

# ANNALES

## BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES

Sessions 2010 et 2011

Editions UPBM – EDILION  
Lycée de la Martinière  
Avenue Andréï SAKHAROV  
69339 LYON Cedex 9  
<http://www.upbm.org>

Les sujets des annales du BTS Bio Analyses et Contrôles des années 2010 et 2011 ont été collectés par Michèle ROBLIN et Catherine POCHE et pour les sujets de Biochimie, Microbiologie, Biologie Cellulaire et Moléculaire et Sciences et Technologies Bio-Industrielles ont été fournis sous forme numérisée par Monsieur Jean Pascal DUMON IA-IPR que nous tenons à remercier pour cette précieuse collaboration.

Nous tenons également à remercier les professeurs d'enseignement général et technologique qui ont participé aux propositions de corrigés et/ou à leur relecture :

Mesdames BURON MOUSSEAU, EVEN, GERAULT, NOSSEREAU, SAKR et WINUM

Messieurs BOGUE, DURAND, TOKARSKI

Il est important de signaler que les sujets et les propositions de corrigé ne prennent pas en compte :

- **la nouvelle réglementation concernant l'étiquetage des produits chimiques (SGH) pour les sujets de 2010**
- **les recommandations concernant les vitesses de catalyse et activités enzymatiques (Opéron n°56 - 2010)**

ISBN 978-2-910069-68-1



Photographies de couverture (Catherine POCHE – Bruno DURAND)

Epithéliums végétaux : feuille de persil avec stomates et fleur de fuchsia

# Règlement d'examen

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

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

# Table des matières

## Année 2010

Sujet d'Anglais	5
Sujet de Mathématiques	7
Sujet de Sciences physiques et chimiques	11
Sujet de Biochimie	17
Sujet de Microbiologie	27
Sujet de Biologie cellulaire et moléculaire	35
Sujet de Sciences et Technologies Bio Industrielles	41
Sujet de Techniques de Biochimie	49
Sujet de Techniques de Microbiologie 1 <sup>ier</sup> Jour	59
Sujet de Techniques de Microbiologie 2 <sup>ième</sup> Jour	70
Sujet de Techniques de Biologie Cellulaire et Moléculaire	78
Eléments de corrigé d'Anglais	82
Eléments de corrigé de Mathématiques	83
Eléments de corrigé de Sciences Physiques	86
Eléments de corrigé de Biochimie	89
Eléments de corrigé de Microbiologie	95
Eléments de corrigé de Biologie Cellulaire et Moléculaire	100
Eléments de corrigé de Sciences et Technologies Bio Industrielles	103

## Année 2011

Sujet de Mathématiques	107
Sujet de Sciences physiques et chimiques	110
Sujet de Biochimie	118
Sujet de Microbiologie	128
Sujet de Biologie cellulaire et moléculaire	137
Sujet de Sciences et Technologies Bio Industrielles	144
Sujet de Techniques de Biochimie	150
Sujet de Techniques de Microbiologie 1 <sup>ier</sup> Jour	163
Sujet de Techniques de Microbiologie 2 <sup>ième</sup> Jour	173
Sujet de Techniques de Biologie Cellulaire et Moléculaire 1 <sup>ier</sup> jour	178
Sujet de Techniques de Biologie Cellulaire et Moléculaire 2 <sup>ième</sup> jour	186
Eléments de corrigé de Mathématiques	188
Eléments de corrigé de Sciences Physiques	192
Eléments de corrigé de Biochimie	196
Eléments de corrigé de Microbiologie	202
Eléments de corrigé de Biologie Cellulaire et Moléculaire	206
Eléments de corrigé de Sciences et Technologies Bio Industrielles	209

## Sujet d'Anglais

**Durée : 2 heures - Coefficient: 2**

**L'usage de la calculatrice est interdit.**

**L'usage d'un dictionnaire bilingue est autorisé**

### **Now food police plan to swoop on your fridge**

**By Mark Reynolds**

Squadrons of "Food Police" are to start knocking on doors to lecture families on how to feed themselves properly.

In a move branded "Government nannying at its worst", the teams - operated by councils across the country - will be recruited to visit homes at meal times before handing out advice on diet and how to reduce waste.

Eight thousand Food Police, or Love Food Champions under their official title, will be paid up to £8.50 an hour of taxpayers' cash.

And if a pilot scheme is successful, the idea could be rolled out across the country, costing the taxpayer tens of millions of pounds.

Employed by a private contractor, the teams will advise householders on how to plan their shopping carefully so that they do not over-cater.

They will also explain the difference between "best before", "use by" and "sell by" dates, before giving out tips on home composting. Advice will be given on how to cook with leftovers and how best to use your freezer.

In addition to knocking on doors, the officials will leave a leaflet at every address they visit. The project is part of the Waste and Resources Action Programme's Love Food Hate Waste campaign, which has so far cost £4 million. Critics remain unimpressed.

Peter Ainsworth, Shadow Environment Secretary, said: "You might have thought, at a time of economic hardship, that spending public money on stating the obvious is hardly a priority. With household budgets under pressure, most people are looking to spend wisely and waste less anyway."

TaxPayers' Alliance chief executive Matthew Elliott said: "This is a prime example of excessive Government nannying and a waste of public money."

The programme claims food waste has a significant environmental impact, in terms of the carbon generated to grow, transport and package items and the cost of having to dispose of them.

It says stopping food waste could reduce the annual emission of carbon dioxide by 18 million tons the same as taking one in five cars off the roads.

The scheme is also designed to fight obesity and poor diet. In a seven-week trial, eight thousand officials will call at 24,500 homes, giving advice and recipes.

The pilot scheme, costing £30,000, may be extended nationwide if seen as a success. It will initially cover six council areas in Worcestershire and Herefordshire.

A Department of Health source said: "It's only by knocking on doors you can find out what people have for tea and offer healthy tips."

Tim Burns, from Waste Watch, the contractor responsible, said: "Food waste has a high impact on climate change and we can all do something about it."

He defended the amount of paper used in the free booklet, saying it would help to reduce waste overall.

*Daily Express*, January 26, 2009

## **QUESTIONS**

### **I. COMPRÉHENSION (10 points)**

1. Faire un compte rendu de l'article en français en mettant en évidence les idées essentielles (100 mots  $\pm$  10%).

2. Traduire en français de la ligne 28, *The scheme is also designed...*, à la ligne 30, ... *seen as a success*.

II. EXPRESSION EN LANGUE ANGLAISE (10 points)

Answer the following questions in English.

1. Would you agree with the government interfering in your private life as far as your food diet were concerned? (60 words  $\pm$  10%)
2. Where do you think young people should learn about what is good and healthy for them? (100 words  $\pm$  10%)

Le candidat précisera le nombre de mots utilisés à la fin de chaque réponse.

## Sujet de Mathématiques

**Durée : 2 heures – Coefficient : 2**

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

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

Le formulaire de mathématiques est joint au sujet.

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

### EXERCICE 1 (10 points)

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

#### A. Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) :  $y' + 2y = 2e^{-2t}$ .

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

1. Déterminer les solutions sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  de l'équation différentielle

$$(E_0) : y' + 2y = 0$$

2. Soit  $h$  la fonction définie sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  par :  $h(t) = 2t e^{-2t}$ .

Démontrer que  $h$  est une solution particulière de l'équation différentielle (E).

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

4. Déterminer la solution  $f$  de l'équation différentielle (E) qui prend la valeur 1 pour  $t = 0$ .

#### B. Étude d'une fonction.

Soit la fonction  $f$  définie sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  par :  $f(t) = (1 + 2t) e^{-2t}$ .

On désigne par  $C$  la courbe représentative de la fonction  $f$  dans un repère orthogonal.

1. Déterminer  $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t)$ . Que peut-on en déduire pour la courbe  $C$  ?

$t \rightarrow +\infty$

2. On désigne par  $f'$  la fonction dérivée de la fonction  $f$ .

a. Vérifier que pour  $t$  appartenant à l'intervalle  $[0; +\infty[$  :  $f'(t) = -4te^{-2t}$ .

b. En déduire le signe de  $f'(t)$  pour  $t$  appartenant à l'intervalle  $[0; +\infty[$  et donner le tableau de variation de la fonction  $f$  sur l'intervalle  $[0; +\infty[$ .

3.

a. Compléter le tableau de valeurs donné en **annexe (page 6)**. Arrondir à  $10^{-2}$ .

b. Tracer la courbe  $C$  dans le repère donné en **annexe (page 6)**.

#### C. Application de la partie B

Dans les régions de production, on peut contrôler le taux de sucre des melons avec un réfractomètre à mesure rapide.

Le taux de défaillance du réfractomètre dans l'intervalle de temps  $[0; +\infty[$  peut être modélisé par la fonction  $g$  définie sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  par :  $g(t) = 1 - f(t) = 1 - (1 + 2t)e^{-2t}$ , où  $t$  est exprimé en heures et  $f$  est la fonction étudiée dans la partie B.

1. Dans cette question, on donnera les valeurs exactes puis les valeurs arrondies à  $10^{-2}$ .
  - a. Quel est le taux de défaillance du réfractomètre au bout d'une heure ?
  - b. Quel est le taux de défaillance du réfractomètre au bout de deux heures ?
2. Pour des raisons de fiabilité, on doit changer le réfractomètre lorsque le taux de défaillance est supérieur ou égal à 0,75.
  - a. Montrer que le taux de défaillance est supérieur ou égal à 0,75 lorsque  $f(t) \leq 0,25$ .
  - b. En utilisant la courbe représentative de la fonction  $f$  tracée en **annexe (page 6)**, déterminer graphiquement, à  $10^{-1}$  près, la durée d'utilisation du réfractomètre.  
On laissera les traits de construction apparents.

### **EXERCICE 2 (10 points)**

Les quatre parties de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.  
Une usine fabrique en grande quantité des récipients cylindriques pour le laboratoire.

#### **A - Loi normale**

Le couvercle d'un récipient est conçu pour avoir un diamètre de 60 millimètres.  
Il est non défectueux lorsque son diamètre, exprimé en millimètres, appartient à l'intervalle  $[59,93 ; 60,07]$ .  
On note  $X$  la variable aléatoire qui, à chaque récipient prélevé au hasard dans la production d'une journée, associe le diamètre, en millimètres, de son couvercle.  
On suppose que la variable aléatoire  $X$  suit la loi normale de moyenne 60 et d'écart type 0,03.  
Calculer la probabilité qu'un récipient prélevé au hasard dans la production ait un couvercle non défectueux. On arrondira à  $10^{-2}$ .

#### **B. Événements indépendants**

Les récipients fabriqués sont susceptibles de présenter deux défauts : un défaut au niveau de leur couvercle ou un défaut de contenance.  
On prélève un récipient au hasard dans la production d'une journée.  
On considère les événements suivants :  
 $E_1$  : «le couvercle du récipient prélevé est défectueux» ;  
 $E_2$  : «le récipient prélevé présente un défaut de contenance».

On suppose que les événements  $E_1$  et  $E_2$  sont indépendants.

On admet que :  $P(E_1) = 0,02$  et  $P(E_2) = 0,01$ .

Dans cette partie, on donnera les valeurs exactes des probabilités demandées.

1. Calculer la probabilité qu'un récipient prélevé au hasard dans la production d'une journée présente les deux défauts.
2.
  - a. Calculer la probabilité qu'un récipient prélevé au hasard dans la production d'une journée présente au moins un des deux défauts.

b. Calculer la probabilité qu'un récipient prélevé au hasard dans la production d'une journée ne présente aucun des deux défauts.

### C. Loi binomiale et approximation d'une loi binomiale par une loi de Poisson

On prélève au hasard 50 récipients dans un stock pour vérification de leur couvercle. Le stock est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 50 récipients.

On rappelle que la probabilité qu'un récipient prélevé au hasard ait un couvercle défectueux est égale à 0,02.

On considère la variable aléatoire  $Y$  qui, à tout prélèvement de 50 récipients, associe le nombre de récipients de ce prélèvement ayant un couvercle défectueux.

1. On admet que la variable aléatoire  $Y$  suit une loi binomiale. Déterminer les paramètres de cette loi.

2. Calculer la probabilité que, dans un prélèvement, un seul récipient ait un couvercle défectueux. On arrondira à  $10^{-2}$ .

3. On considère que la loi suivie par  $Y$  peut être approchée par une loi de Poisson.

a. Déterminer le paramètre  $\lambda$  de cette loi de Poisson.

b. On désigne par  $Y_1$  une variable aléatoire suivant la loi de Poisson de paramètre  $\lambda$ , où  $\lambda$  est la valeur obtenue au a.

En utilisant la loi suivie par  $Y_1$ , calculer la probabilité qu'au plus trois récipients d'un prélèvement aient un couvercle défectueux. On arrondira  $10^{-2}$ .

### D. Intervalle de confiance

Dans cette partie on s'intéresse à la contenance de chaque récipient, exprimée en centimètres cubes.

On prélève au hasard et avec remise un échantillon de 50 récipients dans un lot important.

Soit  $\bar{C}$  la variable aléatoire qui, à tout échantillon de 50 récipients prélevés au hasard et avec remise dans le lot, associe la moyenne des contenances des récipients de cet échantillon.

On suppose que  $\bar{C}$  suit la loi normale de moyenne inconnue  $\mu$  et d'écart type  $\frac{\sigma}{\sqrt{50}}$  avec  $\sigma = 0,06$ .

Pour l'échantillon prélevé, la moyenne obtenue, arrondie à  $10^{-2}$ , est :  $\bar{x} = 119,88$ .

Déterminer un intervalle de confiance centré sur  $\bar{x}$  de la moyenne  $\mu$  des contenances des récipients de ce lot, avec un taux de confiance supérieur ou égal à 95 %.

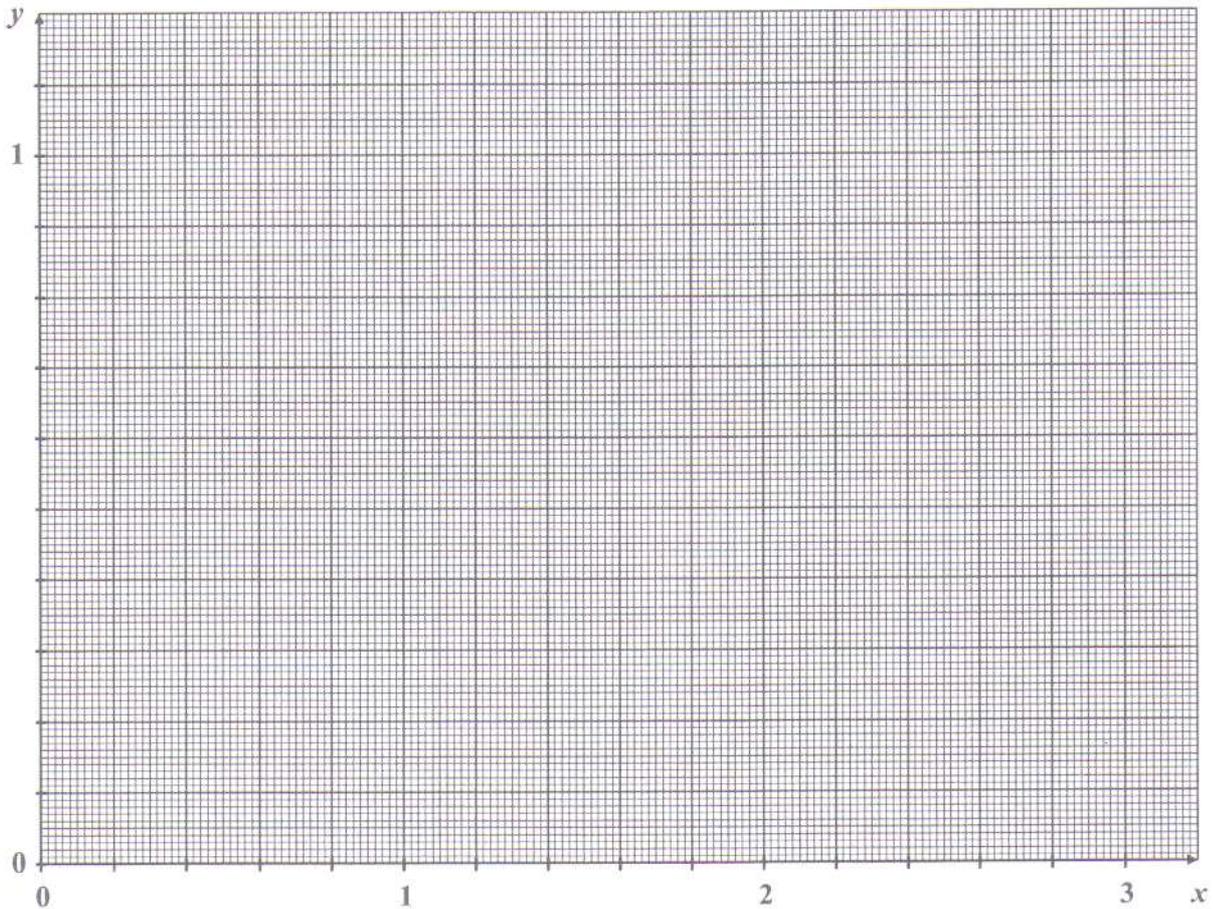
On arrondira à  $10^{-2}$  les bornes de cet intervalle.

**Annexe (à rendre avec la copie)**

Exercice 1, partie B, question 3

a. Tableau de valeurs (arrondies à  $10^{-2}$ ) de la fonction  $f$ 

$x$	0	0,5	1	1,5	2	3
$f(x)$						

B. Tracé de la courbe  $C$ 

## Sujet de Sciences physiques et chimiques

**Durée : 2 heures – Coefficient : 3**

**Usage autorisée de la calculatrice**

### A. Détecteur ionique de fumée (16 points)

L'américium, de symbole Am, est un radionucléide artificiel dont l'isotope 241 a été synthétisé pour la première fois par Glenn T. Seaborg en 1944. L'américium est instable: il décroît par désintégration  $\alpha$  en neptunium de symbole Np. L'américium 241 descend du plutonium 241 et constitue par conséquent un déchet radioactif dans les réacteurs nucléaires.

Plusieurs applications techniques font appel aux propriétés de l'américium 241. C'est le cas notamment des détecteurs ioniques de fumée qui contiennent une source d'américium (sous forme d'oxyde  $\text{AmO}_2$ ). Deux électrodes soumises à une différence de potentiel permettent de collecter le courant créé après ionisation de l'air des particules  $\alpha$  émises par la source. Lorsque la fumée pénètre dans l'espace inter-électrode, l'intensité de l'ionisation et donc celle du courant mesuré diminue. Cette variation déclenche le système d'alarme.

#### Données

*Demi-vie (ou période radioactive) de l'américium 241:  $T = 432$  ans*

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

*Constante de Planck :  $h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$*

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

*Masse molaire :  $M(\text{Am}) = 241 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$*

*Unités usuelles:*

*le curie :  $1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq}$*

*le gray :  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J}\cdot\text{kg}^{-1}$*

*l'électron-volt :  $1 \text{ eV} = 1,60 \cdot 10^{-19} \text{ J}$*

La détermination de la masse d'américium contenue dans la source d'un détecteur de fumée est explicitée dans les questions numérotées de 1 à 5.

1. Que représentent les nombres 95 et 241 dans la représentation symbolique suivante  ${}_{95}^{241}\text{Am}$  ?
2. Ecrire l'équation de la désintégration d'un noyau d'américium 241. Précisez la composition du noyau fils.
3. Montrer que la constante de désintégration radioactive  $\lambda$  vaut  $5,08 \cdot 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ .
4. Exprimer en béquerel l'activité  $A_1$  d'un échantillon de masse  $m = 1,00 \text{ g}$  d'américium 241. Cette activité représente l'activité massique de l'américium 241. Faire l'application numérique.
5. La documentation d'un détecteur de fumée indique que la source qu'il contient a une activité  $A_s$  de  $0,9 \mu\text{Ci}$ , soit  $3,3 \cdot 10^4 \text{ Bq}$ . En déduire la masse  $m_s$  d'américium contenue dans la source.  
L'impact radiologique sur un utilisateur situé près du détecteur est explicité dans les questions numérotées de 6 à 8.

6. Sachant que 36% des désintégrations de l'américium 241 s'accompagnent de l'émission d'un photon  $\gamma$  d'énergie  $E = 60 \text{ keV}$ , calculer, en joule, l'énergie d'un photon  $\gamma$ . Ce photon est-il plus ou moins énergétique qu'un photon de la lumière visible?

7. Les particules  $\alpha$  émises par l'américium sont très énergétiques (5MeV) mais ne sont pas dangereuses pour l'utilisateur dans la mesure où elles sont arrêtées par quelques centimètres d'air ou le plastique d'un détecteur.

Les rayons  $\gamma$  sont-ils arrêtés par le boîtier? Si non, comment pourrait-on s'en protéger?

8. La dose maximale reçue est évaluée dans cette question.

8.1 Déterminer le nombre de photons  $\gamma$  émis en moyenne par la source chaque seconde.

8.2 On montre que l'énergie  $W$  libérée par la source pendant une seconde et contenue dans le rayonnement  $g$  est de  $1,2 \cdot 10^{-10} \text{ J}$ . En supposant que toute cette énergie est captée par le corps de l'utilisateur (de masse  $m_u = 70 \text{ kg}$ ), déterminer la dose horaire en nGy.

8.3 Comparer ce résultat à la dose horaire moyenne reçue en France due à la radioactivité naturelle (tellurique, cosmique...) :  $91 \text{ nGy} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Remarque de culture générale, sans incidence sur la résolution des questions de cet exercice:

La loi dite Morange et Meslot, applicable en 2010, rend obligatoire la présence d'un détecteur de fumée de type photoélectrique dans chaque logement. Les modèles de type ionique sont aujourd'hui interdits à la vente et doivent être remplacés en raison de la complexité et du coût du retraitement des sources radioactives ainsi que du risque de leur dissémination dans l'environnement ;

### **B. Sédimentation d'un globule rouge (14 points)**

La vitesse de sédimentation (VS) est une mesure non spécifique de l'inflammation utilisée fréquemment comme test médical d'orientation.

Pour effectuer ce test, un échantillon de sang est placé dans un tube vertical, et la vitesse à laquelle les globules rouges tombent est reportée en  $\text{mm} \cdot \text{h}^{-1}$ .

En présence d'un processus inflammatoire, la teneur en fibrinogène du sang est élevée et induit une agglomération des globules rouges. Les globules rouges agglutinés en rouleaux sédimentent plus vite.

La vitesse de sédimentation qui, chez une personne normale est inférieure à 10 millimètre par heure, est donc augmentée dans un syndrome inflammatoire (rhumatisme, artérite temporale, syndromes infectieux...).

#### **Données:**

Rayon d'un globule rouge assimilé à une sphère :  $r = 2,0 \mu\text{m}$

Volume d'une sphère :  $V = (4/3) \cdot \pi \cdot r^3$

Masse volumique du globule rouge :  $\mu = 1,06 \cdot 10^3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$

Coefficient de viscosité du sang à la température de l'expérience :  $\eta = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ SI}$

Valeur de l'accélération de la pesanteur :  $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$

Expression de l'intensité de la force de frottement s'exerçant sur une sphère en mouvement dans un fluide:  $f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$

Intensité de la poussée d'Archimède : elle correspond à l'intensité du poids du volume de liquide déplacé (égal au volume de la particule entièrement immergée)

On se propose de déterminer la vitesse de sédimentation d'un patient qui présente des symptômes d'une éventuelle inflammation. Pour cela, on étudie la sédimentation d'un globule rouge, assimilé à une sphère, sous l'effet de la pesanteur.

1. Analyse des forces appliquées au globule

1.1 Déterminer, fonction des données, l'expression littérale de l'intensité de chacune des forces appliquées au globule rouge.

1.2 Représenter sur un schéma la direction et le sens de chacun des trois vecteurs force.

2. Etude dynamique

Le globule rouge est lâché à l'extrémité supérieure du tube d'analyse sans vitesse initiale. On pourra s'appuyer sur la deuxième loi de Newton (ou théorème du Centre d'Inertie ou Principe Fondamental de la Dynamique) dans les questions 2.1, 2.2 et 2.3, sans effectuer de calcul.

2.1 Le début du mouvement est-il uniforme, accéléré ou ralenti? Expliquer votre réponse brièvement.

2.2 Au bout d'un temps suffisamment long, l'accélération s'annule. Quelle est la force dont l'intensité a varié? Quelle est la nature du mouvement?

2.3 Montrer que lors de la phase rectiligne et uniforme, la vitesse est donnée par la relation:

$$v = \frac{2.r^2.g(\mu - \mu')}{9.\eta}$$

2.4 Calculer la valeur de  $v$  en  $\text{m.s}^{-1}$  puis en  $\text{mm.h}^{-1}$  et en déduire si le patient est dans une phase inflammatoire.

### **C. Dosage des ions sulfate dans une eau minérale (15 points)**

Les ions sulfates  $\text{SO}_4^{2-}$  sont présents dans de nombreux composés minéraux ou organiques aux applications diverses:

*le sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4$  entre dans la composition de la bouillie bordelaise, agent fongicide et bactéricide utilisé notamment en viticulture.*

*le sulfate de magnésium  $\text{MgSO}_4$  (ou sel d'Epsom ou encore sel amer) est utilisé comme agent thérapeutique, comme additif alimentaire.*

*le sulfate de calcium  $\text{CaSO}_4$  entre dans la composition du gypse, le constituant minéral du plâtre*

*etc...*

Les ions sulfates sont également présents dans les eaux, notamment les eaux de boisson. La composition ionique d'une eau détermine sa potabilité. On souhaite vérifier la concentration massique en ions sulfate dans une eau minérale, sachant que l'étiquette de la bouteille indique une concentration massique  $C = 1,2 \text{ g.L}^{-1}$ . A cette fin on effectue un dosage de l'eau étudiée par une solution aqueuse de chlorure de baryum ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $2 \text{ Cl}^-$ ). On utilise la propriété de très faible solubilité du sulfate de baryum  $\text{BaSO}_4$  dans l'eau. Lorsqu'une solution titrante contenant des ions baryum est ajoutée à l'eau minérale à doser contenant des ions sulfates, un précipité de  $\text{BaSO}_4$  se forme. On veut suivre le dosage par conductimétrie.

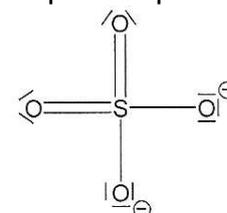
Le sujet traite de la structure de l'ion sulfate et du dosage conductimétrique de l'eau minérale étudiée par la solution aqueuse de chlorure de baryum.

## 1. Etude de l'ion sulfate

1.1 Donner les configurations électroniques de l'atome de soufre ( $Z=16$ ) et de l'atome d'oxygène ( $Z=8$ ) dans leur état fondamental.

1.2 Sachant que l'oxygène se trouve dans la 2<sup>ème</sup> période et dans la 16<sup>ème</sup> colonne de la classification périodique des éléments (déduire (à l'aide de la question 1.1) l'emplacement (période + colonne) du soufre dans la classification périodique. Argumenter la réponse.

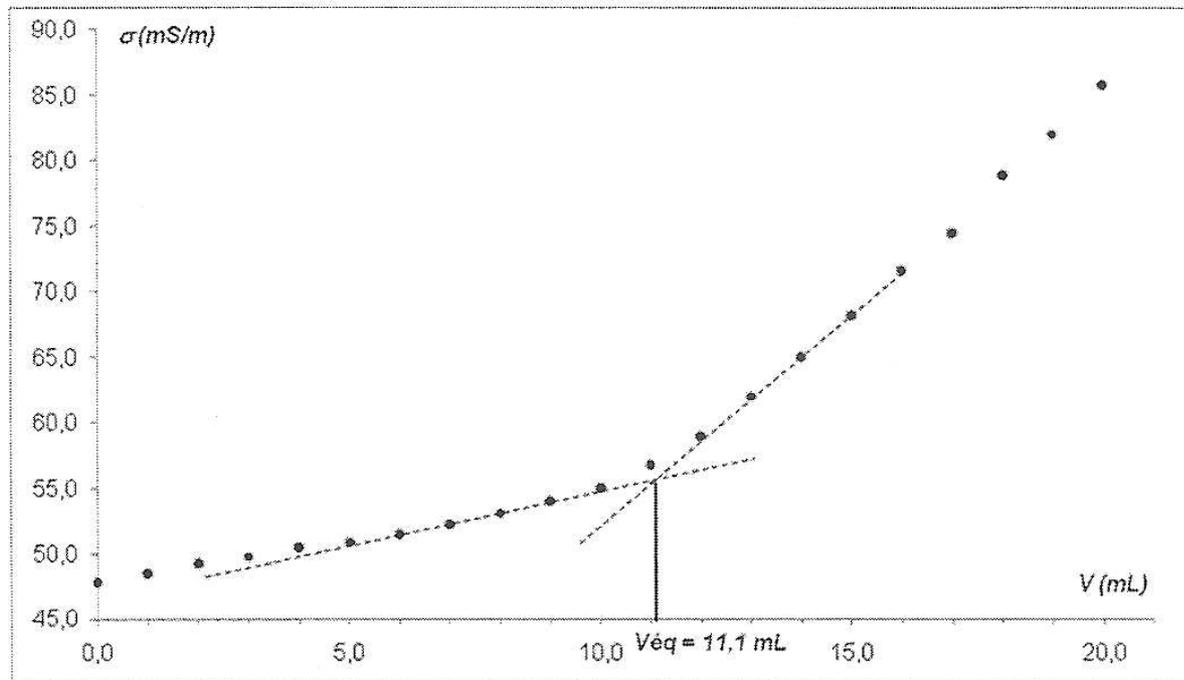
1.3 La structure de Lewis de l'ion sulfate est donnée ci-contre:



En appliquant les règles du modèle VSEPR (ou modèle de Gillespie) à l'ion sulfate, donner la géométrie autour de l'atome de soufre. Argumenter la réponse

## 2. Dosage conductimétrique des ions sulfate dans une eau minérale

Dans le cadre du dosage on négligera la très faible dissolution du solide  $\text{BaSO}_4$  dans l'eau. On place dans un bécher un volume  $V = 50$  mL d'eau minérale à doser, ainsi que 200 mL d'eau distillée. On dose les ions sulfate présents dans cette eau par une solution aqueuse de chlorure de baryum telle que  $[\text{Ba}^{2+}] = C_0 = 5,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . On relève la conductivité  $\sigma$  de la solution en fonction du volume de solution de chlorure de baryum ajouté. La courbe de dosage est donnée ci-dessous.



2.1. Si on avait choisi un bécher de 100 mL pour doser directement le volume  $V$  d'eau minérale, la cellule conductimétrique aurait été parfaitement immergée. Pourquoi a-t-on préféré un bécher de 500 mL et l'ajout d'eau distillée avant le dosage?

2.2. Le technicien doute de l'exactitude de la concentration de la solution de chlorure de potassium ( $K^+ + Cl^-$ ) utilisée pour étalonner le conductimètre. Le résultat risque-t-il d'être faussé?

2.3. Ecrire l'équation de la réaction mise en jeu lors du dosage et calculer sa constante d'équilibre (notée  $K$ ). Que peut-on en déduire?

2.4. Etablir l'expression littérale de la concentration  $[SO_4^{2-}]$  en ions sulfate dans l'eau minérale en fonction de  $V$ ,  $C_0$  et  $V_{eq}$ . Détailler le raisonnement.

2.5. Calculer la valeur de la concentration  $[SO_4^{2-}]$  en  $mol.L^{-1}$ .

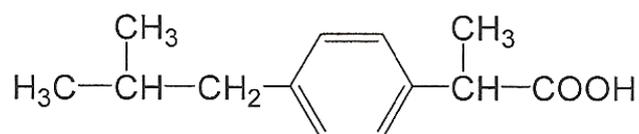
2.6. Le résultat de la question 2.5 est-il compatible avec la concentration indiquée sur la bouteille d'eau minérale:  $C = 1,2 g.L^{-1}$ ?

On donne  $M(SO_4^{2-}) = 96,1 g.mol^{-1}$

### D. synthèse de l'ibuprofène ( 15 points)

L'ibuprofène est un analgésique (anti-douleur) et un anti-inflammatoire au même titre que l'aspirine.

La formule semi-développée de l'ibuprofène est donnée ci-dessous :

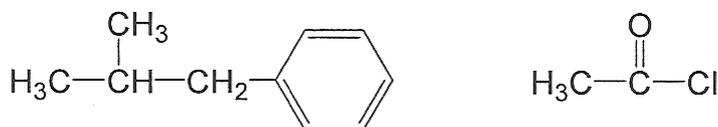


C'est le constituant actif de nombreux produits commerciaux: il fait partie des analgésiques en vente libre les plus répandus. La molécule a été découverte dans les années 1960 et a fait l'objet d'un procédé de synthèse breveté.

Plus tard, dans les années 1990, le procédé "vert" a pris le pas sur l'ancien procédé de synthèse. Dans le procédé "vert", le nombre d'étapes réactionnelles est réduit et les sous-produits des réactions sont valorisés.

Cet exercice propose une voie de synthèse de l'ibuprofène, inspirée des deux procédés de synthèse industrielle évoqués ci-dessus.

**Une première étape de synthèse consiste à faire réagir les réactifs (A) et (B) représentés ci-dessous, en présence de chlorure d'aluminium  $AlCl_3$  :**



(A)

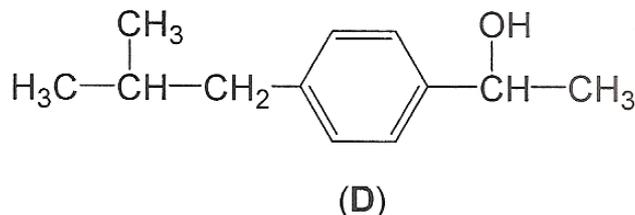
(B)

Un mélange de deux isomères est obtenu : (C) (majoritaire) et (C') (minoritaire).

1. Donner les noms des deux réactifs (A) et (B) en utilisant la nomenclature officielle.
2. Ecrire l'équation de réaction conduisant à l'isomère (C) (isomère le plus abondant)
3. Donner le nom de la réaction entre (A) et (B).

4. Expliciter les différentes étapes du mécanisme de cette réaction.

La deuxième étape de la synthèse est la réduction du composé (C) par le borohydrure de sodium  $\text{NaBH}_4$ . On obtient le composé (D) représenté ci-dessous:

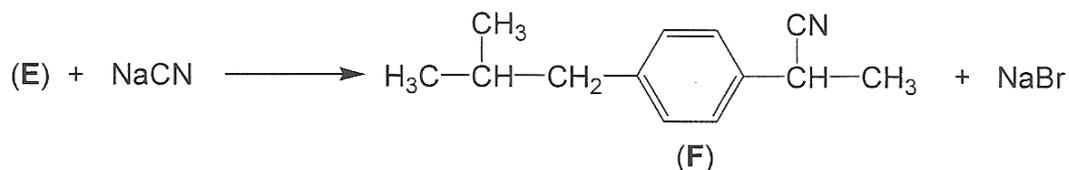


Lors de la troisième étape de la synthèse la molécule (D) est mise en présence de bromure d'hydrogène  $\text{HBr}$  : on observe la formation de plusieurs produits, notamment un composé (E) de formule brute  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{Br}$ .

5. Ecrire l'équation complète de la réaction en faisant apparaître la formule semi-développée de (E).

6. Parmi les mots suivants le(s)quel(s) pourrai(en)t qualifier la réaction de formation de (E): addition, substitution, élimination, électrophile, radicalaire, nucléophile.

La quatrième étape de la synthèse permet l'obtention du composé (F) par action du cyanure de sodium sur le composé (E), selon l'équation de réaction suivante :



7. Quel est le nom de la fonction organique apparue lors de la quatrième étape de synthèse et qui est présente par conséquent dans la molécule (F)?

8. Le cyanure de sodium  $\text{NaCN}$  est un composé ionique.

L'ion cyanure a pour formule  $[\text{C}\equiv\text{N}]^-$ . Expliquer pour quelle raison l'ion cyanure est une espèce nucléophile et pourquoi la réaction s'apparente à une substitution nucléophile.

La cinquième étape de la synthèse consiste en une hydrolyse acide à chaud de la molécule (F) qui conduit à l'ibuprofène.

9. L'ibuprofène peut exister sous formes de deux énantiomères. Expliciter cette affirmation.

10. Seul l'énantiomère de configuration absolue(S) de l'ibuprofène présente une activité thérapeutique. Représenter cet énantiomère en citant (sans les détailler) les règles utilisées.

Pour simplifier on pourra noter "Ar" le groupe comportant le noyau benzénique.

11. La séparation des deux énantiomères de l'ibuprofène étant délicate et coûteuse, ce médicament est souvent commercialisé sous forme d'un mélange équimolaire des deux énantiomères. Comment nomme-t-on un tel mélange ?

## Sujet de Biochimie

**Durée 3 heures – Coefficient 3**  
**Calculatrice autorisée**  
**Dictionnaire Anglais Français autorisé**

### LES AGROCARBURANTS

Les agrocarburants sont produits à partir de matériaux organiques non-fossiles. Il existe deux filières principales :

- la filière alcool,
- la filière huile et dérivés (biodiesel).

D'un point de vue écologique et social, ces filières sont controversées. Malgré tout, les recherches restent actives, car elles donnent des perspectives d'utiliser des réserves agricoles non alimentaires.

#### **1 - La filière alcool (36,5 points)**

L'alcool est produit à partir d'amidon et de cellulose.

**1.1** - L'amidon et la cellulose sont des homoglycanes de glucose, l'un de réserve et l'autre de structure (7,5 points).

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon est catalysée par des amylases : les  $\alpha$ -amylases catalysent l'hydrolyse des liaisons osidiques en milieu de chaîne ; les  $\beta$ -amylases catalysent l'hydrolyse de l'amidon en maltose à partir de son extrémité non réductrice. Ces amylases sont sans effet sur la cellulose.

**1.1.1** - Expliquer la distinction entre molécule de réserve et molécule de structure.

**1.1.2** - Quelles différences structurales existe-t-il entre l'amidon et la cellulose. Justifier la réponse par l'écriture chimique de l'enchaînement d'au moins trois résidus glucose. Expliquer l'absence d'effet des amylases sur la cellulose (représentation de Haworth exigée).

**1.1.3** - Sur la formule de l'amidon, localiser les extrémités non réductrice et réductrice.

**1.1.4** - Citer la classe et le numéro d'ordre des amylases dans la classification internationale.

**1.2** - Le glucose nécessaire à la production d'éthanol est obtenu à partir de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (10 points).

Trois souches de champignons filamenteux sont cultivées et testées pour leur activité cellulasique (**document 1**).

**1.2.1** - Expliquer le rôle du témoin activité (**document 1**).

**1.2.2** - Expliquer la réalisation du blanc réactif et indiquer son rôle.

**1.2.3** - Rappeler les conditions opératoires généralement utilisées pour mesurer une activité enzymatique.

**1.2.4** - La formule de la concentration d'activité catalytique cellulasique est la suivante :

$$C_{\text{cat}} (\text{U.mL}^{-1}) = 0,215.A.$$

**1.2.4.1** - Écrire la formule littérale exprimant la quantité de glucose apparu après mesure de l'activité cellulasique.

**1.2.4.2** - Justifier le facteur 0,215 de la formule de calcul de la concentration d'activité catalytique.

**Données** :

Une unité cellulase correspond à la quantité de cellulase faisant apparaître 1  $\mu\text{mole}$  de glucose par minute.

$$M_{\text{glucose}} = 180 \text{ g.mol}^{-1}$$

**1.2.5** - En déduire la formule littérale donnant l'activité totale de chaque milieu ( $A_T$  en U).

**1.2.6** - Exprimer littéralement cette activité par g de biomasse ( $A_{\text{biomasse}}$  en  $\text{U.g}^{-1}$ ). Réaliser l'application numérique pour les 3 souches étudiées. Commenter les résultats pour l'ensemble des souches.

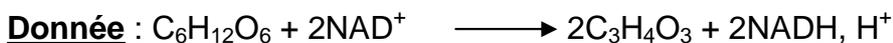
**1.3** - Le glucose, produit d'hydrolyse de l'amidon ou de la cellulose subit, sous l'action de levures du genre *Saccharomyces* une oxydation en acide pyruvique (8 points).

L'acide pyruvique subit ensuite une décarboxylation puis une transformation en éthanol.

**1.3.1** - Nommer la voie métabolique conduisant à la transformation du glucose en acide pyruvique.

**1.3.2** - Écrire la séquence réactionnelle conduisant à la transformation d'acide pyruvique en éthanol (nom des enzymes et formules chimiques exigés).

**1.3.3** - Établir le bilan moléculaire de la transformation d'une molécule de glucose en éthanol.



**1.3.4** - Pour conduire à la formation d'éthanol, il est nécessaire que les levures soient cultivées en parfaite anaérobiose.

Justifier cette précaution, en précisant le devenir du glucose si cette condition n'est pas respectée (noms des voies métaboliques et localisation cellulaire exigés).

**1.4** - L'éthanol produit par les levures peut être dosé par voie enzymatique en point final (**document 2**) (6 points).

**1.4.1** - Présenter la composition qualitative du milieu à mettre en présence de l'échantillon pour réaliser le dosage de l'éthanol par cette méthode.

**1.4.2** - Tracer l'évolution de l'absorbance en fonction du temps et justifier le terme « point final ».

Sur le graphe précédent, tracer l'évolution de l'absorbance obtenue avec deux fois moins d'éthanol au départ. Justifier.

**1.4.3** - La température d'incubation a-t-elle une influence sur la méthode de dosage en point final.

**1.5** - Étude cinétique de l'alcool déshydrogénase (ADH) (5 points).

**1.5.1** - À partir d'une certaine concentration en éthanol, la cinétique de l'ADH peut être confondue avec une cinétique michaëlienne.

Démontrer que dans ce cas la courbe  $v_i^{-1} = f([S]^{-1})$  est une droite.

**1.5.2** - Des résultats expérimentaux (obtenus dans les conditions précédentes) sont présentés ci-dessous.

Présenter dans un tableau les résultats numériques  $V_i^{-1}$  et  $[S]^{-1}$ .

Calculer les paramètres de la droite de régression et en déduire les valeurs des paramètres cinétiques de l'éthanol déshydrogénase dans les conditions opératoires.

$[NAD^+] \mu\text{mol.L}^{-1}$	10	20	40	100
$V_i \text{ en } \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	14,3	22,2	30,8	40

## 2 - La filière huile (23,5 points)

**2.1** - L'huile végétale brute peut être utilisée directement dans certains moteurs ou transformée en biodiesel (aussi appelé diester). L'huile de graines de colza est souvent utilisée pour cette fabrication (7 points).

**2.1.1** - Les huiles sont essentiellement constituées de triglycérides (99 %) et d'un peu d'insaponifiables.

**2.1.1.1** - Donner la formule générale d'un triglycéride.

**2.1.1.2** - Définir le terme insaponifiable.  
Citer un exemple de lipide insaponifiable.

**2.1.2** - La richesse des graines en huile est un facteur déterminant pour la sélection variétale des plants de colza. Cette richesse est appréciée par RMN ou par la méthode de Soxhlet (**document 3**).

**2.1.2.1** - À partir de l'analyse du **document 3** dégager le principe d'extraction des lipides des graines de colza.

**2.1.2.2** - Une balance infrarouge (balance munie d'un système de chauffage) permet de déterminer rapidement la teneur en matières sèches du broyat de graines.

Calculer la teneur en matière sèche des graines.

**Données** : Résultat de la balance infrarouge

Masse de broyat de graines = 2,154 g

Masse du broyat de graines après séchage = 1,852 g

**2.1.2.3** - Déterminer la teneur en huile des graines en % par rapport à la matière sèche.

**2.2** - L'acide érucique (C22 : 1  $\Delta^{6,13}$ ) est un acide gras que l'on trouve dans certaines variétés de colza, il est responsable de pathologies cardiaques chez le rat.

Les variétés de colza riches en acide érucique sont destinées à l'industrie alors que les variétés pauvres (canola) donnent des huiles alimentaires.

L'union européenne a fixé une teneur maximale autorisée d'acide érucique dans les huiles destinées à la consommation humaine (moins de 2 % des acides gras totaux).

La proportion en acide érucique dans l'huile extraite des graines de colza détermine son orientation vers la filière industrielle ou alimentaire (16,5 points).

**2.2.1** - Présenter la formule semi-développée de l'acide érucique. Justifier la réponse en expliquant la notation C22 : 1  $\Delta^{6,13}$ .

**2.2.2** - Les nutritionnistes classent les acides gras insaturés en série « oméga ». Suivant cette classification quelle est l'écriture de l'acide érucique ?

**2.2.3** - La séparation des acides gras et leur dosage sont effectués par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (**documents 4 et 5**).

Compléter le schéma de principe d'un chromatographe en phase gazeuse (**document 4**).

**2.2.4** - Expliquer succinctement le principe de fractionnement par CPG.

**2.2.5** - Les triglycérides subissent une méthyl-trans-estérification par le méthanol. On obtient alors des acides gras méthylés (EMAG) et du glycérol.

Écrire la réaction de trans-estérification d'un triglycéride par le méthanol.

Justifier la méthyl-trans-estérification en préalable à la CPG.

**2.2.6** - L'élution s'effectue à l'aide d'un gradient de température. Justifier son intérêt.

**2.2.7** - Le premier pic du chromatogramme ne correspond à aucun EMAG. À quoi correspond-il ?

**2.2.8** - Sachant que les EMAG sont élués dans l'ordre croissant de leur nombre de carbone et à nombre égal de carbone, dans l'ordre croissant du nombre d'insaturation, identifier les pics du chromatogramme.

Quelle grandeur permet l'identification ? Définir cette grandeur.

**2.2.9** - L'analyse d'une huile de colza dans les mêmes conditions chromatographiques donne les résultats suivants :

$t_R$ en min	8,69	11,15	11,47	12,09	13,00	14,21	14,32	16,11
Hauteur du pic en (mV)	15,75	10,3	312,0	114,3	52,0	10,0	13,5	8,9

Calculer le pourcentage en acide érucique par rapport aux acides gras totaux.

**Donnée** : Pour le calcul, on confondra la surface des pics avec leur hauteur.

**2.2.10** - Conclure quant à la qualité de l'huile de colza analysée.

## DOCUMENT 1

### MESURE DE L'ACTIVITÉ CELLULASIQUE

Trois souches de champignons filamenteux sont cultivées dans 100 mL de milieu liquide afin d'isoler les souches les plus productrices de cellulases extra-cellulaires.

Après 72 heures à 25°C, le milieu de culture est filtré. L'activité cellulasique est mesurée sur 0,5 mL de filtrat. La biomasse recueillie sur le filtre est séchée et pesée.

Le résultat de l'activité cellulasique est exprimé en  $\mu\text{mol}$  de glucose apparu par min et par g de biomasse.

#### **Mode opératoire**

##### **Mesure d'activité sur les filtrats de culture**

- 0,5 mL de filtrat
- 0,5 mL de carboxyméthyl cellulose à 1 % dans du tampon acétate à 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 6

Incuber 1 heure à 50°C avant de procéder à la colorimétrie au 3,5 DNS.

##### **Témoin activité**

- 0,5 mL de milieu de culture non ensemencé
- 0,5 mL de carboxyméthyl cellulose à 1 % dans du tampon acétate à 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 6

Incuber 1 heure à 50°C avant de procéder à la colorimétrie au 3,5 DNS.

##### **Étalon glucose**

- 0,5 mL de solution de glucose à 1  $\text{g.L}^{-1}$
- 0,5 mL d'eau distillée

Réaliser la colorimétrie au 3,5 DNS.

##### **Méthode au 3,5 DNS**

Ajouter 1,5 mL de 3,5 DNS.

Porter 5 minutes au bain-marie bouillant exactement 5 minutes. Refroidir immédiatement.

Ajouter 7,5 mL d'eau distillée avant de mesurer les absorbances à 530 nm contre un blanc réactif.

#### **Résultats**

##### **Étalon de glucose**

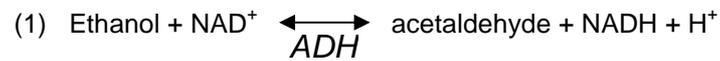
Absorbance de l'étalon glucose mesurée à 530 nm contre le blanc réactif  $A_{Et} = 0,430$ .

##### **Mesure d'activité**

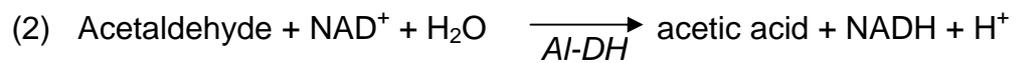
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma harzadium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Témoin activité
<b>Biomasse en g</b>	10,54	15,63	6,34	0,00
<b>A : Absorbance lue à 530 nm contre le blanc réactif</b>	0,210	0,462	0,301	0,001
<b>Activité cellulasique (<math>\text{U.g}^{-1}</math>)</b>	0,43	0,64	1,02	-----

**DOCUMENT 2**  
**PRINCIPE DU DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'ETHANOL**

Ethanol is oxidized to acetaldehyde by nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) in the presence of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) (1).



The equilibrium of this reaction lies on the side of ethanol and NAD. It can be completely displaced to the right side at alkaline conditions and by trapping of acetaldehyde formed. Acetaldehyde is quantitatively oxidized to acetic acid in the presence of aldehyde dehydrogenase (Al-DH) (2)



NADH is determined by means of its light absorbance at 340nm.

### DOCUMENT 3

## PRINCIPE DE LA MÉTHODE DE SOXHLET

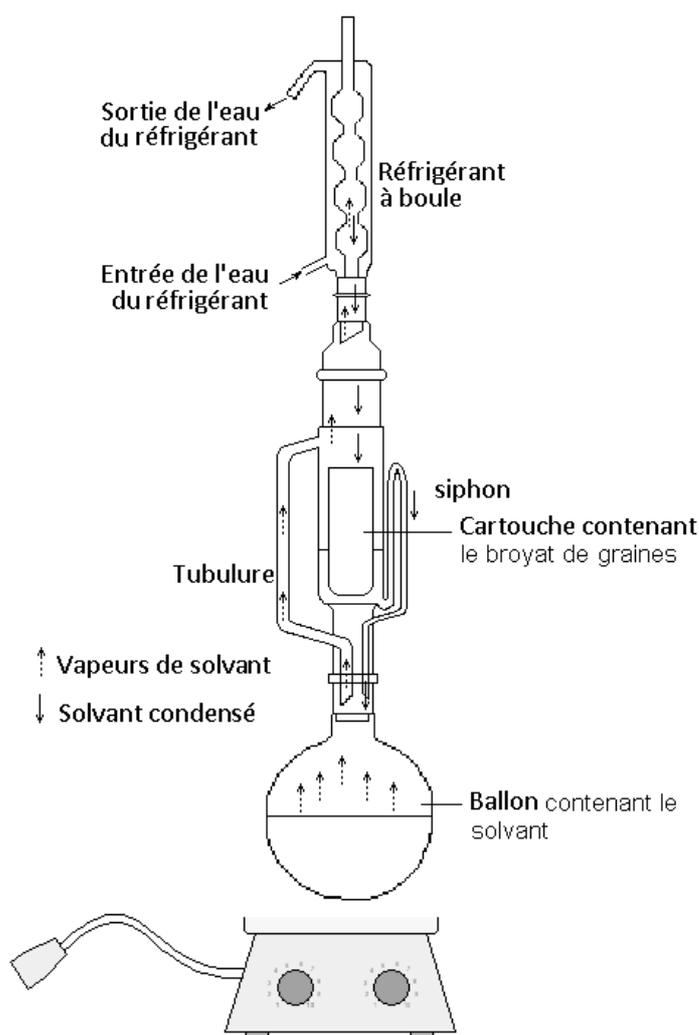
Les graines broyées sont introduites dans l'appareil de Soxhlet (schéma suivant). L'extraction est réalisée par de nombreux passages d'isohexane tiède sur le broyat (environ 8 heures de fonctionnement). En fin d'extraction, l'isohexane est récupéré par évaporation et le ballon contenant l'huile extraite, est pesé.

La quantité d'huile dans les graines est exprimée en g par rapport à 100g de matière sèche de broyat de graines.

### **Résultat de l'extraction par la méthode de Soxhlet**

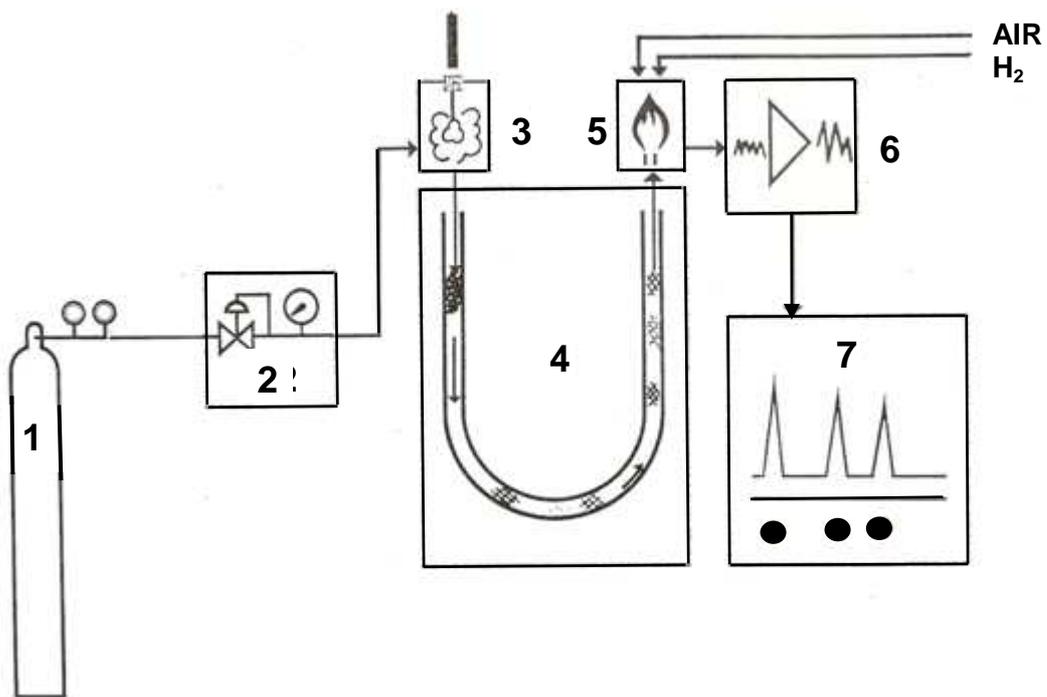
- Masse de broyat de graines = 10 g
- Masse du ballon vide = 153,740 g
- Masse du ballon après extraction et évaporation de l'iso-hexane = 155,290 g

### Schéma de fonctionnement de l'appareil de Soxhlet



**DOCUMENT 4**  
**SCHÉMA DE PRINCIPE D'UN CHROMATOGRAPHE**  
**EN PHASE GAZEUSE**  
**À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE**

- 1 :
- 2 :
- 3 :
- 4 :
- 5 :
- 6 :
- 7 :



## DOCUMENT 5

### CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ACIDES CONSTITUTIFS DES TRIGLYCÉRIDES DE L'HUILE

#### *Chromatographie en phase gazeuse des acides gras constitutifs des triglycérides de l'huile.*

#### Préparation avant injection

Les acides gras des triglycérides (en solution dans l'heptane), en présence de méthanol, subissent une méthyl-trans-estérification. La réaction est réalisée à chaud en milieu alcalin et en présence de catalyseur ( $\text{BCl}_3$ ). Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont extraits dans l'hexane.

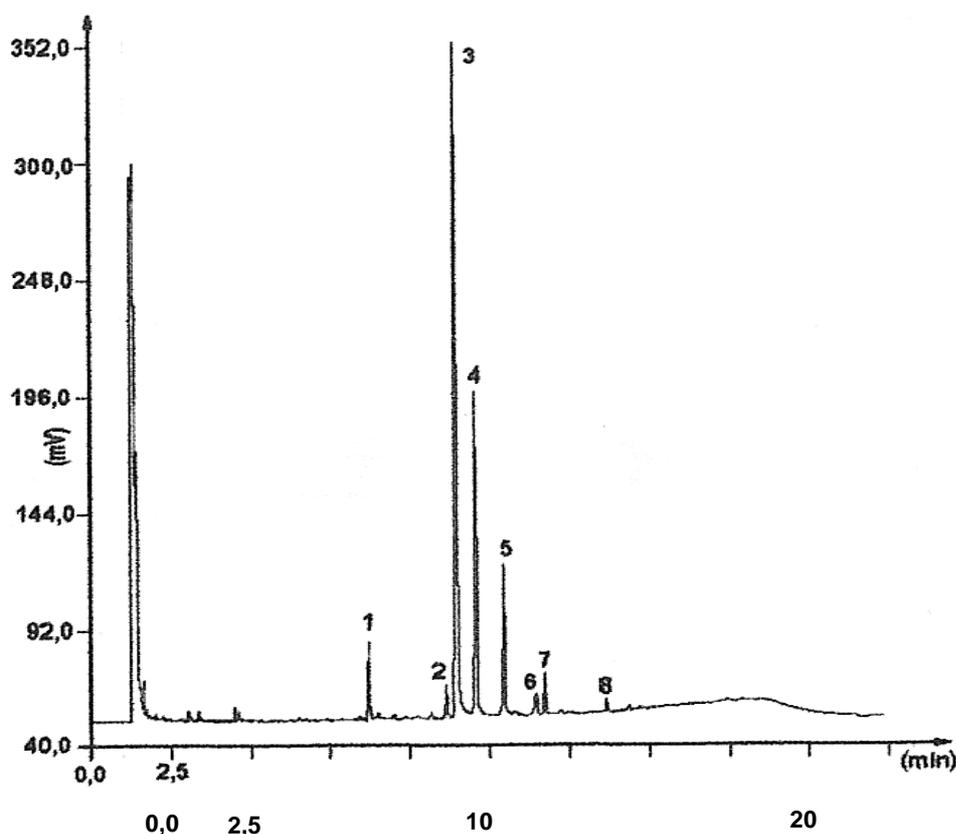
Cet extrait est analysé par CPG.

#### Conditions chromatographiques

- Colonne capillaire en silice fondue 50m x 0,25 mm recouverte de cyanopropylsilicone sur 0,2  $\mu\text{m}$
- Volume d'injection : 1  $\mu\text{L}$
- Température de l'injecteur : 250°C
- Température du four : gradient 165°C pendant 5 min puis augmentation de 5°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 200°C
- Température du détecteur : 260°C
- Détecteur ; ionisation de flamme
- Gaz porteur : Hélium à 1,2 mL.min<sup>-1</sup>

#### Chromatogramme réalisé avec un mélange EMAG étalons dans l'hexane

Composition du mélange : C16 : 0 ; C18 : 0 ; C18 : 1 ; C18 : 2 ; C18 : 3 ; C20 : 0 ; C20 : 1 ; C22 : 1.



## Sujet de Microbiologie

**Durée 3 heures – Coefficient 3**

**Calculatrice interdite**

**Dictionnaire Anglais Français autorisé**

### LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES ALIMENTS

Les biocontaminations sont la préoccupation majeure des industries agroalimentaires. L'hygiène des aliments est préservée par des démarches préventives ainsi que par la mise en œuvre de procédés de conservation.

#### **1 - Hygiène des aliments (12 points)**

**1.1** - Les aliments peuvent être contaminés par une flore exogène comportant des microorganismes divers.

**1.1.1** - Quelles sont les origines possibles de ces contaminants exogènes contribuant à une mauvaise hygiène des aliments ?

**1.1.2** - Citer deux bactéries ou flores bactériennes dénombrées lors de contrôles d'hygiène des procédés. Précisez pour chacune d'elles la signification de leur présence anormalement élevée.

**1.2** - En dessous de 10°C, en atmosphère humide, la surface des pièces de viande est en quelques jours envahie par des bacilles psychrotrophes Gram négatif qui forment un biofilm appelé limon. Ces microorganismes produisent des enzymes capables de dégrader les protéines et les acides aminés.

**1.2.1** - Définir une bactérie psychrotrophe.

**1.2.2** - Qu'est-ce qu'un biofilm ? Expliquer brièvement les différentes étapes de sa formation et préciser la nature du composant bactérien qui le constitue.

**1.2.3** - Quelles peuvent être les conséquences de la formation de biofilms dans l'industrie agroalimentaire ?

**1.2.4** - La dégradation des acides aminés aboutit à la libération d'amines biogènes toxiques pour l'organisme.

**1.2.4.1** - Quelle catégorie d'enzyme est responsable de la formation d'amines ? Écrire la réaction chimique générale qu'elle catalyse.

**1.2.4.2** - Certaines de ces enzymes sont recherchées pour l'identification des bacilles Gram négatif.

Citer deux de ces enzymes et le nom d'un milieu d'identification dans lequel elles sont recherchées.

Exposer le principe de leur mise en évidence en vous basant sur la composition du milieu.

## **2 - Prévention des contaminations (18 points)**

Dans les industries agroalimentaires, les surfaces des équipements ne doivent pas constituer une source de contamination pour les aliments qui entrent en contact avec elles.

Il est indispensable de réaliser des opérations de nettoyage et désinfection efficaces après chaque production.

**2.1** - Définir les termes « nettoyage » et « désinfection ».

**2.2** - Comme les antiseptiques et les antibiotiques, les désinfectants ont une activité antimicrobienne.

**2.2.1** - Comparer ces trois familles de molécules à activité antimicrobienne.

**2.2.2** - Exposer les mécanismes d'action qui expliquent l'activité antibactérienne des désinfectants.

Illustrer à l'aide d'exemples précis.

**2.2.3** - Quels sont les paramètres conditionnant l'efficacité d'un protocole de désinfection ?

**2.3** - Le seuil d'efficacité d'un désinfectant est évalué par sa CMB.

Une laiterie veut déterminer la CMB d'un produit désinfectant pour sols et surfaces sur une souche bactérienne isolée de manière répétitive lors des contrôles de surfaces.

Cette détermination est réalisée en 2 temps :

- détermination des concentrations inhibitrices ;
- détermination de la CMB.

**2.3.1** - La détermination des concentrations inhibitrices est réalisée par la technique en microplaque en bouillon Mueller-Hinton, **document 1**.

**2.3.1.1** - Élaborer un tableau décrivant le travail réalisé. Dans ce tableau, indiquer les résultats obtenus dans le cas d'une CMI correspondant à une dilution finale au 1/128. Justifier.

**2.3.1.2** - Sachant que la concentration en substance active est de 4 g/L, calculer la valeur de la CMI. Justifier.

**2.3.2** - La CMB est déterminée par transfert puis étalement sur gélose du contenu des cupules dans lesquelles on observe l'absence de croissance. Que signifie CMB ?

Dans le cas d'un effet bactéricide, quel est le nombre maximal de colonies attendues sur la géloseensemencée avec la totalité du contenu de la cupule CMI ?

**Donnée** : À la CMB 99,999 % des bactéries sont tuées.

## **3 - Conservation des produits alimentaires (30 points)**

**3.1** - Différentes stratégies sont utilisées afin de réduire le développement des flores d'altération.

**3.1.1** - Toute l'eau présente dans un produit alimentaire est-elle disponible pour les microorganismes ? Justifier.

**3.1.2** - Quels paramètres physico-chimiques permettent d'estimer la proportion et la disponibilité en eau d'un produit alimentaire ?

**3.1.3** - Citer deux stratégies différentes utilisées dans le but de réduire la disponibilité en eau.

**3.2** - Produits par des bactéries lactiques ou des Actinomycètes, les conservateurs d'origine biologique sont de plus en plus employés dans le secteur agroalimentaire afin de stabiliser les aliments.

La nisine est un polypeptide de 34 acides aminés, seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire (E234). C'est un métabolite secondaire synthétisé naturellement par les souches de *L. lactis* spp *lactis*.

**3.2.1** - À partir du **document 2**, expliquer le mode d'action de la nisine. Justifier son action létale sur la bactérie.

**3.2.2** - Quel est le spectre d'action de la nisine ? Justifier la réponse.

**3.2.3** - La nisine est utilisée comme additif dans la fabrication des fromages à pâte cuite, elle prévient les gonflements tardifs causés par le développement de la bactérie *Clostridium tyrobutyricum*.

**3.2.3.1** - Préciser les principaux caractères morphologiques et culturels des bactéries appartenant au genre *Clostridium*.

**3.2.3.2** - Proposer une hypothèse expliquant la cause des gonflements tardifs engendrés par le développement de cette bactérie à l'intérieur d'une meule de fromage.

**3.2.4** - L'activité de la nisine a été testée en présence d'autres molécules. Analyser les courbes du **document 3**. En déduire l'association la plus intéressante.

**3.3** - La natamycine ou pimaricine est un antifongique appartenant au groupe des macrolides tétraènes : elle est produite par la bactérie *Streptomyces natalensis* et est employée comme conservateur dans le traitement de surfaces de certains fromages et de produits de charcuterie.

**3.3.1** - Quelle autre famille de composés à activité biologique est principalement produite par des bactéries du genre *Streptomyces* ?

**3.3.2** - En vous aidant du **document 4** :

**3.3.2.1** - Décrire l'aspect macroscopique et microscopique à la coloration de Gram des bactéries du genre *Streptomyces*.

**3.3.2.2** - Préciser l'habitat naturel de ces bactéries.

**3.3.2.3** - Indiquer les caractères culturels de ces bactéries.

**3.3.2.4** - Quel est le rôle de chacun des constituants du milieu de culture proposé.

**3.3.3** - Des études récentes ont montré l'action de la natamycine au niveau de l'inhibition de la synthèse des stérols. Proposer une explication quant à son absence d'efficacité sur les procaryotes.

**3.4** - Un exemple de flore d'altération : les mycètes.

**3.4.1** - L'identification des mycètes repose essentiellement sur leur description morphologique.

Légender les figures du document 5 (de « a » à « n ») et proposer un nom de genre pour les microorganismes A, B, C.

**3.4.2** - Certaines moisissures sont écartées à cause des mycotoxines produites par certaines souches.

**3.4.2.1** - Donner deux exemples de mycotoxines et préciser leur origine.

**3.4.2.2** - Citer des aliments susceptibles de renfermer des mycotoxines.  
Préciser les principaux risques liés à leur ingestion pour la santé humaine.

**3.4.3** - Certains champignons filamenteux peuvent être à l'origine d'altération des produits alimentaires.

Proposer une explication de ce phénomène.

## DOCUMENT 1

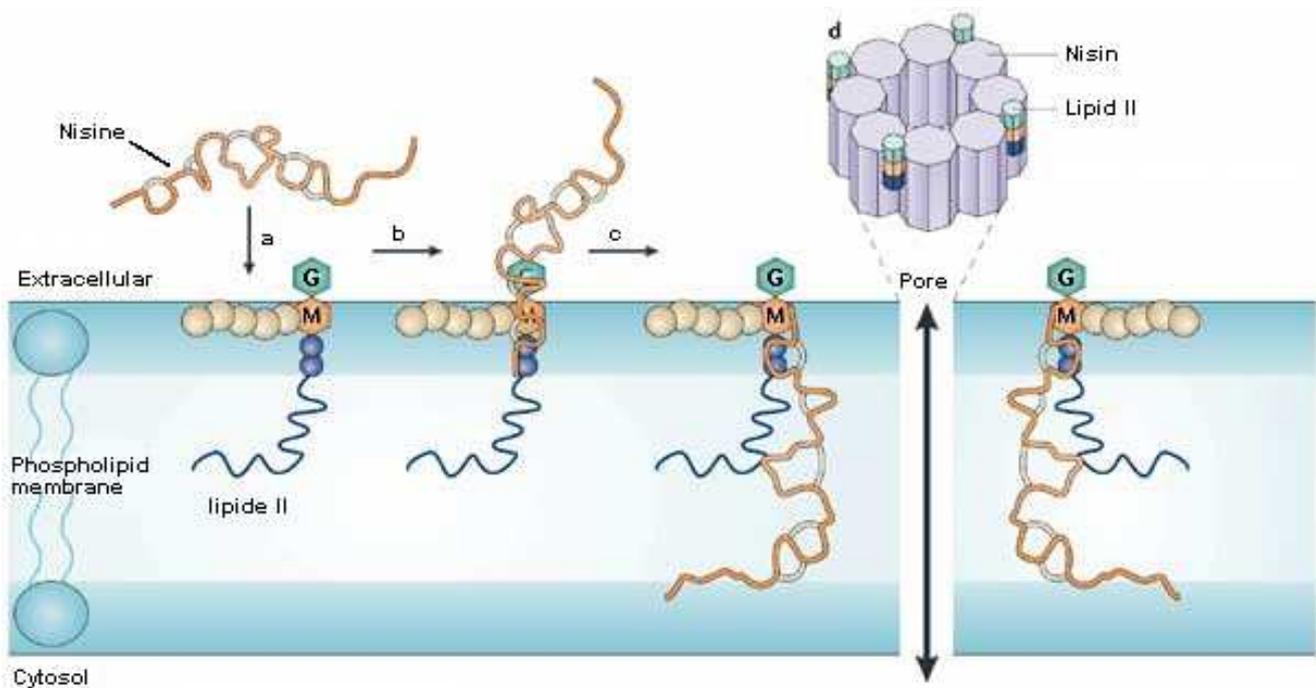
### DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS INHIBITRICES : MODE OPÉRATOIRE

- Dilution en série du désinfectant de 1/1 à 1/2048 selon une progression géométrique de raison  $\frac{1}{2}$  sous un volume de 50  $\mu\text{L}$  en bouillon Mueller-Hinton.
- Addition dans chaque cupule de 50  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne à  $2.10^5$  UFC/mL en bouillon Mueller-Hinton double concentration.
- Incubation à 20°C pendant 18 heures.

Un témoin de croissance est réalisé en même temps.

## DOCUMENT 2

G : N acetyl glucosamine  
M : acide N acetyl muramique

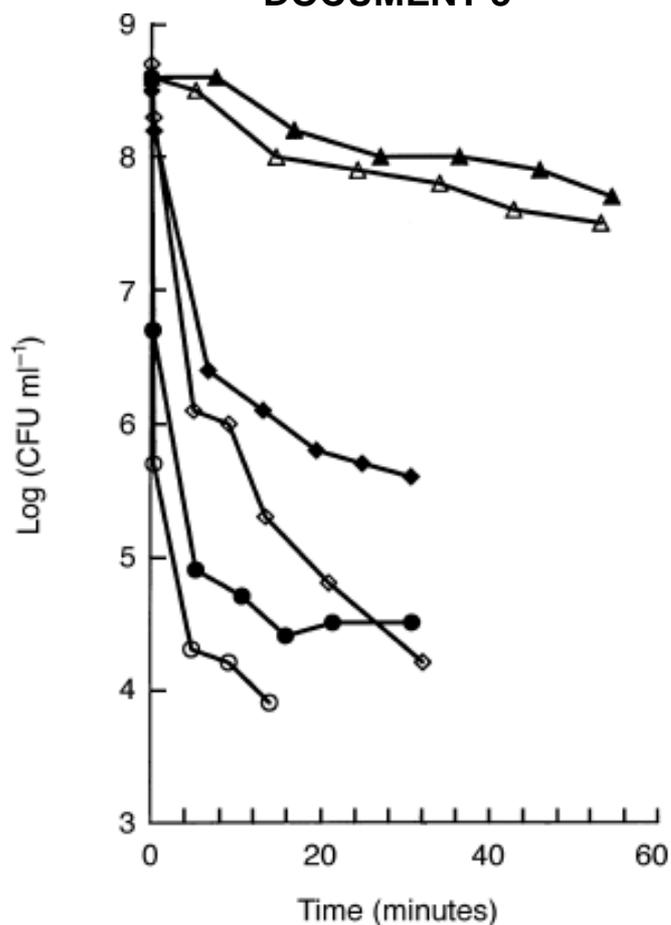


Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Drug Discovery

First, nisin reaches the bacterial plasma membrane (a), where it binds to Lipid II via two of its amino-terminal rings (b). This is then followed by pore formation (c), which involves a stable transmembrane orientation of nisin. During or after assembly of four 1:1 (nisin: Lipid II) complexes, four additional nisin molecules are recruited to form the pore complex (d).

Source : [http://www.nature.com/nrd/journal/v5/n4/fig\\_tab/nrd2004\\_F4.html#figure-title](http://www.nature.com/nrd/journal/v5/n4/fig_tab/nrd2004_F4.html#figure-title)

## DOCUMENT 3



**Fig. 3** Effect of lysozyme on the inhibitory effect of nisin and/or carvone on *L. monocytogenes* at 8 °C. Nisin 5.3 µg ml<sup>-1</sup> (◆), nisin 5.3 µg ml<sup>-1</sup> + lysozyme 313 units (◇), nisin 5.3 µg ml<sup>-1</sup> + carvone 10 mmol l<sup>-1</sup> (●), nisin 5.3 µg ml<sup>-1</sup> + carvone 10 mmol l<sup>-1</sup> + lysozyme 313 units (○), lysozyme 313 units (△), carvone 10 mmol l<sup>-1</sup> + lysozyme 313 units (▲).

Adapté de <http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2672.1999.00606.x>

## DOCUMENT 4

Actinomycete Isolation Agar

## References

1. Pine and Watson. 1959. J. Lab. Clin. Med. 54:107.
2. Ajello, Georg, Kaplan and Kaufman. 1963. CDC laboratory manual for medical mycology. PHS Publication No. 994. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

## Availability

## BBL™ Actinomyces Broth

Cat. No. 210920 Dehydrated – 500 g

## Actinomycete Isolation Agar Glycerol

## Intended Use

Actinomycete Isolation Agar is used with added glycerol for isolating and cultivating actinomycetes from soil and water.

Glycerol is used in preparing microbiological culture media.

## Summary and Explanation

Although some genera are important to human medicine, most of the actinomycetes are part of the indigenous flora of soil, water and vegetation. Actinomycetes may impart a musty odor to water or a muddy flavor to fish.<sup>1</sup> Actinomycetes can cause massive growths which will form a thick foam in the activated sludge process, causing a disruption in wastewater treatment.<sup>2,3</sup> Actinomycetes are gram-positive, acid-fast cells, growing as filaments that may branch and may form irregularly shaped rods and cocci.

Olsen<sup>4</sup> formulated Actinomycete Isolation Agar for isolating and cultivating actinomycetes from soil and water. The formula is supplemented with glycerol, a highly purified fermentable alcohol used occasionally for differentiating certain bacteria and in media for isolating and culturing fastidious bacteria.

## Principles of the Procedure

Actinomycete Isolation Agar contains sodium caseinate which is a source of nitrogen. Asparagine is an amino acid and a

source of organic nitrogen. Sodium propionate is a substrate used in anaerobic fermentation. Dipotassium phosphate provides buffering capability to maintain pH balance. Magnesium sulfate and ferrous sulfate provide sources of sulfates and metallic ions. Agar is the solidifying agent. The added glycerol is a source of carbon.

## Formulae

## Difco™ Actinomycete Isolation Agar

Approximate Formula* Per Liter	
Sodium Caseinate .....	2.0 g
Asparagine .....	0.1 g
Sodium Propionate .....	4.0 g
Dipotassium Phosphate .....	0.5 g
Magnesium Sulfate .....	0.1 g
Ferrous Sulfate .....	1.0 mg
Agar .....	15.0 g

## Difco™ Glycerol

Glycerin

\*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

### Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend 22 g of the powder in 1 L of purified water. Mix thoroughly.
2. Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
3. Add 5 g of Glycerol.
4. Autoclave at 121°C for 15 minutes.
5. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

## Procedure

Inoculate medium and incubate at 30°C for up to 72 hours.

## Expected Results

Refer to appropriate references and procedures for results.

## References

1. Clesceri, Greenberg and Eaton (ed.). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
2. Lechevalier. 1975. Actinomycetes of sewage-treatment plants. Environ. Protection Technol. Ser., EPA-600/2-75-031, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
3. Lechevalier and Lechevalier. 1974. Int. J. Syst. Bacteriol. 24:278.
4. Olsen. 1960. Personal communication.

## Availability

## Difco™ Actinomycete Isolation Agar

Cat. No. 212168 Dehydrated – 500 g

## Difco™ Glycerol

Cat. No. 228210 Bottle – 100 g  
228220 Bottle – 500 g

## User Quality Control

## Identity Specifications

## Difco™ Actinomycete Isolation Agar

Dehydrated Appearance: Light beige, free-flowing, homogeneous.

Solution: 2.2% solution, soluble in purified water upon boiling with 0.5% Glycerol. Solution is light to medium amber, opalescent to opaque with precipitation.

Prepared Appearance: Medium amber, opalescent.

Reaction of 2.2% Solution with 0.5% Glycerol at 25°C: pH 8.1 ± 0.2

## Cultural Response

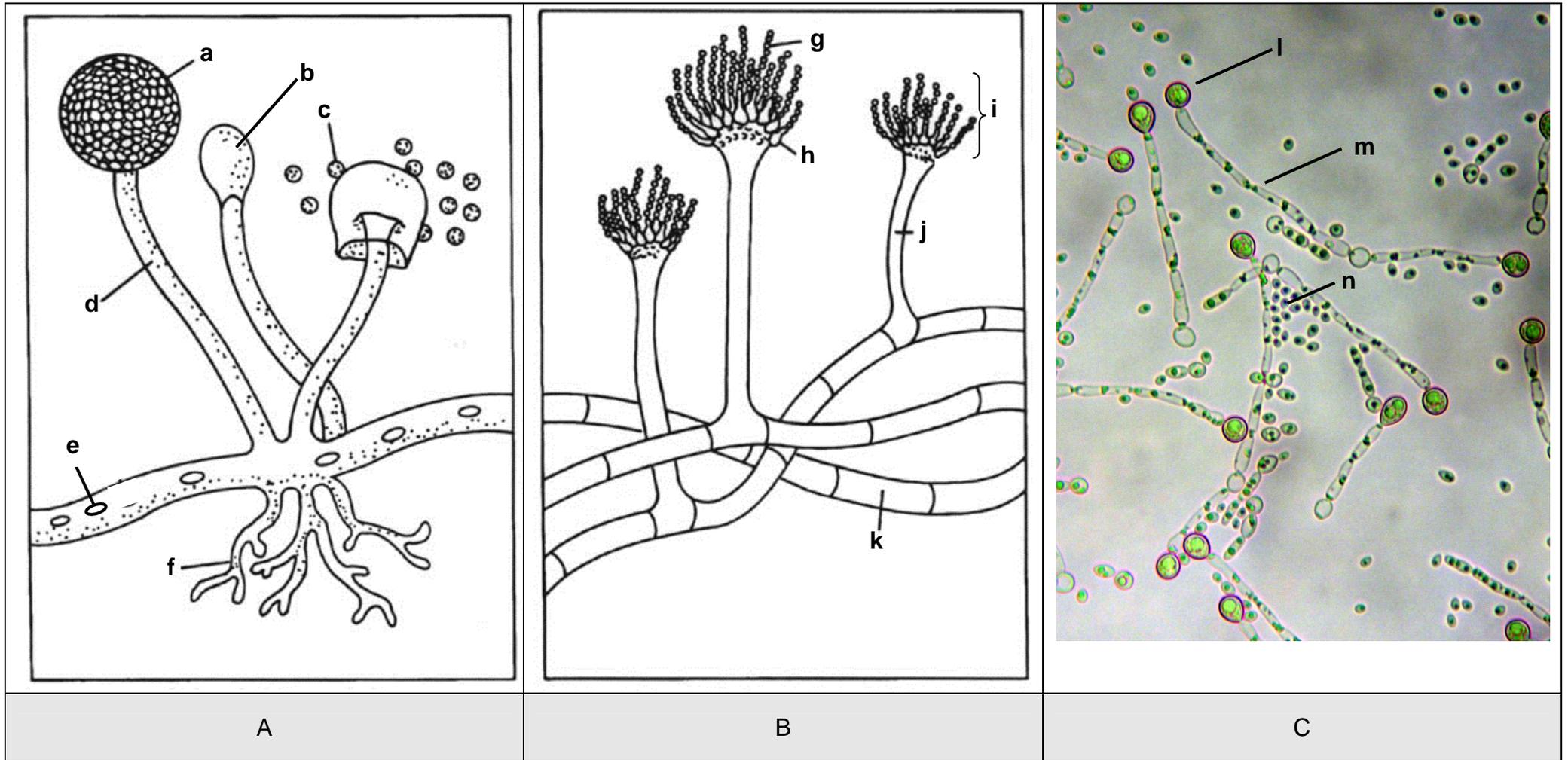
## Difco™ Actinomycete Isolation Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate and incubate at 30 ± 2°C for up to 72 hours.

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY
<i>Streptomyces achromogenes</i>	12767	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	Good
<i>Streptomyces albus</i>	3004	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	Good
<i>Streptomyces lavendulae</i>	8664	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	Good

Source : Extrait du catalogue BBL

DOCUMENT 5 :



## Sujet de Biologie cellulaire et moléculaire

**Durée 2 heures – Coefficient 3**

**Calculatrice interdite**

### LA PROTÉINE PRION

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles ou « maladies à prions » regroupent des maladies humaines comme la maladie de Creutzfeld-Jakob et des maladies du bétail comme la tremblante du mouton ou la maladie de la vache folle (ESB pour encéphalopathie spongiforme bovine).

Ce sont des maladies neurodégénératives causées par un type d'agent infectieux qualifié de non conventionnel. Il s'agirait d'une protéine dite « protéine prion », extrêmement résistante notée PrP<sup>sc</sup> (scrap = mouton), qui n'est qu'une forme différente d'une protéine normalement présente au niveau cellulaire, notée PrP<sup>c</sup> (c pour cellulaire).

#### **1 - La protéine prion normale PrP<sup>c</sup>. (19 points)**

**1.1** - Dans sa forme normale, PrP<sup>c</sup> est une glycoprotéine membranaire d'environ 200 acides aminés issue d'un gène exprimé de manière constitutive dans la plupart des tissus avec néanmoins une expression plus importante au niveau du tissu nerveux. La protéine est ancrée à la membrane cellulaire via un résidu glycosylphosphatidylinositol (GPI).

**1.1.1** - Que signifie le terme « expression constitutive » ?

**1.1.2** - Le **document 1** présente la structure schématique de la protéine prion.

**1.1.2.1** - Quel est le rôle de la séquence signal ?

**1.1.2.2** - Décrire succinctement le mécanisme mis en jeu lors de la reconnaissance de cette séquence signal au niveau du réticulum endoplasmique.

**1.1.3** - La protéine prion subit des modifications post traductionnelles.

**1.1.3.1** - Quel est l'intérêt de ces modifications ?

**1.1.3.2** - D'après le **document 1**, préciser les phénomènes mis en œuvre lors des modifications post-traductionnelles de PrP<sup>c</sup>.

**1.1.4** - Sur quelle face de la bicouche lipidique se trouve la protéine prion ? Justifier la réponse.

**1.2** - Une fois ancrée à la membrane, la protéine PrP<sup>c</sup> peut exercer son(ses) rôle(s) qui est(sont) encore débattu(s). En effet, des travaux sur des souris transgéniques dépourvues d'un gène fonctionnel codant pour la protéine prion montrent qu'elles sont viables et ne présentent apparemment pas d'anomalies. Toutefois les études basées sur des expériences menées *in vivo* et *in vitro* ont permis de proposer plusieurs pistes dont un rôle dans l'apoptose, un rôle dans la croissance axonale et la transmission synaptique.

**1.2.1 - Définir l'apoptose.**

**1.2.2 -** La présence de PrPc au niveau du compartiment présynaptique a été mise en évidence sur diverses photographies prises en immunomicroscopie électronique.

La technique immunohistochimique utilisée permet la détection des PrPc grâce à un anticorps couplé à la protéine A de *Staphylococcus aureus* sur laquelle est fixé de l'or colloïdal.

**1.2.2.1 -** Quel est l'intérêt d'un tel marqueur pour cette technique de détection ?

**1.2.2.2 -** Faire un schéma annoté du complexe moléculaire obtenu après réaction immunologique.

**2 - La protéine prion anormale PrPsc. (10 points)**

**2.1 -** La protéine prion PrPsc est une protéine prion anormalement repliée. Elle échappe ainsi au processus naturel de dégradation par les protéases.

Après sa réinternalisation par endocytose, elle s'accumule dans les lysosomes et le cytoplasme. Des agrégats se forment et donnent naissance à des plaques amyloïdes notamment au niveau des neurones.

**2.1.1 -** Quel est le rôle cellulaire des lysosomes ?

**2.1.2 -** Au début du processus d'endocytose, la membrane forme une invagination. Schématiser une invagination membranaire.

**2.1.3 -** En liaison avec le rôle des lysosomes, que se passe-t-il suite à cette invagination ?

**2.1.4 -** Proposer une explication aux troubles neurologiques consécutifs à la présence de la protéine prion anormale.

**2.2 -** PrPsc peut déformer par contact PrPc. Cette dernière devient alors une PrPsc supplémentaire. Ainsi la protéine prion est capable de se multiplier. C'est pourquoi on qualifie la PrPsc d'agent infectieux.

Quelle est la différence essentielle entre la protéine PrPsc, agent pathogène non conventionnel, et les autres agents pathogènes « classiques » tels une bactérie, une moisissure, un parasite ou un virus ?

**3 - Dépistage de l'ESB dans les carcasses destinées à la consommation humaine.(31 points)**

La détection du prion dans un tissu d'animal destiné à la consommation humaine est sans équivoque un signe de contamination. Plusieurs laboratoires ont donc mis sur le marché différents types de tests pour effectuer cette recherche.

**3.1 - Le Prionics®-Check Western.**

Approuvé en 1999 par l'Union Européenne, le Prionics®-Check Western est un immunoblotting particulièrement performant car capable de détecter le prion pathogène plusieurs mois avant que n'apparaissent les symptômes cliniques chez l'animal infecté.

La première phase des travaux a consisté à produire un anticorps monoclonal, le 6H4 qui a été breveté. Cet anticorps est capable de reconnaître aussi bien une protéine

normale que la protéine anormale. Cela nécessite donc un test en 2 parties. Le protocole est donné au **document 2a**.

**3.1.1** - Définir anticorps monoclonal.

**3.1.2** - Donner les caractéristiques des cellules – en les nommant – impliquées dans la production des anticorps monoclonaux.

**3.1.3** - Justifier l'étape de digestion enzymatique.

**3.1.4** - Quel est le paramètre influençant la séparation électrophorétique ?

**3.1.5** - Expliquer l'intérêt du transfert sur membrane de nitrocellulose.

**3.1.6** - Définir ce qu'est un conjugué.

**3.1.7** - Le **document 2b** schématise les résultats obtenus suite à l'analyse de 2 échantillons E1 et E2. Interpréter ces résultats.

### **3.2 - Le Prionics®-Check Priostrip.**

Il s'agit d'un test immunochromatographique rapide présenté sous forme de peigne qu'il suffit de plonger dans les échantillons de prélèvements de cerveau homogénéisé et digérés (même préparation que pour le test précédent).

Le protocole est fourni **document 3**.

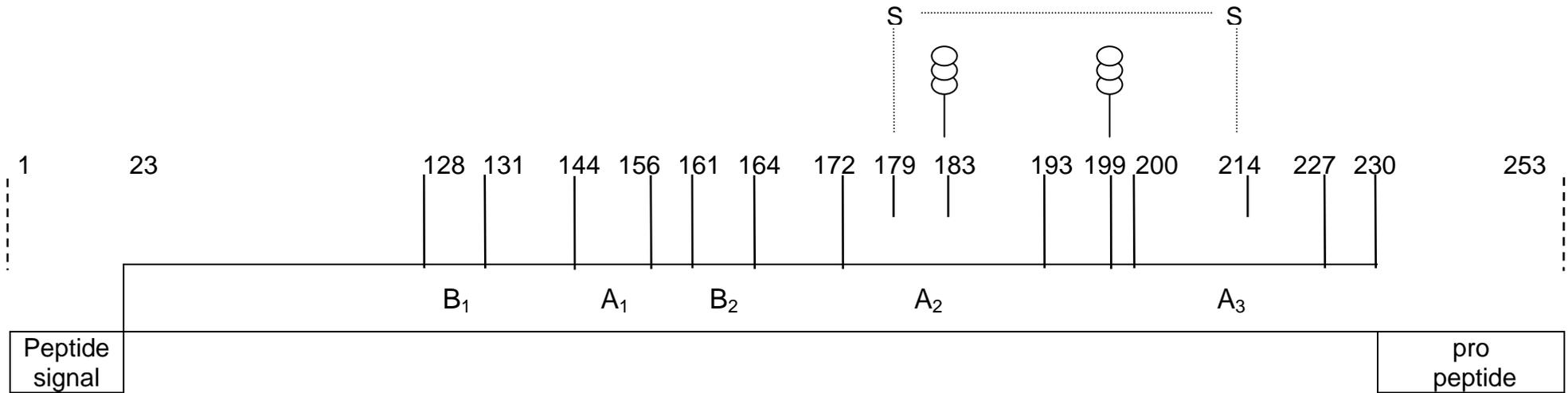
**3.2.1** - Présenter succinctement les étapes de ce test.

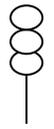
**3.2.2** - Quel est le rôle des billes de latex ?

**3.2.3** - Interpréter les résultats des différentes bandelettes (de A à H) en précisant le rôle de la ligne supérieure.

**3.2.4** - A quel type de technique immunologique connue s'apparente l'édifice moléculaire obtenu au niveau de la ligne inférieure ? Justifier la réponse par un schéma.

**DOCUMENT 1**  
**STRUCTURE SCHÉMATIQUE DE LA PROTÉINE PRION**



 : N glycane

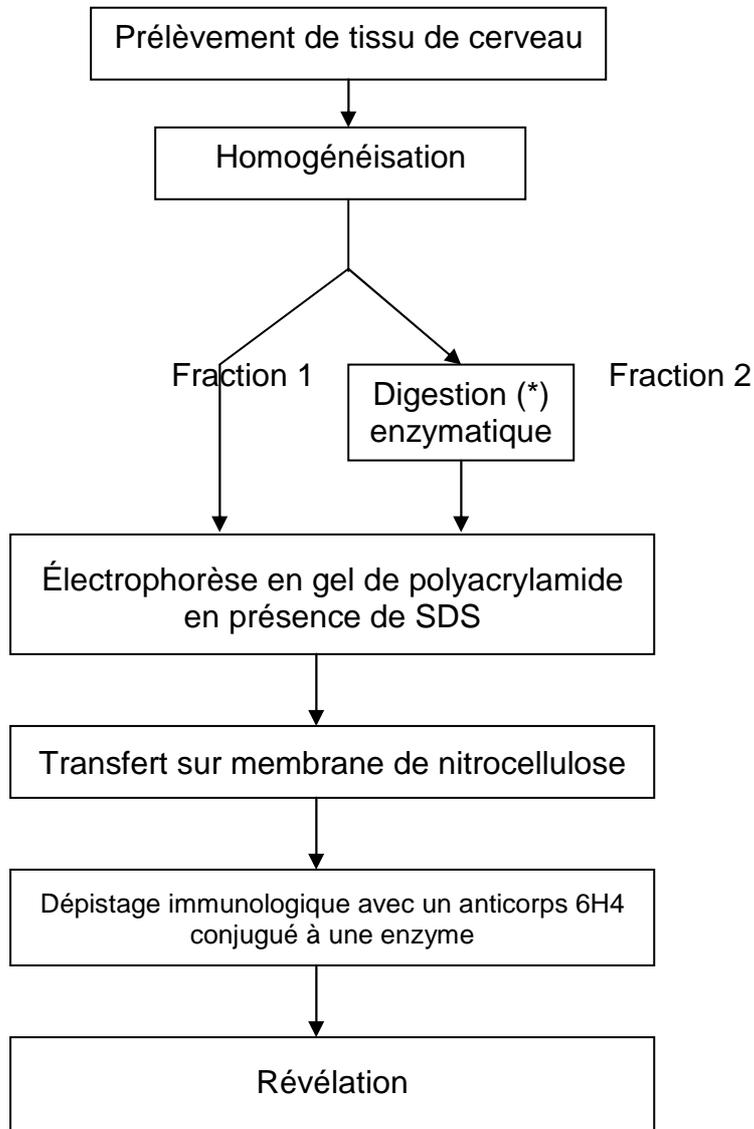
1, 2, ... , 253 : numérotation des acides aminés

A : hélice  $\alpha$

B : hélice  $\beta$

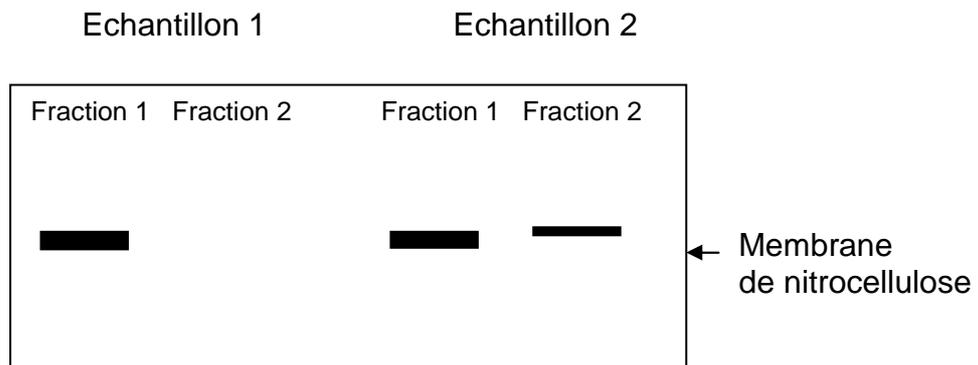
**DOCUMENT 2**  
**PRIONICS®-CHECK WESTERN**

**a) Immunoblotting : protocole opératoire**



(\*) PrPc est totalement hydrolysée – PrPsc n'est hydrolysée que très partiellement, en bout de chaîne.

**b) Résultats**



**DOCUMENT 3**  
**PRIONICS®-CHECK PRIOSTRIP**

Les échantillons digérés sont mélangés dans un premier temps à un premier anticorps 6H4 conjugué à des billes de latex bleues, ceci dans les puits d'une plaque. Les peignes Priostip® sont plongés dans les puits pendant 20 minutes.

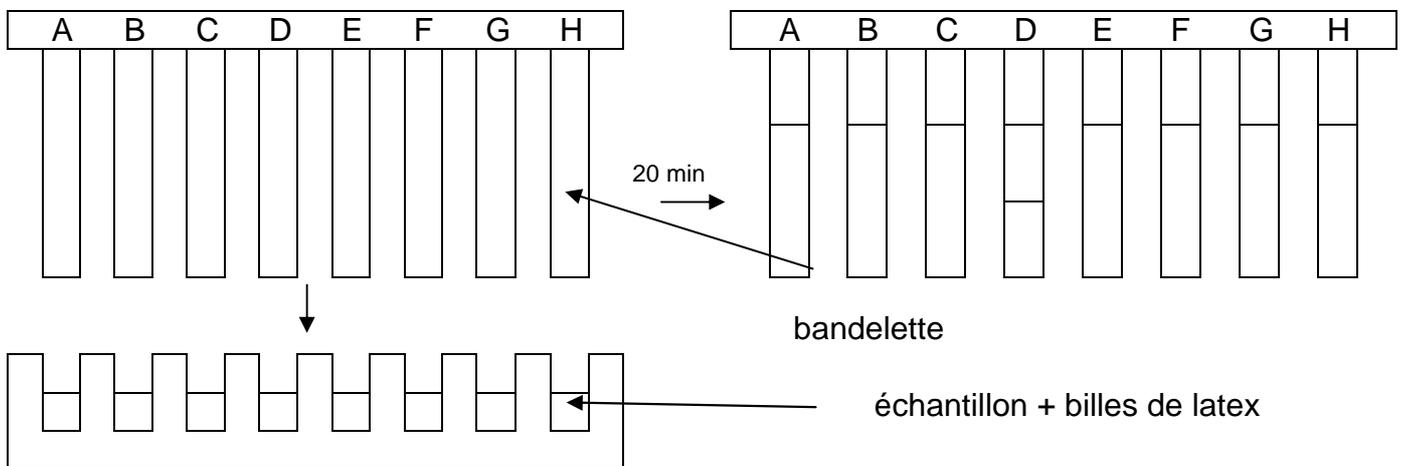
Sur chaque bandelette du peigne, 2 types d'anticorps sont fixés au niveau de 2 lignes distinctes :

- une ligne inférieure avec des anticorps 6H4 fixés,
- une ligne supérieure avec des anticorps anti 6H4 fixés.

Ces deux bandes sont initialement incolores.

Peigne avec bandelettes à plonger dans les puits

Résultats d'une plaque contenant les échantillons à analyser



## Sujet de Sciences et Technologies Bio Industrielles

Durée 2 heures – Coefficient 3

Calculatrice interdite

### PRODUCTION D'UN MÉDICAMENT : EXEMPLE D'UN VACCIN MULTIVALENT.

Un vaccin est un **médicament** qui, administré selon une posologie indiquée, prévient de manière active, sûre, durable, efficace, une ou plusieurs maladies spécifiques.

#### **1 - Aspects réglementaires (8 points)**

Les vaccins sont produits par des entreprises pharmaceutiques ; la production ainsi que la commercialisation sont contrôlées et soumises à des autorisations délivrées par les autorités de santé.

**1.1** - Quel est l'organisme qui contrôle les industries pharmaceutiques et délivre les autorisations ? (Donner le sigle et sa signification).

**1.2** - L'AMM est délivrée sur la base d'un dossier. Donner les 3 propriétés du médicament que ce dossier doit prouver ? Donner la signification du sigle AMM.

**1.3** - Les entreprises pharmaceutiques doivent respecter un référentiel donnant les règles des BPF. Que signifie le sigle BPF ? Il s'agit d'un référentiel pour l'assurance de la qualité. Que signifie cette expression ?

#### **2 - Préparation d'un des principes actifs du médicament (16 points)**

Dans le cas de vaccins multivalents, les différents antigènes sont préparés séparément, puis sont mélangés pour obtenir le « vrac ». Le diagramme de fabrication est présenté dans le **document 1**.

L'emballage commercial de ce type de vaccin : le DT-polio est présenté dans le **document 2**.

**2.1** - Les médicaments sont composés de un ou plusieurs principes actifs et d'excipients. Après avoir défini ces deux types de constituants, les retrouver sur le diagramme de fabrication du vaccin (**document 1**).

##### **2.2 - Préparation de l'antigène A par fermentation.**

L'antigène A est l'anatoxine diphtérique. Pour l'obtenir, on réalise dans un premier temps, la culture de *Corynebacterium diphtheriae* en fermenteur puis l'inactivation de la toxine par le formol et la chaleur.

La culture de *Corynebacterium diphtheriae*, bactérie Gram +, aérobique, se fait en fermenteur industriel de 1000 litres à 37°C schématisé dans le **document 3**.

**2.2.1** - Expliquer la nécessité de la préculture. Donner un ordre de grandeur du volume du préfermenteur.

**2.2.2** - La stérilisation du matériel et du milieu se fait « in situ ». Expliquer ce mode de stérilisation.

**2.2.3** - L'air nécessaire au développement de la culture arrive au fond du fermenteur près des pales d'agitation. Justifier cet emplacement.

**2.2.4** - Quel traitement doit subir l'air à l'entrée et à la sortie du fermenteur ? Justifier dans chaque cas.

**2.2.5** - Le fermenteur est équipé d'une régulation de pH et d'antimousse. Pourquoi chacun de ces équipements est-il indispensable ?

**2.2.6** - Schématiser une boucle de régulation du pH. Expliquer le fonctionnement de la régulation lorsque la mesure est à 5,2 et le point de consigne à 5,5 plus ou moins 0,2.

### **3 - Répartition (9 points)**

Dans le cas des vaccins injectables, la répartition (en seringues ou en flacons) se fait en conditions aseptiques.

**3.1** - À quelles exigences doit répondre l'atmosphère des locaux lors du remplissage stérile ?

**3.2** - Une étape de la validation du remplissage stérile des flacons est la mesure du NA (niveau d'aseptie de l'unité de répartition).

Pour réaliser cette mesure, à la place du vaccin on répartit dans les flacons du milieu de culture. Les flacons sont ensuite incubés pour permettre la croissance des contaminants microbiens éventuels. On inspecte alors chaque flacon pour dénombrer ceux qui sont contaminés. Le NA est la proportion de flacons trouvés contaminés parmi tous les flacons du lot.

**3.2.1** - Sur un lot de 20 000 flacons, 20 sont contaminés. Calculer le NA.

**3.2.2** - Sachant que les exigences de qualité au sein de l'entreprise sont un NA inférieur ou égal à  $10^{-4}$ , l'unité de répartition est-elle conforme ?

**3.2.3** - Dans le cas de non conformité on peut appliquer la règle des « 5M » pour détecter l'anomalie. Donner la signification des 5M. A l'aide de cette règle, proposer 5 causes possibles d'une non conformité du niveau d'asepsie.

### **4 - Lyophilisation (14 points)**

Dans certains cas, le vaccin est conditionné sous forme lyophilisée.

**4.1** - Donner le principe de la lyophilisation.

**4.2** - L'appareillage est composé de trois éléments principaux (**document 4**) :  
l'évaporateur,  
le compresseur,  
le condenseur (piège à froid).

Expliquer les rôles respectifs de ces trois éléments.

**4.3** - À partir de l'analyse des courbes du **document 5**, expliquer les phénomènes associés aux phases 1, 2 et 3 du cycle de lyophilisation.

**4.4** - En cas de surchauffe, quel est le risque pour le produit ?

**4.5** - Citer les 3 contrôles réalisables sur le produit en fin de lyophilisation.

**4.6** - On peut, avant le bouchage des flacons en fin de lyophilisation, injecter de l'azote. Quel est l'intérêt ?

### **5 - Conditionnement (13 points)**

Le conditionnement final du vaccin s'effectue dans un emballage qui doit réglementairement porter un certain nombre d'indications.

**5.1** - Indiquer sur l'emballage présenté dans le **document 2**, les éléments suivants en reportant le numéro correspondant sur celui-ci.

- 1 : le nom commercial
- 2 : le principe actif
- 3 : le numéro d'AMM
- 4 : la date de péremption
- 5 : le lieu de fabrication
- 6 : la forme galénique
- 7 : la voie d'administration
- 8 : le numéro de lot

**5.2** - Citer deux autres formes galéniques d'un médicament et la voie d'administration usuelle correspondante.

**5.3** - Ce vaccin peut-il être acheté sans ordonnance ? Justifier.

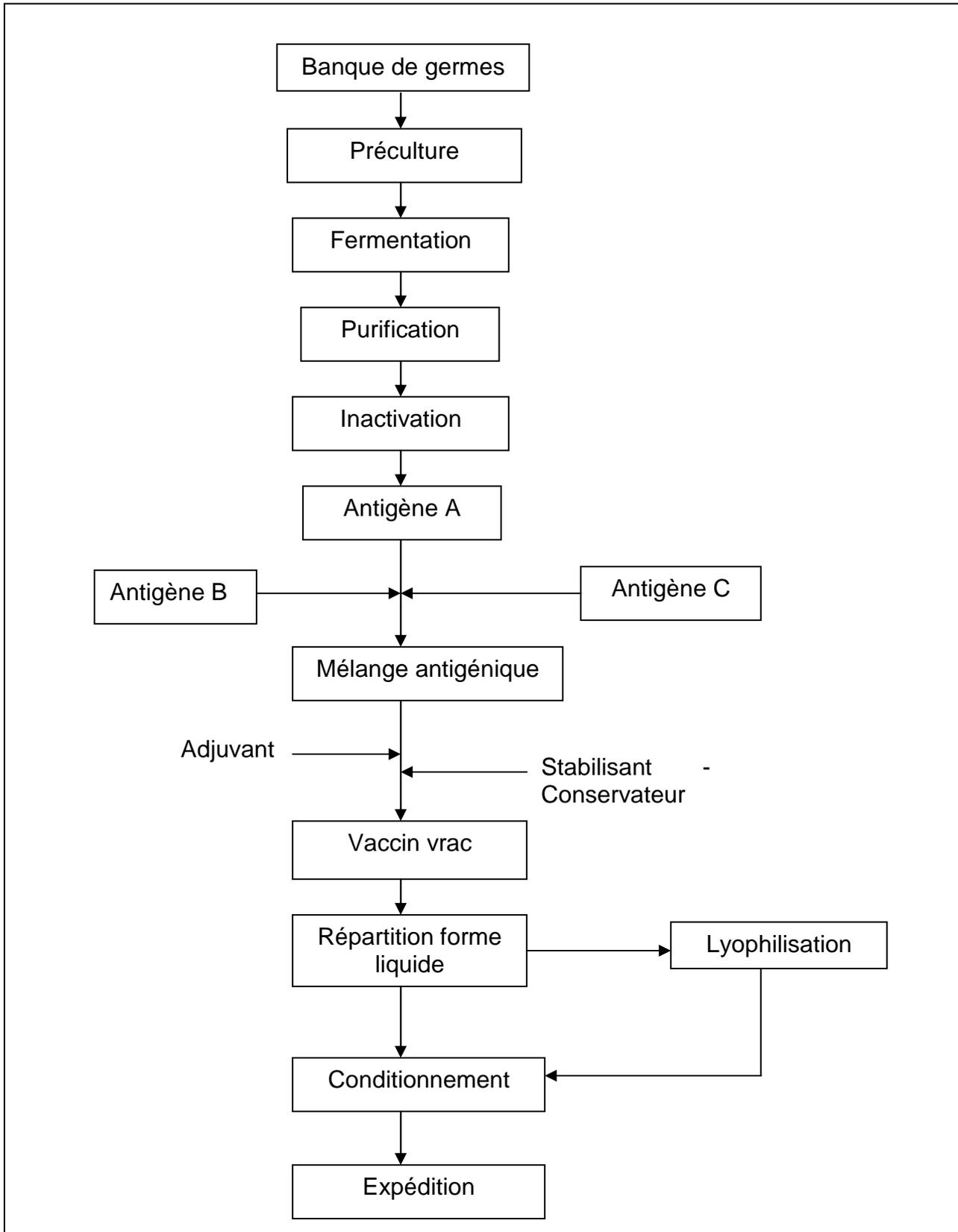
**5.4** - Ce vaccin est une suspension. Quelle est la précaution à prendre avant d'utiliser ce type de produit ? Justifier en rappelant la définition d'une suspension.

**5.5** - Dans la liste des excipients, on indique la présence d'eau pour préparations injectables (eau PPI). Les caractéristiques de cette eau sont décrites dans une monographie de la Pharmacopée.

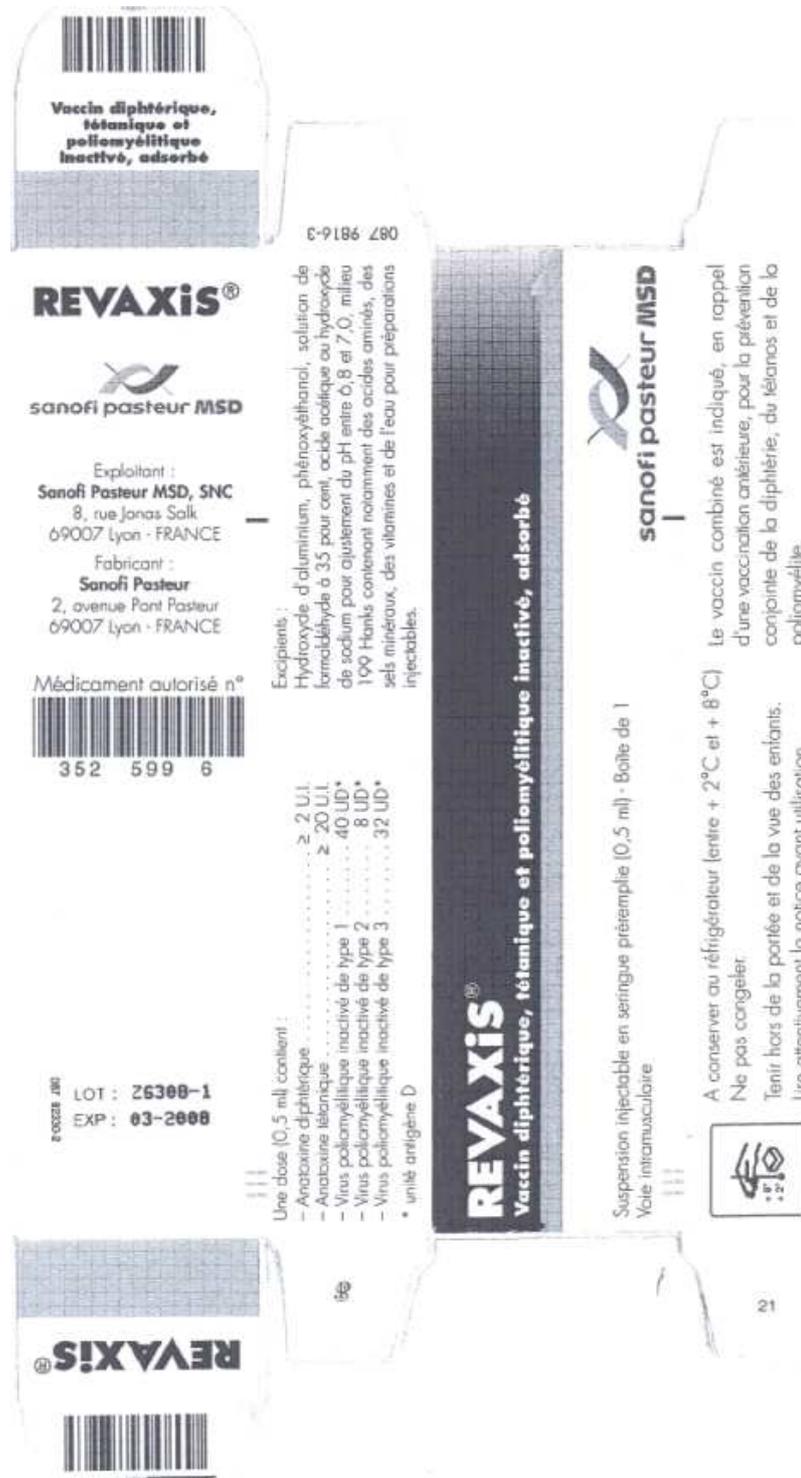
**5.5.1** - Qu'est ce que la Pharmacopée et quelles sont les informations contenues dans une monographie ?

**5.5.2** - L'eau PPI doit être stérile et apyrogène. Définir ces deux caractéristiques.

**DOCUMENT 1 : FABRICATION D'UN VACCIN**



**DOCUMENT 2 : EMBALLAGE DU VACCIN  
À RENDRE AVEC LA COPIE**



Vaccin diphtérique,  
tétanique et  
poliomyélitique  
inactivé, adsorbé

C-9186 280

**REVAXIS®**



Exploitant :  
**Sanofi Pasteur MSD, SNC**  
8, rue Jonas Salk  
69007 Lyon - FRANCE

Fabricant :  
**Sanofi Pasteur**  
2, avenue Pasteur  
69007 Lyon - FRANCE

Médicament autorisé n°



352 599 6

LOT : 26300-1  
EXP : 03-2008

Excipients :  
Hydroxyde d'aluminium, phénoxyéthanol, solution de  
formaldéhyde à 35 pour cent, acide acétique ou hydroxyde  
de sodium pour ajustement du pH entre 6,8 et 7,0, milieu  
199 Hank's contenant notamment des acides aminés, des  
sels minéraux, des vitamines et de l'eau pour préparations  
injectables.

Une dose (0,5 ml) contient :  
- Anticorps diphtérique ..... ≥ 2 U.I.  
- Anticorps tétanique ..... ≥ 20 U.I.  
- Virus poliomyélitique inactivé de type 1 ..... 40 UD\*  
- Virus poliomyélitique inactivé de type 2 ..... 8 UD\*  
- Virus poliomyélitique inactivé de type 3 ..... 32 UD\*  
\* unité antigène D

**REVAXIS®**

**Vaccin diphtérique, tétanique et poliomyélitique inactivé, adsorbé**



Suspension injectable en seringue préremplie (0,5 ml) - Boîte de 1  
Voie intramusculaire

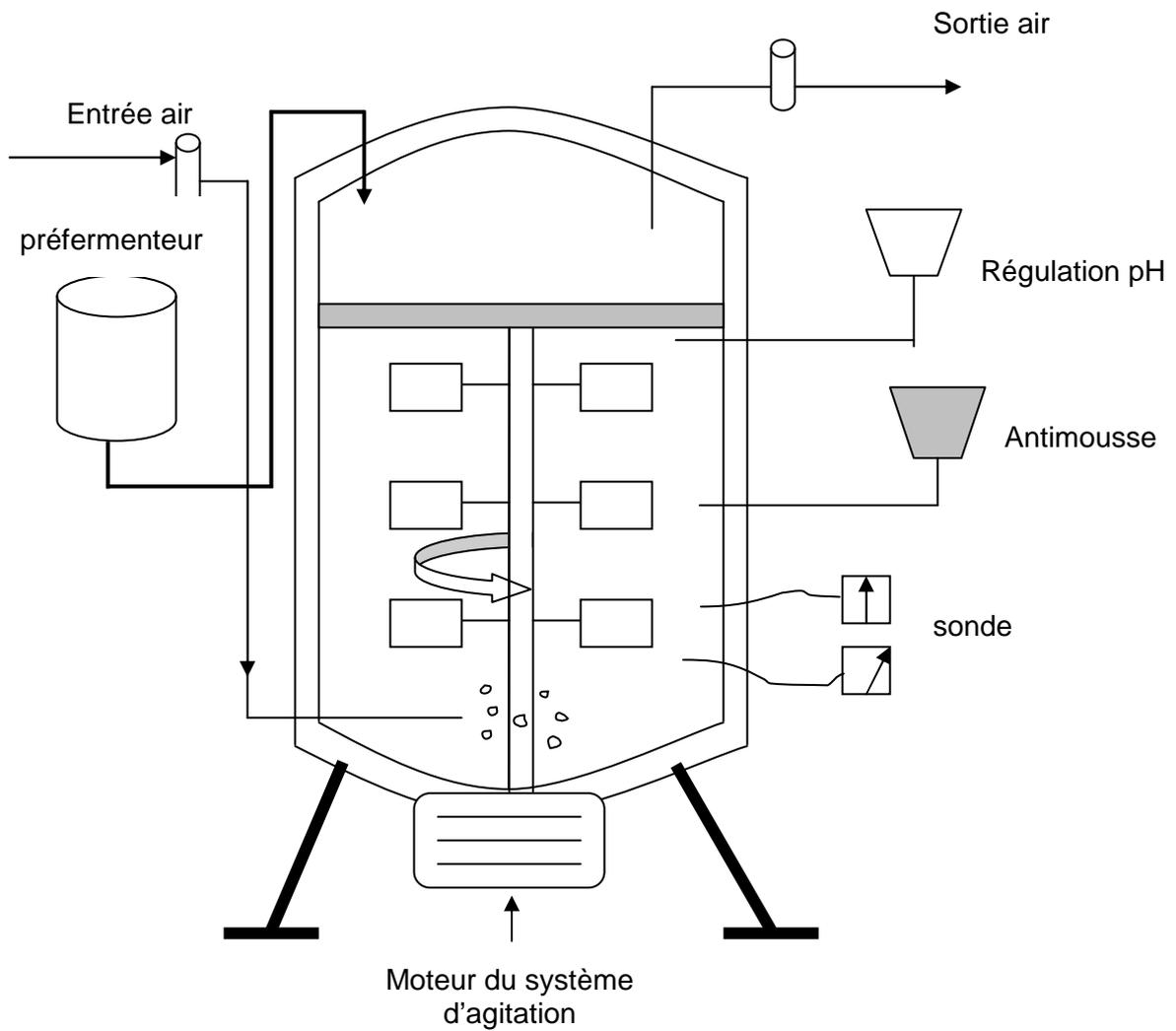
Le vaccin combiné est indiqué, en rappel  
d'une vaccination antérieure, pour la prévention  
conjointe de la diphtérie, du tétanos et de la  
poliomyélite.

A conserver au réfrigérateur (entre + 2°C et + 8°C)  
Ne pas congeler.  
Tenir hors de la portée et de la vue des enfants.  
Lire attentivement la notice avant utilisation.

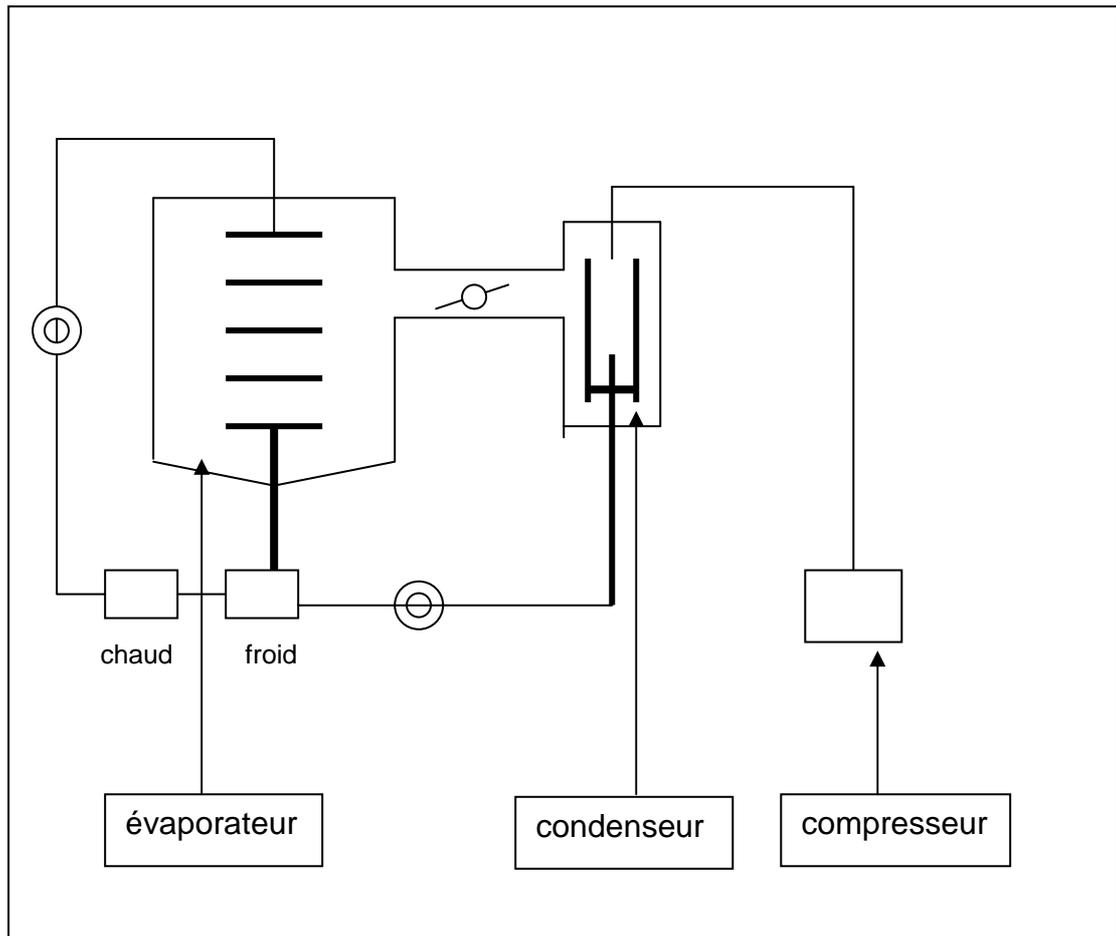


21

**DOCUMENT 3**  
**SCHÉMA D'UN FERMENTEUR ET DE SES PÉRIPHÉRIQUES**

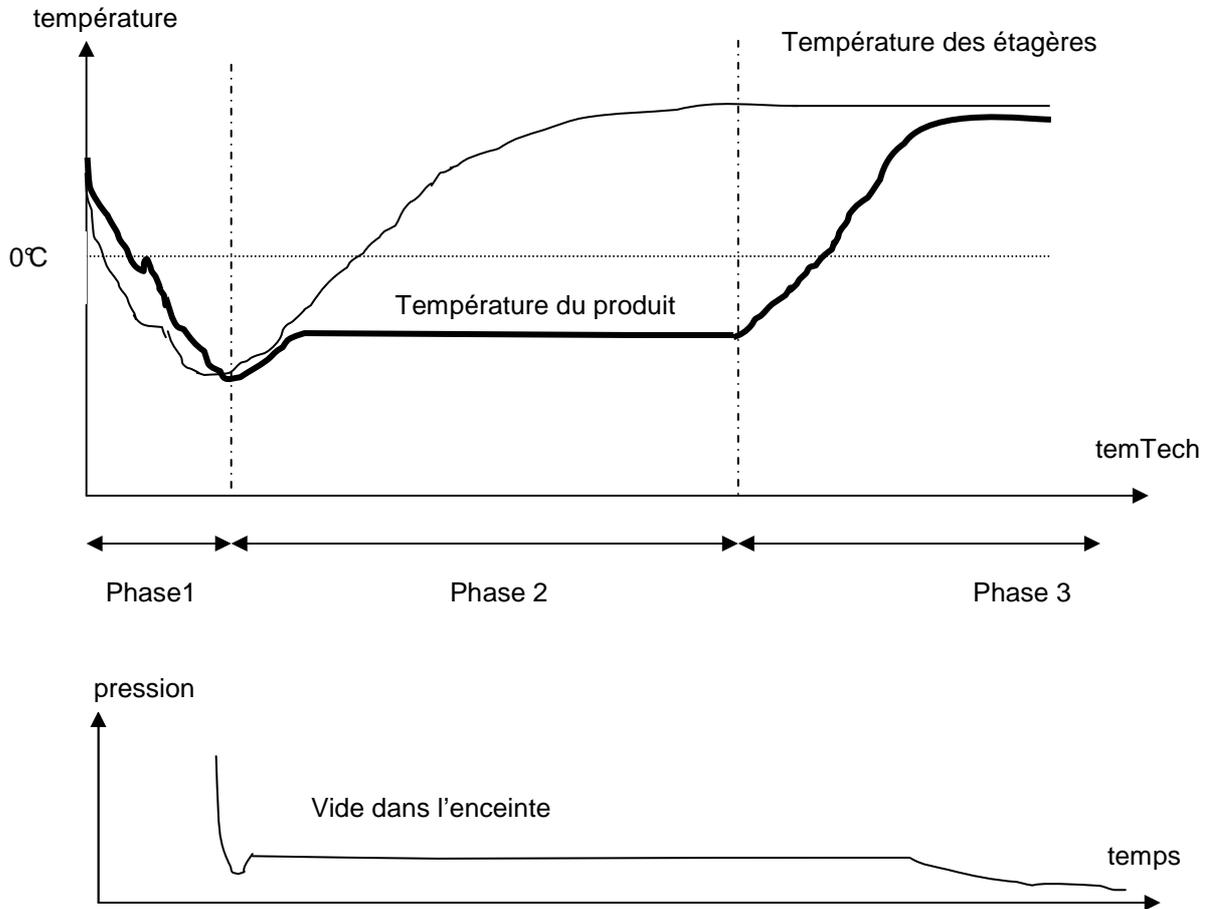


**DOCUMENT 4**  
**SCHÉMA D'UN LYOPHILISATEUR**



### DOCUMENT 5

## COURBES D'ENREGISTREMENT D'UN CYCLE DE LYOPHILISATION



## Sujet de Techniques de Biochimie

Pour les candidats non évalués en CCF

**Durée : 3 h 30 – Coefficient : 4**

**Documents interdits - Calculatrice autorisée**

**Dictionnaire anglais français autorisé**

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

### **CONTRÔLE D'UN VIN DOUX NATUREL : VDN**

Un VDN est un vin muté, dont la fermentation alcoolique est stoppée par addition d'alcool vinique neutre. Ce procédé a pour but d'augmenter la richesse alcoolique du vin tout en conservant une grande partie des sucres naturels du raisin.

#### **Contexte professionnel**

Un laboratoire d'œnologie assure le contrôle qualité d'un muscat :

- Mesure de l'acidité totale par potentiométrie.
- Détermination du pourcentage volumique en alcool par chromimétrie.
- Dosage des sucres résiduels par méthode enzymatique en point final.

L'acidité totale se mesure en équivalent d'acide tartrique (réglementation européenne) : un vin ne doit pas avoir une acidité totale inférieure à  $4,5 \text{ g.L}^{-1}$  d'acide tartrique. En général, cette acidité est rarement supérieure à  $12,2 \text{ g.L}^{-1}$ .

La teneur finale en alcool doit être comprise entre 15 % et 18 %. Pour un bon équilibre du vin, il doit exister un équilibre entre sucres résiduels et acidité.

Les VDN doivent contenir au moins  $45 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels. Jusqu'à  $50 \text{ g.L}^{-1}$ , ils sont secs («vins doux naturels secs»). Entre  $50 \text{ g.L}^{-1}$  et  $80 \text{ g.L}^{-1}$ , ils sont demi-secs et au-dessus de  $80 \text{ g.L}^{-1}$ , ils sont doux. Les muscats ont au moins  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres résiduels.

#### **Compétences**

- Réaliser des analyses électrochimiques.
- Réaliser des analyses volumétriques.
- Réaliser des analyses enzymatiques.
- Exprimer, valider et interpréter les résultats.

#### **Mise en œuvre**

Activités professionnelles	Documents et ressources	Pages
Dosage de l'acidité totale du vin par potentiométrie (15 points)	Fiche « matériel » pH-mètre (au poste de travail) Fiche protocole 1	2
Dosage de l'alcool par chromimétrie (30 points)	Fiche protocole 2 Fiche sécurité biochimique	3 9
Contrôle enzymatique des glucides par méthode en point final (30 points)	Fiche protocole 3 Fiche technique	4 5 et 6
Édition des résultats	Feuille de traçabilité Annexe 1	7 8

Rapport d'analyse (à rédiger sur la copie) (5 points)

Le vin doux naturel contrôlé est-il conforme ? Justifier la réponse.

<b>FICHE PROTOCOLE 1</b>	<b>Dosage de l'acidité totale du vin par potentiométrie</b>	
--------------------------	-------------------------------------------------------------	--

### Principe

Après avoir chassé le dioxyde de carbone par agitation à froid et sous vide, « l'acidité totale » correspond à la somme des acidités titrables lorsqu'on amène le pH à 7 par addition d'une solution alcaline titrée (solution d'hydroxyde de sodium).

**Donnée** : l'acide tartrique est un diacide noté  $H_2A$ , de masse molaire  $150 \text{ g.mol}^{-1}$ .

### Matériel et réactifs

- Solutions tampons étalonnage (pH 4 et pH 7)
- Échantillon noté : « **VDN** » : 70 mL
- Solution d'hydroxyde de sodium à exactement  $0,050 \text{ mol.L}^{-1}$  noté « **NaOH** » : 100 mL
- pH-mètre, agitateur, barreau aimanté
- Fiole et trompe à vide
- Pipette jaugée de 10 mL
- Burette
- 2 béchers

### Mode opératoire (2 essais)

#### **Décarbonation de l'échantillon**

Introduire environ 60 mL de vin dans une fiole à vide. Boucher et créer une dépression à l'aide d'une trompe à vide. Agiter jusqu'à ce que le vin ne mousse plus.

#### **Dosage potentiométrique (2 essais)**

Étalonner le pH-mètre.

Dans un bécher introduire :

- 10 mL de vin décarboniqué
- de l'eau distillée afin de plonger les électrodes

Verser  $V$  (mL) d'hydroxyde de sodium  $0,050 \text{ mol.L}^{-1}$  pour amener le vin à pH 7.

**Remarque** : Les réactifs sont en quantité suffisante pour réaliser un essai préliminaire.

### Compte rendu

1.1 - Compléter le tableau sur la feuille de traçabilité.

1.2 - Déterminer l'acidité totale en  $\text{mmol.L}^{-1}$  d'ions  $H_3O^+$ .

1.3 - Exprimer cette acidité en gramme par litre d'acide tartrique.

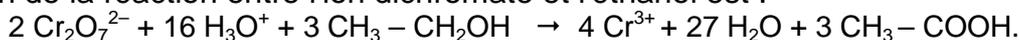
**Donnée** :  $S_r = 1,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ .  
 $U_c = 1,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

<b>FICHE PROTOCOLE 2</b>	<b>Dosage de l'alcool par chromimétrie</b>	
--------------------------	--------------------------------------------	--

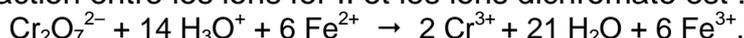
### **Principe**

Après distillation, l'alcool du vin est dosé par oxydoréduction. L'éthanol est oxydé par un excès connu de dichromate de potassium en milieu acide. L'excès de dichromate est dosé par une solution de sel de Mohr.

L'équation de la réaction entre l'ion dichromate et l'éthanol est :



L'équation de la réaction entre les ions fer II et les ions dichromate est :



Un échantillon de 10 mL de vin a été distillé par entraînement à la vapeur, le distillat est recueilli dans une fiole jaugée de 200 mL. On obtient la solution hydro-alcoolique notée « **S** ».

### **Matériel et réactifs**

- Dichromate de potassium à environ  $0,115 \text{ mol.L}^{-1}$  (en distributeur)
- Acide sulfurique concentré (en distributeur)
- Sel de Mohr  $0,344 \text{ mol.L}^{-1}$ , noté « **Sel de Mohr** »
- Acide phosphorique concentré (en distributeur)
- Indicateur redox (diphénylaminosulfate de baryum), noté « **Redox** »
- Échantillon noté « **S** » : 20 mL dans la glace
- 3 fioles d'Erlenmeyer bouchant émeri
- Éprouvette de 100 mL
- Burette
- Pipette jaugée de 5 mL
- 2 béciers de 100 mL

### **Oxydation de l'éthanol (2 essais)**

Dans une fiole d'Erlenmeyer bouchant émeri, introduire :

- E = 10 mL de dichromate de potassium à environ  $0,115 \text{ mol.L}^{-1}$
- 5 mL d'acide sulfurique concentré verser lentement en agitant et en refroidissant

Lorsque le mélange est revenu à température du laboratoire, ajouter :

- E' = 5 mL de solution S

Boucher l'Erlenmeyer et laisser réagir pendant environ 20 minutes (agiter de temps en temps).

### **Dosage de l'excès de dichromate par le sel de Mohr.**

Dans la fiole d'Erlenmeyer, ajouter :

- 100 mL d'eau distillée
- 15 mL d'acide phosphorique concentré
- 20 gouttes d'indicateur redox (diphénylaminosulfate de baryum)

Verser à la burette la solution de sel de Mohr ( $C_{\text{Fe}^{2+}} = 0,344 \text{ mol.L}^{-1}$ ) ; soit  $V_E$  le volume de la chute de burette.

### **Réalisation d'un témoin.**

Opérer comme pour l'essai en remplaçant la solution notée « **S** » par de l'eau distillée. Soit  $V_T$  le volume de la chute de burette.

**Faire relever les différentes chutes de burette par un examinateur.**

***Compte rendu.***

2.1 - Compléter le tableau de la feuille de traçabilité.

2.2 - Établir la formule littérale de calcul de la concentration molaire en éthanol du vin en mol.L<sup>-1</sup>.

2.3 - Réaliser l'application numérique.

2.4 - Calculer le pourcentage volumique en alcool du vin.

**Données** :  $S_r = 3 \text{ mmol.L}^{-1}$

$U_c = 5 \text{ mmol.L}^{-1}$

Masse molaire de l'éthanol  $46 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse volumique de l'éthanol  $\rho = 0,7936 \text{ g.mL}^{-1}$

<b>FICHE PROTOCOLE 3</b>	<b>Contrôle enzymatique des glucides par méthode en point final</b>	
--------------------------	---------------------------------------------------------------------	--

### **Matériel et réactifs**

- Echantillon noté « **VDN** »
- Eau bidistillée
- Solution 1 : tampon pH 4,6 ;  $\beta$ -fructosidase : 0,5 mL
- Solution 2 : tampon pH 7,6, NADP, ATP,  $Mg^{2+}$  : 5 mL
- Suspension 3 : Hexokinase ; glucose-6-phosphatédéshydrogénase : 0,100 mL
- Suspension 4 : Phosphoglucose isomérase : 0,100 mL
- Réactif 5 : Contrôle saccharose 0,5 g.L<sup>-1</sup> : 0,250 mL
- Réactif 6 : Contrôle glucose 0,5 g.L<sup>-1</sup> : 0,250 mL
- Microcuvettes UV : 8
- P<sub>1000</sub>, P<sub>200</sub> et P<sub>20</sub>
- Fiole de 100 mL
- Pipette jaugée de 1 mL

### **Protocole opératoire**

La solution 1 et les suspensions 3 et 4 sont conservées à 4°C (**à demander à l'examinateur**).

Diluer l'échantillon « **VDN** ».

**Donnée** : l'échantillon à doser doit contenir entre 0,10 et 1,5 g.L<sup>-1</sup> de glucides.

**Remarque** : ce dosage enzymatique ne prévoit pas de contrôle fructose.

Les absorbances de chaque échantillon sont déterminées comme suit :

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{essai}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$$

#### **Dosage du glucose**

$$\Delta A_{\text{glucose}} = (A_2 - A_1)_{\text{échantillon glucose/fructose}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc glucose/fructose}}$$

#### **Dosage du fructose**

$$\Delta A_{\text{fructose}} = (A_3 - A_2)_{\text{échantillon glucose/fructose}} - (A_3 - A_2)_{\text{blanc glucose/fructose}}$$

#### **Dosage du saccharose**

$$\Delta A_{\text{glucose total}} = (A_2 - A_1)_{\text{échantillon saccharose}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc saccharose}}$$

$$\Delta A_{\text{saccharose}} = \Delta A_{\text{glucose total}} - \Delta A_{\text{échantillon glucose/fructose}}$$

### **Calculs**

3.1 - Expliquer le calcul de la dilution de l'échantillon « **VDN** ».

3.2 - Compléter les tableaux sur la feuille de traçabilité.

3.3 - Établir les formules littérales du calcul des concentrations en (g.L<sup>-1</sup>) de glucose, fructose et saccharose du vin, et les concentrations en glucides des deux contrôles.

3.4 - Vérifier la validité de la méthode.

3.5 - Effectuer l'édition métrologique des résultats.

**Données** : M(glucose) = 180,16 g.mol<sup>-1</sup>

M(fructose) = 180,16 g.mol<sup>-1</sup>

M(saccharose) = 342,3 g.mol<sup>-1</sup>

$\epsilon_{\text{NADPH,H}^+}^{340 \text{ nm}} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$S_r = 6 \text{ mg.L}^{-1}$   $U_c = 10 \text{ mg.L}^{-1}$  glucose et fructose

$S_r = 20 \text{ mg.L}^{-1}$   $U_c = 30 \text{ mg.L}^{-1}$  saccharose

<b>FICHE TECHNIQUE 3</b>	<b>Contrôle enzymatique des glucides par méthode en point final</b>	
--------------------------	---------------------------------------------------------------------	--

## Sucrose/D-Glucose/D-Fructose/uv method

For the determination of sucrose, D-glucose and D-fructose in foodstuffs and other materials.

### Principle (Ref. A 1)

The D-glucose concentration is determined before and after the enzymatic hydrolysis of sucrose; D-fructose is determined subsequently to the determination of D-glucose.

*Determination of D-glucose before inversion:*

At pH 7.6, the enzyme hexokinase (HK) catalyzes the phosphorylation of D-glucose by adenosine-5'-diphosphate (ATP) with the simultaneous formation of adenosine-5'-diphosphate (ADP) (1).



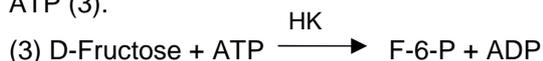
In the presence of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH), the D-glucose-6-phosphate (G-6-P) formed is specifically oxidized by nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP) to D-gluconate-6-phosphate with the formation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (2).



The NADPH formed in this reaction is stoichiometric to the amount of D-glucose and is measured by means of its light absorbance at 334, 340 or 365 nm.

*Determination of D-fructose:*

Hexokinase also catalyzes the phosphorylation of D-fructose to D-fructose-6-phosphate (F-6-P) with the aid of ATP (3).



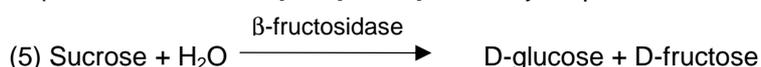
On completion of the reaction (3) F-6-P is converted by phosphoglucose isomerase (PGI) to G-6-P (4).



G-6-P reacts again with NADP with formation of D-gluconate-6-phosphate and NADPH (2). The amount of NADPH formed now is stoichiometric to the amount of D-fructose.

*Enzymatic inversion:*

At pH 4.6, sucrose is hydrolyzed by the enzyme  $\beta$ -fructosidase (Invertase) to D-glucose and D-fructose (5).



The determination of D-glucose after inversion (total D-glucose) is carried out according to the principle outlined above.

The sucrose content is calculated from the difference of the D-glucose concentrations before and after enzymatic inversion.

### Stability of reagents

The contents of bottles 1, 2, 3 and 4 are stable at 2-8°C (see pack label).

Solution 1 and solution 2 are stable for 4 weeks at 2-8°C, or for 2 months at -15 to -25°C.

Bring solutions 1 and 2 to 20-25°C before use.

### Procedure

Wavelength <sup>1</sup> :	340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm
Glass cuvette <sup>2</sup> :	1.00 cm light path
Temperature:	20-25°C
Final volume:	1,51 mL (3.040 ml, determination of D-fructose)
Read against air (without a cuvette in the light path) or against water	
Sample solution:	4-150 $\mu$ g sucrose + D-glucose + D-fructose/assay <sup>3</sup> (in 0.100-1.800 resp. 2.000 ml sample volume)

<sup>1</sup> The absorption maximum of NADPH is at 340 nm. On spectrophotometers, measurements are taken at the absorption maximum; if spectralline photometers equipped with a mercury vapor lamp are used, measurements are taken at a wavelength of 365 nm 334 nm.

<sup>2</sup> If desired, disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes

<sup>3</sup> See instructions for performance of assay

<b>FICHE TECHNIQUE 3 (suite)</b>	<b>Contrôle enzymatique des glucides par méthode en point final</b>	
--------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------	--

Pipette into cuvettes	Blank sucrose sample	Sucrose sample	Blank D-glucose/ D-fructose sample	D-glucose/ D-fructose sample
solution 1* sample solution**	0,100 ml -	0,100 ml 0,050 ml	- -	- 0,050 ml
Mix*, incubate for 15 min at 20-25°C or for 5 min at 37°C (before pipetting, warm up solution 1 to 37°C). Addition of:				
solution 2 redist. water	0,500 ml 0,900 ml	0,500 ml 0,850 ml	0,500 ml 1,000 ml	0,500 ml 0,950 ml
Mix***, read absorbances of the solutions after approx. 3 min ( $A_1$ ). Start reaction by addition of:				
Suspension 3	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml
Mix***, wait for completion of the reaction (approx. 10-15 min) and read absorbances of the solutions ( $A_2$ ). If the reaction has not stopped after 15 min, continue to read the absorbances at 2 min intervals until the absorbance increases constantly over 2 min. Addition of:				
Suspension 4	-	-	0,010 ml	0,010 ml
Mix***, read absorbances of the solutions after 10-15 min ( $A_3$ ).				

If the absorbance  $A_2$  increases constantly, extrapolate the absorbances  $A_2$  to the time of the addition of suspension 3 (HK/G8P-DH).

---

\* Pipette solution 1 and sample solution each, onto the bottom of the cuvette and mix by gentle swirling.

When using a plastic spatula, remove it from the cuvette only directly before measuring absorbance  $A_1$ .

\*\* Rinse the enzyme pipette or the pipette tip of the piston pipette with sample solution before dispensing the sample solution.

\*\*\* For example, with a plastic spatula or by gentle swirling after closing the cuvette with Parafilm (trademark of the American Can Company, Greenwich, Ct., USA).

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ**

NOM DE L'OPÉRATEUR .....Date : .....

Poste n° .....

**Dosage de l'acidité totale par potentiométrie**

Volume d'hydroxyde de sodium versé (mL)		
-----------------------------------------	--	--

**Dosage de l'alcool par chromimétrie**

$V_{E1}$ en mL	
$V_{E2}$ en mL	
$V_T$ en mL	

**Contrôle quantitatif des glucides par méthode enzymatique en point final****Dosage du D-glucose / D-fructose**

A 340 nm	Blanc glucose fructose	Contrôle glucose	Essai 1 vin	Essai 2 vin
$A_1$				
$A_2$				
$A_3$				
$\Delta A_{\text{glucose}}$				
$\Delta A_{\text{fructose}}$				

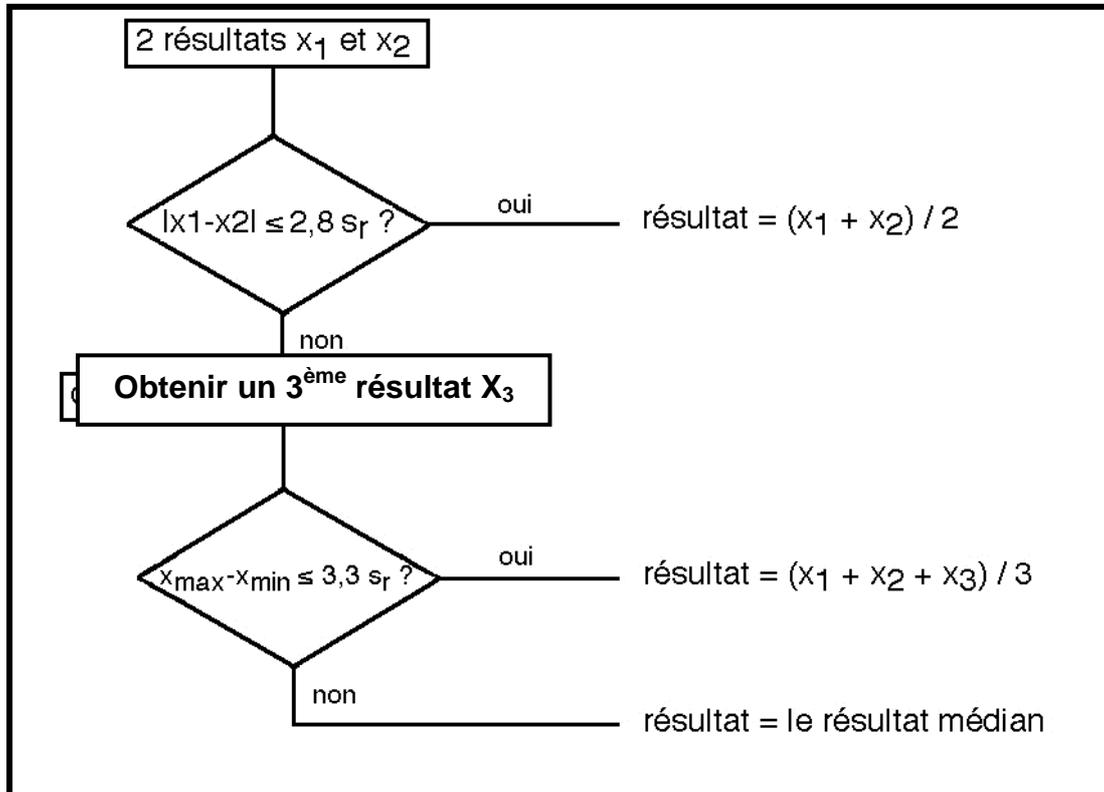
**Dosage du saccharose**

A 340 nm	Blanc saccharose	Contrôle saccharose	Essai 1 vin	Essai 2 vin
$A_1$				
$A_2$				
$\Delta A_{\text{glucose total}}$				
$\Delta A_{\text{saccharose}}$				

## ANNEXE 1

### EXPRESSION MÉTROLOGIQUE DES RÉSULTATS NUMÉRIQUES

#### *Logigramme de traitement des données expérimentales*



#### **Expression du résultat**

Le nombre de chiffres significatifs pour exprimer le résultat final établi sera en adéquation avec l'expression numérique de l'écart-type de répétabilité ( $s_r$ ).

L'expression du résultat comporte :

- La valeur de  $s_r$  ;
- le nombre de résultats d'essai 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 (unité précisée).

## FICHE SÉCURITÉ BIOCHIMIQUE

Nom du produit	Pictogramme	Phrases R et S	Limites	Concentration de travail
Hydroxyde de sodium		R 35 S 26-36/37/39-45 Graves brûlures	conc $\geq$ 5 % R35 2 % < conc. < 5 % R34 0,5 % < conc. < 2% R36/38	$\approx$ 0,25 %
Acide Sulfurique		R 14-35-37 S 26-30-45 Graves brûlures	conc $\geq$ 15 % R35 5 % < conc. < 15 % R36/38	concentré
Acide Phosphorique		R 34 S 26-45	conc $\geq$ 25 % R34 10 % < conc. < 25 % R36/38	concentré
Dichromate de potassium		R 21-25-26-36/38-41-43-46-49-50/53 S 45-53-60-61	0,1 % < conc. < 0,5 % R49/46	$\approx$ 3,4 %

## Sujet de Techniques de Microbiologie 1<sup>er</sup> Jour

Pour les candidats non évalués en CCF

**Durée : 4 h – Coefficient : 4**

**Documents interdits - Calculatrice autorisée**

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

**Attention :**

**Le protocole du premier jour ne pourra être repris le second jour.**

### **PRÉPARATION ET CONTRÔLE QUALITÉ D'UN MILIEU DE CULTURE**

#### ***Contexte professionnel***

Dans les laboratoires de microbiologie des eaux, la qualité de nombreux essais dépend de la constance des milieux de culture et de leur capacité à donner des résultats reproductibles. Les exigences concernant les milieux varient selon le type d'échantillon et les micro-organismes à détecter.

Une entreprise spécialisée dans la fabrication de milieux de culture a mis en place trois étapes principales de validation des milieux :

- une étape de stabilité
- une validation interne qui consiste à tester les performances des milieux en vérifiant différents critères comme la fertilité, la sensibilité, la spécificité et la sélectivité de ces milieux
- une validation externe des performances qui consiste à tester les milieux dans les conditions dans lesquelles ils seront utilisés par les laboratoires ou les industries

Le but de la manipulation est de préparer un milieu de culture sélectif, « la gélose CN, gélose au cétrimide et à l'acide nalidixique », et de contrôler en parallèle la qualité d'un autre lot de ce milieu et donc :

- de réaliser le contrôle qualité de ce milieu selon la norme NF T 90-461 de juillet 2001 (contrôles de la stérilité, de sélectivité, de fertilité et de productivité)
- de vérifier le coefficient de correspondance opacimétrique en vue de préparer une suspension calibrée utilisée pour le contrôle qualité
- de contrôler l'identité d'une souche de référence
- de tester le milieu préparé dans les conditions d'utilisation de celui-ci pour une validation externe des performances

#### ***Compétences***

- Préparer les réactifs milieux et matériels
- Réaliser des techniques d'observation macroscopique et microscopique des microorganismes
- Réaliser des techniques de culture de microorganismes
- Réaliser des techniques d'identification de microorganismes
- Réaliser des techniques de quantification des microorganismes
- Préparer et ordonner les valeurs expérimentales. Exprimer des résultats
- Valider et interpréter des résultats

**Mise en œuvre**

Activités professionnelles	Ressources - Documents	Pages	Documents à compléter et à joindre à la copie
<p><b>1</b></p> <p>Préparation de la gélose CN (9 points)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 1</li> <li>- Fiche technique de la balance (au poste de travail)</li> <li>- PSM à disposition</li> </ul>	<p><b>3 et 4</b></p>	<p>Feuille de traçabilité <b>page 11</b></p>
<p><b>2</b></p> <p>Contrôle qualité du milieu de culture préparé (17 points)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 2</li> </ul>	<p><b>5 et 6</b></p>	
<p><b>3</b></p> <p>Vérification d'un coefficient de correspondance opacimétrique (21 points)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 3</li> <li>- Fiche technique du spectrophotomètre (au poste de travail)</li> </ul>	<p><b>7</b></p>	
<p><b>4</b></p> <p>Vérification de l'identité d'une des souches de référence utilisées dans le contrôle qualité (25 points)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 4</li> <li>- Fiche de la galerie API (au poste de travail)</li> <li>- Fiche de sécurité</li> </ul>	<p><b>8</b></p> <p><b>10</b></p>	
<p><b>5</b></p> <p>Validation externe des performances du milieu CN (8 points)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 5</li> </ul>	<p><b>9</b></p>	

## FICHE PROTOCOLE 1

## Préparation de la gélose CN

## Extrait de la fiche technique du fabricant de la gélose CN

**Domaine d'utilisation**

La gélose CN pour *Pseudomonas* est un milieu sélectif pour l'isolement et le dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux embouteillées, les eaux de piscines, les eaux destinées à la consommation humaine.

**Formule type**

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

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pancréatique de gélatine 16,0 g
  - Hydrolysate acide de caséine 10,0 g
  - Glycérol 10,0 mL
  - Sulfate de potassium 10,0 g
  - Chlorure de magnésium 1,4 g
  - Cétrimide 0,2 g
  - Acide nalidixique 15,0 mg
  - Agar agar bactériologique 11,0 g
- pH milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2

**Préparation**

(pour 1 litre de gélose CN)

- Mettre en suspension 48,6 g de milieu déshydraté BK 165 dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Ajouter 10 mL de glycérol.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Éviter tout chauffage excessif.
- Refroidir et maintenir à 47°C (ne pas refondre un milieu repris en masse).
- Répartir en flacons.

Nota : Une liquéfaction partielle de l'agar entraînera inévitablement une altération significative de la consistance du gel du milieu solidifié, après stérilisation et refroidissement.

**Matériel et réactifs**

- 1 flacon contenant le milieu de culture déshydraté BK 165
- 1 agitateur chauffant
- 1 erlenmeyer de 250 mL propre et sec
- 1 bécher de 100 mL
- 1 éprouvette de 250 mL
- des pipettes graduées de 2, 5 et 10 mL
- de l'eau distillée
- du glycérol
- du coton cardé
- du papier aluminium
- 1 flacon de Duran propre et sec de 250 mL
- 1 flacon contenant du milieu de culture CN préparé extemporanément, maintenu en surfusion en sortie d'autoclave à 50°C et étiqueté « **Gélose CN BK 165, 120 mL** »
- 6 boîtes de Pétri stériles de 90 mm (sous PSM)

<b>FICHE PROTOCOLE 1 (suite)</b>	<b>Préparation de la gélose CN</b>	
--------------------------------------	------------------------------------	--

### ***Mode opératoire***

Afin de tester ce nouveau milieu, à l'aide de la fiche technique du fabricant, préparer le volume nécessaire de milieu CN dans le but de couler 6 boîtes.

#### **Réaliser la pesée devant un examinateur.**

Transférer le milieu préparé en flacon et le donner à l'examineur pour la stérilisation.

Le reste de la manipulation se fera sur un milieu préparé préalablement dans les mêmes conditions et fourni par le centre « **Gélose CN BK 165, 120 mL** ». Ce milieu a été stérilisé, refroidi et maintenu en surfusion à l'étude à 50°C.

Couler ce milieu sous PSM en boîtes de Pétri à raison de 20 mL environ par boîte.

#### **La préparation des boîtes sera réalisée devant un examinateur.**

### ***Compte rendu***

- 1.1 - Présenter le calcul de la masse de milieu en poudre à peser pour réaliser 6 boîtes de milieu.
- 1.2 - Calculer le volume de glycérol à ajouter.

<b>FICHE PROTOCOLE 2</b>	<b>Contrôle qualité d'un milieu de culture</b>	<b>NFT 90 - 461</b>
--------------------------	------------------------------------------------	---------------------

### **Extrait de la norme NF T 90-461**

- **Protocole de réalisation du contrôle de fertilité et de productivité**

« Tester le lot de milieu avec une suspension de bactéries certifiée ou non (matériau de référence stable, homogène, et dont la valeur cible VC est connue).

Un minimum de 5 réplicats par lot de milieu contrôlé est requis.

Ces 5 réplicats doivent comporter un minimum de 100 colonies au total. Pour cela utiliser un matériau de référence dont la VC est supérieure ou égale à 20. »

**Réplicat** : ensemencement en surface du milieu à contrôler avec un inoculum de concentration connue et de volume connu.

**VC** : valeur cible = nombre de colonies théorique attendu sur les réplicats.

- **Protocole de lecture du contrôle de fertilité et de productivité**

« Accepter le lot de milieux préparés si les deux conditions suivantes sont satisfaites (cas de 5 réplicats) :

- Aucune boîte ne doit présenter une absence de croissance.  
Si un seul résultat négatif (absence de croissance), rendre : lot non valide.
- Calculer le rendement relatif R en % à l'aide de la formule suivante :

$$R = \frac{\text{moyenne géométrique}}{VC} \times 100$$

Moyenne géométrique = moyenne des résultats obtenus sur chacun des réplicats.

VC = valeur cible = nombre de colonies théorique attendu sur les réplicats.

R doit être compris entre 66% et 150%. »

### **Extrait adapté de la fiche technique du fabricant de la gélose CN**

#### **Résultats du contrôle qualité réalisé par le fournisseur (Biokar diagnostics)**

- Milieu déshydraté : poudre blanc crème, fluide et homogène
- Milieu préparé (complet) : gélose blanchâtre

Réponse culturelle typique sur milieu complet après (44 ± 4) h d'incubation à (36 ± 2)°C

<b>Micro-organismes</b>	<b>Croissance</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	+
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2541	-

### **Matériel et réactifs**

- 12 boîtes de milieu de culture CN coulées
- Suspension de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 notée « **ATCC 9027** »
- Suspension d'*Enterococcus faecalis* CCM 2541 notée « **CCM 2541** »
- 2 boîtes de milieu TSA
- Suspension de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 à environ 10<sup>2</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> étiquetée « **ATCC 9027 10<sup>2</sup>** »
- Pipettes stériles de 1 mL
- Dispositif d'étalement

<b>FICHE PROTOCOLE 2</b> <b>(suite)</b>	<b>Contrôle qualité d'un milieu de culture</b>	<b>NFT 90 - 461</b>
--------------------------------------------	------------------------------------------------	---------------------

### **Mode opératoire**

#### **Contrôle de stérilité**

Incuber 5 milieux à la température et à la durée d'utilisation habituelle pour le contrôle des eaux.

#### **Contrôle qualitatif de culture et de sélectivité**

Ensemencer une suspension de travail de la souche positive par isolement sur une gélose CN.

Ensemencer une suspension de travail de la souche négative par isolement sur une gélose CN.

#### **Contrôle de fertilité et de productivité**

La fertilité d'un milieu correspond à la capacité d'un milieu à récupérer quantitativement certains microorganismes cibles.

Réaliser le contrôle de fertilité du milieu préparé selon la norme NF T 90-461 de juillet 2001 dont des extraits sont donnés au début de la fiche technique, de façon à obtenir une VC proche de 30, pour la suspension calibrée « **ATCC 9027 10<sup>2</sup>** ».

La norme XP CEN ISO / TS 11133-2 « Guide pratique pour les tests de performance sur les milieux de culture » préconise de contrôler la suspension de travail utilisée sur un milieu de référence non sélectif.

Contrôler cette suspension bactérienne sur un milieu de référence (milieu TSA) dans les mêmes conditions que la réalisation des réplicats (ensemencement, température, durée). Faire deux essais.

### **Réaliser les ensemencements devant un examinateur.**

#### **Compte rendu**

**2.1** - Préciser les conditions d'incubation des milieux.

**2.2** - Pour le contrôle de fertilité et de productivité, présenter le calcul du volume d'inoculum à ensemer pour la réalisation des réplicats afin d'avoir une valeur cible VC proche de 30 pour chaque répliat.

**2.3** - Justifier le choix de la valeur cible (VC environ égal à 30).

<b>FICHE PROTOCOLE 3</b>	<b>Vérification d'un coefficient de correspondance opacimétrique</b>	
--------------------------	----------------------------------------------------------------------	--

Pour réaliser des suspensions de travail de concentration connue en bactéries, il est nécessaire de connaître le coefficient de correspondance  $a'$  : Densité Optique à 600 nm / nombre de microorganismes par mL.

On se propose de contrôler ce coefficient  $a'$  pour la souche de *Pseudomonas aeruginosa* afin d'établir un protocole de préparation de la suspension de travail à  $10^2$  UFC/mL<sup>-1</sup>.

### **Matériel et réactifs**

- 1 tube de culture pure de *Pseudomonas aeruginosa* en bouillon nutritif noté « **Pseudo** »
- 1 tube contenant 10 mL de milieu BN stérile
- tubes vides stériles
- 8 tubes contenant chacun 9 mL de tryptone-sel et notés « **diluant** »
- Dispositif d'étalement
- 6 boîtes de gélose PCA
- Pipettes de 1 mL stériles
- micro-cuves de spectrophotomètre + parafilm
- Spectrophotomètre réglé à 600 nm.

### **Mode opératoire**

Mesurer la densité optique de la culture « **Pseudo** » à 600 nm, en déduire sa concentration en tenant compte des données fournies par le centre d'examen (coefficient de correspondance  $a'$ , limite de linéarité).

Contrôler cette concentration par ensemencement de trois solutions en surface sur géloses PCA.

### **Montrer la réalisation d'une dilution à un examinateur.**

Incuber à 30°C pendant 24 heures.

### **Compte rendu.**

- 3.1 - Justifier le choix des dilutions retenues.

FICHE PROTOCOLE 4	Vérification de l'identité d'une des souches de référence utilisées dans le contrôle qualité	NFT 90 - 461
-------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------	--------------

La norme NF T 90-461 de juillet 2001 préconise de réaliser le contrôle de productivité du milieu CN en utilisant les souches de références ci-dessous :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Enterococcus faecalis* CCM 2541

### **Matériel et réactifs**

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Enterococcus faecalis* CCM 2541
- Cultures pures en Bouillon Nutritif et sur Gélose Nutritive inclinée de la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, notée « **Ref** »
- Réactifs pour la coloration de gram
- Réactifs pour tests enzymatiques rapides

### **Mode opératoire**

Contrôler l'identité de la souche de référence « *Pseudomonas aeruginosa* » en réalisant :

- Étude microscopique
- Test enzymatique adapté

**Présenter à l'examineur les observations microscopiques.**

**Réaliser le test enzymatique en présence d'un examineur.**

Suggérer une galerie miniaturisée et les milieux associés permettant de confirmer le genre et l'espèce de cette souche.

**La proposition de galerie est à présenter à un examineur  
45 minutes au moins avant la fin de l'épreuve.**

Ensemencer la galerie et les milieux attribués.

### **Compte rendu**

- 4.1 - Consigner les résultats obtenus et orienter l'identification (feuille de traçabilité).

<b>FICHE PROTOCOLE 5</b>	<b>Validation externe des performances du milieu CN</b>	
--------------------------	---------------------------------------------------------	--

Le milieu CN est préconisé pour le dénombrement des *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux.

Le laboratoire désire tester les performances du milieu CN par filtration d'un échantillon d'eau volontairement contaminé par *Pseudomonas aeruginosa*.

### **Matériel et réactifs**

- 2 échantillons d'eau de 250 mL contenant environ 30 UFC de *Pseudomonas aeruginosa* noté « **E250** »
- 2 membranes de filtration de porosité 0,45 µm
- 1 petite boîte de gélose Trypticase Soja (TSA)
- 1 petite boîte de gélose au cétrimide (CN)

### **Mode opératoire**

Filtrer stérilement sur membrane les échantillons d'eau à tester.

À la surface des boîtes préparées, déposer la membrane à la surface de la gélose en veillant à ce que le contact soit parfait.

Incuber à  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant  $44 \pm 4$  heures.

**Réaliser une filtration devant un examinateur.**

## FICHE DE SÉCURITÉ

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES R ET S ASSOCIEES
<b>REACTIFS DE COLORATION</b>		
<b>Cristal Violet</b>	<i>Autre dénomination : Violet de gentiane</i>	
 <b>T</b>	Benzèneméthanol, 4-(diméthylamino)- $\alpha$ -hydrochlorure $C_{25}H_{30}N_3Cl$  Solvant : éthanol, oxalate d'ammonium	<b>R45</b> – Peut causer le cancer <b>S36/37</b> – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés ; <b>S45</b> – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette) ; <b>S53</b> – Éviter l'exposition et se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation
<b>Réactif de Lugol</b>	<i>Autres dénominations : Réactif iodo-ioduré, Solution d'iodure de potassium iodée</i>	
 <b>Xn</b>	Iode $I_2$  Iodure de potassium $KI$	<b>R20/21</b> – Nocif par inhalation et par contact avec la peau <b>S23</b> – Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols ; <b>S25</b> – Éviter le contact avec les yeux
<b>Éthanol</b>		
 <b>F</b>	Éthanol (alcool éthylique dénaturé) 95 % $CH_3CH_2OH$	<b>R11</b> – Facilement inflammable <b>S7</b> – Conserver le récipient bien fermé ; <b>S16</b> – Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles. Ne pas fumer
<b>Fuchsine</b>	<i>Utilisée après dilution au 1/10<sup>e</sup></i>	
 <b>Xn</b>	Rosaniline $C_{20}H_{20}ClN_3$  Solvant : éthanol, phénol	<b>R10</b> – Inflammable ; <b>R21/22</b> – Nocif par contact avec la peau et par ingestion ; <b>R36/38</b> – Irritant pour les yeux et la peau <b>S36/37</b> – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés
<b>REACTIFS POUR TESTS ENZYMATIQUES</b>		
 <b>Xn</b>	« Réactif oxydase »  TMPD : N,N,N',N'-tétraméthyl-1,4-phénylènediamine $C_{10}H_{16}N_2$	<b>R20/21/22</b> – Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion <b>S28.1</b> – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau  <i>Le conditionnement en disque déshydraté ne justifie pas de mesure de protection particulière.</i>
<b>Peroxyde d'hydrogène</b>	<i>Autre dénomination : Eau oxygénée</i>	
 <b>C</b>   <b>O</b>	Peroxyde d'hydrogène > à 60% $H_2O_2$	<b>R8</b> – Favorise l'inflammation des matières combustibles ; <b>R34</b> – Provoque des brûlures <b>S3</b> – Conserver dans un endroit frais ; <b>S28.1</b> – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau ; <b>S36</b> – Porter un vêtement de protection approprié ; <b>S45</b> – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ**  
**(à rendre avec la copie)**

**NOM DE L'OPÉRATEUR** ..... **Date** : .....  
**Poste n°** .....

**1 - Préparation de la gélose CN**

Masse de poudre de milieu à peser :

Volume de glycérol à prélever :

**2 - Contrôle qualité du milieu CN**

Volume d'inoculum à ensemercer :

Justification du calcul :

Conditions d'incubation du milieu :

**3 - Préparation d'une suspension calibrée utilisée pour le test de productivité**

Choix des dilutions retenues :

**4 - Vérification de l'identité d'une des souches de référence utilisée**

Liste des milieux :

## **Sujet de Techniques de Microbiologie 2<sup>ième</sup> Jour**

**Durée : 1 h 30 – Coefficient : 4**

**Documents interdits - Calculatrice autorisée**

**Attention :**

**Le protocole du premier jour ne pourra être repris le second jour.**

### **PRÉPARATION ET CONTRÔLE QUALITÉ D'UN MILIEU DE CULTURE**

#### ***Rappel du contexte professionnel***

Dans les laboratoires de microbiologie des eaux, la qualité de nombreux essais dépend de la constance des milieux de culture et de leur capacité à donner des résultats reproductibles. Les exigences concernant les milieux varient selon le type d'échantillon et les micro-organismes à détecter.

Une entreprise spécialisée dans la fabrication de milieux de culture a mis en place trois étapes principales de validation des milieux :

- une étape de stabilité
- une validation interne qui consiste à tester les performances des milieux en vérifiant différents critères comme la fertilité, la sensibilité, la spécificité et la sélectivité de ces milieux
- une validation externe des performances qui consiste à tester les milieux dans les conditions dans lesquelles ils seront utilisés par les laboratoires ou les industries

Le but de la manipulation est de préparer un milieu de culture sélectif, « la gélose CN, gélose au cétrimide et à l'acide malidixique », et de contrôler en parallèle la qualité d'un autre lot de ce milieu et donc :

- de réaliser le contrôle qualité de ce milieu selon la norme NF T 90-461 de juillet 2001 (contrôles de la stérilité, de sélectivité, de fertilité et de productivité)
- de vérifier le coefficient de correspondance opacimétrique en vue de préparer une suspension calibrée utilisée pour le contrôle qualité
- de contrôler l'identité d'une souche de référence
- de tester le milieu préparé dans les conditions d'utilisation de celui-ci pour une validation externe des performances

**Mise en œuvre**

Activités professionnelles	Ressources - Documents	Pages	Documents à compléter et à joindre à la copie
<p><b>1</b> Préparation de la gélose CN (9 points)</p>	---	---	<p>Feuille de traçabilité <b>pages 4 et 5</b></p> <p>Rapport d'analyse <b>page 6</b></p>
<p><b>2</b> Contrôle qualité du milieu de culture préparé (17 points)</p>	- Fiche protocole 2	2	
<p><b>3</b> Vérification d'un coefficient de correspondance opacimétrique (21 points)</p>	---	---	
<p><b>4</b> Vérification de l'identité d'une des souches de référence utilisées dans le contrôle qualité (25 points)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche de lecture de la galerie API 20 NE (au poste de travail)</li> <li>- Fiche de sécurité</li> <li>- Outil informatique + logiciel type API</li> </ul>	3	
<p><b>5</b> Validation externe des performances du milieu CN (8 points)</p>	---	---	

<b>FICHE PROTOCOLE 2</b>	<b>Contrôle qualité d'un milieu de culture</b>	<b>NFT 90 - 461</b>
--------------------------	------------------------------------------------	---------------------

**Extrait adapté de la fiche technique du fabricant de la gélose CN**

**Résultats du contrôle qualité réalisé par le fournisseur (Biokar diagnostics)**

- Milieu déshydraté : poudre blanc crème, fluide et homogène
  - Milieu préparé (complet) : gélose blanchâtre.
- Réponse culturale typique sur milieu complet après (44 ± 4) h d'incubation à (36 ± 2)°C

Micro-organismes	Croissance
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	+
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2541	-

**Extrait de la norme NF T 90-461**

**Protocole de réalisation du contrôle de fertilité et de productivité**

« Tester le lot de milieu avec une suspension de bactéries certifiée ou non (matériau de référence stable, homogène, et dont la valeur cible VC est connue).

Un minimum de 5 réplicats par lot de milieu contrôlé est requis.

Ces 5 réplicats doivent comporter un minimum de 100 colonies au total. Pour cela utiliser un matériau de référence dont la VC est supérieure ou égale à 20 ».

**Réplicat** : ensemencement en surface du milieu à contrôler avec un inoculum de concentration connue et de volume connu.

**VC** : valeur cible = nombre de colonies théorique attendu sur les réplicats.

**Protocole de réalisation du contrôle de fertilité et de productivité**

« Accepter le lot de milieux préparés si les deux conditions suivantes sont satisfaites (cas de 5 réplicats) :

- Aucune boîte ne doit présenter une absence de croissance.  
Si un seul résultat négatif (absence de croissance), rendre : lot non valide.
- Calculer le rendement relatif R en % à l'aide de la formule suivante :

$$R = \frac{\text{moyenne géométrique}}{VC} \times 100$$

Moyenne géométrique = moyenne des résultats obtenus sur chacun des réplicats.

VC = valeur cible = nombre de colonies théorique attendu sur les réplicats.

R doit être compris entre 66% et 150% ».

**Exemples de résultats obtenus :**

**Exemple 1**

Réplicats	Nombre de colonies
1	30
2	25
3	32
4	28
5	38

- VC = 35
- N colonies sur l'ensemble des réplicats = 153
- Moyenne géométrique = 30
- R = 86 %

**Conclusion :**

Aucun réplicat ne comporte 0 colonie.

Le nombre de colonies sur l'ensemble des réplicats (= 153) est bien supérieur à 100.

R = 86 % est bien compris entre 66 et 150 %.

Donc lot accepté.

**Exemple 2**

Réplicats	Nombre de colonies
1	30
2	25
3	32
4	0
5	38

- VC = 35
- N colonies sur l'ensemble des réplicats = 125
- Moyenne géométrique = 38

**Conclusion :**

Un réplicat comporte 0 colonie, donc lot refusé.

## FICHE DE SÉCURITÉ

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES R ET S ASSOCIEES
<b>REACTIFS DE REVELATION (LECTURE DE GALERIES)</b>		
<b>Réactif NIT 1</b> <i>Autre dénomination : Acide sulfanilique (en solution acétique)</i>		
 <b>Xi</b>	Acide sulfanilique (acide 4-aminobenzène-sulfonique) <chem>C6H7NO3S</chem>	<b>R36/38</b> – Irritant pour les yeux et la peau ; <b>R43</b> – Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau <b>S24/25</b> – Éviter le contact avec la peau et les yeux ; <b>S37</b> – Porter des gants appropriés
 <b>C</b>	Solvant : acide acétique (acide éthanoïque) <chem>CH3COOH</chem>	<b>R10</b> – Inflammable ; <b>R35</b> – Provoque de graves brûlures <b>S23</b> – Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols ; <b>S26</b> – En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste ; <b>S45</b> – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)
<b>Réactif NIT 2</b> <i>Autre dénomination : α-naphtylamine (en solution acétique)</i>		
 <b>Xn</b>	α-naphtylamine (1-aminonaphtalène) <chem>C10H9N</chem>	<b>R22</b> – Nocif par ingestion <b>S24</b> – Éviter le contact avec la peau
 <b>C</b>	Solvant : acide acétique (acide éthanoïque) <chem>CH3COOH</chem>	<b>R10</b> – Inflammable ; <b>R35</b> – Provoque de graves brûlures <b>S23</b> – Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols ; <b>S26</b> – En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste ; <b>S45</b> – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)
<b>Zinc</b>  <b>F</b>	Poudre de zinc <chem>Zn</chem>	<b>R15</b> – Au contact de l'eau, dégage des gaz extrêmement inflammables ; <b>R17</b> – Spontanément inflammable à l'air <b>S7/8</b> – Conserver le récipient bien fermé et à l'abri de l'humidité ; <b>S43.1-2</b> – Pour éteindre, utiliser du sable, de la terre, de la poudre ou de la mousse, ne jamais utiliser d'eau
<b>Réactif KOVACS</b> <i>Autre dénomination : Réactif d'Ehrlich-Kovacs En remplacement du réactif « JAMES »</i>		
 <b>Xn</b>	Paradiméthylaminobenzal-déhyde (diméthylamino-4-benzaldéhyde) <chem>(CH3)2NC6H4CHO</chem>	<b>R22</b> – Nocif en cas d'ingestion ; <b>R36/37/38</b> – Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau <b>S26</b> – En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste ; <b>S36</b> – Porter un vêtement de protection approprié

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ**  
**(à rendre avec la copie)**

**NOM DE L'OPÉRATEUR** ..... **Date** : .....

**Poste n°** .....

**2 - Contrôle qualité du milieu CN**

**2.1 - Contrôle de stérilité**

Vérification de l'aspect du milieu :

Contrôle de stérilité :

**2.2 - Contrôle qualitatif de culture et de sélectivité (voir annexe 1)**

Aspect macroscopique des colonies :

Contrôle de stérilité :

**2.3 - Contrôle de fertilité et de productivité (voir annexe 2)**

Détermination du nombre moyen de colonies sur milieu TSA (VC) :

Détermination du nombre moyen de colonies sur milieu CN (moyenne géométrique) :

Calcul du rendement relatif R :

**3 - Vérification d'un coefficient de correspondance opacimétrique**

**Rappel** : La norme NF T 90-461 de juillet 2001 préconise de réaliser le contrôle de productivité des milieux avec une suspension calibrée à  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Coefficient de correspondance utilisé :

Tableau des résultats du dénombrement de la culture de *Pseudomonas aeruginosa* initiale :

Calcul de la concentration de *Pseudomonas aeruginosa* dans la culture initiale :

Calcul du coefficient de correspondance a' :

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ (suite)**  
**(à rendre avec la copie)**

**NOM DE L'OPÉRATEUR** .....**Date** : .....

**Poste n°** .....

**4 - Vérification de l'identité d'une ses souches de référence utilisées dans le contrôle qualité**

**Rappel** : La norme NF T 90-461 de juillet 2001 préconise de réaliser le contrôle de productivité du milieu en CN en utilisant les souches de références ci-dessous :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Enterococcus faecalis* CCM 2541

Validation des résultats :

Lecture de la VF et conclusion :

Lettre de la galerie API par méthode probabiliste (**feuille de résultat API à joindre avec la copie**) :

**5 - Validation externe des performances du milieu CN**

**Rappel** : L'échantillon d'eau contaminée devrait contenir 30 UFC de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau des résultats de la lecture des milieux TSA et CN :

**RAPPORT D'ANALYSES**  
**(à rendre avec la copie)**

**NOM DE L'OPÉRATEUR** .....**Date** : .....

**Poste n°** .....

**2 - Contrôle qualité du milieu CN**

**21 - Contrôle de stérilité**

Validation de la stérilité :

**22 - Contrôle qualitatif de culture et de sélectivité**

Validation de la sélectivité :

**23 - Contrôle de fertilité et de productivité**

Validation de la fertilité et productivité :

Conclusion sur la qualité du milieu CN :

**3 - Vérification d'un coefficient de correspondance opacimétrique**

Conclusion sur le coefficient de correspondance a' :

**4 - Vérification de l'identité d'une des souches de référence**

Conclusion :

Validation de la souche de référence :

**5 - Validation externe des performances du milieu CN**

Concentration de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'échantillon d'eau volontairement contaminé :

Conclusion sur les performances du milieu CN :

## Sujet de Techniques de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Durée 3 h – Coefficient 2

Documents interdits - Calculatrice autorisée

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

### COMPARAISON DE DEUX MÉTHODES DE MESURE DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE

#### **Contexte professionnel**

La mesure de la viabilité de populations cellulaires est très importante lors d'études toxicologiques.

Des techniques spectrophotométriques, rapides et peu coûteuses, permettent de réaliser ces mesures sur de grandes séries d'échantillons.

Un laboratoire se propose d'étudier l'exactitude d'une mesure et la sensibilité d'une de ces techniques en vue de sa prochaine utilisation en routine.

#### **Compétences**

- Dénombrer des cellules en suspension au microscope.
- Classer les travaux à effectuer et gérer les priorités.
- Présenter et ordonner les valeurs expérimentales. Exprimer les résultats.
- Valider et interpréter les résultats.

#### **Mise en œuvre**

Activités professionnelles	Ressources et documents	Pages	Documents à compléter et à joindre avec la copie
<p><b>1</b> Mesure spectrophotométrique de viabilité cellulaire (14 points)</p>	<p>- Fiche protocole 1 - Fiche sécurité</p>	<p>2 4</p>	Feuille de tableur à compléter
<p><b>2</b> Mesure de la viabilité cellulaire par technique microscopique (12 points)</p>	<p>- Fiche protocole 2 - Fiche sécurité</p>	<p>3 4</p>	
<p><b>3</b> Analyse et interprétation des résultats (10 points)</p>			

#### **Rapport d'analyses (à rédiger sur la copie) (4 points)**

Comparer les résultats du dénombrement de la suspension « **CQ** » obtenus par les deux techniques.

<b>FICHE PROTOCOLE 1</b>	<b>Mesure spectrophotométrique de viabilité cellulaire par réduction du bromure de diméthyl-thiazoldiphényl tétrazolium (MTT)</b>	
--------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

### **Principe**

Le MTT est hydrosoluble et donne en solution une couleur jaune. Les cellules viables peuvent réduire cette molécule : le produit ainsi formé est violet et insoluble dans l'eau mais soluble dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO). Ce produit, une fois en solution dans le DMSO, présente un pic d'absorbance à 570 nm (lecture possible à 540 nm). Les cellules mortes ne peuvent réduire le MTT. La mesure de l'absorbance à 570 nm (ou à 540 nm) permet l'estimation du nombre de cellules viables présentes dans le milieu.

### **Matériel et réactifs**

- Pipette automatique 5-20 µL, pipette automatique 20-200 µL, cônes adaptés
- Microplaque de 96 puits à fond plat avec couvercle
- 1,5 mL de suspension cellulaire étalon notée « **ET** » (obtenue après trypsination d'une culture de fibroblastes murins en monocouche)
- 0,5 mL de suspension cellulaire notée « **CQ** »
- 10 mL de milieu complet
- 0,3 mL de MTT à 10 mg.mL<sup>-1</sup>
- 5 mL de DMSO

Matériel commun :

- Étuve à 5 % de CO<sub>2</sub>, 37°C
- Lecteur de microplaque (filtre à 540 nm)
- Agitateur pour microplaques
- Ordinateur avec tableur (Open Calc ou équivalent)
- Gants à disposition

### **Protocole opératoire**

Les étalons et les essais sont à préparer en double.

Diluer au demi la suspension étalon « **ET** » fournie dans le milieu de culture,

Distribuer les volumes de suspension fille (de A2 à A7 : 20, 40, 60, 80, 100, 120 µL – répéter de B2 à B7).

Compléter à 120 µL avec du milieu complet.

Réaliser en A1 un témoin servant de zéro optique.

Placer en C1 et C2 les essais : 120 µL de suspension « **CQ** ».

Placer la microplaque 45 minutes à 37°C dans l'étuve à CO<sub>2</sub> à 5 %, étape nécessaire pour l'adhérence.

Distribuer 10 µL de solution de MTT dans chaque puits.

Incuber 45 minutes à 37°C dans l'étuve à 5 % de CO<sub>2</sub>.

Aspirer en inclinant légèrement la plaque, le milieu surnageant et en laissant un peu de milieu au fond des puits.

Ajouter 100 µL de DMSO, couvrir et agiter 10 minutes.

Lire à 540 nm.

### **Compte rendu**

1.1 - Rendre sur la copie un tableau de préparation en y joignant le relevé de mesures rendu par le lecteur de microplaques.

1.2 - Compléter les champs grisés dans la feuille de tableur prévue à cet effet.

1.3 - Calculer, en le justifiant, le nombre de fibroblastes murins viables dans le puits A3.

<b>FICHE PROTOCOLE N° 2</b>	<b>Mesure de la viabilité cellulaire par technique microscopique en hématimètre de Malassez</b>
-----------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------

**Matériel et réactifs**

- Hématimètre de Malassez et sa lamelle planée
- Pipette P<sub>50</sub> avec cônes adaptés
- Matériel et réactifs nécessaires à la décontamination de l'hématimètre
- Compteur manuel de cellules
- 0,5 mL de « bleu de Funk » à 0,4 %
- Suspensions « **ET** » et « **CQ** » (figurant dans la fiche protocole 1)

**Protocole opératoire**

Réaliser une numération de la suspension cellulaire étalon « **ET** » fournie en présence de bleu de Funk à 0,1 % final.

Réaliser une numération de la suspension cellulaire « **CQ** » en présence de bleu de Funk à 0,1 % final.

**Présenter un des champs de numération au correcteur en précisant le nombre de cellules mortes et le nombre de cellules vivantes dans le rectangle de numération présenté.**

**Compte rendu**

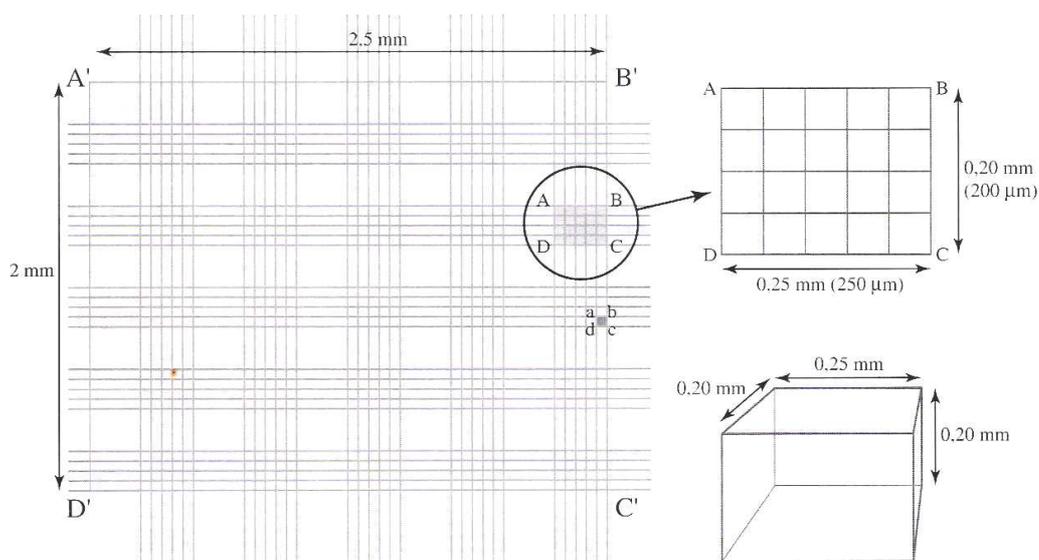
2.1 - Présenter, sous forme d'un tableau, les résultats du dénombrement.

2.2 - Saisir les résultats obtenus dans les champs grisés de la feuille de tableur.

2.3 - Calculer le nombre de fibroblastes murins viables par mL de « **ET** » et de « **CQ** ». Présenter le résultat pour un niveau de confiance à 95 %, et avec un facteur d'élargissement  $k = 2$ .

Donnée : l'incertitude composée est de  $\pm 0,10 \cdot 10^5$  cellules viables/mL.

**SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ**



**FICHE SÉCURITÉ****DMSO (Dimethyl Sulfoxide)*****Indications particulières sur le danger pour l'homme et l'environnement :***

Le produit est à étiqueter, conformément au procédé de calcul de la « Directive générale de classification pour les préparations de la CE », dans la dernière version valable.

R 22 Nocif en cas d'ingestion  
R 36/38 Irritant pour les yeux et la peau

**MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)*****Indications particulières sur le danger pour l'homme et l'environnement :***

Mutagène catégorie 2.

Conserver le récipient bien fermé dans un local frais et bien aéré.

Ne pas jeter à l'évier, conserver les déchets dans les fûts spécialisés.

R 46 Peut causer des altérations génétiques héréditaires.  
R 20/021/22 Nocif par inhalation, ingestion et par contact avec la peau.

S 22 Ne pas respirer les poussières  
S36/37/39 Porter un vêtement de protection des gants adaptés, un masque et des lunettes.  
S45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin, lui montrer l'étiquette si possible.

**PROCÉDURE DE NETTOYAGE-DÉSINFECTION DE L'HÉMATIMÈTRE**

- 1 Lavage avec un détergent : verser sur l'hématimètre jusqu'à recouvrement.
- 2 Rinçage à l'eau distillée.
- 3 Désinfection à l'eau de javel pendant 3 minutes.
- 4 Rinçage soigneux à l'eau.
- 5 Séchage.

## Éléments de corrigé d'Anglais

### I. Compréhension (10 points)

1. Faire un compte rendu de l'article en français en mettant en évidence les idées essentielles (100 mots  $\pm$  10%).

Le gouvernement souhaite expérimenter, dans deux comtés anglais, un projet qui verra, sur une période de sept semaines, huit mille agents de « police alimentaire » enquêter sur la façon dont plus de vingt mille familles se nourrissent puis leur prodiguer, à domicile, des conseils pratiques sur la meilleure façon d'acheter, d'utiliser et de conserver les produits alimentaires.

Ce programme pourrait se révéler bénéfique tant pour la santé des personnes que pour l'environnement. Mais des voix s'élèvent pour évoquer une coûteuse ingérence de l'Etat dans la vie privée. **(90 mots)**

2. Traduire en français de « The scheme is also designed... » à « ... if seen as a success. ».

Le projet vise également à lutter contre l'obésité et les mauvaises habitudes alimentaires. Pendant une période d'essai / d'expérimentation de sept semaines, huit mille agents de l'Etat se rendront dans 24500 foyers pour prodiguer des conseils et donner des recettes ! Le projet expérimental, d'un coût de £30 000, est susceptible d'être étendu à l'ensemble du pays s'il s'avère concluant.

### II. Expression en langue anglaise (10 points)

1. Would you agree with the government interfering in your private life as far as your food diet were concerned? (60 words  $\pm$  10%)

"An Englishman 's house is his castle". It's not up to a democratic State to interfere in an individual 's private life. The world today is stressful enough and everybody needs a quiet place to relax and do whatever they like, provided this is not harmful to anybody. A diet has to do with personal, cultural, religious, economic, seasonal and environmental criteria. **(60 words)**

2. Where do you think young people should learn about what is good and healthy for them? (100 words  $\pm$  10 %)

To start with, young people should observe and learn their food and eating habits from their parents and grand parents, go shopping with them and be informed about the quality, the use and the price of what they buy.

At school the students should also be taught to discriminate between the various places they can buy their food at. They should be made aware of the origin and traceability of the product, what the barcode means, the nutrition facts of the product. They should also learn about how to balance their food and what it means for their body to have a healthy diet. **(104 words)**

## Eléments de corrigé de Mathématiques

### Exercice 1

#### PARTIE A

(E) :  $y' + 2y = 2e^{-2t}$

1) (E<sub>0</sub>) :  $y' + 2y = 0$  si  $y' = -2y$  : ensemble des solutions :  $y_1(t) = Ke^{-2t}$

2) Pour tout t de  $[0 ; +\infty[$  :  $h(t) = 2te^{-2t}$  d'où  $h'(t) = 2e^{-2t} + 2t \times (-2e^{-2t}) = 2e^{-2t} - 4te^{-2t}$   
 Pour tout t de  $[0 ; +\infty[$  : on a donc  $h'(t) + 2h(t) = 2e^{-2t} - 4te^{-2t} + 2 \times (2te^{-2t}) = 2e^{-2t} - 4te^{-2t} + 4te^{-2t} = 2e^{-2t}$

On en déduit que h est une solution particulière de (E)

3) L'ensemble des solutions de (E) est :  $y(t) = y_1(t) + h(t) = Ke^{-2t} + 2te^{-2t}$

4) Comme f est solution de (E) alors :  $f(t) = Ke^{-2t} + 2te^{-2t}$  donc  $f(0) = Ke^0 + 2 \times 0 \times e^0 = K$

Or :  $f(0) = 1$ . Donc  $K = 1$

On a donc :  $f(t) = e^{-2t} + 2te^{-2t} = (2t + 1)e^{-2t}$

#### PARTIE B

Soit f la fonction définie sur  $[0 ; +\infty[$  par :  $f(t) = (1 + 2t)e^{-2t} = e^{-2t} + 2te^{-2t}$

1) On a :  $\lim_{t \rightarrow +\infty} (-2t) = -\infty$  donc  $\lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-2t} = 0$  et comme  $\lim_{t \rightarrow +\infty} te^{-t} = 0$  alors :  $\lim_{t \rightarrow +\infty} 2te^{-2t} = 0$

d'où  $\lim_{t \rightarrow +\infty} (e^{-2t} + 2te^{-2t}) = 0 = \lim_{t \rightarrow +\infty} f(t)$

La droite d'équation  $y=0$  (axe des abscisses) est asymptote horizontale à la courbe C vers  $+\infty$

2) a) On pose :  $u = 2t + 1$  ;  $u' = 2$   
 $v = e^{-2t}$  ;  $v' = -2e^{-2t}$

$f'(t) = 2e^{-2t} + (2t + 1) \times (-2e^{-2t}) = 2e^{-2t} - 4te^{-2t} - 2e^{-2t} = -4te^{-2t}$

b)  $f'(t)$  du signe de  $-4t$  car  $e^{-2t} > 0$

Or :  $-t \leq 0$  car  $t \in [0 ; +\infty[$

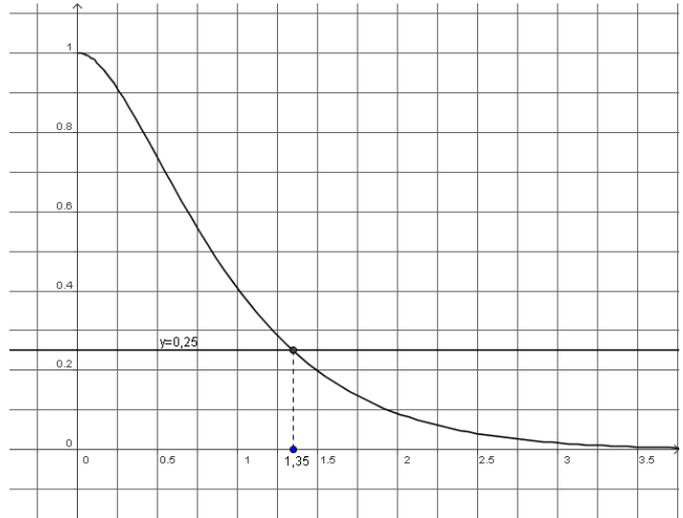
Donc  $f'(t) \leq 0$  et f décroît sur  $[0 ; +\infty[$

Tableau :

t	0	$+\infty$
-4t		-
Signe de f'(t)		-
Variations de f	1	0

3)a) Tableau de valeurs et courbe

t	0	0,5	1	1,5	2	3
f(t)	1	0,74	0,41	0,20	0,09	0,02



**PARTIE C**

1)  $g(t) = 1 - f(t) = 1 - (1 + 2t)e^{-2t}$  (t en heures)

a) Au bout d'une heure :  $g(1) = 1 - f(1) = 1 - 0,41 = 0,59$

b) Au bout de deux heures :  $g(2) = 1 - f(2) = 1 - 0,09 = 0,91$

2

a) Taux de défaillance supérieur à 0,75 :  $g(t) \geq 0,75$  ssi  $1 - f(t) \geq 0,75$  ssi  $f(t) \leq 0,25$

b) D'après l'énoncé, on peut utiliser le réfractomètre si  $f(t) \geq 0,25$

Or, (v. graphique)  $f(t) \geq 0,25$  si  $t \leq 1,35 \approx 1,4$ . On peut utiliser le réfractomètre durant environ 1,4h c'est-à-dire 1h24min

**EXERCICE 2**

**PARTIE A**

X suit la loi normale de moyenne 60 et d'écart-type 0,03.

on pose :  $X' = \frac{X-60}{0,03}$  on a alors : X' suit  $N(0 ; 1)$

$P(\text{non défectueux}) = P(59,93 \leq X \leq 60,07) = P\left(\frac{59,93-60}{0,03} \leq X' \leq \frac{60,07-60}{0,03}\right) = P(-2,33 \leq X' \leq 2,33)$

$P(\text{non défectueux}) = 2\Pi(2,33) - 1 = 2 \times 0,9901 - 1 = 0,9802 \approx 0,98$

**PARTIE B**

$P(E_1) = 0,02$  et  $P(E_2) = 0,01$

1) Le produit présente les 2 défauts : événement  $E_1 \cap E_2$

$E_1$  et  $E_2$  étant indépendants, on a  $P(E_1 \cap E_2) = P(E_1) \times P(E_2) = 0,02 \times 0,01 = 2.10^{-4}$

2)

a) Le produit présente au moins un des 2 défauts : événement  $E_1 \cup E_2$

$P(E_1 \cup E_2) = P(E_1) + P(E_2) - P(E_1 \cap E_2) = 0,02 + 0,01 - 2.10^{-4} = 0,0298$

b) Le produit ne présente aucun défaut : événement  $\overline{E_1} \cap \overline{E_2}$

$P(\overline{E_1} \cap \overline{E_2}) = 1 - P(E_1 \cup E_2) = 1 - 0,0298 = 0,9702$

On peut aussi utiliser un tableau :

	$E_1$	$\bar{E}_1$	Total
$E_2$	$0,02 \times 0,01 \times 100 = 0,02$	$1 - 0,02 = 0,98$	1
$\bar{E}_2$	$2 - 0,02 = 1,98$	$98 - 0,98 = 97,02$	99
Total	2	98	100

**PARTIE C : Loi binomiale et loi de Poisson**

- 1) Pour chaque comprimé choisi : 2 issues contraires : couvercle défectueux ou pas  
Indépendance des tirages car on assimile le prélèvement à un tirage avec remise  
Y comptabilise le nombre de récipients ayant un couvercle défectueux parmi les 50  
Donc Y suit une loi binomiale de paramètres  $N = 50$  et  $p = 0,02$
- 2) 1 seul défectueux : «  $Y=1$  » :  $P(Y=1) = C_{50}^1 \times (0,02)^1 \times (0,98)^{49} \approx 0,37$
- 3) a) On considère que la loi  $B(50 ; 0,02)$  peut être approchée par une loi de Poisson  
Le paramètre est  $\lambda = Np = 50 \times 0,02 = 1$

b)  $Y_1$  suit  $\mathcal{P}(1)$

$$P(Y_1 \leq 3) = P(Y_1=0) + P(Y_1=1) + P(Y_1=2) + P(Y_1=3)$$

$$\text{Donc } P(Y_1 \leq 3) = 0,368 + 0,368 + 0,184 + 0,061 \approx 0,98 \text{ (table de la loi de Poisson)}$$

**PARTIE D**

2)  $\bar{C}$  suit une loi normale de moyenne  $\mu$  et d'écart-type  $\frac{\sigma}{\sqrt{50}}$  avec  $\sigma = 0,06$

Donc  $\bar{C}$  suit une loi normale  $N(\mu ; \frac{0,06}{\sqrt{50}})$  c'est-à-dire  $N(\mu ; 0,0085)$

on pose :  $\bar{C}' = \frac{\bar{C} - \mu}{0,0085}$  on a alors :  $\bar{C}'$  suit  $N(0 ; 1)$ .

On cherche h tel que :  $P(\mu - h \leq \bar{C} \leq \mu + h) = 0,95$  ssi  $P(\frac{(\mu-h)-\mu}{0,0085} \leq \bar{C}' \leq \frac{(\mu+h)-\mu}{0,0085}) = 0,95$

$$\text{Ssi : } P(-\frac{h}{0,0085} \leq \bar{C}' \leq \frac{h}{0,0085}) = 0,95 \quad \text{ssi} \quad 2 \Pi(\frac{h}{0,0085}) - 1 = 0,95 \quad \text{ssi} \quad \Pi(\frac{h}{0,0085}) = \frac{1+0,95}{2} = 0,975$$

$$\text{Ssi} \quad \frac{h}{0,0085} = 1,96 \quad \text{ssi} \quad h = 1,96 \times 0,0085 \approx 0,02$$

En prenant  $\mu \approx \bar{x} = 119,88$  (intervalle centré sur  $\bar{x}$ ), on obtient  $I_{0,95} = [119,88 - 0,02, 119,88 + 0,02] = [119,86 ; 119,90]$

## Eléments de corrigé de Sciences Physiques

### A-Détecteur ionique de fumée

1.

95: nombre de protons    241: Nombre de nucléons

2.



Le noyau fils de neptunium est composé de 93 protons et 144 neutrons

3.

$$\lambda = \frac{\ln 2}{T} = \frac{\ln 2}{432.365, 25.24, 0.3600} = 5,08.10^{-11} \text{ s}^{-1}$$

4.

Un échantillon de 1 g a une activité

$$A_1 = \lambda \cdot N = \frac{\lambda \cdot m \cdot N_A}{M} = 1,27.10^{11} \text{ Bq}$$

5.

$$m_s = \frac{A_s}{A_1} = 2,6.10^{-7} \text{ g} = 0,26 \mu\text{g} \text{ ou } m_s = \frac{A_s \cdot M}{\lambda \cdot N_A} = 2,6.10^{-7} \text{ g}$$

7.

Les rayons  $\gamma$  ne sont pas arrêtés par le boîtier. Il faut une large épaisseur de plomb pour les absorber.

8.1

 $A_S$  en Bq représente le nombre de désintégrations par seconde, chaque seconde on a donc  $0,36 \cdot A_S = 1,2 \cdot 10^4$  photons  $\gamma$  émis par la source.

8.2

$$\text{Dose horaire reçue} = \frac{W \cdot 3600}{m_u} = 5,9.10^{-9} \text{ Gy} = 5,9 \text{ nGy}$$

8.3

Cette dose est très inférieure à la dose moyenne naturelle, mais pas négligeable.

### B- Sédimentation d'un globule rouge

1.1 - Le globule rouge est soumis à trois forces:

- son poids  $m\vec{g}$  avec  $mg = (4/3) \cdot \pi \cdot r^3 \cdot \mu \cdot g$
- la poussée d'Archimède  $\vec{F}_a$  avec  $F_a = (4/3) \cdot \pi \cdot r^3 \cdot \mu \cdot \Delta \rho \cdot g$
- la force de frottement  $\vec{f}$  avec  $f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$

1.2

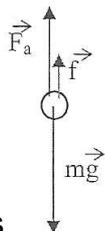


Schéma des trois forces

2.1 -

Au début du mouvement  $mg - F_a - f = ma$  avec  $f = 0$ .Le mouvement est accéléré car  $a > 0$

2.2 - Puis comme  $f$  augmente avec la vitesse, au bout d'un moment  $mg - F_a - f = 0$  et le mouvement devient uniforme

2.3 - On a alors:  $mg = F_a + f$

$$(4/3) \cdot \pi \cdot r^3 \cdot \mu \cdot g = (4/3) \cdot \pi \cdot r^3 \cdot \mu \cdot g + 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$$

$$\text{Et } v = \frac{2 \cdot r^2 \cdot g (\mu - \mu')}{9 \cdot \eta}$$

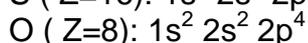
2.4

$$v = 2,1 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1} \text{ soit } 7,6 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$$

$7,6 < 10$ : le patient ne présente pas de syndrome inflammatoire

### C- Dosage des ions sulfate dans une eau minérale

1.1



1.2 - Le soufre et l'oxygène ont le même nombre d'électrons externes: ils se trouvent donc tous les deux dans la 16<sup>ème</sup> colonne.

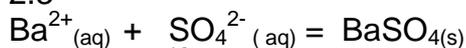
Le soufre se trouve dans la troisième période. En effet la 3<sup>ème</sup> couche électronique est la dernière entamée.

1.3 - Le soufre est entouré de 4 zones de densité électronique, ces 4 zones se repoussent selon un tétraèdre, l'ion sulfate présente donc une géométrie tétraédrique.

2.1 - Travailler dans un plus grand volume total (variant peu au cours du dosage) permet d'avoir deux portions de droite sur la courbe de dosage. On est obligé sinon de calculer puis de tracer la conductivité corrigée pour exploiter ce dosage.

2.2 - Un mauvais étalonnage changerait la valeur de conductivité d'un même facteur pour chaque mesure; l'abscisse des points sur la courbe et la forme de la courbe ne seraient pas modifiées, donc le volume équivalent non plus.

2.3



$$K = 1/K_S = 10^{10}$$

$K \gg 10^3$ , cette réaction de dosage est quantitative

2.4

A l'équivalence:  $(n\text{SO}_4^{2-})_{\text{initialement présent}} = (n\text{Ba}^{2+})_{\text{ajouté à l'équivalence}}$

$$\text{Ainsi } [\text{SO}_4^{2-}] \times V_0 = [\text{Ba}^{2+}] \times V_{\text{eq}}$$

$$\text{Soit } [\text{SO}_4^{2-}] = \frac{[\text{Ba}^{2+}]}{V_0} \cdot V_{\text{eq}}$$

2.5

Application numérique:  $1,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.6

$$\text{Calcul de C: } C = [\text{SO}_4^{2-}] \times M(\text{SO}_4^{2-}) = 1,16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$$

Ce qui est concordant avec l'étiquette.

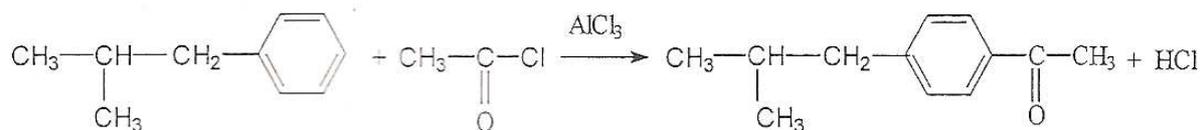
### D-Chimie organique

1.

(A): 2-méthyl-1-phénylpropane (ou isobutylbenzène)

(B): chlorure d'éthanoyle

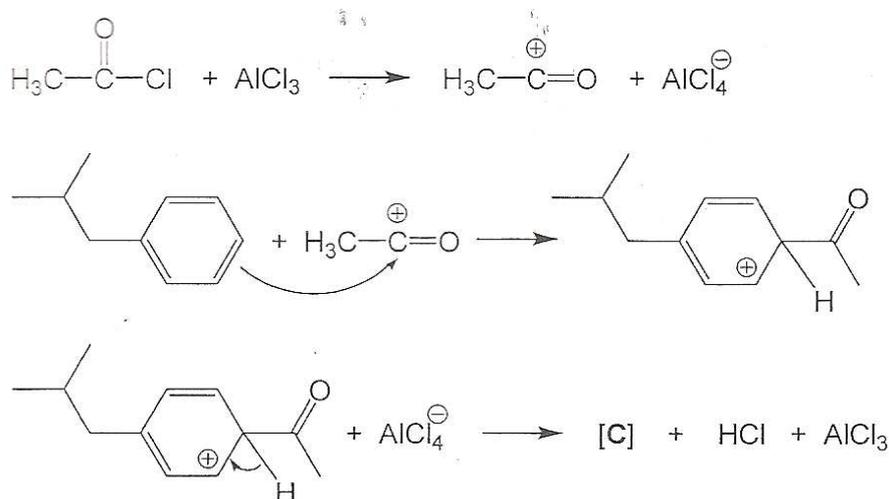
2.



Isomère majoritaire para.

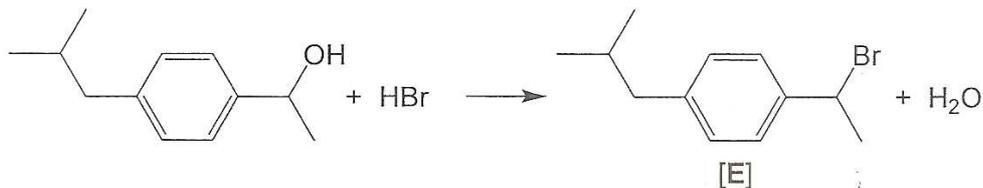
3. - Cette réaction s'appelle l'acylation de Friedel et Crafts

4.



Formation électrophile

5.



6. - Substitution nucléophile

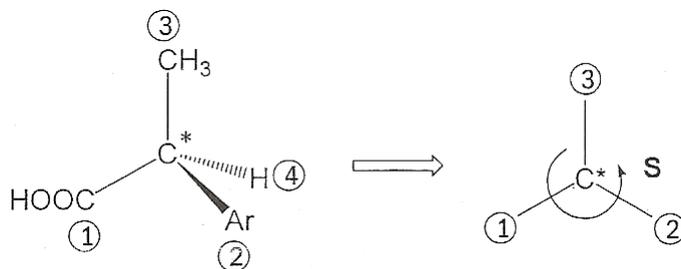
7. - La molécule [F] contient une fonction nitrile

8. - L'ion cyanure est nucléophile en raison d'un fort excès de densité électronique sur l'atome de carbone (doublet non liant + charge négative)

Il s'agit d'une substitution de l'atome e brome par un réactif nucléophile NC<sup>-</sup>.

9. - La molécule d'ibuprofène possède un atome de carbone asymétrique C\*.

10.



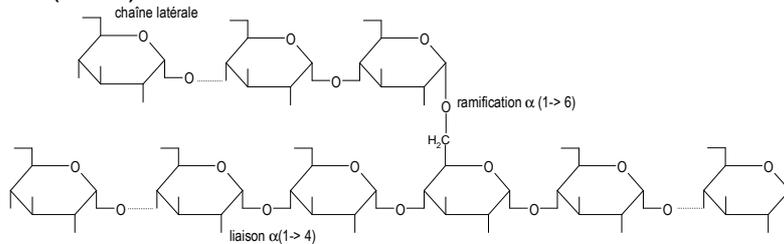
11. - Un mélange équimolaire de deux énantiomères est un mélange racémique.

## Éléments de corrigé de Biochimie

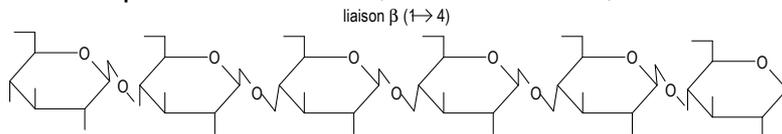
1.1.1 – Les molécules de réserve ont un **rôle énergétique** et les molécules de structure jouent un rôle dans la **constitution** des éléments cellulaires et intercellulaires.

1.1.2 – La différence structurale est une **anomérie  $\alpha/\beta$** .

Pour l'écriture chimique de l'amidon, chaîne principale liaisons o-osidique  $\alpha$  (1→4), ramifications  $\alpha$  (1→6)

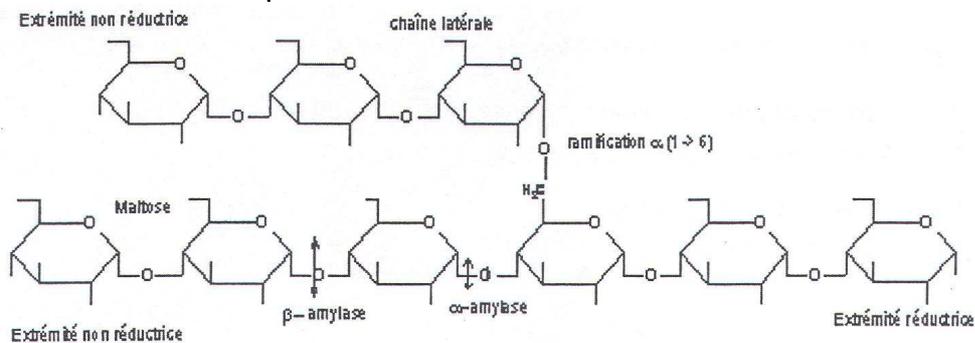


Pour l'écriture chimique de la cellulose, chaîne linéaire, liaisons o-osidique  $\beta$  (1→4)



Il y a absence d'effet des amylases sur la cellulose car **la liaison  $\beta$ -osidique** est non reconnue par les amylases  $\alpha$  et  $\beta$ .

1.1.3 - Sur la formule de l'amidon, l'extrémité **non réductrice** est située en **C<sub>4</sub>** et l'extrémité **réductrice** en **C<sub>1</sub>**.



1.1.4 - La classe et le numéro d'ordre des amylases dans la classification internationale sont : Hydrolase, E.C.3

1.2.1 - Le rôle du témoin activité du document 1 est de soustraire l'absorbance due aux glucides réducteurs présents **sans catalyse cellulasique**.

1.2.2 –

La réalisation du blanc réactif est la suivante:

- Mettre dans un tube :
 

Eau distillée	0,5 mL
Milieu de culture	0,5 mL
Réactif au 3,5 DNS	1,5 mL
- Porter 5 minutes exactement au BM bouillant.

- Refroidir
- Ajouter  
Eau distillée                      7,5 mL

Son rôle est de faire le zéro du spectrophotomètre c'est-à-dire éliminer l'absorbance due aux réactifs et à la cuve de mesure

**1.2.3** - Les conditions opératoires généralement utilisées pour mesurer une activité enzymatique sont :  
pH et température fixée et stable (milieu tamponné et thermostaté) ;  
[substrat] saturante.

**1.2.4.1 –**

Nombre de μmoles de glucose apparu par minute et par mL de filtrat :

A du témoin =0

A filtrat - A témoin = A filtrat donnant l'absorbance due au glucose apparu sous l'action des cellulases fongiques.

On compare cette A à celle du témoin

La colorimétrie est réalisée de la même façon pour l'étalon et l'essai, on peut écrire que :

Ce qui donne  $\Delta n_{glu}$  apparu dans 0,5 mL de filtrat =  $\frac{A}{A_{et}} \cdot \frac{\rho_{et} \cdot V_{et}}{M_{glu}}$

**1.2.4.2 –**

$$C_{cat} = \frac{A}{A_{et}} \cdot \frac{\rho_{et} \cdot V_{et}}{M_{glu}} \cdot \frac{1}{t_{incubation}} \cdot \frac{1}{V_{filtrat}} = \frac{A}{A_{et}} \cdot \frac{\rho_{et}}{M_{glu}} \cdot \frac{1}{t_{incubation}}$$

$$[U.mL^{-1}] = \frac{[ ]}{[ ]} \cdot \frac{[g \cdot L^{-1}]}{[g \cdot mol^{-1}]} \cdot \frac{1}{[min]} = 10^3 \mu mol.mL^{-1} \cdot min^{-1}$$

$$C_{cat} = A \times \frac{10^3}{60 \times 0,430 \times 180} = A \times 0,215$$

**1.2.5** - la formule littérale donnant l'activité totale de chaque milieu (A<sub>T</sub> en U) est :

$$A_{Totale} = C_{cat} \times V_{Total\ filtrat}$$

**1.2.6** – L'expression littérale de l'activité par g de biomasse est :

$$Activité_{biomasse} = \frac{A_{Totale}}{m_{biomasse}}$$

Les résultats pour les souches du document 1 sont

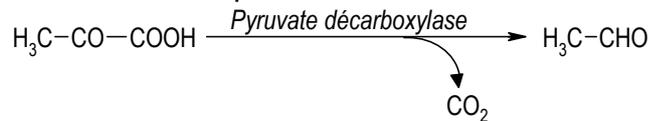
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma harzadium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
A biomasse U.g <sup>-1</sup>	0,43	0,64	1,02

*Fusarium oxysporum* présente l'activité cellulastique la plus élevée et correspond donc à la souche la plus intéressante.

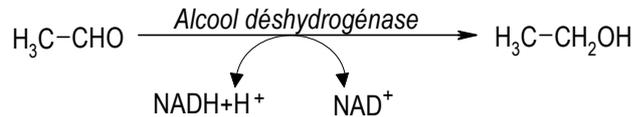
**1.3.1** – La voie métabolique conduisant à la transformation du glucose en acide pyruvique est la **Glycolyse**.

**1.3.2** – La séquence réactionnelle conduisant à la transformation d'acide pyruvique en éthanol est la suivante

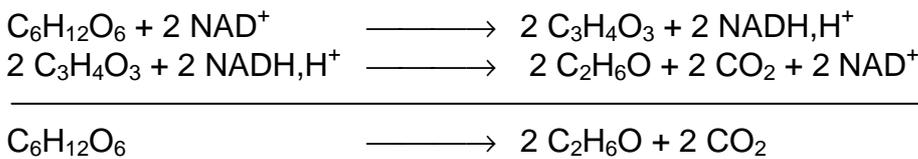
Etape 1 de la fermentation éthanolique



Etape 2 de la fermentation éthanolique



**1.3.3** – Le bilan moléculaire de la transformation d'une molécule de glucose en éthanol est le suivant :



**1.3.4** – La nécessité de la parfaite anaérobiose pour cultiver les levures afin de produire de éthanol est justifiée par le fait

Que l'anaérobiose est la voie fermentaire

Qu'en présence d'oxygène, c'est la voie respiratoire qui est préférée.

Le devenir du glucose en aérobie après la glycolyse dans le cytosol est

Au niveau de la matrice mitochondriale : la décarboxylation oxydative du pyruvate et la dégradation par le cycle de Krebs

Au niveau de la membrane interne mitochondriale : la chaîne respiratoire

**1.4.1** – La composition qualitative du milieu à mettre en présence de l'échantillon pour doser l'éthanol par méthode enzymatique en point final est :

Enzymes : ADH et Al-DH,  
Tampon pH,  
NAD<sup>+</sup> en excès non limitant.

**1.4.2 -**

Tracé du graphe A=f(t)

Le terme « point final » signifie que la mesure d'absorbance a lieu lorsque l'absorbance ne varie plus (équilibre chimique)

Tracé du graphe avec une concentration en éthanol est deux fois moins importante au départ

A<sub>eq</sub> est deux fois plus faible.

**1.4.3 -**

Si la température est non régulée, cela n'a pas d'influence.

Il suffit d'attendre l'A à l'équilibre, mais le temps d'attente plus ou moins long selon température d'action.

1.5.1 - Si la cinétique de l'ADH est confondue avec une cinétique michaëlienne, alors Courbe  $V_i^{-1} = f([S]^{-1}) =$  droite de coefficient directeur  $a = \frac{K_M}{V_{i_{max}}}$  et d'ordonnée à

l'origine  $b = \frac{1}{V_{i_{max}}}$

$$\frac{1}{V_i} = \frac{[S] + K_M}{V_{i_{max}} [S]} = \frac{K_M}{V_{i_{max}} [S]} + \frac{[S]}{V_{i_{max}} [S]} \qquad \frac{1}{V_i} = \frac{K_M^B}{V_{i_{max}}} = \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{i_{max}}}$$

1.5.2 –

Les résultats de  $V_i^{-1}$  et  $[S]^{-1}$

$1/[NAD^+] \text{ L. } \mu\text{mol}^{-1}$	0,100	0,050	0,025	0,010
$1/V_i \text{ en L.h.}\mu\text{mol}^{-1}$	0,070	0,045	0,032	0,025

Les paramètres de la droite de régression.

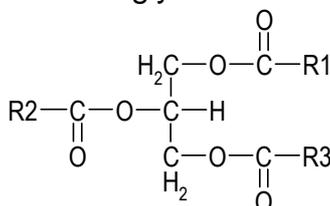
Coefficient directeur	$r^2$	Ordonnée origine
0,503	0,9999	0,0197

$r^2 \approx 1$  donc modèle michaëlien

Les valeurs des paramètres cinétiques de l'éthanol déshydrogénase dans les conditions opératoires:

$K_M \mu\text{mol.L}^{-1}$	25,6	$V_{i_{max}} \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	50,8
----------------------------	------	--------------------------------------------------	------

2.1.1.1 – Formule générale d'un triglycéride



Les insaponifiables sont des lipides qui ne sont pas des esters d'acide gras et d'alcool. Comme exemples, on peut citer les lipides terpéniques, le cholestérol...

2.1.2.1 – A partir du document 3, on peut déduire que :

Le solvant tiède (hexane apolaire) dissout les lipides du broyat de graines et retombe par le siphon dans le ballon.

Seul le solvant s'évapore et se condense dans l'appareil, de sorte que les lipides des graines s'accumulent dans le ballon.

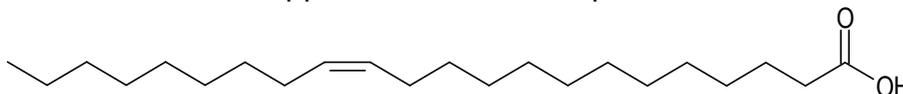
De nombreux cycles "épuisent" les graines en lipides.

2.1.2.2 – la teneur en matières sèches des graines peut être calculée

$m_{\text{huile}} \text{ g}$	% MS
1,55	$\frac{1,852}{2,154} \times 100 = 86 \%$

## 2.1.2.3 – la teneur en huiles des graines en % de matière sèche

$m_{\text{huile}} \text{ g}$	% huile/MS
1,55	$\frac{1,55}{10 \times 0,86} \times 100 = 18 \%$

2.2.1 - Formule semi-développée de l'acide érucique C22 : 1  $\Delta^{c,13}$ 

22 : nombre de carbone ;

1 : nombre de double liaison ;

$\Delta^{c,13}$ : 13 position de la double liaison et c isomérisation

2.2.2 – L'écriture de l'acide érucique est la suivante :  $\omega_9$ 

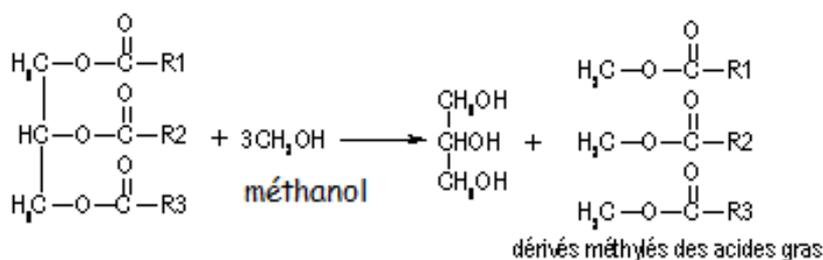
## 2.2.3 – Schéma de principe d'un chromatographe en phase gazeuse

- 1 Gaz vecteur
- 2 Manomètre ou détendeur
- 3 Injecteur
- 4 Four ou colonne
- 5 Détecteur ou système d'ionisation
- 6 Analyseur ou amplificateur
- 7 Enregistreur

## 2.2.4 - La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation et d'analyse des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés.

Les différents constituants sous forme gazeuse sont inégalement retenus par la phase stationnaire, donc cheminent moins vite que la phase mobile gazeuse; les vitesses de cheminement sont inégales, donc les différents composés ont des temps de rétention différents.

## 2.2.5 - La réaction de trans-estérification d'un triglycéride par le méthanol peut s'écrire ainsi :



Les acides gras sont séparés et volatiles sous forme méthylée.

## 2.2.6 - Le gradient de température pour l'éluion permet de diminuer le temps de l'analyse.

## 2.2.7 - Le premier pic du chromatogramme correspond au solvant, l'hexane.

Pics du chromatogramme sont identifiés grâce au temps de rétention, qui est le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui déterminé au maximum du pic

t <sub>R</sub> en min	8,69	11,15	11,47	12,09	13,00	14,21	14,32	16,11
AG	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:1

**2.2.9** - L'analyse d'une huile de colza dans les mêmes conditions chromatographiques permet de repérer l'acide érucique repéré à t<sub>R</sub> = 16,11 min  
La hauteur du pic est proportionnelle à la quantité d'acide gras injecté si on admet que les facteurs de réponse sont tous identiques

$$\% \text{ acide érucique : } T_m = \frac{8,9}{536,7} \times 100 = 1,7 \%$$

**2.2.10** - L'huile peut être à destinée alimentaire car < 2%

## Éléments de corrigé de Microbiologie

1.1.1. Les contaminants exogènes peuvent provenir de

- l'environnement : air, sol, eau, matériel.
- des flores de l'homme et des animaux
- du matériel

1.1.2. Les flores dénombrées lors de contrôles d'hygiène sont :

- la flore aérobie mésophile totale dont la présence en trop grande quantité témoigne d'une défaillance dans le respect des règles générales d'hygiène.
- les Entérobactéries (*E.coli*) dont la présence témoigne d'une contamination fécale
- les *Staphylococcus* coagulase positive signifiant la présence d'un porteur asymptomatique ou non (panaris).

1.2.2. Les bactéries psychrotrophes sont des bactéries mésophiles capables de se développer à température de réfrigération (en dessous de 6°C).

1.2.3. Le biofilm est une communauté bactérienne (plusieurs espèces cohabitant) adhérant à un support et emprisonnés dans une matrice organique exocellulaire.

Les étapes de formation d'un biofilm sont :

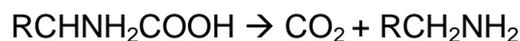
- adhérence réversible puis irréversible au support,
- multiplication des microorganismes avec production d'exopolymères (recrutement nouvelles espèces via sécrétion de molécules chimioattractives)...

La nature du composant bactérien : exopolymères polysaccharidiques (EP).

1.2.3. Les conséquences d'un biofilm en industrie agroalimentaire sont :

- la difficulté de désinfection
- la source de contamination exogène des aliments par le matériel.

1.2.4.1. Les enzymes responsables de la formation d'amines biogènes sont les décarboxylases



1.2.4.2.

La LDC (lysine décarboxylase), l'ADH (arginine dihydrolase) et l'ODC (ornithine décarboxylase) sont recherchées dans les milieux de Falkow, Moëller, additionnés de l'acide aminé adapté...

Le milieu contient une faible quantité de glucose (1 g/L) qui permet l'acidification du milieu nécessaire à l'expression des décarboxylases. Après épuisement du glucose et acidification, les bactéries productrices de décarboxylase peuvent produire des amines à partir de l'acide aminé présent et réalcaliniser le milieu.

Le pH du milieu est suivi par un indicateur, le BCP :

- un milieu de couleur jaune après incubation témoigne d'une acidification donc de l'absence de production d'une décarboxylase ;
- un milieu violet témoigne d'un réalcalinisation donc de la production de décarboxylase.

2.1. Définitions :

**Nettoyage** : élimination des salissures grâce à des agents tensioactifs associés à une action mécanique.

**Désinfection** : procédé consistant à éliminer temporairement les microorganismes présents sur une surface inerte grâce à un produit désinfectant.

2.2.1. Comparaison

	Désinfectants	Antiseptiques	Antibiotiques
Utilisation	Traitement des surfaces inertes	Traitement local des tissus vivants	Traitement local ou général des organismes animaux
Spectre	Très large : mycètes, virus, bactéries	Très large : mycètes, virus, bactéries	Large à étroit mais activité exclusivement antibactérienne
Concentrations utilisées	Fortes	Fortes	Faibles
Action	Momentanée Microbicide	Momentanée Microbicide	Bactéricide ou Bactériostatique
Rapidité d'action	Immédiate	Immédiate	Lente (quelques heures)

2.2.2. Modes d'actions des désinfectants

- dénaturation protéique ou des acides nucléiques (ex : formaldéhyde)
- oxydations moléculaires : protéines, lipides... (ex : eau de javel, produits iodés)
- désorganisation membranaire (ex : alcool, ammonium quaternaires)
- blocage de la multiplication cellulaire (ex : oxyde d'éthylène)

2.2.3. Paramètres conditionnant l'efficacité d'un protocole de désinfection

- nettoyage préalable
- respect des consignes de préparation : qualité de l'eau utilisée comme diluant (pH, dureté) et d'utilisation (concentration du produit, température d'utilisation, temps d'application).

2.3.1.1. Protocole de détermination de la CMI

Dilution initiale	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	Témoin
V Mueller Hinton (µL)	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
V Désinfectant (µL)	50	50											
V reporté (µL)			50	50	50	50	50	50	50	50	50	50*	
V inoculum à $2.10^5$ UFC/mL (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Dilution finale	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	Témoin
Incubation 18 h – 20°C													
Résultat	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

- : absence de trouble donc de croissance bactérienne
- + : présence de trouble donc de croissance bactérienne

La CMI est la plus faible concentration en désinfectant capable d'inhiber toute croissance visible de la bactérie *in vitro*. Le tube correspondant à la dilution finale 1/128 est donc le dernier à ne pas présenter de trouble.

2.3.1.2. Valeur de la CMI :

$C_i = 4 \text{ g/L}$ , dilution correspondant à la CMI = 1/128

$$\rightarrow C_f = C_i \cdot d = 4/128 = 0,03125 \text{ g/L} = 31,25 \text{ mg/L}$$

2.3.2. La **CMB** (concentration minimale bactéricide) est la plus faible concentration en désinfectant pour laquelle 99,999% des bactéries de l'inoculum sont détruites soit une réduction de 5Log. La concentration initiale est de  $2 \cdot 10^5$  UFC/mL soit :  $N_0 = 1 \cdot 10^4$  UFC/50 $\mu$ L.

Le nombre maximal N de colonies attendues pour un effet bactéricide est donc de :

$$N = N_0 \cdot 1/10^5 = 1 \cdot 10^4 / 1 \cdot 10^5 = 0,1 \text{ colonie donc } 0 \text{ colonie.}$$

3.1.1. L'eau liée aux molécules constituant l'aliment n'est pas disponible pour les microorganismes.

3.1.2. **Les paramètres évaluant la disponibilité en eau sont :**

- la teneur en eau ou humidité relative en % mesurant l'eau totale,
- l' $A_w$  permet d'évaluer l'eau disponible du produit.

3.1.3. **Les stratégies différentes permettant de diminuer l' $A_w$  peuvent être :**

- la diminution de l'eau de l'aliment par déshydratation ou chauffage,
- l'augmentation des concentrations en sel ou sucre.

3.2.1. **Le mode d'action de la nisine présentée sur le document 2 correspond à :**

- une association avec des lipides membranaires (lipide II) et formation de pores transmembranaires,
- la mort cellulaire provoquée par la fuite de constituants cytoplasmiques.

3.2.2. **Le spectre d'action de la nisine :**

L'action est ciblée sur les bactéries Gram + sans membrane externe pouvant laisser passer la nisine (gros peptide ne pouvant traverser la membrane externe des bactéries Gram -)

3.2.3.1. Les caractères morphologiques et structuraux de ***Clostridium*** sont :

- Bacilles Gram +
- sporulés,
- anaérobies stricts
- (non exigeants,
- fermentant le glucose).

3.2.3.2. La cause du gonflement tardif peut s'expliquer par la germination des spores avec croissance bactérienne puis la production de gaz lors de la fermentation butyrique et gonflement du fromage.

3.2.4. **Analyse du document 3 :**

- Lysozyme seul ou avec carvone : effet limité car réduction 1 Log en 60 minutes.
- Nisine seule : réduction de 3 Log en 30 min.
- Nisine + lysozyme : réduction de 4 Log en 30 min.

- Nisine + carvone : réduction de 4 Log en 20 min puis stabilisation
- Nisine + lysozyme + carvone : réduction de 4 Log en 4 min. puis supérieure à 4,5 Log à partir de 16 min (5 Log en 15 minutes).

L'association la plus efficace est nisine + lysozyme + carvone

3.3.1. Les *Streptomyces* produisent également des molécules à activité antibiotique comme aminosides, streptomycine.

3.3.2.1.

L'aspect macroscopique des *Streptomyces* :

- aspect macroscopique : colonies sèches
- aspect microscopique : bacilles filamenteux Gram positifs, pouvant présenter des embranchements et des formes irrégulièrement présentes comme des coques.

3.3.2.2. L'habitat naturel des *Streptomyces* est la terre, l'eau et les végétaux.

3.3.2.3. Les caractères cultureux des *Streptomyces* sont :

- anaérobie,
- mésophile avec température 30°C, croissance lente , pH 8,1
- exigence,

3.2.3.4. Les rôles des composants du milieu de culture :

- caséine et asparagine : apport d'azote et base nutritive
- acide propionique et glycérol : apport de carbone et d'énergie
- phosphate dipotassique : rôle tampon et apport de phosphore
- sulfate de magnésium et de fer : apport de soufre et de microéléments.
- agar : gélifiant
- eau : solvant et hydratant.

3.3.3. Les membranes procaryotes ne contiennent pas de stérols d'où l'absence d'efficacité de la natamycine sur ces micro-organismes.

3.4.1. Identification des éléments présentés sur le document 5

- a : sporange ;
- b : columelle ;
- c : sporangiospores ;
- d : sporangiophore ;
- e : filament coenocytique ;
- f : rhyzoïdes ;
- g : conidiospores ;
- h : phialides ;
- i : tête aspergillaire ;
- j : conidiophore ;
- k : filament septé ;
- l : chlamydospore ;
- m : pseudofilament ;
- n : blastospores ou levures.
- A : *Rhizopus* ;
- B : *Aspergillus* ;
- C : *Candida*

## 3.4.2.1. Exemples de mycotoxines produites :

- ochratoxine produite par des espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*,
- aflatoxine produite par des espèces d'*Aspergillus*.

## 3.4.2.2. Aliments pouvant contenir des mycotoxines :

- tout aliment d'origine végétale en particulier les céréales et oléagineux, mais aussi les fruits...
- la viande de porc pour l'ochratoxine,
- le lait.

**Principaux risques pour la santé humaine** : les mycotoxines sont pour la plupart des molécules mutagènes (provoquant des cancers en particulier du foie et des reins), immunosuppressives, neurotoxiques et tératogènes.

3.4.3. Les mycètes sont des organismes chimio-organotrophes hétérotrophes qui se développent en se nourrissant de matières organiques en décomposition.

Les produits alimentaires composés de matières organiques sont des substrats adaptés au développement des moisissures. Par ailleurs, beaucoup de moisissures sont psychrotrophes et halophiles et se développent donc malgré la réfrigération ou la baisse de l'Aw par ajout de sel ou de saccharose.

## Éléments de corrigé de Biologie Cellulaire et Moléculaire

A noter dans l'introduction une erreur : scrap ne signifie pas mouton mais démangeaison, grattage en référence aux symptômes de la scrapie maladie du mouton.

1.1.1 – Le terme « expression constitutive » signifie que la molécule est exprimée, synthétisée en permanence par la cellule quelles que soient les conditions où se trouve la cellule.

1.1.2.1 – La séquence signal permet l'adressage de la molécule (ici le réticulum endoplasmique granuleux (REG)) en vue de sa destination finale.

1.1.2.2 – Les différentes étapes sont :

- la reconnaissance du peptide signal par une protéine cytosolique (SRP),
- la fixation du complexe sur un récepteur présent sur la membrane externe du REG,
- la translocation de la chaîne en élongation dans le REG (et élimination de la séquence signal).

1.1.3.1 - Les modifications post traductionnelles permettent de donner à la chaîne d'acides aminés une structure de protéine fonctionnelle.

1.1.3.2 – Les phénomènes mis en jeu sont ceux qui aboutissent à une structure secondaire en hélice alpha ou bêta, la formation de liaisons par ponts SS et les réactions de glycosylation (N glycane).

1.1.4 – La protéine Prion se trouve sur la face externe de la membrane plasmique car elle est glycosylée et liée au GPI.

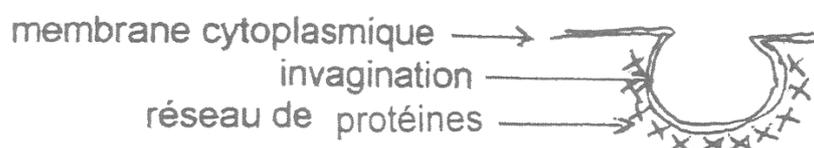
1.2.1 – L'apoptose est le terme définissant la mort programmée de la cellule suite à des stimuli internes ou externes.

1.2.2.1 – La microscopie électronique à transmission utilise les propriétés des structures cellulaires d'être plus ou moins opaques aux électrons. Les particules d'or colloïdal sont utilisées car elles sont opaques aux électrons et permettent donc aux éléments marqués par eux d'être ainsi repérés.

1.2.2.2 – le complexe moléculaire obtenu après réaction immunologique est le suivant :  
PrPc – Ac anti PrPc - Prot A - Or colloïdal

2.1.1. - Les lysosomes sont des organites cellulaires contenant des protéines transmembranaires non enzymatiques ou enzymatiques (ATPases, perméases), des hydrolases (protéases, lipases, phospholipases, glycosidases et nucléases) pour la dégradation (hydrolyse) de molécules en provenance du milieu extérieur (phagocytose, endocytose), du cytosol (peptides) ou d'un mécanisme d'autophagie.

2.1.2 - L'invagination membranaire peut ainsi être représentée :



2.1.3 –L'invagination va permettre la formation d'un endosome. La fusion des membranes du lysosome et de l'endosome permet la libération des hydrolases dans l'endosome et la dégradation des molécules qu'il contient.

2.1.4 - Il est bien difficile de répondre à cette question. On peut imaginer que, la PrPsc n'étant pas dégradée et s'accumulant dans le cytosol des cellules nerveuses, elle peut entraîner des anomalies de la conduction de l'influx nerveux.

2.2.- Les agents conventionnels exercent leur pathogénicité en élaborant des substances toxiques et se multiplient seuls (bactéries, parasites, moisissures) ou en détournant la machinerie cellulaire (virus) par **réplication de leur matériel nucléaire**

Les protéines Prions produisent d'autres molécules anormales en modifiant la structure d'une protéine existante la rendant résistante à la destruction.

3.1.1 – On appelle « anticorps monoclonal » : réactif contenant des anticorps ayant tous la même spécificité (idiotype) pour un seul épitope issus d'un seul clone cellulaire.

3.1.2 – Les cellules produisant des anticorps monoclonaux sont des hybridomes issus de la fusion

- d'un plasmocyte sécrétant l'anticorps d'intérêt mais ne formant pas de lignées continues,
- d'une cellule cancéreuse capable de constituer une lignée continue possédant une double mutation la rendant incapable de produire des bases azotées sur milieu HAT et de sécréter des anticorps.

3.1.3 - La digestion enzymatique permet d'identifier les échantillons contenant la protéine PrPsc résistante à la digestion enzymatique alors que la protéine normale est totalement protéolysée. Elle est rendue nécessaire par le fait que l'anticorps reconnaît les deux formes de la protéine.

3.1.4 - L'électrophorèse étant réalisée en présence de SDS, agent dénaturant, toutes les molécules ont la même charge et la séparation se fera sur la différence de taille.

3.1.5 - Le transfert sur membrane de nitrocellulose permet des techniques de visualisation plus faciles avec accès des anticorps aux molécules, plus sophistiquées avec blocage des sites non spécifiques en respectant la position initiale obtenue sur le gel et de manipulation plus facile que les gels.

3.1.6 – Un conjugué est un couple de deux composés, l'un étant l'élément spécifique de celui recherché et l'autre étant le marqueur.

3.1.7

Interprétation des résultats :

Pour les deux échantillons, les fractions 1 non soumises à la digestion enzymatique montrent une seule bande large après révélation immunologique et valident ainsi la technique d'électrophorèse.

Pour les fractions 2, obtenues après digestion enzymatique de la protéine normale, l'échantillon 1 ne montre aucune bande alors que l'échantillon 2 montre une bande mettant en évidence dans cet échantillon la présence de protéines PrPsc résistantes à l'hydrolyse enzymatique.

Conclusion :

L'échantillon animal testé en 1 ne présente pas de protéine PrPsc alors que celui testé en 2 provient d'un animal atteint d'ESB

### 3.2.1

Différentes étapes du test

1 – préparation de l'échantillon avec digestion enzymatique

2 – première réaction immunologique avec incubation des échantillons traités avec un conjugué : Ac 6H4 anti PrPc/PrPsc-billes de latex bleues

3 – migration chromatographique du mélange sur une bandelette

4 – deuxième réaction immunologique au niveau de deux lignes d'Ac fixés :

- une inférieure avec des Ac 6H4
- une supérieure avec des Ac anti 6H4

### 3.2.2

les billes de latex de couleur bleue jouent le rôle de marqueur et permettent ainsi la visualisation des complexes immobilisés.

### 3.2.3

La ligne supérieure où sont présents des Ac anti 6H4 correspond à l'immobilisation des anticorps 6H4 liés aux billes de latex n'ayant pas fixé de protéine Prion et ayant migré jusqu'en haut de la bandelette : c'est un témoin de migration qui doit être positif dans tous les cas.

La ligne inférieure où sont présents des Ac 6H4 signe la présence dans l'échantillon de PrP.

Toutes les bandes montrent une ligne supérieure donc des techniques validées.

Seule la bande D montre une ligne inférieure donc signe la présence, dans l'échantillon D, de protéine Prion PrPsc non digéré par le traitement enzymatique.

Absence de PrPsc dans les autres échantillons.

### 3.2.4

Edifice moléculaire de la ligne inférieure :

Bandelette - Ac 6H4–PrPsc–Ac 6H4–bille de latex bleue

Technique sandwich utilisant des anticorps ou antigènes marqués

## Éléments de corrigé de Sciences et Technologies Bio Industrielles

### 1 - Aspects réglementaires.

1.1 - AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.

1.2 - Ce dossier doit démontrer : la qualité, l'innocuité et l'efficacité du produit.  
AMM = Autorisation de Mise sur le Marché.

1.3 – Les Bonnes Pratiques de Fabrication permettent l'Assurance de la qualité : assurance que les produits sont fabriqués avec des processus contrôlés, reproductibles et enregistrés dans le système documentaire.

### 2 - Préparation d'un des principes actifs du médicament.

#### 2.1 –

Principe actif : molécule responsable de l'effet thérapeutique du médicament.

Excipients : ensemble des composants qui sont ajoutés au principe actif afin d'assurer sa mise en forme ou sa conservation.

Sur le diagramme : PA = antigènes A, B et C.

Excipients = adjuvant + stabilisant + conservateur.

2.2.1 - La préculture permet d'obtenir rapidement et en grande quantité les bactéries (inoculum) dans le fermenteur.

Le volume correspond en général à 2 à 10 % du volume du fermenteur ; soit ici 20 à 100 litres.

2.2.2 - Stérilisation « in situ » signifie que le fermenteur est stérilisé sur place. Pour cela, on le remplit avec le milieu de culture et on réalise une stérilisation par chauffage de la cuve. Le chauffage est réalisé soit par une résistance électrique immergée, soit par de la vapeur qui circule dans une double paroi.

2.2.3 - L'air arrive en bas pour qu'il puisse remonter et traverser toute la hauteur de la cuve. Les bulles d'air assez grosses au départ, sont divisées par les pales d'agitation en de nombreuses petites bulles, augmentant ainsi la surface d'échange oxygène /milieu, permettant, de ce fait, une meilleure oxygénation pour un même débit d'air.

#### 2.2.4 –

**À l'entrée** : filtration sur membrane stérilisante pour protéger la culture des contaminations extérieures.

**À la sortie** : filtration pour éviter que les bactéries contenues dans le fermenteur ne se propagent dans l'environnement extérieur. Protection du personnel.

#### 2.2.5 –

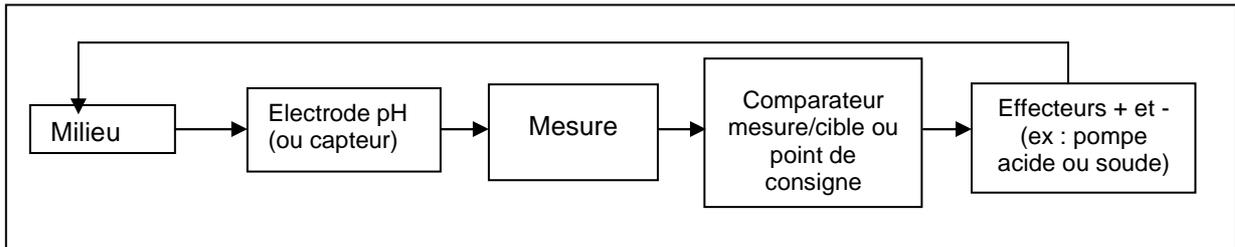
**Régulation du pH** : Au cours du développement des bactéries, il y a production de métabolites qui peuvent modifier le pH (en général acidification) et créer des conditions défavorables à la multiplication des bactéries cultivées. La régulation du

pH permet donc de maintenir les conditions optimales de culture pour avoir un rendement maximum.

**Régulation de la formation de mousse** : lors de l'agitation intense pour la bonne homogénéisation du milieu, la formation de mousse pourrait colmater les sorties (gêne les mesures par les capteurs, l'homogénéité du milieu et peut altérer les dilutions).

### 2.2.6 - Schéma d'une boucle de régulation du pH.

La consigne du pH se situe entre 5.3 et 5.7. La mesure effectuée à 5.2 sort de la consigne. Le pH est trop bas. Le milieu est trop acide. La pompe à soude se déclenche ramenant le pH dans la fourchette autorisée.



## 3 - La répartition.

3.1 - Les locaux doivent être sous atmosphère contrôlée pour éviter la pénétration de contaminants extérieurs (ex : air filtré, surpression, température, humidité, niveau d'empoussièrément minimum,...).

3.2 -

3.2.1 -  $NA = 20/20000 = 10^{-3}$ .

3.2.2 -  $10^{-3} > 10^{-4}$  : l'unité n'est pas conforme.

3.2.3 - La règle des 5 M : vérification au niveau de : *matière première* (flacons vides, vaccin à répartir), *milieu* (atmosphère de la salle de répartition), *matériel* (machine de répartition), *main d'œuvre* (tenue, hygiène...), *méthode* (respect des procédures de remplissage ou nettoyage par ex...ou contrôle des particules microscopiques et poussières).

## 4 - La lyophilisation.

4.1 - Principe : technique de dessiccation par sublimation de la glace de la solution préalablement solidifiée par congélation.

4.2 – **L'évaporateur** est l'enceinte dans laquelle on place des flacons de produit sur des plateaux et où l'on procède à sa congélation et à sa sublimation.

**Le compresseur** assure la mise sous vide de l'évaporateur afin d'abaisser la pression.

**Le condenseur** permet de recueillir la vapeur d'eau provenant du produit et de la piéger sous forme de glace.

4.3 - **Phase 1** = phase de congélation : la température de l'enceinte diminue ce qui provoque le refroidissement du produit qui passe à l'état congelé. L'eau se

transforme en glace. En fin de phase 1, on fait le vide dans l'enceinte (P diminue).

**Phase 2** = phase de sublimation : le vide est maintenu et on chauffe le produit et il y a alors transformation de la glace en vapeur. (La température du produit est toujours négative car toujours à l'état congelé). La combinaison des facteurs température, pression dans l'enceinte permet l'évaporation de la totalité de l'eau libre du produit. La vapeur se condense sur le piège ce qui provoque une remontée de la température de celui-ci.

**Phase 3** = dessiccation secondaire ou désorption de l'eau liée (lorsque toute l'eau libre est évaporée c'est l'eau liée qui est évaporée) et la température du produit augmente progressivement pour atteindre la température des étagères.

4.4 - La dénaturation du produit.

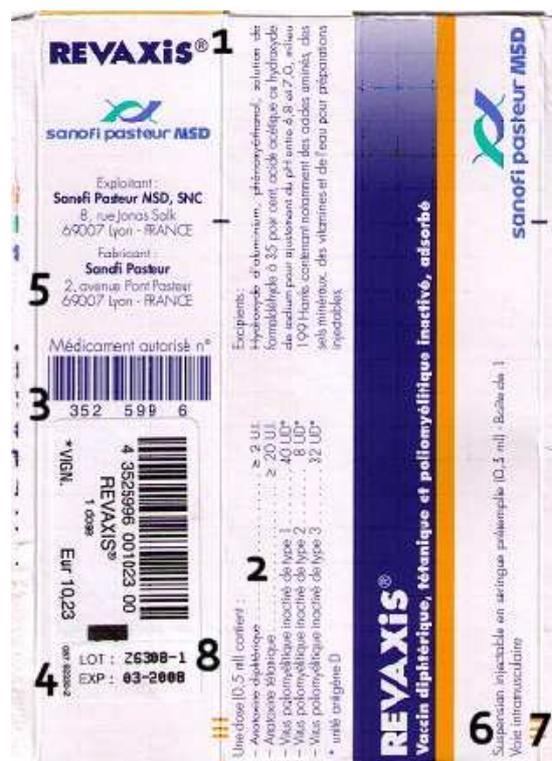
4.5 -

- Humidité résiduelle.
- Remise en solution du lyophilisat.
- Activité du principe actif.

4.6 – Le conditionnement sous atmosphère modifiée consiste au remplacement de l'air contenant de l'O<sub>2</sub> (susceptible de dégrader le produit par oxydation) par un gaz inerte (neutre).

## 5 - Le conditionnement.

5.1 -



5.2 – Autres formes galéniques :

- sirop : voie orale ;
- pommade ou crème : voie cutanée ;
- suppositoire : voie rectale ;
- comprimé, granulé... = voie orale.

5.3 - L'emballage du vaccin n'a pas de mention précisant une inscription particulière, donc il peut être vendu sans ordonnance.

**5.4** - Une **suspension** est une dispersion d'un solide dans un liquide. Il faut donc agiter le produit pour une bonne homogénéisation.

**5.5** -

**5.5.1 – Une monographie** correspond à une fiche descriptive pour un produit ou un composant utilisé dans la fabrication de médicaments. Elle donne des informations sur l'identification du produit, ses caractéristiques et les méthodes d'analyse.

**La Pharmacopée** est un ouvrage réglementaire utilisé dans l'industrie pharmaceutique.

**5.5.2 – L'eau stérile** est une eau où il y a absence totale de germes.

**L'eau apyrogène** est une eau qui ne provoque pas de fièvre après injection.

## Sujet de Mathématiques

**Durée : 2 heures – Coefficient : 2**

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

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

Le formulaire de mathématiques est joint au sujet (non fourni dans ces annales).

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

Une feuille de papier millimétrée est fournie.

### EXERCICE 1 (11 points)

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

#### A. Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) :  $5y' + y = e^{-0,2t}$

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

1. Déterminer les solutions sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  de l'équation différentielle

$$(E_0) : 5y' + y = 0.$$

2. Soit  $h$  la fonction définie sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  par :  $h(t) = at e^{-0,2t}$

où  $a$  est une constante réelle.

Déterminer  $a$  pour que la fonction  $h$  soit une solution particulière de l'équation différentielle (E).

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

4. - Déterminer la solution  $f$  de l'équation différentielle (E) qui vérifie la condition initiale :

$$f(0) = 0$$

#### B. Étude d'une fonction

Soit la fonction  $f$  définie sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  par :  $f(t) = 0,2t e^{-0,2t}$ .

On note  $C$  la courbe représentative de la fonction  $f$  dans le plan muni d'un repère orthogonal.

1 - Déterminer la limite de la fonction  $f$  en  $+\infty$

Que peut-on en déduire pour la courbe  $C$  ?

2 - On désigne par  $f'$  la fonction dérivée de la fonction  $f$ .

Montrer que pour tout  $t$  de l'intervalle  $[0; +\infty[$  :  $f'(t) = (-0,04t + 0,2)e^{-0,2t}$

3 - Étudier les variations de la fonction  $f$  sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  et donner son tableau de variations. On précisera les valeurs remarquables de  $t$  et  $f(t)$ .

4 - a) Recopier et compléter le tableau de valeurs ci-dessous. On arrondira les résultats à  $10^{-2}$ .

$x$	0	2,5	5	10	15	20	25
$f(x)$							

b) Tracer la courbe  $C$  sur la feuille de papier millimétrée fournie.

Sur l'axe des  $x$ , 2cm représentent 5 unités. Sur l'axe des  $y$ , 2 cm représentent 0,05 unités.

#### C. Application

A l'aide d'une perfusion, on injecte pendant cinq minutes un médicament antalgique à un patient. Après l'injection, l'organisme élimine peu à peu le médicament.

On s'intéresse à la quantité de médicament présente dans l'organisme du patient au cours du temps. L'instant  $t = 0$  correspond au début de l'injection.

On fait l'hypothèse qu'à l'instant  $t$ , exprimé en minute (min), la quantité de médicament, exprimée en millilitre (ml), est égale à  $f(t) = 0,2t e^{-0,2t}$ , où  $f$  est la fonction étudiée dans la partie B.

1. Déterminer graphiquement, à une minute près, l'instant à partir duquel la quantité de médicament redevient inférieure à 0,05 ml.

On fera apparaître les traits de construction utiles sur le graphique.

2. a) On considère la fonction  $F$  définie sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  par  $F(t) = (-t-5) e^{-0,2t}$ .

Montrer que la fonction  $F$  est une primitive de la fonction  $f$ .

b) En déduire la valeur moyenne de la fonction  $f$  sur l'intervalle  $[0; +\infty[$ . On donnera la valeur exacte puis une valeur approchée arrondie à  $10^{-2}$ .

c) Que représente la valeur moyenne calculée au b) dans le contexte de l'exercice ?

### EXERCICE 2 (9 points)

Les trois parties de cet exercice sont indépendantes.

Une usine fabrique des tubes en polyéthylène pour le chauffage géothermique.

On s'intéresse à trois types de tubes appelés tubes de type 1, tubes de type 2 et tubes de type 3.

#### A. Loi normale

Un tube de type 1 est accepté au contrôle si son épaisseur est comprise entre 1,35 millimètres et 1,65 millimètres.

1. On désigne par  $X$  la variable aléatoire qui à chaque tube de type 1 prélevé au hasard dans la production d'une journée associe son épaisseur exprimée en millimètre.

On suppose que la variable aléatoire  $X$  suit la loi normale de moyenne 1,5 et d'écart type 0,07.

Calculer la probabilité qu'un tube de type 1 prélevé au hasard dans la production de la journée soit accepté au contrôle. On donnera le résultat arrondi à  $10^{-2}$ .

2. L'entreprise désire améliorer la qualité de la production des tubes de type 1 : il est envisagé pour cela de modifier le réglage des machines produisant ces tubes.

On note  $X_1$  la variable aléatoire qui, à chaque tube de type 1 prélevé dans la production future, associera son épaisseur. On suppose que la variable aléatoire  $X_1$  suit une loi normale de moyenne 1,5 et d'écart type  $\sigma_1$ .

Déterminer  $\sigma_1$  pour que la probabilité qu'un tube de type 1 prélevé au hasard dans la production future soit accepté au contrôle soit égale à 0,99.

On donnera le résultat arrondi à  $10^{-2}$ .

#### B. Loi binomiale

On considère un lot de tubes de type 2,

On note  $E$  l'événement : « un tube prélevé au hasard dans ce lot de tubes de type 2 est défectueux. ». On suppose que  $P(E) = 0,02$ .

On prélève au hasard 20 tubes de type 2 dans ce lot pour vérification.

Le lot est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement de 20 tubes de type 2 à un tirage avec remise.

On considère la variable aléatoire  $Y_1$  qui, à tout prélèvement de 20 tubes de type 2, associe le nombre de tubes défectueux de ce prélèvement.

1 - Justifier que la variable aléatoire  $Y_1$  suit une loi binomiale dont on donnera les paramètres.

2 - Calculer la probabilité que, dans un tel prélèvement, au plus un tube soit défectueux.

On donnera le résultat arrondi à  $10^{-2}$ .

**C. Test d'hypothèse**

Un client a passé une commande de tubes de type 3. La longueur de ces tubes doit être de 300 millimètres. On se propose de construire un test d'hypothèse bilatéral pour contrôler, au moment de la livraison, la moyenne  $\mu$  de l'ensemble des longueurs, en millimètres, des tubes de type 3.

On note  $Z$  la variable aléatoire qui, à chaque tube de type 3 prélevé au hasard dans la livraison, associe sa longueur en millimètre. La variable aléatoire  $Z$  suit la loi normale de moyenne inconnue  $\mu$  et d'écart type  $\sigma = 1$ .

On désigne par  $\bar{Z}$  la variable aléatoire qui, à chaque échantillon aléatoire de 100 tubes de type 3 prélevés dans la livraison, associe la moyenne des longueurs, en millimètre, des tubes de cet échantillon. La livraison est assez importante pour que l'on puisse assimiler ces prélèvements à des tirages avec remise.

L'hypothèse nulle est  $H_0: \mu = 300$ . L'hypothèse alternative est  $H_1: \mu \neq 300$ .

Le seuil de signification du test est fixé à 0,05.

1. Sous l'hypothèse  $H_0$ , on admet que la variable aléatoire  $Z$  suit la loi normale de moyenne 300 et d'écart type  $\frac{1}{\sqrt{100}} = 0,10$ .

Déterminer sous cette hypothèse le nombre réel positif  $h$  tel que :

$$P(300 - h \leq \bar{Z} \leq 300 + h) = 0,95$$

On donnera le résultat arrondi à  $10^{-2}$ .

2. En déduire la règle de décision permettant d'utiliser ce test.

3. On prélève un échantillon de 100 tubes de type 3 dans la livraison et on observe que, pour cet échantillon, la moyenne des longueurs des tubes est :

$$\bar{z} = 299,90, \text{ valeur arrondie à } 10^{-2}.$$

Peut-on, au seuil de 5 %, conclure que la livraison est conforme pour la longueur ?

## Sujet de Sciences physiques et chimiques

**Durée : 2 heures – Coefficient : 3**

Matériel autorisé : toutes les calculatrices de poche, y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante

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

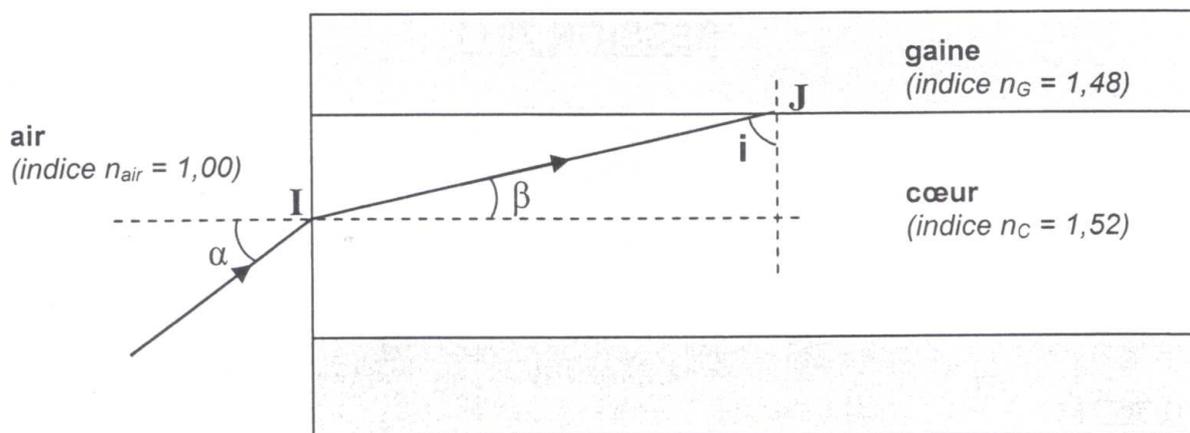
### A : FIBRE OPTIQUE (15 points)

Les fibres optiques sont maintenant connues du grand public, par leurs applications en médecine (fibroscopie) ou dans la transmission de données (télécommunications, télévision, internet). À l'heure actuelle, les fibres optiques représentent plusieurs centaines de milliers de kilomètres de câbles sous-marins autour de la planète.

Cet exercice propose de rappeler le principe de fonctionnement des premières fibres, puis de comprendre une de leurs améliorations. Il comporte des questions indépendantes.

#### 1 - Fibre optique à saut d'indice

On considère une fibre optique à saut d'indice. Dans ce type de fibre, l'indice de réfraction varie brusquement entre le cœur et la gaine de la fibre. Le schéma ci-dessous représente une coupe longitudinale de cette fibre optique.



**1-1** - Un rayon lumineux arrive sur l'interface séparant l'air et le cœur de la fibre au point d'incidence I.

**1-1-1** - Donner la relation liant l'angle d'incidence  $\alpha$ , l'angle de réfraction  $\beta$ , l'indice de réfraction de l'air  $n_{air}$  et l'indice de réfraction du cœur  $n_c$ . En déduire l'expression de l'angle  $\beta$  en fonction de  $\alpha$ ,  $n_{air}$  et  $n_c$ .

**1-1-2** - Calculer la valeur de l'angle  $\beta$  sachant que l'angle d'incidence  $\alpha$  vaut  $17,0^\circ$ .

**Données** :  $n_{air} = 1,00$  ;  $n_c = 1,52$ .

**1-1-3** - À quel savant est associée la relation évoquée à la question **1.1.1**. ?

**1-2** - Le rayon réfracté au point I se propage dans le cœur de la fibre jusqu'à atteindre l'interface entre le cœur et la gaine, au point d'incidence J.

**1-2-1** - Sachant que les deux normales (en pointillés sur le schéma) sont perpendiculaires, donner la relation liant l'angle  $\beta$  et l'angle  $i$ .

**1-2-2** - Vérifier que l'angle d'incidence  $i$  est égal à  $78,9^\circ$ .

**1-3** - Les rayons lumineux se propagent dans une fibre optique par le phénomène de réflexion totale.

**1-3-1** - Rappeler pourquoi cette réflexion totale est nécessaire à la propagation correcte des rayons lumineux dans la fibre optique.

**1-3-2** - Indiquer la condition sur l'angle d'incidence  $i$  pour que le rayon lumineux subisse une réflexion totale au point J. Détailler le raisonnement.

On notera  $n_G$  l'indice de réfraction de la gaine.

**1-3-3** - On rappelle que  $i = 78,9^\circ$ . La condition de réflexion totale en J est-elle ici remplie ? Justifier la réponse.

**Donnée :  $n_G = 1,48$ .**

**1-3-4** - Pour avoir le maximum de chance qu'un faisceau lumineux se propage dans une telle fibre, faut-il essayer de le faire entrer dans la fibre avec des angles d'incidence  $\alpha$  plutôt faibles ou plutôt élevés ?

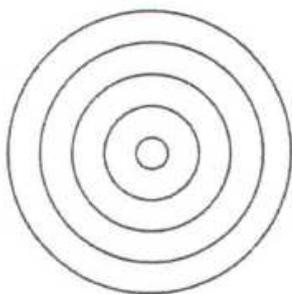
*Un inconvénient de la fibre à saut d'indice est que des rayons entrant simultanément dans la fibre avec des incidences  $\alpha$  différentes parcourent des longueurs différentes et donc ressortent à l'autre extrémité de la fibre à des instants différents. Ce phénomène limite le nombre d'impulsions lumineuses que l'on peut faire passer par la fibre chaque seconde, donc son débit.*

*La fibre optique à gradient d'indice permet d'avoir la même durée de parcours pour toutes les incidences  $\alpha$  à l'entrée de la fibre.*

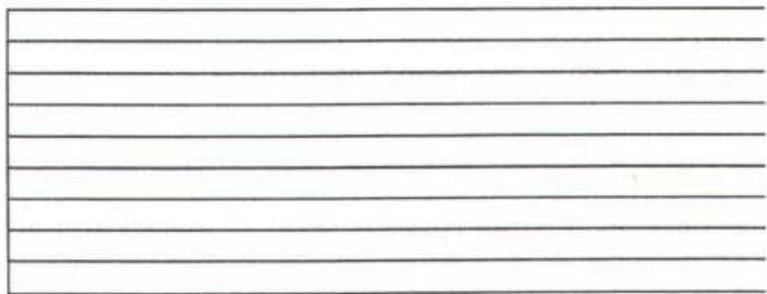
## 2 - Fibre optique à gradient d'indice

Dans une fibre à gradient d'indice, l'indice de réfraction varie progressivement du centre vers la surface extérieure de la fibre.

On peut modéliser la fibre par un assemblage de strates concentriques d'indice de réfraction légèrement différent :

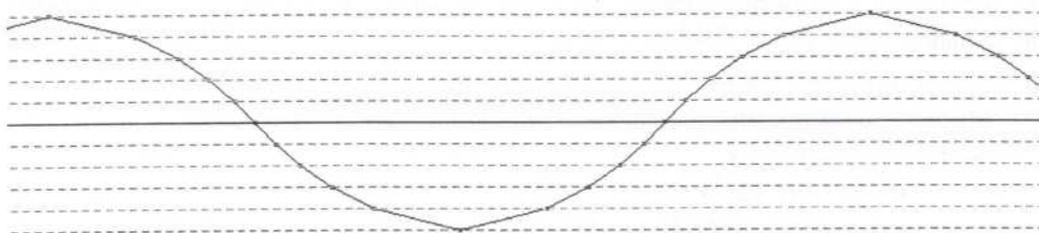


coupe transversale



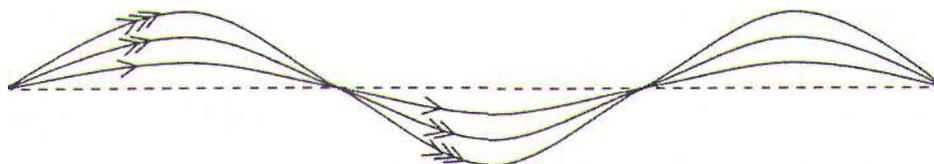
coupe longitudinale

Un rayon lumineux se propage en ligne droite dans chaque strate, il subit une réfraction à chaque changement de strate. Quand son incidence est trop élevée, il subit une réflexion totale, ce qui lui permet de rester dans la fibre, comme le montre la figure ci-dessous :



**2-1** - D'après la trajectoire du rayon sur la figure ci-dessus, indiquer si l'indice de réfraction des différentes strates augmente ou diminue du centre vers l'extérieur de la fibre. Argumenter la réponse.

**2-2** - Les rayons d'un faisceau monochromatique entrant simultanément dans cette fibre sous des incidences différentes n'ont pas la même trajectoire (figure ci-dessous).



**2-2-1** - Que représente l'indice de réfraction d'un milieu transparent ?

**2-2-2** - D'après la figure ci-dessus, les rayons parcourent donc des distances différentes dans la fibre, mais ressortent pourtant quasiment simultanément de la fibre optique. Expliquer pourquoi.

## **B : ANALYSE RADIOCHIMIQUE DE LA VANILLINE (15 points)**

*L'arôme de vanille, ingrédient utilisé dans la préparation de nombreux desserts, provient en grande partie de la vanilline, composé aromatique très puissant. Les gousses de vanille contiennent peu de vanilline : dans 1 kg de gousses, il y a 25 g de vanilline. Le prix de revient de la vanille est élevé : les extraits de vanille naturelle coûtent plus de 1500 € le kilogramme. De ce fait, la vanilline commercialisée peut contenir de la vanilline synthétique, dont le prix de revient est beaucoup plus faible.*

La vanilline naturelle manifeste une activité liée à la présence du carbone 14, comme dans toute substance végétale, suivant le mécanisme décrit ci-après :

Dans la nature, l'élément carbone possède deux noyaux isotopes : le carbone 12 noté  $^{12}_6\text{C}$  et le carbone 14 noté  $^{14}_6\text{C}$ .

Ce carbone 14 est spontanément radioactif  $\beta^-$  et a une période ou temps de demi-vie  $T$  égale à 5570 ans.

On note  $N(t)$  le nombre de noyaux radioactifs présents à l'instant  $t$  dans l'échantillon.

L'activité  $A(t)$  mesurée en becquerel (Bq) d'un échantillon radioactif est le nombre de désintégrations qu'il produit par seconde soit :

$$A(t) = -\frac{dN(t)}{dt} = \lambda N(t)$$

$\lambda$  : constante de désintégration radioactive du noyau.

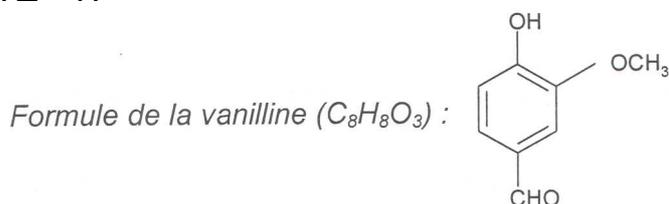
Dans la matière vivante, les échanges d'élément carbone entre l'organisme végétal ou animal et l'air atmosphérique font que le rapport  $N(\text{carbone } 14) / N(\text{carbone } 12)$  est constant. À la mort de la matière vivante, ces échanges prennent fin ce qui entraîne la décroissance de ce rapport. C'est le cas pour les gousses de vanille à partir de la récolte.

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

Masses molaires atomiques en  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$  : C : 12 ; H : 1 ; O : 16. Numéros atomiques :

Élément carbone C :  $Z = 6$ .

Élément azote N :  $Z = 7$ .



On se propose de déterminer la proportion de vanilline naturelle dans un échantillon à partir de la mesure de l'activité de celui-ci.

## 1 - Réaction nucléaire

**1-1** - Citer les lois de conservation permettant l'écriture des équations des réactions nucléaires.

**1-2** - Écrire l'équation de désintégration du carbone 14.

**1-3** - Définir la période ou temps de demi-vie  $T$  du carbone 14.

**1-4** - Exprimer puis calculer la constante de désintégration radioactive du carbone 14,  $\lambda$  en  $\text{s}^{-1}$ .

## 2 - La vanilline naturelle pure

La vanilline naturelle renferme une faible proportion de molécules marquées au carbone 14, chacune ne comportant qu'un seul atome  $^{14}_6\text{C}$ .

L'activité  $A$ , à un instant  $t$ , d'un gramme de vanilline naturelle a pour valeur 7200 Bq.

**2-1** - Calculer le nombre  $N$ , à l'instant  $t$ , de molécules marquées au carbone 14 dans une masse  $m = 1,00 \text{ g}$  de vanilline naturelle.

**2-2** - Calculer la masse molaire  $M$  de la vanilline.

**2-3** - En déduire le nombre total  $N'$  de molécules dans une masse  $m = 1,00 \text{ g}$  de vanilline naturelle.

**2-4** - En déduire la proportion de molécules marquées.

### 3 - La vanilline mixte

Un échantillon de masse 1,00 g de vanilline présente une activité de 1200 Bq, due uniquement à la vanilline naturelle. Il peut contenir également de la vanilline synthétique d'activité nulle. Déterminer la proportion de vanilline naturelle dans cet échantillon.

### **C : DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE DANS UN COMPRIMÉ (15 points)**

L'acide ascorbique ou vitamine C, de formule  $C_6H_8O_6$  est un anti-scorbut et un anti-infectieux. Il joue également un rôle important dans la synthèse du collagène.

C'est un agent réducteur qui réagit facilement avec divers oxydants, notamment avec le dioxygène présent dans l'air. Cette propriété entraîne un ralentissement de l'oxydation par le dioxygène de certains constituants présents dans les aliments. Par conséquent l'acide ascorbique est souvent utilisé comme agent anti-oxydant dans l'industrie agro-alimentaire (code E300). Le couple d'oxydoréduction mis en jeu est  $C_6H_6O_6/C_6H_8O_6$ .

Par ailleurs, l'acide ascorbique peut amplifier l'action de certains médicaments, ce qui permet d'en réduire les doses ou les effets secondaires. Par exemple, une dose d'acide ascorbique ingérée avec de l'aspirine amplifie son effet analgésique tout en diminuant sa toxicité. Il existe ainsi des comprimés d'aspirine contenant de la vitamine C.

Dans cet exercice, on utilisera les propriétés réductrices de l'acide ascorbique pour son dosage dans un comprimé « Aspirine Vitaminée C ». L'oxydant utilisé dans ce cas est le diiode  $I_2$ , introduit en excès; le diiode restant est dosé en retour par une solution aqueuse de thiosulfate de sodium ( $2 Na^+ + S_2O_3^{2-}$ ).

**Données** : Masse molaire :  $M(\text{acide ascorbique}) = 176,13 \text{ g.mol}^{-1}$

Potentiels standards d'oxydoréduction :  $E^\circ(C_6H_6O_6/C_6H_8O_6) = 0,13 \text{ V}$ .

$E^\circ(I_{2(aq)}/I_{(aq)}) = 0,62 \text{ V}$ .

Constante de Faraday :  $1 F = 96500 \text{ C}$ .

Constante du gaz parfait :  $R = 8,31 \text{ S.I}$ .

Un comprimé « Aspirine Vitaminée C » est broyé puis dissous dans 100,0 mL d'eau distillée ; cette solution aqueuse est notée S.

À un volume  $V_0 = 20,0 \text{ mL}$  de la solution S d'acide ascorbique sont ajoutés un volume  $V_1 = 20,0 \text{ mL}$  d'une solution aqueuse de diiode  $I_2$  de concentration molaire  $C_1 = 0,050 \text{ mol.L}^{-1}$  et un volume  $V = 10 \text{ mL}$  d'une solution d'acide orthophosphorique à 5 %. Le milieu réactionnel est agité pendant quelques minutes.

L'excès de diiode n'ayant pas réagi avec l'acide ascorbique est ensuite dosé en retour à l'aide d'une solution aqueuse de thiosulfate de sodium ( $2 Na^+ + S_2O_3^{2-}$ ) de concentration molaire  $C_2 = 0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ .

Le volume de solution de thiosulfate de sodium nécessaire pour réagir avec l'excès de diiode est  $V_2 = 15,55 \text{ mL}$ .

**1** - Écrire l'équation de la réaction d'oxydoréduction entre le diiode  $I_2$  et l'acide ascorbique  $C_6H_8O_6$ .

On passera par les demi-équations d'oxydation et de réduction.

**2** - Calculer la différence de potentiels standard  $\Delta E^\circ$  entre les deux couples en présence.

3 - Donner l'expression de la valeur de l'enthalpie libre standard  $\Delta_R G^\circ$  de la réaction d'oxydoréduction en fonction de  $\Delta E^\circ$ . Calculer la valeur de  $\Delta_R G^\circ$ .

4 - En déduire que la constante de l'équilibre mis en jeu vaut  $K = 3,8 \cdot 10^{16}$  à 298 K. Quel commentaire suscite cette valeur ?

5 - Malgré la valeur élevée de la constante K, un dosage direct entre le diiode et l'acide ascorbique n'est pas envisageable. Proposer une explication en faisant appel à un autre paramètre important de la réaction.

6 - Écrire l'équation de la réaction du dosage de l'excès de diiode  $I_2$  par l'ion thiosulfate  $S_2O_3^{2-}$ .

On passera par les demi-équations d'oxydation et de réduction. On rappelle que le couple  $S_4O_6^{2-}/S_2O_3^{2-}$  est mis en jeu.

7 -Après avoir donné la relation entre la quantité de diiode dosée  $(n_{I_2})_{excès}$  et la quantité de thiosulfate  $(n_{S_2O_3^{2-}})_{éq}$  ajoutée à l'équivalence, donner l'expression de  $(n_{I_2})_{excès}$  en fonction de  $C_2$  et  $V_2$ .

8 - Donner l'expression de la quantité totale de diiode  $(n_{I_2})_{tot}$  introduit en début de dosage en fonction de  $C_1$  et  $V_1$

9 - En déduire l'expression de la quantité de diiode  $(n_{I_2})_{réagi}$  ayant réagi avec l'acide ascorbique en fonction de  $C_1$ ,  $V_1$ ,  $C_2$  et  $V_2$ . Justifier le raisonnement.

10 - En déduire que la quantité d'acide ascorbique  $n_{asc}$  présente dans 100 mL de la solution S, autrement dit dans le comprimé est donnée par  $n_{asc} = 5 \times (C_1 \times V_1 - \frac{C_2 \times V_2}{2})$ .

Détailler le raisonnement et calculer la valeur de  $n_{asc}$ .

11 - Le résultat de la question précédente est-il compatible avec les indications du fournisseur, à savoir une masse  $m_{asc} = 200$  mg d'acide ascorbique dans un comprimé «Aspirine Vitaminée C» ?

12 - On souhaite réaliser le même dosage quelques jours plus tard. Expliquer pourquoi on ne peut pas se servir de la solution S, c'est-à-dire pourquoi il est nécessaire de préparer une nouvelle solution du comprimé pour réaliser ce dosage.

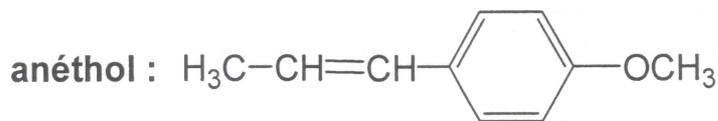
### **D : SYNTHÈSE DE L'ANETHOL (15 points)**

La badiane chinoise, ou anis étoile, est un fruit utilisé notamment dans les domaines alimentaires et pharmaceutiques. D'une part, cette épice contient de fortes quantités d'anéthol, molécule responsable de l'odeur caractéristique des boissons anisées. D'autre part la badiane chinoise contient de l'acide **shikimique**, qui constitue la matière première pour la fabrication du vaccin nommé Tamiflu®, utilisé contre les différentes gripes (humaines, aviaires et porcines).

Les risques récents de pandémie grippale ont amené les laboratoires pharmaceutiques à produire le Tamiflu® en grandes quantités. Dans ce contexte, la demande en badiane chinoise a fortement augmenté, entraînant un surcoût, non seulement à l'achat, mais aussi lors du traitement consistant à en extraire l'anéthol.

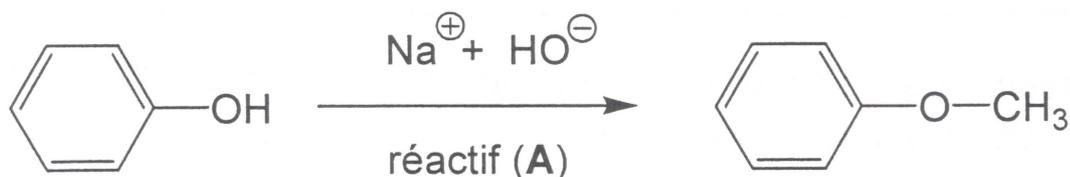
Par conséquent, il est devenu intéressant de produire la molécule par une voie de synthèse chimique qui fait l'objet de l'étude proposée dans cet exercice.

La formule semi-développée de cette molécule est donnée ci-dessous :



### 1 - Première étape

L'action d'un réactif noté (A) sur le phénol Ph-OH, en présence d'hydroxyde de sodium, conduit à la formation de méthoxybenzène (ou anisole), selon le schéma réactionnel ci-dessous :



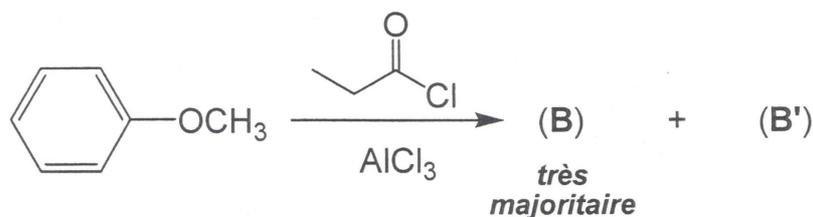
1-1 - Proposer un réactif (A) qui permet de réaliser cette réaction.

1-2 - Préciser le type de réaction mise en jeu.

### 2 - Deuxième étape

Le méthoxybenzène précédemment obtenu est placé en présence du réactif de formule  $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{COCl}$  et de chlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$ , selon le schéma réactionnel donné ci-dessous.

On observe la formation de deux composés isomères (B) (très majoritaire) et (B').



2-1 - Nommer le réactif  $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{COCl}$  en utilisant les règles de nomenclature officielle.

2-2 - Donner les formules semi-développées du produit majoritaire (B) et du produit minoritaire (B') obtenus lors de cette réaction.

2-3 - Expliciter la régiosélectivité de la réaction.

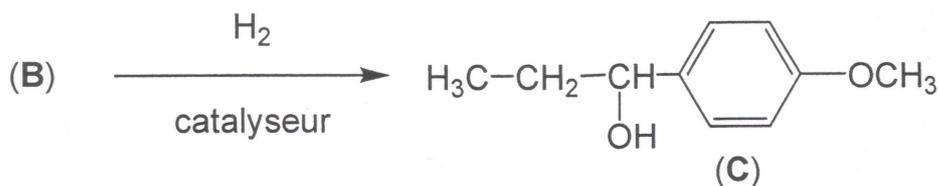
2-4 - Écrire l'équation de la réaction conduisant de l'anisole au produit majoritaire (B).

2-5 - Indiquer le rôle du chlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  dans cette réaction.

2-6 - Donner le nom de cette réaction.

### 3 - Troisième étape

La molécule (B) est soumise à l'action de dihydrogène gazeux en présence d'un catalyseur métallique pour conduire au composé (C) selon le schéma réactionnel donné ci-dessous :



**3-1** - Préciser le type de réaction mise en jeu en choisissant un ou plusieurs noms adaptés à la transformation de (B) en (C) parmi les noms suivants : addition, substitution, élimination, hydrogénation, déshydrogénation, oxydation, réduction.

**3-2** - Recopier la molécule (C) et indiquer, en les entourant, les fonctions organiques présentes dans cette molécule. Préciser leur classe éventuellement.

**3-3** - En raison de la présence d'un atome de carbone asymétrique dans la molécule (C), cette dernière est obtenue sous forme d'un mélange racémique.

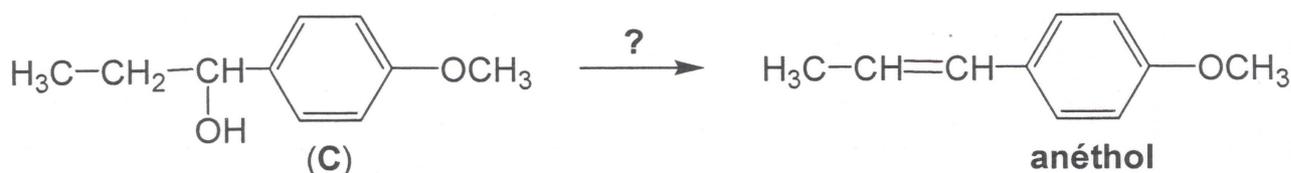
**3-3-1** - Donner la définition d'un mélange racémique.

**3-3-2** - Représenter le stéréoisomère de configuration (R) en explicitant les règles suivies.

*Pour simplifier, on pourra noter « Ar » le groupe comportant le noyau benzénique.*

### 4 - Quatrième étape

L'anéthol est obtenue en une étape par déshydratation de la molécule (C) :



**4-1** - Préciser dans quelles conditions opératoires cette réaction peut être effectuée.

**4-2** - L'anéthol présente une stéréoisomérisation.

**4-2-1** - Indiquer la nature de cette stéréoisomérisation.

**4-2-2** - Représenter les deux stéréoisomères de l'anéthol en précisant la configuration de la double liaison dans chaque isomère.

## Sujet de Biochimie

**Durée 3 heures – Coefficient 3**  
**Calculatrice autorisée**  
**Dictionnaire Anglais Français autorisé**

### ÉTUDE DE LA COMPOSITION D'UN ALIMENT POUR PORCELET

Chez les porcins, le coût lié à l'alimentation correspond à une forte part (environ 50%) du coût de revient total de l'animal à l'abattage. Dans le cadre d'un élevage intensif, les porcelets sont nourris après sevrage, par des mélanges complexes apportant l'ensemble des éléments nutritifs nécessaires à leur développement.

La composition de ces aliments doit satisfaire certains impératifs :

- constituer un apport énergétique suffisant à une croissance rapide ;
- assurer un apport suffisant en protéines et autres matières azotées pour une augmentation importante de la masse musculaire ;
- permettre le maintien en bonne santé de l'animal.

On se propose d'étudier certains composants de ces aliments.

#### **1 - Les apports carbonés (27 points)**

Ils sont constitués à environ 75 % par des céréales comme le blé et l'orge, de mélasses de canne, de pois ou encore de soja. Certains aliments sont complétés par un apport de matières grasses. L'aliment testé contient 66% de céréales dont le glucide essentiel est l'amidon.

**1.1** - Donner la composition chimique de l'amidon.

**1.2** - Donner la structure développée des molécules composant l'amidon. Préciser la nature et la configuration des liaisons chimiques rencontrées.

**1.3** - Stockage des glucides chez les animaux.

Une partie des glucides ingérés sous forme d'amidon peut être utilisée après hydrolyse pour la formation d'une autre forme de réserve glucidique : le glycogène.

**1.3.1** - Le **document 1** expose les étapes de la synthèse et de la dégradation hépatique du glycogène. Nommer les enzymes E1, E2, E3 et E4, ainsi que les intermédiaires X et Y.

**1.3.2** - Les enzymes E3 et E4 sont deux enzymes clés de deux voies métaboliques antagonistes. Nommer ces voies et donner leur rôle respectif.

**1.3.3** - L'activité de ces enzymes est régulée par modification covalente. Préciser les caractéristiques de ce mode de régulation et indiquer les formes actives des deux enzymes. En déduire l'intérêt de ce mode de régulation pour des voies métaboliques antagonistes.

**1.4** - L'aliment contient aussi de la mélasse de canne composée à environ 50 % de saccharose et de traces d'autres glucides comme du glucose. Le **document 2** présente le mode de préparation de l'échantillon et le protocole de dosage du saccharose dans cet échantillon.

1.4.1 - Donner la dénomination officielle du saccharose.

1.4.2 - Préparation de l'échantillon E.

1.4.2.1 - Le réactif de Carrez est un défécant. Sur quel type de molécule ce réactif a-t-il une action ? Quelle est la conséquence de l'addition d'un tel réactif dans le milieu ?

1.4.2.2 - Citer un autre procédé pouvant être utilisé pour obtenir le même résultat que celui observé avec le réactif de Carrez. Décrire le phénomène mis en jeu.

1.4.3 - Analyse de la technique de dosage du saccharose utilisée (**document 2**).

1.4.3.1 - De quel type de dosage s'agit-il ? Justifier.

1.4.3.2 - Préciser les conditions du dosage. Calculer les concentrations massiques limites en glucose + saccharose de l'échantillon. A quoi correspondent ces deux valeurs ?

1.4.3.3 - L'échantillon E peut-il être dosé sans dilution ?

**Données** : L'aliment pour porcelet contient 2 % (m/m) de mélasse de canne. La mélasse de canne contient environ 50 % (m/m) de saccharose et des traces d'autres glucides, comme le glucose.

1.4.3.4 - Trois enzymes interviennent au cours de ce test : l'hexokinase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la  $\beta$ -fructosidase.

Préciser à quelle classe appartient chacune de ces trois enzymes après avoir expliqué le principe de la classification internationale des enzymes.

1.4.3.5 - Le calcul de la concentration massique  $c$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) en saccharose dans l'échantillon est réalisé à l'aide de la formule :  $c = 1,64 * \Delta A$ .

Retrouver la valeur du facteur 1,64.

**Données** :  $\Delta A = \Delta A_{\text{saccharose}} - \Delta A_{\text{glucose}}$ .

$\Delta A_{\text{saccharose}} = (A2_{\text{essai saccharose}} - A1_{\text{essai saccharose}}) - (A2_{\text{blanc saccharose}} - A1_{\text{blanc saccharose}})$ .

$\Delta A_{\text{glucose}} = (A2_{\text{essai glucose}} - A1_{\text{essai glucose}}) - (A2_{\text{blanc glucose}} - A1_{\text{blanc glucose}})$ .

Masse molaire du saccharose :  $342 \text{ g.mol}^{-1}$ .

1.4.3.6 - Quel est le rôle de l'essai glucose ?

## 2 - Les apports azotés (10 points)

L'apport en protéines chez le porc est essentiel. L'origine des protéines ajoutées influence la quantité des rejets azotés.

Le pois protéagineux comme source azotée dans les aliments pour porcins présente pour avantages :

- un bon rendement de culture ;
- l'augmentation des qualités organoleptiques de la viande.

Toutefois, son incorporation massive dans les aliments est déconseillée à cause de la présence de facteurs antinutritionnels comme les inhibiteurs trypsique.

2.1 - L'aliment est enrichi en lysine, méthionine et thréonine qui sont des acides aminés essentiels des porcins.

2.1.1 - Qu'est-ce qu'un acide aminé essentiel ? Citer 2 autres d'acides aminés essentiels chez l'homme.

2.1.2 - Pourquoi ces acides aminés doivent-ils être ajoutés dans l'aliment ?

2.2 - Certaines des protéines des pois protéagineux sont sensibles à la protéolyse. Celle-ci est catalysée par des protéases, par exemple la trypsine.

2.2.1 - Écrire l'équation de la réaction catalysée par une protéase à partir de la formule d'une liaison peptidique.

2.2.2 - Selon la localisation de la liaison hydrolysée, il existe plusieurs classes de protéases. Nommer et définir ces classes.

2.2.3 - Le pois contient de nombreuses albumines dont certaines inhibent la trypsine.

2.2.3.1 - Nommer et décrire les principaux types d'inhibitions enzymatiques.

2.2.3.2 - L'action des inhibiteurs tryptiques est levée à saturation en substrat. En déduire le type d'inhibition mis en jeu.

### **3 - Ajouts d'huiles essentielles (23 points)**

L'ajout d'huiles essentielles comme le thymol remplace l'emploi d'antibiotiques dans certaines préparations alimentaires. Ces concentrés de principes actifs ont des propriétés biologiques intéressantes. Toutefois, à certaines doses ils présentent des effets néfastes (irritants, diurétiques ...).

On se propose d'élaborer une méthode de mise en évidence et de dosage du thymol par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

#### **3.1 - Extraction (7,5 points)**

Les étapes de l'extraction sont exposées dans le **document 3**. Cette technique fait intervenir l'utilisation d'un appareil de Soxhlet (**document 4**).

3.1.1 - Identifier les parties A à D de l'appareil de Soxhlet.

3.1.2 - Expliquer succinctement les étapes de cette extraction.

3.1.3 - Le **document 3** mentionne la réalisation de 20 cycles au cours de l'extraction.

3.1.3.1 - Que représente un cycle d'extraction ? Pourquoi en effectue-t-on plusieurs ?

3.1.3.2 - À la fin de l'extraction, que contiennent les parties B et D de l'appareil ?

#### **3.2 - Séparation par CPG (13,5 points)**

3.2.1 - Donner le principe général d'une séparation chromatographique.

3.2.2 - À partir du principe précédemment énoncé, dégager les caractéristiques particulières de la CPG.

**3.2.3** - Le **document 5** représente un schéma de l'appareil utilisé. Justifier :

- la présence d'une bombonne d'hélium ;
- la présence d'un four ;
- le conditionnement de la colonne en spirale.

**3.2.4** - La séparation nécessite l'application d'un gradient de température. Plusieurs conditions ont été testées. Le **document 6** présente les différents essais de cette mise au point.

**3.2.4.1** - L'azulène est une substance de structure proche de celle des principales huiles essentielles mais jamais retrouvée dans les extraits utilisés. Il a été ajouté en même quantité finale dans chacun des essais réalisés. Pourquoi avoir introduit de l'azulène lors de la préparation ?

**3.2.4.2** - Pourquoi, lors de la mise au point du dosage, avoir ajouté dans le milieu d'autres substances chimiques que le thymol ? (benzaldéhyde, cinnéole, cinnamaldéhyde, carvacol et eugénol).

**3.2.4.3** - Quel protocole apparaît utilisable par la suite pour doser le thymol ? Justifier la réponse en analysant chaque cas.

**3.2.5** - Analyse quantitative.

**3.2.5.1** - Indiquer la grandeur déduite du chromatogramme qui servira à l'évaluation de la quantité de substance extraite.

**3.2.5.2** - On désire préparer des étalons contenant 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 et 1 mg de thymol par litre à partir d'une solution mère à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de ce produit. L'azulène doit être présent dans ces étalons en même concentration que dans les essais. Le diluant est le pentane. Le volume final de chaque étalon doit être de 5 mL.

À l'aide de ces informations et du **document 3**, justifier le mode de préparation de l'étalon à  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de thymol.

Donner sous forme de tableau la composition complète des 6 tubes de gamme.

**3.2.5.3** - Comment appelle-t-on ce type d'étalonnage ? Quel est son rôle ?

### **3.3 - Détermination du rendement d'extraction du thymol (2 points)**

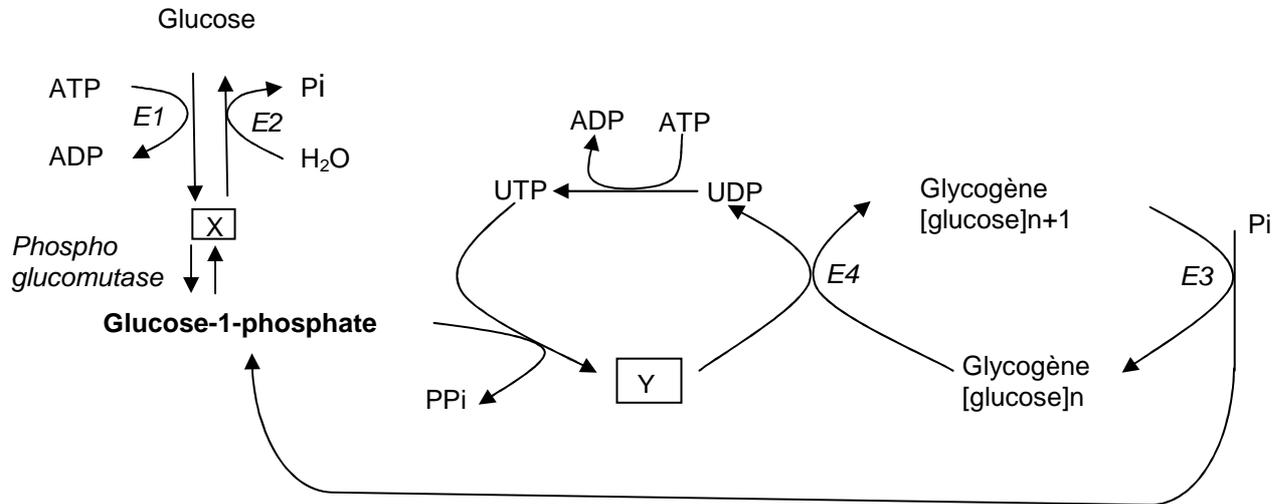
Le **document 7** expose :

- le mode de préparation de l'aliment
- les résultats obtenus au cours de la réalisation de la gamme d'étalonnage ;
- les résultats des essais réalisés sur un aliment pour porcelet.

En déduire la teneur en thymol de l'aliment en g/kg.

Calculer le rendement de l'extraction.

**DOCUMENT 1**  
**ÉTAPES DU MÉTABOLISME DU GLYCOGÈNE**



## DOCUMENT 2

## PROTOCOLE DE DOSAGE DU SACCHAROSE

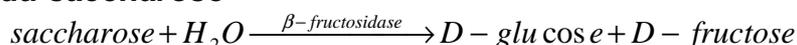
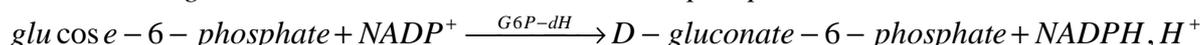
**Préparation de l'échantillon**

Peser 5g d'aliment. Réduire en fine poudre et introduire dans une fiole jaugée de 100 mL. Ajouter environ 70 mL d'eau et chauffer au bain thermostaté à 60-65°C pendant 20 minutes. Refroidir. Ensuite, ajouter avec précautions 5 mL de solution I de Carrez (hexacyanoferrate de potassium 31,3 g/L) et 5 mL de solution de Carrez II (sulfate de Zinc à 250 mmol.L<sup>-1</sup>). Ajuster à pH compris entre 7,5 et 8,5. Mélanger après l'addition de chaque réactif et ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée. Mélanger.

Pour séparer les matières grasses, placer au réfrigérateur pendant au moins 20 minutes. Filtrer la solution froide au travers d'un filtre préalablement humidifié avec la solution. Ecarter les premiers millilitres de filtrat. Le filtrat clair ainsi obtenu est appelé «**échantillon E**».

**Dosage du saccharose****Principe**

La concentration en glucose est déterminée avant et après hydrolyse.

**Hydrolyse du saccharose****Dosage du glucose****Composition des réactifs**

<b>Solution 1</b>	<b>Suspension 2</b>	<b>Solution 3</b>
- tampon triéthanolamine pH 7,6 - NADP 110 mg - ATP 260 mg - sulfate de magnésium	- Hexokinase (HK) 320 U - Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-dH) 160 U	- tampon citrate pH 4,6 - β-fructosidase 720 U

**Mode opératoire**

$\lambda=340 \text{ nm}$  ; cuve de 1 cm ; température : 20-25°C ; me sure contre l'air ;  $\epsilon_{\text{NADH}} = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$   
Solution essai de 4 µg à 150 µg de glucose + saccharose par cuve.

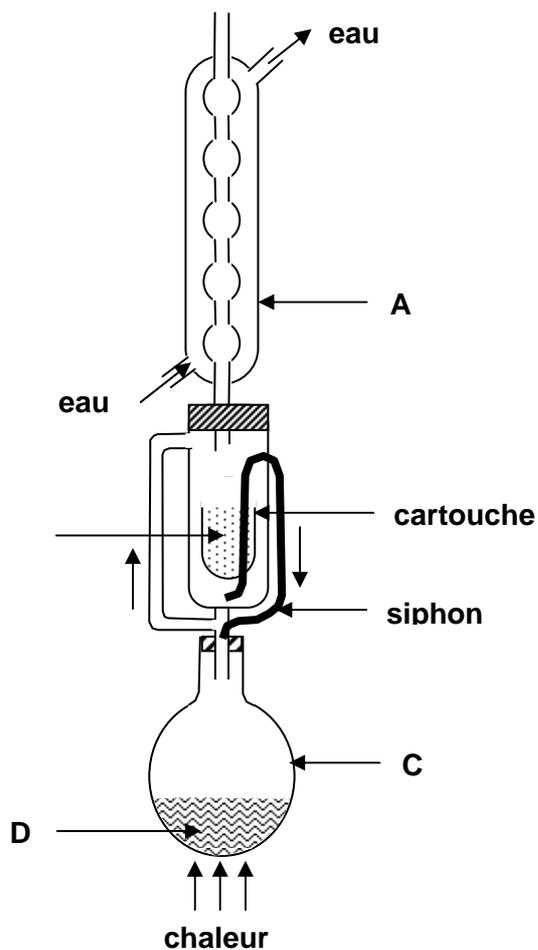
	Blanc saccharose	Essai saccharose	Blanc glucose	Essai glucose
Solution 3	0,200 mL	0,200 mL	-	-
Echantillon E	-	0,100 mL	-	0,100 mL
Mélanger. Incuber 15 minutes à 20-25°C ou 5 minutes à 37°C. Ajouter				
Solution 1	1,000 mL	1,000 mL	1,000 mL	1,000 mL
Eau distillée	1,800 mL	1,700 mL	2,000 mL	1,900 mL
Mélanger. Lire les absorbances de ces solutions après environ 3 minutes ( <b>A1</b> ). Déclencher la réaction par addition de :				
Suspension 2	0,020 mL	0,020 mL	0,020 mL	0,020 mL
Mélanger. Attendre que la réaction soit complète (approx. 10-15 minutes) et lire les absorbances des solutions ( <b>A2</b> ). Si la réaction n'est pas arrêtée après 15 minutes, continuer à lire les absorbances à 2 minutes d'intervalles jusqu'à ce que l'absorbance se stabilise.				

**DOCUMENT 3**

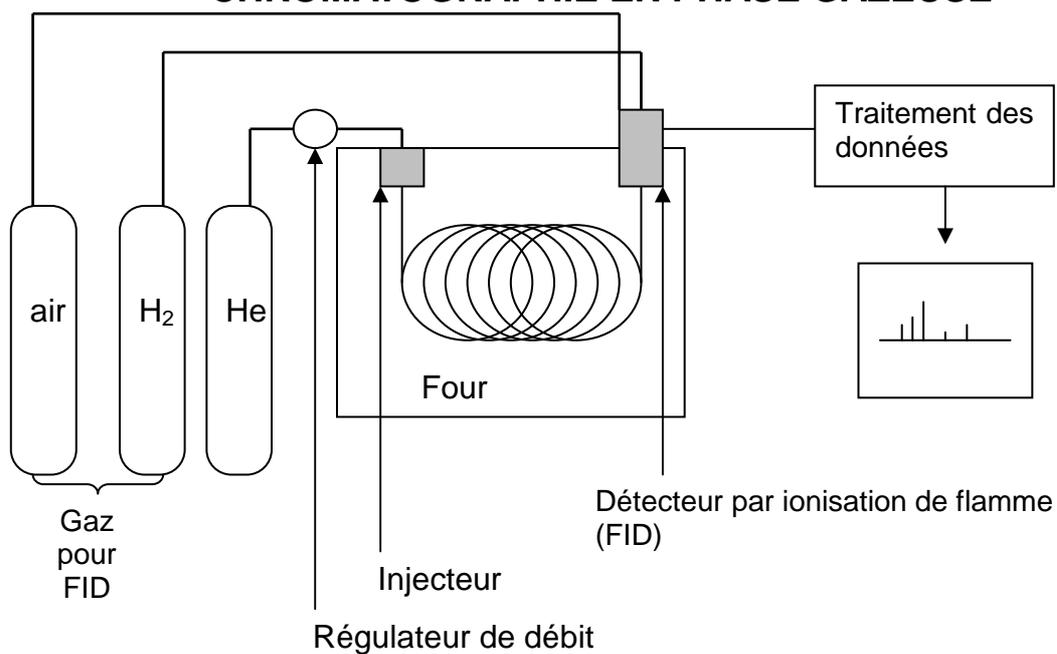
**ÉTAPE DE L'EXTRACTION DU THYMOL**

- Broyer 50g d'aliment pour obtenir une poudre fine.
- Introduire 20g exactement de poudre dans une cartouche de Soxhlet.
- Ajouter environ 200 mL de pentane dans l'appareil.
- Réaliser 20 cycles d'extraction.
- Transvaser dans une fiole jaugée de 200 mL.
- Ajouter 2 mL d'une solution d'azulène à 50 µg/mL.
- Compléter au trait de jauge.

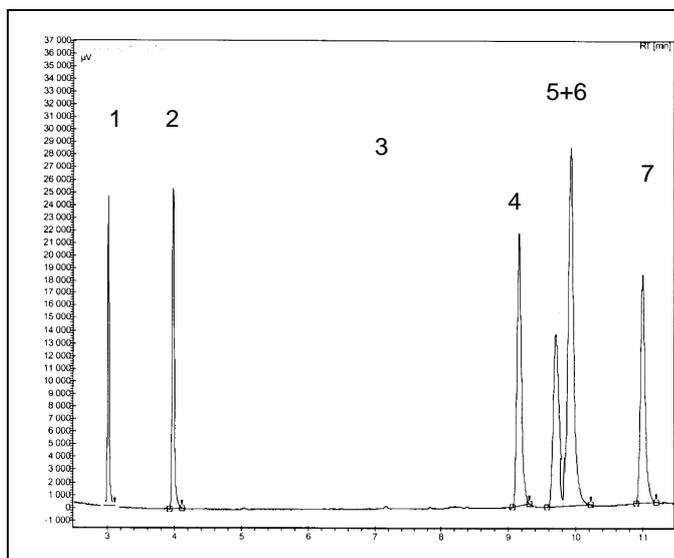
**DOCUMENT 4**  
**APPAREIL DE SOXHLET**



**DOCUMENT 5 : SCHÉMA SIMPLIFIÉ D'UN APPAREIL DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE**

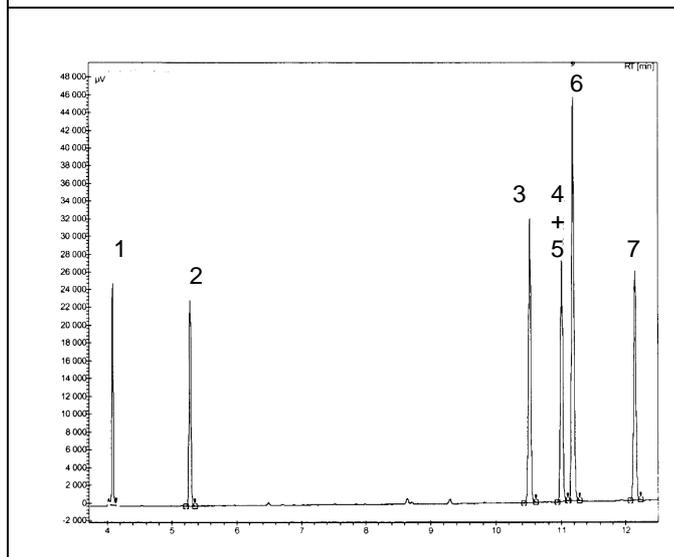


**DOCUMENT 6**  
**MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE SÉPARATION**  
**ET DE DOSAGE DES HUILES ESSENTIELLES**



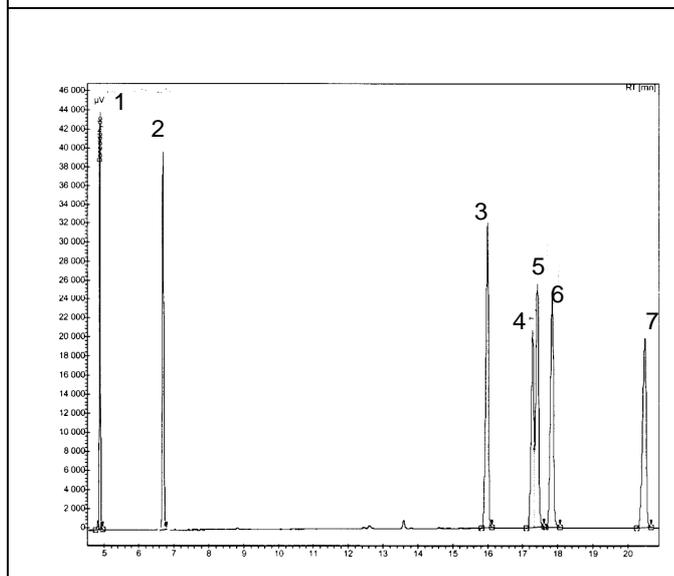
**ESSAI 1**  
**Protocole 1**

- 1 : benzaldéhyde
- 2 : cinéole
- 3 : cinnamaldéhyde
- 4 : thymol
- 5 : carvacrol
- 6 : azulène
- 7 : eugénol



**ESSAI 2**  
**Protocole 2**

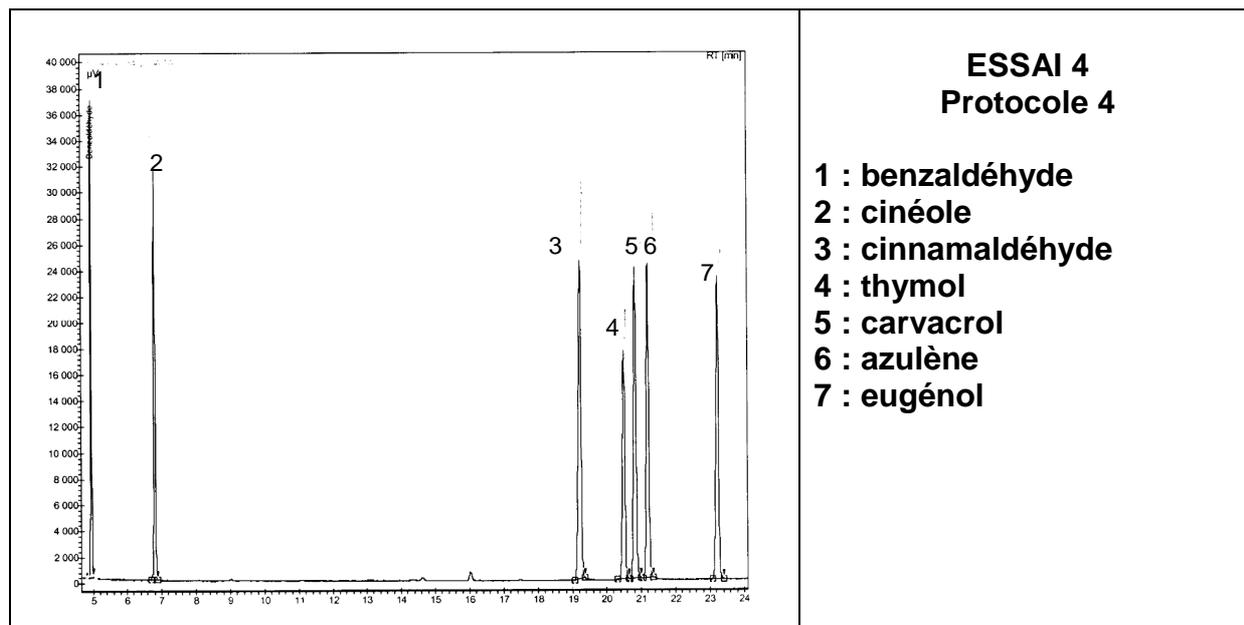
- 1 : benzaldéhyde
- 2 : cinéole
- 3 : cinnamaldéhyde
- 4 : thymol
- 5 : carvacrol
- 6 : azulène
- 7 : eugénol



**ESSAI 3**  
**Protocole 3**

- 1 : benzaldéhyde
- 2 : cinéole
- 3 : cinnamaldéhyde
- 4 : thymol
- 5 : carvacrol
- 6 : azulène
- 7 : eugénol

**DOCUMENT 6 : SUITE**



**ESSAI 4  
Protocole 4**

- 1 : benzaldéhyde
- 2 : cinéole
- 3 : cinnamaldéhyde
- 4 : thymol
- 5 : carvacrol
- 6 : azulène
- 7 : eugénol

**DOCUMENT 7  
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX**

***Préparation de l'aliment***

On utilise un aliment sec pour porcelet ne contenant pas de thymol  
Ajouter à 50,0 g d'aliment 4 mL d'étalon thymol à 100 mg/L.  
Mixer l'échantillon.  
Procéder comme décrit dans le **document 4**.

***Gamme d'étalonnage***

Étalon	1	2	3	4	5
Concentration en thymol mg/L	1	0,5	0,2	0,1	0
Aires corrigées	0,0915	0,0445	0,0165	0,0056	0,000

***Traitement de l'essai***

Essai	1	2
Masse pesée (g)	20,01	20,00
Aire corrigée	0,0694	0,0690

## Sujet de Microbiologie

**Durée 3 heures – Coefficient 3**

**Calculatrice interdite**

### **LA GESTION DE L'HYGIÈNE DANS LA FILIÈRE VIANDE**

L'hygiène des procédés est un impératif pour assurer la qualité sanitaire des produits alimentaires. C'est pourquoi la France impose la mise en place d'un plan de maîtrise sanitaire qui comprend le suivi du guide de bonnes pratiques d'hygiène (GBPH) conçu par chaque secteur et selon la taille de l'entreprise, l'élaboration d'un plan HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point).

Dans le plan HACCP d'une grande entreprise de découpe et de transformation de carcasses de viande, les phases de nettoyage et de désinfection sont considérées comme des CCP (Critical Control Point). Les procédures de nettoyage/désinfection avant d'être appliquées doivent être validées et leur efficacité contrôlée. En ce qui concerne l'efficacité des désinfectants, cette dernière est limitée par la présence de microorganismes sous une forme particulière : les biofilms.

#### **1 - Formation et physiologie des biofilms (24,5 points)**

Un biofilm est une communauté microbienne incluse dans une matrice elle-même constituée de polymères organiques pour l'essentiel d'origine cellulaire.

Les 5 étapes de la cinétique de formation d'un biofilm sont présentées sur le **document 1**.

#### **1.1 - Éléments structuraux à l'origine de la formation des biofilms (6,5 points)**

Certaines étapes de la formation des biofilms mettent en jeu des éléments de la structure des cellules microbiennes.

##### **1.1.1 - L'étape de transport (document 1, étape 1).**

**1.1.1.1** - Le transport de certaines bactéries retrouvées dans les biofilms peut être facilité par la présence d'une structure responsable de la mobilité. Citer cet élément et en préciser la nature biochimique.

**1.1.1.2** - Décrire une technique permettant de mettre en évidence la présence éventuelle d'une telle structure chez les bactéries.

**1.1.1.3** - Citer trois genres bactériens donnant des résultats positifs à ce même test.

##### **1.1.2 - Les étapes d'adsorption et d'adhésion (document 1, étapes 2 et 3).**

Les structures antigéniques cellulaires et la surface inerte interagissent. À ce stade, le processus est réversible. Citer les différents types de liaisons mises en jeu et justifier la réversibilité du processus.

##### **1.1.3 - Étape de colonisation (document 1, étape 4).**

La colonisation de la surface inerte se fait, entre autres, grâce à la synthèse d'exopolysaccharides.

Expliquer l'avantage essentiel que retirent les microorganismes à être inclus dans une telle matrice organique.

## 1.2 - L'influence de la forme physiologique dans la formation des biofilms (13,5 points)

L'état physiologique des microorganismes, en particulier les formes sporulées des *Bacillus*, est aussi un paramètre important dans l'adhésion.

**1.2.1** - Le **document 2** montre la structure de la forme sporulée pour deux espèces de *Bacillus*.

**1.2.1.1** - Reporter sur la copie les numéros 1 à 4 du **document 2** et donner les légendes correspondantes.

**1.2.1.2** - Pourquoi les spores posent-elles des problèmes lors de l'application des procédures de nettoyage/désinfection ?

**1.2.2** - Pour évaluer les forces d'adhésion des formes sporulées, des tests d'arrachement vertical de spores sur supports « inox » sont réalisés. Le **document 3** montre l'organigramme du protocole du test et le **document 4** représente les résultats obtenus dans les mêmes conditions pour *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*.

**1.2.2.1** - Justifier l'emploi des supports « inox ».

**1.2.2.2** - Quel est l'intérêt d'une supplémentation de la gélose nutritive avec le TTC (TriphenylTetrazoliumChloride).

**1.2.2.3** - Analyser les deux figures du **document 4**.

**1.2.2.4** - À partir des informations du **document 3**, établir la formule exprimant le pourcentage de spores arrachées (décrochées) par boîte.

**1.2.2.5** - Comparer la capacité d'adhésion des deux espèces de *Bacillus* et émettre une hypothèse quant à la structure qui pourrait en être responsable.

**1.2.3** - Indiquer le paramètre sur lequel il est possible d'agir au niveau de l'étape de nettoyage pour décrocher les spores adhérentes.

## 1.3 - La physiologie des biofilms (4,5 points)

La colonisation (**document 1, étape 4**) se poursuit par l'épaississement du biofilm. Cette augmentation de volume est due au phénomène de division microbienne et à la synthèse massive d'exopolymères organiques.

À ce stade, la communauté microbienne qui peuple le biofilm mature montre une certaine hétérogénéité, notamment aux niveaux morphologique, physiologique et métabolique.

La stratification observable au sein d'un biofilm mature est présentée sur le **document 5**.

**1.3.1** - Pourquoi des bactéries telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, ou certains *Bacillus* se situent-elles dans la strate supérieure du biofilm ?

**1.3.2** - Dans les strates profondes du biofilm, on assiste à la miniaturisation des cellules et à l'apparition de microcolonies. Justifier.

**1.3.3** - Le métabolisme adopté par les microorganismes dans la partie profonde du biofilm est à l'origine d'une corrosion des surfaces métalliques pouvant servir de support. Expliquer ce phénomène.

## 2 - Du nettoyage à la désinfection (27,5 points)

Parmi les installations de l'entreprise de découpe et de transformation des carcasses, certaines sont peu accessibles ou démontables ce qui implique un nettoyage en place (NEP).

**2.1** - Expliquer en quoi le nettoyage est une étape importante avant la désinfection. Proposer un protocole opératoire simple dans le cadre d'un nettoyage en place (NEP) permettant d'éliminer les substances organiques d'une part puis les substances minérales d'autre part.

**2.2** - Dans le fonctionnement de cette entreprise, le nettoyage n'est pas systématiquement suivi par une désinfection.

**2.2.1** - Définir le terme désinfection.

**2.2.2** - Les deux tableaux du **document 6** présentent des données concernant les associations possibles des désinfectants et leur activité respective sur les différents microorganismes.

**2.2.2.1** - Indiquer la signification des termes synergie et antagonisme.

**2.2.2.2** - Commenter le choix d'une association, dans un premier cas, entre le chlorhexidine et l'alcool à 70° dans une solution désinfectante et, dans un deuxième cas, entre le chlorhexidine et un ammonium quaternaire.

**2.2.3** - Après avoir fixé les niveaux de risque associés à chaque zone de travail, des auto-contrôles microbiologiques par la méthode des boîtes de contact sont effectués deux fois par semaine après l'étape de désinfection. Ils sont réalisés en suivant une procédure mettant en œuvre la norme ISO 18593 (2004) qui préconise l'application de boîtes de contact via un applicateur de boîte.

**2.2.3.1** - Expliciter pourquoi la gélose présente dans la boîte de contact doit être obligatoirement bombée et sèche ?

**2.2.3.2** - Proposer une supplémentation du milieu utilisé dans les boîtes contact, afin que la revivification des microorganismes prélevés après désinfection soit totale.

**2.2.3.3** - Un exemple d'applicateur est présenté dans le **document 7**. Indiquer sur quel critère de performance de la méthode influe l'utilisation d'un tel applicateur. Expliquer la réponse.

**2.2.3.4** - Le **document 8** présente une série de résultats. Le **document 9** est un guide d'interprétation. Analyser les résultats et conclure.

**2.3** - Les étapes de nettoyage et de désinfection étant des CCP, le responsable qualité souhaite mettre en place une méthode de contrôle systématique de ces opérations. Son choix se porte sur l'ATPmétrie.

**2.3.1** - Sur quel principe repose la méthode ATPmétrique ?

**2.3.2** - Citer les avantages de cette méthode de contrôle. Quel en est le principal inconvénient ?

**2.3.3** - Des essais employant l'ATPmétrie ont été menés parallèlement à des contrôles microbiologiques sur boîtes de contact après nettoyage mais également après désinfection.

L'analyse des résultats a abouti à l'établissement d'une valeur seuil en ATPmétrie au-dessous de laquelle le nettoyage est considéré comme satisfaisant, par contre les résultats des mesures après désinfection n'étaient pas exploitables.

**2.3.3.1** - À l'aide du principe de la méthode, proposer une justification aux mauvais résultats obtenus après désinfection.

**2.3.3.2** - Justifier l'intérêt d'employer l'ATPmétrie pour contrôler (uniquement) les nettoyages.

### **3 - Échec de la procédure de nettoyage et de désinfection (8 points)**

Malgré ce contexte sécuritaire, les contaminations accidentelles par les bactéries en général et *Bacillus cereus* en particulier ne peuvent être absolument exclues. De telles contaminations peuvent avoir deux types de conséquences :

- une altération de la qualité marchande,
- une altération de la qualité sanitaire.

**3.1** - Expliquer en quoi les activités protéase et lécithinase, par ailleurs utilisées pour l'identification phénotypique de *Bacillus cereus*, peuvent être responsables de l'altération de la qualité marchande de la viande.

**3.2** - *Bacillus cereus* après germination dans la matrice alimentaire produit deux types de toxines capables de générer un syndrome gastro-entéritique sévère.

**3.2.1** - Quels sont les principaux symptômes constituant le syndrome de gastro-entérite ?

**3.2.2** - Citer et donner les propriétés du type de toxines responsables de ces symptômes.

**3.3** - Depuis 1987, les cas de TIAC font l'objet d'une déclaration auprès des services de la DDASS et de la DSV. Le **document 10** présente le nombre de cas de TIAC déclarés sur la période de 1987 à 2000.

**3.3.1** - Quelle est la signification des sigles DDASS et DSV ?

**3.3.2** - Proposer deux hypothèses permettant d'expliquer que, malgré des procédures de nettoyage/désinfection optimisées et contrôlées, le nombre de cas a tendance à augmenter.

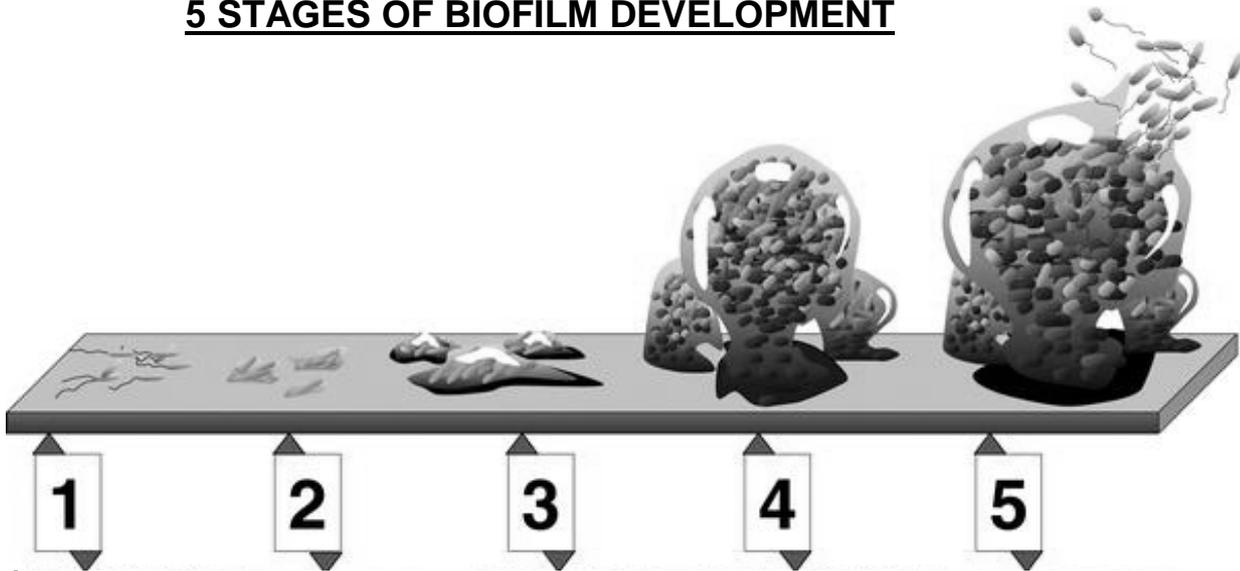
**3.4** - Il est établi que *Bacillus cereus* est un pathogène opportuniste et que les cas de TIAC provoqués par *Bacillus cereus* ont une incidence faible : environ 4,6 %.

**3.4.1** - Qu'est-ce qu'un pathogène opportuniste ?

**3.4.2** - Proposer deux exemples de microorganismes responsables de TIAC et ayant une incidence plus élevée en France.

**DOCUMENT 1**

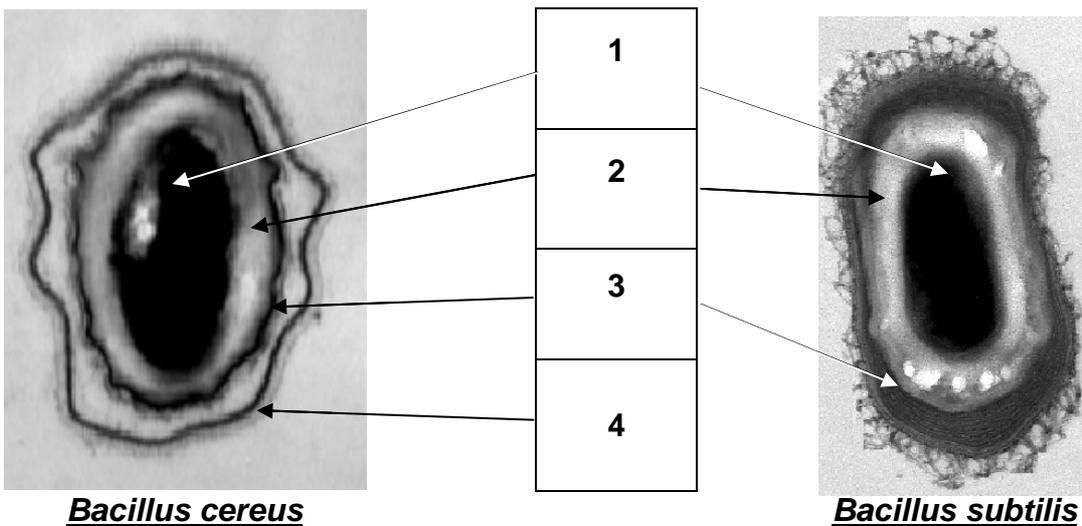
**5 STAGES OF BIOFILM DEVELOPMENT**



1	Transport des bactéries jusqu'à une surface inerte (acier inoxydable...)
2	Adsorption spontanée à la surface inerte
3	Adhésion réversible des microorganismes grâce au début de la synthèse d'exopolymères divers
4	Colonisation puis maturation du biofilm grâce à la synthèse massive d'exopolymères
5	Décrochement et essaimage

**DOCUMENT 2**

**MICROGRAPHIES DE SPORES DE *BACILLUS***



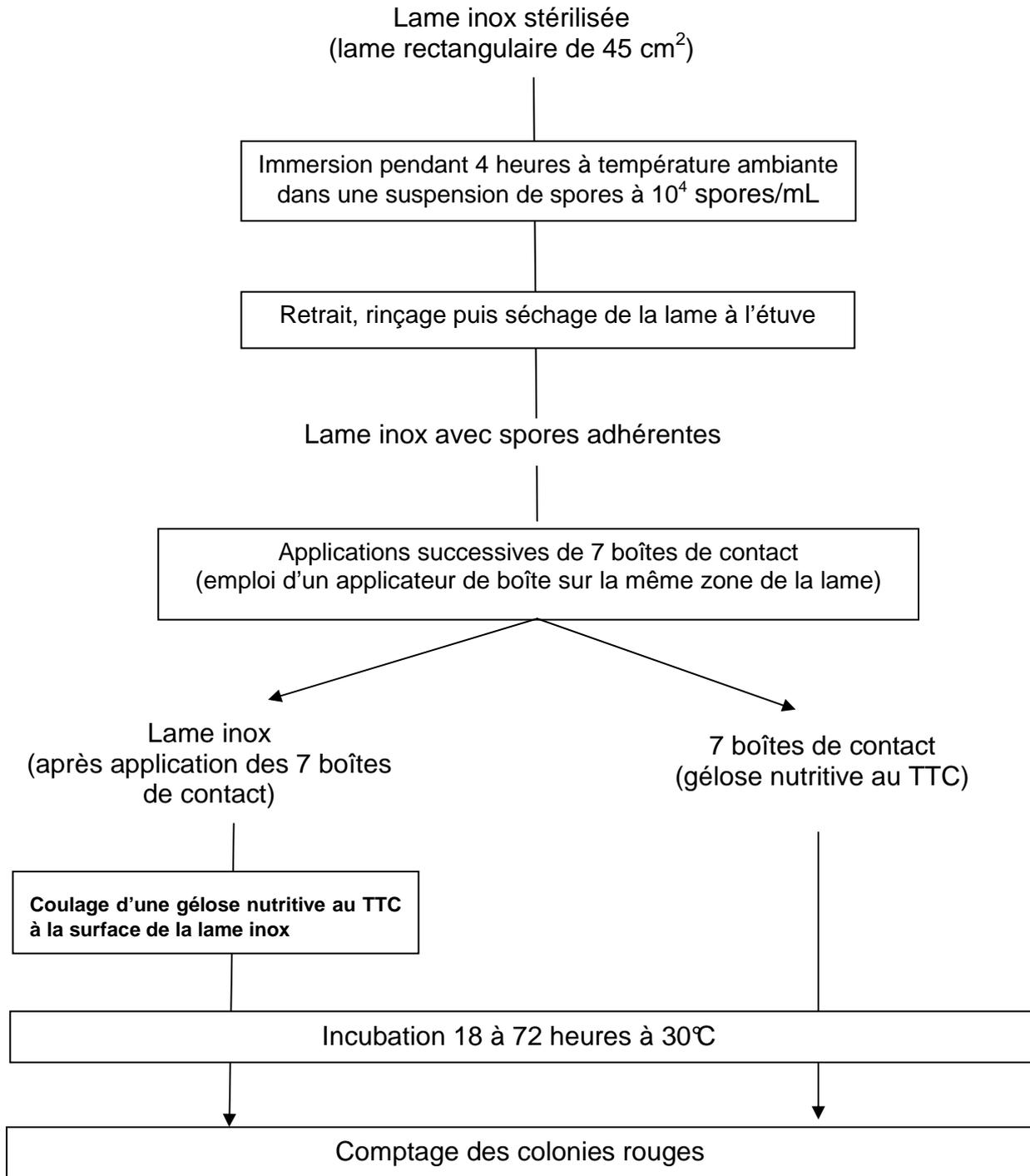
***Bacillus cereus***

***Bacillus subtilis***

**DOCUMENT 3**

**PROTOCOLE DU TEST D'ARRACHEMENT DE SPORES SUR LAME INOX**

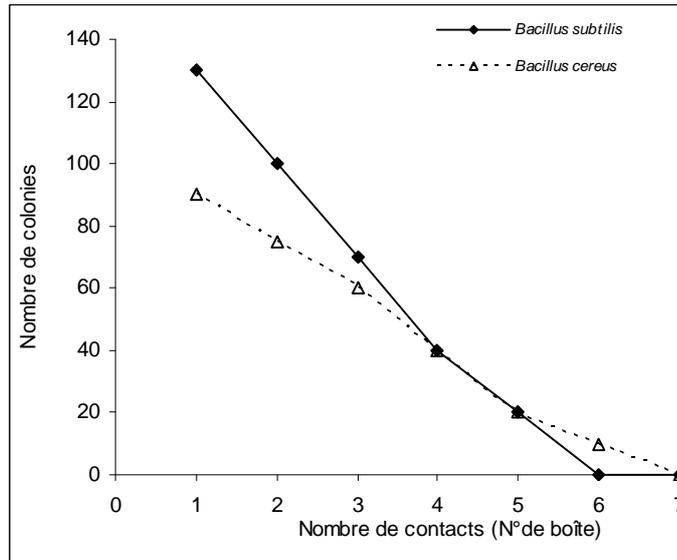
**ORGANIGRAMME SIMPLIFIÉ**



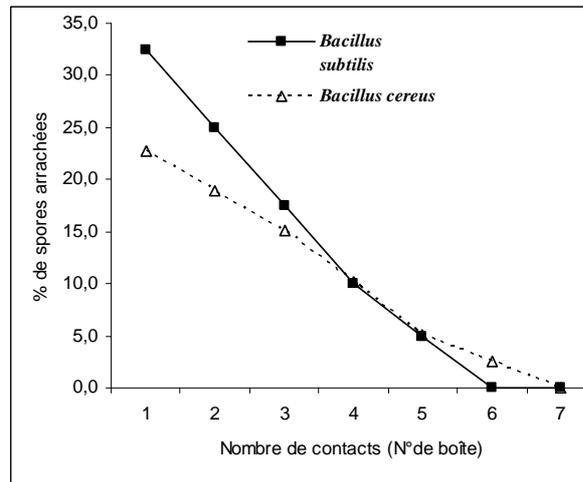
A = est le nombre de colonies comptées pour une boîte contact.  
 B =  $\Sigma$  des colonies comptées sur l'ensemble des 7 boîtes contact.  
 C = nombre de colonies comptées sur la lame inox à la fin du test.

**DOCUMENT 4 :**  
**CINÉTIQUES D'ARRACHEMENT DES SPORES SUR LAMES INOX**

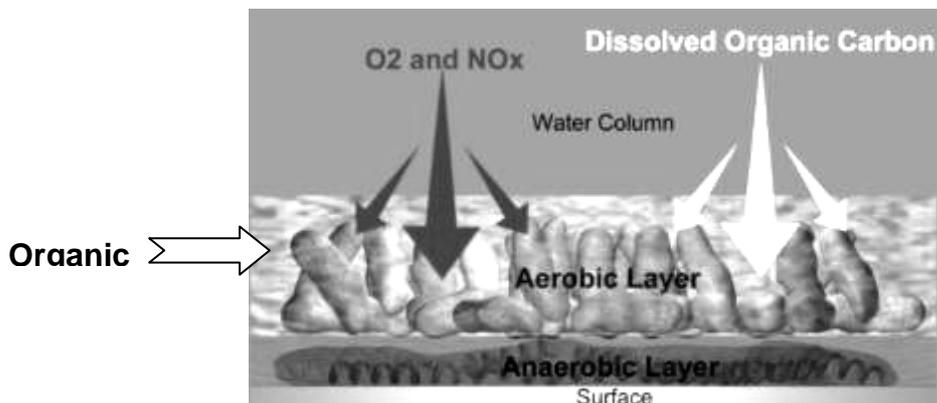
**FIG.1**



**FIG.2**



**DOCUMENT 5**  
**STRATIFICATION DES BIOFILMS**



**DOCUMENT 6****Tableau 1 : antagonisme et synergie de quelques désinfectants**

Famille		Antagonisme	Synergie
Halogènes	Composés chlorés	Matières organiques Thiosulfates Sulfures Acides forts	
	Composés iodés	Matières organiques Composés mercuriels Thiosulfates de sodium	Savon Ammoniums quaternaires
Aldéhydes		Ammoniaque	Degré d'hygrométrie > 50 %
Alcools		Matières organiques	Eau Composés iodés
Tensioactifs	anioniques	Matières organiques Ammoniums quaternaires	
	cationiques (ammoniums quaternaires)	Matières organiques Calcium, magnésium, aluminium	
	amphotères	Tensioactifs anioniques	Crésol
Dérivés des métaux	Mercure	Matières organiques	
Biguanides	Chlorhexidine	Matières organiques Composés soufrés	Ammoniums quaternaires Amphotères
	Hexamidine	Ions phosphates	Alcools, halogènes Excipients mouillants

**Tableau 2 : activités de quelques désinfectants**

Désinfectants	Bactéries		Mycobactéries	Spores	Moisissures	Phages	Virus
	Gram +	Gram -					
Acide peracétique	+++	+++	\	++	++	++	++
Alcools	++	++	\	-	++	++	+
Chlorhexidine	+++	++	+	-	+	+	-
glutaraldéhyde	+++	+++	++	+	+++	++	++
Ammoniums quaternaires	+++	+	-	-	+	+	+
Amphotères	+++	+	\	-	+	+	-
Dérivés mercuriels	++	++	-	-	+	+	\

( \ ) : activité non testée.

### DOCUMENT 7 : EXTRAIT D'UNE PUBLICITÉ POUR UN APPLICATEUR DE BOÎTES CONTACT (Applicateur de boîte contact BIOCONTACT-99)

- Conforme aux recommandations de l'annexe C de l'ISO 14698-1 et la norme NF V08-037.
- Applique une force constante de  $25 \text{ g/cm}^2$  (soit 600 g pour une boîte de 55 mm) pendant 10 secondes. La poussée exercée par l'opérateur sur le corps de l'applicateur est transmise à un piston par l'intermédiaire d'un ressort calibré travaillant à la compression et limitant la force d'appui à 600 grammes et ce, quelle que soit la pression d'appui exercée par l'opérateur sur l'applicateur.
- Le décompte du temps d'application n'est activé que si la jupe du corps de l'applicateur est en contact avec la surface à contrôler (position du corps de l'appareil confirmant que le milieu gélosé est effectivement en contact avec la surface à contrôler à la pression de 600 grammes). Alimentation par pile.



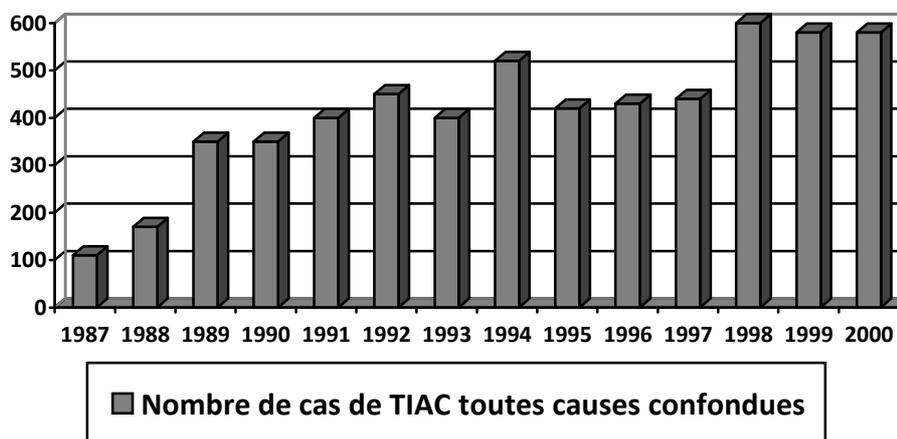
### DOCUMENT 8 : RÉSULTATS DE L'ANALYSE DE PLUSIEURS ZONES DE DÉCOUPE DE VIANDES

N°de la zone contrôlée	1	2	3	4	5
Niveau de risque	2	2	3	2	2
Surface comptée sur la boîte en $\text{cm}^2$	25	25	25	25	25
Nombre moyen de colonies par boîte	150	< 15	40	200	25

### DOCUMENT 9 : NIVEAU DE RISQUE ET ÉTAT SANITAIRE DES SURFACES

Classification des zones à risque : niveau de risque	Nombre de colonies par $\text{cm}^2$
Très élevé : 4	< 5
Élevé : 3	< 5
Moyen : 2	< 50
Faible ou négligeable : 1	< 125

### DOCUMENT 10 : DÉCLARATION DES CAS DE TIAC ENTRE 1987 ET 2000



## Sujet de Biologie cellulaire et moléculaire

**Durée 2 heures – Coefficient 3**

**Calculatrice non autorisée**

### **UN ORGANISME GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉ : LE MAÏS Bt**

Un texte concernant la mention obligatoire d'étiquetage des organismes génétiquement modifiés (OGM), a été mis en place par la commission européenne à Bruxelles. En Europe, les aliments génétiquement modifiés doivent mentionner, dans leur étiquetage, la présence d'OGM si la teneur est supérieure à 1%.

Il est donc nécessaire de tester les aliments et les récoltes pour identifier ceux qui contiennent des génomes génétiquement modifiés. On se propose d'étudier quelques étapes clés liées à l'obtention et la détection des OGM.

#### **1 - Obtention d'un maïs transgénique (22 points)**

**1.1 - Le document 1** représente un schéma de l'ultrastructure d'une cellule végétale.

**1.1.1 -** Légender sur votre copie (n°1 à 14) le **document 1**.

**1.1.2 -** Quels éléments présents dans la cellule végétale sont absents de la cellule animale ?

**1.2 -** Donner la définition d'un organisme génétiquement modifié.

**1.3 - Le document 2** montre les étapes nécessaires pour transformer des cellules végétales de maïs par un gène Bt. Ce gène contrôle la fabrication d'une protéine toxique pour un insecte ravageur, la pyrale. Le **document 3** présente le vecteur utilisé au cours de la transgénèse.

**1.3.1 -** Obtention de cellules végétales du maïs.

**1.3.1.1 -** Définir le cal.

**1.3.1.2 -** Quelle propriété des cellules végétales permet d'obtenir le stade cal.

**1.3.1.3 -** Quelles phytohormones est-il nécessaire d'ajouter au milieu de culture pour obtenir le stade cal ? En quelle proportion sont-elles apportées ?

**1.3.2 -** Obtention du vecteur de transfert.

**1.3.2.1 -** Qu'appelle-t-on un vecteur de transfert ?

**1.3.2.2 -** Quel est le rôle de la séquence « ori » du plasmide ?

**1.3.2.3 -** Le gène Bt est introduit dans l'ADN-T au niveau du site de clonage. Expliquer le principe de cette insertion.

**1.3.3 -** Le **document 4** montre l'organisation de l'ADN-T du plasmide modifié.

1.3.3.1 - Quels sont les rôles du promoteur et du terminateur d'un gène ?

1.3.3.2 - Pourquoi n'utilise-t-on pas les promoteurs et terminateurs natifs du gène d'intérêt (Bt) dans la plante recombinée ?

1.3.3.3 - Quel critère de sélection permet de valider les différentes étapes de la création du maïs Bt ? Justifier.

## **2 - Détection des plants OGM : Obtention du réactif anticorps pour la technique ELISA (15 points)**

La technique ELISA (enzyme - linked immunosorbent assay) permet une identification des protéines produites dans les récoltes par les plantes génétiquement modifiées. Ce test est basé sur l'utilisation d'anticorps spécifiques de la protéine recherchée. Dans le cas du maïs Bt, la toxine n'est exprimée que dans les parties vertes de la plante.

2.1 - Obtention des sérums. Deux types de sérums peuvent être utilisés, des sérums polyclonaux obtenus par immunisation de lapins et sérums monoclonaux obtenus par la technique des hybridomes.

2.1.1 - Définir les termes « polyclonaux » et « monoclonaux ».

2.1.2 - Lors du protocole d'immunisation d'un lapin, il est possible d'associer la protéine d'intérêt à un adjuvant.

2.1.2.1 - Quel est son rôle ? Citer un adjuvant couramment utilisé.

2.1.2.2 - Plusieurs injections de la protéine d'intérêt sont réalisées à 0, 10, 20 et 70 jours. Représenter graphiquement l'évolution du taux des anticorps, obtenus au cours des différentes injections. Préciser les classes des anticorps synthétisés.

2.1.3 - L'obtention d'anticorps monoclonaux nécessite deux types cellulaires.

2.1.3.1 - Quelles sont les deux cellules impliquées ?

2.1.3.2 - Indiquer les principales caractéristiques de l'hybridome obtenu.

2.1.3.3 - Présenter succinctement la méthode de sélection des hybridomes.

2.2 - La technique ELISA doit cependant être réservée aux produits agricoles bruts (fruits, légumes) ou obtenus par des transformations " douces ". Quelle en est la raison ?

2.3 - Dans le cas du maïs Bt cette technique ne peut plus être utilisée si les échantillons analysés proviennent exclusivement des grains de maïs ? Justifier votre réponse.

## **3 - Détection des séquences d'ADN par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) (23 points)**

La PCR est une méthode de détection, basée sur l'analyse de l'ADN. Elle permet d'obtenir une détection sur l'ensemble du génome. Elle est moins dépendante des conditions de traitement thermiques et chimiques de l'échantillon analysé car l'ADN est une molécule relativement stable.

Le protocole du **document 5** montre le déroulement de la technique de PCR.

**3.1.** - Citer les trois étapes thermiques définissant un cycle d'amplification. En déduire le principe de la PCR.

**3.2.** - Le kit contient un jeu d'amorces pour détecter des séquences spécifiques des OGM et un jeu d'amorces qui identifient l'ADN végétal qu'il soit ou non dérivé d'OGM (**document 6**).

**3.2.1** - Quelle est la nature biochimique des amorces ? Quel est leur rôle ?

**3.2.2** - Quelle(s) amorce(s) permet(tent) de détecter les séquences spécifiques de l'OGM ? Justifier.

**3.2.3** - Un jeu d'amorces permet de valider l'extraction de l'ADN. Quel en est l'intérêt ?

**3.3** - À la fin de la PCR, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 %.

**3.3.1** - Expliquer de manière rédigée le principe de l'électrophorèse d'ADN.

**3.3.2** - Justifier le choix de l'acrylamide par rapport à l'agarose.

**3.3.3** - Quel est le rôle des marqueurs de poids moléculaires dans l'électrophorèse ?

**3.4** - Le **document 7** montre les résultats obtenus sur des chips de maïs.

**3.4.1** - Analyser les résultats obtenus pour les couloirs 1, 5, 6. Justifier la présence des différents fragments.

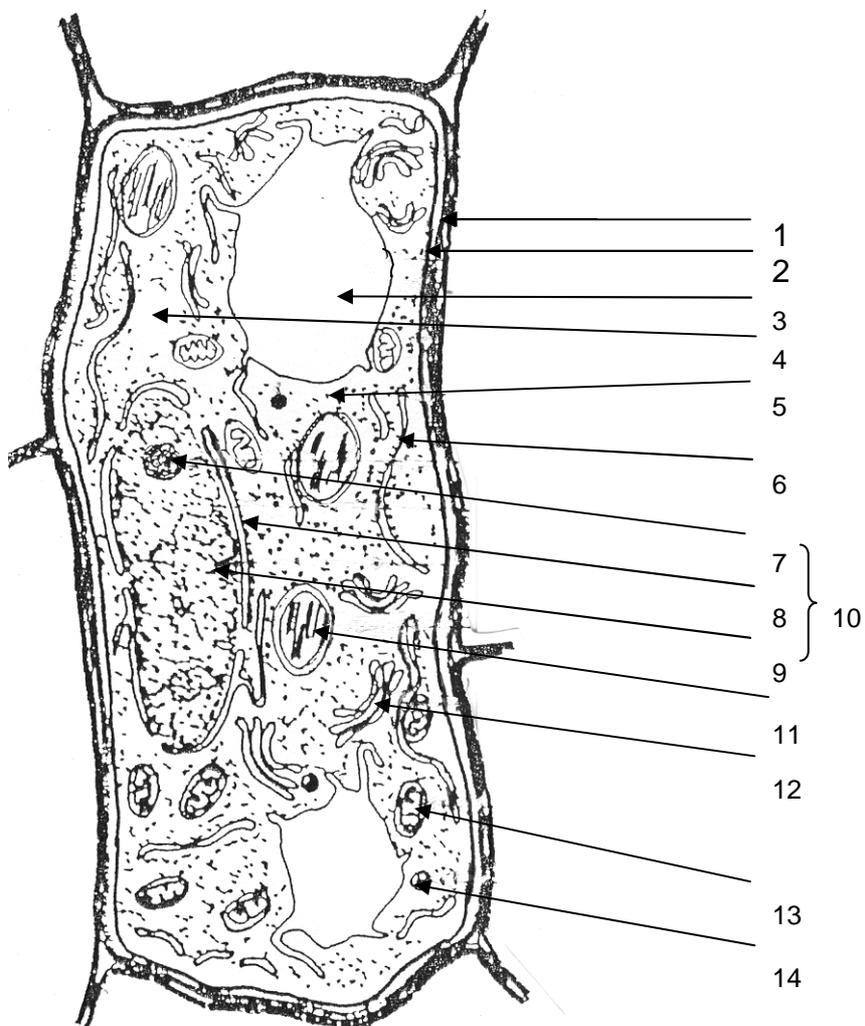
**3.4.2** - Le couloir 2 permet de vérifier la non contamination lors de la manipulation. Pourquoi ?

**3.4.3** - Les résultats obtenus pour l'aliment analysé sont-ils exploitables ? Justifier.

**3.4.4** - L'aliment analysé est-il génétiquement modifié ? Justifier votre réponse.

**3.4.5** - Pour quelle raison est-il précisé, dans le mode d'emploi du kit, que celui-ci ne permet d'identifier que 85 % des OGM ?

**DOCUMENT 1**  
**ULTRASTRUCTURE DE LA CELLULE VÉGÉTALE**



**DOCUMENT 2 : CRÉATION DU MAÏS TRANSGÉNIQUE Bt**

Isolement d'un gène Bt à partir de la bactérie *Bacillus thurengiensis*. Ce gène contrôle la fabrication d'une protéine toxique pour un insecte ravageur : la pyrale



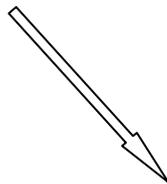
Introduction du gène Bt et d'un gène de résistance à la kanamycine dans un plasmide Ti désarmé au niveau de la zone ADN-T



Sélection et réplication du plasmide chez *E.coli*



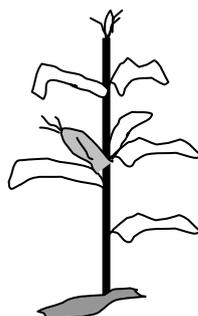
Transfert du plasmide modifié par conjugaison dans *Agrobacterium tumefaciens*  
Sélection des bactéries transformées



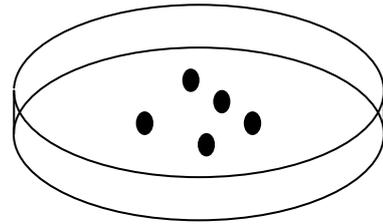
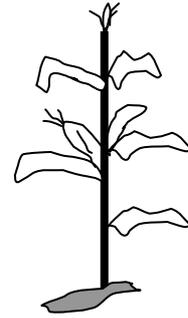
Infection des cellules de cal par *Agrobacterium tumefaciens* transformée



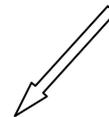
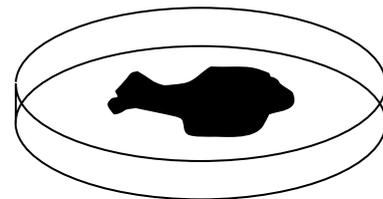
Identification des cellules végétales transformées sur un milieu sélectif et mise en culture *in vitro*.



Obtention d'une plante génétiquement modifiée



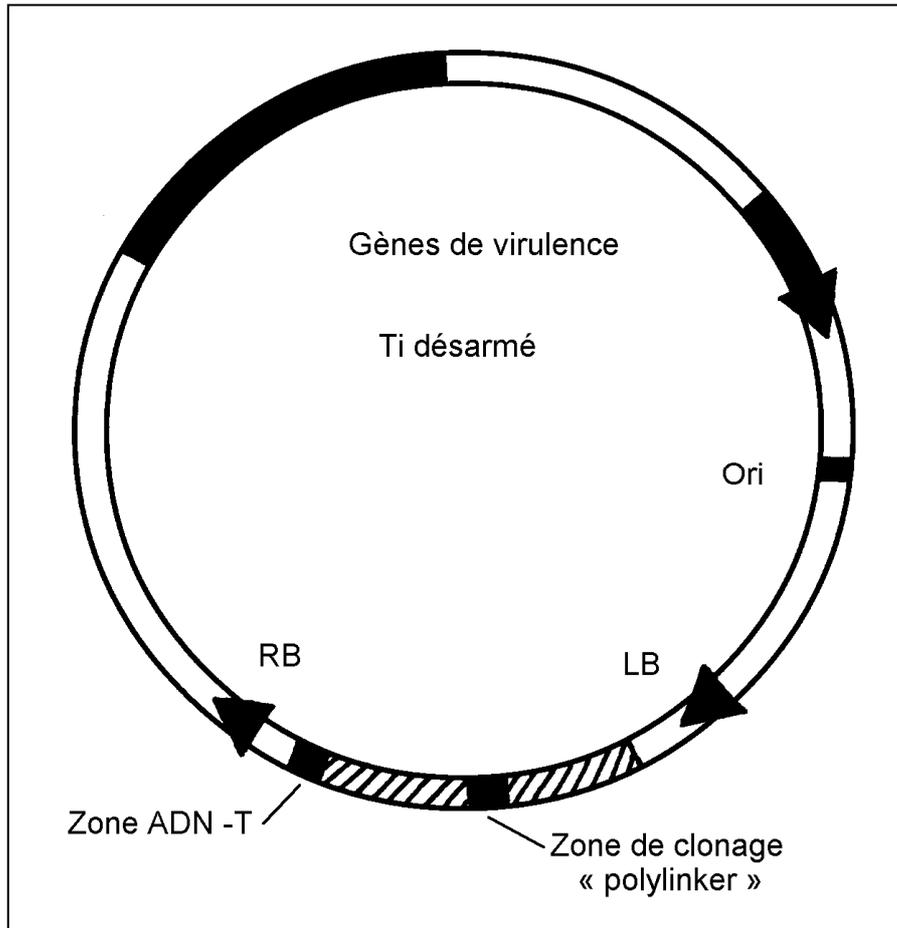
Développement du cal



**DOCUMENT 3**

Les souches sauvages d'*Agrobacterium tumefaciens* provoquent la maladie du collet. On utilise pour la transgénèse une souche *Agrobacterium tumefaciens* modifiée qui héberge un plasmide Ti désarmé c'est-à-dire dont les gènes responsables de la maladie du collet ont été ôtés.

Le plasmide Ti est utilisable comme vecteur de transfert par la propriété de la zone ADN-T : toute séquence d'ADN insérée entre les bordures RB et LB est transférable à une cellule végétale avec l'implication de la zone virulence.



Où ?

**DOCUMENT 4 : SÉQUENCE DE L'ADN-T**



Gène Bt : gène codant pour la protéine toxique pour la pyrale

Gène NTP II : gène de résistance à la kanamycine

Zone de clonage

p35S (\*) : promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur

tNOS (\*) : terminateur du gène de la nopaline synthétase (NOS) d'*Agrobacterium tumefaciens*

(\*) promoteur et/ou terminateur utilisés pour la construction de la plupart des OGM.

## DOCUMENT 6 : SÉQUENCES GÉNIQUES AMPLIFIÉES

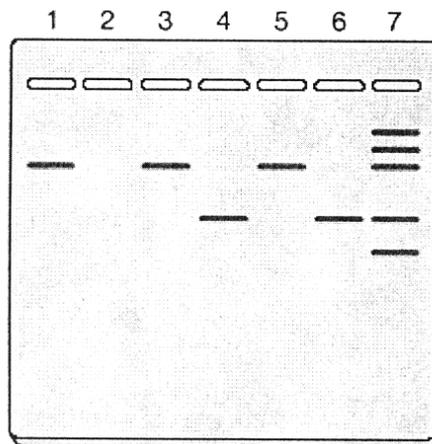
Les gènes insérés en génie génétique n'utilisent qu'un petit nombre de séquences régulatrices pour contrôler l'expression des gènes insérés dans les récoltes OGM.

Deux séquences régulatrices les plus courantes sont le promoteur p35S du virus de la mosaïque du chou fleur et/ou le terminateur de la nopaline synthase (tNOS) de *Agrobacterium tumefaciens*.

Amorces	Taille de l'amplicon
Fragment du promoteur p35S	203 pb
Fragment du terminateur tNOS	225 pb
Fragment du gène du chloroplaste du photosystème II	455 pb

pb = paire de base

## DOCUMENT 7 : RÉSULTATS DE LA PCR : Kit GMO Investigator - Aliment testé : chips de maïs



### Légende du gel :

- Couloir 1 : Contrôle non OGM avec amorces de plante
- Couloir 2 : Contrôle non OGM avec amorces d'OGM
- Couloir 3 : Aliment à tester avec amorces de plante
- Couloir 4 : Aliment à tester avec amorces d'OGM
- Couloir 5 : Contrôle OGM positif avec amorces de plante
- Couloir 6 : Contrôle OGM positif avec amorces d'OGM
- Couloir 7 : Marqueurs de poids moléculaires de PCR (1000, 700, 500, 200,100 pb)

**Remarque** : Le kit GMO Investigator permet d'identifier 85 % des récoltes génétiquement modifiées actuellement approuvées dans le monde entier.

## Sujet de Sciences et Technologies Bio Industrielles

**Durée 2 heures – Coefficient 3**

**Calculatrice non autorisée**

### LES SANDWICHS INDUSTRIELS

L'entreprise LEPLUS fabrique des pains dans le but de confectionner des sandwiches, conditionnés sous atmosphère protectrice, et destinés à la vente en grande distribution. Différents types de pains sont proposés ainsi que toute une gamme de garnitures. Les sandwiches « crudités-œufs durs » et « omelette-salade » sont les plus appréciés par les consommateurs.

#### **1 - La farine (15 points)**

##### 1.1 - La meunerie

Le **document 1** présente l'organisation fonctionnelle d'un moulin industriel, le **document 2** un broyeur.

1.1.1 - Décrire le broyeur présenté et expliquer son fonctionnement.

1.1.2 - À l'aide du **document 1**, décrire les étapes de fabrication de la farine (éventuellement à l'aide d'un diagramme brièvement commenté).

1.2 - Le **document 3** présente les types de farines classés selon leur taux d'extraction.

1.2.1 - Dédurre de la structure d'un grain de blé le choix de ce critère pour classer les types de farine.

1.2.2 - La détermination de la teneur en cendres permet d'apprécier la concentration en minéraux présents dans les farines.

Expliquer l'évolution de cette teneur en cendres selon les différents types de farines.

1.2.3 - L'entreprise LEPLUS achète essentiellement des farines de type 55 et des farines de type 150. La durée de conservation d'une farine de type 150 est plus courte que celle d'une farine de type 55. Justifier ce fait en vous basant sur leur composition chimique.

1.3 - Le gluten joue un rôle important lors de la panification.

1.3.1 - Préciser les deux principales molécules constituant le gluten. Indiquer leur nature biochimique. Quelles propriétés mécaniques confèrent-elles à la pâte ?

1.3.2 - D'autres molécules s'associent au gluten et établissent des liaisons hydrogène au cours du pétrissage. Citer ces molécules.

#### **2 - Les ovoproduits (23 points)**

Parmi les fournisseurs de l'entreprise LEPLUS, l'entreprise GALLINA fabrique des ovoproduits destinés à l'industrie agroalimentaire, ainsi que des ovoproduits transformés (œufs durs en barre, omelettes cuites).

**2.1** - L'entreprise GALLINA est un établissement agréé par la DSV.  
Donner la signification du sigle DSV.

**2.2** - Cassage des œufs.

**2.2.1** - Indiquer les risques de contamination possibles au cours du cassage des œufs.

En vous appuyant sur l'analyse du **document 4**, proposer les mesures à prendre pour minimiser ces risques.

**2.2.2** - Quel est le rôle de la filtration des œufs ?

**2.2.3** - Les coquilles, riches en calcium, sont réduites en poudre et utilisées pour l'alimentation animale. Pour cette entreprise, les coquilles constituent-elles un déchet, un sous-produit ou un coproduit ?

Justifier la réponse en définissant ces trois termes.

**2.3** - Pasteurisation des ovoproduits.

**2.3.1** - Les ovoproduits sont pasteurisés à 70°C pendant 30 secondes.

Calculer la valeur pasteurisatrice à l'aide de la formule suivante :

$$VP = t \cdot 10^{(T-T_{ref})/z}$$

Commenter le résultat obtenu.

**Données** :  $T_{ref} = 60^\circ\text{C}$   
 $z = 10^\circ\text{C}$

**2.3.2** - Donner la définition de z.

Que caractérise cette grandeur ?

Expliquer pourquoi cette grandeur peut varier pour une bactérie donnée.

**2.3.3** - Montrer que le temps de réduction décimale atteint lors de la pasteurisation est de 15 secondes.

**Données** :  $D_{60} = 2,5$  minutes avec  $z = 10^\circ\text{C}$

**2.3.4** - Déterminer le taux de réduction décimale atteint lors de la pasteurisation.

La charge initiale est de  $10^3$  bactéries/g ; la charge résiduelle doit être inférieure à  $10^2$  bactéries/g. Le traitement thermique est-il adéquat ?

**2.3.5** - Le pasteurisateur est muni d'un enregistreur de température : le **document 5** montre le diagramme obtenu lors de la pasteurisation.

**2.3.5.1** - Analyser le **document 5** et montrer l'intérêt de ce diagramme.

**2.3.5.2** - Les graphiques doivent être datés, classés et conservés pendant 6 mois.  
Quel est l'intérêt de cette procédure ?

**2.3.6** - Contrôle microbiologique des ovoproduits.

**2.3.6.1** - Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale est réalisée selon la norme AFNOR réf : NF ISO 7218.

Donner la signification des sigles AFNOR et ISO.

**2.3.6.2** - Indiquer les bactéries pathogènes susceptibles de contaminer les ovoproduits.

### **3 - Conditionnement et contrôles des sandwiches (22 points)**

Chaque sandwich est placé dans une barquette préformée ; la barquette est mise sous atmosphère constituée de 70 % N<sub>2</sub>, 30 % CO<sub>2</sub> ; la machine d'opercutage scelle un film plastique sur la barquette, qui est ensuite étiquetée.

**3.1** - Indiquer l'objectif de ce type de conditionnement.

**3.2** - Préciser le rôle des gaz utilisés et indiquer la conséquence de la solubilisation du CO<sub>2</sub> dans la phase aqueuse des aliments.

**3.3** - Indiquer les qualités requises des matières plastiques utilisées dans ce conditionnement.

**3.4** - Proposer les contrôles à effectuer sur les sandwiches conditionnés.

**3.5** - Indiquer les critères à établir afin de réaliser un contrôle de lot. Définir le NQA.

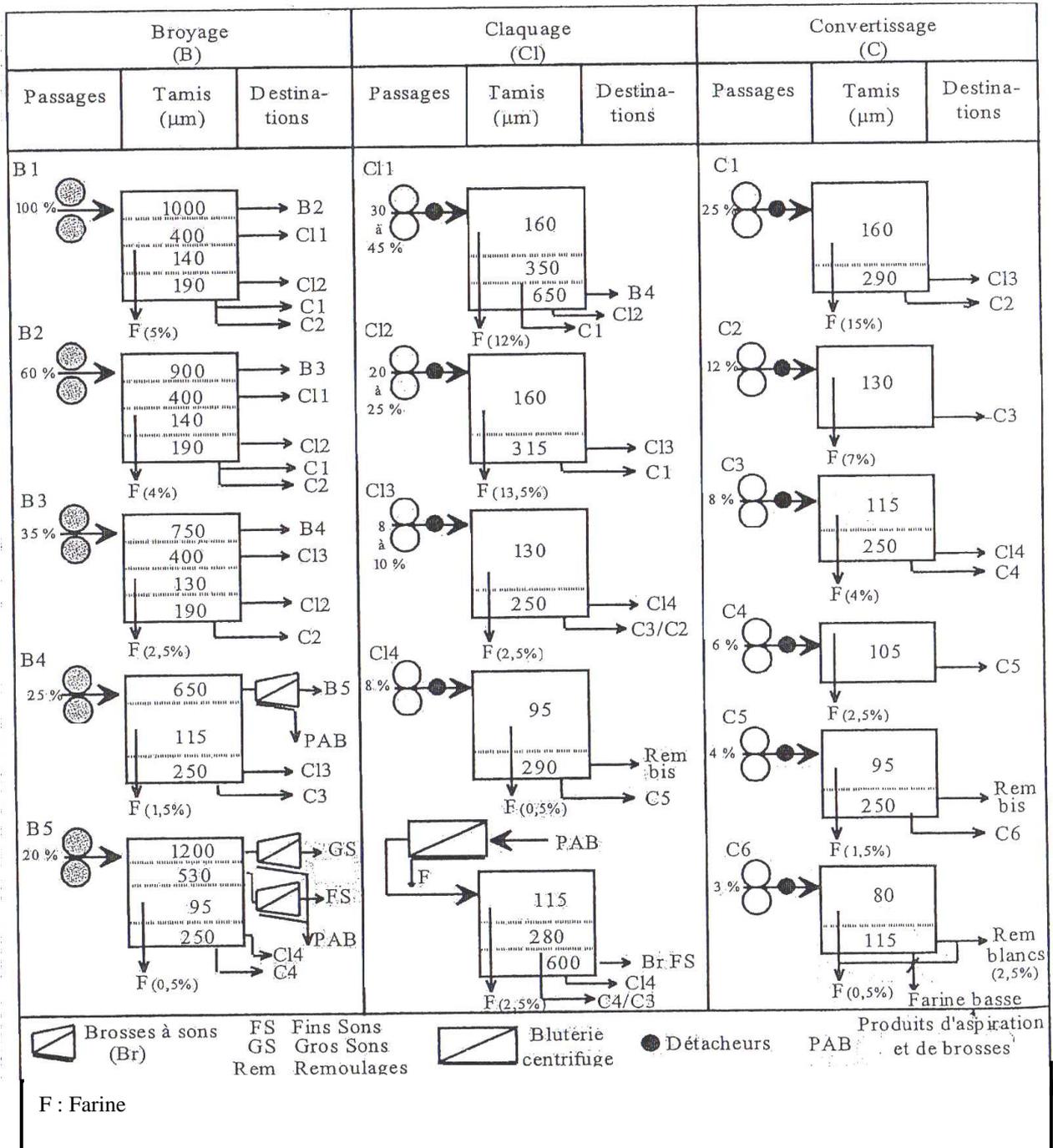
**3.6** - Afin de prévenir toute contamination microbiologique au cours de la préparation des sandwiches, le Responsable Assurance Qualité utilise la règle des 5 M pour établir un diagramme d'Ishikawa.

**3.6.1** - Indiquer la signification des 5 M et proposer les mesures de maîtrise à réaliser pour chacun d'entre eux.

**3.6.2** - En utilisant la méthode QQQQCP, indiquer les éléments que l'on doit trouver dans un plan de nettoyage-désinfection.

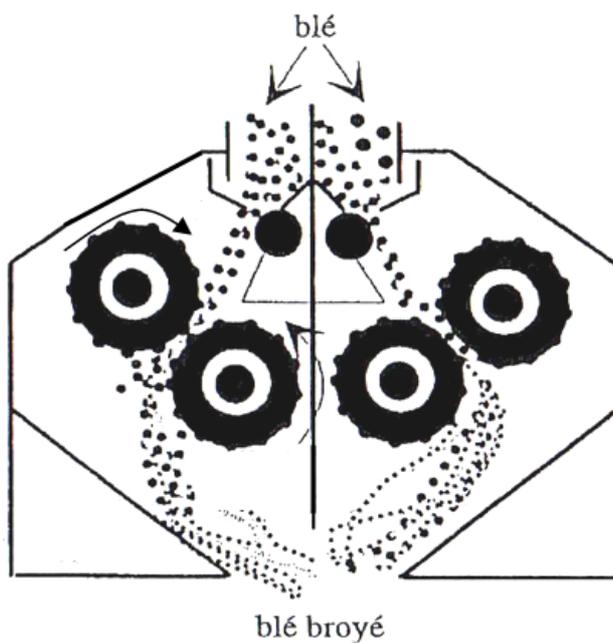
DOCUMENT 1

LOGIGRAMME DE L'ORGANISATION FONCTIONNELLE D'UN MOULIN INDUSTRIEL (WILM, 1982)



## DOCUMENT 2

### REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UN BROYEUR

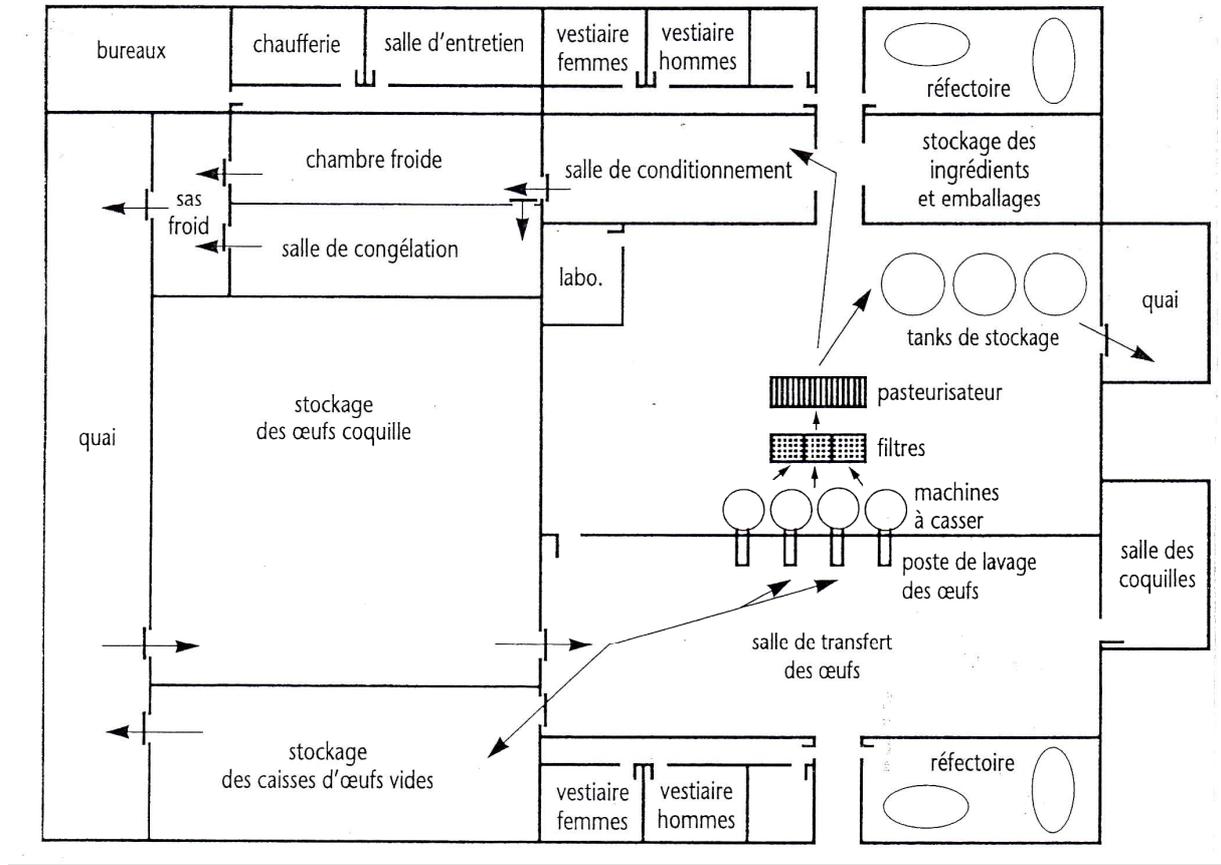


## DOCUMENT 3

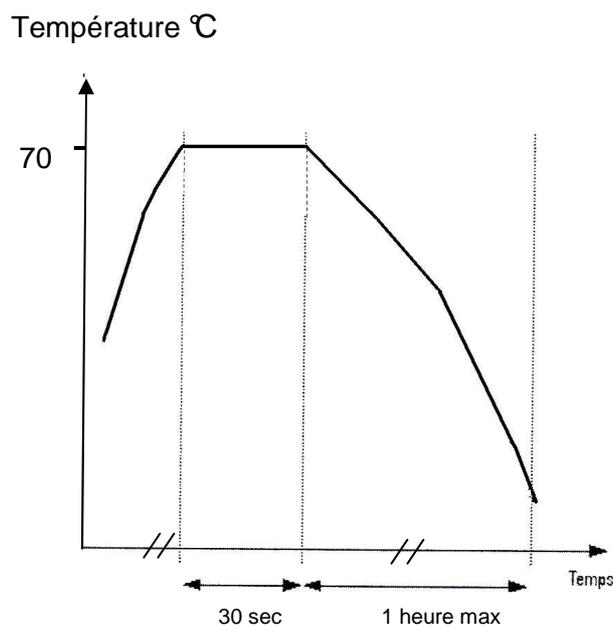
### TYPES LÉGAUX DES FARINES

Types	Taux d'extraction en %	Cendres % matières sèches	Utilisations
55	74	0,50 – 0,60	Pain courant, biscottes, panification fine, biscuiterie, pâtisserie (sachets)
65	78	0,62 – 0,75	Biscuiterie
80	82	0,75 – 0,90	Pains spéciaux
110	85	1,00 – 1,20	Pain bis
150	94	> 1,40	Pains complets

**DOCUMENT 4**  
**PLAN TYPE D'UNE CASSERIE**



**DOCUMENT 5**  
**DIAGRAMME DE PASTEURISATION**



## Sujet de Techniques de Biochimie

Pour les candidats non évalués en CCF

**Durée : 4 h – Coefficient : 4**

**Documents interdits - Calculatrice autorisée**

**Dictionnaire anglais français autorisé**

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

### CONTRÔLE QUALITÉ D'UNE BOISSON ÉNERGÉTIQUE POUR SPORTIF

#### **Contexte professionnel**

On étudie le complément alimentaire **Active PRO 80 goût vanille**. Très riche en protides, il est destiné aux sportifs de haut niveau. Le laboratoire de contrôle souhaite effectuer un contrôle qualité du produit en vérifiant les données annoncées sur l'étiquette (**document 1, page 8/11**). On reprend une masse  $m$  exacte de poudre **Active PRO 80** dans 200 mL d'eau distillée (la masse  $m$  précisée le jour de l'épreuve :  $m = \dots\dots\dots$ )

On obtient la solution S.

Les contrôles portent sur :

- La concentration en protéines.
- La présence des acides aminés essentiels.
- La concentration en vitamine C.

#### **Compétences**

Réaliser des analyses mettant en œuvre des appareillages optiques.

Réaliser des analyses mettant en œuvre une technique chromatographique.

Préparer et prétraiter les échantillons.

Exprimer, valider et interpréter les résultats.

#### **Mise en œuvre**

Activités professionnelles	Documents et ressources	Pages
<b>1</b> Dosage colorimétrique des protéines par la méthode du biuret. <b>(33 points)</b>	Fiche protocole 1 Fiche sécurité Fiche spectrophotomètre (au poste de travail) Document 1 Document 2	3 12 et 13 9 11
<b>2</b> Chromatographique bidimensionnelle sur couche mince. <b>(20 points)</b>	Fiche protocole 2 Fiche sécurité	4, 5 et 6 12 et 13
<b>3</b> Dosage de la vitamine C méthode spectrophotométrique. <b>(23 points)</b>	Fiche protocole 3 Fiche sécurité Fiche centrifugeuse (au poste de travail) Document 1 Document 2	7 et 8 12 et 13 9 11
<b>4</b> Édition des résultats	Feuille de traçabilité <b>(à compléter et à rendre avec la copie)</b>	10

***Rapport d'analyses (4 points)***

Conclure à l'aide du document 1 :

→ quant à la conformité par rapport à l'étiquetage du complément alimentaire **Active PRO 80**,

→ quant à la présence des acides aminés essentiels dans le complément alimentaire.

<b>FICHE PROTOCOLE 1</b>	<b>Dosage des protéines par méthode colorimétrique de biuret.</b>	
--------------------------	-------------------------------------------------------------------	--

### **Principe**

En milieu alcalin, toutes les molécules possédant au moins deux liaisons peptidiques voisines, peuvent former avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$  contenus dans le réactif de Gornall un complexe bleu-violacé dont le maximum d'absorption se situe à 540 nm.

### **Matériel et réactifs**

Solution notée « **S** » : 10 mL

Solution notée « **étalon Alb** » d'albumine à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  : 5 mL

Eau physiologique : 20 mL

Réactif de Gornall : 25 mL (en distributeur)

Macrocuves de spectrophotomètre : 8

Fiole jaugée de 10 mL

Tubes à hémolyse : 8

Pipette jaugée de 2 mL

Pipette automatique P<sub>1000</sub> + cônes

### **Protocole opératoire**

#### **Étalonnage**

Dans 6 tubes à hémolyse, introduire de 0 à 0,500 mL de solution notée « **étalon Alb** ».

Compléter les tubes à 0,500 mL avec de l'eau physiologique.

Ajouter 2 mL de réactif de Gornall.

Attendre 30 minutes à l'obscurité, à température du laboratoire.

Lire l'absorbance à 540 nm contre le témoin réactif.

**Faire relever toutes les absorbances par un examinateur.**

#### **Dosage de la solution S**

Réaliser deux essais sur  $E = 0,500 \text{ mL}$  de prise d'essai de solution S diluée au 1/5.

**Réaliser la dilution en présence d'un examinateur.**

Diluer la solution « **S** » au 1/5 en eau physiologique.

#### **Compte rendu**

1.1 - Présenter un tableau complet de colorimétrie.

1.2 - Compléter le tableau sur la feuille de traçabilité.

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

1.4 - Déterminer la concentration massique de protéines en  $\text{g.L}^{-1}$  dans la solution S.

1.5 - Calculer la masse de protéines pour 100 g de poudre **Active PRO 80**. Exprimer le résultat en conformité avec **le document 2, page 11/13**.

**Données** :  $s_r = 1 \text{ mg} / 100 \text{ g}$  de poudre

$u_c = 2 \text{ mg} / 100 \text{ g}$  de poudre

<b>FICHE PROTOCOLE 2</b>	<b>Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince.</b>	
--------------------------	-----------------------------------------------------------	--

Parmi les acides aminés standards, neuf sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme : Leu, Thr, Lys, Trp, Phe, Val, Met, Ile et His. On souhaite vérifier leur présence dans le produit analysé.

La chromatographie sera réalisée sur un échantillon noté « **C** » obtenu par traitement de la solution notée « **S** ». Ce traitement détruit certains acides aminés.

### **Principe**

La chromatographie bidimensionnelle permet de séparer des composés de polarité proche. On utilise pour cela deux phases mobiles successives de polarité différente.

### **Matériels et réactifs**

- Cuve à chromatographie
- Plaque de silice 20 x 20 cm tamponnée à pH 6,8
- Phase mobile 1 PM1 : éthanol / méthanol / eau (40/30/30)
- Phase mobile 2 PM2 : propanol 2 / eau (60/40)
- Réactif de révélation à la ninhydrine avec pinceau
- Mélange témoin MT1 : His, Phe, Val (1 mL)
- Mélange témoin MT2 : Lys, Leu, Trp (1 mL)
- Mélange témoin MT3 : Ile, Met, Thr (1 mL) en tubes à
- Échantillon noté « **C** » (1 mL)
- Thermoventilateur
- Étuve à 105°C
- Capillaires : 4

### **Protocole opératoire**

Tracer 2 lignes de dépôt comme indiqué sur le gabarit.

Déposer l'échantillon noté « **C** » (une application).

Déposer les mélanges témoins notés « **MT1** », « **MT2** », « **MT3** », sur les lignes dépôts 1 et 2 (une seule application pour chaque étalon).

Effectuer la première migration dans le solvant 1 sur une hauteur d'environ 8 cm (durée estimée 1 heure).

Sécher la plaque.

Effectuer la deuxième migration dans le solvant 2 sur une hauteur d'environ 8 cm (durée estimée 1 heure).

Sécher et révéler la plaque à la ninhydrine.

### **Compte rendu**

**2.1** - À l'aide des résultats présentés **page 6/13**, identifier visuellement les acides aminés des mélanges témoins (le calcul des Rf n'est pas demandé).

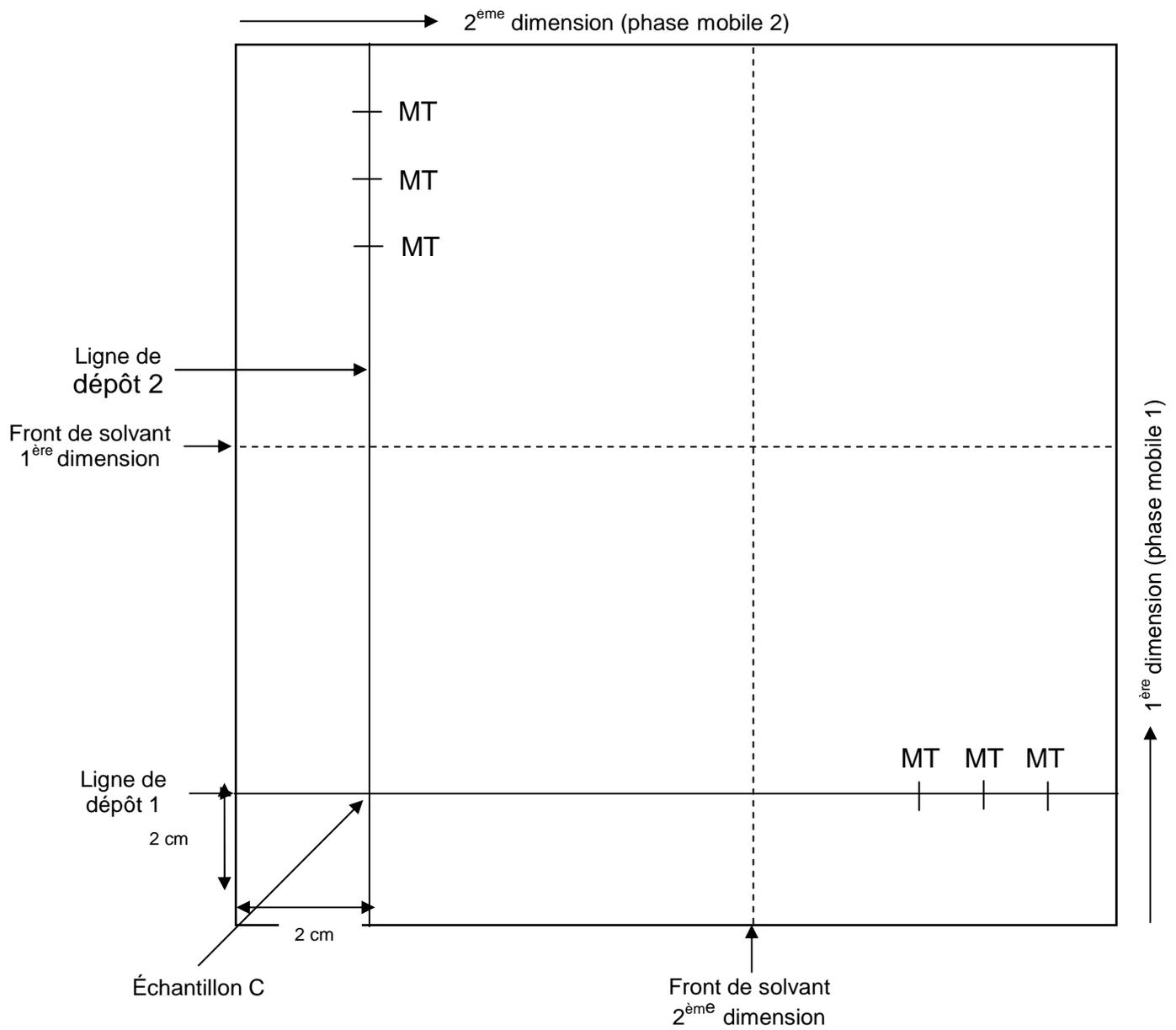
**2.2** - Identifier sur le chromatogramme les acides aminés présents dans l'échantillon noté « **C** ».

**2.3** - Conclure.

**Laisser le chromatogramme sur la pailasse.**

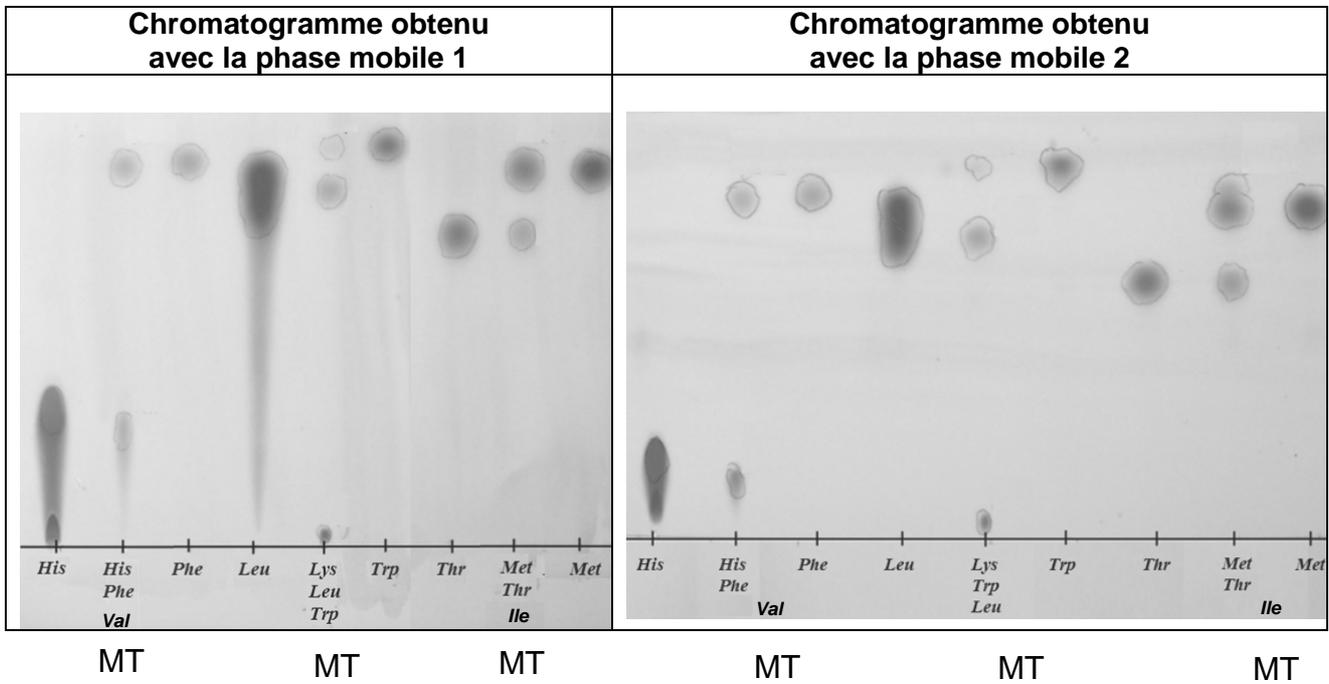
<p><b>FICHE PROTOCOLE 2 (SUITE)</b></p>	<p><b>Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince.</b></p>	
---------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------	--

**Gabarit**



<p><b>FICHE PROTOCOLE 2</b> (suite)</p>	<p><b>Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince</b></p>	
---------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------	--

**Résultats obtenus pour les étalons**



<b>FICHE PROTOCOLE 3</b>	<b>Dosage de la vitamine C méthode spectrophotométrique au DCPIP.</b>	
--------------------------	-----------------------------------------------------------------------	--

Le DCPIP (2,6 de solution de dichlorophénol indophénol) oxydé est rose en milieu acide, bleu en milieu basique ou neutre. Il est incolore sous sa forme réduite.

À pH4, le DCPIP :

- est réduit instantanément par la vitamine C (réaction mole à mole),
- se réduit spontanément mais lentement.

En suivant au cours du temps la diminution de l'absorbance à 520 nm, il est possible de déterminer par extrapolation graphique l'absorbance au temps zéro. Cette valeur d'absorbance est reliée à la quantité de Vitamine C dans l'échantillon.

Le DCPIP et la Vitamine C réagissent mole à mole.

### **Matériel et réactifs**

- Solution notée « **S** »
- Acide trichloracétique 20 % noté « **TCA** » : 2 mL
- DCPIP 100 mg.L<sup>-1</sup> : 3 mL
- Acide métaphosphorique 20 g.L<sup>-1</sup> : 3 mL
- Solution étalon de Vitamine C à exactement 30 mg/L notée « **Vit C** »
- 1 tube eppendorf + mini-centrifugeuse
- 4 microcuves + portoir
- Eau distillée
- P<sub>1000</sub> + cônes
- Chronomètre
- Spectrophotomètre
- Eau distillée bouillie et refroidie

### **Protocole opératoire**

#### **Défécation de la solution S**

Introduire dans un tube eppendorf :

- E = 1 mL de solution S
- 0,50 mL d'acide trichloracétique 20 %

Centrifuger 1 minute à 14 000 rpm.

On obtient le surnageant S'.

#### **Blanc**

On réalisera le zéro du spectrophotomètre à 520 nm sur 0,50 mL d'acide métaphosphorique + 1 mL d'eau distillée bouillie et refroidie.

#### **Témoin de la réduction spontanée du DCPIP**

Introduire dans une microcuve :

- 0,50 mL d'acide métaphosphorique
- 0,50 mL eau distillée bouillie et refroidie

À t = 0, ajouter 0,50 mL de DCPIP, mélanger rapidement et lire les absorbances toutes les 15 secondes pendant 5 minutes (la 1<sup>ère</sup> mesure sera faite à t = 30 secondes).

<b>FICHE PROTOCOLE 3 (suite)</b>	<b>Dosage de la vitamine C méthode spectrophotométrique au DCPIP.</b>	
--------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------	--

### Étalon

Opérer comme pour le témoin en remplaçant l'eau distillée bouillie et refroidie par 0,50 mL de solution étalon de Vit C.

### Essai vitamine C

Réaliser 1 essai en suivant le protocole décrit pour le témoin en remplaçant l'eau distillée bouillie et refroidie par 0,5 mL de surnageant S'.

### Résultats

**3.1** - Réaliser les 3 représentations graphiques  $A_{520} = f(t)$  sur une même feuille de papier millimétré. Extrapoler la partie linéaire de chaque courbe afin de déterminer les 3 absorbances au temps  $t = 0$ .

**3.2** - Compléter le tableau sur la feuille de traçabilité.

**3.3** - Calculer la masse de vitamine C contenue dans la cuve essai selon la formule suivante :

$$m_{\text{vit C essai}} = \frac{m_{\text{vit C étalon}} \cdot \Delta A_{\text{essai}}}{\Delta A_{\text{étalon}}}$$

avec  $m_{\text{vit C étalon}}$  : masse de Vit C dans la cuve étalon en mg.

**3.4** - En déduire la masse de vitamine C contenue dans 100 g de poudre. Exprimer le résultat en conformité avec **le document 2, page 11/13**.

### Données :

$$\Delta A_{\text{essai}} = A_{\text{témoin}} - A_{S'}$$

$$\Delta A_{\text{étalon}} = A_{\text{témoin}} - A_{\text{étalon}}$$

$$u_c = 3 \text{ mg/100 g de poudre}$$

## DOCUMENT 1

Caractéristiques du produit - Valeurs pour		100 g
<b><u>Valeurs Nutritionnelles</u></b>	<b>Energie (/100g)</b>	366 kcal
	<b>Energie (/100g)</b>	1553 kj
	<b>Proteine (/100g)</b>	80 g
	<b>Glucides (/100g)</b>	9.6 g
	<b>Lipides (/100g)</b>	0.8 g
<b><u>Vitamines et Minéraux</u></b>	<b>Acide Folique</b>	0.2 mg
	<b>Acide Pantothénique</b>	6 mg
	<b>Vitamine B1</b>	1.4 mg
	<b>Vitamine B12</b>	0.001 mg
	<b>Vitamine B2</b>	1.6 mg
	<b>Vitamine B6</b>	2 mg
	<b>Vitamine C</b>	60 mg
	<b>Calcium</b>	1100 mg
	<b>Vitamine E</b>	10 mg
	<b>Magnésium</b>	125 mg
	<b>Niacine</b>	12 mg
	<b>Phosphore</b>	670 mg
	<b>Sodium</b>	40 mg
<b><u>Acides Aminés</u></b>	<b>Acide L. Aspartique</b>	7500 mg
	<b>Acide L. Glutamique</b>	22000 mg
	<b>L. Alanine</b>	3200 mg
	<b>L. Arginine</b>	3800 mg
	<b>L. Cystine</b>	500 mg
	<b>L. Glycine</b>	2000 mg
	<b>L. Histidine</b>	3200 mg
	<b>L. Isoleucine</b>	5900 mg
	<b>L. Leucine</b>	10200 mg
	<b>L. Lysine</b>	8400 mg
	<b>L. Methionine</b>	3000 mg
	<b>L. Phénylalanine</b>	5.4 g
	<b>L. Proline</b>	10200 mg
	<b>L. Serine</b>	6300 mg
	<b>L. Threonine</b>	4800 mg
	<b>L. Tryptophane</b>	1400 mg
	<b>L. Tyrosine</b>	5700 mg
<b>L. Valine</b>	7400 mg	

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ**  
 (à compléter et à rendre avec la copie)

**NOM DE L'OPÉRATEUR** .....

**Date :** .....

**Poste n°** .....

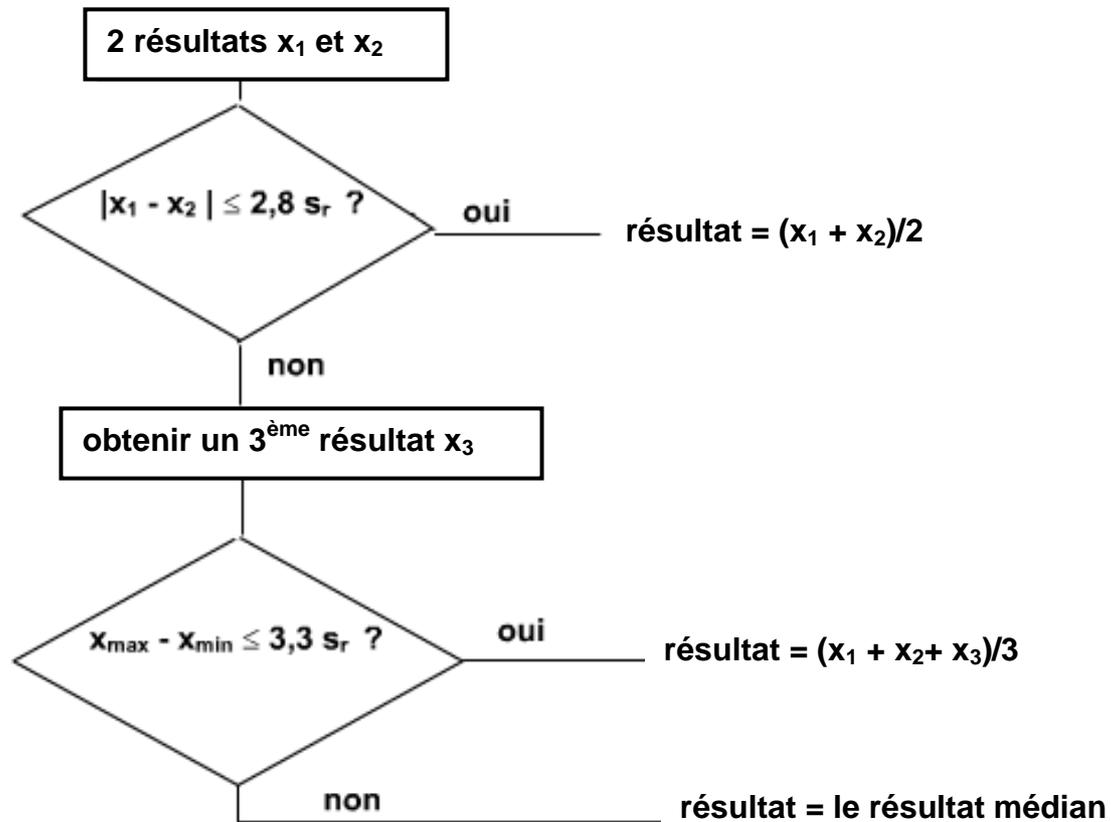
***Dosage des protéines par méthode colorimétrique du Biuret***

	0	1	2	3	4	5	E1	E2
<b>masse d'albumine (mg / tube)</b>								
<b>A<sub>540</sub></b>								

***Dosage de la vitamine C par le DCPIP***

	Témoin	Étalon	S'
<b>A<sub>540</sub> à t = 0</b>	A <sub>témoin</sub> =	A <sub>étalon</sub> =	A <sub>S'</sub> =

## DOCUMENT 2

**Logigramme de traitement des données expérimentales****Expression du résultat**

Le nombre de chiffres significatifs pour exprimer le résultat final établi sera en adéquation avec l'expression numérique de l'écart type de répétabilité ( $s_r$ ).

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 (unité précisée).

$$(*) s_r = \frac{Cv \cdot \bar{x}}{100}$$

## FICHE SÉCURITÉ

### PRODUITS PURS

Réactifs & Pictogrammes & Mentions d'avertissement	Mentions de danger	Conseils de prudence
<p><b>Éthanol</b></p>  <p><b>Danger</b></p>	<p><b>H 225</b> : Liquide et vapeurs très inflammables.</p>	<p><b>P 210</b> : Tenir à l'écart de la chaleur/ des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer.</p>
<p><b>Méthanol</b></p>  <p><b>Danger</b></p>	<p><b>H 225</b> : Liquide et vapeurs très inflammables.</p> <p><b>H 331</b> : Toxique par inhalation.</p> <p><b>H 311</b> : Toxique par contact cutané.</p> <p><b>H 301</b> : Toxique par ingestion.</p> <p><b>H 370</b> : Risque avéré d'effets graves pour les organes.</p>	<p><b>P 210</b> : Tenir à l'écart de la chaleur/ des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer.</p> <p><b>P 280</b> Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.</p> <p><b>P 302 + P 352</b> : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.</p> <p><b>P 305 + P 351+ P 338</b> : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.</p> <p><b>P 309 + P 311</b> : EN CAS D'EXPOSITION OU D'UN MALAISE : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.</p>
<p><b>Alcool isopropylique</b> <b>Propanol 2</b></p>  <p><b>Danger</b></p>	<p><b>H 225</b> : Liquide et vapeurs très inflammables.</p> <p><b>H 319</b> : Provoque une sévère irritation des yeux.</p> <p><b>H 336</b> : Peut provoquer somnolence ou vertiges.</p>	<p><b>P 210</b> : Tenir à l'écart de la chaleur/ des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer.</p> <p><b>P 233</b> : Maintenir le récipient fermé de manière étanche.</p> <p><b>P 305 + P 351 + P 338</b> : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.</p>
<p><b>Acide trichloroacétique</b> <b>20 %</b></p>  <p><b>Danger</b></p>	<p><b>H 314</b> : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.</p> <p><b>H 335</b> : Peut irriter les voies respiratoires.</p> <p><b>H 410</b> : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.</p>	<p><b>P 273</b> : Éviter le rejet dans l'environnement.</p> <p><b>P 280</b> : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.</p> <p><b>P 301 + P 330 + P 331</b>: EN CAS D'INGESTION : Rincer la bouche. NE PAS faire vomir.</p> <p><b>P 305 + P 351 + P 338</b> : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.</p> <p><b>P 309 + P311</b> : EN CAS D'EXPOSITION OU D'UN MALAISE : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.</p>

## FICHE SÉCURITÉ (suite)

### MÉLANGES

Réactifs & Pictogrammes	Phrases de risque	Conseils de prudence
<b>Réactif de Gornall</b> 	<b>R 22</b> : Nocif en cas d'ingestion <b>R 36/38</b> : Irritant pour les yeux et la peau <b>R 50/53</b> : Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique <b>R 34</b> : Provoque des brûlures	<b>S 22</b> : Ne pas respirer les poussières. <b>S 60</b> : Éliminer le produit et son récipient comme déchet dangereux. <b>S 61</b> : Éviter le rejet dans l'environnement. <b>S 26</b> : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. <b>S 36/37/39</b> : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. <b>S 45</b> : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.
<b>Solvant</b> 	<b>R 11</b> : Facilement inflammable <b>R 22</b> : nocif en cas d'ingestion <b>R 37/38</b> : Irritant pour les voies respiratoires et la peau. <b>R 41</b> : Risque de lésions oculaires graves <b>R 67</b> : L'inhalation de vapeur peut provoquer somnolence et vertiges. <b>R 10</b> : Inflammable <b>R 35</b> : Provoque de graves brûlures	<b>S 7</b> : Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé. <b>S 16</b> : Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles. Ne pas fumer <b>S 23</b> : Ne pas respirer les gaz / vapeurs / fumées / aérosols. <b>S 26</b> : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. <b>S 36/37/39</b> : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage <b>S 45</b> : En cas d'accident ou de malaise: consulter immédiatement un médecin.
<b>Réactif à la ninhydrine</b> 	<b>R 11</b> : Facilement inflammable <b>R 36</b> : Irritant pour les yeux. <b>R 66</b> : L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau. <b>R 67</b> : L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertige	<b>S 7</b> : Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé. <b>S 16</b> : Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles. Ne pas fumer <b>S 26</b> : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
<b>Acide métaphosphorique à 20 g.L<sup>-1</sup></b> 	<b>R 36/38</b> : Irritant pour les yeux et la peau	<b>S 26</b> : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. <b>S 28</b> : Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec ... (produit approprié à indiquer par le fabricant) <b>S 64</b> : En cas d'ingestion, rincer la bouche avec de l'eau (seulement si la personne est consciente)

## Sujet de Techniques de Microbiologie 1<sup>er</sup> Jour

Pour les candidats non évalués en CCF

**Durée : 3 heures 30 Coefficient : 4**  
**Documents interdits - Calculatrice autorisée**

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

**Attention : le protocole du premier jour ne pourra être réutilisé le second jour.**

### **SUIVI D'UNE PRODUCTION DE VITAMINE B12 EN BIORÉACTEUR PAR DOSAGE MICROBIOLOGIQUE**

#### ***Contexte professionnel***

Une bio-industrie produit de la vitamine B12 par fermentation utilisant une souche de mycète productrice. Dans le cadre d'une recherche d'amélioration des rendements de production, l'entreprise teste deux nouveaux protocoles expérimentaux en bioréacteur pilote : un protocole en batch et un second en fed-batch. On dispose dans les deux cas du moût de fermentation récupéré en fin de procédé après 60 heures de fermentation.

On détermine dans ces moûts la concentration finale de vitamine B12 par dosage microbiologique. La souche utilisée pour le dosage est une entérobactérie : *Escherichia.coli* « B12 », souche auxotrophe vis-à-vis de ce facteur de croissance.

Lors des précédents essais en bioréacteur pilote, les moûts de fermentation récupérés étaient fréquemment contaminés par une souche bactérienne que l'entreprise a pu isoler.

On se propose d'identifier ce contaminant et de déterminer la CMI d'un antibiotique à large spectre régulièrement utilisé dans l'entreprise pour préserver les cultures vis-à-vis de cette souche.

#### ***Objectifs***

Réaliser un dosage microbiologique de vitamine B12 issue d'une production en bioréacteur.

Identifier une souche bactérienne contaminant un moût de fermentation.

Déterminer la CMI d'un antibiotique vis-à-vis du contaminant.

#### ***Compétences évaluées***

Préparer les réactifs milieux et matériels.

Réaliser des techniques d'observation macroscopique et microscopique des microorganismes.

Réaliser des techniques de culture de microorganismes.

Réaliser des techniques d'identification de microorganismes.

Réaliser des techniques de quantification des microorganismes et des virus.

Réaliser des techniques d'études relatives aux agents antimicrobiens.

Présenter et ordonner les valeurs expérimentales. Exprimer des résultats.

Valider et interpréter des résultats.

Utiliser l'outil informatique.

**Mise en œuvre**

Activités professionnelles	Ressources - Documents	Pages	Documents à compléter et à joindre à la copie
<p><b>1</b>                      Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation  <b>(35 points)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 1</li> <li>- Document 1 : gabarit de dépôts</li> <li>- Fiche technique du spectrophotomètre (au poste de travail)</li> </ul>	<p>3 et 4 5</p>	<p>Feuille de traçabilité <b>(page 10)</b></p>
<p><b>2</b>                      Identification de la souche bactérienne contaminant les moûts de fermentation  <b>(25 points)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 2</li> <li>- Fiche protocole d'ensemencement de la galerie (fournie par le centre)</li> <li>- Fiches de sécurité 1 et 2</li> </ul>	<p>6 8 et 9</p>	
<p><b>3</b>                      Détermination de la CMI vis-à-vis de la souche « S »  <b>(20 points)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 3</li> </ul>	<p>7</p>	

<b>FICHE PROTOCOLE 1</b>	<b>Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation.</b>	
--------------------------	------------------------------------------------------------------	--

Le dosage est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé ensemencé avec une souche test auxotrophe vis-à-vis de la vitamine B12. La vitamine est déposée par la méthode des disques.

### **Matériel et réactifs**

- Souche test *E.coli* notée « **B12** » isolée sur gélose en boîte de Pétri
- Échantillons à doser :
  - Moût de culture de fin de procédé batch à **t = 60 h** (noté « **batch t = 60 h** »)
  - Moût de culture de fin de procédé fed-batch à **t = 60 h** (noté « **fed-batch t = 60 h** »)
- 2 tubes de 10 mL d'eau physiologique stérile
- Tubes à hémolyse
- Spectrophotomètre ou densitomètre de paillasse (600 nm)
- Cuves spectrophotométriques + parafilm
- 2 boîtes de Pétri carrées 12 cm x 12 cm
- Boîte de Pétri stérile contenant 20 disques cartonnés de diamètre 6 mm
- 12 mL d'une solution tampon phosphate stérile pH 7,5
- 1 mL d'une solution étalon mère de vitamine B12 à 5 µg.mL<sup>-1</sup>
- Tubes Eppendorf stériles de capacité 1,5 mL
- 2 flacons de 60 mL de gélose base\* pour dosage de vitamine, en surfusion à 60°C
- Pipettes automatiques + cônes stériles
- Pipettes graduées ou équivalent stérile de 1, 2 et 5 mL

\*Donnée : Composition de la gélose base pour dosage microbiologique :

- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 2 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 6 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 14 g ; glucose : 10 g ; agar : 15 g ; eau distillée : qsp 1 litre

### **Préparation de la culture**

À partir d'une culture de souche test isolée, préparer en eau physiologique 10 mL d'une suspension ajustée à 0,2 unités d'absorbance à 600 nm (à 10 % près).

**Montrer la réalisation des mesures à un examinateur.**

À partir de la suspension ajustée précédemment, réaliser un ensemencement en masse, dans 2 flacons de 60 mL de gélose base (maintenue en surfusion à 60°C), de manière à obtenir environ 2.10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Homogénéiser en évitant la formation de bulles.

**Présenter à un examinateur le calcul de volume d'inoculum avant de réaliser la préparation.**

Après inoculation, couler immédiatement le contenu de chaque flacon dans une boîte de Pétri carrée 12 cm x 12 cm.

Après solidification, laisser les boîtes reposer environ 15 minutes avant dépôt des disques.

\*Donnée :

- la correspondance DO-N (UFC.mL<sup>-1</sup>) = .....

- linéarité de la méthode à 600 nm : 0,600.

### **Préparation d'une gamme étalon de vitamine B12 :**

À partir de la solution mère de vitamine B12 à 5 µg.mL<sup>-1</sup>, préparer en tubes Eppendorf stériles une série de 5 dilutions successives suivant une suite géométrique de raison ½ (diluant : tampon phosphate pH 7,5).

**Compléter et faire viser la feuille de traçabilité par un examinateur avant de réaliser la manipulation.**

<b>FICHE PROTOCOLE 1 (SUITE)</b>	<b>Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation.</b>	
--------------------------------------	----------------------------------------------------------------------	--

### ***Dépôt des solutions de vitamine B12***

Imprégner préalablement les 2 séries de disques fournis avec 10 µL des différentes solutions :

- les 5 dilutions de vitamine B12 et la solution mère
- le prélèvement en fed-batch (1 essai)
- le prélèvement en batch (1 essai)

une solution tampon phosphate pH 7,5 sur le dernier disque

Déposer ensuite les disques à la surface du milieu selon le gabarit fourni (**document 1**).

Laisser reposer sur la paillasse pendant 30 minutes à température ambiante.

Incuber à 37°C pendant 48 heures.

### **Compte rendu (sur la copie)**

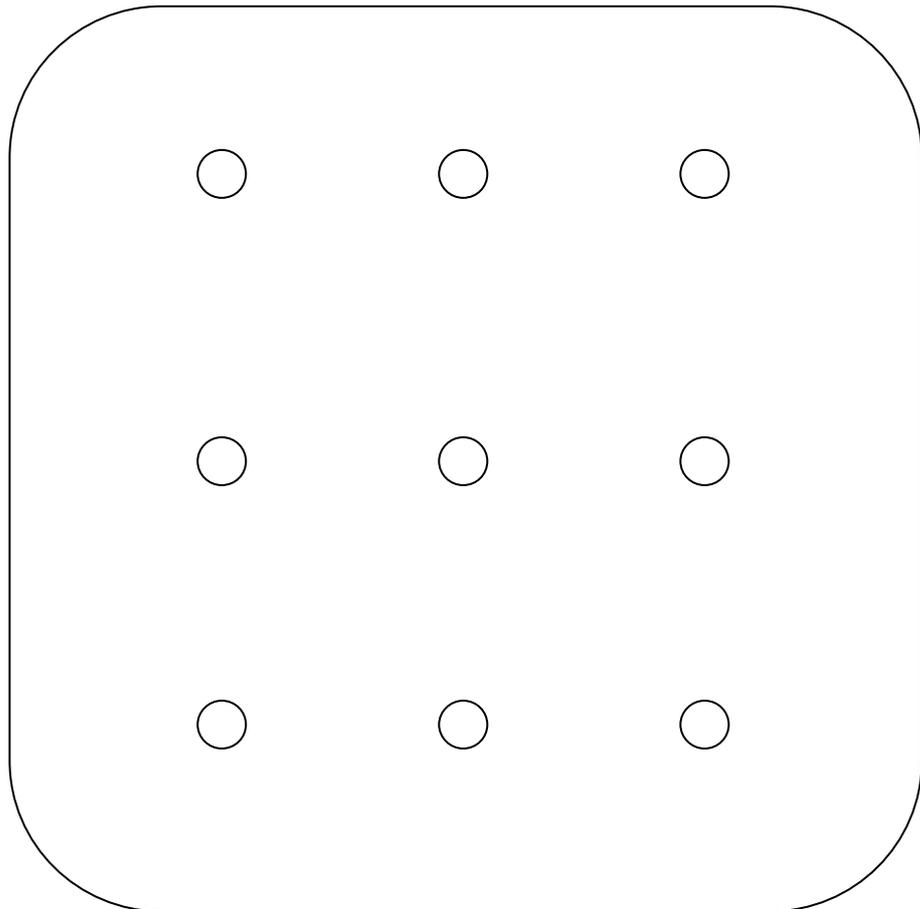
**1.1** - Après avoir analysé la composition de la gélose base utilisée, justifier l'emploi de ce milieu.

**1.2** - Justifier le temps d'attente de 30 minutes à température ambiante avant incubation.

**1.3** - Justifier le dépôt de tampon phosphate pH 7,5 sur le dernier disque.

**DOCUMENT 1**

**Gabarit de dépôts (9 disques – 12 cm x 12 cm)**



<b>FICHE PROTOCOLE 2</b>	<b>Identification de la souche bactérienne contaminant les mouûts de fermentation</b>	
--------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------	--

La souche bactérienne « **S** » a été isolée sur gélose nutritive inclinée. On procède à son identification.

***Matériel et réactifs***

- Réactifs pour la coloration de Gram
- Réactifs pour tests enzymatiques rapides

***Mode opératoire***

Réaliser les examens nécessaires à l'orientation de l'identification.

***Montrer la réalisation des tests à un examinateur.***

Proposer une liste de milieux adaptés à la vérification du genre et de l'espèce.

***Faire viser la liste sur la feuille de traçabilité par un examinateur au plus tard une heure avant la fin de l'épreuve.***

Ensemencer la galerie distribuée par le centre d'examen et incuber à 37°C pendant 24 heures.

**Compte rendu (sur la copie)**

2.1 - Consigner les résultats obtenus et orienter l'identification.

<b>FICHE PROTOCOLE 3</b>	<b>Détermination de la CMI vis-à-vis de la souche « S ».</b>	
--------------------------	--------------------------------------------------------------	--

Afin d'éliminer le contaminant « S » des cuves de fermentation, il est possible d'ajouter un antibiotique à large spectre dans le milieu de culture : l'ampicilline. On souhaite optimiser le traitement.

### ***Matériel et réactifs***

- 5 mL d'une culture de la souche « S » en bouillon Mueller Hinton à environ  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>
- Pipette automatique P<sub>1000</sub> + cônes stériles
- 4 mL de solution d'ampicilline à 10 µg.mL<sup>-1</sup>, notée « Amp »
- 9 tubes à hémolyse vides et stériles
- 1 flacon contenant 20 mL de bouillon Mueller Hinton

### ***Détermination de la CMI de l'ampicilline vis-à-vis du contaminant « S »***

À partir de la solution d'ampicilline à 10 µg.mL<sup>-1</sup>, réaliser en tubes à hémolyse stériles 8 dilutions successives suivant une suite géométrique de raison  $\frac{1}{2}$  en bouillon Mueller Hinton (volume final 1 mL) : identifier les tubes par leur concentration en ampicilline en µg.mL<sup>-1</sup>.

Ajouter 1 mL de l'inoculum à  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> à chaque dilution d'ampicilline et réaliser un témoin pour valider la méthode. Incuber la gamme et le témoin à 37°C pendant 48 heures.

### **Compte rendu (sur la copie)**

**3.1** - Donner la composition du témoin utilisé et justifier son rôle.

**3.2** - Compléter le tableau de préparation de la gamme (feuille de traçabilité).

## FICHE DE SÉCURITÉ 1

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES DE SECURITE
<b>REACTIFS DE COLORATION</b>		
<b>Cristal Violet</b> <i>Autre dénomination : Violet de gentiane</i>		
 <p style="text-align: center;"><b>T</b></p>	Benzèneméthanol, 4-(diméthylamino)- $\alpha$ -hydrochlorure $C_{25}H_{30}N_3Cl$  Solvant : éthanol, oxalate d'ammonium	<b>R45</b> – Peut causer le cancer. <b>S36/37</b> – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. <b>S45</b> – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). <b>S53</b> – Éviter l'exposition et se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation.
<b>Réactif de Lugol</b> <i>Autres dénominations : Réactif iodo-ioduré, Solution d'iodure de potassium iodée</i>		
 <p style="text-align: center;"><b>Xn</b></p>	Iode $I_2$  Iodure de potassium $KI$	<b>R20/21</b> – Nocif par inhalation et par contact avec la peau. <b>S23</b> – Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols. <b>S25</b> – Éviter le contact avec les yeux.
<u>Éthanol</u>   <p style="text-align: center;"><b>Danger</b></p>	Éthanol (alcool éthylique dénaturé) 95 % $CH_3CH_2OH$	<b>H 225</b> : Liquide et vapeurs très inflammables.  <b>P 210</b> : Tenir à l'écart de la chaleur/ des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer.
<u>Éthanol</u>   <p style="text-align: center;"><b>F</b></p>		<b>R11</b> – Facilement inflammable. <b>S7</b> – Conserver le récipient bien fermé. <b>S16</b> – Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles. Ne pas fumer.
<b>Fuchsine</b> <i>Utilisée après dilution au 1/10<sup>e</sup></i>		
 <p style="text-align: center;"><b>Xn</b></p>	Rosaniline $C_{20}H_{20}ClN_3$  Solvant : éthanol, phénol	<b>R10</b> – Inflammable. <b>R21/22</b> – Nocif par contact avec la peau et par ingestion. <b>R36/38</b> – Irritant pour les yeux et la peau. <b>S36/37</b> – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

## FICHE DE SÉCURITÉ 2

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES DE SECURITE
<b>REACTIFS POUR TESTS ENZYMATIQUES</b>		
<p>« Réactif oxydase »</p>  <p><b>Attention</b></p>  <p><b>Xn</b></p>	<p>TMPD : N, N, N', N'-tétraméthyl-1,4-phénylènediamine C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub></p>	<p><b>H 302</b> Nocif par ingestion. <b>H 312</b> Nocif par contact cutané. <b>H 332</b> Nocif par inhalation.</p> <p><b>R20/21/22</b> – Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. <b>S28.1</b> – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.</p> <p><i>Le conditionnement en disque déshydraté ne justifie pas de mesure de protection particulière.</i></p>
<p><b>Peroxyde d'hydrogène</b>      <i>Autre dénomination : Eau oxygénée</i></p>		
 <p><b>Danger</b></p>	<p>Peroxyde d'hydrogène &gt; à 60% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></p>	<p><b>H 302</b> : Nocif par ingestion. <b>H 31</b> : Provoque des lésions oculaires graves. <b>H 331</b> : Toxique par inhalation.</p> <p><b>P 261</b> : Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz /brouillards/ vapeurs/aérosols. <b>P 280</b> : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. <b>P305 + P351 + P338</b> : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.</p>
 <p><b>C</b></p>  <p><b>O</b></p>		<p><b>R8</b> – Favorise l'inflammation des matières combustibles. <b>R34</b> – Provoque des brûlures. <b>S3</b> – Conserver dans un endroit frais. <b>S28.1</b> – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau. <b>S36</b> – Porter un vêtement de protection approprié. <b>S45</b> – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).</p>

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ**  
(à rendre avec la copie)

**NOM DE L'OPÉRATEUR** ..... **Date** : .....  
**Poste n°** .....

**1 - Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation**

Protocole de préparation de la gamme d'étalonnage

Volume final préparé pour chaque dilution (en µL) :

Tableau de préparation de la gamme d'étalonnage à proposer :

**2 - Identification de la souche bactérienne contaminant les moûts de fermentation**

Liste des milieux :

**3 - Détermination de la CMI vis-à-vis de la souche « S »**

Tableau de préparation de la gamme d'ampicilline

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
V <sub>ampicilline</sub> à 10 µg.mL <sup>-1</sup> (mL)								
V reprise (mL)								
V bouillon MH (mL)								
V inoculum (mL)								
C <sub>ampicilline</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )								

## Sujet de Techniques de Microbiologie 2<sup>ième</sup> Jour

Durée : 1 h 30 – Coefficient : 4

Documents interdits - Calculatrice autorisée

### SUIVI D'UNE PRODUCTION DE VITAMINE B12 EN BIORÉACTEUR PAR DOSAGE MICROBIOLOGIQUE

#### **Rappel du contexte professionnel**

Une bio-industrie produit de la vitamine B12 par fermentation utilisant une souche de mycète productrice. Dans le cadre d'une recherche d'amélioration des rendements de production, l'entreprise teste deux nouveaux protocoles expérimentaux en bioréacteur pilote : un protocole en batch et un second en fed-batch. On dispose dans les deux cas du moût de fermentation récupéré en fin de procédé après 60 heures de fermentation.

On détermine dans ces moûts la concentration finale de vitamine B12 par dosage microbiologique. La souche utilisée pour le dosage est une entérobactérie : *E.coli* « B12 », souche auxotrophe vis-à-vis de ce facteur de croissance.

Lors des précédents essais en bioréacteur pilote, les moûts de fermentation récupérés étaient fréquemment contaminés par une souche bactérienne que l'entreprise a pu isoler.

On se propose d'identifier ce contaminant et de déterminer sa CMI vis-à-vis d'un antibiotique à large spectre régulièrement utilisé dans l'entreprise pour préserver les cultures vis-à-vis de cette souche.

#### **Objectifs**

- Lecture des boîtes de dosage de la vitamine B12 et exploitation informatique des résultats.
- Identification du genre et de l'espèce de la souche contaminante.
- Lecture des résultats de la CMI et exploitation.

#### **Mise en œuvre**

Activités professionnelles	Ressources- Documents	Pages	Documents à compléter et à joindre à la copie
1 Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation <b>(35 points)</b>	- Outil informatique + tableur		Feuille de traçabilité <b>(page 5)</b>  Rapport d'analyses <b>(page 6)</b>
2 Identification de la souche bactérienne contaminant les moûts de fermentation <b>(25 points)</b>	- Fiche de lecture de la galerie API STAPH (fournie par le centre) - Outil informatique + logiciel type API - Fiches de sécurité 1 et 2	3 et 4	
3 Détermination de la CMI vis-à-vis de la souche « S » <b>(20 points)</b>	--		

## FICHE DE SÉCURITÉ 1

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES DE SECURITE
<b>REACTIFS DE REVELATION (LECTURE DE GALERIES)</b>		
<b>Réactif NIT 1</b>		
 <b>Xi</b>   <b>C</b>	<i>Autre dénomination : Acide sulfanilique (en solution acétique)</i> Acide sulfanilique (acide 4-aminobenzène-sulfonique) $C_6H_7NO_3S$	<b>R36/38</b> – Irritant pour les yeux et la peau. <b>R43</b> – Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau. <b>S24/25</b> – Éviter le contact avec la peau et les yeux. <b>S37</b> – Porter des gants appropriés.
	Solvant : acétique (acide éthanoïque) $CH_3COOH$	<b>R10</b> – Inflammable. <b>R35</b> – Provoque de graves brûlures. <b>S23</b> – Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols. <b>S26</b> – En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. <b>S45</b> – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).
<b>Réactif NIT 2</b>		
 <b>Xn</b>   <b>C</b>	<i>Autre dénomination : <math>\alpha</math>-naphtylamine (en solution acétique)</i> $\alpha$ -naphtylamine (1-aminonaphthalène) $C_{10}H_9N$	<b>R22</b> – Nocif par ingestion. <b>S24</b> – Éviter le contact avec la peau.
	Solvant : acétique (acide éthanoïque) $CH_3COOH$	<b>R10</b> – Inflammable. <b>R35</b> – Provoque de graves brûlures. <b>S23</b> – Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols. <b>S26</b> – En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. <b>S45</b> – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).
<b>Réactif VP 1</b>		
 <b>Danger</b>	<i>Autre dénomination : Soude (hydroxyde de sodium)</i>  Hydroxyde de sodium NaOH	<b>H 314</b> : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. <b>H 290</b> : Peut être corrosif pour les métaux.  <b>P 280</b> : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. <b>P 301 + P 330 + P 331</b> : EN CAS D'INGESTION : Rincer la bouche. NE PAS faire vomir.  <b>P 305 + P 351+ P 338</b> : 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. <b>P 309 +P 310</b> : EN CAS d'exposition ou d'un malaise: Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
 <b>C</b>		<b>R35</b> – Provoque de graves brûlures. <b>S26</b> – En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. <b>S36/37</b> – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. <b>S45</b> – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).

## FICHE DE SÉCURITÉ 2

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES DE SECURITE
<p><b>Réactif VP 2</b></p>  <p><b>Danger</b></p>	<p><i>Autre dénomination : α-naphtol</i></p> <p>Napht-1-ol C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>OH</p>	<p><b>H 312</b> : Nocif par contact cutané.  <b>H 302</b> : Nocif en cas d'ingestion.  <b>H 315</b> : Provoque une irritation cutanée.  <b>H 318</b> : Provoque des lésions oculaires graves.</p> <p><b>H 335</b> : Peut irriter les voies respiratoires.</p> <p><b>P 280</b> : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.</p> <p><b>P 260</b> : ne pas respirer les poussières.</p> <p><b>P 302+ P 352</b> : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.</p> <p><b>P 305 + P 351 + P 338</b> : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.</p>
 <p><b>Xn</b></p>		<p><b>R21/22</b> – Nocif par contact avec la peau et par ingestion.  <b>R36/38</b> – Irritant pour les voies respiratoires et la peau.  <b>R41</b> – Risque de lésions oculaires graves.  <b>S22</b> – Ne pas respirer les poussières.  <b>S26</b> – En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.  <b>S37</b> – Porter des gants appropriés.</p>
<p>« <b>ZYM A</b> »</p>  <p><b>Xn</b></p>	<p>Tris-hydroxyméthyl – aminométhane – HCl 37% - laurylsulfate de sodium</p>	<p><b>R36/38</b> – Irritant pour les yeux et la peau.</p> <p><b>S26</b> – En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.</p>
<p>« <b>ZYM B</b> »</p>  <p><b>T</b></p>	<p>Fast blue BB (matière active) – méthanol - DMSO</p>	<p><b>R10</b> – Inflammable.  <b>R39/23/24/25</b> – Toxique : danger d'effets irréversibles très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.  <b>R36/37/38</b> – irritant pour les yeux et la peau ; irritant pour les voies respiratoires.</p>
 <p><b>Xn</b></p>		<p><b>R22</b> – Nocif en cas d'ingestion.  <b>R36/37/38</b> – Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau.  <b>S26</b> – En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.  <b>S36</b> – Porter un vêtement de protection approprié.</p>

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ  
(à rendre avec la copie)**

**NOM DE L'OPÉRATEUR** ..... **Date** : .....

**Poste n°** .....

**1 - Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation**

Tableau de relevé des diamètres des zones de croissance :

$C_{vit\ B12}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	Essai batch	Essai fed-batch
Ø croissance boîte 1 (cm)								
Ø croissance boîte 2 (cm)								
Ø moyen (cm)								

Validation de la technique :

Courbe d'étalonnage :  $\log C_{vit\ B12} = f(\text{Ø zone de croissance})$

→ graphe à joindre avec la copie (réalisé avec l'outil informatique)

**2 - Identification de la souche bactérienne contaminant les moûts de fermentation**

Validation des résultats :

Lecture de la VF et conclusion :

Lecture de galerie API par méthode probabiliste (**feuille de résultats API à joindre avec la copie**).

**3 - Détermination de la CMI vis-à-vis de la souche « S »**

Tableau de résultats :


Validation des résultats :

Lecture de la CMI :

**RAPPORT D'ANALYSES**  
**(à rendre avec la copie)**

**NOM DE L'OPÉRATEUR** ..... **Date** : .....

**Poste n°** .....

**1 - Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation**

-  $C_{\text{Vit B12}}$  (prélèvement batch = 60 h) :

- Productivité volumique horaire du procédé batch (en  $\mu\text{g}_{\text{Vit B12}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) :

-  $C_{\text{Vit B12}}$  (prélèvement fed-batch = 60 h) :

- Productivité volumique horaire du procédé fed-batch (en  $\mu\text{g}_{\text{Vit B12}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) :

- Conclusion

**2 - Identification de la souche bactérienne contaminant les moûts de fermentation**

- Conclusion :

**3 - Détermination de la CMI vis-à-vis de la souche « S »**

- Conclusion :

## Sujet de Techniques de Biologie Cellulaire et Moléculaire 1<sup>ier</sup> jour

**Durée 2 h – Coefficient 2**

**Documents interdits - Calculatrice autorisée**

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

**Attention : le protocole du premier jour ne pourra être réutilisé le second jour.**

### **CONTRÔLE DE LA QUALITÉ D'UN CLONAGE**

#### ***Contexte professionnel***

Une entreprise pharmaceutique tente de faire exprimer une sous unité protéique du récepteur GABA en vue de développer de nouveaux agonistes gabaergiques.

Ainsi, la séquence du gène correspondant (900 paires de bases pb) a été clonée dans un vecteur plasmidique de 1 600 pb.

L'insertion est réalisée au niveau du site de restriction Pvu I.

Les étapes de ce contrôle sont :

- contrôler la pureté de l'extrait plasmidique par spectrophotométrie UV,
- vérifier la présence de l'insert par digestion plasmidique puis migration électrophorétique.

### Compétences

Analyser et quantifier des fragments nucléotidiques par des techniques spectrophotométriques et électrophorétiques.

Valider et interpréter les résultats.

### Mise en œuvre

Les activités de spectrophotométrie UV et d'électrophorèse d'ADN sont indépendantes.

**Un ordre de passage sera indiqué en début de séance pour l'utilisation du spectrophotomètre UV.**

**Temps limité à 10 minutes par candidat.**

Activités professionnelles	Ressources - Documents	Pages	Documents à compléter et à joindre avec la copie
<p><b>1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Évaluer la qualité de la purification de l'extrait plasmidique par spectrophotométrie UV.</li> <li>- Mesurer la concentration en ADN de la solution plasmidique par spectrophotométrie UV.</li> </ul> <p><b>(11 points)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 1</li> <li>- Fiche technique relative au spectrophotomètre UV fournie par le centre (au poste spectrophotomètre)</li> </ul>	3	Feuille de traçabilité 1 <b>(page 7)</b>
<p><b>2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Préparer une digestion plasmidique</li> </ul> <p><b>(6 points)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 2</li> </ul>	4	Feuille de traçabilité 2 <b>(page 8)</b>
<p><b>3</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Réaliser un électrophorèse d'ADN</li> </ul> <p><b>(12 points)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 3</li> <li>- Fiche de sécurité BET</li> </ul>	5 6	

**La feuille de traçabilité 2 devra être complétée avant .....**

**Une feuille de traçabilité 2 complétée sera fournie si nécessaire.**

FICHE PROTOCOLE 1	Évaluation de la qualité de la purification du plasmide et détermination de la concentration en ADN par spectrophotométrie UV.	
-------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

### ***Matériel et réactifs***

#### **Au poste de travail**

- Solution plasmidique obtenue après purification notée « **PI** » (environ 50 µL)
- Eau distillée, notée « **eau BM** »
- Micropipettes P<sub>10</sub>, P<sub>100</sub> et P<sub>1000</sub> avec cônes adaptés
- 1 microtube

#### **Au laboratoire de biologie/biochimie**

- Spectrophotomètre UV
- Cuves de spectrophotomètre, à choisir, au poste de spectrophotomètre

### ***Mode opératoire***

***À réaliser au poste de spectrophotométrie en présence d'un examinateur.***

Réaliser en eau distillée une dilution au 1/20 de la solution d'ADN sous un volume final de 500 µL.

Remplir la cuve UV.

Faire le « blanc » selon les indications fournies pour l'appareil.

Placer la cuve remplie et mesurer l'absorbance à 260 et 280 nm.

### ***Compte rendu***

1.1 - Compléter la feuille de traçabilité 1 (**à rendre avec la copie**).

<b>FICHE PROTOCOLE 2</b>	<b>Préparation du « mix » de digestion plasmidique.</b>	
--------------------------	---------------------------------------------------------	--

## ***Matériel et réactifs***

### **Au poste de travail**

- Solution plasmidique obtenue après purification prête pour la digestion notée « **PII** » (environ 10 µL d'ADN à 50 µg/mL)
- Endonucléase de restriction Pvu I notée « **Pvu I** » à 5 U/ µL (dans la glace pilée)
- Tampon d'hydrolyse 10 X noté « **T** » pour l'enzyme Pvu I
- Eau distillée notée « **eau BM** »
- Glace pilée
- Micropipettes P<sub>10</sub>, P<sub>100</sub> et P<sub>1000</sub> avec cônes adaptés
- Bain-marie thermostaté à 37°C pour microtubes Eppendorf®
- Thermomètre
- Centrifugeuse pour microtube
- 2 microtubes

### **Calculs préliminaires**

***Remplir la feuille de traçabilité 2 en suivant les instructions données ci-dessous et la soumettre à un examinateur avant de manipuler.***

#### Microtube 1 : contrôle ADN plasmidique

Calculer le volume de suspension plasmidique PII à prélever pour obtenir la quantité de 100 ng.

Calculer le volume de tampon T pour obtenir une concentration finale 1X.

Compléter avec de l'eau distillée qsq 20 µL.

#### Microtube 2 : hydrolyse de l'ADN plasmidique

Calculer le volume de suspension plasmidique PII à prélever pour obtenir la quantité de 100 ng.

Calculer le volume de suspension d'enzyme Pvu I à prélever pour obtenir la quantité de 10 U.

Calculer le volume de tampon T pour obtenir une concentration finale 1X.

Compléter avec de l'eau distillée qsq 20 µL.

### ***Mode opératoire***

Préparer dans la glace pilée les mix 1 et 2 à partir de la feuille de traçabilité 2 validée par les examinateurs.

***Montrer la préparation du microtube 2 à un examinateur.***

Centrifuger les tubes quelques secondes.

Placer les tubes à 37°C pendant 45 minutes.

<b>FICHE PROTOCOLE 3</b>	<b>Réalisation d'une électrophorèse de fragments d'ADN.</b>	
--------------------------	-------------------------------------------------------------	--

**Matériel et réactifs**

**Au poste de travail**

- Glace pilée
- Micropipettes P<sub>10</sub>, P<sub>100</sub> et P<sub>1000</sub> avec cônes adaptés
- Solution de charge 6 X, noté « **SCh** »
- Centrifugeuse pour microtubes

**Au poste d'électrophorèse**

- Marqueur de taille prêt à l'emploi
- Gel d'agarose à 1 % (m/VI additionné de bromure d'éthidium prêt à l'emploi et déjà positionné)
- Cuve d'électrophorèse et générateur prêt à l'emploi

**Mode opératoire**

Ajouter 4 µL de la solution de charge dans chacun des 2 microtubes. Centrifuger quelques secondes et conserver les tubes dans la glace.

**Signaler à l'examineur que les dépôts peuvent être réalisés.**

Déposer (à la demande d'un examinateur) les 2 échantillons et le marqueur de taille selon le plan de dépôts fourni ci-dessous. Le volume de dépôt Vd = ..... µL.

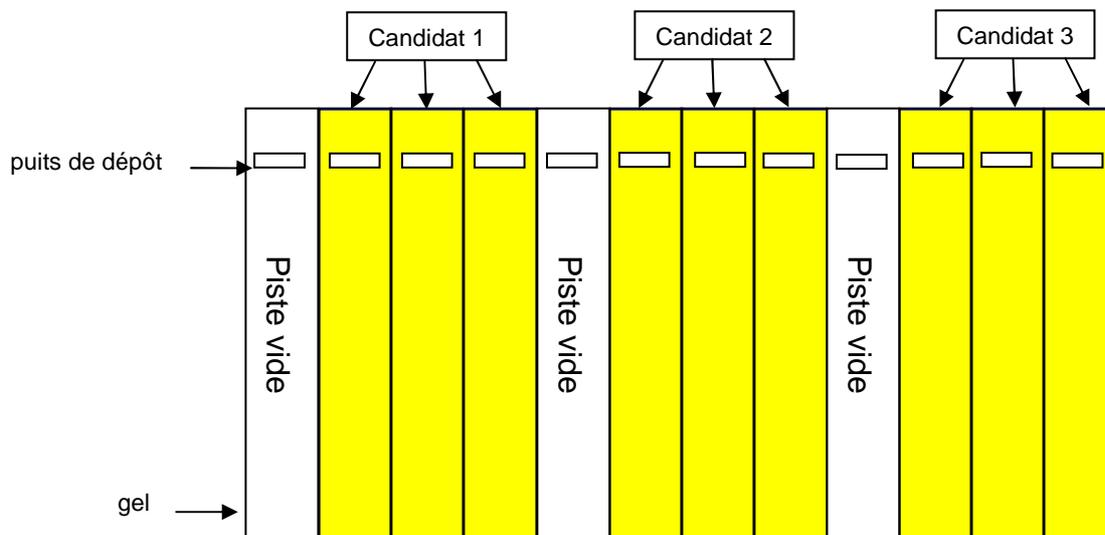
**Effectuer les dépôts en présence d'un examinateur.**

Mettre en migration sur une durée comprise entre 30 minutes et 1 heure sous une tension de 7V/cm.

Rincer quelques minutes en tampon TBE.

} Gestes effectués par un examinateur

**Plan de dépôts pour électrophorèse**



## FICHE DE SÉCURITÉ

BET : Bromure d'éthidium pur en poudre (Les risques sont les phrases H encadrées)

Toxicité aiguë	
<b>Classification</b>	<b>Catégorie 4</b>
<b>PICTOGRAMME</b>	
<b>Mention d'avertissement</b>	Attention
<b>Mention de danger : toxicité par voie orale</b>	<b>H302</b> Nocif en cas d'ingestion.

Corrosion cutanée/irritation cutanée	
<b>Classification</b>	<b>Catégorie 2</b>
<b>PICTOGRAMME</b>	
<b>Mention d'avertissement</b>	Attention
<b>Mention de danger</b>	<b>H315</b> Provoque une irritation cutanée.

Lésions oculaires graves et irritation oculaire	
<b>Classification</b>	<b>Catégorie 2</b>
<b>PICTOGRAMME</b>	
<b>Mention d'avertissement</b>	Attention
<b>Mention de danger</b>	<b>H319</b> Provoque une sévère irritation des yeux.

Agents mutagènes sur les cellules germinales	
<b>Classification</b>	<b>Catégorie 2</b>
<b>PICTOGRAMME</b>	
<b>Mention d'avertissement</b>	Attention
<b>Mention de danger</b>	<b>H341</b> Susceptible d'induire des anomalies génétiques (indiquer la voie d'exposition s'il est formellement prouvé qu'aucune autre voie d'exposition ne conduit au même danger).
<b>Effets sur la reproduction</b>	Le bromure d'éthidium provoque des malformations sévères dans un essai de tératogenèse sur l'embryon de grenouille (test FETAX). Les malformations atteignent tous les organes majeurs ; on observe, entre autres, courbure de la moelle épinière, anencéphalie, microcéphalie et microphthalmie. La DL <sub>50</sub> du bromure d'éthidium dans ce test est de 0,05 mg/mL et la dose efficace qui induit 50 % de malformations (DE <sub>50</sub> ) est de 0,035 mg/mL.

Le BET est introduit dans le gel d'agarose pour une concentration finale de 5 µg/mL.

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ 1**  
(à rendre avec la copie)

**NOM DE L'OPÉRATEUR** .....

**Date** : .....

**Poste n°** .....

**Réalisation de la dilution**

- Volume d'eau « BM » : ..... µL
- Volume de solution plasmidique « PI » : ..... µL
- Justification des choix de volume

**Absorbances relevées**

- $A_{260\text{ nm}}$  :
- $A_{280\text{ nm}}$  :

**Interprétation**

	Résultat	Critère	Conclusion
$R = \frac{A_{260}}{A_{280}}$		Compris entre 1,8 et 2 : ADN qualifié pur	

	Données	Calcul et résultat
<b>Concentration massique en ADN de la solution plasmidique</b>	1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration d'ADN de 50 µg/mL	

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ 2**  
(à remplir par le candidat et à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR .....

Date : .....

Poste n° .....

Mise en microtubes	Eau distillée Qsp 20 $\mu$ L	Tampon 1 X final	ADN plasmidique PII	Enzyme Pvu I
1	V =	V =	V =	V =
2	V =	V =	V =	V =

Justification des calculs pour le microtube 2 :

## Sujet de Techniques de Biologie Cellulaire et Moléculaire 2<sup>ième</sup> jour

Durée 1 h – Coefficient 2

### Documents interdits - Calculatrice autorisée CONTRÔLE DE LA QUALITÉ D'UN CLONAGE

#### **Rappel du contexte professionnel**

Une entreprise pharmaceutique tente de faire exprimer une sous unité protéique du récepteur GABA en vue de développer de nouveaux agonistes gabaergiques.

Ainsi, la séquence correspondant (900 paires de bases pb) a été clonée dans un vecteur plasmidique de 1 600 pb.

L'insertion est réalisée au niveau du site de restriction Pvu I.

Les étapes de ce contrôle sont :

- contrôler la pureté de l'extrait plasmidique par spectrophotométrie UV,
- vérifier la présence du l'insert par digestion plasmidique puis migration électrophorétique.

#### **Compétences**

Analyser des fragments nucléotidiques par des techniques électrophorétiques.

Utilisation de l'outil informatique.

#### **Mise en œuvre**

Activités professionnelles	Ressources - Documents	Documents à compléter et à joindre avec la copie
<p style="text-align: center;"><b>4</b></p> <p>Analyser et interpréter un gel d'électrophorèse de fragments nucléotidiques <b>(9 points)</b></p>	<p>- Électrophorégramme - Caractéristiques du marqueur de taille fourni en début d'épreuve</p>	<p style="text-align: center;">Feuille de traçabilité Jour 2 <b>(page 3)</b></p>
<p style="text-align: center;"><b>5</b></p> <p>Tracer un graphe d'étalonnage <b>(2 points)</b></p>	<p>- Outil informatique</p>	<p style="text-align: center;">Graphe tracé à l'ordinateur</p>

#### **Exploitation des résultats**

Observer le gel au transilluminateur.

À partir de l'électrophorégramme obtenu (échantillon et marqueur de taille), mesurer la distance de migration des bandes d'ADN.

**Les caractéristiques du marqueur de taille sont indiquées en début d'épreuve.**

Renseigner la feuille de traçabilité Jour 2.

À l'aide de l'outil informatique, réaliser un graphe permettant d'étalonner le gel **(à joindre avec la copie)**.

En utilisant le graphe :

- Déterminer la taille des fragments obtenus après la digestion du plasmide par Pvu I et sans digestion (feuille de traçabilité Jour 2),
- Interpréter les résultats et conclure (feuille de traçabilité Jour 2).

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ (Jour 2)**  
 (à remplir par le candidat et à rendre avec la copie)

**NOM DE L'OPÉRATEUR** .....

**Date :** .....

**Poste n°** .....

	<b>Numéro des bandes observées par rapport au dépôt</b>	<b>Distance de migration (mm)</b>	<b>Taille du fragment (pb)</b>	<b>Transformation mathématique des données expérimentales en vue de leur exploitation</b>
<b>Marqueur de taille</b>				
<b>Microtube 1</b>				
<b>Microtube 2</b>				

***Interprétation - Conclusion***

.

## Éléments de corrigé de Mathématiques

### Exercice 1

#### Partie A

1)  $(E_0)$  est une équation différentielle du premier ordre sans second membre, les solutions sur  $[0; +\infty[$  sont :

$$y(t) = k e^{-\frac{1}{5}t} = k e^{-0,2t} \quad \text{où } k \in \mathbb{R} .$$

2)  $h(t) = at e^{-0,2t} \quad h'(t) = a e^{-0,2t} + at(-0,2e^{-0,2t}) = a e^{-0,2t} - 0,2at e^{-0,2t}$  (de la forme  $uv$ ).

$h$  est solution particulière de  $(E) \Leftrightarrow 5h'(t) + h(t) = e^{-0,2t}$

$$\Leftrightarrow 5(a e^{-0,2t} - 0,2at e^{-0,2t}) + at e^{-0,2t} = e^{-0,2t}$$

$$\Leftrightarrow 5ae^{-0,2t} - ate^{-0,2t} + ate^{-0,2t} = e^{-0,2t}$$

$$\Leftrightarrow 5ae^{-0,2t} = e^{-0,2t}$$

$$\Leftrightarrow 5a = 1 \quad \text{car pour tout } t \in [0; +\infty[ \quad e^{-0,2t} \neq 0$$

$$\Leftrightarrow a = \frac{1}{5}$$

Soit  $h(t) = \frac{1}{5}t e^{-0,2t} = 0,2t e^{-0,2t}$ .

Pour  $a = 0,2$ , la fonction  $h$  est bien une solution particulière de  $(E)$ .

3) Les solutions de  $(E)$  sont formées des solutions de l'équation homogène  $(E_0)$  et d'une solution particulière de  $(E)$ . Donc :  $y(t) = k e^{-0,2t} + 0,2t e^{-0,2t} \quad \text{où } k \in \mathbb{R} .$

4)  $y(0) = k e^{-0,2 \times 0} + 0,2 \times 0 \times e^{-0,2 \times 0} = k e^0 = k$  Or  $y(0) = 0$  donc  $k = 0$  et par conséquent : pour tout  $t \in [0; +\infty[$ ,  $f(t) = 0,2t e^{-0,2t}$ .

#### Partie B

1) C'est une forme indéterminée «  $+\infty \times 0$  », mais :  $f(t) = 0,2t e^{-0,2t} = \frac{0,2t}{e^{0,2t}}$ .

Or  $\lim_{t \rightarrow +\infty} 0,2t = +\infty$  et  $\lim_{x \rightarrow +\infty} \frac{e^x}{x} = +\infty$  donc  $\lim_{t \rightarrow +\infty} \frac{e^{0,2t}}{0,2t} = +\infty$  d'où  $\lim_{t \rightarrow +\infty} \frac{0,2t}{e^{0,2t}} = 0$  soit

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 0 .$$

Comme  $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 0$ , la courbe  $C$  possède une asymptote horizontale d'équation  $y = 0$  (l'axe des abscisses).

2) La fonction  $f$  est dérivable sur  $[0; +\infty[$  comme produit et composée de fonctions dérivables sur  $[0; +\infty[$ .

$f$  est un produit, on utilise la forme  $(uv)' = u'v + v'u$  où  $u(t) = 0,2t$   $u'(t) = 0,2$

$$v(t) = e^{-0,2t} \quad v'(t) = -0,2e^{-0,2t}$$

$$f'(t) = 0,2e^{-0,2t} + 0,2t(-0,2e^{-0,2t}) = 0,2e^{-0,2t} - 0,04te^{-0,2t} \quad \text{donc } \boxed{f'(t) = e^{-2t}(0,2 - 0,04t)}$$

3)

$t$	0	5	$+\infty$
$e^{-0,2t}$		+	+
$-0,04t + 0,2$		+	-
$f'(t)$		+	-
$f(t)$	0	$e^{-1}$	0

Pour tout  $t \in [0; +\infty[$ ,  $e^{-0,2t} > 0$

et

$$0,2 - 0,04t \geq 0 \Leftrightarrow -0,04t \geq -0,2$$

$$\Leftrightarrow t \leq \frac{-0,2}{-0,04}$$

$$\Leftrightarrow t \leq 5$$

$$f(0) = 0$$

$$f(5) = 0,2 \times 5 e^{-0,2 \times 5} = e^{-1} \approx 0,368$$

4) a)

$t$	0	2,5	5	10	15	20	25
$f(t)$	0	0,30	0,37	0,27	0,15	0,07	0,03

b)



**Partie C**

1) Graphiquement, au bout de 23 minutes, la quantité de médicament redevient inférieure à 0,05 ml.

2)

a-  $F$  est dérivable sur  $[0; +\infty[$  :

$$F'(t) = (-1)e^{-0,2t} + (-t-5)(-0,2e^{-0,2t}) = -e^{-0,2t} + 0,2te^{-0,2t} + e^{-0,2t} = 0,2te^{-0,2t} = f(t).$$

Comme  $F' = f$ ,  $F$  est une primitive de  $f$  sur  $[0; +\infty[$ .

$$b - V_m = \frac{1}{23-0} \int_0^{23} f(t) dt = \frac{1}{23} [F(x)]_0^{23} = \frac{1}{23} (F(23) - F(0))$$

$$\text{Or } F(23) = (-23-5)e^{-0,2 \times 23} = -28e^{-4,6} \quad \text{et } F(0) = (-0-5)e^{-0,2 \times 0} = -5.$$

$$\text{Donc : } \boxed{V_m = \frac{1}{23} (-28e^{-4,6} + 5) \approx 0,21 \text{ à } 10^{-2} \text{ près.}}$$

c - La valeur moyenne sur l'intervalle  $[0; 23]$  (les 23 premières minutes) est de 0,21 ml.

**Exercice 2****A. Loi normale**

1)  $X$  suit une loi normale de paramètres 1,5 ; 0,07.

$$P(1,35 \leq X \leq 1,65) = P(-0,15 \leq X - 1,5 \leq 0,15) = P\left(\frac{-0,15}{0,07} \leq \frac{X - 1,5}{0,07} \leq \frac{0,15}{0,07}\right) = P\left(\frac{-15}{7} \leq \frac{X - 1,5}{0,07} \leq \frac{15}{7}\right)$$

Et  $Y = \frac{X - 1,5}{0,07}$  suit une loi  $N(0;1)$  donc :  $P\left(\frac{-15}{7} \leq Y \leq \frac{15}{7}\right) = 2\pi\left(\frac{15}{7}\right) - 1 \approx 2 \times 0,9838 - 1 \approx 0,97$   
à  $10^{-2}$  près.

2)  $X_1$  suit une loi normale de paramètres 1,5 ;  $\sigma_1$ . On a donc:

$$P(1,35 \leq X_1 \leq 1,65) = 0,99 \Leftrightarrow P(1,35 - 1,5 \leq X_1 - 1,5 \leq 1,65 - 1,5) = 0,99$$

$$\Leftrightarrow P\left(\frac{-0,15}{\sigma_1} \leq \frac{X_1 - 1,5}{\sigma_1} \leq \frac{0,15}{\sigma_1}\right) = 0,99$$

Et  $Y_1 = \frac{X_1 - 1,5}{\sigma_1}$  suit une loi  $N(0;1)$ , donc :

$$P\left(\frac{-0,15}{\sigma_1} \leq Y_1 \leq \frac{0,15}{\sigma_1}\right) = 0,99 \Leftrightarrow 2\pi\left(\frac{0,15}{\sigma_1}\right) - 1 = 0,99 \Leftrightarrow \pi\left(\frac{0,15}{\sigma_1}\right) = \frac{1+0,99}{2} = 0,995.$$

Par lecture de la table :  $\frac{0,15}{\sigma_1} = 2,58$  d'où  $\sigma_1 = \frac{0,15}{2,58} \approx 0,06$  à  $10^{-2}$  près.

**B. Loi Binomiale**

1) Le tirage est assimilé à un tirage avec remise, les événements sont donc indépendants. Il y a 2 issues possibles : un tube est soit défectueux, soit non défectueux.

$Y_1$  compte le nombre de tubes défectueux dans le prélèvement de 20 tubes, la variable aléatoire  $Y_1$  suit donc une loi binomiale de paramètres :

$n = 20$  et  $p = p(E) = 0,02$ .  $Y_1 \square B(20; 0,02)$

2)  $p(Y_1 \leq 1) = p(Y_1 = 0) + p(Y_1 = 1) = \binom{20}{0} (0,02)^0 (0,98)^{20} + \binom{20}{1} (0,02)^1 (0,98)^{19} \approx 0,94$  à  $10^{-2}$  près.

### C. Test d'hypothèse

1) Sous l'hypothèse  $H_0$  :  $\bar{Z}$  suit une loi normale de paramètres  $\mu = 300$  et d'écart type  $\sigma = \frac{1}{\sqrt{100}} = \frac{1}{10} = 0,1$ .

$$P(300 - h \leq \bar{Z} \leq 300 + h) = 0,95 \Leftrightarrow P(-h \leq \bar{Z} - 300 \leq h) = 0,95 \Leftrightarrow P\left(\frac{-h}{0,1} \leq \frac{\bar{Z} - 300}{0,1} \leq \frac{h}{0,1}\right) = 0,95.$$

La variable aléatoire  $\frac{\bar{Z} - 300}{0,1}$  suit une loi  $N(0;1)$ . On a alors :

$$P\left(\frac{-h}{0,1} \leq \frac{\bar{Z} - 300}{0,1} \leq \frac{h}{0,1}\right) = 0,95 \Leftrightarrow 2\pi\left(\frac{h}{0,1}\right) - 1 = 0,95 \Leftrightarrow \pi\left(\frac{h}{0,1}\right) = \frac{1 + 0,95}{2} = 0,975.$$

Par lecture de la table :  $\frac{h}{0,1} = 1,96$ , soit  $h = 1,96 \times 0,1 = 0,196 \approx 0,20$  à  $10^{-2}$  près.

2) Si la moyenne d'un échantillon est dans l'intervalle  $[300 - 0,20; 300 + 0,20]$ , soit  $[299,80; 300,20]$ , on accepte la commande avec un risque d'erreur de 5%.

Si la moyenne d'un échantillon n'est pas dans l'intervalle  $[299,80; 300,20]$ , on n'accepte pas la commande avec un risque d'erreur de 5%.

3) Comme  $299,90 \in [299,80; 300,20]$ , on peut, au seuil de 5%, conclure que la livraison est conforme pour la longueur.

## Éléments de corrigé de Sciences Physiques

### A - Fibre optique

$$1.1.1 - n_{\text{air}} \times \sin \alpha = n_c \sin \beta$$

$$\text{D'où } \beta = \arcsin\left(\frac{n_{\text{air}} \times \sin \alpha}{n_c}\right)$$

$$1.1.2 - \beta = 11,1^\circ$$

1.1.3 – Il s'agit de la deuxième loi de Descartes (Snell)

$$1.2.1 - \beta + i = 90^\circ \text{ angles complémentaires}$$

$$1.2.2 - i = 90 - \beta = 78,9^\circ$$

1.3.1 - La réflexion totale est nécessaire à l'intérieur de la gaine car s'il existe un rayon réfracté dans la gaine, une partie de l'énergie lumineuse est perdue à chaque fois que l'on arrive sur l'interface cœur/gaine.

$$1.3.2 - \text{Soit } r \text{ l'angle de réfraction en J : } \sin r = \frac{n_c \times \sin i}{n_G}$$

Il y a réflexion totale si  $r$  n'est pas défini, c'est-à-dire si  $\frac{n_c \times \sin i}{n_G} > 1$ .

C'est-à-dire si  $\sin i > \frac{n_G}{n_c}$  ou encore si  $i > \arcsin\left(\frac{n_G}{n_c}\right)$

1.3.3 –

$$\arcsin\left(\frac{n_G}{n_c}\right) = 76,8^\circ$$

$i = 78,9^\circ > 76,8^\circ \Rightarrow$  la condition de réflexion totale est remplie et le rayon se propage dans la fibre.

1.3.4 - Pour avoir une bonne propagation il faut des angles  $i$  les plus grands possible, donc des angles  $r$  les plus petits possible, donc des angles  $\alpha$  les plus petits possible (il faut faire pénétrer le faisceau orthogonalement à la face d'entrée).

2.1 - Lorsque le rayon se propage du centre vers l'extérieur de la fibre, l'indice de réfraction diminue. En effet, le rayon s'écarte de la normale

Ou il ne peut y avoir réflexion totale que lorsqu'on va d'un milieu d'indice plus grand vers un milieu d'indice plus petit.

2.2.1 –

indice de réfraction :  $n = c / v$

avec :

$c$  : célérité de la lumière dans le vide.

$v$  : célérité de la lumière dans le milieu transparent.

2.2.2 -

Si deux rayons entrés en même temps parcourent des distances différentes mais ressortent en même temps, c'est que le rayon ayant parcouru un chemin plus long se propageait **plus rapidement** que le rayon ayant parcouru un chemin plus court.

### **B – Analyse radiochimique de la vanilline**

1.1 –

Les lois de conservation permettant l'écriture des équations nucléaires sont les suivantes :

- Conservation de masse A
- Conservation du nombre de charge Z

1.2 – L'équation de désintégration du carbone 14 est :  ${}^{14}_6\text{C} \rightarrow {}^{14}_7\text{N} + {}^0_1\text{e}$

1.3 – La période ou temps de demi-vie T du carbone 14 est le temps nécessaire pour que la moitié des noyaux initiaux soient désintégrés

1.4 – La constante de désintégration radioactive du carbone 14 s'exprime selon la formule :  $\lambda = \ln 2 / T$

Le calcul de  $\lambda$  en  $\text{s}^{-1}$  avec  $T = 5570$  ans soit  $5570 \times 365,25 \times 24 \times 3600 = 1,76 \cdot 10^{11}$  s  

$$\lambda = 3,9 \cdot 10^{-12} \text{ s}^{-1}$$

2.1 - Le nombre N de molécules marquées au carbone 14, à l'instant t, dans une masse  $m = 1,00$  g de vanilline naturelle sachant que A, l'activité à un instant t d'un gramme de vanilline est de 7200 Bq est donné par

$$N = A / \lambda \text{ soit } 7200 / 3,9 \cdot 10^{-12} = 1,8 \cdot 10^{15}$$

2.2 - La masse molaire M de la vanilline ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ) est de  $M = 152 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

2.3 -

La quantité de matière dans 1,00 g de vanilline est de  $n = m/M = 6,58 \cdot 10^{-3}$  mol.

Le nombre N' de molécules dans une masse  $m = 1,00$  g de vanilline naturelle est donc de  

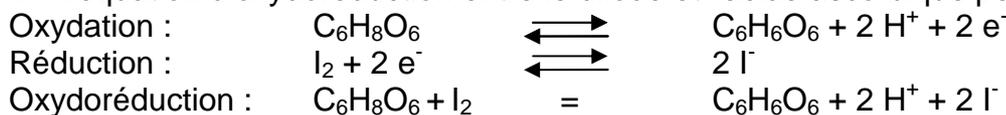
$$N = n \times N_A = N_A \times 1/M = 3,96 \cdot 10^{21}$$
 molécules

2.4 - La proportion de molécules marquées est  $N/N'$  soit  $4,62 \cdot 10^{-7}$  soit  $4,62 \cdot 10^{-5} \%$

3 - La proportion de vanilline naturelle est  $1200 / 7200$  soit  $1,67 \cdot 10^{-1}$  ou 16,7 %.

### **C – Dosage de l'acide ascorbique dans un comprimé (15 points)**

1 – l'équation d'oxydoréduction entre le diiode et l'acide ascorbique peut s'écrire ainsi :



2 – La différence de potentiels standard entre les deux couples en présence se calcule :

$$\begin{aligned} \Delta E^\circ &= E^\circ(\text{I}_2/\text{I}^-) - E^\circ(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) \\ &= 0,49 \text{ V} \end{aligned}$$

3 – L'expression de la valeur de l'enthalpie libre standard  $\Delta E^\circ$  est

$$\Delta R G^\circ = -2 \times F \times \Delta E^\circ$$

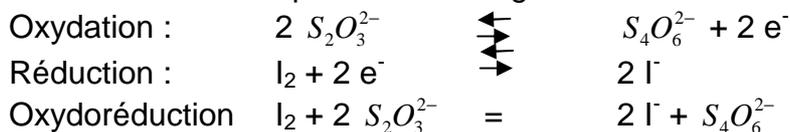
La valeur de  $\Delta R G^\circ$  est de  $-94,57 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

4 – Le calcul de la constante d'équilibre mis en jeu  $K = e^{\frac{\Delta R G^\circ}{RT}} = 3,8 \cdot 10^{16}$

La réaction est donc une réaction totale car  $K \gg 10^4$

5 – Un dosage direct entre le diiode et l'acide ascorbique n'est pas envisageable malgré la valeur élevée de la constante  $K$  car, même si la réaction est totale, elle est probablement lente et une réaction doit être suffisamment rapide pour être mise en œuvre dans un dosage.

6 – L'écriture de l'équation du dosage est la suivante :



7 – D'après l'équation du dosage ci-dessus,  $(n_{I_2})_{excès} = \frac{(n_{S_2O_3^{2-}})_{eq}}{2}$

$$\text{Ainsi } (n_{I_2})_{excès} = \frac{C_2 x V_2}{2}$$

8 – L'expression de la quantité totale de diiode ayant réagi avec l'acide ascorbique est :

$$(n_{I_2})_{total} = C_1 x V_1$$

9 – Puisque  $n_{tot} = n_{excès} + n_{réagi}$

$$(n_{I_2})_{réagi} = (n_{I_2})_{tot} - (n_{I_2})_{excès} = C_1 x V_1 - \frac{C_2 x V_2}{2}$$

10 – D'après l'équation de la réaction entre le diiode et l'acide ascorbique, la quantité de matière d'acide ascorbique présente dans 20 mL de solution S est  $C_1 x V_1 - \frac{C_2 x V_2}{2}$ .

Ainsi, dans 100 mL, il y en aura 5 fois plus, d'où :

$$n_{asc} = 5 x (C_1 x V_1 - \frac{C_2 x V_2}{2}) = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$$

11 – Cette quantité de matière correspond à une masse  $m$  telle que :

$$\begin{aligned} m &= n_{asc} x M_{asc} \\ &= 0,196 \text{ g} = 196 \text{ mg} \end{aligned}$$

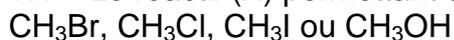
Ce qui est parfaitement compatible avec l'indication du fournisseur.

(2 % d'écart ou oxydation partielle de la vitamine lors de la manipulation du comprimé).

12 – L'acide ascorbique est rapidement oxydé par le dioxygène présent dans l'air. Sa quantité au bout de quelques jours ne serait donc plus la même.

### **D – Synthèse de l'anéthol (15 points)**

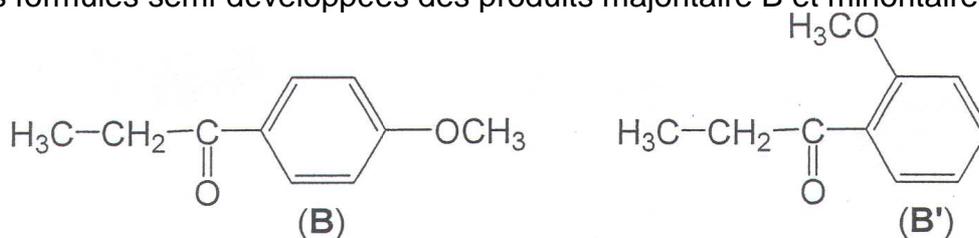
1.1 – Le réactif (A) permettant de réaliser cette réaction peut être :



1.2 – Le type de réaction mise en jeu est une réaction de substitution.

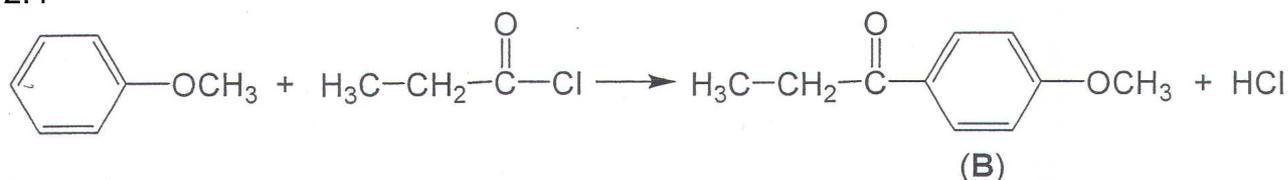
2.1 –  $CH_3-CH_2-COCl$  est le chlorure de propanoyle

2.2 – Les formules semi-développées des produits majoritaire B et minoritaire B' sont :



2.3 – Le groupement  $-\text{OCH}_3$  est o/p orienteur d'après les règles de Holleman. Le composé para est majoritaire car les gênes stériques entre  $-\text{OCH}_3$  et  $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_3$  sont moindres par rapport au composé ortho.

2.4 –



2.5 - Le chlorure d'aluminium présente un rôle catalytique dans la réaction.

2.6 - Il s'agit de la réaction d'acylation de Friedel et Crafts.

3.1 – Le type de réaction mise en jeu est une réaction d'addition (réduction, hydrogénation)

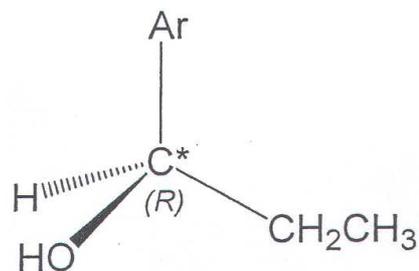
3.2 – Il faut entourer la fonction alcool secondaire et la fonction HP ??

3.3.1 - Un mélange racémique est un mélange équimolaire de 2 énantiomères.

3.3.2 -

Les règles suivies sont :

- Conventions de Cram correctes
- Numérotation de substituants  $\text{OH} > \text{Ar} > \text{CH}_2\text{CH}_3 > \text{H}$
- Enantiomère R correctement représenté

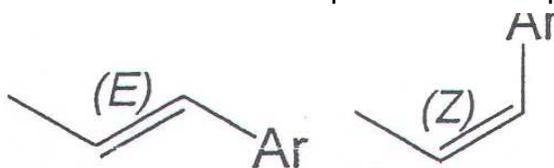


4.1 - Les conditions opératoires dans lesquelles la réaction de déshydratation peut être effectuée sont :

- présence d'un catalyseur tel un acide de type  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{H}_3\text{PO}_4$
- action d'un chauffage.

4.2.1 – Il s'agit d'une diastéréoisomérisie (ou isomérisie de type Z/E)

4.2.2 – Les deux stéréoisomères de l'anéthol peuvent être représentés ainsi :



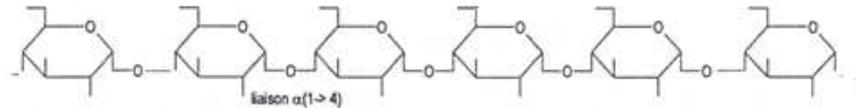
## Eléments de corrigé de Biochimie

### 1 - Les apports carbonés

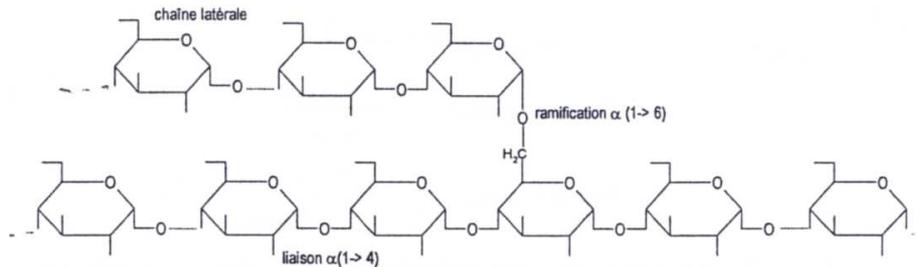
1.1 - L'amidon est un mélange d'amylose et d'amylopectine. Ces molécules sont composées uniquement de glucose (CHO)

1.2 - Structure développée des molécules composant l'amidon

Amylose : Chaîne linéaire de D-glucoses liés par des liaisons osidiques  $\alpha$  1-4



Amylopectine : structure ramifiée avec des chaînes principales de D-glucose liés en  $\alpha$  1-4 et des chaînes latérales de glucose (liés en  $\alpha$  1-4) se branchant sur l'OH en C6 des chaînes principales par une liaison osidique  $\alpha$  (1-6)



1.3 - Stockage des glucides chez les animaux

1.3.1 - Document 1 :

E1 glucokinase (ou hexokinase)

E2 glucose-6-phosphatase

E3 glycogène phosphorylase

E4 glycogène synthase

X glucose-6-phosphate

Y UDP glucose

1.3.2 - E3 : glycogénolyse : mobilisation des réserves glucidiques sous forme de glycogène pour le maintien de la glycémie

E4 : glycogénogénèse : mise en réserve du glucose excédentaire sous forme de glycogène

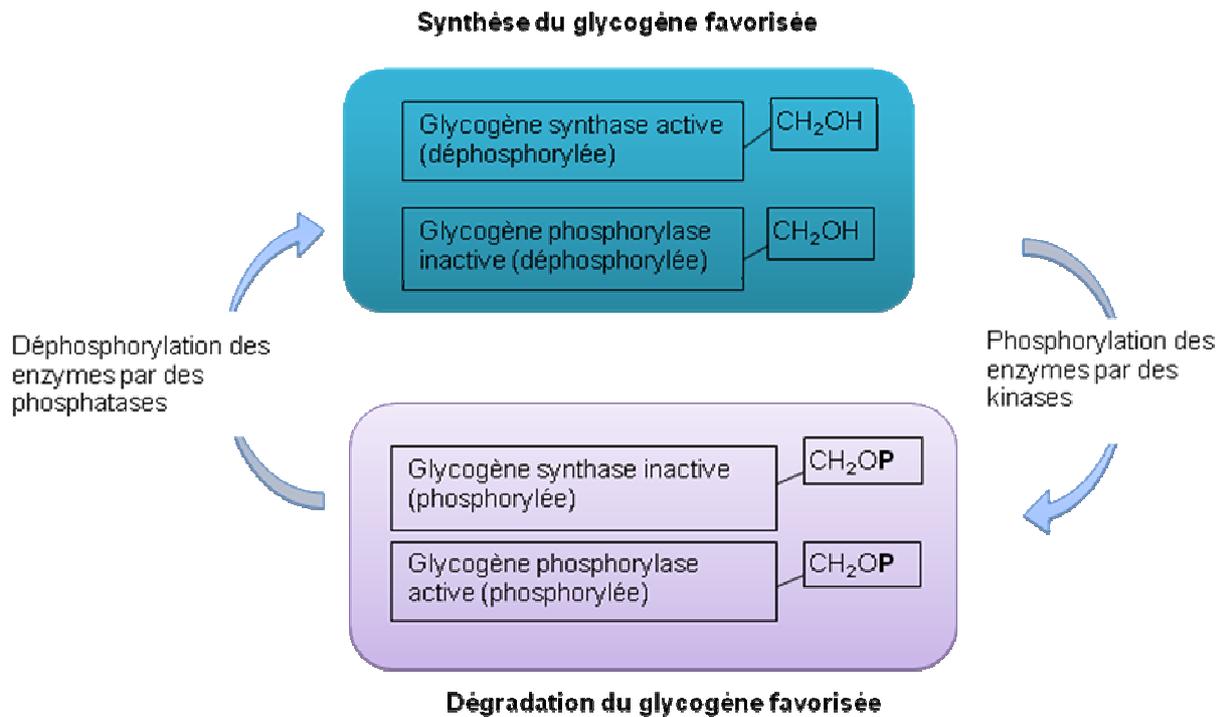
1.3.3 - L'activité de ces enzymes est régulée par un mécanisme de phosphorylation – déphosphorylation :

La glycogène synthase est active sous forme déphosphorylée alors que la glycogène phosphorylase est active sous forme phosphorylée et vice versa.

Les deux enzymes sont toujours phosphorylées ou déphosphorylées en même temps.

Les deux métabolismes ne peuvent avoir lieu en même temps.

Intérêt : une même hormone (régulateur) active un des métabolismes et inhibe l'autre : on ne peut avoir en même temps synthèse et dégradation du glycogène.



#### 1.4 - (Document2)

1.4.1 - Dénomination systématique du saccharose :  $\alpha$  D glucopyranosyl (1-2)  $\beta$  D fructofuranoside

1.4.2.1 - Le réactif de Carrez est un réactif de précipitation des protéines, il a une action sur les protéines via les liaisons ioniques en les précipitant

1.4.2.2 - Au choix :

Les acides comme l'ATCA dénaturent irréversiblement des protéines : modification du pH

Précipitation par les sels comme le sulfate d'ammonium : phénomène de relargage ou salting out.

*Autres : Addition de solvants organiques, augmentation de la température....*

1.4.3 - Analyse de la technique de dosage du saccharose

1.4.3.1 - C'est un dosage enzymatique de substrat en point final

Prise de l'absorbance à stabilisation c'est-à-dire en fin de réaction lorsque tout le substrat a été consommé. La réaction doit être totale.

1.4.3.2 - Les conditions du dosage sont :

Réglage à  $\lambda = 340$  nm – zéro effectué sur l'air- température ambiante

Substrats secondaires et enzymes en **quantités non limitantes**

Substrat à doser en quantité limitante.

Calcul des concentrations massiques limites en glucose et saccharose dans l'échantillon :

Les masses  $m$  dans la cuve doivent être comprises entre 4 et 150  $\mu$ g

Le volume de prise d'essai  $V_{PE}$  (et non le volume total de la cuve) est de 0,1 mL

Donc  $\rho = m/V_{PE}$

Concentration massique limite inférieure

$$\rho_{\text{inf}} = 4/0,1 = 40 \mu\text{g.mL}^{-1} = 40 \text{ mg.L}^{-1} \text{ soit } 0,04 \text{ g.L}^{-1}$$

$\rho_{\text{inf}}$  correspond au **seuil de détection**

Concentration massique limite supérieure  $\rho_{\text{sup}} = 150/0,1 = 1500 \mu\text{g.mL}^{-1} = 1500 \text{ mg.L}^{-1}$  soit  $1,50 \text{ g.L}^{-1}$

$\rho_{\text{sup}}$  correspond à la **limite de linéarité**

1.4.3.3 - Dilution éventuelle de l'échantillon E à l'aide du document 2 et de la donnée

$$5\text{g d'aliment traité qsp à } 100 \text{ ml donc } \rho_{\text{aliment}} = m_{\text{aliment}} / V_{\text{fiolle}} = 5/0,1 = 50 \text{ g.L}^{-1}$$

Or l'aliment contient 5 % de mélasse donc  $\rho_{\text{mélasse}} = \rho_{\text{aliment}} * \%_{\text{mélasse}}$

$$\rho_{\text{mélasse}} = 50 * 2/100 = 1 \text{ g.L}^{-1}$$

Sachant que le % de saccharose dans la mélasse est de 2 % :

$$\rho_{\text{saccharose}} = \rho_{\text{mélasse}} * \%_{\text{saccharose}} = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$$

L'échantillon E peut être dosé sans dilution :  $\rho_{\text{saccharose}} = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$  est comprise dans l'intervalle des concentrations limites.

1.4.3.4 - Principe de la classification des enzymes : les enzymes sont regroupés en 6 classes en fonction du type de réaction catalysée.

Chaque classe est divisée en sous classes et sous sous classes en fonction du type de substrat, de la liaison et de coenzymes mis en jeu. A chaque enzyme est attribué un numéro d'ordre composé de 4 nombres.

- $\beta$  fructosidase : classe 3 des hydrolases
- Hexokinase : classe 2 des transférases
- Glucose -6- phosphate déshydrogénase : classe 1 des oxydoréductases

1.4.3.5 -

$$\rho_{\text{saccharose}} = \Delta A * \frac{V_{\text{cuve}} * M_{\text{saccharose}}}{\epsilon_{\text{NADPH,H}} * l * V_{\text{échantillon}}} = \Delta A * \frac{3,02 * 342}{6300 * 1 * 0,1} = \Delta A * 1,64$$

$$\text{Avec } \epsilon_{\text{NADPH,H}} = 630 \text{ mol}^{-1} \text{ m}^2 = 6300 \text{ L.mol}^{-1} . \text{cm}^{-1}$$

1.4.3.6 - Par cette technique de dosage, c'est le glucose qui est dosé donc :

Par l'essai saccharose, on dose à la fois le glucose issu de l'hydrolyse du saccharose par la  $\beta$  fructosidase et le glucose libre ou initialement présent dans l'échantillon.

L'essai glucose permet de déterminer le glucose libre ou initialement présent dans l'échantillon

Cet essai glucose permet donc d'éliminer les variations d'absorbance dues au glucose présent initialement dans l'échantillon à l'essai saccharose.

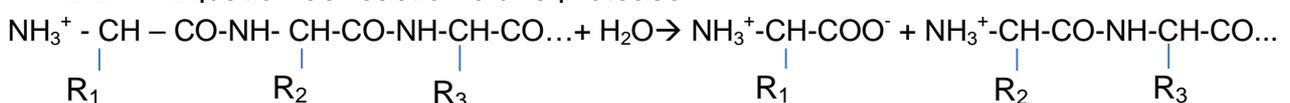
## 2 - Les apports azotés

2.1.1 - Un acide aminé essentiel est un acide aminé qui ne peut être synthétisé par l'organisme et doit être apportée par l'alimentation

Deux aux choix : Ala (A) -Leu( L)- Ile (I) – Phe (F) – Trp (W) – Val (V)

2.1.2 - La plupart des protéines ne seraient pas synthétisée car l'organisme ne produit pas tous les acides  $\alpha$  aminés qui les composent

2.2.1 - Equation de réaction d'une protéase



2.2.2 - Les deux types de classes de protéases sont les exoprotéases et les endoprotéases

Les exoprotéases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques à partir d'une extrémité d'une protéine (exemples l'aminopeptidase et la carboxypeptidase)

Les endoprotéases hydrolysent les liaisons peptidiques dans la protéine au niveau d'acide  $\alpha$  aminé spécifique. (ex : trypsine)

2.2.3.1 - Les principaux types d'inhibitions sont

L'inhibition compétitive : l'inhibiteur se fixe sur le site actif et prend la place du substrat. La  $V_{\text{imax}}$  est inchangée et  $K_{\text{M apparent}} > K_{\text{M}}$

L'inhibition non compétitive : l'inhibiteur s'associe à un site spécifique différent du site actif. Cette association rend le site catalytique inactif sans modifier l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat. Donc  $V_{\text{imax}}$  diminue en présence de l'inhibiteur et  $K_{\text{M}}$  inchangé

L'inhibition incompétitive : l'inhibiteur ne se fixe que sur le complexe enzyme-substrat donnant un complexe ternaire (ESI) inactif.

$V_{\text{imax}} > V_{\text{imax apparent}}$  et  $K_{\text{M}} > K_{\text{M apparent}}$

2.2.3.2 - L'inhibition étant levée à saturation en substrat, il entre donc en compétition avec l'inhibiteur : il s'agit d'une inhibition compétitive

### 3 - Ajouts d'huiles essentielles

3.1.1 –

A : réfrigérant à eau ;

B : substance contenant la molécule à extraire ou poudre

C : ballon ;

D : solvant d'extraction

3.1.2 - Les différentes étapes de cette extraction sont :

1 : Par chauffage du ballon, le solvant passe à l'état de vapeurs. Ces vapeurs pénètrent dans le corps de l'appareil puis dans le réfrigérant où elles se condensent

2 : le solvant tombe alors dans la cartouche et percole dans la matière solide en extrayant les molécules qu'il peut solubiliser.

3 : Le solvant s'accumule dans le corps de l'appareil

4 : Le solvant retourne dans le ballon par le siphon.

3.1.3.1 - Un cycle se déroule entre 2 siphonages c'est-à-dire entre l'évaporation du solvant et son retour dans le ballon par effet siphon. Plusieurs cycles sont effectués car la solubilité des molécules dans le solvant est généralement insuffisante. A chaque cycle, c'est du solvant pur qui percole la substance en extrayant une partie de la substance. La multiplication des cycles augmente le rendement d'extraction.

3.1.3.2 - B ne contient plus que les molécules qui ne sont pas solubles dans le pentane (solvant)

D est une solution de toutes les molécules solubles dans le pentane qui étaient contenues dans l'échantillon de départ

## 3.2 - Séparation par CPG

3.2.1 - Séparation des molécules d'un mélange grâce à la différence d'affinité de ces substances pour 2 phases non miscibles : une phase stationnaire qui exerce une force de rétention, et une phase mobile qui exerce une force d'entraînement.

3.2.2 - Phase mobile est un gaz inerte vis-à-vis des molécules à séparer  
Phase stationnaire est un solide ou liquide fixé

3.2.3 - He : gaz vecteur ou gaz porteur

- Four : Les molécules étant entraînées par un gaz, elles doivent être amenées à l'état de vapeur donc placées à une température suffisante.
- Colonne en spirale : séparation lente, elle nécessite une très grande surface de phase stationnaire. Le conditionnement en spire permet d'avoir une grande surface de contact pour un encombrement minimal.

3.2.4 - Document 6

3.2.4.1 - L'azulène joue le rôle d'étalon interne. Il permet de s'affranchir des variations des volumes injectés dans l'appareil.

3.2.4.2 - Lors de la mise au point du dosage, on veut être certain que le pic évalué est bien le thymol et uniquement le thymol. Ces autres substances sont rajoutés car :

- soit ces molécules ont probablement des structures proches du thymol, elles pourraient donc interférer lors de la séparation,
- soit elles ont un effet matrice.

3.2.4.3 -

- Cas 1 : l'étalon interne est non dissocié d'un autre marqueur : il ne peut servir de référence
- Cas 2 : le thymol a le même Tr qu'un autre marqueur : la surface du pic n'est pas proportionnelle à la seule concentration en thymol
- Cas 3 : les pics du thymol et du cavacrol mal dissociés : la surface du pic est imprécise
- Cas 4 : tous les pics sont bien dissociés : condition convenable

3.2.5 - Analyse quantitative

3.2.5.1 - La grandeur décrite correspond au rapport aire de l'échantillon/aire étalon interne

3.2.5.2 - Calcul de la concentration massique de l'azulène d'après les **documents 3 et 7**

D'après le **document 3** la concentration en azulène dans les essais est :

$$50 \cdot 2 / 200 = 0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (\text{dilution au } 1/100)$$

$$\rho_{\text{azulène}} \text{ essais} = \rho_{\text{azulène}} \text{ étalons} = 0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

– Calcul du volume d'azulène à ajouter dans tous les tubes :

$$V_{\text{azulène}} = 0,5 \cdot 5 / 50 = 0,05 \text{ mL} = 50 \mu\text{L}$$

– Mode de préparation de l'étalon  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  à partir d'une solution étalon de thymol à  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $V_{\text{final}} = 5 \text{ mL}$

$$V_{\text{thymol}} = (0,5 * 5)/10 = 0,25 \text{ ml} = 250 \mu\text{L}$$

$$V_{\text{pentane}} = V_{\text{tube}} - V_{\text{thymol}} - V_{\text{azulène}} = 5 - 0,25 - 0,05 = 4,7 \text{ mL}$$

$C_{\text{thymol}} (\text{mg.L}^{-1})$	0	0,1	0,2	0,5	1
$V_{\text{thymol}} (\mu\text{L})$	0	50	100	250	500
$V_{\text{azulène}} (\mu\text{L})$	50	50	50	50	50
$V_{\text{pentane}} (\mu\text{L})$	4,95	4,9	4,85	4,7	4,45

3.2.5.3 - C'est un étalonnage interne. Il permet de relier les valeurs expérimentales données par la méthode (ici les rapports d'aire) aux concentrations réelles de produit (ici le thymol) en éliminant les variations dues aux variations de volume injecté

### 3.3 - Détermination du rendement d'extraction du thymol

Calcul de l'équation de droite de régression : Aire corrigée =  $9,3 \cdot 10^{-2} \rho - 1,89 \cdot 10^{-3}$

Concentration massique des essais :

$$\rho_{\text{thymol } 1} = 0,766 \text{ mg.L}^{-1} \quad \rho_{\text{thymol } 2} = 0,762 \text{ mg.L}^{-1}$$

Teneur en mg/g =  $(\rho_{\text{thymol}} * V_{\text{fiolle}})/\text{masse pesée}$

$$\text{Teneur essai 1} = (0,766 * 0,2)/20,01 = 0,00766 \text{ mg.g}^{-1} = 7,66 \cdot 10^{-3} \text{ g.kg}^{-1}$$

$$\text{Teneur essai 2} = (0,762 * 0,2)/20,00 = 0,00762 \text{ mg.g}^{-1} = 7,62 \cdot 10^{-3} \text{ g.kg}^{-1}$$

$$\text{Teneur moyenne} = 7,64 \cdot 10^{-3} \text{ g.kg}^{-1}$$

$$\text{Teneur réelle} = (\rho_{\text{thymol}} * V_{\text{thymol}})/\text{masse d'aliment} = (100 * 4 \cdot 10^{-3})/50,0 = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mg.g}^{-1} \\ = 8 \cdot 10^{-3} \text{ g.kg}^{-1}$$

$$\text{Rendement} = 7,64 \cdot 10^{-3} / 8 \cdot 10^{-3} * 100 = 95,5 \%$$

## Eléments de corrigé de Microbiologie

### 1 – Formation et physiologie des biofilms

1.1.1.1 - L'élément facilitant le transport des bactéries retrouvées dans le biofilm est le flagelle, constitué de flagelline de nature protéique.

1.1.1.2 - Plusieurs techniques peuvent être utilisées au laboratoire pour mettre en évidence la présence de flagelles chez une bactérie et donc sa mobilité :

Le milieu Mannitol Mobilité Nitrate, milieu semi solide ensemencé par piqûre et qui montre ou pas la diffusion de la bactérie à partir de la piqûre ;

L'état frais où les bactéries, mises au point entre lame et lamelle et observées au grossissement x400, se déplacent selon plusieurs possibilités ;

La coloration des cils par immunofluorescence ou l'imprégnation argentique qui gaine les flagelles et permettent leur observation microscopique ;

La mise en évidence du chimiotactisme

1.1.1.3 - *Escherichia* ; *Salmonella* ; *Pseudomonas* ; *Vibrio* peuvent être citées comme étant mobiles.

1.1.2 – Les différents types de liaisons mises en jeu dans les étapes d'adsorption et d'adhésion sont :

- Interactions hydrophobes ;
- Interactions électrostatiques ;
- Forces de Van Der Waals,
- Liaisons H ;

Ces liaisons sont faibles donc réversibles.

1.1.3 - L'avantage essentiel des microorganismes inclus dans cette matrice est la protection contre les diverses agressions de l'environnement comme les agents chimiques ; physiques...

1.2.1.1 – Légendes de la structure de la forme sporulée des *Bacillus* :

1. protoplaste ou cytoplasme ou core
2. cortex
3. tunique
4. exosporium

1.2.1.2 - Les spores posent des problèmes lors de l'application des procédures de nettoyage car elles présentent une grande résistance aux agents chimiques.

1.2.2.1 – L'inox est utilisé dans les tests d'arrachement vertical des supports car c'est un matériau «inerte» employé dans la fabrication des instruments de coupes, plan de travail... de la filière viande.

1.2.2.2 - Le TTC est un indicateur rédox, il est réduit en un composé rose-rouge par la plupart des bactéries et permet donc une meilleure visualisation des colonies.

1.2.2.3 - Descriptions des courbes

Les 2 courbes ont même allure.

Les arrachages successifs épuisent les spores fixées sur le support.

Toutes les spores sont décrochées après 6 boîtes (*B. subtilis*) et 7 boîtes (*B. cereus*).

## 1.2.2.4 –

Le pourcentage de spores arrachées est calculé en divisant le nombre de spores arrachées (A) par le nombre initial de spores (B+C) et en multipliant par 100

$$\% = \frac{A \times 100}{B+C}$$

## 1.2.2.5 - Analyse des courbes

Pour un même n° de boîte, le % de spores arrachées pour *B subtilis* est supérieur à celui de *B. cereus* (la pente de la courbe correspond aux essais sur *B subtilis* est plus forte) donc *B subtilis* adhère moins aux lames que *B cereus*. Une hypothèse peut être formulée quant à la présence d'un exosporium chez *B cereus* (légende 4 fig 2) alors que *B. subtilis* n'en possède pas, donc l'exosporium pourrait être impliqué dans le mécanisme d'adhésion.

## 1.2.3 – Les paramètres sur lesquels il est possible d'agir sont :

- augmentation de la pression ;
- action mécanique ;
- changement de produit ;
- augmentation du temps de contact.

1.3.1 - Dans l'épaisseur du biofilm, la PO<sub>2</sub> diminue au fur et à mesure que l'on va vers le support. Les bactéries citées étant aérobies strictes, elles sont localisées là où il y a de l'oxygène disponible.

## 1.3.2 - Plus ou s'enfonce dans le biofilm

- **moins** il y a de nutriment
- **plus** l'espace dont disposent les colonies est étroit
- **plus** le métabolisme respiratoire peut être modifié : oxydatif en surface et fermentatif en profondeur donc moins énergétique

1.3.3 - Lorsque la pression en O<sub>2</sub> diminue, les microorganismes peuvent adopter un catabolisme fermentaire ou une respiration anaérobie avec production de substances acides à l'origine de la corrosion du support.

## 2. Du nettoyage à la désinfection

2.1 - Le nettoyage permet d'éliminer la majorité des souillures pour que la désinfection soit plus efficace.

Protocole nettoyage :

- Passage d'un détergent (basique) pour éliminer les substances organiques.
- Rinçage à l'eau.
- Passage d'une solution acide pour éliminer les substances minérales.
- Rinçage à l'eau.

2.2.1 La désinfection est le procédé par lequel on procède à une destruction momentanée des microorganismes sur des surfaces inertes.

## 2.2.2.1

Synergie = augmentation de l'effet obtenu lors de l'association de 2 substances par rapport à la somme des actions individuelles de chaque substance.

Antagoniste = diminution de l'effet obtenu lors de l'association de 2 substances par rapport à la somme des actions individuelles de chaque substance.

## 2.2.2.2

Association Chlorhexidine + alcool 70°

Tableau 1 : pas de synergie ni d'antagonisme

Tableau 2 : augmentation du spectre d'activité sur les virus

Association Chlorhexidine + ammonium quaternaire

Tableau 1 : effet synergique

Tableau 2 : légère augmentation du spectre

2.2.3.1 - La face bombée est nécessaire pour assurer une zone de contact la plus large possible entre la gélose et la surface à étudier. La nécessité d'utiliser une gélose sèche est justifiée par une meilleure adhésion, pour éviter les glissements et limiter l'envahissement.

2.2.3.2 - Le milieu doit contenir un agent neutralisant pour éviter que le désinfectant continue d'agir. Il peut également contenir un supplément vitaminique pour favoriser la croissance de toutes les bactéries.

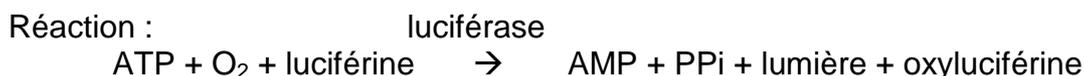
2.2.3.3 – Le critère de performance est la fidélité (reproductibilité et répétabilité) Il faut que la pression et le temps de contact soient toujours identiques.

## 2.2.3.4

N° de la zone	1	2	3	4	5
Niveau de risque	2	2	3	2	2
Surface comptée sur la boîte en cm <sup>2</sup>	150/25 = 6	15/25 = 0,6 (<1)	40/25 = 1,6 (<2)	200/25 = 8	25/25 = 1
Critères retenus	<50	<50	<5	<50	<50

Conclusion : les résultats des analyses sont inférieurs aux critères fixés. Les désinfections ont été correctement effectuées.

2.3.1 - ATPmétrie = quantification des microorganismes par mesure de l'activité métabolique via l'ATP.



Plus la quantité de lumière émise est élevée, plus il y a d'ATP présent au départ, donc plus y a de microorganismes.

## 2.3.2 –

Avantages : méthode rapide, simple d'utilisation, méthode sensible.

Inconvénient : coût plus élevé, résultat non spécifique de microorganismes particuliers.

## 2.3.3.1 –

Hypothèses :

- Le désinfectant peut rester et inhiber la luciférase.
- Le seuil de détection est trop fort.

2.3.3.2 - L'ATPmétrie permet d'estimer de manière rapide et régulière l'efficacité du nettoyage **ou** permet de savoir si le nettoyage est fait ou non **ou** permet de savoir si désinfection nécessaire ou pas.

### **3. Echec de la procédure de nettoyage et de désinfection**

3.1 - Les protéases dégradent les protéines de la viande et la lécithinase dégrade les lipides de la viande.

3.2.1 - Les principaux symptômes du syndrome de gastroentérite sont :  
nausées, vomissements ; maux de ventre ; diarrhées

3.2.2. – Les toxines responsables sont :

- une toxine émétique thermosensible,
- une toxine diarrhéique thermorésistante.

Ces exotoxines protéiques sont à l'origine de la synthèse d'anticorps et ont un haut pouvoir toxique...

3.3.1 -

DDASS = Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales

DSV = Direction des Services Vétérinaires

3.3.2 –

Le changement des habitudes alimentaires avec plus de restauration collectives et l'optimisation des techniques de détection des pathogènes permettent d'expliquer l'augmentation du nombre de cas détectés.

3.4.1 – Un pathogène opportuniste est un microorganisme qui ne cause habituellement pas de maladies mais qui peut devenir pathogène dans certaines conditions, lorsque le système immunitaire est affaibli.

3.4.2 –

Comme exemples de microorganismes responsables de TIAC à incidence élevée en France :

*Staphylococcus aureus* ; *Salmonella*.

## Éléments de corrigé de Biologie Cellulaire et Moléculaire

### 1. Obtention d'un maïs transgénique

#### 1.1.1 - Ultrastructure d'une cellule végétale

1 : Paroi pecto-cellulosique

2 : Membrane plasmique

3 : Vacuole

4 : Cytosol

5 : ribosomes

6 : Réticulum endoplasmique granuleux (REG)

7 : Nucléole

8 : Enveloppe nucléaire

9 : Chromatine (ou nucléoplasme)

10 : Noyau

11 : Chloroplaste

12 : Appareil de Golgi

13 : Mitochondrie

14 : Granule de réserve, vésicule ou lysosome

#### 1.1.2 - Eléments absents de la cellule animale

Paroi, vacuole et chloroplaste sont des éléments spécifiques des cellules végétales.

#### 1.2 – Définition de l'OGM

Organisme vivant (microorganisme, végétal ou animal) ayant subi une modification génétique non naturelle (par intervention de l'homme) dans toutes ces cellules au niveau de ses caractéristiques initiales par suppression ou ajout/remplacement d'au moins un gène.

#### 1.3.1 – Obtention de cellules végétales

Le cal est un ensemble de cellules indifférenciées se multipliant activement

Il est obtenu en culture par dédifférenciation de cellules somatiques. Les cellules ont la propriété de pouvoir redonner après différenciation toutes les cellules de la plante.

Les phytohormones à ajouter au milieu de culture sont l'auxine et la cytokinine en proportions égales (rapport auxine/cytokinine = 1).

#### 1.3.2 – Obtention du vecteur

Un vecteur de transfert est une séquence d'acide nucléique dans laquelle peut être insérée un fragment d'ADN contenant une séquence d'intérêt.

IL est capable de se répliquer de façon autonome et peut être transféré dans une cellule.

La séquence « ori » constitue l'origine de réplication du plasmide, là où peut se fixer l'ADN polymérase.

L'insertion du gène Bt au niveau de l'ADN-T peut se faire par recombinaison grâce à l'utilisation d'enzymes de restriction qui vont catalyser des réactions d'hydrolyse sur des séquences connues et spécifiques sur les deux acides nucléiques (mêmes enzymes pour les deux ADN) et permettre après ouverture de l'ADN plasmidique d'insertion du gène Bt avec ligation.

#### 1.3.3.- Plasmide modifié

Les rôles des séquences appelées promoteur et terminateur permettent l'expression du gène. Sur le promoteur se fixe l'ARN polymérase qui va permettre le début de la transcription avec synthèse d'une molécule d'ARNm complémentaire jusqu'au terminateur (fin de la transcription).

Le promoteur et le terminateur doivent être des séquences reconnues par les enzymes végétales car la transcription a lieu dans la plante.

Le transfert à la cellule végétale de la séquence LB/RB lui confère le gène de résistance à la kanamycine dont la présence peut être vérifiée par culture malgré la présence de cet antibiotique.

## 2. Détection des plants OGM

### 2.1.1

Les sérums polyclonaux sont obtenus par ponction du sang d'un animal immunisé après coagulation et recueil du sérum : ils contiennent différents idiotypes d'anticorps dirigés contre tous paratopes de l'antigène utilisé.

Les sérums monoclonaux contiennent des anticorps produits par un seul clone d'hybridomes spécifique d'un seul épitope.

### 2.1.2 -

L'adjuvant est un composé administré en même temps que l'antigène et qui permet d'augmenter la réponse immunitaire en amplifiant la réaction inflammatoire en intensité et dans le temps (persistance de l'antigène dans les tissus). Un adjuvant couramment utilisé est constitué de sels d'aluminium en médecine humaine et pour l'immunisation animale l'adjuvant de Freund avec hydroxyde d'aluminium.

Le schéma réalisé montrera :

- Pour la réponse primaire (première injection) un temps de latence et la production IgM puis IgG dont le taux diminue.
- Pour la réponse secondaire, le taux d'IgG qui augmente à chaque nouvelle injection de l'antigène

### 2.1.3 –

Les cellules impliquées pour l'obtention d'anticorps monoclonaux sont

- des plasmocytes spécifiques de l'antigène prélevés dans la rate de l'animal immunisé,
- des plasmocytes tumoraux issus de la même espèce.

L'hybridome obtenu par fusion de ces deux types cellulaires a les capacités suivantes :

- production d'anticorps contre l'antigène injecté,
- culture in vitro en lignées continues.

La sélection des « bons » hybridomes se fait grâce à la culture des cellules sur milieu HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine) où seules peuvent proliférer les hybridomes issus de la fusion d'un plasmocyte myélomateux et d'un plasmocyte de la rate de l'animal immunisé :

- possédant l'enzyme HGPRT (Hypoxanthine Guanine Phospho Ribosyl Transférase) (les plasmocytes issus de la rate possèdent l'enzyme HGPRT qui permet la culture sur milieu HAT)
- et ayant la capacité de se constituer en lignées continues (plasmocytes tumoraux ou cellules cancéreuses).

2.2 – La recherche des plantes transgéniques peut se faire par des techniques ELISA pour identifier la protéine toxique produite par les cellules végétales à la condition qu'elle ne soit pas dénaturée ou détruite par les méthodes de transformation des industries agroalimentaires produisant des résultats faussement négatifs.

2.3 – La protéine Bt n'est exprimée qu'au niveau de la partie verte de la plante et donc non retrouvée au niveau des grains de maïs.

## 3. Détection des séquences d'ADN par PCR

3.1 – les trois étapes thermiques définissant un cycle d'amplification sont :

- **La dénaturation** à 94°C qui permet de séparer les deux brins d'ADN.

- **L'hybridation** à 59 °C qui permet la fixation des amorces sur les séquences complémentaires du brin matrice qui délimitent le gène à amplifier.
- **L'élongation** à 72°C grâce à l'ADN polymérase (Taq polymérase) avec la polymérisation des dNTP à partir de chaque amorce pour former un brin antiparallèle complémentaire du brin matrice.

Ces trois étapes formant un cycle se répètent un nombre de fois n (souvent entre 30 et 40) pour aboutir à la synthèse d'environ  $2^n$  molécules d'ADN cible.

### 3.2 -

Les amorces sont des **oligonucléotides**, petites séquences d'ADN simple brin, complémentaires de séquences présentes de chaque côté de l'ADN cible. Elles sont nécessaires à l'ADN polymérase pour démarrer la synthèse du brin complémentaire.

Les amorces spécifiques des OGM permettent l'amplification de séquences spécifiques de l'OGM : amplification du promoteur p35S et/ou terminateur tNOS.

Le jeu d'amorces permettant l'amplification d'un fragment du gène du chloroplaste du photosystème II identifie la présence d'un ADN végétal prouvant ainsi la bonne extraction de l'ADN et donc validant l'éventuelle présence d'ADN spécifique de l'OGM dans l'ADN végétal.

### 3.3 -

L'ADN extrait est placé dans le puits d'un gel immergé dans un tampon placé à la cathode. Le pH du tampon permet une charge négative de l'ADN. Des électrodes présentes dans le tampon vont permettre de générer un champ électrique.

Les molécules d'ADN vont donc migrer plus ou moins rapidement vers l'anode selon leur taille ce qui permet de les séparer.

Le gel d'acrylamide permet d'obtenir des mailles plus fines et donc une résolution plus grande, meilleure séparation de molécules de taille proche.

Le marqueur de poids moléculaire déposé au puits 7 contient des fragments d'ADN de tailles variées et permet donc d'obtenir une échelle de taille et à partir de là, une identification possible des fragments des gènes analysés.

Il peut permettre de donner rapidement une indication de PM ou même de quantifier exactement en traçant la courbe  $\log(p_b) = f(h)$  avec  $h$  = distance parcourue par les molécules à partir du puits de dépôt.

### 3.4-

« couloirs » 1 et 5 : présence d'un spot à 500 pb correspond à la séquence amplifiée d'ADN végétal d'un aliment de contrôle non OGM ou d'un aliment de contrôle OGM positif

« couloir » 6 : présence d'un spot à 200 pb correspond à la séquence d'ADN amplifiée spécifique d'OGM d'un aliment de contrôle OGM positif

« couloir » 2 : pas de spot pour une amplification d'un ADN de plante non OGM avec des amorces reconnaissant la séquence spécifique d'OGM -> ce qui montre une **non contamination**.

L'aliment à tester montre la présence d'ADN végétal (spot à 500 pb du « couloir » 3) ce qui montre une bonne extraction mais aussi la présence de la séquence d'ADN amplifiée spécifique d'OGM (spot à 200 pb du « couloir » 4) : cet aliment contient des cellules génétiquement modifiées.

Le kit utilisé emploie comme amorce pour détecter la séquence d'ADN spécifique OGM des oligonucléotides complémentaires des fragments du promoteur p35S et du terminateur tNOS les plus couramment utilisés pour la construction du plasmide recombinant.

Il en existe d'autres qui ne seront alors pas reconnus par ce kit.

## Éléments de corrigé de Sciences et Technologies Bio Industrielles

### 1 - La farine

1.1.1 - Le broyeur comporte :

- Un système d'alimentation (trémie) convoyant les grains de blé par le haut de l'appareil.
- Des cylindres cannelés tournant à contre sens à vitesse différentes pour broyer les grains
- Une pente pour conduire le blé broyé en sortie

Le fonctionnement se fait par gravité

1.1.2 - Broyage sur des rouleaux

- Tamisage pour séparer les éléments obtenus par granulométrie
- Traitement des parties retenues sur les différents tamis :
  - o Les plus grosses parties à nouveau broyées sur les cylindres dentés
  - o Les parties plus fines broyées sur des cylindres plus resserrés (claquage)
  - o Les parties ultrafines sur des cylindres lisses (convertissage en farine)
- Récupération des gros éléments (sons et remoulages) pour produits animaux.

*Remarques : les réglages concernent les vitesses de rotation des différents cylindres (broyeurs, convertisseurs et claqueurs) ; l'écartement entre deux cylindres est de plus en plus faible du premier au dernier broyeur, de même pour les claqueurs et les convertisseurs.*

1.2.1 - Un grain de blé est constitué de l'amande et de ses enveloppes. C'est la présence ou non d'enveloppes qui conditionne le type de farine.

Le taux d'extraction est la quantité de farine obtenue à partir de 100 Kg de farine. Plus le taux d'extraction est faible, moins il y a d'enveloppe dans la farine.

La détermination de la teneur en cendres, c'est-à-dire la masse du résidu minéral incombustible obtenu après incinération à 900°C exprimé en % de la matière sèche permet un classement des farines selon leur indice de pureté;

Type 55 : farine ne contenant que l'albumen avec un taux d'extraction faible

Type 65 à 150 : présence de plus en plus grande d'éléments de l'enveloppe avec un taux d'extraction de plus en plus élevé.

1.2.2 - Les minéraux sont liés aux enveloppes.

Plus il y a d'enveloppe, plus il y a de minéraux qui ne seront pas calcinés et constitueront les matières sèches.

1.2.3 - La farine type 150 contient plus d'éléments qui peuvent se dénaturer avec le temps comme les protéines et lipides.

Le risque d'oxydation des lipides au cours du stockage explique la durée de conservation plus courte.

1.3.1 - Le gluten est constitué de deux types de molécules protéiques : les gliadines et les gluténines.

Lorsque la farine est hydratée, elles s'associent et forme un réseau souple, élastique et résistant conférant à la pâte les propriétés d'extensibilité, d'élasticité (gonflement) et de ténacité.

1.3.2 - Ce sont les molécules d'eau qui s'associent aux deux molécules protéiques mais aussi l'amidon et les lipides amphiphiles.

## **2 - Les ovoproduits**

2.1 - La DSV est la Direction des Services Vétérinaires, organisme ayant pour mission de contrôler et de certifier dans les domaines de la santé et de la protection des animaux, la sécurité sanitaire des aliments et des installations classées pour la protection de l'environnement.

*Remarque : Depuis janvier 2010, il y a eu regroupement départemental des services de la DDSV et de la DDCCRF (Direction départementale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes) en un organisme la DDPP (Direction Départementale de la Protection des Personnes) ou selon la taille du département la DDCSPP (Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Personnes) qui permet une meilleure coordination des actions par le préfet.*

2.2.1 - Les coquilles des œufs peuvent être le support de prolifération bactérienne alors que le contenu des œufs est stérile.

Le contact entre le contenu et la coquille peut entraîner une contamination du produit.

Le contenu, une fois l'œuf cassé, est en contact avec l'appareillage, l'air ambiant, le personnel.

Il est donc important

- de réaliser un lavage des œufs avant le cassage
- de séparer physiquement les pièces contenant des œufs entiers et celles contenant les contenus
- de respecter la marche en avant du produit
- de surveiller l'hygiène du personnel et des locaux
- de contrôler le nettoyage des appareils
- de réaliser une filtration de l'air dans les zones où sont exposés les œufs cassés
- de réaliser une pasteurisation de la coule pour éliminer la flore pathogène et d'altération.

2.2.2 - La filtration des œufs permet d'éliminer des débris de coquilles ainsi que les membranes et germes.

2.2.3 - Un déchet provient d'un chaîne de fabrication et doit être éliminé : pas de réutilisation possible dans une autre filière

Un sous-produit est un résidu d'une chaîne de fabrication avec une possibilité de réutilisation directe ou dans un process de fabrication d'un autre produit (Ex : Produits finis non conformes, surplus, produits retirés de l'alimentation humaine pour défaut de présentation, emballages abîmés...)

Un co produit est une matière, intentionnelle et inévitable, créée au cours du même processus de fabrication et en même temps que le produit principal répondant comme le produit fini principal à des spécifications de caractéristiques et apte à être utilisé directement pour un usage particulier.

Ex : de coproduits d'IAA : tourteaux d'oléagineux (colza, tournesol, lin), drèches de céréales (blé, orge), pulpes de betterave, fibres et protéines de PdT...

Apparemment, dans cette entreprise, les coquilles sont stockées et non valorisées : elles constituent donc un déchet pour l'entreprise. Elles pourraient être broyées et utilisées pour l'alimentation animale ; ainsi valorisées, elles constitueraient alors un co produit.

2.3.1 - La valeur pasteurisatrice est le temps théorique de chauffage d'un produit à une température constante de référence.

$VP = 30 \times 10^{(70-60)/10} = 30 \times 10^1 = 300$  secondes ou 5 minutes.

Pour avoir une efficacité identique, il faut chauffer 5 min à 60°C ou 30 secondes à 70°C.

2.3.2 - Z est le facteur de réduction décimale, c'est l'augmentation de température nécessaire pour diviser par 10 le temps de réduction décimale (de diminuer le temps de traitement d'1/10 en obtenant la même réduction de population).

La valeur de z dépend des conditions physicochimiques : humidité, pression ...

Mais aussi de la forme bactérienne à traiter : forme végétative ou forme sporulée

2.3.3 - Le temps de réduction décimale D à la température T = 70°C peut être calculé à partir du temps de réduction décimale à la température de référence 60°C et de z par la formule suivante :

$$D_T = D_{T_{ref}} \times 10^{(T_{ref}-T)/z}$$

L'application numérique donne :  $D_{70} = D_{60} \times 10^{(60-70)/10} = 2,5 \times 10^{-1} = 0,25$  min = 15 secondes.

Donc à 70°C, la durée de traitement pour réduire la population de cellules vivantes d'un facteur 10 est de 15 secondes.

2.3.4 - Le taux de réduction décimale n est donné par la formule :  $T_{70}=n \times D_{70}$

D'où  $n = 30/15 = 2$ .

La charge initiale est de  $10^3$  bactéries/g. Comme  $n = 2$ , la charge résiduelle est diminuée de  $10^{-2}$  donc est

$$10^3 \times 10^{-2} = 10 \text{ bactéries/g}$$

Cette valeur est inférieure à  $10^2$ /g donc le traitement thermique est bien adéquat.

2.3.5.1 - Le graphe représente l'évolution de la température en fonction du temps.

Il y a une montée en température jusqu'à 70°C puis un palier pendant 30 secondes qui correspond au temps d'application du barème de pasteurisation. Le refroidissement est rapide après la pasteurisation car la baisse de température se réalise en moins d'une heure.

Ce graphe permet de vérifier le couple temps-température (70°C ; 30 sec) c'est-à-dire le barème de pasteurisation.

2.3.5.2 - Cette procédure correspond à un enregistrement des paramètres d'une opération unitaire : c'est un élément du système documentaire garantissant la traçabilité du produit pour prouver que le produit fini a été traité correctement en cas de contrôles.

2.3.6.1 - Deux organismes, l'un français et l'autre international, publiant des normes :

AFNOR Association Française de Normalisation

ISO : International Organisation for Standardization

2.3.6.2 - Essentiellement : *Salmonella* (dont Typhimurium et *enteritidis*) *Staphylococcus aureus*....

### **3 - Conditionnement et contrôle des sandwiches**

3.1 - L'objectif de la mise sous atmosphère modifiée est d'augmenter la durée de conservation par préservation des qualités nutritionnelles par l'élimination de l'oxygène.

3.2 - L'azote N<sub>2</sub> est un gaz neutre servant de remplissage (remplaçant le dioxygène)

Le CO<sub>2</sub> à concentration supérieure à 20% exerce un effet bactériostatique et fongistatique.

Le CO<sub>2</sub> soluble dans la phase aqueuse entraîne une baisse de pH et donc une acidification de l'aliment.

3.3 - Les propriétés des matières plastiques utilisées dans les emballages alimentaires de ce type (sous atmosphère modifiée) :

- Imperméabilité bidirectionnelle aux gaz et à la vapeur d'eau.
- Imperméabilité aux bactéries pour éviter toute contamination.
- Résistance mécanique à la soudure (pelabilité pour faciliter l'ouverture)
- Transparence
- Répondant aux principes d'inertie

3.4 – Les différents contrôles à mener :

- Contrôle de l'étanchéité des barquettes
- Contrôle de l'étiquetage : température de conservation, DLC
- Contrôle de l'opercutage

3.5 – Critères pour établir un contrôle des lots sont les suivants :

- Déterminer l'effectif de l'échantillon représentatif (nombre d'individus à prélever selon la taille du lot)
- Réaliser les prélèvements au hasard (tous les individus du lot doivent avoir la même probabilité d'être prélevés)
- Définir la fréquence des contrôles
- Définir un plan de prélèvement avec un critère d'acceptation, un critère de refus.

Le NQA est le Niveau de Qualité Acceptable, c'est à dire le nombre ou proportion maximum p d'individus défectueux d'un lot qui peut être considéré comme satisfaisant

3.6 -

Les 5M sont Matières premières, Méthodes, Main d'œuvre, Matériel et Milieu :

- Matières premières : cahier des charges avec les fournisseurs (pain, ovoproduits, emballage) avec contrôle à la réception, contrôle de la température et de la durée de stockage.
- Méthodes : testées et adaptées au process, contrôlées régulièrement ici préparation des sandwiches rapidement conditionnés
- Main d'œuvre : formation et information du personnel sur l'hygiène (lavage des mains, tenue), les procédures et le process de fabrication
- Matériel : conforme, maintenu en état, nettoyé et désinfecté selon procédures écrites, contrôlées et vérifiées
- Milieu : hygiène des locaux de préparation avec plan de nettoyage désinfection, hygrométrie, pression, température

QQOQCP Qui ? Quand ? Où ? Quoi ? Comment ? Pourquoi ?

- Qui ? affectation des personnels à identifier précisément et à surveiller
- Quand ? calendrier de fréquence
- Où ? description des locaux concernés par le plan
- Quoi ? précision des surfaces soumises à l'activité de nettoyage désinfection
- Comment ? rédaction de procédure de nettoyage (produits, concentration à utiliser, température, action mécanique, rinçage ...)
- Pourquoi ? prévenir tout risque de contamination microbiologique