

EPREUVE E5. UNITÉ U52**Réalisation pratique d'opérations techniques**

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

ANALYSE ET CONTROLE DE SOLUTIONS DE NETTOYAGE ET D'ENTRETIEN DE LENTILLES DE CONTACT.**BIOCHIMIE (70 points)**

Durée : 4 H

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début de séance.

On se propose de déterminer :

- l'activité protéasique d'une solution de déprotéinisation des lentilles de contact (solution A) ;
- la teneur en peroxyde d'hydrogène d'une solution de décontamination des lentilles (solution B).

1 - Détermination de l'activité protéasique spécifique (solution A). (50 points)**1.1 - Réactifs.**

- Solution L-BAPNA-DMSO à 0,025 mol.L⁻¹.
- DMSO.
- Tampon Tris 10X.
- Tampon Tris dilué DMSO.
- Solution A : échantillon A1.
- Solution A : échantillon A2.
- Réactif Rc (en distributeur).
- Solution de SAB à 1,6 mg.mL⁻¹.
- Eau physiologique.

1.2 - Mesure de la concentration d'activité catalytique de la solution A.

La solution A est obtenue en dissolvant un comprimé de protéase dans 10 mL d'une solution tamponnée.

On opère sur l'échantillon A1, partie adiquote de la solution A.

1.2.1 - Principe.

La mesure est faite par méthode cinétique. Le substrat utilisé est le L-BAPNA (N-benzoyl-arginyl-L-paranitroanilide). Ce substrat, solubilisé par addition de diméthylsulfoxyde (DMSO), est hydrolysé en présence de protéase suivant la réaction :



Le PNA est coloré en jaune : on peut suivre son apparition par spectrophotométrie à 405 nm.

1.2.2 - Mode opératoire.

- Préparation de la solution de travail « ST ».

Au moment de l'emploi, introduire dans une fiole jaugée de 10 mL :

- L-BAPNA-DMSO à 0,025 mol.L⁻¹ : 0,5 mL ;
- DMSO : 1,5 mL ;
- Tampon Tris 10 X : 1 mL.

Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- Dosage (2 essais).

Dans une cuve de 1 cm de trajet optique, introduire successivement :

- Solution de travail « ST » 1,5 mL ;
- tampon Tris dilué DMSO 0,5 mL.

Préincuber à 30°C pendant 10 minutes. Faire le zéro du spectrophotomètre sur l'eau distillée.

Déclencher la réaction en ajoutant 0,05 mL d'échantillon A1 puis placer la cuve dans son compartiment thermostaté à 30°C. Faire une mesure d'absorbance toutes les 15 secondes pendant 2 minutes.

1.2.3 - Compte rendu et résultats.

A l'aide de l'ordinateur, tracer la courbe $A(405 \text{ nm}) = f(\text{temps})$. Rendre un graphique légendé.

En déduire la vitesse initiale en unités d'absorbance par minute.

Etablir la formule littérale donnant la concentration d'activité catalytique en U.mL^{-1} et faire l'application numérique.

Donnée : absorbance linéique molaire du PNA : $\epsilon_{405\text{nm}} = 11000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

1.3 - Dosage des protéines de la solution A.

On opère sur l'échantillon A2, partie aliquote de la solution A.

La méthode proposée utilise le bleu de Coomassie d'un réactif commercial prêt à l'emploi (réactif « Rc »).

1.3.1 - Mode opératoire.

- Gamme d'étalonnage.

A partir d'une solution de SAB à $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$, préparer une solution fille à $16 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans une fiole jaugée de 10 mL (diluante = eau physiologique).

Dans 6 cuves de spectrophotomètre, verser respectivement des volumes de solution fille croissants de 0 mL à 1 mL. Compléter chaque cuve à 1 mL avec de l'eau physiologique.

Puis ajouter 1 mL de réactif « Rc » dans chaque cuve. Attendre 10 minutes et lire à 595 nm contre le blanc-réactif.

- Essais : 2 essais seront préparés comme suit :

- échantillon A2 dilué au 1/5 1 mL ;
- réactif « Rc » 1 mL.

Traiter dans les mêmes conditions que la gamme.

1.3.2 - Compte rendu et résultats.

Compléter la feuille de relevés des valeurs expérimentales.

A l'aide de l'ordinateur, donner l'équation de la droite de régression ainsi que le coefficient de corrélation.

Calculer la concentration massique en protéines de l'échantillon A2 (la précision du dosage est évaluée à 3 %).

1.4 - Conclusion.

Calculer l'activité spécifique de la solution A en U.mg^{-1} .

Calculer la teneur en protéines d'un comprimé et en déduire le nombre d'unités protéasiques par comprimé.

2 - Dosage du peroxyde d'hydrogène (solution B). (20 points)

2.1 - Réactifs.

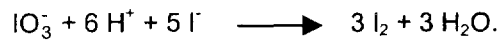
- Solution de thiosulfate de sodium à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.
- Solution d'iodure de potassium à 100 g.L^{-1} .
- Iodate de potassium (au dessiccateur).
- Acide sulfurique dilué au 1/5 (dans un distributeur).

- Empois d'amidon.
- Solution de molybdate d'ammonium à 50 g.L⁻¹.
- Solution B.

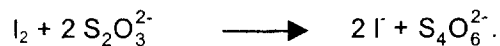
2.2 - Etalonnage de la solution de thiosulfate de concentration voisine de 0,1 mol.L⁻¹.

2.2.1 - Principe.

En milieu acide, l'iodate de potassium oxyde les ions iodure I⁻ en diiode suivant la réaction :



Le diiode libéré est dosé par la solution de thiosulfate suivant la réaction :



2.2.2 - Mode opératoire.

Préparation de la solution étalon d'iodate de potassium.

Faire une pesée exacte voisine de 0,25 g d'iodate de potassium pur. Dissoudre dans de l'eau distillée et transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 50 mL. Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Dosage (2 essais).

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL introduire :

- solution d'iodate 10 mL ;
- eau distillée 10 mL ;
- solution de KI à 100 g.L⁻¹ 10 mL ;
- H₂SO₄ dilué au 1/5 5 mL.

Agiter et laisser reposer 5 minutes.

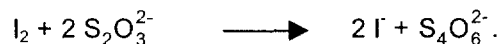
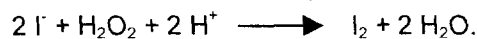
Doser par la solution de thiosulfate jusqu'à virage à l'incolore (possibilité d'utiliser l'empois d'amidon pour apprécier le virage).

2.3 - Dosage du peroxyde d'hydrogène.

2.3.1 - Principe.

En milieu acide, le peroxyde d'hydrogène oxyde les ions iodure I⁻ en diiode I₂.

Le diiode libéré est dosé par la solution de thiosulfate précédemment étalonnée :



2.3.2 - Mode opératoire (2 essais).

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, verser successivement :

- eau distillée 100 mL ;
- solution de KI à 100 g.L⁻¹ 10 mL ;
- H₂SO₄ au 1/5 5 mL ;
- solution de molybdate d'ammonium à 50 g.L⁻¹ 1 mL ;
- solution B 0,5 mL.

Agiter, puis laisser reposer 5 minutes.

Doser par la solution de thiosulfate jusqu'à virage à l'incolore (possibilité d'utiliser l'empois d'amidon pour apprécier le virage).

2.4 - Compte rendu et résultats.

Etablir la formule littérale permettant de calculer la concentration molaire de la solution de thiosulfate, puis effectuer l'application numérique.

Etablir la formule littérale permettant de calculer la concentration molaire de la solution B en peroxyde d'hydrogène (mol.L⁻¹). Faire l'application numérique.

Exprimer ce résultat en volume de dioxygène que peut dégager un litre de solution B par auto oxydo-réduction, sachant qu'une mole de H₂O₂ libère 11,2 litres d'O₂ (H₂O₂ → H₂O + ½ O₂).

<u>Données :</u>	K	I	O
M (g.mol ⁻¹) :	39,1	127	16

DANS CE CADRE

Académie : _____ Session : _____

Examen ou Concours _____ Série* : _____

Spécialité/option* : _____ Repère de l'épreuve : _____

Épreuve/sous-épreuve : _____

NOM : _____

(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms : _____ N° du candidat

Né(e) le : _____

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

Repère: BCREA1/A

SESSION 2001

Durée : 10 H

Page : 4/4

Coefficient : 8

NE RIEN ÉCRIRE

NUMERO DE POSTE :

FEUILLE DE RESULTATS

A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE

MESURE DE LA CONCENTRATION D'ACTIVITE CATALYTIQUE DE LA SOLUTION A :

Temps (secondes)	0	15	30	45	60	75	90	105	120
Absorbance (405nm)									

DOSAGE DES PROTEINES DE LA SOLUTION A :

N° cuve	0	1	2	3	4	5	Essai 1	Essai 2
Volume de solution SAB 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (mL)								
Volume de l'échantillon A ₂ dilué (mL)								
Masse de protéines (μg)								
Absorbance à 595 nm								

ETALONNAGE DE LA SOLUTION DE THIOSULFATE :

Masse d'iodate pesée (g) =

Volumes de thiosulfate versés (mL) = V_1 :

V_2 :

DOSAGE DE H₂O₂ DANS LA SOLUTION B :

Volumes de thiosulfate versés (mL) = V_3 :

V_4 :

EPREUVE E5. UNITÉ U52**Réalisation pratique d'opérations techniques**

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

ANALYSE ET CONTROLE DE SOLUTIONS DE NETTOYAGE ET D'ENTRETIEN DE LENTILLES DE CONTACT.**MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**
(90 points)

1er jour

Durée : 4 H 30**I - MICROBIOLOGIE** (50 points)

Le port de lentilles de contact nécessite un nettoyage quotidien avec une solution qui contient, entre autres, un conservateur. Celui-ci permet de garder la solution stérile.

Les larmes contiennent une certaine quantité de protéines entraînant une légère opacification des lentilles. Il est donc nécessaire de procéder à une déprotéinisation régulière à l'aide d'une protéase : la subtilisine.

1 - Préparation et dénombrement des micro-organismes de la suspension inoculum.

La norme européenne relative aux antiseptiques et désinfectants (NF EN 1040, 1997) prévoit une réduction minimale de 99,999 % du nombre de bactéries avec un temps de contact de 15 minutes.

1.1 – Matériel.

- 4 cuves de spectrophotomètre.
- 4 morceaux de parafilm.
- 1 bouillon nutritif ordinaire.
- 7 tubes de 9 mL d'eau.
- 8 pipettes de 1 mL.
- 6 x 15 mL de milieu P.C.A en surfusion.
- 6 boîtes de Pétri.

1.2 – Protocole opératoire.

La souche test *Staphylococcus aureus* notée « S₁ » est cultivée en bouillon nutritif ordinaire.

- Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre réglé à 600 nm.
- Ajuster cette suspension à environ 0,1 UA : on obtient la suspension S₂.

Appeler un examinateur pour la mesure de l'absorbance.

Donnée : 0,1 UA correspond à environ $1,5 \cdot 10^8$ bactéries/mL.

- A partir de cette relation, dénombrer par ensemencement dans la masse, les micro-organismes de S₂ sur 3 dilutions en double.
- Incuber à 37°C.

1.3 – Compte rendu.

Justifier les calculs pour le choix des dilutions.

2 – Contrôle du pouvoir bactéricide du conservateur.

2.1 – Matériel.

- 1 culture de *Staphylococcus aureus* en bouillon nutritif ordinaire notée « C » ajustée à 0,1 UA (au réfrigérateur).
- 1 tube de 8 mL de conservateur noté « conservateur ».
- 1 tube d'eau distillée : 2 mL.
- 2 pipettes de 1 mL.
- 1 pipette automatique + cône.
- 1 fiole d'Erlenmeyer contenant 50 mL d'eau stérile notée « eau 50 mL ».
- 1 filtre Millipore.
- 1 milieu P.C.A. coulé en petite boîte de Pétri.
- 1 chronomètre.
- 10 mL d'eau stérile notée « rinçage ».

2.2 – Principe.

Après un temps de contact de 15 minutes, la vérification de la neutralisation du conservateur doit se faire par une méthode validée. Celle-ci consiste en une filtration sur membrane. Le dénombrement des bactéries survivantes est effectué et la réduction du nombre de cellules viables est calculée.

2.3 – Protocole opératoire.

Dans le tube de conservateur (volume 8 mL), introduire successivement :

- 1 mL de la suspension inoculum C ;
- 1 mL d'eau distillée.

Agiter.

Laisser en contact 15 minutes.

Prélever 0,1 mL du mélange et le transférer dans 50 mL d'eau en fiole d'Erlenmeyer notée « eau 50 mL ».

Mélanger puis filtrer immédiatement.

Déposer le filtre sur la boîte de gélose P.C.A.

Incuber à 37°C.

Appeler un examinateur pour la filtration.

2.4 – Compte rendu.

Quel est le nombre initial de cellules que l'on filtre ? Après action du conservateur, combien de bactéries survivantes devrait-on au maximum obtenir ?

3 - Dosage de la production de subtilisine.

Afin d'obtenir une production maximale de subtilisine, 3 milieux de culture sont testés : M1, M2, M3.

3.1 – Matériel.

- 3 milieux de culture M1, M2, M3 préincubés à 37° C avec la souche *Bacillus subtilis*.
- 1 solution de subtilisine 2 mL notée « solution mère de subtilisine à 0,04 mg/mL ».
- 5 tubes à hémolyse stériles.
- 1 tube eau distillée 10 mL.
- 1 emporte-pièce.
- 1 boîte d'agar à la gélatine notée « gel ».
- 1 pipette automatique P 100 + cônes.
- 1 gabarit (voir annexe microbiologie).

3.2 – Protocole opératoire.

A partir de la solution mère de subtilisine, réaliser une gamme de dilution de raison $\frac{1}{2}$ et de volume final 2 mL : prévoir 5 concentrations.

Creuser 12 puits dans une boîte d'agar à la gélatine suivant gabarit donné en annexe.

Déposer 50 μ L de la solution mère et de chaque dilution.

Déposer en double 50 μ L de chaque culture M1, M2, M3.

Incuber à 37° C.

3.3 – Compte rendu.

Présenter sous forme de tableau la réalisation de la gamme d'étalonnage.

II – BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE (40 points)**TOXICOLOGIE IN VITRO**

La solution de déprotéinisation, destinée à éliminer les dépôts de protéines lacrymales sur les lentilles de contact, contient de la subtilisine A extraite de *Bacillus subtilis*. L'activité protéolytique doit être ajustée de manière :

- à assurer une activité déprotéinisante satisfaisante au bout de 6 heures de contact avec les lentilles (temps de contact préconisé sur la notice d'utilisation) ;
- à garantir l'innocuité du traitement pour l'utilisateur, notamment dans le cas où les lentilles seraient insuffisamment rincées après déprotéinisation. La subtilisine, à cause de son activité protéolytique, est susceptible de provoquer, sous certaines conditions, des altérations de la cornée.

Pour évaluer ces risques, la solution déprotéinisante doit faire l'objet de tests toxicologiques. L'activité protéolytique de la subtilisine est ainsi évaluée d'une part sur la membrane plasmique d'hématies de mouton (GRM), d'autre part sur des cellules animales en culture.

1 - Evaluation sur GRM.**1.1 – Principe.**

Des dilutions de subtilisine sont incubées à 37°C avec des GRM. L'activité toxique est mesurée au bout de 30 minutes par observation de l'hémolyse obtenue.

Deux échantillons (A et B) de subtilisine sont testés.

1.2 - Matériel et réactifs.

- Suspension de GRM à 50 % (v/v) dans un tampon isotonique neutre. Volume 0,5 mL.
- Echantillon A de subtilisine à 0,08 g.dm⁻³, tube étiqueté « A », volume 0,5 mL.
- Echantillon B de subtilisine à 0,4 g.dm⁻³, tube étiqueté « B », volume 0,5 mL.
- Tampon phosphate isotonique et neutre, tube étiqueté « T », volume 4 mL.
- Solution hémolysante, tube étiqueté « solution hémolysante », volume 0,5 mL.
- Microplaque de 96 puits à fond rond avec couvercle.
- Etuve à 37°C.

1.3 - Mode opératoire.

1.3.1 - Préparer 2,5 mL de GRM à 2 % à partir de la suspension à 50 % et du tampon.

1.3.2 - Réalisation du test.

Déposer 100 μ L d'échantillon A en A1 et A2.

Déposer 100 μ L d'échantillon B en B1 et B2.

A partir de A2 d'une part, de B2 d'autre part, réaliser des dilutions en série de raison $\frac{1}{2}$, depuis la dilution $\frac{1}{2}$ (respectivement en A2 et B2) jusqu'à la dilution $\frac{1}{2048}$ (respectivement en A12 et B12).

Les dilutions sont réalisées avec le tampon. Le volume final est de 100 μ L.

Utiliser la ligne C pour les témoins :

- témoin 0 % d'hémolyse ;
- témoin 50 % d'hémolyse ;
- témoin 100 % d'hémolyse.

Remarque : pour le témoin « 50 % d'hémolyse », il faut obtenir, après sédimentation, un culot de GRM égal à 50 % de celui du témoin 0 %. Ce témoin sera réalisé à partir de GRM et de tampon phosphate.

Homogénéiser la suspension de GRM à 2 % et en déposer 50 µL dans chaque puits des lignes A et B. Réaliser également les dépôts nécessaires pour les témoins.

Agiter la plaque 2 minutes sur agitateur, placer le couvercle et incuber 30 minutes dans l'étuve à 37°C.

Sortir la plaque et la placer à + 4 °C.

1.4 – Compte rendu.

Compléter la feuille de résultats et la remettre avec la copie.

2 - Préparation d'une suspension cellulaire destinée à l'évaluation de l'activité protéolytique de la subtilisine.

2.1 - Matériel et réactifs.

- Sous la hotte à flux laminaire :

- pipettes stériles de 5 mL ;
- pipettes stériles de 1 mL et de 2 mL ;
- 1 tube à hémolyse stérile ;
- 1 flacon de 25 cm² de culture cellulaire en monocouche dans du milieu RPMI additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) ;
- 1 flacon de 7 mL de tampon PBS stérile sans calcium ni magnésium, étiqueté « PBS » ;
- 1 tube de 1,5 mL de trypsine stérile, étiqueté « trypsine » ;
- 1 flacon de 7 mL de solution de Earle stérile enrichie à 10 % avec du SVF, étiqueté « EARLE + 10 % SVF » ;
- 1 récipient pour récupération des liquides souillés ;
- 1 récipient pour récupération du matériel souillé.

- Au poste de travail :

- 1 hématimètre de Malassez avec lamelle planée ;
- 1 chambre humide ;
- 1 tube de 1 mL de bleu Trypan à 0,2 %, étiqueté « bleu Trypan ».

2.2 - Préparation de la suspension cellulaire.

2.2.1 - Examens de la culture.

Réaliser :

- un examen macroscopique ;
- un examen microscopique au microscope inversé.

Noter les résultats sur le compte rendu.

2.2.2 - Trypsinisation.

Réaliser en 25 minutes maximum, sous hotte à flux laminaire, les opérations suivantes :

- éliminer le milieu de culture par retournement du flacon ;
- réaliser un lavage du tapis cellulaire avec 5 mL de PBS ;
- éliminer le PBS puis introduire 1 mL de trypsine. Laisser agir 30 secondes sous la hotte puis rejeter l'excédent de trypsine en ne laissant qu'une fine couche de liquide sur les cellules ;
- laisser agir quelques minutes à l'incubateur à 37°C, puis surveiller le décollement du tapis.

Lorsque les cellules sont en suspension, ajouter 5 mL de solution de EARLE à 10 % de SVF et homogénéiser.

Transférer 500 µL de suspension dans le tube à hémolyse stérile.

La suite des opérations sera réalisée au poste de travail à partir du tube à hémolyse préparé.

2.2.3 - Numération.

Ajouter dans le tube 500 μL de bleu Trypan à 0,2 % et homogénéiser.

Effectuer la numération des cellules viables et totales en cellule de Malassez.

Lors du comptage, dénombrer obligatoirement les 10 rectangles de la première rangée horizontale en haut du champ. Présenter le champ microscopique à un examinateur.

Poursuivre librement le comptage.

La cellule de Malassez comporte une chambre de 1 mm^3 divisée en 100 rectangles.

Compléter la feuille de résultats pour le dénombrement de la première rangée horizontale de 10 rectangles.

Présenter, sur le compte rendu, l'ensemble des résultats de la numération :

- nombre total de rectangles dénombrés ;
- nombre total de cellules comptées ;
- nombre de cellules viables comptées.

Calculer le nombre de cellules totales par mL de suspension.

Calculer le pourcentage de viabilité.

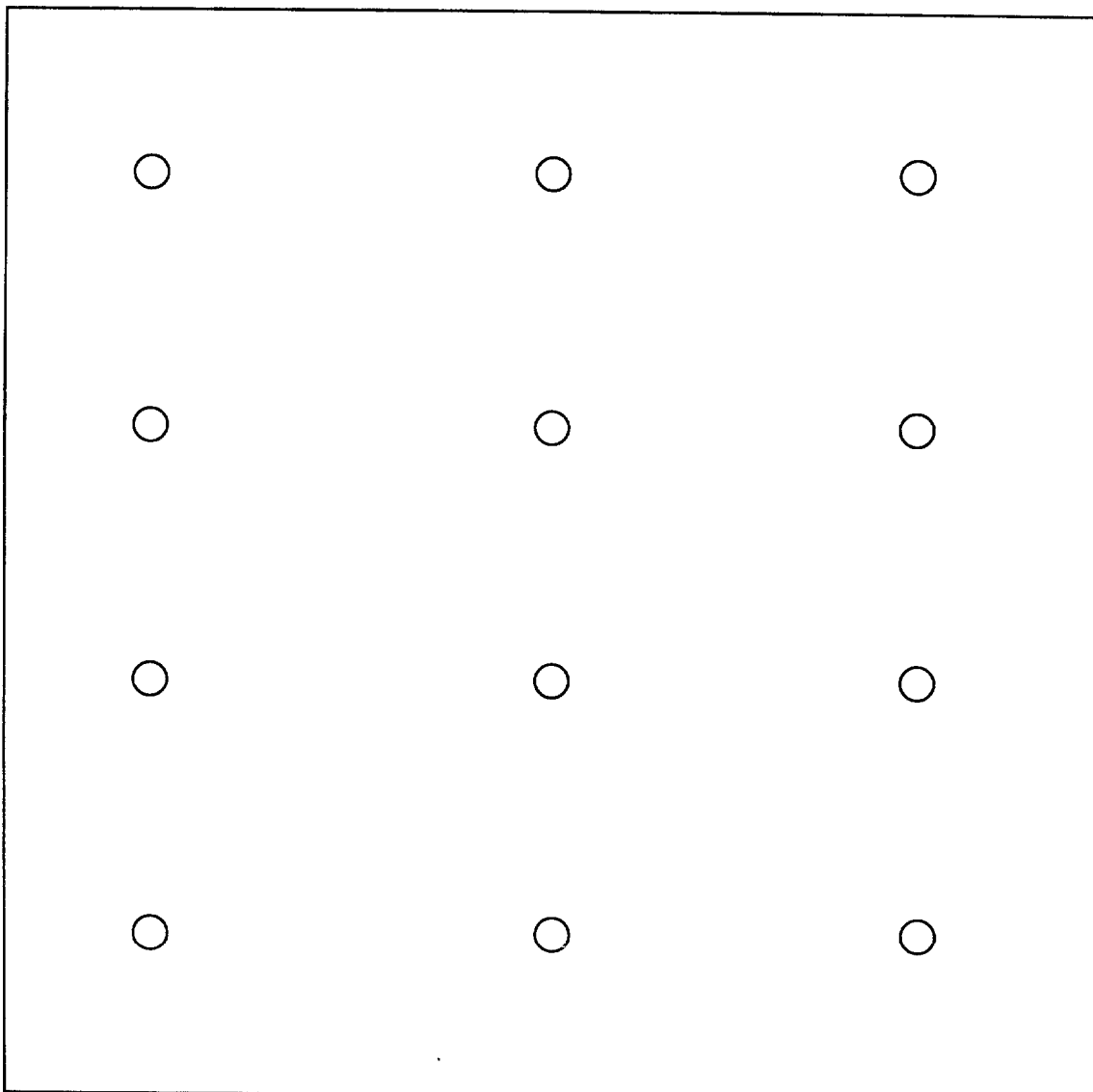
Pour les tests toxicologiques in vitro, ces cellules doivent être déposées dans une microplaque à raison de 8 000 cellules viables par puits. Calculer le volume de suspension cellulaire à déposer dans chaque puits.

MICROBIOLOGIE

ANNEXE

GABARIT POUR CREUSEMENT DES PUIITS.

Boîte de 150 mm avec 12 puits



Académie : _____ Session : _____

Examen ou Concours _____ Série* : _____

Spécialité/option* : _____ Repère de l'épreuve : _____

Épreuve/sous-épreuve : _____

NOM : _____

(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms : _____ N° du candidat

Né(e) le : _____ (le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

Repère: BCREA1/B

SESSION 2001

Durée : 10 H

Page : 7/7

N° DE POSTE :

Coefficient : 8

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

FEUILLE DE RESULTATS

1 - Evaluation sur GRM

1-1 – Réalisation de la suspension de GRM à 2 % (v/v).

Volume de suspension à 50 %	
Volume de tampon	
Dilution réalisée	

1-2 – Réalisation des dilutions en série (volumes donnés en μL).

N° puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Echantillon A ou B	100	100										
Tampon												
Redistribution												
Dilution	1/1	1/2										1/2048

1-3 – Réalisation des témoins (volumes donnés en μL).

Témoin	Hémolyse 0 %	Hémolyse 50 %	Hémolyse 100 %
Volume tampon			
Volume solution hémolysante			
Volume GRM à 2 %			

2 - Préparation d'une suspension cellulaire

Résultats du dénombrement de la 1^{ère} rangée horizontale de 10 rectangles.

- nombre total de cellules (viables + non viables) dans la première rangée horizontale de 10 rectangles.
- règles adoptées pour le dénombrement de cette première rangée (cellules qui chevauchent les bords).

Calcul du volume de suspension cellulaire à déposer dans chaque puits.

B.T.S. BIOCHIMISTE

EPREUVE E5. UNITÉ U52**Réalisation pratique d'opérations techniques**

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

ANALYSE ET CONTROLE DE SOLUTIONS DE NETTOYAGE ET D'ENTRETIEN DE LENTILLES DE CONTACT.**MICROBIOLOGIE – BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**
(90 points)

2ème jour

Durée : 1 H 30**I - MICROBIOLOGIE** (50 points)**1 - Préparation et dénombrement des micro-organismes de la suspension inoculum.**

Compter les colonies.

En déduire la concentration cellulaire de la suspension S_2 .**2 - Contrôle du pouvoir bactéricide du conservateur.**

Compter les colonies sur le filtre.

En déduire le nombre de bactéries viables dans le volume d'inoculum filtré.

Le taux de réduction minimum de 99,999 % est-il vérifié ? Justifier.

3 - Dosage de la production de subtilisine.**Respecter les consignes de sécurité données en début de séance pour la manipulation du réactif de révélation.**

Inonder les boîtes avec environ 2 à 3 mL de « solution de révélation ».

Laisser en contact 3 à 4 minutes puis aspirer l'excès de la solution.

Mesurer les diamètres d'hydrolyse de la gélatine.

A l'aide de l'ordinateur, tracer la courbe : diamètre (en mm) = f (log [subtilisine]).

En déduire le taux de production de subtilisine dans les trois milieux M1, M2, M3.

Quel est le milieu le plus adapté à cette production ?

II – BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE (40 points)**TOXICOLOGIE IN VITRO****Evaluation sur GRM.****1 - Matériel.**

Miroir de lecture pour l'observation des culots de sédimentation.

2 - Lecture.

Observer les résultats des témoins réalisés.

A l'aide des résultats des témoins, évaluer l'hémolyse dans chaque puits des lignes A et B.

L'hémolyse sera exprimée selon les critères suivants :

- 0 % absence d'hémolyse ;
- 50 % aspect du témoin correspondant pour le culot de GRM ;
- 100 % aspect du témoin correspondant ;
- 25 % hémolyse comprise entre 0 et 50 % ;
- 75 % hémolyse comprise entre 50 et 100 %.

Aussitôt la lecture terminée, replacer le couvercle et faire contrôler la plaque par un examinateur.

Remarques importantes :

- pour le témoin 50 % réalisé, seul l'aspect du culot de GRM doit être pris en compte. Ce témoin, s'il a été réalisé conformément aux indications fournies le premier jour, ne doit pas présenter de surnageant hémolysé ;
- si le candidat estime que les témoins réalisés ne donnent pas les résultats attendus et ne permettent pas la lecture des lignes A et B, il peut demander la fourniture de témoins conformes. Cette demande entraînera une sanction dans la notation.

3 - Compte rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Calculer, s'il y a lieu, pour chaque échantillon de subtilisine :

- la plus petite concentration provoquant 100 % d'hémolyse ;
- la plus forte concentration ne provoquant aucune hémolyse.

Exprimer les résultats en mg.dm^{-3} .

A l'issue de ces tests, quel échantillon semble le plus adapté aux exigences d'innocuité souhaitées ?

Justifier.

DANS CE CADRE

NE RIEN ÉCRIRE

Académie : _____ Session : _____

Examen ou Concours _____ Série* : _____

Spécialité/option* : _____ Repère de l'épreuve : _____

Épreuve/sous-épreuve : _____

NOM : _____

(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms : _____ N° du candidat

Né(e) le : _____

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

Repère: BCREA1/C

SESSION 2001

Durée : 10 t

Page : 3/3

Coefficient : 8

N° DE POSTE :**BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE****FEUILLE DE RESULTATS****TEMOINS**

Témoin	Hémolyse 0 %	Hémolyse 50 %	Hémolyse 100 %
Schéma de l'aspect du puits			
% d'hémolyse		50 (estimé sur le culot)	

Commentaires sur les résultats des témoins.

ECHANTILLONS

N° puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilution	1/1	1/2										1/ 2048
Hémolyses ligne A												
Hémolyses ligne B												