

**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.

**ETUDE DE LA FERMENTATION LACTIQUE DANS LA FABRICATION DU YAOURT****BIOCHIMIE (70 points)**

Durée : 4 H

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

Pour étudier la fermentation lactique au cours de la fabrication du yaourt, le milieu M suivant est réalisé :

Composition du milieu M :

- yaourt 10 mL ;
- lait UHT tiédi à 44°C 190 mL.

Ce milieu M est réparti en tubes stériles à raison de 10 mL par tube.

Deux lots de tubes sont réalisés :

- les tubes H<sub>0</sub> : tubes immédiatement mis dans de la glace ;
- les tubes H<sub>4</sub> : tubes incubés 4 heures à 44°C.

L'étude de la fermentation lactique comportera :

- la détermination de l'acidité titrable produite ;
- le dosage du lactose ;
- le dosage de l'acide lactique.

**1 – Détermination de l'acidité titrable. (16 points)**

L'acidité titrable est l'acidité dosable par une solution d'hydroxyde de sodium en présence de phénolphtaléine comme indicateur.

**1.1 – Mode opératoire.**

Vider le contenu d'un tube H dans un petit bécher (si le contenu du tube H est solidifié, agiter pour le liquéfier).

Rincer le tube avec environ 10 mL d'eau distillée ; recueillir les eaux de rinçage.

Ajouter 4 gouttes d'une solution de phénolphtaléine.

Doser par une solution d'hydroxyde de sodium de concentration  $c$  voisine de  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  (la concentration exacte sera précisée en salle) jusqu'à teinte rose persistante pendant une dizaine de secondes.

Noter le volume  $V$  de NaOH versé.

**1.2 – Dosages à réaliser.**

Déterminer l'acidité titrable sur les échantillons :

- H<sub>0</sub> (2 essais)
- H<sub>4</sub> (2 essais)

**1.3 – Résultats.**

Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales.

Pour chaque échantillon calculer l'acidité titrable en mmol d'ions  $H^+$  par litre de milieu M.

Convertir le résultat en g d'acide lactique par litre de milieu M.

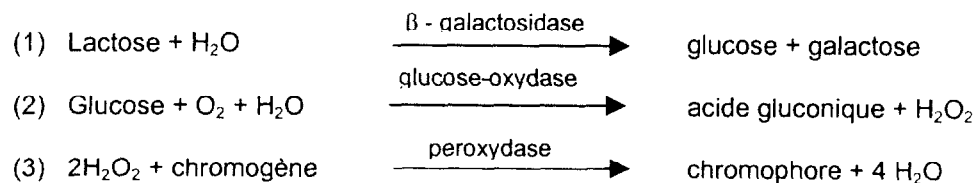
**Donnée :**  $M_{\text{acide lactique}} = 90 \text{ g.mol}^{-1}$ .

**2 – Dosage du lactose. (26 points)****2.1 – Principe.**

Le lactose est hydrolysé en D-glucose et D-galactose en présence de la  $\beta$ -galactosidase (1).

Le D-glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène en présence d'une glucose-oxydase (2).

Le peroxyde d'hydrogène réagit avec un chromogène incolore (amino - 4 antipyrine + phénol) pour donner un chromophore utilisable dans un dosage colorimétrique. Cette réaction est catalysée par une peroxydase (3).

**2.2 – Réactifs utilisés.**

- L1 : Tampon acéto-acétate pH 4,5 ;  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .
- L2 : Solution de  $\beta$ -galactosidase en tampon acéto-acétate pH 4,5.
- L3 : Tampon phosphate pH 7 ;  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ .
- L4 : Réactif GOD/POD.

**2.3 – Mode opératoire.**

Le lactose est dosé à partir de filtrats de défécation des tubes  $H_0$  et  $H_4$ .

**2.3.1- Préparation des filtrats.**

Préparer les filtrats  $F_0$  et  $F_4$  à partir respectivement des tubes  $H_0$  et  $H_4$ .

**Mode opératoire :**

Introduire dans un bécher étroit :

- échantillon  $H_0$ ..... 2 mL
- acide trichloracétique à  $3 \text{ mol.L}^{-1}$  ..... 1 mL

Mélanger **doucement** et laisser coaguler

- eau distillée ..... 20 mL

**Laisser reposer 10 minutes**

**Neutraliser** avec une solution de NaOH à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  en amenant le pH à la valeur  $7 \pm 0,5$  à l'aide d'un pH-mètre.

**Transvaser** dans une fiole jaugée de 100 mL.

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

**Filtrer pour obtenir environ 10 mL de filtrat.**

**2.3.2 - Dosage du lactose sur les filtrats F.**

Faire deux essais sur chaque filtrat  $F_0$  et  $F_4$  (travailler en tubes à hémolyse).

Tube	Témoin réactifs	Essai
Eau distillée	100 $\mu$ L	-
Echantillon	-	100 $\mu$ L
L1 : tampon acéto-acétate pH 4,5	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
L2 : solution de $\beta$ -galactosidase	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Incuber 30 minutes à 37°C		
L3 : tampon phosphate pH 7 ; 1 mol.L <sup>-1</sup>	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
L4 : réactif GOD	2 mL	2 mL
Incuber 15 min à 37°C. Lire l'absorbance à 510 nm contre le témoin.		

De plus, pour chaque filtrat réaliser un tube « **témoin glucose** », permettant d'évaluer la présence éventuelle de glucose.

### 2.3.3 - Etalonnage.

A partir d'une solution étalon de lactose à 5 mmol.L<sup>-1</sup>, réaliser une gamme de solutions étalons filles allant de 0 à 5 mmol.L<sup>-1</sup> en lactose. Préparer chaque solution avec un volume final de 5 mL.

A partir de cette gamme, réaliser un étalonnage de la méthode.

### 2.3.4 - Résultats.

Expliquer la préparation du témoin glucose.

Expliquer la préparation de la gamme d'étalonnage.

Etablir le tableau de colorimétrie.

Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales.

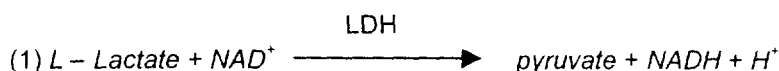
Exploiter les résultats de colorimétrie à l'aide de l'ordinateur ; indiquer les valeurs expérimentales retenues pour le calcul de la droite de régression ; donner l'équation de cette droite de régression et le coefficient de corrélation. Rendre un graphique légendé.

Déterminer la concentration molaire en lactose dans les tubes H<sub>0</sub> et H<sub>4</sub> en mmol.L<sup>-1</sup>. La précision du dosage est évaluée à 4 %.

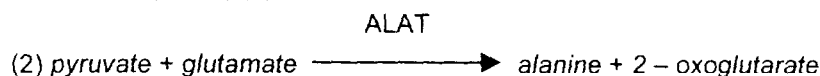
## 3 – Dosage de l'acide L-lactique. (20 points)

### 3.1 - Principe.

L'acide L- lactique est oxydé en pyruvate en présence de la L- lactate déshydrogénase (1).



La réaction est rendue totale grâce à une réaction couplée catalysée par une alanine-amino-transférase (ALAT) (2)



La variation de la concentration en NADH,H<sup>+</sup> est suivie en mesurant l'absorbance à 340 nm.

### 3.2 - Réactifs.

R1 : tampon glycylglycine de pH 10, acide glutamique, stabilisants.

R2 : solution de NAD<sup>+</sup>.

R3 : alanine-amino-transférase (ALAT).

R4 : L- lactate déshydrogénase.

Solution contrôle d'acide L- lactique à 0,200 g.L<sup>-1</sup>.

**3.3 - Mode opératoire.**

Travailler en cuve UV.

Doser l'acide L- lactique dans les filtrats  $F_0$  et  $F_4$  obtenus précédemment.

Faire un essai pour chaque filtrat.

Cuve	Blanc	Contrôle	$F_0$	$F_4$
R1 (mL)	1,00	1,00	1,00	1,00
R2 (mL)	0,20	0,20	0,20	0,20
Eau distillée (mL)	1,00	0,90	0,90	0,90
R3 (mL)	0,02	0,02	0,02	0,02
Echantillon (mL)	-	0,100	0,100	0,100
Mélanger. Incuber 5 min à 20 – 25°C. Lire les absorbances A1 à 340 nm contre de l'eau distillée.				
R4 (mL)	0,02	0,02	0,02	0,02
Mélanger. Incuber 20 min à 20 – 25°C. Lire les absorbances A2 à 340 nm contre de l'eau distillée.				

**3.4 - Résultats.**

Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales.

Etablir une formule littérale de calcul de la concentration molaire en acide L- lactique dans les tubes  $H_0$  et  $H_4$  et dans la solution contrôle.

En déduire les concentrations massiques en acide L- lactique dans la solution contrôle et dans les tubes  $H_0$  et  $H_4$  en  $g.L^{-1}$ .

Calculer les incertitudes absolue et relative de ce dosage.

**Données :**  $\epsilon_{NADH,H^+} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

acide lactique :  $M_{\text{acide lactique}} = 90 \text{ g.mol}^{-1}$ .

**4 – Conclusion. (8 points)**

- Déterminer l'augmentation d'acidité titrable dans le milieu M en 4 heures de fermentation en mmol d'acide L- lactique. $L^{-1}$ .
- Déterminer la production d'acide lactique dans le milieu M en 4 heures de fermentation en mmol d'acide L- lactique. $L^{-1}$ .
- Déterminer la quantité de lactose disparu dans le milieu M en 4 heures en mmol de lactose. $L^{-1}$ .

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: BCREA4/A

SESSION 2001

Durée : 10 H

Page : 5/5

Coefficient : 8

## FEUILLE DE RESULTATS

### A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE

N° de poste :

#### 1 - DETERMINATION DE L'ACIDITE TITRABLE :

Chutes de burette V (mL)	H <sub>0</sub>	H <sub>4</sub>
Essai 1		
Essai 2		

#### 2 - DOSAGE DU LACTOSE :

tubes	
<u>A 510 nm</u>	

tubes	
<u>A 510 nm</u>	

#### 3 - DOSAGE DE L'ACIDE L- LACTIQUE :

	Blanc	Contrôle	F <sub>0</sub>	F <sub>4</sub>
A1 340 nm				
A2 340 nm				

**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.

**ANALYSES ET CONTROLES DANS L'INDUSTRIE LAITIERE****MICROBIOLOGIE ET IMMUNOLOGIE (90 points)**

1er jour

Durée : 3 H 30**I - MICROBIOLOGIE (60 points)****1 - Contrôles de laits crus arrivant en laiterie.****1.1 - Dénombrement de la flore totale d'un lait cru « L<sub>1</sub> ».**

Critère de la norme : moins de 10<sup>5</sup> UFC par mL, seuil maximal égal à 10 fois la norme.

**1.1.1 - Matériel.**

- Echantillon à analyser : lait « L<sub>1</sub> » en tube à vis, à conserver dans la glace.
- 6 tubes de 20 mL de gélose dénombrement notés « PCA » en surfusion.
- 6 boîtes de Pétri stériles.
- 6 tubes contenant 9 mL d'eau distillée stérile.
- 7 pipettes stériles de 1 mL.

**1.1.2 - Mode opératoire.**

Réaliser une série de dilutions de raison 1/10 du lait « L<sub>1</sub> ».

Dénombrer dans la masse en double couche.

Faire viser sur le compte rendu la justification du choix des suspensions ensemencées.

**1.2 – Recherche de mycobactéries dans un lait cru « L<sub>2</sub> ».**

Le lait cru « L<sub>2</sub> » a été centrifugé pendant 5 min (4000 tours.min<sup>-1</sup>), puis l'anneau de crème a été retiré.

**1.2.1 - Matériel.**

- Culot et surnageant du lait « L<sub>2</sub> » en tube à centrifuger conique.
- Colorants, réactifs et notice technique pour coloration de Ziehl (ou une méthode équivalente).

**1.2.2 - Mode opératoire.**

Eliminer le surnageant, puis mélanger le culot avec les quelques gouttes de liquide restant.

Faire le frottis à l'aide de ce mélange, le sécher, puis le fixer à froid (éthanol pendant 5 min).

Réaliser la coloration, puis observer.

**Montrer un champ microscopique à un examinateur.**

**1.2.3 - Compte rendu.**

Décrire les flores observées. Conclure.

## **2 - Contrôles sur une chaîne de conditionnement de yaourts.**

Suite à des accidents de fabrication dans un atelier de conditionnement de yaourts, divers contrôles de surfaces sont effectués par des techniques d'écouvillonnage et à l'aide de géloses contact.

D'autre part, un dénombrement de la flore totale de l'eau du réseau est entrepris.

### **2.1 – Isolement à partir d'un liquide d'écouvillonnage.**

Un nez de robinet a été écouvillonné à l'aide d'une solution stérile neutralisante, transférée ensuite dans un tube d'eau peptonée tamponnée. Ce dernier a été incubé à 30°C pour revivification.

#### **2.1.1 - Matériel.**

- Echantillon à étudier : tube d'eau peptonée tamponnée « EP ».
- Gélose trypticase-soja en boîte de Pétri « GTS ».

#### **2.1.2 - Mode opératoire.**

Réaliser sur la gélose trypticase-soja un isolement à partir de l'échantillon.

Incuber à 30°C.

### **2.2 – Identification d'une souche bactérienne provenant d'une gélose contact.**

Une gélose contact a été appliquée sur un plan de travail. Après incubation, des colonies sont observées. Ces colonies sont ensuite purifiées sur gélose ordinaire.

#### **2.2.1 - Matériel.**

- Souche pure « S » isolée sur gélose ordinaire.
- 2 tubes de 2 mL d'eau distillée stérile.
- Réactifs pour tests enzymatiques rapides.

#### **2.2.2 - Protocole opératoire.**

Réaliser les tests d'orientation.

**Présenter Gram et test(s) enzymatique(s) rapide(s) à un examinateur.**

Sur le compte rendu, noter les résultats de cette orientation et proposer une galerie permettant l'identification complète de cette souche.

**Faire viser le compte rendu par un examinateur.**

Poursuivre l'identification en ensemençant la galerie fournie.

Indiquer sur le compte rendu la température d'incubation de cette galerie.

### **2.3 – Dénombrement de la flore totale par filtration.**

#### **2.3.1 - Matériel.**

- Appareil de filtration.
- Echantillon à étudier : flacon d'eau du réseau, fraîchement prélevée « eau de réseau ».
- 1 gélose PCA.
- 1 membrane filtrante.
- 3 tubes d'eau distillée stérile pour rinçages.

#### **2.3.2 – Mode opératoire.**

**Réaliser la filtration en présence d'un examinateur.**

Filter 50 mL d'eau du réseau.

Déposer la membrane filtrante sur la gélose PCA.

Indiquer sur le compte rendu la température d'incubation.

## II - IMMUNOLOGIE (30 points)

### DOSAGE DU COMPLEMENT NECESSAIRE A LA SEROLOGIE DE LA BRUCELLOSE

La brucellose peut être transmise par voie orale par l'intermédiaire des produits laitiers crus. La recherche indirecte de la maladie est faite soit par des tests d'agglutination, soit par réaction de fixation du complément (RFC).

Les résultats sont comparables mais la RFC présente des avantages :

- détection précoce des anticorps,
- phénomène de zone très rare,
- utilisable en microméthode.

La réaction de fixation du complément nécessite de placer dans les cupules une quantité connue de complément équivalente à 2 unités hémolytiques.

On doit réaliser un titrage du complément à tout changement de lot du complément et ce pour chaque sorte d'antigène utilisé.

#### 1 - Préparation des réactifs.

Le complément est vendu lyophilisé et reconstitué par un réactif stabilisateur qui permet une conservation à 4°C pendant 4 semaines en récipients clos. La première dilution a été réalisée au 1/2 au moment de l'emploi par du tampon Véronal (VBS) et conservée au réfrigérateur jusqu'à son utilisation (150 µL de C étiqueté « C au 1/2 »).

##### 1.1 - Réactifs et matériel.

- Une microplaque à fond en U.
- Un film adhésif.
- Tampon véronal « VBS » ; 5 mL.
- Complément dilué au 1/2 en VBS, marqué « C au 1/2 » ; 0,2 mL.
- Antigène brucellique « Ag pur » ; 50 µL.
- Tube à hémolyse.
- Carré de papier filtre.

##### 1.2 - Réalisation de la gamme de dilution du complément.

Dans la ligne A d'une microplaque, réaliser une série de dilutions en déposant successivement le complément dilué au 1/2 et du tampon VBS selon le tableau suivant :

<u>N° cupule</u>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Complément au 1/2 (µL)</b>	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8		
<b>Tampon VBS (µL)</b>	90	140	190	215	240	265	290	252	272	292		

Homogénéiser.

##### 1.3 - Préparation de la dilution de l'antigène.

Diluer l'antigène au 1/20 en tampon VBS.



**1.4 - Dépôt des réactifs (ligne D).**

Transférer 25  $\mu\text{L}$  de complément dilué de chaque cupule de 1 à 10 de la ligne A dans les mêmes numéros de la ligne D.

Ajouter 25  $\mu\text{L}$  de l'antigène dilué au 1/20 dans les cupules 1 à 11.

Ajouter :

- 25  $\mu\text{L}$  de tampon VBS dans les cupules 1 à 10 ;
- 50  $\mu\text{L}$  dans la cupule 11 ;
- 75  $\mu\text{L}$  dans la cupule 12.

Homogénéiser la plaque. La recouvrir de papier filtre humidifié de VBS, puis d'un film adhésif. Placer 16 à 24 h à 4°C.

**1.5 – Compte rendu.**

Expliquer la préparation de la solution diluée d'antigène brucellique.

Reprendre le tableau de dilution du complément en indiquant la dilution correspondant à chacune des cupules.

**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.**

**ANALYSES ET CONTROLES DANS L'INDUSTRIE LAITIERE****MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE (90 points)**

2ème jour

Durée : 2 H 30**I - MICROBIOLOGIE (60 points)****1 - Dénombrement de la flore totale du lait cru « L<sub>1</sub> ».**

Compter les colonies.

Présenter les résultats sous forme de tableau.

Conclure.

**2 - Contrôles sur une chaîne de conditionnement de yaourts.****2.1 - Liquide d'écouvillonnage.**

Orienter le diagnostic d'identification de chaque type de colonie.

**Présenter les observation(s) microscopique(s) et test(s) enzymatique(s) à un examinateur.**

**2.2 - Souche bactérienne provenant d'une gélose contact.**

Exploiter les résultats.

Identifier cette bactérie.

**2.3 - Dénombrement des coliformes totaux.**

Exprimer le résultat en nombre d'U.F.C. de coliformes totaux par litre d'eau du réseau.

Justifier le calcul.

**2.4 - Conclure sur les résultats de ces contrôles.****II - IMMUNOLOGIE (30 points)****1 - Réactifs et matériel.**

- Une pipette P 1000.
- Une pipette P 100.
- Un tube à hémolyse vide.
- Suspension de GR de mouton à 2 % en tampon VBS : « GRM à 2 % ».
- Solution d'anticorps anti-hématies de mouton notée « SH ».

**2 - Pré-incubation de la plaque de microtitration.**

Sortir la plaque de microtitration du réfrigérateur et la placer 15 min à l'étuve à 37°C.

**3 - Préparation et pré-incubation du système hémolytique.**

Mélanger :

- 0,5 mL de la suspension d'hématies de mouton à 2% en VBS (étiqueté « GRM à 2 % »),
- 0,5 mL solution d'anticorps anti-hématies de mouton (étiqueté SH).

Aspirer et refouler délicatement 3 fois le mélange pour favoriser la sensibilisation.

Laisser 15 min à température ambiante.

**4 - Dépôt des hématies de mouton sensibilisées.**

Déposer, dans les cupules 1 à 12 de la ligne D, 50  $\mu$ L de système hémolytique.

Homogénéiser mécaniquement.

Incuber 15 à 25 minutes à 37°C.

**5 - Centrifugation.**

Centrifuger 3 minutes les microplaques dans des supports spéciaux à 200 g.

**6 - Lecture.**

Elle peut se faire dans les 2 h maximum après la centrifugation.

Observer à l'œil nu l'aspect des cupules et noter :

- NH s'il n'y a pas d'hémolyse
- HP s'il y a hémolyse partielle
- HT s'il y a hémolyse totale
- 

**Présenter la microplaque à un examinateur en même temps que le report des observations sur la feuille de compte rendu en annexe.**

**7 - Interprétation - Conclusion.**

Après avoir validé les témoins, donner le taux de dilution maximum du complément donnant une hémolyse complète. Cette dilution est supposée contenir 1 unité hémolytique.

Sachant que pour une sérologie de la brucellose, on souhaite introduire 2 unités hémolytiques par cupule avec un dépôt de 25  $\mu$ L de complément dilué, calculer la dilution du complément testé à utiliser.

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: BCREA4/C

SESSION 2001

Durée : 10 H

Page : 3/3

Coefficient : 8

**EPREUVE E5. UNITÉ U52**

**Réalisation pratique d'opérations techniques**

**FEUILLE DE COMPTE RENDU D'IMMUNOLOGIE**

N° de poste :

Volumes en  $\mu\text{L}$

N° cupule	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Complément au 1/2 ( $\mu\text{L}$ )	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8		
VBS ( $\mu\text{L}$ )	90	140	190	215	240	265	290	252	272	292		
Dilution du complément												
Complément dilué ( $\mu\text{L}$ )	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25		
Ag dilué au 1/20 ( $\mu\text{L}$ )	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
Tampon VBS ( $\mu\text{L}$ )	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50	75
GRM sensibilisé ( $\mu\text{L}$ )	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Aspect												