

**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.**

**LES CLOSTRIDIÉS****BIOCHIMIE (70 points)**

Durée : 4 H 15

**DEFINITION D'UN MILIEU DE FERMENTATION  
POUR UNE SOUCHE DE CLOSTRIDIUM SOLVANTOGENE**

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

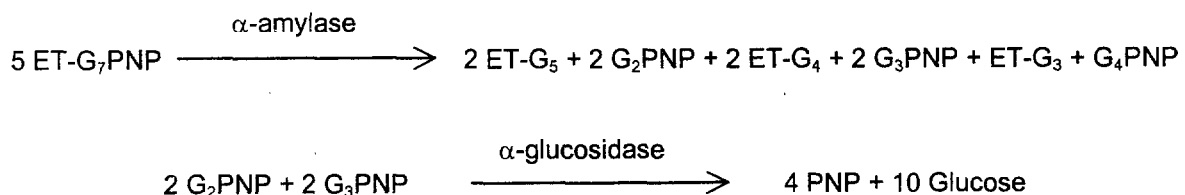
De nouveaux « substrats » industriels riches en amidon, mais de composition variable en vitamines, acides aminés, sels minéraux peuvent servir à la fabrication de milieux de fermentation.

Une souche de *Clostridium* est testée sur sa capacité à utiliser ces substrats tout en conservant ses propriétés solvantogènes. On se propose de :

- doser son activité  $\alpha$ -amylasique,
- déterminer les suppléments en acides aminés nécessaires à sa croissance,
- doser l'éthanol qu'elle produit, comme indicateur du bon déroulement de la fermentation.

**1 – Dosage de l'activité  $\alpha$ -amylasique. (35 points)****Principe du dosage**

Les réactions enzymatiques impliquées dans le dosage de l' $\alpha$ -amylase sont les suivantes :



G = glucose

ET = éthylidène

PNP = p-nitrophénol (4-nitrophénol)

L' $\alpha$ -amylase catalyse l'hydrolyse du 4,6-Ethylidène-G<sub>7</sub>-PNP (ET-G<sub>7</sub>-PNP) en G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> et G<sub>4</sub>-PNP. L' $\alpha$ -glucosidase catalyse l'hydrolyse du G<sub>2</sub>-PNP et du G<sub>3</sub>-PNP pour former du 4-nitrophénol et du glucose.

La détermination de l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase nécessite de connaître le coefficient d'extinction molaire du 4-nitrophénol dans les conditions opératoires du dosage, c'est-à-dire à 405 nm, à 30°C et à pH 7.

**1.1 - Détermination du coefficient d'extinction molaire du 4-nitrophénol.****1.1.1- Mode opératoire.**

Préparer une solution fille de 4-nitrophénol par dilution au 1/50 dans l'eau distillée d'une solution mère à 10 mmol.L<sup>-1</sup>.

Manipulation à réaliser dans un bain thermostaté à 30°C.

- Dans 6 tubes à essais, introduire les volumes de solution fille de façon à obtenir de 0 à 0,2 micromole de 4-nitrophénol par tube.
- Compléter tous les tubes à 1 mL avec de l'eau distillée.
- Ajouter dans chaque tube 5 mL de tampon phosphate à 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7.
- Attendre 5 minutes, puis lire l'absorbance à 405 nm, en spectrophotomètre thermostaté à 30°C.

Donnée : on indiquera en début de séance la durée de stabilité de la coloration.

**1.1.2- Résultats et compte rendu.**

- Etablir le tableau de colorimétrie.
- A l'aide de l'ordinateur, tracer la droite : Absorbance = f (**concentration** en 4-nitrophénol) ; indiquer les valeurs expérimentales retenues pour le calcul de la droite de régression ; donner l'équation de cette droite et le coefficient de corrélation.
- Rendre un graphe renseigné.
- Déterminer le coefficient d'extinction molaire du 4-nitrophénol en L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

**1.2 - Détermination de l'activité enzymatique de l'α-amylase par méthode cinétique.****1.2.1- Mode opératoire (1 seul essai à réaliser, selon le planning, au poste prévu à cet effet).**

- Dans une microcuvette de 1 cm de trajet optique, introduire 1 mL de « Réactif Amylase » (ET-GT<sub>7</sub>PNP, α-glucosidase, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, tampon, stabilisateur).
- Ajouter 20 μL de surnageant de culture de *Clostridium* (échantillon A).
- Après un délai de 2 minutes, enregistrer l'évolution de l'absorbance pendant 2 minutes.
- Après avoir vérifié la linéarité, relever la valeur de  $\Delta A/\Delta t$ .

**1.2.2- Résultats et compte-rendu.**

- Présenter l'enregistrement de l'absorbance en fonction du temps.
- En déduire l'activité amyliasique en unités par litre de surnageant de culture.
- Le CV de la méthode est évaluée à 10 %.

Donnée : une unité d'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme capable de produire une micromole de 4-nitrophénol par minute.

**2 – Détermination des besoins en acides aminés par chromatographie sur couche mince. (15 points)**

La bonne croissance de la souche de *Clostridium* sélectionnée pour la fermentation nécessite parfois une supplémentation des milieux de culture en acides aminés. Dans le milieu utilisé, les acides aminés sérine, proline, valine, leucine et acide glutamique ont été ajoutés à la concentration de 1g.L<sup>-1</sup>.

On se propose de suivre leur utilisation à différents temps de la fermentation.

**2.1 – Matériel et réactifs.**

- Plaque recouverte d'une couche mince de gel de silice (10 x 10 cm).
- Cuve à chromatographie.
- Solvant de chromatographie :
  - butanol : 3 vol.
  - acide acétique : 1 vol.
  - eau distillée : 1 vol.
- Solutions témoins d'acides aminés à 1 g.L<sup>-1</sup> : Ser, Pro, Val, Leu, Glu.
- Echantillons de milieu de culture supplémenté en acides aminés :
  - F1 : échantillon prélevé à t = 1 heure
  - F24 : échantillon prélevé à t = 24 heures
- Révélateur à la ninhydrine (à disposition sous la hotte).

**2.2 - Mode opératoire.**

- Saturer la cuve en vapeurs de solvant.
- Réactiver la plaque de chromatographie.
- A l'aide de capillaires, faire 2 dépôts successifs de chaque solution, en séchant entre chaque dépôt.
- Faire migrer, puis sécher la plaque.
- Immerger un court instant la plaque dans le révélateur, l'égoutter en position verticale, sur un papier filtre (ou utiliser un pinceau).
- Révéler à l'étuve à 100°C quelques minutes.

**2.3 – Compte rendu.**

- Analyser le chromatogramme obtenu.
- Comparer les acides aminés présents dans les deux prélèvements à ceux ajoutés au départ.
- Conclure.

**3 – Dosage de l'éthanol produit par méthode enzymatique en point final. (20 points)**

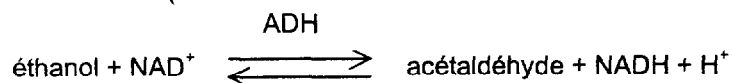
Le dosage de l'éthanol est réalisé à partir du moût de fermentation (échantillon E).

La concentration des solvants (éthanol, butanol, acétone) présents en fin de fermentation est habituellement comprise entre 16 et 20 g.L<sup>-1</sup>. La proportion en éthanol est environ de 4 %.

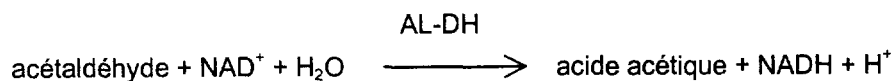
Pour ce dosage, la quantité d'éthanol dans la cuve doit être comprise entre 0,5 et 6 µg.

**Principe du dosage.**

En présence de l'alcool-déshydrogénase (ADH), l'éthanol est oxydé en acétaldéhyde par le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>).



Grâce à une seconde réaction, qui piège l'acétaldéhyde, catalysée par l'aldéhyde déshydrogénase (AL-DH), la première réaction est rendue totale.



La quantité de NADH, H<sup>+</sup> formé est proportionnelle à la quantité d'éthanol présent dans le moût de fermentation. Elle est suivie par spectrophotométrie à 340 nm.

**3.1- Mode opératoire.**

Opérer directement dans les cuves selon le tableau suivant. Réaliser deux essais.

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai
Mélange réactionnel (NAD <sup>+</sup> , AL-DH, tampon, stabilisateurs)	3,00 mL	3,00 mL
Eau distillée	0,10 mL	---
Echantillon E (éventuellement dilué)	---	0,10 mL
Mélanger ; après environ 3 min à température ambiante, lire contre l'air l'absorbance (A <sub>1</sub> ) des solutions. Déclencher la réaction par addition de :		
Solution d'ADH	0,05 mL	0,05 mL
Mélanger. En fin de réaction (10 min à température ambiante), lire contre l'air l'absorbance (A <sub>2</sub> ) des solutions, immédiatement les unes après les autres.		

**Précautions.**

Compte tenu de la grande volatilité de l'éthanol, la dilution éventuelle de l'échantillon doit être réalisée avec les précautions suivantes :

- remplir au  $\frac{3}{4}$  d'eau distillée la fiole jaugée,
- ajouter la prise d'essai d'échantillon en plongeant la pipette **sous** l'eau, puis compléter jusqu'au trait de jauge avec l'eau distillée,
- conserver les échantillons dans la glace pilée.

**3.2- Résultats et compte rendu.**

- Fournir le relevé des valeurs expérimentales.
- Justifier la dilution préalable de l'échantillon « E » éventuellement effectuée.
- Etablir la formule permettant de calculer la concentration massique de l'éthanol dans l'échantillon E.
- Le CV de la méthode est évaluée à 5 %.

**Données :**

- trajet optique = 1 cm,
- $\epsilon_{\text{NADH,H}^+} = 6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

**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.

**LES CLOSTRIDIÉS****IMMUNOLOGIE ET MICROBIOLOGIE (90 points)**

1er jour

Durée : 4 H 45

*Les candidats commencent par l'immunologie.*

**I - IMMUNOLOGIE (35 points)****PREPARATION D'UN ANTISÉRUM EN VUE DE LA RÉALISATION D'UNE TECHNIQUE IMMUNOLOGIQUE D'IDENTIFICATION DE CLOSTRIDIUM.**

L'identification de *Clostridium toxinogenes* peut se faire par méthode immunologique utilisant des antisérums antitoxines. On se propose de suivre l'immunisation d'un lapin par dosage des anticorps antitoxine contenus dans son sérum, grâce à une technique d'hémagglutination passive.

On utilise des hématies de mouton que l'on sensibilise par une toxine (T) purifiée à partir d'une culture sporulante de l'espèce de *Clostridium* à identifier.

**1 – Matériels et réactifs.**

- une microplaque à fond rond et un film autocollant ;
- 2 tubes à hémolyse avec bouchon ;
- « tampon de sensibilisation » ;
- « tampon PBS » pH 7,2 ; 5 mL ;
- solution de « toxine T » ; 1,5 mL ;
- sérum de lapin immunisé (préalablement adsorbé sur des hématies pour éliminer les agglutinines non spécifiques et déjà dilué au 1/1250), étiqueté « S 1/1250 » ; 200 µL ;
- « contrôle positif » ; 100 µL ;
- « acide tannique » ; 1,5 mL ;
- globules rouges de mouton (formolés) à 2,5 % en PBS étiquetés « GRM à 2,5 % » ;
- « PBS-PVP » (solution de polyvinylpyrrolidone à 0,35 % dans le tampon PBS) ; 2,5 mL.

**2 – Mode opératoire.****2.1 – Sensibilisation des hématies.**

Préparer, en parallèle, dans deux tubes à hémolyse, des GR S (globules rouges sensibilisés par la toxine T) et des GR NS (globules rouges non sensibilisés).

Dans chaque tube à hémolyse en plastique, introduire :

- 1 mL de suspension de globules rouges à 2,5 % ;
- 0,5 mL de tampon PBS ;
- 0,5 mL d'acide tannique.

Boucher et agiter par retournements pendant 3 minutes.

Centrifuger à 1700 g pendant 3 minutes. Eliminer le surnageant par décantation.

Prendre chaque culot par 1 mL de tampon de sensibilisation. Remettre en suspension.

Ajouter 1 mL de toxine T dans le tube GR S et 1 mL de tampon PBS dans le tube GR NS.

Agiter par quelques retournements, puis sur un agitateur à plateau horizontal à 170 tours par minute pendant 5 minutes (éventuellement, cette agitation peut être une homogénéisation manuelle continue pendant 5 minutes). Laisser reposer pendant 10 minutes.

Centrifuger à 1700 g pendant 3 minutes. Rejeter les surnageants.

Remettre en suspension chaque culot dans 2 mL de tampon PBS. Centrifuger. Rejeter les surnageants et répéter ce lavage. Centrifuger. Rejeter les surnageants.

Remettre enfin chaque culot en suspension dans 1 mL de PBS-PVP : on obtient ainsi les GR S et GR NS à 2,5 %.

## 2.2 – Technique d'agglutination passive.

Répartir dans une microplaque à fond rond :

Rejeter Rejeter Rejeter

Cupule	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tampon PBS (en $\mu\text{L}$ )	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
Sérum à doser préalablement dilué (en $\mu\text{L}$ )	75										---	75
Redistribution (en $\mu\text{L}$ )	---	75	75	75	75	75	75	75	75	---	---	---
Contrôle positif (en $\mu\text{L}$ )	---	---	---	---	---	---	---	---	---	75	---	---
GR S à 2,5 % (en $\mu\text{L}$ )	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	---
GR NS à 2,5 % (en $\mu\text{L}$ )	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	50

Recouvrir la plaque d'un film autocollant. Agiter manuellement par tapotements latéraux sur la plaque puis par mouvements rotatifs. Laisser incuber à l'abri de toute vibration à température ambiante pendant 1 heure 30 à 2 heures.

## 3 - Résultats et compte rendu.

Que contient le réactif « contrôle positif » ?

Lecture et interprétation :

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

- Présenter les résultats sous forme d'un tableau, en indiquant les dilutions du sérum à doser (avant addition des globules rouges).
- Que représentent respectivement les cupules 10, 11 et 12 ? Quels sont leurs rôles ?
- Donner le titre du sérum inconnu.
- Sachant que, pour pouvoir servir de réactif dans un kit d'identification de *Clostridium*, l'antisérum doit encore donner une réaction positive pour une dilution au 1/320 000, conclure sur l'efficacité de l'immunisation.

**Donnée :** Le titre correspond à l'inverse de la plus haute dilution donnant une réaction à 1 +.

## II - MICROBIOLOGIE (55 points)

### CLOSTRIDIENNES ET AUTRES INDICATEURS DE CONTAMINATION FÉCALE : ANALYSE D'UNE EAU DE RIVIÈRE EN VUE DE L'AMÉNAGEMENT D'UN SITE DE BAINADE.

L'évaluation du niveau de contamination fécale est un élément important de l'analyse microbiologique des eaux.

Les bactéries recherchées et dénombrées sont :

- les coliformes,
- les entérocoques,
- les anaérobies sulfito-réductrices.

On se propose d'étudier plus particulièrement les bactéries sulfito-réductrices et de dénombrer les phages spécifiques d'un coliforme : *Escherichia coli*.

#### **1 - Dénombrement des spores de Clostridium sulfito-réducteurs. (12 points)**

##### **1.1 - Matériel et réactifs.**

- eau à analyser étiquetée « ES » ;
- 5 tubes de gélose TSN (tryptone – sulfite – néomycine) en surfusion à 56°C ;
- 4 tubes contenant exactement 9 mL d'eau distillée stérile ;
- 5 pipettes stériles de 1 mL ;
- 1 récipient pour refroidissement.

##### **1.2 - Mode opératoire.**

Placer un prélèvement d'eau notée « ES » à 80°C pendant 10 minutes.

Après refroidissement, effectuer, en eau distillée stérile, des dilutions décimales jusqu'à 10<sup>-4</sup>.

**Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution.**

Pour dénombrer les spores de chacune des suspensions (prélèvement et dilutions), ensemencer 1 mL dans la masse des géloses TSN. Refroidir immédiatement et incuber à 37°C.

#### **2 – Identification d'une souche de Clostridium sulfito-réducteur isolée de l'eau de rivière. (18 points)**

##### **2.1 - Matériel et réactifs.**

- souche « S » présentée sur gélose au sang et incubée en anaérobiose ;
- 1 tube contenant de l'eau distillée stérile ;
- 1 ampoule API 20 A médium ;
- 1 galerie API 20 A + fiche technique ;
- 1 étalon n° 3 MAC FARLAND ;
- 1 écouvillon stérile ;
- 1 flacon d'huile de paraffine stérile ;
- 1 GENBAG-ANAER + barrette de fermeture + fiche technique.

##### **2.2 – Mode opératoire.**

A partir de la souche « S » :

- effectuer un frottis coloré au GRAM pour vérifier la pureté de la culture.

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

- ensemencer une galerie API 20 A et incuber 24 heures à 37°C et en anaérobiose, en utilisant le matériel mis à disposition.

Noter, sur le compte rendu, les observations macroscopiques et microscopiques effectuées.

**3 – Dénombrement de phages T2 dans l'eau de rivière. (25 points)**

Un test de Mackenzie s'étant révélé positif à partir de cette eau, on se propose de dénombrer les phages spécifiques d'*Escherichia coli*.

**3.1 - Matériel.**

- suspension de phages témoins T2 (100 µL en tube Eppendorf) notée « TT<sub>2</sub> » ;
- eau à analyser filtrée présentée en tube Eppendorf et notée « ET<sub>2</sub> » ;
- culture en bouillon d'*Escherichia coli* sensible au phage T<sub>2</sub> ;
- 10 mL de solution de CaCl<sub>2</sub> stérile à 11,4 g.L<sup>-1</sup> ;
- 6 tubes à hémolyse stériles pour dilution de l'eau « ET<sub>2</sub> » ;
- 2 pipettes graduées de 1 mL ;
- 1 pipette automatique P200 avec cônes adaptés ;
- 7 boîtes de gélose coulée et séchée ;
- 6 tubes contenant 4 mL de gélose molle en surfusion en bain thermostaté à 45°C ;

**3.2 - Mode opératoire.**

Vérifier que le bouillon d'*Escherichia coli* a une absorbance comprise entre 0,8 et 1 à 600 nm.

**Mesure à réaliser devant un examinateur.**

Effectuer une série de dilutions décimales de l'eau « ET<sub>2</sub> » en solution de CaCl<sub>2</sub>, de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>.

Dans chaque tube contenant 4 mL de gélose molle maintenue à 45 °C, introduire :

- 0,2 mL de suspension de *E. coli* sensible,
- 0,1 mL des dilutions (de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>) de l'eau « ET<sub>2</sub> » à analyser.

Verser rapidement chaque mélange sur une gélose coulée en boîte de Pétri. Laisser solidifier.

Sur la dernière boîte de gélose, partagée en trois zones, effectuer :

- un témoin de viabilité de la souche,
- un témoin de sa sensibilité aux phages,
- un témoin vérifiant l'efficacité de la filtration de l'eau à analyser « ET<sub>2</sub> ».

Incuber l'ensemble à 37°C, 24 à 48 heures.

**3.3 – Compte rendu.**

Préciser les démarches de réalisation des dilutions et des témoins.

Quel est l'intérêt de la filtration de « ET<sub>2</sub> » ?



**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.

**LES CLOSTRIDIÉS****MICROBIOLOGIE (55 points)**

2ème jour

**Durée : 1 H****CLOSTRIDIÉS ET AUTRES INDICATEURS DE CONTAMINATION  
FÉCALE : ANALYSE D'UNE EAU DE RIVIÈRE EN VUE DE  
L'AMÉNAGEMENT D'UN SITE DE BAINNADE.****1 – Dénombrement des spores de *Clostridium* sulfito-réducteurs.**

Compter les colonies.

Calculer le nombre de spores de *Clostridium* sulfito-réducteurs par mL d'eau en UFC.mL<sup>-1</sup>.**2 – Identification de la souche.**

Lire la galerie et identifier la souche « S » en justifiant la démarche.

**3 – Dénombrement des phages dans l'eau de rivière.**

Lire les témoins et conclure.

Déterminer le nombre de plages de lyse.

Conclure sur le nombre d'unités formant plages par mL d'eau (UFC.mL<sup>-1</sup>).