

---

# ANNALES

# BTS BIOANALYSES

# ET CONTRÔLES

Sessions 2012 et 2013

Avec éléments de corrigés

Les sujets des annales du BTS Bio Analyses et Contrôles 2012 et 2013 ont été collectés et mis en page par Michèle ROBLIN, Catherine POCHET, et Jean-Noël JOFFIN. Les sujets technologiques 2012 ont été fournis sous forme numérisée par Monsieur Jean-Pascal DUMON (IGEN), que nous remercions pour sa collaboration.

Nous remercions également les nombreux professeurs de l'enseignement technologique et général qui ont participé à la collecte des sujets, aux relectures et propositions de corrigés, en particulier : Mesdames Martine BADOU, Catherine BARDIAUX, Christine BENAYOUN, Isabelle CHRETIEN, Lydie NOSSEREAU, Marie WURSTEISEN, Messieurs Bruno DURAND, Thierry MERCIER et André Le TEXIER.

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

Photographie de couverture : *Cellules de cancer du colon*  
par Baptiste Becquet- Étudiant en STS Bioanalyses et Contrôles à Caen

# TABLE DES MATIÈRES

---

## Session 2012

Sujet de mathématiques 2012 .....	1
Sujet de sciences physiques et chimiques 2012 .....	3
Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2012.....	9
Sujet de microbiologie et de technologies d'analyse 2012 .....	19
Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et de technologies d'analyse 2012.....	25
Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2012 .....	29
Techniques de biochimie 2012.....	35
Techniques de microbiologie 2012 .....	43
Techniques de biologie cellulaire et moléculaire 2012.....	50

## Session 2013

Sujet de mathématiques 2013 .....	56
Sujet de sciences physiques et chimiques 2013 .....	60
Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2013.....	66
Sujet de microbiologie et technologies d'analyse 2013 .....	74
Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse 2013.....	82
Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2013 .....	88
Techniques de biochimie 2013.....	94
Techniques de microbiologie 2013 .....	104
Techniques de biologie cellulaire et moléculaire 2013.....	118

## Corrigés 2012

Éléments de corrigé de mathématiques 2012 .....	126
Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2012 .....	130
Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2012.....	135
Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2012.....	138
Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2012 .....	141
Éléments de corrigé de sciences et technologies bioindustrielles 2012 .....	144

## Corrigés 2013

Éléments de corrigé de mathématiques 2013 .....	146
Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2013 .....	150
Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2013.....	153
Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2013 .....	156
Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2013 .....	160
Éléments de corrigé de sciences et technologie bioindustrielles 2013 .....	162

## RÈGLEMENT D'EXAMEN

			Voie scolaire, apprentissage, formation professionnelle continue dans les établissements publics, privés non habilités, enseignement à distance et candidats justifiant de 3 ans d'expérience professionnelle	Formation professionnelle continue dans les établissements publics habilités	
Épreuves	Unités	Coef	Forme	Durée	Forme
<b>E1 Anglais</b>	U10	<b>2</b>	CCF 2 épreuves en fin de deuxième année		2 situations d'évaluation
<b>E2 Mathématiques et Sciences physiques et chimiques</b>		<b>5</b>	ponctuelle écrite	4h	2 situations d'évaluation
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 technologie d'analyses</b>		<b>9</b>	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 bio-industrielles</b>	U40	<b>3</b>	ponctuelle écrite	2h	2 situations d'évaluation
<b>E5 techniques d'analyses et de contrôles et opérations unitaires</b>		<b>10</b>		2X12h maxi	
Sous-épreuve de techniques de biochimie	U51	4	CCF 2 épreuves en fin de première et deuxième année	4 h maxi	ponctuelle pratique
Sous-épreuve de techniques de microbiologie	U52	4	CCF 2 épreuves en fin de première et deuxième année	6 h maxi	ponctuelle pratique
Sous-épreuve de techniques de biologie cellulaire et moléculaire	U53	2	CCF 2 épreuves en fin de première et deuxième année	3h maxi	ponctuelle pratique
<b>E6 Soutenance de projet</b>	U60	<b>4</b>	ponctuelle orale	45 min	1 situation d'évaluation
<b>Épreuve facultative : langue vivante étrangère</b>	UF1	<b>1</b> (points au-dessus de la moyenne)	ponctuelle orale	20 min	ponctuelle orale



# Sujet de mathématiques 2012

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. *Une feuille de papier millimétré est fournie.*

## EXERCICE 1 (11 points)

Cet exercice propose l'étude de la contamination accidentelle d'un cours d'eau par un polluant.

La partie B est consacrée à l'étude d'une fonction qui permet d'exprimer, dans la partie C, la concentration de polluant dans l'eau en fonction du temps.

**Les deux premières parties de l'exercice peuvent être traitées de façon indépendante.**

### A. Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) :  $y' + 0,25y = 3e^{-t}$ , 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 ( $E_0$ ) :  $y' + 0,25y = 0$
- 2 - Soit  $h$  la fonction définie sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  par :  $h(t) = -4e^{-t}$ . 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 vérifie la condition initiale :  $f(0) = 75$

### B. Étude d'une fonction et calcul intégral

Soit  $f$  la fonction définie sur l'intervalle  $[0; +\infty[$  par :  $f(t) = 79e^{-0,25t} - 4e^{-t}$

On désigne par  $C$  la courbe représentative de la fonction  $f$  dans un repère orthogonal  $(O; \vec{i}; \vec{j})$ .

**Sur l'axe des  $x$  l'unité est : 0,5 cm. Sur l'axe des  $y$  l'unité est : 0,25 cm.**

- 1 - Déterminer la limite de la fonction  $f$  en  $+\infty$ . Que peut-on en déduire pour la courbe  $C$  ?
- 2 - a) Démontrer que pour tout  $t$  appartenant à l'intervalle  $[0; +\infty[$  :  $f'(t) = e^{-0,25t}(-19,75 + 4e^{-0,75t})$   
 b) Justifier que pour tout  $t$  appartenant à l'intervalle  $[0; +\infty[$  :  $-19,75 + 4e^{-0,75t} < 0$   
 c) En déduire le signe de  $f'(t)$  et le sens de variation de la fonction  $f$  sur l'intervalle  $[0; +\infty[$ .
- 3 - a) Compléter, après l'avoir reproduit sur la copie, le tableau de valeurs suivant dans lequel **les valeurs de  $f(t)$  seront arrondies au dixième.**

$t$	0	5	10	15	20	25
$f(t)$		22,6		1,9	0,5	

- b) Construire la courbe  $C$  sur une feuille de papier millimétré.
- 4 - a) Démontrer que la valeur moyenne de la fonction  $f$  sur l'intervalle  $[0, 20]$  est :

$$V_m = \frac{1}{20}(-316e^{-5} + 4e^{-20} + 312)$$

- b) Donner la valeur approchée de  $V_m$  arrondie au dixième.

### C. Exploitation des résultats de la partie B

On admet que,  $t$  semaines après la contamination, la concentration de polluant dans l'eau, exprimée en milligramme par litre, est  $\frac{1}{3} f(t)$ , où  $f$  est la fonction étudiée dans la partie B.

1 - La baignade est sans danger lorsque la concentration de polluant dans l'eau est inférieure ou égale à 2,5 milligrammes par litre. En utilisant la courbe C construite au 3° b) de la partie B, déterminer au bout de combien de semaines la baignade peut être autorisée.

Laisser apparents les traits utiles sur le graphique.

2 - Quelle est la valeur moyenne, au cours des 20 semaines suivant la contamination, de la concentration de polluant dans l'eau ?

## EXERCICE 2 (9 points)

Toutes les parties de cet exercice peuvent être traitées de façon indépendante.

### A. Probabilités conditionnelles

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

À la suite d'une campagne de vaccination lancée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour lutter contre une pandémie, on estime que, dans une population donnée, il ne reste plus 1% de personnes non vaccinées.

D'après une étude, on estime également que 95% des personnes vaccinées sont immunisées contre le virus de la pandémie et que 20% des personnes non vaccinées sont naturellement immunisées contre ce virus.

On choisit au hasard une personne dans la population concernée.

On note  $A$  l'événement « la personne choisie est vaccinée »,

et  $B$  l'événement « la personne choisie est immunisée contre le virus ».

1 - Montrer que la probabilité que la personne choisie soit immunisée contre le virus est égale à 0,9425.

2 - Calculer la probabilité que la personne choisie ait été vaccinée sachant qu'elle est immunisée contre le virus. Arrondir au millième.

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

On admet que 1% des personnes d'une population donnée n'a pas été vaccinée.

On prélève au hasard 400 personnes de cette population. L'effectif de la population est assez important pour que l'on puisse assimiler ce prélèvement à un tirage avec remise de 400 personnes.

On considère la variable aléatoire  $X$  qui, à tout prélèvement de 400 personnes, associe le nombre de personnes de ce prélèvement n'ayant pas été vaccinées.

1 - Justifier que la variable  $X$  suit une loi binomiale et préciser les paramètres de cette loi.

2 - Calculer la probabilité qu'un prélèvement de 400 personnes contienne au plus une personne non vaccinée. Arrondir au millième.

3 - On admet que la loi de  $X$  peut être approchée par une loi de Poisson.

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

b) On désigne par  $X_1$  une variable aléatoire suivant la loi de Poisson de paramètre  $\lambda$ , où  $\lambda$  a la valeur obtenue au a).

Calculer une valeur approchée de  $P(X_1 > 5)$  arrondie au millième.

Interpréter le résultat obtenu dans le contexte de l'exercice.

### C. Approximation d'une loi binomiale par une loi normale

On estime que 20% des personnes non vaccinées sont naturellement immunisées contre le virus. Parmi les personnes non vaccinées, on prélève au hasard 200 personnes.

On considère la variable aléatoire  $Y$  qui, à tout prélèvement de 200 personnes parmi les personnes non vaccinées, associe le nombre de personnes de ce prélèvement qui ne sont pas immunisées contre le virus.

On admet que  $Y$  suit la loi binomiale de paramètres 200 et 0,8.

1 - On considère que la loi suivie par  $Y$  peut être approchée par une loi normale.

Montrer que les paramètres de cette loi normale sont :

$m = 160$  et  $\sigma \approx 5,66$  (valeur de  $\sigma$  arrondie au centième).

2 - On désigne par  $Y_1$  une variable aléatoire suivant la loi normale de paramètres  $m = 160$  et  $\sigma = 5,66$ .

On souhaite calculer la probabilité qu'il y ait, dans un prélèvement de 200 personnes, entre 155 et 165 personnes non immunisées contre le virus en utilisant la loi de  $Y_1$  et en tenant compte de la correction de continuité.

Pour cela, calculer une valeur approchée de  $P(154,5 \leq Y_1 \leq 165,5)$  arrondie au centième.

# Sujet de sciences physiques et chimiques 2012

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

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

## A. SPECTROPHOTOMÉTRIE (15 points)

Le rouge Ponceau 4R, appelé également rouge cochenille A ou coccine nouvelle est le colorant alimentaire de code européen E124. Son usage est toujours répandu, notamment en pâtisserie pour la fabrication des macarons. Très soluble dans l'eau, il peut être dosé en solution aqueuse par spectrophotométrie.

Comme les autres colorants azoïques (colorants synthétiques produits par diazotation), le rouge Ponceau est soupçonné depuis les années 1970 d'augmenter les risques d'hyperactivité chez les enfants.

Une étude publiée en 2007 a provoqué une évolution de la législation, même si ses conclusions sont controversées : depuis le 20 juillet 2010, les fabricants sont tenus d'indiquer au consommateur qu'un tel colorant « peut avoir des effets indésirables sur l'activité et l'attention chez les enfants ».

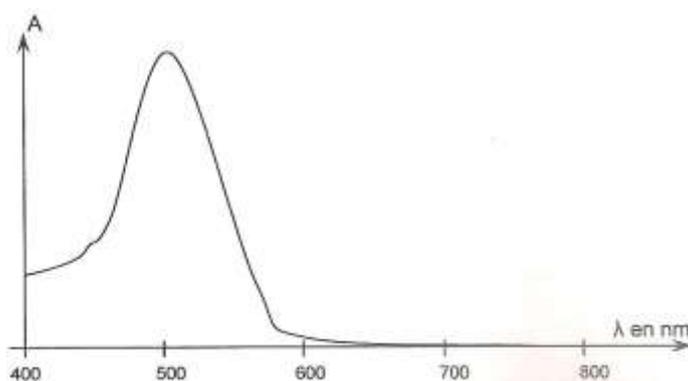
Les industriels et les artisans cherchent d'autres espèces chimiques qui pourraient remplacer ces colorants azoïques.

L'exercice a pour but de déterminer la teneur d'un macaron en rouge Ponceau afin de vérifier s'il est conforme à la législation en vigueur.

### 1 – Spectre d'absorption du rouge Ponceau

Le spectrophotomètre est un appareil de mesure permettant de relever l'absorbance  $A$  d'une solution homogène colorée. Il utilise une source polychromatique permettant de mesurer, pour différentes longueurs d'onde  $\lambda$ , la valeur de l'absorbance  $A$  de la solution étudiée.

L'étude d'une solution de rouge de ponceau permet d'obtenir le spectre d'absorption représenté ci-dessous.



1.1 - Le spectrophotomètre utilise une source de lumière polychromatique.

Comment appelle-t-on la partie de cet appareil permettant de sélectionner la longueur d'onde  $\lambda$  qui traverse ensuite la cuve d'échantillon ?

1.2 - Quel élément de cet appareil permet de réaliser la dispersion de la lumière en radiations monochromatiques ?

1.3 - En utilisant le spectre donné ci-dessus, quelles sont les couleurs absorbées par la solution de rouge de Ponceau ? Justifier alors la couleur de la solution de ce colorant éclairé en lumière blanche

1.4 - Pour doser par spectrophotométrie le rouge de Ponceau, on fixe la longueur d'onde d'étude à la valeur  $\lambda = 507 \text{ nm}$ , correspondant au maximum d'absorbance. Pourquoi doit-on choisir cette longueur d'onde ?

## 2 - Loi de Beer-Lambert

2.1 - Écrire l'expression littérale de la relation traduisant cette loi et expliciter chaque grandeur.

2.2 - Indiquer pour chaque grandeur l'unité du système international.

2.3 - Cette loi exprime une proportionnalité. Dans quelle gamme d'absorbance doit-on travailler ? Expliciter.

## 3 - Dosage spectrophotométrique du rouge Ponceau contenu dans un macaron

Un macaron est lyophilisé puis réduit en poudre dans un mortier. Après solvatation et filtration sur Büchner on obtient 25 mL de filtrat. On considère que la totalité du rouge Ponceau du macaron est bien récupérée dans cette solution aqueuse.

On remplit avec ce filtrat une cuve de longueur  $L = 1,0 \text{ cm}$  et on mesure son absorbance  $A = 0,94$ .

Cette valeur appartient au domaine de linéarité.

3.1 - Donner l'expression littérale de la concentration molaire  $C$  en rouge Ponceau dans le filtrat.

Calculer sa valeur numérique. Le coefficient d'absorption linéique molaire a pour valeur  $\epsilon_\lambda = 2,5 \cdot 10^3 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ .

3.2 - Montrer que la concentration massique en rouge ponceau dans le filtrat vaut :  $c = 23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Masse molaire du rouge Ponceau :  $M = 604 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

3.3 - Déterminer la masse du rouge Ponceau dans la totalité du filtrat.

3.4 - La législation impose de ne pas dépasser 50 mg par kilogramme d'aliment. Le macaron a une masse de  $m = 15 \text{ g}$  : la réglementation est-elle respectée dans ce cas ?

## B. MICROSCOPE (15 points)

« L'invention du microscope à la fin du XVII<sup>e</sup> siècle ouvrit la voie à l'exploration de la structure des organismes vivants à une échelle inaccessible à l'œil nu. [...] Il a fallu attendre le début du XIX<sup>e</sup> siècle et le perfectionnement de l'optique des microscopes pour que l'accumulation des observations faites forme la base d'une théorie unificatrice : la théorie cellulaire ».

D'après Michel Serres et Nayla Farouki, *Dictionnaire des sciences*, Flammarion.

Une des menaces pour la santé mondiale est l'apparition de souches de bactéries résistantes aux traitements, comme l'a montré la contamination entérohémorragique par *Escherichia coli* qui, partie d'Allemagne, a causé plusieurs dizaines de victimes à travers toute l'Europe au printemps 2011.

On se propose ici d'étudier le microscope dont les caractéristiques techniques sont données ci-dessous et de prévoir s'il est utilisable pour observer la bactérie *Escherichia coli* que l'on notera *E. coli*.

### Notations :

Objectif et oculaire sont modélisés par deux lentilles minces, respectivement  $L_1$  et  $L_2$ , de centres optiques  $O_1$  et  $O_2$ .

Les distances focales de l'objectif et de l'oculaire sont respectivement :  $f_1' = \overline{O_1 F_1'}$  et  $f_2' = \overline{O_2 F_2'}$

L'intervalle optique entre les deux lentilles, noté  $\Delta$ , est la distance qui sépare le foyer image  $F_1'$  de l'objectif du foyer objet  $F_2$  de l'oculaire :  $\Delta = \overline{F_1' F_2}$

L'angle sous lequel est observé AB à l'œil nu (angle apparent ou diamètre apparent), est noté  $\theta$ .

L'objet est observé à travers le microscope par un œil normal sans accommodation ; on dit qu'il y a « vision à l'infini ». Dans ces conditions, l'objet à observer sera noté AB, son image intermédiaire  $A_1B_1$  et l'image finale  $A'B'$  ; l'angle sous lequel est observée l'image finale  $A'B'$ , est noté  $\theta'$ . L'indice de réfraction du milieu considéré est noté  $n$ .

**Données :**

- Grandissement de l'objectif:  $\left| \gamma_{obj} \right| = \frac{A_1B_1}{AB} = 50$ , pour la vision à l'infini.
- Ouverture numérique de l'objectif :  $n \times \sin u = 0,70$ .
- Grossissement commercial de l'oculaire :  $G_{oc}=20$ .
- Intervalle optique :  $\Delta = 16 \text{ cm}$ .
- Taille de *E. coli* :  $AB = 1 \mu\text{m}$ .
- Pour des petits angles exprimés en radians, on peut utiliser l'approximation :  $\tan \theta = \theta$
- Pouvoir de résolution de l'œil :  $3 \times 10^{-4} \text{ rad}$ .
- Grossissement commercial du microscope:  $G_c = \frac{\theta'}{\theta} = \left| \gamma_{obj} \right| \times G_{oc}$
- Pouvoir de résolution du microscope:  $\varepsilon = \frac{0,6 \times \lambda}{n \times \sin u}$

## 1 - Observation à l'œil nu

L'œil de l'expérimentateur est emmétrope, c'est-à-dire qu'il peut voir nettement un objet situé de l'infini à la distance minimale  $d_m = 25 \text{ cm}$ .

- 1.1 - Calculer l'angle  $q$  sous lequel est vue *E. coli* lorsqu'elle est placée à la distance  $d_m$  de l'œil.
- 1.2 - Montrer que la bactérie n'est pas visible à l'œil nu.

## 2 - Vision à l'infini

On veut que le microscope soit réglé pour que l'image finale soit rejetée à l'infini.

- 2.1 - Quel est l'intérêt d'un tel réglage ?
- 2.2 - Convient-il à toute vision sans correction ?
- 2.3 - Ou doit se former l'image intermédiaire  $A_1B_1$  pour que cette condition soit vérifiée ?

## 3 - Grandissement du microscope

3.1 - Faire un schéma sans respect d'échelle du microscope permettant de comprendre son fonctionnement pour une vision à l'infini. On tracera la marche de deux rayons lumineux particuliers.

3.2 - En utilisant le schéma de la question précédente, montrer que le grandissement de l'objectif, dans les conditions de vision à l'infini, peut s'exprimer par  $\left| \gamma_{obj} \right| = \frac{\Delta}{f_1}$  où  $f_1$  représente la distance focale de l'objectif et

$\Delta$  l'intervalle optique.

3.3 - Calculer alors la distance focale  $f_1$  de l'objectif puis sa vergence  $C_1$ .

## 4 - Observation de la bactérie

- 4.1 - Calculer le grossissement commercial  $G_c$  du microscope et en déduire l'angle  $\theta'$  sous lequel est vu *E. coli* à travers cet instrument.
- 4.2 - Cette bactérie est-elle maintenant visible ?

## 5 - Pouvoir de résolution du microscope

La diffraction de la lumière à travers l'objectif limite l'utilisation du microscope. On définit ainsi le pouvoir de résolution du microscope noté  $\varepsilon$ .

5.1 - Pour une longueur d'onde  $\lambda = 500$  nm, calculer  $\varepsilon$ . En déduire si *E. coli* est observable à travers cet instrument.

5.2- Pourquoi l'observation de bactéries de taille beaucoup plus petite nécessite-t-elle d'immerger l'objectif dans un bain d'huile ?

## C. ÉTUDE DE L'ACIDE BENZOÏQUE ET DU BENZOATE DE SODIUM (15 points)

L'acide benzoïque et son sel le benzoate de sodium ont des propriétés fongicides et antibactériennes.

L'industrie les utilise comme conservateurs dans de nombreux produits cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires (notamment dans les boissons gazeuses).

Dans la nature, l'acide benzoïque est présent, par exemple, dans la propolis (sous-produit du miel) et dans les canneberges (arbustes à baies rouges comestibles).

Cet exercice se propose d'étudier certaines propriétés chimiques de ces deux espèces.

<u>Données à 25°C</u>	Acide benzoïque	Benzoate de sodium
Formule semi-développée	$C_6H_5-COOH$	$C_6H_5-COONa$
Masse molaire	$122 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$144 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Solubilités dans l'eau	Très peu soluble $s = 2,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	Très soluble $s = 650 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

- $pK_a$  du couple ( $C_6H_5-COOH / C_6H_5-COO^-$ ) = 4,2
- Produit ionique de l'eau  $K_e = 10^{-14}$

### Les 3 parties sont indépendantes

#### 1 - Étude d'un soda

L'étiquette d'une bouteille de boisson « light » indique la présence du conservateur E210, qui est le code européen de l'acide benzoïque.

1.1 - Sur une échelle de pH, représenter les domaines de prédominance de l'acide benzoïque ( $C_6H_5-COOH$ ) et de l'ion benzoate ( $C_6H_5-COO^-$ ).

1.2 - Le pH de cette boisson vaut 3,0.

En déduire le constituant du couple  $C_6H_5-COONH / C_6H_5-COO^-$  qui est majoritaire dans cette boisson.

1.3 - Donner l'expression littérale du rapport  $\frac{[C_6H_5-COO^-]}{[C_6H_5-COOH]}$

1.4 - Calculer la valeur de ce rapport et vérifier que le résultat numérique obtenu est cohérent avec la réponse de la question 1-2.

## 2 - Étude d'une solution d'acide benzoïque

On prépare une solution aqueuse d'acide benzoïque ( $C_6H_5-COOH$ ), notée ( $S_1$ ), de concentration molaire  $C_1$  égale à  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ .

- 2.1** - Après avoir calculé la solubilité de l'acide benzoïque en  $\text{mol} \cdot L^{-1}$ , indiquer si la solution ( $S_1$ ) est saturée. Expliquer.
- 2.2** - Écrire l'équation de la réaction chimique de l'acide benzoïque avec l'eau.
- 2.3** - Établir l'expression du pH de la solution ( $S_1$ ) puis le calculer. Commenter le résultat et vérifier les hypothèses formulées.

## 3 - Étude d'une solution de benzoate de sodium

On dispose d'une solution aqueuse de benzoate de sodium ( $C_6H_5-COO^- + Na^+$ ), notée ( $S_2$ ). On y ajoute un peu d'acide chlorhydrique concentré ( $H_3O^+ + Cl^-$ ), de telle sorte que l'acide chlorhydrique soit en défaut par rapport au benzoate de sodium. Un précipité blanc apparaît.

- 3.1** - Écrire l'équation de la réaction chimique mise en jeu lors de l'ajout de la solution d'acide chlorhydrique.
- 3.2** - Étude de l'équilibre associé à la réaction chimique.
- 3.2.1** - Donner l'expression littérale de la constante d'équilibre  $K$  associée à cette réaction en fonction de  $K_a$ .
- 3.2.2** - Calculer la valeur de la constante d'équilibre  $K$ . Conclure.
- 3.3** - Étude du produit solide obtenu.
- 3.3.1** - Nommer le précipité observé.
- 3.3.2** - Interpréter qualitativement sa formation.
- 3.4** - On titre la solution obtenue et on mesure son pH. Celui-ci vaut 4,2.
- 3.4.1** - Quelle propriété possède la solution titrée ainsi obtenue? Proposer une justification.
- 3.4.2** - Exploiter cette propriété.

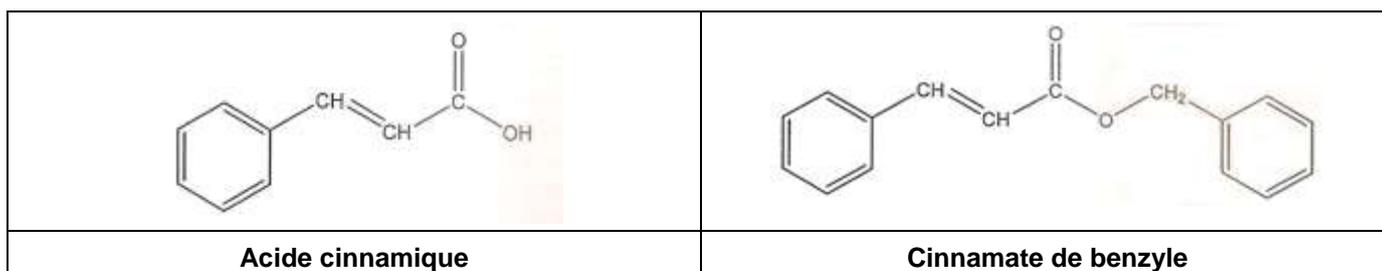
## D. SYNTHÈSE DU CINNAMATE DE BENZYLE (15 points)

Les allergies de contact aux produits cosmétiques sont très courantes et peuvent entre autres provoquer de l'eczéma. Dans 45 % des cas, ces allergies sont dues aux parfums contenus dans le produit cosmétique (viennent ensuite les conservateurs avec 21 % et les émulsifiants avec 10 %).

Pour savoir si un sujet est allergique au parfum, les médecins utilisent entre autres, sous forme de patch, le baume du Pérou.

Ce baume du Pérou, doté de propriétés aromatisantes et antibactériennes, est la sève extraite du tronc d'un arbre d'Amérique centrale. Elle contient plusieurs centaines de constituants dont certains, comme le cinnamate de benzyle, utilisé dans l'industrie cosmétique, sont allergènes.

Cet exercice propose d'étudier quatre étapes de la synthèse du cinnamate de benzyle à partir de l'acide cinnamique. Les formules semi-développées de ces deux composés sont données ci-dessous :



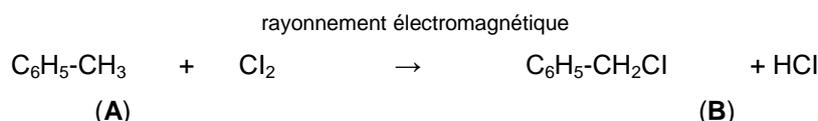
## 1 - Première étape

L'action du chlorométhane  $\text{CH}_3 - \text{Cl}$  sur le benzène conduit à la formation d'un composé **(A)** de formule semi-développée  $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_3$ .

- 1.1 - Écrire l'équation de la réaction mise en jeu lors de la formation de **(A)**.
- 1.2 - Donner le nom et la formule d'un catalyseur fréquemment utilisé.
- 1.3 - Détailler les différentes étapes du mécanisme de cette transformation chimique.
- 1.4 - Si l'on ne prend pas suffisamment de précaution, on obtient fréquemment des produits secondaires de formule brute  $\text{C}_8\text{H}_{10}$ . Donner les formules semi-développées des deux produits les plus probables. Justifier leur formation.

## 2 - Deuxième étape

Le composé **(A)** réagit avec le dichlore en présence d'un rayonnement électromagnétique pour donner le composé **(B)** selon le schéma réactionnel ci-dessous :



- 2.1 - Parmi les termes suivants, choisir celui (ou ceux) qui caractérise(nt) la transformation étudiée:  
addition - électrophile - élimination - nucléophile - radicalaire - substitution
- 2.2 - Quel est le mode d'action du rayonnement électromagnétique? Proposer un type de rayonnement adapté.

## 3 - Troisième étape

Le composé **(B)** réagit avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ( $\text{Na}^+ + \text{HO}^-$ ) pour donner le composé **(C)** de formule brute  $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$ .

- 3.1 - Écrire l'équation de la réaction mise en jeu lors de la formation du composé **(C)**.
- 3.2 - Indiquer pourquoi l'ion hydroxyde  $\text{HO}^-$  peut être considéré comme une espèce nucléophile.
- 3.3 - Nommer la fonction organique oxygénée présente dans le composé **(C)** ainsi que la classe de cette fonction.

## 4 - Quatrième étape

Le composé **(C)** réagit avec l'acide cinnamique en présence d'acide sulfurique pour donner le cinnamate de benzyle.

- 4.1 - Nommer la nouvelle fonction organique présente dans le cinnamate de benzyle.
- 4.2 - Écrire l'équation de la réaction mise en jeu lors de la formation du cinnamate de benzyle.
- 4.3 - Nommer cette réaction.
- 4.4 - Cette réaction présente un rendement faible. Donner une explication succincte.
- 4.5 - Proposer deux façons d'augmenter le rendement de cette quatrième étape de la synthèse.

# Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2012

## LA $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASE : APPLICATION À LA PRODUCTION DE PRÉBIOTIQUES

Les fructo-oligosaccharides (FOS), exemples de prébiotiques, sont des glucides trouvés dans la nature (banane, oignon, tomate) qui, lorsqu'ils sont consommés, contribuent à apporter de nombreux bénéfices pour la santé (action sur la flore intestinale). On cherche actuellement à les produire par voie enzymatique, par exemple à l'aide de la  $\beta$ -fructofuranosidase (FFase).

Dans ce but, on se propose de purifier et de caractériser la FFase, en vue d'une production industrielle de FOS.

### 1 - Activités enzymatiques de la $\beta$ -fructofuranosidase (FFase) (27,5 points)

Selon la nomenclature internationale, la  $\beta$ -fructofuranosidase (FFase) est appelée EC 3.2.1.26. Elle est plus communément connue sous les noms d'invertase et de saccharase.

Elle est répertoriée dans les cultures de moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*) et de levures (*Saccharomyces*, *Rhodotorulla*).

La FFase présente deux types d'activité :

- une activité fructofuranosidase (FA) qui catalyse l'hydrolyse des  $\beta$ -D-fructofuranoses situés à l'extrémité non réductrice de  $\beta$ -D-fructofuranosides (le plus simple de ces substrats est le saccharose),
- une activité fructosyl-transférase (FTA), encore appelée transfructosylase.

#### 1.1 - L'activité fructofuranosidase (FA) de la FFase (7 points)

1.1.1 - À quelle classe enzymatique appartient la FFase ?

1.1.2 - Écrire la réaction enzymatique catalysée par la FFase lorsque le substrat est du saccharose (formules exigées en représentation de Haworth).

1.1.3 - Pourquoi est-elle appelée également invertase ?

**Données :**  $[\alpha]_D^{20}$  saccharose = + 66,5° .cm<sup>3</sup> .g<sup>-1</sup> .dm<sup>-1</sup>

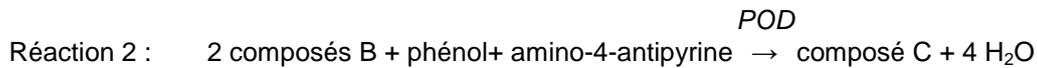
$[\alpha]_D^{20}$  glucose = + 52,7° .cm<sup>3</sup> .g<sup>-1</sup> .dm<sup>-1</sup>

$[\alpha]_D^{20}$  fructose = - 92,2° .cm<sup>3</sup> .g<sup>-1</sup> .dm<sup>-1</sup>

#### 1.2 - Dépistage de la FFase dans les cultures de moisissures (10,5 points)

Un test colorimétrique indirect a été développé (**document 1**) pour mettre en évidence la présence de FFase dans les cultures de différentes souches d'*Aspergillus* ou d'*Aureobasidium*. Il est basé sur la détection du fructose et du glucose.

**1.2.1** - Compléter les réactions biochimiques mises en jeu lors de la détection du glucose, en précisant la nature des composés A, B et C.



**1.2.2** - Préciser la réaction indicatrice et la réaction principale. Justifier la réponse.

**1.2.3** - Quelles sont les conditions opératoires généralement respectées pour la détermination d'une activité enzymatique.

**1.2.4** - Le **document 1** détaille le test de dépistage de la FFase dans les cultures de moisissures.

**1.2.4.1** - Indiquer le(s) rôle(s) du contrôle négatif. Préciser le résultat attendu.

**1.2.4.2** - Expliquer la présence d'un halo violet lors d'une réaction positive.

**1.2.4.3** - Interpréter les résultats obtenus à partir des différentes souches de moisissures. Conclure.

### 1.3 - L'activité fructosyl-transférase (FTA) de la FFase : test enzymatique (10 points)

L'activité FTA est utilisée pour produire les FOS : elle catalyse le transfert d'un groupement fructosyl d'un donneur vers un accepteur.

Les FOS sont composés d'une unité de glucose reliée à :

- une unité de fructose (saccharose)
- deux unités de fructose (1-kestose, GF<sub>2</sub>)
- trois unités de fructose (nystose, GF<sub>3</sub>)
- quatre unités de fructose (fructofuranosyl-nystose, GF<sub>4</sub>)

**1.3.1** - Expliquer, en écrivant les réactions biochimiques, comment la FFase peut produire du 1-kestose en utilisant le saccharose comme seule source de substrat.

**1.3.2** - Le test enzymatique mis au point, la détection des produits de la réaction ainsi qu'un exemple type de résultat sont décrits dans le **document 2**. Quelles injections préalables permettent d'interpréter les résultats du chromatogramme du document ?

**1.3.3** - Quelle est la méthode de détection utilisée ? Pourquoi est-elle applicable aux produits et aux substrats étudiés lors de cette réaction ?

**1.3.4** - Si l'on souhaitait optimiser le résultat présenté dans le **document 2**, quels paramètres pourrait-on faire varier ?

**1.3.5** - Schématiser une « chaîne HPLC » et ses différents modules.

**1.3.6** - Expliquer l'intérêt d'analyser ce test enzymatique en HPLC et non en chromatographie basse pression.

## 2 - Purification de la FFase (11,5 points)

Le préalable à la production industrielle de FOS est l'extraction, la purification et la caractérisation de la FFase.

880 g d'*Aspergillus niger* ATCC 20611 sont congelés à -20°C et ramenés à température ambiante puis soniqués pendant 5 minutes dans un tampon pH 5,0; les opérations sont renouvelées 2 fois. Les produits de sonication sont centrifugés à 6000 g pendant 15 minutes (**document 3**, étape 1).

**2.1** - Quel est l'intérêt de ces manipulations ?

Du sulfate d'ammonium est ajouté au surnageant jusqu'à 75 % de saturation. La solution obtenue est centrifugée (**document 3**, étape 2).

**2.2** - Quelle propriété des protéines est mise en application à cette étape de la purification ?

Le surnageant est concentré et déposé sur une colonne DEAE-Sephadex® (**document 3**, étape 3). Les résultats sont présentés dans le **document 4**.

**2.3** - Exposer le principe de la chromatographie d'échange d'ions au cours de la purification de la FFase.

Expliquer le type d'élution choisi et proposer une stratégie d'élution alternative.

**2.4** - Pourquoi doit-on tester l'activité enzymatique sur toutes les fractions obtenues ?

**2.5** - Bilan de la purification de la FFase d'*A. niger* ATCC 20611.

Le bilan est résumé dans le tableau suivant :

	C <sub>cat</sub> (U.mL <sup>-1</sup> )	Volume (mL)	Masse protéines(mg)
<b>Extrait brut</b>	109	3400	6770
<b>Surnageant</b>	2050	80	198
<b>Pool fraction FFase*</b>	11588	8,0	47,7
<b>Extrait purifié</b>	4477	8,6	13,7

1 U correspond à la quantité de FFase qui produit 1 µmol de 1-kestose par minute à partir d'une solution de saccharose à 60 %, à 55°C dans un tampon citrate pH 5,0.

\* pool des fractions présentant une activité FFase à l'issue de l'étape 3

**2.5.1** - Calculer le rendement de purification et l'enrichissement. Conclure.

**2.5.2** - Citer une méthode biochimique classique pouvant être mise en œuvre afin de déterminer la masse moléculaire de la FFase ainsi purifiée.

### 3 - Applications en industrie alimentaire (21 points)

#### 3.1 - Fabrication de sirops à teneur élevée en FOS (10 points)

La stabilité des FOS vis à vis de la température et du pH, ainsi que leur propriété gustative et d'amélioration du transit intestinal ont pour conséquence le lancement de la production de FOS à des fins commerciales.

**3.1.1** - À partir des résultats présentés dans le tableau ci-dessous proposer le substrat le plus approprié pour lancer la production industrielle des FOS. Justifier la réponse.

substrat	produit	K <sub>M</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> µmol.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>
<b>Saccharose</b>	GF2	0,07	508
<b>GF2</b>	GF3	0,15	499
<b>GF3</b>	GF4	0,55	265

**3.1.2** - L'utilisation de méthodes chromatographiques permet de préparer :

- Le « Néosucre G » constitué de 55-60 % de FOS, 30 % de glucose et de 10-12 % de saccharose.
- Le « Néosucre P » constitué de 95 % de FOS.

Ces techniques étant toutefois coûteuses, une alternative à la préparation du Néosucre P serait la nanofiltration. Le dispositif de nanofiltration et les résultats obtenus sont présentés dans le **document 5**.

**3.1.2.1** - Comment évolue un flux de perméation au cours d'une (nano)filtration ?

Quel est le principal inconvénient de cette technique ?

**3.1.2.2** - Expliquer le terme pression transmembranaire.

**3.1.2.3** - Analyser précisément les résultats consignés dans le tableau du **document 5**. Conclure.

### 3.2 - Émergence d'effecteurs de la $\beta$ -fructofuranosidase (11 points)

Les laboratoires de recherche en agro-alimentaire travaillent sur la synthèse de molécules reconnues et non hydrolysées par la FFase.

Un effecteur, le  $\beta$ -thio-fructofuranoside (le 2-hydroxyéthyl-S- $\beta$ -fructofuranoside) noté « **Fru-S-ME** » a ainsi été produit par réaction du saccharose sur le  $\beta$ -mercaptoéthanol.

Une étude a été menée sur cet effecteur (**document 6**).

**3.2.1** - Pourquoi peut-on stopper la réaction avec du NaOH ?

**3.2.2** - Interpréter l'effet du Fru-S-ME sur la FFase. Justifier.

**3.2.3** - Calculer le  $K_i$  de la FFase vis à vis du Fru-S-ME.

**Donnée :**  $K_{M,\text{apparent}} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$

**3.2.4** - Quelle application les industriels peuvent-ils mettre en œuvre avec ce  $\beta$ -thio-fructofuranoside dans le cadre de la purification de la FFase ? Citer son principal avantage.

# DOCUMENT 1 : TEST DE DÉPISTAGE DE LA FFase DANS LES CULTURES DE MOISSURES

## 1 - Principe

La détection du fructose est suivie grâce au test colorimétrique suivant



D-Fructose + MTT + phénazine méthosulfate → 5-céto-D-Fructose + chromophore bleu.

MTT = bromure de méthylthiazolyldiphényl tétrazolium.

FDH = Fructose déshydrogénase.

La détection du glucose est basée sur le système GOD (glucose-oxydase) - POD (peroxydase).

## 2 - Mode opératoire

Différentes souches de moisissures sont mises en culture en boîte de Pétri à 25°C pendant 5 à 7 jours. Un disque de 8 mm d'une colonie est prélevé et mis en culture sur une nouvelle boîte de Pétri à 25°C pendant 72 h.

Après incubation, la colonie est recouverte avec de l'agar (0,7 % m/v) contenant les différents réactifs nécessaires au test enzymatique. Les résultats sont analysés après 10 minutes d'incubation.

On réalise un contrôle négatif sans moisissure.

## 3- Résultats

La présence d'un halo violet autour de la colonie est considérée comme un résultat positif.

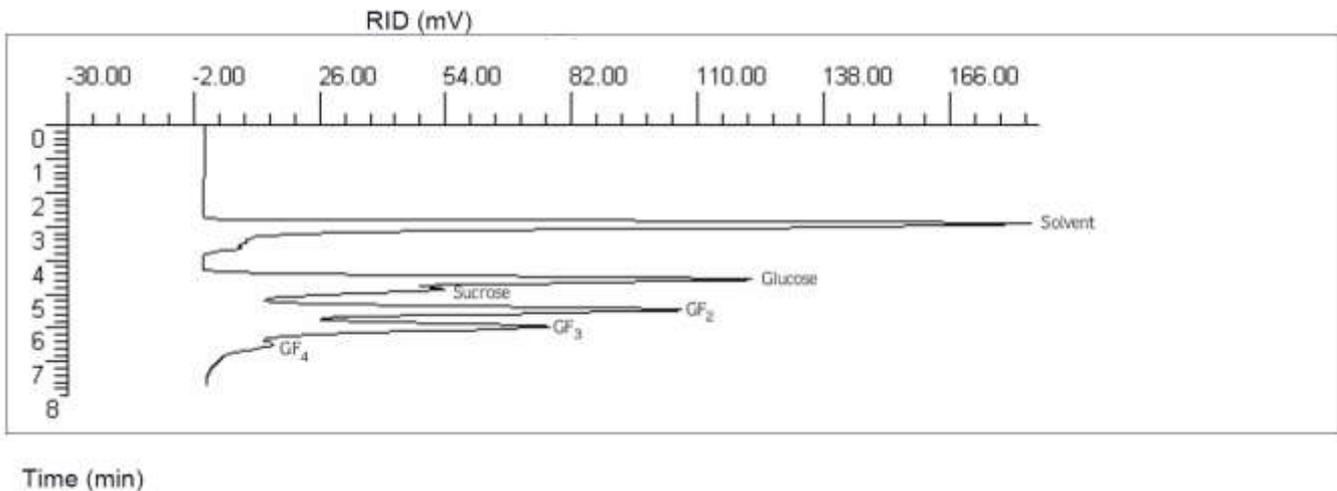
microorganisme	résultat
<i>Aspergillus niger</i> MUM 05.14	Halo en bordure de la colonie
<i>Aspergillus niger</i> MUM 05.15	Halo en bordure de la colonie
<i>Aspergillus niger</i> MUM 05.16	Halo en bordure de la colonie
<i>Aureobasidium pulullans</i> CCY 27-1-94	Halo de 3 cm de diamètre
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 20611	Halo recouvrant toute la boîte de Pétri
<i>Aspergillus</i> MUM 03-50	Halo de 3 cm de diamètre
<i>Aspergillus</i> MUM 03-51	Halo de 3 cm de diamètre

## DOCUMENT 2 : TEST ENZYMATIQUE ET DÉTECTION DES PRODUITS DE LA RÉACTION

Production of FOS was carried out using a reaction mixture, which consisted of 250  $\mu$ L of enzyme and 750  $\mu$ L of 60% (w/v) sucrose in citrate buffer (pH 5.0). Incubation took place at 55 °C for 3 H in a shaking water bath. At the end of incubation, the reaction was arrested, and the products in the reaction mixture were analyzed by an HPLC (Shimadzu, Japan) equipped with an RID Refractive Index Detector (Shimadzu, Japan), using an Aminopropyl column 250  $\times$  4.6 mm Excil amino 5  $\mu$ m (SGE, Australia). We injected 10  $\mu$ l of 20-fold dilution of the reaction mixture into the HPLC using an injector syringe (Hamilton, Nevada, USA). The analysis was carried out at room temperature using acetonitrile/water (65:35) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min.

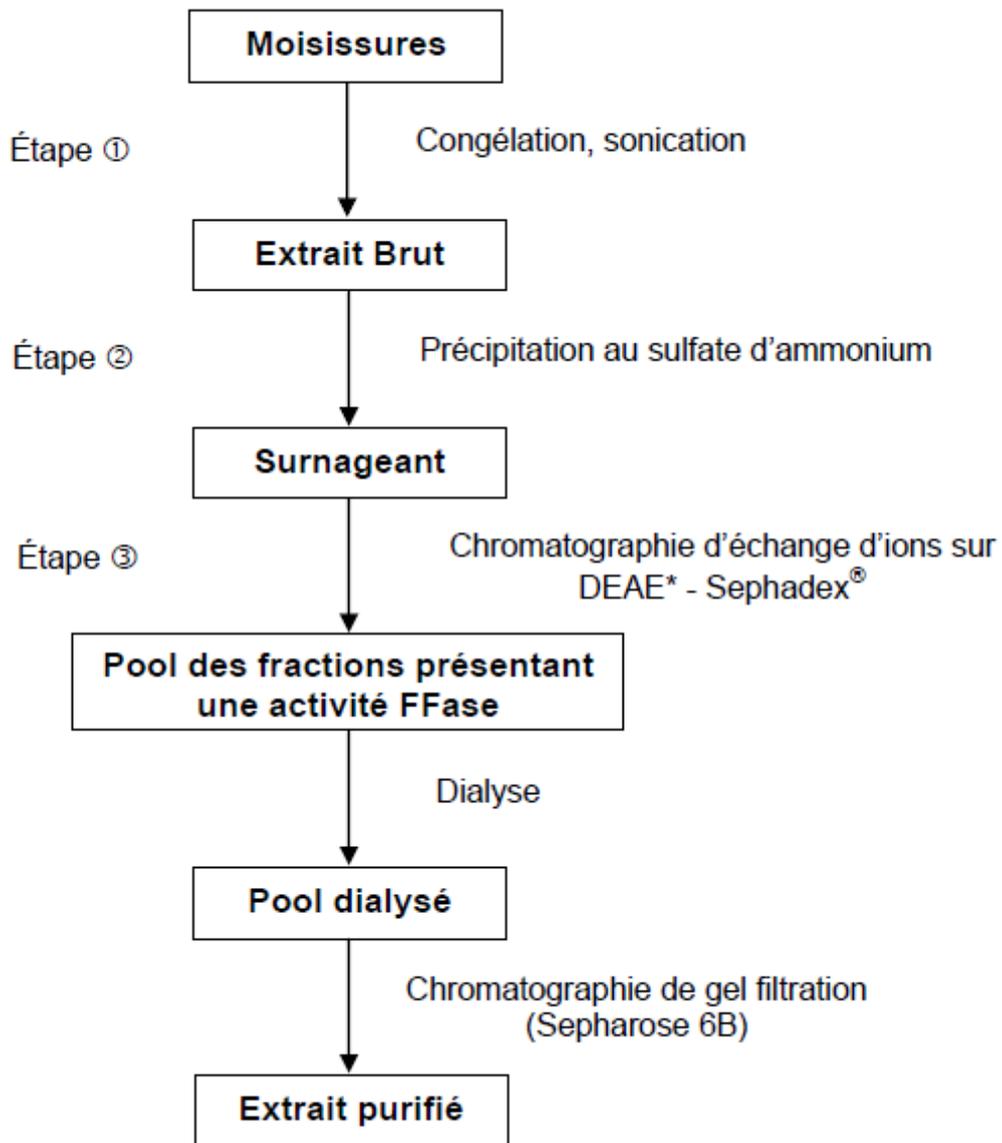
The final yield of FOS was expressed as the percentage of conversion yield based on the initial concentration of sucrose.

**Donnée** : « sucrose » = saccharose.



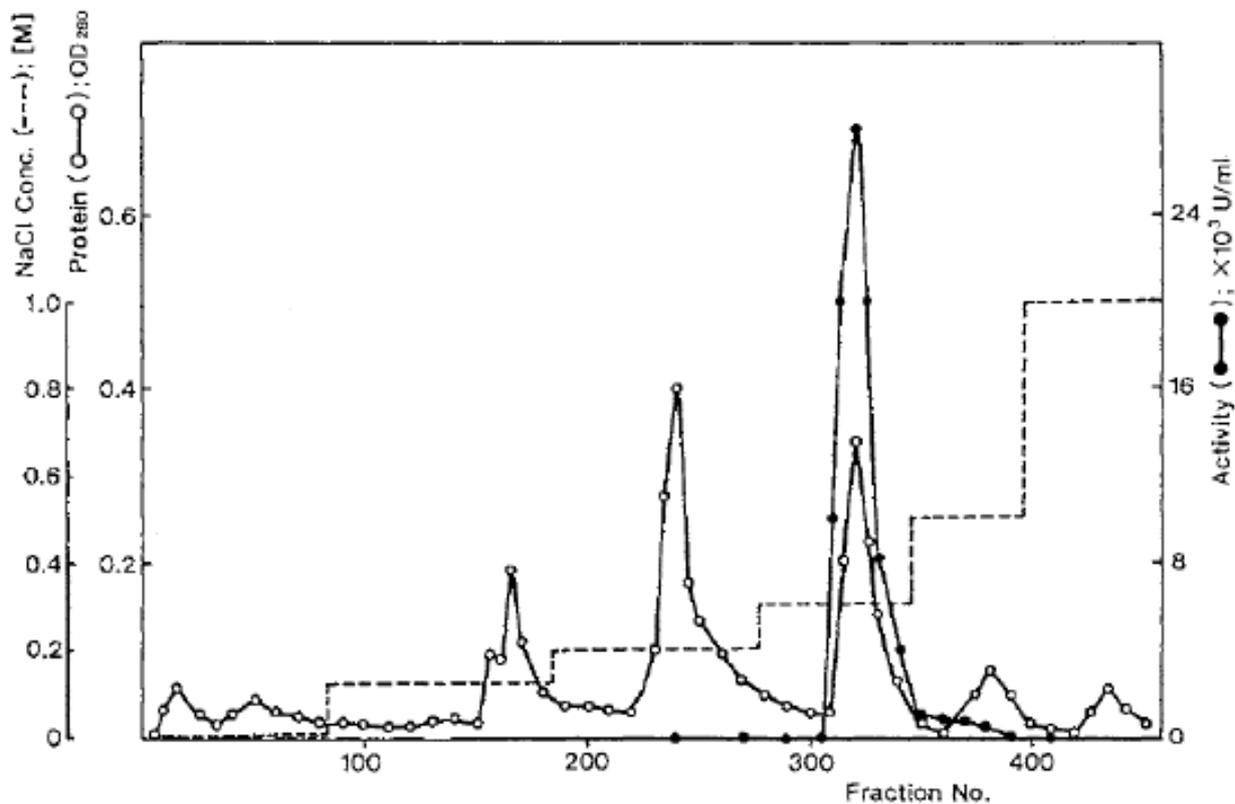
A typical HPLC chromatogram of the reaction mixture at the end of 3 H of incubation, indicating monosaccharide, disaccharide, and oligomers

D'après : Lateef, A. *et al.* (2007) *Turk. J. Biol.*, **31**, 147-154.

**DOCUMENT 3 : PLAN DE PURIFICATION DE LA FFase**

DEAE\* = Di Éthyl Amino Éthyl chargé positivement

## DOCUMENT 4 : CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS SUR DEAE-SEPHADEX

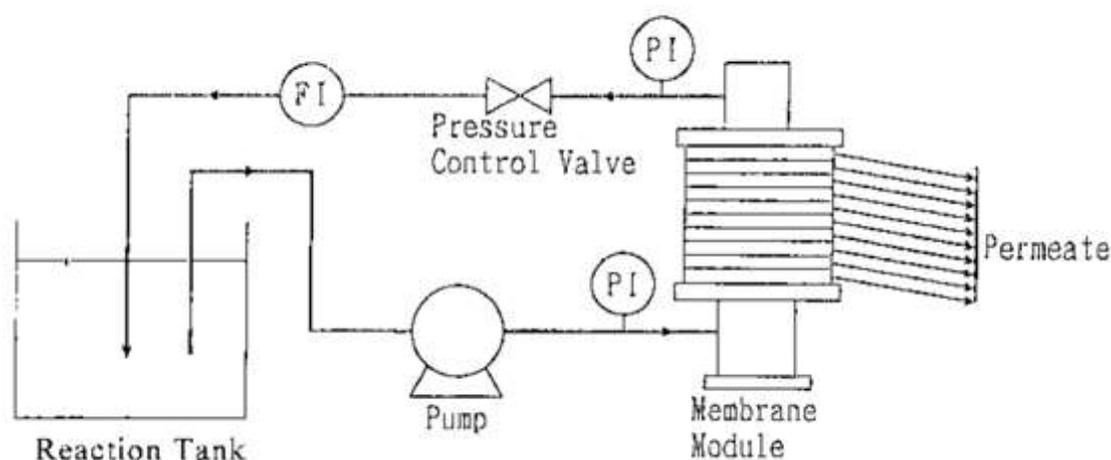


DEAE-Sephadex A-50 Column Chromatograph of the Crude Extract from *A. niger* ATCC 20611.

The crude extract was put onto a DEAE-Sephadex A-50 column (5.0 × 35 cm) equilibrated with 20 mM phosphate buffer, pH 6.0. A step-wise elution was done with 0 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.5 M and 1.0 M NaCl in 20 mM phosphate buffer, as indicated by the dotted line. Ten-ml fractions of eluent were collected at a flow rate of 120 ml per hr. ●—●, transfructosylating activity; O—O, absorbance at 280 nm; -----, NaCl concentration.

## DOCUMENT 5 : FOS PAR NANOFILTRATION

### 1 - Dispositif expérimental du pilote de nanofiltration (10 L)



### 2 - Mode opératoire

10 L d'une solution de saccharose à 30% dans un tampon pH 5,0 et la FFase (25 U par g de substrat) sont introduits dans le réservoir. La surface de la membrane est de  $0,36 \text{ m}^2$ . Le débit est de  $5,0 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ . Le flux de perméation au début de la réaction est de  $5,6 \times 10^6 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . La pression transmembranaire est de 4,0 MPa. La température est maintenue à 55°C. La nanofiltration est conduite pendant 12 H. Des prélèvements sont effectués aux temps 1 H, 3 H, 6 H et 12 H et sont analysés par HPLC.

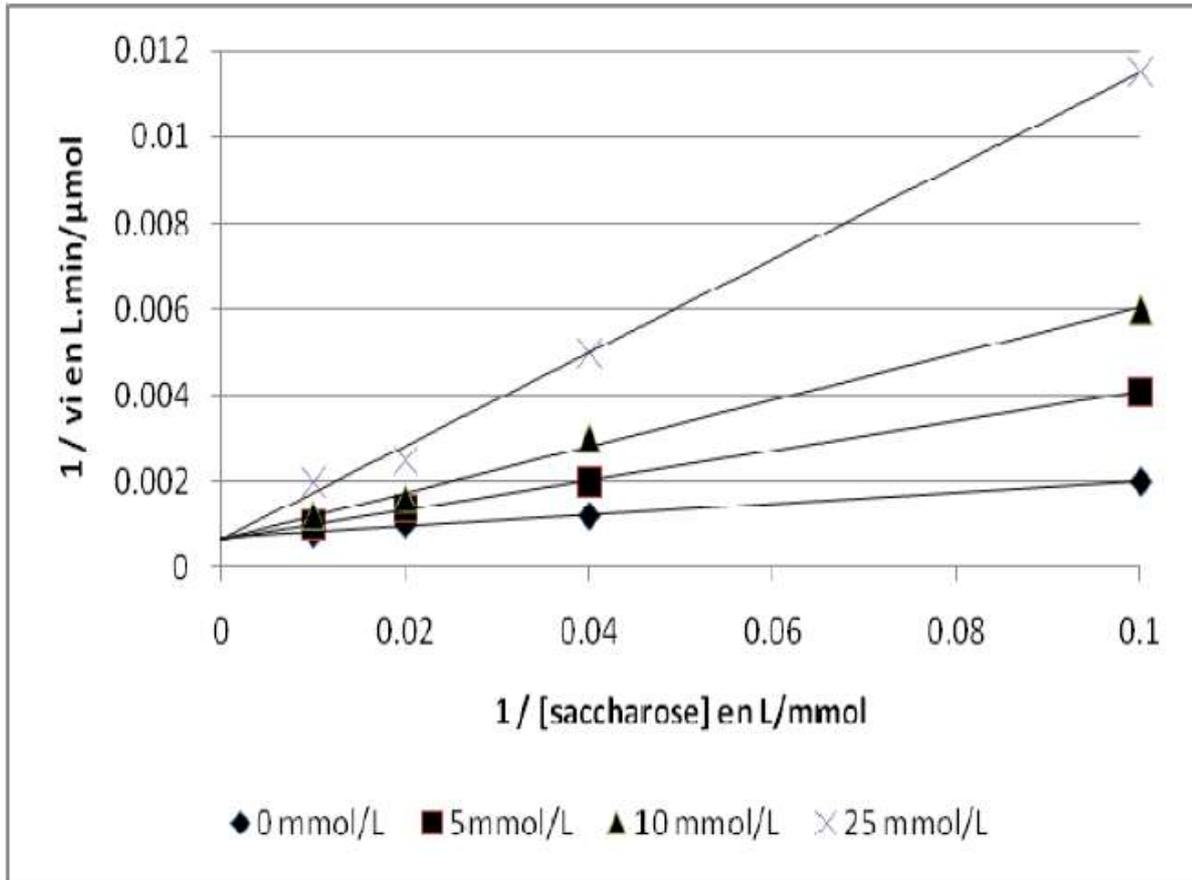
### 3 – Résultats : Composition en oses, en osides et en FOS du Néosucre G, du Néosucre P et des rétentats

		% Glucose	% Saccharose	% GF <sub>2</sub>	% GF <sub>3</sub>	% GF <sub>4</sub>	% FOS
Néosucre G		30	10	27	27	6	60
Néosucre P		2	3	36	50	9	95
Rétentat	0 h	--	100	--	--	--	--
Rétentat	1 h	17	31	44	8	--	52
Rétentat	3 h	19	16	46	18	1	65
Rétentat	6 h	12	8	40	35	5	80
Rétentat	12 h	2	5	36	48	9	93

D'après : Nishizawa, K. *et al.* (2001) *Food Sci. Technol. Res.*, **7 (1)**, 39-44.

## DOCUMENT 6 : GRAPHES DE LINEWEAVER-BURK

Hydrolyse du saccharose par la FFase de *Saccharomyces cerevisiae* en présence de Fru-S-ME



D'après : Kiso, T. *et al.* (2003) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67** (8), 1719-1724.

### Mode opératoire

50  $\mu\text{L}$  de saccharose sont mélangés avec 50  $\mu\text{L}$  de Fru-S-ME (les concentrations varient de 0 mmol/L à 25 mmol/L). La réaction débute par addition de 100  $\mu\text{L}$  de FFase. Elle est arrêtée après une incubation à 40°C pendant 10 minutes par ajout de 150  $\mu\text{L}$  de solution de NaOH 0,2 mol/L.

### Données

Le point d'intersection sur l'axe des abscisses de la courbe obtenue avec 25 mmol/L de Fru-S-ME a pour coordonnées (-0,00647 ; 0).

Le point d'intersection sur l'axe des abscisses de la courbe obtenue avec 0 mmol/L de Fru-S-ME a pour coordonnées (-0,03333 ; 0).

# Sujet de microbiologie et de technologies d'analyse 2012

---

## Matériel autorisé :

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

## PRODUCTION INDUSTRIELLE D'INSECTICIDE PAR *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis*, bactérie appartenant naturellement à la flore du sol, possède la capacité de tuer des insectes. Cet effet pathogène est dû aux cristaux protéiques que la bactérie synthétise lors de la sporulation. Ingérés par l'insecte, ces cristaux libèrent des toxines qui détruisent les cellules de son tube digestif, provoquant rapidement un arrêt de sa consommation alimentaire puis sa mort. Il existe de nombreuses variétés de *Bacillus thuringiensis*, chacune n'étant toxique que pour un nombre limité d'insectes. Il en résulte le bioinsecticide le plus utilisé dans le monde actuellement.

## **CARACTÉRISTIQUES DE *BACILLUS THURINGIENSIS*** **(18 points)**

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie insecticide à Gram positif capable de sporuler.

### **1 - Structure et comportement environnemental de *B. thuringiensis*** **(12 points)**

- 1.1 - En se basant sur des caractères structuraux, justifier la coloration différentielle des bactéries dans la technique de Gram.
- 1.2 - La sporulation a été bien étudiée chez *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus*.
  - 1.2.1 - Reporter sur la copie les numéros 1 à 8 du **document 1** et donner les légendes correspondantes.
  - 1.2.2 - Proposer une méthode de coloration des spores bactériennes.
  - 1.2.3 - La thermorésistance est une propriété des spores bactériennes des *Bacillus*. Quelles sont les structures et propriétés physico-chimiques de la spore à l'origine de cette propriété ?
  - 1.2.4 - Indiquer les conditions environnementales amenant une forme bactérienne végétative à sporuler.

### **2 - Systématique bactérienne (6 points)**

La principale différence phénotypique entre *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus* est la production d'un ou plusieurs cristaux à propriétés insecticides. Par ailleurs, de récentes études moléculaires ont montré que ces bactéries pouvaient être considérées comme une seule et même espèce.

- 2.1 - Quelles études moléculaires permettent de remettre en question la taxonomie phénotypique ?
- 2.2 - Une classification des *Bacillus thuringiensis* en différents sérotypes est basée sur la présence de déterminants antigéniques flagellaires. Rappeler le principe d'une telle détermination sérotypique.

# OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ DE FERMENTATION INDUSTRIEL (42 points)

Afin d'améliorer les rendements de production de bioinsecticide, plusieurs pistes sont envisagées, notamment le développement de nouveaux fermenteurs. Historiquement, les cultures en batch de *B. thuringiensis* ont été conduites. Afin de réduire les coûts de production liés notamment au milieu de culture utilisé, différentes alternatives sont testées : choix différentiels du milieu de culture et du procédé de fermentation.

## 3 - Évaluation de procédés de culture en milieu liquide (36 points)

Dans le cadre de la lutte contre *Spodoptera littoralis*, ver parasite des cultures de coton, une étude comparative cherche à distinguer le mode de production le plus efficace et rentable. La chronologie et les étapes de cette étude sont résumées dans le **document 2**.

### 3.1 - Choix du milieu de culture (17 points)

Six milieux de culture différents (numérotés de 1 à 6) sont testés lors d'une culture de *B. thuringiensis* en batch.

**3.1.1** - Quel contrôle fondamental doit être réalisé sur la préculture avant ensemencement du fermenteur ?

**3.1.2** - Justifier la supplémentation du milieu de préculture en extrait de levure.

**3.1.3** - Qu'est-ce qu'une peptone en bactériologie ? Préciser son intérêt nutritionnel.

**3.1.4** - D'après les conditions expérimentales de la culture, préciser le type respiratoire probable de *Bacillus thuringiensis*.

**3.1.5** - Préciser pour chacun de ces milieux de culture la(les) source(s) de carbone utilisable(s). En déduire les deux milieux les plus riches de ce point de vue.

**3.1.6** - Le **document 3** présente les résultats obtenus avec chacun des milieux.

- Analyser les graphes.

- Conclure quant au choix des milieux les mieux adaptés à la production de bioinsecticide.

- Corréler le choix final du milieu en tenant compte d'un critère économique.

### 3.2 - Choix du procédé de fermentation (19 points)

**3.2.1** - Schématiser un fermenteur de type batch.

**3.2.2** - Des mousses apparaissent fréquemment au cours d'une fermentation en bioréacteur. Expliquer leur formation. Pourquoi est-il nécessaire de les limiter ?

**3.2.3** - Indiquer la différence fondamentale entre une culture en batch et une culture en fed-batch.

**3.2.4** - Analyser l'allure des courbes présentées dans le **document 4**. En déduire l'intérêt d'envisager une culture en fed-batch.

**3.2.5** - Le **document 5** présente les résultats en culture fed-batch.

**3.2.5.1** - Calculer le débit d'apport de mélasse en g de mélasse par litre de milieu par heure.

**3.2.5.2** - Montrer l'intérêt d'adapter le procédé de fermentation pour la production de bioinsecticide.

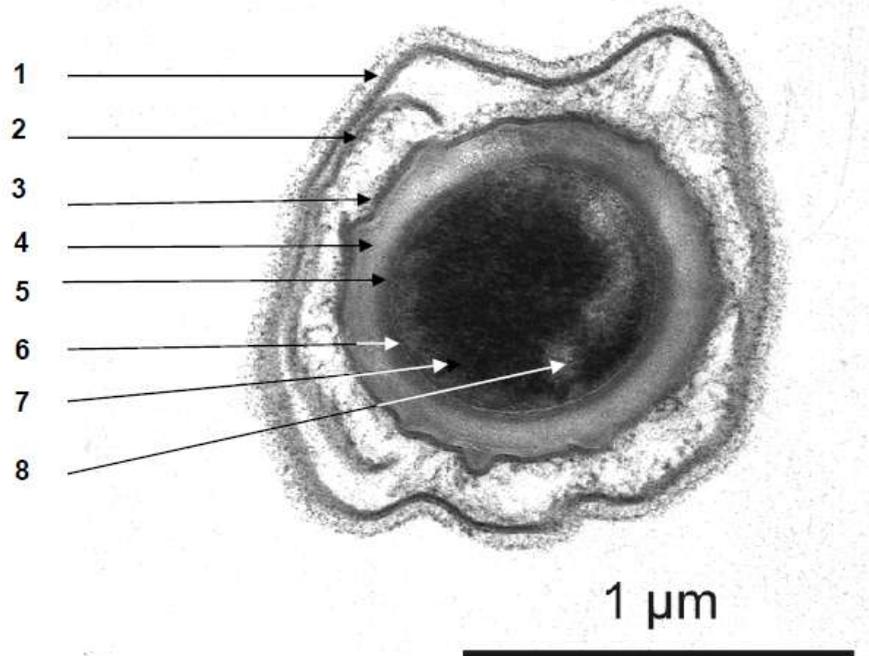
## 4 - Évaluation d'un nouveau procédé de culture en milieu solide (6 points)

*Spodoptera frugiperda* est un ver parasite qui infecte les cultures de maïs. Il est détruit *in situ* par *Bacillus thuringiensis tolworthi*. Cette observation est à l'origine d'une nouvelle stratégie qui utilise la fermentation en milieu solide. À cette fin, du riz humide stérile contenu dans des sacs en polypropylène est ensemencé à l'aide d'une préculture de *Bacillus thuringiensis tolworthi* cultivée en incubateur à agitation (paramètres 30°C, 15h, 150 rpm). Une fois scellés, les sacs sont incubés à 30°C durant 4 jours. Un suivi de la production de spores est entrepris. Les résultats sont présentés dans le **document 6**.

**4.1** - Sur quel principe repose le dénombrement des spores ?

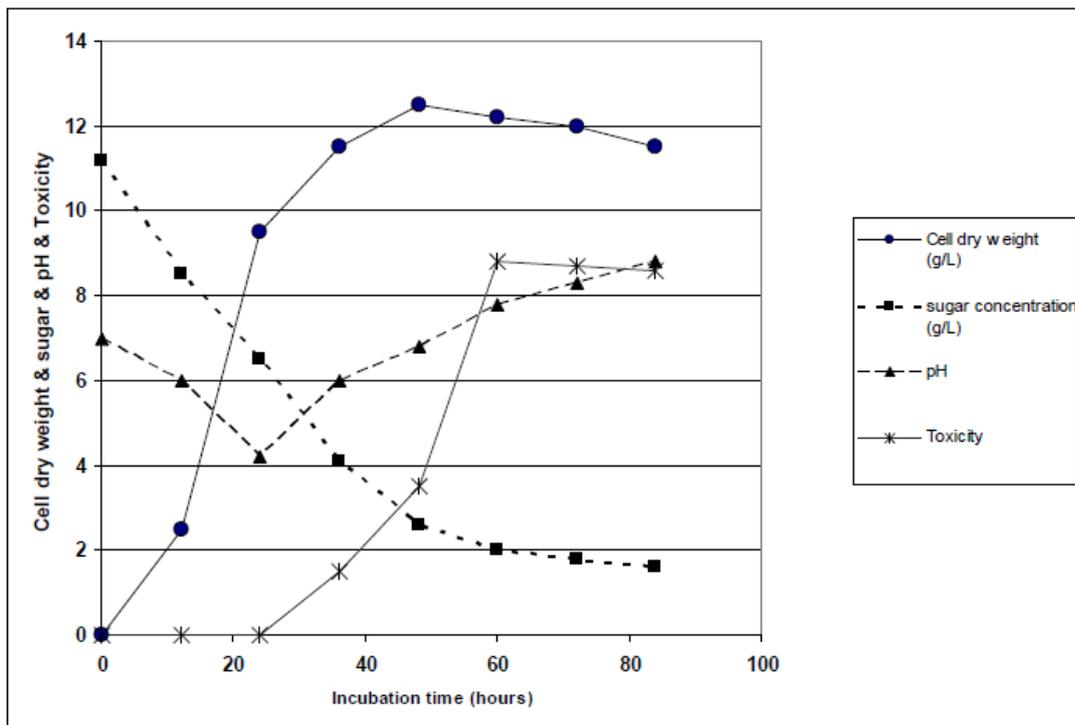
**4.2** - Définir puis déterminer en justifiant la démarche les paramètres cinétiques  $\mu_{\text{expo}}$  et G de la croissance.

## DOCUMENT 1 : MORPHOLOGIE D'UNE SPORE BACTÉRIENNE



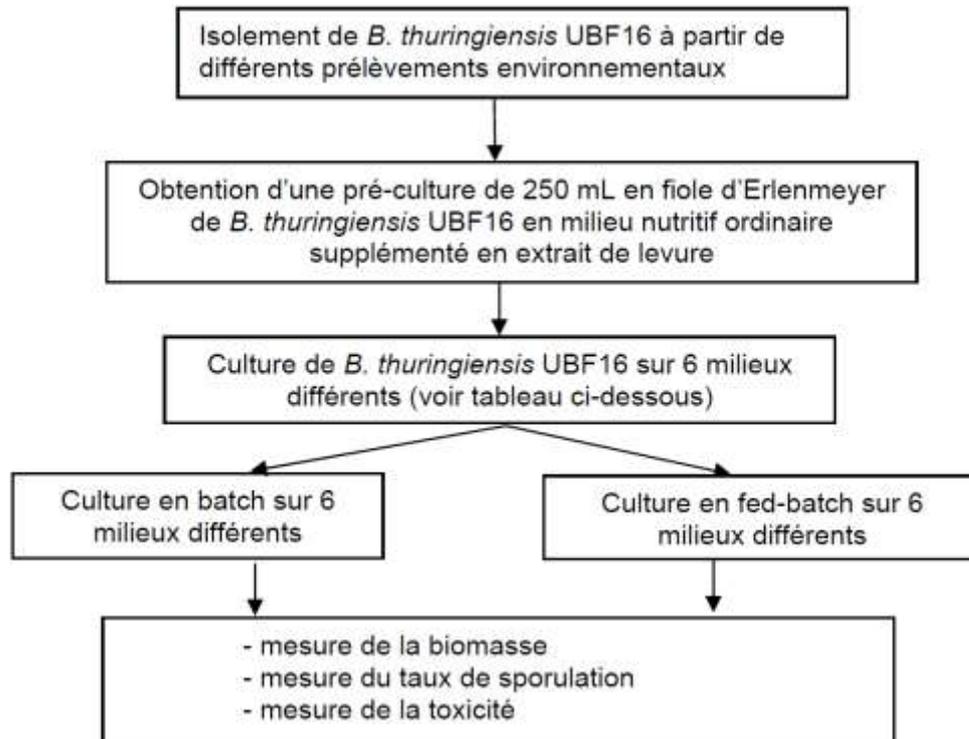
Coupe de spore de *Bacillus cereus* observée en microscopie électronique (C Faille)

## DOCUMENT 4 : SUIVI D'UNE FERMENTATION EN BATCH



Growth of *B. thuringiensis* UBF16 on fodder yeast-molasses, consumed sugar, pH and toxicity during 72h at 30°C using bioreactor as a batch culture.

## DOCUMENT 2 : OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE *B.thuringiensis* EN CULTURE BATCH ET FED-BATCH



### Conditions opératoires

#### Expérimentation de la culture en batch :

- inoculation 1% v/v
- volume de travail 2 L
- stérilisation du milieu *in situ*
- température de culture 30°C
- agitation : 200 rpm
- saturation O<sub>2</sub> : 20%
- agent anti-mousse
- milieu de culture testé

#### Expérimentation de la culture en fed-batch :

Paramètres initiaux identiques à la culture en batch avec apport de mélasse à 20 g/L au débit de 2,5 mL/L/h (arrêt apport après 40 heures)

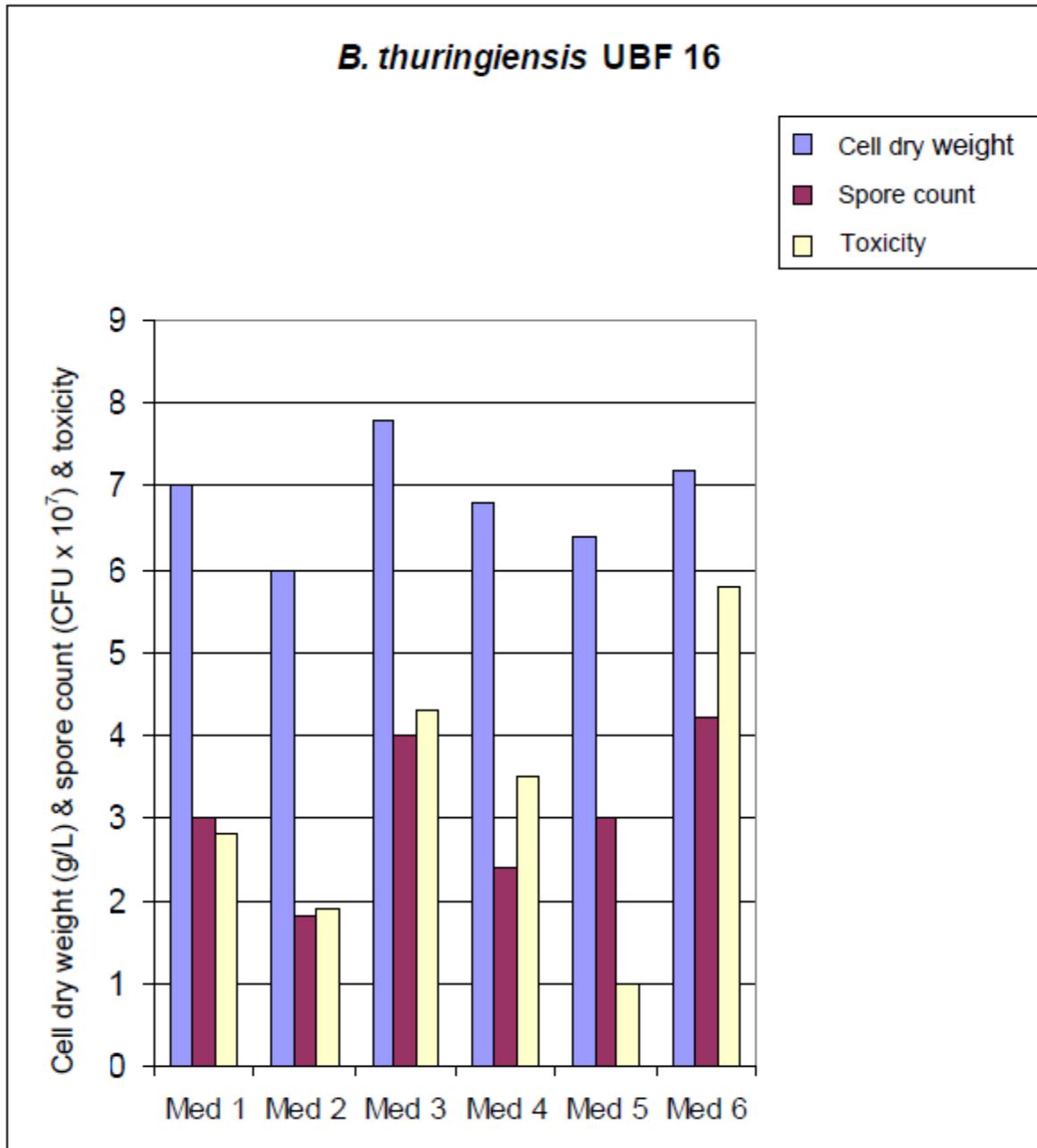
### Composition des milieux de culture testés

milieu	Composition (g.L <sup>-1</sup> )
Milieu 1 : LB	Glucose (1) – yeast extract (5) – casein (10) – NaCl (5) – pH 7
Milieu 2 : T <sub>3</sub>	Tryptone (3) – tryptose (2) – yeast extract (1,5) – MnCl <sub>2</sub> (0,005) – pH 6,8
Milieu 3	Tryptose (20) – glucose (2) – NaCl (5) – Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2,5)
Milieu 4	Peptone (3) – beef extract (5) – yeast extract (0,5) – MnCl <sub>2</sub> (0,006) – CaCl <sub>2</sub> (0,08) – MgCl <sub>2</sub> (0,7)
Milieu 5	Peptone (10) – beef extract (10) – NaCl (5)
Milieu 6	Fodder* yeast (40) – molasses** (15) – K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1) – MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O

\* fourragère

\*\* mélasses

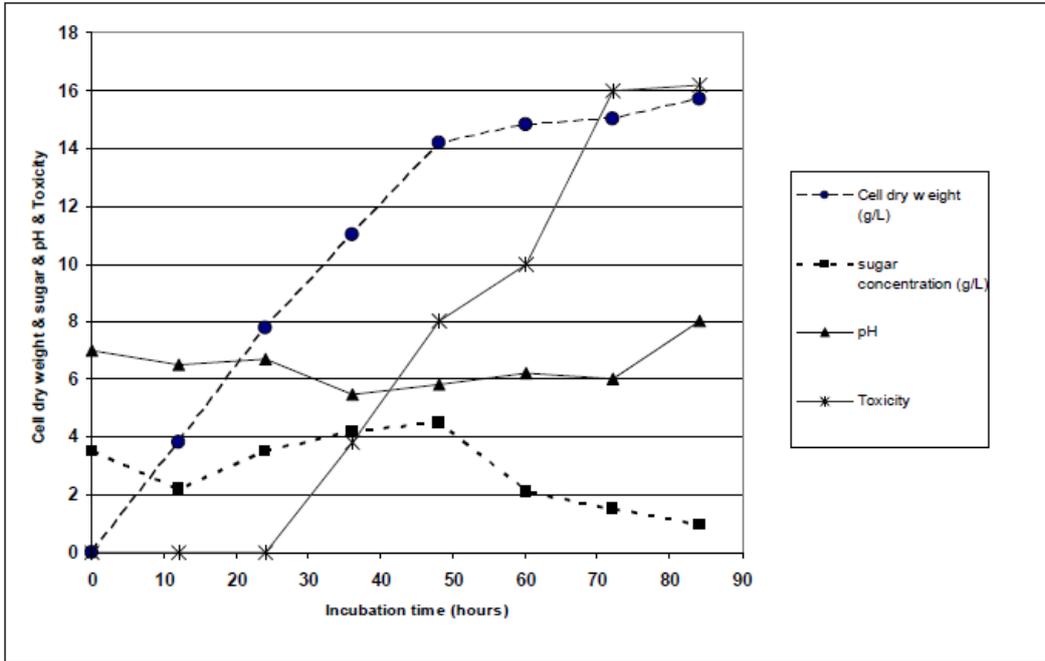
## DOCUMENT 3 : PRODUCTION DE *B. thuringiensis* EN CULTURE BATCH : CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE



Cell dry weight and spore count of *B. thuringiensis* UBF 16 strains and its toxicity against cotton leafworm\* after 72 h incubation on different media at 30 °C using shake flask as a batch culture.

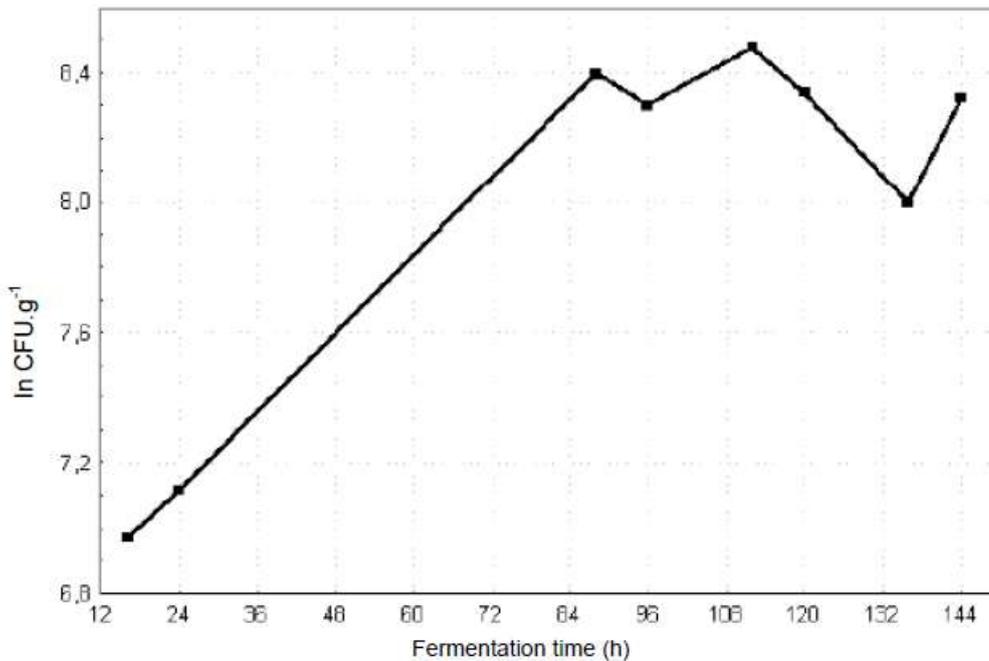
\* cotton leafworm : chenille de la noctuelle du coton.

# DOCUMENT 5 : SUIVI D'UNE FERMENTATION EN FED-BATCH



Growth of *B. thuringiensis* UBF16, consumed sugar, pH and toxicity (%) on fodder yeast-molasses medium using bioreactor as a fed-batch culture at 2.5 mL.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> continuous addition rate of molasses.

# DOCUMENT 6 : FERMENTATION DE *Bacillus thuringiensis* TOLWORTHII (Btt) EN MILIEU SOLIDE



Spore-count during Btt growth by solid substrate fermentation on rice.

# Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et de technologies d'analyse 2012

---

Calculatrice non autorisée.  
Dictionnaire Français-Anglais autorisé.

## CONTRÔLES VÉTÉRINAIRES DANS LE CADRE DE L'EXTRACTION D'UN ANTICOAGULANT

Les héparines sont des anticoagulants très utilisés obtenus à partir d'intestins de porc.

Suite à différentes crises sanitaires des contrôles sur la qualité des matières premières et la recherche de toute contamination par des muqueuses d'origines ovine, caprine ou bovine sont effectués. Pour cela des techniques d'immunoprécipitation sont mises en œuvre.

Les virus porcins étant très répandus, il convient aussi de vérifier l'état de santé des porcs chez qui les muqueuses sont prélevées. Ces contrôles s'effectuent par des techniques de biologie moléculaire.

### 1 - Contrôle de la qualité d'un lot de muqueuses intestinales (22 points)

Une technique d'immunoprécipitation utilisant un mélange polyclonal d'anticorps permet de détecter la présence de muqueuses intestinales d'origines ovine, caprine ou bovine dans les muqueuses intestinales de porc. On détecte cette contamination en recherchant une protéine, l'albumine, présente chez toutes les espèces.

**1.1** - Dans un premier temps, il s'agit d'obtenir « le mélange polyclonal d'anticorps » par immunisation de lapins.

**1.1.1** - Définir l'expression « mélange polyclonal d'anticorps ».

**1.1.2** - Indiquer le protocole d'immunisation permettant d'obtenir ce mélange polyclonal.

**1.1.3** - À l'aide du **document 1**, dégager les principales caractéristiques des réponses immunitaires humorales des anticorps primaire et secondaire produits. Préciser la classe des anticorps produits.

**1.1.4** - Les anticorps utilisés pour les réactions d'immunoprécipitation sont des IgG. Présenter la structure d'une IgG à l'aide d'un schéma légendé.

**1.2** - Dans un deuxième temps, il s'agit de tester la spécificité des anticorps obtenus, selon la technique d'Ouchterlony. Le **document 2** présente les résultats obtenus.

**1.2.1** - Expliquer succinctement le principe de la technique d'Ouchterlony.

**1.2.2** - Analyser les résultats obtenus (**document 2**).

**1.2.3** - Expliquer pourquoi l'antisérum obtenu chez le lapin est utilisé pour rechercher les contaminations ovine, caprine ou bovine dans des extraits de muqueuse intestinale de porc.

**1.3** - Dans un troisième temps, ces anticorps sont utilisés dans le cas de la recherche d'une contamination de la muqueuse intestinale de porc. Nommer une technique d'immunoprécipitation, autre que la technique d'Ouchterlony, permettant de réaliser cette recherche.

## 2 - Contrôle sanitaire : détection du virus de la peste porcine classique (38 points)

**2.1** - La peste porcine classique est une maladie virale contagieuse due au CSFV (classical swine fever virus). Elle touche les suidés (dont le porc domestique et le sanglier). Les virus peuvent être observés en microscopie électronique par coloration négative.

**2.1.1** - Présenter le principe de la coloration négative. Préciser l'aspect de l'image obtenue.

Le CSFV appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre *Pestivirus*. Il possède un génome à ARN linéaire non segmenté simple brin à polarité positive et polycistronique. Le génome code à la fois les protéines structurales (protéines d'enveloppe : Erns, E1 et E2 et protéines de capsid), et les protéines non structurales (réplicase et protéase de maturation). La capsid virale est de symétrie icosaédrique.

**2.1.2** - Réaliser, à partir des éléments donnés précédemment, un schéma annoté avec précision de la structure du CSFV.

**2.1.3** - Que signifient les expressions « ARN non segmenté » et « ARN à polarité positive » ?

**2.1.4** - L'extrémité 5' du génome viral présente un site d'entrée de ribosome interne (IERS).

Indiquer les particularités des extrémités 5' et 3' d'un ARN messager eucaryote.

**2.1.5** - Présenter la réplication du génome viral sous forme d'un schéma simplifié sachant qu'il s'agit d'un ARN à polarité positive.

**2.2** - Les méthodes de laboratoire pour le diagnostic du CSFV ont pour objectif la mise en évidence du virus et son acide nucléique. La recherche du virus dans le sang ou les tissus, prélevés sur un animal fiévreux, est la méthode de choix pour détecter, précocement, les élevages infectés.

Le **document 3** présente un protocole d'immunofluorescence pour la détection du virus.

**2.2.1** - Quelle est la nature du conjugué utilisé ?

**2.2.2** - Élaborer un schéma légendé de l'édifice moléculaire obtenu pour un résultat positif.

**2.2.3** - Indiquer les rôles des contrôles proposés dans le protocole du **document 3**.

**2.3** - Afin de limiter les pertes économiques dues aux *Pestivirus*, les recherches actuelles se tournent vers la production d'un vaccin à ADN basé sur la préparation d'un plasmide recombinant. La vaccination par ADN consiste en l'introduction dans les tissus des porcs d'élevage (par injection intramusculaire par exemple) du plasmide purifié contenant une séquence codant un antigène donné. Après administration du plasmide recombinant, l'antigène est exprimé par les cellules transfectées induisant une réponse immunitaire spécifique.

Le vecteur utilisé peut être par exemple le plasmide pcDNA 3 présenté dans le **document 4**.

**2.3.1** - Quelles sont les caractéristiques générales des vecteurs plasmidiques ?

La protéine d'enveloppe E2 du CSFV s'avère être très antigénique : c'est donc le gène de cette protéine qui est ciblé pour la fabrication du vaccin à ADN. Le CSFV étant un virus à ARN (+), cela nécessite de travailler avec un ADNc, codant la protéine E2, avant l'insertion dans le vecteur plasmidique.

**2.3.2** - Présenter à l'aide de schémas légendés l'obtention de l'ADNc à partir de l'ARN viral. Préciser la signification du sigle ADNc.

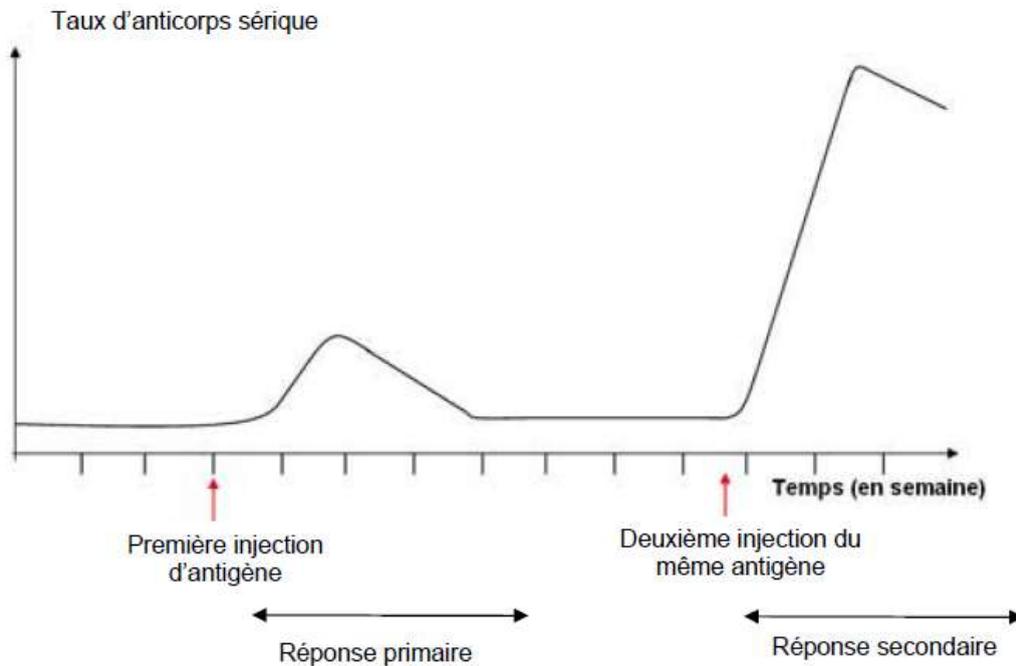
L'ADNc obtenu est amplifié par PCR. Le **document 5** précise les amorces sens et anti sens utilisées.

**2.3.3** - Définir le sigle PCR. Quelle est l'enzyme utilisée dans cette technique ? Quelles sont ses particularités ?

**2.3.4** - À l'aide des **documents 4 et 5**, indiquer les étapes et les modalités techniques d'obtention du plasmide recombinant utilisé dans le vaccin à ADN contre le CSFV.

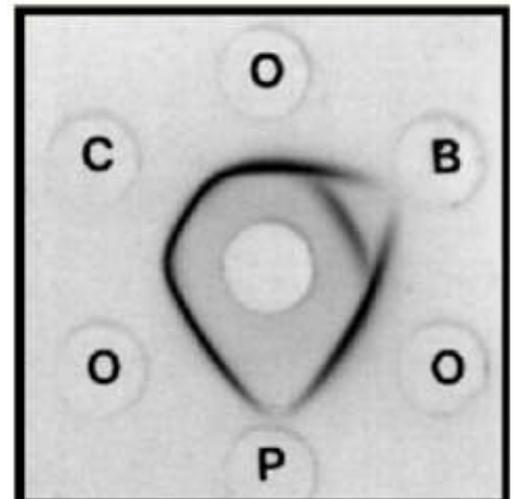
## DOCUMENT 1 : Production d'un antisérum polyclonal obtenue après immunisation d'un lapin

### Cinétique de la réponse immunitaire humorale



## DOCUMENT 2 : SPECIFICITY TEST ANTISERA TO RUMINANT ALBUMINS BY AGAR GEL DOUBLE IMMUNODIFFUSION

- Central hole:  
Rabbit anti Ovin Serumalbumin
- Peripheral holes:  
B: Bovin serumalbumin  
O: Ovin serumalbumin  
C: Caprin serumalbumin  
P: Porcin serumalbumin



## DOCUMENT 5 : Cloning of the CSFV (classical swine fever virus) E2 gene

cDNA product was used as a template for amplification of the E2 region.

The sense primer contains the BamHI restriction enzyme site.

The antisense primer contains the XbaI restriction enzyme site and a stop codon.

After digestion with these two enzymes, the E2 PCR product was inserted into the BamHI and the XbaI sites of the pcDNA3 mammalian expression vector.

### DOCUMENT 3 : Protocole d'immunofluorescence in situ

(from "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008")

1. Cut out a piece of tissue of app. 1 x 1 x 0,5 cm and mount it on a cryostat chuck.
2. Freeze the piece of organ (the freezing temperature of the cryostat should be -15-20°C.)
3. Cut sections of maximum 5 µm thickness and mount them onto microscope slides. Prepare several slides with sections from the same tissue.
4. Fix the mounted sections for 10 minutes in acetone (analytic grade) at -20°C.
5. Immerse the sections briefly in washing buffer.
6. Dispense the FITC-conjugate at the suitable working dilution in washing buffer onto the entire section, close the moist chamber and incubate in the dark for 30 minutes at 37 °C.
7. Wash the sections 3 x 10 minutes at room temperature with washing buffer;
8. If necessary, counterstain in evans blue for 30 seconds.
9. Place a cover slip with mounting buffer onto the section.
10. Examine the sections for fluorescence by UV microscopy.

#### Controls

Negative and positive control sections must be included in each series of organ samples to be examined.

#### FITC-conjugate (fluorescein isothiocyanate –conjugate)

It is recommended that primary diagnosis is carried out with FITC-conjugates prepared from a polyclonal antibody to *Pestivirus*.

This will not distinguish between the antigens of different pestiviruses, but does provide assurance that minor variant viruses will not be missed.

FITC-conjugates should be prepared from immune serum prepared in specific pathogen free pigs.

#### Interpretation

Any sample showing specific cytoplasmic reaction (brilliant green fluorescence) shall be considered positive for *Pestivirus*.

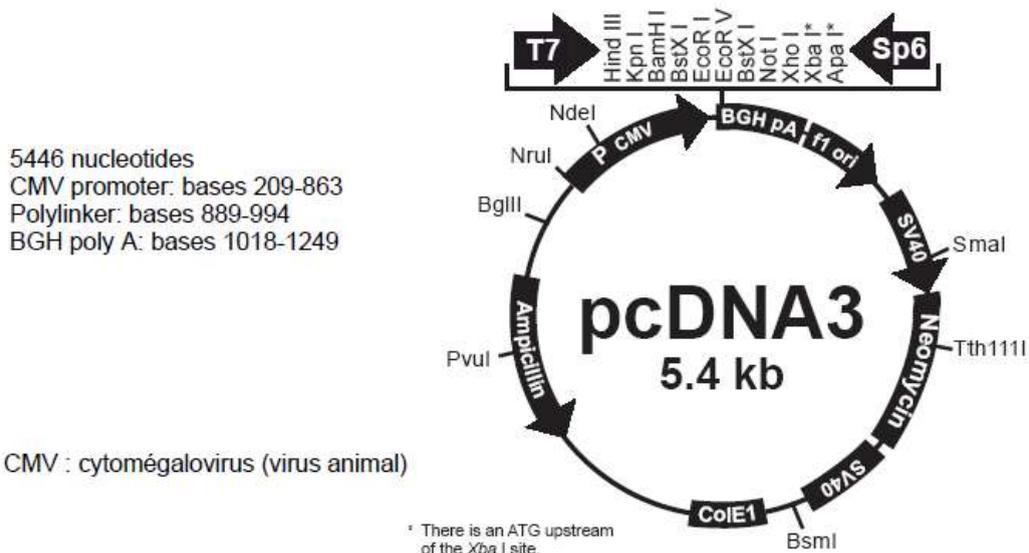
#### Vocabulaire

Cryostat chuck: support du microtome sur lequel on fixe l'échantillon

Cover slip: lamelle de verre circulaire

Counterstain: contre-coloration

### DOCUMENT 4 : PLASMIDE pcDNA 3 (Invitrogen)



# Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2012

---

Calculatrice non autorisée.

## LES ŒUFS ET OVOPRODUITS

Les œufs sont très utilisés en tant qu'ingrédients dans les industries agroalimentaires (IAA) pour leur valeur nutritionnelle, leurs propriétés fonctionnelles et organoleptiques.

Ils servent de matière première pour l'élaboration de nombreux ovoproduits et entrent dans la composition de produits alimentaires variés, dont les pâtes alimentaires aux œufs.

### 1 - La matière première : les œufs (14 points)

Les œufs utilisés en IAA sont généralement des ovoproduits issus d'œufs de catégorie B, présentés sous forme de poudre ou de liquide. Les œufs de catégorie A sont destinés aux consommateurs.

**1.1** - La technique de mirage permet de distinguer les œufs de catégorie A et B.

Présenter succinctement le principe de la technique de mirage.

**1.2** - Donner la définition légale d'un ovoproduit.

**1.3** - Le blanc d'œuf est une solution visqueuse de protéines, de glucides et de minéraux. Citer trois protéines du blanc d'œuf.

**1.4** - Les protéines du blanc d'œuf ont une valeur biologique très élevée, mais un coefficient d'utilisation digestive (CUD) faible si l'œuf est cru.

Expliquer la notion de « valeur biologique » d'une part, et la faible valeur du CUD pour le blanc d'œuf cru d'autre part, sachant qu'il contient un facteur antitryptique.

**1.5** - Donner les propriétés fonctionnelles des protéines du blanc d'œuf et leur intérêt technologique respectif.

**1.6** - Le jaune d'œuf a une composition plus complexe que le blanc. Les composants de la matière sèche du jaune d'œuf sont associés pour former les lipoprotéines.

Donner la composition des lipoprotéines du jaune d'œuf, leurs noms et la propriété fonctionnelle du jaune d'œuf qui en est la conséquence.

### 2 - Étude des procédés de fabrication des ovoproduits (32 points)

Les œufs entrent dans la formulation des pâtes alimentaires aux œufs. Ces derniers sont généralement incorporés sous forme de poudre d'œufs.

**2.1** - Citer les qualités apportées par les œufs.

**2.2** - Fabrication de poudres d'œufs : analyser des diagrammes de fabrication (**document 1**).

**2.2.1** - Préciser succinctement le rôle de chacune des opérations unitaires réalisées pour le blanc d'œuf et le jaune d'œuf.

Dégager les similitudes et les différences entre les deux processus de fabrication.

**2.2.2** - Démarche HACCP pour réduire le risque microbiologique.

**2.2.2.1** - Donner la signification du sigle CCP.

**2.2.2.2** - Pour la fabrication du blanc en poudre, la pasteurisation est un CCP. Justifier à l'aide de l'arbre de décision du **document 2**.

**2.2.2.3** - Quels sont les CCP pour la fabrication du jaune en poudre ? Justifier à l'aide de l'arbre de décision.

**2.3 - Opération unitaire de pasteurisation (8 points)****2.3.1 - Comparer pasteurisation et stérilisation.**

Le graphique du **document 3** présente la cinétique de destruction de la flore totale dans une coule d'œuf à une température de 60°C.

**2.3.2 - Définir le temps de réduction décimale D et le facteur de réduction décimale z.**  
Déterminer ( $D_{60^{\circ}\text{C}}$ ) graphiquement en expliquant la démarche utilisée.

**2.3.3 - Le facteur de réduction décimale est  $z = 6^{\circ}\text{C}$ .** Déterminer le temps de réduction décimale pour la flore totale à  $T = 66^{\circ}\text{C}$  ; justifier la réponse.

**2.3.4 - La charge initiale de la coule d'œuf est de  $10^3$  cellules/g.** On estime que la charge résiduelle doit être inférieure à  $10^2$  cellules/g. Pour obtenir un tel résultat, on procède à une flash-pasteurisation à  $72^{\circ}\text{C}$ . Calculer la durée de pasteurisation pour que le procédé choisi soit efficace.

**2.4 - Préservation de la teneur en lysozyme lors de traitements thermiques (8 points)**

Les contaminations des ovoproduits sont le plus souvent dues à des bacilles Gram<sup>-</sup>, car la présence de lysozyme dans le blanc d'œuf s'oppose davantage à la prolifération des bactéries Gram<sup>+</sup>.

**2.4.1 - Indiquer la nature et la fonction biochimiques du lysozyme.** Expliquer son rôle par rapport aux contaminations bactériennes.

Le graphique du **document 4** représente les courbes  $\log(\text{TPL}/100) = f(\Delta t)$ .

- TPL = taux de préservation du lysozyme
- $\Delta t$  = durée d'un chauffage à  $60^{\circ}\text{C}$  (trait plein) et à  $66^{\circ}\text{C}$  (trait en pointillés)

**2.4.2 - Déterminer graphiquement pour chacune des deux courbes, la durée du traitement qui conduit à la destruction de 90 % du lysozyme.**

À l'aide du graphique du **document 4**, comparer l'influence de ces deux traitements thermiques sur le taux de préservation du lysozyme (TPL).

**2.4.3 - On peut démontrer qu'un traitement thermique d'un ovoproduit à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 100 minutes est équivalent, sur le plan microbiologique, à un traitement thermique à  $66^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes.**

Au vu de l'analyse précédente, quel barème de traitement thermique doit-on préconiser pour préserver les molécules d'intérêt (enzymes, vitamines, etc.) contenues dans les aliments ? Justifier.

**2.5 - Opération unitaire de séchage (6 points)**

**2.5.1 - Le procédé d'atomisation est le plus fréquemment utilisé.** Présenter succinctement son principe.

**2.5.2 - Donner les avantages de l'utilisation des œufs sous forme de poudre.**

## **3 - Qualité d'une préparation à base d'œufs : les pâtes fraîches (14 points)**

L'entreprise productrice de pâtes fraîches bénéficie d'une certification ISO 9001 : 2008 et son produit est labellisé.

Le diagramme de fabrication des pâtes fraîches conditionnées en barquettes operculées et un extrait du plan de contrôle des produits finis au laboratoire sont présentés dans les **documents 5 et 6**.

**3.1 - Donner la signification du sigle ISO en anglais et en français.**

**3.2 - Les pâtes fraîches sont conditionnées sous vide.** Montrer l'intérêt de ce conditionnement.

**3.3 - Citer le principal genre bactérien susceptible de présenter un risque lors de l'utilisation d'ovoproduits.**

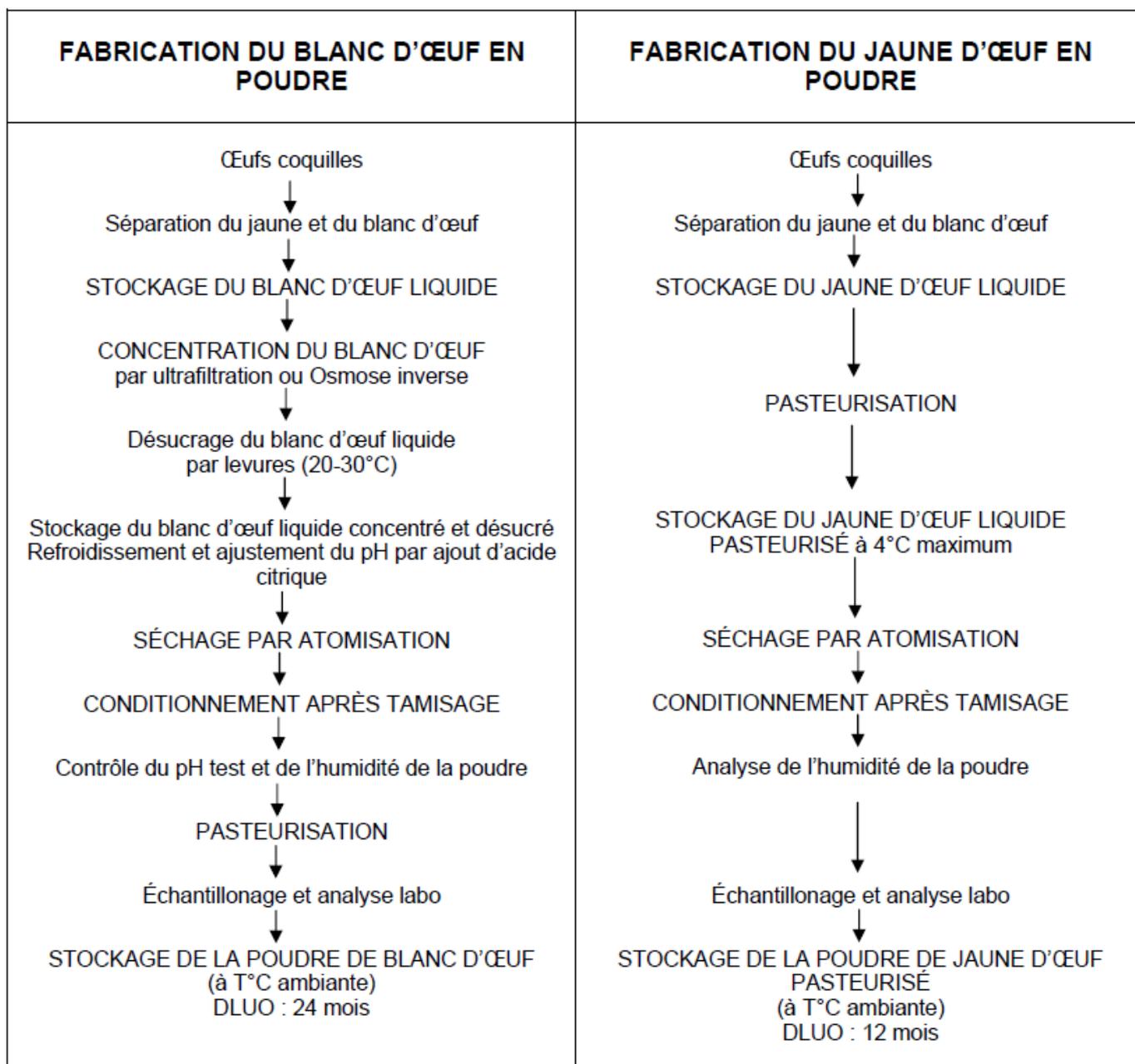
Ce type de produit porte une DLC.

Donner la signification du sigle DLC et justifier la nécessité d'une DLC.

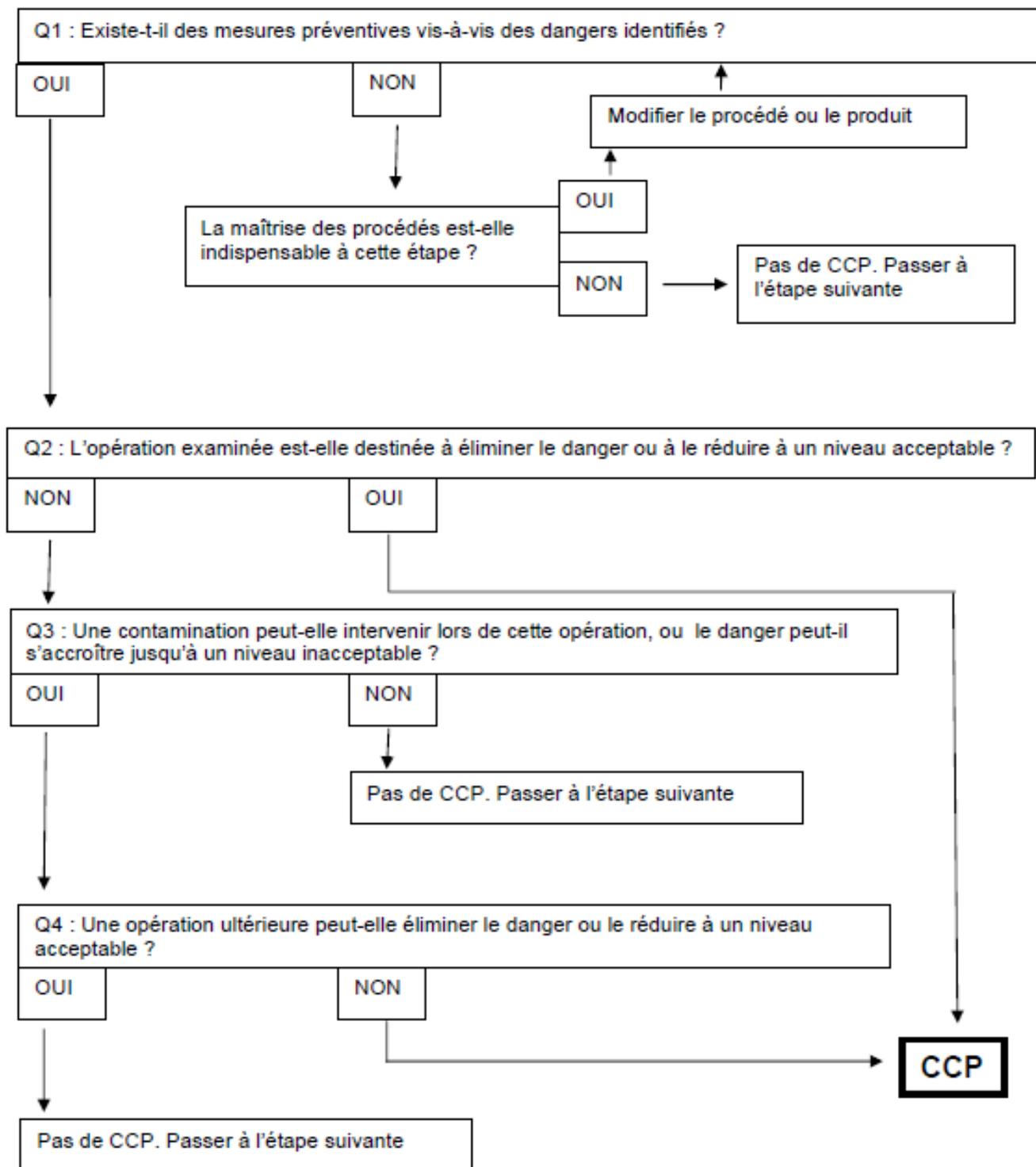
**3.4 - Définir le NQA.**

**3.5 - Réaliser une étude critique des valeurs de NQA et proposer, si besoin, des modifications de NQA en les justifiant.**

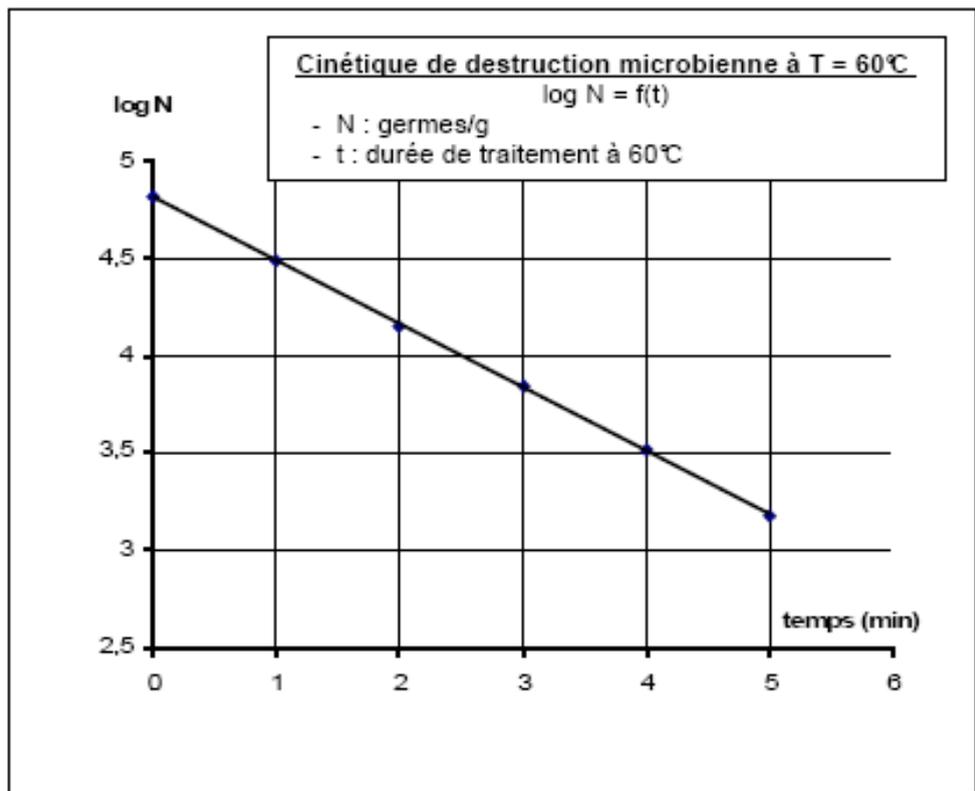
**3.6 - Quel élément distinctif sur l'emballage du produit fini permet d'identifier que le produit est labellisé ? Citer un exemple.**

**DOCUMENT 1**

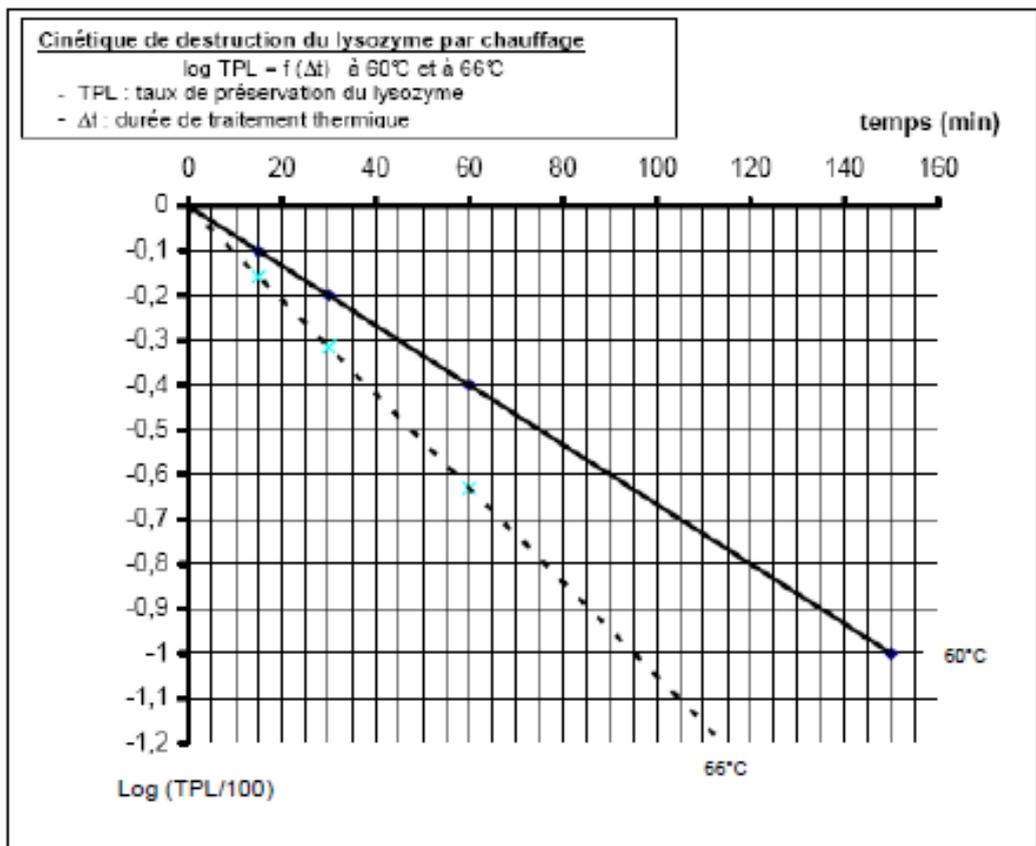
## DOCUMENT 2 : ARBRE DE DÉCISION



### DOCUMENT 3

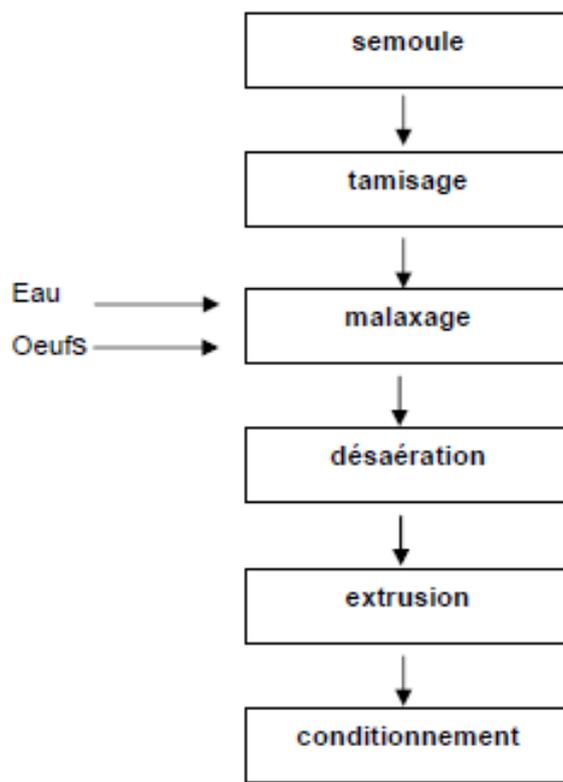


### DOCUMENT 4



Log (TPL/100)	TPL (%)
0,00	100,0
-0,02	95,5
-0,05	89,1
-0,10	79,4
-0,20	63,1
-0,30	50,1
-0,40	39,8
-0,50	31,6
-0,60	25,1
-0,70	20,0
-0,80	15,8
-0,90	12,6
-1,00	10,0
-1,10	7,9
-1,20	6,3

## DOCUMENT 5 : FABRICATION DES PÂTES FRAÎCHES CONDITIONNÉES EN BARQUETTES OPERCULÉES



## DOCUMENT 6 : EXTRAIT DU PLAN DE CONTRÔLE DES PRODUITS FINIS AU LABORATOIRE

ITEM	NQA
Film taché	0,65
Lisibilité de la DLC	0,65
Centrage du graphisme	1
Étanchéité des barquettes	0,25
Texte non-conforme (n° lot)	0,25
Absence de produit ou incomplet	1
Barquettes avec produits étrangers	0,25
Légers défauts d'aspect de la barquette	0,65
Découpe irrégulière n'affectant pas l'étanchéité	0,25

# Techniques de biochimie 2012

---

Pour les candidats non évalués en CCF

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

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

Matériels autorisés :

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

Document à rendre et àagrafer avec la copie : Feuille de traçabilité

## ANALYSES D'UNE BOISSON AU COLA

### Contexte professionnel

Les principaux ingrédients du Coca Cola® sont :

- eau gazéifiée
- sucre
- colorant : E 150
- acidifiant : E 338 = acide phosphorique
- arômes naturels
- caféine

Une canette de 33 cL de Coca Cola® contient environ 35 g de sucres. Cette forte teneur permet de réaliser un dosage par mesure de la masse volumique.

Le résultat de ce dosage est vérifié par méthode enzymatique en point final.

Incorporé à raison de 0,05 % (m/v), l'acide phosphorique confère au Coca Cola® un pH de 2,3.

L'ingestion répétée d'acide phosphorique entrave le fonctionnement des reins et favorise les calculs rénaux. Compte tenu de cette nocivité, la concentration maximale en acide phosphorique est fixée par une norme à 0,70 g.L<sup>-1</sup>.

Le dosage de l'acide phosphorique est effectué par méthode pH-métrie.

Le laboratoire associé à l'usine de production est chargé de ces contrôles.

### Compétences

- Étalonner les solutions titrantes.
- Réaliser des analyses électrochimiques.
- Réaliser des mesures de paramètres physico-chimiques.
- Réaliser des techniques d'analyses enzymatiques.
- Exprimer, valider et interpréter les résultats.

## Mises en œuvre

Activités professionnelles	Documents et ressources	Page
<p style="text-align: center;"><b>1</b></p> <p>Étalonnage d'une solution d'hydroxyde de sodium par pesée.</p> <p style="text-align: center;"><b>(16,5 points)</b></p>	Fiche protocole 1 Fiche matériel « balance » (au poste de travail)	37
<p style="text-align: center;"><b>2</b></p> <p>Dosage de l'acide phosphorique par méthode pH-métrique.</p> <p style="text-align: center;"><b>(14,5 points)</b></p>	Fiche protocole 1 Fiche matériel « balance » (au poste de travail)	37
<p style="text-align: center;"><b>3</b></p> <p>Préparation de solutions étalons de saccharose et mesure de la masse volumique des solutions préparées.</p> <p style="text-align: center;"><b>(19,5 points)</b></p>	Fiche protocole 2 Fiche matériel « balance » (au poste de travail)	38
<p style="text-align: center;"><b>4</b></p> <p>Dosage enzymatique par méthode en point final des sucres.</p> <p style="text-align: center;"><b>(23,5 points)</b></p>	Fiche protocole 3 Fiche technique 1	39 40
<p style="text-align: center;"><b>5</b></p> <p>Edition des résultats</p>	Feuille de traçabilité <b>(à compléter et à rendre avec la copie)</b> Document 1 Outil informatique	41 42

## Rapport d'analyses (6 points)

Comparer les résultats par rapport aux valeurs annoncées (sucres) ou par rapport à la norme (acide phosphorique).

Conclure sur les différentes parties.

## Fiche protocole 1 : Contrôle de la concentration en acide phosphorique (E338)

### Principe

L'acide phosphorique  $\text{H}_3\text{PO}_4$  possède trois fonctions acides qui vont être successivement neutralisées par une base forte : l'hydroxyde de sodium. L'équivalence sera déterminée à partir de la courbe pH-métrique.

La boisson contient un autre acide : l'acide carbonique utilisé pour la gazéification. Il doit être préalablement éliminé pour ne pas interférer avec les mesures.

### Matériel et réactifs

- Solution d'hydroxyde de sodium à environ  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  : 100 mL
- Cristaux d'hydrogénophthalate de potassium présenté en dessiccateur : 0,7 g
- Phénolphtaléine
- Boisson au cola, préalablement dégazée par chauffage à reflux pendant 30 minutes, refroidie à l'abri de l'air : 75 mL
- Solutions tampon pH 4 et 7 pour étalonnage du pH-mètre
- Fiole d'Erlenmeyer de 150 mL
- Burette de 25 mL
- Pipette jaugée de 50 mL
- Becher 100 mL forme haute
- pH-mètre avec électrode de verre
- Agitateur magnétique et barreau aimanté
- Sabot de pesée

### Protocole opératoire

#### Étalonnage de la solution étalon d'hydroxyde de sodium (2 essais)

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 150 mL, introduire :

- une masse  $m$  exacte d'environ 0,200 g d'hydrogénophthalate de potassium,
- de l'eau distillée pour la dissolution,
- quelques gouttes de phénolphtaléine.

Doser par la solution d'hydroxyde de sodium jusqu'au virage de l'indicateur.

**Appeler un examinateur pour la réalisation d'une des pesées.**

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

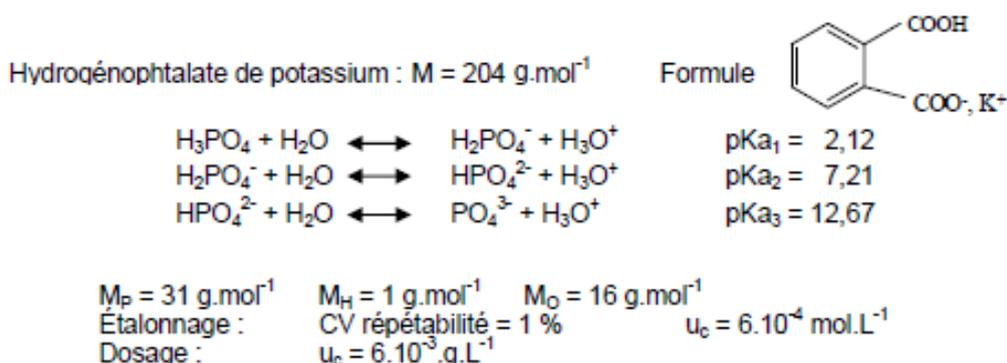
#### Dosage de l'acide phosphorique dans la boisson au cola (1 essai)

- Étalonner le pH-mètre.
- Dans un bécher forme haute, introduire 50,00 mL de la boisson au cola préalablement dégazée.
- Plonger les électrodes, mettre sous agitation magnétique et doser par la solution d'hydroxyde de sodium préalablement étalonnée en réalisant un suivi pH-métrique du dosage.

### Compte rendu

- 1.1 - Compléter la feuille de traçabilité.
- 1.2 - Calculer la concentration molaire exacte de la solution d'hydroxyde de sodium.
- 1.3 - Sur papier millimétré, tracer la courbe pH-métrique du dosage de la boisson au cola.
- 1.4 - Calculer la concentration massique de l'acide phosphorique dans la boisson analysée.

### Données



## Fiche protocole 2 : Contrôle de la teneur en sucres par mesure de masse volumique

### Principe

La présence de sucres dissous a un impact sur la masse volumique de la solution.

Les sucres utilisés dans les boissons au cola sont généralement le saccharose et un sirop de glucose/fructose. On admet que l'impact de ces différents glucides sur la masse volumique est identique ; une courbe d'étalonnage, établie à partir de solutions de saccharose seul, permettra donc d'obtenir une évaluation satisfaisante du pourcentage en sucres de la boisson.

### Matériel et réactifs

- Saccharose : 30 g
- Boisson au cola préalablement dégazée : 30 mL
- 4 fioles jaugées de 50 mL
- Pipette jaugée de 20 mL
- Bêchers de 25 mL
- Balance et matériel pour la pesée
- Thermomètre
- Sabot de pesée

### Protocole opératoire

#### Gamme d'étalonnage de saccharose

Préparer par pesée précise de saccharose, 50,00 mL de chacune des solutions étalons à 5, 10, 15 et 20 g/100 mL. Peser un petit Becher de 25 mL : relever la masse  $m_0$ .

Verser dans ce Becher, 20,00 mL de solution étalon de saccharose et peser de nouveau : soit la masse  $m_1$  obtenue.

Répéter ces opérations pour les 4 solutions étalons de saccharose (sol sac).

#### Dosage de la boisson

Peser comme précédemment 20,00 mL de la boisson au cola.

**NB** : La masse volumique dépendant de la température, il est important que l'eau distillée (utilisée pour la réalisation des solutions étalons) et la boisson au cola soient à la même température. Cette température sera relevée et indiquée sur la courbe d'étalonnage tracée.

### Compte rendu

**2.1** - Déterminer les masses de saccharose à peser pour préparer chacune des solutions étalons.

**2.2** - Calculer le pourcentage (m/v) exact en sucres.

**2.3** - Calculer la masse m de chaque solution pesée (étalons, boisson). En déduire la masse volumique de chacune des solutions.

**2.4** - Compléter le tableau des résultats du dosage sur la feuille de traçabilité.

**2.5** - À l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe d'étalonnage de l'évolution de la masse volumique en fonction du pourcentage exact en sucres.

Valider les mesures et indiquer les paramètres de la droite de régression.

**2.6** - Déterminer le pourcentage (m/v) de sucres dans la boisson analysée.

**Donnée** :  $u_C = 0,30$  g de sucre pour 100 mL.

## Fiche protocole 3 : Contrôle de la teneur en sucres par méthodes enzymatiques en point final

### Matériel et réactifs

- Boisson au cola préalablement dégazée
- Tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7
- Kit saccharose Bio Sentec
- Fiole jaugée de 100 mL
- Pipette graduée 10 mL
- Pipettes automatiques réglables
- Microcuvettes UV
- Spectrophotomètre

### Protocole opératoire

#### Préparation de l'échantillon :

Dans une fiole jaugée de 100 mL, introduire :

- 0,500 mL de boisson au cola
- 10 mL de solution tampon phosphate pour amener à pH 7
- de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge

#### Dosage :

1 essai saccharose (sucrose), 1 essai glucose/fructose.

Cf. fiche technique du kit (page 6/8).

### Compte rendu

**3.1** - Justifier le protocole mis en œuvre pour la préparation de l'échantillon de boisson au cola.

**3.2** - Compléter le tableau (feuille de traçabilité).

**3.3** - Établir les expressions littérales donnant les concentrations massiques (g.L<sup>-1</sup>) en glucose, fructose et saccharose dans la boisson au cola analysée.

**3.4** - Faire les applications numériques.

### Données :

$$\varepsilon_{\text{NADPH,H}^+} = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$$

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

$$M_{\text{saccharose}} = 342 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$u_{\text{c saccharose}} = 2,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$u_{\text{c fructose}} = u_{\text{c glucose}} = 1,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$$

## Fiche technique 1 : Contrôle de la teneur en sucres par méthode enzymatique en point final

<b>BioSenTec</b>		<b>Sucrose kit</b> <b>Kit Saccharose</b> Cat. No. 013		
Sucrose + H <sub>2</sub> O $\xrightarrow{\beta\text{-F}}$ D-glucose + D-fructose D-Glucose + ATP $\xrightarrow{\text{HK}}$ Glucose- $\beta$ -phosphate + ADP D-Fructose + ATP $\xrightarrow{\text{HK}}$ Fructose- $\beta$ -phosphate + ADP Fructose- $\beta$ -phosphate $\xrightarrow{\text{PGI}}$ Glucose- $\beta$ -phosphate Glucose- $\beta$ -phosphate + NAD <sup>+</sup> $\xrightarrow{\text{G-}\beta\text{-PDH}}$ D-gluconate- $\beta$ -phosphate + NADH, H <sup>+</sup>				
Hydrolysis reagent RH		1 x 6,7 mL Buffer pH 4,6 / $\beta$ -fructosidase 1000 U		
R1	1 x 30 mL – Buffer pH 7,5 / NAD 70 mg / ATP 90 mg			
R2	1 x 0,6 mL – HK 160 U / G- $\beta$ -PDH 200 U			
R3	1 x 0,6 mL – PGI 380 U			
C	Control solution			
<b>Assay procedure:</b> Wavelength: 340 nm / Optical path: 1 cm / Temperature: 20-37°C Measurement: against water or air. Linearity : 0,05 to 0,80 g.L <sup>-1</sup>				
	Sucrose		Glucose / Fructose	
	Blank	Sample	Blank	Sample
Hydrolysis reagent RH	0,10 mL	0,10 mL	0	0
Sample	0	0,05 mL	0	0,05 mL
Mix and wait 20 min				
R 1	0,50 mL	0,50 mL	0,50 mL	0,50 mL
Water	0,90 mL	0,85 mL	1,00 mL	0,95 mL
Mix and read A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>
R 2	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL
Mix and read A <sub>2</sub> after 15 min	A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>
R 3	0	0	0,01 mL	0,01 mL
Mix and read A <sub>3</sub> after 15 min			A <sub>3</sub>	A <sub>3</sub>
<b>Calculation</b>				
Determine the values for blank and samples: From D-Glucose / D-Fructose column.				
	$\Delta A_{\text{glucose}} = [A_2 - A_1]_{\text{sample}} - [A_2 - A_1]_{\text{blank}}$			
	$\Delta A_{\text{fructose}} = [A_3 - A_2]_{\text{sample}} - [A_3 - A_2]_{\text{blank}}$			
From Sucrose column:				
	$\Delta A_{\text{total glucose}} = [A_2 - A_1]_{\text{sample}} - [A_2 - A_1]_{\text{blank}}$			
Determine				
	$\Delta A_{\text{sucrose}} = \Delta A_{\text{total glucose}} - \Delta A_{\text{glucose}}$			
<b>Storage instructions and reagent stability</b>				
The reagents are stable up to the indicated month of expiry, if stored at 2-8°C, contamination is avoided.				
<b>Warnings and precautions</b>				
Do not swallow. Avoid contact with the skin and mucous membranes. Take necessary precautions for the use of laboratory reagents.				
<b>General information on sample preparation</b>				
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Use liquid samples, clear, colorless and with pH practically 7.5, directly or after dilution.</li> <li>• Crush or homogenize solid or semi-solid samples.</li> <li>• Deproteinize samples containing proteins with perchloric acid; alternatively clarify with Carrez reagents.</li> </ul>			

## FEUILLE DE TRAÇABILITÉ

(à compléter et à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR .....

Date : .....

Poste n° .....

Dosage pH-métrique d'un polyacide : l'acide phosphorique (E338) Étalonnage

	Essai 1	Essai 2
m hydrogénophthalate de potassium (g)		
V NaOH versé (mL)		

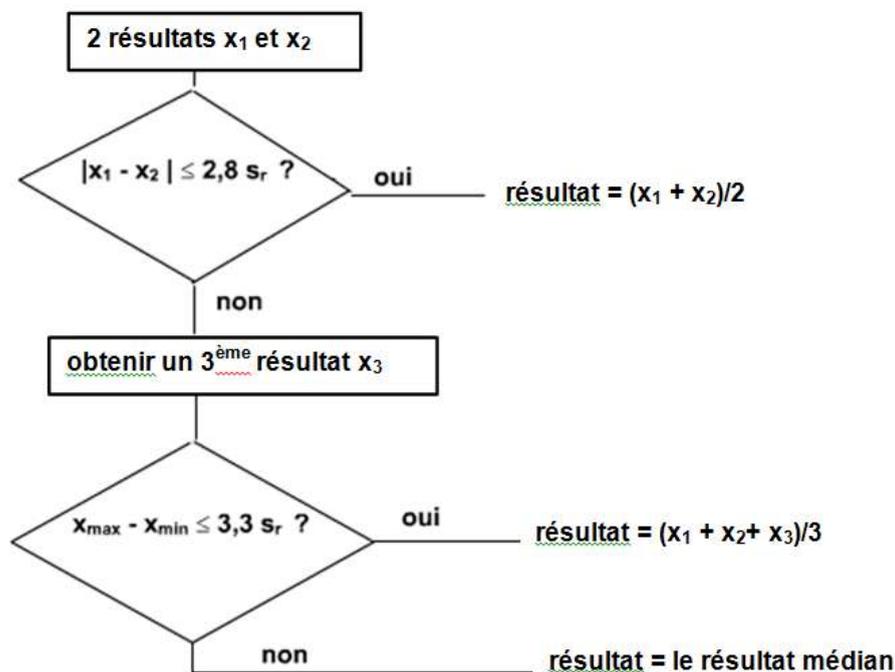
Dosage des sucres par mesure de la masse volumique

	Solution saccharose à 5 g/100 mL	Solution saccharose à 10 g/100 mL	Solution saccharose à 15 g/100 mL	Solution saccharose à 20 g/100 mL	Boisson au cola
m saccharose pesée en g					
% en sucres exact					
$m_0$ en g					
$m_1$ en g					
m en g					
masse volumique en g/100 mL					

Dosage des sucres par méthode enzymatique en point final

	Témoin saccharose	Essai saccharose	Témoin glucose- fructose	Essai glucose- fructose
Absorbance A <sub>1</sub>				
Absorbance A <sub>2</sub>				
Absorbance A <sub>3</sub>				

## DOCUMENT 1 : 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).

$$(*)s_r = \frac{Cv.\bar{x}}{100}$$

# Techniques de microbiologie 2012

---

Pour les candidats non évalués en CCF

Durée : 3 heures

Coefficient : 4

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

Matériels autorisés :

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

Document à rendre et àagrafer avec la copie : Feuille de traçabilité

**Attention : le protocole du premier jour ne pourra être réutilisé le second jour.**

## CONTRÔLE QUALITÉ ET SURVEILLANCE D'UNE ZONE CONCHYLICOLE

### Contexte professionnel

Un laboratoire indépendant est chargé du contrôle qualité et de la surveillance d'une zone conchylicole (élevage de bivalves comme les moules, les huîtres...).

Dans le cadre du contrôle qualité, un dénombrement d'*Escherichia coli* est réalisé régulièrement afin de détecter une éventuelle contamination fécale.

Les *Escherichia coli* sont d'autre part dénombrés dans la chair des coquillages pour répondre au critère microbiologique de sécurité des denrées alimentaires du règlement CE n° 2073/2005.

Une surveillance des phycotoxines peut se faire indirectement par le dénombrement d'algues incriminées.

À des fins d'accréditation, le laboratoire met en place une validation de sa méthode de dénombrement ainsi qu'une vérification de la souche de référence.

### Objectifs

Réaliser des dénombrements par filtration et méthode NPP. Vérifier l'identité de la souche de référence.

### Compétences évaluées

- Préparer les matériels et milieux.
- Réaliser des techniques d'observation macroscopique et microscopique des microorganismes. Réaliser des techniques d'identification.
- Réaliser des techniques de quantification des microorganismes et des virus. Réaliser des techniques de culture de microorganismes.
- Vérifier les équipements et mettre en œuvre les mesures de prévention adaptées.

**Mise en œuvre**

<b>Activités professionnelles</b>	<b>Ressources-Documents</b>	<b>Page</b>	<b>Documents à compléter et à joindre à la copie</b>
<p style="text-align: center;"><b>1</b></p> <p style="text-align: center;">Vérification de l'identité de la souche de référence</p> <p style="text-align: center;"><b>(21 points)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 1</li> <li>- Fiche technique protocole d'ensemencement de la galerie fournie par le centre</li> <li>- Fiches sécurité 1 et 2</li> </ul>	<p style="text-align: center;">45</p> <p style="text-align: center;">48</p>	Feuille de traçabilité 50
<p style="text-align: center;"><b>2</b></p> <p style="text-align: center;">Validation de la méthode de dénombrement après filtration</p> <p style="text-align: center;"><b>(11,5 points)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 2</li> <li>- Fiche technique du spectrophotomètre ( au poste de travail)</li> <li>- Fiche protocole 3</li> </ul>	<p style="text-align: center;">46</p> <p style="text-align: center;">47</p>	
<p style="text-align: center;"><b>3</b></p> <p style="text-align: center;">Dénombrement d'<i>E. coli</i> dans l'eau d'élevage</p> <p style="text-align: center;"><b>(17 points)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 3</li> </ul>	<p style="text-align: center;">46</p>	
<p style="text-align: center;"><b>4</b></p> <p style="text-align: center;">Dénombrement d'<i>E. coli</i> dans la chair des coquillages</p> <p style="text-align: center;"><b>(21 points)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiche protocole 4</li> <li>- Document 1 : préparation de la suspension de coquillages</li> </ul>	<p style="text-align: center;">47</p> <p style="text-align: center;">47</p>	

## Fiche protocole 1 : Validation de l'identité de la souche de référence

La souche utilisée pour la validation de méthode est *Escherichia coli* de référence :

ATCC<sup>®</sup> 25922. On se propose de vérifier l'identité, notamment à l'aide d'une microgalerie d'identification.

### Matériel et réactifs

- 1 gélose nutritive inclinée notée « **GNI N° X** »
- 1 tube contenant 2 mL d'eau physiologique noté « **eau  $\phi$  2 mL** »
- 1 tube contenant 5 mL d'eau physiologique noté « **eau  $\phi$  5 mL** »
- 1 milieu VF
- 1 gélose nutritive
- 1 galerie API 20E avec notice
- Pipettes Pasteur
- Réactifs pour la coloration de Gram
- Réactifs pour tests enzymatiques rapides

### Mode opératoire

Réaliser des examens nécessaires à l'orientation de l'identification.

***Montrer la réalisation des tests à un examinateur.***

Ensemencer la galerie de milieu distribuée par le centre et incuber à 37°C pendant 24 heures.

### Compte rendu (sur la copie)

1.1 - Consigner les résultats obtenus et indiquer s'ils sont en accord avec ceux attendus.

## Fiche protocole 2 : Préparation de la souche de référence en vue de la validation de la méthode de filtration

La souche de référence *Escherichia coli* doit être préparée à 1 UFC.mL<sup>-1</sup> dans un flacon de 100 mL d'eau physiologique.

### Matériel

- Souche d'*E. coli* de référence en bouillon nutritif à environ 0,1 unité de DO (0,1 unité de DO correspond à 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>)
- Glace
- Spectrophotomètre
- 3 cuves + parafilm
- Pipettes Pasteur
- 1 bouillon nutritif stérile
- 7 tubes contenant chacun 9 mL d'eau physiologique
- 8 pipettes stériles de 1 mL
- Micropipettes
- 1 flacon contenant 100 mL d'eau physiologique stérile noté « **eau  $\phi$  100 mL** »

### Mode opératoire

***Vérifier la densité optique (DO) 600 nm de la souche en présence d'un examinateur.***

Préparer des dilutions de la souche en eau physiologique afin d'obtenir 100 UFC dans le flacon de 100 mL. Le volume utilisé sera compris entre 0,1 et 1 mL.

### Compte rendu

2.1 - Compléter la feuille de traçabilité.

## **Fiche protocole 3 : Dénombrement des *E. coli* de l'eau par filtration**

Le dénombrement des *E. coli* dans l'eau est effectué par une méthode de filtration sur membrane et mise en culture noté milieu Rapid'*E. coli* 2.

### **Matériel**

- 1 appareil à filtration
- 2 membranes de filtration
- 2 géloses Rapid' *E. coli* 2
- 1 flacon noté « **eau de rinçage** » (200 mL)
- 1 flacon noté « **eau d'élevage** » (référence : « ZE... »)
- 1 flacon de 100 mL d'eau physiologique de la souche de référence *E. coli* préparée selon la fiche protocole 2

### **Mode opératoire**

Filtrer 100 mL de la souche de référence *E. coli*, suspension préparée selon la fiche protocole 2. Déposer la membrane sur le milieu fourni.

Effectuer la même opération sur 100 mL d'eau d'élevage. Mettre en incubation.

### **Compte rendu (sur la copie)**

**3.1** - Préciser les conditions d'incubation.

**3.2** - Indiquer sur la feuille de traçabilité le nombre de colonies attendu après filtration et incubation de la souche de référence.

## Fiche protocole 4 : Dénombrement en milieu liquide des *Escherichia coli* contaminant les coquillages

Le dénombrement des *E. coli* s'effectue par la méthode du NPP après préparation de la suspension selon le protocole indiqué dans le **document 1**.

### Matériel

- 1 flacon noté « **échantillon pour essai** » (environ 40 mL) (référence : « ZE... »)
- 3 flacons contenant exactement 45 mL de diluant
- 12 tubes contenant 5 mL de Laurylsulfate-Tryptose triple concentration + cloche
- 12 tubes contenant 5 mL d'eau peptonée sans indole
- 4 pipettes stériles de 10 mL
- 5 pipettes stériles de 5 mL

### Mode opératoire

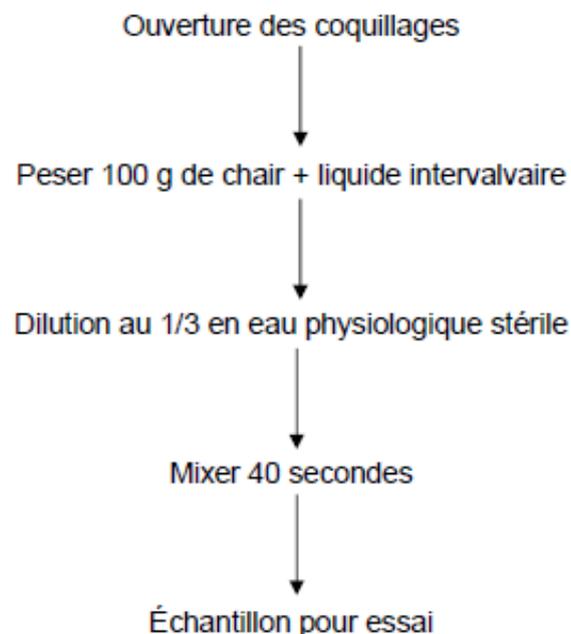
Effectuer les dilutions au  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  dans 45 mL de diluant.

Ensemencer 10 mL de l'échantillon pour essai et de chacune des dilutions en triple exemplaires dans le bouillon Laurylsulfate-Tryptose (milieu à triple concentration, 5 mL par tube + cloche de Durham) et en eau peptonée.

### Compte rendu (sur la copie)

- 4.1 - Indiquer la température d'incubation.
- 4.2 - Indiquer sur la feuille de traçabilité la réalisation de dilutions.

## DOCUMENT 1 : Préparation de la suspension de coquillage



## Fiche de sécurité 1

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES DE SECURITE
<b>REACTIFS DE COLORATION</b>		
<b>Cristal Violet</b>  T	<i>Autre dénomination :</i> Violet de gentiane Benzèneméthanol, 4-(diméthylamino)- $\alpha$ -hydrochlorure $C_{25}H_{30}N_3Cl$ Solvant : éthanol, oxalate d'ammonium	R45 – Peut causer le cancer. S36/37 – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. S45 – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). S53 – Éviter l'exposition et se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation.
<b>Réactif de Lugol</b>  Xn	<i>Autres dénominations :</i> Réactif iodo-ioduré, Solution d'iodure de potassium iodée Iode $I_2$ Iodure de potassium KI	R20/21 – Nocif par inhalation et par contact avec la peau. S23 – Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols. S25 – Éviter le contact avec les yeux.
<b>Éthanol</b>  Danger	Éthanol (alcool éthylique dénaturé) 95 % $CH_3CH_2OH$	H 225 : Liquide et vapeurs très inflammables. P 210 : Tenir à l'écart de la chaleur/ des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer.
<b>Éthanol</b>  F		R11 – Facilement inflammable. S7 – Conserver le récipient bien fermé. S16 – Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles. Ne pas fumer.
<b>Fuchsine</b>  Xn	<i>Utilisée après dilution au 1/10*</i> Rosaniline $C_{20}H_{20}ClN_3$ Solvant : éthanol, phénol	R10 – Inflammable. R21/22 – Nocif par contact avec la peau et par ingestion. R36/38 – Irritant pour les yeux et la peau. S36/37 – 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>		
<b>Réactif oxydase</b>  Attention  Xn	TMPD : N, N, N', N'-tétraméthyl-1,4-phénylènediamine $C_{10}H_{15}N_2$	H 302 Nocif par ingestion. H 312 Nocif par contact cutané. H 332 Nocif par inhalation.  R20/21/22 – Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. S28.1 – 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>  Danger   O  C	<i>Autre dénomination :</i> Eau oxygénée  Peroxyde d'hydrogène > à 60% $H_2O_2$	H 302 Nocif par ingestion. H 318 Provoque des lésions oculaires graves. H 331 Toxique par inhalation.  P 261 : Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz /brouillards/ vapeurs/aérosols. P 280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P305+P351+P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.  R8 – Favorise l'inflammation des matières combustibles. R34 – Provoque des brûlures. S3 – Conserver dans un endroit frais. S28.1 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau. S36 – Porter un vêtement de protection approprié. S45 – 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 souche de référence en vue de la validation de la méthode de filtration

DO de la souche d'*E. coli* en bouillon nutritif

$DO_{600nm} =$

Préparation du flacon de 100 mL de la souche de référence en eau physiologique

Nombre de colonies attendu après filtration et incubation de la souche de référence

N =

2 - Dénombrement des *E. coli* dans les coquillages bivalves vivants

Réalisation des dilutions :

# Techniques de biologie cellulaire et moléculaire 2012

---

Pour les candidats non évalués en CCF

Durée : 3 heures

Coefficient : 2

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

Matériels autorisés :

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

Document à rendre et àagrafer avec la copie : Feuille de traçabilité

## CONTROLE D'UN LOT DE VACCIN CONTRE LA ROUGEOLE

### Contexte professionnel

Un laboratoire pharmaceutique réalise le contrôle d'un produit fini sur un lot de vaccin contre la rougeole (lot 218 B).

Le vaccin contrôlé est constitué d'une souche de virus vivant atténué.

Le contrôle implique la vérification du titre en virus par deux techniques :

- hémagglutination,
- technique des plages de lyse.

### Compétences

- Identifier et/ou quantifier par des techniques d'immunoprécipitation et d'agglutination.
- Étudier et quantifier un effet cytotoxique.
- Valider et interpréter des résultats.

## Mise en œuvre

L'ordre de passage sous PSM sera indiqué en début de séance

Activités professionnelles	Ressources et documents	Pages	Document à compléter et à joindre à la copie
<p style="text-align: center;"><b>1</b></p> Évaluation de l'activité hémagglutinante du vaccin contre la rougeole <p style="text-align: center;"><b>(14 points)</b></p>	Fiche protocole 1	52	Feuille de traçabilité <b>(page 56)</b>
<p style="text-align: center;"><b>2</b></p> Détermination du titre de la suspension virale vaccinant contre la rougeole <p style="text-align: center;"><b>(22 points)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Préparation de la suspension cellulaire</li> <li>-Préparation de la gamme de dilutions de la suspension cellulaire obtenue</li> <li>-Détermination du titre</li> </ul>	Fiche protocole 2  Fiche hématimètre	53 et 54  54	

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

Valider la technique des plages de lyse sachant qu'une quantité minimale de  $10^4$  cellules doit être introduite dans chaque puits.

Conclure quant à la validité du lot de vaccin testé par ces deux méthodes, sachant que pour pouvoir servir de vaccin, le titre hémagglutinant doit être supérieur à 1280 et que le vaccin est considéré comme efficace avec un titre supérieur à  $5.10^4$  UFP.mL<sup>-1</sup> de vaccin pur.

## Fiche protocole 1 : Évaluation de l'activité hémagglutinante du vaccin contre la rougeole

### Principe

Le virus de la rougeole possède à sa surface des protéines capables d'agglutiner certains globules rouges. Cette propriété est utilisée pour déterminer le titre hémagglutinant du vaccin testé.

La détermination du titre de la suspension vaccinale est réalisée en microplaque.

### Matériel et réactifs

- 1 microplaque avec un couvercle
- 1 microtube
- Pipettes automatiques
- Diluant noté « Dil » : 500 µL
- Contrôle positif noté « C<sup>+</sup> » : 50 µL
- Contrôle négatif noté « C<sup>-</sup> » : 50 µL
- Globules rouges à 1 % noté « GR » : 1 mL
- Vaccin à tester noté « VAC 218 B » : 50 µL
- Agitateur de microplaques
- Miroir pour la lecture

### Protocole opératoire

Réaliser une dilution au 1/20 du vaccin à analyser

Répartir dans les puits de la microplaque (volume en µL)

N° cupules	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Diluant		25	25	25	25	25	25	25	25	25		
Vaccin prédilué au 1/20	25	25										
Redistribuer			25	25	25	25	25	25	25	25		
Contrôle positif											25	
Contrôle négatif												25
Globules rouges	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75

**Réaliser les dilutions du vaccin devant un examinateur.**

Rejet 25 µL

Couvrir la plaque.

Agiter la plaque sur un agitateur de microplaques.

Laisser à température ambiante 1 heure en évitant les vibrations. Procéder à la lecture.

#### Convention de lecture :

- 2+ : Agglutination avec tapis uni d'hématies couvrant le fond du puits.
- 1+ : Agglutination avec tapis uni d'hématies un peu rétracté avec ou sans bouton résiduel.
- : Bouton de sédimentation.

### Compte rendu

- 1.1 - Préciser la composition des réactifs « contrôle positif » et « contrôle négatif ».
- 1.2 - Indiquer le rôle des contrôles.
- 1.3 - Renseigner la feuille de traçabilité.
- 1.4 - Donner le titre du vaccin testé sachant que le titre hémagglutinant correspond à l'inverse de la plus forte dilution finale donnant une réaction à 1+.

## Fiche protocole 2 : Détermination du titre de la suspension virale vaccinant contre la rougeole

### Principe

Le virus de la rougeole a un effet cytopathogène et cytolitique sur certaines cellules dites permissives.

On dispose d'une culture confluente de cellules Véro permissives au virus de la rougeole. Après trypsination, on met en contact les cellules et des dilutions du virus de la rougeole présent dans le vaccin testé dans une plaque 6 puits de culture cellulaire. Après incubation plusieurs jours et coloration au bleu de méthylène, on compte le nombre de plages de lyse obtenu pour chaque dilution du virus.

### Matériel et réactifs.

#### Au poste de travail :

- 1 hématimètre de Malassez et sa lamelle planée
- 1 microtube
- 1 pipette automatique P50
- 1 compteur manuel de cellules
- Bleu de méthylène de Funk noté « **BM** » : 500 µL

#### Au poste de culture cellulaire :

- Pipettes stériles + système d'aspiration
- Tube à hémolyse bouché
- 1 microplaque de culture cellulaire 6 puits
- 1 boîte de culture de cellules confluentes « **Vero** »
- 1 flacon de PBS noté « **PBS** » : 7 mL
- 1 tube de trypsine (à l'étuve à 37°C) noté « **trypsine** » : 1,5 mL
- 1 flacon de DMEM + 2 % de sérum de veau fœtal noté « **DMEM** » : 6 mL
- Vaccin contre la rougeole stérile dilué au 1/20 noté « **Vaccin 1/20** » : 1 mL Matériel commun
- Microscope inversé
- Étuve à 37°C - 5 % de CO<sub>2</sub>

### Protocole opératoire

#### Préparation de la suspension cellulaire :

Observer la culture cellulaire au microscope inversé.

***Montrer à un examinateur le champ observé au microscope inversé.***

Éliminer le milieu de culture.

Rincer la surface du tapis cellulaire avec 5 mL de PBS puis ré-aspirer. Ajouter 1 mL de trypsine.

Incuber à 37°C pendant 5 à 10 minutes en surveillant le décollement complet des cellules au microscope. Arrêter l'action de la trypsine avec 5 mL de milieu DMEM.

Homogénéiser la suspension cellulaire.

Transférer dans un tube à hémolyse pour réaliser une numération.

#### Préparation de la gamme de dilutions de la suspension virale :

Réaliser, respectivement dans les puits numérotés 1 à 5 de la plaque de culture cellulaire, avec le milieu DMEM, des dilutions successives de raison 1/10 de la suspension virale fournie dans 450 µL final. Le puits 6 servira de témoin.

Ajouter, dans chaque puits, 100 µL de la suspension cellulaire préparée. Ajouter 1 mL de DMEM.

Incuber à 37°C dans une étuve avec 5 % de CO<sub>2</sub> pendant au moins 5 jours sans déplacer les plaques.

#### Numération de la suspension cellulaire obtenue :

Réaliser une dilution volume à volume de la suspension cellulaire dans le bleu de méthylène de Funk.

***Réaliser la mise en hématimètre devant un examinateur.***

Compter les cellules en hématimètre de Malassez (schéma du quadrillage de l'hématimètre (page 64 ).

***Présenter un champ microscopique à un examinateur.***

Déterminer le nombre de cellules viables par mL de suspension cellulaire.

**Détermination du titre :**

Après 5 à 6 jours d'incubation le protocole de coloration des plages de lyse proposé ci-dessous a été réalisé.

- Observation au microscope inversé la présence de plages de lyse.
- Élimination dans ce cas du milieu de culture des puits.
- Ajout dans chaque puits d'1 mL de formol à 10 %.
- Incubation d'une heure.
- Élimination du fixateur.
- Coloration au bleu de méthylène.
- Comptage à l'œil nu des plages de lyse.
- Les résultats suivants ont été obtenus :

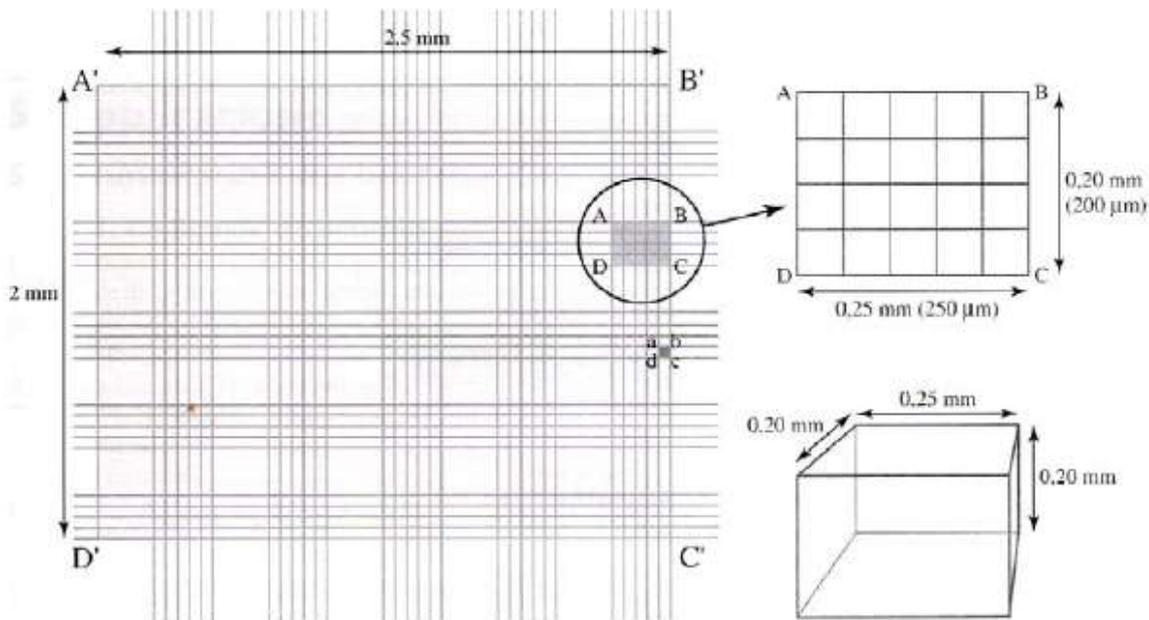
Puits	1	2	3	4	5	T
Nombre de plages de lyse	Incomptable	256	27	3	0	0

**Compte rendu**

- 2.1 - Décrire le résultat des observations macroscopique et microscopique de la culture.
- 2.2 Présenter, sous forme d'un tableau récapitulatif, les résultats de la numération de la culture cellulaire en précisant le volume de comptage, le nombre total de cellules, le nombre de cellules viables comptées.
- 2.3 - Déterminer le nombre de cellules viables introduit dans chaque puits de la plaque.
- 2.4 - Calculer les dilutions initiales du virus réalisées dans les puits 1 à 5 et compléter le tableau de la feuille de traçabilité.
- 2.5 - Justifier la composition du puits témoin. Expliquer son rôle.
- 2.6 - Déterminer le titre du virus de la rougeole en UFP.mL<sup>-1</sup> de vaccin pur.

**HÉMATIMÈTRE ET SES NETTOYAGE/DÉSINFECTION**

SCHÉMA DU QUADRILLAGE DE L'HÉMATIMÈTRE DE MALASSEZ



- 1 - Lavage avec un détergeant : 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.

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

NOM DE L'OPÉRATEUR .....

Date : .....

Poste n° .....

Lot : .....

### Évaluation de l'activité hémagglutinante du vaccin contre la rougeole

N° cupules	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Dilutions finales du vaccin												
Résultats												

### Numération de la suspension cellulaire obtenue

Nombre de rectangles comptés :

Nombre de cellules totales numérotées :

Règles de comptage :

Puits	1	2	3	4	5	T
Dilution initiale du virus						
Nombre de plages de lyse	Incomptable	256	27	3	0	0

# Sujet de mathématiques 2013

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.

Une feuille de papier millimétré est fournie.

## EXERCICE 1 (10 points)

Les bordures d'autoroute possèdent parfois des bassins de décantation dont le rôle est de recueillir les eaux pluviales ruisselant sur l'asphalte et les éléments polluants qu'elles peuvent drainer.

À la suite d'un accident de la circulation, un camion-citerne déverse une partie de son contenu sur la chaussée d'une autoroute. La réglementation en vigueur impose l'isolation, par fermeture de vannes, du bassin de décantation proche de l'accident, de façon à ce que la concentration en matières polluantes dans le bassin ne dépasse pas  $15 \mu\text{g/L}$ . Cette concentration est de  $1,3 \mu\text{g/L}$  au moment où les matières polluantes provenant du camion-citerne commencent à se déverser dans le bassin.

**Dans cet exercice, on cherche à prévoir au bout de combien de temps la concentration en matières polluantes dans le bassin atteindra  $15 \mu\text{g/L}$  si on n'isole pas le bassin et à quel moment les capteurs installés dans le bassin déclencheront la fermeture des vannes.**

On mesure en minute le temps  $t$  écoulé à partir de l'instant où les matières polluantes provenant du camion-citerne commencent à se déverser dans le bassin de décantation. On admet que, tant que le bassin n'est pas isolé par fermeture des vannes, la concentration à l'instant  $t$  en matières polluantes dans le bassin, exprimée en  $\mu\text{g/L}$ , peut être modélisée par  $f(t)$ , où  $f$  est solution de l'équation différentielle (E) :  $y' + 0,03y = 0,75$ . On a donc  $f(0) = 1,3$ .

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

### A. Résolution sur l'intervalle $[0; +\infty[$ de l'équation différentielle (E) : $y' + 0,03y = 0,75$

1. On considère l'équation différentielle ( $E_0$ ) :  $y' + 0,03y = 0$ , où  $y$  est une fonction de la variable  $t$ , définie et dérivable sur l'intervalle  $[0 ; +\infty [$ , et  $y'$  la fonction dérivée de la fonction  $y$ . Déterminer les solutions de l'équation différentielle ( $E_0$ ) sur l'intervalle  $[0 ; +\infty [$ .

2. Soit  $g$  la fonction définie sur l'intervalle  $[0 ; +\infty [$  par  $g(t) = a$ , où  $a$  est une constante réelle. Déterminer  $a$  pour que la fonction  $g$  soit une solution particulière de l'équation différentielle (E).

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

4. Démontrer que la solution  $f$  de l'équation différentielle (E) qui vérifie la condition initiale  $f(0) = 1,3$  est la fonction définie sur l'intervalle  $[0 ; +\infty [$  par :  $f(t) = 25 - 23,7 e^{-0,03t}$ .

## B. Étude de la fonction $f$

$f$  est définie sur l'intervalle  $[0 ; +\infty[$  par:  $f(t) = 25 - 23,7 e^{-0,03t}$ .

On note C sa courbe représentative dans le plan muni d'un repère orthogonal.

1 - Déterminer la limite de la fonction  $f$  quand  $t$  tend vers  $+\infty$

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

a) Calculer  $f'(t)$  pour tout  $t$  de l'intervalle  $[0 ; +\infty[$ .

b) Expliquer le signe de  $f'(t)$  pour tout  $t$  de l'intervalle  $[0 ; +\infty[$ .

3 - Dresser le tableau de variations complet de la fonction  $f$ .

4 - a) Recopier et compléter le tableau de valeurs ci-dessous. Arrondir les résultats au dixième.

$t$	0	10	20	30	40	50	60
$f(t)$	1,3						

b) Tracer la courbe C sur la feuille de papier millimétré jointe au sujet ou visualiser cette courbe sur l'écran de la calculatrice et indiquer sur la copie les caractéristiques de la fenêtre utilisée (valeurs de X min, X max, Y min et Y max et des «pas ») et l'allure de la courbe obtenue.

## C. Traitement de la problématique

On rappelle que  $f(t)$  modélise la concentration (exprimée en  $\mu\text{g/L}$ ) en matières polluantes dans le bassin à l'instant  $t$  (exprimé en minute) tant que le bassin n'est pas isolé par fermeture des vannes.

1 - Si le bassin n'était pas équipé d'un dispositif d'isolation par fermeture de vannes, quelle serait la valeur autour de laquelle se stabiliserait la concentration en matières polluantes ? Justifier.

2 - A l'aide de la courbe C obtenue à la question **B 4 b)**, sur papier millimétré ou sur écran de la calculatrice, déterminer graphiquement une valeur approchée à l'unité du temps  $t_0$  (exprimé en minute) au bout duquel la concentration en matières polluantes dans le bassin atteindrait  $15 \mu\text{g/L}$  si le bassin n'était pas isolé par fermeture de vannes. Expliquer la démarche.

3 - La concentration en matières polluantes dans le bassin est relevée par un capteur dont les mesures sont légèrement instables.

Pour prendre en compte cette instabilité, on met en place un dispositif associant la fermeture des vannes à l'instant  $t$  ( $t \geq 2$ ) à la valeur moyenne de la concentration en matières polluantes mesurée par le capteur entre les instants  $t - 2$  et  $t$ . La fermeture des vannes est déclenchée lorsque cette valeur moyenne atteint  $14 \mu\text{g/L}$ .

La valeur moyenne de la concentration (exprimée en  $\mu\text{g/L}$ ) en matières polluantes entre les instants  $t - 2$  et  $t$  est modélisée par:

$$V(t) = \frac{1}{2} \int_{t-2}^t f(u) du = \frac{1}{2} (F(t) - F(t-2)), \text{ où } F \text{ est une primitive de la fonction } f.$$

a) Donner une primitive  $F$  de la fonction  $f$  sur l'intervalle  $[0 ; +\infty[$ .

b) Calculer  $V(t)$  et vérifier que:  $V(t) = 25 + Ae^{-0,03t}$  avec  $A \approx -24,4$ .

c) Résoudre l'équation:  $25 - 24,4e^{-0,03t} \approx 14$ . Donner une valeur approchée au dixième de la solution  $T$  de cette équation.

d) Que représente  $T$  dans le contexte de l'exercice ?

## EXERCICE 2 (10 points)

Une coopérative est spécialisée dans la récolte de la fleur de sel. Elle utilise une machine automatique pour remplir des sachets de fleur de sel dont la masse théorique doit être de 250 grammes. Un sachet est dit conforme si sa masse  $m$ , exprimée en gramme, vérifie :  $240 \leq m \leq 260$

*Les probabilités demandées dans cet exercice peuvent être calculées en utilisant le formulaire joint au sujet ou la calculatrice. Quelle que soit l'option retenue on fera figurer sur la copie quelques étapes de la démarche suivie. Les résultats des calculs de probabilités seront arrondis*

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

### A. Loi normale

L'étude statistique de la production permet d'admettre que la variable aléatoire  $M$  qui mesure, en gramme, la masse d'un sachet suit une loi normale de moyenne  $\mu = 250$  et d'écart type  $\sigma = 5,3$ .

1 - On choisit au hasard un sachet dans la production. Calculer la probabilité que le sachet soit conforme.

2 - a) Calculer  $P(M \geq 245)$ .

b) Un gros client exigeant souhaite qu'au moins trois quarts des sachets qu'il achète aient une masse supérieure à 245 grammes. Sera-t-il satisfait? Justifier.

### B. Loi binomiale et loi de Poisson

*On considère dans cette partie que la probabilité qu'un sachet ne soit pas conforme est:  $p=0,06$*

La coopérative constitue des lots de 50 sachets pour la vente et étudie le nombre de sachets non conformes contenus dans un lot.

La production de la coopérative est suffisamment importante pour que l'on puisse assimiler la constitution d'un lot à un tirage au hasard et avec remise de 50 sachets. On note  $X$  la variable aléatoire qui associe à chaque lot de 50 sachets le nombre de sachets non conformes de ce lot.

1 - Justifier que la variable aléatoire  $X$  suit une loi binomiale et préciser ses paramètres.

2 - Que représente la probabilité  $P(X=1)$  dans le contexte de l'exercice? Calculer  $P(X=1)$ .

3 - On approche la loi de probabilité de  $X$  par une loi de Poisson.

a) Justifier que cette loi de Poisson a pour paramètre  $\lambda = 3$ .

b) On note  $Y$  une variable aléatoire qui suit une loi de Poisson de paramètre  $\lambda = 3$ . En utilisant la variable aléatoire  $Y$ , estimer la probabilité qu'il y ait au plus cinq sachets non conformes dans un lot de 50 sachets.

### C. Test d'hypothèse

Après la révision annuelle de la machine utilisée pour remplir les sachets de fleur de sel, le responsable qualité de la coopérative veut contrôler la valeur de la masse moyenne  $m$  (exprimée en gramme) d'un sachet de fleur de sel. Il construit pour cela un test d'hypothèse bilatéral au seuil de signification de 5%. L'hypothèse nulle  $H_0$  est:  $m = 250$ . L'hypothèse alternative  $H_1$  est:  $m \neq 250$ .

On note  $\bar{M}$  la variable aléatoire qui, à chaque échantillon aléatoire de 50 sachets prélevés dans la production de la coopérative, associe la masse moyenne (en gramme) d'un sachet de l'échantillon. La production est suffisamment importante pour qu'on puisse assimiler la constitution d'un échantillon à un tirage au hasard et avec remise de 50 sachets.

On suppose que la variable aléatoire  $\bar{M}$  suit une loi normale de moyenne  $m$  et d'écart type  $\frac{5,3}{\sqrt{50}}$ .

1 - Sous l'hypothèse nulle  $H_0$ , déterminer le nombre réel positif  $a$  tel que

$$P(250-a \leq M \leq 250+a) = 0,95 .$$

Arrondir au centième.

2 - Énoncer la règle de décision du test.

3 - On prélève au hasard 50 sachets dans la production.

Les masses en gramme de ces sachets se répartissent de la façon suivante :

Masse en gramme	[236;240 [	[240;244 [	[244;248 [	[248;252 [	[252;256 [	[256;260 [	[260;264 [
Nombre de sachets	5	6	9	13	8	7	2

a) En utilisant les centres des intervalles, calculer une valeur approchée de la masse moyenne d'un sachet de cet échantillon.

b) Quelle va être la conclusion du responsable qualité?

# Sujet de sciences physiques et chimiques 2013

La calculatrice (conforme à la circulaire n°99-186 du 16-11-99) est autorisée. La clarté du raisonnement et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation de copies.

## A. RADIOACTIVITÉ (15 points)

La thyroïde est une glande, située dans la région cervicale antérieure, appliquée contre le larynx et la partie supérieure de la trachée. La fonction principale de cette glande est la sécrétion des hormones thyroïdiennes à partir de l'**iode** alimentaire que nous consommons (poissons, fruits de mer, lait...) qui se fixe temporairement sur cette glande.

En cas de rejet d'iode radioactif dans l'atmosphère lors d'un accident nucléaire, il est recommandé de prendre des comprimés d'iode stable. En effet, la prise de ces comprimés a pour objectif de saturer la thyroïde en iode et d'éviter que l'iode radioactif ne s'y fixe après inhalation, ce qui augmenterait la probabilité de développer un dysfonctionnement de la thyroïde.

L'iode a pour numéro atomique  $Z = 53$ . Il existe de nombreux isotopes de l'iode mais seul l'iode 127 est stable. L'iode 131 est l'isotope principal rejeté par les réactions de fission des centrales nucléaires. Il se désintègre par radioactivité de type  $\beta^-$  et sa demi-vie est de 8 jours.

Données:

Extrait de la classification périodique des éléments :

antimoine ${}_{51}\text{Sb}$	tellure ${}_{52}\text{Te}$	iode ${}_{53}\text{I}$	xénon ${}_{54}\text{Xe}$	césium ${}_{55}\text{Cs}$
---------------------------------	-------------------------------	---------------------------	-----------------------------	------------------------------

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

Masse molaire de l'iode 131:  $M = 131 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

1 - Donner la composition du noyau d'iode  ${}^{131}_{53}\text{I}$ .

2 - L'iode 127 et l'iode 131 sont des isotopes. Donner la définition de deux isotopes.

3 - L'iode 131 est radioactif  $\beta^-$ .

Écrire l'équation de désintégration de l'iode 131 en rappelant les lois utilisées.

4 - Donner la relation de la loi de décroissance radioactive décrivant l'évolution du nombre de noyaux radioactifs  $N$  en fonction du temps, pour un échantillon comportant initialement un nombre  $N_0$  de noyaux radioactifs.

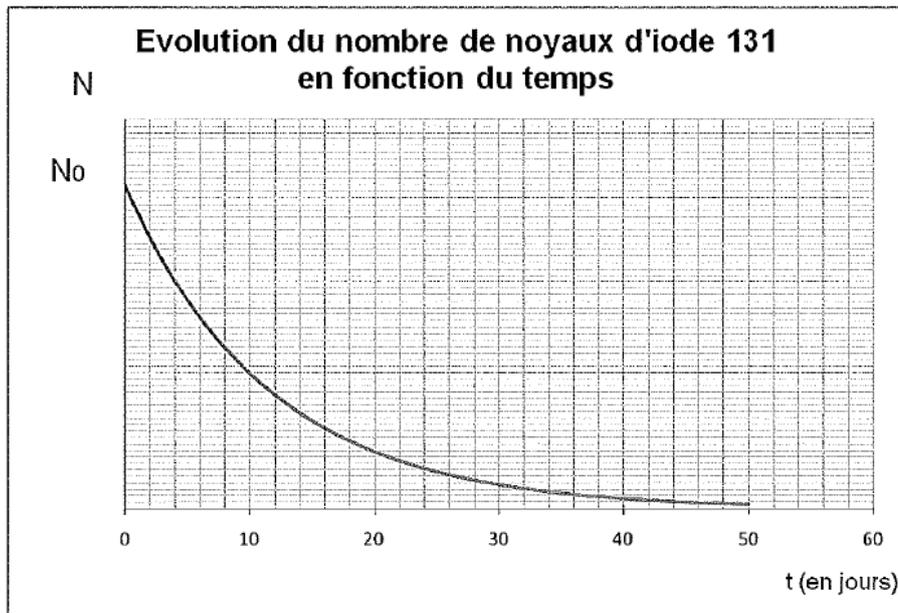
5 - Détermination de la valeur de la demi-vie  $t_{1/2}$  de l'iode 131.

On souhaite déterminer la valeur de la demi-vie de l'iode 131. Pour cela, on étudie un échantillon d'iode 131, on mesure à différentes dates le nombre  $N$  de noyaux d'iode 131 restants. Les résultats obtenus figurent dans le graphique ci-dessous.

5-1 - Rappeler la définition de la demi-vie radioactive notée  $t_{1/2}$ .

5-2 - Déterminer graphiquement, en explicitant votre démarche, la valeur de cette demi-vie  $t_{1/2}$  de l'iode 131.

5-3 - En utilisant la relation entre la constante radioactive  $\lambda$  de l'iode 131 et sa demi-vie  $t_{1/2}$ , retrouver la valeur précédente de cette demi-vie. On précise que la valeur de la constante radioactive de l'iode 131 est égale à  $\lambda = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$



### 6 -Durée de traitement nécessaire.

En cas d'accident nucléaire, les autorités sanitaires conseillent de prendre un comprimé d'iode stable.

On suppose qu'il n'y a plus de danger sanitaire lorsque le nombre  $N$  de noyaux radioactifs présents a été divisé par 10 par rapport à la quantité initiale  $N_0$  produite au moment de l'incident.

En supposant que le nuage radioactif reste immobile, déterminer en utilisant la loi de décroissance radioactive, au bout de combien de jours le traitement pourra être arrêté ?

## B. TRAITEMENT DES EAUX PAR FLOCCULATION (15 points)

Les traitements des eaux usées constituent le premier enjeu de santé publique à l'échelle mondiale.

Ces traitements se divisent généralement en plusieurs étapes. L'une d'elle est l'étape de coagulation / floculation, permettant de séparer les petites particules solides présentes dans l'eau. Les séparations liquide-solide telles que décantation, sédimentation, deviennent inefficaces lorsque les particules solides sont trop petites (dimension inférieure au  $\mu\text{m}$ ). Le principe de la coagulation / floculation est de rassembler les très fines particules contenues dans l'eau, afin de créer des flocons ou « flocs », particules plus grosses qui sédimenteront plus facilement.

### Données:

Accélération de la pesanteur:  $g = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$

Masse volumique des particules en suspension:  $\rho = 1,54 \cdot 10^3 \text{ kg.m}^{-3}$

Rayon moyen d'une particule:  $r = 0,80 \mu\text{m}$

Masse volumique de l'eau à température de travail:  $\rho_e = 1,00 \cdot 10^3 \text{ kg.m}^{-3}$

Viscosité de l'eau à la température de travail:  $\eta_e = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ Pa.s}$

Volume d'une sphère de rayon  $r$ :  $V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3$

Force de frottement visqueux, qui s'exerce sur une particule sphérique de rayon  $r$  en mouvement, à la vitesse  $v$  dans l'eau de viscosité  $\eta_e$  s'écrit  $\vec{f} = -k\vec{v}$  avec  $k = 6 \pi \eta_e r$

### 1 - Sédimentation des particules

On considère une particule sphérique de masse volumique  $\rho$  et de rayon  $r$ , initialement immobile, en suspension dans l'eau ; celle-ci acquiert rapidement un mouvement rectiligne. On suppose que la poussée d'Archimède notée  $P_A$  s'applique sur la particule.

**1-1** - Représenter sur un schéma, sans souci d'échelle, en les identifiant clairement les forces appliquées à la particule : poids, poussée d'Archimède et force de frottement visqueux.

**1-2** - Établir l'expression littérale de chacune des 3 forces s'exerçant sur la particule, en fonction des données.

**1-3** - On constate expérimentalement qu'à partir de l'instant initial, la vitesse de la particule augmente et atteint très rapidement une limite constante notée  $v_{lim}$ . Quelle est alors la nature du mouvement ?

**1-4** - Quelle relation vectorielle entre les trois forces précédemment citées peut-on écrire, lorsque la vitesse a pour valeur  $v_{lim}$  ?

**1-5** - En projetant sur un axe ZZ' vertical orienté vers le haut, donner la relation entre les expressions des forces s'exerçant sur la particule lorsque la vitesse atteint la limite constante  $v_{lim}$ .

**1-6** - Montrer que la vitesse limite s'exprime par  $v_{lim} = \frac{2(\rho - \rho_e) r^2 g}{9 \eta_e}$  puis calculer sa valeur.

**1-7** - Quelle est la durée  $\Delta t$  mise par la particule pour parcourir 1,0 cm? Justifier alors l'affirmation soulignée dans le texte d'introduction.

## 2 - Intérêt de la floculation

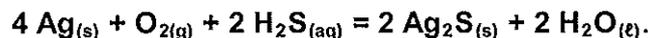
On étudie un « floc » constitué par un groupement d'une centaine de particules. La grandeur qui est alors modifiée par rapport à l'étude précédente est le rayon  $r$  de la particule. On considérera que le « floc » est de forme sphérique avec un rayon  $r' = 8 r$ , la masse volumique restant inchangée ( $\rho' = \rho$ ). On note  $v'_{lim}$  la vitesse limite du « floc ».

**2-1** - Montrer que  $\frac{v'_{lim}}{v_{lim}} = 64$  et expliquer alors l'intérêt de la floculation dans le traitement des eaux chargées.

**2-2** - En dehors de la floculation, la centrifugation est une autre technique fréquemment utilisée. Expliquer brièvement son principe, en précisant en particulier quelle grandeur est modifiée lors de l'utilisation de cette technique.

## C. ENTRETIEN DES OBJETS ARGENTÉS (15 points)

Les objets recouverts d'argent (bijoux, orfèvrerie, ...) se dégradent au fil du temps du fait de l'apparition d'un film noir de sulfure d'argent  $Ag_2S$ . La formation de ce solide résulte de l'action conjuguée du dioxygène atmosphérique et du sulfure d'hydrogène  $H_2S$  (présent dans l'atmosphère, issu de l'alimentation ou issu des protéines de notre organisme). Le processus répond à l'équation de réaction suivante:



Cet exercice propose dans un premier temps l'explicitation de la formation du film noir de sulfure d'argent sur un couvert argenté.

Dans un deuxième temps sera abordée une technique visant à régénérer l'argent métallique par élimination du dépôt noir de sulfure d'argent afin de redonner au couvert argenté son éclat originel.

Donnée : A 25 °C :  $\frac{RT}{F} \cdot \ln x \approx 0,06 \cdot \log x$

### 1 - Formation du film de sulfure d'argent à la surface d'un couvert argenté

En l'absence d'ion sulfure  $S^{2-}$ , le potentiel standard du couple  $Ag^+/Ag(s)$  vaut  $E_1^0 = + 0,80 V$ .

En présence d'ion sulfure (issu de l'hydrogène sulfureux  $H_2S$ ), l'argent métallique  $Ag$  devient très sensible à l'oxydation, comme en témoigne la valeur du potentiel standard :

$$E_2^0 \text{ du couple } Ag_2S(s) / Ag(s) : E_2^0 = - 0,69 V$$

Nous allons mettre en évidence de façon qualitative l'évolution du potentiel d'oxydoréduction  $E(Ag^+/Ag(s))$

**1-1** --Écrire la demi-équation électronique du couple  $Ag^+/Ag(s)$

**1-2** - En déduire l'expression littérale du potentiel d'oxydoréduction, noté  $E(\text{Ag}^+/\text{Ag}(s))$ , du couple  $\text{Ag}^+/\text{Ag}(s)$  en fonction de  $E_1^0$  (à  $\theta = 25^\circ\text{C}$ )

**1-3** - En présence d'ion sulfure  $\text{S}^{2-}$ , les ions argent  $\text{Ag}^+$  conduisent à la formation d'un précipité de sulfure d'argent  $\text{Ag}_2\text{S}$ . Écrire l'équation de réaction de précipitation.

**1-4** - À partir de la réponse donnée à la question 1-3, expliquer sans calcul, pourquoi le potentiel d'oxydoréduction  $E(\text{Ag}^+/\text{Ag}(s))$  diminue lorsque des ions sulfure sont présents dans le milieu.

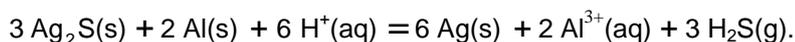
**1-5** - Expliquer alors succinctement pourquoi l'oxydation de l'argent métallique  $\text{Ag}$  par le dioxygène de l'air est beaucoup plus facile en présence d'ions sulfure. On précise que dans ces conditions:  $E(\text{O}_2(\text{g}) / \text{H}_2\text{O}(\ell)) > E(\text{Ag}^+ / \text{Ag}(s)) > E(\text{Ag}_2\text{S}(s) / \text{Ag}(s))$ .

## 2 - Entretien d'un couvert argenté terni

Au fond d'un cristallisoir rempli d'eau salée, on dispose une feuille de papier aluminium ( $\text{Al}(s)$ ). On y plonge l'objet argenté terni par la couche noire de sulfure d'argent, en assurant un contact entre l'aluminium et l'objet. Après quelques minutes, on observe la réduction du sulfure d'argent en argent métallique : l'objet a retrouvé son éclat.

Une odeur désagréable d'« œuf pourri » émane du cristallisoir au fur et à mesure de la disparition du sulfure d'argent.

**2-1** - En vous aidant des demi-équations électroniques des couples  $\text{Al}^{3+} / \text{Al}(s)$  et  $\text{Ag}_2\text{S}(s) / \text{Ag}(s)$ , montrer que l'équation de la réaction d'oxydoréduction mise en jeu lors du processus s'écrit :



Données :  $E^0(\text{Ag}_2\text{S}(s) / \text{Ag}(s)) = -0,69 \text{ V}$  et  $E^0(\text{Al}^{3+} / \text{Al}(s)) = -1,68 \text{ V}$  à  $\theta = 25^\circ\text{C}$

**2-2** - Donner l'expression littérale de la force électromotrice standard  $\Delta E^0$  de la pile ainsi formée. Calculer sa valeur.

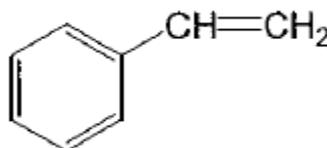
**2-3** - Expliciter le caractère spontané de cette réaction dans les conditions standards.

**2-4** - À partir de l'équation de la réaction, justifier l'odeur désagréable qui émane du milieu réactionnel.

**2-5** - Préciser pourquoi il est nécessaire d'utiliser de l'eau salée plutôt que de l'eau distillée pour réaliser cette expérience.

## D. CHIMIE ORGANIQUE (15 points)

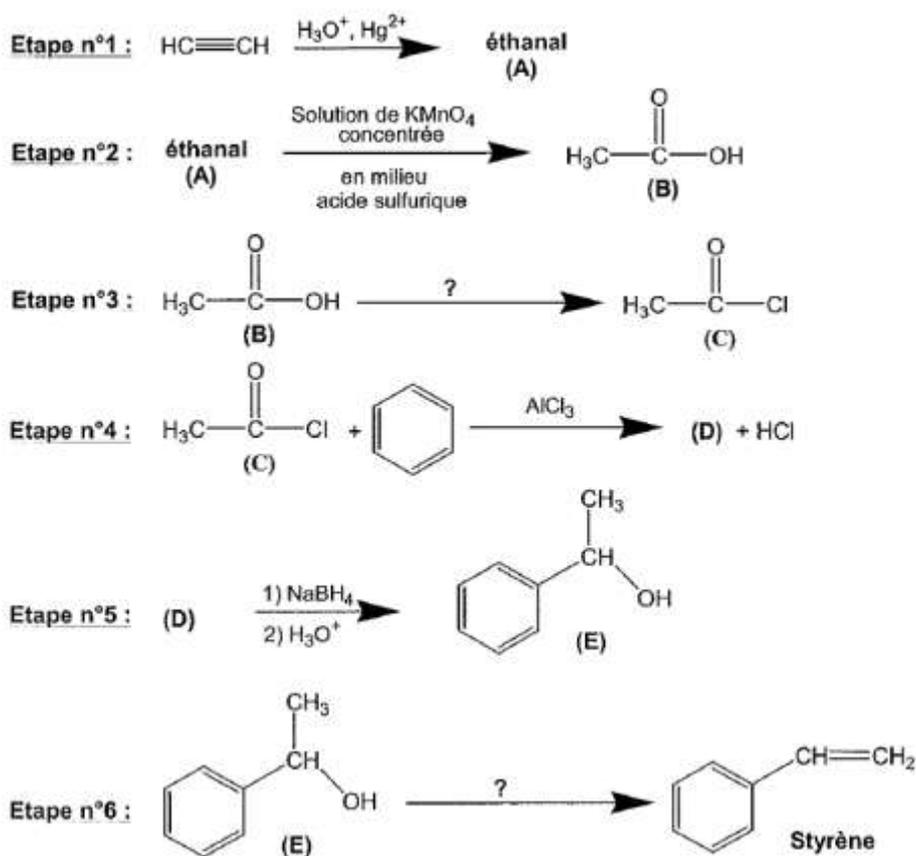
Le styrène est un composé issu de la pétrochimie. Il est également naturellement présent (en faibles quantités) dans certaines plantes. La formule semi-développée du styrène est donnée ci-dessous :



La production industrielle de styrène a évolué très rapidement à partir de la seconde guerre mondiale pour répondre aux besoins croissants en caoutchouc. À l'heure actuelle, le styrène constitue la matière première pour la fabrication de matières plastiques telles que :

- le polystyrène cristal qui entre dans la constitution des boîtiers pour CD ;
- le polystyrène expansé utilisé pour l'emballage ;
- le polystyrène blanc avec lequel on fabrique des couverts en plastique ;
- un caoutchouc synthétique noté SBR, utilisé notamment dans les pneumatiques...

Le styrène est produit industriellement en deux étapes à partir du benzène et de l'éthylène (ou éthène) en présence de catalyseurs appropriés. Cet exercice se propose d'étudier une autre voie de synthèse envisageable pour le styrène :



## 1 - Étape n° 1

1-1 - En appliquant le modèle VSEPR (ou modèle de Gillespie), préciser la géométrie autour des 2 atomes de carbone dans l'acétylène  $\text{HC}\equiv\text{CH}$ . Détailler le raisonnement.

1-2 - Donner la formule semi-développée de l'éthanal (A).

## 2 - Étape n° 2

2-1 - Nommer la molécule (B) selon les règles de nomenclature officielle.

2-2 - Écrire les demi-équations d'oxydation et de réduction mises en jeu et écrire l'équation globale de la réaction. On rappelle que le couple  $\text{MnO}_4^- / \text{Mn}^{2+}$  est mis en jeu.

## 3 - Étape n° 3

3-1 - Indiquer un réactif qui permet de transformer (B) en (C).

3-2 - Nommer la molécule (C) selon les règles de nomenclature officielle.

## 4 - Étape n° 4

4-1 - Écrire la formule semi-développée de la molécule (D).

4-2 - Donner le nom de la réaction mise en jeu.

4-3 - Préciser le rôle du chlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  dans la réaction.

## 5 - Étape n° 5

5-1 - On réalise le spectre infrarouge du composé obtenu à l'issue de cette étape. En utilisant le tableau de données IR fourni en annexe, indiquer comment on peut vérifier que l'on a bien formé le composé (E) d'une part et qu'il ne reste plus de réactif (D) d'autre part.

5-2 - Nommer la molécule (E) selon les règles de nomenclature officielle.

5-3 - La molécule (E) peut exister sous forme de deux énantiomères. Représenter l'énantiomère de configuration absolue R. On justifiera le raisonnement en citant (sans les détailler) les règles utilisées.

## 6 - Étape n° 6

6-1 - Préciser les conditions opératoires permettant de passer de la molécule (E) au styrène.

6-2 - Indiquer le type de réaction mise en jeu

## ANNEXE : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE : TABLE DES NOMBRES D'ONDE DES VIBRATIONS D'ÉLONGATION ET DE DÉFORMATION.

Liaison	Nature	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )
O-H alcool libre	Élongation	3590-3650
O-H alcool lié	Élongation	3200-3600
N-H amine	Élongation	3300-3500
N-H amide	Élongation	3100-3500
C <sub>di</sub> -H	Élongation	-3300
C <sub>tri</sub> -H	Élongation	3030-3100
C <sub>tri</sub> -H aromatique	Élongation	3000-3100
C <sub>tet</sub> -H	Élongation	2850-2970
C <sub>tri</sub> -H aldéhyde	Élongation	2700-2900
O-H acide carboxylique	Élongation	2500-3200
C=C	Élongation	2100-2260
C=N nitriles	Élongation	2200-2260
C=O anhydride	Élongation	1800-1850
C=O chlorure d'acide	Élongation	1790-1815
C=O ester	Élongation	1735-1750
C=O aldéhyde et cétone	Élongation	1700-1740
C=O acide carboxylique	Élongation	1700-1725
C=O amide	Élongation	1650-1700
C=C	Élongation	1620-1690
C=C aromatique	Élongation	1450-1600
N=N	Élongation	1400-1500
C=N	Élongation	1640-1690
C <sub>tet</sub> -O-C <sub>tet</sub> (étheroxydes)	Élongation	1070-1150
C <sub>tet</sub> -OH (alcools)	Élongation	1010-1200
C <sub>tet</sub> -O-C <sub>tri</sub> (esters) C <sub>tri</sub> -O-C <sub>tri</sub> (anhydrides)	Élongation	1050-1300

# Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2013

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

## LES MICROALGUES : UNE SOURCE D'ACIDES GRAS POLYINSATURÉS (AGPI)

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques unicellulaires que l'on trouve dans les eaux douces et marines et qui entrent dans la composition du phytoplancton.

Certaines microalgues sont particulièrement intéressantes puisque leurs lipides sont riches en acides gras polyinsaturés d'intérêt des séries oméga 3 (par exemple l'acide docosahexaénoïque;  $C_{22:6 \omega 3}$  ou D.H.A.) et oméga 6 (par exemple l'acide arachidonique ;  $C_{20:4 \omega 6}$ ).

Ces acides gras polyinsaturés sont particulièrement importants pour le développement du cerveau et en tant que précurseurs de messagers biologiques comme les prostaglandines.

Les AGPI sont extraits aujourd'hui essentiellement à partir d'huile de poisson, ce qui présente des problèmes organoleptiques et d'approvisionnement selon la saison de pêche.

Les microalgues fournissent donc une alternative intéressante pour la fourniture de ces acides gras polyinsaturés. Cultivées en bioréacteurs, leur approvisionnement est constant et les extraits lipidiques ne présentent pas d'odeur désagréable.

Aujourd'hui des microalgues, comme *Odontella aurita*, sont même commercialisées, sous forme de gélules, en tant que complément alimentaire du fait de leur richesse en oméga 3.

### 1 - Origine et aspects structuraux des acides gras polyinsaturés (5 points)

La biosynthèse des acides gras polyinsaturés se déroule selon le schéma donné dans le **document 1**.

**1.1-** Chez les mammifères les acides gras polyinsaturés doivent faire l'objet d'un apport exogène. Justifier à l'aide du **document 1**. Comment appelle-t-on ce type d'acides gras?

**1.2-** Écrire la formule développée de l'acide palmitique.

**1.3-** Chez les végétaux, les désaturases catalysent l'oxydation de l'acide oléique lié à une phosphatidylcholine pour produire les AGPI.

Donner la formule développée d'une phosphatidylcholine contenant un acide gras  $C_{18:0}$  en position 1 et de l'acide oléique en position 2.

**1.4 -** Préciser la position des doubles liaisons présentes dans la molécule d'acide arachidonique à l'aide de la nomenclature biochimique conventionnelle.

### 2 - La biosynthèse des acides gras (24 points)

La biosynthèse des acides gras débute par la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA puis une série de réactions permet d'allonger la chaîne en incorporant à chaque fois un chaînon dicarbone (**document 2**).

#### 2.1 - Formation du malonyl-CoA (13 points)

**2.1.1 -** Compléter la réaction présentée dans le **document 2a**.

Donner les formules développées des groupements acétyl et malonyl.  
Préciser le nom de l'enzyme et celui du coenzyme impliqué.

**2.1.2** - Chez les vertébrés, l'enzyme qui catalyse la formation du malonyl-CoA est une enzyme allostérique.

**2.1.2.1** - Quelles sont les caractéristiques structurales et cinétiques de ce type d'enzyme ?

**2.1.2.2** - Le palmitoyl-CoA, considéré comme un produit final de la voie métabolique exerce un **effet feed-back** sur cette enzyme. Expliquer ce type de régulation.

**2.1.2.3** - Le citrate est un activateur de cette enzyme.

Représenter l'allure des courbes  $V_i = f([\text{substrat}])$  en présence et en absence de citrate.

**2.1.3** - Chez les végétaux, le début de la biosynthèse des acides gras se situe dans le stroma des chloroplastes.

La formation du malonyl-CoA y est régulée par une modification du pH et de la concentration en  $\text{Mg}^{2+}$ . L'activation de l'enzyme qui catalyse cette formation a lieu lors de la phase lumineuse de la photosynthèse. Montrer que cette activation est due à une augmentation du pH dans le stroma.

## 2.2 - Incorporation des chaînons dicarbonés (11 points)

**2.2.1** - L'ensemble des réactions permettant l'allongement de la chaîne d'acide gras est catalysé par un complexe multienzymatique.

**2.2.1.1** - Nommer ce complexe.

**2.2.1.2** - Définir la notion de complexe multienzymatique. Quel est l'intérêt d'une telle organisation ?

**2.2.2** - D'après les réactions des **documents 2a** et **2b**, établir le bilan de la biosynthèse de l'acide palmitique à partir de l'acétyl-CoA.

**2.2.3** - La biosynthèse des acides gras nécessite l'apport d'ATP et de pouvoir réducteur sous forme de NADPH,  $\text{H}^+$ .

**2.2.3.1** - Comment appelle-t-on un processus qui consomme de l'énergie ?

**2.2.3.2** - A partir du document 3, écrire l'équation de la réaction d'oxydo-réduction du couple  $\text{NADP}^+$ , NADPH,  $\text{H}^+$ .

**2.2.3.3** - Montrer l'intérêt de la localisation de la biosynthèse des acides gras dans le chloroplaste chez les végétaux.

**2.2.3.4** - Chez les vertébrés, citer une origine possible du NADPH,  $\text{H}^+$ .

## 3 - Étude expérimentale de l'enrichissement en AGPI d'extraits de microalgues (21 points)

La microalgue retenue pour l'étude est *Isochrysis galbana*, du fait de la grande richesse en acide docosahexanoïque ( $\text{C}_{22} : 6 \omega 3$  ou D.H.A.) de ses phospholipides.

La méthode d'enrichissement retenue est la suivante :

- extraction des lipides totaux
- séparation des différentes classes de lipides
- hydrolyse en présence d'une lipase discriminante contre le DHA
- transméthylation des acides gras polyinsaturés et dosage par chromatographie en phase gazeuse.

### 3.1 - Extraction des lipides totaux (1 point)

L'extraction des lipides est effectuée selon le protocole donné dans le **document 4**.

Dans quelle phase, méthanolique ou chloroformique, retrouvera-t-on les lipides ? Justifier.

### 3.2 - Séparation des différentes classes de lipides (4 points)

La séparation des lipides (cholestérol, glycolipides, phospholipides et triglycérides) est réalisée sur une mini colonne de silice non greffée.

Après évaporation du solvant sous un flux d'azote, l'extrait est repris dans 100  $\mu\text{L}$  de chloroforme et déposé en haut de la colonne après que celle-ci ait été rincée par 5 mL de chloroforme,

L'élution se fait alors en trois étapes :

- récupération d'une fraction 1 par passage de 20 mL de chloroforme
- récupération d'une fraction 2 par passage de 30 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (5V/1V).
- récupération d'une fraction 3 par passage de 20 mL de méthanol.

3.2.1 - Citer le type de chromatographie mise en œuvre. Justifier.

3.2.2 - Indiquer la composition de chacune des trois fractions récupérées. Justifier la réponse.

### 3.3 - Hydrolyse en présence d'une lipase discriminante (6 points)

Une lipase discriminante agit préférentiellement sur les liaisons engageant des acides gras saturés ou monoinsaturés et très peu sur celles engageant les AGPI à longue chaîne.

3.3.1 - Le **document 5** présente les activités discriminantes de quelques lipases. La lipase F est la plus appropriée pour l'étape d'enrichissement en AGPI. Justifier la réponse.

3.3.2 - A quelle classe d'enzyme appartiennent les lipases ?

3.3.3 - Expliquer le principe de la codification internationale des enzymes définie par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie et donner le premier chiffre de ce numéro de code dans le cas des lipases.

3.3.4 - Cette lipase présente une grande spécificité de coupure. Définir les termes spécificité et affinité.

### 3.4 - Préparation de la solution enzymatique et contrôle de l'activité lipasique (10 points)

3.4.1 - La lipase commerciale est étiquetée à 1,5  $\mu\text{Katal.g}^{-1}$ .

3.4.1.1 - A quelle grandeur correspond la valeur donnée en  $\mu\text{Katal.g}^{-1}$  ?

3.4.1.2 - Sachant que la lipase commerciale n'est pas pure, comment évoluerait cette valeur si le pourcentage de pureté augmentait ? Justifier la réponse.

3.4.1.3 - Quelle masse d'enzyme faut-il peser pour préparer 200 mL de solution de lipase à exactement 200  $\text{U.L}^{-1}$ .

3.4.2 - La lipase commerciale ayant été stockée quelques mois, on contrôle son activité. Ceci est réalisé grâce au kit enzymatique présenté dans le **document 6a**.

3.4.2.1 - Les mesures d'absorbance ont été réalisées toutes les 20 secondes pendant 4 minutes contre un blanc réactif. Les résultats sont présentés dans le **document 6b**.

Donner la composition du blanc réactif.

3.4.2.2 - La concentration d'activité catalytique de la solution enzymatique est obtenue en multipliant la variation d'absorbance en fonction du temps par un facteur  $F = 199793$ .

Concentration d'activité catalytique lipasique ( $\text{U.L}^{-1}$ ) =  $F \cdot \Delta A / \Delta t$  avec  $\Delta A / \Delta t$  en  $\text{s}^{-1}$

Justifier la valeur de F.

3.4.2.3 - Calculer la concentration d'activité catalytique de la solution lipasique. Conclure sur la conservation de l'enzyme sachant que l'écart type en conditions de reproductibilité de la méthode de dosage est de 3  $\text{U.L}^{-1}$ .

## 4 - Étude de la composition en acides gras de l'extrait d'algues par chromatographie en phase gazeuse (10 points)

Après l'étape de coupure enzymatique, les acides gras encore greffés sur les phospholipides sont transméthylés en présence de méthanol en milieu alcalin et à température ambiante, **document 7**. Les acides gras méthylés sont dosés par chromatographie en phase gazeuse.

4.1 - Quel est le double intérêt de la réaction de transméthylation ?

4.2 - Donner un schéma de principe d'un chromatographe en phase gazeuse.

4.3 - Le **document 8** présente le chromatogramme obtenu suite à l'injection de la fraction initiale d'extrait de microalgues.

4.3.1 - Analyser l'ordre de sortie des différents acides gras.

4.3.2 - Quelles modifications pourront être observées sur le chromatogramme de l'extrait après l'étape discriminante ?

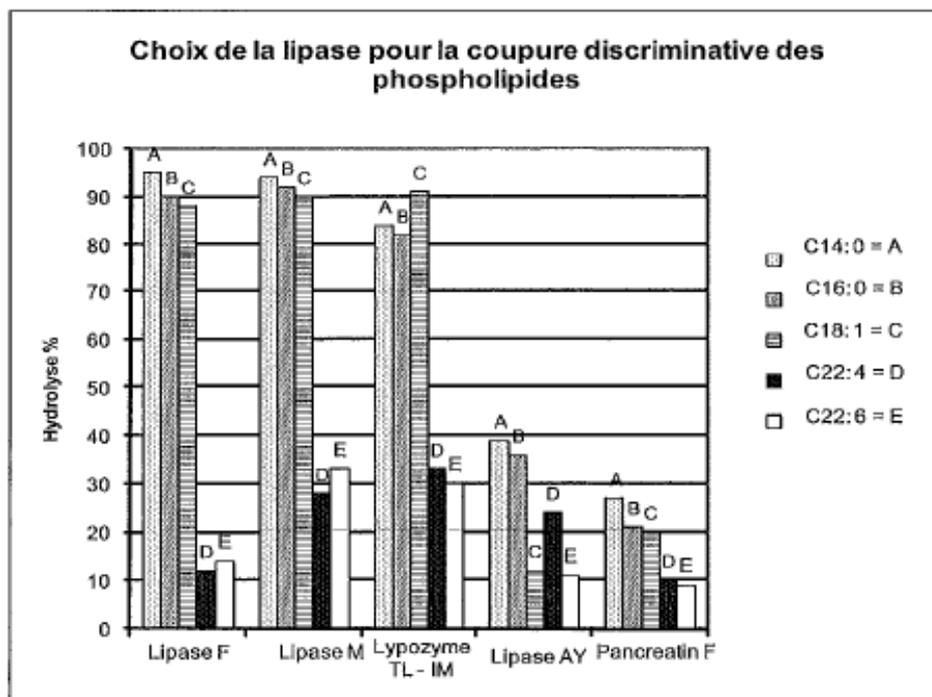
### DOCUMENT 4 : Extraction des Lipides d'*Isochrysis Galbana*

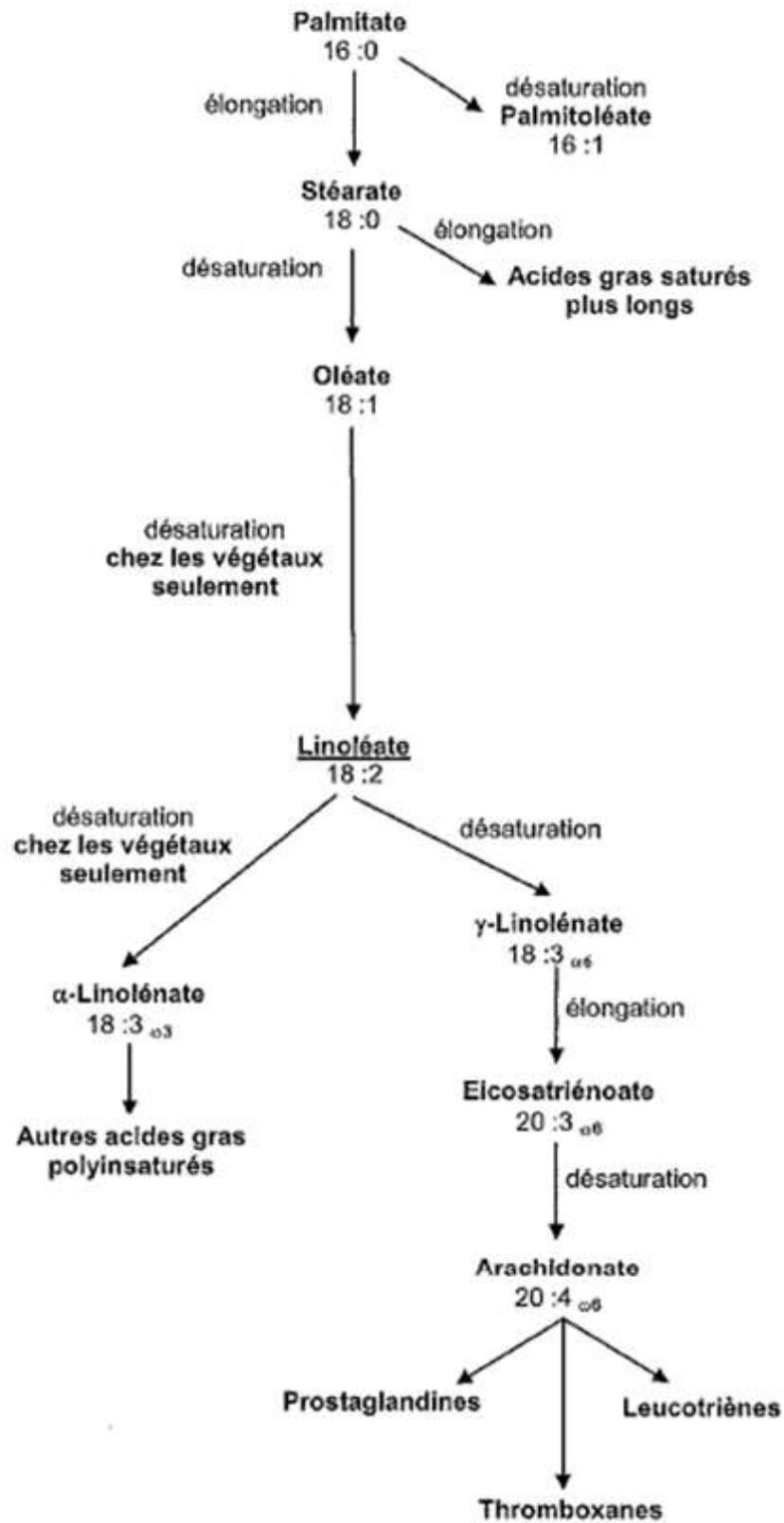
- Peser 1 g d'algues
- Introduire 200 µL d'eau osmosée  
2 mL de méthanol  
1 mL de chloroforme
- Broyer les cellules avec le pilon
- Introduire 2 mL de chloroforme
- Récupérer la phase inférieure

Répéter l'opération sur quatre autres pesées de 1 g et réunir les fractions lipidiques dans un ballon

- Évaporer le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif.

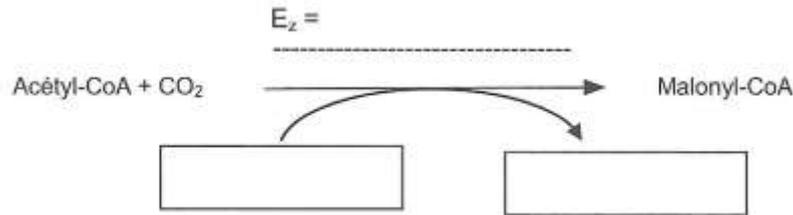
### DOCUMENT 5



**DOCUMENT 1**

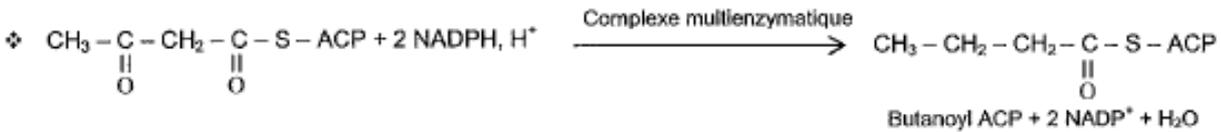
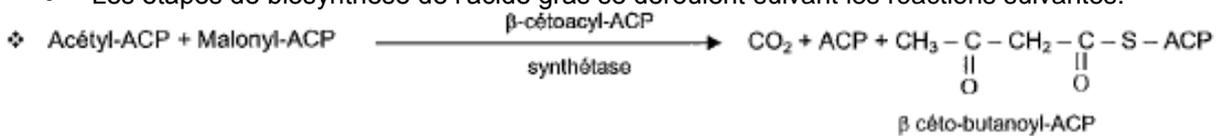
## DOCUMENT 2 (à rendre avec la copie)

### DOCUMENT 2a



### DOCUMENT 2b

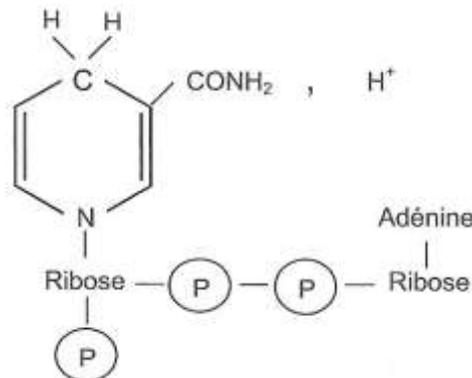
- La prise en charge de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA par le complexe multienzymatique se fait par transacétylation sur une protéine centrale du complexe : l'ACP-SH.
- Les étapes de biosynthèse de l'acide gras se déroulent suivant les réactions suivantes:



❖ Réincorporation de chaînons dicarbonés sous forme de malonyl-ACP jusqu'à l'obtention du palmitoyl-ACP.

- Lorsque le palmitoyl-ACP est formé, il est libéré du complexe grâce à une désacylase.

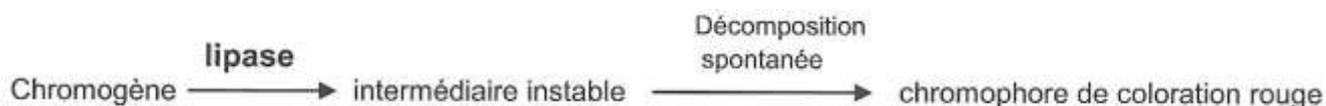
## DOCUMENT 3 : FORMULE DU NADPH, H+



## DOCUMENT 6a

Le substrat chromogène est scindé, en solution alcaline sous l'effet de la lipase en un produit intermédiaire instable qui se décompose spontanément en acide glutarique et méthyl-6-résufurine de coloration rouge.

L'intensité de la coloration développée, directement proportionnelle à l'activité de la lipase, est mesurée par photométrie.



### Réactifs :

**R1** Tampon/colipase/cholate

**R2** Emulsion/substrat chromogène/cholate

### Protocole opératoire :

Longueur d'onde : 570 nm

Cuve : 1 cm de trajet optique

Température de mesure : 37°C

Mesure contre un blanc réactif

Introduire dans une cuve :

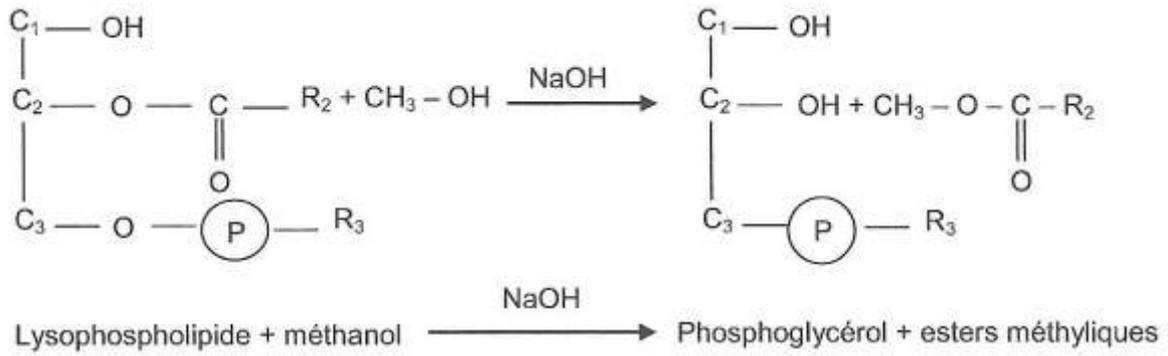
	Solution réactionnelle
Réactif R1	1,0 mL
Echantillon	0,01 mL
Mélanger et incuber 5 minutes Ajouter le réactif R2 pour déclencher la réaction	
Réactif R2	0,6 mL
Bien mélanger. Après 1 minute, mesurer l'absorbance, contre le blanc réactif, toutes les 20 secondes pendant 4 minutes	

$$\epsilon_{\text{chromophore } 570\text{nm}} = 48,35 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \quad \epsilon_{\text{chromophore } 578\text{nm}} = 51,49 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

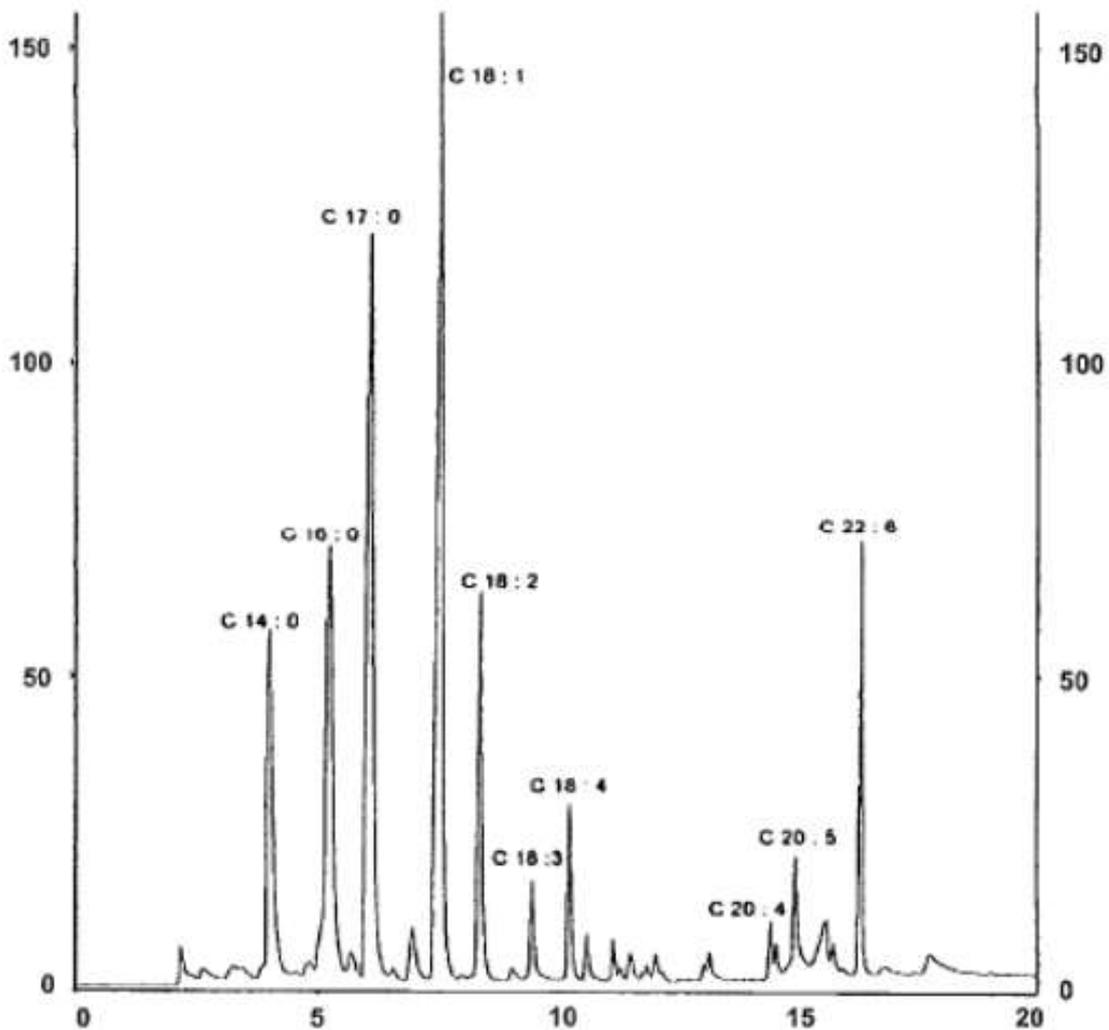
## DOCUMENT 6b : Mesures

<b>Temps secondes</b>	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
<b>A<sub>570nm</sub></b>	0,000	0,019	0,037	0,057	0,075	0,091	0,113	0,133	0,134	0,140	0,141	0,141	0,147

### DOCUMENT 7



### DOCUMENT 8 : CHROMATOGRAMME DES ACIDES GRAS DES LIPIDES DES EXTRAITS D'ALGUES AVANT ATTAQUE ENZYMATIQUE



# Sujet de microbiologie et technologies d'analyse 2013

---

La calculatrice (conforme à la circulaire n°99-186 du 16-11-99) est autorisée ainsi que l'usage d'un dictionnaire Anglais-français.

## DU RAISIN AU VIN : ÉTUDE DES FLORES MICROBIENNES

Sur le raisin, les micro-organismes trouvent un support et des conditions convenables pour s'installer, se multiplier ou survivre. Cette microflore très variée à la surface des baies va se retrouver brutalement dans le moût de raisin après pressage des grappes.

La vinification se produit spontanément, bien que l'homme actuellement améliore ou oriente ce processus.

**Les levures et les bactéries sont les seuls acteurs de la vinification.**

### 1 - Les levures et la fermentation alcoolique (28 points)

#### 1.1 - Caractères généraux des microorganismes (4 points)

Comparer les caractères généraux des levures et des bactéries en remplissant le tableau du **document 1** (à rendre avec la copie).

#### 1.2 - Taxonomie des levures (19 points)

L'identification des nombreuses espèces de levures sur le raisin a été longtemps réalisée par des tests phénotypiques, et en particulier celle de l'utilisation des glucides.

**1.2.1** - Donner la définition générale d'une « espèce » dans le monde vivant. Pourquoi cette définition ne convient-elle pas pour les micro-organismes comme les bactéries et les levures ?

**1.2.2** - Préciser ce qu'est un caractère « phénotypique ».

**1.2.3** - Le **document 2** est un extrait du tableau « caractéristiques physiologiques des principales espèces de levure du raisin et du vin (Barnett et al, 1990) ». Le **document 3** indique la composition de deux milieux gélosés utilisés dans l'étude des levures industrielles.

**1.2.3.1** - Analyser la **partie T** du tableau, en déduire une caractéristique nutritionnelle pour la majorité des levures.

**1.2.3.2** - Analyser de façon précise la composition (qualitative et quantitative) du milieu B en précisant clairement le rôle des constituants (ces constituants pourront être regroupés de façon judicieuse). Comment peut-on qualifier ce milieu ?

**1.2.4** - La composition des milieux A et B est présentée dans le **document 3**.

**1.2.4.1** - Qualifier le type respectif de chacun des deux milieux.

**1.2.4.2** - Justifier le choix d'un des deux milieux pour :

- la fermentation du glucose,
- l'utilisation du glucose comme seule source de carbone.

**1.2.4.3** - Proposer un mode d'utilisation pour chacun de ces milieux (présentation du milieu, ensemencement, incubation et lecture).

**1.2.5** - Le **document 4** indique le pourcentage de réassociation ADN-ADN entre quatre espèces du genre *Saccharomyces*, espèces impossibles à différencier les unes des autres par des tests physiologiques.

**1.2.5.1** - Quelle information taxonomique nous apportent les résultats du tableau du **document 4** ?

**1.2.5.2** - Expliquer le principe du test d'hybridation ADN-ADN.

### 1.3 - La fermentation alcoolique (5 points)

La fermentation alcoolique dans un premier temps permet la transformation du sucre en éthanol. Elle est assurée par les levures principalement *Saccharomyces cerevisiae*.

Le métabolisme énergétique des levures est à la fois respiratoire et fermentaire, selon les conditions environnementales.

Dans le moût de raisin, on observe que le métabolisme est exclusivement fermentaire, même en conditions aérobies, à cause de l'effet « Crabtree » : une concentration élevée en glucide ( $\geq 2$  g/L) inhibe la respiration.

**1.3.1** - Définir un métabolisme fermentaire. Préciser le mécanisme de production d'ATP. Ecrire l'équation bilan (sans formule) de la fermentation d'une molécule de fructose.

**1.3.2** - La production industrielle de levures œnologiques permet d'ensemencer le moût avec des souches connues et performantes.

Cette production se fait à partir de milieux aérés et présentant une concentration en glucide inférieure à 1 g/L. Justifier le choix de ces conditions de production.

## 2 - La fermentation malolactique et les bactéries lactiques (6 points)

Dans un deuxième temps, la fermentation malolactique liée à l'implantation des bactéries lactiques permet d'améliorer les qualités organoleptiques du vin.

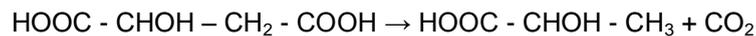
*Oenococcus oeni* (apparentée au genre *Lactococcus*) est la principale bactérie lactique responsable de la fermentation malolactique.

**2.1** - Présenter les caractéristiques générales des bactéries lactiques et donner trois noms de genre.

**2.2** - En fin de fermentation alcoolique, la faible oxygénation favorise le développement de *Oenococcus oeni* : une bactérie anaérobie aérobie tolérante.

Définir l'expression soulignée ; en déduire le métabolisme énergétique de la souche et le caractère peroxydase d'une telle souche.

**2.3** - La fermentation malolactique s'écrit



Nommer les molécules mises en jeu ; proposer un intérêt de cette fermentation lors de la vinification.

## 3 - Les flores d'altération de la vinification (26 points)

### 3.1 - Les bactéries acétiques (3 points)

Certaines espèces présentes dans le moût parviennent à s'implanter et à provoquer des altérations. C'est le cas des bactéries acétiques et de certaines espèces de levure.

Les bactéries acétiques appartiennent aux genres *Gluconobacter* et *Acetobacter*; ce sont de petits bacilles Gram négatifs, aérobies stricts. Elles produisent de l'acide acétique (appelé officiellement acide éthanoïque) à l'origine de la piquûre acétique des vins.

**3.1.1** - Dans ce contexte, comment peut-on qualifier la flore acétique ?

**3.1.2** - A partir de l'analyse du tableau du **document 5**, en déduire le métabolisme énergétique des bactéries acétiques et préciser la nature des molécules chimiques mises en jeu.

### 3.2 - Les levures d'altération (10 points)

De nombreuses espèces de levures perturbent les processus de production du vin, notamment les espèces :

- *Brettanomyces bruxellensis* : à l'origine d'odeurs désagréables (odeurs animale, de bois mouillé, de fumée). Cette levure est naturellement présente sur les baies de raisin, source importante de contamination.
- *Kluyveromyces phaffii* : espèce « killer » caractérisée par la libération de substances toxiques responsables de la mort de souches d'intérêt œnologique.

On se propose d'étudier un milieu de culture mis au point et les conditions de croissance de la souche afin d'optimiser sa détection au laboratoire. Le **document 6** indique la composition du milieu liquide EBB qui permet la mise en culture directement des baies de raisin.

**3.2.1** - Analyser le milieu. Justifier sa composition.

**3.2.2** - Afin de vérifier l'efficacité du milieu de culture, on réalise des co-cultures de plusieurs souches de levures dont quatre souches de *B. bruxellensis* (**document 7**) que l'on trouve naturellement sur les baies. On obtient les tracés présentés dans le **document 8**.

Nommer et définir la méthode de culture en fermenteur utilisée lors de cette expérimentation (**document 7**).

**3.2.3** - Les tracés montrent une phase de latence (**document 8**). A quoi correspond physiologiquement cette phase ?

**3.2.4** - Définir et calculer la vitesse spécifique de croissance de *B. bruxellensis* I.

**3.2.5** - A partir de l'analyse des tracés (**document 8**) :

- le milieu EBB semble-t-il approprié à l'enrichissement de la souche *B. bruxellensis* ? Justifier.
- quelle est la durée de culture la plus propice à la détection de *B. bruxellensis* ? Justifier

### 3.3 - Recherche et caractérisation de levures « killer » (13 points)

On se propose d'analyser une procédure de mise en évidence de l'activité « Killer » (production de la toxine KpKt) de *Kluyveromyces phaffii*. Le **document 9** présente le test.

**3.3.1** - Construire un diagramme présentant le déroulement du test.

**3.3.2** - Quels témoins peut-on réaliser afin de valider ce test ?

On cherche à comparer la toxicité de deux toxines. Pour cela on réalise des mesures de viabilité d'une culture calibrée d'une levure sensible mise en contact avec deux toxines (K1 et KpKt) par cytofluorométrie après marquage à l'iodure de Propidium (PI) qui se fixe sur l'ADN fragmenté. On obtient les résultats du **document 10**.

**3.3.3** - Donner l'intérêt du test « a ». Justifier la réponse.

**3.3.4** - Préciser le type de cellules colorées par l'iodure de Propidium.

**3.3.5** - Analyser les résultats obtenus lors des tests « b » et « c », préciser en le justifiant la toxine qui présente l'effet toxique le plus important.

**DOCUMENT 1 : TABLEAU COMPARATIF DE QUELQUES CARACTÈRES DES LEVURES ET DES BACTÉRIES**

à rendre avec la copie

	LEVURES	BACTÉRIES
Règne		
Type de cellule		
Modes de reproduction possibles		
Paroi : présence/absence Composants principaux		
Type trophique vis-à-vis de la source de carbone		
Autres caractères distinctifs Stéroïls : absence/présence		
Taille		

**DOCUMENT 4 : POURCENTAGE DE RÉASSOCIATION ADN/ADN ENTRE LES QUATRE ESPÈCES APPARTENANT AU GENRE SACCHAROMYCES (VAUGHAN ET MARTINI, 1987)**

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. bayanus</i>	<i>S. pastorianus</i>	<i>S. paradoxus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	100			
<i>S. bayanus</i>	20	100		
<i>S. pastorianus</i>	58	70	100	
<i>S. paradoxus</i>	53	24	24	100

**DOCUMENT 5 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN OXYGÈNE DISSOUS ET DE LA POPULATION DES BACTERIES ACÉTIQUES LORS DU SOUTIRAGE D'UN VIN D'UNE BARRIQUE À UNE AUTRE**

	Oxygène dissous (mg/L)	Bactéries acétiques (UFC/mL)
Avant soutirage	0,2	1.10 <sup>3</sup>
Pendant soutirage	6	-
Après 3 jours	0,8	1,2.10 <sup>4</sup>
Après 20 jours	0,6	2.10 <sup>3</sup>

NB : Le soutirage consiste au transfert du vin d'une cuve à une autre.

**DOCUMENT 2 : CARACTÉRISTIQUES PHYSIOLOGIQUES DES PRINCIPALES ESPÈCES DE LEVURES DU RAISIN ET DU VIN (BARNETT ET ALL , 1990)**

Species	C90 Glycerol growth	C81 nyo-feroid growth	C82 D-Glucose-L-fructose growth	C33 Keto-D-glucose growth	C34 Keto-D-glucose growth	C35 D-Glucose growth	C38 D-Lactate growth	C28 Sucrose growth	C10 Citrate growth	C42 Ethanol growth	N1 Noaa growth	N2 Nitro growth	N3 Ethyane growth	N4 Lysine growth	N5 Cadaverine growth	N6 Creatine growth	N7 Creatine growth	N8 Glucosamine growth	V1 Growth W/O vitamins	V2 Growth W/O nyo-feroid	V3 Growth W/O Palatamide	V4 Growth W/O Biotin	V5 Growth W/O Thiamin	V6 Growth W/O Biotin & Thiamin	V7 Growth W/O Pyridoxine	V8 Growth W/O Pyridoxine & Thiamin	V9 Growth W/O Niacin	T3 Growth at 30°C	T4 Growth at 37°C	T5 Growth at 40°C	O1 0.01% Cycloheximide growth	O3 1% Acetic acid growth	O74 50 % D-Glucose growth	K2 Acetic acid production	K3 Urea hydrolysis		
<i>Candida albida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Candida vini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida famata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Debarya anomala</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Debarya truxillensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia anomala</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia fermentans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kujveromyces thermotolerans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PARTIE T

+ : test positif  
 - : test négatif  
 (\*) ne peut être distingué par ces tests de *S.bayanus*, *S.paradoxus* et *S.pastorianus*.  
 W/O : without  
 v : test variable

**DOCUMENT 3 : MILIEU ET RÉACTIF À DISPOSITION**

<p><b>Milieu A : milieu nutritif W.L. (Wallerstein Laboratories Nutriment medium)</b></p> <p><u>Composition en g/L</u></p> <p>a. Yeast Extract ..... 4 g</p> <p>b. Enzymatic Digest of Casein ..... 5 g</p> <p>c. D-Glucose ..... 50 g</p> <p>d. Monopotassium Phosphate ..... 0.55 g</p> <p>e. Potassium Chloride ..... 0.425 g</p> <p>f. Calcium Chloride ..... 0.125 g</p> <p>g. Magnesium Sulfate ..... 0.125 g</p> <p>h. Ferric chloride ..... 0.0025 g</p> <p>i. Manganese Sulfate ..... 0.0025 g</p> <p>j. Bromocresol Green ..... 0.022 g</p> <p>k. Agar ..... 20 g</p> <p>pH final : 5.5 ± 0.2 at 25°C</p>	<p><b>Milieu B : gélose Yeast Nitrogen Base (YNB) de DIFCO</b></p> <p><u>Composition en g/L</u></p> <p>a. Biotin ..... 2 µg</p> <p>b. Calcium pantothenate ..... 400 µg</p> <p>c. Folic acid ..... 2 µg</p> <p>d. Inositol ..... 2000 µg</p> <p>e. Niacin ..... 400 µg</p> <p>f. p-Aminobenzoic acid ..... 200 µg</p> <p>g. Pyridoxine hydrochloride ..... 400 µg</p> <p>h. Riboflavin ..... 200 µg</p> <p>i. Thiamine hydrochloride ..... 400 µg</p> <p>j. L-Méthionine ..... 20 mg</p> <p>k. L-Tryptophane ..... 20 mg</p> <p>l. L-Histidine ..... 10 mg</p> <p>m. Copper sulfate ..... 40 µg</p> <p>n. Potassium iodide ..... 100 µg</p> <p>o. Ferric chloride ..... 200 µg</p> <p>p. Manganese sulfate ..... 400 µg</p> <p>q. Sodium molybdate ..... 200 µg</p> <p>r. Zinc sulfate ..... 400 µg</p> <p>s. Potassium phosphate monobasic ..... 1 g</p> <p>t. Magnesium sulfate ..... 500 mg</p> <p>u. Sodium chloride ..... 100 mg</p> <p>v. Calcium chloride ..... 100 mg</p> <p>w. Ammonium sulfate ..... 2 g</p> <p>x. Boric acid ..... 500 µg</p> <p>y. Agar ..... 12 g</p> <p>+ solution de glucide à 10 g/L final</p>
---	--

**DOCUMENT 6 : COMPOSITION DU MILIEU EBB (*Enrichment medium B. bruxellensis*)**

Commercial grape juice	200 mL/L
Ethanol	40 mL/L
Malt extract	1.5 g/L
Yeast extract	1.5 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g/L
Tween 80	1 mL/L
Biphenyl	0.02% w/v
Chloramphenicol	0.005% w/v

The pH was adjusted to 5.0. The incubation of the berries was carried out at 30°C with slow shaking.

(Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries, Vincent Renouf, Aline Lonvaud-Fune, Microbiological Research 162 (2007) 154—167)

## DOCUMENT 7 : LISTE DES SOUCHES UTILISÉES ET PROCÉDÉ DE MISE EN CULTURE

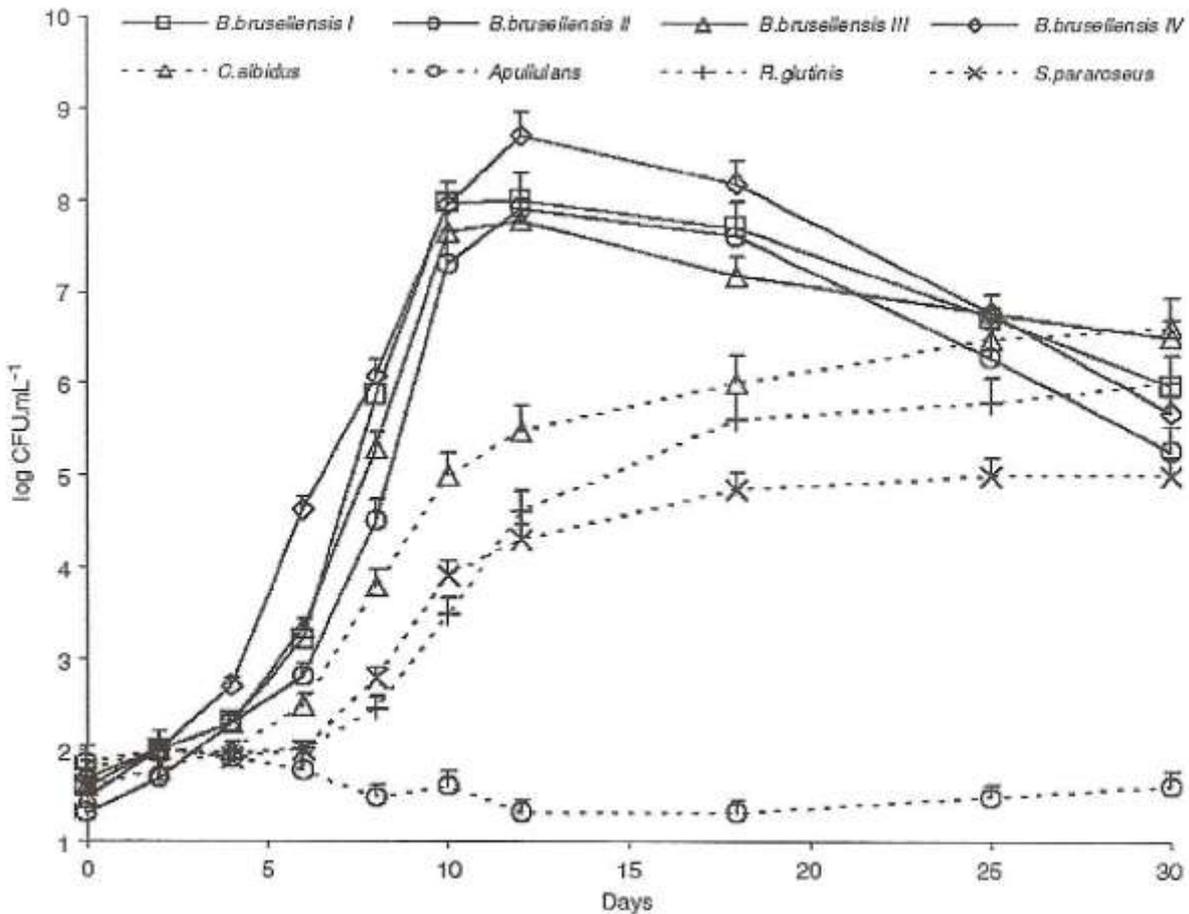
Species

- Aureobasidium pullulans*
- Brettanomyces bruxellensis* I
- Brettanomyces bruxellensis* II
- Brettanomyces bruxellensis* III
- Brettanomyces bruxellensis* IV
- Cryptococcus albidus*
- Rhodosporidium babjevae*
- Sporidiobolus pararoseus*

Les fermenteurs sont inoculés selon les directives suivantes :

Appropriate volumes of inoculum were transferred into 125 mL bottles containing 100 mL of the enrichment medium to obtain  $10^2$  CFU/mL, which was verified by plating aliquots of each strain 3 h after inoculation. The inoculated bottle and the control bottles (without yeast) were incubated and maintained at 30°C with slow shaking.

## DOCUMENT 8 : COURBES DE CROISSANCE DE LEVURES EN MILIEU NON RENOUVELÉ



Growth in EBB medium of four *Brettanomyces bruxellensis* strains and four non-*Brettanomyces* species currently found on grapes.

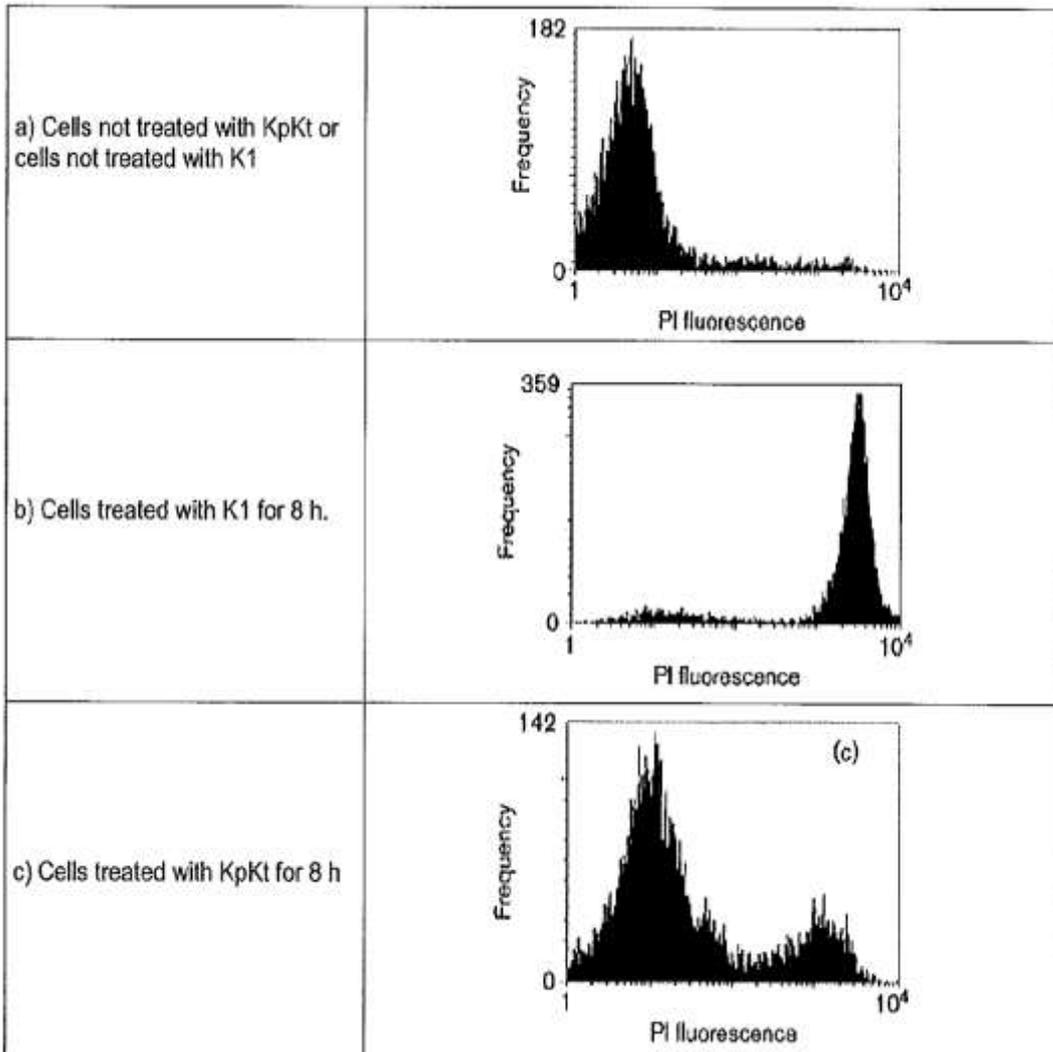
**DOCUMENT 9 : TEST D’ESSAI DE MESURE DE L’ACTIVITÉ KILLER**

**Killer activity assay and measurement.** KpKt activity was determined according to Somers & Bevan (1969). 70 µl toxin samples were filter-sterilized through 0,45 µm pore-size membrane filters (Millipore) and put into wells (7 mm diameter) cut in the malt agar plates that had previously been seeded with 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup> of a sensitive indicator strain. The killing activity was measured as the diameter of the inhibition halo around the well after incubation for 72 h at 20 °C, and is defined as the mean zone of inhibition of replicate wells. The linear relationship observed between the logarithm of killer toxin concentration and the diameter of the inhibition halo assayed by this well-test method was used to define KpKt activity in arbitrary units (aU). One aU is defined as the toxin concentration that results in an inhibition halo of 15 mm (actual diameter 8 mm, considering the 7 mm diameter of the well)  
 One U corresponds to about 1,0 mg killer protein.

Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. Ciani, M. & Faticenti, F. (2001). Appl Environ Microbiol 67, 3058-3063.

Replicate wells : double essai.

**DOCUMENT 10 : RÉSULTATS DU CYTOFLUORIMÈTRE**



NB : l'axe des abscisses représente l'intensité de fluorescence en unité arbitraire  
 l'axe des ordonnées représente le pourcentage de cellules (fréquence statistique)

# Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse 2013

---

Calculatrice non autorisée

Dictionnaire anglais-français autorisé

## LES VENINS ET LES SÉRUMS ANTIVENIMEUX

Les venins de serpents et de scorpions sont particulièrement dangereux pour l'homme. C'est seulement en 1894 que C. Phisalix et G. Bertrand mettent au point une technique d'atténuation du venin par chauffage leur permettant d'immuniser des chevaux. En récupérant le sérum de ces animaux immunisés, ils démontrèrent que le sérum avait des effets protecteurs sur des animaux et des humains envenimés.

### 1 - Venins : mode d'action et pharmacologie (31 points)

#### 1.1 - Immunisation par des venins chauffés

Les venins de scorpions et de serpents sont constitués de nombreuses protéines qui sont des neurotoxines de faibles poids moléculaires.

La stratégie initiale d'immunisation consiste à injecter à des animaux des petites quantités à intervalles réguliers des venins chauffés à 80°C pendant 5 minutes. Après immunisation, le sérum de ces animaux est récupéré, purifié pour être utilisé en sérothérapie.

1.1.1 - Justifier l'intérêt du chauffage du venin.

1.1.2 - Préciser le principal type d'anticorps obtenu lors d'une première immunisation et lors des suivantes. Indiquer les intérêts de réaliser des injections répétées.

#### 1.2 - Mode d'action des venins

Du fait de la complexité des venins, il est encore difficile de savoir précisément le mode d'action de chaque neurotoxine. L'une d'elles, l'alpha bungarotoxine agit sur les récepteurs post synaptiques à l'acétylcholine et bloque la transmission neuromusculaire, ce qui provoque une paralysie rapide de la proie.

1.2.1 - L'acétylcholine est un neurotransmetteur. Définir cette catégorie de molécules.

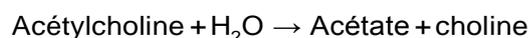
1.2.2 - Le récepteur à l'acétylcholine est un récepteur canal sodique dont la structure est rappelée dans le **document 1**.

Expliquer comment la fixation de l'acétylcholine sur son récepteur nicotinique provoque une entrée massive d'ions  $\text{Na}^+$ .

1.2.3 - Préciser par quel type de transport se fait l'entrée des ions  $\text{Na}^+$ . Comparer ce transport à celui d'un transport actif.

1.2.4 - Proposer une explication du mode d'action de l'alpha bungarotoxine au niveau des récepteurs nicotiniques pour comprendre ses effets paralysants.

1.2.5 - Il existe aussi dans certains venins des toxines possédant une activité enzymatique comparable à celle de l'acétylcholine estérase, enzyme normalement présente dans les synapses. Elle catalyse la réaction suivante :



Expliquer pourquoi ces toxines présentent les mêmes effets physiologiques que ceux de l'alpha bungarotoxine.

### 1.3 - Pharmacocinétique des venins

Après inoculation intraveineuse, le venin diffuse rapidement dans l'ensemble de l'organisme. Une courbe de pharmacocinétique par injection intraveineuse du venin est présentée en **document 2**.

**1.3.1** - A partir de la courbe « témoin non traité » déterminer les différentes phases pharmacocinétiques du venin.

**1.3.2** - Un paramètre important en pharmacocinétique est la biodisponibilité. Définir ce terme et expliquer comment il serait possible de la déterminer à partir du **document 2**.

**1.3.3** - Le foie est un des organes qui intervient dans la métabolisation des xénobiotiques.

Décrire les principales modifications hépatiques des xénobiotiques.

**1.3.4** - Expliquer les conséquences de ces modifications sur l'élimination des xénobiotiques.

**1.3.5** - Citer le principal organe responsable de cette élimination.

**1.3.6** - La gravité des envenimements croît avec la quantité du venin présent dans le sang des patients. On parle d'effet dose-dépendants.

**1.3.6.1** - Sous forme d'un graphe, représenter une courbe dose réponse (utiliser les axes suivants : % d'effet et concentration en venin).

**1.3.6.2** - Définir la dose efficace 50 et la positionner sur le graphe.

## 2 - Les sérums antivenimeux (29 points)

Tout au long du XX<sup>ième</sup> siècle, les chercheurs ont tenté d'augmenter l'efficacité des sérums antivenimeux polyclonaux tout en diminuant leurs effets secondaires principalement dus aux intolérances aux protéines de cheval.

### 2.1 - Composition et amélioration des sérums antivenimeux

**2.1.1** - Pourquoi ces sérums provoquent-ils des problèmes d'intolérance ?

**2.1.2** - Une des avancées majeures pour éviter ce problème d'intolérance a consisté à éliminer le fragment de l'immunoglobuline G fixant le complément par une protéolyse ménagée des anticorps.

Schématiser précisément une immunoglobuline G en faisant plus particulièrement ressortir la notion de domaine d'immunoglobuline.

Préciser les localisations du fragment fixant le complément et celui de la fixation à l'antigène. Localiser sur ce schéma la partie de l'immunoglobuline qui porte les antigènes spécifiques de l'espèce et préciser son nom.

**2.1.3** - La découverte des anticorps monoclonaux a suscité de grands espoirs pour un usage thérapeutique, espoirs rapidement estompés du fait de l'origine murine de ces anticorps qui étaient alors très mal tolérés par l'homme.

Définir les termes suivants : anticorps monoclonaux et anticorps polyclonaux.

Citer les principaux avantages d'un anticorps monoclonal par rapport aux anticorps polyclonaux.

### 2.2 - Principe général de la production d'un anticorps monoclonal

**2.2.1** - Sur le **document 3** (à rendre avec la copie), repérer les étapes principales d'une production d'anticorps monoclonal.

**2.2.2** - Les étapes **1** et **2** de la production des anticorps monoclonaux sont détaillées dans le **document 4**.

**2.2.2.1** - Préciser l'intérêt d'utiliser des cellules de myélome comme partenaire de fusion.

**2.2.2.2** - La sélection des hybridomes est réalisée sur un milieu spécifique : nommer et indiquer les caractéristiques de ce milieu.

**2.2.2.3** - Préciser le principe de la sélection des hybridomes.

**2.2.3** - Les hybridomes sont congelés avant utilisation. Présenter succinctement le protocole de congélation des cellules eucaryotes.

**2.2.4** - Quels sont les processus généralement utilisés pour amplifier des hybridomes à l'échelle industrielle ?

## 2.3 - Effets thérapeutiques des sérums antivenimeux

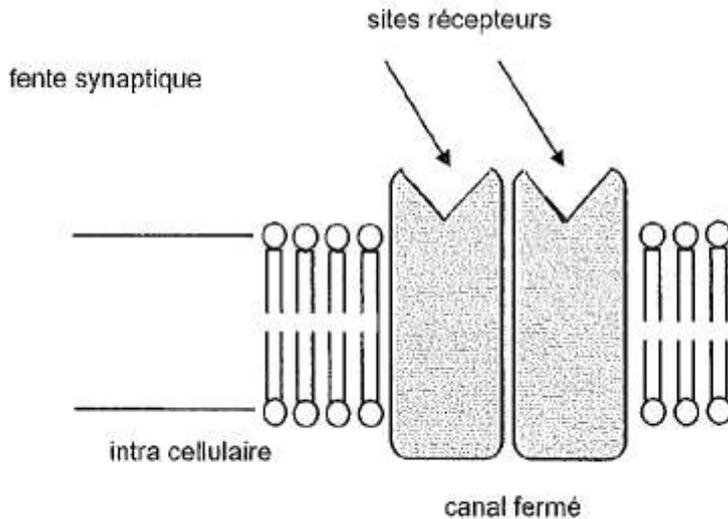
À partir des années 1970, des études cliniques et pharmacologiques ont permis de mieux comprendre l'effet thérapeutique des sérums antivenimeux. Pour cela, le venin est dosé à intervalles réguliers dans le sang avec ou sans sérums antivenimeux (**document 2**). Les sérums utilisés pour cette étude ont subi une protéolyse ménagée à l'aide de la pepsine ou de la papaïne.

**2.3.1** - Définir la valence d'un anticorps. Préciser celle des fragments obtenus après digestion par la papaïne (Fab) et par la pepsine ( $F(ab')_2$ ).

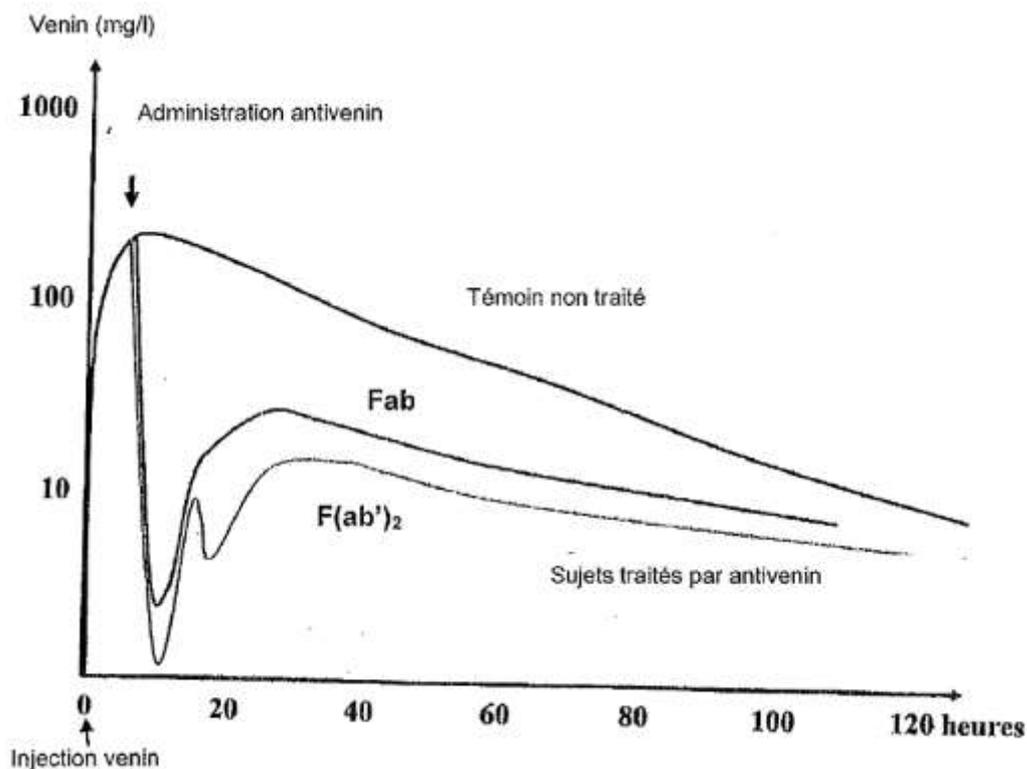
**2.3.2** - À l'appui de la réponse à la question **2.1.2**, justifier l'intérêt d'utiliser ces fragments: Fab et  $F(ab')$ .

**2.3.3** - À partir des courbes du **document 2**, déterminer le sérum anti-venin le plus efficace. Justifier la réponse.

## DOCUMENT 1 : Structure schématique du récepteur à l'Acétylcholine



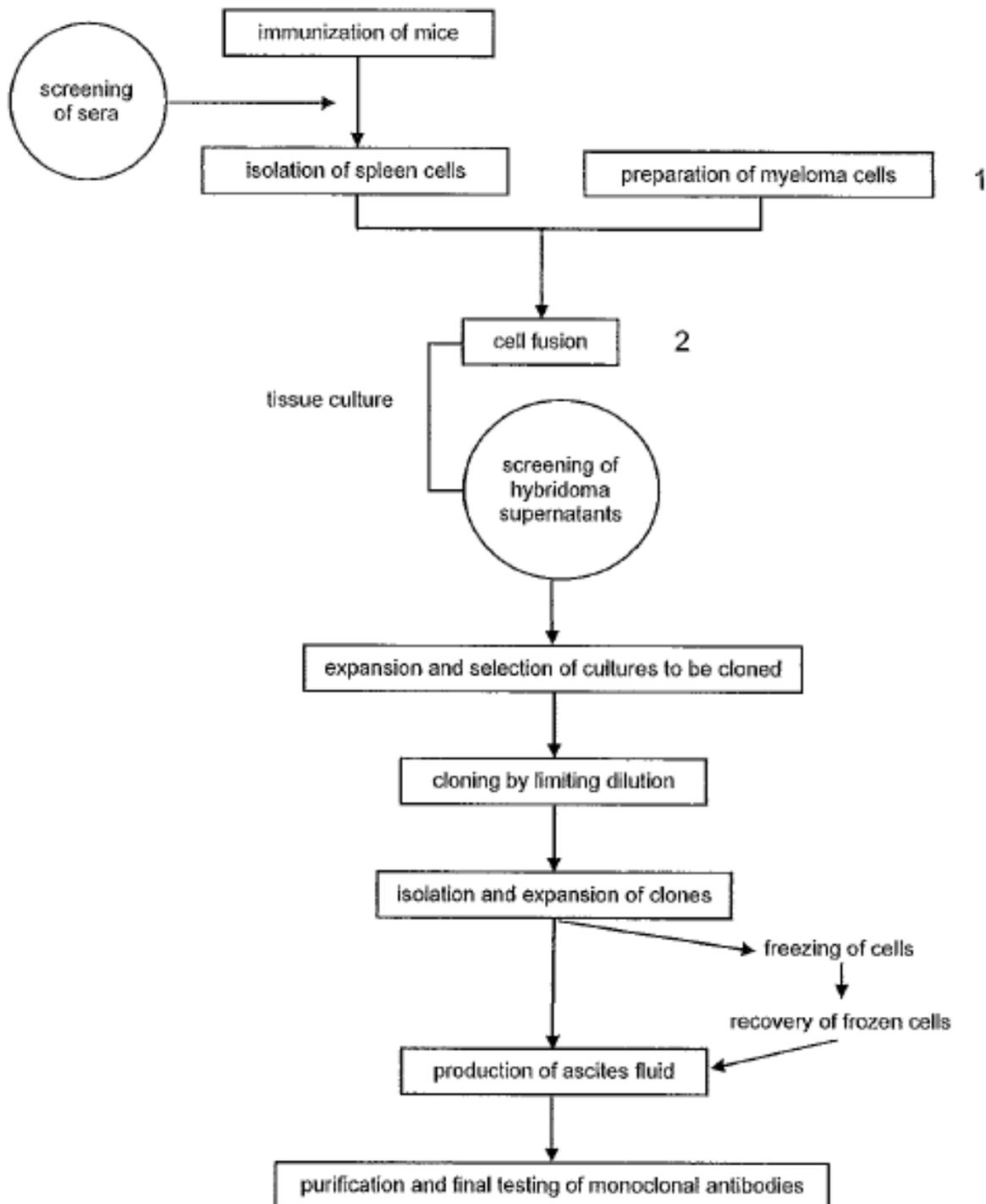
## DOCUMENT 2 : Évolution des taux plasmatiques de venins (en mg/L) après injection intraveineuse chez l'animal, sans (témoin non traité) ou avec sérum antivenimeux (Fab ou F(ab')<sub>2</sub>)



**DOCUMENT 3**

(à rendre avec la copie)

In part, prepared from Current Protocols in Molecular Biology. Ed: Frederick M. Ausubel 1998.



## **DOCUMENT 4 : Deux étapes de la procédure de production des anticorps monoclonaux**

### **1: Preparation of Myeloma Cells**

Fusing antibody-producing spleen cells, which have a limited life span, with cells derived from an immortal tumor of lymphocytes (myeloma) results in a hybridoma that is capable of unlimited growth. Myeloma cells are immortalized cells that are cultured with 8-azaguanine to ensure their sensitivity to the hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) selection medium used after cell fusion. A week before cell fusion, myeloma cells are grown in 8-azaguanine. Cells must have high viability and rapid growth. The HAT medium allows only the fused cells to survive in culture.

### **2: Fusion of Myeloma Cells with Immune Spleen Cells.**

Single spleen cells from the immunized mouse are fused with the previously prepared myeloma cells. Fusion is accomplished by co-centrifuging freshly harvested spleen cells and myeloma cells in polyethylene glycol, a substance that causes cell membranes to fuse. Only fused cells will grow in the special selection medium. The cells are then distributed to 96 well plates, with a specific culture medium.

# Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2013

---

Calculatrice non autorisée

## FABRICATION D'UNE GALETTE SURGELÉE EN VUE D'UNE CERTIFICATION « AGRICULTURE BIOLOGIQUE »

L'Agriculture Biologique est une démarche officielle de qualité qui recouvre des formes d'agriculture réglementées qui n'utilisent pas de produits industriels de synthèse. Pour faire référence à l'agriculture biologique, dans l'étiquetage ou la vente de produits, une entreprise doit donc être contrôlée et certifiée selon la réglementation.

L'entreprise « Saveurbio » produit déjà une galette bio surgelée aux 3 fromages et souhaite étendre la certification à une galette surgelée au saumon fumé.

### 1 - Mise en conformité avec la législation (9 points)

L'entreprise fait appel à un organisme certificateur spécialisé dans les filières agricoles et agroalimentaires pour valider son dossier et certifier son produit.

1.1 - Définir le terme certification.

1.2 - L'organisme certificateur est accrédité et agréé par l'INAO.

1.2.1 - Citer l'organisme responsable de l'accréditation

1.2.2 - Donner la signification du sigle INAO.

1.3 - L'organisme certificateur réalise un contrôle d'évaluation du cahier des charges. Donner deux spécifications que l'on peut trouver dans le cahier des charges de la galette surgelée.

1.4 - Un produit peut comporter dans sa dénomination de vente des indications relatives au mode de production biologique s'il contient au moins 95 % d'ingrédients d'origine agriculture biologique.

1.4.1 - Justifier à l'aide du **document 1** la conformité du produit fabriqué.

1.4.2 - Donner l'origine des logos qui figurent sur l'emballage du produit.

### 2 - Caractéristiques de la pâte et de la garniture de la galette (25 points)

La recette de fabrication de la galette doit respecter strictement l'emploi des matières premières données dans le **document 1** et le procédé de fabrication fourni dans le **document 3**.

#### 2.1 - Préparation des matières premières

La préparation de la galette nécessite la pesée des matières premières. Dans le cadre de sa démarche qualité, l'entreprise est tenue de consigner régulièrement les résultats de la qualification de ses balances.

Les caractéristiques de la balance FKB30 sont données dans le **document 2**

2.1.1 - Des pesées en conditions de reproductibilité ont permis de calculer un écart type  $S_R$  égal à 0,8 g.

2.1.1.1 - Indiquer les conditions de reproductibilité.

2.1.1.2 - D'après le **document 2**, la fidélité mesurée est-elle en accord avec les données du fabricant ? Justifier la réponse.

2.1.2 - L'entreprise a acheté un étalon de référence de 10,000 kg. Dix mesures de masse de l'étalon sont effectuées et la moyenne des masses obtenues est égale à 10,006 kg.

Commenter le résultat par rapport aux données du fabricant.

## 2.2 - Préparation de la pâte de la galette

2.2.1 - Les œufs utilisés dans la préparation sont achetés sous forme d'œufs entiers en poudre.

Pourquoi doit-on employer le terme d'ovoproduit pour ce produit ?

2.2.2 - Le jaune d'œuf est riche en lipides. Parmi ceux-ci les lécithines jouent un rôle technologique essentiel.

2.2.2.1 - Citer les trois principales catégories de lipides présents dans le jaune d'œuf. Dans quelle catégorie se trouvent les lécithines ?

2.2.2.2 - La pâte de la galette est une émulsion. Définir ce terme.

2.2.2.3 - En quoi la structure des lécithines explique-t-elle leur rôle dans l'élaboration de la pâte de la galette ?

2.2.3 - Les protéines du blanc d'œuf participent à la tenue de la pâte de la galette. Citer deux propriétés fonctionnelles des protéines du blanc d'œuf

## 2.3 - Préparation de la garniture au saumon fumé

2.3.1 - Le saumon contient des muscles « rouges » et « blancs » en proportions inégales. Comment expliquer cette différence de couleur entre les deux types de muscles ? Que peut-on en déduire sur le métabolisme de ces deux muscles ?

2.3.2 - La qualité du poisson va dépendre des conditions de la mort de l'animal.

2.3.2.1 - Expliquer l'évolution du muscle au cours de la phase de rigidité cadavérique.

2.3.2.2 - Pourquoi existe-t-il des risques de contaminations microbiologiques à cette étape ?

2.3.3 - Le fumage du poisson est réalisé de manière traditionnelle à froid.

2.3.3.1 - Décrire ce procédé.

2.3.3.2 - Rappeler les effets des constituants de la fumée sur le poisson.

## 3 - Conservation et conditionnement de la galette (18 points)

3.1 - Les galettes sont surgelées à - 18°C avant d'être conditionnées Citer deux avantages de ce mode de conservation pour les consommateurs.

3.2 - La taille et la répartition des cristaux sont fonction de la vitesse de congélation.

3.2.1 - Indiquer les conséquences d'une congélation lente et d'une congélation rapide sur la cristallisation.

3.2.2 - Quel type de congélation sera privilégié par l'industriel ? Justifier.

Le **document 4** présente la proportion d'eau congelée dans le produit fini.

3.3.1 - Que montre cette courbe ?

3.3.2 - Que peut-on en déduire pour un produit surgelé à - 18°C ?

3.3.3 - Quelle est la précaution à prendre lors du stockage du produit ? Justifier.

3.3.4 - Le fabricant propose une DLUO de 12 mois à - 18°C. Expliquer ce terme et préciser pourquoi la législation n'impose pas une DLC pour ce type de produit.

3.4 - L'entreprise « Saveur bio » utilise un congélateur à air soufflé.

3.4.1 - Expliquer pourquoi les galettes sont surgelées avant leur mise en boîte.

3.4.2 - Donner le principe de l'appareil présente dans le **document 5**. Indiquer un inconvénient de cette technique.

## 4 - Présentation de la démarche HACCP de l'entreprise (8 points)

4.1 - Que signifie le terme HACCP en anglais et en français ?

4.2 - Quelles sont les trois étapes clés d'une telle démarche ?

4.3 - La surgélation et le passage au détecteur de métal sont des CCP. D'après le diagramme de fabrication (**document 3**) et l'arbre de décision (**document 6**), justifier cette affirmation après avoir identifié chaque danger.

4.4 - Le détecteur de métaux permet un type de contrôle particulier. Donner son nom et ses principales caractéristiques.

### DOCUMENT 1 : LISTE DES INGRÉDIENTS

**Garniture 50 %** : saumon fume\* 35 %, béchamel\* 34 %, emmental\* 23 % (France, Allemagne), oseille 8 %.

**Pâte 50 %** : eau\*\*, farine de sarrasin, farine de blé type 65\*, œuf entier en poudre\*, lactose\*, sel\*\*, huile de tournesol\*, lait écrémé en poudre\*.

\* *Ingrédients issus de l'agriculture biologique*

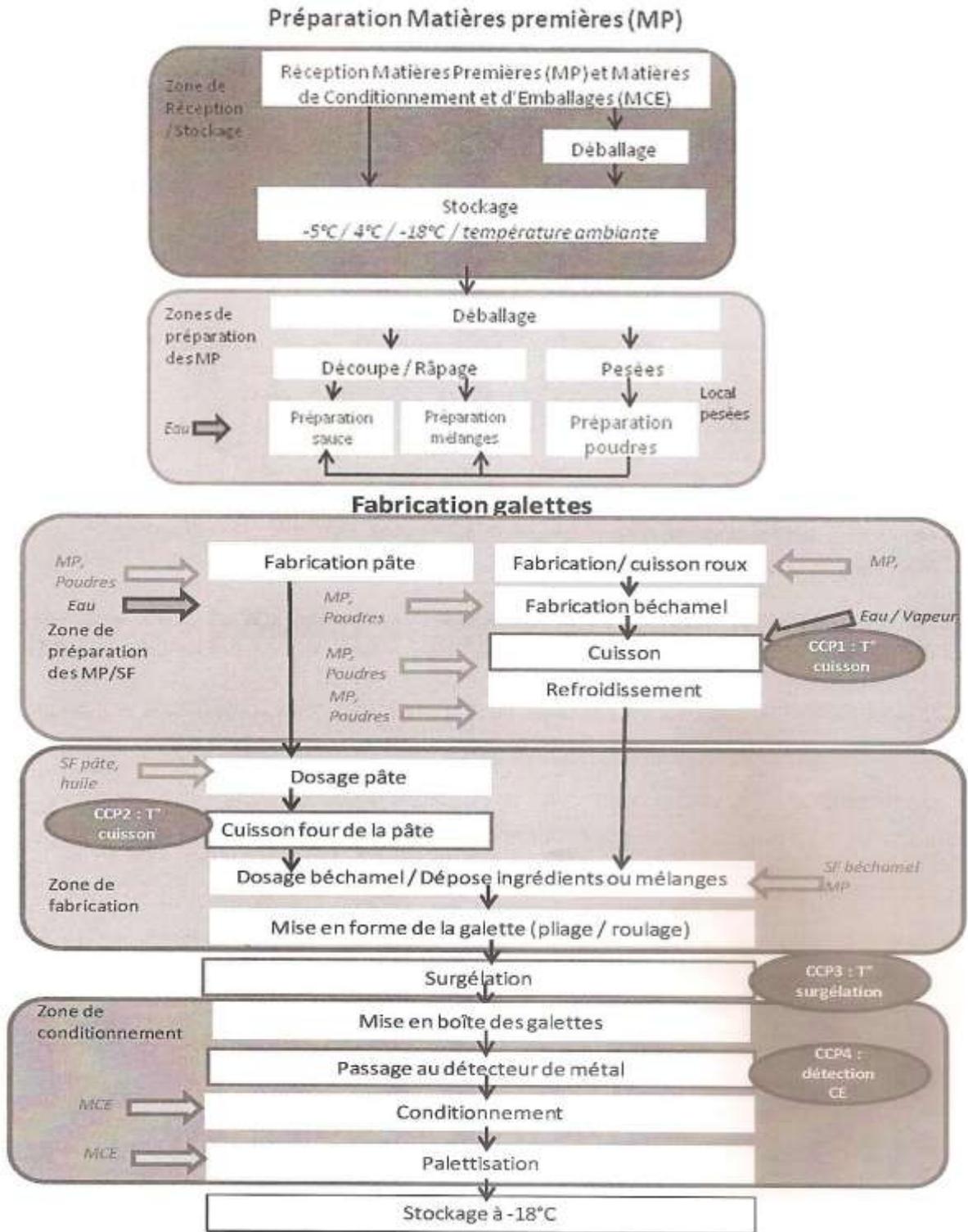
\*\* *L'eau et le sel de cuisine ne sont pas pris en compte dans le calcul des ingrédients d'origine agricole*



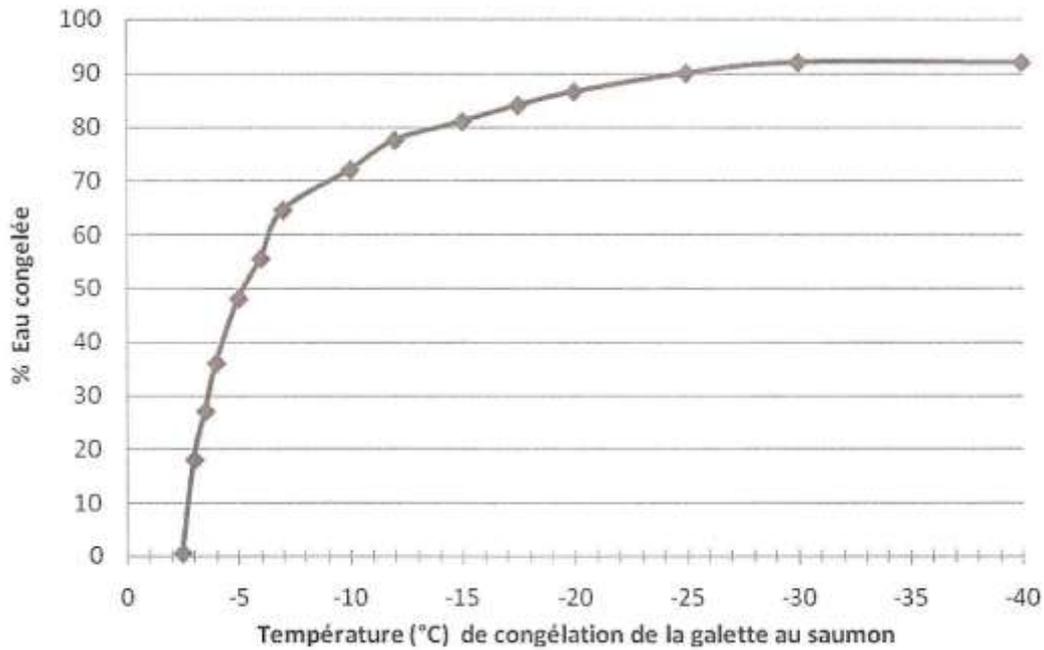
### DOCUMENT 2 : CARACTÉRISTIQUES TECHNIQUES DE LA BALANCE FKB30

Critères	FKB30
Lisibilité	1 g
Plage de pesée (max)	30 Kg
Plage de tarage (par soustraction)	30 Kg
S <sub>R</sub> fabricant	1 g
Erreur de justesse tolérée	10 g
Temps de préchauffage	2 heures
Poids d'ajustage recommandés	10 Kg, 20 Kg ou 30 Kg
Température de fonctionnement	+ 5°C à + 35°C
Degré hygrométrique	Max 80 % (non condensant)

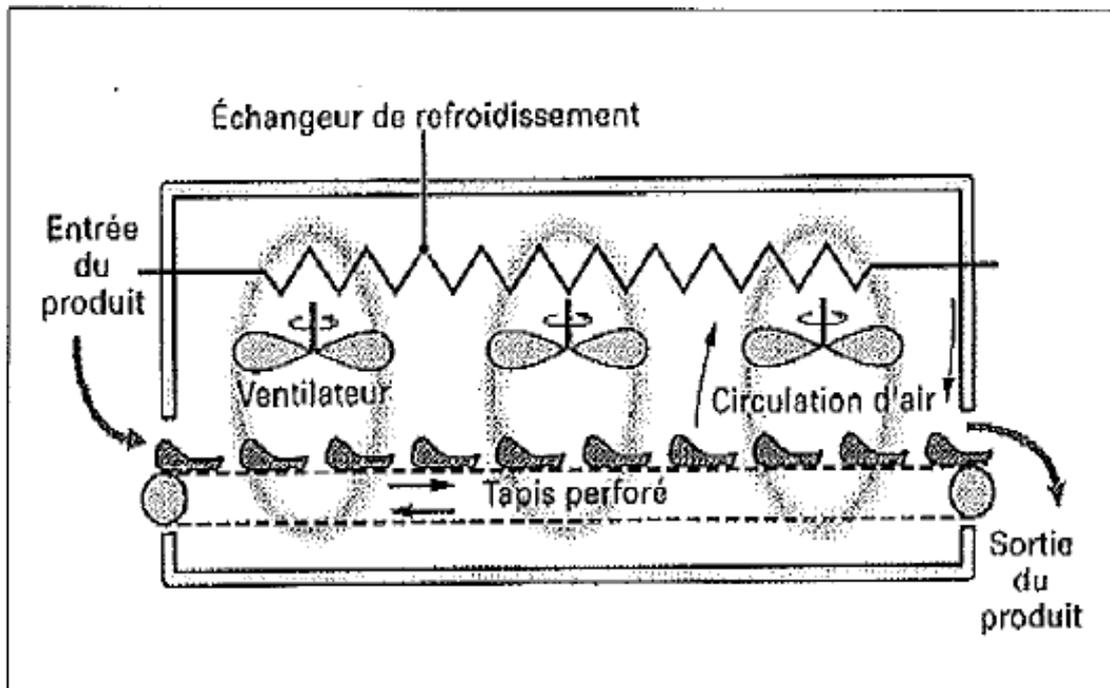
# DOCUMENT 3 : PROCÉDÉS DE FABRICATION



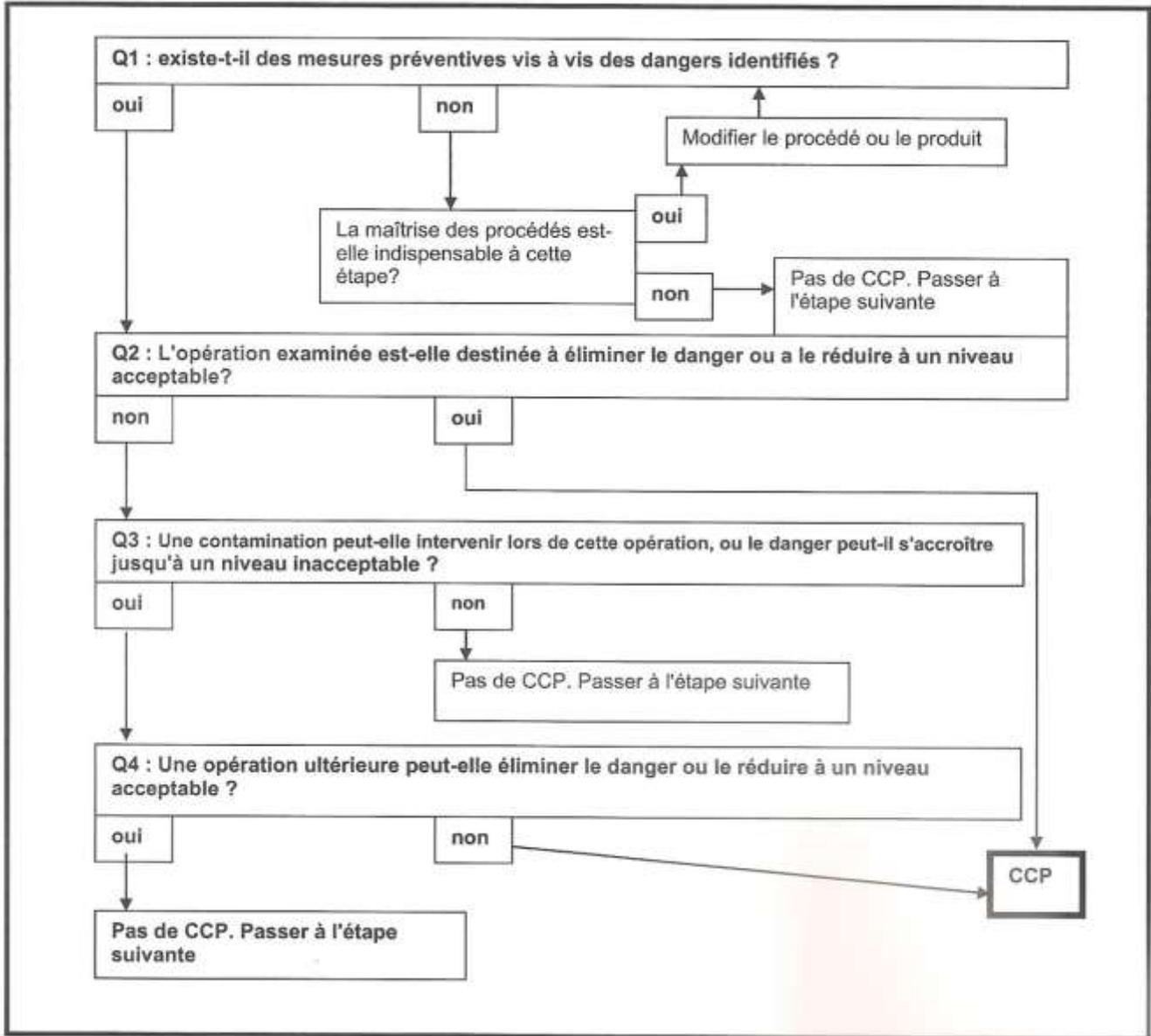
## DOCUMENT 4 : PROPORTION D'EAU CONGELÉE SELON LA TEMPÉRATURE FINALE ATTEINTE



## DOCUMENT 5 : TUNNEL DE CONGÉLATION



# DOCUMENT 6 : ARBRE DE DÉCISION DANS LA PROCÉDURE HACCP



# Techniques de biochimie 2013

Pour les candidats non évalués en CCF Durée : 3h30 Coefficient : 4

## Matériels autorisés

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

## Document à rendre et àagrafer avec la copie :

- Feuille de traçabilité

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

## CONTRÔLES QUALITÉ D'UN SÉRUM DE VEAU FŒTAL

### Contexte professionnel

Le sérum de veau fœtal est couramment utilisé comme complément aux milieux de cultures cellulaires. Il est très riche en diverses substances nutritives (protéines, acides aminés, glucose, acides gras libres ...), en éléments minéraux (fer, calcium, potassium, phosphore, sodium...), en enzymes, hormones ...

**Il est donc nécessaire de procéder à de nombreux contrôles afin de déterminer la composition exacte du sérum en ces différentes substances.** Parmi ces contrôles, on se propose de vérifier le taux de phosphore et l'activité transaminasique ASAT.

Spécifications	
pH	6,8 à 8,2
Protéines totales	30 à 45 g.L <sup>-1</sup>
Phosphore libre	1,0 à 3,0 mmol.L <sup>-1</sup>
Activité ASAT	40 à 60 U.L <sup>-1</sup>

### Compétences évaluées

Réaliser des analyses et des contrôles biochimiques (25 points).

Préparer les appareils et installations.

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

Analyser, interpréter et valider des résultats (10 points).

Présenter et ordonner les valeurs expérimentales. Exprimer des résultats. Valider et interpréter des résultats.

Utiliser l'outil informatique (5 points).

**Mise en œuvre**

<b>Activités professionnelles</b>	<b>Documents et ressources</b>	<b>Pages</b>
1. Contrôle gravimétrique d'une pipette automatique P200	Fiche protocole 1 Document de validation (annexe 1)	96 et 101
2. Dosage colorimétrique de phosphore libre par la méthode de Briggs	Fiche protocole 2	97 et 98
3. Dosage de l'activité ASAT (aspartate-amino-transférase)	Fiche protocole 3	99
Édition des résultats	Fiche de traçabilité (à compléter et à rendre avec la copie)	100 et 41
Sécurité	Fiche sécurité	102 et 103

## Fiche protocole 1 : Contrôle gravimétrique d'une pipette automatique P200

Les pipettes automatiques du laboratoire devront être certifiées conforme selon la norme ISO 8655-6 (méthode d'essai gravimétrique). Il est convenu d'appliquer la procédure conforme à la norme ISO 8655-6 pour le **volume 200  $\mu$ L de la P200**.

### Principe

Il s'agit de la procédure de vérification d'une pipette volumétrique à piston monocanal à déplacement d'air selon la norme ISO 8655-6.

**La température de l'eau dans son récipient et la pression barométrique dans le laboratoire doivent être relevées et reportées dans la feuille de traçabilité (détermination de z).**

La durée d'un cycle de pesée (temps nécessaire pour effectuer la pesée d'un volume) doit être la plus faible possible. Il convient qu'elle ne dépasse pas 60 secondes. Il est important qu'elle soit régulière.

### Réactifs et Matériel

- Pipette automatique P200
- Cônes
- Petits béchers
- Eau distillée
- Balance de précision
- Baromètre et thermomètre dans la salle de pesée

### Protocole opératoire (adaptation de la norme ISO 8655-6)

- 1- Mettre en place le cône.
- 2- Positionner le volumètre de la pipette au point haut, soit 200  $\mu$ L.  
Pour éviter que la mouillabilité du cône n'interfère avec les mesures à effectuer, il est nécessaire de réaliser deux ou trois fois le pré-rinçage du cône.
- 3- Placer sur le plateau de la balance, un bécher contenant un volume quelconque d'eau (afin d'éviter l'évaporation des faibles volumes de liquide pipeté).
- 4- Faire le zéro de la balance. Prélever le volume d'eau défini et l'ajouter dans le bécher: noter le résultat (m) après stabilisation, portes fermées.
- 5- Recommencer 9 fois l'opération 4 de façon à obtenir dix mesures.

### Compte rendu

- A l'aide de l'annexe 1, déterminer le facteur z.
- Calculer à l'aide d'un tableur la moyenne des masses m ( $m_m$ ) et l'écart-type ( $s_m$ )
- Ces valeurs exprimées en mg doivent être converties en  $\mu$ L en utilisant le facteur z.
- On obtient en  $\mu$ L le volume moyen  $V_m$  et l'écart type  $s_v$ .
- Conclure sur la justesse et la fidélité de la P200.

### Données

**Justesse** :  $\Delta V = V_m - V_{\text{affiché}}$  ( $\mu$ L)

Si  $|\Delta V| \leq \text{valeur de référence}$  la pipette est juste.

**Fidélité** :  $s_v$  ( $\mu$ L)

Si  $s_v \leq \text{valeur de référence}$  la pipette est fidèle.

## Fiche protocole 2 : Dosage colorimétrique du phosphore libre par la méthode de Briggs

### Principe

Le phosphore sous forme  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , réagit en milieu acide avec le molybdate d'ammonium pour former le complexe phosphomolybdique.

Ce dernier est réduit pour donner le complexe phosphomolybdeux-molybdique qui absorbe à 700 nm. Pour doser le phosphore libre du sérum, il faut au préalable éliminer les protéines. Elles seront précipitées par ajout d'acide trichloracétique (ATCA), puis éliminées.

La méthode employée utilise le monoréactif de Briggs qui contient du réactif molybdique, de l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  et du sulfate ferreux.

### Matériel et réactifs

- Tube conique à centrifuger
- 2 fioles jaugées de 100 mL Pipette jaugée de 5 mL
- 2 pipettes graduées de 2 mL, Pipette jaugée de 1 mL, Pipette automatique P<sub>1000</sub>
- Pipette graduée de 5 mL
- Tubes à hémolyse : 8
- Macrocuves visible : 8
- Papier aluminium
- Sérum de veau foetal noté « sérum » : 2 mL
- Pilulier de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Réactif de Briggs en distributeur
- Acide trichloracétique ATCA à  $200 \text{ g.L}^{-1}$

### Protocole opératoire

#### - Préparation de l'échantillon

Dans un tube à centrifuger conique, introduire :

Sérum de veau foetal.....1 mL

ATCA à  $200 \text{ g.L}^{-1}$  .....3 mL

Boucher le tube, agiter puis laisser reposer 10 minutes. Centrifuger 10 minutes à 4000 rpm. Pratiquer rapidement la réaction de dosage sur le surnageant S.

#### - Préparation de la solution étalon et de la gamme d'étalonnage

Préparer par pesée exacte 100 mL d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à  $1,760 \text{ g.L}^{-1}$  à 1 mg près.

##### Réaliser la pesée en présence de l'examineur.

À partir de cette solution mère préparer 100 ml d'une dilution au  $1/20^{\text{ème}}$ .

Réaliser une gamme étalon de 6 tubes selon le tableau ci-dessous :

Tube	0	1	2	3	4	5
Volume solution fille	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2
Eau distillée (ml)	2	1,6	1,2	0,8	0,4	0
Monoréactif de Briggs	2					
Laisser reposer 30 minutes à l'obscurité						
Lire l'absorbance à 700 nm (la coloration est stable plusieurs heures)						

#### - Dosage du surnageant S

Réaliser 2 essais contenant 1 mL du surnageant S.

## Compte rendu

- Compléter la fiche de traçabilité.
- À l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe  $A_{700\text{ nm}} = f(\mu\text{g de P par tube})$ , et déterminer les **paramètres de régression linéaire**.
- Calculer la concentration molaire en phosphore libre du sérum testé en  $\text{mmol. L}^{-1}$ .

À l'aide de l'annexe 1, valider les résultats.

Exprimer la concentration molaire avec son incertitude.

- Conclure en fonction des spécifications du sérum de veau fœtal.

## Données

Masses atomiques ( $\text{g.mol}^{-1}$ ):                      K: 39,1      P: 30,9      O: 16      H: 1.

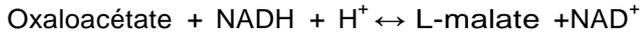
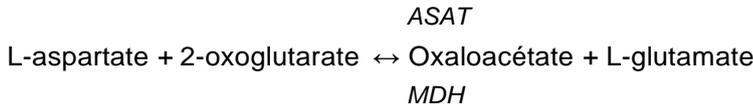
Le coefficient de variation CV de répétabilité est de 4 %, et

$$s_r = \frac{CV_{\bar{x}}}{100}$$

L'incertitude type composée  $u_c = 0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

# Fiche protocole 3 : Dosage de l'activité de l'aspartate aminotransférase AST

## Principe



ASAT = aspartate aminotransférase et MDH = malate deshydrogénase.

La disparition du NADH est suivie au cours du temps par mesure de l'absorbance à 340 nm.

## Matériels et réactifs

- Sérum de veau foetal : 2 mL
- Réactif R contenant : Tampon Tris pH 7,8: L-Aspartate.  $\text{NaN}_3$ , 2-oxoglutarate, NADH, ASAT. MDH: 2,5 mL
- P1000
- P200
- 2 microcuvettes UV
- 1 chronomètre

## Protocole opératoire (à réaliser en présence d'un examinateur)

Faire le zéro du spectrophotomètre contre l'air

Préchauffer le réactif R à 37°C

Dans une microcuvette, introduire 1 mL réactif R préchauffé à 37°C

Déclencher la réaction en ajoutant 200  $\mu\text{L}$  de sérum, déclencher le chronomètre et homogénéiser.

Après un temps de latence de 1 minute, relever les absorbances à 340 nm toutes les 20 secondes pendant 3 minutes.

## Compte rendu

- Reporter les résultats expérimentaux dans la fiche de traçabilité.
- A l'aide de l'outil informatique, tracer  $A_{340} = f(t)$  et déterminer  $\Delta A/\Delta t$  en  $\text{min}^{-1}$ .
- Calculer la concentration d'activité catalytique du sérum, notée  $b$  en  $\text{U.L}^{-1}$  d'enzyme.

À l'aide de l'annexe 2, valider les résultats.

Exprimer la concentration d'activité catalytique du sérum avec son incertitude.

## Données

- $\epsilon_{340 \text{ nm}}^{\text{NADH}} = 6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
- $s_r = 2,5 \text{ U.L}^{-1}$ .
- $b = \frac{\Delta A/\Delta t}{\epsilon.l} \cdot \frac{V_{\text{MR}}}{V_{\text{sérum}}} \cdot 10^6 \text{ (U.L}^{-1}\text{)}$
- L'incertitude type composée  $u_c = 3 \text{ U.L}^{-1}$
- $U = \mu\text{mol}$  de substrat transformé par minute dans des conditions opératoires données

## Fiche de traçabilité

(à compléter et rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR:

Date:

Poste n°

### 1 - Dosage colorimétrique du phosphore libre par la méthode Briggs

Masse de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pesée :

Matériel utilisé pour réaliser la dilution au  $1/20^{\text{ème}}$  :

Composition des tubes essais :

Tube								
Quantité de Phosphore en $\mu\text{g}$								
A à 700 nm								

### 2 - Contrôle d'une pipette automatique P200

Température relevée dans le laboratoire :

Pression relevée dans le laboratoire :

Facteur z:

Valeurs en mg									
---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

### 3 - Dosage de l'activité ASAT (aspartate amino transférase)

Temps	0	20	40	60	80
$A_{340}$ essai 1					
$A_{340}$ essai 2					

Temps	100	120	140	160	180
$A_{340}$ essai 1					
$A_{340}$ essai 2					

## ANNEXE 1 - Document de validation du contrôle de pipette

Pression (Pascal)	98000	99000	100000	101000	102000	103000	104000	105000
20	1,0029	1,0030	1,0030	1,0030	1,0030	1,0030	1,0030	1,0030
21	1,0031	1,0032	1,0032	1,0032	1,0032	1,0032	1,0032	1,0032
22	1,0034	1,0034	1,0034	1,0034	1,0034	1,0034	1,0034	1,0034
23	1,0036	1,0036	1,0036	1,0036	1,0036	1,0036	1,0036	1,0037
24	1,0038	1,0038	1,0038	1,0038	1,0039	1,0039	1,0039	1,0039
25	1,0041	1,0041	1,0041	1,0041	1,0041	1,0041	1,0041	1,0041
26	1,0043	1,0043	1,0043	1,0044	1,0044	1,0044	1,0044	1,0044
27	1,0046	1,0046	1,0046	1,0046	1,0046	1,0047	1,0047	1,0047
28	1,0049	1,0049	1,0049	1,0049	1,0049	1,0049	1,0050	1,0050
29	1,0052	1,0052	1,0052	1,0052	1,0052	1,0052	1,0053	1,0053
30	1,0055	1,0055	1,0055	1,0055	1,0055	1,0056	1,0056	1,0056

	Valeurs de référence					
	Point bas			Point haut		
	Valeur affichée (µL)	Justesse (µL)	Fidélité (µL)	Valeur affichée (µL)	Justesse (µL)	Fidélité (µL)
P20	2	± 0,04	≤ 0,05	20	± 0,04	≤ 0,05
P100	20	± 0,35	≤ 0,10	100	± 0,8	≤ 0,15
P200	50	± 0,5	≤ 0,20	200	± 1,6	≤ 0,30
P1000	200	± 3,0	≤ 0,60	1000	± 8,0	≤ 1,50
P5000	1000	± 12,0	≤ 3,00	5000	± 30,0	≤ 8,00

## ANNEXE 2 - Acceptabilité des résultats

Il s'agit du même document que celui présenté page 44 (document1)

## ANNEXE 3 - FICHE SÉCURITÉ

Réactifs et Pictogrammes et mentions d'avertissement	Mention de danger	Conseils de prudence
<p><b>Molybdate d'ammonium 2%</b> (m/V)</p>  <p>Danger si C &gt; 25%</p>	<p>H302- Nocif en cas d'ingestion</p> <p>H315- Provoque une irritation cutanée</p> <p>H319- Provoque une sévère irritation des yeux</p> <p>H335- Peut irriter les voies respiratoires</p>	<p>P280- Porter des gants/vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/du visage</p> <p>P302-EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU</p> <p>P352- Laver abondamment à l'eau et au savon</p> <p>P305- EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX</p> <p>P351- Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes</p> <p>P338- enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer</p>
<p><b>Vanadate d'ammonium 0,05%</b></p>   <p>Danger si C &gt; 7%</p> <p>Danger si C &gt; 25%</p>	<p>H301- Toxique en cas d'ingestion</p> <p>H332- Nocif par inhalation</p> <p>H319- Provoque une sévère irritation des yeux</p> <p>H335- Peut irriter les voies respiratoires</p>	<p>P280- Porter des gants/vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/du visage</p> <p>P305- EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX</p> <p>P351- Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes</p> <p>P338- enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer</p> <p>P309 EN CAS d'exposition ou d'un malaise</p> <p>P311- Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin</p>
<p><b>Acide nitrique 10%</b> (V/V)</p>   <p>Danger si C &gt; 10%</p>	<p>H272- Peut aggraver un incendie ; comburant</p> <p>H314- Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves</p>	<p>P280- Porter des gants/vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/du visage</p> <p>P301-EN CAS D'INGESTION</p> <p>P330- Rincer la bouche</p> <p>P331- Ne pas faire vomir</p> <p>P303- EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU ( ou les cheveux)</p> <p>P361- Enlever immédiatement les vêtements contaminés</p> <p>P353- Rincer la peau à l'eau/se doucher</p> <p>P305- EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX</p> <p>P351- Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes</p> <p>P338- enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer</p> <p>P310- Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin</p> <p>P501- Éliminer le contenu/réceptacle dans ...</p>
<p><b>Acide sulfurique</b></p>  <p>danger</p>	<p>H314- Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves</p>	<p>P280- Porter des gants/vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/du visage</p> <p>P305- EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX</p> <p>P351- Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes</p> <p>P338- enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer</p> <p>P302-EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU</p> <p>P352- Laver abondamment à l'eau et au savon</p> <p>P301-EN CAS D'INGESTION</p> <p>P330- Rincer la bouche</p> <p>P331- Ne pas faire vomir</p>



**Sérum de veau fœtal**

	Concentration (mol L <sup>-1</sup> )	Concentration %	Mentions de danger	Mentions de prudence	Mention d'avertissement	Pictogrammes	Gestion des déchets
<p>ATCA Danger Attention</p>  <p>H314 : Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires</p> <p>H410 : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.</p> <p>P260 : Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.</p> <p>P303+P361+P353 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher.</p> <p>P305+P351+P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.</p> <p>P310 : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOLISON ou un médecin.</p> <p>P405 : Garder sous clé!</p> <p>P501 : Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale</p>	C ≥ 0.613	C ≥ 10%	H314 H410	P260 P303+P361+P353 P305+P351+P338 P310 P501	Danger		Récupération dans le flacon de déchets prévu à cet effet
	0.307 ≤ C ≤ 0.613	5% ≤ C ≤ 10%	H314 H410	P260 P303+P361+P353 P305+P351+P338 P310 P501	Danger		Récupération dans le flacon de déchets prévu à cet effet

# Techniques de microbiologie 2013

---

Pour les candidats non évalués en CCF

Durée : 3 heures 30

Coefficient : 4

## Matériels autorisés :

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

## Documents à rendre et àagrafer avec la copie :

- Feuilles de traçabilité 1 et 2

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.

## VALIDATION DE MÉTHODES D'ANALYSES DE MATIÈRES PREMIÈRES EN INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE

### Contexte professionnel

Une industrie pharmaceutique contrôle systématiquement les matières premières utilisées pour la production de médicaments. Les contrôles microbiologiques de routine consistent à vérifier l'absence de contamination des matières premières par des bactéries ou des mycètes.

Néanmoins, certaines matières premières ont un effet inhibiteur sur la croissance microbienne et peuvent fausser les dénombrements réalisés en routine. C'est pourquoi le laboratoire doit au préalable valider les méthodes de dénombrement et contrôler l'innocuité du produit analysé sur différentes souches tests, dont *Escherichia coli*, avant de pouvoir appliquer ces méthodes en routine.

En première intention, des solutions mères sont préparées dans un diluant PCS (peptone caséine soja) et le dénombrement est réalisé dans la masse d'un milieu gélosé. Si cette étude de validation initiale met en évidence une toxicité du produit sur la flore microbienne, la solution mère est alors préparée en diluant-neutralisant et l'analyse est réalisée par filtration.

On se propose ici de réaliser les études de validation des méthodes de dénombrement des *Escherichia coli* dans deux matières premières :

- X dont l'étude de validation initiale doit être mise en œuvre,
- Y dont l'étude de validation initiale a montré une toxicité sur le développement des *Escherichia coli* et sur laquelle l'étude en diluant-neutralisant avec filtration doit être réalisée.

### Objectifs

- Contrôler les caractères microbiologiques de la souche test d'*Escherichia coli*.
- Préparer un inoculum d'*Escherichia coli* ajusté à  $5 \cdot 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>
- Réaliser l'étude de validation de la méthode de dénombrement d'*Escherichia coli* dans une matière première X.
- Réaliser l'étude de validation de la méthode de dénombrement d'*Escherichia coli* dans une matière première Y inhibitrice.

## Compétences évaluées

### Réaliser des analyses et des contrôles microbiologiques. (26 points)

Réaliser des techniques d'observations macroscopique et microscopique des microorganismes.

Réaliser des techniques de culture de microorganismes.

Réaliser des techniques d'identification des microorganismes.

Réaliser des techniques de quantification des microorganismes et des virus.

### Adapter ou optimiser des procédures ou des procédés (3 points)

### Analyser, Interpréter et valider des résultats. (9 points)

### Organiser le travail dans le temps et dans l'espace. (1 point)

### Analyser et prévenir les risques liés à son activité. (1 point)

## Mise en œuvre

Activités professionnelles	Ressources Documents	- Page	Documents à compléter et à joindre à la copie
<b>1</b> Contrôler les caractères microbiologiques d'une souche test d' <i>Escherichia coli</i>	Fiche protocole 1	106	Feuille de traçabilité 1
<b>2</b> Préparer un inoculum <i>Escherichia coli</i> ajusté à $5.10^3$ UFC.mL <sup>-1</sup>	Fiche protocole 2	107	Feuille de traçabilité 2
<b>3</b> Réaliser l'étude de validation de la méthode de dénombrement d' <i>Escherichia coli</i> dans une matière première X.	Fiche protocole 3	108	Feuille de traçabilité 3
<b>4</b> Réaliser l'étude de validation de la méthode de dénombrement d' <i>Escherichia coli</i> dans une matière première Y inhibitrice.	Fiche protocole 4	109	Feuille de traçabilité 4

## **Fiche protocole 1 : Contrôle des caractères microbiologiques de la souche test d'*Escherichia coli***

La souche test d'*Escherichia coli* a été isolée sur gélose nutritive inclinée. On procède au contrôle de ses caractères morphologiques et biochimiques.

### **Matériel et réactifs**

- Souche test d'*Escherichia coli* sur gélose nutritive inclinée notée « E »
- 1 tube de 10 mL d'eau distillée stérile noté « **Eau distillée** »
- 1 tube à hémolyse stérile
- Réactifs pour la coloration de Gram
- Lames
- Pipettes Pasteur stériles
- Réactifs pour tests enzymatiques rapides

### **Protocole opératoire**

Vérifier les caractères morphologiques de la souche test.

***Présenter l'examen microscopique à un examinateur, accompagné du compte-rendu de l'observation sur la feuille de traçabilité 1.***

Réaliser le test enzymatique rapide approprié et compléter la feuille de traçabilité 1.

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

Vérifier l'adéquation des caractères observés avec l'identité de la souche sur la feuille de traçabilité. Proposer une microgalerie et des milieux associés à ensemercer pour vérifier l'identité de la souche test.

***Faire valider votre proposition sur la feuille de traçabilité par un examinateur au plus tard une heure avant la fin de l'épreuve.***

Ensemencer la galerie et les milieux distribués par le centre d'examen et incubé à 36°C pendant 24 heures.

## Fiche protocole 2 : Préparation d'un inoculum d'*Escherichia coli* ajusté à $5.10^3$ UFC.mL<sup>-1</sup>

La suspension de la souche test d'*Escherichia coli* est ajustée au spectrophotomètre puis diluée pour obtenir un inoculum de concentration connue.

### Matériel et réactifs

- Souche test d'*Escherichia coli* notée « E » en bouillon TS (culture de 24 h)
- 1 tube de 10 mL de BTS (Bouillon Trypticase Soja) stérile noté « BTS »
- 6 tubes à hémolyse stériles
- 1 flacon de 20 mL d'eau physiologique stérile noté « Eau <p>»
- 4 cuves spectrophotométriques
- Parafilm
- Spectrophotomètre réglé à la longueur d'onde 600 nm
- Tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile notés « Eau φ »
- 40 mL de gélose PCA en surfusion à 55°C notée « PCA »
- 2 boîtes de Pétri stériles
- Pipettes graduées ou équivalent stériles de 1, 2 et 5 mL et dispositifs d'aspiration adaptés
- Pipette automatique P1000 et cônes adaptés stériles.

### Préparation de l'inoculum

Préparer à partir de la culture « E », une suspension ajustée à une DO de 0,2 à 600 nm (à ± 10 %).

***Montrer la réalisation des mesures spectrophotométriques à un examinateur***

Présenter la préparation de l'inoculum sous forme d'un organigramme sur la feuille de traçabilité 2.

***Faire valider les calculs de préparation de l'inoculum par un examinateur avant de continuer vos manipulations***

Préparer à partir de la suspension ajustée, un minimum de 3 mL d'un inoculum à  $5.10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> en eau physiologique.

***Réaliser la ou les dilution(s) en présence d'un examinateur***

### Données:

Seuil de linéarité de la méthode spectrophotométrique à 600 nm : 0,6

Corrélation DO/Concentration en UFC.mL<sup>-1</sup> par unité de DO à 600 nm (donnée par le centre) : .....

### Contrôle de l'inoculum

Réaliser des dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  de l'inoculum en eau physiologique.

Dénombrer la dilution  $10^{-2}$  dans la masse d'une gélose PCA en double couche et en double essai.

Incuber 24 h à 36°C.

### Compte rendu (sur feuille de traçabilité 2)

- Préciser le rôle du contrôle de l'inoculum.

#### Remarques :

- l'inoculum sera utilisé dans le protocole 3.

- la dilution  $10^{-1}$  de l'inoculum sera utilisée dans le protocole 4.

## Fiche protocole 3 : Validation de la méthode de dénombrement d'*Escherichia coli* dans une matière première X

Un inoculum connu d'une souche test d'*Escherichia coli* est mis en contact avec une solution mère d'une matière première X. Un dénombrement dans la masse d'une gélose nutritive permet ensuite de mettre en évidence un éventuel effet du produit X sur le résultat du dénombrement.

### Matériel et réactifs

- Inoculum d'*Escherichia coli* préparé dans le protocole 2
- Flacon de 15 mL de solution mère du produit X préparée par dissolution de 10 g de produit dans 90 mL de diluant PCS notée « X »
- Flacon de 15 mL de diluant PCS noté « DPCS »
- 120 mL de gélose PCA en surfusion à 55°C notée « PCA »
- 6 boîtes de Pétri stériles
- 2 tubes à essais stériles
- Pipette automatique P100 ou P200 et cônes adaptés stériles
- Pipettes graduées ou équivalent stériles de 1 et 10 mL et dispositifs d'aspiration adaptés

### Protocole opératoire pour la validation

Préparer les tubes suivants :

	Témoin DPCS+	Essai produit X
Diluant DPCS (mL)	9,9	-
Solution mère X (mL)	-	9,9
Inoculum (mL)	0,1	0,1

Réaliser sur chaque tube un dénombrement dans la masse d'une gélose PCA en double couche et en double essai.

Prévoir deux témoins (en simple essai) permettant de contrôler le diluant PCS et la solution mère « X ».

Incuber 24h à 36°C.

### Compte rendu (sur feuille de traçabilité 3)

- Présenter l'organigramme de la manipulation.
- Présenter le rôle du témoin DPCS+.
- Présenter les compositions et les rôles des contrôles du diluant PCS et de la solution mère « X ».
- Préciser les résultats attendus pour l' « Essai produit » et le « Témoin DPCS+ » :
  - en cas d'innocuité du produit X
  - en cas de toxicité du produit X.

## Fiche protocole 4 : Validation de la méthode de dénombrement d'*Escherichia coli* dans une matière première Y inhibitrice.

Une étude de validation initiale du dénombrement des *Escherichia coli* dans une matière première Y a montré un effet inhibiteur de ce produit sur le développement d'*Escherichia coli* faussant le résultat de l'analyse.

On recommence donc l'étude de validation du dénombrement avec les conditions suivantes :

- préparation d'une solution mère de Y en diluant-neutralisant,
- mise en contact avec un inoculum connu d'*Escherichia coli*,
- dénombrement par filtration sur membrane.

L'objectif est de vérifier que le diluant-neutralisant choisi, associé à une filtration, permet de neutraliser l'activité inhibitrice du produit Y.

### Matériel et réactifs

- Dilution  $10^{-1}$  de l'inoculum d'*Escherichia coli* préparée dans le protocole 2
- Flacon de 15 mL de solution mère du produit Y préparée par dissolution de 10 g de produit dans 90 mL de diluant-neutralisant notée « Y »
- Flacon de 15 mL du diluant-neutralisant utilisé pour la préparation de la solution mère noté « DN »
- 2 tubes à essais stériles
- Pipette automatique P100 et cônes adaptés stériles
- Pipettes graduées ou équivalent stériles de 10 mL et dispositifs d'aspiration adaptés
- 2 membranes de filtration 0,45 µm
- Système de filtration (Fiche technique fournie par le centre d'examen)
- Flacon d'eau stérile pour rinçage notée « Eau de rinçage »
- 2 boîtes de gélose PCA + TTC de 55 mm notées « PCA + TTC »

### Données

Composition de la gélose PCA + TTC : Tryptone 5 g ; Extrait de levures 2,5 g ; Glucose 4 g ; Agar 9 g ; Eau distillée qsp 1L ; Triphényltétrazolium (TTC) 25 mg ajouté dans le milieu en surfusion juste avant l'utilisation.

### Protocole opératoire pour la validation

Préparer les tubes suivants :	Témoin DN+	Essai produit Y
Diluant Neutralisant (mL)	9,9	-
Solution mère Y (mL)	-	9,9
Dilution $10^{-1}$ de l'inoculum (mL)	0,1	0,1

Réaliser, pour chaque tube, une filtration sur membrane.

Déposer les membranes sur gélose PCA +TTC.

**La réalisation des filtrations sera réalisée devant un examinateur selon un ordre de passage déterminé en début de séance**

Incuber 24h à 36°C.

### Compte rendu (sur feuille de traçabilité 4)

- Après avoir analysé la composition de la gélose PCA +TTC utilisée, justifier l'emploi de ce milieu.
- Préciser les compositions et les rôles des témoins qui auraient pu être réalisés pour contrôler le diluant-neutralisant et la solution mère « Y ».
- Préciser le nombre de colonies attendues sur chaque membrane :
  - en cas de neutralisation du produit Y,
  - en cas de non-neutralisation du produit Y.

## Feuille de traçabilité 1

(à rendre avec la copie)

Date : .....

### 1 - Contrôle des caractères microbiologiques de la souche test d'*Escherichia coli*

- (Fiche protocole 1)
- Observation microscopique :
  
- Test enzymatique:
- Orientation de l'identification :
  
- Microgalerie et milieux complémentaires demandés

## Feuille de traçabilité 2

### 2 - Préparation d'un inoculum d'*Escherichia coli* ajusté à $5.10^3$ UFC.mL<sup>-1</sup>

(Fiche protocole 2)

Organigramme et calculs de la préparation de l'inoculum :

- Rôle du contrôle de l'inoculum :

## Feuille de traçabilité 3

(à rendre avec la copie)

Date : .....

### 3 - Validation de la méthode de dénombrement des *Escherichia coli* dans une matière première X

(Fiche protocole 3)

Organigramme de la manipulation.

Rôle du témoin DPCS+ :

Compositions et rôles des contrôles du diluant PCS et de la solution mère « X » :

Résultats attendus pour l' « Essai produit » et le « Témoin DPCS+ » :

- en cas d'innocuité du produit X :
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- en cas de toxicité du produit X.
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- en cas de toxicité du produit X.

## Feuille de traçabilité 4

(à rendre avec la copie)

Date : .....

### 4 - Validation de la méthode de dénombrement des *Escherichia coli* dans une matière première Y

(Fiche protocole 4)

Justification de l'emploi de la gélose PCA + TTC utilisée :

Compositions et les rôles des témoins qui auraient pu être réalisés pour contrôler le diluant-neutralisant et la solution mère « Y » :

Nombre de colonies attendues sur chaque membrane :

- en cas de neutralisation du produit Y :
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- en cas de non-neutralisation du produit Y.

## 2<sup>ème</sup> JOUR

Durée : 2 heures

# VALIDATION DE MÉTHODES D'ANALYSES DE MATIÈRES PREMIÈRES EN INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE

## Rappel du contexte professionnel

Une industrie pharmaceutique contrôle systématiquement les matières premières utilisées pour la production de médicaments. Les contrôles microbiologiques de routine consistent à vérifier l'absence de contamination des matières premières par des bactéries ou des mycètes.

Néanmoins, certaines matières premières ont un effet inhibiteur sur la croissance microbienne et peuvent fausser les dénombrements réalisés en routine. C'est pourquoi le laboratoire doit au préalable valider les méthodes de dénombrement et contrôler l'innocuité du produit analysé sur différentes souches tests, dont *Escherichia coli*, avant de pouvoir appliquer ces méthodes en routine.

En première intention, les solutions mères sont préparées dans un diluant PCS (peptone caséine soja) et le dénombrement est réalisé dans la masse d'un milieu gélosé. Si cette étude de validation initiale met en évidence une toxicité du produit sur la flore microbienne, la solution mère est alors préparée en diluant-neutralisant et l'analyse est réalisée par filtration.

On se propose ici de réaliser les études de validation des méthodes de dénombrement d'*Escherichia coli* dans deux matières premières :

- X dont l'étude de validation initiale doit être mise en œuvre,
- Y dont l'étude de validation initiale a montré une toxicité sur le développement d'*Escherichia coli* et sur laquelle l'étude en diluant-neutralisant avec filtration doit être réalisée.

## Objectifs

- Vérifier la conformité des caractères microbiologiques de la souche test d'*Escherichia coli*.
- Contrôler l'inoculum d'*Escherichia coli* préparé le premier jour.
- Lire et exploiter les résultats de la validation de la méthode de dénombrement d'*Escherichia coli* dans une matière première X.
- Lire et exploiter les résultats de la validation de la méthode de dénombrement d'*Escherichia coli* dans une matière première Y inhibitrice.

**Mise en œuvre**

Activités professionnelles	Ressources Documents	- Page	Documents à compléter et à joindre à la copie
<b>1</b> Contrôler les caractères microbiologiques d'une souche test d' <i>Eschérichia coli</i>	Fiche de sécurité 1 et 2 Logiciel API ou Taxon	115	Feuille de traçabilité
<b>2</b> Préparer un inoculum <i>Eschérichia coli</i> ajusté à 5.103 UFC.mL <sup>-1</sup>			Rapport d'analyses
<b>3</b> Réaliser l'étude de validation de la méthode de dénombrement d' <i>Escherichia coli</i> dans une matière première X.			
<b>4</b> Réaliser l'étude de validation de la méthode de dénombrement d' <i>Escherichia coli</i> dans une matière première Y inhibitrice.			

## FICHE DE SÉCURITÉ 1

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES DE SECURITE
<b>REACTIFS DE REVELATION (LECTURE DE GALERIES)</b>		
<b>Réactif NIT 1</b> <i>Autre dénomination : Acide sulfanilique (en solution acétique)</i>		
	Acide sulfanilique (acide 4-aminobenzène-sulfonique) <chem>C6H7NO3S</chem>	H319 : Provoque une sévère irritation des yeux. H315 : Provoque une irritation cutanée. H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.
	Solvant : acide acétique (acide éthanotique) <chem>CH3COOH</chem>	H226 : Liquide et vapeurs inflammables. H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
<b>Réactif NIT 2</b> <i>Autre dénomination : o-naphtylamine (en solution acétique)</i>		
	o-naphtylamine (1-aminonaphtalène) <chem>C10H9N</chem>	H302 : Nocif en cas d'ingestion. H411 : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme.
	Solvant : acide acétique (acide éthanotique) <chem>CH3COOH</chem>	H226 : Liquide et vapeurs inflammables. H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
<b>Poudre de zinc</b>		
	Zn en poudre	H228 : Solide inflammable. H260 : Dégage, au contact de l'eau, des gaz inflammables qui peuvent s'enflammer spontanément. H410 : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme.
<b>Réactif VP 1</b> <i>Autre dénomination : Soude (hydroxyde de sodium)</i>		
	Hydroxyde de sodium <chem>NaOH</chem>	H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. H290 : Peut être corrosif pour les métaux
Danger		

## FICHE DE SÉCURITÉ 2

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES DE SECURITE
<b>Réactif VP 2</b> <i>Autre dénomination : o-naphtol</i>		
	Napht-1-ol <chem>C10H7OH</chem>	H332 : Nocif par inhalation. H302 : Nocif en cas d'ingestion. H400 : Très toxique pour les organismes aquatiques.
Danger		
<b>Réactif TDA</b>		
	Perchlorure de fer <chem>FeCl3</chem>	H302 : Nocif en cas d'ingestion. H319 : Provoque une sévère irritation des yeux. H316 : Provoque une irritation cutanée.
<b>Réactif d'Erlich-Kovacs (ou réactif de James)</b>		
	Butane1 ol <chem>C4H10O</chem> Acide chlorhydrique <chem>HCl</chem> Diméthylamino 4 benzaldéhyde <chem>C9H11NO</chem>	H226 : Liquide et vapeurs inflammables. H302 : Nocif en cas d'ingestion. H315 : Provoque une irritation cutanée. H318 : Provoque des lésions oculaires graves. H335 : Peut irriter les voies respiratoires. H336 : Peut provoquer somnolence ou vertiges.
Danger		

## Feuille de traçabilité (à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR .....

Date: .....

Poste n° .....

### 1 - Contrôle des caractères microbiologiques de la souche test

- Validation des résultats :

- Lecture de la galerie API par méthode probabiliste (feuille de résultats API à joindre avec la copie).

### 2 - Préparation d'un inoculum d'*Escherichia coli* ajusté à $5.10^3$ UFC.mL<sup>-1</sup>

	Contrôle inoculum
Nombre de colonies par boîte : n	

### 3 - Validation de la méthode de dénombrement d'*Escherichia coli* dans une matière première X

	Témoin DPCS+	Essai produit « X »	Témoin 1	Témoin 2
Nombre de colonies par boîte : n				

### 4 - Validation de la méthode de dénombrement d'*Escherichia coli* dans une matière première Y inhibitrice

	Témoin DN+	Essai produit « Y »
Nombre de colonies par boîte : n		

## Rapport d'analyses

(à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR .....

Date: .....

Poste n° .....

### Contrôle des caractères microbiologiques de la souche test

Conclusion :

### Préparation d'un inoculum d'*Escherichia coli* ajusté à $5.10^3$ UFC.mL<sup>-1</sup>

Concentration de l'inoculum :

Conclusion :

### Validation de la méthode de dénombrement d'*Escherichia coli* dans une matière première X

$$\text{Toxicité diluant} = \frac{n_{\text{contrôle inoculum}} - n_{\text{témoin DPCS+}}}{n_{\text{contrôle inoculum}}} \times 100 =$$

Analyse des témoins et contrôles :

$$\text{Toxicité produit X} = \frac{n_{\text{contrôle inoculum}} - n_{\text{essai produit}}}{n_{\text{contrôle inoculum}}} \times 100 =$$

Interprétation et conclusion :

Donnée : une toxicité inférieure à 30% est considérée comme négative.

### Validation de la méthode de dénombrement d'*Escherichia coli* dans une matière première Y inhibitrice

$$\text{Toxicité diluant-neutralisant} = \frac{n_{\text{contrôle inoculum}} - n_{\text{témoin DN+}}}{n_{\text{contrôle inoculum}}} \times 100 =$$

Analyse du témoin DN+ :

$$\text{Toxicité produit Y} = \frac{n_{\text{contrôle inoculum}} - n_{\text{essai produit}}}{n_{\text{contrôle inoculum}}} \times 100 =$$

### Interprétation et conclusion :

Donnée : une toxicité inférieure à 30% est considérée comme négative.

# Techniques de biologie cellulaire et moléculaire 2013

---

Pour les candidats non évalués en CCF

Durée : 3 heures

Coefficient : 2

## Matériels autorisés :

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

## Documents à rendre et à agraffer avec la copie :

Feuilles de traçabilité

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

## ÉTUDE DE L'EFFET D'UNE INFECTION AU CYTOMEGALOVIRUS SUR DES FIBROBLASTES EN CULTURE

### Contexte professionnel

Le cytomégalovirus (CMV) qui appartient à la famille des *Herpes viridae*, est un virus très largement répandu dans le monde. L'infection par le CMV est, chez les sujets sains, le plus souvent cliniquement asymptomatique, mais peut conduire chez les patients immunodéprimés et chez les nouveau-nés, à des atteintes viscérales sévères. De nombreux types cellulaires sont infectés, notamment les fibroblastes, des cellules épithéliales, des cellules endothéliales et des muscles lisses.

Parmi les modèles animaux, les modèles murin et cochon d'Inde sont actuellement les plus utilisés. On se propose ici, dans le cadre du modèle murin, d'utiliser des fibroblastes murins en culture qui, à la fois, pourront servir à la mise en évidence de l'effet cytopathogène du virus et à l'analyse des cytokines produites par les fibroblastes infectés.

### Activités à réaliser

- Trypsination d'une culture de fibroblastes et estimation de la viabilité de fibroblastes avant infection par le CMV
- Mise en évidence de cytokines par immunoprécipitation dans les surnageants de fibroblastes après infection par le CMV

### Compétences évaluées

- Réaliser des analyses et des contrôles utilisant des anticorps (12 points)
- Réaliser des analyses et des contrôles utilisant des cultures cellulaires (20 points)
- Analyser, interpréter, valider des résultats (8 points)

## Mise en œuvre

*L'ordre de passage sous PSM sera indiqué en début de séance. La durée prévue par étudiant est de 20 minutes.*

Activités professionnelles	Ressources et documents	Document à compléter et à joindre à la copie
1 – Préparation du milieu de culture pour les fibroblastes murins	Fiche protocole 1	Feuille de traçabilité 1
2 – Estimation de la viabilité des fibroblastes murins par technique microscopique	Fiche protocole 2	Feuille de traçabilité 2
3 – Contrôle par électrosynérèse de l'expression de l'interleukine 1 (IL-1) par les fibroblastes infectés	Fiche protocole 3	Feuille de traçabilité 3

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

- Conclure à partir des informations suivantes :
  - Seules les cultures comportant au moins 85% de fibroblastes viables pourront être utilisées pour l'observation de l'effet cytopathogène.
  - Seuls les fibroblastes producteurs d'IL-1 seront utilisés pour l'étude du cycle viral.
- L'étude de l'infection des fibroblastes par le CMV nécessite un repiquage.

Proposer un protocole (volumes de suspension cellulaire et réactifs) permettant un repiquage des fibroblastes dans un flask de culture à une concentration finale de  $4 \cdot 10^5$  cellules viables.mL<sup>-1</sup> sous un volume final de 5 mL.

# Fiche protocole 1 : Préparation du milieu de culture pour fibroblastes murins

## Principe

La culture de fibroblastes murins exige la préparation extemporanée d'un milieu de culture MEM complet (supplémenté en SVF, glutamine et antibiotiques). Ce milieu complet sera utilisé en particulier dans le protocole 2 pour estimer la viabilité des fibroblastes murins.

## Matériel et réactifs

### POUR LE POSTE DE CULTURE CELLULAIRE

- Pipettes graduées stériles : 10 mL, 5 mL, 2 mL, 1 mL
- Pipettes automatiques P50 et P200 + cônes
- 1 flacon stérile vide
- 1 tube de 10 mL milieu MEM noté « **MEM 2 X** »
- 1 tube de 1 mL de sérum de veau fœtal noté « **SVF** »
- 1 tube de 0,5 mL de glutamine noté « **Glutamine** » 200 mmol.L<sup>-1</sup>
- 1 tube de 0,5 mL de solution antibiotique noté « **ATB** »
- 1 flacon de 10 mL de tampon noté « **PBS1** »

## Mode opératoire

Préparer le milieu MEM complet stérile selon le tableau suivant :

Composition	Volume final ou concentrations finales
Milieu MEM complet	1 X
SVF	5% (v/v)
Glutamine	0,2 mmol.L <sup>-1</sup>
Antibiotiques	0,1% (v/v)

## Compte rendu (à rédiger sur la copie)

- Expliquer en détail la préparation du milieu complet de culture.
- Reporter uniquement les volumes calculés sur la feuille de traçabilité 1 (à rendre à la demande de l'examineur).

## Fiche protocole 2 : Estimation de la viabilité des fibroblastes murins

### Principe

Les fibroblastes ont été cultivés en flask de 25 cm<sup>2</sup>.

Sous PSM, les fibroblastes sont récupérés, à partir du tapis cellulaire par dissociation enzymatique à 37°C, et remis en suspension dans le milieu complet MEM stérile. La concentration et la viabilité cellulaire de la suspension sont évaluées afin de préparer les conditions d'un repiquage pour l'infection de ces cellules par le CMV.

### Matériel et réactifs

#### POUR LE POSTE DE CULTURE CELLULAIRE

- 1 flask de culture de fibroblastes de souris avec N° du candidat « **Fibro** »
- 1 tube de 3 mL de trypsine-EDTA noté « **trypsine** »
- 1 tube de 7 mL de tampon noté « **PBS2** »
- Milieu MEM complet préparé par le candidat selon la fiche protocole 1
- Pipettes graduées stériles : 5 mL, 2 mL, 1 mL
- 1 tube à hémolyse vide

#### POUR LA PAILLASSE

- 1 cellule de Malassez
- 1 compteur manuel
- 1 tube de 200 µL de bleu de Funk noté « **BF** »
- 1 tube de 1 mL de tampon noté « **PBS3** »
- 1 pipette automatique P200 + cônes
- 1 tube hémolyse vide (pour dilution avec le bleu de Funk)

### Mode opératoire

- Au microscope inversé, observer la culture cellulaire fournie.
- Sous PSM, mettre en œuvre, à partir du flask de culture de fibroblastes, les différentes étapes nécessaires à la préparation d'une suspension cellulaire en milieu MEM complet qui servira au dénombrement, à l'aide des données suivantes :

Étapes	Volumes de réactifs nécessaires
Lavage cellulaire	5 mL de PBS
Décollement cellulaire	1 mL trypsine-EDTA, stérile
Arrêt décollement cellulaire	5,0 mL milieu MEM complet, stérile

- Au poste de travail :
  - Diluer les cellules au ½ en bleu de Funk
  - Dénombrer les cellules en hématimètre de Malassez (si nécessaire, réaliser une dilution de la suspension cellulaire en tampon PBS).

(un champ microscopique sera montré à l'examineur avec indication de la densité cellulaire/rectangle sur la feuille de traçabilité 2).

### Compte-rendu (à rédiger sur la copie)

- Décrire les observations macroscopique et microscopique de la culture de fibroblastes.
- Compléter la feuille de traçabilité 2.

# Fiche protocole 3 : Contrôle par électrosynérèse de l'expression de l'interleukine 1 par les fibroblastes murins

## Principe

L'infection virale par le CMV (en réalité MCMV pour Murine CMV) provoque une modification de l'expression de certaines cytokines dans les fibroblastes suite à l'activation du récepteur PPAR $\gamma$ .

Afin de contrôler l'expression de l'interleukine 1 (IL-1) dans les fibroblastes infectés par le virus, trois surnageant de cultures de fibroblastes, notés S1, S2 et S3, sont testés par une technique d'électrosynérèse. .

Donnée : *pHi de l'interleukine 1 égal à 7.*

## Matériel et réactifs

Par candidat

- Deux lames de verres (une lame en supplément pour entraînement)
- 2 tubes de 10 mL de solution d'agarose à 1% en tampon véronal pH 9,2, en surfusion au bain thermostaté 55°C :
- Pipettes automatiques P50, P200 + cônes
- 3 tubes à hémolyse vides sur un portoir
- 1 tube 2 mL de tampon véronal pH 9,2 noté « **Tp** »
- 1 tube 100  $\mu$ L de solution d'interleukine 1 à 0,1 g.L<sup>-1</sup> noté « **IL-1** »
- 1 tube 100  $\mu$ L de solution d'anticorps anti- interleukine 1 noté « **anti- IL-1** »
- 3 tubes 20  $\mu$ L de solution des trois surnageant cytokiniques de culture de fibroblastes infectés notés respectivement « **S1** », « **S2** » et « **S3** ».
- 1 tube 20  $\mu$ L de solution d'un surnageant de culture des fibroblastes non infectés noté « **S4** ».

Matériel collectif

- Systèmes emporte-pièce pour la perforation des puits

Au poste électrophorèse

- Cuves remplies de tampon véronal pH 9,2 et générateurs d'électrophorèse
- 2 Papiers Whatman prédécoupés
- Gants et pinces

## Mode opératoire

Préparation du gel

- Couler le gel d'agarose sur la lame en verre sur une surface horizontale. Laisser prendre en masse (on peut éventuellement placer la lame à 4°C si nécessaire).
- Perforer le gel à l'aide d'un emporte-pièce en utilisant le gabarit fourni sur la feuille de de traçabilité 3.

Réalisation des dilutions de la solution d'interleukine 1

Effectuer des dilutions en tampon véronal pH 9,2 de la solution d'interleukine 1 au 1/2, 1/3 et 1/5 en tube à hémolyse.

### Dépôts des solutions

- Tester la solution d'interleukine 1 pure ainsi que les trois dilutions préparées précédemment.
- Tester les quatre surnageants purs de culture (S1 à S4).
- Utiliser la solution pure d'anticorps anti- interleukine 1.
- Choisir le contenu et la disposition des différents puits et indiquer ces choix en complétant le gabarit figurant sur la **feuille de traçabilité 3**.

***Appeler un examinateur pour présenter le gabarit de dépôts complété avant de procéder au remplissage des puits (feuille de traçabilité 3).***

- Déposer, après validation, 10  $\mu$ L au maximum de chaque solution par puits.

### Migration électrophorétique

- Disposer la lame dans la cuve contenant le tampon de migration à pH 9,2 en respectant l'orientation choisie précédemment.
- Appliquer les ponts de papier Whatman.
- Laisser migrer 45 minutes sous une tension de 150 volts (**pas avant l'accord de l'examineur**).

### **Compte rendu (à rédiger sur la copie)**

- Justifier la disposition des différentes solutions dans les puits. Insérer le gabarit de dépôts dans le compte-rendu.
- Présenter sous forme de tableau les dilutions de la solution d'interleukine 1 réalisées.
- Observer la lame en utilisant le fond noir.
- Compléter le gabarit de résultats en représentant sur la **feuille de traçabilité 3** les résultats obtenus.
- Préciser l'intérêt de « S4 » et le valider.
- Interpréter les résultats obtenus.

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ 1**

(à rendre avec la copie)

Date : .....

Poste N° : .....

NOM DE L'OPERATEUR : .....

**PRÉPARATION DU MILIEU DE CULTURE POUR FIBROBLASTES MURINS**

Réactifs	Volumes à prélever (mL)
MEM 2 X	
SVF	
Glutamine	
ATB	
Tampon PBS	

**FEUILLE DE TRAÇABILITÉ 2**

(à rendre avec la copie)

Date : .....

Poste N° : .....

NOM DE L'OPERATEUR : .....

**ESTIMATION DE LA VIABILITÉ DES FIBROBLASTES MURINS****Résultats**

Densité cellulaire par rectangle (champ microscopique montré à l'examineur)	
Nombre de rectangles comptés	
Nombre de cellules totales	
Nombre de cellules vivantes	
% de viabilité	

**Justification des calculs**

# FEUILLE DE TRAÇABILITÉ 3

(à rendre avec la copie)

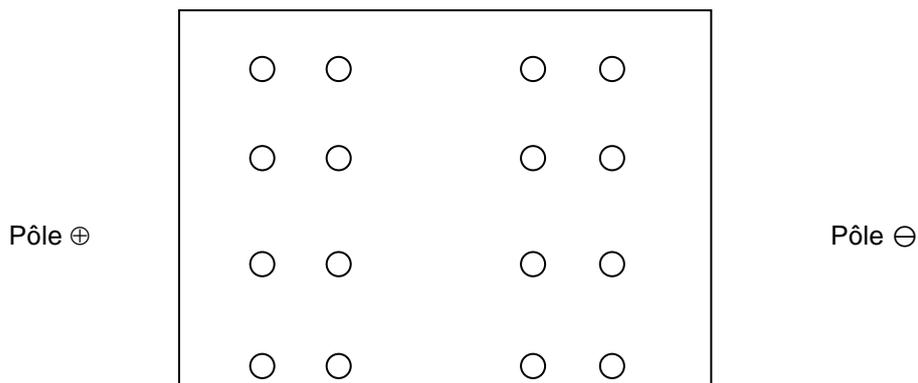
Date : .....

Poste N° : .....

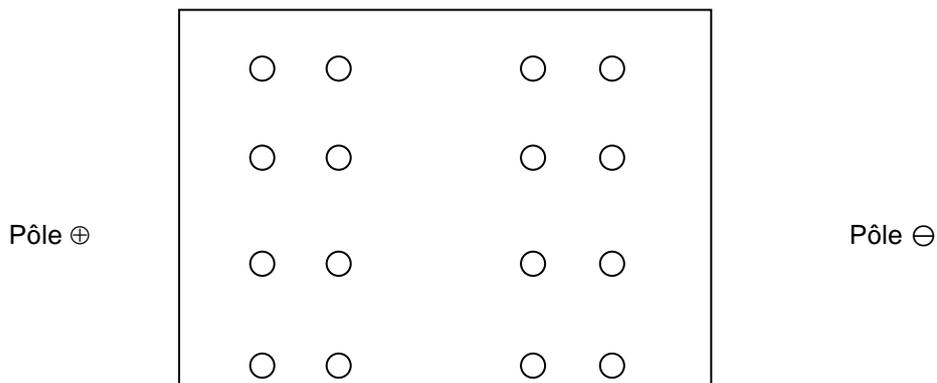
NOM DE L'OPÉRATEUR : .....

## CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DE L'INTERLEUKINE 1 PAR LES FIBROBLASTES MURINS INFECTES

### Gabarit de dépôts



### Résultats



# Éléments de corrigé de mathématiques 2012

---

## Exercice 1

### A. Résolution d'une équation différentielle

1)  $a(t) = 1$   $b(t) = 0,25$  donc  $\frac{b(t)}{a(t)} = 0,25$  de primitive  $F(t) = 0,25t$ .

Les solutions de  $(E_0)$  sont de la forme :  $y_0(t) = Ce^{-0,25t}$  où  $C$  est une constante.

2) Pour tout  $t \in [0; +\infty[$  :  $h(t) = -4e^{-t}$  donc  $h'(t) = -4(-e^{-t}) = 4e^{-t}$ .

$$h'(t) + 0,25h(t) = 4e^{-t} + 0,25 \times (-4e^{-t}) = (4-1)e^{-t} = 3e^{-t}$$

Donc  $h$  est solution de l'équation (E).

3) Les solutions de (E) sont de la forme :  $y(t) = y_0(t) + h(t) = Ce^{-0,25t} - 4e^{-t}$  où  $C \mapsto \dots$

4)  $f$  est solution de (E), donc :  $f(t) = Ce^{-0,25t} - 4e^{-t}$ .

$$f(0) = 75 \Leftrightarrow Ce^{-0,25 \times 0} - 4e^0 = 75 \Leftrightarrow C - 4 = 75 \Leftrightarrow C = 79$$

D'où  $f(t) = 79e^{-0,25t} - 4e^{-t}$  pour tout  $t \in [0; +\infty[$ .

### B. Étude d'une fonction et calcul intégral différentielle

1)

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} -0,25t = -\infty$$

$$\lim_{T \rightarrow -\infty} e^T = 0$$

donc :  $\lim_{t \rightarrow +\infty} 79e^{-0,25t} = 0$

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} -t = -\infty$$

$$\lim_{T \rightarrow -\infty} e^T = 0$$

donc :  $\lim_{t \rightarrow +\infty} -4e^{-t} = 0$

D'où  $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 0$ .

La courbe  $C$  admet une **asymptote horizontale d'équation  $y = 0$**  (l'axe des abscisses) en  $+\infty$ .

2) a- Pour tout  $t \in [0; +\infty[$  :  $f'(t) = 79(-0,25e^{-0,25t}) - 4(-e^{-t}) = -19,75e^{-0,25t} + 4e^{-t}$

Or  $e^{-0,25t}(-19,75 + 4e^{-0,75t}) = -19,75e^{-0,25t} + 4e^{-0,25t-0,75t} = -19,75e^{-0,25t} + 4e^{-t}$

Donc :  $f'(t) = e^{-0,25t}(-19,75 + 4e^{-0,75t})$ .

b- Pour tout  $t \in [0; +\infty[$  :  $e^{-0,75t} < 1$  car  $-0,75t < 0$

Donc  $4e^{-0,75t} < 4$  et  $-19,75 + 4e^{-0,75t} < -15,75 < 0$

c- Pour tout  $t \in [0; +\infty[$  :

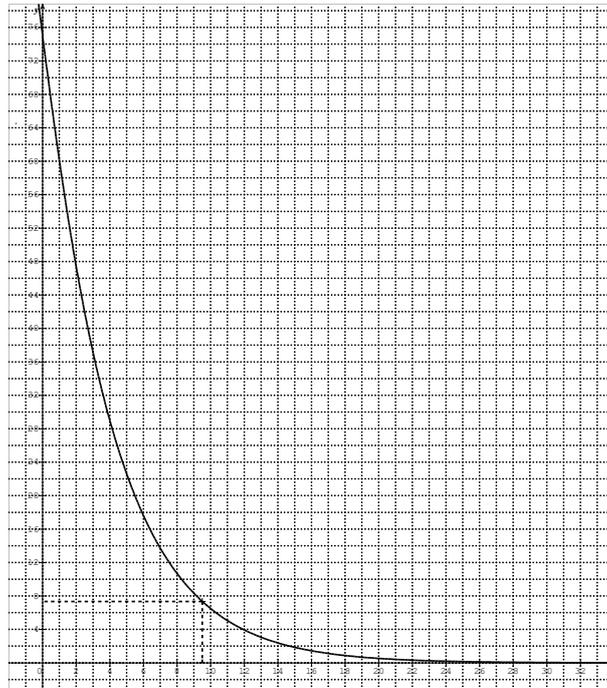
$e^{-0,25t} > 0$  et  $-19,75 + 4e^{-0,75t} < 0$  donc  $f'(x) < 0$ .

$f$  est donc strictement **décroissante** sur  $[0; +\infty[$ .

3) a-

$t$	0	5	10	15	20	25
$f(t)$	75	22,6	6,5	1,9	0,5	0,2

3) b-



4) a-

$$V_m = \frac{1}{20} \int_0^{20} f(t) dt = \frac{1}{20} \left[ -\frac{79}{0,25} e^{-0,25t} + 4e^{-t} \right]_0^{20}$$

$$V_m = \frac{1}{20} (-316e^{-5} + 4e^{-20} + 316 - 4) = \frac{1}{20} (-316e^{-5} + 4e^{-20} + 312)$$

4) b-  $V_m = 15,5$ .

### C. Exploitation des résultats de la partie B

$$1) \frac{1}{3}f(t) \leq 2,5 \Leftrightarrow f(t) \leq 7,5$$

On peut donc autoriser la baignade après 9 semaines et demi.

$$2) V = \frac{1}{3}V_m \approx \frac{15,5}{3} \approx 5,2.$$

La valeur moyenne de la concentration du polluant est environ 5,2 milligrammes par litre.

## Exercice 2

### A. Probabilités conditionnelles

A est l'évènement : « la personne choisie est vaccinée » avec  $p(A) = 0,99$ .

B est l'évènement : « la personne choisie est immunisée contre le virus ».

1) Les évènements A et  $\bar{A}$  forment une partition de l'univers, d'où, d'après la formule des probabilités totales :

$$B = (B \cap A) \cup (B \cap \bar{A})$$

$$p(B) = p(B \cap A) + p(B \cap \bar{A})$$

$$p(B) = p_A(B) \times p(A) + p_{\bar{A}}(B) \times p(\bar{A})$$

$$p(B) = 0,95 \times 0,99 + 0,20 \times 0,01$$

$$p(B) = 0,9405 + 0,002 = \mathbf{0,9425}$$

$$2) p_B(A) = \frac{p(A \cap B)}{p(B)} = \frac{0,9405}{0,9425} = \mathbf{0,998} \text{ au millième près.}$$

La probabilité que la personne choisie ait été vaccinée sachant qu'elle est immunisée contre le virus est de **0,998** au millième près

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

1) Chaque prélèvement est constitué par **400** épreuves élémentaires indépendantes puisque le prélèvement est assimilé à un tirage avec remise.

▪ Chaque épreuve élémentaire a deux issues possibles:

Soit la personne n'a pas été vaccinée et on admet que  $p = \mathbf{0,01}$ .

Soit la personne a été vaccinée et on pose  $q = 1 - p = 0,99$ .

▪ La variable aléatoire X qui à tout prélèvement de 400 personnes associe le nombre de personnes n'ayant pas été vaccinées suit la loi binomiale **B ( 400 ; 0,01 )**.

2) On demande :  $p(X \leq 1)$

$$p(X \leq 1) = p(X = 0) + p(X = 1) \text{ et on sait que } p(X = k) = \binom{n}{k} \times p^k \times q^{n-k}, \text{ d'où :}$$

$$p(X \leq 1) = 1 \times (0,01)^0 \times (0,99)^{400} + 400 \times 0,01 \times (0,99)^{399} = \mathbf{0,090} \text{ au millième près.}$$

La probabilité qu'un prélèvement de 400 personnes contienne au plus une personne non vaccinée est de **0,090** au millième près.

3). On admet que  $X$  peut être approchée par une loi de Poisson.

a) Le paramètre  $\lambda$  de cette loi de Poisson est  $\lambda = np$ , ce qui donne  $\lambda = 400 \times 0,01 = 4$

b)  $p(X_1 > 5) = 1 - p(X_1 \leq 5)$

$$p(X_1 > 5) = 1 - (p(X_1 = 0) + p(X_1 = 1) + p(X_1 = 2) + p(X_1 = 3) + p(X_1 = 4) + p(X_1 = 5))$$

$$p(X_1 > 5) = 1 - (0,784) \quad \text{d'après le tableau de la loi de Poisson de paramètre 4}$$

$$p(X_1 > 5) = \mathbf{0,216} \quad \text{au millième près.}$$

La probabilité qu'un prélèvement de 400 personnes contienne plus de 5 personnes non vaccinées est de **0,216** au millième près.

### C. Approximation d'une loi binomiale par une loi normale

1). On admet que  $Y$  suit la loi binomiale de paramètres 200 et 0,8 et on considère que la loi suivie par  $Y$  peut être approchée par une loi normale.

$$m = n \times p = 200 \times 0,8 = 160 \quad \text{et} \quad \sigma = \sqrt{npq} = \sqrt{200 \times 0,8 \times 0,2} = \sqrt{32} \approx 5,66.$$

2) On désigne par  $Y_1$  une variable aléatoire suivant la loi normale  $N(160; 5,66)$ .

Soit  $T = \frac{Y_1 - 160}{5,66}$ , alors  $T$  suit la loi normale  $N(0; 1)$ .

$$p(154,5 \leq Y_1 \leq 165,5) = p\left(\frac{-5,5}{5,66} \leq T \leq \frac{5,5}{5,66}\right) = 2\Pi\left(\frac{5,5}{5,66}\right) - 1 \approx 2\Pi(0,97) - 1$$

On lit  $\Pi(0,97) = 0,8340$ , ce qui nous donne  $p(154,5 \leq Y_1 \leq 165,5) = 0,67$  au centième près.

En tenant compte de la correction de continuité, la probabilité qu'il y ait, dans un prélèvement de 200 personnes, entre 155 et 165 personnes non immunisées contre le virus est de **0,67** au centième près..

# Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2012

---

## A : SPECTROPHOTOMÉTRIE

### 1 – Spectre d'absorption du rouge Ponceau

1.1 – Partie du spectrophotomètre permettant de sélectionner la longueur d'onde  $\lambda$  : **le monochromateur**

1.2 - Élément du spectrophotomètre permettant de réaliser la dispersion de la lumière en radiations monochromatiques : **le réseau de diffraction** (prisme également accepté)

1.3 - Le spectre montre que le colorant absorbe les plus courtes longueurs d'onde du spectre de la lumière blanche (violet, bleu, vert) mais laisse passer (et diffuse) les plus grandes qui correspondent aux radiations rouges.

1.4 – Pour toutes les concentrations, c'est à  $\lambda$  que l'absorbance sera la plus élevée, donc que l'incertitude relative sur les mesures sera la plus faible. (meilleure sensibilité acceptée)

### 2 - Loi de Beer-Lambert

2.1 et 2.2 - -  $A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$

A : absorbance de la solution, sans unités

$\varepsilon_{\lambda}$  : coefficient d'absorbance linéique molaire du soluté, en  $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

l : longueur du trajet optique en m

c : concentration molaire de la solution en  $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$

2.3 - Conditions de validité de la loi : A inférieure à 1, ensuite  $\varepsilon_{\lambda}$  n'est plus indépendant de c.

### 3 - Dosage spectrophotométrique du rouge Ponceau contenu dans un macaron

3.1 - Expression littérale et calcul de la concentration molaire C en rouge Ponceau dans le filtrat :

$$C = \frac{A}{\varepsilon_{\lambda} l} = \frac{0,94}{(2,5 \cdot 10^3 \cdot 10^{-2})} = 3,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$$

3.2 - Calcul de la concentration massique c en rouge ponceau dans le filtrat :

$$c = C \cdot M = 3,8 \cdot 10^{-5} \cdot 604 = 23 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} = 23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

3.3 - masse m de rouge Ponceau dans la totalité du filtrat (donc dans un macaron)

$$m = cV = 23 \cdot 10^{-3} \cdot 25 \cdot 10^{-3} = 5,8 \cdot 10^{-4} \text{ g} = 0,58 \text{ mg}$$

3.4 - 0,58 mg de colorant dans 15 g d'aliment, équivaut à 39 mg dans 1kg : la réglementation est respectée.

## B : MICROSCOPE (15 points)

### 1 - Observation à l'œil nu

1.1 - Pour des angles petits,

$$q = \tan q = \frac{AB}{d_m} = \frac{10^{-6}}{25 \cdot 10^{-2}} = 4,0 \cdot 10^{-6} \text{ rad}$$

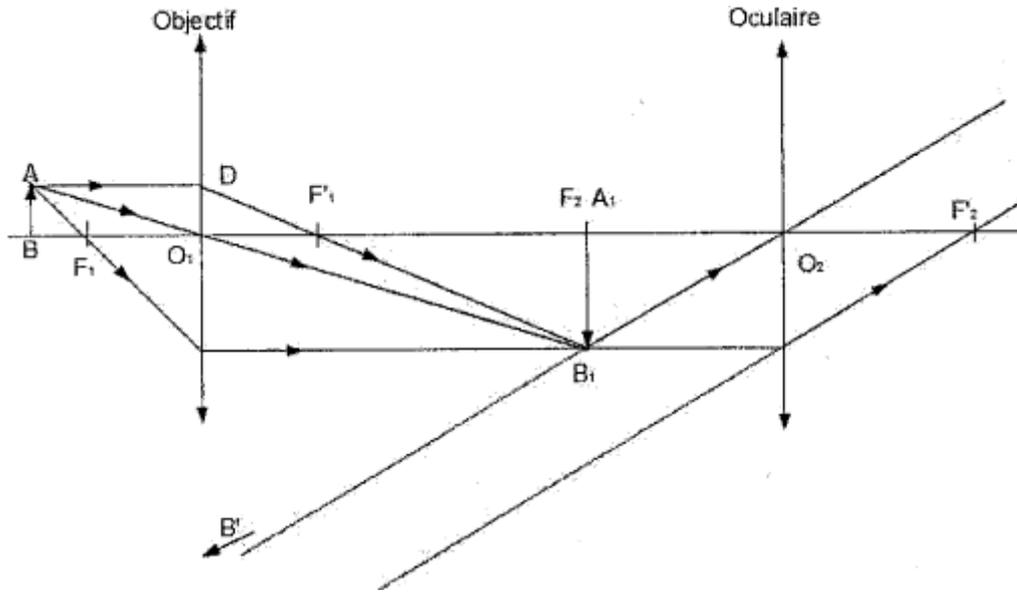
1.2 - La bactérie *E.coli* n'est pas visible à l'œil nu, car  $\theta < \text{Pouvoir de résolution de l'œil qui est de } 3 \times 10^{-4} \text{ rad}$ .

## 2 - Vision à l'infini

- 2.1 – Dans ces conditions (réglage pour image finale rejetée à l'infini), l'œil emmétrope n'a pas à accommoder.
- 2.2 – Ce réglage ne conviendrait pas à un œil myope non corrigé, qui ne voit pas nettement les objets éloignés.
- 2.3 – Pour que l'image A'B' soit à l'infini, il faut que A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> se forme sur le plan focal objet de l'oculaire.

## 3 - Grandissement du microscope

3.1- Schéma du microscope permettant de comprendre son fonctionnement pour une vision à l'infini



3.2 - En utilisant le schéma ci-dessus, et en appliquant le théorème de Thalès, on peut écrire que :  $\frac{AB}{O_1D} = \frac{F'_1F_2}{O_1F'_1}$

or  $O_1D = AB$ ,  $O_1F'_1 = f'_1$  et  $F'_1F_2 = \Delta$

d'où  $|\gamma_{obj}| = \frac{\Delta}{f'_1}$

3.3 – On a donc  $f'_1 = \frac{D}{|\gamma_{obj}|} = \frac{16 \cdot 10^{-2}}{50} = 3,2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$  et  $C_1 = 1/f'_1 = 1/3,2 \cdot 10^{-3} = 310 \text{ } \delta$

## 4 - Observation de la bactérie

4.1 -  $G_c = |\gamma_{obj}| \times G_2 = 50 \times 20 = 1000$  et  $\theta' = G_c \times \theta = 1000 \times 4,0 \cdot 10^{-6} = 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ rad}$

4.2 -  $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ rad} > 3,10^{-4} \text{ rad}$ , donc *E.coli* est visible au microscope.

## 5 - Pouvoir de résolution du microscope

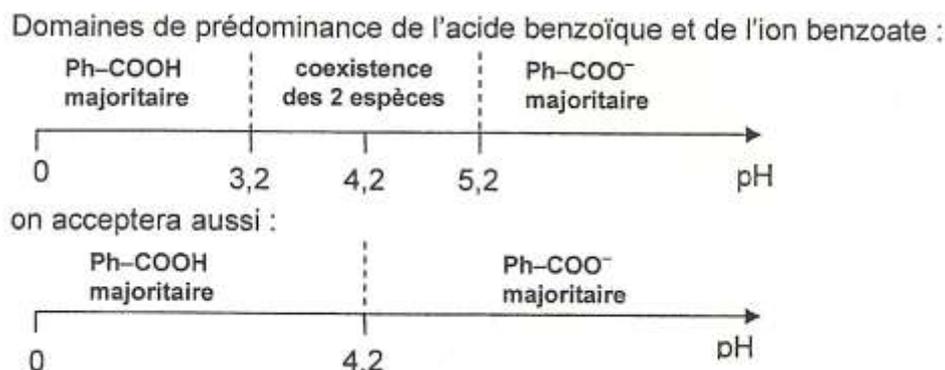
5.1 -  $e = \frac{0,6/\lambda}{n \sin u} = \frac{0,6 \cdot 500 \cdot 10^{-9}}{0,7} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ m} < 10^{-6} \text{ m}$  donc cette bactérie est observable avec ce microscope.

5.2 - Remplacer l'air par l'huile permet d'augmenter l'indice de réfraction n du milieu, et ainsi de rendre plus petit le pouvoir de résolution  $\epsilon$  du microscope, et donc d'observer des objets encore plus petits.

## C : ÉTUDE DE L'ACIDE BENZOÏQUE ET DU BENZOATE DE SODIUM

### 1 - Étude d'un soda

1.1 -



1.2 - Puisque  $\text{pH} < \text{pKa} - 1$ , la forme acide  $\text{Ph-COOH}$  est prédominante

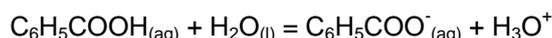
$$1.3 - \text{ et } 1.4 - \frac{[\text{Ph-COO}^-]}{[\text{Ph-COOH}]} = \frac{K_a}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = 10^{\text{pH} - \text{pKa}} = 10^{-1,2} = 0,063$$

donc la forme acide est bien majoritaire (cohérent avec la réponse 1.2)

### 2 - Étude d'une solution d'acide benzoïque

2.1 -  $s = 2,4 \text{ g.L}^{-1} = 2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  la solution n'est donc pas saturée.

2.2 - équation de la réaction chimique de l'acide benzoïque avec l'eau :



2.3 - On néglige l'autoprotolyse de l'eau. La réaction prépondérante est

	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$	$+$	$\text{H}_2\text{O}$	$=$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-$	$+$	$\text{H}_3\text{O}^+$	
EI	$C_1$				0		0	Tableau d'avancement volumique
EF	$C_1 - x$				x		x	

(le tableau d'avancement n'est pas exigé)

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{Ph-COO}^-]}{[\text{Ph-COOH}]} = \frac{x^2}{C_1 - x}$$

Or l'acide est faible et est donc peu dissocié, la réaction limitée

$$\Rightarrow C_1 - x \approx C_1$$

$$\text{On a donc } K_a = \frac{x^2}{C_1} \text{ et } \text{pH} = -\log([\text{H}_3\text{O}^+]) = -\log\sqrt{K_a C_1} = 3,1$$

Vérifications des approximations :

- Autoprotolyse de l'eau négligeable
- Acide faiblement dissocié (x petit)

### 3 - Étude d'une solution de benzoate de sodium

3.1 -  $\text{Ph-COO}^- + \text{H}_3\text{O}^+ = \text{Ph-COOH} + \text{H}_2\text{O}$  (→ acceptée)

3.2 - Etude de l'équilibre associé à la réaction chimique.

3.2.1 -  $K = 1/K_a$

3.2.2 -  $K = 10^{4,2} = 1,6 \cdot 10^4 > 10^3$ , la réaction est donc totale.

3.3 - Etude du produit solide obtenu.

3.3.1 - Le précipité observé est l'acide benzoïque.

3.3.2 - L'acide benzoïque étant peu soluble dans l'eau, il précipite.

3.4 - On titre la solution obtenue et on mesure son pH. Celui-ci vaut 4,2.

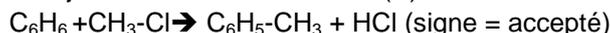
3.4.1 - On obtient ainsi une solution tampon.

3.4.2 - C'est une solution dont le pH évolue peu lors d'un ajout modéré d'acide fort, de base forte ou d'eau.

## D : SYNTHÈSE DU CINNAMATE DE BENZYLE (15 points)

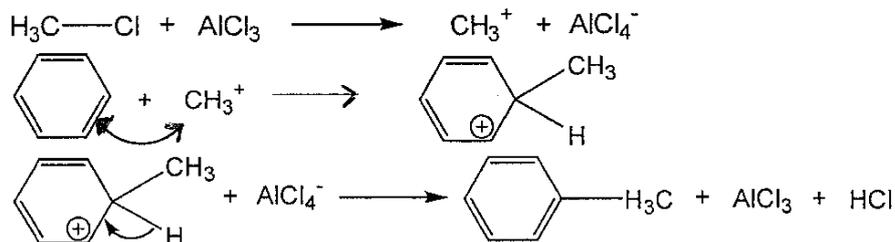
### 1 - Première étape

1.1 - équation de la réaction mise en jeu lors de la formation de (A).

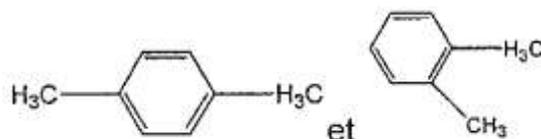


1.2 - Catalyseurs fréquemment utilisés : chlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  ou chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) ou autre acide de Lewis ( $\text{BF}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ...)

1.3 - Étapes du mécanisme de cette transformation chimique :



1.4 - Les deux produits les plus probables sont :



car le groupement  $-\text{CH}_3$  oriente la seconde substitution en ortho et en para.

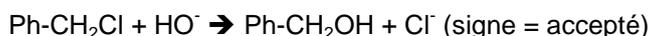
### 2 - Deuxième étape

2.1 - Substitution radicalaire.

2.2 - Rayonnement ultra-violet, car le plus énergétique (ou plus courtes longueurs d'onde).

### 3 - Troisième étape

3.1 - Équation de la réaction mise en jeu lors de la formation du composé (C) :



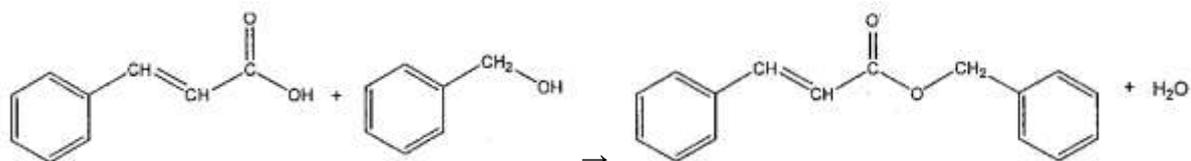
3.2 - L'ion hydroxyde  $\text{HO}^-$  peut être considéré comme une espèce nucléophile car l'oxygène est un site riche en densité électronique (du fait des doublets non liants et de sa charge).

3.3 - Le composé (C) comporte une fonction alcool. Cet alcool est primaire.

## 4 - Quatrième étape

4.1 - Le cinnamate de benzyle comporte une fonction ester.

4.2 - Équation de la réaction mise en jeu lors de la formation du cinnamate de benzyle :



4.3 - Cette réaction est une estérification.

4.4 - Le rendement est faible car la réaction est limitée (ou non totale, ou équilibrée)

4.5 - On peut augmenter le rendement de cette quatrième étape de la synthèse :

- en travaillant avec un excès d'un des deux réactifs
- en éliminant l'eau (ou l'ester) ou fur et à mesure de sa formation
- en remplaçant l'acide par le chlorure d'acide correspondant.

# Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2012

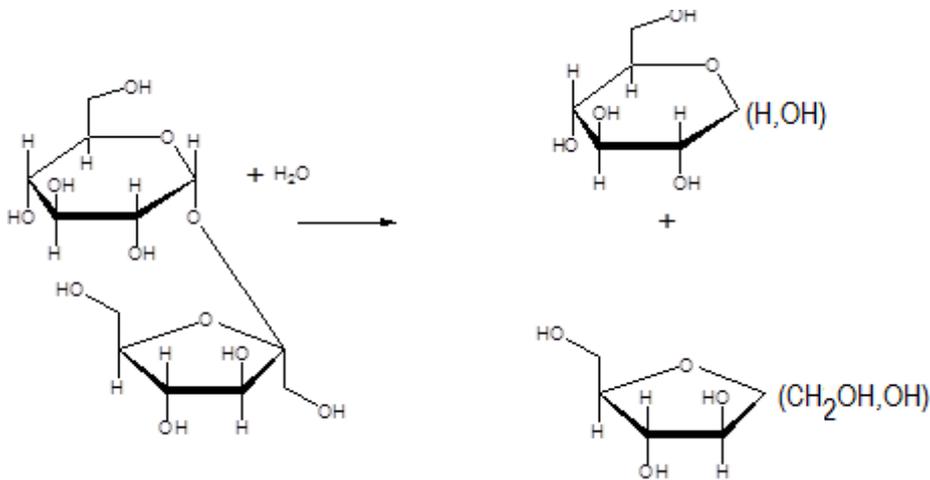
## LA $\beta$ -FRUCTO FURANOSIDASE APPLICATION À LA PRODUCTION DE PRÉBIOTIQUES

### 1 - Activités enzymatiques de la $\beta$ -fructofuranosidase (FFase)

#### 1.1 - L'activité fructofuranosidase (FA) de la FFase

1.1.1 - Hydrolase

1.1.2 - Saccharose + H<sub>2</sub>O → glucose + fructose



1.1.3 - Le pouvoir rotatoire spécifique du saccharose est dextrogyre ( $+66,5 \text{ } ^\circ \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}$ ), après hydrolyse totale, le mélange glucose/fructose est globalement lévogyre ( $-39,5 \text{ } ^\circ \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}$ ) = inversion du pouvoir rotatoire spécifique. L'enzyme qui catalyse l'hydrolyse est donc appelée invertase.

#### 1.2 Dépistage de la FFase dans les cultures de moisissures

1.2.1 - Composé A = acide gluconique ou gluconolactone

Composé B = peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Composé C = chromophore (= quinonéimine, rose).

1.2.2 - Réaction 1 = réaction principale car elle est spécifique du produit dosé = le glucose

Réaction 2 = réaction indicatrice car elle permet de « visualiser » la réaction 1

1.2.3 - Conditions de mesure fixes et stables : température, pH, force ionique...

Conditions de durée : connue et dans la période initiale

Conditions de [S]<sub>0,MR</sub> : saturante pour que l'enzyme soit totalement sous forme [ES] (mesure d'une  $v_{\text{imax}}$ )

1.2.4.1 - Vérification de l'absence de réaction non spécifique (absence de mélange glu/fru dans la gélose, absence d'hydrolyse spontanée du saccharose...), seule la présence de FFases produites par les moisissures doit donner un halo violet. On attend une absence de coloration pour valider les résultats expérimentaux.

**1.2.4.2** - La présence de FFase provoque une hydrolyse du saccharose. Le glucose est dépisté par apparition d'un chromophore rose, le fructose par un chromophore bleu. La somme des deux couleurs provoque une couleur violette dans le milieu.

**1.2.4.3** - Toutes les souches analysées présentent une activité de la FFase, mais n'ont pas la même activité enzymatique car le halo violet est plus ou moins large.

Souche	quantité de FFase excrétée dans le milieu
MUM 05.14	+
MUM 05.15	+
MUM 05.16	+
CCY 27-1-94	++
ATCC 20611	+++
MUM 03-50	++
MUM 03-51	++

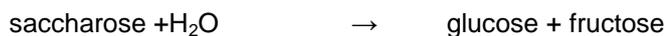
Pour obtenir une production importante de FFase, il faut choisir la souche ATCC 20611.

### 1.3 - L'activité fructosyl-transférase (FTA) de la FFase : test enzymatique

**1.3.1** - Le 1-kestose = glucose-fructose-fructose.

2 possibilités de formation

- Formation en deux étapes



- OU transfert direct en une étape



**1.3.2** - Injection de 5 étalons (glucose, fructose, GF2, GF3, GF4) pour repérer leur  $t_R$  respectif.

**1.3.3** - Détection : réfractométrie.

La présence de glucides dans l'effluent modifie son indice de réfraction. Détecteur universel.

**1.3.4** - Pour améliorer la résolution des pics, on peut modifier le débit et/ou la composition de la phase mobile (% acétonitrile/eau).

**1.3.5** - Sur un schéma faire figurer : la phase mobile - la pompe - l'injecteur - la colonne - le détecteur - l'amplificateur de signal - l'intégrateur/enregistreur et la sortie/récupération des effluents.

**1.3.6** - Les sucres ont des propriétés physico-chimiques très proches. L'HPLC permet une analyse rapide et une bonne résolution.

## 2 - Purification de la FFase

**2.1** - Étapes de lyse des cellules, libération du contenu cellulaire.

**2.2** - Précipitation différentielle des protéines par perte de solubilité en modifiant la concentration en sels.

**2.3** - Chromatographie d'échanges d'ions. Les protéines chargées négativement sont retenues par la résine chargée positivement et échangées contre des contre-ions négatifs. L'élution est réalisée par un gradient discontinu d'ions  $\text{Cl}^-$  (compétition).

Élution alternative : par modification du pH du tampon éluant (pH décroissant) : les protéines deviennent progressivement chargées positivement et se décrochent de la résine.

**2.4** - Aucune donnée ne permet d'identifier les fractions contenant les FFases. Un test activité sur toutes les fractions est donc nécessaire.

**2.5.1 -**4 types de calculs  $Z_t$ ,  $Z_{sp}$ , Rdt, Ert

	$Z_t$ en U	$Z_{sp}$ en U.mg <sup>-1</sup>	Rdt	Ert
Extrait brut	$\frac{109 \cdot 3400}{10^5} = 3,7$	$\frac{109 \cdot 3400}{6770} = 54,7$		
Extrait final	$\frac{4447 \cdot 8,6}{38500} =$	$\frac{4477 \cdot 8,6}{13,7} = 2810,4$	$\frac{3850}{3,7 \cdot 10^5} = 10,4\%$	$\frac{2810,4}{54,2} = 52$

Il reste environ 10 % de l'enzyme après purification et elle a été concentrée environ 52 fois.

**2.5.2 -** Méthode = SDS-PAGE ou gel-filtration ou ultracentrifugation

### 3 . Application en industrie alimentaire

#### 3.1 Fabrication de sirops à teneur élevée en FOS

**3.1.1 -**  $K_M$  représente l'inverse de l'affinité pour le substrat testé et  $V_{max}$  représente la rapidité de la catalyse. Globalement la meilleure efficacité est obtenue pour le saccharose.

**3.1.2.1 -** Diminution du flux de perméation par obturation des pores = colmatage progressif de la membrane de filtration.

**3.1.2.2 -** Différence de pression exercée de part et d'autre de la membrane.

**3.1.2.3 -** La nanofiltration permet de concentrer les FOS ( transformation du saccharose par les FFases et élimination d'eau par nanofiltration). On obtient un produit de composition proche du néosucré P. Il faut un temps de nanofiltration d'au moins 12 heures pour obtenir le néosucré P.

#### 3.2 - Émergence d'effecteurs de la 3-fructofuranosidases

**3.2.1 -** NaOH (faible volume, faible concentration) modifie le pH sans doute très différent du  $pH_{optimal}$  d'où la perte d'activité.

**3.2.2 -** En présence de Fru-S-ME les  $v_i$  (sauf  $v_{max}$ ) diminuent, donc un effet inhibiteur est observé.

L'affinité ( $1/K_M$ ) est diminuée et la  $v_{max}$  est inchangée, il s'agit d'un inhibiteur compétitif.

**3.2.3 -**

$$\frac{1}{K'_M} = 0,00647 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \text{ avec } [I] = 25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

et

$$\frac{1}{K_M} = 0,0333 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \text{ sans I}$$

$$\text{Soit } K'_M = 154,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ et } K_M = 30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

L'application de la formule  $K'_M = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$  donne  $K_I = 6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

**3.2.4 -** Possibilité d'utiliser Fru-S-ME comme ligand dans une chromatographie d'affinité pour purifier la FFase . Cette technique, très efficace, permettrait de diminuer le nombre d'étapes de purification, d'augmenter le rendement et l'enrichissement.

# Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2012

## PRODUCTION INDUSTRIELLE D'INSECTICIDE PAR *Bacillus thuringiensis*

### CARACTÉRISTIQUES DE *Bacillus thuringiensis*

#### 1 - Structure et comportement environnemental de *B. thuringiensis*

1.1 - La paroi des G+ (peptidoglycane plus épais) est plus imperméable à l'éthanol que celle des G- (membrane externe déstabilisée par l'éthanol).

1.2.1 -

1	Exosporium	5	Paroi
2	Tunique	6	Membrane cytoplasmique
3	Tunique	7	Cœur = cytoplasme
4	Cortex	8	ADN

1.2.2 - Méthode de coloration au vert malachite, puis contre coloration (safranine).

1.2.3 - La thermorésistance est liée en partie :

- structuralement : présence de tuniques et de cortex.

- chimiquement : présence de dipicolinate de calcium.

- état de déshydratation de la spore : la spore bactérienne est plus pauvre que la forme végétative en eau (faible activité de l'eau, donc activités métaboliques réduites) : cette pauvreté en eau joue un rôle essentiel dans la résistance de la spore à la chaleur.

1.2.4 - Conditions de croissance et environnementales défavorables : manque d'éléments nutritifs.

#### 2 - Systématique bactérienne

2.1 - Le séquençage de l'ARN 16S, le calcul du GC% et l'hybridation ADN/ADN permettent de rapprocher des espèces phénotypiquement éloignées mais phylogénétiquement proches, telles que *B. thuringiensis* et *B. cereus*.

Étude génotypique avec deux exemples

2.2 - Principe sérotypage : méthode d'agglutination sur lame mettant en jeu des complexes antigène-anticorps : les anticorps poly ou monoclonaux étant dirigés contre les antigènes flagellaires (protéiques) à la base de la distinction de l'espèce *thuringiensis* en différents sérotypes.

# OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ DE FERMENTATION INDUSTRIEL

## 3 - Évaluation de procédés de culture en milieu liquide

3.1.1 - Contrôle de pureté de la préculture.

3.1.2 - L'extrait de levure apporte des facteurs de croissance (vitamines, acides aminés et bases azotées).

3.1.3 - Hydrolysate protéique : apport carboné en acides aminés (source d'azote et carbone).

3.1.4 - Condition expérimentale : O<sub>2</sub> (20 %).

Type respiratoire : aérobic strict ou facultatif.

3.1.5 - Sources de carbone des milieux, utilisables par la bactérie en cours de fermentation :

Milieu 1	Glucose, extrait levures, caséines	Milieu 4	Peptone, extrait bœuf, extrait levure
Milieu 2	Tryptone, tryptose, levure	Milieu 5	Peptone, extrait bœuf
Milieu 3	Tryptone, glucose	Milieu 6	Levures, mélasse

Les milieux semblant les plus riches, compte tenu des quantités impliquées sont :

- le milieu 3 (tryptone 22 g/L)
- le milieu 6 (fodder yeast 40 g/L et mélasse 15 g/L).

3.1.6 - Analyse des graphes :

Biomasse : peu de différence entre les 6 milieux mais meilleure production avec milieu 3. Spore : grande variabilité avec meilleure production avec M3 et M6.

Toxicité : grande variabilité, plus forte toxicité avec M6.

Choix des milieux

Les M3 et M6 présentent les meilleurs résultats mais biomasse et sporulation équivalentes, c'est M6 qui présente la plus forte toxicité.

Choix final :

Donc le choix se porte sur le milieu 6 d'autant que son coût de revient est le plus bas (mélasse : déchet de l'industrie sucrière).

3.2.1 - Schéma fermenteur batch mentionnant :

- cuve fermée
- système d'agitation
- moteur
- système d'aération : apport d'oxygène ou d'air (avec filtre)
- sondes : température, pH, PO<sub>2</sub>
- sortie air (avec réfrigérant)
- système de thermorégulation
- arrivée d'acide/base
- arrivée anti-mousse
- canule de prélèvement
- voie d'entrée (pour préculture)

**3.2.2** - Présence de protéines, agitation et O<sub>2</sub> entraînent la formation de mousse.

Problématique car risque de contamination extérieure due à un débordement du bioréacteur.

**3.2.3** - Culture en batch : pas de renouvellement de milieu.

Culture en fed-batch : apport continu ou ponctuel de milieu (sans retrait de milieu).

**3.2.4** - Phases de croissances :

- phase exponentielle de croissance (absence latence et accélération)
- phase de ralentissement
- phase stationnaire (courte)
- phase de déclin

La phase de ralentissement s'explique par la chute de la concentration en sucre observée.

La variation de pH correspond à la production d'acides suite à l'utilisation des molécules glucidiques : l'augmentation consécutive provient de la production de déchets métaboliques, contribuant ainsi à la phase de déclin.

La toxicité augmente suite à la phase ralentissement de croissance et s'arrête en phase stationnaire

Il est donc indispensable de retarder l'apparition de la phase stationnaire afin de retarder l'arrêt de production de toxicité.

Il est ainsi intéressant d'envisager la culture en fed-batch.

**3.2.5.1** - Apport en mélasse : 2,5 mL/L/h → avec 20 g/L = 0,05 g/L/h.

**3.2.5.2** - La culture en fed-batch avec alimentation continue en mélasse donc en source de carbone et d'énergie permet de :

- maintenir le pH relativement stable,
- prolonger la phase de croissance,
- retarder la phase stationnaire et supprimer la phase de déclin, donc de prolonger la production de toxicité et donc d'augmenter la concentration finale de toxine (doublement).

## 4 - Évaluation d'un nouveau procédé de culture en milieu solide

**4.1** - Dénombrement des spores :

- sur la sélection thermique des spores,
- sur leur germination sur milieu adapté.

**4.2** -  $\mu_{\text{expo}}$  : vitesse spécifique de croissance = 0,020 h<sup>-1</sup> ;

G = temps de génération = temps mis par une population pour doubler = 34 heures.

# Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2012

---

## CONTRÔLES VÉTÉRINAIRES DANS LE CADRE DE L'EXTRACTION D'UN ANTICOAGULANT

### 1 - Contrôle de la qualité d'un lot de muqueuses intestinales

1.1.1 - Mélange polyclonal = solution d'Ac différant par leur spécificité antigénique issus de clones différents.

1.1.2 - Injection d'une dose d'antigène suffisante pour provoquer une réponse immunitaire.

Injections répétées.

Voie d'injection immunogène : sous cutanée (intrapéritonéale).

Utilisation de molécules permettant d'augmenter le pouvoir immunogène de l'ag = adjuvants.

1.1.3 - Première injection : phase de latence avant réponse primaire : IgM : sensibilisation du système immunitaire.

Faible taux d'AC ; présence transitoire dans l'organisme. (fabrication de cellules mémoire).

Deuxième injection : phase de latence courte : mémoire immunitaire mobilisée.

Réponse secondaire = IgG.

Taux d'anticorps élevé et présence durable dans l'organisme.

1.1.4 - 2 chaînes H + 2 chaînes L.

Pont SS intra/inter caténaire

Oligosides

Régions charnières

Paratopes

1.2.1 - AC et ag diffusent dans les mailles du gel.

En zone d'équivalence : formation d'un réseau tridimensionnel de complexes Ag – Ac spécifiques qui précipite.

1.2.2 - Pour les puits O et C : 1 arc de précipitation donc un système Ag/Ac : arcs confluent donc identité antigénique entre les albumines ovine et caprine.

Pour le puits B : 1 arc de précipitation dont un système Ag/Ac. Arc en éperon avec celui des puits O : parenté antigénique entre les albumines ou un arc seul (absence d'éperon) (les deux réponses sont acceptées).

Pas d'arc avec le puits P : le mélange polyclonal ne réagit pas avec l'albumine de porc. Pas d'Ac dirigé contre cette albumine dans le mélange.

1.2.3 - Le sérum polyclonal permet de mettre en évidence la présence d'albumines ovine, caprine ou bovine dans les muqueuses intestinales de porc, donc de détecter la contamination.

Il ne faut pas qu'il y ait de réaction avec l'albumine porcine, ce qui est le cas.

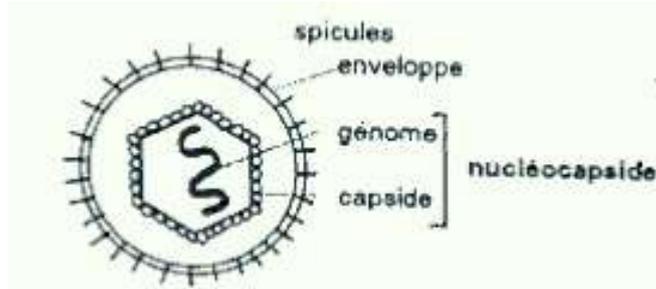
1.3 - Technique d'électrosynérèse.

### 2 - Contrôle sanitaire : détection du virus de la peste porcine classique

2.1.1- mise en suspension des échantillons viraux dans une solution opaque aux électrons (ex : acide phosphotungstique),

- accumulation de la solution opaque aux électrons autour des virus. Le virus apparaît clair sur fond sombre.

2.1.2 -

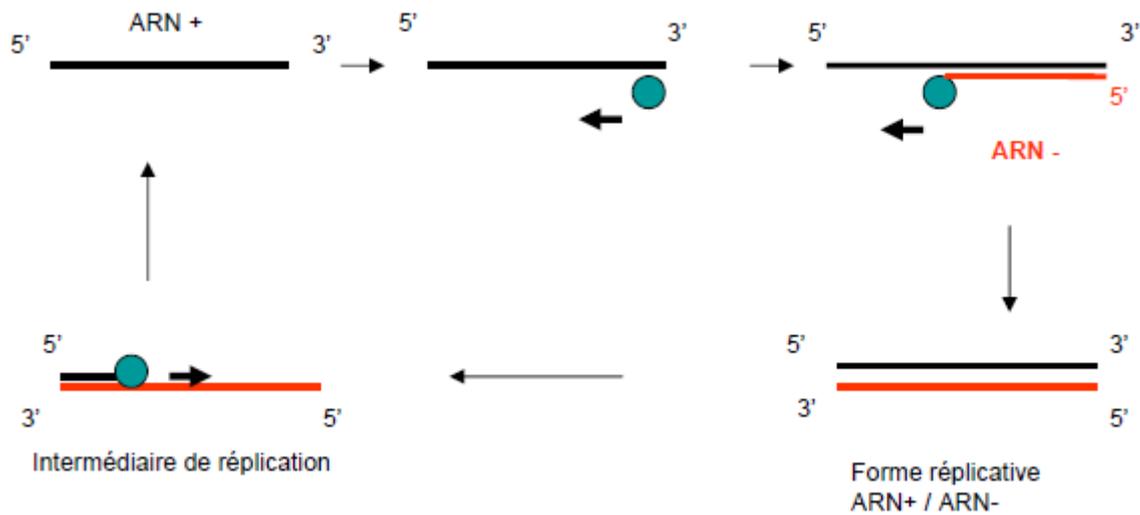


2.1.3 - « ARN non segmenté » génome constitué d'un seul segment d'ARN.

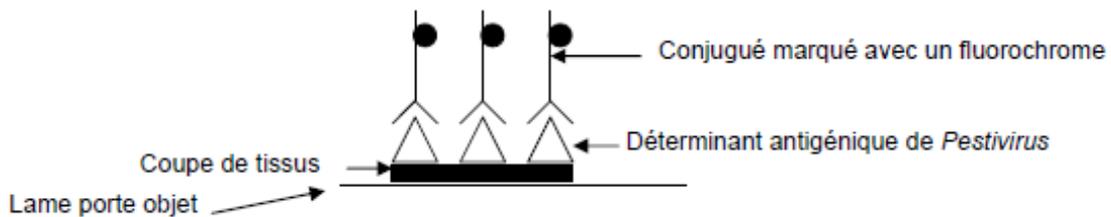
« ARN à polarité positive » : ARN viral directement traduit par les ribosomes.

2.1.4 - Coiffe en 5' et queue poly A en 3'

2.1.5 - Réplication



2.2.1 -

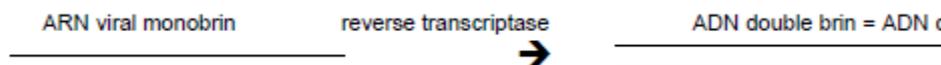


2.2.2 - Rôle des contrôles (contrôle négatif et contrôle positif).

- contrôle positif : efficacité de la réaction
- contrôle négatif : spécificité de la réaction.

2.3.1 -Plasmide : petite molécule d'ADN double brin, circulaire, se répliquant de façon autonome, contenant un ou plusieurs site de restriction, et en général un ou plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques.

2.3.2 - ADNc : ADN complémentaire.



**2.3.3** - PCR = polymerase chain reaction.

enzyme utilisée : la Taq polymérase = ADN polymérase ADN dépendante

- comme toutes les ADN polymérases : nécessite des amorces pour initier la polymérisation de manière complémentaire et antiparallèle.
- elle est thermorésistante (température de travail habituelle : autour de 72°C) et reste donc active pendant les phases de dénaturation thermique de l'ADN, nécessite  $Mg^{2+}$ .

**2.3.4** - Fabrication du plasmide recombinant.

Il s'agit d'insérer une molécule d'ADNc codant pour le gène de E2 dans le plasmide pcDNA3.

Les molécules d'ADNc montrent deux sites de restriction spécifiques des enzymes BamH1 et Xba1 (sites localisés dans les amorces utilisées lors de la PCR). Il faut donc effectuer :

1. une double digestion du plasmide pcDNA 3 par ces deux enzymes de restriction : BamH1 et Xba1 donc linéariser le plasmide pcDNA 3.
2. une digestion des molécules d'ADNc obtenues par les 2 mêmes enzymes de restriction, donc obtenir des extrémités compatibles avec celles du plasmide linéarisé.
3. la mise en contact des molécules d'ADNc digérées et du plasmide linéarisé en présence d'une ligase, donc permettre l'insertion et la ligation de l'ADNc de la protéine E2 dans le plasmide pcDNA 3.

# Éléments de corrigé de sciences et technologies bioindustrielles 2012

## LES ŒUFS ET OVOPRODUITS

### 1 - La matière première : les œufs

1.1 - Mirage : mesure de la chambre à air par translumination – tri par système optique.

Pour rappel :

Catégorie A : œufs frais destinés aux consommateurs, chambre à air réduite (4 à 6 mm), ni lavés, ni nettoyés...

Catégorie B : chambre à air 9 mm (industries).

1.2 - Les ovoproduits sont les produits obtenus à partir de l'œuf, de ses différents composants ou de leur mélange après élimination de la coquille et des membranes et transformations (séchage en poudre, congélation, concentration, cristallisation,...). Ils sont destinés à la consommation humaine : ils entrent dans la composition de produits alimentaires en tant qu'ingrédient (pâtes, omelettes, biscuiterie...).

1.3 - Ovalbumine, ovomucine, ovomucoïde, lysozyme, avidine...

1.4 - Valeur biologique : les protéines de l'œuf sont riches en AA essentiels.

CUD faible : existence d'un facteur antitrypsique inactivé par la chaleur.

1.5 - Propriétés des protéines :

- Thermo sensibilité : propriétés gélifiantes ou coagulantes (tenue des aliments après chauffage).
- Amphiphilie : tensioactif : propriétés moussantes (stabilisation de la mousse lors du foisonnement).

1.6 - Composition : protéines, lipides (triglycérides et phospholipides).

Noms : HDL (Lipovitelline) et LDL (Lipovitellenine).

Propriétés : émulsifiantes (Tensio-actifs et caractère amphiphile).

### 2 - Étude des procédés de fabrication des ovoproduits

2.1 - Belle couleur aux pâtes, meilleure tenue à la cuisson, apport nutritif, goût, ...

2.2.1 - Analyse du document 1, *attention à la pertinence de la comparaison des deux diagrammes.*

- Pasteurisation : les œufs doivent subir un traitement thermique s'ils sont utilisés comme ingrédient, transformés par la suite ou stockés. (intérêt DLUO)
- Blancs, désucrage, fermentation : éliminer du glucose pour éviter les réactions de Maillard.
- Séchage : élimination d'eau pour conserver plus facilement le produit (durabilité, stockage, transport).
- Concentration (UF ou OI) : élimination d'une partie de l'eau (séchage plus rapide).
- Tamisage : obtenir des grains de taille homogène.

2.2.2.1 - CCP : *Critical Control Point* : maîtrise des points critiques.

2.2.2.2 - Blanc : pasteurisation = CCP : oui (question 1) → oui (question 2)

2.2.2.3 - Jaune : 3 CCP : séchage oui (question 1) → oui (question 2)

Conditionnement après tamisage oui → non → oui → non

Stockage oui → non → oui → non

2.3 - Opération unitaire de pasteurisation.

2.3.1 - Pasteurisation : traitement thermique modéré mais suffisant pour détruire les microorganismes pathogènes et la plupart des microorganismes d'altération.

Stérilisation : traitement thermique intense détruisant complètement les microorganismes, y compris les spores et les enzymes d'altération.

**2.3.2** - Temps de réduction décimale : c'est le temps nécessaire pour réduire la population microbienne d'un facteur 10 à une température donnée.

Facteur de réduction décimale : c'est l'élévation de température permettant de réduire d'un facteur 10 la durée de réduction décimale.

$D_{60^{\circ}\text{C}} = 3$  minutes ou 180 secondes, démarche graphique à expliquer.

**2.3.3** -  $66^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C} = 6^{\circ}\text{C}$  or  $z = 6^{\circ}\text{C}$  donc par définition D est réduit d'un facteur 10.  $D_{66^{\circ}\text{C}} = 0,3$  min = 18 secondes

2.3.4 - La réduction de la population souhaitée correspond à un facteur 10, pour y parvenir :

$D_{72^{\circ}\text{C}} = 0,03$  min = 1,8 secondes. (même raisonnement que question 2.3.3) donc

$$V_s = n. D_{72^{\circ}\text{C}} = 1 \times 0,03 \text{ min} = 0,03 \text{ min}$$

**2.4** - Préservation de la teneur en lysozyme lors de traitements thermiques.

**2.4.1** - Le lysozyme est une protéine enzyme.

Le lysozyme catalyse la dégradation du peptidoglycane, constituant de la paroi bactérienne. L'effet du lysozyme sur la paroi des bactéries Gram<sup>+</sup> presque uniquement formé de peptidoglycane est plus déterminant que sur la paroi des bactéries Gram<sup>-</sup> dont une partie seulement est constituée de peptidoglycane.

**2.4.2** - Déterminations graphiques :

Pour  $\log \text{TPL} = -1$  (TPL = 10 %), on a  $D_{t1} = 150$  minutes et  $D_{t2} = 95$  minutes.

Le traitement à  $60^{\circ}\text{C}$  permet de mieux préserver la teneur en lysozyme dans le temps.

**2.4.3** - Taux de préservation.

Traitement thermique 100 minutes à  $60^{\circ}\text{C}$  : TPL = compris entre 20 et 25 %. Traitement thermique 10 minutes à  $66^{\circ}\text{C}$  : TPL = 90 % environ.

Barème à choisir : 10 minutes à  $66^{\circ}\text{C}$ .

Un traitement thermique (TT) de courte durée et à haute température est préférable à un TT plus long mais à plus basse température.

**2.5** - Opération unitaire de séchage.

**2.5.1** - Atomisation : fluide envoyé sous pression, nébulisé dans un courant d'air chaud à  $180^{\circ}\text{C}$ . Formation de poudre par déshydratation (air humide évacué à mi-hauteur).

**2.5.2** - Améliorer la conservation (cf. DLUO) et stabilité microbiologique ( $a_w$ ).

Diminution du volume : diminution des coûts de transport et de stockage. Facilité d'emploi...

### **3 - Qualité d'une préparation à base d'œufs : les pâtes fraîches**

**3.1** - International Standard Organisation.

**3.2** - L'absence d'O<sub>2</sub> limite l'oxydation des lipides de l'œuf et limite le développement de la flore aérobie.

**3.3** - L'œuf peut contenir des salmonelles. Ce danger est plus marqué si les œufs sont frais.

DLC : Date Limite de Consommation.

Le produit contient des ingrédients à risque microbiologique, n'est pas stérilisé et doit être conservé au froid.

**3.4** - NQA : Niveau de Qualité Acceptable.

C'est la proportion d'individus non conformes qui ne doit pas être dépassée pour qu'une production puisse être considérée comme acceptable dans l'échantillon examiné.

**3.5** - ITEM critiques qui devraient être sans NQA (texte non conforme, DLC illisible, mauvaise étanchéité, produits étrangers).

ITEM majeurs qui devraient avoir des NQA plus faibles ou inchangées (absence de produits ou barquette incomplète : pas de risque sanitaire).

ITEM mineur pour le consommateur qui pourraient avoir des NQA plus forts (film taché, légers défauts d'aspect de la barquette, centrage du graphisme, découpe irrégulière n'affectant pas l'étanchéité : NQA de 1 ou +).

**3.6** - Logo ou n° d'homologation. Label rouge.

# Éléments de corrigé de mathématiques 2013

## EXERCICE 1

A- 1) Les solutions de  $(E_0)$  sont de la forme :  $y_0(t) = Ce^{-0,03t} \quad \forall t \in [0; +\infty[$  où  $C$  est un réel.

2)  $\forall t \in [0; +\infty[ \quad g(t) = a, \text{ donc } g'(t) = 0.$

$g$  est solution de  $(E) \Leftrightarrow g'(t) + 0,03g(t) = 0,75$

$$\Leftrightarrow 0,03a = 0,75$$

$$\Leftrightarrow a = \frac{0,75}{0,03} = 25$$

D'où,  $\forall t \in [0; +\infty[ \quad g(t) = 25.$

3) Les solutions de  $(E)$  sont de la forme :  $y(t) = y_0(t) + g(t) = Ce^{-0,03t} + 25 \quad \forall t \in [0; +\infty[.$

4)  $f$  est solution de l'équation  $(E)$ , donc  $f(t) = Ce^{-0,03t} + 25 \quad \forall t \in [0; +\infty[.$

$$f(0) = 1,3 \Leftrightarrow C + 25 = 1,3 \Leftrightarrow C = -23,7$$

D'où,  $f(t) = 25 - 23,7e^{-0,03t} \quad \forall t \in [0; +\infty[.$

B- 1)  $\left. \begin{array}{l} \lim_{t \rightarrow +\infty} -0,03t = -\infty \\ \lim_{T \rightarrow -\infty} e^T = 0 \end{array} \right\} \text{ donc } \lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-0,03t} = 0$

D'où :  $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 25.$

2) a-  $f'(t) = -23,7(-0,03e^{-0,03t}) = 0,711e^{-0,03t} \quad \forall t \in [0; +\infty[.$

b-  $\forall t \in [0; +\infty[ \quad e^{-0,03t} > 0, \text{ donc : } f'(t) > 0 \quad \forall t \in [0; +\infty[.$

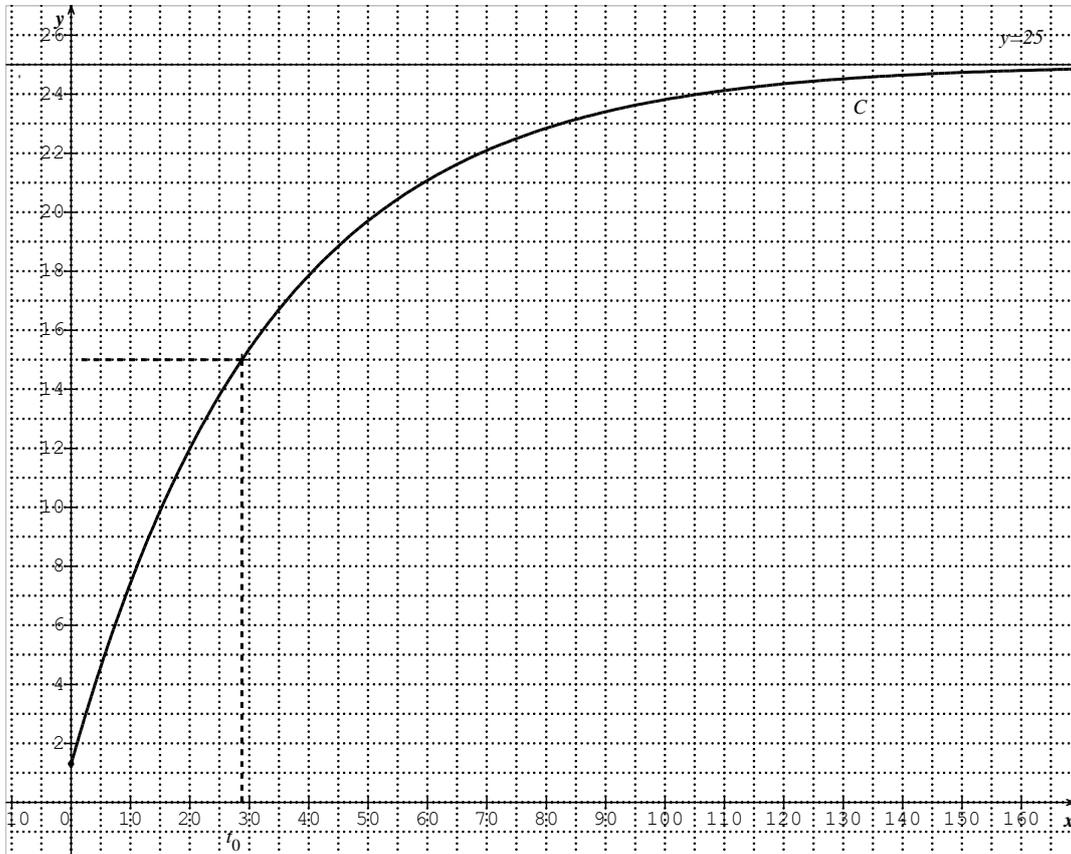
3)

$t$	0	$+\infty$
$f'(t)$	+	
$f(t)$	1,3	25

4) a-

$t$	0	10	20	30	40	50	60
$f(t)$	1,3	7,4	12	15,4	17,9	19,7	21,1

b- Courbe



C- 1) On a vu que :  $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 25$ , donc la concentration en matières polluantes, devrait se stabiliser autour de 25  $\mu\text{g/L}$ .

2) Pour résoudre graphiquement l'équation  $f(t) = 15$ , on cherche l'abscisse du point de la courbe C d'ordonnée 15. On lit :  $t_0 \approx 29$ .

La concentration en matières polluantes atteindrait 15  $\mu\text{g/L}$  au bout d'environ 29 minutes.

3) a- 
$$F(t) = 25t + \frac{23,7}{0,03} e^{-0,03t} = 25t + 790e^{-0,03t} \quad \forall t \in [0, +\infty[.$$

b-

$$V(t) = \frac{1}{2} \left( 25t + 790e^{-0,03t} - 25(t-2) - 790e^{-0,03(t-2)} \right)$$

$$V(t) = \frac{1}{2} \left( 25t + 790e^{-0,03t} - 25t + 50 - 790e^{-0,03t+0,06} \right)$$

$$V(t) = \frac{1}{2} \left( +790e^{-0,03t} + 50 - 790e^{-0,03t} e^{0,06} \right)$$

$$V(t) = 25 + \frac{790 - 790e^{0,06}}{2} e^{-0,03t}$$

$$V(t) \approx 25 - 24,4e^{-0,03t}$$

$$c- \quad 25 - 24,4e^{-0,03t} = 14 \Leftrightarrow -24,4e^{-0,03t} = -11 \Leftrightarrow e^{-0,03t} = \frac{11}{24,4}$$

$$\Leftrightarrow -0,03t = \ln\left(\frac{11}{24,4}\right) \Leftrightarrow t = -\frac{\ln\left(\frac{11}{24,4}\right)}{0,03}$$

Donc :  $\boxed{T \approx 26,6}$ .d- T représente le temps au bout duquel la fermeture des vannes est déclenchée.**EXERCICE 2**A- M suit la loi normale de moyenne  $\mu = 250$  et d'écart-type  $\sigma = 5,3$ .On pose  $T = \frac{M - 250}{5,3}$ , T suit la loi centrée réduite.

$$1) P(240 \leq M \leq 260) = P(-1,89 \leq T \leq 1,89) = 2P(T \leq 1,89) - 1 \approx 2 \times 0,9706 - 1 \approx 0,941.$$

$$2) a- P(M \geq 245) = P(T \geq -0,94) = P(T \leq 0,94) \approx 0,825.$$

$$P(M \geq 245) = P\left(T \geq \frac{-5}{5,3}\right) = P\left(T \leq \frac{5}{5,3}\right) \approx P(T \leq 0,94) \approx 0,825$$

b- La probabilité que la masse d'un sachet soit supérieure à 245g est égale à environ 0,825, valeur supérieure à trois quart, donc le client sera satisfait.Valeurs obtenues en utilisant directement la calculatrice :

$$P(240 \leq M \leq 260) \approx 0,941 \quad \text{et} \quad P(M \geq 245) \approx 0,827$$

B- 1) On répète 50 fois de manière indépendante (constitution du lot assimilée à un tirage avec remise) une épreuve de Bernoulli dont le succès est l'événement « le sachet n'est pas conforme », et sa probabilité  $p = 0,06$ . La variable aléatoire X égale au nombre de sachets non conformes dans un lot de 50 sachets, suit donc la loi binomiale de paramètres  $n = 50$  et  $p = 0,06$ .2)  $P(X = 1)$  est la probabilité d'avoir un sachet non conforme dans un lot.

$$P(X = 1) = \binom{50}{1} \times 0,06^1 \times 0,94^{49} \approx 0,145.$$

3) a-  $\lambda = n \times p = 50 \times 0,06 = 3$ .

b-  $Y$  suit la loi de Poisson de paramètre  $\lambda = 3$ .

$$P(Y \leq 5) = P(Y = 0) + P(Y = 1) + P(Y = 2) + P(Y = 3) + P(Y = 4) + P(Y = 5) \approx 0,916.$$

C- 1)  $\bar{M}$  suit la loi normale de moyenne  $m = 250$  (sous l'hypothèse nulle  $H_0$ ) et d'écart-type  $\sigma = \frac{5,3}{\sqrt{50}}$ .

On pose  $\bar{T} = \frac{\bar{M} - 250}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}}$ ,  $\bar{T}$  suit la loi centrée réduite.

$$P(250 - a \leq \bar{M} \leq 250 + a) = 0,95 \Leftrightarrow P\left(-\frac{a}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}} \leq \bar{T} \leq \frac{a}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}}\right) = 0,95$$

$$\Leftrightarrow 2P\left(\bar{T} \leq \frac{a}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}}\right) - 1 = 0,95 \Leftrightarrow P\left(\bar{T} \leq \frac{a}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}}\right) = 0,975$$

D'après la table :  $\frac{a}{\frac{5,3}{\sqrt{50}}} = 1,96$ , donc  $a \approx 1,47$

2) D'après la question précédente, on sait que la probabilité que la masse moyenne d'un échantillon soit comprise dans l'intervalle  $I = [248,53 ; 251,47]$  est égale à 0,95.

On donne alors la règle de décision suivante :

$m_e$  étant la moyenne obtenue pour l'échantillon :

Si  $m_e \in I$   $m \in I$ , alors on accepte l'hypothèse  $H_0$ , au risque de 5%.

Si  $m_e \notin I$   $m \notin I$ , alors on rejette l'hypothèse  $H_0$ , au risque de 5%.

3) a-  $m_e = \frac{238 \times 5 + 242 \times 6 + 246 \times 9 + 250 \times 13 + 254 \times 8 + 258 \times 7 + 262 \times 2}{50} \approx 249,36$ .

b-  $m_e \in I$ , alors on accepte l'hypothèse  $H_0$ , au risque de 5%. Le responsable qualité peut estimer, au seuil de 5%, que la machine est correctement réglée.

# Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2013

---

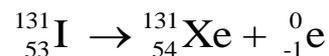
## A : RADIOACTIVITÉ

1 - Composition du noyau d'iode 131 :

$A = 131$  nucléons ;  $Z = 53$  protons et  $A - Z = 78$  neutrons

2 - L'iode 127 et l'iode 131 sont des isotopes  $\rightarrow$  signifie qu'ils ont un même nombre de protons mais un nombre de nucléons différent.

3 - En utilisant les lois de conservation du nombre de nucléons et de la charge :



4 - Loi de décroissance radioactive :  $N = N_0 e^{-\lambda t}$

5.1 - La demi-vie d'un échantillon radioactif correspond à la durée au bout de laquelle la moitié de la quantité initiale de noyaux radioactifs a disparu.

5.2 - Au bout d'une durée de demi-vie, le nombre de noyaux restants est égal à la moitié des noyaux initiaux  $N_0$

L'ordonnée  $N_0/2$  conduit à une durée de demi-vie de 8 jours

5.3 -

$$\lambda = \ln 2 / t_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / \lambda = 6,93 \cdot 10^5 \text{ s}$$

$$t_{1/2} = 8 \text{ jours}$$

6 -  $N = N_0 / 10 = N_0 e^{-\lambda t}$

d'où  $\ln(1/10) = -\ln(10) = -\lambda \cdot t$

$t = \ln(10) / \lambda = \ln(10) / (1 \cdot 10^{-6}) = 2302585 \text{ s} = 26,7 \text{ jours}$ .

## B : TRAITEMENT DES EAUX PAR FLOCCULATION

1.1 -



1.2 - Le poids  $P = \rho \cdot V \cdot g$

La poussée d'Archimède  $P_A = \rho_e \cdot V \cdot g$

Les frottements  $f = 6 \cdot \pi \cdot \eta_e \cdot r \cdot v$

1.3 - Mouvement rectiligne uniforme

1.4 - D'après la seconde loi de Newton si  $v = \text{cte}$  alors  $\sum \vec{F} = \vec{0}$  soit  $\vec{P} + \vec{P}_A + \vec{f} = \vec{0}$

1.5 -  $-P + P_A + f = 0$

$$1.6 - -\rho \cdot V \cdot g + \rho_e \cdot V \cdot g + 6\pi\eta_e r \cdot v_{\text{lim}} = 0$$

$$\Leftrightarrow -\rho \cdot \frac{4\pi r^3}{3} \cdot g + \rho_e \cdot \frac{4\pi r^3}{3} \cdot g + 6\pi\eta_e r \cdot v_{\text{lim}} = 0$$

$$\Leftrightarrow -\frac{2r^2}{3} \cdot g \cdot (\rho_e - \rho) + 3\eta_e v_{\text{lim}} = 0$$

$$\Leftrightarrow v_{\text{lim}} = \frac{2(\rho_e - \rho)r^2 g}{9\eta_e}$$

$$\text{AN : } v_{\text{lim}} = 7,5 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$1.7 - \Delta t = d/v_{\text{lim}} = 1,3 \cdot 10^4 \text{ s} = 3\text{h}40$$

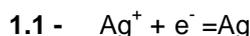
Cette durée est très longue et incompatible avec un traitement efficace des eaux.

$$2.1 - \frac{v'_{\text{lim}}}{v_{\text{lim}}} = \frac{\frac{2(\rho - \rho_e)r^2 g}{9\eta_e}}{\frac{2(\rho - \rho_e)r^2 g}{9\eta_e}} = \left( \frac{r'}{r} \right) = 64$$

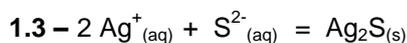
La vitesse de sédimentation est bien plus élevée, donc le temps de sédimentation est réduit d'autant.

2.2 - Dans une centrifugeuse, un mouvement de rotation permet de créer une accélération bien supérieure à  $9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$  ce qui permet d'augmenter fortement la vitesse de migration des particules, et donc de réduire le temps de migration.

## C : ENTRETIEN DES OBJETS ARGENTÉS



$$1.2 - E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} = E_1^0 + 0,06 \cdot \log[\text{Ag}^+]$$



1.4 - La précipitation du sulfure d'argent entraîne inévitablement une diminution de la concentration en ions  $\text{Ag}^+$ .

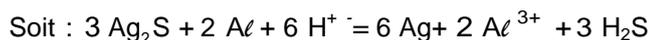
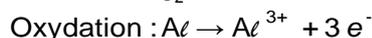
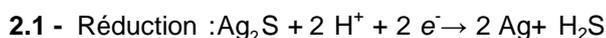
Ainsi  $\log[\text{Ag}^+]$  diminue et donc  $E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}$  diminue.

1.5 - L'oxydation est beaucoup plus favorable en présence d'ion sulfure car l'argent est un bien meilleur réducteur qu'en l'absence de sulfure.

ou

La différence de potentiel entre le couple  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  et le couple  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$  est beaucoup plus importante qu'entre le couple  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  et le couple  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$ .

*ou toute autre réponse convenable*



$$2.2 - \Delta E^\circ = E_{\text{Ag}_2/\text{Ag}} - E^\circ_{\text{Al}^{3+}/\text{Al}}$$

$$\Delta E^\circ = -0,69 - (-1,68)$$

$$\Delta E^\circ = +0,99\text{V}$$

2.3 - Cette réaction est spontanée, dans les conditions standards, car  $\Delta E > 0$

2.4 - L'odeur désagréable résulte de la formation de sulfure d'hydrogène  $\text{H}_2\text{S}$ .

2.5 - La présence de sel ( $\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$ ) permet d'augmenter la conductivité de la solution et donc de favoriser les échanges de charges.

## D : CHIMIE ORGANIQUE

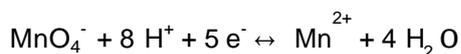
1.1 - Autour de chaque carbone : Modèle AX<sub>2</sub>

=> figure de répulsion linéaire => géométrie linéaire

1.2 - Ethanal : CH<sub>3</sub>-CH=O

2.1 - (B) : acide éthanoïque

2.2 - CH<sub>3</sub>-CH=O + H<sub>2</sub>O ↔ CH<sub>3</sub>COOH + 2 H<sup>+</sup> + 2 e<sup>-</sup>



5 CH<sub>3</sub>-CH=O + 2 MnO<sub>4</sub><sup>-</sup> + 6 H<sup>+</sup> → 5 CH<sub>3</sub>COOH + 2 Mn<sup>2+</sup> + 3 H<sub>2</sub>O

3.1 - Exemple de réactifs : SOCl<sub>2</sub>, PCl<sub>3</sub> ou PCl<sub>5</sub>

3.2 - (C) : Chlorure d'éthanoyle

4.1 - (D) Ph-CO-CH<sub>3</sub>

4.2 - La réaction est l'acylation de Friedel & Crafts (SEAr acceptée)

4.3 - Le chlorure d'aluminium est le catalyseur de la réaction.

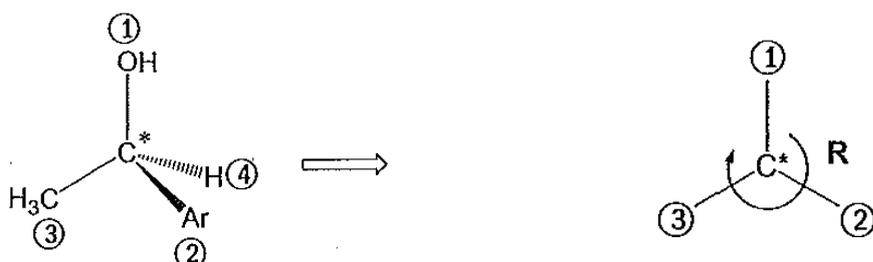
5.1 - Sur le spectre du composé obtenu, on doit observer :

L'absence d'une bande à  $\sigma \approx 1700 \text{ cm}^{-1}$  caractéristique de la vibration d'élongation d'une double liaison C=O

La présence d'une bande vers  $\sigma \approx 3200 \text{ à } 3650 \text{ cm}^{-1}$ , caractéristique de la vibration d'élongation d'une liaison O-H

5.2 - (E): 1-phényléthan-1-ol (ou 1-phényléthanol)

5.3 - Enantiomère R



6.1 - Pour réaliser le passage de (E) au styrène, il faut se placer en milieu acide et chauffer.

6.2 - Il s'agit d'une réaction d'élimination (déshydratation acceptée aussi)

# Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2013

## LES MICROALGUES : UNE SOURCE D'ACIDES GRAS POLYINSATURÉS

### 1. Origine et aspects structuraux des acides gras polyinsaturés

1.1 - Apport par l'alimentation car les désaturases ne sont pas présentes chez les mammifères. Notion d'acides gras essentiels.

1.2 - Formule développée de l'acide palmitique.

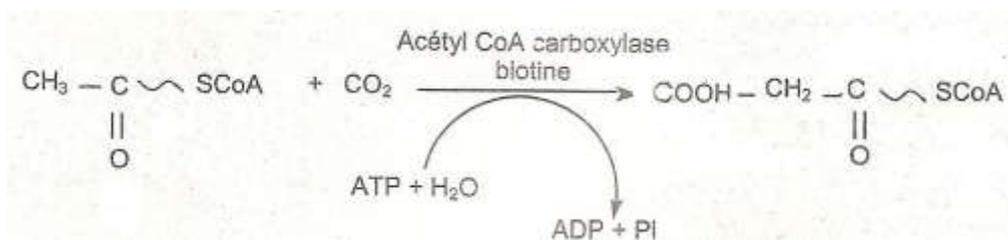
1.3 - Phosphatidyl-choline formule.

1.4 - Acide arachidonique  $C_{20:4} \omega 6 = C_{20:4} \Delta^{5,8,11,14}$

### 2. La biosynthèse des acides gras

#### 2.1 - Formation du malonyl-CoA

2.1.1 -



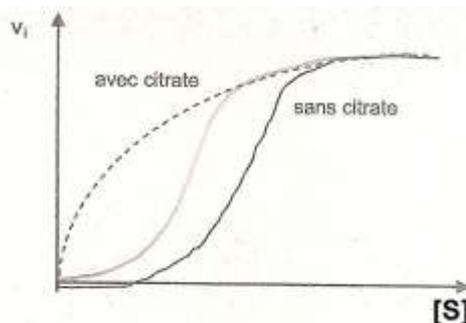
2.1.2.1 - Caractéristiques structurales : molécules oligomériques comprenant généralement un nombre pair de sous-unités identiques, assemblées suivant au moins un axe de symétrie et existantes sous deux formes R et T : R est favorable et T est défavorable à l'acte catalytique. Le passage d'une forme à l'autre se fait par transition allostérique.

Caractéristiques cinétiques : La courbe  $v_i = f([S])$  est une sigmoïde, traduisant l'effet coopératif entre les sous-unités : la fixation du substrat sur une sous-unité favorise la transition allostérique vers la forme favorable à la fixation des molécules de substrats suivantes. A partir d'un certain seuil, l'enzyme devient très sensible aux variations de concentration, d'où l'effet régulateur de ces enzymes.

L'effet coopératif se rencontre également avec les effecteurs.

2.1.2.2 - Contrôle négatif par le produit de la réaction : la régulation négative de l'activité de la première enzyme de la voie réactionnelle évite l'accumulation du produit final.

2.1.2.3 -



**2.1.3** - Pendant la phase lumineuse de la photosynthèse, les électrons circulent le long de la chaîne des transporteurs à partir des photosystèmes I et II, ce qui provoque la création d'un gradient d'ions  $H^+$  de part et d'autre de la membrane des thylacoïdes. Vu l'orientation des molécules dans cette membrane, les ions  $H^+$  sont pompés depuis le stroma vers la lumière des thylacoïdes. Le pH augmente dans le stroma lors de l'illumination des végétaux ce qui permettra l'activation de l'enzyme.

## 2.2 - Incorporation des chaînons dicarbonés

**2.2.1.1** - Complexe acide gras synthase

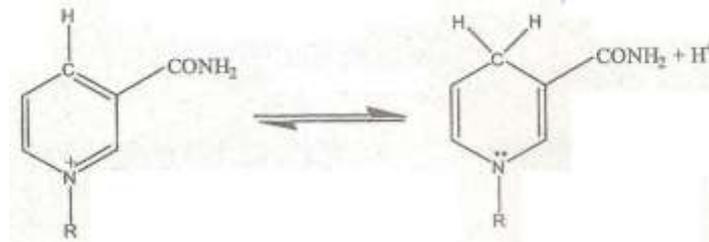
**2.2.1.2** - Superstructure enzymatique au sein de laquelle les différentes enzymes sont plus ou moins étroitement associées de façon à ce que l'efficacité et donc la rapidité de la réaction globale soit augmentée.

**2.2.2** -



**2.2.3.1** - Processus endergonique

**2.2.3.2** - Mécanisme d'oxydoréduction  $\text{NADP}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADPH, H}^+$



**2.2.3.3** - Lieu de production du  $\text{NADPH, H}^+$  pendant la photosynthèse

**2.2.3.4** - Réaction d'oxydoréduction de la voie des pentoses-phosphates ou décarboxylation oxydative de l'acide malique.

## 3. Étude expérimentale de l'enrichissement en AGPI d'extraits de microalgues

### 3.1 - Extraction des lipides totaux

Phase chloroformique (phase apolaire solubilise les lipides)

### 3.2 - Séparation des différentes classes de lipides

**3.2.1** - Chromatographie d'adsorption (polarité)

**3.2.2** - Fraction 1 : solvant le moins polaire donc élution des lipides neutres : cholestérol et triglycérides

- Fraction 2 : glycolipides

- Fraction 3 : phospholipides dans le solvant le plus polaires

### 3.3 – Choix de la lipase discriminante contre le DHA

**3.3.1** - La lipase élimine un maximum d'acides gras saturés et mono-insaturés tout en conservant greffés les acides gras d'intérêt .

**3.3.2** – Hydrolases

3.3.3 - E.C. suivi de 4 numéros séparés par des points :

- Premier chiffre : classe de l'enzyme, ici 3
- Deuxième chiffre : sous-classe, nature du groupement donné
- Troisième chiffre : sous-sous-classe, type de l'accepteur
- Quatrième chiffre : ordre de caractérisation dans la sous-sous-classe

3.3.4 - Spécificité : capacité pour une enzyme à différencier deux molécules. Reconnaissance spécifique par complémentarité de structure

Affinité : Force avec laquelle enzyme et ligand s'associent.

### 3.4 - Préparation de la solution enzymatique et contrôle de l'activité lipasique

3.4.1.1 - Activité spécifique

3.4.1.2 - Elle augmenterait (élimination des protéines autres que l'enzyme)

3.4.1.3 -  $m = 0,444 \text{ g}$

3.4.2.1 - Blanc réactif : remplacer l'échantillon par 0,01 mL d'eau distillée

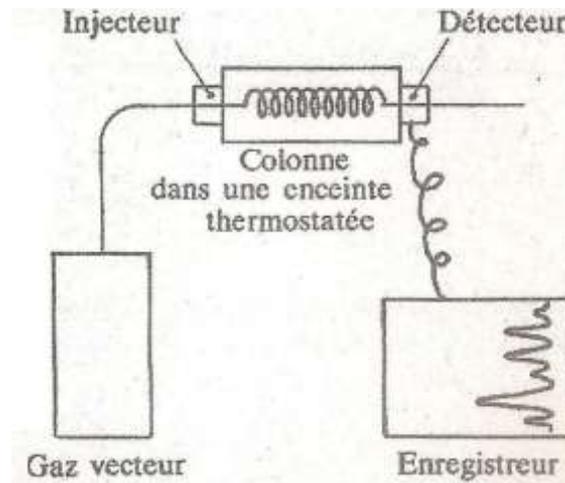
3.4.2.2 -  $F = 199\,793 \text{ U.L}^{-1}$

3.4.2.3 - Concentration d'activité catalytique =  $(180 \pm 6) \text{ U.L}^{-1}$ . Mauvaise conservation.

## 4. Étude de la composition en acides gras de l'extrait d'algues par chromatographie en phase gazeuse

4.1 – Libération des acides gras et méthylation afin de les rendre volatils

4.2 –



4.3.1 - Plus le nombre de carbone augmente et plus le nombre d'insaturation augmente pour un même nombre de carbone, plus le temps de rétention est important.

4.3.2 - Disproportion des pics, diminution des pics mono-insaturés et des saturés. Disparition AG à 18 ou moins de 18C, saturés et monoinsaturés.

# Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2013

## PRODUCTION INDUSTRIELLE D'INSECTICIDE PAR *BACILLUS THURINGIENSIS*

### 1.1 - Comparaison levures/bactéries

	Levures	Bactéries
Domaine*	Eukarya	Bacteria
Type de cellule	Eucaryote	Procaryote
Mode de reproduction	Sexuée ou asexuée Ou mitose ou méiose	Asexuée Ou scissiparité
Paroi : présence/absence Composants	Présence Mannoprotéines, glucanes, chitine	Présence Peptidoglycane
Type trophique / carbone	Hétérotrophe	Hétérotrophe ou autotrophe
Stérols	Présence de stérols membranaires (Ribosomes 80 S Présence d'organites)	Absence de stérols membranaires (Ribosomes 70 S Absence d'organites)
Taille	10-20 µm	1 à quelques µm

\* le terme « Règne » utilisé dans le sujet n'est plus adapté.

#### 1.2.1 - Une espèce est un ensemble d'individus qui :

- présente un grand nombre de caractères phénotypiques communs
- possède un nombre important de gènes en commun,
- occupe une même niche écologique
- présente une reproduction sexuée avec une descendance fertile.

Problème pour les bactéries : pas de reproduction sexuée.

#### 1.2.2 - Un caractère phénotypique est un caractère observable, apparent d'un individu.

1.2.3.1 - Analyse de la partie T du document 2 : montre la capacité de différentes souches à cultiver sans vitamine. Beaucoup de levures ne cultivent pas sans vitamine donc sont auxotrophes voire polyauxotrophes.

#### 1.2.3.2 - Milieu YNB (doc 3)

- a à i : vitamines ; rôle de facteurs de croissance
- J à l : acides aminés ; rôle de facteurs de croissance
- m à v : apports de macro-, micro- et oligo-éléments ; rôles : cofacteurs enzymatiques, équilibre physicochimique
- sulfate d'ammonium : source d'azote
- agar : gélifiant
- glucide : source de carbone et d'énergie
- Quantités connues de chaque composant.
- Concentrations en vitamines et en acides aminés trop faibles pour servir de source de carbone.
- Caractéristiques : milieu synthétique, enrichi, solide, non sélectif.

#### 1.2.4.1 - Types respectifs des deux milieux : A empirique et B synthétique.

**1.2.4.2 - Choix des milieux :**

A utilisable pour la fermentation du glucose (acidification détectée par le bromocrésol vert, indicateur de pH)

B utilisable pour l'utilisation du glucose comme seule source de C car pas d'autre source de C que le glucide ajouté.

**1.2.4.3 - Mode d'utilisation des deux milieux :**

A : en tube (culot), ensemencement de la souche en profondeur, incubation à 30°C, observation du virage de l'indicateur de pH en cas d'acidification.

B : en tube (pente) ou en boîte de Pétri, ensemencement de la souche en surface du milieu B contenant le glucose, incubation à 30°C, observation de la présence d'une culture en cas d'utilisation du glucose.

Ou, ensemencement de la souche dans la masse du milieu B en boîte de Pétri et dépôt d'un disque imbibé de glucose, incubation et observation de la présence d'une culture autour du disque en cas d'utilisation du glucose.

**1.2.5.1 - Hybridation ADN-ADN :**

Informe sur la complémentarité de séquence entre les ADN des deux souches donc sur la proximité phylogénétique des souches.

Plus le pourcentage d'hybridation est élevé plus les souches sont proches.

Met en évidence que des souches proches phénotypiquement peuvent être phylogénétiquement éloignées.

**1.2.5.2 - Principe :**

Les ADN de deux souches sont dénaturés.

La mise en présence des ADN simple brin des deux souches permet une hybridation et la formation d'un hybride hétérologue.

Un témoin est réalisé par réhybridation de l'ADN d'une des souches (ADN homologue) et permet d'obtenir 100% d'hybridation.

La quantité d'ADN hétérologue formé est comparée à celle du témoin ADN homologue pour déterminer le pourcentage d'hybridation.

Plus les ADN des deux souches présentent des séquences complémentaires, plus la quantité d'ADN hétérologue se rapproche de celle du témoin et plus le pourcentage d'hybridation sera élevé.

**1.3.1 - Métabolisme fermentaire :** métabolisme permettant la ré-oxydation de coenzymes réduits en dehors d'une chaîne respiratoire et qui met en jeu un système d'oxydo-réduction avec un transfert d'électron cytoplasmique vers un accepteur final organique.

Production d'ATP : phosphorylation au niveau du substrat.

Equation bilan :  $\text{Fructose} + 2 \text{ADP} + 2\text{P}_i \rightarrow 2 \text{Ethanol} + 2 \text{ATP} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$

**1.3.2 - Conditions de production :** favorise un métabolisme respiratoire (aération : apport d'O<sub>2</sub>, glucides 1g/L : pas d'effet Crabtree). Permet une production optimisée d'une biomasse de levures.

**2.1 - Caractéristiques générales des bactéries lactiques :** bactéries Gram+, anaérobies aérotolérants, à métabolisme fermentaire, produisant de l'acide lactique, auxotrophes.

Genres : *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*...

Remarque : *Oenococcus* est un ancien *Leuconostoc* (pas proche de *Lactococcus*).

**2.2 - Anaérobie aérotolérant :** métabolisme uniquement fermentaire, mais tolérance du contact avec l'O<sub>2</sub> grâce à la production d'enzymes de détoxification comme la peroxydase.

**2.3 - Fermentation malolactique :** ac. malique → ac. lactique + CO<sub>2</sub>

Intérêt : diminution de l'acidité et de l'astringence, stabilisation du vin.

**3.1.1 - Flore acétique dans ce contexte :** flore d'altération.

**3.1.2 - Métabolisme énergétique :** la quantité de bactéries acétiques augmente en présence d'O<sub>2</sub> donc ces bactéries présentent un métabolisme respiratoire.

Nature des molécules mises en jeu : oxydation de l'éthanol en acide acétique avec production de coenzymes réduits qui seront réoxydés dans une chaîne respiratoire.

**3.2.1 - Analyse milieu EBB :**

- Jus de raisin : base nutritive se rapprochant de l'environnement naturel des levures
- Ethanol : permet de reproduire les conditions de la fermentation alcoolique
- Extrait de malt : base nutritive
- Extraits de levures : facteur d'enrichissement
- Sulfate d'ammonium : apport d'azote et de soufre
- Sulfate de magnésium : apport de soufre et de magnésium
- Tween 80 : favorise la dispersion, apport carboné
- Biphényl : conservateur anti-moisissures
- Chloramphénicol : antibiotique inhibiteur bactérien
- pH 5 : favorise la croissance des mycètes

Milieu inhibant le développement de bactéries (pH, antibiotique) et des moisissures (biphényl). Milieu dont la composition se rapproche d'un mout de raisin (jus de raisin, éthanol) donc favorise la multiplication des levures du raisin.

⇒ milieu d'enrichissement sélectif des levures.

**3.2.2 - Méthode de culture :** batch ou discontinu ; culture sans renouvellement du milieu dans laquelle la croissance s'arrête quand les nutriments s'épuisent ou quand les déchets métaboliques s'accumulent.

**3.2.3 - Phase de latence :** phase d'adaptation de la souche au milieu avec production d'enzymes permettant l'utilisation des substrats présents.

**3.2.4 - Vitesse spécifique de croissance :**  $Q_x$  = augmentation relative de la biomasse par unité de temps (pente de la droite en phase exponentielle).

Attention : graphe en  $\text{Log } N = f(t)$

Deux points pris en phase exponentielle : 1 :  $\text{Log } N = 3,2$  ;  $t = 6$  j

2 :  $\text{Log } N = 8$  ;  $t = 10$  j

$$Q_x = (\text{Ln } N_2 - \text{Ln } N_1) / (t_2 - t_1) = (\text{Ln } 10^8 - \text{Ln } 10^{3,2}) / (10 - 6) = 2,7 \text{ jour}^{-1}$$

**3.2.5 - Milieu approprié :**

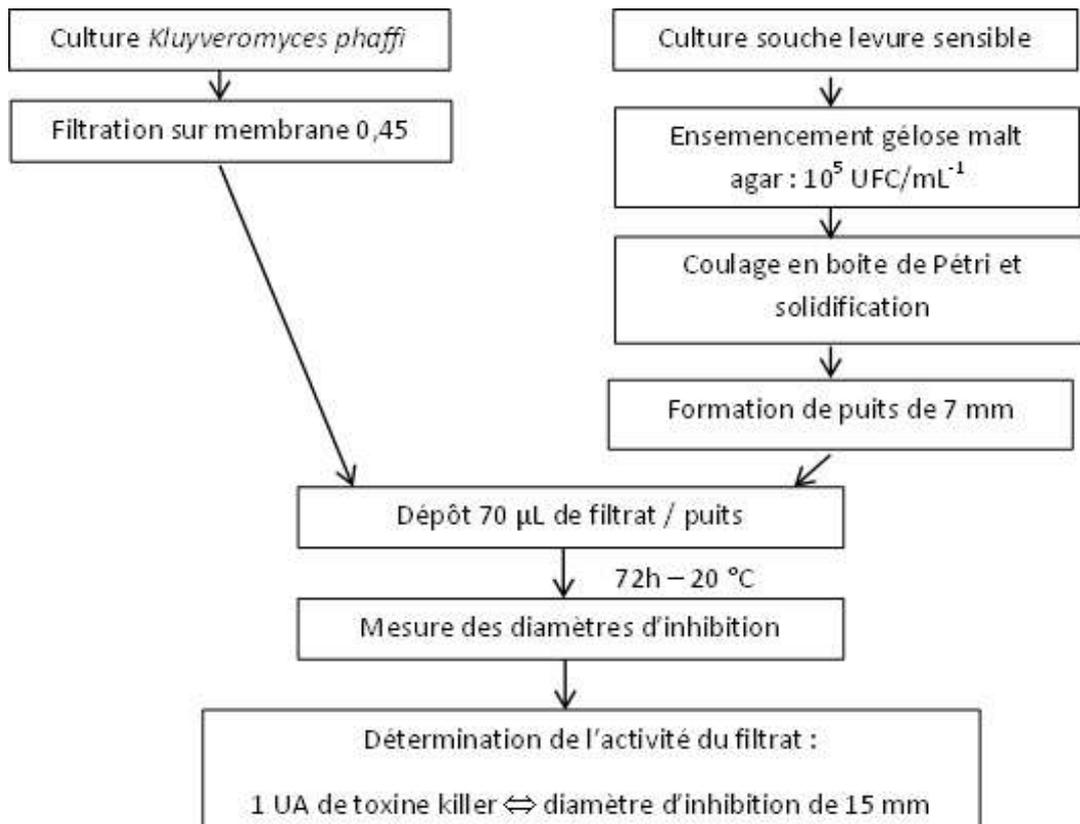
Vitesses de croissance des souches de *Brettanomyces* au minimum deux fois supérieures à celles des autres genres.

Concentrations de levures en phase stationnaire (entre 10 et 18 jours) : au moins 100 fois supérieure pour les souches de *Brettanomyces* comparées aux autres genres.

⇒ milieu approprié

Temps de culture le plus approprié : 10-12 j au moment où la différence de concentration avec les autres genres est maximale.

## 3.3.1 - Diagramme test killer :



## 3.3.2 - Témoins :

Puits avec 70 µL de milieu de culture utilisé pour *Kluyveromyces* mais stérile : montre l'absence d'inhibition de la souche sensible par les composants du milieu contenant la toxine.

Puits avec 70 µL d'un filtrat contenant la toxine KpKt et présentant une activité connue : contrôle qualité positif vérifiant l'efficacité de la méthode.

**3.3.3 - Viabilité :** *a* est un témoin permettant de visualiser la fluorescence basale d'une culture de levures en absence de toxine. Nécessaire car présence de cellules mortes inévitable. On observe que la fluorescence est faible ( $<10^2$ ) donc que la plupart des cellules sont en vie.

**3.3.4 - Cellules colorées :** l'iodure de Propidium se fixe sur l'ADN fragmenté donc marque les cellules tuées par la toxine.

## 3.3.5 - Analyse du document 10 :

- pour K1 : fluorescence importante (entre  $10^3$  et  $10^4$ ) pour un grand nombre de cellules. Donc la toxine a tué la plupart des levures.

- pour KpKt :

Fluorescence modérée ( $<10^2$ ) pour une partie importante des cellules qui sont donc vivantes.

Fluorescence importante (entre  $10^3$  et  $10^4$ ) pour une faible quantité de cellules qui sont donc mortes.

La toxine a tué une proportion limitée des levures.

Conclusion : la toxine K1 présente l'effet toxique le plus important.

# Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2013

---

## LES VENINS ET LES SÉRUMS ANTIVENIMEUX

### 1 - Venins : mode d'action et pharmacologie

#### 1.1 - Immunisation par des venins chauffés.

1.1.1 - Le chauffage va dénaturer (partiellement) les toxines (donc atténuation de l'activité toxique tout en conservant le caractère immunogène).

1.1.2 - Première immunisation : IgM, les suivantes: IgG.

Deux intérêts : fabriquer surtout des IgG car plus spécifiques, fabriquer des Ig en quantité importante.

#### 1.2 - Mode d'action des venins.

1.2.1 - Petites molécules libérées par les neurones dans une synapse qui agit sur un récepteur postsynaptique et qui assure la transmission du message nerveux.

1.2.2 - La fixation de Ach provoque un changement de conformation du récepteur, ouverture d'un canal qui laisse entrer préférentiellement les ions  $\text{Na}^+$  (selon leur gradient électrochimique).

1.2.3 - Transport facilité : se fait grâce à une protéine de transport, selon gradient électrochimique, sans consommation d'énergie. Transport actif: se fait grâce à une protéine de transport, contre le gradient électrochimique, nécessite de l'énergie.

1.2.4 - La toxine agit comme un antagoniste qui, en se fixant sur le récepteur, bloque l'ouverture du canal même en présence d'Ach. Le terme antagoniste n'est pas attendu.

1.2.5 -- Cette enzyme fait rapidement baisser les taux d'Ach dans la synapse, ainsi si une toxine possède cette action, elle aura le même effet: pas d'entrée massive de  $\text{Na}^+$ , donc aucune transmission neuromusculaire, donc paralysie.

#### 1.3 - Pharmacocinétique des venins.

1.3.1 -- De 0 à 10 heures: distribution du venin dans tout l'organisme (pas d'absorption car intraveineux), de 10 à 20 heures : élimination du venin.

1.3.2 - La biodisponibilité désigne le pourcentage de xénobiotique qui parvient dans le compartiment central.

Elle se détermine en mesurant l'aire sous la courbe.

1.3.3 - Réactions de type I: oxydation, réduction ou hydrolyse du xénobiotique.

Réactions de type II : conjugaison : fixation d'une molécule endogène sur le xénobiotique (glucuroconjugaison, acétylation ...).

1.3.4 - Conséquences: molécule rendue plus hydrosoluble (donc moins ré-absorbable au niveau du néphron).

1.3.5 -- Les reins.

1.3.6.1 - Schéma d'une courbe dose réponse avec les bons axes.

1.3.6.2 - DE50: dose efficace 50 = dose de molécules qui permet d'obtenir 50 % de l'effet maximal. .

Repérage correct sur le graphe.

## 2 - Les sérums antivenimeux

### 2.1 - Composition et amélioration des sérums antivenimeux.

**2.1.1** --Intolérance car les Ag de chevaux sont reconnus par notre système immunitaire comme des antigènes étrangers.

**2.1.2** --Schéma d'une IgG, faisant apparaître les domaines constants et variables des chaînes légères et lourdes, faisant apparaître qu'un domaine d'Ig se répète dans cette structure et qu'il comporte un pont disulfure. Localisation de Fc et Fab (ou paratopes). Localisation des zones isotypiques et nom : isotype.

**2.1.3** - ACm : dérivé d'un clone. Ils ont tous la même spécificité et affinité.

Ac polyclonaux : les anticorps polyclonaux sont un mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné avec différentes affinités et spécificités. Ils sont produits par plusieurs clones de lymphocytes B.

Avantages : les ACm sont de meilleures spécificités et sont sélectionnés pour leur excellente affinité, ils sont tous identiques.

### 2.2 - Principe général de la production d'un anticorps monoclonal.

**2.2.1** - Repérage des étapes :

- immunisation de souris,
- fusion entre plasmocyte et cellule. myéломateuse HGPRT-,
- sélection des hybridomes en milieu HAT,
- dilution limite pour n'avoir qu'un hybridome par puits,
- production en masse.

**2.2.2.1** - Les hybridomes proviennent de la fusion d'un LB qui apporte le caractère productif (Ac) et l'HGPRT avec une cellule cancéreuse qui apporte l'immortalité (lignée cellulaire).

**2.2.2.2** - Milieu HAT + signification des lettres.

**2.2.2.3** - Sélection des hybrides HGPRT+ en présence d'aminoptérine qui bloque la voie de synthèse (de novo) des nucléotides. Seule la voie alterne est effective à partir d'hypoxanthine apportée par le milieu HAT.

**2.2.3** - Cellules mises en contact avec un cryoprotecteur (DMSO) et refroidies par congélation lente (- 80°C) ou par azote liquide.

**2.2.4** - Amplification chez l'animal par injection intrapéritonéale d'hybridomes.

Amplification par culture en suspension ou batch.

**2.3** - Effets thérapeutiques des sérums antivenimeux.

**2.3.1** - Valence : nombre d'épitope identique qu'un Ac peut fixer.

Valence Fab : 1. Valence F(ab')<sub>2</sub> : 2.

- Perte des marqueurs isotypiques dont absence de réponse immunitaire.

**2.3.3** - D'après ces 2 courbes, l'administration de F(ab')<sub>2</sub> montre une courbe en dessous de celle de Fab donc il semble que F(ab')<sub>2</sub> soit plus efficace que Fab.

# Éléments de corrigé de sciences et technologie bioindustrielles 2013

---

## FABRICATION D'UNE GALETTE SURGELÉE EN VUE D'UNE CERTIFICATION «AGRICULTURE BIOLOGIQUE »

### 1- Mise en conformité avec la législation

1.1 - La certification est la reconnaissance écrite et officielle par un organisme compétent et indépendant que le produit répond bien à des exigences particulières. Il s'agit d'une preuve de conformité à un référentiel.

1.2.1 - L'organisme responsable de l'accréditation est le COFRAC (COmité FRançais d'ACcréditation).

1.2.2 - INAO : Institut national de l'origine et de la qualité.

1.3 - Exemples de spécifications. *Ce cahier regroupe :*

- les caractéristiques techniques du produit fabriqué
- la description des différentes étapes de production et de contrôle
- les données concernant le matériel utilisé, les locaux et le personnel impliqués.

1.4.1 - La liste des ingrédients montre que l'eau, le sel ne sont pas pris en compte pour le calcul et seule l'oseille n'est pas issue de l'agriculture biologique. Or l'oseille représente 8 % de la garniture (50 % des ingrédients) donc 4 % de la totalité des ingrédients. Le produit contient donc bien au moins 95 % d'ingrédients d'origine agricole biologiques.

1.4.2 - Logo 1 : logo français.

Logo 2 : logo européen.

### 2 - Caractéristiques de la pâte et de la garniture de la galette

#### 2.1 - Préparation des matières premières

2.1.1.1 - Conditions de reproductibilité : les résultats sont obtenus par la même méthode mais les lieux, les opérateurs *et/ou* les systèmes de mesure, les jours sont différents.

2.1.1.2 - Le  $S_R$  calculé (0.8g) est inférieur au  $S_R$  toléré par le fabricant (1 g), donc la balance est en accord avec les données du fabricant.

- Biais =  $10,006 - 10 = 0,006$  kg soit 6 g. L'erreur de justesse calculée est inférieure à l'erreur de justesse tolérée (10 g) donc la balance est juste par rapport aux données du fabricant.

#### 2.2 - Préparation de la pâte de la galette

2.2.1 - Les ovoproduits sont les produits obtenus à partir de l'œuf, de ses différents composants ou de leur mélange après élimination de la coquille et des membranes.

2.2.2.1 - Les 3 principales catégories de lipides dans le jaune d'œuf sont les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol. Les lécithines font partie des phospholipides.

2.2.2.2 - Émulsion: division en fines particules d'un liquide dans un autre liquide non miscible au premier. Ces deux substances ne peuvent pas se mélanger et forment donc une préparation biphasique.

2.2.2.3 - Bons agents tensio-actifs : elles stabilisent les phases huile - eau d'une émulsion (caractère amphiphile ou bipolaire des lécithines).

2.2.3 - Deux propriétés fonctionnelles des protéines du blanc d'œuf utiles pour la préparation de la pâte parmi : propriété coagulante, liante, moussante, anti cristallisante, émulsifiante.

## 2.3 - Préparation de la garniture au saumon fumé

### 2.3.1 -

	<i>Muscle blancs</i>	<i>Muscles rouges</i>
<i>Myoglobine</i>	<i>Peu</i>	<i>beaucoup</i>
<i>Métabolisme</i>	<i>Glycolyse anaérobie</i>	<i>.aérobie</i>

**2.3.2.1** - Phase de rigidité cadavérique ou « rigor mortis » : Elle résulte.:

- liaison irréversible entre la myosine et l'actine : complexe d'actomyosine lié à diminution de la teneur en ATP et augmentation  $Ca^{2+}$  : la dureté augmente.

- dégradation anaérobie du glycogène conduit à la formation d'acide lactique. La baisse de pH dans le poisson est suffisante pour entraîner une baisse de la rétention d'eau.

**2.3.2.2** - Le poisson est souvent blessé au moment de la pêche et le pH 6 - 6,7 permet une prolifération bactérienne d'où de nombreuses précautions à prendre.

**2.3.3.1** - Le fumage à froid s'effectue par une combustion lente de sciure ou copeaux de bois entre 15 et 25°C.

**2.3.3.2** - Deux notions attendues parmi :

- effet organoleptique : couleur, arôme, texture
- effet sur la conservation : diminution  $a_w$ , antimicrobien et antioxydant.

## 3 - Conservation et conditionnement de la galette

**3.1** --La surgélation augmente la durée de vie des produits, préserve les qualités nutritionnelles et organoleptiques et présente des aspects pratiques.

**3.2.1** - La congélation rapide est privilégiée car :

- Congélation lente : Formation de gros cristaux, en petit nombre, plutôt à l'extérieur des cellules - cryoconcentration à l'extérieur

- Congélation rapide : Formation de nombreux petits cristaux à l'intérieur et à l'extérieur des cellules.

**3.2.2** - Congélation lente : la migration d'eau de l'intérieur vers l'extérieur provoque un dessèchement des cellules. Une exsudation importante accompagnera la décongélation : produit de qualité moindre.

Congélation rapide : la structure des cellules est mieux conservée, peu d'exsudation lors de la décongélation, la qualité du produit est mieux préservée.

**3.3.1** - 2 notions attendus parmi :

- Début de congélation à - 2°C → solution complexe différente de l'eau.

- Un pourcentage d'eau dans les aliments congelés demeure incongelable : seule l'eau libre peut être congelée.

- Une congélation inférieure à - 30°C est inutile.

**3.3.2** - On observe d'après la courbe qu'à -18°C, toute l'eau libre n'a pas été congelée puisque le % d'eau congelée augmente encore à - 20°C et à - 30°C. Des réactions peuvent encore se réaliser et la conservation du produit sera moins bonne.

**3.3.3** - Lors de l'entreposage du produit congelé, il faudra veiller à ce qu'il n'y ait pas de variations de température. Ces variations provoquent une modification des proportions d'eau congelée et donc des cycles de décongélation - congélation préjudiciables à la qualité du produit.

**3.3.4** - DLUO : Date limite d'utilisation optimale. Elle garantit les qualités organoleptiques, physiques (couleur) et nutritives (vitamines) du produit.

La législation n'impose pas une DLC car le produit est sans danger sanitaire pour le consommateur.

**3.4.1** - Maîtrise de la congélation à cœur du produit. Éviter la condensation (emballage - produit).

**3.4.2** - Le fluide frigorigère est de l'air pulsé par des ventilateurs et refroidi à travers l'échangeur de refroidissement de l'installation. Les produits circulent sur un tapis roulant perforé et sont refroidis au contact de l'air. Risque de dessèchement du produit et de brûlures par le froid.

## **4- Présentation de la démarche HACCP de l'entreprise (8 points)**

**4.1** - HACCP signifie en anglais : Hazard Analysis Critical Control Point. En français cela peut être traduit par "analyse des dangers et points critiques en vue de leur maîtrise".

**4.2** - Trois idées principales sont attendues:

- identifier les dangers spécifiques et prendre des mesures préventives,
- déterminer des points de contrôle pour les risques à maîtriser,
- définir des mesures correctives à adopter en vue de maîtriser ces risques.

**4.3** - Le tableau n'est pas exigé.

	<b>Q1</b>	<b>Q2</b>	<b>Q3</b>	<b>Q4</b>	<b>Conclusion</b>
Surgélation  <b>danger: microbiologique</b>	<b>Oui:.</b>  BPF CCP 1 CCP2	<b>Oui:</b>  Méthode de stabilisation et de réduction des microorganismes	/	/	CCP
Détecteur métal  <b>danger: physique</b>	<b>Oui:</b>  BPF	<b>Oui:</b>  Élimination du danger par le détecteur de métal	/	/	CCP

**4.4** - Contrôle à 100 % ou contrôle aux attributs. Contrôle non destructeur.