

---

## ÉPREUVE PRATIQUE DE SVT-BIOTECHNOLOGIES

### *SOUS-EPREUVE DE BIOTECHNOLOGIES*

*Le sujet comporte 7 pages numérotées de 1 à 7.*

*Le temps prévu pour la réalisation du sujet est de 1h30.*

*Aucun document n'est autorisé.*

*La calculatrice est autorisée.*

*Tout au long de l'épreuve, penser à présenter clairement tout résultat brut et à indiquer tout mode de calcul ou formule utilisés pour exploiter ces résultats bruts.*

### THEMATIQUE ET PROBLEMATIQUE

#### Dénombrement de microorganismes

#### Contrôle qualité d'un probiotique

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets bénéfiques sur la santé. Ces bactéries du genre *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, ou levures du genre *Saccharomyces*, enrichissent le microbiote intestinal impliqué dans le fonctionnement des entérocytes au cours de l'assimilation des nutriments, stimulent le système immunitaire et préviennent ou traitent la diarrhée. On se propose d'effectuer un contrôle qualité d'un complément alimentaire désigné ULTRA-LEVURE en vérifiant la conformité du contenu d'une gélule par numération cellulaire et dénombrement de *Saccharomyces boulardii*. L'AMM\* du complément alimentaire ULTRA-LEVURE n'est obtenue que si **au moins  $1.10^9$  micro-organismes vivants sont ingérés par jour** lors d'un traitement mettant en œuvre une posologie usuelle à raison de 4 gélules par jour.

Ce contrôle qualité s'effectuera par deux méthodes : une numération directe en cellule de comptage et un dénombrement des colonies après culture sur gélose. Il faudra alors faire une comparaison de ces deux méthodes.

*\*autorisation de mise sur le marché*

### OBJECTIFS

- Dénombrer en cellule de comptage
- Dénombrer en surface d'une gélose
- Comparer les deux méthodes de dénombrement
- Vérifier la conformité du contenu d'une gélule

---

## MISE EN ŒUVRE

PARTIE	ACTIVITES EXPERIMENTALES	FICHES PROTOCOLE	ANNEXES
A	Mise en suspension de la gélule de probiotique	<i>1</i>	-
B	Dénombrement direct des levures vivantes en cellules de comptage	<i>2</i>	<i>1</i>
C	Dénombrement des UFC en surface d'une gélose	<i>3</i>	<i>2 et 3</i>

## DONNEES UTILES

Limite de linéarité du spectrophotomètre à 600 nm en opacimétrie = 0,5

En opacimétrie, 1 unité d'absorbance équivaut à  $10^7$  levures.mL<sup>-1</sup>

FICHE PROTOCOLE 1	A – MISE EN SUSPENSION DES LEVURES
<i>Matériel biologique</i>	<i>Milieux – Réactifs – Equipement spécifique</i>
- Gélule d'ULTRA-LEVURES	- Tube de 10 mL d'eau physiologique

**MISE EN ŒUVRE**

<b>A1</b>	<p><b>Réalisation de la suspension de levures</b></p> <p>① Transvaser quantitativement le contenu d'une gélule d'ULTRA-LEVURE dans 10 mL d'eau physiologique stérile.</p> <p>② Bien homogénéiser.</p> <p>③ Attendre 10 minutes pour permettre la réhydratation des levures.</p>	
-----------	---	--

**FICHE PROTOCOLE 2**      **B – NUMERATION EN CELLULE DE COMPTAGE**

<i>Matériel biologique</i>	<i>Milieux – Réactifs – Equipement spécifique</i>
- Suspension de levures issues de la gélule d'ULTRA-LEVURES	<ul style="list-style-type: none"> <li>- P1000 + cônes, P200 + cônes</li> <li>- Spectrophotomètre réglé à 600 nm, microcuves visibles, parafilm</li> <li>- Cellule de comptage C-CHIP</li> <li>- Eau physiologique</li> <li>- Bleu trypan phéniqué</li> <li>- Gants</li> <li>- Compte-globule</li> <li>- Microscope optique</li> </ul>

**MISE EN ŒUVRE**

<b>B1</b>	① Estimer la concentration en levures de la suspension réalisée après passage au spectrophotomètre.	
<b>B2</b>	<p><b>La manipulation du bleu trypan phéniqué doit se faire avec gants et lunettes.</b></p> <p>② Effectuer, si nécessaire, la dilution nécessaire à la réalisation de la numération cellulaire.</p> <p>③ Mélanger 20 µL de cette dilution à 20 µL de bleu trypan phéniqué.</p> <p>④ Procéder à la numération cellulaire des levures en simple essai.</p> <p>☞ <b>Présenter à l'examineur un champ caractéristique de la numération avec le résultat de comptage associé.</b></p>	

## RAPPORT D'ACTIVITES

**Q1 :** Présenter les calculs nécessaires à la préparation de la numération en cellule de comptage.

**Q2 :** Présenter les résultats de la numération sous une forme appropriée.

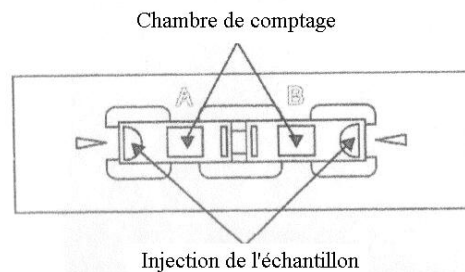
**Q3 :** Calculer le pourcentage de viabilité et commenter ce résultat.

**Q4 :** Conclure quant au contrôle qualité du probiotique en précisant s'il répond à l'autorisation de mise sur le marché.

### ANNEXE 1

### FICHE TECHNIQUE DE LA CHAMBRE DE COMPTAGE

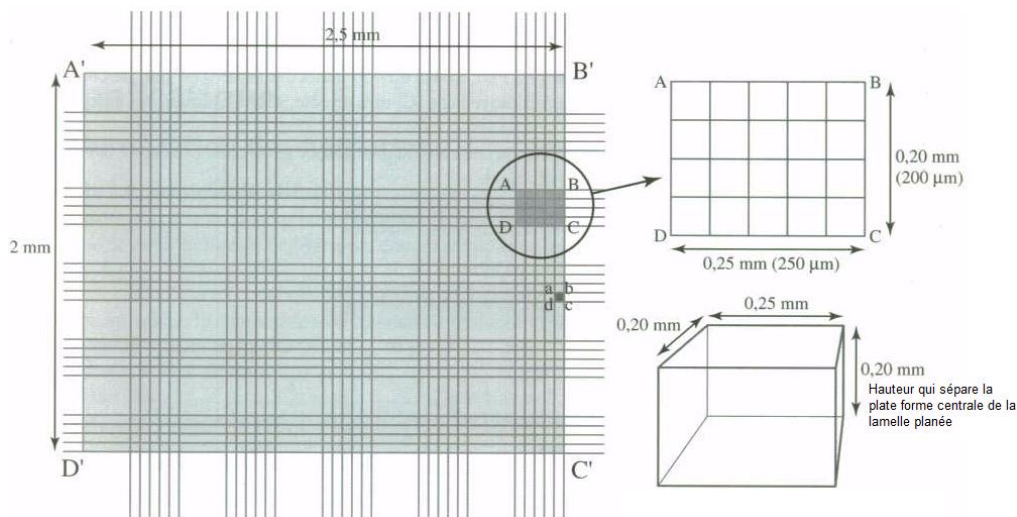
#### 1. DESCRIPTION DE L'HEMATIMETRE DE MALLASSEZ



L'hématimètre de Malassez est une double lame épaisse en plastique jetable sur laquelle on trouve deux chambres de comptage. Chaque chambre de comptage comporte :

- Une lame inférieure sur laquelle on trouve un quadrillage particulier, permettant de se repérer lors du comptage des cellules (quadrillage A'B'C'D').
- Une lamelle supérieure située exactement à 200 µm (0,2 mm) au-dessus de la lame inférieure.

L'échantillon à dénombrer est introduit entre la lame et la lamelle.



Le quadrillage complet A'B'C'D' comporte **100 rectangles ABCD (10x10)**.

Chaque rectangle ABCD surmonté de la lamelle formera une unité de comptage d'un volume

$$V = l \times L \times h ; V = 0,2 \times 0,25 \times 0,2 = 0,01 \text{ mm}^3 = 0,01 \mu\text{L}$$

**Le volume total du quadrillage de Malassez (grand rectangle A'B'C'D') :**

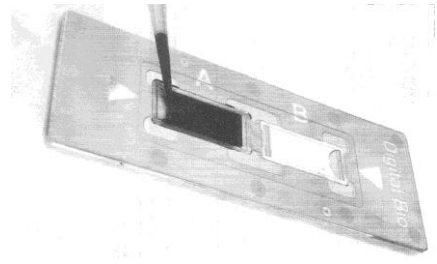
$$V_{\text{total}} = 2 \times 2,5 \times 0,2 = 1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{L} \quad \text{Ou} \quad V_{\text{total}} = 100 \times V = 1 \mu\text{L}$$

---

## 2. RÉALISATION PRATIQUE

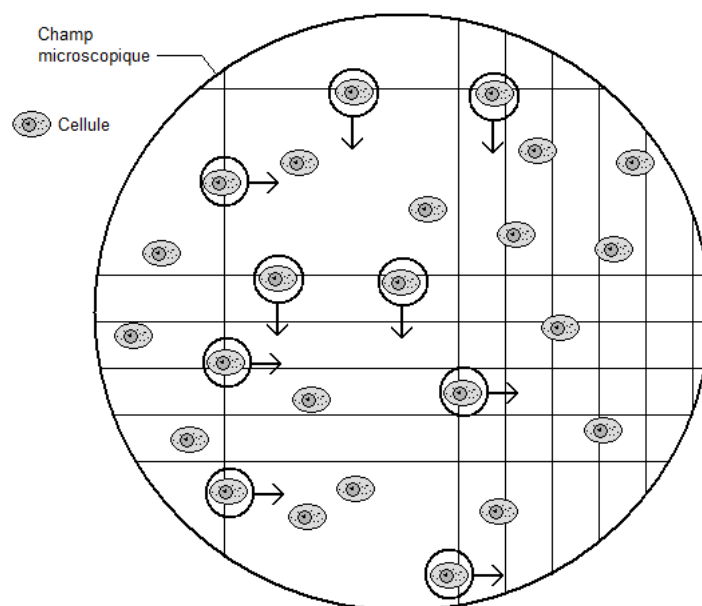
### 2.1 Mise en hématimètre

- Homogénéiser la suspension cellulaire par flux et reflux à la pipette automatique sans faire de bulles.
- Prélever un volume de 20 à 30  $\mu\text{L}$  et remplir intégralement la chambre de comptage en une seule fois, sans bulle, sans débordement.
- Laisser sédimenter les cellules la chambre bien à plat pendant quelques minutes.



### 2.2 Numération

- Vérifier que la répartition des cellules est bien homogène à l'objectif x 10. Si la répartition n'est pas homogène, refaire la mise en hématimètre de la suspension diluée.
- Réaliser la numération à l'objectif x40.
- **Pour réaliser une numération correcte, le nombre de levures par unité de comptage (rectangle ABCD) doit être compris entre 20 et 50 cellules.**
- Procéder au comptage d'environ 200 cellules
  - Soit en balayant le quadrillage de gauche à droite et de haut en bas pour compter dans l'intégralité du quadrillage.
  - Soit en choisissant des rectangles ABCD éloignés les uns des autres pour compter dans une partie du quadrillage.
  - Pour les cellules à cheval entre deux rectangles ABCD, ne compter que les cellules sur les lignes en haut et à gauche du rectangle.
  - Les bourgeons des levures ne sont comptabilisés que si leur diamètre est supérieur à la moitié du grand axe de la cellule mère.



**FICHE PROTOCOLE 3****C – DENOMBREMENT EN SURFACE D'UNE GELOSE**

<i>Matériel biologique</i>	<i>Milieux – Réactifs – Equipement spécifique</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suspension de levures issues de la gélule d'ULTRA-LEVURES</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- P1000 + cônes, P200 + cônes</li> <li>- Tubes à hémolyse</li> <li>- Eau physiologique</li> <li>- Vortex</li> <li>- 2 géloses Sabouraud coulées</li> <li>- Billes de verre ou râteaux</li> </ul>

**MISE EN ŒUVRE**

<b>CI</b>	<p>① Réaliser la gamme de dilutions en cascade au 1/10<sup>ème</sup> sous un volume final de 1 mL en eau physiologique.</p> <p>② Etaler 0,1 mL d'inoculum en surface d'une gélose Sabouraud à l'aide de billes de verre ou d'un râteau pour chacune des deux dilutions choisies. L'ensemencement des géloses se fera en simple essai.</p> <p>③ Incuber les géloses à 30°C 24 à 48h.</p> <p>☞ <b>Montrer à l'examineur la réalisation d'une dilution.</b></p>
-----------	--

**RAPPORT D'ACTIVITES**

**Q5 :** Présenter les calculs nécessaires à la préparation du dénombrement en surface de la gélose Sabouraud.

**Q6 :** Calculer la concentration en UFC.mL<sup>-1</sup> obtenue à partir des résultats donnés dans l'annexe 3. Remarque : le temps d'incubation de 24h vous empêchant de dénombrer les UFC des boîtes que vous avez réalisées, des résultats vous sont fournis afin de poursuivre l'exploitation des manipulations. Ce sont des résultats d'un dénombrement qui aurait été réalisé en double essai.

**Q7 :** Conclure quant au contrôle qualité du probiotique en précisant s'il répond à l'autorisation de mise sur le marché.

**Q8 :** Comparer la méthode de numération en cellule de comptage à la méthode de dénombrement sur gélose sur un plan technique et économique.

**Q9 :** Expliquer les éventuelles différences de résultats obtenus.

**Q10 :** Conclure sur le choix de la méthode.

**ANNEXE 2****ETAPES PRINCIPALES DU DENOMBREMENT EN SURFACE**

- ① Mettre en suspension la gélule de levures en eau physiologique
- ② Estimer la concentration en levures par spectrophotométrie grâce à la corrélation donnée entre l'absorbance à 600 nm et la concentration en levures

- ③ Calculer la dilution cible permettant d'obtenir un nombre d'UFC convenable sur la gélose
- ④ Réaliser la gamme de dilutions décimales en cascade en eau physiologique
- ⑤ Étaler en surface de la gélose 0,1 mL d'inoculum pour chaque dilution choisie
- ⑥ Incuber les géloses à 30°C 24 à 48h
- ⑦ Dénombrer les UFC obtenues selon la norme AFNOR ci-dessous
- ⑧ Calculer et exprimer le résultat de la concentration en UFC.mL<sup>-1</sup> selon la norme AFNOR ci-dessous.

La norme AFNOR est officiellement utilisée pour réaliser un dénombrement de micro-organismes. On considère qu'il est possible de dénombrer jusqu'à 300 colonies sur une boîte. Dans tous les cas, le résultat sera exprimé avec deux chiffres significatifs au maximum de 1,0 à 9,9 associé à la puissance de 10 appropriée.

Cas 1 : Il existe deux dilutions successives pour lesquelles les colonies sont dénombrables et au moins une boîte en contient plus de 15.

On utilise la formule :

$$C_N = \frac{\sum c}{v(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Avec :

$\sum c$  : somme des UFC retenues

v : volume d'inoculum

$n_1$  : nombre de boîtes retenues à la dilution la plus faible des deux dilutions retenues

$n_2$  : nombre de boîtes retenues à la dilution la plus forte des deux dilutions retenues

d : dilution la plus faible des deux retenues

Cas 2 : Une seule des deux dilutions montre des colonies dénombrables. On utilisera la formule de la norme AFNOR en posant  $n_2=0$  et d correspond à la dilution de la boîte comptable.

Cas 3 : Toutes les boîtes ont moins de 15 colonies. S'il y a au moins 1 colonie, calculer la concentration en cellules dans le tube qui a été étalé puis en déduire la concentration en cellules dans le tube initial. S'il n'y a aucune colonie, faire le calcul comme s'il y en avait 1 sur la boîte de la plus forte dilution et conclure par « il y a moins de ... cellules.mL<sup>-1</sup> ».

Cas 4 : Toutes les dilutions ont plus de 300 colonies. Calculer la concentration en cellules dans le tube avec la dilution la plus forte qui a été étalée en prenant 300 colonies. En déduire la concentration dans le tube initial. Le résultat sera exprimé en : « plus de ... cellules.mL<sup>-1</sup> ».

### ANNEXE 3

### RESULTATS DU DENOMBREMENT EN SURFACE

Tableau des résultats obtenus après 24h d'incubation à 30°C :

Dilutions étalées	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
UFC dénombrées	46	3
	47	8