text{total}} = n_{N \text{échantillon}} + n_{H^+ \text{correspondant aux impuretés}} = 2n_{H_2SO_4 \text{dosage}}$

$$m_{N \text{échantillon}} = (2 C V_1 - 2 C V_0) \times M_N = 2 C (V_1 - V_0) \times M_N$$

(C : concentration de l'acide sulfurique)

1.2.4. $\% (m/m) = m_{\text{prot}} \times 100 / m(\text{farine sèche}) = (100 / 17,5) \times m_N \times 100 / (m \times (100 - H) / 100)$

avec V en mL, m en g et M_N en g/mol

$$\% (m/m) = 5,7 \times 2 \times 0,05 \times (V_1 - V_0) \times 10^{-3} \times 14 \times \frac{1}{m} \times \frac{100}{(100 - H)} \times 100$$

$$\% (m/m) = 0,798 \times (V_1 - V_0) \times \frac{1}{m} \times \frac{100}{(100 - H)}$$

1.3 - Analyse des protéines de la farine
1.3.1.

1.3.1.1. Amphotères. Création d'un gradient de pH. pH 3,5 \rightarrow pH 9

1.3.1.2. pHi. La charge des protéines se modifie en cours de migration. Lorsque le pH du gel correspond au pHi de la protéine, la charge de celle-ci devient globalement neutre et la migration s'arrête.

1.3.2.

1.3.2.1. Agents dénaturants

Urée : liaisons hydrogène

Dithiothréitol : réducteur des ponts disulfure

1.3.2.2. Rôles du SDS : dérouler protéines (détergent amphiphile, supprime les liaisons non covalentes) et les charger négativement (à raison de 1 SDS tous les deux AA) → toutes les protéines auront le même rapport charge /masse.

→ séparation des protéines suivant leur taille uniquement.

1.3.2.3. protéines chargées globalement négativement, migration vers l'anode (pôle +)



1.3.2.4. Acrylamide : unité de construction du gel

Bis-acrylamide : agent de réticulation

1.3.2.5. Mailles du gel trop serrées → peu de migration.

Les gels 1 et 2 sont moins concentrés en acrylamide donc les mailles sont plus lâches.

1.3.3.

1.3.3.1. HMW-GS : groupe A (haut poids moléculaire donc faible migration verticale).

1.3.3.2. B : LMW-GS acides (pHi faibles) et faible poids moléculaire

C : LMW-GS basiques (pHi élevés) et faible poids moléculaire

1.3.4.

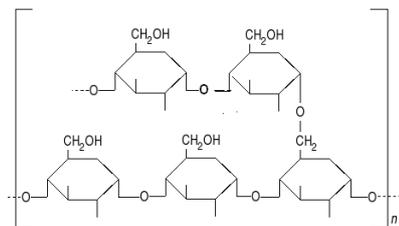
1.3.4.1. Hélice α , stabilisée par liaisons H entre $>C=O$ et $>N-H$ des liaisons peptidiques.

1.3.4.2. Ponts disulfure réduits, donc réseau moins solide donc moins élastique.

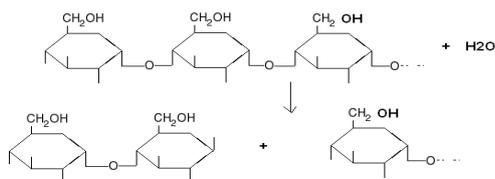
2- Dégradation de l'amidon et fermentation panaire

2.1- Structure de l'amidon et de ses produits d'hydrolyse

2.1.1.



2.1.2. $(glc)_n + H_2O \rightarrow \beta\text{-maltose} + (glc)_{(n-2)}$



2.1.3. L'hydrolyse libre des fonctions hémicétyl (maltose). Donc augmentation du pouvoir réducteur

2. 2- Dosage de l' α -amylase d'une farine

2.2.1.

2.2.2.1. Méthode en 2 points : mesure d'une vitesse moyenne entre 2 instants situés dans la phase de V_i ($[S]$ saturant pour que $V_i = V_{max}$).

2.2.2.2. Trizma® Base : réactif d'arrêt

2.2.2.3. « blanc α -amylase » :

Introduire dans un tube à essai :

- 3 mL de réactif arrêtant l'activité de la α -amylase (trizmabase) préincubé à 40°C pendant environ 5 min ;
- 0,2 mL de mélange substrat + α -glucosidase + amyloglucosidase ;
- 0,2 mL du surnageant.

Incuber à 40°C pendant exactement 10 min.

Diluer la solution au 1/10 avant le passage au spectre.

2.2.2. Résultats

2.2.2.1. $C_{cat} = (\Delta A / \Delta t) \times 1 / (\epsilon \times l) \times (V_f / E) \times f_d = 0,714 \text{ U / mL}$

(E : prise d'essai de surnageant ; V_f : volume total après arrêt de la réaction)

2.2.2.2. Act (U/g) = $(\Delta A / \Delta t) \times 1 / (\epsilon \times l) \times (V_f / E) \times (V_s / m) \times f_d = 7,0 \text{ U / g}$

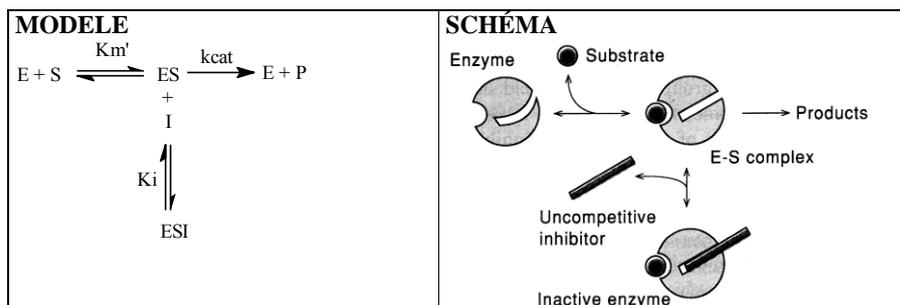
(V_s = volume total de surnageant ; m = masse de farine)

2. 3- Caractérisation d'un inhibiteur des α -amylases

2.3.1. Détermination du type d'inhibition

2.3.1.1. Inhibition incompétitive : V_{max} et K_m diminuent dans les mêmes proportions.

2.3.1.2. I se fixe sur ES uniquement :



2.3.2. Détermination de la constante d'inhibition K_i

2.3.2.1. $1/V_{max \text{ app}} = (1 + [I]/K_i)/V_{max} = (1/V_{max}) + [I]/(K_i \times V_{max})$

2.3.2.2. Abscisse à l'origine : $1/V_{max \text{ app}} = 0 \Leftrightarrow (1/V_{max}) + [I]/(K_i \times V_{max})$

$\Leftrightarrow [I] = -K_i$

$K_i \approx 15 \mu\text{mol.L}^{-1}$

2. 4- La fermentation panaire

2.4.1.1.

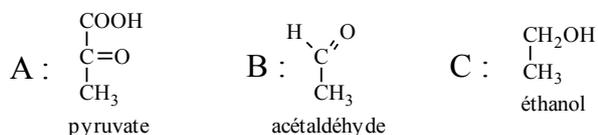
étapes 3 et 5 : ATP consommé, ADP libéré

étape 8 : Pi, NAD⁺ consommés, NADH + H⁺ libéré

étapes 9 et 12 : ADP consommé, ATP libéré

enzyme 3 : hexokinase ; enzyme 5 : PFK1 ; enzyme 8 : glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase ; enzyme 12 : pyruvate kinase

2.4.1.2.



D : CO₂ ; E : NADH, H⁺ ; F : NAD⁺

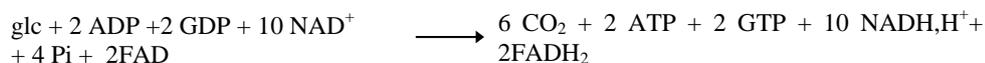
Le CO₂ (gaz) fait lever la pâte.

2.4.1.3. $\text{glc} + 2 (\text{ADP} + \text{Pi}) \rightarrow 2 \text{éthanol} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{ATP}$

2.4.1.4. $(30,2 \cdot 2 / 166) = 36,4 \%$

2.4.2.

2.4.2.1. Oxydation complète du glc :



2.4.2.2. $10 \text{NADH, H}^+ \rightarrow 10 \times 3 \text{ATP}$

$2 \text{FADH}_2 \rightarrow 2 \times 2 \text{ATP}$

Bilan en ATP de l'oxydation complète du glucose :

Formation de $34 + 2 + 2 = 38 \text{ATP}$

2.4.2.3. Oxydation aérobie : 38 ATP

Fermentation alcoolique : 2 ATP

L'oxydation aérobie est $38/2 = 19$ fois plus efficace, ce qui signifie qu'une anaérobiose les cellules doivent utiliser plus de glucose pour effectuer le même travail (croissance par exemple).

MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006

1. Toxi-infections bactériennes d'origine alimentaire

1.1. Le pouvoir pathogène bactérien

1.1.1.

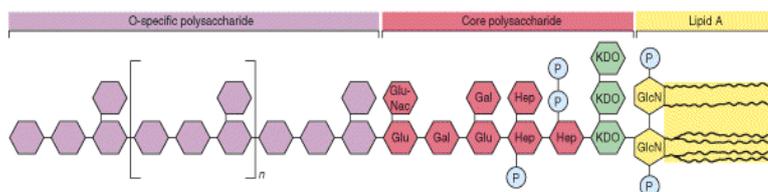
Structure d'adhésion	Nature chimique	Localisation	Propriétés
Glycocalyx	polyosidique	Externe à la paroi	
Pili communs ou fimbriae	Protéique (piline + adhésine)	Externe à la paroi	<ul style="list-style-type: none"> - adhérence sur les cellules d'un hôte ou sur un support inerte - site de fixation pour bactériophage - pouvoir antigénique
Autre adhésine	protéique	<ul style="list-style-type: none"> - Ancrée dans la membrane plasmique (Hémagglutinine de Vibrio) - Ancrées dans la paroi (internaline de Listeria ou invasine de Yersinia) 	

1.1.2. Le pouvoir pathogène d'une bactérie se manifeste par :

- Le pouvoir invasif = aptitude du microorganisme à pénétrer et à se multiplier chez l'hôte malgré ses défenses immunitaires.
- Le pouvoir toxine ou toxigène = capacité d'un microorganisme à produire une toxine

1.2. Prévention des salmonelloses

1.2.1. LPS = Lipopolysaccharide.



Nom	Nature chimique	Localisation	Propriétés
Lipide A	glycophospholipidique	Ancré dans la membrane externe de la paroi des gram-	Fraction hydrophobe du LPS Pouvoir toxique = pyrogène
core	polyosidique	Fixé sur le lipide A	Peu de variabilité inter-espèce Fraction hydrophile du LPS
chaînes latérales = Antigène O	polyosidique	Le plus externe du LPS, fixé sur le core	Partie la plus variable du LPS Propriétés antigéniques

1.2.2.

1.2.2.1. Il existe deux types de méthodes normalisées :

- méthodes horizontales utilisables pour tous les produits alimentaires
- méthodes sectorielles spécifiques d'un produit

1.2.2.2. avantages des méthodes alternatives : rapides, simples à exécuter.

1.2.3.**1.2.3.1. Etape de pré-enrichissement non sélectif.**

Rôle = favoriser le développement de tous les microorganismes présents dans l'aliment initialement.

Etape d'enrichissement sélectif.

Rôle = enrichir la suspension en bacilles gram- dont *Salmonella* car présence d'agents sélectif (vert de malachite, chlorure de magnésium, sélénite)

1.2.3.2. Sur le milieu VBRP, on lit la non utilisation par les *Salmonella* du lactose et du saccharose, donc l'absence d'acidification. Or d'autres bactéries (certains *Proteus*, *Morganella*, *Shigella*, *Citrobacter*) sont également lac (-) et sac(-).

Sur Rambach, on lit l'acidification due à l'utilisation du propylène glycol : seulement *Salmonella* et certains *Citrobacter* le métabolisent. La distinction entre les deux genres peut se faire grâce à l'absence chez *Salmonella spp* d'une β -galactosidase, donc absence de dégradation du substrat Xgal.

Les colonies de *Salmonella* apparaîtront rouges.

Les colonies de coliformes apparaîtront bleues.

1.2.4. Probabilité que le profil biochimique expérimental corresponde à :

- *Salmonella Paratyphi A* : $0,99 \times 0,01 \times 0,01 \times 0,99 \times 0,01 \times 0,05 = 5.10^{-8}$

- *Salmonella spp* : $0,97 \times 0,69 \times 0,96 \times 0,95 \times 0,75 \times 0,85 = 0,39$

La souche a une plus forte probabilité d'être *Salmonella spp*.

1.2.5. Sérotype = bactéries regroupées sur la base de leur structure antigénique commune

Lysotype = ensemble de bactéries présentant le même profil de sensibilité face à une collection de bactériophages.

1.2.6.

1.2.6.1. On tiendra compte de la qualité et de la logique de la réponse :

Par la DEFT, toutes les cellules sont dénombrées.

Le nombre de cellules cultivables sur gélose ordinaire diminue.

Par conséquent, le nombre de cellules mortes ou vivantes non cultivables augmente.

1.2.6.2. Principales étapes de la DEFT :

- filtration sur membrane de l'échantillon. Les bactéries à numérer sont retenues sur le filtre.

- Rinçage

- Filtration d'une solution de fluorochrome

- Rinçage

- Observation au microscope à épifluorescence des cellules fluorescentes.

1.2.6.3. Ce test permet d'évaluer la viabilité des bactéries.

Utilisation de 2 marqueurs des acides nucléiques : un fluorochrome vert pénétrant dans les cellules vivantes et mortes, et un fluorochrome rouge, ne pénétrant que dans les cellules dont la membrane est endommagée.

Donc les bactéries vivantes apparaissent vertes, alors que les bactéries mortes apparaissent rouges (la fluorescence rouge diminuant la fluorescence verte dans les cellules endommagées).

Ce test est sensible, rapide ; il ne nécessite pas d'étape de lavage et peut être utilisé sur des suspensions bactériennes ou sur des bactéries fixées sur un filtre.

1.3. Toxi-infections alimentaires à *Staphylococcus aureus***1.3.1.**

1.3.1.1. $GC \% = \left(\frac{[G] + [C]}{[A] + [T] + [G] + [C]} \right) \times 100$

1.3.1.2. T_m = température de demi-dénaturation correspondant à la température permettant d'obtenir une absorbance égale à 50% de l'absorbance maximale.

1.3.1.3. Plus le GC% est élevé, plus la T_m est élevée. Les bases G et C sont liées par 3 liaisons hydrogène contre deux pour les bases A et T.

1.3.2.

1.3.2.1. Présence de nombreux porteurs sains ou asymptomatiques = personnes abritant les micro-organismes pathogènes sans manifester de signe clinique = véritable réservoir de transmission pour la bactérie.

1.3.2.2. toxines protéiques et toxines polysaccharidiques.

Propriétés	Toxines protéiques	Toxines polysaccharidiques
Dénaturation par la chaleur	Oui, thermolabiles	Non, thermostables
Formation d'anatoxine	Oui	Non
Toxicité	Forte + + +	Faible +
Mode d'action	spécifique	Commun à toutes

1.3.2.3. milieu empirique = composition connue seulement approximativement.

milieu synthétique = composition connue exactement, qualitativement et quantitativement

Principe du suivi de croissance par opacimétrie = mesure du trouble en utilisant un spectrophotomètre. La densité optique est proportionnelle à la concentration bactérienne dans certaines conditions : faible concentration en microorganismes en dessous d'un certain seuil de densité optique.

G = Temps de génération = temps de doublement de la population

μ = Vitesse spécifique de croissance = vitesse volumique de croissance rapportée à l'unité de biomasse.

Détermination de μ :

$$N = N_0 \cdot e^{\mu t}$$

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t$$

Pour 2 points A_1 et A_2 pris en phase exponentielle :

$$\ln N_{A_2} = \ln N_{A_1} + \mu (t_2 - t_1)$$

$$\mu = \frac{(\ln N_{A_2} - \ln N_{A_1})}{(t_2 - t_1)} = \text{pente de la droite de la phase expo}$$

$$\mu = 0,0154 \text{ min}^{-1} = 0,92 \text{ h}^{-1}$$

Détermination de G :

$$G = t_2 - t_1 \text{ tel que } N_2 = 2 N_1$$

$$\text{Donc } \ln N_2 = \ln 2 + \ln N_1$$

Pour déterminer G graphiquement, on choisit en ordonnées $\ln N_1$, on ajoute $\ln 2 = 0,7$ pour obtenir $\ln N_2$

Et on reporte ces deux points sur la droite puis sur l'axe des abscisses où on lit $t_2 - t_1$ correspondant à G .

$$\text{Ou } G = \ln 2 / \mu = 0,76 \text{ h} = 45,45 \text{ min}$$

1.3.3.

1.3.3.1. m = critère, M = valeur maximale acceptable, n = nombre d'unités de l'échantillon, c = nombre d'unités de l'échantillon dont la teneur en microorganismes peut être comprise entre m et M, les autres unités de l'échantillon ayant une teneur inférieure à m.

1.3.3.2. pyruvate de sodium = accélérateur de croissance
émulsion de jaune d'œuf = révélateur de lécithinase et protéase
tellurite de potassium = inhibiteur, indicateur d'oxydo-réduction

1.3.3.3. Les colonies sont :

- noires car réduction du tellurite en tellure
- entourées d'un halo translucide dû à l'activité lipoprotéasique
- après 48h, entourées d'un halo opaque dû à l'activité lécithinasique.

1.3.3.4. In vivo, cette enzyme permet la formation de caillots de fibrine au point d'infection protégeant les bactéries des cellules phagocytaires et ainsi facilitant leur multiplication.

La coagulase est une enzyme catalysant l'hydrolyse du fibrinogène soluble en fibrine insoluble donc visible par coagulation.

1^{er} jour : ensemencer une BCC avec la suspension bactérienne, incubé 24h à 37°C

2^{ème} jour : dans un tube à hémolyse, mettre, volume à volume, du BCC ensemencé et du plasma de lapin, incubé 15 min à 24h à 37°C.

1.3.4. Plus rapide : il est possible de lire directement après incubation la présence éventuelle d'une coagulase.

2. Parasitoses d'origine alimentaire**2.1. L'amibiase**

2.1.1. règne des Protistes

2.1.2.

Cellule procaryote	Cellule eucaryote
Ne possède pas de membrane nucléaire	Possède une membrane nucléaire
Possède un seul chromosome	Possède 2n chromosomes
Ne possède pas d'organites cytoplasmiques (sauf des ribosomes)	Possède de nombreux organites cytoplasmiques (mitochondries, RER, golgi, ribosomes...)

2.1.3. Une amibe appartient au groupe des Rhizopodes : elle se déplace grâce à des pseudopodes, prolongements cytoplasmiques.

2.2. La toxoplasmose

2.2.1. Incidence = nombre de nouveaux cas apparus pendant une période donnée par rapport à une population de référence (rapporté à 100 000 personnes généralement)

Prévalence = nombre de cas existant à un moment ou pendant une période donnée, rapporté au nombre d'individus de la population concernée = nombre total de sujets infectés au sein de la population susceptible, à un moment donné.

2.2.2. légumes crus, viandes crues ou mal cuites

2.2.3. Laver abondamment les végétaux crus, bien cuire la viande, éviter les contacts avec les chats.

2.2.4. Chez l'adulte, les manifestations sont en général bénignes : fatigue, mononucléose. Problème sanitaire important chez la femme enceinte = une femme non immunisée, contaminée pendant la grossesse, peut transmettre le parasite au fœtus par passage transplacentaire (rare). Le fœtus est très sensible à l'infestation toxoplasmique et l'enfant contaminé peut développer une maladie grave : ictère néonatal, hydrocéphalie avec retard psychomoteur, encéphalopathies...

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2006

1 - Étude microscopique de la cellule végétale

1.1 - Microscopie électronique en transmission

Le microscope électronique en transmission utilise comme rayonnement un faisceau d'électrons. Un système de lentilles magnétiques permet de dévier ou de focaliser le rayon d'électrons sur un échantillon « extrêmement fin ». Suivant l'épaisseur, la densité ou la nature chimique de celui-ci, les électrons sont plus ou moins absorbés ou diffractés. L'image ou le cliché de diffraction obtenu peut être vu sur un écran fluorescent, enregistré sur un film photographique ou bien détecté par un capteur CCD.

1.2 -

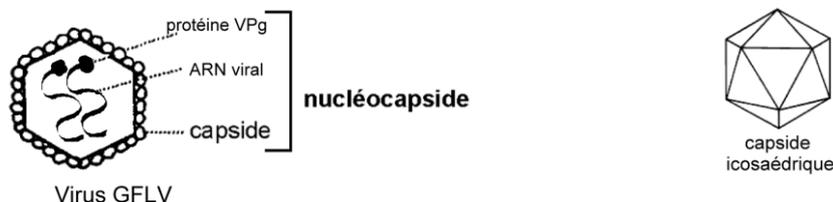
- | | |
|-------------------------|----------------------------|
| 1- paroi végétale | 5- hétérochromatine |
| 2- enveloppe nucléaire | 6- mitochondrie |
| 3- noyau (euchromatine) | 7- hyaloplasme |
| 4- nucléole | 8- réticulum endoplasmique |

2 - Création de plantes génétiquement modifiées

2.1 -

2.1.1 - L'ARN (+) est traduit par les ribosomes. Il se comporte comme un ARNm.

2.1.2 -



2.2 -

2.2.1 - Un plasmide désigne une petite molécule d'ADN bicaténaire circulaire distincte de l'ADN chromosomique et capable de répllication autonome.

Ils sont de petite taille permettant l'insertion d'un fragment d'ADN « étranger » de taille relativement importante tout en gardant une bonne efficacité de transformation. Ils sont faciles à manipuler. Le nombre de copies par cellule peut être très important permettant d'obtenir de grandes quantités d'ADN. Ils comportent des marqueurs phénotypiques facilitant la sélection des clones.

2.2.2 - construction du plasmide recombinant:

digestion du plasmide par une enzyme de restriction (générant de préférence des extrémités cohésives),

mélange du plasmide linéarisé et du gène viral (après avoir généré des extrémités cohésives aux extrémités identiques à celles du plasmide) et ajout de l'ADN ligase et d'ATP pour former des liaisons phosphodiester entre les fragments d'ADN associés.

- introduction du plasmide dans la bactérie : transformation de bactéries compétentes (bactéries en phase exponentielle traitées au chlorure de calcium) par choc thermique (passage de 4 °C à 42 °C).

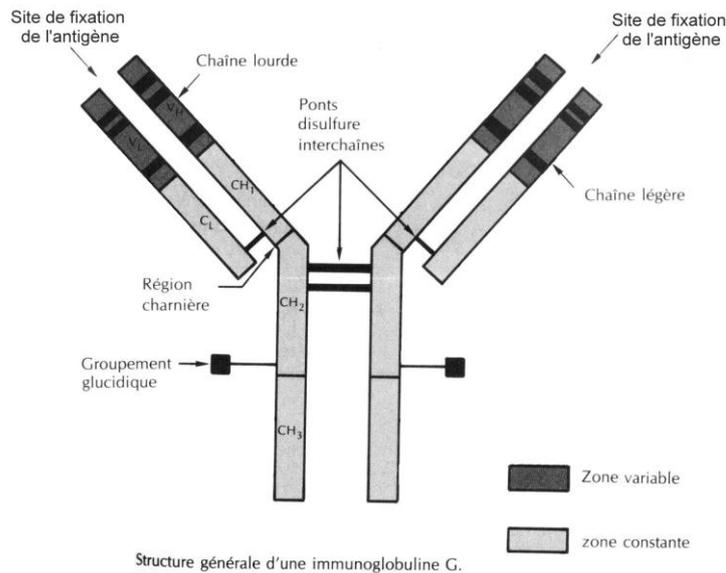
- sélection des clones transformés : les bactéries non transformées sont éliminées par l'utilisation d'un antibiotique dont la résistance est apportée aux bactéries transformées par le plasmide. L'expression d'un gène marqueur fonctionnel par le plasmide non recombiné (gène

de la β galactosidase par exemple) permet de distinguer les bactéries transformées par un plasmide non recombiné de celles transformées par un plasmide recombiné (contenant le gène viral).

3 - Détection d'une infection d'un plant de vigne par le GFLV

3.1 - Test immunologique de détection du GFLV

3.1.1 - Le site de fixation de l'antigène est appelé paratope.



3.1.2 - Les lymphocytes B sont des cellules mortelles HGPRT(+) et les cellules myélomateuses utilisées sont HGPRT(-), immortelles (et non sécrétant d'Ig).

3.1.3 -

1- immunisation de l'animal

2- fusion cellulaire

4-5- clonage des hybridomes et sélection des clones d'intérêt.

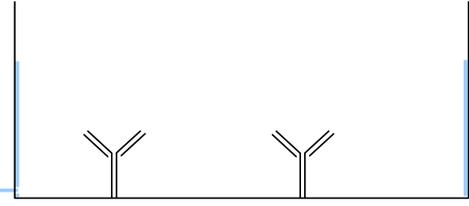
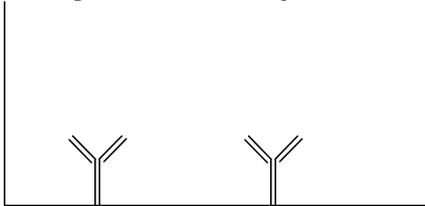
6- Production en quantité des Ac monoclonaux (exemple : injection d'hybridomes dans la cavité péritonéale d'une souris qui développe alors un ascite)

Étape 3 : les lymphocytes B meurent spontanément. Les cellules de myélome de phénotype HGPRT(-) ne peuvent pas utiliser la voie de récupération des nucléotides. Or l'aminoptérine présent dans le milieu de culture bloque la voie de novo de synthèse de nucléotides. Privées de synthèse de nucléotides, ces cellules ne peuvent plus se diviser et meurent.

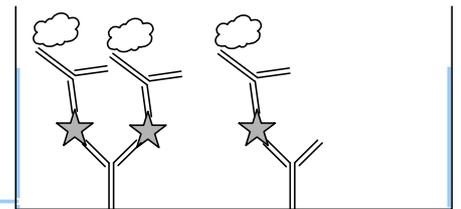
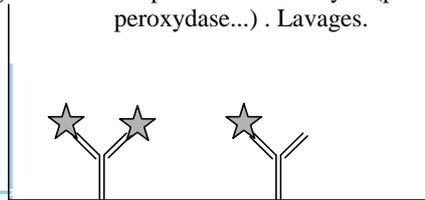
Les hybridomes HGPRT (+) peuvent utiliser la voie de récupération et synthétiser des nucléotides à partir de la thymine et de l'hypoxanthine contenu dans le milieu.

3.1.4 -

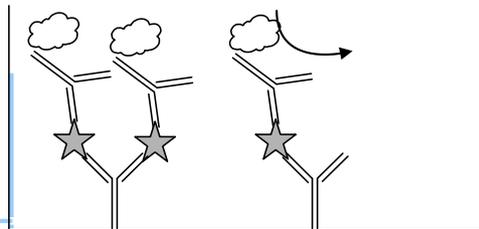
1ère étape : sensibilisation des cupules par des anticorps anti GFLV. Lavages. **2ème étape** : saturation des sites de fixation non spécifiques puis lavages.



3ème étape : 1ère réaction immunologique : incubation de l'échantillon contenant éventuellement des virus GFLV. Lavages. **4ème étape** : 2ème réaction immunologique : incubation du conjugué, anticorps anti GFLV couplé à une enzyme (phosphatase alcaline, peroxydase...). Lavages.



5ème étape: révélation de l'activité enzymatique: incubation du substrat de l'enzyme conduisant à un produit coloré. (Ajout d'un réactif d'arrêt.) Mesure des absorbances.



3.2 - Test moléculaire de détection : RT-PCR.

3.2.1 - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction : on synthétise des ADN à partir des ARN par réverse transcription puis on réalise une PCR « classique ».

3.2.2 -

3.2.2.1 - étape 1 : éclatement, lyse des cellules

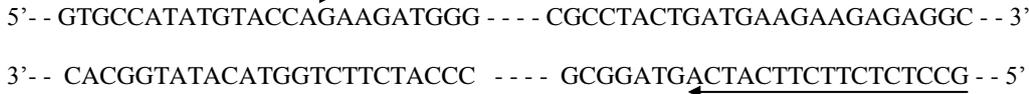
étape 2 : extraction des acides nucléiques : EDTA inhibe les nucléases en complexant le magnésium et le SDS déstabilise les membranes et dénature les protéines.

étape 3 : élimination des protéines et des lipides par action du phénol et du chloroforme (les protéines dénaturées par ces solvants vont se placer après centrifugation à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse).

3.2.2.2 - Les hexamères sont des petits morceaux d'ADN de synthèse composés de 6 nucléotides dans un ordre aléatoire. Leur séquence très courte ne les rend pas spécifique de gène particulier. Ils peuvent donc s'hybrider avec n'importe quel ARN et constitué ainsi une amorce pour la réverse transcriptase.

3.2.3 -

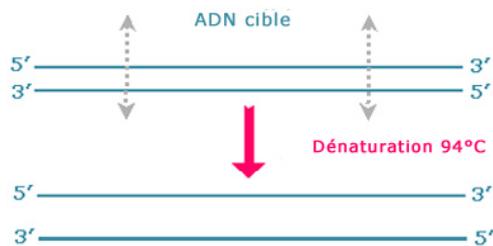
3.2.3.1 -



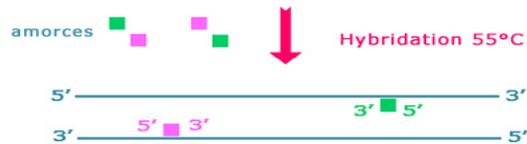
3.2.3.2 - Les 2 amorces du couple A s'hybrident avec le même brin d'ADN : il ne peut donc pas convenir. Les amorces du couple B s'hybrident chacune sur un brin différent et elles sont correctement orientées de façon à amplifier la zone délimitée par les 2 amorces (cf flèches).

3.2.4 - Déroulement d'un cycle de PCR : 3 étapes :

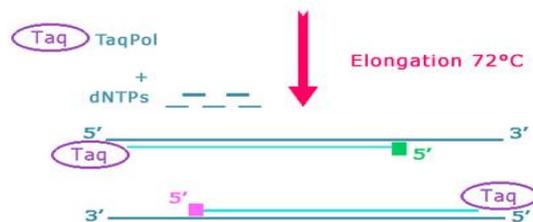
- **Dénaturation** : Le tube est chauffé à 94°C. Les double brins d'ADN se séparent.



- **Hybridation** : La température est abaissée à la température d'hybridation choisie (environ température de fusion de l'amorce - 5°C soit environ entre 50 et 60°C). Les amorces « reconnaissent » leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cibles.



- **Élongation** : La température est ensuite amenée à 72°C, température optimale de la Taq polymérase qui allonge les amorces hybridées dans le sens 5' vers 3'.



3.3 - Comparaison des deux méthodes.

Elisa : méthode facile à mettre en oeuvre, relativement rapide et automatisable. Elle nécessite de disposer des anticorps très spécifiques.

RT PCR : méthode très sensible et très spécifique. Il est nécessaire de prendre beaucoup de précautions pour éviter des contaminations des échantillons par des molécules d'ADN recherchées, conduisant à des réactions faussement positives. L'analyse est plus longue que le

test Elisa. La méthode proposée utilise des produits chimiques dangereux : phénol, chloroforme, BET.

SCIENCES ET TECHNOLOGIES BIOINDUSTRIELLES 2006

1 – La matière première : le lait (20 points)**1.1 –**

Eau	850 à 900 g/L
Glucides : lactose	40 à 50 g/L
Protéines solubles et sous forme de micelles	30 à 40 g/L
Lipides	30 à 50 g/L
Sels minéraux	8 g/L

1.2.1.1 – Les particules ou molécules à séparer sont soumises à une accélération centrifuge supérieure à celle de la pesanteur, la sédimentation est accélérée.

1.2.1.2 – Les deux phases doivent être de masses volumiques (ou de densités) différentes.

1.2.1.3 – Action sur la viscosité et la vitesse angulaire.

Modification du diamètre des particules ou du rayon de la centrifugeuse

1.2.2.1 –

- a phase lipidique (crème)
- b phase aqueuse (lait écrémé)
- c assiette
- d axe du rotor (éventuellement moteur)
- e arrivée du lait entier
- f sortie des boues

1.2.2.2 -

Entrée du lait

Séparation de la phase légère lipidique qui sort par (a) et de la phase aqueuse qui se trouve dans la partie la plus externe de la centrifugeuse et sort par (b)

1.2.2.3 - Densité de la crème plus faible que celle du lait écrémé. Elle glisse sur la face supérieure des assiettes vers l'axe. Le lait écrémé, plus dense, glisse sur la face inférieure des assiettes vers la périphérie.

1.2.3.1 – Diminution et standardisation de taille des globules gras dispersés.

1.2.3.2 – Stabilisation de l'émulsion (diminution du diamètre des globules) évitant le crémage (et le rancissement au contact de l'air).

2. Étude des étapes de la fabrication du comté (17 points)

2.1.1 - Protéolyse partielle de la caséine, agrégation des micelles déstabilisées, formation d'un gel en présence de calcium

2.1.2 – Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique par fermentation à partir du lactose.

La baisse de pH qui en résulte fait précipiter les protéines (caséine)

2.2.1 – L = lactosérum

2.2.2 – Eau, reste de lactose, protéines solubles, sels minéraux

2.2.3 –

Préparation de concentrés de protéines

Alimentation animale

Milieu de base pour la fermentation de microorganismes

Extraction d'enzymes, du lactose

2.3.1 –

Diminution de l' a_w : rôle de conservateur

Facteur inhibant/favorisant la multiplication de certaines souches microbiennes

Propriétés organoleptiques

2.3.2 –

Par immersion
 Par saupoudrage
 Par frottage

2.4.1 - Modifications de la composition chimique par actions enzymatiques

Protéolyse avec apparition d'acides aminés aromatiques

Lipolyse avec apparition d'acides gras et de dérivés donnant la flaveur

2.4.2- Influence sur la sélection, la croissance et la vitesse de multiplication des bactéries, qui produisent les enzymes responsables de réactions biochimiques avec modifications organoleptiques

3 - L'A.O.C. (23 points)

3.1 – Une appellation d'origine contrôlée garantie un ensemble de critères (cahier des charges) : fabrication dans une région, avec des matières premières, un mode de production (notion de terroir) et selon un savoir faire particulier.

3.2 – INAO : Institut National des Appellations d'Origine.

3.3.1 – Contrôles biochimiques : protéines, matière grasse, etc.

Contrôles bactériologiques : flore mésophile, absence de germes pathogènes

3.3.2 - Température stockage, ensemencement, brassage, préaffinage, affinage

Durées maturation, chauffage, brassage, pressage, affinage

Pression pressage

Hygrométrie affinage

3.3.3.1 –Valeur cible : 55,0 °C

Valeur cible ± 2 ET (54,0 et 56,0) °C : limites d'alerte, procédé sous surveillance

Valeur cible ± 3 ET (53,5 et 56,5) °C : limites de contrôle

3.3.3.2 –en J8 alerte : action de surveillance, de vigilance

de J12 à J20 : dérive du même côté avec action corrective effectuée à J20

en J22 : température trop basse hors contrôle : correction obligatoire

3.4 - Définition du champ d'étude : équipe, produit, utilisation prévue, diagramme de fabrication, ...

Analyse des dangers, évaluation des risques, mise en place des mesures préventives.

Recherche des CCP (points critiques de maîtrise) avec pour chacun, la fixation de limites critiques et de mesures correctives.

Organisation de l'enregistrement de la procédure et des contrôles.

3.5.1.1 – DGCCRF : Direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes.

3.5.1.2 –

$$\frac{\text{massede matièresgrasses}}{\text{massed'extrait sec total}} \times 100$$

pourcentage de matières grasses dans le produit fini

3.5.2 -

Dénomination de vente

AOC

Nom ou raison sociale du fabricant

Numéro de lot de fabrication

Date limite

Masse nette et pourcentage de matière grasse

Conservation

Éléments de corrigé - sujets 2007

Supprimé: 6

Avertissement important : l'UPBM signale au lecteur qu'il s'agit d'éléments de corrigé, ayant pour but d'aider au mieux les étudiant(e)s dans leur préparation à l'examen, et non d'un corrigé-type.

ANGLAIS 2007

I. COMPRÉHENSION (10 points)

1. Tony Blair demande aux Britanniques d'être davantage responsables de leur santé face aux fléaux modernes que sont l'obésité, l'alcoolisme et le tabagisme. Pour lui, améliorer le bien-être de la population relève autant de choix personnels que de décisions gouvernementales.

En effet, obésité, tabac, alcoolisme sont le résultat de choix individuels qui ont un coût de plus en plus lourd pour la collectivité. Si les services de santé se doivent de toujours traiter efficacement les malades, le débat sur la santé en Grande Bretagne doit également porter sur la prévention des maladies et la responsabilité des individus quant à leur choix de vie.

Le rôle du gouvernement consiste à informer le public pour l'aider à faire les bons choix et à vivre plus sainement, sinon le gouvernement adoptera des mesures plus coercitives. (123 mots).

2. À l'avenir, la notion de santé publique ne peut se limiter aux soins des malades ; il s'agit aussi de nous aider à vivre sainement. Ceci exige plus d'efforts de la part de tous, qu'il s'agisse des individus, des entreprises ou du gouvernement. Concernant ce dernier, il doit encourager, il doit informer, mais, s'il le faut, il doit être prêt à agir plus fermement que jamais.

II. EXPRESSION EN ANGLAIS (10 points)

1. Smoking, drinking alcohol, eating fat food are matters of individual choice and personal freedom. Yet, obesity, alcoholism and cigarette addiction are likely to lead to serious diseases such as diabetes, heart condition or cancer. These illnesses often mean lesser productivity at work or lost work, they also require expensive treatment that generates heavy healthcare costs to be supported by the nation's budget.

Now isn't our consumer society largely responsible for encouraging young people to smoke, drink and eat junk food? (80 words)

2. The candidate may consider the following aspects related to the question :

• A ban on smoking will mean considerable gains for public health :

- employees who work long hours in pubs & restaurants will be protected from the effect of passive smoking,
- young people will have fewer opportunities to smoke at school,
- it can help those who want to stop,
- cigarette smoke is dangerous as it leads to heart disease & lung cancer (according to scientists, lung cancer kills more people than the other types of cancer combined), British physicians claim that a ban on smoking in the workplace will increase the country 's productivity significantly.

• Economic & social problems :

- a ban can increase the tension between smokers & non-smokers,
- some professions are concerned by the consequences (tobacconists, bar-tenders are afraid they will lose customers & revenues.)

Possible conclusion: non-smokers have the right to be protected, but can you 'force people to do what they don't choose to do'?

MATHÉMATIQUES 2007

EXERCICE 1 (10 points)

Dans cet exercice, on s'intéresse à un flotteur réalisé en plastique allégé.

1- Solution de l'équation différentielle (E) : $y' - y = -e^x$

1.1- Résolution de l'équation sans second membre associée $y' - y = 0$

La solution générale de cette équation est $y = C e^x$

1.2- On veut vérifier que $h(x) = -x e^x$ est une solution particulière de (E).

Pour cela on calcule : $h'(x) - h(x) = -e^x - x e^x - (-x e^x) = -e^x$. Donc h est bien une solution de (E)

1.3- La solution générale de (E) est donc définie sur \mathbb{R} par : $y(x) = C e^x - x e^x$

(Vérification : $y'(x) = C e^x - e^x - x e^x$ d'où : $y'(x) - y(x) = C e^x - e^x - x e^x - C e^x + x e^x = -e^x$)

1.4- On cherche alors la solution particulière qui vérifie la condition $f(0) = 2$

Cela donne $C = 2$

La solution cherchée est donc : $f(x) = (2 - x) e^x$

2- Etude de la fonction f sur $[-2 ; 2]$

Les variations de la fonction f sont données par le signe de sa dérivée.

Or $f'(x) = (1 - x) e^x$

Le signe de $f'(x)$ ne dépend que du signe de $1 - x$.

Cela donne le tableau de signe puis le tableau de variation suivant :

X	- 2	1	2
$f'(x)$	+	0	-
f			
	$4 e^{-2}$		0

Résolution de l'inéquation $f(x) \geq 2 - x$

$$(2 - x)e^x - (2 - x) \geq 0$$

$$(2 - x)(e^x - 1) \geq 0$$

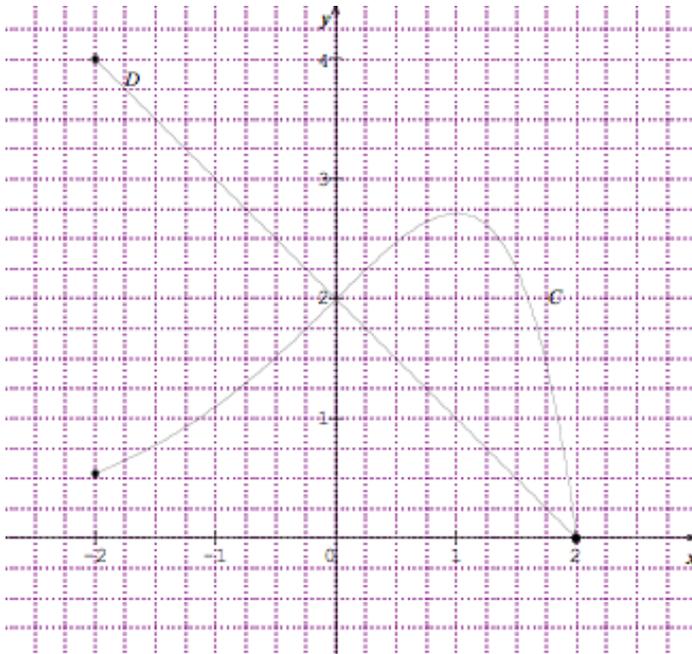
Tableau de signe :

x	- 2	0	2
$2 - x$	+		+
$e^x - 1$	-	0	+
$(2 - x)(e^x - 1)$	-	0	+

On a alors $S = [0 ; 2]$.

On retrouve graphiquement ce résultat en lisant l'ensemble des abscisses des points de la courbe qui se situent au dessus de la droite D d'équation $y = 2 - x$.

Graphique :



Pour démontrer que F est une primitive de $[f(x)]^2$, on calcule $F'(x)$:

$$\begin{aligned} F'(x) &= (x - \frac{5}{2})e^{2x} + 2e^{2x}(\frac{1}{2}x^2 - \frac{5}{2}x + \frac{13}{4}) \\ &= e^{2x}(x^2 - 4x + 4) \\ &= e^{2x}(x - 2)^2 \\ &= e^{2x}(2 - x)^2 \\ &= [f(x)]^2 \end{aligned}$$

Application : calcul du volume du flotteur :

$$\begin{aligned} V &= \pi \int_{-2}^2 [f(x)]^2 dx \\ &= \pi [F(x)]_{-2}^2 \\ &= \pi [(2 - 5 + \frac{13}{4})e^4 - (2 + 5 + \frac{13}{4})e^{-4}] \\ &= \frac{\pi}{4}(e^4 - 41e^{-4}) \text{ en u.v.} \end{aligned}$$

or l'unité graphique est 2cm, alors 1 u.v. = 2^3 cm^3 , d'où $V \approx 338,332 \text{ cm}^3$

EXERCICE 2 (10 points)

On s'intéresse maintenant au contrôle de la qualité de la fabrication du modèle de flotteur.

1- Loi binomiale

1.1- Chaque prélèvement de n flotteurs est constitué par n épreuves élémentaires indépendantes (tirage avec remise).

Chaque épreuve élémentaire (le tirage d'un flotteur) a deux issues possibles et deux seulement :

- le flotteur a une masse acceptable avec la probabilité $p = 0,26$
- ou
- le flotteur n'a pas une masse acceptable avec une probabilité $q = 0,74$.

La variable aléatoire X associée à ces tirages le nombre total de flotteurs dont la masse est acceptable.

Donc X suit la loi binomiale de paramètres n et $0,26$.

$$\text{Et } P(X=k) = C_n^k 0,26^k 0,74^{n-k}$$

1.2- On suppose $n = 6$

1.2.1- La probabilité d'avoir exactement 2 flotteurs acceptables est : $P(X = 2) \approx 0,30$

1.2.2- La probabilité d'avoir au plus 2 flotteurs acceptables est $P(X \leq 2) = P(X=0) + P(X=1) + P(X=2) \approx 0,81$

1.3- On prélève n flotteurs

1.3.1- calcul de $P(X=0)$: $P(X=0) = 0,74^n$

1.3.2- On cherche n_0 tel que $P(X \geq 1) \geq 0,95$.

Or $P(X \geq 1) = 1 - P(X=0)$

D'où $1 - P(X=0) \geq 0,95$ soit $P(X=0) \leq 0,05$

ce qui donne $(0,74)^n \leq 0,05$

$n \ln(0,74) \leq \ln 0,05$

$$n \geq \frac{\ln 0,05}{\ln 0,74} \quad \text{soit } \boxed{n_0 = 10}$$

2- Loi normale

Y est la variable aléatoire qui, à chaque flotteur associe sa masse exprimée en g.

Y suit une loi normale de moyenne 25 et d'écart-type 1,58

$$\mathbf{2.1-} P(X \leq 27) = P\left(T \leq \frac{27-25}{1,58}\right) \approx \Pi(1,27) \approx 0,90$$

avec $T = \frac{X-25}{1,58}$ (T suit la loi normale centrée réduite)

$$\mathbf{2.2-} P(X \leq 24,5) = P\left(T \leq \frac{-0,5}{1,58}\right) \approx 1 - \Pi(0,32) \approx 0,37$$

3- Probabilités conditionnelles

3.1- D'après l'énoncé :

$$P(A_1) = 0,60 \quad P(A_2) = 0,40 \quad P(D/A_1) = 0,013 \quad P(D/A_2) = 0,018$$

$$\mathbf{3.2-} P(A_1 \cap D) = P(D/A_1) \times P(A_1) = 0,0078$$

de même $P(A_2 \cap D) = P(D/A_2) \times P(A_2) = 0,0072$

D'où $P(D) = P(A_1 \cap D) + P(A_2 \cap D) = 0,015$

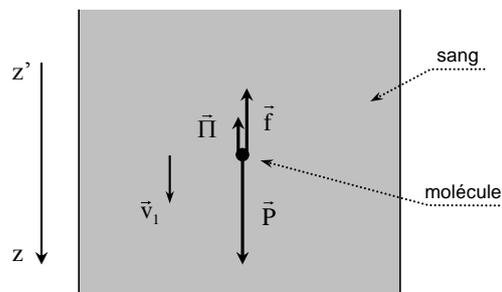
$$\mathbf{3.3-} \text{On peut calculer alors, } P(A_1/D) = \frac{P(A_1 \cap D)}{P(D)} = 0,52$$

SCIENCES PHYSIQUES ET CHIMIQUES 2007

A : SÉDIMENTATION : DÉCANTATION ET CENTRIFUGATION

1 – Séparation de l'hémoglobine du sang par décantation (sédimentation sous l'action de la pesanteur) :

1.1 – Représentation des forces qui s'exercent sur la molécule :



Expression de l'intensité des forces qui s'exercent sur la molécule en fonction des données :

Poids de la molécule : $P = mg = \rho Vg = \rho \frac{4}{3} \pi r^3 g$ (avec $r = 5.10^{-9}$ m)

Poussée d'Archimède : $\Pi = \rho_L Vg = \rho_L \frac{4}{3} \pi r^3 g$

Force de frottement : $f = 6 \pi \eta r v$

1.2 – Principe d'inertie appliqué à la molécule en mouvement rectiligne uniforme :

$$\vec{P} + \vec{\Pi} + \vec{f} = \vec{0}$$

Principe d'inertie en projection sur l'axe vertical descendant $z'z$: $P - \Pi - f = 0$

$$\text{soit } \rho \frac{4}{3} \pi r^3 g - \rho_L \frac{4}{3} \pi r^3 g - 6 \pi \eta r v = 0$$

$$\text{d'où } v_1 = \frac{\frac{4}{3} \pi r^3 g (\rho - \rho_L)}{6 \pi \eta r}$$

$$\text{d'où } v_1 = \boxed{\frac{2r^2 (\rho - \rho_L) g}{9\eta}}$$

$$\mathbf{1.3 - A.N. : } v_1 = \frac{2 \times (5.10^{-9})^2 \times (1,35.10^3 - 1,05.10^3)}{9 \times 4.10^{-3}} \times 9,81 \text{ soit } \mathbf{v_1 = 4,09.10^{-12} m.s^{-1}.}$$

1.4 – Durée t_1 nécessaire pour que la molécule sédimente sur une distance $d = 1$ mm :

$$v_1 = \frac{d}{t_1} \text{ d'où } t_1 = \frac{d}{v_1} = \frac{10^{-3}}{4,09.10^{-12}} \text{ soit } \mathbf{t_1 = 2,45.10^8 s = 7,76 \text{ ans.}}$$

2 – Séparation de l'hémoglobine du sang par centrifugation :

La molécule se trouve à une distance $R = 6$ cm de l'axe du rotor, le système tournant à $15\,000$ tr.min^{-1} soit $\omega = 1,57.10^3 \text{ rad.s}^{-1}$.

2.1 – Calcul de l'accélération a :

$$a = \omega^2 R = (1,57.10^3)^2 \times 6.10^{-2} \text{ soit } \mathbf{a = 1,48.10^5 m.s^{-2}.}$$

$$\text{Calcul de la valeur du rapport } a/g : \frac{a}{g} = \frac{1,48.10^5}{9,81} \text{ soit } \mathbf{a/g = 1,51.10^4 \approx 15\,100}$$

2.2 – Vitesse de migration de la molécule vers le fond du tube : $v_2 = \frac{2r^2(\rho - \rho_L)}{9\eta} a$.

$$v_2 = \frac{2 \times (5.10^{-9})^2 \times (1,35.10^3 - 1,05.10^3)}{9 \times 4.10^{-3}} \times 1,48.10^5 \quad \text{soit} \quad v_2 = 6,17.10^{-8} \text{ m.s}^{-1}.$$

2.3 – Nouvelle durée t_2 nécessaire pour que la molécule sédimente sur une distance $d = 1 \text{ mm}$:

$$t_2 = \frac{d}{v_2} = \frac{10^{-3}}{6,17.10^{-8}} \quad \text{soit} \quad t_2 = 1,62.10^4 \text{ s} = 4,50 \text{ heures.}$$

2.4 – Comparaison : $t_2 \ll t_1$ ($\frac{t_2}{t_1} = \frac{a}{g} = 15 \text{ } 100$).

L'intérêt de la centrifugation est de réduire notablement la durée de sédimentation des petites particules.

B : SPECTROPHOTOMÈTRE D'ABSORPTION ET RÉSEAU

1 – Dans les solutions de concentrations C connues, les ions Fe^{2+} sont complexés par de l'orthophénantroline, ce qui colore ces solutions en rouge.

Le rouge étant la couleur complémentaire du vert-bleu, ces solutions ont une absorbance maximale à 510 nm . On choisit donc 510 nm comme longueur d'onde de travail de manière à optimiser la précision et la sensibilité des mesures.

2 –

2.1 – La loi de Beer-Lambert s'écrit : $A = \epsilon \ell C$.

L'absorbance y apparaît donc proportionnelle à la concentration C , ce qui peut se noter sous la forme $A = a C$ où a est un coefficient de proportionnalité constant ($a = \epsilon \ell$).

On peut vérifier cette loi de trois manières différentes :

a) en calculant le rapport A/C pour la série de mesures.

C en mg.L⁻¹	0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
Absorbance A	0	0,35	0,72	1,10	1,46	1,88
A/C en L.mg⁻¹	X	0,1750	0,1800	0,1833	0,1825	0,1880

On obtient un rapport sensiblement constant, ce qui prouve la **proportionnalité** entre A et C , résultat en accord avec la première mesure ($C = 0$; $A = 0$).

La loi de Beer-Lambert est donc vérifiée.

b) en effectuant une régression linéaire à l'aide de la calculette.

On obtient une relation affine du type $y = a x + b$ (où $y = A$ et $x = C$ en mg/L), avec

$$a = 0,1873$$

$$b = -0,0181$$

$$r = 0,9997$$

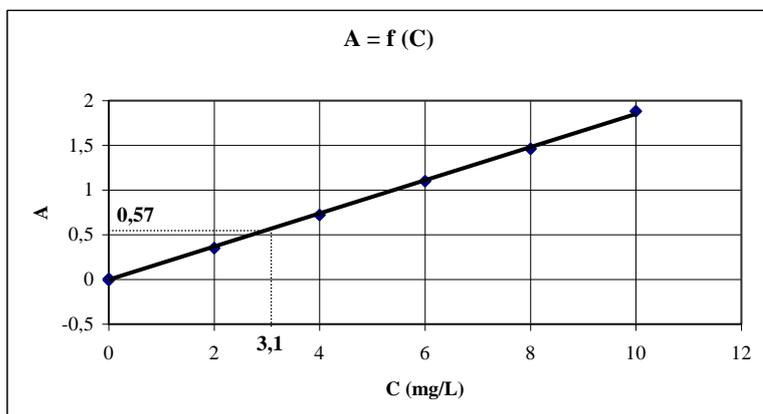
L'ordonnée à l'origine b est très faible et peut être considérée comme nulle.

Le coefficient de corrélation r est voisin de 1 donc la relation affine est validée.

Conclusion : **A et C sont proportionnels** ($A = a C$) et la loi de Beer-Lambert est vérifiée.

c) en traçant le graphe $A = f(C)$.

On obtient alors une **droite passant par l'origine**, ce qui prouve la **proportionnalité** entre A et C et donc la véracité de la loi de Beer-Lambert.



On obtient un coefficient $a = 0,1848 \text{ L.mg}^{-1}$.

2.2 – La concentration d’une solution d’absorbance $A = 0,57$ est obtenue de trois manières différentes :

a) à partir du rapport A/C calculé pour la série de mesures.

On calcule la moyenne des rapports obtenus avec les 5 mesures : $(A/C)_{\text{moy}} = 0,1818 \text{ L.mg}^{-1}$.

On en déduit la concentration : $C = A / 0,1818 = 0,57 / 0,1818$ soit $C = 3,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

b) à partir de la régression linéaire faite sur la calculette.

On obtient $A = a C$ avec $a = 0,1873 \text{ L.mg}^{-1}$.

On en déduit la concentration : $C = A / a = 0,57 / 0,1873$ soit $C = 3,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

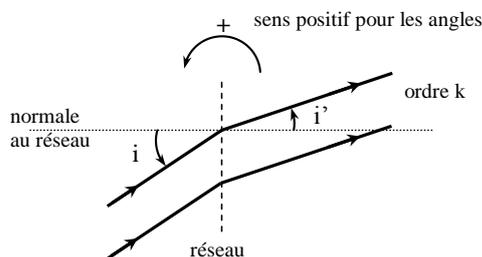
c) à partir du graphe $A = f(C)$, par lecture directe sur la courbe,

on obtient : $C = 3,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

3 – Réseau : $n = 1250 \text{ traits.mm}^{-1} = 1250.10^3 \text{ traits.m}^{-1}$; utilisé avec $\lambda = 510 \text{ nm} = 510.10^{-9} \text{ m}$.

Formule du réseau : $\sin i' - \sin i = k n \lambda$.

3.1 – Schéma du réseau :



3.2 – Termes de cette formule :

i angle d’incidence

i' angle de diffraction (ou d’émergence ou direction d’un maxima de lumière)

k ordre d’observation (entier relatif)

n nombre de traits par mètre du réseau

λ longueur d’onde de la radiation incidente

3.3 – Incidence normale : $i = 0$.

Pour l'ordre $k = 1$, l'angle d'émergence i' de la radiation choisie ($\lambda = 510 \text{ nm}$) est donné par

la relation : $\sin i' - \sin i = k n \lambda$ avec $\sin i = \sin 0^\circ = 0$

soit $\sin i' = k n \lambda$

d'où $\sin i' = 1 \times 1250 \cdot 10^3 \times 510 \cdot 10^{-9}$ d'où $i' = 39,6^\circ$.

C : OXYDORÉDUCTION ET COMPLEXATION**1 – Pile :**

- Demi-pile (1) : $\text{Pb} | \text{Pb}^{2+} + 2 \text{NO}_3^-$; $V_1 = 100 \text{ mL}$; $C_1 = 0,100 \text{ mol.L}^{-1}$;

$$E_{\text{Pb}^{2+}/\text{Pb}}^\circ = E_1^\circ = -0,13 \text{ V}.$$

- Demi-pile (2) : $\text{Ag} | \text{Ag}^+ + \text{NO}_3^-$; $V_2 = 100 \text{ mL}$; $C_2 = 0,050 \text{ mol.L}^{-1}$;

$$E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^\circ = E_2^\circ = 0,80 \text{ V}.$$

1.1 – Demi équation électronique correspondant à la demi pile (1) : $\text{Pb} = \text{Pb}^{2+} + 2 e^-$

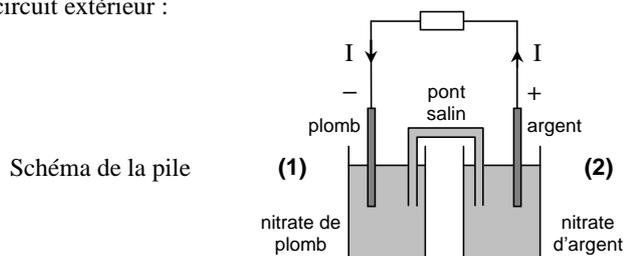
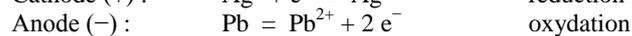
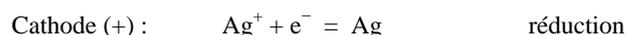
$$E_1 = E_{\text{Pb}^{2+}/\text{Pb}}^\circ + \frac{RT}{2F} \log [\text{Pb}^{2+}] = E_1^\circ + \frac{0,06}{2} \log [\text{Pb}^{2+}]$$

$$E_1 = -0,13 + \frac{0,06}{2} \log (0,1) \quad \text{soit} \quad E_1 = -0,16 \text{ V}.$$

1.2 – Demi équation électronique correspondant à la demi pile (2) : $\text{Ag} = \text{Ag}^+ + e^-$

$$E_2 = E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^\circ + \frac{RT}{F} \log [\text{Ag}^+] = E_2^\circ + 0,06 \log [\text{Ag}^+]$$

$$E_2 = 0,80 + 0,06 \log (0,05) \quad \text{soit} \quad E_2 = 0,72 \text{ V}.$$

1.3 – $E_2 > E_1$ donc le pôle positif de la pile est la lame d'argent de la demi-pile (2).**1.4 – Schéma de la pile avec polarités des électrodes et sens de circulation du courant électrique dans le circuit extérieur :****1.5 – Équation de la réaction globale dans la pile en fonctionnement :****1.6 – Force électromotrice E (f.é.m.) de la pile en début de fonctionnement :**

$$E = E_2 - E_1 = 0,72 - (-0,16) \quad \text{soit} \quad E = 0,88 \text{ V}.$$

2 – On ajoute $n_0 = 15.10^{-3}$ mol de NH_3 dans la demi-pile (2), sans modification de volume. La demi-pile (2) adopte alors le nouveau potentiel $E_2' = 0,45$ V.

2.1 – Équation de formation de l'ion complexe : $\text{Ag}^+ + 2 \text{NH}_3 = \text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$

2.2 – Calcul de la nouvelle concentration C_2' en ions argent Ag^+ dans la demi-pile (2) à l'équilibre :

Nouveau potentiel : $E_2' = E_2^\circ + 0,06 \log [\text{Ag}^+]$

$$\text{d'où } \log [\text{Ag}^+] = \frac{E_2' - E_2^\circ}{0,06} \quad \text{d'où } C_2' = [\text{Ag}^+] = e^{\frac{E_2' - E_2^\circ}{0,06}} = e^{\frac{0,45 - 0,80}{0,06}}$$

$$\text{soit } C_2' = 1,47.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}.$$

2.3 – On remarque que $C_2' \ll C_2$ ($1,47.10^{-6} \ll 0,05$) donc la réaction de formation de l'ion complexe $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ est **quasi-totale**.

2.3 – Bilan molaire de la réaction de formation de l'ion complexe :

Bilan molaire	Ag^+	+	2NH_3	=	$\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$
État initial	$C_2 V_2 = 5.10^{-3}$ mol		$n_0 = 15.10^{-3}$ mol		0
État final : $x_{\text{max}} = 5.10^{-3}$ mol	$5.10^{-3} - x = C_2' V_2 \approx 0$		$15.10^{-3} - 2x = 5.10^{-3}$		$x = 5.10^{-3}$

$$2.4 - \beta = \frac{[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+]_{\text{éq}}}{[\text{Ag}^+]_{\text{éq}} [\text{NH}_3]_{\text{éq}}^2}$$

$$2.5 - \text{Avec } [\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+]_{\text{éq}} = [\text{NH}_3]_{\text{éq}} = \frac{5.10^{-3}}{0,100} = 5.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1},$$

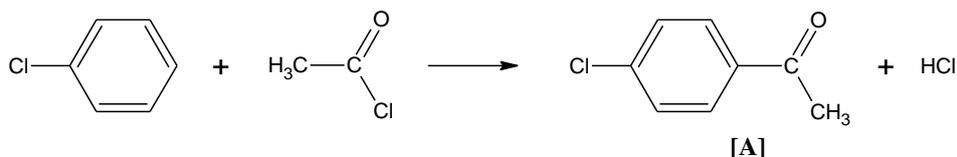
$$\text{et } [\text{Ag}^+]_{\text{éq}} = 1,47.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1},$$

$$\text{on obtient } \beta = \frac{5.10^{-2}}{1,47.10^{-6} \times (5.10^{-2})^2} \quad \text{soit } \beta = 1,36.10^7.$$

D : CHIMIE ORGANIQUE

1 –

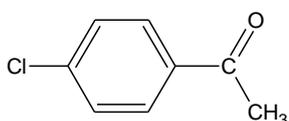
1.1 – Équation de la réaction du chlorobenzène avec le chlorure d'éthanoyle :



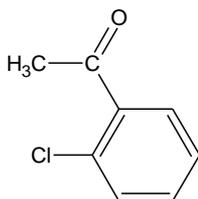
1.2 – Type de la réaction : **substitution électrophile**.

1.3 – Le catalyseur usuellement employé est le chlorure d'aluminium AlCl_3 (acide de Lewis).

1.4 – Par son effet mésomère donneur, le chlore active le cycle et oriente la substitution en positions ortho et para (la position ortho étant défavorisée à cause de l'encombrement stérique) :



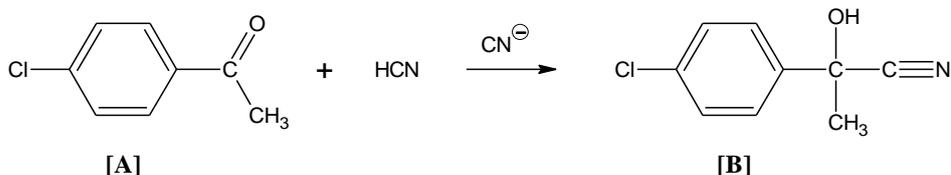
[A] : isomère para



[A] : isomère ortho

2 – [A] est traité par l'acide cyanhydrique HCN ; on obtient un composé [B] de formule brute C_9H_8NOCl .

2.1 – Équation de la réaction de l'acide cyanhydrique HCN sur [A] :



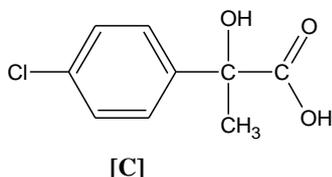
2.2 – Fonctions organiques présentes dans la molécule [B] :

- Fonction alcool (-OH) ;
- Fonction nitrile (-CN) ;
- Fonction dérivé halogéné (-Cl) ;
- Fonction aromatique (-C₆H₄-) ;

2.3 – Type de réaction : **addition nucléophile.**

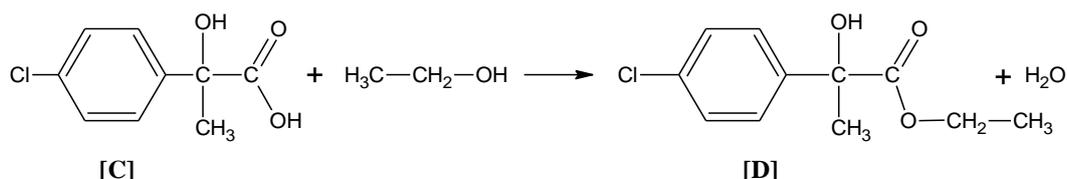
3 – L'hydrolyse du composé [B] conduit à la formation d'un acide carboxylique [C], dont la formule brute est $C_9H_7O_3Cl$.

Formule semi-développée de [C] :



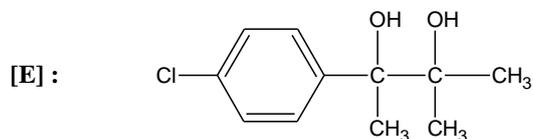
4 – Le composé [C] réagit avec l'éthanol pour donner le composé [D].

4.1 – Équation de la réaction :



4.2 – Nom de cette réaction : **estérification.**

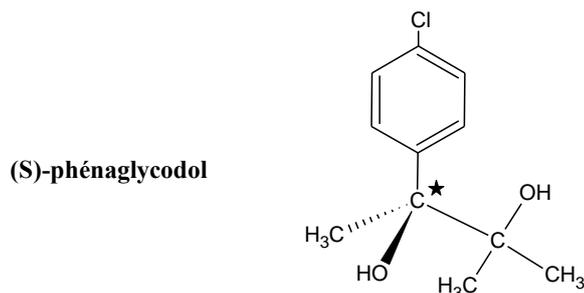
5 – Le composé [D] est traité par un large excès de CH_3MgBr . Après hydrolyse, on obtient le phénaglycodol [E] de formule :



5.1 – Le composé CH_3MgBr appartient à la famille des **organomagnésiens**.

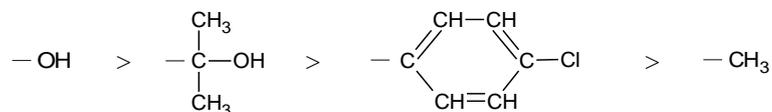
5.2 – Il peut exister **2 stéréoisomères** du phénaglycodol [E] car ce composé comporte **un atome de carbone asymétrique** noté C^* (ayant 4 substituants différents).

5.3 – Représentation de Cram d'un des stéréoisomères du phénaglycodol :



La configuration absolue R ou S (ici S) est déterminée à l'aide des règles C.I.P. :

- Classement des 4 groupements du carbone asymétrique par ordre de priorité décroissante, la priorité étant fondée sur la valeur du numéro atomique (ou de la masse atomique pour les isotopes) des atomes liés au C^* (1^{er} ordre), puis des atomes suivants (ordres 2, 3, ...):

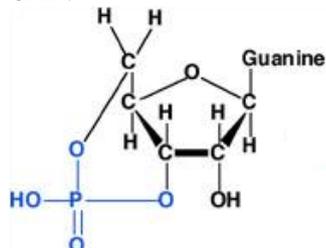


- On place le substituant de plus faible priorité (ici $-\text{CH}_3$) vers l'arrière. Les 3 autres substituant étant regardés de face, si on descend les priorités en tournant dans le sens trigonométrique, la configuration absolue est S, mais si on doit tourner dans le sens des aiguilles d'une montre, la configuration est R.

BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007

1- Mode d'action du principe actif, le citrate de sildénafil.**1.1.1.**

GMPc

**1.1.2.** $\text{GMP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{GMPc}$ **1.1.3.** Classe des hydrolases (Classe 3)

1.1.4. Réaction exergonique ($\Delta G^\circ < 0$), donc réaction totale dans le sens de l'hydrolyse. La réaction d'hydrolyse étant totale, l'effet de signal de second messenger est donc rapidement éteint.

1.2.**1.2.1.**

Équation de Lineweaver-Burk à démontrer à partir de l'équation de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

1.2.2. Paramètres de régression (a, b et r ou r²)En absence de Sildénafil : $Y = 356,28x + 19,12$

• $V_m = 1/19,12 = 0,052 \text{ UA}$

r = 0,99994

• $K_m = 19 \text{ mM}$

En présence de Sildénafil : $Y = 778,53x + 18,875$

• $V_m = 0,053 \text{ UA}$

r = 0,99999

• $K_m = 41 \text{ mM}$

1.2.3. V_m inchangé ; K_m augmente donc le Sildénafil agit comme inhibiteur compétitif vis-à-vis du GMPc des PDE5.

(Schéma éventuel)

conséquences physiologiques : en inhibant les PDE5, le Sildénafil permet de prolonger l'effet de signal du second messenger, donc relâchement des muscles lisses des artérioles vasculaires prolongé.

1.2.4. A partir de l'équation $K'_M = K_M \cdot (1 + \frac{[I]}{K_i})$ on peut écrire $K'_M = \frac{K_M}{K_i} \cdot [I] + K_M$ et ainsi sur

le tracé $K'_M = f([I])$ on aura $A = K_M$ et $B = -K_i$

$$K_i = (K_M \times [I]) / (K'_M - K_M) \quad \text{donc, } K_i = (19 \times 0,5) / (41 - 19) = 0,43 \text{ mM}$$

1.3.

1.3.1. Caractéristiques des isoenzymes = molécules protéiques présentant une activité enzymatique similaire mais qui possèdent des propriétés physiques, chimiques et cinétiques spécifiques.

1.3.2. Electrophorèse + Principe de l'électrophorèse.

1.3.3.1. Enzyme allostérique \equiv Enzyme impliquée dans des régulations métaboliques et dont la caractéristique structurale majeure consiste en une organisation de niveau quaternaire

(plusieurs protomères). De plus : enzyme sous forme active (R) ou inactive (T), cinétique non Michaélienne, présence de sites actifs et régulateurs sur chaque protomère.

1.3.3.2. Domaine : Unité structurale constituée de combinaisons d'éléments de structure secondaire et de motifs connectés par des boucles.

1.3.3.3.

• Le signe α associé correspond à un motif structural secondaire : hélice α .

Caractéristiques structure α :

- niveau secondaire
- stabilisé par des liaisons H inter liaisons peptidiques parallèles à l'axe de rotation de l'hélice
- hélice droite de 3,6 résidus par tour
- les chaînes latérales pointent vers l'extérieur de l'hélice

• Les lettres correspondent aux résidus d'acides aminés de la séquence protéique. Portion de séquence résidu 88 à 96.

	88	96
Mouse :	G-I-A-G-H-V-A-I-I-	
Human :	G-I-V-G-H-V-A-A-L	

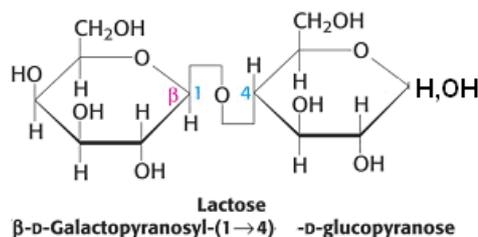
Résidus 90, 95 et 96 modifiés. Alanine remplacé par Valine (résidu 90); Isoleucine par Alanine (résidu 95) et Isoleucine par Leucine (résidu 96).

Les acides aminés modifiés sont de même nature (aliphatique), il n'y aura aucune incidence sur la structure secondaire entre les deux espèces donc conservation de la structure α .

2. Le lactose excipient de choix en galénique issu de l'industrie agro-alimentaire.

2.1. Le lactose, structure et propriétés

2.1.1.



2.1.2. Oui, le pouvoir réducteur porté par le carbone porteur d'un $-OH$ hémiacétalique non engagé dans la liaison osidique.

2.1.3. Réduction du 3,5-dinitrosalicylate par le lactose avec formation d'un produit coloré. Lecture de l'absorbance au spectrophotomètre.

2.2. Les étapes de purification du lactose.

2.2.1. Étape d'ultrafiltration

2.2.1.1. En mode tangentiel : Le perméat contient les petits solutés (Lactose, sels minéraux, acide lactique). Le rétentat contient, en plus des petits solutés, les grosses particules qui sont retenues par la membrane d'ultrafiltration (essentiellement les protéines et les matières grasses, d'après **document 5**). En effet le seuil de coupure indique que le diamètre des pores de la membrane retient des molécules de masse $>$ à 8000 kD.

En mode frontal : le perméat contient la phase liquide et les petits solutés alors que le rétentat correspond aux grosses molécules retenues sur la membrane.

2.2.1.2. Le taux de rétention R est compris entre 0 et 1.

Rétention nulle si $C_l = C_p$ alors $R = 0$ Rétention totale si $C_p = 0$, alors $R = 1$.

La membrane 3 est la meilleure des trois car R se rapproche de 1

2.2.2. Étape de déminéralisation par chromatographie d'échange d'ions

2.2.2.1. Bon choix de la résine cationique : groupement sulfonique (Re-SO_3^-); groupement carboxyle ($\text{Re-CH}_2\text{-COO}^-$);

Réaction d'échange :

$\text{Re-COO}^-, \text{H}^+ + \text{Cations}^+ \rightleftharpoons \text{Re-COO}^-, \text{Cations}^+ + \text{H}^+$

Le perméat élué s'acidifie car la résine cationique perd ses protons.

2.2.2.2. Capacité d'échange = n_{H^+} décrochés/masse de résine = $C_{\text{NaOH}}V_{\text{NaOH}}$ /masse de résine
donc Capacité d'échange = 2,4 mmol de cation monovalent / g de résine sèche.

2.2.3. Étape de cristallisation

2.2.3.1. La valeur lue au réfractomètre dépend de la valeur de l'extrait sec de la solution. Plus la cristallisation sera poussée, moins il restera de substances en solution donc plus l'extrait sec sera faible et donc plus la valeur lue au réfractomètre sera faible.

2.2.3.2. Dépend de la température (inversement proportionnel), de la longueur d'onde de la lumière (indice du milieu quand l augmente) et bien sur de la concentration en sucre.

2.2.3.3. Position du OH hémiacétalique sur le C1 de résidu glucose. On suit l'interconversion anomérique par la mesure du pouvoir rotatoire (polarimètre)

2.3. Mise au point du dosage du lactose par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

2.3.1. Système chromatographique :

- chromatographie en **phase inverse** : phase stationnaire Hypersil APS-2, phase mobile acétonitrile/eau (80/20)
- débit constant (1mL/min).
- granulométrie de la phase stationnaire : 5 μ m
- longueur de la colonne : 100 mm
- diamètre interne de la colonne : 3mm
- Volume injection : 10 mL.

2.3.2. Schéma annoté comportant : Flacons phase mobile ; pompes ; injecteur ; colonne, détecteur, évacuation.

Autres détecteurs utilisés : Spectrophotomètre UV/Visible ; fluorimètre, réfractomètre....

2.3.3. Méthode d'étalonnage externe.

Exemple de calcul :

Dilution au 1/10^o de la solution stock (1mg/mL)

Gamme 0,1- 0,2- 0,4- 0,6-0,8- 1 mL de la dilution

Compléter avec le solvant (mélange HCL à 0,01M, éthanol/eau) qsp 1 MI

2.3.4.

2.3.4.1. Signal plus élevé avec la position « Off ».La sensibilité est un paramètre exprimant la variation du signal de sortie d'un appareil de mesure en fonction de la variation du signal d'entrée.

2.3.4.2. Tr (temps mis par le composé depuis l'injection jusqu'à la détection), Tr environ 2,25 minutes

2.3.5. Justesse. Réalisation pratique : Six injections de la solution étalon à 80 mg/mL ; moyenne des résultats et calcul de l'écart avec le standard.

Autre paramètre : fidélité

3 . Effets secondaires du médicament

3.1.1. Voie de la glycogénolyse.

Glycogène phosphorylase catalyse la réaction de phosphorolyse à partir des extrémités non-réductrices de la molécule de glycogène. Il y a libération de Glucose-1-Phosphate.

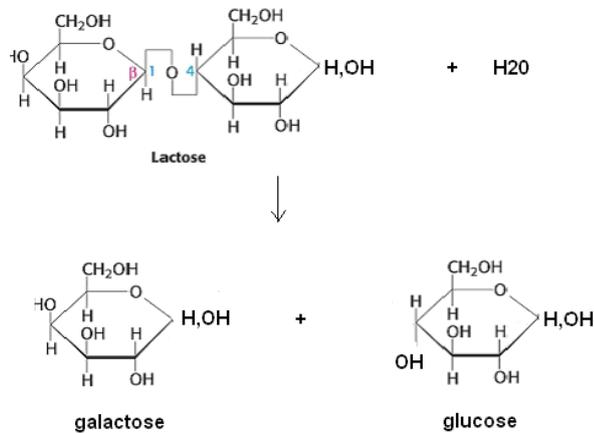
Une *Glucosidase* enzyme à activité « débranchante », clive l'unique résidu restant pour donner du glucose libre :

3.1.2. Glycogène phosphorylase existe sous deux formes interconvertibles :

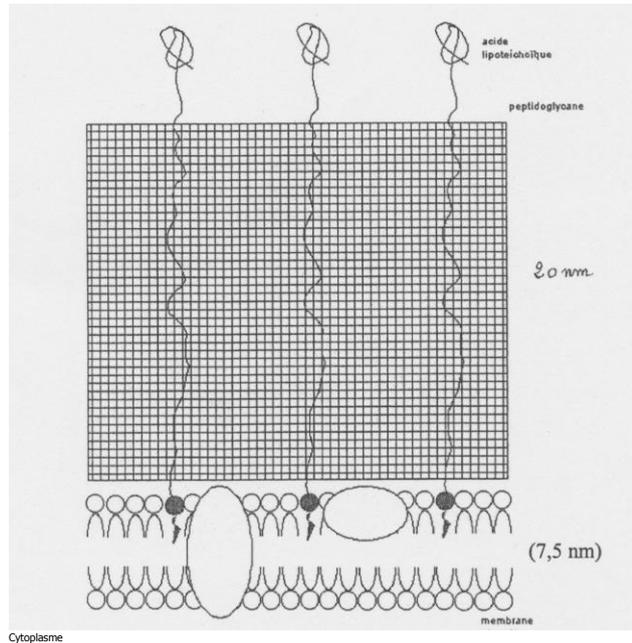
Gpa active sous forme phosphorylée et GPb inactive sous forme déphosphorylée.

Action d'un couple phosphatase/phosphorylase dans le mécanisme.

3.2.



BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE 2007

1 - Caractéristiques des souches de probiotiques.**1.1 - Aspects morphologiques et physiologiques.****1.1.1.1 -**

Termes attendus dans la légende : peptidoglycane, acide (lipo)teichoïque, membrane plasmique (avec protéines et phospholipides).

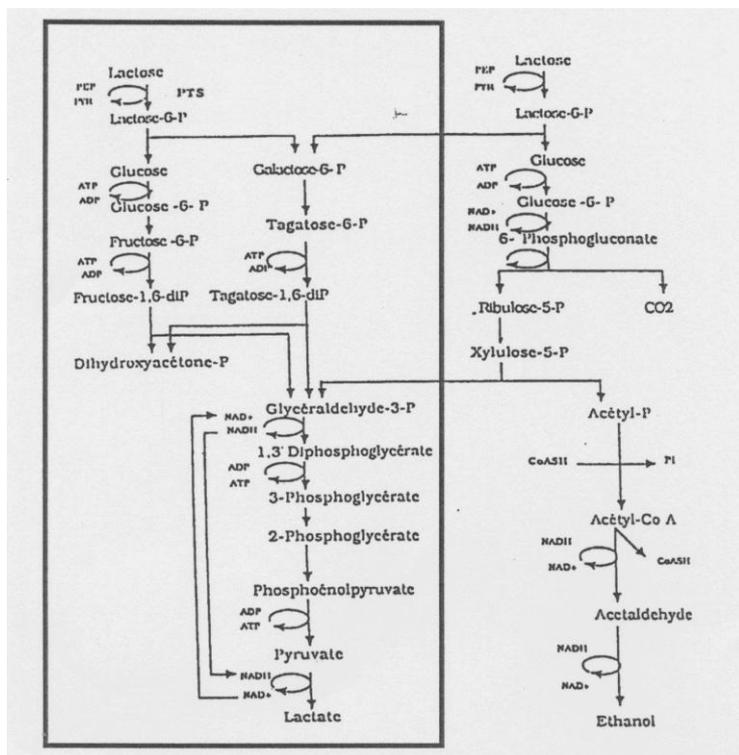
1.1.1.2 - Type trophique énergétique : Chimioorganotrophe = ATP produit par des réactions d'oxydo-réduction (respiration ou fermentations) à partir d'un donneur d'électrons de nature organique.

Type trophique carboné : Hétérotrophe, la bactérie peut fabriquer toutes ses molécules carbonées à partir d'une source de C organique.

1.1.1.3 - Polyauxotrophe.

1.1.2-

1.1.2.1 - Métabolisme homofermentaire : concerne ici le catabolisme du lactose qui aboutit à une production exclusive d'acide lactique.



1.1.2.2 - Les souches de *Lactobacillus* sont anaérobies aérotoles. Elles n'ont pas de catalase ce qui les rend sensibles à H_2O_2 mais, contrairement aux bactéries anaérobies strictes, possèdent des peroxydases qui leur permettent d'éliminer une partie de H_2O_2 .

1.2 - Propriétés spécifiques des probiotiques.

1.2.1 - Bouche (salive) : lysozyme, estomac : acidité gastrique, intestin : sels biliaires.

1.2.2 - Flore dominante (99 °A) : anaérobies stricts (10^8 à $10^{10}/g$) : (*Bacteroides*), non sporulés (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*), sporulés (*Clostridium*) et (*Peptostreptococcus*).

Flore sous-dominante (1 %) : anaérobies facultatifs (10^7 à $10^8/g$) ; *E.coli* et streptocoques fécaux (*Streptococcus* et *Enterococcus*).

Flore variable d'un individu à l'autre (10^2 à $10^5/g$) ; entérobactéries, levures et moisissures.

1.2.3 -

1.2.3.1 - Environ 10^8 UFC.g-1.

1.2.3.2 - Le taux de *Lactobacillus* est maximal dans l'intestin dès le 4^{ème} jour de consommation et durant toute la période d'alimentation ; ce taux correspond à la concentration dans le lait. Dès que l'alimentation supplémentée cesse, le taux diminue. Par comparaison, les spores mettent plus de temps à « s'implanter ».

A priori, le probiotique utilisé ici ne s'implante pas vraiment dans l'intestin (ni au niveau de la muqueuse, ni au niveau du mucus) puisque le taux intestinal (fécal en fait) correspond à celui de l'aliment : il n'y a pas multiplication et ce taux régresse dès l'arrêt du traitement. Donc probablement simple survie dans la lumière intestinale.

1.2.3.3 - Permet d'avoir des micro-organismes résistants aux conditions hostiles du tube digestif.

1.2.4-

1.2.4.1 - Molécule apolaire. Perméabilité par voie lipophile.

1.2.4.2 - Formation d'un complexe antibiotique — ARN polymérase. Inhibition de la transcription.

1.2.4.3- Mécanismes de résistance aux antibiotiques :

- pas d'entrée de l'antibiotique ou excrétion active,
- destruction ou modification de l'antibiotique,
- modification de la cible,
- changement de voie métabolique.

2 - Avantage de l'utilisation de souches probiotiques sur l'hôte.**2.1 - Inhibition du développement des bactéries entéro-pathogènes.**

2.1.1 - TIA = ensemble des accidents résultant de l'ingestion d'un aliment contaminé par des microorganismes pathogènes

2.1.2 -

2.1.2.1 - Fixation de la bactérie aux entérocytes au niveau de glycolipides.

Secrétions de toxines protéiques de type AB dans l'intestin.

La sous-unité B se fixe sur la membrane.

La sous-unité A pénètre dans la cellule.

A stimule l'adényl-cyclase → production importante d'AMPc ou GMPc → provoque une sortie active de chlorures et donc d'eau.

2.1.2.2 - Le réservoir de la bactérie est l'homme (malade ou porteur sain). Transmission par ingestion d'eau (ou d'aliments) contaminés. Mains sales.

2.1.2.3 - Effet de biomasse : la colonisation des sites intestinaux par les probiotiques ne laisserait plus de place pour la fixation des bactéries entéro-pathogènes.

Production de molécules toxiques à activité antibactérienne plus ou moins spécifiques : acides, bactériocines...

2.2 - Amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire.

2.2.1 - La bêta-galactosidase « hydrolyse » le lactose du lait en galactose et glucose. Les souches de probiotiques possédant une bêta-galactosidase pourront hydrolyser le lactose du lait.

2.2.2 -

2.2.2.1 - L'ONPG peut être hydrolysé par la bêta-galactosidase bactérienne en galactose + ONP- qui est jaune.

À partir d'une culture en milieu solide, faire une suspension dense et ajouter un disque imprégné de réactif. Incuber à 37°C entre 15 minutes et 24 heures. Test positif : coloration jaune de la suspension.

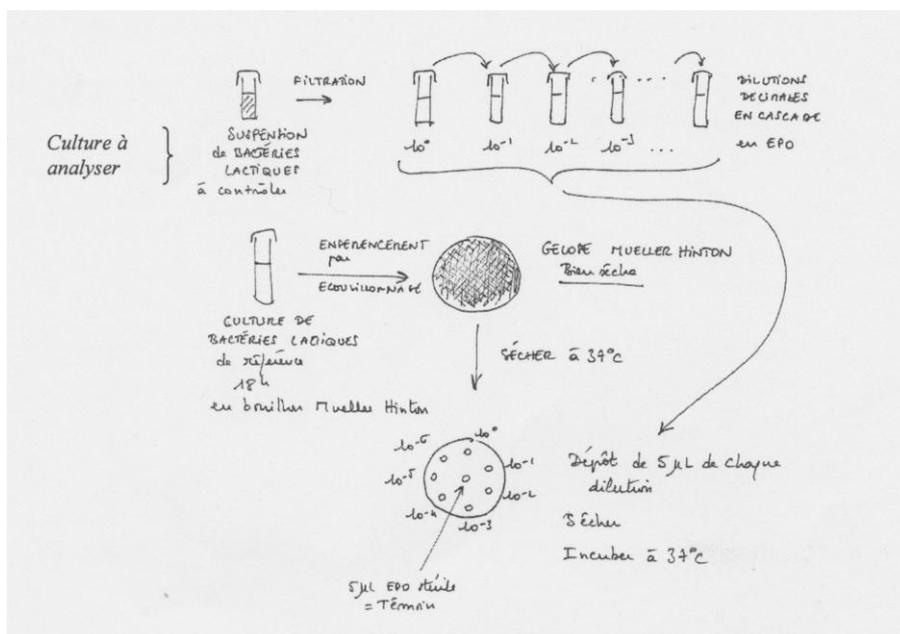
2.2.2.2 - Une bactérie lactose- peut avoir un déficit en lactose-perméase ou en bêta-galactosidase ou ne posséder aucune de ces deux enzymes fonctionnelles

L'ONPG peut, au moins en petite quantité, pénétrer dans la bactérie sans passer par la lactose-perméase, donc on peut discriminer si la bactérie est lac-ONPG+ (lactoseperméase non fonctionnelle, bêta-gal fonctionnelle) ou bien lac-ONPG- (lacperméase et/ou bêta-gal non fonctionnelles)

3- Production de souches probiotiques au niveau pilote.**3.1 - Processus de culture.**

3.1.1 - Batch. Les souches lactiques produisant beaucoup d'acide, leur croissance peut être freinée précocement.

3.1.2 - Dénombrement des bactériophages par la technique des micro-gouttes :



3.2 – Étude des conditions de production de *Bifidobacterium longum*.

3.2.1 - American type culture collection. La souche a été référencée par la banque de souches américaine.

3.2.2 -

3.2.2.1 - Perméat de lactosérum : le lactosérum issu du caillage du lait et ultra-filtré contient essentiellement du lactose et des ions.

3.2.2.2 -

0,2 g Na_2CO_3

0,5 g cystéine

25 g perméat de lactosérum

Peptone	Source de C, N et énergie
Extraits de viande et de levure	Source de facteurs de croissance non spécifiques
Glucose	Source de C et énergie
Perméat de lactosérum	Source de lactose (C et énergie) et d'ions (maintien de la pression osmotique)
Tween 80	Source d'acide gras = facteurs de croissance spécifique
Hydrogénophosphate de potassium	Maintien du pH
Acétate de sodium et citrate d'ammonium	Inhibiteurs
Sulfate de Mg et Mn	Source de macro nutriments minéraux spécifiques
Cystéine	Agent réducteur du milieu = protection vis à vis de O_2

3.2.3-

3.2.3.1 - Utiliser un cryoprotecteur tel que le glycérol à 10 % environ.

3.2.3.2 - Environ 66 mL.

3.2.4 -

3.2.4.1 - Les cultures réalisées en triple permettent de tester la répétitivité des résultats et de donner les résultats avec une incertitude.

3.2.4.2 - Dilutions décimales en cascade. Ensemencement de 3 dilutions choisies en surface (0,1 mL d'inoculum) sur gélose MRS. Incubation en jarre + 10 % CO₂.

3.2.5 -

3.2.5.1 - En a) la culture est faite en MRS, dont le seul glucide du milieu est le glucose.

En b) la culture est faite en MRS+perméat de lactosérum, dont le milieu contient du glucose et du lactose apporté par le perméat.

3.2.5.2 - En MRS, le glucose est complètement consommé au bout de 10 heures de culture alors qu'en MRS-WP, c'est le lactose qui est consommé préférentiellement et disparaît au bout de 12 heures, mais il reste un taux résiduel de glucose correspondant à environ le 1/3 du taux de départ.

D'autre part, le galactose produit est certainement également consommé par la souche.

La production d'acides lactique et acétique est plus forte en MRS-WP qu'en MRS seul : un peu moins d'1/3 de plus en acide lactique et 2 fois plus d'acide acétique.

Il est probable que le milieu MRS-WP favorise la culture de la bactérie car les glucides ne constituent pas un facteur limitant comme dans le MRS

**BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET TECHNOLOGIES
D'ANALYSE 2007**
1 - Le virus *influenza* de la grippe aviaire.
1.1 - Morphologie du virus *influenza*

1.1.1 - ARN (-) = Ne peut pas être traduit car non reconnu par les ribosomes. Il doit être transcrit en ARNm pour être exprimé. La séquence est complémentaire à celle de l'ARNm.

- 1.1.2**- 1) protéine associée à l'ARN (-) ou autre réponse possible : nucléocapside
2) capsid
3) ARN viral
4) bicouche lipidique ou enveloppe
5) protéines de l'enveloppe ou spicules

1.2 - Phase de pénétration du virus dans une cellule animale

- 1.2.1** 1) puits recouvert ou puits tapissé
2) vésicule recouverte ou vésicule tapissée
3) endosome
4) virus ou particule virale

1.2.2 - Adhésion du virus à un puits recouvert de clathrine. Reconnaissance des protéines d'enveloppe virale par des récepteurs membranaires. Invagination de la membrane et formation d'une vésicule recouverte.

1.2.3 - Reconnaissance spécifique de cellules cibles.

1.3 - Phase de décapsulation

1.3.1 - Les lysosomes.

1.3.2 - l'acidification du contenu de l'endosome (grâce à l'activité des pompes à H⁺.)

1.4 - Phases précoce et tardive

1.4.1 - Transcriptase : enzyme permettant la formation d'ARNm à partir d'ARN (-) pour la synthèse des protéines.

Réplicase : enzyme permettant la formation d'ARN (+) à partir de l'ARN viral (-) et de reconstituer le génome viral ARN (-) à partir des ARN (+) néosynthétisés.

1.4.2 - Phase précoce : étape au cours de laquelle est assurée la synthèse des protéines permettant la réplication des ARN génomiques.

Phase tardive : étape au cours de laquelle sont synthétisées les protéines de structure de la capsid et de l'enveloppe.

1.4.3 - Le début de la traduction aboutit à la synthèse d'un peptide signal (extrémité NH₂). Ce peptide signal est reconnu par une protéine (SRP), elle-même reconnue par un récepteur spécifique présent sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique rugueux. Le peptide signal s'ancre dans la membrane du réticulum où s'organise un canal par lequel la protéine pénètre dans la lumière du réticulum. Le peptide signal est clivé lors de cette translocation. (Ces protéines à destinée membranaire s'ancrent dans la membrane du réticulum endoplasmique.)

1.5- Maturation des protéines virales

1.5.1 - Titre : appareil de Golgi.

Légendes :

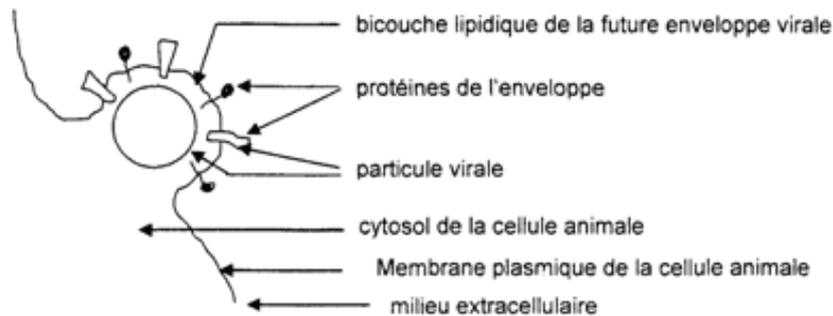
- 1) face cis
- 2) citerne/dictyosome
- 3) vésicule de transport
- 4) face trans

1.5.2 - Des glycosylations, clivages protéolytiques, assemblage des sous unités....

1.6 - L'exocytose des particules virales

1.6.1- Les vésicules d'exocytose bourgeonnent de l'appareil de Golgi. Les protéines virales doivent présenter une région riche en acides aminés apolaires (hydrophobes) s'intégrant dans la bicouche lipidique.

1.6.2-



2 - Sérodiagnostic de la grippe aviaire par précipitation.

2.1 - Dépôt de l'Ag et de l'Ac dans 2 puits au sein d'un gel d'agarose. L'antigène et l'anticorps diffusent l'un vers l'autre en créant un gradient de concentration décroissant. À la zone d'équivalence, il y a formation d'un arc de précipitation.

2.2 -

2.2.1 - Pour S1, S3, S4, S7, S8 et S9, il n'y a pas d'arc de précipitation. Ces sérums ne présentent pas d'anticorps vis-à-vis des antigènes testés. Ces sérums sont négatifs.

Les sérums S2, S6, S11 et S5 présentent un arc de précipitation de forte intensité. (S5 présente 2 arcs de précipitation : 1 de forte intensité, 1 de faible intensité). Ces sérums contiennent des anticorps dirigés contre les antigènes testés. Ils sont positifs.

S10 présente un arc petit et de faible intensité. Il est douteux ou positif.

S12 présente un arc de faible intensité. Il est douteux ou positif.

Les sérums positifs S2, S5, S6, S11 et les sérums douteux S10 et S12 sont repris dans l'étape de confirmation.

2.2.2 - Pour S2 : Présence d'un arc avec l'Ag⁺ et cet arc fusionne avec celui du couple S⁺/Ag⁺, absence d'arc avec l'Ag⁻, Sérum positif.

Pour S5 : Présence d'un arc avec l'Ag⁺ et cet arc fusionne avec celui du couple S⁺/Ag⁺, absence de cet arc avec l'Ag⁻.

Présence d'un arc de faible intensité avec l'Ag⁺, absent chez le couple S⁺/Ag⁺ mais persistant avec l'Ag⁻ : mise en évidence d'hétéroanticorps. Sérum positif contenant également d'autres anticorps antiviraux.

Pour S6 : Présence d'un arc avec l'Ag⁺ ne fusionnant pas avec l'arc du couple S⁺/Ag⁺. Cet arc n'est pas présent avec l'Ag⁻. Sérum positif (faible concentration).

Pour S10 : Présence d'un arc de faible intensité avec l'Ag⁺ qui ne fusionne pas avec l'arc du couple S⁺/Ag⁺ et qui persiste avec l'Ag⁻. Présence d'Ac non représentatifs d'une infection par le virus aviaire (= hétéroanticorps). Sérum négatif.

Pour S11 : Présence d'un arc avec l'Ag⁺ qui croise avec l'arc du couple S⁺/Ag⁺ et qui persiste avec l'Ag⁻ (= hétéroanticorps). Sérum négatif.

Pour S12 : Présence d'un arc de faible intensité avec l'Ag⁺ qui fusionne avec l'arc du couple S⁺/Ag⁺.

Absence d'arc avec l'Ag⁻. Sérum positif.

3 - Contrôle de la vaccination contre la grippe aviaire par méthode ELISA.

3.1 - ELISA : Enzym Linked ImmunoSorbent Assay.

3.2- Pour les groupes 1 et 2, on obtient des résultats positifs identiques pour les trois méthodes.

Pour les groupes 3 et 4, on détecte des résultats positifs plus précocément après la vaccination avec les méthodes AGP et ELISA .

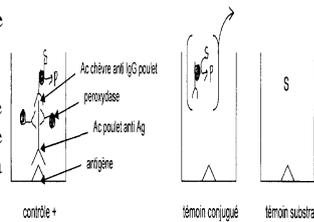
Ce sont donc des méthodes plus sensibles que la méthode HI.

3.3-

3.3.1 - Contrôle + sert à vérifier la qualité des réactifs et que la réaction spécifique a bien lieu.

Témoins -:

- Témoin conjugué: on n'introduit pas dans la cupule d'Ac de poulet anti Ag (remplacé par du PBS). Ce témoin permet de vérifier que le conjugué (anti IgG de poulet couplé à la peroxydase) ne se fixe pas ailleurs que sur l'IgG de poulet.



Témoin substrat : on n'introduit pas de conjugué dans la cupule (remplacé par du PBS). Permet de vérifier que le substrat ne s'hydrolyse pas spontanément.

3.3.2-

- Méthode ELISA indirecte.
- Méthode sensible car il y a amplification de la réaction (plusieurs enzymes pour un IgG de poulet).
- Méthode moins onéreuse car un seul type de conjugué peut reconnaître toutes les IgG de poulet quelle que soit leur spécificité pour un Ag.
- Méthode automatisable —> rapidité.
- Méthode quantitative.

SCIENCES ET TECHNOLOGIES BIOINDUSTRIELLES 2007

1 –

1.1- Molécule possédant un effet thérapeutique

1.2- Excipient : facilite la fabrication du médicament, l'administration et la conservation du principe actif

1.3- Lactose : filière lait et produits lactés

Gélatine : filière viandes et produits carnés

1.4-

1.4.1- Contamination par le prion contenu dans la viande de bœuf atteint d'ESB (Encéphalopathie Spongiforme Bovine), maladie de la vache folle.

1.4.2- Augmentation de la surface de contact entre couenne et HCl
Hydrolyse chimique du collagène et dissociation des cellules.

1.4.3- Extraction des protéines hydrolysées.
Liquéfaction de la graisse éliminée par écrémage.

1.4.4- Acidification : pH
Stérilisation : température
Atomisation : aw

1.4.5-

1.4.5.1- Procédé de déshydratation par pulvérisation ou nébulisation d'un produit liquide sous forme de microgouttelettes dans un courant d'air sec et très chaud permettant une évaporation poussée et quasi instantanée de l'eau.

1.4.5.2-

1 - entrée du produit liquide ;
2 – nébuliseur (buse d'atomisation) ;
3 – chambre de séchage (1 cyclone) ;
4 – sortie du produit séché en poudre ;
5 – cyclone de dépoussiérage de l'air ;
6 – sortie des fines ;
7 – entrée d'air chaud et sec ;
8 – sortie d'air humide

1.4.5.3- Stockage et transport plus pratique.

Conservation longue à température ambiante à l'abri de l'humidité car aw faible.

2-

2.1- Choix d'un référentiel (ISO 17 025 pour les laboratoires de contrôles), mise en place du système qualité et documentaire, dépôt de demande auprès du COFRAC, audit interne et correction, audit externe, délivrance ou non de l'accréditation et suivi.

2.2- COFRAC Comité Français d'ACCréditation.

2.3- Homogénéité d'un mélange de poudre : analyse d'un constituant du mélange sur des prélèvements effectués en différents endroits du mélangeur.

2.4-

2.4.1- NQA (Niveau de Qualité Acceptable) : pourcentage maximum toléré de non conformes, accepté par consentement mutuel entre le producteur et le client.

2.4.2- 1^{er} tableau : 5 000 gélules → taille de l'échantillon n= 200 .

2^{ème} tableau : NQA = 0,065 → A = 0 et R = 1.

Contrôle de la masse de 200 gélules sur chaque lot de 5 000 gélules. Sur les 200 gélules contrôlées, refus du lot si la masse d'une seule gélule n'est pas dans le critère de masse fixée ($150 \pm 0,3$ mg).

2.5-

2.5.1- Distribution normale (Loi de Gauss : masses distribuées symétriquement autour d'une moyenne de 0,150 g avec aspect en cloche).

2.5.2- Toutes les masses mesurées sont à l'intérieur de l'intervalle des valeurs de spécification (149,7 à 150,3 mg). Le nombre de non conformes est égal à 0, inférieur à $R = 1$. Lot accepté

3-

3.1- Étude du devenir du principe actif dans l'organisme : A (Absorption) D (Distribution) M (Métabolisme) E (Élimination).

3.2- Forme galénique : présentation médicamenteuse formulée la mieux adaptée à l'objectif recherché et fonction de la voie d'administration

Voie orale : comprimé, sirop ; voie sanguine : perfusion, injection ; voie anale : suppositoire ; etc.

3.3-

3.3.1- Émulsion : mélange d'au moins deux liquides non miscibles, l'un formant la phase dispersante ou continue et l'autre la phase dispersée ou discontinue.

3.3.2- H/L : la phase la plus importante, dispersante, est lipophile, la phase dispersée est hydrophile.

3.3.3- L'élévation de température diminue la viscosité et augmente la dispersion donc la stabilité de l'émulsion.

3.3.4- Présence de tensioactif ou émulsionnant diminuant la tension superficielle entre les deux phases.

Schéma.

côté hydrophile vers la phase discontinue (stabilisant les gouttelettes hydrophiles) et pôle hydrophobe vers la phase continue lipophile.

3.4-

3.4.1- Schéma.

Soudan III hydrophobe colorant de la phase dispersante lipophile en bleu violet et les gouttelettes hydrophiles en rouge.

3.4.2- Gouttelettes d'huile dans une phase non colorée : émulsion inversée et de répartition non homogène.

Production non conforme.

4-**4.1-**

1 : vignette de remboursement ;

2 : code AMM ;

3 : identification du producteur du médicament (adresse, raison sociale) ;

4 : nom commercial du médicament ;

5 : Nom et dosage du principe actif ;

6 : forme galénique ;

7 : numéro du lot de production ;

8 : date limite d'utilisation.

4.2- Autorisation de Mise sur le Marché délivrée par l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) et/ou l'EMA (agence européenne du médicament).

4.3- Pharmacovigilance : suivi des risques et des effets inattendus d'un médicament, liés à son utilisation au delà de son AMM. Elle est assurée par les professionnels de santé et les entreprises de médicament coordonnés par l'AFSSAPS.

Rappel éventuel possible d'un médicament par son n° lot (traçabilité).