



MINISTÈRE
DE L'ÉDUCATION
NATIONALE, DE
L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR ET DE
LA RECHERCHE

EAI BIO 1

SESSION 2016

AGRÉGATION CONCOURS INTERNE ET CAER

Section : BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE

PREMIÈRE ÉPREUVE

Durée : 6 heures

Le dictionnaire bilingue anglais français est autorisé.

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout autre dictionnaire et de tout matériel électronique (y compris la calculatrice) est rigoureusement interdit.

Dans le cas où un(e) candidat(e) repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il (elle) le signale très lisiblement sur sa copie, propose la correction et poursuit l'épreuve en conséquence.

De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, il vous est demandé de la (ou les) mentionner explicitement.

NB : *La copie que vous rendrez ne devra, conformément au principe d'anonymat, comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé comporte notamment la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de signer ou de l'identifier.*

Tournez la page S.V.P.

A

L'épreuve, qui prend appui sur un dossier technique relatif à un problème biotechnologique, s'organise en deux parties :

- la première permet d'évaluer les capacités du candidat à utiliser ses connaissances scientifiques et techniques pour expliciter ou valider les solutions retenues ;
- la seconde permet d'évaluer les capacités du candidat à utiliser le support proposé pour élaborer un exercice permettant l'évaluation des connaissances et méthodes acquises par les élèves à un niveau de formation déterminé.

Le candidat doit situer l'exercice dans un processus d'apprentissage et par rapport aux autres enseignements scientifiques ou techniques qui lui sont associés.

*Dans le sujet, la lettre **C** identifie les questions mobilisant les connaissances scientifiques et techniques, la lettre **P** identifie les questions d'ordre pédagogique.*

Des extraits d'un référentiel de BTS sont regroupés en fin de sujet.

Stevia rebaudiana Bertoni est une plante vivace de la famille des Asteraceae. Elle est originaire d'Amérique du Sud, plus particulièrement du Paraguay où on la surnomme « *caá-êhé* », l'herbe douce. En effet, un très grand nombre d'agents édulcorants sont produits dans ses tissus foliaires. Ces molécules, principalement des glycosides diterpéniques, ont un pouvoir sucrant 30 à 320 fois supérieur à celui du saccharose. Il n'est donc pas étonnant que cette plante soit cultivée à des fins commerciales à une époque où la demande en produits d'origine naturelle se fait de plus en plus grande.



De nombreux procédés ont été développés afin d'isoler et d'identifier les différents dérivés diterpéniques contenus dans les feuilles de *Stevia rebaudiana*. Ces molécules sont issues du stéviol par isomérisation (isostéviol) ou glycosylation (stévioside, rebaudiosides, ...).

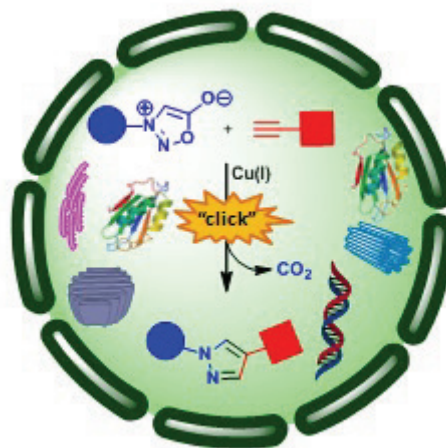
Des auteurs suggèrent qu'outre leur propriété hypocalorique, le stéviol et ses dérivés possèderaient diverses activités biologiques. De ce fait, ce seraient des cibles de choix pour les industries pharmaceutiques.

Les différentes parties du sujet visent à étudier trois aspects de la biologie de ces molécules d'intérêt :

- ✓ l'utilisation de dérivés d'isostéviol triazole en thérapie anti-tumorale ;
- ✓ une méthode de purification du stévioside ;
- ✓ l'utilisation d'extraits de *Stevia* comme agents de prévention des caries.

1 Synthèse et étude de nouvelles drogues anti-tumorales

La chimie « CLICK » est un procédé récent développé par deux équipes du CEA en 2013. Cette technique permet de connecter en une seule réaction deux molécules ou nanoparticules dans des milieux biologiques.



Une équipe de recherche américaine a utilisé ce procédé afin de synthétiser de nouvelles drogues anti-tumorales à partir d'isostéviol (Khaybullin et al., Molecules 2014). La stratégie consiste à combiner une molécule d'isostéviol et un « noyau » triazole (exemples **document 1**), l'objectif de l'association étant d'augmenter la demi-vie des différents types de conjugués formés.

On se propose d'étudier les effets cytotoxiques de ces molécules sur différentes lignées de cellules tumorales adhérentes et non adhérentes.

- C1** Présenter sous forme d'un tableau comparatif les principales caractéristiques d'une lignée cellulaire établie et d'une culture primaire.
- C2** Citer les composants d'un milieu de culture complet pour cellules eucaryotes, préciser leur rôle et indiquer les conditions physico-chimiques de culture.

C3 *Présenter sous forme d'organigramme les étapes d'entretien de cultures de cellules eucaryotes adhérentes et non adhérentes. Préciser la liste des matériels et des réactifs nécessaires à cette manipulation.*

L'activité cytotoxique des conjugués isostéviol triazole est testée sur différentes lignées cellulaires adhérentes issues de tumeurs humaines : poumon (A549), pancréas (ASPC-1), sein (MDA-MB231), prostate (PC-3), colon (HCT116) et utérus (HeLa) (**document 2**).

C4 *Justifier les différentes densités cellulaires initiales utilisées lors de l'ensemencement (**document 2a**).*

Le MTT est un sel de tétrazolium réduit sous la forme d'un précipité de formazan en présence de la succinate déshydrogénase mitochondriale.

C5 *Expliquer en quoi l'utilisation du MTT permet d'obtenir une estimation de la quantité cellulaire.*

C6 *Analyser les résultats du **document 2b**.*

Dans le cadre de l'introduction d'une activité technologique en STS Biotechnologies portant sur l'analyse de toxiques, plusieurs points sont abordés.

P1 *Exposer, en exploitant les **documents 2b et 2c**, l'organisation d'une séance de TD permettant d'introduire la notion d'IC50. Présenter les objectifs associés à chaque étape.*

Les différents conjugués sont également testés sur deux lignées de cellules tumorales non adhérentes, MOLT-4 et HL-60, en plaque de 96 puits selon le protocole utilisé précédemment à l'exception du coffret de dosage. En effet, le coffret CellTiter-Glo® (Promega) est utilisé cette fois-ci pour la réalisation des mesures de viabilité cellulaire. Une partie du protocole est décrite dans le **document 3**.

C7 *Présenter le principe de la méthode de mesure de viabilité cellulaire.*

Afin de pouvoir être utilisé sur une culture cellulaire, le *CellTiter-Glo® Reagent* doit contenir un autre réactif, en plus de ceux cités dans le **document 3**.

C8 *Identifier sa nature et préciser son intérêt.*

La viabilité cellulaire peut être mesurée par des méthodes différentes de celles citées précédemment.

C9 *Présenter le principe de l'une d'entre elles.*

Chez l'Homme, le stéviol est issu d'une hydrolyse de différents dérivés osidiques. Cette hydrolyse, très limitée, n'est le fait que de la flore intestinale. L'un des principaux dérivés contenu dans les extraits de *Stevia rebaudiana* est le stévioside ou 19-O-β-D-Glucopyranosyl-13-O-[β-D-Glucopyranosyl(1→2)-β-D-Glucopyranosyl]-stéviol.

C10 *Ecrire la formule du dérivé 19-O-β-D-Glucopyranosyl-13-O-[β-D-Glucopyranosyl(1→2)-β-D-Glucopyranosyl]-stéviol, à partir de la structure du stéviol présentée en **document 4**.*

2 Purification des stévioides

Il existe différentes méthodes pour extraire et purifier les stévioides à partir des feuilles de *Stevia rebaudiana*. Une méthode éco-responsable et peu onéreuse a été développée en 2012 (Adari Bhaskar Rao et al., *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012).

Elle utilise des procédés membranaires en mode tangentiel avec recirculation du rétentat permettant, non seulement d'améliorer le rendement, mais aussi les qualités organoleptiques et les propriétés antioxydantes du produit final.

Les différentes étapes de l'extraction - purification sont présentées dans le **document 5**.

C11 *Proposer un schéma annoté des étapes membranaires permettant de suivre la circulation des différents fluides.*

Dans un tableau, préciser la répartition des différents types de molécules présentes dans le produit à traiter entre les différents fluides.

Le **document 6** présente l'évolution du débit lors d'une filtration frontale et d'une filtration tangentielle.

C12 *Analyser les graphiques et expliquer l'évolution du débit de filtration dans chaque cas.*

Le **document 7** regroupe les principaux paramètres caractérisant le fonctionnement du procédé d'ultrafiltration en mode tangentiel.

C13 *Expliquer les modifications du flux de perméation au cours du traitement du produit.*

La caractérisation de la sélectivité est illustrée par la courbe du **document 8**.

P2 *A l'aide de ce document, concevoir un exercice illustrant le principe de l'ultrafiltration en STS Bioanalyses et Contrôles. Indiquer les principaux éléments de corrigé.*

Une autre méthode utilisant également des procédés membranaires a été développée (Zhang Shi Qiu et al., *Food Research International*, 2000). Elle intègre une microfiltration avant l'ultrafiltration et la nanofiltration. Ces trois opérations s'accompagnent d'une diafiltration. Le schéma des différentes étapes est présenté dans le **document 9**.

La diafiltration est une opération qui consiste, au cours d'une séparation par filtration, à ajouter de l'eau ou une solution appropriée au rétentat qui est retraité dans le module de filtration (recirculation) en mode tangentiel.

C14 *Expliquer en quoi cette opération permet d'améliorer les performances de la filtration.*

Lors de la mise en œuvre d'une ultrafiltration en STS Bioanalyses et Contrôles on se propose d'étudier le résultat du traitement de 100 mL de lactosérum ayant permis de recueillir 90 mL de perméat et 10 mL de rétentat. L'ultrafiltration est effectuée sans diafiltration avec recirculation du rétentat.

Après avoir réalisé l'ultrafiltration, les étudiants devront doser le lactose dans les trois fractions : lactosérum, perméat et rétentat, en utilisant le coffret de dosage Mégazyme, Lactose & D-galactose.

La composition du lactosérum est présentée dans le tableau du **document 10**.

Des extraits de la fiche technique du coffret de dosage sont présentés en **document 11**.

P3 Concevoir des questions permettant d'introduire tous les calculs préliminaires nécessaires à la préparation des échantillons pour la réalisation du dosage et indiquer les éléments de correction.

P4 Concevoir des questions permettant d'introduire tous les calculs nécessaires à l'exploitation des résultats et indiquer les éléments de correction.

Afin d'améliorer la qualité des résultats, il est possible de tenir compte des pertes liées à la préparation de l'échantillon en réalisant des expériences de récupération, c'est-à-dire en ajoutant une quantité connue de lactose ou de D-galactose à l'échantillon initial.

C15 Présenter les calculs de concentration tenant compte du rendement de récupération.

3 Etude de l'efficacité d'extraits de *Stevia rebaudiana* sur la croissance de bactéries cariogènes

La chlorhexidine a des effets irritants et allergisants ce qui conduit à chercher une alternative à cette molécule. Des études ont montré les effets antimicrobiens des extraits de *Stevia* sur les champignons et de nombreuses bactéries.

L'objectif de l'étude proposée est de comparer l'efficacité d'extraits aqueux et alcooliques de *Stevia rebaudiana* envers *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus acidophilus* à celle de la chlorhexidine, antiseptique et anti plaque dentaire utilisé en bain de bouche.

Les deux souches bactériennes testées sont réputées cariogènes. Présentes dans la salive, elles forment facilement un biofilm et produisent de l'acide lactique responsable de la déminéralisation dentaire.

Des extraits aqueux et alcooliques de *Stevia* ont été préparés selon le protocole décrit dans le **document 12**.

La méthode de diffusion en milieu gélosé a été utilisée pour tester leur efficacité ainsi que celle de la chlorhexidine sur *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus acidophilus*. Le **document 13** décrit les étapes du protocole.

C16 Rappeler la signification d'ATCC. Préciser l'intérêt de l'utilisation de souches ATCC.

P 5 En exploitant le **document 14**, proposer un exercice permettant d'analyser un milieu de culture de microorganismes ; indiquer les éléments de corrigé.

C17 Analyser les résultats présentés dans le **document 13**.

Lors de séances d'activités technologiques consacrées à la réalisation d'antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé, en première année de STS Analyses de Biologie Médicales, plusieurs mises en situation sont envisagées.

P6 Proposer une séance d'activités technologiques permettant d'illustrer la nécessité de la standardisation d'un tel antibiogramme : lister les paramètres de cette standardisation, préciser l'organisation de la séance et les conditions matérielles de sa réalisation.

Lors d'une séance de lecture d'un antibiogramme en milieu gélosé, les étudiants ont mesuré les diamètres d'inhibition de culture. Ils disposent d'abaques de lecture dont un extrait est présenté dans le **document 15**.

P7 *Dégager les notions essentielles à transmettre aux étudiants à l'aide de ce **documents15** afin d'exploiter leurs résultats.*

La CMI a été déterminée en milieu liquide selon le protocole présenté dans le **document 16a**. La suspension doit être ajustée à environ 10^5 micro-organismes par millilitre.

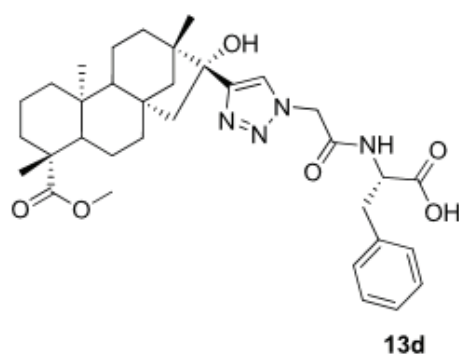
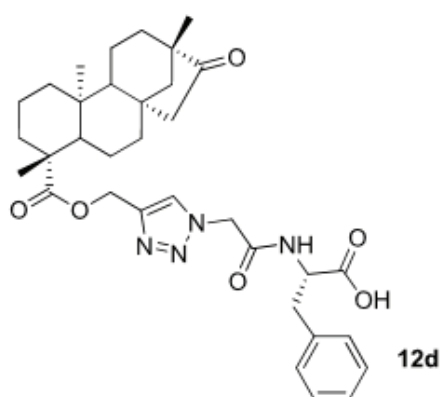
C18 *Expliquer l'importance de cet ajustage et indiquer une méthode rapide permettant de le réaliser.*

C19 *Construire un tableau complet de la manipulation.*

C20 *Déterminer la CMI dans chacun des cas à l'aide des résultats du **document 16b**. Analyser ces résultats et formuler des hypothèses pour expliquer les différences obtenues avec les deux extraits. Proposer une expérience complémentaire pour trancher entre ces hypothèses.*

Document 1

Deux exemples d'association entre une molécule d'isostéviol et un « noyau » triazole
(adapté de Khaybullin et al., Molecules, 2014)



Document 2

Etude de l'effet cytotoxique des différents conjugués

Document 2a

Etapes permettant la détermination de l'effet cytotoxique des différents conjugués

- Ensemencement des cellules en plaque 96 puits avec des densités cellulaires allant de 5000 à 12000 cellules par puits, en fonction du type cellulaire considéré.
- Traitement pendant 72 h avec différents conjugués, à différentes concentrations.
- Incubation pendant 4 h avec 100 μL de MTT à 0,5 mg.mL^{-1} (bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium).
- Elimination du surnageant de culture et ajout du DMSO dans chaque puits.
- Lecture de l'absorbance à 570 nm.

Document 2b

Résultats des activités cytotoxiques des différents conjugués
sur six lignées différentes issues de tumeur humaines adhérentes

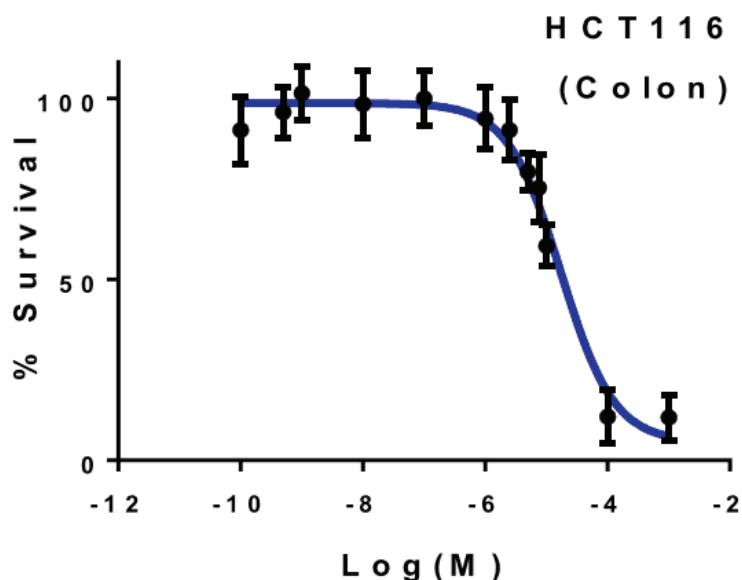
Table 1. Cytotoxic activities of isosteviol derivatives against six human attached cancer cell lines ^a.

Compound	IC ₅₀ (μM)					
	A549 (Lung)	ASPC-1 (Pancreas)	MDA231 (Breast)	PC-3 (Prostate)	HCT116 (Colon)	HeLa (Cervical)
12a	9.95 ± 0.24	4.79 ± 0.18	13.76 ± 0.63	18.23 ± 0.95	6.60 ± 0.38	20.18 ± 1.03
12b	98.42 ± 5.63	>100	>100	>100	13.66 ± 0.41	5.83 ± 0.33
12c	63.71 ± 3.84	>100	>100	>100	>100	51.14 ± 3.65
12d	>100	>100	>100	>100	>100	>100
13a	43.52 ± 1.52	>100	69.2 ± 5.23	>100	45.95 ± 2.33	29.62 ± 1.52
13b	31.7 ± 1.84	>100	38.12 ± 1.82	73.65 ± 5.61	37.71 ± 1.03	30.72 ± 0.62
13c	56.4 ± 1.98	54.68 ± 3.28	50.13 ± 3.08	43.84 ± 1.33	48.9 ± 1.93	40.57 ± 2.81
13d	>100	>100	>100	>100	>100	>100

^a Cell viability was analyzed by the MTT assay. All measurements were performed in triplicate. Data was represented as mean ± standard deviation (SD).

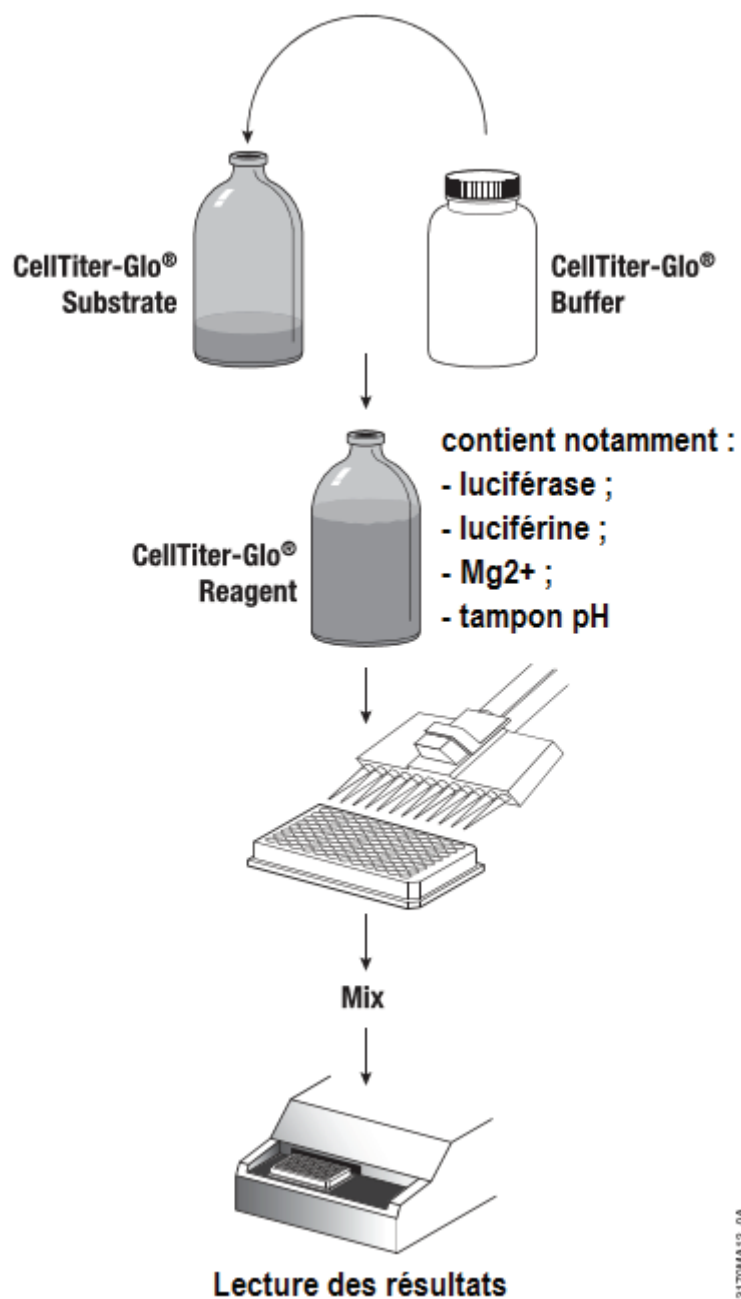
Document 2c

Résultats obtenus avec le conjugué 12a sur la lignée HCT116 dérivée d'un cancer du côlon
(M : concentration molaire du conjugué)



Document 3

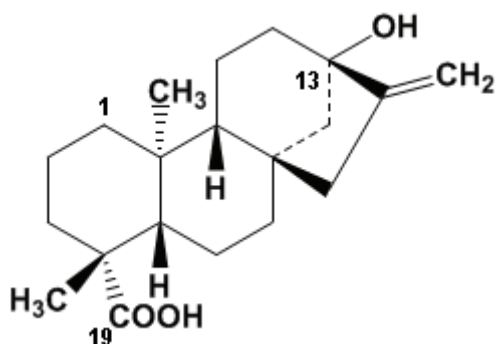
Diagramme montrant le mode opératoire simplifié du coffret CellTiter-Glo® Reagent



3170MA12_0A

Document 4

Structure semi-développée du stéviol



Document 5

Isolation and Purification of Steviosides

(Adari Bhaskar Rao, Ernala Prasad, Goka Roopa, Sundergopal Sridhar, Yerrapragada Venkata Lakshmi Ravikumar, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012, 3, 327-335)

The leaves (5 kg) of *Stevia rebaudiana* were initially air dried at 50°C and treated with non polar organic solvent to remove color pigments and waxy material present on the surface of stevia leaves. Thus obtained leaves were powdered to 20 - 30 mm mesh size and steviosides were extracted in aqueous solution (1:10) adjusted to pH 3, at 60°C, with agitation. On incubation for 6 hours the extract was subjected to pressurized hot water extractor (PHWE) operating at optimized conditions of 100 kPa pressure at temperatures of 100°C - 110°C for 10 minutes, for extraction of steviosides.

Thus, obtained crude extract was cooled and filtered solution was adjusted to pH 10 by adding 0.1 N sodium hydroxide and heated to 60°C for one hour, the precipitate formed was filtered and the stevioside rich solution was neutralized to pH 7 by adding dilute acid (0.1 N HCl).

The crude solution rich in stevioside was passed through ultrafiltration (UF) membrane of 30 kDa, molecular weight cut-off (MWCO), operating at a feed pressure of experimental conditions. The concentration of stevioside present in the extracts was determined 200 - 500 kPa, at room temperature. This process removes cell debris and helps in clarification of the leaf extract, in obtaining a clear solution containing sweet steviol glycosides. The UF membrane unit operation results in retaining leaf carotenoid pigments (70% - 80%); quantified through spectrophotometer.

The obtained filtrate was passed through nanofiltration membrane (NF) with a MWCO ranging of 250 Da, operated at a transmembrane pressure of 1500 kPa at a room temperature to concentrate the product stevioside in the retentate by removing 80% - 90% of water through permeate.

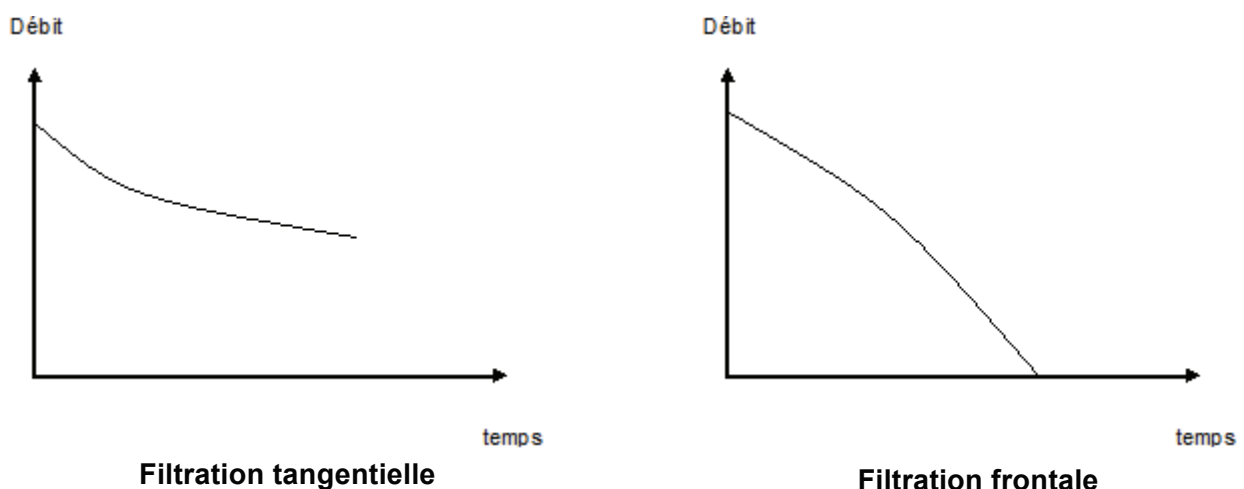
Thus obtained stevioside rich solution was treated with active animal charcoal (20%) and filtered through ciliate (5%) for to obtain a clear solution enriched with steviosides, this on spray drying gave a white stevioside powder.

All the operating conditions carried out by UF/NF membrane process in isolation and purification steviosides from stevia leaves were carried at optimum by HPLC.

The structure of steviosides were confirmed by NMR and mass spectral studies (LC-Mass chromatogram) and compared with standard stevioside.

Document 6

Evolution du débit de filtration au cours du temps



Document 7

Principaux paramètres caractérisant le fonctionnement du procédé d'ultrafiltration tangentielle

(Tableau adapté de Principes de base de la filtration membranaire de Patrice Bacchin)

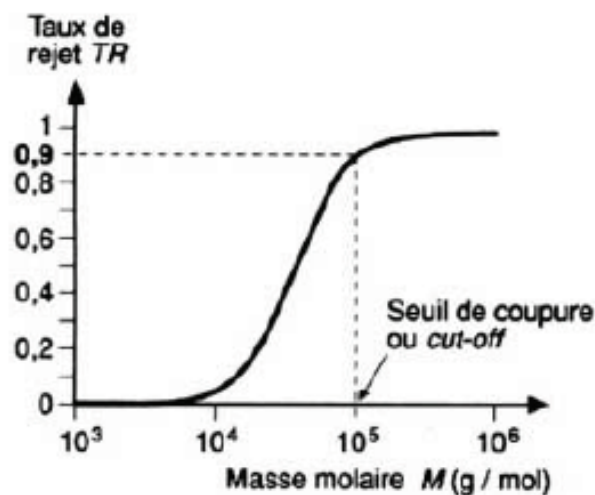
Paramètre	Signification	Expression mathématique
Pression transmembranaire (PTM)	Force agissante de l'opération définie par la moyenne des pressions alimentation P_A et rétentat P_R , à laquelle on soustrait la pression du compartiment perméat, P_P	$PTM = \frac{P_A + P_R}{2} - P_P$
Flux de perméation (J)	Productivité du procédé défini par le débit de perméation, Q_p , divisé par la surface membranaire S	$J = \frac{Q_p}{S}$
Taux de rejet (ou taux de rétention) (R)	Sélectivité du procédé : mesure le taux de rétention d'un soluté avec C_P = concentration dans le perméat et C_R = concentration dans le rétentat	$R = 1 - \frac{C_P}{C_R}$
Perméabilité de la membrane au solvant (L_P)	Paramètre intrinsèque de la membrane décrivant sa résistance hydraulique, R_m , vis à vis du solvant	$L_P = \frac{1}{R_m} = \frac{J}{PTM}$
Taux de conversion (Y)	Fraction de liquide qui traverse la membrane	$Y = \frac{Q_P}{Q_A}$

Lorsque l'échantillon est filtré le flux de perméation devient : $J = \frac{PTM - \Delta\pi}{R_m + R_c}$

Avec $\Delta\pi$ = contre-pression osmotique et R_c = résistance hydraulique supplémentaire.

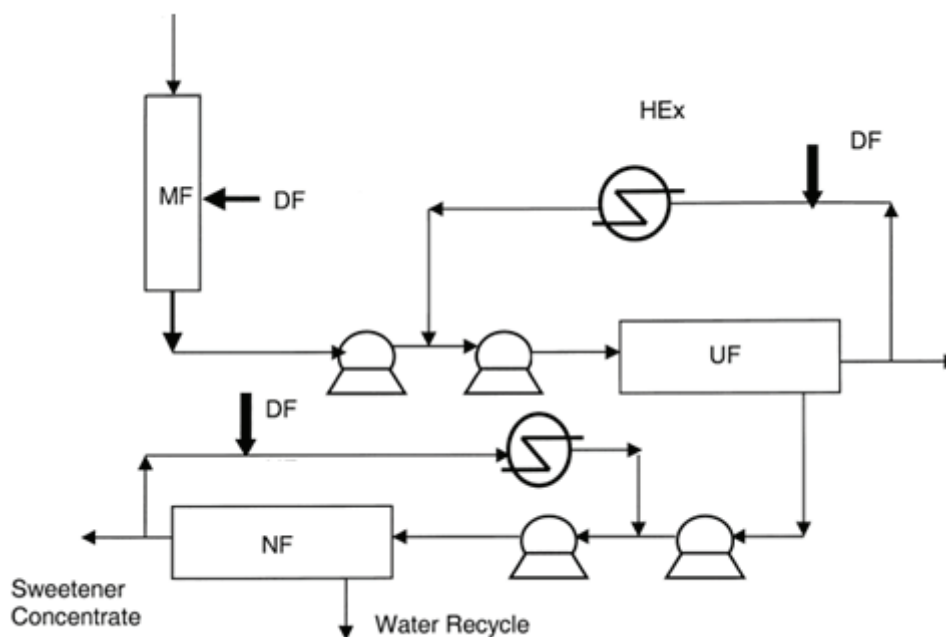
Document 8

Caractérisation de la sélectivité d'une membrane



Document 9

A conceptual process flow diagram for producing stevia sweetener concentrate
(Zhang, Shi Qiu et al, Food Research International, 2000)



= pompe

MF = microfiltration à 104 kPa et 80°C

UF = ultrafiltration à 440 kPa et 80°C

NF = nanofiltration à 510 kPa et 80°C

DF = injection d'eau pour diafiltration

Hex = échangeur de chaleur

Document 10

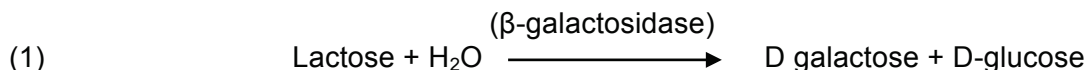
Tableau de la composition moyenne d'un lactosérum

Constituants	Concentrations en g.L ⁻¹
Matières sèches	60 à 65
Lactose	39 à 50
Glucose	0,07
Galactose	0,02
Protéines	7,2 à 8,5
Minéraux	5 à 7,2
Acide lactique	1 à 6

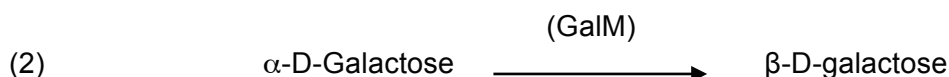
Document 11
Extraits de la fiche technique kit Mégazyme, Lactose & D-galactose

PRINCIPE

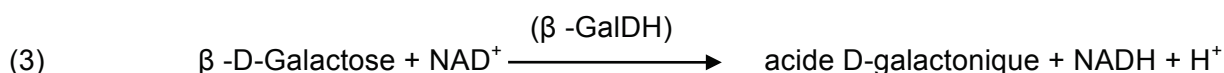
Dans cette procédure décrite (une modification de la méthode AOAC 984.15 ; lactose dans le lait) le lactose est hydrolysé en D-galactose et D-glucose en présence des β -galactosidases d'*Aspergillus niger* à pH 5,0 (1).



L'inter-conversion des formes α - et β - du D-galactose est catalysée présence de la galactose mutarotase (GalM) (2).



Le β -D-galactose est oxydé par le NAD^+ en acide D-galactonique en présence de β -galactose déshydrogénase (β -GalDH) à pH 8,6 (3).



SPECIFICITE, SENSIBILITE, LINEARITE ET PRECISION :

Les dosages sont spécifiques du lactose et D-galactose. La plus faible absorbance permettant une différenciation dans ce dosage est de 0,010 unité d'absorbance. Cela correspond à 1,48 mg.L⁻¹ de lactose (ou 0,74 mg de D-galactose.L⁻¹) de solution échantillon au volume maximal de 1,00 mL. La limite de détection est de 2,96 mg de lactose.L⁻¹, dérivée d'une différence d'absorbance de 0,020 pour le volume maximal d'échantillon de 1,00 mL.

Le dosage est linéaire sur une gamme allant de 4 à 80 μg de D-galactose (ou 8 à 160 μg de lactose) par dosage. Dans les dosages en duplicat d'une solution échantillon, une différence d'absorbance entre 0,005 et 0,010 est possible. Avec un volume d'échantillon de 1,00 mL, cela correspond à une concentration de lactose d'environ 0,74 à 1,48 mg.L⁻¹ de solution échantillon. Si l'échantillon est dilué durant sa préparation, le résultat est multiplié par le facteur de dilution, F.

PROCEDURE A : (Procédure Standard)

Longueur d'onde :	340 nm
Cuve :	trajet optique 1 cm (verre ou plastique)
Température :	25°C
Volume final :	2,72 mL
Solution échantillon :	4-80 μg de D-galactose (ou 8-160 μg de lactose) par cuve (dans un volume d'échantillon de 0,20 à 1,00 mL)

Effectuer la lecture par rapport à l'air (sans cuve dans le trajet optique) ou par rapport à l'eau.

Pipeter dans les cuves	Lactose		Galactose	
	Blanc	Echantillon	Blanc	Echantillon
Solution échantillon solution 4 (β -Galactosidase)	- 0,20 mL	0,20 mL 0,20 mL	- -	0,20 mL -
S'assurer que toutes les solutions sont délivrées dans le fond de la cuve. Mélanger délicatement par agitation. Couvrir les cuves et les incuber 10 min à 25°C. Puis ajouter :				
Eau distillée (à 25°C)	2,20 mL	2,00 mL	2,40 mL	2,20 mL
Solution 2 (tampon)	0,20 mL	0,20 mL	0,20 mL	0,20 mL
Solution 3 (NAD^+)	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL
Mélanger, lire les absorbances des solutions (A_1) après environ 3 min et démarrer les réactions par addition de :				
Suspension 5 (β -GalDH/GalM)	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL
Mélanger, lire les absorbances des solutions (A_2) à la fin de la réaction (< 5 min). Si la réaction n'est pas terminée au bout de 6 min, continuer à lire les absorbances toutes les minutes jusqu'à ce que les absorbances restent identiques sur 1 min.				

PREPARATION DES ECHANTILLONS

1. Dilution de l'échantillon

La quantité de D-galactose présent dans la cuve doit être comprise entre 4 et 80 μg (i.e. la quantité de lactose présent doit être comprise 8 et 160 μg).

2. Clarification de l'échantillon

a. Solutions

Solution de Carrez I. Dissoudre 3,60 g d'hexacyanoferrate de potassium (II) $\{\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]\cdot 3\text{H}_2\text{O}\}$ (Réf. Sigma P-9387) dans 100 mL d'eau distillée. Conserver à température ambiante.

Solution de Carrez II. Dissoudre 7,20 g de sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Réf. Sigma Z-4750) dans 100 mL d'eau distillée. Conserver à température ambiante.

Hydroxyde de sodium (NaOH , 100 mM). Dissoudre 4 g de NaOH dans 1 L d'eau distillée. Conserver à température ambiante.

b. Procédure

Pipeter l'échantillon liquide dans une fiole jaugée de 100 mL contenant environ 60 mL d'eau distillée, ou peser une quantité suffisante de l'échantillon dans une fiole jaugée de 100 mL et ajouter 60 mL d'eau distillée. Ajouter avec précaution 5 mL de solution de Carrez I, 5 mL de solution de Carrez II et 10 mL de solution de NaOH (100 mM). Mélanger après chaque addition. Compléter la fiole jaugée jusqu'à la marque, mélanger et filtrer.

3. Considérations générales

(a) Échantillons liquides : les échantillons liquides clairs, légèrement colorés et approximativement neutres, peuvent être utilisés directement pour le dosage.

(b) Échantillons acides : si plus de 0,1 mL d'échantillon acide doit être analysé non dilué (tel que du vin ou du jus de fruit), le pH de la solution doit être augmenté à environ 8,6 en utilisant du NaOH 2 M et la solution doit être mise en incubation à température ambiante pendant 30 minutes.

(c) Dioxyde de carbone : les échantillons ayant une forte teneur en dioxyde de carbone, comme la bière, doivent être dégazés en augmentant le pH à environ 8,6 au moyen de NaOH 2 M et en les agitant doucement, ou en les agitant avec une baguette de verre.

(d) Échantillons colorés : dans le cas des échantillons colorés, il peut être nécessaire d'analyser un blanc supplémentaire, c'est-à-dire un échantillon sans β -GalDH/GalM.

(e) Échantillons fortement colorés : en cas d'utilisation non dilués, les échantillons fortement colorés doivent être traités par addition de 0,2 g de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)/10 mL d'échantillon. Agiter le tube vigoureusement pendant 5 min puis filtrer avec du papier filtre Whatman n°1.

(f) Échantillons solides : homogénéiser ou broyer les échantillons solides dans l'eau distillée et filtrer si nécessaire.

(g) Échantillons contenant des graisses : extraire ces échantillons à l'eau chaude à une température supérieure au point de fusion des graisses, par exemple dans une fiole jaugée de 100 mL à 60°C. Ajuster à température ambiante et compléter la fiole jaugée jusqu'à la marque avec de l'eau. Conserver sur de la glace ou au réfrigérateur pendant 15 à 30 min puis filtrer. Éliminer les quelques premiers mL de filtrat et utiliser le surnageant clair (pouvant être légèrement opalescent) pour le dosage. Il est également possible de clarifier la solution au moyen des réactifs de Carrez.

(h) Échantillons contenant des protéines : déprotéiniser les échantillons contenant des protéines par addition d'un volume égal d'acide perchlorique glacial 1 M et mélanger. Centrifuger à 1500 g pendant 5 minutes et neutraliser le surnageant avec KOH 1 M. Alternativement, clarifier au moyen des réactifs de Carrez.

Document 12

Préparation des extraits de Stevia

- Test materials used :

- a. *Stevia* leaf powder (dried *Stevia* leaf extract powder was procured from M/s Amruth Kesari Depot, Bangalore, Karnataka)
- b. Aqueous solution
- c. Ethanol

- Preparation of Stevia aqueous extract:

The powder was weighed up to 50 g and then mixed with 100 mL of sterile distilled water. The extract was then filtered. The concentration of the *Stevia* achieved is considered as 100%.

- Preparation of Stevia ethanolic extract:

The powder was weighed up to 50 g and then mixed with 100 mL of 70% (W/v) ethyl alcohol for a week. The extract was then filtered. The concentration of the *Stevia* achieved is considered as 100%.

Document 13

Etude de l'activité antimicrobienne par méthode de diffusion en milieu gélosé

Réactifs et milieux :

- a. Chlorhexidine à 0,2%
- b. Extrait aqueux de *Stevia* 100%
- c. Extrait alcoolique de *Stevia* 100%
- d. Milieu gélosé Cœur cerveau (Brain Heart Infusion agar)

Microorganismes :

- a. *S.mutans* ATCC 25175
- b. *L.acidophilus* ATCC 4356

Protocole :

Deux boîtes de Pétri contenant 18 mL de milieu BHI agar ont été préparées. Chaque souche a été écouvillonnée en surface d'une gélose et des puits de 8 mm de diamètre ont été creusés à l'emporte-pièce. 100 µL de chaque extrait de *Stevia* ou de chlorhexidine ont été déposés dans les puits. Les boîtes sont alors incubées à 37°C pendant 48 h. Le diamètre de la zone d'inhibition obtenue autour de chaque puits est mesuré en millimètre.

Résultats de la méthode de diffusion en milieu gélosé

Echantillon	Diamètre de la zone d'inhibition en mm pour <i>S.mutans</i>	Diamètre de la zone d'inhibition en mm pour <i>L.acidophilus</i>
Extrait aqueux de <i>Stevia</i> 100%	22,8	10,8
Extrait alcoolique de <i>Stevia</i> 100%	24,7	12,3
Chlorhexidine à 0,2%	26,5	13,2

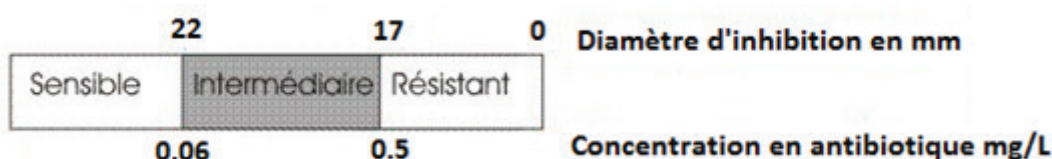
Document 14
Composition du milieu Brain Heart Infusion (BHI agar)

Formule en g par litre d'eau purifiée :

Infusion cœur-cerveille (matières solides)	8,0
Digestion pepsique de tissu animal	5,0
Digestion trypsique de caséine	16,0
Chlorure de sodium	5,0
Glucose	2,0
Phosphate d'hydrogène disodique	2,5
Agar	13,5

pH 7,4 ± 0,2

Document 15
Extrait d'un abaque de lecture relatif à la Rifampicine



Document 16
Document 16a : Protocole de détermination de la CMI en milieu liquide

Réactifs et milieux :

- a. Extrait aqueux de *Stevia* 100%
- b. Extrait alcoolique de *Stevia* 100%
- c. Bouillon Cœur cerveau (BHI)

Microorganismes :

- a. *S.mutans* ATCC 25175
- b. *L.acidophilus* ATCC 4356

Protocole :

- **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture de 24 h à 37°C en bouillon BHI des deux souches étudiées, préparer une suspension ajustée à 10⁵ micro-organismes par millilitre en utilisant un étalon 0,5 Mc Farland.

- **Dilution en série des extraits de *Stevia***

Réaliser dans 10 tubes à hémolyse stériles, une série de dilutions de raison 1/2 de chacun des deux extraits de *Stevia* sous un volume final de 200 µL, en bouillon BHI. Le premier tube correspond à l'extrait non dilué.

- **Ensemencement**

Ajouter 200 µL de l'inoculum dans chacun des tubes à hémolyse préparés précédemment.

- **Incubation**

Incuber 48 h à 37°C.

Document 16b : Résultats de la détermination de la CMI en milieu liquide

	Concentration de l'extrait aqueux de <i>Stevia</i> en pourcentage									
Micro-organisme	50	25	12,5	6,25	3,1	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09
<i>S.mutans</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.acidophilus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ trouble / - absence de trouble

	Concentration de l'extrait alcoolique de <i>Stevia</i> en pourcentage									
Micro-organisme	50	25	12,5	6,25	3,1	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09
<i>S.mutans</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>L.acidophilus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ trouble / - absence de trouble

Sciences et Technologies Bioindustrielles

L'enseignement de Sciences et technologies bioindustrielles sera assuré par un professeur de Biochimie-Génie Biologique. Il est recommandé que ce professeur intervienne également dans un autre enseignement professionnel (cours et/ou activités technologiques) de cette formation.

Module 2 *Filières, produits, procédés*

Le choix des filières proposées permet :

- d'appréhender la diversité du secteur des bioindustries ;
- d'aborder les principales opérations unitaires ;
- de placer les analyses et contrôles dans un contexte de production ou de recherche développement.

L'approche de chaque filière comprendra l'étude :

- des matières premières et additifs, leurs évolutions au cours du temps et durant les opérations de transformation ;
- des opérations unitaires et de leur enchaînement (diagramme de production) ;
- des mécanismes des altérations physicochimiques et biologiques des matières premières, des produits en cours de transformation et des produits finis ;
- des analyses et contrôles réalisés sur les installations et produits, dans un objectif de qualité ou d'optimisation.

La nature des processus biologiques se déroulant au cours des transformations ou des altérations nécessite que cet enseignement soit réalisé en étroite collaboration avec les autres enseignements professionnels. Ainsi, les méthodologies des analyses mises en œuvre sur les produits sont étudiées dans les enseignements de biochimie, microbiologie, biologie cellulaire et moléculaire et des exemples d'analyses sont vus durant les activités technologiques.

Chacune des opérations unitaires du programme est mentionnée en association avec l'une des filières. Ces associations sont des exemples. D'autres associations peuvent être choisies, l'objectif étant d'étudier l'ensemble des opérations suivantes :

- stabilisation : congélation, pasteurisation, stérilisation, atomisation, lyophilisation, séchage, fumage ;
- séparation : centrifugation, filtration, procédés membranaires (osmose inverse, ultrafiltration), échange d'ions ;
- mélange et mise en forme : agglomération, émulsion, mélange ;
- conditionnement : conditionnement aseptique et sous atmosphère modifiée ;
- fermentation.

Contenus filières, produits	Contenus procédés
3.3.1. Fromages - Classification, réglementation - Ferments utilisés (<i>en liaison avec le cours de microbiologie</i>) - Un exemple de fabrication : lignes de fabrication, opérations unitaires, analyses et contrôles	
3.3.2. Produits dérivés : lactosérum, lactose, concentrés de protéines - Lignes de fabrication, opérations unitaires - Analyses et contrôles	Osmose inverse, ultrafiltration - Principes, définition - Paramètres de fonctionnement - Différents types de membranes et modules - Equipements

Activités Technologiques d'Opérations Unitaires

Ces activités technologiques consistent en la réalisation d'une fabrication relevant des domaines pharmaceutique, alimentaire, cosmétique.

Elles comprennent :

- - la préparation du pilote, des matériels et produits nécessaires ;
- - l'identification des points de consigne et de contrôle ;
- - la conduite de la fabrication (pilotage manuel ou informatique), l'acquisition et le traitement des données ;
- - la réalisation des prélèvements ;
- - la réalisation des analyses associées à la fabrication ;
- - la gestion des déchets ;
- - l'optimisation des paramètres de fonctionnement afin que le produit fini réponde aux spécifications préconisées : paramètres organoleptiques, physico – chimiques, biologiques ;
- - le nettoyage et la désinfection de l'installation.

Ces activités sont rattachées à une discipline technologique. Elles sont cependant l'occasion d'un travail interdisciplinaire pour la réalisation des contrôles et analyses ainsi que pour leur exploitation.

Opérations unitaires	Mises en œuvre dans les activités technologiques suivantes
1. Fermentation Domaine alimentaire ou pharmaceutique	Microbiologie
2. Pasteurisation ou stérilisation Domaine alimentaire ou pharmaceutique	Microbiologie
3. Ultrafiltration ou échange d'ions Domaine alimentaire	Biochimie
4. Formulation ou émulsion Domaine alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique	Biochimie