

**ÉPREUVE 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.

**Remarque préliminaire :**

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

**ÉTUDE DE QUELQUES ASPECTS DE L'ÉCOLOGIE MARINE**1<sup>er</sup> jourDurée : 4 H 00**BIOCHIMIE****(80 points)****Etude de biomarqueurs d'exposition aux polluants chimiques chez la moule**

Les zones côtières sont depuis toujours un lieu privilégié pour l'installation des activités humaines. Leur contamination par des polluants chimiques est donc possible.

Les moules (*Mytilus galloprovincialis*) possèdent une extraordinaire capacité de filtration ; leur contamination par des toxiques est rapide ; ce sont donc de très bons marqueurs d'écotoxicologie.

On se propose de doser sur un homogénat de moules :

- les protéines totales,
- l'activité acétylcholinestérasique,
- les nitrates.

**Préparation des homogénats de moules pour l'ensemble des dosages.**

Les opérations suivantes ont été réalisées à partir du lot de moules à analyser selon le protocole suivant :

5 grammes de moules sont pesés et broyés dans 45 millilitres de tampon TBS (Tris Buffer Saline).

L'homogénat est ensuite transvasé dans un tube en plastique et centrifugé à 4°C et à 9 000 rpm pendant 10 minutes.

On récupère le **surnageant « S »** destiné aux différents dosages.

Le volume de surnageant total obtenu est ajusté à **50 mL**.

3 aliquotes « SP », « SA » et « SN » sont prélevés et respectivement utilisés pour le dosage des protéines totales, de l'activité acétylcholinestérasique et des nitrates.

**1 – Dosage des protéines totales : Méthode du biuret, technique en microplaque (33 points).****1.1 – Réactifs.**

- Solution étalon de sérum albumine bovine « SAB » à 10 g.L<sup>-1</sup> (5 mL).
- Surnageant à doser « SP » (200 µL).
- Tampon TBS pH 7,4 (5 mL).
- Réactif de Gornall.

**1.2 – Mode opératoire.****1.2.1 – Préparation des solutions filles :**

A partir de la solution étalon mère de « SAB » à  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , préparer en tampon TBS sous un volume final de 1 mL, 4 solutions étalons filles à  $2 \text{ g.L}^{-1}$  (SF<sub>1</sub>),  $4 \text{ g.L}^{-1}$  (SF<sub>2</sub>),  $6 \text{ g.L}^{-1}$  (SF<sub>3</sub>) et  $8 \text{ g.L}^{-1}$  (SF<sub>4</sub>).

**1.2.2 – Réalisation de la gamme d'étalonnage et des essais :**

Introduire dans les cupules d'une microplaque :

- 50  $\mu\text{L}$  de tampon TBS dans la cupule A,
- 50  $\mu\text{L}$  des différentes solutions étalons (solution mère et solutions filles) dans les cupules B à F,
- 50  $\mu\text{L}$  de solution « SP » dans les cupules G et H.

Ajouter dans toutes les cupules 200  $\mu\text{L}$  de réactif de Gornall.

Agiter quelques secondes.

Recouvrir d'un film autocollant.

Incuber 20 minutes à température ambiante.

Lire l'absorbance à 540 nm contre la cupule A (témoin réactif). Stabilité de la coloration : 1 h.

**1.3 – Résultats et compte rendu.**

Compléter le tableau de résultats en annexe.

Tracer la droite d'étalonnage au moyen de l'ordinateur. Valider les points expérimentaux.

Donner l'équation et le coefficient de corrélation de la droite de régression.

Rendre un graphique renseigné.

Déterminer la concentration massique en protéines du surnageant « SP ».

En déduire le pourcentage massique de protéines.

Donnée : Le coefficient de variation de la méthode du biuret est de 3 %.

**2 – Mesure de l'activité acétylcholinestérasique (25 points).**

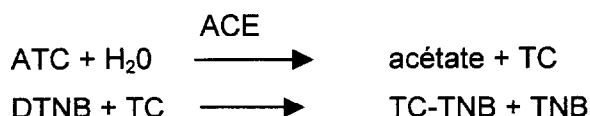
L'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) « ACE » catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine, neurotransmetteur du système nerveux, en acide acétique et choline.

Elle est inhibée par de nombreux polluants chimiques ; la présence de ceux-ci dans l'eau de mer est donc susceptible de modifier l'activité de cette enzyme chez les moules.

**2.1 – Principe.**

La méthode choisie est celle développée par Ellman et coll ; un analogue structural de l'acétylcholine, l'acétylthiocholine (ATC) est utilisé comme substrat.

La cinétique est suivie en mesurant l'apparition du TNB (thionitrobenzène) de couleur jaune, produit à l'issue des réactions suivantes :



TC = thiocholine

DTNB = dithionitrobenzène

**2.2 – Réactifs.**

- Tampon phosphate EDTA pH 8 noté « PE » (4 mL).
- Solution de DTNB à 10 mmol.L<sup>-1</sup> (500 µL).
- Solution d'ATC à 10 mmol.L<sup>-1</sup> (300 µL).
- Surnageant à doser « SA » (500 µL).

**2.3 – Mode opératoire (2 essais).**

Dans une cuve de spectrophotomètre, introduire dans l'ordre :

- 1,6 mL de tampon PE
- 200 µL de DTNB à 10 mmol.L<sup>-1</sup>
- 100 µL d'ATC à 10 mmol.L<sup>-1</sup>

Préincuber 5 minutes à 30° C.

Faire le zéro du spectrophotomètre au moyen de cette cuve.

Déclencher la réaction par ajout de 200 µL de surnageant noté « SA ».

Suivre l'évolution de l'absorbance à 410 nm toutes les 20 secondes pendant 3 minutes.

**2.4 – Résultats et compte rendu.**

A l'aide de l'outil informatique, tracer l'évolution de l'absorbance en fonction du temps.

Rendre un graphique renseigné.

Déterminer la concentration d'activité catalytique en U.L<sup>-1</sup> du surnageant « SA ».

Déterminer l'activité spécifique du surnageant « SA » en U.g<sup>-1</sup> de protéine.

Déterminer l'activité acétylcholinestérasique totale en U.g<sup>-1</sup> de moules.

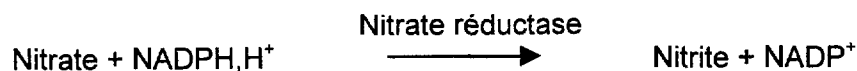
Données :

Le coefficient de variation de la méthode est de 5 %.

$\epsilon_{\text{TNB}} = 13\,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

**3 – Dosage des nitrates par une méthode enzymatique (20 points).****3.1 – Principe.**

Les nitrates sont réduits en nitrites selon la réaction suivante :



La quantité de NADPH, H<sup>+</sup> oxydée est proportionnelle à la quantité de nitrates présents. La diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm.

**3.2 – Réactifs.**

- Mélange réactionnel 2 : tampon pH 7,8 ; NADPH, H<sup>+</sup> (3,5 mL).
- Solution 3 : nitrate réductase notée « NR » (250 µL).
- Surnageant à doser « SN » (300 µL).

**3.3 – Mode opératoire (1 témoin, 2 essais).**

Longueur d'onde : 340 nm.

Lecture contre l'air.

Température : ambiante.

Introduire dans l'ordre

	Témoin	Essai
Mélange réactionnel 2 (mL)	1	1
Surnageant « SN » (mL)	-	0,1
Eau distillée (mL)	2	1,9
Mélanger et lire les absorbances des solutions (A1) après 3 minutes. Déclencher la réaction par addition de :		
Solution « NR » (mL)	0,05	0,05
Mélanger et lire l'absorbance des solutions (A2) après 40 minutes exactement. Attendre 20 minutes exactement, puis lire à nouveau les absorbances (A3).		

Soit :

$$\Delta A_{\text{Nitrate}} = \Delta A_{\text{essai}} - A \Delta_{\text{témoin}} \text{ avec :}$$

$$\Delta A_{\text{essai}} = (A1 - A2)_{\text{essai}} - 2 (A2 - A3)_{\text{essai}}$$

$$\Delta A_{\text{témoin}} = (A1 - A2)_{\text{témoin}} - 2 (A2 - A3)_{\text{témoin}}$$

### **3.4 – Calculs et compte-rendu.**

Calculer le  $\Delta A$  nitrate.

Etablir la formule permettant de calculer la concentration molaire en nitrates dans le surnageant « SN », en fonction du  $\Delta A$  Nitrate.

Calculer la concentration massique en nitrates dans « SN ».

Données :

$$\varepsilon_{\text{NADPH,H}^+} \text{ à } 340 \text{ nm} = 6\,300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$M : \quad \text{O} = 16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} ; \text{N} = 14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}.$$

Le coefficient de variation de la méthode est de 4 %.

### **4 – Conclusion (2 points).**

Conclure sur l'élevage de moules concerné sachant que l'on considère que la pollution de l'eau de mer est significative si :

- l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase est inférieure à  $4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de protéine ;
- la concentration en nitrates dans le surnageant « SN » est supérieure à  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

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 de la session de septembre

Repère: BCREA1/A      SESSION 2003      Durée : 10 H

Page : 5/5      Coefficient : 8

**NUMERO DE POSTE :**

**FEUILLE DE RÉSULTATS**

**(À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE)**

**1. Dosage des protéines dans le surnageant « SP ».**

PUITS	A	B	C	D	E	F	G	H
Abs 540 nm								
mg de protéine par cupule								

**2. Mesure de l'activité acétylcholinestérase dans le surnageant « SA ».**

Temps (s)	20	40	60	80	100	120	140	160	180
Abs 410 nm 1 <sup>er</sup> essai									
Abs 410 nm 2 <sup>ème</sup> essai									

**3. Dosage des nitrates dans le surnageant « SN ».**

	TEMOIN	ESSAI 1	ESSAI 2
A1			
A2			
A3			
ΔA			

**ÉPREUVE 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.

**Remarque préliminaire :**

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

**ÉTUDE DE QUELQUES ASPECTS DE L'ÉCOLOGIE MARINE**1<sup>er</sup> jourDurée : 4 H 15**MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE** 1<sup>er</sup> jour (80 points)**A – MICROBIOLOGIE** - 1<sup>er</sup> jour (50 points)**RECHERCHE DES CAUSES DE MORTALITÉ CHEZ LES GORGONES DE MÉDITERRANÉE**

Durant l'été 1999, une mortalité massive des grands invertébrés marins et notamment des coraux et des gorgones a été observée en Méditerranée.

On a noté une augmentation de la température de l'eau de mer d'environ 5°C entre 0 et 45 mètres de profondeur durant les semaines précédant la nécrose. Cette hausse de la température aurait pu être bénéfique à la prolifération de micro-organismes, susceptibles de participer à ce phénomène de nécrose.

**1 – Dénombrement des espèces revivifiables aérobies mésophiles sur les gorgones nécrosées (18 points).**

Un filtrat « F » en eau physiologique stérile a été obtenu à partir d'une gorgone nécrosée.

On réalise le dénombrement sur milieu 2216E de composition suivante pour 1 litre :

- agar	15 g
- peptone	5 g
- extrait de levure	1 g
- orthophosphate ferrique	0,1 g
- eau de mer	750 mL
- eau distillée	250 mL

**1.1 – Matériel et réactifs.**

- 6 tubes contenant 15 mL de gélose 2216E en surfusion.
- 6 tubes contenant 4 mL de gélose 2216E en surfusion.
- 6 boîtes de Pétri stérile.
- 8 pipettes de 1 mL
- 8 tubes d'eau physiologique stérile de 9 mL.
- 2 cuves de spectrophotomètre.

**1.2– Mode opératoire.**

Mesurer l'absorbance à 600 nm du filtrat F.

**Montrer la mesure de l'absorbance à un examinateur.**

En déduire les dilutions à effectuer pour réaliser le dénombrement demandé sachant que 0,1 UA correspondant à  $10^8$  bactéries par mL.

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

Ensemencer dans la masse les boîtes de Pétri avec les dilutions appropriées selon la méthode de la double couche.

Incuber 24 heures à 30° C.

**1.3– Compte rendu.**

Justifier le choix des dilutions ensemencées.

**2 – Identification d'une souche microbienne retrouvée en quantité importante sur les gorgones nécrosées (18 points).****2.1– Matériel et réactifs.**

- Culture de la souche à identifier notée « S » en bouillon 2216E.
- Culture de la souche à identifier notée « S » présentée sur gélose 2216E inclinée.
- 1 tube de 2 mL d'eau physiologique.
- Tube à hémolyse stérile.
- Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).
- Réactif oxydase.

**2.2– Mode opératoire.**

Effectuer les observations microscopiques nécessaires puis un test d'orientation rapide.

**Appeler un examinateur pour les observations microscopiques et pour la réalisation du test d'orientation rapide.**

Proposer sur le compte-rendu une orientation de diagnostic et un choix de galerie d'identification de la souche « S » par microméthode.

Justifier le choix des milieux demandés.

**Rendre cette partie du compte-rendu 45 minutes avant la fin de l'épreuve.**

Poursuivre l'identification jusqu'au stade de l'espèce en ensemencant les milieux distribués.

**3 – Détermination de l'activité antimicrobienne de l'eau de mer : notion de pouvoir auto-épurateur (14 points).**

On dispose d'une suspension en milieu 2216E liquide de la souche éventuellement responsable de la nécrose des gorgones notée « R ».

On compare l'activité antimicrobienne d'un prélèvement d'eau de mer noté « M » à celle d'une solution d'antibiotique de référence notée ATB sur cette souche.

**3.1– Matériel et réactifs.**

- Suspension bactérienne en milieu 2216E notée « R ».
- Prélèvement d'eau de mer noté « M ».
- Solution d'antibiotiques de référence notée « ATB à 2048 U.mL<sup>-1</sup> ».
- 1 microplaque stérile de 96 puits.
- 1 film autocollant.
- 2 tubes de milieu 2216E liquide (10 mL).
- Pipette automatique P<sub>100</sub> + cônes stériles.
- Une anse calibrée de 10  $\mu$ L.

**3.2– Mode opératoire.****3.2.1– Préparation d'une suspension bactérienne à  $10^5$  bactéries par mL.**

Réaliser une dilution au 1/1000 en milieu 2216E de la suspension bactérienne notée « R ».

On obtient ainsi une suspension bactérienne à environ  $10^5$  bactéries par mL.

**3.2.2– Réalisation des gammes de dilution de l'eau de mer notée « M » et de la solution d'antibiotique de référence notée ATB.**

En microplaque stérile, préparer pour l'eau de mer et pour la solution d'antibiotique, une série de 12 dilutions de raison 1/2 en milieu 2216E sous un volume final de 50  $\mu\text{L}$  (dilution au 1/2 dès la première cupule).

**3.2.3– Mise en culture.**

Ajouter dans chaque puits 50  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne à environ  $10^5$  bactéries par mL.

Recouvrir d'un film autocollant.

Incuber 24 heures à 30° C.

**Prévoir le ou les témoins(s) nécessaire(s).**

**3.3– Compte rendu.**

Expliquer sous forme d'un tableau la réalisation de la gamme de dilution pour la solution de référence d'antibiotique.

Préciser les dilutions finales et les concentrations en antibiotiques dans chaque cupule de cette gamme.

Donner la composition et le rôle du ou des témoin(s) réalisé(s).

**B – IMMUNOLOGIE - 1<sup>er</sup> jour (30 points)****DOSAGE D'UNE NEUROTOXINE CHEZ LES MOLLUSQUES PAR IMMUNODIFFUSION RADIALE**

Les mollusques peuvent accumuler la saxitoxine de *Gonyaulax tamarensis* et par suite empoisonner le consommateur. Cette neurotoxine peut être dosée dans les mollusques, tels que les moules et les huîtres, par immunodiffusion radiale de Mancini.

**1 – Réactifs et matériels.**

- 1 tube contenant 12 mL d'agarose à 1 % en surfusion à 55°C.
- Anticorps anti-saxitoxine « anti S » (0,15 mL).
- Saxitoxine étalon « S » (0,5 mL).
- Diluant (1 mL).
- Extrait d'huître A à doser « A » (20  $\mu\text{L}$ ).
- Extrait d'huître B à doser « B » (20  $\mu\text{L}$ ).
- 1 gélose coulée en petite boîte de Pétri (entraînement à la confection des puits).
- 1 grande boîte de Pétri (glycérinée ou glacée).
- 6 tubes Eppendorf.
- 1 emporte-pièce.
- Pipettes automatiques P<sub>20</sub>, P<sub>100</sub>.

**2 – Mode opératoire.****2.1– Préparation du gel.**

Ajouter 120  $\mu\text{L}$  d'anticorps anti-saxitoxine aux 12 mL d'agarose à 1 % en surfusion.

Couler dans la boîte de Pétri.

Laisser solidifier à température ambiante puis au réfrigérateur.

Perforer le gel à l'aide de l'emporte-pièce selon le gabarit proposé en annexe n°1.



**2.2 – Préparation de la gamme d'étalonnage.**

A partir de la solution étalon de saxitoxine « S » à 5 mg.L<sup>-1</sup> réaliser dans des tubes eppenforf une gamme de concentration en saxitoxine correspondant aux pourcentages volumiques (v/v) suivants : 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % et 60 %.

Préparer 100  $\mu$ L de chacune des dilutions.

**2.3 – Dépôts.**

Introduire 5  $\mu$ L des 6 solutions étalons et des deux extraits d'huîtres « A » et « B » à analyser dans les différents puits.

Incuber 24 heures en chambre humide à température ambiante.

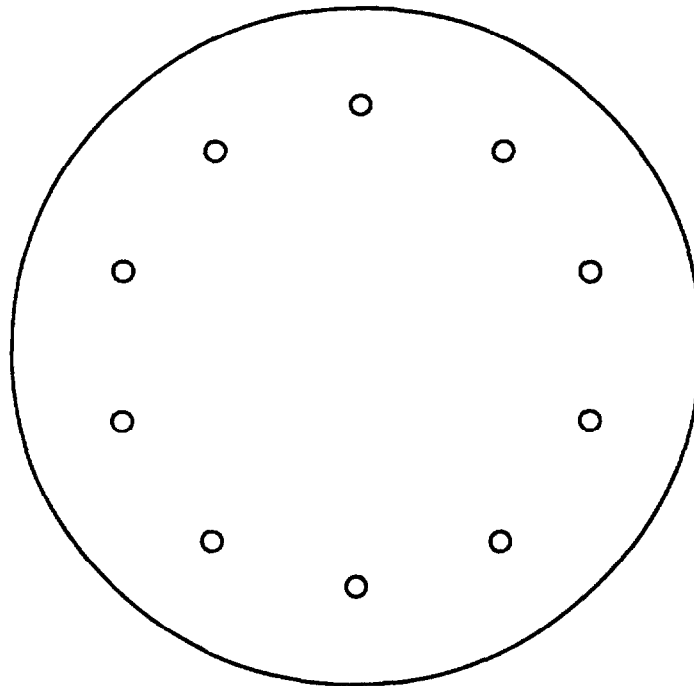
**3 – Compte rendu.**

Indiquer dans le tableau fourni en annexe n° 2 la réalisation de la gamme d'étalonnage en précisant les concentrations en saxitoxine obtenues.

Compléter le gabarit fourni.

**ANNEXE 1**

GABARIT



**ANNEXE 2**

	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6

**ÉPREUVE 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.

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

**MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE (80 points)**

Durée : 1 H 45

**A - MICROBIOLOGIE - 2<sup>ème</sup> jour (50 points)****RECHERCHE DES CAUSES DE MORTALITÉ CHEZ LES GORGONES DE MÉDITERRANÉE****1 – Dénombrement des espèces revivifiables aérobies mésophiles sur les gorgones nécrosées.**

Compter les colonies.

Présenter les résultats sous forme d'un tableau.

Calculer le nombre de bactéries revivifiables aérobies par mL de filtrat.

Conclure sachant que les numérations sur l'eau de mer et sur les filtrats de gorgones saines ont donné les résultats suivants :

- eau de mer :  $6.10^2 \text{ UFC.mL}^{-1}$
- filtrat de gorgone saine :  $1.10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$

**2 – Identification d'une souche microbienne retrouvée en quantité importante sur les gorgones nécrosées.**

Identifier le micro-organisme. Justifier la démarche.

**3 – Détermination de l'activité antimicrobienne de l'eau de mer : notion de pouvoir auto-épurateur.**

Définir et déterminer la concentration minimale inhibitrice pour la solution d'antibiotique de référence.

Déterminer la plus forte dilution en eau de mer donnant une absence de croissance visible. En déduire la concentration en principe actif antimicrobien en  $\text{U.mL}^{-1}$  de l'eau de mer.

Conclure sur le pouvoir auto-épurateur de l'eau de mer.

**B - IMMUNOLOGIE - 2<sup>ème</sup> jour (30 points)****DOSAGE D'UNE NEUROTOXINE CHEZ LES MOLLUSQUES PAR IMMUNODIFFUSION RADIALE**

Au-delà de  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de saxitoxine par extrait d'huître, le mollusque est considéré comme impropre à la consommation.

1. Elaborer un tableau des résultats obtenus.
2. Tracer la courbe d'étalonnage en fonction de la teneur massique de saxitoxine en  $\text{mg.L}^{-1}$  à l'aide de l'outil informatique. Rendre un graphique renseigné.
3. Déterminer la teneur massique de saxitoxine dans les deux extraits d'huîtres testées.  
Conclure.