

Brevet de technicien supérieur

Bioanalyses et contrôles

Sujets et corrigés
Sessions 2016 - 2017



UPBM-Édition
Publications de l'UPBM

ANNALES

BTS BIOANALYSES

ET CONTRÔLES

Sessions 2016 et 2017

Avec éléments de corrigés

Nous remercions les nombreux professeurs de l'enseignement technologique et général qui ont participé à la collecte des sujets, aux relectures et propositions de corrigés.

Merci aussi à Monsieur Sylvain ANDRE (IA-IPR de biotechnologies - génie biologique) pour la transmission des sujets 2017 et à mesdames Christine BENAYOUN, Emmanuelle GRIMAL, monsieur André LE TEXIER pour les sujets de travaux pratiques 2016 (À partir de 2017 les sujets de travaux pratiques ne sont plus divulgués).

Enfin, merci à Monsieur Antoine GAUDIN dont l'aide précieuse a grandement facilité la réalisation de la couverture.

Éditions UPBM-ÉDILION
Lycée de la Martinière
Avenue Andreï Sakharov
69339 Lyon Cedex 9
[http:// www.upbm.org](http://www.upbm.org)

Sujets et corrections collectés et mis en page par Michèle ROBLIN.

Photos de couverture, de haut en bas et de gauche à droite: fragment de galerie Api/ appareil pour le contrôle de masse volumique de poudre/ dosage protéique miniaturisé.

RÈGLEMENT D'EXAMEN

			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	
Épreuves	Unités	Coef	Type d'épreuve	Durée	Forme
E1 Anglais	U10	2	CCF 2 épreuves en fin de deuxième année		2 situations d'évaluation
E2 Mathématiques et Sciences physiques et chimiques		5		4h	
Sous-épreuve de mathématiques	U21	2	écrit	2h	
Sous épreuve de sciences physiques et chimiques	U22	3	écrit	2h	
E3 Biochimie, biologie et technologie d'analyses		9	écrit	8h	
Sous-épreuve de Biochimie et technologies d'analyse	U31	3	écrit	3h	
Sous épreuve de microbiologie et technologies d'analyse	U32	3	écrit	3h	
Sous épreuve de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	U33	3	écrit	2h	
E4 Sciences et technologies bio-industrielles	U40	3	écrit	2h	
E5 techniques d'analyses et de contrôles et opérations unitaires		10		2X12h 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	3h maxi	2 situations d'évaluation pratique en laboratoire
E6 Soutenance de projet	U60	4	oral	45 min	
Épreuve facultative : langue vivante étrangère	UF1	1 (points au-dessus de la moyenne)	oral	20 min	

TABLE DES MATIÈRES

Session 2016

Sujet de mathématiques 2016	2
Sujet de sciences physiques et chimiques 2016	6
Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2016	12
Sujet de microbiologie et de technologies d'analyse 2016	21
Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et de technologies d'analyse 2016	29
Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2016	35
Techniques de biochimie 2016	42
Techniques de microbiologie 2016	49
Techniques de biologie cellulaire et moléculaire 2016	58

Session 2017

Sujet de mathématiques 2017	64
Sujet de sciences physiques et chimiques 2017	68
Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2017	75
Sujet de microbiologie et technologies d'analyse 2017	87
Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse 2017	100
Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2017	109
Corrections	119

Corrections session 2016

Éléments de corrigé de mathématiques 2016	120
Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2016	122
Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2016	124
Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2016	127
Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2016	130
Éléments de corrigé de sciences et technologies bioindustrielles 2016	132

Corrections session 2017

Éléments de corrigé de mathématiques 2017	134
Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2017	136
Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2017	138
Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2017	141
Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2017	144
Études associées à la production d'un riz génétiquement modifié	144
Éléments de corrigé de sciences et technologie bioindustrielles 2017	147

Session 2016

Sujet de mathématiques 2016

La calculatrice (conforme à la circulaire n°99-186 du 16-11-99) est autorisée.

EXERCICE 1 (11 points)

Le Ténébrion meunier (*Tenebrio molitor*) est un insecte de l'ordre des coléoptères, de la famille des ténébrionidés. Il est capable de vivre dans des denrées stockées très sèches, notamment dans la farine, d'où son nom de meunier. (Wikipédia).

De par la facilité de son élevage, cet insecte est très utilisé dans les laboratoires de recherches pour des études physiologiques sur son développement et sur son endocrinologie : sa nymphe est très sensible à l'hormone juvénile par exemple. Le vers est également un très bon appât notamment pour la pêche de la truite en étang.

Les parties A et B peuvent être traitées de façon indépendante.

Partie A

Kévin, un apprenti boulanger, décide d'élever des vers de farine pour son club de pêche. Il commence son élevage 7 mois avant l'ouverture de la saison de pêche. Dans un large bac adapté qu'il entretient à 27 °C, il dispose de la farine et 500 vers, il laisse se faire les choses. Il suit l'évolution du nombre de vers et obtient les résultats suivants :

Nombre de quinzaines : t_i	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre de vers : N_i	500	749	1122	1681	2518	3772	5650	8464	12678	18992

1 - Kévin se fait la remarque suivante : « chaque quinzaine la population augmente d'environ 50 % ». Expliquer cette modélisation. Est-elle réaliste sur le long terme ?

2 - Kévin souhaite connaître le nombre de vers dont il disposera lors de l'ouverture de la prochaine saison. Il présente ses données à son professeur de mathématiques qui lui propose un nouveau modèle à partir du changement de variable suivant : $y_i = \ln \left(\frac{33000}{N_i} - 1 \right)$

(a) Compléter le tableau donné en annexe. Arrondir au centième.

(b) Déterminer, à l'aide de la calculatrice, une équation de la droite d'ajustement Δ de y en t par la méthode des moindres carrés. Arrondir les coefficients au centième.

(c) Parmi les propositions suivantes quelle est celle qui estime le mieux le nombre de vers pour l'ouverture de la saison de pêche ? Justifier.

33000	146000	9200	30300
-------	--------	------	-------

3 - Maxime, un ami du club, affirme qu'à ce rythme là, le nombre de vers va dépasser 50000. Kévin a déterminé que le nombre de vers en fonction du nombre de quinzaines t est donné approximativement par le nombre :

$$N(t) = \frac{33000}{1 + 75e^{-0,48t}}$$

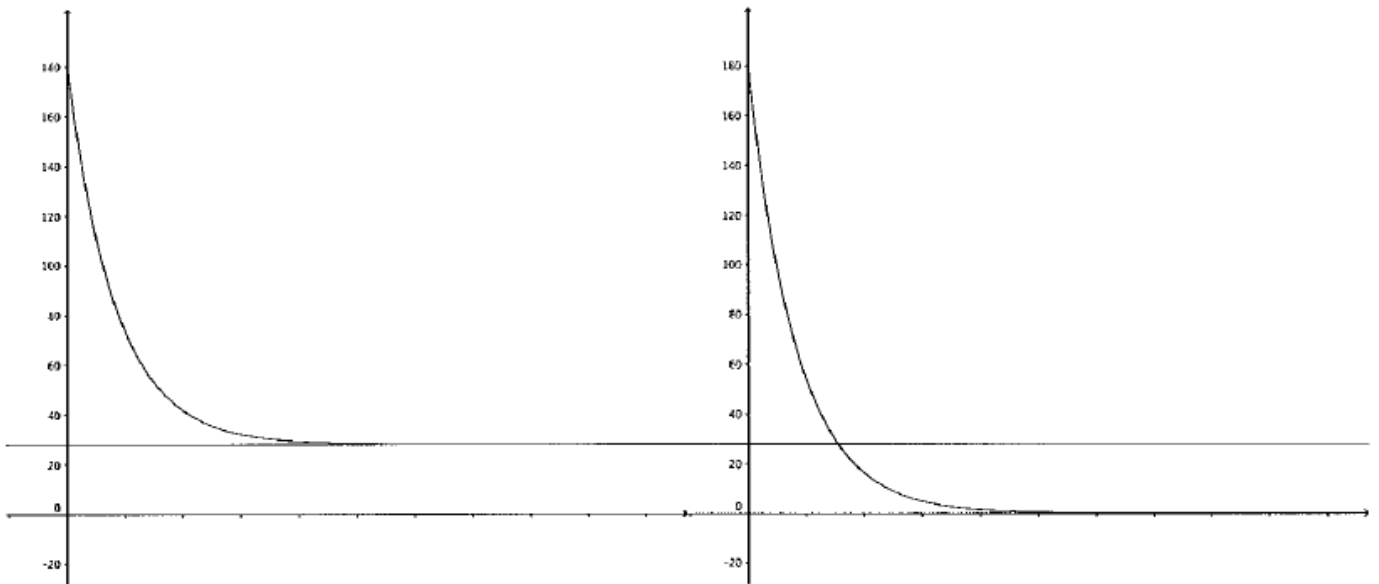
Kévin peut-il confirmer l'affirmation de Maxime ? Justifier votre réponse.

Partie B

De retour à l'école, Kévin apprend que la température de refroidissement du pain à la sortie du four dépend du type de pain et de la température ambiante supposée constante de la pièce dans laquelle il est entreposé.

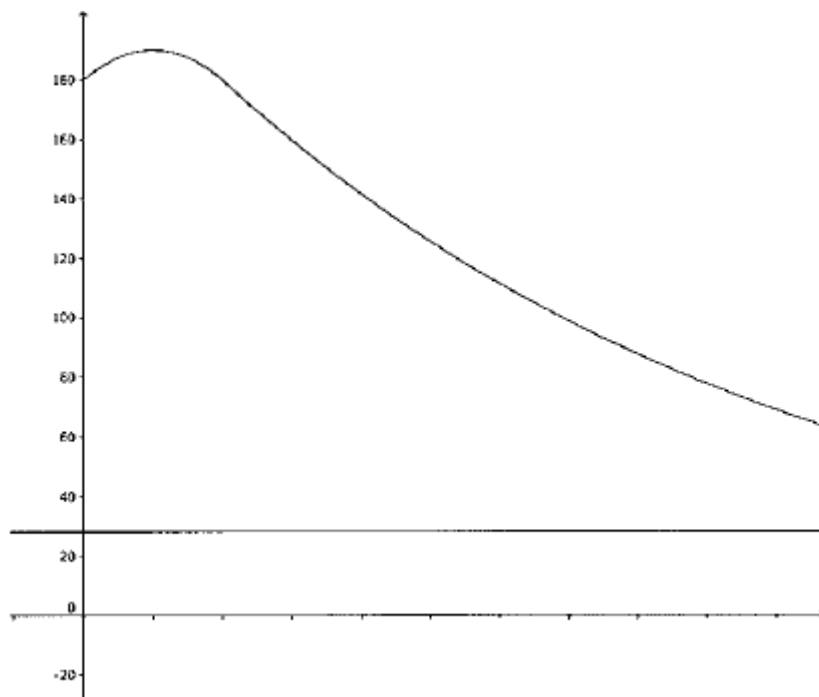
On note a cette température constante de la pièce, exprimée en degrés Celsius.

Pour $t \geq 0$, on désigne par $y(t)$ la température du pain au bout d'un temps t après sa sortie du four. La durée t est exprimée en heures et la température $y(t)$ est exprimée en degrés Celsius. Question préliminaire : parmi les trois courbes suivantes, quelle est celle qui correspond à l'évolution de la température du pain à la sortie du four en fonction du temps ? Argumenter votre réponse.



Courbe1

Courbe2



Courbe 3

La fonction y vérifie l'équation différentielle : $(E) : y'(t) + 6y(t) = 6a$

I - Résolution d'une équation différentielle

Dans cette partie on considère que le pain est entreposé dans une pièce dont la température constante est a . À la sortie du four, c'est-à-dire à l'instant $t = 0$, le pain est à une température de 180°C .

- 1 - Déterminer les solutions sur $[0 ; +\infty[$ de l'équation $(E_0) : y' + 6y = 0$
- 2 - Soit g la fonction définie sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$ par $g(t) = k$, où k est une constante réelle dépendant de a . Déterminer k pour que la fonction g soit une solution particulière de l'équation différentielle (E) .
- 3 - En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E) .
- 4 - Démontrer que la fonction h définie sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$ par $h(t) = (180 - a)e^{-6t} + a$ est la solution de (E) correspondant à la condition initiale donnée.

II - Étude d'une fonction

- 1 - Dans cette question, le pain est entreposé à une température de 28°C .
 - (a) Soit f définie pour tout $t \geq 0$ par $f(t) = 152e^{-6t} + 28$.
Vérifier que f est la solution de l'équation (E) dans le contexte proposé.
 - (b) Étudier les variations de f sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$
 - (c) Déterminer la température θ du pain une demi-heure après la sortie du four. On donnera une valeur approchée de θ à un degré près.
 - (d) Le boulanger sort une fournée de pains du four. Déterminer par la méthode de votre choix au bout de quelle durée D le pain sera à une température de 62°C . On donnera une valeur approchée de D à une minute près.
- 2 - Quelle devrait être la température, au degré près, de la pièce dans laquelle est entreposé le pain afin que ce pain, sorti du four à 16h, soit à une température de 30°C à 16h30 ?

EXERCICE 2 (9 points)

La mesure précise des volumes est d'une grande importance au laboratoire. Elle peut être effectuée à l'aide d'une pipette jaugée ou graduée. Une pipette sert à prélever un volume précis d'un liquide (de 1 à 100 mL). Elles sont utilisées pour réaliser des dosages.

Les parties A et B peuvent être traitées de façon indépendante.

Partie A Défauts de fabrication et conformité

On rappelle que la probabilité qu'un événement E se réalise sachant que l'événement F (de probabilité non nulle) est réalisé se note $P_F(E)$ et vérifie : $P_F(E) = \frac{P(E \cap F)}{P(F)}$

L'entreprise AGOREX fabrique et distribue des pipettes jaugées en verre. Deux chaînes de production (A et B) permettent de répondre à la demande journalière.

- 55 % des pipettes viennent de la chaîne de production A et 2,6 % des pipettes de cette chaîne sont inutilisables ;
- 3,6 % des pipettes provenant de la chaîne de production B sont inutilisables. On choisit au hasard une pipette dans le stock journalier de l'entreprise et on note :
 - A l'événement : « La pipette est sortie de la chaîne de production A » ;
 - B l'événement : « La pipette est sortie de la chaîne de production B » ;
 - l'événement : « La pipette est inutilisable »

Les questions 1, 2 et 3 peuvent être traitées de façon indépendante.

1 - Calculer à 10^{-3} près la probabilité qu'une pipette soit inutilisable.

2 - On suppose que la probabilité (arrondie au centième) qu'une pipette soit inutilisable est égale à 0,03.

On prélève au hasard un échantillon de 100 pipettes dans le stock de l'entreprise. Le nombre de pipettes produites est suffisamment important pour que l'on assimile ce prélèvement à un tirage avec remise de 100 pipettes. On considère la variable aléatoire X qui, à tout prélèvement de 100 pipettes, associe le nombre de pipettes inutilisables.

(a) Déterminer la loi suivie par X en précisant ses paramètres.

(b) Quelle est la probabilité de l'événement : «au moins une des pipettes est inutilisable» ? On arrondira cette probabilité au millième.

3 - Pour répondre au cahier des charges de certains laboratoires, l'entreprise AGOREX est amenée à effectuer des tests de conformité. Une pipette utilisable est dite conforme si sa contenance est comprise entre 98 mL et 102 mL. On note C la variable aléatoire qui à chaque pipette prise au hasard dans le stock d'un laboratoire associe sa contenance (en millilitres). On admet que C suit une loi normale de moyenne 100 et écart type $\sigma = 1,021$. On prélève au hasard une pipette dans la production.

(a) Quelle est la probabilité, à 10^{-4} près, pour que cette pipette soit conforme ?

(b) Au final sur un lot de 1 000 pipettes produites combien seraient conformes ?

Partie B Estimation

Le laboratoire BIOMATOP effectuant des analyses se fournit en pipettes auprès de l'entreprise AGOREX.

Dans cette partie on considère une grande quantité de pipettes livrées au laboratoire. On considère un échantillon de 200 pièces prélevées au hasard dans cette livraison. La livraison est assez importante pour que l'on puisse assimiler ce tirage à un tirage avec remise.

Dans cet échantillon, on constate que 5 pipettes sont cassées.

1 - Donner une estimation ponctuelle de la proportion inconnue p_c des pipettes cassées de cette livraison.

2 - Déterminer un intervalle de confiance de la proportion p_c avec le coefficient de confiance de 95%.

ANNEXE

Exercice 1

Nombre de quinzaines : t_i	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre de vers : N_i	500	749	1122	1681	2518	3772	5650	8464	12678	18992
y_i	4,17	3,76			2,49			1,06	0,47	

Sujet de sciences physiques et chimiques 2016

Matériel autorisé : Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999).

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

A : LE THÉ JAPONAIS ET LA RADIOACTIVITÉ (12 points)

Le 15 juin 2011, la direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes intercepte à l'aéroport de Roissy un lot de thé vert japonais. Ce thé provient du sud-ouest de Tokyo, ville touchée par la catastrophe nucléaire de Fukushima.

Les feuilles de thé ayant capté des quantités importantes de césium 137, ce lot de thé est radioactif.

Après infusion des feuilles contaminées dans un litre d'eau chaude, on détecte une activité radioactive de 40 Bq.

Dans cet exercice, on cherche à savoir s'il faut s'inquiéter de la seule consommation de ce thé.

Données :

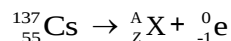
Noyau ou particule	Électron	Césium 134	Césium 137	Xénon	Baryum
Symbole	${}^0_{-1}\text{e}$	${}^{134}_{55}\text{Cs}$	${}^{137}_{55}\text{Cs}$	${}^{136}_{54}\text{Xe}$	${}^{137}_{56}\text{Ba}$

- Demi-vie radioactive du césium ${}^{137}_{55}\text{Cs}$: $t_{1/2} = 30$ ans.
- L'activité $A(t)$, mesurée en Becquerel (Bq), d'un échantillon radioactif est proportionnelle au nombre $N(t)$ de noyaux radioactifs présents à l'instant t dans cet échantillon : $A(t) = \lambda \times N(t)$ avec λ : constante radioactive du noyau.
- La relation entre la demi-vie radioactive $t_{1/2}$ et la constante radioactive λ est : $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$

1 - Donner la composition du noyau de césium ${}^{137}_{55}\text{Cs}$.

2 - Le césium 137 est un isotope du césium 134. Donner la signification du terme isotope.

3 - Le césium 137 est radioactif β^- . L'équation de désintégration du césium 137 est de la forme :



À partir des données de l'exercice, déterminer les deux valeurs de A et Z ainsi que la nature de X en précisant les lois de conservation utilisées.

4 - L'activité d'un kilogramme de ce thé radioactif a été mesurée à 1000 Bq, ce qui est supérieur à la norme autorisée.

4.1 - Indiquer ce que représente une activité de 1 Bq.

4.2 - Définir la demi-vie radioactive $t_{1/2}$.

4.3 - Si ce kilogramme de thé radioactif n'avait pas été détruit, son activité aurait atteint la norme autorisée en juin 2041. En déduire la valeur de l'activité correspondant à cette norme autorisée.

5 - Le Sievert (Sv) est une unité qui permet d'évaluer les effets biologiques des rayonnements sur le corps humain. Le milliSievert est fréquemment employé pour exprimer la dose efficace D reçue par une personne exposée à la radioactivité ($1 \text{ mSv} = 10^{-3} \text{ Sv}$).

Dans le cas d'une ingestion d'un aliment contaminé, la conversion de l'activité A de l'aliment en dose efficace D est donnée par la relation :

$D = F \times A$ où F est le facteur de dose par ingestion dont l'unité est le milliSievert par Becquerel.

Pour le césium 137, F vaut $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ mSv.Bq}^{-1}$.

5.1 - Déterminer la dose efficace D reçue par un consommateur buvant un litre de thé radioactif d'activité $A = 40 \text{ Bq}$, durant une journée.

5.2 - En considérant l'activité constante sur une année, montrer que le consommateur reçoit une dose efficace proche de $0,20 \text{ mSv}$ par an.

5.3 - Les sources d'exposition aux rayonnements radioactifs naturels ou artificiels sont multiples.

Par exemple, la dose reçue peut atteindre $0,30 \text{ mSv}$ lors d'une radiographie des poumons. Dans ces conditions, la seule consommation du thé contaminé mettrait-elle la santé des consommateurs en danger ?

B : LA VISCOSITÉ DU LAIT DE VACHE (8 points)

Plus la viscosité d'un liquide est élevée, plus celui-ci s'écoule difficilement.

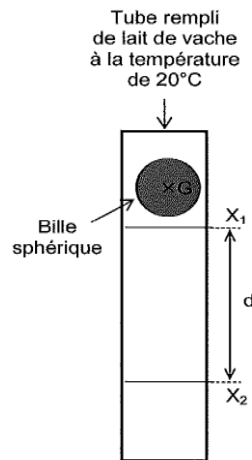
Dans le cas du lait, les teneurs en protéines et en matière grasse influent de façon importante sur la viscosité.

Lors de recherches sur internet, une étudiante a trouvé pour un lait de vache une viscosité double de celle de l'eau. Elle souhaite valider ou invalider cette information en réalisant une expérience.

Pour cela, elle utilise un viscosimètre à chute de bille qui comporte un long tube de verre vertical, rempli de lait **écrémé** acheté dans le commerce et dans lequel elle laisse tomber une bille sphérique.

Le mouvement vertical descendant de la bille est uniforme entre les deux repères fixes X_1 et X_2 (figure ci-contre).

À l'aide d'un chronomètre, l'étudiante mesure la durée moyenne Δt nécessaire au déplacement de la bille entre ces deux repères séparés d'une distance d .



Données :

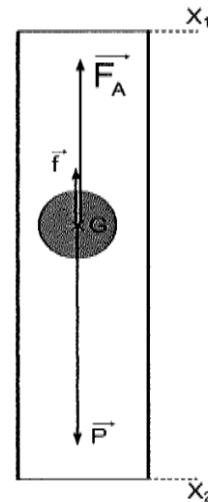
- Masse volumique de l'eau à 20°C : $\rho_E = 1000 \text{ kg.m}^{-3}$
- Viscosité de l'eau à 20°C : $\eta_E = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ Pa.s}$
- Intensité de la pesanteur : $g = 9,81 \text{ N.kg}^{-1}$
- Masse volumique de la bille : $\rho_B = 1050 \text{ kg.m}^{-3}$
- Volume d'une sphère : $V = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3$
- Rayon de la bille : $r = 1,00 \text{ mm}$
- La valeur de la poussée d'Archimède s'exerçant sur la bille sphérique de rayon r , immergée dans le lait de masse volumique ρ_L est donnée par : $F_A = \rho_L \times \frac{4}{3} \times \pi \times r^3 \times g$
- La valeur de la force de frottement fluide s'exerçant sur la bille sphérique de rayon r , en mouvement à la vitesse v , dans le lait de viscosité dynamique η_L est donnée par :

$$f = \frac{1}{2} \times \pi \times \eta_L \times r \times v$$
- On prendra $\pi = 3,14$.

1 - La durée moyenne de chute de la bille entre les repères X_1 et X_2 , distants de $d = 30,0 \text{ cm}$, est $\Delta t = 15,8 \text{ s}$. Montrer que la vitesse moyenne de la bille est $v = 1,90 \cdot 10^{-2} \text{ m.s}^{-1}$.

Les forces appliquées à la bille, lors de la chute rectiligne et uniforme, sont représentées sur la figure ci-contre :

- son poids $\vec{P}$
- la poussée d'Archimède $\vec{F}_A$
- la force de frottement fluide $\vec{f}$



2 - Par application du principe d'inertie au mouvement de la bille, on montre que : $P = F_A + f$.

En déduire que la viscosité du lait est donnée par la relation : $\eta_L = \frac{P - F_A}{6\pi \times r \times v}$

3 - Pour déterminer la viscosité du lait, il est nécessaire de connaître la valeur du poids de la bille.

3.1 - A partir des données, calculer la masse de la bille en kg.

3.2 - Montrer que le poids de la bille a pour valeur $P = 4,31 \cdot 10^{-5}$ N.

4 - L'étudiante a déterminé la masse volumique ρ_L du lait afin de calculer la valeur F_A de la poussée d'Archimède. Elle aboutit à $F_A = 4,24 \cdot 10^{-5}$ N.

4.1 - Proposer un protocole pour déterminer expérimentalement la masse volumique ρ_L du lait.

4.2 - A l'aide de la question 2, calculer la viscosité η_L du lait.

5 - L'étudiante peut-elle valider ou invalider l'information trouvée sur internet, compte tenu des éléments d'introduction sur la viscosité du lait et du résultat de son expérience ?

C : CONTRÔLE DE LA QUALITÉ D'UN VIN (8 points)

La casse ferrique :

Le vin contient naturellement en faible quantité des ions fer (II) et fer (III). Lors des différentes manipulations du vin (pompage et transvasement, débouchage des bouteilles, etc. ...) la dissolution du dioxygène de l'air dans le vin entraîne une oxydation partielle des ions Fe^{2+} en ions Fe^{3+} .

Si la concentration en ions Fe^{3+} est trop importante, ces ions précipitent avec les ions phosphate PO_4^{3-} présents dans le vin.

Le trouble blanc obtenu, appelé casse ferrique, rend impossible la commercialisation du vin.

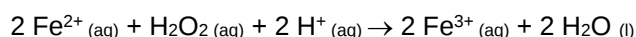
Un vin présente un risque de casse ferrique lorsque sa teneur en élément fer dépasse $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Il est donc nécessaire de déterminer la concentration totale en élément fer dans un vin pour évaluer le risque de casse ferrique. On se propose de contrôler la qualité d'un vin blanc.

Le dosage par étalonnage comporte plusieurs étapes.

1 - Première étape : oxydation des ions fer (II) par le peroxyde d'hydrogène en milieu acide

Afin de déterminer la quantité totale de fer dans un vin, il faut que tout le fer soit sous forme d'ions fer (III). Pour cela, on ajoute sur l'échantillon de vin analysé, en milieu acidifié, du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en excès pour oxyder les ions fer (II) en ions fer (III). L'équation de la réaction est la suivante :



Indiquer un intérêt de l'utilisation du peroxyde d'hydrogène comme oxydant.

2 - Deuxième étape : complexation des ions fer (III) par les ions thiocyanate

On verse ensuite une solution de thiocyanate de potassium ($K^+_{(aq)} + SCN^-_{(aq)}$). Les ions SCN^- forment avec les ions Fe^{3+} obtenus lors de la première étape un complexe rouge sang. Ce complexe est l'ion thiocyanatofer (III) de formule $[Fe(SCN)]^{2+}$.

L'équation de la réaction de formation de ce complexe s'écrit : $Fe^{3+}_{(aq)} + SCN^-_{(aq)} \leftrightarrow [Fe(SCN)]^{2+}_{(aq)}$.

Sa constante d'équilibre vaut $K = 1,3 \cdot 10^2$.

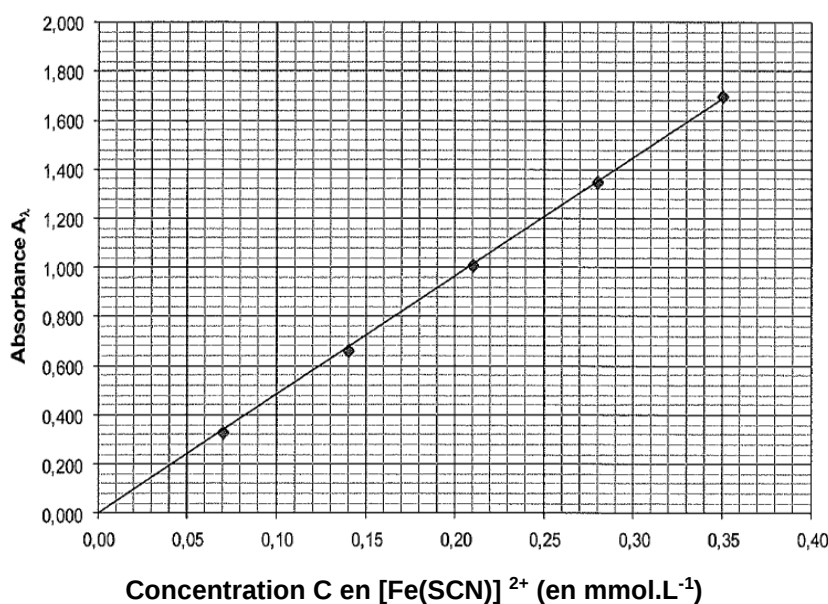
Expliquer la nécessité d'introduire les ions thiocyanate en excès.

3 - Troisième étape : dosage spectrophotométrique de l'élément fer dans le vin blanc analysé

On a préparé une gamme de solutions étalons de complexe $[Fe(SCN)]^{2+}_{(aq)}$. Pour chacune de ces solutions étalons, on mesure l'absorbance A_λ à une longueur d'onde λ judicieusement choisie.

La courbe représentant l'évolution de l'absorbance A_λ en fonction de la concentration C est donnée ci-dessous.

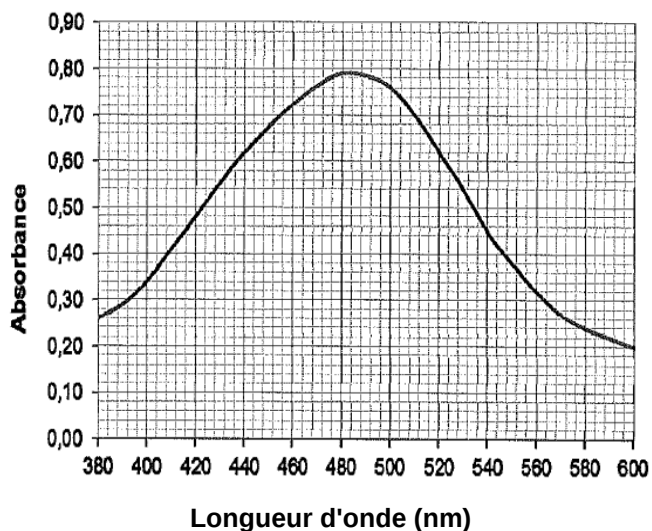
Absorbance d'une solution de complexe $[Fe(SCN)]^{2+}_{(aq)}$ en fonction de sa concentration, réalisée à une longueur $\lambda = 480$ nm (courbe d'étalonnage)



3.1- Montrer que la courbe est en accord avec la loi de Beer-Lambert.

3.2 - À l'aide du spectre d'absorption de l'ion complexe $[Fe(SCN)]^{2+}$ donné ci-dessous, expliquer le choix de la longueur d'onde $\lambda = 480$ nm utilisée pour ce dosage.

Spectre d'absorption de l'ion complexe thiocyanatofer (III)



Dans un tube à essais, on verse 5,0 mL du vin blanc analysé, 1,5 mL d'une solution d'acide chlorhydrique, 2,0 mL d'une solution de peroxyde d'hydrogène et enfin 1,5 mL d'une solution de thiocyanate de potassium, pour un volume total de 10 mL. On note S_{vin} la solution rouge obtenue à partir de ce vin blanc.

Dans les mêmes conditions de mesures, l'absorbance de cette solution est $A_{\lambda}(S_{\text{vin}}) = 0,720$.

3.3 - En utilisant la courbe d'étalonnage, déterminer graphiquement la concentration molaire C_s en complexe $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$. En déduire la concentration molaire en élément fer dans la solution S_{vin} . On s'appuiera sur les informations issues des questions 1 et 2.

3.4 - Montrer que la concentration molaire C_0 en élément fer dans le vin blanc analysé vaut $C_0 = 0,30 \text{ mmol.L}^{-1}$.

3.5 - Calculer la concentration massique C_{m0} en élément fer dans le vin blanc analysé et conclure sur la qualité de ce vin.

Donnée : masse molaire atomique du fer : $M(\text{Fe}) = 55,8 \text{ g.mol}^{-1}$.

D : SYNTHÈSE DE LA PHÉNYLALANINE (12 points)

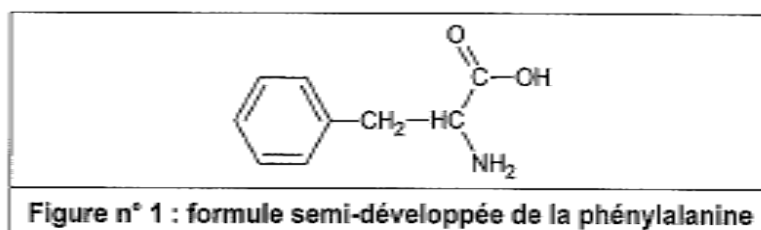
La phénylalanine est un acide α -aminé aromatique qui contribue au fonctionnement optimal du système nerveux de l'être humain.

L'organisme étant incapable de synthétiser la phénylalanine, elle doit être apportée par l'alimentation.

La phénylalanine est aussi un constituant de l'aspartame, dipeptide utilisé comme édulcorant dans les boissons et les aliments allégés.

Cet exercice a pour but d'étudier quelques étapes de la synthèse de cet acide α -aminé à partir du benzène.

1 - La formule semi-développée de la phénylalanine est représentée à la **figure n° 1** ci-dessous :



1.1 - Après avoir recopié la formule semi-développée de la phénylalanine sur la copie, entourer et nommer les deux fonctions chimiques présentes dans cette molécule.

1.2 - Cette molécule possède un atome de carbone asymétrique. Repérer, par un astérisque, cet atome de carbone asymétrique sur la formule semi-développée recopiée précédemment.

1.3 - La phénylalanine est une molécule chirale. Préciser ce que cela signifie.

La synthèse de la phénylalanine se fait en plusieurs étapes à partir du benzène.

2 - Étape 1

On fait réagir du chlorométhane $\text{CH}_3\text{-Cl}$ sur le benzène de formule brute C_6H_6 , en présence d'un catalyseur. On obtient le composé **A**.

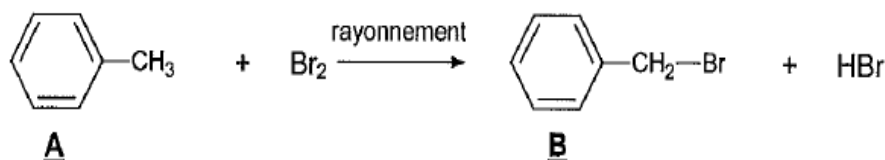
2.1 - Écrire l'équation de la réaction.

2.2 - Donner le nom et la formule d'un catalyseur couramment utilisé pour réaliser cette réaction.

3- Étape 2

Le composé **A** réagit avec du dibrome, en présence de lumière, pour conduire au composé **B**.

La réaction mise en jeu a pour équation :



3.1 - Parmi les termes suivants, choisir celui (ou ceux) qui caractérise(nt) la transformation étudiée : addition - électrophile - élimination - nucléophile - radicalaire - substitution.

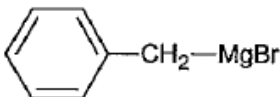
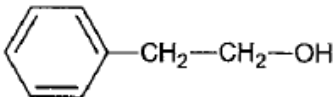
3.2 - Proposer un type de rayonnement adapté.

Étape 3

L'action du magnésium sur le composé **B**, dans l'éther anhydre, donne le **C** (figure n° 2).

4 - Étape 4

Le composé **C** réagit avec le méthanal pour donner, après hydrolyse en milieu acide, l'alcool **D** (figure n° 3).

	
Figure n° 2 : formule semi-développée de C	Figure n° 3 : formule semi-développée de D

4.1 - Préciser la famille chimique du composé **C**.

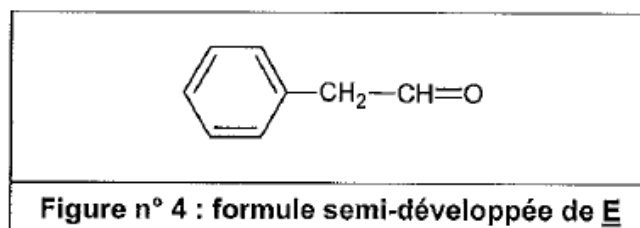
4.2 - Écrire la formule développée du méthanal

4.3 - Lors de l'étape 4, le groupe carbonyle du méthanal subit une addition nucléophile. Préciser la particularité de la liaison C=O qui permet d'expliquer cette addition.

4.4 - Donner le nom de l'alcool **D**.

5 - Étape 5 :

L'alcool **D**, oxydé par des ions permanganate MnO_4^- en milieu acide sulfurique, conduit à l'aldéhyde **E** représenté à la figure n° 4 ci-dessous.

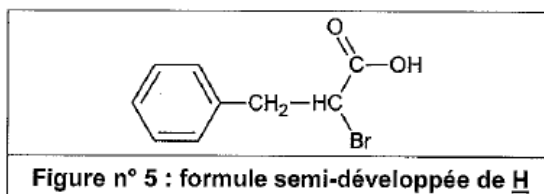


5.1 - Écrire les 2 demi-équations électroniques intervenant dans la réaction qui transforme l'alcool **D** en aldéhyde **E**

Donnée : Couple oxydant/réducteur mis en jeu pour l'élément manganèse : $\text{MnO}_4^- / \text{Mn}^{2+}$.

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

6 - D'autres étapes, non étudiées ici, permettent d'obtenir le composé **H** (figure n° 5) à partir du composé **E**. Finalement, l'action de l'ammoniac NH_3 sur le composé **H** conduit à la phénylalanine.



6.1 - Écrire la structure de Lewis de la molécule d'ammoniac.

Donnée : Numéro atomique de l'élément azote : $Z = 7$.

6.2 - En déduire la propriété de l'ammoniac mise en jeu dans cette transformation.

Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2016

Matériel autorisé : Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999).

Dictionnaire Anglais-Français

TRAITEMENT DES AVC

L'actilyse® est un médicament utilisé dans le traitement des Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC) ischémiques aigus. Le **document n°1** présente la fiche de l'ANSM (agence Nationale de Sécurité du Médicament). Son principe actif est l'activateur du plasminogène ou tPA (noté aussi alteplase), qui a une activité thrombolytique.

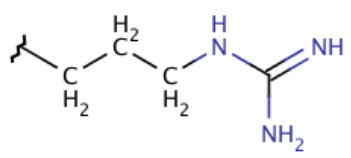
1 - Étude du principe actif tPA (ou alteplase) (27,5 points)

Le tPA est une sérine-protéase, glycoprotéine de PM 72000 Da. Il agit selon la cascade protéolytique présentée dans le **document n°2**, en clivant le plasminogène en plasmine, qui lui-même permet de dégrader la fibrine du caillot. La plasmine favorise le clivage du tPA simple chaîne (sc-tPA) en tPA double chaîne (dc-tPA).

Le clivage de ce plasminogène en plasmine par le tPA se fait entre les acides aminés Arg 561 et Val 562.

1.1 - Réaction catalysée

1.1.1 - Écrire la formule semi-développée de la séquence R561-V562, en respectant l'orientation conventionnelle

Acide aminé	Code 3 lettres	Code 1 lettre	Nom chimique (IUPAC) ou formule de la chaîne latérale
Arginine	Arg	R	
Valine	Val	V	Acide 2-amino-3-méthylbutanoïque

1.1.2 - À l'aide de la formule précédente, présenter l'équation de la réaction catalysée par le tPA.

1.1.3 - Dans la nomenclature IUPAC, l'enzyme tPA est notée 3.4.21.68. Indiquer la signification des deux premiers numéros du code numérique de l'enzyme.

1.2 - Structure du tPA

Le **document n°3** présente la séquence du tPA et son organisation en cinq domaines. L'un d'eux est le domaine catalytique, dont la structure tertiaire est représentée sur le **document n° 4**.

1.2.1 - Définir un domaine protéique.

1.2.2 - Annoter le **document n° 4** (à rendre avec la copie) pour identifier les motifs structuraux secondaires.

1.2.3 - Nommer les interactions qui stabilisent ces structures secondaires et indiquer les groupements impliqués.

1.3 - Les deux formes du tPA : étude par SDS-PAGE

Dans l'actilyse, le tPA se présente sous deux formes : l'une simple chaîne (sc-tPA) et l'autre double chaîne (dc-tPA), obtenue par coupure par la plasmine.

1.3.1 - Compte-tenu de la séquence du tPA présenté sur le **document n° 3**, expliquer les conséquences, en terme d'organisation moléculaire, du clivage du tPA.

Pour distinguer les deux formes sc-tPA et dc-tPA, une technique SDS-PAGE est proposée. Le **document n°5** rassemble la composition des tampons utilisés pour réaliser cette technique, ainsi que des exemple de résultats.

1.3.2 - Indiquer la signification du sigle SDS-PAGE.

1.3.3 - Lister, en respectant leur chronologie, les principales étapes de réalisation de cette technique.

1.3.4 - La composition des tampons utilisés pour réaliser la technique est donnée dans le **document n° 5A**.

1.3.4.1 - Expliquer le rôle du « sample buffer » en insistant sur le rôle du SDS et du Dithiothréitol (DTT)

1.3.4.2 - Préciser les rôles du glycérol, du bleu de bromophénol. Proposer une appellation courante du « sample buffer ».

1.3.5 - Le **document 5B** présente le schéma d'un exemple de résultats de SDS-PAGE sur un échantillon d'actilyse (médicament) , ainsi que sur des témoins (tPA) , après révélation du gel au bleu de Coomassie. Les échantillons 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ont été préparés en "sample Buffer DTT". L'échantillon 4 a été préparé en "sample buffer sans DTT"

1.3.5.2 - Indiquer la composition du marqueur de taille (puits 1)

1.3.5.3 - Orienter le gel et justifier le sens de migration des protéines. Noter sur le document n° 5B le poids moléculaire de chaque constituant du marqueur de taille (piste 6)

1.3.5.4 - Analyser les résultats obtenus pour les puits 2, 3 et 4. Expliquer les différences de profil obtenu.

1.3.5.5 - Analyser les résultats obtenus pour l'échantillon d'actilyse reconstitué, et conclure sur la forme prédominante.

2 - Contrôle de la production de l'actilyse par mesure d'activité enzymatique (19,5 points)

La mesure d'activité enzymatique permet de contrôler la qualité de la production de tPA par les cellules CHO recombinantes.

Cette activité est déterminée par méthode cinétique avec un suivi par spectrofluorimétrie.

2.1 - Principe d'un fluorimètre

Le document n° 6 présente le schéma de fonctionnement d'un spectrofluorimètre.

2.1.1 - Compléter le document n°6 en indiquant le nom des composants A, B et C.

2.1.2 - Indiquer la signification de λ et λ' figurant sur ce schéma. Comparer ces grandeurs. Justifier la réponse.

2.2 - Étalonnage du fluorimètre

Une solution étalon d'AMC (7-amino-4-coumarine) permet d'étalonner le fluorimètre selon la gamme présentée dans le **document n°7**.

2.2.1 - Indiquer la matériel nécessaire pour une préparation de la solution étalon fille d'AMC à $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Préciser les volumes choisis.

2.2.2 - Compléter le tableau de fluorimétrie sur le **document n°7**.

2.2.3 - Établir la relation entre la concentration en AMC (en $\mu\text{mol.L}^{-1}$) et l'intensité de fluorescence I_F (en UF), en précisant les paramètres de la régression linéaire .

2.3 - Détermination de l'activité spécifique du tPA

La fiche technique de détermination de l'activité enzymatique du tPA est donnée dans le **document n°8**.

2.3.1 - Expliquer le principe du test présenté dans le document n°8.

2.3.2 - Préparation de l'échantillon et conditions de mesure :

2.3.2.1 - Lors de la préparation de l'échantillon, seul le surnageant est récupéré après centrifugation. Proposer une justification. Indiquer pourquoi ces opérations se font à 4°C .

2.3.2.2 - Le tampon de dosage est fourni à 2X. Expliquer le « 2X ».

2.3.2.3 - Rappeler les conditions de mesure d'une activité enzymatique.

2.3.3 - Proposer une composition pour un tube permettant de faire le "zéro" du spectrofluorimètre..

2.3.4 - Une mesure est réalisée sur un surnageant de culture,

2.3.4.1 - Expliquer comment on s'assure que la mesure est bien réalisée en période initiale.

2.3.4.2 - Rappeler la définition de la concentration d'activité enzymatique(b)

2.3.4.3 - Dans les conditions de la mesure, pour le tPA, le calcul de b s'exprime par la formule

$$b = k \cdot \frac{\Delta IF}{\Delta t}$$

IF = intensité de fluorescence (UF)

Montrer que $b = 55,56$.

Données:

- b en nkat.L⁻¹
- $\frac{\Delta IF}{\Delta t}$ en UF.min⁻¹
- On considérera une stœchiométrie 1/1 pour la réaction catalysée par le tPA.
- 1 katal est la quantité d'enzyme qui permet de transformer 1 mol de substrat par seconde.

2.3.4.4 - Le surnageant testé a donné $\frac{\Delta IF}{\Delta t} = 9$ UF.min⁻¹, calculer sa concentration d'activité catalytique b.

2.3.4.5 - La concentration protéique dans le surnageant est de 20 mg.L⁻¹. Après avoir défini l'activité spécifique z_{sp} , calculer l'activité spécifique du surnageant en tPA.

2.3.5 - Ce surnageant subit plusieurs étapes de purification. Une dernière mesure est réalisée sur la fraction purifiée. On obtient une activité spécifique de 250 μ kat.g⁻¹. Comparer les deux activités spécifiques et conclure sur l'enrichissement en fin de purification

3 - Conséquences de l'AVC ischémique : aspect biochimique

Les AVC ischémique sont dus à l'obstruction d'une artère. Les cellules cérébrales ne sont alors plus irriguées et ne reçoivent plus suffisamment d'oxygène et de glucose, ce qui peut être à l'origine de lésions plus ou moins étendues. Ces lésions entraînent le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et de certaines voies métaboliques.

3.1 - Chaîne respiratoire

Le **document n° 9** présente un schéma fonctionnel d'une chaîne respiratoire eucaryote.

3.1.1 - Indiquer (sur la copie) la signification des lettres A, B, C, D et E

3.1.2 - Nommer le type de réactions mises en jeu au niveau des complexes I, II, III et IV.

3.1.3 - Expliquer le passage des protons au niveau des complexes I, III et IV.

3.1.4 - Le dernier élément du **document n°9**, présente un complexe moléculaire « F0F1 ». Rappeler le nom de ce complexe et présenter le rôle respectif des parties F0 et F1 de ce complexe

3.1.5 -. Préciser les conséquences d'un défaut d'approvisionnement en O₂.

3.2 - Métabolisme anaérobie

Suite à un AVC ischémique, un métabolisme anaérobie peut se mettre en place. Le document n°10 présente deux voies métaboliques.

3.2.1 - Indiquer le nom des voies 1 et 2.

3.2.2 - Renseigner les repères de F à K du document n°10 (à rendre avec la copie).

3.2.3 - Conclure sur l'intérêt de cette voie en cas d'AVC ischémique.

DOCUMENT N°1: EXTRAIT DE LA FICHE ANSM DE L'ACTILYSE**1. DENOMINATION DU MEDICAMENT**

ACTILYSE, poudre et solvant pour solution injectable et perfusion

2. COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

Un flacon de poudre contient 10 (ou 20 ou 30) mg d'altéplase

L'altéplase est produite par la technique de l'ADN recombinant dans une lignée cellulaire d'ovaire de hamster chinois (CHO).

L'activité spécifique de la substance de référence interne est de 580 000 Unités Alteplase/mg, (...)

3. FORME PHARMACEUTIQUE

Poudre et solvant pour solution injectable et perfusion.

La poudre se présente sous la forme d'un gâteau de lyophilisation blanc à jaune pâle.

4. DONNEES CLINIQUES (paragraphe non reproduit intégralement)**4.1. Indications thérapeutiques**

Utilisation pour le traitement fibrinolytique de l'accident vasculaire cérébral ischémique à la phase aiguë

4.2. Posologie et mode d'administration

Avant l'administration et dans des conditions rigoureuses d'asepsie, dissoudre l'altéplase (10, 20 ou 50 mg) dans un volume d'eau pour préparations injectables conformément au tableau suivant, afin d'obtenir une concentration finale soit de 1 mg d'altéplase/ml, soit de 2 mg d'altéplase/ml:

La solution reconstituée doit alors être administrée par voie intraveineuse.

5. DONNEES PHARMACEUTIQUES**Liste des excipients**

Poudre pour solution:

Arginine

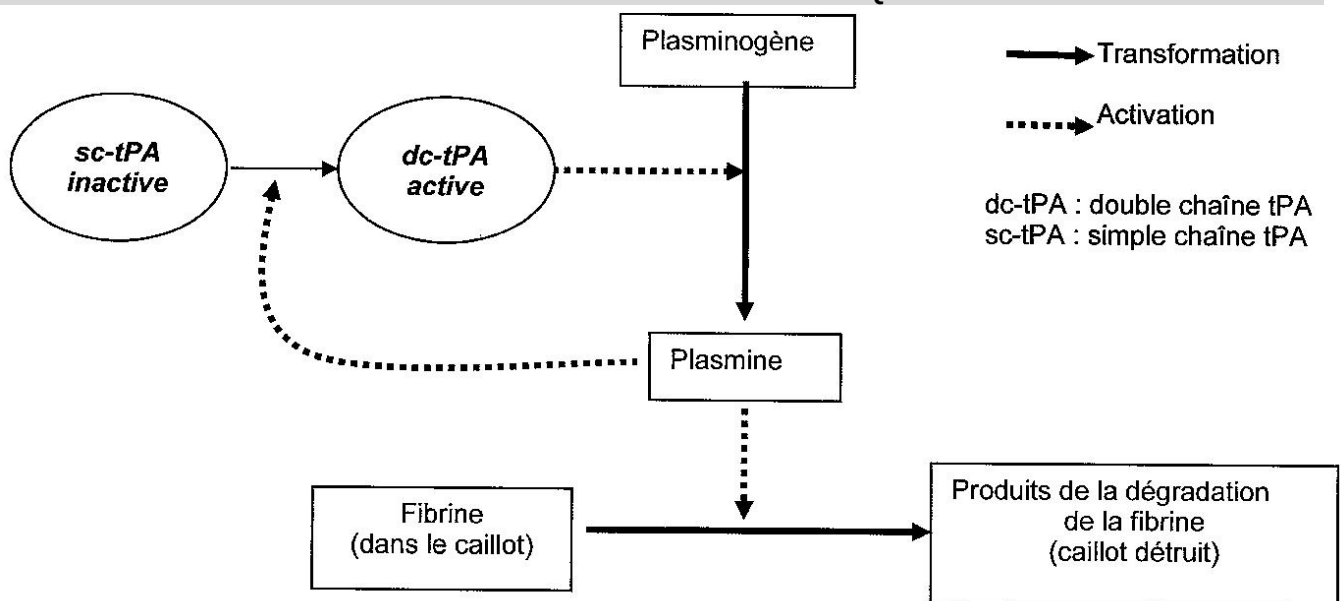
Acide phosphorique dilué

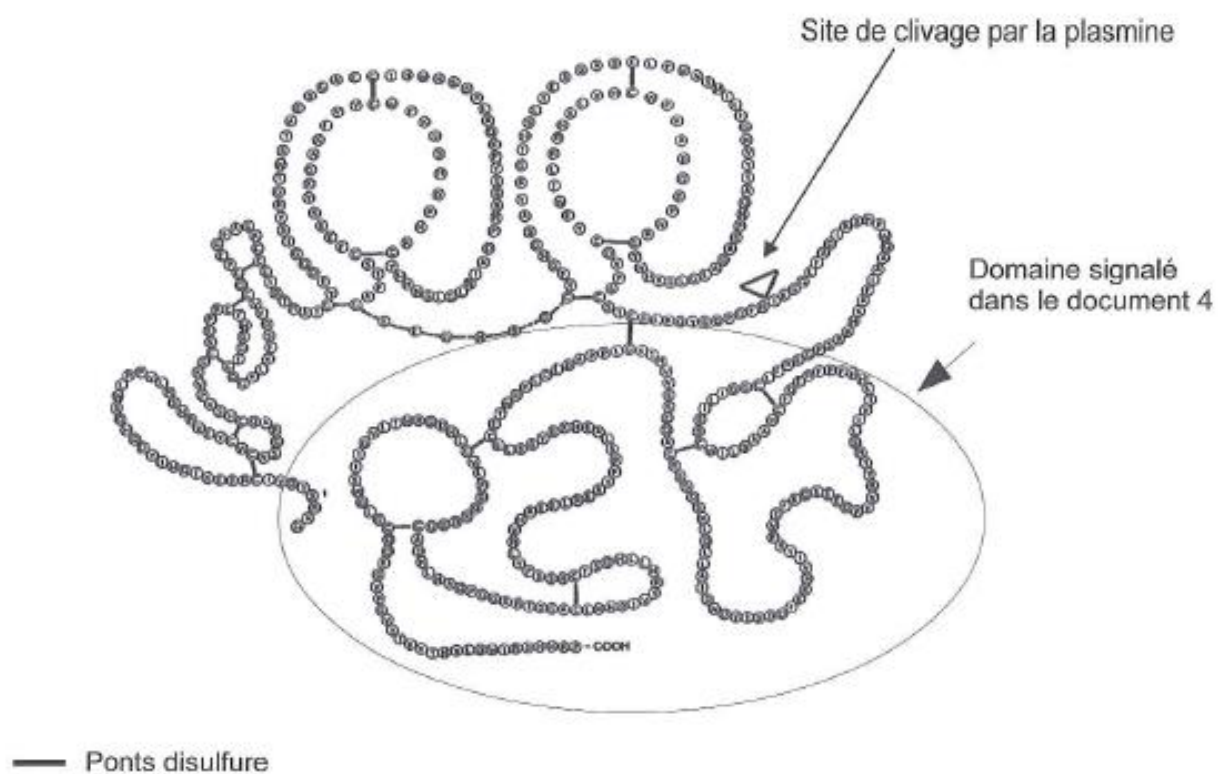
Polysorbate 80.

Solvant:

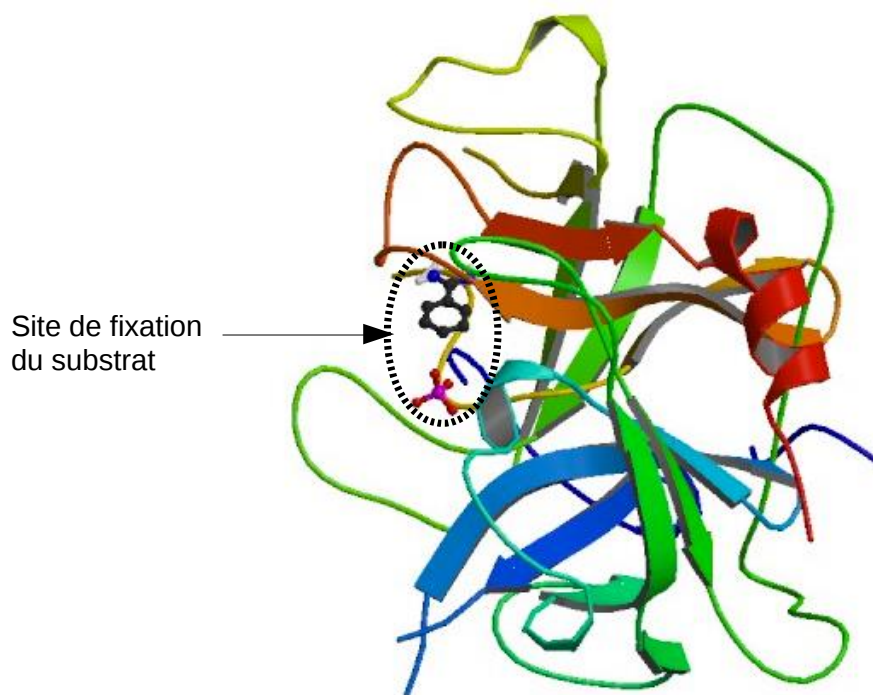
Eau pour préparations injectables.

Le pH de la solution reconstituée est $7,3 \pm 0,5$.

DOCUMENT 2 : CASCADE PROTÉOLYTIQUE

DOCUMENT N°3 : STRUCTURE DU tPA SOUS SA FORME SIMPLE CHAÎNE**DOCUMENT N°4 : À RENDRE AVEC LA COPIE**

Domaine catalytique du tPA



DOCUMENT N°5 : ÉTUDE DU tPA PAR SDS-PAGE
À RENDRE AVEC LA COPIE

5A : Composition des tampons*5x Sample Buffer*

10% w/v	SDS
10 mmol.L ⁻¹	Dithiothreitol, or beta-mercapto-ethanol
20 % v/v	Glycerol
0,2 mol.L ⁻¹	Tris-HCl, pH 6.8
0,05% w/v	Bromophenolblue

5x Sample Buffer sans DTT

10% w/v	SDS
20 % v/v	Glycerol
0,2 mol.L ⁻¹	Tris-HCl, pH 6.8
0,05% w/v	Bromophenolblue

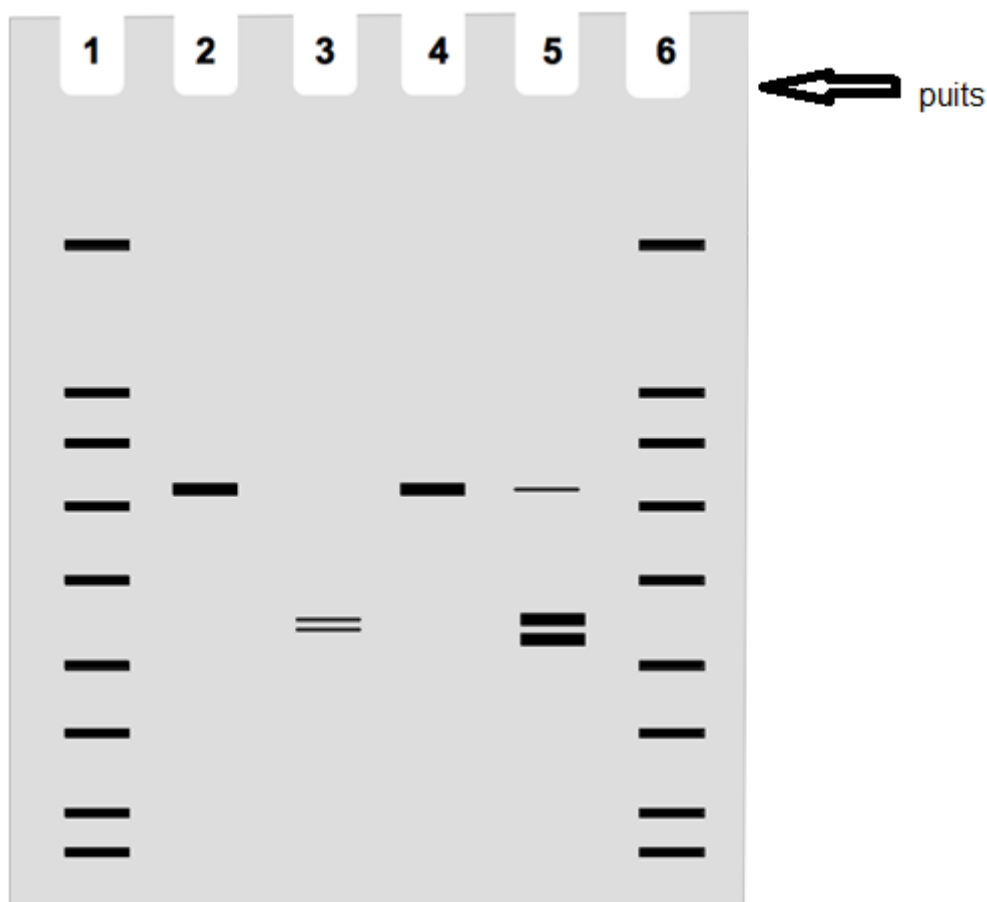
Should add up to 8M urea for really hydrophobic proteins

1x Running Buffer:

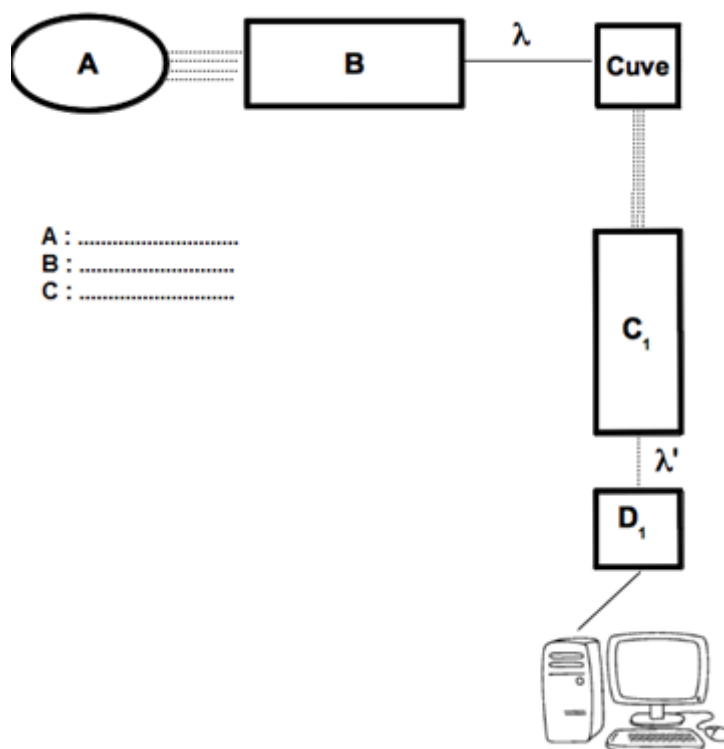
25 mmol.L ⁻¹	Tris-HCl
200 mmol.L ⁻¹	Glycine
0,1% (w/v)	SDS

5B : Exemple de résultats :

Puits 1 et 6	Marqueur de taille (200 ; 116 ; 97,4 ; 66 ; 45 ; 31 ; 21,5 ; 14,4 ; 6,5 en kDa)
Puits 2	sc- tPA purifié
Puits 3	dc -tPA purifié
Puits 4	dc -tPA purifié , préparé en tampon "Sample Buffer sans DTT"
Puits 5	Échantillon d'actilyse reconstitué



**DOCUMENT 6 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN FLUORIMÈTRE
À RENDRE AVEC LA COPIE**

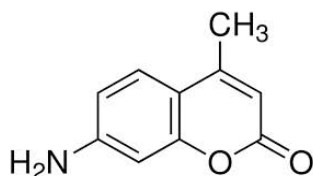


**DOCUMENT 7 : ETALONNAGE DU FLUORIMÈTRE
À RENDRE AVEC LA COPIE**

Protocole d'étalonnage

FLUOROCHROME :

AMC ou
7-amino-4-coumarine



L'AMC émet une lumière bleue vive, qui peut être enregistrée avec les réglages suivants :
excitation à 354 nm
émission à 442 nm

- à partir de l'étalon AMC à 4 mmol.L⁻¹, préparer une solution étalon fille à 40 μmol.L⁻¹ avec le tampon 1X utilisé pour la détermination d'activité enzymatique, puis réaliser la gamme présentée ci-dessous.
- Mesurer l'intensité de fluorescence pour le couple Ex/Em = 354/442 nm, en UF (unité arbitraire de fluorescence)

Tubes	Blanc	1	2	3	4
Volume (en μL) de solution étalon fille à 40 μmol.L ⁻¹					
Tampon 1X qsp 200 μL					
[AMC] en μmol.L ⁻¹	0	5	10	15	20
I _F = Intensité de fluorescence (UF)	0	2,9	6,0	9,3	11,8

DOCUMENT N°8 : DÉTERMINATION D'ACTIVITÉ

Fiche technique ANASPEC / Sensolyte® AMC tPA Activity Assay Kit *Fluorimetric

Principles

This kit contains a fluorogenic substrate with a high reactivity and low background. Upon protease cleavage, this substrate generates the AMC fluorophore emitting bright blue fluorescence. Increase in AMC fluorescence is proportional to tPA activity.

Kit components :

- TPA substrate solution, in 2X Assay Buffer, 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.
- 2X Assay Buffer

Protocol

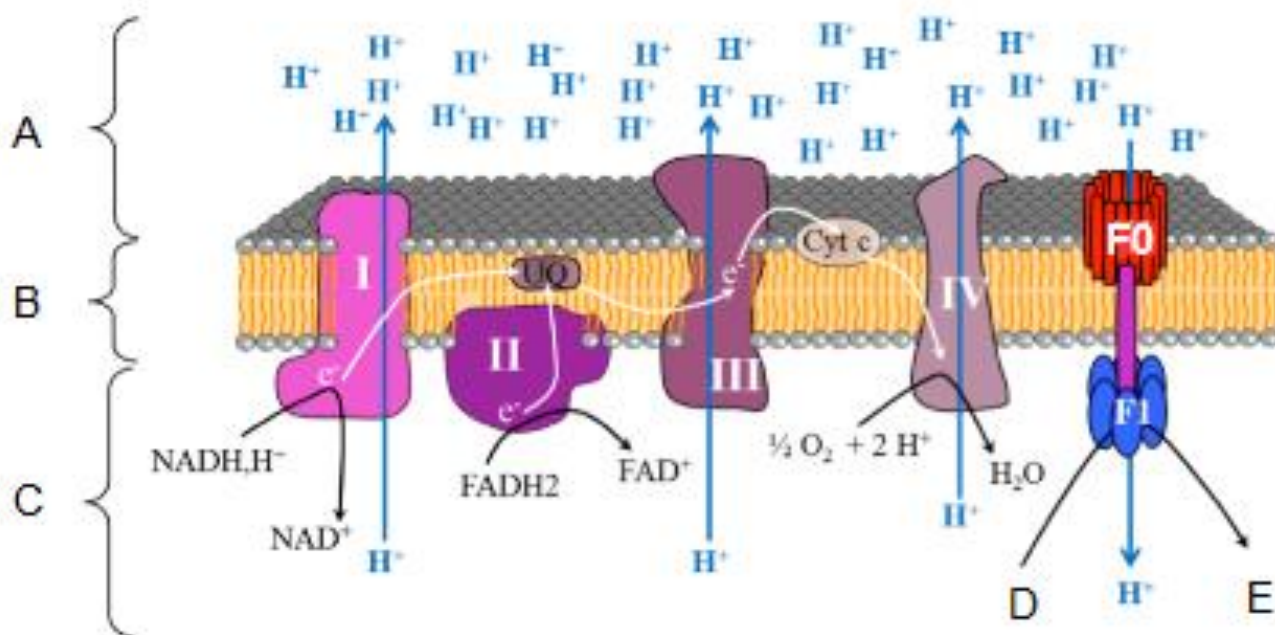
1. Sample Preparation and Storage : Centrifuge cell culture media at 3000 x g for 15 minutes at 4 °C to remove debris. Collect supernatants. Samples can be store at < -80 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles

2. Set up and run enzymatic reaction :

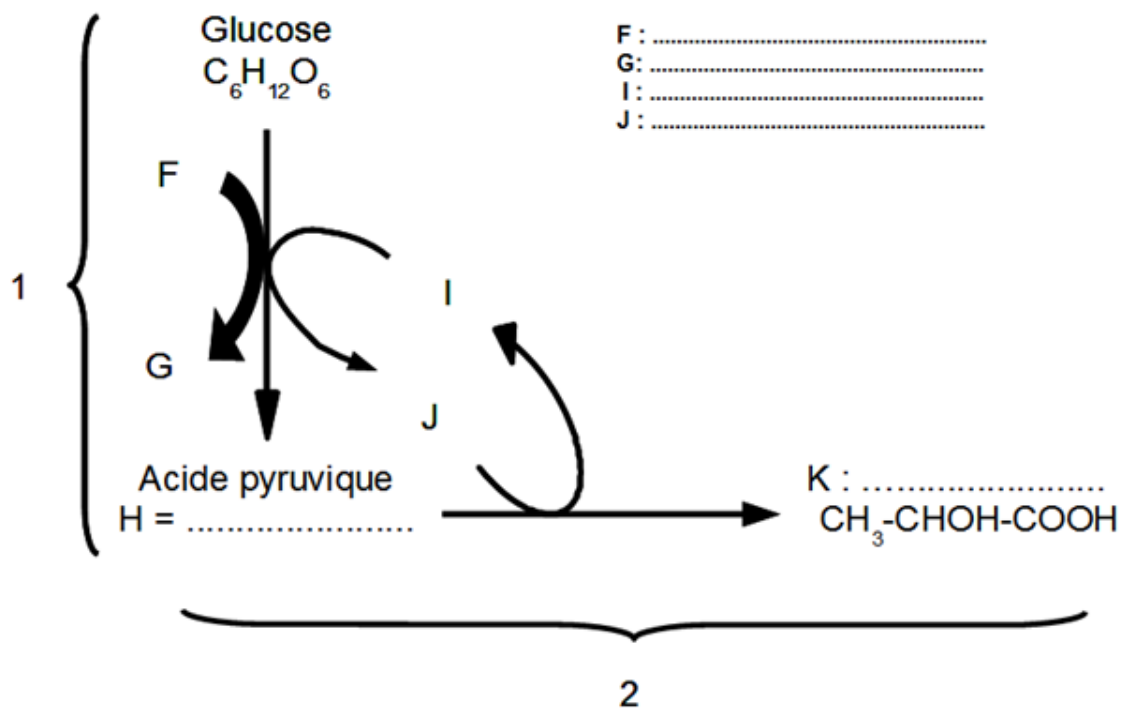
- in each well
 - add 50 μL of tPA containing sample
 - add 50 μL of tPA substrate solution (first equilibrated to the experiment temperature)
- mix the reagents completely by shaking the plate gently for 30 sec.
- immediately start measuring fluorescence intensity continuously
- determine the range during the reaction is linear.
- obtain the initial reaction velocity by determining the slope of the linear portion of the data plot. The increase of intensity of fluorescence (I_F) is measured in UF.min^{-1} .

Any temperature from room temperature to 37 °C may be used, as long as the incubation are performed at the same temperature.

DOCUMENT N°9 : SCHEMA D'UNE CHAINE RESPIRATOIRE EUCARYOTE ASSOCIEE AU COMPLEXE F0F1



**DOCUMENT N°10 : VOIE METABOLIQUE APRES AVC ISCHEMIQUE
À RENDRE AVEC LA COPIE**



Sujet de microbiologie et de technologies d'analyse 2016

Matériel autorisé : Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999).

Dictionnaire Anglais-Français

ANALYSES ET CONTRÔLES DANS LE CADRE DE LA FABRICATION D'UN FROMAGE

Une filière d'un grand groupe européen s'est spécialisée dans la fabrication et la commercialisation des fromages à pâte molle à partir de lait de vache, de brebis et de chèvre.

Cette entreprise reçoit le lait et réalise toutes les étapes de sa transformation en fromage. La fabrication d'un fromage comporte de nombreuses étapes notamment :

- La sélection et la croissance des ferments utilisés ;
- Le contrôle du lait avant transformation ;
- Le contrôle du produit fini.

1 - Analyse de la croissance des ferments de fabrication (19,5 points)

Le **document 1** représente le diagramme de fabrication du fromage.

1.1 - Croissance et conservation des bactéries lactiques

1.1.1 - *Streptococcus* et *Lactobacillus* sont des bactéries lactiques. Citer trois autres genres de bactéries lactiques.

1.1.2 - Le **document 2** met en correspondance la courbe de croissance d'une souche de bactérie lactique et la production d'acide dans le lait.

1.1.2.1 - Analyser la courbe de croissance.

1.1.2.2 - Définir et calculer les paramètres de la croissance en phase exponentielle.

1.1.2.3 - À partir des **documents 1 et 2**, expliquer le rôle des ferments lactiques dans la fabrication du fromage.

1.1.2.4 - Indiquer deux types de fermentations glucidiques mises en œuvre par les bactéries lactiques. Nommer les produits formés dans chacune des fermentations.

1.1.3 - Proposer deux méthodes de conservation des bactéries lactiques. Préciser pour chacune d'elles les précautions à respecter.

1.1.4 - La fabrication du fromage intègre une étape de salage. Préciser son rôle.

1.2 - Facteurs influençant la culture des bactéries lactiques

1.2.1 - Le **document 3** indique la composition du lait de vache.

Analyser la composition du lait. Indiquer les raisons pour lesquelles les bactéries lactiques peuvent y cultiver.

1.2.2 - La nutrition azotée constitue un facteur limitant de la croissance des bactéries lactiques dans le lait. Aussi, la plupart de ces bactéries possède une protéase de paroi.

1.2.2.1 - Le **document 4** représente deux courbes de croissance de *Streptococcus thermophilus* en présence de substrats azotés dans du lait.

- La **figure a** représente la courbe de croissance type d'une souche « **protéase -** »
- La **figure b** représente la courbe de croissance d'une souche « **protéase +** »

Comparer les deux courbes. Justifier le tracé particulier de la courbe de la **figure b**.

1.2.2.2 - Lors d'une culture pure de *Streptococcus thermophilus* « **protéase -** », la concentration bactérienne obtenue en phase stationnaire est de $4,5 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹ de lait. Dans les mêmes conditions expérimentales, mais en culture mixte en présence d'une souche « **protéase +** », *Lactobacillus delbrueckii*, la biomasse de *Streptococcus thermophilus* en phase stationnaire devient $4,3 \cdot 10^{10}$ UFC.mL⁻¹ de lait. Commenter cette évolution de la biomasse de *Streptococcus thermophilus*.

1.2.2.3 - En déduire un critère décisif pris en compte dans le choix des ferments mixtes actuellement utilisés dans la fabrication du fromage.

2 - Contrôle du lait avant transformation (21,5 points)

La traite des vaches, même réalisée dans des conditions d'hygiène conformes, s'accompagne toujours de contaminations par des microorganismes variés ; ceux-ci constituent une flore complexe qui se dissémine facilement et rapidement dans le lait.

2.1 - Action d'agents antibactériens

2.1.1 - La flore exogène constitue la contamination la plus importante du lait.

2.1.1.1 - Définir le terme « flore exogène ». Préciser les origines des microorganismes qui la constituent.

2.1.1.2 - Préciser en conséquence le mode de conservation du lait, imposé au producteur. Justifier la réponse.

2.1.1.3 - Aussitôt après la traite, *Pseudomonas* représente moins de 1 % de la flore totale du lait. Après 4 jours de conservation à 5 °C, il en représente plus de 90 %. Justifier cette évolution.

2.1.1.4 - Expliquer un effet possible sur le fromage de la présence de *Pseudomonas*.

2.1.2 - Dans l'entreprise, le lait utilisé pour la fabrication des fromages est préalablement pasteurisé.

2.1.2.1 - Indiquer l'intérêt de la pasteurisation.

Avant la pasteurisation, le pH du lait est contrôlé. Quelles seraient les conséquences de la pasteurisation d'un lait trop acide ?

2.1.2.2 - Après chaque cycle de pasteurisation, l'opérateur effectue un nettoyage - désinfection de l'appareil. Proposer un protocole opératoire complet. Justifier les différentes étapes.

2.2 - Recherche d'antibiotiques dans le lait

2.2.1 - À son arrivée dans l'entreprise, le lait subit différents contrôles. Pour détecter la présence d'antibiotiques, le laboratoire utilise le test « ECLIPSE Farm » dont le mode opératoire est détaillé **document 5**. Ce test repose sur des caractéristiques de *Geobacillus stearothermophilus*, bacille aéroanaérobie facultatif capable de fermenter des glucides.

2.2.1.1 - Les antibiotiques de la classe des β lactamines sont largement utilisés dans le traitement des mammites et autres infections des vaches laitières. Nommer deux β lactamines. Préciser leur mode d'action et leur spectre d'activité.

2.2.2.2 - Après traitement par antibiotiques d'une mammite, le producteur doit jeter, pendant 4 jours le lait produit par la vache soignée. Justifier cette obligation réglementaire.

2.2.2 - Le test présenté dans le **document 5** comprend des contrôles et des essais sur des échantillons de lait.

2.2.2.1 - Indiquer la composition du tube contrôle négatif. Justifier le changement de couleur de ce tube après l'incubation en précisant les phénomènes à l'origine de ce résultat.

2.2.2.2 - Indiquer l'aspect d'un tube contenant du lait provenant d'une vache traitée pour une mammite. Justifier la réponse.

2.2.2.3 - Argumenter le choix de l'incubation à 65 °C.

2.2.3 - Le lait doit être exempt de toute autre substance indésirable notamment l'aflatoxine M1. Préciser l'origine de cette substance dans le lait et la catégorie de toxine à laquelle appartient cette molécule.

3 - Contrôle microbiologique du produit fini (19 points)

Le laboratoire de microbiologie de l'entreprise effectue de nombreuses analyses afin de contrôler la qualité des fromages. La mise en œuvre de ces tests et leur interprétation sont guidées par des critères de sécurité pour la mise sur le marché et d'hygiène pour le procédé de fabrication.

3.1 - Analyses microbiologiques réalisées par l'entreprise

3.1.1 - Pour chacun des critères, sécurité, hygiène du procédé de fabrication, préciser le type de microorganisme recherché et la conséquence sur le produit dans le cas d'une contamination avérée.

3.1.2 - Sur chaque lot de fromages préparés selon le diagramme de fabrication exposé dans le **document 1**, le laboratoire d'analyses microbiologiques recherche la présence de *Listeria monocytogenes* et effectue un dénombrement d'*Escherichia coli*.

3.1.2.1 - Indiquer la signification de la présence d'*Escherichia coli* dans un fromage au lait pasteurisé.

3.1.2.2 - *Listeria monocytogenes* est recherchée car elle peut être responsable d'intoxication alimentaire. Définir une intoxication alimentaire.

3.1.2.3 - Indiquer et décrire les étapes de l'envahissement de l'épithélium intestinal par *Listeria monocytogenes*.

3.2 - Utilisation d'une méthode alternative pour la recherche de *Listeria monocytogenes*

Pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le fromage, le laboratoire utilise une méthode alternative décrite dans le **document 6**. Cette méthode repose sur un test immuno-enzymatique.

3.2.1 - Nommer et justifier les étapes utilisant successivement le bouillon Fraser 1/2, puis le bouillon Fraser.

3.2.2 - Préciser la composition du conjugué présent dans le tube 6 de la cartouche. Schématiser l'édifice moléculaire annoté obtenu dans le cône « essais » pour un résultat positif.

3.2.3 - En cas de résultat positif, la méthode préconise une confirmation grâce à la méthode de référence pratiquée sur le bouillon Fraser conservé à basse température. Exposer les étapes nécessaires pour aboutir à la confirmation.

3.2.4 - Citer une autre catégorie de méthode alternative utilisable pour détecter les antigènes de *Listeria monocytogenes* dans le bouillon Fraser.

3.3 - Dénombrement d'*Escherichia coli* dans le fromage

Pour le dénombrement d'*Escherichia coli*, le laboratoire utilise la méthode NF ISO 16649 qui repose sur l'utilisation du milieu chromogène TBX dont la composition est indiquée dans le document 7.

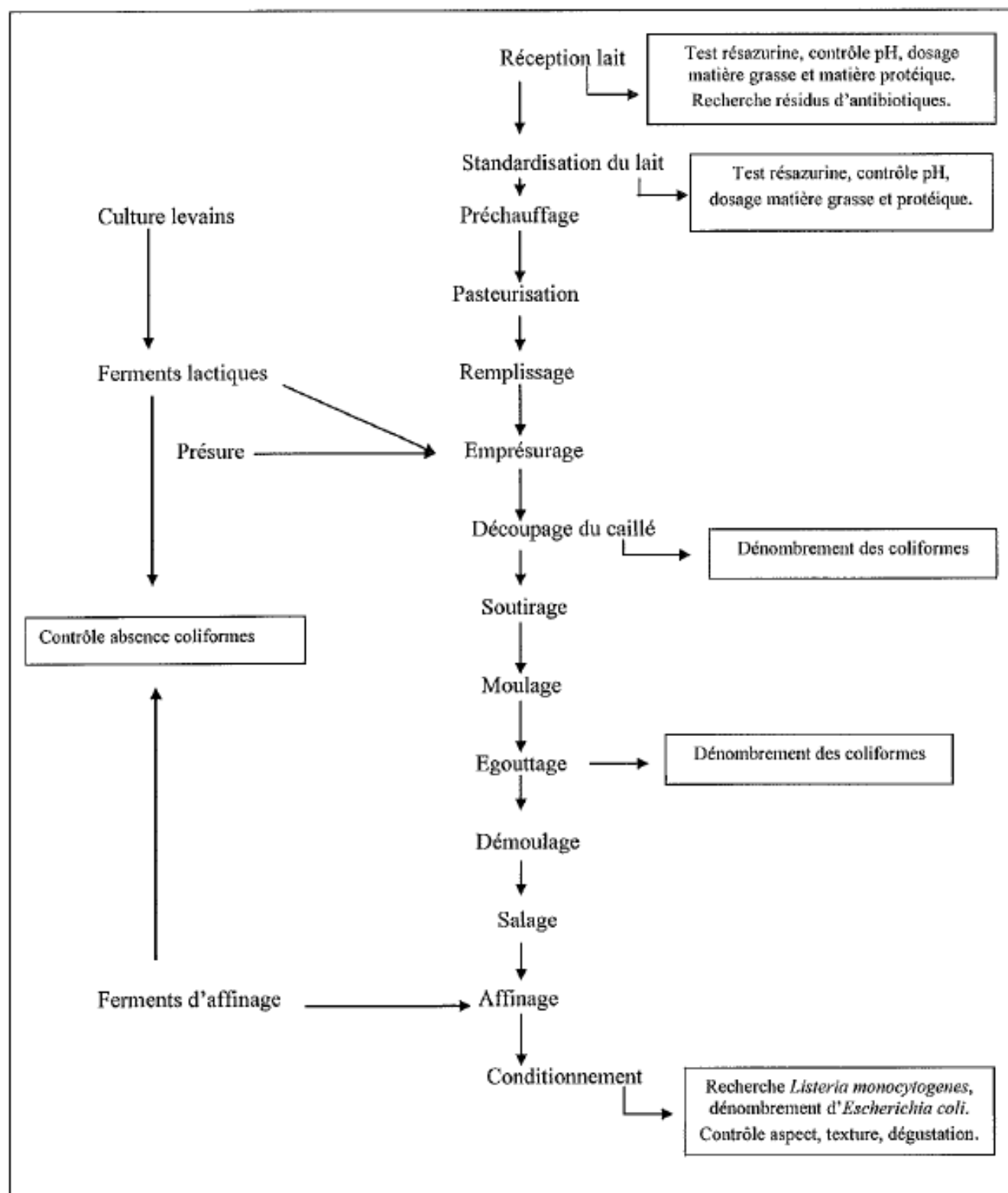
3.3.1 - Indiquer les caractères culturels et biochimiques d'*Escherichia coli* permettant ce dénombrement.

3.3.2 - Le dénombrement réalisé sur le lot de fromages a donné les résultats suivants (en UFC.g⁻¹) :

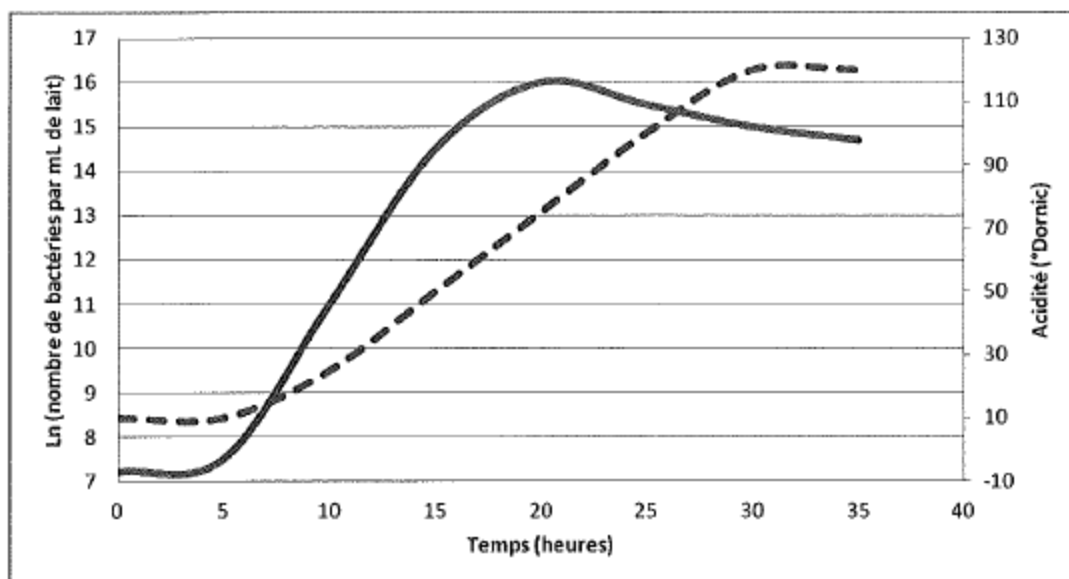
F1	F2	F3	F4	F5
5,0.10 ¹ UFC.g ⁻¹	8,5. 10 ¹ UFC.g ⁻¹	1,2. 10 ² UFC.g ⁻¹	9,4. 10 ¹ UFC.g ⁻¹	1,4. 10 ² UFC.g ⁻¹

En utilisant le **document 8**, conclure sur la qualité bactériologique du lot. Justifier la réponse.

DOCUMENT 1 : DIAGRAMME DE FABRICATION D'UN FROMAGE A PÂTE MOLLE



**DOCUMENT 2 : CROISSANCE ET PRODUCTION D'ACIDE D'UNE BACTÉRIE LACTIQUE DANS LE LAIT
À RENDRE AVEC LA COPIE**



Courbe en trait plein : Courbe de croissance : $\ln(\text{nombre de bactéries par mL de lait}) = f(\text{temps})$

Courbe en pointillés : Courbe d'évolution de l'acidité : $\text{degré Dornic} = f(\text{temps})$

Adapté de : www.fao.org

DOCUMENT 3 : PRINCIPAUX COMPOSANTS DU LAIT DE VACHE

Composants	Concentration en g.L ⁻¹
Eau	905
Lactose	49
Lipides	35
Protides : Caséines, protéines solubles (globulines, albumine), substances non protéiques (acides aminés libres, petits peptides)	34 en faible quantité
Acide citrique	2
Acide phosphorique	2,6
Chlorure de sodium	1,7
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	traces

pH : 6,4 à 6,8
(D'après Alais)

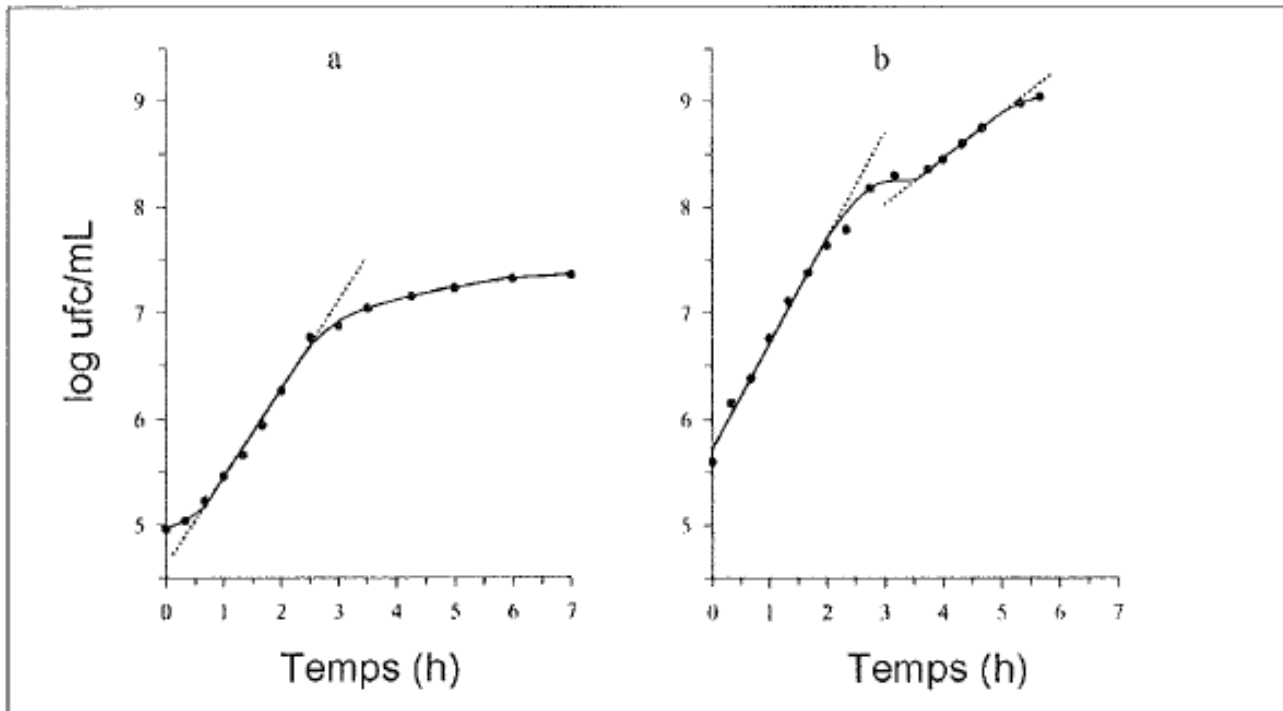
DOCUMENT 4 : CROISSANCE DE SOUCHES DE *Streptococcus thermophilus* DANS LE LAIT

Figure a : souche protéase moins - Figure b : souche protéase plus
(Extrait de Letort *et al*, 2002)

DOCUMENT 5 : LE TEST ÉCLIPSE Farm

ECLIPSE farm est un test de détection qualitative des antibiotiques et des inhibiteurs dans les laits de vache, brebis ou chèvre.

Composition du coffret :

- Tubes unitaires. Chaque tube contient un milieu gélosé et glucosé au pourpre de bromocrésol. Ce milieu renferme des spores de *Geobacillus stearothermophilus*.
- Pipettes, film adhésif.
- Certificat qualité témoignant de la couleur violette initiale du milieu.

Stockage et conservation

Le coffret doit être conservé entre 4 et 12 °C à l'abri de la lumière. Sa durée de vie est de 12 mois après fabrication.

Matériel complémentaire non fourni

- Une étuve réglée à 65 °C.
- Pour les contrôles négatifs : Poudre de lait de vache ou poudre de lait de brebis ou poudre de lait de chèvre.
- Pour le contrôle positif : solution de Pénicilline G

Mode opératoire

- Distribuer dans chaque tube 100 µL de lait à analyser. Effectuer les contrôles en parallèle
- Fermer les tubes avec le film adhésif et placer les tubes dans une étuve à 65 °C pendant 2 h 45 minutes. À la fin de l'incubation, le contrôle négatif doit avoir changé de couleur. Effectuer la lecture des différents tubes.

DOCUMENT 6 : PRÉSENTATION DE LA MÉTHODE ALTERNATIVE : VIDAS LMO2

Étapes de préparation de l'échantillon à analyser :

- Préparer la suspension mère de fromage en bouillon Fraser 1/2, incuber 24 à 26 heures à 30 °C - Pratiquer un repiquage en bouillon Fraser complet, incuber 24 à 26 heures à 30 °C.
- Le test VIDAS LMO2 est ensuite réalisé à partir d'un aliquote de Fraser complet. Le reste du bouillon est conservé au froid pour une éventuelle confirmation.

Présentation du matériel et des réactifs

Chaque test nécessite :

Un cône à usage unique. Ce cône sert à la fois de phase solide et de système de pipetage pour le test. L'intérieur du cône est recouvert d'anticorps *anti-Listeria monocytogenes* absorbés sur sa surface.



Le cône

Une cartouche représentée ci-dessous. Elle est constituée de tubes qui contiennent les différents réactifs : solution de lavage, conjugué et substrat de la phosphatase alcaline

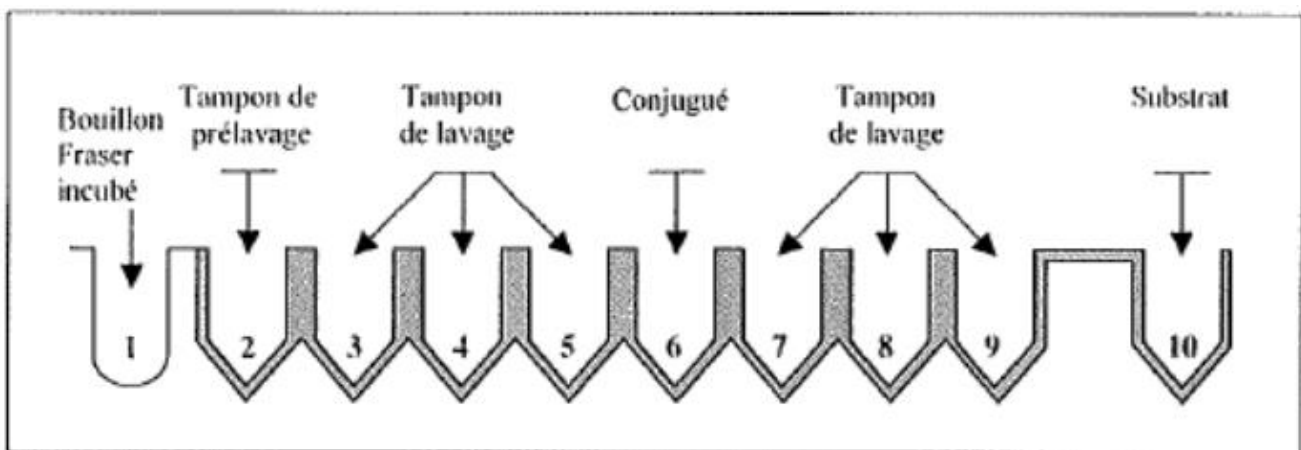


Schéma de la cartouche adapté de « Microbiologie alimentaire » de C et JN. JOFFIN

Mode opératoire

Toutes les réactions ont lieu dans le cône. Le traitement automatisé comprend plusieurs étapes successives :

- Prélavage du cône par aspiration /refoulement du contenu du tube 2 de la cartouche.
- Aspiration dans le cône puis refoulement de l'aliquote de bouillon Fraser placé dans le tube 1 de la cartouche.
- Lavage du cône (en 3, 4, 5).
- Aspiration dans le cône puis refoulement du conjugué (en 6).
- Lavage du cône (en 7, 8 et 9)
- Aspiration dans le cône de la solution de 4-méthyl-umbelliféryl-phosphate (substrat de la phosphatase alcaline) puis refoulement dans le même tube qui servira de cuve optique.
- Mesure de l'absorbance à 450 nm du contenu du tube 10.
- Si le résultat est négatif, l'analyse n'est pas poursuivie. Par contre en cas de résultat positif, une confirmation est nécessaire.

DOCUMENT 7 : MILIEU TBX**COMPOSITION**

Composants	Concentration en g.L ⁻¹ d'eau distillée
Tryptone	20
Sels biliaires	1,5
BCIG (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronique)	0,075
Agar-agar	9

MODE D'EMPLOI

- Ensemencement dans la masse
- Incubation à 44 °C pendant 18 à 24 h

LECTURE

Procéder au comptage des colonies bleues caractéristiques dans les boîtes contenant moins de 150 colonies.

DOCUMENT 8 : EXTRAIT DES CRITÈRES MICROBIOLOGIQUES UTILISÉS DANS L'ENTREPRISE

Désignation	Plan d'échantillonnage	<i>Escherichia coli</i>
Lait ayant subi un traitement thermique plus faible que la pasteurisation	n = 5 c = 2	m = 10 ¹ UFC.g ⁻¹ M = 10 ² UFC.g ⁻¹
Fromage au lait pasteurisé	n = 5 c = 2	m = 10 ² UFC.g ⁻¹ M = 10 ³ UFC.g ⁻¹

Analyse des résultats :

- Qualité satisfaisante si toutes les valeurs observées sont $\leq m$.
- Qualité acceptable lorsqu'un maximum de c/n valeurs se situe entre m et M et que le reste des valeurs observées est $< m$.
- Qualité insatisfaisante lorsqu'une ou plusieurs valeurs observées sont $> M$ ou lorsque c/n valeurs se situent entre m et M.

Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et de technologies d'analyse 2016

Matériel autorisé : Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999).

Dictionnaire Anglais-Français

APPROCHES VACCINALES POUR LA LUTTE CONTRE LES PAPILLOMAVIRUS

Les papillomavirus (*Human Papilloma Virus* : HPV) sont des virus communs qui peuvent infecter la peau et les muqueuses. Une vingtaine de ces papillomavirus peut être à l'origine d'anomalies cellulaires et de cancers dont le cancer du col de l'utérus. Deux types de virus sont à haut risque : HPV16 et HPV18. La mise en évidence de ces HPV s'appuie sur un diagnostic de biologie moléculaire effectué sur des prélèvements cytologiques suspects (génotypage). Des vaccins prophylactiques ont été développés en administrant des particules virales dénuées de matériel génétique.

1 - Les HPV : cycle viral et dépistage (17 points)

Les papillomavirus sont des petits virus à ADN double brin non-enveloppés.

1.1 - Le cycle viral

1.1.1 - La phase de pénétration du virus est une endocytose, clathrine-dépendante. Expliquer à l'aide d'un schéma annoté et commenté les étapes de ce processus.

1.1.2 - Le cycle viral comporte une phase d'éclipse. Justifier le terme d'éclipse et citer les étapes qui constituent cette phase.

1.2 - La détection des HPV

Les techniques de détection et de typage des HPV peuvent reposer sur la technique de PCR.

1.2.1 - Indiquer la signification du sigle PCR.

1.2.2 - La PCR utilise une ADN polymérase particulière. Préciser sa propriété principale.

1.2.3 - Nommer les principales phases d'un cycle d'amplification génique.

1.2.4 - Établir la formule de détermination du nombre de copies du gène cible obtenues après n cycles d'amplification.

Le **document n°1** présente le principe du génotypage par hybridation inverse sur bandelettes. Ce test permet la détection spécifique de 37 types d'HPV.

1.2.5 - À l'aide du **document n°1**, expliquer comment valider la technique du génotypage.

1.2.6 - Compléter le **document n°2** pour présenter le résultat attendu pour une patiente infectée par HPV16 et HPV31 (le document sera annexé à la copie).

2 - Stratégie vaccinale (43 points)

Les deux vaccins commercialisés sont des VLP (Virus Like Particule). Ils sont composés des protéines majeures de capside L1 différentes selon les génotypes HPV.

Le vaccin bivalent est composé des protéines L1 des génotypes HPV 16 et 18. Le vaccin quadrivalent est composé des protéines L1 des génotypes HPV 6, 11, 16 et 18.

2.1 - Réponse immunitaire

2.1.1 - Annoter la structure de l'immunoglobuline G (IgG) présentée sur le **document n°3** (le document sera annexé à la copie).

2.1.2 - Analyser le **document n°4** afin de caractériser les réponses immunitaires suite à l'introduction de l'antigène.

2.2 - Vecteur YEG α -HPV16 L1

Dans le cas du vaccin quadrivalent, la production des VLP est obtenue par expression du gène de la protéine L1 des HPV de génotypes 6, 11, 16 et 18 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour obtenir des VLP16 L1 (vaccin contenant la protéine capsidiale L1 du génotype HPV16), on utilise un vecteur plasmidique (YEG α -HIR525), auquel on a ajouté des séquences génomiques spécifiques des levures :

- une origine de réplication,
- le promoteur du gène GAL,
- le gène URA3, codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse de l'uracile.

Le gène HPV16 L1 est donc introduit dans ce plasmide (YEG α -HIR525). On obtient alors le vecteur d'expression YEG α -HPV16 L1 schématisé dans le **document n°5**.

2.2.1 - Définir un « vecteur d'expression ».

2.2.2 - Préciser la nature des molécules « EcoR I » et « Sal I » et expliquer leur rôle lors de l'introduction du gène HPV16 L1 dans le vecteur.

2.2.3 - Après transformation des levures par le vecteur d'expression, la culture des levures est réalisée dans un milieu sans uracile. Justifier le choix de ce milieu de culture.

2.2.4 - Expliquer l'intérêt de la présence d'une origine de réplication dans la construction du vecteur d'expression YEG α -HPV16 L1.

2.2.5 - Préciser le rôle du promoteur.

2.3 - Purification des protéines capsidales, principe actif du vaccin

Les principales étapes de purification du vaccin sont présentées dans le **document n°6**.

2.3.1 - Nommer cette méthode de centrifugation.

2.3.2 - Expliquer le principe de cette méthode de séparation.

2.3.3 - Indiquer ce que contiennent les fractions contenant de 30 à 40 % de saccharose.

2.4 - Contrôle des VLP

Après obtention de VLP16 L1 purifiées, leur diamètre est contrôlé afin de s'assurer qu'il est conforme à celui des virions HPV, soit environ 50 nm par observation microscopique, dont un champ est présenté sur le **document n°7**.

2.4.1 - Indiquer le type de microscopie réalisé afin d'obtenir cette image et expliquer brièvement son principe.

2.4.2 - Préciser l'intérêt d'utiliser une solution d'acétate d'uranyle (métal lourd).

2.4.3 - D'après l'image obtenue, estimer la taille des particules et justifier que les VLP16 L1 produites sont conformes aux attentes.

2.5 - Immunogénicité des vaccins bivalent et quadrivalent

Le **document n°8** présente le protocole ELISA du dosage des anticorps anti-HPV dans le sérum de sujets vaccinés, afin de tester l'immunogénicité du vaccin bivalent.

2.5.1 - Représenter un schéma annoté de l'édifice moléculaire obtenu dans la cupule du contrôle positif.

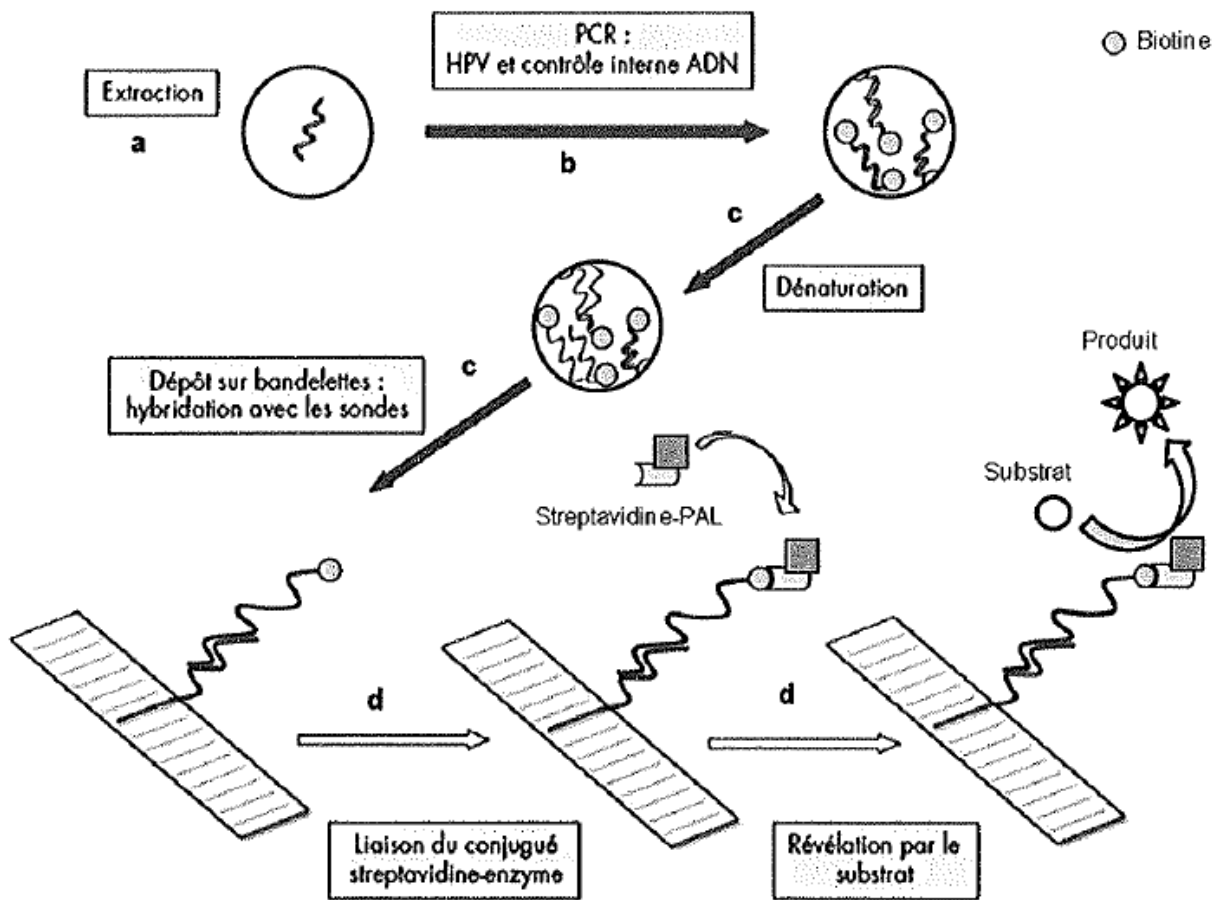
2.5.2 - Indiquer le rôle des contrôles réalisés et le résultat attendu pour chacun.

Les vaccins commercialisés contiennent chacun un adjuvant :

- l'hydroxyde d'aluminium ($\text{Al}(\text{OH})_3$), pour le vaccin quadrivalent,
- le phosphate d'aluminium associé à un lipide A monophosphorylé (AS04), pour le vaccin bivalent.

2.5.3 - Indiquer le rôle d'un adjuvant.

2.5.4 - Analyser les résultats présentés sur le **document n°9** et conclure sur l'effet des adjuvants utilisés dans la composition des vaccins bivalent et quadrivalent.

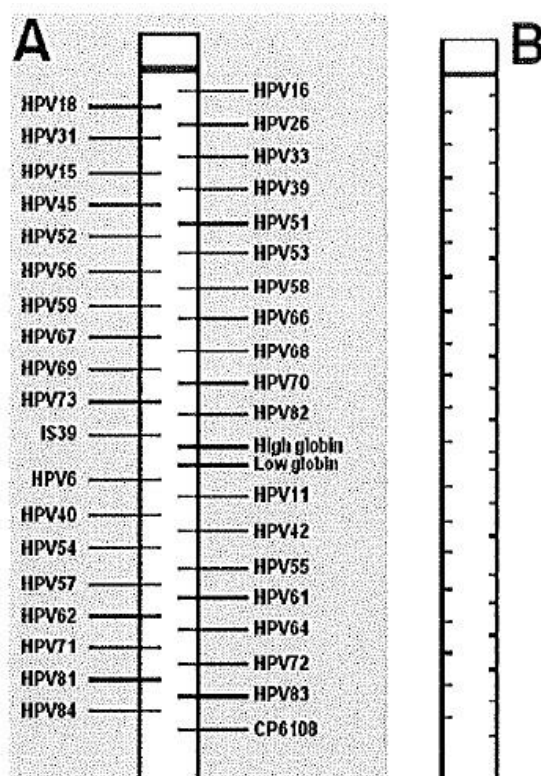
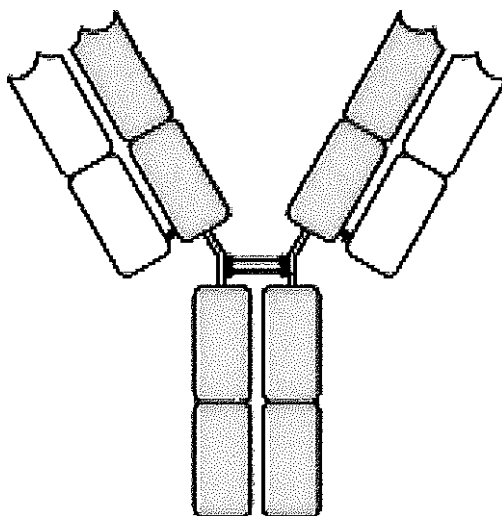
DOCUMENT N° 1 : PRINCIPE DU GÉNOTYPAGE PAR HYBRIDATION INVERSE SUR BANDELETTES**Ce test comporte plusieurs étapes :**

- a) Extraction de l'ADN (viral et cellulaire) à partir d'un prélèvement suspect du col de l'utérus.
- b) Amplification par PCR d'un fragment de 450 pb au sein de la région L1 du génome d'HPV en utilisant des amorces PGMY09/11 biotinylées consensus.
Un contrôle interne de la présence d'ADN est intégré au kit permettant d'amplifier le gène de la β -globine. Il s'agit d'un gène constitutif humain permettant la synthèse de deux protéines : Low et High globin.
- c) Les amplicons biotinylés sont ensuite hybridés avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques des types d'HPV qui sont immobilisées en lignes parallèles sur des bandelettes de nitrocellulose.
- d) Après hybridation et lavage, le conjugué streptavidine/phosphatase alcaline (PAL) est ajouté et se lie à tout hybride biotinylé formé. L'incubation avec le chromogène BCIP/ NBT forme un précipité violet au niveau des lignes réactionnelles permettant une interprétation visuelle des résultats.

DOCUMENT N° 2 : LECTURE DU GÉNOTYPAGE PAR HYBRIDATION INVERSE SUR BANDELETTE**À RENDRE AVEC LA COPIE**

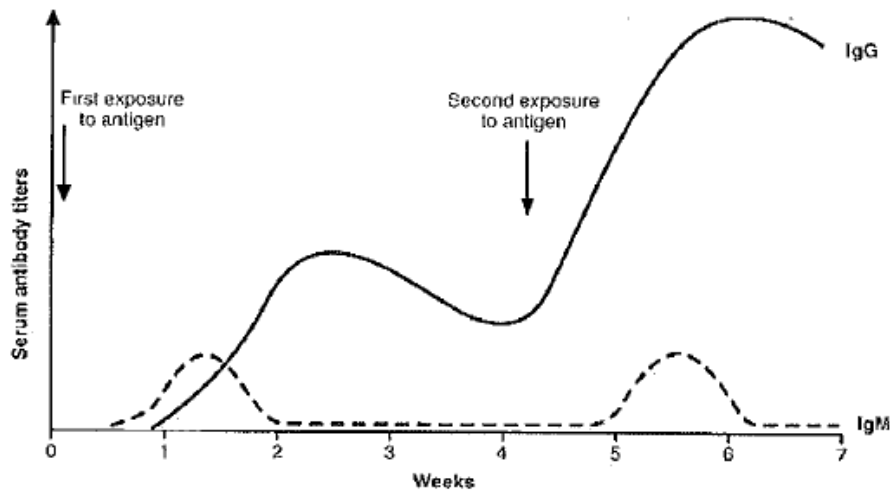
A : position des sondes spécifiques sur la bandelette.

B : Résultat attendu

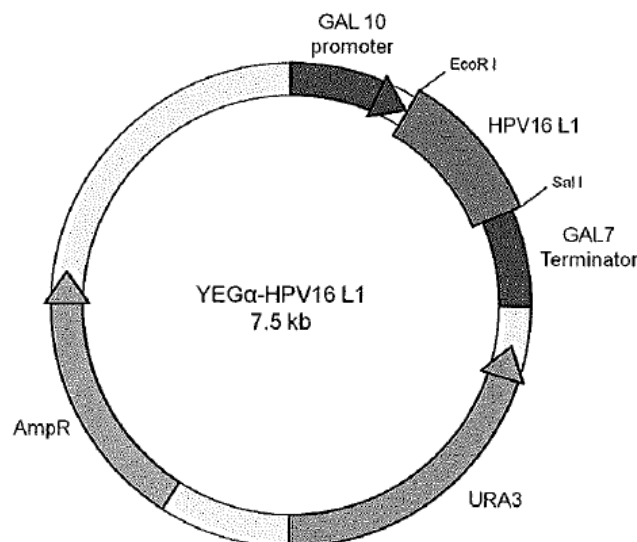
**DOCUMENT N° 3 : SCHÉMA SIMPLIFIÉ DE LA STRUCTURE D'UNE IMMUNOGLOBULINE G****À RENDRE AVEC LA COPIE**

DOCUMENT N° 4 : PRODUCTION D'ANTICORPS SUITE À DES INJECTIONS D'UN ANTIGÈNE

<http://www.jpboiseret.eu/index.php?page=les-differents-mecanismes-de-defense>

**DOCUMENT N° 5 : YEAST EXPRESSION VECTOR PLASMID FOR HPV 16 L1 GENE**

D'après Park et al., Production and Prophylactic Efficacy Study of Human PapillomaVirus-like Particle Expressing HPV16 L1 Capsid Protein, 2002, The journal of Microbiology, Vol.40, pp.313-318

**DOCUMENT N° 6 : PURIFICATION DES VLP16 L1**

La purification des VLP16 L1 contenues dans les levures est réalisée en plusieurs étapes :

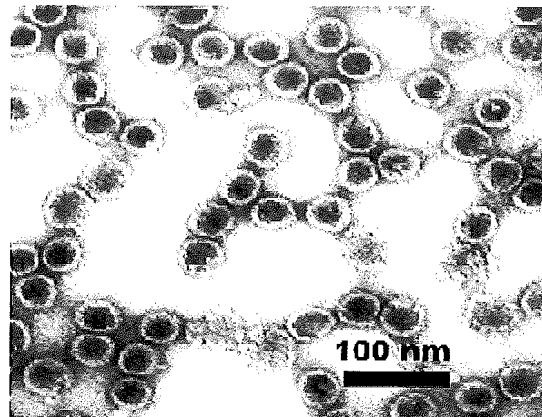
- obtention d'un lysat cellulaire,
- centrifugation,
- chromatographie d'exclusion,
- chromatographie d'échange d'ions.

La méthode de centrifugation utilisée consiste à déposer un volume V d'extrait cellulaire à la surface d'un gradient de saccharose (10 - 65 %) préparé en tampon PBS - 0,5 mol.L⁻¹ NaCl dans un tube de centrifugation. Le tube est ensuite centrifugé à 154000 g pendant 1 h dans une centrifugeuse réfrigérée à 4° C. Le contenu du tube est fractionné, du fond vers le haut du tube, en 23 aliquotes d'approximativement 500 µL chacun. Les fractions contenant de 30 à 40 % de saccharose sont ensuite rassemblées, dialysées contre du tampon PBS - 0,5 mol.L⁻¹ NaCl et centrifugées à nouveau (183 000 g 1 h à 4 °C). Le culot cellulaire est enfin repris dans du tampon PBS - 0,5 mol.L⁻¹ NaCl.

DOCUMENT N° 7 : CHAMP MICROSCOPIQUE MONTRANT DES VLP16 L1 PURIFIÉES, APRES COLORATION NEGATIVE AVEC DE L'ACETATE D'URANYLE

(<http://www.abcam.com/hpv16-11-full-length-protein-ab-119880.html>)

DOCUMENT N° 8 : PROTOCOLE DE DOSAGE SÉROLOGIQUE DES ANTICORPS ANTI-HPV 16 ET 18 APRES INJECTIONS DU VACCIN BIVALENT PAR MÉTHODE ELISA



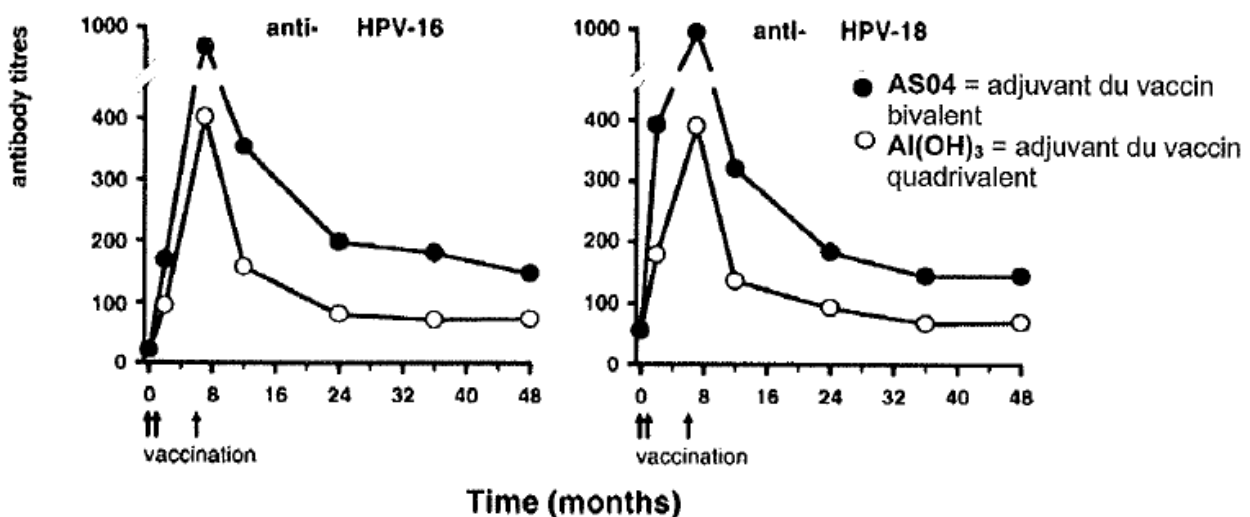
- ELISA plate (96-wells plate) is coated with 200 ng of 16/18 VLPs in the coating buffer (carbonate buffer, pH 9.6) at 4 °C overnight, washed three times with washing buffer (0.01 % Tween-20 in PBS), and blocked with 10 % milk casein in washing buffer at 37 °C for 1 hour.
- Study serum and control reagents were diluted in 2 % non-fat milk and 0.05 % TWEEN H20 in TBS, added and incubated for 1 hour at 37 °C.

The HPV16/18 positive and HPV negative serums were used as control reagents.

- Unbound antibodies were removed by washing and goat anti-human HRP conjugate was added (HRP= Horseradish peroxidase)
- When the incubation time was over, peroxidase substrates were added.
- The color reaction was stopped by adding 2.5 M H₂SO₄ and absorbance was recorded at 450 nm.

DOCUMENT N° 9 : RÉSULTAT DES DOSAGES SÉROLOGIQUES DES IgG ANTI-HPV 16 ET DES IgG ANTI-HPV18 APRES VACCINATION PAR LE VACCIN BIVALENT OU LE VACCIN QUADRIVAL

Schwarz and Leo, Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with AS04- adjuvanted HPV-16/18 vaccine: Improving upon nature, 2008, Gynecologic oncology, Vol 110, pp.S1-S10



Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2016

Matériel autorisé : Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999).

CONTRÔLE DU FLUOR DANS UNE PÂTE DENTIFRICE

Le fluor est un des principes actifs des dentifrices. Par sa présence, il renforce la résistance de l'émail aux acides organiques produits par les microorganismes de la flore buccale.

Néanmoins, l'excès de fluor peut provoquer des atteintes du tissu dentaire et osseux d'autant que d'autres sources de fluor sont disponibles (l'eau de boisson, les aliments et les produits de santé).

Il est donc essentiel de maîtriser la quantité de fluor entrant dans la composition de la pâte dentifrice.

1 - Formulation et production (19 points)

Selon la teneur en fluor, les dentifrices entrent dans la législation des cosmétiques ou des produits pharmaceutiques. En tant que principe actif, le fluor est mentionné dans la liste des ingrédients du dentifrice.

1.1 - Composition et législation du dentifrice (documents n°1 et n°2)

En référence avec l'Arrêté du 27 février 2013, le fabricant de Fluorix désire que son produit soit classé en tant que produit cosmétique.

Q1 - En utilisant les documents,

- **démontrer** par un calcul que le dentifrice Fluorix entre bien dans la catégorie des produits cosmétiques
- **conforter** cette conclusion à l'aide d'un autre argument.

Q2 - Parmi les éléments repérés par des numéros sur l'étiquette, **nommer** ceux permettant la traçabilité du produit. **Montrer** comment ils sont utilisés en cas d'alerte sanitaire en argumentant la réponse.

1.2 - Fabrication du dentifrice (documents n° 3 et n° 4)

Le dentifrice est fabriqué dans un mélangeur-homogénéisateur sous vide dans lequel les différents ingrédients sont mélangés.

Q3 - Un des ingrédients, le sodium lauryl sulfate (SLS) ou dodecylsulfate de sodium (SDS) est un tensio-actif. D'après les propriétés chimiques d'un tensio-actif, **expliquer** son intérêt dans l'efficacité d'un dentifrice.

Le schéma du mélangeur-homogénéisateur est présenté dans le **document n°3**.

Q4 - **Indiquer** sur la copie le nom des éléments A à H représentés. **Préciser** la fonction des éléments B, E, F et G.

Q5 - **Déterminer** les paramètres à programmer en **argumentant** la réponse.

Le schéma de fabrication de l'eau purifiée entrant dans la composition du dentifrice est fourni dans le **document n°4**.

Q6 - **Expliquer** le rôle des différents traitements effectués pour produire cette eau purifiée.

2 - Étude de l'origine d'une teneur trop élevée en fluorures dans un lot de dentifrice (19 points)

Lors des contrôles qualité effectués sur le lot de Fluorix du 25 mai, la teneur en fluorures s'est révélée légèrement trop élevée. Quatre hypothèses sont envisagées : un problème lié à la méthode de dosage, un manque d'homogénéité du lot, une erreur lors de la pesée des matières premières ou un apport exogène de fluor par l'eau.

2.1 - Vérification d'un paramètre de la méthode du dosage du fluor (document n°5)

Q7 - Expliquer la méthode de détermination de la teneur en fluorures d'un dentifrice, à partir d'une mesure de potentiel de l'essai. Retrouver par le calcul la valeur de 1395 ppm.

Q8 - Plusieurs paramètres ont été nécessaires pour la validation de cette méthode. Dédurre du document le paramètre contrôlé dans cette expérience.

2.2 - Contrôle de l'homogénéité du lot (document n° 6)

Pour chaque lot, l'uniformité de la teneur en fluorure est mesurée sur un échantillon de 10 tubes. Les résultats du lot 4256897 sont indiqués dans le **document n°6**.

Q9 - Commenter les résultats obtenus et conclure sur l'acceptabilité du lot.

2.3 - Utilisation de la norme ISO pour assurer la qualité des pesées de matières premières (document n° 7)

Pour les exigences qualité des pesées, l'entreprise suit les recommandations des bonnes pratiques de fabrication (Norme ISO 22 716 : **document n° 7**). Les opérateurs doivent disposer de formulaires de suivi qualité dans la salle de pesée. Ces documents n'indiquent aucune non-conformité lors de la pesée des matières premières fluorées.

Un audit externe a confirmé le respect des BPF par l'entreprise.

Q10 - Expliquer l'intérêt de suivre une norme ISO pour les bonnes pratiques de fabrication des produits cosmétiques.

Q11 - À partir de la norme, indiquer trois documents de suivi permettant de confirmer la qualité de la pesée des matières premières et leur traçabilité.

2.4 - Étude des cartes de contrôle sur la ligne de production d'eau purifiée (document n° 8)

La conductivité d'eau purifiée est contrôlée régulièrement par des tests hors ligne en différents points de la production. Les cartes de contrôles du dernier mois sont présentées dans le **document n°8**.

Q12 - Expliquer la construction de la carte de contrôle de conductivité en sortie d'osmoseur et l'absence de LCI (limite de contrôle inférieure).

Q13 - Commenter les résultats obtenus.

2.5 - Conclusion

Q14 - En reprenant les quatre hypothèses envisagées, conclure sur une origine possible de la teneur élevée en fluorures.

Q15 - Proposer une action corrective.

DOCUMENT N° 6 : HOMOGÉNÉITÉ DU LOT

Résultat de dosage du fluor en ppm : lot 4256897m

Résultat sur 10 tubes

1431	1441	1397	1383	1456	1441	1431	1431	1426	1431
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Résultats sur 20 tubes

1436	1421	1421	1416	1392	1426	1451	1446	1431	1421
1416	1426	1411	1431	1397	1392	1426	1416	1411	1416

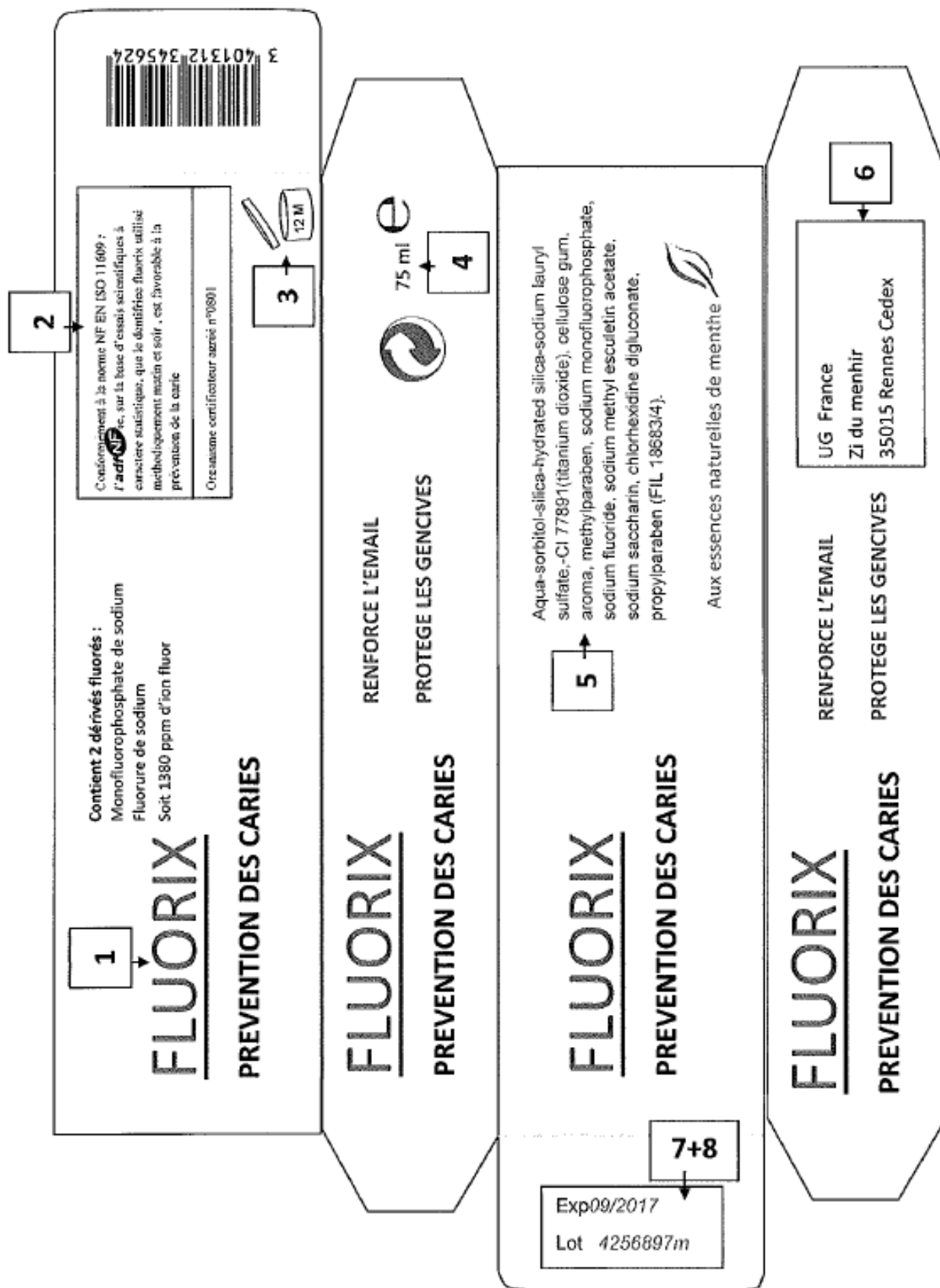
Spécifications

- Si 10 tubes ont une teneur de 95 à 105 % de la teneur attendue => Conforme
- Si 2 tubes ou plus hors limite 95 - 105 % => NON Conforme
- Si 1 tube hors limite 90 - 110 % => NON Conforme
- Si 1 teneur est entre 90 et 95% ou entre 105 et 110% : prélever au hasard 20 autres tubes :
 - Si 1 au plus hors limites 95 - 105 %
 - Si aucun hors limites 90 - 110 %
 - Si 2 ou plus hors limites 95 - 105 %
 - Si 1 hors limites 90 - 110 %

}=> Conforme

}=> Non conforme

DOCUMENT N° 1: EMBALLAGE SECONDAIRE DU DENTIFRICE

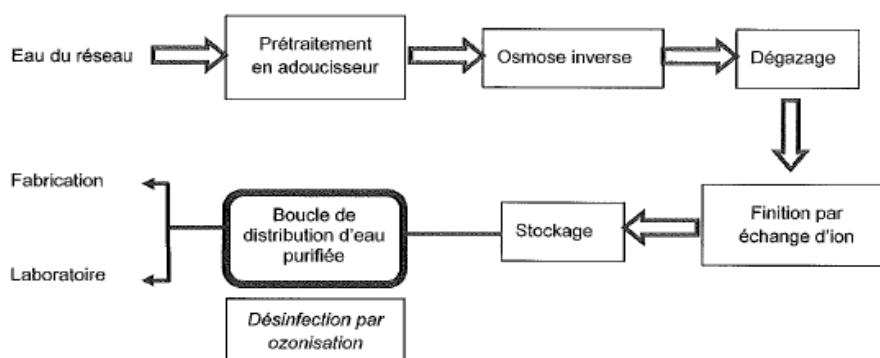


DOCUMENT N° 2 : ARRÊTÉ DU 27 FÉVRIER 2013**LISTE DES SUBSTANCES QUI NE PEUVENT ÊTRE UTILISÉES DANS LES PRODUITS COSMÉTIQUES EN DEHORS DES RESTRICTIONS ET CONDITIONS PRÉVUES**

N° d'ordre	Substance	Restrictions		CONDITIONS D'EMPLOI et avertissements à reprendre obligatoirement sur l'étiquetage
		Champ d'application et/ou usage	Concentration maximale autorisée dans le produit cosmétique fini	
26	Monofluorophosphate d'ammonium.	Produits d'hygiène buccale.	0,15 % (en fluor). En cas de mélange avec d'autres composés fluorés autorisés par la présente annexe, la concentration maximale en fluor reste fixée à 0,15 %	Contient du monofluorophosphate d'ammonium (6).
27	Monofluorophosphate de sodium.	Idem n° 26.	0,15 % idem N°26.	Contient du monofluorophosphate de sodium (6).
28	Monofluorophosphate de potassium.	Idem n° 26.	0,15 % idem N°26..	Contient du monofluorophosphate de sodium (6).
29	Monofluorophosphate de calcium.	Idem n° 26.	0,15 % idem N°26.	Contient du monofluorophosphate de sodium (6).
30	Fluorure de calcium.	Idem n° 26.	0,15 % idem N°26..	Contient du fluorure de calcium (6).
31	Fluorure de sodium.	Idem n° 26	0,15 % idem N°26..	Contient du fluorure de sodium (6).

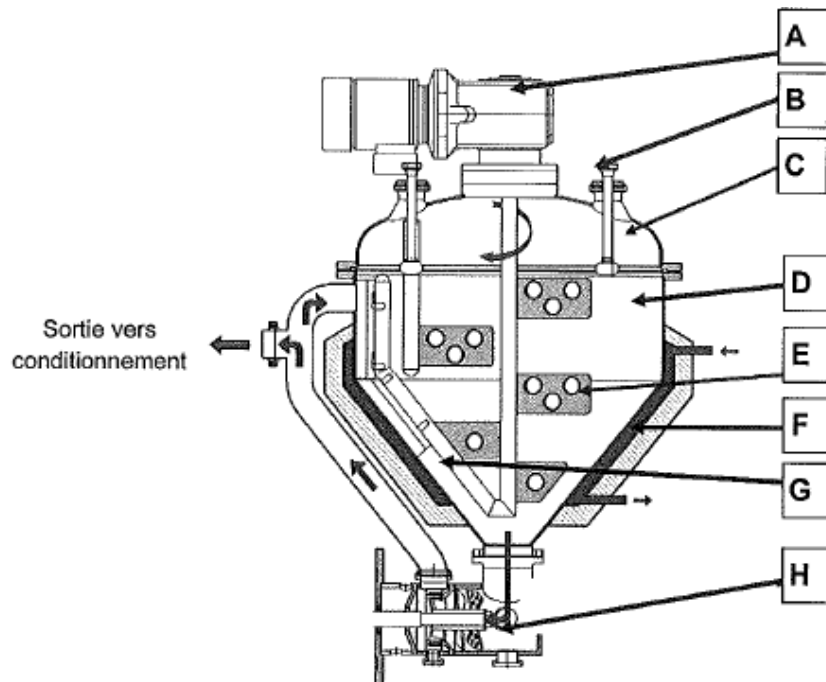
(6) Sauf s'il est indiqué sur l'étiquetage qu'ils sont contre-indiqués pour les enfants (par exemple, par une mention type "pour adultes seulement"), les dentifrices contenant des composés dont la concentration en fluor est comprise entre 0, 1 et 0,15 % calculée en F doivent obligatoirement porter les mentions suivantes :

"Enfants de six ans ou moins : utiliser une quantité de dentifrice de la taille d'un petit pois sous la surveillance d'un adulte afin d'en minimiser l'ingestion. En cas d'apport de fluorures provenant d'autres sources, consultez un dentiste ou un médecin."

DOCUMENT N° 4 : SCHÉMA DE PRODUCTION DE L'EAU PURIFIÉE

DOCUMENT N°3 : MÉLANGEUR HOMOGÉNÉISATEUR SOUS VIDE

Dans un premier temps, les agents épaississants, humidifiants, les sels solubles et l'eau sont mélangés à une température déterminée pour former un gel. Ensuite les abrasifs (comme la silice) sont introduits sous vide dans le mélangeur. Suit une désaération partielle puis les arômes et les tensioactifs sont ajoutés. Enfin la pâte obtenue est homogénéisée avant d'être conditionnée.

**Annotations à reporter sur la copie pour chaque lettre de A à H :**

- | | |
|--------------------|----------------------------|
| • Couvercle | • Pâle racleuse ou racleur |
| • Pâle | • Trompe à vide |
| • Homogénéisateur | • Moteur |
| • Double enveloppe | • Cuve |

DOCUMENT N° 7 : EXTRAITS DE LA NORME ISO 22716 COSMÉTIQUES BONNES PRATIQUES DE FABRICATION

5.4.1 - Il convient que les instruments de mesure de laboratoire et de production, qui sont importants pour la **qualité du produit, soient étalonnés régulièrement.**

5.4.2 - Si les résultats de l'étalonnage sont en dehors des critères d'acceptation, il convient que les instruments de mesure soient identifiés de façon appropriée et qu'ils soient mis hors service.

5.6.1 - Il convient que les équipements soient régulièrement maintenus.

5.6.2 - Il convient que les opérations de maintenance n'affectent pas la qualité du produit.

5.6.3 - Il convient que les équipements défectueux soient identifiés de façon appropriée, que leur utilisation soit exclue et qu'ils soient isolés, si possible.

7.2.1.2 - Il convient que les opérations de fabrication soient effectuées selon la documentation de fabrication, incluant

1. les équipements adéquats,
2. la formule pour le produit,
3. la liste de toutes les matières premières identifiées selon les documents appropriés, indiquant les numéros de lot et les quantités,
4. les opérations de fabrication détaillées pour chaque étape, telles que l'ajout de matières premières, les températures, les vitesses, les temps de mélange, l'échantillonnage, le nettoyage et, si nécessaire, la désinfection des équipements, ainsi que le transfert du produit vrac.

17.2.1 - Il convient que les documents soient composés d'éléments tels que des procédures, des instructions, des spécifications, des protocoles, des rapports, des méthodes et des enregistrements, appropriés aux activités couvertes par ces lignes directrices.

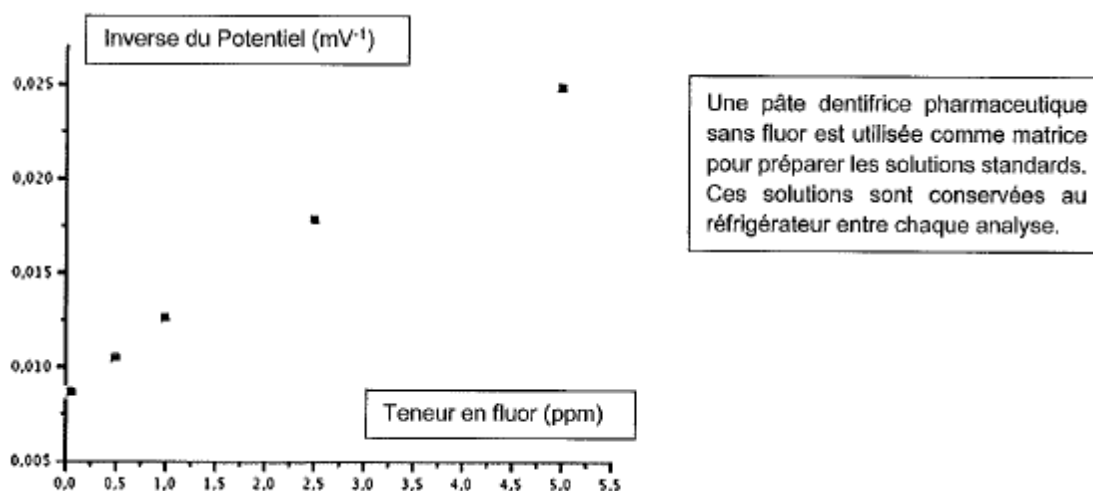
DOCUMENT N° 5 : DOSAGE DES IONS FLUORURE**Principe de la méthode ISO 6356**

Extraction en milieu aqueux du monofluorophosphate de sodium ou des ions fluorure contenus dans la pâte dentifrice et fusion de l'extrait avec du carbonate de sodium afin de le transformer en fluorure de sodium. La teneur en fluorure est ensuite déterminée par potentiométrie à l'aide d'une électrode sensible aux ions fluorure.

Mode opératoire adapté de la norme ISO 6356

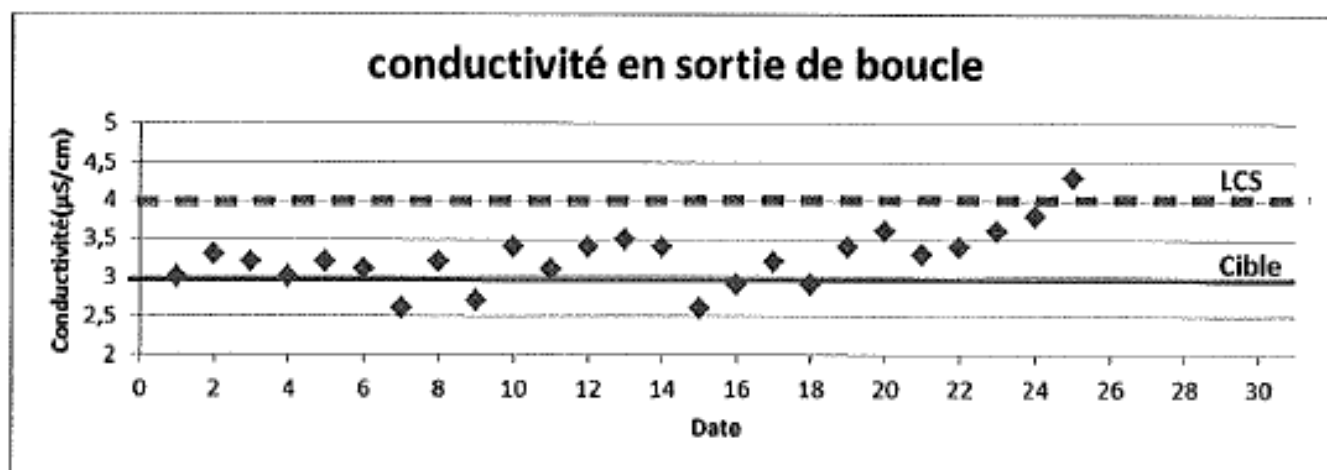
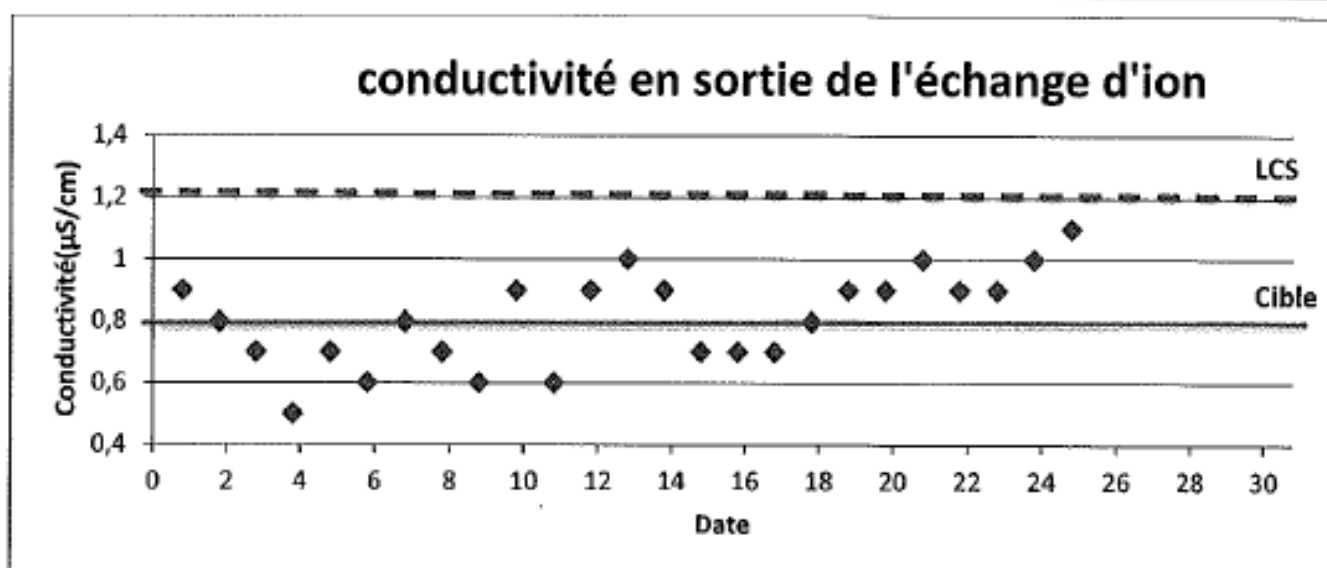
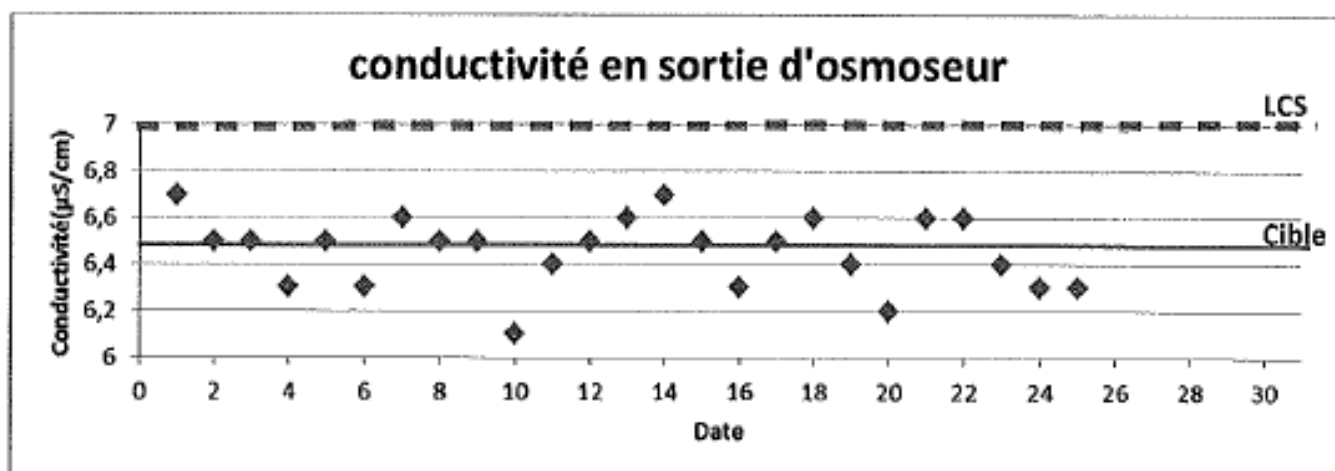
- Peser un échantillon de $0,2 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ de dentifrice dans un bécher de 250 mL.
- Ajouter 50 mL de TISAS (Total Ionic Strength Adjustment Buffer).
- Faire bouillir pendant 2 minutes sous forte agitation.
- Laisser refroidir à l'air libre puis transvaser dans une fiole jaugée de 100mL.
- Compléter au trait de jauge avec de l'eau purifiée.
- Effectuer la mesure.

Résultat obtenu



Régression linéaire	$Y = ax + b$
Nombre de valeurs retenues	5
a	3,395E-03
b	8,533E-03
Coefficient de corrélation	0,99805
Potentiel mesuré (moyenne sur 3 mesures) (mV)	55,6
Inverse du potentiel (mV^{-1})	0,018
Teneur en fluor mesurée (ppm)	2,79
Teneur en fluor dans le dentifrice	1395

DOCUMENT N° 8 : CARTES DE CONTRÔLES DE SUIVI DE PRODUCTION D'EAU PURIFIÉE



LCS = limite de contrôle supérieure

Techniques de biochimie 2016

Pour les candidats non évalués en CCF

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

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

Matériels autorisés :

- Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999)
- Dictionnaire anglais-français.

Document à rendre et à agraffer avec la copie : Feuille de traçabilité et rapport d'analyses

INNOVATION TECHNOLOGIQUE : LES TYROSINASES DANS LE YAOURT

Contexte professionnel

Les industriels recherchent de nouveaux outils protéiques pour modifier la structure et les propriétés sensorielles des produits laitiers. Actuellement, les tyrosinases fongiques ont été mises en œuvre avec succès pour améliorer la texturation des yaourts.

Ces tyrosinases sont extraites et purifiées à partir d'une culture d'*Aspergillus niger*.

On se propose :

- de réaliser la dernière étape de purification de cette enzyme par chromatographie gel filtration,
- de déterminer le rendement et l'enrichissement de la purification en réalisant différents dosages :
 - mesures des activités de la tyrosinase dans l'extrait brut et dans l'extrait purifié,
 - détermination de la concentration massique en protéines de l'extrait purifié.

Compétences

Réaliser des analyses et des contrôles biochimiques (25 points)

- Réaliser des analyses mettant en œuvre des techniques chromatographiques
- Réaliser des techniques d'analyses enzymatiques.
- Réaliser des analyses mettant en œuvre des appareillages optiques.

Exprimer, valider et interpréter les résultats (10 points)

Utiliser l'outil informatique (5 points)

Mises en œuvre

Activités professionnelles	Documents et ressources	Pages
1 : Purification de la tyrosinase par chromatographie gel filtration	Fiche protocole 1	
2 : Détermination de l'activité enzymatique de l'extrait purifié de tyrosinase	Fiche protocole 2	
3 : Dosage des protéines par méthode colorimétrique dans l'extrait purifié de tyrosinase	Fiche protocole 3 Annexe 2 : acceptabilité des résultats Annexe 3 : fiche de sécurité	
4 : Édition des résultats	Feuille de traçabilité (à compléter et à rendre avec la copie)	

Rapport d'analyses

Déterminer le rendement et l'enrichissement de la purification de la tyrosinase (annexe 1 à compléter et à rendre avec la copie).

FICHE PROTOCOLE 1	Purification de la tyrosinase par chromatographie gel filtration
--------------------------	---

Contexte

La tyrosinase est purifiée à partir d'un extrait brut (« **EB** ») d'*Aspergillus niger* en trois étapes :

- Première étape : précipitation par des solvants organiques;
- Deuxième étape : deux précipitations différentielles au sulfate d'ammonium.

À l'issue de ces deux premières étapes, la solution obtenue en cours de purification est appelée « **EBS** ».

- Troisième étape : chromatographie gel filtration .

Principe

La chromatographie gel filtration permet de dessaler la solution de tyrosinase appelée « **EBS** ».

Matériels et réactifs

- Solution de tyrosinase à dessaler notée « **EBS** » : 60 μL
- Solution tampon phosphate 0,02 mol.L⁻¹ pH 6,5 : 30 mL
- Colonne gel filtration : PD10 (séphadex G25)
- Fiole jaugée de 10 mL
- Pipette automatique P₁₀₀ + cônes
- Éprouvette de 10 mL
- Glace pilée

Protocole opératoire

À réaliser devant un examinateur.

Équilibrer la colonne avec 10 mL de tampon phosphate 0,02 mol.L⁻¹ pH 6,5.

Soustraire l'excès de tampon phosphate 0,02 mol.L⁻¹ pH 6,5 et amener le niveau de liquide surnageant tangent à la surface du gel.

Ne jamais laisser le gel à sec lors de la manipulation.

Déposer à la surface du gel, 50 μL de solution de tyrosinase « **EBS** » à dessaler. La laisser pénétrer.

Éluer lentement avec la solution de tampon phosphate 0,02 mol.L⁻¹ pH 6,5.

Recueillir environ 6 mL en fiole jaugée de 10 mL. Rincer la colonne avec de l'eau distillée.

Ajuster la fiole jaugée à 10 mL avec le tampon phosphate pH 6,5. On obtient l'extrait de tyrosinase purifiée nommée « **EP_{chromato}** ».

Attention :

Cet extrait « **EP_{chromato} » ne sera pas utilisé pour la suite des expériences : l'extrait « **EP** » fourni sera à utiliser pour les déterminations d'activité enzymatique et de concentration en protéines.**

FICHE PROTOCOLE 2	Détermination des activités enzymatiques des extraits brut et purifié de tyrosinase par méthode cinétique
--------------------------	---

Principe

La détermination de l'activité de la tyrosinase (EC 1.14.18.1) est réalisée par méthode cinétique à 280 nm à température ambiante en présence de tyrosine en milieu tamponné et oxygéné

La réaction est la suivante à pH 6,5 : **L-Tyrosine + O₂ → Dopaquinone**.

La formation de la dopaquinone s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance à 280 nm.

Une unité de tyrosinase (U_{tyr}) est définie comme la quantité d'enzyme provoquant une augmentation d'absorbance de 0,001 unité par minute dans les conditions opératoires.

Matériels et réactifs

- Extrait brut de tyrosinase noté « **EB** » : extrait non fourni, puisque la mesure a déjà été réalisée
- Extrait purifié de tyrosinase noté « **EP** » **fourni** (obtenu au préalable selon le protocole 1) : 5 mL
- Milieu réactionnel oxygéné par bullage : 10 mL
- Pipettes automatiques P₅₀₀₀, P₂₀₀, P₁₀ + cônes
- Macrocuves UV
- Chronomètre
- Papier parafilm

Protocole opératoire

La mesure de l'activité enzymatique de l'extrait brut « EB » a été réalisée selon le protocole ci-dessous :

Ramener l'extrait brut « **EB** » à température ambiante.

Dans une macrocuve UV, introduire 3 mL de milieu réactionnel oxygéné.

Faire le zéro du spectrophotomètre sur ce mélange réactionnel.

Déclencher la réaction en ajoutant 10 µL d'extrait brut « **EB** », déclencher le chronomètre et homogénéiser.

Après un temps de latence de 7 minutes, relever les absorbances à 280 nm toutes les 30 secondes pendant 3 minutes.

Mesure de l'activité enzymatique de l'extrait purifié de tyrosinase « EP » (1 essai)

Un **extrait purifié « EP »** à température ambiante est fourni.

Dans une macrocuve UV, introduire 2,8 mL de milieu réactionnel oxygéné.

Faire le zéro du spectrophotomètre sur ce mélange réactionnel.

Déclencher la réaction en ajoutant 200 µL d'extrait purifié « **EP** », et déclencher le chronomètre.

Après un temps de latence de 7 minutes, relever les absorbances toutes les 30 secondes pendant 3 minutes.

À réaliser devant un examinateur.

Compte rendu

2.1 - Compléter la feuille de traçabilité.

2.2 - À l'aide de l'outil informatique, tracer les courbes $A_{280} = f(t)$.

2.3 - A partir de la courbe obtenue, déterminer, pour l'extrait « **EP** », le coefficient directeur de la droite en période initiale en $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$. Pour l'extrait brut « **EB** », la V_i ($\text{UA} \cdot \text{min}^{-1}$) est donnée par l'examineur.

En déduire l'activité enzymatique de chaque extrait z_{EB} et z_{EP} en U_{tyr} dans le mélange réactionnel.

2.4 - Pour chaque extrait, établir les équations aux grandeurs, aux unités, et aux valeurs numériques, donnant :

- la concentration d'activité catalytique b en $U_{tyr} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'extrait enzymatique.
- l'activité totale z en U_{tyr} dans le volume total de chaque extrait.

Donnée : le volume d'extrait brut « **EB** » est de 2 mL.

FICHE PROTOCOLE 3	Dosage des protéines dans l'extrait purifié de tyrosinase par la méthode colorimétrique de Folin - Lowry
--------------------------	--

Principe

Les protéines forment avec le réactif de Folin un complexe soluble coloré en bleu présentant un maximum d'absorption à 700 nm.

Matériels et réactifs

- Extrait purifié de tyrosinase « **EP** » fourni (5 mL déjà fournis pour la fiche protocole 3).
- Solution d'albumine à 0,1g.L⁻¹ « **étalon Alb** » : 5 mL
- Eau physiologique : 5 mL
- Réactif de Lowry : 50 mL (en distributeur)
- Réactif de Folin : 5 mL (en distributeur)
- Macrocuves de spectrophotomètre : 8
- Tubes à essais : 8
- Pipette automatique P₁₀₀₀ + cônes
- Papier parafilm

Protocole opératoire

Étalonnage

Dans 6 tubes à essais, introduire de 0 à 1,0 mL de solution d'albumine « **étalon Alb** ».
Compléter les tubes à 1,0 mL avec de l'eau physiologique. Ajouter 5 mL de réactif de Lowry.
Homogénéiser et attendre 5 minutes, à température du laboratoire. Ajouter 0,5 mL de réactif de Folin.
Homogénéiser et attendre 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Lire l'absorbance à 700 nm contre le témoin réactif.

Relever les absorbances en présence d'un examinateur.

Dosage de l'extrait purifié de tyrosinase « EP »

Réaliser deux essais sur E = 1,0 mL de prise d'essai d'extrait « **EP** » fourni.

Compte rendu

3.1 - Présenter un tableau complet de colorimétrie.

3.2 - Compléter le tableau sur la feuille de traçabilité .

3.3 - À l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe d'étalonnage du spectrophotomètre .

3.4 - Déterminer les équations aux grandeurs, aux unités, et aux valeurs numériques donnant la concentration massique en protéines dans l'extrait « EP » en mg.L⁻¹

À l'aide du logigramme présenté dans l'annexe 2, valider les résultats.

Exprimer la concentration massique.

Données :

- Le coefficient de variation de répétabilité CV_r est de 3%, et $s_r = \frac{CV \cdot \bar{x}}{100}$.
- L'incertitude type composée U_c est 0,1 mg.L⁻¹.
- La concentration en protéines de l'extrait brut « **EB** » est 5,50 mg.mL⁻¹.

FEUILLE DE TRAÇABILITÉ

(à compléter et à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR

Date :

Poste n°

Spectrophotomètre n°

Détermination de l'activité enzymatique de l'extrait purifié de tyrosinase***Extrait Purifié EP***

temps									
A _{280nm}									

temps									
A _{280nm}									

Dosage des protéines de l'extrait purifié EP par la méthode colorimétrique de Folin- Lowry

	0	1	2	3	4	5	E1	E2
masse de protéines par tube en								
A _{700 nm}								

ANNEXE 1 : RAPPORT D'ANALYSES**(à compléter et à rendre avec la copie)**

NOM DE L'OPÉRATEUR

Date :

Poste n°

Compte rendu

- Calculer le rendement R de purification. Le rendement de purification est le rapport des activités totales après et avant purification, exprimé en %.
- Conclure sachant qu'un rendement de purification $R \geq 20\%$ est considéré comme satisfaisant.
- Calculer les activités spécifiques z_{sp} en $U_{tyr}.mg^{-1}$ de l'extrait de tyrosinase purifiée « **EP** » et de l'extrait brut « **EB** ».
- En déduire l'enrichissement de la purification, sachant que l'enrichissement E est le rapport des activités spécifiques après et avant purification.
- Conclure quant à l'efficacité de cette purification, sachant qu'un enrichissement $E \geq 5$ est satisfaisant.

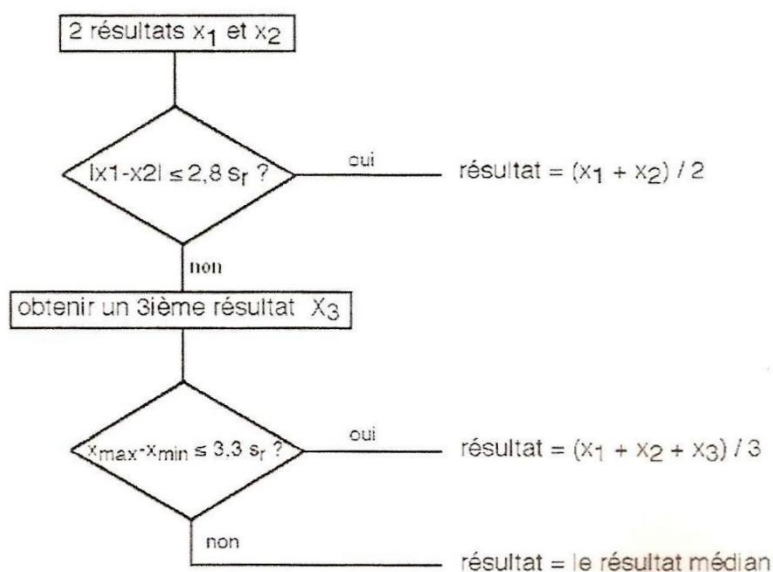
Tableau de résultats

Activité totale ZEB (en U_{tyr})	
Activité totale ZEP (en U_{tyr})	
Rendement de purification (%)	

Activité spécifique z_{sp} EB (en $U_{tyr}.mg^{-1}$)	
Activité spécifique z_{sp} EP (en $U_{tyr}.mg^{-1}$)	
Enrichissement de la purification	

ANNEXE 2 : Acceptabilité des résultats

Logigramme de compatibilité en répétabilité à 2 valeurs



Expression du résultat

L'expression du résultat comporte :

- La valeur de s_r
- Le nombre de résultats expérimentaux utilisés pour le calcul du résultat final établi
- Le traitement mathématique à l'origine du résultat (moyenne arithmétique ou médiane) .
- L'incertitude élargie calculée à l'aide de l'incertitude composée (u_c) et d'un facteur d'élargissement 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95%
- Le résultat final encadré : $X \pm$ incertitude élargie (unités précisées)
- Le nombre de signes significatifs pour exprimer le résultat final établi sera en adéquation avec l'expression numérique de l'incertitude élargie.

ANNEXE 3 : FICHE SÉCURITÉ RÉACTIF FOLIN CIOCALTEU

Symbol	 GHS05
Signal word	Warning
Hazard statements	H290-H315-H319
Precautionary statements	P280-P305 + P351 + P338-P337 + P313
RIDADR	UN 3264 8 / PGIII
WGK Germany	1

Techniques de microbiologie 2016

Pour les candidats non évalués en CCF

Durée : 3 heures

Coefficient : 4

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

Matériels autorisés : Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999)

1^{er} Jour

PRÉPARATION ET CONTRÔLES DES ÉCHANTILLONS EN VUE DE LA REALISATION D'UNE FERMENTATION

Contexte professionnel

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée industriellement à des fins de production. Une industrie souhaite mettre en œuvre la procédure de fermentation en bioréacteur, présentée dans l'annexe 1. Pour cela, le laboratoire de contrôle souhaite effectuer un contrôle qualité de la souche microbienne et d'un milieu de culture utilisés pour la fermentation.

Objectifs

Détermination de la viabilité de *Saccharomyces cerevisiae*.

Contrôle de pureté et de stabilité des caractères d'identification de la souche. Vérification de l'efficacité de l'antibiotique du milieu de culture.

Compétences évaluées

Réaliser des analyses et des contrôles microbiologiques (11 points)

Techniques d'observations macroscopique et microscopique des microorganismes.

Techniques de culture de microorganismes.

Techniques d'identification des microorganismes.

Techniques de quantification des microorganismes et des virus.

Techniques d'étude relatives aux agents antimicrobiens.

Analyser, interpréter et valider des résultats (8 points)

Organiser le travail dans le temps et dans l'espace (1 points)

Mise en œuvre

Activités professionnelles	Ressources - Documents	Documents à compléter et à joindre à la copie
1 : Détermination de la viabilité de la levure (jour 1)	- Fiche protocole 1 - Fiche sécurité - Annexe 1 : Diagramme du procédé de fermentation - Annexe 2 : Fiche technique Cellule de Malassez (fournie par le centre)	Feuille de traçabilité
2 : Contrôle de pureté et de stabilité des caractères d'identification de la souche de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	- Fiche protocole 2 - Fiche sécurité - Annexe 3 : Fiche technique API 20 C AUX (fournie par le centre)	
3 : Vérification de l'efficacité de l'antibiotique du milieu de culture.	- Fiche protocole 3 - Annexe 4 : Gélose de Sabouraud au chloramphénicol	Feuille de traçabilité

FICHE PROTOCOLE 1**Détermination de la viabilité d'une levure**

Le test de viabilité est réalisé sur une suspension de levure nommée « **S** », en cellule de Malassez, en présence de bleu de méthylène de Funk. Le bleu de méthylène de Funk est un colorant d'exclusion. Il colore en bleu les cellules mortes, les vivantes sont peu ou pas colorées.

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

Matériel et réactifs

- 1 tube contenant un échantillon de la préculture de la souche *Saccharomyces cerevisiae* notée « **S** » ;
- 1 cellule de Malassez + lamelle;
- 2 pipettes Pasteur stériles de 1 mL;
- 3 pipettes graduées de 1 mL stériles ;
- 1 tube à hémolyse stérile ;
- 1 tube de 9 mL d'eau physiologique stérile ;
- Compteur de cellules ;
- 1 tube contenant 1 mL de bleu de méthylène de Funk.

Protocole opératoire

Effectuer une dilution 10^{-1} de l'échantillon « **S** ».

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

Effectuer le dénombrement en cellule de Malassez.

Montrer à l'examineur la mise en hématimètre et un champ microscopique accompagné du comptage associé.

Compte rendu**Sur la feuille de traçabilité :**

Présenter le résultat de votre dénombrement.

Déterminer la concentration cellulaire et le pourcentage de viabilité.

Sur la copie :

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

D'après le diagramme de procédure de fermentation (annexe 1), la préculture « **S** » doit-elle être diluée avant l'introduction dans le bioréacteur ?

FICHE PROTOCOLE 2**Contrôle de pureté et de stabilité des caractères d'identification d'une souche**

La vérification de la pureté et de la stabilité des caractères biochimiques de la souche de *Saccharomyces cerevisiae* est effectuée à partir d'un isolement de 48 h sur gélose Sabouraud.

Matériel et réactifs

- une culture sur gélose Sabouraud de la souche S notée « **Sab** » ;
- 1 gélose Sabouraud coulée en boîte de Pétri ;
- 2 pipettes Pasteur stériles de 1 mL ;
- 1 API 20 C AUX + ampoule API AUX Médium ;
- étalons Mac Farland ;
- lames + lamelles ;
- 1 tube à hémolyse de 2 ml d'eau physiologique stérile ;
- réactifs pour la coloration de Gram.

Protocole opératoire

Contrôler :

- Les caractères morphologiques de la souche à l'état frais.

Présenter à l'examineur l'examen microscopique réalisé, accompagné du compte-rendu de l'observation.

- La pureté par :

- un isolement sur gélose Sabouraud en boîte de Pétri
- une observation microscopique adaptée mettant en évidence la présence éventuelle de contaminants bactériens (coloration de Gram).

Présenter à l'examineur l'examen microscopique réalisé, accompagné du compte-rendu de l'observation.

- Les caractères biochimiques par ensemencement d'une galerie API 20 C AUX. Annoter et incuber la galerie dans les conditions optimales.

Montrer à l'examineur l'ensemencement d'une cupule de la galerie.

Compte rendu

Sur la copie :

Présenter les comptes rendus des observations microscopiques.

FICHE PROTOCOLE 3**Vérification de l'efficacité de l'antibiotique du milieu de culture sur une souche de référence**

Le milieu de culture utilisé est de composition identique au milieu Sabouraud au chloramphénicol, mais exempt d'agar.

La fiche technique du milieu de culture Sabouraud au chloramphénicol fourni en annexe 4 précise les souches microbiennes de référence à utiliser pour tester le pouvoir inhibiteur de l'antibiotique.

Dans un contexte de qualité, il est nécessaire de contrôler l'activité antimicrobienne de l'antibiotique présent dans le milieu.

Il s'agit donc de vérifier le pouvoir inhibiteur du chloramphénicol sur une souche de référence et déterminer la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide.

Matériel et réactifs

- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 9763 en bouillon nutritif ;
- *Candida albicans* ATCC 10231 en bouillon nutritif ;
- *Escherichia coli* ATCC 25922 en bouillon nutritif ;
- 1 Pipette automatique P1000 + cônes stériles ;
- 13 tubes à hémolyse stériles ;
- Solution de chloramphénicol à 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ATB) ;
- 15 mL d'eau physiologique stérile ;
- 15 mL de bouillon Mueller Hinton.

Protocole opératoire

Choisir le microorganisme de référence d'après l'annexe 4 et les souches mises à votre disposition.

Avant de continuer, présenter à l'examineur, par écrit, le choix de la souche.

Préparer l'inoculum en ajoutant 0,1 mL de culture de microorganismes choisie à 15 mL de bouillon Mueller Hinton.

Réaliser la gamme d'antibiotiques en tubes à hémolyse stériles suivant une suite géométrique de raison 2 en bouillon Mueller Hinton (volume final de 1 mL).

Ajouter 1 mL de l'inoculum préparé précédemment.

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Eau physiologique (mL)	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution d'ATB 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Concentration intermédiaire ATB ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)												
Inoculum	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Concentration finale en ATB ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)												

Incuber l'ensemble de vos tubes à 37 °C pendant 48 h.

Montrer à l'examineur la réalisation d'une dilution en tube à hémolyse.

Compte rendu**Sur la feuille de traçabilité :**

Justifier le choix de la souche de référence parmi celles proposées.

Compléter le tableau de la gamme. Justifier un calcul de la concentration en antibiotique.

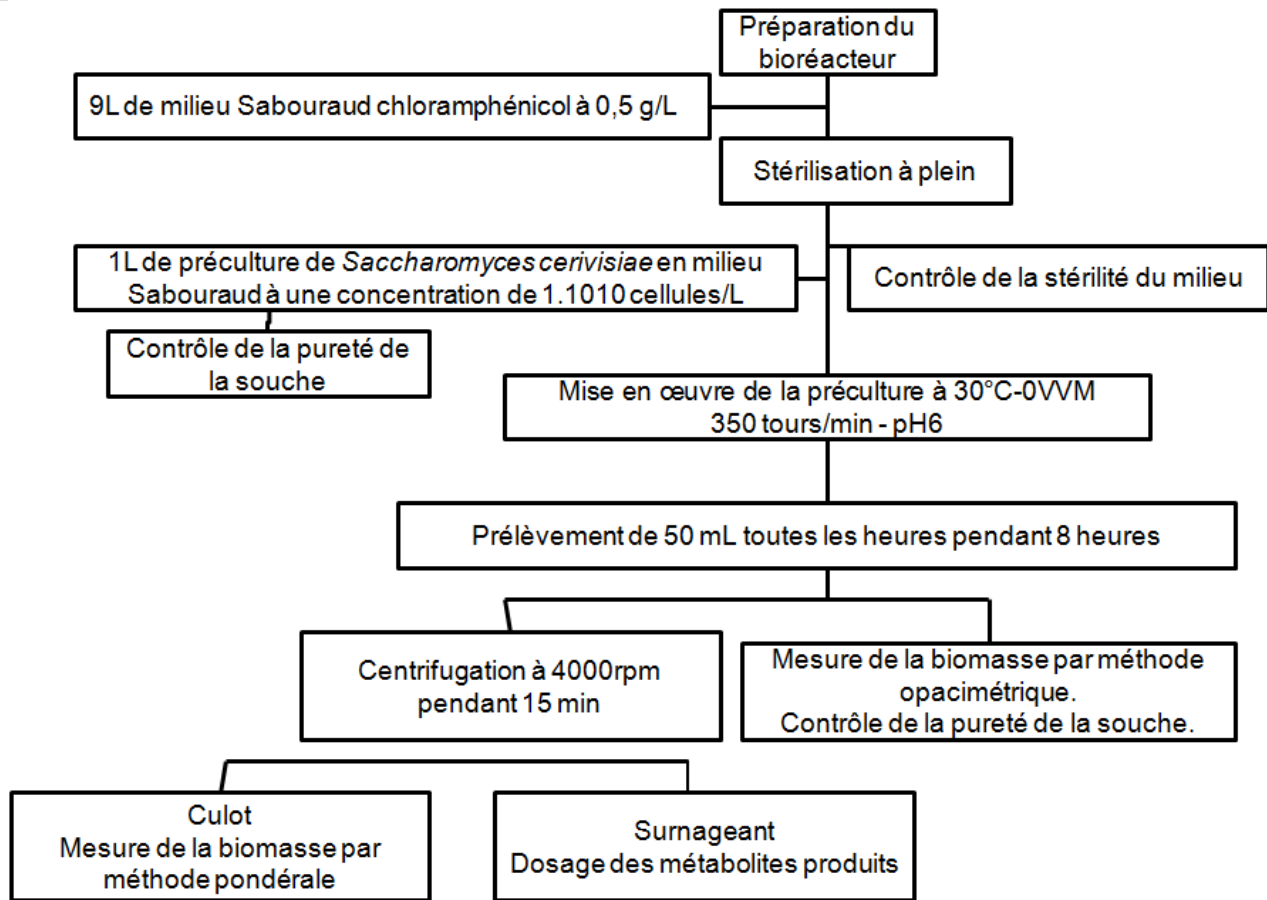
Sur la copie :

Pourquoi réalise-t-on l'inoculum en bouillon Mueller Hinton ?

Quel est l'intérêt du tube 1 ?

Pourquoi doit-on éliminer 1 mL de solution d'antibiotique dans le tube 12 ?

ANNEXE 1
Diagramme de procédure d'une fermentation en bioréacteur



ANNEXE 2 fournie par le centre
Numération en cellule de Malassez

ANNEXE 3 fournie par le centre
Ensemencement de la galerie API 20 C AUX

FICHE SÉCURITÉ
à disposition dans le centre

Violet de gentiane
 Réactif de Lugol
 Éthanol
 Fuschine
 Bleu Trypan

ANNEXE 4

Gélose de SABOURAUD au chloramphénicol

DOMAINE D'UTILISATION

La gélose de Sabouraud au chloramphénicol est recommandée pour l'isolement des levures et des moisissures, surtout lorsque les prélèvements sont fortement contaminés par des bactéries.

PRINCIPES

- La peptone pepsique de viande constitue la source azotée de croissance.
- Le glucose est une source énergétique.
- Le chloramphénicol, antibiotique thermostable à large spectre antibactérien, inhibe le développement de la microflore contaminante.

PRÉPARATION

- Mettre en suspension 45,5 g de milieu déshydraté (BK027) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

MODE D'EMPLOI

- Refroidir et maintenir le milieu à 47 °C.
- Transférer 1 mL du produit à analyser et de ses dilutions décimales successives dans des boîtes de Pétri stériles.
- Couler 10 à 15 mL de milieu.
- Homogénéiser parfaitement.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber à 25-30 °C pendant 3 et 5 jours.

LECTURE

Les boîtes doivent être examinées chaque semaine, pendant 5 semaines avant de conclure à l'absence de cultures.

FORMULE - TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande 10,0 g
- Glucose 20,0 g
- Chloramphénicol 0,5 g
- Agar agar bactériologique 15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 5,7 ± 0,2.

CONTRÔLE QUALITE

- Milieu déshydraté : poudre blanc crème, fluide et homogène.
- Milieu préparé : gélose ambrée.
- Réponse culturale typique après 72 heures d'incubation à 30 °C :

Microorganismes	Croissance (Rapport de productivité: PR)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC® 9763	PR ≥ 50%
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	PR ≥ 50%
<i>Aspergillus brasiliensis</i> DSM 1988	PR ≥ 50%
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	inhibée
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	inhibée

FEUILLE DE TRAÇABILITÉ
(à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR

Date :

Poste n°

1- Détermination de la viabilité d'une levure

- Comptage en cellule de Malassez

N° de rectangle									
Nombre de cellules vivantes par rectangle									
Nombre de cellules mortes par rectangle									

N° de rectangle									
Nombre de cellules vivantes par rectangle									
Nombre de cellules mortes par rectangle									

Nombre de rectangles comptés :**Nombre total de cellules vivantes :****Nombre total de cellules mortes :**

- Déterminer la concentration cellulaire et le pourcentage de viabilité. Justifier les calculs.
- Conclure.

2 - Vérification de l'efficacité de l'antibiotique du milieu de culture sur une souche de référence

- Justifier le choix de la souche de référence parmi celles proposées
- Compléter le tableau
Présenter un calcul de concentration en antibiotique

2^{ème} Jour**FICHE PROTOCOLE 1****Contrôle de pureté et de stabilité des caractères d'identification d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae***

La vérification de la pureté des caractères biochimiques de la souche de *Saccharomyces cerevisiae* est effectuée à partir d'un isolement de 48 h sur gélose Sabouraud.

Matériel et réactifs

- Fiche lecture galerie API20 AUX (fournie par le centre).

Protocole opératoire

Effectuer la lecture des milieux et de la galerie ensemencés.
Faire contrôler la lecture de la galerie par un examinateur.

Compte rendu

Compléter la feuille de traçabilité et le rapport d'analyses.

FICHE PROTOCOLE 2**Vérification de l'efficacité de l'antibiotique du milieu de culture sur une souche de référence**

Le milieu de culture utilisé est de composition identique au milieu Sabouraud au chloramphénicol, mais exempt d'agar.

Dans un contexte de qualité, il est nécessaire de contrôler l'activité antimicrobienne de l'antibiotique présent dans le milieu.

Il s'agit donc de vérifier le pouvoir inhibiteur du chloramphénicol sur une souche de référence et déterminer la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide.

Donnée : Rappel du protocole du jour 1 et annexe 2

Compte rendu

Compléter la feuille de traçabilité et le rapport d'analyses.

FEUILLE DE TRAÇABILITÉ
(à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR

Date :

Poste n°

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

- Validation des résultats :
- Lecture de la galerie API en vous aidant de l'annexe et identification (feuille de résultats API à joindre avec la copie).

2 - Vérification de l'efficacité de l'antibiotique du milieu de culture

- Tableau de résultats :

+ : Trouble

- : Absence de trouble

- Validation des résultats :
- Déterminer la CMI vis-à-vis de la souche ATCC 25922 :

Rapport d'analyses

(à rendre avec la copie)

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

Conclure :

2 - Vérification de l'efficacité de l'antibiotique du milieu de culture

Conclure quant à la sélectivité du milieu de fermentation dans le procédé décrit en **annexe 2**.

Techniques de biologie cellulaire et moléculaire 2016

Pour les candidats non évalués en CCF

Durée : 3 heures

Coefficient : 2

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

Matériels autorisés :

Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999)

ENTÉROTOXÉMIE ET TOXINE ALPHA DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* EN MILIEU VÉTÉRINAIRE

Contexte professionnel

L'entérottoxémie, maladie aiguë ou suraiguë touchant toutes les espèces animales domestiques est due à la présence dans la circulation sanguine de toxines bactériennes produites dans l'intestin.

Les bactéries responsables des entérottoxémies appartiennent en majorité au genre *Clostridium*, en particulier à l'espèce *Clostridium perfringens*. Cette bactérie Gram positive anaérobie présente différents types A, B, C, D et E définis selon leur capacité à produire des toxines létales majeures. En règle générale, de grandes quantités de bactéries et de toxines bactériennes sont retrouvées dans le fluide intestinal des animaux morts d'entérottoxémie. Des campagnes de vaccination ont lieu au niveau des élevages pour protéger les animaux de ces pathologies. Des tests sont réalisés pour suivre la sérologie des animaux après vaccination par une technique ELISA vis-à-vis de la toxine létale.

Par ailleurs, on prépare une suspension cellulaire afin de vérifier l'effet cytotoxique de l'entérottoxine sur des cellules en culture.

Compétences

Réaliser des analyses et des contrôles utilisant des anticorps (6 points)

Réaliser des analyses et des contrôles utilisant des cultures cellulaires (8,5 points)

Analyser, interpréter, valider des résultats (5,5 points)

Mise en œuvre

Les techniques immunoenzymatique et de cytotoxicité cellulaire sont indépendantes et un ordre de passage sera indiqué en début de séance pour les manipulations sous PSM.

Activités professionnelles	Ressources - Documents	Documents à compléter et à joindre avec la copie
1 Évaluation du niveau de positivité de sérums animaux par technique immunoenzymatique	- Fiche protocole 1 - Fiche technique relative au spectrophotomètre fournie par le centre (poste spectrophotomètre) - Fiche technique relative au lavage des microplaques fournie par le centre - Fiche de sécurité liée à NaOH fournie par le centre - Annexe 1 : Logigramme de traitement des données expérimentales	Feuille de traçabilité 1
2 Préparation d'une suspension cellulaire en vue d'un test de cytotoxicité	- Fiche protocole 2 - Annexe 2 : Fiche relative à l'hématimètre de Malassez fournie par le centre	Feuille de traçabilité 2

FICHE PROTOCOLE 1**Évaluation du niveau de positivité de sérums animaux par technique immunoenzymatique****Matériel et réactifs****Au poste de travail**

- 2 barrettes 1 et 2 de 8 puits ayant subi le traitement suivant :
 - **sensibilisation** par la toxine alpha de *Clostridium perfringens* dans tous les puits sauf dans les puits A1 et B1 de la barrette 1,
 - **saturation** (« coating ») de tous les puits par une solution d'albumine
- Microtubes contenant 400 µL des différents sérums à tester notés «**S1**», «**S2**», «**S3**», «**S4**»
- Microtubes contenant 400 µL de sérums positif et négatif respectivement notés «**C+**», «**C-**»
- Tube contenant 4 mL de tampon de dilution noté « **Tp PBS** »
- Tube contenant 2 mL de conjugué (anticorps anti-toxine D marqué à la phosphatase alcaline) noté « **Conj** »
- Tube contenant 2 mL de substrat pNPP, noté « **Sub** »
- Tube contenant 1,5 mL de solution NaOH à 5 mol.L⁻¹ noté « **Sol arrêt** »
- P100 et P1000 avec cônes adaptés

Au laboratoire

- Boîtes de gants
- Spectrophotomètre pour microplaques ou barrettes
- Dispositif de lavage de microplaques (flacons de tampon de lavage PBS-Tween)
- Étuve à 37 °C
- Chronomètre
- Ordinateur

Mode opératoire

- Procéder à trois lavages en PBS-Tween des barrettes distribuées déjà sensibilisées et saturées.
- Diluer au 1/2 en tampon de dilution les différents sérums à tester et les sérums de contrôle.

(À réaliser en présence d'un examinateur)

- Distribuer 100 µL des sérums selon le plan de distribution suivant (dans les trois puits témoins A1, B1, C1, remplacer le sérum par 100 µL de PBS).

A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
T1	T2	T3		C+	C+	C-	C-

A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4

- Laisser incuber 30 minutes à 37 °C.
- Distribuer, à la sortie de l'incubation sans vider ni laver les puits, 100 µL de conjugué dans tous les puits sauf dans le puits A1 où seront déposés 100 µL de tampon PBS.
- Laisser incuber 30 minutes à 37°C.
- Procéder à trois lavages des différents puits en PBS-Tween.
- Distribuer 100 µL de substrat dans tous les puits.
- Laisser incuber exactement chaque puits 30 minutes à 37 °C.
- Ajouter à chaque puits 50 µL de solution d'arrêt.
- Mélanger en imprimant de légers mouvements de rotation.
- Lire les absorbances des puits au lecteur de microplaque à 405 nm (Le zéro réglé sur cupule A1).
- Imprimer la feuille de résultats de l'appareil. Joindre ces valeurs sur la feuille de traçabilité

FICHE PROTOCOLE 1
(suite)
Évaluation du niveau de positivité de sérums animaux par technique immunoenzymatique

- Établir, à l'aide d'un tableur, une feuille de calcul présentant les résultats obtenus pour chaque cupule test et contrôle :
- Absorbances brutes (absorbances lues contre la cupule A1)
- Absorbances nettes (absorbances brutes - absorbance de la cupule B1)
- % inhibitions calculés, à partir des absorbances nettes, selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{A_{\text{cupuleC1}} - A_{\text{cupuleB1}}}{A_{\text{cupuleC1}}} \times 100$$

- Sauvegarder le travail selon les consignes données par le centre d'examen.
- Imprimer le tableau de données et le coller sur le compte rendu.

Compte rendu

1.1 - Justifier la formule de calcul des absorbances nettes d'une part, et celle du pourcentage d'inhibition d'autre part.

1.2 - Après avoir réalisé un schéma de principe de la réaction ELISA dans le cas d'une réaction positive, préciser le rôle des témoins.

1.3 - Valider les témoins .

1.4 - Après avoir vérifié leur répétabilité à partir des données ci-dessous et de l'annexe 1, valider les contrôles qualité C- et C+.

1.5 - Déterminer le niveau de positivité des échantillons testés, en utilisant l'échelle du tableau 1 et conclure.

Données

- Écart type de répétabilité est de $s_r = 0,05 \text{ UA}_{405 \text{ nm}}$
- $A_{C+} - A_{C-} > 0,7$
- % inhibition C+ > 50 %

Tableau 1	
Valeur calculée	Niveau de positivité
% inhibition < 20	0
$20 \leq \% \text{ inhibition} < 40$	+
$40 \leq \% \text{ inhibition} < 60$	++
$60 \leq \% \text{ inhibition} < 80$	+++
$80 \leq \% \text{ inhibition}$	++++

FICHE PROTOCOLE 2**Étude de la cytotoxicité : Préparation d'une suspension cellulaire****Matériel et réactifs****Au poste de travail**

- 1 flacon de 25 cm² d'une culture de cellules
- P₁₀₀ et embouts adaptés stériles
- 1 hématimètre et sa lamelle
- 1 compteur manuel de cellules
- 1 microscope
- 1 tube contenant exactement 100 µL de bleu de Funk noté «Bleu de Funk»

Au poste de culture cellulaire

- Pipettes stériles et système d'aspiration
- 1 tube Eppendorf stérile sur portoir
- 1 tube contenant 4 mL de solution de trypsine-EDTA noté «Trypsine» (préchauffée à 37 °C)
- 1 flacon contenant 7 mL de tampon PBS stérile noté «PBS»
- 1 tube contenant 7 mL de milieu DMEM à 2 % de sérum de veau fœtal (SVF) noté «DMEM»

Matériel commun

- Microscope inversé
- Étuve à 37 °C et 5 % de CO₂

Mode opératoire**Observation de la culture fournie**

Réaliser les observations macroscopique et microscopique (au microscope inversé) de la culture en flacon fournie.

Obtention de la suspension cellulaire (trypsination)

Réaliser les étapes sous PSM et selon un ordre de passage défini par les examinateurs

- Éliminer le milieu de culture.
- Rincer la surface du tapis cellulaire par 5 mL de PBS puis éliminer la solution.
- Ajouter 2 mL de la solution de trypsine-EDTA dans le flacon.
- Suivre l'action de la trypsine (contrôler éventuellement au microscope inversé et incuber si nécessaire à 37 °C pour en accélérer l'effet) .
- Arrêter l'action de la trypsine par ajout de 5 mL de milieu DMEM neuf.
- Homogénéiser par aspiration-refoulement.
- Prélever un aliquote (quelques gouttes) de suspension cellulaire obtenue et le déposer dans le tube Eppendorf.

Vérification de la concentration et de la viabilité cellulaire**Au poste de travail**

- Ajouter, dans le tube contenant 100 µL de bleu de Funk 100 µL de suspension cellulaire à dénombrer.

Montrer la mise en hématimètre à un examinateur

- Compter les cellules au microscope.

Présenter un champ optique à l'examineur

Compte rendu (sur la feuille de traçabilité 2)

2.1 - Noter le résultat des observations de la culture.

2.2 - Présenter sous la forme d'un tableau les résultats de la numération de la suspension cellulaire (nombre de **cellules vivantes, nombre de cellules mortes et nombre de rectangles ABCD comptés sur l'hématimètre**).

2.3 - Calculer le pourcentage de viabilité et conclure sachant que la viabilité est correcte lorsque le pourcentage de viabilité est supérieur à 90 %.

2.4 - Calculer le nombre de cellules viables par mL.

FICHE DE SÉCURITÉ: NaOH 5 mol.L⁻¹**ANNEXE 1**

Logigramme de traitement des données expérimentales et expression des résultats

ANNEXE 2

Quadrillage de l'hématimètre de Malassez

FEUILLE DE TRAÇABILITÉ 1

(à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR

Date :

Poste n°

FEUILLE DE TRAÇABILITÉ 2

(à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR

1- Observation de la culture cellulaire fournie**2 - Tableau de résultats de la numération****3 - Pourcentage de viabilité****4 - Concentration de cellules viables**

Session 2017

Sujet de mathématiques 2017

Matériel autorisé :

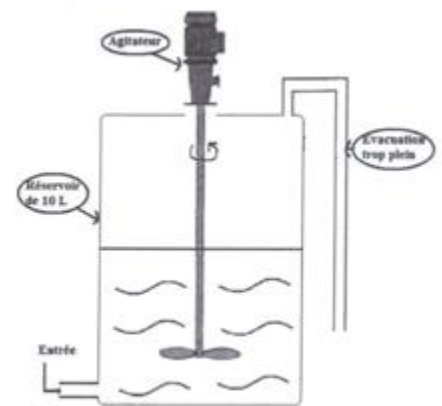
Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique sont autorisées à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999).

Exercice 1 : (10 points)

Un réservoir d'une capacité de 10 litres contient 2 litres d'un concentré de parfum. On y introduit, à partir de l'instant $t=0$, de l'éthanol, avec un débit de 20 cm^3 par seconde. Le liquide présent dans le réservoir est mélangé en permanence par un agitateur.

Dans tout le problème, $Q(t)$ désigne la quantité, en cm^3 , d'éthanol présente dans le réservoir, à l'instant t exprimé en seconde.

On rappelle qu'un litre vaut 1000 cm^3 .



PARTIE A : Étude qualitative du problème

1 - (a) Vérifier que le réservoir contient 5 litres de mélange concentré-éthanol au bout de 150s.

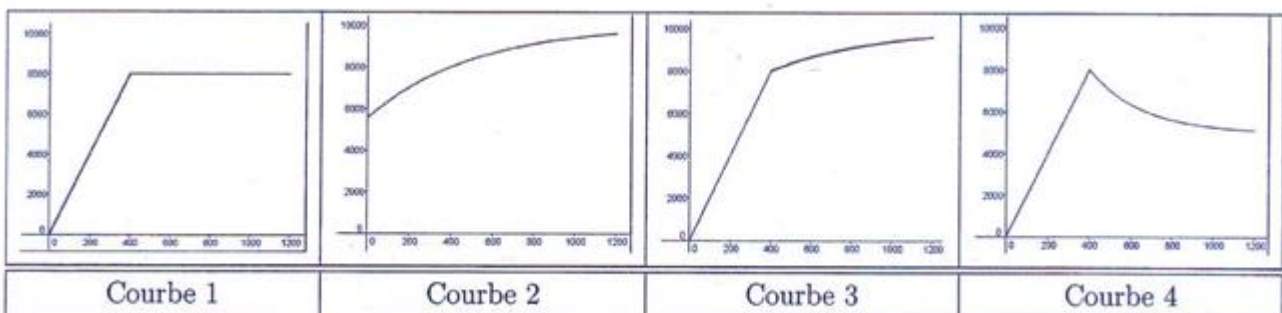
(b) Au bout de combien de temps le réservoir est-il plein ?

2. - Alors que le réservoir est plein, suite à un incident, la pompe continue à l'alimenter dans les mêmes conditions. Un système de trop-plein a été prévu dans ce cas de figure, et dès cet instant, chaque seconde, 20 cm^3 de liquide homogène s'échappe par ce système.

On s'intéresse à la quantité Q d'éthanol présente dans le récipient depuis l'instant initial, moment où commence le remplissage du réservoir.

(a) D'après vous, comment varie cette quantité Q en fonction du temps ? Argumenter.

(b) Parmi les quatre courbes ci-dessous (l'axe des abscisses représente le temps exprimé en secondes, l'axe des ordonnées, la quantité Q exprimée en cm^3), une seule représente la quantité d'éthanol présente dans le réservoir en fonction du temps. Laquelle ? Justifier votre choix.



Dans la suite du problème, on va modéliser plus précisément la quantité Q , suite à l'incident.

Partie B : Une équation différentielle.

On admet que, pour tout instant $t \geq 400$, la quantité d'éthanol présente dans le réservoir vérifie l'équation différentielle :

$$Q'(t) + 0,002 Q(t) = 20, \text{ avec } Q(400) = 8000.$$

On considère l'équation différentielle suivante :

$$(E) : y' + 0,002 y = 20$$

où l'inconnue y est une fonction de la variable t , avec $t \in [400 ; +\infty[$.

1 - Déterminer l'ensemble des solutions de l'équation différentielle homogène associée

$$(E_0): y' + 0,002 y = 0.$$

2 - Déterminer le réel a tel que la fonction constante $t \rightarrow a$ soit une solution particulière de (E) .

3 - En déduire l'ensemble des solutions de (E) .

4 - Déterminer la fonction Q répondant au problème posé.

Partie C : Étude d'une fonction.

On considère la fonction Q_1 définie pour tout réel t de l'intervalle $[400 ; +\infty[$ par :

$$Q_1(t) = 10000 - 4451,1 e^{-0,002t}$$

On admet que cette fonction exprime la quantité d'éthanol présente dans le récipient pour $t \geq 400$.

1- Calculer la limite de Q_1 en $+\infty$. Interpréter ce résultat.

2 - En étudiant les variations de la fonction Q_1 , vérifier mathématiquement le résultat de la partie A question 2 (a).

3 - On veut déterminer l'instant t où la proportion d'éthanol dans le réservoir vaut 85%. Par la méthode de votre choix, déterminer une valeur approchée à l'unité près de la solution.

4 - On donnera une description de la méthode utilisée.

5 - Cette question fait l'objet d'un QCM : on écrira l'unique réponse correcte sur la copie, aucune justification n'est demandée.

On considère l'algorithme suivant :

Demander A un nombre réel compris strictement entre 8000 et 10000
 Mettre 400 dans T
 Tant que $10000 - 4451,1 e^{-0,002T} < A$
 Mettre $T + 10$ dans T
 Fin du Tant que
 Afficher T

Cet algorithme a pour but de :

Réponse (a) : Déterminer la valeur exacte de l'équation $Q_1(t) = A$ dans l'intervalle $[400 ; +\infty[$.

Réponse (b) : Déterminer une valeur approchée par défaut à 10 près de l'équation $Q_1(t) = A$ dans l'intervalle $[400 ; +\infty[$.

Réponse (c) : Déterminer une valeur approchée par excès à 10 près de l'équation $Q_1(t) = A$ dans l'intervalle $[400 ; +\infty[$.

Réponse (d) : Déterminer les solutions de l'inéquation $Q_1(t) > A$ dans l'intervalle $[400 ; +\infty[$.

Exercice 2 : (10 points)

Les parties A, B, C et D suivantes peuvent être traitées de façon indépendante.

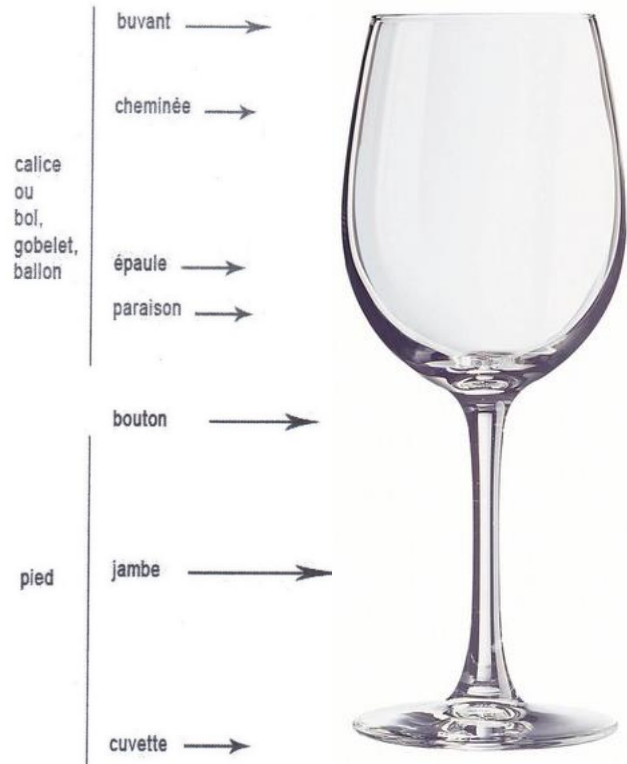
Partie A : Défaut de fabrication.

Un verre à pied est constitué de deux parties : le calice (ou bol) et le pied. Ces deux parties sont assemblées à chaud et fabriquées par deux procédés différents. Elles peuvent présenter des défauts indépendamment l'une de l'autre.

On a constaté que la machine qui fabrique les calices produit 5 % de calices défectueux et que la machine qui fabrique les pieds produit 2 % de pieds défectueux. On appelle A l'événement « le calice est défectueux » et B l'événement « le pied est défectueux ».

On prélève un verre au hasard dans la production.

- 1 - Calculer la probabilité pour que le verre ait les deux défauts.
- 2 - Calculer la probabilité pour que le verre soit défectueux c'est-à-dire que le verre ait au moins un des deux défauts.



Partie B : Vérification d'un lot.

Dans un stock important de verres à pied, on en prélève 20 au hasard pour vérification. Le stock est assez important pour qu'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 20 verres. On considère la variable aléatoire X qui à tout prélèvement de 20 verres associe le nombre de verres défectueux. On suppose que la probabilité qu'un verre soit défectueux est de $p = 0,069$.

- 1 - Justifier que X suit une loi binomiale dont on précisera les paramètres.
- 2 - Calculer à 10^{-2} près la probabilité de l'événement « dans un tel prélèvement, cinq verres au moins sont défectueux ».

Partie C : Diamètre du buvant du verre.

Dans cette question on s'intéresse au diamètre, exprimé en millimètre, d'ouverture du verre appelée « buvant » du verre.

On note D la variable aléatoire qui à chaque verre associe le diamètre de son « buvant ». On admet que D suit la loi normale de paramètres $m = 46$ et $\sigma = 0,3$

On prélève au hasard un verre dans la production.

- 1 - Calculer à 10^{-2} près la probabilité que le diamètre de ce verre soit compris entre 45,8 et 46,3.
- 2 - Déterminer, par la méthode de votre choix, une valeur approchée à 10^{-1} du nombre réel a tel que $P(46 - a \leq D \leq 46 + a) = 0,95$.

Partie D : Brillance des verres.

La brillance des verres est contrôlée par un dispositif électronique qui analyse les reflets du verre. La durée de bon fonctionnement de ce dispositif, exprimée en mois, est modélisée par une variable aléatoire T qui suit une loi exponentielle de paramètre λ avec $\lambda > 0$. Ainsi, pour tout réel t positif, la probabilité que le dispositif ait un temps de bon fonctionnement inférieur ou égal à t mois, est donnée par:

$$P(T \leq t) = \int_0^t \lambda e^{-\lambda x} dx$$

- 1 - Montrer que $P(T \leq t) = 1 - e^{-\lambda t}$.
- 2 - Sachant que $P(T \leq 24) = 0,93$, montrer que la valeur arrondie au centième de λ est 0,11.
- 3 - Quelle est l'espérance de la durée de bon fonctionnement de ce dispositif? On arrondira à l'unité et on interprétera le résultat.
- 4 - La probabilité que la durée de vie soit supérieure à 4 ans est-elle supérieure à 1% ? Justifier.

On rappelle que e^u est une primitive de $u'e^u$.

Sujet de sciences physiques et chimiques 2017

Matériel autorisé: Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999)

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

S'il apparaît au candidat qu'une donnée est manquante ou erronée, il pourra formuler toutes les hypothèses qu'il jugera nécessaires pour résoudre les questions posées. Il justifiera, alors, clairement et précisément ces hypothèses.

A : Spectrophotométrie (10 points)

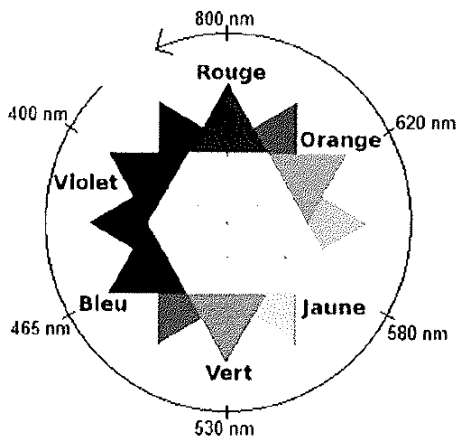
Le bleu patenté est un colorant alimentaire (E131) de couleur bleue. Il entre dans la composition de certains bonbons, sirops, etc.

Il est aussi utilisé en médecine dans le repérage des vaisseaux lymphatiques et des territoires artériels, ainsi qu'en cancérologie.

Cet exercice traite de la vérification, par spectrophotométrie, de la concentration en bleu patenté d'une solution pharmaceutique affichant une concentration massique C_{mo} égale à $25,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Données:

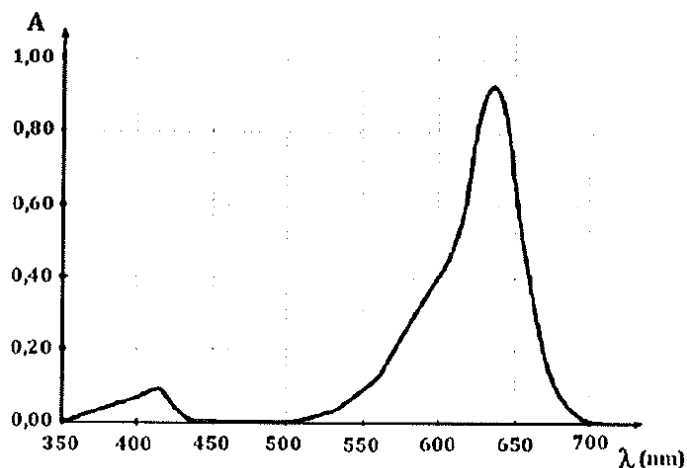
- Masse molaire du bleu patenté : $M = 560 \text{ g.mol}^{-1}$
- Largeur de la cuve spectrophotométrique $\ell = 1,0 \text{ cm}$
- Cercle chromatique



1. Spectre d'absorption du bleu patenté

On donne ci-contre le spectre d'absorption d'une solution diluée de bleu patenté.

- 1.1 - Donner la longueur d'onde $\lambda_{\max}$ correspondant au maximum d'absorption de cette solution.
- 1.2 - Justifier la couleur de la solution.



2 - Loi de Beer-Lambert

Afin de procéder au dosage spectrophotométrique de la solution pharmaceutique de bleu patenté, on a réalisé une série de mesures d'absorbance de solutions de bleu patenté de concentrations connues. Ces mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde $\lambda = 640 \text{ nm}$ et sont consignées dans le tableau ci-dessous :

C (mol.L ⁻¹)	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$7,1 \cdot 10^{-6}$	$8,9 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$
A	0,28	0,58	0,72	0,88	1,12	1,42

2.1 - Écrire la relation correspondant à la loi de Beer-Lambert.

2.2 - Nommer les grandeurs intervenant dans cette relation et préciser leurs unités.

2.3 - Exploiter les mesures pour établir la relation entre A et C.

2.4 - Montrer que la gamme d'étalonnage réalisée est de bonne qualité.

3 - Dosage de la solution pharmaceutique

La solution pharmaceutique est très concentrée, son absorbance ne peut être mesurée directement. Elle est donc diluée avec un facteur de dilution de 5000.

L'absorbance A de la solution diluée vaut 0,68.

3.1 - Montrer que la concentration molaire C_{dil} en bleu patenté de la solution diluée vaut $8,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.2 - En déduire la valeur de la concentration molaire C_{ph} de la solution pharmaceutique.

3.3 - Calculer la concentration massique C_m en bleu patenté de la solution pharmaceutique.

3.4 - Les normes imposent un écart relatif inférieur à 5%. Vérifier que la solution pharmaceutique est conforme.

B : Le microscope (10 points)

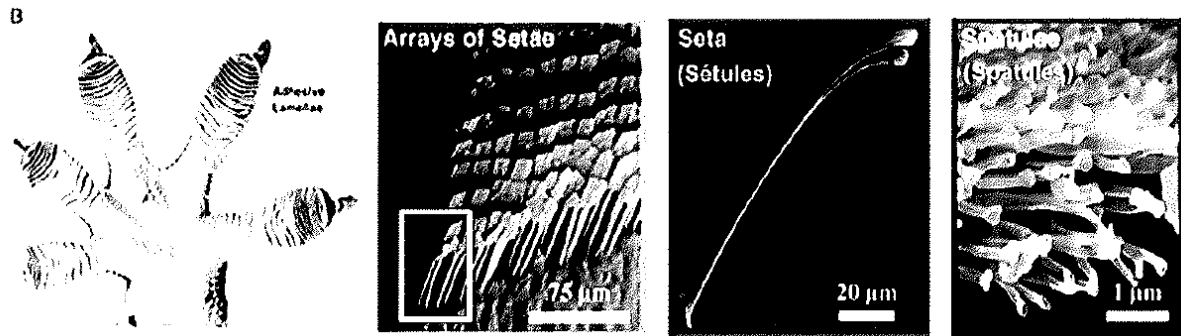
Le gecko est un lézard capable d'escalader les surfaces les plus lisses et même de marcher sur les plafonds. Cette adhérence sur les surfaces lisses s'explique par la structure particulière de ses pattes.

En *effet*, les pattes du gecko sont constituées de sétules (setae) elles-mêmes constituées de microscopiques spatules (spatulae).

Ce sont ces spatules qui, par interactions de type Van der Waals avec les surfaces, assurent l'adhérence du gecko.

Afin d'observer la structure des pattes du gecko on utilise un microscope optique muni de trois objectifs marqués x 10, x 20 et x 100.

Le but de cet exercice est de choisir le bon objectif permettant l'observation des sétules puis des spatules.

**Notations:**

- L'objectif et l'oculaire du microscope sont respectivement deux lentilles convergentes L_1 et L_2 de distances focales $f'_1 = \overline{O_1F'_1}$ et $f'_2 = \overline{O_2F'_2}$ (O_1 et O_2 sont les centres optiques des deux lentilles).
- On appelle intervalle optique Δ la distance qui sépare le foyer image F'_1 de l'objectif et le foyer objet F_2 de l'oculaire, soit $\Delta = \overline{F'_1F_2}$
- Les sétules ou les spatules observées seront modélisées par une flèche objet AB perpendiculaire à l'axe optique.
- L'image intermédiaire obtenue à travers l'objectif sera notée A'B' et l'image finale observée A''B''

Données:

- Taille d'une sétule : $75 \mu\text{m}$
- Taille d'une spatule : $0,30 \mu\text{m}$
- Grossissement de l'oculaire $G_{oc}=20$
- Intervalle optique $\Delta = 16,0 \text{ cm}$

Valeur absolue du grandissement γ de l'objectif	10	20	100
Ouverture numérique O.N.	0,25	0,40	1,25

On utilise tout d'abord le microscope avec un objectif de grandissement γ de valeur absolue égale à 20. On observe une sétule d'un gecko et on effectue les réglages pour observer une image à l'infini

- 1 - Préciser l'intérêt de former une image finale à l'infini.
- 2 - Donner la position de l'image intermédiaire A'B' permettant l'observation de l'image finale A''B'' à l'infini.
- 3 - Schématiser le modèle du microscope décrit ci-dessus, sans souci d'échelle. On y fera figurer, entre autres, l'image intermédiaire A'B', l'image définitive A''B'' ainsi que les rayons utiles.
- 4 - Rappeler l'expression du grossissement commercial G_c du microscope en fonction du grandissement γ de l'objectif et du grossissement de l'oculaire G_{oc} . Calculer sa valeur.
- 5 - Le pouvoir de résolution d'un microscope est limité par le phénomène de diffraction. La dimension $AB_{\min}$ du plus petit objet observable est donnée par la relation : $AB_{\min} = \frac{0,6 \times \lambda}{\text{O.N.}}$

avec λ : longueur d'onde de la radiation utilisée (en m) et O.N. : ouverture numérique de l'objectif

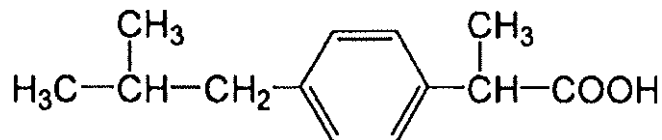
- 5.1 - Déterminer $AB_{\min}$ pour l'objectif étudié sous une longueur d'onde de 500 nm.
- 5.2 - Peut-on observer une sétule dans ces conditions ? Peut-on observer une spatule ? Justifier les réponses.
- 5.3 - Parmi les deux autres objectifs disponibles sur le microscope, choisir celui qui permettrait l'observation d'une spatule. Justifier.

C : Titrage d'un comprimé contenant de l'ibuprofène (10 points)

L'ibuprofène est, comme l'aspirine, une substance analgésique (antidouleur), antipyrétique (lutte contre la fièvre) et anti-inflammatoire, constituant le principe actif de nombreux médicaments.

Pour le traitement de la douleur chez l'adulte, il est recommandé de prendre 200 à 400 mg d'ibuprofène par administration, jusqu'à un maximum de 1,2 g par jour.

Sa formule semi-développée est :



Dans le cadre d'un contrôle qualité, un technicien doit vérifier la teneur en ibuprofène d'un comprimé. L'ibuprofène possédant une fonction acide carboxylique, il est possible de réaliser un titrage acido-basique de cette substance.

Pour cela on suit le protocole suivant :

Réduire en poudre le comprimé dans un mortier à l'aide d'un pilon.

Séparer la molécule active des excipients par dissolution dans l'éthanol puis filtration et évaporation (les excipients sont insolubles dans l'éthanol).

Dissoudre la poudre obtenue dans l'eau distillée pour obtenir un volume total V de solution égal à 40,0 mL.

La solution obtenue est notée S

Le titrage du volume $V = 40$ mL de solution S est effectué à l'aide d'une burette graduée contenant une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ($\text{Na}^+_{(\text{aq})} + \text{HO}^-_{(\text{aq})}$) de concentration molaire apportée $C_b = 0,20 \text{ mol.L}^{-1}$. On note V_b le volume de solution titrante versé. Le titrage est suivi par pH-métrie.

La courbe de titrage représentant l'évolution du pH en fonction du volume V_b versé est fournie en **ANNEXE A RENDRE AVEC LA COPIE**.

Par la suite, l'ibuprofène sera noté R-COOH .

Données à 25 °C :

Produit ionique de l'eau K_e avec $\text{p}K_e = 14,0$

Constante d'acidité du couple R-COOH/R-COO^- K_a avec $\text{p}K_a = 4,5$

Masse molaire de l'ibuprofène $M = 206,0 \text{ g.mol}^{-1}$

L'équation de la réaction support du titrage est : $\text{R-COOH}_{(\text{aq})} + \text{HO}^-_{(\text{aq})} \rightarrow \text{RCOO}^-_{(\text{aq})} + \text{H}_2\text{O}_{(\text{aq})}$

1 - Étude de la réaction support du titrage

1.1 - Exprimer la constante K associée à cette réaction en fonction de K_e et du K_a du couple R-COOH/R-COO^- .

1.2 - Calculer la valeur de K . En déduire le caractère quantitatif de cette réaction.

2 - Exploitation du titrage

2.1 - Donner la définition de l'équivalence d'un titrage.

2.2 - Déterminer sur la courbe en **ANNEXE A RENDRE AVEC LA COPIE** les coordonnées du point d'équivalence E . Le tracé devra clairement apparaître sur la courbe.

2.3 - Déterminer la quantité de matière n_{ibu} d'ibuprofène dans la solution S .

2.4 - En déduire la masse m_{ibu} d'ibuprofène dans un comprimé.

2.5 - Calculer le nombre maximal de comprimés de ce type qu'un adulte peut ingérer par jour.

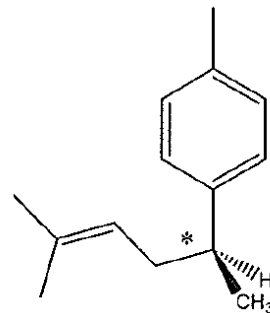
D : Synthèse de l' α -curcumène (10 points)

L' α -curcumène est un terpène contenu dans l'huile essentielle de l'immortelle, plante aromatique du bassin méditerranéen. L' α -curcumène est utilisé en parfumerie pour son odeur florale. Son extraction étant longue et coûteuse, de nombreux procédés industriels de synthèse ont vu le jour. On se propose ici d'étudier le début d'une synthèse réalisable en laboratoire à partir du benzène.

1 - Structure de l' α -curcumène

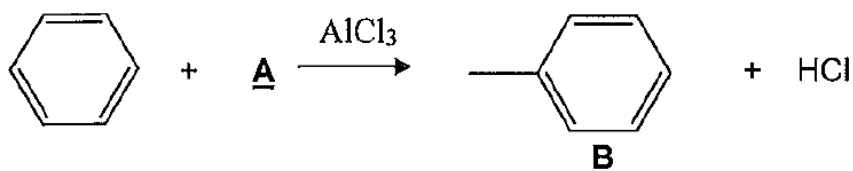
Une représentation de Cram de l' α -curcumène est donnée ci-contre

Déterminer la configuration absolue R ou S de l'atome de carbone asymétrique en détaillant le raisonnement.



2 - Étude de l'étape 1

Étape 1

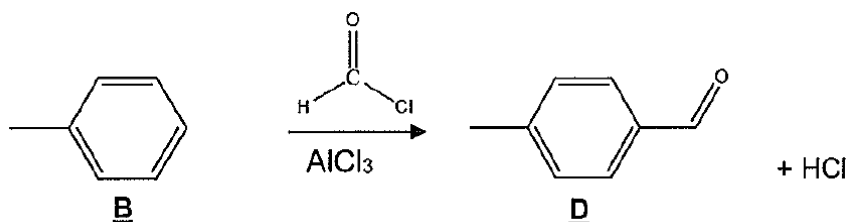


2.1 - Donner la formule semi-développée et le nom du réactif **A**.

2.2 - Préciser le rôle du chlorure d'aluminium.

3 - Étude de l'étape 2

Étape 2

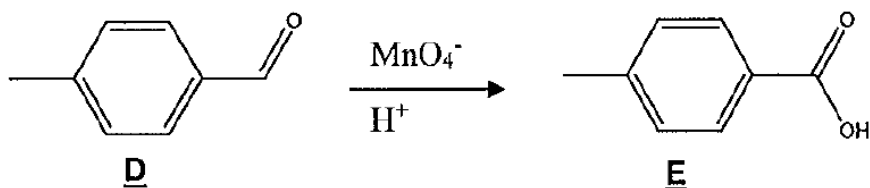


3.1 - Nommer la fonction créée lors de cette étape.

3.2 - Cette nouvelle fonction est venue se fixer sur le cycle en occupant une position particulière par rapport au groupe méthyle déjà présent. Proposer une interprétation à l'obtention majoritaire de ce composé **D**.

4 - Étude de l'étape 3

Étape 3



Il s'agit d'une réaction d'oxydation de la fonction du composé **D**.

4.1 - Donner le nom de la nouvelle fonction du composé **E**.

4.2 - Établir l'équation de la réaction mise en jeu au cours de cette étape 3. On donne les couples mis en jeu : $\text{MnO}_4^- / \text{Mn}^{2+}$ et $\text{R-COOH} / \text{R-CHO}$

5 - Étude de l'étape 4

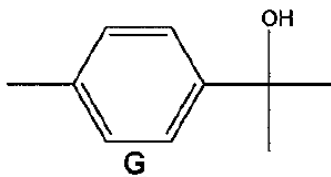
Étape 4 : Le composé **E** est mis à réagir avec l'éthanol pour former le composé **F** de formule brute $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_2$ par réaction d'estérification.

5.1 - Écrire la formule semi-développée ou topologique du composé **F**.

5.2 - Citer deux caractéristiques de la réaction d'estérification mise en jeu.

6 - Étude de l'étape 5

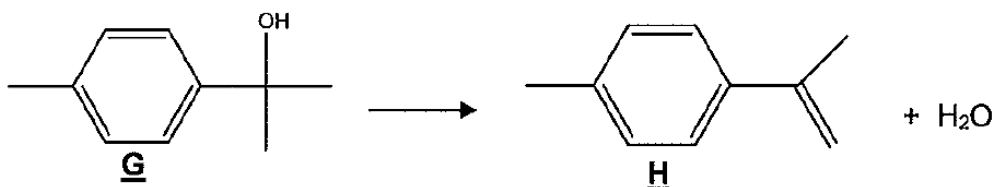
Étape 5 : Le composé **F** est traité par le bromure de méthylmagnésium CH_3MgBr afin d'obtenir le composé **G** suivant :



L'électronégativité du magnésium est de 1,31 ; celle du carbone est de 2,55. En déduire la réactivité de l'organomagnésien CH_3MgBr

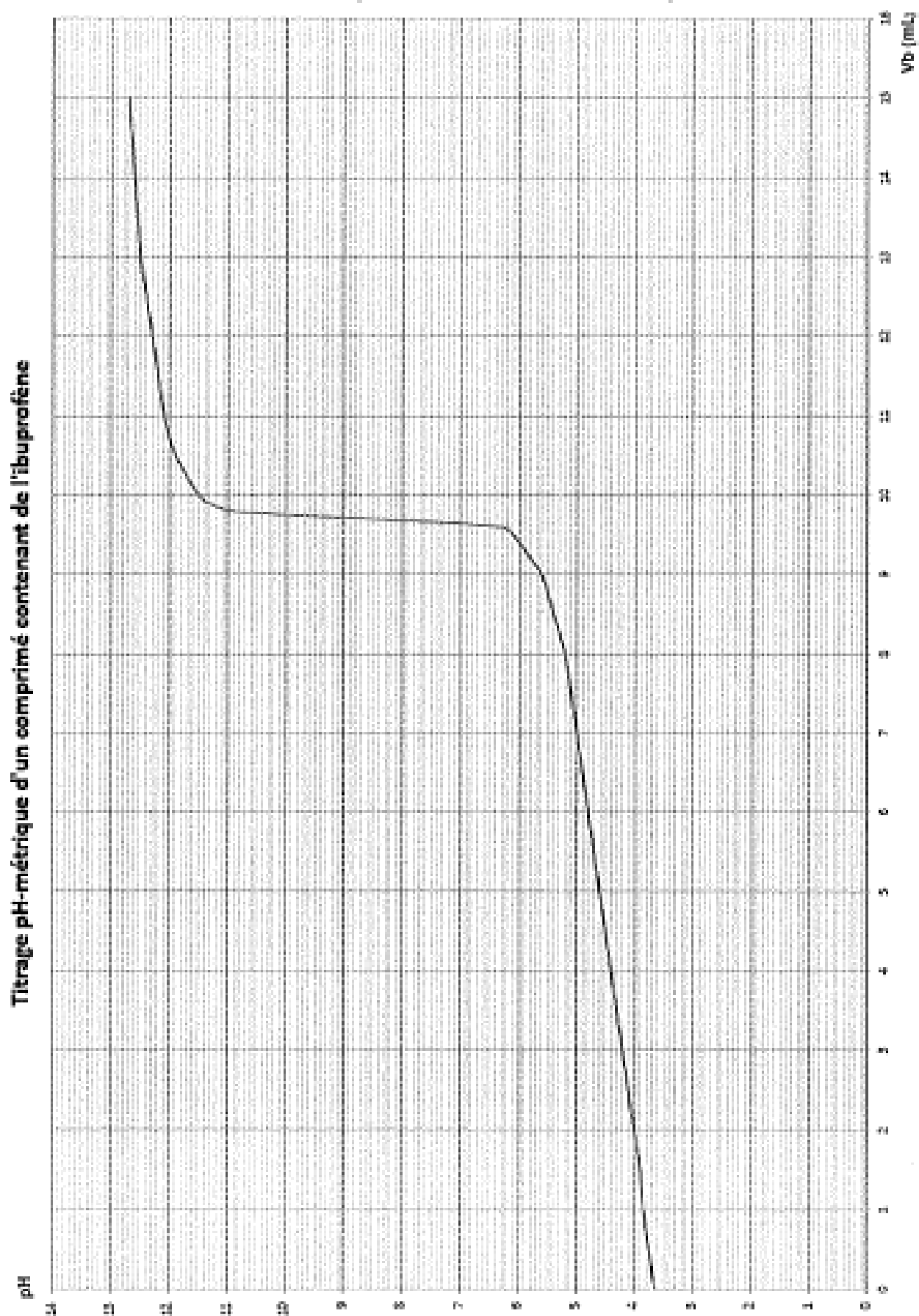
7 - Étude de l'étape 6

Étape 6



Donner le nom du type de réaction mise en jeu au cours de cette étape.

Une série d'étapes, non étudiées ici, permettent de former l' α -curcumène à partir de **H**

ANNEXE (A RENDRE AVEC LA COPIE)

Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2017

Matériel autorisé:

- Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999)
- Dictionnaire anglais-français

L'expression écrite, le soin et la formulation des réponses (concision, qualité des schémas, des tableaux...) seront évalués à hauteur de 3 points sur 60.

Les biotechnologies et l'évolution des dispositifs de mesure de la glycémie pour les patients diabétiques

Les diabètes sont des pathologies en forte progression depuis la fin du XX^{ème} siècle. Ils se caractérisent par une incapacité de l'organisme à réguler la glycémie et sont responsables de nombreuses complications médicales parfois très graves. Le dépistage et le suivi de ces pathologies sont donc de véritables enjeux de santé publique.

Le contrôle de la glycémie est le seul moyen pour les sujets diabétiques de gérer la maladie et d'éviter ses complications. Le dosage du glucose peut être réalisé au laboratoire d'analyses médicales sur prescription par le médecin, et également de façon beaucoup plus régulière à domicile par le patient lui-même. Il existe pour cela différents dispositifs fiables et simples d'utilisation qui ont été mis en place et améliorés avec l'avancée des biotechnologies, et plus précisément du génie enzymatique.

Nombre de ces dispositifs utilisent une enzyme : la Glucose Oxydase (GOD) comme auxiliaire technologique. Le choix de cette enzyme repose en premier lieu sur sa spécificité vis-à-vis du glucose, mais aussi sur la maîtrise des techniques pour sa production et son conditionnement.

Il est donc judicieux, compte-tenu des enjeux d'efficacité technologique et des enjeux financiers, de l'utiliser pour la détermination de la glycémie dans des coffrets de diagnostic par colorimétrie ou au niveau de biocapteurs.

1 - Optimisation de la purification d'un extrait de Glucose Oxydase (GOD) (14 points)

L'enzyme peut être extraite et purifiée à partir d'une culture de souches productrices : *Aspergillus* ou *Penicillium*. Les différentes étapes de purification réalisées à 4 °C sont résumées dans le logigramme fourni dans le **document 1**.

Q1 - Analyser le logigramme du **document 1** pour :

- **identifier** les caractéristiques physico-chimiques des molécules permettant leur séparation à chaque étape,
- **préciser** le rôle des deux étapes de dialyse.

Lors de l'optimisation du protocole de purification par précipitation fractionnée, différentes concentrations de sulfate d'ammonium ont été testées sur différentes souches. Les résultats de purification de la GOD sont présentés dans le **document 2**.

Q2 - Expliquer le calcul de l'activité spécifique et du rendement de conservation de l'enzyme en prenant pour exemple un des résultats obtenus pour la souche *Fusarium sp.*

Q3 - Commenter les résultats obtenus pour les différentes souches et **conclure** de façon argumentée sur le choix de la souche et de la concentration en sulfate d'ammonium.

Remarque : le contrôle *Fusarium sp* sera utilisé pour les trois souches.

Le **document 3** donne les principales propriétés catalytiques de la GOD ainsi qu'une représentation schématique de son site actif.

Q4 - À partir des représentations du **document 3**, montrer l'importance de la structure tertiaire de la GOD pour son activité.

2- Contrôles de qualité internes lors du dosage enzymatique du glucose au laboratoire (12 points)

Le dosage du glucose est réalisé classiquement au laboratoire d'analyses médicales par une méthode enzymatique fondée sur la réaction d'oxydation du glucose catalysée par la Glucose Oxydase.

Différents coffrets enzymatiques sont utilisés pour ce dosage, par exemple le kit Glucose RTU™ (Biomérieux) dont un extrait de la fiche technique est fourni dans le **document 4**.

Q5 - Expliquer l'utilité de la réaction catalysée par la peroxydase.

Q6 - Retrouver toutes les conditions opératoires permettant de déduire que le type de dosage enzymatique est un dosage de substrat en point final.

Montrer, à l'aide des données toxicologiques présentées dans le **document 5** que le réactif RTU utilisé répond aux conditions de non dangerosité.

Q7 - Établir l'équation aux grandeurs permettant le calcul de la concentration en glucose de l'échantillon.

Pour s'assurer de la validité de chaque série de dosages, le laboratoire effectue systématiquement des contrôles préliminaires. Pour réaliser cette validation, le dosage est mis en œuvre sur un sérum contrôle «normal» UNITROL™ et un sérum contrôle «haut» LYOTROL™ P. Les valeurs obtenues doivent se situer dans l'intervalle d'acceptabilité.

	Concentration en glucose	Limites de l'intervalle d'acceptabilité
UNITROL™	5,73 mmol.L ⁻¹ . (1,03 g.L ⁻¹)	4,93 - 6,53 mmol.L ⁻¹ (0,89 - 1,18 g.L ⁻¹)
LYOTROL™ P	11,1 mmol.L ⁻¹ . (2,00 g.L ⁻¹)	10,4 - 11,8 mmol.L ⁻¹ (1,87 - 2,13 g.L ⁻¹)

Les résultats obtenus dans les conditions de réalisation du test sont :

	A _{505nm}
Sérum UNITROL™	0,319
Sérum LYOTROL™ P	0,715
Solution étalon de glucose à 1,00 g.L ⁻¹	0,344

Q9 - Calculer les valeurs expérimentales obtenues pour la concentration de chaque sérum contrôle et conclure. **Montrer** l'intérêt d'utiliser ces deux contrôles dans le cas du diabète.

3 - Les dispositifs d'autocontrôle de la glycémie (18 points)

La technologie des électrodes à enzymes qui s'est considérablement développée depuis les années 1970 a permis la mise au point de biocapteurs enzymatiques utilisés dans de nombreux dispositifs d'autocontrôle commercialisés pour un suivi de la glycémie par le patient lui-même, à domicile et de façon beaucoup plus régulière.

Le principe de fonctionnement est décrit dans le **document 6**.

3.1- Immobilisation de la GOD

Il existe différentes techniques d'immobilisation reposant sur des procédés chimiques ou physiques. Les principales méthodes utilisées sont le greffage covalent sur un support, la réticulation sur une protéine neutre ou l'inclusion dans un gel. Selon les cas l'enzyme est alors insolubilisée ou simplement confinée tout en restant soluble.

Q9 - Expliquer le principal intérêt de l'immobilisation des enzymes dans les procédés technologiques.

Q10 - Illustrer à l'aide de schémas simples les différentes techniques d'immobilisation présentées.

Comparer les valeurs de K_M de la GOD données dans le **document 3** et proposer une hypothèse expliquant l'origine de cette différence de valeur.

3.2- Fonctionnement de l'électrode à enzyme

Au niveau du biocapteur, l'oxydation du glucose se fait en deux étapes avec transfert des électrons libérés sur un médiateur dont l'oxydation anodique est finalement responsable du signal électrique mesuré.

Q11 - À l'aide des potentiels redox standards donnés dans le **document 6**, **calculer** la variation d'enthalpie libre standard au cours de l'oxydation d'une mole de glucose au niveau du biorécepteur et commenter le résultat.

Données: $\Delta G^0 = -n F (E^0_{\text{couple oxydant}} - E^0_{\text{couple réducteur}})$
 n : nombre d'électrons échangés $F = 96500 \text{ J.V}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

Les électrodes à enzymes permettent de mettre en œuvre des dosages enzymatiques de substrat par méthode cinétique. Dans certaines conditions opératoires, il est en effet possible d'obtenir une quasi proportionnalité entre la vitesse initiale de la réaction catalysée par une enzyme Michaelienne et la concentration initiale en substrat dans la solution où l'électrode est plongée.

Q12 - Écrire l'équation de Michaelis-Menten. **Préciser** la condition qui permet de simplifier cette relation et montrer que cette équation peut être simplifiée à l'équation d'une droite du type $v_i = \text{constante} \times [S]$. **Exprimer** cette constante.

3.3 - Limites de fiabilité de ces dispositifs

La détermination de la concentration limite d'utilisation de ces électrodes à enzymes consiste à réaliser de nombreuses mesures.

Pour cela, différentes solutions étalons de glucose sont testées avec l'électrode étudiée et l'intensité du signal électrique est mesurée.

Q13 - Tracer l'allure de la courbe de Michaelis-Menten.

Annoter les points clés sur les axes et **repérer** sur cette courbe le domaine de concentrations possible pour l'utilisation de l'électrode.

Préciser la concentration maximale de la solution étalon de glucose qui permet de rester dans le domaine de concentrations possible pour l'utilisation de l'électrode (on considérera pour cela la valeur moyenne de K_M annoncée dans le **document 3**).

Les résultats obtenus avec ce type de dispositif peuvent être faussés par des interférences pathologiques ou médicamenteuses dont certaines ont fait l'objet d'une note édictée par l'afssaps (<http://afssaps.sante.fr/> ; rubrique « sécurité sanitaire et alertes », informations & recommandations, 2004).

Le principe actif d'un médicament est notamment suspecté de pouvoir jouer un rôle inhibiteur par compétition au niveau du biorécepteur.

Q14 - Tracer sur le graphe précédent la courbe qui serait obtenue en présence de cet inhibiteur compétitif en **justifiant** l'évolution des paramètres cinétiques V_m et K_M par l'action de l'inhibiteur. En **déduire** les conséquences pour le patient qui recevrait ce type de traitement.

4 - Importances métaboliques de la régulation de la glycémie (13 points)

Chez les diabétiques, sans suivi ni contrôle médical, des variations excessives et fréquentes de la glycémie peuvent présenter des risques importants pour l'organisme : la glycémie est essentiellement régulée grâce à deux hormones pancréatiques à action antagoniste : l'insuline et le glucagon.

Le mode d'action de l'insuline est résumé dans le **document 7**.

Les troubles métaboliques observés dans les diabètes sont la conséquence de l'absence de sécrétion d'insuline ou d'une anomalie dans l'action de cette dernière.

Q15 - Identifier les voies métaboliques numérotées 4, 5 et 6 dans le **document 7**.

Lors du diabète, le déficit en insuline empêche l'entrée du glucose dans les cellules, et entraîne l'activation de la glycogène phosphorylase. Cette enzyme catalyse la dégradation des réserves de glycogène à partir de l'extrémité non réductrice.

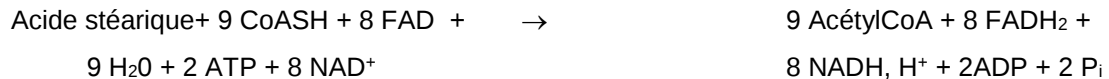
Q16 - Écrire l'équation de la réaction de phosphorolyse d'une liaison osidique du glycogène, qui sera noté pour simplifier D-glucopyranosyl α (1 $\rightarrow$ 4)_n.

Le **document 8** présente une autre voie métabolique activée : la dégradation des acides gras.

Q17 - Représenter sur la copie les formules chimiques des molécules A, B et C manquantes.

Établir le bilan moléculaire d'un tour d'hélice.

Le bilan moléculaire de la dégradation de l'acide stéarique (C18) est le suivant:



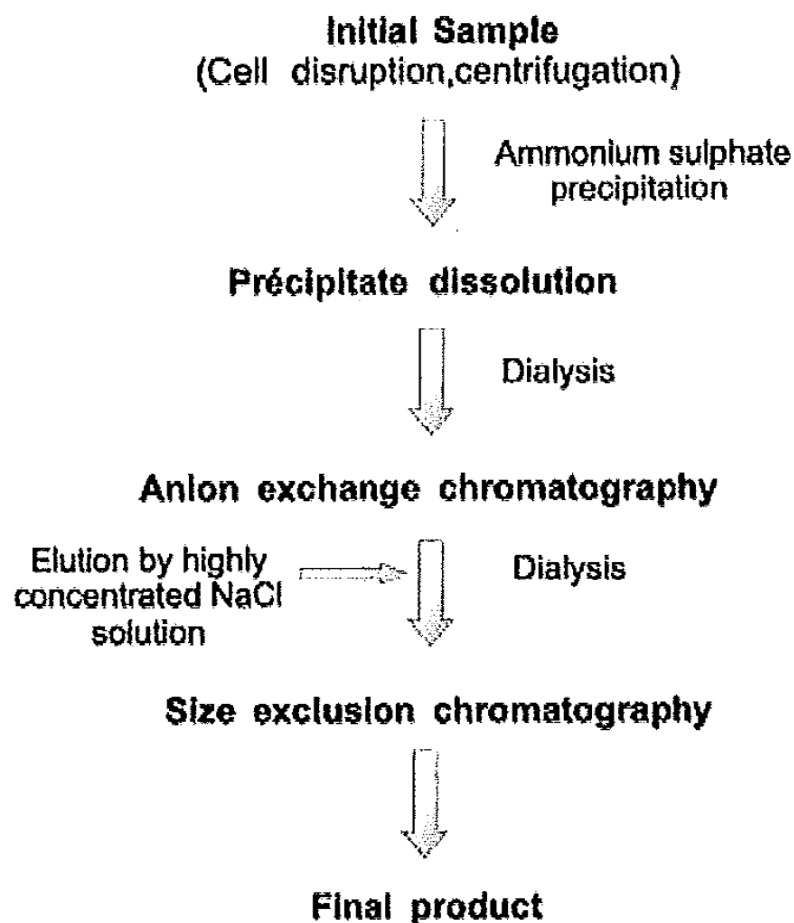
Préciser le devenir possible de l'acétylCoA en nommant la voie métabolique qu'il rejoint.

Citer le rôle de cette voie dans le métabolisme cellulaire.

Q18 - Calculer le bilan énergétique de la dégradation d'un acide gras en C18 jusqu'à l'acétylCoA, après réoxydation des coenzymes réduits par la chaîne respiratoire mitochondriale sachant que : la réoxydation de 1 NADH, H⁺ permet la formation de 3 ATP et la réoxydation de 1 FADH₂ permet la formation de 2 ATP.

Montrer l'intérêt de cette voie métabolique pour l'organisme dans le cas du diabète.

DOCUMENT N°1 : Les différentes étapes de purification de la GOD fongique



DOCUMENT N°2 : Purification de la GOD produite à partir de différentes souches par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

The precipitation of crude glucose oxidase enzyme extract was carried out by adding different amounts of ammonium sulphate to give saturation from 10 to 50 % . The solution was left overnight at 4 °C until the complete precipitation occurred, and then centrifuged at 15000 rpm for 15 minutes. Each fraction precipitate was dissolved immediately in a known volume (20 mL) of 0.1 M citrate phosphate buffer (pH 5.6). The dissolved fractional precipitates were tested for both glucose oxidase activity and protein content.

U : One unit of enzyme was defined as the amount that could oxidize 1.0 μmol of D-glucose to gluconic acid and H_2O_2 per minute at pH 5.6 at 30 °C.

Ammonium sulphate conc. %	Total glucose oxidase activity (U/100 mL)	Total protein content (mg/100mL)	Specific activity (U/mg protein)	Enzyme yield percentage
<i>Fusarium sp.</i>				
Control*	99.2	5.65	17.6	100
10	21.6	1.30	16.6	22
20	38.4	2.16	17.8	39
30	42.1	2.35	17.9	42
40	57.7	3.21	18.0	58
50	60.4	3.32	18.2	61
<i>Penicillium sp.</i>				
10	99.6	2.73	36.5	86
20	86.6	2.54	34.1	75
30	78.6	2.36	33.3	68
40	59.1	2.21	26.8	51
50	35.6	1.69	21.0	31
<i>Aspergillus flavus</i>				
10	36.9	1.63	22.6	32
20	99.8	2.70	36.9	86
30	87.1	2.50	34.8	75
40	78.9	2.31	34.1	68
50	31.2	1.74	17.9	27

* Control : before ammonium precipitation

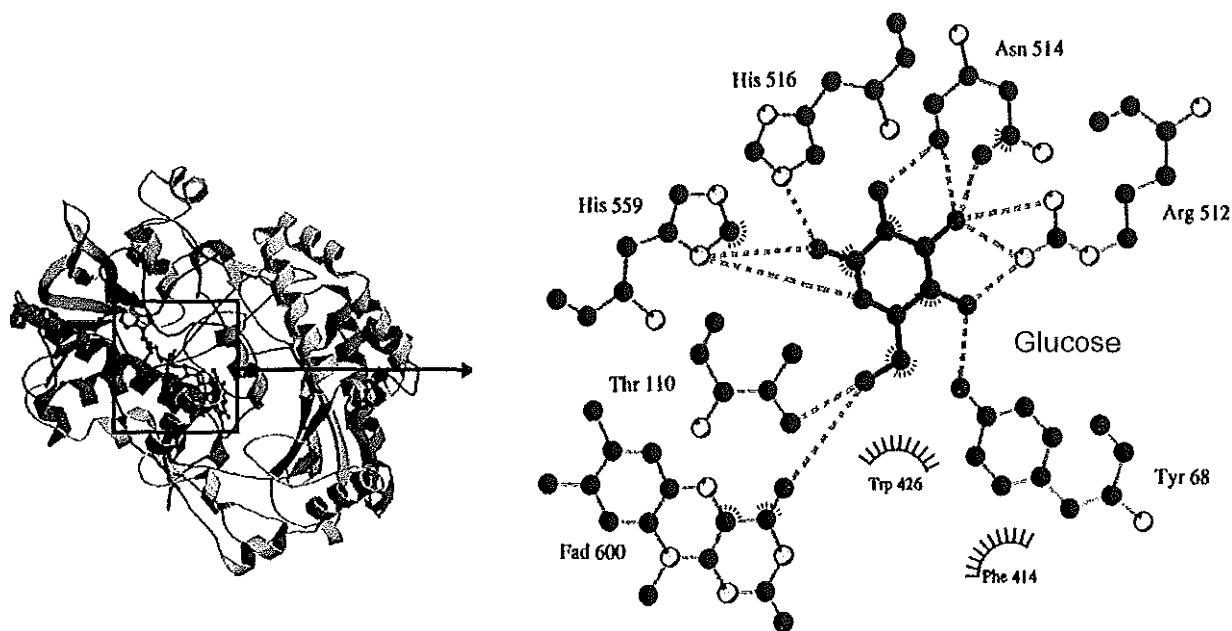
Adapted from International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS) ISSN:2319-7706 Volume2 Number6 (2013) pp.153-161

DOCUMENT N°3 : Propriétés catalytiques de la GOD**GOD-FAD**

La catalyse de l'oxydation du glucose par la GOD requiert le coenzyme FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) qui sert d'accepteur initial des électrons et se trouve ainsi réduit en FADH₂. Il sera ensuite réoxydé en FAD par l'oxygène moléculaire, accepteur final des électrons et réduit à son tour en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Caractéristiques de la GOD (valeurs moyennes, variables selon l'origine fongique)

- Enzyme Michaélienne dimérique
- $M \approx 160 \text{ kDa}$
- $T_{\text{optimum}} \approx 25^\circ\text{C}$
- $\text{pH}_{\text{optimum}} \approx 5$
- Pour l'enzyme libre $K_M \approx 7 \text{ mmol.L}^{-1}$.
- Pour l'enzyme immobilisée $K_M \approx 60 \text{ mmol.L}^{-1}$

**Représentation tridimensionnelle de la GOD**

site residues in glucose oxidase from *A. niger*.
Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. (1995).

<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=1cf3>
<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1cf3>

Représentation schématique du site actif

Schematic representation of the hydrogen bonds and hydrophobic interactions

of the modeled substrate β -D- glucose with active-site residues (LIGPLOT; Wallace et al., 1995 [Wallace, A. C., Protein Eng. 8, 127-134.1]).

DOCUMENT N°4 : Extrait de la fiche technique du kit Glucose RTU™ commercialisé par Biomérieux**REF 61 269 / 61 270**07987 I - fr - 2010/07 **FR****Glucose RTU™****IVD**

Dosage enzymatique du glucose dans urines, sérum et plasma humains.

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST (1)

Le glucose constitue la principale source énergétique des cellules (glycolyse). Il est apporté par l'alimentation sous forme de polysaccharides (amidon, glycogène exogène) ou de disaccharides (saccharose, lactose, maltose). Ceux-ci sont hydrolysés au cours de la digestion en monosaccharides, dont le glucose.

Au niveau du foie et des muscles, le glucose est partiellement transformé en glycogène, polymère de stockage. En cas de besoins énergétiques accrus, il y a glycogénolyse et/ou biosynthèse de glucose (néoglucogenèse au niveau du foie). L'homéostasie glycémique assure un apport énergétique permanent aux cellules. La régulation de la glycémie est complexe et fait intervenir des enzymes hépatiques régulatrices et des hormones (insuline, hormones thyroïdiennes, glucagon...) qui assurent une adaptation rapide.

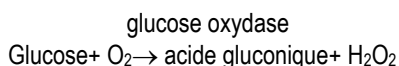
La régulation de la glycémie est en relation avec celle d'autres métabolismes dont celui des protéines et celui des acides gras.

En conditions physiologiques normales, le glucose n'est pas excrété dans les urines.

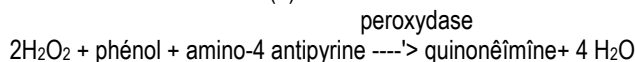
En dehors du dépistage et de la surveillance des états diabétiques, le dosage du glucose est réalisé lors d'affections pancréatiques, métaboliques ou endocriniennes. La fièvre et la dénutrition protéique entraînent également une baisse de la glycémie.

PRINCIPE

Le glucose est dosé en utilisant la séquence glucose oxydase - peroxydase - chromogène :



L'eau oxygénée formée est dosée selon la réaction de TRINDER(2)



L'intensité de la coloration (quinonéimine), mesurée à 505 nm, est proportionnelle à la quantité de glucose présente dans l'échantillon.

PRESENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET

(Réf. 61 269 : 400 tests . Réf. 61 270 : 1000 tests)

Glucose RTU Ref.61 269: 4 x 100 mL(liquide)	Tampon phosphate pH6,6	225 mmol/L
Glucose RTU Ref.61 270: 4 x 250 mL(liquide)	Amino-4-antipyrine	0,3 mmol/L
	Phénol	8,5 mmol/L
	EDTA	5 mmol/L
	Peroxydase	≥ 300 U/L
	Glucose oxydase	≥ 10 000U/L
1 notice		

**Attestation de non dangerosité**

Biomérieux® SA certifie que le produit ci-dessus n'est pas considéré comme dangereux selon les critères décrits dans les directives Européennes 67/548 CEE (substances dangereuses) , 1999/45/CE (préparations dangereuses) et leur mise à jour.

En conséquence, nous ne délivrons pas de fiche de données de sécurité pour ce produit

DOCUMENT N°4 Extrait de la fiche technique du kit Glucose RTU™ commercialisé par Biomérieux (suite)**Réalisation du test**

Longueur d'onde : _____ 505 nm (492 à 550 nm)

Zéro de l'appareil : _____ blanc réactif

	Blanc réactif	Etalon	Dosage
Etalon	-	10 µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Réactif	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger.
Photométrer après une incubation de :
 • 10 minutes à 37°C.
 • 20 minutes à 20-25°C.

Stabilité de la coloration : _____ 1 heure à 20-25°C.**Stabilité de l'étalonnage :** Effectuer un étalonnage à chaque série de dosages.**RESULTATS ET INTERPRETATION**

L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.

Calcul

$$\text{Concentration de l'échantillon} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times n$$

n = concentration de l'étalon

Pour les urines, multiplier, si nécessaire, le résultat obtenu par le facteur de dilution.

FACTEUR DE CONVERSION

$$\text{mmol/l} \times 0,180 = \text{g/l}$$

$$\text{g/l} \times 5,56 = \text{mmol/l}$$

$$M_{\text{glucose}} = 180 \text{ g.mol}^{-1}$$

CONTROLE DE QUALITE

- LYOTROL™ N (Réf. 62 373)
- LYOTROL™ P (Réf. 62 383)
- MONOTROL™ (Réf. 62 472)
- UNITROL™ (Réf. 62 453)

Pour s'assurer de la validité de la série, effectuer un contrôle à chaque série de dosages. La valeur obtenue doit être dans l'intervalle d'acceptation.

VALEURS ATTENDUES

Ces valeurs sont données à titre indicatif, il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence sur une population rigoureusement sélectionnée.

Sérum ou plasma (1, 7)

	mmol/l	g/l	mg/dl
Prématurés	1,10 – 3,30	0,20 – 0,59	20 - 59
Nouveaux nés	1,70 – 3,30	0,31 – 0,59	31 - 59
Enfants	3,30 – 5,60	0,59 – 1,01	59 - 101
Femmes	4,10 – 5,90	0,74 – 1,06	74 – 106
Hommes	4,20 – 6,10	0,76 – 1,10	76 – 110

Urines

En conditions physiologiques normales, le glucose n'est pas excrété dans les urines.

PERFORMANCES (8)

Les études du réactif Glucose RTU™ ont donné les résultats suivants.

Les performances présentées ont été obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice.

Toute déviation de méthodologie peut modifier les résultats.

Les performances sont données à titre indicatif.

Limite de détection analytique

Elle a été déterminée à partir de dosages effectués sur de l'eau déminéralisée (moyenne + 5 x écart type).

La limite de détection est inférieure ou égale à 0,07 mmol/l (0,013 g/l ou 1,26 mg/dl).

Linéarité

Le réactif est linéaire jusqu'à 22,2 mmol/l (4,00 g/l ou 400 mg/dl).

PrécisionPrécision intra-série

Trois échantillons sériques ont été dosés dans la même série.

	n	Moyenne (mmol/l)	C.V (%)
Niveau 1	20	2,58	2,01
Niveau 2	20	7,49	1,20
Niveau 3	20	17,00	1,10

Trois échantillons urinaires ont été dosés dans la même série.

	n	Moyenne (mmol/l)	C.V (%)
Niveau 1	20	1,21	3,45
Niveau 2	20	10,96	2,48
Niveau 3	20	31,50	2,15

Précision inter-séries

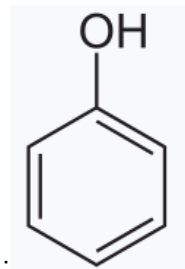
Trois échantillons sériques ont été dosés dans 20 séries différentes (1 série par jour).

	n	Moyenne (mmol/l)	C.V (%)
Niveau 1	20	1,85	3,01
Niveau 2	20	6,44	0,87
Niveau 3	20	19,80	1,17

DOCUMENT N°5 : Extrait de la fiche toxicologique du phénol

Pictogrammes

Mention d'avertissement : Danger



Formule chimique :

N° CAS: 108-95-2

M = 94 g.mol⁻¹

Mentions de danger

- H301 - Toxique en cas d'ingestion
- H311 - Toxique par contact cutané
- H314 - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves
- H331 - Toxique par inhalation
- H341 - Susceptible d'induire des anomalies génétiques
- H373 - Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée

Limites de toxicité:**H301 - H311 - H331 si concentration ≥ 0,1 % (m/v)****H314 - H341 si concentration ≥ 1 %****H373 si concentration ≥ 10 %**

Conseils de prudence

- P261 - Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz/ brouillards/ vapeurs/aérosols
- P280 - Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage
- P301 + P310 - En cas d'ingestion : appeler immédiatement un centre antipoison ou un médecin
- 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
- P310 - Appeler immédiatement un centre antipoison ou un médecin.

DOCUMENT N°6 : Les biocapteurs enzymatiques

Un biocapteur enzymatique est un appareil qui utilise une réaction biochimique catalysée par une enzyme pour détecter et doser spécifiquement son substrat, en général par des signaux électriques.

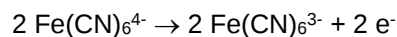
Il se compose d'une enzyme immobilisée reliée à une électrode permettant de transformer un signal biochimique (transformation du substrat en produit) en un signal électrique ensuite amplifié et dont l'intensité est proportionnelle, dans certaines conditions, à la concentration du substrat de l'enzyme dans l'échantillon analysé.

Exemple d'un biocapteur à usage unique (de type «one touch»)

Une goutte de sang est déposée sur la bandelette support de l'électrode. Elle est ensuite introduite dans le lecteur (ampèremètre) pour obtenir la concentration en glucose dans le sang.

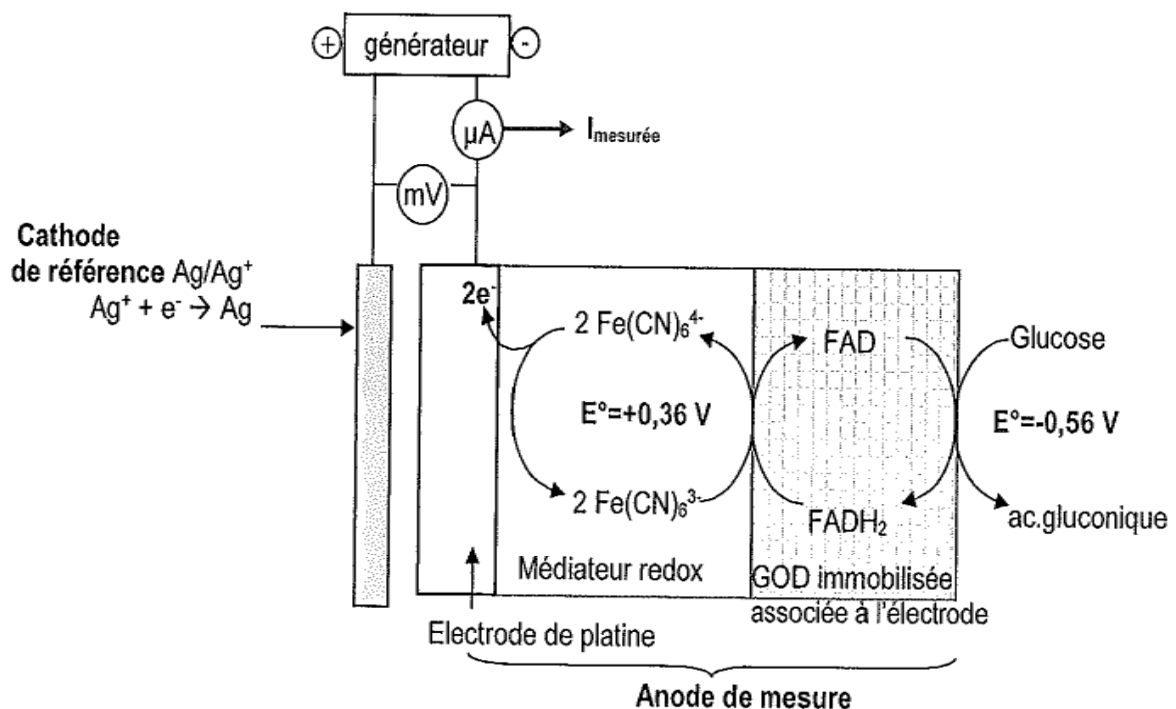
**Principe de fonctionnement d'un biocapteur ampérométrique à Glucose**

Le capteur utilise l'oxydation du glucose catalysée par la GOD avec transfert des électrons libérés sur un médiateur redox : le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ qui subira ensuite une oxydation anodique :



Une tension est appliquée entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence et on mesure l'intensité du courant obtenu. Dans certaines conditions, l'intensité de ce courant est proportionnelle à la vitesse d'apparition du médiateur réduit, donc à la vitesse d'oxydation du glucose catalysée par la GOD :

$$I_{\text{mesurée}} = k \times V_i \text{ de la réaction enzymatique}$$

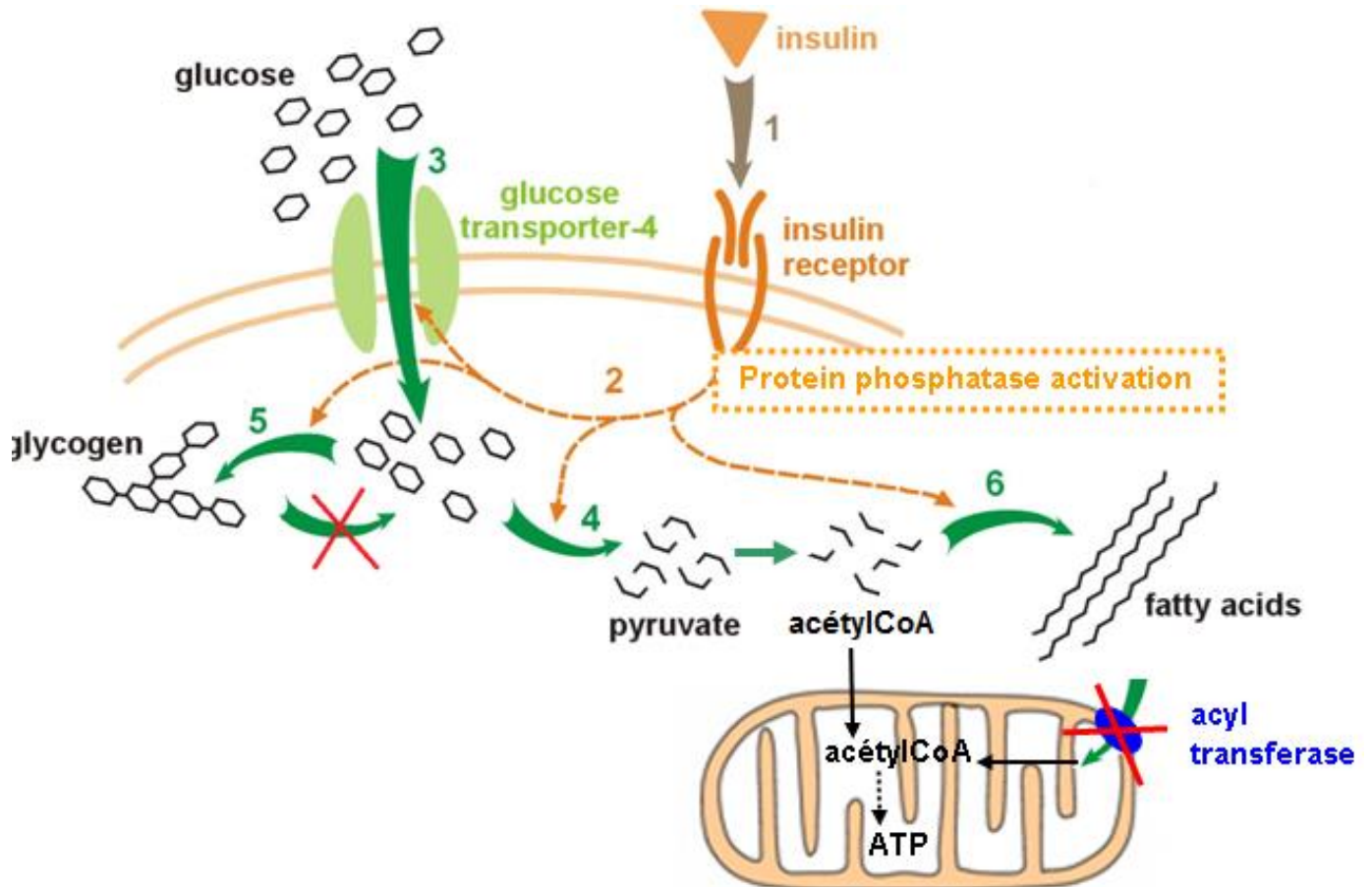


DOCUMENT N°7 : Mode d'action de l'insuline

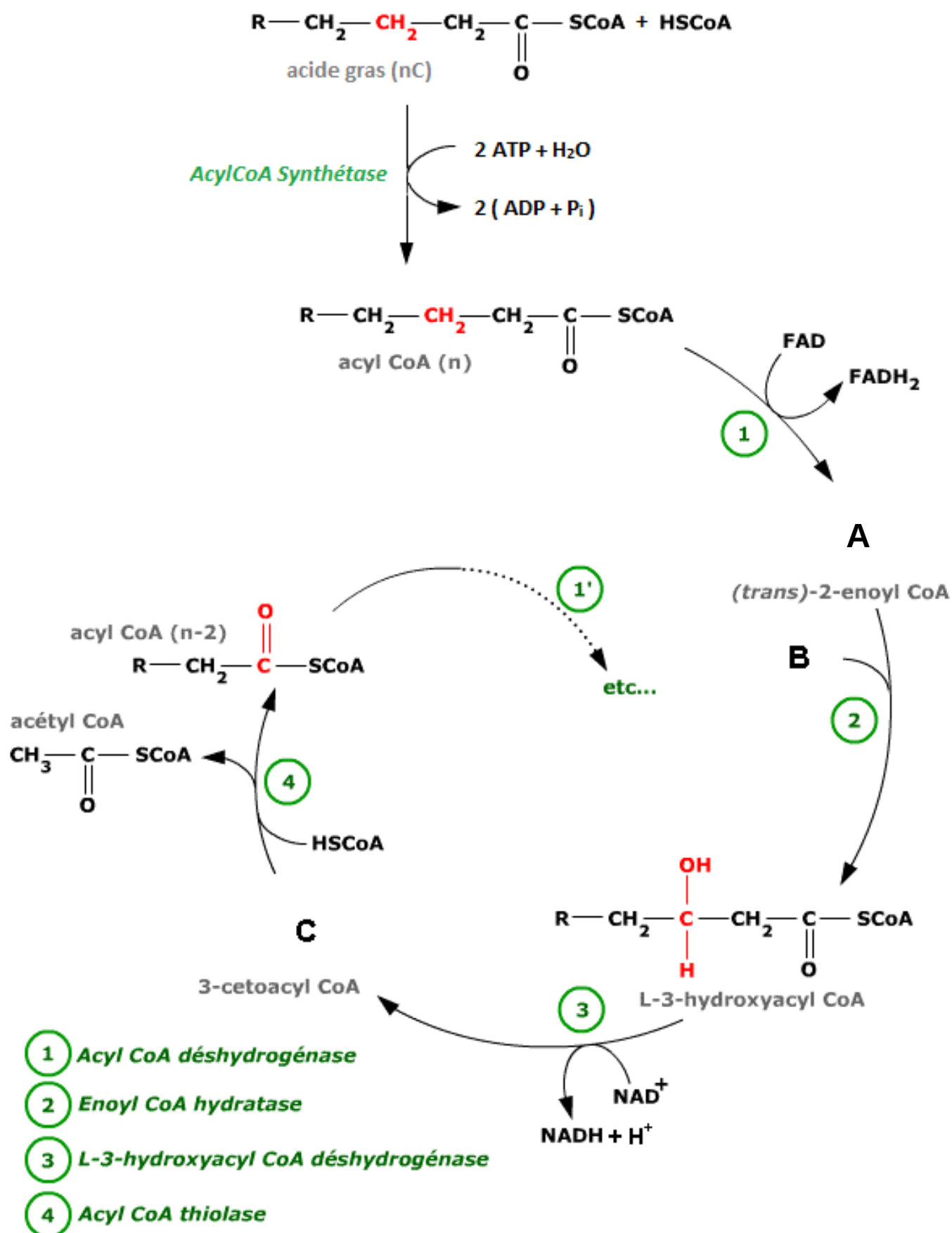
En hyperglycémie le pancréas secrète de l'insuline qui se fixe sur un récepteur membranaire

(1) au niveau de ses cellules-cibles (hépatocytes, adipocytes et cellules musculaires) et déclenche une cascade d'événements intracellulaires (2).

L'insuline va favoriser l'entrée du glucose dans les cellules via un transporteur membranaire (3), sa dégradation (4) et en cas de surplus son stockage sous forme de glycogène (5) ou de réserves lipidiques (6).



DOCUMENT N°8 : Voie métabolique de dégradation des acides gras



Sujet de microbiologie et technologies d'analyse 2017

Matériel autorisé:

- Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999)
- Dictionnaire anglais-français

L'expression écrite, le soin et la formulation des réponses (concision, qualité des schémas, des tableaux...) seront évalués à hauteur de 3 points sur 60.

Élimination des bactéries multi-résistantes en milieu hospitalier

Les cas de bactéries multirésistantes aux antibiotiques impliquées dans des infections nosocomiales sont de plus en plus nombreux. Les procédures de nettoyage-désinfection dans les hôpitaux doivent donc être parfaitement maîtrisées afin d'éviter la transmission de ces souches.

De nombreux cas de multi-résistances *Escherichia coli* (*E. coli*) sont décrits dans la littérature. Ces souches habituellement fragiles dans l'environnement sont bien plus persistantes dans le cas du milieu hospitalier, notamment par leur capacité à s'implanter sur les surfaces au sein de biofilms.

Lorsqu'une souche multirésistante est détectée, l'hôpital procède à son identification précise, à la recherche des différentes niches microbiennes dans les locaux, et à la mise au point de techniques d'élimination efficaces.

1 - Identification d'une souche multirésistante détectée à l'hôpital (9 points)

Une souche multirésistante est détectée à l'hôpital et compte-tenu du contexte clinique, *E. coli* est suspectée. L'identification de l'espèce bactérienne est réalisée dans un premier temps par séquençage d'une partie du gène codant pour l'ARNr 16S.

1.1 - Comparaison de séquences ARNr 16S

Un pourcentage d'identité inférieur à 97 % entre deux séquences est l'indication d'un genre bactérien différent. Un pourcentage supérieur à 99 % permet une identification à l'espèce.

Une analyse bioinformatique de la séquence donne les résultats présentés dans le **document n°1**.

Q1 - Analyser les résultats de l'étude de l'ARNr 16 S de la bactérie recherchée et **argumenter** sur la nécessité d'approfondir l'identification.

Afin de poursuivre l'identification de la bactérie, une hybridation ADN/ADN est réalisée.

1.2 - Hybridation ADN/ADN

Cette méthode consiste en une hybridation entre l'ADN de l'organisme à analyser et celui d'une souche de référence. Un pourcentage d'hybridation supérieur à 70 % ainsi qu'une stabilité thermique des hybrides permettent de confirmer qu'il s'agit bien d'organismes de la même espèce. Le critère de stabilité est défini par une réduction du T_m des hétéroduplex (« *melting temperature* » ou température de demi-dénaturation) n'excédant pas les 5 °C.

Une hybridation entre l'ADN de la bactérie à identifier et celui d'une souche de référence d'*E. coli* est réalisée. Le pourcentage d'hybridation obtenu lors de l'hybridation des hétéroduplex est supérieur à 70 %. Le **document n°2** montre les courbes de fusion obtenues.

Q2 - Comparer les T_m obtenus pour les deux souches testées. **Conclure** sur l'identification de la souche multirésistante étudiée.

Les bactéries multi-résistantes identifiées sont envoyées au centre national de référence des souches pour procéder à une recherche de plasmides bactériens, souvent décrits comme impliqués dans les phénomènes de multi-résistance.

1.3 - Étude du plasmide impliqué dans la multi-résistance

Le plasmide pHNSHP45 est présenté dans le **document n°3**. Ce plasmide comporte un gène *mcr-1* impliqué dans la résistance aux antibiotiques, ainsi que d'autres gènes conférant des caractéristiques complémentaires.

Q3 - Proposer deux arguments justifiant que ce plasmide peut également être à l'origine de la propagation de résistances aux antibiotiques et d'implantation en milieu hospitalier.

Lorsqu'une souche d'*E. coli* multirésistante a été découverte et caractérisée, il est indispensable de trouver toutes les niches microbiennes susceptibles de l'héberger avant de l'éradiquer. Une recherche est alors effectuée dans les locaux.

2. Détection de la souche dans les locaux (27 points)

2.1- Méthodes microbiologiques conventionnelles

Dans un premier temps, la pollution microbiologique globale de l'atmosphère des locaux a été mesurée. La démarche et les résultats sont présentés dans le **document n°4**.

Q4 - Identifier les paramètres à régler sur l'aérobiocollecteur pour réaliser le protocole 1. **En argumentant** la réponse, **proposer** un exemple de réglages qui permettraient de satisfaire le protocole pour un prélèvement de 25 minutes.

Ensuite la recherche de souches d'*E. coli* potentiellement multi-résistantes a été réalisée à différents niveaux :

- des prélèvements ont été réalisés sur les sols de plusieurs zones du service hospitalier après leur nettoyage et leur désinfection (salle de consultation, couloirs du service de chirurgie et bloc opératoire). Sur ces prélèvements, la flore totale a été recherchée en parallèle.
- au niveau du bloc opératoire, différents prélèvements ont été réalisés sur plusieurs surfaces horizontales, également après nettoyage et désinfection :
 - o la table d'opération ;
 - o le plateau supérieur du chariot d'instruments chirurgicaux ;
 - o le scialytique (éclairage mobile au-dessus de la table d'opération).

La démarche, les milieux utilisés et les résultats sont présentés dans le **document n°5**.

Q 5- Préciser les raisons pour lesquelles le milieu TBX est adapté à une recherche spécifique d'*E. coli*.

Q6 - Expliquer l'intérêt de l'emploi du thiosulfate de sodium dans le protocole 2 et l'intérêt de l'étape de rinçage à l'eau physiologique du protocole 3.

Q7 - Établir la formule de calcul qui permet d'obtenir les résultats en UFC/cm² du protocole 2. **Retrouver** par le calcul la valeur de $2,0 \cdot 10^1$ UFC/cm² obtenue pour la flore totale dans le bloc opératoire, sachant que 5 colonies ont été dénombrées pour cet essai.

Q8 - Comparer l'ensemble des résultats obtenus pour les protocoles 1 et 2 avec les informations du **document n°6**. **En déduire** la conformité des résultats par rapport à la norme NF ISO 14698. **Commenter** les résultats de recherche d'*E. coli* (protocoles 2 et 3). **Proposer** des actions correctives à mettre en œuvre si nécessaire pour maîtriser la pollution microbiologique de l'atmosphère des locaux, des sols et des surfaces.

Ces méthodes de détection mises en œuvre à l'hôpital impliquent une étape d'incubation de 24h. Les responsables envisagent donc de mettre en place une nouvelle technique de détection plus rapide.

2.2- Mise en place d'une méthode alternative de détection des niches bactériennes

E. coli peut persister dans l'environnement en s'incluant dans des biofilms. Afin de détecter rapidement ces potentielles sources de contamination à *E. coli*, l'hôpital utilise l'ATPmétrie (**document n°7**).

Q9 - Citer les grandes étapes de la formation des biofilms pour montrer qu'ils sont des sources de contamination redoutées en milieu hospitalier.

Q10 - A l'aide du document n°7, expliquer le principe de l'ATPmétrie afin de **montrer** comment cette méthode permet de détecter et quantifier la présence de micro-organismes.

L'objectif de l'hôpital est de détecter sur ces surfaces, toute contamination, et le cas échéant de pouvoir la quantifier.

Deux méthodes proposées par deux fournisseurs de systèmes d'ATPmétrie sont testées pour vérifier la qualité des opérations de nettoyage - désinfection (sur les surfaces horizontales en plastique du bloc opératoire: table d'opération, chariot à instruments, scialytique).

Le **document n°8** montre la procédure de réalisation et les résultats de ces essais.

Les essais réalisés mettent en jeu notamment les étapes suivantes :

- la contamination artificielle d'une surface par *E. coli* ;
- l'emploi d'un réactif de lyse cellulaire.

Q11 - Expliquer l'intérêt de ces deux étapes.

Q12 - D'après les courbes de calibration obtenues, **indiquer** pour chaque méthode les seuils de détection et les limites de quantifications supérieures en UFC/cm². **Argumenter** afin de sélectionner la méthode la plus adaptée aux objectifs de l'hôpital.

Cette nouvelle méthode permettra à l'hôpital d'être plus réactif pour traiter efficacement les locaux contaminés.

3 - Élimination de la souche d'*E. coli* multirésistante (21 points)

3.1- Validation de l'efficacité d'un nouveau désinfectant chimique

Un nouveau désinfectant APESIN Clean Bacto®, utilisé pour la propreté des sols, est testé au laboratoire. La fiche fournisseur du désinfectant est présentée dans le **document n°9**. Le service hygiène de l'hôpital cherche à valider son efficacité sur la souche multi-résistante d'*E. Coli*.

Le désinfectant comporte une molécule tensio-active qui a de ce fait une action bactéricide.

Q13 - Expliquer cet effet bactéricide du désinfectant sur *E. coli*.

Dans un premier temps, le laboratoire évalue la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) du désinfectant vis à vis de la souche multi-résistante.

La détermination de la CMI est réalisée en milieu liquide et en microplaque, en mettant en contact un inoculum calibré de la souche à 1·10⁶ bactéries/mL avec des concentrations décroissantes du désinfectant.

Q14 - Présenter un tableau de dilution sachant qu'on utilise:

- une microplaque contenant 12 puits par ligne
- du bouillon Mueller Hinton stérile
- du désinfectant APESIN Clean Bacto®
- un inoculum calibré de la souche multirésistante
- un volume final par puits de 100 µL
- le puits 1 pour réaliser un témoin de culture.

Après incubation de la microplaque, lecture et interprétation des résultats, on détermine une CMI comprise entre 0,20 et 0,10 % (0,10 % < CMI ≤ 0,20 %).

Q15 - Expliquer le raisonnement qui conduit à cette conclusion.

Dans un second temps, la CMB (Concentration Minimale Bactéricide) du désinfectant est recherchée selon un protocole adapté de la norme NFT 72-150. Le protocole et les résultats sont présentés dans le **document n°10**.

Q16 - Analyser le **document n°10**, afin de déterminer la CMB du désinfectant vis à vis de la souche multi-résistante. A partir du **document n°9**, **repérer** la concentration d'utilisation minimale du désinfectant. **Conclure** quant à la validité du nouveau désinfectant APESIN Clean Bacto®, choisi par l'hôpital.

Les patients pouvant être en contact avec le désinfectant, des risques d'allergies à ce composé chimique peuvent se déclarer. L'hôpital souhaite donc envisager une alternative biologique.

3.2· Étude d'une alternative à la désinfection chimique, les cocktails de phages

L'utilisation des phages pour éliminer les contaminations bactériennes fait l'objet de nombreux brevets, depuis longtemps, pour différentes applications en industrie agro- alimentaire, pharmaceutique ou pour la maîtrise de l'hygiène en milieu médical. Les phages restent donc des alternatives potentielles à la désinfection chimique.

L'hôpital souhaite tester l'utilisation d'un « cocktail » de phages fournis par une entreprise spécialisée. Le « cocktail » est une suspension contenant 5 phages différents à haute concentration, tous étant lytiques et dirigés spécifiquement contre *E. coli*.

Une première étude est réalisée pour vérifier la sensibilité d'*E. coli* aux différents phages constitutifs. Le **document n°11** montre la réalisation et les résultats de cet essai.

Q17 - Expliquer pourquoi la mise en contact phage / bactérie peut conduire à obtenir des zones dites clarification de la culture.

Q18 - Commenter les résultats obtenus, d'une part pour le cocktail de phages, d'autre part pour chaque phage constitutif du cocktail. **Proposer** une hypothèse expliquant la différence de comportement entre les différents phages du cocktail.

Le cocktail de phages utilisé étant jugé suffisamment efficace, une étude de la cinétique de destruction d'*E. coli* a été réalisée dans un second temps. L'objectif est de comparer l'efficacité de la désinfection « phagique » par rapport à la désinfection chimique (avec le désinfectant d'origine utilisé par l'hôpital). Le protocole et les résultats figurent dans le **document n°12**.

Q19 - Analyser les résultats et **présenter** un tableau comparatif «avantages-inconvénients» des deux méthodes d'élimination (désinfectant et cocktail phagique).

DOCUMENT n°4 : Protocole 1 - Estimation de la pollution microbiologique de l'atmosphère des locaux

La recherche est réalisée selon la norme NF ISO 14698 relative à la pollution microbiologique des salles propres et environnements maîtrisés.

On utilise des aérobiocollecteurs, appareils qui aspirent l'air et projettent les particules en suspension sur une gélose (gélose PCA, « plate count agar», dans ce protocole). La détection des micro-organismes totaux, représentant la pollution microbiologique globale, est réalisée par comptage des colonies après incubation. Les appareils sont télécommandés afin de déclencher le prélèvement à distance, après que l'opérateur (qui est vecteur de contamination) soit sorti du local à contrôler.

Conditions de mesure :

- Volume d'air contrôlé = 1 m³
- Le prélèvement doit être réalisé de la façon suivante :
 - o en plaçant l'aérobiocollecteur au centre du local à contrôler, en le positionnant à 80 cm du sol (sur un chariot par exemple),
 - o avec un débit d'aspiration ne dépassant pas 50 L/min au risque de créer des turbulences qui nuiraient au prélèvement.

Résultats:

Zone contrôlée	Salle de consultation	Couloir du service de chirurgie	Bloc opératoire
Nombre d'UFC	80	4	0

DOCUMENT n°1 : Résultats de l'analyse bioinformatique de séquences de l'ARNr 16S

Extrait du meilleur alignement de la séquence recherchée avec une base de données de séquences d'ARNr 16S (Quick BioInformatic Phylogeny of Prokaryotes v1.0.1)

```
>Escherichia_coli~v~N~IM995446=Bacteria-Proteobacteria-
Gammaproteobacteria-Enterobacteriales-Enterobacteriaceae-Escherichia-
Escherichia_coli
Length = 1482
Score = 2065 bits (1160)
Identities = 1177/1201 (98%), Gaps = 1/1201 (0%)

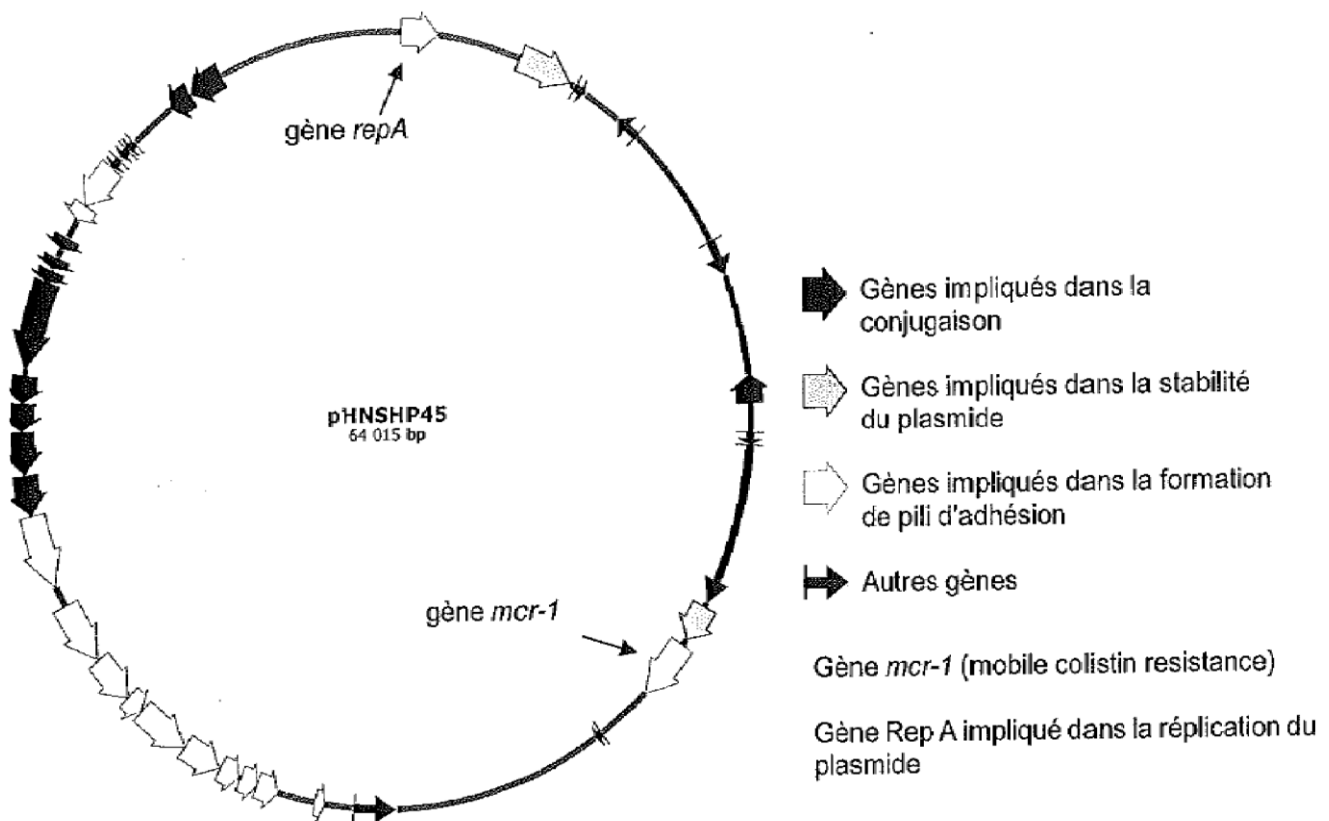
Query: 1      ctacgggaggcagcagtggggaatattgccaatggcgca-gcctgatgcagccatgcc 60
             |||
Sbjct: 282    ctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatggcgcaagcctgatgcagccatgcc 341

Query: 61      gcgtgtatgaagaaggccttcgggttgtaaagtactttcagcggggaggaagggagtaaa 120
             |||
Sbjct: 342    gcgtgtatgaagaaggccttcgggttgtaaagtactttcagcggggaggaagggagtaaa 401

Query: ...
Sbjct: ...
```

DOCUMENT n°3 : Carte du plasmide pHNSHP45 portant le gène *mcr-1*

d'après Liu *et al.*, Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study (2015)



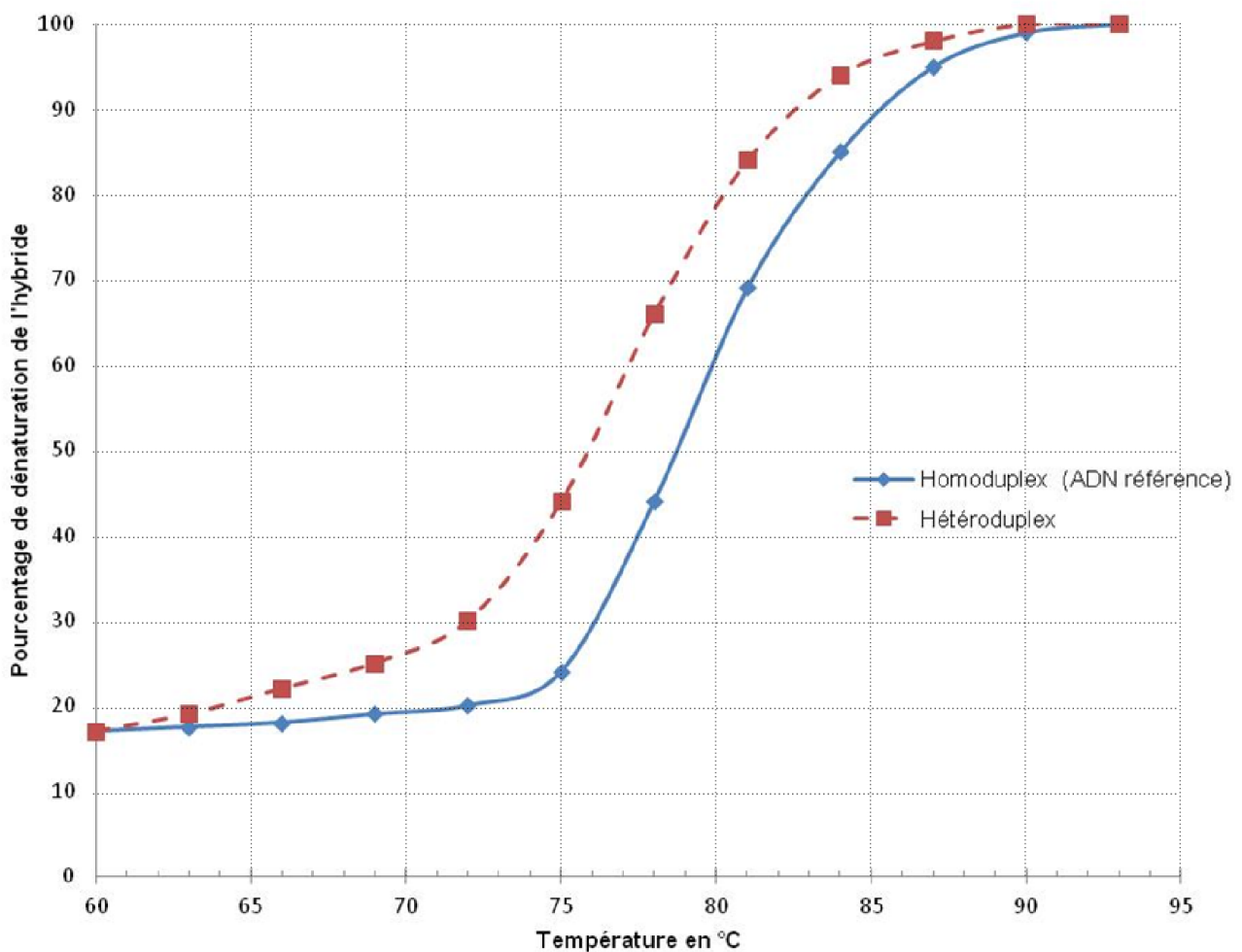
DOCUMENT n°2 : Méthode d'étude comparée de deux souches d'*E. coli* par hybridation ADN/ADNProtocole de réalisation de l'hybridation ADN/ADN :

On réalise dans un premier temps la dénaturation d'extraits d'ADN, par un chauffage progressif, sur la souche de référence et sur la souche à comparer.

Les produits de dénaturation sont alors mis en contact afin de produire des hétéroduplex (molécules d'ADN double brin issu de l'hybridation de deux brins d'origines distinctes), en diminuant lentement la température.

La dénaturation des hétéroduplex est alors suivie au cours d'une augmentation progressive de la température. Il est possible de déterminer la T_m (température à laquelle 50 % des ADN sont dénaturés).

Une comparaison est réalisée entre la dénaturation des hétéroduplex et celle des homoduplex issus uniquement de l'ADN de la souche de référence.

Courbes de fusion de l'hybridation ADN/ADN entre les ADN de la bactérie étudiée et une souche de référence *E. coli*

DOCUMENT n°5: Recherche de contamination sur les surfaces après nettoyage- désinfection**Protocole 2 - Essais flore totale et *E. coli* sur les sols après nettoyage et désinfection**Composition de la gélose TBX pour recherche d'*E. coli*:

Tryptone	20 g/L
Sels biliaires	1,5 g/L
Agar	15 g/L
5-bromo 4-chloro 3-indolyl P-D glucuronide	0,075 g/L

Conditions de réalisation du protocole :

- Avec du ruban adhésif, délimiter une surface à contrôler de 25 cm²,
- A l'aide d'un écouvillon stérile, frotter la surface en effectuant 20 passages,
- Plonger l'écouvillon dans un tube de 10 ml de diluant, bien homogénéiser pour disperser le prélèvement.
- Transférer aseptiquement 1 mL du tube précédent dans 9 mL d'une solution neutralisante de thiosulfate de sodium à 0,05 %. Homogénéiser.
- Ensemencer en masse, une gélose TBX et une gélose PCA, avec 1 mL provenant du tube précédent,
- Incuber les milieux à température / durée adaptée,
- Dénombrer les UFC après incubation et exprimer les résultats en UFC/cm²

Résultats:

Sols contrôlés	Salle de consultation	Couloir du service de chirurgie	Bloc opératoire
Flore totale : UFC / cm ²	2,2·10 ¹	2,4·10 ¹	2,0·10 ¹
<i>E. coli</i> : UFC / cm ²	1,6·10 ¹	1,2·10 ¹	1,2·10 ¹

Protocole 3 : Essais *E. coli* sur des surfaces horizontales du bloc opératoire après nettoyage et désinfectionConditions de réalisation :

- Avec du ruban adhésif, délimiter une surface à contrôler de 25 cm²,
- A l'aide d'un écouvillon stérile, frotter la surface en effectuant 20 passages,
- Plonger l'écouvillon dans un tube de 10 mL de diluant, bien homogénéiser pour disperser le prélèvement,
- Filtrer le contenu du tube sur membrane filtrante 0,45 µm,
- Rincer le filtre avec environ 20 mL d'eau physiologique stérile,
- Transférer le filtre sur gélose TBX,
- Incuber à température / durée adaptée,
- Dénombrer les UFC après incubation et exprimer les résultats en UFC/cm²

Résultats:

Surfaces horizontales contrôlées	Table d'opération	Plateau du chariot d'instrument	Scialytique
UFC / cm ²	4	3	4

DOCUMENT n°6 : Classification des zones à risque et recommandations réglementaires en milieu hospitalier (adapté à partir de la norme NF ISO 14698)

ZONE		1 Faible risque	2 Risque modéré	3 Haut risque	4 Très haut risque
Exemples		Administration Services techniques	Psychiatrie Salles d'attente Salles de consultation Traumatologie	Urgences Soins intensifs Service de chirurgie Maternité Pédiatrie	Blocs opératoires Néonatalogie Oncologie
Sols et surfaces	Technique de traitement à employer	Balayage humide	Balayage humide + Bio-nettoyage des sols	Balayage humide + Bio-nettoyage des sols et des surfaces horizontales faciles d'accès	Balayage humide + Bio-nettoyage des sols et des surfaces horizontales
	Produits à employer	Détergent	Détergent désinfectant	Détergent désinfectant	Détergent désinfectant
	Fréquence d'application	Selon usage des locaux	Quotidiennement	Quotidiennement	Pluri-quotidiennement
	Pollution microbiologique acceptée (flore totale)	< 5 UFC / cm ²	< 2 UFC / cm ²	< 0,2 UFC / cm ²	< 0,2 UFC / cm ²
Air	Pollution microbiologique acceptée (flore totale)	-	< 100 UFC / m ³	< 10 UFC / m ³	< 5 UFC / m ³

Bio-nettoyage = terme utilisé en milieu hospitalier pour désigner une décontamination des surfaces à l'aide d'un détergent et d'un désinfectant

DOCUMENT n°7: L'ATPmétrie

L'ATPmétrie permet de mesurer la quantité d'ATP présente dans un échantillon. La mesure repose sur une réaction mettant en jeu le couple luciférine / luciférase :

luciférase



L'émission de lumière est mesurée par un luminomètre. Les résultats sont exprimés en RLU (Relative Light Unit).

DOCUMENT n°8 : Essais des protocoles d'ATPmétrie

Conduite de l'essai : pour chaque protocole, les 4 étapes suivantes sont réalisées :

1- Préparation de suspensions étalons d'*E. coli*

A partir d'une suspension d'*E. coli* à $2,5 \cdot 10^{10}$ bactéries mL, réaliser 9 dilutions décimales en eau physiologique stérile.

2- Contamination artificielle d'une surface en plastique

- Sur une plaque en plastique parfaitement nettoyée, matérialiser avec un marqueur 10 zones carrées de 5 cm de côté,
- Déposer, respectivement au niveau de chaque zone, 1 ml de chaque suspension étalon, suspension mère comprise. Étaler pour répartir le dépôt et sécher.

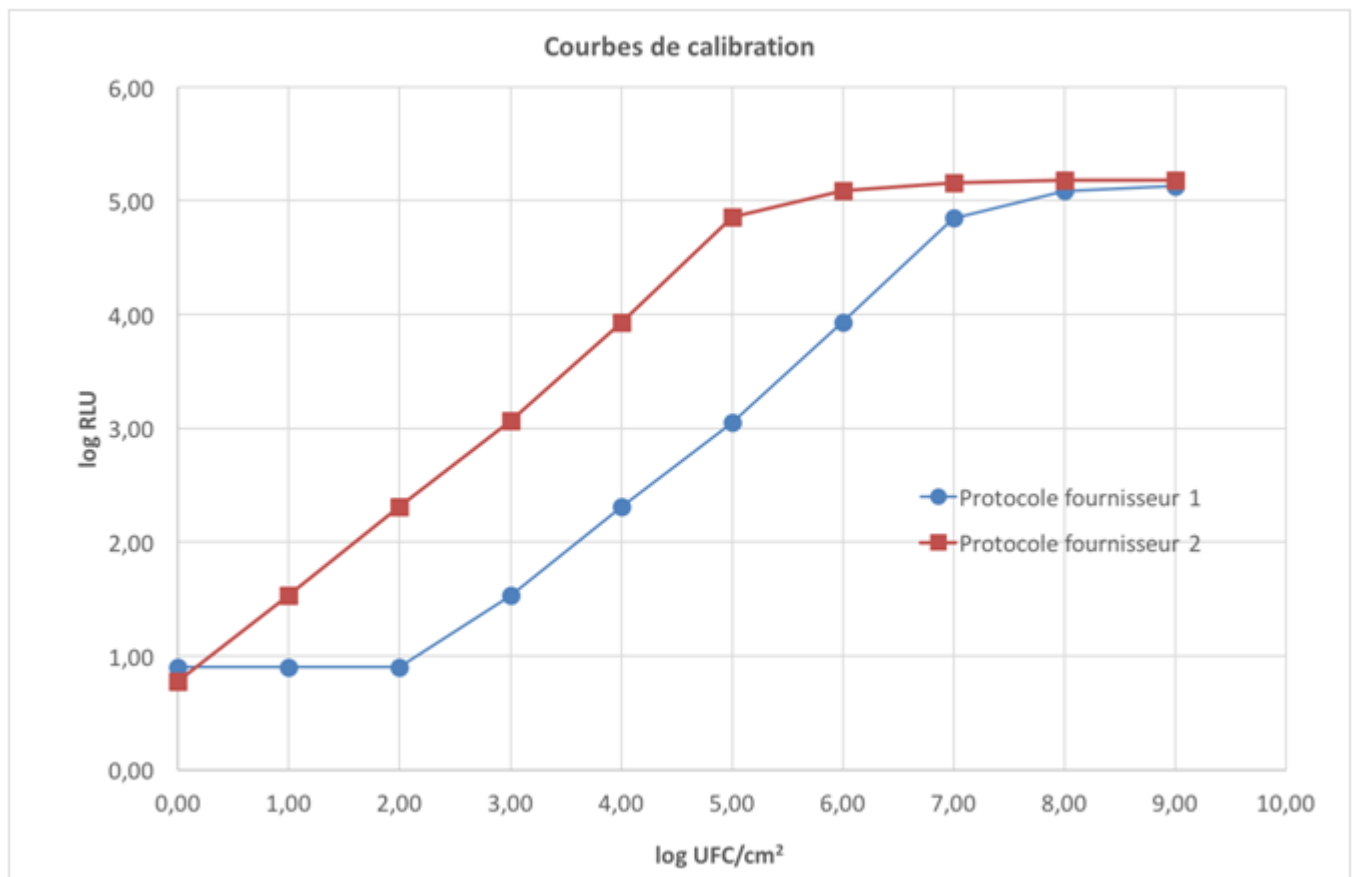
3 -Mesure de la quantité d'ATP

- Au niveau de chaque zone, frotter toute la surface en utilisant un écouvillon d'ATPmétrie.
- Transférer l'écouvillon dans le tube fournisseur contenant le réactif de lyse cellulaire et les réactifs d'ATPmétrie, homogénéiser et laisser agir 1 minute,
- Introduire le tube dans le luminomètre et relever immédiatement la valeur en RLU.
- Recommencer pour réaliser la mesure dans les autres zones.

4 - Construction de la courbe de calibration

Tracer la courbe de calibration dite « log-log » : $\log \text{RLU} = f(\log \text{UFC/cm}^2)$. Exploiter les zones de proportionnalité en traçant une régression linéaire.

Courbes de calibration obtenues :



Donnée: $\log \text{UFC/cm}^2 = 1$ correspond à un nombre de micro-organismes de 10^1 par cm^2

DOCUMENT n°9 Étiquette fournisseur du désinfectant



Fiche Technique

APESIN clean bacto



Détergent désinfectant sols et surfaces

- Bactéricide, Mycobactéricide, Levuricide et Virucide
- Actif dès 20°C
- Toutes eaux

Performances

- APESIN clean bacto est bactéricide, mycobactéricide (tuberculocide), levuricide (fongicide versus *Candida albicans*), et virucide : voir tableau des propriétés désinfectantes en page 2.
- APESIN clean bacto a un excellent pouvoir désinfectant dès 0,25% en présence de salissures. Il a été spécialement étudié pour garantir un grand respect des surfaces et un confort d'utilisation optimum.
- Sa formule est conforme à la réglementation relative aux produits de nettoyage des surfaces pouvant se trouver au contact de denrées alimentaires, arrêté du 19/12/13.

Utilisation & Dosage

Nettoyage/Désinfection des sols

Méthode manuelle d'immersion ou de pré-immersion

1. Diluer APESIN clean bacto, se référer au tableau de dosage ci-dessous (à partir de 0,25% selon la norme visée et le degré de salissures)
2. Mettre le nombre de bandeaux nécessaire à tremper par rapport à la quantité de solution.
3. Si nécessaire, placer un bandeau sur la grille pour l'égoutter.
4. Fixer le bandeau au support velcro du balai.
5. Laver le sol avec un mouvement de godille.
6. Laisser agir le temps du séchage.
7. En cas de salissures importantes, augmenter les dosages.
8. Utilisation en autolaveuse ou en spray.

Nettoyage/Désinfection des surfaces

1. Diluer APESIN clean bacto dans un seau ou un pulvérisateur se référer au tableau de dosage ci-dessous (à partir de 0,25% selon la norme visée et le degré de salissures).
2. Appliquer sur la surface à nettoyer et à désinfecter.
3. Frotter si nécessaire.
4. Laisser agir le temps du séchage.
5. Inutile de rincer (sauf les surfaces pouvant entrer en contact avec les denrées alimentaires où le rinçage est obligatoire).

Domaines d'application:

- Tous types de sols résistant à l'eau.
- Tous types de surfaces résistant à l'eau (tables, chariots, plans de travail, baignoires...).
- Sols protégés par une émulsion.

Ingrédients:

100g de produit contiennent:

7,5% : N-(3-aminopropyl)-N'-dodécylpropane-1,3-diamine (n° cas 2372-82-9), <5% agents de surface anioniques, <5% agents de surface non ioniques, parfums, Limonene, Coumarin.

Site de production et développement durable



Précautions d'utilisation, de stockage et de conservation

Sécurité: Produit réservé à un usage strictement professionnel. Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels, et accessible sur www.diese-fds.com. Utiliser les biocides avec précaution. Lire attentivement l'étiquette et la fiche technique avant chaque utilisation.

Stockage: Stocker à température ambiante dans l'emballage d'origine. Protéger du gel.

Environnement: Ne jeter que les emballages entièrement vides dans les containers spéciaux.

DOCUMENT n°10 : Détermination de la CMB de la souche multirésistante vis-à-vis du nouveau désinfectant (adapté à partir de la norme NFT 72-150)

Principe:

Le protocole consiste à déterminer la concentration minimale à laquelle le désinfectant est **capable de réduire de 99,999% le nombre de cellules vivantes (soit une réduction de 10^5) en 5 minutes** de contact à 20 °C.

La détermination repose sur une appréciation visuelle de l'intensité du développement bactérien d'un mélange souche / désinfectant et d'une comparaison à des témoins de croissance.

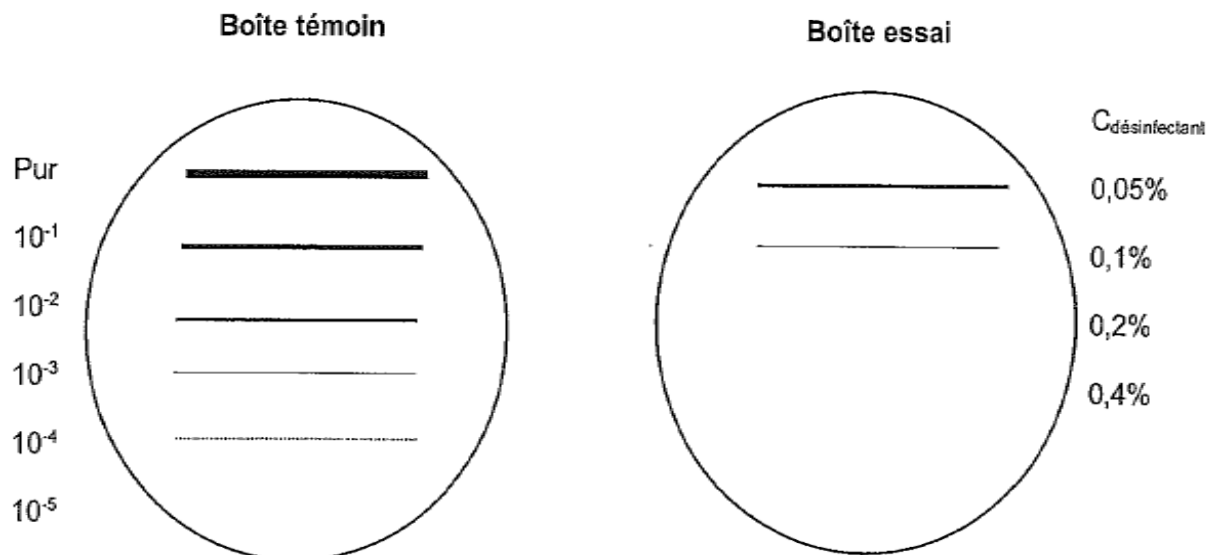
Protocole:

Réalisation d'une boîte témoin permettant d'estimer une réduction de 10^5 de l'inoculum de la souche multirésistante. Pour cela une gélose Mueller Hinton est ensemencée en stries avec l'inoculum pur de la souche et les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} de celui-ci.

Réalisation de la boîte essai :

- Une gamme de concentration du désinfectant est réalisée et chaque concentration est mise en contact avec l'inoculum pur pendant 5 minutes à 20°C.
- Les différents mélanges désinfectant / inoculum sont ensuite ensemencés en strie à la surface d'une gélose Mueller Hinton. Une strie correspond à une concentration en désinfectant testé.

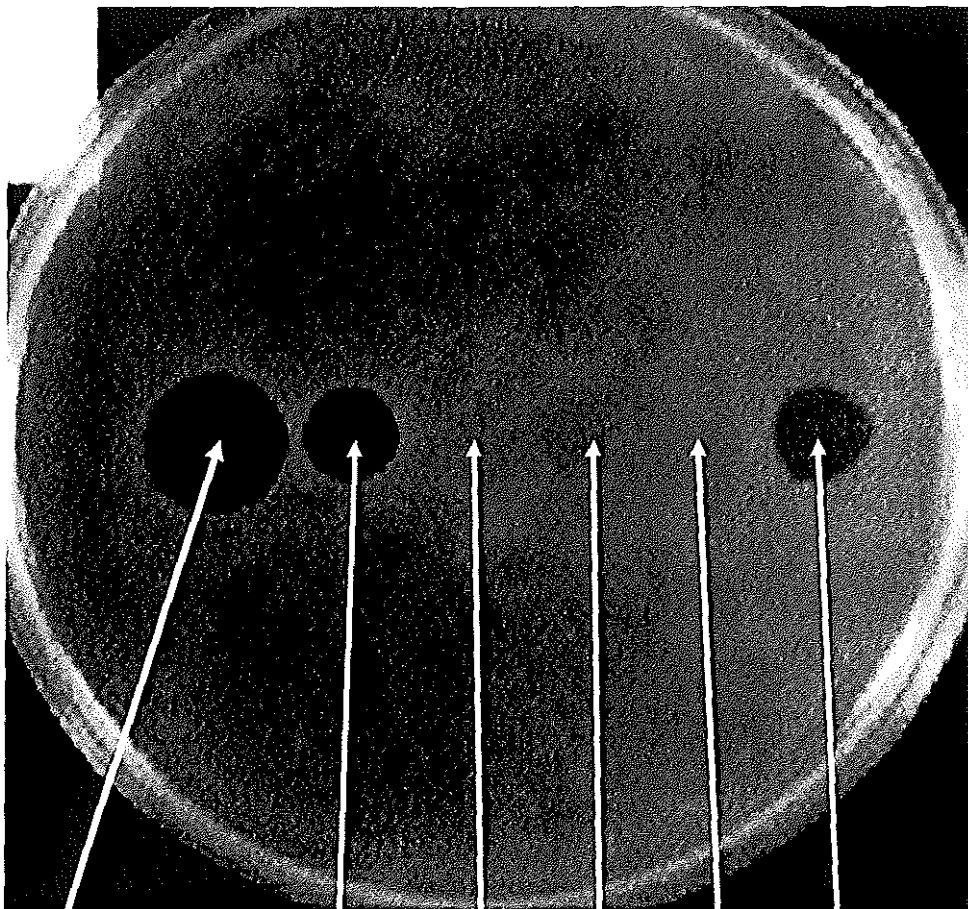
Résultats après incubation :



DOCUMENT n°11 : Étude de sensibilité d'*E. coli* aux différents phages du cocktailProtocole:

La souche d'*E. coli* est ensemencée en masse sur gélose non sélective. Une fois la gélose solidifiée et séchée, différents dépôts de suspensions phagiques sont réalisés en surface par la technique des micro-gouttes : 5 µL de chaque suspension phagique testée sont déposés sur la gélose de façon à former un dépôt de 1 à 2 mm de diamètre maximum.

Après séchage des dépôts, la gélose est incubée 24 h à 37 °C. On observe les zones de clarification après incubation.

Résultats après incubation :

Position de dépôt du cocktail de phages
(phages 1 + 2 + 3 + 4 + 5)

Position des dépôts
des suspensions phagiques:
de gauche à droite, phage 1 → 2 → 3 → 4 → 5

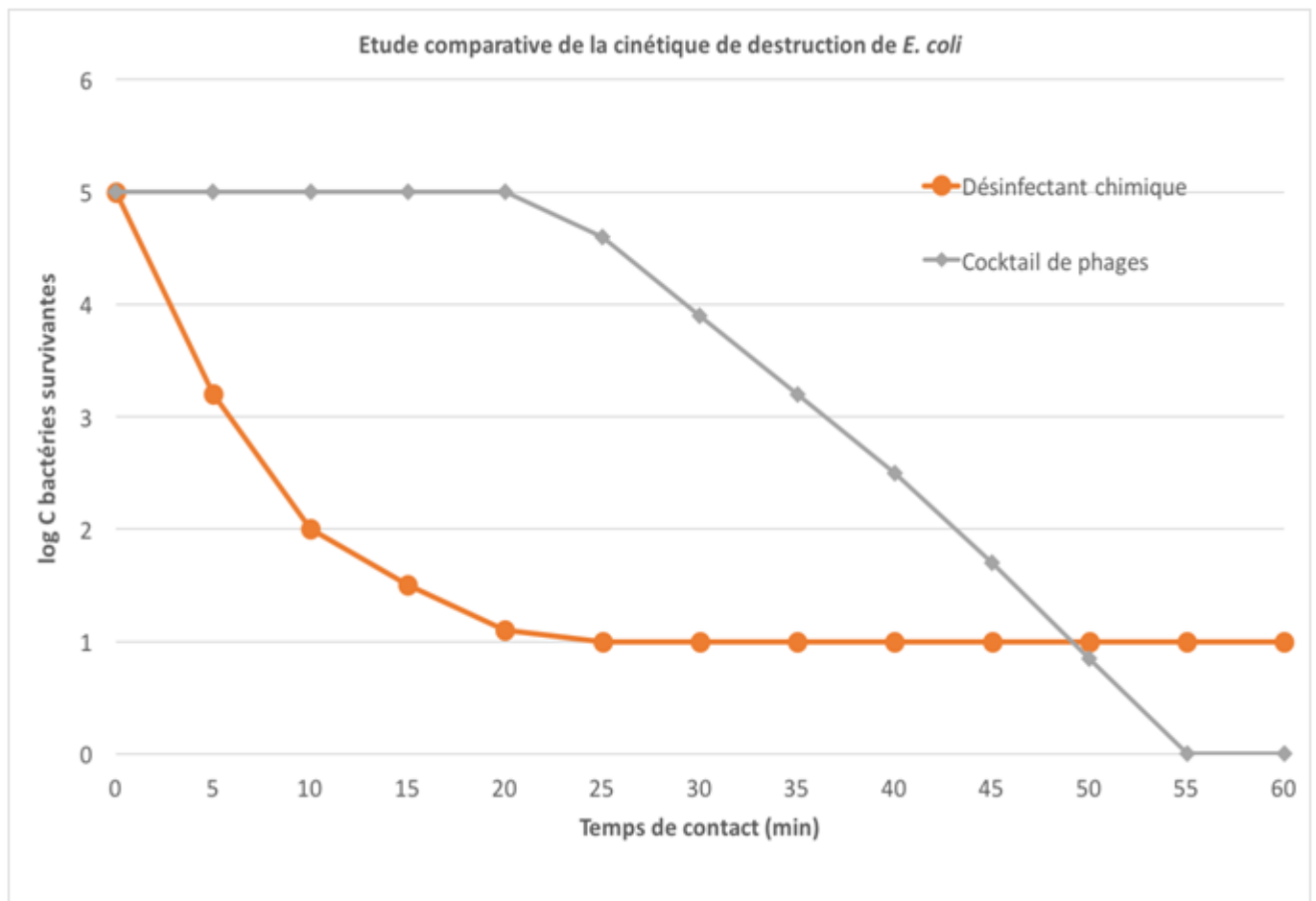
DOCUMENT n°12: Étude comparative de la cinétique de destruction d'*E. coli*Protocole:

Deux tubes de 9 mL d'une suspension de la souche d'*E. coli* calibrée à $1,1 \cdot 10^5$ bactéries / mL sont préparés.

Dans le premier tube, à $t = 0$, on ajoute 1 mL du désinfectant chimique. Dans le second tube, à $t = 0$, on ajoute 1 mL de suspension du cocktail phagique.

Toutes les 5 minutes pendant une heure, un prélèvement est effectué dans chaque tube, l'action du phage ou du désinfectant est neutralisé et on dénombre les bactéries survivantes.

Pour visualiser la cinétique de destruction, on trace le logarithme de la concentration en bactéries survivantes en fonction du temps.

Courbe cinétique de destruction d'*E. coli* obtenue :**Étude comparative de la cinétique de destruction de *E. coli***

Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse 2017

Matériel autorisé: Dictionnaire anglais-français

L'expression écrite, le soin et la formulation des réponses (concision, qualité des schémas, des tableaux...) seront évalués à hauteur de 3 points sur 40.

Études associées à la production d'un riz génétiquement modifié

Certaines plantes sont modifiées génétiquement afin de produire des insecticides biologiques. C'est le cas des plantes exprimant les toxines de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (ou toxines Bt) qui tuent la majorité des espèces d'insectes dont les nuisibles pour les récoltes comme les larves des papillons de l'espèce *Plutella xylostella*.

Des travaux ont démontré l'adaptation de certains insectes aux toxines « Bt » générant ainsi un phénomène de résistance. Dans l'optique d'éviter ce phénomène de résistance, des laboratoires ont mis au point des riz transgéniques produisant des toxines Bt mutées recombinantes (Btm).

Ces plantes OGM doivent faire l'objet de diverses études de toxicité, dont l'évaluation de leur immuno-toxicité.

L'étude présentée ici propose :

- d'évaluer l'efficacité insecticide de la toxine Btm sur les larves du papillon *Plutella xylostella*,
- d'étudier la production de plants de riz transgéniques exprimant cette toxine Btm, d'évaluer un aspect de l'immuno-toxicité de ces riz OGM.

1 - Étude de l'efficacité insecticide de la toxine Btm (5 points)

L'étude de l'effet de la toxine Btm est réalisée sur des larves du papillon *Plutella xylostella*.

Le protocole et les résultats sont présentés dans le **document 1**.

Q1 - Expliquer la détermination graphique d'une dose létale 50, DL50.

Q2 - Analyser les résultats pour la souche sensible et la souche résistante de *P. xylostella*.

Conclure sur l'efficacité de la toxine « Bt » modifiée.

2 - Production et caractérisation du riz exprimant la toxine recombinante modifiée (21 points)

Les plants de riz recombinants sont modifiés par un vecteur d'expression de la toxine Btm. La transgénèse est effectuée par transfert direct de gènes au moyen d'un canon à ADN (biolistique).

Les étapes de la transgénèse sont résumées dans le **document 2**. Pour la toxine Btm, deux plasmides sont co-transférés dans les embryons de plant de riz :

- un plasmide contenant le gène de la toxine modifiée ;
- le plasmide pWRG1515 décrit dans le **document 3**, contenant un gène de sélection et un gène rapporteur.

La présence démontrée d'un des deux plasmides dans une cellule transformée permet de confirmer la présence des deux plasmides.

Q3 - Expliquer les notions de gène de sélection et de gène rapporteur en vous appuyant sur les données du **document 3**.

Le plasmide pWRG1515 est cloné par transformation d'*E.coli* puis extrait et purifié par la méthode de lyse alcaline. Le protocole de cette étape est présenté dans le **document 4**.

Q4 - Préciser le rôle de l'étape et des réactifs soulignés dans ce protocole.

Avant l'étape de biolistique, la qualité de l'ADN plasmidique purifié est vérifiée par analyse des fragments de restriction sur gel d'agarose. Les réactifs utilisés sont listés dans le **document 5**.

Q5 - Calculer les volumes de réactifs à utiliser pour préparer les deux mélanges réactionnels. **Présenter** les résultats dans un tableau de composition.

Le profil de restriction est analysé sur gel d'agarose à 1 %.

Q6 - A l'aide de l'analyse de la carte génétique du plasmide présenté document 3, déterminer le nombre et la taille des fragments obtenus pour chaque enzyme de restriction. **Proposer** un schéma annoté de l'électrophorégramme attendu.

Après ces vérifications,

- des cals embryogénèse de 6 jours sont produits à partir de semences matures de riz sur milieu A de Murashige & Skoog ;
- ils sont ensuite bombardés avec des particules d'or recouvertes des plasmides contenant le gène de la toxine et pWRG1515, en utilisant un canon à ADN;
- deux jours après, les cals sont transférés sur du milieu A de Murashige & Skoog neuf supplémenté avec de l'hygromycine B ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ;
- les plants sélectionnés sont enfin transférés sur le milieu B de Murashige & Skoog supplémenté avec de l'hygromycine B ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

La composition des milieux A et B de Murashige & Skoog utilisés est présentée dans le **document 6A**. Le **document 6B** exprime l'influence de l'équilibre auxine/cytokinine sur l'organogenèse végétale.

Q7 - Comparer au niveau de chaque catégorie moléculaire la composition des milieux A et B. Confirmer que la composition de chacun de ces milieux est adaptée à l'orientation du développement des vitroplants de riz transgéniques.

Une PCR est réalisée pour détecter la présence des transgènes toxiques (gènes apportés par le second vecteur co-transféré) dans les feuilles de plants recombinants. Le principe utilisé pour l'amplification du gène *btm* ainsi que l'analyse des produits de réactions de PCR par électrophorèse sont présentés sur le **document 7**.

Q8 - Établir la liste des réactifs à utiliser pour réaliser cette PCR et analyser les résultats obtenus.

3. Étude de l'effet immuno-toxique de la consommation du riz génétiquement modifié (11 points)

L'évaluation de l'immuno-toxicité globale d'une substance comprend un dosage des anticorps totaux, mais également des anticorps spécifiques. L'étude qui suit ne présente que les résultats concernant les anticorps spécifiques.

La lectine E du haricot rouge (ou érythroagglutinine de *Phaseolus vulgaris*, PHA-E) sert de contrôle positif. Elle est connue pour avoir des effets immunotoxiques chez les insectes et les mammifères.

On étudie:

- l'effet de la lectine PHA-E : les animaux sont nourris avec du riz contrôle (non OGM) et différentes concentrations de lectine PHA-E, pendant 28 jours ;
- l'effet de la toxine Btm : les animaux sont nourris avec du riz contrôle (non OGM) ou du riz génétiquement modifié produisant la toxine Btm, ou du riz contrôle supplémenté avec 0,1 % de toxine Btm, pendant 28 jours.

Après 28 jours, les animaux sont sacrifiés. Les sérums sont récupérés et analysés par la technique ELISA présentée dans le **document 8**.

Q9 - Schématiser l'édifice moléculaire obtenu dans le cas de la recherche d'anticorps dirigés contre la lectine PHA-E pour un puits donnant un résultat positif.

Q10 - Présenter la composition des témoins positif et négatif.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **document 9**.

Q11 - Analyser les résultats et conclure sur l'effet immunostimulant de la toxine Btm.

Q12 - Discuter l'intérêt que présenterait la réalisation du dosage de la toxine Btm dans le riz OGM utilisé dans cette étude.

DOCUMENT N° 1 : Étude de l'effet des toxines Bt et Btm

(Adapté de Tabashnick et al, Nature Biotechnology, 2011)

Protocole

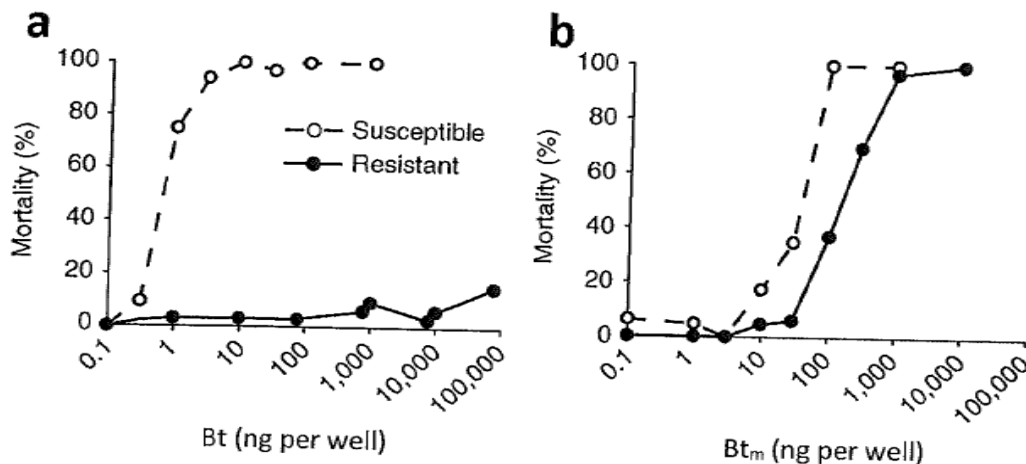
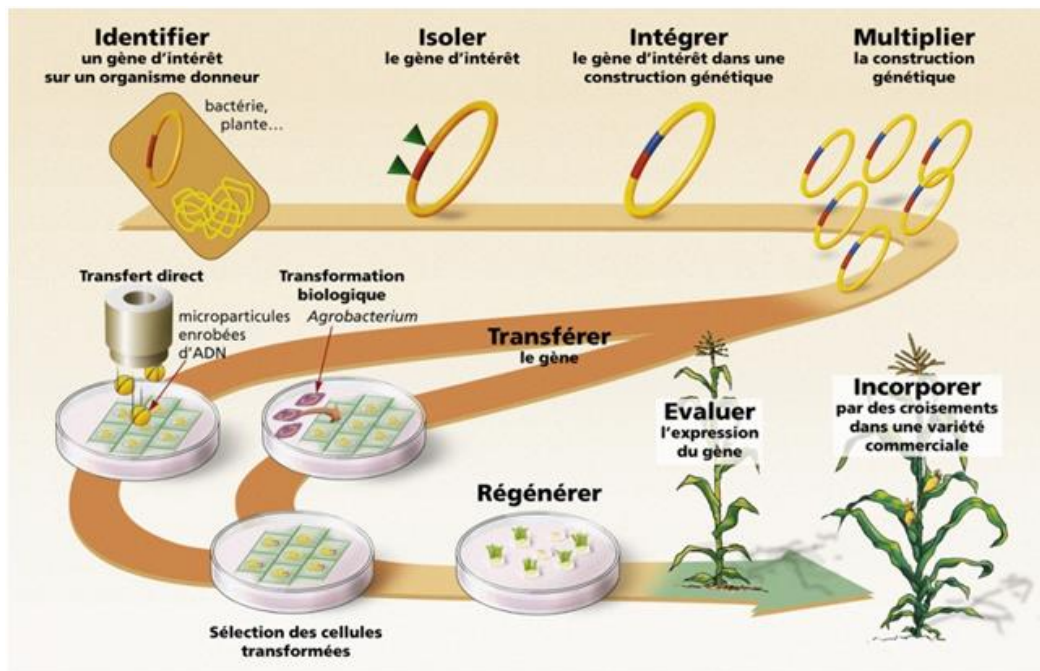
On travaille avec deux souches de *P. xylostella*, une souche sensible à la toxine Bt native (S) et une souche résistante à la toxine Bt (R).

- Les larves de chaque souche sont cultivées dans des plaques multi-puits. On dispose une larve par puits et on dépose 50 μ L de solution de toxine dans de l'eau contenant du triton X-100 à 0,005 %.
- On mesure le taux de mortalité des larves après 6 jours d'incubation à 27 °C.
- On teste ainsi les deux souches de *P. xylostella* (S et R) avec les 2 toxines Bt et Btm

Remarque : le nombre de larves utilisées par expérience varie de 384 à 816.

Résultats

Taux de mortalité des souches sensibles (*susceptible*) et résistantes de *P. xylostella* aux toxines Bt natives et modifiées

**DOCUMENT N° 2 : Les étapes de la transgénèse**

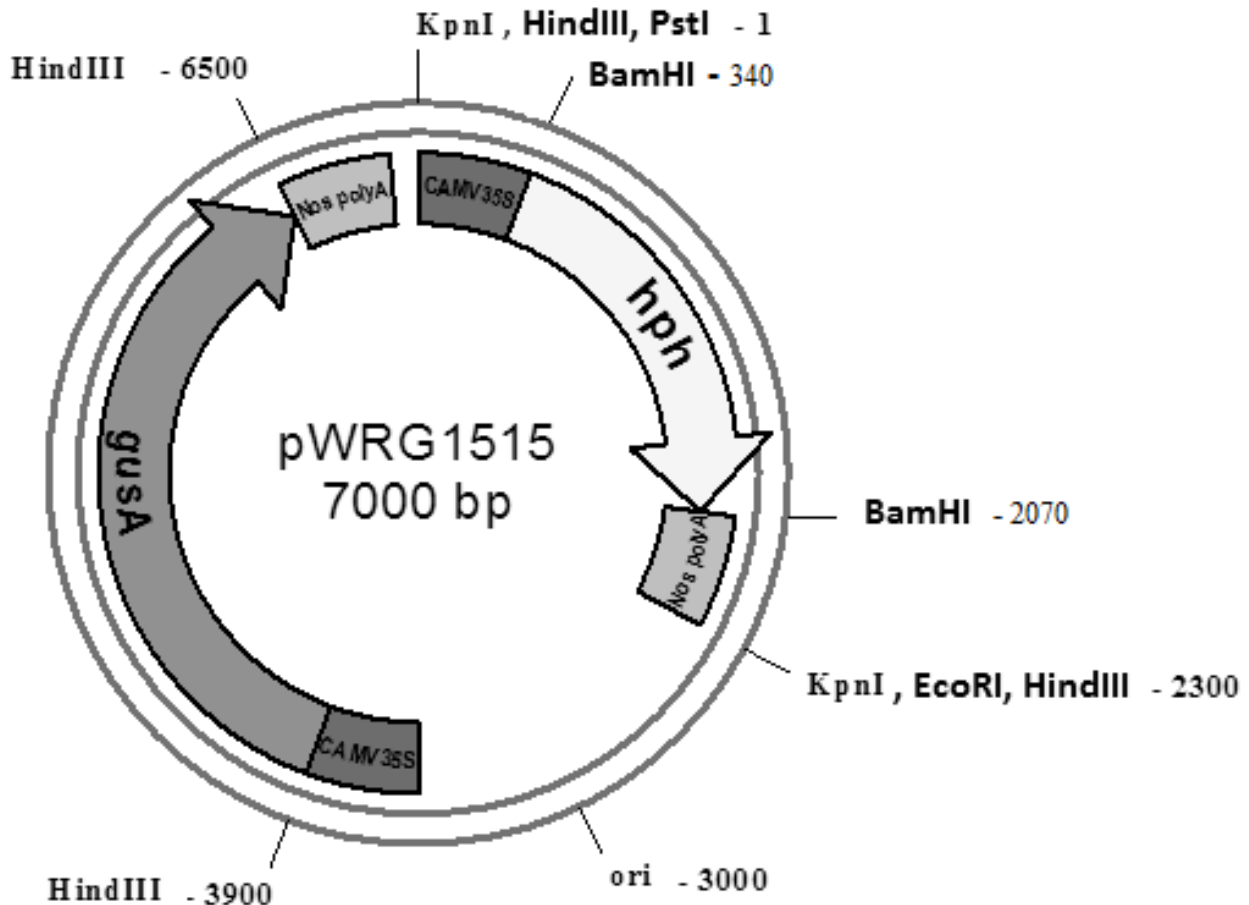
D'après le GNIS (Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants)

DOCUMENT N° 3 : Carte génétique du plasmide pWRG1515

Le plasmide utilisé (pWRG1515) contient les gènes codant pour l'hygromycine B phosphotransférase (*hph*) et la bêta-glucuronidase (*gusA*) sous le contrôle cfu promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV35S).

L'hygromycine B est un antibiotique aminoside qui cible aussi bien les bactéries que les cellules eucaryotes et entraîne la mort des cellules en inhibant la biosynthèse des protéines. L'enzyme Hph (hygromycine B phosphotransférase) codée par le gène *hph* induit la phosphorylation de l'hygromycine B qui perd alors tout effet biologique.

Le gène *gusA*, isolé d'*Escherichia coli*, code pour l'enzyme de la bêta-glucuronidase qui catalyse l'hydrolyse de certains glucuronides. Cette enzyme, en présence du substrat X- Glue (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-glucuronide) conduit à l'apparition d'un précipité insoluble de couleur bleue.



DOCUMENT N° 4 : Purification de plasmides par lyse alcaline

Extrait de la fiche technique GenElute™ Plasmid Miniprep Kit

Bacterial Culture**1. Prepare cleared lysate. Pellet and resuspend cells. Alkaline lyse. Neutralize.**

- Pellet cells from 1-5 ml overnight culture 1 minute. Discard supernatant.
- Resuspend cells in 200 µL Resuspension Solution (50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg.mL⁻¹ Rnase A). Pipette up and down or vortex.
- Add 200 µl of **Solution L (200 mM NaOH, 1 % SDS)**. Invert gently to mix. Do not vortex. Allow to clear for 5 minutes
- Add 350 µL of Neutralization Solution (3,0 .acétate de potassium, pH 5,5) Invert 4-6 limes to mix.
- Pellet debris 10 minutes at max speed

2. Prepare binding column

- Add 500 µL Column Preparation Solution to binding column in a collection tube.
- Spin at ≥12,000 x g, 1 minute. Discard flow-through.

3. Bind plasmid DNA to column

- Transfer cleared lysate into binding column.
- Spin 30", 1 minute. Discard flow-through

4. Wash to remove contaminants

- Add 750 µl **Solution W (Ethanol 95%)** to column. Spin 30", 1 minute. Discard flow-through.
- Spin 1 minute to dry column.

5. Elute purified plasmid DNA

- Transfer column to new collection tube.
- Add 100 µl Elution Solution. Spin 1 minute

Pur Plasmid DNA

DOCUMENT N° 5 : Hydrolyse d'ADN par endonucléases de restriction**Réactifs**

- Solution d'ADN du plasmide pWRG1515 à 25 ng.µL⁻¹
- Solutions d'enzymes de restriction : Hind III à 10 U. µL⁻¹ et KpnI à 4 U µL⁻¹
- Tampons d'hydrolyse 10X pour Hind III et KpnI
- Eau qualité biologie moléculaire

Protocole

1. Le tableau ci-dessous présente les 2 hydrolyses à réaliser, avec quantité ou concentration voulues dans le mélange réactionnel.

N° tube	Enzyme	Quantité d'ADN	Quantité d'enzyme	Concentration finale du tampon	Volume total du mélange réactionnel
1	Hind III	100 ng	10 U	tampon Hind III: 1X	20 µL
2	KpnI	200 ng	10 U	tampon KpnI : 1X	20 µL

2. Réaliser les mélanges réactionnels dans des microtubes et incuber 1 heure à 37°C.

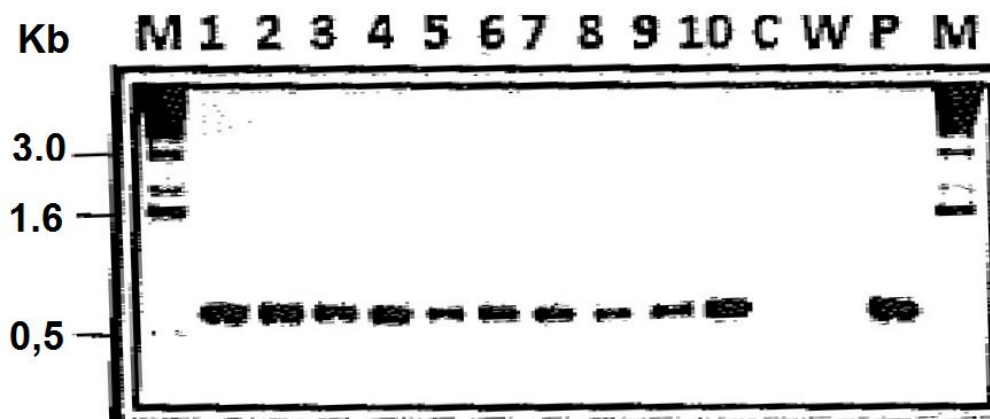
DOCUMENT N°7 : PCR analysis of putative transgenic plants**Protocol**

DNA samples from putative transgenic rice plants were extracted from leaf tissue. PCR analysis was carried out using the following primers (5' primer: 5'-GACATCCTCAGGGAGACC-3'; 3' primer: 5'-ACCTGGMGAGGGAGTAGAG-3'). These primers amplify a 600 bp fragment from the *btm* gene. PCR conditions were as follows :

- **95 °C** for 7 min, **54 °C** for 1 min, and **72 °C** for 1 min (one cycle)
- followed by **95 °C** for 1 min, **54°C** for 1 min and **72 °C** for 1 min (30 cycles).
- The final cycle was carried out at **72 °C** for 7 min.

Results

A 10 µL aliquot from each reaction was used for electrophoresis on 1% agarose gel.



PCR amplification of *btm* in transgenic rice

Lanes 1-10: amplified DNA from plants 1-10; **M**: 1kb ladder; **C**: negative control (wild type plant);

W : water control (no DNA); **P**: amplified *btm* DNA

DOCUMENT N° 6**Document 6A: Composition des milieux de multiplication et d'enracinement (d'après Murashige & Skoog)**

MILIEU mg/l	A	B
Macro éléments		
KNO ₃	1900	950
NH ₄ NO ₃	1650	825
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	370	185
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440	220
KH ₂ PO ₄	170	85
Micro éléments		
Mn SO ₄ 4H ₂ O	22,3	11,15
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,6	4,3
H ₃ BO ₃	6,2	3,1
KI	0,83	0,415
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25	0,125
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025	0,0125
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025	0,0125
FeNa EDTA	36,7	18,4
Vitamines		
méso-inositol	100	100
pyridoxine (HCl)	0,5	0,5
acide nicotinique	0,5	0,5
thiamine (HCl)	0,5	0,5
pantothénate de calcium	0,5	0,5
biotine	0,01	0,01
Saccharose	20000	20000
gélose	8000	8000
pH	5,7	5,7
AIA	0,2	0,01
BA	0,2	-

A : milieu de multiplication

B: milieu d'enracinement

Document 6B : Influence de l'équilibre auxine/cytokinine sur l'organogénèse

	Formation de tige feuillée	Formation d'un cal	Formation de racines
[AIA] µg.mL ⁻¹	0,01	0,2	0,01
[BA] µg.mL ⁻¹	1	0,2	-

AIA: Acide indole 3-acétique (auxine de synthèse)

BA: Benzyladénine (cytokinine de synthèse)

DOCUMENT N°8 : Dosage des anticorps spécifiques de la lectine PHA-E ou de la toxine Bt par la technique ELISA

(adapté de Kroghsbo et al, Toxicology, 2008)

PHA-E-specific antibody response

1. For detection of PHA-E-specific IgM, IgG1, plates (96-well, MaxiSorp, Nunc) were coated for 3- 4 days at 4°C with 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of purified recombinant PHA-E lectin in carbonate buffer.
2. Plates were washed five times with phosphate-buffered saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4), containing 0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO) prior to each subsequent step, using an automatic plate washer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT).
3. Plates were blocked for 1 H at 37°C with blocking solution (containing casein)
4. Then plates were incubated with serial dilutions of rat sera (starting at 1:4) for 1 H at room temperature.
5. Plates were then incubated with HRP-labeled mouse anti-rat IgG1 (1:2000; Zymed) or goat anti- rat IgM (0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Bethyl Laboratories) antibodies for 1 H at room temperature.
6. Plates were developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)-one substrate (Kem-En-Tec, Copenhagen, Denmark) for 10 min in the dark, and the reaction terminated with 0.2M sulphuric acid and read at 450 nm, using a microtiter plate reader (Bio-Tek Instruments).

- Positive and negative controls were realised in each plate.
- The antibody titers were expressed as 1092 titers and defined as the interpolated dilution (three-parameter analysis, kineticalc software, Version 2.7) of a serum sample leading to an absorbance of 0.2 (IgG1) or 0.4 (IgM).

Btm-specific antibody response

Le protocole est le même à l'exception de la première étape où la lectine PHA-E est remplacée par 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de toxine Btm recombinante purifiée placée dans du tampon carbonate.

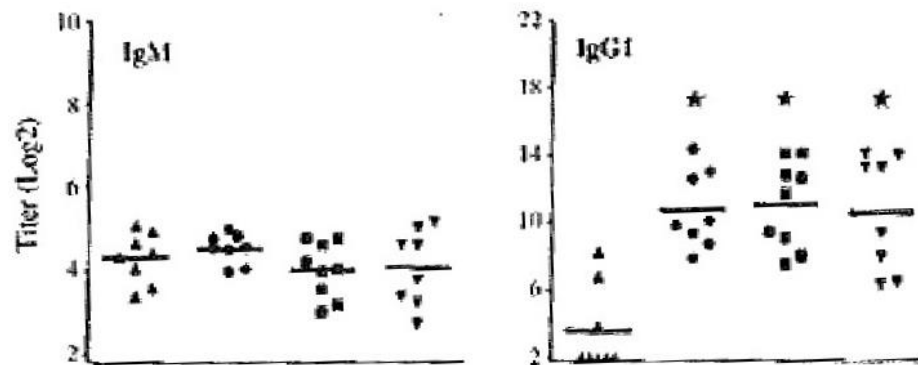
DOCUMENT N°9 : Résultats des dosages ELISA des anticorps spécifiques produits chez des rats selon le type d'alimentation

(Adapté de Kroghsbo et al, Toxicology, 2008)

Résultat des dosages des IgM et IgG1 spécifiques de la lectine PHA-E produits chez des rats (n = 6 à 9 animaux)

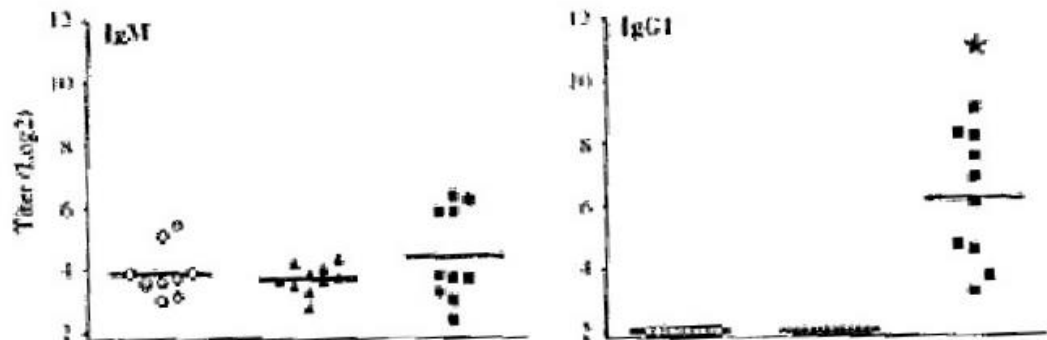
Riz contrôle
supplémenté
avec :

- 0 % (Δ ,
contrôle) ;
- 0,01% ($\bullet$) ;
- 0,02% ($\blacksquare$) ;
- 0,08% ($\blacktriangledown$)
de lectine
PHA-E



Résultat des dosages des IgM et IgG1 spécifiques de la toxine Btm produits chez des rats (n = 10 animaux)

- riz contrôle
($\circ$) ;
- riz
transgénique
exprimant la
toxine Bt_m
($\blacktriangle$) ;
- Riz contrôle
supplémenté
avec 0,1% de
toxine Bt_m
recombinante
purifiée($\blacksquare$) ;



Note:

- Les barres horizontales représentent les moyennes des résultats.
- Le symbole $\star$ correspond à une différence significative entre l'essai et le contrôle.

Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2017

Matériel autorisé : Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999).

L'expression écrite, le soin et la formulation des réponses (concision, qualité des schémas, des tableaux...) seront évalués à la hauteur de 2 points sur 40.

MISE AU POINT D'UNE PIZZA DE QUALITÉ SUPÉRIEURE

La société *FRESH PIZZA* confectionne depuis plusieurs années des pizzas industrielles surgelées, de «qualité courante».

Afin de se diversifier, la société met en œuvre une série d'études préalables avant la mise sur le marché de «Surpizz», une nouvelle pizza de qualité supérieure. Cette dernière sera commercialisée sous forme fraîche prête à cuire, emballée sous atmosphère modifiée, avec une DLC de 10 jours après fabrication. Des éléments du cahier des charges de la qualité supérieure sont repris dans le **document 1**.

Les études préalables d'optimisation des pizzas portent sur la farine, la sauce tomate, les lardons, la mozzarella et la qualité sanitaire du produit fini.

1 - Choix de la farine (11points)

La société travaille déjà avec plusieurs farines pour ses pizzas surgelées. Elle souhaite savoir si elle doit en changer.

Q1 - À partir de l'analyse du **document 2**, **déduire** le paramètre qui définit le « type » d'une farine.

L'entreprise cherche à comparer quatre de ses farines (F1 à F4). Pour cela le laboratoire réalise des alvéogrammes dont un résultat est présenté **document 3**.

Q2 - Utiliser les données des **documents 1 et 3** afin de **sélectionner** les deux paramètres d'intérêt pour l'obtention d'une pâte fine.

Discuter les résultats obtenus pour les quatre farines analysées et **proposer** une farine qui semble adaptée.

Des analyses sont réalisées pour évaluer les effets de l'ajout de l'antioxydant acide ascorbique dans la farine. Les résultats sont rassemblés dans le **document 4**.

Q3 - **Analyser** les résultats et en **déduire** si l'ajout d'acide ascorbique est recommandé.

Pour s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus, on vérifie la conformité de l'alvéographe à l'aide de la farine de la référence européenne (BCR563) dont les paramètres sont décrits dans le **document 5**. Les résultats de huit mesures de force boulangère W sont reportés ci-dessous :

Farine BCR563 Valeurs expérimentales de W ($\times 10^{-4}$) J/g	302,9	302,8	302,9	302,7	302,8	302,7	302,9	302,7
--	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Q4 - Calculer le biais sur W et conclure sur la conformité.

2 - Optimisation du temps de pasteurisation de la sauce tomate (4 points)

La société fabrique sa propre sauce tomate, habituellement pasteurisée 3,00 min à 75 °C à l'aide d'un échangeur tubulaire. Elle est préparée à l'avance, puis conservée quelques jours en poches plastifiées aseptiques de 20 kg, en chambre réfrigérée.

Q5 - Dans le but de limiter une couleur de «trop-cuit», **calculer** le temps minimal de pasteurisation à 75 °C qui pourrait être appliqué, tout en gardant un niveau de qualité d'hygiène satisfaisant.

Données:

$N_0 = 2 \cdot 10^4$ microorganismes . g ⁻¹ Charge résiduelle $N = 1$ microorganisme . g ⁻¹ nombre de réduction décimale : n $n = \log(N_0 / N)$	Pour le germe de référence, $D_{70^\circ\text{C}} = 3$ min et $z = 7^\circ\text{C}$ $\log(D_2 / D_1) = - (T_2 - T_1) / z$
---	--

Q6 - Proposer une action sur l'échangeur tubulaire qui permette d'ajuster le temps de traitement.

3 - Lardons (8points)

Les lardons fumés, ingrédients de «Surpizz», peuvent être obtenus par deux procédés schématisés dans les documents 6 et 7.

Q7 - Expliquer l'incidence de chacun des deux procédés sur la qualité sanitaire et la qualité organoleptique des lardons fumés.

Pour son produit «Surpizz», l'entreprise souhaite vérifier que la teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) des lardons fumés traditionnellement est conforme à la réglementation. Un extrait de celle-ci est présenté sur le document 8. L'entreprise demande à un laboratoire sous-traitant d'analyser les lardons fumés d'un fournisseur. Les HAP sont dosés par Chromatographie Liquide Haute Performance. Le document 9 présente un chromatogramme de l'HPLC et son exploitation.

Q8 - Calculer les teneurs des HAP des lardons fumés. **Vérifier** que les lardons analysés sont conformes à la réglementation.

4 - Choix de la Mozzarella (11 points)

La garniture fromagère de la pizza «Surpizz» sera exclusivement constituée de mozzarella d'appellation d'origine protégée, dont la fiche produit est donnée dans le document 10.

Q9 - Repérer les éléments qui illustrent les deux spécificités d'une appellation d'origine protégée (AOP).

La technologie fromagère autorise la concentration préalable du lait en matière azotée protéique (MAP). Un procédé possible consiste en une ultrafiltration à l'aide d'une membrane de seuil de coupure de 50 nm.

Q10 - Réaliser un schéma de principe annoté d'une ultrafiltration tangentielle.

Repérer sur le schéma la fraction d'intérêt.

L'influence de la teneur en MAP sur la coagulation du lait dans le process de fabrication des fromages est présentée document 11.

Q11 - Analyser le document et **justifier** l'intérêt d'ultrafiltrer le lait préalablement à la fabrication du fromage.

5 - Contrôle du respect des normes d'hygiène (4 points)

L'entreprise souhaite adapter les critères microbiologiques des plans d'échantillonnage utilisés pour ses nouvelles pizzas. Le document 12 présente un plan d'échantillonnage en lien avec les critères microbiologiques sur les aliments à base de viande.

Q12 - À l'aide des commentaires du plan d'échantillonnage, **dresser la liste argumentée** des contrôles retenus et non retenus, à réaliser pour les pizzas «Surpizz», avant leur distribution.

DOCUMENT 1**Extrait du cahier des charges de la pizza «Surpizz» Label Rouge**

(sauce tomate, lardons fumés, mozzarella, origan)

1. Éléments justificatifs de la qualité supérieure

Pâte à pain très fine
Lardons fumés traditionnellement dont la teneur en HAP est limitée
Mozzarella de bufflonne AOP
Produits conservés et manipulés selon les normes d'hygiène et de traçabilité

2. Caractéristiques de «Surpizz» par rapport à la pizza « qualité courante »

Caractéristiques de la pizza de « qualité courante »	Caractéristiques explicites du produit «Surpizz» de qualité supérieure	Paramètres impactant la qualité
Pâte épaisse (fortement levée)	Pâte très fine (faiblement levée)	- Type de farine. - Qualité boulangère. - Présence d'additifs (acide ascorbique, farine de fève et/ou de soja, gluten).
Sauce tomate pasteurisée.	Sauce tomate pasteurisée de couleur proche de celle de la tomate fraîche (couleur ni trop orange ou trop brune)	- Traitement thermique
Lardons traités par fumées liquides.	Lardons fumés traditionnellement.	- Teneur en benzopyrènes
Mozzarella au lait de vache.	Utilisation exclusive de mozzarella de bufflonne AOP.	- Goût spécifique lié à un terroir e/ou la provenance d'un animal spécifique

DOCUMENT 2**Caractéristiques des farines selon leur « Type »**

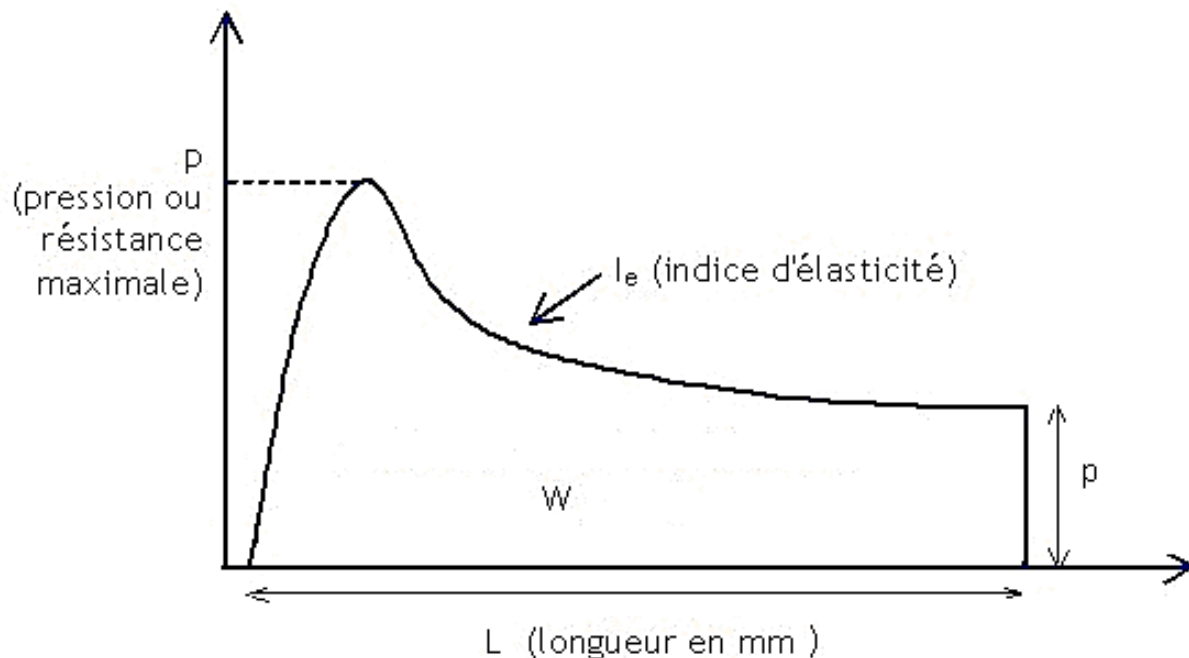
D'après le site d'AGIR (Agroalimentaire Innovation Recherche)

<http://www.agir-crt.com/blog/classification-farines/>

Amidon (%)	Taux de cendres (% de la matière sèche)	Humidité (%)	Type	Utilisations
70	< 0,5	14-16	45	Pâtes à tarte, crêpes, gâteaux ordinaires, cuisine
70	0,5 à 0,6	14-16	55	Pain blanc ordinaire, brioches ou autres pâtes fermentées, biscuiterie, viennoiseries
67	0,62 à 0,75	14-16	65	Pains de campagne, pâtes fermentées, biscuiterie
66	0,75 à 0,9	14-16	80	Pains bis (de campagne), gâteaux rustiques
65	1 à 1,2	14-16	110	Pain complet
60	> 1,4	14-16	150	Pain au son

DOCUMENT 3
Analyse des alvéogrammes

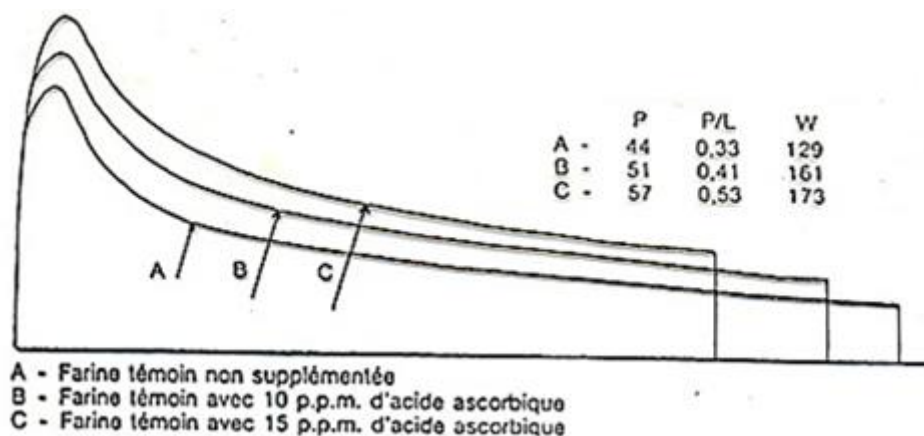
Un pâton standardisé est déposé sur l'alvéographe. De l'air est insufflé pour faire gonfler la pâte. On mesure la pression interne dans la bulle au cours du temps, jusqu'à éclatement. On obtient l'alvéogramme ci-dessous et on détermine les paramètres suivants :



- **P** : pression maximale dans la bulle.
- **L** : **longueur** ou **allongement** (mm sur l'enregistrement). Représente l'**extensibilité** de la pâte, du gonflement jusqu'à l'éclatement de la bulle.
- **p** (mm sur l'enregistrement). C'est la résistance de la pâte à l'extension maximale, juste avant son déchirement.
- **W** : **travail de déformation** (ou **valeur boulangère**) en Joules. W est proportionnel à la surface sous la courbe. W varie de 100 à 360. 10^{-4} J/g. Au-dessus de $220 \cdot 10^{-4}$ J/g, la valeur boulangère est très bonne car la pâte résiste bien aux bulles de fermentation. Plus la valeur boulangère est élevée, plus la pâte sera levée.

Caractéristiques des farines F1 à F4, déjà utilisées chez *FRESH PIZZA*

Farine	P (mm d'H ₂ O)	L (mm)	W (10^{-4} J/g)
F1	61	80	280
F2	54	90	275
F3	58	78	260
F4	70	100	320

DOCUMENT 4**Alvéogrammes comparatifs de l'action de l'acide ascorbique****DOCUMENT 5**

Paramètres de la farine étalon européenne BCR563

<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma.../1/crm-jrc-imm-catalog.pdf>

Parameters (determined according to ISO and ICC standards)	Cat. No. BCR563 Common wheat flour		
Protein contentg/100 g dry matter basis	11.71	±	0.13
Ash content dry matter basis	0.562	±	0.008
Falling number / s	319	±	15
Zeleny sedimentation 4 volume / mL	44	±	1
CHOPIN ALVEOGRAPH			
P/mmH ₂ O	80.8	±	2.1
L/mm	109	±	7.2
P/L	0.8	±	0.1
W (10 ⁻⁴) Joules/g	289.9	±	10.4

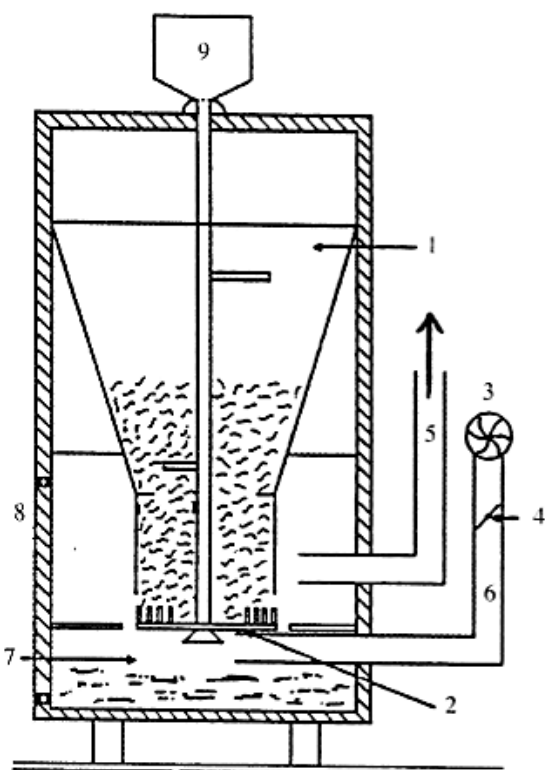
DOCUMENT 6**Fumage par nébulisation**

« La nébulisation est la méthode qui se rapproche le plus du fumage traditionnel. La fumée liquide est vaporisée dans la cellule à l'aide de buse(s) installée(s) dans la cellule et d'air comprimé. Lors de la production de nos fumées liquides, celles-ci subissent des phases de filtration, d'où une pureté maximale qui a pour effet de réduire les contenus en goudrons et autres résidus. »

Société « Amcam Smoke Forest Flavors »

DOCUMENT 7
Générateur de fumée conventionnel

D'après: Muller, 1995



- 1- Réservoir à copeaux avec agitateur
- 2- Grille de combustion
- 3- Ventilateur
- 4- Valve de régulation d'air
- 5- Départ de la fumée
- 6- Arrivée de l'air
- 7- Réservoir à cendres
- 8- Porte du générateur
- 9- Moteur électrique

DOCUMENT 8

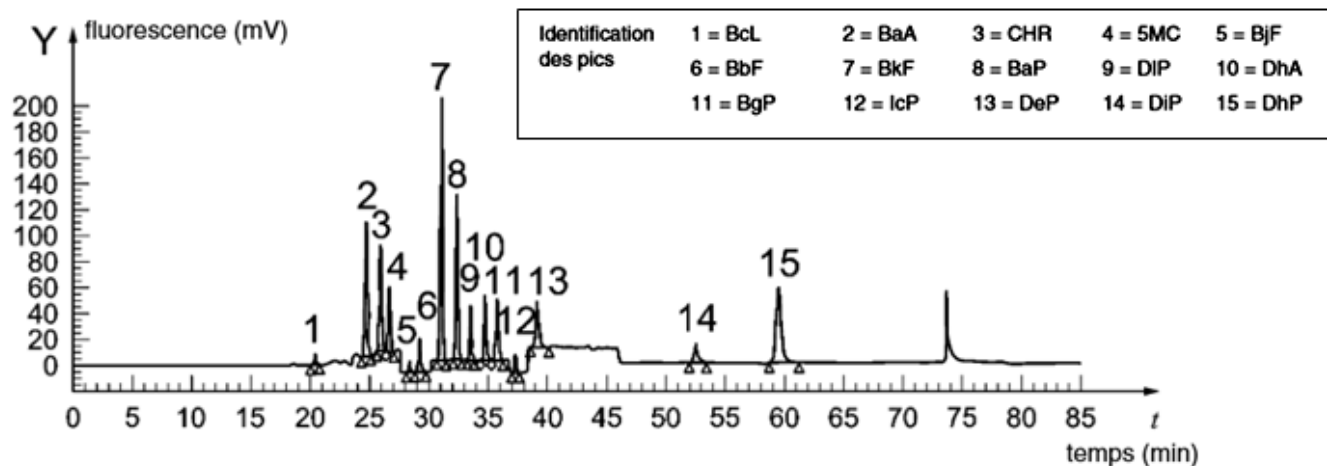
Règlement (UE) n°835/2011 de la Commission du 19 août 2011 modifiant le règlement (CE) n° 1881/2006. (JO L 215 du 20.8.2011)

Hydrocarbures aromatiques polycycliques - Teneurs maximales (µg/kg)

Denrées alimentaires	Benzo[a]pyrène	Somme de benzo[a]pyrène benzo[a]anthracène benzo[b]fluoranthène et chrysène
Mollusques bivalves fumés	6,0	35,0
Sprats fumés; harengs de la Baltique; bonite séchée; viandes traitées thermiquement et produits à base de viande traitée thermiquement	5,0	30,0
Chair musculaire des autres produits de la pêche fumés	2,0	12,0
Viandes fumées et produits de viande fumés	2,0	12,0

DOCUMENT 9

Résultats d'une chromatographie HPLC

A - Chromatogramme obtenu à partir d'une matrice étalon chargée artificiellement en HAP à 10 µg/kg**B - Résultat des aires de la matrice étalon et d'un échantillon de lardons fumés traditionnellement**

Composés		Matrice étalon (lardons nature, artificiellement chargés en HAP)		Lardons fumés traditionnellement par générateur de fumée
		Teneur (µg/kg)	Aire	Aire
1 BcI		10	1 810	1 030
2 BaA	Benzo[a]anthracène	10	456 820	50 250
3 CHR	Chrysène	10	354 983	159 742
4 5MC		10	314 760	25 403
5 BjF		10	50 475	1 920
6 BbF	Benzo[b]fluoranthrène	10	157 986	58 455
7 BkF		10	835 412	59 681
8 BaP	Benzo[a]pyrène	10	598 673	95 788
9 DIP		10	302 154	12 450
10 DhA		10	310 540	6 816
11 BgP		10	305 641	15 361
12 IcP		10	75 986	740 123
13 DeP		10	284 657	75 406
14 DIP		10	102 598	31 263
15 DhP		10	416 210	13 625

DOCUMENT 10**Mozzarella di bufala Campana AOP**

<http://www.tentationfromage.fr/le-fromage-mozzarella-di-bufala-campana-aop.html>

La *Mozzarella di Bufala Campana* ou de bufflonne est une Appellation d'Origine Protégée (AOP). Elle est fabriquée en Campanie à partir de lait cru de bufflonnes d'eau à robe noire. Le lait de bufflonne lui confère de saveurs généreuses et typiques.

La Mozzarella ne nécessite pas de temps d'affinage et peut donc être consommée immédiatement après sa fabrication. La saumure dans laquelle elle est plongée lui permet une conservation dans des conditions optimales.

La véritable *Mozzarella di Bufala Campana* ne peut être produite que dans une région relativement restreinte comprise entre la Campanie, le Latium, les Pouilles, et le Molise. Le fromage *Mozzarella di Bufala Campana* est produit à partir du caillé frais de Bufflonne qui est ensuite plongé rapidement dans l'eau bouillante, avant d'être filé puis découpé en boules de différentes tailles selon les besoins.

**DOCUMENT 11**

Incidence de la richesse en MAP des laits sur la formation du caillé

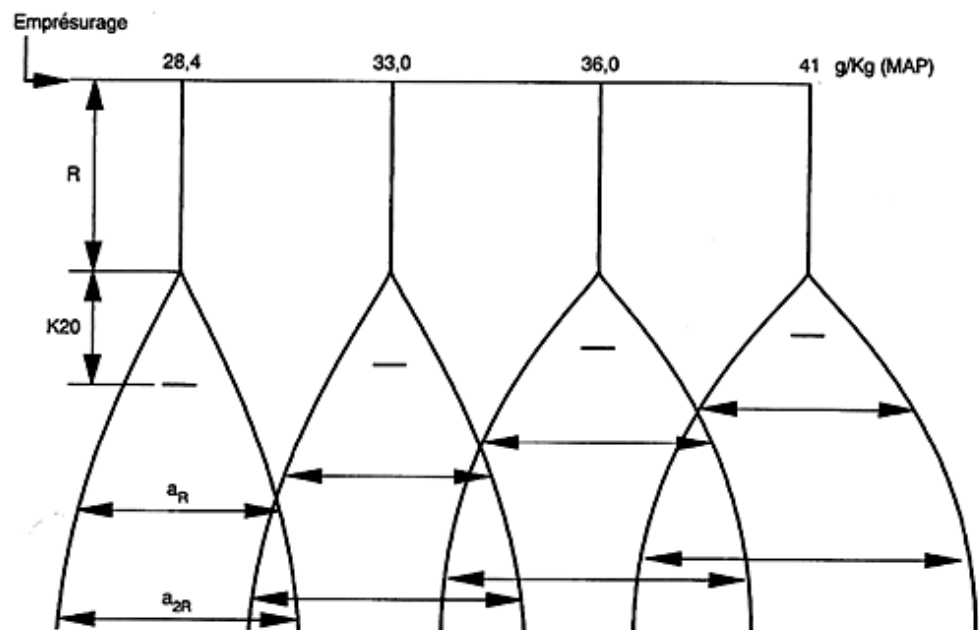
D'après : Mietton et al. 1985

Légende :

R : temps de prise du lait

K_{20} : temps d'organisation du gel

a_R et a_{2R} : fermeté du gel



DOCUMENT 12**Critères microbiologiques sur les aliments à base de viande**D'après: Fédération du Commerce et de la Distribution (FCD)- Version du 28/01/2016 <http://www.fcd.fr/documentation>Cas d'un plan d'échantillonnage avec $n = 5$ et $A = 0$

Germe	Critères Règlement européen CE 2073/2005	Critères FDC (microorganismes.g ⁻¹)		Commentaires
		Critère à la distribution	Critère à la DLC/DLUO	
FMA 30°C	-	10 ⁵	10 ⁶	Non significatif pour les produits mis sur le marché à base de pain (ou pâte à pain) non cuit
Flore lactique	-	À rechercher Pour calculer le rapport ci-dessous		-
Rapport FMA / Flore lactique	-	10	10 ²	-
Entérobactéries 37°C	-	10 ³	-	Non retenu pour produit mis sur le marché contenant des végétaux crus ou du fromage
<i>E. coli</i>	-	-	10	-
			500	Si le produit contient des viandes crues ou des préparations de viande crue
			10 ⁵	Si le produit contient du fromage au lait cru
Staphylocoques coagulase +	-	10 ²	10 ²	
			10 ⁵	Pour les produits mis sur le marché contenant du fromage au lait cru
<i>Clostridium perfringens</i>	-	30	30	Critère à privilégier pour les produits mis sur le marché à base de produits carnés
<i>Bacillus cereus</i>	-	500	500	Critère à retenir si produit mis sur le marché est à base de féculents et légumes cuits
<i>Salmonella</i>	-	Abs / 25 g	Abs / 25 g	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Abs / 25 g	Abs / 25 g	100*	* Pour les produits mis sur le marché pour lesquels il reste moins de 5 jours de conservation résiduelle

Corrections

Corrections session 2016

Éléments de corrigé de mathématiques 2016

EXERCICE 1 : (11 points)

Partie A (4,5 points)

1 - $\frac{749}{500} \approx 1,5$, $\frac{1122}{749} \approx 1,5$, donc Kévin a conjecturé une suite géométrique de raison 1,5 soit une augmentation par quinzaine de 50 %.

La limite d'une suite géométrique de raison supérieur à 1 est $+\infty$, donc avec ce modèle sur le long terme les vers seraient en quantité infinie ce qui n'est pas réaliste (manque de nourriture pour les vers, place dans le bac, etc.).

2a-

t_i	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombres de vers N_i	500	749	1122	1681	2518	3772	5650	8464	12678	18992
y_i	4,17	3,76	3,35	2,92	2,49	2,05	1,58	1,06	0,47	-0,30

2b - $y = -0,48t + 4,32$

2c - L'ouverture de la pêche a lieu dans 7 mois donc dans 14 quinzaines. En utilisant l'ajustement affine précédent on obtient $y = -0,48 \times 14 + 4,32$ soit $y = -2,4$.

Or $y = \ln\left(\frac{33000}{N} - 1\right)$ d'où $\ln\left(\frac{33000}{N} - 1\right) = -2,4$ soit $\frac{33000}{N} - 1 = e^{-2,4}$

Par transformation on obtient : $N = \frac{33000}{e^{-2,4} + 1} \approx 30255$. La proposition 30 300 estime le mieux le nombre de vers pour l'ouverture de la saison de pêche.

3 - Déterminons $\lim_{t \rightarrow +\infty} N(t)$ avec $N(t) = \frac{33000}{1 + 75e^{-0,48t}}$

Si $t \rightarrow +\infty$ alors $-0,48t \rightarrow -\infty$ d'où $e^{-0,48t} \rightarrow 0$. Donc $\lim_{t \rightarrow +\infty} N(t) = \frac{33000}{1} = 33000$.

Non Kevin ne peut pas confirmer l'affirmation de Maxime.

Partie B (6,5 points)

Question préliminaire. En sortant du four, le pain se refroidit directement (il ne se chauffe pas tout seul) donc ce n'est pas la courbe 3.

Sa température va se stabiliser à la température ambiante (qui n'est pas de 0°C) donc l'évolution de la température du pain à la sortie du four en fonction du temps correspondrait à la courbe 1.

I.1 - L'équation $y' + 6y = 0$ est du modèle $y' + ay = 0$ avec $a = 6$. Donc les solutions de (E_0) sont les fonctions de la forme Ce^{-6t} avec C une constante réelle.

I.2 La fonction $g(t) = k$ est solution de $y' + 6y = 6a$ donc $g'(t) + 6g(t) = 6a$ d'où $0 + 6k = 6a$ soit $k = a$.

I.3 - $y(t) = Ce^{-6t} + a$, $C \in \mathbb{R}$

I.4 - Soit $h(t) = Ce^{-6t} + a$ solution de (E) vérifiant d'après le texte la condition $h(0) = 180$.

D'où $Ce^{-6 \times 0} + a = 180$ soit $C = 180 - a$. Donc $h(t) = (180 - a)e^{-6t} + a$.

II.1.a - On remplace a par 28 dans $h(t)$.

Donc les solutions de (E) deviennent $(180 - 28)e^{-6t} + 28$ soit $152e^{-6t} + 28$.

$f(t)$ est bien solution de (E) dans le contexte proposé.

II.1.b - Calculons $f'(t)$. $f'(t) = 152 \times (-6)e^{-6t} + 0 = -912e^{-6t}$

Pour tout $t \in [0 ; +\infty[$, $e^{-6t} > 0$ et $-912 < 0$, donc $f'(t) < 0$ sur $[0 ; +\infty[$.

La fonction f est donc décroissante sur $[0 ; +\infty[$.

II.1.c - $f(0,5) \approx 36$

II.1.d - On peut résoudre $f(t) = 62$ par calcul. On trouve $t \approx 0,245$ ce qui correspond à environ 15 minutes.

II.2. Dans cette question, on doit reprendre la fonction $h(t) = (180 - a)e^{-6t} + a$ avec a la température ambiante. D'après le texte on cherche donc a tel que $h(0,5) = 30$.

On obtient l'équation $(180 - a)e^{-6 \times 0,5} + a = 30$ soit $(180 - a)e^{-3} + a = 30$.

Soit $180e^{-3} - ae^{-3} + a = 30$; $a(-e^{-3} + 1) = 30 - 180e^{-3}$; $a = \frac{30 - 180e^{-3}}{-e^{-3} + 1} \approx 22$.

La température de la pièce devrait être d'environ 22°C

EXERCICE 2 : (9 points)

Partie A (7 points)

1 - $P(I) = 0,55 \times 0,026 + 0,45 \times 0,036 \approx 0,031$ (faire un arbre ou un tableau pour justifier la réponse).

2.a - Chacun des 100 tirages est identique et indépendant des autres (assimilation à un tirage avec remise). Chaque tirage a deux issues possibles : succès (pipette inutilisable) avec une probabilité de 0,03 et échec. Donc X suit donc une loi binomiale de paramètres $n = 100$ et $p = 0,03$.

2.b - Il faut calculer $P(X \geq 1)$, c'est à dire $1 - P(X = 0)$.

$P(X = 0) \approx 0,04755$ d'où $P(X \geq 1) \approx 0,952$

3.a - $P(98 \leq C \leq 102) \approx 0,9499$

3.b - $IC_{95\%} = [0,025 - 1,96 \times \sqrt{\frac{0,025(1-0,025)}{200-1}} ; 0,025 + 1,96 \times \sqrt{\frac{0,025(1-0,025)}{200-1}}]$

Soit $IC_{95\%} = [0,0033 ; 0,0467]$.

Partie B (2 points)

1 - Estimation de p : $\frac{5}{200} = 0,025$

2 $IC_{95\%} = [0,025 - 1,96 \times \sqrt{\frac{0,025(1-0,025)}{200-1}} ; 0,025 + 1,96 \times \sqrt{\frac{0,025(1-0,025)}{200-1}}]$

Soit $IC_{95\%} = [0,0033 ; 0,0467]$.

Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2016

A : LE THÉ JAPONAIS ET LA RADIOACTIVITÉ (12 points)

1 - $Z = 55$ protons et $N = A - Z = 137 - 55 = 82$ neutrons

2 - Des noyaux isotopes ont le même numéro atomique Z (donc le même nombre de protons) mais des nombres de nucléons A différents (donc des nombres de neutrons différents).

3 - Au cours d'une transformation nucléaire, il y a conservation :

- du nombre de charges : $55 = Z - 1$, soit $Z = 56$: il se forme du baryum $X = \text{Ba}$;
- du nombre de nucléons : $137 = A + 0$. $A = 137$.

4.1 - Un Becquerel correspond à une désintégration par seconde.

4.2 - Le temps de demi-vie d'un échantillon radioactif est la durée au bout de laquelle la moitié des noyaux initialement présents s'est désintégrée : $N(t_{1/2}) = N_0/2$.

4.3 - Entre 2011 et 2041 il s'est écoulé 30 ans soit une demi-vie, donc l'activité a été divisée par deux :

$A = 500$ Bq pour un kilogramme

5.1 - Après une journée de consommation de ce thé contaminé : $D = 1,4 \cdot 10^{-5} \times 40 = 5,6 \cdot 10^{-4}$ mSv

5.2 - Après une année de consommation de ce thé contaminé : $D = 5,6 \cdot 10^{-4} \times 365 = 0,20$ mSv.

5.3 - La dose efficace reçue après une année de consommation de ce thé est plus faible que celle reçue par l'exposition à certaines irradiations artificielles lors d'examens médicaux.

Un consommateur de thé contaminé ne mettrait donc pas sa santé en danger.

B : LA VISCOSITÉ DU LAIT DE VACHE (8 points)

1 - $v = \frac{d}{\Delta t} = \frac{0,300}{15,8} = 1,90 \cdot 10^{-2} \text{ m.s}^{-1}$

2 - démonstration attendue

Principe d'inertie : $\vec{P} + \vec{F}_A + \vec{f} = \vec{0}$

Par projection sur un axe vertical, on obtient $-P + F_A + f = 0$

D'où $P = F_A + f$

3.1 - $V = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3 = (4,19 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3)$

$m = \rho_B \times V = 4,40 \cdot 10^{-6} \text{ kg}$.

3.2 - $P = m \times g = \rho_B \times V \times g = 4,31 \cdot 10^{-5} \text{ N}$

4.1 - On détermine la masse d'un volume choisi de lait à l'aide de matériel adapté

4.2 - $\eta_L = \frac{4,31 \cdot 10^{-5} - 4,24 \cdot 10^{-5}}{6\pi \times 1,00 \cdot 10^{-3} \times 1,90 \cdot 10^{-2}} = 2,09 \cdot 10^{-3} \text{ Pa.s}$

4.3 - La valeur obtenue pour la viscosité du lait écrémé est quasiment le double de celle de l'eau à la même température.

L'étudiante peut valider l'information sachant que le lait de vache, plus gras, sera sans doute plus visqueux car la viscosité du lait dépend de la teneur en matière grasse et en protéines

C : CONTRÔLE DE LA QUALITÉ D'UN VIN (8 points)**1 - Formation d'eau :**

- Pas de réaction possible d'un produit formé avec les ions du fer.
- Intérêt environnemental (pas de déchet).

2 - L'ajout d'un excès d'ions thiocyanate déplace l'équilibre de formation du complexe dans le sens direct de l'équation (constante d'équilibre faible) ce qui a pour effet de transformer tous les ions Fe^{3+} en ions $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ (transformation totale).

3.1 - Loi de Beer-Lambert : $A_\lambda = k \times C$ donc A est proportionnelle à C ce qui est en accord avec le fait que l'on ait une droite passant par l'origine

3.2 - Le spectre d'absorption de l'ion complexe $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ présente un maximum à 480 nm. C'est aux environs de cette longueur d'onde qu'il faut se placer pour faire l'étude spectrophotométrique avec la meilleure sensibilité.

3.3 - D'après le graphe (figure 3) : $A_\lambda (S_{\text{vin}}) = 0,720$ correspond en abscisse à $C_s = 0,15 \text{ mmol.L}^{-1}$.

On a transformé les ions Fe^{2+} en ions Fe^{3+} puis tous les ions Fe^{3+} en complexe : donc C_s est aussi la concentration totale en élément fer.

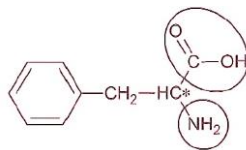
3.4 - Le vin blanc ayant été dilué par 2 ($F = V_f/V_i = 10/5 = 2$), on en déduit que $C_o = 2 \times C_s = 0,30 \text{ mmol.L}^{-1}$.

3.5 - $C_{\text{mo}} = C_o \times M(\text{Fe}) = 0,30 \times 55,8 = 17 \text{ mg.L}^{-1} > 10 \text{ mg.L}^{-1}$: le vin blanc analysé présente donc un risque de casse ferrique.

D : SYNTHÈSE DE LA PHÉNYLALANINE (12 points)

1.1 - $-\text{COOH}$: fonction acide carboxylique et $-\text{NH}_2$: fonction amine (voir ci-dessous).

1.2 - On repère par un astérisque (*) l'atome de carbone asymétrique



1.3 - Une molécule chirale est une molécule non superposable à son image dans un miroir plan

2.1 -



2.2 - Catalyseur adapté : chlorure d'aluminium AlCl_3

3.1 - La réaction mise en jeu est une substitution radicalaire.

3.2 - Le rayonnement UV provoque la formation de radicaux libres

4.1 - Le composé C appartient à la famille des organomagnésiens.



4.2 - Formule développée du méthanal

4.3 - La liaison carbonyle est polarisée. L'oxygène étant plus électronégatif que le carbone, il attire vers lui les électrons.

La liaison $\text{C}=\text{O}$ est polarisée dans le sens : $\overset{\delta+}{\text{C}}=\overset{\delta-}{\text{O}}$

Un réactif de la forme B^- (nucléophile) va attaquer le carbone ce qui permet de réaliser l'addition (addition nucléophile).

4.4 - Le composé D est le 2-phényléthan-1-ol.

5.1 - Couple $\text{MnO}_4^- / \text{Mn}^{2+}$: $(\text{MnO}_4^- + 8 \text{H}^+ + 5 \text{e}^- = \text{Mn}^{2+} + 4 \text{H}_2\text{O}) \times 2$

Couple $\text{C}_7\text{H}_7\text{-CHO} / \text{C}_7\text{H}_7\text{-CH}_2\text{-OH}$: $(\text{C}_7\text{H}_7\text{-CH}_2\text{-OH} = \text{C}_7\text{H}_7\text{-CHO} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-) \times 5$

5.2 - $5 \text{C}_7\text{H}_7\text{-CH}_2\text{-OH} + 2 \text{MnO}_4^- + 6 \text{H}^+ \rightarrow 5 \text{C}_7\text{H}_7\text{-CHO} + 2 \text{Mn}^{2+} + 8 \text{H}_2\text{O}$

6.1 - Structure de Lewis (développée ou semi-développée) avec présence du doublet non liant sur l'atome d'azote.

6.2 - Présence d'un doublet non liant donc caractère nucléophile de NH_3 .

Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2016

ÉTUDE D'UN MÉDICAMENT DESTINÉ AU TRAITEMENT DES AVC

1 - Étude du principe actif tPA (ou alteplase) (27,5 points)

1.1 - Réaction catalysée

1.1.1 - Formule semi-développée R561-V562. Formule aa / formule liaison peptidique attendues et orientation C→N

1.1.2 - Réaction catalysée par le tPA : ne pas oublier l'eau, et fonctions amine et COOH libres.

1.1.3 - Le 1^{er} chiffre correspond à la classe (ici 3 = hydrolase) et le 2^{ème} correspond à la sous-classe qui précise la spécificité d'action (ici hydrolyse de liaison peptidique).

1.2 - Structure du tPA

1.2.1 - Les domaines protéiques sont des régions compactes des protéines avec des fonctions propres (relation structure/fonction).

1.2.2 - Hélice alpha, plusieurs feuillets beta, séparés par des coudes.

1.2.3 - Stabilisés par des liaisons H entre CO et NH de la liaison peptidique.

1.3 - Les deux formes du tPA : étude par SDS-PAGE

1.3.1 - La plasmine clive le tPA en un site, ce qui génère 2 chaînes. Mais celles-ci restent reliées entre elles par un pont SS.

Rq : Ce clivage induit aussi des modifications conformationnelles expliquant l'activation de l'activité protéolytique.

1.3.2 - SDS-PAGE = Sodium Dodécyl Sulfate - PolyAcrylamid Gel Electrophoresis.

1.3.3 - Étapes SDS-PAGE

- préparation des échantillons avec le « sample buffer » : dénaturation des protéines
- dépôt des échantillons dans les puits du gel pré-coulé
- migration dans le « running buffer »
- révélation / lecture

1.3.4.1 - « Sample buffer » ajouté lors de la préparation des échantillons. Son rôle principal est la dénaturation (déroutement) des protéines, grâce à l'action combinée :

- du DTT, un agent réducteur qui permet de rompre les liaisons SS (intra et éventuellement inter-chaînes)
- du SDS : sa partie apolaire interagit avec les régions hydrophobes des protéines, ce qui modifie leur organisation et les déroule. Par ailleurs, le SDS apporte des charges négatives réparties régulièrement sur toute la protéine dépliée (densité de charge homogène)
- éventuellement de l'urée, qui complète l'action du SDS pour les protéines très hydrophobes

1.3.4.2 - Le glycérol permet d'augmenter la densité des échantillons, afin qu'ils se déposent au fond du puits.

Bleu de bromophénol : marqueur de front.

On appelle aussi le « sample buffer » : « tampon de charge ».

1.3.5.1 - Marqueur de taille : mélange de protéines de tailles connues.

1.3.5.2 - Dépôt borne - (cathode), migration vers borne + (anode), car protéines chargées négativement avec le SDS.

Marqueur de taille : 9 bandes obtenues comme attendu (les plus petites protéines ont migré le plus loin).

1.3.5.3 - Analyse des « témoins »

Piste 2 : tPA sc : 1 seule bande autour de 70 kDa, comme attendu d'après l'énoncé (tPA de PM 72 kDa)

Piste 3 : tPA dc : 2 bandes autour de 35 kDa (la somme des tailles donne la taille du tPA sc)

Piste 4 : tPA dc non réduit : 1 seule bande, comme en 2, autour de 70 kDa. En effet le tPA est bien dc, mais les 2 chaînes sont encore reliées entre elles.

Bilan : pour distinguer les deux formes de tPA, il est nécessaire de pré-traiter les échantillons au DTT.

1.3.5.4 - Pour l'échantillon d'actilyse reconstitué, 3 bandes/ La première correspond à du tPA sc (bande peu épaisse, moindre concentration). 2 bandes plus épaisses à 35 kDa correspondant au tPA_{dc}.

Bilan : 2 formes présentes dans le médicament, avec surtout du dc.

2 - Contrôle de la production de l'actilyse par mesure d'activité enzymatique (19,5 points)

2.1 - Principe d'un spectrofluorimètre

2.1.1 - A : source de lumière polychromatique

B : monochromateur (ou filtre)

C : (photo)détecteur

2.1.2 - λ : longueur d'onde excitatrice et λ' : longueur d'onde d'émission avec $\lambda < \lambda'$ car $E = hc/\lambda'$ et

$E_{\text{excitation}} > E_{\text{émise}}$.

2.2 - Étalonnage du spectrofluorimètre

2.2.1 - Préparation de la solution étalon fille d'AMC : 2 contraintes :

- dilution au 1/100
- volume total à préparer, ici au moins 250 μL

Dilution judicieuse adaptée

2.2.2 - Tableau de spectrofluorimétrie (document 7)

Tubes	Blanc	1	2	3	4
Volume de solution étalon fille à 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (en μL)	0	25	50	75	100
Tampon 1X qsp 200 μL	200	175	150	125	100
[AMC] en $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0	5	10	15	20
IF = Intensité de fluorescence (UF)	0	2,9	6,0	9,3	11,8

2.2.3 - Régression linéaire : $r^2 = 0,998$.

IF = 0,60 [AMC] (b négligeable) avec [AMC] en $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et IF en UF.

2.3 - Détermination de l'activité spécifique du tPA

2.3.1 - Principe du test : méthode cinétique : on suit en continu, grâce au fluorimètre, l'apparition d'un composé fluorescent (AMC) produit sous l'action du tPA.

tPA

substrat $\rightarrow$ produit fluorescent (AMC) suivi par spectrofluorimétrie.

2.3.2.1 - Le tPA est sans doute sécrété, c'est pourquoi on le récupère dans le surnageant après centrifugation. On manipule à 4°C afin de conserver l'activité enzymatique du tPA.

2.3.2.2 - Tampon 2 fois concentré par rapport à sa concentration pour mesure. Lors de la préparation de la mesure, dilué 2 fois, donc ramené à 1X.

2.3.2.3 - Conditions de mesure : pH et Ture fixés, travail en conditions saturantes en période initiale.

2.3.2.4 - Blanc : 50 μL de substrat + 50 μL de tampon ou d'eau déminéralisée . "zéro" sur air accepté.

2.3.4.1 - Période initiale : période pendant laquelle IF augmente de façon linéaire par rapport au temps.

2.3.4.2 - $b = z/V_{\text{enz}}$,

2.3.4.3 - Avec $z = 1/1$ $dn_{\text{AMC}}/dt = V_{\text{MR}} \cdot d[\text{AMC}]/dt$, en repartant de la relation entre [AMC] et IF, on trouve

$b = (V_{\text{MR}}/V_{\text{enz}}) \cdot (1/0,6) \cdot \frac{dIF}{dt}$ + passage en s^{-1} et conversion $\mu\text{kat}/\text{nkat}$.

2.3.4.4 - $b = 500 \text{ nkat.L}^{-1}$.

2.3.4.5 - $Z_{sp} = z/m_{\text{prot}} = b/\rho = 25 \mu\text{kat.g}^{-1}$

2.3.5 1- - Z_{sp} après purification = $1/4.10^{-3} = 250 \mu\text{kat.g}^{-1}$

2.3.5.2 - $10 Z_{sp}$ surnageant soit un enrichissement de 10 fois.

3 - Conséquence de l'AVC ischémique : aspect biochimique (13 points)

3.1 - Chaîne respiratoire

3.1.1 -

A : espace intermembranaire (eim)

B : mb interne mitochondriale

C : matrice mitochondriale

Au niveau des complexes I, II, III et IV, transfert d'électrons (flèches blanches) exergonique, permettant le pompage de protons dans l'eim.

3.1.2 - Successions de réactions redox entre couples des complexes I, II, III et IV

3.1.3 - Ce transfert d'électrons (flèches blanches) est exergonique et permet le pompage de protons dans l'eim, au niveau des complexes I, III et IV / Notion de couplage énergétique..

3.1.4 - Complexe moléculaire « F₀F₁ » : F₀ : canal à protons (retour des protons dans la matrice, dans le sens du gradient / retour exergonique).

F₁ : activité catalytique de synthèse d'ATP, grâce à l'énergie récupérée lors du retour des protons.

3.1.5 - Un défaut d'approvisionnement en O₂ entraîne une moindre formation d'ATP.

3.2 - Métabolisme anaérobie

3.2.1 - 1 : glycolyse // 2 : fermentation lactique, catalysée par la LDH.

3.2.2 - H : acide pyruvique : CH₃-CO-COOH

K : acide lactique.

F : (2) ADP // G : (2) ATP // I : (2) NAD⁺ // J : (2) NADH, H⁺.

3.2.3 - Voie fermentaire : rendement énergétique moindre, seulement 2 ATP par glucose, mais permet réoxydation possible des coenzymes en absence d'O₂.

Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2016

ANALYSES ET CONTRÔLES DANS LE CADRE DE LA FABRICATION D'UN FROMAGE

1 - Analyse de la croissance des ferments de fabrication (19,5 points)

1.1 - Croissance et conservation des bactéries lactiques

1.1.1 - *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* ...

1.1.2.1 - Analyser : 4 phases habituelles dans la courbe de croissance.

1.1.2.2 - Production d'acide lactique pendant les phases exponentielle et stationnaire.

G = environ 1 h

μ = environ 0,7 .h⁻¹

μ = vitesse spécifique de croissance pendant la phase exponentielle.

G = temps nécessaire pour que la population double

1.1.2.3 - D'après le document 2, la multiplication des bactéries lactiques entraîne une acidification du lait.

D'après le document 1, la présure en milieu acide permet la coagulation de la caséine donc le caillage du lait, étape essentielle à la fabrication du fromage.

1.1.2.4 - Fermentation homolactique : formation essentiellement d'acide lactique.

Fermentation hétérolactique : formation d'acide lactique et d'autres produits (acide acétique ; éthanol ; CO₂).

1.1.3 - Congélation lente à - 80 °C en utilisant un cryoprotecteur (glycérol). Lyophilisation : utilisation d'un agent protecteur (lait ou glycérol à 10 %).

1.1.4 - Le sel inhibe la flore contaminante (et participe aux qualités organoleptiques du fromage, contribue à la formation de la croûte du fromage).

1.2 - Facteurs influençant la culture des bactéries lactiques

1.2.1 - Milieu complet car présence de :

- Source de carbone et d'énergie : le lactose
- Source d'azote : acides aminés et secondairement les protéines et les peptides
- Eau + ions minéraux : Na⁺ ; Cl⁻
- Des facteurs de croissance : vitamines.....

1.2.2.1 - Courbe a : courbe type montrant classiquement 3 phases : une phase de latence, une phase exponentielle de croissance et une phase stationnaire.

Courbe b : Pas de phase de latence ; deux phases de croissance exponentielle séparées par une phase stationnaire.

Durant la première phase exponentielle la bactérie utilise les acides aminés libres comme source d'azote. La phase stationnaire correspond à l'épuisement du milieu en acides aminés libres. La deuxième phase de croissance exponentielle se met en place quand la bactérie dégrade les protéines présentes dans le milieu car il s'agit d'une souche protéase +.

1.2.2.2 - La concentration finale en *Streptococcus thermophilus* en culture mixte est plus importante qu'en culture pure. *Lactobacillus delbrueckii* dégrade les protéines grâce à sa protéase de paroi et permet ainsi une meilleure croissance de *Streptococcus thermophilus*.

1.2.2.3 - Choisir des souches présentant une complémentarité leur permettant de mieux cultiver et/ou d'être plus efficace, souche protéase +.

2 - Contrôle du lait avant transformation (21,5 points)**2.1 - Action d'agents antibactériens**

2.1.1.1 - Ensemble des microorganismes apportés secondairement dans les bioproduits lors de sa fabrication, sa transformation ou son stockage.

Il s'agit de microorganismes provenant des milieux naturels (eau, sol, air) ou du manipulateur (bactéries commensales), du matériel.

2.1.1.2 - Abaissement de la température à au moins 4°C pour ralentir la multiplication des bactéries mésophiles (flore exogène).

2.1.1.3 - Après 4 jours de conservation, la proportion de *Pseudomonas* a augmenté car contrairement à la plupart des bactéries du lait, elle se multiplie à 4 °C car elle est psychrotrophe.

2.1.1.4 - Altération des qualités organoleptiques du fromage. *Pseudomonas* possède des protéases dégradant les protéines du fromage.

Lipolyse acceptée => rancissement.

2.1.2.1 - Destruction par la chaleur de la plupart des bactéries et en particulier des bactéries pathogènes. Si le pH est trop faible, le lait va coaguler sous l'effet de la chaleur dans les conduits du pasteurisateur.

2.1.2.2 - Différentes étapes :

- Rinçage à l'eau froide pour éliminer les résidus du lait
- Passage d'une solution basique à chaud pour éliminer les substances organiques.
- Rinçage à l'eau froide pour éliminer la solution basique.
- Passage d'une solution acide pour éliminer les substances minérales
- Rinçage à l'eau froide pour éliminer la solution acide
- Passage d'une solution de désinfectant pour éliminer les microorganismes
- Rinçage à l'eau froide pour éliminer le désinfectant

2.2 - Recherche d'antibiotiques dans le lait

2.2.1.1 - Les β lactamines inhibent la synthèse du peptidoglycane (transpeptidation) de la paroi. Agissent essentiellement sur les bactéries Gram +.

Pénicilline G, ampicilline, céphalosporine...

2.2.1.2 - Inhibition de la multiplication des bactéries lactiques ; pas d'acidification du lait et donc pas de coagulation du lait (ou autre réponse logique).

2.2.2.1 - Milieu de culture + spores de *Geobacillus stearothermophilus* + 100 μ L de lait sans antibiotique. (Le lait est de même nature que celui des essais) (vache, lait, brebis). (Germination des spores) puis multiplication bactérienne. Fermentation du glucose et acidification du milieu d'où virage au jaune de l'indicateur de pH : le BCP.

2.2.2.2 - Violet. Pas de multiplication bactérienne due à la présence d'antibiotique ; pas d'acidification ; pas de virage du BCP.

2.2.2.3 - *Geobacillus stearothermophilus* est une bactérie thermophile. Les bactéries mésophiles éventuellement contaminantes ne perturberont pas le résultat du test.

2.2.3 - Présence de moisissures dans les aliments (ensilage....). Mycotoxine.

3 - Contrôle microbiologique du produit fini (19 points)**3.1 - Analyses microbiologiques réalisées par l'entreprise****3.1.1 -**

Critère	Stade d'application	Nature des microorganismes	Solution
Critère de sécurité	Applicable au produit mis sur le marché	Microorganismes pathogènes	Produit retiré du marché
Critère hygiène des procédés	Applicable pendant le procédé de fabrication	Microorganismes indicateurs d'une contamination	Mise en route d'actions correctives

3.1.2.1 - La présence d'*Escherichia coli* dans le fromage témoigne d'une contamination fécale.

3.1.2.2 - Les intoxications alimentaires sont des maladies contractées à la suite de l'ingestion d'aliments contaminés par des agents pathogènes ou des substances néfastes pour la santé.

3.1.2.3 -

- Adhésion des bactéries aux entérocytes grâce à une adhésine : l'internaline
- Induction de la phagocytose par les entérocytes
- Lyse de la membrane du phagosome avant la fusion avec les lysosomes grâce à la listériolysine O et à une phospholipase C. Les *Listeria* sont alors libres dans le cytoplasme
- Multiplication des bactéries dans le cytoplasme de l'entérocyte
- Polymérisation de l'actine créant des comètes qui propulsent les bactéries dans les entérocytes voisins...

3.2 - Utilisation d'une méthode alternative pour la recherche de *listeria monocytogenes*

3.2.1 - Milieu Fraser 1/2 : Enrichissement primaire ou pré-enrichissement sélectif, il permet la revivification et la multiplication des *Listeria* stressées et limite le développement des autres bactéries.

Milieu Fraser : Enrichissement secondaire plus sélectif de *Listeria*.

3.2.2 - Le conjugué est constitué d'anticorps anti *Listeria monocytogenes* liés à la phosphatase alcaline. Aspect du cône dans le cas d'un résultat positif : le schéma doit représenter : la surface du cône sur laquelle sont fixés dans l'ordre : Ac anti *Listeria monocytogenes* - *Listeria monocytogenes* - Conjugué.

3.2.3 - À partir du bouillon Fraser :

- Isolement sur milieu sélectif des *Listeria* (Ottaviani - Agosti et PALCAM (ou Oxford).
- Incubation à 30, 35 ou 37 °C pendant 24 à 48 h.
- Repérage d'une colonie suspecte et isolement sur milieu non sélectif tel que gélose TSAYE.
- Incubation 24 h à 37 °C
- Examen microscopique, test catalase et ensemencement d'une galerie telle que Api *Listeria*
- Lecture de la galerie et confirmation

3.2.4 - Immunochromatographie, immunofluorescence.

3.3 - Dénombrement d' *Escherichia coli* dans le fromage

3.3.1 - Cultive à 44 °C y compris en présence de sels biliaires. Possède la β glucuronidase.

3.3.2 -

F1	F2	F3	F4	F5
5,0.10 ¹ UFC/g < m	8,5.10 ¹ UFC/g < m	1,2.10 ² UFC/g m<R<M	9,4.10 ¹ UFC/g < m	1,4.10 ² UFC/g m<R<M

(Cinq échantillons doivent être testés (n = 5))

Trois résultats sont satisfaisants et deux résultats sont compris entre m et M ; or c = 2 donc la qualité est acceptable.

Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2016

APPROCHES VACCINALES POUR LA LUTTE CONTRE LES PAPILLOMAVIRUS

1- Les HPV : cycle viral et dépistage (17 points)

1.1- Le cycle viral

1.1.1 - Schéma non obligatoire

- Fixation du virus à des récepteurs membranaires spécifiques
- Invagination de la membrane en puits recouverts de clathrine
- Internalisation du virus dans une vésicule d'endocytose recouverte

1.1.2 - La phase d'éclipse est une phase silencieuse = pas de virus détectable.

Elle comporte la transcription et la traduction des protéines virales et la réplication du génome viral.

1.2 - La détection des HPV

1.2.1 - Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne).

1.2.2 - L'ADN polymérase est thermorésistante (soit notion de résistance à la température de dénaturation soit sa température optimale de polymérisation est élevée).

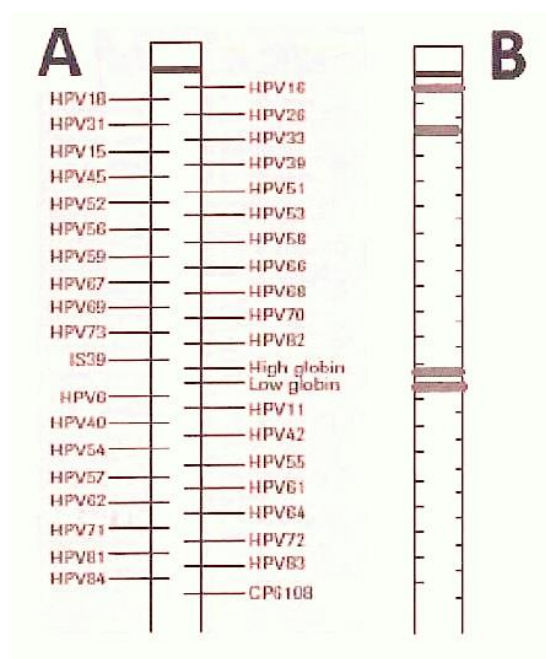
1.2.3 - La manipulation se réalise par cycles de trois étapes :

- 1 : dénaturation thermique de l'ADN double brin en ADN simple brin
- 2 : hybridation des amorces sur l'ADN sb
- 3 : élongation par l'ADN polymérase à partir des amorces

1.2.4 - À chaque cycle on double environ le nombre de copies de la séquence cible ; en n cycles, on a 2^n exemplaires (à chaque cycle, persistent les deux brins issus de l'amplification directe des brins d'origine, plus longs que la séquence cible).

1.2.5 - Le contrôle interne permet de vérifier la présence d'ADN et donc de valider les étapes d'extraction et d'amplification de l'ADN de l'échantillon (présence de bandes au niveau de High et Low globin).

1.2.6 - On attend ici 4 bandes (2 contrôles, 2 échantillons).



2 - Stratégie vaccinale (43 points)**2.1 - Réponse immunitaire**

2.1.1 - Chaînes lourdes et légères, ponts disulfure (ou autre comme zone charnière, zone glucidique...), domaines constants (CL, CH1, CH2, CH3) et domaines variables (VL et VH), paratope indiqué.

2.1.2 - Réponse primaire : latence de quelques jours, puis production d'IgM avec un taux faible, qui redevient basal au bout de 2 semaines. Production d'IgG après une semaine de latence avec un taux qui augmente régulièrement pour dépasser celui des IgM (2 fois supérieur), au bout de 2,5 semaines. Le taux d'IgG diminue très lentement sur plusieurs semaines.

Réponse secondaire : même profil du taux d'IgM après la deuxième injection d'Ag. Par contre, la production d'IgG est plus rapide (pas de latence) et plus importante atteignant un taux maximal deux fois plus important que pour la réponse primaire en moins de deux semaines. Le taux d'IgG reste élevé de façon plus durable (diminue très lentement sur un nombre de semaines plus important).

2.2 - Vecteur YEG α HPV16 L1

2.2.1 - C'est une petite molécule d'ADN, circulaire, contenant le gène codant pour une protéine d'intérêt (présence d'un promoteur, d'une origine de réplication, d'un gène marqueur) pour qu'elle soit transférée dans une cellule où elle pourra être synthétisée donc bien « exprimée ».

2.2.2 - Enzymes de restriction qui coupent l'ADN du vecteur pour y introduire le gène HPV16 L1 (2 enzymes différentes permettent d'orienter le gène).

2.2.3 - C'est un milieu de sélection des levures transformées. Le milieu ne contenant pas d'uracile, seules les levures contenant le vecteur et contenant le gène URA3 pourront synthétiser de l'uracile et donc survivre dans ce milieu (vecteur contenant l'insert ou non).

2.2.4 - Grâce à cette origine, le vecteur se réplique de manière autonome (ce qui permet son maintien dans les cellules filles).

2.2.5 - Séquence particulière de l'ADN (séquence consensus) en amont du gène, à laquelle se fixe l'ARN polymérase pour débiter la transcription du gène.

2.3 - Purification des protéines capsidales principe actif du vaccin

2.3.1 - Centrifugation en gradient de densité ou centrifugation zonale.

2.3.2 - Principe : au cours de la centrifugation, les constituants de l'extrait cellulaire à purifier sont séparés en fonction de leur densité (ou forme ou taille) car ils possèdent une vitesse de déplacement différente dans le gradient.

2.3.3 - Ces fractions contiennent notamment les protéines VLP16 L1 que l'on veut purifier.

2.4 - Contrôle des VLP

2.4.1 - MET. Dans une enceinte sous vide, un faisceau d'électrons est généré par un canon à électrons qui permet d'accélérer les électrons. Le faisceau traverse un jeu d'électroaimants afin d'être focalisé sur l'échantillon. Les électrons transmis par l'échantillon percutent ensuite un écran, ce qui permet de produire une image.

2.4.2 - Les solutions de métaux lourds sont opaques aux électrons.

2.4.3 - D'après l'échelle indiquée sur le champ microscopique, on peut estimer la taille des VLP à environ 50 nm, ce qui est conforme à la taille des virions HPV.

2.5 - Immunogénicité des vaccins bivalent et quadrivalent

2.5.1 - VLP = Ag fixés / caséine de lait pour saturation de la plaque / Ac humains anti-VLP (Ac primaire fixé sur VLP par paratopes) / Ac (de chèvre) anti- Ac humains marqués par la peroxydase (Ac secondaire conjugué) fixés sur l'immunocomplexe.

2.5.2 - Le contrôle négatif (sérum HPV 16/18 négatif) vérifie l'absence de fixation non spécifique du conjugué : pas d'Ac anti-HPV donc pas de fixation du conjugué, donc absorbance nulle ou faible. Le contrôle positif (sérum HPV 16/18 positif) vérifie l'efficacité (spécificité) de la méthode de dosage avec obtention d'une absorbance forte.

2.5.3 - L'adjuvant stimule la réponse immunitaire (immunogénicité du vaccin). Injecté en même temps que le vaccin, il permet d'augmenter la production d'anticorps.

2.5.4 - On observe que la production d'Ac anti HPV 16 et anti- HPV 18 après vaccination par le vaccin bivalent est supérieure à celle obtenue avec le vaccin tétravalent (titres 1000 > 400).

La production d'Ac est aussi plus durable après vaccination par le vaccin bivalent car après 48 mois, on observe des titres plus élevés d'Ac anti-HPV 16 et 18 (titres de 150 > 100).

On peut donc en conclure que l'adjuvant ASO4 est plus efficace pour stimuler la réponse immunitaire humorale

Éléments de corrigé de sciences et technologies bioindustrielles 2016

CONTRÔLE DU FLUOR DANS UNE PÂTE DENTIFRICE

Q1 - La teneur en fluor dans le dentifrice est de 1380 ppm = 1380 µg /g doit $1380/10^6 = 0,138\%$, ce qui est inférieur au 0,15% de la réglementation cosmétique.

Présence de PAO sur l'emballage

Q2 - Le nom commercial (1) permet d'identifier les produits défectueux et de prévenir les consommateurs. Les produits sont rappelés par le fabricant (6 nom et adresse) et le numéro de lot (8) permet de retrouver l'historique de fabrication.

Q3 – Tensioactif = molécule amphiphile (partie polaire et apolaire) avec une action détergente (et moussante) pour le rôle nettoyant du dentifrice.

Q4 –

A : Moteur	B : Trompe à vide (introduction des ingrédients)
E : Pâte (pour le mélange)	F : Double enveloppe (régulation de température)
C : Couvercle	D : Cuve
G : Pâte racleuse (récupération du produit)	H : Homogénéisateur

Q5 – Température (et durée): pour le mélange, il est préférable que les ingrédients soient tous à la même température. Certains sont solides, il faudra les faire fondre.

Vitesse d'agitation (et durée) : peut être variable pour les différentes étapes de fabrication

Vide : pour introduire les ingrédients par aspiration

Q6 – L'eau est adoucie (premier échangeur d'ions) pour éliminer le calcium et le magnésium en quantité importante dans l'eau du réseau.

L'osmose inverse élimine tous les solutés (composés organiques, ions...) et ici elle élimine également les particules présentes dans l'eau du réseau.

Les gaz dissous sont éliminés par dégazage.

Le traitement de finition par échange d'ions élimine les ions résiduels non éliminés par l'osmoseur.

Désinfection par ozonisation : une contamination microbienne étant possible lors du stockage une désinfection est réalisée par un gaz neutre (O_3)

Q7 – A l'aide d'étalons, on établit une corrélation entre la mesure de potentiel et les teneurs en fluor de ces étalons. Le modèle mathématique testé est celui d'une droite (entre l'inverse du potentiel et la teneur en fluor).

La mesure de potentiel est ensuite réalisée sur l'échantillon mis en solution et comparé aux étalons (équation du modèle mathématique).

Ici $E = 55,6$ mv, soit $E^{-1} = 0,018$ mV⁻¹, donc teneur en fluor mesuré = $(0,018 - 8,533E-03)/3,95E-03$
= 2,79 ppm 2,79 µg pour 1g

En admettant que 100mL = 100 g, la fiole contient 279 µg de fluor apporté par 0,2 g de dentifrice, soit $279/0,2 = 1395$ ppm.

Q8 – Le modèle mathématique testé est une droite, le coefficient de corrélation est proche de 1, ce qui montre qu'il y a bien une relation linéaire entre l'inverse du potentiel et la teneur en fluor.

Q9 – Rappel cible : 1380 ppm

Min₁₀ 1380*95% = 1311 ppm

Max₁₀ 1380*105% = 1449 ppm

Min₂₀ 1380*90% = 1242 ppm

Max₂₀ 1380*110% = 1518 ppm

Sur les 10 tubes testés un tube présente une valeur supérieure à la limite de 105%. Il faut donc prélever 20 autres tubes

Parmi ces 20 tubes aucun n'est hors limites 90-110% et seul 1 tube est hors limite 95-105%.

On en conclut que le lot est conforme.

Q10 – L'ISO est un organisme international de normalisation, les BPF permettent d'assurer aux clients que le produit cosmétique a été fabriqué dans les conditions optimales de qualité. Ainsi la qualité de la production sera reconnue par un grand nombre de pays, facilitant les échanges et la diffusion du produit.

Q11 – Documents possibles : Certificat d'étalonnage des balances, fiche de vie (maintenance) des balances, enregistrement des pesées consignées dans le dossier de lot ...

Q12 – Le corrigé attendait l'utilisation de la carte de contrôle et non pas sa construction.

Les contrôles sont reportés quotidiennement et les valeurs de conductivité sont comparées à une cible et une limite de contrôle supérieure à ne pas dépasser qui indique une forte concentration en ions.

Il n'y a pas de limite inférieure car l'objectif est d'obtenir une eau déminéralisée (sans ion).

Q13 – Le procédé d'osmose inverse est sous contrôle car les points sont répartis aléatoirement autour de la valeur cible et aucun point n'est au dessus de la LCS.

Le procédé d'échanges d'ions est sous contrôle au début du mois mais montre une dérive à partir du 18 mai car 6 points sont au dessus de la cible.

Le procédé d'ozonisation est sous contrôle en début de mois, mais comme pour l'échangeur d'ions on constate une dérive à partir du 18 sans doute la conséquence de celle notée sur l'échangeur placé juste avant. Cela conduit à un point hors limite le 25.

Q14 – 4 origines possibles à la forte valeur de fluor :

- problème lié au dosage
- manque d'homogénéité du lot
- erreur des pesées des matières premières
- apport exogène de fluor par l'eau de production

D'après le sujet le lot est homogène, la pesée a été *a priori* correctement effectuée, il n'y a pas assez d'élément pour estimer si le dosage peut être mis en cause. Par contre les cartes de contrôle montrent qu'un problème de conductivité est identifié au niveau de l'échangeur d'ions. Il ne fait plus son travail et ne retient plus les fluorures.

Q15 – Les résines échangeuses d'ions doivent être régénérées ou changées.

Corrections session 2017

Éléments de corrigé de mathématiques 2017

Exercice 1 : (10 points)

PARTIE A : Étude quantitative du problème

1 (a) - Avec un débit de 20 cm^3 par seconde, on met 20×150 soit $3\,000 \text{ cm}^3$ au bout de 150 s. Donc 3 litres ont été ajoutés dans le réservoir aux 2 litres de concentré de parfum. Au total, il y aura bien 5 litres dans ce réservoir au bout de 150s.

(b) - Pour remplir totalement ce réservoir il faut ajouter 8 litres d'éthanol soit $8\,000 \text{ cm}^3$. Il faudra donc $\frac{8000}{20}$ soit 400 s pour remplir cette cuve.

2 (a) - Pendant les 400 premières secondes le réservoir se remplit donc la quantité d'éthanol Q augmente. Ensuite de l'éthanol pur entre toujours mais un mélange d'éthanol-parfum en ressort par le trop-plein. Il y a donc encore une augmentation de la quantité d'éthanol. Conclusion la quantité Q en fonction du temps augmente. Cette fonction sera donc croissante.

(b) - C'est la courbe n°3 qui représente la quantité Q en fonction du temps.

Dans une première phase (le remplissage) la quantité augmente de façon linéaire (proportionnalité entre quantité et temps grâce au débit constant) puis dans un second temps (trop-plein) la quantité d'éthanol augmente toujours comme indiquée à la question précédente.

PARTIE B : Une équation différentielle

1 - L'équation différentielle (Eo) du modèle est $y' + a y = 0$ avec $a=0,002$. Donc d'après le cours, les solutions de (Eo) sont les fonctions de la forme $t \rightarrow k e^{-at} = k e^{-0,002 t}$ avec k une constante réelle.

2 - La fonction constante a est solution particulière de (E) donc elle vérifie cette équation.

D'où $0 + 0,002 a = 20$ soit $a = \frac{20}{0,002} = 10\,000$.

3 - Les solutions de l'équation différentielle (E) sont donc de la forme $k e^{-0,002 t} + 10\,000$.

4 - La fonction Q solution de (E) vérifie la condition $Q(400)=8\,000$.

D'où $k e^{-0,002 \times 400} + 10\,000 = 8\,000$ soit $k = \frac{-2000}{e^{-0,8}} \approx -4451,1$. Conclusion $Q(t) = 10\,000 - 4451,1 e^{-0,002 t}$.

PARTIE C : Étude d'une fonction

1 - Si $t \rightarrow +\infty$ alors $-0,002 t \rightarrow -\infty$ d'où $e^{-0,002 t} \rightarrow 0$ donc $Q_1(t) \rightarrow 10\,000$.

La droite d'équation $y = 10\,000$ est donc asymptote horizontale au voisinage de $+\infty$ à la représentation graphique de Q_1 .

2 - Calculons la dérivée de Q_1 :

$$Q'_1(t) = 0 - 4451,1 \times (-0,002) e^{-0,002 t} = 8,9022 e^{-0,002 t}$$

Étudions le signe de cette dérivée :

$e^{-0,002 t}$ et 8,9022 sont toujours strictement positif donc la dérivée est strictement positive.

La fonction est donc strictement croissante sur $[400 ; +\infty[$.

On vérifie ainsi la réponse donnée à la question **A-2-(a)**.

3 - Il faut donc chercher t tel que $\frac{Q_1(t)}{10000} = 0,85$.

$$Q_1(t) = 8500 \text{ donc } 10\,000 - 4451,2 e^{-0,002t} = 8500$$

$$e^{-0,002t} = \frac{1500}{4451,1}$$

on obtient $t = 544$.

$$-0,002t = \ln\left(\frac{1500}{4451,1}\right)$$

La proportion d'éthanol dans le réservoir vaut 85% au bout d'environ 544 secondes.

4 - Réponse (c).

Vérification non demandée dans le sujet

Par exemple avec $A = 8\,100$, on obtient pas à pas avec cet algorithme

T	400	410	420	430
$Q_1(T)$	$\approx 8\,000$	$\approx 8\,040$	$\approx 8\,078$	$\approx 8\,116$
Condition Tant que	Vrai	Vrai	Vrai	Faux

L'algorithme affiche alors 430 qui est une valeur approchée par excès de l'équation $Q_1(t) = 8\,100$

Exercice 2 : (10 points)

PARTIE A : Défauts de fabrication

1 - Il faut calculer $P(A \cap B)$. Or les événements sont indépendants donc $P(A \cap B) = P(A) \times P(B)$
On obtient alors avec les données de texte $P(A \cap B) = 0,05 \times 0,02$ soit 0,001.

2 - Au moins un défaut est l'événement $A \cup B$. Or $P(A \cup B) = P(A) + P(B) - P(A \cap B)$.
D'où la probabilité que le verre soit défectueux est de $0,05 + 0,02 - 0,001$ soit de 0,069.

PARTIE B : Vérification du lot

1 - Expérience à deux issues possibles : « verre défectueux » (succès) ou « verres sans défaut » (échec). Donc $P(\text{succès}) = p = 0,069$.

Expériences identiques et indépendantes répétées 20 fois (*assimilation à un tirage avec remise*).

D'où X , qui compte les succès, suit une loi binomiale de paramètres 20 et 0,069.

2 - Il faut calculer $P(X \geq 5)$ soit $1 - P(X \leq 4)$ pour pouvoir utiliser au mieux la calculatrice.
 $P(X \geq 5) = 1 - 0,9899 \approx 0,01$.

Partie C : Diamètre du buvant du verre

1 - A la calculatrice, on obtient $P(45,8 \leq D \leq 46,3) \approx 0,59$.

2 - On estime qu'avec une loi normale de paramètres m et σ , $P(m - 2\sigma \leq D \leq m + 2\sigma) \approx 0,95$.

Donc $a \approx 2 \times 0,3$ soit $a \approx 0,6$

Partie D : Brillance des verres

1 - $P(T \leq t) = F(t) - F(0)$ où F est une primitive de $\lambda e^{-\lambda t}$.

$$F(t) = -e^{-\lambda t} \text{ d'où } P(T \leq t) = (-e^{-\lambda t}) - (-e^{-\lambda \times 0}) = (-e^{-\lambda t}) - (-1) = 1 - e^{-\lambda t}.$$

2 - $P(T \leq 24) = 0,93$ donc $1 - e^{-\lambda \times 24} = 0,93$ soit $e^{-\lambda \times 24} = 0,07$.

En utilisant le logarithme népérien on obtient $-24\lambda = \ln(0,07)$ soit $\lambda \approx 0,11$.

3 - On sait que pour une loi exponentielle de paramètre λ , l'espérance mathématique est $\frac{1}{\lambda}$.

Donc $E(T) \approx 9$.

En moyenne ce dispositif fonctionne correctement pendant 9 mois.

4 - 4 ans correspondent à 48 mois. Calculons donc $P(T > 48)$ soit $1 - P(T \leq 48) = 1 - (1 - e^{-0,11 \times 48})$

D'où $P(T > 48) = e^{-5,28} \approx 0,005$.

La probabilité que la durée de vie soit supérieure à 4 ans n'est pas supérieure à 1%.

Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2017

A- Spectrophotométrie

1.1 - $\lambda_{\max} = 640 \text{ nm}$

1.2 - La solution absorbe dans le rouge-orangé elle apparaît donc bleu-vert d'après le cercle chromatique (la couleur d'une solution correspond à la couleur complémentaire de la couleur absorbée).

2.1 - Loi de Beer-Lambert : $A = \varepsilon \cdot \ell \cdot c$

2.2 - - A: absorbance de la solution (sans unité)

- ε : coefficient d'absorption linéique molaire et ε s'exprime en $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

- ℓ : largeur de la cuve s'exprime en mètres

- c : concentration de la substance absorbante en $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$

2.3 - En effectuant la régression linéaire $A = f(c)$ on obtient: $a = 80 \text{ S.I.}$ $b = -4,3 \cdot 10^{-4}$ et $r = 0,9993$

La valeur de b est négligeable donc $A = 80 \cdot c$ avec les unités SI (mais on peut accepter toute réponse conforme aux unités utilisées; par exemple $A = 80 \cdot 10^3 \cdot c$ avec c en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.4 - D'après la régression linéaire, le coefficient de corrélation est très proche de 1 : la relation obtenue est bien conforme à la loi de Beer-Lambert, donc la gamme d'étalonnage est de bonne qualité.

3.1 - $c_{\text{diluée}} = A / (80 \cdot 10^3) = 8,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3.2 - En tenant compte du facteur de dilution $c = 4,3 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3.3 - Concentration massique: $c_m = M \cdot c = 24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

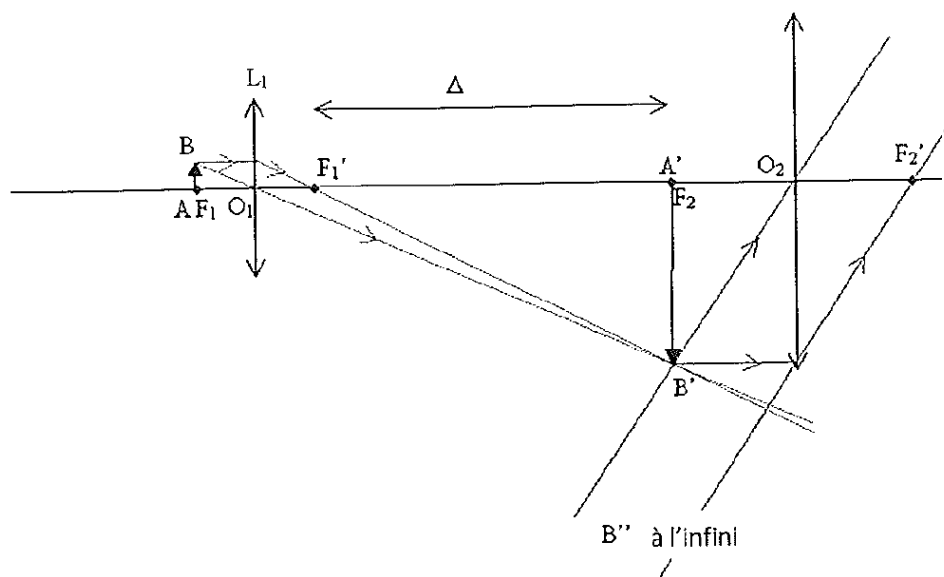
3.4 - La valeur attendue est de $25,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ce qui donne un écart relatif de 4,0 % par rapport au résultat expérimental. Le résultat expérimental est donc conforme.

B- Le microscope

1 - L'observation d'une image à l'infini se fait sans accommodation donc sans fatigue de l'œil.

2 - Il faut que l'image intermédiaire A'B' soit située dans le plan focal objet de l'oculaire L_2 .

3 -



4 - Le grossissement G est $G = |\gamma| \times G_{oc} = 20 \times 20 = 400$

5.1 - Pour l'objectif de grossissement x20 on a $n \sin u = 0,40$

Donc $AB_{\min} = 7,5 \cdot 10^{-7} \text{ m}$ soit $AB_{\min} = 0,75 \mu\text{m}$

5.2 - $AB_{\min} < \text{taille sétule}$ donc on peut observer une sétule.

$AB_{\min} > \text{taille spatule}$ donc on ne peut pas observer une spatule.

5.3 - Pour pouvoir observer la spatule il faut diminuer $AB_{\min}$ donc augmenter l'ouverture numérique. L'objectif de grandissement $\times 10$ ne peut pas convenir.

Avec l'objectif de grandissement $\times 100$ on a $AB_{\min} = 0,24 \mu\text{m}$ et dans ce cas la spatule est observable.

C-Titrage d'un comprimé d'ibuprofène

$$1.1 - K = \frac{K_a}{K_e} \quad \text{soit} \quad K = \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pK_e}}$$

1.2 - $K = 3,2 \cdot 10^9$ La valeur de K étant très élevée on peut considérer que la réaction est très déplacée dans le sens direct.

2.1 - L'équivalence d'un titrage correspond à l'introduction des réactifs titré et titrant dans les proportions stœchiométriques.

2.2 - Par la méthode des tangentes on a $V_{ q} = 9,7 \text{ mL}$ et $\text{pH}_{ q} = 8,8$

$$2.3 - n(\text{ibu}) = n(\text{HO}\cdot)_{ q}$$

$$\text{Soit } n(\text{ibu}) = C_b \times V_{ q}$$

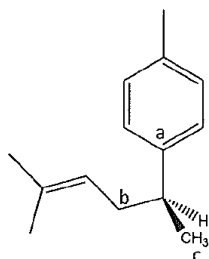
$$\text{A.N. : } n(\text{ibu}) = 1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol.}$$

$$2.4 - m(\text{ibu}) = n(\text{ibu}) \times M = 0,39 \text{ g soit } m(\text{ibu}) = 3,9 \cdot 10^2 \text{ mg}$$

2.5- La masse maximale qu'un adulte peut ingérer par jour est de 1,2 g, soit 3 comprimés.

D- Synthèse de l' -curcumène

1 -



D'après les règles de Cahn, Ingold et Prelog, le groupement a est prioritaire devant b puis c, donc le carbone a pour configuration : S

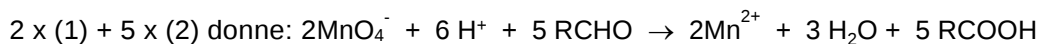
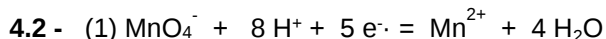
2.1 - $\text{CH}_3\text{-Cl}$; chlorométhane

2.2 - Le chlorure d'aluminium joue le rôle de catalyseur.

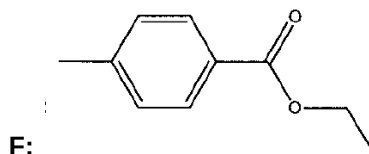
3.1 - Fonction aldéhyde

3.2 - Le groupe méthyle est donneur : les règles de Holleman prévoient une orientation majoritaire en para.

4.1 - Fonction acide carboxylique



5.1 -



5.2 - Cette réaction d'estérification est une réaction lente et limitée.

6 - Le carbone est plus électronégatif que le magnésium. La polarité de la liaison C-Mg donne un comportement **nucléophile**   l'organomagnésien.

7 - Il s'agit d'une déshydratation intramoléculaire (ou élimination) d'un alcool.

Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2017

Les biotechnologies et l'évolution des dispositifs de mesure de la glycémie pour les patients diabétiques

I. Optimisation de la purification d'un extrait de Glucose Oxydase (GOD)

Q1

↳ Identification des caractéristiques de séparation

Étape de précipitation au sulfate d'ammonium : solubilité en fonction de la force ionique

Étape de dialyse : séparation selon la taille des macromolécules et des petites molécules dialysables ou ions

Chromatographie anionique : séparation selon la charge.

Chromatographie d'exclusion-diffusion : séparation selon la taille.

↳ Rôles des étapes de dialyse

Première étape : éliminer le sulfate d'ammonium utilisé pour la précipitation fractionnée

Deuxième étape: éliminer le NaCl utilisé pour l'élution de la chromatographie d'échanges d'ions.

Q2

$Z_{sp} = Z_{GOD} \text{ dans } V_{\text{extrait}} / m_{\text{protéines}} \text{ dans même } V_{\text{extrait}}$

Ex : pour 10% $Z_{sp} = 21,6 / 1,30 = 16,6 \text{ U/mg}_{\text{protéines}}$

$R_{\text{conservation}} = (Z_{\text{totale}} \text{ extrait après précipitation fractionnée} / Z_{\text{totale}} \text{ extrait initial})$
 $= (Z_{\text{totale}} \text{ essai} / Z_{\text{totale}} \text{ témoin})$

Ex : Pour 50% $R_{\text{conservation}} = 60,4 / 99,2 = 0,61$ soit 61%

Q3

↳ Commenter les résultats

- pour *Fusarium* la précipitation fractionnée n'est pas spécifique de l'enzyme car Z_{sp} change peu et le rendement de conservation est faible donc on perd beaucoup d'enzyme
- pour *Penicillium* et *Aspergillus*, selon le pourcentage en sulfate d'ammonium utilisé, on obtient une Z_{sp} plus grande ($\sim \times 2$) donc on a bien séparé la GOD des autres protéines tout en conservant une bonne proportion de l'enzyme ($R > 80\%$).

↳ Choix de la souche et de la concentration

Penicillium sp. avec précipitation fractionnée sous 10% de sulfate d'ammonium ou *Aspergillus flavus* sous 20%.

Q4 Rapprochement des acides aminés éloignés dans la structure primaire qui forment le site actif.

II. Contrôles de qualité internes lors du dosage enzymatique du glucose au laboratoire

Q5 Ni S ni P n'ont de propriété spectrale, il faut donc une réaction indicatrice

Q6

↳ Conditions opératoires

Le temps d'incubation est **long** (10 à 20 min selon T) pour doser tout le glucose de l'échantillon (fin de la réaction, point final)

↳ Sécurité

$C_{\text{phénol}}$ dans réactif RTU = $8,5 \text{ mmol.L}^{-1} \rightarrow C_{\text{mphénol}} = 0,800 \text{ g.L}^{-1} = 0,0800\% < \text{limites de toxicité} (< 0,1\%)$.

Q7

$A_{405\text{nm}}$ à la fin des réactions = $\epsilon_{\text{quinnéimine à } 405\text{nm}} \times l \times C_{\text{quinnéimine apparue dans MR}}$

$$= \frac{1}{2} \epsilon_{\text{quinnéimine à } 405\text{nm}} \times l \times C_{\text{glucose oxydé dans MR}}$$

$$= \frac{1}{2} \epsilon_{\text{quinnéimine à } 405\text{nm}} \times l \times C_{\text{glucose initial dans MR}}$$

$$= \frac{1}{2} \epsilon_{\text{quinnéimine à } 405\text{nm}} \times l \times C_{\text{glucose dans PE}} \times V_{\text{PE}} / V_{\text{MR}}$$

$$\textcircled{1} A_{\text{essai}} = \frac{1}{2} \epsilon_{\text{quinnéimine à } 405\text{nm}} \times l \times C_{\text{glucose dans échantillon}} \times V_{\text{PE échantillon}} / V_{\text{MR}}$$

$$\textcircled{2} A_{\text{étalon}} = \frac{1}{2} \epsilon_{\text{quinnéimine à } 405\text{nm}} \times l \times C_{\text{glucose dans étalon}} \times V_{\text{PE étalon}} / V_{\text{MR}}$$

En faisant $\textcircled{1}/\textcircled{2} \rightarrow C_{\text{glucose dans échantillon}} = (A_{\text{essai}} / A_{\text{étalon}}) \times C_{\text{glucose dans étalon}}$.

Q8

$$C_{\text{Glucose UNITROL}} = 0,319 / 0,344 \times 1,00 = 0,93 \text{ g.L}^{-1}$$

$$C_{\text{Glucose LYOTROL}} = 0,715 / 0,344 \times 1,00 = 2,08 \text{ g.L}^{-1}$$

Valeurs situées dans les intervalles d'acceptabilité → série de dosages validée

Lors du diabète, il y a hyperglycémie ($C_{\text{glucose}} \gg 1 \text{ g/L}$) donc un contrôle haut est nécessaire

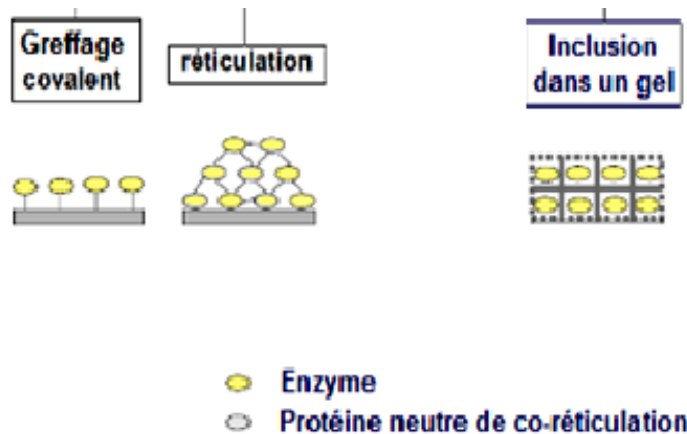
III. Les dispositifs d'autocontrôle de la glycémie

Q9

Récupération et donc économie de l'enzyme.

Q10

Illustrer



Comparaison et argumentation

K_M immobilisé > K_M enzyme libre

Hypothèse : site actif de l'enzyme moins accessible à son substrat → risque de perte d'activité et/ou d'affinité confirmé par l'augmentation de K_M (ou toute explication cohérente)

Q11

$$\Delta G = -2 \times 96500 \times (0,36 - (-0,56)) = -178 \cdot 10^3 \text{ J.mol}^{-1} = -178 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Réaction très exergonique et spontanée dans le sens étudié et les conditions d'utilisation de l'électrode

Q12

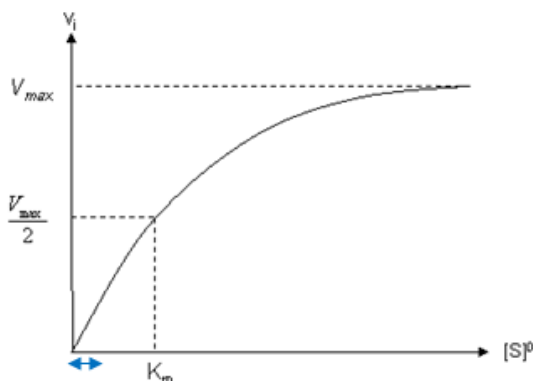
$$v_i = V_m \times [S]_i / (K_M + [S]_i)$$

Expliquer les conditions pour $v_i = \text{constante} \times [S]_i \Rightarrow v_i \approx [S]_i \times V_m / K_M$ si $[S]_i$ négligeable devant K_M au dénominateur
cad si $[S]_i < 0,1 K_M$

Alors constante = V_m / K_M

Q13

Tracer la courbe de Michaelis Mettre les points clés : V_m , K_M et repérer la zone initiale quasi-linéaire pour $[S]_0 < 0,1 K_M$



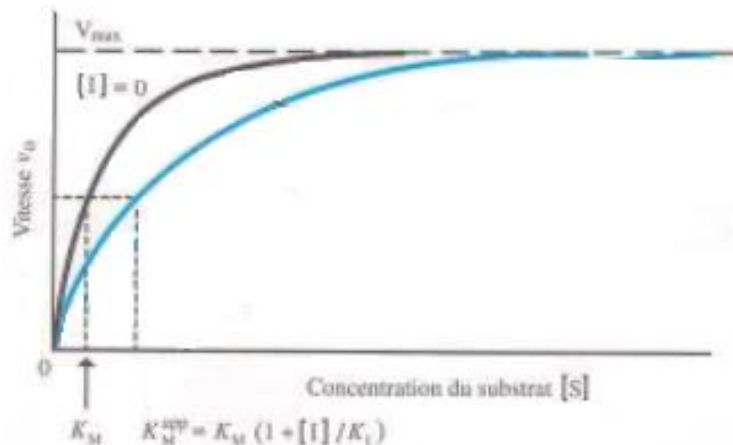
domaine de concentration

Attention tout petit, $[S]_0 < K_M/10$

Choix de la concentration en glucose = 6 mmol/L ($K_M/10$).

Q14

Tracer la courbe avec l'inhibiteur : courbe inférieure à la précédente puisque v_i plus faible avec inhibiteur, même asymptote et K_M plus grand.



K_M plus grand car compétition au niveau du site de fixation entre le S et l'I → affinité apparente pour le S diminue

Même V_m car une saturation en S déplace l'équilibre en faveur du S

Conséquences pour le patient : Le médicament diminue l'affinité de la GOD pour le glucose. Le dosage peut être sous-évalué si la réaction n'est pas totale.

IV. Importances métaboliques de la régulation de la glycémie**Q15**

4-Glycolyse

5-Glycogénogenèse/Glycogénolyse

6-Biosynthèse des acides gras

Q16

D-glucopyranosyl α (1→4)_n + Pi → D-glucopyranosyl α (1→4)_{n-1} + glucose 1P

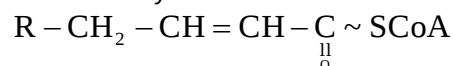
Q17

Formules chimiques des trois molécules

A - transenoylCoA

B - H₂O

C - 3-cetoacylCoA



Bilan moléculaire d'un tour



Devenir de l'acétylCoA : Oxydation complète en CO₂ par le cycle de Krebs et production d'énergie.

Q18

Calcul du bilan énergétique de la dégradation de l'acide stéarique par la β -oxydation.

$$(8 \times 2) + (8 \times 3) - 2 = 38 \text{ ATP}$$

Si diabète : diminution insuline

diminution entrée glucose dans les cellules cibles

diminution glycolyse → diminution pyruvate → diminution acétylCoA → diminution cycle de Krebs

↳ Moins d'énergie produite

Donc la dégradation des AG permet de compenser cette diminution d'énergie disponible pour la cellule.

Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2017

Surveillance des bactéries multirésistantes en milieu hospitalier

Q1- D'après l'alignement, il existe 98 % d'identité avec une souche *E. coli*. Supérieur à 97% donc identification du genre *Escherichia* mais inférieur à 99% donc douteux pour l'espèce. Il est donc nécessaire d'utiliser une méthode permettant une comparaison plus globale de la souche afin de l'identifier formellement

Q2- T_m homoduplex = 79 °C T_m hétéroduplex = 76 °C $\Delta T_m = 3$ °C
 ΔT_m inférieur à 5 °C et pourcentage d'hybridation supérieur à 70 % donc même espèce.

Q3- Gènes impliqués dans la conjugaison : permet la transmission horizontale du plasmide à d'autres bactéries.

Gènes impliqués dans la formation de pili : favorise les phénomènes d'adhésion aux surfaces et aux tissus vivants par la mise en place de pili donc favorise la persistance dans l'environnement hospitalier.

Q4- Selon les appareils on peut régler le volume d'air à aspirer, le temps pour réaliser l'aspiration, le débit...

Pour satisfaire le protocole (1m³ et débit maxi de 50 L/min). En 25 minutes, il faut régler le débit à 40 L/min, il n'y aura pas de turbulences car cette valeur est inférieure à 50 L/min.

Q5- Le milieu comporte des sels biliaires, agents inhibiteurs des Gram⁺ et un chromogène (BCIG) qui une fois clivé par la glucuronidase d'*E.coli* permettra d'obtenir une coloration spécifique des colonies permettant son identification.

Q6- Le thiosulfate de sodium est un neutralisant qui arrête donc l'action du désinfectant, permettant le dénombrement des bactéries survivantes après le temps de contact. L'étape de rinçage a le même but : elle élimine le désinfectant sur filtre en le rinçant (et permet aussi de récupérer toutes les bactéries contenues dans le tube).

Q7-

$$N \text{ UFC/cm}^2 = \frac{Nb_{\text{UFCdénombré}} \times V_{\text{diluant}}}{V_{\text{inoculum}} \times \text{Surface à traiter} \times \text{dilution liée à la neutralisation}}$$

$$N \text{ UFC/cm}^2 = \frac{5 \times 10}{1 \times 25 \times 1/10} = 20 \text{ UFC/cm}^2 = 2,2 \cdot 10^1 \text{ UFC/m}^2$$

Q8- Protocole 1 : Salle de consultation (zone 2) : 80 UFC/m³ < valeur limite de 100 UFC/m³

Couloir du service (zone 3) : 4 UFC/m³ < valeur limite de 10 UFC/m³

Bloc (zone 4) : 0 UFC/m³ < valeur limite de 5 UFC/m³.
 → conformité pour les 3 essais.

Protocole 2 : Salle de consultation (zone 2) : $2,2 \times 10^1 \text{ UFC/cm}^2 > \text{valeur limite de } 2 \text{ UFC/cm}^2$

Couloir du service (zone 3) : $2,4 \times 10^1 \text{ UFC/cm}^2 > \text{valeur limite de } 0,2 \text{ UFC/cm}^2$

Bloc (zone 4) : $2,0 \times 10^1 \text{ UFC/cm}^2 > \text{valeur limite de } 0,2 \text{ UFC/cm}^2$
 → non conformité pour les 3 essais.

E.coli : la souche est détectée dans tous les locaux et sur toutes les surfaces testées après nettoyage – désinfection. La concentration en *E. coli* est supérieure aux critères de flore totale donc est forcément trop élevée.

La pollution de l'atmosphère des locaux est bien maîtrisée, il n'y a pas d'action correctives à mettre en œuvre.

Sur les sols et surfaces, les résultats flore totale ne sont pas satisfaisants et *E.coli* est retrouvé systématiquement.

Actions correctives (2 attendues) : le désinfectant utilisé n'est pas efficace pour maîtriser la pollution microbiologique, notamment sur *E.coli*, il faut donc le remplacer ou augmenter la concentration, le temps d'action ou la fréquence de nettoyage, ou utiliser un mélange de 2 produits synergiques.

Q9- Étapes de formation des biofilms :

- adhésion (réversible puis irréversible) de micro-organismes sur une surface,
- production d'exopolymères de surface par les micro-organismes formant une matrice de protection contre les procédures de bionettoyage,
- développement des micro-organismes au sein de cette matrice, formant des micro-colonies dont l'épaisseur augmente,
- libération de microorganismes sources de contaminations.

Q10- L'ATPmétrie est une méthode qui permet de mesure la quantité d'ATP.

Le système luciférine-luciférase transforme l'énergie chimique de l'ATP en lumière.

Il y a proportionnalité entre les RLU mesurées et la quantité d'ATP, elle-même étant liée au nombre de cellules vivantes.

Il est donc possible de détecter et quantifier la présence de microorganismes grâce à un étalonnage.

Q11- Contamination artificielle d'une surface = condition simulant les biofilms hébergeant la souche d'*E.coli* que l'on souhaite détecter et permettant l'obtention de valeurs expérimentales pour la calibration.

Réactif de lyse cellulaire = permet d'extraire l'ATP des cellules afin de pouvoir le faire réagir avec les réactifs d'ATPmétrie.

Q12- Limites de quantifications inférieures ou limite de détection :

- environ 10^2 UFC/cm² fournisseur 1
- environ 1 UFC/cm² fournisseur 2

Limites de quantification supérieures :

- environ 10^7 UFC/cm² fournisseur 1
- proche de 10^5 UFC/cm² fournisseur 2.

L'objectif de l'hôpital est de détecter toute contamination potentielle, donc même la plus infime, et de pouvoir quantifier. Le fournisseur 2 propose la méthode avec la limite de détection la plus faible puisqu'elle permet de quantifier pour de très faibles contaminations : on retient cette méthode.

Q13- Le désinfectant ayant une action tensioactive, il agit principalement au niveau des phospholipides qu'il désorganise : cela entraîne des perforations des membranes et des pertes de contenu cellulaire, d'où un effet bactéricide.**Q14- Tableau de mode opératoire :**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volume Bouillon Mueller Hinton (μL)	50	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Volume désinfectant (μL)	0	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V redistribué du tube précédent (μL)	-	-	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50*
Volume Inoculum (μL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Concentration finale en désinfectant (%)	0	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10	0,05

* Rejeter 50 (μL)

Q15- La CMI correspond à la plus petite concentration en désinfectant inhibant toute croissance visible de la souche. Le puits présentant une concentration en désinfectant de 0,2% ne présente donc pas de croissance visible de la souche (pas de trouble) contrairement au puits suivant correspondant à une concentration de 0,10%.

Q16- Analyse : d'après la boîte témoin, à la dilution 10^{-5} (qui correspond à une réduction du nombre de bactéries de l'inoculum pur de 10^5 fois), il y a absence de colonies au niveau de la strie.

La concentration en désinfectant entraînant le même résultat correspond donc à la CMB. Après lecture de la seconde boîte, la plus petite concentration entraînant l'absence de colonie sur la strie est de 0,2% soit une **CMB = 0,2 %**.

D'après le document n°9, la concentration d'utilisation minimale préconisée par le fournisseur est de 0,25 %.

Conclusion : les résultats montrent une CMI et une CMB vis à vis de la souche multirésistante égale à 0,2 % ; $0,25 > 0,20$ %, le nouveau désinfectant APESIN Clean Bacto® est donc validé et devrait permettre d'éliminer la souche lorsqu'il est utilisé à la concentration usuelle.

Q17- Les phages du cocktail sont lytiques. Ils détruisent les bactéries par lyse et se propagent de proche en proche aux autres bactéries voisines. Dans cette zone d'action du phage, les bactéries ne se développent donc pas et on obtient une zone de clarification car exempte de culture.

Q18- Phages témoins = obtention d'une zone de lyse pour les phages 1 et 5 seulement, ils sont actifs sur la souche d'*E.coli* testée. Les autres phages ne sont pas actifs sur la souche d'*E.coli* testée.

Cocktail de phages = large zone de lyse → le cocktail phagique est efficace sur la souche de *E.coli* testée. On suppose une action conjointe synergique ou additive.

Proposition d'hypothèse cohérente pour expliquer que certains phages du cocktail entraînent une lyse et d'autres non, notion de lysotype : pas de site d'adhésion complémentaire sur la bactérie, système de restriction bactérien (endonucléase) qui détruit l'acide nucléique du phage après injection, etc.

Q19- Désinfectant chimique :

- avantage = action rapide pour réduire une population d' *E.coli*
- inconvénient = l'action n'est pas totalement bactéricide. Il y a une diminution de 4 log de la population mais il reste des bactéries survivantes.

Désinfectant phagique :

- avantage = effet totalement bactéricide avec destruction totale de la souche testée,
- inconvénient = temps d'action plus important pour éliminer significativement la souche.

Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2017

Études associées à la production d'un riz génétiquement modifié

1 – Étude de l'efficacité insecticide de la toxine Btm

Q1 - La DL_{50} correspond à la quantité de toxine (ici en ng/puits) nécessaire pour obtenir 50 % de mortalité chez les larves testées. On lit donc cette valeur sur la courbe en se plaçant en ordonnée à 50 %.

Q2 - La toxine Bt native est efficace sur la souche sensible et inefficace sur la souche résistante.

La toxine modifiée est active sur les souches sensibles et résistantes.

DL_{50} de la toxine mutée (10 -100 ng par puit) est supérieure à la DL_{50} de la toxine native (1 ng par puit) donc la toxine mutée est moins efficace que la toxine native.

La toxine mutée est moins efficace que la toxine native mais elle est active sur la souche résistante.

2 – Production et caractérisation de riz exprimant la toxine recombinante mutée

Q3 - (Le plasmide utilisé (**pWRG1515**) contient les gènes codant pour l'hygromycine B phosphotransférase (*hph*) et la bêta-glucuronidase (*gusA*) sous le contrôle d'un promoteur fort.

Le gène *hph* est un marqueur de sélection. En effet, en présence d'hygromycine, seuls les explants (cals) ayant intégré ce gène pourront poursuivre leur développement dans le milieu A puisque l'enzyme Hph inactive l'hygromycine (antibiotique inhibant la synthèse protéique).

Le gène *gusA* quant à lui est un gène rapporteur car il permet de mettre en évidence les cellules ayant incorporé le plasmide : en présence du substrat X-Gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-glucuronide), l'enzyme conduit à l'apparition d'un précipité insoluble de couleur bleue permettant de détecter les cellules la synthétisant.

Q4 - Le **SDS** est un **détergent** qui déstabilise la membrane bactérienne, **libérant ADN** et protéines dans la solution. La **soude** permet d'obtenir un **pH alcalin**, elle favorise la lyse et permet la précipitation de l'ADN chromosomique de haut poids moléculaire qui est dénaturé .

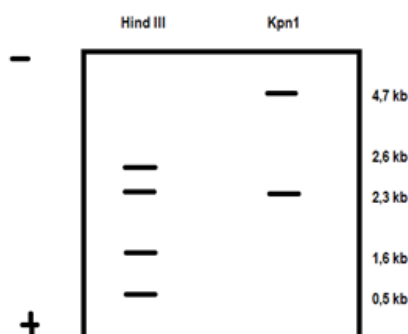
A l'étape 3, adsorption de l'ADN plasmidique sur la colonne (de Silice).

L'**éthanol** permet un lavage et libère la majorité des molécules adsorbées dans la colonne à l'exception de l'ADN plasmidique.

Q5 -

n° tube	Solution d'ADN du plasmide pWRG1515 à 25 ng.µL ⁻¹	Tampons 10X	Eau bidistillée stérile	HindIII à 10 U/µL	KpnI à 4 U/µL
1	4 µL	2 µL	13 µL	1 µL	/
2	8 µL	2 µL	7,5 µL	/	2,5 µL

Q6 - Électrophorégramme attendu



Q7 - Les milieux présentés contiennent :

	Milieu A	Milieu B
<u>Des sels minéraux</u>	Les sels minéraux sont deux fois plus concentrés dans A que dans B. Les sels minéraux sont fournis en plus grande quantité car le système d'absorption racinaire est absent sur l'explant.	
<u>Glucide/Vitamines/pH/agar</u>	Même composition	
<u>Phytohormones :</u>	A contient une auxine (AIA) et une cytokinine (BA) en quantité égale, formation d'un cal	Auxine seule, favorise l'enracinement

Q8- La réaction de PCR nécessite :

- La matrice d'ADN génomique extrait des feuilles de plants transgéniques
- Les sondes oligonucléotidiques (ou primers, ou amorces) « forward » et « reverse »
- Du tampon pour la PCR 1X
- **Du MgCl₂ (si absent du tampon)**
- Des dNTPs
- La Taq polymérase.

L'analyse par migration électrophorétique des produits de PCR sur gel d'agarose montre que, pour - ***le contrôle sans ADN (contrôles négatifs) il n'y a aucune bande : Pas de contamination.**

***les réactions utilisant de l'ADN de plants non transgéniques : aucune bande : pas d'amplification non spécifique.**

*pour **contrôle d'efficacité de PCR** (ADN de btm), (notion de témoin positif accepté) on **observe une bande** légèrement au-dessus du standard 500kb ce qui est cohérent avec l'amplicon attendu avec les amorces utilisées (600kb).

Les contrôles – et le contrôle de migration étant validés, on peut analyser les résultats obtenus.

Pour les 10 plants testés : **on retrouve une bande** similaire à celle obtenue dans le contrôle de migration soit une bande à **600pb**: **les 10 plants présentent donc** (à un nombre de copies variable) **le gène de la toxine Bt dans leur génome.**

3 – Étude de l'effet immuno-toxique de la consommation du riz génétiquement modifié

Q9 - Caséine + lectine PHA-E + Acl de rat spécifique de la lectine + AclI de souris (conjugué anti-Acl couplé à la HRP) + TMB → P (précipité bleu).

Q10 - Plusieurs témoins négatifs sont possibles

Étape	Témoin positif	Témoin négatif	Témoin négatif	Témoin négatif
1	lectine PHA-E coatées ou toxine Btm coatées	lectine PHA-E ou toxine Bt coatées	tampon	lectine PHA-E ou toxine Bt coatées
2	Lavage			
3	Saturation puis lavage			
4	sérum de rat immunisé avec la lectine PHA-E ou sérum de rat immunisé la toxine Bt	sérum de rat non immunisé ou tampon PBS	sérum de rat immunisé avec la lectine PHA-E ou la toxine Bt	sérum de rat immunisé avec la lectine PHA-E ou la toxine Bt
	Lavage			
5	conjugués anti-anticorps de rat-HRP	conjugués anti-anticorps de rat-HRP	conjugués anti-anticorps de rat-HRP	tampon
	Lavage			
6	Révélation			

Q11 -**Lectine PHA-E :**

- ✓ IgM : aucune différence significative par rapport au contrôle
- ✓ IgG1: les résultats sont significativement différents de ceux des contrôles → forte augmentation des taux d'IgG1 spécifiques de la lectine. Il n'y a pas d'effet dose-dépendant pour les IgG1.

On en conclut qu'il y a une RI spécifique contre la lectine PHA-E d'où un effet immuno-toxique, effet attendu. Expérience d'action immunotoxique à laquelle on pourra se référer.

Toxine Btm :

- ✓ IgM : aucune différence significative par rapport au contrôle
- ✓ IgG1 : pas de différence significative avec le régime au riz modifié

seul le résultat obtenu avec le riz contrôle + 0.1% de Bt_m purifiée est significativement augmenté.

On en conclut que seule la toxine libre à 0,1% entraîne une production d'Ac spécifiques.

Q12 - Il faudrait pouvoir doser la quantité de toxine Bt présente dans la ration de riz transgénique Bt utilisée dans l'étude.

Le dosage de la toxine Bt dans la ration de riz transgénique utilisée dans l'étude permettrait de savoir si la différence notée entre le résultat obtenu avec le riz GM et celui obtenu avec le riz contrôle + 0.1% de Bt est lié à une différence quantitative en Bt ou à une absorption faible de la toxine exprimée dans le riz transgénique.

Éléments de corrigé de sciences et technologie bioindustrielles 2017

MISE AU POINT D'UNE PIZZA DE QUALITE SUPÉRIEURE

Q1 - Type est relatif au taux de cendres

Q2 - Les 2 paramètres sont : L et W

La pâte doit être fine donc extensible donc : L élevé

La pâte ne doit pas trop lever donc : W pas trop élevé

Toutes les farines ont $W > 220 \times 10^{-4}$ J/g donc bonne qualité boulangère.

On peut éliminer F1 car L faible et W élevé.

Remarque :

LW de F1 = 0,286

F2 = 0,327

F3 = 0,300

F4 = 0,312 F2 semble le meilleur compromis.

D'autres réponses sont possibles selon le paramètre privilégié dans le raisonnement.

Q3 - Si ajout d'acide ascorbique on remarque sur le document 4 que W augmente et donc la pâte sera plus levée et moins extensible. Donc on ne rajoutera pas d'acide ascorbique.

Q4 - Pour l'étalon on trouve $W_{\text{exp moyen}} = 302,8 \times 10^{-4}$ J/g

Or $W_{\text{ref}} = 289,9 \times 10^{-4}$ J/g

Donc le biais est de $|W_{\text{ref}} - W_{\text{exp moyen}}| = |289,9 - 302,8| \times 10^{-4}$ J/g = $12,9 \times 10^{-4}$ J/g

Cette valeur est supérieure à l'incertitude ($10,4 \times 10^{-4}$ J/g) donc alvéographe non conforme.

Q5 - Pour réduire la population, de $2 \cdot 10^4$ à 1 microorganisme.g⁻¹, il faut appliquer un temps

$t_{75} = n \times D_{75}$.

•Calcul de D_{75} :

$$\log(D_{75} / D_{70}) = - (75 - 70) / 7$$

$$D_{75} / D_{70} = 10^{-(75 - 70) / 7}$$

$$D_{75} = D_{70} \cdot 10^{-5/7} = 0,58 \text{ min}$$

•Calcul de n : $n = \log(N_0/N) = \log 2 \cdot 10^4 = 4,3$

Donc $t_{75} = n \cdot D_{75} = \log(2 \cdot 10^4) \times 0,58 \text{ min} = 2,49 \text{ min}$ (au lieu de 3,00 min)

Q6 - Pour passer d'un temps de traitement de 3,00 à 2,49 min, il faut augmenter le débit dans le chambreur de l'échangeur ou diminuer la longueur totale de l'échangeur.

Q7 - Les deux fumages sont différents par leur goût et ne présentent pas la même qualité sanitaire :

fumage traditionnel (présence de substances toxiques émanant de la fumée) fumage par nébulisation (faible taux de substances toxiques).

Q8 - Les teneurs maximales autorisées sont de 2 µg/kg pour le benzo[a]pyrène
et de 12 µg/kg pour la somme des 4 HAP

Les pics obtenus par HPLC pour

Benzo[a]pyrène (pic n°8) est de : 1,6 µg/kg (calcul $T_{BaP} = \frac{A_{ech}}{A_{ét}} \cdot 10$) < 2µg/kg

Calculs des teneurs des 4 HAP :

4 HAP (pics 8+ 2+3+6) est de : 1,6+ 1,1 +4,5 + 3,7 = 10,9 µg/kg < 12 µg/kg

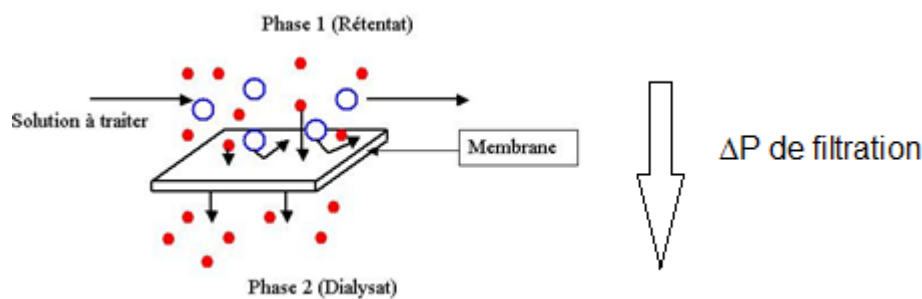
Donc l'entreprise peut utiliser les lardons fumés comme ingrédients de la SURPIZZ car ils répondent aux critères autorisés par le Règlement (UE) n°835/2011 de la Commission du 19 août 2011

Q9 - 2 spécificités de l'AOP : produit issu d'un terroir et fabriqué selon une recette traditionnelle

Mozzarella : issue de la région de la Campanie, du Latium, des Pouilles, et de Molise.

Recette : lait cru de bufflonne, non affiné, caillé trempé dans l'eau chaude puis filé.

Q10 - Schéma ultrafiltration



Le rétentat contient les protéines qui ne peuvent franchir la membrane = fraction d'intérêt

Remarque : dialysat ou filtrat ou perméat

Q11 - Analyse

D'après le document , lorsque la concentration des MAP augmente, on observe :

- pas d'influence sur le temps de prise du lait mais
- diminution du temps d'organisation du gel
- augmentation de la fermeté du gel.

Justification

L'ultrafiltration retient les protéines du lait (= concentration en protéines). Elle entraîne donc une augmentation de la teneur en matières protéiques azotées (MAP) et donc ainsi favorise la fabrication du fromage par action sur la formation du gel et sa fermeté.

Q12 - Choisir la colonne "critère à la distribution"

FMA 30 °C : Non significatif pour les produits à base de pâte à pain non cuit (pizza fraîche)

Flore lactique : pas à rechercher car FMA pas recherchée

Rapport FMA / Flore lactique : Non calculé

Entérobactéries 37 °C (Non retenu car produit mis sur le marché contenant du fromage)

E. coli : Non retenu car aucun critère à la distribution

Staphylocoques coagulase + : 10^2 microorganismes (fromage au lait cru)

Clostridium perfringens : 30 microorganismes (lardons)

Bacillus cereus : 500 microorganismes car produit mis sur le marché est à base de féculents (pâte) et légumes cuits (tomates).

Salmonella : absence dans 25 g

Listeria monocytogenes : absence dans 25 g.