

**B - BIOLOGIE CELLULAIRE et MOLECULAIRE****(30 points)****Etapes préalables à l'étude d'un effet cytotoxique sur des cellules animales.**

Onensemence les puits d'une plaque avec une suspension cellulaire de cellules adhérentes. On dispose d'une culture en flacon de 25 cm<sup>2</sup>.

**1 - Réactifs et matériel (sur le poste de travail ou sous PSM).**

- Un flacon contenant la culture de cellules Véro.
- Solution de lavage : tampon PBS sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>.
- Solution de trypsine –EDTA.
- Milieu de culture : milieu essentiel minimum de Eagle prêt à l'emploi (additionné de glutamine, sérum de veau foetal, antibiotiques).
- Solution de bleu Trypan.
- Pipettes stériles à usage unique : 1 mL, 5 mL et 10 mL.
- Plaque multi-puits à ensemenecer.
- Cellule de Malassez.
- 2 tubes à hémolyse.

**2 - Protocole opératoire.****2.1 - Trypsination de la culture en flacon.**

Observer la culture disponible (examen macroscopique et microscopique au microscope inversé).

Eliminer le milieu de culture du flacon.

Ajouter environ 2 mL de solution de lavage, laisser agir puis éliminer cette solution.

Introduire dans le flacon 2 mL de trypsine –EDTA et suivre régulièrement la trypsination.

Lorsque celle – ci est achevée, ajouter environ 3 mL de milieu neuf.

**2.2 - Dénombrement de la suspension cellulaire.**

Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,4 mL de suspension cellulaire. Ajouter 0,1 ml de bleu Trypan, puis compter les cellules totales et viables de cette suspension.

En déduire la concentration cellulaire de la suspension obtenue.

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

**2.3 - Ensemencement de la plaque multi-puits.**

On désire obtenir environ 250 cellules par mm<sup>2</sup>.

Calculer le volume à introduire dans chaque puits.

Ensemencer 4 puits avec le volume de suspension nécessaire (si cela apparaît utile, la suspension cellulaire préparée au 2.1 pourra être diluée au préalable).

Ajouter ensuite 2 mL de milieu par puits.

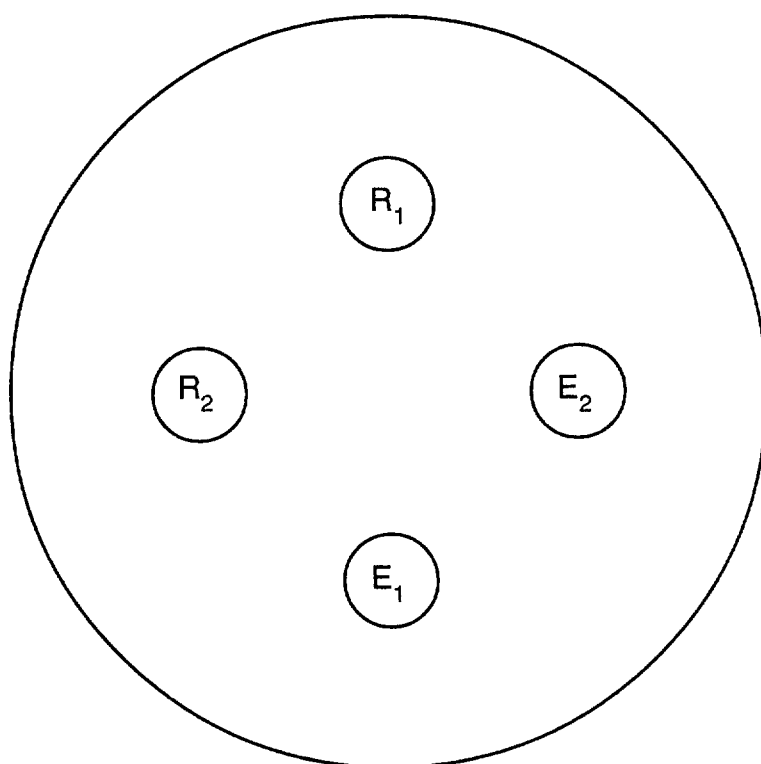
Incuber à 37°C en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>.

**3 - Compte rendu.**

**3.1** - Calculer la concentration en cellules viables de la suspension obtenue après trypsination.

**3.2** - Justifier le volume de suspension cellulaire introduit dans chaque puits.

Gabarit



**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.

**LES NEUTRALISANTS****MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE**

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

1<sup>er</sup> jourDurée : 4 H 30**A - MICROBIOLOGIE**

(55 points)

**Vérification de l'activité bactéricide d'un désinfectant.****Méthode par dilution-neutralisation.****1 - Vérification de l'activité bactéricide d'un désinfectant.**

Dans un souci d'optimisation de la procédure de nettoyage-désinfection des locaux d'un laboratoire de contrôles microbiologiques, on souhaite vérifier l'activité bactéricide du désinfectant habituellement utilisé.

La désinfection a pour objectif de réduire d'une quantité préalablement définie par la Norme Européenne les micro-organismes éventuellement présents sur un support.

Après une procédure de désinfection bien respectée, il doit y avoir une réduction d'un facteur  $10^5$  du nombre de cellules bactériennes viables appartenant à des souches de référence dans des conditions définies dans la norme EN 1276.

Les souches de référence sont les suivantes :

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442

*Escherichia coli* ATCC 10536

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538

*Enterococcus hirae* ATCC 10541

Le but de la présente manipulation est de tester l'efficacité du désinfectant **D** sur une seule souche de référence, à température ambiante après un temps de contact de 15 minutes, en utilisant la méthode de dilution-neutralisation.

**1.1 - Préparation de la souche test.**

La souche test choisie est la souche **A**, présentée en bouillon cœur-cerveille.

**1.1.1 - Préparation de la suspension de la souche test.**

On désire obtenir une suspension contenant  $1,5 \cdot 10^8$  à  $5 \cdot 10^8$  UFC (unités formant colonies)/mL.

Les absorbances à 620 nm doivent être pour cela comprises dans une fourchette indiquée en début d'épreuve.

**Remarque** : la limite de linéarité du spectrophotomètre sera précisée en début d'épreuve.

**1.1.1.1 - Matériel.**

- spectrophotomètre, semi-microcuvettes, Parafilm, pipettes Pasteur, 1 flacon de 20 mL de bouillon cœur-cerveille stérile (noté BCC).
- souche A.

**1.1.1.2 - Réalisation de la suspension.**

Préparer environ 4 mL minimum de suspension ajustée.

**La mesure de l'absorbance de la suspension sera présentée à l'examineur.**

**1.1.1.3 - Compte rendu.**

Expliquer la démarche utilisée.

**1.1.2 - Dénombrement de la suspension précédemment ajustée.**

Le dénombrement est effectué par la technique en masse avec une prise d'essai de 1 mL, en double essai.

**1.1.2.1 - Matériel.**

- pipettes 1 mL graduées stériles ;
- tubes de tryptone-sel 9 mL ;
- 4 boîtes de Pétri stériles ;
- 4 tubes de gélose TSA (Tryptone Soja Agar) en surfusion ;
- Vortex.

**1.1.2.2 - Réalisation du dénombrement.**

Diluer la suspension ajustée précédemment de façon à obtenir un nombre de colonies exploitable.

Les boîtes seront incubées 48 heures à 37°C.

**Montrer la technique de dilution à l'examineur.**

**1.1.2.3 - Compte rendu.**

Justifier le choix des dilutions testées.

**1.2 - Réalisation de l'essai : méthode de la dilution-neutralisation.****1.2.1 - Matériel.**

- 2 boîtes de Pétri vides stériles ;
- 2 tubes de gélose TSA en surfusion ;
- pipettes de 1 mL et 10 mL graduées stériles ;
- 1 tube de 5 mL d'eau distillée ;
- 1 tube de 8 mL de neutralisant noté N (lécithine et tween 80) pour arrêter l'efficacité du désinfectant ;
- 1 flacon de 20 mL de désinfectant dilué, noté D ;
- 1 tube de 3 mL de substance interférente, notée I, composée d'albumine bovine et d'extrait de levure.

**Remarque** : cette substance est utilisée pour vérifier que le désinfectant a toujours la même activité en présence de certaines substances telles les protéines qu'on retrouve éventuellement sur les surfaces à désinfecter.

**1.2.2 - Protocole.**

Introduire dans un tube à essai :

- 1 mL de substance interférente ;
- 1 mL de suspension bactérienne contenant  $1,5 \cdot 10^8$  à  $5,10^8$  UFC /mL.

Agiter et déclencher le chronomètre : laisser **2 minutes (±10 sec)** à température ambiante.

Ajouter 8 mL de désinfectant.

Agiter et déclencher le chronomètre : laisser **15 minutes (±10 sec)** à température ambiante.

Agiter juste avant la fin du temps de contact.

Transférer immédiatement 1 mL du mélange précédent dans un tube contenant 8 mL de neutralisant ; ajouter 1 mL d'eau distillée.

Après **5 minutes (±10 sec)** de neutralisation à température ambiante, prélever en double 1 mL, déposer dans 2 boîtes de Pétri, recouvrir de gélose TSA en surfusion ramenée à 45°C.

Les boîtes seront incubées 48 heures à 37°C.

### 1.3 - Réalisation des témoins.

● **Matériel pour la préparation de la suspension à environ  $7,5 \cdot 10^2$  -  $2,5 \cdot 10^3$  UFC / mL et les deux témoins :**

- 1 flacon de 20 mL de tryptone-sel ;
- pipettes de 1 mL stériles ;
- tubes de tryptone-sel de 9 mL ;
- 6 boîtes de Pétri vides stériles ;
- 6 tubes de gélose TSA en surfusion ;
- 2 tubes de 8 mL de neutralisant notés N ;
- tubes à essais vides stériles.

**1.3.1 - Réalisation d'une suspension à environ  $7,5 \cdot 10^2$  -  $2,5 \cdot 10^3$  UFC / mL à partir de la suspension ajustée au 1.1.1.**

Réaliser une suspension à environ  $7,5 \cdot 10^2$  -  $2,5 \cdot 10^3$  UFC / mL.

**Compte rendu** : indiquer le protocole suivi.

**1.3.2 - Dénombrement de la suspension à environ  $7,5 \cdot 10^2$  -  $2,5 \cdot 10^3$  UFC / mL.**

Le dénombrement est réalisé par la technique dans la masse dans la gélose TSA, en double essai, sur une seule dilution correctement choisie.

Les boîtes seront incubées 48 heures à 37°C.

**Compte rendu** : justifier le choix de la dilution retenue.

**1.3.3 - Témoin 1.**

● **Mode opératoire.**

Introduire 1 mL de suspension bactérienne à environ  $7,5 \cdot 10^2$  -  $2,5 \cdot 10^3$  UFC / mL dans un tube à essai contenant 8 mL de neutralisant ; ajouter 1 mL d'eau distillée.

Agiter, déclencher le chronomètre et laisser à température ambiante **5 minutes ( $\pm 10$  sec)**.

Prélever en double 1 mL, déposer dans 2 boîtes de Pétri, recouvrir de gélose TSA en surfusion ramenée à 45°C.

**1.3.4 - Témoin 2.**

● **Mode opératoire.**

Dans un tube à essai, introduire :

- 1 mL de tryptone-sel et 1 mL de substance interférente ;
- 8 mL de désinfectant.

Déclencher le chronomètre et laisser ce tube à température ambiante **15 minutes ( $\pm 10$  sec)**.

Transférer 1 mL de ce mélange dans un tube contenant 8 mL de neutralisant.

Laisser à température ambiante **5 minutes ( $\pm 10$  sec)**.

Ajouter 1 mL de la suspension bactérienne à environ  $7,5 \cdot 10^2$  -  $2,5 \cdot 10^3$  UFC / mL.

Agiter et déclencher le chronomètre. Laisser **30 minutes ( $\pm 1$  min)** à température ambiante.

Mélanger juste avant la fin du temps de contact.

Prélever en double 1 mL, déposer dans 2 boîtes de Pétri, recouvrir de gélose TSA en surfusion ramenée à 45°C.

Les boîtes seront incubées 48 heures à 37°C.

**1.4 - Compte rendu.**

Indiquer le rôle de chacun des témoins.

Quels sont les résultats attendus pour l'essai proprement dit ?

**2 - Vérification de la pureté d'une souche test B.**

En vue d'effectuer des tests ultérieurs sur le désinfectant D, on vérifie la pureté d'une souche test B présentée en bouillon ordinaire.

**2.1 - Première partie.**

Effectuer les examens microscopiques.

**Compte rendu.**

Décrire et interpréter les examens microscopiques.

Proposer le choix d'un milieu sélectif permettant d'isoler le(s) éventuel(s) contaminant(s). Justifier.

*Faire viser ce choix par un examinateur.*

**2.2 - Deuxième partie.**

Ensemencer la gélose trypticase soja fournie.

Ensemencer le milieu sélectif distribué par les examinateurs.

**B - IMMUNOLOGIE**

**(25 points)**

La souche test choisie pour vérifier l'activité bactéricide du désinfectant possède différentes exo-enzymes dont une désoxyribonucléase (ADNase).

La désoxyribonucléase a la propriété d'hydrolyser l'ADN, un couplage au vert de méthyle permettant de visualiser la réaction : l'ADN, coloré en vert à l'état polymérisé, se décolore après hydrolyse.

**On se propose, par une technique de neutralisation de l'activité enzymatique, de titrer la désoxyribonucléase présente au sein d'un filtrat de culture de la souche test précédemment choisie.**

Le titre en UI / mL de l'enzyme est déterminé grâce à une solution enzymatique étalon traitée dans les mêmes conditions.

**Matériel et réactifs**

- 1 plaque de microtitration à fond rond
- 1 pipette automatique P 5-50  $\mu$ L avec cônes
- 1 feuille de cellophane adhésive
- 60  $\mu$ L de filtrat de culture à titrer noté "ADNase essai"
- 60  $\mu$ L de ADNase étalon notée "ADNase étalon"
- 600  $\mu$ L de sérum anti-ADNase noté "anti-ADNase"
- 1000  $\mu$ L de ADN- vert de méthyle
- 2 mL de tampon Tris

**Mode opératoire**

- Réaliser le titrage selon le protocole fourni en annexe (volumes en  $\mu$ L).
- Procéder de manière identique avec la solution enzymatique étalon et le filtrat de culture à titrer.
- Réaliser les témoins nécessaires dans les cupules 11 et 12.

**Compte rendu**

Indiquer le nom, la composition et le rôle des témoins effectués.

**ANNEXE****Titrage de la désoxyribonucléase présente au sein du filtrat de culture de la souche test****Protocole opératoire**

CUPULES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tampon	-	25	25	25	25	25	25	25	25			
« ADNase essai » ou « ADNase étalon »	25	25	-	-	-	-	-	-	-			
Redistribuer	-	-	25	25	25	25	25	25	25			
Sérum anti-DNase	25	25	25	25	25	25	25	25	25			
	Agiter 15 secondes - Incuber 30 min à 37°C											
ADN- vert de méthyle	50	50	50	50	50	50	50	50	50			
	Agiter 15 secondes. Couvrir les plaques. Incuber 24 heures à 37°C.											

rejeter 25

**Tous les volumes sont exprimés en  $\mu$ L.**

**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.

**CONTRÔLE ET DEVELOPPEMENT  
EN INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE**2<sup>ème</sup> jourDurée : 1 H 30**MICROBIOLOGIE**

(50 points)

**1 - Contrôle rapide de l'identité du micro-organisme présent dans le probiotique. (11 points)**

Commenter l'isolement.

**2 - Evaluation du taux de survie des *L. casei* après passage dans l'estomac. (12 points)**

Comparer les « boîtes test » aux « boîtes étalon » et évaluer le taux de survie des lactobacilles.

Conclure sachant qu'un taux de survie minimum de 0,1% est nécessaire pour que le probiotique ait un effet bénéfique.

**3 - Evaluation du niveau de la contamination par les mycètes. (19 points)**

Présenter et exploiter les résultats du dénombrement des mycètes.

**4 - Identification d'un mycète contaminant isolé d'une culture de *L. casei*. (8 points)**

La quantification de la contamination par les mycètes étant réalisée, il reste à établir le genre du contaminant.

**4.1 - Matériels et réactifs.**

- Contaminant « C » sur gélose Sabouraud.
- Lames et lamelles.
- Adhésif.
- Tube d'eau physiologique stérile.
- Colorant des mycètes (Bleu Cotton...).

**4.2 - Identification.**

Procéder aux observations macroscopique et microscopique nécessaires à l'identification du contaminant « C » présenté sur gélose Sabouraud.

**Présenter un champ microscopique à un examinateur.****4.3 - Compte rendu.**Schématiser les observations et annoter.  
Etablir le genre du mycète contaminant.



**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.

**ÉTUDE D'UNE EAU DESTINÉE A LA CONSOMMATION HUMAINE**

**MICROBIOLOGIE – BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**

(85 points)

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

2<sup>ème</sup> jour

Durée : 1 H 30

**A - MICROBIOLOGIE** 2<sup>ème</sup> jour (50 points)

**1 - Recherche et dénombrement des *E.coli*.**

Les paramètres microbiologiques, selon le décret du 20 décembre 2001, stipulent l'absence d'*E.coli* dans 100 mL d'eau de consommation.

**1.1 - Matériel.**

Réactif de recherche de l'indole.

Ce réactif répond aux données suivantes :

Diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA) à 1 %

R 36/38 : irritant pour les yeux et la peau

S 28 : après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec l'eau.

**1.2 - Protocole opératoire.**

Compter le nombre  $n$  de colonies obtenues. Réaliser la recherche de l'indole sur  $n'$  colonies selon les modalités suivantes :

- si  $n < 5$   $n' = n$
- si  $5 \leq n < 25$   $n' = 5$
- si  $25 \leq n$   $n' = \sqrt{n}$  arrondi au nombre entier supérieur

Déposer sur chaque colonie 1 goutte de réactif. Une coloration bleue apparaissant en quelques minutes révèle la présence d'indole.

Expression du résultat :  $N = n \cdot n_E / n'$

$N$  est le nombre d'*E.coli* pour le volume donné

$n_E$  est le nombre de colonies indole + caractérisées

Conclure.

**2 - Étude des bactéries dénitrifiantes d'un biofilm.**

**2.1 - Recherche des capacités de dénitrification d'une souche bactérienne.**

**2.1.1 - Détermination du type de nitrate réductase.**

Observer la présence de culture sur les différents milieuxensemencés et conclure.

**Données :**

Pour les bactéries dénitrifiantes possédant une nitrate réductase de type A respiratoire, le chlorate est réduit à la place du nitrate pour donner des intermédiaires hautement toxiques, ce qui explique l'absence de culture dans la masse de la gélose VF nitraté additionnée de chlorate.

Pour les bactéries possédant une nitrate réductase assimilatrice de type B, le chlorate n'est pas un substrat, elles poussent dans la masse de la gélose VF nitraté additionnée de chlorate.

2.1.2 - Identification d'une souche bactérienne.

Lire la galerie d'identification et conclure.

**2.2 - Dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa*.**

Donner le résultat du dénombrement.

Conclure.

**B – BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE 2<sup>ème</sup> jour (35 points)**

**Lecture et compte rendu :**

Au microscope inversé, observer l'aspect de chacun des puits.

Déterminer la DES (dose sans effet toxique) c'est-à-dire la plus grande quantité de pesticide ne présentant pas d'effet cytotoxique sur les fibroblastes, dans les conditions opératoires.

**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.

**CONTRÔLES ET ESSAIS REALISES DANS UNE INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE**2<sup>ème</sup> jourDurée : 1 H 30**A - MICROBIOLOGIE**

(60 points)

**1 - Essai en vue de la validation des Pétrifilms pour le dénombrement des levures dans une matière première : le gluconate de calcium. (23 points)**

Effectuer les dénombrements en géloses Sabouraud et en Pétrifilms.  
Exprimer les résultats en UFC pour 100 mL de la solution de gluconate de calcium préparée.  
Comparer avec le résultat attendu (par numération en cellule de Malassez).  
Comparer les 2 techniques entre elles.

**2 - Contrôle de matière première : gluconate de calcium pour solution injectable. (16 points)**

Compter les colonies obtenues sur les 2 membranes.  
Donner le résultat en UFC pour 1g de gluconate de calcium en poudre.  
Conclure en fonction des critères de la norme.

**Critères microbiologiques de la norme :**

- Germes aérobies mésophiles totaux = bactéries + levures : Total < 100 UFC / g
- *Escherichia coli*: 0 / g
- *Staphylococcus aureus*: 0 / g
- *Pseudomonas*: 0 / g

**Rappels :**

- la solution A a été obtenue en dissolvant 20 g de gluconate de calcium dans 80 mL de diluant ;
- filtration sur membrane de 10 mL de solution A.

**3 - Contrôle de la concentration de gentamicine sulfate. (21 points)**

Mesurer, pour chaque solution testée, les diamètres des zones d'inhibition obtenues.  
Calculer la valeur moyenne des diamètres pour chacune d'elles.  
Evaluer la concentration effective de la solution à doser.

**B - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**

(30 points)

**Ensemencement d'une plaque multi-puits avec une suspension de cellules adhérentes.**

Réaliser les examens macroscopique et microscopique de la culture obtenue et conclure.

**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.

**LES NEUTRALISANTS****MICROBIOLOGIE- IMMUNOLOGIE**2<sup>ème</sup> jourDurée : 1 H 30**A - MICROBIOLOGIE**

(55 points)

**1 - Vérification de l'activité bactéricide d'un désinfectant.**

1.1 - Vérifier que :

- N est compris entre  $1,5 \cdot 10^8$  et  $5 \cdot 10^8$  UFC/mL ;
- n est compris entre  $7,5 \cdot 10^2$  et  $2,5 \cdot 10^3$  UFC / mL.

où

N est le nombre d'UFC/mL de la suspension bactérienne ajustée ;

n est le nombre d'UFC/mL de la suspension bactérienne préparée à partir de la suspension ajustée .

1.2 - Vérifier que :

- $n_1 \geq 0,05 \cdot n$  ;
- $n_2 \geq 0,5 \cdot n_1$ .

où

 $n_1$  est le nombre d'UFC/mL pour le témoin 1 ; $n_2$  est le nombre d'UFC/mL pour le témoin 2.

et conclure

1.3 - Déterminer la réduction du nombre de cellules viables obtenue lors de l'essai et conclure quant à l'activité bactéricide du désinfectant D dans les conditions opératoires testées.

**Rappel** : après une procédure de désinfection bien respectée, il doit y avoir une réduction d'un facteur  $10^5$  du nombre de cellules bactériennes viables.

**2 - Contrôle de la pureté de la souche test B.**

Lire les deux isolements réalisés.

Effectuer la recherche d'enzymes respiratoires.

Confirmer l'orientation de la souche test B et orienter le diagnostic pour le (ou les) contaminant(s) éventuel(s).

**B - IMMUNOLOGIE**

(25 points)

Effectuer la lecture des réactions.

Rendre le résultat sous forme de tableau.

Préciser le titre en ADNase du filtrat de culture par comparaison au profil des résultats obtenus pour l'étalon.

Le titre de la solution étalon sera indiqué par l'examineur.