

# Brevet de technicien supérieur

## Bioanalyses et contrôles

Sujets et corrigés  
Sessions 2018 - 2019



UPBM-Édition  
Publications de l'UPBM

# **ANNALES**

# **BTS BIOANALYSES**

# **ET CONTRÔLES**

Sessions 2018 et 2019

Avec éléments de corrigés

Nous remercions tout particulièrement monsieur Sylvain ANDRÉ (IA-IPR de biotechnologies - génie biologique) pour la transmission des sujets et monsieur Antoine GAUDIN pour la réalisation de la couverture.

Merci également aux professeurs de l'enseignement technologique et général qui ont participé à la collecte des sujets, aux relectures et propositions de corrigés.

Éditions UPBM-ÉDILION Lycée de la Martinière Avenue Andrei Sakharov 69339 LYON Cedex 9 <a href="http://www.upbm.org">http:// www.upbm.org</a>
---

Sujets et corrections collectés et mis en page par Michèle ROBLIN, Nathalie GÉRAULT et Lydie NOSSEREAU.

Les photos de couverture correspondent à des résultats d'activités technologiques d'étudiants en STS BioAC

De haut en bas et de gauche à droite :

- Étude du métabolisme microbien en microplaque
- Culture *in vitro* de pommes de terre
- Intégration d'un gène de protéine fluorescente chez *E. coli*
- Culture d'un contaminant aérien sur gélose PCA

## RÈGLEMENT D'EXAMEN

Épreuves	Unités	Coef	Type d'épreuve	Durée	Forme
			Voie scolaire, apprentissage, formation professionnelle continue dans les établissements publics, privés non habilités, enseignement à distance et candidats justifiant de 3 ans d'expérience professionnelle	Formation professionnelle continue dans les établissements publics habilités	
<b>E1 Anglais</b>	U10	<b>2</b>	CCF 2 épreuves en fin de deuxième année		2 situations d'évaluation
<b>E2 Mathématiques et Sciences physiques et chimiques</b>		<b>5</b>		4 h	
Sous-épreuve de mathématiques	U21	2	écrit	2 h	
Sous-épreuve de sciences physiques et chimiques	U22	3	écrit	2 h	
<b>E3 Biochimie, biologie et technologie d'analyses</b>		<b>9</b>	écrit	8 h	
Sous-épreuve de Biochimie et technologies d'analyse	U31	3	écrit	3 h	
Sous-épreuve de microbiologie et technologies d'analyse	U32	3	écrit	3 h	
Sous-épreuve de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	U33	3	écrit	2 h	
<b>E4 Sciences et technologies bioindustrielles</b>	U40	<b>3</b>	écrit	2 h	
<b>E5 techniques d'analyses et de contrôles et opérations unitaires</b>		<b>10</b>		2X12 h maxi	
Sous-épreuve de techniques de biochimie	U51	4	CCF 2 épreuves en fin de première et deuxième année	4 h maxi	2 situations d'évaluation pratique en laboratoire
Sous-épreuve de techniques de microbiologie	U52	4	CCF 2 épreuves en fin de première et deuxième année	6 h maxi	2 situations d'évaluation pratique en laboratoire
Sous-épreuve de techniques de biologie cellulaire et moléculaire	U53	2	CCF 2 épreuves en fin de première et deuxième année	3 h maxi	2 situations d'évaluation pratique en laboratoire
<b>E6 Soutenance de projet</b>	U60	<b>4</b>	oral	45 min	
<b>Épreuve facultative : langue vivante étrangère</b>	UF1	<b>1</b> (points au-dessus de la moyenne)	oral	20 min	

## TABLE DES MATIÈRES

### SUJETS

<b>Session 2018</b> .....	<b>1</b>
Sujet de mathématiques 2018 .....	2
Sujet de sciences physiques et chimiques 2018.....	6
Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2018 .....	12
Sujet de microbiologie et de technologies d'analyse 2018 .....	22
Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et de technologies d'analyse 2018.....	32
Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2018 .....	40
<b>Session 2019</b> .....	<b>49</b>
Sujet de mathématiques 2019 .....	50
Sujet de sciences physiques et chimiques 2019.....	54
Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2019 .....	59
Sujet de microbiologie et technologies d'analyse 2019 .....	69
Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse 2019.....	80
Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2019 .....	88

### CORRECTIONS

<b>Corrections session 2018</b> .....	<b>98</b>
Éléments de corrigé de mathématiques 2018.....	98
Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2018.....	100
Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2018 .....	102
Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2018 .....	105
Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2018.....	108
Éléments de corrigé de sciences et technologies bioindustrielles 2018 .....	111
<b>Corrections session 2019</b> .....	<b>113</b>
Éléments de corrigé de mathématiques 2019.....	113
Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2019.....	115
Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2019 .....	117
Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2019 .....	120
Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2019.....	122
Éléments de corrigé de sciences et technologie bioindustrielles 2019 .....	124

# **Session 2018**

# Sujet de mathématiques 2018

La calculatrice est autorisée.

## Exercice 1

La scanographie est un procédé radiologique, réalisé à l'aide d'un scanner, qui permet de reconstruire informatiquement l'image d'une coupe du corps humain à partir d'une série d'analyses. Elle permet notamment de détecter des tumeurs. Dans cet exercice, on s'intéresse aux scanographies réalisées dans un hôpital.

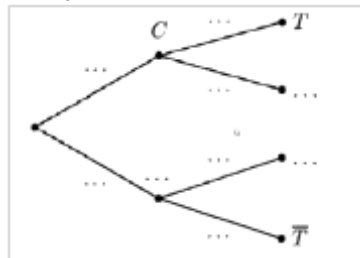
### PARTIE A

Une étude effectuée dans cet hôpital montre que :

- 60 % des scanographies effectuées concernent le cerveau et, parmi celles-ci, 20 % détectent une tumeur
- 90 % des autres scanographies effectuées ne détectent pas de tumeur au patient.

Parmi les patients de l'hôpital qui ont besoin d'une scanographie, on en choisit un au hasard. On note  $C$  l'événement « le patient fait une scanographie du cerveau » et  $T$  l'événement « le patient a une tumeur ».

1. Recopier et compléter l'arbre pondéré ci-contre :

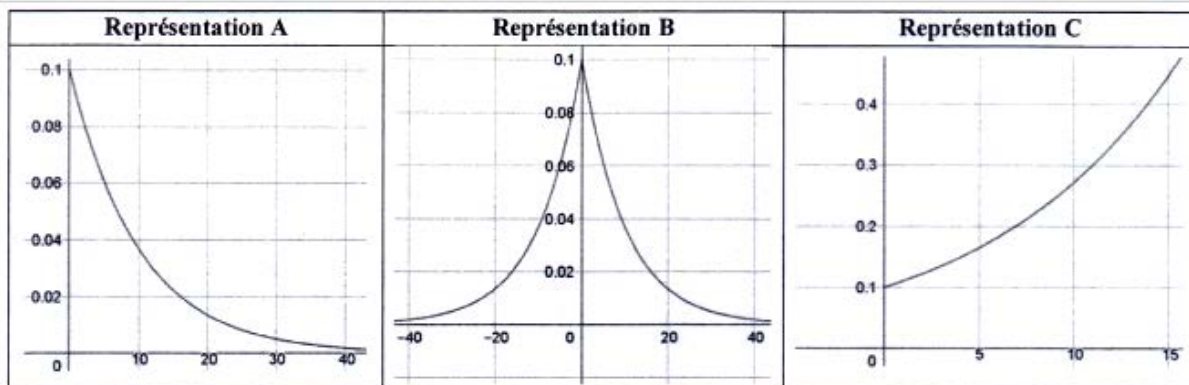


2. Montrer que la probabilité que le patient a une tumeur est égale à 0,16.
3. La scanographie permet de détecter une tumeur au patient. Quelle est la probabilité que cette tumeur ait été détectée au cerveau ?
4. Sur un échantillon de 40 patients atteints d'une tumeur au cerveau, un médecin constate que 25 patients ont été guéris après un traitement approprié.
  - a) Donner une estimation ponctuelle  $f$  de la proportion inconnue  $p$  de patients guéris d'une tumeur au cerveau après un traitement approprié.
  - b) Estimer maintenant cette proportion  $p$  par un intervalle de confiance au seuil de 95 % (on prendra des valeurs approchées à  $10^{-3}$  près pour les bornes de l'intervalle).

### PARTIE B

On admet que le délai d'attente en jours pour réaliser une scanographie à cet hôpital suit une loi exponentielle de paramètre  $\lambda$  et que le délai d'attente moyen est égal à 10 jours.

1. Déterminer la valeur de  $\lambda$ .
2. Parmi les trois représentations graphiques ci-dessous, une seule représentation correspond à la densité de probabilité de cette loi exponentielle. Sans justifier la réponse, indiquer la représentation correspondante.



3. On rappelle que, si  $T$  est une variable aléatoire qui suit la loi exponentielle de paramètre  $\lambda$ , alors pour tout réel  $t$  de  $[0; +\infty[$ , on a :  $P(T \leq t) = 1 - e^{-\lambda t}$ .  
 Déterminer alors la probabilité, arrondie au millième, que le délai d'attente d'un patient pour une scanographie ne dépasse pas 8 jours.

**PARTIE C**

Cette partie est un questionnaire à choix multiples. Pour chacune des questions, trois réponses sont proposées, dont une seule est exacte. Le candidat portera sur la copie le numéro de la question suivi de la réponse choisie. On ne demande pas de justification. Aucun point n'est enlevé en l'absence de réponse ou en cas de réponse fausse.

On admet que la probabilité, arrondie au centième, que le délai d'attente d'un patient pour une scanographie ne dépasse pas 8 jours est égale à 0,55.

On construit aléatoirement un échantillon de 200 patients de l'hôpital, qui se voient prescrire une scanographie. On appelle  $X$  la variable aléatoire égale au nombre de ces patients dont le délai d'attente ne dépasse pas 8 jours.

**Question 1 :**

La variable aléatoire  $X$  suit :

- A) la loi binomiale de paramètres 200 et 0,55 ;
- B) la loi normale de paramètres 200 et 0,55 ;
- C) la loi exponentielle de paramètres 200 et 0,55.

**Question 2 :**

La probabilité que le quart de ces 200 patients ait un délai d'attente qui ne dépasse pas 8 jours est égale à :

- A)  $P(X \leq 8)$
- B)  $P(X = 1/4)$
- C)  $P(X = 50)$ .

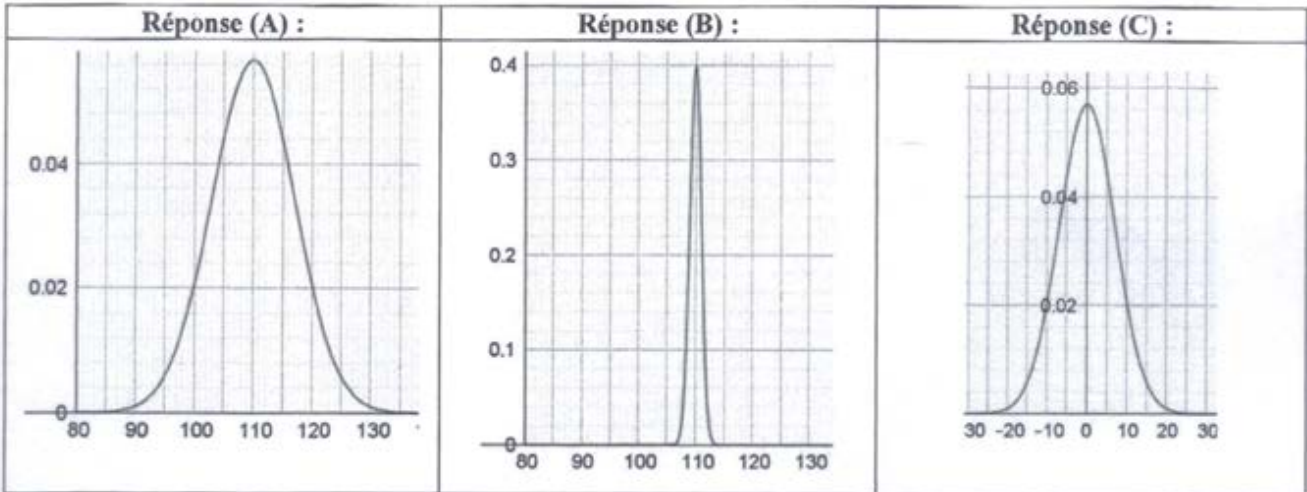
**Question 3 :**

La probabilité que moins de la moitié des 200 patients ait un délai d'attente qui ne dépasse pas 8 jours est égale à  $10^{-3}$  près à :

- A) 0,021
- B) 0,068
- C) 0,932.

**Question 4 :**

On admet que la loi suivie par la variable aléatoire  $X$  peut être approchée par une loi normale. La représentation graphique de cette loi normale est alors :



**Exercice 2 : (11 points)**

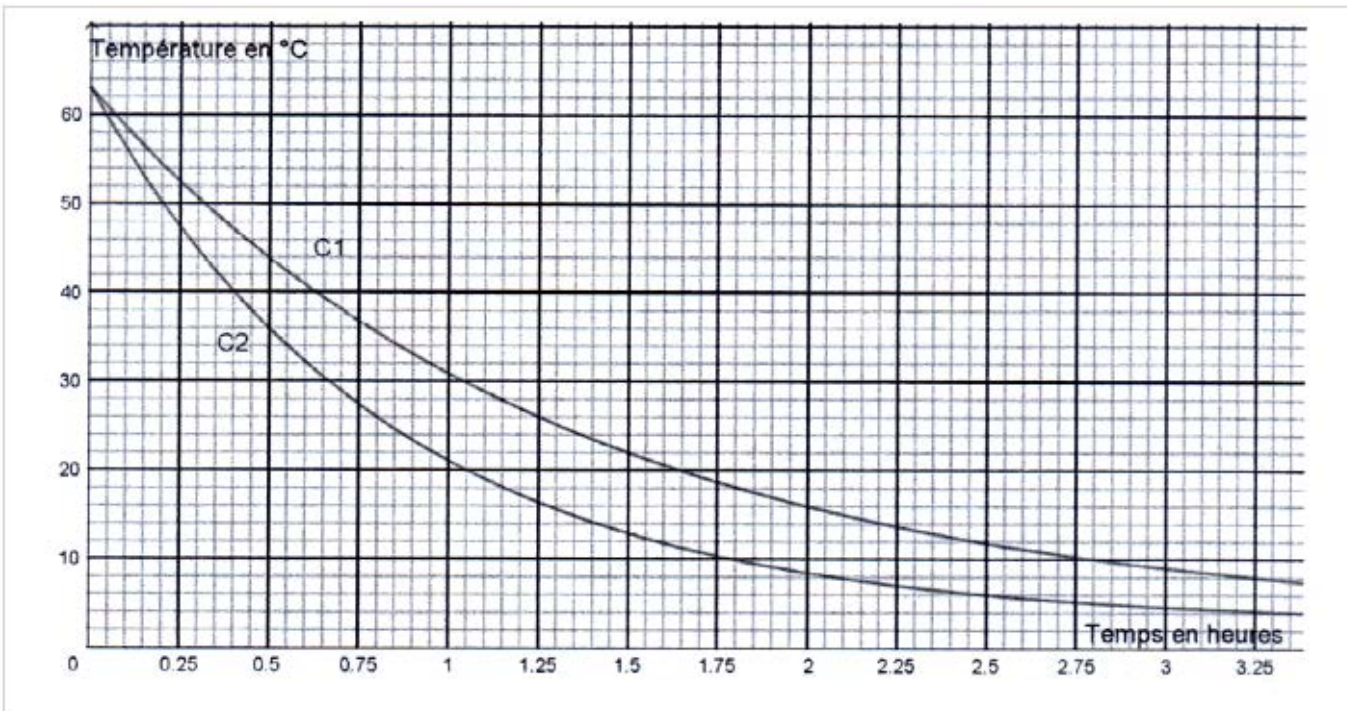
Lors du processus de fabrication de plats cuisinés en restauration collective, le refroidissement est une phase cruciale pour éviter la croissance de germes. La réglementation impose que le refroidissement rapide des barquettes de plats cuisinés soit opéré de telle manière que leur température ne demeure pas à des valeurs comprises entre +10 °C et +63 °C pendant plus de 2 heures (arrêté du 8 octobre 2013, dispositions particulières applicables aux établissements de restauration collective).

Une entreprise de restauration collective fabrique des barquettes de plats cuisinés, soumises à une attention particulière : lorsqu'elles ont atteint une température de +63 °C, elles sont placées dans une cellule de refroidissement rapide, et cela afin de respecter la réglementation précédente.



**PARTIE A**

On procède à deux réglages différents de la cellule de refroidissement rapide (réglage n° 1 et réglage n° 2). Sur le graphique ci-dessous, sont représentées les courbes C1 et C2, qui correspondent respectivement à la température d'une barquette placée dans la cellule en fonction du temps pour le réglage n°1 et pour le réglage n°2.



1. Indiquer la température de la barquette au bout de 90 minutes dans la cellule de refroidissement rapide avec le réglage n° 1.
2. a) Le réglage n° 1 satisfait-il à la réglementation définie ci-dessus ? Justifier.  
 b) Le réglage n° 2 satisfait-il à la réglementation définie ci-dessus ? On estimera, avec ce réglage, combien de temps la barquette doit rester dans la cellule de refroidissement rapide pour atteindre une température de + 10°C.
3. Un employé en charge du réglage de la cellule de refroidissement rapide affirme que la température de la barquette baisse de 5 % toutes les minutes avec le réglage n° 2. Expliquer pourquoi cette affirmation est en contradiction avec la courbe C2.
4. Dans cette question, on admet que la température de la barquette baisse de 2 % toutes les minutes avec un réglage n° 3. Recopier et compléter les lignes 3, 4 et 5 de l'algorithme ci-dessous afin que ce dernier permette de déterminer au bout de combien de temps la température de la barquette sera inférieure à + 10°C :

```

1  N ← 0
2  T ← 63
3  Tant que .....
4  Affecter à N la valeur .....
5  Affecter à T la valeur .....
6  Fin Tant que
    
```



**PARTIE B**

Dans toute cette partie, la température de la cellule de refroidissement rapide est réglée à +3°C (afin que la température de la barquette ne soit jamais inférieure à +3 °C).

Pour le réglage n° 2, la température de la barquette est modélisée par une fonction  $f$  qui, à tout temps  $t$  en heures, associe la température  $f(t)$  de la barquette en °C.

1. On admet que la fonction  $f$  est solution de l'équation différentielle  $y' = -1,2(y - 3)$  sur  $[0; + \infty[$ .
  - a) Démontrer que cette équation différentielle s'écrit encore sous la forme (E) :  $y' + 1,2y = 3,6$ .
  - b) Déterminer les solutions de l'équation différentielle  $y' + 1,2y = 0$  sur  $[0; + \infty[$ .
  - c) Vérifier que la fonction constante  $t \rightarrow 3$  est une solution particulière de l'équation différentielle (E). En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E).
  - d) Expliquer pourquoi  $f(0) = 63$ . Déduire de ce qui précède une expression de  $f(t)$  pour tout réel  $t$  de  $[0; + \infty[$ .

Dans ce qui suit, on admet que, pour tout réel  $t$  de  $[0; + \infty [$ ,  $f(t) = 60e^{-1,2t} + 3$ .

2. Donner la valeur arrondie à  $10^{-2}$  de  $f(2)$ . Interpréter dans le contexte de l'exercice.
3. Déterminer la limite de la fonction  $f$  en  $+\infty$ . Interpréter dans le contexte de l'exercice.

4. Avec un logiciel de calcul formel, on obtient  $\frac{1}{1,5-0} \int_0^{1,5} f(t)dt \approx 30,8$  (à  $10^{-1}$  près). Interpréter ce résultat

dans le contexte de l'exercice.

5. Pour le réglage n° 1, la température de la barquette est modélisée par une fonction  $g$ , qui, à tout temps  $t$  en heures, associe la température  $g(t)$  de la barquette en °C. On admet que la courbe C1 est la représentation graphique de cette fonction  $g$ .

En s'inspirant de la forme de l'expression de la fonction  $f$  proposer une expression de  $g(t)$  pour tout réel  $t$  de  $[0; + \infty [$ . Expliquer la démarche.

**Formulaire**

**Intervalle de confiance d'une proportion**

On mesure une fréquence  $f$  d'un caractère d'un échantillon de taille  $n$  et on souhaite estimer la proportion  $p$  inconnue de la population toute entière. L'intervalle de confiance à 95% de la proportion  $p$  inconnue est l'intervalle centré sur  $f$  :

$$\left[ f - 1,96\sqrt{\frac{f(1-f)}{n}}; f + 1,96\sqrt{\frac{f(1-f)}{n}} \right]$$

**Lois de probabilités suivies par la variable aléatoire X**

Nom de la loi	Paramètre(s)	Espérance $E(X)$	Ecart type $\sigma(X)$
Binomiale	$n$ et $p$	$np$	$\sqrt{np(1-p)}$
Normale	$\mu$ et $\sigma$	$\mu$	$\sigma$
Poisson	$\lambda$	$\lambda$	$\sqrt{\lambda}$
Exponentielle	$\lambda$	$\frac{1}{\lambda}$	$\frac{1}{\lambda}$

**Équation différentielle :  $ay' + by = 0$**

Les solutions sont les fonctions de la forme  $f(t) = ke^{-\frac{b}{a}t}$  où  $k$  est une constante réelle.

# Sujet de sciences physiques et chimiques 2018

Matériel autorisé : L'usage de tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé. Tout autre matériel est interdit.

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

## A : DOSAGE D'UNE SOLUTION DE BLEU DE MÉTHYLÈNE (8,5 points)

Le bleu de méthylène est un colorant pour préparation microscopique utilisé essentiellement pour colorer les noyaux et autres structures oxydantes afin d'apprécier plus précisément le nombre de cellules mortes.

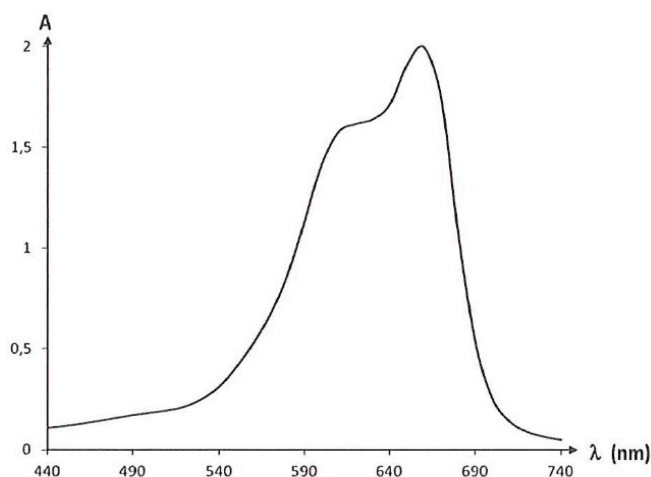
Les solutions colorantes utilisées sont obtenues par dissolution du bleu de méthylène dans de l'eau distillée.

Un personnel de laboratoire souhaite déterminer avec précision la concentration du colorant d'une solution X dont l'étiquette porte l'indication : « *Bleu de méthylène 1,0 g·L<sup>-1</sup>* ».

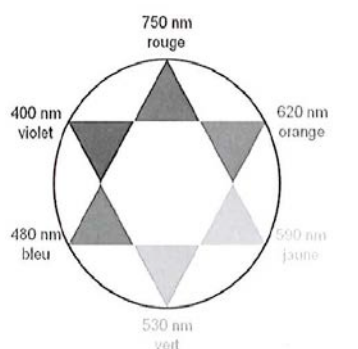
On note  $C_x$  la concentration en bleu de méthylène de la solution X. La détermination de cette concentration se fait par spectrophotométrie.

On mesure l'absorbance  $A$  d'une solution de bleu de méthylène pour différentes longueurs d'onde  $\lambda$  du rayonnement visible.

La courbe d'absorbance obtenue est donnée ci-dessous :



1. A partir de la courbe d'absorbance du bleu de méthylène et de l'étoile chromatique ci-contre :



1.1. Déterminer la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la solution de bleu de méthylène.

1.2. Justifier la couleur de la solution de ce colorant.

2. Afin de déterminer la concentration  $C_x$  de la solution X en bleu de méthylène, on a dilué une solution mère de bleu de méthylène et réalisé une gamme de solutions filles de concentrations  $C_F$ .

L'absorbance  $A$  des solutions filles a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur la longueur d'onde  $\lambda = 660 \text{ nm}$ .

L'absorbance nulle  $A = 0$  a été fixée avec une cuve contenant de l'eau distillée.

Les résultats des mesures d'absorbance des solutions filles sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Numéro de la solution fille	1	2	3	4	5
Concentration massique $C_F$ (en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$5,0 \cdot 10^{-1}$	1,0	2,0	3,0	4,0
Absorbance $A$	0,058	0,126	0,243	0,374	0,488

2.1. Écrire l'expression littérale de la loi de Beer-Lambert, nommer chaque grandeur et en donner l'unité SI.

2.2. La courbe d'étalonnage donnée en **ANNEXE 1 À RENDRE AVEC LA COPIE** représente l'absorbance  $A$  des solutions filles en fonction de leur concentration  $C_F$ . Justifier, sans calcul, que la courbe est en accord avec la loi de Beer-Lambert.

3. Une solution  $S_D$  de bleu de méthylène a été obtenue en diluant 400 fois la solution X. La mesure de l'absorbance de la solution  $S_D$  est  $A_D = 0,325$ .

3.1. À partir de la courbe d'étalonnage donnée en **ANNEXE 1 À RENDRE AVEC LA COPIE**, déterminer la concentration  $C_D$  de la solution  $S_D$ .

3.2. En déduire la concentration  $C_x$  de la solution X.

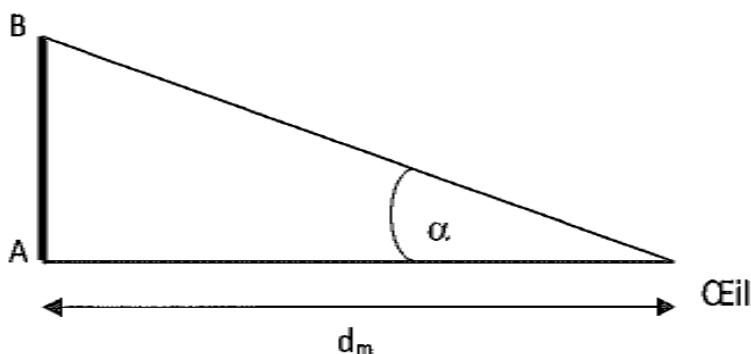
3.3. La valeur de  $C_x$  confirme-t-elle l'étiquetage de la solution X contrôlée par le personnel de laboratoire ? Justifier.

## B : OBSERVATION D'UNE LEVURE AU MICROSCOPE (11 points)

Les levures sont les premiers microorganismes à avoir été observés au microscope par Antoni Van Leeuwenhoek, commerçant et savant néerlandais de la fin du XVII<sup>ème</sup> siècle. Parmi les levures, *saccharomyces cerevisiae* peut être distinguée au microscope plus facilement après coloration au bleu de méthylène.

On veut observer au microscope optique une levure *saccharomyces cerevisiae* de longueur notée  $AB$  égale à  $8,0 \times 10^{-6} \text{ m}$ . On se propose d'étudier le fonctionnement de ce microscope et de prévoir s'il est utilisable pour observer cette levure.

### 1. Première partie: observation à l'œil nu



L'objet est placé à la distance minimale de vision distincte de l'œil, notée  $d_m = 25 \text{ cm}$ . Le diamètre apparent de l'objet  $AB$ , noté  $\alpha$ , est l'angle sous lequel est vu cet objet à l'œil nu.

1.1. A partir du schéma ci-dessus, montrer que  $\alpha$  vaut  $3,2 \times 10^{-5} \text{ rad}$ .

1.2. Le pouvoir séparateur de l'œil, noté  $\varepsilon$ , a pour valeur  $3 \times 10^{-4} \text{ rad}$ . Justifier que la levure *saccharomyces cerevisiae* ne peut pas être observée à l'œil nu.

**2. Deuxième partie : observation au microscope**

- Ce microscope est modélisé par l'association de deux lentilles convergentes, centrées sur le même axe optique :
  - une lentille convergente  $L_1$ , appelée objectif, de centre optique  $O_1$ , qui donne de l'objet AB une image intermédiaire  $A_1B_1$ . La distance focale de cette lentille  $L_1$  est  $f_1 = \overline{O_1F_1} = 5,00 \text{ mm}$
  - Une lentille convergente  $L_2$ , appelée oculaire, de centre optique  $O_2$ , qui donne de l'image intermédiaire  $A_1B_1$  une image définitive A'B'. La distance focale de cette lentille  $L_2$  est  $f_2 = \overline{O_2F_2} = 2,00 \text{ cm}$ .
- La distance entre l'objectif et l'oculaire est fixe. On la repère par l'intervalle optique, noté  $\Delta$  avec  $\Delta = \overline{F_1F_2}$
- La relation entre le grandissement de l'objectif  $\gamma_1$  et l'intervalle optique  $\Delta$  est :  $|\gamma_1| = \frac{\Delta}{f_1}$

**2.1.** L'objet AB est maintenant observé au microscope. Il est perpendiculaire à l'axe optique du microscope, le point A étant sur l'axe optique.

**2.1.1.** Indiquer la position de l'image définitive A'B' pour une observation sans fatigue par un œil normal, c'est-à-dire sans accommodation.

**2.1.2.** Dans ce cas, donner la position de l'image intermédiaire  $A_1B_1$  de l'objet AB formée par l'objectif  $L_1$ .

**2.1.3.** Schématiser le modèle du microscope décrit ci-dessus, **sans souci d'échelle**. On y fera figurer, entre autres, l'image intermédiaire  $A_1B_1$ , l'image définitive A'B' ainsi que les rayons utiles.

**2.2.** La formule de conjugaison pour l'objectif  $L_1$  est :  $\frac{1}{\overline{O_1A_1}} - \frac{1}{\overline{O_1A}} = \frac{1}{f_1}$

L'objet AB est à 5,14 mm devant l'objectif, ce qui signifie que la distance  $\overline{O_1A}$  est égale à -5,14 mm.

**2.2.1.** A l'aide d'un calcul, montrer que la position de  $A_1$  par rapport à  $O_1$  est telle que  $\overline{O_1A_1}$  est égale à 18,4 cm.

**2.2.2.** Montrer que l'intervalle optique  $\Delta$  est égal à 17,9 cm. On pourra s'aider du schéma réalisé à la question

**2.2.3.** En déduire la valeur du grandissement  $|\gamma_1|$  de l'objectif.

**2.3.** Le grossissement commercial  $G_c$  du microscope est égal à 450.

L'angle  $\alpha'$  (en radians) est l'angle sous lequel l'œil, placé au foyer  $F_2$  de l'oculaire, voit l'image définitive A'B' donnée par le microscope.

La valeur de  $\alpha'$  est donnée par la relation  $\alpha' = \frac{G_c \times AB}{4}$

Calculer la valeur de  $\alpha'$  et montrer que la levure est visible à travers ce microscope.

## C : DOSAGE DES IONS CHLORURE CONTENUS DANS UN SÉRUM PHYSIOLOGIQUE (9 points)

Le sérum physiologique est une solution aqueuse stérile de chlorure de sodium utilisée pour l'hygiène nasale et ophtalmique.

La concentration massique en chlorure de sodium indiquée sur une dose de sérum physiologique est  $9,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (à 5 % près).

Le but des expériences décrites dans cet exercice est de vérifier cette indication en dosant les ions chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) contenus dans une solution aqueuse de sérum physiologique par une solution aqueuse de nitrate d'argent ( $\text{Ag}^+ + \text{NO}_3^-$ ) en utilisant l'ion chromate  $\text{CrO}_4^{2-}$  comme indicateur de fin de réaction.

Cet exercice comporte deux parties indépendantes :

- la première permet de justifier l'utilisation des ions chromate comme indicateur de fin de réaction de titrage
- la seconde consiste à exploiter le titrage.

### Données à $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

- Masse molaire du chlorure de sodium :  $M(\text{NaCl}) = 58,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- Produits de solubilité :  $K_s(\text{AgCl}) = 1,8 \times 10^{-10}$  ;  $K_s(\text{Ag}_2\text{CrO}_4) = 1,2 \times 10^{-12}$

### 1. Première partie : étude de la précipitation sélective des ions chlorure

On considère un mélange contenant des ions chlorure de concentration molaire  $C_1$  égale à  $0,150 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et d'ions chromate de concentration molaire  $C_2$  égale à  $5,9 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Dans le mélange précédent, on verse une solution aqueuse contenant des ions argent ( $\text{Ag}^+$ ). Deux précipités peuvent se former : le chlorure d'argent  $\text{AgCl}_{(s)}$  et le chromate d'argent  $\text{Ag}_2\text{CrO}_{4(s)}$  de couleur rouge.

**Remarque :** Dans la suite de l'exercice, on ne tiendra pas compte de la variation de volume du mélange réactionnel due à l'ajout de solution de nitrate d'argent.

**1.1.** Écrire l'équation de la réaction de formation du précipité de chlorure d'argent  $\text{AgCl}$  et donner l'expression littérale de son produit de solubilité noté  $K_s(\text{AgCl})$ .

**1.2.** Montrer que lorsque le chlorure d'argent  $\text{AgCl}$  commence à précipiter dans le mélange précédemment décrit, la concentration molaire, notée  $[\text{Ag}^+]_1$ , en ions argent ( $\text{Ag}^+$ ) dans le milieu réactionnel vaut alors  $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**1.3.** Lorsque le chromate d'argent  $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$  commence à précipiter dans le mélange précédemment décrit, la concentration molaire, notée  $[\text{Ag}^+]_2$ , des ions argent ( $\text{Ag}^+$ ) dans le milieu réactionnel vaut  $4,5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Retrouver cette valeur par le calcul. En déduire que le chlorure d'argent précipite en premier. Justifier.

### 2. Deuxième partie : dosage des ions chlorure dans un sérum physiologique

Dans un erlenmeyer on introduit  $V_1 = 5,0 \text{ mL}$  de sérum physiologique et  $V_2 = 0,10 \text{ mL}$  de solution aqueuse de chromate de potassium ( $2 \text{ K}^+ + \text{CrO}_4^{2-}$ ) de concentration molaire  $C_2 = 3,00 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

On dose ce mélange par une solution aqueuse de nitrate d'argent ( $\text{Ag}^+ + \text{NO}_3^-$ ) de concentration molaire  $C' = 0,050 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

L'équation de la réaction de titrage est :  $\text{Ag}^+_{(aq)} + \text{Cl}^-_{(aq)} = \text{AgCl}_{(s)}$ .

A l'équivalence du dosage, le chromate d'argent  $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$  commence à précipiter. Le chromate d'argent étant rouge, le milieu réactionnel qui était initialement jaune vire alors à l'orangé.

**2.1.** Définir l'équivalence du dosage.

**2.2.** Le volume de la solution aqueuse de nitrate d'argent versé à l'équivalence  $V_{\text{éq}}$  étant de  $16,0 \text{ mL}$ , montrer que la concentration molaire, notée  $C$ , des ions chlorure contenus dans le sérum physiologique est égale à  $0,16 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**2.3.** En déduire la valeur de la concentration massique en chlorure de sodium, notée  $C_m$ , contenu dans le sérum physiologique.

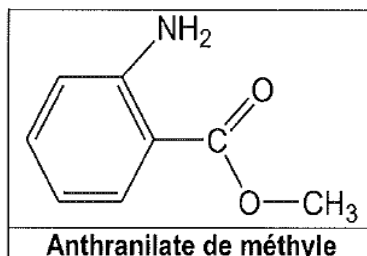
**2.4.** Ce résultat est-il cohérent avec la valeur indiquée sur l'étiquette ? Justifier la réponse.

## D: SYNTHÈSE DE L'ANTHRANILATE DE MÉTHYLE (11,5 points)

Présent dans les substances odorantes de plusieurs variétés de fleurs, l'antranilate de méthyle est une molécule classique de la palette du parfumeur. En effet cette molécule participe au parfum du genêt, de la fleur d'oranger, du gardénia, de la fleur de champaca, et dans une moindre mesure du jasmin grandiflorum et de l'ylang-ylang.

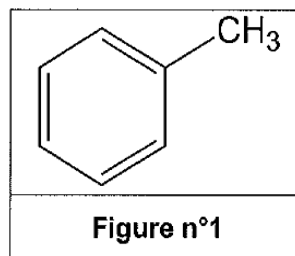
Les oiseaux détesteraient l'odeur de l'antranilate de méthyle. Des industriels ont mis à profit cette caractéristique pour proposer des produits répulsifs à base de cette molécule, utilisables par les agriculteurs, les gestionnaires d'aéroport ou dans le cadre de toute autre activité nécessitant de faire fuir les oiseaux.

**L'objectif de cet exercice est d'étudier la synthèse de l'antranilate de méthyle à partir du benzène.**



### 1. Première étape

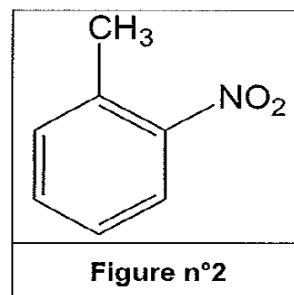
L'action du chlorométhane  $\text{CH}_3\text{-Cl}$  sur le benzène conduit à la formation d'un composé **A**, de formule semi-développée  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$ , représenté à la **figure n°1** ci-contre.



- 1.1. Écrire l'équation de la réaction mise en jeu lors de la formation du composé **A**.
- 1.2. Nommer le composé **A** en utilisant les règles de la nomenclature officielle.
- 1.3. Donner le nom et la formule d'un catalyseur fréquemment utilisé pour cette réaction.
- 1.4. Parmi les termes suivants, choisir celui (ou ceux) qui caractérise(nt) la transformation étudiée :  
addition - électrophile - élimination - nucléophile - radicalaire - substitution.

### 2. Deuxième étape

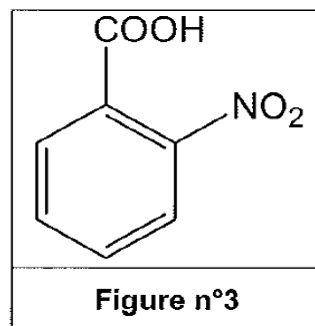
La nitration du composé **A** permet d'obtenir minoritairement le composé **B** représenté ci-contre à la **figure n°2**.



- 2.1. Donner le(s) réactif(s) nécessaire(s) à la réaction de nitration du composé **A**.
- 2.2. Au cours de cette réaction, il se forme également un composé **B** majoritaire. Donner sa formule semi-développée.

**3. Troisième étape**

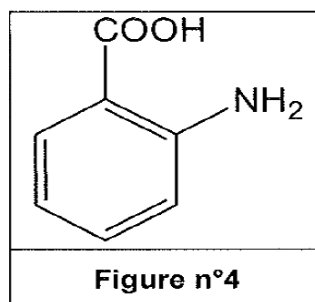
L'oxydation par les ions permanganate  $\text{MnO}_4^-$  en milieu acide du composé **B'** conduit au composé **C**, l'acide 2-nitrobenzoïque, représenté **figure n°3**.



Écrire l'équation de la réaction d'oxydoréduction mise en jeu, sachant que l'ion permanganate appartient au couple  $\text{MnO}_4^-/\text{Mn}^{2+}$

**4. Quatrième étape**

Le composé C est réduit par le dihydrogène en présence de carbonate de cuivre (II) afin d'obtenir l'acide anthranilique **D** représenté **figure n°4**.



- 4.1. Après avoir recopié la formule semi-développée de l'acide anthranilique sur la copie, entourer et nommer les fonctions chimiques présentes dans cette molécule.  
4.2. Nommer l'acide anthranilique en utilisant les règles de la nomenclature officielle.

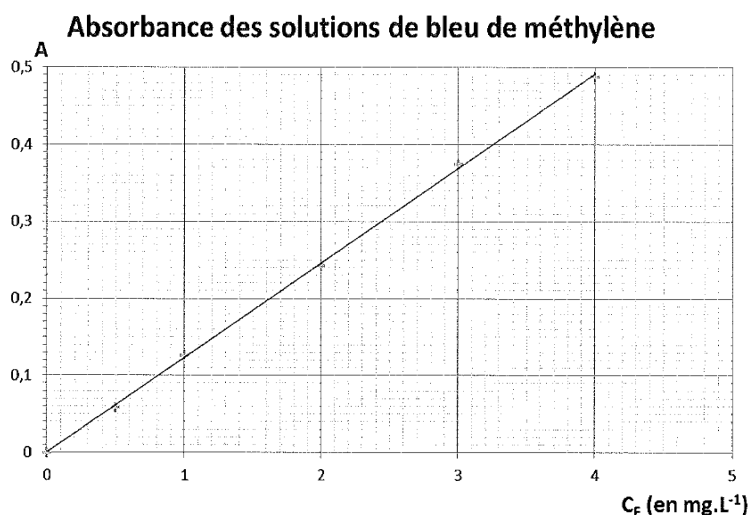
**5. Cinquième étape**

L'acide anthranilique réagit avec le méthanol  $\text{CH}_3\text{OH}$  en milieu acide pour donner l'antranilate de méthyle.

- 5.1. Écrire l'équation de la réaction mise en jeu en utilisant les formules semi-développées.  
5.2. Nommer cette réaction.  
5.3. Citer deux caractéristiques de cette réaction.  
5.4. Proposer une façon d'augmenter le rendement de cette cinquième étape de la synthèse.

**ANNEXE 1**

À rendre avec la copie





# Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2018

---

## ÉTUDE D'UN EXTRAIT COAGULANT D'ORIGINE VÉGÉTALE, UTILISABLE EN FROMAGERIE

La présure, coagulant du lait utilisé dans l'industrie fromagère, est traditionnellement extraite à partir de la caillette (4<sup>ème</sup> estomac) de jeunes ruminants abattus avant le sevrage. Elle est constituée d'enzymes actives appelées chymosine et pepsine.

Dans certains pays d'Afrique, comme au Cameroun, l'abattage de jeunes ruminants est proscrit par la législation afin de préserver le cheptel. D'autre part, l'importation de la présure peut poser des problèmes économiques, car ce constituant coûte cher, ses conditions d'approvisionnement restent difficiles et le produit est très souvent défectueux à l'arrivée.

L'Institut de Recherche Agronomique pour le Développement (IRAD) camerounais cherche donc des substituts de la présure, capables d'être utilisés en fromagerie. Ces ersatz peuvent provenir des feuilles de plantes, de la sève et des écorces d'arbres, mais cela présente des inconvénients pour l'environnement en participant à la déforestation. Une solution est alors possible pour résoudre ce problème : l'utilisation d'un extrait coagulant protéolytique issu des fruits du dattier du désert.

L'IRAD, dans le cadre d'une collaboration, a donc confié à un laboratoire de recherche universitaire français, le soin d'étudier les propriétés de cet extrait de nature protéique.

### I. Préparation de l'extrait coagulant contenu dans les fruits

Le schéma d'obtention de l'extrait coagulant est donné par le **document n°1**.

La première étape consiste à préparer un extrait brut (EB) à partir de fruits débarrassés de leur écorce.

**Q1** : Expliquer pourquoi les différentes manipulations de l'étape 1 sont menées à 4 °C et en milieu tamponné.

La deuxième étape correspond à une précipitation des protéines en présence de sulfate d'ammonium puis à une centrifugation pour séparer le surnageant du culot.

**Q2** : Nommer et expliquer le mécanisme conduisant à la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium. Préciser le contenu du surnageant et du culot.

Lors de la troisième étape, le culot de précipitation est placé en solution en présence de tampon phosphate de sodium, pH 6 dans un boudin de dialyse. Le bain de dialyse est remplacé plusieurs fois pendant au moins 12 h et est maintenu à 4 °C.

**Q3** : Indiquer le rôle de l'étape de dialyse.

Lors de la quatrième étape, le contenu du boudin de dialyse subit une ultrafiltration frontale basée sur l'utilisation de la pression et d'une force centrifuge. L'ultrafiltration est réalisée en utilisant une unité de filtration Millipore Amicon, présentée dans le **document n°2**. Le seuil de coupure de la membrane est de 10000 Da. Cette opération conduit à l'obtention d'un rétentat et d'un perméat.

**Q4** : Indiquer le but de cette étape. Expliquer la composition qualitative du rétentat et du perméat.

La cinquième étape consiste à décolorer le rétentat afin d'obtenir l'extrait brut concentré (EBC).

## II. Suivi de purification de la protéine d'intérêt à partir de l'extrait brut concentré

L'extrait brut concentré (EBC) est purifié par chromatographie sur colonne d'échange d'ions.

La résine utilisée est une Q-Sepharose Fast Flow en tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8,0.

Le **document n°3** présente les phases stationnaires disponibles au laboratoire, les paramètres de la chromatographie et le profil d'élution obtenu.

**Q5** : Exposer le principe de la chromatographie d'échange d'ions avec cet échangeur. L'élution est réalisée par un gradient discontinu de NaCl, expliquer le mode d'élution. Exposer une méthode alternative à cette élution, basée sur une propriété physico-chimique des protéines.

**Q6** : Analyser le profil d'élution obtenu pour en déduire une caractéristique physico-chimique des protéines du pic 1 par rapport aux protéines des trois autres pics.

Dans le cadre du suivi de purification, on réalise sur chaque extrait EB, EBC et sur les fractions des pics 1, 2, 3 et 4 :

- une détermination de la concentration en protéines par la méthode de Bradford,
- un dosage de l'activité coagulante selon le protocole du **document n°4**.

Les résultats sont présentés sur le **document n°5**.

**Q7** : Démontrer que la concentration d'activité coagulante est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Concentration d'activité coagulante (en U}\cdot\text{mL}^{-1}\text{extrait)} = \frac{60 \times 1}{\text{temps de coagulation(en min)}} \times 5$$

**Q8** : Établir les équations aux grandeurs permettant de calculer pour chaque fraction :

- l'activité spécifique en U·mg<sup>-1</sup>protéines ;
- le facteur d'enrichissement par rapport à l'extrait brut.

Établir les équations aux valeurs numériques pour la fraction EBC.

Commenter les valeurs obtenues et formuler une hypothèse quant à la fraction contenant la protéine d'intérêt.

Pour confirmer ces résultats, l'activité protéolytique dans les différentes fractions a été déterminée par la méthode colorimétrique décrite dans le **document n°6**.

**Q9** : Évaluer la(les) situation(s) exposante(s) à risque chimique. Établir les mesures de prévention à mettre en œuvre au cours de cette étape.

**Q10** : Le dosage enzymatique se fait par méthode « deux points ». Rappeler le principe et les conditions opératoires à respecter pour mesurer une activité enzymatique par cette méthode. Établir, sous forme d'un tableau, le mode opératoire de la réalisation des témoins et d'un échantillon. Donner le rôle du témoin substrat.

Après obtention des résultats présentés dans le **document 7**, les chercheurs du laboratoire ont décidé de poursuivre les manipulations sur la fraction du pic 3.

**Q11** : Justifier ce choix.

## III. Étude des caractéristiques structurales et cinétiques de la protéase

Dans un premier temps, une étude de la structure de la protéase d'intérêt du pic 3 est envisagée. Pour cela, 2 électrophorèses en SDS-PAGE sont réalisées en présence et en absence de β-mercaptoéthanol (que l'on pourrait remplacer par du DTT : DiThioThréitol).

Le **document n°8** présente le principe et la technique SDS-PAGE, ainsi que les résultats obtenus.

**Q12** : Calculer les volumes d'eau déminéralisée, d'acide acétique et de méthanol nécessaires à la préparation de 100 mL de bain de décoloration.

**Q13** : Expliquer les rôles respectifs du SDS et du β-mercaptoéthanol. Analyser les profils électrophorétiques pour déduire la structure de la protéase d'intérêt.

Dans un second temps, on cherche à connaître les paramètres cinétiques de la protéase d'intérêt du pic 3. Pour cela, on réalise les analyses présentées dans le **document n° 9** :

- une étude de l'activité de la protéase dans différentes conditions de température et de pH,
- une détermination des paramètres cinétiques de la protéase végétale en comparaison à la chymosine.

**Q14** : Déduire de l'analyse des courbes 1 et 2 la température optimale et le pH optimal de la protéase.

**Q15** : Déterminer et comparer les paramètres cinétiques des 2 enzymes. Discuter de l'utilisation éventuelle de cette protéase d'origine végétale en remplacement de la présure.

## **IV. Perspective de la coagulation végétale**

La coagulation du lait correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine du lait.

Dans la pratique, cette déstabilisation est réalisée de deux manières :

- par voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes contenues dans la présure ;
- par voie fermentaire : acidification à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminants à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levain).

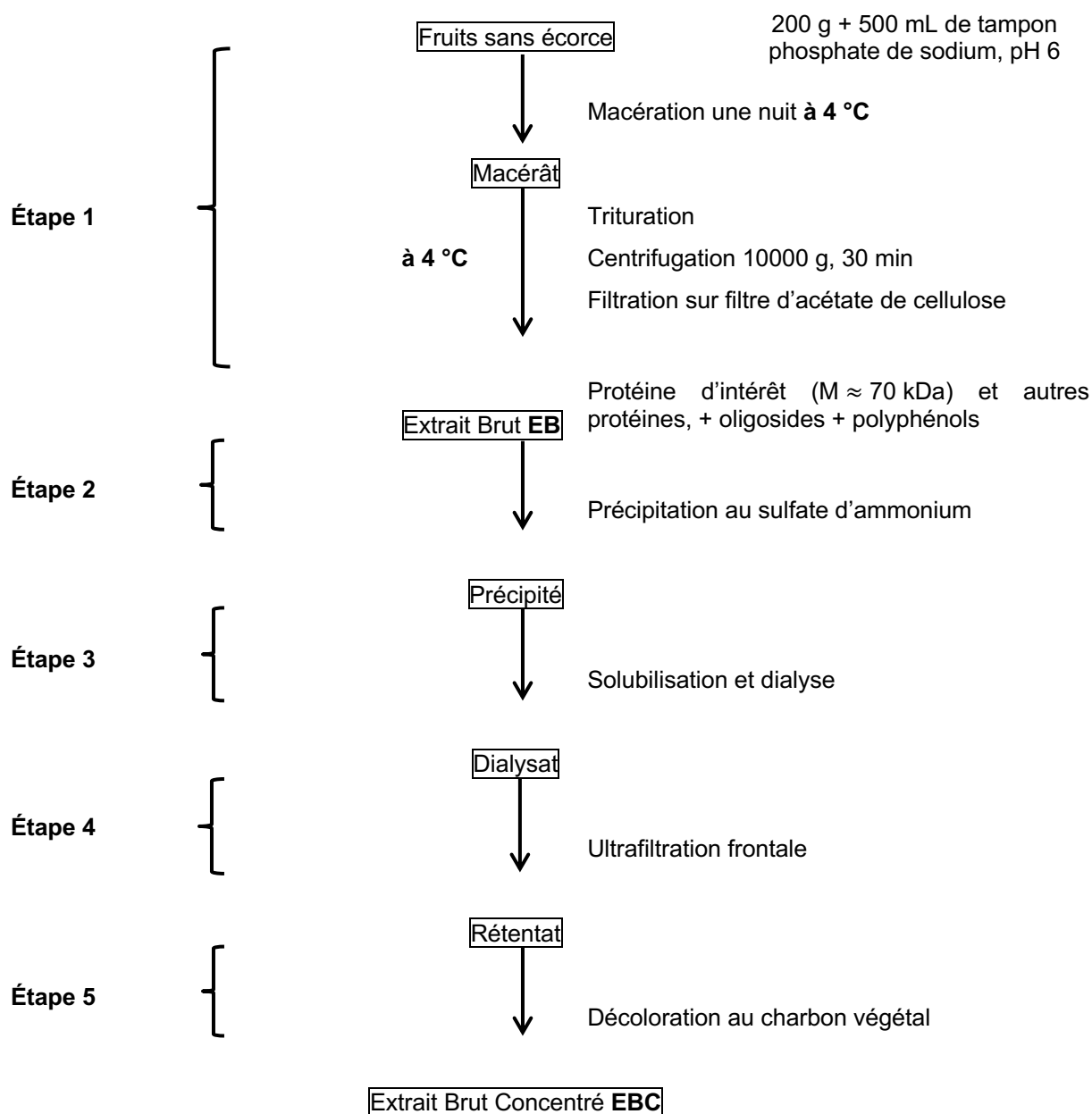
Aussi dans la perspective d'obtenir un meilleur rendement fromager, le laboratoire de recherche envisage l'utilisation de l'extrait végétal coagulant étudié précédemment couplé à une bactérie lactique : *Lactococcus lactis*.

La pénétration du lactose ( $\beta$ -D-galactopyranosyl 1  $\rightarrow$  4 D-glucopyranose) dans la bactérie est assurée par un système phosphotransférase, puis il est dégradé en acide lactique (ou lactate) selon la voie métabolique donnée dans le **document n°10**.

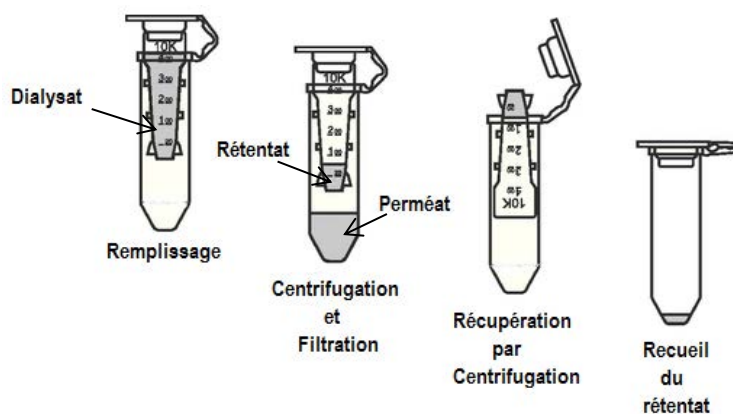
**Q16** : Préciser dans quelle condition la voie fermentaire est prépondérante. Discuter de l'intérêt métabolique de la dernière étape de cette fermentation.

**Q17** : Établir, en détaillant le raisonnement, le bilan moléculaire de la transformation d'une molécule de lactose en acide lactique.

Document n°1 : PRÉPARATION DE L'EXTRAIT COAGULANT



Document n°2 : UNITÉ DE FILTRATION MILLIPORE AMICON BIOSÉPARATION ®



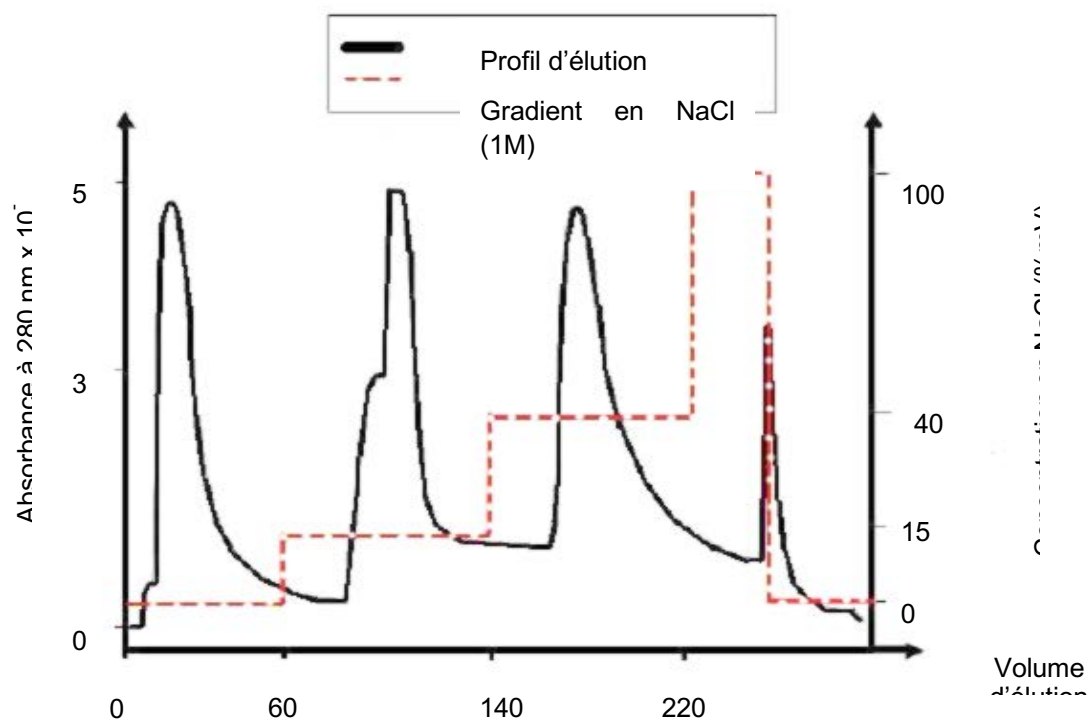
3a. Caractéristiques de quelques résines de chromatographie d'échange d'ions

Property	SP Sepharose Fast Flow	CM Sepharose Fast Flow	Q Sepharose Fast Flow	DEAE Sepharose Fast Flow
Matrix	6 % highly cross-linked agarosa	6 % highly cross-linked agarosa	6 % highly cross-linked agarosa	6 % highly cross-linked agarosa
Mean particle size	45 – 165 µm	45 – 165 µm	45 – 165 µm	45 – 165 µm
Charged group	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-O-CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-N <sup>+</sup> H <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )
Total ionic capacity	-18-0.25 mmol H <sup>+</sup> /mL medium	0.09-0.13 mmol H <sup>+</sup> /mL medium	0.18-0.25 mmol Cl <sup>-</sup> /mL medium	0.11-0.16 mmol Cl <sup>-</sup> /mL medium
Dynamic binding capacity 1	70 mg ribonuclease A/ml medium	50 mg ribonuclease A/ml medium	120 mg HASµ/ml medium	110 mg HASµ/ml medium
pH stability:				
Short term	3-14	2-14	1-14	1-14
Long term	4-13	4-13	2-12	2-12
Storage temperature	4 °C to 30 °C	4 °C to 30 °C	4 °C to 30 °C	4 °C to 30 °C
Storage buffer	supplied in 0.2 M sodium acetate in 20 % ethanol	supplied in 20 % ethanol	supplied in 20 % ethanol	supplied in 20 % ethanol

3b. Résultats obtenus sur Q-Sepharose

Le chromatogramme est obtenu par passage de l'extrait brut concentré sur Q-Sepharose, équilibré par le tampon Tris-HCl 50 mmol•L<sup>-1</sup>, pH 8,0.

Équipements chromatographiques Pharmacia AKTA®. Débit de la phase mobile : 0,5 mL•min<sup>-1</sup>.



#### Document n°4 : DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ COAGULANTE

La mesure de l'activité coagulante est réalisée grâce au test de coagulation du lait effectué selon la méthode officielle française de l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique).

##### Préparation du lait :

12 g de lait en poudre sont dissous en fiole jaugée de 100 mL par une solution de  $\text{CaCl}_2$  à  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

##### Mode opératoire :

Dans des tubes à hémolyse, 200  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon est mélangé avec 1 mL de lait reconstitué, puis incubé en bain thermostaté à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation lente.

La durée de coagulation est le temps en min compris entre l'introduction de l'extrait coagulant et la formation d'un mince film de coagulation contre la paroi du tube à hémolyse.

##### Résultat :

La concentration d'activité coagulante est exprimée en unité coagulante par mL d'extrait :  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}_{\text{extrait}}$

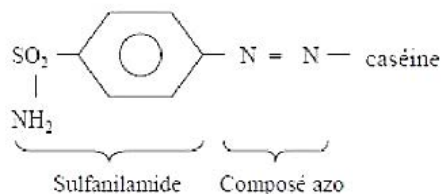
L'unité d'activité coagulante est définie comme étant la quantité d'enzyme permettant la coagulation de 1 mL de lait en 60 minutes à  $37^\circ\text{C}$  et à pH 6,4.

#### Document n°5 : TABLEAU DES RÉSULTATS DU SUIVI DE PURIFICATION

FRACTIONS	EB	EBC	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Pic 4
Concentration en masse de protéines (en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	0,27	4,56	0,24	0,28	0,35	0,05
Temps de coagulation (en min)	160	20	1555	250	10	3335
Concentration d'activité coagulante (en $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}_{\text{extrait}}$ )	1,87	15	0,19	1,20	30	0,09
Activité coagulante spécifique (en $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}_{\text{protéines}}$ )	6,93	3,29	0,79	4,29	85,71	1,80
Facteur d'enrichissement	1	0,47	0,11	0,61	12,37	0,26

**Document n°6 : MESURE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE AVEC L'AZOCASÉINE**

- Le substrat est une solution de sulfanilamide-azocaséine à 2 % préparée dans le tampon phosphate de sodium pH 6 ;
- L'hydrolyse du substrat permet la libération de sulfanilamide et d'azocaséine ;



- Le substrat et l'enzyme sont amenés à la température de la réaction ;
- La réaction débute dès que 150 µL d'enzyme sont ajoutés à 250 µL de solution de substrat.
- Le mélange est incubé à 40 °C pendant 1 h ;
- La réaction est arrêtée en ajoutant 1,2 mL d'acide trichloracétique (ATCA) à 10 % ;
- Un témoin substrat est préparé en mélangeant 150 µL de tampon à 250 µL de substrat ;
- Un témoin activité  $t_0$  permettra de déterminer l'absorbance au temps 0 ;
- Les tubes sont centrifugés à 8000 g pendant 5 minutes ;
- L'absorbance est lue à 440 nm après avoir neutralisé l'ATCA en ajoutant 1,4 mL d'hydroxyde de sodium à 4 %.

**EXTRAIT DES FICHES INRS :**

**Acide Trichloracétique ≥ 10 %**

N° CAS : 76-03-9

Masse molaire (g·mol<sup>-1</sup>) : 163,39



H314 - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves

H335 - Peut irriter les voies respiratoires

H410-Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme

**Hydroxyde de sodium > 2 %**

N° CAS : 1370-73-2

Masse molaire (g·mol<sup>-1</sup>) : 40,00



H 314 - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves

**Document n°7 : RÉSULTATS DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE AVEC L'AZOCASÉINE**

FRACTIONS	EB	EBC	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Pic 4
Estimation de l'activité protéolytique en $\Delta A_{440nm} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	0,0011	0,0033	<<0,0010	0,0040	0,0850	<<0,0010



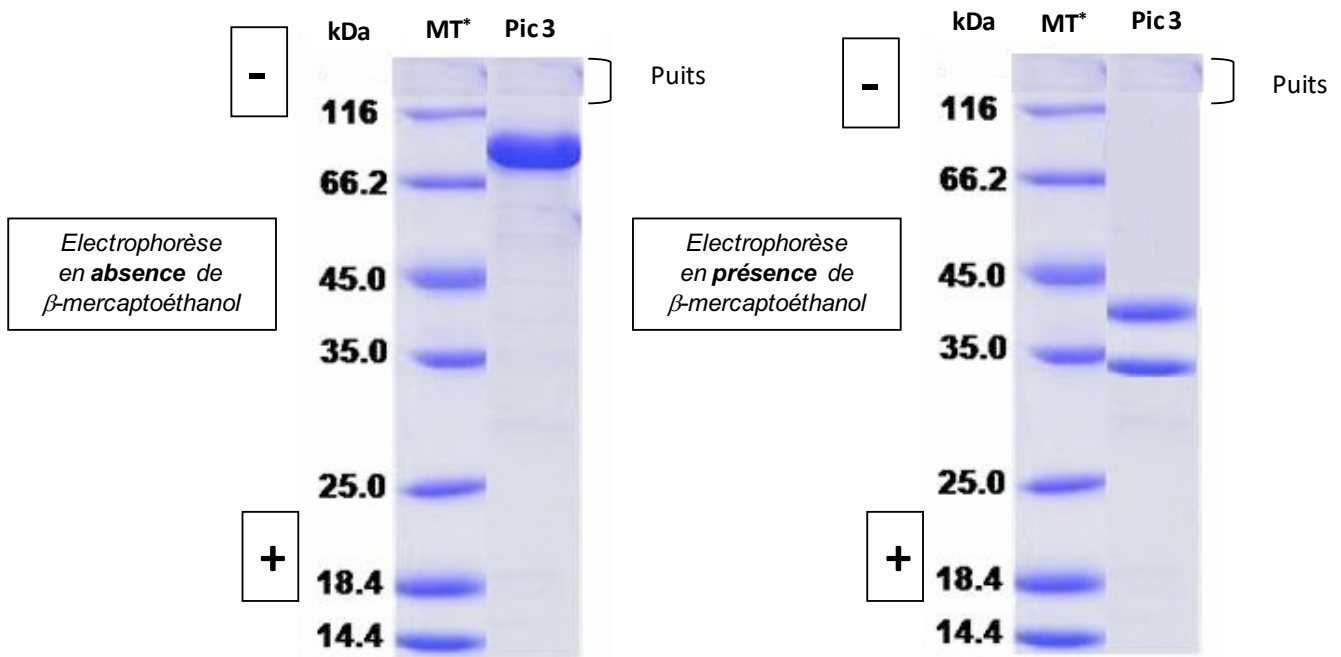
### 8a. Technique de SDS-PAGE

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate est réalisée selon la méthode de *Laemmli*. Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire.

Les échantillons sont préparés en absence ou présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Leur migration à travers les gels est effectuée à une intensité constante de 35 mA sous un courant électrique de 100 V et dans un tampon tris-HCl 15 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,3 glycine 15 mmol·L<sup>-1</sup> pendant 3 heures.

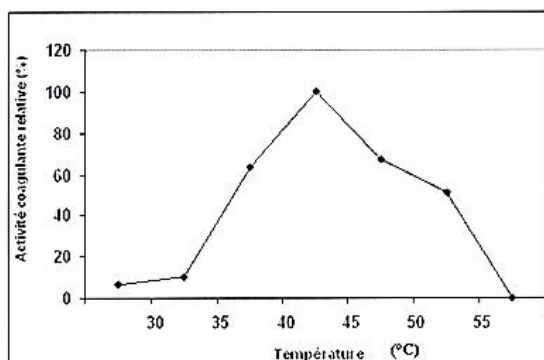
Les gels sont colorés avec une solution de bleu de Coomassie dans un mélange méthanol / acide acétique / eau (5 V / 1 V / 4 V), puis décolorés dans un mélange méthanol / acide acétique / eau (2,5 V / 1 V / 6,5 V).

### 8b. Profils électrophorétiques

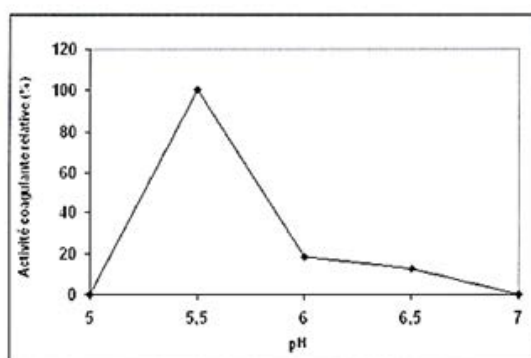


MT\* = marqueur de taille

9a. Détermination des paramètres physico-chimiques optimaux



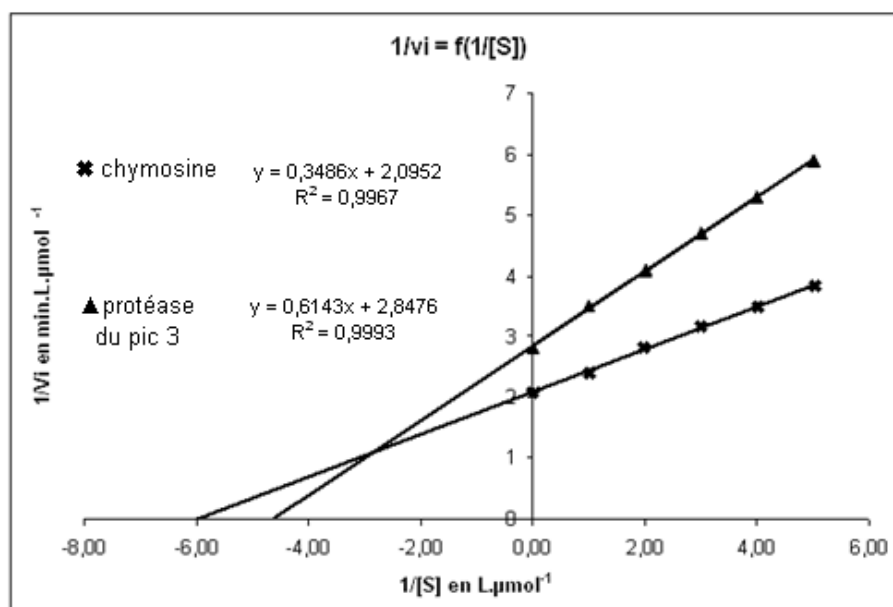
Courbe 1 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique purifié à pH 6,4

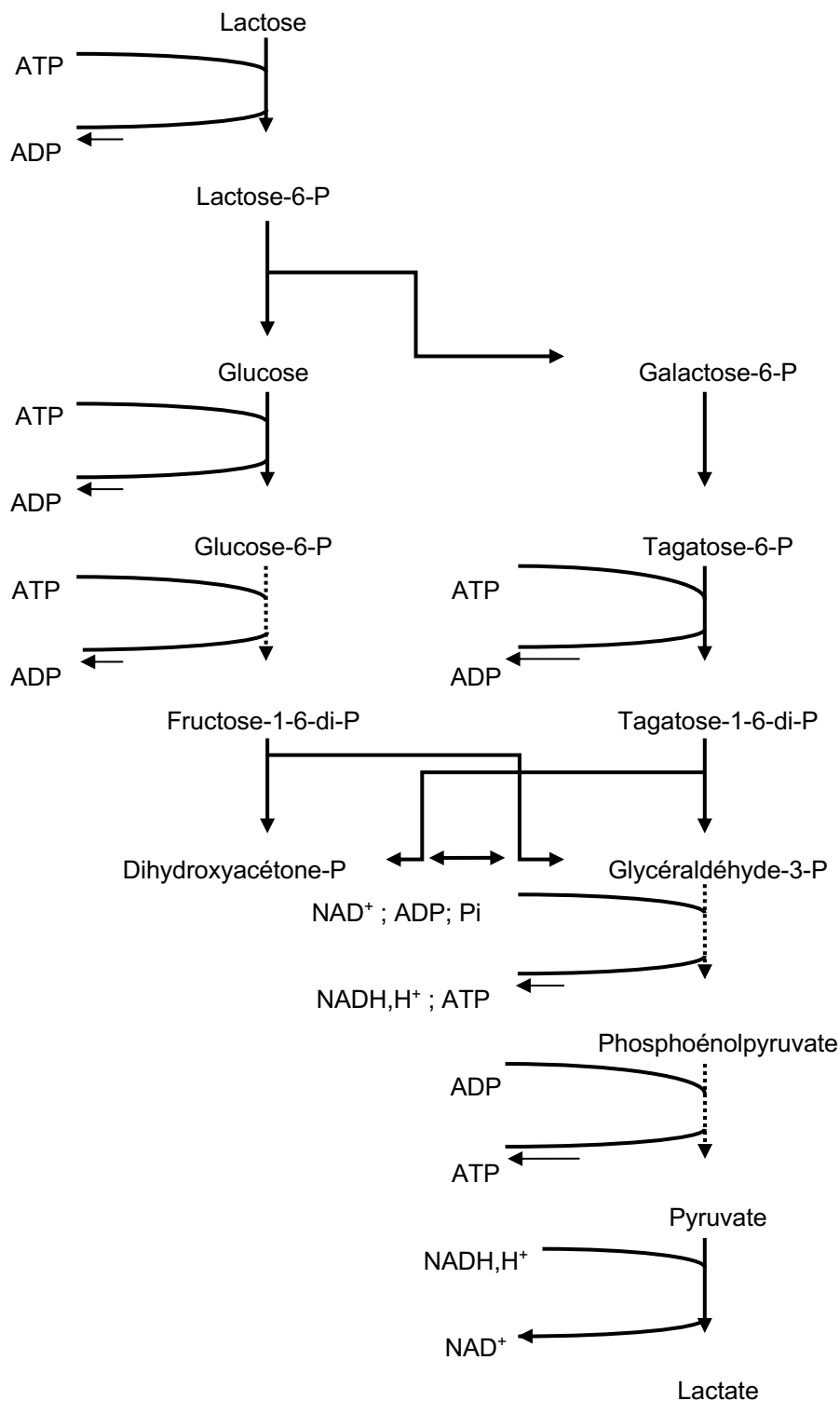


Courbe 2 : Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique purifié à 37 °C

9b. Détermination des paramètres cinétiques de la protéase

Représentation en coordonnées inverses de la vitesse initiale de la chymosine et de la protéase du pic 3 en fonction de la concentration en caséine à 45 °C et à pH 5,3





Remarque :

Les pointillés .....→représentent plusieurs réactions non détaillées de la voie de la glycolyse.

# Sujet de microbiologie et de technologies d'analyse 2018

---

## Altération des jus de fruits et démarche qualité

Produits et conditionnés sans conservateurs, les jus de fruits sont dans certaines circonstances vulnérables à des contaminations au cours de leur production.

Parmi les risques de la filière des jus de fruits, dont la production industrielle est en forte croissance, sont particulièrement redoutés :

- Le genre *Alicyclobacillus* est souvent associé à une molécule malodorante affectant la qualité marchande des jus de fruit. Ces bactéries ont affecté en particulier la production de jus de fruits en Espagne en 2013, suscitant alors la vigilance des industriels français.
- Le dépassement de la concentration en patuline synthétisée par des moisissures contaminantes, au-delà du seuil de  $50 \mu\text{g} / \text{kg}$ , qui engendre des problèmes de santé.

### 1. *Alicyclobacillus*, bactérie d'altération des jus de fruits

L'altération se manifeste dès lors que la bactérie se développe dans la boisson en produisant une quantité élevée de gaïacol, une molécule malodorante, et du 2,6 dibromophénol qui donne un goût âcre à la boisson.

Deux espèces sont plus particulièrement incriminées : *Alicyclobacillus acidoterrestris*, qui induit la détérioration la plus forte, et *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

#### 1.1 Taxonomie et caractérisation des souches d'altération

Dans la première édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, *Alicyclobacillus* était connu sous le nom de genre *Bacillus*. Grâce à l'étude de l'ARNr 16S, ce groupe très hétérogène a été réorganisé phylogénétiquement, et le genre *Alicyclobacillus*, est apparu en 1992. Les principales caractéristiques de ce genre bactérien sont mentionnées sur le **document n° 1**.

**Q1.** *Alicyclobacillus* a des similitudes avec le genre *Bacillus*. Parmi les caractères soulignés, identifier le caractère phénotypique qui peut permettre de différencier ces deux genres.

**Q2.** Qualifier ces germes d'altération en fonction de leurs conditions de culture.

Le **document n° 2** présente le dendrogramme montrant la relation phylogénétique des bactéries Gram +. Ce dendrogramme a montré la nécessité de créer un nouveau genre *Alicyclobacillus*.

**Q3.** Expliquer à quoi correspond un groupe phylogénétique. Argumenter la création du nouveau genre *Alicyclobacillus*, considérant qu'en-dessous d'un pourcentage de similitude de 87 %, deux souches bactériennes sont classées dans deux genres différents. Vérifier également que ces trois espèces appartiennent au même genre.

Pour rechercher *Alicyclobacillus* dans les jus de fruits, les acteurs de la filière utilisent le milieu de culture BAT Agar (Merck), présenté dans le **document n° 3**.

**Q4.** Identifier le rôle de chaque constituant du milieu. La souche étant chimio-organo- hétérotrophe, justifier l'utilisation de ce milieu par rapport à son type trophique.

Montrer en quoi le milieu BAT-Agar est adapté aux conditions de culture d'*Alicyclobacillus*.

Analyser le logigramme présentant la démarche de détection d'*Alicyclobacillus*.

Expliquer en quoi la culture sur PC-Agar conduit à rendre un résultat négatif.

Lorsque la bactérie altérante *Alicyclobacillus* est détectée, on détermine sa capacité à produire du gaïacol. Le protocole est présenté dans le **document n° 4**.

**Q5.** Proposer la réalisation d'un témoin positif et d'un témoin négatif en précisant pour chacun leur composition et le résultat attendu.

## 1.2 Optimisation de la pasteurisation des jus de fruits

Le barème de pasteurisation classique des jus de fruit (72 °C pendant 15 s) permet de conserver les qualités organoleptiques et est sans effet sur les spores. Les industriels sont demandeurs d'un protocole de pasteurisation plus efficace.

Le document n° 5 présente une micrographie d'une observation d'une suspension d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* en contraste de phase.

**Q6.** Rappeler deux particularités de la spore expliquant la thermorésistance bactérienne. Montrer en quoi la micrographie illustre le caractère imperméable de la spore.

Le document n° 6 présente une étude ayant abouti au calcul des temps de réduction décimale après avoir soumis la souche à différentes températures.

**Q7.** Expliquer le rôle du lysozyme en précisant son mode d'action moléculaire au niveau de la paroi.

**Q8.** Définir le temps de réduction décimale. Commenter les valeurs obtenues en montrant les conséquences de l'application de telles températures sur le jus de fruits.

La nisine, utilisée comme additif alimentaire, est un polypeptide antibactérien, qui agit sur les bactéries à Gram positif et sur certaines formes sporulées. Sa relative stabilité à la chaleur permet d'envisager de l'associer à un protocole de pasteurisation. Afin de se rapprocher d'un barème de pasteurisation classique, l'effet de la nisine est testé sur la thermorésistance des spores (résultat donné dans le document n° 7).

**Q9.** Commenter les résultats et conclure quant à l'utilisation de la nisine.

## II. Étude de la contamination par des moisissures productrices de patuline

### II.1. Identification du risque sanitaire

La patuline est une molécule essentiellement mise en évidence dans les jus de pommes. Deux moisissures productrices de patuline sont particulièrement redoutées dans la filière : *Penicillium expansum* (principal producteur) et *Aspergillus clavatus*.

Leur aspect microscopique est présenté sur le document n° 8.

**Q10.** Préciser à quelle catégorie de molécule appartient la patuline et rappeler un risque majeur associé à son ingestion.

**Q11.** Légender les photographies A et B (reporter les numéros 1 à 4 et leur légende respective sur votre copie). Identifier chaque genre représenté en argumentant la réponse.

### II.2 Lutte contre la prolifération des moisissures

Après la récolte, il est fréquent que les agriculteurs utilisent un fongicide, le thiabendazole (TBZ), pour éviter la prolifération de ces différentes moisissures. Son mode d'action est présenté sur le document n° 9.

**Q12.** Dégager les deux mécanismes d'inhibition du TBZ sur les moisissures. Expliquer pourquoi cette molécule ne peut en aucun cas être efficace sur les bactéries telles qu'*Alicyclobacillus*.

Afin de mieux lutter contre l'incidence de la patuline, les producteurs cherchent à déterminer les conditions optimales de stockage des fruits. Pour ce faire, une étude des principaux facteurs qui contribuent à la croissance de ces moisissures et à l'apparition de patuline est réalisée.

### II.3 Évaluation de l'influence de la température sur la croissance et la production de patuline par l'espèce *P. expansum*

#### II.3.1 Essais *in vitro*

Dans un premier temps, on réalise la préparation d'un inoculum de *P. expansum*, dont la concentration est contrôlée à l'hématimètre. Cette étape est présentée sur le document n° 10.

**Q13.** Calculer la concentration initiale en spores de la suspension de *P. expansum* à partir de la numération en cellule de Neubauer puis **déterminer** la dilution à réaliser afin de procéder à l'ajustage souhaité.

Chaque expérience est ensuite conduite en inoculant centralement un milieu avec la suspension de spores précédemment ajustée. Le milieu choisi est le milieu agar Czapek et les températures testées sont : 4, 8, 16, 25 et 30 °C.

**Q14.** Argumenter le choix des températures testées, toujours en lien avec la filière de production de jus de fruit.

Les mesurages ont été effectués pour une période globale de quatorze jours. Les résultats sont présentés sur le **document n° 11**. Au cours de l'incubation,

- on mesure le diamètre du thalle (**document n° 11A**),
- on calcule le taux de croissance radiale en cm/jour (**document n° 11B**)
- on estime par HPLC la quantité de patuline produite sur le milieu gélosé (**document n° 11C**).

**Q15.** Exploitation des résultats :

- comparer l'influence de la température sur la croissance des thalles, d'après les courbes obtenues, afin de dégager les différences significatives,
- déterminer le comportement de cette souche vis-à-vis de la température,
- repérer les différences entre la croissance du germe et la toxinogénèse,
- conclure sur la température de stockage des pommes à préconiser.

### II.3.2 Essais *in vivo*, sur diverses variétés de pommes

Afin d'évaluer la validité des résultats expérimentaux précédents en situation réelle pour des denrées alimentaires, trois pommes de variétés Golden Delicious, Granny Smith et Royal Gala ont été utilisées.

Le protocole et les résultats obtenus sont présentés sur le **document n°12**.

**Q16.** Préciser le rôle et mode d'action de l'hypochlorite de sodium et **énoncer** deux paramètres à respecter pour garantir l'efficacité d'un tel traitement chimique.

**Q17.** Comparer l'effet du désinfectant sur la croissance de *P. expansum in vivo* et *in vitro* quelle que soit la température testée. Montrer que l'effet matrice sur la croissance de la moisissure est plus important à 8 °C qu'à 25 °C en présence d'hypochlorite de sodium à 2%.

#### **Bilan:**

**Q18.** Pour conclure sur la filière et la prévention des dangers biologiques, proposer trois points critiques à surveiller, depuis les matières premières au produit fini.

#### Document n°1 : Caractéristiques générales du genre *Alicyclobacillus*

Les bactéries du genre *Alicyclobacillus* sont des **bacilles Gram +** non pathogènes, **sporulés, aérobies stricts**, communément retrouvés dans la flore tellurique.

Ces bactéries cultivent entre 20 et 70 °C, avec un optimum d'environ 50 °C selon les souches et dans une gamme de pH comprise entre 2,0 et 6,0, avec un pH optimal moyen de 4,0.

#### Document n° 4 : Confirmation for guaiacol producing *Alicyclobacillus* by peroxidase test

*Alicyclobacillus*, which can spoil products by producing guaiacol, can be specifically identified by the following method: 26 ACB Best Practice Guideline - July 2008/ AIJN:

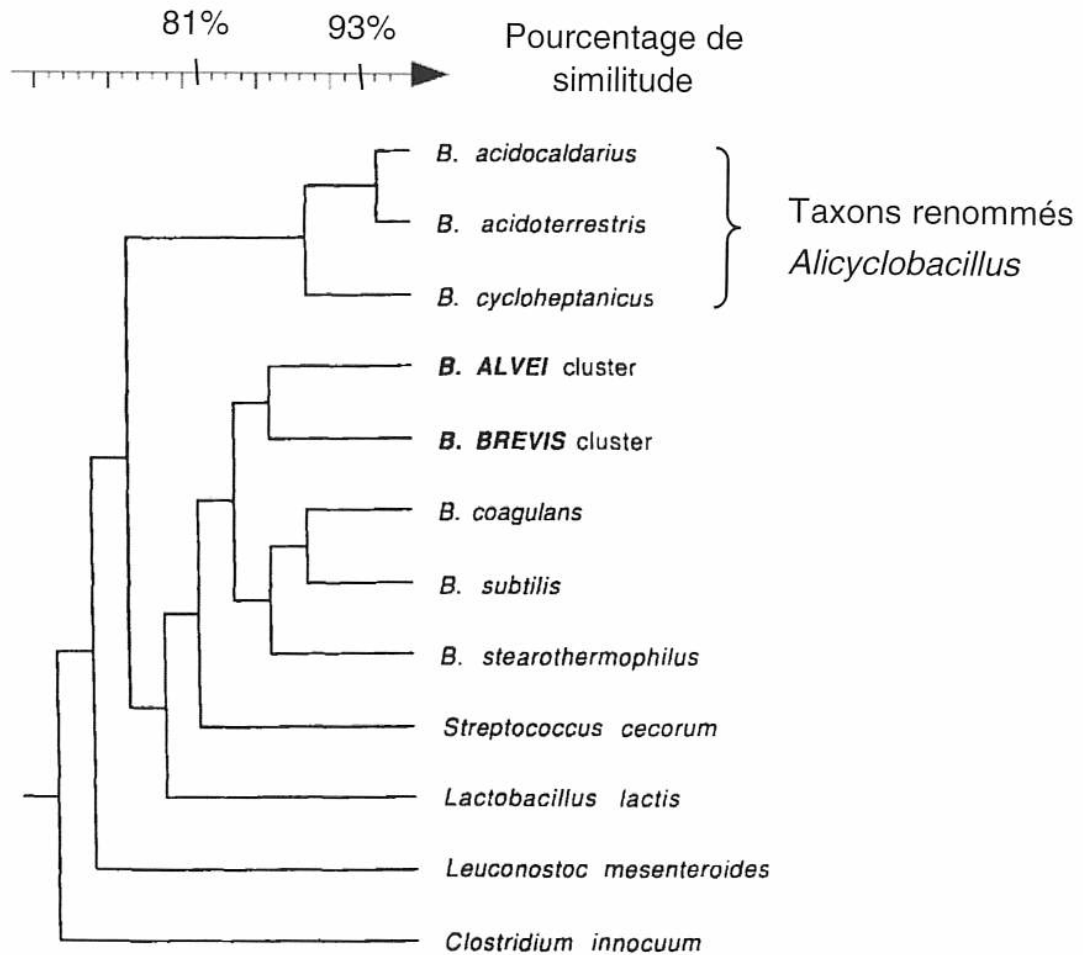
- prepare YSG broth and add vanillic acid
- inoculate a fresh colony into the tubes
- incubate, shaking, at 45 °C for at least 3 hours, but over night is recommended
- add butter, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and peroxidase solution to incubated tubes and mix well
- after 5 - 10 minutes, observe the change of colour by visual evaluation.

The principle of the test is that guaiacol producing strains convert vanillic acid to guaiacol.

Guaiacol reacts with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and peroxidase to form tetraguaiacol which is a brown coloured complex.

**Document n°2 : Dendrogramme montrant la relation entre les trois espèces du nouveau genre *Alicyclobacillus* par rapport aux membres du genre *Bacillus***

Le dendrogramme a été obtenu grâce au séquençage de l'ARNr16S.



Source : **Wisotzkey** et Al., IJSB , Avril 1992, p263-269, Comparative Sequence Analyses on the 16S rRNA of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov.

**Document n° 3 BAT Agar, recommended by the IFU (International Federation of Fruit Juice Producers)**

Medium for the detection of *Alicyclobacillus* spp in fruits juices and other beverages

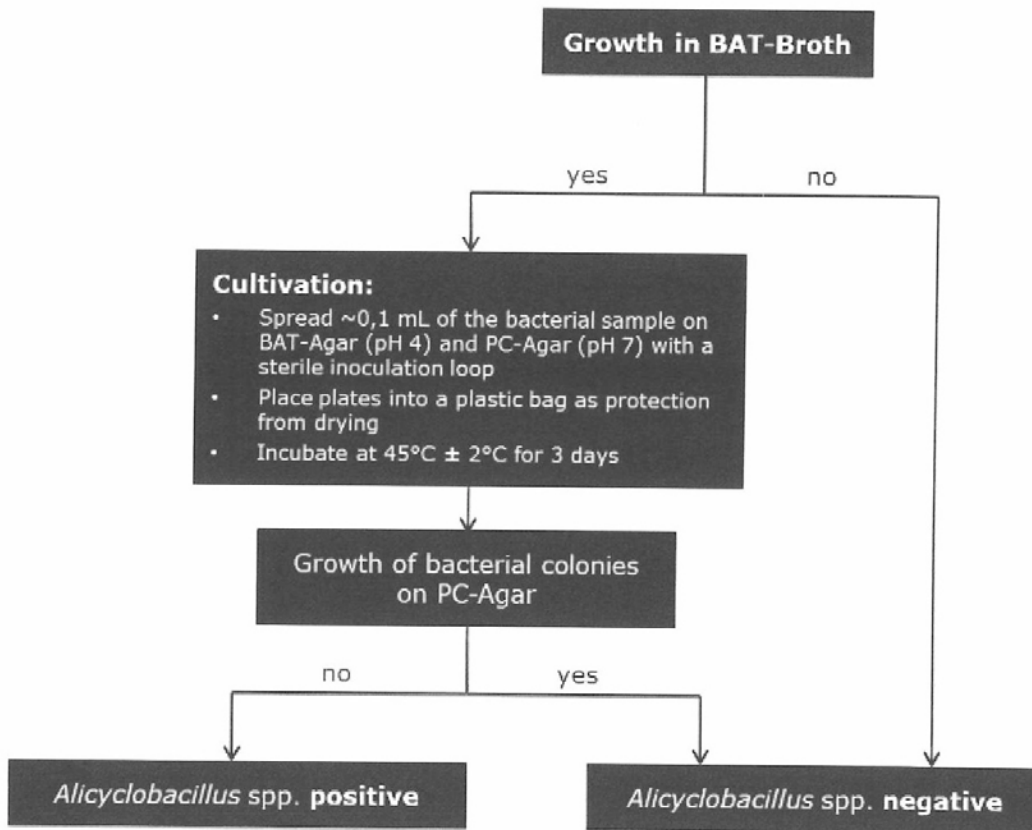
Typical composition of BAT Agar (g·L<sup>-1</sup>)

Yeast extract	2,0
D(+) glucose	5,0
Calcium chloride	0,25
Magnesium sulfate	0,5
Ammonium sulfate	0,2
Potassium dihydrogenophosphate	3,0
Agar-agar	18,0
Trace Minerais solution	
pH (à 25 °C)	4,0 ± 0,2



**Suite document 3 :**

Démarche de détection d'*Alicyclobacillus* (extrait de la fiche technique VWR)



**Document n° 5 :**  
Phase-contrast micrograph of cells of *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. Cells were cultured on liquid BAM for 3 days at 55 °C



(d'après <http://ijs.microbiologyresearch.org>)

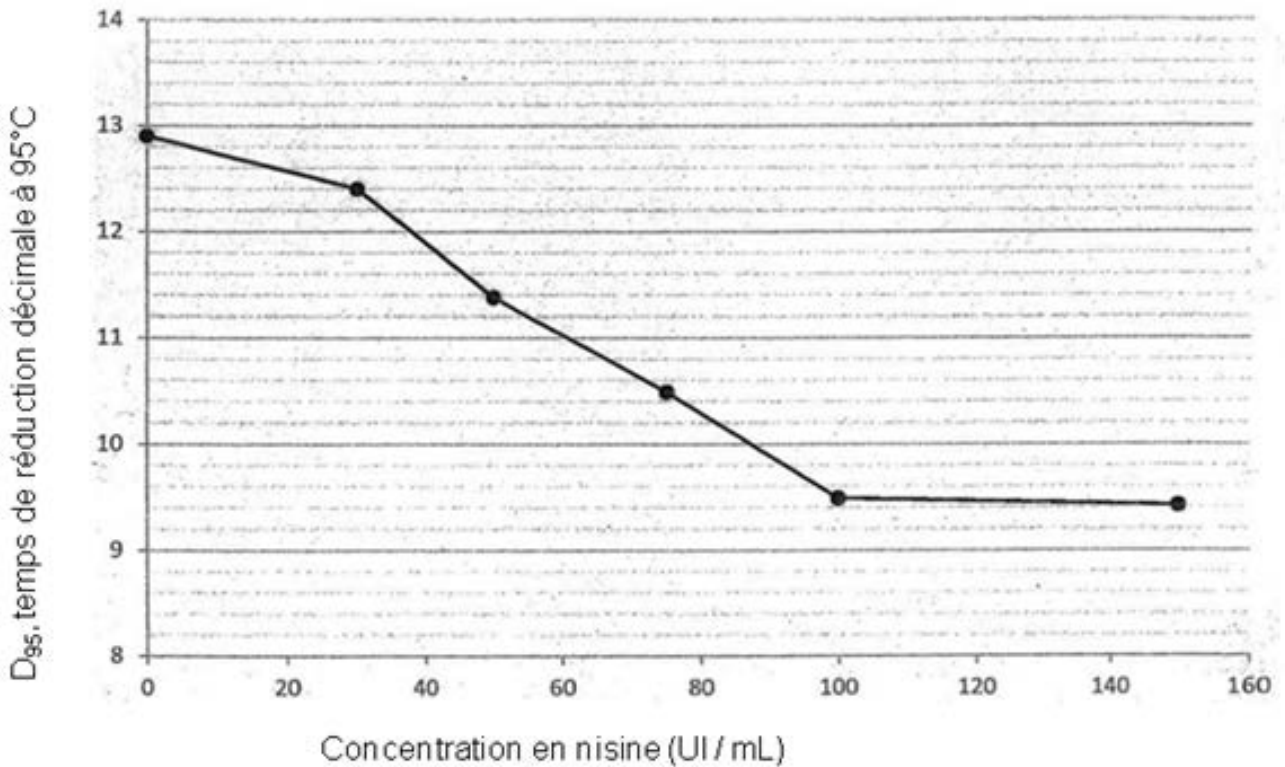
**Document n° 6:**  
**Étude de la thermorésistance des spores d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* cultivé en jus d'orange concentré (pH = 3,68) sans nisine**

**Préparation de la suspension de spores :** une suspension de spores a été réalisée. La souche sous forme végétative est inoculée dans un milieu de sporulation ; après centrifugation et lavage, du lysozyme est ajouté au culot, puis la suspension de spores est obtenue après un dernier lavage.

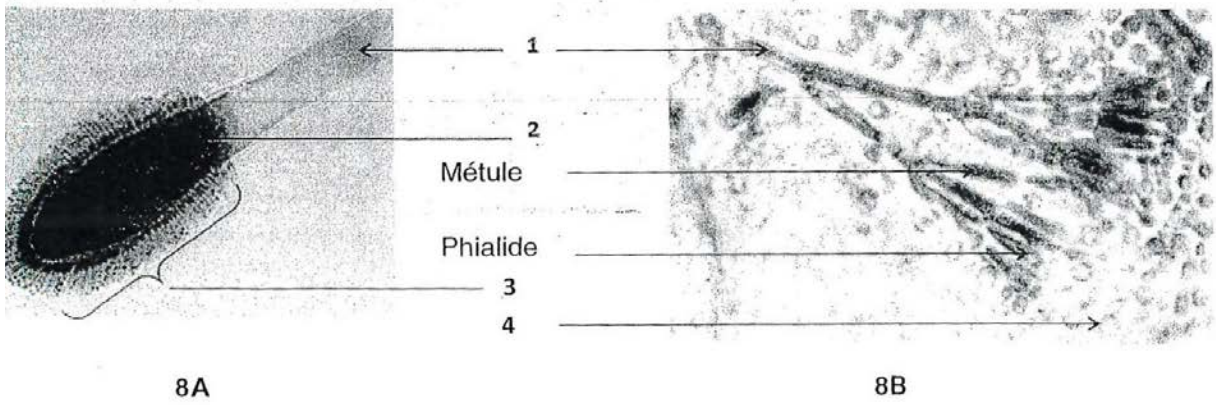
**Résultats obtenus :**

Température en °C	D, temps de réduction décimale en min
92	25,5
95	12,9
98	6,1
105	2,3

**Document n° 7:**  
**Étude de la thermorésistance des spores d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 cultivé en jus d'orange concentré (pH = 3,68) en présence de nisine. Résultats à 95 °C.**

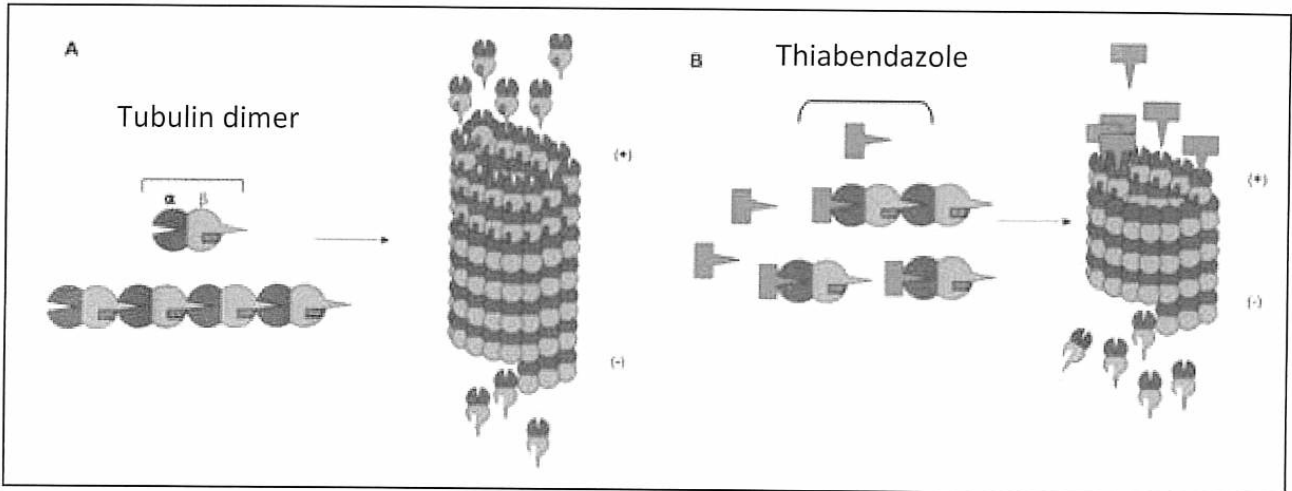


**Document n° 8: Aspects microscopiques de deux moisissures redoutées dans la filière**

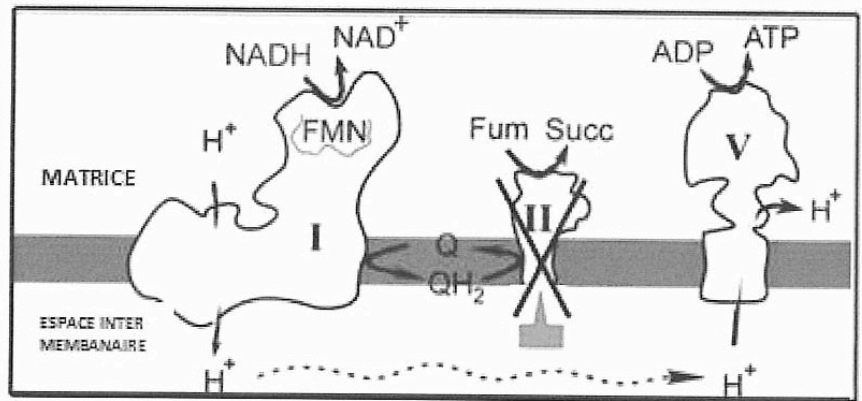


**Document n° 9 : Cibles et modes d'action du thiabendazole (TBZ) dans une cellule fongique.**  
**A : sans TBZ; B : avec TBZ**

Protéines du cytosquelette = dimères de tubuline



Chaîne respiratoire mitochondriale

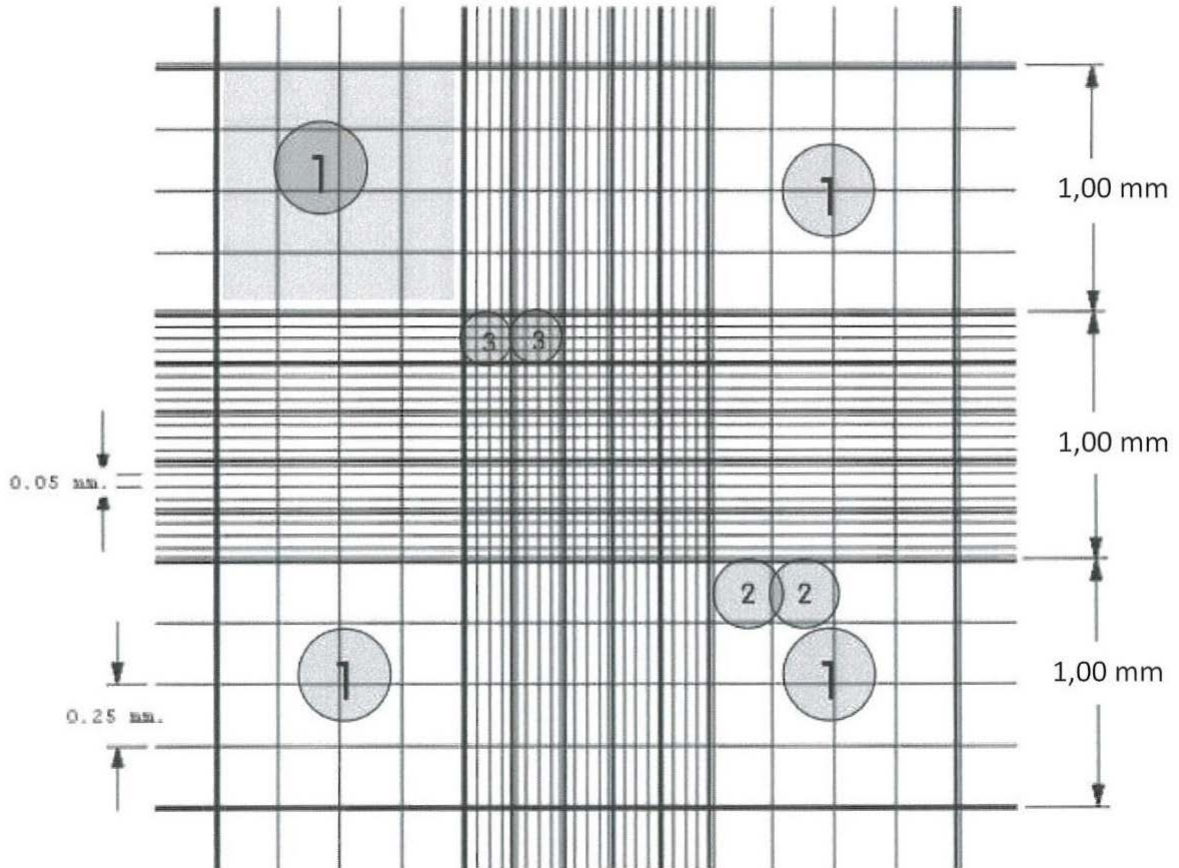


**Document n° 10 Préparation de l'inoculum de *P. expansum***

La souche étudiée est cultivée sur un milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) et incubée à 25 °C durant 7 jours afin d'obtenir une culture fortement sporulante. La suspension conidienne a été préparée en lavant la surface de la culture fraîche avec 10 mL d'eau distillée stérile combinée à du tween 80 et en frottant doucement avec un écouvillon stérile. La concentration des spores a été déterminée par microscopie à l'aide d'une chambre de comptage Neubauer puis ajustée à  $10^5$  spores/mL.

**Comptage à l'hématimètre de Neubauer**

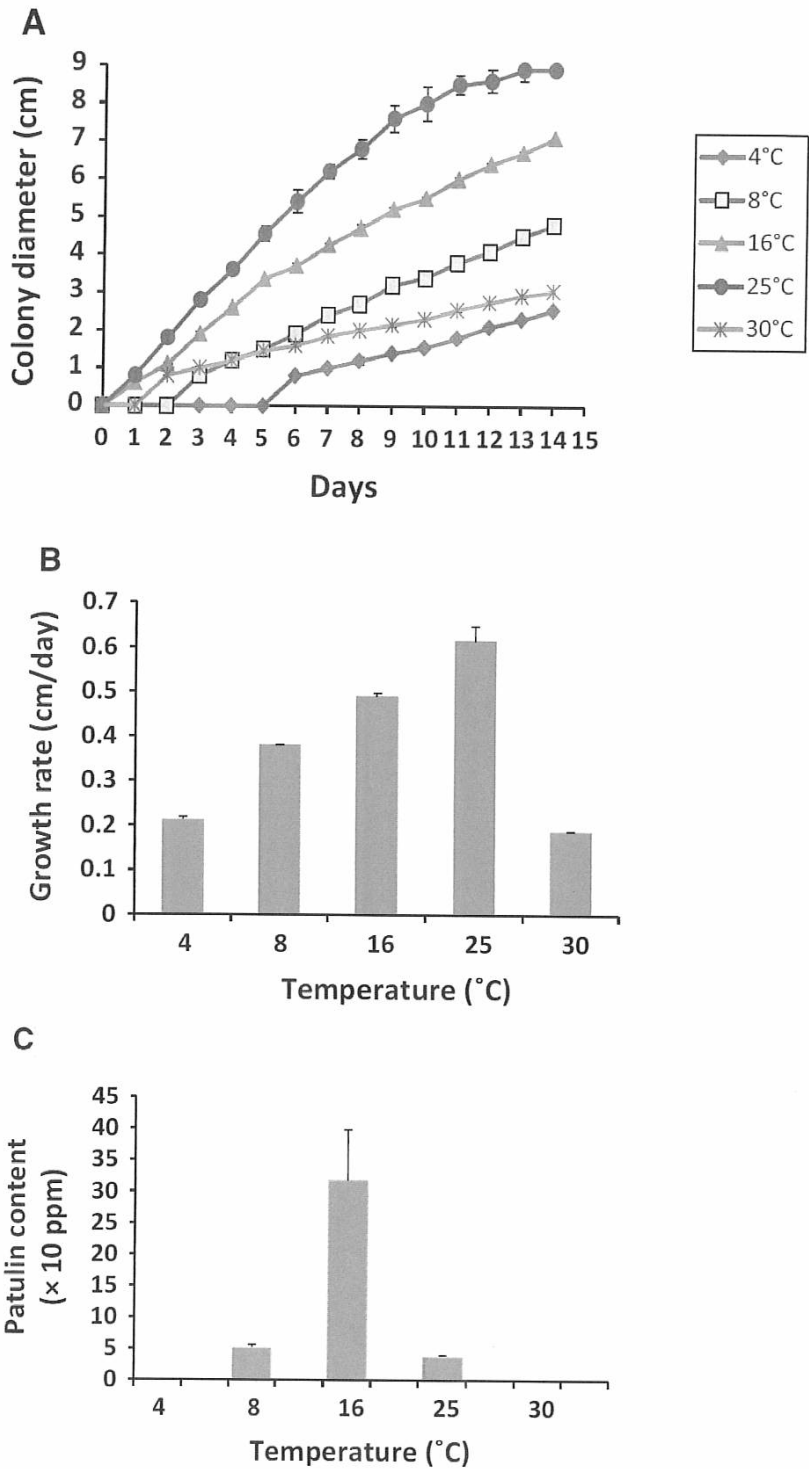
L'hématimètre est constitué d'un grand carré, subdivisés en 9 carrés moyens, notés n°1. Épaisseur de la lame 0,1 mm.



<b>Unité de comptage : carré moyen G)</b>	<b>Nombre de spores</b>
<b>1<sup>er</sup> carré</b>	<b>29</b>
<b>2<sup>ème</sup> carré</b>	<b>24</b>
<b>3<sup>ème</sup> carré</b>	<b>22</b>
<b>4<sup>ème</sup> carré</b>	<b>25</b>

d'après <http://www.celeromics.com>

**Document n° 11 : Influence de la température sur la croissance et la production de patuline par l'espèce *P. expansum***



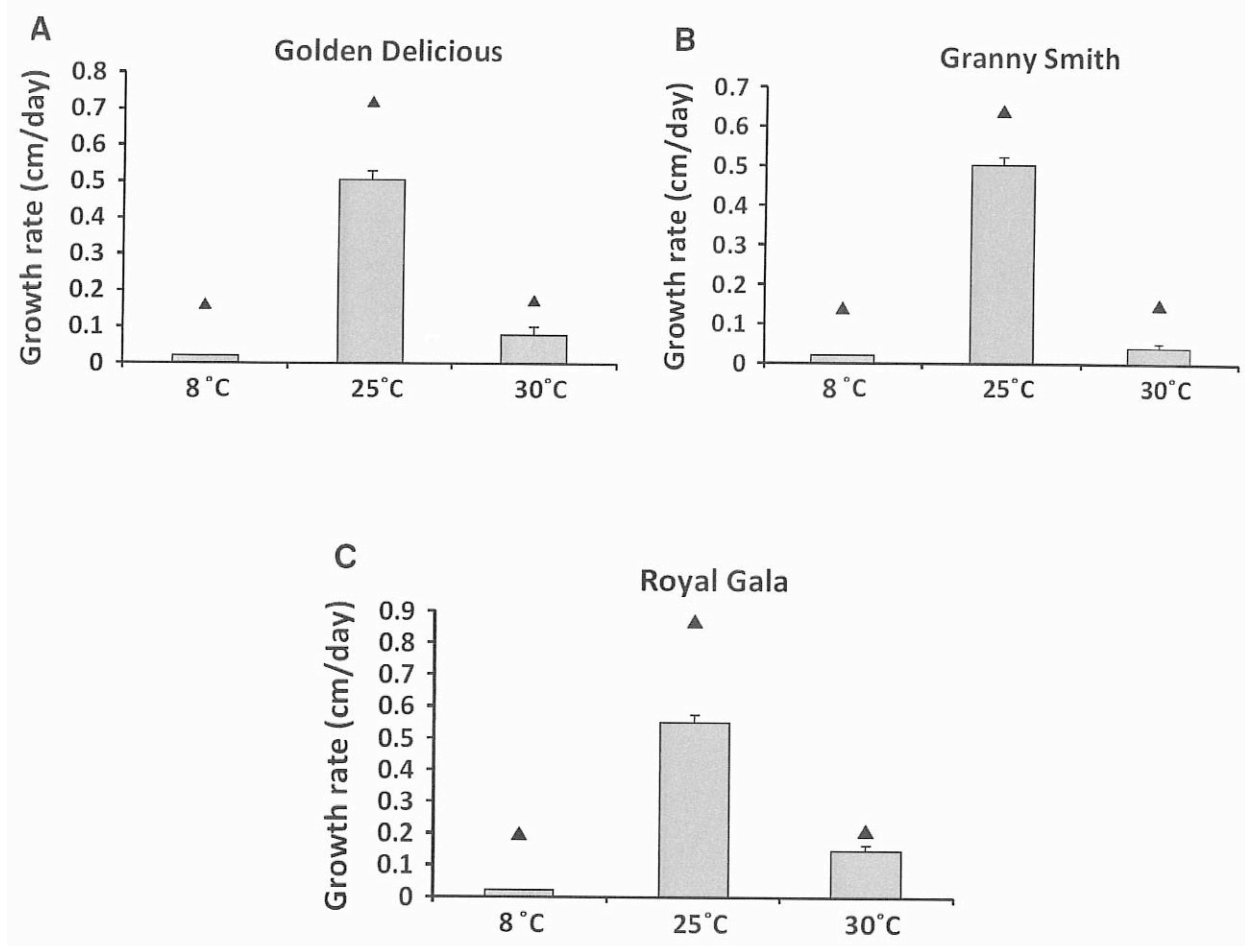
Growth curves (A), radial growth rates (cm/day) (B) and patulin production (ppm) of *Penicillium expansum* NRRL 35695 on Czapek glucose agar medium under different temperatures

Five different temperatures were tested (4 , 8 , 16 , 25 and 30 °C). The results shown are the mean of these three technical replicates for each condition.

**Document n° 12 : Comparaison des résultats de la croissance de *P. expansum* obtenus sur des pommes à ceux obtenus sur milieux de culture en présence d'hypochlorite de sodium à 2%.**

Les pommes sont traitées en surface à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 2 % puis rincées à l'eau. Elles sont ensuite blessées en utilisant un cure-dent stérile à une profondeur d'environ 0,5 cm, et inoculées avec 10 µL de suspension conidienne de *P. expansum* à une concentration de  $10^4$  conidies /µL.

Les pommes infectées ont été incubées pendant 2 semaines sous trois températures différentes (8 °C, 25 °C et 30 °C). Des analyses en double ont été effectuées sur chaque ensemble de conditions.



The experimental growth rate values are shown in histograms (■), while the *in vitro* values are represented by black triangles (▲). The experimental growth rate values are the average of two replicates for each condition with the standard deviations shown as error bars.

# Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et de technologies d'analyse 2018

---

## Grippe aviaire : Techniques de détection et d'identification, enjeux majeurs dans la lutte contre la pandémie

Le diagnostic d'infections virales par la grippe A chez les volailles ou les oiseaux sauvages est un enjeu de santé humaine et vétérinaire persistant. Il est rendu difficile notamment par des variations de pathogénicité du virus selon les hôtes aviaires.

La méthode standard de diagnostic au laboratoire repose sur l'isolement du virus, son typage H et N, et son profil de pathogénicité. Cette technique de diagnostic est cruciale pour une analyse virologique complète, en particulier lors d'une épidémie initiale, mais les délais qu'elle implique ne sont pas compatibles avec un contrôle efficace de la maladie.

L'évolution récente des techniques de biologie moléculaire permet de mettre en place de nouvelles méthodes de diagnostic accéléré :

- RT-PCR ;
- amplification isotherme d'acide nucléique ;
- méthodes de séquençage de nouvelle génération ;
- immuno-chromatographie...

Ces techniques contribuent à un diagnostic plus simple et plus rapide. Les avantages de chacune de ces techniques diagnostiques doivent permettre d'améliorer l'efficacité du contrôle de la grippe aviaire.

*Référence : M. Okamoto et al. / The Veterinary Journal 215 (2016) 82–86*

### 1. Les virus de la grippe

Le virus de la grippe ou virus Influenza type A, dont la structure est présentée dans le **document n° 1**, est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité négative. Le génome viral est constitué de 8 segments d'ARN qui subissent un épissage alternatif schématisé dans le **document n° 2**.

**Q1.** Expliquer l'intérêt de cet épissage alternatif en lien avec la structure du génome viral.

**Q2.** Justifier la présence de la polymérase au sein de la particule virale en précisant son activité enzymatique.

### 2. Isolement du virus par culture cellulaire

#### 2.1 Culture sur œufs embryonnés

La culture sur œufs embryonnés décrite dans le **document n° 3** est la technique de référence pour diagnostiquer les premiers cas cliniques et obtenir la souche virale isolée nécessaire aux autres analyses de laboratoire. Les échantillons sont prélevés à partir d'animaux morts ou vivants (féces, cloaque, prélèvement oro-pharyngé) par écouvillonnage.

**Q3.** Expliquer l'intérêt d'ajouter des antibiotiques au tampon PBS. Préciser l'importance de moduler leur composition en fonction du type de prélèvement.

**Q4.** Donner la signification de « SPF ». Déduire l'importance de l'utilisation d'œufs SPF pour la réussite de la technique.

## 2.2 Culture in vitro sur lignée cellulaire

La culture de cellules de mammifères MDCK (*Madin Darbin Canine Kidney*) peut également être une alternative pour la production de souches virales d'influenza. Ces cellules sont cultivées en adhérence dans du milieu EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) complété de sérum de veau fœtal (SVF), selon le protocole de maintenance présenté dans le **document n° 4**. Leur temps de génération est d'environ 24 heures.

**Q5.** Exposer les rôles et les effets du sérum de veau fœtal en culture cellulaire. En déduire le rôle des lavages au PBS avant la trypsination.

Un nouveau type cellulaire est à l'étude pour la culture de virus Influenza. Il s'agit des cellules HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*) qui ont la particularité de cultiver en suspension. Afin de valider cette lignée cellulaire pour l'étude du virus de la grippe aviaire, l'expression de récepteurs de type acide sialique sur la membrane plasmique des cellules est recherchée par cytométrie de flux, couplée à un marquage fluorescent dont le principe est représenté dans les **documents n° 5 et n° 6**.

**Q6.** Schématiser l'édifice moléculaire présent sur les cellules et détecté par le FACS.

**Q7.** Commenter les résultats du FACS pour tous les contrôles. Interpréter les résultats obtenus pour les cellules HEK-293 et conclure sur l'intérêt de leur choix pour la culture du virus Influenza.

**Q8.** Proposer une méthode permettant de vérifier l'infectiosité du virus Influenza sur les cellules HEK-293.

## 3. Détection par génie moléculaire : RT-PCR multiplex

Le principal inconvénient de l'isolement du virus est le temps nécessaire à l'obtention du diagnostic. Il nécessite de plus du matériel biologique contrôlé (œufs embryonnés, lignées cellulaires en culture) et des installations de laboratoire de biosécurité.

Une détection directe dans des échantillons d'un ou plusieurs segments du génome de la grippe A par RT-PCR permet une rapidité et une sensibilité améliorées pour la détection, le typage et le sous-typage du virus de la grippe. Un protocole de RT-PCR multiplex permettant de détecter plusieurs souches du virus Influenza est présenté dans le **document n°7**.

**Q9.** Identifier le but de l'étape 2.

**Q10.** Dans le tableau 1 de l'étape 3, les séquences des amorces sont données par paire. Schématiser un segment d'ADN double brin à amplifier en positionnant les deux amorces.

Le **document n° 8** présente un exemple de résultat obtenu par cette méthode.

**Q11.** Expliquer le sens de migration des échantillons.

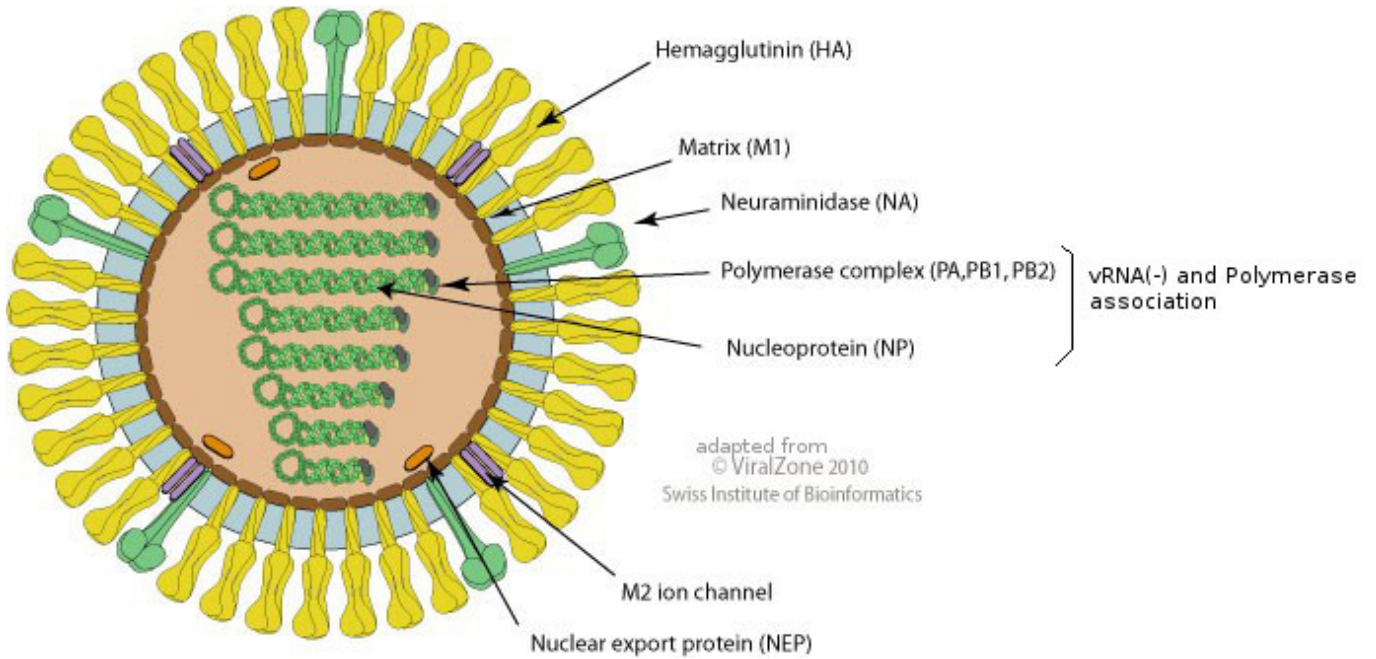
**Q12.** Proposer une composition possible du contrôle négatif.

**Q13.** Analyser l'électrophorégramme pour valider la technique et conclure sur le type et le sous-type des trois souches testées.

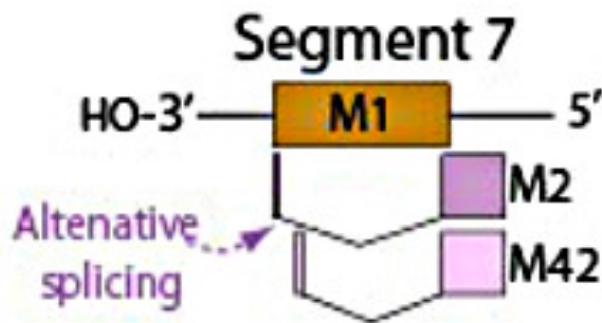
**Q14.** Conclure sur l'intérêt de cette technique de RT-PCR multiplex par rapport à une RT-PCR classique.



**Document n°1 : Structure du virus *Influenza***



**Document n° 2 : Exemple d'épissage alternatif sur le segment 7 du génome viral**



Adapted from  
© ViralZone 2014  
SB Swiss Institute of Bioinformatics

**Document n° 3 : Culture de virus sur œuf embryonné**

La méthode de référence pour multiplier le virus influenza A est l'inoculation d'œufs embryonnés de poulet SPF (« *specific pathogen free* »).

- Dilution des échantillons en tampon PBS (*isotonic phosphate-buffered saline*, pH 7,0–7,4) additionné d'antibiotiques (pénicilline (2000 units/mL), streptomycine (2 mg/mL), gentamycine (50 µg/mL) et mycostatine (1000 units/mL) pour les prélèvements oro-pharyngés, mais 5 fois plus concentrés pour les échantillons de fèces ou cloaque).
- Clarification des suspensions par centrifugation à 1000 g des suspensions en PBS + antibiotiques.
- Inoculation du sac allantoïque des œufs embryonnés SPF de 9 à 11 jours d'incubation.
- Incubation à 37 °C ( $\pm 2$  °C) durant 2 à 7 jours.
- Refroidissement des œufs 4 h à 4 °C.
- Prélèvement du sac allantoïque et criblage par différentes techniques (immunodiffusion en gel, ELISA, RT-PCR, ...)

*d'après OIE Terrestrial Manual 2015*

#### Document n° 4 : Maintenance des cellules MDCK

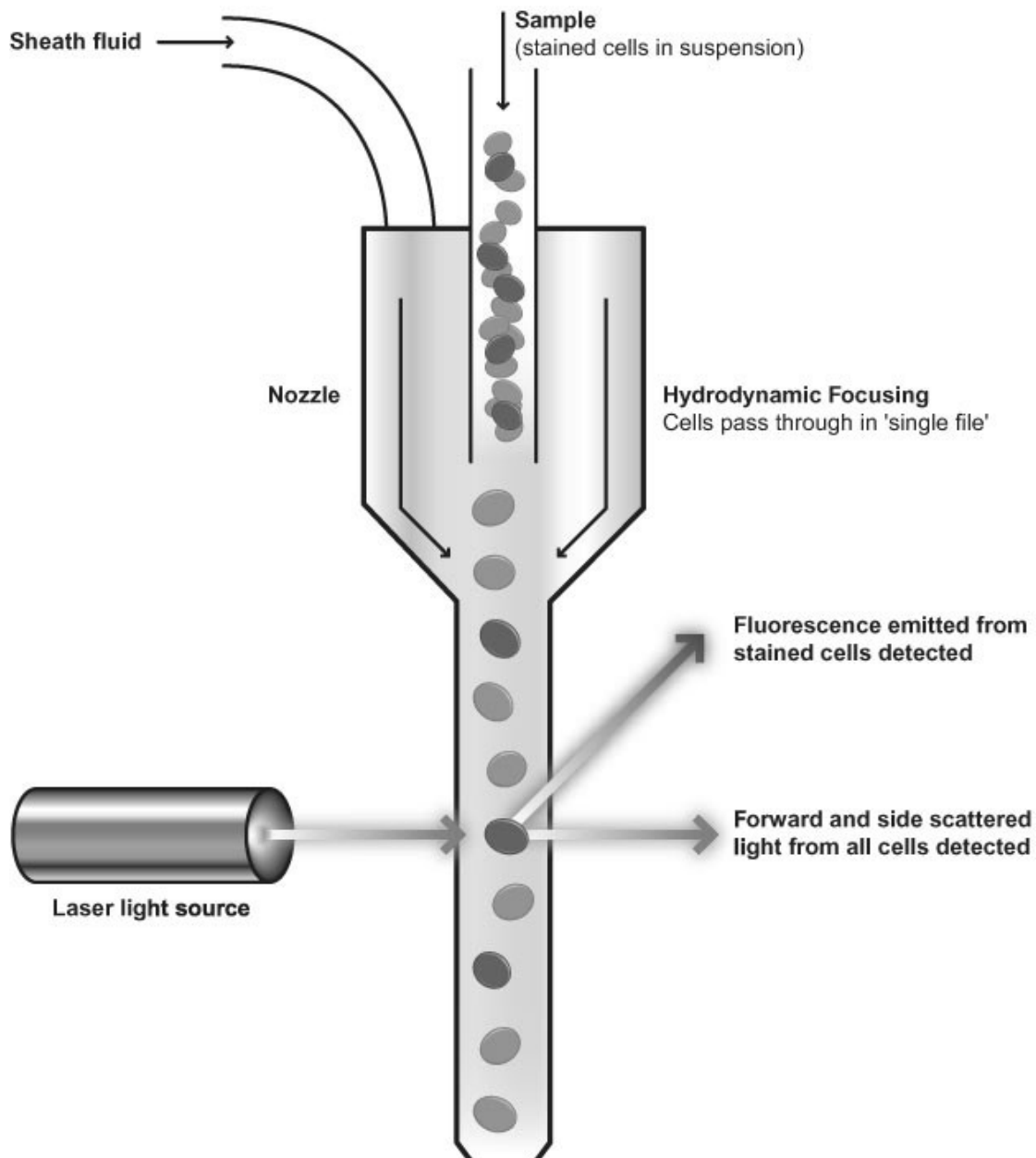
Les cellules MDCK sont cultivées en adhérence (flasques T-75) dans du milieu EMEM supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur (30 min à 56 °C). Ces cellules sont re-ensemencées 2 à 3 fois par semaine dans du milieu frais, à des densités allant de 0,05 à  $0,15 \cdot 10^6$  cellules/mL (volume de culture : 10 mL), et incubées à 37 °C et 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **Trypsination des cellules :**

Après 2 lavages au PBS pour retirer toute trace de sérum, les cellules sont décollées sous action de 0,25 % Trypsine-EDTA à raison de 2-3 mL de trypsine par flasque T-75 (7-15 min). Une fois les cellules décollées, l'action de la trypsine est arrêtée par ajout de 7-8 mL de milieu de culture (EMEM + 10 % SVF), et les cellules sont comptées et repiquées à la densité voulue.

**Document n° 5 : Principe de la cytométrie en flux**

La cytométrie en flux (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS) est une technique permettant de faire défiler des cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, en les comptant et en les caractérisant. Couplée à l'utilisation de marqueurs fluorochromes spécifiques, la lumière réémise (par fluorescence) permet de caractériser des populations cellulaires (taille, granulométrie, type cellulaire, ...).



**Document n° 6 : Test de détection Sia2-3Gal et Sia2-6Gal**

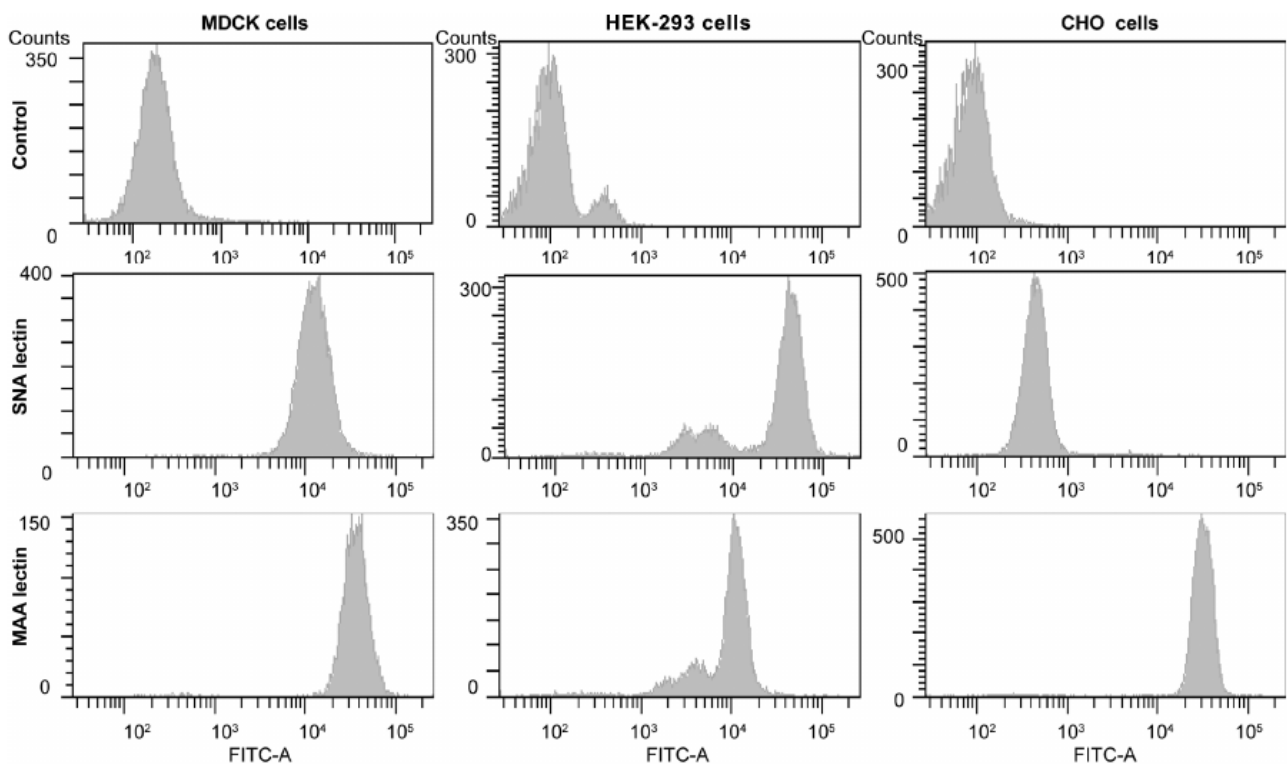
La présence des acides sialiques de type Sia2-3Gal et Sia2-6Gal nécessaires à la fixation du virus influenza sur la cellule est déterminée en utilisant un kit commercial (DIG Glycan Differentiation kit, Roche). Ce kit contient des lectines marquées au DIG, reconnues par un anticorps anti-DIG conjugué à un fluorochrome FITC-A. La détection se fait ensuite par cytométrie de flux (FACS).

Les deux lectines sont Sambucus nigra agglutinin (SNA) qui se fixe spécifiquement sur Sia2-6Gal, et Maackia amurensis agglutinin (MAA) qui se fixe sur Sia2-3Gal.

**Préparation des échantillons :**

- Trypsination des cellules adhérentes (CHO ou MDCK)
- Ajustement à la densité de  $0,25 \cdot 10^6$  cellules totales dans 0,5 mL de PBS (CHO, HEK-293 ou MDCK)
- Addition de 2  $\mu$ L de lectine SNA-DIG ou 10  $\mu$ L de lectine MAA-DIG dans 0,5% de BSA, et incubation sur de la glace pendant 30 min.
- Centrifugation (200 g x 5 min) des cellules pour éliminer le surnageant, et re-suspension avec 10  $\mu$ L (1/50<sup>ème</sup>) d'anticorps anti-DIG conjugués au FITC-A, puis incubation sur de la glace pendant 30 min.
- Centrifugation (200 g x 5 min) des cellules et élimination du surnageant. Re-suspension des cellules dans 0,5 mL de PBS + 0,5 % BSA.
- Conservation à 4 °C avant analyses au FACS.

**Résultats du FACS (représentations monoparamétriques)**



**Données d'interprétation :**

- Seuil de positivité du signal fluorescent (FITC-A) : valeurs supérieures à 1000.
- La ligne « control » correspond à la mesure de fluorescence de cellules trypsinées mais non marquées.
- Les cellules MDCK et les CHO servent de contrôles : les cellules MDCK exprimant à la fois Sia2-3Gal et Sia2-6Gal et les cellules CHO n'exprimant que Sia2-3Gal.

**Document n° 7 : Protocole de RT-PCR multiplex***d'après S. Dhakad & Co. Indian Journal of Medical Microbiology, vol 33, p73-77, 2015***Étape 1 :**

L'extraction d'ARN a été réalisée sur un échantillon de 350 µL avec le Mini kit RNEASY (Qiagen).

**Étape 2 :**

Pour un volume réactionnel de 12,5 µL, 5,0 µL d'ARN viral, 500 ng d'amorces aléatoires avec 200 µM de chaque désoxynucleotide triphosphate (dNTPs) et 10 unités d'AMV RT (reverse transcriptase de myéloblaste aviaire) ont été utilisés.

Le mélange réactionnel a été incubé à 37 °C pendant 90 minutes, puis chauffé à 65 °C pendant 10 minutes pour inactiver l'enzyme.

**Étape 3 :**

La PCR multiplex a été réalisée avec 5 µL d'ADNc synthétisé à l'étape 2. Les 25 µL de volume réactionnel contiennent 200 µM de chaque dNTPs, 50 picomoles de tous les couples d'amorces sens (F) et antisens (R) (Tableau 1), et 1,5 U de TaqPolymérase.

L'amplification d'ADN a été exécutée en utilisant une dénaturation initiale pendant 3 minutes à 94°C, suivie de 40 cycles de dénaturation pendant 30 s à 94 °C, d'hybridation pendant 30 s à 50 °C et d'extension pendant 30 s à 72 °C, avec une extension finale pendant 10 minute à 72 °C dans un thermocycleur.

**Données :** Les amorces utilisées pour la détection du virus de la grippe visent l'amplification du gène M ou Mat (segment 7) pour la grippe A et du gène NS (segment 8) pour la grippe B. Le typage de la grippe A (H1N1 et H3N2) est réalisé par l'utilisation d'amorces spécifiques du gène HA codant l'hémagglutinine (segment 4) et du gène NA codant la neuraminidase (segment 6).

Table 1: Primer sequences used for typing and sub-typing of influenza virus by Multiplex RT-PCR

Primer	Genomic location and sequences (5'-3')	Amplicon size (bp)
TypeA/Mat-I	F-CGAGATCGCACAGAGACTGAAGAT R-GGCAAGTGCACCAGCAGAATAACT	311
TypeA/Mat-II	F-AGGTCGAAACGTACGTTCTTTCTA R-AGTAGCTT AGTGACACTTCTTTGG	348
TypeB/NS	F-ACAAATGAGGGGGTCCG R-ACCAGGGTAGTCAAGGGCT	108
Sub-type H1	F-AATTTGCTATGGCTGACGGA R-CTACAGAGACATAAGCATTTC	164
Sub-type H3	F-GCAAGCTTACAGCAACTGTT R-ATAGTCAGCTTCAGCGCTG	232
Sub-type N1	F-AAGGGGTTTTTCATACAGGTATGGT R-TCTGTCCATCCATTAGGATCC	106
Sub-type N2	F-GGAAATCGTTCATATTAGCCCATTG R-AGCACACATAACTGGAAACAATGC	173
HA-1 (Pdm)	F-TGTAACACGACGGCCAGTAG R-CAGGAAACAGCTATGACCCA	465

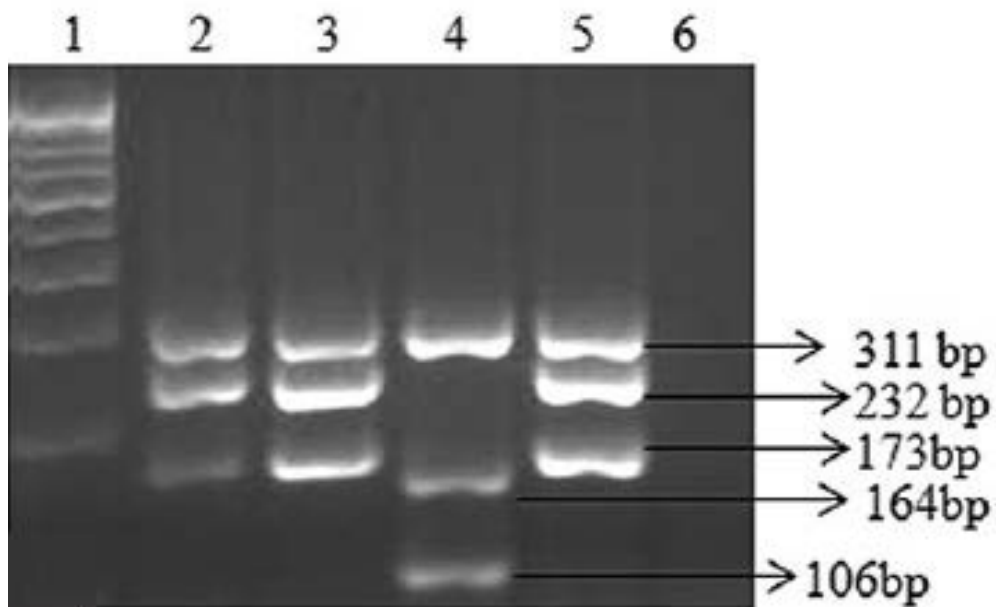
**Document n°8 : Électrophorégramme de RT-PCR multiplex****Dépôts :**

1- Marqueurs de taille (*100 pb ladder*)

2 à 4 - Échantillons de souches testées

5- Contrôle positif obtenu à partir d'une souche de type A/Mat-I, sous-type H3N2

6- Contrôle négatif



Migration en gel d'agarose concentré.

Révélation au bromure d'éthidium.

# Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2018

---

## CONTRÔLE QUALITÉ DU SURIMI

Le **surimi**, appelé à tort « bâtonnet de crabe », est un produit alimentaire réalisé à base de chair ou de pâte de poisson ; *surimi* signifiant « poisson haché » en japonais. Le surimi produit en France est à base de poissons sauvages à chair blanche pêchés en haute mer ; notamment le colin d'Alaska.

Il est composé de chair de poisson, de lait écrémé, de fécule de pomme de terre, d'arômes de crabe et d'huile de colza.

Son procédé de fabrication est présenté dans le **document n°1**.

Plusieurs contrôles seront réalisés tout au long de sa fabrication :

- contrôles à réception des matières premières
- contrôles du procédé de fabrication.

### I- Contrôle d'une matière première : le colin d'Alaska

Un des contrôles réalisé sur le poisson est le dosage d'ABVT dont la définition est donnée dans le **document n° 2**.

**Q1-** Expliquer l'origine de l'ABVT dans le poisson et montrer l'intérêt de son dosage. Citer deux autres contrôles non biochimiques ayant le même intérêt.

La méthode de référence de dosage de l'ABVT consiste en une distillation d'un extrait déprotéinisé suivie d'une titration par un acide ; les résultats sont exprimés en mg d'azote pour 100 g de muscle.

Le lot de poisson LK526 est testé selon un contrôle normal : d'après les tables statistiques, l'effectif de l'échantillon est de 13.

La teneur en ABVT maximale tolérée par l'entreprise est de 20 mg d'azote pour 100 g de muscle.

Le **document n° 3** présente les plans d'échantillonnages pouvant être utilisés. Le **document n° 4** donne les résultats du contrôle effectué.

**Q2-** Repérer dans le plan d'échantillonnage les critères d'acceptation **A** et de refus **R**, sachant que le NQA choisi par l'entreprise est de 1 %.

Conclure sur l'acceptabilité du lot LK526.

Le laboratoire Contrôle Qualité souhaite utiliser une méthode alternative par HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance). Les résultats obtenus sur une série de 30 mesures, à partir d'une solution de référence à 15 mg d'azote pour 100 g, sont présentés dans le **document n°5**.

**Q3-** Calculer le biais et le coefficient de variation pour chacune des méthodes et comparer la fidélité et la justesse des deux méthodes. Expliquer le raisonnement.

**Q4-** D'après ces critères, justifier le choix de l'entreprise de remplacer la méthode de référence par l'HPLC. Indiquer deux autres caractéristiques permettant d'orienter le choix d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.

Le colin d'Alaska est pêché en mer et directement surgelé sur le bateau de pêche.

Arrivé en pêcherie, il est ensuite décongelé de façon à récupérer la chair, qui est mixée puis pressée pour donner une pâte blanche. Cette pâte va être congelée en plaque, conditionnement plus pratique pour les industriels. Cette opération unitaire est réalisée à l'aide d'un congélateur à plaques verticales.

Le **document n° 6** présente deux types de congélateurs pouvant être utilisés.

**Q5-** Nommer les éléments numérotés de 1 à 6.

**Q6-** Lister les avantages et inconvénients de la congélation par pulvérisation d'azote liquide et expliquer l'intérêt d'une vitesse de congélation rapide sur un produit.

**Q7-** Justifier le choix fait par l'industriel d'utiliser un congélateur à plaques, en tenant compte des caractéristiques des plaques de colin et de leur devenir, présenté dans le diagramme de fabrication du surimi.

Les plaques de chair congelée arrivent à l'entreprise de fabrication de surimi avec l'étiquetage présenté dans le **document n° 7**.

**Q8-** Repérer un élément de l'étiquetage permettant la traçabilité. Justifier les consignes de conservation données.

Un extrait de la réglementation en vigueur sur les produits surgelés est présenté dans le **document n° 8**.

**Q9-** Expliquer pourquoi les plaques de colin sont étiquetées « congelé » et non pas « surgelé ».

## II- Contrôles des étapes de fabrication

L'entreprise utilise la méthode HACCP pour assurer la qualité de ses produits. Le **document n° 9** présente l'arbre de décision utilisé.

**Q10-** Vérifier que les étapes de pasteurisation et de stockage à 4 °C sont des CCP.

**Q11-** Citer un paramètre permettant la surveillance de ces CCP et nommer un outil qualité permettant de mettre en évidence la dérive de ce paramètre.

**Q12-** Calculer le temps de traitement à 60 °C, permettant d'aboutir à 10 réductions décimales sachant que  $D_{60} (E. faecalis) = 3 \text{ min}$ .

## III- Étude du produit fini

Un des contrôles réalisé sur le surimi est de vérifier l'espèce du poisson utilisé dans la fabrication : en effet, des poissons d'élevage à chair blanche peuvent parfois être utilisés à moindre coût. C'est le cas de certains poissons d'eau douce comme le panga.

Les étapes à suivre sont alors extraction de l'ADN de poisson, amplification par PCR d'un fragment de gène caractéristique d'espèce, restriction enzymatique sur ce fragment et électrophorèse en gel d'agarose.

L'électrophorégramme est présenté dans le **document n° 10**.

**Q13-** Analyser l'électrophorégramme et conclure sur le surimi testé.

Il existe sur le marché des surimis vendus sous la dénomination « Surimis 70 % Bio » dont un extrait de l'étiquetage est présenté dans le **document n° 11**. Le **document n° 12** présente la certification associée au logo européen « agriculture biologique ».

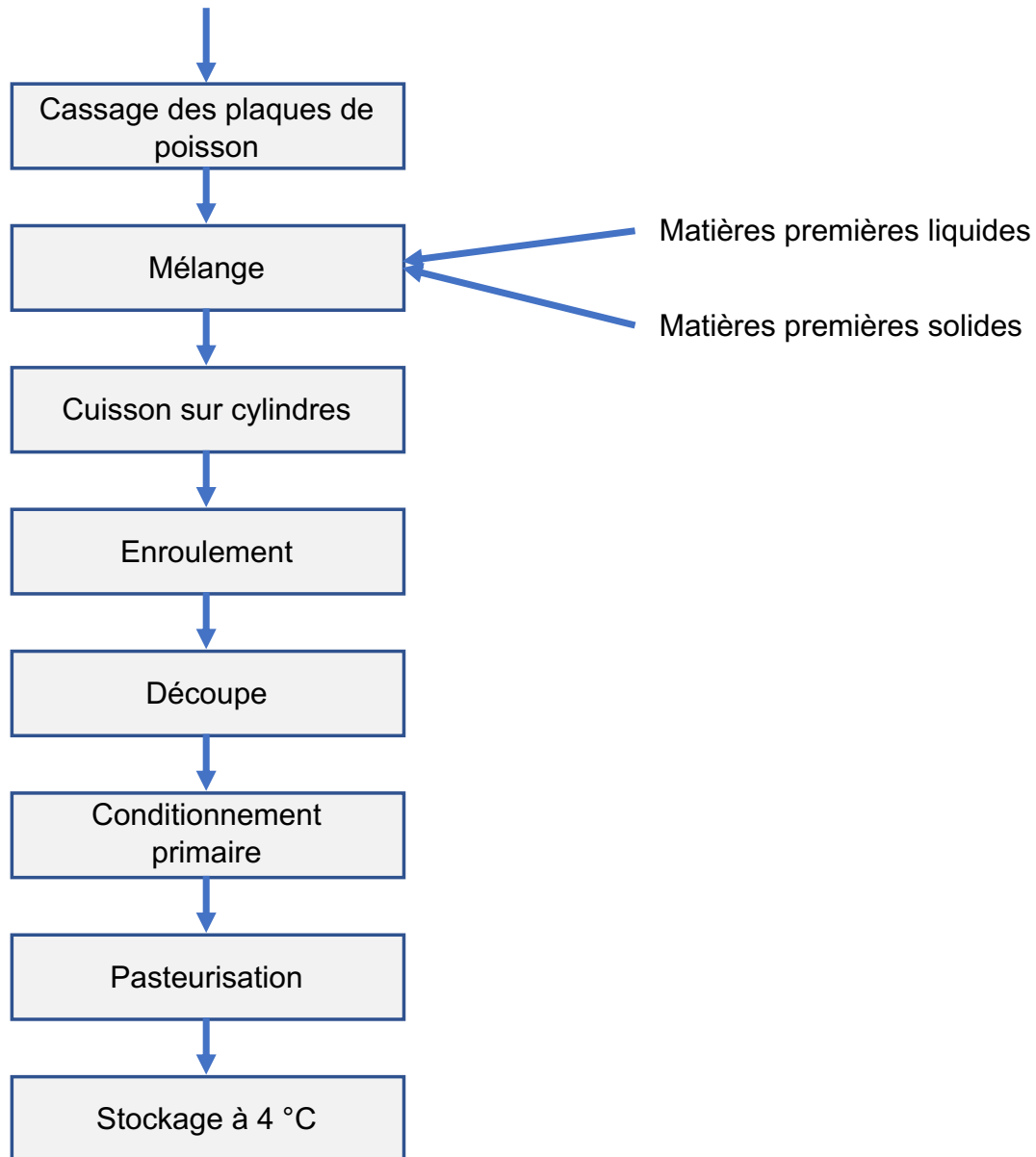
**Q14-** Exposer les étapes permettant à une entreprise d'obtenir une certification.

**Q15-** Expliquer pourquoi ces surimis ne peuvent obtenir un label Agriculture Biologique.



**Document n° 1 : Diagramme de fabrication du surimi**

Plaques de poisson congelées

**DOCUMENT 2 : Définition de l'ABVT (Azote Basique Volatil Total)**

L'ABVT est principalement constitué par l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ), la diméthylamine (DMA), la triméthylamine (TMA) et d'autres amines de faible poids moléculaire.

Ces composés ont en commun deux caractéristiques : la basicité et la volatilité. Ils sont responsables de l'odeur ammoniacquée qui peut parfois se dégager d'un poisson.

Document n° 3 : Plans d'échantillonnage

**Plans d'échantillonnage simple, renforcé, réduit**  
**Pourcentage d'individus non conformes**  
 (Normes : NFX 06-022 - MIL STD 105E)

		Critères d'acceptation pour le contrôle réduit														
		A=0 R=1	A=0 R=2	A=1 R=3	A=1 R=4	A=2 R=5	A=3 R=6	A=4 R=7	A=5 R=8	A=6 R=9	A=7 R=10	A=8 R=11	A=9 R=12	A=10 R=13		
Lettre code	Contrôle normal n	Critères d'acceptation pour le contrôle normal et le contrôle renforcé												Contrôle réduit n	Lettre code	
		A=0 R=1	A=1 R=2	A=2 R=3	A=3 R=4	A=4 R=5	A=5 R=6	A=6 R=7	A=7 R=8	A=8 R=9	A=9 R=10	A=10 R=11	A=11 R=12			A=12 R=13
A	2	2.53 6.5 68.4													2	A
B	3	1.70 4.0 53.6													2	B
C	5	1.02 2.5 36.9	7.63 10 58.4												2	C
D	8	0.64 1.5 25.0	2.64 6.5 40.6	11.1 10 53.9											3	D
E	13	0.394 1.0 16.1	2.81 4.0 26.8	6.63 6.5 36.0	11.3 10 44.4										5	E
F	20	0.256 0.65 10.9	1.80 2.5 18.1	4.22 4.0 24.5	7.13 6.5 30.4	14.0 10 41.5									8	F
G	32	0.161 0.4 6.94	1.13 1.5 11.6	2.59 2.5 15.8	4.39 4.0 19.7	8.50 6.5 27.1	13.1 10 34.1								13	G
H	50	0.103 0.25 4.50	0.712 1.0 7.56	1.66 1.5 10.3	2.77 2.5 12.9	5.34 4.0 17.8	8.20 6.5 22.4	9.39 10 26.0	12.9 10 29.1						20	H
J	80	0.064 0.15 2.84	0.444 0.65 4.78	1.03 1.0 6.52	1.73 1.5 8.16	3.32 2.5 11.3	5.06 4.0 14.2	5.87 6.5 16.2	7.91 10 18.6	9.61 11.9 22.2	11.9 10 24.2				32	J
K	125	0.041 0.10 1.84	0.284 0.4 3.11	0.654 0.65 4.26	1.09 1.0 5.35	2.09 1.5 7.42	3.19 2.5 9.42	3.76 4.0 10.4	4.94 6.5 12.3	6.15 7.40 14.2	7.40 6.5 16.1	9.95 11.9 19.8	11.9 10 22.5		50	K
L	200	0.0256 0.065 1.15	0.178 0.25 1.95	0.409 0.40 2.66	0.683 0.65 3.34	1.31 1.0 4.64	1.99 1.5 5.89	2.35 2.5 6.50	3.09 4.0 7.70	3.85 4.62 8.89	4.62 4.0 10.1	6.22 7.45 12.4	7.45 6.5 14.1		80	L
M	315	0.0163 0.040 0.731	0.112 0.15 1.23	0.259 0.25 1.69	0.433 0.40 2.12	0.829 0.65 2.94	1.26 1.0 3.74	1.49 1.5 4.13	1.96 2.5 4.89	2.44 2.94 5.65	2.94 2.5 6.39	3.95 4.73 7.86	4.73 4.0 8.95		125	M
N	500	0.0103 0.025 0.461	0.071 0.10 0.778	0.164 0.15 1.06	0.273 0.25 1.34	0.523 0.40 1.86	0.796 0.65 2.35	0.939 1.0 2.60	1.23 1.0 3.08	1.54 1.85 3.56	1.85 1.5 4.03	2.49 2.98 4.95	2.98 2.5 5.64		200	N
P	800	0.0064 0.015 0.288	0.044 0.065 0.486	0.102 0.10 0.665	0.171 0.15 0.835	0.327 0.25 1.16	0.498 0.40 3.47	0.587 0.65 1.62	0.771 1.0 1.93	0.961 1.16 2.22	1.16 1.0 2.52	1.56 1.86 3.09	1.86 1.5 3.52		315	P
Q	1250	0.0041 0.010 0.184	0.028 0.040 0.310	0.065 0.065 0.426	0.109 0.10 0.534	0.209 0.15 0.742	0.318 0.25 0.942	0.376 0.40 1.04	0.494 0.40 1.23	0.615 0.740 1.42	0.740 0.65 1.61	0.995 1.19 1.98	1.19 1.0 2.25		500	Q
R	2000	0.0026 0.025 0.115	0.018 0.040 0.195	0.041 0.040 0.266	0.068 0.065 0.334	0.131 0.10 0.464	0.199 0.15 0.589	0.235 0.25 0.650	0.309 0.40 0.770	0.385 0.462 0.889	0.462 0.40 1.01	0.622 0.745 1.24	0.745 0.65 1.41		800	R

La flèche donne la correspondance entre le contrôle normal et le contrôle renforcé correspondant.  
 Exemple : un contrôle normal lettre code J, NQA 0,65 deviendra le contrôle renforcé K, NQA 0,4

## Document n°4 : Résultats des dosages d'ABVT sur le lot de poisson LK526

Élément de l'échantillon	Teneur en ABVT en mg d'Azote pour 100 g de muscle $\pm$ 1 g
1	13
2	12
3	15
4	17
5	14
6	14
7	15
8	23
9	12
10	16
11	14
12	11
13	10

## Document n° 5 : Comparaison de deux méthodes de dosage de l'ABVT

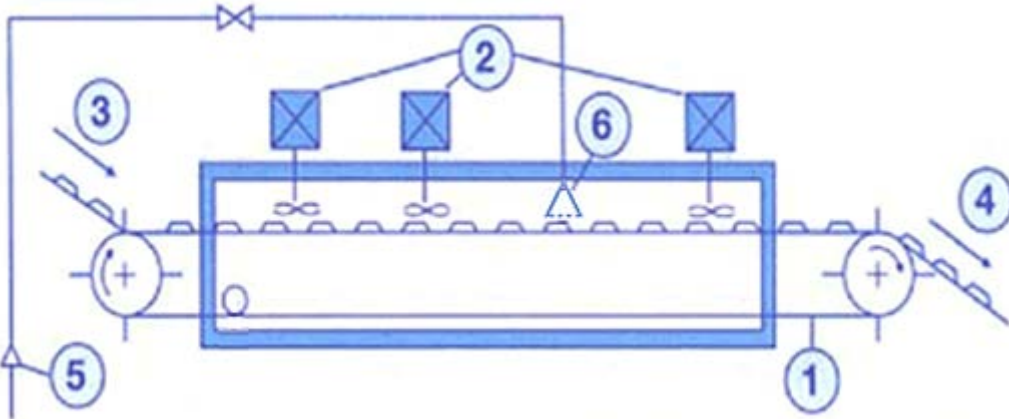
	Méthode de référence	HPLC
Taille de l'échantillon	30	30
Moyenne (mg N/100 g)	15,8	15,2
Écart type estimé (mg N/100 g)	0,82	0,41

**Document n° 6 : Présentation de deux types de congélateurs**

**Les congélateurs à plaques verticales**

Ces appareils utilisent une méthode qui consiste à placer le produit à congeler entre deux plaques métalliques verticales dans lesquelles circule un fluide réfrigérant dont la température est maintenue à une température inférieure à  $-18\text{ °C}$  par un système de réfrigération mécanique. Le mode de conditionnement des produits influe directement sur la valeur du coefficient de transfert de chaleur et donc sur le temps de traitement des produits.

**Les congélateurs à pulvérisation d'azote liquide**



La congélation par froid cryogénique consiste à utiliser la basse température d'évaporation de fluides tels que l'azote liquide ( $-195,5\text{ °C}$ ) pour extraire de la chaleur du produit à congeler et atteindre des vitesses de congélation très rapides, idéales pour la congélation de petits produits fragiles.

Les fluides cryogéniques sont appliqués directement sur les produits à congeler qui peuvent être emballés puis ils s'évaporent dans l'atmosphère en extrayant du produit à congeler la chaleur latente nécessaire à leur vaporisation. La quantité de fluide cryogénique à répandre sur les produits à congeler doit être calculée en fonction du poids des produits. Des limites peuvent être imposées pour la sécurité des opérateurs. La congélation cryogénique nécessite un approvisionnement régulier en fluides cryogéniques et une maintenance du système de congélation (limitation des pertes dues à des fuites dans le système de tuyauterie).

Le rendement économique d'une telle installation repose alors sur le type de produit à congeler, le choix du fournisseur (distance, prix...) et sur les conditions de stockage des fluides cryogéniques (limitation des pertes par déperdition).

**Document n° 7 : Étiquetage des plaques de poisson congelées**

**Colin d'Alaska congelé**

N° lot : 5563 KV

DLUO : 09/2018

**Consignes de conservation :**

- 24 heures à  $4\text{ °C}$
- Plusieurs mois à  $-18\text{ °C}$
- Ne jamais recongeler un produit décongelé

**Document n° 8 : Extrait de la réglementation\* concernant les produits surgelés**

Le qualificatif “surgelé” ou toute autre dénomination comprenant un composé ou dérivé de ce mot ou évoquant l’idée de congélation ultra-rapide est réservé aux produits alimentaires ou boissons qui :

- a) se trouvaient au moment de leur surgélation dans un parfait état de fraîcheur ;
- b) répondaient, au même moment, et chacun en ce qui le concerne, aux caractéristiques prévues par les textes spéciaux en vigueur en matière de répression des fraudes et pour les viandes, abats et produits d’origine animale, en matière de salubrité ;
- c) ont fait l’objet des opérations nécessaires de triage et de parage ;
- d) ont été soumis en vue de leur stabilisation à un abaissement de température suffisant pour permettre l’obtention à “cœur” d’une température égale ou inférieure à -18 °C appliquée le plus tôt possible après la capture, l’abattage ou la préparation. L’opération de surgélation doit être conduite de manière à franchir très rapidement la zone de température de cristallisation maximum.

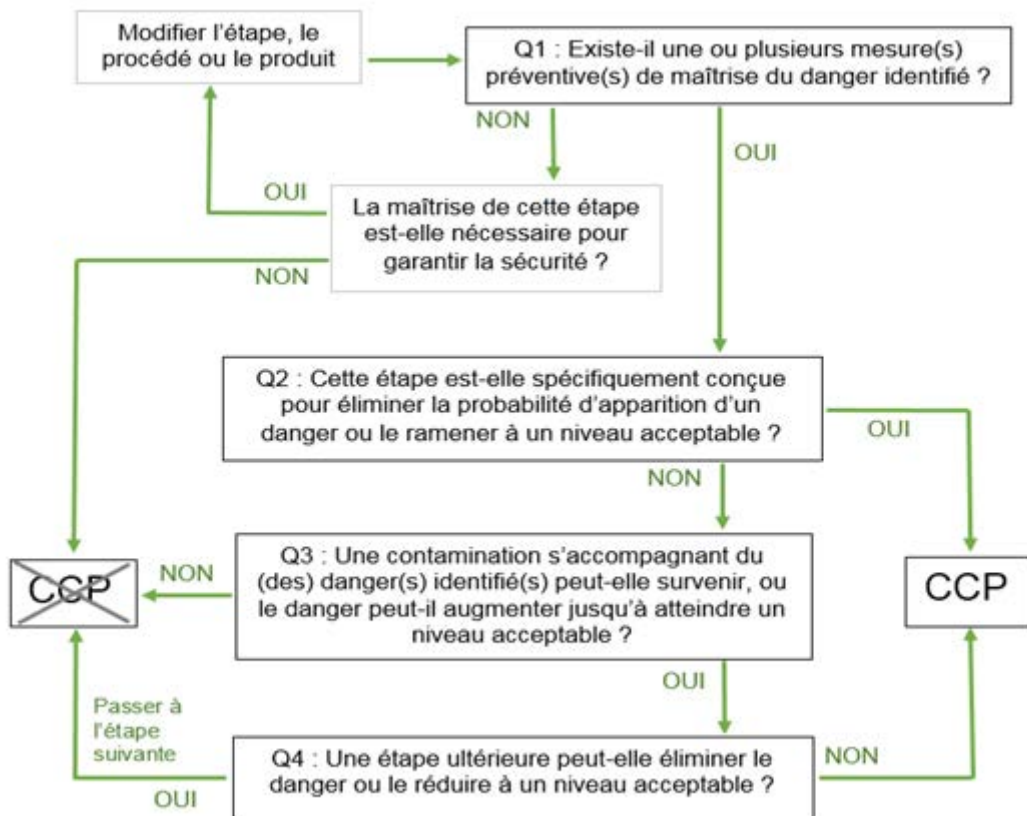
Pendant l’opération de congélation il est interdit d’utiliser en contact direct avec les produits des fluides frigorigènes autres que ceux dont la liste et les conditions d’emploi sont fixées par arrêté pris dans les formes prévues à l’article 1er du décret du 15 avril 1912 susvisé.

- e) Ont été maintenus, en tous points, à une température inférieure ou égale à -18 °C depuis la surgélation jusqu’à la remise au consommateur final ou l’utilisation par les restaurants, hôpitaux, cantines et autres collectivités similaires. Toutefois, cette température peut, pendant le transport et pendant la conservation dans les meubles de vente, subir de brèves variations en hausse n’excédant pas 3 °C.

\* Décret n°64-949 du 9 Septembre 1964, modifié par le décret n°97-1016 du 5 Novembre 1997

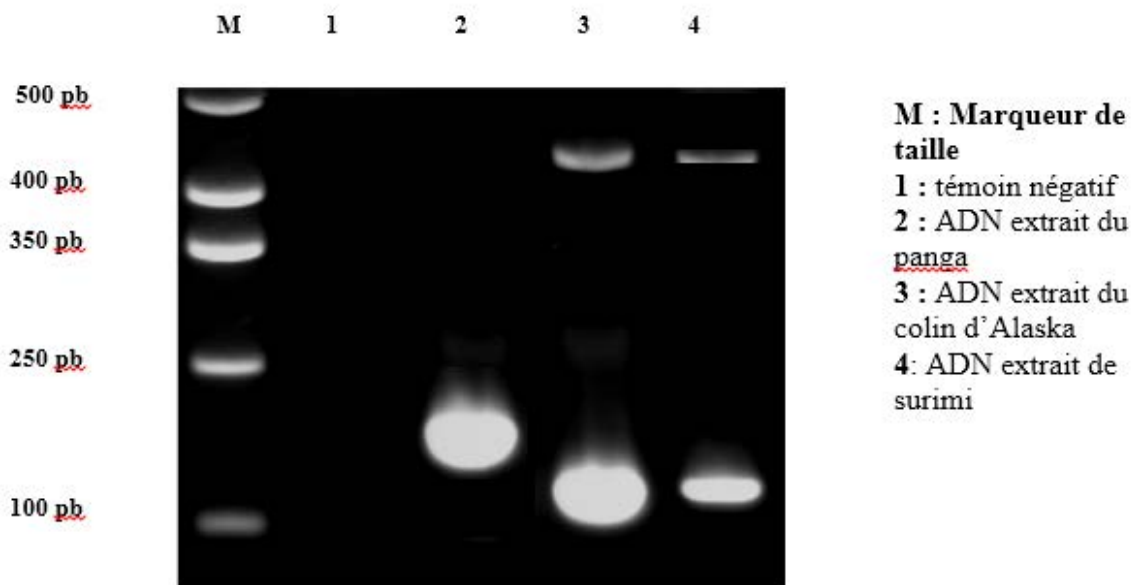
**Document n° 9 : Arbre de décision**

SARL QUAPA





## Document n°10 : Électrophorégramme des gènes d'espèce



## Document n° 11 : Composition des bâtonnets surimi à 70% Bio

Surimi base 27 % (chair de merlan, sucre de canne\*), blanc d'œuf en poudre réhydraté\*, blanc d'œuf\*, amidon de blé\*, huile de tournesol\*, arôme naturel de crabe, carraghénanes, sel de Guérande, arôme naturel de paprika.

(\*) Produit issu de l'agriculture biologique

## Document n° 12 : Logo bio européen



Le logo européen "agriculture biologique", encore appelé "Eurofeuille", a pour objet d'aider les consommateurs à repérer les produits biologiques. Sa présence sur l'étiquetage assure le respect du règlement sur l'agriculture biologique de l'Union européenne.

Le logo européen peut être appliqué sur les produits qui :

- contiennent 100 % d'ingrédients issus du mode de production biologique ou au moins 95 % de produits agricoles biologiques dans le cas des produits transformés, si la part restante n'est pas disponible en bio et est expressément autorisée,
- sont conformes aux règles du système officiel de contrôle et certification,
- portent le nom du producteur, du préparateur ou du distributeur et le numéro d'agrément de l'organisme de certification.



# **Session 2019**



# Sujet de mathématiques 2019

L'usage de tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.

## Exercice 1 : (10 points)

*Staphylococcus Aureus* (SA), plus communément appelé staphylocoque doré, est une bactérie responsable de nombreuses intoxications alimentaires. Elle est naturellement présente chez l'homme. Déposée sur un aliment et sous certaines conditions (comme notamment la présence suffisante de nutriments), elle se développe très fortement et produit des toxines. Ces toxines, une fois ingérées, sont responsables de troubles alimentaires, qui peuvent aller, dans certains cas extrêmes, jusqu'à la mort de la personne touchée.

### PARTIE A : Équation différentielle

- Déterminer les solutions sur l'intervalle  $[0 ; +\infty[$  de l'équation différentielle  $20y' - 20,8y = 0$  où  $y$  est une fonction de la variable réelle  $t$ , définie et dérivable sur l'intervalle  $[0 ; +\infty[$ .
- En déduire la fonction  $f$  solution de cette équation différentielle qui vérifie  $f(0) = 10$ .

### PARTIE B : Modèle exponentiel

On souhaite étudier la croissance de bactéries SA à température ambiante sur un échantillon de mix (le mix est un mélange contenant en grande partie du lait permettant la fabrication de glaces à l'italienne).

On suppose que 10 bactéries sont déposées en même temps sur 1 g de mix. Voici les relevés du nombre de bactéries SA heure par heure, mesuré à partir du moment où les bactéries sont déposées sur le mix.

Heure ( $t_i$ )	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de bactéries SA ( $N_i$ )	10	27	78	232	650	1800	5100	14100	39000

- On effectue un changement de variable de type logarithmique  $Z_i = \ln(N_i)$ . Compléter le tableau donné en **annexe à rendre avec la copie**. On arrondira les valeurs au centième.
- À l'aide de la calculatrice, déterminer une équation de la droite d'ajustement  $\Delta$  du nuage de points  $(t_i, Z_i)$  par la méthode des moindres carrés sous la forme  $z = at + b$ .  
On arrondira les valeurs de  $a$  et  $b$  au millième.
- En utilisant la question précédente, déterminer une expression de la fonction  $N$  qui modélise le nombre de bactéries SA à l'instant  $t$  exprimé en heures.  
  
Dans la suite, on prendra  $N(t) = 10 e^{1,04t}$  pour tout réel  $t$  de l'intervalle  $[0; +\infty[$ . On admet que la fonction  $N$  modélise le nombre de bactéries SA relevées sur le mix en fonction du temps.
- Une population donnée de bactéries voit son effectif doubler au bout d'un temps appelé « temps de génération bactérienne » et noté  $G$ . Estimer cette durée  $G$  en minutes.
- Calculer la limite de  $N$  en  $+\infty$ .

#### ANNEXE :

Exercice 1- question B.1- À rendre avec la copie

Heure ( $t_i$ )	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de bactéries SA ( $N_i$ )	10	27	78	232	650	1800	5100	14100	39000
$Z_i = \ln(N_i)$									

**PARTIE C : Modèle logistique**

Dans cette partie, on étudie et on utilise un deuxième modèle, appelé modèle logistique et défini par une fonction  $M$ , qui, à tout instant  $t$  exprimé en heures, associe le nombre  $M(t)$  de bactéries de SA à l'instant  $t$  donné par :

$$M(t) = \frac{13500}{1350 \times e^{-1,04t} + 1}$$

1. La dérivée de  $M$  est fournie par un logiciel de calcul formel :

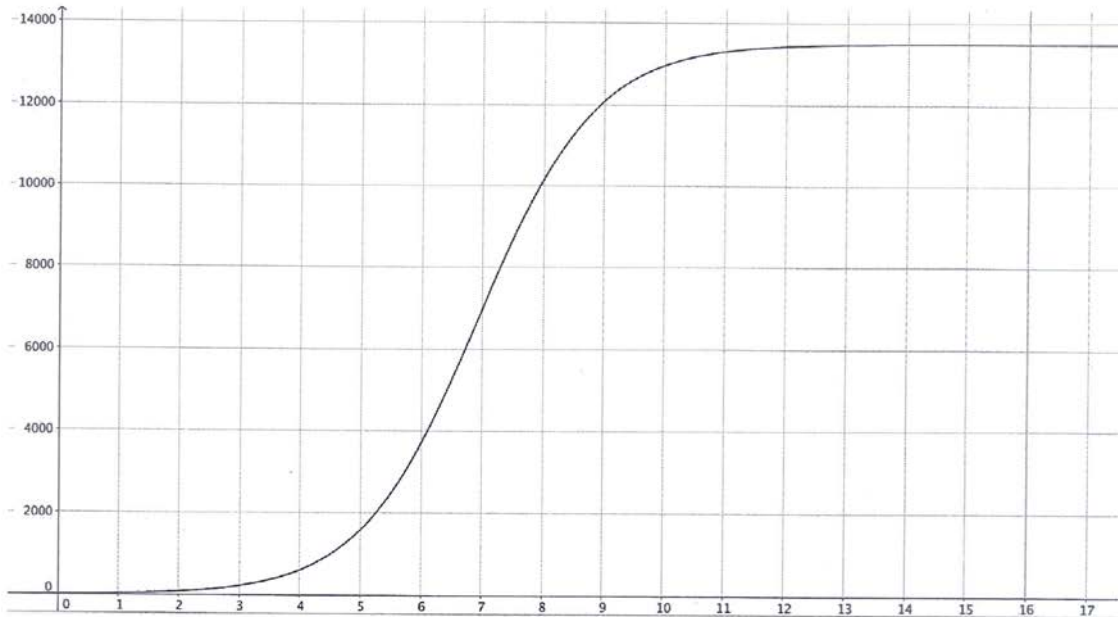
$$M'(t) = \frac{13500 \times 1350 \times 1,04 \times e^{-1,04t}}{(1350 \times e^{-1,04t} + 1)^2}$$

Étudier les variations de la fonction  $M$  sur l'intervalle  $[ 0; + \infty [$ .

2. a. Déterminer la limite de  $M$  en  $+\infty$ .

b. L'un des modèles de croissance de bactéries SA (exponentiel ou logistique) est plus vraisemblable. Lequel ?

La courbe représentative de la fonction  $M$  est présentée ci-dessous.



3. Déterminer le temps nécessaire pour que le nombre de bactéries SA dépasse 10 000. Arrondir à l'heure.

Pour tout instant  $t$  exprimé en heures, le réel  $M'(t)$  est appelé vitesse de prolifération bactérienne.

4. Dans cette question, on s'intéresse à l'instant où la vitesse de prolifération bactérienne est maximale. Parmi les quatre propositions suivantes, une seule d'entre elles correspond à une valeur approchée de cet instant. Laquelle ? Pourquoi ?

- a.  $t = 4$  h
- b.  $t = 7$  h
- c.  $t = 9$  h
- d.  $t = 16$  h

**Exercice 2 : (10 points)**

Dans cet exercice, les probabilités seront données en valeurs décimales à  $10^{-4}$  près.

**Les parties A, B et C peuvent se traiter de façon indépendante.**

On s'intéresse à la production industrielle de bouteilles d'eau minérale naturelle ou d'eau de source. On s'intéresse à la qualité de l'eau contenue dans les bouteilles produites : plusieurs paramètres sont pris en compte, notamment microbiologiques (présence de bactéries, de coliformes, de germes...) et physico-chimiques (présence d'arsenic, de nickel...).

**PARTIE A : Eau de source et eau minérale naturelle**

En 2017, des analyses identiques ont été menées sur la qualité de l'eau de 126 000 bouteilles produites. Ainsi 37 000 bouteilles d'eau minérale naturelle et 89 000 bouteilles d'eau de source ont été analysées.

Parmi les analyses portant sur les bouteilles d'eau minérale naturelle, on constate que 0,12 % des analyses révèlent une eau non conforme. Parmi celles portant sur les bouteilles d'eau de source, on constate que 0,08 % des analyses révèlent une eau non conforme.

On choisit le résultat d'une analyse d'une bouteille d'eau au hasard parmi toutes celles qui ont été réalisées.

Dans la suite, on notera les événements suivants :

$M$  : « L'analyse porte sur une bouteille d'eau minérale naturelle » ;

$S$  : « L'analyse porte sur une bouteille d'eau de source » ;

$N$  : « L'analyse révèle une eau non conforme ».

1. Calculer les probabilités  $P(M)$  et  $P(S)$ .

Pour les deux questions suivantes, on pourra s'aider d'un arbre pondéré.

2. Calculer la probabilité de choisir une analyse qui révèle une eau non conforme.

3. Calculer la probabilité qu'une analyse porte sur une bouteille d'eau minérale naturelle, sachant qu'elle révèle une eau non conforme.

**PARTIE B : Étude du nitrate présent dans l'eau**

Une entreprise produisant des bouteilles d'eau minérale naturelle affirme que la moyenne du taux de nitrate de sa production est égale à 4,5 mg/L. L'objectif de cette partie est de juger de la véracité de cette affirmation.

On note  $\mu$  la moyenne, mesurée en mg/L, du taux de nitrate de la production, et  $\sigma$  son écart type.

On réalise 600 prélèvements dans la production. Les résultats sont les suivants :

Taux de nitrate (en mg/L)	[4,2 ; 4,3 [	[4,3 ; 4,4 [	[4,4 ; 4,5 [	[4,5 ; 4,6 [	[4,6 ; 4,7 [	[4,7 ; 4,8 [
Nombre de prélèvements	5	57	181	233	110	14

1. En faisant l'hypothèse que les valeurs observées sont respectivement celles du centre de chaque classe, déterminer, à l'aide de la calculatrice, la moyenne  $\bar{x}$  et l'écart type  $s$  de cet échantillon. On donnera les résultats à  $10^{-4}$  près.

2. Vérifier que  $s = 0,0976$  est un estimateur de l'écart type  $\sigma$ .

3. On souhaite réaliser le test bilatéral suivant, au seuil de 5% :

$$H_0 : \mu = 4,5 \text{ contre } H_1 : \mu \neq 4,5.$$

Soit  $\bar{X}$  la variable aléatoire qui à tout échantillon de 600 prélèvements associe la moyenne du taux de nitrate de ces prélèvements. On considère que  $\bar{X}$  suit la loi normale d'espérance  $\mu$  et d'écart type  $\frac{\sigma}{\sqrt{600}}$

Dans la suite, on remplace  $\sigma$  par son estimateur  $s = 0,0976$ . Sous l'hypothèse  $H_0$ ,  $\bar{X}$  suit donc approximativement la loi normale d'espérance 4,5 et d'écart type 0,004.

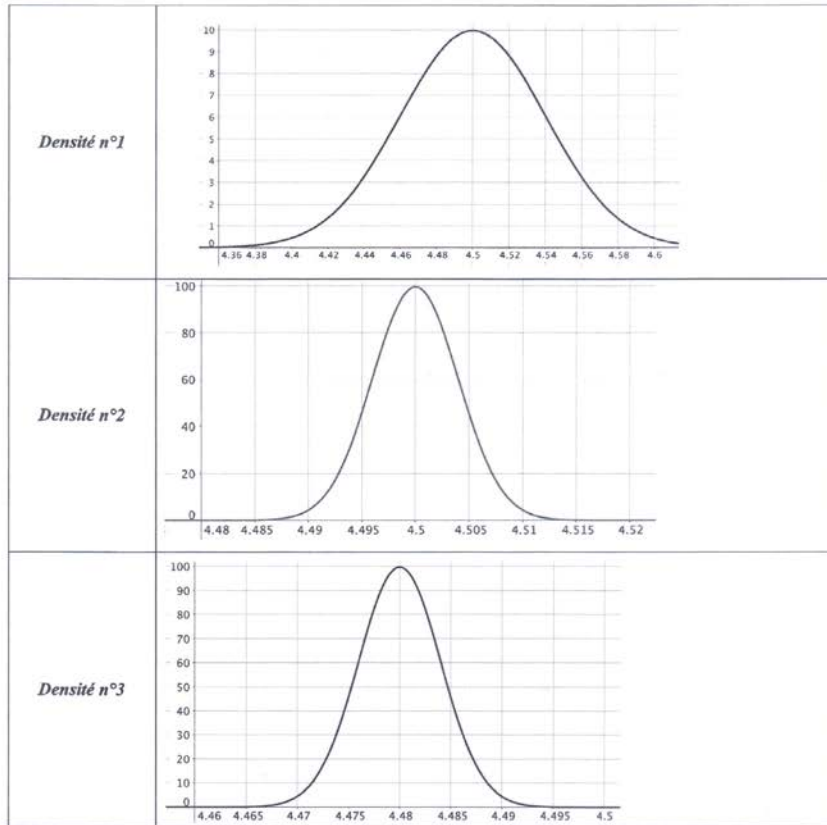
On a présenté les représentations de trois densités de probabilité (voir ci-contre) :

a) Laquelle de ces trois représentations est associée à la variable aléatoire  $\bar{X}$  ? Justifier la réponse.

b) Donner un nombre réel  $a$  à  $10^{-3}$  près vérifiant :  $P(4,5 - a \leq X \leq 4,5 + a) \approx 0,95$ .

c) Énoncer la règle de décision de ce test.

d) D'après les résultats obtenus dans l'échantillon donné, peut-on accepter l'hypothèse  $\mu = 4,5$  ?



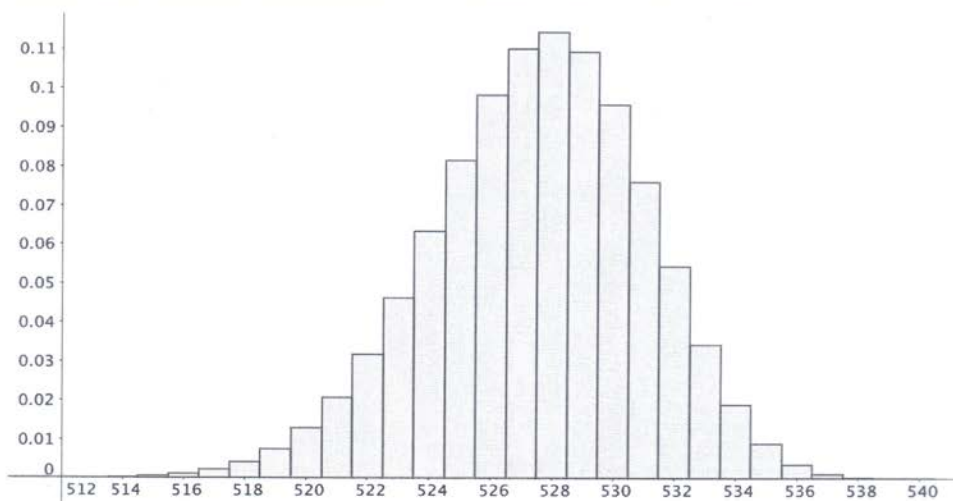
**PARTIE C : Distribution**

L'entreprise précédente fournit une grande surface en eau minérale. Chaque semaine, 540 bouteilles contenant un litre d'eau minérale sont réceptionnées par la grande surface.

Une bouteille d'eau minérale d'un litre est de très bonne qualité si elle contient moins de 4,7 mg de nitrate.

On prélève au hasard un lot de 540 bouteilles dans la production, jugée suffisamment importante pour assimiler ce choix à un tirage avec remise. On note alors  $Y$  la variable aléatoire qui, à chaque lot de 540 bouteilles, associe le nombre de bouteilles de très bonne qualité du lot.

On admet que  $Y$  suit une loi binomiale dont une représentation graphique est fournie ci-dessous :



1. Au vu de ce graphique, un biologiste estime que la probabilité qu'un lot de 540 bouteilles prélevé au hasard dans la production contienne moins de 520 bouteilles de très bonne qualité est environ égale à 0,005. A-t-il raison ? Justifier la réponse.
2. On admet que le nombre moyen de bouteilles de très bonne qualité sur l'ensemble des échantillons de 540 bouteilles est égal à 528. Donner alors les paramètres  $n$  et  $p$  de la loi binomiale suivie par la variable aléatoire  $Y$ . On arrondira  $p$  à  $10^{-3}$ .

# Sujet de sciences physiques et chimiques 2019

Différentes méthodes de stérilisation et de conservation sont utilisées dans le domaine de l'industrie, de la pharmaceutique et du monde médical. On analysera successivement deux méthodes physiques puis quelques aspects de deux méthodes chimiques.

On donne ci-dessous les constantes physico-chimiques ainsi que certaines relations entre grandeurs physiques. Elles sont valables dans les unités du système international.

## Données

### Constantes fondamentales

Célérité de la lumière dans le vide :  $c = 3,00 \times 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$

Constante de Planck :  $h = 6,68 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$

Accélération de la pesanteur :  $g = 9,81 \text{ N}\cdot\text{kg}^{-1}$

Constante d'Avogadro :  $N_A = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

### Formulaire

$\lambda$  : constante radioactive ;  $T$  : période radioactive ;  $A$  : activité ;  $N$  : nombre de noyaux

$$\lambda = \frac{\ln 2}{T} \quad A = \lambda \times N$$

$E$  : énergie du photon ;  $\nu$  : fréquence  $E = h \times \nu$

$F$  : force pressante ;  $\Delta p$  : différence de pression entre le haut et le bas d'une colonne de liquide de hauteur  $h$  et de masse volumique  $\rho$  ;  $S$  : surface ;  $P$  : poids ;  $m$  : masse

$$F = p \times S \quad \Delta p = \rho \times g \times h \quad P = m \times g$$

### Masse volumique de l'eau de mer

$$P = 1030 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$$

### Correspondances entre unités

$$1 \text{ Mev} = 1,61 \times 10^{-13} \text{ J} ; 1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$$

### Numéros atomiques

$$Z_H = 1 \quad Z_C = 6 \quad Z_N = 7 \quad Z_{Br} = 35$$

## Partie 1 - Stérilisation par irradiation (9 points)

### Document 1

À faible dose, l'irradiation sert à inhiber la germination (pommes de terre, oignons, ail, gingembre), à désinfecter et déparasiter les céréales, les plantes légumineuses, les fruits frais et secs, les poissons et viandes, à ralentir le processus physiologique de décomposition des fruits et légumes frais.

À dose moyenne, l'ionisation par irradiation permet la prolongation de la conservation des poissons frais, des fraises, l'élimination des agents d'altération et des micro-organismes pathogènes sur les fruits de mer, les volailles et viandes (produits frais ou congelés). Elle permet également l'amélioration des aliments, par exemple l'augmentation du rendement en jus de raisin ou la diminution de la durée de cuisson des légumes déshydratés.

À forte dose, l'ionisation permet la stérilisation des viandes, volailles et fruits de mer, des aliments prêts à l'emploi, des rations hospitalières, et la décontamination de certains additifs et ingrédients alimentaires comme les épices, les gommes, les préparations d'enzymes. Ces techniques d'irradiation de produits de consommation peuvent être autorisées car à l'issue de leur traitement, ces produits ne présentent aucune radioactivité artificielle ajoutée.

Source : Site web de l'ASN, autorité de sécurité nucléaire.

On donne ci-dessous un extrait du tableau périodique des éléments chimiques :

Nom de l'élément chimique	Manganèse	Fer	Cobalt	Nickel	Cuivre
Symbole	Mn	Fe	Co	Ni	Cu
Numéro atomique	25	26	27	28	29

Le cobalt 60 cité dans le texte est un noyau radioactif émetteur  $\beta^-$  dont la période radioactive est d'environ 2000 jours.

Masse molaire du cobalt 60 :  $M_{Co} = 60 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

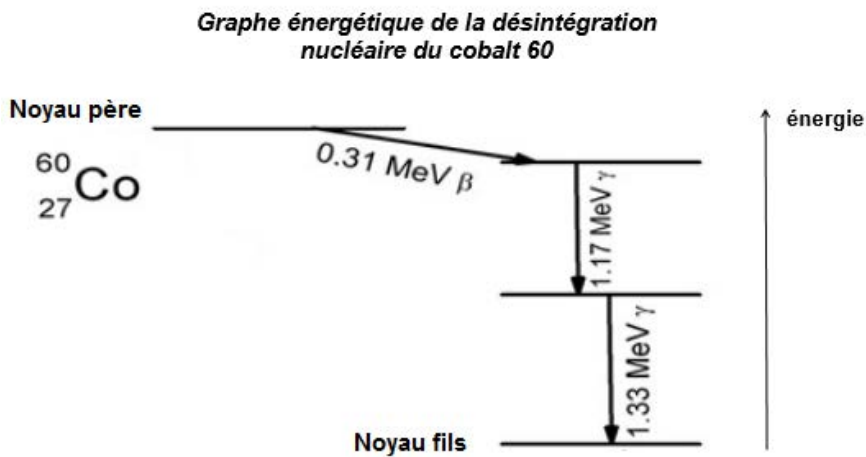
- 1.1. Préciser si ce type de stérilisation est dangereux du point de vue sanitaire. Argumenter à l'aide du document 1.
- 1.2. Écrire l'équation de la désintégration du cobalt 60.
- 1.3. Donner la définition de la période radioactive d'un élément.
- 1.4. Montrer que la valeur de la constante radioactive  $\lambda$  du cobalt 60 vaut  $4 \times 10^{-9} \text{ SI}$ .
- 1.5. Donner la définition de l'activité  $A$  d'une source radioactive.

Les irradiateurs industriels utilisent des sources de cobalt 60 dont l'activité totale peut atteindre  $2,5 \times 10^{17} \text{ Bq}$ .

- 1.6. La source ayant une activité  $A = 2,5 \times 10^{17} \text{ Bq}$ , montrer que le nombre de noyaux la constituant est de  $6 \times 10^{25}$  noyaux.
- 1.7. Calculer la masse de cobalt contenue dans cette source.

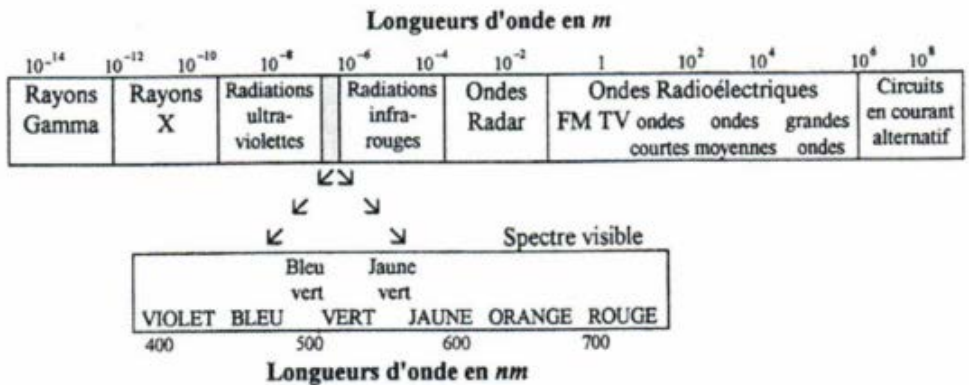
**Document 2**

Le schéma ci-dessous donne les énergies du rayonnement  $\beta$  émis, et des deux rayonnements  $\gamma$  (gamma) produits par le noyau fils lors de son retour à son niveau fondamental :



- 1.8. Déterminer la fréquence et la longueur d'onde du rayonnement le plus énergétique émis par le noyau fils lors de sa désexcitation.

**Document 3**



- 1.9. Justifier qu'il s'agit bien d'un rayonnement  $\gamma$ .

## Partie 2 - Stérilisation par pascalisation (3,5 points)

La pascalisation est une technique consistant à soumettre des produits alimentaires à des pressions très élevées, de l'ordre de 6000 bar, soit 6 fois la pression rencontrée dans les profondeurs de l'océan (environ 10 km), dans le but d'améliorer leur conservation.

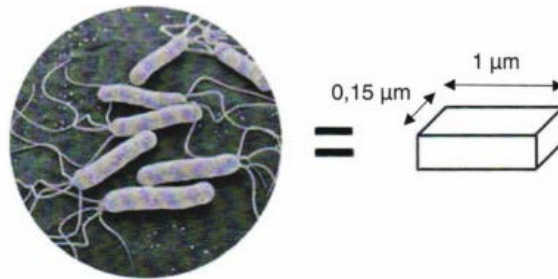
Ce traitement très haute pression, qui peut être opéré à température ambiante ou à basse température, maintient les qualités organoleptiques du produit d'origine. Il offre ainsi pour les produits sensibles à la chaleur une alternative intéressante aux traitements thermiques classiques.

Ce traitement n'est applicable que pour des produits conditionnés dans des emballages souples, seuls susceptibles de transmettre à leur contenu la pression subie. Ceux-ci sont disposés dans une enceinte pleine d'eau qui, après fermeture, est comprimée à l'aide d'une pompe. Ils y sont maintenus, une fois que la pression voulue est atteinte, de 3 à 5 min en général. La pression s'exerçant de façon uniforme, les aliments ainsi traités conservent leur forme originelle.

D'après <http://genie-alimentaire.com/spip.php?article112>

Les hautes pressions sont susceptibles de dégrader les structures physico-chimiques des micro-organismes, ce qui conduit à leur mort.

- 2.1. Identifier l'intérêt de la pascalisation par rapport aux traitements thermiques.
- 2.2. Retrouver par le calcul l'affirmation du texte : « des pressions très élevées, de l'ordre de 6 000 bar, soit 6 fois la pression rencontrée dans les profondeurs de l'océan (environ 10 km) »
- 2.3. Dans le cadre d'une modélisation simpliste, on assimile une bactérie (ici *Helicobacter Pylori*) à un parallélépipède :



Calculer la force exercée sur la paroi supérieure de la bactérie lorsqu'elle est soumise à une pression de 6 000 bar.

- 2.4. Déterminer la masse hypothétique qu'il faudrait déposer sur la bactérie pour exercer la même force. Comparer le résultat obtenu avec la masse d'une bactérie qui est de l'ordre de  $10^{-11}$  mg.

## Partie 3 - Stérilisation à l'oxyde d'éthylène (10 points)

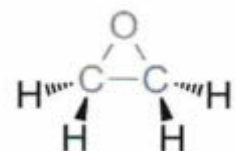
### Document 4

La méthode chimique de stérilisation au gaz la plus couramment utilisée est celle à l'oxyde d'éthylène. Ce dernier joue le rôle d'un agent d'alkylation conduisant à des « adduits » de l'ADN et des protéines qui les rendent incompatibles avec leurs fonctions biologiques, ce qui conduit à la mort de l'organisme.

Ce gaz est souvent utilisé pour stériliser les instruments chirurgicaux, gants, seringues en plastique, aiguilles jetables, ensembles de tubes, et appareils de dialyse. Les temps de stérilisation varient entre 2 et 6 heures à une température de 55 °C.

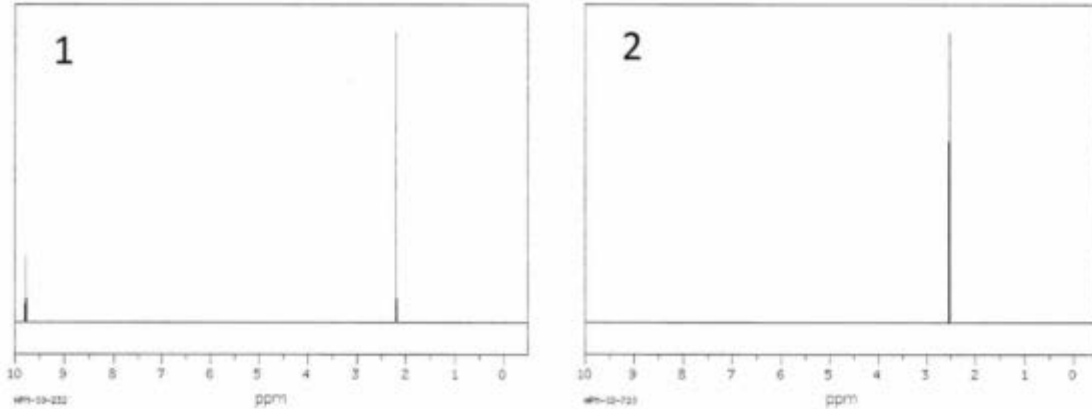
D'après <http://certoclav.com/fr/support/science/show/methodes-de-sterilisation-physiques-et-chimiques.html>

L'oxyde d'éthylène est une molécule cyclique représentée ci-dessous :



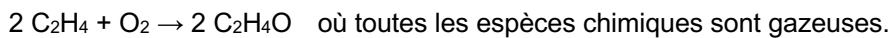


- 3.1. Écrire la formule semi-développée de deux isomères de l'oxyde d'éthylène.
- 3.2. Entourer sur chacun d'eux le groupe caractéristique et nommer la fonction chimique correspondante.
- 3.3. On donne deux spectres de RMN <sup>1</sup>H de deux isomères de formule brute C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O. Identifier celui qui correspond à l'oxyde d'éthylène. Expliquer le raisonnement.  
Remarque : il n'est pas attendu ici d'exploiter les valeurs des déplacements chimiques.



D'après [https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_search.cgi](https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_search.cgi)

L'oxyde d'éthylène est obtenu par oxydation de l'éthène (nommé aussi éthylène) selon l'équation :



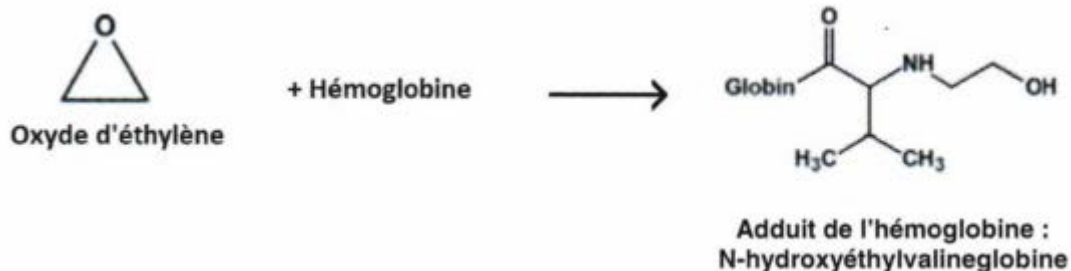
La réaction se fait sur un catalyseur à base d'argent, à une température de l'ordre de 220 °C sous une pression de 25 bar. Le rendement de cette synthèse est de l'ordre de 75 %.

L'enthalpie standard de cette réaction est de  $\Delta_r H^0 = - 4 \times 10^2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

- 3.4. Interpréter le signe de  $\Delta_r H^0$ .
- 3.5. En utilisant la loi de Van 't Hoff, expliquer si le rendement de cette synthèse peut être amélioré en augmentant la température.
- 3.6. Donner la définition d'un catalyseur.
- 3.7. Indiquer si la présence d'un catalyseur peut changer le signe de l'enthalpie libre standard de réaction  $\Delta_r G^0$ . Justifier.
- 3.8. Préciser le signe attendu pour l'entropie standard de réaction  $\Delta_r S^0$ . Justifier.

**Document 5**

Dans le corps humain, l'oxyde d'éthylène se répartit rapidement et plutôt uniformément dans l'organisme. Il peut donc théoriquement atteindre n'importe quel tissu et y exercer ses propriétés alkylantes. Il peut s'additionner à des protéines comme l'hémoglobine par alkylation de l'azote situé sur la valine terminale d'une des globines selon le schéma suivant :



On peut ainsi suivre l'exposition d'une personne à ce gaz toxique en dosant cet adduit, par exemple par chromatographie en phase gazeuse.

- 3.9. Expliquer pourquoi l'oxyde d'éthylène est électrophile.
- 3.10. Indiquer en quoi la structure de l'atome d'azote permet l'alkylation d'une amine.



Il existe cependant des voies de métabolisation permettant d'éliminer l'oxyde d'éthylène avant qu'il ne produise les adduits toxiques. Par exemple, celle faisant intervenir l'époxyde hydrolase transforme l'oxyde d'éthylène en un diol symétrique par hydratation et ouverture du cycle. Ce diol sera ensuite transformé en un diacide symétrique qui sera éliminé dans les urines.

**3.11.** Écrire la formule semi-développée des deux produits issus du métabolisme de l'oxyde d'éthylène.

**3.12.** Proposer une interprétation de la solubilité élevée du diacide dans les urines.

## Partie 4 - Le formaldéhyde comme conservateur (7,5 points)

### Document 6

Le méthanal HCHO ou formaldéhyde est une substance chimique qui a été longtemps librement utilisée en cosmétique en tant qu'agent conservateur sous forme de solution aqueuse (formol).

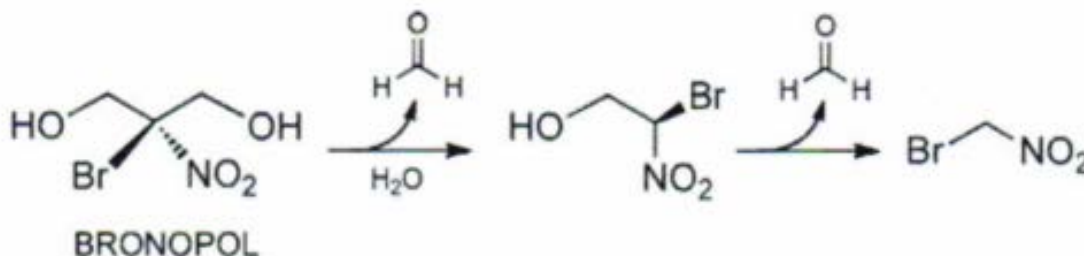
Reconnu aujourd'hui fort allergène, il fait l'objet de bon nombre de restrictions et d'interdictions dans les produits cosmétiques selon la réglementation cosmétique en vigueur. Tout produit cosmétique dont la teneur massique en formaldéhyde dépasse 0,05 % doit faire apparaître sur son étiquetage la mention « contient du formaldéhyde ».

La teneur maximale est de 0,2 % sauf pour les produits d'hygiène buccale où elle est de 0,1 %.

De ce fait, une attention particulière doit être apportée sur les produits finis contenant des systèmes conservateurs appelés « libérateurs de formaldéhyde » et sur les matériaux d'emballage en contact avec la formule (packaging) et qui peuvent contenir du formaldéhyde.

D'après <http://www.intertek-france.com/chimie/analyses-dosage-formaldehyde/>

Un des libérateurs de formaldéhyde mentionné est le bronopol (masse molaire égale à 200 g/mol) qui libère du formaldéhyde selon le processus suivant :



**4.1.** Indiquer le nom du bronopol en nomenclature officielle.

**4.2.** Recopier la formule topologique du produit intermédiaire de cette chaîne (2-bromo-2-nitroéthanol) et indiquer par un astérisque la position de l'atome de carbone asymétrique.

**4.3.** Donner la configuration absolue (R ou S) de l'énantiomère représenté ci-dessus. Justifier.

On souhaite maintenant vérifier la concentration en formaldéhyde d'un gel douche. On réalise un dosage d'oxydoréduction par l'ion hypoiodite IO<sup>-</sup>. Le protocole expérimental exact n'est pas détaillé ici.

Il fait intervenir les couples IO<sup>-</sup> / I<sup>-</sup> et HCOO<sup>-</sup> / HCHO.

**4.4.** Écrire les demi-équations d'oxydoréduction puis l'équation de la réaction de dosage entre le formaldéhyde et l'ion hypoiodite.

On prélève 10 g de ce gel douche qui sont dilués dans 100 mL d'eau distillée puis dosés par une solution d'ions hypoiodite de concentration  $c = 0,18 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . L'équivalence est obtenue pour un volume d'ion hypoiodite  $V_e = 12,9 \text{ mL}$ .

**4.5.** La masse molaire du formaldéhyde est de  $30,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Calculer le pourcentage massique de formaldéhyde contenu dans ce gel douche en exploitant les résultats du dosage.

**4.6.** Vérifier si ce gel douche respecte la législation.

**4.7.** On admettra que la totalité du formaldéhyde présent dans le gel douche provient du bronopol. Calculer la masse maximale de bronopol pouvant être introduite dans la formulation de 250 g de gel douche pour respecter la norme.

# Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2019

## OPTIMISATION DE LA PURIFICATION DE LA R-PHYCOÉRYTHRINE À PARTIR D'UNE ALGUE ROUGE

Les algues sont une source importante de molécules d'intérêt. Elles contiennent en particulier de nombreux pigments originaux, non présents dans les végétaux. Parmi ces pigments, on trouve la **R-phycoérythrine (R-PE)**, faisant partie du groupe des phycobiliprotéines, utilisée dans des domaines multiples des biotechnologies.

En effet, elle peut être utilisée :

- en tant que colorant rouge dans l'industrie alimentaire ou cosmétique (bonbons, boissons, rouges à lèvres ...);
- en tant que marqueur fluorescent (cytométrie de flux, dosage immunologiques, puces à ADN);
- en tant que principe actif potentiel en pharmacologie pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, immunomodulatrices et neuroprotectrices.

Un fournisseur de matières premières souhaite optimiser la purification de la R-phycoérythrine (R-PE) à partir de l'algue *Gracilaria gracilis*, qui présente l'intérêt d'être abondante même en hiver et d'être déjà utilisée pour la production d'agar et de carraghénanes.

### 1. Amélioration de l'extraction par utilisation d'une étape d'hydrolyse enzymatique

Au préalable, l'entreprise vérifie la conformité des caractéristiques biochimiques habituelles de l'espèce.

Le **document 1** présente la méthode et les données obtenues pour la détermination des fractions matière sèche et matière minérale.

**Q1.** Expliquer le calcul et vérifier les valeurs des teneurs de matières sèches et de cendres.

La procédure d'extraction habituellement utilisée pour ce pigment hydrosoluble est une simple macération en milieu aqueux. Cependant, cette extraction est rendue difficile par la présence de grandes quantités de polysides de paroi qui bloquent l'extraction de la R-phycoérythrine. Pour optimiser cette procédure, une hydrolyse enzymatique préalable est donc nécessaire. Trois activités enzymatiques sont testées : cellulase, xylanase et glucanase.

Les cellulases commerciales sont un mélange d'exo- $\beta$ -glucosidases, d'endo-1,4- $\beta$ -D-glucosidases et de cellobiosidases.

Dans le **document 2** les sites de coupures possibles sont repérés par les lettres A à D.

**Q2.** Indiquer le(s) site(s) de coupure possibles pour chaque enzyme puis nommer les produits d'hydrolyse.

*Donnée : Le cellobiose est un diholoside : D glucopyranosyl  $\beta$  (1-4) D glucopyranose.*

Le spectre d'absorption de la R-PE est présenté dans le **document 3**.

L'indice de pureté (IP) de la R-phycoérythrine est calculé grâce à la relation  $A_{565} / A_{280}$ .

**Q3.** Expliquer pourquoi ce ratio permet d'évaluer la pureté du pigment.

La concentration des protéines hydrosolubles est déterminée par la méthode de Bradford. Un contrôle d'exactitude est nécessaire pour valider la méthode. Les résultats obtenus sont fournis dans le **document 4**.

**Q4.** Exploiter ces résultats et conclure sur la validation de méthode.

Afin d'adapter la quantité d'enzyme à introduire, l'activité catalytique spécifique est déterminée. La procédure utilisée est présentée dans le **document 5**.

**Q5.** Démontrer la formule du calcul de l'activité catalytique spécifique notée  $Z_{sp}$  exprimée en  $U \cdot mg^{-1}$  d'enzyme. Calculer  $Z_{sp}$ .

*Donnée : 1 unité U représente le nombre de micromole de nitrophénol libéré en une heure (ou 1 unité représente le nombre de micromole de cellobiose libéré en une heure).*

Trois durées d'extraction ont été testées avec les cellulases : 20 minutes, 360 minutes (= 6 h) et 960 min (= 16 h). Les résultats sont présentés dans le **document 6**.

**Q6.** Analyser ces résultats et en déduire la durée optimale de traitement.

## 2. Purification de la R-PE par chromatographie

Pour que la R-PE soit considérée comme pure, l'indice de pureté (IP) doit être supérieur à 3,2. Après extraction, l'IP ne dépasse pas 0,15 ; on procède alors à une purification. On choisit de tester une technique de chromatographie échangeuse d'ions (CEI) en HPLC.

Le système et la procédure utilisés sont présentés dans le **document 7**.

**Q7.** Expliquer l'intérêt d'utiliser un détecteur à barrette de diodes.

Nommer le mode d'élution choisi.

Schématiser l'étape d'élution d'une protéine.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 8**.

**Q8.** Expliquer pourquoi il est judicieux de poursuivre les analyses sur les trois fractions obtenues.

Afin de vérifier la pureté des fractions et l'absence de dénaturation du pigment purifié, on réalise une chromatographie d'exclusion.

Le même système HPLC que précédemment est utilisé pour la chromatographie d'exclusion.

**Q9.** Préciser les éléments du système chromatographique qui doivent être changés pour réaliser cette analyse.

Le **document 9** présente les caractéristiques techniques de la colonne.

Les résultats obtenus pour la chromatographie d'exclusion sur l'extrait brut puis sur les différentes fractions issues de la purification par échange d'ions sont regroupés dans le **document 10**.

Dans l'extrait brut, on retrouve la présence de R-PE Native (forme hexamérique) à 260 kDa et d'une forme dissociée (donc dénaturée) à 60 kDa.

**Q10.** Préciser quel paramètre permet de séparer les protéines dans ce cas. Justifier que cette colonne est bien adaptée à la purification de la R-PE.

**Q11.** Expliquer l'ordre d'élution et donner les temps de rétention de la forme native et de la forme dissociée.

**Q12.** Expliquer pourquoi la fraction permettant d'obtenir le meilleur résultat est la fraction AE-200.

Afin de confirmer la pureté de cette fraction AE-200, on procède à une électrophorèse PAGE (*Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) non dénaturante. Les résultats sont présentés dans le **document 11**.

**Q13.** Expliquer pourquoi cette technique ne permet pas de déterminer la masse molaire de la R-PE.

La R-PE native est fluorescente et peut être révélée en éclairant le gel sous UV à 365 nm.

**Q14.** Présenter l'intérêt de colorer aussi les gels au bleu de Coomassie. Conclure sur la pureté de la R-PE.

La fabrication des gels nécessite l'utilisation d'acrylamide dont la fiche sécurité est présentée en **document 12**.

**Q15.** Évaluer les risques liés à la fabrication de ces gels et établir les mesures préventives à mettre en œuvre.

### 3. Particularités et intérêt des phycobiliprotéines

La R-PE et la phycocyanine (**document 13**) ont des structures similaires. Elles appartiennent à la famille des phycobiliprotéines.

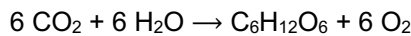
**Q16.** Identifier la structure secondaire majoritaire de ces protéines. Nommer les liaisons qui stabilisent une telle structure. Identifier et localiser la partie de cette protéine responsable de sa couleur.

Ces hétéroprotéines font partie de la chaîne photosynthétique des plastides des algues rouges nommés rhodoplastes. Leur fonction est de collecter l'énergie lumineuse.

La chaîne photosynthétique est présentée dans le **document 14**.

**Q17.** Repérer le donneur et l'accepteur final d'électrons de cette chaîne. Présenter deux points communs et deux différences entre cette chaîne photosynthétique et la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'équation bilan de la photosynthèse est la suivante :



La valeur de la variation d'enthalpie libre de cette réaction est  $\Delta G' = + 2800 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

**Q18.** Conclure quant au rôle de la lumière captée par les pigments des organismes photosynthétiques.

#### Document 1 : détermination des matières sèches et des cendres de l'échantillon.

##### 1. Principe

La matière sèche est déterminée par mise à l'étuve d'environ 5 g ( $m_1$ ) d'algues fraîches pendant 12 heures à 105 °C. Les algues sont à nouveau pesées après étuvage ( $m_2$ ). La teneur en matières sèches est exprimée en pourcentage de matière fraîche.

Pour déterminer la matière minérale, l'échantillon sec ( $m_2$ ) est introduit dans un creuset en céramique puis dans un four à moufle réglé à 600 °C pendant toute une nuit. A la sortie, le creuset est mis à refroidir dans un dessiccateur, puis la teneur en matière minérale est déterminée par méthode gravimétrique (masse pesée =  $m_3$ ).

##### 2. Résultats bruts

$$m_1 = 5,120 \text{ g} \quad m_2 = 0,982 \text{ g} \quad m_3 = 0,043 \text{ g}$$

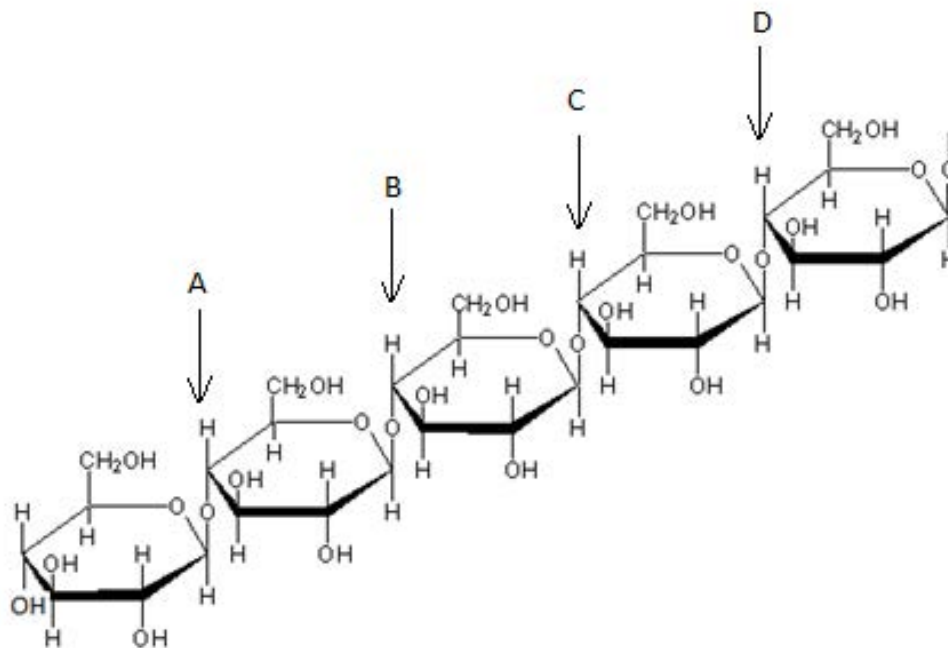
##### 3. Teneurs calculées

Contenus	Teneur (g pour 100 g)
Matière sèche (MF)	19,19
Cendres (MS)	4,37

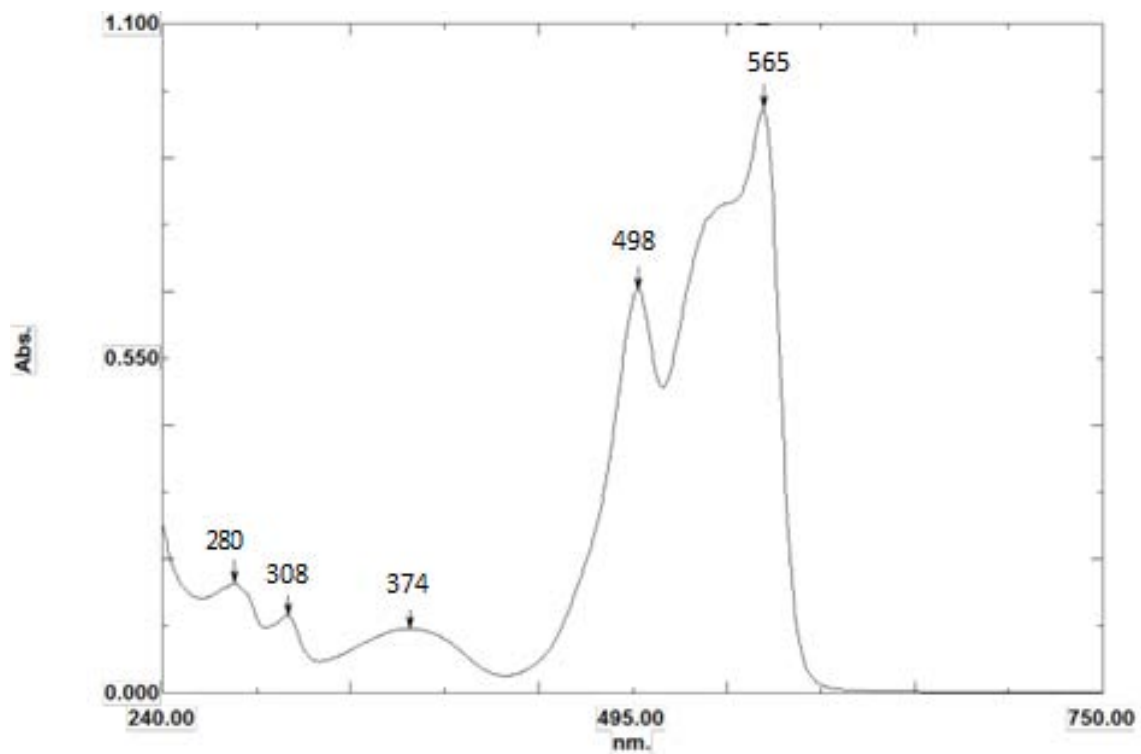
N.B : MF = exprimée en pourcentage de matière fraîche, MS = exprimée en pourcentage de matière sèche

*Documents 1, 7, 8 et 10 adaptés de Huu Phuoc Trang NGUYEN, thèse de doctorat (2017) Optimisation du procédé d'hydrolyse enzymatique appliqué à l'extraction du pigment rouge, la R-phycoérythrine à partir de Mastocarpus stellatus et Gracilaria gracilis.*

## Document 2 : structure de la cellulose.



## Document 3 : spectre d'absorption de la R-phycoérythrine.



Source : Entreprise Phyco-Biotech ; [www.phyco-biotech.com](http://www.phyco-biotech.com)

**Document 4 : validation du dosage des protéines par la méthode de Bradford.**

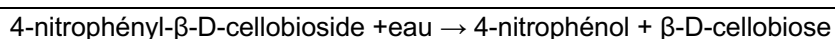
Tube	0	1	2	3	4	5	6	Contrôle
$\rho_{\text{prot}}$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0	2	4	6	8	10	12	-
$A_{595 \text{ nm}}$	0	0,104	0,223	0,342	0,461	0,579	0,698	0,330

L'étalon de contrôle annoncé à  $6,00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  est traité selon la même procédure que les essais

L'EMT (Ecart Maximal Toléré) pour ce dosage est de  $0,32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Document 5 : procédure de dosage de l'activité spécifique des cellulases.**

- Réaction catalysée par les cellulases :



- Préparation de l'enzyme :

200 mg d'enzyme dissous dans 100 mL d'eau + 0,15 % de polyhexaméthylène diguanide (PHMB).

- Mode opératoire

Introduire dans des cuves spectrophotométriques de 1 cm de trajet optique	Témoin	Essai
4-nitrophényl- $\beta$ -D-cellobioside	1,0 mL	1,0 mL
Soude	1,0 mL	-
Enzyme	0,1 mL	0,1 mL
Mélanger et incuber 2 heures à température $30 \text{ }^\circ\text{C}$		
Soude	-	1,0 mL
Lire les absorbances à 420 nm contre l'air		

- Résultats :

	Témoin	Essai
A 420	0,023	0,122

- Calcul :

$$Z_{sp} = \Delta A \times \frac{2,1}{1,8}$$

$\varepsilon$  : coefficient d'absorbance linéique molaire du 4-nitrophénol à 420 nm =  $4500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

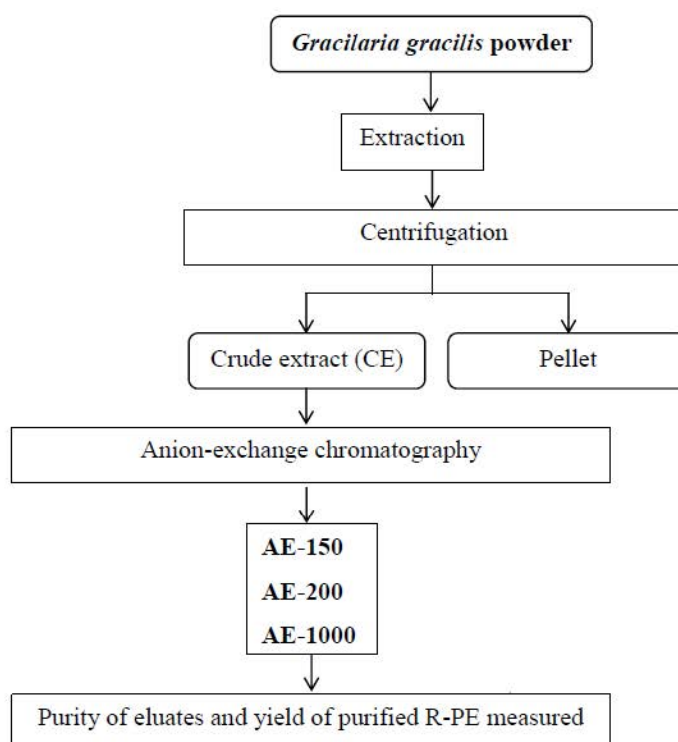
1 unité U représente le nombre de micromole de nitrophénol libérées en une heure (ou 1 unité représente le nombre de micromole de cellobiose libérés en une heure).

**Document 6 : rendement d'extraction en R-phycoérythrine et IP moyens obtenus selon différentes durées d'extraction à partir de l'algue *Gracilaria gracilis*, avec utilisation de cellulases.**

Durée (min)	Rendement R-PE ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ matière sèche)	IP (Indice Pureté)
20	3,21	0,11
360	3,13	0,10
960	2,67	0,07

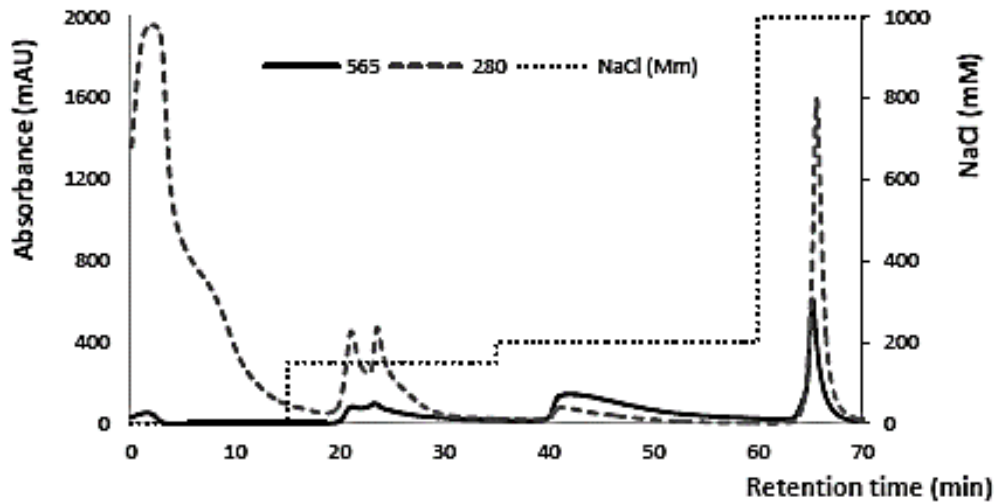
**Document 7 : procédure d'extraction et de purification de la R-PE de *Gracilaria gracilis* et présentation du système HPLC utilisé.**

The HPLC system consisted of a piston pump (Schimadzu) interfaced with a diode array detector ((DAD SPD-M20A), Shimadzu). Chromatograms were monitored at 280 nm and 565 nm. Data were acquired using the Lab solutions/LC solution software. The mobile phase was constituted of two buffers: buffer A consisted of 20 mM phosphate pH 7.1 and buffer B consisted of 20 mM phosphate, 1M NaCl pH 7.1. The crude extract was applied on anion exchange column of DEAE – Sepharose Fast Flow (26 mm x 100 mm) and the elution was developed by a threestep increase in buffer ionic strength.: 0 - 150, 150- 200 and 200 – 1000 mM. The fractions containing R-PE were collected at 150, 200, and 1000 mM NaCl and were named AE-150, AE-200, and AE-1000, respectively.



Scheme for R-phycoerythrin extraction and purification procedure from *Gracilaria gracilis*

**Document 8 : résultat de la purification de la R-PE par chromatographie d'échange d'ions, à partir de l'extrait brut.**



Purification step of the CE by anion exchange HPLC on DEAE Sepharose. Chromatograms were monitored by UV-visible spectrophotometry at :

- (-----) 280 nm
- (——) 565 nm ( $\lambda_{max}$  R-PE)
- (.....) NaCl concentration

The fractions were eluted at: AE-150/AE-200/AE-1000

**Document 9 : extrait de la fiche technique de la colonne Superdex 200.**

Characteristics of Superdex 200 Increase medium

Fractionation range	$M_r$ 10 000 to 600 000 (globular proteins) $M_p^*$ 1000 to 100 000 (dextrans)
Exclusion limit	$M_r$ 1 300 000 (globular proteins)
pH stability	3 to 12 (long-term) 1 to 14 (short-term)
Temperature stability	4°C to 40°C
Working and storage temperature	4°C to 30°C
Matrix	Composite of cross-linked agarose and dextran
Average bead size	8.6 $\mu$ m

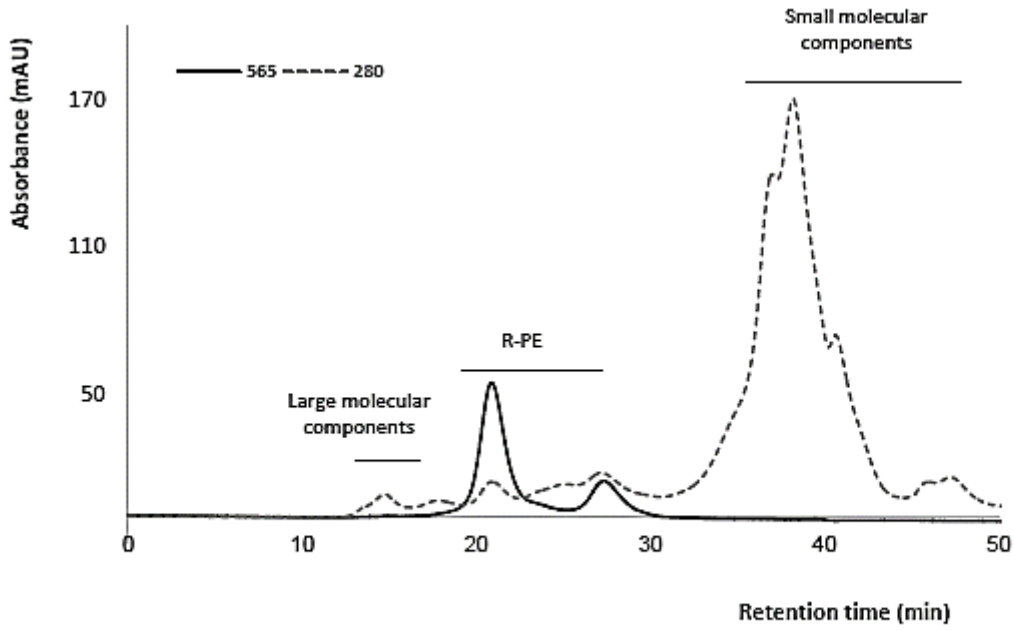
\* Peak molecular weight

Source : GE-Healthcare



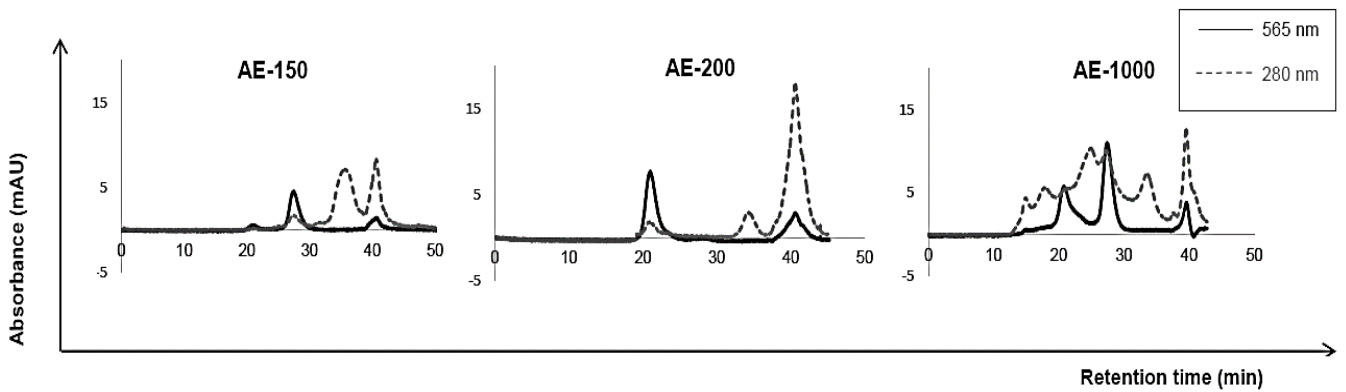
**Document 10 : résultats obtenus en chromatographie d'exclusion.**

À partir de l'extrait brut :



Gel filtration chromatogram of the crude extract (CE) from *Gracilaria gracilis*.

À partir des fractions purifiées AE-150, AE-200 et AE-1000 :



Gel filtration chromatograms of fractions: A (AE-150, AE-200, AE-1000)

**Document 11 : résultat du contrôle de pureté de la fraction AE-200 par électrophorèse PAGE non dénaturante.**





**The PAGE (lane 1 and 2) of the purified R-PE in native situation.**

Lane 1 yellow fluorescent bands of the R-PE in native red color under UV-light at 365 nm;  
Lane 2 blue bands of the R-PE showed after the gel was stained by Coomassie Blue G-250.

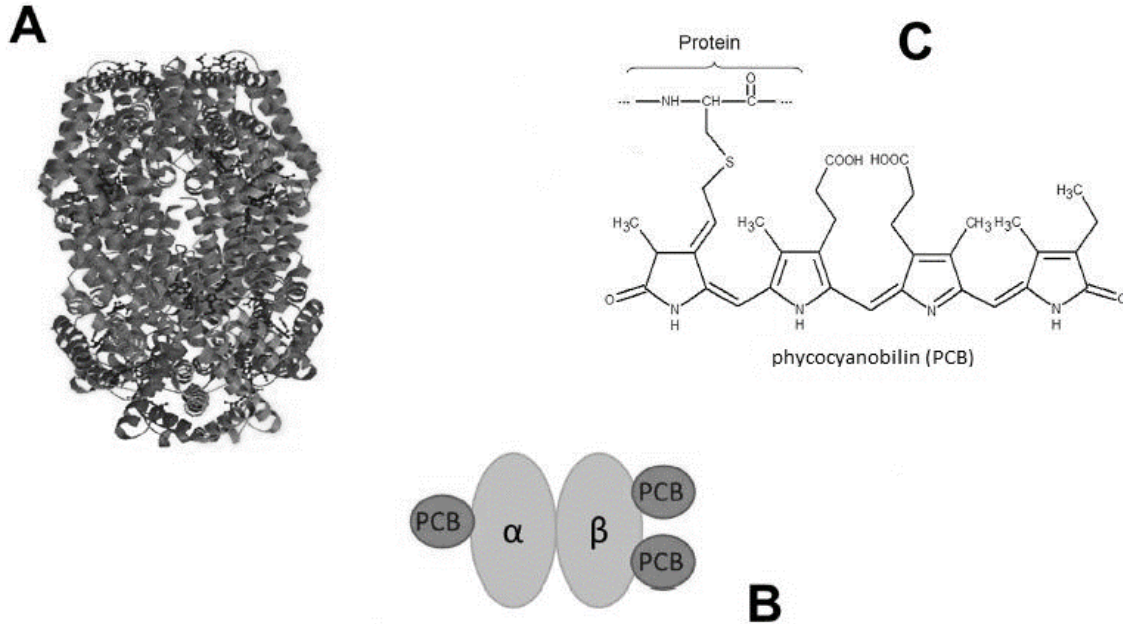
*d'après Wang L, Wang S, Fu X, Sun L (2015) Characteristics of an R-Phycoerythrin with Two Subunits Prepared from Red Macroalga Polysiphonia urceolata. PLoS ONE 10(3)*

**Document 12 : extrait de la fiche de données de sécurité de l'acrylamide.**

Pictogrammes	Mentions de danger	Conseils de prudence
 	<p>H302 + H332 : nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation.</p> <p>H315 : Provoque une irritation cutanée.</p> <p>H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.</p> <p>H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.</p> <p>H340 : Peut induire des anomalies génétiques.</p> <p>H350 : Peut provoquer le cancer.</p> <p>H361f : Susceptible de nuire à la fertilité.</p> <p>H372 : Risque avéré d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.</p>	<p>P201 : Se procurer les instructions avant utilisation.</p> <p>P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.</p> <p>P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.</p> <p>P304+P340+P31 : EN CAS D'INHALATION : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer ; appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.</p> <p>P305+P351+P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes ; enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.</p> <p>P308 +P313 : EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : Consulter un médecin.</p>

Source : <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a3574?lang=fr&region=FR>

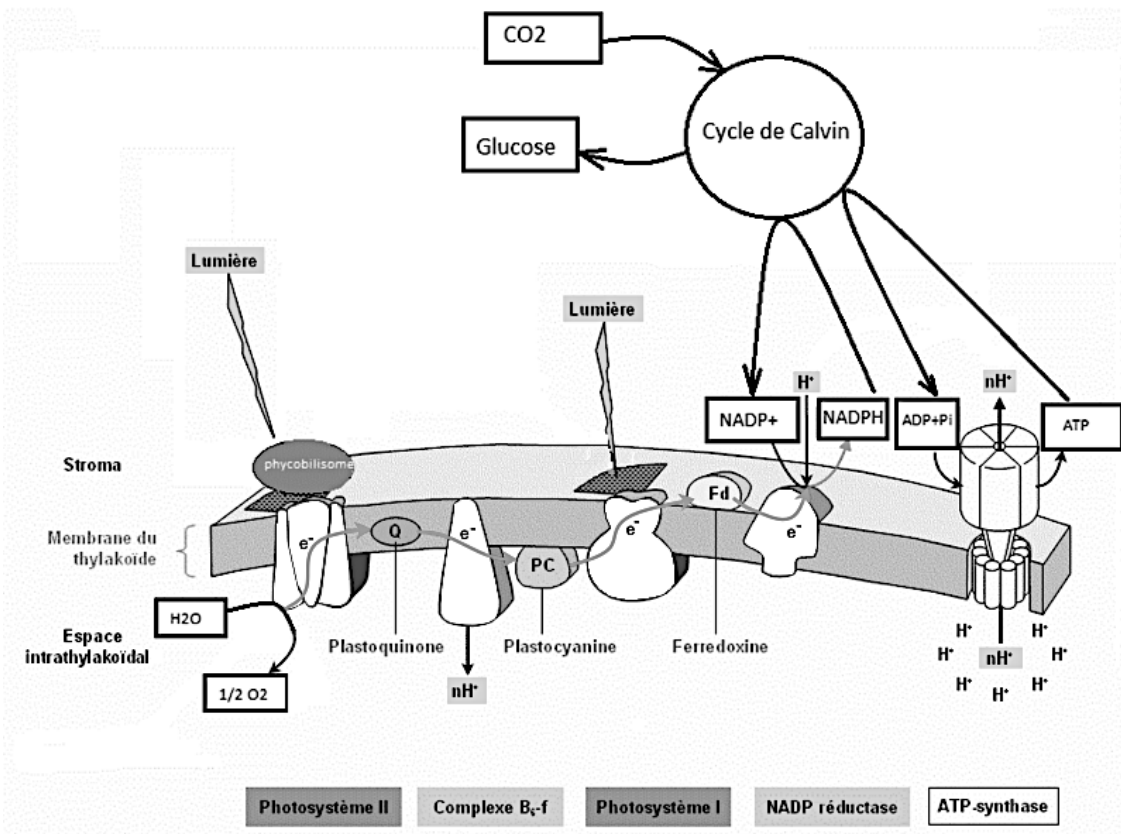
**Document 13 : structure d'une phycobiliprotéine : la phycocyanine.**



Phycocyanin (PC) structure. (A) Crystal structure of PC from cyanobacterium *S. platensis* in form of hexamer, image from PDB (<http://www.rcsb.org>) of PDB ID 1GH0 (2011). (B) Schematic representation of PC assembly. It is composed of two protein subunits,  $\alpha$  and  $\beta$  chains, one phycocyanobilin (PCB) is bound to the  $\alpha$  subunit and two PCBs are bound to the  $\beta$  subunit. (C) Chemical structure of PCB, the chromogen responsible of blue color of PC.

D'après : <http://www.binmeibio-fr.com/info/nutraceutical-properties-of-phycocyanin-23243402.html>

**Document 14 : chaîne photosynthétique d'algue rouge.**



# Sujet de microbiologie et technologies d'analyse 2019

---

## OPTIMISATION DE POINTS CRITIQUES DANS L'INDUSTRIE LAITIÈRE

Les produits laitiers sont consommés par une part importante de la population mondiale. Produits alimentaires très complets, ils abritent de nombreux micro-organismes qui peuvent poser de sérieux problèmes sanitaires comme en témoignent les retraits récurrents de produits du marché (laites infantiles, fromages...).

La sécurité alimentaire ne repose pas uniquement sur le contrôle du produit fini mais aussi sur la mise en œuvre de « bonnes pratiques » dans les procédés de fabrication. Pour cela, une entreprise de fromage au lait cru cherche à identifier des points critiques dans son process : ce sont des étapes qui vont permettre des ajustements.

Quelques points critiques potentiels lors de la collecte et de la transformation du lait sont identifiés :

- Suivi et inhibition de la formation d'un biofilm bactérien sur les mamelles bovines.
- Condition de stockage et de caillage du lait.
- Recherche de *Listeria monocytogenes* dans le produit fini.

### 1. Suivi de la formation de biofilms chez le producteur de lait

Le **document 1** présente les étapes de la formation d'un biofilm.

**Q1.** Proposer une définition d'un biofilm et légendier les actions (1) à (5).

**Q2.** Identifier la nature biochimique et le rôle des deux structures bactériennes qui contribuent à former des biofilms bactériens. Déduire deux stratégies de lutte contre les biofilms.

#### 1.1. Stratégie d'inhibition des *Staphylococcus aureus* impliqués dans les biofilms

On peut observer des biofilms au niveau des mamelles bovines. *Staphylococcus aureus* entéropathogène est l'un des micro-organismes possiblement présents et problématiques pour l'industrie laitière. Les souches de *S. aureus* retrouvées correspondent souvent à un biotype humain.

Une étude de 2016 propose l'application directe d'huiles essentielles dérivées d'agrumes sur les zones lésées pour agir sur cette espèce. Elle se base sur les résultats de tests *in vitro* dont la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice ou CMI (**document 2**).

**Q3.** Expliquer l'origine possible de *S. aureus* dans ces biofilms.

**Q4.** Proposer une stratégie classique de traitement des mammites infectieuses, et expliquer en quoi la substitution par l'application directe d'huile essentielle présente un intérêt.

Pour la détermination de la CMI, une cupule témoin positif est réalisée.

**Q5.** Expliquer la composition qualitative de la cupule témoin positif puis expliquer la détermination de la CMI après incubation.

## 1.2 Caractérisation des souches d'*Escherichia coli* impliqués dans les biofilms

Des cas récurrents de mammites à *Escherichia coli* ont été reportés dans des fermes canadiennes et ont donné lieu à une étude épidémiologique. L'hypothèse formulée est que la présence de biofilms permet la persistance de souches d'*E. coli* pathogènes et l'augmentation des récidives de mammites.

Les employés de ces fermes ont été formés pour réaliser des prélèvements, à l'aide d'écouvillon, de sécrétions anormales présentes au niveau des quatre parties (quartiers) de la mamelle. Des empreintes génétiques des *E. coli* isolés ont ensuite été réalisées afin de définir les génotypes de ces souches. Les résultats du génotypage des *E. coli* au cours des mammites sont donnés pour 18 vaches sur le **document 3**. Le travail sur les mammites a nécessité le recours à des souches de référence conservées à l'aide du coffret « Microbank™ Dry » de ProLab (**document 4**) en utilisant les équipements de sécurité préconisés (**document 5**).

**Q6.** Proposer une précaution à prendre lors des prélèvements et une conséquence possible si cette précaution n'est pas respectée.

**Q7.** Analyser l'électrophorégramme de la vache A et déterminer :

- Le nombre de cas de mammite différentes caractérisées par leur génotype.
- Le nombre total de récidives présentes.
- Le nombre de cas de mammite dont le génotype et le quartier sont identiques.

Établir un lien entre les récidives observées pour l'ensemble des vaches et l'existence de biofilms.

**Q8.** Présenter sous forme d'organigramme, le mode opératoire pour la préparation des tubes et la congélation des souches de référence. Expliquer le mode d'action des agents cryoprotecteurs et en donner un exemple.

**Q9.** Identifier sur la coupe de Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) à quoi correspondent :

- Les flèches en traits pleins.
- Les flèches en pointillés.
- Les zones hachurées.

Déduire les trois avantages de l'utilisation de cet équipement.

## 2. Suivi de la transformation du lait en fromage

### 2.1 Température de stockage du lait

Le stockage du lait, entre la traite et la transformation, se fait dans le but de préserver les qualités microbiologique, nutritionnelle et organoleptique du lait. Il se fait habituellement à 4 °C. Dans le but de faire des économies d'énergie, l'industriel voudrait augmenter la température de stockage à 8 °C.

Le **document 6** présente les résultats d'une étude de 2001 comportant :

- Une comparaison de la lipolyse, de la protéolyse et des propriétés sensorielles lors du stockage du lait après la traite, ce à 4 °C ou 8 °C pendant les 48 h suivant la traite.
- Un dénombrement la flore mésophile aérobie totale à 30 °C.
- Un dénombrement la flore psychrotrophe à 8 °C.

Un décret de 2004 présente la population microbienne tolérable sur un lait cru. Un extrait est fourni dans le **document 7**.

**Q10.** Expliquer la distinction faite entre germes psychrophile et psychrotrophe. Analyser les résultats du suivi de 2001. Conclure sur la possibilité de stocker le lait après la traite à 8 °C en précisant la durée maximale de conservation à cette température.

### 2.2 Recherche de bactériophages susceptibles d'altérer les ferments lactiques dans les eaux de rinçage

*Lactococcus lactis* et *Lactococcus thermophilus* sont parmi les espèces bactériennes les plus utilisées dans l'industrie fromagère. Cependant ces bactéries sont très vulnérables à l'attaque de phages virulents.

Ceux-ci peuvent provenir de la matière première : le lait cru est en effet un réservoir de bactéries lactiques mais également un réservoir de leurs phages.

L'eau utilisée dans la fromagerie ou dans la ferme pour rincer les équipements peut aussi être le vecteur de phages. L'entreprise a réalisé une étude préliminaire sur l'effet du traitement aux UV de l'eau utilisée pour diminuer la charge phagique. Elle utilise le couple *L. thermophilus* et le phage 2972. Les phages spécifiques de *L. thermophilus* ont tous une structure proche et sont lytiques (**document 8**). Pour doser les phages restants après traitement de l'eau, on peut utiliser la méthode de la double couche (**document 9**). Le rapport [nombre de virions / nombre de bactéries] est appelé *multiplicity of infection* ou MOI.

**Q11.** Expliquer pourquoi une MOI faible est nécessaire à la mise en œuvre d'un dénombrement de phages.

**Q12.** Analyser le protocole de titration phagique en donnant le rôle des éléments soulignés. Construire un tableau de dilution des phages d'une eau non encore traitée (titre attendu pour les eaux de rinçage d'environ  $10^6$  UFP•mL<sup>-1</sup>).

**Q13.** Proposer un mode opératoire pour réaliser deux boîtes témoin et préciser le résultat attendu.

### 2.3 Suivi de la présence de *Listeria monocytogenes* dans le produit fini

Ce micro-organisme omniprésent dans l'environnement affecte un groupe restreint de personnes : les YOPIs (*young old pregnant immunodeficients*). La maladie provoquée appelée listériose peut être fatale dans 30 % des cas. Ce micro-organisme est souvent présent à cause de contaminations par manque d'hygiène lors de la fabrication du fromage. Dans le cadre d'une démarche qualité, l'entreprise réalise des autocontrôles et recherche notamment la présence de *Listeria* dans le fromage au lait cru.

Le **document 10** donne le plan de recherche de référence de ce micro-organisme qui passe par l'utilisation notamment de la gélose Oxford (**document 11**). À côté de ce plan de référence on peut utiliser des méthodes alternatives dans un premier temps et confirmer l'identité des colonies suspectes par la méthode de référence.

**Q14.** Donner le rôle des constituants apparaissant en gras dans la composition de la gélose Oxford et justifier l'aspect d'une colonie caractéristique de *L. monocytogenes*.

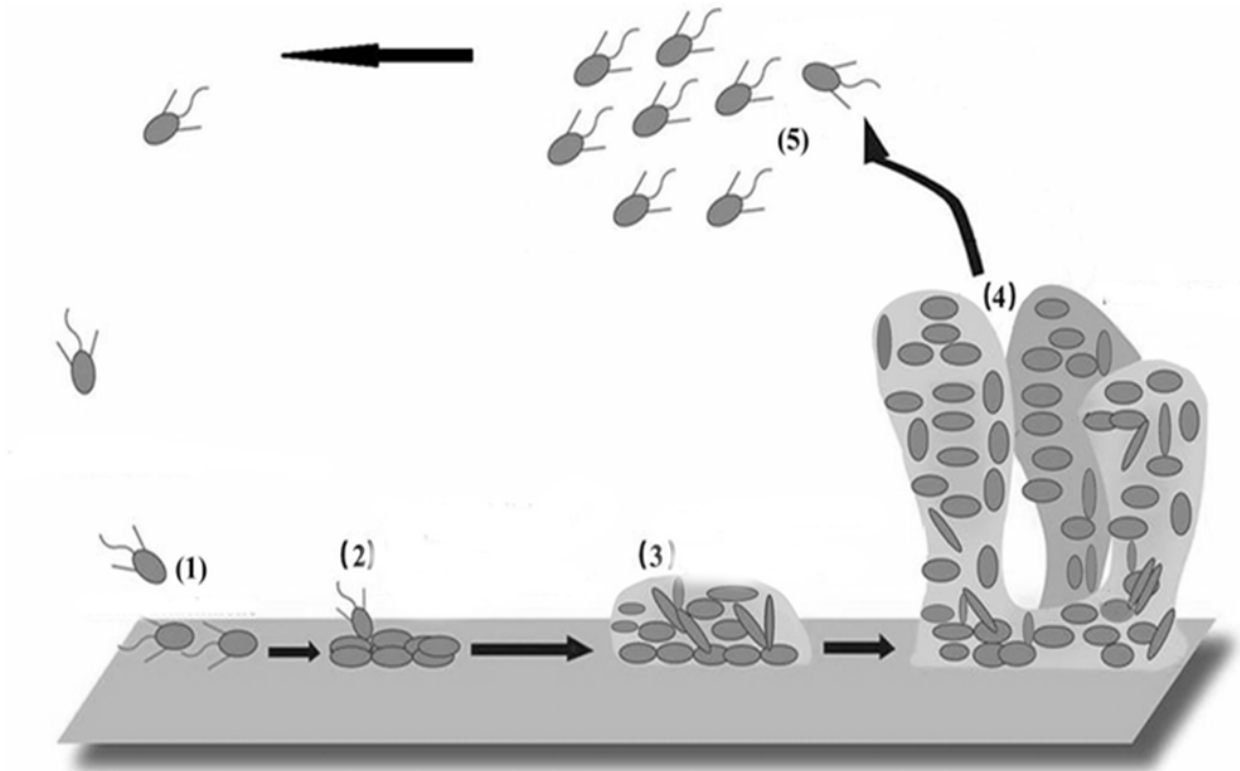
**Q15.** Expliquer l'intérêt de l'utilisation des méthodes alternatives fondées sur la PCR ou sur la spectrométrie de masse.

## Bilan

Le logigramme de l'OMS (**document 12**) permet de déterminer si une étape constitue un point critique. L'entreprise a utilisé cette démarche pour mettre en évidence les différents points critiques de son process, dont les exemples développés précédemment.

**Q16.** Justifier que l'étape de stockage du lait, avant transformation, constitue un point critique.

**Document 1 : étapes de la formation d'un biofilm bactérien.**



Source : <http://amgar.blog.processalimentaire.com/wp-content/uploads/2015/06/biofilm.png>

**Document 2: procédure de détermination de la concentration minimale inhibitrice (MIC) d'une huile essentielle d'agrumes (citrus derived oil) sur une souche de *Staphylococcus aureus*.**

**Bacterial strain and growth conditions**

*Staphylococcus aureus* ATCC 29740 was used in this study. This strain has been isolated from bovine mastitic milk. Bacteria were maintained in nutrient broth or nutrient agar and were grown for 18 to 24h before use.

**Preparation of citrus-derived essential oil (CDO)**

Terpeneless, cold-pressed Valencia orange oil was provided by Firmenich Citrus Center. A stock solution was prepared by dissolving CDO in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, St Louis, MO) to a final concentration of 40% CDO.

**Determination of MIC**

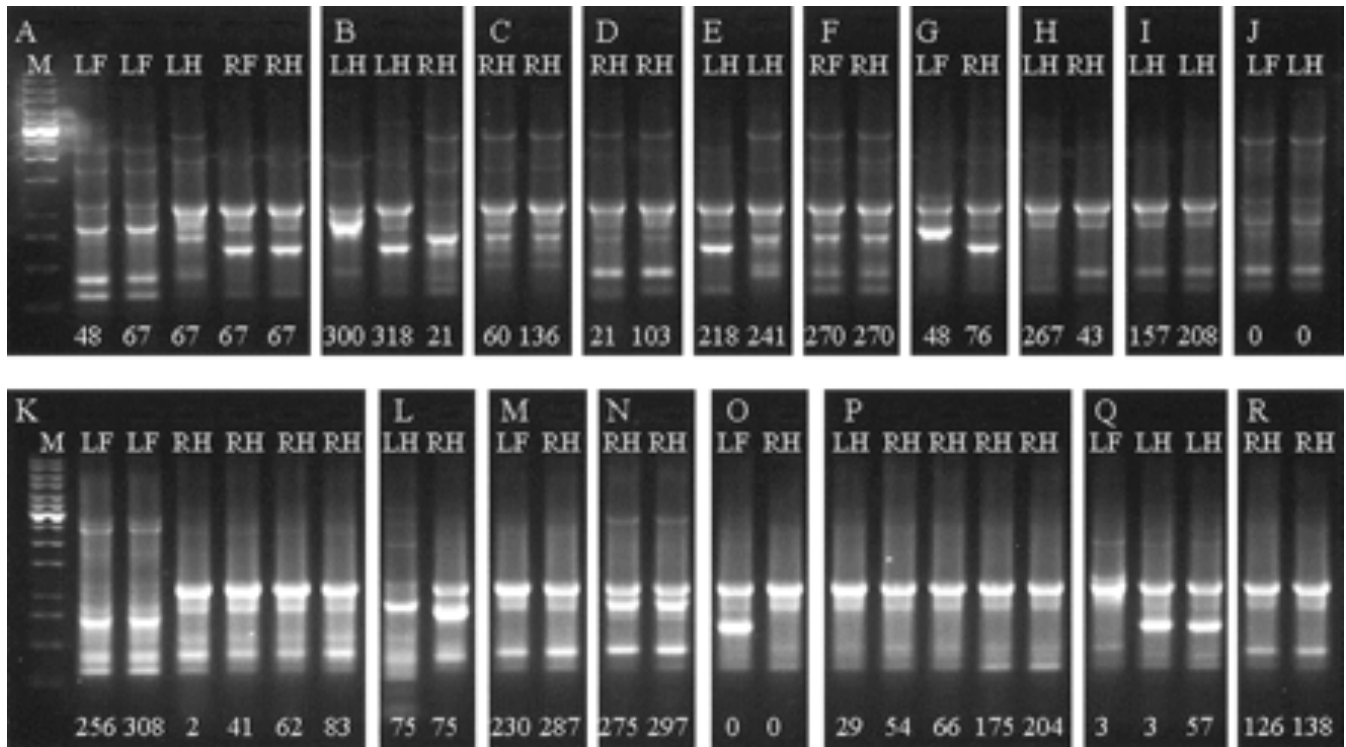
Using a spectrophotometer, *S. aureus* was diluted to  $10^5$  CFU/mL in nutrient broth (Difco, Becton, Dickinson and company, Franklin lanes, NJ) by adjusting it to an attenuation at 600 nm of 0.08 to 0.12 ( $10^8$  CFU/mL). This was further diluted to  $10^5$  CFU/mL.

The broth dilution method was used to determine the MIC of *S. aureus*. Concentrations of CDO ranging from 0.0125% to 0.4% CDO with half-step dilutions were added to 24 well plates containing  $10^5$  CFU/mL/well of *S. aureus*. Plates were incubated overnight.

Source : C. Federman et al; « Citrus-derived oil inhibits *S. aureus* growth and alters its interactions with bovine mammary cells. », *J.Dairy Sci*, 2016, 99: 3667-3674.

**Document 3 : empreintes ADN d'isolats d'*E. coli* de vaches.**

(De: A.J. Bradley, M.J Green; "Adaptation of *E. coli* to the bovine mammary gland", Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(5): 1845-1849).



Légende :

- A à R : vaches ayant présenté des mammites récurrentes.
- Lignes M : marqueur de poids moléculaire 1 kb de Promega.
- Nombre en bas de ligne : jour de la lactation où l'inflammation a été constatée.
- Quartiers de la mamelle : LF avant gauche ; LH arrière gauche ; RF avant droit ; RH arrière droit.

Donnée :

On comptabilise une récurrence :

- Présence d'*E. coli* à un intervalle de 5 jours ou plus, sur le même quartier.
- Présence d'*E. coli* au niveau de deux quartiers au même moment.



**Document 4 : extrait de la fiche technique du kit « Microbank™ Dry » de Promega.**

**PROCEDURE**

**A. PREPARATION**

1. Cryopreservative is prepared based on the customer's formulation and sterilized.
2. Using aseptic technique, add cryopreservative to the required number of Microbank™-Dry vials:
  - a. Unscrew the Microbank™-Dry vial cap.
  - b. Using a sterile pipette transfer 1 mL of cryopreservative into the Microbank™-Dry vial.
  - c. Replace the cap on the Microbank™-Dry vial tightly.

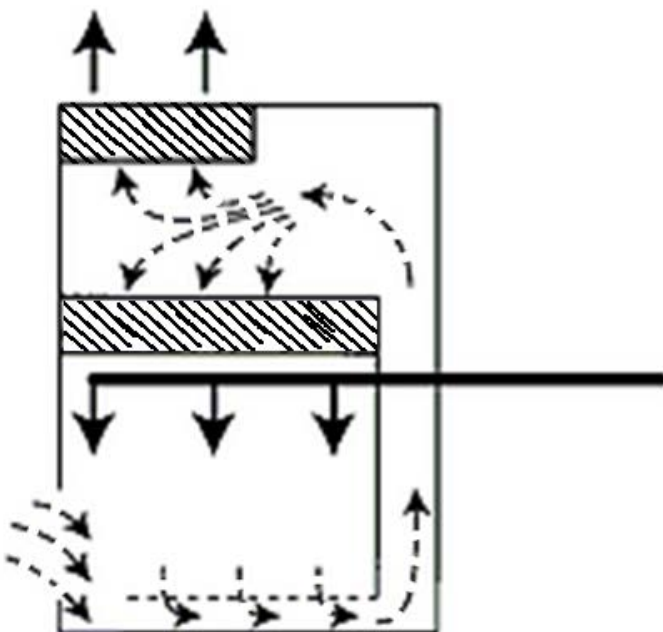
**B. INOCULATION OF MICROBANK™**

1. Using a permanent marker, label a separate Microbank™ vial for each organism to be stored.
2. Using aseptic technique, unscrew the Microbank™ vial cap.
3. Using a sterile inoculating loop or cotton swab, pick off enough colonies from a pure culture to achieve a 3-4 McFarland standard in the cryopreservative. In general, an overnight culture (18-24 hours) of the isolate is preferred.
4. Using aseptic technique, replace the cap on the Microbank™ vial tightly and invert it 4-5 times to emulsify the organism. DO NOT VORTEX!
5. Let the Microbank™ vial sit for 2 minutes to allow the isolate to bind to the beads. Remove the cap and use a sterile disposable pasteur pipette to remove the cryopreservative. The beads should be as free of liquid as possible.
6. Close the Microbank™ vial finger tight only. It is important that the Microbank™ vials are not overtightened.
7. Place the Microbank™ vial in a Microbank™ Freezer Storage Box and freeze at -70 °C.

**C. RECOVERY OF THE BACTERIAL AND FUNGUS ISOLATES**

1. Remove the Microbank™ vial from the -70°C freezer and place it in a cold cryoblock (PL.155-1).
2. Using aseptic technique, open the Microbank™ vial and using a sterile needle or forceps remove one coloured bead. Close the Microbank™ vial finger tight and return as soon as possible to the freezer. Excessive changes in temperature will reduce the viability of the frozen isolates.
3. The bead may then be streaked directly onto a solid medium or may be inoculated into an appropriate liquid medium.

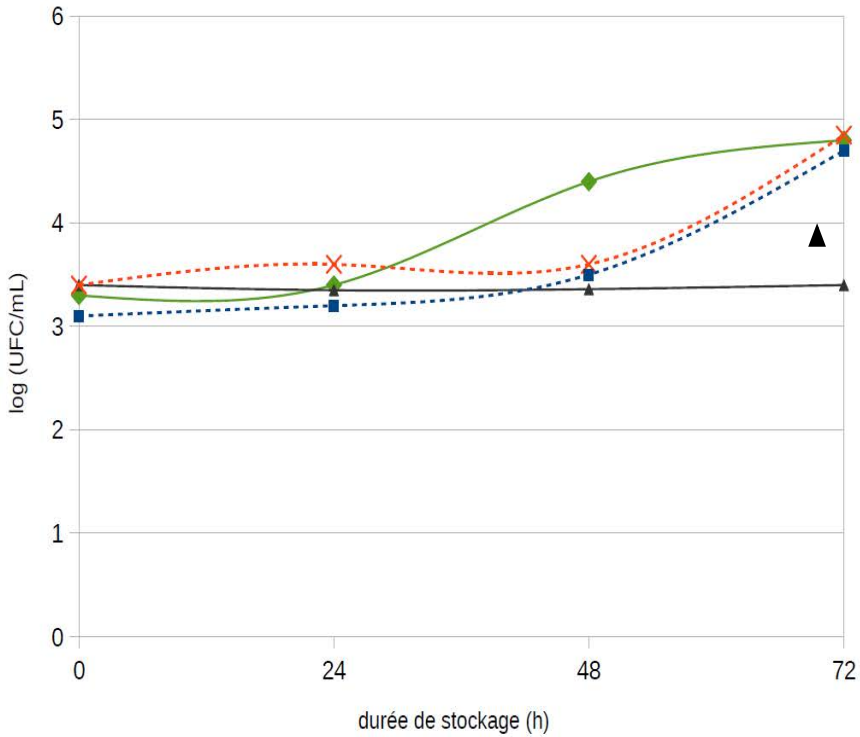
**Document 5 : coupe verticale du PSM de type II.**



**Document 6 : résultats de l'étude sur l'effet de la température de stockage du lait cru.**

- **Suivi de la flore mésophile aérobie totale et des bactéries psychrotrophes dans le lait cru, en fonction de la température de stockage.**

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale et des bactéries psychrotrophes sont réalisés sur gélose PCA (*Plate Count Agar*). Les temps d'incubation sont de 3 jours à 30 °C pour la flore totale et 10 jours à 8 °C pour les psychrotrophes.



**Légende**

- Courbes en traits pleins : microorganismes stockés à 4 °C (losanges : psychrotrophes, triangles: flore totale).
- Courbes en pointillés : microorganismes stockés à 8 °C (croix : flore totale, carrés: psychrotrophes).

**Comparaison de la lipolyse, protéolyse et propriétés sensorielles en fonction de la température de stockage.**

La plupart des modifications enzymatiques apparaissent à partir d'un jour de stockage réfrigéré (à 4 °C) du lait cru. Entre les jours 1 et 3, on n'observe pas d'augmentation ultérieure de la protéolyse et de la lipolyse. Ceci concorde avec les données sensorielles, étant donné que des modifications apparaissent dès le jour 1 et qu'il n'y en a pas d'autres entre les jours 1 et 3 quelle que soit la température de stockage.

Le stockage du lait cru à 8 °C provoque un ralentissement de la lipolyse et de la protéolyse en comparaison avec ce qu'on observe à 4 °C.

*Source : A.O'Connell, †P.L.Ruegg,†K.Jordan,‡B.O'Brien, \*D.Gleeson\* "The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk" J Dairy Sci. 2001 May;99(5):3367-3374.*

**Document 7 : extrait du règlement CE n°853/2004 du 29 avril 2004.**

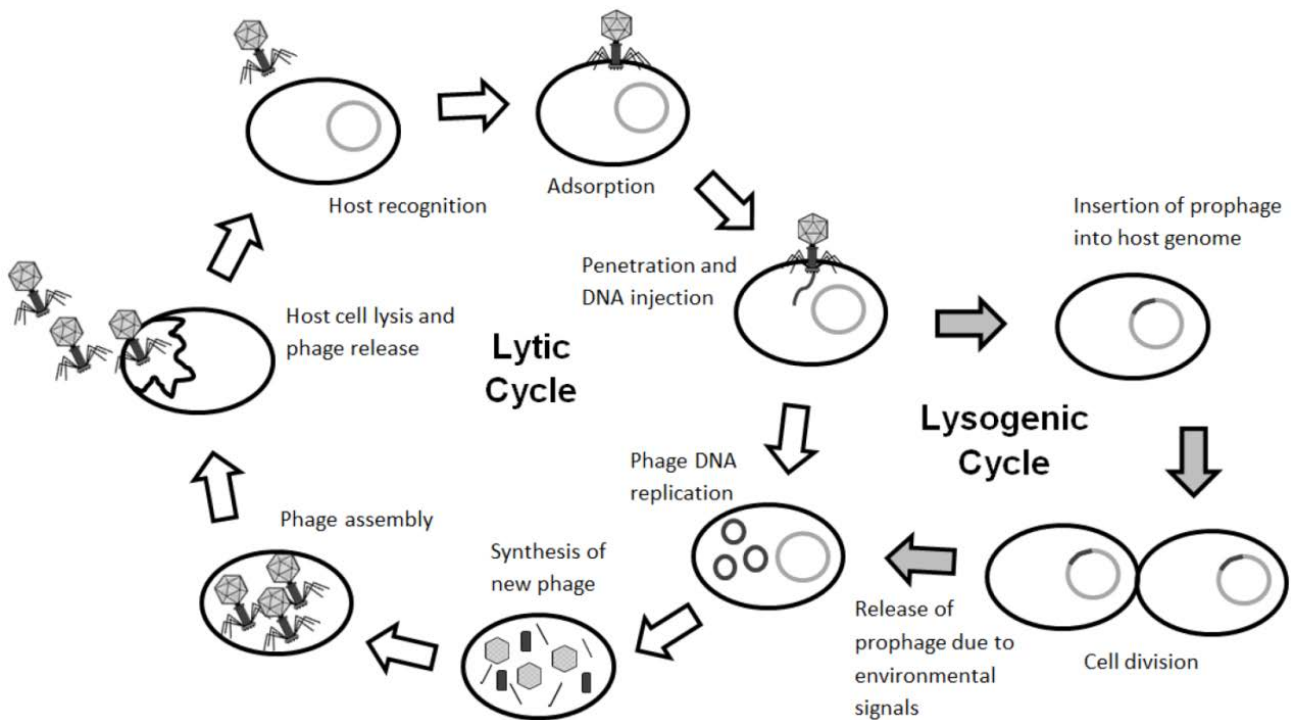
**Laits collectés et/ou destinés à la transformation.**

PRODUIT	CRITÈRES D'HYGIÈNE DES PROCÉDÉS
Lait cru de vaches collecté	Germes à 30 °C ≤ 100 000 / mL (1)
	Cellules somatiques ≤ 400 000 (2)
Lait cru d'autres espèces que les vaches	Germes à 30 °C ≤ 1 500 000 / mL (3)
Lait cru de vaches avant transformation	Germes à 30 °C < 300 000 / mL
Lait ayant fait l'objet d'un traitement thermique pour fabrication de produits laitiers	Germes à 30 °C < 100 000 / mL
Lait d'autres espèces que les vaches, pour fabrication de produits au lait cru sans traitement thermique	Germes à 30 °C ≤ 500 000 / mL

- (1) Moyenne géométrique variable constatée sur une période de deux mois, avec au moins deux prélèvements par mois.
- (2) Moyenne géométrique variable constatée sur une période de trois mois, avec au moins un prélèvement par mois.
- (3) Moyenne géométrique variable constatée sur une période de deux mois, avec au moins deux prélèvements par mois.

Source : (Règlement (CE) n°853/2004 du 29 avril 2004 - Annexe III - Section IX lait cru et produit laitiers – III Critères applicables au lait cru).

**Document 8 : cycles de reproduction des phages.**



Source : [https://res.mdpi.com/viruses/viruses-09-00050/article\\_deploy/html/images/viruses-09-00050-g002.png](https://res.mdpi.com/viruses/viruses-09-00050/article_deploy/html/images/viruses-09-00050-g002.png)

**Document 9 : dosage des phages par méthode en double couche.****Matériel, réactifs, souches**

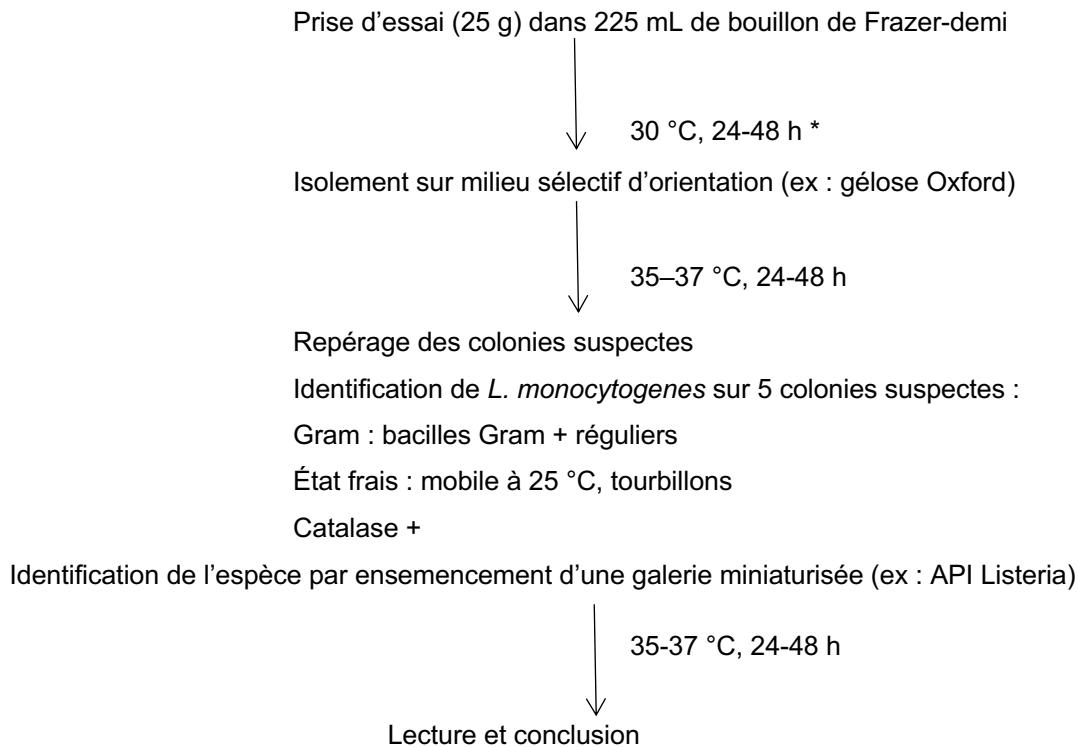
- Souche *L. thermophilus* sensible au phage en bouillon LB. Culture de la nuit.
  - Suspension de phages de référence ou bioproduit à analyser.
  - Flacon de 30 mL de NaCl 9 g/L stérile.
  - 6 boîtes de Petri de milieu nutritif gélosé LB.
  - Tubes à essai stériles.
  - Top LB agar : milieu LB à 6 g/L d'agar, maintenu en surfusion à 46 °C.
- Réaliser des dilutions en série géométrique de raison 1/10 de la suspension de phages à titrer.
- Tester 3 dilutions successives choisies selon l'échantillon.

**Procédure opératoire**

Dans une série de 3 tubes stériles préchauffés à 37 °C, mélanger 100 µL de dilution de chacune des suspensions phagiques à tester et 100 µL de culture de bactérie. Transférer immédiatement 4 minutes à 37 °C (séjour à l'étuve).

Revenir à la paillasse rapidement et ajouter alors très doucement 3 mL de milieu gélosé en surfusion «gélose demi-molle» (top LB agar). Homogénéiser très doucement et, avant refroidissement, verser et répartir à la surface d'une boîte de Petri préchauffée quelques minutes à 37 °C contenant du milieu nutritif agarosé. Incuber boîtes retournées.

Compter les plages de lyse des boîtes exploitables. Une boîte lisible de dénombrement présente 100 plages de lyse.

**Document 10 : plan de recherche de *listeria monocytogenes* dans un produit alimentaire.**

\* Après la première incubation on peut extraire l'ADN et réaliser une PCR. On ne poursuit l'identification que si le résultat de PCR est positif.

**Document 11 : gélose Oxford (d'après Biokar diagnostics).**

## DOMAINE D'UTILISATION

La gélose Oxford est un milieu sélectif utilisé pour la différenciation, l'isolement et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les fromages, ainsi que dans les autres produits alimentaires, même fortement contaminés.

## FORMULE - TYPE du milieu complet

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

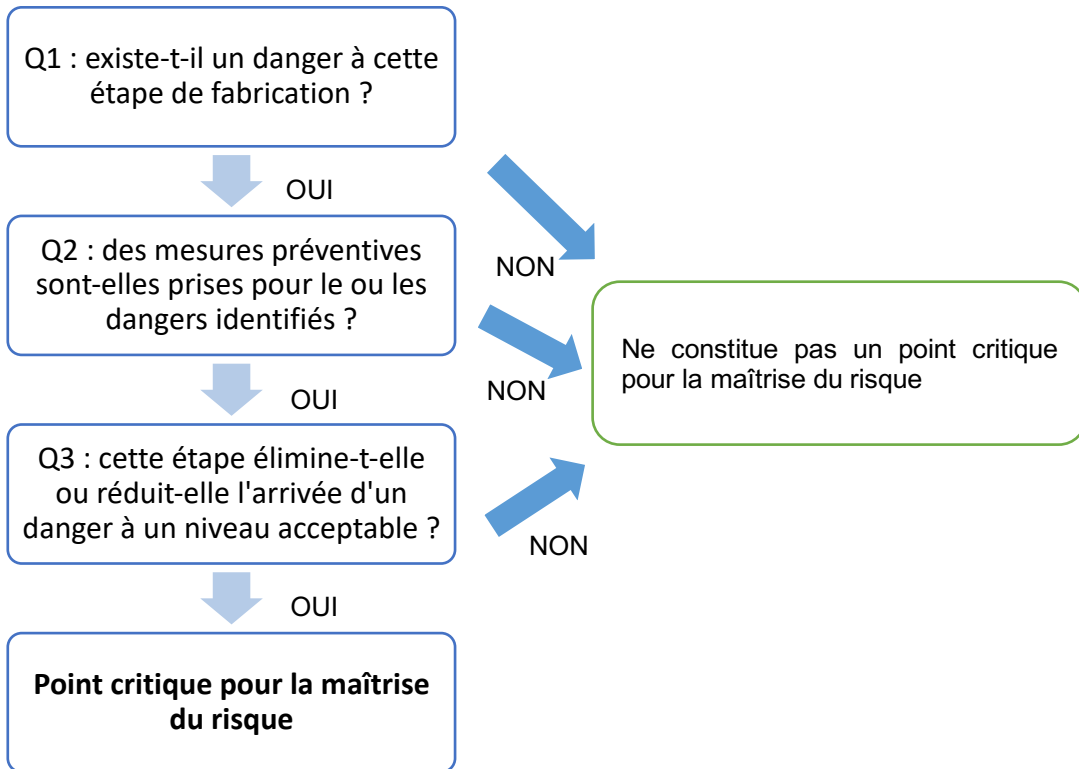
- Polypeptone .....	20,0 g
- Extrait autolytique de levure .....	3,0 g
- Amidon .....	1,0 g
- Chlorure de sodium .....	5,0 g
- Esculine .....	1,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal .....	0,5 g
- Chlorure de lithium .....	15,0 g
- Cycloheximide .....	400,0 mg
- Colistine (sulfate) .....	20,0 mg
- Céfotétan .....	2,0 mg
- Fosfomycine .....	10,0 mg
- Acriflavine .....	5,0 mg
- Agar agar bactériologique .....	13,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,0 ± 0,2.

## LECTURE

Après 24 heures d'incubation, *Listeria monocytogenes* forme des colonies vert-olive entourées d'un halo noir. Après 48 heures, elles deviennent plus foncées avec un centre noir et sont entourées de zones noires.

**Document 12 : arbre de décision pour la détermination des points critiques (d'après un document de l'Organisation Mondiale de la Santé ou OMS).**



# Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse 2019

## ÉTUDES PRÉCLINIQUES DU RITUXIMAB, UN ANTICORPS MONOCLONAL THÉRAPEUTIQUE

Le rituximab est un anticorps monoclonal qui sert de principe actif dans des médicaments anticancéreux. La mise au point de ce principe actif a nécessité des études précliniques, en vue de la constitution du dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché. Ces études se déclinent en plusieurs domaines : les études pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et toxicologiques.



### 1. Production du principe actif.

Le **document 1** présente une classification des anticorps monoclonaux thérapeutiques, à laquelle appartient le rituximab.

**Q1.** Réaliser un schéma annoté du rituximab à l'aide de la liste ci-dessous :

*Chaîne lourde, Chaîne légère, Région variable murine, Région constante humaine, Paratope, Ponts disulfures.*

Argumenter l'intérêt des anticorps chimériques ou humanisés en thérapie humaine.

Le **document 2** présente la technique d'obtention des hybridomes.

**Q2.** Rappeler les trois caractères essentiels des deux types de cellules utilisées pour l'obtention des hybridomes.

On sélectionne les hybridomes candidats à l'aide d'un milieu de culture contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine (milieu HAT).

Le **document 3** schématise les voies de biosynthèse des nucléotides.

**Q3.** Expliquer la méthode de sélection des hybridomes candidats.

**Q4.** Indiquer une méthode permettant l'isolement des hybridomes candidats et une méthode de sélection de l'hybridome sécrétant l'anticorps de spécificité souhaitée.

### 2. Pharmacodynamie du principe actif.

Le récepteur cellulaire du rituximab, présent sur les lymphocytes B, est une protéine transmembranaire. Cette protéine CD20 est schématisée dans le **document 4**.

**Q5.** Indiquer la polarité des parties 1, 2 et 3 de la protéine CD20.

Les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) se caractérisent par une multiplication anarchique des lymphocytes B. Le **document 5** propose un schéma simplifié des voies de transduction du signal après fixation du rituximab sur le récepteur CD20.

**Q6.** Argumenter l'utilisation du rituximab comme anticancéreux efficace dans le traitement des LLC.

### 3. Pharmacocinétique du principe actif.

Les protocoles de traitement des LLC mettent en jeu plusieurs injections sous-cutanées de rituximab. Des suivis pharmacocinétiques sont obtenus par un dosage régulier du rituximab dans le sang des patients par une technique ELISA 1 dont un extrait du protocole est présenté dans le **document 6**.

**Q7.** Schématiser l'édifice moléculaire obtenu dans un puits contenant du rituximab.

Un témoin positif et un témoin négatif sont nécessaires à la validation de la technique ELISA 1.

**Q8.** Pour chaque témoin, indiquer sa composition qualitative, expliquer son rôle et préciser le résultat attendu.

Le **document 7** compare la technique d'ELISA 1 présentée dans le **document 6**, avec deux autres techniques ELISA existantes (ELISA 2 et ELISA 3).

**Q9.** Comparer les trois techniques ELISA et justifier l'utilisation préférentielle de la technique ELISA 3.

Le **document 8** présente un exemple de suivi pharmacocinétique du rituximab par la technique ELISA 3.

**Q10.** Déterminer graphiquement  $C_{max}$  et  $T_{1/2}$  après la sixième injection.

### 4. Toxicologie du principe actif.

Le rituximab peut, dans certains cas, favoriser la réactivation du virus de l'hépatite B.

Le **document 9** présente ce virus.

**Q11.** Dédire les trois caractéristiques principales du virus de l'hépatite B permettant son positionnement taxonomique.

Lors des phases de test sur volontaires sains, un suivi de la virémie (taux de virus dans le sang) est réalisé par PCR.

Le **document 10** présente un extrait modifié de la fiche technique utilisée.

**Q12.** Indiquer le rôle des réactifs (1) à (5) de la colonne « Component » du tableau. Calculer les volumes V1, V4 et V5 pour préparer 100  $\mu$ L de mélange réactionnel.

Dans un but économique et écologique, le laboratoire souhaite effectuer plusieurs PCR successives en utilisant les mêmes tubes.

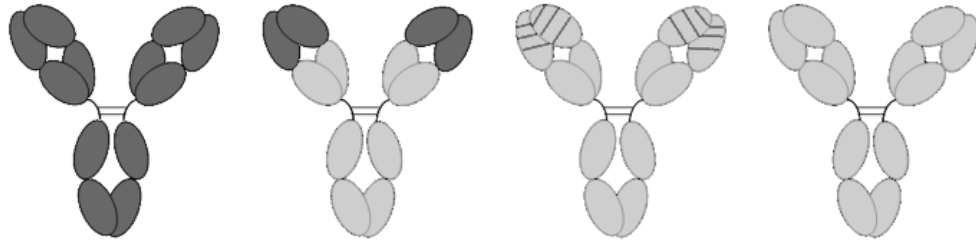
Pour empêcher les contaminations croisées entre les amplicons résiduels de la PCR précédente avec la matrice à amplifier de la PCR à réaliser, il utilise le réactif AmpErase® UNG.

**Q13.** Présenter l'origine et la nature du réactif AmpErase® UNG.

Expliquer comment ce réactif limite les contaminations croisées au cours des PCR successives.



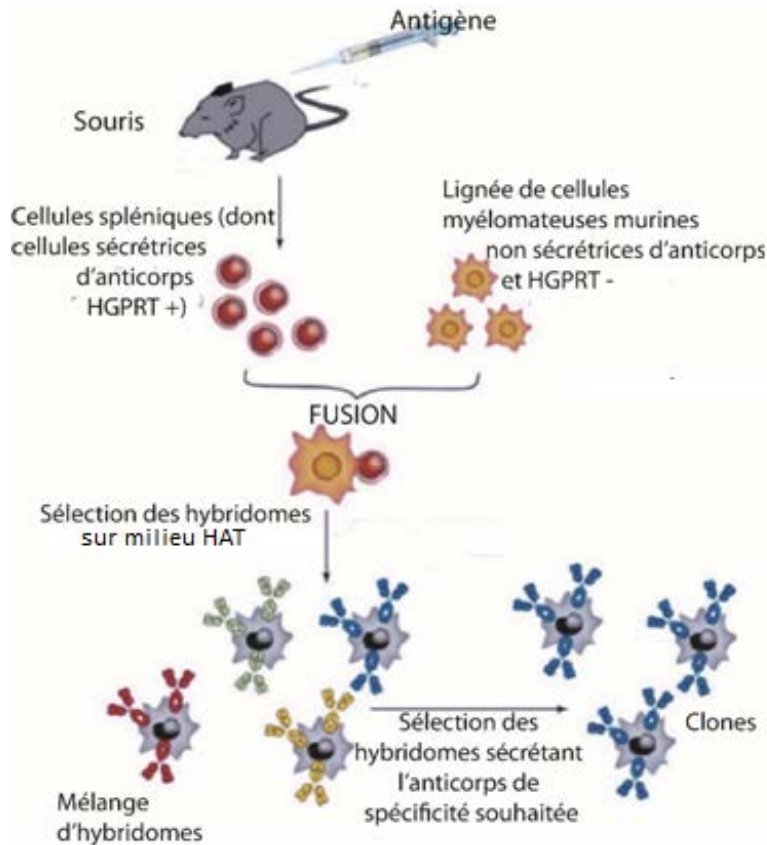
**Document 1 : classification des anticorps monoclonaux thérapeutiques (mAbs) par types : murins, chimériques, humanisés, humains.**



Type of mAb	Murine	Chimeric	Humanized	Human
<b>Exemples</b>	Ibritumomab tiuxetan (CD20) : IgG1κ Tositumomab- <sup>131</sup> I (CD20) : IgG2aλ	Cetuximab (EGFR) : IgG1κ <b>Rituximab</b> (CD20) : IgG1κ	Trastuzumab (ERB2) : IgG1κ Bevacizumab (VEGF) : IgG1	Panitumumab (EGFR) : IgG2

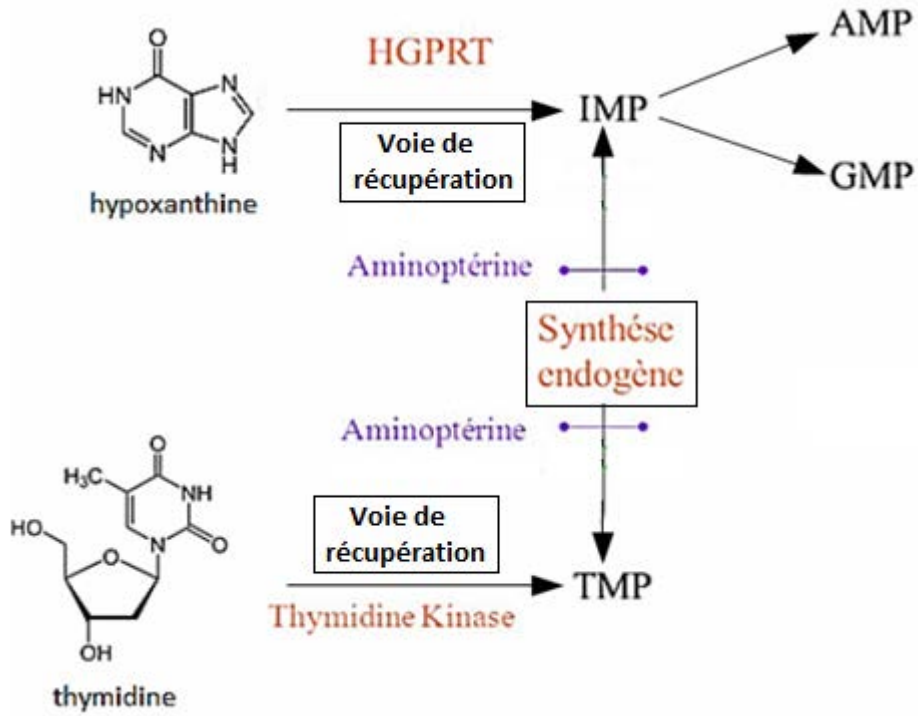
Source : Kohzoh Imai & Akinori Takaoka Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer Nature Reviews Cancer 6, 714-727 (September 2006)

**Document 2 : principe général de la technique d'obtention des anticorps monoclonaux.**

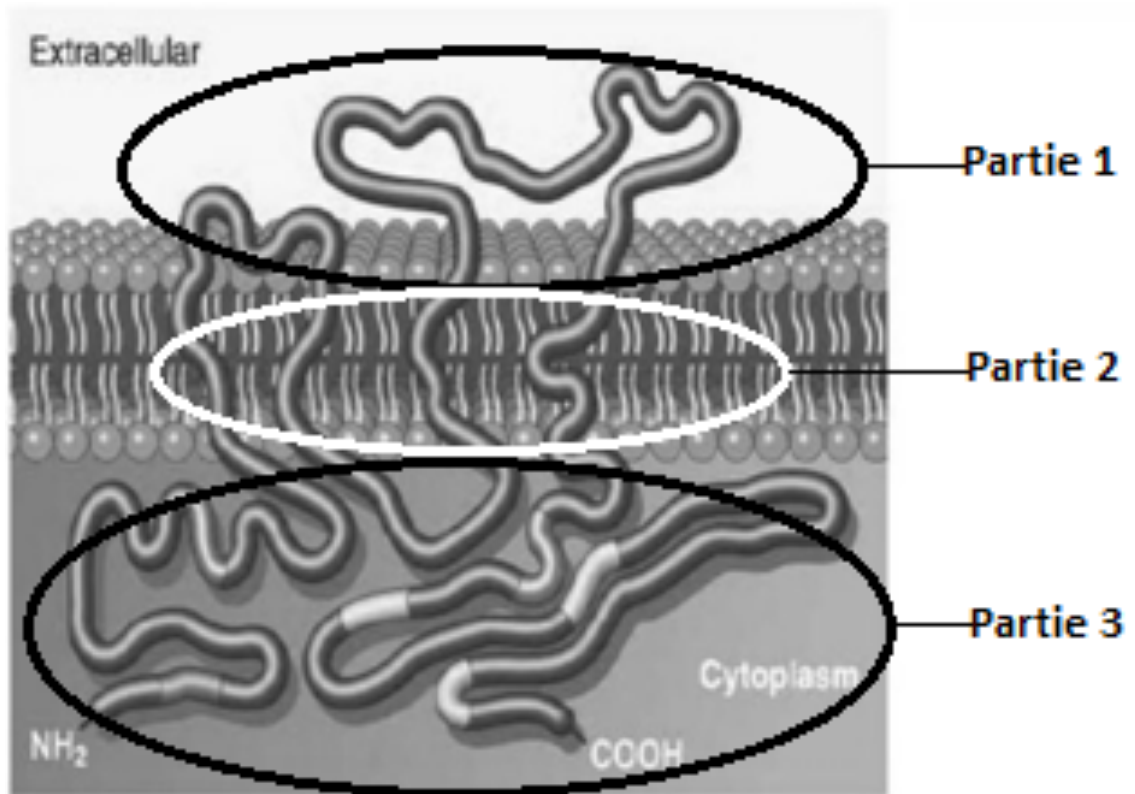


Source : CARTRON G. In Histoire de la thérapie ciblée en cancérologie (2007) [CD-ROM]. John Libbey Eurotext. Livre (152 p)

**Document 3 : schéma simplifié des voies de biosynthèse des nucléotides.**

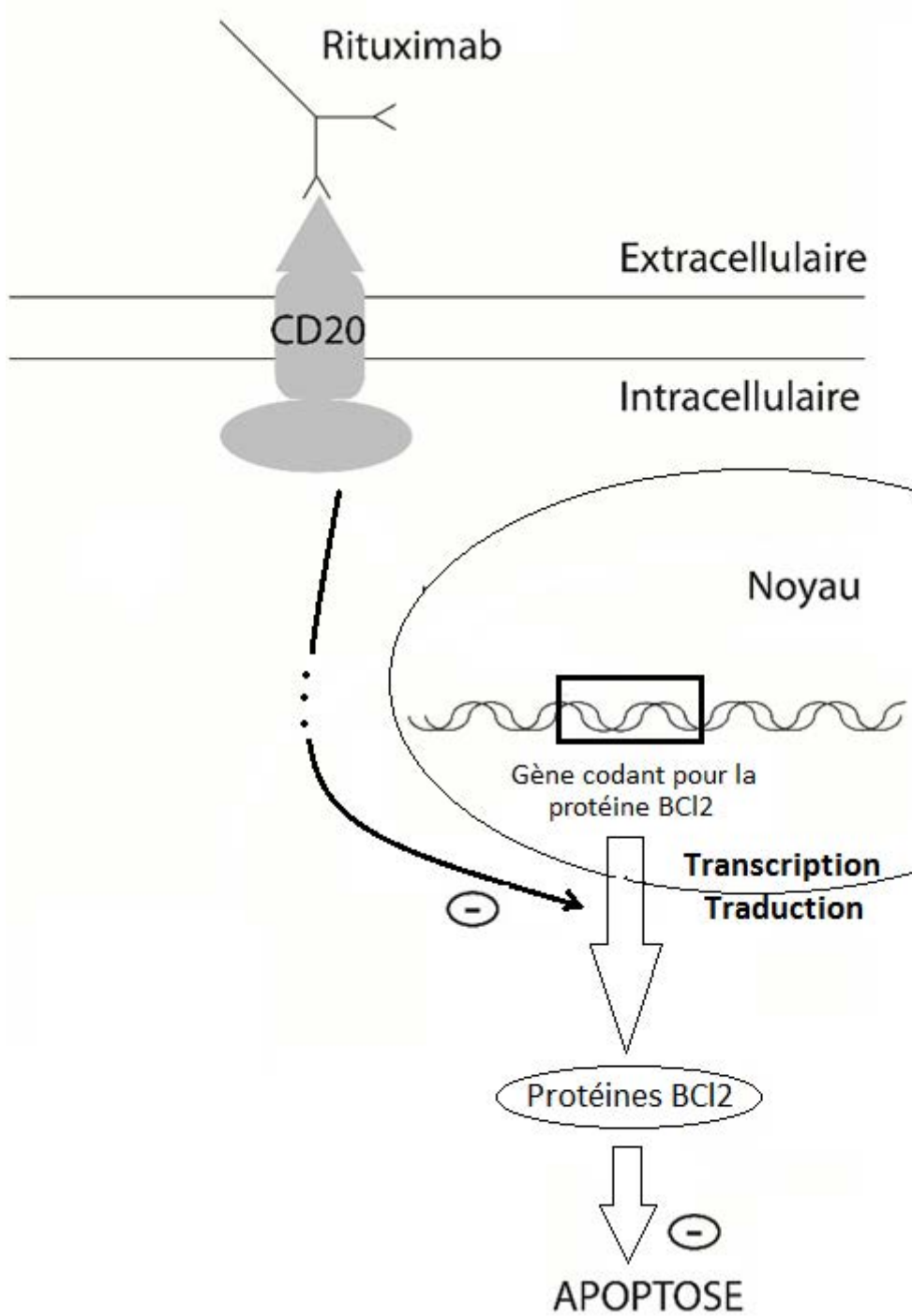


**Document 4 : schéma de la protéine CD20.**



Source : thèse d'exercice de pharmacie, Emmanuelle SURGA, université Henri Poincaré, 2011  
[www.docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA\\_T\\_2011\\_SURGA\\_EMMANUELLE.pdf](http://www.docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA_T_2011_SURGA_EMMANUELLE.pdf)

**Document 5 : schéma simplifié d'une des voies de transduction du signal activée par le rituximab.**



**Document 6 : extrait d'un protocole de dosage du rituximab par une technique ELISA (ELISA1).**

At your disposal : serum with rituximab at  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and serum with no rituximab

1. Coating : add CD20 peptides in each well. Incubate 2 h at room temperature (RT)
2. Wash 3 times with PBS Tween
3. Saturation : add BSA in PBS buffer and incubate 2 h at RT
4. Wash 3 times with PBS Tween
5. Add Standards rituximab at known concentration or samples and incubate 1 h at RT
6. Wash 3 times with PBS Tween
7. Add peroxydase-conjugated goat anti-Fc fragment from human IgG and incubate 1 h at RT
8. Wash 3 times with PBS Tween
9. Add OPD substrat
10. Add Stop solution after 5 minutes
11. Measure absorbance at 450 nm

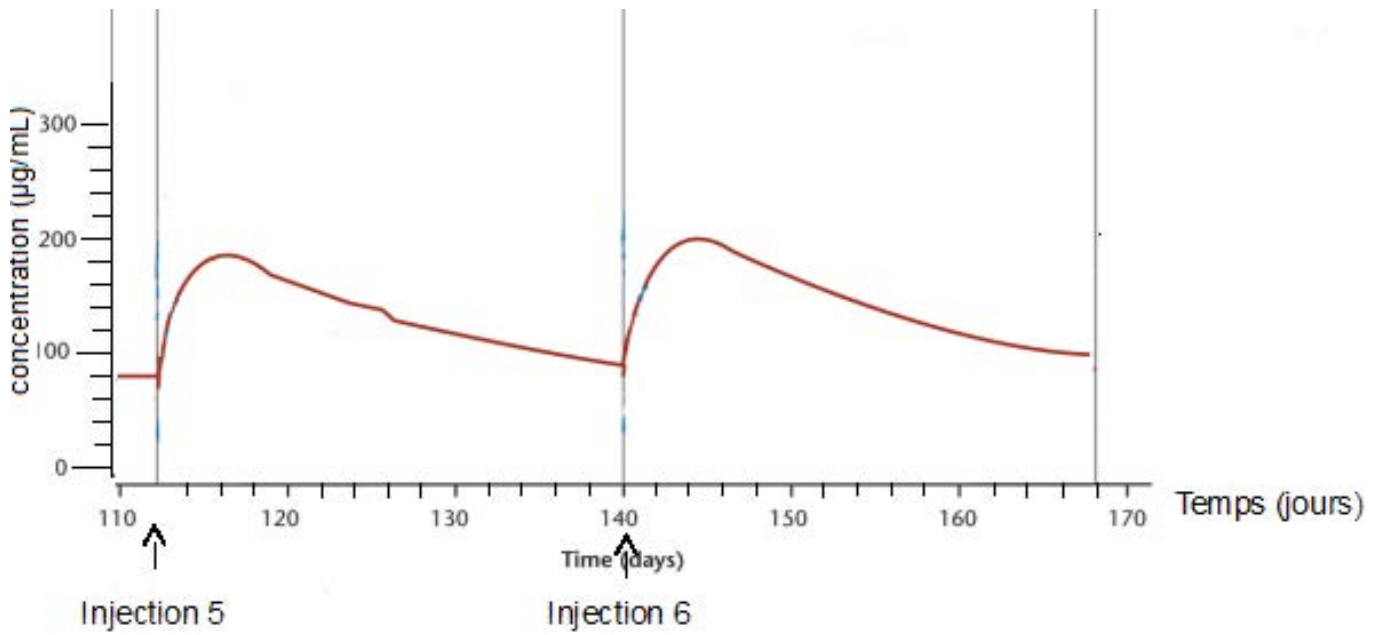
*Adapté de Blasco, et al. Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum  
Journal of Immunological Methods, Volume 325, Issue 1, Pages 127-139*

**Document 7 : Comparaison de 3 techniques ELISA utilisées pour doser le rituximab dans le sang.**

	<b>ELISA 1</b>	<b>ELISA 2</b>	<b>ELISA 3</b>
Limite de détection	$50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$30 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
Forme de rituximab dosée	Libre uniquement	Libre et lié	Libre et lié
Reproductibilité	Élevée	Moyenne	Élevée

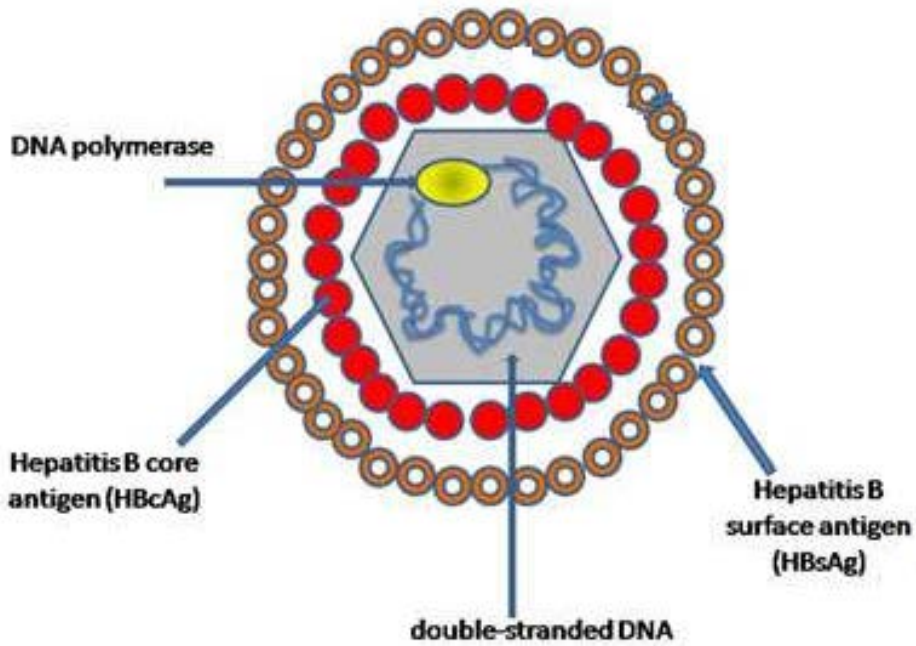
*Adapté de Cartron, et al. Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: Thought for the best use? Critical Reviews in Oncology/Hematology 62 (2007) 43–52 et « Rituximab ELISA (mAb-based) » distribué par Eagle Biosciences, Inc.*

**Document 8 : pharmacocinétique du rituximab : mesurage par la technique ELISA 3.**



Adapté de Assouline S, et al, *Pharmacokinetics and safety of subcutaneous rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukemia. Br J Clin Pharmacol* 2015; 80: 1001–09.

**Document 9 : représentation schématique du virion de l'hépatite B.**



Adapté de <https://futura-sciences.com>

**Document 10 : extrait adapté de la fiche technique du réactif AmpErase® Uracil N-Glycosylase (UNG).**

**Product description:**

AmpErase® Uracil N-Glycosylase (UNG) is a 26-kDa ultrapure, recombinant enzyme encoded by the *E.coli uracil N-glycosylase* gene, designed to degrade PCR products from previous amplifications without degrading native nucleic acid templates.

AmpErase® UNG has activity below 55 °C.

Prior PCR amplicons are degraded because in the reaction mix, dTTP are substituted by dUTP.

The annealing temperature should be  $\geq 55$  °C to avoid degradation of newly synthesized dU-containing products by residual AmpErase® UNG activity.

AmpErase® UNG is denatured during the PCR reaction.

**Exemple de mix PCR utilisant le réactif AmpErase® :**

N°	Component	Volume	Final Concentration
/	Autoclaved, distilled water	qsp 100 $\mu$ L	/
1	10X PCR Buffer II	$V_1$	1X
2	10 mM dATP	2 $\mu$ L	0,2 mM
	10 mM dCTP	2 $\mu$ L	0,2 mM
	10 mM dGTP	2 $\mu$ L	0,2 mM
	20 mM dUTP	2 $\mu$ L	0,2 mM
3	25 mM MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu$ L	2,0 mM
4	10 $\mu$ M forward primer	$V_4$	0,2 $\mu$ M
	10 $\mu$ M reverse primer	$V_4$	0,2 $\mu$ M
/	Template DNA	variable	< 2 $\mu$ g/100 $\mu$ L
5	AmpliTaq DNA polymerase (5 U. $\mu$ L <sup>-1</sup> )	$V_5$	2,5 U/100 $\mu$ L
/	AmpErase® UNG (1 U. $\mu$ L <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ L	1 U/100 $\mu$ L

# Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2019

## AMÉLIORATION D'UNE BOISSON RAFRAICHISSANTE SANS ALCOOL

Les boissons rafraîchissantes sans alcool (BRSA) occupent une place importante dans le marché des boissons, c'est un secteur concurrentiel dont les parts de marché ne cessent d'augmenter. Une entreprise commercialise une BRSA à base de jus de fruits concentré en canettes, qui est l'objet de réclamations clients :

- détérioration de la couleur dans le temps ;
- instabilité du goût ;
- défaut d'impression sur le fond des canettes.

La qualité des produits est une préoccupation essentielle de l'équipe de direction. Le service Recherche et Développement (R&D) et le service Qualité sont saisis pour mettre en place des améliorations.

### 1. Amélioration de la recette initiale par le service R&D

Le document 1 liste les ingrédients entrant dans la composition de la boisson à base de jus de fruit et présente deux modifications envisagées pour améliorer le produit.

Les documents 2 et 3 apportent des informations sur deux ingrédients majeurs entrant dans la composition de la boisson.

**Q1** - L'eau de source reste le principal composant de cette boisson. Argumenter le choix de conserver une eau de source pour fabriquer la boisson.

La gomme arabique et l'acide citrique sont utilisés dans cette boisson comme additifs. La Commission Européenne a établi une liste positive pour les additifs utilisés en agroalimentaire.

**Q2** - Expliquer l'importance d'une telle liste pour les consommateurs.

Un des rôles de la gomme arabique, présentée dans le document 3, est de stabiliser les gouttelettes lipidiques qui se forment avec les composés terpéniques des fruits. Ces composés sont responsables du goût et de la couleur.

**Q3** - Schématiser deux gouttelettes lipidiques stabilisées par l'Arabino-Galactane Protéine (AGP), dans un environnement aqueux, en identifiant ses zones hydrophiles et hydrophobes.

Le service R&D met en cause l'acidité de la boisson dans l'efficacité du stabilisant. Il propose dans la nouvelle recette de diminuer la teneur en acide citrique afin de faire évoluer le pH de 3,5 (recette initiale) à 4,5 (recette modifiée).

**Q4** - Expliquer comment ce changement de pH provoque une augmentation de charge des gouttelettes. En déduire en quoi la recette modifiée améliore la stabilité des gouttelettes.

Pour améliorer la qualité organoleptique, l'entreprise envisage des modifications du procédé de fabrication du concentré de jus de fruits présenté dans le document 4. Initialement, la concentration du jus de fruit était réalisée par évaporation de l'eau. Le service R&D remplace ce procédé par une série continue de filtrations sur membranes dont le diagramme fonctionnel est présenté dans le document 5.

**Q5** - Expliquer en quoi cette modification participe à l'amélioration de la qualité de la boisson.

**Q6** - Expliquer la démarche du procédé de concentration présenté.

Identifier la fraction K.

La ligne de production de la boisson nécessite d'obtenir un débit massique de sortie  $D_{MS} = 2574 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ . Pour répondre à cette exigence, le débit massique d'entrée ( $D_{ME}$ ) doit être de  $15444 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ .

**Q7** - Déterminer le facteur de concentration du jus obtenu par ce procédé. Justifier la valeur de ce  $D_{ME}$ .

Pour la pasteurisation du mélange de concentrés (étape n°9 du document 4), on choisit le microorganisme le plus thermorésistant comme germe de référence, *Candida pelliculosa*, ayant les paramètres de thermorésistance suivants :  $D_{60^{\circ}\text{C}} = 3 \text{ min}$  et  $z = 30^{\circ}\text{C}$  (définitions rappelées dans le document 6).

Pour conserver au mieux les qualités organoleptiques, le service R&D propose une pasteurisation à  $90^{\circ}\text{C}$ .

**Q8** - Justifier le choix du microorganisme le plus thermorésistant comme germe de référence.

**Q9** - En s'appuyant sur la signification de D et z, détailler la méthode de calcul de la durée du traitement thermique à  $90^{\circ}\text{C}$  pour obtenir 7 réductions décimales de la population (7 log). Calculer cette valeur.

## 2. Amélioration par le service Qualité

Le service qualité choisit un nouveau fournisseur de gomme arabique assurant à ses clients des garanties en matière de qualité. Parmi les fournisseurs potentiels, la société Nexira présente à ses clients le document 7.

**Q10** - Identifier les aptitudes de Nexira garanties par l'attestation. Indiquer le rôle et préciser l'action du bureau Veritas.

**Q11** - UKAS signifie «*United Kingdom Accreditation Service*», indiquer la structure qui joue un rôle équivalent au niveau français. Argumenter l'intérêt de faire apparaître le logo de l'UKAS sur le document établi par le bureau Veritas.

La ligne de conditionnement assure le remplissage des canettes. La date de durabilité minimale (DDM) est imprimée par jet d'encre sur le fond des canettes (document 1).

**Q12** - Justifier la décision d'impression d'une DDM et non d'une DLC.

Suite aux plaintes de clients, le responsable qualité veut quantifier les non conformités de l'impression de la DDM. Il décide de mettre en place un contrôle statistique pour l'acceptabilité des lots. Il s'appuie sur la norme NF ISO 2859-1 présentée dans le document 8.

Le niveau de qualité acceptable (NQA) a été fixé à 0,025 %, en concertation avec le client.

Un lot de 100 000 unités correspond à 5 heures de fonctionnement de la ligne de conditionnement. Un échantillonnage de n boîtes est effectué par prélèvement aléatoire en début, en milieu et en fin de production du lot. 20 boîtes ne présentent pas de DDM imprimée ou lisible.

**Q13** - Justifier leur mode de prélèvement et identifier le nombre n de boîtes prélevées.

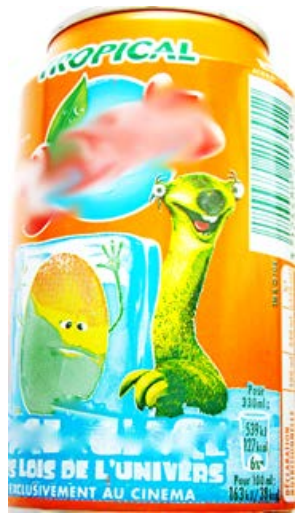

**Q14** - Conclure sur l'acceptabilité du lot. Proposer une action corrective.

Le document 9 présente les définitions des principes de management de la qualité selon la norme ISO 9001 : 2015.

**Q15** - Montrer à l'aide de deux exemples que l'entreprise a engagé des actions compatibles avec les grands axes de la norme ISO 9001 : 2015.



**Document 1 : BRSA commercialisée en canette.**

 	<p><b>Ingrédients</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eau de source (80%)</li> <li>• Jus de fruits à base de concentré : orange 6,4%, pomme, 5,5%, fruit de la passion 0,1%, mangue 0,07%</li> <li>• Sucre</li> <li>• Acidifiant : acide citrique</li> <li>• Arômes</li> <li>• Antioxydant : acide ascorbique</li> <li>• Stabilisant : gomme arabique</li> <li>• Colorant : extrait de paprika</li> </ul>	<p><b>Modifications</b></p> <p>Diminution de la teneur en acide citrique</p> <p>Changement de fournisseur de gomme arabique</p>
--	--	---

**Document 2 : les eaux de consommation.**

Les eaux de consommation sont classées dans trois grandes catégories :

- Les eaux de source, aptes à la consommation humaine sans traitement autre qu'une décantation ou une filtration voire un ajout de dioxyde de carbone. Ce sont donc des eaux d'origine souterraine, microbiologiquement saines et protégées contre les risques de pollution. La composition en solutés peut varier dans le temps et de ce fait la consommation des eaux de source n'apporte pas de bénéfice particulier pour la santé.
- Les eaux minérales naturelles ont une composition en minéraux et oligo-éléments apportant un bénéfice pour le consommateur. Leur teneur en sels minéraux étant parfois significative, il faut en tenir compte dans le bilan alimentaire total, notamment pour les insuffisants rénaux... Par ailleurs, certains minéraux et oligo-éléments, préconisés pour certains troubles sont fortement déconseillés pour d'autres. L'exploitation d'une telle eau est autorisée par le ministère de la santé qui permet les traitements suivants : décantation, filtration, élimination et/ou ajout de dioxyde de carbone.
- Les eaux d'adduction, obtenues par traitements microbiologiques et physico-chimiques d'eau d'origine variée (cours d'eau naturel, plan d'eau,...). Le traitement est effectué dans des unités de potabilisation. Un réseau de transport l'amène jusqu'aux consommateurs.

**Document 3 : la gomme arabique.**

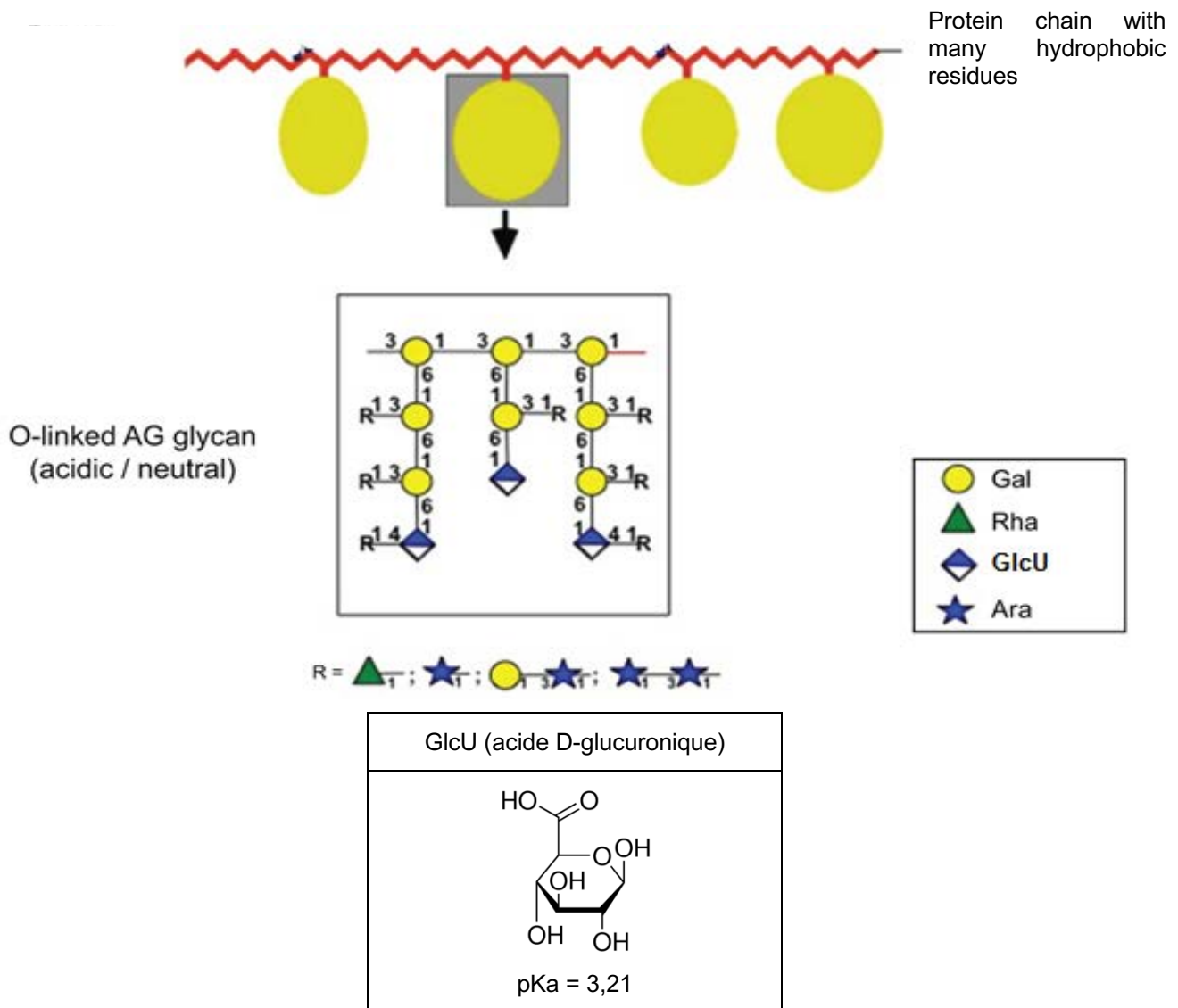
La gomme arabique est un exsudat de sève descendante solidifié, produit naturellement ou à la suite d'une incision, sur le tronc et au pied d'arbres de la famille des acacias.

On la trouve dans le commerce sous forme de poudre ou de cristaux non moulus plus ou moins ronds de couleur jaune pâle à jaune brunâtre.

Elle est listée comme agent de texture (agent d'enrobage, stabilisant, épaississant, ...) et utilisable dans une large gamme d'aliments, mais aussi dans les médicaments et les cosmétiques.

La gomme arabique est constituée de plusieurs molécules dont la plus volumineuse est l'Arabino-Galactane Protéine (**AGP**). Celle-ci est constituée d'une chaîne polypeptidique de 250 acides aminés, riche en résidus hydrophobes, et des blocs glucidiques liés par covalence à des résidus sérine ou hydroxyproline.

Structure schématique de l'AGP

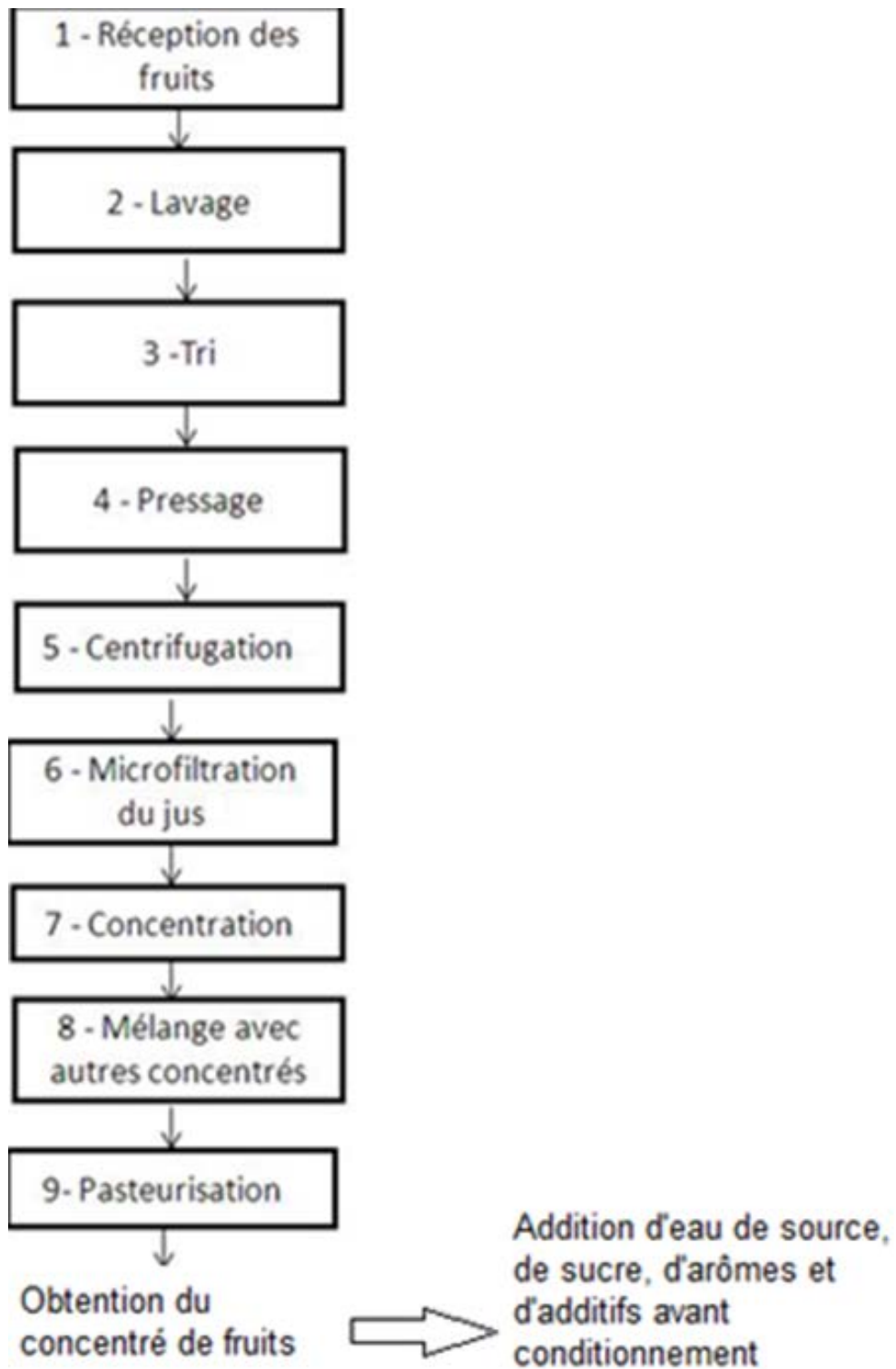


Sources : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2012.00140/full>

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Gomme\\_arabique](https://fr.wikipedia.org/wiki/Gomme_arabique)

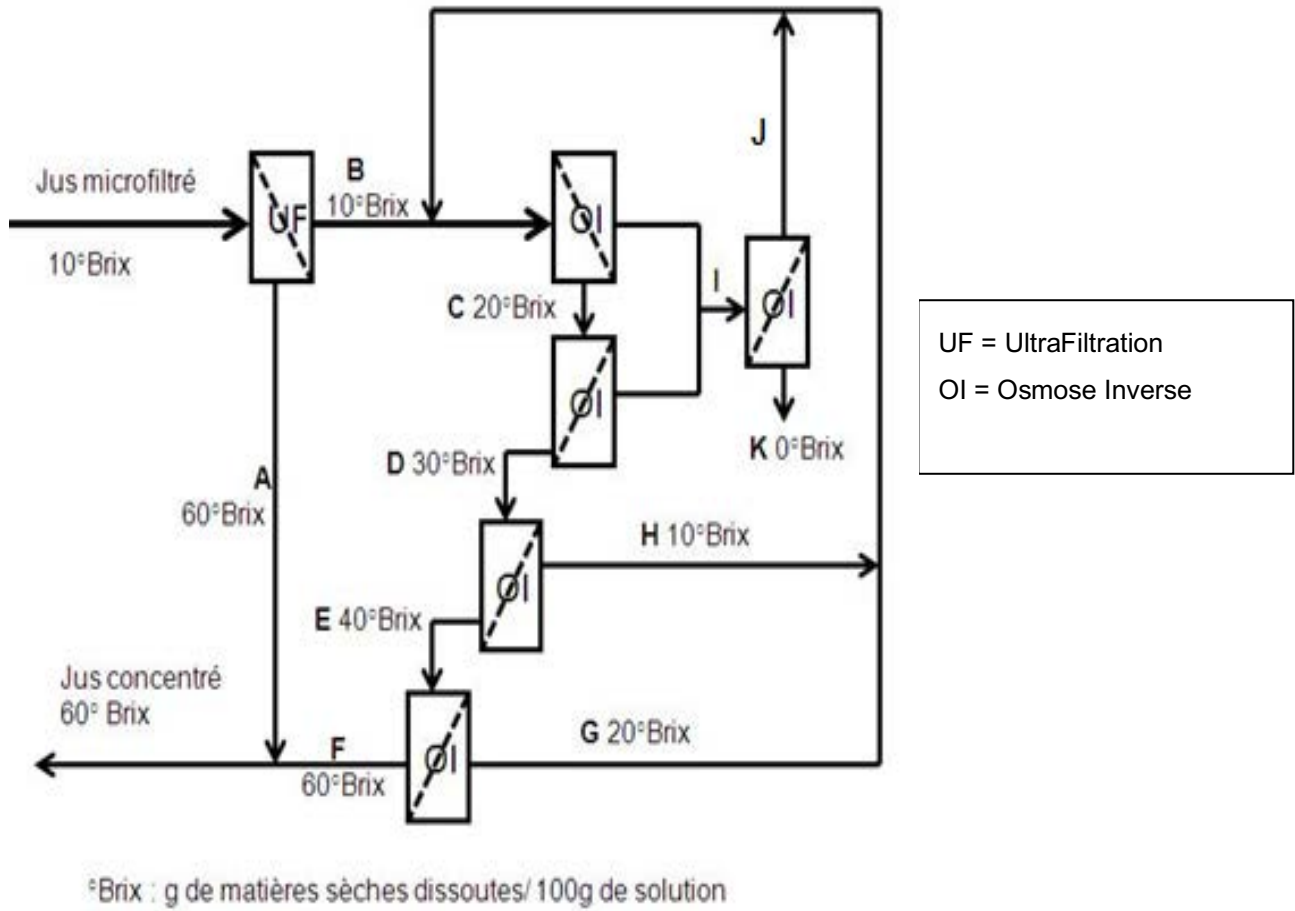
[https://webgate.ec.europa.eu/sanco\\_foods/main/index.cfm?event=substance.view&identifiant=159](https://webgate.ec.europa.eu/sanco_foods/main/index.cfm?event=substance.view&identifiant=159)

Document 4 : diagramme de fabrication du concentré de jus de fruits.



**Document 5 : diagramme du procédé de concentration par filtration.**

(Étape n°7 du document 4)



*D'après Filtration membranaire. Application en agro-alimentaire. Geneviève Gegan-Guiziou*

**Document 6 : rappel de définitions de paramètres relatifs au traitement thermique.**

La valeur **D**, ou temps de réduction décimale, mesure le temps, à une température donnée, pour réduire la concentration de germes de 90 %.

La valeur **z** est le nombre de degré entraînant une variation de D d'un facteur 10.

Document 7 : document à disposition des clients d'un fournisseur de gomme arabique.



**NEXIRA**

129 CHEMIN DE CROISSET – CS 94151  
76723 ROUEN CEDEX - FRANCE

*Bureau Veritas Certification Holding SAS – UK Branch certifies that the Management System of the above organisation has been audited and found to be in accordance with the requirements of the management system standard detailed below :*

*Standard*

**FSSC 22000**

Certification scheme for food safety systems including  
ISO 22000:2005, ISO/TS 22002-4:2013 and additional FSSC 22000  
requirements

*Scope of supply*

**RECEPTION, STORAGE, KIBBLING AND PACKAGING OF ACACIA GUM  
AND DAMAR GUM. INTERNAL TRANSFER.**  
**RECEPTION, STOCKAGE, CONCASSAGE ET CONDITIONNEMENT DE GOMME  
ARABIQUE ET DAMAR. TRANSFERT INTERNE.**  
Product category: K1

*This certificate is provided on the base of the FSSC 22000 certification scheme, version 3.2, published on 26 February 2015. The certification system consists of an annual audit of the food safety management systems and an annual verification of the PRP elements and additional requirements as included in the scheme and the ISO/TS 22002-4:2013.*

Certification cycle start date: **11 December 2015**

Subject to the continued satisfactory operation of the organization's Management System, this certificate expires on: **10 December 2018**

Original certification date: **11 December 2015**

Certificate No. **FR026071-1**  
Contract No. **6261081**

Jacques **MATILLON**  
Managing Director

Date : 16 December 2015



Certification body address: 66 Prescott Street, London, E1 8HG,  
United Kingdom  
Local office: Bureau Veritas Certification France  
60, avenue du Général de Gaulle – 92046 Paris La Défense - France

A blue ink signature of Jacques Matillon over a white background.



008

Further clarifications regarding the scope of this certificate and the applicability of the management system requirements may be obtained by consulting the organization.  
To check this certificate validity please call + 33(0) 1 41 97 00 60

**Document 8 : tableaux extraits de la norme NF ISO 2859-1 : Règles d'échantillonnage pour les contrôles par attributs.**

Lettres-code d'effectif d'échantillon pour un niveau de contrôle général II

effectif du lot		lettre code effectif échantillon
501 à	1 200	J
1 201 à	3 200	K
3 201 à	10 000	L
10 001 à	35 000	M
35 001 à	150 000	N
150 001 à	500 000	P

Lettre-code d'effectif d'échantillon	Effectif de l'échantillon	Niveau de qualité acceptable (NQA), pourcentage d'individus non conformes et non-conformités par 100 individus																									
		0,010	0,015	0,025	0,040	0,065	0,10	0,15	0,25	0,40	0,65	1,0	1,5	2,5	4,0	6,5	10	15	25	40	65						
		Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re						
A	2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↓	↓	1 2	2 3	3 4						
B	3	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6					
C	5	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8				
D	8	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11			
E	13	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15		
F	20	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	
G	32	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	↑
H	50	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	↑
J	80	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	↑
K	125	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	↑
L	200	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	↑
M	315	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	↑
N	500	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	↑
P	800	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	↑
Q	1 250	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	↑
R	2 000	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0 1	↑	↓	1 2	2 3	3 4	5 6	7 8	10 11	14 15	21 22	↑

↓ = Utiliser le premier plan d'échantillonnage figurant sous la flèche. Si l'effectif de l'échantillon est égal ou supérieur à l'effectif du lot  
 ↑ = Utiliser le premier plan d'échantillonnage figurant au-dessus de la flèche.

Ac = critère d'acceptation  
 Re = critère de rejet

**Document 9 : extraits de définitions des principes de management de la qualité ISO 9000 et 9001 v 2015.****2.3.1 - Orientation client****2.3.1.1 - Énoncé**

Le principal objectif du management de la qualité est de satisfaire aux exigences des clients et de s'efforcer d'aller au-devant de leurs attentes.

**2.3.2 - Leadership****2.3.2.1 - Énoncé**

A tous les niveaux, les dirigeants établissent la finalité et les orientations et créent des conditions dans lesquelles le personnel est impliqué pour atteindre les objectifs qualité de l'organisme.

**2.3.3 - Implication du personnel****2.3.3.1 - Énoncé**

Un personnel compétent, habilité et impliqué à tous les niveaux de l'organisme est essentiel pour améliorer la capacité de l'organisme à créer et fournir de la valeur.

**2.3.4 - Approche processus****2.3.4.1 - Énoncé**

Des résultats cohérents et prévisibles sont obtenus de manière plus efficace et efficiente lorsque les activités sont comprises et gérées comme des processus corrélés fonctionnant comme un système cohérent.

**2.3.5 - Amélioration****2.3.5.1 - Énoncé**

Le succès d'un organisme repose sur une volonté constante d'amélioration.

**2.3.6 - Prise de décision fondée sur des preuves****2.3.6.1 - Énoncé**

Les décisions fondées sur l'analyse et l'évaluation de données et d'informations sont davantage susceptibles de produire les résultats escomptés.

**2.3.7 - Management des relations avec les parties intéressées****2.3.7.1 - Énoncé**

Pour obtenir des performances durables, les organismes gèrent leurs relations avec les parties intéressées pertinentes, telles que les prestataires.

# Corrections



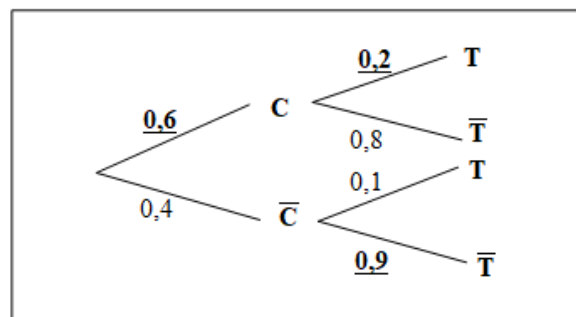
# Corrections session 2018

## Éléments de corrigé de mathématiques 2018

### EXERCICE 1

#### Partie A :

1. Remarque : valeurs du texte écrites en gras souligné



2.  $P(T) = P(C \cap T) + P(\bar{C} \cap T) = 0,6 \times 0,2 + 0,4 \times 0,1 = 0,16$

3. Calculons  $P_T(C) = \frac{P(C \cap T)}{P(T)} = \frac{0,6 \times 0,2}{0,16} = 0,75$

4.a) Comme estimation ponctuelle de  $p$  on prend la fréquence observée dans l'échantillon soit  $f = \frac{25}{40} = 0,625$

b)  $p \in \left[ 0,625 - 1,96 \sqrt{\frac{0,625 \times (1-0,625)}{40}}; 0,625 + 1,96 \sqrt{\frac{0,625 \times (1-0,625)}{40}} \right] \approx [0,548; 0,702]$

#### Partie B

1. Pour une loi exponentielle, comme rappelé dans le formulaire distribué,  $E(X) = \frac{1}{\lambda}$ . Dans le texte le délai moyen est de 10 jours donc  $\lambda = 0,1$

2. La représentation A correspond à la densité de probabilité de cette loi exponentielle.

3.  $P(T \leq 8) = 1 - e^{-0,1 \times 8} \approx 0,551$

#### Partie C

question 1 : réponse A

question 2 : réponse C

question 3 : réponse B

question 4 : réponse A

**EXERCICE 2****Partie A**

1. 90 minutes correspondent à 1,5 heure. D'après le graphique pour un temps de 1,5, on obtient une température de 22 °C.
2. a) Non car au bout de 2 h la température est toujours au-dessus de 10 °C
- b) Oui. Pour atteindre 10 °C, il faut environ 1,75 h soit 1 h et 45 minutes.
3. Par exemple avec une baisse de 5 % sur 15 minutes on aurait une température de  $63 \times 0,95^{15} \approx 29$  °C, en utilisant la formule explicite d'une suite géométrique. Or avec la courbe C2, on a environ 47 °C.
- 4.

1	N ← 0
2	T ← 63
3	Tant que T ≥ 10
4	Affecter à N la valeur N + 1
5	Affecter à T la valeur T x 0,98
6	Fin Tant que

**Partie B**

1. a)  $y' = -1,2 (y - 3)$  s'écrit aussi  $y' = -1,2 y + 3,6$  soit  $y' + 1,2 y = 3,6$

b) L'équation différentielle  $y' + 1,2 y = 0$  est du modèle  $y' + a y = 0$  avec  $a=1,2$ . Donc d'après le cours les solutions sont les fonctions de la forme  $t \mapsto k e^{-1,2 t}$  avec  $k$  une constante réelle.

c) La fonction constante  $t \mapsto 3$  est solution particulière de (E) donc elle doit vérifier cette équation.

Or  $0 + 1,2 \times 3 = 3,6$ . Les solutions de l'équation différentielle (E) sont donc de la forme :  $t \mapsto k e^{-1,2 t} + 3$ .

d) D'après le texte, on place les barquettes dans la cellule de refroidissement, c'est à dire au temps  $t = 0$ , lorsque la température du plat cuisiné atteint + 63 °C. D'où  $f(0)=63$ .

La fonction  $f$  solution de (E) vérifie donc la condition  $f(0)=63$ , d'où  $k e^{-1,2 \times 0} + 3 = 63$  soit  $k = 60$ . Conclusion  $f(t) = 60 e^{-1,2 t} + 3$

2. A la calculatrice, on obtient  $f(2) \approx 8,44$ . Au bout de 2 h la température de la barquette est d'environ 8,44°C.

3. Si  $t \rightarrow +\infty$  alors  $-1,2 t \rightarrow -\infty$  d'où  $e^{-1,2 t} \rightarrow 0$  donc  $f(t) \rightarrow 3$ . Si on laisse la barquette dans la cellule de refroidissement sa température se stabilisera à 3 °C.

4. Ce résultat correspond à la valeur moyenne de la fonction entre 0 et 1,5. La température moyenne de la barquette au cours de la première heure et demie sera de 30,8 °C.

5. Graphiquement la fonction  $g$  possède les mêmes propriétés que la fonction  $f$ . C'est à dire  $g(0) = 63$  et sa limite en  $+\infty$  serait 3.

Donc, on peut admettre que  $g(t)$  est de la forme  $60 e^{a t} + 3$  avec  $a$  une constante.

D'après la courbe on aurait  $g(1,5) = 22$ , d'où  $60 e^{1,5 \times a} + 3 = 22$ . D'où on obtient  $a \approx -0,76$ .

On peut donc proposer  $g(t) = 60 e^{-0,76 t} + 3$ .

Avec la calculatrice on constate que la représentation graphique de la fonction ainsi définie « correspond » bien à la courbe C2.

# Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2018

## A : DOSAGE D'UNE SOLUTION DE BLEU DE MÉTHYLÈNE)

1.1 La longueur d'onde correspondant à l'absorbance maximale est 660 nm environ.

1.2 Cette longueur d'onde d'absorbance maximale est celle du rouge-orangé. La couleur de ce colorant est la couleur complémentaire du rouge-orangé, c'est-à-dire le bleu.

2.1 Loi de Beer-Lambert :  $A = \varepsilon \times \ell \times C$

A : absorbance de la solution - sans unité

$\varepsilon$  : coefficient d'extinction molaire - en  $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

$\ell$  : longueur de la cuve - en m

C : Concentration - en  $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$

On admet d'autres unités sous réserve de cohérence entre elles.

2.2 La courbe obtenue est une droite passant par l'origine, ce qui est bien en accord avec la loi de Beer-Lambert (A proportionnel à C).

3.1 Par lecture graphique, on obtient  $C_D = 2,65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

3.2  $C_x = 400 \times C_D = 1060 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

3.3 La valeur obtenue est identique à l'étiquetage à 6 % près, ce qui est un résultat acceptable.

## B: OBSERVATION D'UNE LEVURE AU MICROSCOPE

1.1 Petit angle donc on peut confondre l'angle en radian et sa tangente.  $\alpha = \tan \alpha$

$\alpha = AB / d_m = 8 \cdot 10^{-6} / 0,25 = 3,2 \cdot 10^{-5} \text{ rad}$

La calculatrice étant autorisée, l'approximation n'est pas exigible.

1.2  $3,2 \cdot 10^{-5} < 3 \cdot 10^{-4}$  donc  $\alpha < \varepsilon$  donc la levure ne peut être distinguée à l'œil nu.

2.1.1 L'image définitive A'B' doit être à l'infini.

2.1.2 L'image intermédiaire  $A_1B_1$  doit alors être au foyer objet de l'oculaire  $F_2$ .

2.1.3 Schéma correct avec  $A_1$  confondu avec  $F_2$ , et A'B' à l'infini.

$$2.2.1 \quad \frac{1}{\overline{O_1A_1}} = \frac{1}{f_1} + \frac{1}{\overline{O_1A}} \Rightarrow \overline{O_1A_1} = \frac{1}{\frac{1}{f_1} + \frac{1}{\overline{O_1A}}} = \frac{1}{\frac{1}{5} + \frac{1}{-5,14}} = 184 \text{ mm}$$

2.2.2 Détermination graphique  $\Delta = \overline{F_1F_2} = \overline{O_1A_1} - \overline{O_1F_1} = 0,184 - 5,00 \cdot 10^{-3} = 0,179 \text{ m}$

Ou par calcul  $|\gamma_1| = \overline{O_1A_1} / \overline{O_1A} = 184 / (-5,14) = 35,8$

et  $\Delta = |\gamma_1| \times f_1 = 35,8 \times 5,00 \cdot 10^{-3} = 0,179 \text{ m}$

2.2.3  $|\gamma_1| = \Delta / f_1 = 0,179 / 5,00 \cdot 10^{-3} = 35,8$

2.2.3  $\alpha' = G_c \times AB / 4 = 450 \times 8 \cdot 10^{-8} / 4 = 900 \cdot 10^{-6} = 9 \cdot 10^{-4} \text{ radian}$

$9 \cdot 10^{-4} > 3 \cdot 10^{-4}$  donc  $\alpha' > \varepsilon$  donc on peut distinguer la levure à travers le microscope.

### C. DOSAGE DES IONS CHLORURE CONTENUS DANS UN SÉRUM PHYSIOLOGIQUE



1.2  $[\text{Ag}^+]_1 = [\text{Ag}^+]_{\text{eq}} = \frac{K_s(\text{AgCl})}{[\text{Cl}^-]} = \frac{K_s(\text{AgCl})}{C_1} = \frac{1,2 \cdot 10^{-12}}{5,9 \cdot 10^{-2}} = 1,2 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$

1.3  $([\text{Ag}^+]_2)^2 = ([\text{Ag}^+]_{\text{eq}})^2 = \frac{K_s(\text{Ag}_2\text{CrO}_4)}{[\text{CrO}_4^{2-}]} = \frac{K_s(\text{Ag}_2\text{CrO}_4)}{C_2} = \frac{1,2 \cdot 10^{-12}}{5,9 \cdot 10^{-2}} = 4,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$

$[\text{Ag}^+]_1 < [\text{Ag}^+]_2$  donc le chlorure d'argent précipite en premier.

2.1 L'équivalence du dosage est atteinte quand les réactifs sont introduits dans les proportions stoechiométriques.

2.2 A l'équivalence  $n(\text{Cl}^-) = n(\text{Ag}^+)$  soit  $C \times V_1 = C' \times V_{\text{eq}}$

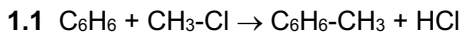
donc  $C = \frac{C' \times V_{\text{eq}}}{V_1} = \frac{0,050 \times 16,0}{5,0} = 0,16 \text{ mol.L}^{-1}$

2.3  $C_m = C \times M(\text{NaCl}) = 1,16 \times 58,5 = 9,36 \text{ g.L}^{-1} = 9,4 \text{ g.L}^{-1}$

2.4 L'étiquette indique une concentration massique en chlorure de sodium de  $9 \text{ g.L}^{-1}$  à 5 % près soit  $8,55 \text{ g.L}^{-1} < C_m(\text{étiquette}) < 9,45 \text{ g.L}^{-1}$

ou  $8,55 \text{ g.L}^{-1} < C_m < 9,45 \text{ g.L}^{-1}$  donc le résultat obtenu est cohérent avec la valeur indiquée sur l'étiquette.

### D: SYNTHÈSE DE L'ANTHRANILATE DE MÉTHYLE



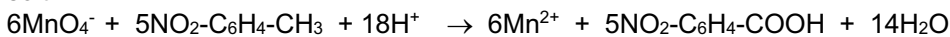
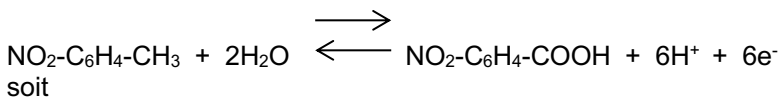
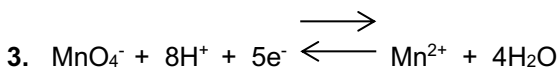
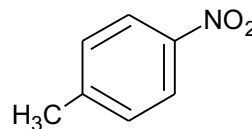
1.2 Le composé **A** est le méthylbenzène

1.3 Trichlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$

1.4 Substitution électrophile

2.1 Réactifs nécessaires à la réaction de nitration :  $\text{HNO}_3$  (acide nitrique) +  $\text{H}_2\text{SO}_4$

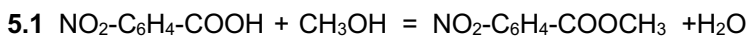
2.2 Formule du composé **B** isomère para = paranitrotoluène



4.1 Fonction amine

Fonction acide carboxylique

4.2 Acide 2-aminobenzoïque



5.2 Estérification

5.3 Lente, limitée, athermique

5.4 On peut augmenter le rendement :

- en travaillant avec un excès d'un des deux réactifs,
- en éliminant l'eau (ou l'ester) au fur et à mesure de sa formation,
- en remplaçant l'acide anthranilique par le chlorure d'acide correspondant.

# Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2018

## ÉTUDE D'UN EXTRAIT COAGULANT D'ORIGINE VÉGÉTALE, UTILISABLE EN FROMAGERIE

### I. Préparation de l'extrait coagulant contenu dans les fruits

**Q1** : Protéine d'intérêt = enzyme donc éviter la dénaturation et préserver l'activité.

**Q2** : Mécanisme = relargage ou *salting out*

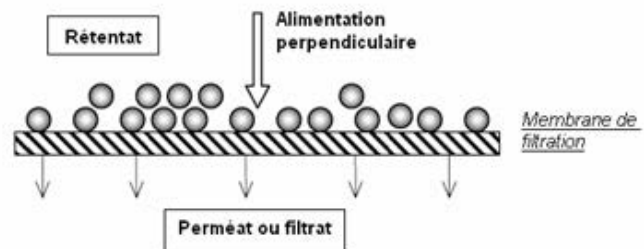
Le sulfate d'ammonium (ions) forme des liaisons avec l'eau au détriment des protéines qui s'agrègent entre elles et précipitent.

Surnageant = glucides, polyphénols, (protéines non précipitées), ions  
et Culot = protéines dont protéase d'intérêt + ions.

**Q3** : Dessalage de la solution protéique. Élimination du sulfate d'ammonium (ions = petites molécules)

**Q4** : But de l'ultrafiltration frontale :

But = récupération de la protéine d'intérêt concentrée  
ou concentration de la protéine d'intérêt



Seuil de coupure de la membrane = 10 000 Da donc retient les protéines (taille > 10 000 Da) et laisse passer les petites molécules (taille < 10 000 Da)

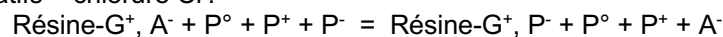
Perméat = eau, petites protéines (éventuellement résidus de glucides, polyphénols non éliminés par précipitation et dialyse)

Rétentat = protéine d'intérêt concentrée.

### II. Suivi de purification de la protéine d'intérêt à partir de l'extrait brut concentré

**Q5** : Résine Q-sépharose = résine échangeuse d'anions (ou de forme cationique) car elle porte des groupes amine quaternaire chargés positivement.

Les protéines chargées négativement à pH 8 sont donc retenues par la résine chargée positivement et échangées contre les contre-ions négatifs = chlorure Cl<sup>-</sup>.



Le gradient de NaCl croissant permet d'éluer progressivement les molécules les plus fixées sur la résine : les ions Cl<sup>-</sup> entrent en compétition.

Méthode alternative : gradient décroissant de pH → les protéines deviennent progressivement chargées positivement et se décrochent de la résine.

**Q6** : Le pic 1 correspond aux protéines non retenues donc chargées positivement (protéines basiques pHi > 8).

Les pics 2,3 et 4 correspondent aux autres protéines, chargées négativement.

**Q7** : Démonstration : 1 unité coagulante = quantité d'enzyme qui permet la coagulation de 1 mL de lait en 60 min à 37 °C et à pH 6,4.

Donc activité sur 1 mL de lait =  $\frac{60 \times 1}{tdc}$

et on utilise 200 µL d'extrait par mL de lait donc  
 activité pour 1 mL d'extrait =  $\frac{60 \times 1}{tdc} \times 5$

**Q8 :**

\* Activité spécifique en U•mg<sup>-1</sup> de protéine  $\frac{\text{Activité coagulante en U} \cdot \text{mL}^{-1}}{\text{Concentration en protéines en mg} \cdot \text{mL}^{-1}}$

\* Facteur d'enrichissement par rapport à l'extrait brut  $\frac{\text{Activité coagulante spécifique de la fraction}}{\text{Activité coagulante spécifique de EB}}$

Activité spécifique =  $\frac{15}{4,56} = 3,29 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$

Facteur d'enrichissement =  $\frac{3,29}{6,93} = 0,47$

Commentaires :

- Seul le pic 3 a une activité coagulante vis-à-vis du lait. L'activité spécifique et l'enrichissement sont très élevés par rapport aux autres pics. Temps de coagulation faible (10 min)
- L'activité coagulante est 25 fois plus élevée pour le pic 3 que pour le pic 2.

Hypothèse : La protéase d'intérêt se trouve donc purifiée dans le pic 3.

**Q9 :** L'ATCA est utilisé ici à 10 %. Son utilisation lors de l'arrêt de la réaction enzymatique présente un risque. Il est :

- Corrosif → gants + lunettes
- dangereux pour les voies respiratoires → hotte aspirante ou masque
- dangereux pour l'environnement → récupération

L'hydroxyde de sodium est utilisé ici à 4%, il est corrosif à partir de 2 %, donc son utilisation lors de la neutralisation de l'ATCA présente un risque ;→ gants + lunettes

**Q10 :** Méthode 2 points : mesure de la quantité de produit apparu au bout d'un temps donné. Réaction arrêtée pendant la phase stationnaire initiale (partie linéaire croissante) à un temps fixé par modification du pH ou de T°.

Conditions opératoires : température et pH fixes et proches de l'optimum, concentration en substrat saturante ([S] > 10 Km) ou substrat en large excès par rapport à l'enzyme.

	Témoin substrat	Témoin activité	Échantillon
Volume Substrat	250 µL	250 µL	250 µL
Volume tampon	150 µL		
Volume échantillon			150 µL
<b>40 °C pendant 1 H précise</b>			
ATCA 10%		1,2 mL	
Volume échantillon		150 µL	
<b>Centrifugation 8000 g pendant 5 min</b>			
Hydroxyde de sodium 1 mol•L <sup>-1</sup>		1,4 mL	

Rôle : Le témoin substrat sert à quantifier l'auto-hydrolyse du substrat, sans la présence de la protéase.

**Q11 :** Activité protéolytique plus importante pour l'enzyme du pic 3. Le pic 3 contient bien la protéase d'intérêt.

### III. Étude des caractéristiques structurales et cinétiques de la protéase

**Q12 :** Pour 100 mL de solvant de décoloration : 25 mL de méthanol, 10 mL d'acide acétique et 65 mL d'eau déminéralisée.

**Q13 :** Le SDS se fixe à la protéine par sa partie apolaire → dépliement de la protéine

Le SDS charge négativement les protéines. Toutes les protéines migrent vers l'anode donc migration en fonction du PM.

$\beta$ -mercaptoéthanol : agent réducteur des ponts disulfure

En absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol : 1 seule bande correspondant à 1 seule protéine dont le PM est compris entre 66,2 et 116 kDa

En présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol : 2 bandes entre 30 et 45 kDa correspondant à 2 SU protéiques.

Le  $\beta$ -mercaptoéthanol est agent dénaturant qui réduit les ponts disulfure entre les sous unités protéiques.

La protéine du pic 3 est donc constituée de 2 sous unités.

Protéine composée de 2 sous unités différentes (hétérodimère) reliées par un ou des ponts disulfures.

**Q14 :** Température optimale = 43 °C environ et pH optimal = 5,5

**Q15 :** Valeurs voisines :

Pour la chymosine : $V_{\text{Max}} = 0,477 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ $K_M = 0,166 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Pour la protéase : $V_{\text{Max}} = 0,351 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ $K_M = 0,216 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
---	--

On remarque :

- Valeur de  $V_{\text{max}}$  est plus élevée pour la chymosine que pour la protéase,  
→ Vitesse de catalyse enzymatique est plus faible pour la protéase que pour la chymosine.
- Valeur de  $K_M$  plus élevée pour la protéase que pour la chymosine,  
→ Affinité de la protéase pour le substrat est moins bonne que celle de la chymosine.

Choix d'une enzyme =  $V_{\text{max}}$  élevée et  $K_M$  faible.

La chymosine est plus efficace que la protéase d'origine végétale.

L'utilisation de la protéase d'origine végétale est possible même si elle est moins efficace (ou toute réponse cohérente).

### IV. Perspective de la coagulation végétale

**Q16 :** Condition de la voie fermentaire = anaérobiose.

Intérêt de la voie fermentaire = consommer les coenzymes réduits qui ne peuvent être réoxydés dans la chaîne respiratoire. Production de plus d'acide lactique.

**Q17 :**

- 1 lactose +  $\text{H}_2\text{O}$  → 1 glucose + 1 galactose P avec consommation de 1 ATP.
- 1 glucose + 2 ATP → 2 G3P + 2 ADP  
1 galactose P + 1 ATP → 2 G3P + 1 ADP
- 1 G3P + 1  $\text{NAD}^+$  + 1  $\text{NADH},\text{H}^+$  + 2 ADP + 1 Pi → 1 lactate + 1  $\text{NADH},\text{H}^+$  +  $\text{NAD}^+$  + 2 ATP  
Donc 1 glucose + 2 ATP + 4 ADP → 2 lactate + 2 ADP + 4 ATP  
Soit 1 glucose + 2 ADP → 2 lactate + 2 ATP  
Donc 1 galactose P + 1 ATP + 4 ADP → 2 lactate + 1 ADP + 4 ATP  
Soit 1 galactose P + 3 ADP → 2 lactate + 3 ATP
- 1 ATP consommé pour l'activation du lactose

**Bilan :** 1 lactose + 4 (ADP + Pi) → 4 lactate + 4 ATP.

# Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2018

## ALTÉRATION DES JUS DE FRUITS

### I. *Alicyclobacillus*, bactérie d'altération des jus de fruits

#### I.1. Caractérisation des souches altérantes

Q1. Le type respiratoire ou pas de différence car *Bacillus* est AS ou AAF

Q2. **Acidophile** ( $pH_{opt} \sim 4$ ) et **thermophile** ( $T_{opt} \sim 50^{\circ}C$ ) ;

Q3. **Groupe contenant des espèces regroupées selon leur degré de parenté** (- selon leur histoire évolutive = phylogénie -). Cette classification est donc basée sur l'étude de l'ADN.

Le % d'homologies de l'ARNr16S entre les souches est  $< 87\%$  entre les 3 *Bacillus* concernés et les autres genres. En revanche, entre eux, il y a plus de 87% d'identité au niveau de leur ARN16S (plus de 93% - 92% sur le document))

Les pourcentages sont nécessaires pour pouvoir les comparer aux seuils fournis.

Dendrogramme : La distance entre le groupe de 3 *Bacillus* et les *Bacillus* traditionnels (type *B. subtilis* ...) est grande ; il y a beaucoup de nœuds entre chaque (d'où un ancêtre commun éloigné).

#### Q4. Doc3

- Yeast extract .....	2,0	facteurs de croissance, N, C, énergie
- D(+) glucose .....	5,0	source C, énergie
- Calcium chloride .....	0,25	minéraux + pression osmotique
- Magnesium sulfate .....	0,5	minéraux + pression osmotique
- Ammonium sulfate .....	0,2	source minérale <u>d'azote</u>
- Potassium dihydrogenophosphate .....	3,0	pouvoir tampon
- Agar-aga .....	18,0	solidifiant
- Trace Minerals solution .....		minéraux
- pH (à 25 °C) .....	<b>4,0 ± 0,2</b>	

La souche est donc **chimio-organo-hétérotrophe**, c'est-à-dire qu'elle utilise des molécules (chimiques) comme source d'énergie, elle utilise des molécules organiques comme donneurs de protons et d'électrons (ici le glucose par voie aérobie => respiration) et elle utilise aussi des molécules organiques comme source de carbone (ici, c'est également le glucose).

Analyse du doc : La bactérie est cultivée sur Bat-Agar à pH4 et sur PCA à pH 7, seules les colonies d'*Alicyclobacillus* spp pourront se développer à pH 4 et pas à pH 7

Explication : La souche étant **acidophile** ; la culture sur PCA (pH 7) est impossible.

Q5. T+ : Prendre une **souche d'*Alicyclobacillus*** connue, **productrice de gaïacol** (ou un milieu contenant du gaïacol), faire le test comme mentionné (culture en présence d'acide vanillique / incubation / révélation avec de réactifs  $H_2O_2$  et peroxydase).

Une réaction positive est attendue, par l'apparition d'une couleur **marron**, après révélation.

T- : Prendre une **souche d'*Alicyclobacillus*** connue (ou autre ou un milieu sans gaïacol), **non-productrice de gaïacol**, faire le test de la même façon que le témoin positif.

Une réaction négative est attendue, par l'absence de couleur marron, après révélation.

#### I.2. Étude de la thermorésistance d'*Alicyclobacillus*

Q6. La thermorésistance est liée notamment :

- **À la structure de la spore** : la présence des tuniques et du cortex (et éventuellement de l'exosporium) jouent le rôle de barrière physique.

- **À l'état de déshydratation de la spore** : elle ne contient que 10-15 % d'eau contre 80-85 % pour la forme végétative, ce qui explique sa résistance à la chaleur (+ le *ralentissement de son métabolisme car  $a_w$  faible = ralentissement des réactions chimiques*).



- À la présence de molécules chimiques protectrices comme

- o le dipicolinate de calcium qui est présent dans le cytoplasme
- o les protéines SASPs (= Small Acid Spore Protein)

À la coloration de Gram (non-dit dans le document), la spore n'est pas colorée (pas de pénétration des colorants)

**Q7.** Le lysozyme clive les liaisons osidiques  $\beta$ -1-4 entre ANAM et NAG du **peptidoglycane**, donc il **lyse** les bactéries Gram+.

Cela permet d'éliminer les formes végétatives, sans détruire les spores imperméables.

**Q8.** Le **Dt** est le **temps nécessaire pour diviser par 10 une population** (ici, les spores) **à une température donnée**.

On constate que **plus la T°C augmente, plus le Dt diminue**, c'est-à-dire que si on augmente la température, il faut alors moins de temps pour détruire la même proportion de spores.

C'est un **Dt très élevé** : le temps de traitement très long est plus fort que la pasteurisation classique 72 °C, 15 sec ; le jus d'orange risque de perdre des qualités organoleptiques / nutritionnelles par un barème aussi poussé.

**Q9.** On constate que sans nisine, on retrouve la valeur de Dt précédente à savoir de 12,9 min.

Au fur et à mesure que **la concentration en nisine augmente, le Dt diminue** donc la thermorésistance faiblit, c'est-à-dire qu'il faudra moins de temps à la température testée (ici, 95 °C) pour avoir la même efficacité de traitement (soit diviser par 10, la population bactérienne). Pas de changement au-delà de 100 UI/mL

L'ajout de nisine permettant de diminuer le Dt et donc d'augmenter l'efficacité du traitement thermique, il paraît envisageable **d'utiliser conjointement la nisine** (à une concentration adéquate) **et un traitement thermique pour éliminer les spores d'*Alicyclobacillus*** dans les jus de fruits. Autre interprétation possible si argumentée : le gain de temps de 3 min est faible au regard de la quantité de nisine à rajouter (100 UI/mL).

## II. Étude du risque patuline

### II.1. Identification du risque

**Q10.** La patuline est une **mycotoxine**, effet chronique : **génétoxique, cancérogène, immunosuppresseur**. (un des 3 effets est attendu)

**Q11.**

Doc 8A : *Aspergillus* : forme de « tête » caractéristique...

Doc 8B : *Penicillium* : forme de « main/pinceau » caractéristique...

1- conidiophore ; 2- vésicule ; 3- appareil sporifère (tête aspergillaire) ; 4- conidie / spore / condiospore

### II.2. Lutte contre la prolifération des moisissures

**Q12.** Les deux modes d'action du TBZ sont :

- Inhibition de la polymérisation des **microtubules**,
- Inhibition de la **respiration** (fumarate)

Les microtubules et les mitochondries étant des éléments **absents** d'une cellule **procaryote**, il est donc logique que le TBZ soit **inefficace** sur les bactéries telles qu'*Alicyclobacillus*.

### II.3. Évaluation de l'influence de la température sur la croissance et la production de patuline par l'espèce *P. expansum*

#### II.2.1. Essais in vitro

**Q13.**

**Volume correspondant à un carré** :  $1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ }\mu\text{L}$

Nombre total de spores = 100 pour 4 carrés, soit Nombre moyen de spores par carré : 25

$C = 25 / 0,1 \cdot 10^{-3} = 250000 = 2,5 \cdot 10^5$  spores de *P. expansum* /mL

On souhaite ajuster la suspension à  $10^5$  spores de *P. expansum* /mL soit la réalisation d'une dilution 2/5 :  
 $d = C_f / C_i = 1 \cdot 10^5 / 2,5 \cdot 10^5 = 1 / 2,5 = 2/5^{\text{ème}}$

**Q14.** La fourchette de 4 à 30 °C reflète les **températures de stockage potentielles** des pommes et autres fruits : dans des **réfrigérateurs (à 4 °C)** ou à **l'extérieur** / dans des hangars où des températures de 25-30 °C sont parfois atteintes.

**Q15.** Doc A : La souche étudiée de *P. expansum* se développe dans la gamme des températures étudiées mais on note tout de même la présence **d'une phase de latence** de 5 et 2 jours **aux températures les plus basses de 4 °C et 8 °C**, respectivement, et de 1 jour à la température la plus élevée (30 °C). Pas de phase de latence en revanche pour 16 et 25 °C.

⇒ **Le froid n'empêche pas la croissance de *P. expansum*, mais il retarde son apparition et ralentit sa croissance.**

Doc B : La souche étudiée de *P. expansum* se développe dans la gamme de température étudiée (comme mentionné sur le document A). Le taux de croissance de *P. expansum* en fonction de la température semble **avoir une distribution en forme de cloche** avec un maximum de 0,67 cm par jour de développement pour la température de 25 °C. (croissance faible à 30 °C)

⇒ **Sa température optimale de croissance est de 25 °C : germe mésophile.**

Doc C : La production de patuline par *P. expansum* est variable selon la température et surtout **plus restrictive que celle de la croissance** : forme de cloche caractéristique, avec un **optimum de concentration à 16 °C, et pas de toxigenèse à 4 °C et à 30 °C.**

Conclusion : **La température de stockage des pommes à préconiser est de 4 °C** car à cette température il y a inhibition de la production de patuline et phase de latence la plus longue donc permet de retarder l'apparition du germe sur le fruit (même si taux de croissance par jour est légèrement plus élevé qu'à 30 °C)

## II.2.2. Essais in vivo, sur diverses variétés de pommes

**Q16.** Désinfection/asepsie de la pomme, pour standardiser les conditions

Action oxydante

Concentration, temps de contact, (T°C), propreté

**Q17.** La croissance de *Penicillium* sur les pommes **est plus lente que celle obtenue sur milieu de culture**, et ce quelles que soient la température et la variété de pommes.

A 8 °C : il y a environ 90 à 80 % d'inhibition de la croissance

A 25 °C il y a environ 30 à 20 % d'inhibition de la croissance quelle que soit la variété de pomme.

donc l'effet matrice est plus important à 8 °C.

(les raisons pour lesquelles cet effet matrice est plus important ne sont pas demandées).

**Q18.** Trois points critiques énumérés par le guide de recommandation (HACCP):

- Contrôle des matières premières (fruits du verger) : non moisi, non abîmé
- Lavage des fruits => référence aux germes telluriques
- Régulation de la température et durée de stockage (cf stockage de la patuline)

*Toute autre proposition cohérente est acceptée.*

# Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2018

## Grippe Aviaire : techniques de détection et d'identification, enjeux majeurs dans la lutte contre la pandémie

### 1. Les virus de la grippe

**Q1.** L'épissage conduit à accoler des portions d'ARNm différents et permettre ainsi la synthèse de plusieurs protéines différentes à partir d'un même ARNm. Le virus code ainsi plus de protéines sur un génome restreint ; ainsi le segment 7 permet la synthèse des protéines M1, M2 et M42. L'intérêt est une "économie de place".

**Q2.** ARN – (ne pouvant être traduit) → ARN+ (traductible ou utilisable pour la réplication)

ARN polymérase ARN dépendante : pas d'équivalent dans les enzymes cellulaires

### 2. Isolement du virus par culture cellulaire

#### 1.1 Sur œuf embryonné

**Q3.** Les antibiotiques permettent d'éliminer ou d'inhiber la prolifération des bactéries nécessairement présentes dans les prélèvements biologiques (*les conditions de culture de virus étant très favorables au développement bactérien*).

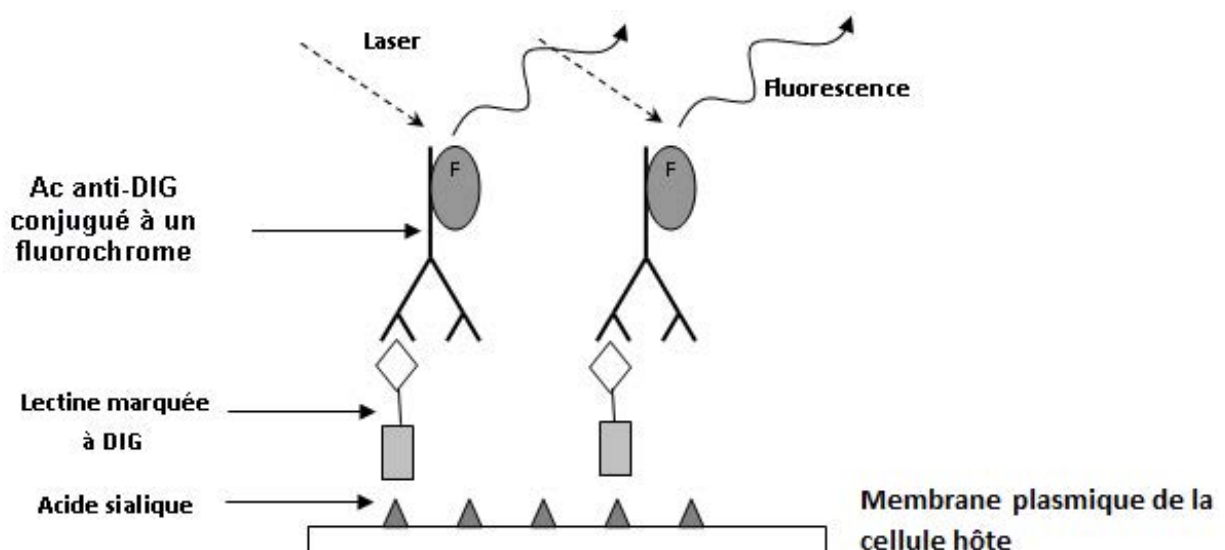
Les prélèvements fèces ou cloaque sont très riches en bactéries. L'augmentation de la dose d'ATB est donc nécessaire pour garantir leur élimination complète.

**Q4.** SPF = *specific pathogen free* : œuf dépourvu d'agents pathogènes spécifiques de l'espèce. Cette caractéristique permet de s'assurer que le virus multiplié provient bien du prélèvement et non de l'œuf lui-même.

#### 1.2 Sur lignée cellulaire

**Q5.** Rôles et effet du SVF en culture cellulaire : apport de facteurs de croissance, facteurs d'adhésion des cellules au support et apport d'inhibiteurs de trypsine. Les lavages permettent d'éliminer cet inhibiteur de la trypsine avant trypsination.

**Q6.** Schéma de l'édifice moléculaire avec Sia, lectine, DIG, Ac anti-DIG, FITC.



**Q7. Commentaires des contrôles :**

- Contrôle négatif sans lectine : détection des cellules mais signal faible (autour de  $10^2$ ) non significatif → les 3 types cellulaires n'ont pas de fluorescence naturelle. Ces contrôles sont nécessaires pour évaluer la différence avec les cellules marquées.
- En présence de lectine SNA : Cellules contrôles : signal non significatif avec les cellules CHO témoin négatif et signal à  $10^4$  environ avec les cellules MDCK témoins positif (*référence pour interprétation des cellules testées*)
- En présence de lectine MAA : Cellules contrôles : signal voisin de  $10^5$  avec les cellules CHO et MDCK, témoins positifs (*référence pour interprétation des cellules testées*)

=>Témoins conformes → Validation de la méthode de détection des récepteurs Sia.

Interprétation des résultats pour les cellules HEK-293 :

- signal voisin de  $10^5$  → présence de lectines SNA → présence de nombreux Sia2-6Gal
- signal voisin de  $10^4$  → signal légèrement inférieur aux cellules de référence → présence de lectines MAA → présence modérée de Sia2-3Gal

=> Les cellules HEK-293 possèdent les deux récepteurs sialiques testés. Elles peuvent donc être utilisées pour détecter des virus se fixant sur l'un ou l'autre acide sialique, et peuvent, en plus, être cultivées en suspension, sans passage par la culture en boîte, permettant un gain de temps.

*Le manque d'un contrôle négatif pour lectine MAA peut être relevé mais non exigé.*

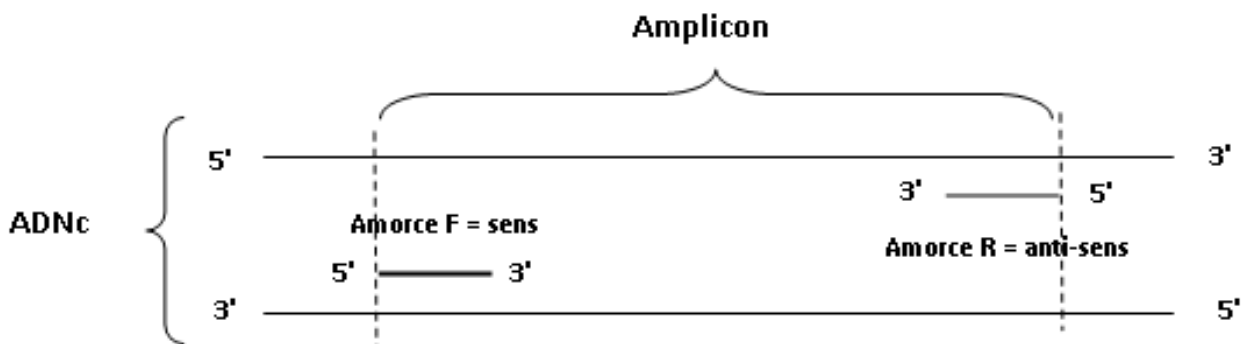
**Q8.** Culture des cellules HEK / addition du virus / flasque témoin sans virus / recherche d'effet cytopathogène ou toute autre méthode de quantification du virus (qPCR...)

**3. Détection par génie moléculaire : RT-PCR multiplex**

**Q9.** Rôle de l'étape 2 : transcription inverse : ARN viral → ADN complémentaire

*Intérêt des amorces aléatoires non exigé.*

**Q10.** Schéma indiquant l'ADN matrice double brin avec son orientation et les amorces hybridées avec leur orientation.



**Q11.** L'ADN chargé négativement, est placé à la cathode et il migre vers le pôle +.

**Q12.** Composition du contrôle négatif : mix PCR identique (amorces, dNTP et TaqPol) sans ADN ou avec un autre ADN.

**Q13.**

Puits	Observation	Interprétation
1	Bandes d'ADN de différente taille	Le protocole de migration électrophorétique permet de séparer les amplicons attendus
6	Absence de bande	Contrôle conforme , sans l'ADNc viral recherché il n'y a pas d'amplicon → PCR <b>spécifique</b>
5	3 bandes de taille 311,232 et 173 pb	Type A/Mat I, sous-type H3N2 → contrôle + <b>conforme</b> → <b>efficacité</b> de la méthode de détection, le protocole de détection est correct (amorces sont bien choisies, d'amplification suffisante, enzymes actives...)
<b>Les contrôles étant conformes → la manipulation est validée et les puits 2,3 et 4 peuvent être interprétés</b>		
2 et 3	3 bandes de taille 311, 232 et 173 pb	Présence d'ARN viraux Type A/Mat I, sous-type H3N2
4	3 bandes de taille 311,164 et 106 pb	Présence d'ARN viraux Type A/Mat I, sous-type H1N1
Conclusion	<i>Deux virus sont des virus de type A sous type H3N2 (comme le contrôle +) Le troisième virus est un virus de type A sous type H1N1 Récapitulatif non exigible</i>	

**Q14.** La technique RT PCR multiplex a permis de préciser les types et sous-types des souches en une seule manipulation. Rapidité de l'identification

# Éléments de corrigé de sciences et technologies bioindustrielles 2018

## CONTRÔLES QUALITÉ D'UN SURIMI

**Q1-** origine ABVT : hydrolyse des protéines (ou matières azotées)

Intérêt : indicateur de fraîcheur du poisson

Contrôles non biochimiques : contrôles visuels (œil, mucus, écailles..), contrôle de la texture, de l'odeur...

Contrôles microbiologiques (FMAT) admis.

**Q2-** Pour  $n = 13$  et  $NQA = 1\%$ ,  $A = 0$  et  $R = 1$

1 valeur supérieure à 20 mg N/100 g (échantillon 8), donc le lot LK526 est non conforme.

**Q3- Méthode de référence :**

Biais =  $15,8 - 15 = 0,8$  mg N/100 g

CV =  $(s/moy) \times 100 = 5,2\%$

**Méthode HPLC :**

Biais =  $15,2 - 15 = 0,2$  mg N/100 g

CV =  $0,41/15,2 \times 100 = 2,7\%$

Biais<sub>HPLC</sub> < Biais<sub>méthode de référence</sub> donc valeurs obtenues par HPLC sont plus proches de la cible, donc méthode HPLC est plus juste.

CV<sub>HPLC</sub> < CV<sub>méthode de référence</sub>, donc résultats obtenus par HPLC sont moins dispersés, donc méthode HPLC est plus fidèle.

**Q4-** HPLC est plus juste et plus fidèle donc les résultats sont plus fiables.

Autres critères de choix : rapidité, autres critères métrologiques (limite de détection, de quantification, sensibilité, linéarité..), coût, sécurité ...

**Q5-**

- 1- bande porteuse (ou équivalent)
- 2- ventilateurs (ou moteur du ventilateur)
- 3- entrée des produits
- 4- sortie des produits
- 5- arrivée d'azote liquide
- 6- pulvérisation d'azote

**Q6-** Avantages : rapidité, possible sur produit emballé, pour produit fragile...

Inconvénient : coût, sécurité, maintenance, stockage et disponibilité du fluide...

Congélation rapide donc petits cristaux intra et extra cellulaires ce qui limite la quantité d'exsudat lors de la décongélation (membranes cellulaires mieux préservées- moins de perte de liquide intracellulaire). Le produit est mieux préservé d'un point de vue organoleptique et nutritionnel

**Q7-** Choix du congélateur à plaques :

- la forme du produit est adaptée (surface de contact importante)
- les plaques de poisson ne sont pas fragiles car sont destinées à être cassées.

**Q8- N° lot**

Plus la température de conservation est basse, plus la croissance microbienne est ralentie voire stoppée donc plus le temps de conservation est long. Pas de comparaison des températures attendue.

« Ne jamais recongeler un produit décongelé » : à chaque décongélation la croissance microbienne reprend ainsi un produit congelé/décongelé plusieurs fois possède une flore microbienne supérieure à celle du produit de départ.

**Q9-** D'après le document, une justification au choix :

- le colin était déjà surgelé avant d'être transformé en plaque de poisson: n'est pas « frais »
- autre possibilité : vitesse de congélation moins rapide.

**Q10-**

	Pasteurisation	Stockage à 4 °C produit fini
<b>Q1</b>	OUI	OUI
<b>Q2</b>	OUI	NON
<b>Q3</b>		OUI
<b>Q4</b>		NON
<b>CI</b>	<b>CCP</b>	<b>CCP</b>

Avec une justification et une explication valable on peut admettre aussi pour l'étape de stockage Q1 : OUI et Q2 : OUI

**Q11-** Température

Outil qualité = carte de contrôle. Attention, la question porte sur l'outil qualité, thermomètre ou sonde de température sont des outils de mesure

**Q12-** Durée =  $n \times D_{60} = 10 \times 3 = 30$  minutes

**Q13- Électrophorégramme :**

Puits 1 : pas de bande donc ce témoin (négatif) conforme à ce qui est attendu.

Puits 2 : pour l'ADN de poisson asiatique, on obtient une bande (ou un fragment entre 100 et 250 pb).

Puits 3 : pour l'ADN de colin d'Alaska, on obtient 2 bandes distinctes de celle du panga (ou 2 fragments respectivement de 450 pb et 100 pb).

Puits 4 : pour l'ADN extrait du surimi, on observe 2 bandes identiques au profil obtenu pour l'ADN issu du colin d'Alaska.

Conclusion : le surimi ne contient pas de panga (contient bien du colin d'Alaska – non prouvé mais toléré).

**Q14- Étapes pour une certification :**

- choix d'un référentiel
- application du référentiel dans l'entreprise (et évaluation par audit interne)
- audit externe de certification par un organisme certificateur (ou accrédité)
- (certification délivrée ou non)

**Q15-** D'après le référentiel bio européen, il faut au moins 95 % de produits agricoles pour justifier l'appellation « Eurofeuille » Ici 30 % des ingrédients ne sont pas issus de l'agriculture Biologique.

# Corrections session 2019

## Éléments de corrigé de mathématiques 2019

### EXERCICE 1 :

#### Partie A :

1. Soit  $t$  un réel positif. Cette équation différentielle équivaut à :  $y' - (20,8/20)y = 0$  soit  $y' - 1,04y = 0$ . Les solutions de cette équation sont donc les fonctions du type  $y(t) = ke^{1,04t}$  où  $k$  est une constante réelle.
2. Avec la condition  $f(0) = 10$ , en la remplaçant dans l'équation précédente, on obtient :  $ke^{1,04 \times 0} = 10$ , soit  $k = 10$  donc  $f(t) = 10e^{1,04t}$ .

#### Partie B :

1. Voici le tableau des valeurs :

Heure ( $t_i$ )	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Quantité de SA ( $N_i$ )	10	27	78	232	650	1800	5100	14100	39000
$z_i = \ln(N_i)$	2,30	3,30	4,36	5,45	6,48	7,50	8,54	9,55	10,57

2. A l'aide de la calculatrice, on trouve :  $z(t) = 1,037t + 2,301$ .

3. Comme  $z_i = \ln(N_i)$  alors  $N_i = e^{z_i}$  donc  $N(t) = e^{1,037t + 2,301}$ .

4. On résout l'équation  $N(t) = 20$  donc  $10e^{1,04t} = 20$

$$\text{soit } e^{1,04t} = 2 \Rightarrow 1,04t = \ln 2 \Rightarrow t = \frac{\ln 2}{1,04} \approx 0,666$$

On obtient environ  $G \approx 60 \times 0,666 \approx 40$  minutes.

5. Comme  $t \rightarrow +\infty$ , alors  $1,04t \rightarrow +\infty$ ,  $e^{1,04t} \rightarrow +\infty$  et  $10e^{1,04t} \rightarrow +\infty$  donc la limite de  $N$  en  $+\infty$  est  $+\infty$ .

#### Partie C :

1. Afin de trouver le sens de variation de la fonction  $M$  sur  $[0 ; +\infty[$ , on étudie le signe de sa dérivée  $M'$ : le dénominateur est strictement positif du fait car c'est un carré, et le numérateur est également strictement positif puisque c'est le produit de constantes positives et  $e^{1,04t} > 0$ .

Ainsi  $M'(t) > 0$  donc la fonction **M est strictement croissante sur  $[0; +\infty[$ .**

2.a. Quand  $t$  tend vers  $+\infty$ , alors :  $-1,04t \rightarrow -\infty$ ,  $e^{-1,04t} \rightarrow 0$  donc  $1350e^{-1,04t} + 1 \rightarrow 1$ . Ainsi la limite de  $M$  en  $+\infty$  est **13500**.

2.b. Dans la réalité, le nombre de bactéries ne peut pas augmenter de manière illimitée. **C'est le modèle logistique de la fonction M qui semble le plus vraisemblable** comparé au modèle exponentiel où la fonction a pour limite  $+\infty$  quand  $t$  tend vers  $+\infty$ .

3. Par lecture graphique, on voit que cela correspond à **8 heures**.

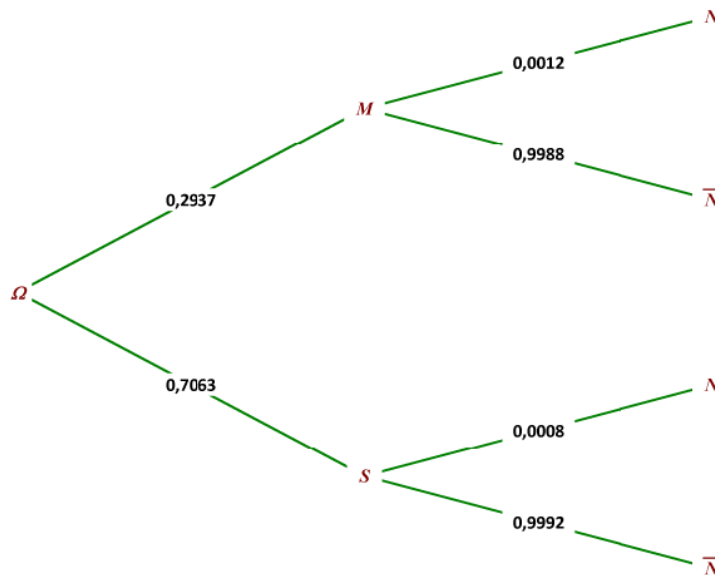
4. La **réponse b.** est la réponse correcte. En effet, c'est à **7 heures** que la courbe de la fonction  $M$  admet la tangente la plus pentue, c'est à dire avec le coefficient directeur le plus élevé.



**EXERCICE 2 :**

**Partie A :**

- $p(M) = 37000/126000$  soit environ **0,2937** et  $p(S) = 89000/126000$  soit environ **0,7063**.
- En utilisant un arbre pondéré :



- A l'aide de la formule des probabilités totales, on obtient :  
 $p(N) = p(M) \times p_M(N) + p(S) \times p_S(N) = 0,2937 \times 0,0012 + 0,7063 \times 0,0008 \approx \mathbf{0,0009}$ .
- $p_N(M) = \frac{p(M \cap N)}{p(N)} = \frac{0,2937 \times 0,0012}{0,0009} \approx \mathbf{0,3916}$ .

**Partie B :**

- La moyenne pour cette série donne  $\bar{x} \approx \mathbf{4,5213}$  et l'écart-type  $s' \approx \mathbf{0,0975}$ .
- La valeur estimée de  $\sigma$  est égale à  $s = s' \sqrt{\frac{600}{599}} \approx \mathbf{0,0976}$ .
- a. Le graphique choisi est celui qui a son pic dont l'abscisse est située à 4,5, ce qui correspond à la moyenne (n°1 et n°2). De plus, l'écart-type étant de 0,004, on sait que 99% des valeurs se situent dans l'intervalle  $[\mu - 3\sigma ; \mu + 3\sigma] \approx [4,512 ; 4,488]$ . On en déduit qu'il s'agit de la **courbe n°2**.
- b. Pour que cette probabilité soit environ égale à 0,95, ce nombre « a » doit être égal à  $2 \times \sigma$ , donc à **0,008**.
- c. Si le taux moyen de nitrate de l'échantillon appartient à l'intervalle  $[4,5 - 0,008 ; 4,5 + 0,008]$  soit  $[4,492 ; 4,508]$  alors on accepte l'hypothèse  $H_0$  sinon on accepte  $H_1$ .
- d.  $\bar{x} \approx 4,5213$  donc **l'hypothèse que le taux moyen de nitrate de la production soit égal à 4,5 est rejetée au risque de se tromper de 5%**.

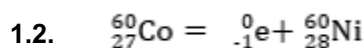
**Partie C :**

- Le biologiste semble avoir tort car pour considérer la probabilité qu'un lot de 540 bouteilles prélevées au hasard contienne moins de 520 bouteilles de très bonne qualité, il faut additionner les probabilités liées à 0, 1, ..., 518, 519 bouteilles de très bonne qualité. **Graphiquement, on constate qu'en additionnant, on dépasse les 0,005.**
  - n=540** car on peut obtenir au maximum 540 bouteilles de très bonne qualité.
- De plus, on sait que l'espérance de Y correspond au nombre moyen de bouteilles de très bonne qualité car on considère que la production est jugée suffisamment importante.
- $E(Y) = np = 528$  donc  $p = 528/540$  soit environ 0,978. Ainsi Y suit la loi binomiale **B(540, 0,978)**.

# Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2019

## Partie 1

1.1. À l'issue de leur traitement, ces produits ne présentent aucune radioactivité artificielle ajoutée. Toute réponse sensée est acceptée



1.3. C'est le temps nécessaire pour que la moitié des noyaux présents initialement se soient désintégrés

1.4.  $\lambda = \ln 2/T = \ln(2)/(2000 \times 24 \times 3600) = 4 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$

Le sujet indiquant « environ 2000 jours », seul un chiffre significatif est attendu.

1.5. L'activité d'une source est le nombre de désintégrations par unité de temps.

1.6.  $N = A / \lambda = (2,50 \cdot 10^{17}) / (4 \cdot 10^{-9}) = 6 \cdot 10^{25}$  noyaux

1.7.  $n = N/N_A = 6 \cdot 10^{25} / 6,02 \cdot 10^{23} = 1 \cdot 10^2$  mol soit  $m = n \cdot M = 1 \cdot 10^2 \times 60 = 6 \cdot 10^3$  g.

1.8. D'après le document 2:  $E = 1,33 \text{ MeV}$

$$\nu = E / h = (1,33 \times 1,61 \cdot 10^{-13} / 6,63 \cdot 10^{-34}) = 3,23 \cdot 10^{20} \text{ Hz}$$

$$\lambda = c / \nu = 3,00 \cdot 10^8 / 3,23 \cdot 10^{20} = 9,29 \cdot 10^{-13} \text{ m} = 0,929 \cdot 10^{-12} \text{ m}$$

1.9. La longueur d'onde fait partie du domaine un peu au-dessous de la limite X/γ : il s'agit bien de rayons γ.

## Partie 2

2.1. «Ce traitement maintient les qualités organoleptiques du produit d'origine. Il offre ainsi pour les produits sensibles à la chaleur une alternative intéressante aux traitements thermiques classiques. »

2.2.  $P_A - P_B = p \times g \times h$  soit  $P_A - P_B = 1030 \times 9,81 \times 10000 = 1,01 \cdot 10^8$  Pa soit environ 1000 bars.

2.3.  $F = p \times S = 6000 \cdot 10^5 \times 1 \cdot 10^{-6} \times 0,15 \cdot 10^{-6} = 9 \cdot 10^{-5}$  N

2.4.  $m = P / g = 9 \cdot 10^{-5} / 9,81 = 9 \cdot 10^{-6}$  kg.

Ce qui est énorme,  $\approx 10^{12}$  fois plus, comparativement à la masse de la bactérie.

## Partie 3

3.1.  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{OH}$  et  $\text{CH}_3\text{CHO}$  soit  $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{O}$

3.2.  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{OH}$  groupe hydroxyle - fonction alcool

$\text{CH}_3-\text{CH}=\text{O}$  groupe carbonyle - fonction aldéhyde

3.3. Dans l'oxyde d'éthylène, tous les H sont équivalents (même blindage) il n'y aura qu'un seul pic dans le spectre RMN. Ce n'est pas le cas des deux autres. C'est donc le spectre 2.

3.4. La réaction est exothermique (signe -)

3.5. Non, car une augmentation de la température conduirait l'équilibre à se déplacer dans le sens indirect (d'après la loi de Van't Hoff) ce qui abaisserait le rendement alors que l'on veut justement l'augmenter.

3.6. Un catalyseur est une espèce chimique qui accélère une réaction sans participer à son bilan.

3.7. Un catalyseur ne rend pas spontanée (possible) une réaction qui ne le serait pas et ne change donc pas le signe de  $\Delta_r G_0$ .

3.8. Le signe attendu pour l'entropie standard de réaction  $\Delta_r S^\circ$  est négatif, car «le désordre» décroît puisque le nombre de moles de gaz diminue au cours de la réaction.

3.9. La liaison C-O étant polarisée, l'oxyde d'éthylène possède des charges partielles positives sur les atomes de carbone ; il est donc électrophile.

3.10. L'azote a un doublet libre.

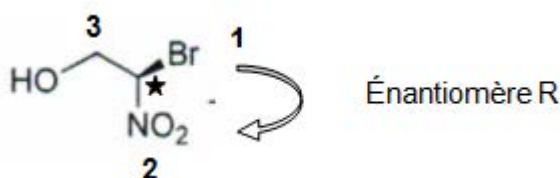
3.11. HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH et HOOC-COOH

3.12. Le diacide forme facilement des liaisons hydrogène avec l'eau (les quatre atomes d'oxygène ainsi que les deux atomes d'hydrogène peuvent en effet se lier respectivement avec les atomes d'hydrogène et d'oxygène de l'eau) : il est donc très soluble dans les urines.

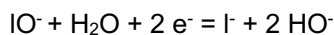
## Partie 4

4.1. 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol

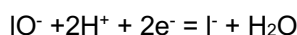
4.2. et 4.3.



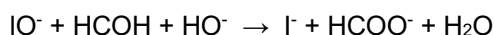
4.4.



ou



Équation bilan :



4.5. À l'équivalence, les réactifs ont été versés dans les proportions stœchiométriques :

on a donc  $n_{\text{Formol}} = n_{(\text{IO}^-)\text{versé}}$ .

$$\text{Soit } n_{\text{Formol}} = [\text{IO}^-] \times V_{\text{eq}} = 0,18 \times 12,9 \cdot 10^{-3} = 2,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.}$$

$$m_{\text{Formol}} = n_{\text{Formol}} \times M_{\text{Formol}} = 2,3 \cdot 10^{-3} \times 30 = 0,070 \text{ g dans } 10 \text{ g ce qui correspond à } 0,7 \text{ \%}.$$

4.6. Ce gel douche est non conforme à la législation, car sa teneur en formol est supérieure à 0,2 %.

4.7. Selon la norme, la teneur maximale en formol est de 0,2 % soit 0,2 g de formol dans 100 g de gel douche. Soit dans 100 g de gel :

$$n_{(\text{Formol, max})} = m_{(\text{Formol, max})} / M_{\text{Formol}} = 0,2 / 30 = 6,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol.}$$

$$\text{Or } n_{\text{Bronopol}} = \frac{1}{2} n_{\text{Formol}}$$

$$\text{Donc } n_{(\text{Bronopol max})} = 6,67 \cdot 10^{-3} / 2 = 3,33 \cdot 10^{-3} \text{ mol.}$$

La masse de bronopol maximale dans 100 g de gel :

$$m_{\text{Bronopol}} = n_{\text{Bronopol}} \times M_{\text{Bronopol}} = 3,33 \cdot 10^{-3} \times 200 = 0,667 \text{ g}$$

La masse de bronopol maximale dans 250 g de gel est :  $0,667 \times 2,5 = 1,67 \text{ g}$

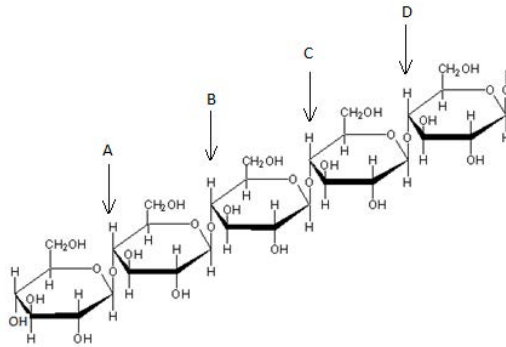
# Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2019

## OPTIMISATION DE LA PURIFICATION DE LA R-PHYCOÉRYTHRINE À PARTIR D'UNE ALGUE ROUGE

$$\text{Q1. Matière sèche} = \frac{m_2}{m_1} \times 100 = \frac{0,982}{5,120} \times 100 = 19,18 \%$$

$$\text{Cendres} = \frac{m_3}{m_2} \times 100 = \frac{0,043}{0,982} \times 100 = 4,37 \%$$

Q2.



Considérant la molécule dessinée comme substrat potentiel, les produits d'hydrolyse seront :

- du glucose par l'exoglucosidase → hydrolyse en A ;
- du cellobiose (= D glucopyranosyl β (1-4) D glucopyranose) par la cellobiosidase → hydrolyse en B ;
- du glucose par l'endoglucosidase → hydrolyse en B ou C ou D.

Remarque : les données de l'énoncé n'étant pas assez explicites, toutes réponses cohérentes et justifiées sont acceptées.

Q3. La R-PE est une protéine. L'ensemble des protéines absorbe à 280 nm, cette absorbance n'est donc pas spécifique de la R-PE. Le spectre du doc 3 montre un pic spécifique de la R-PE à 565 nm. L'absorbance à 565 nm est donc liée à la R-PE. Le rapport 565/280 permet donc d'estimer la proportion de R-PE par rapport à l'ensemble des protéines de l'extrait, donc sa pureté.

Q4. Équation de la droite d'étalonnage :  $A = 0,05860714 \times \rho_{\text{prot}} - 0,007785$  avec un très bon alignement car  $r^2 = 0,9997$

$$\text{Donc } \rho_{\text{prot contrôle}} = (0,330 + 0,007785) / 0,05860714 = 5,7635 \dots \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} = 5,76 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$6,00 - 5,76 = 0,24 < \text{EMT} = 0,32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

Le dosage effectué est exact (erreur dans le texte car on ne valide pas une méthode avec un seul contrôle !)

Q5. L'apparition du substrat correspondant à la catalyse enzymatique est obtenue avec  $\Delta A = A_{\text{essai}} - A_{\text{témoin}}$ .

La durée de mesure  $\Delta t$  étant de 2 heures.

$$\text{Par définition : } z_{\text{sp}} = \frac{z_{\text{total}}}{m_{\text{totale}}} = \frac{b}{\rho_{\text{prot}}}$$

$$\text{avec } b = \frac{z}{V_{PE \text{ enzyme}}} = \frac{\Delta n_4\text{-nitrophénol}}{\Delta t} \times \frac{1}{V_{PE \text{ enzyme}}} = \frac{\Delta A \cdot V_{\text{cuve}}}{\varepsilon \cdot l \cdot \Delta t} \times \frac{1}{V_{PE \text{ enzyme}}} = \frac{\Delta A \times 2,1 \times 10^{-3}}{4500 \times 1 \times 2} \times \frac{1}{0,1} \text{ en } \text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{\Delta A \times 2,1 \times 10^3}{4500 \times 1 \times 2 \times 0,1} \text{ en } \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\rho_{(enzyme:sol)} = \frac{m_{enzyme}}{V_{sol\ enzyme}} = \frac{200}{100} = 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$z_{sp} = \frac{b}{\rho_{prot}} = \frac{\Delta A \times 2,1 \times 10^3}{4500 \times 1 \times 0,1 \times 2 \times 2} = \frac{\Delta A \times 2,1 \times 10^3}{2,8 \times 10^3} = \frac{\Delta A \times 2,1}{2,8}$$

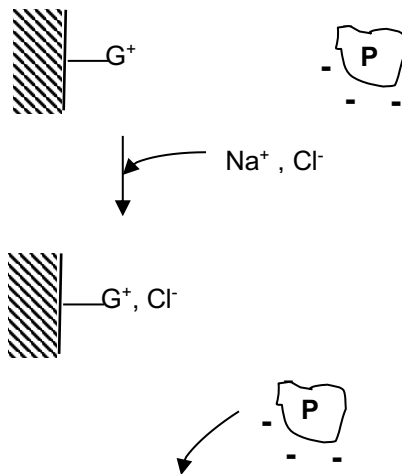
Calcul :  $z_{sp} = (0,122-0,023) \times 2,1/1,8 = 0,1155 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$

**Q6.** Rendement d'extraction et IP sont plus élevés à 20 minutes, ce sera donc le temps choisi pour optimiser l'extraction. De plus l'extraction sera plus rapide (20 minutes)

**Q7.** Le détecteur à barrette de diodes permet de mesurer les absorbances à plusieurs longueurs d'onde en même temps, ce qui permet d'avoir très rapidement des spectres et de calculer très rapidement le rapport 565/280 pour obtenir l'IP de chaque fraction d'élution.

Le mode d'élution est réalisé avec un gradient discontinu en trois paliers de force ionique croissante : 0/150mM, puis 150/200 mM, puis 200/1000 mM

La phase stationnaire est une résine échangeuse d'anions. Dans un premier temps les protéines chargées négativement à pH 7,1 et à faible force ionique sont retenues dans la colonne et elles sont progressivement éluées. Lorsque la force ionique augmente, les ions Cl<sup>-</sup> prenant la place des protéines sortant de la colonne. Toutes les protéines ne sont pas échangées à la même force ionique.



**Q8.** Les fractions recueillies avec AE150 (entre 20 et 30 min) ou avec AE-200 (entre 40 et 50 min) ou avec AE-1000( vers 65 min) montre la présence de protéines ( $A_{280}$  non nulle) qui contiennent des R-PE ( $A_{565}$  non nulle). Ces trois fractions méritent donc d'être analysées avec plus de précision car elles sont susceptibles de contenir la R-PE cherchée.

Remarque : Les premières fractions (avant 20 min) sont des protéines majoritairement non R-PE ( $A_{280}$  élevée et  $A_{565}$  proche de 0). Elles ne sont pas intéressantes, elles ne sont pas retenues.

**Q9.** La phase stationnaire (colonne HPLC d'exclusion-diffusion) doit être changée ainsi que le phase mobile.

**Q10.** En chromatographie d'exclusion diffusion le paramètre de séparation est la taille (donc la masse moléculaire). Les petites molécules diffusent et sont éluées avec le volume total de la colonne, les grosses molécules sont exclues et sortent avec le volume mort. Entre les deux, les molécules sont séparées selon leur masse moléculaire, ici de domaine de fractionnement du gel est compris entre 10 et 600 kDa . La R-PE ayant une MM de 260 kDa (60 kDa dissociée), la colonne est adaptée pour la purification de la R-PE.

**Q11.** Les protéines sortent dans l'ordre de masse moléculaire décroissante, la forme native correspond au premier pic ( $t_R \approx 21$  min) et la forme dénaturée au second ( $t_R \approx 28$  min).

**Q12.** Pour que la purification soit bonne, le rapport 565/280 doit être élevé et la R-PE ne doit pas être dénaturée. La meilleure fraction est la AE-200 car il y a un pic à 21 min (donc forme native) avec une absorbance élevée à 565 et faible à 280

AE-150 à 565 nm présente surtout un pic 28 min donc R-PE dénaturée.

AE-1000 à 565 nm présente un pic à 21 min mais avec une A280 importante, ce qui signifie que la R-PE est « contaminée » par d'autres protéines. La purification n'est pas optimale.

**Q13.** L'électrophorèse PAGE doit être dénaturante (SDS-PAGE) pour permettre de déterminer la masse moléculaire. En électrophorèse non dénaturante, comme dans le cas présent, la migration dépend essentiellement de la charge de la protéine (et donc de son pHi).

**Q14.** La coloration au bleu de Coomassie permet de révéler toutes les protéines, y compris les non fluorescentes, ce qui permet de vérifier l'absence de protéines non R-PE dans l'extrait et donc sa pureté. Ici en fluorescence, comme au bleu de Coomassie, on observe une seule bande. L'extrait ne contient la R-PE (fluorescence) et uniquement elle (pas de bandes parasites au bleu de Coomassie).

**Q15.** L'acrylamide est un produit CMR = cancérigène, mutagène, dangereux pour la fertilité, allergène et toxique en cas d'exposition répétées ou prolongée. Le produit ne doit être ni inhalé ni touché donc les mesures préventives à mettre en œuvre (en plus des BPL classiques) sont le travail sous hotte (avec vitre ou lunettes de protection) et le port de gants. La récupération et le traitement des déchets doivent aussi être prévus.

**Q16.** On observe majoritairement des hélices alpha. Liaisons hydrogènes entre CO et NH des liaisons peptidiques proches dans la structure primaire des protéines.

D'après la remarque (C) du document 13, le groupement prosthétique PCB est à l'origine de la couleur de la protéine

**Q17.** Donneur d'électrons :  $\text{H}_2\text{O}$  (non demandé :  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$ )

Accepteur final d'électrons :  $\text{NADP}^+$  (non demandé :  $\text{NADP}^+ + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{NADPH} + \text{H}^+$ )

Points communs : structure générale : 2 complexes membranaires, 2 transporteurs mobiles ; Association à une ATP synthase de structure similaire, pompage de protons, transfert d'électrons, production d'ATP... (autres propositions pertinentes acceptées).

Différences : sens de la réaction redox, utilisation d'énergie lumineuse pour oxyder, NADPH au lieu de NADH... (autres propositions pertinentes acceptées).

**Q18.** Le  $\Delta G$  est positif donc la synthèse de glucose est endergonique, cette réaction n'est pas possible sans apport d'énergie. Elle doit donc être couplée à un apport d'énergie pour se produire (hydrolyse d'ATP).

L'énergie lumineuse permet via l'ATP synthase (document 14), la synthèse d'ATP dans le stroma. Et l'ATP est utilisé dans le stroma pour synthétiser du glucose (cycle de Calvin document 14)

# Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2019

## OPTIMISATION DE POINTS CRITIQUES DANS L'INDUSTRIE LAITIÈRE

**Q1.** Biofilm = film biologique composé d'un ensemble de microorganismes (bactéries, mycètes...) adhérents les uns aux autres (par la sécrétion d'une matrice) et adhérents à une surface.

Légendes étapes : 1 : approche support et adhésion réversible ; 2 : colonisation (multiplication) et adhésion irréversible ; 3 : production de slime ou exopolymère, microcolonies ; 4 : macrocolonie ou biofilm fonctionnel ; 5 : détachement et dissémination (acquisition de flagelles pour atteindre une nouvelle niche de développement).

**Q2.** Deux structures :

- Pili communs : filaments de protéine (piline) + molécule d'adhésion au sommet (adhésine). Rôle d'adhésion.
- *Slime* ou exopolymère de nature glucidique. Rôle de protection.

Deux stratégies de lutte : empêcher adhésion par modification des propriétés des surfaces (lisses, matériaux...) ; nettoyage et désinfection avec action mécanique pour éliminer le biofilm en place.

**Q3.** Origine de *S. aureus* : souvent biotype humain : porteurs sains (peau des mains) ou présentant une plaie cutanée infectée (panaris...), contamination manuportée lors de la traite. Autre possibilité : flore animale, sur la peau des mamelles et trayons.

**Q4.** Traitement : antibiotiques ou antiseptiques.

L'utilisation d'huile essentielle évite l'apparition de résistance aux antibiotiques et les allergies aux antibiotiques. Elle évite la toxicité de certains antiseptiques (ex iodés). Elle limite aussi la perte économique (lait avec antibiotique non commercialisé).

**Q5.** Composition qualitative cupule témoin +

- Témoin de croissance de la souche en absence d'huile essentielle: diluant (diméthylsulfoxyde) + *S. aureus* à  $10^5$  UFC•mL<sup>-1</sup> ou bien
- Témoin d'activité de l'huile essentielle : CDO à forte concentration + *S. aureus* à  $10^5$  UFC•mL<sup>-1</sup>. On vérifie l'absence de croissance donc la sensibilité de la souche.

Détermination CMI : plus petite concentration en CDO inhibant totalement la croissance de *S. aureus* donc plus petite concentration en CDO pour laquelle on n'observe pas de trouble.

**Q6.** Précaution pour prélèvement : écouvillon stérile, ne pas toucher l'écouvillon, port de gants, changement d'écouvillon entre chaque prélèvement... afin de ne pas contaminer le prélèvement par ADN exogène ou DNase.

**Q7.** Vache A : 3 profils différents, 2 récurrences repérables, 1 récurrence avec génotype et quartier identique.

Lien avec biofilm : nombreux profils de récurrences sur le même quartier (1 pour C, 1 pour D, 1 pour I, 3 pour K, 1 pour N, 3 pour P, 1 pour Q, 1 pour R) pouvant être expliqués par la persistance de la souche (même génotype) sous forme de biofilm (protection due au slime) avec aussi possibilité d'un détachement du biofilm (étape 5 doc 1) pour aller contaminer d'autres parties.

**Q8.** Schéma de mode opératoire avec les étapes suivantes :

- Transfert d'1 mL de cryoprotecteur dans le cryotube
- Inoculation du cryoprotecteur par la souche en culture pure pour obtenir une suspension à 3-4 Mc Farland
- Homogénéisation par retournement 4-5 fois, pas de vortex
- Repos 2 minutes
- Élimination du surnageant avec une pipette stérile
- Congélation à -70 °C.

Mode d'action du cryoprotecteur : éviter la formation de cristaux intracellulaires lors de la congélation.

Exemple : glycérol, DMSO...

**Q9.** Flèches en gras : air stérilisé

Flèches en pointillés : air contaminé

Zones hachurées : filtres HEPA ou absolu ou haute performance

Intérêts PSM II : protection manipulation et manipulateur et environnement.

**Q10.** Psychrophile : microorganisme dont la température optimale de croissance est voisine de la température de réfrigération (aime le froid) et qui ne se développe pas au-delà de 20 °C.

Psychrotrophe : microorganisme dont la température optimale de croissance est voisine de 25 °C, donc supérieure à la température optimale de croissance des psychrophiles, mais qui se développe quand même, lentement, aux températures de réfrigération (tolère le froid).

Analyse du document : graphique semi-logarithmique représentant la population bactérienne en fonction de la durée de stockage du lait cru pour 2 températures de stockage :

- À 4 °C : pas de développement de la flore totale, développement de la flore psychrotrophe à partir de 24 h, les deux flores restant inférieures à 72 h au critère d'hygiène des procédés (doc 7) de 300 000 UFC•mL<sup>-1</sup> pour un lait cru de vache avant transformation, ou même de 100 000 UFC•mL<sup>-1</sup> pour un lait cru de vache collecté.
- À 8 °C : développement des flores totale et psychrotrophe à partir de 48 h, les deux flores restant inférieures à 72 h au critère d'hygiène des procédés.

De plus les modifications enzymatiques (lipolyse et protéolyse) sont moins rapides à 8 °C qu'à 4 °C donc il y a moins d'altération de la qualité sensorielle à 8 °C qu'à 4 °C.

Bilan : le lait peut être stocké à 8 °C pendant 72 h en conservant les qualités microbiologique, nutritionnelle et organoleptique du lait. L'industriel peut en réaliser les économies d'énergie envisagées.

**Q11.** Dans cette méthode on compte le nombre de plaque de lyse comme nombre de phages initialement présents. Il faut alors que chaque phage initialement présent puisse infecter une bactérie et qu'après la lyse de la bactérie les phages puissent infecter des bactéries voisines, créant une plaque de lyse. Il faut donc beaucoup plus de bactéries que de phage, donc un MOI très faible, sinon le titre phagique sera sous-estimé.

**Q12.** Tubes préchauffés car les phages se multiplient uniquement dans les bactéries en croissance.

Phages + bactéries 4 min à 37 °C : durée nécessaire à l'adsorption des phages sur les bactéries.

Gélose demie-molle : permet la diffusion des phages pour infecter les bactéries voisines.

Homogénéisation douce du mélange phage adsorbé + bactéries : pour éviter que les phages ne se décrochent.

Exemple de tableau (d'autres volumes sont possibles pour réaliser les dilutions au 1/10<sup>ième</sup>) :

	T1	T2	T3	T4
Dilution réalisée	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Eau non traitée (µL)	50			
NaCl (µL)	450	450	450	450
Volume de reprise du tube précédent (µL)		50	50	50
UFP/boîte attendues	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>

UFP/boîte attendues = titre attendu x dilution réalisée x volume ensemencé par boîte

Avec titre attendu = 10<sup>6</sup> UFP.mL<sup>-1</sup> et volume ensemencé par boîte = 0,1 mL

Les 3 dilutions à tester pour cette eau de rinçage non traitée sont les dilutions 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>.

**Q13.** Boîte témoin croissance souche : 100 µL NaCl + 100 µL culture bactérienne *L. thermophilus*. Résultat attendu : tapis bactérien sans plaque de lyse.

Boîte témoin sensibilité souche au phage : 100 µL dilution phage de référence 2972 + 100 µL culture bactérienne. Résultat attendu : présence de plaque de lyse.

**Q14.** Colonies entourées d'un halo noir car *L. monocytogenes* possède une esculinase et que le milieu contient de l'esculine et du fer III. Le produit d'hydrolyse de l'esculine par l'esculinase réagit avec les ions fer III pour former un précipité noir.

**Q15.** La PCR ou la spectrométrie de masse sont des techniques plus rapides donc qui permettent une libération de lot plus rapide.

**Q16.** voir questions du document 12

Q1 : il existe bien un danger à cette étape de fabrication : le développement de la flore,

Q2 : la mesure préventive appliquée est la réfrigération du lait (8 °C d'après l'exploitation du doc 6),

Q3 : la réfrigération permet de respecter le critère réglementaire pour la concentration de la flore.

Donc le stockage du lait avant transformation est bien un point critique.



# Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2019

## ÉTUDES PRÉCLINIQUES DU RITUXIMAB, UN ANTICORPS MONOCLONAL THÉRAPEUTIQUE

**Q1.** Schéma IgG + « Chaîne lourde, Chaîne légère » + paratope + Ponts disulfures + région variable murine + région constante humaine.

Intérêt Ac chimérique et humanisé : pas de réaction immunitaire du receveur (Homme) contre les anticorps administrés, parce que la majeure partie de ces molécules (fragment Fc) est d'origine humaine.

**Q2.** Cellules spléniques : mortelles, synthèse d'Ac, HGPRT+

Cellules myélomateuses : immortelles, non sécrétrices d'Ac, HGPRT-

**Q3.** Aminoptérine inhibiteur la synthèse de novo des nucléotides.

Hypoxanthine, Thymidine : précurseurs des voies alternes ou de récupération des nucléotides.

Hybridomes cellules spléniques – cellules spléniques : mortelles donc disparition rapide (absence de multiplication à long terme),

Hybridomes cellules myélomateuses – cellules myélomateuses : HGPRT-, donc pas de survie en milieu HAT par impossibilité de synthèse des nucléotides (ni par voie *de novo*, ni par voies de récupération),

Hybridomes cellules myélomateuses – cellules spléniques : HGPRT+ et immortelles donc survie sur milieu HAT et au cours du temps.

**Q4.** Chromatographie d'affinité OU dilution limite OU cytométrie de flux.

Recherche des Ac spécifiques dans le surnageant de culture par des techniques immunoenzymatiques ou immunofluorescentes (ELISA ...).

**Q5.** Partie 1 et 3 : hydrophiles / polaires.

Partie 2 : hydrophobe / apolaires.

**Q6.** Rituximab se fixe sur CD20 spécifique des LB, cascade de réactions qui inhibe la synthèse de la protéine BCL2.

BCL2 est un anti-apoptotique donc l'inhibition de l'apoptose est levée et l'apoptose des LB est donc déclenchée. Progression tumorale ralentie.

**Q7.** Puits + CD20 + RiTuximab + conjugué (anti-Fc + peroxydase)

**Q8.**

	Témoin POSITIF	Témoin NÉGATIF
Composition	CD20 SAB Rituximab Conjugué OPD Solution stop	CD20 SAB <u>Tampon</u> Conjugué OPD Solution stop
Rôles	Efficacité/réactivité Éviter faux négatifs	Spécificité Éviter faux positifs
Résultats attendus	Absorbance 450 nm élevée	Absorbance 450 nm faible ou nulle

**Q9. Comparaison ELISA :**

- Limite de détection plus basse et donc meilleure pour ELISA 3,
- Détection des deux formes par ELISA 2 et 3.
- Meilleure reproductibilité pour ELISA 3.

=> choix de ELISA 3 qui détecte toutes les formes, qui est plus reproductible et avec un seuil de détection plus bas.

**Q10. C<sub>max</sub> :** concentration maximale atteinte dans le sang = 200 µg•mL<sup>-1</sup>

T<sub>1/2</sub> : temps de demi-vie de la molécule : temps nécessaire pour que la concentration soit divisée par deux (C<sub>max</sub> à 144 jours, C<sub>max</sub>/2 à 164 jours) ~ 20 jours.

**Q11. Virus enveloppé, icosaédrique, à ADN (double brin).****Q12. Rôles :**

Buffer : tampon pH optimal pour la taq pol

dNTP : précurseurs pour polymérisation

MgCl<sub>2</sub> : Mg<sub>2+</sub> cofacteur de la taq pol

Primer : amorces pour la Taq pol

Taq pol : enzyme de réplication

Component	100-µL rxn
Autoclaved, distilled water	to 100 µL
10X PCR Buffer II	10 µL
10 mM dATP	2.0 µL
10 mM dCTP	2.0 µL
10 mM dGTP	2.0 µL
20 mM dUTP*	1-5 µL
25 mM MgCl <sub>2</sub> **	8.0 µL
10 µM Forward primer	2.0 µL
10 µM Reverse primer	2.0 µL
Template DNA	Varies
AmpliTaq® DNA Polymerase (5 U/µL)	0.5 µL
AmpErase® UNG (1 U/µL)	1 µL

**Q13 . Enzyme ou N glycosidase issue d'un *E. coli* (transformé génétiquement).**

En ajoutant avant toute PCR une étape de dégradation sélective d'amplicons de PCR précédentes, on limite le risque de contamination. Les amplicons de la nouvelle PCR ne sont pas détruits car l'enzyme est dénaturée par la chaleur (T ≥ 55 °C) au premier cycle de PCR.

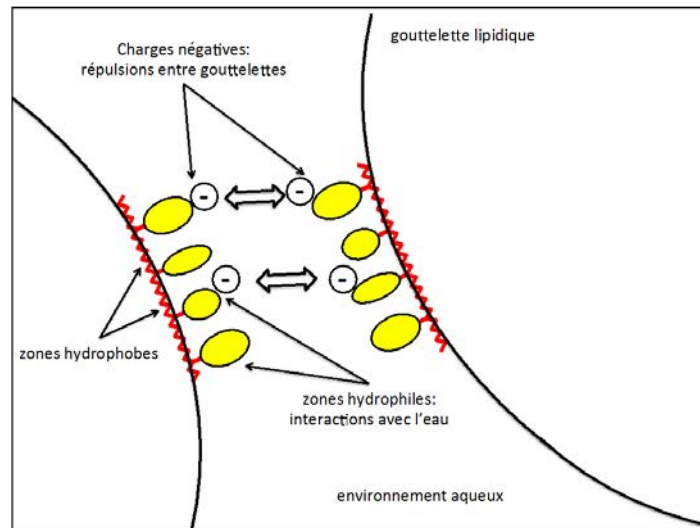
# Éléments de corrigé de sciences et technologie bioindustrielles 2019

## AMÉLIORATION D'UNE BOISSON RAFRAÎCHISSANTE SANS ALCOL (BRSA)

**Q1.** Une eau de source : pas de traitement nécessaire, aucune contre-indication santé car sa richesse en minéraux est faible (*a priori* pas à l'origine des réclamations).

**Q2.** Liste positive répertorie les additifs autorisés suite à une étude toxicologique. Elle permet de garantir l'innocuité des additifs.

**Q3.**



Les zones hydrophobes correspondent aux résidus d'acides aminés hydrophobes de la chaîne polypeptidique. Les zones hydrophiles correspondent aux blocs glucidiques : riches en groupes  $-OH$  et  $COOH / COO^-$  (acide D glucuronique).

**Q4.** Le pKa de l'acide D-glucuronique est de 3,21.

La proportion de la forme ionisée  $-COO^-$  est plus élevée dans la recette modifiée (pH= 4,5) que dans la recette initiale (pH = 3,5).

Les répulsions ioniques entre gouttelettes sont donc plus importantes.

**Q5.** La concentration par évaporation de l'eau nécessite un chauffage entraînant une **perte des qualités organoleptique et nutritionnelle** (goût, couleur, vitamines ...).

**Q6.** Deux types de procédés membranaires sont utilisés : une UF et plusieurs OI successives

L'UF est suivie d'OI en cascade pour lesquelles la membrane présente une porosité plus faible permettant d'obtenir un perméat correspondant à de l'eau pure : fraction K.

Les perméats B, G, H, I J subissent une recirculation dans le système de façon à optimiser la récupération des solutés.

Le concentré est le mélange des réténats de filtration A et F.

Le degré Brix augmente car l'élimination d'eau concentre les solutés,

**Q7.** Le Brix passant de  $10^\circ$  à  $60^\circ$ , le facteur de concentration est de 6.

$$D_{ME} = 2574 \times 6 = 15444 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$$

**Q8.** *Candida pelliculosa* est le germe le plus difficile à détruire, donc s'il est détruit les autres le seront aussi.

**Q9.**

$z = 30$  °C donc lorsqu'on augmente la température de 30 °C (passage de 60 à 90), la valeur de D est divisée par 10 :  $D_{90^{\circ}\text{C}} = 0,3$  min

D correspond à la durée nécessaire pour réduire d'un log de la population or ici on souhaite une réduction de 7 log.  
Durée de traitement à 90 °C =  $n \times D_{90^{\circ}\text{C}} = 2,1$  min

**Q10.** Aptitudes : réception, stockage ..... en suivant les normes ISO 22000 :2005 ISO/TS 22002-4 :2013.

Le bureau Veritas est un organisme certificateur : vérifie que l'activité de la société cliente est conforme aux référentiels.

**Q11.** Le COFRAC est la structure d'accréditation française, c'est l'équivalent national de l'UKAS.

UKAS atteste de la compétence de l'organisme certificateur, cela permet de donner confiance dans la réalisation de l'évaluation de la conformité.

**Q12.** Le produit ne présente pas de danger microbiologique pour la santé (*le pH est défavorable au développement des microorganismes*). Après la DDM, seules les qualités organoleptiques (et nutritionnelles) peuvent être altérées.

**Q13.** L'échantillon doit être représentatif du lot donc les canettes sont prélevées de façon aléatoire à différents moments sur la ligne.

L'effectif du lot est de 100 000 canettes, d'après le tableau, l'effectif échantillon est de 500 canettes (lettre N).

**Q14.** Pour statuer sur le lot, il faut prélever de façon aléatoire 500 canettes et observer s'il y a présence ou absence de marquage sur chaque unité.

D'après le tableau,  $A_c = 0$  et  $R_e = 1$

On note ici l'absence de marquage sur 20 unités, ce qui est très supérieur au critère de rejet. Le lot n'est pas accepté.

Proposition corrective à choisir : Vérifier le niveau d'encre, canettes sales sur lesquelles l'encre ne tient pas, qualité de l'encre...

**Q15.** Répertorier au moins 2 actions compatibles avec 2 axes :

L'entreprise a engagé des démarches en conformité avec les principes de management de la norme ISO 9001 : 2015.

Orientation client :

Des modifications ont été mises en œuvre pour répondre aux réclamations clients.

Leadership :

L'équipe de direction s'engage en matière de qualité (La qualité des produits est une de ses préoccupations essentielles).

Approche processus :

Les deux services (R&D et qualité) sont saisis et travaillent de façon cohérente pour résoudre le même problème.

Amélioration :

La recette du produit est modifiée de façon à le rendre plus stable, un changement de fournisseur permet d'obtenir des garanties sur les matières premières.

Prise de décision fondée sur des preuves :

La décision d'acceptation ou rejet du lot repose sur l'analyse objective d'un échantillon représentatif et sur l'utilisation de règles normées.