



Concours du second degré

Rapport de jury

Concours :

CAPET EXTERNE

Section :

BIOTECHNOLOGIES

Option :

BIOCHIMIE GENIE BIOLOGIQUE

Session 2015

Rapport de jury présenté par : Mme Françoise GUILLET
Présidente de jury

**Les rapports des jurys des concours sont établis sous la responsabilité des
présidents de jury**

SOMMAIRE

	Page
Composition du jury	3
Renseignements statistiques	4
Epreuves d'admissibilité	
Première épreuve d'admissibilité	
Sujet	5
Rapport de jury	9
Seconde épreuve d'admissibilité	
Sujet	11
Rapport de jury	13
Epreuves d'admission	
Epreuve de mise en situation professionnelle	
Sujet A	16
Sujet D	25
Sujet B	38
Sujet C	52
Rapport de jury	70
Entretien à partir d'un dossier	
Rapport de jury	71
Conclusion générale	74

COMPOSITION DU JURY

Présidente : Françoise GUILLET Inspectrice générale de l'Éducation nationale groupe STVST

Vice-présidente : Élisabeth CHANIAUD Inspectrice d'académie inspectrice pédagogique régionale
IA IPR Académie de Paris

Secrétaire générale : Catherine MILLET chef de travaux lycée PG de Gennes Paris

Membres du jury :

Nom Prénom	académie
AMMEUX Cécile	Lille
ANDRE Sylvain	Orléans Tours
AUBERT Sébastien	Reims
BARREAU Stéphanie	Toulouse
BEAUMESNIL Olivier	Rouen
BIGOT Armelle	Paris
BOCHARD Valérie	Rennes
CHAVANEL Muriel	Bordeaux
CHIES Carole	Besançon
COMBES Anne	Versailles
COQUET Bruno	Aix Marseille
DAUGERON Sylvère	Orléans Tours
DENDALECHTE Joël	Toulouse
DESCHAMPS Delphine	Rouen
DUBOIS Nicolas	Paris UPEC
DUBRAC Claire	Reims
DUVET Sandrine	Lille
EI MALOULI Farida	Paris
ETANCELIN Catherine	Créteil
GAUBIAC Fabrice	Montpellier
GIRARD Frédéric	Montpellier
GRIMAL Emmanuelle	Paris
GUAY Isabelle	Amiens
HEBERT Hugues	Paris
JUILLE Odile	Paris
LARCHER Christelle	Bordeaux
LEONETTI Brigitte	Paris
LESELLIER Tiphaine	Caen
LISSANDRE Anne-Laure	Rouen
MALLET Catherine	Toulouse
MELINE Fabienne	Amiens
MEUNIER Patrick	Dijon
MORIN Olivier	Lille
RAMI Guillaume	Aix Marseille
RIVENET Florence	Aix Marseille
VIENNET Bérangère	Besançon
WURSTENTEIN LEVEAU Marie	Caen
ZILIANI Philippe	Nice
GARNIER Philippe IPR	Poitiers
NARBONNE Philippe IPR	Rennes
PRAT Michel IPR	Lille
SCHUSTER Claudine IPR	Créteil

RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

CONCOURS CAPET EXTERNE

Candidats inscrits	475
Candidats présents aux épreuves d'admissibilité	213
Candidats admissibles	69
Candidats présents aux épreuves d'admission	66
Candidats proposés pour l'admission	30

Epreuves d'admissibilité

Meilleure moyenne obtenue	16,54/20
Moyenne générale des candidats admissibles	10,90/20

Epreuves d'admission

Meilleure moyenne obtenue	18,15/20
Moyenne des candidats admis	13,70/20

Ensemble du concours (admissibilité et admission)

Meilleure moyenne obtenue	17,16/20
Moyenne générale des candidats admis	13,16/20

CONCOURS D'ACCÈS A L'ÉCHELLE DE RÉMUNÉRATION (CAFEP)

Candidats inscrits	89
Candidats présents aux épreuves d'admissibilité	42
Candidats admissibles	12
Candidats présents aux épreuves d'admission	11
Candidats proposés pour l'admission	6

Epreuves d'admissibilité

Meilleure moyenne obtenue	12,54/20
Moyenne générale des candidats admissibles	10,79/20

Epreuves d'admission

Meilleure moyenne obtenue	15,90/20
Moyenne des candidats admis	14,18/20

Ensemble du concours (admissibilité et admission)

Meilleure moyenne obtenue	14,78/20
Moyenne générale des candidats admis	13,34/20

EPREUVES D'ADMISSIBILITE

SUJETS

Les sujets des épreuves d'admissibilité sont en ligne sur le site du Ministère : www.education.gouv.fr Ils sont accessibles depuis la page « SIAC2 »

ECRIT 1 - Première épreuve d'admissibilité

Durée : 5 heures – coefficient : 1

LES BACTÉRIOPHAGES : OUTILS POUR LES BIOTECHNOLOGIES

Les bactériophages sont des acteurs incontournables du monde vivant. Utilisés dès le début du 20^{ème} siècle, les bactériophages oubliés un temps suscitent à l'heure actuelle un regain d'intérêt face aux enjeux des biotechnologies modernes.

Démontrer qu'ils sont des parasites acellulaires, en présentant leurs caractéristiques.

Ces caractéristiques sont le support d'applications, dans la santé, dans l'agro-alimentaire et en génie génétique.

Présenter ces différentes applications tout en mettant en évidence, le cas échéant, les enjeux sociétaux liés à celles-ci.

DOCUMENT 1 : Lutte contre la colibacillose aviaire

La colibacillose, dont l'agent étiologique est *Escherichia coli*, a toujours représenté une pathologie importante dans les élevages avicoles. Néanmoins, ces dernières années, on assiste à une augmentation inquiétante du nombre de cas dans les élevages de poules pondeuses. Le traitement de la colibacillose repose à l'heure actuelle essentiellement sur l'utilisation d'antibiotiques.

Des études ont montré que l'utilisation d'un phage virulent (phage R) qui utilise la capsule K1 (facteur de virulence majeur des souches d'*E.coli*) comme récepteur pour s'attacher à la bactérie, donnait des résultats encourageants. Ce phage a été capable de se propager sur de nombreuses souches d'*E.coli* possédant la capsule K1.

Sur des animaux contaminés, lorsque l'administration des phages est effectuée 24h après l'inoculation de la souche, on obtient une bonne protection ; par contre les animaux étaient peu protégés si les phages étaient administrés 48h après l'inoculation de la souche...

Source : www.rippa.fr/media/recueil_chap9__070232400_1736_04072012.pdf

DOCUMENT 2 : Extrait de la fiche fournisseur d'une préparation antibactérienne, « ListShield » utilisée contre *Listeria monocytogenes*

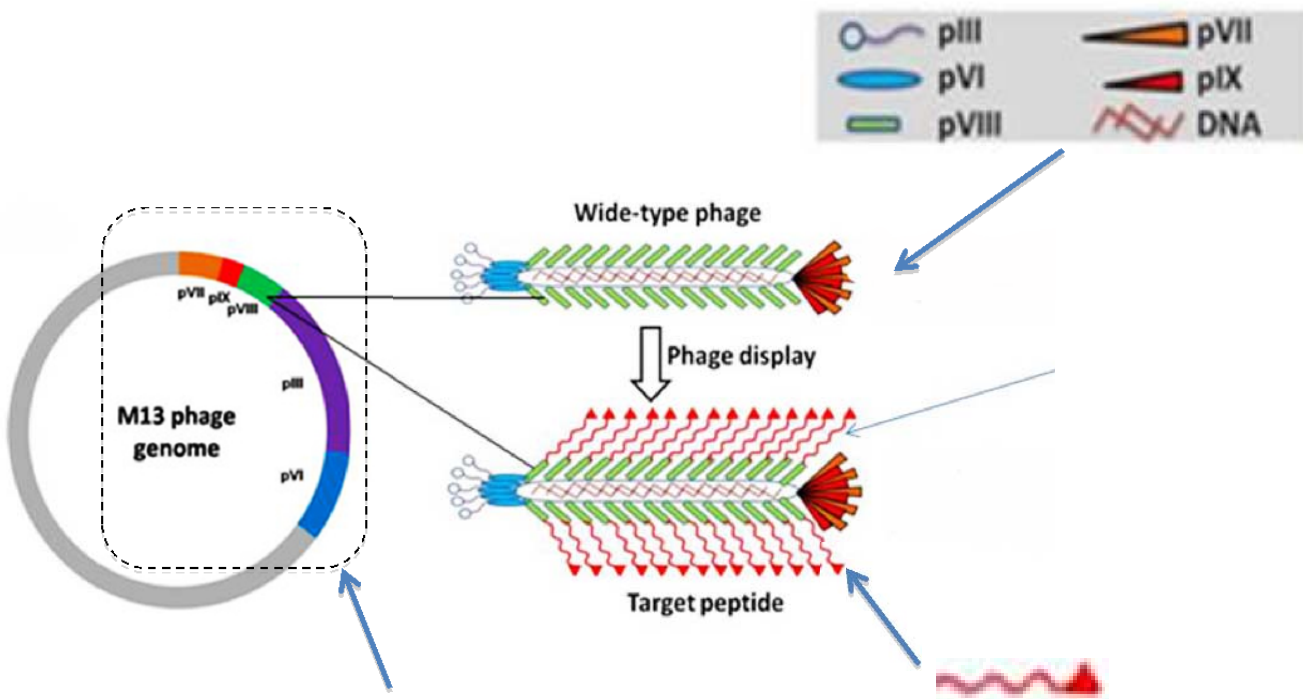


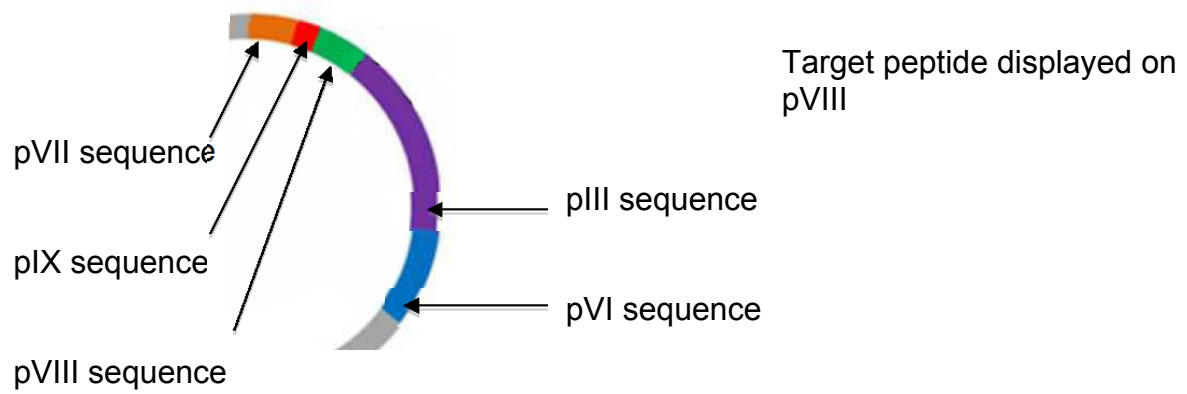
ListShield introduction.

ListShield is an FDA (Food and Drug administration) cleared non-chemical antimicrobial preparation for controlling the foodborne bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. The active ingredients of ListShield are naturally occurring bacteriophages that selectively and specifically kill *L.monocytogenes*. ListShield is designed for treating foods that are high risk for *L.monocytogenes* contamination. It can also be used to eliminate or reduce the levels of *L.monocytogenes* on non-food contact equipment, surfaces, etc. in food processing plants and other food establishments. ListShield is ideal for use in HACCP programs that have identified *L.monocytogenes* control as a potential problem.

Source : www.intralytix.com

DOCUMENT 3 : Illustration schématique de l'utilisation du phage M13 dans un protocole « phage display » pour l'expression d'un peptide





Source : www.nature.com/srep/2013/130207/srep01242/fig_tab/srep01242_F1.html

Résultats session 2015

Moyenne générale : 06.51/20
Note la plus haute : 18,68/20
Note la plus basse : 00.08/20

RAPPORT

Rapport établi par :

mesdames et messieurs AUBERT Sébastien, BEAUMESNIL Olivier, BOCHARD Valérie, CHAMBORD Magali, CHIES Carole, COQUET Bruno, DUBOIS Nicolas, DUBRAC Claire, DUVET Sandrine, ELMALLOULI Farida, GAUBIAC Fabrice, HEBERT Hugues, LISSANDRE Anne-Laure, MALLET Catherine, RAMI Guillaume, RIVENET Florence

Commentaires sur le sujet

Le sujet de l'épreuve de synthèse portait sur les bactériophages et leur utilisation comme outils dans différents aspects des biotechnologies.

Le plan est suggéré par le sujet :

-une première partie permet de démontrer d'une part que les bactériophages sont de nature acellulaire, et d'autre part qu'ils sont des parasites. Cette partie assez classique permet d'apprécier les connaissances de base des candidats au sujet de la structure et de la classification des bactériophages, et de leurs cycles infectieux lytique ou lysogénique.

Il est demandé au candidat de démontrer que les bactériophages sont des parasites acellulaires, en présentant leurs caractéristiques : il est donc attendu une démarche cohérente et didactique, avec un plan adapté où les idées sont mises en relation, afin de permettre cette démonstration.

-la seconde partie est consacrée aux applications potentielles. Cette partie doit permettre de vérifier que les candidats maîtrisent les aspects technologiques de l'utilisation des bactériophages, tout en validant l'actualité de leurs connaissances.

Cette seconde partie fait apparaître plusieurs domaines d'applications : santé, agro-alimentaire et génie génétique. Le plan pouvait reprendre ou non, partie après partie, ces domaines.

Les documents proposés dans le sujet permettent aux candidats d'avoir quelques exemples concrets d'applications afin de les guider pour certaines parties.

Il convient d'utiliser ces documents comme « tremplin » pour une ouverture plus large sur les applications potentielles liées aux bactériophages. Des développements sur ces applications, au-delà du contenu des documents, sont donc attendus.

Remarques sur les copies

Il était indispensable que les candidats s'approprient le sujet par une introduction : délimitation du sujet, énoncé de la problématique, présentation du plan qui permettait d'y répondre. Certains candidats ont de plus été capables de replacer les bactériophages dans un contexte historique ou biotechnologique, ce qui a été très apprécié.

Pour le traitement du sujet, un certain nombre de connaissances fondamentales devaient apparaître : diversité des structures et des cycles de multiplication des bactériophages, développement d'exemples d'applications biotechnologiques. Certaines applications complexes comme la thérapie génique nécessitaient une maîtrise rigoureuse de leur principe pour être abordées avec succès, faute de quoi des contre-sens étaient commis.

Le jury déplore à nouveau de nombreux « hors-sujets », qu'ils soient dus à un problème de délimitation ou à une volonté de masquer des lacunes sur le sujet. Ainsi, des développements non contextualisés sur la structure de la bactérie, de l'ADN, sur le principe de la PCR ou du clonage n'avaient pas leur place.

Le plan – qui pouvait être celui suggéré par le sujet – devait être apparent et permettre de traiter la problématique. Des liens logiques entre les parties s'imposaient.

Certains candidats ont su construire une argumentation solide, appuyée sur un vocabulaire scientifique rigoureux, pour répondre aux deux principaux attendus du sujet : démonstration du caractère de parasites acellulaires des bactériophages, et lien entre les applications et leurs enjeux sociétaux. Le jury rappelle à nouveau que face aux questions sociétales, il attend de la part des candidats des prises de position nuancées, réalistes et non caricaturales.

Au-delà de leurs connaissances solides, les meilleurs candidats ont fait preuve d'esprit d'analyse en construisant un développement cohérent et didactique et un esprit de synthèse en mettant en évidence les points essentiels. Ces qualités sont appréciées par le jury bien qu'une réelle transposition pédagogique ne soit pas attendue dans cette épreuve.

Les qualités de communication reposant à la fois sur des supports variés (tableaux, schémas), une présentation soignée et une formulation synthétique sans verbiage font également partie des compétences attendues pour de futurs enseignants.

Enfin, le jury a été heurté par le niveau inacceptable d'orthographe et de syntaxe dans un certain nombre de copies. Il rappelle que la maîtrise de la langue française est indispensable et constitue un prérequis incontournable pour envisager de devenir enseignant.

Conclusion du jury

Le jury a apprécié que les conseils des rapports précédents aient été suivis par bon nombre de candidats et tient à féliciter particulièrement celles et ceux qui ont produit des compositions de synthèse d'excellente qualité.

ECRIT 2 - Deuxième épreuve d'admissibilité

Durée : 5 heures – coefficient : 1

LA RECHERCHE ET LA PRODUCTION D'ADN POLYMERASES PERFORMANTES

Les polymérases thermorésistantes sont d'usage courant dans les laboratoires d'analyses et de recherche. L'utilisation de ces enzymes requiert le contrôle de nombreux paramètres pour assurer la qualité des résultats obtenus. Parmi ces paramètres, l'efficacité de la réplication est l'un des plus importants.

Dans une première partie, en vous appuyant sur les documents fournis, vous exposerez les stratégies développées pour trouver, produire et caractériser des ADN polymérases efficaces. Vous vous attacherez notamment à présenter les principales technologies utilisées.

Dans une seconde partie, dans le cadre d'un enseignement de biotechnologies en classe de terminale STL vous présenterez une démarche pédagogique sur les applications des outils de biologie moléculaire. Vous utiliserez, tout ou partie des documents présentés en justifiant vos choix. Vous construirez un ou des supports utiles au travail avec les élèves.

**Extrait du Bulletin officiel n°8 du 13 octobre 2011
Enseignement de biotechnologies de la série sciences et technologies de
laboratoire – classe terminale**

Outils essentiels de la biologie moléculaire

Objectifs de formation et supports théoriques	Compétences transversales et technologiques
<ul style="list-style-type: none">• Enzymes : polymérases, enzymes de restriction• Polymérisation des acides nucléiques et amplification en chaîne par polymérisation (ACP ou PCR)• Vecteurs d'amplification ou d'expression Marqueur de sélection, origine de réplication, promoteur, site de clonage multiple, gène rapporteur, gène d'intérêt <p>Seules les notions nécessaires à la compréhension de la technique d'amplification de l'ADN seront abordées (ADN matrice, amorce, enzymes, nucléotides).</p> <p>Le rôle des deux types de vecteurs sera présenté par une comparaison des éléments constitutifs des deux types de vecteurs.</p>	<p>Réaliser une électrophorèse en gel d'agarose</p> <p>Réaliser une amplification d'un fragment d'ADN</p>

DOCUMENT 1 : Utilisation et mise au point d'ADN polymérase

http://wwz.ifremer.fr/grands_fonds/Les-enjeux/Les-applications/Ressources-biologiques/La-biotechnologie/Les-enzymes Dernière modification le : Vendredi 24 Février 2012

<http://www.larecherche.fr/savoirs/dossier/biologie-moleculaire-colonisee-enzyme>

DOCUMENT 2 : Purification originelle de la Taq polymérase

Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*
J.Bacteriol. 1976, 127(3):1550. A Chien, D B Edgar and J M Trela

DOCUMENT 3 : Première utilisation d'une Taq polymérase recombinante

Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*
Biotechniques 19:780 – 784 (November 1995) Urvi J. Desai and Patrick K Pfaffle »

DOCUMENT 4 : Évaluation de la sensibilité des polymérases à des inhibiteurs

Traduit et adapté d'après Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 5
Milko B. Kermekchiev1, Lyubka I. Kirilova, Erika E. Vail and Wayne M. Barnes

DOCUMENT 5 : Performances lors de la PCR de Tag polymerases modifiées

adapté d'après PCR performance of the B-type DNA polymerase from the thermophilic euryarchaeon
Thermococcus aggregans improved by mutations in the Y-GG/A motif.
Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28

DOCUMENT 6a : Evaluation de la fidélité de polymérases thermostables

DOCUMENT 6b : Evaluation de la fidélité de polymérases thermostables

DOCUMENT 6c : Le plasmide pUCIQ17 et LacI^q

DOCUMENT 6d : L'opéron lactose

DOCUMENT 6e : *Escherichia coli* DH5 alpha

DOCUMENT 6f : X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside

BRUNO FREY AND BERNHARD SUPPMANN

Boehringer Mannheim GmbH, Department of Molecular Biology.

Nonnenwald, D-82372 Penzberg, Germany

Résultats session 2015

Moyenne générale : 06,81 /20

Note la plus haute : 15,00 /20

Note la plus basse : 00,20 /20

RAPPORT

Rapport établi par :

mesdames et messieurs CHAVANEL Muriel, COMBES Anne, DAUGERON Sylvère, DENDALECHTE Joël, DESCHAMPS Delphine, ETANCELIN Catherine, GIRARD Frédéric, GRIMAL Emmanuelle, LEONETTI Brigitte, LESELLIER Tiphaine, MELINE Fabienne, MEUNIER Patrick, MORIN Olivier, RIALLAND Valérie, VIENNET Bérangère, WURSTENTEIN Marie, ZILIANI Philippe

Le sujet présente 2 parties :

- Dans la première, le jury attend du candidat qu'il sélectionne au sein d'un dossier documentaire riche et varié les informations pertinentes, afin de répondre à la question posée, tout en faisant preuve d'un esprit de synthèse et d'analyse, de ses connaissances technologiques et de ses qualités didactiques.
- Dans la seconde, le candidat doit élaborer une démarche pédagogique en lien avec les compétences proposées et en s'appuyant sur tout ou partie des documents fournis. Cette année les compétences étaient extraites du programme de terminale STL biotechnologies

A propos de la forme

La qualité de l'expression écrite et la présentation de la copie sont le plus souvent satisfaisantes. Cependant, quelques copies sont inacceptables, notamment sur le plan de l'écriture, de l'orthographe et de la syntaxe. Un futur enseignant se doit de maîtriser la langue française. Il est également attendu davantage de rigueur dans l'utilisation du vocabulaire scientifique.

Le jury regrette dans certaines copies l'absence d'illustrations pourtant utiles à la communication. Les copies présentant des organigrammes, tableaux, schémas..., bien légendés, sont valorisées. Le jury rappelle que la conception d'illustrations soignées et pertinentes, le choix d'exemples significatifs et leur utilisation dans le raisonnement font partie des compétences professionnelles recherchées chez un enseignant.

Concernant la mobilisation des documents du sujet, il est demandé que le numéro de chaque document soit rappelé lors de son exploitation dans la copie.

Enfin, une ouverture vers des enjeux sociétaux, culturels, éthiques ou écologiques est souhaitable.

Au niveau de l'exploitation des documents

Les connaissances scientifiques du candidat doivent être mobilisées à bon escient pour l'analyse critique des documents.

Cette analyse doit consister en un développement construit dans un plan explicite et énoncé au terme de l'introduction.

Il est important de gérer le temps de l'épreuve de façon à répondre au sujet dans son ensemble sans négliger aucune des parties.

La capacité à sélectionner des informations pertinentes est une qualité professionnelle attendue chez un futur enseignant. Ainsi, tous les documents sont utiles pour répondre à la problématique du sujet mais le candidat doit faire preuve de discernement dans leur exploitation, pour poser la problématique, pour expliquer les principes des techniques, pour analyser les résultats ...

Au niveau de la partie pédagogique

Le jury regrette que cette partie n'ait pas été suffisamment développée au profit de la première partie. Les compétences didactiques associées à cette partie n'ont pas pu être évaluées dans certaines copies.

Les applications pédagogiques proposées devaient être réalistes et adaptées au niveau de la classe terminale et nécessitaient de faire un choix parmi les documents du dossier. Elles pouvaient aussi donner lieu à une ouverture interdisciplinaire.

La démarche pédagogique proposée doit présenter des activités prévues avec les élèves en justifiant le contenu, la forme, et la finalité.

Le support pédagogique destiné aux élèves ne doit pas être un « copier-coller » des illustrations présentées en première partie, mais doit être une construction originale et une aide au travail mené avec les élèves.

Le jury a apprécié les copies contenant des « supports élèves » variés et pertinents en accord avec une formation biotechnologique.

ÉPREUVES D'ADMISSION

Épreuve 1 d'admission :

Mise en situation professionnelle

Conditions de l'épreuve :

Les sujets présentent le contexte de la séquence, le niveau d'enseignement et des manipulations permettant d'atteindre les objectifs de formation précisés.

Cette année, des manipulations réalisables (protocoles opératoires et matière d'œuvre) étaient associées à des protocoles opératoires complémentaires et non réalisables dans le temps de l'épreuve, parfois accompagnés de résultats.

Des ressources documentaires diverses : éléments de contexte, supports théoriques, documents d'interprétation, aide-mémoire de métrologie, extrait de référentiel de formation étaient mises à disposition sous forme numérique et papier. Il n'était pas possible cette année de collecter des informations sur internet.

Déroulement de l'épreuve :

Le candidat dispose d'une clé USB contenant 3 dossiers :

- un dossier sujet (forme numérique)
- des ressources documentaires
- un dossier pour la production du candidat

Les programmes ou référentiels complets des niveaux concernés sont mis à disposition des candidats.

Le candidat compose pendant 4 heures au laboratoire.

L'examineur peut apporter quelques informations relatives au matériel disponible dans le laboratoire. L'organisation du travail, la qualité des gestes techniques, le respect des bonnes pratiques de laboratoire sont évaluées en cours d'épreuve.

Le candidat s'organise comme il le souhaite afin de construire sa présentation en lien avec le cahier des charges et de réaliser des activités techniques qu'il juge utiles. Des outils numériques sont à sa disposition pour la préparation de sa présentation. Il expose pendant 30 minutes à l'aide d'outils numériques également et échange avec le jury pendant les 30 minutes suivantes.

SUJETS

SUJET A

Contexte	L'invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Niveau d'enseignement	Terminale STL Biotechnologies – Enseignement de Biotechnologies
Manipulations réalisables	Objectifs de formation associés aux manipulations proposées
Étude de la flore d'un grain de raisin (protocole 1)	Les étapes de la recherche d'une flore particulière dans un produit polymicrobien
Détermination de la concentration en cellules d'une culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (protocole 2)	Les méthodes de dénombrement d'une flore d'un produit polymicrobien
Dosage spectrophotométrique des glucides réducteurs par la méthode au 3,5 DNS (protocole 3)	Méthodes de dosage Démarche spécifique aux activités de biotechnologies Exploitation des résultats et qualité
Manipulations non réalisables entièrement dans le temps de l'épreuve	Objectifs de formation associés aux manipulations proposées
Isolement d'une souche de levure à partir d'un grain de raisin Lecture du milieu fourni et de la galerie API 20 C AUX (protocole 4)	Les étapes de la recherche d'une flore particulière dans un produit polymicrobien Les champignons microscopiques
Suivi de croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en milieu non renouvelé (protocole 5)	Modélisation de la croissance en milieu non renouvelé
Mesure de l'activité de l'invertase (protocole 6)	Étude cinétique des enzymes michaeliennes
Ressources	
<p>Annexe 1 : Extraits de programme relatifs aux objectifs de formation Annexe 2 : Extrait de l'article « Production of extracellular invertase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain isolated from grapes » Annexe 3 : Invertase et sucre inverti Annexe 4 : Fiche technique : la gélose Sabouraud + chloramphénicol Annexe 5 : Aide-mémoire de métrologie</p> <p>Annexe au poste de travail Fiche technique de la galerie API 20 C AUX</p>	

Protocole 1 Réalisation d'un frottis coloré par la méthode de Gram

Produit et matériel

- Bouillon nutritif ensemencé avec 1 g de grain de raisin et incubé 48h à 30 °C, noté « GR »
- Matériel courant de bactériologie

Préparation du frottis

- Déposer une goutte d'une suspension bactérienne ou d'une culture en bouillon à la surface d'une lame propre et l'étaler sur une surface de 3 cm².
- Laisser sécher.
- Fixer le frottis à la chaleur ou en le recouvrant d'alcool et laisser agir 3 minutes.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.

Coloration du frottis

- Recouvrir le frottis de violet de gentiane pendant 1 minute.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.
- Recouvrir d'une solution de lugol pendant 30 secondes.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.
- Décolorer à l'alcool (éthanol) durant une dizaine de secondes (cela dépendra de l'épaisseur du frottis).
- Rincer délicatement à l'eau.
- Contre - colorer à la fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute.
- Rincer le frottis à l'eau et le sécher délicatement.

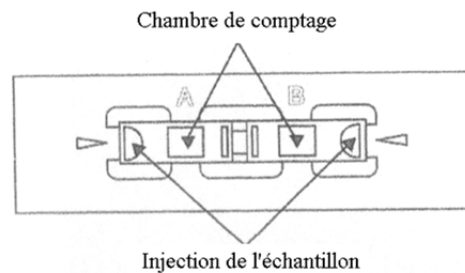
Protocole 2

Détermination de la concentration en cellules d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae* par numération en cellule de Malassez

Produit et matériel

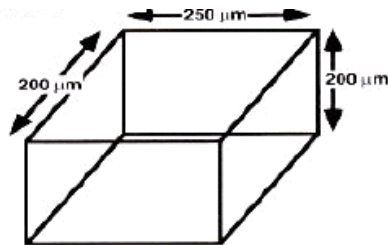
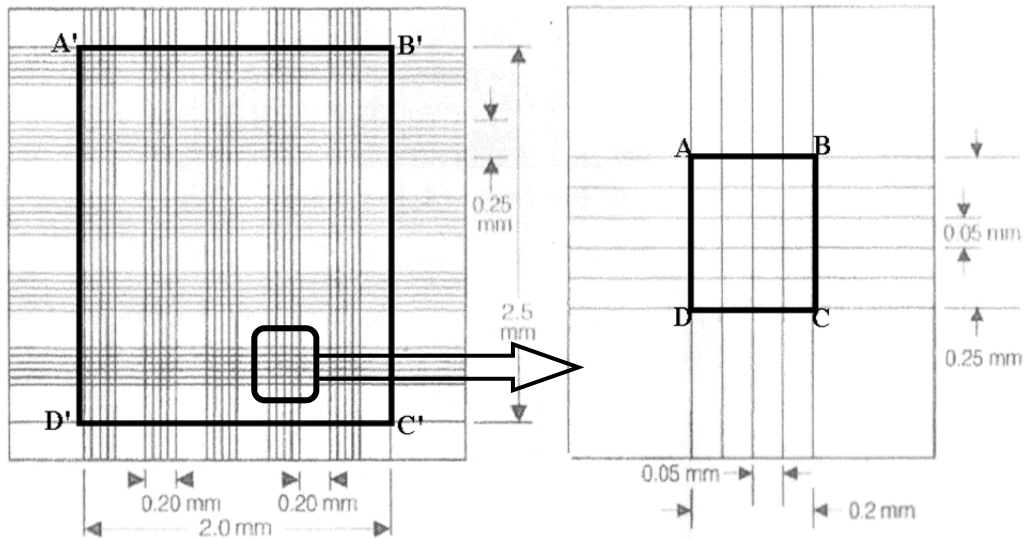
- Culture de *Saccharomyces cerevisiae* notée « C Sc »
- Cellule de Malassez

Présentation de la cellule de Malassez



C'est une double lame épaisse en plastique jetable sur laquelle on trouve deux chambres de comptage.

Le quadrillage de la cellule de Malassez est conçu de la façon suivante :



Il est constitué d'un grand rectangle A'B'C'D' de :

- 2,5 mm de longueur
- 2 mm de largeur.

Il est divisé en 100 rectangles égaux ABCD :

- 25 rectangles sont clairs ;
- 50 rectangles sont divisés en bandes ;
- 25 rectangles (ABCD) sont divisés en 20 petits carrés (abcd).

La chambre parallélépipédique correspondant au grand rectangle A'B'C'D' a un volume total de :

$$V_{\text{total}} = 2,5 \times 2,0 \times 0,20 = 1 \text{ mm}^3$$

Le parallélépipède correspondant à chaque rectangle (ABCD) a un volume de :

$$V_{\text{rectangle ABCD}} = 0,25 \times 0,20 \times 0,20 \\ = 0,01 \text{ mm}^3$$

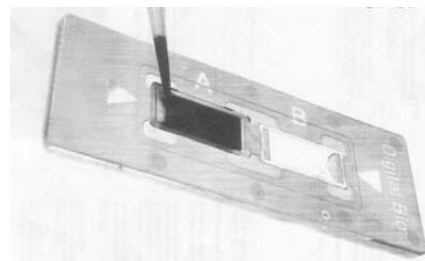
Mode opératoire

(1) Homogénéiser la suspension.

(2) Remplir la cellule de Malassez :

- prélever la suspension à la pipette compte-gouttes
- placer l'extrémité de la pipette, légèrement inclinée, sur

le plateau central près de la lamelle et remplir par capillarité la chambre de l'hématimètre.



La cellule de Malassez doit être remplie en une seule fois sans bulles d'air et sans débordement. Le plateau quadrillé doit être rempli en entier.

(3) Laisser sédimenter les cellules :

- laisser les cellules sédimenter pendant 5 minutes, l'hématimètre bien horizontal.

(4) Compter les cellules :

- compter les cellules dans le nombre de rectangles ABCD nécessaire pour obtenir au moins 200 cellules.

Donnée :

$$U = 0,5 \cdot 10^6 \text{ levures} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Protocole 3

Dosage spectrophotométrique des glucides réducteurs par la méthode au 3,5 DNS

Réactifs

Solution de glucides réducteurs à doser après action de l'invertase « Essai »

Solution de glucides réducteurs à doser sans action de l'invertase « Essai blanc »

Solution étalon de glucides réducteurs à $2,40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ « Étalon »

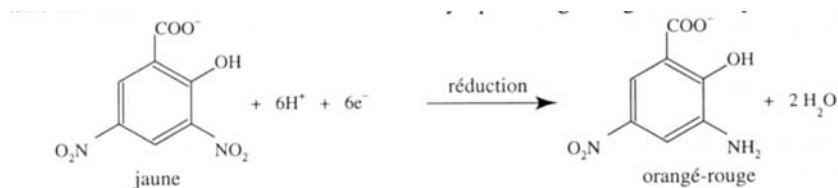
Solution étalon de contrôle de glucides réducteurs à $2,00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ « Contrôle »

Réactif au 3,5 DNS

Principe

Les glucides réducteurs peuvent être dosés, en milieu alcalin et à chaud, grâce à leurs propriétés réductrices vis-à-vis de l'acide 3-5 dinitrosalicylique (3-5 DNS).

Le 3-5 DNS (jaune) est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (rouge-orangé) dont on peut mesurer l'absorbance à $\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$. La coloration est stable pendant plusieurs heures.



Remarque 1 : Comme elle n'est pas stœchiométrique, la réaction dépend des conditions opératoires notamment de la température.

Remarque 2 : Le coefficient d'extinction molaire ϵ de l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique n'étant pas connu dans les conditions du dosage, on opérera par référence à un étalon.

Mode opératoire

Procéder selon le mode opératoire suivant :

Tube	0	« Étalon »	« Contrôle »	« Essai blanc »	« Essai »
Solution « étalon » de glucides réducteurs à 2,40 mmol.L ⁻¹ (mL)	0	1	0	0	0
Solution « contrôle » de glucides réducteurs à 2,00 mmol.L ⁻¹ (mL)	0	0	1	0	0
Solution « essai blanc » sans action de l'invertase (mL)	0	0	0	1	0
Solution « essai » après action de l'invertase	0	0	0	0	1
Eau déminéralisée (mL)	3	2	2	2	2
Réactif au 3-5 DNS (mL)	2	2	2	2	2
	<ul style="list-style-type: none">- Homogénéiser- Boucher les tubes avec du coton cardé (ou du papier d'aluminium)- Porter au bain-marie à 100°C pendant exactement 5 min- Refroidir dans un bain d'eau froide				
Eau déminéralisée (mL)	15	15	15	15	15
	<ul style="list-style-type: none">- Homogénéiser- Laisser reposer 15 min- Lire les absorbances à 530 nm contre le tube 0				

Données

Limite d'acceptabilité du contrôle :


Valeur de référence $C_{(\text{glucides réducteurs, ref})} = 2,00 \text{ mmol.L}^{-1}$

Limites d'acceptabilité = 1,88 à 2,12 mmol.L⁻¹

$s_r = 0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$

$u_c (\text{cglucides réducteurs ; milieu réactionnel}) = 0,030 \text{ mmol.L}^{-1}$

Prévention des risques chimiques

Produit	Pictogramme	Phrases de danger	Phrases de prévention
3,5 DNS		H 302 Nocif en cas d'ingestion H 315 Provoque une irritation cutanée H 335 Peut irriter les voies respiratoires	P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/vapeurs/aérosols P264 Se laver soigneusement les mains après manipulation P270 Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant le produit P301+P312 En cas d'ingestion, appeler immédiatement un centre antipoison ou un médecin P301+P330 En cas d'ingestion, rincer la bouche P501 Éliminer le contenu dans un récipient approprié

Protocole 4

Identification d'une souche de levure à l'aide d'une microgalerie API 20 C AUX

Matériel

Gélose Sabouraud + chloramphénicol ensemencée avec une souche de levure, incubée 48h à 30°C et notée « Sab »

Galerie API 20 C AUX ensemencée avec une souche de levure, incubée 48h à 30°C et notée « G 48 h 30 °C »

Lecture et détermination

Pour procéder à la lecture de la galerie API 20 C AUX, la fiche technique est fournie au poste.

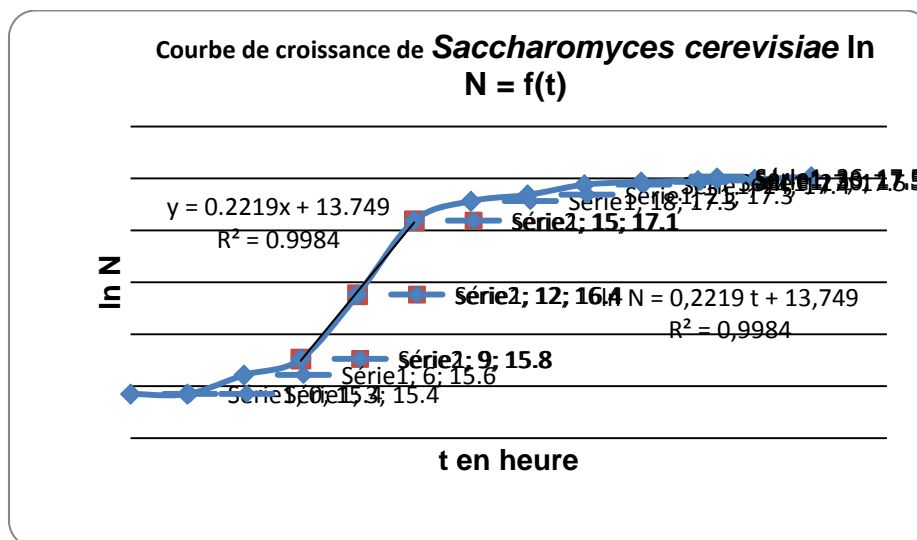
Protocole 5

Suivi de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* en milieu non renouvelé

Principe

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* est mise en culture dans un milieu Sabouraud + saccharose. La concentration en levures de la culture est déterminée à différents temps par numération en cellule de Malassez. La courbe $\ln N = f(t)$ est construite.

Résultats



L'équation figurant sur le tracé correspond à la partie linéaire de la courbe.

Protocole 6

Mesure de l'activité de l'invertase

Tube	« Essai blanc »	« Essai »
Volume de tampon acétate 50 mmol.L ⁻¹ pH 5,5 (mL)	2,5	2,5
Volume de solution de saccharose à 300 mmol.L ⁻¹ (mL)	0	0,1
Volume d'eau distillée (mL)	0,1	0
	Pré-incuber environ 5 minutes à 35 °C.	
Volume d'invertase extraite et purifiée à partir d'une culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (mL)	0,1	0,1
	Incuber exactement 5 minutes à 35°C. Incuber 5 minutes à 100 °C. Refroidir à température ambiante.	

Annexe 1

Extraits de programme STL Biotechnologies

« Objectifs de formation et supports théoriques » et « compétences transversales et technologiques » correspondant aux éléments suivants

Les étapes de la recherche d'une flore particulière dans un produit polymicrobien

Les méthodes de dénombrement d'une flore dans un produit polymicrobien

Méthodes de dosages

Démarches spécifiques aux activités de biotechnologies

Exploitation des résultats et qualité

Les champignons microscopiques

Modélisation de la croissance en milieu non renouvelé

Etude cinétique des enzymes michaéliennes

Annexe 2

Extrait de l'article « Production of extracellular invertase from *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from grapes »

« Enzymes are biocatalyst synthesized by living systems, which are important in synthetic as well as degradative processes. The study of enzymes is an important area, because it exists just on the borderline where the biological and physical sciences meet. Life depends on the complex network of chemical reactions carried out by specific enzyme may have far reaching consequences for the living organism. Most of the industrial enzymes are of microbial origin. The development during the last 25 years has taken place primarily within this group, presumable because the variation in microbial enzymes is wide and because microorganisms can be easily and rapidly cultivated thus forming an unlimited enzyme source. A wide range of microorganisms produced invertase and can thus utilise sucrose as a nutrient. Commercially, invertase is biosynthesized chiefly by yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* or *Saccharomyces carlsbergensis*.

Invertase is extensively used in confectionaries, food industries and in pharmaceuticals. Microbial invertase is used for the manufacture of calf food and food for honey bees. Many microorganisms produce invertase such as *Neurospora crassa*, *Candida utilis*, *Fusarium oxyspor*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* is the organism of choice for invertase production because of its characteristic high sucrose fermentability »

Extrait de International Journal of Current Research and Academic Review 2013 (www.ijcrar.com)

Annexe 3

Invertase et sucre inverti

L'invertase est considérée comme un additif alimentaire (E1103).

L'invertase catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et en fructose. Ce mélange est appelé « sucre inverti ».

Le sucre inverti présente plusieurs avantages par rapport au saccharose :

- pouvoir sucrant plus élevé (PS = 1,1)
- Aw faible
- hygroscopie plus élevée
- pouvoir anti-cristallisant du fructose.

Le sucre inverti est très utilisé en confiserie dans la fabrication de gommes, pâtes à mâcher.

Annexe 4

Fiche technique : la gélose Sabouraud + chloramphénicol

Composition

Peptone..... 10 g
Glucose massé..... 20 g
Chloramphénicol 0,5 g
Agar..... 15 g
Eau distillée (qsp)..... 1 000 mL
pH = 6,0

Caractéristiques

Ce milieu de base favorise la culture des champignons microscopiques (levures, moisissures) grâce à son pH relativement acide.

La culture des bactéries est inhibée par la présence du chloramphénicol.

Annexe 5

Aide-mémoire de métrologie

On considère que les qualités de justesse et de fidélité des procédures de mesure utilisées ont été étudiées et reconnues.

1. Vérification de la bonne exécution de la procédure

Lorsqu'un mesurage est effectué, deux types de vérification sont possibles afin de pouvoir accepter les valeurs mesurées obtenues pour des échantillons inconnus.

On peut effectuer, dans la même série de mesurages :

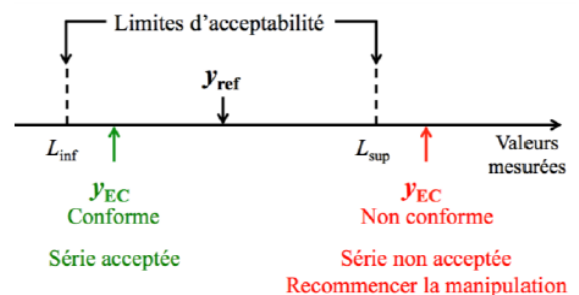
- un essai sur un étalon de contrôle ; la valeur mesurée obtenue est notée y_{EC} .
- un ou deux essais sur chacun des échantillons à doser.

1.1 Vérification de l'exactitude de mesure à l'aide d'un étalon de contrôle

On dispose d'un étalon de contrôle avec sa valeur conventionnelle (y_{ref}) ainsi que ses limites d'acceptabilité (L_{inf} et L_{sup}). On recherche si la valeur mesurée (y_{EC}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit : $L_{inf} < y_{EC} < L_{sup}$

Si la valeur mesurée y_{EC} appartient à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée y_{EC} est **exacte**, donc **conforme** : l'exécution de la procédure de mesure est satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées obtenues pour les échantillons inconnus dans la même série sont **acceptées**.

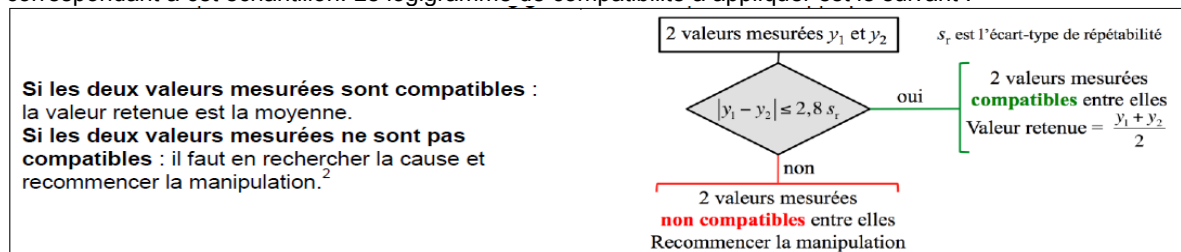


Si la valeur mesurée y_{EC} n'appartient pas à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée n'est **pas exacte** donc **non conforme** : l'exécution de la procédure de mesure n'est pas satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées de toute la série **ne sont pas acceptées**; il faut rechercher l'origine de la mauvaise exactitude avant de recommencer la manipulation.¹

1.2 Vérification de la compatibilité métrologique dans le cas de deux essais effectués en répétabilité

Soient deux valeurs mesurées (y_1 et y_2) pour un même échantillon et l'écart-type de répétabilité (s_r) de la procédure de mesure correspondant à cet échantillon. Le logigramme de compatibilité à appliquer est le suivant :



Si les deux valeurs mesurées sont compatibles :
la valeur retenue est la moyenne.
Si les deux valeurs mesurées ne sont pas compatibles : il faut en rechercher la cause et recommencer la manipulation.²

2. Guide pour l'expression du résultat de mesure

L'incertitude élargie (U) est directement donnée avec son niveau de confiance ou calculée en multipliant l'incertitude-type composée (uc) par le facteur d'élargissement k , par exemple $k = 2$ pour un niveau de confiance de 95 %.

L'incertitude élargie est ensuite arrondie. Selon les cas :

- si le premier chiffre significatif est 1, 2 ou 3 : garder deux chiffres significatifs ;
- si le premier chiffre significatif est 4 ou plus : garder un chiffre significatif.

La valeur retenue du résultat est arrondie de la façon suivante : le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

Expression du résultat de mesure :

Grandeur mesurée (analyte ; système) = (valeur retenue \pm U) unité
--

1 2 Si pour des raisons matérielles il n'est pas possible de recommencer les manipulations, le candidat poursuivra l'exploitation d'une de ses valeurs mesurées afin d'exprimer un résultat de mesure de façon complète, mais en signalant clairement que ce résultat n'est pas « accepté » au sens métrologique.

SUJET D

Contexte	Le maïs transgénique
Niveau d'enseignement	Terminale STL enseignement de biotechnologies

Manipulations réalisables	Objectifs de formation associés aux manipulations
Dosage immunoenzymatique de la toxine Bt (Protocole 1)	Analyse immunologique des échantillons biologiques (Annexe 1)
Mise en évidence du transgène après amplification (Protocole 2)	Outils essentiels de la biologie moléculaire Quelques applications de biologie moléculaire et du génie génétique (Annexe 1)
Manipulations non réalisables entièrement dans le temps de l'épreuve	
Amplification par PCR du gène de la toxine Bt (Protocole 3)	Outils essentiels de la biologie moléculaire Quelques applications de biologie moléculaire et du génie génétique (Annexe 1)
Extraction d'un plasmide d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Protocole 4)	Sensibilisation à l'environnement de travail et aux exigences spécifiques à la pratique de la biologie moléculaire Méthodes de fractionnement (Annexe 1)

Ressources
<p>Protocole 1 : Dosage immunoenzymatique de la toxine Bt</p> <p>Protocole 2 : Mise en évidence du transgène amplifié</p> <p>Protocole 3: Amplification par PCR du gène de la toxine Bt</p> <p>Protocole 4 : Extraction d'un plasmide d'<i>Agrobacterium tumefaciens</i></p> <p>Annexe 1 : Extraits de programme relatifs à l'objectif de formation</p> <p>Annexe 2 : Toxine Bt et plantes transgéniques</p> <p>Annexe 3 : Les étapes de l'obtention d'une plante transgénique</p> <p>Annexe 4 : Carte d'un plasmide utilisé pour l'obtention d'une plante transgénique</p> <p>Annexe 5 : Aide-mémoire de métrologie</p>

Protocole 1 : Dosage immuno-enzymatique de la toxine Bt

Matériel et réactifs

A disposition par candidat :

- Barrette de 2 x 8 puits + support,
 - o les puits B1 à H1 et A2 à H2 ont été :
 - sensibilisés par l'anticorps anti – toxine Bt
 - saturés par la serum albumine bovine
 - o le puits A1 a été :
 - saturé par la serum albumine bovine
- Fermeture plastique autocollante pour la barrette 2 x 8 puits
- solution étalon de la toxine Bt à 200 ng/mL, noté « **toxine Bt** »
- extrait de feuilles de maïs étudié, noté « **extrait maïs** »
- extrait de feuilles de maïs non OGM, noté « **extrait non OGM** »
- anticorps anti - toxine Bt conjugué à la phosphatase alcaline, noté « **conjugué** »
- solution de 4-nitrophényl phosphate, noté « **pNPP** »
- solution de NaOH, noté « **NaOH** »
- Solution de lavage en pissette, noté « **PBS-Tween** »
- Solution en tube noté « PBS-Tween »
- Pipette automatique P200 et cônes
- 10 tubes à hémolyse + portoir

Dans la salle :

- Agitateur orbital
- Étuve à 37°C
- Lecteur de microplaque

Protocole

1) Préparation de la gamme étalon

A partir de la solution de toxine à 200 ng/mL, réaliser une gamme géométrique de toxine dans un extrait de feuilles de maïs non OGM de 100 ng/mL à environ 1 ng/mL .

2) Plan de dépôt

Prévoir des témoins et concevoir le plan de dépôt.

3) Dosage immunoenzymatique

a. Dépôt de la toxine Bt

Vider les cupules et réaliser trois lavages.

Dans chaque cupule introduire 100 µL des solutions étalons ou de l'extrait maïs.

Couvrir la plaque et incuber 30 min à 37°C.

b. Ajout du conjugué

Vider les cupules et réaliser trois lavages.

Ajouter 100 µL de conjugué dans chaque cupule.

Couvrir la plaque et incuber 30 min à 37°C.

c. Ajout du substrat

Vider les cupules et réaliser trois lavages.

Ajouter 100 µL de solution de pNPP dans toutes les cupules.


Couvrir et incuber environ 5 à 15 minutes à 37°C en surveillant l'apparition de la coloration.

Ajouter dans toutes les cupules 50 µL de solution NaOH. Agiter.

d. Lecture

Lire les absorbances sur le lecteur de microplaques à 405 nm contre l'air.

Prévention des risques

Produit	Mention	Pictogramme	Phrase(s) de danger	Phrase(s) de prévention
NaOH	Danger		H314 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.	P280 Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage. P305 + P351 + P338 en cas de contact avec les yeux: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

Données

$s_r = 0,6 \text{ ng/mL}$

$u_c = 1,0 \text{ ng/mL}$

Protocole 2 : Mise en évidence du transgène après amplification

Matériel

A disposition, par candidat

- Amplicons obtenus numérotés 1 à 6 (voir protocole 3)
- Marqueur de taille (prêt à l'emploi), noté « **MT** »
- Eau déminéralisée dépourvue de nucléase, notée « **eau** »
- Tampon de dépôt 10X, noté « **bleu 6X** »
- Gel d'agarose 1,2 % contenant du GelGreen®
- Poubelle pour déchets contenant du GelGreen®
- Cuve pour électrophorèse horizontale
- Générateur
- Tampon TBE 1X
- Bac étanche
- Pipette P10 et cônes

Dans la salle :

- Transilluminateur visible avec matériel photo.
- Gants
- Pissette d'eau
- Pissette d'acétone

Protocole

Pour chaque échantillon, numéroté de 1 à 6, préparer 12 µL de solution contenant

- 2 µL de tampon de dépôt
- 2 µL d'échantillon
- 8 µL d'eau

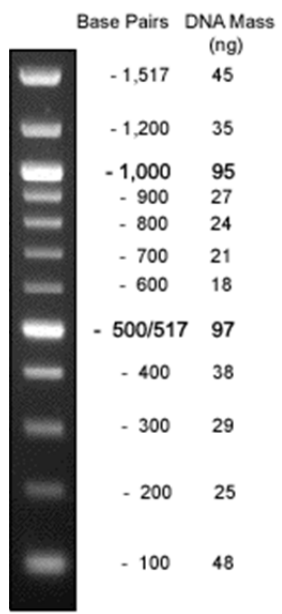
Déposer 10 µL de chaque solution ainsi que 10 µL du marqueur de taille dans les puits du gel.

Faire migrer pendant 30 à 45 min sous une tension de 100V.


Observer le gel sur le transilluminateur UV.

Données

Composition du marqueur de taille



Prévention des risques

Produit	Mention	Pictogramme	Phrase(s) de danger	Phrase(s) de prévention
GelGreen ®	Par précaution et compte-tenu du fait qu'il s'agit d'un dérivé du bromure d'éthidium, se reporter aux données concernant le bromure d'éthidium.			
Bromure d'éthidium	Danger		H302 : Nocif en cas d'ingestion H330 : Mortel par inhalation H341 : Susceptible d'induire des anomalies génétiques	P260 Ne pas respirer les poussières/ fumées/ gaz/ brouillards/ vapeurs/ aérosols. P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P302+P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau/... P304+P340 EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. P305+P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant

				plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. P310 Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin
--	--	--	--	---

Protocole 3 : Amplification par PCR du gène de la toxine Bt

Protocole

Préparer 6 microtubes et réaliser les amplifications suivantes :

Tube	1	2	3	4	5	6
matrice	Eau	ADN extrait de maïs à tester	Eau	ADN extrait de maïs non OGM	ADN extrait de maïs Bt	ADN extrait de maïs à tester
amorces	D-plante G-plante	D-plante G-plante	D-OGM G-OGM	D-OGM G-OGM	D-OGM G-OGM	D-OGM G-OGM

Pour chaque tube, pipeter les réactifs suivants dans cet ordre :

Réactifs	Volume à pipeter
Tampon PCR10 X	2,5 µL
MgCl ₂ 25 mmol/L	1,5 µL
eau	qsp 25 µL
mix de dNTP à 2,5 mmol/L (chacun)	2 µL
Mélange d'amorces à 5 µmol/L (chacune)	2,5 µL
ADN extrait de maïs	5 µL
Taq polymérase à 0,5 U / µL	2 µL

Placer les tubes dans le thermocycleur et mettre en œuvre le programme suivant :

5 min à 94 °C

30 cycles de

30 sec à 94 °C

30 sec à 53°C

60 sec à 72 °C

5 min à 72 °C.

Exploitation des résultats (voir protocole 2)

Données

Amorces D-plante et G-plante : amorces permettant d'amplifier un amplicon de 0,6 kb. La région amplifiée est située dans un gène chloroplastique codant une protéine du photosystème II.

Amorces D-OGM et G-OGM : amorces permettant d'amplifier un amplicon de 0,2 kb. La région amplifiée est située dans le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, un promoteur souvent employé pour l'expression d'un transgène dans des cellules végétales.

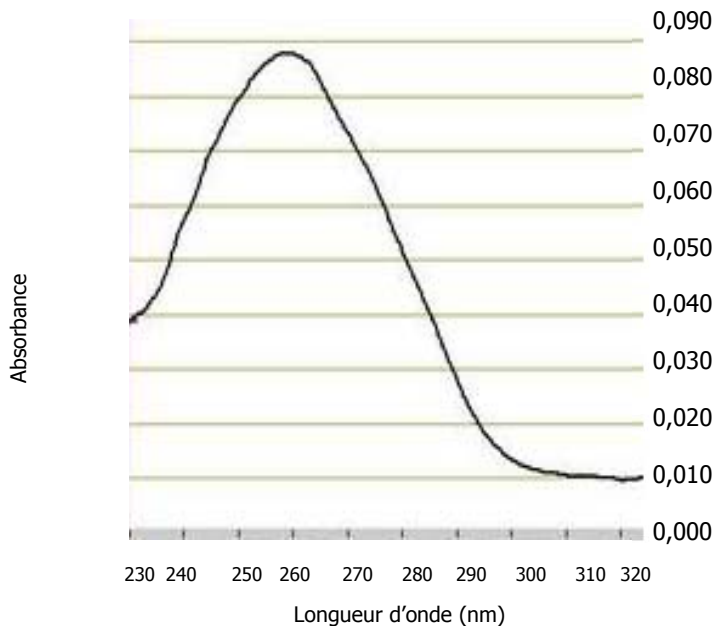
Protocole 4 : Extraction d'un plasmide d'*Agrobacterium tumefaciens*

Protocole

1. Grow *Agrobacterium* cells overnight (20-24 h) at 28°C and 250 rpm in 2 mL YEP medium containing an appropriate concentration of antibiotics (e.g. 50 µg/mL Kanamycin plus 50 µg/mL Gentamycin and 50 µg/mL Rifampicin).
2. Transfer the culture to a 1.5 mL tube and pellet by centrifugation for 1 min (4°C, 14 000 rpm). Take out all the supernatant with a drawn-out Pasteur pipette.
3. Resuspend cells in 100 µL of ice-cold Solution I (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mg/mL Lysozyme).
4. Incubate for 15 min at room temperature.
5. Add 200 µL of Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) and invert gently to mix.
6. Incubate for 5 min at room temperature.
7. Add 30 µL phenol (Tris-phenol, pH 8.0) equilibrated with 2 volumes of Solution II. Mix well by inversion.
8. Add 150 µL Sodium Acetate (3 mol/L pH 4.8) and mix by inversion.
9. Incubate at -20°C for 20 min.
10. Centrifuge for 15 min (4°C, 14 000 rpm). Transfer the supernatant into a new 1.5 mL tube.
11. Add 1 mL ice-cold 95% ethanol to the supernatant. Mix by inversion and store at -20°C for 20 min.
12. Centrifuge for 15 min (4°C, 14 000 rpm) and remove supernatant.
13. Add 1 mL 80% ethanol. Centrifuge for 10 min and remove supernatant.
14. Resuspend pellet in 20 µL TE (Tris pH 8.0 10 mmol/L EDTA 1mmol/L).
15. Store DNA sample at -20°C.

Résultat fourni

Spectre d'absorption du plasmide (dilué au 1 / 10 ème)
(absorbance en fonction de la longueur d'onde)






$R = A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	Commentaire
$R < 1,7$	Traces de protéines
$1,7 \leq R \leq 1,9$	ADN pur
$1,9 < R \leq 2,1$	Traces d'ARN

$R = A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	Commentaire
$R < 2$	ADN contaminé par de l'EDTA, des glucides, du phénol ...
$2,0 \leq R \leq 2,2$	ADN pur

Une solution d'ADN double brin à 50 µg/mL a une absorbance de 1,00 à 260 nm.

Prévention des risques

Produit	Mention	Pictogramme	Phrase(s) de danger	Phrase(s) de prévention
Phenol	Danger	 	H 341 - Susceptible d'induire des anomalies génétiques. H 331 – Toxique par inhalation. H 311 – Toxique par contact cutané. H 301 – Toxique en cas d'ingestion. H 373 - Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées	P280 Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage. P260: Ne pas respirer les poussières, fumées, gaz, brouillards, vapeurs, aérosols. : P301+P310: EN CAS D'INGESTION : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. P302+P352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon. P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever

			<p>ou d'une exposition prolongée. H 314 - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.</p>	<p>les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. P304+P340: EN CAS D'INHALATION : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut respirer confortablement.</p>
--	--	--	--	--

Annexe 1

Extraits de programme

« Introduction au programme de terminale » : démarche technologique et conduite accompagnée d'un projet expérimental en laboratoire de biotechnologies

« Objectifs de formation et supports théoriques » et « compétences transversales et technologiques » correspondant aux éléments suivants

Analyse immunologiques des échantillons biologiques

Outils essentiels de la biologie moléculaire

Quelques applications de la biologie moléculaire et du génie génétique

Initiation à la biologie moléculaire et au génie génétique : sensibilisation à l'environnement de travail et aux exigences spécifiques à la pratique de la biologie moléculaire

Préparation et analyse de produits biologiques : méthodes de fractionnement

Annexe 2 : Toxine Bt et plantes transgéniques

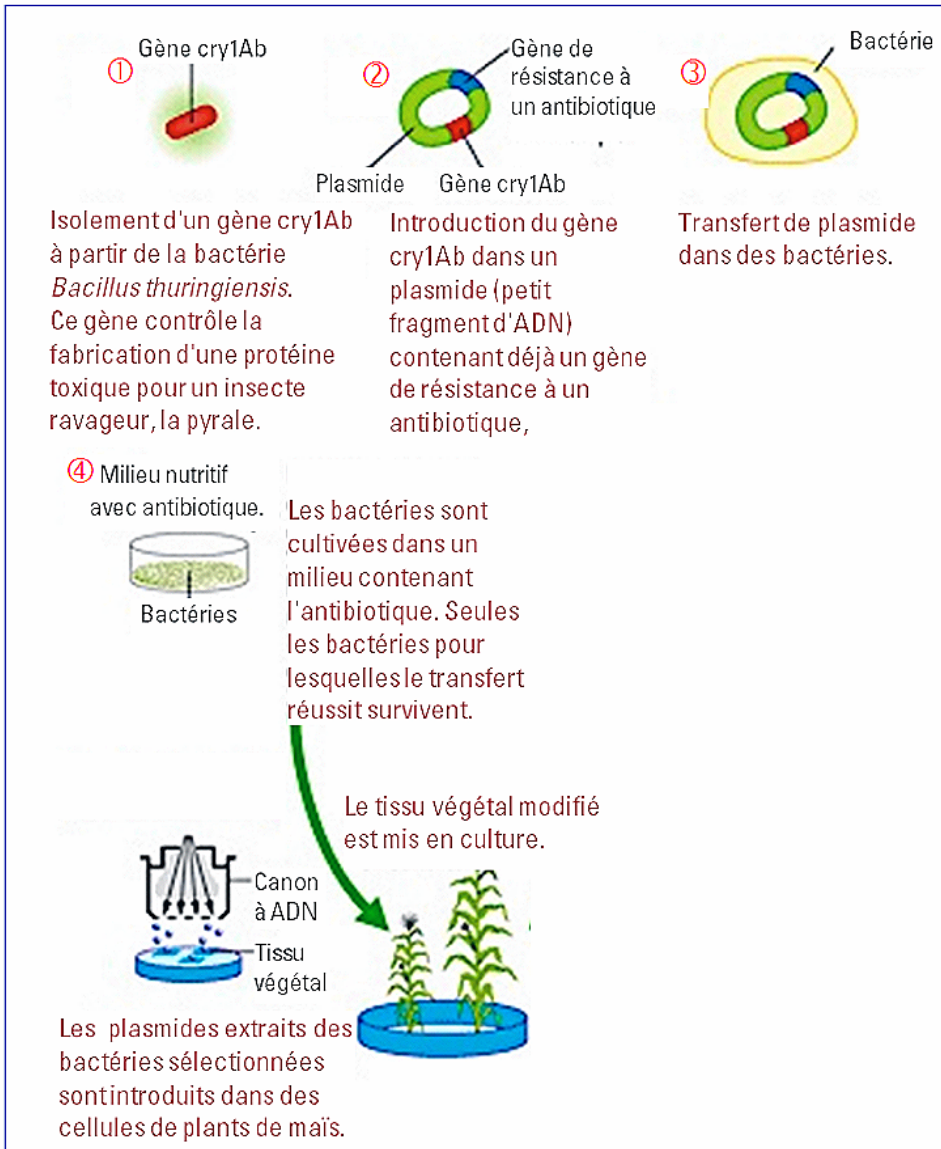
Les maïs Bt sont des variétés de maïs qui ont été modifiées génétiquement par l'ajout d'un gène leur conférant une résistance à certains insectes nuisibles et en particulier à une pyrale : la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis*. L'abréviation Bt fait référence à la bactérie donneuse du gène, *Bacillus thuringiensis* dont on a extrait le gène codant la toxine Cry1Ab.

Les bactéries de l'espèce *Bacillus thuringiensis* sécrètent naturellement jusqu'à une vingtaine de toxines insecticides différentes (sous forme de cristaux nommés Cry) qui attaquent spécifiquement certaines familles d'insectes. Les toxines Cry1 et Cry2 sont actives contre des insectes de l'ordre des lépidoptères dont fait partie la pyrale du maïs, les toxines Cry3 contre certains coléoptères et les toxines Cry4 contre certains diptères. La protéine Cry1Ab est active sur les chenilles de la pyrale du maïs mais aussi sur des chenilles d'autres espèces de lépidoptères. Elle agit en se fixant spécifiquement sur des récepteurs intestinaux et provoque une paralysie intestinale.

Le premier produit commercial contenant une des protéines insecticides produite par *Bacillus thuringiensis*, la Bactospéine, a été mis au point en 1959 pour lutter contre les chenilles de lépidoptères. Aujourd'hui encore, ces protéines sont utilisées sous forme de traitements traditionnels (pulvérisations), en agriculture biologique notamment.

Pour obtenir un maïs Bt, on introduit dans la variété de maïs un ou plusieurs gènes permettant la synthèse de Cry1ab ou des autres protéines citées.

Annexe 3 : Les étapes de l'obtention d'une plante transgénique



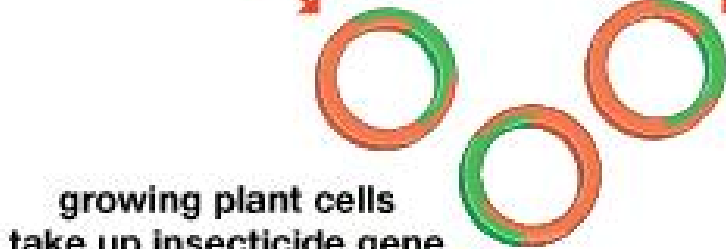
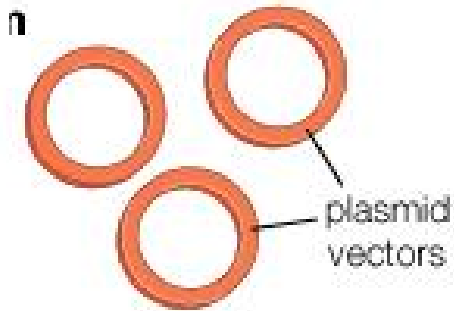
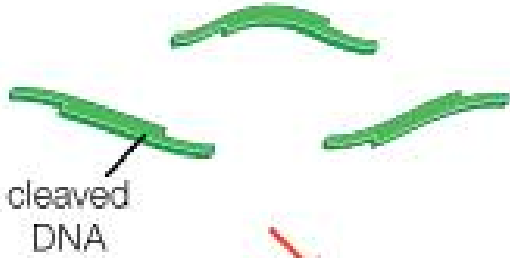
source : Livre
Chimie,
Biochimie,
Sciences du
vivant terminale
STL éditeur :
CANOPE CRDP
de Bordeaux
édition 2013

Annexe 3 suite: Les étapes de l'obtention d'une plante transgénique

insecticide gene created using recombinant DNA technology



digestion with restriction enzymes



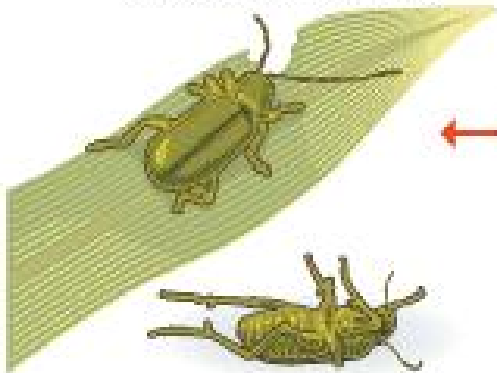
growing plant cells take up insecticide gene from plasmid vectors



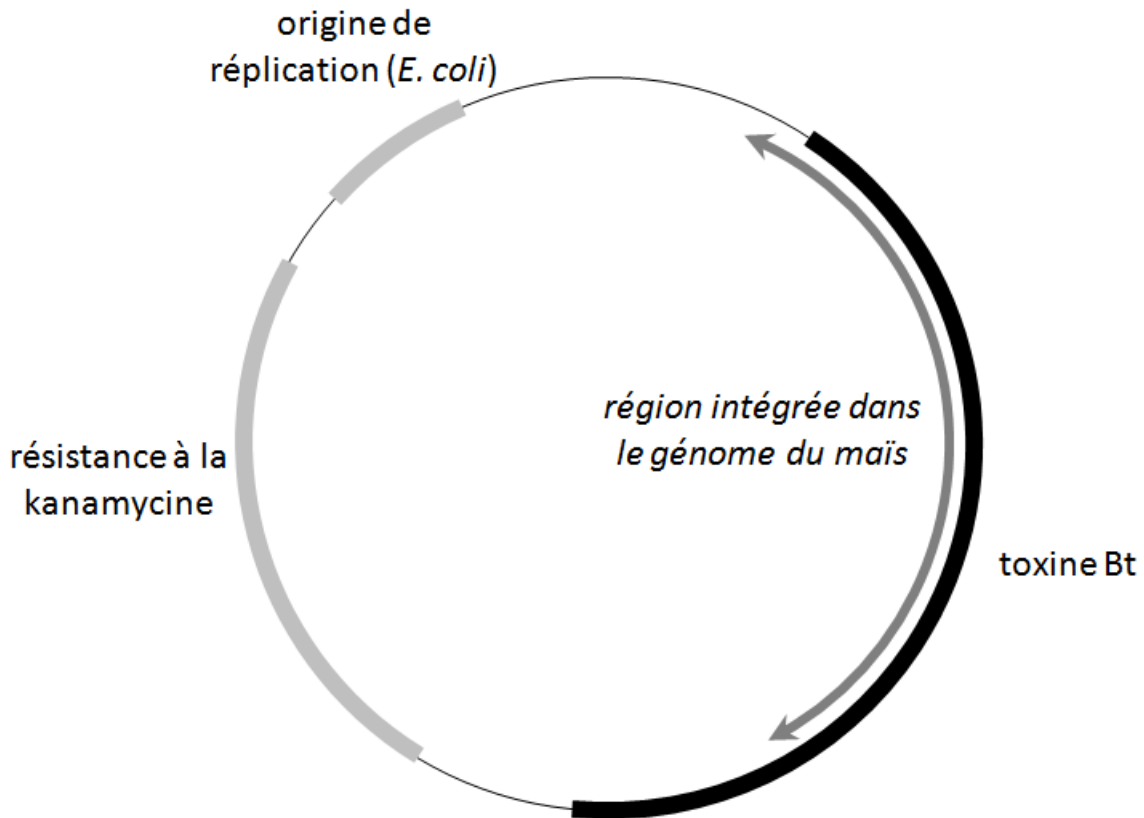
select for insecticidal cells

cells used for plant propagation

insects that feed on the plants will die



Annexe 4 : Carte d'un plasmide utilisé pour construire des maïs transgéniques



Carte du plasmide pV-ZMBK07 utilisé pour la construction du maïs transgénique MON810 (Monsanto)

Annexe 5 : Aide mémoire de métrologie

On considère que les qualités de justesse et de fidélité des procédures de mesure utilisées ont été étudiées et reconnues.

1. Vérification de la bonne exécution de la procédure

Lorsqu'un mesurage est effectué, deux types de vérification sont possibles afin de pouvoir accepter les valeurs mesurées obtenues pour des échantillons inconnus.

On peut effectuer, dans la même série de mesurages :

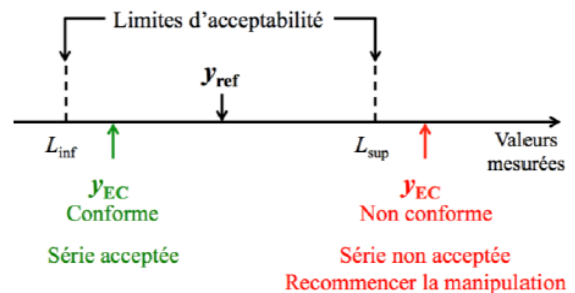
- un essai sur un étalon de contrôle ; la valeur mesurée obtenue est notée y_{EC} .
- un ou deux essais sur chacun des échantillons à doser.

1.1 Vérification de l'exactitude de mesure à l'aide d'un étalon de contrôle

On dispose d'un étalon de contrôle avec sa valeur conventionnelle (y_{ref}) ainsi que ses limites d'acceptabilité (L_{inf} et L_{sup}). On recherche si la valeur mesurée (y_{EC}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit : $L_{inf} < y_{EC} < L_{sup}$

Si la valeur mesurée y_{EC} appartient à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée y_{EC} est **exacte**, donc **conforme** : l'exécution de la procédure de mesure est satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées obtenues pour les échantillons inconnus dans la même série sont **acceptés**.



Si la valeur mesurée y_{EC} n'appartient pas à l'intervalle d'acceptabilité :

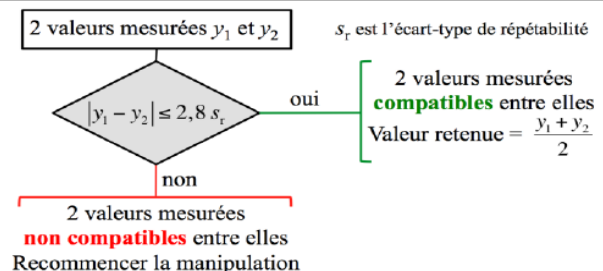
- la valeur mesurée n'est **pas exacte** donc **non conforme** : l'exécution de la procédure de mesure n'est pas satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées de toute la série **ne sont pas acceptées**; il faut rechercher l'origine de la mauvaise exactitude avant de recommencer la manipulation.¹

1.2 Vérification de la compatibilité métrologique dans le cas de deux essais effectués en répétabilité

Soient deux valeurs mesurées (y_1 et y_2) pour un même échantillon et l'écart-type de répétabilité (s_r) de la procédure de mesure correspondant à cet échantillon. Le logigramme de compatibilité à appliquer est le suivant :

Si les deux valeurs mesurées sont compatibles :
la valeur retenue est la moyenne.

Si les deux valeurs mesurées ne sont pas compatibles : il faut en rechercher la cause et recommencer la manipulation.²



2. Guide pour l'expression du résultat de mesure

L'incertitude élargie (U) est directement donnée avec son niveau de confiance ou calculée en multipliant l'incertitude-type composée (uc) par le facteur d'élargissement k , par exemple $k = 2$ pour un niveau de confiance de 95 %.

L'incertitude élargie est ensuite arrondie. Selon les cas :

- si le premier chiffre significatif est 1, 2 ou 3 : garder deux chiffres significatifs ;
- si le premier chiffre significatif est 4 ou plus : garder un chiffre significatif.

La valeur retenue du résultat est arrondie de la façon suivante : le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

Expression du résultat de mesure :

Grandeur mesurée (analyte ; système) = (valeur retenue \pm U) unité

^{1 2} Si pour des raisons matérielles il n'est pas possible de recommencer les manipulations, le candidat poursuivra l'exploitation d'une de ses valeurs mesurées afin d'exprimer un résultat de mesure de façon complète, mais en signalant clairement que ce résultat n'est pas « accepté » au sens métrologique.

SUJET B

Contexte	Les mollusques marqueurs de pollution aquatique et vecteurs potentiels d'infections alimentaires
Niveau d'enseignement	Terminale STL Biotechnologies – Enseignement de Biotechnologies
Manipulations réalisables	Objectifs de formation associés aux manipulations proposées
Mesure d'une activité acétylcholine estérase (protocole 1)	Enzymologie appliquée
Dosage des protéines totales par la méthode de Biuret (protocole 2)	Méthodes de dosage Exploitation des résultats et qualité
Identification d'un micro-organisme pathogène du mollusque (protocoles 3 et 4)	Identification et classification des microorganismes
manipulation non réalisable dans le temps de l'épreuve	
Electrophorèse en gel d'agarose de fragments d'amplification PCR (protocole 5)	Polymérisation des acides nucléiques et amplification en chaîne par polymérisation (PCR) Méthodes d'identification moléculaire
Annexes	
<p>Document 1 : Biomarqueurs et écotoxicologie Document 2 : <i>Vibrio</i> et produits de la pêche Document 3 : Fiche technique – la gélose TS (Trypticase Soja) Document 4 : Fiche technique – le milieu TCBS Document 5 : résultat d'identification sur galerie API 20NE (photographie)</p> <p>Annexe 1 : Aide-mémoire de métrologie Annexe 2 : Extraits de référentiel Annexe au poste de travail Fiche technique de la galerie API 20 NE</p>	

Protocole 1

Mesure d'une activité Acétylcholinestérase (AcE)

Objectif

Mesurer l'activité acétylcholinestérase dans 2 homogénats de moules, provenant l'un d'un élevage en zone saine et l'autre d'une zone potentiellement polluée par des pesticides (voir aussi

Document 1)

Principe

L'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) ou AcE catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine, neurotransmetteur du système nerveux, en acétate et choline.

La mesure de l'activité AcE se fait selon la méthode développée par Ellman et coll : un analogue structural de l'acétylcholine, l'acétylthiocholine (ATC), est utilisé comme substrat.

On mesure l'apparition du TNB (thionitrobenzène), de couleur jaune, produit à partir des réactions suivantes :

$\text{ATC} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acétate} + \text{TC}$, réaction catalysée par l'AcE

$\text{DTNB} + \text{TC} \rightarrow \text{TC-TNB} + \text{TNB}$

TC : thiocholine

DTNB : dithionitrobenzène

Le TNB formé présente un maximum d'absorption à 410 nm

Préparation des homogénats de moules

5 grammes de moules sont pesés et broyés dans 40 mL de tampon TBS (Tris Buffer Saline). La suspension est ensuite transvasée dans un tube et centrifugée à 4°C et 9000 rpm pendant 15 minutes.

Le surnageant est récupéré, transvasé dans une fiole jaugée de 50 mL et ajusté au trait de jauge avec du tampon TBS. On obtient ainsi :

- le surnageant témoin (ST) réalisé à partir de moules prélevées en zone saine
- le surnageant (SP) réalisé à partir de moules prélevées en zone potentiellement polluée par des pesticides

Réactifs

- Surnageants (ST) et (SP)
- tampon Phosphate EDTA pH 8 noté « PE »
- solution de DTNB à 10 mmol.L^{-1}
- solution d'ATC à 10 mmol.L^{-1}

Mode opératoire

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

1,6 mL de tampon PE

0,2 mL de DTNB

0,1 mL d'ATC

Faire le zéro du spectrophotomètre au moyen de cette cuve

Déclencher la réaction par ajout de 0,2 mL du surnageant (ST)

Suivre l'évolution de l'absorbance à 410 nm pendant 3 minutes

Refaire la manipulation dans les mêmes conditions avec le surnageant (SP)

Donnée

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

Protocole 2

Dosage spectrophotométrique des protéines totales dans des homogénats de moules

Principe

En milieu alcalin, les liaisons peptidiques des protéines forment avec les ions cuivriques (Cu^{2+}) un complexe coloré en bleu violet et absorbant à 540 nm

Matériel

- Solution étalon de protéines à 10 g.L^{-1}
- Homogénat de moules (S) préparé selon le même mode opératoire que ceux du protocole 1
- Eau physiologique
- Réactif de GORNALL


Mode opératoire

- Réaliser une gamme d'étalonnage renfermant de 0 à 10 mg de protéines par tube dans un volume final de 1 mL en eau physiologique
- Effectuer le dosage sur 1 mL de surnageant (S)
- Ajouter 4 mL de réactif de GORNALL
- Homogénéiser les tubes
- Laisser la coloration se développer 30 minutes
- Lire au spectrophotomètre les absorbances à 540 nm. La coloration est stable 1h

Données

- Ecart type de répétabilité $s_r = 0,15 \text{ g.L}^{-1}$
- Incertitude type composée $u_c = 0,2 \text{ g.L}^{-1}$
- la concentration en protéines chez les Moules est constante et peu affectée par la présence de polluants.

Prévention des risques

Produit	Mention	Pictogramme	Phrases de danger	Phrases de prévention
Réactif de GORNALL	Attention		H319 Provoque une sévère irritation des yeux H315 Provoque une irritation cutanée	P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage P302 + P352 En cas de contact avec la peau : laver abondamment à l'eau et au savon P305+P351+P338 En cas de contact avec les yeux : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

Protocole 3

Réalisation d'un frottis coloré par la méthode de Gram

Produit, matériel et réactifs

- Souche bactérienne présentée sur gélose TS (**Doc 3**). Cette souche provient d'un prélèvement réalisé à l'intérieur d'un bac de culture de moules, déposé sur gélose TCBS (**Doc 4**). Après 24H de culture, des colonies ayant poussé sur ce milieu ont été réisolées sur gélose TS.
- Matériel courant de bactériologie

Préparation du frottis

- Déposer une goutte d'une suspension bactérienne ou d'une culture en bouillon à la surface et d'une lame propre l'étaler sur une surface de 3 cm^2 .
- Laisser sécher.
- Fixer le frottis à la chaleur ou en le recouvrant d'alcool et laisser agir 3 minutes.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.

Coloration du frottis

- Recouvrir le frottis de violet de gentiane pendant 1 minute.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.
- Recouvrir d'une solution de lugol pendant 30 secondes.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.
- Décolorer à l'alcool (éthanol) durant une dizaine de secondes (cela dépendra de l'épaisseur du frottis).
- Rincer délicatement à l'eau.
- Contre - colorer à la fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute.
- Rincer le frottis à l'eau et le sécher délicatement.

Protocole 4

Réalisation des tests enzymatiques

Technique de recherche de la catalase

- Déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame propre
- A partir de la culture sur gélose TS, prélever une colonie et la déposer dans la goutte d'eau oxygénée
- Rechercher l'apparition d'un dégagement gazeux (bulles). Ce dernier indique la présence d'une activité catalasique

Technique de recherche de l'oxydase

- A partir de la culture sur gélose TS, prélever une colonie isolée et la déposer sur un disque imprégné de réactif pour la recherche de l'oxydase (chlorhydrate ou oxalate de diméthyl ou tétraméthyl para phénylène diamine). Le prélèvement des colonies ne doit pas être réalisé avec un instrument pouvant oxyder le réactif
- Un résultat positif se traduit par l'apparition, au niveau de la zone de dépôt, d'une tache violette le plus souvent en moins de trente secondes.

Protocole 5

Electrophorèse en gel d'agarose d'un produit d'amplification PCR Application à l'identification de *Vibrio parahaemolyticus* par PCR

La recherche de *Vibrio parahaemolyticus* par les techniques de microbiologie classiques présente des limites, car elle nécessite la remise en culture de la bactérie et son isolement sur des milieux spécifiques. Les techniques de biologie moléculaire comme la PCR (Polymerase Chain Reaction) permettent une identification plus rapide et avec une meilleure sensibilité à partir de sources variées (prélèvements dans l'environnement, dans les aliments, les selles,....)

À partir de la séquence d'une portion de l'ADN chromosomique de *Vibrio parahaemolyticus*, 3 oligonucléotides ont été synthétisés pour servir d'amorces à la Taq polymérase (schéma ci-dessous) :

- un oligonucléotide sens : VP33
- deux oligonucléotides antisens : VP 32 et VP 35

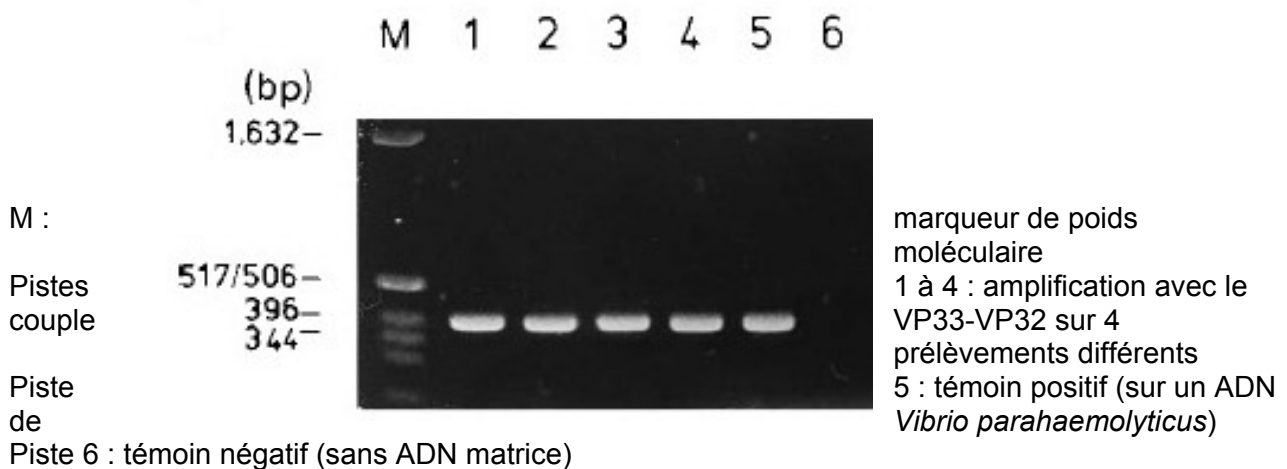
```

1  AGCTTAGCTA GTCATTTTCAG TCTACATGCA TTCTTCTCTA CTATTTTGCT
51  AATATCGATA CGGGACTCGC TTTCCCAAT TTCCAATCGT CTTGAGTAAT
                                     VP33 -->
101  ATGAGTTTGT CGATTTGATT CAATCTATAA GATTAAGCAT GCGAATTCGA
151  TAGGGTGTTA ACCACCTTTG TCTGTTTTTT TCGAGAGTGAG CCTAGTTTC
202  AATCCTTTAA TAATTATTTT TTAAGCCGTT CTAAGGTGCT TAGAACTAAT
                                     <-- VP35
251  CAAATACCGC TCTGTATTTA TGTTTAAAAG GTGTGTAGGG CCCTTCAGGG
301  TGAGATATGT CTTTTGAAA AAGACTGCCG TGTACAAAAA AAGCCCAACA
351  TAAGTTGGGC TTTCGAAAGA CAAATAAGCG GAAGATATTT AAAGGATACG
401  CTTTAAAACA CCGTCAGCTT TTAAGCGTGT GATTTTTCTC ACGAGTTTTT
451  GCACAGCAAG CGGGTAATCT TCGACTTTTT CCAACTGTTT GTAAGTGCAG
501  ATTAGCIGCG TATGTTCAAG GATTCGGGCT ACTTCATCTT CAAACTTATG
                                     <-- VP32
551  AGTAAGGTTT GCGTAGTCAT CTTGAATCAA CAAACCATTT TCAAGTCGAG
601  AGACCAAGCA CGCGGATTTA AGTTGTTACC CGTAAGCAGC ATGTATCGCT
651  TATCAACCCA GATACCCTTT AGGTGGAAGC TGTTGTTTTC ATGCTTCCAT
701  AAGTGCACAG A

```

La réaction de PCR a été menée sur plusieurs prélèvements réalisés sur des échantillons d'huître, en utilisant ou bien le couple VP33-VP32, ou bien le couple VP33-VP35, selon un protocole classique de 35 cycles.

Le résultat de l'amplification avec le couple VP33-VP32 est fourni ci-dessous (en gel d'agarose



Conditions opératoires :

PCR amplification. The PCR solution contained 1X PCR amplification buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, 200 mM (each) deoxynucleoside triphosphates, 1 mM (each) primers, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Promega), 5 µl (40 ng) of template DNA or lysed bacterial broth, and double-distilled water treated with 0.1% diethylpyrocarbonate to make a final volume of 50 µl. The mixtures were overlaid with 50 µl of mineral oil (Sigma) and subjected to 35 PCR cycles in a programmable temperature cycler (ASTEPC-700, Tokyo, Japan). The parameters for the amplification cycles were :

- denaturation for 1 min at 94°C
- annealing of primers for 1 min at 60°C
- elongation for 1 min at 72°C

After the last cycle, the PCR mixtures were incubated for 10 min at 72°C.

Detection of PCR products. PCR-amplified DNAs were detected by agarose gel electrophoresis in 2% agarose gels (Clontec). Ten microliters each of the amplification mixtures and molecular weight markers was subjected to electrophoresis and ethidium bromide staining. The specific amplified DNA fragments were visualized by UV illumination.

Source :

Sequence of a Cloned pR72H Fragment and Its Use for Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish with the PCR

CHIA-YIN LEE,* SHWU-FEN PAN, AND CHIEN-HSIEN CHEN

Graduate Institute of Agricultural Chemistry, National Taiwan University,
Taipei, Taiwan 10764, Republic of China

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Apr. 1995, p. 1311–1317

Document 1

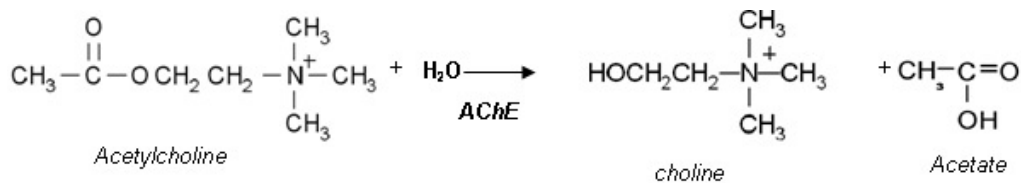
Biomarqueurs et écotoxicologie

L'**écotoxicologie** est la discipline qui évalue les effets des perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, les voies de transfert des contaminants et leur action sur l'environnement. Elle fait intervenir l'utilisation de **biomarqueurs** ayant pour but de mettre en évidence de façon précoce une pollution.

Un **biomarqueur** se définit comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, de l'organisme, de la population ou de l'écosystème qui peut être reliée à une exposition ou à des effets toxiques de polluants chimiques environnementaux (Lagadic et al., 1997; Galloway & Depledge, 2001; van der Oost et al., 2003).

Acétylcholine et acétylcholinestérase

Dans les jonctions neuromusculaires et interneuronales, l'acétylcholine est le neurotransmetteur qui permet la transmission de l'influx nerveux. L'acétylcholinestérase est une enzyme qui, en inactivant rapidement l'acétylcholine par hydrolyse, permet au système de revenir immédiatement à l'état de repos.



De nombreux neurotoxiques, dont des insecticides et des pesticides, inhibent l'acétylcholinestérase, ce qui provoque l'accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique et donc le maintien de la transmission de l'influx nerveux : celui-ci débouche sur la tétanie musculaire puis la mort.

L'acétylcholinestérase est utilisée comme **biomarqueur** de pollution des eaux littorales par de nombreux laboratoires de surveillance et de recherche comme l'IFREMER ou l'INRA. Les principaux organismes vivants chez lesquels l'activité acétylcholinestérase est évaluée sont les poissons et les mollusques (huitre, moule)

Document 2
Vibrio spp. dans les produits de la pêche : risques et prévention

N. Cohen^{1*}, H. Karib²

1 Laboratoire de Microbiologie et d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement, Institut Pasteur Maroc.

2 Département H.I.D.A.O.A., Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II.

Extraits de la revue « Les technologies de Laboratoire » N°3, Mars-Avril 2007

Les poissons et fruits de la mer constituent la deuxième source de protéines animales derrière les viandes. Au Maroc, en 2000, 900 mille tonnes de poissons et fruits de mer ont été produits, soit 0.7% de la production mondiale. Actuellement, en raison de l'évolution récente de la réglementation européenne (CEE n° 2073/2005), la recherche des *Vibrio* pathogènes pour l'homme dans les produits de la pêche destinés à l'exportation est exigée par le ministère de l'Agriculture et des pêches Maritimes. Ce règlement relatif aux critères microbiologiques préconise la mise au point de méthodes fiables pour l'évaluation des risques liés aux *Vibrio* dans les produits de mer. En effet, depuis quelques années, l'incidence des infections à *Vibrio* suite à l'ingestion des produits de la pêche est en constante et régulière progression dans le monde. Cette progression pourrait être directement liée à une concentration des eaux côtières en vibrions, consécutive à l'anthropisation du littoral. Mais il est vraisemblable que la modification des habitudes alimentaires, avec l'augmentation de la consommation des produits de la mer et notamment des produits crus ainsi que la mondialisation des échanges commerciaux des produits alimentaires y contribuent de façon substantielle (.../...)

Les *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, d'un diamètre compris entre 0,5 et 0,8 µm et une longueur comprise entre 1,4 et 2,6 µm. Ils présentent une mobilité polaire due à un seul flagelle. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs. Toutes les espèces de *Vibrio*, à l'exception de *V. metschnikovii* et de *V. gazogenes*, sont positives pour le test de l'oxydase. La plupart des espèces fermentent le glucose, sans production de gaz. A l'exception des espèces, *V. cholerae* et *V. mimicus*, qui sont halotolérantes, les espèces de *Vibrio* sont halophiles et requièrent du sodium pour leur croissance.

Elle poussent abondamment en milieux peptonés simples et croient aisément sur le milieu "marine agar" et sur la gélose Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (TCBS). Le pourcentage en guanine – cytosine de l'acide désoxyribonucléique (ADN) des *Vibrio* est compris entre 38 et 51 %. Les *Vibrio* donnent sur gélose trypticase soja, au bout de 24 h, des colonies de 2 à 3 mm de diamètre, circulaires à bords réguliers, légèrement convexes et transparentes. (.../...)

Le tableau ci-dessous résume les facteurs de virulence des principales espèces de vibrions non cholériques.

Facteurs	Espèces	Syndromes
Entérotoxines	<i>Vibrio cholerae</i> (nonO1/nonO139)	gastroentérite
Hémolysine	<i>Vibrio cholerae</i> (nonO1/nonO139) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio vulnificus</i>	gastroentérite gastroentérite lésions tissulaires
Capsule polysaccharidique	<i>Vibrio cholerae</i> (nonO1/nonO139) <i>Vibrio vulnificus</i>	septicémie septicémie

Habitat

Les *Vibrio* spp. ont pour habitat les milieux aquatiques et notamment les eaux des estuaires et les eaux côtières. Ils sont capables de coloniser de nombreux organismes marins : poissons, mollusques, crustacés, éponges, coraux, algues, zooplancton.

V. cholerae est une bactérie saprophyte retrouvée dans l'environnement, particulièrement dans les eaux saumâtres des estuaires, les lits des fleuves au contact du zooplancton des algues marines et des plantes aquatiques dans la plupart des zones côtières des régions tempérées ou tropicales du monde.

V. parahaemolyticus est présent dans l'environnement marin et isolé surtout des eaux dont la température est supérieure à 10 °C. Sa multiplication est favorisée par une température supérieure à 20 °C et une salinité modérée (15 à 25 g par litre). A des températures inférieures à 10 °C, l'isolement de *V. parahaemolyticus* devient difficile car la bactérie rentre dans un état viable non cultivable. La répartition géographique est vaste et *V. parahaemolyticus* a été isolé des eaux côtières de très nombreux pays répartis dans les cinq continents.

Les manifestations cliniques des TIA (Toxi Infections Alimentaires Collectives) à *Vibrio*

Espèces de <i>Vibrio</i>	Manifestations cliniques	Dose infectieuse (Log 10)
<i>Vibrio Cholerae</i>	Choléra: diarrhée abondante, crampes abdominales, Vomissements, déshydratation	3 à 6
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Diarrhée, douleurs abdominales, nausées, vomissements	5 à 9

Durée de survie de *V. cholerae*

Aliments	Temps de survie En jours
Poisson entreposé à 3–8°C	14–25
Crevettes congelées	180
Légumes en humidificateur, 20°C	10
Carottes	10
Chou-fleur	20
Eau de rivière	210

Document 3

Fiche technique - GELOSE GTS (Gélose Trypticase Soja) Milieu de base non sélectif pour l'isolement des bactéries

COMPOSITION

En grammes par litre d'eau distillée

Peptone papaïnique de soja	5
Peptone trypsique de soja	15
NaCl	5
Agar	15

pH final = 7,3

PRINCIPE

Milieu de base qui permet la culture des bactéries non exigeantes

LECTURE

Après 24H en aérobiose, il peut être réalisé un examen macroscopique des colonies

La culture sur ce milieu prouve la non exigence de la souche

Document 4
Fiche technique - GELOSE TCBS
Milieu d'isolement sélectif pour les vibrions entéro-pathogènes

I- DOMAINE D'UTILISATION

La gélose au Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (TCBS) constitue un milieu sélectif destiné à l'isolement de *Vibrio cholerae* et des autres vibrions entéro-pathogènes, en particulier *Vibrio parahaemolyticus* dans les poissons, les produits de la mer et les autres prélèvements biologiques d'origine animale.

Il est recommandé par la norme AFNOR V 08-024, NF ISO 8914.

II- PRINCIPE

- Les concentrations élevées en thiosulfate et en citrate de sodium ainsi que la forte alcalinité du milieu inhibent fortement la croissance des entérobactéries.
- La bile de bœuf et le cholate de sodium ralentissent la culture des entérocoques et inhibent le développement des autres bactéries Gram positif.
- La concentration relativement forte en chlorure de sodium inhibe la croissance des bactéries non halotolérantes
- L'acidification du milieu résultant de la fermentation du saccharose, provoque le virage au jaune de l'indicateur au thymol et au bleu de bromothymol.
- A partir du thiosulfate, qui constitue une source de soufre, la production de sulfure d'hydrogène est révélée en présence de citrate ferrique. Tous les *Vibrio* sont H₂S-négatifs.

III-FORMULE – TYPE pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone10,0 g
- Extrait autolytique de levure.....5,0 g
- Saccharose20,0 g
- Bile de bœuf bactériologique5,0 g
- Cholate de sodium3,0 g
- Citrate de sodium.....10,0 g
- Thiosulfate de sodium.....10,0 g
- Chlorure de sodium.....10,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....1,0 g
- Bleu de bromothymol40,0 mg
- Bleu de thymol40,0 mg
- Agar agar bactériologique.....14,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 8,6 ± 0,2.

IV-PREPARATION

- Mettre en suspension 88,1 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Ne pas autoclaver.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47°C.
- Couler en boîtes de Pétri stériles.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.
- Ensemencer l'inoculum par étalement en surface.
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures, à l'abri de la lumière.

V- LECTURE

Les colonies de certaines espèces de *Vibrio* présentent les aspects suivants :

Micro-organismes	Aspect macroscopique	Caractères biochimiques
<i>Vibrio cholerae</i>	Colonies jaunes sans centre noir	Saccharose + / H ₂ S -
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Colonies incolores à centre vert foncé	Saccharose - / H ₂ S -



VI- CONTROLE QUALITE

1. Contrôle d'aspect :

- Milieu déshydraté : poudre beige verdâtre, fluide et homogène.
- Milieu préparé : gélose vert foncé.

2. Contrôle de stérilité :

- Incubation 24H à 37°C +/- 1°C une gélose non ensemencée
- Validation par absence de culture après incubation

3. Contrôle de performance :

Réponse culturale typique après 24 heures d'incubation à 37°C :

Microorganismes	Croissance et Caractéristiques
<i>Vibrio cholerae</i> El Tor ATCC® 14033	Bonne, colonies jaunes
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749	Bonne, colonies jaunes
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	Bonne, colonies bleu vert
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	inhibée

Document 5

Résultat de l'ensemencement d'une galerie API20NE avec une souche bactérienne prélevée dans un élevage de moules

(Photographie fournie aux candidats)

Annexe 1 : Aide - mémoire de métrologie

On considère que les qualités de justesse et de fidélité des procédures de mesure utilisées ont été étudiées et reconnues.

1. Vérification de la bonne exécution de la procédure

Lorsqu'un mesurage est effectué, deux types de vérification sont possibles afin de pouvoir accepter les valeurs mesurées obtenues pour des échantillons inconnus.

On peut effectuer, dans la même série de mesurages :

- un essai sur un étalon de contrôle ; la valeur mesurée obtenue est notée y_{EC} .
- un ou deux essais sur chacun des échantillons à doser.

1.1 Vérification de l'exactitude de mesure à l'aide d'un étalon de contrôle

On dispose d'un étalon de contrôle avec sa valeur conventionnelle (y_{ref}) ainsi que ses limites d'acceptabilité (L_{inf} et L_{sup}). On recherche si la valeur mesurée (y_{EC}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit :

$$L_{inf} \leq y_{EC} \leq L_{sup}$$

Si la valeur mesurée y_{EC} appartient à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée y_{EC} est exacte, donc conforme : l'exécution de la procédure de mesure est satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées obtenues pour les échantillons inconnus dans la même série sont acceptées.



Si la valeur mesurée y_{EC} n'appartient pas à l'intervalle d'acceptabilité :

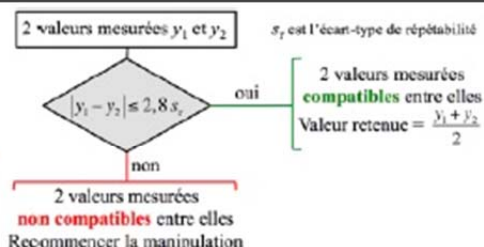
- la valeur mesurée n'est pas exacte donc non conforme : l'exécution de la procédure de mesure n'est pas satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées de toute la série ne sont pas acceptées; il faut rechercher l'origine de la mauvaise exactitude avant de recommencer la manipulation.¹

1.2 Vérification de la compatibilité métrologique dans le cas de deux essais effectués en répétabilité

Soient deux valeurs mesurées (y_1 et y_2) pour un même échantillon et l'écart-type de répétabilité (s_r) de la procédure de mesure correspondant à cet échantillon. Le logigramme de compatibilité à appliquer est le suivant :

Si les deux valeurs mesurées sont compatibles :
la valeur retenue est la moyenne.

Si les deux valeurs mesurées ne sont pas compatibles :
il faut en rechercher la cause et recommencer la manipulation.²



2. Guide pour l'expression du résultat de mesure

L'incertitude élargie (U) est directement donnée avec son niveau de confiance ou calculée en multipliant l'incertitude-type composée (u_c) par le facteur d'élargissement k , par exemple $k = 2$ pour un niveau de confiance de 95 %.

L'incertitude élargie est ensuite arrondie. Selon les cas :

- si le premier chiffre significatif est 1, 2 ou 3 : garder deux chiffres significatifs ;
- si le premier chiffre significatif est 4 ou plus : garder un chiffre significatif. La valeur retenue du résultat est arrondie de la façon suivante : le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

Expression du résultat de mesure :

$$\text{Grandeur mesurée (analyte ; système)} = (\text{valeur retenue} \pm U) \text{ unité}$$

^{1,2} Si pour des raisons matérielles il n'est pas possible de recommencer les manipulations, le candidat poursuivra l'exploitation d'une de ses valeurs mesurées afin d'exprimer un résultat de mesure de façon complète, mais en signalant clairement que ce résultat n'est pas « accepté » au sens métrologique.

Annexe 2

Extraits de programme 1 ère et T ale STL Biotechnologies
« Objectifs de formation et supports théoriques » et « compétences transversales et technologiques » correspondant aux éléments suivants

Caractérisation identification et classification des micro-organismes

Méthodes de dosage

Etude cinétique des enzymes michaéliennes

Les enzymes, catalyseurs biologiques et outils de transformation spécifique des molécules : les Enzymes protéines catalytiques à site actif

Enzymologie appliquée

Outils essentiels de la biologie moléculaire

Les étapes de la recherche d'une flore particulière dans un produit polymicrobien

SUJET C

Contexte	Analyses en laboratoire hospitalier : aspergillome pulmonaire chez un sujet diabétique
Niveau d'enseignement	Terminale STL -Enseignement de biotechnologies

Manipulations réalisables	Objectifs de formation associés aux manipulations proposées
Diagnostic indirect d'une aspergillose pulmonaire par agglutination (Protocole 1)	Analyse immunologique des échantillons biologiques (Annexe 1)
Contrôle qualité d'un nouveau kit de dosage du glucose (Protocole 2)	Exploitation des résultats et qualité (Annexe 1)

Manipulations non réalisables dans le temps de l'épreuve	Objectifs de formation associés aux manipulations proposées
Identification directe d'une aspergillose pulmonaire (Protocole 3)	La démarche de l'analyse microbiologique Les champignons microscopiques (Annexe 1)
Identification des aspergilloses invasives par PCR (Protocole 4)	Outils essentiels de la biologie moléculaire Quelques applications de biologie moléculaire et du génie génétique (Annexe 1)

Ressources documentaires fournies
<p>Protocole 1 : Diagnostic indirect d'une aspergillose pulmonaire par agglutination</p> <p>Protocole 2 : Contrôle qualité d'un nouveau kit de dosage du glucose</p> <p>Protocole 3 : Diagnostic direct d'une aspergillose pulmonaire</p> <p>Protocole 4 : Identification des aspergilloses invasives par PCR</p> <p>Annexe 1 : Extraits de programme relatifs aux objectifs de formation</p> <p>Annexe 2 : Fiche technique du dosage Biolabo du glucose par voie enzymatique</p> <p>Annexe 3 : Aide mémoire de métrologie</p> <p>Annexe 4 : L'aspergillome</p> <p>Annexe 5 : Principales espèces d'<i>Aspergillus</i> rencontrées en pathologie humaine</p> <p>Annexe 6 : Fiches de sécurité des réactifs des protocoles 1 et 2</p>

Protocole 1 : Diagnostic indirect d'une aspergillose pulmonaire par agglutination

Contexte de la recherche

La détection des anticorps sérique dirigés contre *Aspergillus fumigatus* est réalisée pour le diagnostic des différentes pathologies aspergillaires d'évolution chronique, comme l'aspergillome ainsi que l'aspergillose chronique nécrosante.

Elle fait aussi partie des critères de définition de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique.

Cette recherche est indiquée pour le diagnostic initial de la maladie aspergillaire et son suivi.

Les résultats sérologiques pour un patient donné doivent être interprétés en fonction de sa clinique et des autres données disponibles (imagerie, biologie dont la mycologie).

Principe de la recherche:

Le test ASPERGILLOSE FUMOUE® permet la détermination quantitative des anticorps sériques dirigés contre *Aspergillus fumigatus* par hémagglutination indirecte.

Les hématies sensibilisées sont constituées d'hématies de mouton recouvertes par un antigène d'*Aspergillus fumigatus*. La présence d'anticorps sériques spécifiques entraîne une agglutination des hématies sensibilisées qui se traduit par un voile rouge / marron tapissant la cupule. En l'absence d'anticorps spécifiques, ces hématies sédimentent au fond de la cupule sous la forme d'un anneau. Des hématies non sensibilisées assurent la spécificité de la réaction et permettent d'éliminer les interférences dues aux agglutinines naturelles anti-mouton (hétéroanticorps de Forssman, anticorps de la mononucléose infectieuse...).

La réaction s'effectue en microplaque à fond en U. Les résultats sont obtenus en 45 minutes.

Matériel et réactifs

- P1000 P50
- Tubes à hémolyses
- Microplaque à fond rond
- Film transparent
- Compte-gouttes fins
- Tampon phosphate
- Sérum patient
- Hématies sensibilisées
- Hématies non sensibilisées

Précautions d'utilisation:

- Laisser les réactifs et les échantillons revenir à température ambiante avant d'effectuer le test.
- Agiter soigneusement les suspensions d'hématies avant utilisation.
- Lors de la distribution des suspensions d'hématies, veiller à ce que le compte-gouttes soit parfaitement vertical. Vérifier l'absence de bulles d'air dans les gouttes, afin que les volumes délivrés soient constants.
- En cas de versement accidentel de réactif, nettoyer le plan de travail à l'aide de papier absorbant et rincer avec de l'eau. En cas de versement de sérum, nettoyer à l'aide d'eau de Javel et de papier absorbant.
- Éviter tout contact de réactif avec la peau, les yeux et les muqueuses. Ne pas ingérer.
- Les sérums, les réactifs ainsi que le matériel et les produits contaminés doivent être éliminés dans un conteneur pour déchets contaminés, selon les recommandations et la réglementation en vigueur.
- Tous les réactifs, sauf le tampon phosphate, contiennent du matériel d'origine animale. Par conséquent, ils doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés avec précaution.

Mode opératoire

1- Préparation d'une dilution mère du sérum à analyser (1/40)

- Distribuer dans un tube à hémolyse et mélanger :
 - o 50 µL de sérum à analyser ;
 - o 1,95 mL de tampon phosphate.

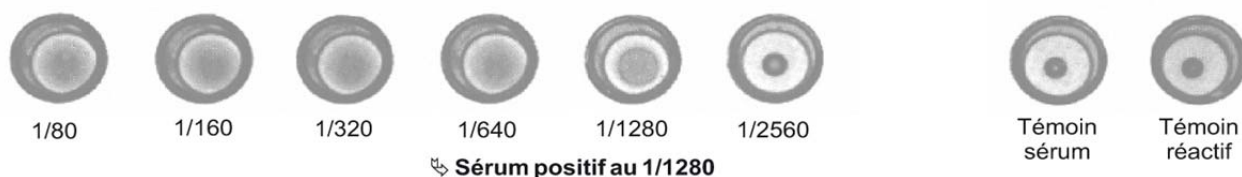
2- Réalisation du test sur microplaque

- A l'aide d'une micropipette, distribuer 50 µL de tampon phosphate dans 8 cupules de la microplaque.
- Distribuer 50 µL de la dilution mère du sérum dans la 1^{er} cupule.
- Mélanger avec le tampon et reporter 50 µL de la 1^{er} cupule dans la 2^e,
- Mélanger avec le tampon et reporter 50 µL de la 2^e dans de la 3^e et ainsi de suite jusqu'à la 6^e cupule en rejetant 50 µL de la 6^e cupule.
- Distribuer 50 µL de la dilution mère du sérum dans la 7^e cupule. Mélanger avec le tampon et rejeter 50 µL. Cette dilution (1/80) constitue le témoin sérum, dont le rôle est de détecter les agglutinines naturelles anti-mouton que peuvent contenir certains sérums.
- Agiter soigneusement les suspensions d'hématies.
 - o Déposer 1 goutte d'hématies sensibilisées dans les 6 premières cupules.
 - o Déposer 1 goutte d'hématies non sensibilisées dans la 7^e cupule (témoin sérum).
 - o Déposer 1 goutte d'hématies sensibilisées dans la 8^e cupule (témoin réactif) dont le rôle est de contrôler la validité du tampon et des hématies sensibilisées.
- Couvrir les cupules à l'aide d'un film transparent.
- Homogénéiser très soigneusement le contenu des cupules à l'aide d'un agitateur vibreur pour plaques à microtitration (par exemple 1300 tours / minute pendant 10 secondes).
- Laisser ensuite la plaque immobile à l'abri de toute vibration.
- Lire la réaction 45 minutes plus tard.

Lecture des résultats

ABSENCE D'HÉMAGGLUTINATION Présence d'un anneau plus ou moins large au fond de la cupule	RÉACTION NÉGATIVE
PRESENCE D'HÉMAGGLUTINATION Présence d'un voile rouge/marron tapissant la cupule; parfois présence d'un fin liseré périphérique	RÉACTION POSITIVE

Une image réactionnelle d'hémagglutination, obtenue avec un sérum positif, est représentée ci-dessous :



Le titre est donné par la première dilution présentant un anneau large et périphérique.

Le titre est rendu après validation des témoins.

Interprétation des résultats

TITRE < 1/320	Réaction non significative. Absence probable d'aspergillose profonde. Renouveler le test 2 à 3 semaines plus tard et associer une électrosynérèse ou une immunoélectrophorèse.
TITRE = 1/320	Réaction douteuse. Renouveler le test 2 à 3 semaines plus tard et associer une électrosynérèse ou une immunoélectrophorèse.
TITRE ≥ 1/640	Réaction significative en faveur d'une aspergillose profonde.

Performance:

Le diagnostic sérologique présente un grand intérêt dans les suspicions d'aspergillose profonde. Elle permet de confirmer le rôle pathogène éventuel d'un *Aspergillus* isolé en culture, ou d'orienter le diagnostic lorsque le champignon ne peut être isolé directement à partir d'un prélèvement.

Le réactif ASPERGILLOSE FUMOUIZE® est constitué d'hématies sensibilisées par un antigène *Aspergillus fumigatus* qui assure sensibilité et spécificité à cette réaction d'hémagglutination indirecte. Ainsi, les résultats des évaluations du test montrent une sensibilité de 80 % et une spécificité de 98 %.

Protocole 2 : Contrôle qualité d'un nouveau kit de dosage du glucose

Matériel et réactifs

- Étalon de travail de glucose à 30 mmol.L⁻¹
- Étalon R2 de glucose 1 g.L⁻¹
- Solution de contrôle biolabo-exatrol-P de concentration en glucose connue = 2,75 g.L⁻¹
- Acide ascorbique
- Coupelle de pesée
- Balance de précision (portée minimale = 0,1 g ; portée maximale = 210 g)
- Fioles jaugées de 50, 100 et 200 mL
- Pipettes jaugées de 1, 2, 5 et 10 mL
- P20 P100 P1000
- Tubes à hémolyses
- Microcuves de spectrophotométrie
- Réactif de coloration
- Spectrophotomètre

a) Vérification de la linéarité de la méthode

- Réaliser une gamme de 5 solutions étalons filles allant jusqu'à 30 mmol.L⁻¹ à partir de la solution **étalon de travail à 30 mmol.L⁻¹** sous un volume final de 1 mL et en eau déminéralisée.
- En microcuve, mettre 10 µL de chaque solution fille et ajouter 1 mL de réactif de coloration. Incuber à température ambiante et lire les résultats selon les indications du protocole en **annexe 2**.

b) Détermination des paramètres de fidélité et de justesse de mesure (taux élevé)

Les paramètres de fidélité et de justesse sont définis dans l'**annexe 3**.

- Quantifier les défauts de fidélité et de justesse de la méthode de l'**annexe 2** au taux élevé en réalisant 10 dosages de la **solution de contrôle biolabo-Exatrol-P** selon le protocole de l'**annexe 2**.

c) Mise en évidence d'interférences

- Préparer par pesée une solution d'acide ascorbique à 300 mg.L⁻¹
- Réaliser le dosage selon le protocole de l'**annexe 2** :
 - d'une solution test composée de 5 µL de **solution de contrôle biolabo-Exatrol-P** et de 5 µL de solution d'acide ascorbique à 300 mg.L⁻¹
 - d'une solution témoin composée de 5µL d'eau distillée et de 5 µL de solution d'acide ascorbique à 300 mg.L⁻¹.
- Faire 2 essais pour la solution test.

Protocole 3: Diagnostic direct d'une aspergillose pulmonaire

Matériel et réactifs

- Gélose Sabouraud +chloramphénicol ensemencée avec un prélèvement de patient
- Géloses Sabouraud ensemencées avec :
 - *Aspergillus fumigatus*
 - *Aspergillus flavus*
 - *Aspergillus nidulans*
 - *Aspergillus terreus*
 - *Aspergillus niger*

Le diagnostic direct se fait en suivant la procédure ci-dessous.

1) Prélèvements

Broncho-pulmonaire : Lavage bronchoalvéolaire, aspiration bronchique ou expectoration.
Autres : biopsie pulmonaire, cérumen, pus ...

2) Examen direct du prélèvement

A l'état frais ou après coloration (bleu coton) du prélèvement, on observe des filaments septés de 2 à 3 µm de diamètre, à bords parallèles, ramifiés (à angle droit) ainsi que parfois des têtes aspergillaires. Un examen direct positif est fortement en faveur d'une pathologie mycosique.

3) Culture

Elle se fait sur gélose Sabouraud + antibiotique (chloramphénicol, gentamicine ...)

La culture est décelable après 48h à 37°C et à 25°C mais il faut attendre 4 à 5 jours pour que l'aspect des colonies soit caractéristique.

4) Identification de la culture

L'identification de l'espèce aspergillaire se fait par l'analyse des critères macroscopiques et microscopiques du champignon.

a) observations macroscopiques

En fonction des espèces, l'aspect macroscopique et en particulier la couleur et la texture des colonies varie.

b) observations microscopiques

On recherche à l'objectif X 10 les têtes aspergillaires, et on réalise l'identification de l'espèce en fonction de :

- la longueur et aspect du conidiophore
- l'aspect de la tête
- le nombre de rangées de phialides
- la couleur des conidies

La figure 1 présente les observations macroscopique et microscopique correspondant à la culture obtenue sur sabouraud + chloramphénicol d'un prélèvement de lavage bronchoalvéolaire (LBA) effectué chez un patient.

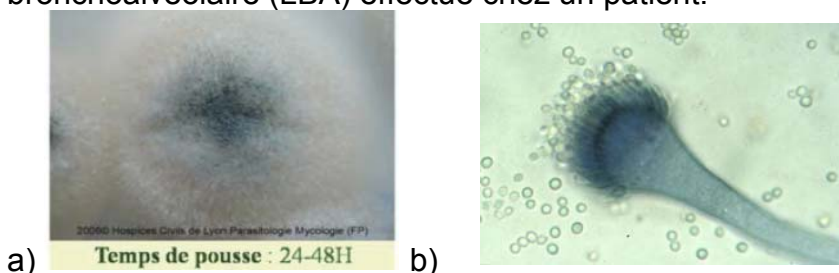


Figure 1 : Macroscopie (a) et microscopie (b) d'une culture sur Sabouraud + chloramphénicol de LBA

L'**annexe 5** présente les caractéristiques qui permettent de différencier les principales espèces responsables de pathologies humaines.

Protocole 4 : Identification des aspergilloses invasives par PCR en temps réel

Extraction d'ADN du liquide broncho-alvéolaire

- Ajouter dans un microtube :
 - o 600 µL de billes de verre
 - o 200 µL de tampon de lyse
 - o 50 µL de protéinase K
 - o 400 µL de liquide broncho-alvéolaire
- Homogénéiser pendant 60 s.
- Incuber à 56°C pendant 15 min.
- Centrifuger rapidement.
- Transférer le surnageant (additionné de 5 µL d'ADN de bactériophage λ) sur un automate d'extraction (MAGNA™ Roche)
- Éluer l'échantillon dans un volume de 100µL.

PCR

- Pour chaque échantillon, réaliser 2 amplifications en parallèle, chacune en duplicat, l'une pour amplifier le gène de l'ARN16S d'*Aspergillus*, l'autre pour amplifier un gène de λ .
- Pour chaque amplification, pipeter dans un microtube :
 - o 5 µL de mélange d'oligonucléotides amorces / sonde (*),
 - o 15 µL de pré-mélange réactionnel (contenant l'ADN polymérase, les dNTP, du tampon, de la sérum albumine bovine),
 - o 10 µL d'ADN extrait.
- Placer le tube dans un thermocycleur et réaliser les cycles de température suivants:
 - Dénaturation 95°C pendant 20 s
 - 45 cycles composés de :
 - o 95°C pendant 3 s,
 - o 60°C pendant 30 s.
- Amplifier des étalons composés du gène cible d'*Aspergillus* (de 50 à $5 \cdot 10^6$ copies par réaction) dans les mêmes conditions.
- Analyser les produits obtenus en PCR temps réel : déterminer le cycle seuil (C_T).

* *Un ensemble de 2 amorces de PCR et d'une sonde (couplée à la fluorescéine en 5' et à un quencher en 3') dirigées soit contre un gène d'ARN16S conservé au sein du genre *Aspergillus*, soit contre une séquence de λ (contrôle interne) est utilisé.*

Résultats fournis

Le seuil de positivité est défini comme $C_T < 40$ cycles.

Les résultats de la gamme d'étalonnage sont présentés en figure 2 :

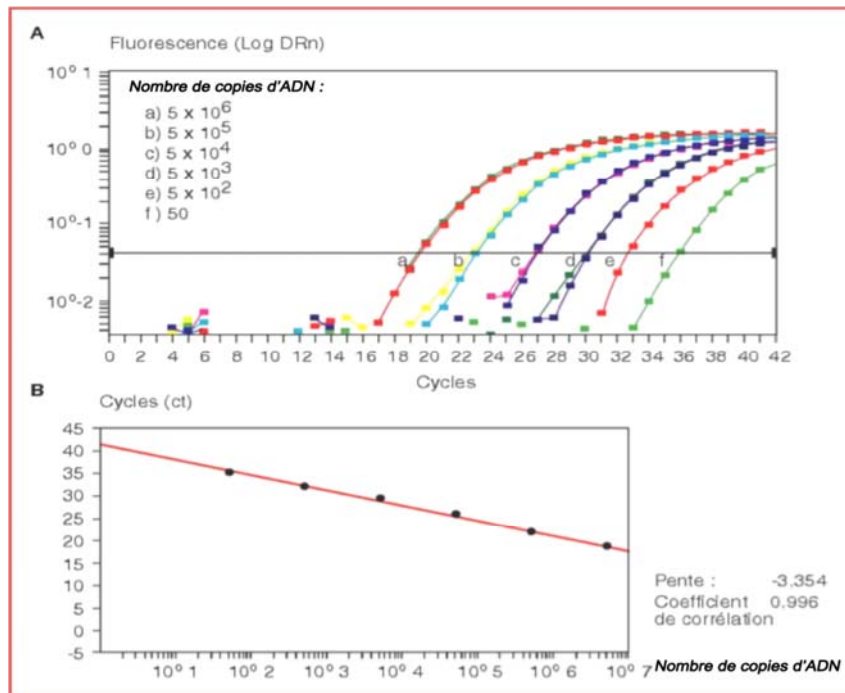


Figure 2 : gamme d'étalonnage de la méthode de dosage de l'ADN d'*A.fumigatus* par PCR en temps réel

Les résultats du contrôle négatif (échantillon sans ADN codant l'ARN 16S de *A. fumigatus* traité comme l'échantillon patient) sont présentés en figure 3 :

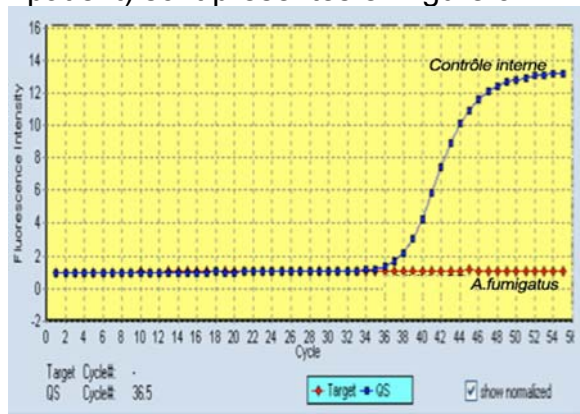


Figure 3 : résultat du contrôle négatif de la méthode de dosage de l'ADN d'*A.fumigatus* par PCR en temps réel

Un exemple de résultat patient positif est présenté en figure 4 :



Figure 4 : Résultat d'un patient pour la méthode de dosage de l'ADN d'*A.fumigatus* par PCR en temps réel

Annexe 1

Extraits de programme 1^{ère} et T^{ale} STL Biotechnologies
« Objectifs de formation et supports théoriques » et « compétences transversales et technologiques » correspondant aux éléments suivants

Introduction au programme de terminale
analyse immunologique des échantillons biologiques
exploitation des résultats et qualité
la démarche de l'analyse microbiologique : recherche et ou dénombrement
les champignons microscopiques
Outils essentiels de la biologie moléculaire
Quelques applications de la biologie moléculaire et du génie génétique

Annexe 2 Fiche technique du dosage Biolabo du glucose par voie enzymatique



REACTIFS BIOLABO
www.biolabo.fr

FABRICANT :
BIOLABO SA,
02160, Maizy, France

GLUCOSE

GOD-PAP

Liquide Prêt à l'emploi

Réactif pour le dosage quantitatif du glucose dans le plasma, le sérum et le liquide céphalorachidien (LCR) humains, ou les urines

REF LP80209	R1	2 X 200 mL	R2	1 x 5 mL
REF LP87809	R1	8 X 200 mL	R2	1 x 5 mL

CODE CNQ : HV

SUPPORT TECHNIQUE ET COMMANDES

Tel : (33) 03 23 25 15 50

Fax : (33) 03 23 256 256



IVD USAGE IN VITRO

INTERET CLINIQUE (1) (6)

La concentration en glucose sanguin est maintenue à l'intérieur de limites relativement étroites dans différentes situations (absorption de nourriture, jeûne ou exercice intense) par des hormones régulatrices comme l'insuline, le glucagon ou l'épinéphrine. Le dosage du glucose est un des tests les plus fréquemment réalisés au laboratoire d'analyses médicales, conjointement avec d'autres tests de tolérance (épreuve d'hyperglycémie provoquée, glycémie post-prandiale...).

Le désordre du métabolisme des carbohydrates sanguins le plus couramment rencontré est l'hyperglycémie due au diabète mellitus.

Une hyperglycémie supérieure à 3,0 g/L (16,5 mmol/L) peut conduire à une cétose-acidose et un coma hyperosmolaire.

Toute hypoglycémie durable, inférieure à 0,30 g/L (1,7 mmol/L), est susceptible d'entraîner des lésions encéphaliques graves et irréversibles.

PRINCIPE (4) (5)

Méthode de Trinder. Le glucose est oxydé par la GOD en acide gluconique et H₂O₂ qui réagit en présence de POD avec le chloro-4-phénol et le PAP pour former une quinonéimine rouge. L'absorbance du complexe coloré, proportionnelle à la concentration en glucose dans le spécimen est mesurée à 500 nm.

REACTIFS

flacon R1 REACTIF DE TRAVAIL

Tampon phosphate	150	mmol/L
Glucose oxydase (GOD)	≥ 20 000	UI/L
Péroxydase (POD)	≥ 1000	UI/L
4-Amino-antipyrine (PAP)	0,8	mmol/L
Chloro-4-phénol	2	mmol/L

flacon R2 ETALON

Glucose	1	g/L (5,55 mmol/L)
---------	---	-------------------

PRECAUTIONS

Les réactifs BIOLABO sont destinés à du personnel qualifié, pour un usage in vitro.

- Vérifier l'intégrité des réactifs avant leur utilisation.
 - Utiliser des équipements de protection (blouse, gants, lunettes).
 - Ne pas pipeter avec la bouche.
 - En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau et consulter un médecin.
 - La fiche de données de sécurité peut être obtenue sur simple demande.
 - Elimination des déchets : respecter la législation en vigueur.
- Par mesure de sécurité, traiter tout spécimen comme potentiellement infectieux. Respecter la législation en vigueur.

PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs sont prêts à l'emploi.

STABILITE ET CONSERVATION

Stocker à l'abri de la lumière, dans le flacon d'origine bien bouché à 2-8°C.

- Réactif (flacon R1) et Etalon (flacon R2) : Transvaser la quantité nécessaire, bien reboucher et stocker à 2-8°C.
- En l'absence de contamination, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret, s'ils sont utilisés et conservés dans les conditions préconisées.
- Ne pas utiliser le réactif (flacon R1) s'il est trouble ou si l'absorbance mesurée à 500 nm est > 0,400.
- Ne pas utiliser le réactif de travail après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret.

Ce réactif doit être réfrigéré pendant le transport.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DU SPECIMEN (2)

Sérum ou plasma :

Séparé rapidement des cellules sanguines pour prévenir la glycolyse. Si le fluorure est utilisé comme conservateur, une diminution de 0,09 g/L (0,5 mmol/L) est observée dans les deux premières heures, la concentration se stabilise ensuite.

Le glucose est stable dans le sérum et le plasma hépariné :

- 8 h à 25°C.
- 72 h à 2-8°C.

Le glucose est stable dans le plasma (fluorure de sodium ou iodoacétate) :

- 24 h à température ambiante.

LCR :

Analysé immédiatement après collecte pour éviter des résultats sous évalués. Conserver à -20°C.

Urines :

collectées en flacon opaque et conservées à 2-8°C. Conserver les urines de 24 h avec 5 mL d'acide acétique glacial ou 5 g de sodium benzoate ou fluorure.

INTERFERENCES (3)

- Acide ascorbique : Pas d'interférence jusqu'à 100 mg/L.
- Bilirubine totale : Interférence négative à partir de 200 mg/L.
- Bilirubine directe : Pas d'interférence.
- Hémolyse : Pas d'interférence.
- Lactescence : Interférence positive à partir de 6,26 g/L de triglycérides.

Young D.S. a publié une liste des substances interférant avec le dosage.

REACTIFS ET MATERIEL COMPLEMENTAIRES

1. Equipement de base du laboratoire d'analyses médicales,
2. Sérums de contrôle normaux et pathologiques.

CALIBRATION (7)

Etalon du coffret (flacon R2) ou BIOLABO-Multicalibrator **REF** 95015 traçable sur SRM 965a.

Ou tout calibrant raccordé sur une méthode ou un matériau de référence.

La fréquence de calibration dépend des performances de l'analyseur et des conditions de conservation du réactif.

Il est recommandé de calibrer à nouveau dans les cas suivants :

1. Changement du lot de réactif.
2. Après opérations de maintenance sur l'analyseur.
3. Les valeurs sortent des limites de confiance, même après utilisation d'un deuxième flacon de contrôle fraîchement reconstitué.

CONTRÔLE DE QUALITE CODE CNQ : HV

BIOLABO EXATROL-N (taux I) **REF** 95010.

BIOLABO EXATROL-P (taux II) **REF** 95011.

Tout autre sérum de contrôle titré pour cette méthode.

Programme externe de contrôle de la qualité.

Il est recommandé de contrôler dans les cas suivants :

- Au moins un contrôle par série.
- Au moins un contrôle par 24 heures.
- Changement de flacon de réactif.
- Après opérations de maintenance sur l'analyseur.

Lorsqu'une valeur de contrôle se trouve en dehors des limites, appliquer les actions suivantes :

1. Répéter l'opération en utilisant le même contrôle.
2. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, préparer un contrôle fraîchement reconstitué et répéter le test.
3. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, utiliser un autre calibrant ou un calibrant fraîchement reconstitué et répéter le test.
4. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, calibrer à nouveau en utilisant un autre flacon de réactif et répéter le test.
5. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, contacter le service technique BIOLABO ou le revendeur local.

INTERVALLES DE REFERENCE (2)

Dans le sérum ou le plasma :	g/L	[mmol/L]
Nouveau-né, 1 jour	0,40-0,60	[2,2-3,3]
Nouveau-né > 1 jour	0,50-0,80	[2,8-4,4]
Enfant	0,60-1,00	[3,3-5,6]
Adulte	0,74-1,06	[4,1-5,9]
60-90 ans	0,82-1,15	[4,6-6,4]
> 90 ans	0,75-1,21	[4,2-6,7]

Dans le LCR :	g/L	[mmol/L]
Enfant	0,60-0,80	[3,3-4,4]
Adulte	0,40-0,70	[2,2-3,9]

Dans les urines de 24 h : 0,01 à 0,15 g/L [0,1-0,8 mmol/L]
<0,5 g/24 h [<2,78 mmol/24 h]

Il est recommandé à chaque laboratoire de définir ses propres valeurs de référence pour la population concernée.

PERFORMANCES

Intra-série N = 30	Taux normal	Taux élevé	Inter-série N = 60	Taux normal	Taux élevé
Moyenne g/L	0,81	2,69	Moyenne g/L	0,81	2,84
S.D. g/L	0,01	0,02	S.D. g/L	0,01	0,03
C.V. %	1,3	0,67	C.V. %	1,2	1,06

Limite de détection : environ 0,10 g/L.

Sensibilité pour 1 g/L : environ 0,420 Abs. à 500 nm.

Comparaison avec réactif du commerce :

$$y = 0,969 x + 0,0133 \quad r = 0,9984$$

LIMITE DE LINEARITE

La réaction est linéaire jusqu'à 5 g/L (28 mmol/L).

Au-delà, diluer le spécimen avec une solution NaCl à 9 g/L et refaire le dosage en tenant compte de la dilution dans le calcul du résultat. La limite de linéarité dépend du rapport de volume spécimen/réactif.

MODE OPERATOIRE (TECHNIQUE MANUELLE)

Ramener les réactifs et spécimens à température ambiante.

Mesurer dans des tubes à essais bien identifiés :	Blanc	Etalon	Dosage
Réactif	1 mL	1 mL	1 mL
Eau déminéralisée	10 µL		
Etalon		10 µL	
Spécimen			10 µL

Bien mélanger. Incuber 10 minutes à 37°C ou 20 minutes à température ambiante.

Lire les absorbances à 500 nm (460-560) contre le blanc réactif.

La coloration est stable 15-20 minutes à 37°C, puis décroît lentement.

Remarque : des procédures spécifiques sont disponibles pour les analyseurs automatiques. Contacter le service technique BIOLABO.

CALCUL

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

$$\text{Résultat} = \frac{\text{Abs (Dosage)}}{\text{Abs (Etalon)}} \times \text{concentration de l'Etalon}$$

REFERENCES

- (1) TIETZ Textbook of clinical chemistry, 3rd Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders (1999) p. 750-785.
- (2) Clinical Guide to Laboratory Test, 4th Ed. N.W. TIETZ (2006) p. 444-451
- (3) YOUNG D.S. Effect of Drugs on Clinical laboratory Tests, 4th Ed. (1995) p. 3-274 à 3-294.
- (4) FARRANCE I., Clin. Biochem. reviews (1987), 8, p.55 à 68.
- (5) TRINDER P., Ann. Clin. Biochem. (1969), 6, p.24-27.
- (6) BERNARD S., Biochimie clinique, 2^{ème} éd., Edition Maloine Paris (1989), p.165-167
- (7) SRM : Standard Reference Material ®

Annexe 3 Aide-mémoire de métrologie

1 - Fidélité de mesure

Définition de la qualité « fidélité de mesure »

« Étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées » (VIM).

Le défaut de fidélité résulte des erreurs aléatoires.

1.1 - Différentes conditions d'étude de la fidélité

On distingue la fidélité selon un ensemble de conditions de répétabilité ou selon un ensemble de conditions de reproductibilité ou selon un ensemble de conditions de fidélité intermédiaire.

Répétabilité de mesure : « Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité » (VIM).

« Conditions de répétabilité : condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps » (VIM).

Reproductibilité de mesure : « Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de reproductibilité » (VIM).

Conditions de reproductibilité : condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés avec la même procédure de mesure, sur le même objet ou des objets similaires.

1.2 - Quantification du défaut de fidélité dans le cas d'une approche INTRA-laboratoire

On peut étudier la **répétabilité dans des conditions INTRA-laboratoire**.

Le défaut de répétabilité dans ces conditions est quantifié par un "écart-type expérimental" calculé à partir des résultats obtenus pour un échantillon dosé plusieurs fois dans des conditions de répétabilité.

Écart-type :

$$s = \sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Coefficient de variation

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

2 - Justesse de mesure

Définition de la qualité « justesse de mesure »

« Étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence » (VIM).

Quantification du défaut de justesse : biais de mesure (erreur de justesse)

« Estimation d'une erreur systématique » (VIM).

On l'estime par la **différence entre la moyenne d'un nombre fini de valeurs mesurées et une valeur de référence**.

La valeur de référence est en général une valeur conventionnelle.

$$\text{biais} = \bar{x} - x_{\text{référence}}$$

Le **biais** est la valeur algébrique qui permet de quantifier le **défaut de justesse**. Il faut indiquer clairement son signe « + » ou « - ».

Le biais est la quantification du défaut de justesse.

Il est possible d'exprimer le biais relatif (ou erreur de justesse relative) par l'expression suivante :

$$\text{biais relatif} = \frac{\bar{x} - x_{\text{référence}}}{x_{\text{référence}}} \times 100$$

3. Vérifications conduisant à l'acceptabilité des valeurs mesurées

3.1. Condition préalable à l'utilisation d'une procédure de mesure

Une procédure de mesure ne peut être utilisée dans un laboratoire que si l'on a préalablement fait une étude de ses qualités dans le laboratoire lui-même, avec les systèmes de mesure dont dispose le laboratoire ; en particulier il faut avoir vérifié, par une étude statistique complète, que **cette procédure de mesure est juste et fidèle**. De plus, chaque fois que cette procédure de mesure est utilisée, le laboratoire doit vérifier que son exécution est satisfaisante ; pour cela, on peut utiliser les deux types de vérifications ponctuelles présentés ci-dessous.

Il faut effectuer **dans la même série de mesurages** :

- un essai sur un étalon de contrôle ;
- un ou deux essais sur chacun des échantillons à doser.

3.2. Vérification de l'exactitude de mesure à l'aide d'un étalon de contrôle

3.2.1. Objectif

Vérifier si la valeur mesurée pour l'étalon de contrôle (y_{EC}) se situe, ou non, dans l'intervalle d'acceptabilité proposé pour celui-ci, afin de savoir si on peut accepter, ou non, la série des dosages réalisés dans les mêmes conditions.

3.2.2. Démarche

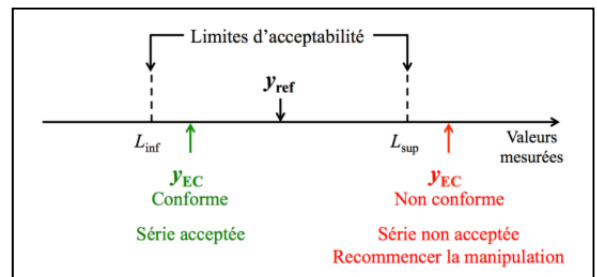
Lors de cette étude, le mesurage est mis en oeuvre sur un étalon de contrôle de **valeur conventionnelle** connue (y_{ref}) accompagnée de ses limites d'acceptabilités soit : $L_{inf} \leq y_{ref} \leq L_{sup}$

Si la valeur mesurée y_{EC} appartient à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée y_{EC} est **exacte** donc **conforme** ; on vérifie que l'exécution de la procédure de mesure est satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées obtenues pour les échantillons inconnus dans la même série sont **acceptées**.

Si la valeur mesurée y_{EC} n'appartient pas à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée n'est **pas exacte** donc **non conforme** ; l'exécution de la procédure de mesure n'est pas satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées de toute la série ne sont **pas acceptées** ; il faut rechercher l'origine de la mauvaise exactitude et recommencer la manipulation (étalon de contrôle et série d'échantillons à doser).



3.3. Vérification de la compatibilité métrologique dans le cas de deux essais effectués en répétabilité

3.3.1. Objectif

Cette démarche peut s'ajouter à la vérification à l'aide d'un étalon de contrôle ; dans ce cas, deux essais sont réalisés pour chaque échantillon inconnu.

En effet, plus le nombre d'essais est grand, plus la moyenne a de chances de se rapprocher de l'espérance mathématique donc plus cette moyenne est fiable.

3.3.2. Démarche

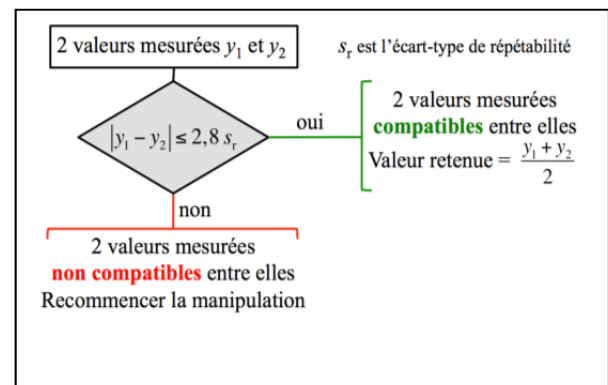
Soient deux valeurs mesurées (y_1 et y_2) pour un même échantillon et l'écart type de répétabilité (s_r) de la procédure de mesure correspondant à cet échantillon. Le logigramme de compatibilité à appliquer est le suivant :

Lorsque les deux valeurs mesurées sont **compatibles** :

- elles sont **acceptées**
- la valeur retenue est la **moyenne**.

Lorsque les deux valeurs mesurées ne sont **pas compatibles** :

- elles ne sont **pas acceptées**
- il faut en rechercher la cause et recommencer la manipulation.



4 - Expression du résultat de mesure

On dispose de la valeur retenue après vérification de l'exactitude de la valeur mesurée pour l'étalon de contrôle et après vérification de la compatibilité des valeurs mesurées entre elles si deux essais ont été effectués.

L'expression du résultat final nécessite de connaître l'**incertitude-type composée**.

Pour atteindre un niveau de confiance d'environ 95 % (cas le plus fréquent) dans le cas où la distribution pour ce mesurage suit une loi normale, cette incertitude-type composée est multipliée par le **facteur d'élargissement $k = 2$** , ce qui permet d'obtenir l'**incertitude élargie** qui sera utilisée dans l'expression du résultat.

Pour l'incertitude-type composée uc et pour l'incertitude élargie U , il est recommandé de conserver un ou deux chiffres significatifs selon les cas :

- si le premier chiffre est 1, 2 ou 3 : garder DEUX chiffres significatifs (faire le calcul avec 3 chiffres et arrondir),
- si le premier chiffre est 4 ou plus : garder UN SEUL chiffre significatif (faire le calcul avec 2 chiffres et arrondir).

Pour l'arrondissement du résultat, le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

Tout arrondissement s'effectue selon la règle mathématique « au plus proche »

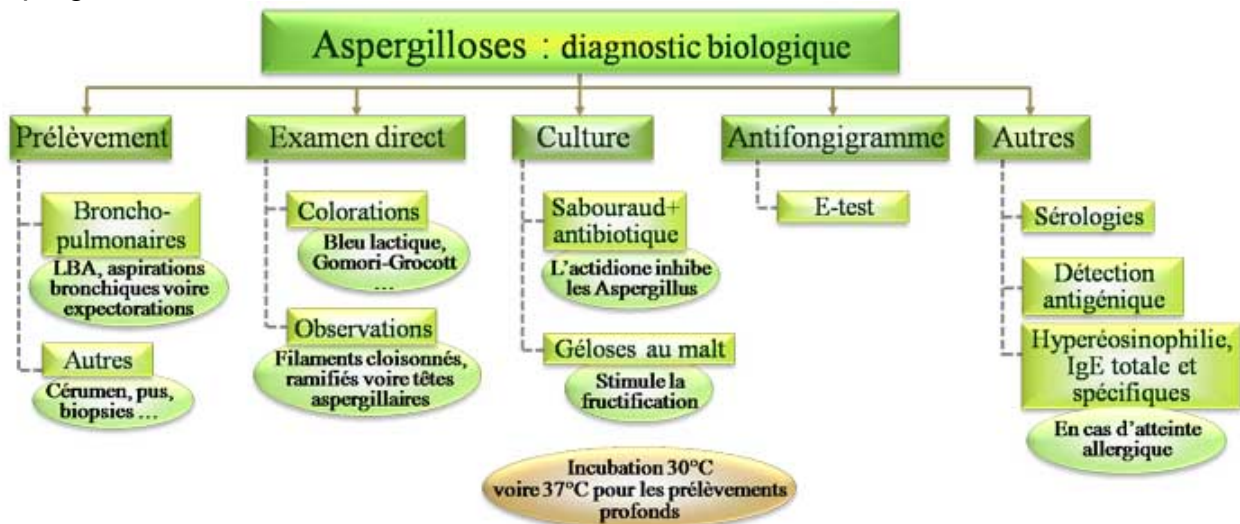
Annexe 4 L'aspergillome

L'aspergillome est une maladie qui résulte de la colonisation par un *Aspergillus* d'une cavité préformée (le plus souvent secondaire à une tuberculose ou carcinome pulmonaire) communiquant avec les bronches et ayant perdu ses défenses phagocytaires. Les spores germent dans cette cavité pour former une boule « mycélienne ». La maladie peut passer inaperçue, surtout dans les phases précoces. Perte de poids, toux chronique, fatigue, expectorations sanglantes (chez 50 à 80% des personnes infectées) signent les stades avancés de la mycose. Les facteurs favorisant la survenue d'un aspergillome sont la présence d'une cavité préformée associée à un diabète ou un traitement de corticothérapie de longue durée par exemple.

A. fumigatus est l'espèce la plus souvent incriminée en pathologie humaine.

Le diagnostic associe des signes cliniques locaux (toux, dyspnée, douleur thoracique, hémoptysie) et généraux (fièvre, altération de l'état général), des signes radiologiques, et des arguments biologiques (mycologie et sérologie anticorps positives).

Le diagramme ci-dessous présente les différentes étapes du diagnostic biologique des aspergilloses.



source : mémobio

Annexe 5 Principales espèces d'*Aspergillus* rencontrées en pathologie humaine

Source: www.memobio.fr

<i>Aspergillus</i>	Aspect macroscopique	Tête aspergillaire	Conidiophore	Vésicule	Conidies
<i>A. fumigatus</i>	Blanc puis vert, vert-gris puis vert foncé à gris-noirâtre Verso : incolore, jaune, vert ou brun-rouge	Unisériée En colonne	Court (300µm), lisse, incolore, évasement progressif au sommet (aspect en massue)	Hémisphérique , 20-30µm, phialides au sommet	Rondes, vertes, échinulées ou lisses 2,5-3µm
<i>A. flavus</i>	Duveteux à poudreux, blanc puis jaune à jaune-vert Verso : incolore, rosé à brun rouge foncé	Radiée Uni ou bisériée	Long (jusqu'à 2,5mm) Souvent verruqueux incolore Parois épaisses	Sphérique (25- 45µm)	Grosses (3,5-4,5µm) globuleuses à subglobuleuses, vert pâle, échinulées
<i>A. niger</i>	Blanc puis jaune puis granuleux et noirâtre Verso : incolore à jaune pâle	Radiée Bisériée	Long : 1,5-3mm Large 15-20µm Lisse Incolore à jaune brun	Sphérique (30- 100µm)	Grosses conidies globuleuses (3,5- 5µm), brunes, échinulées
<i>A. nidulans</i>	Duveteux à poudreux, vertes foncé à jaunâtres (cléistothèces) Verso : rougeâtre, pourpre	Bisériée En colonne courte	Court : 75-100µm, sinueux, brun, lisse	Hémisphérique (8-10µm)	Conidies (3-3,5µm), vertes, échinulées
<i>A. terreus</i>	Duveteuse à poudreuses, beige à cannelle Verso : jaune à brun-orange	Bisériée En colonne longue Aspect en éventail	100-250µm, lisse, incolore	Hémisphérique (10-16µm)	Conidies petites (1,5- 2,5µm), lisses, globuleuses à légèrement elliptiques
<i>A. versicolor</i>	Ocre puis de couleur variée (rose, jaune, ocre, vert ...) Verso : incolore ou jaune à brun-rougeâtre	Bisériée Radiée	Long (500-700µm), lisse, jaunâtre	Ovale (12- 16µm)	Conidies (2-3,5µm), globuleuses, échinulées

Photographies : aspects macroscopique de la colonie et microscopique de l'*Aspergillus* sont fournies aux candidats

Annexe 6 Fiches de données de sécurité (extraits)

FICHE DE SECURITE DE L'ASPERGILLOSE

1 - Identification de la préparation et de la société

Identification de la préparation :

- Nom de produit : ASPERGILLOSE
- Catégorie du produit : Tests de mise en évidence d'anticorps mycologiques Aspergillus (Code EDMA : 15-06-01-01 / Code GMDN : 37741)
- Référence du produit : 524400

Utilisation de la préparation :

L'ASPERGILLOSE est un dispositif médical de diagnostic in vitro, pour usage in vitro et professionnel uniquement. L'ASPERGILLOSE permet la détermination quantitative des anticorps sériques dirigés contre *Aspergillus fumigatus* par hémagglutination indirecte.

2 – Identification des dangers

- Classification des préparations :

Le produit est classé comme non dangereux selon la directive 1999/45/CE. Il contient cependant des substances d'origine animale et peut contenir des substances d'origine humaine (cf. notice). Par conséquent, il doit être considéré comme potentiellement infectieux et manipulé avec précaution.

- Principaux effets néfastes physico-chimiques pour la santé humaine et pour l'environnement :
Aucun effet néfaste.

3 - Composition / Informations sur les composants

Le dispositif ne contient pas de substance chimique dangereuse à une concentration supérieure ou égale à 1%, ni de substance chimique toxique, bioaccumulable et persistante à une concentration supérieure ou égale à 0,1%.

4 – Premiers secours

Contact avec les yeux : rincer immédiatement et abondamment à l'eau, consulter un médecin.

En cas d'ingestion : rincer la bouche et consulter un médecin.

Contact avec la peau : rincer abondamment à l'eau.

Date de mise en application : 02/10/2012

Version : 10

Page 1 / 4

6 – Mesures à prendre en cas de rejet accidentel

Précautions individuelles : /

Précautions pour la protection de l'environnement :

- Éviter la contamination des égouts, des eaux de surface, des eaux souterraines ainsi que du sol ;

Méthodes de nettoyage :

- Absorber, laver à l'eau javellisée, essuyer et éliminer les éléments utilisés et recueillis comme des déchets biologiques.

7 – Manipulation et stockage

Manipulation :

- Port des gants ;
- Port d'un vêtement de protection approprié.
- Éviter les contacts avec la peau et les yeux ;
- Ne pas ingérer.

8 – Contrôle de l'exposition / protection individuelle

Valeurs limites d'exposition : /

Contrôle de l'exposition :

Contrôle de l'exposition professionnelle :

- Protection respiratoire : /
 - Protection des mains : Porter des gants de protection
 - Protection des yeux : /
 - Protection de la peau : Porter un vêtement de protection
- Contrôle de l'exposition de l'environnement : /

Respecter les règles d'hygiène, les Bonnes Pratiques de Laboratoire et le Guide de Bonnes Exécutions des Analyses.

11 – Informations toxicologiques

Aucun effet connu dans les conditions normales d'utilisation.

12 – Informations écologiques

Ecotoxicité : /

Toxicité pour les poissons : /

Toxicité pour les crustacés : /

Informations supplémentaires sur l'écologie :


Données non disponibles.

13 – Considérations relatives à l'élimination

Les produits biologiques utilisés et le matériel souillé doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Leur élimination doit se faire soit après décontamination (autoclavage à 121°C pendant 2 heures minimum ou trempage à l'eau de javel à 5% d'hypochlorite de sodium pendant 30 minutes) soit par l'emploi d'un container spécial pour les déchets contaminés.

L'élimination doit être effectuée en conformité avec la législation locale, régionale, nationale ou européenne. Il faut se mettre en rapport avec une entreprise spécialisée dans l'élimination des déchets pour procéder à l'élimination de ce produit.


BIOLABO S.A. FORM/IE/002 Indice : A



Exatrol-P

REF : 95011

BIOLABO S.A. FORM/IE/002 Indice : A



Exatrol-P

REF : 95011

FICHE DE DONNEES DE SECURITE
Selon la réglementation (EC) N° 1907/2006 Annexe II (18/12/2006)

1- Identification de la Substance ou Préparation et de la Société.

Nom du produit : Exatrol-P.

Réactif pour le control interne de qualité en chimie clinique.

REF 95011: 10 X 5 ML

Identification de la société et Numéro de téléphone d'urgence :

Fabricant:
BIOLABO SA
Les Hautes Rives
F-02160 MAIZY (FRANCE)

Numéro de téléphone d'urgence :
BIOLABO : (33) (0) 323 25 15 50
Fax : (33) (0) 323 25 62 56
ORFILA : (33) (0) 145 42 59 59

Siège social: 02220 PAARS (FRANCE)
WEB : <http://www.biolabo.fr>
e-mail : info@biolabo.fr

Date de préparation: 15/05/2009

2- Composition/ information sur les composants

Flacon	Nom du réactif	Composants dangereux	Concentration	N° Einecs	N° Cas/ Carn
1	Sérum de control lyophilisé	Non présent (*) en quantité soumise à déclaration.	100%	//	//
2	Diluant : eau déminéralisée	Non présent (*) en quantité soumise à déclaration.	//	//	//

(*) Présent en quantité inférieure au minimum indiqué dans les directives européennes 1999/45/CE (en date du 31 mai 1999).

3- Information sur les dangers

Non classé en temps que préparation dangereuse en accord avec les Directives 1999/45/EC
Les propriétés toxicologiques des produits n'ont pas encore été totalement vérifiées. Prendre toute précaution utile pour éviter le contact direct avec la peau et les yeux.
BIOLABO EXATROL-P provient uniquement d'animaux Norvégiens sains aptes pour la consommation humaine. La Norvège est connue pour être libre de la majorité des maladies contagieuses et la BSE (encéphalopathie spongiforme bovine) n'a jamais été reportée en Norvège. Il n'y a pas de risqué connu de HIV et Hépatite dans le sérum animal. Cependant, BIOLABO EXATROL-P doit être manipulé avec les mêmes précautions qu'un échantillon de patient.

4- Premiers secours

Symptômes : Non.

Secours : Précautions comme pour un sérum humain.

Ingestion : En cas d'ingestion boire de l'eau et consulter un médecin.

Peau : Laver avec de l'eau et du savon

Yeux : En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau. En cas d'irritation, consulter un médecin.

5- Mesures de lutte contre l'incendie

Feu : Non considéré comme présentant un risque d'incendie.

Explosion : Non considéré comme présentant un risque d'explosion.

Informations sur l'extincteur : Utiliser de l'eau, du dioxyde de carbone ou de la mousse pour éteindre le feu.

Procédures spéciales pour éteindre le feu : Non définies.

6- Mesures à prendre en cas de dispersion accidentelle

Protection personnelle : Porter des gants. Manipuler comme un échantillon de patient ordinaire.

Déversement accidentel : Rincer l'endroit avec de l'eau.

Elimination : Eliminer le restant à grande eau (Peut être soumis aux réglementations locales).

7- Manipulation et stockage

Manipulation : Manipuler le produit comme potentiellement infectieux

Stockage : Suivre les indications données sur l'étiquetage. Eviter les hautes températures et l'exposition à la lumière.

Stockage des produits incompatibles : Non défini.

8- Contrôle de l'exposition/Protection individuelle

Ventilation : Non.

Protection respiratoire : Non.

Peau : Gants et blouse exigés.

Yeux : Protection exigée. Porter des lunettes de protection.

Les Bonnes Pratiques de laboratoire sont vivement recommandées.



GLUCOSE GOD-PAP

REF : 80109
80009
87109
16GL8

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

According to Regulation (EC) N°1907/2006 Annexe II (18/12/2006)

2) HAZARDS IDENTIFICATION:

Not classified as dangerous preparations or dangerous substances according to criteria defined in directives 67/548/CEE (dangerous substances) and 1999/45/CE (dangerous preparations) as well as their updates.
The toxicological properties of this material have not been investigated. Exercise appropriate care to avoid direct contact with skin and eyes.

3) COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS:

See § 16 to know the signification of security symbols, risk and safety codes.

Vials	Preparation Name	Hazardous ingredients	Concentration	N°Einecs	N°C
1	Enzymes	None present (*)		//	//
2	Chromogen	Chloro 4 phenol : Xn, N, R20/21/22, R51/53,	1 à 2 %	2035826	108
3	standard	None present (*)		//	//

(*) according to criteria defined in directives 67/548/CEE (dangerous substances) and 1999/45/CE (dangerous preparations) as well as their updates.

4) FIRST AID MEASURES:

Symptoms: Swallowing, contact with eyes or skin, inhalation (vial R1) may cause irritation.

First aid:

Inhalation: Provide fresh air. If breathing is difficult, obtain medical attention
Ingestion: Seek medical advice if ingestion is suspected
Skin: Immediately flush with copious amount of water
Eye: Immediately flush with copious amount of water

8) EXPOSURE CONTROL/PERSONAL PROTECTION:

Ventilation: Not required.
Respiratory protection: Avoid breathing dusts (vial R1). The use of a dust mask is recommended.
Skin: Gloves and laboratory coat required.
Eyes: Protection required.
Good Laboratory Practices procedures should be followed.

12) ECOLOGICAL INFORMATION:

Take care to prevent chemicals from entering the ground, water courses or drainage systems.

13) DISPOSAL CONSIDERATION:

Disposal of the preparation and of the contaminated packaging should be via an approved cc be subject to local laws.

16) OTHER INFORMATION:

For in vitro diagnostic use.
Any professional using our product is responsible for observing any local laws and guidelines applicables.

Risk Symbol	Signification
N	Harmful for the environment
Xn	Harmful

Risk sentences	Signification
R : 20/21/22	Harmful by inhalation, in case of contact with skin, if swallowed.
R : 51/53	Toxic for aquatic organisms. Long term harmful effects for aquatic environment.

The information contained herein is furnished without warranty of any kind. Users should consider this data only as supplement to other information collected by them and must make independent investigations to assure proper use and disposal of this material and to assure safety and health of employees and customers.

RAPPORT

Rapport établi par :

mesdames et messieurs AMMEUX Cécile, ANDRE Sylvain, BIGOT Armelle, COMBES Anne, DAUGERON Sylvère, DUBRAC Claire, GARNIER Philippe, GRIMAL Emmanuelle, GUAY Isabelle, LEONETTI Brigitte, LESELLIER Tiphaine
LISSANDRE Anne-Laure, MELINE Fabienne, MORIN Olivier, NARBONNE Philippe
PRAT Michel, RIVENET Florence, SCHUSTER Claudine, ZILIANI Philippe

Remarques du jury

Le jury apprécie l'aisance technique dans l'environnement du laboratoire, l'organisation dans le temps, la gestion des risques et le respect des règles de sécurité, ainsi que la prise en main du matériel.

Le candidat doit s'approprier et développer le cadre contextuel pour construire une séquence. Il élabore une démarche méthodologique pertinente en lien avec les objectifs de formation, les ressources mises à sa disposition et les explorations menées pendant la préparation.

La mise en forme des supports de présentation pendant le temps de préparation ne doit pas prendre le pas sur la réflexion pédagogique.

Le jury pourra interroger le candidat sur les choix d'utilisation ou de non-utilisation des différentes ressources du dossier dans le cadre de la réalisation de sa démarche. Le candidat doit pouvoir expliciter ses choix en intégrant des objectifs de formation, la faisabilité au niveau considéré, les contraintes supposées au sein d'une classe. L'évaluation fait partie intégrante de la conception d'une séquence pédagogique.

Le jury apprécie les candidats qui ont su montrer comment ils envisageaient d'expliquer aux élèves un principe, un aspect d'un protocole, un document, un article.

Les candidats doivent se projeter dans les réalités du métier et de la relation aux élèves ; et montrer une certaine connaissance du fonctionnement d'un lycée.

Bien que cette épreuve mobilise inévitablement des connaissances scientifiques, on rappelle à nouveau que ces connaissances, même de niveau acceptable, ne permettent pas de satisfaire aux exigences du concours lorsque elles ne sont pas ancrées dans une culture technologique.

Conclusion :

Le jury a apprécié l'attitude positive et l'ouverture d'esprit de l'ensemble des candidats. Certains candidats ont fait la preuve d'une bonne expertise scientifique et technique, accompagnée de qualités de communication ce qui a rendu leur prestation remarquable. Le jury a constaté que les meilleurs candidats avaient fait de réels efforts de préparation pour acquérir une connaissance du métier de professeur et des enjeux de l'enseignement des biotechnologies.

Épreuve 2 d'admission : Entretien à partir d'un dossier

RAPPORT

Rapport établi par :

mesdames et messieurs BOCHARD Valérie, CHAVANEL Muriel, CHIES Carole, COQUET Bruno, DESCHAMPS Delphine, DUBOIS Nicolas , DUVET Sandrine
EI MALLOULI Farida, GAUBIAC Fabrice , GIRARD Frédéric, HEBERT Hugues
JUILLE Odile, LARCHER Christelle, MALLET Catherine, MEUNIER Patrick
RAMI Guillaume, RIALLAND Valérie, Sébastien AUBERT, Stéphanie BARREAU
VIENNET Bérangère, WURSTENTEIN Marie

L'épreuve est centrée sur l'exploitation pédagogique issue d'une réalité professionnelle. Le jury attend donc que l'expérience professionnelle présentée par les candidats soit choisie dans l'objectif de la construction d'une séance d'enseignement technologique.

La partie scientifique du dossier doit être contextualisée dans un environnement professionnel défini, et doit porter sur une problématique dont le jury apprécie « *l'authenticité et l'actualité* ». Les thématiques choisies par les candidats doivent présenter un potentiel scientifique et technologique servant de support à une transposition pédagogique dans un des enseignements des différents champs de compétences d'un professeur de biochimie génie biologique : enseignements d'exploration de seconde, enseignement de biologie et physiopathologie humaines de la série ST2S, enseignements technologiques de la série STL Biotechnologies, enseignements des différentes sections de technicien supérieur de biologie appliquée. Il est pertinent que le candidat s'appuie sur les référentiels des formations pour construire sa séquence pédagogique.

Le jury a apprécié les efforts faits pour synthétiser des travaux scientifiques, y compris des travaux universitaires et pour les adapter à un objectif de transposition pédagogique.

Il s'agit notamment de faire des choix pour la partie technique, de présenter les manipulations réalisées, d'en maîtriser les principes, de les illustrer et de présenter des résultats expérimentaux, exploités et interprétés. La maîtrise des concepts scientifiques et technologiques fondamentaux est évaluée ainsi que les qualités pédagogiques dont le candidat fait preuve tant dans la présentation de son dossier que dans sa prestation orale.

Le jury rappelle que l'application décrite doit permettre de démontrer que le candidat s'inscrit dans une démarche pédagogique d'enseignement technologique avec la prise en compte :

- des objectifs de formation,
- de la nécessaire approche concrète,
- de l'organisation des activités,
- des contraintes et exigences de mise en œuvre des activités technologiques : organisation matérielle et temporelle réaliste, moyens financiers...
- de la gestion du groupe,
- des modalités d'évaluation....

Il est exclu que le candidat donne des indications précises sur son parcours universitaire et/ou professionnel.

Dossier écrit :

Le jury rappelle qu'il convient de :

- donner au dossier un titre concis, explicite, et reflétant la problématique choisie par le candidat,
- rédiger le dossier de façon claire et synthétique, en prenant en compte les finalités de l'épreuve,
- respecter un équilibre entre les parties techniques et pédagogiques,
- relire le dossier pour éviter les fautes d'orthographe et de syntaxe, ainsi que les erreurs de pagination,
- illustrer les propos à l'aide de supports visuels pertinents,
- prévoir un sommaire détaillé et une bibliographie.

Le droit de la propriété intellectuelle doit être respecté, et les sources des documents cités (textes, photos, schémas) doivent être précisées.

Exposé :

Les soutenances ont été globalement bien préparées par les candidats; les supports de présentation orale sont, pour la majorité d'entre eux, bien utilisés.

La qualité du support de présentation orale est un élément d'appréciation des compétences pédagogiques et des qualités de communication du candidat. Le jury souhaite que l'exposé présente de façon synthétique les éléments du dossier technique essentiels à la compréhension. Les candidats devront veiller à respecter un équilibre entre le développement de la partie scientifique et celui de la transposition pédagogique.

La présentation ne doit pas être qu'une transposition des documents du dossier écrit. Des documents visuels différents peuvent enrichir l'exposé.

Il est nécessaire de trouver un positionnement adapté vis à vis des interrogateurs, qui ne constituent ni un jury de thèse, ni un groupe d'élèves.

Certains candidats ont réussi à « se projeter dans leur future classe » pour imaginer la mise en œuvre pratique de la séance, avec prévention raisonnée des risques, répartition du travail et accompagnement des élèves, évaluation... Ces aspects impliquent de réfléchir et de s'informer sur les spécificités des enseignements technologiques telles que la connaissance des principes des techniques, la gestion des risques, la faisabilité en terme de coût et d'équipement et l'organisation pédagogique.

Entretien

Dans un premier temps, le jury s'attache à vérifier la maîtrise des concepts scientifiques et technologiques abordés dans le dossier.

Certains candidats ont montré de profondes lacunes sur les fondamentaux scientifiques et technologiques en lien avec la thématique choisie, lacunes incompatibles avec un enseignement relevant du champ de compétences d'un professeur de biochimie génie biologique. Pour la préparation de cette épreuve, les candidats doivent mener des recherches approfondies pour maîtriser les points scientifiques et technologiques de leur dossier. Ils doivent également faire preuve de curiosité en explorant les domaines connexes à leur étude.

Dans un second temps, le jury explore les qualités de réflexion sur la proposition pédagogique.

Sont prises en compte aussi bien les qualités d'écoute et d'adaptabilité du candidat que sa posture, qui doit être celle d'un futur enseignant.

Le jury constate chez certains candidats une méconnaissance du système éducatif.

Le jury a apprécié la capacité à réfléchir et à répondre avec authenticité, notamment sur les valeurs de la République et une attitude irréprochable.

Conclusion

Dans l'ensemble, le jury a apprécié la qualité des prestations des candidats qui ont bien tenu compte des rapports du jury antérieurs.

Les candidats présentant de façon didactique un sujet scientifique contextualisé et maîtrisé, proposant une transposition pédagogique pertinente, et faisant preuve de qualités de communication avec une posture compatible avec le métier ont montré au jury leur aptitude à enseigner.

Le jury se réjouit de l'intérêt porté par des candidats de très haut niveau à l'ensemble des filières de biotechnologies.

Conclusion générale

Les concours rénovés se caractérisent par l'introduction de la dimension pédagogique, sous des formes différentes, dans chacune des épreuves, qu'elles soient d'admissibilité ou d'admission. La maîtrise des savoirs essentiels liés à la discipline, de même que la capacité à transmettre ces savoirs de façon claire, rigoureuse, adaptée au public visé que constituent élèves ou étudiants sont évaluées lors des épreuves.

La première épreuve d'admissibilité, engage à la construction d'un développement en réponse au sujet proposé et requiert ainsi à la fois des connaissances précises, actuelles mais également une démarche d'explicitation, d'argumentation rigoureuses et une expression claire.

La préparation d'un enseignement exige de recourir à des sources, données, informations sous leurs diverses formes, que l'enseignant doit ensuite utiliser en les transformant, en apprêtant leur présentation, en les explicitant, en les articulant avec d'autres afin de les rendre accessibles, intéressantes visant un ou des objectifs de formation spécifiés. C'est ce travail qui est demandé aux candidats dans la seconde épreuve d'admissibilité.

Dans la première épreuve d'admission, sont requises des capacités à mettre en œuvre des protocoles, obtenir des résultats de qualité, s'approprier des principes de manipulations. C'est la réflexion sur l'utilisation de l'ensemble des informations qui est initiée et qui doit être indissociable de la construction de la démarche pédagogique.

Enfin, puisqu'il s'agit d'un enseignement technologique, qui se fonde sur un permanent aller-retour entre l'approche du réel pour comprendre et l'utilisation du savoir pour analyser ou faire, la présentation d'un dossier construit à partir d'une réalité du champ des biotechnologies et exploité pour un enseignement, complète l'approche des compétences requises pour un futur enseignant.

Bien sûr il ne peut être exigé des candidats une totale connaissance des objectifs pédagogiques de chacun des programmes ou référentiels, ni qu'ils aient acquis dans leur formation une complète maîtrise des démarches, des méthodes pédagogiques mais tout du moins peut-on attendre des candidats qu'ils se soient mis en position d'enseigner, qu'ils aient pu s'interroger sur la façon dont peut se concevoir une stratégie pédagogique, afin de répondre aux besoins de formation. Et cela va au-delà de l'approche disciplinaire et doit conduire le futur enseignant à s'intéresser à tout ce qui va contribuer à la construction des compétences des élèves et étudiants.

Se familiariser avec le lycée, rencontrer des enseignants de biotechnologies mais aussi des équipes pédagogiques, suivre des séances de formation dans différents niveaux d'enseignement est assurément un moyen d'appréhender la posture de l'enseignant et les exigences du métier.

Ces exigences recouvrent également l'éducation aux valeurs républicaines qui doit être investie par chaque enseignant.

- Au travers de la discipline, il s'agit de permettre à l'élève de se construire un raisonnement éclairé lui permettant de distinguer ce qui relève des sciences et de la connaissance de ce qui relève des opinions et des croyances, de faire de lui un acteur averti et responsable de l'usage des biotechnologies et d'en connaître les enjeux éthiques.

- Au travers des pratiques disciplinaires, l'enseignant de biotechnologies peut engager l'élève à adopter un positionnement citoyen par la pratique du travail d'équipe, par la responsabilisation, l'engagement individuel dans un projet commun mais aussi par sa capacité à évaluer dans tout acte mettant en jeu les biotechnologies, l'impact environnemental et les coûts énergétiques.

Le jury félicite les candidats admis au CAPET et au CAFEP. Le jury a apprécié les prestations de ces candidats qu'il se réjouit de compter bientôt comme futurs collègues.

Le jury tient à remercier madame la Proviseur, l'équipe des techniciens des laboratoires de biochimie, microbiologie, biologie et l'équipe d'accueil et de maintenance informatique du lycée Pierre Gilles de Gennes à Paris pour l'accueil et l'aide efficace apportés lors des épreuves d'admissibilité et d'admission qui ont eu lieu, cette année encore, dans d'excellentes conditions.

Le jury tient enfin à remercier Madame la gestionnaire du CAPET externe biotechnologies option biochimie génie biologique au ministère de l'éducation nationale pour son efficacité et son dévouement.