

SESSION 2011

**CAPET
CONCOURS INTERNE
ET CAER**

**Section : BIOTECHNOLOGIES
Option : BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIQUE**

ÉTUDE SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE

Durée : 5 heures

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

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

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

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

Tournez la page S.V.P.

Contrôle de la qualité hygiénique dans la filière viande de l'industrie agro-alimentaire

Dans la filière viande de l'industrie agro-alimentaire, des contrôles rigoureux ont été mis en place. Ils permettent la surveillance de l'état sanitaire des animaux et garantissent la qualité des matières premières et des produits transformés.

Les techniques évoquées ci-dessous illustrent ces contrôles, en particulier dans les cas de protection contre l'encéphalopathie spongiforme bovine, la pneumonie porcine et la listériose.

1. Contrôle de la qualité microbiologique d'aliments carnés : respect des critères microbiologiques et des normes dans l'exemple d'un jambon cuit entier

Respect des critères dans l'exemple d'un jambon cuit entier

Les critères auxquels doit satisfaire un jambon cuit entier sont définis dans le règlement CE 1441-2007 et les recommandations de la Fédération des Entreprises du Commerce et de la Distribution (FCD) du 18.04.2008 (document 1)

Les critères sont classés en deux catégories : critères de sécurité d'une denrée alimentaire et critères d'hygiène de procédés.

1.1. Définir le terme « critère » en microbiologie alimentaire et préciser les caractéristiques d'un indicateur significatif de l'hygiène des procédés

1.2. Définir les paramètres n et c utilisés dans le document 1.

Définir :
- micro-organisme indicateur de sécurité de denrée alimentaire,
- micro-organisme indicateur d'hygiène des procédés

1.3. Définir les entérobactéries et justifier l'importance de leur recherche dans les procédures. Préciser l'espèce de cette famille qui constitue un indicateur particulièrement performant dans le cadre étudié. Justifier la réponse.

1.4. Exploitation de quelques données

Calculer la contamination due aux micro-organismes aérobies contenus dans un échantillon pour lequel les résultats du dénombrement sont les suivants.

Inoculum	Nombre de colonies	
	1 ^{ère} boîte	2 ^{ème} boîte
1 gramme à la dilution 10 ⁻⁴	144	130
1 gramme à la dilution 10 ⁻⁵	18	12
1 gramme à la dilution 10 ⁻⁶	0	2

Justifier le choix des boîtes retenues pour ce calcul.

En tenant compte du résultat précédent, interpréter la qualité hygiénique de cet échantillon de jambon cuit entier.

1.5. Présenter le diagramme de décision, soit à 2 classes, soit à 3 classes, selon le type de micro-organisme testé. On envisagera le cas :

- d'un micro-organisme de sécurité de denrée alimentaire,
- d'un micro-organisme d'hygiène des procédés.

On pourra utiliser les données du document 1.

2. A propos de *Listeria*

Ces dernières années, plusieurs contaminations d'aliments carnés par *Listeria* ont attiré l'attention sur ce bacille à Gram positif responsable de la listériose.

Les principales complications de cette maladie sont l'avortement chez la femme et la méningo-encéphalite en particulier chez l'immunodéprimé, le vieillard et le nouveau-né.

2.1. Etude des interactions entre *Listeria monocytogenes* et les cellules hôtes au cours d'une listériose : approche cellulaire et moléculaire

Pénétration de *Listeria* dans l'organisme

La principale voie d'entrée de cette bactérie est intestinale, consécutive à l'ingestion d'un produit contaminé.

Après avoir traversé l'épithélium intestinal en passant par les cellules M, les *Listeria* se fixent au pôle basolatéral des entérocytes (document 2). Une protéine de surface des *Listeria*, appelée internaline A, se lie à un récepteur cellulaire de l'entérocyte et déclenche l'endocytose de la bactérie. Cette interaction spécifique entre l'internaline A et son récepteur caractérise une pénétration de la bactérie par endocytose à récepteur.

2.1.1. A l'aide d'un schéma simple, présenter la particularité d'une endocytose à récepteur en prenant l'exemple de *Listeria monocytogenes*. Nommer le type de transport utilisé.

La listériolysine O rompt la membrane de la vésicule d'endocytose, permettant à la bactérie de s'échapper avant toute fusion avec un lysosome.

Libérée dans le cytoplasme, la bactérie se déplace grâce à une protéine Act A capable de polymériser l'actine à la surface de la bactérie.

2.1.2. L'actine est une protéine du cytosquelette. Citer les différentes familles de protéines filamenteuses constitutives du cytosquelette. Donner pour chaque catégorie un exemple de protéine et de fonctions assurées.

Les *Listeria* se propulsent vers les entérocytes voisins et pénètrent dans leur cytoplasme, entourées d'une double membrane. Des phospholipases participent à la rupture de cette double membrane et un nouveau cycle de multiplication commence.

2.1.3. Expliquer comment les phospholipases conduisent à la rupture des membranes cellulaires. Préciser, à l'aide d'un schéma, les différents sites d'action de ces enzymes.

Les *Listeria* quittant les entérocytes sont phagocytées par les macrophages sous-épithéliaux

2.1.4. Détailler la chronologie des événements cellulaires impliqués dans la phagocytose. Expliquer pourquoi la présence de complément augmente l'efficacité de la phagocytose. En déduire l'étape limitante.

2.2. Etude du modèle murin de la réponse immunitaire adaptative anti *Listeria*,

La souris est un animal sur lequel on s'attache d'une part à caractériser le pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* et d'autre part à élucider la réponse immunitaire adaptative. Des études récentes montrent que l'on peut considérer cet organisme pathogène comme un parasite intracellulaire strict, au même titre qu'un virus.

2.2.1. Préciser le type d'immunité adaptative majoritairement développée.

2.2.2. Expliquer comment sont présentés les motifs antigéniques de la bactérie (chronologie des événements, organites impliqués et molécule de CMH mobilisée). Schématiser cette molécule de CMH et décrire ses caractéristiques structurales.

2.2.3. Présenter un schéma d'activation des cellules impliquées dans cette immunité en commentant la chronologie des différents phénomènes.

2.2.4. Expliquer le mécanisme d'élimination des cellules infectées par *Listeria* en précisant les principaux acteurs biochimiques et leur mode d'action.

2.2.5. Une fois cette immunité mise en place chez la souris, on constate le maintien à long terme des défenses anti *Listeria*. Nommer ce phénomène. Des protocoles d'immunisation ont mis en évidence la responsabilité de la listériolysine O dans le phénomène d'immunité à long terme. Préciser les cellules immunitaires impliquées dans ce mécanisme.

2.3. Recherche de *Listeria* au laboratoire (Norme NF EN ISO 11290-1 du 1/02/2005)

2.3.1. A partir de l'exemple de la recherche de *Listeria*, (voir document 3) présenter la logique d'une analyse microbiologique alimentaire s'inscrivant dans le cadre du contrôle d'un critère de sécurité alimentaire.

2.3.2. Nommer chaque étape, en précisant son but.

2.3.3. Pour chacun des milieux - Fraser-demi, Fraser, ALOA et PALCAM, (document 3 et document 4) - expliquer en quoi il est bien adapté à l'étape correspondante.

3. Recherche de l'agent de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)

Après l'infection d'un bovin par l'agent de la maladie, la durée d'incubation est comprise entre 20 mois et plus de 15 ans avant que l'animal ne présente des symptômes cliniques comme, par exemple, la baisse de la production de lait, des tremblements ou un caractère craintif.

L'agent infectieux responsable de la maladie est une protéine prion pathologique notée Pr^{PESB}, présente dans certaines parties du corps de l'animal comme les yeux, la cervelle, la moelle épinière et l'iléon.

3.1. Structure des protéines

3.1.1. Dans les protéines, les acides aminés sont principalement liés entre eux par la liaison peptidique : décrire cette liaison et citer ses principales propriétés. Préciser les autres liaisons rencontrées dans les protéines.

3.1.2. Définir : structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire d'une protéine.

3.1.3. Faire un schéma annoté d'une hélice α .

3.1.4. Expliquer la principale différence structurale entre la protéine PrP^{ESB}, variant anormal et pathologique, et la protéine cellulaire normale : la PrP^C.

Les tests rapides utilisent la propriété de la PrP^{ESB} de résister à certaines enzymes protéolytiques dont la protéinase K, tandis que dans les mêmes conditions la protéine normale (PrP^C) est entièrement dégradée par ces protéases.

A l'heure actuelle, 11 tests sont validés par la communauté européenne dont un test de la société Prionics[®] qui repose sur la technique du Western Blot (Prionics[®] check-WB).

3.2. Différents « blots »

Définir et décrire sommairement les principales étapes des techniques de Southern blot, Northern blot et Western blot. Mettre en évidence les différences majeures entre ces trois techniques.

3.3. Electrophorèse des protéines.

La première étape du test Prionics[®] check-WB est une électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (PAGE) en conditions dénaturantes au dodécyl sulfate de sodium (SDS).

3.3.1. Donner le principe général de la méthode d'électrophorèse des protéines en conditions non dénaturantes ; préciser en particulier les critères de séparation des protéines et les rôles du tampon.

3.3.2. Donner le principe général de la méthode d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ; préciser en particulier les critères de séparation des protéines et les rôles des constituants du tampon de charge : SDS, glycérol et 2 mercapto-éthanol.

3.3.3. Donner les propriétés du gel de polyacrylamide : constituants, obtention, différentes réticulations ; préciser les rôles et fonctionnements du gel de concentration (stacking gel) et du gel de migration (running gel).

3.3.4. Faire un schéma de principe commenté du montage utilisé pour réaliser une électrophorèse SDS PAGE ; préciser en particulier les bornes et le sens de migration.

Le document 5 présente le résultat de la première étape.

Remarque : un traitement préalable permet d'éliminer les chaînes glycosylées de toutes les formes de la PrP.

3.3.5. Commenter la migration des protéines marqueurs de poids moléculaire. Expliquer le principe de détermination de la masse moléculaire des protéines par cette technique. Estimer la masse moléculaire de la PrP^{ESB}.

3.3.6. Expliquer la présence d'une seule bande dans le puits n°2 par comparaison aux bandes du puits n°3.

3.4. Electro-transfert et immuno-empreinte

La technique par SDS-PAGE ne permet pas d'affirmer que la bande visualisée correspond à la protéine PrP^{ESB}, variant anormal et pathologique de la protéine cellulaire normale PrP^c. La confirmation est apportée à l'aide d'anticorps spécifiques dans la deuxième étape du test Prionics® check-WB.

L'électrophorèse est suivie d'un électro-transfert (étapes 6 et 7 du document 6).

3.4.1. Préciser le but de l'électro-transfert.

3.4.2. Donner le principe de l'électro-transfert, schématiser le « sandwich de transfert » (étape 6 du document 6) et positionner les électrodes.

Après la vérification de l'efficacité de ce transfert, le fragment résistant à la protéinase K PrP27-30 spécifique de la forme anormale PrP^{ESB}, est révélé immunologiquement.

3.4.3. Donner un nom explicite aux étapes 9 à 12 du document 6.

3.4.4. Présenter le schéma final du système de révélation immunologique en l'annotant le plus précisément possible. Nommer ce type de révélation.

3.4.5. Ces immuno-empreintes sont réalisées avec les protéines extraites des prélèvements, avec et sans traitement à la protéinase K.

Représenter l'aspect d'un blot obtenu :

- à partir d'un animal sain,
- à partir d'un animal atteint de l'ESB.

4. Recherche du mycoplasme agent de la pneumonie porcine par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Chez les animaux d'élevage, des mycoplasmes pathogènes sont responsables d'avortements, de pathologies respiratoires et diverses.

Des tests de détection directe utilisant les techniques de PCR ont été développés pour aider au diagnostic ou à l'épidémiologie de ces mycoplasmoses. La présence du mycoplasme pathogène est révélée par l'identification de son ADN spécifique.

4.1. Structure de l'ADN

4.1.1. Décrire les molécules de bases constitutives de l'ADN

4.1.2. Décrire à l'aide de schémas commentés la structure tridimensionnelle de l'ADN

4.2. Extraction de l'ADN

La première étape de ces tests est une extraction de l'ADN à partir des biopsies effectuées sur les animaux suspects (document 7) :

4.2.1. Préciser les enzymes présentes dans la solution d'extraction.

4.2.2. Expliquer le rôle de l'incubation à 95 °C lors de la phase d'extraction.

4.2.3. Préciser la répartition des constituants de l'extrait entre le précipité et le surnageant, après centrifugation.

4.3. Amplification génique

La seconde étape d'identification des souches pathogènes consiste en une amplification de l'ADN par PCR à l'aide d'amorces spécifiques.

4.3.1. Décrire les trois phases d'un cycle PCR. Préciser l'enzyme utilisée dans cette technique et donner ses principales propriétés.

On veut amplifier une séquence cible d'ADN spécifique à la pneumonie porcine par PCR (document 7.3). On dispose des amorces décrites dans le document 7.

4.3.2. Déterminer et justifier à l'aide d'un schéma commenté, le (les) couple(s) d'amorces permettant d'amplifier cette séquence.

La taille des amplifiats est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose. (document 7.4)

4.3.3. Indiquer les critères de séparation des acides nucléiques dans une électrophorèse en gel d'agarose. Préciser le lieu de dépôt des échantillons par rapport aux électrodes.

4.3.4. Analyser les risques liés à ce protocole de révélation et indiquer les précautions à prendre.

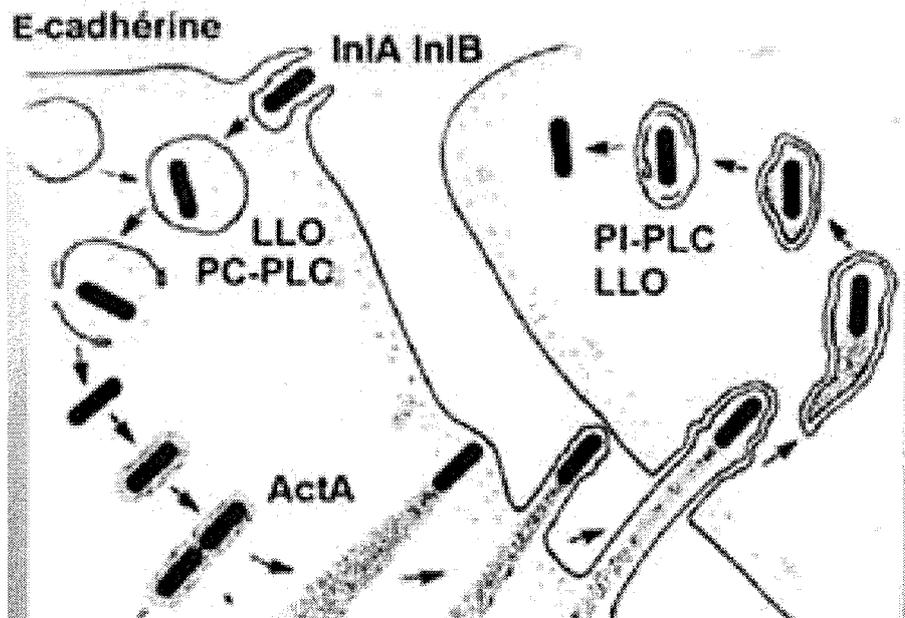
4.3.5. Lorsque la taille des amplifiats est celle recherchée, décrire brièvement une technique complémentaire confirmant que la séquence amplifiée est bien la séquence cible.

**Document 1 : Critères microbiologiques d'un jambon cuit entier
(règlement CE 1441-2007 et recommandations de la FCD du 18.04.2008)**

Micro-organismes / Toxines / métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites	
	n	c	m	M
Micro-organismes aérobies	5	2	1.10 ⁶ ufc / g	1.10 ⁷ ufc / g
<i>E. coli</i>	5	2	10 ufc / g	100 ufc / g
<i>Staphylococcus coagulase +</i>	5	2	100 ufc / g	1000 ufc / g
<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
<i>Listeria</i>	5	0	100 ufc / g	

Document 2 : Schéma de l'invasion des entérocytes par *Listeria monocytogenes*

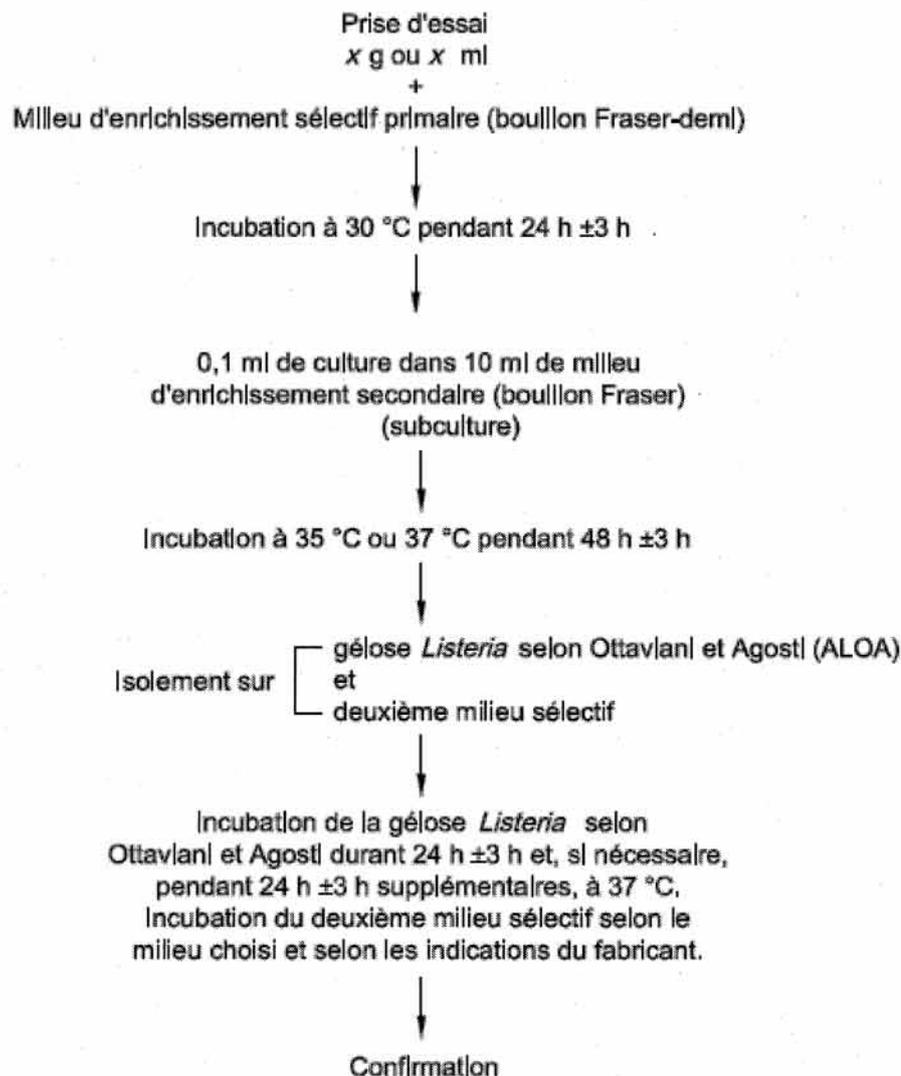
Référence <http://mcb.berkeley.edu/labs/portnoy/>



**Document 3 : Procédure de recherche de *Listeria* dans un produit
carné
selon la norme NF EN ISO 11290-1 du 1/02/2005**

- 1^{ère} séance : - broyer 25 g d'aliment carné dans 225 mL de bouillon Fraser-demi
- incuber 24 h à 30°C
- 2^{ème} séance : - ensemencer 0,1 mL de la culture précédente dans 10 mL de bouillon Fraser
- incuber 48 h à 37°C.
- 3^{ème} séance : - à partir de la culture précédente, ensemencer par stries sur gélose *Listeria* selon Ottaviani et Agosti et incuber 24 h à 37°C.
- Procéder de la même façon avec un deuxième milieu d'isolement sélectif, comme PALCAM et incuber 24h à 37°C
- 4^{ème} séance : à partir de colonies suspectes sur les deux milieux :
- ensemencer une galerie API *Listeria*, incuber 18 – 24 h à 37°C

Diagramme de procédure



Document soumis au droit d'auteur d'AFNOR : utilisation documentaire de cette norme exclusivement dans le cadre de ce concours, sans possibilité de diffusion de tout ou partie et sous quelque forme que ce soit à des tiers. - AFNOR 2010



BOUILLON FRASER DEMI

Bouillon d'enrichissement sélectif pour *Listeria monocytogenes*
Usage *In Vitro*
Conservé entre 2 et 25°C

PRINCIPE

Le milieu complet est une modification de la formulation proposée par Donnelly et Baigent. La concentration en acide malactique est réduite à 20 mg/l tandis que celle en acétylène est augmentée à 25 mg/l afin de renforcer la sélectivité. L'acide malactique inhibe la pousse des bactéries Gram négatif et l'acétylène celle des bactéries Gram positif. Le chlorure de lithium inhibe les entérocoques qui hydrolysent également l'esculine. Le chlorure de sodium inhibe la sélectivité et l'effet tampon est assuré par la présence de sels de phosphate dans les tubes supposés contenir des bactéries hydrolysant l'esculine, comme *Listeria*. L'esculine est un glucoside qui produit de l'acétylène et du glucose lorsqu'il est hydrolysé. L'esculine réagit avec le citrate ferrique ammoniacal pour donner un complexe brun foncé à noir.

Le milieu Fraser Demi a été développé à partir de ce milieu en le rendant moins sélectif par diminution des quantités d'acide malactique et d'acétylène aux concentrations respectives de 10 et 12,5 mg/l.

FORMULE

Base déshydratée pour Fraser Demi
En grammes par litre d'eau purifiée

Protéose peptone	5,0
Tryptone	5,0
Extrait de viande	5,0
Extrait de levure	5,0
Chlorure de sodium	20,0
Phosphate disodique anhydre	9,6 ⁽¹⁾
Phosphate monopotassique	1,55
Esculine	1,0
Chlorure de lithium	5,0
Acide malactique	0,010
Acétylène HCl	0,0125

pH final : 7,2 ± 0,2 à 25°C

(1) : équivalent à 12 g de Phosphate disodique dihydraté (Na₂HPO₄ · 2 H₂O).

Supplément pour Fraser et Fraser Demi

Citrate ferrique ammoniacal 0,5

PREPARATION

Verser 55 grammes de poudre dans un litre d'eau purifiée. Si nécessaire, changer à ébullition pour compléter la dissolution. Répartir 225 ml en flacons.

Autoclaver 15 minutes à 121°C.
NE PAS SURCHAUFFER.
Avant inoculation, ajouter aseptiquement 2,25 ml de supplément pour Fraser à chaque flacon de milieu ou une solution stérile préparée au laboratoire contenant 112,5 mg de citrate ferrique ammoniacal.

Le citrate ferrique ammoniacal peut être ajouté avant autoclavage, sous forme liquide ou sous forme déshydratée, à une concentration finale de 0,5 gramme par litre de bouillon provoquant alors un léger précipité non préjudiciable à l'analyse.

AES CHEMUNEX - Rue Maryse Bastié - Ker Lann - CS 17219 - F-35172 Bruz Cedex
Tél : +33 (0)2 23 50 12 Fax : +33 (0)2 23 50 12 00 <http://www.aeschmunex.com> - contact@aeschmunex.com



BOUILLON FRASER
Bouillon d'enrichissement sélectif pour *Listeria monocytogenes*
Usage *In Vitro*

PRINCIPE

Le milieu complet est une modification de la formulation proposée par Donnelly et Baigent. La concentration en acide malactique est réduite à 20 mg/l tandis que celle en acétylène est augmentée à 25 mg/l afin de renforcer la sélectivité. L'acide malactique inhibe la pousse des bactéries Gram négatif et l'acétylène celle des bactéries Gram positif. Le chlorure de lithium inhibe les entérocoques qui hydrolysent également l'esculine. Le chlorure de sodium inhibe la sélectivité et l'effet tampon est assuré par la présence de sels de phosphate dans les tubes supposés contenir des bactéries hydrolysant l'esculine, comme *Listeria*. L'esculine est un glucoside qui produit de l'acétylène et du glucose lorsqu'il est hydrolysé. L'esculine réagit avec le citrate ferrique ammoniacal pour donner un complexe brun foncé à noir.

FORMULE

Base déshydratée pour Fraser.
En grammes par litre d'eau purifiée

Protéose peptone	5,0
Tryptone	5,0
Extrait de viande	5,0
Extrait de levure	5,0
Chlorure de sodium	20,0
Phosphate disodique anhydre	9,6 ⁽¹⁾
Phosphate monopotassique	1,55
Esculine	1,0
Chlorure de lithium	3,0
Acide malactique	0,020
Acétylène HCl	0,025

pH final : 7,2 ± 0,2 à 25°C

(1) : équivalent à 12 g de Phosphate disodique dihydraté (Na₂HPO₄ · 2 H₂O).

Supplément pour Fraser et Fraser Demi
En grammes pour 10 ml d'eau purifiée

Citrate ferrique ammoniacal 0,5

PREPARATION

Verser 55 grammes de poudre dans un litre d'eau purifiée. Si nécessaire, changer à ébullition pour compléter la dissolution. Répartir en tubes de 10 ml.

Autoclaver 15 minutes à 121°C.
NE PAS SURCHAUFFER.
Avant inoculation, ajouter aseptiquement 0,1 ml de supplément pour Fraser respectivement à chaque tube de milieu ou une solution stérile préparée au laboratoire contenant 5 mg de citrate ferrique ammoniacal.

Le citrate ferrique ammoniacal peut être ajouté avant autoclavage, sous forme liquide ou sous forme déshydratée à une concentration finale de 0,5 gramme par litre de bouillon provoquant alors un léger précipité non préjudiciable à l'analyse.

Fabrique par
AES CHEMUNEX - Combourg - France
140422 : 11/06/09 - I

AES CHEMUNEX - Rue Maryse Bastié - Ker Lann - CS 17219 - F-35172 Bruz Cedex
Tél : +33 (0)2 23 50 12 Fax : +33 (0)2 23 50 12 00 <http://www.aeschmunex.com> - contact@aeschmunex.com

MODE OPERATOIRE

• Méthode de référence norme AFNOR NF EN ISO 11290-1
Des échantillons de 25 g des prélèvements à contrôler, sont débordés enrichis par homogénéisation dans 225 ml de Fraser Demi et incubés à 30°C pendant 24 ± 2 heures.
• Méthode alternative AES 1013 - 69/90 ALOA® One Day
Ensemencer une boîte de gélose ALOA® par étalement avec 0,1 ml du bouillon incubé.
• Méthode de réf. norme NF EN ISO 11290-1/ A1 - 02/05
Réaliser un enrichissement secondaire en transférant 0,1 ml du bouillon d'enrichissement primaire dans des tubes contenant 10 ml de bouillon Fraser. Incuber 48 ± 2 heures à 37°C et isoler à chaque étape par étalement sur gélose ALOA® et sur une seconde gélose, par exemple OXFORD ou PALCAM.

LIMITES ET PRECAUTIONS

Les *Listeria* et autres bactéries hydrolysant l'esculine provoquent un enrichissement du milieu. L'utilisation d'un milieu unique est recommandée à la détection exhaustive des micro-organismes significatifs d'un échantillon. Les agents de culture sélectifs peuvent inhiber certaines souches indésirables, notamment si ces dernières sont présentes en grand nombre dans le prélèvement.

L'ensemencement comparatif des échantillons sur des milieux non sélectifs est donc recommandé pour l'obtention du maximum d'éléments informatifs et faciliter le recouvrement des genres potentiellement pathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fraser and Speer. 1988. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. J. Food Prot. 51:762-765.
2. Donnelly and Baigent. 1986. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. Appl. Environ. Microbiol. 52:689-695.
3. AFNOR NF EN ISO 11290-1 / A1. Février 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 1. Méthode de recherche.

PRESENTATION
Milieu déshydraté - Contient les antibiotiques
(à conserver entre 1 et 30°C)
AEB140422 : Flacon de 500 g

Milieu prêt à l'emploi - Complet
(à conserver entre 2 et 25°C)
AEB110422 : 20 tubes de 10 ml
AEB110429 : 100 tubes de 10 ml

Supplément pour Fraser
(à conserver entre 2 et 25°C)
AEB110425 : 20 tubes de 10 ml
(à conserver entre 1 et 30°C)
B111016 : Pot de 1 kg (déshydraté)

Milieu pour l'isolement et de dénombrement sélectif et de *Listeria monocytogenes*
Usage In Vitro
Conserver entre 2 et 8°C

LIMITES ET PRECAUTIONS

Pour les boîtes fortement chargées, la lecture peut être facilitée en comparant l'opacité de la gélose entre les centres de la boîte et sa périphérie (voir protocole analytique) ou par rapport à une boîte d'ALOA™ non ensémençée.

La présence de colonies de *L. monocytogenes*, même nombreuses, se traduit par une opacification intense de la gélose qui permet de la distinguer aisément des boîtes sur lesquelles *L. monocytogenes* est absente (milieu non ensémençé). En cas de doute, procéder à un ré-isolement sur une autre gélose ALOA™.

Après 24 heures d'incubation, certaines souches de *Listeria ivanovi* peuvent présenter un léger halo très étroit. Après 48 heures d'incubation, *Listeria ivanovi* peut présenter le même aspect que *Listeria monocytogenes*. Dans ces deux cas de figure, la mise en œuvre des tests de confirmation permet de différencier sans équivoque les deux espèces. Les boîtes d'ALOA™ peuvent être placées au réfrigérateur après incubation pendant 48 heures sans que le halo et la couleur des colonies n'évoluent. Certaines souches de *B. cereus* peuvent produire des colonies plates, rugueuses, au contour crénelé de couleur blanc à bleu non homogène avec un halo large et intense.

BIBLIOGRAPHIE
1. Ottaviani F., Ottaviani M., Agosti M. (1997). Differential agar Medium for *Listeria monocytogenes*. In "Quimper food. Symposium proceedings". Pg A.D.R.I.A.
2. Ottaviani F., Ottaviani M., Agosti M. (1997). Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari
3. Vilbrennek G., Lafarge V., Scorer S. (2000). Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. Journal of Applied Microbiology, 88 : 430-441.
4. Artaud S., Buid J.L., Delval Y., Gaillard N. Validation AFNOR de la méthode ALOA pour la détection de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires. Collège Société Française de Microbiologie, 19-20 octobre 2000.
5. ISO 11290 partie 1 et 2 - Amendement 1 (2004) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*.

PRESENATION

Milieu prêt à l'emploi:
AEB520080 : Coffret de 20 boîtes, 90 mm
AEB520079 : Coffret de 120 boîtes, 90 mm
AEB120082 : Coffret de 10 boîtes de 140 mm
AEB620088 : ALOA COUNT (bases + suppléments)
5 x 200 ml base + suppléments

PRINCIPE

Le milieu ALOA™ est destiné à la recherche et au dénombrement de *L. monocytogenes* dans les aliments (méthodes certifiées AFNOR, VALIDATION - voir protocoles joints). Il permet également la recherche et le dénombrement des *L. monocytogenes* et de *L. spp* dans les aliments et tout autre type de prélèvement (Protocoles de référence ISO 11290).

Sur ce milieu, les *Listeria* forment des colonies rondes, régulières, de couleur bleue à bleu vert (détection de la bêta-glucosidase grâce à un substrat chromogénique spécifique). Les colonies de *Listeria monocytogenes* présentent en plus un halo opaque qui permet de les différencier aisément des autres espèces de *Listeria*. Ce halo est lié à l'activité d'une phosphatase impliquée dans le processus infectieux de cette bactérie. La sélectivité est obtenue par l'action combinée du chlorure de lithium et des antibiotiques et antifongiques contenus dans le milieu.

FORMULE (en g/l de milieu)
Digestat enzymatique de tissu animal 18 g
Désinat enzymatique de coenzyme 6 g
Extrait de levure 10 g
Pyruvate de sodium 2 g
Glucose 2 g
Glycérophosphate de magnésium 1 g
Sulfate de magnésium 0,5 g
Chlorure de sodium 5 g
Chlorure de lithium 10 g
Hydrogénophosphate disodique anhydre 2,5 g
X-galactoside 0,05 g
Acide malidibique 0,02 g
Ceftriaxime 0,02 g
Polymyxine B 76700 U
Amphotéricine B 0,01 g
Phosphatidylinositol 2 g
Agar 13,5 g

pH final 7,2 +/- 0,2 à 25°C

MODE OPERATOIRE

Recherche et dénombrement de *Listeria monocytogenes* selon les protocoles normalisés :
Se référer aux normes ISO 11290 partie 1 et 2 et amendement 1 (2004).

RESULTATS

Noter l'aspect des colonies :
Listeria spp. : Colonies bleues à bien vert, rondes, régulières, sans halo opaque, de 1 à 2 mm de diamètre.

Listeria monocytogenes : colonies typiques de *Listeria spp.* entourées d'un halo opaque. Les souches de *Listeria monocytogenes* forment des colonies typiques en 24 heures.

AES CHEMUNEX - Rue Maysee Bastié - Ker Lann - CS 17219 - 35172 Bruz Cedex
Tel. 02 23 50 12 12 Fax. 02 23 50 12 00 <http://www.aeschemunex.com> - contact@aeschemunex.com

Isolément sélectif de *Listeria monocytogenes*
Usage In Vitro

RESULTATS

Ensemencer les boîtes directement à partir d'une culture en bouillon d'enrichissement approprié.

Incuber à 37°C pendant 24 et 48 heures.

Noter l'aspect des colonies suivantes :

Listeria monocytogenes : colonies verdâtres, de 1,5-2 mm de diamètre, cernée d'un halo noir.
Z. enterocolitica : petites colonies blanc-gris, de diamètre inférieur à 1 mm cernées d'un halo vert.
Staphylococcus : colonies blanches ou jaunes, de 1,5-3 mm de diamètre, cernées d'un halo blanc.
A partir des colonies suspectes, procéder aux tests classiques de confirmation.

BIBLIOGRAPHIE

1. Van Notten P., Van De Ven A., Perales I. and Mossel D.A.A. 1988. A selective and diagnostic for use in the enumeration of *Listeria spp.* in foods. Int. J. Food Microbiol. 6:187-198.
2. Van Notten P., Perales I. and Mossel D.A.A. 1988. An improved selective and diagnostic medium for isolation and counting of *Listeria spp.* in heavily contaminated foods. Lett. Appl. Microbiol. 7:17-21.

3. Van Notten P., Perales I., Van De Moosdijk A., Curtis G.D. W. and Mossel D.A.A. 1989. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria spp.* Int. J. Food Microbiol. 8:299-316.
4. AFNOR NF EN ISO 11290-1. Février 1997. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*.
Partie 1 : Méthode de recherche.

PRESENTATION

Milieu déshydraté
Conservé entre 1 et 30°C
AEB152042 : Flacon 500g

Supplément sélectif

Conservé entre 2 et 8°C
AEB184042:10 g + p. 500ml lyophilisés

Milieu Pré-coût complet

Conservé entre 2 et 8°C à l'obscurité
AEB32050 : Coffret de 20 boîtes Ø 90mm
AEB32049 : Coffret de 120 boîtes Ø 90mm
AEB12063 : Coffret 10 boîtes Ø 140mm

Made by AES CHEMUNEX - Combourg - France

152042: 21/01/10 - J

PRINCIPE

Le milieu PALCAM est destiné à l'isolement et aux dénombrements directs de *Listeria monocytogenes* dans tous les types de prélèvements même fortement contaminés.

A la base nutritive sont ajoutés des inhibiteurs sélectifs, le chlorure de lithium inhibe la pousse des *Enterococcus*, l'acétamide telle des *Gram -* et la plupart des *Gram -*.
L'addition d'autres agents inhibiteurs, sulfate de Polymyxine B et Ceftriaxime, renforce la sélectivité du milieu.

Certaines caractéristiques biochimiques des *Listeria (Group I, group II et group III)*, ont conduit à l'inclusion de 2 systèmes d'indicateurs différentiels au sein du milieu PALCAM :

- a) l'esculine, hydrolysée en esculetine, produit, en présence d'un trans férrique, un complexe vert olive à noir marbré qui confère aux colonies de *Listeria*. Si ces dernières sont confluentes, elles conduisent à une coloration brun foncé du milieu.
- b) Les souches de staphylocoques et entérocoques manitol (+) se développant malgré les conditions hostiles, donnent des colonies jaunes.

FORMULE

En grammes par litre d'eau purifiée

Peptone	23,00
Amidon de maïs	1,00
Extrait de levure	3,00
Chlorure de Sodium	5,00
Glucose	6,50
Mannitol	10,00
Esculine	0,80
Citrate Ferrique ammoniacal	0,50
Chlorure de Lithium	15,00
Rouge de Phénol	0,08
Agar	15,00

Supplément sélectif (pour 5ml d'eau purifiée)
Acridavine HCl 2,5 mg
Ceftriaxime 10,0 mg
Sulfate de Polymyxine B 5,0 mg

Final pH 7,2 à 25°C

Pouvent être ajoutés afin d'obtenir des performances optimales.

PREPARATION

Porter 75,9 grammes de poudre dans un litre d'eau purifiée. Verser à doublement le contenu, en agitant jusqu'à complète dissolution. Autoclaver 15 minutes à 121°C.

MODE OPERATOIRE

Faire bouillir le milieu dans un bain-marie bouillant puis refroidir vers 44-47 °C. Ajouter aseptiquement, par 500ml de base gélosée une ampoule de supplément sélectif PALCAM reconstituée préalablement avec 5ml d'eau purifiée stérile. Bien homogénéiser et couler en boîtes de Pétri stériles.

AES CHEMUNEX - Rue Maysee Bastié - Ker Lann - CS 17219 - 35172 Bruz Cedex
Tel. +33(0)2 23 50 12 12 Fax. +33(0)2 23 50 12 00 <http://www.aeschemunex.com> - contact@aeschemunex.com

Document 5 : Électrophorèse des protéines

L'électrophorèse de deux échantillons provenant du même animal, a été réalisée à pH 7, en milieu SDS, sur gel de polyacrylamide à 10 %.

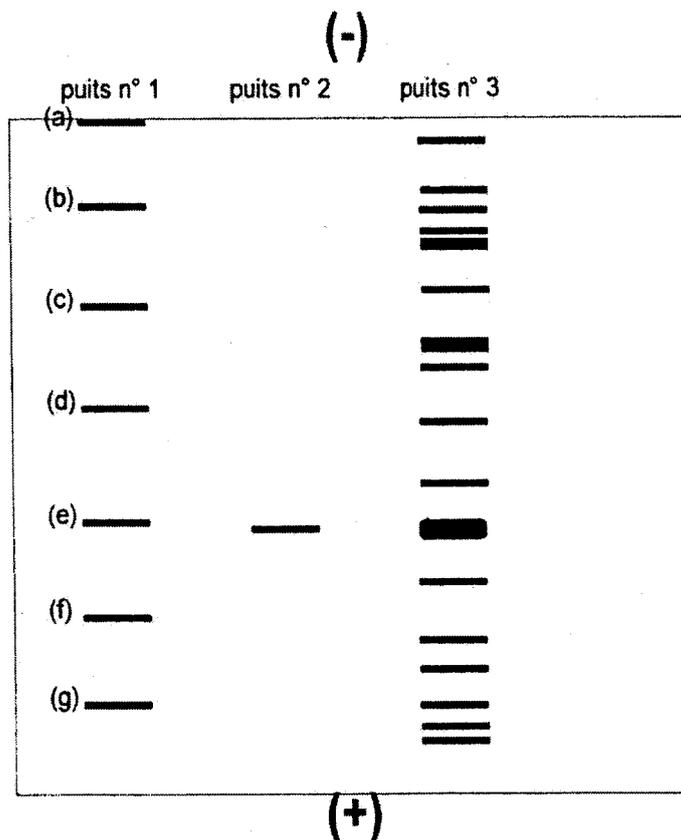
Chaque échantillon renferme 0,25 µg de protéine dans 0,1 mL de tampon.

Le premier échantillon, après traitement à la protéinase K, a été déposé dans le puits n° 2.

Le second (non traité à la protéinase K) a été déposé dans le puits n° 3.

Les marqueurs de masse moléculaire (puits n° 1) utilisés sont les suivants :

	Masse molaire (kDa)
alpha lactalbumine	14,4
alpha anti-trypsinogène	20,1
anhydrase carbonique	29
ovalbumine	45
sérum albumine	66
phosphorylase b	97,4
β-galactosidase	116



Électrophorèse des protéines : migration une heure à 150 V ; coloration au bleu de Coomassie R 250

Document 6 (1/2): kit Prionics® check-WB

Matériel inclus et protocole simplifié

Concentré de tampon d'homogénéisation.

(5 fois concentré, à diluer avant l'emploi). Un flacon contient 200 mL de solution tampon d'homogénéisation. Diluer avec de l'eau ultra pure dans un volume final de 1 litre.

Concentré de tampon blocage PVDF.

(5 fois concentré, à diluer avant l'emploi). Un flacon contient 100 mL de solution concentrée de PVDF, remplaçant la caséine du lait. Diluer le tampon de blocage avec de l'eau ultra pure dans un volume final de 0,5 litre.

Tampon de digestion.

Un tube de 4 mL de tampon de digestion. A +4 °C, le tampon de digestion est stable pendant 12 mois.

Protéinase K.

Un tube de 4 mL de protéinase K. A stocker à +4°C, il est préférable de faire des aliquotes et de les stocker à -20°C.

Digestion stop. (Pefabloc® SC).

Un tube de 4 mL de solution qui bloque l'activité protéolytique de la protéinase K. A stocker à +4°C.

Tampon de charge.

Un flacon contient 25 mL de tampon de charge gel SDS polyacrylamide (PAGE).

Echantillon de contrôle moléculaire.

En tube de 200 µL il est composé de marqueurs moléculaire 97,0 66,0 45,0 30,0 20,1 14,4 kDa) inclus dans du tampon de charge.

1er anticorps (6H4).

Un tube contient 30 µL d'anticorps monoclonal anti-PrP (IgG1 anti-PrP de souris) à concentration de 2 mg/mL. A diluer au 1/5000^e en tampon de blocage PVDF.

2ème anticorps-AP.

Un tube contient 30 µL à 0,3 mg/mL d'IgG-AP de chèvre (conjugué avec une phosphatase alcaline contre le premier anticorps). A diluer au 1/5000^e avec du TBST.

Concentré de tampon de luminescence.

(10 fois concentré, à diluer avant l'emploi). Un flacon contient 27 mL de concentré de tampon de luminescence. Diluer ce tampon avec de l'eau ultra pure dans un volume final de 270 mL.

Document 6 (2/2): kit Prionics® check-WB Protocole synthétique

Homogénéisation et digestion des échantillons

1. Homogénéisation	<ul style="list-style-type: none"> Couper et peser un échantillon de moelle épinière (0,4-0,8 g) Diluer 10X grâce au tampon d'homogénéisation (p/v), ex : 5 mL pour 0,5 g de tissu et homogénéiser 1 min avec de l'homogénéisateur OMNI. Prélever deux fois 1 mL par homogénat et déposer dans la plaque matrice (on travaille en double).
2. Digestion	<ul style="list-style-type: none"> Déposer 10 µL de tampon de digestion dans chaque puits de la plaque de digestion. Transférer 100 µL d'homogénat de la plaque matrice à la plaque de digestion. Ajouter 10 µL de protéinase K, bien homogénéiser. Digérer 40 min à 47°C (Afficher 50°C au bloc chauffant). Stopper la réaction avec 10 µL de solution stop.

Electrophorèse en gel

Etapes préliminaires	<ul style="list-style-type: none"> Préparer les gels NuPAGE. Chauffer le contrôle moléculaire à 65°C durant 2 min.
3. Dénaturation des échantillons	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 100 µL de tampon de charge aux échantillons digérés, bien homogénéiser et chauffer 5 min à 96°C. Les échantillons chauffés peuvent être congelés et conservés à -20°C.
4. Dépôt des échantillons	<ul style="list-style-type: none"> Déposer 10 µL de l'échantillon de contrôle dans le premier puits du gel. Déposer 10 µL d'échantillon à la pipette multicanaux. Remplir la cuve d'électrophorèse avec de la solution tampon de migration. Ajouter 500 µL d'antioxydant, mais seulement dans la cuve INTÉRIEURE.
5. Electrophorèse	<ul style="list-style-type: none"> Faire migrer à 150V pendant 1 heure.

Hybridation

Etapes préliminaires	<ul style="list-style-type: none"> Laver la membrane PVDF (la tremper quelques secondes dans du méthanol), puis l'équilibrer durant 15 min dans du tampon de transfert. Remplir l'unité de transfert avec du tampon de transfert réfrigéré.
6. Réalisation du sandwich de transfert	<ul style="list-style-type: none"> Dans la cassette de transfert, placer une éponge, du papier Whatman puis la membrane. Ouvrir l'enveloppe des gels, en retirer les gels et les placer sur la membrane. Recouvrir les gels avec du papier Whatman, et une deuxième éponge. Fermer la cassette de transfert et la placer dans la cuve de transfert.
7. Transfert des protéines	<ul style="list-style-type: none"> Mettre sous tension de 150V durant 1 heure à +4°C. Attention au sens de transfert.
8. Coloration des protéines	<ul style="list-style-type: none"> Reprendre la membrane et vérifier le transfert en colorant les protéines liées à la membrane PVDF au Ponceau S durant 2 min. Repérer la position des puits et des marqueurs moléculaires. Rincer la membrane avec du TBST jusqu'à disparition de la couleur rouge.

Détection immunologique

9. _____	<ul style="list-style-type: none"> Incuber la membrane dans env. 50 ml de tampon blocage PVDF durant ½-1 heure à température ambiante.
10. _____	<ul style="list-style-type: none"> Diluer le 1er anticorps dans 50 mL de tampon blocage PVDF (1:5000), verser sur la membrane et incuber 1-2 heures à température ambiante (ou 12-18h à +4°C). Laver la membrane 4 fois 5-10 min avec du TBST.
11. _____	<ul style="list-style-type: none"> Diluer le 2e anticorps-AP, (IgG de chèvre anti-souris associé à une phosphatase alcaline) dans 50 mL de TBST (1:5000), verser sur la membrane et incuber 0.5-1 heure à température ambiante. Laver la membrane 4 fois 5-10min avec du TBST.
12. _____	<ul style="list-style-type: none"> Equilibrer la membrane durant 5 min dans du tampon de luminescence. Diluer 100 µl de CDP-Star (50x) dans 5 mL de tampon de luminescence. Eliminer l'excédent de liquide sur membrane en l'égouttant. Répartir le CDP-Star sur la membrane et incuber 5 min à température ambiante. Eliminer l'excédent de liquide avec un Kleenex doux, couvrir la membrane avec une feuille de film alimentaire. Exposer un HyperFilm ECL à la membrane durant 1 min, développer le film. Plusieurs expositions sont possibles pour optimiser la révélation.

Document 7 : Extraction d'ADN à partir de biopsies tissulaires

7.1 Prélèvement biopsique et lyse enzymatique :

- A partir des tissus, prélever trois biopsies d'une taille d'environ 1 mm³.
- Rincer les biopsies provenant du même tissu dans un microtube à l'aide d'une solution de lavage.
- Transférer les biopsies dans un microtube contenant le tampon de lyse, fermer le microtube et effectuer la lyse enzymatique pendant 2 heures à 56 °C ou une nuit à 37°C.

7.2 Extraction du matériel génétique :

- Après agitation des microtubes préparés lors de l'étape de lyse, prélever 100 µL et les transférer dans un microtube stérile contenant la solution d'extraction.
- Vortexer pendant 10 secondes et incubé à 95 °C pendant 15 minutes.
- Centrifuger 5 minutes à 8 000 g et à température ambiante.
- Transférer le surnageant dans un second microtube stérile et conserver l'ADN extrait à moins 20°C.

7.3 PCR

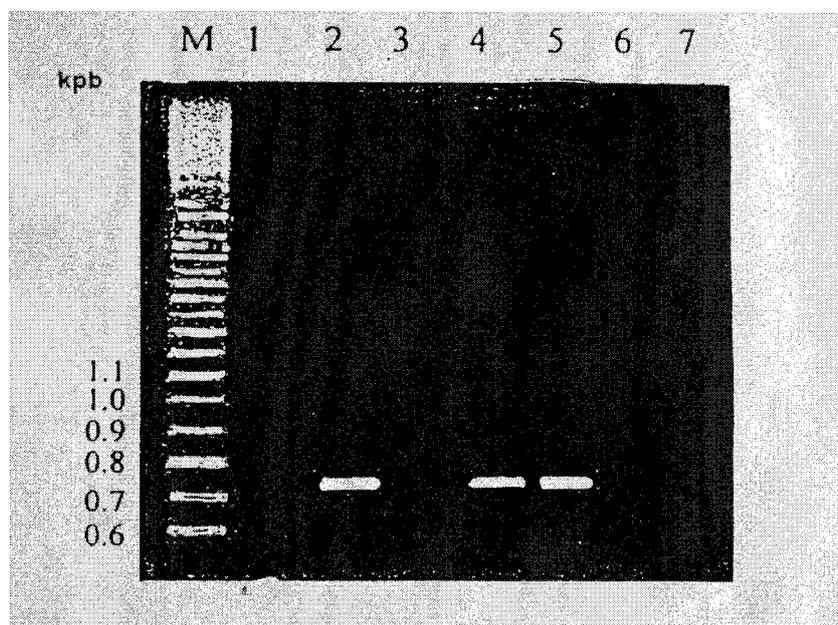
On veut amplifier par PCR une séquence cible d'ADN spécifique du mycoplasme de la pneumonie porcine, séquence d'environ 750 paires de bases ; cet ADN cible possède la séquence suivante :

5'-GAATCCATGGCTAGTCATGCA / 700 nucléotides / CATCGATGCTTGCAACGGGCAACC-3'

On dispose au laboratoire des amorces suivantes : de (a1) à (a6).

(a1)	CTTAGGTACCGGATCA	(a4)	CCAACGGGCAACGTTA
(a2)	GAATCCATGGCTAGTC	(a5)	GGTTGCCCGTTGCAAG
(a3)	GCTTGCAACGGGCAAC	(a6)	CATCGATGCTTGCAAC

7.4 Résultats des produits PCR



Piste M : marqueurs de masse moléculaire (exprimée en kpb)

Piste 1 : témoin négatif

Piste 2 : témoin positif

Pistes 3 à 7 : essais

15 µL des produits de chaque PCR ont migré dans un gel d'agarose à 0,8 %, en tampon TBE (Tris, Borate, EDTA) ; révélation par le bromure d'éthidium (0,1 %) sous illumination U.V