

ANNALES

BTS BIOANALYSES

ET CONTRÔLES

Sessions 2014 et 2015

Avec éléments de corrigés

Nous remercions les nombreux professeurs de l'enseignement technologique et général qui ont participé à la collecte des sujets, aux relectures et propositions de corrigés, en particulier : Mesdames Christine BENAYOUN, Frédérique DENIAU, Nathalie GERAULT, Hélène LANERY Sandrine LE PETIT CORPS, Dominique MALLET, Ariane MASCLE, Isabelle PIVETEAU, Lucile TIGER, Messieurs Bruno DURAND, Pascal LEVALLOIS, André LETEXIER, Thierry MERCIER et Philippe SUDRON.

Les sujets des annales du BTS Bio Analyses et Contrôles 2014 et 2015 ont été collectés et mis en page par Michèle ROBLIN et Jean-Noël JOFFIN.

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

Photographies de couverture , de haut en bas et de gauche à droite:

Dilution automatisée sous PSM

Pilote Lit Fluidisé

Électrophorèse d'amplicons - BET (Victor PETIT- BTS Bioanalyses et contrôles Promotion PAULING Caen)

Dessin (Chloé MARTIN - BTS Bioanalyses et contrôles Promotion PAULING Caen)

Métrologie: Contrôle de sonde thermique

TABLE DES MATIÈRES

Session 2014

<i>Sujet de mathématiques 2014</i>	1
<i>Sujet de sciences physiques et chimiques 2014</i>	5
<i>Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2014</i>	11
<i>Sujet de microbiologie et de technologies d'analyse 2014</i>	20
<i>Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et de technologies d'analyse 2014</i>	30
<i>Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2014</i>	35
<i>Techniques de biochimie 2014</i>	41
<i>Techniques de microbiologie 2014</i>	47
<i>Techniques de biologie cellulaire et moléculaire 2014</i>	55

Session 2015

<i>Sujet de mathématiques 2015</i>	61
<i>Sujet de sciences physiques et chimiques 2015</i>	65
<i>Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2015</i>	70
<i>Sujet de microbiologie et technologies d'analyse 2015</i>	80
<i>Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse 2015</i>	88
<i>Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2015</i>	93
<i>Techniques de biochimie 2015</i>	100
<i>Techniques de microbiologie 2015</i>	107
<i>Techniques de biologie cellulaire et moléculaire 2015</i>	116

Corrigés 2014

<i>Éléments de corrigé de mathématiques 2014</i>	123
<i>Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2014</i>	127
<i>Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2014</i>	130
<i>Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2014</i>	133
<i>Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2014</i>	136
<i>Éléments de corrigé de sciences et technologies bioindustrielles 2014</i>	139

Corrigés 2015

<i>Éléments de corrigé de mathématiques 2015</i>	141
<i>Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2015</i>	145
<i>Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2015</i>	147
<i>Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2015</i>	151
<i>Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2015</i>	154
<i>Éléments de corrigé de sciences et technologie bioindustrielles 2015</i>	158

RÈGLEMENT D'EXAMEN

			Voie scolaire, apprentissage, formation professionnelle continue dans les établissements publics, privés non habilités, enseignement à distance et candidats justifiant de 3 ans d'expérience professionnelle	Formation professionnelle continue dans les établissements publics habilités	
Épreuves	Unités	Coef	Type d'épreuve	Durée	Forme
E1 Anglais	U10	2	CCF 2 épreuves en fin de deuxième année		2 situations d'évaluation
E2 Mathématiques et Sciences physiques et chimiques		5		4h	
Sous-épreuve de mathématiques	U21	2	écrit	2h	
Sous-épreuve de sciences physiques et chimiques	U22	3	écrit	2h	
E3 Biochimie, biologie et technologie d'analyses		9	écrit	8h	
Sous-épreuve de Biochimie et technologies d'analyse	U31	3	écrit	3h	
Sous-épreuve de microbiologie et technologies d'analyse	U32	3	écrit	3h	
Sous-épreuve de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	U33	3	écrit	2h	
E4 Sciences et technologies bio-industrielles	U40	3	écrit	2h	
E5 techniques d'analyses et de contrôles et opérations unitaires		10		2X12h maxi	
Sous-épreuve de techniques de biochimie	U51	4	CCF 2 épreuves en fin de première et deuxième année	4 h maxi	2 situations d'évaluation pratique en laboratoire
Sous-épreuve de techniques de microbiologie	U52	4	CCF 2 épreuves en fin de première et deuxième année	6 h maxi	2 situations d'évaluation pratique en laboratoire
Sous-épreuve de techniques de biologie cellulaire et moléculaire	U53	2	CCF 2 épreuves en fin de première et deuxième année	3h maxi	2 situations d'évaluation pratique en laboratoire
E6 Soutenance de projet	U60	4	oral	45 min	
Épreuve facultative : langue vivante étrangère	UF1	1 (points au-dessus de la moyenne)	oral	20 min	

Session 2014

Sujet de mathématiques 2014

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

L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé. Le formulaire de mathématiques est joint au sujet. La calculatrice (conforme à la circulaire n°99-186 du 16-11-99) est autorisée.

EXERCICE 1 (10 points)

Une société agro alimentaire produit des plats cuisinés. Elle utilise pour cela des pièces de viande de 2 kg initialement congelées à une température de -21°C . On considère par la suite que les pièces de viande sont identiques.

Lors de la décongélation, les pièces de viande sont placées dans une zone d'un réfrigérateur maintenue à une température constante de $T^{\circ}\text{C}$. L'entreprise doit respecter des contraintes sanitaires et des contraintes liées à la qualité gustative des produits qu'elle fabrique.

Elle mène pour cela une étude sur l'évolution de la température au cœur d'une pièce de viande au cours de la décongélation.

La loi de refroidissement de Newton permet théoriquement, sous certaines conditions, de modéliser cette évolution, en fonction du temps, par une fonction θ vérifiant :

$$\theta'(t) = k(\theta(t) - T) \quad (E)$$

où

- k est une constante liée aux caractéristiques de la pièce de viande,
- T est la température de la zone du réfrigérateur dans laquelle est placée la viande,
- t est la durée, exprimée en heure, écoulée depuis le début de la décongélation
- et $\theta(t)$ est la température, exprimée en degré Celsius ($^{\circ}\text{C}$), au cœur de la pièce de viande après t heures de décongélation.

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

PARTIE A : Détermination de la constante k

Le réglage standard d'un réfrigérateur domestique est de $T = 5^{\circ}\text{C}$.

On place une des pièces de viande dans une zone du réfrigérateur maintenue à cette température.

L'évolution de la température au cœur de la pièce de viande est suivie à l'aide de sondes thermocouples et mène aux relevés suivants :

i	1	2	3	4	5	6
t_i : durée écoulée, en heures	0	5	10	15	20	25
θ_i : température en degrés Celsius	- 21	- 5,1	1,1	3,5	4,4	4,8

1. On pose $z_i = \ln(5 - \theta_i)$. Donner les valeurs de z_i pour i variant de 1 à 6. Arrondir au centième.
2. Donner une équation de la droite d'ajustement affine de z en t par la méthode des moindres carrés sous la forme $z = at + b$. Arrondir au centième les valeurs de a et b .

3. En déduire que l'on peut estimer la température au cœur de la pièce de viande après t heures (t compris entre 0 et 25) par :

$$\theta(t) = -26,58e^{-0,19t} + 5$$

4. Calculer $\theta'(t)$ et $\theta(t) - 5$.

Justifier que le modèle de l'équation (E) (donnée dans le préambule de l'exercice) s'applique dans le cas présent avec des constantes k et T dont on donnera les valeurs.

PARTIE B : Durée de décongélation

On considère qu'une pièce de viande est décongelée lorsque la température au cœur de la viande est supérieure ou égale à 0°C .

Une viande décongelée donne, lorsqu'on la consomme après cuisson, l'illusion du produit frais si sa décongélation a duré **au moins 12 heures**.

L'ajustement effectué dans la partie A permet d'estimer qu'une pièce de viande de 2 kg décongèle dans une zone du réfrigérateur maintenue à $T = 5^\circ\text{C}$ en 8h 50 min, ce qui ne convient pas.

Par souci de **qualité gustative**, la société agro alimentaire décide donc de décongeler plus lentement la viande en la plaçant dans une zone plus froide du réfrigérateur. Par ailleurs, si on décongèle une pièce de viande à une température supérieure à 2°C , il y a reprise de la prolifération de certaines bactéries.

On choisit donc $T = 2^\circ\text{C}$.

D'après la loi de Newton, la température de la pièce de viande est modélisée par une fonction θ vérifiant :

$$\theta'(t) = -0,19(\theta(t) - 2), \text{ c'est à dire : } \theta'(t) + 0,19\theta(t) = 0,38.$$

1. Résolution d'une équation différentielle

On considère l'équation différentielle (E) : $y' + 0,19y = 0,38$, 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 .

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

$$(E_0) : y' + 0,19y = 0.$$

b) Soit h la fonction définie sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par $h(t) = c$, où c est un nombre réel.

Déterminer le nombre réel c pour que la fonction h soit une solution particulière de l'équation différentielle (E).

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

2. Détermination de la fonction θ

On rappelle que θ est solution de l'équation (E) et que $\theta(0) = -21$.

a) Justifier que : $\theta(t) = -23 e^{-0,19t} + 2$.

b) Déterminer $\lim_{t \rightarrow +\infty} \theta(t)$. Interpréter le résultat obtenu dans le contexte concret étudié.

3. Durée de décongélation

a) Estimer le temps nécessaire pour que les pièces de viande, placées dans une zone du réfrigérateur maintenue à $T = 2^\circ\text{C}$, soient décongelées.

Plusieurs méthodes peuvent être employées. Le candidat devra indiquer celle qu'il a choisie et en donner les étapes.

b) La viande ainsi décongelée donnera-t-elle, lorsqu'on la consommera, l'illusion du produit frais ?

PARTIE C : Prise en compte de la réglementation sanitaire

Initialement, la concentration bactérienne dans les pièces de viande congelées utilisées par la société agroalimentaire est estimée à 50 bactéries par gramme.

On admet qu'à partir du moment où la viande est décongelée, les bactéries reprennent leur prolifération et que, tant que la viande est laissée dans une zone du réfrigérateur maintenue à 2°C, la vitesse de croissance de la concentration bactérienne à l'instant t (exprimé en heure) est modélisée sur l'intervalle $[0; +\infty[$ par

$$v(t) = 3e^{0,06t}$$

La concentration bactérienne (exprimée en bactéries par gramme) de la viande à l'instant t est donc modélisée par la primitive G_0 de la fonction v qui vérifie $G_0(0) = 50$.

1. Détermination de la fonction G_0

a) Déterminer les primitives G de la fonction v .

b) En déduire l'expression de $G_0(t)$ pour t supérieur ou égal à 0.

2. Le niveau de tolérance fixé par la réglementation sanitaire de plusieurs pays est de 100 bactéries par gramme pour la viande que l'on cuisine.

Un lot de pièces de viande termine sa décongélation à 18 h, un soir de la semaine.

Si les employés le laissent au réfrigérateur, à 2°C, et ne le cuisinent que le lendemain à 8 h, la réglementation sanitaire de ces pays sera-t-elle respectée ?

EXERCICE 2 (10 points)

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 **les étapes de la démarche suivie**.

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

Une usine fabrique en série des pompes de surface destinées à l'irrigation agricole.

Le cahier des charges demande que ces pompes aient un débit de $6 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ (6 mètres cubes par heure) avec une tolérance de $\pm 0,25 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.

En sortie de chaîne de fabrication, une pompe peut présenter deux types de défauts indépendants : un défaut de débit et un défaut mécanique.

PARTIE A : le défaut mécanique

Une étude statistique permet d'estimer que 1 % des pompes fabriquées présente un défaut mécanique.

Les pompes sont conditionnées par caisses de cinquante.

On considère, pour l'étude, que la constitution d'une caisse peut être assimilée à un prélèvement au hasard et avec remise de cinquante pompes dans la production, très importante, de l'usine.

On note X la variable aléatoire qui, à chaque caisse de cinquante pompes, associe le nombre de pompes présentant un défaut mécanique.

1. Justifier que X suit une loi binomiale et préciser les paramètres de cette loi.

2. a) Calculer la probabilité qu'une caisse contienne une pompe présentant un défaut mécanique. Arrondir le résultat au millième.

b) Calculer la probabilité qu'une caisse contienne au moins deux pompes présentant un défaut mécanique. Arrondir le résultat au millième.

3. On décide d'approcher la loi de X par une loi de Poisson de paramètre λ .

a) Quelle valeur du paramètre λ choisit-on ? Justifier.

b) On note Y une variable aléatoire suivant une loi de Poisson de paramètre λ .

En utilisant la variable aléatoire Y , estimer la probabilité qu'une caisse contienne au moins quatre pompes présentant un défaut mécanique. Arrondir le résultat au millième.

PARTIE B : le défaut de débit

Une pompe est conforme au cahier des charges pour le débit si celui-ci est compris entre $5,75 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ et $6,25 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Dans le cas contraire, la pompe présente un défaut de débit.

On note Z la variable aléatoire qui associe à chaque pompe produite son débit exprimé en $\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. On suppose que la variable aléatoire Z suit une loi normale de moyenne $m = 6$ et d'écart type $s = 0,15$.

Calculer la probabilité qu'une pompe, prélevée au hasard dans la production, présente un défaut de débit. Arrondir le résultat au millième.

PARTIE C : estimation du débit moyen des pompes d'une livraison

Une entreprise commande un nombre important de pompes.

Lors de la livraison, le service qualité de l'entreprise cherche à estimer la moyenne inconnue μ exprimée en $\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, des débits des pompes qui lui sont livrées à partir de mesures faites sur un échantillon de cinquante pompes prises dans la livraison.

On considère que cet échantillon peut être assimilé à un prélèvement au hasard et avec remise de cinquante pompes dans la livraison.

1. Les résultats des mesures effectuées sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Débit en $\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$	5,7	5,8	5,9	6,0	6,1	6,2	6,3
Nombre de pompes	9	8	10	9	10	3	1

Calculer la moyenne et l'écart type de la série de mesures ci-dessus. On arrondira l'écart-type au millième.

2. On note \bar{X} la variable aléatoire qui, à chaque échantillon de 50 pompes choisies au hasard dans la livraison, associe la moyenne des débits de ces 50 pompes, exprimée en $\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.

On admet que \bar{X} suit la loi normale de moyenne inconnue μ et d'écart type $\frac{0,16}{\sqrt{50}}$.

a) Déterminer un nombre a tel que $P(\mu - a \leq \bar{X} \leq \mu + a) = 0,95$.

Donner une valeur approchée au millième par excès de a .

b) Donner un intervalle de confiance de la moyenne μ des débits des pompes livrées avec un coefficient de confiance supérieur ou égal à 95% .

Sujet de sciences physiques et chimiques 2014

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. ÉTUDE D'UN FILAMENT DE MYCÉLIUM (15 points)

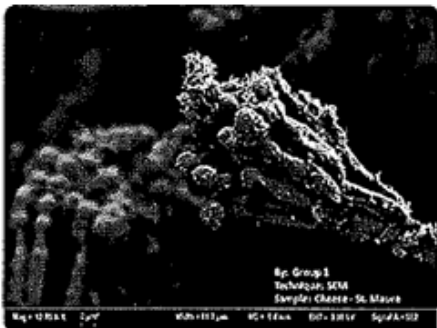
L'artisan fromager démontre tout son savoir-faire lorsqu'il fabrique du camembert. La production de ce type de fromage exige une bonne maîtrise des techniques de fabrication car elle se base sur l'apport d'une flore bien particulière, c'est-à-dire les levures et les moisissures. Cette flore fongique est responsable de l'apparence et du goût caractéristiques du fromage camembert. Il devient donc primordial d'être en mesure de suivre l'évolution de cette flore au cours de la maturation et de détecter rapidement la présence de contaminants. [.....]

L'élaboration de l'aspect, de la texture, du goût et des arômes caractéristiques des fromages repose le plus souvent sur l'activité des microorganismes.

Pour un fromage de type camembert, certains microorganismes comme *Penicillium Camemberti* sont typiques de la phase de maturation.

Le *Penicillium Camemberti* dont chaque spore a un diamètre de l'ordre de 4,0 μm est caractérisé par ses filaments de mycélium qui se développent en un feutrage blanc. Ce dernier transforme la surface du camembert en croûte, son cœur en pâte molle voire coulante.

D'après : [http://www.novalait.ca/pdf/Articles et autres documents/2009-2010/2009-09 Les fromages a pates molles sous la loupe.pdf](http://www.novalait.ca/pdf/Articles%20et%20autres%20documents/2009-2010/2009-09%20Les%20fromages%20a%20pates%20molles%20sous%20la%20loupe.pdf)



Structure en pinceau de *Penicillium Camemberti*

D'après : <http://www.gurumed.com/2011/02/13/paysages-microbiens-le-paradis-des-champignons>

On se propose d'observer une spore de *Penicillium Camemberti* à l'aide d'un microscope dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Objectif : lentille L_1 de centre optique O_1 , de distance focale $f'_1 = 4,0 \text{ mm}$;
- Oculaire : lentille L_2 de centre optique O_2 de distance focale $f'_2 = 2,0 \text{ cm}$;
- Intervalle optique Δ de cet instrument est de $\Delta = \overline{F'_1 F_2} = 16,0 \text{ cm}$;
- Distance minimale de vision distincte pour un œil normal : $d_m = 25 \text{ cm}$;
- Grossissement commercial du microscope: $G_c = \frac{\Delta \times d_m}{f'_1 \times f'_2} = \frac{\theta'}{\theta}$

Données :

Pouvoir de résolution de l'œil : $\theta_m = 3 \cdot 10^{-4} \text{ rad}$

Indice de réfraction de l'air : $n_{\text{air}} = 1,00$

1. La spore de *Penicillium Camemberti* à observer sera notée AB dans la suite de l'exercice.

1.1 - Quelle doit être la position de l'image intermédiaire A_1B_1 , de l'objet AB, donnée par L_1 , pour qu'un observateur puisse observer l'image définitive A'B' à l'infini ?

1.2 - Quelle est la nature de l'image intermédiaire A_1B_1 ? Préciser ses caractéristiques.

1.3 - Faire un schéma clair du microscope, sans soucis d'échelle, représentant la situation proposée ci-dessus.

2 - Calculer la valeur du grossissement commercial G_c du microscope.

3 - Calculer l'angle θ sous lequel on voit à l'œil nu une spore de *Penicillium Camemberti* située à 25 cm de l'œil. Faire un schéma simple permettant d'expliquer votre démarche.

4 - Calculer l'angle θ' sous lequel on voit cette même spore à travers le microscope.

5 - Comparer θ et θ' au pouvoir de résolution de l'œil θ_m puis conclure.

6 - Le pouvoir de résolution d'un microscope est limité par le phénomène de diffraction. La dimension AB_{\min} du plus petit objet observable est donnée par la relation :

$$AB_{\min} = \frac{1,22 \times \lambda}{2 \times n \times \sin u}$$

λ : longueur d'onde de la radiation utilisée (en m)

$n \times \sin u$: ouverture numérique de l'objectif

6-1 - Calculer la dimension AB_{\min} lorsque l'objet est dans l'air, la longueur d'onde de la lumière utilisée étant $\lambda = 555,0$ nm et l'angle u valant 60° .

6-2 - Est-il possible d'observer la spore de *Penicillium Camemberti* à travers le microscope utilisé? Justifier la réponse.

6.3 - Les grandeurs u et λ étant maintenues constantes, justifier l'utilisation d'un bain d'huile afin d'améliorer ce pouvoir séparateur ?

B. SPECTROPHOTOMÉTRIE (15 points)

La liqueur de Dakin a été mise au point lors de la première guerre mondiale pour soigner les plaies infectées des soldats. Elle constitue un antiseptique efficace encore commercialisé de nos jours.

Parmi les différents constituants de la liqueur de Dakin, on trouve l'hypochlorite de sodium qui en est le principe actif ainsi que le permanganate de potassium qui sert à le stabiliser tout en lui donnant sa couleur rosée. La concentration en permanganate de potassium dans la liqueur de Dakin est égale à 10 mg.L^{-1} .

Dans cet exercice, on contrôle par une méthode spectrophotométrique la concentration en permanganate de potassium d'une solution commerciale de liqueur de Dakin ouverte depuis plusieurs semaines.

Le spectrophotomètre utilisé comporte une source de lumière polychromatique et un réseau possédant 8.10^5 traits par mètre. Il est muni d'une cuve de longueur l égale à 1 cm.

Données:

Longueurs d'ondes dans le spectre visible :

Couleur	VIOLET	BLEU	VERT	JAUNE	ORANGE	ROUGE
Longueur d'onde (nm)	380	450	495	590	620	750

- Masse molaire du permanganate de potassium KMnO_4 : $M(\text{KMnO}_4) = 158,0 \text{ g.mol}^{-1}$
- Coefficient d'absorption linéique molaire du permanganate dans l'eau à 25°C pour $\lambda = 525 \text{ nm}$: $\varepsilon = 225 \text{ mol}^{-1}.\text{m}^2$

- 1 -
- 1.1 - Donner l'expression littérale de la relation traduisant la loi de Beer-Lambert et expliciter chacune des grandeurs.
- 1.2 - Préciser pour chaque grandeur son unité dans le système international.
- 2 - Indiquer le rôle du réseau présent dans le spectrophotomètre.
- 3 - Justifier le choix d'une longueur d'onde λ de travail du spectrophotomètre égale à 525 nm.
- 4 - La mesure de l'absorbance A de la liqueur de Dakin est égale à 0,103. En déduire la valeur de la concentration molaire en permanganate de potassium de la solution commerciale.
- 5 - Montrer que la concentration massique en permanganate de potassium de la solution testée vaut $C_m = 7,24 \text{ mg.L}^{-1}$
- 6 -
- 6.1 - Calculer l'écart relatif en % entre la valeur de la concentration massique en permanganate de potassium donnée à la question 5 et celle attendue.
- 6.2 - Commenter le résultat obtenu à la question 6-1 et proposer une interprétation.

C. THERMOCHIMIE (15 points)

En 1909, le chimiste allemand Fritz Haber réussit à synthétiser de l'ammoniac gazeux par réaction du diazote gazeux sur le dihydrogène gazeux. Cette synthèse, réalisée à $T = 450^\circ\text{C}$ avec un catalyseur à base de fer, a pour équation : $\text{N}_{2(\text{g})} + 3\text{H}_{2(\text{g})} = 2\text{NH}_{3(\text{g})}$.

La synthèse de l'ammoniac a eu une importance capitale car elle a permis la production à grande échelle d'engrais azotés permettant de nourrir une population mondiale toujours croissante. Fritz Haber reçut ainsi le prix Nobel de chimie en 1918.

Cet exercice propose de montrer que cette réaction est thermodynamiquement possible et de comprendre le choix de la température utilisée pour cette synthèse.

Données :

- Enthalpies standard de formation et entropies standard absolues de certains composés à la température $T = 298 \text{ K}$.

Composés	$\text{N}_{2(\text{g})}$	$\text{H}_{2(\text{g})}$	$\text{NH}_{3(\text{g})}$
$\Delta_f H^\circ (\text{kJ.mol}^{-1})$	0	0	-46,19
$S^\circ (\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1})$	191,5	130,6	192,5

- Constante des gaz parfaits : $R = 8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

- 1 -
- 1.2 - Exprimer puis calculer l'enthalpie standard de réaction, notée $\Delta_r H^\circ$, de la réaction de synthèse de l'ammoniac à la température $T = 298 \text{ K}$.
- 1.3 - La réaction est-elle endothermique ou exothermique à cette température ? Justifier la réponse.
- 2 -
- 2.1 - Exprimer puis calculer l'entropie standard de réaction, notée $\Delta_r S^\circ$ de l'ammoniac à la température $T = 298 \text{ K}$ de la réaction de synthèse
- 2.2 - Montrer qu'il était possible, à partir de l'équation-bilan de la réaction, de prévoir le signe de l'entropie standard de réaction $\Delta_r S^\circ$

3 -

3-1 - Montrer que l'enthalpie libre standard de réaction, notée $\Delta_r G^0$ de la réaction de synthèse de l'ammoniac à la température $T = 298 \text{ K}$ est égale à $-3,329 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$

3.2 - Dans les conditions standards, la réaction est-elle thermodynamiquement possible ou thermodynamiquement impossible ? Justifier la réponse

3.3.1- Exprimer et calculer la valeur de la constante d'équilibre, notée K , associée à la réaction de synthèse de l'ammoniac à 298 K .

3.3.2 - La valeur trouvée est-elle en accord avec la réponse à la question **3-2** ? Justifier la réponse.

4. -

4.1 Quelle est l'influence d'une augmentation de pression sur l'équilibre étudié ? Justifier la réponse.

4.2 - Faut-il augmenter ou abaisser la température pour favoriser la réaction dans le sens direct ? Justifier la réponse.

4.3 - Expliquer alors le choix d'une température $T = 450^\circ\text{C}$ pour effectuer la synthèse de l'ammoniac.

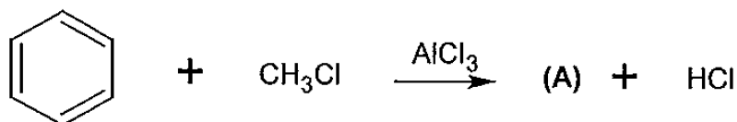
D. PRÉPARATION DE LA PROCARBAZINE (15 points)

La Procarbazine est le principe actif d'un médicament qui détruit ou empêche la prolifération des cellules cancéreuses. Ce composé, dérivé de la méthylhydrazine, comporte un noyau benzénique et une fonction amide.

Dans cet exercice, on étudie quelques étapes de la synthèse de ce composé afin d'en déterminer la formule semi-développée.

Étape n° 1 :

Au cours de cette étape, il se forme un composé (A). La réaction mise en jeu a pour équation :



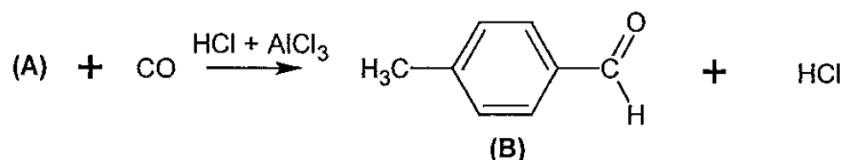
1.1 - Donner la formule semi-développée de la molécule (A) et la nommer.

1.2 - Préciser le rôle joué par le trichlorure d'aluminium AlCl_3 au cours de cette réaction.

1.3 - Proposer un mécanisme réactionnel pour cette substitution électrophile.

Étape n° 2 :

Le composé (A) obtenu lors de l'étape n° 1 réagit avec le monoxyde de carbone pour donner un mélange de deux composés isomères appelés (B) et (B'). L'isomère (B) est obtenu majoritairement selon l'équation :



Le monoxyde de carbone en présence de chlorure d'hydrogène et de trichlorure d'aluminium réagit comme le chlorure de méthanoyle.

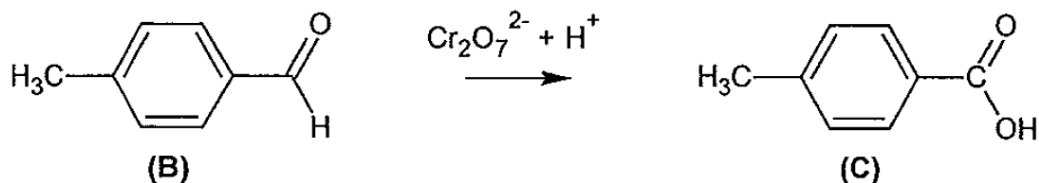
2.1 - Donner la formule semi-développée du chlorure de méthanoyle.

2.2 - Justifier l'existence des deux composés isomères (B) et (B').

2.3 - Donner la formule semi-développée de la molécule (B').

Étape n° 3 :

Le composé (B) obtenu lors de l'étape n° 2 réagit avec le dichromate de potassium en milieu acide pour donner un composé (C) selon le schéma réactionnel ci-dessous :

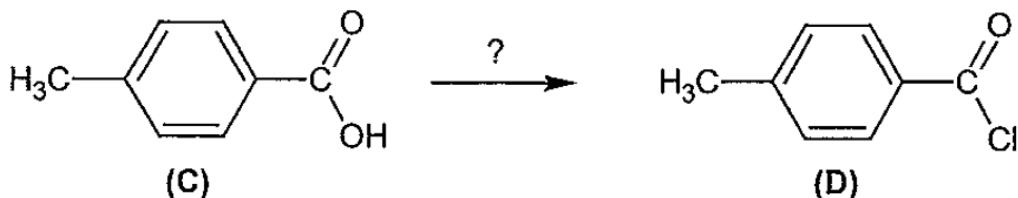


3.1 - Écrire les demi-équations électroniques des deux couples rédox intervenant, puis l'équation-bilan de la réaction. On rappelle que le couple $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}/\text{Cr}^{3+}$ est mis en jeu.

3.2 - Nommer le composé (C) en utilisant les règles de la nomenclature officielle.

Étape n° 4 :

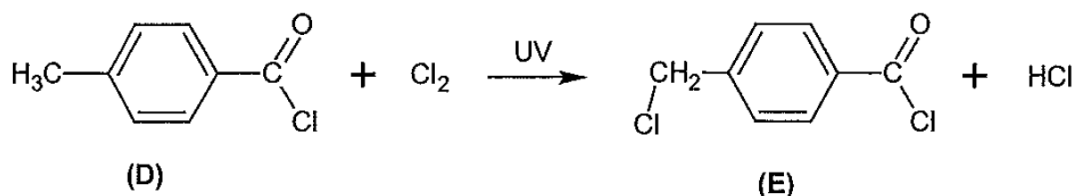
Le composé (C) est transformé en un composé (D) selon le schéma réactionnel ci-dessous :



4 - Donner la formule et le nom d'un réactif permettant de réaliser cette transformation.

Étape n° 5 :

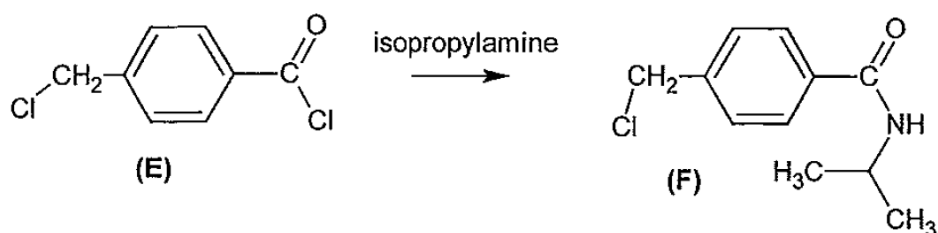
Le composé (D) obtenu lors de l'étape n° 4 réagit avec le dichlore Cl_2 , en présence de lumière pour donner le composé (E). La réaction mise en jeu a pour équation :



5 - Choisir, parmi les termes qui suivent, celui (ou ceux) qui caractérise(nt) la réaction étudiée : *addition - élimination - substitution - nucléophile - électrophile - radicalaire*.

Étape n° 6 :

Le composé (E) obtenu lors de l'étape n° 5 réagit avec l'isopropylamine pour donner le composé (F) selon le schéma réactionnel suivant :

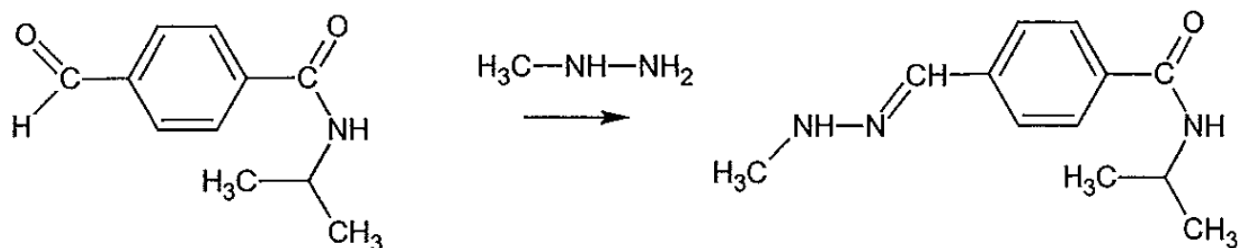
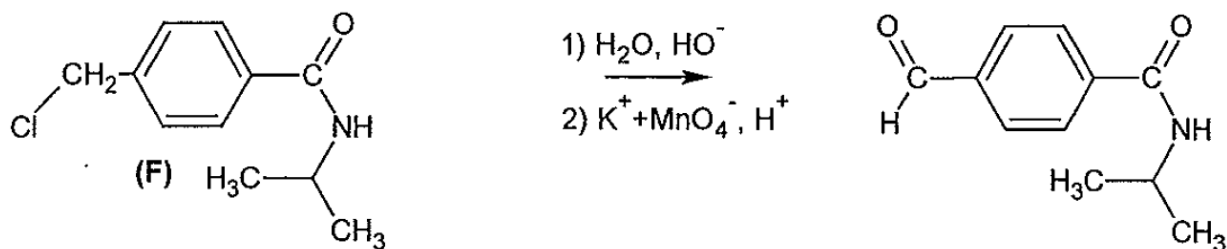


6.1 - Donner la formule semi-développée de l'isopropylamine.

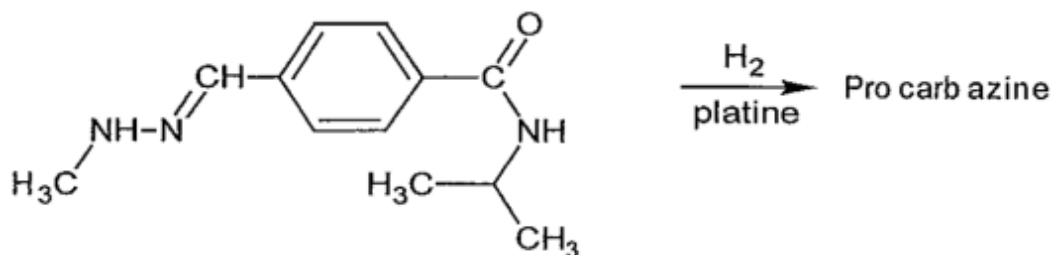
6.2 - Nommer la nouvelle fonction contenue dans le composé (F).

Étape n° 7 - Fin de la synthèse:

Les dernières étapes de la synthèse étudiée sont les suivantes :



La dernière étape de la synthèse est une réaction d'hydrogénation qui conduit à la Procarbazine :



7 - Donner la formule semi-développée de la Procarbazine.

Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2014

Calculatrice autorisée

LES ARÔMES ALIMENTAIRES

Les arômes contribuent aux propriétés organoleptiques d'une denrée alimentaire. L'analyse des arômes est donc un enjeu majeur pour l'industrie agroalimentaire puisqu'elle conditionne l'acceptabilité de l'aliment par le consommateur. En recherche et développement, l'analyse des arômes naturels a pour but d'identifier les composés aromatisants caractéristiques. L'étude des arômes synthétiques a pour principal objectif de développer des techniques d'extraction et d'analyse qui seront ensuite utilisées par le laboratoire de contrôle qualité.

1 - Voies métaboliques de biosynthèse des arômes (32 points)

Les composés aromatisants peuvent être synthétisés à partir de plusieurs voies cataboliques : celle des glucides, des lipides, des acides aminés.

1.1 - Arôme issu du catabolisme des glucides

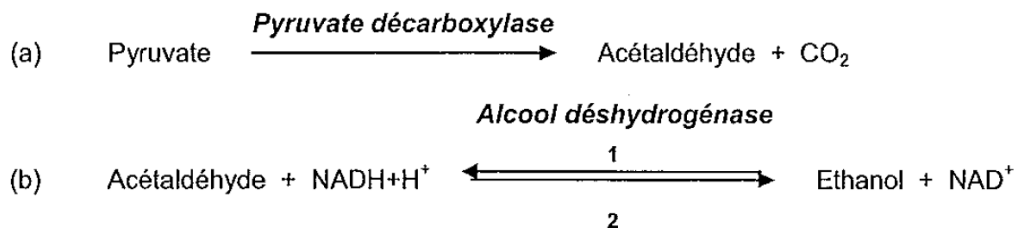
Dans les produits laitiers frais, les arômes sont issus en partie de la dégradation du lactose présent dans le lait. Son entrée dans les bactéries lactiques capables de l'assimiler provoque l'apparition d'un excès d'acide pyruvique dans la cellule.

1.1.1 - Écrire la réaction d'hydrolyse du lactose en indiquant les formules semi-développées ainsi que l'enzyme impliquée.

1.1.2 - La voie métabolique conduisant à la synthèse d'acide pyruvique est présentée dans le **document 1**. Compléter ce document en précisant le nom de la voie.

1.1.3 - Chez certaines souches bactériennes, le pyruvate synthétisé peut servir à la production d'acétaldéhyde (composé qui donne une sensation de fraîcheur au yaourt) et d'éthanol par fermentation alcoolique.

La séquence réactionnelle aboutissant à la synthèse d'acétaldéhyde (éthanal) puis d'éthanol à partir du pyruvate est la suivante :



1.1.3.1 - Calculer la variation d'enthalpie libre standard $\Delta G'^0$ de la réaction (b) et justifier le sens thermodynamiquement favorisé (1 ou 2) dans les conditions standards.

Données : $F = 96500 \text{ C}$
 $n = 2$
 Potentiels rédox standards à pH 7 et à 37°C : Acétaldéhyde/éthanol = - 0,197 V
 $\text{NAD}^+/\text{NADH} = - 0,320 \text{ V}$.

1.1.3.2 - À partir du résultat précédent, calculer la constante d'équilibre K'_{eq} de la réaction (b) à pH 7 et à 37°C. Le résultat obtenu confirme-t-il le sens thermodynamique précédemment justifié ?

Données : $R = 8,32 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

1.1.4 - Écrire la réaction bilan du catabolisme du glucose par fermentation alcoolique.

1.1.5 - La variation d'enthalpie libre standard, $\Delta G'^0$, de la réaction de fermentation alcoolique à partir du glucose étant de $- 166 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, calculer le rendement énergétique de la fermentation du glucose en éthanol

Donnée : Variation d'enthalpie libre standard d'hydrolyse de l'ATP en ADP : $\Delta G'^0 = - 30,2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

1.2 - Arômes issus du catabolisme des lipides

Les composés les plus fréquemment à l'origine des arômes sont les acides gras ayant subi une β -oxydation. Dans certains cas, leur β -oxydation est incomplète. Elle libère des méthylcétones participant à la note aromatique des fromages.

Il est possible de suivre l'accroissement de la production d'une méthylcétone : l'heptan-2-one en cultivant des spores de *Penicillium camembertii* dans un milieu de culture à base de lait contenant de l'acide palmitique comme substrat énergétique. Les résultats obtenus sont consignés dans le document 2.

1.2.1 - Analyser ce document.

1.2.2 - À partir des concentrations massiques, calculer le rendement de conversion de l'acide palmitique en heptan-2-one après 400 minutes de fermentation.

1.2.3 - Proposer une hypothèse pour expliquer la baisse de concentration en heptan-2-one après 400 minutes.

Données : $M_{\text{acide palmitique}} = 256 \text{ g.mol}^{-1}$
 $M_{\text{heptan-2-one}} = 114 \text{ g.mol}^{-1}$

1.3 - Arômes issus du catabolisme des acides aminés

Les acides aminés sont également des sources d'arômes importantes, particulièrement dans les produits fermentés.

1.3.1 - La voie de dégradation la plus commune chez les levures est la voie d'Ehrlich qui met en œuvre une étape de transamination conduisant à un α -cétoacide.

Citer un exemple de transamination conduisant à un α -cétoacide (indiquer le nom des substrats, produits, enzyme et coenzyme impliqués; formules chimiques non exigées).

1.3.2 - La méthionine est un précurseur de composés aromatisants importants dans certains fromages. Chez certaines bactéries, cet acide aminé est synthétisé à partir d'aspartate et implique une enzyme clé : l'aspartokinase.

La thréonine est un effecteur de cette voie de biosynthèse.

Le **document 3** représente la cinétique de l'aspartokinase en fonction de la concentration en aspartate en présence ou en absence de thréonine.

1.3.3.1 - Commenter l'allure de la courbe 1 du **document 3**.

En déduire les caractéristiques structurales et cinétiques de l'aspartokinase.

1.3.3.2 - À l'aide de la courbe 2 du **document 3**, expliquer l'effet de la thréonine sur l'aspartokinase.

2 - Analyse de composés aromatisants de l'abricot (28 points)

La qualité de l'analyse des composés aromatisants dépend fortement de la méthode d'extraction utilisée pour récupérer la totalité des composés, sans induire de réactions biochimiques ou de dégradations thermiques.

2.1 - Mise au point d'une technique de micro extraction en phase solide (SPME) des composés aromatisants de l'abricot

La SPME est devenue en quelques années une technique incontournable pour permettre l'analyse des arômes. Son principe et la technique utilisée pour extraire les composés aromatisants de l'abricot sont résumés dans le **document 4**.

2.1.1 - Détermination du temps d'extraction.

Cinq temps d'extraction ont été testés : $\Delta t = 5, 15, 20, 30$ et 40 minutes.

Les résultats d'extraction obtenus pour cinq composés aromatisants de l'abricot (hexylacetate, γ -decalactone, benzaldéhyde, linalool et β -ionone) sont représentés dans le **document 5**.

Analyser ces résultats et conclure sur le temps d'extraction le plus approprié pour extraire la majorité des composés.

2.1.2 - Choix de la fibre d'extraction.

3 types de fibres ont été testés :

- PDMS : polydiméthylsiloxane
- PDMS/DVB : polydiméthylsiloxane/divinylbenzène
- CAR/PDMS : carboxen/ polydiméthylsiloxane

La concentration des 5 composés extraits par ces 3 types de fibre est représentée dans le **document 6**. Analyser les résultats et conclure quant à la fibre la plus appropriée pour l'extraction de ces composés.

2.2 - Analyses quantitatives de composés aromatisants d'une variété d'abricot**2.2.1 - Dosage du benzaldéhyde par chromatographie en phase gazeuse.**

2.2.1.1 - Les conditions utilisées en CPG pour l'analyse quantitative de ces composants aromatiques sont présentées dans le **document 7**.

2.2.1.1.1 - Définir le terme "colonne capillaire".

2.2.1.1.2 - Quel est l'intérêt du gradient de température en CPG ?

2.2.1.2 - Le dosage du benzaldéhyde se fait par étalonnage externe.

Une courbe d'étalonnage a été établie en injectant successivement 4 solutions étalons de benzaldéhyde à l'aide d'une seringue SPME dans les mêmes conditions expérimentales que la solution à analyser.

Solutions étalons n°	1	2	3	4
Concentration massique en benzaldéhyde en mg.L ⁻¹	4	8	12	16
Aire des pics x 10 ⁴ (UA)	4,82	9,66	14,45	19,26

2.2.1.2.1 - Expliquer pourquoi l'étalonnage externe est possible en CPG par la technique SPME.

2.2.1.2.2 - A partir du tableau précédent et du **document 8**, déterminer la concentration massique en benzaldéhyde.

2.2.2.2.3 - La teneur en benzaldéhyde déterminée expérimentalement dans la purée d'abricot équivaut à 12,6 ppm.

Quel critère de qualité permet d'apprécier l'écart entre la valeur mesurée et la valeur de référence ?

Évaluer ce critère par un calcul et conclure.

Données :

- Valeur de référence de la teneur en benzaldéhyde pour la variété d'abricot *Rouge du Roussillon* : 12,7 ppm.
- ppm = partie par million.

2.2.2 - Dosage de la fraction glucose de composés aromatiques glycosylés par méthode enzymatique.

Certains composés aromatiques glycosylés ont pu être mis en évidence. Ils intéressent particulièrement les industries agroalimentaires car ils sont considérés comme des précurseurs potentiels d'arômes volatils intéressants, car libérables à la suite de traitements industriels.

On se propose de déterminer la teneur en glucose de ces dérivés glycosylés par enzymologie. Le dosage est réalisé selon le protocole indiqué dans le **document 9**.

2.2.2.1 - De quelle méthode de dosage de substrat s'agit-il ? Justifier la réponse.

2.2.2.2 - Exprimer ΔA (§ 2.4, **document 9**) en fonction de A_1 témoin, A_1 essai, A_2 témoin, A_2 essai

2.2.2.3 - Justifier la valeur du coefficient 0,863 (§ 2.5, **document 9**).

2.2.2.4 - Calculer la concentration massique en glucose dans la fraction (ρ) à partir des résultats expérimentaux suivants :

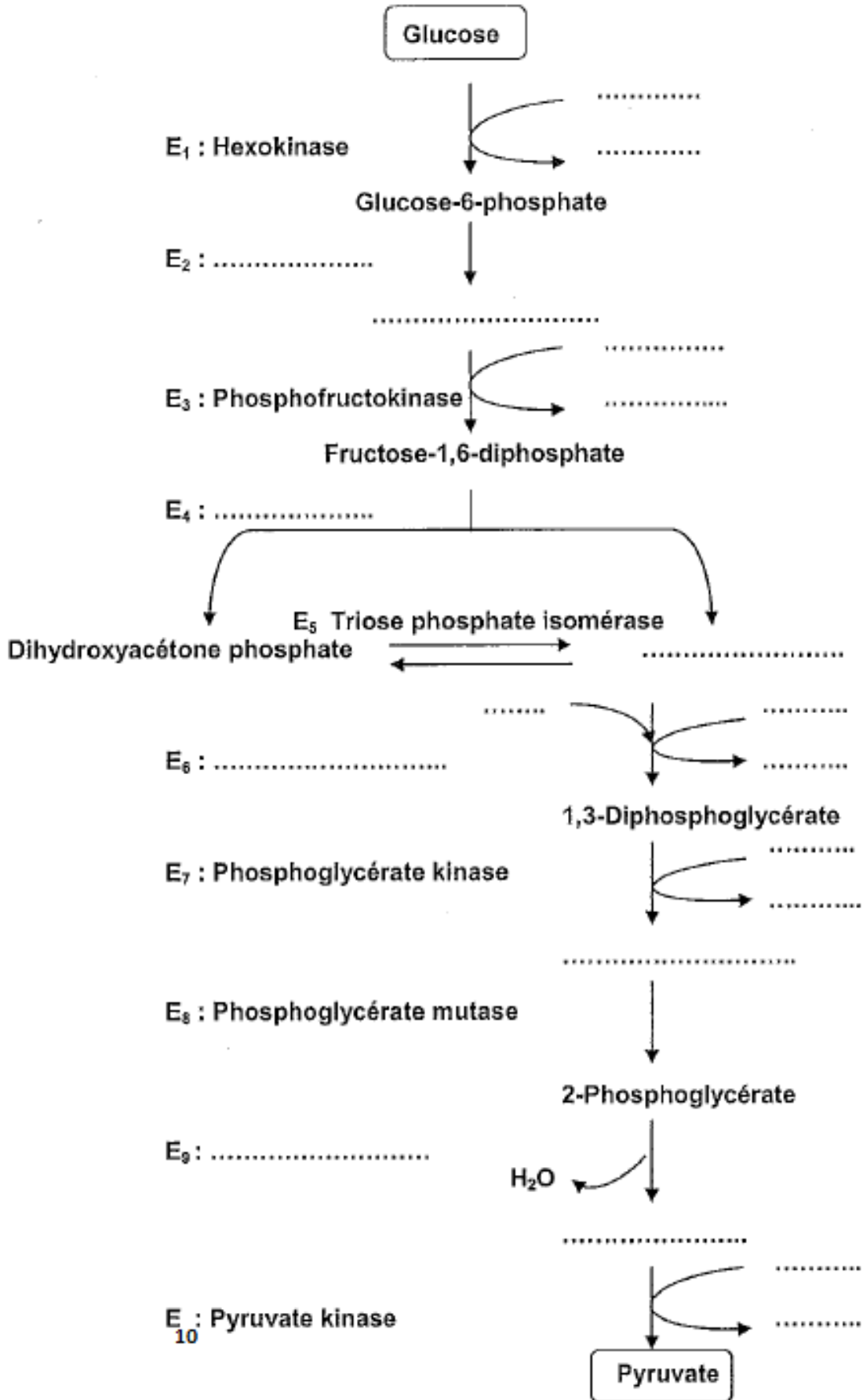
Témoin : $A_1 = 0,107$ $A_2 = 0,111$

Essai : $A_1 = 0,122$ $A_2 = 0,595$

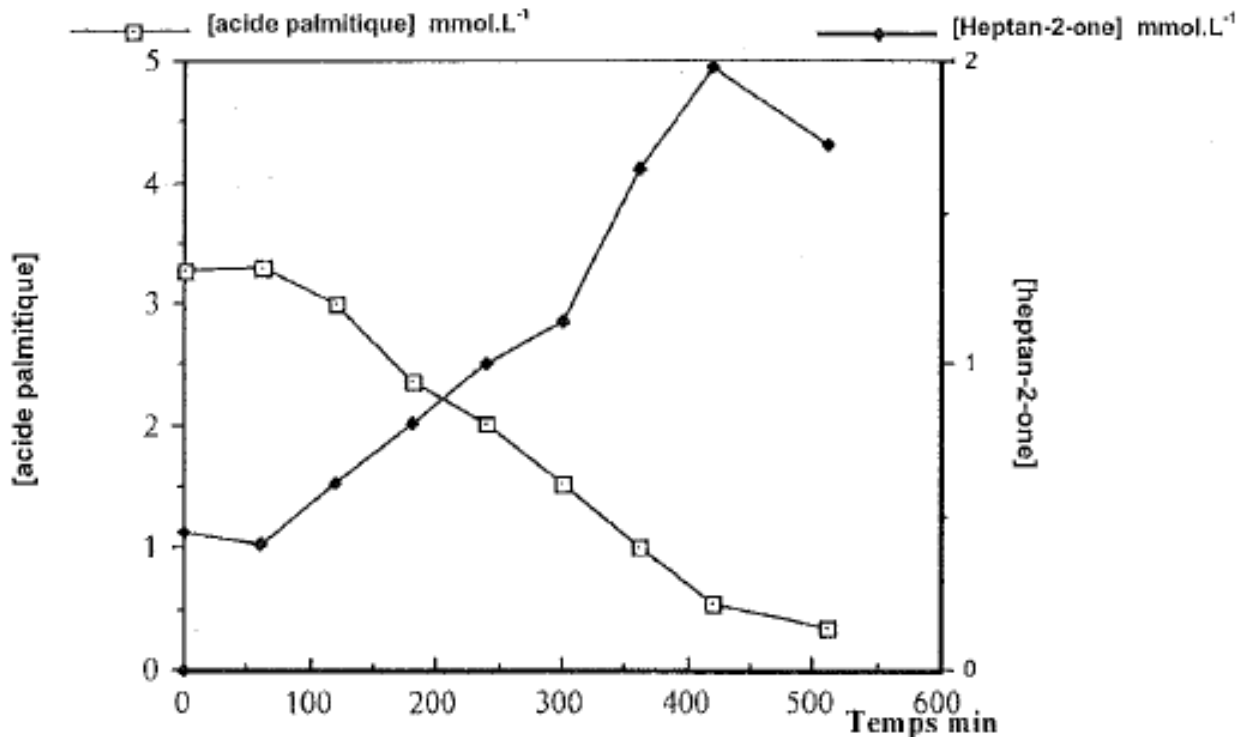
2.2.2.5 - A partir du protocole d'extraction présenté dans le **document 9**, déterminer la teneur en résidus glucose des composés aromatiques glycosylés en mg de glucose par kg d'abricot.

Donnée : $uc = 5 \text{ mg.kg}^{-1}$

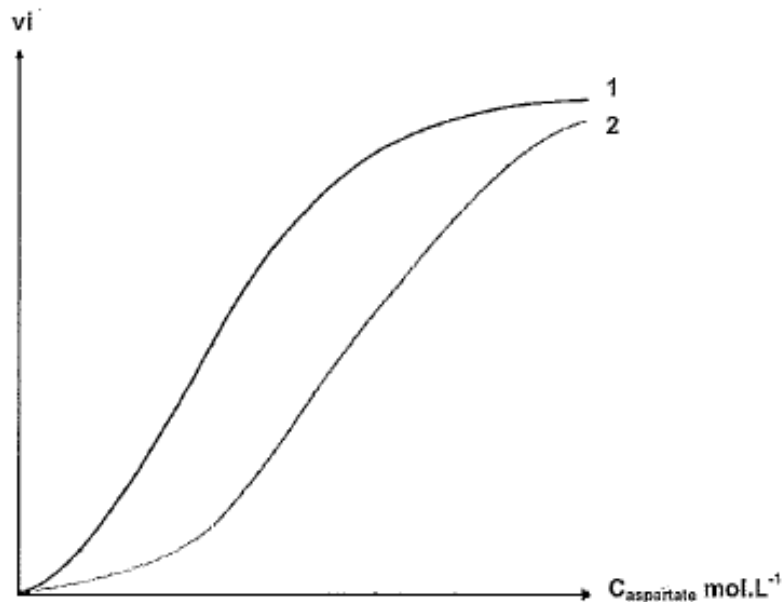
**DOCUMENT 1 : VOIE DE DÉGRADATION DU GLUCOSE
À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE**



DOCUMENT 2: PRODUCTION D'HEPTAN-2-ONE A PARTIR D'ACIDE PALMITIQUE PAR *PENICILLIUM CAMENRBERYTII*



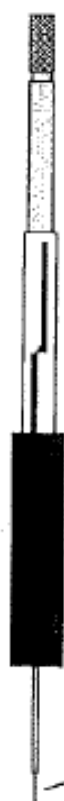
DOCUMENT 3 : CINÉTIQUE DE L'ASPARTOKINASE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ASPARTATE EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE THREONINE



Courbe 1 : en absence de thréonine
 Courbe 2 : à une concentration en thréonine = $0,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹

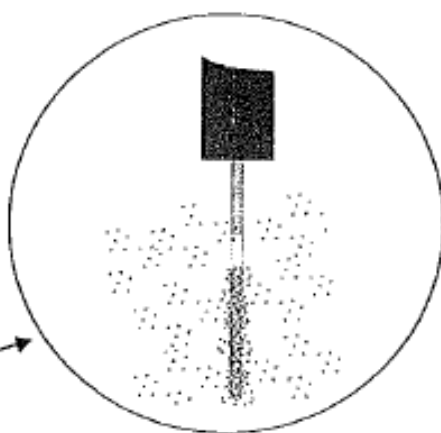
DOCUMENT 4 : MICRO-EXTRACTION EN PHASE SOLIDE (SPME) DES COMPOSANTS AROMATIQUES DE L'ABRICOT

1 - Principe

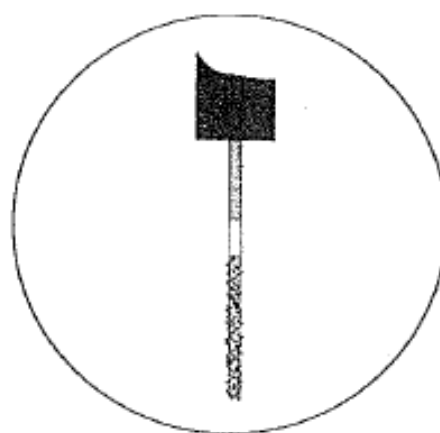


Le support est une fibre en silice fondue, placée à l'intérieur d'une aiguille creuse amovible. Sur cette fibre est greffée une phase stationnaire. La fibre est plongée dans la solution analysée. Les composés aromatiques vont s'adsorber sur la phase stationnaire selon leur polarité respective. Après un temps de contact suffisant et des conditions expérimentales bien définies, il s'établit un équilibre de partage entre la phase solide constituée par la fibre et la phase liquide de la solution analysée. La quantité d'analyte adsorbée est alors fonction de sa concentration dans la solution analysée.

La fibre est ensuite rétractée dans l'aiguille et retirée de l'échantillon pour être directement placée dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse. Les analytes sont alors thermiquement désorbés et vaporisés pour être transportés vers la colonne par le gaz vecteur.



en cours d'extraction



en fin d'extraction

2 - Mode opératoire

Peser et mixer $m = 50$ g d'abricots pour obtenir une purée d'abricot soit $V_{\text{purée}} = 48$ mL.

Placer la purée d'abricot dans un flacon, puis refermer hermétiquement le flacon à l'aide d'un septum en téflon.

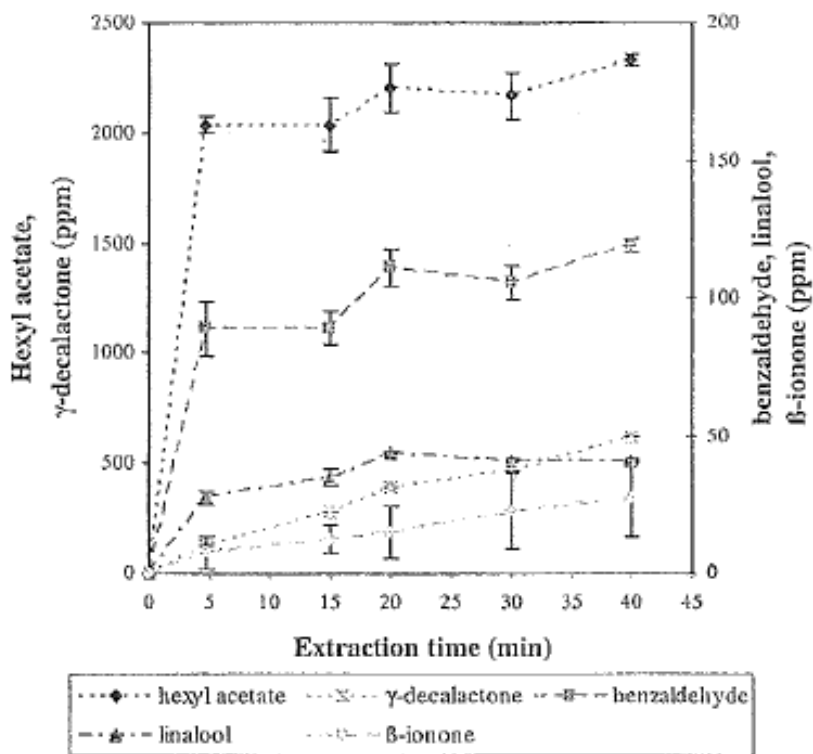
Percer le septum à l'aide de l'aiguille SPME pour mettre en contact la phase stationnaire avec l'échantillon.

Laisser l'adsorption des analytes se réaliser à 40°C pendant un certain temps Δt .

Retirer l'aiguille de l'échantillon.

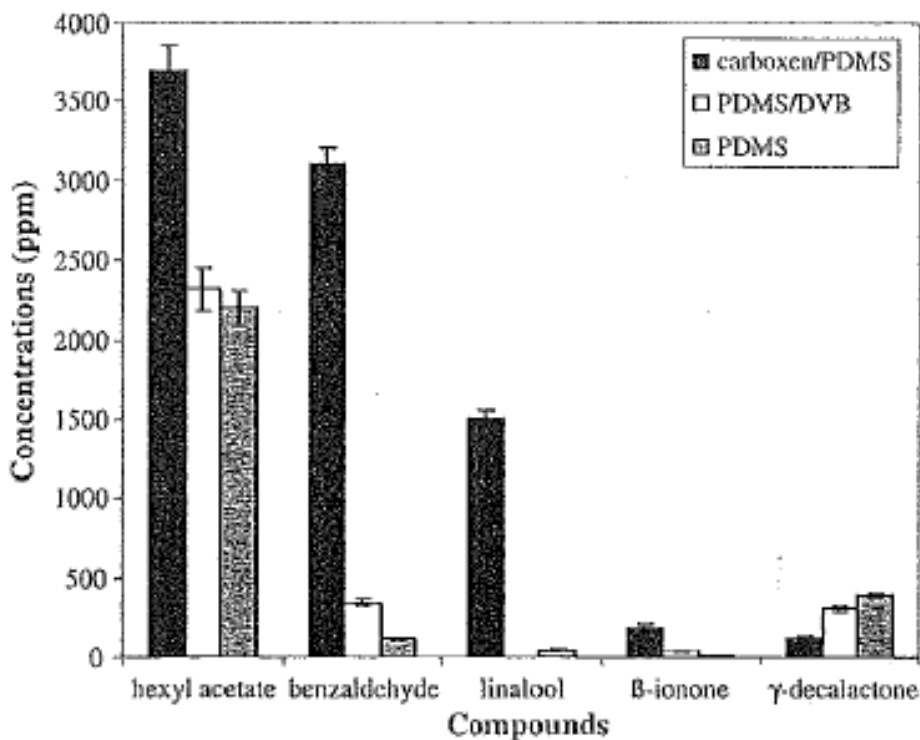
Désorber les analytes en plaçant l'aiguille pendant 4 minutes dans l'injecteur du chromatographe chauffé à 250°C .

DOCUMENT 5 : EXTRACTION DE CINQ COMPOSÉS AROMATISANTS DE L'ABRICOT



S. Guillot et al Food Chemistry 96 (2006) 147-155

DOCUMENT 6 : ÉTUDE DU TYPE DE FIBRES D'EXTRACTION



S. Guillot et al Food Chemistry 96 (2006) 147-155

**DOCUMENT 7 : CONDITIONS UTILISÉES EN CPG POUR L'ANALYSE QUANTITATIVE
DES COMPOSANTS AROMATIQUES**

Injection : injecteur à vaporisation directe dit à septum

Colonne : capillaire en silice fondue

- Caractéristiques :
film de type DB-WAX ; épaisseur 0,25 µm
longueur colonne : 30 m ; diamètre interne : 0,25 µm
- Conditions d'utilisation :
température initiale 60 °C
température finale 250 °C
gradient de température : 5°C.min⁻¹
- Gaz vecteur : Hélium à 1,5 mL.min⁻¹

Détecteur : ionisation de flamme (FID)

**DOCUMENT 8 : IDENTIFICATION PAR CPG DES COMPOSÉS AROMATISANTS DE
L'ABRICOT « ROUGE DU ROUSSILLON »**

Composés	RI	Aire des pics x 104 (UA)
Ethyl acetate	872	23,72
Butyl acetate	990	25,31
Hexanal	1022	25,03
Limonène	1178	8,58
E-hexen-2-al	1223	21,95
<i>p</i> -Cymene	1246	30,53
Hexyl acetate	1308	14,20
6-methyl-5hepten-2-one	1336	13,82
1-hexanol	1345	14,51
Acetic acid	1446	3,05
1-octen-3-ol	1448	1,54
Menthone	1486	1,57
2-ethyl-1-hexanol	1492	3,86
Benzaldéhyde	1500	15,80
Linalool	1540	6,12
β-cyclocitral	1598	2,52
Pugelone	1600	2,00
Z-citral	1666	4,53
E-citral	1718	3,81
Geranyl acetone	1798	3,15
Benzyl alcohol	1866	2,12
β-ionone	1914	0,59
γ-decalactone	2106	1,95

S.Guillot et al Food Chemistry 96 (2006) 147-155

Donnée : RI : Retention index : indice de rétention linéaire des composés calculés à partir d'une série de n-alcanes (C8 à C32)

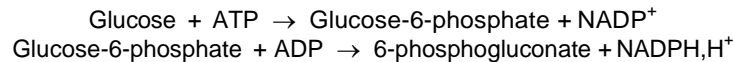
DOCUMENT 9 : EXTRACTION ET DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLUCOSE

1 - Extraction des composés aromatiques glycosylés de l'abricot

- Mixer 50 g d'abricots lavés et dénoyautés en présence d'eau distillée.
- Incuber 90 minutes à 25°C en présence d'un mélange de cellulase (5 g/L), pectinol (2 g/L) et polyvinylpyrrolidone (0,2g/L) et centrifuger à 10 000g pendant 30 minutes.
- Récupérer le surnageant.
- Resolubiliser le précipité dans un volume d'eau distillée (1:1, m/v) et centrifuger la solution dans les mêmes conditions.
- Pooler les 2 surnageants : soit $V_{\text{surnageant}} = 200 \text{ mL}$
- Faire passer 100 mL de surnageant dans une colonne contenant une résine adsorbante non polaire de type XAD-2 à un débit de $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- Rincer par 50 mL d'eau distillée
- Éluer dans un 1^{er} temps les composés volatiles libre par 50 mL de pentane-dichlorométhane (2:1, v/v).
- Rincer par 50 mL d'eau distillée.
- Éluer dans un second temps les composés aromatiques glycosylés par 50 mL de méthanol pur. Filtrer l'éluat obtenu et évaporer le méthanol sous vide à 45 °C.
- Le résidu sec obtenu correspond à la fraction aromatique glycosylée.
- Cette fraction aromatique glycosylée est soumise à une hydrolyse acide par H_2SO_4 à 2,25 mol/L à 100 °C pendant 1 h, puis neutralisée pour le dosage enzymatique : soit $V_{\text{fraction}} = 10 \text{ mL}$

2 - Dosage enzymatique du glucose de la fraction par spectrophotométrie (méthode UV)

2.1- Principe du dosage



La formation de NADPH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm est proportionnelle à la quantité de glucose.

2.2 - Composition des solutions

Solution 1		Solution 2	
tampon triéthanolamine	pH 7,6	Hexokinase	environ 320 U
NADP ⁺	110 mg	Glucose-6-phosphate déshydrogénase	environ 160 U
ATP	260 mg		
Sulfate de magnésium			
Stabilisateurs			

2.3 - Mode opératoire

Longueur d'onde : 340 nm Trajet optique = 1 cm Température 20-25°C Mesure contre l'air

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai
Solution 1	1,00 mL	1,00 mL
Solution essai	-	0,10 mL
Eau bidistillée	2,00 mL	1,90 mL
Mélanger, lire les absorbances A_1 des solutions après 2 minutes environ. Déclencher la réaction par addition de		
Suspension 2	0,02 mL	0,02 mL
Mélanger, attendre la fin de la réaction (environ 15 minutes) et lire les absorbances A_2 des solutions		

2.4 - Calculs: Formule générale (équation aux grandeurs) pour le calcul de la concentration massique en glucose de la solution essai :

$$\rho = \frac{V \times M}{\epsilon \times l \times v} \times \Delta A$$

- ρ = concentration massique de la substance à doser dans la solution essai en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
- V : volume du test
- v : volume de la solution essai
- M : masse molaire de la substance à doser
- ϵ : coefficient d'absorbance linéique molaire du NADPH à 340 nm = $6,3 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- l : longueur du trajet optique = 1 cm

2.5 - Résultats

Dans les conditions décrites, on obtient $\rho = 0,863 \cdot \Delta A$.

Sujet de microbiologie et de technologies d'analyse 2014

Matériel autorisé : Calculatrice et dictionnaire anglais-français

PRÉVENTION DES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES À *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGIQUE

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie fréquente du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. La plupart des souches d'*E. coli* sont sans danger. Certaines souches, cependant, comme les souches entérohémorragiques (ECEH), peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires (TIA) graves. La transmission à l'homme se fait par la consommation d'aliments contaminés, viande hachée crue ou mal cuite, lait cru et légumes consommés crus par exemple.

Son importance pour la santé publique est apparue en 1982, à la suite d'une flambée de TIA aux Etats-Unis. Depuis ces 30 dernières années, les souches d'ECEH sont impliquées dans de nombreuses épidémies alimentaires dans le monde et sont considérées comme une famille de pathogènes émergents.

La prévention des TIA à ECEH inclut notamment :

- l'étude des souches incriminées,
- le développement des méthodes de recherche des ECEH dans les aliments,
- la lutte contre la contamination des animaux par les sérotypes les plus pathogènes, principalement *E. coli* O157:H7.

1 - Étude des souches d'*E. coli* entérohémorragiques (ECEH) (19 points)

L'infection par ECEH peut prendre plusieurs aspects comprenant une simple diarrhée, une colite hémorragique et, pour les cas les plus graves, un syndrome hémolytique et urémique (SHU) touchant principalement les enfants en bas âge.

1.1 - Épidémiologie

En France, le suivi des infections à ECEH est basé, depuis 1996, sur la surveillance du SHU chez l'enfant de moins de 15 ans. Le **document 1** présente quelques données épidémiologiques du SHU observées en France.

1.1.1 - Définir le terme "incidence".

1.1.2 - Analyser et interpréter le **document 1a**.

1.1.3 - Analyser le **document 1b**. Proposer une hypothèse expliquant la variation saisonnière.

1.2 - Caractéristiques et physiopathologie des ECEH

1.2.1 - *Escherichia coli* appartient au groupe des coliformes thermotolérants.

1.2.1.1 - Définir les coliformes thermotolérants.

1.2.1.2 - Indiquer les caractères biochimiques permettant de différencier *E. coli* des autres espèces de coliformes thermotolérants.

1.2.2 - Les ECEH se multiplient dans une fourchette de température de 7°C à 50°C, la température optimale étant de 37°C. Leur pH optimal de croissance est autour de 7, mais certaines souches de ECEH peuvent se développer dans des aliments acides, jusqu'à pH 4,4. La cuisson détruit les ECEH quand toutes les parties de l'aliment atteignent au moins 70°C.

Qualifier le plus précisément possible les ECEH par rapport à leurs conditions de culture.

1.2.3 - Les ECEH sont des bactéries entéroinvasives sécrétant des exotoxines dénommées shiga- toxines pour leur similitude avec la toxine de *Shigella dysenteriae*. Définir les termes « entéroinvasives » et « exotoxines ».

1.2.4 - Le sérotype O157:H7 est le plus important en santé publique.

1.2.4.1 - Donner le principe général d'un sérotypage bactérien.

1.2.4.2 - Expliquer la signification de l'appellation « O157:H7 », en précisant la localisation et la nature biochimique des structures impliquées dans ce sérotype.

1.2.5 - *E.coli* O157:H7 possède un plasmide appelé pO157 qui porte une vingtaine de gènes de virulence.

1.2.5.1 - Définir un plasmide.

1.2.5.2 --Quels autres types de gènes peuvent être portés par un plasmide ?

2 - Recherche d' *E. coli* O157: H7 dans les aliments (18,5 points)

Dans le but d'être validée, une nouvelle méthode alternative de recherche par PCR d' *E. coli* O157:H7 dans la viande de bœuf est comparée à la méthode de référence.

La méthode de référence est présentée en **document 2** et la méthode alternative en **document 3**.

2.1 - Méthode de référence

2.1.1 - Que signifie méthode « horizontale » ?

2.1.2 - Qualifier la 1^{ière} étape de la méthode et expliquer son intérêt.

2.1.3 - Justifier le choix de la température d'incubation utilisée lors de cette étape.

2.1.4 - Isolement sur milieu Mac Conkey Sorbitol (CT-SMAC).

2.1.4.1 - Citer les rôles respectifs des constituants du milieu, présentés sur le **document 4**.

2.1.4.2 - Déduire de la composition du milieu les types trophiques d' *E. coli* O157:H7. Justifier la réponse.

2.1.4.3 - Sur ce milieu, les colonies suspectes d'*E. coli* O157:H7 sont incolores, pouvant présenter un halo orangé. Interpréter, en justifiant, ces caractéristiques.

Donnée : Rouge neutre

Forme acide : rouge - Zone de virage : pH 6,8 à pH 8- Forme basique :jaune-orangé.

2.1.5 - Isolement sur milieu chromogène ChromID O157: H7 (milieu comparable au milieu Chromagar O157) : **document 5**.

2.1.5.1 - Qu'est-ce qu'un milieu chromogène ?

2.1.5.2 - Analyser la fiche technique de ce milieu afin d'expliquer son efficacité pour la recherche d'*E. coli* O157:H7.

2.2 - Méthode alternative par PCR

2.2.1 - Quel est l'organisme officiel chargé, en France, de la validation des méthodes alternatives ?

2.2.2 - Quel est le but de l'étape 2 (**document 3**) ?

2.2.3 - Préciser le principal intérêt que présente la méthode alternative de recherche d'*E. coli* O157:H7 par rapport à la méthode référence. Justifier la réponse.

2.2.4 - Citer un autre exemple de méthode alternative utilisée dans la recherche de bactéries pathogènes.

3 - Stratégies de lutte contre la contamination des bovins par *E. coli* O157:H7 (22,5 points)

Le cheptel bovin est considéré à l'heure actuelle comme le principal réservoir d'*E. coli* O157:H7, bactérie qui peut coloniser le système digestif des bovins. Ces derniers sont des porteurs sains. Ils peuvent contaminer l'eau, les aliments et l'équipement des exploitations par leurs matières fécales.

La mise en œuvre de stratégies visant à réduire le nombre de bovins contaminés est donc indispensable. Plusieurs sont à l'étude actuellement.

3.1 - Hygiène des exploitations bovines

L'équipement, comme les sources d'approvisionnement en eau, peut être un vecteur de propagation d'un animal à l'autre. Les abreuvoirs doivent donc présenter un haut niveau d'hygiène.

Le **document 6** présente la fiche commerciale d'un désinfectant pouvant être utilisé pour l'entretien des abreuvoirs.

3.1.1 - Relever le(s) principe(s) actif(s) du produit et préciser le groupe de désinfectants auquel il(s) appartient(nen)t.

3.1.2 - Indiquer le mode d'action de ce groupe de désinfectants.

3.1.3 - L'activité de l'Agroxyde II est conforme à la norme AFNOR 72171.

Citer une méthode permettant d'évaluer l'activité d'un désinfectant et en présenter le principe.

3.2 - Thérapie bactériophagique contre *E. coli* O157:H7

La capacité, de différents bactériophages spécifiques d'*E. coli* O157:H7 (nommés KH1 à KH5) à lyser des cultures d'*E. coli* O157:H7 au laboratoire, a été testée. Le **document 7** présente les résultats d'une étude.

3.2.1 --Exploitation de la courbe « control » du **document 7a**.

3.2.1.1 - Compléter le tableau du document 7a.

3.2.1.2 - Déterminer la vitesse spécifique de croissance de la souche d' *E. coli* O157:H7 testée. Justifier la démarche.

3.2.2.3 - Définir et calculer le temps de génération.

3.2.2 - D'après l'analyse du **document 7**.

3.2.2.1 - Montrer que l'utilisation des bactériophages de manière isolée ne peut pas être envisagée pour lutter contre la multiplication d'*E. coli* O157:H7 (**document 7a**).

3.2.2.2 - Indiquer, en justifiant, les conditions possibles d'utilisation des bactériophages pour l'élimination d'*E. coli* O157: H7 en culture (**document 7b**).

3.3 - Utilisation de levures probiotiques chez les ruminants

La recherche a montré, sur un modèle intestinal au laboratoire, qu'un ajout de levures-probiotiques (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856) à l'alimentation animale pouvait être envisagé dans le but de réduire la croissance intestinale du pathogène *E. coli* O157:H7.

3.3.1 - Définir le terme « probiotique ».

3.3.2 - Citer deux moyens par lesquels une souche probiotique peut limiter la croissance d'un micro-organisme pathogène.

3.3.3 - Dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856, l'effet inhibiteur pourrait être lié à la production d'éthanol.

3.3.3.1 - Quel type de métabolisme peut conduire à la production d'éthanol par les levures ?

3.3.3.2 - Établir l'équation bilan de production d'éthanol à partir du glucose par cette voie métabolique.

3.3.3.3 - Justifier l'utilisation de ce métabolisme par les levures dans le cadre d'un modèle intestinal.

DOCUMENT 1 : DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES DU SHU EN FRANCE

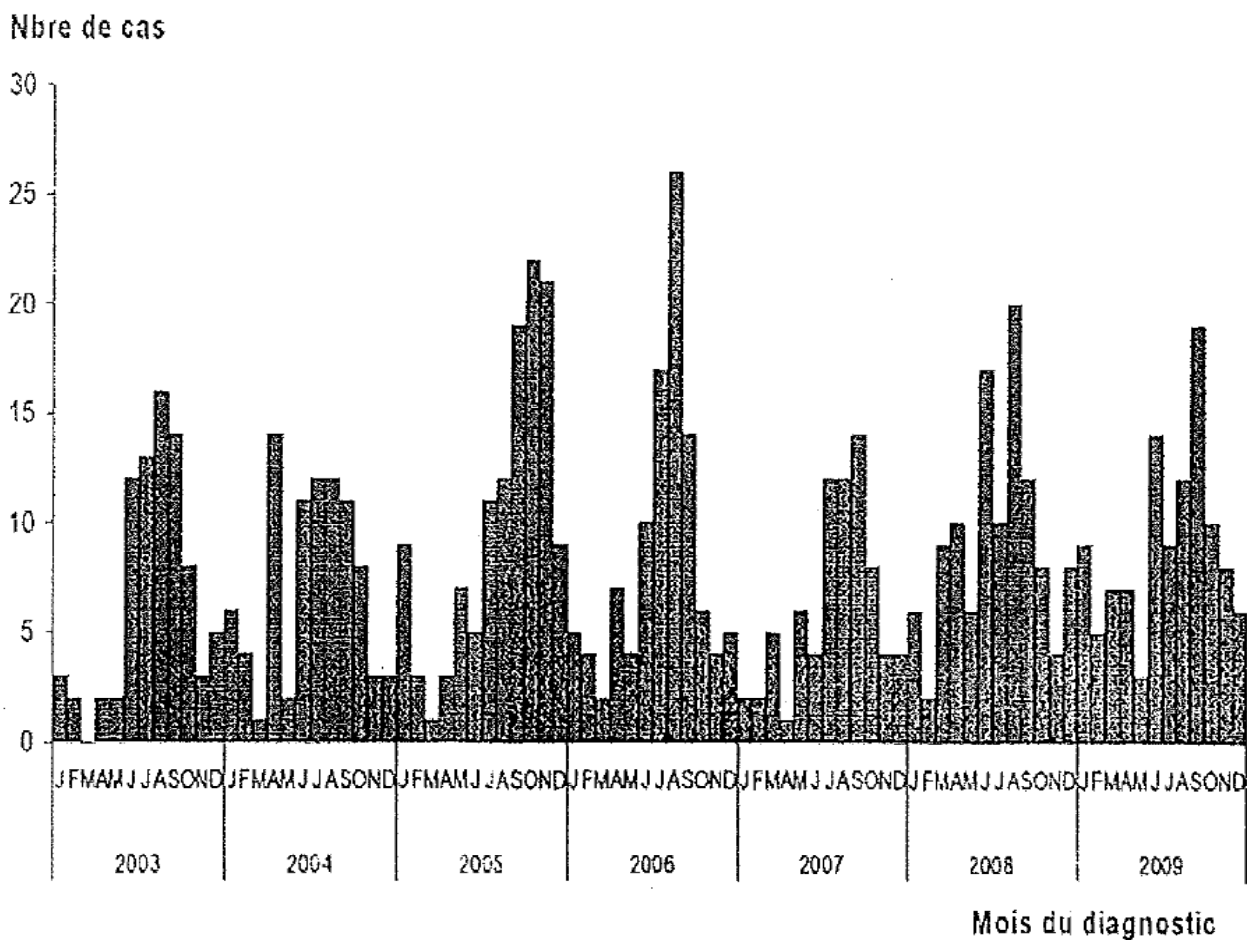
Document 1a

Incidence annuelle du SHU par 100 000 enfants de moins de 15 ans, France, 1996-2009

Année	Nombre de cas de SHU	Incidence annuelle	Année	Nombre de cas de SHU	Incidence annuelle
1996	81	0,66	2004	87	0,72
1997	92	0,75	2005	122	1,01
1998	76	0,59	2006	104	0,87
1999	93	0,76	2007	74	0,62
2000	79	0,64	2008	112	0,94
2001	74	0,61	2009	109	0,91
2002	73	0,60			
2003	80	0,66	Total	1256	0,74

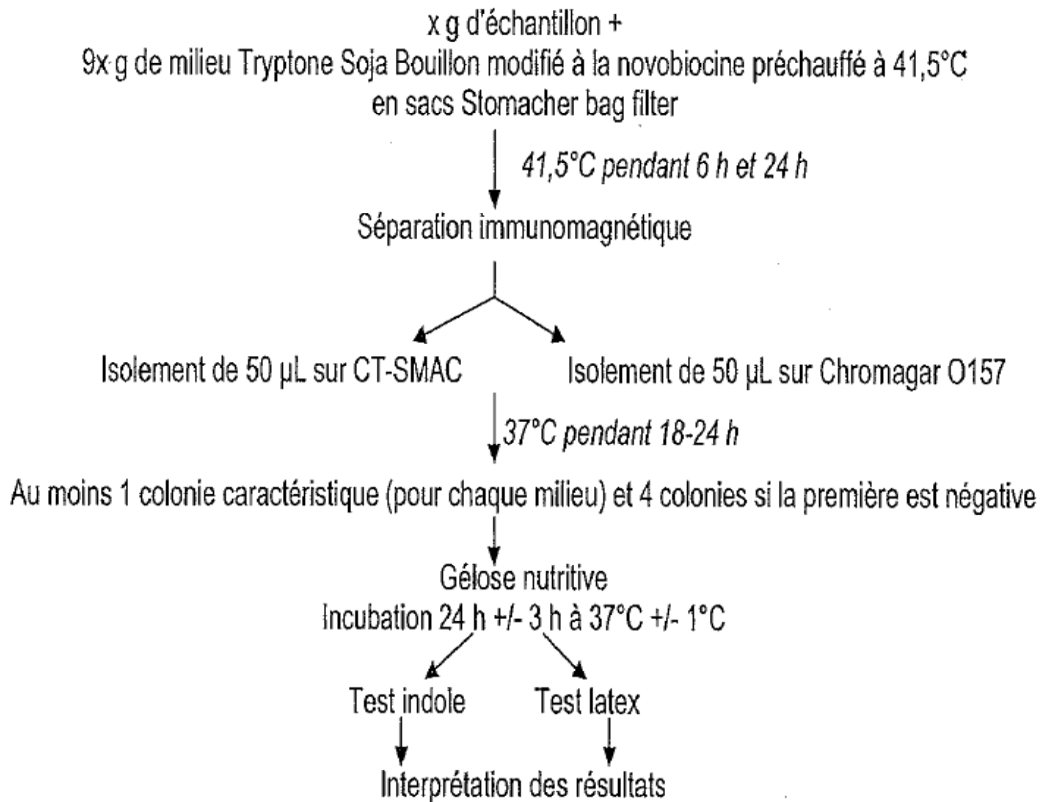
Document 1b

Distribution mensuelle du nombre de S HU chez l'enfant de moins de 15 ans, France, 2003-2009



Source : Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2009 – Lisa King et al – INVS / Institut Pasteur / Hôpital Robert Debré.

DOCUMENT 2 : MÉTHODE HORIZONTALE DE RÉFÉRENCE NF EN ISO 16654 DE RECHERCHE D'E.COLI O157



CT-SMAC: Cefixime-tellurite Sorbitol Mac Conkey (voir document 4)

D'après « Validation ISO 16140 de la méthode iQ-Check™ Escherichia coli O157:H7 pour les viandes crues de bœuf - ADRIA DEVELOPPEMENT - 28/07/2008 »

DOCUMENT 4 : MILIEU MAC CONKEY SORBITOL (CT-SMAC base)

Extrait de la fiche technique du milieu Biokar®

FORMULE - TYPE du milieu complet

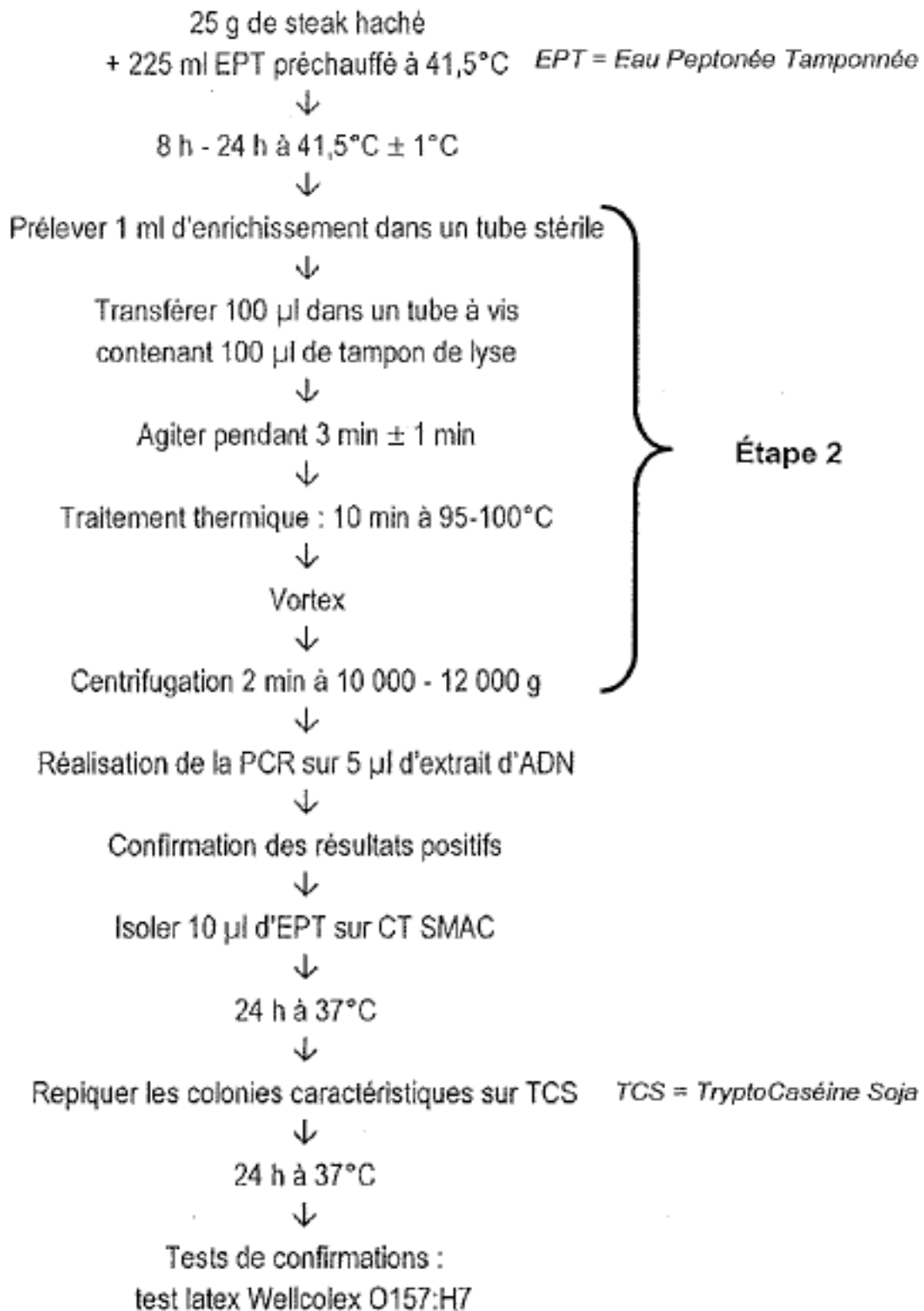
(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	17,0 g
- Peptone pepsique de viande	3,0 g
- D-Sorbitol	10,0 g
- Sels biliaires n°3	1,5 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Rouge neutre	30,0 mg
- Cristal violet	1,0 mg
- Céfixime	0,05 mg
- Tellurite de potassium.....	2,5 mg
- Agar agar bactériologique.....	13,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.

DOCUMENT 3 : MÉTHODE ALTERNATIVE POUR LA RECHERCHE D'E.COLI O157:H7



Source: Validation ISO 16140 de la méthode iQ-Check™ Escherichia coli O157:H7 pour les viandes crues de bœuf - ADRIA DEVELOPPEMENT - 28/07/2008

DOCUMENT 5 : MILIEU CHROMOGÈNE ChromID O157:H7

Extrait de la fiche technique du milieu Biomérieux®

Summary and explanation

ChromID O157:H7 agar enables the detection and presumptive identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotype O157:H7 responsible for gastrointestinal infections.

According to the standard NF EN ISO 16654, it may be used to detect *E.coli* O157.

Principle

This agar contains a mixture of carbohydrates and two chromogenic substances for the detection of two enzymatic activities:

- β -D-galactosidase present in all the strains of *E.coli* irrespective of their serotype,
- β -D-glucuronidase specific to all strains of non 157.H7- *E.coli*.

The selectivity for Gram (+) bacteria is provided by sodium desoxycholate.

To increase its selectivity for enterobacteria, a Cefixime-Tellurite (CT) mixture can be added to the chromID O157:H7 medium.

Composition

Gelatin peptone (bovine or porcine)	6,5 g	Sodium desoxycholate (bovine or ovine)	1,5 g
Yeast extract	6 g	Mixture of carbohydrates (bovine)	24 g
Sodium chloride	5 g	Mixture of activators	0,25 g
Sodium carbonate	0,13 g	Mixture of chromogenic substrates	0,25 g
Neutral red	0,01 g	Agar	12,5 g
Purified water	1 L		
pH 7,1			

Reading and interpretation

- After incubation, observe the bacteria growth.
- Record the presence of characteristic colonies of *E.coli* O157:H7 which are of a green or bluish-green color.
This color is particularly intense when the incubation time is close to 24 hours.
- Identification of characteristic colonies must be followed by biochemical and/or immunological tests.

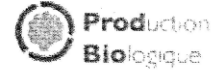
Quality control

The nutrient capacity of the medium can be tested using the following strain(s):

Strain	Results at 33-37°C	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC® 43894	Growth after 24 hours	Bluish-green colonies
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922		Purple colonies

DOCUMENT 6 FICHE COMMERCIALE DE L'AGROXYDE II**AGROXYDE II**

**DESINFECTANT D'ALTERNANCE POUR
ELEVAGES TERRESTRES - TRES PUISSANT
ET RAPIDE**



A.M.M A PARTIR DE 0,25 %.

AVANTAGES

- Désinfectant - désodorisant efficace en eau dure et en présence de protéines : actif dans toutes les conditions.
- Très large spectre d'activité à basse dilution : élimine économiquement les contaminations bactériennes, fongiques et virales.
- Ne laisse pas de résidu car se dégrade en eau, oxygène et acide acétique : n'affecte pas l'environnement.
- Conforme à l'arrêté ministériel concernant les produits de nettoyage des matériels destinés à être en contact avec les denrées et boissons alimentaires.
- Ses composants figurent sur la liste autorisée par le règlement CE n° 1804/1999 sur la production biologique des produits agricoles.
- Autorisé par ECOCERT (pour l'utilisation en Agriculture Biologique).

UTILISATION

- Pour tous élevages terrestres : volailles de chair, volailles pondeuses, lapins, porcs, bovins, vaches laitières, veaux, ovins, caprins, chevaux, ...
- Désinfection des surfaces après nettoyage : matériels, véhicules et logements d'animaux, locaux et matériels de stockage et de préparation de la nourriture des animaux.

MODE D'EMPLOI

- 1- Vide sanitaire : murs, plafonds, sols, abords, abreuvoirs, pipettes, mangeoires, circuits d'eau, cages, bacs, silos...
 - Désinsectisation et nettoyage-rinçage préalable.
 - Diluer AGROXYDE II de 0,25 % à 0,75 %.
 - Traiter par pulvérisation, trempage, lavage en laissant agir 20'.
 - Rincer à l'eau et contrôler l'élimination d'AGROXYDE II.
- 2. Pédiluves et rotoluves : solution d'AGROXYDE II à 0,25 % qu'il faut renouveler quotidiennement.
- Utilisable avec systèmes de dosage peroxyde DOSATRON. Non utilisable avec centrale LB9.

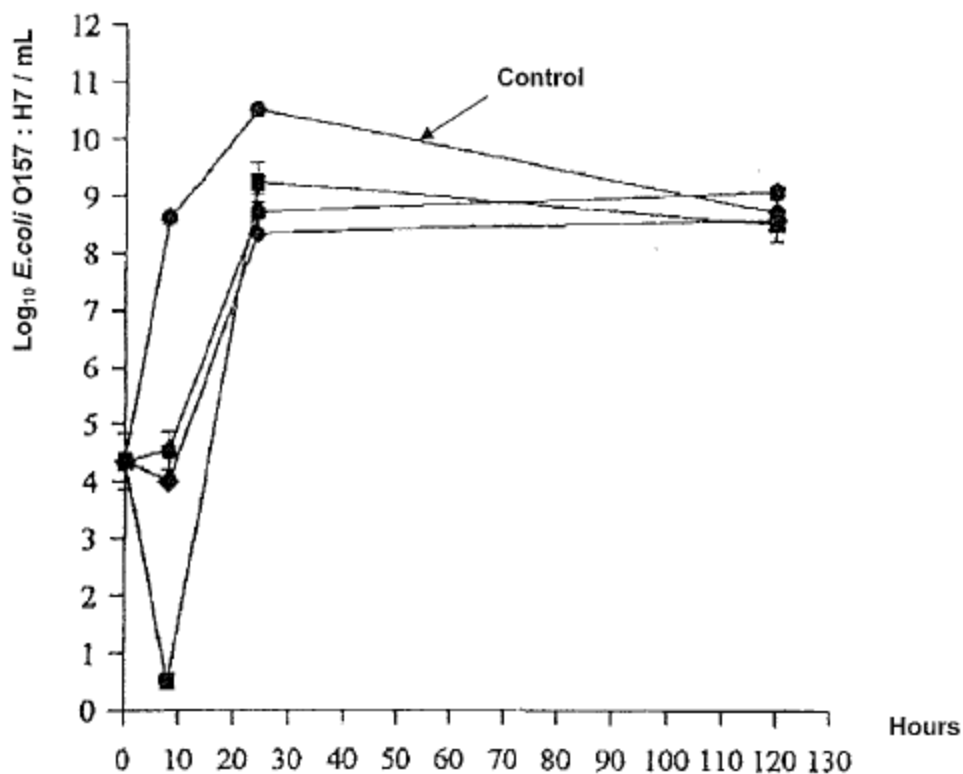
CARACTERISTIQUES

- Liquide limpide, incolore, comburant, lentement volatil.
- pH à 0,75 % = 2,7.
- Composition : 216,1g/l d'acide péracétique et de peroxyde d'hydrogène.
- Conforme aux tests des normes AFNOR 72171 (bactéricide à 0,25 %), 72301 (fongicide à 0,75 %) et 72180 (virucide à 0,25 %).
- A.M.M. du Ministère de l'Agriculture n°2010192 à 0,25 % (bactéricidie et virucidie) et à 0,75 % (fongicidie).
- Notamment actif sur le virus Influenza à 0.10 %.



DOCUMENT 7 : ÉTUDE DE L'ACTION DE BACTÉRIOPHAGES SUR *E. COLI* O157:H7
À RENDRE AVEC LA COPIE

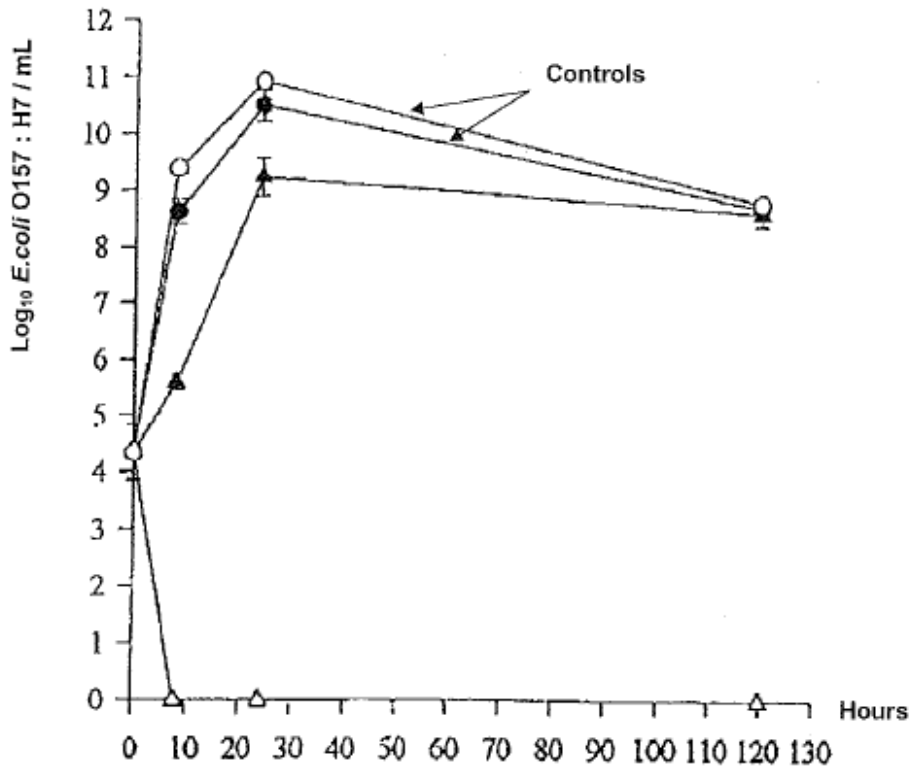
Document 7a : Comparison of lytic efficiencies of phages on *E. coli* O157:H7 cultures at 37°C.



E. coli O157:H7 ($3 \cdot 10^4$ CFU) was treated with KH1 (■), KH4 (●) or KH5 (◆). The multiplicity of infection was 10^3 PFU / CFU – The control contained only *E. coli* O157:H7 (●)

Concentration E. Coli O157:H7		Hours	0	10	20	120
		log	CFU/mL	log	CFU/mL	log
Contrôle	log		4,4	8,6	10,5	8,5
	CFU/mL					
Essay KH ₁	log		4,4	0,4	9,1	8,3
	CFU/mL					
Essay KH ₄	log		4,4	4,5	8,8	9,0
	CFU/mL					
Essay KH ₅	log		4,4	4,0	8,3	8,4
	CFU/mL					

Document 7b : *E. coli* O157:H7 lysis by a mixture of phages, with or without aeration, at 37°C



E. coli O157:H7 ($3 \cdot 10^4$ CFU) was infected with a mixed phage suspension (10^7 PFU) containing equal concentrations of KH1, KH4, and KH5. Cultures were incubated with (Δ) or without (\blacktriangle) aeration. The controls contained only *E. coli* O157:H7 and were either aerated (\circ) or not aerated (\bullet).

Source : Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-Specific Bacteriophages - INIDIRA T.KUDVA et al - Applied and Environmental Microbiology , Sept.1999.

Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et de technologies d'analyse 2014

Calculatrice non autorisée.
Dictionnaire Anglais-Français autorisé.

ÉTUDE D'UN BIOCIDÉ NATUREL

Les moustiques sont considérés comme source de nuisance pour l'homme, puisqu'ils peuvent être des vecteurs de maladies (paludisme, fièvre jaune ...).

Dans les campagnes de lutte anti-moustique, la plupart des insecticides sont composés de matières actives de synthèse très efficaces sur les moustiques, mais qui présentent plusieurs inconvénients (coût élevé, problèmes environnementaux, développement de résistance ...).

La lutte en faveur d'une gestion durable de l'environnement a favorisé la mise en place d'études sur les substances naturelles à large spectre d'action, comme des bactéricides, des fongicides et des insecticides de substitution.

Les extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis*) sont utilisés comme biocide naturel par certaines populations d'Afrique pour limiter le nombre de moustiques. Les connaissances sur le biocide sont encore réduites. Les principales études en cours portent sur :

- l'évaluation de la toxicité du biocide sur des larves de moustique ;
- son mode d'action ;
- les modalités de culture, *in vitro*, du plant de ricin.

1 - Étude de la toxicité du biocide (21 points)

1.1 --Des tests de toxicité sont réalisés sur deux espèces de larves de moustiques à partir d'extraits de feuilles de ricin.

Les résultats sont consignés dans le **document 1**.

1.1.1- Définir le sigle et le terme DL 50.

1.1.2 - Déterminer la DL 50 obtenue pour chaque espèce de larve de moustique.

1.1.3 - Conclure sur l'efficacité des extraits de feuille de ricin comme anti-larvaire pour les espèces de moustiques testées.

1.2 - Des tests de toxicité ont aussi été réalisés sur des cultures de cellules de moustique en suspension. Les cultures de cellules d'insecte sont réalisées en milieu supplémenté en SVF et dans un incubateur à 25°C (5% CO₂ et 100% H₂O).

Plusieurs dilutions du biocide sont testées sur des cultures cellulaires contenant chacune 5.10⁶ cellules/mL. Après 24 heures, une mesure est réalisée par cytométrie en flux

1.2.1 - Indiquer les rôles du SVF. Préciser les problèmes posés par son utilisation.

1.2.2 - Argumenter l'incubation en présence de CO₂.

1.2.3 - Préciser le rôle de la cytométrie en flux.

1.3 - Chez la souris, les tests de toxicité se sont révélés négatifs, même après une grande absorption du biocide. La partie toxique est transportée par voie sanguine essentiellement sous forme libre, et très peu sous forme liée.

L'évolution de la concentration plasmatique de la molécule toxique en fonction du temps permet de déterminer un T_{max} d'environ 1 heure et un T_{1/2} inférieur à 4 heures.

L'élimination rénale est très rapide car le foie réalise des biotransformations de phase I et II de la molécule toxique.

1.3.1 - Donner un exemple de transporteur sanguin.

1.3.2 - Définir T_{\max} et $T_{1/2}$.

1.3.3 - Décrire les biotransformations hépatiques de type I et II. Préciser leur importance physiologique.

2 - Étude du mode d'action du biocide (20 points)

2.1 - Au niveau digestif, différentes études ont montré que le biocide ingéré par les larves pénètre dans les entérocytes par transport actif de type symport couplé aux ions Na^+ . La molécule traverse la membrane basale par diffusion simple et atteint la circulation sanguine avant d'être disséminée dans tout l'organisme de la larve.

2.1.1 - Indiquer les caractéristiques du transport actif de type symport couplé au Na^+ .

2.1.2 - Quelles sont les différences entre un transport actif et une diffusion simple ?

2.2 - Au niveau cellulaire, le biocide s'associe à une protéine membranaire pour former un complexe. Le **document 2** présente un protocole de Western blot (aussi appelé immuno-empreinte) qui a permis de déterminer que la zone de la feuille qui fixe le plus de biocide est le limbe.

2.2.1 - Étudier le protocole du **document 2** et schématiser l'édifice moléculaire issu des étapes 7 à 11. En déduire le type de dosage mis en jeu pour détecter le complexe protéique.

2.2.2 - Analyser les résultats du western blot présentés dans le **document 3** et déterminer la zone de la feuille qui fixe le plus de biocide. Estimer la masse moléculaire du complexe protéique.

2.3 - Au niveau intra cellulaire, la molécule toxique agirait sur la traduction.

2.3.1 - Indiquer la structure d'un ribosome eucaryote et préciser le lieu de formation des sous unités.

2.3.2 - Décrire brièvement les trois principales étapes de l'élongation de la traduction.

3 - Étude de la multiplication *in vitro* de la plante de ricin (19 points)

3.1 - Des études de multiplication *in vitro* ont montré que seule la zone située autour de la nervure principale permet d'obtenir des plantes dans 100 % des cas.

3.1.1 - Renseigner le **document 4** (à rendre avec la copie) représentant une feuille de ricin.

3.1.2 - Indiquer les particularités ultrastructurales des cellules végétales par rapport aux cellules animales.

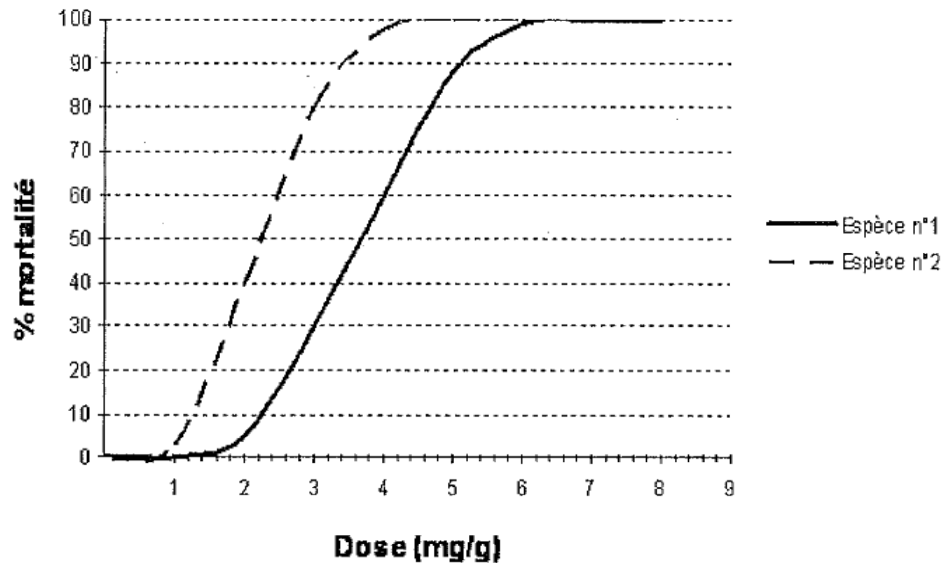
3.1.3 - Titrer et annoter le **document 5** (à rendre avec la copie) représentant un organite présent en très grande quantité dans les feuilles de ricin. Préciser son rôle dans la cellule.

3.2 - Pour déterminer la concentration optimale de deux phytohormones (NAA et BA) à utiliser pour la culture *in vitro* du ricin, des fragments de feuille ont été mis en culture en présence de concentrations variables en ces deux hormones dans le milieu de culture.

3.2.1 - Définir le terme phytohormone.

3.2.2 - À partir des résultats obtenus (**document 6**), analyser l'influence des concentrations en phytohormones NAA et BA associées sur la morphogenèse végétative.

3.2.3 - Décrire de façon concise les étapes de la culture *in vitro* mise en œuvre à partir des fragments de feuilles afin d'orienter la culture vers la calogénèse.

DOCUMENT 1**Résultats des tests de toxicité effectués sur des larves de moustiques d'espèces différentes****DOCUMENT 2****Protocole du western blot :**

Technique de transfert sur membrane de protéines à partir d'un gel de polyacrylamide

- Transfert sur membrane :

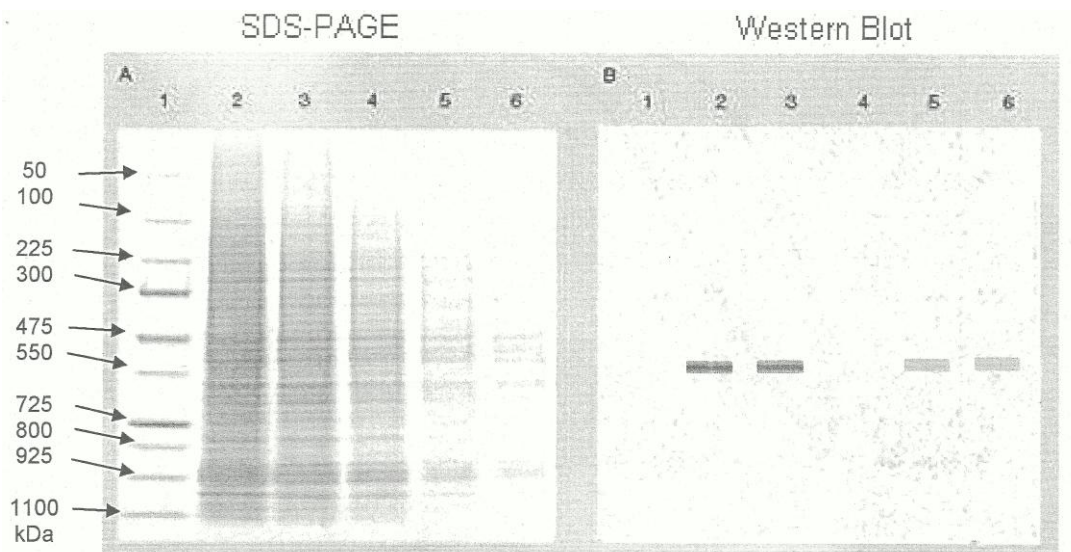
1. Load the samples in the wells of an 1X SDS-polyacrylamide gel (use a pre-stained molecular weight marker to determine the end-point of the electrophoresis).
2. Run the apparatus at 160V during 30 minutes.
3. Pre wet the PVDF (*) membrane using 100% methanol for 10 seconds and immerse in distilled H₂O, and soak the filter pads in PVDF transfer buffer.
4. Assemble the membrane and the filters in the tank with the gel.
5. Run the transfer protocol at 0,1 A overnight.
6. After completing electrophoretic transfer, block the membrane in 5% non fat dry milk bath for 2 hours.

- Immuno - empreinte :

7. Incubate the membrane with the mouse primary antibody for 16 hours at 4°C.
8. Remove the antibody and perform 3 room temperature washes (10 minutes of rotation each) with TBS (Tris, NaCl, pH=7,5 plus Tween 20).
9. Incubate the membrane with anti-mouse alkaline phosphatase conjugated antibody for 30 minutes at room temperature.
10. Remove the antibody and perform 3 room temperature washes (10 minutes of rotation each) with TBS.
11. Put into developer: BCIP-T (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine salt) and NBT (Nitro Blue Tetrazolium).

Reaction product is purple, and appears in a few minutes; can incubate for up to an hour if the signal is weak. Watch development of reaction and stop with water. Some of background disappears on drying.

(*) PVDF : Polyvinylidene fluoride.

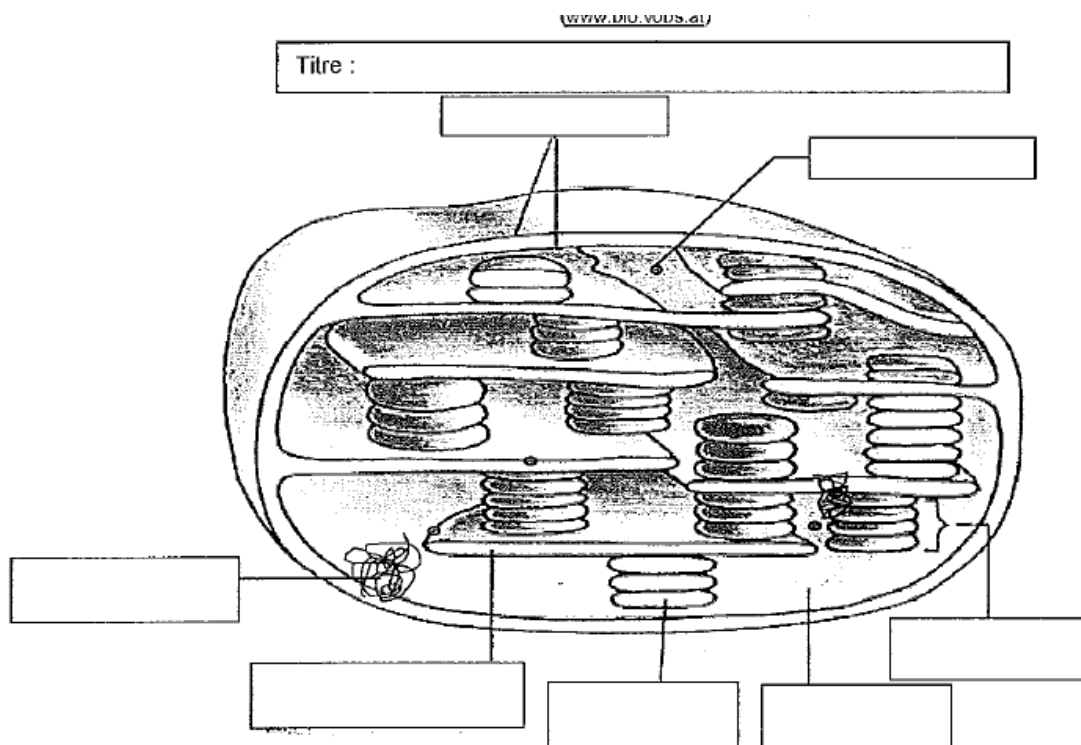
DOCUMENT 3

- 1 : marqueur de masse moléculaire
- 2 : extrait de feuille entière
- 3 : extrait de limbe
- 4 : extrait de pétiole
- 5 : extrait de nervure principale
- 6 : extrait de nervures secondaires

DOCUMENT 4

(à rendre avec la copie)

Feuille palmée du *Ricinus communis*

DOCUMENT 5**(à rendre avec la copie)****DOCUMENT 6****Résultats de la culture *in vitro* des fragments de feuille du ricin**

Expérience	A	B	C
[NAA] µg/mL	0,01	1	3
[BA] µg/mL	2	1	0,02
Observations	Formation de tiges feuillées	Formation d'un cal	Formation de racines

NAA : α -Naphthalen Acetic Acid (Auxine de synthèse) BA : N-Benzyl Adenine (Cytokinine de synthèse)

Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2014

Calculatrice autorisée.

LE THON : DE LA PÊCHE À LA CONSERVE

L'industrie de transformation du thon en conserve est la première industrie de transformation de pêche dans le monde.

Les thons pêchés sont éviscérés puis congelés dans les bateaux. Ils constituent la matière première des entreprises de fabrication de thon en conserve. On se propose d'étudier différents aspects de cette industrie de transformation : mise en place d'un système qualité, matière première utilisée, procédé de fabrication.

1 - Mise en place d'un système qualité (21 points)

Le CODEX ALIMENTARIUS est un organisme international. Il a proposé en 2009 un code d'usages pour l'industrie de transformation de la filière « pêche et produits de la mer » dans lequel la fabrication du thon en conserve est longuement évoquée, en particulier par l'illustration de la méthode **HACCP**.

1.1 - Que signifie le terme « filière » ? Donner un autre exemple de filière agroalimentaire.

1.2.- Le *codex alimentarius* élabore des normes alimentaires, des recommandations et des codes d'usage.

1.2.1 - Qu'est-ce qu'une norme ?

1.2.2 - Citer un objectif poursuivi par le *codex alimentarius*.

1.3 - La marche à suivre pour la mise en place de la méthode HACCP est rappelée dans le **document 2**.

1.3.1 - Quel est le but de la mise en place d'un système HACCP ?

1.3.2 - Indiquer deux apports de la démarche HACCP par rapport à un système qualité basé sur le contrôle des produits finis.

1.4 - L'étape 2 du **document 2** demande de décrire le produit. Le **document 3** propose différents éléments de description d'une conserve de thon.

1.4.1 - Pourquoi est-il important de détailler les caractéristiques de la matière première ?

1.4.2 - En quoi l'acidité d'un produit influence-t-elle sa salubrité ? Justifier la réponse.

1.4.3 - Pourquoi ce type de produit a-t-il une durée de conservation longue ? Par quel sigle désigne-t-on cette durée ?

1.5 - L'étape 6 du **document 2** demande d'identifier les différents dangers réels ou potentiels pour chaque étape de la fabrication.

1.5.1 - Indiquer les trois catégories de dangers. Donner pour chacun d'eux un exemple en utilisant le **document 1**.

1.5.2 - L'étape 7 du **document 2** concerne la recherche des CCP.

En utilisant l'arbre de décisions donné dans le **document 4**, justifier que l'étape de traitement thermique (étape 12 du **document 1**) est un CCP.

1.5.3 - L'application du système de surveillance des CCP s'appuie sur les seuils critiques, la manière d'établir la surveillance des CCP et les actions correctives éventuelles.

1.5.3.1 --Sur quels paramètres va-t-on établir les seuils critiques de l'étape 12 du procédé de fabrication ?

Comment peut-on établir la surveillance de ce CCP ?

1.5.3.2 - En cas d'un résultat non-conforme, citer deux actions correctives possibles sur le produit.

2 - Étude de la matière première principale : le thon congelé (19 points)

La matière première principale est un poisson (thon albacore) congelé. Dans les pays du Sud de l'Europe, le thon était appelé "bœuf marin" en raison de sa ressemblance avec la viande des espèces terrestres.

Les compositions du muscle du thon et du muscle squelettique du bœuf sont données dans le **document 5**.

2.1 - Le thon nage presque en permanence. Il contient beaucoup de muscles sombres. Comment peut-on relier ces deux observations ?

2.2 - La chair du thon contient plus de 4 % de lipides. Pourquoi cette propriété est-elle un inconvénient pour la conservation du thon ?

2.3 - À la mort du poisson, ses muscles subissent des modifications physiques et biochimiques se caractérisant par une rigidité musculaire et une diminution du pH qui passe de 7 à 6 dans le cas du thon.

2.3.1 - Comment appelle-t-on cet état ?

2.3.2 - Expliquer de façon précise les modifications biochimiques entraînant ce phénomène.

2.3.3 - Dans le cas d'un muscle de bœuf on observe le même phénomène mais le pH diminue jusqu'à 5,5. À l'aide du **document 5**, expliquer cette diminution plus forte du pH dans le cas du muscle de bœuf.

2.4 - Sur les grands thoniers, les thons peuvent être congelés par immersion dans de la saumure à -18°C après avoir été préalablement refroidis à 0°C dans des cuves.

2.4.1 - Quel est le principe de conservation par congélation.

2.4.2 - À partir du **document 6**, indiquer la composition quantitative choisie de la saumure (en pourcentage de NaCl) et justifier son rôle dans la congélation.

2.4.3 - La densité du thon, mesurée à la même température que les données pour la saumure du **document 6**, est de .1,06. Quel problème technologique cela entraîne-t-il ? Proposer une solution possible.

3 - Étude d'une opération unitaire : le traitement thermique (20 points)

3.1 - Définir la notion d'opération unitaire.

3.2 - Lors du remplissage des boîtes (étape 8 du **document 1**), la saumure est ajoutée à une température supérieure à 60°C.

Quel est son intérêt par rapport au barème de stérilisation ?

3.3 - L'appareil de stérilisation est un autoclave *steriflow* décrit dans le **document 7**.

3.3.1 - On distingue sur le schéma deux circuits d'eau : (1) et (2). Indiquer à quoi correspondent ces deux circuits.

3.3.2 - Comment appelle-t-on l'élément de l'appareil permettant un contact entre les deux circuits ?

3.3.3 - Préciser la nature du fluide circulant dans l'élément C, indiquer le sens de circulation lors de l'étape de refroidissement.

3.3.4 - L'autoclave *steriflow* est un procédé discontinu.

Indiquer les avantages et les inconvénients de ce type de procédé par rapport à un procédé continu.

3.4 - La valeur stérilisatrice recommandée pour la préparation des conserves est de 20 minutes à 121°C. On compare cette valeur au barème de stérilisation suivant : (75 minutes, 116°C).

3.4.1 - Calculer la valeur stérilisatrice de ce barème. Peut-on utiliser ce barème pour la stérilisation du thon ?

Données :

a) $z = 10^\circ\text{C}$.

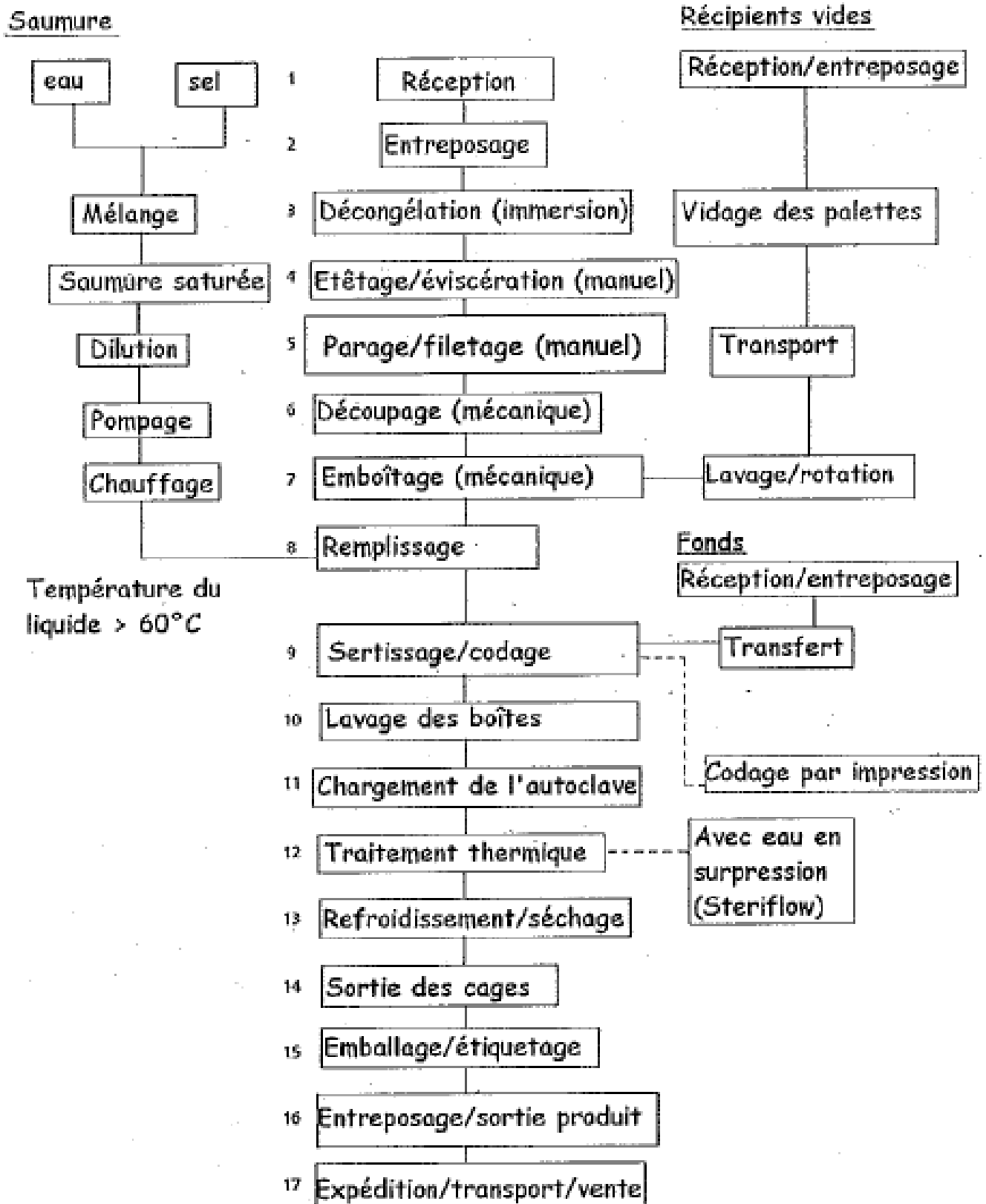
b) Relation entre durée de barème à des températures différentes et ayant la même efficacité :

$$\text{Log} \left(\frac{t_1}{t_2} \right) = \frac{(\theta_1 - \theta_2)}{z} \quad \text{avec } t = \text{durée} \quad \text{et} \quad \theta_2 = 121^\circ\text{C}$$

3.4.2 - Quels seraient les inconvénients de ce barème ?

3.5 - Citer deux techniques de décontamination athermique des aliments et illustrer chaque réponse par un exemple.

**DOCUMENT 1 : DIAGRAMME DE FABRICATION DE CONSERVES
DE THON AU NATUREL**

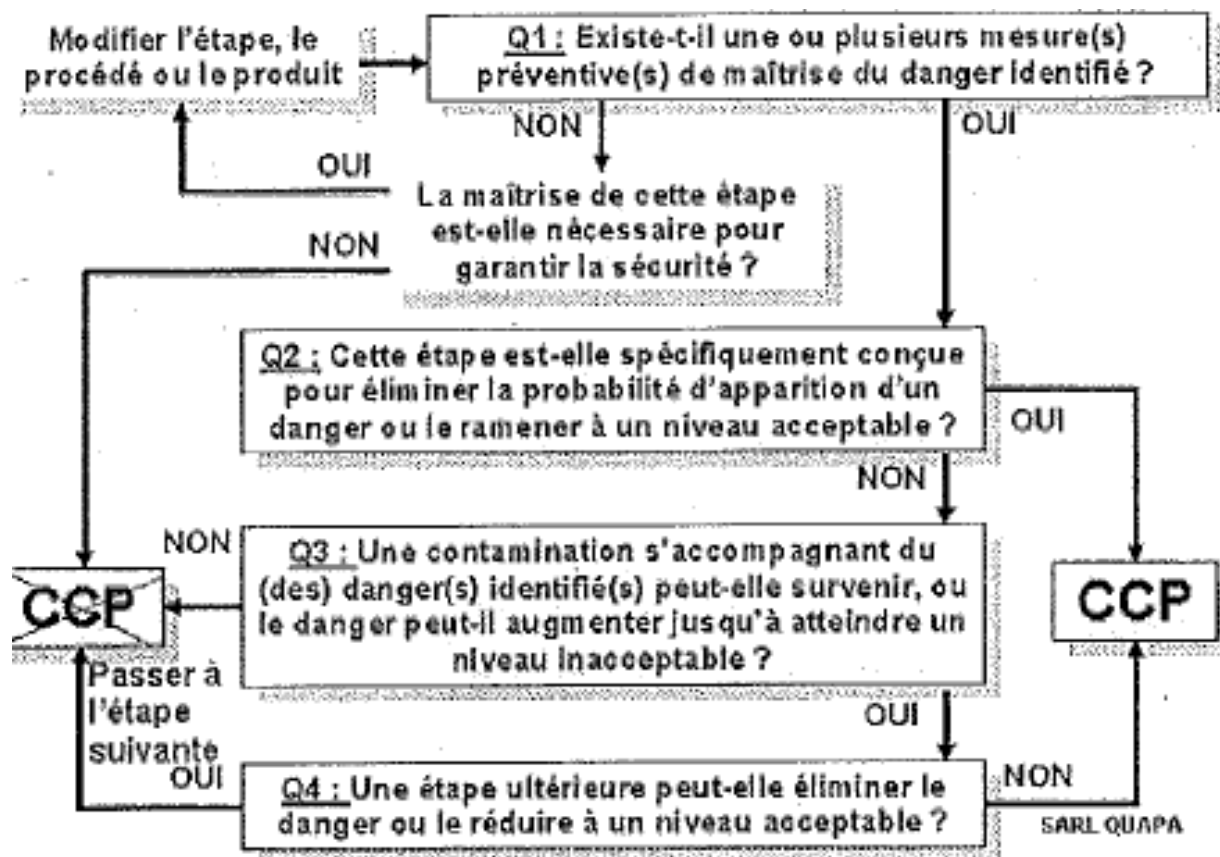


**DOCUMENT 2 : MARCHE À SUIVRE POUR LA MISE EN PLACE D'UN
SYSTEME HACCP ET D'ANALYSE DES DEFAUTS**

1. Constituer l'équipe HACCP
2. Décrire le produit
3. Déterminer l'utilisation prévue
4. Établir un diagramme des opérations
5. Confirmer le diagramme des opérations
6. Effectuer une analyse des dangers
7. Déterminer les CCP
8. Fixer des seuils critiques pour chaque CCP
9. Mettre en place un système de surveillance pour chaque CCP
10. Prendre des mesures correctives
11. Appliquer des procédures de vérification
12. Tenir des registres et constituer des dossiers
13. Réviser les plans HACCP

DOCUMENT 3 : DESCRIPTION D'UNE CONSERVE DE THON AU NATUREL

Paramètre	Intérêts du paramètre décrit	Exemple
Nom du produit	Identifier l'espèce et la méthode de transformation	Thon en conserve à l'eau salée
Caractéristiques de la matière première	Décrire l'origine du poisson et les traitements subits	Albacore capturé dans le golfe de Guinée et congelé entier dans la saumure
Caractéristiques importantes du produit fini	Salubrité du produit	Aliments « peu acides » ; intégrité de la soudure de la
Ingrédients	Substances ajoutées pendant la transformation	Eau, sel
Emballage	Compatibilité avec usage alimentaire	Récipient en acier chromé.
Durée de conservation	Début de détérioration du	Trois années
Lieu de vente du produit	Facilite la conformité avec les règlements et les normes du marché ciblé	Vente au détail sur le marché intérieur

DOCUMENT 4 : ARBRE DE DÉCISIONS**DOCUMENT 5 : COMPOSITION CHIMIQUE DU MUSCLE DE THON ET DU MUSCLE SQUELETTIQUE DE BŒUF**

	Muscle de thon a) %	Muscle squelettique de bœuf b) %
Eau	71	75
Protéines	24	20
Lipides	4	3
Glucides (glycogène)	< 0,5	1
Cendres	1	1

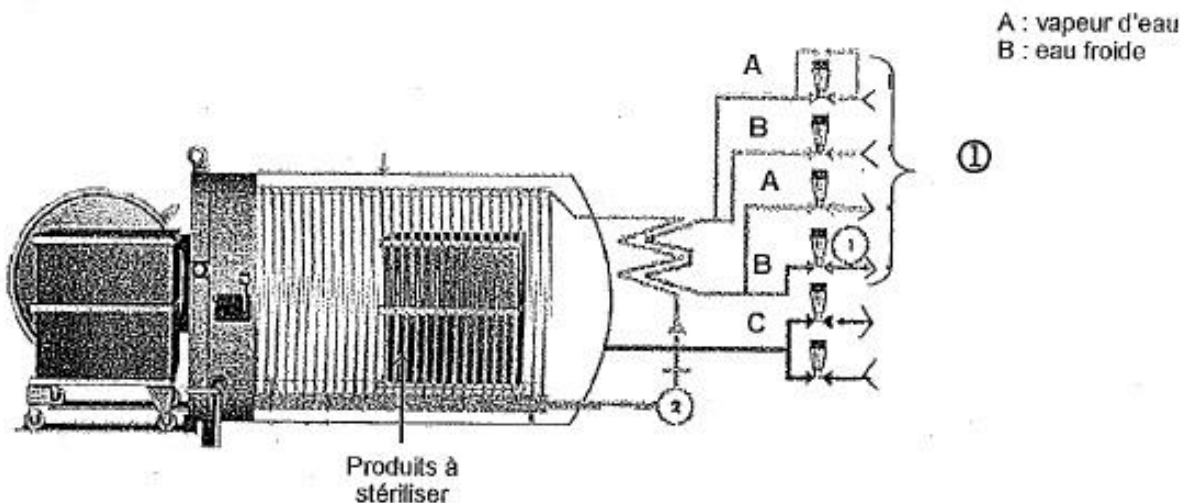
Sources : a) Murray et Burt (1969). b) Stansby (1962)

DOCUMENT 6 : DENSITÉ ET TEMPÉRATURE DE CONGÉLATION DE DIVERSES SOLUTIONS SALINES

Densité	NaCl (g/L)	Eau (g/L)	Température de congélation (°C)
1,063	96	968	-6
1,071	107	964	-6,6
1,086	130	955	-8,3
1,093	142	951	-10
1,101	154	947	-10,2
1,109	166	942	-11,4
1,116	179	938	-12
1,124	191	933	-13
1,132	204	928	-14
1,140	217	923	-15,5
1,148	230	918	-16,2
1,156	243	913	-17,5
1,164	256	908	-19
1,172	270	903	-20,7

DOCUMENT 7 : AUTOCLAVE STERIFLOW

- Le faible volume d'eau stocké à la base de la cuve est repris par la pompe de circulation, traverse l'échangeur de chaleur où il est reconditionné en température et ruisselle en circuit fermé à un très fort débit autour des récipients grâce au système de distribution.
- La pression est régulée indépendamment de la température par admission ou échappement d'air comprimé de la cuve suivant la consigne de pression programmée.
- Le refroidissement avec eau froide qui se trouve séparée de l'eau de stérilisation.
- En fin de refroidissement, la pompe de circulation s'arrête, le volant d'eau est stocké à la base de la cuve, l'enceinte est mise à la pression atmosphérique. L'appareil peut être déchargé.



Techniques de biochimie 2014

Pour les candidats non évalués en CCF

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

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

Matériels autorisés :

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

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

BIOCONTRÔLES DANS UNE UNITE ARTISANALE PRODUCTRICE DE YAOURTS

Contexte professionnel

Certains consommateurs s'étant plaint de l'acidité trop forte des yaourts, un nouveau protocole de fermentation lactique a été établi. Le laboratoire de contrôles analyse la composition de 2 yaourts A et B produits respectivement suivant l'ancien et le nouveau protocole.

A la suite du procédé de fabrication des yaourts, les micro-organismes doivent se trouver vivants et abondants dans le produit final. Au moment de la vente au consommateur les yaourts ne doivent pas contenir moins de 0,6 g d'acide lactique pour 100 g de yaourt (0,6% m/m).

Les contrôles effectués sur les yaourts A et B portent sur :

- La détermination de l'acidité titrable.
- La détermination des concentrations en lactose et en acide lactique.

Compétences évaluées

Réaliser des analyses et des contrôles biochimiques (27 points).

- Préparer OU prétraiter les échantillons.
- Réaliser des analyses mettant en oeuvre des appareillages optiques.
- Réaliser des techniques d'analyses enzymatiques.

Analyser, interpréter, valider des résultats (10 points)

Utiliser l'outil informatique (3 points)

Mises en oeuvre

Activité professionnelles	Documents et ressources
1: Précipitation des protéines du yaourt	Fiche protocole 1
2: Dosage colorimétrique du lactose par la méthode au DNS	Fiche protocole 2 Annexe: acceptabilité des résultats Fiches sécurité: Réactif de Carrez II et réactif au DNS
3: Dosage de l'acide lactique par méthode enzymatique	Fiche protocole 3 Fiche technique Annexe: acceptabilité des résultats
4: Edition des résultats	Feuille de traçabilité (à compléter et à rendre avec la copie)

Rapport d'analyses

La détermination de l'acidité titrable des yaourts A et B par méthode volumétrique a été réalisée. Les résultats sont les suivants :

Acidité titrable en g d'acides pour 100 g de yaourt	
Yaourt A	Yaourt B
1,16 ± 0,04	0,78 ± 0,04

Comparer sous forme d'un tableau les résultats obtenus pour les 2 yaourts. Conclure.

FICHE PROTOCOLE 1**Précipitation des protéines du yaourt**

Le dosage du lactose et de l'acide lactique nécessite la précipitation préalable des protéines. Les analyses s'effectuent sur le filtrat réalisé.

Matériels et réactifs

- Yaourts A et B
- Solution de Carrez I
- Solution de Carrez II
- Solution d'hydroxyde de sodium (la concentration sera précisée le jour de l'épreuve)
- 2 fioles jaugées de 100 mL
- 2 filtres
- 2 entonnoirs
- 3 béchers de 100 mL
- 1 éprouvette graduée de 100 mL
- Compte-goutte
- Pipette automatique de 5 mL (P5000) et cônes adaptés, ou pipette graduée de 5 mL
- 1 balance de précision
- 1 sabot de pesée et 1 spatule

Protocole opératoire

- Peser exactement une masse voisine de 1 g de yaourt et la transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL contenant 60 mL d'eau distillée.
- Ajouter 2 mL de solution de Carrez I et homogénéiser.
- Ajouter 2 mL de solution de Carrez II et homogénéiser.
- Ajouter 4 mL de solution d'hydroxyde de sodium à $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ et homogénéiser.
Appeler un examinateur pour la fin de la manipulation.
- Ajuster à 100 mL avec de l'eau distillée et homogénéiser.
- Filtrer et recueillir le filtrat dans un bécher. Noter le volume de filtrat obtenu.
On obtient donc 2 filtrats : le filtrat F_A (obtenu à partir du yaourt A), et le filtrat F_B (obtenu à partir du yaourt B)

FICHE PROTOCOLE 2	Dosage colorimétrique du lactose par la méthode au DNS
--------------------------	---

Principe

Les glucides réducteurs, dont le lactose, peuvent être dosés grâce à leurs propriétés réductrices en milieu alcalin et à chaud, vis-à-vis de l'acide 3-5 dinitrosalicylique (3,5-DNS).

La réaction est non stoechiométrique et très dépendante des conditions opératoires. Par conséquent le dosage est réalisé par référence à une gamme d'étalonnage.

Le 3,5-DNS jaune est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique orange-rouge, quantifiable par colorimétrie à 530 nm.

Matériels et réactifs

- Filtrats F_A et F_B
- Solution étalon de lactose monohydraté à 1 g.L^{-1} noté « Lactose étalon 1 g.L^{-1} »
- Réactif au 3,5-DNS en distributeur
- 2 béchers de 100 mL
- Pipette automatique 1m L (P1000)
- Pipette graduée de 2 mL et pipette graduée de 10 mL
- 9 tubes à essais
- 9 macrocuvettes (visible)
- Glace
- Papier d'aluminium, coton cardé, chronomètre, vortex
- Spectrophotomètre + fiche d'utilisation
- Bain marie

Protocole opératoire**Conditions opératoires pour avoir des résultats reproductibles :**

- La coloration doit se développer au bain-marie pendant un temps précis.
- Les tubes doivent être refroidis immédiatement dans un bain d'eau froide.
- La coloration est stable pendant une heure.

Préparation de la gamme d'étalonnage :

- A partir de la solution étalon de lactose, préparer une gamme d'étalonnage de 5 tubes contenant de 0 à 1 mg de lactose monohydraté.
- Compléter à 2 mL avec de l'eau distillée.
- Ajouter 2 mL de réactif au 3-5 DNS.
- Boucher les tubes à l'aide de coton cardé et de papier aluminium. Homogénéiser.
- Porter au bain-marie pendant exactement 5 minutes.
- Refroidir immédiatement dans un bain d'eau glacée.
- Après refroidissement, ajouter 6 mL d'eau distillée.

Dosages :

Effectuer les dosages sur 1 mL de chaque filtrat (2 essais par filtrat F_A et F_B) dans les mêmes conditions que la gamme d'étalonnage.

Lire les absorbances à 530 nm contre le témoin réactif.

Compte-rendu

- Etablir le tableau de colorimétrie. Justifier sur un tube le calcul de la masse de lactose.
- Compléter la feuille de traçabilité.
- A l'aide de l'outil informatique, tracer la droite d'étalonnage $A_{530\text{nm}} = f(\text{mg de lactose par tube})$. Rendre un graphe renseigné, y indiquer tous les paramètres de la régression linéaire.
- Etablir l'équation aux grandeurs permettant de calculer la teneur en lactose des deux yaourts exprimée en g de lactose pour 100 g de yaourt.
- Calculer et exprimer ces teneurs.

Données:

$s_r = 0,10 \%$ (m/m)

$u_c = 0,20 \%$ (m/m)

FICHE PROTOCOLE 3

Dosage de l'acide lactique par méthode enzymatique

Matériels et réactifs

- Filtrats F_A et F_B
- Solution 1: tampon glycyl-glycine et glutamate :4 mL
- Solution 2 : NAD⁺: 1 mL
- Suspension 3 : suspension de D-Glutamate-pyruvate transaminase (D-GPT) : 0,2 mL
- Suspension 4 :suspension de L-Lactate deshydrogenase (L-LDH) :0,2 mL
- Microcuves « UV » : 5
- P5000, P1000, P200, P50
- 1 chronomètre
- 1 spectrophotomètre pour lecture UV et fiche d'utilisation

Protocole opératoire (réaliser deux essais par filtrat)

- Les solutions 1 et 2 et les suspensions 3 et 4 sont conservées à 4°C (à demander à l'examineur)
- Suivre la fiche.technique et effectuer le dosage sur les filtrats F_A et F_B

Compte-rendu

- Compléter le tableau sur la feuille de traçabilité.
- Calculer la concentration en acide L-lactique en g.L⁻¹ des filtrats.
- Déterminer la teneur en acide L-lactique des yaourts A et B en g.100 g⁻¹

Données

- Equation aux grandeurs de la concentration massique des filtrats en acide L-lactique (ρ) en g.L⁻¹:

$$\rho_{\text{acide lactique}} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot l} \times \frac{V_{\text{MR}}}{V_{\text{E}}} \times M_{\text{acide lactique}}$$

Avec :

ΔA	=(A ₂ -A ₁) _{échantillon} - (A ₂ -A ₁) _{blanc}
ε	Coefficient d'absorbance linéique molaire du NADH,H ⁺ à 340 nm: 6300 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹
l	Longueur du trajet optique: cm
V _{MR}	Volume final de milieu réactionnel (mL)
V _E	Volume d'échantillon (mL)
M _{acide lactique}	Masse molaire de l'acide L-lactique (g.mol ⁻¹)

- s_r =0,20 % (m/m)

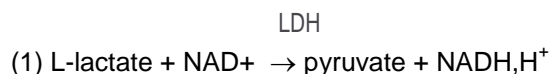
- u_c = 0,50 % (m/m)

FICHE TECHNIQUE	Dosage de l'acide lactique par méthode enzymatique
------------------------	---

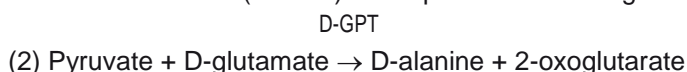
Kit L-Lactic Acid (L-Lactate)

Principle

The quantification of L-lactic acid requires two enzyme reactions. In the first reaction catalysed by L-lactate dehydrogenase (L-LDH). L-lactic acid (L-lactate) is oxidized to pyruvate by nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) (1)



However, since the equilibrium of reaction (1) lies firmly in the favour of L-lactic acid and NAD⁺, a further reaction is required to "trap" the pyruvate product. This is achieved by the conversion of pyruvate to D and 2-oxoglutarate, with the enzyme D-glutamate-pyruvate transaminase (D-GPT) in the presence of a large excess of D-glutamate (2).



The amount of NADH formed in the above coupled reaction is stoichiometric with the amount of acid. It is the NADH which is measured by the increase in absorbance at 340 nm.

Procedure

Wavelength 340 nm
 Cuvette 1cm light path (glass or plastic)
 Temperature 20-25°C
 Final volume 2,24 mL
 Sample solution 0,3 - 30 µg of lactic-acid per cuvette (in 0,10 -1,5 mL sample volume)
 Read against air (without a cuvette in the light path).

Pipette into cuvettes	Blank	Sample
Distilled water	1,6 mL	1,5 mL
Sample	-	0,10 mL
Solution 1 (glycerylglycerine buffer-glutamate)	0,50 mL	0,50 mL
Solution 2 (NAD ⁺)	0,10 mL	0,10 mL
Suspension 3 (D-GPT)	0,02 mL	0,02 mL
Mix, read the absorbances of the solutions (A ₁) after approx. 3 min and start the reactions by addition of:		
Suspension 4 (L-LDH)	0,02 mL	0,02 mL
Mix, read the absorbances of the solutions (A ₂) at the end of the reaction (approx. 10 min). If the reaction has not stopped after 10 min, continue to read the absorbances at 5 min intervals until the absorbances remain the same		

Feuille de traçabilité

(à compléter et à rendre avec la copie)

Précipitation des protéines du yaourt :

	Yaourt A	Yaourt B
Masse de yaourt (g)		
Volume de filtrat (mL)		

Dosage colorimétrique du lactose par la méthode au DNS :

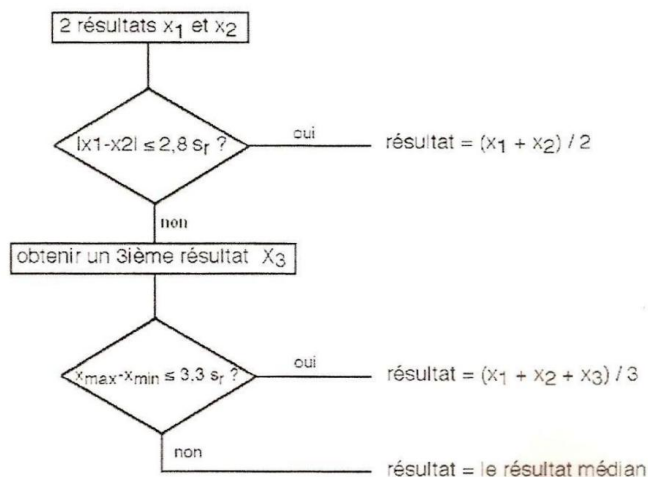
N°tube	0	1	2	3	4	Filtrat A essai1	Filtrat A essai2	Filtrat B essai1	Filtrat B essai2
Masse de lactose en mg par tube									
A à 530 nm									

Dosage de l'acide lactique par méthode enzymatique :

A à 340 nm	Blanc	F _{A1}	F _{A2}	F _{B1}	F _{B2}
A ₁					
A ₂					
A ₂ - A ₁					
ΔA					

ANNEXE : ACCEPTABILITÉ DES RÉSULTATS

Logigramme de traitement des données expérimentales



Expression du résultat

Le nombre de signes significatifs pour exprimer le résultat final établi sera en adéquation avec l'expression numérique de l'incertitude élargie.

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) qui donne un niveau de confiance d'environ 95%
- Le résultat final encadré : $X \pm$ incertitude élargie (unités précisées)

Techniques de microbiologie 2014

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)

CONTROLE DE L'HYGIENE DANS UNE INDUSTRIE LAITIERE

Contexte professionnel

Des prélèvements ont été effectués au niveau d'une chaîne de production de yaourt. Un contaminant a été retrouvé. Afin d'éliminer ce contaminant, l'entreprise a décidé d'utiliser un nouveau désinfectant Agréger 1510 sans phénol et sans formol. Avant d'employer ce désinfectant en production, le laboratoire de contrôle doit vérifier la sensibilité du contaminant à ce désinfectant à la concentration préconisée par le fournisseur (0,25 %). D'autre part, le responsable du laboratoire veut tester une nouvelle technique de prélèvement, en étudiant le rendement de récupération des microorganismes par ce nouveau procédé.

Objectifs

Identification d'un contaminant retrouvé sur la chaîne de production.
Détermination de la CMI du désinfectant Agrigerm 1510 vis-à-vis du contaminant.
Vérification de l'efficacité d'un nouveau protocole de contrôle de surface.

Compétences évaluées

Réaliser des analyses et des contrôles microbiologiques.

Techniques d'observations macroscopique et microscopique des microorganismes.

Techniques de culture de microorganismes.

Techniques d'identification des microorganismes.

Techniques de quantification des microorganismes et des virus.

Techniques d'étude relatives aux agents antimicrobiens.

Analyser, Interpréter et valider des résultats.

Organiser le travail dans le temps et dans l'espace.

Premier jour

Mise en œuvre

Activités professionnelles	Ressource-documents	Documents à compléter et à joindre à la copie
1 : Identification d'un contaminant retrouvé sur la chaîne de production	Fiche protocole 1	Feuilles de traçabilité
2 : Détermination de la CMI du désinfectant Agrigerm 1510 vis-à-vis du contaminant	Fiche protocole 2	
3 : Vérification de l'efficacité d'un nouveau protocole de contrôle de surface	Fiche protocole 3	

Fiche de sécurité à disposition

- Cristal violet
- Réactif de Lugol
- Ethanol
- Fuchsine
- Réactif VP 2
- Zinc
- Réactif de Kovacs

FICHE PROTOCOLE 1	Identification d'un contaminant retrouvé sur la chaîne de production
--------------------------	---

Un contaminant a été isolé sur gélose nutritive en pente à partir d'un prélèvement réalisé sur la chaîne de production. On cherche à identifier ce contaminant.

Matériel et réactifs

- tube de 2 mL d'eau physiologique
- gélose nutritive en pente ensemencée avec le contaminant marquée « C »
- réactif test de la catalase '
- réactif test de l'oxydase
- colorants de Gram

Protocole opératoire

A partir d'une colonie du contaminant repiqué sur gélose nutritive en pente notée « C », réaliser les observations macroscopique et microscopique nécessaires et le test enzymatique approprié.

Présenter un champ microscopique à l'examineur.

Présenter la réalisation du test à un examineur.

Proposer une galerie miniaturisée et les milieux complémentaires pour identifier ce contaminant « C ».

La proposition de galerie miniaturisée doit être présentée par écrit à l'examineur au moins une heure avant la fin de l'épreuve.

Réaliser les ensemencements de la galerie et des milieux fournis.

Compte rendu

Consigner les résultats obtenus avec la commande de milieux sur la feuille de traçabilité à rendre avec le compte-rendu.

Justifier le choix de la galerie.

FICHE PROTOCOLE 2**Détermination de la CMI du désinfectant Agrigerm 1510 vis-à-vis du contaminant**

L'entreprise souhaite éliminer le contaminant par désinfection de la chaîne de production. Le laboratoire de contrôle qualité est chargé de contrôler l'efficacité du désinfectant sur le contaminant et de valider la concentration de 0,25 % préconisée par le fournisseur.

Matériel et réactifs

- tube contenant 10 mL de solution du désinfectant Agrigerm 1510 à 20% marqué "désinfectant » ;
- tube à hémolyse contenant une culture de 24 heures en bouillon nutritif du contaminant marqué " C",
- flacon contenant 50 mL d'eau distillée stérile,
- 7 tubes de 9 mL de gélose PCA en surfusion à 55°C;
- 7 boîtes de Pétri stériles de 55 mm de diamètre,
- 2 tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile,
- 6 tubes à hémolyse stériles,
- pipettes de 1mL stériles
- pipettes de 5 mL stériles
- anses calibrées 10 µL ou pipette automatique + cônes stériles

Protocole opératoire**1-Préparation de la gamme de désinfectant Agrigerm 1510 :**

A partir de la solution de désinfectant Agrigerm 1510 à 20 %, réaliser une gamme de dilutions selon le protocole ci-dessous.

Numéro	1	2	3	4	5	6
Eau distillée (mL)	5	5	5	5	5	5
Désinfectant 20% (mL)	5					
Transfert (mL)		5	5	5	5	5

Déposer 1mL de chaque dilution dans une boîte de Pétri de 55 mm de diamètre.

Couler 9 mL de gélose de dénombrement en surfusion.

Réaliser un témoin dans les mêmes conditions.

Homogénéiser et laisser solidifier.

2 - Préparation de la souche contaminante et ensemencement :

A partir du bouillon de culture « C », préparer une dilution au 1/100^{ième} en eau physiologique stérile.

Après séchage complet des boîtes, ensemencer l'inoculum en touche au centre de la gélose à l'aide d'une anse calibrée de 10 µL ou d'une pipette automatique. Laisser sécher et incuber 24 h à 35°C

Compte rendu

Sur la feuille de traçabilité :

- Calculer la concentration de désinfectant Agrigerm, exprimée en %, dans les tubes de la gamme étalon et dans chacune des boîtes.
- Préciser la composition du témoin.
- Justifier le rôle du témoin ainsi que le résultat attendu.

FICHE PROTOCOLE 3**Vérification de l'efficacité d'un nouveau protocole de contrôle de surface**

Afin de vérifier l'efficacité du nouveau protocole de contrôle de surface, le rendement de récupération d'un microorganisme test est évalué. Le microorganisme test retenu est *Staphylococcus aureus*.

Le protocole suivant a été mis en œuvre :

- dépôt sur une surface carrelée parfaitement délimitée de 0,3 mL de suspension test de *Staphylococcus aureus* notée « SA 10⁵ UFC/mL » étalonnée à environ 10⁵ bactéries/mL ;
- écouvillonnage de la totalité de la surface contaminée
- transfert de l'écouvillon dans 5 mL d'eau peptonnée tamponnée au NaCl avec neutralisant (lécithine + tween 80),
- homogénéisation. La suspension notée « S » est ainsi obtenue.

Matériel et réactifs

- 1 tube contenant 3 mL de la culture de *Staphylococcus aureus* notée « SA 10⁵ UFC/mL »
- 1 tube contenant 5 mL de la suspension notée "S"
- 7 tubes de 9 mL d'eau peptonnée tamponnée au NaCl avec neutralisant marqués "9 mL EP"
- 10 pipettes 1 mL stériles à usage unique
- 1 tube de billes de verre stériles .
- 1 flacon d'évacuation des billes de verre contaminées
- 12 géloses GTS sèches

Protocole opératoire

La méthode retenue est la méthode de dénombrement en surface d'un milieu gélosé.

1. Vérification de la concentration de la suspension test de *Staphylococcus aureus*

Réaliser les dilutions en eau peptonnée tamponnée au NaCl jusqu'à la dilution 10⁻³.

Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution

Réaliser l'ensemencement des dilutions 10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³ (2 boîtes par dilution), à l'aide de billes de verre stériles.

Incuber à 35°C pendant 24 h.

2. Détermination du rendement de récupération de la technique par écouvillonnage

Réaliser les dilutions 10⁻¹ et 10⁻² de la suspension notée « S ».

Réaliser l'ensemencement de S et de ces dilutions (2 boîtes par dilution); à l'aide de billes de verre stériles.

Incuber à 36°C pendant 24 h.

Expliquer, par le calcul, le choix de ces ensemencements.

Compte rendu

Sur la feuille de traçabilité, justifier le choix des dilutions réalisées pour le dénombrement de la suspension « S ».

FEUILLE DE TRAÇABILITÉ
(à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPERATEUR

Date :.....
Poste n°

1 - Identification du contaminant retrouvé sur la chaîne de production

- Observation macroscopique :

- Observation microscopique:

- Test enzymatique :

- Orientation :

- Micro galerie et milieux complémentaires demandés (à faire viser par un examinateur au plus tard une heure avant la fin de l'épreuve) :

2 - Détermination de la CMI du désinfectant Agrigerm 1 510 vis-à-vis du contaminant

Numéro	1	2	3	4	5	6
Eau distillée (mL)	5	5	5	5	5	5
Désinfectant 20 % (mL)	5					
Transfert (mL)		5	5	5	5	5
Concentration du désinfectant en % dans les tubes						
Concentration du désinfectant en % dans les boîtes						

- Exemple de calcul :

- Composition du témoin :

- Rôle du témoin et résultat attendu :

3 - Vérification de l'efficacité d'un nouveau protocole de contrôle de surface

Justification du choix des dilutions réalisées pour le dénombrement de la suspension " S" :

Deuxième jour

Mise en œuvre

Activités professionnelles	Ressource-documents	Documents à compléter et à joindre à la copie
1 : Identification d'un contaminant retrouvé sur la chaîne de production	Fiche protocole 1	Feuilles de traçabilité
2 : Détermination de la CMI du désinfectant Agrigerm 1510 vis-à-vis du contaminant	Fiche protocole 2	
3 : Vérification de l'efficacité d'un nouveau protocole de contrôle de surface	Fiche protocole 3	

Fiches sécurité

- Réactif oxydase
- Peroxyde d'hydrogène
- Réactif NIT 1
- Réactif NIT 2
- Réactif VP1

FICHE PROTOCOLE 1	Identification d'un contaminant retrouvé sur la chaîne de production
--------------------------	---

Un contaminant a été isolé sur gélose nutritive en pente à partir d'un prélèvement réalisé sur la chaîne de production. On cherche à identifier ce contaminant.

Matériel et réactifs

- Réactifs de révélation de la galerie API
- Fiches lecture galerie API 20 E
- Logiciel API OU Taxon

Protocole opératoire

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

Compte rendu

Compléter la feuille de traçabilité

FICHE PROTOCOLE 2**Détermination de la CMI du désinfectant Agrigerm 1510 vis-à-vis du contaminant**

Rappel: le fournisseur préconise d'utiliser le désinfectant Agrigerm 1510 à 0,25 %.

Le désinfectant à 20 % a été dilué de la façon suivante et testé sur le contaminant identifié dans le protocole 1.

Numéro	1	2	3	4	5	6
Eau distillée (mL)	2	2	2	2	2	2
Désinfectant 20 % (mL)	2					
Transfert (mL)		2	2	2	2	2
Concentrations du désinfectant en % dans les boîtes	1,0	0,50	0,25	0,12	0,062	0,031

Déterminer la CMI.

Compte rendu

Compléter la feuille de traçabilité

FICHE PROTOCOLE 3**Vérification de l'efficacité d'un nouveau protocole de contrôle de surface**

Rappel: Afin de vérifier l'efficacité du nouveau protocole de contrôle de surface, le rendement de récupération d'un microorganisme test est évalué. Le microorganisme test retenu est *Staphylococcus aureus*.

L'expérience suivante a été mise en œuvre :

- dépôt sur une surface carrelée parfaitement délimitée de 0,3 mL de suspension test de *Staphylococcus aureus* notée « SA 10⁵ UFC/mL » Etalonnée à environ 10⁵ bactéries/mL ;
- écouvillonnage de la totalité de la surface contaminée
- transfert de l'écouvillon dans 5 mL d'eau peptonnée tamponnée au NaCl avec neutralisant (lécithine + tween 80),
- homogénéisation. La suspension notée « S » est ainsi obtenue.

Protocole opératoire

Dénombrer les colonies sur les différentes séries de boîtes.

Compte rendu

Sur la feuille de traçabilité:

- Présenter les résultats sous une forme appropriée.
- Calculer la concentration de la suspension test de *Staphylococcus aureus*, à l'aide de la formule AFNOR donnée en annexe1.
- Calculer la concentration de la suspension S.
- En déduire le rendement de récupération des bactéries par écouvillonnage de la surface contaminée.

ANNEXE 1

Formule de calcul par moyenne pondérée

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

- $\sum c$ somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives
 V volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en mL
 n₁ nombre des boîtes retenues à la première dilution
 n₂ nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution
 d dilution correspondant à la première dilution retenue

FEUILLE DE TRAÇABILITÉ
(à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPERATEUR

Date :.....

Poste n°

1 - Identification du contaminant retrouvé sur la chaîne de production- Résultats et analyse de l'isolement GTS- Lecture et analyse des milieux VF et Hugh et Leif son- Feuille de lecture de la galerie API- Identification du contaminant**2 - Détermination de la CMI du désinfectant Agrigerm 1510 vis-à-vis du contaminant**

Numéro	1	2	3	4	5	6	Témoin
Concentration du désinfectant en % dans les boîtes	1,0	0,50	0,25	0,12	0,062	0,031	
Résultats							

Légende :

Interprétation :

Conclusion :

3 - Vérification de l'efficacité d'un nouveau protocole de contrôle de surface**Détermination de la concentration de la suspension test de *Staphylococcus aureus* :**

- Présentation des résultats :
- Calcul de la concentration de la suspension test :

Détermination de la concentration de la suspension « S » :

- Présentation des résultats :
- Calcul de la concentration de la suspension test :

Calcul du rendement de récupération des bactéries par écouvillonnage de la surface contaminée :**Conclusion :**

Techniques de biologie cellulaire et moléculaire 2014

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)

DETECTION DU VIRUS DE SCHMALLEMBERG (SBV)

Contexte professionnel

Le virus de Schmallenberg est un virus nouvellement apparu en Europe en 2011. Il affecte le bétail (bovin, ovin et caprin) provoquant des malformations néonatales. Il n'a pas encore (Janvier 2012) reçu de nom officiel. Son nom provisoire dérive de Schmallenberg, ville allemande d'où proviennent les premiers échantillons positifs. Sa transmission semble assurée par des moucheron. En France, les premiers cas de la maladie due au virus de Schmallenberg ont été identifiés le 26 Janvier 2012 dans des élevages ovins de la région Lorraine.

La disponibilité d'un kit ELISA SBV rend possible la réalisation d'enquêtes sérologiques SBV. D'autre part, la charge virale peut être détectée par RT-PCR.

Objectifs

Identifier et quantifier le SBV dans les échantillons sériques prélevés dans 4 cheptels de la région Lorraine, par ELISA.

A l'aide d'une électrophorèse en gel d'agarose, analyser et identifier les fragments nucléotidiques du virus amplifiés par RT-PCR,

Compétences évaluées

Réaliser des analyses et des contrôles utilisant des anticorps (11 points)

Réaliser des analyses et des contrôles utilisant les outils de la biologie moléculaire (10 points).

Analyser, interpréter, valider des résultats (15 points)

Organiser le travail dans le temps et dans l'espace (2 points)

Gérer la santé et la sécurité au travail (2 points)

Mise en œuvre

Activité professionnelles	Ressources et documents	Document à compléter et à joindre avec la copie
1 Sérodiagnostic du SBV	Fiche protocole 1 Fiche technique du lecteur de microplaque (a cote de l'appareil)	Feuille de traçabilité
2 Dépistage du virus SBV par RT-PCR	Fiche protocole 2 - Annexe 1 :pourcentage d'agarose en fonction de la taille des fragments d'ADN Annexe 2 :résultats de RT-PCR	

Rapport d'analyse

Comparer les résultats obtenus par les deux méthodes sur les quatre cheptels

FICHE PROTOCOLE 1**Sérodiagnostic du SBV (ELISA)**

Dans le cadre d'une enquête épidémiologique, 4 échantillons de sérums ont été prélevés dans 4 cheptels de la région Lorraine.

Matériels et réactifs

- gants
- pipettes automatiques P200 et cônes
- 1 barette double (16 puits) sensibilisés sur un cadre support + film autocollant
- 1 flacon contenant 50 mL de tampon de lavage: "PBS-Tween"
- 1 tube à hémolyse contenant 1 mL de sérum faiblement positif noté "S+"
- 1 tube à hémolyse contenant 1 mL de sérum fortement positif noté "Sf+"
- 1 tube à hémolyse contenant 1 mL de sérum négatif noté "S-"
- 1 tube à hémolyse contenant 3,5 mL de conjugué= Ac anti-IgG de mouton marqué par la phosphatase alcaline noté "conjugué"
- 1 tube à hémolyse contenant 1 mL de sérum à tester noté "S1"
- 1 tube à hémolyse contenant 1 mL de sérum à tester noté "S2"
- 1 tube à hémolyse contenant 1 mL de sérum à tester noté "S3"
- 1 tube à hémolyse contenant 1 mL de sérum à tester noté "S4"
- 1 tube à hémolyse contenant 2 mL de tampon "PBS"
- 1 tube à hémolyse contenant 3,5 mL de substrat= solution de paranitrophénylphosphate (pNPP) à 1 mg.L^{-1} en tampon Tris-HCl à 1 mol.L^{-1} , pH 9,8, noté "pNPP"
- 1 tube à hémolyse contenant 1 mL de NaOH à 3 mol.L^{-1} noté "NaOH"
- 1 bac pour rejet des liquides de rinçage
- 1 poubelle pour déchets biologiques

Matériel commun

- agitateur de microplaques
- lecteur de microplaques
- étuve à 37°C

Mode opératoire**1- Sensibilisation de la barette (déjà réalisée)**

Les cupules G2 et H2 ne sont pas utilisées

Toutes les cupules de la colonne 1 et 2 sauf F2 ont été sensibilisées de la manière suivante:

- Dépôt de 200 μL d'Ag viral
- Incubation 1h30 à 37°C
- Lavage avec du PBS-Tween

2- Saturation avec de la sérumalbumine bovine (déjà réalisée)

Toutes les cupules ont été saturées de la manière suivante:

- Dépôt de 200 μL de PBS-SAB
- Incubation 30 minutes à 37°C
- 3 lavages avec du PBS-Tween

3- Diagnostic sérologique

Les essais, contrôles et témoins, seront distribués selon le plan de plaque suivant:

	Colonne 1	Colonne 2
A	Sérum de contrôle fortement positif	Sérum 3
B	Sérum de contrôle faiblement positif	Sérum 4
C	Sérum de contrôle négatif	Sérum 4
D	Sérum 1	Témoin 1
E	Sérum 1	Témoin 2
F	Sérum 2	Témoin 3
G	Sérum 2	
H	Sérum 3	

FICHE PROTOCOLE 1 (suite)	Sérodiagnostic du SBV (ELISA)	
--------------------------------------	--------------------------------------	--

Appeler l'examineur au moment d'un pipetage.

Réaliser les étapes suivantes :

- Dans la cupule A1, introduire 100 µL de sérum de contrôle positif
- Dans la cupule B1, introduire 100 µL de sérum de contrôle faiblement positif
- Dans la cupule C1, introduire 100 µL de sérum de contrôle négatif
- Dans les cupules D1 et E1, introduire 100 µL de sérum « S1 »
- Dans les cupules F1 et G1, introduire 100 µL de sérum « S2 »
- Dans les cupules H1 et A2, introduire 100 µL de sérum « S3 »
- Dans les cupules B2 et C2, introduire 100 µL de sérum « S4 »
- Dans les cupules D2 et F2, introduire 100 µL de sérum de contrôle positif
- Dans la cupule E2, introduire 100 µL de tampon PBS.

Couvrir la plaque et incuber 1 heure à 37°C.

Réaliser 3 lavages successifs avec 200 µL de PBS-Tween dans chaque cupule.

- Dans toutes les cupules sauf D2, ajouter 200 µL de conjugué.
- Dans la cupule D2, distribuer 200 µL de tampon PBS.

Couvrir la plaque et incuber 30 minutes à 37°C

Réaliser 3 lavages successifs en PBS-Tween.

- Dans toutes les cupules, ajouter 200 µL de substrat pNPP.

Couvrir la plaque et incuber 30 minutes à 37°C.

- Arrêter la réaction en ajoutant dans toutes les cupules 50 µL de solution de NaOH à 1 mol.L⁻¹

Agiter

Lire les absorbances à 405 nm contre l'air.

Compte rendu (sur la copie)

1.1 - Compléter la feuille de traçabilité (à rendre avec la copie).

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

1.3 - On considère qu'un témoin est valide lorsque sa valeur d'absorbance est inférieure à 0,150. Valider les témoins.

1.4 - On considère qu'un sérum est positif si la différence des absorbances (absorbance sérum - absorbance D2) est supérieure à 0,200.

1.4.1 - Valider les contrôles

1.4.2 - Conclure, sur la feuille de traçabilité, pour les 4 sérums testés.

FICHE PROTOCOLE 2**Dépistage du virus SBV par RT-PCR**

Une autre technique de détection du virus de Schmallenberg utilise une RT-PCR.

Le virus de Schmallenberg est un virus à ARN. Dans un premier temps, on extrait l'ARN viral à partir du sérum des ovins. L'ARN viral est formé de 3 segments notés S, M et L.

Une RT-PCR est réalisée sur le segment L de l'ARN viral. On obtient des « amplicons » d'une longueur correspondant à 384 pb (paire de bases).

La détection des « amplicons » se fait sur gel d'agarose.

Matériel et réactifs

- 5 tubes Eppendorf vides
- P20 + cônes stériles
- 5 tubes Eppendorf renfermant les produits d'amplification nommés AS1, AS2, AS3, AS4 et AS+ obtenus respectivement à partir des sérums S1, S2, S3, S4 et S+
- solution de charge (glycérol, xylène cyanol, bleu de bromophénol)

Matériel commun

- cuve à électrophorèse
- 1 gel d'agarose prêt à l'emploi
- 3 L de Tampon TAE 1X
- marqueur de taille

Mode opératoire

- Préparation des échantillons :

Dans cinq tubes Eppendorf, déposer 5 µL de solution de charge puis ajouter 10 µL de chacun des « amplicons » à analyser. On testera 4 « amplicons » provenant des 4 échantillons de sérums identiques à ceux testés dans la fiche protocole 1. Ils sont notés AS1, AS2, AS3 et AS4 et un témoin de contrôle positif noté AS+.

- Disposer le gel dans la cuve en présence de l'examineur.

- Déposer 10 µL de chaque échantillon préparé précédemment au fond des puits du gel d'agarose.

Appeler l'examineur lors de la réalisation de l'un des dépôts

- Au milieu du gel, dans un des puits central, déposer 10 µL du marqueur de taille.

Lorsque les dépôts ont été réalisés, éviter d'agiter les cuves.

- Les étapes suivantes seront réalisées par un examinateur : Recouvrir la cuve à électrophorèse. Brancher les électrodes. Régler le voltage sur 70 V. Laisser migrer.

Compte rendu (sur la copie)

2.1- A l'aide de l'annexe 1, déterminer le pourcentage d'agarose du gel à préparer. En déduire la masse d'agarose à peser pour préparer 80 mL de gel d'agarose.

2.2 - Expliquer le rôle du marqueur de taille.

2.3 - Préciser l'orientation du gel dans la cuve d'électrophorèse.

2.4 - Interpréter les résultats donnés en **annexe 2**.

FEUILLE DE TRAÇABILITE
(à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPERATEUR:.....

DATE:

Poste n °:.....

1 - Sérodiagnostic du SBV (ELISA)

Résultats de la lecture (Abs = absorbance à 405nm)

	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
Abs à 405 nm								
	A2	B2	C2	D2	E2	F2		
Abs à 405 nm								

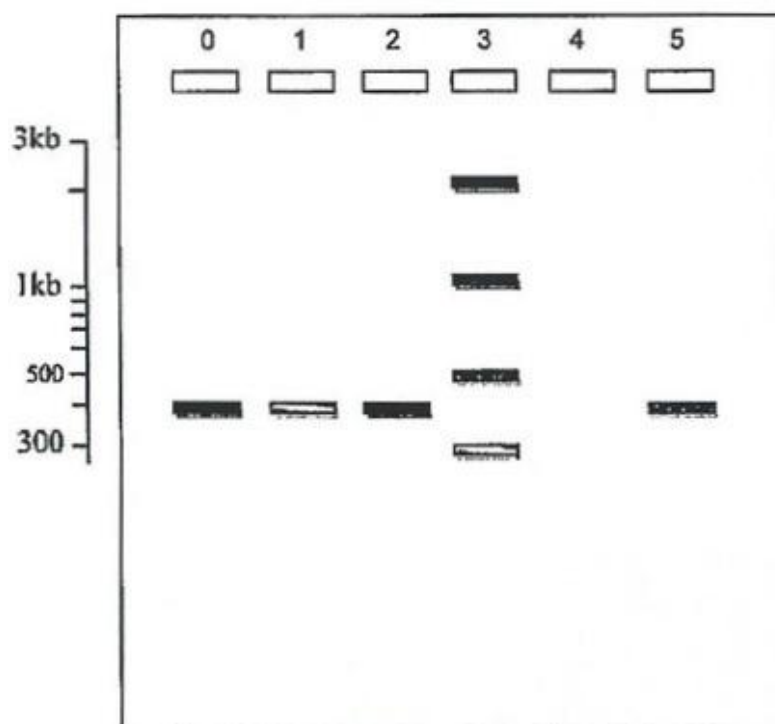
	Sérum de contrôle positif	Sérum de contrôle faiblement positif	Sérum de contrôle négatif	S1	S2	S3	S4
Abs _{essai} - Abs _{D2}							
Conclusion							

ANNEXE 1**Pourcentage d'agarose en fonction de la taille des fragments d'ADN**

Pourcentage d'agarose	Domaine de fractionnement en pb
0,3	60 000 à 5 000
0,6	20 000 à 1 000
0,7	10 000 à 800
0,9	7 000 à 500
1,2	6 000 à 400
1,5	4 000 à 200
2,0	3 000 à 100

ANNEXE 2

Resultats obtenus par RT-PCR

**Vérification des produits de la RT-PCR sur gel d'agarose**

Ligne 0 :Produits d'amplification AS+

Ligne 1 :Produits d'amplification AS1

Ligne 2 :Produits d'amplification AS2

Ligne 3 :Marqueur de taille

Ligne 4 :Produits d'amplification AS3

Ligne 5 :Produits d'amplification AS4

Session 2015

Sujet de mathématiques 2015

Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique sont autorisées à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante

EXERCICE 1(11points)

Pharmacocinétique

On s'intéresse à une maladie dégénérative de l'œil qui occasionne des troubles de la vision. Afin de freiner son évolution, deux traitements sont possibles. Dans cet exercice, on étudie, pour ces deux traitements, l'évolution de la quantité des principes actifs présents dans le sang en fonction du temps.

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

Partie A : Etude du premier traitement

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

Le premier traitement consiste à faire absorber au malade par voie orale un médicament qui libère peu à peu le principe actif qui passe dans le sang. Il est efficace lorsque la quantité de principe actif est supérieure ou égale à 5 mg. On admet qu'à l'instant $t = 0$ la quantité de principe actif présente dans le sang est de 1 mg.

1. Résolution d'une équation différentielle

L'évolution en fonction du temps (exprimé en heures), de la quantité de principe actif présente dans le sang après absorption (exprimée en mg) est modélisée par une fonction vérifiant l'équation différentielle :

$$(E) : y' + 0,1y = 2e^{-0,1t}$$

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

- Déterminer les solutions sur $[0 ; +\infty[$ de l'équation $(E_0) : y' + 0,1y = 0$.
- Soit h la fonction définie sur $[0 ; +\infty[$ par $h(t) = 2te^{-0,1t}$. Vérifier que h est une solution particulière de (E) .
- En déduire l'ensemble des solutions de l'équation différentielle (E) .
- Déterminer la solution de (E) correspondant au problème posé.

2. Etude d'une fonction

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

- On admet que la limite de f en $+\infty$ est 0.
Interpréter graphiquement cette limite.
- On note f' la fonction dérivée de f et on admet que $f'(t) = (1,9 - 0,2t)e^{-0,1t}$.

- i. Etudier le signe de $f'(t)$ sur l'intervalle $[0 ; +\infty[$
- ii. Dresser le tableau des variations de f sur $[0 ; +\infty[$

3. Application

- (a) Au bout de combien de temps la quantité de principe actif dans le sang sera-t-elle maximale ?
- (b) Sur quel intervalle de temps le médicament sera-t-il efficace ?

Dans cette question, toute trace de recherche, même incomplète, ou d'initiative même non fructueuse, sera prise en compte dans l'évaluation.

(c) On donne :

$$\int_0^{24} f(t)dt = 210 - 690e^{-2,4}$$

Déterminer la quantité moyenne de principe actif présente dans le sang entre 0 et 24 h. On arrondira le résultat au dixième.

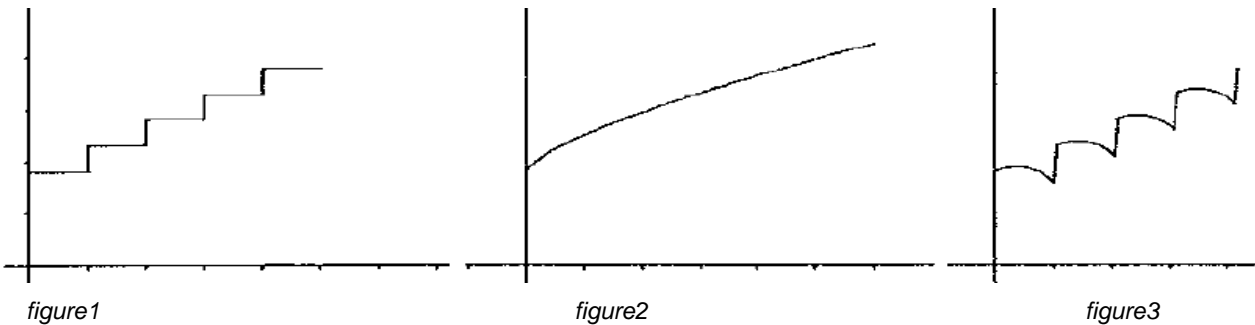
Partie B : Etude statistique du second traitement

Le second traitement consiste à injecter par intraveineuse un médicament qui permet une meilleure vascularisation des vaisseaux sanguins de la rétine. A l'instant $t = 0$, on injecte une dose de 1,8 mg de médicament, appelée dose de charge. On suppose que ce procédé diffuse instantanément dans le sang le principe actif qui est ensuite progressivement éliminé par les reins.

1. Administrations répétées du médicament

On décide de réinjecter une dose de 1,8 mg toutes les heures, dose supportable par le patient.

Parmi les trois courbes suivantes, quelle est celle qui représente le mieux l'évolution de la quantité de médicament présente dans le sang ? Argumenter votre choix.



2. Administration continue du médicament : recherche de la courbe de tendance

Après avoir injecté la dose de charge de 1,8 mg, on décide d'administrer ce médicament à l'aide d'une pompe, de manière continue, afin de réduire le plus possible les oscillations de la quantité de principe actif dans le sang.

L'étude consiste à déterminer l'état stationnaire (steady state) pour ce médicament. On considère que l'état stationnaire est atteint lorsque la différence entre la quantité limite et la quantité dans le sang est inférieure ou égale à 1mg.

On effectue sept mesures régulières pendant 24 h et on obtient les relevés suivants, où q_i désigne la quantité en mg de principe actif dans le sang à l'instant t_i .

t_i (en heure)	0	4	8	12	16	20	24
q_i (en mg)	1,8	9,5	15,5	20,2	23,7	26,8	28,7

On cherche à modéliser l'expression de la quantité de principe actif dans le sang en fonction du temps. Un ajustement affine n'étant pas judicieux, on décide de procéder à un changement de variable.

(a) On pose $y_i = \ln(36 - q_i)$.

i. Donner les 3 valeurs manquantes de ce tableau. Arrondir au centième.

t_i	0	4	8	12	16	20	24
q_i	1,8	9,5	15,5	20,2	23,7	26,8	28,7
y_i	3,53	3,28			2,51	2,22	

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

(b) Donner une expression de la quantité q en fonction de t déduite de cet ajustement.

Dans la question suivante, toute trace de recherche, même incomplète, ou d'initiative même non fructueuse, sera prise en compte dans l'évaluation.

(c) Un médecin affirme que l'état stationnaire est atteint en moins de trois jours. En admettant que la quantité limite est de 36 mg, quel argument peut-il fournir pour justifier cette affirmation ?

EXERCICE 2 (9 points)

Industrie agroalimentaire

L'entreprise agro-alimentaire Flavornuts fabrique des arômes naturels servant à l'amélioration des préparations culinaires pour la pâtisserie ou la cuisine. Elle les conditionne dans des flacons de 58 mL qu'elle achète à l'entreprise Verremballage, qui conçoit, développe et commercialise des solutions d'emballages primaires composées de flacons standards.

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

Partie A : Etiquetage

L'étiquetage des denrées alimentaires préemballées est obligatoire (articles R. 112-1 et suivants du code de la consommation). Certaines mentions sont imposées par la législation, d'autres sont facultatives. Toutes sont fournies par les fabricants, sous leur responsabilité. L'étiquetage est constitué par " les mentions, indications, marques de fabrique ou de commerce, images ou signes se rapportant d'une denrée alimentaire. et figurant sur tout emballage, document, écriteau, étiquette, bague ou collerette accompagnant ou se référant à cette denrée alimentaire (article R. 112-1 du code de la consommation). "

Une fois fabriquées, les étiquettes peuvent présenter deux défauts : un défaut du visuel (graphisme, photo, couleur . . .) ou l'absence de la date limite de consommation.

On considère les événements suivants :

- A : « la date limite de consommation n'apparaît pas sur l'étiquette ».
- D : « l'étiquette comporte un défaut du visuel » ;

On suppose que les événements A et D sont indépendants.

On admet que les probabilités des événements sont : $p(A) = 0,01$ et $p(D) = 0,03$.

1. Calculer la probabilité qu'une étiquette prélevée au hasard dans la production présente les deux défauts.
2. Calculer la probabilité qu'une étiquette prélevée au hasard dans la production ne présente aucun de ces deux défauts.

Partie B : Etude de la contenance

Dans cette partie, les résultats seront arrondis, si nécessaire, à 10^{-2} près.

On définit une variable aléatoire V associant à chaque flacon son volume utile exprimé en mL. On suppose que V suit la loi normale de moyenne $m = 58$ (valeur annoncée par le fournisseur) et d'écart type $\sigma = 0,04$. Le cahier des charges indique que le flacon est conforme lorsque ce volume appartient à l'intervalle $[57,90 ; 58,10]$. On choisit un flacon au hasard dans la production.

1. Déterminer la probabilité pour qu'il soit non conforme.
2. Donner une valeur arrondie au centième du réel h tel que : $p(58 - h \leq V \leq 58 + h) = 0,95$.

Toute trace de recherche sera prise en compte dans l'évaluation.

Partie C : Test d'hypothèse.

À l'occasion d'une commande, le service contrôle du laboratoire reçoit un lot de flacons. Il effectue un prélèvement aléatoire de 80 flacons. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Volume	[57,93 ; 57,97[[57,97 ; 58,01[[58,01 ; 58,05[[58,05 ; 58,09[[58,09 ; 58,13[
Effectif	2	10	39	21	8

1. Calculer la moyenne \bar{v} et l'écart type s de cet échantillon (arrondir le résultat à 10^{-3} près) en faisant l'hypothèse que les valeurs observées sont respectivement celles du centre de chaque classe.

2. Construction du test

Le volume des flacons doit être de 58 mL. On se propose de construire un test d'hypothèse bilatéral au seuil de signification de 5 % pour contrôler, au moment de la livraison, la moyenne μ de l'ensemble des volumes (en mL) des flacons. On note V la variable aléatoire qui, à chaque échantillon de 80 flacons prélevés au hasard dans l'ensemble de la production associe la moyenne des volumes.

On considère:

- L'hypothèse nulle $H_0 : \mu = 58$
- L'hypothèse alternative $H_1 : \mu \neq 58$

Le seuil de signification est fixé à 0,05.

On admet que, sous l'hypothèse H_0 , \bar{V} suit la loi normale $N(58; \frac{0,04}{\sqrt{80}})$.

(a) Parmi les quatre intervalles proposés, lequel utiliseriez-vous pour effectuer le test ? Justifier votre choix.

$$I = \left[58,04 - 1,65 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}} ; 58,04 + 1,65 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}} \right]$$

$$J = \left[58,04 - 1,96 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}} ; 58,04 + 1,96 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}} \right]$$

$$K = \left[58 - 1,65 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}} ; 58 + 1,65 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}} \right]$$

$$L = \left[58 - 1,96 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}} ; 58 + 1,96 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}} \right]$$

(b) Énoncer la règle de décision du test.

3. Utilisation du test

En utilisant les informations recueillies sur l'échantillon de 80 flacons, le service de contrôle acceptera-t-il cette livraison ? Justifier.

Sujet de sciences physiques et chimiques 2015

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)

A : POLARIMETRIE (15 points)

Dans le commerce, on peut trouver des solutions aqueuses de glucose pour perfusion en cas de déshydratation ou d'hypoglycémie.

Le glucose de formule brute $C_6H_{12}O_6$ est un sucre monosaccharide (encore appelé ose).

Le stéréoisomère naturel du glucose est le D-Glucose. Comme tous les oses, il possède des atomes de carbone asymétriques qui lui donnent un caractère chiral. Le plan de polarisation d'une lumière incidente polarisée rectilignement peut donc tourner à la traversée d'une solution aqueuse de glucose.

Le pouvoir rotatoire spécifique du D-glucose pour la raie D du sodium et pour une température de 20°C est $[\alpha]_D^{20} = +0,527^\circ \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$

Dans le cadre d'un contrôle qualité, un technicien de laboratoire doit vérifier, par polarimétrie, la valeur du pourcentage massique d'une solution aqueuse glucosée S_0 dont l'emballage indique : $(5,00 \pm 0,20) \%$

- 1 - Donner l'expression littérale de la loi de Biot pour une solution contenant une substance optiquement active dans un solvant inactif.
- 2 - Préciser la signification de chacun des termes et leur unité dans le système international.
- 3 - Une solution aqueuse de D-glucose est-elle dextrogyre ou lévogyre ? Justifier.
- 4 - Pour vérifier la valeur du pouvoir rotatoire spécifique du D-glucose, ce technicien place dans un tube polarimétrique de longueur $\ell = 20,0$ cm des solutions aqueuses de D-glucose de concentrations connues. Il mesure leur pouvoir rotatoire α_D^{20} avec un polarimètre de Laurent, à 20°C pour la raie D du sodium. Ses résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Concentration ($kg \cdot m^{-3}$)	0,00	20,0	40,0	60,0	80,0	100,0
α_D^{20} (°)	0,00	2,12	4,22	6,31	8,42	10,56

- 4.1 - Effectuer la régression linéaire donnant α_D^{20} en fonction de la concentration sous la forme $\alpha_D^{20} = a \cdot C + b$.

Donner la valeur des coefficients a et b, préciser leur unité. Donner la valeur du coefficient de régression linéaire.

- 4.2 - Montrer que la loi de Biot est vérifiée pour cette série de mesures.

- 4.3 - En déduire la valeur expérimentale du pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D^{20}$ et la comparer à la valeur donnée en introduction après avoir calculé la valeur de l'écart relatif notée ER.

- 5 - Afin de déterminer la concentration de la solution S_0 à contrôler, le technicien mesure, dans les mêmes conditions expérimentales que dans la question précédente, son pouvoir rotatoire : il trouve $\alpha_D^{20} = 5,10^\circ$.

- 5.1 - A partir de cette valeur de α_D^{20} , déterminer la concentration massique C_m de cette solution glucosée S_0 .

- 5.2 - Sachant qu'un litre de solution glucosée à 10,0 % contient 100 g de glucose, quelle est la valeur du pourcentage massique en glucose, noté p, de cette solution ?

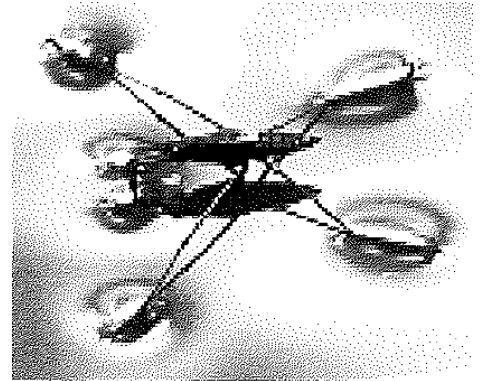
5.3 - Pourquoi ce technicien peut-il valider son contrôle qualité ?

B : LES GERRIS COMME DETECTEUR DE POLLUTION DE L'EAU (10 points)

Les Gerris sont des petits insectes capables de se déplacer sur la surface de l'eau. On peut les observer particulièrement à la surface d'eaux stagnantes (étangs, lacs, bords de rivières lentes...). Ils ne pénètrent pas dans l'eau mais restent en contact avec la surface de l'eau.

Ce phénomène s'explique par l'existence de forces de tension superficielle qui s'exercent sur chacune des pattes du Gerris et qui compensent son faible poids.

En portant atteinte aux forces de tension superficielle, les "tensioactifs", agents polluants, condamnent nos Gerris à la noyade. Les Gerris sont donc d'excellents "bio indicateurs", leur mode de vie les rendant particulièrement sensibles aux pollutions, notamment à celles touchant la surface des eaux.



Le Gerris commun

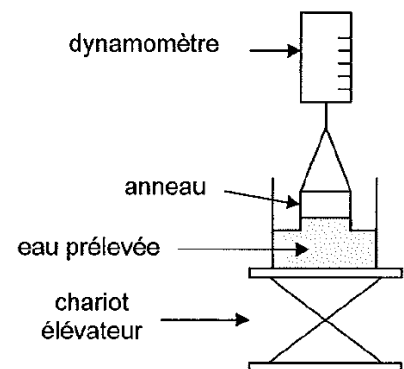
Source: <https://domeicus.malleotus.free.fr>

On se propose, à l'aide de deux techniques de mesure du coefficient de tension superficielle, noté σ , de justifier la disparition des Gerris d'une zone marécageuse.

Première technique : Méthode de l'anneau

Le dispositif est représenté sur le schéma ci-contre. L'eau prélevée dans la zone marécageuse est placée dans un bécier sur un chariot élévateur. Au-dessus du bécier est placé un anneau relié à un dynamomètre qui permettra la mesure de l'intensité de la force F de tension superficielle.

A l'aide du chariot élévateur, on remonte le liquide jusqu'à effleurement de l'anneau. Sous l'action des forces de tension superficielle, celui-ci plonge dans le liquide. On redescend alors le bécier contenant le liquide et on lit sur le dynamomètre l'intensité de la force F au moment où l'anneau est arraché du liquide.



La force de tension superficielle F (exprimée en Newton) exercée sur l'anneau a pour expression $F=2\pi.d.\sigma$ où d représente le diamètre moyen de l'anneau. Pour la suite de l'exercice on prendra comme diamètre moyen $d = 57,0 \text{ mm}$.

1 - Préciser l'unité du coefficient de tension superficielle σ dans le système international.

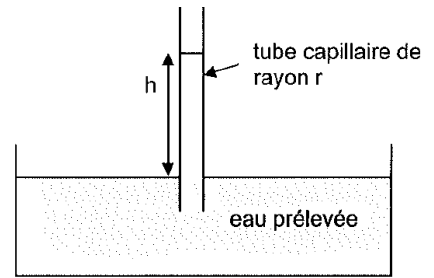
2 - L'intensité de la force F lue sur le dynamomètre à l'arrachement est de 20,0 mN.

Calculer la valeur ainsi obtenue par la méthode de l'anneau du coefficient de tension superficielle σ_1 pour cette eau marécageuse.

Seconde technique : Méthode du tube capillaire

Lorsque l'on plonge un tube capillaire dans un liquide, ce dernier remonte dans le tube sous l'action des forces de tension superficielle. L'eau prélevée dans la zone marécageuse est placée dans un cristalliseur. On mesure une hauteur d'ascension $h = 11,4$ cm dans le tube capillaire. Dans le cadre du mouillage parfait, la hauteur h d'ascension est donnée par la loi de Jurin :

$$h = \frac{2\sigma}{\rho g r}$$



Avec ρ : masse volumique du liquide ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

g : intensité de pesanteur ($\text{N}\cdot\text{kg}^{-1}$)

r : rayon du tube capillaire (m)

Données : $g = 9,80 \text{ N}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\rho = 1,00 \cdot 10^3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ $r = 1,00 \cdot 10^{-4} \text{ m}$.

3 - Calculer la valeur ainsi obtenue par la méthode du tube capillaire du coefficient de tension superficielle σ_2 pour cette eau marécageuse.

Exploitation des résultats des deux méthodes

A l'aide du tableau ci-dessous et des résultats obtenus aux questions 2 et 3 :

4 - Identifier la qualité de l'eau de la zone marécageuse.

5 - Expliquer alors la disparition des gerris dans cette zone marécageuse.

6 - Montrer que la valeur minimale, notée m_{in} , d'ascension dans le tube capillaire permettant de qualifier rapidement une eau de non polluée est $m_{in} = 13,0$ cm.

Qualité de l'eau	Eau très polluée	Eau moyennement polluée	Eau non polluée
Pourcentage de tensioactifs dans l'eau	Supérieur à 1%	Entre 0,01% et 1%	Inférieure à 0,01%
σ (SI)	Inférieure à $3,90 \cdot 10^{-2}$	Entre $3,90 \cdot 10^{-2}$ et $6,40 \cdot 10^{-2}$	Supérieure à $6,40 \cdot 10^{-2}$

C : CONDUCTIMÉTRIE (10 points)

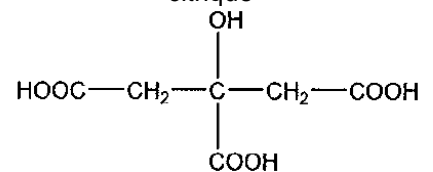
L'acide citrique est un additif alimentaire souvent utilisé comme acidifiant.

Il tient son nom de son origine, le citron, dans lequel il est naturellement présent en grande quantité.

Un étudiant pense que l'acidité du jus de citron est due à l'unique présence de l'acide citrique. Il souhaite vérifier cette hypothèse par un dosage conductimétrique.

Au cours de ses recherches, il apprend que l'acide citrique de formule brute $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ est un triacide dont la formule semi-développée est représentée ci-contre et que sa concentration massique moyenne dans un citron est de l'ordre de $62 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Formule semi-développée de l'acide citrique



Mise en œuvre du dosage conductimétrique

L'étudiant presse un citron pour en récupérer le jus. Après filtration, il dilue ce jus 20 fois et dispose alors d'une solution S. Pour réaliser le dosage conductimétrique, il prélève ensuite un volume $V_A = 20,0$ mL de cette solution S auquel il ajoute un volume de 300 mL d'eau distillée.

La solution titrante est une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ($\text{Na}_{\text{aq}}^+ + \text{HO}_{\text{aq}}^-$) de concentration molaire $C_B = 0,100$ mol.L⁻¹.

Ses différentes mesures ont permis de tracer le graphique donnant l'évolution de la conductance G en fonction du volume V de solution titrante versé. Ce graphique figure en annexe.

- 1 - Justifier l'ajout des 300 mL d'eau distillée.
- 2 - Ecrire l'équation de la réaction de titrage correspondant au dosage simultané des trois acidités de l'acide citrique. On notera AH_3 l'acide citrique et A^{3-} l'ion citrate.
- 3 - Définir en quelques mots ce qu'est l'équivalence d'un dosage.
- 4 - En utilisant le document de l'annexe, à rendre avec la copie, montrer graphiquement que le volume équivalent obtenu est $V_{\text{eq}} = 10,3$ mL.
- 5 - Montrer que la concentration molaire en acide citrique de la solution S ainsi déterminée expérimentalement par l'étudiant a pour valeur $C_s = 1,72 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹.
- 6 - En déduire les valeurs des concentrations molaire et massique correspondantes (notées respectivement C_{jus} et C_m) en acide citrique du jus de citron pur.
- 7 - Comparer la valeur de C_m précédemment trouvée à la valeur de la concentration massique moyenne dans un citron. Cette expérience suffit-elle à valider ou invalider l'hypothèse formulée par l'étudiant ?

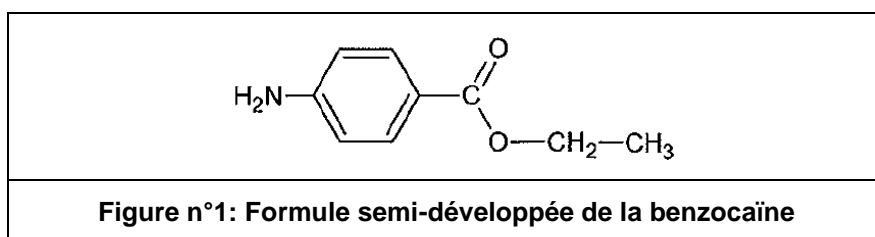
Donnée : $M(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7) = 192$ g.mol⁻¹

D : CHIMIE ORGANIQUE (15 points)

La **benzocaïne** est une molécule dérivée de l'acide 4-aminobenzoïque (para-aminobenzoïque) utilisée comme anesthésique local dans de nombreuses préparations « grand public » : antihémorroïdaires, pastilles pour la gorge, sirop de dentition, crèmes pour soulager les coups de soleil.

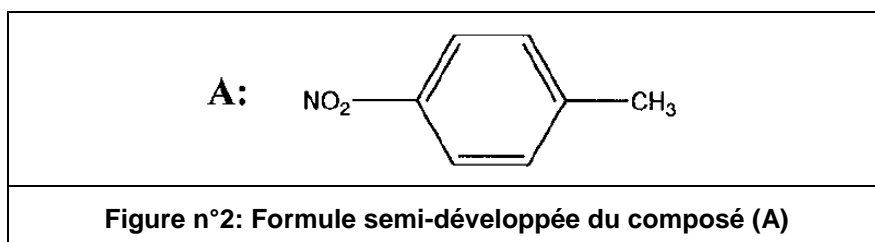
Elle a été synthétisée pour la première fois en 1902 par la firme pharmacologique Ritsert à Eberbach en Allemagne.

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



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

- 2 - La première étape de la synthèse de la benzocaïne est réalisée à partir du composé **(A)** (**figure n° 2**) obtenu par nitration du toluène de formule $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$.



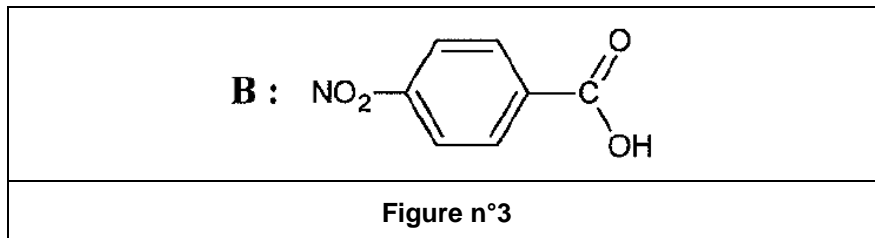
- 2.1- Donner le nom en nomenclature officielle du composé **(A)**.

2.2 - Quel(s) réactif(s) est (sont) utilisé(s) couramment pour réaliser la nitration du toluène ?

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

3 - La deuxième étape de la synthèse de la benzocaïne est réalisée à partir du composé (A).

Ce dernier, oxydé par du dichromate de sodium en milieu acide sulfurique, conduit au composé (B), l'acide 4-nitrobenzoïque représenté à la figure n° 3.



3.1 - Ecrire les 2 demi-équations redox sachant que l'ion dichromate $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ appartient au couple redox $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}/\text{Cr}^{3+}$.

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

3.3 - Le dichromate de sodium est toxique et dangereux pour l'environnement. Proposer un autre oxydant permettant de réaliser cette transformation et qui est plus respectueux de l'environnement.

4 - Lors de la troisième étape de la synthèse de la benzocaïne, on fait réagir de l'acide 4-nitrobenzoïque (composé (B)) avec un alcool de formule $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ en milieu acide. Il se forme un composé (C) et de l'eau.

4.1 - Ecrire l'équation de réaction relative à cette transformation chimique en faisant apparaître les formules semi-développées.

4.2 - Donner le nom en nomenclature officielle de l'alcool utilisé.

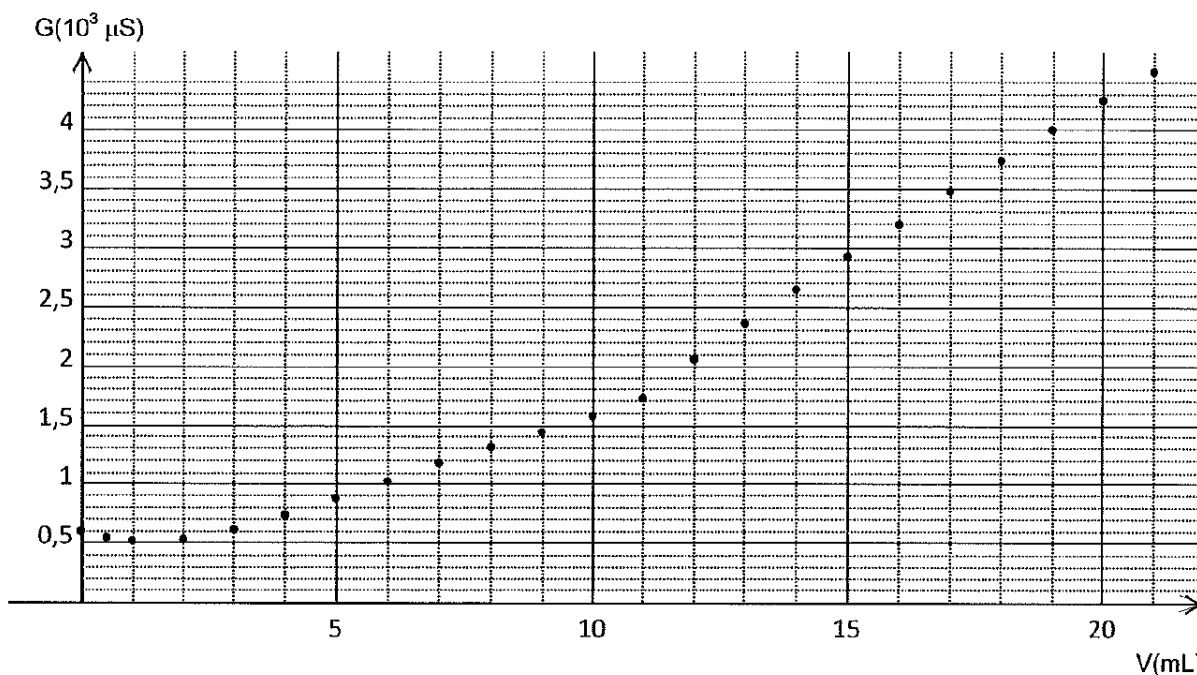
4.3 - Donner le nom et citer les trois caractéristiques de cette réaction.

4.4 - Proposer une méthode pour améliorer le rendement de cette réaction.

5 - L'hydrogénation de C, catalysée par du platine, conduit à la benzocaïne. Ecrire l'équation de réaction de cette hydrogénation.

ANNEXE (à rendre avec la copie)

PARTIE C : CONDUCTIMETRIE - Question 4



Evolution de la conductance G au cours du dosage de la solution S, en fonction du volume V de solution titrante versé.

Sujet de biochimie et technologies d'analyse 2015

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

SOJA ET ALIMENTATION

Du fait de la méfiance vis à vis des produits carnés, du nombre croissant des personnes intolérantes au lait de vache, ainsi que de l'intérêt pour l'alimentation de pays du sud-est asiatique, les produits alimentaires à base de soja représentent un marché en pleine expansion.

Le soja étant utilisé dans l'alimentation sous forme de concentrats ou d'isolats protéiques, on s'intéressera tout d'abord à leur procédé de fabrication, puis à leur composition en protéines et enfin à une utilisation industrielle de ces isolats.

1 - Procédé d'extraction pour la préparation de concentrats ou d'isolats de soja (15,5 points)

L'industrie agroalimentaire utilise des isolats ou concentrats de protéines issues de graines de soja comme agents liants pour remplacer de façon totale ou partielle les caséinates (protéines animales laitières) habituellement utilisées.

Le procédé de fabrication des isolats (ou isolés) de soja repose sur 2 étapes à partir de la farine de soja obtenue par broyage des graines. La première étape consiste en une solubilisation des protéines qui sont ainsi séparées des composés insolubles (essentiellement les glucides des parois : cellulose, hémicellulose et pectines). Dans une deuxième étape, les protéines sont concentrées et purifiées. Cette dernière peut se faire selon deux voies : soit par précipitation isoélectrique, soit par ultrafiltration.

La composition de la farine de soja est décrite dans le **document 1**.

Le **document 2** présente le procédé de fabrication.

1.1 - La première centrifugation

1.1.1 - Préciser dans quelle fraction issue de la première centrifugation se trouvent :

- l'extrait protéique
 - les polysaccharides insolubles
- Justifier les réponses.

1.1.2 - Parmi les polysaccharides insolubles, on trouve de la cellulose. Ecrire la structure développée de la molécule de cellulose en représentant au moins trois résidus.

1.2 - La précipitation isoélectrique

1.2.1 - A partir du **document 3**, analyser l'évolution de la solubilité des protéines du soja en fonction du pH.

1.2.2 - En fonction du pH, la solubilité des protéines varie. Argumenter le fait que la variation de solubilité est liée à des modifications des charges de la protéine.

1.2.3 - A partir des **documents 2 et 3**, déterminer la valeur X du pH utilisé lors de la précipitation isoélectrique.

1.3 - L'ultrafiltration

1.3.1 - Réaliser un schéma annoté d'un appareillage d'ultrafiltration.

1.3.2 - Cette ultrafiltration peut être réalisée avec des membranes en fibres creuses de seuil de coupure de 100 kDa. Définir la notion de seuil de coupure.

1.3.3 - A partir du **document 1**, préciser la composition en protéines du rétentat et du perméat. Justifier la réponse.

2 - Etude et mise en évidence des protéines du soja (21 points)

Les protéines de soja sont de plus en plus utilisées dans la fabrication des aliments. Le contrôle de leur présence est réalisé par électrophorèse SDS-PAGE.

2.1 - Structure des protéines

Réaliser un tableau présentant les définitions des différents niveaux de structure des protéines et, pour chacun de ces niveaux, les liaisons et les interactions mises en jeu.

2.2 - SDS-PAGE

L'utilisation d'isolat ou de concentrat de soja dans les aliments peut être mise en évidence par séparation de ces différentes fractions protéiques par SDS-PAGE (**document 4**).

2.2.1 - Rappeler la signification du sigle "SDS-PAGE".

2.2.2 - Préciser le rôle de chacun des composants intervenant dans la préparation du gel.

2.2.3 - Préciser le critère de séparation des molécules utilisé dans cette technique. Justifier la réponse.

2.2.4 - Quel est le pourcentage du gel préparé dans le protocole du **document 4** ? Expliquer le calcul.

2.2.5 - Indiquer le rôle du β -mercaptoéthanol utilisé lors du traitement des échantillons.

2.2.6 - Optimisation de la méthode

Afin de repérer les différentes protéines dans le gel, le protocole nécessite l'utilisation de marqueurs de poids moléculaire. Pour optimiser la méthode, des essais ont été réalisés sur différents gels numérotés 1, 2 et 3 (**document 5**).

2.2.6.1 - Que représente le pourcentage indiqué pour chacun des 3 gels ?

Préciser sur quel paramètre du gel ce pourcentage a une influence. Argumenter la réponse.

2.2.6.2 - Indiquer le meilleur gel à utiliser. Justifier par l'analyse des résultats.

Le profil électrophorétique obtenu avec le meilleur gel est présenté dans le **document 6**.

2.2.7 - Orienter l'électrophorégramme à l'aide d'un schéma indiquant la ligne des dépôts, l'emplacement des bornes et le sens de migration. Justifier la réponse.

2.2.8 - Les protéines de soja du contrôle positif sont révélées au niveau des bandes A, B, C, D et E de la piste 2.

Identifier chaque bande en référence à la composition précisée dans le tableau du **document 7**.

Justifier la réponse.

2.2.9 - La présence de protéines de soja dans un échantillon est révélée essentiellement par la présence des bandes A, B et E.

Deux échantillons de viande sont contrôlés (pistes 3 et 4), conclure quant à la présence de protéines de soja dans ces échantillons. Argumenter la conclusion.

3- Yaourts au soja : les soyourts (23,5 points)

3.1 - Fabrication et fermentation du tonyu

Le **tonyu** désigne traditionnellement le jus de soja obtenu après cuisson et extraction d'un broyat de graines entières et d'eau. Il est parfois appelé "lait de soja". Le tonyu est utilisé dans les pays occidentaux en remplacement du lait de vache pour les individus digérant difficilement ce dernier.

Les **soyourts** ou "yaourts" au soja sont des produits fermentés de soja obtenus par transformation lactique du tonyu additionné de glucides, lipides, protéines et éventuellement d'arômes (lors de la formulation).

La fabrication des soyourts repose sur le même mode de fermentation que pour les yaourts classiques avec l'emploi des deux ferments de base (*Lactobacillus bulgaricus* qui apporte au yaourt son acidité et *Streptococcus thermophilus* qui développe les arômes). D'autres ferments peuvent être ajoutés comme *Bifidobacterium* (bifidus probiotique). Des stabilisants peuvent être employés pour améliorer la consistance des produits (farines de graine de caroube, agar-agar, pectine...).

3.1.1 - Compléter le **document 8 (à rendre avec la copie)** présentant la voie métabolique de cette fermentation lactique.

3.1.2 - Ecrire le bilan moléculaire de la fermentation d'une molécule de glucose.

3.2 - Contrôle qualité du produit : amélioration de la saveur des soyourts

Le principal inconvénient des produits dérivés du soja est le "goût de haricot". Celui ci apparaît dès le broyage des graines. Il est dû à l'apparition de composés, les isoflavones, provenant de l'hydrolyse des glucosides en présence d'une β -glucosidase.

Cette hydrolyse peut être limitée par addition de glucono- δ -lactone (GDL), inhibiteur de cette enzyme. La production d'isoflavones pendant la macération du soja a été étudiée en présence et en absence de GDL, les résultats obtenus sont présentés dans le **document 9**.

3.2.1 - Sur l'intervalle de temps 6-16 heures, déterminer les activités moyennes de l'enzyme, en présence et en absence de GDL. Exprimer les résultats en mg d'isoflavones produit par heure.

3.2.2 - En déduire le pourcentage d'inhibition due à la présence de GDL.

La β -glucosidase agit selon le modèle michaëlien. Des études ont également été réalisées à l'aide d'un substrat synthétique de la β -glucosidase: le para-nitrophényl- β -glucopyranoside (p-NPG), en présence et en absence de GDL.

Les représentations graphiques selon les coordonnées inverses de Lineweaver-Burk sont présentées dans le **document 10**.

3.2.3 - Préciser la spécificité d'action d'une β -glucosidase.

3.2.4 - A partir de l'équation de Michaëlis-Menten, démontrer la relation en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk.

3.2.5 - Déterminer les valeurs des paramètres cinétiques de l'enzyme en présence et en absence de GDL. Expliquer les calculs.

3.2.6 - Préciser le type d'inhibiteur auquel correspond le GDL. Justifier la réponse.

3.2.7 - Préciser le mécanisme d'action de ce type d'inhibiteur. Justifier la réponse à l'aide des structures du p-NPG et GDL données dans le **document 11**.

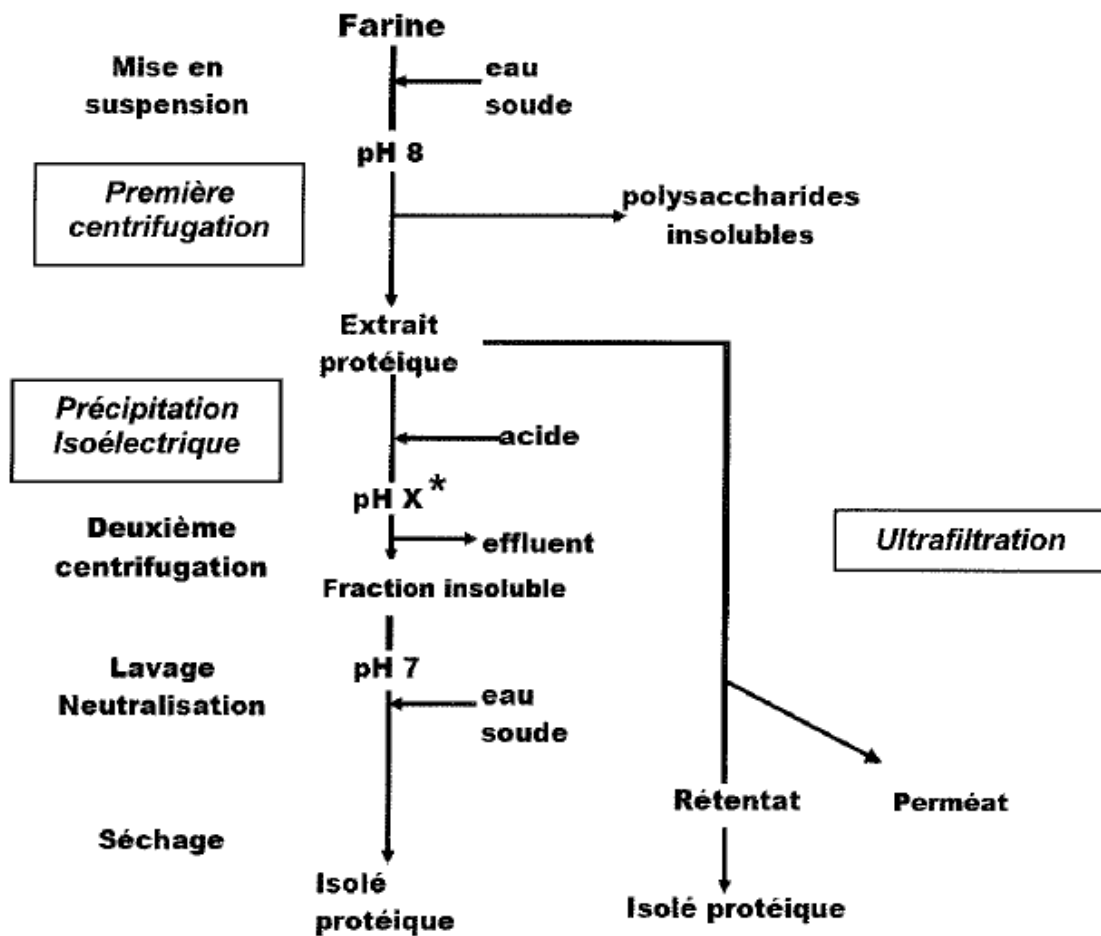
3.2.8 - Déterminer l'expression littérale de la constante d'inhibition K_i correspondante et calculer sa valeur.

Donnée : Facteur d'inhibition : $F = 1 + (C_i/K_i)$ avec C_i = concentration en inhibiteur.

DOCUMENT 1 : COMPOSITION BIOCHIMIQUE DE LA FARINE DE SOJA

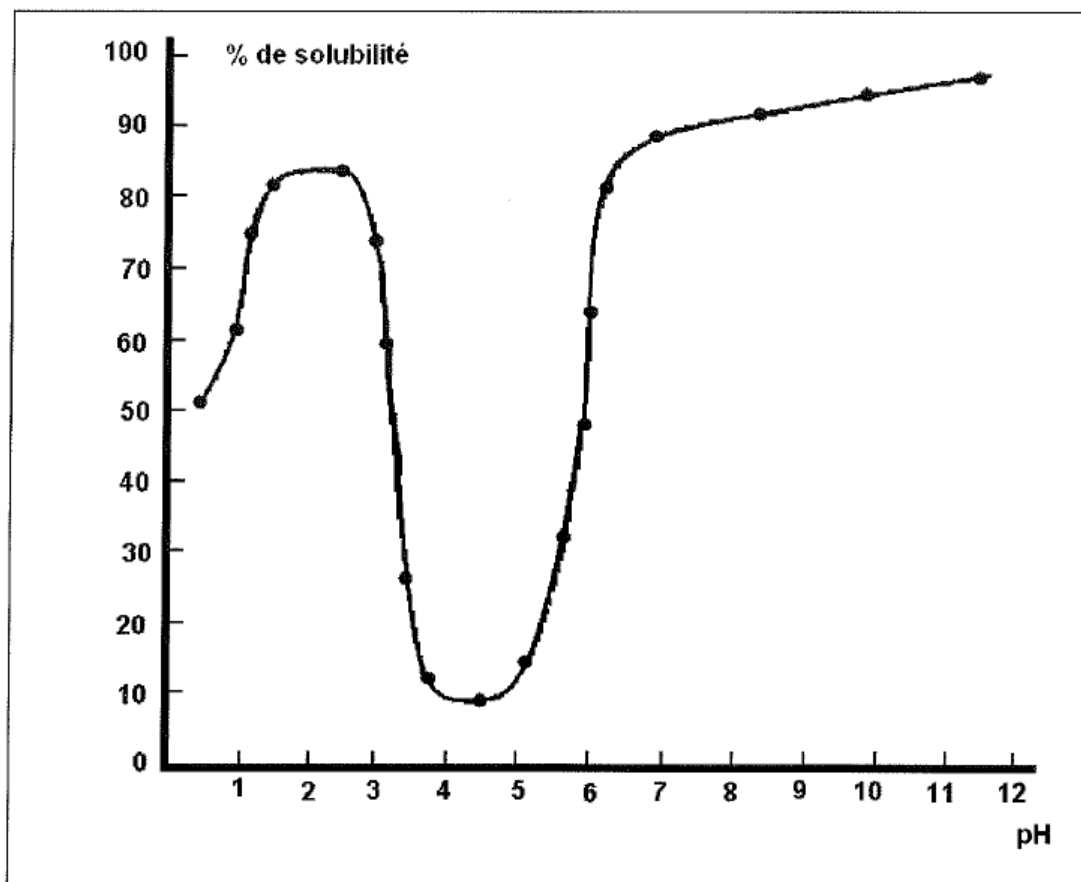
Nature des composés	% matière sèche	Poids moléculaire (kDa)
Protéines	53	
Inhibiteurs trypsiques		8-21,5
Cytochrome C		12
Hémagglutinine		110
Lipoxygénase		102
α-amylase		61,7
Globuline 7 S		182-210
Globuline 11 S		350
Glucides		
Simples et oligosides.....	13	-
Polyosides des parois.....	17	-
(cellulose, hémicellulose et pectines)		
Lipides totaux	2	-
Polyphénols de masse molaire élevée	2,5	-
Matières minérales	7	-

DOCUMENT 2 : SCHEMA DE FABRICATION D'ISOLES DE SOJA



* La valeur X du pH est à déterminer dans la question 1.2.3 -

DOCUMENT 3 : COURBE DE SOLUBILITE DES PROTEINES DE SOJA EN FONCTION DU pH



DOCUMENT 7 : COMPOSITION DES PROTEINES DE SOJA ISOLEES UTILISEES DANS LA PREPARATION DU CONTROLE POSITIF

PROTÉINES		POIDS MOLÉCULAIRE
Globulines 11 S	Sous unité acide (notée α)	40 kDa
	Sous unité basique (notée β)	20 kDa
Globulines 7 S	Sous unité α	84 kDa
	Sous unité α'	72 kDa
	Sous unité β	51 kDa
Enzymes cellulaires et protéines de structure	-----	-----

DOCUMENT 4 : MISE EN EVIDENCE DE PROTEINES DE SOJA DANS UN ALIMENT PAR SDS-PAGE

Matériel :

- une cuve à électrophorèse verticale
- un générateur de courant continu
- deux plaques de verres avec espaceurs et joints d'étanchéité
- peigne en téflon

Réactifs :

- Tampon de migration : TM 8,3

- o Tris 25 mmol.L⁻¹
- o glycine 192 mmol.L⁻¹
- o SDS 0,1%
- o pH 8,3

- Réactifs pour traitement des échantillons

- o Tampon Tris HCl 0.025 mmol.L⁻¹ pH 6,8
- o SDS 3%
- o β-mercaptoéthanol 1%

- Solution stock d'acrylamide à 30% :

- o 29,2 g d'acrylamide
- o 0,8 g de bis-acrylamide
- o eau qsp 100 ml

Préparation des échantillons :

- Broyage de l'échantillon.
- Extraction de l'échantillon avec du Tris-HCl-SDS-mercaptoéthanol : Environ 10 g de l'échantillon sont préalablement broyés en solution d'extraction contenant 0,0625 mol.L⁻¹ Tris-HCl (pH 6,8), sodium dodécyl sulfate 3% (sodium SDS) et β-mercaptoéthanol à 1%.
- Homogénéisation pendant deux minutes.
- Centrifugation à 3000 tr/ min pendant 15 minutes sous 4°C.
- Dilution au 1/6^{ème} du surnageant.

Préparation du contrôle positif :

Le contrôle positif de protéines a été fait en préparant le mélange suivant :

600 µL d'un extrait de viande + 100 µL de protéines de soja isolées de concentration 0,01 g.mL⁻¹

Le mélange a ensuite subi le même traitement que les échantillons.

Préparation du gel :

Solution stock d'acrylamide et de bisacrylamide 30%	1,93 mL
Tampon Tris/HCl 1,5 mol.L ⁻¹ pH 8,8	2,50 mL
SDS 10%	100 µL
TEMED*	5 µL
Persulfate d'ammonium à 10%	75 µL

*TEMED : N,N,N',N' - tétraméthyléthylènediamine

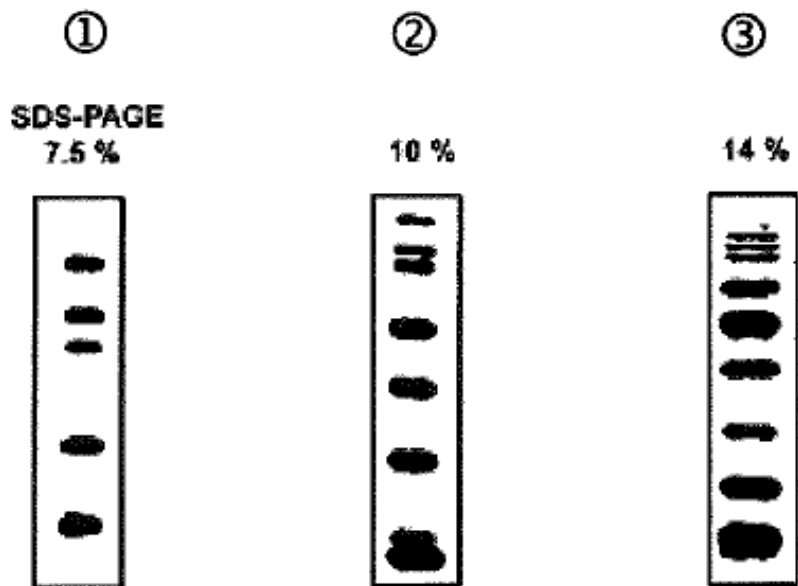
Révélation :

La révélation a été réalisée par une coloration au Bleu de Coomassie.

**DOCUMENT 5 : OPTIMISATION DE L'ELECTROPHORESE
DEPOT DU MARQUEUR DE POIDS MOLECULAIRE SUR DIFFERENTS GELS**

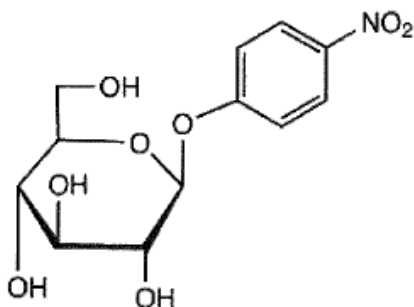
<u>Marqueur de PM</u>	<u>kDa</u>
Myosine	221,2
β-Galactosidase	116,0
β-phosphorylase	103,0
Sérum albumine bovine 1	99,8
Sérum albumine bovine 2	80,7
Ovalbumine	49,8
Anhydrase carbonique	36,5
Inhibiteur trypsique	28,8
Lysozyme	19,5

Résultats des différents essais

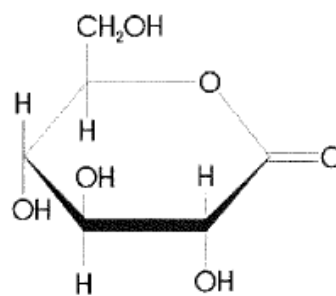


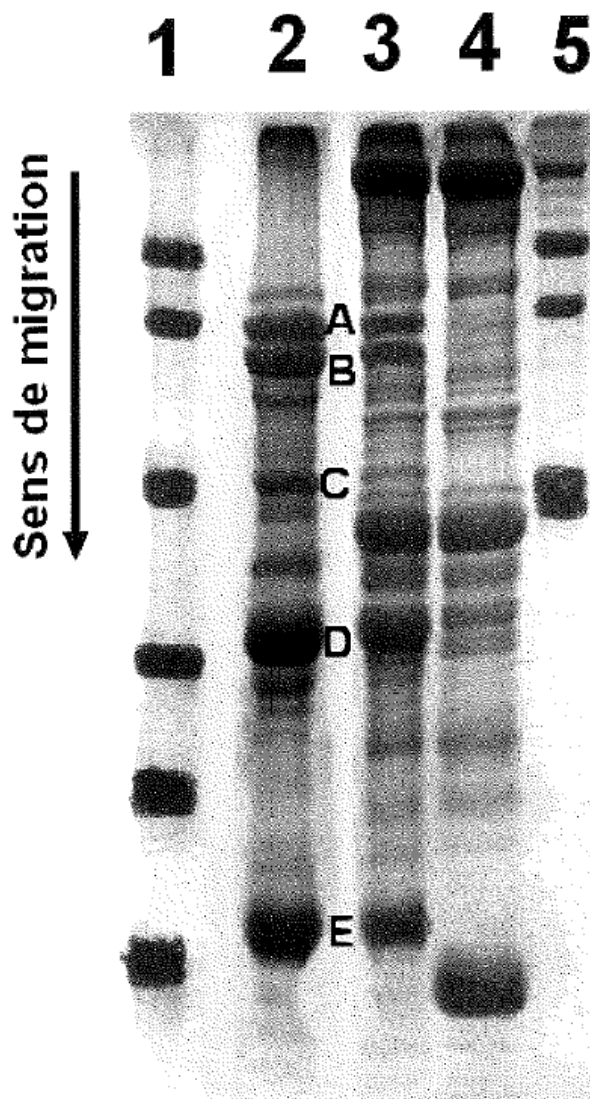
DOCUMENT 11

Structure du p-NPG :



Structure du GDL :



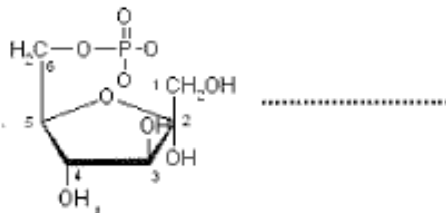
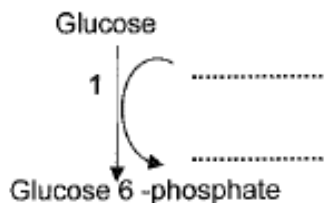
DOCUMENT 6 : PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES

PISTES	Nature du dépôt	Composition protéique	Poids moléculaire (kDa)
1	Repère de poids moléculaire	Phosphorylase Sérum albumine bovine 2 Ovalbumine Anhydrase carbonique Inhibiteur trypsique Lysozyme	103,0 80,6 49,8 36,5 28,8 19,5
2	Contrôle positif	Protéines de soja : A à E	/
3	Echantillon 1	/	/
4	Echantillon 2	/	/
5	Repère de poids moléculaire	Myosine β -galactosidase Sérumalbumine bovine 1 Ovalbumine	211,2 116,0 99,8 49,8

DOCUMENT 8 : FERMENTATION LACTIQUE

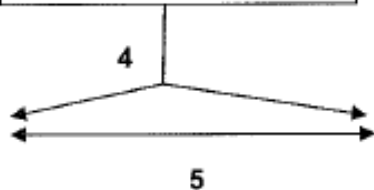
Noms des enzymes :

- 1 :
- 2 : Phosphohexose isomérase
- 3 :
- 4 : Aldolase
- 5 :
- 6 :
- 7 : 3-phosphoglycérate kinase
- 8 : Phosphoglycérate mutase
- 9 : Enolase
- 10 :
- 11 :

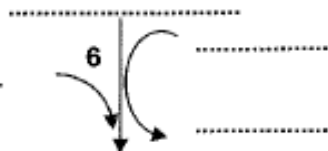


Formule

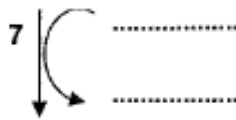
Formule



Dihydroxyacétone phosphate



1,3-Diphosphoglycérate



3-Phosphoglycérate



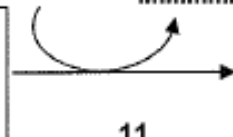
2-Phosphoglycérate



Phosphoénolpyruvate



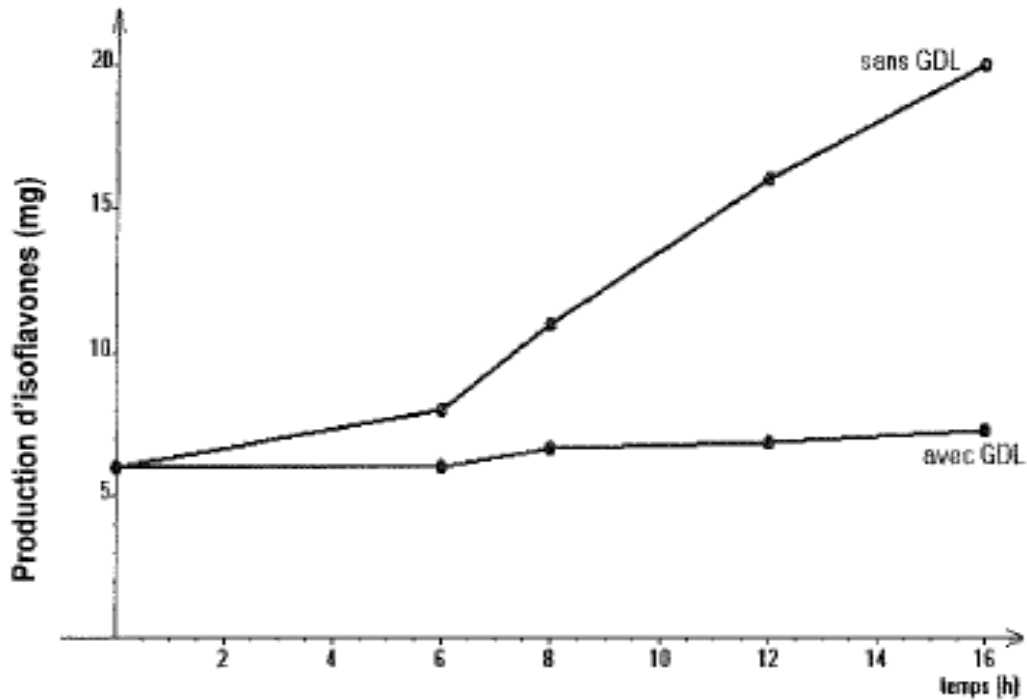
Formule :



Formule :

Lactate

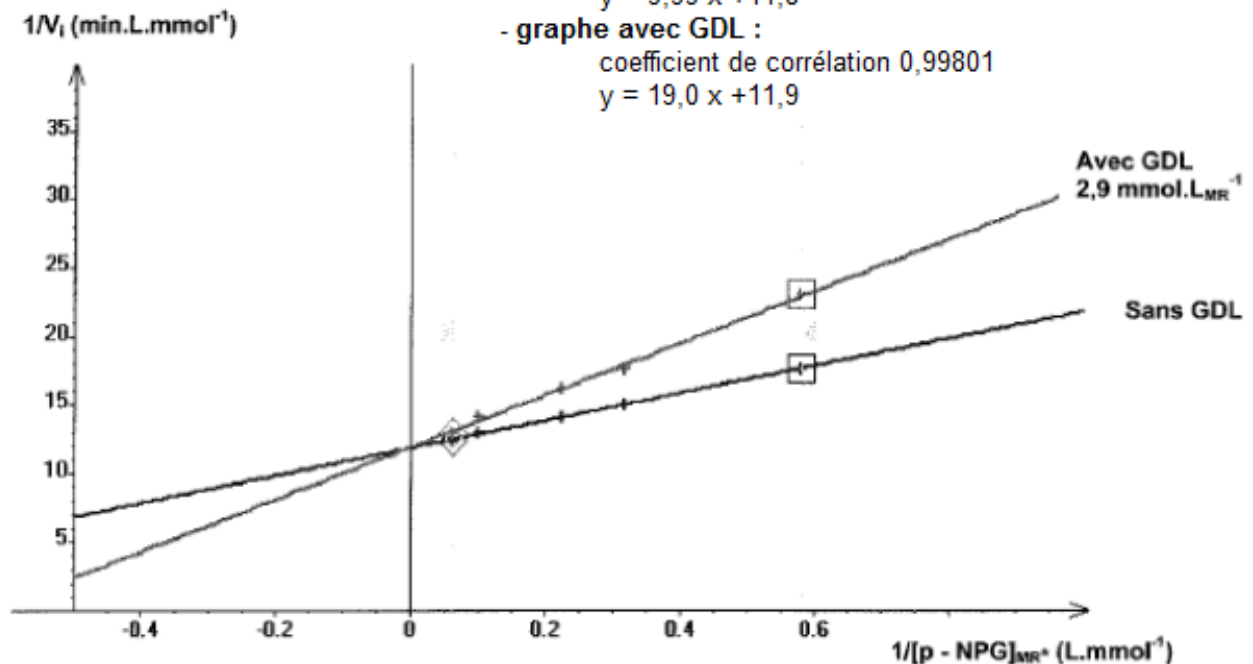
DOCUMENT 9 : PRODUCTION D'ISOFLAVONES PENDANT LA MACERATION DU SOJA A 20°C, EN PRESENCE ET EN ABSENCE DE GLUCONO-δ-LACTONE (GDL)



**DOCUMENT 10 : ETUDE DE L'ACTIVITE β-GLUCOSIDASE :
représentation selon Lineweaver-Burk**

Paramètres de régression :

- graphe sans GDL :
coefficient de corrélation 0,99947
 $y = 9,99 x + 11,8$
- graphe avec GDL :
coefficient de corrélation 0,99801
 $y = 19,0 x + 11,9$



* MR : milieu réactionnel

Sujet de microbiologie et technologies d'analyse 2015

Calculatrice non autorisée

Dictionnaire anglais-français autorisé

POTENTIEL PROBIOTIQUE DE BIFIDOBACTERIES D'ORIGINE HUMAINE

Les bifidobactéries ont initialement été isolées par Tissier en 1900 à l'institut Pasteur. Ces bactéries ont rapidement suscité un intérêt pour leur rôle probiotique. Aujourd'hui, si leur bénéfique santé chez l'individu sain reste discuté, des études mettent en évidence leur intérêt dans la prévention de certaines pathologies intestinales (maladies inflammatoires, perturbations intestinales liées à l'antibiothérapie).

On se propose d'étudier le potentiel probiotique de deux souches de *Bifidobacterium* isolées de fèces de nourrissons, pour la prévention des infections à *E.coli* O157:H7. L'objectif est leur utilisation industrielle dans des laits fermentés.

1 - Isolement et caractérisation des souches de *Bifidobacterium* (21,5 points)

1.1 - Isolement de bifidobactéries à partir de fèces de nourrissons nourris au sein

Les bifidobactéries font partie du microbiote, ou flore commensale intestinale de l'homme et de l'animal. Des échantillons de fèces de nourrissons âgés d'une semaine et nourris au sein, sont dilués en eau peptonée, homogénéisés au stomacker® et isolés sur milieu sélectif des bifidobactéries. Après observation au Gram, les colonies constituées de bacilles bifides, à gram positif et non sporulés sont re-isolées pour purification.

1.1.1 - Définir la notion de commensalisme.

1.1.2 - Présenter la composition de la flore intestinale humaine.

1.1.3 - Préciser les conditions d'incubation des boîtes d'isolement.

1.2 - Identification des souches isolées

1.2.1 - Deux souches S1 et S2 ont été isolées et purifiées. L'identification du genre de ces 2 souches est réalisée par PCR. Pour cela, on effectue une amplification spécifique du gène de l'ARN 16S de *Bifidobacterium* permettant d'obtenir un amplicon de 1,35 kb. Les résultats de l'électrophorèse des produits de PCR en gel d'agarose sont présentés dans le **document n° 1**.

1.2.1.1 - Justifier le choix du gène de l'ARN 16S pour l'identification du genre.

1.2.1.2 - Expliquer le rôle de chaque contrôle.

1.2.1.3 - Analyser les résultats.

1.2.2 - Une identification de l'espèce des deux souches est réalisée ensuite par étude du profil de fermentation des sucres.

Le métabolisme des bifidobactéries est uniquement fermentaire.

Les sucres sont notamment catabolisés par une voie de fermentation lactique particulière schématisée dans le **document n° 2**.

1.2.2.1 - Nommer la voie fermentaire observée chez les bifidobactéries. Justifier la réponse.

L'analyse des profils de fermentation des sucres a permis d'identifier S1 et S2 comme appartenant toutes les deux à l'espèce *Bifidobacterium bifidum* mais avec des coefficients de corrélation relativement faibles.

1.2.2.2 - Citer une autre technique d'identification génétique qui permettrait de confirmer ces résultats.

1.3 - Tests de résistance au lysozyme, à l'acidité, et à la bile

Les tests de résistance sont menés sur les deux souches S1 et S2, et sur des souches de référence utilisées habituellement comme probiotiques. Le **document n° 3** présente les conditions des tests ainsi que les résultats obtenus.

1.3.1 - Justifier le choix des tests de résistance effectués.

1.3.2 - Préciser l'activité enzymatique du lysozyme.

1.3.3 - Donner la signification du terme CMI. Définir la CMI.

1.3.4 - Proposer la composition de deux témoins nécessaires pour valider les résultats de la souche S1. Présenter leurs rôles.

1.3.5 - Analyser les résultats présentés dans le **document n° 3**. Conclure d'après le contexte de l'étude.

2 -Prévention des infections à *E. coli* O157:H7 (35,5 points)

2.1 - Pouvoir pathogène d'*E. coli* O157:H7

E. coli O157:H7 fait partie des *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC). Les souches appartenant à ce pathovar sont responsables de la colite hémorragique parfois compliquée par un syndrome hémolytique et urémique (SHU).

Ce syndrome touche particulièrement les enfants avec une létalité de 3 à 5 % et des séquelles rénales à long terme pour plus d'un tiers des patients (source : InVS). *E. coli* O157:H7 est le principal sérovar responsable de SHU. Ce sérovar se différencie notamment des autres *E. coli* par une absence de fermentation du sorbitol.

2.1.1 - Définir les termes « sérovar » et « pathovar ».

2.1.2 - Localiser et préciser la nature des antigènes O et H.

Le pouvoir pathogène d'*E. coli* O157:H7 met en jeu :

- une adhérence forte à la muqueuse intestinale avec disparition des microvillosités par un mécanisme équivalent à celui observé chez les EPEC (*E. coli* entéro-pathogènes),
- la production d'une shigatoxine (STX).

2.1.3 - Citer deux structures intervenant dans l'adhérence des bactéries à Gram - aux cellules intestinales.

2.1.4 - La STX est une toxine de type AB (à activité intracellulaire) qui provoque une nécrose cellulaire.

2.1.4.1 - Présenter la structure et le mode d'action général des toxines de type AB.

2.1.4.2 - Préciser le mécanisme physiopathologique responsable des symptômes intestinaux.

2.2 - Etudes in vitro

Les tests *in vitro* consistent à étudier la capacité des souches S1 et S2 à inhiber :

- la croissance d'*E. coli* O157:H7
- l'adhérence d'*E. coli* O157:H7 aux cellules Caco-2 en culture.

2.2.1 - Le **document n° 4** présente le protocole et les résultats obtenus pour le test d'inhibition de croissance d'*E. coli* O157:H7

2.2.1.1 - Présenter le principe du test.

2.2.1.2 - Préciser :

- la composition et le rôle du contrôle,
- le rôle du spot *B. breve* ATCC 15700.

2.2.1.3 - Analyser les résultats.

2.2.2 - Le test d'inhibition d'adhérence d'*E. coli* O157:H7 aux cellules Caco-2 consiste à :

- cultiver les cellules Caco-2 dans des plaques 6 puits jusqu'à confluence.
- mettre au contact des cellules Caco-2, une suspension calibrée d'*E. coli* O157:H7 avec des concentrations croissantes de bifidobactéries.
- compter les *E. coli* adhérentes aux cellules récupérées après trypsination. Les résultats du test sont présentés dans le **document n° 5**.

2.2.2.1 - Justifier l'utilisation de cellules Caco-2.

2.2.2.2 - Proposer un protocole détaillé permettant de dénombrer les *E. coli* O157:H7 adhérentes.

2.2.2.3 - Analyser les résultats. En déduire une conclusion quant aux propriétés anti-adhérentes des souches S1 et S2 pour *E. coli* O157:H7

2.3 - Etudes *in vivo* chez la souris

Les études *in vivo* sont menées sur un modèle animal particulier. Des souris BALB/c sont traitées à la streptomycine ajoutée dans leur eau de boisson. Ce traitement permet d'obtenir 100 % de mortalité après ingestion d'une dose de $5 \cdot 10^3$ UFC d'*E. coli* O157:H7 alors que des doses supérieures à 10^6 UFC sont habituellement nécessaires pour provoquer une infection.

2.3.1 - Proposer une explication à l'augmentation de sensibilité des souris à *E. coli* O157:H7 suite au traitement à la streptomycine.

2.3.2 - Le protocole d'étude mené sur les souris est présenté dans le **document n° 6**.

Quatre paramètres sont étudiés :

- les concentrations bactériennes d'*E. coli* O157:H7, S1 et S2 dans les selles,
- la mortalité des animaux,
- la concentration des IgA sécrétées anti - *E. coli* O157:H7 dans les selles,
- la concentration en STX dans le contenu intestinal (caséum) des souris.

2.3.2.1 - La composition du milieu Sorbitol - Mac Conkey agar, utilisé pour le dénombrement des *E. coli* O157:H7 est présentée dans le **document n° 7**. Justifier, par l'analyse de sa composition, l'utilisation de ce milieu. Préciser l'aspect des colonies d'*E. coli* O157:H7 sur ce milieu.

2.3.2.2 - Analyser les résultats du suivi des concentrations bactériennes et de la mortalité des souris.

2.3.2.3 - Analyser les résultats de l'étude des concentrations en IgA à 7 jours après infection.

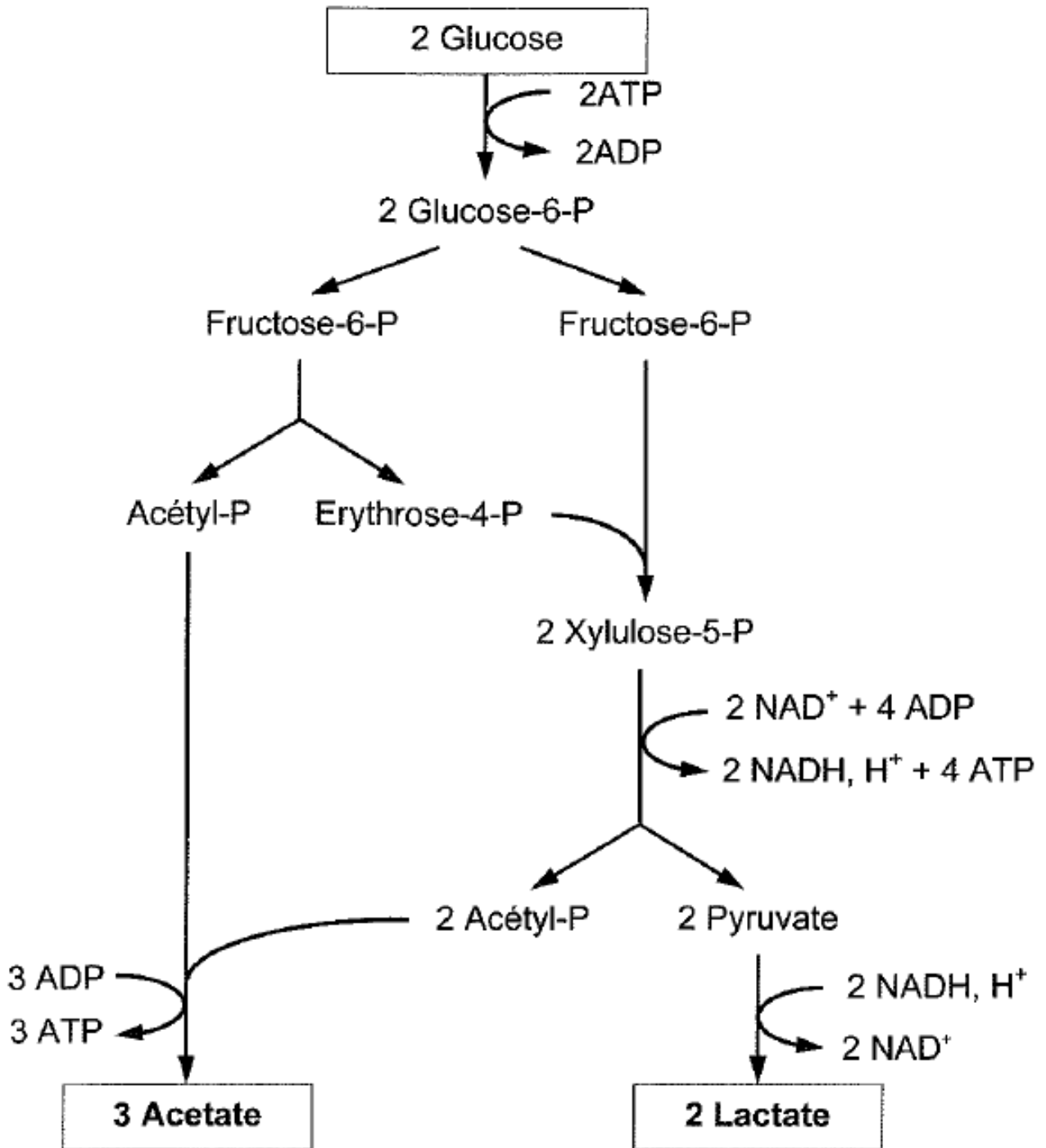
2.3.2.4 - Le dosage de la STX dans les selles est réalisé par agglutination passive au latex sur lame. Présenter, à l'aide d'un schéma légendé, le principe de ce test.

2.3.2.5 - Analyser les résultats de l'étude des concentrations en STX à 7 jours après infection.

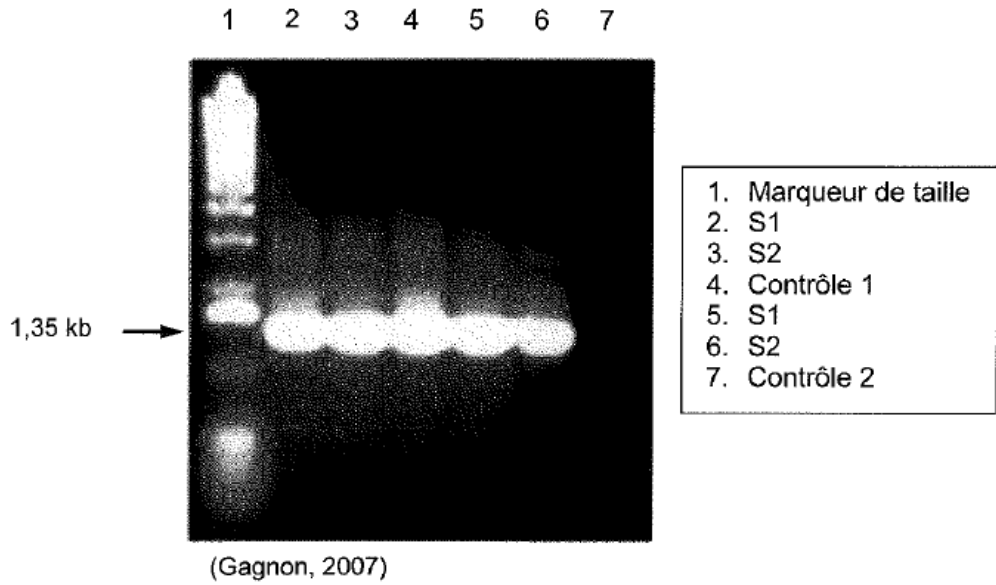
3 - Conclusion (3 points)

Synthétiser les résultats obtenus pour les deux souches de bifidobactéries et conclure sur leur intérêt probiotique respectif.

DOCUMENT N° 2 : VOIE MÉTABOLIQUE SIMPLIFIÉE DU CATABOLISME DU GLUCOSE CHEZ LES BIFIDOBACTERIES



DOCUMENT N° 1 : ELECTROPHORÉGRAMME DES AMPLICONS DE PCR DU GENE DE L'ARN 16S DE DEUX SOUCHES S1 ET S2 DE BIFIDOBACTERIUM



Contrôle 1 : échantillon de Bifidobacterium

Contrôle 2 : mix-PCR + eau distillée

DOCUMENT N° 3 : TESTS DE RÉSISTANCE AU LYSOZYME, A LA BILE, A L'ACIDITE

Conditions des tests :

Pour chaque souche, les tests sont réalisés en microplaque par ajout d'un inoculum calibré à du bouillon MRS dans les conditions précisées dans le tableau ci-dessous.

Paramètre	Conditions	Expression de la résistance
Lysozyme	Concentrations finales : 100 à 500 µg/mL	Détermination de la CMI
Sels biliaires	Concentration finale : 0,3 %	Présence ou absence de culture
pH	3,0 à 6,5	pH le plus faible pour lequel l'absorbance est inférieure ou égale à 40 % de l'absorbance à pH 6,5

Résultats lus:

Souches	Tests		
	Lysozyme (µg/mL)	Sels biliaires à 0,3 %	pH
S1	350	+	3,5
S2	400	+	3,5
<i>B. breve</i> ATCC 15700	300	+	4
<i>B. longum</i> A TCC 15708	200	+	4
<i>B. infantis</i> A TCC 15697	350	+	4
<i>B. bifidum</i> A TCC 15696	350	+	4

Les quatre souches de référence sont des souches habituellement utilisées comme probiotiques.

DOCUMENT N° 4 : TESTS D'INHIBITION DE CROISSANCE d'E.COLI O157:H7

Protocole (d'après Gagnon, 2007)

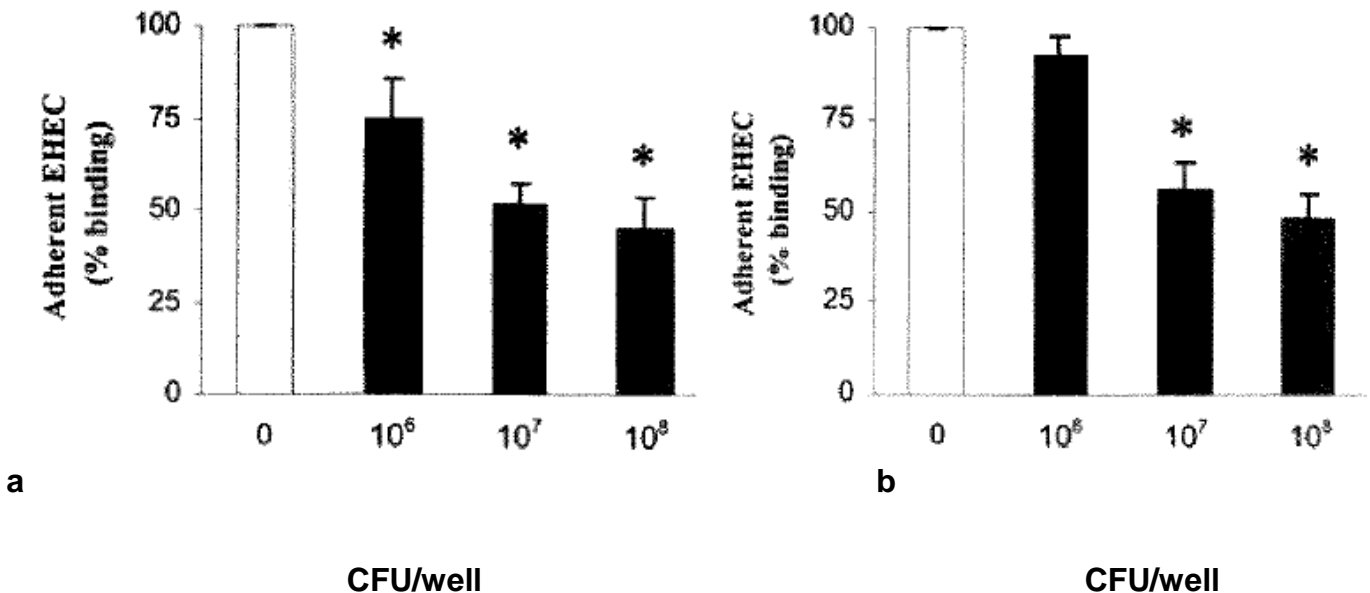
To detect antimicrobial activity against *E.coli* O157:H7, a modification of the agar spot test described by Tagg et al. (1976) was used. Overnight bifidobacterial culture (2 µl) in MRS broth was spotted on 1.5 % MRS agar plates. The plates were dried for 30 min at room temperature, incubated anaerobically at 37°C for 18 h and overlaid with 10 ml Tryptic Soy agar (0.85 %) at 45°C seeded with 1 % (v/v) of an overnight culture of *E. coli* O157:H7 to obtain a final concentration of 10⁶ cfu/ml. Plates were then incubated aerobically at 37°C for 18 h and checked for zones of inhibition (clear agar) around the bifidobacterial colonies

Spots composition : 1. control; 2 : *Bifidobacterium breve* ATCC15700 ; 3. S1 Strain ; 4. S2 Strain.

Spots	Inhibition zones (mm)
1	0
2	28
3	32
4	30

DOCUMENT N° 5 : TEST D'INHIBITION D'ADHERENCE D'E.COLI O157:H7

AUX CELLULES Caco-2 EN CULTURE



Inhibition of enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 adhesion to enterocyte-like Caco-2 cells by infant bifidobacterial isolates, (a) S1 strain and (b) S2 strain. To each well of growing Caco-2 cells, 2.5 x 10⁷ cfu of *E. coli* O157:H7 were added simultaneously to increasing concentrations of bifidobacteria (•). The values shown on this graph are the average of triplicate analysis ± SE (SE : standard error). The asterisk (*) indicates significant differences (P < 0.05) between the trials with bifidobacteria and those without bifidobacteria (□). (Gagnon, 2007)

DOCUMENT N° 6 : PROTOCOLE ET RÉSULTATS D'UNE ETUDE IN VIVO DE L'EFFET DES SOUCHES S1 ET S2 ADMINISTRÉES PRÉALABLEMENT À UNE INFECTION PAR *E. COLI* O157:H7 CHEZ DES SOURIS TRAITÉES À LA STREPTOMYCINE

Protocole : (Takashi Asahara et al, 2004)

Streptomycine sulfate at a concentration of 5 mg/ml was given to 45 mice in drinking water from day 6 until day 16.

S1 and S2 (1.10^8 to 3.10^8 CFU/mouse/day) in 0,1 ml physiological saline was administered to 15 mice respectively, once a day, from day -4 to day -2. 15 mice were administered with physiological saline in the same way.

All mice were infected orally with *E. coli* O157:H7 (5.10^3 CFU) on day 0.

(A) Feces for bacteriological analysis were obtained in each group on days 0 to 16 after the *E.coli* infection.

Viable counts of *E. coli*, S1 and S2 were examined respectively by culture in Sorbitol-Mac Conkey agar and modified BD Bifidobacterium agar. *E.coli* O157:H7 is sorbitol negative (other *E.coli* are sorbitol positive).

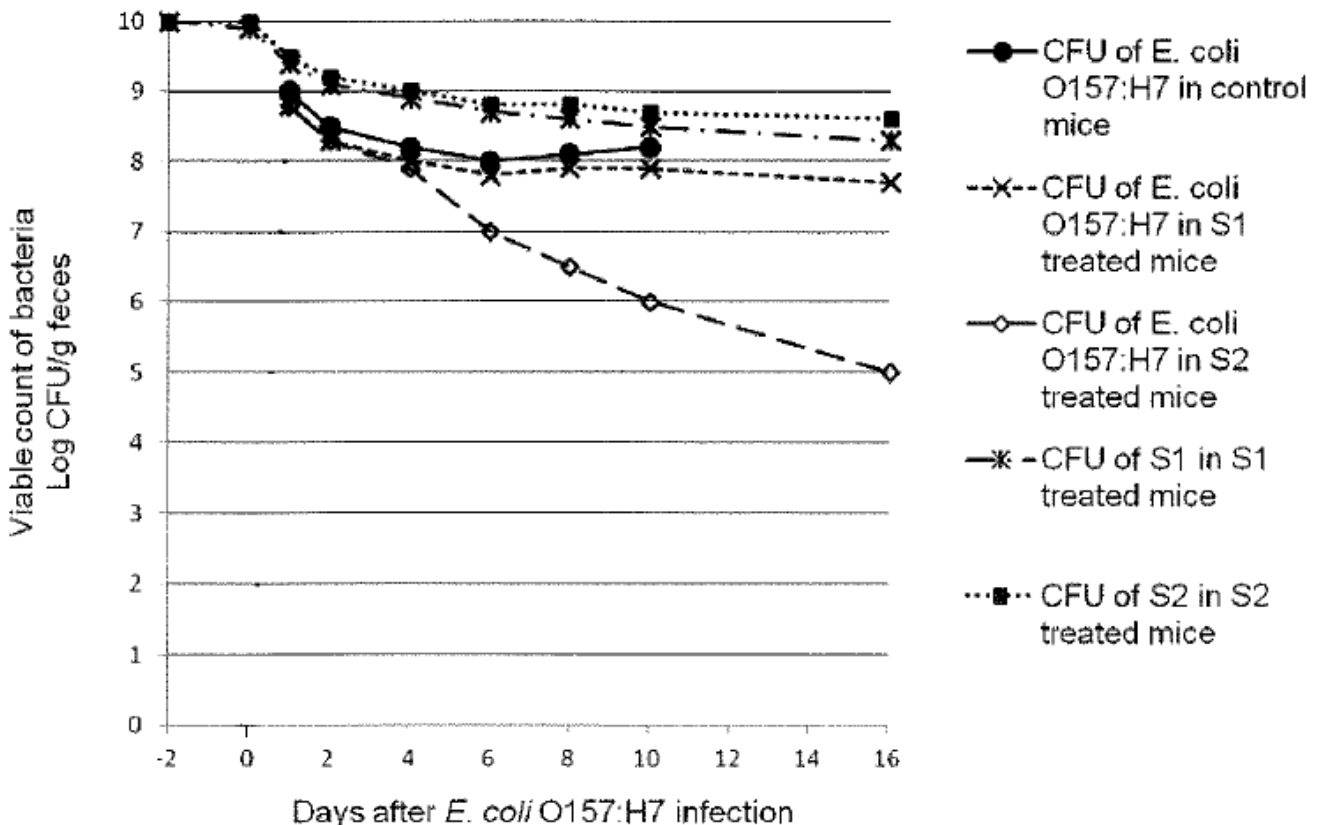
(B) Control and treated mice were observed for survival during 16 days after the challenge infection.

(C) Feces for bacteriological analysis were obtained in each group at day 7 for IgA anti-*E.coli* O157:H7 ELISA quantification.

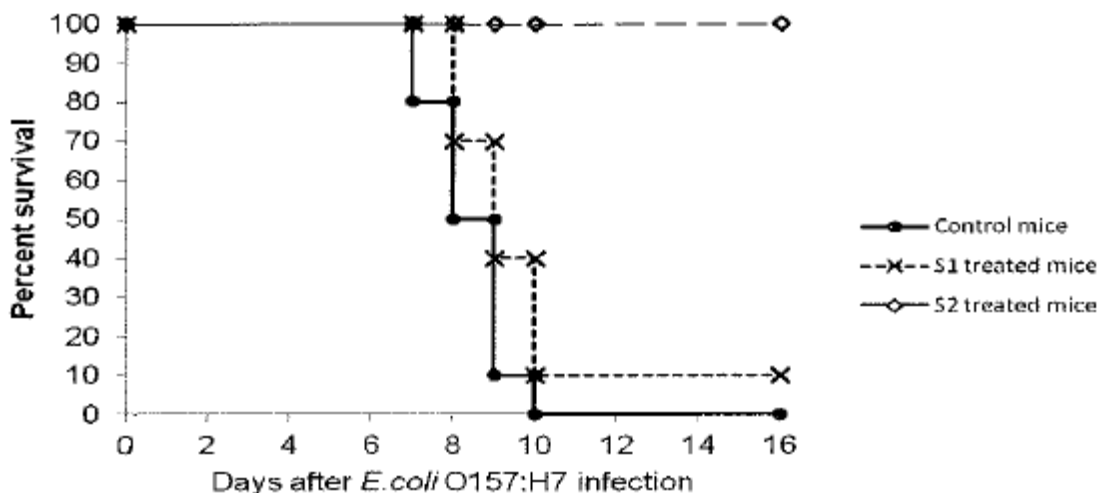
(D) 5 mice in each group were sacrificed and caecum content samples were prepared for STX RPLA quantification.

A - Dénombrement des *E. coli* O157:H7 et des bifidobactéries S1 et S2 dans les selles des souris contrôle et traitées

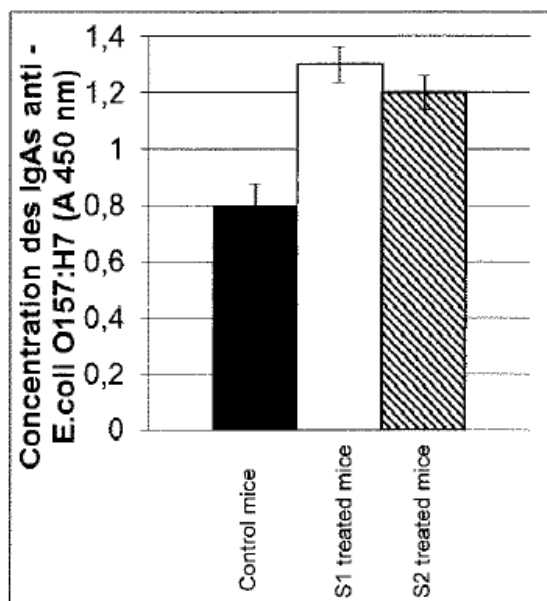
On dénombre les bactéries dans les matières fécales car elles reflètent fidèlement la composition de la flore intestinale.



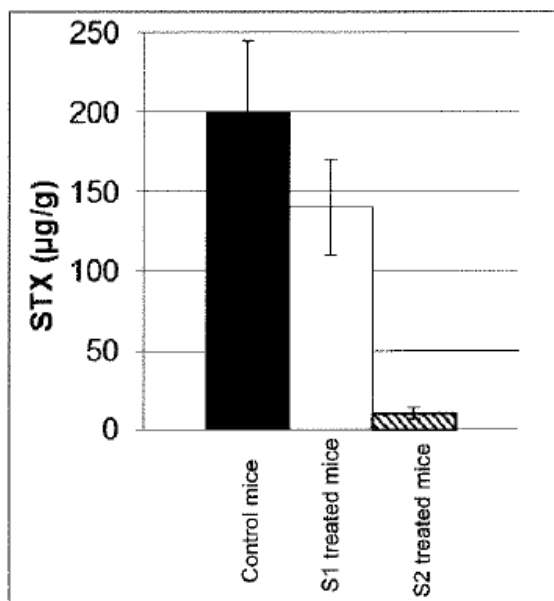
B- Suivi du pourcentage de survivants dans les lots de souris contrôle et traités



C - Concentrations en IgA sécrétoires (IgAs) anti - E. coli O157: H7 dans les selles



D - Concentrations en STX dans le contenu intestinal des lots de souris contrôle et traitées à 7 jours post-infection



DOCUMENT N° 7 : COMPOSITION DU MILIEU SORBITOL - MAC CONKEY AGAR

Composants	mg.L ⁻¹	Composants	mg.L ⁻¹
Peptone	20,0	Rouge neutre	0,03
Sorbitol	10,0	Cristal violet	0,001
Sels biliaires n°3	1,5	Agar	15,0
NaCl	5,0	H ₂ O qsp 1L	pH 7,1 ± 0,2

Sujet de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse 2015

Calculatrice non autorisée.

Dictionnaire anglais-français autorisé

PRODUITS DE LA MER ET TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES

Chez l'homme, les toxi-infections alimentaires se produisent après consommation d'aliments contenant des microorganismes ou des toxines, comme des fruits de mer contaminés. On se propose d'étudier quelques contrôles sur les produits de la mer visant à détecter le virus de Norwalk et la présence d'éventuelles toxines.

1 - Virus de NORWALK (35 points)

Le virus de Norwalk provoque des gastro-entérites avec vomissements, diarrhée, douleurs musculaires, grande fatigue et crampes abdominales.

1.1- Structure et cycle du virus de Norwalk

1.1.1 - La classification de ce virus donne les indications suivantes :

Virus family	Examples (common name)	Naked/Enveloped	Symmetry	RNA type	Group
<i>Calciviridae</i>	<i>Norwalk virus</i>	Naked	Icosahedral	ss (+)	IV

1.1.1.1 - D'après ces données, préciser les trois particularités du génome du virus de Norwalk.

1.1.1.2 - Quelles sont les indications de ce tableau qui permettent de déterminer la (les) structure(s) entourant son matériel génétique ?

1.1.2 - Le **document 1** représente le cycle de multiplication du virus de Norwalk.

1.1.2.1 - A l'aide du **document 1**, nommer chacune des étapes correspondantes aux repères A à H du cycle de multiplications du virus.

1.1.2.2 - Indiquer les fonctions respectives des deux principaux types de protéines produites au cours de l'étape C.

1.1.2.3 - Le **document 2** schématise une phase de l'événement C du **document 1**. Indiquer sur la copie la signification des numéros 1 à 9 et préciser les repères A et B d'orientation.

1.2 - Détection du virus de Norwalk par Reverse Transcriptase - PCR (RT-PCR)

1.2.1 - La première étape consiste à extraire les ARNm présents dans l'échantillon, par exemple à l'aide d'un coffret dont le principe est décrit dans le **document 3**.

1.2.1.1 - Indiquer les principales modifications post-transcriptionnelles intervenant sur un ARNm. Préciser le compartiment cellulaire dans lequel l'ARNm acquiert ces modifications. Citer les rôles de ces structures *in vivo*.

1.2.1.2 - Quelle structure est mise à profit dans le coffret d'extraction pour permettre l'hybridation sur les billes magnétiques ?

1.2.2 - La deuxième étape est une RT-PCR.

1.2.2.1 - Préciser, en citant les enzymes impliquées, les principales étapes moléculaires d'une RT-PCR.

1.2.2.2 - La PCR est réalisée dans le mix du **document 4**. Compléter le tableau de ce document en indiquant les volumes de chaque solution à prélever afin de composer le mix nécessaire à la PCR.

1.2.2.3 - On dispose de deux couples 1 et 2 d'amorces spécifiques du gène de l'ARN polymérase ARN dépendante du virus de Norwalk. A l'aide du T_m de chaque amorce, justifier le choix du couple 2 en sachant que la température d'hybridation choisie est de + 51°C.

Données : T_m d'une amorce (°C) = 2 .(A+T) + 4 . (C+G)

Couple 1

amorce A : 5'-CTTGTTGGTTTGAGGCCATAT-3'

amorce B : 5'-ATAAAAGTTGGCATGAACA-3'

Couple 2

amorce C : 5'-GTTGACACAATCTCATCATC-3'

amorce D : 5'-GCACCATCTGAGATGGATG-3'

1.2.3 - La troisième étape consiste à détecter la séquence spécifique. Plusieurs techniques sont disponibles dont celle décrite dans le **document 5**.

Schématiser les événements moléculaires illustrant la révélation de l'amplicon.

2 - Toxines marines et effets cellulaires (25 points)

2.1 - Les cultures cellulaires sont une alternative à l'expérimentation animale pour tester les effets cytotoxiques des molécules.

2.1.1 - Certaines molécules présentent une toxicité aiguë et d'autres une toxicité chronique. Définir les expressions soulignées.

2.1.2 - Plusieurs solutions sont nécessaires pour réaliser un test de cytotoxicité *in vitro*.

2.1.2.1 - Citer les catégories de constituants retrouvées classiquement dans un milieu de culture cellulaire non complet ainsi que leurs rôles respectifs.

2.1.2.2 - Proposer trois rôles attribués au sérum de veau fœtal dans les différentes étapes d'un entretien de cultures cellulaires.

2.1.2.3 - Expliquer l'intérêt de l'ajout extemporané de la L-glutamine.

2.1.2.4 - Pourquoi l'EDTA est-il souvent présent dans la solution de trypsine ?

2.2 - La saxitoxine est produite par une algue microscopique du phytoplancton, retrouvée chez les mollusques filtreurs. Sa cytotoxicité a été mise en évidence sur des neurones en culture.

2.2.1 - Le **document 6** représente une synapse neuromusculaire. A l'aide des repères A à D, présenter brièvement les phénomènes cellulaires permettant la contraction musculaire à l'arrivée d'un potentiel d'action.

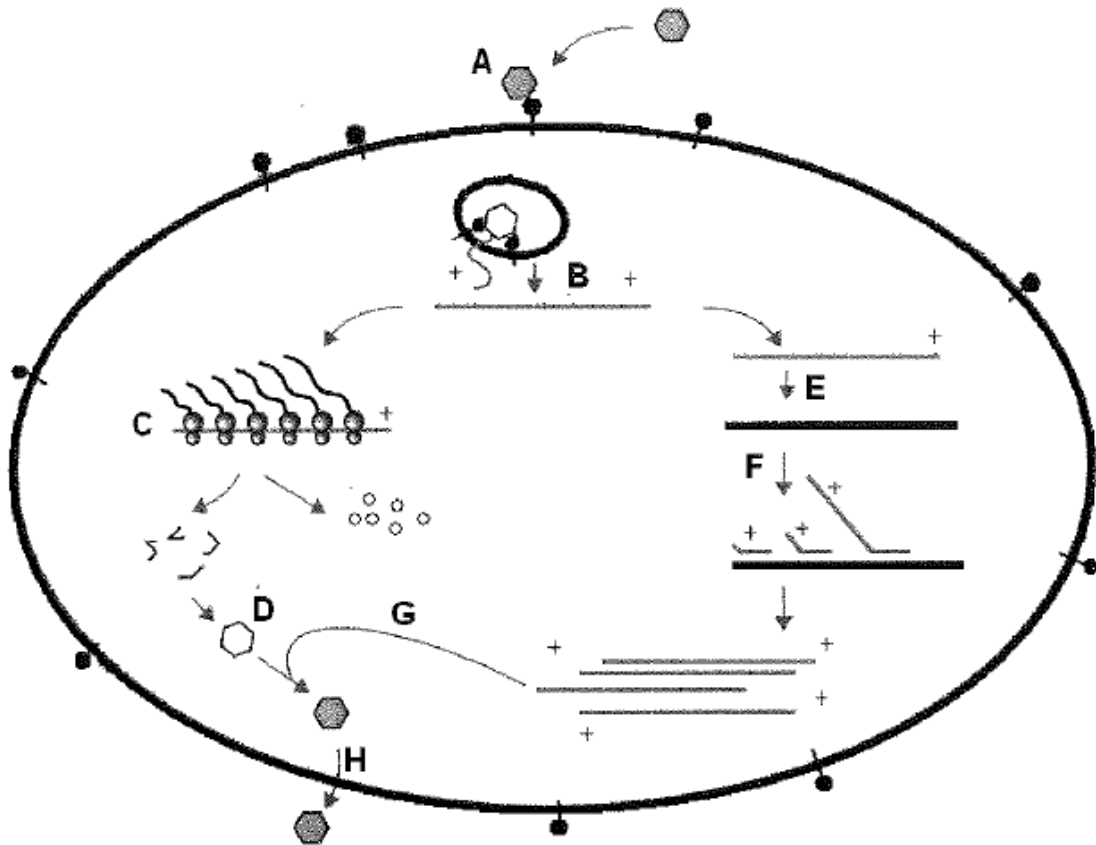
2.2.2 - Sachant que la saxitoxine empêche le phénomène "A", en déduire son impact sur la cellule musculaire.

2.3 - Chez les poissons "bleus", la rupture de la chaîne du froid accélère la croissance de microorganismes commensaux du poisson ; ces derniers dégradent l'histidine des protéines en histamine, responsable d'intoxinations. La diphenhydramine est un principe actif dans le traitement des intoxications à l'histamine. Son efficacité et sa puissance sont étudiées *in vitro*.

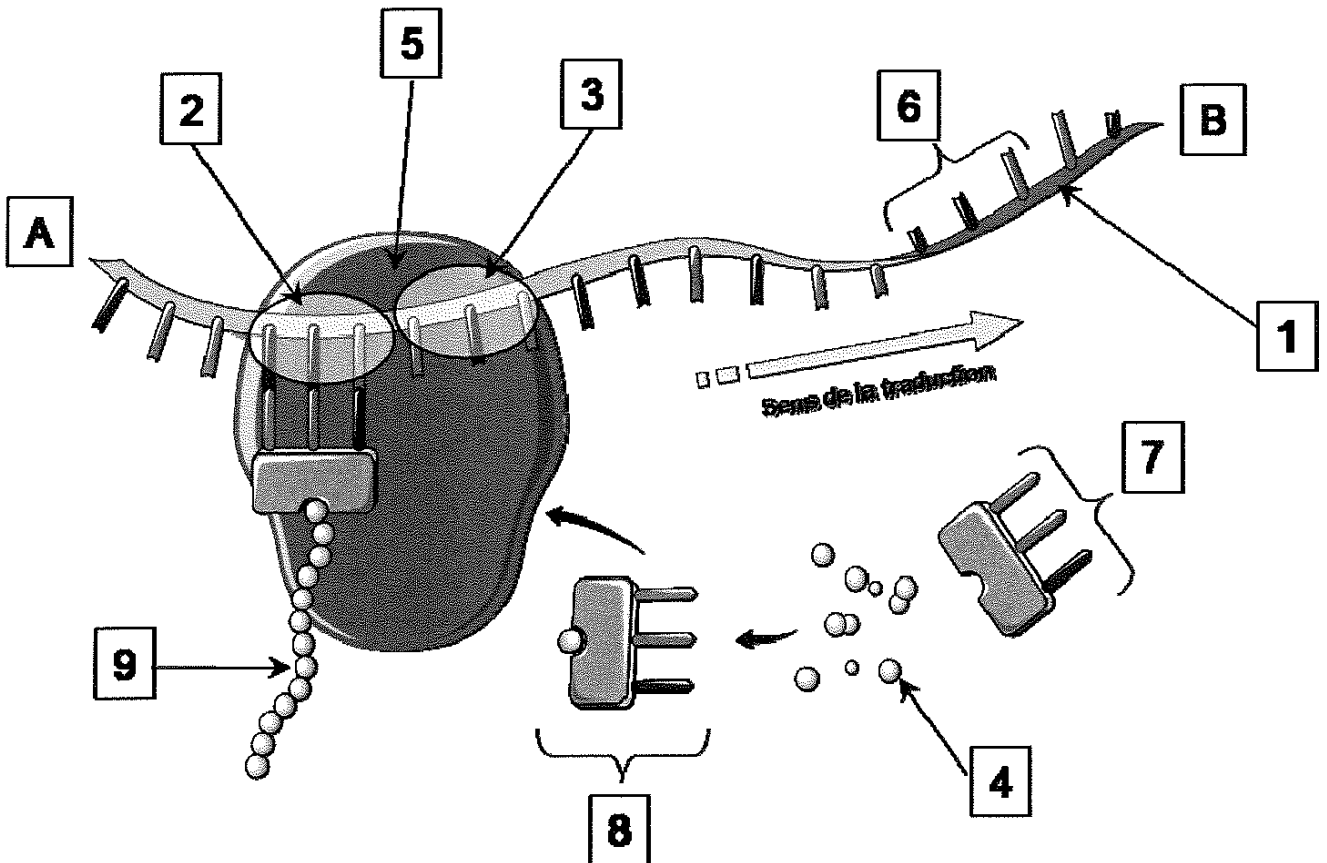
2.3.1 - Exploiter les courbes pour montrer que la diphenhydramine est un antagoniste compétitif des récepteurs de l'histamine (récepteurs "H1").

2.3.2 - Les H1 sont des récepteurs couplés à des protéines G. Préciser les étapes qui conduisent à une réponse cellulaire suite à la fixation du ligand sur ce type de récepteurs.

DOCUMENT 1 : CYCLE DE MULTIPLICATION DU VIRUS DE NORWALK



DOCUMENT 2 : PHASE MOLECULAIRE DE L'EVENEMENT C DU DOCUMENT 1



DOCUMENT 3 : PRINCIPE DU COFFRET « AMBION'S POLY(A) PURIST MAG™ »

Le kit *Ambion's Poly(A) Purist MAG™* rend la purification des ARNm plus facile en proposant une méthode rapide pour isoler, avec la pureté la plus élevée possible, les ARNm des ARN totaux. Ce kit met en jeu une purification basée sur des billes magnétiques-oligo(dT) avec un protocole d'hybridation optimisé, de sorte que les ARNm se lient de façon efficace mais sans co-rétention des ARNr.

DOCUMENT 4 : PREPARATION DU MIX DE PCR
(à rendre avec la copie)

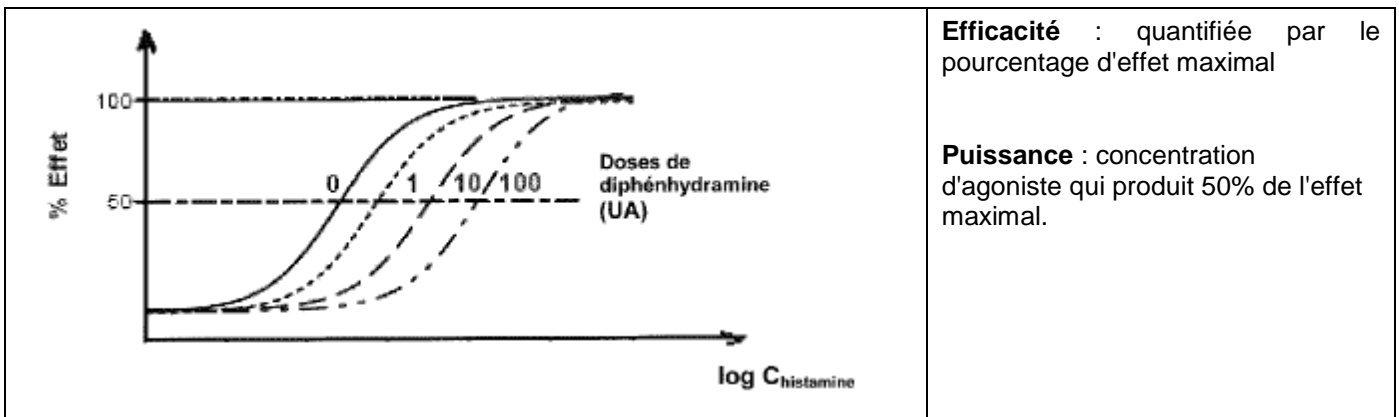
Réactifs	Concentration des réactifs	Concentration (ou quantité) nécessaire dans le mix pour un tube test	Volume (µL)
Solution ADNc	-	10 µL	
Tampon	10X	1X	
Solution de dNTPs	10 mmol.L ⁻¹	200 µmol.L ⁻¹	
Amorce sens	5 µmol.L ⁻¹	0,1 µmol.L ⁻¹	
Amorce anti-sens	5 µmol.L ⁻¹	0,1 µmol.L ⁻¹	
Taq polymérase	1U.µL ⁻¹	2U	
Eau de qualité biologie moléculaire	-	Qsp 50 µL	

DOCUMENT 5

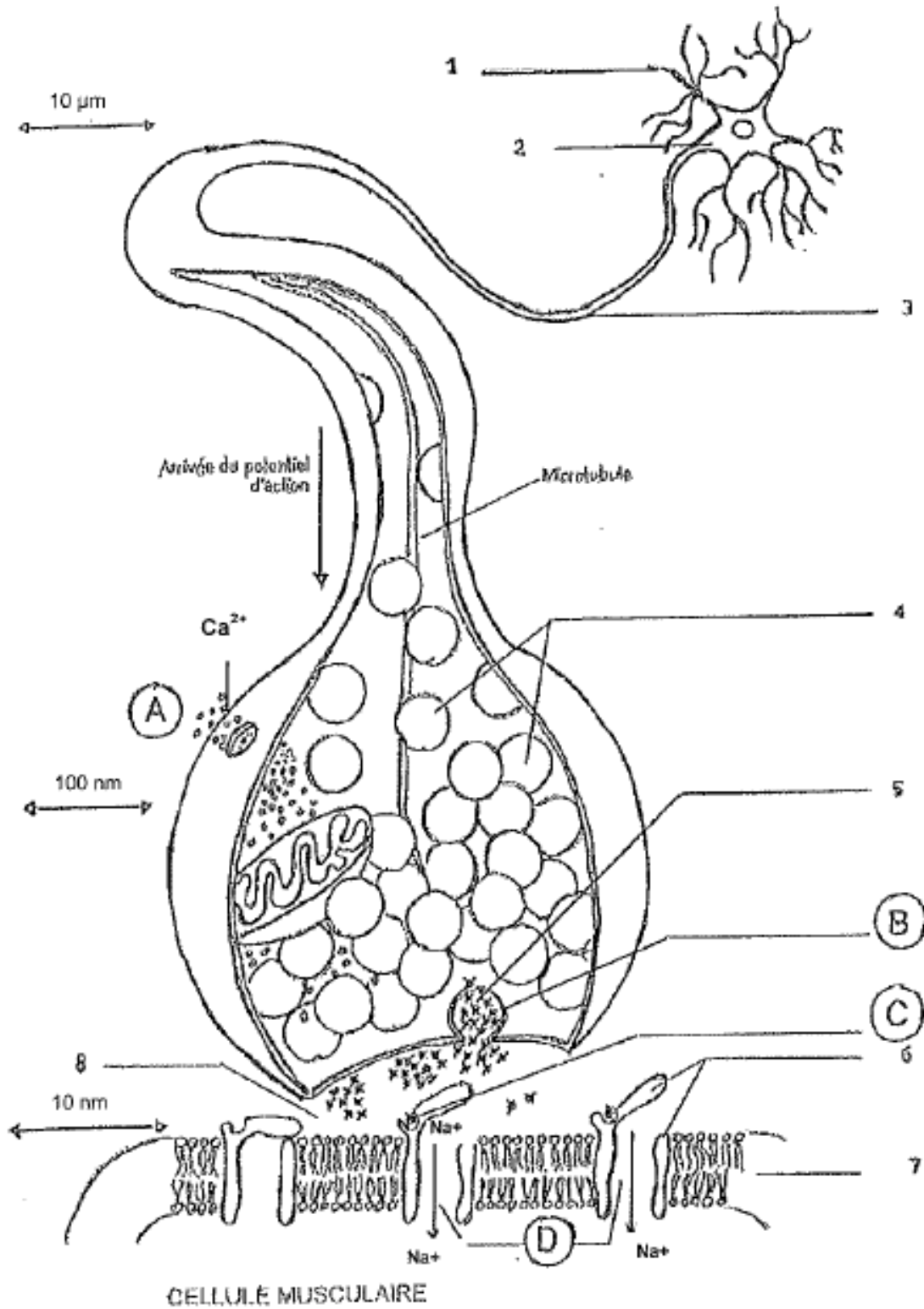
RT-PCR products were transferred on a nitrocellulose membrane. A specific probe **(1)**, 3'-end-labeled with digoxigenin-dUTP, and then hybridized overnight on the membrane. Immunological detection of PCR product-probe hybrids was performed by using an anti-digoxigenin alkaline phosphatase antibody conjugate and enzyme catalyzed colorimetric reaction with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium salt as substrates. The blots were washed five times.

(1) Probe = sonde.

DOCUMENT 7 : COURBES DOSE/REPONSE



DOCUMENT 6 : SCHEMA D'UNE SYNAPSE NEUROMUSCULAIRE



- 1 : dendrites
- 2 : corps cellulaire (ou cytoplasme ou cytosol)
- 3 : axone
- 4 : vacuoles ou vésicules de neurotransmetteur
- 5 : acétylcholine (ou neurotransmetteur)
- 6 : récepteur - canal ionique
- 7 : membrane de la fibre musculaire
- 8 : fente synaptique

Sujet de sciences et technologies bioindustrielles 2015

Calculatrice non autorisée

Dictionnaire anglais-français autorisé

FROMAGE AOC BANON

Le Banon est un fromage de chèvre au lait cru et entier, mûri dans des feuilles de châtaigniers. Déjà servi à la table des empereurs romains, il bénéficie depuis 2003 de l'AOC, dont l'objectif est de contribuer à préserver ce patrimoine culturel et gastronomique.

1 - Fabrication (18 points)

Le **document 1** présente le diagramme de fabrication du fromage AOC Banon.

Le Banon a de tout temps été produit selon une technologie présure imposée par les conditions climatiques - température élevée et sécheresse du climat ambiant - qui obligent un caillage rapide du lait pour éviter qu'il ne tourne.

1.1 - Le lait cru

Pour la préparation du caillé, le lait est utilisé cru.

1.1.1 - Présenter les différentes phases du lait cru. Préciser leur composition qualitative.

Ces phases sont mises en évidence après repos du lait 24 h à 48 h à température ambiante. Tracer un schéma annoté du phénomène observé.

1.1.2 - Le lait cru est collecté chez les producteurs puis transformé à la fromagerie. Quelle enzyme faut-il rechercher pour s'assurer que ce lait n'a pas subi de traitement thermique? Justifier la réponse.

1.1.3 - Lister les avantages et les inconvénients de l'utilisation du lait cru dans l'industrie fromagère.

1.2 - Les additifs alimentaires

A l'exception d'un ajout de présure, de ferments lactiques, de ferments d'affinage et de sel, tout ajout au lait est interdit.

1.2.1 - Définir le terme «additif alimentaire».

1.2.2 - Indiquer pour la présure et les ferments, s'il s'agit d'organismes vivants ou de biomolécules. Préciser leur nature.

1.2.3 - Expliquer les modifications provoquées par l'ajout de présure.

1.2.4 - Présenter, succinctement, les rôles des ferments lors de l'affinage ainsi que leurs actions sur les biomolécules.

2 - Signes de qualité (23 points)

2.1 - L'étiquette : premier élément de transparence

2.1.1 - Présenter les objectifs de l'étiquetage.

2.1.2 - Annoter l'étiquette du Banon proposée dans le **document 2**. Pour cela, recopier sur la copie les numéros de 1 à 7 et indiquer leur signification. Préciser les mentions obligatoires.

2.1.3 - Détailler les différentes informations apportées par l'élément 5 de l'étiquette. Justifier l'intérêt de la présence de cet élément.

2.1.4 - La date de durabilité indiquée sur l'étiquette est-elle une DLC ou DLUO ? Définir ces notions et justifier le choix du type de date effectué par le producteur.

2.2 - L'AOC : la garantie officielle de qualité

L'AOC BANON est délivrée par l'INAO après une série d'audits réalisés par l'organisme certificateur Qualisud. Sur le site de l'INAO, on peut télécharger la fiche du Banon fournie dans le **document 3**.

2.2.1 - La fiche du Banon indique que celui-ci a les statuts « AOC » et « AOP ». Expliquer ce que signifie et garantit l'AOC et ce que l'AOP apporte de plus.

2.2.2 - Définir le terme « audit ». Citer deux catégories d'audits et préciser leur principale différence.

2.2.3 - Indiquer la signification du sigle INAO. Préciser le rôle de l'INAO.

2.2.4 - Nommer l'organisme qui accorde l'accréditation à l'organisme certificateur.

2.3 - Les contrôles

Citer trois catégories d'analyses nécessaires pour contrôler l'aspect sanitaire et l'origine du produit. Donner un exemple pour chaque catégorie.

3 - Traitement du lactosérum (19 points)

Lors de la fabrication fromagère, un liquide résiduel - le lactosérum - est obtenu. Son volume représente 80 à 90% de celui du lait et il contient environ 45% de la matière sèche du lait. Pour des raisons économiques et par souci de protection de l'environnement, le traitement du lactosérum s'est imposé aux fabricants.

3.1 - Le lactosérum : un coproduit de fabrication

Le lactosérum est l'un des déchets industriels banals (DIB) des industries agroalimentaires. Il peut être considéré comme un coproduit et non comme un déchet.

3.1.1 - Pour le lactosérum, justifier l'appellation de coproduit.

3.1.2 - Présenter un autre DIB d'une industrie agroalimentaire et une de ses voies de valorisation possible.

3.2 - Etude des étapes de préparation des isolats de protéines sériques (IPL)

Après traitement, le lactosérum permet de préparer des IPL ayant des propriétés biologiques intéressantes. La lactoferrine et la lactoperoxydase ont par exemple une activité antimicrobienne sur une large gamme d'agents infectieux.

Le **document 4** présente le diagramme de fabrication des IPL.

Le **document 5** présente un procédé de purification de la lactoferrine et de la lactoperoxydase par chromatographie d'échange d'ions.

3.2.1 - Chromatographie d'échange d'ions

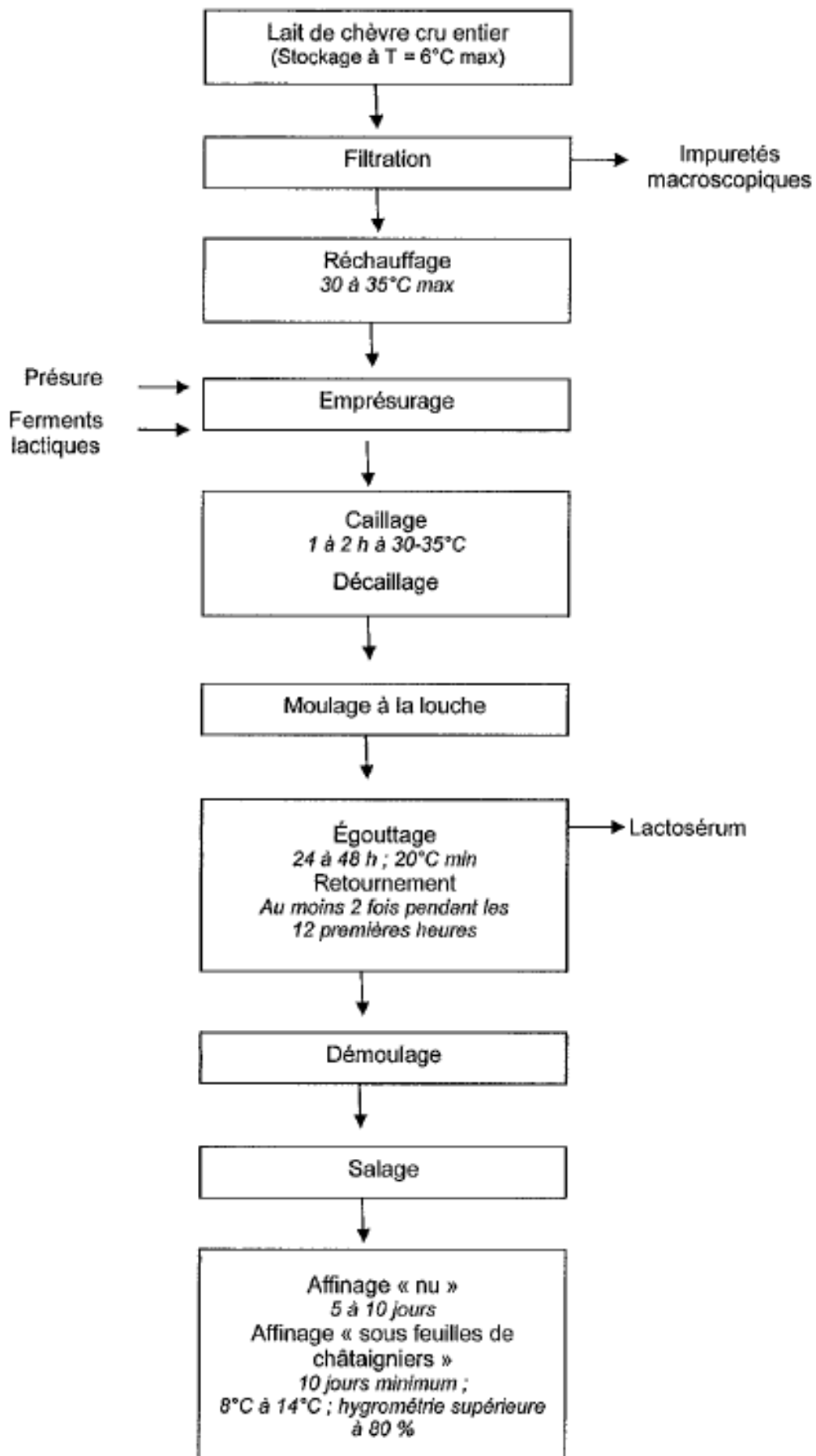
3.2.1.1 - Présenter le principe de la chromatographie d'échange d'ions.

3.2.1.2 - A partir de l'analyse des **documents 5** et **6**, indiquer la nature du support de l'échangeur d'ions, le type d'ions échangés et le mode d'élution.

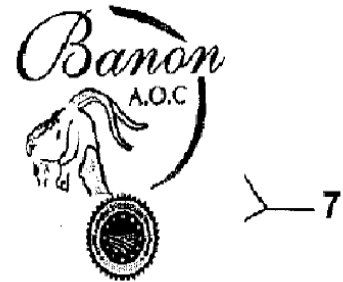
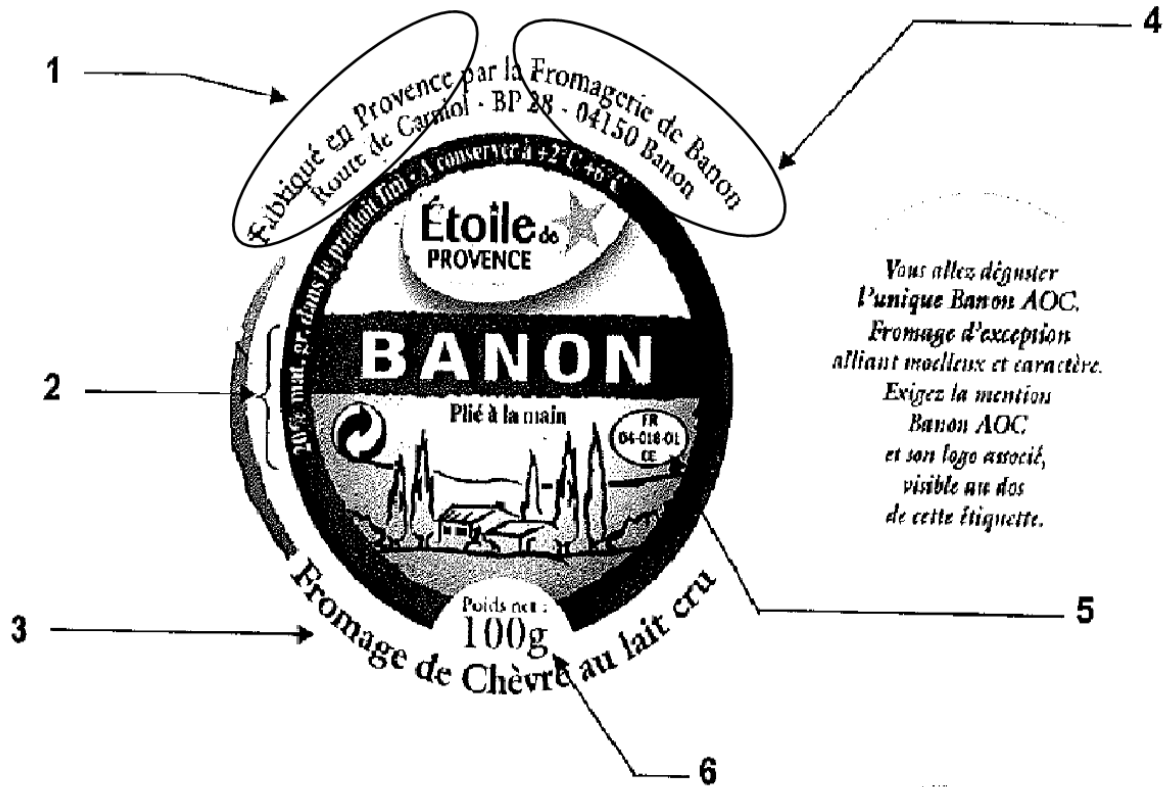
3.2.1.3 - Nommer sur la copie les étapes 1 à 5 (**document 5**) et expliquer l'objectif de chacune d'elles.

3.2.2 - Ultra filtration

A l'aide d'un schéma annoté, expliquer le principe de ce procédé. Préciser la phase où se trouve le concentré de protéines.

DOCUMENT 1 : DIAGRAMME DE FABRICATION DU BANON

DOCUMENT 2 : ETIQUETES DU BANON



BANON AOP

20 % de matière grasse dans le produit fini / 20 % fat content in the product i.e.
 Poids net / net weight : 100 g
 N° lot / lot number : 30801101
 Fromage de chèvre au lait cru / cheese made from raw milk.
 Ingr : lait cru de chèvre, sel, ferments lactiques, présure / Goat's raw milk, salt, lactic starters ferments, rennet.
 A consommer de préférence avant le / use by date : 20/05/11



3 461680 002062

À conserver à + 2°C + 6°C
www.fromageries-etoile.com

DOCUMENT 3 : FICHE « BANON »

Extrait de la fiche "Banon". Source www.inao.gouv.fr

Mise à jour : 04/03/2011

PRODUIT : Banon

Mots-clés	1.3 - Fromages - Chèvre	Statut CE	AOP -
Statut FR Appellation	AOC -	Dénomination	Banon
Appellation	Banon		

DESCRIPTION

Le Banon est un fromage à pâte molle fabriqué à partir de lait de chèvre cru et entier. (...) Il est présenté plié dans des feuilles naturelles de châtaigniers brunes, liées avec du raphia naturel. (...) Sa pâte est homogène, crémeuse, onctueuse et souple. Son poids est de 90 à 110 g. (...) Le diamètre est de 75 à 85 mm et la hauteur est de 20 à 30 mm. Il contient au minimum 40 grammes de matière sèche pour 100 grammes de fromage et 40 grammes de matière grasse pour 100 grammes de fromage après complète dessiccation.

AIRE GÉOGRAPHIQUE

Le berceau d'origine du BANON est la Haute-Provence, (...). Il s'agit d'une vaste région caractérisée par des étendues herbeuses et une végétation forestière de faible densité favorables au pastoralisme. (...)

MODE DE PRODUCTION

Le lait utilisé pour l'obtention du Banon devra provenir uniquement de chèvres de races Communes Provençales, Roves, Alpines et croisées issues de ces races. (...). La collecte du lait à la ferme devra être journalière et le stockage du lait avant collecte se fera à une température de 8°C.

MODE D'ELABORATION**Préparation du caillé**

Le lait est mis en œuvre cru et entier, non normalisé en protéines et matières grasses. Tout traitement physique ou chimique est interdit à l'exception d'une filtration destinée à éliminer les impuretés macroscopiques, d'un refroidissement à une température positive en vue de la conservation et d'un réchauffage du lait jusqu'à 35°C maximum avant emprésurage. A l'exception d'un ajout de présure, de ferments lactiques, de ferments d'affinage ou de sel (chlorure de sodium), tout retrait ou ajout à ce lait est interdit. Le lait est emprésuré à une température comprise entre 29°C et 35°C.

Fabrication des fromages

Le caillé est moulé manuellement en faisselles. Le démoulage intervient entre 24h et 48h après le moulage. Le fromage est salé.

Affinage des fromages

L'affinage se déroule en deux temps :

- premier affinage de la tome nue avant pliage pendant 5 à 10 jours à une température minimum de 8°C,
- second affinage après pliage sous feuilles de châtaigniers pendant 10 jours minimum à une température comprise entre 8 et 14°C. Ce double affinage permet le développement des caractéristiques aromatiques du fromage.

LIEN AU TERROIR**Une production adaptée au terroir**

Le fromage dénommé "Banon" détient son nom de la commune de BANON située dans les Alpes-de-Haute-Provence. (...)

Une technologie de fabrication typique

(...) Le Banon a de tout temps été fabriqué selon une technologie présure. Cette technologie de fabrication a toujours été présente dans cette zone et attestée par la présence de larges trous dans les faisselles utilisées ce qui indique que le caillé est de type présure. (...)

Le pliage est aussi une technique traditionnelle associée à ce fromage. C'est à la fois une technique de conservation (facteur d'isolation de l'air) et une technique d'affinage (développement de caractéristiques organoleptiques) du fromage. (...)

PREUVE DE L'ORIGINE

Chaque producteur de lait, atelier de transformation et atelier d'affinage remplit une "déclaration d'aptitude" enregistrée par les services de l'I.N.A.O. et permettant à ce dernier d'identifier tous les opérateurs. Ils doivent tenir à la disposition de l'I.N.A.O. des registres ainsi que tout document nécessaire au contrôle de l'origine, de la qualité et des conditions de production du lait et des fromages.

Une vignette destinée à assurer le suivi du produit doit être apposée sur chaque fromage.

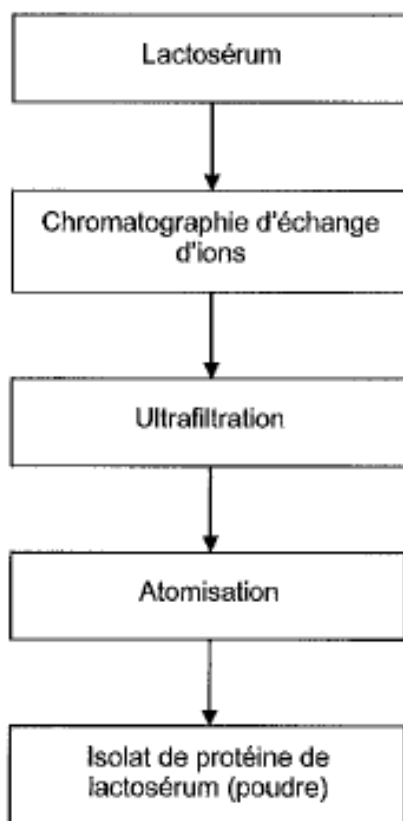
Dans le cadre du contrôle effectué sur les caractéristiques du produit d'appellation d'origine, un examen analytique et organoleptique vise à s'assurer de la qualité et de la typicité des produits présentés à cet examen.

ORGANISME DE DEFENSE ET DE GESTION

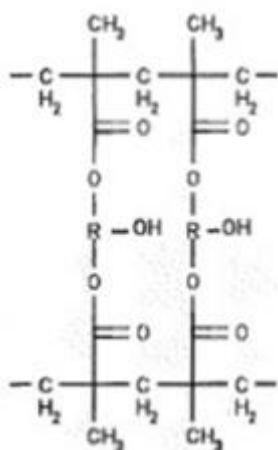
Syndicat Interprofessionnel de Défense et de Promotion du Banon

ORGANISME DE CONTROLE

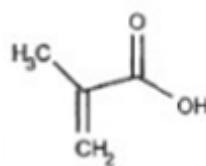
QUALISUD - Organisme certificateur - Agrément(s) : CER.AOC n° 03, INS.AOC n°07, LA n° 36

DOCUMENT 4 : DIAGRAMME DE FABRICATION DES IPL**DOCUMENT 6 : CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANGEUR SULFOPROPYL TOYOPEARL****Support Toyopearl : Polymère d'ester d'acide méthacrylique**

Polymère



Acide méthacrylique



Ester d'acide méthacrylique

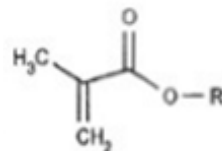
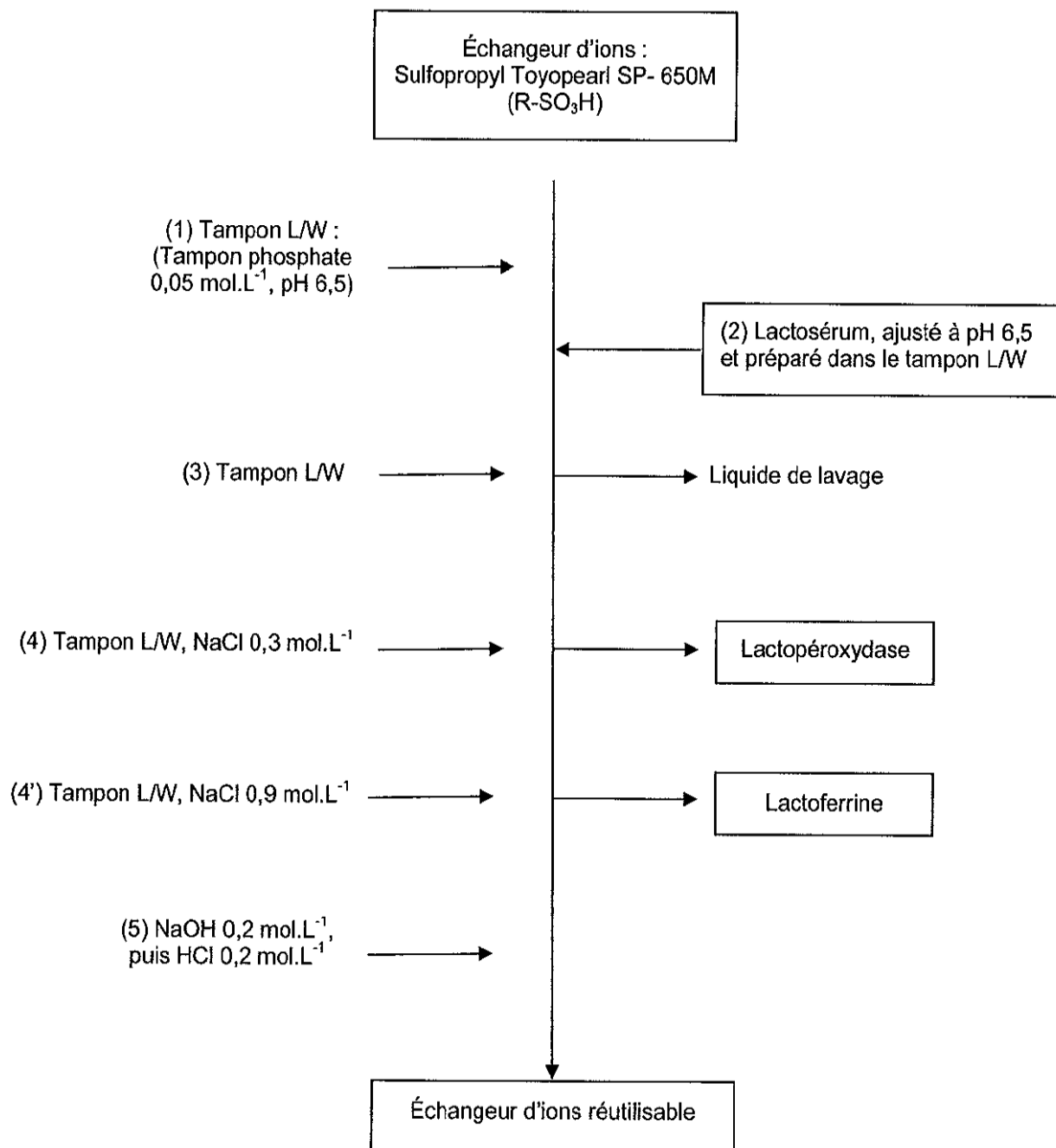


Schéma de l'échangeur avec son groupement fonctionnel sulfopropyl



Support Toyopearl Groupement fonctionnel

DOCUMENT 5 : ÉTAPES DE PURIFICATION DE LA LACTOPEROXYDASE ET DE LA LACTOFERRINE PAR CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGES D'IONS



Techniques de biochimie 2015

Pour les candidats non évalués en CCF Durée : 4h Coefficient : 4

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)

Document à rendre et à agraffer avec la copie : **Feuille de traçabilité**

CONTROLES QUALITE SUR UN PRODUIT PHARMACEUTIQUE : EVALUATION DE LA COMPOSITION D'UN COMPRIME ANTISEPTIQUE

Contexte professionnel

La lysopaïne® (Boehringer Ingelheim) est un comprimé préconisé en cas de mal de gorge peu intense et sans fièvre. Ses principes actifs sont le lysozyme, dont l'activité est de lyser le peptidoglycane des bactéries, et le cétylpyridinium, qui est un agent antibactérien. Le comprimé contient également des excipients, dont le sorbitol.

On se propose de contrôler la composition d'un comprimé de lysopaïne®. La composition attendue, pour un comprimé, est la suivante :

- chlorure de cétylpyridinium : 1,5 mg
- chlorhydrate de lysozyme : 20 mg
- excipient ayant un effet notoire : Sorbitol.

Compétences évaluées

Réaliser des analyses et des contrôles biochimiques (26 points).

- Préparer ou prétraiter les échantillons.
- Réaliser des analyses mettant en œuvre des appareillages optiques. Réaliser des techniques d'analyses enzymatiques.

Analyser, interpréter et valider des résultats (11points).

Utiliser l'outil informatique (3 points).

Mises en œuvre

Activité professionnelles	Documents et ressources
<p>1:</p> <p>Réalisation de la solution mère de comprimé</p>	Fiche protocole 1
<p>2:</p> <p>Dosage du lysozyme dans le filtrat F</p>	Fiche protocole 2 Feuille de traçabilité à compléter et à rendre avec la copie, annexe 2 Annexe 3: acceptabilité des résultats
<p>3: Dosage du cétylpyridinium sur la solution comprimé déprotéinisée (solution P fournie)</p>	Fiche protocole 3 Feuille de traçabilité à compléter et à rendre avec la copie, annexe 2 Annexe 3 : expression du résultat
<p>4:</p> <p>Dosage d'un excipient: le sorbitol</p>	Fiche protocole 4 Feuille de traçabilité à compléter et à rendre avec la copie, annexe 2 Validation de la méthode, annexe 1 Annexe 3: acceptabilité des résultats

Rapport d'analyses

Conclure quant à la conformité de la composition du comprimé de lysopaïne® analysé.

FICHE PROTOCOLE 1	Réalisation de la solution mère de comprimé
--------------------------	--

Matériels et réactifs

- Mortier et pilon petit modèle - Fiole jaugée de 50 mL - Filtre plissé et entonnoir - Pipette graduée de 2 mL - Flacon vide étiqueté « Filtrat F » - Pipette plastique compte-gouttes	- Solution d'acide chlorhydrique à 0,1 mol.L ⁻¹ - Solution tampon phosphate 0,2 mol.L ⁻¹ , pH 6,4
---	--

• Protocole opératoire

- Broyer finement un comprimé dans un mortier.
- Ajouter 2 mL de solution d'acide chlorhydrique à 0,1 mol.L⁻¹ et homogénéiser pour bien dissoudre tout le comprimé.
- Lorsque le comprimé est bien dissous, transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 50 mL.
A réaliser en présence de l'examineur.
- Compléter avec la solution tampon phosphate 0,2 mol.L⁻¹ pH 6,4.
- Filtrer sur filtre plissé :le filtrat obtenu est noté filtrat F.

FICHE PROTOCOLE 2	Dosage du lysozyme
--------------------------	---------------------------

Principe

L'activité catalytique du lysozyme peut être suivie par mesure de la diminution de la densité optique (DO) d'une suspension de *Micrococcus lysodeikticus*. La densité optique est lue à 450 nm, et sa diminution est proportionnelle à la quantité de lysozyme initialement présent dans l'échantillon.

Matériels et réactifs

<ul style="list-style-type: none"> - Bain thermostaté - Fiole jaugée de 10 mL - Pipette jaugée de 1mL - Tube à essai (1) - Cuves « visible » (4) - Spectrophotomètre à 450 nm - Chronomètre - Pipette automatique - Pipettes graduées de 5 mL 	<ul style="list-style-type: none"> - Solution étalon de lysozyme : solution de chlorhydrate de lysozyme à 6 mg.mL⁻¹ préparée en tampon phosphate à diluer au 1/10ème en tampon phosphate - Substrat : <i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698 (200 mg.L⁻¹ préparé en tampon phosphate - Filtrat F' - Solution tampon phosphate 0,2 mol.L⁻¹ pH6,4
--	--

Protocole opératoire

- Réaliser la dilution au 1/10^{ème} de la solution étalon de lysozyme.
- Préchauffer la suspension de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, en tube à essai, à 25°C dans le bain thermostaté, pendant 5 minutes.
- Faire le zéro du spectrophotomètre sur le tampon phosphate.
- Transférer 2,5 mL de la suspension de *Micrococcus lysodeikticus* en cuve.
- Mesurer la densité optique (DO₁) de la cuve contenant la suspension de *Micrococcus lysodeikticus*.
- Ajouter 100 µL d'enzyme (solution étalon de lysozyme diluée ou filtrat F) et déclencher le chronomètre .
A réaliser en présence de l'examineur.
- Homogénéiser.
- Mesurer la densité optique (DO₂) après 2 minutes exactement.
Réaliser 2 essais sur le filtrat F et 1 essai sur la solution étalon diluée.

Données

- s_r = 0,030 ΔDO pour 2 minutes
- U_c = 0,20 mg / comprimé.

Le dosage du lysozyme par comparaison avec une solution étalon, permet le calcul de la masse de lysozyme selon l'équation aux grandeurs suivantes :

$$m_{\text{lysozyme}} = \frac{\Delta DO_{\text{échantillon}}}{\Delta DO_{\text{étalon}}} \times m_{\text{étalon}}$$

Compte-rendu

- Calculer ΔDO = DO₁ - DO₂
- Calculer la quantité de lysozyme en mg contenue dans le filtrat F.
- En déduire la quantité de lysozyme en mg contenue dans un comprimé, et conclure.

FICHE PROTOCOLE 3	Dosage du cétylpyridinium sur la solution P
--------------------------	--

Principe

Le cétylpyridinium est une molécule aromatique absorbant à 260 nm.

Il est donc possible de doser le principe actif du comprimé étudié par mesure de l'absorbance dans l'UV.

Matériels et réactifs

-Microcuvettes UV (7) - Spectrophotomètre - Pipette automatique	-Solution étalon de cétylpyridinium à 150 mg.L ⁻¹ - Solution P à analyser; filtrat F déprotéinisé (<u>la déprotéinisation provoque une dilution du filtrat F au demi</u>) - Eau distillée
---	---

Protocole opératoire

- Préparation de la gamme d'étalonnage :
Réaliser en microcuvettes, une gamme contenant de 0 à 200 µL de la solution étalon, compléter à 1 mL avec de l'eau distillée.
- Dosage : réaliser deux essais sur la solution P fournie.
- Mesurer les absorbances à la longueur d'onde adéquate.

Données

- $s_r = 0,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$
- $u_c = 0,10 \text{ mg / comprimé}$

Compte-rendu

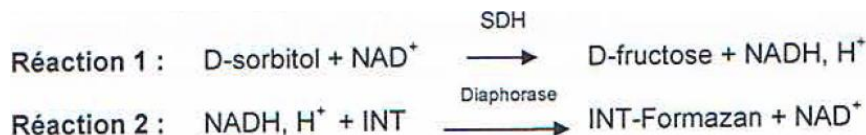
- Justifier la longueur d'onde choisie pour doser le cétylpyridinium à partir du spectre d'absorption fourni réalisé.
- A l'aide de l'outil informatique, tracer la droite d'étalonnage et déterminer les paramètres de la régression linéaire.
- En déduire la concentration massique en cétylpyridinium de la solution P (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$).
- Calculer la teneur en cétylpyridinium d'un comprimé de lysopaïne® (en mg / comprimé).
- Conclure.

FICHE PROTOCOLE 4	Dosage du Sorbitol par méthode enzymatique en point final
--------------------------	--

Principe

Le D-sorbitol est oxydé par le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD^+) en D-fructose. en présence de la Sorbitol DesHydrogénase (SDH) avec production de Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit (NADH , H^+) Le NADH , H^+ formé permet la réduction du IodoNitroTétrazolium chloride (INT) en IodoNitroTétrazolium-Formazan (INT-Formazan) en présence de la diaphorase.

La quantité d'INT-Formazan produit est proportionnelle à la quantité de D-sorbitol présent dans le milieu réactionnel. L'INT-Formazan absorbe à 492 nm.



Matériels et réactifs

<ul style="list-style-type: none"> -Cuves "visible" (5) - Spectrophotomètre à 492 nm - Pipette automatique - Pipette graduée de 5 mL - Fiole jaugée de 200 mL - Pipette jaugée de 1 mL - Chronomètre - Papier aluminium 	<ul style="list-style-type: none"> -Solution étalon de D-sorbitol à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ -Filtrat F (voir fiche protocole1) - Solution 1 : Solution tampon (TEA) $0,24 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,6 - Solution 2 : NAD^+ et INT -Suspension 3 : suspension de diaphorase (150 U.mL^{-1}) - Solution 4 : SDH - eau distillée
---	--

Caractéristiques techniques

- Longueur d'onde : 492 nm
- Cuve : 1 cm de trajet optique
- Température : environ 25°C
- Volume de milieu réactionnel : 2,87 mL
- Lecture contre l'air (sans cuve dans le trajet optique).

Protocole opératoire

- Diluer le filtrat F au $1/200^{\text{eme}}$ en solution tampon.
- Réaliser deux essais sur la solution étalon de D-sorbitol et deux essais sur le filtrat F dilué.

Déposer dans les cuves	Blanc	Essai
Eau distillée	2,10 mL	2,00 mL
Echantillon	-	0,10 mL
Solution 1	0,50 mL	0,50 mL
Solution 2	0,20 mL	0,20 mL
Suspension 3	0,02 mL	0,02 mL
Homogénéiser et relever l'absorbance A1 après environ 2 minutes Démarrer la réaction par addition de :		
Solution 4	0,05 mL	0,05 mL
Homogénéiser et relever l'absorbance A2 après environ 15 minutes d'incubation à l'obscurité Vérifier que la réaction est terminée en relevant à nouveau l'absorbance 5 minutes après. Si les absorbances sont stables (moins de 0,02 UA entre les deux mesures), on considère la réaction totale. :		

Réaliser les mesures en présence de l'examineur.

FICHE PROTOCOLE 4 (suite)	Dosage du Sorbitol par méthode enzymatique en point final
----------------------------------	--

Données

Equation aux grandeurs de la concentration massique en sorbitol (ρ) en g.L^{-1}

$$\rho = \frac{\Delta A}{\epsilon \times l} \times \frac{V_{MR}}{V_E} \times M_{\text{sorbitol}} \times Fd$$

avec

ΔA	$= (A_2 - A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - A_1)_{\text{étalon}}$
E	Coefficient d'absorbance linéique molaire du INT-Formazan à 492 nm: $19\,900 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
l	Longueur du trajet optique en cm
V_{MR}	Volume le milieu réactionnel (mL)
V_E	Volume d'échantillon (mL)
M_{sorbitol}	Masse molaire du sorbitol = $182,17 \text{ g.mol}^{-1}$
Fd	Facteur de dilution de l'échantillon

- $s_r = 0,30 \text{ g.L}^{-1}$
- $U_c = 0,030 \text{ g / comprimé}$

Compte-rendu

A l'aide de l'annexe 1, valider la méthode.

- Calculer la concentration massique en D-sorbitol dans le filtrat F en g.L^{-1} .
- Calculer la teneur pour un comprimé en g / comprimé.
- Conclure quant à l'éventuelle toxicité du sorbitol pour un adulte sachant que :
 - > la dose journalière admissible du sorbitol est de 10 à 15 g,
 - > la posologie maximale conseillée du médicament est de 6 comprimés par jour.

ANNEXE 1 : Validation par le dosage d'une solution de contrôle

L'objectif est de vérifier que la mesure de l'échantillon de contrôle (solution étalon) se situe bien dans l'intervalle proposé afin de valider les résultats de la série de dosages réalisés dans les mêmes conditions.

L'écart type de reproductibilité s_R est fourni ainsi que l'incertitude composée $u_c(a)$.

Calcul de l'écart normalise (EN) :

$$EN = \frac{|x - a|}{\sqrt{u_c^2(a) + s_R^2}}$$

a : Valeur de référence de l'échantillon de contrôle (solution étalon)

x : mesure de « a » par le laboratoire

$u_c(a)$: Incertitude type composée affectée à l'échantillon « a »

s_R : écart type de reproductibilité pour le mesurage de « a »

Données

- $s_R = 0,0115 \text{ g.L}^{-1}$
- $U_c(a) = 0,010 \text{ g.L}^{-1}$

Si $EN < 2$, le biais n'est pas significatif, et le résultat obtenu peut être validé.

ANNEXE 2 : Feuille de traçabilité
(à compléter et à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPERATEUR :

Date :

Poste n°

Dosage du lysozyme :

Cuves	Essai 1 filtrat	Essai 2 filtrat	Etalon Lysozyme
DO ₁ (450 nm)			
DO ₂ (450 nm)			
Δ DO			

Détermination de la teneur en cétylpyridinium :

Cuves	Gamme étalon					Solution P	
	0	1	2	3	4	Essai 1	Essai 2
A _(260nm)							
Concentration massique en μg.mL ⁻¹							

Dosage du sorbitol :

Cuves	Blanc	Essai 1	Essai 2	Etalon 1	Etalon 2
A ₁ (492nm)					
A ₂ (492nm)					

ANNEXE 3 : Acceptabilité des résultats

Il s'agit du même document que celui présenté page 46

Techniques de microbiologie 2015

Pour les candidats non évalués en CCF

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

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

Attention : les annexes 1 et 2 (du jour 1) sont à restituer au candidat le jour 2.

CONTROLE DE QUALITE MICROBIOLOGIQUE D'UNE PREPARATION PHARMACEUTIQUE A BASE DE PLANTES

Premier jour

Durée : 3 heures Coefficient : 4

Contexte professionnel

La préparation pharmaceutique à contrôler correspond à des gélules d'Arkophyton, médicament préconisé lors de douleurs articulaires : les gélules renferment un broyat de racines de la plante Arkophyton. Ce médicament appartient à la catégorie C.

La Pharmacopée Européenne impose le contrôle de la qualité microbiologique des produits pharmaceutiques à base de plantes.

L'étude se limitera au dénombrement des germes aérobies totaux, des moisissures et levures totales, des bactéries Gram négatives résistantes aux sels biliaires.

Avant de libérer les lots on effectue fréquemment en plus (hors Pharmacopée Européenne) :

- une recherche de *Staphylococcus aureus*
- une recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

En parallèle et en préalable, on réalise un contrôle de stérilité du diluant utilisé.

Compétences évaluées

Réaliser des analyses et des contrôles microbiologiques.

- Réaliser des techniques d'observation 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.
- Préparer des appareils et des installations

Analyser, interpréter, valider des résultats.

Organiser le travail dans le temps et dans l'espace.

Mise en oeuvre

Activités professionnelles	Ressource-documents	Documents à compléter et à joindre à la copie
1 : Contrôle microbiologique du produit fini	- Fiche protocole 1 - Annexe 1: Qualité microbiologique des médicaments à base de plantes - Annexe 2 : Composition des milieux de culture	
2 : Contrôle de la stérilité de la solution tamponnée peptonée au NaCl utilisée comme diluant	- Fiche protocole 2	

FICHE PROTOCOLE 2

Contrôle de la stérilité de la solution tamponnée peptonée au NaCl utilisée comme diluant

1 • Matériel

- 1 système de filtration
- 1 membrane filtrante stérile de seuil de coupure de 0,45 µm
- le flacon de 150 mL d'eau peptonée tamponnée stérile utilisé précédemment
- 1gélose PCA en boîte de Pétri de 60 mm de diamètre
- 1 flacon de 100 mL d'eau distillée stérile
- 1 fiche technique du système de filtration

2 • Mode opératoire

Filtrer 10 mL du diluant et déposer la membrane sur une gélose PCA. Incuber 48 H à 30-35°C.

La filtration est à réaliser devant un examinateur.

FICHE PROTOCOLE 1**Contrôle microbiologique du produit fini****1 - Préparation de l'échantillon (suspension mère)****1.1 - Principe**

Il est nécessaire de revivifier les microorganismes éventuellement présents dans les gélules.

1.2 - Matériel

- 1 boîte de gélules d'Arkophyton
- 1 flacon à bouchon rouge stérile
- 1 spatule stérile
- 1 flacon de 150 mL d'eau peptonée tamponnée au NaCl stérile (à conserver pour la suite des manipulations)
- 1 pipette graduée stérile de 10 mL
- 1 balance de précision sous PSM

1.3 - Mode opératoire

La préparation se fait sous PSM.

Peser un flacon à bouchon rouge stérile sur une balance de précision placée sous le PSM. Réaliser le tarage.

Ouvrir le flacon à bouchon rouge, poser le bouchon à l'envers sur le plateau de la balance : les gélules seront prélevées au hasard dans la boîte.

Ouvrir les gélules une à une au-dessus du flacon à bouchon rouge et peser 1 gramme.

Ajouter ensuite dans le flacon à bouchon rouge 9 mL de solution tamponnée peptonée au NaCl (**composition en annexe 2**). On obtient la suspension mère (dilution 10^{-1}).

La réalisation de la pesée et de la suspension mère sont à réaliser devant un examinateur.

Donner le flacon à bouchon rouge réalisé à un examinateur, il sera placé à 20°C pendant un temps de 2 à 5 h pour la revivification.

Remarque : pour la suite des manipulations, une suspension mère déjà revivifiée vous sera fournie. La réclamer au moment nécessaire.

2. Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et de moisissures / levures totales (DMLT)**2.1 - Matériel**

- 1 flacon à bouchon rouge de suspension mère revivifiée
- 2 milieux Sabouraud dextrosé gélosé au chloramphénicol en boîte de Pétri
- le flacon de 150 mL d'eau peptonée tamponnée stérile préalablement utilisé
- 1 flacon de 100 mL de milieu gélosé de peptones de caséine et de soja en surfusion à 55°C (à conserver en surfusion pour la suite des manipulations)
- tubes à essais stériles
- boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre
- pipette graduée stérile de 10 mL
- pipettes de 1 mL
- étaleurs ou billes de verre

2.2 - Mode opératoire

En tenant compte des critères spécifiés en **annexe 1**, réaliser en solution peptonée tamponnée au NaCl, une série de dilutions décimales nécessaires pour les 2 dénombrements.

La réalisation d'une dilution est à réaliser devant un examinateur.

2.2.1 - Ensemencement pour le DGAT

Ensemencer chaque dilution réalisée (exclue la suspension mère) dans la masse d'un milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (**composition en annexe 2**). Faire un essai par dilution.

Incuber 48 H à 30-35°C.

2.2.2- Ensemencement pour le DMLT

Ensemencer 2 dilutions successives, judicieusement choisies dans la série, par étalement à la surface d'un milieu Sabouraud dextrosé gélosé au chloramphénicol (**composition en annexe 2**). Faire un essai par dilution. Incuber 48 H à 20-25°C.

2.3-- Compte rendu

Indiquer les dilutions décimales réalisées pour le DGAT et le DMLT et les justifier.

3 - Dénombrement des bactéries Gram négatives résistantes aux sels biliaires

Le dénombrement des bactéries Gram négatives résistantes aux sels biliaires s'effectue en deux étapes :

- réalisation de dilutions décimales de la suspension mère en milieux d'enrichissement EE selon Mossel et incubation
- repiquage de chaque tube de EE en milieu gélosé VRBG et incubation

La lecture s'effectuant en recherchant la présence ou l'absence de colonies caractéristiques sur les milieux VRBG.

3.1 -- Matériel

- 4 tubes de milieu d'enrichissement EE selon Mossel ensemencés 24 H auparavant
- 4 géloses VRBG stériles en boîtes de Pétri

3.2 -- Mode opératoire

À partir de la suspension mère (dilution 10^{-1}) réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, des dilutions décimales ont été effectuées dans des tubes de 9 mL de milieu liquide d'enrichissement EE selon Mossel, jusqu'à la dilution finale 10^{-4} . Elles ont été incubées 24 H à 30 - 35°C. Cette étape a déjà été réalisée.

Isoler chaque dilution fournie sur une gélose VRBG.

Incuber 18 à 24 H à 30-35°C (**composition des milieux en annexe 2**).

3.3 -- Compte rendu

Justifier le choix du milieu VRBG et préciser l'aspect des colonies recherchées.

4 -Recherche de germes spécifiés

La recherche de germes spécifiés tels que *S.aureus* et *P.aeruginosa* nécessite un enrichissement de la suspension mère.

Ce qui a été fait préalablement de la manière suivante :

- préparation d'une suspension mère par dissolution de 10 g de gélules Arkophyton dans 90 mL d'eau peptonée tamponnée
- transfert de 1 mL de suspension mère dans 9 mL de bouillon à l'hydrolysate de caséine (**composition en annexe 2**)
- incubation à 30 - 35°C pendant 24 H, pour enrichissement

4.1 -- Matériel

- 1 bouillon à l'hydrolysate de caséine, noté HC
- 1 gélose Chapman
- 1 gélose cétrimide

4.2 - Mode opératoire pour la recherche de *Staphylococcus aureus*

A partir du bouillon d'enrichissement, réaliser un isolement sur gélose Chapman. Incuber 18 à 48 H à 30-35°C (**composition du milieu en annexe 2**).

4.3 - Mode opératoire pour la recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

À partir du bouillon d'enrichissement, réaliser un isolement sur gélose au cétrimide. Incuber 18 à 48 H à 30- 35°C (**composition du milieu en annexe 2**).

ANNEXE 1 QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES MÉDICAMENTS A BASE DE PLANTES

5.1.8. QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES MÉDICAMENTS À BASE DE PLANTES POUR USAGE ORAL

Ce chapitre présente les critères d'acceptation recommandés en matière de qualité microbiologiques pour les médicaments à base de plantes.

La présence de certains microorganismes dans des préparations non stériles peut nuire, voire annuler, l'activité thérapeutique du produit et constitue un danger potentiel pour la santé du patient. Les fabricants sont donc tenus d'assurer une faible charge microbienne (biocharge) dans les formes pharmaceutiques finies, par la mise en œuvre des textes en vigueur sur le BPF au cours de la fabrication, de la conservation et de la distribution des préparations pharmaceutiques.

Le contrôle microbiologique des produits non stériles est utilisé selon les méthodes décrites dans les chapitres généraux 2.6.12, 2.6.13 et 2.6.31. Des critères d'acceptation applicables aux produits pharmaceutiques non stériles, fondés sur le dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et des moisissures/levures totales (DMLT), sont donnés ci-après.

Ces critères d'acceptation reposent sur des résultats individuels ou sur des résultats moyens lorsque l'on effectue plusieurs dénombrements (réplicats), par exemple pour les dénombrements sur plaques.

Une liste des microorganismes spécifiés pour lesquels sont établis des critères d'acceptation est donnée ci-après. Cette liste n'est pas forcément exhaustive et la recherche d'autres microorganismes peut être nécessaire pour une préparation donnée, selon la nature de la matière de départ et le procédé de fabrication utilisés.

A-Médicaments à base de plantes contenant des drogues végétales, avec ou sans excipients, qui sont destinés à la préparation d'infusions ou décoctions avec de l'eau bouillante (exemple : tisanes avec ou sans aromatisants)

DGAT (2.6.12)	Critère d'acceptation: 10^7 UFC/g Nombre maximal admissible : 50 000 000 UFC/g
DMLT(2.6.12)	Critère d'acceptation: 10^5 UFC/g Nombre maximal admissible : 500 000 UFC/g
<i>Escherichia coli</i> (2.6.31)	Critère d'acceptation: 10^3 UFC/g
Salmonella (2.6.31)	Absence (25g ou 25 mL)

B. Médicaments à base de plantes contenant, par exemple, des extraits et /ou des drogues végétales, avec ou sans excipients, dont le procédé de production (par exemple par extraction) ou le cas échéant, dans le cas des drogues végétales, de prétraitement permet de réduire le nombre de microorganismes présents jusqu' à niveau inférieur aux critères spécifiés pour la catégorie

DGAT (2.6.12)	Critère d'acceptation: 10^4 UFC/g ou UFC/mL Nombre maximal admissible : 50 000 UFC/g ou UFC/mL
DMLT(2.6.12)	Critère d'acceptation: 10^4 UFC/g ou UFC/mL Nombre maximal admissible : 50 000 UFC/g ou UFC/mL
Bactérie gram négatives résistantes aux sels biliaires	Critère d'acceptation: 10^2 UFC/g ou UFC/mL Nombre maximal admissible : 500 UFC/g ou UFC/mL
<i>Escherichia coli</i> (2.6.31)	Absence (1g ou 1 mL)
Salmonella (2.6.31)	Absence (25g ou 25 mL)

C. Médicaments à base de plantes contenant, par exemple, des extraits et/ou des drogues végétales, avec ou sans excipients., dont il peut être démontré que le procédé de production (par exemple par extraction à l'éthanol de faible concentration ou à l'eau non bouillante, ou par concentration à basse température) ou, dans le cas des drogues végétales, de prétraitement ne permet pas de réduire suffisamment le nombre de microorganismes présents pour satisfaire aux critères spécifiés pour la catégorie B

DGAT (2.6.12)	Critère d'acceptation: 10^5 UFC/g ou UFC/mL Nombre maximal admissible : 500 000 UFC/g ou UFC/mL
DMLT(2.6.12)	Critère d'acceptation: 10^4 UFC/g ou UFC/mL Nombre maximal admissible : 50 000 UFC/g ou UFC/mL
Bactérie gram négatives résistantes aux sels biliaires	Critère d'acceptation: 10^4 UFC/g ou UFC/mL
<i>Escherichia coli</i> (2.6.37)	Absence (1g ou 1 mL)
Salmonella (2.6.37)	Absence (25g ou 25 mL)

Il est admis que, pour certains médicaments à base de plantes, les critères indiqués ci-dessous A, B, C pour le DGAT, le DMLT et les bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires sont impossibles à satisfaire en raison du niveau usuel de contamination microbienne. Des critères d'acceptation plus élevés peuvent alors être appliqués sur la base d'une évaluation du risque prenant en compte la caractérisation qualitative et quantitative de la biocharge et l'usage auquel est destiné le médicament considéré.

S'il a été démontré qu'aucune des recherches prescrites ne permet un dénombrement valide des microorganismes au niveau spécifié, une méthode validée ayant une limite de détection aussi proche que possible du critère d'acceptation indiqué est utilisée.

ANNEXE 2 : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE**Solution tamponnée peptonée au NaCl**

NaCl	8,5 g
Peptone de caséine, pancréatique	1,0 g
Eau purifiée	1000 mL
pH : 7,0 ± 0,1	

Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja

Peptone pancréatique de caséine	15,0 g
Peptone papaïque de soja	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar agar	15 g
Eau purifiée	1000 mL
pH : 7,3 ± 0,2	

Gélose Sabouraud au chloramphénicol

Peptone pepsique de viande	10,0 g
Glucose	20,0 g
Chloramphénicol	0,5 g
Agar agar	15g
Eau purifiée	1000 mL
pH du milieu 5,7 ± 0,2	

Bouillon d'enrichissement pour les Entérobactéries (EE selon Mossel)

Peptone pancréatique de gélatine	10,0 g
Bile de bœuf bactériologique	20,0 g
Glucose	5 g
Phosphate disodique	6,45 g
Phosphate monopotassique	2,0 g
Vert brillant	15,05mg
Eau purifiée	1000 mL
pH du milieu 7,2 ± 0,2	

Milieu VRBG (Violet Rouge Bile Glucose Agar)

Peptone de viande	7,0 g
Extrait de levure	3,0 g
D-glucose	10,0 g
Sels biliaires (sels biliaires purifiés)	1,5 g
NaCl	5,0 g
Rouge neutre	0,03 g
Violet cristallisé	0,002 g
Agar-agar	15 g
Eau purifiée	1000 mL
pH 7,4 ± 0,2	

Milieu Chapman

Peptone	10 g
Extrait de viande de bœuf	1 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol	10 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar	15 g
Eau purifiée	1000 mL
pH 7,4 - 7,5	

Gélose cétrimide

Peptone	20,0 g
Sulfate de potassium	10,0 g
Chlorure de magnésium	1,4 g
Cétrimide	0,3 g
Agar	15 g
Eau purifiée	1000 mL
pH 7,2 ± 0,2	

Milieu liquide à l'hydrolysate de caséine

Hydrolysate pancréatique de caséine	17 g
Hydrolysate papaïque de farine de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	2,5 g
Glucose monohydraté / anhydride	2,5 g/2,3 g
Eau	Qsp 1 L
pH du milieu après stérilisation : 7,3 ± 0,2	

Deuxième jour

Durée : 2 heures Coefficient : 4

Contexte professionnel

La préparation pharmaceutique à contrôler correspond à des gélules d'Arkophyton, médicament préconisé lors de douleurs articulaires : les gélules renferment un broyat de racines de la plante Arkophyton. Ce médicament appartient à la catégorie C.

La Pharmacopée Européenne impose le contrôle de la qualité microbiologique des produits pharmaceutiques à base de plantes.

L'étude se limitera au dénombrement des germes aérobies totaux, des moisissures et levures totales, des bactéries Gram négatives résistantes aux sels biliaires.

Avant de libérer les lots on effectue fréquemment en plus (hors Pharmacopée Européenne) :

- une recherche de *Staphylococcus aureus*
- une recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

En parallèle et en préalable, on réalise un contrôle de stérilité du diluant utilisé.

Compétences évaluées

Réaliser des analyses et des contrôles microbiologiques.

- Réaliser des techniques d'observation 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.
- Préparer des appareils et des installations

Analyser, interpréter, valider des résultats.

Organiser le travail dans le temps et dans l'espace.

Mise en œuvre

Activités professionnelles	Ressource-documents	Documents à compléter et à joindre à la copie
1 : Contrôle microbiologique du produit fini	Fiche protocole 1	Annexe
2 : Contrôle de la stérilité de la solution tamponnée peptonée au NaCl utilisée comme diluant		

FICHE PROTOCOLE 1	Contrôle microbiologique du produit fini
--------------------------	---

1 - Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et des moisissures / levures totales (DMLT)

Procéder au dénombrement sur les géloses aux peptones de caséine et de soja, et sur les géloses Sabouraud - dextrosées au chloramphénicol.

Présenter les résultats sous forme de tableaux.

Calculer la concentration en DGAT et en DMLT pour chaque dilution exploitable et calculer la moyenne.

Compléter le rapport d'essai fourni.

Conclure.

Donnée : dans la Pharmacopée Européenne, l'absence de colonie sur une boîte est notée moins de 1 UFC pour la boîte

2 - Dénombrement des bactéries Gram négatives résistantes aux sels biliaires

2.1 - Exploitation des résultats

Interpréter les résultats des repiquages sur milieu VRBG.

- Résultats :
 - Si colonies de bactéries rouges ou rougeâtres \Rightarrow résultats positifs (+)
 - Si absence de colonies rouges ou rougeâtres \Rightarrow > résultats négatifs (-)

Résultats obtenus avec une quantité de produit de				Nombre probable de bactéries / g de produit
0,1g	0,01 g	0,001 g	0,0001 g	
+	+	+	+	$> 10^4$
+	+	+	-	$< 10^4$ ET $> 10^3$
+	+	-	-	$< 10^3$ ET $> 10^2$
+	-	-	-	$< 10^2$ ET > 10
-	-	-	-	< 10

Compléter le rapport d'essai fourni. Conclure.

2.2 - Orientation de l'identification à partir des colonies observées

Proposer un ou des tests complémentaires et l'ensemencement d'une galerie.

La demande de réactifs, de milieux et de la galerie miniaturisée doit être présentée à l'examinateur au moins une heure avant la fin de l'épreuve.

Compléter l'annexe à rendre à l'examinateur.

Réaliser le(s) test(s) complémentaires avec le matériel fourni.

La réalisation du (des) test(s) complémentaire(s) est à présenter à l'examinateur.

3 - Recherche de *Staphylococcus aureus* (hors Pharmacopée Européenne)

Interpréter le résultat.

Si absence de colonies jaunes sur le milieu Chapman : le produit satisfait à l'essai.

Si présence de colonies jaunes sur le Chapman, réaliser le test d'agglutination : utiliser le kit fourni et la fiche technique donnée par le centre. Conclure.

Compléter le rapport d'essai fourni. Conclure.

4 - Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* (hors Pharmacopée Européenne)

Interpréter le résultat.

Si absence de croissance sur le milieu au cétrimide : le produit satisfait à l'essai.

Si présence de colonies sur le milieu au cétrimide, repiquer sur milieu de King A incubé à 30°C et repiquer sur GTS incubé à 41 - 43°C

Compléter le rapport d'essai fourni. Conclure.

5 - Conclusion générale

Présenter l'ensemble des résultats obtenus pour l'analyse du produit pharmaceutique dans le rapport d'essai fourni. Conclure.

Les analyses effectuées pour les autres recherches, ont donné les résultats suivants :

- *Escherichia coli* : absence dans 1 gramme
- *Salmonella* : absence dans 25 g

ANNEXE (à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPERATEUR

Date :

Poste n°

Fiche de demande de réactif(s) et milieux**Demande de réactif(s)**

(A présenter à l'examineur}

Demande de milieux

(A rendre au plus tard 1 H avant la fin de l'épreuve)

Rapport d'essai :

	Critères d'acceptation	Résultats de l'essai	Interprétation
DGAT			
DMLT			
Bactéries Gram négatives résistantes aux sels biliaires			
<i>Escherichia coli</i>			
Salmonelles			
<i>Staphylococcus aureus</i>			

Contrôle de stérilité :

Techniques de biologie cellulaire et moléculaire 2015

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 àagrafer avec la copie :

- Feuille de traçabilité
- Fiche de sécurité et de gestion des déchets

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

CONTRÔLE PHYTOSANITAIRE DU POIRIER

Contexte professionnel

Il existe différentes pathologies du poirier et une des plus préjudiciables pour la production est celle du « feu bactérien ».

L'agent responsable est une bactérie de la famille des *Enterobacteriaceae* : *Erwinia amylovora*.

Suite à l'infection, les fleurs et les feuilles des bouquets floraux flétrissent et noircissent. Dans des conditions favorables, des branches entières peuvent flétrir et se dessécher en quelques jours. La pointe encore herbacée des jeunes rameaux infectés se recourbe en forme de crosse. À la différence d'autres maladies, les organes (fleurs, feuilles, fruits) infectés et desséchés restent attachés à l'arbre. Un chancre peut se développer sur l'écorce.

Aucun produit phytosanitaire n'est homologué sur cette maladie et aucun produit testé n'a éradiqué cette pathologie.

La seule lutte possible est d'éliminer les fruitiers attaqués, de désinfecter les outils de taille, de ramasser les organes atteints et de les brûler puis de replanter des poiriers sains.

Chez l'Homme, cette bactérie n'est pas connue *a priori* pour développer des symptômes.

Activités à réaliser

- recherche de l'agent pathogène : *Erwinia amylovora* sur 12 poiriers du genre *Pyrus communis* par test ELISA qualitatif,
- mise en culture de pépins sans tégument de poiriers sains afin de pouvoir obtenir de futurs arbres non malades.

Compétences évaluées

Réaliser des analyses et des contrôles utilisant des anticorps (24 points)

Réaliser des analyses et des contrôles utilisant des cultures cellulaires (10 points)

Analyser et prévenir les risques liés à son activité (6 points)

Mise en œuvre

Pour une organisation optimale, les candidats sont invités à commencer par l'activité professionnelle n° 1.

La durée de passage prévue par étudiant sous PSM, pour l'activité professionnelle n° 2, sera de 20 minutes. L'ordre de passage sous PSM sera indiqué en début de séance.

Activités professionnelles	Ressources et documents	Documents à compléter et à joindre avec la copie
<p>1 :</p> <p>Recherche d' <i>Erwinia amylovora</i> par ELISA qualitatif</p>	<p>- Fiche protocole 1 - Annexe 1 distribuée au cours de l'épreuve : schéma de barrette corrigé</p> <p><u>Disponible dans le laboratoire :</u></p> <p>- Fichier avec phrases H et P - Procédure de gestion des déchets</p>	<p>Feuille de traçabilité</p> <p>Fiche de sécurité et de gestion des déchets</p>
<p>2 :</p> <p>Mise en culture in vitro des pépins de poiriers sains</p>	<p>- Fiche protocole 2</p> <p><u>Disponible dans le laboratoire :</u></p> <p>- Procédure de gestion des déchets</p>	<p>Fiche de sécurité et de gestion des déchets</p>

Rapport d'analyse (à rédiger sur la copie)

Conclure sur la présence d'*Erwinia amylovora* dans les différents poiriers testés.

FICHE PROTOCOLE 1	Recherche d' <i>Erwinia amylovora</i> par ELISA qualitatif
-------------------	--

Principe

Le test ELISA spécifique pour la recherche d'*Erwinia amylovora* utilise :

- un anticorps spécifique de la bactérie phytopathogène *Erwinia amylovora*,
- un anticorps spécifique de la bactérie phytopathogène *Erwinia amylovora* conjugué à un enzyme, la peroxydase,
- le substrat OPD (ortho phénylène diamine) spécifique à l'enzyme utilisé.

L'OPD est transformé en présence de peroxydase en un produit coloré jaune/orangé .

Au laboratoire de diagnostic en phytoprotection, l'identification des bactéries par le test ELISA se fait toujours à partir d'une suspension bactérienne extraite du végétal et non directement à partir du tissu végétal.

Les témoins sont des suspensions bactériennes de concentration connue.

Matériel et réactifs

- 1 barrette de 16 cupules à fond plat + cadre + parafilm.
- 4 mL de tampon PBS (PBS).
- Pissette contenant du tampon PBS-tween.
- 300 µL de suspension étalon de *Erwinia amylovora*.
- 300 µL de suspension étalon de *Rhizobium rhizogenes*.
- 12 échantillons de suspension bactérienne antigénique extraite de 12 poiriers : P1 à P12 (150 µL).
- 1 mL de conjugué.
- 1 mL de substrat OPD (o-phénylène diamine : **SGH06, SGH08, SGH09** : H301-312-317-319-332-341-351-410, P273-280-(301 +310)-(305+351+228)-501, en tampon citrate et en présence de H₂O₂ = **substrat**. Le substrat n'est stable que pendant une heure : le demander au moment de son utilisation.
- 1 mL de solution d'arrêt (acide sulfurique à environ 2 mol.L⁻¹ : **SGH05** : H314, P280-305+351+338-310).

Étude préalable du mode opératoire

Indiquer la composition des cupules en complétant la feuille de traçabilité.

Les puits A1 et B1 n'ont pas été sensibilisés.

Les témoins suivants sont nécessaires : témoin positif, témoin négatif, témoin d'autolyse du substrat et témoin d'adsorption aspécifique du conjugué.

Après 20 minutes, rendre à un examinateur la feuille de traçabilité.

Un schéma de la barrette (**annexe 1**) à réaliser vous sera donné en échange.

Mode opératoire

1- Sensibilisation et saturation

La sensibilisation et la saturation de toutes les cupules ont déjà été réalisées comme suit :

- Introduire 200 µL d'anticorps *anti-Erwinia amylovora* dans toutes les cupules sauf A1 et B1.
- Recouvrir la barrette d'une bande de parafilm.
- Incuber à + 37°C pendant 2 heures30.
- Laver 3 fois en tampon PBS-Tween.
- Mettre 100 µL de réactif de saturation dans chaque cupule puis incuber 30 minutes à température ambiante.
- Vider les cupules et conserver la barrette au réfrigérateur à + 4°C.

2 - Recherche de l'antigène (Ag) bactérien

La barrette vous est donnée à ce stade et la suite du protocole doit être réalisée selon le schéma de l'**annexe 1**.

- Laver 3 fois en tampon PBS-Tween.
- Déposer 50 µL des Ag appropriés ou de tampon PBS dans les différentes cupules de la barrette selon le schéma de l'annexe 1.
- Incuber 35 minutes à température ambiante sur agitateur rotatif.
- Rejeter le contenu des cupules et laver 3 fois en tampon PBS-tween.
- Déposer dans chacune des cupules appropriées 50 µL de conjugué ou de tampon PBS selon le schéma de l'**annexe 1**.
- Incuber 30 minutes à température ambiante sur agitateur rotatif.
- Rejeter le contenu des cupules et laver 3 fois en tampon PBS-tween.
- Déposer 50 µL du substrat dans les cupules appropriées ou de tampon PBS selon le schéma de l'**annexe 1**.
- Dès l'apparition d'une coloration jaune pour le témoin positif, ajouter 20 µL de solution d'arrêt dans chaque cupule.
- Laisser la barrette à votre poste.

Compte rendu (à rédiger sur la copie)

1.1 - Schématiser et nommer le type d'ELISA mis en œuvre.

1.2 - Présenter vos résultats expérimentaux sous forme d'un tableau.

1.3 - Interpréter les résultats obtenus pour les témoins, puis valider la procédure de mesure. Conclure sur la présence d'*Erwinia amylovora* dans les différents poiriers testés

FICHE PROTOCOLE 2**Culture *in vitro* de poiriers sains****Principe**

Des pépins de poiriers sains sont mis sur un milieu de culture *in vitro* afin de favoriser leur germination. Ils seront ensuite placés en chambre de culture végétale.

Matériel et réactifs

- Organisme végétal : pépins de poire d'arbres sains.
- 1 boîte de Pétri contenant du milieu MS-H « mou ».
- Matériels usuels pour la mise en culture végétale.
- Éthanol à 70 % : **SGH02** : H225, P210

Mode opératoire

À la paillasse :

Placer les pépins dans un sachet fait à partir de papier-filtre plié et agrafé

Mouiller le sachet dans un bain d'éthanol à 70 % (1 minute)

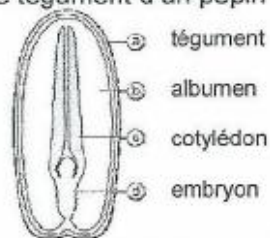
Placer le sachet dans le bain de désinfectant durant 6 minutes en agitant de temps en temps

Passage sous PSM

Sous PSM :

Rincer 3 fois le sachet dans des bains d'eau déminéralisée stérile de 4 minutes chacun

Placer les graines dans une boîte de Petri stérile et enlever le tégument d'un pépin



Placer 1 pépin sans tégument sur le milieu de culture « MS-H » mou

Remarque : ne rien écrire sur les sachets, tout s'efface!

Compte rendu (à rédiger sur ta copie)

Faire un inventaire de tout le matériel et des réactifs nécessaires à cette manipulation.

FEUILLE DE TRAÇABILITÉ :**Schéma de composition des différentes cupules de la barrette****(à rendre avec la copie)**

NOM DE L'OPÉRATEUR

Date :.....

Poste n°

N° puits	Composition	N°puits	composition
A1	Témoin	A2	
B1	Témoin	B2	
CD11	Témoin	C2	
E1	Témoin	D2	
F1		F2	
G1		G2	
H1		H2	

Fiche de sécurité et de gestion des déchets (à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR

Date :

Poste n°

Fiche de sécurité

Risque chimique		
Nom du produit	Symbole de danger	Précautions à prendre

Gestion des déchets

Nature des déchets	Moyen d'élimination

Annexe 1 : schéma de composition de la barrette

N° puits	Composition	N° puits	Composition
A1	<u>Témoin conjugué</u> PBS PBS Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt	A2	<u>Poirier 5</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 5 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt
B1	<u>Témoin autolyse S</u> PBS PBS PBS Substrat OPD Réactif d'arrêt	B2	<u>Poirier 6</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 6 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt
C1	<u>Témoin positif</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag; suspension bactérienne d' <i>Erwinia amylovora</i> Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt	C2	<u>Poirier 7</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 7 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt
D1	<u>Témoin négatif</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag; suspension bactérienne " <i>Rhizobium</i> " Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt	D2	<u>Poirier 8</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 8 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt
E1	<u>Poirier 1</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 1 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt	E2	<u>Poirier 9</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 9 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt
F1	<u>Poirier 2</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 2 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt	F2	<u>Poirier 10</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 10 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt
G1	<u>Poirier 3</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 3 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt	G2	<u>Poirier 11</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 11 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt
H1	<u>Poirier 4</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 4 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt	H2	<u>Poirier 12</u> Anticorps <i>anti-Erwinia amylovora</i> Ag :suspension bactérienne extraite du poirier 12 Conjugué Substrat OPD Réactif d'arrêt

Résultat plaque

A1	<u>Témoin conjugué</u> : PBS/PBS/Conjugué/Substrat	A2	Poirier 5
B1	<u>Témoin autolyse S</u> : PBS/PBS/PBS/Substrat	B2	Poirier 6
C1	<u>Témoin positif</u> : Ac capture/Ag: suspension bactérienne <i>Erwinia amylovora</i> à 10^8 bactéries.mL ⁻¹ / conjugué/Substrat	C2	Poirier 7
D1	<u>Témoin négatif</u> : Ac capture/Ag: suspension bactérienne <i>Micrococcus</i> / conjugué/Substrat	D2	Poirier 8
E1	Poirier 1	E2	Poirier 9
F1	Poirier 2 t	F2	Poirier 10
G1	Poirier 3	G2	Poirier 11
H1	Poirier 4	H2	Poirier 12

Corrections session 2014

Éléments de corrigé de mathématiques 2014

EXERCICE 1 (10 points)

PARTIE A : Détermination de la constante k

1. On pose $z_i = \ln(5 - \theta_i)$ (on doit avoir $\theta < 5$).

t_i	0	5	10	15	20	25
z_i	3,26	2,31	1,36	0,41	-0,51	-1,61

2. La calculatrice donne : $z = -0,19t + 3,28$ au centième près

3.

$$\ln(5 - \theta(t)) = z(t)$$

$$5 - \theta(t) = e^{z(t)}$$

$$\theta(t) = -e^{-0,19t+3,28} + 5$$

$$\theta(t) = -e^{3,28} \times e^{-0,19t} + 5$$

$$e^{3,28} \approx 26,58 \quad \text{d'où } \theta(t) = -26,58 \times e^{-0,19t} + 5 \quad (t \text{ compris entre } 0 \text{ et } 25).$$

4.

$$\theta'(t) = -26,58 \times (-0,19) \times e^{-0,19t} \quad \text{ce qui donne } \theta'(t) = 5,0502 \times e^{-0,19t}$$

$$\theta'(t) = 5,0502 \times e^{-0,19t} \quad \text{et } \theta(t) - 5 = -26,58 \times e^{-0,19t}$$

De l'équation (E) : $\theta'(t) = k(\theta(t) - T)$, on en déduit avec $T=5$,

$$5,0502 \times e^{-0,19t} = k(-26,58) \times e^{-0,19t} \quad \text{et par suite } k = \frac{5,0502}{-26,58} = -0,19$$

PARTIE B : Durée de décongélation

1. Résolution d'une équation différentielle : $y' + 0,19y = 0,38$

a) Les solutions de (E_0) , $y' + 0,19y = 0$ sont de la forme : $y_0(t) = Ce^{-0,19t} \quad \forall t \in [0; +\infty[$
avec C constante réelle

b) $\forall t \in [0; +\infty[\quad h(t) = c, \quad \text{donc } h'(t) = 0.$

$$\begin{aligned} h \text{ est solution de (E)} &\Leftrightarrow h'(t) + 0,19h(t) = 0,38 \\ &\Leftrightarrow 0,19c = 0,38 \\ &\Leftrightarrow c = \frac{0,38}{0,19} = 2 \end{aligned}$$

$$\text{D'où, } \forall t \in [0; +\infty[\quad h(t) = 2.$$

c) Les solutions de (E) sont de la forme :

$$y(t) = y_0(t) + h(t) = Ce^{-0,19t} + 2 \quad \forall t \in [0; +\infty[\quad , C \text{ constante réelle}$$

2. Détermination de la fonction θ

a) θ est solution de l'équation (E), donc $\theta(t) = Ce^{-0,19t} + 2 \quad \forall t \in [0; +\infty[$.

$$\text{d'où } \theta(t) = -23e^{-0,19t} + 2 \quad \forall t \in [0; +\infty[.$$

b)

$$\left. \begin{array}{l} \lim_{t \rightarrow +\infty} -0,19t = -\infty \\ \lim_{T \rightarrow -\infty} e^T = 0 \end{array} \right\} \text{ donc } \lim_{t \rightarrow +\infty} e^{-0,19t} = 0 \text{ d'où } \lim_{t \rightarrow +\infty} \theta(t) = 2$$

La température de la viande ne dépassera pas 2°C au fil des heures.

3. Durée de décongélation

a) Soit à résoudre l'inéquation $\theta(t) \geq 0$

$$-23e^{-0,19t} + 2 \geq 0 \Leftrightarrow e^{-0,19t} \leq \frac{2}{23} \Leftrightarrow -0,19t \leq \ln\left(\frac{2}{23}\right) \Leftrightarrow t \geq \frac{-1}{0,19} \ln\left(\frac{2}{23}\right)$$

$$\frac{-1}{0,19} \ln\left(\frac{2}{23}\right) \approx 12,85 \text{ d'où un temps nécessaire à la décongélation d'environ 12 heures et 51 minutes.}$$

Remarques:

- une réponse utilisant une résolution graphique (décrivant la méthode) ou une résolution approchée est aussi acceptée.

- on ne demande pas la précision attendue dans le résultat ce qui permet de choisir l'approximation, à condition que la réponse permette de répondre à la question suivante.

b) La durée étant supérieure à 12 heures, la viande ainsi décongelée donnera l'illusion du produit frais.

PARTIE C : Prise en compte de la réglementation sanitaire

1.

a) $v(t) = 3e^{0,06t} \quad \forall t \in [0; +\infty[$, d'où les primitives G de la fonction v sont :

$$G(t) = \frac{3}{0,06} e^{0,06t} + k = 50e^{0,06t} + k \quad \forall t \in [0; +\infty[\quad , k \text{ constante réelle}$$

b) La primitive G_0 de la fonction v vérifie $G_0(0) = 50$, ce qui donne : $50 + k = 50 \Leftrightarrow k = 0$

$$G_0(t) = 50e^{0,06t} \quad \forall t \in [0; +\infty[$$

2.

Entre 18 h le soir et 8 h le lendemain matin, il s'est écoulé 14 heures.

$$G_0(14) \approx 115,82 > 100, \text{ donc la réglementation sanitaire de ces pays ne sera pas respectée.}$$

EXERCICE 2 (10 points)

PARTIE A : le défaut mécanique

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 « la pompe présente un défaut mécanique » et sa probabilité est $p = 0,01$. La variable aléatoire X égale au nombre de succès dans un lot de 50 pompes, suit donc la loi binomiale de paramètres $n = 50$ et $p = 0,01$

2.

a) $P(X = 1)$ est la probabilité d'avoir une pompe présentant un défaut mécanique.

$$P(X = 1) = \binom{50}{1} \times 0,01^1 \times 0,99^{49} \approx 0,306 \text{ au millième près.}$$

La probabilité qu'une caisse contienne une pompe présentant un défaut mécanique est 0,306.

b) On demande $P(X \geq 2)$

$$P(X \geq 2) = 1 - [P(X = 0) + P(X = 1)]$$

$$P(X \geq 2) = 1 - [0,605 + 0,306] = 1 - 0,911 = 0,089 \text{ à } 10^{-3} \text{ près}$$

La probabilité qu'une caisse contienne au moins deux pompes présentant un défaut mécanique est 0,089.

3.

a) $\lambda = n \times p = 50 \times 0,01 = 0,5$.

b) Y suit la loi de Poisson de paramètre $\lambda = 0,5$.

$$P(Y \geq 4) = 1 - P(Y < 4) = 1 - [P(Y = 0) + P(Y = 1) + P(Y = 2) + P(Y = 3)]$$

$$P(Y \geq 4) = 1 - [0,998] \text{ d'après le tableau de la loi de Poisson de paramètre } 0,5$$

$$P(Y \geq 4) = 0,002 \text{ au millième près.}$$

La probabilité qu'une caisse contienne au moins quatre pompes présentant un défaut mécanique est 0,002

PARTIE B : le défaut de débit

On suppose que Z suit une loi normale de moyenne $m = 6$ et d'écart type $s = 0,15$.

Calculons la probabilité que la pompe soit conforme

Soit $T = \frac{Z - 6}{0,15}$, alors T suit la loi normale $N(0; 1)$.

$$P(5,75 \leq Z \leq 6,25) = P\left(\frac{-5}{3} \leq T \leq \frac{5}{3}\right) = 2\Pi\left(\frac{5}{3}\right) - 1$$

On lit sur la table de la loi normale centrée réduite, $\Pi\left(\frac{5}{3}\right) \approx 0,9525$, ce qui nous donne

$P(5,75 \leq Z \leq 6,25) = 0,905$ au millième près, ou directement à la calculatrice et on obtient 0,904 *au millième près*.

On en déduit que la probabilité qu'une pompe présente un défaut de débit est de :

$1 - 0,905$ c'est-à-dire **0,095** *au millième près* ou

$1 - 0,904$ c'est-à-dire **0,096** *au millième près*.

PARTIE C : estimation du débit moyen des pompes d'une livraison

1. On obtient 5,932 pour la moyenne et 0,162 pour l'écart type au millième près.

2.

a) On admet que \bar{X} suit la loi normale de moyenne inconnue μ et d'écart type $\sigma = \frac{0,16}{\sqrt{50}}$.

On sait que $P(\mu - 1,96 \times \sigma \leq \bar{X} \leq \mu + 1,96 \times \sigma) = 0,95$ d'où $a = 1,96 \times \frac{0,16}{\sqrt{50}} = 0,045$ au millième près **par**

excès.

b) La moyenne de l'échantillon 5,932 est un bon estimateur de la moyenne inconnue μ , ce qui nous donne comme intervalle de confiance avec un coefficient de confiance supérieur ou égal à 0,95 :

$$[5,932 - 0,045 ; 5,932 + 0,045] = [\mathbf{5,887} ; \mathbf{5,977}]$$

Vérification à la calculatrice $P(\bar{X} \in [5,887; 5,977]) \approx 0,973$

Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2014

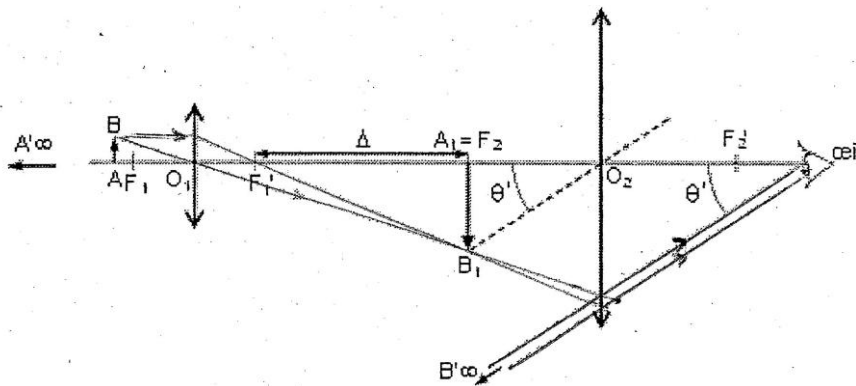
A.-ETUDE D'UN FILAMENT DE MYCELIUM

1.1 - Pour qu'un observateur puisse observer l'image définitive A'B' à l'infini, il faut que l'image intermédiaire A₁B₁ se trouve dans le plan focal objet de l'oculaire c'est à dire A₁ confondu avec F₂.

1.2 - L'image A₁B₁ est réelle.

Elle est agrandie par rapport à AB et renversée par rapport à AB.

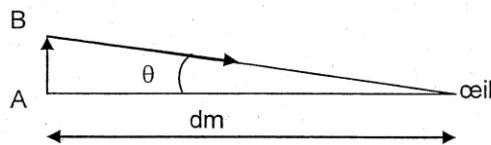
1.3 -



2-

$$G_c = \frac{\Delta \times d_m}{f_1 \times f_2} = \frac{16.10^{-2} \times 25.10^{-2}}{4.10^{-3} \times 2.10^{-2}} = 500$$

3 -



L'angle sous lequel l'objet AB est vu à l'œil nu à la distance $d_m = 25$ cm, se calcule en utilisant le triangle rectangle (A, B, œil) : avec $\tan \theta = \theta$ car θ petit.

$$\tan \theta = \theta = \frac{AB}{d_m} = \frac{4.10^{-6}}{25.10^{-2}} = 1,6.10^{-5} \text{ rad}$$

4 - $\theta' = G_c \times \theta = 500 \times 1,6.10^{-5} = 8.10^{-3} \text{ rad}$

5 - Le pouvoir de résolution de l'œil étant $\theta_m = 3.10^{-4} \text{ rad}$ donc : $\theta_m > \theta$ et $\theta_m < \theta'$.

La spore n'est donc pas discernable à l'œil nu, mais elle l'est au travers du microscope.

6.1 - $AB_{\min} = \frac{1,22 \times 555.10^{-9}}{2 \times 1,00 \times \sin 60} = 3,91.10^{-7} = 0,391 \mu\text{m}$

6.2 -Oui, il est possible d'observer la spore de *Penicillium camemberti* à travers le microscope car sa taille est supérieure au pouvoir de résolution du microscope

6.3 - Améliorer ce pouvoir de séparation revient à diminuer la valeur de AB_{\min} , par conséquent l'indice de réfraction n doit augmenter. C'est pourquoi on utilise un bain d'huile dont l'indice de réfraction est supérieur à celui de l'air.

B: SPECTROPHOTOMETRIE

1.1 - Loi de Beer-Lambert : $A = \varepsilon \times \ell \times C$

A : absorbance de la solution.

ε coefficient d'extinction molaire

ℓ : longueur de la cuve.

C: concentration molaire.

1.2 -

A : sans unité

ε : en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{m}^2$

ℓ : en m

C: en $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$

2 - Le réseau permet de sélectionner une radiation monochromatique

3 - Pour des raisons de sensibilité, on choisit une longueur d'onde permettant une absorbance maximale.

$\lambda = 525 \text{ nm}$ correspond à la longueur d'onde d'une lumière monochromatique de couleur verte, complémentaire de celle de la solution de permanganate de potassium.

4 -

$$C = \frac{A}{\varepsilon \times \ell}$$

$$C = \frac{0,103}{225 \times 10^{-2}} = 4,58 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$$

5 -

$$C_m = C \times M$$

$$C_m = 4,58 \cdot 10^{-5} \times 158$$

$$C_m = 7,24 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} = 7,24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

6.1 - Ecart relatif : $\frac{10 - 7,24}{10} \times 100 = 27,6\%$

6.2 - L'écart avec le résultat attendu est très important. L'écart est trop important pour être dû aux imprécisions expérimentales. Toute hypothèse cohérente justifiant cet écart est acceptée. (Exemple : la concentration en permanganate de potassium a chuté du fait d'une réaction dans la liqueur de Dakin)

C : THERMOCHEMIE

1.1 - $\Delta_r H^\circ = 2 \times \Delta_f H^\circ(\text{NH}_3) - \Delta_f H^\circ(\text{N}_2) - 3 \times \Delta_f H^\circ(\text{H}_2)$ soit $\Delta_r H^\circ = -92,38 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

1.2 - La réaction est exothermique à cette température car $\Delta_r H^\circ < 0$

2.1 - $\Delta_r S^\circ = 2 \times S^\circ(\text{NH}_3) - S^\circ(\text{N}_2) - 3 \times S^\circ(\text{H}_2)$ soit $\Delta_r S^\circ = -198,3 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

2.2 - L'équation-bilan nous montre que 4 molécules de gaz engendrent la formation de 2 molécules de gaz. Le désordre diminuant, il est normal de trouver $\Delta_r S^\circ < 0$

3.1 - $\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T \times \Delta_r S^\circ$ soit $\Delta_r G^\circ = -3,329 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$

3.2 - $\Delta_r G^\circ < 0$

La réaction est thermodynamiquement possible

3.3.1 - $K = \exp(\Delta_r G^\circ / RT)$ soit $K = 6,9 \cdot 10^5$

3.3.2 - $K \gg 1$ donc on retrouve bien que la réaction est thermodynamiquement favorisée.

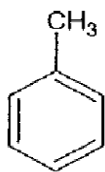
4.1 - Une augmentation de pression déplace l'équilibre dans le sens d'une diminution du nombre de molécules gazeuses soit dans le sens direct.

4.2 - Il faut abaisser la température pour favoriser la réaction dans le sens direct car celle-ci est exothermique

4.3- Ce choix de température élevée se justifie par des raisons cinétiques. A 450°C , la réaction restera totale mais sera plus rapide.

D : PREPARATION DE LA PROCARBAZINE

1.1 -



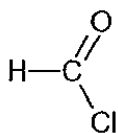
méthylbenzène ou toluène

1.2 - AlCl_3 permet de former le réactif électrophile CH_3^+ ou AlCl_3 joue le rôle de catalyseur.

1.3 - Substitution électrophile (mécanisme)

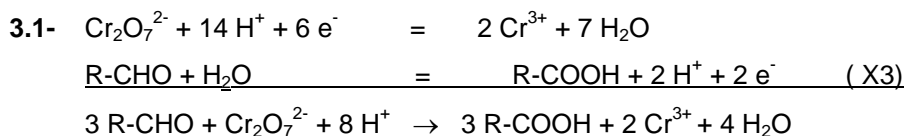
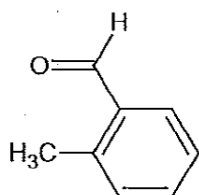
- Formation de l'électrophile
- Addition de l'électrophile
- Reformation de l'aromaticité

2.1 -



2.2 - D'après les règles de Holleman, le groupe méthyle oriente en ortho ou en para d'où l'existence de deux produits.

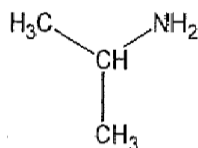
2.3 -



3.2 - Acide 4-méthylbenzoïque

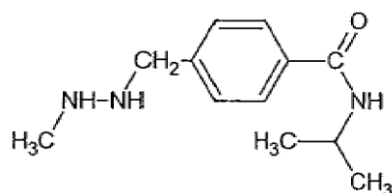
4 - Chlorure de Thionyle SOCl_2 ou pentachlorure de phosphore PCl_5 ou trichlorure de phosphore PCl_3

6.1 -



6.2 - Amide

7 -



Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2014

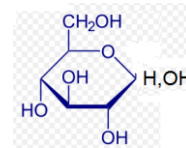
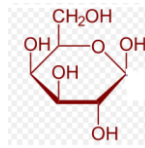
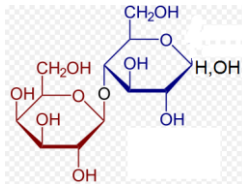
LES ARÔMES ALIMENTAIRES

1 – Biosynthèse des arômes à partir des voies métaboliques (32 points)

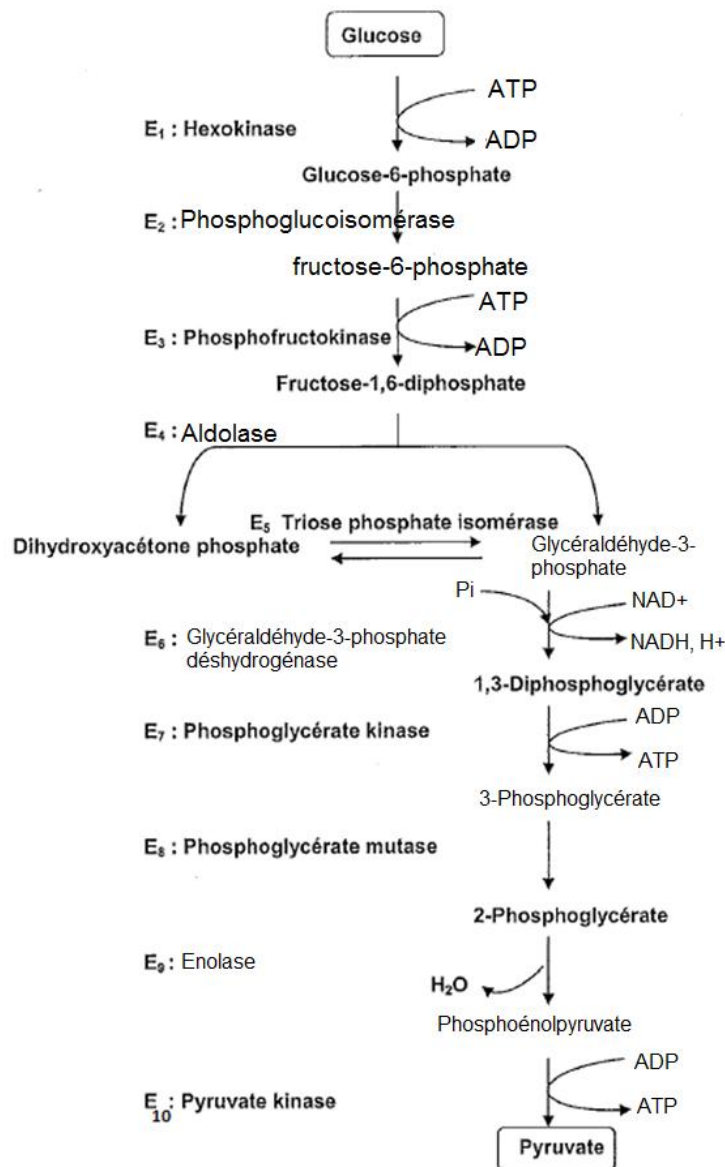
1.1 – Arômes issus du catabolisme des glucides

1.1.1 -

β galactosidase



1.1.2 - Voie impliquée: Glycolyse



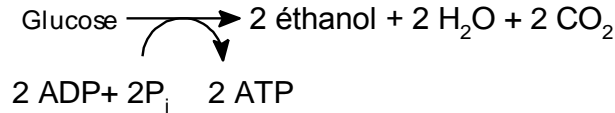
1.1.3 -

$$\begin{aligned}
 1.1.3.1 - \Delta G'0 &= -nF(\Delta E'0) = -nF(E'0_{ox} - E'0_{red}) = -2 \times 96500 \times (-0,197 - -0,320) \\
 &= -23739 \text{ J.mol}^{-1} \\
 &= -23,7 \text{ kJ.mol}^{-1}
 \end{aligned}$$

$\Delta G'0 < -12,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$: sens 2 (attention aux flèches!) thermodynamiquement spontané.

$$1.1.3.2 - \Delta G'0 = -R.T.LnK'_{eq} \text{ donc } K'_{eq} = 9800$$

Valeur qui confirme un équilibre fortement déplacé dans le sens de formation des produits soit le sens 2.

1.1.4 -

$$1.1.5 - \text{rendement} = \frac{2 \Delta G'_{0ATP}}{\Delta G'_{0\text{glucose}}} \times 100 = (2 * 30,2 / 166) * 100 = 36,4\%$$

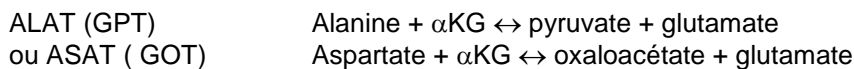
1.2 - Arômes issus du catabolisme des lipides

1.2.1 - Les résultats du document 3 montrent un lien entre l'apparition de l'heptan-2-one et la disparition d'acide palmitique au cours du temps. Il est donc possible de corréler la β -oxydation de l'acide palmitique à la synthèse de méthylcétone.

$$1.2.2 - \text{rendement de conversion} = \frac{\Delta C \text{ mas heptane-2-one}_{\text{produite}}}{\Delta C \text{ mas ac palmitique}_{\text{consommé}}} \times 100 = (0,15 / 0,75) * 100$$

Soit environ 20% selon les données prises sur le graphe.

1.2.3 - Hypothèse: consommation de l'heptan-2-one pour satisfaire les besoins de penicillium car l'acide est quasi totalement consommé.

1.3 - Arômes issus du catabolisme des acides aminés**1.3.1 - Transamination**

Coenzyme impliqué: phosphate de pyridoxal

1.3.2 -

1.3.2.1 - Allure sigmoïde traduisant une catalyse enzymatique difficile à faible concentration en aspartate, puis beaucoup plus facile lorsque la concentration en aspartate augmente jusqu'à atteindre une vitesse maximale de catalyse enzymatique.

Caractéristiques cinétiques: enzyme allostérique du système K: la fixation d'une molécule d'aspartate facilite la fixation des molécules ultérieures, effet coopératif homotrope positif.

Caractéristiques structurales: enzyme multimérique existant sous deux conformations distinctes R et T et possédant des sites de fixation pour substrat, activateur et inhibiteur distincts. Le passage d'une forme à l'autre se fait par transition allostérique.

1.3.2.2 - La Thréonine diminue la vitesse de réaction: inhibiteur allostérique. La fixation d'une molécule d'inhibiteur sur l'enzyme freine la fixation des molécules de substrat.

2 - Analyse des composés aromatisants de l'abricot (28 points)**2.1 - Mise au point d'une technique de microextraction en phase solide (SPME) des composés aromatisant de l'abricot**

2.1.1 - Les résultats indiquent que la technique d'extraction par SPME dans les conditions analytiques utilisées, semble appropriée, puisque l'on a une adsorption rapide des 5 composés dès les 5 premières minutes. L'équilibre d'extraction semble atteint après 20 minutes pour l'hexylacétate, le benzaldéhyde et le linalool. Concernant la γ -décylactone et le β -ionone, l'équilibre ne semble pas atteint au bout de 40 minutes, mais l'augmentation reste toutefois mesurée.

2.1.2 - L'hexylacétate, benzaldéhyde, linalool et β -ionone sont extraits en plus grande quantité avec la fibre Carboxen/PDMS. En revanche la γ -décàlactone semble extraite plus efficacement avec la fibre PDMS.

La fibre PDMS/PVD ne semble pas extraire le linalool. En conclusion, la fibre qui permet d'établir un compromis pour assurer l'extraction la plus efficace des 5 composés est la fibre Carboxen/PDMS.

2.2 - Analyses quantitatives de composés aromatisants d'une variété d'abricot

2.2.1 - Dosage du benzaldéhyde par CPG

2.2.1.1. - Conditions CPG

2.2.1.1.1 - Colonne capillaire: très longue et de très faible diamètre. La phase stationnaire est directement fixée sur la paroi interne

2.2.1.1.2 - Le gradient de température en CPG influe sur la séparation des composés et permet de diminuer le temps de rétention des derniers solutés sortant de la colonne: amélioration de la résolution et diminution du temps d'analyse.

2.2.1.2 - Dosage du benzaldéhyde par étalonnage externe

2.2.1.2.1 - L'étalonnage externe nécessite un volume d'injection rigoureusement identique d'une injection à l'autre pour que la quantité de soluté injecté soit reproductible.

Dans le cas de la SPME, la quantité injectée correspond à la quantité adsorbée sur la fibre SPME. Cette quantité est fonction de la concentration du soluté dans la solution analysée (voir principe document 4), et rend l'injection reproductible.

2.2.1.2.2 - Aire = $12027,5 \times C_{\text{benzaldéhyde}} + 200$

D'après le document 9 : Aire_{benzaldéhyde} = $15,80 \cdot 10^4$ donc $C_{\text{benzaldéhyde}} = 13,12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2.1.2.3 - Teneur en benzaldéhyde = 12,6 ppm

Critère de qualité: inexactitude (erreur de mesure acceptée)

inexactitude absolue* = $X_{\text{mes}} - X_{\text{ref}} = 12,6 - 12,7 = -0,1$ ppm

*ou inexactitude relative = $\frac{(X_{\text{mes}} - X_{\text{ref}})}{X_{\text{ref}}} \times 100$ (environ -0,8%)

2.2.2 - Dosage de la fraction glucose de composés glycosylés par enzymologie

2.2.2.1 - Méthode de dosage de substrat en point final car il est précisé dans le mode opératoire du document 9 d'attendre la fin de réaction avant de mesurer les absorbances. On mesure donc l'absorbance lorsque la réaction est terminée.

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

2.2.2.3 - $\rho = \frac{V \times M}{\epsilon \times l \times v} \times \Delta A = \frac{3,02 \times 180}{6,3 \times 1000 \times 1 \times 0,1} \times \Delta A = 0,863 \times \Delta A$

2.2.2.4 - $\Delta A = (0,595 - 0,122) - (0,111 - 0,107) = 0,469$ et $\rho = 0,4047 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2.2.5 - La concentration massique en glucose provient de $V_{\text{fraction}} = 10 \text{ mL}$

Donc la m_{glucose} dans la fraction = $0,4047 \times 10 \cdot 10^{-3} = 4,047 \cdot 10^{-3} \text{ g}$

Cette masse de glucose est issue du résidu sec provenant de la moitié du surnageant: il y avait donc $4,047 \cdot 10^{-3} \text{ g}$ dans les 100 mL de surnageant soit $8,094 \cdot 10^{-3} \text{ g}$ dans les 200 mL de surnageant.

Cette masse de glucose provient de 50 g d'abricot soit $8,084 \cdot 10^{-3} / 50 = 1,6188 \cdot 10^{-4} \text{ g}$ pour 1 g d'abricot ou 161,88 mg/kg

$2u_c = 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ donc **teneur = (162 +/- 10) mg.kg⁻¹** résultat exprimé avec une incertitude élargie $k=2$ pour avoir un niveau de confiance de 95%

Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2014

PREVENTION DES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES À *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGIQUE

1. Étude des souches d'*E. coli* entérohémorragiques (ECEH) (19 points)

1.1 - Epidémiologie

1.1.1 - Nombre de nouveaux cas d'une maladie pour une population donnée pendant une période donnée.

1.1.2 - Le document 1a est un tableau présentant l'incidence annuelle du SHU de 1996 à 2009 en France. Il montre que le nombre de cas de SHU annuel reste faible (entre environ 70 et moins de 100 cas) quelle que soit l'année considérée. Seule l'année 2005 présente une incidence significativement plus élevée. On peut donc dire que le SHU ne survient pas par épidémie mais sous forme de cas rares.

1.1.3 - Le document 1b est un histogramme présentant l'évolution du nombre de cas de SHU de 2003 à 2009 en fonction des mois de l'année. Quelle que soit l'année considérée on remarque une élévation significative du nombre de cas pour la période de juin à septembre. On peut donc parler de recrudescence estivale de la pathologie.

La température ambiante étant plus élevée les mois d'été, les ruptures de la chaîne du froid ont des conséquences plus importantes sur la multiplication des contaminants dans les aliments d'où un plus grand risque de TIA, le mode de cuisson estival entraîne des aliments moins cuits (barbecue).

1.2 - Caractéristiques et physiopathologie des ECEH

1.2.1.1 - Bacilles Gram - / oxydase - / aéro-anaérobie facultatif / fermentant le lactose avec production d'acide et de gaz à 44°C.

1.2.1.2 - Indole +, β -glucuronidase + (sauf le sérotype O157:H7).

1.2.2 - Mésophile, thermotolérant, neutrophile, (acido-tolérant).

1.2.3 - Entéroinvasive : se dit d'une bactérie se multipliant dans l'épithélium intestinal (entérocytes)

Exotoxine : toxine libérée par une bactérie dans le milieu extérieur.

1.2.4.1 - Recherche des antigènes O et H par une réaction d'agglutination directe entre la souche bactérienne à tester et des immuns sérums contenant des Ac spécifiques contre les différents types d'Ag O et H.

1.2.4.2 - Souche d'*E. coli* possédant l'antigène somatique O numéro 157 et l'antigène flagellaire H numéro 7. Antigène O: polysaccharide, situé dans le LPS de la paroi bactérienne (membrane externe).

Antigène H: protéique, dans le filament flagellaire.

1.2.5.1 - Molécule d'ADN bicaténaire, généralement circulaire, extra chromosomique, douée de réplication autonome et transmissible de façon stable à la descendance .

1.2.5.2 - Gènes de résistance aux antibiotiques ou gènes codant pour des enzymes du métabolisme ou gènes codants pour des bactériocines.

2 - Recherche d'*E. coli* O157:H7 dans les aliments (18,5 points)

2.1 - Méthode de référence

2.1.1 - Méthode d'analyse pouvant s'appliquer à différentes catégories d'aliments.

2.1.2 - Enrichissement sélectif.

Intérêt : permettre la multiplication des bactéries recherchées présentes (en faible quantité) dans l'échantillon, en limitant celle d'autres micro-organismes.

2.1.3 --Sélectionner les bactéries thermotolérantes car *E. coli*, recherchée ici, en fait partie.

2.1.4.1 -

- Tryptone et peptone pepsique de viande : sources -C, N et énergie
- D-Sorbitol : mise en évidence de la dégradation du sorbitol. Agent de différenciation
- Sels biliaires : agent sélectif
- Chlorure de sodium : isotonie du milieu
- Rouge neutre : indicateur coloré de pH pour révéler le caractère sorbitol
- Cristal violet : agent sélectif
- Cefixime : agent sélectif
- Tellurite de potassium : agent sélectif
- Agar Agar : solidification du milieu

2.1.4.2 - Hétérotrophe et chimio-organotrophe car sources de carbone et d'énergie = peptones et sorbitol éventuellement = substances chimiques organiques.

2.1.4.3 -

- Colonies incolores donc il n'y a pas eu d'acidification du milieu donc les *E. coli* O157:H7 ne dégradent pas le sorbitol, elles sont donc sorbitol - (contrairement aux autres sérotypes d'*E. coli*).
- Halo orangé : il y a virage du rouge neutre à sa teinte basique donc alcalinisation du milieu due à la dégradation des peptones.
- ou précipitation des sels biliaires.

2.1.5.1 - Milieu permettant la mise en évidence de la présence d'enzymes chez les bactéries par dégradation spécifique de substrats chromogènes en produits chromophores apportant une coloration caractéristique aux colonies.

2.1.5.2 - Eléments de réponse :

Sélection des entérobactéries par les sels biliaires et le tellurite.

Ce milieu permet de différencier, par la recherche simultanée de 2 enzymes, la β -galactosidase et la β -glucuronidase, les *E. coli* O157:H7 des autres sérotypes d'*E. coli*.

En effet, tous les sérotypes d'*E. coli* sont β -galactosidase + mais, à la différence des autres sérotypes d'*E. coli*, O157:H7 est β -glucuronidase - .

Les colonies d'*E. coli* O157:H7 seront bleu-vert (couleur due à l'action de la β -galactosidase sur le mélange de substrats chromogènes) alors que les colonies des autres sérotypes d'*E. coli* seront violettes (couleur due à l'action de la β -galactosidase et de la β -glucuronidase sur le mélange de substrats chromogènes).

2.2 --Methode alternative par PCR

2.2.1 - AFNOR.

2.2.2 - Extraction de l'ADN bactérien pour l'amplification par PCR.

2.2.3 - Obtention de résultats suspectés positifs plus rapidement car la méthode présente une étape de culture en moins par rapport à la méthode de culture (pas d'isolement sur milieu sélectif avant la PCR).

2.2.4 - Methode immuno-enzymatique (ELISA, Immuno-capture) - Cytométrie de flux.

3 - Stratégies de lutte contre la contamination des bovins par *E. coli* O157:H7 (22,5 points)**3.1 - Hygiène des exploitations bovines**

3.1.1 - Acide peracétique et peroxyde d'hydrogène. Groupe des oxydants.

3.1.2 - Fort pouvoir oxydant d'où dénaturation des protéines et altération de la membrane cellulaire.

3.1.3 - Méthode par filtration OU méthode par dilution-neutralisation.

- Méthode par filtration : mise en contact du désinfectant à tester avec la souche bactérienne, pendant le temps préconisé et à la dilution recommandée, puis arrêt de l'activité du désinfectant par filtration du mélange sur membrane et dénombrement des bactéries survivantes pour déterminer le taux de réduction de la population bactérienne.
- Méthode par dilution-neutralisation : mise en contact du désinfectant à tester avec la souche bactérienne, pendant le temps préconisé et à la dilution recommandée, puis arrêt de l'activité du désinfectant par ajout d'un neutralisant au mélange et dénombrement des bactéries survivantes pour déterminer le taux de réduction de la population bactérienne.

3.2 - Thérapie bacteriophagique contre *E. coli* O157:H7**3.2.1 --Exploitation de la courbe contr6/e de croissance d' *E. coli* O157:H7.****3.2.1.1- Tableau complété.**

3.2.1.2 - Détermination réalisée pendant la phase exponentielle de croissance soit entre 0 h et environ 10 heures.

Equation de la droite : $\ln N = Q_x (t-t_0) + \ln N_0$ Donc $Q_x = (\ln N - \ln N_0) / (t - t_0)$

On se place entre les points A et B :

A : (0 ; 4,4)

B : (environ 10 ; 8,6)

Donc, $Q_x = (\ln 10^{8,6} - \ln 10^{4,4}) / (10-0) = 0,97 \text{ h}^{-1}$

3.2.1.3 - G = temps nécessaire au doublement de la population bactérienne

$G = \ln 2 / Q_x = \ln 2 / 0,97 = 0,71 \text{ h} = 43 \text{ min}$

3.2.2.1 - Les courbes du document 7a montrent l'évolution de la population bactérienne au cours du temps en absence (témoin) et en présence de différents bactériophages.

En comparant les courbes en présence de phages avec la courbe témoin, on remarque que la présence de phages, quelle que soit leur nature, entraîne rapidement une chute ou une stagnation de la population bactérienne alors que la population témoin présente une croissance.

Néanmoins, les croissances en présence de phages repartent à partir de 10 heures pour atteindre, au bout de 120 heures la même densité bactérienne que celle de la population témoin.

On peut donc en déduire que les bactéries deviennent résistantes à l'action des bactériophages et que l'utilisation de chacun de ces phages ajouté seul à la population bactérienne ne peut pas être envisagée pour lutter contre la multiplication d'*E. coli* O157 :H7.

3.2.2.2 - Les courbes du document 7b montrent l'évolution de la population bactérienne au cours du temps en absence (témoin) et en présence d'un mélange des trois phages KH1, KH4 et KH5 dans 2 conditions différentes : sans et avec aération.

On remarque qu'en absence d'aération, la culture témoin présente un départ de croissance légèrement supérieur à la culture en présence des bactériophages, mais les deux atteignent les mêmes densités au bout de 120 heures.

En présence d'aération, la croissance de la culture témoin varie peu par rapport à la culture sans aération par contre, la densité d'*E. coli* O157 :H7 en présence des phages présente une chute spectaculaire pour arriver à l'élimination totale des bactéries au bout de 10 heures, sans redémarrage ultérieur de la croissance.

On en déduit donc que pour éliminer *E. coli* O157:H7 en culture, il faut utiliser le mélange des 3 phages sous aération.

3.3 - Utilisation de levures probiotiques chez les ruminants

3.3.1 - Micro-organisme vivant ajouté comme complément à un aliment produisant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte.

3.3.2 - Compétition pour les nutriments, empêche l'implantation de la souche pathogène en occupant l'espace, libération de substances inhibitrices...

3.3.3.1 - Fermentation alcoolique (éthanolique).

3.3.3.2 $\text{Glc} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ Pi} \rightarrow 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ Ethanol} + 2 \text{ ATP.}$

3.3.3.3 - Les levures utilisent un métabolisme fermentatif car l'intestin de l'animal présente un milieu anaérobie.

Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2014

ETUDE D'UN BIOCIDÉ NATUREL

1 - Etude de la toxicité du biocide

1.1 -

1.1.1 - DL 50 : dose létale 50, quantité de toxique par unité de masse corporelle qui provoque la mort de 50% d'une population animale par rapport à un lot témoin, dans des conditions expérimentales précises.

1.1.2 - Espèce 1 : DL50 = 3,6 mg/g ; Espèce 2 : DL50 = 2,2 mg/g.

1.1.3 - DL50 sur l'espèce 2 plus faible que la DL50 sur l'espèce 1 donc l'espèce 2 est plus sensible que l'espèce 1 aux extraits de feuille de ricin.

1.2 -

1.2.1 - SVF (=sérum de veau fœtal) apporte:
 - des facteurs de croissance (effet mitogène)
 - des hormones.
 - des molécules protectrices des cellules
 - des facteurs d'attachement

Inconvénients :

- même prélevé stérilement et stérilisé par filtration, il peut contenir des contaminants (virus, toxines, prions, des mycoplasmes)
 - riche en protéines donc purification d'une protéine d'intérêt sécrétée par les cellules difficile.
 - composition non définie donc variabilité des lots

1.2.2 - CO₂ : système tampon, maintien l'équilibre acido-basique du milieu.



1.2.3 - Cytométrie en flux : permet le comptage des cellules en suspension, donc ici l'évaluation du niveau de mortalité cellulaire provoquée par les extraits de ricin.

1.3 -

1.3.1 - Transporteur sanguin : albumine, lipoprotéines, protéines spécifiques de transport (ferritine, céruléoplasmine...).

1.3.2 - T_{max} : temps, après administration du toxique, permettant d'observer la concentration plasmatique maximale.

T_{1/2} : temps de demi-vie, temps nécessaire pour que la concentration plasmatique en toxique diminue de moitié par rapport à la concentration maximale.

1.3.3 - Type I : Réactions de fonctionnalisation = modifications des fonctions chimiques de la molécule par oxydation, réduction, hydrolyse, (met en jeu des mono-oxygénases à cytochrome P450). Le toxique devient plus hydrophile et réactif. Il subit alors des réactions de type II.

Type II : conjugaisons → ajout de groupements chimiques: acide glucuronique, sulfate, acétyl...

A l'issue de ces deux types de réactions, le produit obtenu est très l'hydrophile, il peut alors être éliminé facilement par voie rénale ou hépatique.

2. Etude du mode d'action du biocide

2.1 -

2.1.1 - Symport : transport actif (de type II), réalisé par une protéine membranaire. Le transport du Na^+ selon son gradient de concentration fournit l'énergie nécessaire au transport du xénobiotique contre son gradient. Na^+ et xénobiotique sont transportés dans le même sens via la perméase. Ce transport est spécifique et saturable.

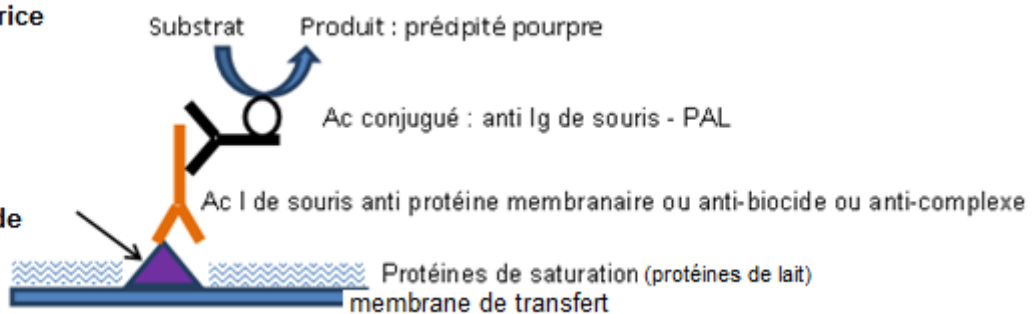
2.1.2 - Différences :

	Diffusion simple	Transport actif
Passage de la membrane	à travers la bicouche lipidique	met en jeu une protéine membranaire
Sens du transport	selon le gradient de la molécule transportée (+ vers -)	contre le gradient de la molécule transportée (- vers +)
Nécessité d'énergie	NON	OUI
Caractéristiques	non spécifique non saturable	spécifique saturable

2.2 -

2.2.1 - Immunomarquage :

protéines réceptrice du biocide
ou
biocide
ou
Complexe récepteur-biocide



Caractéristiques : technique immunoenzymatique indirecte.

Remarque : attention, cette technique n'est pas un dosage, il s'agit d'une révélation

2.2.2 - Résultats :

- Observation : bandes à 500 KDa très marquées pour 2, 3, peu marquées pour 5 et 6. Absente pour 4.
 - Interprétation : une bande colorée est liée à une réaction enzymatique rendue possible par la présence du complexe Ag-Ac et témoigne donc de la présence du biocide (ou de son récepteur cellulaire) Donc présence de biocide (ou du récepteur) dans la plante entière et le limbe en quantité importante. Absence dans le pétiole. Présence faible dans les nervures.
 - Conclusion : le biocide est surtout fixé dans le limbe,
- la masse moléculaire de l'Ag détecté (biocide ou récepteur ou complexe biocide-récepteur) est d'environ 550 KDa par comparaison au marqueur de taille.

2.3.1 - Ribosome eucaryote :

- Ribosome 80 S composé de deux sous-unités de 60S et 40S, formé de protéines et d'ARNr.
- Lieu de formation des sous-unités : nucléole.

2.3.2 - Trois étapes de l'élongation de la traduction :

- Fixation d'un aminoacyl-ARNt dans le site A du ribosome (facteurs d'élongation et énergie nécessaires).
- Formation de la liaison peptidique entre les acides aminés portés par les ARNt des sites A et P.
 - Activité peptidyltransférase dans la grande sous-unité ribosomale
 - Transfert du peptide en formation sur l'acide aminé dans le site A.
- Translocation du ribosome d'un codon vers l'extrémité 3' de l'ARNm.
 - L'ARNt désacylé est libéré.
 - Le peptidyl-ARNt passe du site A au site P
 - Nécessite de l'énergie sous forme de GTP.

3 - Etude de la multiplication *in vitro* de la plante de ricin**3.1 -**

3.1.1 - Feuille : (sens des aiguilles d'une montre) pétiole, nervure, limbe.

3.1.2 - Particularités des cellules végétales : chloroplastes, vacuole, paroi, plasmodesme, absence de centriole et de lysosomes.

3.1.3 - Chloroplaste : (sens des aiguilles d'une montre) membranes externes et internes ou enveloppes ; ribosome ; granum ; stroma ; thylacoïde ; thylacoïde intergranulaire ou lumen ; ADN chloroplastique.

Rôle : photosynthèse.

3.2 -**3.2.1 -** Phytohormone :

- molécule synthétisée par la plante,
- produite dans certaines zones de la plante en réponse à une situation interne ou à un stimulus externe (photopériode, thermopériode, chocs...)
- agissant à distance (transportée par la sève) à très faible concentration,
- se fixant sur des récepteurs cellulaires spécifiques (cellules cibles)
- modifiant la physiologie de la plante.

3.2.2 - Rapport Auxine / Cytokinine < 1 : favorise la formation de tiges et de feuilles.

Rapport Auxine / Cytokinine = 1 : favorise la dédifférenciation et la formation d'un cal.

Rapport Auxine / Cytokinine > 1 : favorise la formation de racines.

3.2.3 - Culture *in vitro* :

- lavage, désinfection (javel, alcool), rinçage des feuilles,
- découpe de fragments de 0,5-1 cm de côté,
- dépôt en surface de milieu de base (MS) additionné d'auxine et cytokinine en rapport 1/1,
- incubation à la lumière à T° ambiante pendant plusieurs semaines.

.

Éléments de corrigé de sciences et technologies bioindustrielles 2014

LE THON : DE LA PECHE A LA CONSERVE

1 - Mise en place d'un système qualité (21 points)

1.1 - Succession des activités qui entrant dans. la transformation et la distribution d'un produit (ou d'un groupe de produits), de la matière première à l'état final dans lequel il est proposé au consommateur.

Filière viande, filière œufs et ovoproduits, ...

1.2.1 - Norme : document écrit consensuel, qui décrit les caractéristiques d'un produit ou la réalisation d'un procédé (analyse ou fabrication).

1.2.2 - Protéger la santé des consommateurs **ou** Assurer des pratiques loyales dans le commerce alimentaire.

1.3.1 - Garantir la salubrité de l'aliment.

1.3.2 - - Surveiller le process en temps réel.- Prévenir !'apparition des dangers.

1.4.1 - Permet de connaître la qualité de la matière première et son éventuel traitement préalable (ici congélation).

1.4.2 - Si pH < 4,5 absence de risque de *C.botulinum*.

1.4.3.- - Absence de microorganismes vivants, enzymes détruits - DLUO

1.4.4 - Biologique : bactéries pathogènes (étape 6).

- Chimique : produits de nettoyage des paillasse de travail ou trop de produits lors du lavage des récipients (étape lavage/rotation).

- Physique : débris solides (arêtes par exemple) (étape 5)

1.5.2 - Q1 : oui : une procédure (barème, méthode) est définie clairement.

Q2 : oui : cette étape a été spécialement conçue pour éliminer les spores : CCP.

1.5.3.1 - Paramètres associés au traitement thermique (durée, température, ...).

1.5.3.2 - Utilisation d'une sonde « embarquée » dans la conserve ou enregistrement de mesures de l'appareil.

1.5.3.3 - - Jeter le lot. - Refaire une stérilisation.

2 - Etude de la matière première principale : le thon congelé (19 points)

2.1 - Les mouvements musculaires sont continus mais pas très forts (métabolisme aérobie adapté). Importance du transport d'oxygène et abondance de l'hémoglobine. Différent du métabolisme anaérobie des muscles blancs (adapté aux efforts importants et brefs).

2.2 - Problème du rancissement des corps gras.

2.3.1 - Rigor mortis.

2.3.2 - Arrêt de la circulation sanguine → diminution de pO₂ → anaérobiose au niveau musculaire.

Production d'ATP par fermentation lactique du glycogène → diminution du pH

Glycogène épuisé → arrêt de la production d'ATP et liaison irréversible de l'actine et de la myosine → rigidité cadavérique du muscle.

2.3.3 - Plus de sucre, donc plus de fermentation lactique. 2.4 .

2.4.1 - Il s'agit par ces méthodes de ralentir ou d'arrêter les processus enzymatiques de dégradation des protéines de la chair du poisson. Arrêt de la croissance bactérienne par action d'une basse température et d'une diminution de l' a_w .

2.4.2 - La concentration en sel doit permettre à la saumure d'être liquide à - 18°C afin de pouvoir y immerger les thons et permettre le refroidissement par conduction.

$\% \text{ NaCl} = (256 / (256 + 908)) \times 100 = 22 \%$.

2.4.3 - Les poissons auront tendance à remonter (densité élevée de la saumure). Des barrières en haut de cuves évitent la remontée des poissons.

3 - Etude d'une opération unitaire : le traitement thermique (20 points)

3.1 - Subdivision d'un procédé industriel.

3.2 - Le raccourcissement du temps de montée en température du produit se traduit par une durée de traitement plus courte.

3.3.1 - .

(2) :circuit de l'eau dans l'autoclave.

(1) :circuit d'eau (pour chauffer et/ou refroidir l'eau de l'autoclave).

3.3.2 - Echangeur de chaleur.

3.3.3 - Air comprimé lors du refroidissement, entrée d'air comprimée dans l'autoclave pour compenser la chute de pression.

3.3.4 - Avantages : simplicité, investissement faible.

Inconvénients :cadences faibles, coût de fonctionnement plus élevé.

3.4.1-- « $\text{Log} (75/ F) \times 10 = 121,1 - 116$ donc $F = 23$ minutes.

23 minutes > 20 minutes : le barème est correct du point de vue de la stérilisation. Une marge de sécurité a été prévue.

3.4.2 --Durée du traitement trop longue (coût).

Problèmes organoleptiques.

3.5 --Fumigation, irradiation (lumière pulsée, UVc), plasmas froids, ultrasons,...

Corrections session 2015

Éléments de corrigé de mathématiques 2015

EXERCICE 1

PARTIE A : Étude du premier traitement

1. Résolution d'une équation différentielle

a) Les solutions de (E_0) sont de la forme : $y_0(t) = Ce^{-0,1t} \quad \forall t \in [0; +\infty[$

b) $\forall t \in [0; +\infty[\quad h(t) = 2te^{-0,1t}$

$$\begin{aligned} \text{Donc} \quad h'(t) &= 2e^{-0,1t} + 2t \times (-0,1)e^{-0,1t} \\ &= 2e^{-0,1t} - 0,2te^{-0,1t} \end{aligned}$$

$$\forall t \in [0; +\infty[\quad h'(t) + 0,1h(t) = 2e^{-0,1t} - 0,2te^{-0,1t} + 0,2te^{-0,1t} = 2e^{-0,1t}$$

Donc h est une solution particulière de l'équation (E).

c) Les solutions de (E) sont de la forme : $f(t) = y_0(t) + h(t) = Ce^{-0,1t} + 2te^{-0,1t} \quad \forall t \in [0; +\infty[$.

d) On a $f(0) = 1 \Leftrightarrow Ce^0 + 2 \times 0 \times e^0 = 1 \Leftrightarrow C = 1$

D'où $f(t) = 1e^{-0,1t} + 2te^{-0,1t} = (2t+1)e^{-0,1t} \quad \forall t \in [0; +\infty[$

2. Étude d'une fonction

$$\text{Sur } [0; +\infty[, \quad f(t) = (2t+1)e^{-0,1t}$$

a) On admet que $\lim_{t \rightarrow +\infty} f(t) = 0$ donc on en déduit que la courbe représentative de f admet une asymptote horizontale d'équation $y = 0$ (axe des abscisses) en $+\infty$.

b) Sur $[0; +\infty[$, on admet que $f'(t) = (1,9 - 0,2t)e^{-0,1t}$

i) Pour tout réel t de $[0; +\infty[$, $e^{-0,1t} > 0$ donc $f'(t)$ est du signe de $1,9 - 0,2t$

$$1,9 - 0,2t > 0 \Leftrightarrow 1,9 > 0,2t$$

$$\Leftrightarrow t < \frac{1,9}{0,2}$$

$$\Leftrightarrow t < 9,5$$

ii) On en déduit le tableau de variations de la fonction :

t	0	9,5	$+\infty$
$f'(t)$	+	0	-
$f(t)$	1	$f(9,5)$	0

$$f(0) = 1$$

$$f(9,5) = (2 \times 9,5 + 1)e^{-0,1 \times 9,5} = 20e^{-0,95} \approx 7,735$$

Application

a) La quantité de principe actif sera maximale quand $t = 9,5$ heures.

b) Le médicament est efficace quand la quantité de principe actif est supérieure ou égale à 5 mg.

Or l'équation $f(t) = 5$ est impossible à résoudre.

Cependant à l'aide du tableau de valeurs de la fonction obtenu à l'aide de la calculatrice, on constate que :

$$f(2,8) \approx 4,99 < 5 \quad \text{et} \quad f(21) \approx 5,27 > 5$$

$$f(2,9) \approx 5,01 > 5 \quad f(22) \approx 4,98 < 5$$

donc on en déduit que le médicament est efficace entre 2,9 heures et 21 heures.

c) On donne $\int_0^{24} f(t) dt = 210 - 690e^{-2,4}$

$$Vm = \frac{1}{24-0} \times \int_0^{24} f(t) dt = \frac{1}{24} \times (210 - 690e^{-2,4}) = 8,75 - 28,75e^{-2,4} \approx 6,14 \approx 6,1$$

La quantité moyenne de principe actif présente dans le sang entre 0 et 24 heures est de 6,1 mg.

PARTIE B : Étude Statistique du second traitement

1. Administrations répétées du médicament

La courbe qui représente le mieux l'évolution de la quantité de médicament présente dans le sang est la figure 3 car elle correspond à une décroissance la quantité en fonction du temps puis le fait de réinjecter une dose de charge de médicament toutes les heures.

2. Administration continue du médicament : recherche de la courbe de tendance

a) i)

t_i	0	4	8	12	16	20	24
q_i	1,8	9,5	15,5	20,2	23,7	26,8	28,7
$y_i = \ln(36 - q_i)$	3,53	3,28	3,02	2,76	2,51	2,22	1,99

ii) A l'aide la calculatrice, on obtient l'équation de D la droite d'ajustement de y en t par la méthode des moindres carrés : D $y = -0,06t + 3,54$

b) On a :

$$y = -0,06t + 3,54$$

$$\Leftrightarrow \ln(36 - q) = -0,06t + 3,54$$

$$\Leftrightarrow 36 - q = e^{-0,06t + 3,54}$$

$$\Leftrightarrow q = 36 - e^{-0,06t + 3,54}$$

On obtient donc l'expression de la quantité $q = 36 - e^{-0,06t + 3,54}$

c) La quantité limite est de 36 mg.

Le médecin affirme que l'état stationnaire est atteint en moins de 3 jours soit en $3 \times 24 = 72$ heures.

Pour $t = 72$, on a $q = 36 - e^{-0,06 \times 72 + 3,54} \approx 35,542$

Soit une différence de $36 - 35,542 = 0,458 < 1$ mg

Donc l'affirmation du médecin est justifiée.

EXERCICE 2

PARTIE A : Étiquetage

1) $p(A \cap D) = p(A) \times p(D)$ car A et D sont indépendants. $p(A \cap D) = 0,01 \times 0,03$

$$p(A \cap D) = 0,0003$$

2) $p(\bar{A} \cap \bar{D}) = p(\bar{A}) \times p(\bar{D})$ car \bar{A} et \bar{D} sont indépendants. $p(\bar{A} \cap \bar{D}) = (1 - 0,01) \times (1 - 0,03)$

$$p(\bar{A} \cap \bar{D}) = 0,9603$$

PARTIE B : Étude de la contenance

1) $p(57,90 \leq V \leq 58,10) \approx 0,9875$

donc $p(V < 57,90) + p(V > 58,10) = 1 - p(57,90 \leq V \leq 58,10) \approx 1 - 0,9875 \approx 0,0124$

Donc la probabilité que le flacon soit non conforme est égale à 0,01.

2) $p(58 - h \leq V \leq 58 + h) = 0,95$ où V suit une loi normale $N(58; 0,04)$

$$p\left(\frac{58 - h - 58}{0,04} \leq \frac{V - 58}{0,04} \leq \frac{58 + h - 58}{0,04}\right) = 0,95$$

$$p\left(\frac{-h}{0,04} \leq T \leq \frac{h}{0,04}\right) = 0,95 \quad \text{où } T = \frac{V - 58}{0,04} \text{ suit une loi normale } N(0; 1)$$

$$2 \times p\left(T \leq \frac{h}{0,04}\right) - 1 = 0,95$$

$$p\left(T \leq \frac{h}{0,04}\right) = 0,975$$

A l'aide de la calculatrice, on obtient : $\frac{h}{0,04} \approx 1,96$ soit $h \approx 1,96 \times 0,04 \approx 0,08$

PARTIE C : Test d'hypothèse

1) A l'aide de la calculatrice, on obtient : $\bar{v} \approx 58,042$ et $s \approx 0,036$

2) Construction du test

a) Au seuil de signification de 5 %, on calcule l'intervalle de confiance de la moyenne à l'aide de la formule :

$$\left[\mu - 1,96 \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}}; \mu + 1,96 \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right].$$

Cela correspond ici à $\left[58 - 1,96 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}}; 58 + 1,96 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}} \right]$ soit l'intervalle L proposé par l'énoncé.

b) Règle de décision du test :

Si $\bar{v} \in L$ alors on accepte l'hypothèse H_0 au seuil de risque de 5 %.

Si $\bar{v} \notin L$ alors on rejette l'hypothèse H_0 et on accepte H_1 au seuil de risque de 5 %.

3) On a $L = \left[58 - 1,96 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}}; 58 + 1,96 \times \frac{0,04}{\sqrt{80}} \right] = [57,991; 58,009]$ et $\bar{v} \approx 58,042$

$\bar{v} \notin L$ donc on rejette la livraison au seuil de risque de 5 %.

Éléments de corrigé de sciences physiques et chimiques 2015

A.-Polarimétrie

1 - Loi de biot : $\alpha = [\alpha]_{\lambda}^{\theta} \cdot c \cdot l$

- 2- Dans le système international, $[\alpha]_{\lambda}^{\theta}$: pouvoir rotatoire spécifique, exprimé en $^{\circ} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{m}^2$
 c : concentration massique de la solution en $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
 α : angle de rotation du plan de polarisation, exprimé en degré
 l : longueur de substance traversée en mètre

3 - $[\alpha]_{\text{D}}^{20} > 0$ donc le D-glucose est dextrogyre

4.1 - $a = 0,105 \text{ } ^{\circ} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{m}^2$
 $b = 9,52 \cdot 10^{-4} \text{ } ^{\circ}$
 et $r = 0,999$

- 4.2 - La valeur de r très proche de 1 montre que $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ est proportionnel à c et donc que la loi de Biot est vérifiée. (b est proche de 0)

4.3 - Et comme la loi de Biot a pour expression $\alpha_{\text{D}}^{20} = [\alpha]_{\text{D}}^{20} \cdot l \cdot c$, on en déduit que $a = [\alpha]_{\text{D}}^{20} \cdot l$

soit $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 0,525 \text{ } ^{\circ} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{m}^2$

Cette valeur est conforme (écart relatif de 0,3%) à la valeur indiquée en question 2.

5.1 - $c = \frac{\alpha_{\text{D}}^{20}}{[\alpha]_{\text{D}}^{20} \cdot l}$ soit $c = 48,6 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$

5.2 - $c = 48,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, donc la valeur qui devrait être étiquetée sur cette solution est $p = 4,86 \%$

5.3 - $4,80 \% < p < 5,20 \%$ donc le contrôle est validé

B: Les gerris comme détecteur de pollution de l'eau

1 - $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$

2 - $\sigma_1 = F / 2\pi d$ soit $\sigma_1 = 5,58 \cdot 10^{-2} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$

3 - $\sigma_2 = \rho g r h / 2$ soit $\sigma_2 = 5,59 \cdot 10^{-2} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$

4 - $\sigma_1 = 5,58 \cdot 10^{-2} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$

$\sigma_2 = 5,59 \cdot 10^{-2} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1} < 6,40 \cdot 10^{-2}$

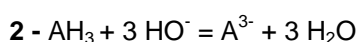
L'eau est moyennement polluée

5 - Les gerris sont sensibles aux eaux polluées (même moyennement)

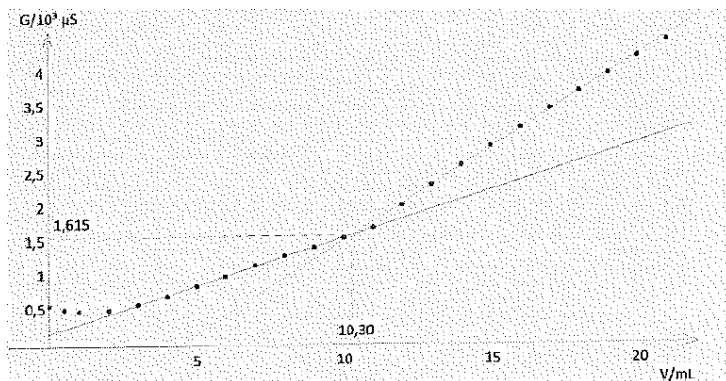
6 - Si $\sigma = 6,40 \cdot 10^{-2} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ alors $h = 13,0 \text{ cm}$

C : Conductimétrie

1 - On ajoute un grand volume d'eau distillée pour négliger l'effet de dilution



3 - À l'équivalence, la solution titrante et la solution titrée ont réagi dans les proportions stœchiométriques.

4 - $V_{eq} = 10,30 \text{ mL}$ 5 - A l'équivalence on a : $n_{\text{AH}_3} = \frac{1}{3} \cdot n_{\text{HO}^- \text{ ajouté}}$

$$C_{\text{AH}_3} \cdot V_{\text{AH}_3} = \frac{1}{3} C_{\text{HO}^-} \cdot V_{\text{HO}^-}$$

$$C_{\text{AH}_3} = \frac{C_{\text{HO}^-} \cdot V_{\text{HO}^-}}{3 \cdot V_{\text{AH}_3}} = \frac{0,100 \cdot 10,3}{3 \cdot 20} = 1,72 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} =$$

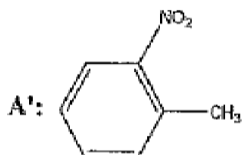
6 - $C_{\text{jus}} = 20 \cdot 1,72 \cdot 10^{-2} = 0,343 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ d'où une concentration massique $C_m = C_{\text{jus}} \cdot M_{\text{AH}_3} = 65,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

7 - Valeur trouvée un peu éloignée de la valeur moyenne mais plausible. Expérience insuffisante pour conclure sur la présence d'autres acides.

D : Chimie organique1 - $-\text{NH}_2$: fonction amine $-\text{COO}-$: fonction ester

2.1 - A est le 4-nitrotoluène

2.2 - Acide sulfurique et acide nitrique ou acide nitrique fumant

2.3 - CH_3 - oriente la substitution en ortho et en para

Le composé A' est donc :

3.1 - couple ; $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} / \text{Cr}^{3+}$: $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 14 \text{H}^+ + 6 \text{e}^- = 2 \text{Cr}^{3+} + 7 \text{H}_2\text{O}$ réduction (1)couple $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_4 / \text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$: $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} = \text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_4 + 6 \text{H}^+ + 6 \text{e}^-$ oxydation (2)3.2 - $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 8 \text{H}^+ + \text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2 = 2 \text{Cr}^{3+} + 5 \text{H}_2\text{O} + \text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_4$

3.3 - Le permanganate de potassium

4.1 -

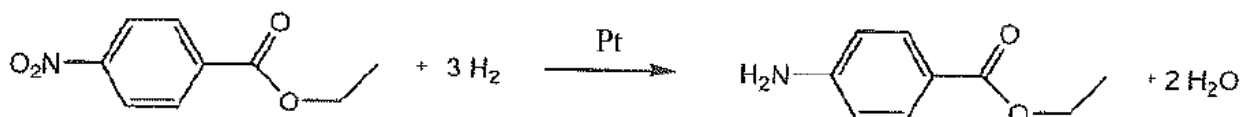


4.2 - Ethanol

4.3 - Réaction d'estérification. réaction lente limitée et athermique

4.4 - Un réactif en excès ou utilisation du chlorure d'acide ou extraction en continu d'un produit.

5 -



Éléments de corrigé de biochimie et de technologie d'analyse 2015

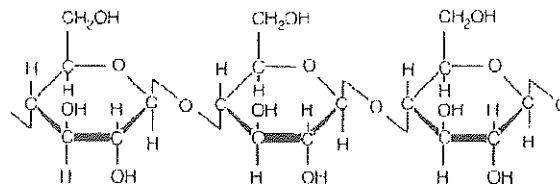
SOJA ET ALIMENTATION

1 - Procédé d'extraction pour la préparation de concentrats ou isolats de soja

1.1 - La première centrifugation et les composés insolubles

1.1.1 - L'extrait protéique est dans le surnageant car solubilisation des protéines.
Les polysaccharides insolubles sont dans le culot car insolubles donc précipités.

1.1.2 - Structure cellulose :



1.2 - La précipitation isoélectrique

1.2.1 - Le mélange constitué par les protéines du soja est le moins soluble dans l'intervalle des pH 4-5.
Forte solubilité à pH très fortement acide pH 2 à 3 et au-delà du pH 6.

La connaissance des propriétés de chacune des protéines (notamment le pH_i) permettrait d'expliquer peut-être la faible solubilité autour des pH 4-5.

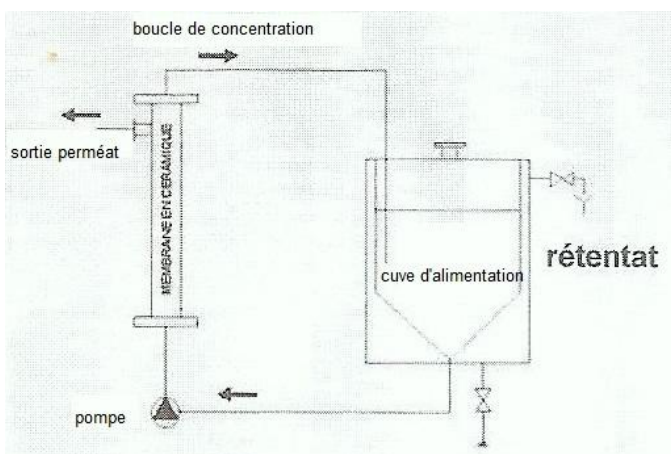
1.2.2 - Le pH modifie l'ionisation des groupements chargés en surface des protéines.

Au pH_i la solubilité est minimale car la charge globale nulle limite les répulsions électrostatiques. Les interactions protéines-protéines sont donc maximales et favorisent la formation d'agrégats

1.2.3 - pH 4,5 car = $pH_{\text{isoélectrique}}$ moyen.

1.3 - L'ultrafiltration

1.3.1 - Schéma :



Annotations:

- Perméat
- Rétentat
- Membrane filtrante ou colonne
- Cuve ou réservoir
- Boucle (sens de circulation à indiquer)
- Pompe

1.3.2 - Seuil de coupure : taille de molécule à partir de laquelle les molécules seront retenues.

1.3.3 - Le rétentat contiendra les protéines de PM > 100 kDa : Hémagglutinine, globuline 7 S et globuline 11 S.

Le perméat contiendra les protéines de PM ≤ 100 kDa : Inhibiteurs trypsiques, cytochrome C et α -amylase.

La lipooxygénase sera dans le perméat et le rétentat car son PM est voisin du seuil de coupure.

2 - Étude et mise en évidence des protéines du soja

2.1 - Structure des protéines

Niveaux de Structure	Définitions	Liaisons et atomes
Primaire	Enchaînement de résidus d'acides aminés de la chaîne peptidique.	Liaison peptidique entre le NH d'un acide aminé et le CO de l'AA adjacent.
Secondaire	Replissements de certaines portions de la chaîne peptidique selon des motifs particuliers comme l'hélice α et le feuillet β .	Liaison H entre le H d'un NH d'une liaison peptidique et le O d'un CO d'une autre liaison peptidique.
Tertiaire	Structure tridimensionnelle de la protéine par repliement global de la chaîne peptidique.	Liaisons secondaires : interactions (H, ionique, hydrophobes, Van der Waals) et ponts disulfures entre les atomes des chaînes latérales-S-S.
Quaternaire	Association de plusieurs chaînes peptidiques formant une protéine oligomérique à plusieurs sous-unités. .	Même type que liaisons de la structure III ^R .

2.2 - SDS-PAGE

2.2.1 - SDS PAGE = électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate).

2.2.2 - Rôles des composants du gel :

- Stock acrylamide : contient acrylamide : agent de polymérisation et bisacrylamide : agent réticulant qui formeront les mailles du gel.
- SDS : agent dénaturant qui dissocie les sous-unités protéiques, déplie les chaînes peptidiques et se fixe sur ces chaînes pour les rendre anioniques.
- TEMED et persulfate d'ammonium : initiateur et catalyseur de la polymérisation.

2.2.3 - Le poids moléculaire car protéines ont toutes la même charge (-) et la même structure due au SDS.

2.2.4 - % = $1,93 \times 30 / 7,73 = 7,5 \%$.

2.2.5 - Il sert à réduire les ponts disulfures séparant entre autres les sous-unités protéiques.

2.2.6.1 - % = pourcentage en acrylamide + bisacrylamide.

Influence la résolution du gel : plus le % augmente plus le gel est résolutif car les mailles sont plus serrées.

2.2.6.2 - Le 3^{ième} gel car toutes les bandes de marqueurs protéiques y apparaissent.

2.2.7 - Schéma avec : ligne dépôts côté cathode et sens migration vers anode car les protéines sont anioniques donc migrent vers l'anode.

2.2.8 - Migration d'autant plus grande que le PM de la sous unité est faible + correspondance de PM avec les bandes de repère de poids moléculaire (kit 1 et 2 des pistes 1 et 5).

A = globuline 7S sous-unité α

D = globuline 11S sous-unité α

B = globuline 7S sous-unité α'

E = globuline 11S sous-unité β

C = globuline 7S sous-unité β

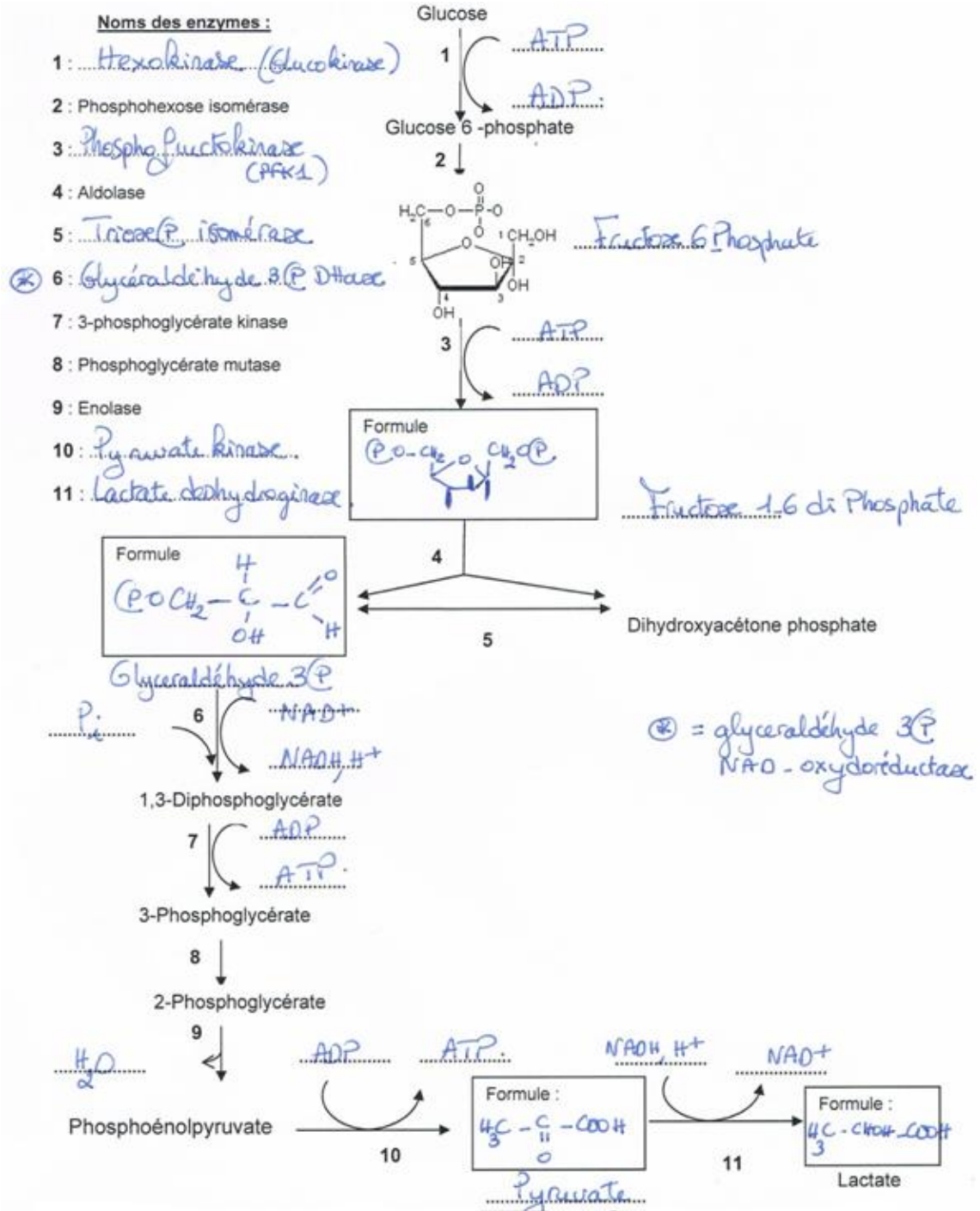
2.2.9 - Échantillon piste 3 : présence de protéines de soja car bandes A, B et E sont visibles.

Échantillon piste 4 : absence de protéines de soja car bandes A, B et E sont non visibles.

3 - Yaourts au soja : les soyourts

3.1- Fabrication et fermentation du tonyu

3.1.1 - Schéma :



3.1.2 - Bilan moléculaire : 1 glucose + 2ADP + 2Pi → 2 acides lactiques + 2 ATP + 2H₂O.

3.2 - Contrôle qualité du produit : amélioration de la saveur des soyourts

3.2.1 - Sans GDL : passage de 8 mg à 20 mg en 10 heures soit 1,2 mg.h⁻¹

Avec GDL : passage de 6 à 7 mg en 10 heures soit 0,1 mg.h⁻¹

3.2.2 - % d'inhibition : 100 - [0,1 x 100 / 1,2] = 91,7 %.

3.2.3 - Spécificité = hydrolyse des liaisons osidiques impliquant un glucose par son C anomérique en anomérie β

3.2.4 - Équations :

$$\text{Michaëlis Menten : } v_i = \frac{v_{\text{imax}} \cdot [S]_{0,\text{MR}}}{K_M + [S]_{0,\text{MR}}}$$

$$\text{Lineweaver Burk : } \frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{v_{\text{imax}}} \cdot \frac{1}{[S]_{0,\text{MR}}} + \frac{1}{v_{\text{imax}}}$$

3.2.5 - D'après les équations de droite :Sans GDL

$$(1/v_{\text{imax}}) = 11,8 \quad \text{soit } v_{\text{imax}} = 0,085 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

$$K_M/v_{\text{imax}} = 9,99 \quad \text{soit } K_M = 0,85 \text{ mmol.L}^{-1}$$

Avec GDL

$$(1/v_{\text{imax}}) = 11,9 \quad \text{soit } v_{\text{imax}} = 0,084 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

$$K_M/v_{\text{imax}} = 19,0 \quad \text{soit } K_M = 1,60 \text{ mmol.L}^{-1}$$

La v_{imax} est inchangée alors que K_M est plus grand en présence de GDL donc l'affinité est plus faible : le GDL est donc un inhibiteur compétitif.

3.2.6 - Le GDL possède un résidu glucose qui est reconnu par l'enzyme, qui le fixe sur son site actif mais ne possède pas de liaison β à hydrolyser, ce qui bloque l'enzyme. Le GDL est un analogue du substrat.

3.2.7 -

$$K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

$$\frac{K'_m}{K_m} = \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \text{ donc } \frac{K'_m}{K_m} - 1 = \frac{[I]}{K_I} \text{ et donc } \frac{K'_m - K_m}{K_m} = \frac{[I]}{K_I} \text{ alors } \frac{K_I}{[I]} = \frac{K_m}{K'_m - K_m} \Rightarrow K_I = \frac{K_m}{K'_m - K_m} \times [I]$$

$$K_I = \frac{K_m}{K'_m - K_m} \times [I] = \frac{0,85}{1,60 - 0,85} \times 2,9 = 3,28 \text{ mmol.L}^{-1}$$

Éléments de corrigé de microbiologie et de technologie d'analyse 2015

POTENTIEL PROBIOTIQUE DE BIFIDOBACTÉRIES D'ORIGINE HUMAINE

1 - Isolement et caractérisation des souches de *Bifidobacterium*

1.1 - Isolement de bifidobactéries à partir de fèces de nourrissons nourris au sein

1.1.1 - Commensalisme : association bénéfique pour le microorganisme dans laquelle l'hôte est relativement indifférent.

1.1.2 - Flore dominante anaérobie stricte 99 % des bactéries intestinales (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* ...);

Flore sous dominante AAF ~ 1 % (entérobactérie : *E.coli*, entérocoques ...);

Flore fluctuante variable d'un individu à l'autre plus faiblement représentée (entérobactéries, levures ...).

1.1.3 - Conditions d'incubation : 37°C, atmosphère anaérobie.

1.2 - Identification des souches isolées

1.2.1 -

1.2.1.1 - Gène de l'ARN 16 S : région conservé avec des régions variables permettant de distinguer des genres proches.

1.2.1.2 - Contrôles :

1 - Contrôle 1 : (mix-PCR + échantillon d'ADN de *Bifidobacterium*) ; vérifie l'efficacité du système d'amplification, la qualité des réactifs.

2 - Contrôle 2 : (mix-PCR + eau distillée) ; vérifie l'absence de contamination par de l'ADN de *Bifidobacterium*.

1.2.1.3 - Analyse :

Contrôles conformes qui valident les essais.

Amplicon de 1,35 kb pour S1 et S2 => reconnaissance spécifique du gène par les amorces. S1 et S2 appartiennent au genre *Bifidobacterium*.

1.2.2 -

1.2.2.1 - Fermentation hétérolactique car production lactate et aussi d'acétate.

1.2.2.2 - Autre technique génétique : hybridation ADN-ADN, séquençage, RFLP.

1.3 - Tests de résistance au lysozyme, à l'acidité. et à la bile

1.3.1 - Intérêt : évaluer la capacité de résistance lors de l'ingestion, au lysozyme de la salive, au pH acide de l'estomac et à la bile dans l'intestin. Une souche trop sensible ne pourrait pas s'implanter en quantité suffisante

1.3.2 - Lysozyme : catalyse l'hydrolyse de la liaison β (1 \rightarrow 4) entre NAM et NAG du peptidoglycane.

1.3.3 - CMI : concentration minimale inhibitrice, plus faible concentration en inhibiteur capable d'empêcher toute croissance visible d'une souche *in vitro*.

1.3.4 - Témoins : 2 au choix

Témoin milieu : milieu seul \rightarrow vérifie la stérilité du milieu.

Témoins souches : milieu + souche S1 -, réalisé sur S1 dans un milieu à pH optimal 6,5 :

contrôle de la capacité de croissance (sert aussi à comparer l'absorbance pour le test pH). Témoins de pureté : isolement sur milieu adapté \rightarrow réalisé sur chaque souche : contrôle de pureté des souches.

1.3.5 - Analyse :

- Lysozyme : résistance de S1 parmi les plus élevées ; résistance de S2 > souches référence.
- Bile : résistance de toutes les souches à la concentration testée.
- pH : résistance de S1 et S2 à un pH plus acide que les souches référence.

=> résistance globale de S1 et S2 plus importante que les souches de référence.

2 - Prévention des infections à *E. coli* O157:H7**2.1 - Pouvoir pathogène d'*E. coli* O157:H7**

2.1.1 - Sérovar : ensemble de souches au sein d'une même espèce présentant un profil antigénique similaire.

Pathovar : ensemble de souches au sein d'une même espèce présentant un même profil de pathogénicité et donc provoquant les mêmes symptômes.

2.1.2 - Antigènes O et H : O : pariétal (LPS) glucidique ; H : flagellaire protéique.

2.1.3 - Adhérence : adhésines (le plus souvent des lectines) portées par des pili, glycocalyx.

2.1.4 -

2.1.4.1 - Toxines AB : 2 sous unités différentes :

- sous-unité B permettant la reconnaissance spécifique d'un récepteur membranaire de la cellule cible et la pénétration de la sous-unité A.
- sous-unité A portant l'activité enzymatique responsable de la toxicité.

2.1.4.2 - Destruction entérocytes entraînant un déficit d'absorption hydrique et minérale.

Diarrhée sanglante car nécrose tissulaire.

2.2 - Études in vitro**2.2.1 -**

2.2.1.1 - Principe : bifidobactéries ensemencées sous forme de spots sur une gélose. Préincubation et croissance. Coulage d'une surcouche de milieu inoculé avec *E.coli*. Inhibition de la croissance d'*E.coli* par les bifidobactéries => halo d'inhibition autour des spots concernés après incubation.

2.2.1.2 - Contrôle : spot milieu MRS stérile -, vérifie l'absence d'inhibition d' *E.coli* par le milieu de culture des bifidobactéries.

Spot *B. breve* : contrôle positif, contrôle la capacité d'une souche de référence à inhiber *E.co/i* dans les conditions opératoires.

2.2.1.3 - Analyse : contrôles conformes qui valident les résultats.

Diamètres d'inhibitions de S1 et S2 > *B. breve*.

Capacité d'inhibition in vitro d' *E.coli* par S1 et S2 > souche de référence.

2.2.2 -

2.2.1.1 - Cellules Caco-2 : équivalente à des entérocytes, permettent de mimer les interactions *in vivo* entre *E.coli* et entérocytes.

2.2.1.2 - Protocole de dénombrement d' *E. coli* O157:H7 adhérentes :

Si le rinçage avant trypsination élimine les *E.Coli* non adhérentes, et si la trypsination détache les *E.coli* adhérentes alors on peut par exemple réaliser:

- Dilutions en série de raison 1/10.
- Dénombrement en milieu gélosé sélectif des *E.coli*
- Incubation en aérobiose.

Ou autre protocole cohérent.(cyto-immunofluorescence avec Ac Anti-Coli marqué...)

2.2.1.3 - Analyse:

- Diminution significative de l'adhérence d' *E.coli* aux cellules à partir de 10^6 UFC de S1/puits et 10^7 UFC de S2/puits.
- Diminution de l'adhérence fonction de la concentration en bifidobactéries.

=> S1 et S2 inhibent toutes les deux l'adhérence d' *E.coli* O157 :H7 aux cellules Caco-2.

2.3 - Études *in vivo* chez la souris

2.3.1 - Augmentation de sensibilité des souris : la streptomycine doit détruire une partie du microbiote et diminuer l'efficacité de la barrière biologique intestinale.

2.3.2 - Le protocole d'étude mené sur les souris est présenté dans le document 6.

2.3.2.1 - Sorbitol - Mac Conkey agar :

- Peptone : base nutritive permettant la croissance.
- Cristal violet et bile : sélection des Gram- comme *E.coli*.
- Sorbitol + rouge neutre : agent de différenciation permettant de distinguer *E.coli* O157:H7 (Sor-, colonies incolores) des autres *E.coli* (Sor+, colonies rouges).

2.3.2.2 - Analyse des documents A et B :

- S1 et S2 : 10^{10} UFC/g à J0 et diminution limitée jusqu'à 10^8 - 10^9 UFC/g à J16. Bonne implantation des deux souches.

- Souris contrôles : infection par *E.coli*

=> 10^9 UFC/g à J1 puis maintien autour de 10^8 UFC d'*E.coli*/g jusqu'à J10,

=> mortalité importante entre J7 et J10 (0% de survivant).

- Souris traitées par S1 : infection par *E.coli*

=> 10^9 UFC/g à J1 puis maintien autour de 10^8 UFC d'*E.coli*/g jusqu'à J16,

=> mortalité importante entre J8 et J10 (10% de survivant).

- Souris traitées par S2 : infection par *E.coli*

=> 10^9 UFC/g à J1 puis diminution progressive jusqu'à de 10^5 UFC d'*E.coli*/g jusqu'à J16,

=> 100 % de survivants à J16.

- Conclusion : traitement par S2 protecteur, par S1 non.

2.3.2.3 - Analyse : Production d'IgAs anti-*E. coli* O157:H7 significativement plus élevée (facteur 1,5) chez les souris traitées par S1 ou S2 par rapport aux souris contrôles.

=> S1 et S2 stimulent la production d'IgAs contre *E.coli*.

2.3.2.4 - RPLA : latex sensibilisé par Ac anti-STX, réseau de complexes immuns (schéma exigé).

2.3.2.5 - Analyse : Production de STX diminuée mais pas de façon significative chez souris traitées par S1 par rapport aux souris contrôles.

Production de STX très diminuée chez souris traitées par S2 par rapport aux souris contrôles (baisse d'un facteur 10 environ)

=> S2 inhibe la production de STX par *E. coli* O157:H7 mais S1 pas ou peu.

3 - Conclusion

- Les deux souches S1 et S2 sont capables de s'implanter dans le tube digestif.
- *In vitro* S1 et S2 présentent une bonne inhibition de la croissance et de l'adhérence d'*E. coli* O157:H7 aux cellules Caco-2, enterocytes like.
- *In vivo*, S1 et S2 stimulent la production d'IgAs MAIS seule S2 semble protectrice contre *E. coli* O157:H7, car elle inhibe la production de STX, et protège de l'infection par *E.coli* O157:H7

⇒ Seule S2 présente potentiellement un intérêt probiotique.

Éléments de corrigé de BCM et de technologie d'analyse 2015

Produits de la mer et toxi-infection alimentaires

1 - Virus de NORWALK

1.1 - Structure et cycle du virus de Norwalk

1.1.1 -

1.1.1.1 - « RNA ss+ » signifie que le génome est constitué d'un ARN simple brin (single strain) positif dont la séquence correspond à celle de l'ARNm viral permettant donc une traduction directe des protéines virales.

1.1.1.2 - *Symmetry icosahedral* signifie que la capsid virale présente une symétrie icosaédrique.

Naked signifie que le virus est « nu » c'est-à-dire non enveloppé.

1.1.2 -

1.1.2.1 - A : adsorption spécifique ; B : décapsidation ; C : synthèse de protéines virales (traduction) ; D : assemblage de la capsid ; E : synthèse de brins d'ARN- matrice ; F : synthèse du génome viral= ARN+ ; G : encapsidation du génome ; H : libération des virions.

1.1.2.2 - Fonctions respectives des protéines virales. Protéines précoces : enzymes de réplication du génome viral et protéines tardives : protéines de structure de la capsid (capsomères).

1.1.2.3 - 1 : ARN+ ou ARNm viral ; 2 : site P du ribosome ; 3 : site A du ribosome ; 4 : acide aminé ; 5 : ribosome ; 6 : codon ; 7 : ARNt ou anticodon ; 8 : aminoacyl-ARNt ; 9 : chaîne peptidique en formation ; A : extrémité 5' ; B : extrémité 3'.

1.2 - Détection du virus de Norwalk par Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

1.2.1 -

1.2.1.1 - Modifications post-traductionnelles :

Modification	Ajout de la coiffe ou cap en 5' (GMP méthylé)	Ajout de la queue poly-A en 3'	Epissage
Lieu	Noyau	Noyau	Noyau
Rôles	Stabilisation, protection Transport nucléo-cytoplasmique Fixation de la petite sous unité du ribosome	Stabilisation, protection Transport nucléo-cytoplasmique	Élimination des introns

1.2.1.2 - Extraction des ARN : utilisation de billes magnétique présentant des oligonucléotides poly-dT capables de fixer les ARNm par leur queue poly-A.

1.2.2 -

1.2.2.1 - RT-PCR :

	Etapes	Enzymes	Objectifs
1	Reverse transcription	Reverse transcriptase	Synthèse d'ADN simple puis double brin à partir de l'ARN viral
2	Dénaturation (95°C)		Séparation des 2 brins d'ADN
3	Hybridation (50-60°C)		Hybridation des amorces
4	Elongation (72°C)	Taq-polymérase	Polymérisation, synthèse de nouveaux brins d'ADN

1.2.2.2 - Mix PCR :

Réactifs	Volume (µL)
ADN	10
Tampon	$C_f \times V_f / C_i = 1 \times 50 / 10 = 5$
dNTPs	$C_f \times V_f / C_i = 0,2 \times 50 / 10 = 1$
Amorce sens	$C_f \times V_f / C_i = 0,1 \times 50 / 5 = 1$
Amorce anti-sens	$C_f \times V_f / C_i = 0,1 \times 50 / 5 = 1$
Taq polymerase	$q/C = 2/1 = 2$
Eau qsp 50 µL	30

1.2.2.3 - Choix des amorces : $T_m = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (C+G)$

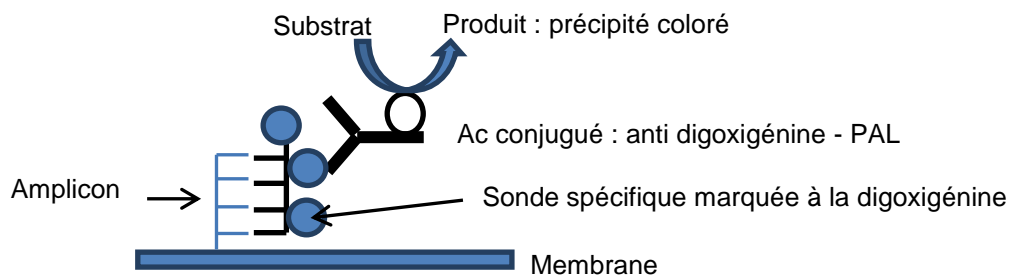
Couples	Amorces	Tm (°C)
1	A	$= 2 \cdot (3+9) + 4 \cdot (3+6) = 60$
	B	$= 2 \cdot (9+4) + 4 \cdot (2+4) = 50$
2	C	$= 2 \cdot (6+6) + 4 \cdot (6+2) = 56$
	D	$= 2 \cdot (5+4) + 4 \cdot (4+6) = 58$

Couple 2 plus adapté car :

Différence de Tm entre les deux amorces inférieure à 5°C (supérieure à 5°C pour le couple 1)

Température d'hybridation de 51°C inférieure à celles des amorces (pas le cas pour l'amorce B du couple 1).

1.2.3 - Immunomarquage de l'amplicon



2 - Toxines marines et effets cellulaires

2.1 -

2.1.1 - Toxicité aiguë : troubles observables rapidement (entre 1 et 14 j) provoqués par un contact unique (ou répété sur moins de 24 h) avec une dose élevée de toxique.

Toxicité chronique : troubles observables tardivement (plus de 1 mois de délai) provoqués par des contacts multiples, avec des doses faibles de toxique.

2.2 -

2.1.2.1 - Milieu non complet :

Composants	Rôles
Acides aminés	Source d'azote
Glucose	Source de C et d'énergie
Sels minéraux	Pression osmotique, cofacteurs enzymatiques, adhésion des cellules sur le support.
Vitamines	Facteurs de croissance, précurseur de cofacteurs enzymatiques
HCO ₃ ⁻	Système tampon avec le CO ₂ atmosphérique
Indicateur coloré de pH	Contrôle de l'efficacité du système tampon, détection d'une contamination
Eau	Solvant, hydratation, P.O.

2.1.2.2 - Rôle SVF :

Apport de facteurs de croissance et nutriments essentiels : hormones stimulant la croissance, vitamines, acides aminés, oligo-éléments ;

Permet l'adhésion par apport de fibrinogène ;

Blocage de l'activité de la trypsine grâce à l' α 1-antitrypsine lors d'un ajout après trypsination.

2.1.2.3 - Ajout extemporané de L-glutamine : acide aminé instable qui se dégrade dans le temps.

2.1.2.4 - EDTA : chélateur de Ca²⁺ et Mg²⁺ qui favorisent l'adhésion cellulaire. Permet de faciliter la séparation cellulaire lors de la trypsination.

2.2 -

2.2.1 - A : l'arrivée d'un potentiel d'action axonal provoque l'ouverture de canaux voltages dépendant au calcium et l'entrée de calcium dans la terminaison axonale.

B : le calcium provoque l'exocytose des vésicules synaptiques et la libération du neurotransmetteur (acétylcholine) dans la fente synaptique.

C : le neurotransmetteur se fixe sur des récepteurs-canaux spécifiques, localisés dans la membrane post-synaptique.

D : la fixation du neurotransmetteur provoque l'ouverture des canaux, une entrée de Na⁺ et une dépolarisation à l'origine d'un potentiel d'action et de la contraction musculaire.

2.2.2 - La saxitoxine empêche l'entrée de calcium donc bloque la communication neuromusculaire et empêche la contraction musculaire.

2.3 -

2.3.1 - La courbe représente le pourcentage de l'effet maximal lié à une augmentation logarithmique de la concentration en histamine pour des concentrations croissantes de diphenhydramine (=principe actif PA).

On observe que l'augmentation de la concentration en PA ne modifie pas l'effet maximal de l'histamine (donc ne modifie pas son efficacité), par contre la dose efficace 50 est augmentée (donc le PA s'oppose à l'histamine). On en déduit que le PA agit par compétition = antagoniste compétitif.

2.3.2 - La fixation d'un ligand (histamine) sur un récepteur couplé à une protéine G se traduit par les étapes suivantes :

- activation du récepteur par le ligand,
- le récepteur active la protéine G,
- la protéine G régule l'activité d'un effecteur enzymatique,
- le taux de second messager produit par l'effecteur est modulé, ce qui permet la réponse cellulaire.

Éléments de corrigé de sciences et technologie bioindustrielles 2015

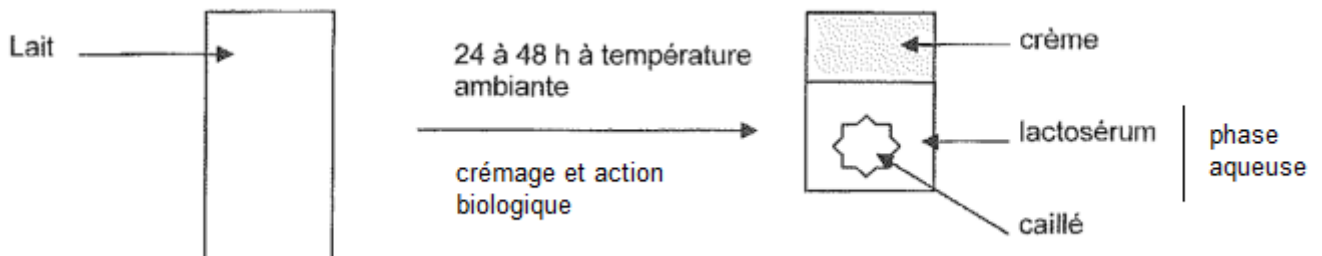
FROMAGE AOC BANON

1 - Fabrication

1.1- Le lait cru

1.1.1- Le lait comporte trois phases.

- Solution (phase aqueuse) : solutés solubles en phase aqueuse. Glucides, protéines solubles, vitamines hydrosolubles, sels minéraux.
- Suspension colloïdale : phase solide dispersée dans la phase aqueuse. Micelles de caséine (protéine insoluble), cellules.
- Émulsion : phase liquide dispersée sous forme de fines gouttelettes dans la phase aqueuse. Globules gras (lipides).



1.1.2 - Enzyme : Phosphatase alcaline. L'absence de cette enzyme indique qu'il y a eu chauffage à une température supérieure à 60°C (exemple en cas de basse pasteurisation, 63°C / 20 minutes).

1.1.3 - Avantages : qualités organoleptiques (odeur, saveur ...) et nutritionnelles (vitamines ...) maintenues. Inconvénients : présence possible de bactéries pathogènes (*Listeria*) ou d'altération (*Clostridium tyrobutyricum* ou de ses spores) ce qui implique un transport (après collecte) vers l'usine de fromage très rapide et une transformation rapide aussi.

1.2 - Les additifs alimentaires

1.2.1 - Additif : substance habituellement non consommée comme aliment en soi, ajoutée dans un but de conservation ou d'amélioration des propriétés organoleptiques, et donc présent dans le produit fini.

1.2.2 - Présure : (biomolécule) protéine : il s'agit plus précisément de l'enzyme chymosine. Ferments (lactiques et d'affinage) : (organismes vivants) bactéries, levures, moisissures.

1.2.3 - La présure entraîne une coagulation enzymatique, transformant le lait en gel, pour laquelle on distingue trois phases :

- Hydrolyse des caséines
- Agrégation des micelles de caséine
- Réticulation : formation d'un gel

1.2.4 - Actions des ferments lors de l'affinage :

Toutes ces réactions contribuent à l'évolution des qualités organoleptiques (arôme, saveur, texture) et à la conservation du fromage.

- Fermentation du lactose résiduel, et consommation de l'acide lactique.
- Lipolyse et protéolyse, suivies de réactions de dégradation des acides gras et acides aminés.

2 - Signes de qualité

2.1- L'étiquette : premier élément de transparence

2.1.1 - Les objectifs de l'étiquetage sont divers:

- Le respect de la réglementation (pour une information juste des consommateurs et la loyauté des transactions entre les intervenants de la filière).
- La mise en valeur du produit.
- La traçabilité

2.1.2 - Légendes :

- 1: origine
- 2: taux de matière grasse sur le produit fini - mention obligatoire
- 3 : dénomination de vente • mention obligatoire
- 4 : nom de la fromagerie et son adresse -mention obligatoire
- 5 : la marque de salubrité ou estampille vétérinaire - mention obligatoire
- 6 : la quantité nette - mention obligatoire
- 7 :signes de qualité du produit

2.1.3 - FR : pays d'origine.

04 : Département, 018 : Commune, 01 : Etablissement ou 04.018.01 : n°d'agrément.

C.E. : Union Européenne.

Assurance du contrôle sanitaire des installations par les services vétérinaires sur les produits d'origine animale, en conformité avec la réglementation européenne.

2.1.4 - DLC : date limite de consommation. DLUO : date limite d'utilisation optimal, désormais DDM date de durabilité minimale.

DLC : pour les denrées pouvant présenter un risque sanitaire après la date du fait de la présence naturelle de microorganismes.

DLUO ou DDM : pour les denrées à plus longue conservation mais date au-delà de laquelle les qualités nutritionnelles et organoleptiques peuvent s'altérer.

Pour le fromage, la date indiquée est une DLUO ou DDM car les opérations de fabrication permettant une plus longue conservation du produit sont :

- stockage du lait au froid lors de la réception : éviter la multiplication microbienne
- filtration :élimine les impuretés
- ajout de ferments lactiques pour le caillage, donc fermentation lactique et donc diminution du pH. On peut également noter que cet ajout crée un "effet de concurrence": la flore technologique limite l'installation de la flore pathogène
- égouttage et salage donc diminution de l'aw, cette diminution se poursuit aussi lors de l'affinage.

2.2 - L'AOC : la garantie officielle de qualité

2.2.1 - AOC :Appellation d'Origine Contrôlée.

Garantit la spécificité du fromage liée au terroir et au savoir-faire local.

AOP : Équivalent européen de l'AOC. Protège le nom du produit dans tous les pays de l'Union Européenne.

2.2.2 - Examen méthodique et indépendant permettant de s'assurer de la conformité des actions menées aux exigences d'un référentiel.

Audit interne et audit externe (réalisé, pour le premier, par le service qualité de l'entreprise, par une personne extérieure à l'entreprise pour le second). D'autres réponses possibles : audit d'évaluation, de qualification/certification, audit de suivi.

2.2.3 - INAO : Institut national de l'origine et de la qualité.

Établissement public chargé de délivrer les signes officiels de qualité et de gérer les contrôles.

2.2.4 - COFRAC (ou comité français d'accréditation).

2.3 - Les contrôles

- tests microbiologiques : dénombrement de *E.coli*, *Staphylococcus* à coagulase positive, recherche de *Salmonella*, *Listeria*...
- tests concernant l'origine du produit (tests immunologiques pour vérifier que la matière première est bien du lait de chèvre), analyse documentaire (traçabilité race laitière, atelier, mode d'élaboration...)
- tests organoleptiques (texture, saveur, odeur).

3 - Traitement du lactosérum

3.1 - Le lactosérum : un coproduit de fabrication

3.1.1 - Coproduit : produit - intentionnel, inévitable - résultant d'un process industriel de transformation d'une matière première, dont la valorisation est totale.

Déchet : résidu de production qui n'est pas valorisé ; il est destiné à l'abandon.

Le lactosérum est un coproduit car il est valorisé et donc pas destiné à l'abandon.

3.1.2 - Ex : déchets de la filière viande : os transformées en farines animales pour la nourriture des poissons.

3.2 - Étude des étapes de préparation des isolats de protéines sériques (IPL)

3.2.1 - Chromatographie d'échange d'ions

3.2.1.1 - Principe :

Séparation par migration différentielle selon leur charge, de solutés déposés sur une phase stationnaire et entraînés par la phase mobile. La séparation est la résultante de la force de rétention liée à l'affinité du soluté pour la phase stationnaire et de la force d'entraînement par l'éluant.

Les interactions entre les solutés et la phase stationnaire sont des liaisons ioniques, qui s'établissent avec les groupements fonctionnels ionisés de l'échangeur. Les groupements fonctionnels échangent leurs contre-ions avec les ions de la solution.

3.2.1.2 - Caractéristiques techniques :

Le support est de nature organique, c'est un polymère d'ester d'acide méthacrylique.

→ L'échangeur d'ions est une résine échangeuse d'ions.

Les groupements fonctionnels sulfopropyl fixés sur le support échangent des cations.

→ L'échangeur d'ions est une résine cationique sulfonique.

La concentration en NaCl de l'éluant augmente.

→ Il y a élution par augmentation de la force ionique.

Des éluants de concentration différentes sont successivement utilisés.

→ L'élution est réalisée en gradient discontinu.

3.2.1.3 - Étapes :

Équilibrage : permet l'ionisation des groupements fonctionnels.

Fixation : dépôt de la solution à traiter et fixation des ions et protéines ionisées sur les groupements fonctionnels.

Lavage : élimination des molécules non retenues par l'échangeur d'ions.

Élution : déplacement des ions fixés, provoqué par augmentation de la force ionique de l'éluant.

Régénération de l'échangeur : ionisation des groupements fonctionnels sous leur forme initiale (non ionisée).

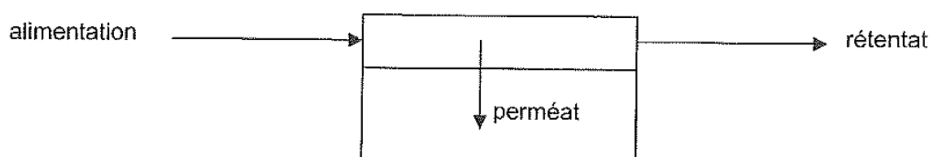
3.2.2 - Ultrafiltration

Procédé de séparation soluté-solvant selon le phénomène d'exclusion de taille, par passage sélectif à travers une membrane semi-perméable, sous l'action d'une pression transmembranaire.

L'écoulement du liquide à filtrer est tangentiel et continu.

La phase liquide contenant les solutés retenus par la membrane se concentre. Elle est appelée le rétentat.

La phase liquide qui traverse la membrane est appelée le perméat. Le concentré de protéines correspond au rétentat.





<http://www.upbm.org>