



Secrétariat Général

Direction générale des  
ressources humaines

MINISTÈRE  
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE

Sous-direction du recrutement

---

## **Concours du second degré – Rapport de jury**

**Session 2012**

### **CERTIFICAT D'APTITUDE AU PROFESSORAT DE L'ENSEIGNEMENT TECHNIQUE (CAPET)**

**CONCOURS EXTERNE ET CAFEP**

**SECTION : BIOTECHNOLOGIES**

**Option : BIOCHIMIE GENIE BIOLOGIQUE**

**Rapport de jury présenté par Françoise GUILLET  
Présidente de jury**

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

---

# SOMMAIRE

<b>Composition du jury.....</b>	<b>Page 3</b>
<b>Renseignements statistiques.....</b>	<b>Page 5</b>
<b>Epreuves d'admissibilité</b>	
<b>Composition d'Epreuve de synthèse</b>	
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 8</b>
<b>Composition d'Etude d'un système, d'un procédé     ou d'une organisation</b>	
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 11</b>
<b>Epreuves d'admission</b>	
<b>Leçon portant sur les programmes des lycées et     des classes post-baccalauréat</b>	
<b>Sujets.....</b>	<b>Page 15</b>
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 70</b>
<b>Epreuve sur dossier</b>	
<b>Rapport.....</b>	<b>Page 73</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>Page 79</b>

# COMPOSITION DU JURY

## Président du jury

Mme Françoise GUILLET, Inspecteur général de l'éducation nationale

## Vice-présidents

Mme Caroline BONNEFOY, Inspecteur d'académie /inspecteur pédagogique régional, Rectorat Académie de Versailles

M. David DUBAYLE, Maitre de conférences des universités, UFR biomédicale des st pères Université Paris Descartes – Paris 6

## Secrétaire général

Mme Martine CHARRIN, Professeur Agrégée

M. Christian PLAS, Professeur Agrégé

## Membres

BARDES Sylvie - Professeur agrégé - LGT Vallée de Chevreuse Gif-sur-Yvette Versailles

BEAUMESNIL Olivier - Professeur certifié - LGT Léopold Sedar Senghor Evreux Rouen

BISSERY Joëlle - Professeur agrégé - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris

BOBENRIETHER Martine - Professeur agrégé - LGT Georges de La Tour Nancy- Metz

BOUQUET Raphael - Professeur certifié - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris

BOYS Sophie - Professeur agrégé - LPO Lycée des métiers Marguerite Yourcenar Beuvry Lille

CARAYOL Géraldine - Professeur agrégé - LGT Marie Curie Versailles

CAZALOT Anne - Professeur certifié - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris

CHAFFAUT Pascal - Professeur agrégé - LGT Lycée des métiers Hugues Libergier Reims

CHANIAUD Elisabeth - Professeur agrégé - Rectorat académie de Paris

CHAVANEL Muriel - Professeur agrégé - LT St Louis Bordeaux

CHAVANT Laurence - Professeur certifié - LPO Jean Rostand Strasbourg

CNOKAERT Joël - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie d'Aix-Marseille

COLOMB Nathalie - Professeur agrégé - LGT Léopold Sedar Senghor Evreux Rouen

COMBES Anne - Professeur certifié - LGT Marie Curie Versailles

DENDALETCHÉ Joel - Professeur agrégé - LGT La Découverte Decazeville Toulouse

DEVAUX Christian - Professeur agrégé - LGT Lycée des métiers Hugues Libergier Reims

DOUCET Sandrine - Professeur agrégé - LT St Louis Bordeaux

DUBRAC Claire - Professeur certifié - LGT Les Lombards Troyes Reims

DUNET JUSTIN Pascale - Professeur certifié - LGT Marie Curie Versailles

DURAND Bruno - Professeur agrégé - LPO Lycée des Métiers Jean Moulin Angers Nantes

ETANCELIN Catherine - EC.R Professeur certifié - LGT Pr Lycée Gen.Et Technol.Prive Gre Vincennes

FALLER Isabelle - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Strasbourg

FAUTREZ Véronique - Professeur certifié - LGT Valentine Labbe La Madeleine Lille

FERLIN Thérèse - Professeur certifié bi-admissible - LGT Honoré d'Urfé St Etienne Lyon

FERRIERES Mélanie - Professeur agrégé - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris

FERRON Patricia - Professeur certifié - LPO du Golf Dieppe Rouen

FOURCY GIRAUD Sigolène - Professeur agrégé - LPO Lycée des métiers Louise Michel Grenoble

FREMY Gilles - Professeur certifié - LPO Lyc métiers Lycée Des métiers De La Plastu Marmande

FRUCHART Martine - Professeur certifié - LGT Marie Curie Versailles

GARNIER Philippe - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Poitiers

GERON LANDRE Bénédicte - Professeur agrégé - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris

GESTIN Cyrille - Professeur agrégé - LGT Ernest Renan St Briec Rennes

GOMEL Frédéric - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Caen

GOUZERH Geneviève - Professeur certifié - LGT Vallée de Chevreuse Gif-sur-Yvette Versailles

GRIMAL Emmanuelle - Professeur agrégé - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris

HAEBERLE MULLER Susanne - Professeur certifié - LPO Lavoisier Mulhouse Strasbourg

HOUQUE Marie-Armelle - Professeur agrégé - Université Institut de gestion de La Rochelle Poitiers

LAZARUS ALTENBURGER Marie Pia - Professeur certifié - LGT Marie Curie Versailles

LAZZARONI Yannick - Professeur certifié - LGT Arthur Varoquaux Tomblaine Nancy-Metz

LE TEXIER André - Professeur certifié - LGT Lycée Pierre-Gilles de Gennes Paris

LESTRA Jean-Luc - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Grenoble

LOKIEC Laurent - EC.R Professeur certifié - Lt Privé Ec Sup Tech Biologie App Paris

MALLET Catherine - Professeur certifié - LGT Bourdelle Montauban Toulouse  
MATRINGE François - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Toulouse  
MEUNIER Patrick - Professeur agrégé - LPO Julien Wittmer Charolles  
NARBONNE Pierre - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Rennes  
PLANEILLE RESTANY Michèle - Professeur certifié - LPO Suzanne Valadon Limoges  
POCHET Catherine - Professeur certifié - LPO Lycée des métiers Jean Moulin Angers Nantes  
PRAT Michel - Inspecteur d'académie/Inspecteur pédagogique régional - Rectorat académie de Créteil  
RAMI Guillaume - Professeur agrégé - LT Marie Curie Aix-Marseille  
SCHLICHTER Elisabeth - Professeur certifié - LGT Robert Schuman Haguenau Strasbourg  
TRINIAC Frédérique - Professeur certifié - LGT Brequigny Rennes  
VANLEEFDAEL Cécile - Professeur agrégé - LPO Jean-Baptiste Poquelin St Germain-en-Laye Versailles  
VINCENT Françoise - Professeur agrégé - LT Marie Curie Aix-Marseille

## RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

### CONCOURS EXTERNE

<b>Nombre de postes</b>	<b>28</b>
<b>Candidats inscrits</b>	<b>368</b>
<b>Candidats présents aux deux épreuves d'admissibilité</b>	<b>123</b>
<b>Candidats admissibles</b>	<b>60</b>
<b>Candidats présents aux épreuves d'admission</b>	<b>52</b>
<b>Candidats proposés pour l'admission</b>	<b>28</b>
<b><u>Epreuves d'admissibilité</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>7.70</b>
<b>Moyenne des candidats admissibles</b>	<b>10.27</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admissible</b>	<b>7.12</b>
<b><u>Epreuve de synthèse</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>7.35</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>10.54</b>
Note maximale	<b>18.82</b>
<b><u>Etude d'un système, d'un procédé ou d'une organisation</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>7.93</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>10.00</b>
Note maximale	<b>15.47</b>
<b><u>Epreuves d'admission</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>10.43</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>13.30</b>
<b><u>Leçon portant sur les programmes des lycées et des classes post-baccalauréat</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>10.31</b>
Moyenne des candidats admis	<b>13.62</b>
Note maximale	<b>20.00</b>
<b><u>Epreuve sur dossier</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>10.42</b>
Moyenne des candidats admis	<b>12.98</b>
Note maximale	<b>19.00</b>
<b><u>Soutenance de dossier /14</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>6.58</b>
Moyenne des candidats admis	<b>8.43</b>
Note maximale	<b>14.00</b>
<b><u>Agir en fonctionnaire /6</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>3.85</b>
Moyenne des candidats admis	<b>4.55</b>
Note maximale	<b>6.00</b>
<b><u>Ensemble du concours</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>10.39</b>
<b>Moyenne la plus élevée</b>	<b>15.29</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>12.50</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admis</b>	<b>10.18</b>

## RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

### Concours d'accès aux fonctions d'enseignement dans les établissements privés sous contrat (CAFEP)

<b>Nombre de postes</b>	<b>5</b>
<b>Candidats inscrits</b>	<b>65</b>
<b>Candidats présents aux deux épreuves d'admissibilité</b>	<b>19</b>
<b>Candidats admissibles</b>	<b>7</b>
<b>Candidats présents aux épreuves d'admission</b>	<b>5</b>
<b>Candidats proposés pour l'admission</b>	<b>3</b>
<b><u>Epreuves d'admissibilité</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>6.26</b>
<b>Moyenne des candidats admissibles</b>	<b>9.74</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admissible</b>	<b>7.77</b>
<b><u>Epreuve de synthèse</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>6.12</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>10.53</b>
Note maximale	<b>15.48</b>
<b><u>Etude d'un système, d'un procédé ou d'une organisation</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>6.38</b>
Moyenne des candidats admissibles	<b>8.93</b>
Note maximale	<b>11.97</b>
<b><u>Epreuves d'admission</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>10.15</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>13.29</b>
<b><u>Leçon portant sur les programmes des lycées et des classes post-baccalauréat</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>7.17</b>
Moyenne des candidats admis	<b>11.08</b>
Note maximale	<b>16.75</b>
<b><u>Epreuve sur dossier</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>10.17</b>
Moyenne des candidats admis	<b>15.50</b>
Note maximale	<b>17.50</b>
<b><u>Soutenance de dossier /14</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>6.25</b>
Moyenne des candidats admis	<b>10.67</b>
Note maximale	<b>12.50</b>
<b><u>Agir en fonctionnaire /6</u></b>	
Moyenne des candidats présents	<b>3.92</b>
Moyenne des candidats admis	<b>4.83</b>
Note maximale	<b>5.00</b>
<b><u>Ensemble du concours</u></b>	
<b>Moyenne des candidats présents</b>	<b>9.93</b>
<b>Moyenne la plus élevée</b>	<b>14.14</b>
<b>Moyenne des candidats admis</b>	<b>11.42</b>
<b>Moyenne du dernier candidat admis</b>	<b>9.14</b>

# **EPREUVES D'ADMISSIBILITE**

## **Epreuve de synthèse**

Durée : 5 heures  
Coefficient : 3

## **Etude d'un système, d'un procédé ou d'une organisation**

Durée : 5 heures  
Coefficient : 3

Les sujets des épreuves d'admissibilité sont en ligne sur le site du Ministère : [www.education.gouv.fr](http://www.education.gouv.fr)

Ils sont accessibles depuis la page « SIAC2 » : <http://www.education.gouv.fr/pid63/siac2.html>

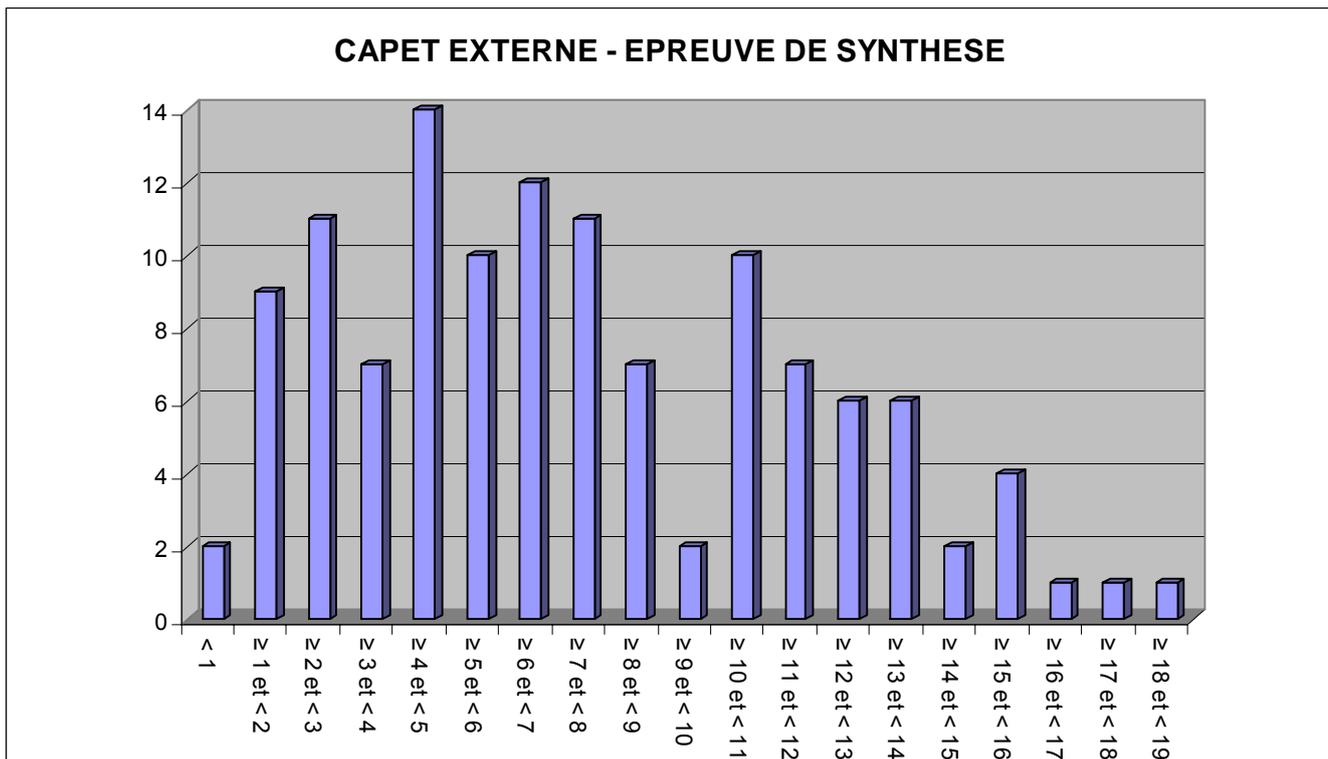
## Rapport de l'épreuve de synthèse

**Rapport établi par :** Mme Joëlle BISSERY, Mme Géraldine CARAYOL, Mme Anne CAZALOT, M. Pascal CHAFFAUT, M. Christian DEVAUX, Mme Pascale DUNET-JUSTIN, M. Bruno DURAND, Mme Patricia FERRON, M. Gilles FREMY, M. Cyrille GESTIN, Mme Emmanuelle GRIMAL, Mme Susanne HAEBERLE-MULLER, Mme Marie-Armelle HOUQUE, M. Yannick LAZZARONI, M. André LE TEXIER

**Résultats :**

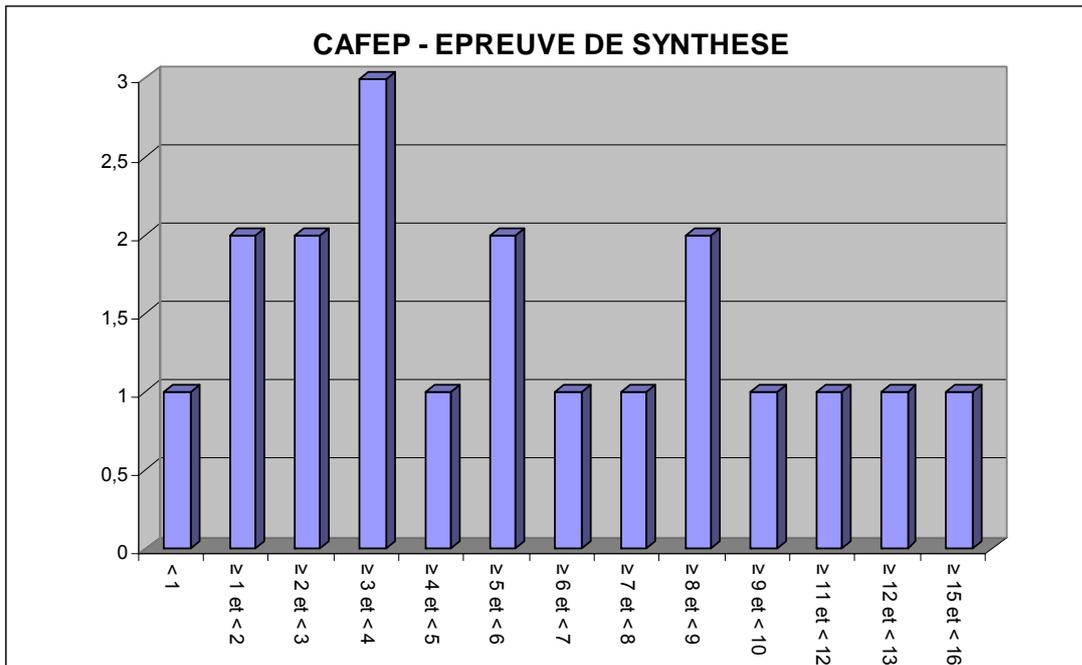
### CAPET

< 1	2	≥ 10 et < 11	10
≥ 1 et < 2	9	≥ 11 et < 12	7
≥ 2 et < 3	11	≥ 12 et < 13	6
≥ 3 et < 4	7	≥ 13 et < 14	6
≥ 4 et < 5	14	≥ 14 et < 15	2
≥ 5 et < 6	10	≥ 15 et < 16	4
≥ 6 et < 7	12	≥ 16 et < 17	1
≥ 7 et < 8	11	≥ 17 et < 18	1
≥ 8 et < 9	7	≥ 18 et < 19	1
≥ 9 et < 10	2		



## CAFEP

< 1	1	≥ 7 et < 8	1
≥ 1 et < 2	2	≥ 8 et < 9	2
≥ 2 et < 3	2	≥ 9 et < 10	1
≥ 3 et < 4	3	≥ 11 et < 12	1
≥ 4 et < 5	1	≥ 12 et < 13	1
≥ 5 et < 6	2	≥ 15 et < 16	1
≥ 6 et < 7	1		



### Commentaires :

Le sujet de synthèse portait sur *Escherichia coli* O:157 H:7 et les effets physiopathologiques de la vérotoxine sécrétée par ce sérovar.

L'énoncé comportait des annexes contenant de nombreuses indications qui devaient conduire les candidats à développer un raisonnement construit s'appuyant sur des connaissances scientifiques et technologiques solides. Les candidats devaient analyser les annexes pour les exploiter, en produisant par exemple des schémas ou des tableaux de synthèse et ne pouvaient se contenter de les paraphraser. La connaissance du vocabulaire scientifique et physiopathologique usuel était nécessaire.

Une introduction, permettant de contextualiser la problématique et d'annoncer le plan, était indispensable. Entre chaque partie, des transitions devaient permettre d'extraire et d'organiser les éléments essentiels développés précédemment puis d'amener logiquement le développement de la partie suivante par une argumentation rigoureuse.

La conclusion, même courte, devait synthétiser les notions fondamentales exposées dans la copie et permettre d'élargir la problématique.

Les candidats devaient montrer leur capacité à structurer leurs connaissances, particulièrement dans la partie portant sur les spécificités des supports génétiques des facteurs de virulence. Il ne s'agissait pas de présenter un catalogue de connaissances sur les différents supports, mais de relever leur diversité, ainsi que leurs propriétés communes ou spécifiques, ce qui devait amener les candidats à présenter les modes de transferts de façon synthétique.

Dans la partie portant sur la mise en évidence du *serovar*, de la toxine et de son gène, le jury attendait que les principes des techniques, et non uniquement un mode opératoire, soient présentées de façon rigoureuse et contextualisée :

- pour les techniques d'identification du *serovar* après culture : les constituants principaux des géloses, permettant la mise en évidence des caractéristiques biochimiques de la souche, devaient être indiqués ;
- pour des techniques de mise en évidence de protéines : il était attendu une présentation de la spécificité des anticorps nécessaire pour une caractérisation par la technique ELISA ;
- pour les techniques de mise en évidence d'un gène : le nom du gène amplifié et la spécificité des amorces pour une PCR devaient être signalés.

La dernière partie nécessitait de posséder des connaissances en physiologie humaine, discipline enseignée au lycée en section ST2S et STL Biochimie génie biologique. Les candidats devaient analyser les informations données dans les annexes afin de relier les symptômes entre eux puis s'appuyer sur leurs connaissances pour faire le lien entre les effets de la vérotoxine et l'apparition de ces symptômes. La maîtrise des connaissances de la physiologie rénale était indispensable pour disposer d'une vision intégrée permettant de répondre de façon cohérente à la question posée.

Le jury a apprécié les efforts de syntaxe, la maîtrise de la langue française et le soin apporté aux illustrations dans les copies des candidats. Le jury a valorisé la dimension didactique du devoir, en particulier la démarche de raisonnement, les choix effectués, la clarté des schémas et des tableaux, la mise en exergue des éléments essentiels, ...

Cette épreuve de synthèse nécessite de disposer de solides connaissances en physiologie, microbiologie et biochimie, ainsi que d'une culture technologique permettant de maîtriser les principes des techniques usuelles des biotechnologies, et pas seulement en biologie moléculaire. La mobilisation de ces connaissances et leur structuration dans une démarche logique permet aux candidats de présenter, de façon rigoureuse, une réflexion construite portant sur le sujet proposé.

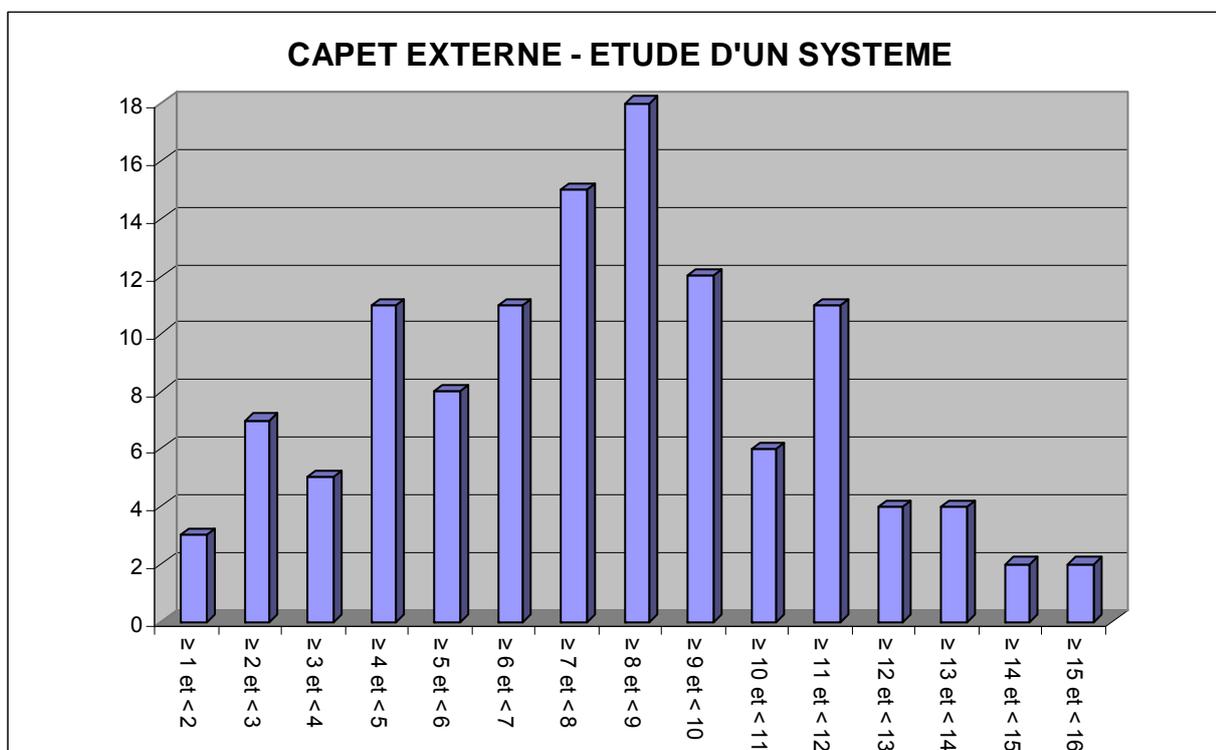
# Rapport de l'étude d'un système, d'un procédé ou d'une organisation

**Rapport établi par :** Mme Sylvie BARDES, M. Raphaël BOUQUET, Mme Sophie BOYS, Mme Laurence CHAVANT, Mme Nathalie COLOMB, Mme Sandrine DOUCET, Mme Véronique FRAUTREZ, Mme Mélanie FERRIERES, Mme Michèle PLANEILLE RESTANY, Mme Catherine POCHET ; Mme Elisabeth SCHLICHTER, Mme Cécile VANLEEFDAEL, Mme Françoise VINCENT

## Résultats :

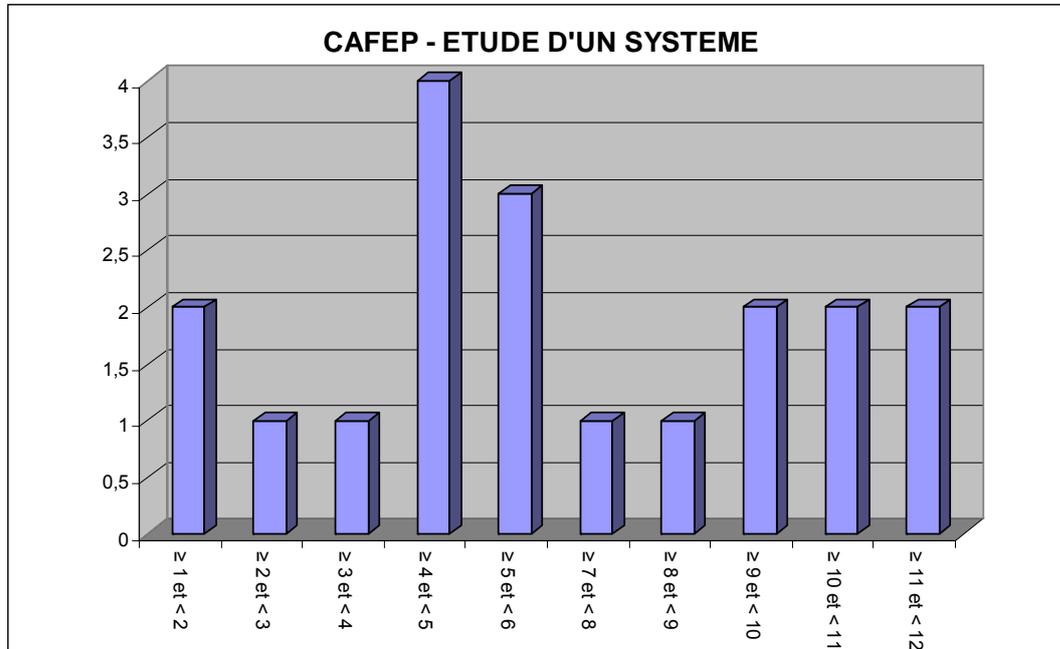
### CAPET

$\geq 1$ et $< 2$	3	$\geq 9$ et $< 10$	12
$\geq 2$ et $< 3$	7	$\geq 10$ et $< 11$	6
$\geq 3$ et $< 4$	5	$\geq 11$ et $< 12$	11
$\geq 4$ et $< 5$	11	$\geq 12$ et $< 13$	4
$\geq 5$ et $< 6$	8	$\geq 13$ et $< 14$	4
$\geq 6$ et $< 7$	11	$\geq 14$ et $< 15$	2
$\geq 7$ et $< 8$	15	$\geq 15$ et $< 16$	2
$\geq 8$ et $< 9$	18		



## CAFEP

$\geq 1$ et $< 2$	2	$\geq 7$ et $< 8$	1
$\geq 2$ et $< 3$	1	$\geq 8$ et $< 9$	1
$\geq 3$ et $< 4$	1	$\geq 9$ et $< 10$	2
$\geq 4$ et $< 5$	4	$\geq 10$ et $< 11$	2
$\geq 5$ et $< 6$	3	$\geq 11$ et $< 12$	2



### Commentaires :

Cette épreuve définie par l'arrêté du 28 décembre 2009 modifié le 26 avril 2010 a pour objectif de conduire une analyse critique de solutions technologiques et/ou d'établir le projet de protocoles dans un contexte défini, ici l'étude de la fabrication de yaourt brassé contenant des fruits.

La moyenne générale pour cette épreuve est de 7,7 / 20 avec :

10,4 /20 pour la forme

6,9/20 pour la formation du gel lactique

4,0/20 pour la production industrielle du yaourt

4,6/20 pour la pasteurisation

8,7/20 pour l'intérêt d'utilisation de la gomme de xanthane et sa production

4,3/20 pour l'amélioration du procédé de production de la gomme

4,4/20 pour les contrôles au cours de la production du yaourt

Le jury rappelle que seuls doivent être intégrés dans la copie les éventuels documents portant la mention « à rendre avec la copie ». En conséquence, toute présence de documents ou parties de documents tirés du sujet sera assimilée à une levée d'anonymat.

## **Commentaires sur le travail effectué**

Cette épreuve, bien que fondée sur une étude de documents, doit faire l'objet d'une rédaction impliquant une introduction, un développement avec un plan structuré apparent et une conclusion. Les différents points à traiter mentionnés dans le sujet, ne constituent pas nécessairement le plan à suivre mais un guide pour traiter la problématique.

Les documents ont été peu ou mal exploités, voire n'ont pas été exploités, trop souvent paraphrasés sans appropriation personnelle. L'exploitation doit faire apparaître les capacités d'analyse, c'est à dire le fil de la réflexion (observation, description et interprétation) et de synthèse. Les données des documents doivent être enrichies par les connaissances scientifiques et technologiques du candidat, bien évidemment adaptées au sujet.

La qualité de l'expression écrite et de la présentation de la copie ont été en général satisfaisantes. Cependant, un effort sur la conception et la réalisation de schémas est nécessaire pour un concours de recrutement de professeurs .

Les conclusions se sont attachées davantage à résumer les différents points du sujet sans proposer de perspectives qu'offrait le thème.

Le jury a relevé une hétérogénéité de la qualité didactique des différentes copies des candidats, futurs enseignants.

Pour ce qui concernait les techniques de contrôle du procédé de fabrication il s'agissait de choisir et de développer le principe des plus pertinentes, sans en donner une liste exhaustive.

Le jury attendait des contrôles liés au décret du 30/12/88 relatif au yaourt : dénombrement des bactéries lactiques vivantes et dosage de l'acide lactique. Certaines copies ont mentionné des méthodes qui n'étaient pas applicables dans le contexte des produits laitiers : quantification bactérienne par mesure d'un trouble ou numération au microscope électronique...

Le jury rappelle que la réussite à cette épreuve nécessite non seulement de solides connaissances scientifiques et technologiques mais aussi la capacité à les réinvestir dans le contexte proposé par le sujet avec un esprit critique. Cette épreuve peut faire appel à l'ensemble des thématiques du programme du concours.

**EPREUVES PRATIQUES ET  
EPREUVES ORALES D'ADMISSION**

**LECON PORTANT SUR LES PROGRAMMES DES LYCEES  
ET DES CLASSES POST-BACCALAUREAT**

**EPREUVE SUR DOSSIER**

**Les épreuves pratiques et orales se sont déroulées au Lycée Pierre-Gilles de Gennes  
(E.N.C.P.B) à PARIS**

# LECON PORTANT SUR LES PROGRAMMES DES LYCEES ET DES CLASSES POST-BACCALAUREAT

## Sujet 1

<b>SEQUENCE</b>	<b>Thématique de projet : Agro-carburants</b>
<b>SEANCE</b>	<b>Suivi de processus de fermentation éthanolique</b>
<b>NIVEAU D'ENSEIGNEMENT</b>	<b>Première STL Biotechnologies Enseignement de Biotechnologies</b>
<b>Manipulations proposées</b>	<b>Matière d'œuvre</b>
Dénombrement par cytométrie <b>(Protocole 1)</b>	Prélèvement de moût de fermentation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à t = 20 minutes dilué au 1/50 <sup>ème</sup> noté « t20 min au 1/50 » Hématimètre de Malassez Compte-globule Bleu de Funk
Dénombrement sur milieux solides en surface <b>(Protocole 2)</b>	Prélèvement de moût de fermentation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à t = 20 minutes noté « t20 min » Géloses Sabouraud + chloramphénicol en boîte de Pétri notées « SAB » Tubes de diluant stérile
Dosage du glucose par colorimétrie <b>(Protocole 3)</b>	Surnageant obtenu à partir de moût de fermentation prélevé à t = 60 minutes noté « surnageant t=60 min » Réactif à la GOD Glucose pur et anhydre Spectrophotomètre
<b>Ressources documentaires fournies</b>	
Document sur les biocarburants <b>(Annexe 1)</b>	
Suivi de fermentation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pour la production d'éthanol <b>(Annexe 2)</b>	
Indications sur la prévention du risque chimique <b>(Annexe 3)</b>	
Fiche de décontamination de l'hématimètre de Malassez <b>(Annexe 4)</b>	
Acceptabilité des résultats expérimentaux et expression des résultats <b>(Annexe 5)</b>	
<b>Protocoles ou résultats expérimentaux (manipulation non réalisables)</b>	
Dénombrement en hématimètre de Thoma à t = 20 minutes : protocole et résultats <b>(Annexe 6)</b>	
Dénombrement en masse du moût de fermentation à t = 240 minutes : protocole et résultats <b>(Annexe 7)</b>	
Dosage de l'éthanol par méthode chromique : protocole et résultats <b>(Annexe 8)</b>	

## PROTOCOLÉ 1

### Dénombrement par cytométrie

**Objectif** : réaliser un suivi de biomasse en dénombrant les levures dans le prélèvement de moût de fermentation à t = 20 minutes.

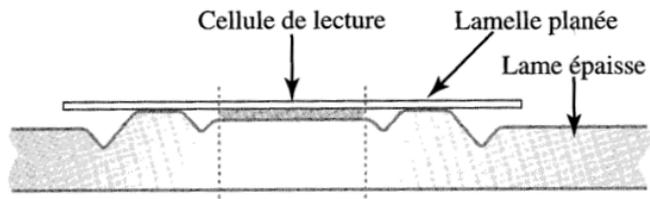
**Protocole** :

Le moût de fermentation prélevé à t = 20 minutes est fourni dilué au 1/50<sup>ème</sup>.  
Réaliser, en hématimètre de Malassez, le dénombrement de cette dilution du moût après avoir effectué une dilution au 1/2 dans une solution de bleu de Funk.

**Données :**

- Le bleu de Funk est un colorant expulsé par les cellules vivantes.
- Présentation de l'hématimètre de Malassez :

Coupe transversale de l'hématimètre :



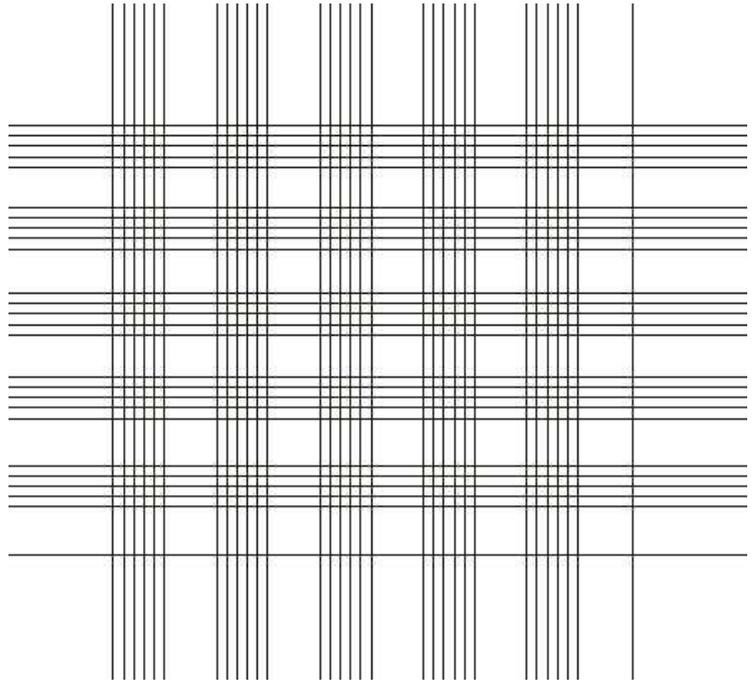
Caractéristiques du quadrillage :

Surface  $2,5 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} = 5 \text{ mm}^2$

Profondeur  $1/5 \text{ mm}$

Soit un volume total de la cellule de numération  $VC = 1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{L}$

Le quadrillage comprend 100 rectangles (r)  
d'un volume  $V_r = 1/100 \text{ mm}^3 = 0,01 \mu\text{L}$



## PROTOCOLE 2

### Dénombrement sur milieux solides en surface

**Objectif :** réaliser un suivi de biomasse en dénombrant les levures dans le prélèvement de moût de fermentation à  $t=20$  minutes

**Protocole :**

- Choisir 3 dilutions à ensemercer pour le dénombrement en milieu solide en surface, sachant qu'on estime la concentration cellulaire du prélèvement à  $t = 20$  minutes à environ  $10^8 \text{ levures.mL}^{-1}$ .
- Réaliser les dilutions décimales en tube d'eau physiologique stérile de 9 mL.

- Pour chaque dilution choisie, ensemer un volume d'inoculum de 0,1 mL par boîte de gélose Sabouraud + chloramphénicol. Réaliser un essai par dilution.
- Incuber dans les conditions adéquates

## **Données : Extrait de la norme NF V08-059**

### **9.3 Numération des moisissures et levures**

Après la période d'incubation procéder au comptage des levures et des thalles présents.

Ne retenir que les boîtes contenant moins de 150 thalles ou levures au niveau de deux dilutions successives.

Si le comptage est effectué à 4, voir 3 jours d'incubation, le mentionner dans le rapport d'essai.

NOTE Ne retenir que les boîtes pour lesquelles les thalles ne confluent pas.

## PROTOCOLE 3

### Dosage du glucose par colorimétrie

**Objectif** : réaliser un suivi de fermentation par dosage du substrat du milieu de production

**Protocole** :

**1) Étalonnage du spectrophotomètre**

- Préparer par pesée une solution étalon de glucose à  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ .
- Réaliser, à partir de la solution étalon de glucose à  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ , une gamme adéquate de 4 ou 5 solutions étalons.
- Introduire dans une microcuve :
  - 20  $\mu\text{L}$  de solution étalon
  - 2 mL de réactif à la GOD (distributeur)
- Homogénéiser et attendre 20 minutes à température ambiante.
- Lire l'absorbance à 505 nm contre un blanc.

**2) Dosage (2 essais)**

Réaliser une dilution du surnageant du moût de fermentation prélevé à  $t = 60$  minutes.  
Effectuer la réaction de coloration sur cette dilution dans les mêmes conditions que l'étalon.

**Données**

- Limite de détection analytique  $\leq 0,013 \text{ g.L}^{-1}$
- Limite de linéarité  $4,00 \text{ g.L}^{-1}$
- Stabilité de la coloration : 1 heure à  $20\text{-}25^\circ\text{C}$
- Masse molaire du glucose  $M_{\text{glucose}} = 180 \text{ g.mol}^{-1}$
- Le réactif de coloration contient du phénol.
- Ecart-type de répétabilité  $S_r = 0,018 \text{ g.L}^{-1}$

**Matériel et réactifs**

- Flacon de glucose pur et anhydre
- Surnageant de moût de fermentation prélevé à  $t = 60$  minutes
- Réactif à la Glucose oxydase (GOD)
- Tubes à hémolyse avec support
- Fioles jaugées de 20 et de 100 mL
- Bécher gradué de 250 mL
- Erlenmeyer de 400 mL
- Pipettes jaugées de 1, 5 et 10 mL
- Pipettes graduées de 1, 5 et 10 mL
- Macrocuves de spectrophotomètre et support
- 1 pipette automatique P20 et cônes
- 1 pipette automatique P1000 et cônes
- Papier filtre et Joseph, film étirable
- 1 pissette d'eau distillée
- Chronomètre
- Spectrophotomètre

## ANNEXE 1

### Production de bioéthanol

(D'après <http://www.biofuels-platform.ch>)

L'idée d'utiliser le bioéthanol comme carburant n'est pas nouvelle. Henry Ford, au début du 20<sup>ème</sup> siècle, avait imaginé utiliser de l'éthanol pour alimenter ses légendaires "Ford T".

Le bioéthanol est en fait de l'alcool éthylique (ou encore éthanol), identique par sa composition à l'alcool de bouche. Il existe deux façons principales de produire de l'éthanol, à savoir par synthèse à partir de d'hydrocarbures et à partir de biomasse. Seule cette deuxième façon de procéder mérite l'appellation "bioéthanol".

#### Les filières de production

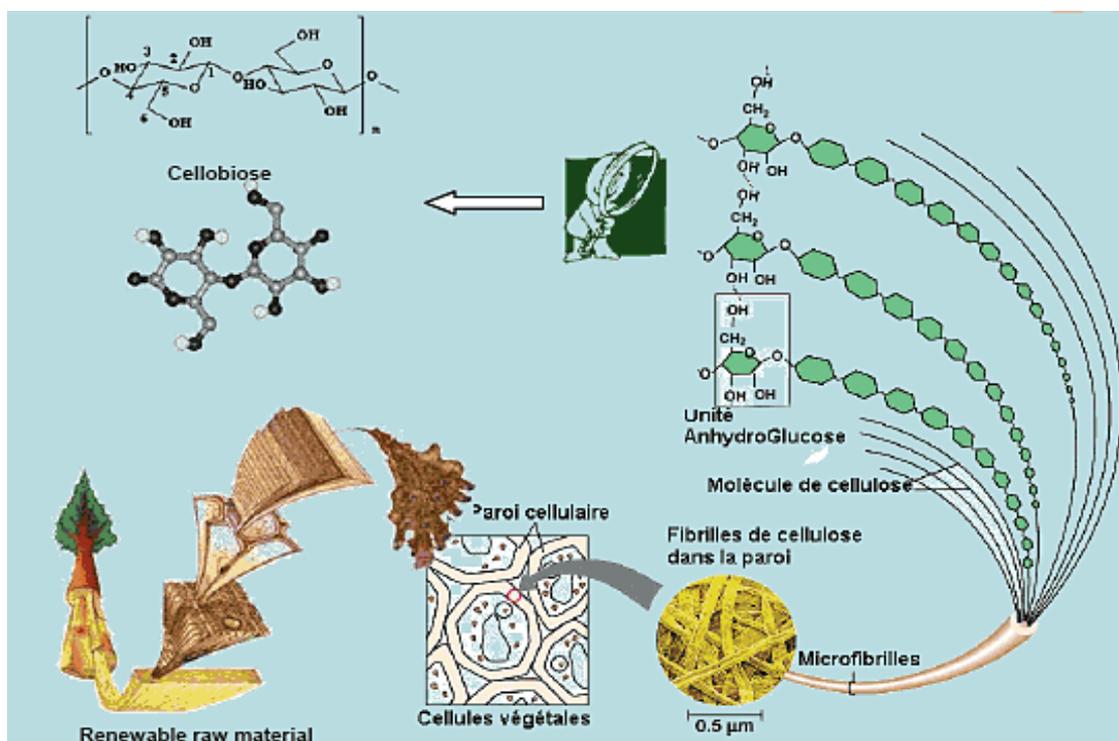
Tous les sucres fermentescibles (glucose, saccharose, etc.) peuvent être transformés en éthanol par fermentation. Ces sucres sont présents dans un état plus ou moins polymérisé dans de nombreuses espèces du monde végétal comme la betterave à sucre, la canne à sucre, le blé, le maïs, la pomme de terre, mais également dans l'herbe ou encore le bois. Des déchets tels que le petit lait ou le vieux papier peuvent également être transformés en bioéthanol.

#### La production bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique

De nouvelles technologies permettent la transformation de la biomasse lignocellulosique (bois, herbe, paille et autres déchets agricoles, etc.) en bioéthanol. A titre d'exemple, si un hectare de canne à sucre produit environ 10 tonnes de sucres simples et 3 tonnes de mélasses, il produit également entre 20 et 25 tonnes de biomasse non comestibles mais toutefois potentiellement convertibles en éthanol. Ces quelques remarques mettent en évidence l'intérêt que représente aujourd'hui la biomasse lignocellulosique en termes de coûts et de disponibilité mais également en ce qui concerne la compétition potentielle avec l'alimentation.

La biomasse lignocellulosique offre sans nul doute les meilleures perspectives en termes de réduction des coûts de production à moyen-court terme, par son abondance et son coût potentiellement inférieur aux autres matières premières.

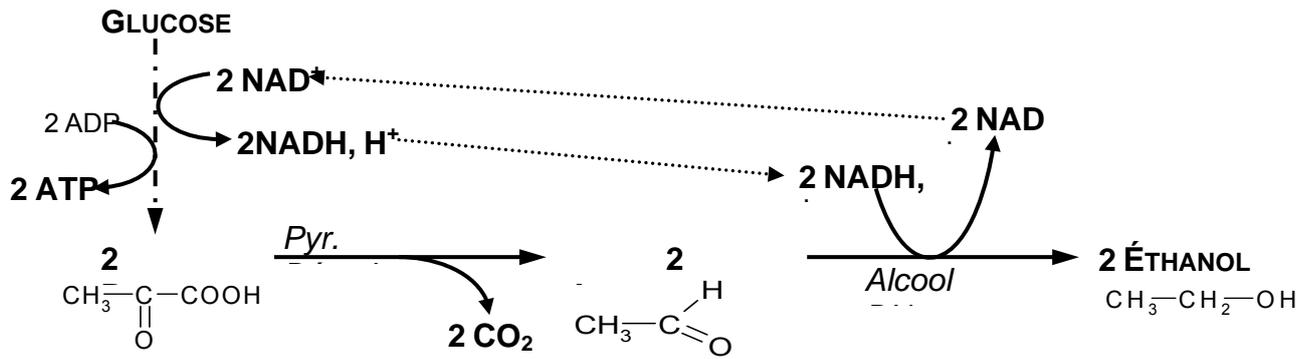
Des 3 constituants majeurs de la biomasse lignocellulosique – cellulose, hémicelluloses et lignine –, seule la cellulose (polymère de glucose) est aujourd'hui facilement transformable en éthanol.



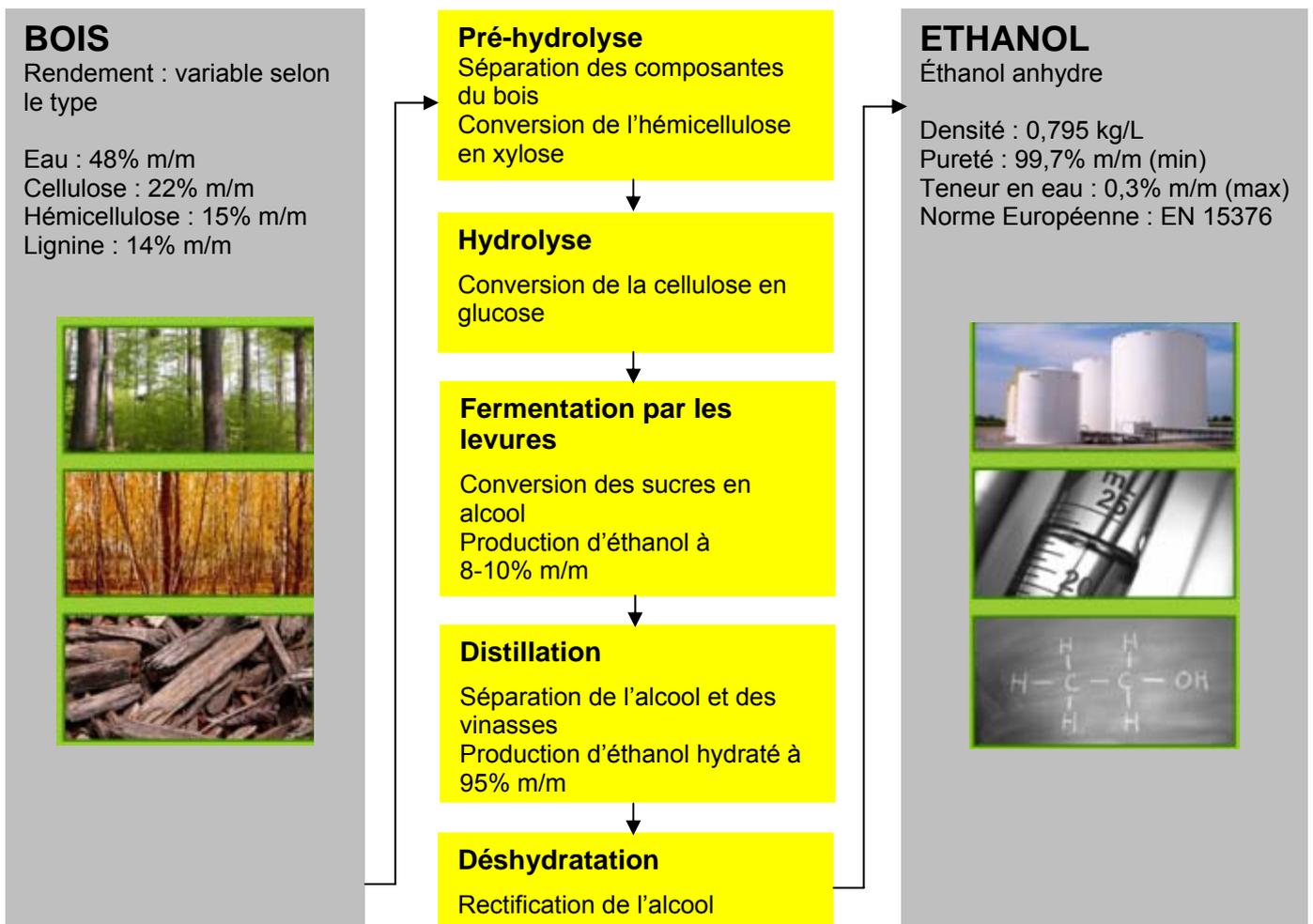
(d'après <http://cerig.efpg.inpg.fr/Note/2010/biomateriau.htm>)

- Étape 1** : extraction de la cellulose par un traitement physico-chimique.
- Étape 2** : hydrolyse enzymatique de la cellulose en glucose (les enzymes utilisées sont issues de micro-organismes).

□ **Étape 3 :** fermentation éthanolique du glucose sous l'action de levures :



□ **Étape 4 :** purification de l'éthanol par distillation puis par déshydratation



## ANNEXE 2

### Suivi de fermentation de *Saccharomyces cerevisiae* pour la production d'éthanol

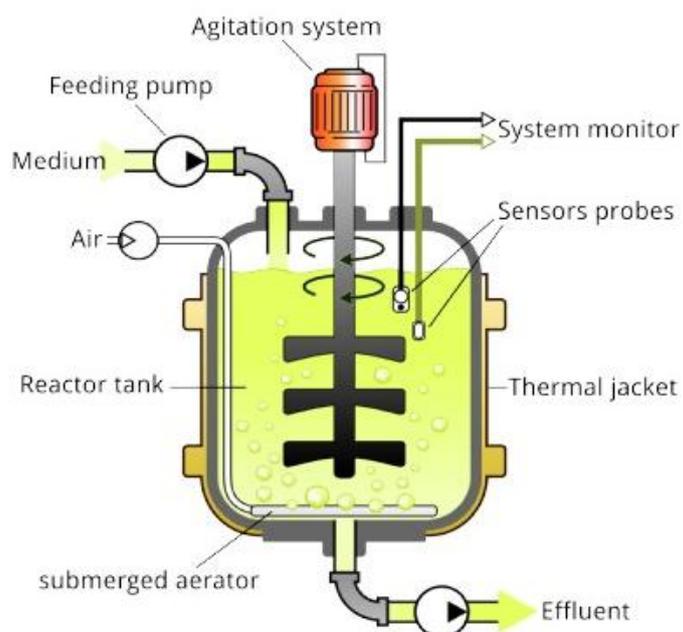
#### CONDITIONS DE PRODUCTION

<b>Milieu</b>	Voir composition ci-après
<b>Volume initial du milieu</b>	2,25 L
<b>Inoculum</b>	0,25 L d'une préculture de 24 h à 30°C en milieu de même composition qualitative que le milieu de production
<b>Procédé utilisé</b>	Batch
<b>Agitation</b>	300 rpm au départ
<b>Température</b>	30°C (régulé au cours de la fermentation)
<b>pH initial</b>	5,0 (non régulé au cours de la fermentation)
<b>Temps de fermentation</b>	240 minutes

#### Milieu de production

Extrait de levure	12,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	62,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5 g
Glucose	50,0 g
Eau distillée	1 L
pH	5

#### Schéma général d'un fermenteur

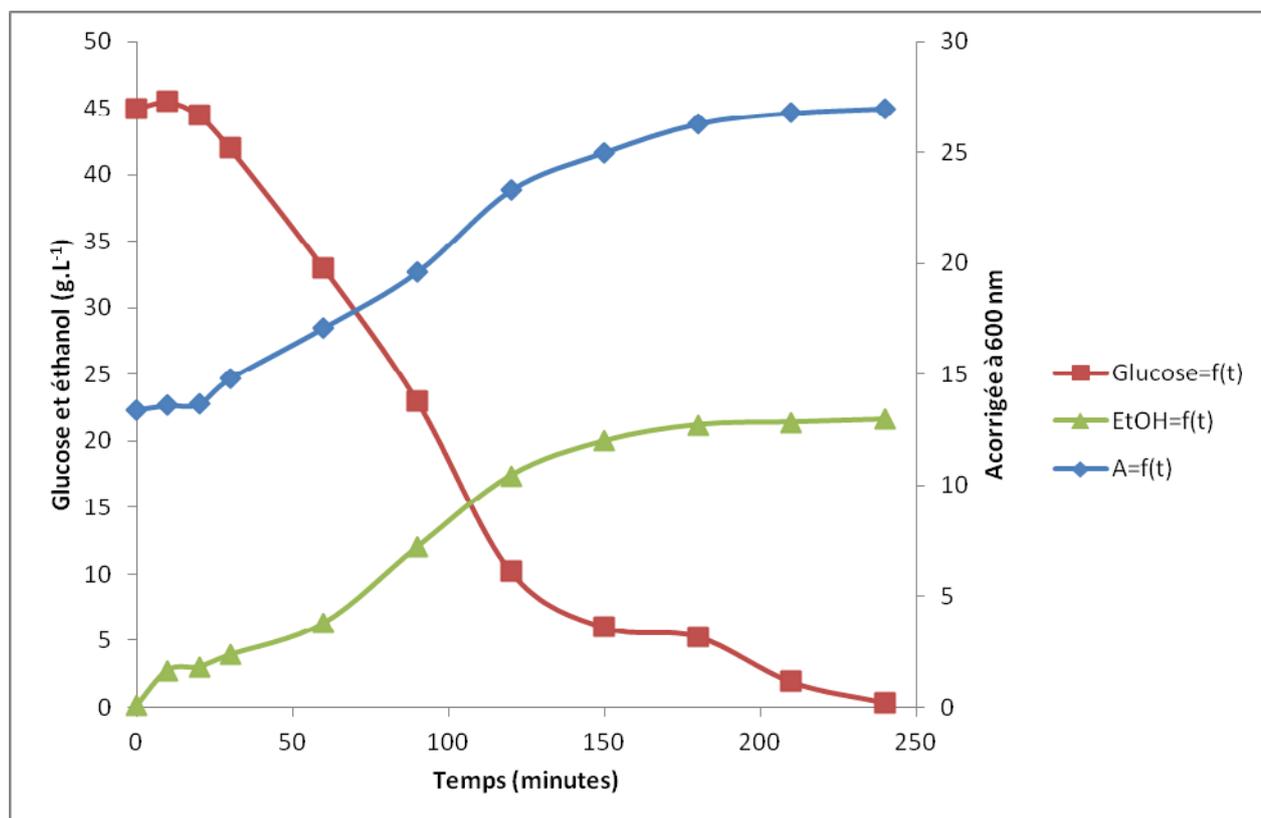


### Résultats du suivi de fermentation

Temps (min)	$A_{\text{corrigée}}$ à 600 nm	Glucose ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Éthanol ( $\text{g.L}^{-1}$ )
0	13,4	45	0,1
10	13,6	45,5	2,75
20	13,65	44,5	3
30	14,8	42	3,9
60	17,1	33	6,3
90	19,6	23	12
120	23,3	10,2	17,4
150	25	6	20
180	26,3	5,3	21,2
210	26,8	1,9	21,4
240	27	0,35	21,6

Correspondance : 1 unité d'absorbance à 600 nm correspond à  $10^7$  levures. $\text{mL}^{-1}$

### Courbes de suivi de fermentation



## ANNEXE 3

### Indications sur la prévention du risque chimique

Produit non dilué	Pictogrammes	Mentions d'avertissement	Mentions de danger	Conseils de prudence
Phénol		Danger	H341 H331 H311 H301 H373 H314	P280 P302+P334 P305+P351+P338 P309+P310

## ANNEXE 4

### Décontamination de l'hématimètre de Malassez (source : 3RB)

#### Matériel et produit

- Cuvette pour recueillir les effluents munie d'un support de lame.
- Détergents
- Désinfectants (eau de Javel fraîchement diluée au 1/7, à 0,4 % de chlore actif soit 1,2 degrés chlorométriques)
- Eau
- Alcool

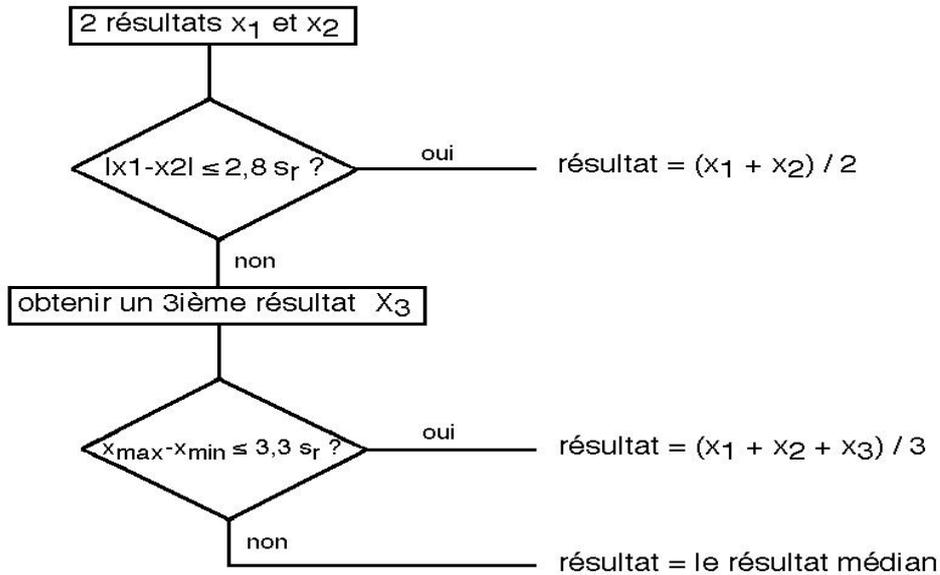
#### Protocole de décontamination

- Placer, immédiatement après utilisation, l'hématimètre sur un support fixé sur une cuvette.
- Recouvrir de détergent en veillant à ce que ce dernier pénètre également sous la lamelle afin de détacher les protéines du verre.
- Rincer abondamment à l'eau.
- Recouvrir alors l'hématimètre par de l'eau de Javel diluée à 0,4% de chlore actif fraîchement préparée.
- Laisser agir 5 minutes.
- Rincer abondamment à l'eau.
- Rincer éventuellement à l'éthanol pour un meilleur séchage.
- Essuyer soigneusement hématimètre et lamelle à l'aide d'un papier non pelucheux.
- Éliminer les effluents à l'évier.

## ANNEXE 5

### Acceptabilité et expression des résultats expérimentaux

#### Logigramme



#### Expression du résultat

Le dernier chiffre significatif du résultat sera à la même position décimale que le dernier chiffre significatif de l'écart type de répétabilité.

## ANNEXE 6

### Résultats du dénombrement du moût de fermentation au temps $t = 20$ minutes en hématimètre de Thoma

**Objectif** : réaliser un suivi de biomasse en dénombrant les levures dans le prélèvement de moût de fermentation à  $t=20$  minutes

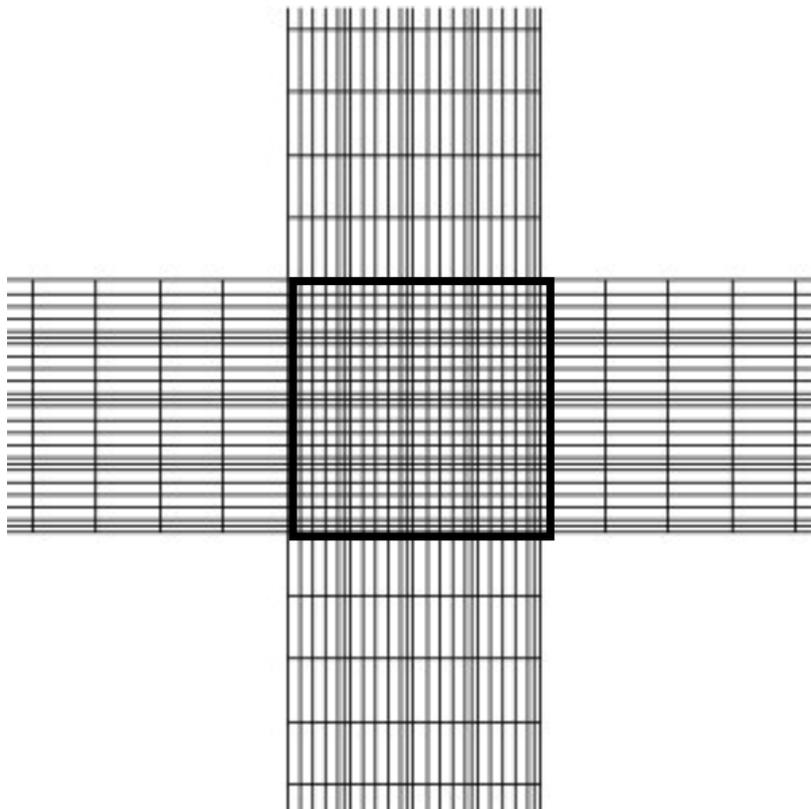
#### Protocole :

Le moût de fermentation à  $t=20$  minutes dilué au  $1/100^{\text{ème}}$  a été dénombré sur la totalité de l'hématimètre de Thoma après dilution au  $1/2$  dans une solution de bleu de Funk. Les résultats obtenus sont les suivants :

Nombre total de cellules	Nombre de levures mortes
72	4

**Données** : caractéristiques de l'hématimètre de Thoma :

- Longueur de la zone de comptage : 1 mm
- Largeur de la zone de comptage : 1 mm
- Hauteur entre hématimètre et lamelle : 0,1 mm



## ANNEXE 7

### Dénombrement en masse du moût de fermentation à t= 240 minutes

**Objectif** : Réaliser un suivi de biomasse en dénombrant les levures dans le prélèvement de moût de fermentation à t=240 minutes

#### **Protocole**

- A partir du moût de prélèvement au temps t=240 minutes, réaliser un dénombrement des levures par cytométrie (Protocole 1).
- A partir des résultats obtenus par cytométrie, choisir 3 dilutions à ensemercer pour le dénombrement en milieu solide en masse.
- Réaliser les dilutions décimales.
- Pour chaque dilution choisie, ensemercer un volume d'inoculum de 1 mL par boîte. Réaliser ce dénombrement en double essai..
- Couler le milieu Sabouraud + chloramphénicol.
- Incuber dans les conditions adéquates

#### **Résultats**

Les dilutions  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  ont été choisies et ensemercées comme indiqué dans le protocole ci-dessus.

**Les boîtes sont fournies après incubation.**

#### **Données : Extrait de la norme NF V08-059**

##### **9.3 Numération des moisissures et levures**

Après la période d'incubation procéder au comptage des levures et des thalles présents.

Ne retenir que les boîtes contenant moins de 150 thalles ou levures au niveau de deux dilutions successives.

Si le comptage est effectué à 4, voir 3 jours d'incubation, le mentionner dans le rapport d'essai.

NOTE Ne retenir que les boîtes pour lesquelles les thalles ne confluent pas.

## ANNEXE 8

### Dosage de l'éthanol par méthode chromique

**Objectif** : réaliser un suivi de fermentation par dosage du produit

#### **Protocole :**

##### 1) **Oxydation de l'éthanol**

- Introduire 10,00 mL de la solution de dichromate de potassium dans une fiole d'Erlenmeyer bouchant émeri de 250 mL.
- Verser lentement 5 mL d'acide sulfurique concentré (à l'aide d'un distributeur) en agitant et en refroidissant au fur et à mesure.
- Ajouter, lorsque le mélange est suffisamment froid, E = 5,00 mL du surnageant du moût prélevé à t=240 minutes et dilué au 1/5.
- Boucher la fiole ; agiter doucement.
- Attendre 15 à 20 minutes.
- Ajouter dans la fiole :  
100 mL environ d'eau distillée,  
15 mL d'acide phosphorique pur

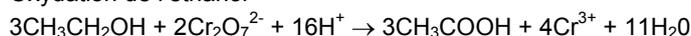
##### 2) **Dosage de l'excès de dichromate de potassium**

- Ajouter 20 gouttes de diphénylaminosulfonate de baryum dans la fiole d'Erlenmeyer bouché émeri.
- Doser par la solution de sel de Mohr jusqu'à la coloration vert émeraude.  
Soit  $V_E$  le volume versé : 14,90 mL

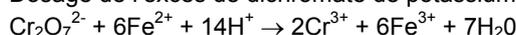
#### **Données**

- Réactions mises en jeu dans le dosage de l'éthanol par méthode chromique

##### 1) Oxydation de l'éthanol



##### 2) Dosage de l'excès de dichromate de potassium



- Formule permettant le calcul de la concentration en éthanol en  $\text{mol.L}^{-1}$  :

$$C_{\text{EtOH}} = \frac{6 \times (C_{\text{dichromate}} \times V_{\text{dichromate}}) - (C_{\text{Mohr}} \times V_{\text{Mohr}})}{4 \times V_{\text{EtOH}}}$$

- Masse molaire de l'éthanol :  $46 \text{ g.mol}^{-1}$
- Concentration de la solution de dichromate de potassium :  $0,115 \text{ mol.L}^{-1}$
- Concentration de la solution de sel de Mohr :  $0,335 \text{ mol.L}^{-1}$

☐ **Sujet 2**

<b>SEQUENCE</b>	<b>Contrôle de matières premières et d'agents de fabrication en industrie agroalimentaire</b>
<b>SEANCE</b>	<b>Contrôle de qualité générale du lait cru et des ferments lactiques en industrie fromagère</b>
<b>NIVEAU D'ENSEIGNEMENT</b>	<b>BTS Bioanalyses et contrôles 2<sup>ème</sup> année</b>
<b>Manipulations proposées</b>	<b>Matière d'œuvre</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Numération de ferments lactiques par la méthode de Breed (<b>Protocole 1</b>)</li> <li>• Dénombrement de ferments lactiques en milieu solide (<b>Protocole 2</b>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Préculture: <i>Lactobacillus bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i> (Yalacta) en lait UHT écrémé</li> <li>• Lame micrométrique</li> <li>• Anse de 10 µL stérile</li> <li>• Gélose M17 en surfusion</li> <li>• Gélose MRS en surfusion</li> </ul> <p>Grandes boîtes de Pétri vides stériles</p>
Etude de l'activité des ferments lactiques ( <b>Protocole 3</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erlenmeyersensemencés avec le Yalacta en lait UHT écrémé à des temps d'incubation différents</li> <li>• Phénolphtaléine</li> <li>• Soude Dornic (1/9 mol.L<sup>-1</sup>)</li> <li>• Burette</li> <li>• pHmètre</li> </ul>
<b>Ressources documentaires fournies</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extrait du programme du BTS Bioanalyses et contrôles</li> <li>• Document sur les bactéries lactiques (<b>Annexe 1</b>)</li> <li>• Les contrôles du lait et produits laitiers (<b>Annexe 2</b>)</li> <li>• Milieux de culture pour bactéries lactiques MRS et M17 (<b>Annexe 3</b>)</li> <li>• Indication sur la prévention du risque chimique (<b>Annexe 6</b>)</li> <li>• Acceptabilité et expression des résultats (<b>Annexe 7</b>)</li> </ul>	
<b>Protocoles ou résultats expérimentaux fournis (manipulations non réalisables)</b>	
<p>Détermination de la teneur en protéines du lait cru : protocole et résultats (<b>Annexe 4</b>)</p> <p>Contrôle de l'absence d'inhibiteurs dans un lait : protocole et résultats (<b>Annexe 5</b>)</p>	

## Protocole 1

### Numération directe par la technique de Breed

En plus de la numération en hématimètre de Malassez, qui se fait sur des microorganismes vivants (levures essentiellement), on peut également **estimer la densité d'une population microbienne à partir d'un frottis coloré et calibré** (microorganismes tués) : cette technique, dite de Breed, est adaptée aux bactéries, et se réalise la plupart du temps à partir d'un produit alimentaire (yaourt, lait...).

#### Matière d'œuvre

#### **Matériel biologique :**

- Préculture : *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (Yalacta) en lait UHT écrémé

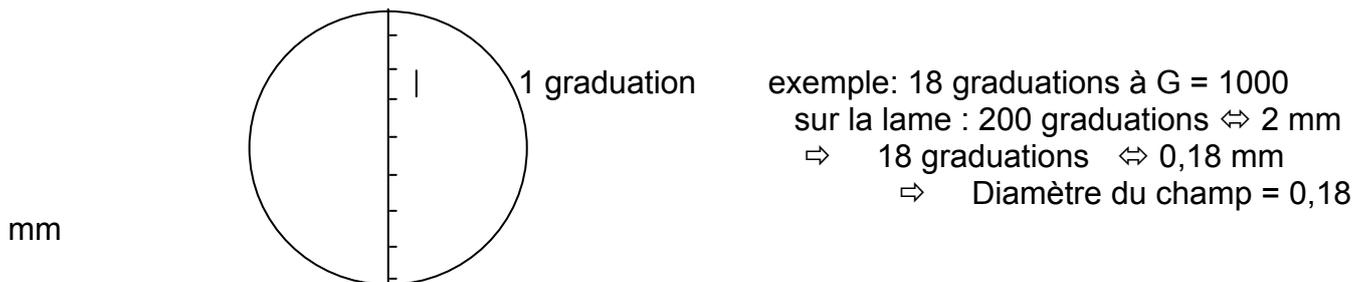
#### **Matériel :**

- Lame micrométrique
- Anse de 10  $\mu\text{L}$  stérile

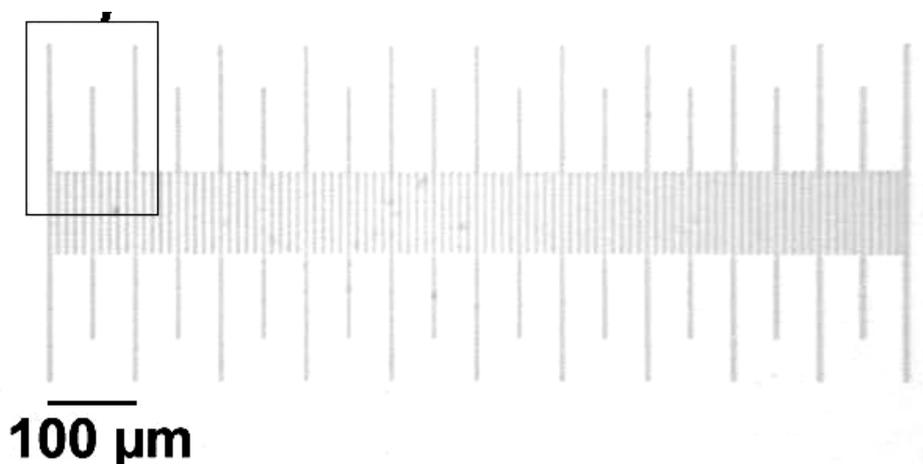
#### Principe :

Afin de déterminer la concentration cellulaire, le volume de numération doit être connu et défini. Mais pour faciliter le dénombrement, ce volume sera ramené à une surface ( $1\text{cm}^2$ ) sur laquelle on réalisera un frottis avec une goutte calibrée (10 $\mu\text{L}$ ).

Cette technique fait intervenir une **LAME MICROMETRIQUE**, servant à **mesurer le diamètre du champ microscopique** observé au grossissement (G) adapté (ici x1000), comme indiqué ci-dessous :



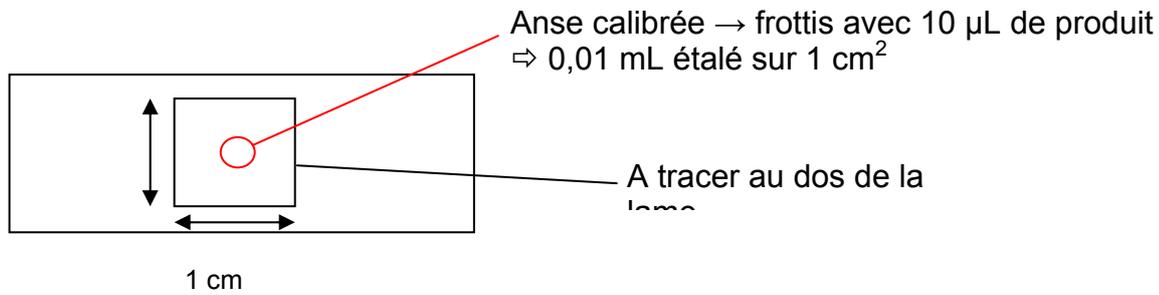
La lame micrométrique est une lame en verre, **objet** que l'on pose sur la platine du microscope, et qui porte une échelle graduée dont on connaît exactement la distance entre 2 graduations : **10  $\mu\text{m}$** .



Visualisation de 10 graduations (intervalles) soit :

$$10 \times 10 \mu\text{m} = 100 \mu\text{m}.$$

Technique et numération :



Sécher

Fixer

Coloration de Gram (voir page suivante)

Observation à l'objectif X100

Nombre de microorganismes / champ (distinguer les différents microorganismes si produit polymicrobien)

- Compter les microorganismes présents dans 20 à 30 champs microscopiques
- Les petits amas et les chaînettes sont en général dénombrés comme 1 seul germe
- Attention à la dilution éventuelle pour avoir ~ 10 à 20 microorganismes / champ
- Pour parcourir la lame, on suit :



les diagonales du carré



ou 1 ligne horizontale et 1 ligne perpendiculaire

Connaissant la surface d'un champ microscopique  $s$  et la surface totale de comptage  $S$ , à partir de la moyenne  $n$  du nombre de germes par champ et du volume  $V$  déposé sur la lame, on calcule le nombre  $N$  de germes dans 1 mL d'échantillon (ne pas oublier de tenir compte d'une éventuelle dilution).

$$N = n \times \frac{S}{s} \times \frac{1}{V} \times Fd$$

$N$  = nombre de germes. $\text{mL}^{-1}$

$n$  = nombre moyen par champ

$S$  = surface de comptage =  $1 \text{ cm}^2$

$Fd$  = facteur de dilution (inverse de  $d$ )

$V$  = volume d'échantillon (mL)

$s$  = surface d'un champ microscopique ( $\text{cm}^2$ )

## Coloration de GRAM

- Colorer le frottis au violet de gentiane (ou cristal violet) durant une minute.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.
- Faire agir une solution de lugol durant une minute.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.
- Décolorer à l'alcool (éthanol) ou alcool-acétone durant une dizaine de secondes (plus ou moins selon l'épaisseur du frottis).
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.
- Contre-colorer à la fuchsine ou la safranine durant 30 secondes à une minute.
- Rincer le frottis à l'eau et sécher délicatement.
- Observer le frottis coloré sec au microscope optique d'abord à l'objectif X40 pour faire la mise au point et choisir une zone d'observation intéressante puis utiliser l'objectif X100 à l'immersion pour une observation précise.

## Protocole 2

### Dénombrement de ferments lactiques par une méthode indirecte (dénombrement en milieu solide)

Les produits laitiers sont issus de la transformation du lait par différents procédés, faisant essentiellement appel à des bactéries, soit de cette flore originelle, soit ajoutées au lait. Il est important de connaître ces différentes bactéries lactiques et de pouvoir les dénombrer spécifiquement.

#### Matière d'œuvre

##### **Matériel biologique :**

- Préculture : *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (Yalacta) en lait UHT écrémé

##### **Milieus / Eaux / Réactifs:**

- 6 tubes de 15 mL de gélose M17 en surfusion
- 6 tubes de 13 mL de gélose MRS en surfusion
- 6 tubes de 9 mL de gélose MRS en surfusion
- Tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile

##### **Matériel :**

- Pipettes graduées stériles 1 mL
- Grandes boîtes de Pétri vides stériles

#### Manipulation

- Réaliser les dilutions à ensemer pour un dénombrement dans la masse des *Lactobacillus bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus* présents dans le Yalacta.
- Réaliser le dénombrement de *Lactobacillus bulgaricus* dans la masse d'une gélose MRS ou M17 (double couche, double essai).
- Réaliser le dénombrement de *Streptococcus thermophilus* dans la masse d'une gélose MRS ou M17 (simple couche, double essai).
- Incuber.

**Donnée** : Le Yalacta commercial contient, d'après les données fournisseur, plus de  $10^7$  germes vivants.mL<sup>-1</sup> après reconstitution

## Protocole 3

### Etude de l'activité des ferments lactiques

#### Matière d'œuvre

##### **Matériel biologique :**

4 fioles d'Erlenmeyer notés  $t_0$ ,  $t_{2h}$ ,  $t_{3h}$  et  $t_{6h}$  fournis dans la glace

Les 4 fioles d'Erlenmeyer, contiennent chacun :

- 100 mL de lait UHT écrémé stérile
- 2 mL d'extrait de levure
- 2 mL de saccharose
- 5 mL de Yalacta

et ont été incubés en bain thermostaté agité à 45°C à différents temps : 0, 2, 3 et 6 heures (notés  $t_0$ ,  $t_{2h}$ ,  $t_{3h}$  et  $t_{6h}$ ).

##### **Réactifs :**

- 1 flacon compte-goutte de phénolphtaléine
- Soude Dornic (1/9 mol.L<sup>-1</sup>)
- 1 flacon de tampon pH 4 et 1 flacon de tampon pH 7

##### **Matériel :**

- 1 pipette graduée propre en verre de 10 mL
- 4 fioles d'Erlenmeyer propres non stériles
- 1 burette + pot de récupération
- pHmètre

#### Manipulation

Sur chaque fiole d'Erlenmeyerensemencée :

- mesurer le pH à l'aide d'un pHmètre étalonné au préalable ;
- prélever 10 mL du contenu de la fiole et les introduire dans une fiole d'Erlenmeyer propre ;
- ajouter 10 gouttes de phénolphaléine ;
- verser à la burette la soude Dornic (1/9 mol.L<sup>-1</sup>) jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistant pendant une dizaine de secondes.

**Données**

- L'acidité est exprimée en degré Dornic D°, c'est-à-dire en décigrammes d'acide lactique par litre et le degré Dornic corrigé est  $D^{\circ}_{\text{corrigé}} = D^{\circ} - D_{\text{to}}$ .

Calcul du degré Dornic :  $D^{\circ} = 10 \times V_{\text{soude}}$  (avec  $V_{\text{soude}}$  exprimé en mL)  
 $M_{\text{acide lactique}} = 90 \text{ g.mol}^{-1}$

- L'activité spécifique acidifiante est exprimée en unités acidifiantes.  
1 U acidifiante correspond à 150 mmoles d'acide lactique produit en 3 heures dans du lait par gramme de ferments.
- La concentration de la préculture Yalacta est de 0,7 g.L<sup>-1</sup>

**Annexe 1**

**Les bactéries lactiques**

**1. Définitions - Caractéristiques communes**

Les bactéries lactiques ont un caractère biochimique commun : elles produisent toutes de l'acide lactique (en plus ou moins grande proportion) lors d'une fermentation anaérobie des glucides, en particulier du lactose du lait. Par contre, elles présentent des différences importantes dans leur morphologie.

**1.1. Caractères bactériologiques**

<b>MORPHOLOGIE</b>	<b>Gram</b>	+	certaines se décolorent facilement (Gram « variable »)
	<b>Forme</b>	variée : <b>coques, bacilles</b> (longs et fins, plus épais, bifides...)	
	<b>Autre</b>	<b>apsorulées</b>	
<b>CULTURE</b>	<b>Type respiratoire</b>	<b>anaérobie</b> : bactéries anaérobies strictes, anaérobies aérotolérantes, microaérophiles	
	<b>Exigence</b>	<b>polyauxotrophie</b> = nombreuses exigences nutritionnelles (AA, vitamines, acides gras, bases azotées) : elles ne peuvent croître qu'en milieu riche (lait, produits laitiers, viandes, végétaux en décomposition) → les milieux utilisés en laboratoire sont spécifiques pour répondre à ces besoins (milieu MRS, gélose enrichie au lait...)	
	<b>pH</b>	<b>acidophiles</b> : la plupart ne cultivent pas à pH > 6, et la croissance continue souvent à pH < 5 (pH souvent atteint suite à la production d'acide lactique). → leur croissance peut être suivie par mesure du pH au cours du temps	
<b>BIOCHIMIE</b>	<b>Catalase</b>	-	Elles sont incapables de synthétiser les molécules constituant la catalase ou les cytochromes des chaînes respiratoires, ce qui explique leur caractère principalement <b>anaérobie</b> . Certaines peuvent cependant être <b>aérotolérantes</b> parce qu'elles disposent de moyens de défense contre les peroxydes engendrés par l'action de l'oxygène et de ses dérivés : flavoprotéines (NADH peroxydase, NADH oxydase) et SOD (super-oxyde dismutase).
	<b>Cytochrome (oxydase)</b>	-	
	<b>Autre</b>	<b>activité protéolytique</b> : exoenzymes (protéases et peptidases) liées à la paroi bactérienne → fabrication du fromage et des produits laitiers : coagulation du lait, affinage des fromages (développement des saveurs).	
	<b>Métabolisme</b>	<b>strictement fermentaire</b> : production d'acide lactique	

## 1.2. Fermentation lactique

La fermentation lactique est la transformation d'un glucide (souvent le lactose, mais aussi le glucose) en acide lactique via le pyruvate. Il existe cependant plusieurs types de fermentations lactiques en raison des voies empruntées et des produits secondaires également synthétisés en proportions variables selon les souches.

### 1.2.1. Homofermentation et hétérofermentation

On peut distinguer les fermentations homo- et les hétérolactiques en fonction du pourcentage du lactate produit par rapport aux autres composés. On distingue alors :

- Les bactéries **HOMOFERMENTAIRES** qui réalisent la fermentation **homolactique**. Cette fermentation est effectuée à pH acide par toutes les espèces des genres bactériens suivants *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Microbacterium*, par beaucoup de *Lactobacillus*, certains *Bacillus* et quelques moisissures (Phycomycètes).
- Les bactéries **HETEROFERMENTAIRES** qui réalisent la fermentation **hétérolactique**. Elle s'observe chez les bactéries lactiques du genre *Leuconostoc* et certaines espèces du genre *Lactobacillus*, ainsi que chez la moisissure *Rhizopus oryzae* chez laquelle elle se réalise essentiellement en aérobiose.

### 1.2.2. Acidification et croissance

Grâce à la capacité de ces bactéries d'acidifier le milieu lorsqu'elles produisent de l'acide lactique, on peut établir leur courbe de croissance par dosage de l'acidité produite au cours du temps.

L'aptitude d'un ferment lactique à réaliser la fermentation lactique peut être mesurée par :

- la vitesse de l'acidification produite par ce ferment.
- le maximum d'acidité qu'il peut produire, avant de s'inhiber lui-même (autoantibiose).

## 2. Les différentes bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont réparties en « 3 groupes », en fonction de leurs principaux rôles et de leurs caractéristiques. D'autres bactéries lactiques n'appartiennent à aucun de ces groupes, mais sont tout de même considérées comme bactéries lactiques en raison de l'acide lactique qu'elles produisent (en plus faible quantité cependant)

	GENRE OU ESPECE	ROLES PRINCIPAUX
1 <sup>ER</sup> GROUPE	<i>Lactococcus</i>	- Lactose → Lactate (homofermentation) → acidification du milieu → conservation-protection - Production d'arômes (diacétyle : qualités organoleptiques)
	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	- Thermorésistance (uniquement <i>S. thermophilus</i> )
2 <sup>IEME</sup> GROUPE	<i>Lactobacillus</i>	- Acidification plus lente mais plus poussée et durable (conservation) : acidophiles - Production d'arômes (acétaldéhyde) - Protéolyse et lipolyse (transformation des matières premières du lait et des produits laitiers) - Probiotiques
3 <sup>IEME</sup> GROUPE	<i>Leuconostoc</i>	- Acidification + arômes (hétérofermentaires) - Fromages (dextranes, gaz = texture), beurre (diacétyle = arômes)... - Parfois responsables de dégradations nuisibles (produits sucrés et acides : bière, cidre)
	<i>Pediococcus</i>	- Souvent responsables d'altération en brasserie
Autres	<i>Bifidobacterium</i>	- Peu d'acide lactique, mais beaucoup d'acide acétique (fermentation acétolactique) - Probiotiques
	<i>Aerococcus</i> , <i>Brochothrix</i> , <i>Oenococcus...</i>	Autres productions mineures (affinage...)

### Principales espèces de bactéries lactiques utilisées dans les IAA

Genre	Espèce	Type fermentaire	Isomère lactate	T° de croissance	Domaines d'utilisation
<b>Lactococcus</b>	<i>lactis lactis</i>	Homo	L	10-40°C	Fromages, laits et crèmes fermentés
	<i>lactis cremoris</i>	Homo	L	10-40°C	
	<i>lactis diacetylactis</i>	Homo	L	10-40°C	
<b>Streptococcus</b>	<i>salivarius thermophilus</i>	Homo	L	40-45°C	Laits fermentés, fromages
<b>Leuconostoc</b>	<i>mesenteroides mesenteroides</i>	Hétéro (O)	D	10-30°C	Fromages, laits et crèmes fermentés
	<i>mesenteroides cremoris</i>	Hétéro (O)	D	10-30°C	
	<i>oenos</i>	Hétéro (O)	D	12-37°C	Vins
<b>Pediococcus</b>	<i>pentosaceus</i>	Homo	DL	25-35°C	Saucissons, ensilage
	<i>acidilactici</i>	Homo	DL	35-50°C	
<b>Lactobacillus</b>	<i>delbrueckii bulgaricus</i>	Homo	D	45-50°C	Laits fermentés, fromages
	<i>helveticus</i>	Homo	DL	45-50°C	Fromages
	<i>acidophilus</i>	Homo	DL	35-45°C	Probiotiques
	<i>casei casei</i>	Hétéro (F)	L	15-40°C	Fromages
	<i>casei rhamnosus</i>	Hétéro (F)	L	15-45°C	Probiotiques
	<i>plantarum</i>	Hétéro (F)	DL	15-40°C	Saucissons, pains, ensilage, probiotiques
	<i>sake</i>	Hétéro (F)	DL	5-40°C	Viandes, saucissons
	<i>curvatus</i>	Hétéro (F)	DL	5-40°C	
<i>brevis</i>	Hétéro (F)	DL	15-40°C	Saucissons, pains, kéfir	

Homo = homofermentaire (homolactique)

Hétéro (F) = hétérofermentaire facultatif (homolactique + hétérolactique)

Hétéro (O) = hétérofermentaires obligatoires (hétérolactique)

## Annexe 2

### Les contrôles du lait et des produits laitiers

#### 1. Contrôles de qualité sanitaire

Pour être propres à la consommation, le lait et les produits laitiers doivent être exempts de microorganismes et/ou de toxines dangereux pour la santé publique.

La qualité sanitaire du produit est aussi fixée par des normes ou des critères. Les contrôles sanitaires permettent ainsi de vérifier que le produit est conforme à ces normes.

Le contrôle sanitaire des vaches laitières permet de prévenir les problèmes liés à une mauvaise qualité microbiologique du lait.

Ces contrôles permettent de numérer :

- la flore mésophile aérobie revivifiable
- des germes témoins de contamination fécale :
- des germes pathogènes (*Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus aureus*...)

#### 2. Contrôles de qualité générale ayant un intérêt économique ou industriel

##### Critères réglementés

Ces contrôles intègrent :

- la qualité physique du lait : le lait doit être exempt de toute impureté
- la qualité chimique du lait :
  - détermination de la teneur en matières grasses en g.L<sup>-1</sup> (supérieure à 38 g.L<sup>-1</sup>)
  - détermination de la teneur en protéines en g.L<sup>-1</sup> (supérieure à 32 g.L<sup>-1</sup>)
- la qualité bactériologique du lait : la flore aérobie mésophile doit être la plus faible possible
- d'autres critères biologiques ou biochimiques :
  - numération cellulaire du lait : numération des leucocytes qui sont des indicateurs de mammites, témoins de l'état inflammatoire de la mamelle et donc indirectement de la présence d'infection.
  - absence d'inhibiteurs : essentiellement recherche d'antibiotiques (pénicilline), ou encore d'inhibiteurs de fermentation (antiseptiques...)

#### 3. Contrôles de fabrication en fromagerie

En fromagerie, les microorganismes sont utilisés comme agents de fabrication. Ces contrôles ont pour but de déterminer le nombre et l'activité des microorganismes suivants :

- la flore lactique : *Lactococcus*, *Lactobacillus*
- les germes gazogènes provoquant l'ouverture des fromages : *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, *Lactobacilles* hétérofermentaires
- le contrôle de maturation : flores caséolytique et lipolytique
- le contrôle des levains lactiques : coloration de Gram, activité.

## Annexe 3

### Milieux de culture pour bactéries lactiques

#### GÉLOSE M 17

##### DOMAINE D'APPLICATION

- Utilisée pour la croissance et le dénombrement des lactocoques dans les produits laitiers.
- Permet également l'étude de la sensibilité de ces bactéries aux bactériophages.
- Utilisée pour la pousse et la conservation des cultures de départ dans les fabriques de fromages et yaourts, car elle empêche leur production d'acide dans le lait à 30°C et à 22°C.
- Bien adapté pour le dénombrement sélectif de *S. thermophilus* dans les yaourts, suivant la méthode officielle adoptée par la Fédération Internationale Laitière, car la forte concentration de glycérophosphate disodique entraîne la suppression de *Lactobacillus bulgaricus*
- Recherche des streptocoques mutants incapables de fermenter le lactose (ces souches mutantes lac – donnent des colonies plus petites que celles fermentant le lactose).

##### COMPOSITION (grammes/litre)

Tryptone	5,0
Peptone de soja	5,0
Infusion de viande	5,0
Extrait de levure	2,5
Acide ascorbique	0,5
Sulfate de magnésium	0,25
Glycérophosphate disodique	19,0
Agar	11,0
pH 6,9 ± 0,2	

La gélose M 17 est basée sur la formule décrite par Terzaghi et Sandine.

500 grammes permettent de préparer 10,4 litres de milieu.

## PRINCIPE & ANALYSE

Les lactocoques sont exigeants et demandent des milieux nutritifs complexes pour une croissance optimale. Ils produisent naturellement une homofermentation acide qui nécessite un milieu bien tamponné pour que le pH reste < 5,7 pendant leur croissance. Le maintien du pH est important, car une baisse de ce dernier peut léser les germes et réduire ainsi le nombre de bactéries recherchées.

- Extrait de levure : source de vitamines du groupe B.
- Acide ascorbique (vitamine C) : stimulateur de croissance.
- Glycérophosphate disodique : pouvoir tampon suffisant même après 24 heures à 30°C.  
Cet agent tampon permet aussi d'ajouter du calcium dans le milieu sans précipitation du complexe formé. Le calcium est utile pour rechercher les bactériophages.

## UTILISATION

- Dénombrement des lactocoques et streptocoques thermophiles : dans la masse à partir de dilutions décimales. L'incubation dépend du microorganisme : 37°C-78h pour *S. thermophilus*, 30°C-48 à 72h pour les lactocoques.
- Recherche de bactériophages

## LECTURE & CONFIRMATION DES RÉSULTATS

Les colonies isolées à partir de produits laitiers suspectées d'être *Streptococcus thermophilus* (1 à 2 mm de diamètre) peuvent être confirmées par la coloration de Gram (cocci Gram+) et la recherche de catalase (négative).

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Contrôle positif : *Streptococcus thermophilus* ATCC® 14486

Contrôle négatif : *Lactobacillus bulgaricus* ATCC® 11842

## GÉLOSE MRS (De Man, Rogosa, Sharpe)

### DOMAINE D'APPLICATION

- Utilisée pour la culture et le dénombrement sélectif des lactobacilles dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires.
- Permet une pousse abondante de toutes les souches de lactobacilles.
- Particulièrement adaptée à la croissance lente de *L. brevis* et *L. fermentum*.
- Permet également le dénombrement de *L. bulgaricus* dans les yaourts.

### COMPOSITION (grammes/litre)

Peptone	10,0
Extrait de viande de boeuf	8,0
Extrait de levure	4,0
Glucose	20,0
Tween 80	1,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2,0
Acétate de sodium 3 H <sub>2</sub> O	5,0
Citrate d'ammonium	2,0
Sulfate de magnésium 7 H <sub>2</sub> O	0,2
Sulfate de manganèse 4 H <sub>2</sub> O	0,05
Agar	10,0
pH 6,9 ± 0,2	

La formule du milieu MRS a été mise au point par De Man, Rogosa et Sharpe afin de remplacer un produit variable (jus de tomate).

500 grammes permettent de préparer 8 litres de milieu.

## PRINCIPE & ANALYSE

Cette formule (qui existe aussi en bouillon) permet de fournir un milieu propice au bon développement des lactobacilles très auxotrophes, y compris des souches poussant faiblement sur les milieux existants. Le milieu MRS est supérieur au milieu au jus de tomate et à l'extrait de viande de De Man, qu'il a remplacé.

Généralement, les bactéries lactiques poussent tardivement en donnant de plus petites colonies que les autres microorganismes, qui peuvent envahir les milieux non sélectifs, surtout lors d'incubation de 2 à 4 jours.

- Extrait de levure : source de vitamines du groupe B.
- Tween 80 (mélange d'esters oléiques) : source d'acides gras indispensables.
- Acétate de sodium, citrate d'ammonium : inhibiteurs du développement des contaminants (streptocoques, moisissures).

Le pH du milieu peut servir de moyen de sélection puisque les *Lactobacillus* tolèrent un pH plus bas que les *Streptococcus*, les *Pediococcus* et *Leuconostoc*

## UTILISATION

- Les lactobacilles sont microaérophiles : technique en double-couche en milieu solide.

- Atmosphère humide adéquate au-dessus de la gélose : elle ne doit pas sécher lors de l'incubation (ceci concentrerait les facteurs sélectifs en surface et rendrait le milieu inhibiteur).
- Le CO<sub>2</sub> stimule la croissance des germes : boîtes incubées sous 5 % de CO<sub>2</sub>.
- L'incubation dépend du microorganisme : 42°C-48h pour les thermophiles comme *L. bulgaricus*, 37°C-48h pour les mésophiles, 25°C-72h pour les psychrophiles...

### LECTURE & CONFIRMATION DES RÉSULTATS

Les colonies obtenues en profondeur ou en surface peuvent être rugueuses ou lisses ; elles sont petites, opaques et plus ou moins blanches : confirmer les colonies suspectes par coloration de Gram.

Les prélever en bouillon MRS : il ne permet pas aux autres germes, initialement inhibés sur gélose sélective (mais présents), de se multiplier. Incuber les tubes de bouillon à la même température et pendant le même temps que pour la gélose MRS, puis confirmer l'identification des germes isolés par examen microscopique et repiquage sur gélose MRS.

Le bouillon MRS peut être utilisé pour d'autres tests d'identification des *Lactobacillus* : température de croissance, croissance en présence de 4 % de NaCl, etc...

### CONTRÔLE DE QUALITÉ

Contrôle positif : *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 19992

Contrôle négatif : *Staphylococcus aureus* ATCC® 2592

## Annexe 4

### Détermination de la teneur en protéines du lait cru

Les protéines sont dosées, en pratique courante, par la méthode colorimétrique au noir amido. Pour étalonner la méthode, on utilise des échantillons de lait dont les teneurs en protéines ont été déterminées par la méthode de référence : la méthode de Kjeldahl.

Après dosage de l'azote total du lait, le taux d'azote peut être converti en taux de protéines, par l'application d'un coefficient multiplicateur conventionnel de 6,38 g de protéines/g d'azote.

#### Principe de la méthode de Kjeldahl :

On transforme l'azote à doser en sulfate d'ammonium par minéralisation en milieu acide et oxydant (acide sulfurique concentré) à chaud, en présence de catalyseurs. Le minéralisat est alcalinisé pour déplacer l'ammoniac que l'on entraîne à la vapeur. On recueille l'ammoniac à la sortie de l'automate d'entraînement à la vapeur dans une solution acide en excès.

L'excès d'acide est dosé par une base titrée, en présence d'un indicateur coloré.

#### Mode opératoire

##### 1. Minéralisation : (déjà réalisée)

La minéralisation a été réalisée préalablement sur une prise d'essai de 5 mL de lait ( $E_{\text{lait}}$ ) à laquelle 5 à 6 g de catalyseur ont été ajoutés, 15 mL d'acide sulfurique concentré et 2 g de sulfate de potassium. Le minéralisat obtenu est présenté dans le récipient de minéralisation (matras).

Y ajouter 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine.

##### 2. Alcalinisation du minéralisat et déplacement de l'ammoniac : 2 essais

Ces opérations sont réalisées par entraînement à la vapeur d'eau ; le « distillat » est recueilli dans une solution d'acide sulfurique en excès.

Introduire dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL :

- $E_E = 25$  mL de solution d'acide sulfurique à environ 0,05 mol.L<sup>-1</sup>
- 25 mL environ d'eau distillée

L'alcalinisation et l'entraînement à la vapeur sont réalisés par un automate.

##### 3. Dosage de l'excès d'acide sulfurique

Doser l'acide sulfurique en excès par une solution d'hydroxyde de sodium titrée, de concentration exacte de 0,100 mol.L<sup>-1</sup>, en présence de rouge de méthyle (noter  $V_E$  le volume versé).

##### 4. Témoin

Dans une fiole d'Erlenmeyer, introduire :

- $E_T = 10$  mL de la solution d'acide sulfurique à environ 0,05 mol.L<sup>-1</sup>
- 50 mL d'eau distillée
- quelques gouttes d'indicateur (rouge de méthyle)

Doser par la solution d'hydroxyde de sodium (noter  $V_T$  le volume versé).

#### Données

CV de répétabilité = 1,5 %

Incertitude type composée 2%

$$\frac{C_{\text{soude}}}{E_{\text{lait}}} \left( \frac{V_T E_E}{E_T} - V_E \right) M_N = C_{\text{massique azote dans le lait}}$$

**Résultats** :  $V_T = 9,60 \text{ mL}$ ,  $V_{E1} = 7,20 \text{ mL}$ ,  $V_{E2} = 7,10 \text{ mL}$

## Annexe 5

### Contrôle de l'absence d'inhibiteurs dans un lait par la méthode de Galesloot et Hassing

La pénicilline ou l'ampicilline sont des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines fréquemment utilisés en médecine vétérinaire, notamment pour le traitement des mammites des vaches. Ils peuvent ainsi se retrouver dans le lait de la vache traitée.

Un lait contenant des antibiotiques est impropre à la consommation humaine (sélection de souches résistantes, bouleversement de la flore commensale, réactions allergiques). Il est donc nécessaire de pouvoir détecter la présence d'antibiotiques dans le lait.

#### Mode opératoire

- Incorporer 1 mL de la souche sensible à la pénicilline (*Bacillus stearothermophilus*) à 5 mL de milieu Mueller-Hinton en surfusion à 45°C : opérer dans le tube de gélose.
- Bien homogénéiser puis couler dans une boîte de Pétri stérile.
- Laisser solidifier.
- Répartir 6 disques de papier filtre stériles à la surface de la boîte
- Déposer sur chaque disque 10  $\mu\text{L}$  de lait ou d'eau de manière à avoir :
  - 1 disque d'eau distillée
  - 1 disque avec le lait témoin à 0,02  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de pénicilline
  - 4 disques de lait à analyser : E1, E2, E3, E4
- Préparer une chambre humide : entourer la boîte de Pétri avec du papier absorbant préalablement imbibé d'eau et envelopper le tout dans du papier d'aluminium.
- Incuber (boîte à l'envers) à 55°C pendant 24h.

**Donnée** : les laits testés présentant un diamètre d'inhibition supérieur ou égal à celui du témoin sont considérés comme positifs.

## Annexe 6

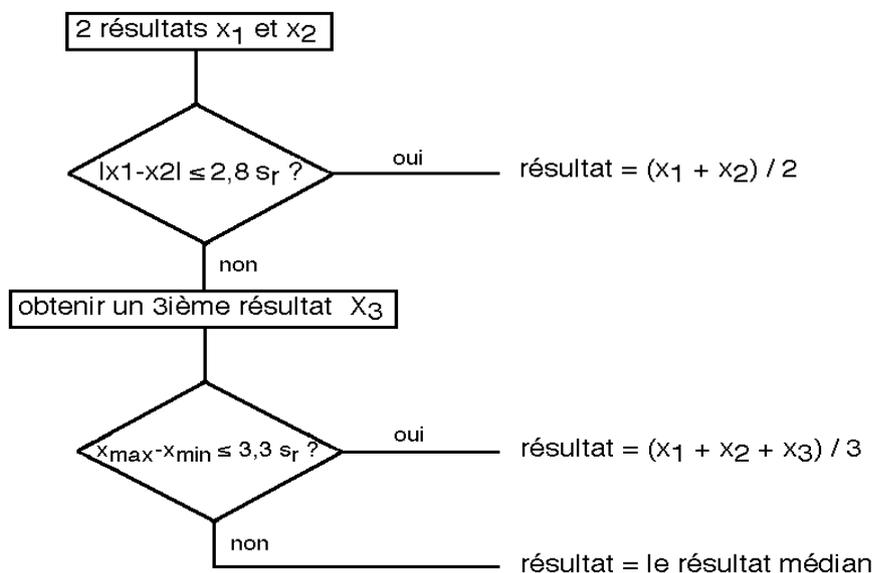
### Indications sur la prévention du risque chimique

Produits non dilués	Pictogrammes	Mentions d'avertissement	Mentions de danger	Conseils de prudence
Lessive de soude		Danger	H314	P280 P301+P330+P331 P305+P351+P338 P309+P310
Acide sulfurique concentré		Danger	H314	P280 P301+P330+P331 P305+P351+P338 P309+P310

## Annexe 7

### Acceptabilité et expression des résultats

#### Logigramme



#### Expression du résultat

Le dernier chiffre significatif du résultat sera à la même position décimale que le dernier chiffre significatif de l'écart type de répétabilité.

### Sujet 3

<b>SEQUENCE</b>	<b>Sensibilité à un agent antimicrobien et cytotoxicité sur des cellules en culture</b>
<b>SEANCE</b>	<b>Introduction à la cytotoxicité sur des cellules eucaryotes</b>
<b>NIVEAU D'ENSEIGNEMENT</b>	<b>BTS Bio-Analyses et Contrôles</b>
<b>Manipulations proposées</b>	<b>Matière d'œuvre</b>
<p>Evaluation de la cytotoxicité immédiate d'un désinfectant fongicide sur une souche de <i>Candida albicans</i> par détermination de la viabilité cellulaire (<b>Protocole 1</b>)</p> 	<p>Solution désinfectante fongicide notée « F »            Suspension de <i>Candida albicans</i> ajustée à une absorbance de 0,1 à 600 nm en eau physiologique notée « C »            Hématimètre de Malassez            Bleu de Funk</p>
<p>Quantification de l'effet inhibiteur d'une solution désinfectante fongicide sur une souche de <i>Candida albicans</i> (<b>Protocole 2</b>)</p> 	<p>Solution désinfectante fongicide notée « F »            Culture de 48h de <i>Candida albicans</i> en bouillon Sabouraud notée « D »            Bouillon Sabouraud stérile noté « Sabouraud »            Microplaque 96 puits stérile            Résultat d'un essai préalable : plaqueensemencée et incubée selon le même protocole notée « F<sub>E0</sub> »</p>
<p>Evaluation de la cytotoxicité de la subtilisine sur des hématies de mouton par recherche d'une hémolyse (<b>Protocole 3</b>)</p>	<p>Solution de subtilisine à 0,40 g.dm<sup>-3</sup> notée « S »            Hématies de mouton notées « GRM »            Tampon isotonique noté « Tp »            Solution hémolysante notée « Sol hem »            Microplaque 96 puits</p>
<b>Ressources documentaires fournies</b>	
<p>Evaluation de la cytotoxicité immédiate d'un désinfectant fongicide sur une souche de <i>Candida albicans</i> par détermination de la viabilité cellulaire (<b>Protocole 1</b>)            Quantification de l'effet inhibiteur d'une solution désinfectante fongicide sur une souche de <i>Candida albicans</i> (<b>Protocole 2</b>)            Evaluation de la cytotoxicité de la subtilisine sur des hématies de mouton par recherche d'une hémolyse (<b>Protocole 3</b>)            Présentation de l'hématimètre de Malassez (<b>Annexe 1</b>)            Fiche technique : décontamination de l'hématimètre de Malassez (<b>Annexe 2</b>)            Action antimicrobienne (<b>Annexe 5</b>)            Eléments de toxicologie cellulaire (<b>Annexe 6</b>)</p>	
<b>Protocoles ou résultats expérimentaux (manipulations non réalisables)</b>	
<p>Protocole et résultats d'une préparation de la suspension de levures ajustée à une absorbance de 0,1 à 600 nm (<b>Annexe 3</b>)            Protocole de dénombrement de levures dans la masse d'une gélose Sabouraud chloramphénicol (<b>Annexe 4</b>) et résultats expérimentaux (<b>Boîtes notées 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup></b>)            Résultats de la détermination de la CMI de l'antifongique testé sur une souche de <i>Candida albicans</i> (<b>Plaque notée « F<sub>E0</sub> »</b>)</p>	

## Protocole 1

### **Evaluation de la cytotoxicité immédiate d'un désinfectant fongicide sur une souche de *Candida albicans* par détermination de la viabilité cellulaire**

#### **Objectif**

Mesurer l'effet cytotoxique du désinfectant fongicide F dilué au 1/10 sur la viabilité des cellules de *Candida albicans*, après une durée d'exposition de 1 h à 30 °C.

#### **Produit, matériel et réactifs**

- Tube de solution désinfectante fongicide « F » à tester
- Suspension de *Candida albicans* ajustée à une absorbance de 0,1 à 600 nm en eau physiologique notée « C »
- 2 tubes à hémolyse stériles
- 2 tubes à hémolyse non stériles
- Tube d'eau physiologique stérile
- Pipettes automatiques et cônes stériles adaptés
- Etuve à 30°C
- Hématimètre de Malassez et lamelle planée
- Bleu de Funk
- Compteur de cellules
- Papier essuie tout
- Cuvette avec support pour nettoyage-désinfection de l'hématimètre
- Jeu de pissettes : eau distillée, détergent, eau de Javel à 0,4% de chlore actif et alcool
- Conteneur pour DASRI
- Présentation de l'hématimètre de Malassez (**Annexe 1**)
- Fiche technique : décontamination de l'hématimètre de Malassez (**Annexe 2**)

#### **Protocole**

- Réaliser, dans un tube à hémolyse, une dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la solution désinfectante fongicide dans la suspension de levures ajustée sous un volume de 1 mL.
- Prévoir un témoin dans un autre tube.
- Incuber les tubes 1 h à 30°C.
- Réaliser, sur chaque tube, un dénombrement des levures viables et mortes à l'hématimètre après dilution au 1/2 dans le bleu de Funk.

Donnée : le bleu de Funk est un colorant expulsé activement par les cellules vivantes.

#### **Résultats obtenus avec une solution antifongique de référence**

	<b>Témoin</b>	<b>Test</b>
<b>% viabilité</b>	95%	30%

## Protocole 2

### **Quantification de l'effet inhibiteur d'une solution désinfectante fongicide sur une souche de *Candida albicans***

#### **Objectif**

Déterminer la CMI en milieu liquide d'une solution désinfectante fongicide sur une souche de *Candida albicans* par microméthode.

### Produit, matériel et réactifs

- Tube de solution désinfectante fongicide « F » à  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  à tester
- Culture de 48 heures de *Candida albicans* en bouillon Sabouraud à environ  $10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$  notée « D »
- Microplaque 96 puits à fond rond stérile
- Pipettes automatiques et cônes stériles adaptés
- Pipette stérile de 2 mL et dispositif d'aspiration
- Conteneur pour DASRI
- Etuve à  $30^\circ\text{C}$
- Bouillon de Sabouraud stérile noté « Sabouraud »
- Tubes à hémolyse stériles
- Agitateur vibrant
- Résultats d'un essai préalable sur la même solution désinfectante : plaqueensemencée et incubée selon le même protocole notée «  $F_{E0}$  »
- Miroir inversé

### Protocole

- Réaliser une série de dilutions de raison 2 de la solution « F », en bouillon Sabouraud stérile, sous un volume final de  $100 \mu\text{L}$  dans 10 puits successifs de la microplaque.
- Prévoir un témoin de culture dans le puits n°11.
- Déposer, dans chaque puits,  $10^3 \text{ UFC}$  de *Candida albicans* apportées par un volume de  $100 \mu\text{L}$ .
- Homogénéiser par tapotement ou sur agitateur vibrant.
- Mettre à incuber à  $30^\circ\text{C}$  durant 24 heures.

### Résultats

- Plaqueensemencée et incubée selon le même protocole notée «  $F_{E0}$  »

### Donnée

- CMI obtenue avec un antifongique de référence :  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$

### Protocole 3

#### Evaluation de la cytotoxicité de la subtilisine (\*) sur des hématies de mouton par recherche d'une hémolyse

##### Objectif

Evaluer l'effet cytotoxique de solutions de subtilisine, provenant d'une solution de déprotéinisation de lentilles de contact, à différentes concentrations sur des hématies de mouton (GRM) par observation de l'hémolyse obtenue après une incubation de 30 minutes à 37°C.

##### Matériel et réactifs

- Suspension de globules rouges de mouton à 2 % (v/v) dans un tampon isotonique notée « GRM »
- Solution de subtilisine à 0,40 g.dm<sup>-3</sup> notée « S »
- Tampon isotonique notée « Tp »
- Solution hémolysante notée «Sol hém»
- Microplaque 96 puits à fond rond
- Pipettes automatiques et cônes stériles adaptés
- Etuve à 37°C.

##### Protocole

- Réaliser, dans la ligne A de la microplaque, une série de dilutions, en tampon isotonique, de la solution de subtilisine « S » de raison 2, depuis la dilution 1/2 jusqu'à la dilution 1/2048 sous un volume final de 100 µL.
- Utiliser la ligne B pour les témoins :
  - o B<sub>1</sub> pour le témoin 0 % d'hémolyse : 100 µL de tampon
  - o B<sub>2</sub> pour le témoin 50 % d'hémolyse : 125 µL de tampon
  - o B<sub>3</sub> pour le témoin 100 % d'hémolyse : 100 µL de solution hémolysante
- Délivrer 50 µL de la suspension de GRM à 2 % homogène dans chaque puits de la ligne A.
- Réaliser également les dépôts nécessaires pour les témoins.
- Agiter la plaque 2 minutes sur agitateur vibrant.
- Recouvrir la plaque avant de l'incuber 30 minutes dans l'étuve à 37°C.
- Sortir la plaque et la laisser sédimenter à température ambiante pendant une heure.
- Réaliser la lecture.

**Remarque :** pour le témoin «50 % d'hémolyse», il faut obtenir, après sédimentation, un culot de GRM égal à 50 % de celui du témoin 0 %.

(\*) Subtilisine : exoenzyme produite par *Bacillus subtilis* à activité sérine protéase.

##### Lecture

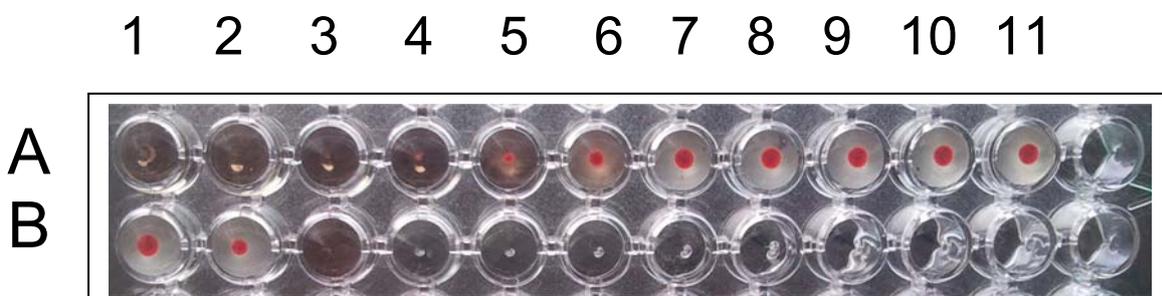
- o Observer les culots des différents puits au miroir de lecture.
- o Evaluer le pourcentage d'hémolyse en adoptant le système de lecture suivant :
  - 0 % : culot de sédimentation maximum, surnageant très clair
  - 50 % : culot correspondant à celui du témoin 50 % d'hémolyse
  - 100 % : culot identique à celui du témoin 100% c'est-à-dire culot minime, surnageant très rouge
  - pour les cas intermédiaires des hémolyses partielles :
    - taille du culot entre celui de 0 et 50 % : « 25 % »,
    - taille du culot entre celui de 50 et de 100 % : « 75 % ».

##### Remarque importante :

Pour le témoin 50 % réalisé, seul l'aspect du culot de globules rouges doit être pris en compte. Ce témoin, s'il a été réalisé conformément aux instructions, ne doit pas présenter d'hémolyse.

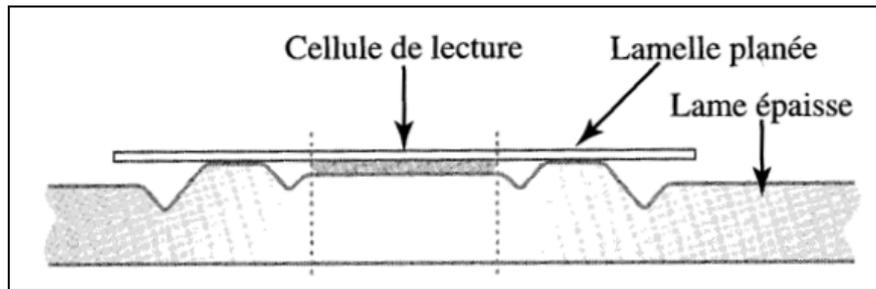
##### Donnée

Photographie d'une plaque réalisée dans les mêmes conditions avec une solution de subtilisine de référence :

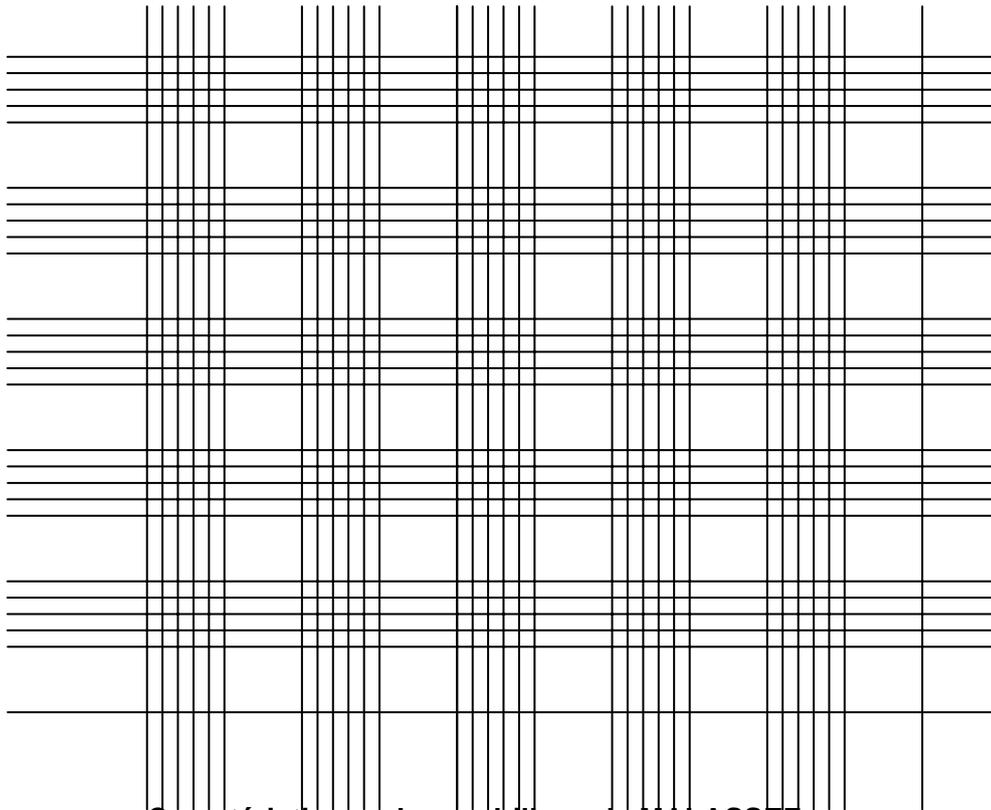


**Annexe 1**  
**Présentation de l'hématimètre de Malassez**

Coupe transversale de l'hématimètre :



Présentation du quadrillage :



**Caractéristiques du quadrillage de MALASSEZ**

Surface  $2,5 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} = 5 \text{ mm}^2$

Profondeur  $1/5 \text{ mm}$

Soit un volume total de la cellule de numération  $V_C = 1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{L}$

Le quadrillage comprend 100 rectangles (r) d'un volume  $V_r = 1/100 \text{ mm}^3 = 0,01 \mu\text{L}$

## Annexe 2

### Décontamination de l'hématimètre de Malassez (source : 3RB)

#### Matériel et produit

- Cuvette pour recueillir les effluents munie d'un support de lame
- Détergent
- Désinfectant (eau de Javel fraîchement diluée au 1/7, soit à 0,4 % de chlore actif ou 1,2 degrés chlorométriques)
- Eau
- Ethanol

#### Protocole de décontamination

- Placer, immédiatement après utilisation, l'hématimètre sur un support fixé sur une cuvette.
- Recouvrir de détergent en veillant à ce que ce dernier pénètre également sous la lamelle afin de détacher les protéines du verre.
- Rincer abondamment à l'eau.
- Recouvrir alors l'hématimètre par de l'eau de Javel diluée à 0,4% de chlore actif fraîchement préparée.
- Laisser agir 5 minutes.
- Rincer abondamment à l'eau.
- Rincer éventuellement à l'éthanol pour un meilleur séchage.
- Essuyer soigneusement hématimètre et lamelle à l'aide d'un papier non pelucheux.
- Éliminer les effluents à l'évier.

## Annexe 3

### Protocole de préparation d'une suspension de levures ajustée

#### Objectif

Préparer une suspension de *Candida albicans* calibrée, par ajustage à une absorbance de 0,1.

#### Produit, matériel et réactifs

- Culture de 48 heures de *Candida albicans* en bouillon Sabouraud
- 1 tube de bouillon Sabouraud stérile
- 1 tube d'eau physiologique stérile
- Tubes à hémolyse stériles
- Pipettes de 1 mL stériles et poire adaptée
- Pipettes automatiques et cônes stériles adaptés
- Cuves pour spectrophotomètre
- Spectrophotomètre
- Carrés de Parafilm®

#### Protocole

- Diluer la suspension mère de levures au ¼ dans une cuve de spectrophotomètre en bouillon Sabouraud.
- Mesurer l'absorbance de cette dilution au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm contre un blanc adapté.
- Calculer l'absorbance de la suspension mère de levures.
- Préparer, dans un tube à hémolyse, une dilution de la suspension mère de *Candida albicans*, en eau physiologique, sous un volume final de 3 mL et ajustée à une absorbance de  $0,1 \pm 0,02$ .
- Contrôler l'absorbance de la suspension calibrée.

Donnée :

limite de linéarité du spectrophotomètre : 0,7

#### Résultats

- Absorbance de la suspension mère diluée au ¼ :  $A = 0,338$
- Absorbance de la suspension calibrée lors du contrôle :  $A = 0,112$

## Annexe 4

### Protocole de dénombrement de levures dans la masse d'une gélose

#### Objectif

Contrôler le dénombrement effectué en cellule de Malassez dans le protocole 1.

#### Produit, matériel et réactifs

- Suspension de *Candida albicans* ajustée à une absorbance de 0,1 à 600 nm en eau physiologique notée « C »
- 5 tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile
- Pipettes de 1 mL stériles et poire adaptée
- 3 boîtes de Pétri stériles
- Flacon de 60 mL de gélose Sabouraud chloramphénicol en surfusion à 55°C
- Etuve à 30°C
- Boîtesensemencées dans les mêmes conditions sur un essai préalable notées  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ .

#### Protocole

- Réaliser une série de dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  de la suspension de *Candida albicans* jusqu'à  $10^{-5}$ .
- Dénombrer les dilutions  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  dans la masse de géloses Sabouraud chloramphénicol avec une double couche.
- Incuber les boîtes 48 h à 30°C.

#### Résultats

- Boîtesensemencées dans les mêmes conditions sur un essai préalable notées  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$

## Annexe 5

### Action antimicrobienne

« ...Les antiseptiques et désinfectants sont capables d'inhiber la croissance des micro-organismes (bactériostase, fongistase, virustase) ou d'avoir une action létale (bactéricidie, fongicidie, virucidie, sporicidie). Certains antiseptiques et désinfectants présentent ces deux modes d'action en fonction des doses. D'autres ont toujours une action létale ou toujours une action bactériostatique ou fongistatique quelle que soit la concentration utilisée... Le mécanisme d'action des produits varie d'une famille d'antiseptiques à l'autre : coagulation des organites intracellulaires, altération de la membrane,...

Selon leur nature et leur concentration, les antiseptiques et désinfectants ont une ou plusieurs cibles à l'intérieur de la cellule. Ils doivent donc traverser la paroi cellulaire pour exercer leur action... »

Source : C.CLIN Paris-Nord

## Principaux agents chimiques utilisés en antiseptie et en désinfection

NOM	FORME UTILISEE	MODE D'ACTION GERMICIDE	UTILISATION - INCONVENIENTS/AVANTAGES
<b>Composés phénoliques</b>	phénol	Dénaturation des protéines Altération des membranes cellulaires	<u>avantages</u> : actifs longtemps après application <u>inconvenients</u> : odeur désagréable, toxicité
<b>Alcools</b>	éthanol isopropanol à 70-80%	Dénaturation des protéines	
<b>Halogènes</b>	iode : - teinture d'iode- iode + éthanol	Oxydation des constituants cellulaires  Protéines cellulaires iodées	<u>inconvenients</u> : risque d'allergie
	iodophores : iode complexé à des transporteurs organiques		<u>avantages</u> : - solubles dans l'eau, non tachants, plutôt stables - brûlures et irritation de la peau réduites <u>utilisation</u> : - antiseptie préopératoire de la peau - désinfectants (hôpitaux, laboratoires) <u>exemples</u> : bétadine et proviodine
<b>Chlores</b>	-gaz (Cl <sub>2</sub> ) -hypochlorite de Ca, de Na	Oxydation des constituants cellulaires	<u>utilisation</u> : - traitement des eaux - désinfection de locaux
<b>Eau oxygénée</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Agent oxydant	
<b>Métaux lourds</b>	-certains métaux -sels de métaux lourds (Ex : sulfate de cuivre)	Dénaturation des protéines	
<b>Ammoniums quaternaires</b>	-savons -détergents	Destructuration de la membrane plasmique	<u>avantages</u> : stables, incolores, inodores <u>utilisation</u> : thérapeutique locale pouvoir antiseptique variable, agents mouillants - <u>anioniques</u> : renforçant l'action d'autres désinfectants - <u>cationiques</u> : désinfectants
<b>Aldéhydes</b>	-formaldéhyde -glutaraldéhyde	Inactivation des protéines	
<b>Gaz stérilisants</b>	-vapeurs de formaldéhyde  - oxyde d'éthylène	Dénaturation des protéines  Blocage de la croissance cellulaire	<u>utilisation</u> : - produits ou objets instables à la chaleur - désinfection de locaux <u>inconvenients</u> : toxiques <u>inconvenients</u> : très toxique

## Spectres d'activité

Désinfectants	Bactéries		Mycobactéries	Spores	Moisissures	Levures	Virus et Phages
	Gram +	Gram -					
Acide peracétique	+++	+++		++	++	++	++
Alcools	++	++		0	++	++	+
Alcools à 70°	++	++	0	+	+	++	+
Aldéhydes : glutaraldéhyde	+++	+++	++	+	+++ (+)	++ (+)	++
Ammoniums quaternaires	+++	+*	0	0	+	+	+
Amphotères	+++	+		0	+	+	0
Biguanidine	++	++		0	(+)	(+)	0
Chlorhexidine	+++	++	+	0	+	+	0
Chlore	+++	+++	++	++	++	++	++
Dérivés mercuriels	++	++	0	0	+	+	
Dérivés phénoliques	Activité variable selon le composé						
Eau oxygénée	+++	+++		+	+	+	0
Iode	+++	+++	++	++	++	++	++

\* : inactif sur *Pseudomonas sp.*

+++ : très bonne activité

++ : bonne activité

+ : activité moyenne

0 : activité nulle

(+) : activité inconstante

## Annexe 6

### **d'après «Éléments de toxicologie cellulaire ou toxicité cellulaire »**

*Thierry Orsière, Irène Sari-Minodier et Alain Botta Faculté de Médecine de Marseille Novembre 2001*

#### **1 - Introduction**

L'étude toxicologique a pour but d'établir le risque encouru par l'homme, avant tout contact (per os, injection, voie cutanée ou respiratoire) avec :

- des agents physiques (rayonnements électro-magnétiques, UV, ionisants...)
- des agents chimiques, qu'il s'agisse d'un médicament, d'un produit chimique, d'un produit cosmétique, d'un pesticide, d'un polluant...

L'étude toxicologique d'une nouvelle molécule fait aujourd'hui appel :

- à des tests in vitro à court terme sur modèles cellulaires et acellulaires: il s'agit alors des études de toxicité cellulaire ou cytotoxicité.
- à des expérimentations in vivo.

#### **2 - Contribution des tests in vitro en toxicologie**

Les tests de cytotoxicité contribuent à l'étude toxicologique d'un agent chimique ou physique dans la mesure où :

- ils sont complémentaires à l'expérimentation animale (un test in vitro ne peut à lui seul remplacer le modèle animal),
- ils permettent de réduire le nombre d'animaux sur lesquels les études d'expérimentations in vivo auront lieu,
- leur coût est limité,
- les réponses sont rapides et relativement fiables,
- ils fournissent des informations précises sur le mécanisme de l'action toxique quant aux interactions moléculaires mises en jeu, au type cellulaire ou organe cible de l'agent toxique et à la cascade des processus biochimiques et/ou physiologiques impliqués,

Ainsi, les batteries de tests in vitro offrent la potentialité de révéler et de caractériser des toxicités de nature très variables.

#### **3 - Cibles biologiques de l'action des toxiques**

Les membranes cellulaires et notamment la membrane cytoplasmique sont les structures cellulaires les plus précocement en contact avec un toxique. Elles peuvent être le siège d'altérations diverses parmi lesquelles les plus fréquentes sont :

- la peroxydation lipidique,
- la perte du contrôle des flux ioniques,
- la perte de la perméabilité sélective de la membrane plasmique.

Les mitochondries sont les organites responsables de l'approvisionnement en énergie de la cellule. A ce niveau, les principales actions des toxiques sont d'inhiber :

- la phosphorylation oxydative,
- la bêta-oxydation des acides gras,
- la respiration cellulaire ayant pour conséquence une chute de concentration en ATP.

Les lysosomes représentent également une cible très concernée par l'action des toxiques. Celle-ci se traduit alors par une inhibition des capacités de dégradation de la cellule.

Le patrimoine génétique peut être altéré par des toxiques qualifiés alors de génotoxiques.

#### **4 - Mécanismes biochimiques impliqués dans la mort cellulaire**

Plusieurs mécanismes jouent un rôle important dans la cascade des événements qui conduisent à la nécrose ou à l'apoptose :

- **l'élévation de la concentration cytosolique en  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}_i$ ) :**
  - le calcium intervient dans la régulation de nombreuses activités cellulaires,
  - une rupture de cette régulation est souvent le premier événement du développement de la toxicité cellulaire,
  - la concentration en  $Ca^{2+}$  est maintenue grâce à un contrôle très strict du transport membranaire et par le maintien des réserves internes situées dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique.
- **la déplétion en ATP et/ou la diminution du rapport ATP/ADP.**

Ces événements sont consécutifs à des atteintes mitochondriales directes ou indirectes et entraînent :

- des troubles concernant toutes les activités cellulaires nécessitant de l'énergie et notamment l'ensemble des réactions biochimiques couplées à une hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi, réactions qui s'inscrivent fréquemment dans le cadre de l'anabolisme,

- un arrêt de la plupart des fonctions cellulaires essentielles,
- une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$ ; par inhibition des ATPases contrôlant l'homéostasie calcique.
- **l'altération de l'état d'oxydoréduction liée à :**
  - l'effondrement du taux de glutathion réduit (GSH), peptide le plus abondant et puissant nucléophile, du fait de sa fonction thiol, jouant un rôle protecteur contre les radicaux libres, les oxydants et les molécules à caractère électrophile ; sa déplétion expose la cellule au stress oxydant,
  - la concentration en GSH, le rapport GSH/GSSG, ainsi que les activités enzymatiques superoxyde dismutase et catalase qui déterminent le statut antioxydant des cellules le GSSG représentant le glutathion oxydé.

## **5 - Approche méthodologique de l'étude d'un toxique**

Le bénéfice lié à l'emploi de ces tests est étroitement lié à la stratégie d'utilisation employée. Une stratégie d'application des tests de cytotoxicité in vitro commune à toute l'industrie pharmaceutique, chimique, cosmétique, etc... repose sur une approche méthodologique qui consiste à procéder aux étapes successives suivantes :

- analyse individuelle d'un composé,
- recueil de toutes les données relatives à celui-ci,
- mise en place d'études mécanistiques in vitro complétées par une expérimentation limitée in vivo ; la mise en place des tests in vitro nécessite :
  - le choix correct des modèles d'études,
  - le choix des approches expérimentales,
  - une interprétation correcte des résultats.

### **5.1 - Choix des modèles expérimentaux**

Il existe trois modèles cellulaires distincts qui sont utilisés dans le cadre des études de cytotoxicité :

- les cellules en culture (en suspension ou en monocouche) ; il s'agit du modèle le plus utilisé du fait de sa commodité de manipulation. Il peut s'agir de lignées cellulaires ou de cellules en primo-culture,
- les organes isolés perfusés,
- les coupes ou tranches d'organe.

Ces modèles sont souvent complémentaires du fait qu'ils présentent différents niveaux d'organisation cellulaire, et sont de ce fait constitués d'une ou de plusieurs populations cellulaires. Ils ont en commun le fait de réaliser in vitro, au moins théoriquement, toutes les fonctions exprimées in vivo, (activités de bio-transformation, systèmes de défense et de réparations, fonctions cellulaires spécifiques). Il est le plus souvent nécessaire d'utiliser des hépatocytes en primo-culture pour détecter les molécules qui ne sont cytotoxiques qu'après bioactivation métabolique.

En complément des différents modèles cellulaires, il existe également un certain nombre de modèles acellulaires présentant un réel intérêt en toxicologie car ils permettent de compléter les informations obtenues à l'aide des modèles cellulaires ou d'atteindre les mécanismes de l'action cytotoxique. Les modèles acellulaires les plus utilisés en toxicologie sont la fraction S9 (ou surnageant 9000g) et des microsomes d'origine hépatique, utilisés comme système de biotransformation des xénobiotiques. Les mitochondries sont utilisées pour analyser les effets des composés sur la chaîne respiratoire, la synthèse d'ATP et la bêta-oxydation des acides gras.

### **5.2 - Critères d'évaluation de la cytotoxicité**

Il existe des critères morphologiques, biochimiques et métaboliques qui révèlent tantôt des altérations non spécifiques, survenant dans différents types cellulaires et indépendantes du(es) mécanisme(s) cytotoxicologique(s) impliqué(s), tantôt des altérations spécifiques. Nous n'aborderons ici que les critères non spécifiques les plus communément utilisés, à savoir :

- la mesure de la croissance cellulaire,
- l'évaluation de l'intégrité cellulaire,
- la détermination de l'activité fonctionnelle cellulaire globale,
- la détermination de l'activité fonctionnelle précise d'un organite.

L'évaluation de la toxicité générale d'un agent physique ou chimique repose sur l'utilisation de :

- lignées cellulaires établies,
- fibroblastes,
- hépatocytes en primo-culture (prise en compte de la bioactivation métabolique),
- cocultures cellules indifférenciées - hépatocytes.

Les tests de toxicité cellulaire peuvent trier un grand nombre de molécules avant l'emploi de tests de toxicité sélective. Pour une étude de tri, un examen morphologique, un paramètre biochimique et/ou un paramètre métabolique sont requis. Il est courant d'établir la  $\text{CI}_{50}$  (concentration d'inhibition 50%), c'est à dire la concentration en toxique qui provoque une modification du paramètre suivi de 50%.

### 5.3 - Évaluation de la cytotoxicité générale

La cytotoxicité générale est donc la recherche d'un effet toxique sur un type cellulaire, le plus souvent peu différencié, par une méthode évaluant un paramètre le plus souvent très général. Le but de cette évaluation consiste en la détermination de la concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) qui pourra ensuite être comparée à la dose létale 50% (DL<sub>50</sub>).

## 6 - Méthodes d'études de la cytotoxicité

Il existe trois grands groupes de méthodes d'études de la cytotoxicité :

- les méthodes fondées essentiellement sur des perturbations de la perméabilité membranaire,
- les méthodes fondées sur des altérations de la prolifération cellulaire,
- les autres méthodes.

Les méthodes fondées essentiellement sur des perturbations de la perméabilité membranaire sont les plus nombreuses et les plus employées. On distingue 2 types de méthodes fondées sur :

- l'utilisation de colorants,
- le "relargage" de molécules biologiques dans le milieu extérieur.

### 6.1 - Méthodes de cytotoxicité utilisant des colorants

Principe : utilisation d'un colorant qui, en fonction de ses caractéristiques, pénètre dans les cellules vivantes OU mortes. La proportion relative des cellules colorées ou non est un reflet exact du nombre de cellules vivantes ou mortes et donc de la viabilité de l'ensemble de la population cellulaire, en relation directe avec la concentration du toxique étudié. Il existe 3 types de colorants :

- les colorants vitaux ou d'exclusion (cellules mortes),
- les colorants supravitaux ou d'inclusion (cellules vivantes),
- les colorants nécessitant une étape de métabolisation (MTT - mesure des capacités métaboliques).

### 6.2 - Méthodes de cytotoxicité basées sur l'altération de la prolifération cellulaire

Principe : tout toxique, en tuant les cellules ou en bloquant le cycle cellulaire, diminue la prolifération de l'ensemble de la population. On distingue 2 grands groupes de méthodes :

- les méthodes de numération qui consistent à dénombrer les cellules à l'aide d'un compteur de particules ou par observation au microscope,
- les méthodes biochimiques, basées sur la détermination semi-quantitative des principaux constituants intracellulaires tels que l'ADN et les protéines, qui sont le reflet du nombre de cellules totales. A ces méthodes s'ajoute l'étude dynamique de l'ADN par incorporation de BrdU dans l'ADN par exemple.

### 6.3 - Autres méthodes de cytotoxicité

Ces autres méthodes sont très nombreuses et très variées tant au niveau de leurs principes que des modes opératoires. A titre d'exemple, nous pouvons citer :

- les méthodes morphologiques, qualitatives, non automatisables,
- les méthodes de pH-métrie quantifiant les modifications du pH du milieu dues à l'arrêt de libération du CO<sub>2</sub> généré par l'activité respiratoire des cellules,
- les méthodes basées sur la détermination quantitative de la charge cellulaire globale en ATP, excellent paramètre de viabilité et de croissance cellulaire,
- les mesures du taux de glutathion réduit,
- la quantification du calcium cytosolique qui apporte des éléments d'information sur les mécanismes précoces d'apparition de la cytotoxicité.

## Sujet 4

<b>SEQUENCE</b>	<b>Production d'eau destinée à la consommation humaine</b>
<b>SEANCE</b>	<b>Etude de la dénitrification d'une eau par action d'un micro-organisme</b>
<b>NIVEAU D'ENSEIGNEMENT</b>	<b>BTS Métiers de l'eau</b>
<b>Manipulations proposées</b>	<b>Matière d'œuvre</b>
<u>Dosage des nitrites dans une eau traitée et une eau non traitée (Protocole 1)</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Échantillon d'eau avant dénitrification</li> <li>• Échantillon d'eau après dénitrification</li> <li>• Solution étalon de nitrites de sodium</li> <li>• Réactif de diazotation</li> </ul>
<u>Identification d'une souche bactérienne</u> Réalisation de frottis coloré(s) par la méthode de Gram ( <b>protocole 2</b> ) Réalisation d'un isolement ( <b>protocole 3</b> ) Réalisation des tests enzymatiques d'orientation 6 ( <b>protocole 4</b> ) Lecture des milieux fournis ensemencés ( <b>Protocole 5</b> ) Fiche technique de la galerie API 20 NE ( <b>Protocole 6</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colorants de Gram, lames</li> <li>• Souche X isolée d'un biofiltre de dénitrification</li> <li>• Gélose trypticase-soja (GTS) en boîtes de Pétri</li> <li>• Réactifs pour la recherche de l'oxydase et de la catalase</li> <li>• Galerie API 20NE</li> <li>• Géloses viande-foie, viande-foie nitraté (VF et VF nitraté) et TS déjà ensemencées avec la souche X, incubées de façon appropriée.</li> <li>• API 20NE déjà ensemencée et incubée selon les préconisations de la fiche technique avec la souche X.</li> </ul>
<b>Ressources documentaires fournies</b>	
Mode d'emploi du spectrophotomètre (à disposition près de l'appareil) Informations sur le danger des produits chimiques ( <b>annexe 1</b> ) Phrases H et P (à disposition dans la salle) Bases biochimiques de l'élimination des nitrates dans les eaux : la dénitrification ( <b>annexe 2</b> ) Tableau d'identification de la galerie API 20NE ( <b>annexe 3</b> ) Acceptabilité des résultats expérimentaux et expression des résultats ( <b>annexe 4</b> ) Norme de qualité d'une eau potable ( <b>annexe 5</b> )	
<b>Protocoles ou résultats expérimentaux (manipulations non réalisables)</b>	
Protocole de réalisation du dosage des chlores ( <b>annexe 6</b> ) Protocole de recherche et dénombrement des coliformes dans l'eau ( <b>annexe 7</b> )	

# PROCOLE 1 : DOSAGE DES NITRITES PAR LA METHODE DE GRIESS – METHODE COLORIMETRIQUE PAR DIAZOTATION

## PRINCIPE

Les ions nitrites, incolores en milieu acide, réagissent avec une amine aromatique : le chlorure de N-(naphthyl-1) diamino-1,2 éthane pour former un sel de diazonium qui en présence de l' amino - 4 benzènesulfonamide donne un complexe coloré stable, de couleur rose, dosable par spectrophotométrie à une longueur d'onde 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en nitrites dans les limites de validité de la loi de Beer-Lambert.

## MODE OPERATOIRE

- Introduire dans un tube à essai:
  - Solution à doser ..... 10,00 mL
  - Réactif de diazotation..... 0,20 mL
    - Acide orthophosphorique concentré (85 %) dilué au 1/10<sup>ème</sup>
    - N-naphtyl-1-éthylènediamine dichlorhydrate
    - Amino-4-benzène sulfonamide
- Homogénéiser.
- Attendre 30 minutes le développement de la coloration.
- Lire les absorbances contre un témoin réactif.

## MATIERE D'ŒUVRE

- Eau après dénitrification notée « Eau DN » 50 mL
- Eau avant dénitrification notée « Eau N » 50 mL
- Solution étalon de nitrite de sodium notée « E » 50 mL
- Réactif de diazotation 5 mL
  
- Tubes à essai
- Fioles jaugées à 50 mL, 100 mL
- Pipettes jaugées de 1 mL, 2 mL, 5 mL
- Pipettes graduées de 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL
- Pipette automatique P 200 et cônes adaptés
- Cuves de colorimétrie
- Spectrophotomètre

## ETALONS ET ECHANTILLONS A DOSER

- A partir d'une solution étalon « E » de nitrite à 100 mg.L<sup>-1</sup>, préparer 100 mL d'une solution étalon de nitrite à 1 mg.L<sup>-1</sup>.
- Préparer une série de solutions étalon de nitrite, sous un volume final de 10 mL, allant de 0 µg à 10 µg de nitrite par tube.
- Réaliser deux essais sur l'eau avant dénitrification et sur l'eau après dénitrification.

## DONNEES D'ACCEPTABILITE DES RESULTATS

Eau avant dénitrification : Sr = 0,02 mg.L<sup>-1</sup>  
Eau après dénitrification : Sr = 0,004 mg.L<sup>-1</sup>

## **PROTOCOLE 2 : PROTOCOLE DE REALISATION D'UN FROTTIS COLORE A LA METHODE DE GRAM**

### **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 d'environ 3 cm<sup>2</sup>.
- Laisser sécher.
- Fixer le frottis en le recouvrant d'alcool laissé sur la lame durant 3 à 5 minutes.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.

### **Coloration du frottis**

- Colorer le frottis au violet de gentiane (ou cristal violet) durant une minute.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.
- Faire agir une solution de lugol durant une minute.
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.
- Décolorer à l'alcool (éthanol) ou alcool-acétone durant une dizaine de secondes (plus ou moins selon l'épaisseur du frottis).
- Rincer délicatement le frottis à l'eau.
- Contre-colorer à la fuchsine ou la safranine durant 30 secondes à une minute.
- Rincer le frottis à l'eau et sécher délicatement.

### **Observation**

Observer le frottis coloré sec au microscope optique d'abord à l'objectif x40 pour faire la mise au point et choisir une zone d'observation intéressante puis utiliser l'objectif x100 à l'immersion pour une observation précise.

## **PROTOCOLE 4 : REALISATION DES TESTS ENZYMATIQUES D'ORIENTATION**

### **TECHNIQUE DE RECHERCHE DE LA CATALASE**

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

### **TECHNIQUE DE RECHERCHE DE L'OXYDASE**

- A partir d'une culture sur milieu gélosé, 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-paraphénylène-diamine) (et préalablement humidifié). Le prélèvement des colonies ne doit pas être réalisé avec un instrument pouvant oxyder le réactif (ciseau métallique).
- Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une tâche colorée (bleu-violet), le plus souvent en moins de 30 secondes, au niveau de la zone de dépôt.

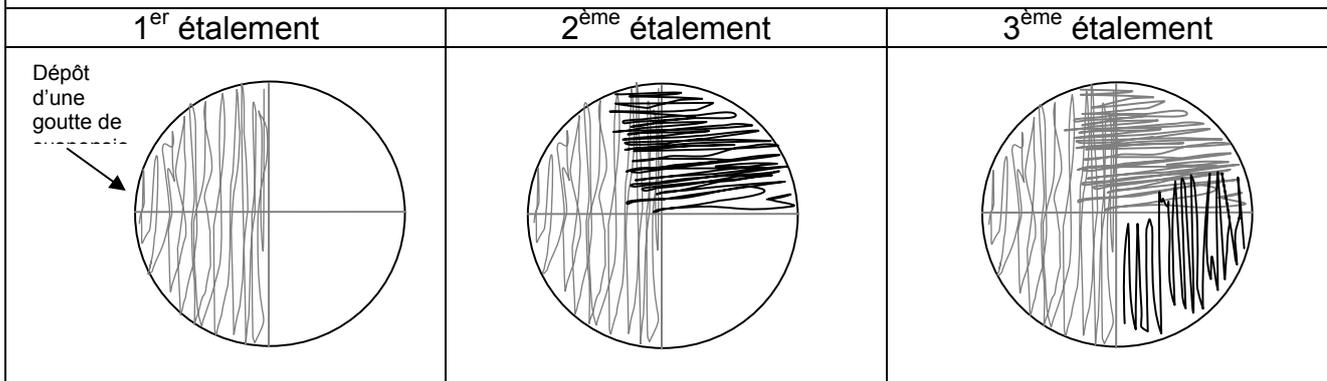
**PROCOLE 3 : PROCOLE DE REALISATION D'UN ISOLEMENT**

**Isolement selon la technique des quadrants**

Il s'agit d'ensemencer la surface d'une gélose en boîte de Pétri à partir d'une suspension bactérienne (culture en bouillon, suspension dans de l'eau...) de façon à obtenir après incubation des colonies isolées.

- Ensemencer à l'oese ou à la pipette Pasteur boutonnée selon les étapes suivantes :
- Tremper l'instrument dans la suspension bactérienne ;
- Déposer l'instrument à la surface de la gélose sur le bord de la boîte ;
- Etaler l'inoculum en stries très serrées sur une moitié de la boîte (quadrants 1 et 2) ;
- Faire pivoter la boîte d'un quart de tour et poursuivre les stries serrées sur le 3<sup>ème</sup> quadrant en repassant légèrement sur les stries du 1<sup>er</sup> étalement ;
- Répéter l'opération dans le 4<sup>ème</sup> quadrant en terminant sans repasser sur les stries précédentes (voir schéma ci-dessous).

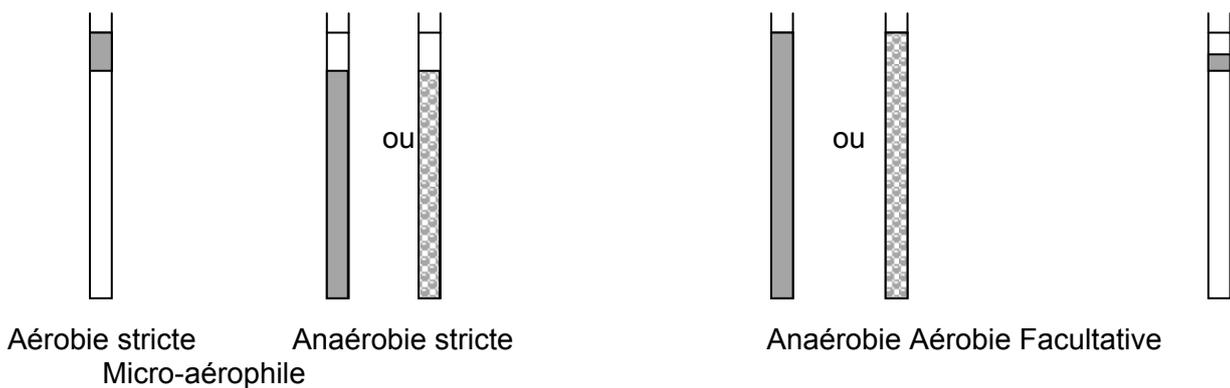
Il est possible de flamber l'instrument entre deux étalements pour éliminer l'excédent de bactéries ; dans ce cas, l'étalement est pratiqué en repassant de façon plus large sur les stries de l'étalement précédent.



**PROCOLE 5 : LECTURE DES MILIEUX FOURNIS ENSEMENCES**

Lecture de la VF : culture : culture gaz :

absence de culture



Système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux

**INTRODUCTION ET OBJET DU TEST**

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice.

**PRINCIPE**

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

**PRESENTATION (coffret de 25 tests)**

- 25 galeries API 20 NE
- 25 boîtes d'incubation
- 25 ampoules d'API AUX Medium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice

**COMPOSITION**

**Galerie**

La composition de la galerie API 20 NE est reportée dans le tableau de lecture de cette notice.

**Milieu**

<b>API AUX Medium 7 ml</b>	Sulfate d'ammonium	2 g
	Agar	1,5 g
	Solution de vitamines	10,5 ml
	Solution d'oligo-éléments	10 ml
	Phosphate monosodique	6,24 g
	Chlorure de potassium	1,5 g
	Eau déminéralisée	qsp 1000 ml
	pH final : 7,0-7,2	

**REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS**

**Réactifs**

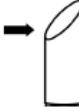
- API NaCl 0,85 % Medium, 2 ml (Réf. 20 070)
- Réactifs : JAMES (Réf. 70 542)
- NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
- Zn (Réf. 70 380)
- Oxydase (Réf. 55 635\*)
- \* référence non commercialisée dans certains pays : utiliser un réactif équivalent.
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- McFarland Standard (Réf. 70 900) point 0,5
- Catalogue Analytique API 20 NE (Réf. 20 090) ou logiciel d'identification **apiweb™** (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)

**Matériel**

- Pipettes ou PSlpettes
- Protège-ampoule
- Portoir pour ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

**PRECAUTIONS D'UTILISATION**

- **Pour diagnostic in vitro et pour contrôle microbiologique.**
  - **Pour usage professionnel uniquement.**
  - Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
  - Les prélèvements, cultures bactériennes et produitsensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI/NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
  - Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
  - Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.
  - Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, ...
  - Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :
    - Placer l'ampoule dans le protège-ampoule.
    - Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut).
    - Bien enfoncer le bouchon.
- \* **Modèle 1 :**


  - Recouvrir la partie inclinée du bouchon avec la première phalange du pouce.
  - Exercer une pression avec le pouce à la base de la partie inclinée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.

\* **Modèle 2 :**


  - Exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.
  - Retirer l'ampoule du protège-ampoule et conserver le protège-ampoule pour une utilisation ultérieure.
  - Enlever délicatement le bouchon.
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
  - L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

## CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

## ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 NE ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements cliniques ou autres.

Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté (ex. gélose Trypccase Soja) selon les techniques usuelles de bactériologie.

## MODE OPERATOIRE

### Test Oxydase

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21<sup>ème</sup> test d'identification à noter sur la fiche de résultats.

### Sélection des colonies

API 20 NE doit être utilisé avec des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux.

**NOTE 1 :** certaines espèces de bacilles à Gram négatif non entérobactéries qui sont oxydase négative (*S. maltophilia*, *Acinetobacter*...) sont parfaitement identifiées avec API 20 NE. On s'aidera du contexte clinique ou bactériologique pour utiliser cette galerie.

**NOTE 2 :** Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 NE. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

### Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

### Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit ou utiliser un tube contenant 2 ml de solution saline à 0,85 %, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSipette, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

**NOTE :** Pour le bon fonctionnement des tests de la galerie API 20 NE, il est très important d'ajuster la densité de l'inoculum au point 0,5 de McFarland. En particulier, une turbidité plus faible conduit à des résultats faussement négatifs. Ne pas toucher les cupules lors des manipulations et veiller à ne pas laisser la galerie exposée à l'air longtemps après inoculation.

## Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests [GLU] à [PAC] en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incubé à 29°C ± 2°C pendant 24 heures (± 2 heures).

## LECTURE ET INTERPRETATION

### Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests NO<sub>3</sub> et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO<sub>3</sub> et TRP.
- **Test NO<sub>3</sub> :**
  - Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO<sub>3</sub>.
  - Après 5 mn, une couleur **rouge** indique une réaction **positive**, à noter sur la fiche de résultats.
  - Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO<sub>3</sub>.
  - Après 5 mn, une cupule restée **incolore** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule devient **rose-rouge**, la réaction est **négative** car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc.

La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO<sub>2</sub> ou de N<sub>2</sub>) est positive.

La production de N<sub>2</sub> peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.

- **Test TRP :** Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive**.

**• Tests d'assimilation :**

Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction positive.

Des pousses d'intensité intermédiaire peuvent être observées et notées ± ou ±.

Une fois cette lecture effectuée, l'identification doit être pratiquée comme indiqué au paragraphe "Interprétation".

Une réincubation est nécessaire dans les cas suivants :

- faible discrimination ;
- profil inacceptable ou profil douteux ;
- si la note suivante est indiquée pour le profil obtenu :

IDENTIFICATION NON VALIDE  
AVANT 48 H D'INCUBATION

Alors, éliminer, à l'aide d'une pipette ou d'une PSipette, les réactifs NIT 1, NIT 2 et JAMES par aspiration, recouvrir immédiatement les tests NO<sub>3</sub> et TRP d'huile de paraffine en formant un ménisque convexe, incubé à nouveau à 29°C ± 2°C puis lire 24 h plus tard, sauf les trois premiers tests : NO<sub>3</sub>, TRP, GLU qui doivent être lus uniquement à 24 h.

**Interprétation**

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

**• Détermination du profil numérique :**

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21<sup>e</sup> test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

**• Identification :**

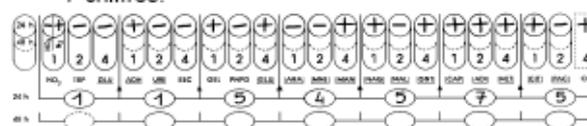
Elle est réalisée à partir de la base de données (V7.0)

\* à l'aide du Catalogue Analytique :

- Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

\* à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™** :

- Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.



1 154 575 *Pseudomonas aeruginosa*

**CONTROLE DE QUALITE**

Les milieux, galeries et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable par l'utilisateur avec la souche

1. *Sphingobacterium multivorum* ATCC® 35656 de préférence ou l'une des souches suivantes :

- 2. *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654
- 4. *Alcaligenes faecalis* ATCC 35655
- 3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	NO <sub>3</sub>	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	LMNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
1.	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
2.	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-*	-	+
3.	+	-	-	V	V	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
4.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+

\* Des réactions faiblement positives peuvent être observées.

Profil obtenu à partir de colonies cultivées sur gélose Trypcase Soja et après 48 heures d'incubation pour les tests ADH à PAC.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

**LIMITES DU TEST**

- Le système API 20 NE est destiné à l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux présents dans la base de données (voir Tableau d'identification en fin de notice) et à eux seuls. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres micro-organismes ou exclure leur présence.
- Les bacilles à Gram négatif non fermentants, isolés de patients atteints de mucoviscidose, peuvent générer des profils biochimiques atypiques susceptibles d'altérer leur identification.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

**RESULTATS ATTENDUS**

Se référer au Tableau d'identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

**PERFORMANCES**

5728 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :

- 92,53 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
- 3,13 % des souches n'ont pas été identifiées.
- 4,34 % des souches ont été mal identifiées.

**ELIMINATION DES DECHETS**

Les ampoules d'API AUX Medium non utilisées peuvent être éliminées comme déchets non dangereux.

Éliminer tous les réactifs utilisés ou non utilisés (autre que les ampoules d'API AUX Medium) ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

## TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	incolore	rose-rouge
			réduction des Nitrates en azote	rose	incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptophane)	incolore vert pâle / jaune	rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-β-D- galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD- Galactopyranosidase)	incolore	jaune
[GLU]	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
[ARA]	L-arabinose	1,4	assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
[MNE]	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
[MAN]	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
[MAL]	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
[GNT]	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
[CAP]	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
[ADI]	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
[MLT]	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
[CIT]	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
[PAC]	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale notamment peptone bovine/porcine.

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. III
TABLES DES SYMBOLES	p. IV

ATCC est une marque utilisée, déposée et/ou enregistrée appartenant à American Type Culture Collection.



**bioMérieux® SA**  
 au capital de 12 029 370 €  
 673 620 399 RCS LYON  
 69280 Marcy-l'Etoile / France  
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00  
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
<http://www.biomerieux.com>

**bioMérieux, Inc**  
 Box 15969,  
 Durham, NC 27704-0969 / USA  
 Tél. (1) 919 620 20 00  
 Fax (1) 919 620 22 11



Imprimé en France

bioMérieux, le logo bleu, API et apiweb sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

ANNEXE 1 : FICHE DE SECURITE

Produit	Mention	Pictogramme(s)	Phrase de danger	Phrase de prévention
<b>Solution de nitrite de sodium</b>	Danger		H272 H301 H400	P 273
<b>Réactif de diazotation</b>  - Acide orthophosphorique concentré (85 %)  - N-naphtyl-1-éthylènediamine dichlorhydrate  - Amino-4-benzène sulfonamide	Danger   Attention		H 314 H 290   H 315 H 319	P280 P301 + P330 + P331 P309 P310 P305 + P351 + P338   P260 P302 + P352 P305 + P351 + P338

**1. Les deux voies de réduction biologique des nitrates**

La réduction des nitrates peut prendre deux voies :

- **voie réductrice assimilatrice** qui réduit les nitrates (+V) en ammoniac (-III). L'ammonium sert ensuite de **source d'azote** et entre dans le métabolisme.



**Cette voie n'existe que chez les végétaux et les Procaryotes.**

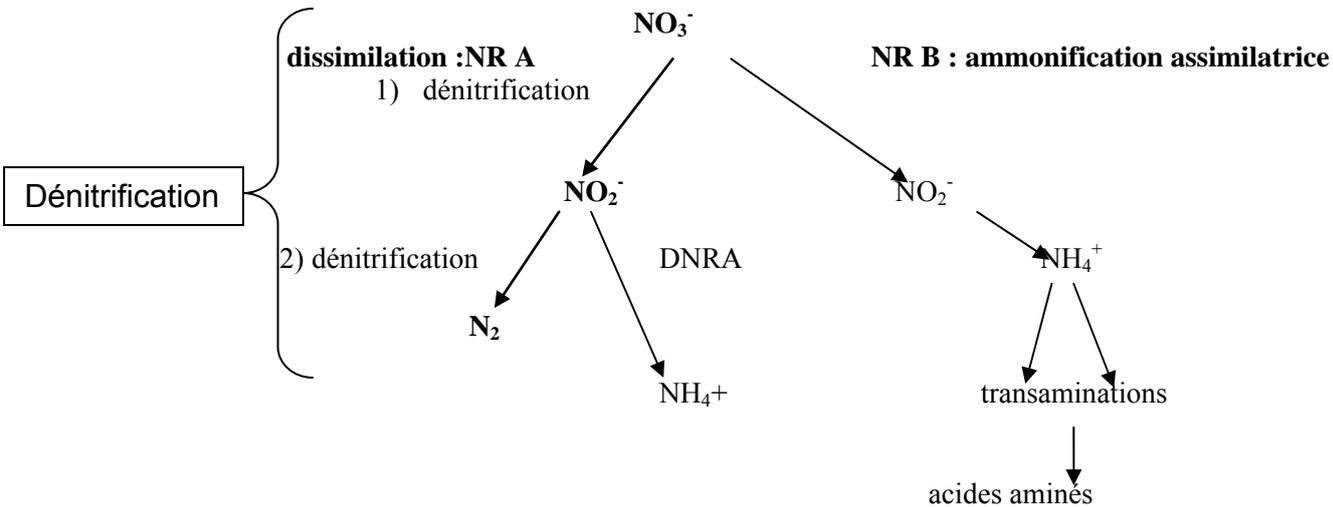
- **voie réductrice dissimilatrice**. Les nitrates sont utilisés comme **accepteur final d'électrons** en anoxie. C'est la dénitrification au sens restreint.



Les bactéries capables de se développer en aérobiose avec les nitrates comme seule source d'azote possèdent généralement les deux types de nitrates réductases. Ex : *Klebsiella*.

Dans tous les cas, il existe **une réaction commune clé** qui est la réduction des nitrates en nitrites par la **nitrate réductase (NR)**.

On en distingue cependant deux types : **NR B cytoplasmique assimilatrice** et la **NR A dissimilatrice liée à la membrane**, qui est en général inhibée en anaérobiose mais non absente.



*Remarque : L'ammonification dissimilatrice du nitrate en ammoniac ou DNRA (Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonia) est distincte de l'ammonification assimilatrice. L'ammonium formé n'est pas assimilé, surtout si le milieu contient déjà une source azotée (acides aminés par exemple). L'azote réduit en excès est excrété sous forme d'ammoniac gazeux. Certaines étapes produisent de l'ATP. Ce type d'ammonification existe chez Clostridium perfringens, E. coli, Desulfovibrio gigas. Elle n'est possible qu'en anaérobiose. Dissimilation et assimilation peuvent être simultanées.*

Les principales bactéries dénitrifiantes : *Achromobacter, Alcaligenes, Bacillus, Corynebacterium, Paracoccus, Pseudomonas, Spirillum, Thiobacillus, Xanthomonas, . . .* **sont toutes des espèces aérobies strictes réalisant la respiration nitrate en anoxie.** Cependant, d'autres espèces telles que *E. coli* possèdent aussi une NR A.

## 2. Dénitrifications autotrophe et hétérotrophe.

La dénitrification est un procédé anoxique pouvant faire intervenir deux types de bactéries : des **organotrophes** et des **lithotrophes**. Les organotrophes sont aussi des hétérotrophes et les lithotrophes des autotrophes. On parle donc de **dénitrification autotrophe ou hétérotrophe**.

### 2.1. La dénitrification hétérotrophe

Dans le traitement des eaux usées qui contiennent du carbone organique, ce sont les germes chimio-organohétérotrophes qui opéreront la dénitrification, en l'absence d'oxygène. Toutefois lors de traitement d'affinage (dénitrification sur biofiltre) il peut être nécessaire de rajouter une source de carbone organique (méthanol, glycérol...).

Dans le traitement d'une eau destinée à la fabrication d'eau potable, il faut ajouter du carbone organique si elle en contient peu, ainsi qu'éventuellement une source de phosphate.

### 2.2. Dénitrification autotrophe

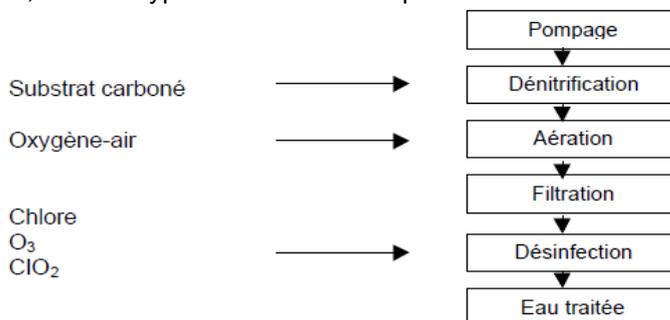
**Aucune installation industrielle n'existe en France.** En effet les bactéries impliquées ont une cinétique de croissance très lente. Les temps de contact élevés et les faibles vitesses de percolation sur biofiltre ( 0,5 à 1 m/h) rendent ces techniques plus difficilement applicables à l'échelle industrielle.

- dénitrification à l'hydrogène : *Hydrogenomonas*  $2 \text{NO}_3^- + 5 \text{H}_2 \rightarrow 4 \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2 + 2 \text{OH}^-$

- dénitrification sur support soufré : *Thiobacillus denitrificans*  
 $6 \text{NO}_3^- + 5 \text{S} + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{N}_2 + 5 \text{SO}_4^{2-} + 4 \text{H}_3\text{O}^+$

## 3. Description des filières

Quelque soit le procédé utilisé, la filière type de dénitrification peut être schématisée de la façon suivante :



Un biofiltre est un procédé de traitement des eaux qui conjugue les avantages d'un traitement biologique à l'aide de bactéries fixées sur un support et celui d'un traitement physique. En effet, le support a également un rôle de filtre qui retient la biomasse en excès et les matières en suspension.

Il existe différents types de biofiltres français commercialisés, en fonction du sens de circulation eau-air :

- Flux ascendant co-courant : **Biofor® (BIOLOGICAL FILTRATION OXYGENATED REACTOR)**, **Biostyr®** et **Nitrazur DN® (figure 1)**

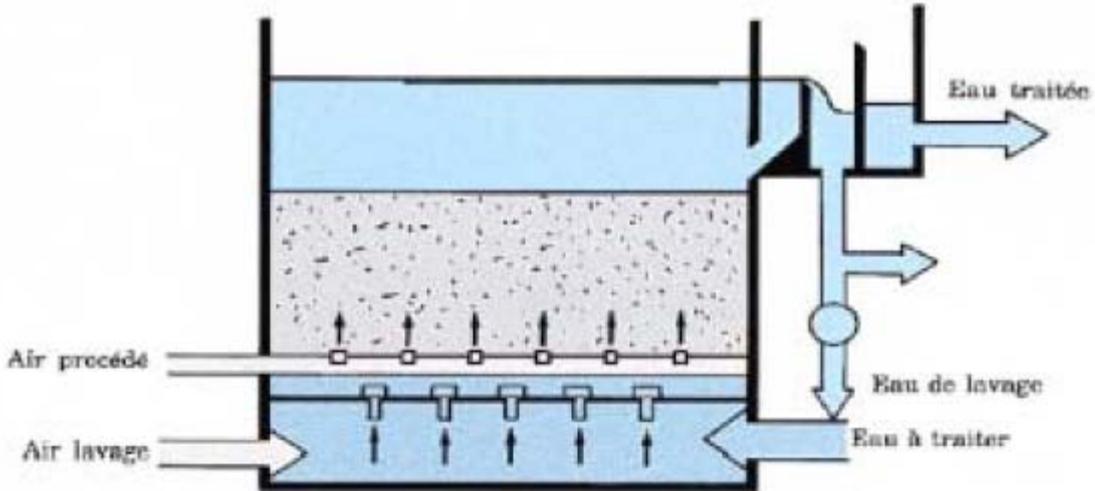
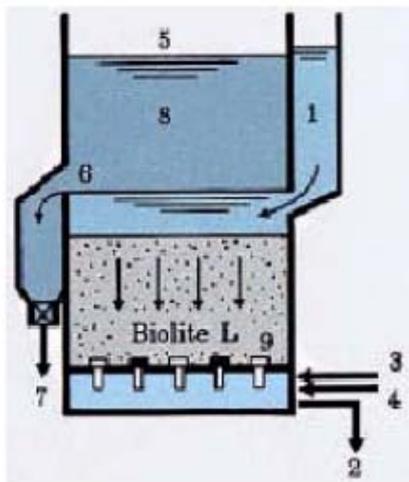


Figure 1. Schéma du BIOFOR

- Flux descendant co-courant : **Biodrof® (BIOLOGICAL DRY OXYGENATED FILTER)** et **Nitrazur N® (figure 2)**



- 1 - Entrée d'eau à nitrifier et d'eau de balayage
- 2 - Sortie d'eau nitrifiée
- 3 - Air de procédé
- 4 - Air et eau de lavage
- 5 - Niveau de fonctionnement normal
- 6 - Niveau de rinçage
- 7 - Départ d'eau de lavage
- 8 - Stockage des eaux sales
- 9 - Plancher à buselures

Figure 2 : Schéma du NITRAZUR N® en nitrification

## ANNEXE 3 : TABLEAU D'IDENTIFICATION DE LA GALERIE API 20NE

api® 20 NE

07615 J - XL - 2006/02

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /  
 TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO /  
 ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABEL /  
 TABELA IDENTYFIKACJI

% de réactions positives après 24-48 h à 29°C ± 2°C / % of positive reactions after 24-48 hrs. at 29°C ± 2°C /  
 % der positiven Reaktionen nach 24-48 Std. bei 29°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 24-48 h a 29°C ± 2°C /  
 % di reazioni positive dopo 24-48 ore a 29°C ± 2°C / % de reacções positivas após 24-48 h a 29°C ± 2°C /  
 % θετικών αντιδράσεων μετά από 24-48 ώρες στους 29°C ± 2°C / % av positiva reaktioner efter 24-48 timmar vid 29°C ± 2°C /  
 % af positive reaktioner efter 24-48 timer ved 29°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 24-48 godzinach w 29°C ± 2°C

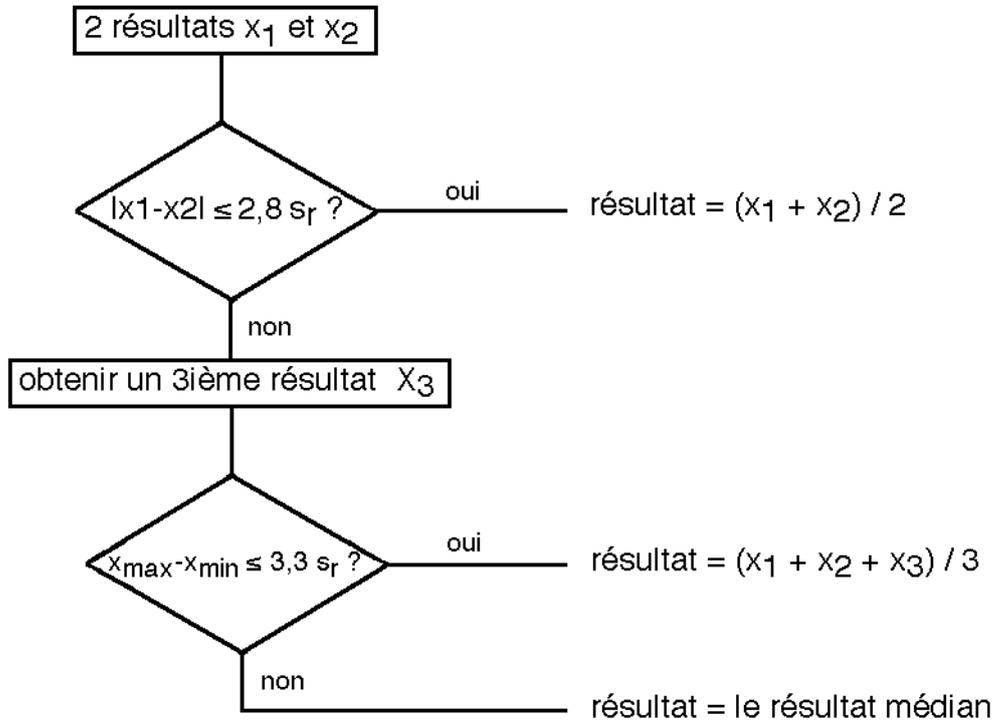
API 20 NE	V7.0	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUS	ARAs	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADLa	MLTa	CITa	PACa	OX
<i>Achromobacter denitrificans</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	0	99	4	95	70	0	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	0	70	20	46	1	36	0
<i>Acinetobacter radioresistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	0	97	100	2	2	97	0
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99
<i>Aer. salm. ssp. masoucida/achromogenes</i>		100	21	9	0	0	2	33	0	66	0	33	50	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>		100	0	57	36	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99	73	91	100	69	73	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	99	0	74	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	99
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100
<i>Brevundimonas vesiculans</i>		16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98
<i>Burkholderia cepacia</i>		39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	66	10	97	0	100	75	0	100	36	0	97
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0	70	98	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	1	12	12	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	99
<i>Comamonas testosteroni/Ps. alcaligenes</i>		75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98
<i>Deiftia acidovorans</i>		96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100
<i>Grimontia hollisae</i>		100	100	31	0	0	0	0	3	10	67	68	0	24	1	41	0	0	94	0	0	100
<i>Mannheimia haemolytica / Pasteurella penhabsi</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99
<i>Moraxella lacunata</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	99
<i>Moraxella spp</i>		34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	99
<i>Myroides spp</i>		0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	60	20	75	76	34	34	4	99	47	1	99
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95	26	96
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	77
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	86
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	61	26	0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damselae</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99
<i>Pseudomonas luteola</i>		78	0	13	71	1	100	30	98	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas oryzae/habitans</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	58	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		60	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Raistonia pickettii</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99
<i>Rhizobium radiobacter</i>		98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Shewanella putrefaciens group</i>		96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	99
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0	65	91	10	76	1	18	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	30	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0	50	64	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	99	17	0	99	50	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	51	98	90	0	1	99	21	1	99
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6	28	0	0	95	91	0	100
<i>Wautersia paucula</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98

Vérifier la mobilité / Check the motility / Beweglichkeit überprüfen / Verificar la movilidad / Verificare la mobilità /

Verificar a mobilidade / Ελέγξε την κινητικότητα / Kontrollera motiliteten / Kontrollér motiliteten / Sprawdzic zdolność do ruchu:

Mobilité / Motility / Beweglichkeit / Movilidad / Mobilità / Mobilidade / Κινητικότητα / Motiliet / Ruch	<i>Brevundimonas diminuta / vesiculans</i>	<i>Moraxella spp</i>
	+	-

### Logigramme



## ANNEXE I

LIMITES ET RÉFÉRENCES DE QUALITÉ DES EAUX  
DESTINÉES À LA CONSOMMATION HUMAINE, À L'EXCLUSION DES EAUX CONDITIONNÉES

## I. – Limites de qualité des eaux destinées à la consommation humaine

## A. – Paramètres microbiologiques

PARAMÈTRES	LIMITES DE QUALITÉ	UNITÉ
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	0	/100 mL
Entérocoques.....	0	/100 mL

## B. – Paramètres chimiques

PARAMÈTRES	LIMITES DE QUALITÉ	UNITÉS	NOTES
Acrylamide.	0,10	µg/L	La limite de qualité se réfère à la concentration résiduelle en monomères dans l'eau, calculée conformément aux spécifications de la migration maximale du polymère correspondant en contact avec l'eau.
Antimoine.	5,0	µg/L	
Arsenic.	10	µg/L	
Baryum.	0,70	mg/L	
Benzène.	1,0	µg/L	
Benzo[a]pyrène.	0,010	µg/L	
Bore.	1,0	mg/L	
Bromates.	10	µg/L	La valeur la plus faible possible inférieure à cette limite doit être visée sans pour autant compromettre la désinfection. La limite de qualité est fixée à 25 µg/L jusqu'au 25 décembre 2008. Toutes les mesures appropriées doivent être prises pour réduire le plus possible la concentration de bromates dans les eaux destinées à la consommation humaine, au cours de la période nécessaire pour se conformer à la limite de qualité de 10 µg/L.
Cadmium.	5,0	µg/L	
Chlorure de vinyle.	0,50	µg/L	La limite de qualité se réfère également à la concentration résiduelle en monomères dans l'eau, calculée conformément aux spécifications de la migration maximale du polymère correspondant en contact avec l'eau.
Chrome.	50	µg/L	
Cuivre.	2,0	mg/L	
Cyanures totaux.	50	µg/L	
1,2-dichloroéthane.	3,0	µg/L	
Epichlorhydrine.	0,10	µg/L	La limite de qualité se réfère à la concentration résiduelle en monomères dans l'eau, calculée conformément aux spécifications de la migration maximale du polymère correspondant en contact avec l'eau.

PARAMÈTRES	LIMITES DE QUALITÉ	UNITÉS	NOTES
Fluorures.	1,50	mg/L	
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).	0,10	µg/L	Pour la somme des composés suivants: benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[ghi]pérylène, indéno[1,2,3-cd]pyrène.
Mercure.	1,0	µg/L	
Total microcystines.	1,0	µg/L	Par « total microcystines », on entend la somme de toutes les microcystines détectées et quantifiées.
Nickel.	20	µg/L	
Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).	50	mg/L	La somme de la concentration en nitrates divisée par 50 et de celle en nitrites divisée par 3 doit rester inférieure à 1.
Nitrites (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).	0,50	mg/L	En sortie des installations de traitement, la concentration en nitrites doit être inférieure ou égale à 0,10 mg/L.
Pesticides (par substance individuelle).	0,10	µg/L	Par « pesticides », on entend :
Aldrine, dieldrine, heptachlore, heptachlorépoxyde (par substance individuelle).	0,03	µg/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>- les insecticides organiques ;</li> <li>- les herbicides organiques ;</li> <li>- les fongicides organiques ;</li> <li>- les nématocides organiques ;</li> <li>- les acaricides organiques ;</li> <li>- les algicides organiques ;</li> <li>- les rodenticides organiques ;</li> <li>- les produits antimoisissures organiques ;</li> <li>- les produits apparentés (notamment les régulateurs de croissance)</li> </ul> et leurs métabolites, produits de dégradation et de réaction pertinents.
Total pesticides.	0,50	µg/L	Par « total pesticides », on entend la somme de tous les pesticides individualisés détectés et quantifiés.
Plomb.	10	µg/L	La limite de qualité est fixée à 25 µg/L jusqu'au 25 décembre 2013. Les mesures appropriées pour réduire progressivement la concentration en plomb dans les eaux destinées à la consommation humaine au cours de la période nécessaire pour se conformer à la limite de qualité de 10 µg/L sont précisées aux articles R. 1321-55 et R. 1321-49 (arrêté d'application).  Lors de la mise en œuvre des mesures destinées à atteindre cette valeur, la priorité est donnée aux cas où les concentrations en plomb dans les eaux destinées à la consommation humaine sont les plus élevées.
Sélénium.	10	µg/L	
Tétrachloroéthylène et trichloroéthylène.	10	µg/L	Somme des concentrations des paramètres spécifiés.
Total trihalométhanes (THM).	100	µg/L	La valeur la plus faible possible inférieure à cette valeur doit être visée sans pour autant compromettre la désinfection. Par « total trihalométhanes », on entend la somme de: chloroforme, bromoforme, dibromochlorométhane et bromodichlorométhane.  La limite de qualité est fixée à 150 µg/L jusqu'au 25 décembre 2008. Toutes les mesures appropriées doivent être prises pour réduire le plus possible la concentration de THM dans les eaux destinées à la consommation humaine, au cours de la période nécessaire pour se conformer à la limite de qualité.

PARAMÈTRES	LIMITES DE QUALITÉ	UNITÉS	NOTES
Turbidité.	1,0	NFU	La limite de qualité est applicable au point de mise en distribution, pour les eaux visées à l'article R.1321-37 et pour les eaux d'origine souterraine provenant de milieux fissurés présentant une turbidité périodique importante et supérieure à 2,0 NFU. En cas de mise en œuvre d'un traitement de neutralisation ou de reminéralisation, la limite de qualité s'applique hors augmentation éventuelle de turbidité due au traitement. Pour les installations qui sont d'un débit inférieur à 1 000 m <sup>3</sup> /j ou qui desservent des unités de distribution de moins de 5 000 habitants, la limite de qualité est fixée à 2,0 NFU jusqu'au 25 décembre 2008. Toutes les mesures appropriées doivent être prises pour réduire le plus possible la turbidité, au cours de la période nécessaire pour se conformer à la limite de qualité de 1,0 NFU.

## II. – Références de qualité des eaux destinées à la consommation humaine

### A. – Paramètres microbiologiques

PARAMÈTRES	RÉFÉRENCES DE QUALITÉ	UNITÉ	NOTES
Bactéries coliformes.	0	/100 mL	
Bactéries sulfitoréductrices y compris les spores.	0	/100 mL	Ce paramètre doit être mesuré lorsque l'eau est d'origine superficielle ou influencée par une eau d'origine superficielle. En cas de non-respect de cette valeur, une enquête doit être menée sur la distribution d'eau pour s'assurer qu'il n'y a aucun danger potentiel pour la santé humaine résultant de la présence de micro-organismes pathogènes, par exemple <i>Cryptosporidium</i> .
Numération de germes aérobie revivifiables à 22 °C et à 37 °C.			Variation dans un rapport de 10 par rapport à la valeur habituelle.

### B. – Paramètres chimiques et organoleptiques

PARAMÈTRES	RÉFÉRENCES DE QUALITÉ	UNITÉS	NOTES
Aluminium total.	200	µg/L	A l'exception des eaux ayant subi un traitement thermique pour la production d'eau chaude pour lesquelles la valeur de 500 µg/L (Al) ne doit pas être dépassée.
Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ).	0,10	mg/L	S'il est démontré que l'ammonium a une origine naturelle, la valeur à respecter est de 0,50 mg/L pour les eaux souterraines.
Carbone organique total (COT).	2,0 et aucun changement anormal	mg/L	
Oxydabilité au permanganate de potassium mesurée après 10 minutes en milieu acide.	5,0	mg/L O <sub>2</sub>	
Chlore libre et total.			Absence d'odeur ou de saveur désagréable et pas de changement anormal.
Chlorites.	0,20	mg/L	Sans compromettre la désinfection, la valeur la plus faible possible doit être visée.
Chlorures.	250	mg/L	Les eaux ne doivent pas être corrosives.
Conductivité.	≥ 180 et ≤ 1 000 ou ≥ 200 et ≤ 1 100	µS/cm à 20 °C  µS/cm à 25 °C	Les eaux ne doivent pas être corrosives.

PARAMÈTRES	RÉFÉRENCES DE QUALITÉ	UNITÉS	NOTES
Couleur.	Acceptable pour les consommateurs et aucun changement anormal notamment une couleur inférieure ou égale à 15	mg/L (Pt)	
Cuivre.	1,0	mg/L	
Equilibre calcocarbonique.	Les eaux doivent être à l'équilibre calcocarbonique ou légèrement incrustantes		
Fer total.	200	µg/L	
Manganèse.	50	µg/L	
Odeur.	Acceptable pour les consommateurs et aucun changement anormal, notamment pas d'odeur détectée pour un taux de dilution de 3 à 25 °C		
pH (concentration en ions hydrogène).	≥ 6,5 et ≤ 9	unités pH	Les eaux ne doivent pas être agressives.
Saveur.	Acceptable pour les consommateurs et aucun changement anormal, notamment pas de saveur détectée pour un taux de dilution de 3 à 25 °C		
Sodium.	200	mg/L	
Sulfates.	250	mg/L	Les eaux ne doivent pas être corrosives.
Température.	25	°C	A l'exception des eaux ayant subi un traitement thermique pour la production d'eau chaude. Cette valeur ne s'applique pas dans les départements d'outre-mer.
Turbidité.	0,5	NFU	La référence de qualité est applicable au point de mise en distribution, pour les eaux visées à l'article R. 1321-37 et pour les eaux d'origine souterraine provenant de milieux fissurés présentant une turbidité périodique importante et supérieure à 2,0 NFU. En cas de mise en œuvre d'un traitement de neutralisation ou de reminéralisation, la référence de qualité s'applique hors augmentation éventuelle de turbidité due au traitement.
	2	NFU	La référence de qualité s'applique aux robinets normalement utilisés pour la consommation humaine.

C. – Paramètres indicateurs de radioactivité

PARAMÈTRES	RÉFÉRENCES DE QUALITÉ	UNITÉS	NOTES
Activité alpha globale.			En cas de valeur supérieure à 0,10 Bq/L, il est procédé à l'analyse des radionucléides spécifiques définis dans l'arrêté mentionné à l'article R. 1321-20.
Activité bêta globale résiduelle.			En cas de valeur supérieure à 1,0 Bq/L, il est procédé à l'analyse des radionucléides spécifiques définis dans l'arrêté mentionné à l'article R. 1321-20.

## ANNEXE 6 : DOSAGE TITRIMETRIQUE DU CHLORE LIBRE ET DU CHLORE TOTAL

### OBJECTIF

Le chlore est l'un des désinfectants les plus utilisés dans la désinfection de l'eau. La quantité maximum de chlore pouvant être utilisée est de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ . Pour une désinfection efficace, la quantité résiduelle de chlore libre devrait excéder  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  après au moins 30 minutes de temps de contact pour une valeur de pH inférieure ou égale à 8.

### PRINCIPE

En solution aqueuse, le chlore existe sous forme libre : dichlore ( $\text{Cl}_{2(\text{aq})}$ ), acide hypochloreux ( $\text{ClOH}_{(\text{aq})}$ ), ions hypochlorite ( $\text{ClO}^-_{(\text{aq})}$ ), ou sous forme combinée : chloramines.

Le chlore libre provoque l'oxydation du N,N-diéthylphénylène-1,4-diamine (DPD) et permet l'obtention d'un complexe coloré rose. Ce complexe est décoloré par titrage avec une solution de sulfate d'ammonium et de fer II.

En l'absence de coloration avec la DPD, l'addition d'ions iodure permet de caractériser le chlore combiné. Les chloramines réagissent à leur tour et donnent la coloration rose.

### MATIERE D'ŒUVRE

- Eau à doser 500 mL
- Réactif à la diéthylparaphénylènediamine 50 mL
- Iodure de potassium en poudre 5 g
- Tampon pH 6,5 50 mL
- Solution de sulfate d'ammonium et de fer II 100 mL  
(sel de Mohr) à  $0,056 \text{ mol.L}^{-1}$
- Pipettes jaugées
- Pipette graduées
- Erlenmeyer 250 mL

### MODE OPERATOIRE

Introduire dans un erlenmeyer

Solution tampon pH 6,5 .....	5,00 mL
Réactif N,N-diéthylphénylène-1,4-diamine ....	5,00 mL
Eau à doser .....	100 mL

Homogénéiser soigneusement.

Doser le chlore libre à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium et de fer II (sel de Mohr) jusqu'au virage à l'incolore du milieu réactionnel.

Pour le dosage du chlore total, ajouter 1 g d'iodure de potassium dans l'erlenmeyer.

Doser à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium et de fer II (sel de Mohr) jusqu'à l'obtention d'une coloration rose du milieu réactionnel stable 2 minutes.

### VALEURS EXPERIMENTALES

Essai 1 :  $1,02 \text{ mg.L}^{-1}$

Essai 2 :  $1,14 \text{ mg.L}^{-1}$

Essai 3 :  $1,09 \text{ mg.L}^{-1}$

Sr :  $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$

## ANNEXE 7 : PROTOCOLE DE RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES COLIFORMES DANS L'EAU SELON LA NORME ISO 9308-1 : 2000

Objectif : cette manipulation a pour but de rechercher et de dénombrer le nombre de coliformes dans une eau ; un coliforme est défini par la norme ISO 9308-1 : 2000 comme étant une bactérie lactose-positive en 24 heures en aérobiose à 37°C sur le milieu utilisé durant cette manipulation (gélose lactosée au TTC et au tergitol 7) ne possédant pas d'oxydase.

Principe : la méthode est fondée sur la filtration sur membrane. Cette filtration est suivie d'une incubation de la membrane sur un milieu sélectif puis d'une caractérisation biochimique des colonies typiques lactose-positives.

### Protocole :

- Filtration : une prise d'essai de l'eau à analyser (variable selon l'objectif de la recherche) est filtrée sur une membrane filtrante (voir matière d'œuvre).
- Incubation de la membrane : cette membrane est placée ensuite sur un milieu de culture sélectif lactosé (voir matière d'œuvre), le tout étant incubé 24 heures à 37 °C ; il faut veiller à ne pas emprisonner de bulles d'air sous la membrane ;
- Caractérisation : après incubation, le nombre de colonies caractéristiques (lactose +) est compté, et les colonies caractéristiques sont repiquées sur une gélose tryptonée au soja pour confirmation de l'oxydase. En cas de nombre vraiment important, on pourra se contenter de repiquer 10 colonies typiques, choisies aléatoirement ;
- Rendu du résultat : il s'agit de calculer le nombre de bactéries coliformes susceptibles d'être présentes dans 100 mL d'échantillon.

### Matière d'œuvre :

- 1- Echantillon d'eau à analyser
- 2- Membrane filtrante composée d'esters de cellulose de 50 mm de diamètre, présentant des caractéristiques de filtration équivalentes à une porosité nominale de 0,45 µm ;
- 3- Trompe à vide et appareil de filtration ;
- 4- Milieu de culture : gélose lactosée au TTC et au tergitol 7 :
  - 5- Milieu de base :
    - 6- Lactose 20 g
    - 7- Peptone 10 g
    - 8- Extrait de levure 6 g
    - 9- Extrait de viande 5 g
    - 10- Bleu de bromothymol 0,05 g
    - 11- Agar-agar 15 g
    - 12- Eau distillée 1000 mL
    - 13- pH 7,2
  - 14- solution de TTC
    - 15- TTC (Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium) 0,05 g
    - 16- Eau distillée 100 mL
  - 17- Solution de tergitol 7
    - 18- tergitol 7 (Héptadécylsulfate de sodium) 0,5 g
    - 19- Eau distillée 100 mL
  - 20- Milieu complet :
    - 21- Milieu de base 100 mL
    - 22- Solution de TTC 5 mL
    - 23- Solution de tergitol 7 5 mL
- 24- Gélose tryptonée au soja :
  - 25- Digestat tryptique de caséine 15 g
  - 26- Peptone de soja 5 g
  - 27- Chlorure de sodium 5 g
  - 28- Agar-agar 15 g
  - 29- Eau distillée 1000 mL
  - 30- pH 7,2
- 31-Test oxydase

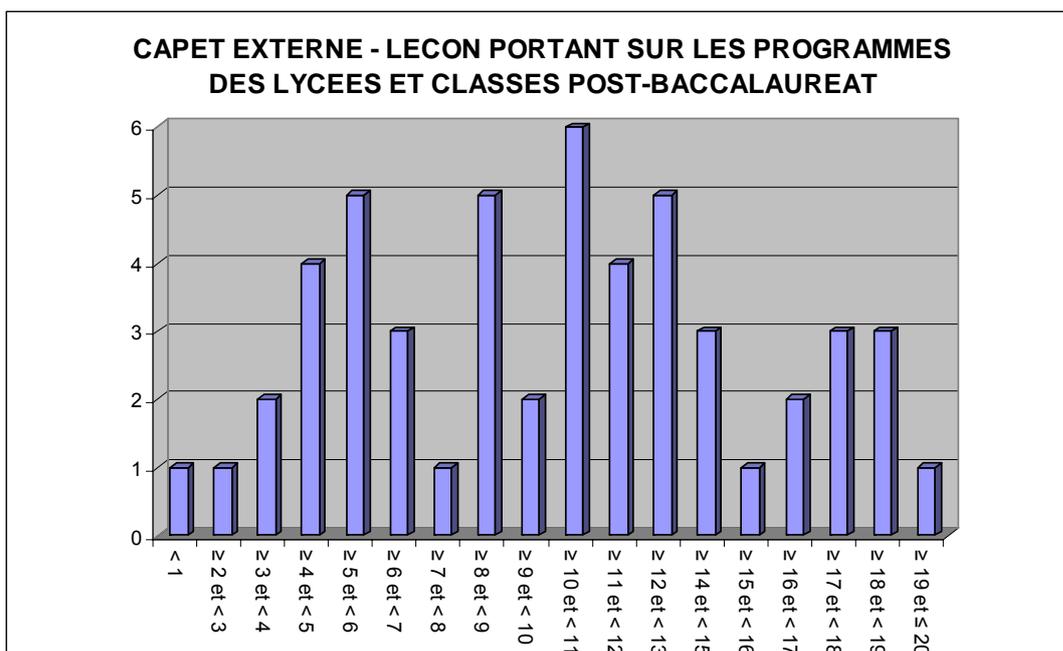
## Rapport de l'épreuve de leçon portant sur les programmes des lycées et des classes post-baccalauréat

Rapport établi par : Mme Sylvie BARDES, Mme Joëlle BISSERY, Mme Sophie BOYS, Mme Anne CAZALOT, M. Pascal CHAFFAUT, Mme Anne COMBES, M. Christian DEVAUX, Mme Pascale DUNET-JUSTIN, M. Bruno DURAND, Mme Isabelle FALLER, Mme Sigolène FOURCY-GIRAUD, Mme Martine FRUCHART, M. Philippe GARNIER, Mme Bénédicte GERON-LANDRE, Mme Geneviève GOUZERH, Mme Emmanuelle GRIMAL, Mme Susanne HAEBERLE-MULLER, Mme Marie Pia LAZARUS-ALTENBURGER, M. Yannick LAZZARONI, M. François MATRINGE, Mme Michèle PLANEILLE-RESTANY, Mme Catherine POCHE, Mme Elisabeth SCHLICHTER, Mme Cécile VANLEEFDAEL, Mme Françoise VINCENT

Résultats :

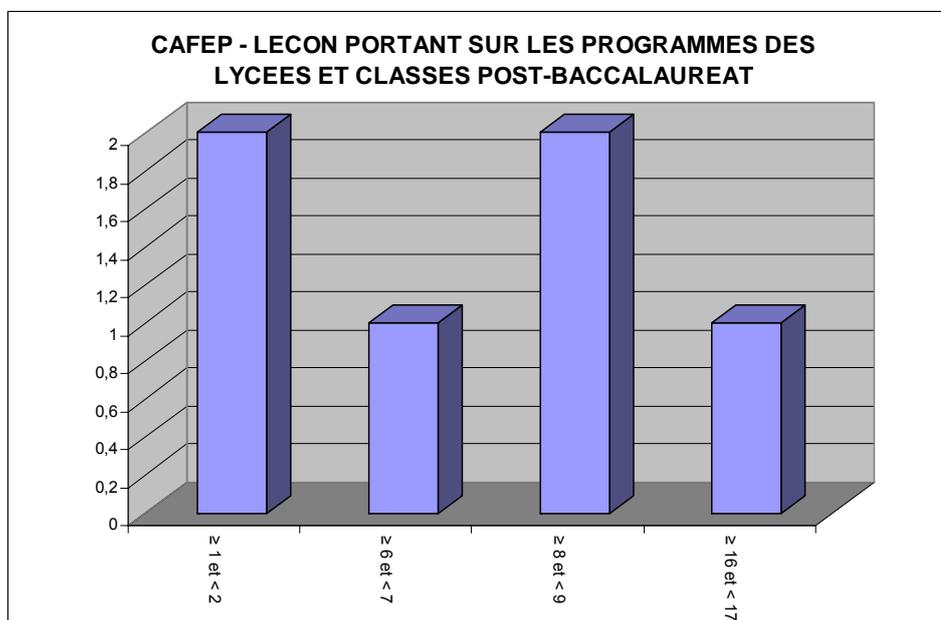
CAPET

< 1	1	≥ 10 et < 11	6
≥ 2 et < 3	1	≥ 11 et < 12	4
≥ 3 et < 4	2	≥ 12 et < 13	5
≥ 4 et < 5	4	≥ 14 et < 15	3
≥ 5 et < 6	5	≥ 15 et < 16	1
≥ 6 et < 7	3	≥ 16 et < 17	2
≥ 7 et < 8	1	≥ 17 et < 18	3
≥ 8 et < 9	5	≥ 18 et < 19	3
≥ 9 et < 10	2	≥ 19 et ≤ 20	1



## CAFEP

$\geq 1$ et $< 2$	2
$\geq 6$ et $< 7$	1
$\geq 8$ et $< 9$	2
$\geq 16$ et $< 17$	1



### Commentaires :

### Déroulement de l'épreuve :

La définition de l'épreuve avait déjà été donnée dans le rapport de la session 2011. Les attentes du jury figuraient en page de garde de chacun des sujets de l'épreuve :

« L'épreuve vise la construction d'une séquence pédagogique sur le thème proposé ainsi que la présentation du déroulé précis d'une séance constitutive de cette séquence, en conformité avec le référentiel indiqué.

La conception de la séquence et l'élaboration de la séance doivent s'effectuer dès le début de l'épreuve. Les manipulations proposées sont réalisables au cours des quatre premières heures. Les résultats expérimentaux seront communiqués aux membres du jury.

Une heure et demie après le début de l'épreuve et pendant une demi-heure, le candidat présente la ou les manipulations qu'il aura choisi de réaliser devant le jury. Cette présentation permet au jury d'évaluer ses compétences technologiques d'une part, et ses qualités pédagogiques d'autre part.

La dernière heure de préparation est exclusivement consacrée à finaliser l'exposé oral. »

Il convient de préciser que la séquence pédagogique est un ensemble continu ou discontinu de séances articulées entre elles dans le temps, incluant une progression qui vise à développer des compétences.

Les compétences technologiques sont évaluées sur l'ensemble des manipulations réalisées.

Les sujets étaient structurés de la façon suivante :

- intitulés de la séquence et de la séance,
- niveau d'enseignement,
- manipulations réalisables (protocole opératoire et matière d'œuvre),
- protocoles opératoires complémentaires et non réalisables, parfois accompagnés de résultats,
- ressources documentaires diverses : éléments de contexte, supports théoriques, documents d'interprétation, ...

	Séquence	Séance	Niveau d'enseignement	Manipulations proposées
<b>Sujet A</b>	Sensibilité à un agent antimicrobien et cytotoxicité sur les cellules en culture	Introduction à la cytotoxicité sur des cellules eucaryotes	BTS Bioanalyses et contrôles	- Evaluation de la cytotoxicité immédiate d'un désinfectant. - Quantification de l'effet inhibiteur d'une solution désinfectante. - Evaluation de la cytotoxicité de la subtilisine.
<b>Sujet B</b>	Production d'eau destinée à la consommation humaine	Etude de la dénitrification de l'eau par action d'un micro-organisme	BTS Métiers de l'eau	- Dosage des nitrites dans une eau traitée et non traitée - Orientation de l'identification d'une souche bactérienne - Identification d'une souche bactérienne
<b>Sujet C</b>	Contrôle de matières premières et d'agents de fabrication en industrie agroalimentaire	Contrôle de qualité générale du lait cru et des ferments lactiques en industrie fromagère	BTS Bioanalyses et contrôles deuxième année	- Numération des ferments lactiques par la méthode de Breed - Dénombrement des ferments lactiques en milieu solide - Etude de l'activité des ferments lactiques
<b>Sujet D</b>	Thématique de projet : agrocaburants	Suivi de processus de fermentation éthanolique	1 <sup>ère</sup> STL : enseignement de biotechnologies	- Dénombrement par cytométrie - Dénombrement par milieu solide en surface - Dosage du glucose par colorimétrie.

Au cours des cinq premières heures de l'épreuve, les candidats disposaient d'une documentation sur la prévention du risque chimique, d'un ordinateur (système d'exploitation Microsoft) et d'une version numérique des référentiels. Lors de cette session, les candidats avaient à leur disposition pour la présentation orale, un rétroprojecteur et un tableau.

Les candidats ont globalement mieux répondu aux attentes de l'épreuve, notamment au cours de l'exposé et de l'entretien, suivant ainsi les conseils prodigués dans le rapport du concours 2011.

Plusieurs éléments expliquent la disparité des résultats obtenus à cette épreuve.

Les candidats ayant obtenu les moins bonnes notes n'ont pas montré une maîtrise suffisante des compétences technologiques et techniques fondamentales et n'ont pas pris la mesure des aspects liés à l'enseignement technologique : organisation de la classe, prise en compte du référentiel, organisation matérielle... La fragilité, voire l'absence d'acquis technologiques ont été révélées dès l'observation en salle de travaux pratiques et souvent confirmées lors de la prestation orale par un manque de réalisme de la séance élaborée et une absence de prise en compte de la réalité du terrain (niveaux des élèves, programmes, aspects pédagogiques, ...).

Concernant le respect des règles d'hygiène, de sécurité et de gestion des déchets, certains comportements inappropriés ont été observés. Il est inquiétant que quelques candidats à un concours de recrutement de professeurs n'aient pas encore intégré cette dimension indispensable au travail de laboratoire en biotechnologie. La gestion du temps a parfois posé problème, en particulier au cours de l'exposé.

En revanche, les candidats ayant obtenu les meilleures notes ont su faire valoir leur capacité à se projeter dans le métier de professeur de biochimie génie biologique en lycée technologique. Le travail réalisé en laboratoire a permis à ces candidats d'identifier les points critiques des manipulations, d'obtenir des résultats exploitables et d'en tenir compte au cours de la leçon. La démonstration technique de 30 minutes au laboratoire ne s'est pas limitée à une simple mise en œuvre des protocoles. Elle a donné lieu à une présentation pédagogique des points significatifs et des particularités techniques. Pour ces candidats, la gestion efficace de la durée de manipulation a laissé suffisamment de temps pour concevoir une présentation orale de qualité.

La séance présentée au jury a été replacée dans une séquence pédagogique en s'appuyant sur le référentiel ou le programme concerné ; les aspects didactiques, pédagogiques et organisationnels ont été développés et les résultats expérimentaux exploités de manière critique. Les transparents préparés étaient soignés et contenaient des données pertinentes, le tableau a été utilisé à bon escient.

Le jury a pu apprécier de la part de ces candidats, la précision et la rigueur de l'expression orale, leur capacité d'analyse et de synthèse, leur qualité d'écoute et leur aptitude à s'interroger sur les différents aspects de leur présentation.

Pour conclure, le jury invite les futurs candidats à relire la définition de l'épreuve et les consignes publiées sur les sites officiels (EDUSCOL, EDUCNET), pour se placer dans les meilleures conditions de réussite. Il leur est également conseillé de se former en conséquence ou de renforcer leurs compétences didactiques et technologiques.

# EPREUVE SUR DOSSIER

## Sujets 2012 Seconde partie

### « Agir en fonctionnaire de l'état et de façon éthique et responsable »

Chaque sujet comprend :

- un texte de référence : extrait de loi, de décret, d'arrêté, de circulaire, de note de service, extraits de document interne à un EPLE...),
- une mise en situation décrivant très brièvement le contexte dans lequel l'enseignant peut se trouver
- une question demandant l'attitude à avoir face à cette situation.

Les sujets de cette session ont porté sur des thématiques variées : l'accompagnement personnalisé, la communication avec les familles, le rôle du professeur principal, l'intégration des élèves avec un handicap, les indicateurs IPES.

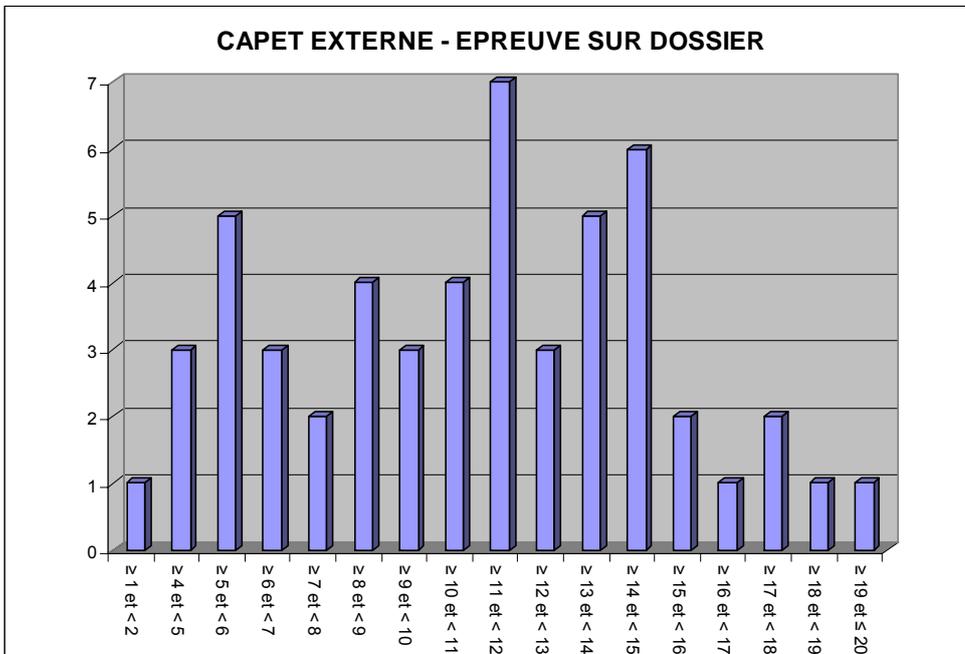
## Rapport de l'épreuve sur dossier

*Rapport établi par* : M. Olivier BEAUMENIL, Mme Géraldine CARAYOL, Mme Elisabeth CHANIAUD, Mme Muriel CHAVANEL, Mme Laurence CHAVANT, M. Joël CNOKAERT, Mme Nathalie COLOMB, M. Joël DENDALETCHÉ, Mme Claire DUBRAC, M. Cyrille GESTIN, M. Frédéric GOMEL, Mme Marie-Armelle HOUQUE, M. Jean-Luc LESTRA, Mme Catherine MALLET, M. Patrick MEUNIER, M. Pierre NARBONNE, M. Michel PRAT, Mme Frédérique TRINIAC

Résultats :

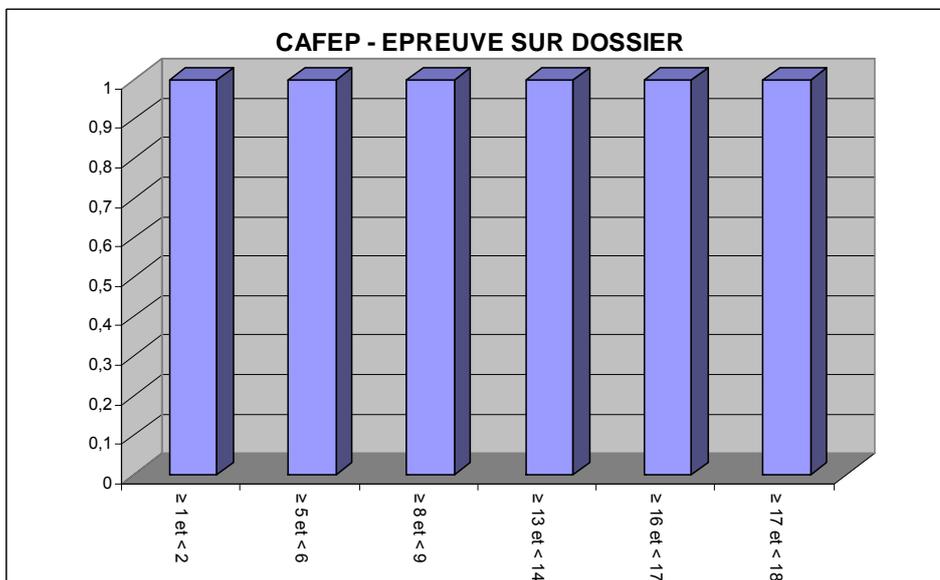
CAPET

≥ 1 et < 2	1	≥ 12 et < 13	3
≥ 4 et < 5	3	≥ 13 et < 14	5
≥ 5 et < 6	5	≥ 14 et < 15	6
≥ 6 et < 7	3	≥ 15 et < 16	2
≥ 7 et < 8	2	≥ 16 et < 17	1
≥ 8 et < 9	4	≥ 17 et < 18	2
≥ 9 et < 10	3	≥ 18 et < 19	1
≥ 10 et < 11	4	≥ 19 et ≤ 20	1
≥ 11 et < 12	7		



### CAFEP

$\geq 1 \text{ et } < 2$	1
$\geq 5 \text{ et } < 6$	1
$\geq 8 \text{ et } < 9$	1
$\geq 13 \text{ et } < 14$	1
$\geq 16 \text{ et } < 17$	1
$\geq 17 \text{ et } < 18$	1



Commentaires : Soutenance de dossier technique

### Dossier

Le jury a apprécié la qualité des prestations des candidats qui se sont adaptés à la nouvelle définition de l'épreuve en tenant compte du rapport du jury antérieur : de nombreux dossiers proposés par les candidats sont

d'un bon niveau scientifique et technologique et présentent une démarche attestant de véritables aptitudes pédagogiques chez le candidat.

Les thématiques choisies par les candidats sont diversifiées et présentent un potentiel scientifique et technologique pouvant servir de support à une transposition pédagogique dans un ou plusieurs enseignements du champ de compétence d'un professeur de biochimie génie biologique : enseignements d'exploration de seconde, enseignement de BPH en ST2S, STL-biotechnologies, STS de biologie appliquée.

Le sujet du dossier doit être contextualisé dans un environnement professionnel défini et doit porter sur une problématique dont le jury apprécie « *l'authenticité et l'actualité* ». Lorsque cela est possible, l'exploitation technique doit être étayée de résultats expérimentaux qui enrichissent la problématique posée. Les travaux universitaires ou les expériences de stage peuvent être le support de l'épreuve à la condition qu'ils soient présentés de façon didactique : l'adaptation du contenu des mémoires ou des thèses, est indispensable afin de répondre aux exigences d'un concours d'enseignement.

Il s'agit donc de présenter la thématique de biotechnologies choisie avec une démarche didactique ainsi que des explications mettant en évidence de véritables aptitudes pédagogiques chez le candidat, d' expliciter la dimension technologique des méthodes ou techniques présentées et utilisées en milieu professionnel, d'effectuer des choix pertinents pour étayer la présentation des méthodes développées.

Les méthodes présentées doivent être suffisamment maîtrisées tant sur leurs dimension théorique : les principes qui sous-tendent ces méthodes doivent être connus et compris pour être expliqués, que sur leur dimension pratique : la mise en œuvre par le candidat de ces méthodes garantit une certaine aisance quant aux contraintes, exigences, qu'elles nécessitent. Enfin, le candidat doit avoir manifesté de la curiosité pour élargir sa culture scientifique relative et connexe au sujet développé.

Concernant la forme, 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,
- relire le dossier pour éviter les fautes d'orthographe et de syntaxe, ainsi que les erreurs de pagination,
- prévoir un sommaire détaillé et une bibliographie.

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

### **Exposé :**

*«L'exposé et l'entretien permettent d'apprécier l'authenticité et l'actualité du problème choisi par le candidat, sa capacité à en faire une présentation construite et claire, à mettre en évidence les questionnements qu'il suscite et à en dégager les points remarquables et caractéristiques de la discipline. »*

Au cours de l'exposé, outre les compétences scientifiques et technologiques qui doivent confirmer celles détectées à la lecture du dossier, la qualité du support de présentation orale est un élément d'appréciation des compétences pédagogiques et didactiques du candidat : le jury souhaite que soient présentés alors les éléments essentiels permettant une compréhension du dossier nécessitant une bonne appropriation du sujet par le candidat.

### ***Exploitation pédagogique***

L'exploitation pédagogique présentée doit également être approfondie et avant tout en adéquation avec la partie scientifique et technique.

Elle doit être pertinente par rapport à la formation : il ne suffit pas de proposer de reproduire en lycée l'expérience faite au cours d'un stage, mais il convient de présenter une séance pédagogique construite et réaliste introduite par un contexte d'actualité motivant, dans laquelle les techniques présentées ne sont pas considérées comme de simples outils, mais comme des supports d'apprentissage.

Dans tous les cas la présentation de la séance doit permettre au candidat de montrer qu'il a mené une réflexion sur :

- les objectifs pédagogiques, qui doivent être cohérents avec le référentiel et à visée formative ;
- les compétences technologiques et scientifiques visées ;

- une réelle analyse raisonnée des risques pour mettre en place une prévention adaptée à la situation lors de la mise en place d'une expérimentation au laboratoire ;
- l'accompagnement des élèves pour la mise en œuvre des activités proposées ainsi que l'évaluation de leurs acquis.

Cela suppose de :

- savoir situer, dans une progression pédagogique, les activités technologiques qui sont proposées. A titre d'illustration, les techniques dont l'acquisition est attendue au baccalauréat doivent être vues avant la fin de deuxième année ;
- connaître les spécificités des enseignements technologiques (connaissance des principes des techniques, gestion des risques, faisabilité en terme de coût et d'équipement, organisation pédagogique...).

Il s'agit de montrer le potentiel de réflexion didactique du candidat même si la maîtrise de la construction de séquence ou de séance n'est pas encore aboutie, et d'amener le candidat à se montrer capable de persuader le jury du bien fondé de ses choix didactiques et pédagogiques. Il montre ainsi une véritable réflexion en amont, retranscrite en une démarche visant à atteindre les objectifs de formation qu'il s'est fixé, au sein du référentiel choisi.

Le jury rappelle l'arrêté du 28 décembre 2009 qui précise que « *L'exposé et l'entretien [...] permettent [...] au candidat de mettre en valeur la qualité de son dossier et l'exploitation pédagogique qu'il peut en faire dans le cadre d'un enseignement.* ».

Par ailleurs, la lecture du même arrêté montre que « *l'épreuve porte sur les programmes des lycées et éventuellement des sections de techniciens supérieurs* » et que le questionnement posé par le candidat doit le conduire à développer « *les points remarquables et caractéristiques de la discipline* » dans laquelle peut enseigner le titulaire d'un CAPET section biotechnologies, option biochimie génie biologique.

Quelques candidats ont présenté une exploitation pédagogique très succincte ou ont exposé une exploitation pédagogique dans des sections sans rapport avec le concours présenté (séquence en lycée professionnel). Une séquence en biologie et physiopathologie humaine de ST2S n'est pas exclue à condition qu'elle permette de démontrer que le candidat sait exploiter l'approche technologique, inductive voire expérimentale pour une construction pédagogique efficace à l'apprentissage des bases de la physiologie humaine dans le contexte santé et social du bac ST2S.

En règle générale, les candidats qui avaient développé une exploitation pédagogique dans leur dossier disposaient d'un support et d'une réflexion préalable qui leur ont permis d'être souvent performants à l'oral. Réserver cette partie pour la présentation orale est un exercice difficile en un temps relativement restreint.

### ***Entretien***

L'entretien permet, entre autres, de vérifier la maîtrise de l'ensemble des concepts scientifiques et technologiques abordés dans le dossier. Le candidat doit pouvoir justifier les choix technologiques et maîtriser aussi bien les concepts scientifiques développés que les principes des techniques mises en œuvre, ainsi que leurs conditions opératoires.

Le jury a constaté chez quelques candidats de profondes lacunes sur les fondamentaux scientifiques et technologiques en lien avec la thématique choisie, lacunes incompatibles avec un enseignement relevant du champ de compétence d'un professeur de biochimie génie biologique. Certains candidats n'ont pas su répondre aux questions relatives aux supports dont ils étaient pourtant l'auteur et pour lesquels ils avaient dû mener des investigations les plus approfondies possible.

Au cours de l'exposé et de l'entretien qui suit, le jury évalue aussi bien les capacités d'analyse du candidat que ses qualités d'écoute et d'adaptabilité ainsi que sa posture, qui doit être celle d'un futur professionnel : la désinvolture dans la préparation matérielle et dans l'attitude face au jury (tenue, expressions, choix du fond d'écran) doit être évitée.

### **Conclusion**

Les candidats qui ont bénéficié d'une véritable expérience en laboratoire de biotechnologies (recherche, industrie, laboratoire d'analyse médicale, vétérinaire, qualité, etc..) expérience qui ne peut se restreindre à une

simple observation mais qui s'accompagne d'une réalisation pratique « à la paillasse » facilitant la prise de conscience de la réalité des contraintes liées aux réalisations, ont généralement tiré profit de cette expérience. Le jury a apprécié les prestations de candidats qui ont réussi à présenter de façon claire et fluide une thématique souvent pointue, à un auditoire de scientifiques non obligatoirement expert de cette thématique, faisant ainsi preuve de réelles qualités pédagogiques.

Le jury a également apprécié, dans certains dossiers puis exposés, la réflexion qui a conduit des candidats à proposer la transposition pédagogique en appréhendant correctement la dimension technologique des différentes techniques.

La pertinence des exploitations pédagogiques nécessite que soient connus :

- les sections au niveau desquelles la discipline est enseignée ;
- les niveaux d'exigence, les spécificités de l'enseignement technologique dans ces différentes classes : enseignement d'exploration de seconde, cycle terminal STL et ST2S, classes de techniciens supérieurs de biologie appliquée ;
- les grandes lignes du programme du niveau dans lequel est proposée l'exploitation pédagogique.

Il convient de rappeler que la présentation d'une séquence, dans laquelle il faut positionner une ou plusieurs séances pour les apprentissages proposés, doit pouvoir être argumentée en incluant les aspects suivants :

- choix des objectifs scientifiques et technologiques visés de la séance, compétences à construire qui sous-tendent des pré-requis,
- réflexion sur les pré-requis : adaptés aux objectifs de la séance.
- choix des activités technologiques.

Les candidats qui ont su faire une présentation didactique d'un sujet scientifique contextualisé, qui en ont proposé une transposition pédagogique pertinente, et ont fait preuve de qualités de communication avec une posture compatible avec le métier ont montré au jury leur aptitude à enseigner.

## **Commentaires : Agir en fonctionnaire de l'état de façon éthique et responsable**

Les sujets étaient tous construits sur un schéma identique : un extrait de texte réglementaire (arrêté, circulaire,...) une mise en situation et une question relative à la situation proposée. Il n'était pas obligatoirement attendu de réponse univoque ou dogmatique mais au minimum un questionnement prenant en compte le contexte, les acteurs de la situation, le caractère toujours délicat des situations rencontrées en lycée.

Les exposés étaient construits et structurés mais leur contenu reprenait trop souvent les éléments d'information donnés dans le texte réglementaire sans prise de recul par rapport à ces éléments. Les candidats ont, le plus souvent, été capables de réagir de façon réaliste et adaptée à la situation proposée et ont souvent montré une attitude responsable lorsque le jury élargissait à d'autres contextes, la question posée.

Les exposés et les réponses aux questions posées ont montré des candidats inégalement préparés à cette épreuve dont certains étaient gênés par leur manque de connaissance dans les domaines suivants :

- fonctionnement de l'établissement scolaire (en particulier, rôles du chef d'établissement),
- la hiérarchie des textes réglementaires,
- le processus de décision dans les établissements (différence entre instance consultatives et instance décisionnelle).

S'il est évident que de futurs enseignants ne peuvent maîtriser intégralement ces éléments, la connaissance globale du positionnement des acteurs dans le fonctionnement des EPLE au sein du système éducatif semble nécessaire à la prise en main de leur futur métier.

La lecture de revues ou de ressources spécialisées, la consultation de sites internet ([www.education.gouv.fr](http://www.education.gouv.fr), [www.eduscol.fr](http://www.eduscol.fr)) aideront les candidats à construire ce socle de connaissances qui comprend en particulier :

- les dix compétences des professeurs
- les récentes évolutions du système éducatif (réforme du lycée, socle commun de connaissances et de compétences ...).

Des observations en établissement, voire une expérience, aideront le candidat à se projeter dans le métier par l'analyse du fonctionnement des établissements, la compréhension des rôles respectifs des différents acteurs, la distinction des missions des instances consultatives et décisionnelles, et surtout l'approche concrète de la réalité du métier de l'enseignant dans la classe et dans l'établissement.

**Le jury recommande aux candidats de ne pas se contenter d'un exposé théorique mais de se projeter dans la situation et répondre avec honnêteté et engagement.**

## **Conclusion**

Certaines prestations ont impressionné le jury, tant par la maîtrise des savoirs et savoir-faire disciplinaires spécifiques aux biotechnologies, par la capacité à concevoir des séquences pédagogiques et par une réflexion déjà très avancée sur le métier de professeur.

## CONCLUSION GENERALE

Le jury félicite les candidates admis au CAPET et au CAFEP.

Comme cela avait été indiqué lors des précédentes sessions, il est nécessaire que les candidats à ce concours se préparent aux épreuves et aient acquis les connaissances scientifiques et technologiques indispensables. Trop de candidats ne les maîtrisent pas et les devoirs révèlent toujours une certaine indigence des éléments présentés.

L'enseignement ne peut se concevoir sans la maîtrise des savoirs enseignés, et celle de l'expression alliant une présentation claire des éléments de réponse et une argumentation des idées développées.

Ce sont ces qualités qui ont été recherchées dans les épreuves d'admissibilité et d'admission.

La première épreuve d'admission a permis de juger à la fois de l'attitude professionnelle des candidates et de leur maîtrise des techniques mais surtout de leur capacité à construire une démarche pédagogique utilisant avec pertinence les éléments techniques. Cette épreuve est difficile car elle nécessite une connaissance des niveaux d'enseignement et des contenus de ces enseignements, une relative maîtrise des gestes techniques qui seront ensuite enseignés aux élèves et enfin elle doit s'appuyer sur un fond culturel scientifique et technique indispensable pour expliquer, analyser, justifier des choix...

Concernant la seconde épreuve d'admission, le jury a, comme l'an passé, globalement apprécié la qualité des dossiers présentés. Cependant trop de dossiers semblent avoir été rédigés rapidement sans vraiment avoir pris la mesure des exigences de l'épreuve en particulier, parfois, les argumentations développées ne s'ancrent que faiblement sur des connaissances scientifiques et technologiques sûres.

La réflexion des candidats face à la compétence agir en fonctionnaire de l'état et de façon éthique et responsable a révélé pour beaucoup d'entre eux un positionnement convenable et une certaine connaissance du système éducatif.

Le jury a apprécié les prestations des candidats reçus qu'il se réjouit de compter bientôt comme futurs collègues.

**Le jury tient à remercier Monsieur le proviseur du lycée Pierre Gilles de Gennes ENCPB et son équipe : proviseur adjoint, enseignants, techniciens, et personnel administratif, pour l'accueil et l'aide efficace apportés tout au long de l'organisation et du déroulement de ce concours qui a eu lieu dans d'excellentes conditions.**