

Concours : CAER CAPET

Section : BIOTECHNOLOGIES

Option : BIOCHIMIE GENIE BIOLOGIQUE

Session 2018

Rapport de jury présenté par : Isabelle FALLER

Présidente du jury

Sommaire

Composition du jury	Page 3
1. Renseignements statistiques	Page 4
2. Epreuve d'admissibilité	Page 5
3. Epreuve d'admission	Page 6
Conclusion générale	Page 8
Annexe : sujet d'admission	Page 9

Composition du jury

Présidente :

Isabelle FALLER – IA-IPR, académies de Strasbourg, Nancy-Metz, Reims

Vice présidente :

Caroline BONNEFOY – IGEN

Secrétaire Générale : Christine SCHNEIDER – DDFPT Académie de Strasbourg

1. RENSEIGNEMENTS STATISTIQUES

Concours : CAER (concours d'accès à l'échelle de rémunération des professeurs certifiés)

Nombre de candidats inscrits	41
Nombre de candidats présents et non éliminés	25 (61 % des inscrits)
Nombre de candidats admissibles	8 (32 % des présents)
Nombre de candidats présents à l'épreuve orale d'admission	7
Nombre de candidats proposés pour l'admission	2
Rappel : Nombre de postes	3

Epreuve d'admissibilité

- Note la meilleure	16.00/20
- Moyenne des notes des candidats admissibles	13.00/20
- Barre d'admissibilité	11.00/20

Epreuve d'admission

- Note la meilleure	14.00/20
- Moyenne des notes des candidats admis	13.50/20

2. ÉPREUVE D'ADMISSIBILITE : RAPPORT DE L'ÉPREUVE

2.1. Attendus de l'épreuve

Le jury rappelle que les épreuves du concours interne du CAPET ont été définies dans l'arrêté du 28 décembre 2009 fixant les sections et les modalités d'organisation des concours du certificat d'aptitude au professorat de l'enseignement technologique (paru au journal officiel du 6 janvier 2010) et complété par l'arrêté du 27 avril 2011.

Par ailleurs, afin de préciser aux candidats les limites de la maîtrise disciplinaire attendue à ce niveau, il est rappelé que le programme, identique à celui du CAPET externe, est consultable dans le Bulletin Officiel de l'Education nationale spécial n° 7 du 8 juillet 2010.

Les deux pages de présentation du parcours

La présentation doit donner une vision globale de la formation initiale du candidat et de son expérience professionnelle. Le candidat présentera son parcours de manière synthétique avec les principales dates et durées de ses différentes expériences professionnelles en lien avec le concours présenté.

De plus, certains éléments choisis dans le parcours doivent illustrer l'adéquation entre l'expérience acquise et le développement des compétences indispensables :

- d'une part à l'exercice du métier d'enseignant,
- d'autre part aux spécificités de l'enseignement technologique en biotechnologies option biochimie génie biologique.

Les six pages : « Construction / Réalisation / Analyse / Projection »

La séquence de formation développée doit être en cohérence avec la discipline du concours et doit inclure la dimension technologique.

Le choix de la situation d'enseignement est déterminant pour faire valoir des compétences didactiques et pédagogiques au travers d'une situation authentique réellement vécue par le candidat. Elle doit permettre une analyse personnelle sur les fonctions de l'enseignant dans cette situation.

En effet la situation choisie doit permettre de montrer la capacité du candidat à mettre en œuvre une démarche technologique avec ses élèves. Le candidat doit expliquer ses choix *a priori*, vérifier leur pertinence après la mise en situation par une analyse *a posteriori* et proposer des actions de remédiation.

2.2. Observations du jury

Le jury a valorisé la capacité des candidats à construire un rapport structuré de manière claire et cohérente, permettant une lecture fluide.

Les rapports les plus pertinents présentent :

- une séance judicieusement choisie dans une séquence pédagogique,
- une réflexion didactique et pédagogique sans se limiter à la seule description du déroulé de la séance,
- une prise en compte de l'hétérogénéité des élèves,
- une évaluation argumentée de l'activité et des compétences des élèves,
- une analyse réflexive *a posteriori*, s'appuyant sur des observations concrètes de la séance,
- une communication écrite de qualité,
- des documents en annexe judicieusement choisis et exploités de façon pertinente.

Le jury regrette que certains rapports présentent une analyse réflexive trop généraliste, déconnectée de la séance proposée.

Les futurs candidats sont invités à tenir compte des observations ci-dessus et à consulter les rapports de jury des sessions précédentes. Le jury encourage les candidats non admis à faire évoluer leur RAEP.

3. ÉPREUVE D'ADMISSION : RAPPORT DE L'ÉPREUVE

3.1. Caractéristiques de l'épreuve

Les candidats ont travaillé sur un même sujet portant sur le programme de biotechnologies de la classe de terminale STL. Il avait pour contexte le contrôle qualité d'une eau de piscine et d'une eau de conchyliculture. Tout au long de l'épreuve, les candidats disposent, en plus du sujet, une clé USB individuelle contenant le sujet et différentes ressources numériques : le programme de l'enseignement de biotechnologies au niveau visé, des fiches techniques en lien avec le sujet, des fiches de données de sécurité, le site 3RB (réseau ressources risques biologiques : www.esst-inrs.fr/3rb/), des logiciels de bureautique (libre office®) nécessaires à l'exploitation des résultats et à la présentation de l'exposé.

Des ouvrages dont la liste figure en annexe 2 en page 62 du rapport du jury de la session 2013 du concours, sont également à disposition.

- L'épreuve débute par cinq heures de préparation en laboratoire de biotechnologies.

Au cours des quatre premières heures, les candidats s'approprient le sujet, réalisent deux des quatre manipulations proposées en vue de l'exposé à présenter au jury. Ils préparent une séquence de formation en lien avec les travaux pratiques comprenant une séance détaillée. Il était demandé d'exploiter au moins une manipulation quantitative.

Une heure et demie après le démarrage de l'épreuve, les candidats effectuent une démonstration technique de leur choix devant les examinateurs. D'une durée de 20 minutes, cette démonstration se décompose en une phase de réalisation commentée tel qu'ils le feraient avec des élèves, puis une phase d'interaction avec le jury.

La dernière heure de préparation permet de finaliser la présentation de l'exposé.

- La partie orale, d'une durée d'une heure face aux membres du jury, est composée d'un exposé et d'un entretien, dans une salle équipée d'un tableau et d'un dispositif de vidéo-projection.

L'exposé de 30 minutes a pour objectifs de décrire une séquence de formation, de présenter de façon détaillée une des séances constitutives de la séquence en y incluant les investigations menées lors des manipulations réalisées au laboratoire, notamment l'exploitation des résultats quantitatifs prenant en compte la métrologie.

L'entretien avec le jury permet au candidat de préciser certains points de sa présentation et de mettre en avant ses qualités pédagogiques, didactiques et sa maîtrise des contenus, notamment les aspects technologiques.

Comme précisé dans l'arrêté du 27 avril 2011, un temps d'entretien maximum 10 minutes est réservé à un échange sur le dossier de RAEP.

3.2. Observations du jury

Pour cette épreuve, le jury évalue les qualités pédagogiques et didactiques, les connaissances scientifiques et technologiques relatives aux techniques mises en œuvre, ainsi que les savoir-faire et attitudes des candidats attendues dans le métier d'enseignant.

Préparation au laboratoire de biotechnologies

Pendant cette première phase, le jury a apprécié pour les meilleurs candidats :

- la posture d'enseignant adoptée dès la démonstration à réaliser dans le laboratoire,
- le choix pertinent des gestes et points critiques exposés devant le jury lors de la visite,
- la bonne organisation dans le temps et l'espace et l'adaptabilité face au matériel à utiliser,
- la réflexion menée et la prise en compte des risques.
- La bonne utilisation des outils informatiques

Des difficultés demeurent pour certains candidats :

- dans l'utilisation de certains matériels usuels : pipettes semi-automatiques, pipette jaugée, balance analytique, burette....,
- dans la réalisation de manipulations classiques : dilutions en série, dosage volumétrique, ensemencement en masse...
- dans l'application de la démarche de prévention, l'utilisation des EPI et la gestion des déchets,
- dans la gestion du temps et le choix des gestes à commenter lors de la visite

Compte tenu de ces constats, les membres du jury conseillent aux futurs candidats :

- de se **préparer** à l'appropriation de documents techniques et à des manipulations pratiquées dans les séries STL, quitte à observer voire à mettre en œuvre ce type de manipulations au cours de séances réalisées par un collègue ;
- de se **préparer** à maîtriser les calculs indispensables à l'exploitation des résultats, prenant en compte les attentes de l'enseignement de mesures et instrumentation (exemple : fondamentaux technologiques et métrologie ...).
- de prendre un temps de lecture du sujet suffisant permettant d'établir un plan d'organisation tenant compte des temps d'attente pour optimiser la gestion des deux manipulations choisies. Au cours de cette lecture, le candidat doit penser à la séance qui sera détaillée au cours de l'exposé et rapidement choisir la démonstration commentée.

Partie orale : exposé et entretien

Le jury rappelle que la définition de l'épreuve impose le réinvestissement des investigations menées au laboratoire, réalisées dans la transposition pédagogique, notamment les points critiques et résultats. Il doit nécessairement faire partie de l'exposé.

Pour certains candidats, le jury a apprécié :

- la posture d'enseignant notamment dans la réactivité, la qualité d'écoute et la maîtrise de la langue ;
- les capacités d'analyse réflexive ;
- une présentation montrant des éléments de créativité, en introduisant dans la séquence des activités cohérentes qui ne figuraient pas dans le sujet ;
- la solidité des connaissances scientifiques et technologiques dans les domaines du sujet ;
- une bonne compréhension de la définition de l'épreuve et des attentes du jury.

Des difficultés demeurent cependant.

La séquence et la séance pédagogiques ne doivent pas se limiter à une simple suite des manipulations non reliées. Une prise de recul et des choix sont nécessaires afin de dégager un sens pédagogique et didactique. Le lien avec les objectifs de formation du programme officiel est attendu pour permettre de dégager les compétences travaillées chez les élèves.

L'évaluation a rarement été développée de manière satisfaisante.

Les concepts liés à métrologie dans l'exploitation et la restitution des résultats, quand ils sont évoqués, sont peu maîtrisés.

L'insuffisance de préparation de certains candidats à ce type de concours ou la mauvaise gestion du stress font courir un risque d'abandon en cours d'épreuve.

Le jury conseille aux candidats :

- d'être attentifs à la posture adoptée qui doit être celle d'un enseignant ;
- de s'approprier les référentiels et de maîtriser les contenus des programmes des enseignements technologiques du domaine des biotechnologies génie biologique;
- d'être en capacité de montrer une certaine prise de recul ou analyse réflexive sur des éléments avancés pour donner du sens aux choix pédagogiques et didactiques ;
- de maîtriser les démarches liées aux enseignements technologiques, notamment la démarche d'analyses de risques, l'exploitation et la validation de résultats conformément aux règles de métrologie ;
- de relire les anciens sujets et rapports de jury pour optimiser sa préparation au concours.

CONCLUSION GENERALE

La session 2018 du CAER interne a admis deux candidats pour les trois postes offerts par le Ministère de l'Education nationale.

L'ensemble du jury tient à féliciter les lauréats. Leur succès au concours de recrutement d'enseignants conduit, dès la rentrée scolaire, à leur nomination en qualité de stagiaire.

Pour l'épreuve d'admissibilité, la plupart des dossiers de RAEP respectait la définition d'épreuve, notamment en termes de forme. Le jury a apprécié les dossiers de RAEP dont la structuration et les contenus personnalisés mettent en valeur les compétences professionnelles développées au cours des années d'exercice des candidats.

Lors de cette session, les candidats ont à nouveau été accueillis la veille de l'épreuve d'admission par la présidente et la secrétaire générale. L'objectif était de préciser aux candidats, les caractéristiques de l'épreuve, son organisation dans le temps, la configuration des locaux mobilisés pendant l'épreuve.

Les candidats admis ont révélé des compétences attendues de la part d'un enseignant : analyse et exploitation efficace des documents, maîtrise des techniques de laboratoire, présentation synthétique, rigoureuse et convaincante des argumentations, maîtrise des contenus, analyse réflexive et enfin qualités d'écoute et de communication.

Si ce concours ne peut être exclusivement réservé aux candidats ayant une expérience d'enseignement en biochimie génie biologique, il est cependant indispensable que les candidats aient pris connaissance de la diversité des enseignements et niveaux de formation auxquels ils peuvent être confrontés en adéquation avec la définition des épreuves.

La diversité des parcours des lauréats montre que ce concours est accessible à des candidats qui savent mettre en valeur leurs acquis et qui ont su élargir leur champ de compétences pour répondre aux différentes dimensions, technologique, pédagogique et didactique attendues.

Pour répondre aux objectifs de l'épreuve d'admission, le candidat doit avoir une réelle maîtrise des notions fondamentales caractéristiques du champ disciplinaire visé par le concours du CAPET CAER de biotechnologies, option biochimie génie biologique. Les supports documentaires de l'épreuve d'admission peuvent aussi bien s'adosser aux programmes des sections technologiques préparant aux baccalauréats scientifiques et technologiques, qu'aux référentiels des sections de technicien supérieur de la filière.

L'expérience d'enseignement se doit d'être doublée d'une préparation sérieuse et rigoureuse pour conduire les candidats à la réussite. Les observations des jurys figurant dans ce rapport ainsi que les rapports précédents, ont vocation à guider les candidats en ce sens.

Le jury tient à remercier, monsieur le Proviseur, madame la directrice déléguée aux enseignements technologiques et l'ensemble des personnels du lycée Jean Rostand de Strasbourg pour l'accueil et l'aide efficace apportés afin que ce concours se déroule dans de bonnes conditions.

CAPET INTERNE

ET CAER

Section : BIOTECHNOLOGIES
Option : BIOCHIMIE – GENIE BIOLOGIQUE

Épreuve pratique d'admission :
Leçon portant sur les programmes des lycées
et des classes post-baccalauréat

Durée : 6 heures
Coefficient : 2

Travaux pratiques : 4 heures
Préparation de l'exposé : 1 heure
Exposé : 30 minutes
Entretien : 30 minutes

Le sujet comporte 15 pages.

Le candidat doit s'assurer de disposer d'un exemplaire complet dès le début de l'épreuve.

Extrait de la définition de l'épreuve

NOR : MENH1310121A

Épreuve pratique d'admission

Leçon portant sur les programmes des lycées et des classes post-baccalauréat.

L'épreuve a pour but d'évaluer, dans l'option choisie, l'aptitude du candidat à concevoir et organiser une séquence de formation pour un objectif pédagogique imposé et un niveau de classe donné.

Elle prend appui sur les investigations et les analyses effectuées au préalable par le candidat au cours de travaux pratiques à partir d'un ou plusieurs protocoles et comporte un exposé suivi d'un entretien avec les membres du jury.

La séquence de formation s'inscrit dans les programmes de lycée ou de classes post-baccalauréat du lycée dans la discipline considérée.

Le candidat est amené au cours de sa présentation orale à expliciter sa démarche méthodologique, à mettre en évidence les informations, données et résultats, issus des investigations conduites au cours des travaux pratiques qui lui ont permis de construire sa séquence de formation, à décrire la séquence de formation qu'il a élaborée, à présenter de manière détaillée une des séances de formation constitutives de la séquence.

Au cours de l'entretien avec le jury, le candidat est conduit plus particulièrement à préciser certains points de sa présentation ainsi qu'à expliquer et justifier les choix de nature didactique et pédagogique qu'il a opérés dans la construction de la séquence de formation présentée. [...]

Conseils du jury :

Le candidat effectue un choix raisonné des compétences à développer chez les élèves ou étudiants, en veillant à la cohérence globale de la séquence bâtie et de la séance détaillée. Les objectifs pédagogiques de la séance seront développés.

Les investigations s'appuieront sur deux protocoles mis en œuvre, par le candidat, au laboratoire. Un de ces protocoles au moins conduira à l'exploitation de résultats quantitatifs, développée lors de la présentation orale.

L'exposé et l'entretien avec le jury permettront au candidat de présenter ses investigations, d'argumenter les choix effectués et d'explicitier sa démarche pédagogique.

La séquence et la séance détaillée à construire, concernent **l'enseignement de biotechnologies** en classe de **terminale STL spécialité biotechnologies**.

Les activités technologiques doivent permettre de développer chez les élèves les compétences du programme. Elles sont proposées dans le cadre du **contrôle qualité d'une eau de piscine** et d'une **eau de conchyliculture**, mais peuvent être envisagées par le candidat dans une autre thématique ou un autre contexte.

Ressources documentaires proposées dans le sujet

Documents d'aide à la contextualisation

Fiche documentaire 1 : évaluation des risques sanitaires liés aux eaux de piscines

Fiche documentaire 2 : évaluation des risques sanitaires liés aux eaux des zones conchylicoles

Fiche documentaire 3 : méthode de dénombrement des micro-organismes revivifiables en milieu gélosé

Fiche documentaire 4 : données sur les cyanobactéries et les microcystines

Fiche documentaire 5 : recherche de *Rotavirus* dans l'eau

Fiches techniques et modes opératoires

Protocole 1 : détermination de l'indice de permanganate

Protocole 2 : réalisation du dénombrement des micro-organismes revivifiables

Protocole 3 : dosage par méthode ELISA en microplaque des microcystines de type ADDA dans l'eau

Protocole 4 : recherche des *Rotavirus* par électrophorèse des produits de RT-PCR

Aide-mémoire de métrologie

Ressources sur support numérique

Fiches et documents techniques : fiches de données de sécurité (FDS)

Logiciels : suite bureautique libre office, régressi

Programmes du cycle terminal de STL biotechnologies :

Mesures et Instrumentation,

Chimie – Biochimie – Sciences du Vivant,

Biotechnologies,

Enseignement Technologique en Langue Vivante.

Site 3RB : site du réseau ressources risques biologiques

Ressources documentaires à disposition dans le laboratoire

Prévention des risques chimiques : signification des phrases du système général harmonisé (SGH)

Liste des ouvrages scientifiques et technologiques disponibles

Précis de biochimie. Harper

Dictionnaire des techniques de microbiologie. CRDP

Les produits laitiers (2^e Éd.). TEC et DOC

Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. LAVOISIER

Science des aliments : Biochimie - Microbiologie - Procédés - Produits. (Volume 1 + Volume 2). LAVOISIER

Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. FLAMMARION

Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. EDUCAGRI

Aliments et boissons - Filières et produits. CRDP

Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. CRDP

Microbiologie alimentaire. Les fermentations alimentaires. TEC et DOC

Microbiologie. DUNOD (initiation à la ..)

Microbiologie. PRESCOTT

Echantillons mis à disposition

- Echantillon d'eau pour la détermination de l'indice permanganate : **eau IP**
- Echantillon d'eau pour le dénombrement des micro-organismes revivifiables : **eau D**
- Echantillon d'eau pour le dosage des microcystines : **eau EL**
- Produit d'amplification de la RT-PCR à partir d'une eau : **PCR**

Fiche documentaire 1 : évaluation des risques sanitaires liés aux eaux de piscines

EXTRAIT DE « Évaluation des risques sanitaires liés aux piscines

Partie I : piscines réglementées - Avis de l'Afsset - Rapport d'expertise collective

Édition de juin 2010 avec addendum de mars 2012 »

« Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

Saisie Afsset n°« 2006/11 » Nouvelle référence 2007-SA-0409 »

Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2007sa0409Ra.pdf> (consulté le 25/03/2018)

La réglementation française relative aux piscines collectives fixe les procédures de déclaration d'ouverture, de contrôle et de maîtrise de la qualité de l'eau, les dispositions relatives à l'hygiène et aux installations sanitaires et les dispositions relatives à l'agrément des nouveaux produits et procédés de désinfection ou de déchloration des eaux de piscines. (...)

Dans cet objectif, l'évaluation des risques a porté sur les piscines françaises à usage collectif, couvertes ou extérieures, alimentées par l'eau du réseau de distribution publique et assujetties au contrôle sanitaire réglementaire au sens du Code de la Santé Publique (CSP). Cette catégorie de piscines représente aujourd'hui plus de 16 000 établissements en France. (...)

La terminologie retenue par l'Afsset pour le terme « piscine » est celle proposée par la commission P91L de l'AFNOR, selon laquelle : « une piscine est un bassin artificiel, étanche, dans lequel se pratiquent des activités aquatiques et dont l'eau est filtrée, désinfectée et désinfectante, renouvelée et recyclée, ainsi que tous les équipements strictement nécessaires à son fonctionnement ».

Paramètres physico-chimiques et microbiologiques proposés dans le cadre du contrôle sanitaire de l'eau et de l'air des piscines collectives ; tableau extrait à partir de la norme présentée dans le rapport INERIS-DRC-15-151883-12362B du 21/07/2016 :

Disponible sur : <https://www.ineris.fr> (consulté le 28/03/2018)

Paramètres physico-chimiques	Valeur impérative*	Valeur guide**
COT : Carbone organique total (mg.L ⁻¹)	≤ 5	-
Turbidité en sortie de filtre (NFU***)	≤ 0,3	-
Chlore actif (mg.L ⁻¹)	0,4 à 1,4	0,3 à 0,6 si les conditions d'hygiène sont respectées
Brome résiduel (mg.L ⁻¹)	1,0 à 2,0	-
pH	6,9 à 8,2 en fonction du désinfectant utilisé	-
Paramètres microbiologiques		Valeur impérative*
<i>Escherichia coli</i> dans 100 mL		Absence
Bactéries aérobies revivifiables à 36°C (UFC dans 1 mL)		< 100
Spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices		Absence
Staphylocoques pathogènes sur les 12 derniers mois pour les piscines ouvertes à l'année : Dans 90 % des échantillons (dans 100 mL) Dans 10 % des échantillons (UFC / 100 mL)		Absence < 30
Staphylocoques pathogènes sur les 12 derniers mois pour les piscines saisonnières : Dans 100 % des échantillons (UFC / 100 mL)		Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (dans 100 mL)		Absence

*Valeur impérative : valeur fixée par une directive

**Valeur guide : valeur plus stricte que la valeur impérative, fixée par l'état

- Bonne qualité si les résultats respectent la valeur guide
- Mauvaise qualité si les résultats ne respectent pas les valeurs impératives
- Qualité moyenne dans les autres cas.

***NFU : Nephelometric Formazine Unit

Fiche documentaire 2 : évaluation des risques sanitaires liés aux eaux des zones conchyloles

Directive Eaux conchyloles

Disponible sur : <http://www.glossaire.eaufrance.fr/concept/directive-eaux-conchyloles> (consulté le 25/03/2018)

Elle concerne la qualité des eaux conchyloles et s'applique aux eaux côtières et aux eaux saumâtres désignées par les états membres comme ayant besoin d'être protégées ou améliorées pour permettre la vie et la croissance des coquillages (mollusques bivalves et gastéropodes) et pour contribuer ainsi à la bonne qualité des produits conchyloles directement comestibles pour l'homme.

Extrait de la directive 79/923/CEE du Conseil, du 30 octobre 1979, relative à la qualité requise des eaux conchyloles

Disponible sur https://aida.ineris.fr/consultation_document/1105 (consulté le 25/03/2018)

Paramètre	Valeur impérative*	Valeur guide**
pH (unité pH)	7 - 9	-
Matières en suspension (mg.L ⁻¹)	L'accroissement de la teneur en matières en suspension provoqué par un rejet ne doit pas, dans les eaux conchyloles influencées par ce rejet, excéder de plus de 30 % celle mesurée dans les eaux non influencées	-
Salinité (‰)	40 ‰	12 - 38 ‰
Oxygène dissous (% de saturation)	70 %	80 %
Substances organo-halogénées	La concentration de chaque substance dans l'eau conchylole ou dans la chair de coquillage ne doit pas dépasser un niveau qui provoque des effets nocifs sur les coquillages et les larves	<i>Ne doit pas dépasser une certaine norme précisée par ailleurs et régulièrement actualisée</i>
Coliformes fécaux/100 mL	-	300 dans la chair de coquillage et le liquide intervalvaire
Saxitoxine (produite par les dino-flagellés)	-	-

*Valeur impérative : valeur fixée par une directive

**Valeur guide : valeur plus stricte que la valeur impérative, fixée par l'état

- Bonne qualité si les résultats respectent la valeur guide
- Mauvaise qualité si les résultats ne respectent pas les valeurs impératives
- Qualité moyenne dans les autres cas.

Fiche documentaire 3 : méthode de dénombrement des micro-organismes revivifiables en milieu gélosé

EXTRAITS DE LA NORME INTERNATIONALE - ISO 6222

Deuxième édition ; 1999-05-15 ; dernier examen en 2015

Introduction

Les eaux, quelle que soit leur nature, contiennent de nombreux micro-organismes d'origines variées (sol, végétation) dont l'estimation globale fournit une information utile pour l'évaluation et la surveillance de la qualité de l'eau.

Le principal intérêt du comptage de colonies réside dans la possibilité de détecter les variations par rapport aux nombres attendus grâce à une surveillance fréquente et à long terme. Une augmentation soudaine du nombre obtenu peut en effet constituer un premier avertissement d'une pollution sérieuse et appeler à des investigations immédiates.

Micro-organismes revivifiables : Toute bactérie aérobie, levure ou moisissure, capable de former des colonies dans le milieu spécifié et dans les conditions d'essai décrites ci-dessous.

Principe

Ensemencement, par mélange dans un milieu de culture spécifié coulé dans des boîtes de Petri, de volumes mesurés d'un échantillon ou de ses dilutions. Incubation d'un jeu de boîtes à 36°C pendant 44 h et d'un autre jeu à 22°C pendant 68 h.

Calcul du nombre d'unités formant colonie (UFC) par millilitre (mL) d'échantillon à partir du nombre de colonies formées dans le milieu.

Milieu de culture

Gélose à l'extrait de levure : Tryptone (6 g), extrait de levure déshydraté (3 g), agar (10 à 20 g en fonction du pouvoir gélifiant), eau qsp 1000 mL.

Mode opératoire

1. Préparation et ensemencement

La dilution doit être choisie de sorte que le nombre présumé de colonies sur la boîte de 90 mm de diamètre soit compris entre 25 et 300.

Utiliser la méthode par incorporation (ISO 8199). Placer un volume de la prise d'essai (ou de ses dilutions) n'excédant pas 2 mL dans la boîte de Petri, ajouter 15 à 20 mL de milieu fondu et mélanger avec précaution par rotation lente.

Laisser le milieu se solidifier. Le temps entre l'addition de la prise d'essai (ou ses dilutions) et l'addition du milieu fondu ne doit pas excéder 15 min. Ensemencer au moins une boîte par température d'incubation.

2. Incubation et examen

Retourner les boîtes et incuber un jeu à (36 ± 2) °C pendant (44 ± 4) h.

Incuber l'autre jeu à (22 ± 2) °C pendant (68 ± 4) h.

Examiner les boîtes aussitôt qu'elles sont retirées des étuves. Si cela n'est pas possible, les conserver à (5 ± 3) °C et les examiner dans les 48 h. Rejeter toute boîte présentant une croissance confluyente.

3. Comptage des colonies

Pour chaque température d'incubation, compter toutes les colonies présentes dans chaque boîte et calculer le nombre estimé d'unités formant colonie présentes dans le volume de référence (généralement 1 ou 100 mL).

Expression des résultats

Exprimer les résultats sous la forme du nombre d'unités formant colonie par millilitre (UFC/mL) d'échantillon pour chaque température d'incubation selon :

$$C_s = \frac{N}{(n_1.V_1.F_1) + (n_2.V_2.F_2) + \dots + (n_i.V_i.F_i)} \times V_s$$

où C_s est le nombre d'unités formant colonie dans le volume de référence V_s d'échantillon.

N est la somme de toutes les colonies comptées provenant des dilutions F_1, F_2, F_i .

n_1, n_2, \dots, n_i sont les nombres de boîtes comptées par dilution.

V_1, V_2, \dots, V_i sont les volumes d'essai de chaque dilution.

F_1, F_2, \dots, F_i sont les facteurs de dilution utilisés pour chaque prise d'essai.

V_s est le volume de référence choisi pour exprimer la concentration de l'échantillon en micro-organismes.

Le comptage total ainsi obtenu est la moyenne pondérée des comptages effectués sur chaque boîte. Il est souhaitable de rendre compte des résultats avec des limites de confiance de 95%.

En l'absence de colonie dans les boîtes ensemencées avec les volumes d'essai de l'échantillon non dilué, exprimer le résultat comme étant non détecté dans un millilitre. Si les boîtes ensemencées avec les plus fortes dilutions

utilisées contiennent plus de 300 colonies, exprimer les résultats sous la forme > 300 ou uniquement en tant que valeurs approximatives.

Fiche documentaire 4 : données sur les cyanobactéries et les microcystines

Les cyanobactéries sont des bactéries photosynthétiques vivant dans l'eau et potentiellement responsables de la production de molécules impactant la qualité de l'eau :

- la géosmine et le méthyl-2-isobornéol sont des **métabolites odorants**, générant des mauvais goûts, surtout en été ou lors de « fleurs d'eau »,
- les cyanotoxines.

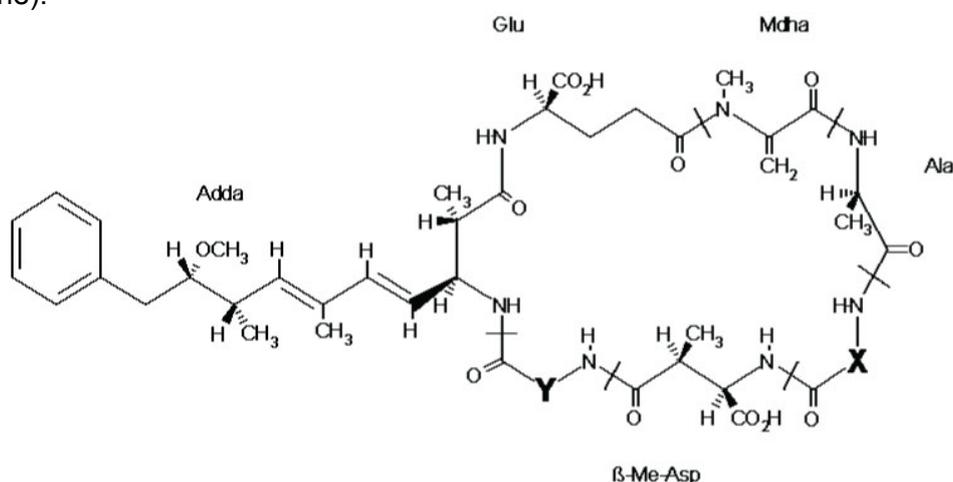
Ces cyanotoxines sont de deux types :

- ⇒ **neurotoxines** : alcaloïdes ; ex : l'anatoxine a produite par *Anabaena*.
- ⇒ **hépatotoxines** : peptides ; ex. les microcystines produites par *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nostoc*...

Les microcystines

Informations sur la molécule

Parmi ces toxines, plus de 80 variétés de microcystines ont été identifiées. Elles possèdent un motif peptidique commun et chacune diffère par la nature de deux acides aminés (nommés X et Y sur le schéma ci-dessous). Le nom de chaque microcystine est terminé par le code à une lettre de ces acides aminés. Par exemple, la microcystine la plus répandue et la plus toxique est la microcystine-LR (Leucine, Arginine).



	X	Y
MC-RR	Arginin	Arginin
MC-YR	Tryptophan	Arginin
MC-LR	Leucin	Arginin
MC-LA	Leucin	Alanin

Elles sont très stables et résistent à la lumière solaire.

Les microcystines s'accumulent dans les poissons, les moules, les palourdes (Groupe scientifique sur l'eau Institut de santé publique du Québec, *Cyanobactéries et cyanotoxines*, 2004), les crevettes, les saumons (Australian Research Network for Algal Toxins, *Microcystins and nodularins*).

Toxicité aiguë

- **Symptômes** : les principaux symptômes sont ceux d'une jaunisse (insuffisance hépatique) : douleurs abdominales, faiblesse musculaire, nausées, vomissements, diarrhées, « chair de poule », forte sensation de soif, pouls élevé, coloration jaune de la peau et urines foncées. La mort survient entre 30 minutes et 24 heures si la dose létale est dépassée.

- **Mode d'action** : la microcystine altère les cellules hépatiques créant une accumulation de sang dans le foie qui peut doubler de volume.

- **Détermination de la dose toxique** : la dose maximale admissible a été définie à partir de la dose sans effets nocifs observables. Elle est donc basée sur des effets de toxicité aiguë.

La valeur guide retenue pour l'eau de boisson est de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (OMS et norme européenne).

Toxicité chronique

Les microcystines sont fortement suspectées d'être un agent promoteur de cancers du foie (Australian Research Network for Algal Toxins, *Microcystins and nodularins*).

Des effets cancérigènes ont été observés chez des animaux (C&B p118 et 130).

Fiche documentaire 5 : recherche de *Rotavirus* dans l'eau

Extrait adapté d'un article de l'Afssa de février 2007

« Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale »

Disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-VirusOral.pdf> (consulté le 25/03/2018)

Nom scientifique: *Rotavirus*, acronyme: HRV (HRV-A : Human Rotavirus A)

Les *Rotavirus* (HRV) sont des virus non enveloppés, leur capsid est de symétrie cubique. Leur génome est constitué de 11 segments d'ARN bicaténaire. Ils appartiennent à la famille des *Reoviridae* et présentent une grande diversité génétique et antigénique. Ils peuvent infecter de nombreuses espèces. L'homme est le réservoir des *Rotavirus* humains. Ces virus sont capables de rester très longtemps infectieux dans l'environnement. La présence de matières fécales augmente leur persistance. Les *Rotavirus* survivent plusieurs heures sur les mains, 9 jours en aérosol (lors des vomissements) et plus de 64 jours à 20°C dans l'eau du robinet.

Méthodes

Seules les techniques capables de détecter un faible nombre d'unités infectieuses sont applicables à la problématique des virus dans les eaux ou dans les aliments. Ceci n'est possible que si une amplification de la cible est réalisée. Cette amplification peut être réalisée soit sur l'ensemble de la particule virale infectieuse en utilisant des cultures de cellules *in vitro* (culture cellulaire) soit sur seulement un des constituants viraux comme le génome en utilisant des réactions enzymatiques *in vitro* (PCR ou RT-PCR).

Enfin il est important de considérer que seule la détection des virus sur culture cellulaire permet de témoigner *in vitro* du pouvoir infectieux du virus isolé : c'est une méthode qui fait référence pour les virus pouvant être multipliés par culture cellulaire.

Néanmoins, certaines souches de *Rotavirus* ne sont pas cultivables sur les lignées actuellement disponibles. Ils ne sont donc pas détectables et *a fortiori* quantifiables par culture cellulaire.

RT-PCR

Avant tout, il est nécessaire de procéder à l'extraction de l'ARN viral en dénaturant les capsides virales. Après extraction, il est nécessaire de le transcrire en ADN complémentaire (ADNc) par RétroTranscription (RT). L'ADNc peut ensuite être amplifié par « Polymerase Chain Reaction » (PCR). Dans ce cadre, il est possible de distinguer les techniques qualitatives des techniques quantitatives.

Pour les protocoles qualitatifs, les produits amplifiés sont détectés :

- **par observation sous UV après électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide** en présence d'un agent intercalant fluorescent (Bromure d'éthidium ou BET, GelRed, ...). Les fragments sont séparés en fonction de leur masse moléculaire. La révélation des fragments amplifiés après une simple électrophorèse reste la technique dont le seuil de détection est assez élevé.

- **par hybridation moléculaire**. Différents cas de figures peuvent alors être envisagés. Il est possible de fixer l'ADN amplifié tel quel sur des membranes de nylon ou de nitrocellulose (dot-blot ou slot blot) et de révéler leur présence par des sondes marquées. Il est aussi envisageable de déposer les produits amplifiés dans des puits de microplaque dont le fond est recouvert de sondes complémentaires du fragment à détecter (DNA Enzyme Immuno Assay ou DEIA). Il est également possible de réaliser l'hybridation sur des puces à ADN pouvant contenir jusqu'à 100 000 sondes différentes.

- **par couplage d'une électrophorèse et d'une hybridation moléculaire** (Southern blot). Les fragments amplifiés sont séparés en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse, puis transférés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose pour finalement être révélés par des sondes spécifiques marquées.

- **par PCR en temps réel**. Il s'agit d'une technique où l'étape de révélation du produit amplifié se fait directement au cours de l'amplification. Le principe de cette technique est fondé sur la mesure de la fluorescence émise au cours de la PCR qui est proportionnelle au nombre de copies d'ADN néosynthétisées.

Le choix de la séquence cible, des amorces est une étape importante en termes de spécificité et de seuil de détectabilité. Ainsi, ce choix est différent selon que l'on cherche à identifier une souche donnée (typage) ou à diagnostiquer la présence d'une contamination virale globale.

Dans le premier cas, des amorces et/ou des sondes s'hybrident sur des séquences spécifiques propres à la souche recherchée, sont utilisées.

Dans le second cas, la détection est fondée sur la recherche de séquences conservées au cours de l'évolution présentes chez toutes les souches à identifier.

Protocole 1 : détermination de l'indice de permanganate

Principe

Il s'agit d'un dosage volumétrique par manganimétrie en retour.

L'indice permanganate (IP) est la masse d'oxygène cédée par l'ion permanganate et consommée par les matières organiques oxydables contenues dans 1 litre d'eau. Il est exprimé en $\text{mg d'O}_2\cdot\text{L}^{-1}$.

Etape 1 : un échantillon d'eau est oxydé en milieu acide, pendant 10 minutes à ébullition, par une solution de permanganate de potassium en excès

Etape 2 : les ions permanganate encore présents réagissent avec une solution d'oxalate de sodium introduite en excès

Etape 3 : les ions oxalate restants réagissent avec un volume minimum de solution de permanganate de potassium.

Le témoin « matière organique » réalisé en amont de l'étalonnage, permet de s'affranchir de la présence de matière organique dans la fiole d'Erlenmeyer

Couples mis en jeu : $\text{MnO}_4^-/_{(\text{aq})}\text{Mn}^{2+}_{(\text{aq})}$ et $\text{CO}_{2(\text{aq})}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}_{(\text{aq})}$

Procédure du dosage

1. Matériel et réactifs

- | | |
|------------------------------------|---|
| ✓ Burette de 25 mL | ✓ Echantillon à doser : eau IP |
| ✓ Fioles d'Erlenmeyer de 250 mL | ✓ Eau déminéralisée |
| ✓ Pipettes jaugées de 20 et 100 mL | ✓ Oxalate de sodium à $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| ✓ Pipette graduée de 20 mL | ✓ Permanganate de potassium à environ $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| ✓ Agitateur à plaque chauffante | (Attention , voir FDS) |
| ✓ Aimant | ✓ Acide sulfurique à $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Corrosif , voir FDS) en distributeur sous hotte |
| ✓ Chronomètre | ✓ Sel de Mohr (solution de lavage) |

Une évaluation des risques *a priori* doit être menée préalablement à la réalisation de la manipulation
Le contenu des fioles d'Erlenmeyer est récupéré dans le bidon de récupération des déchets placé sous la hotte.

La verrerie en contact avec le permanganate de potassium sera rincée avec une solution de sel de Mohr à l'issue de la manipulation.

2. Mode opératoire

2.1. Essai (à réaliser en double)

- Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, introduire une prise d'essai de 100,0 mL d'eau à analyser.
- Ajouter 20 mL d'acide sulfurique à $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ avec le distributeur.
- Homogénéiser et ajouter $V_p = 20,0 \text{ mL}$ de permanganate de potassium ($\text{K}^+_{(\text{aq})} + \text{MnO}_4^-_{(\text{aq})}$) à environ $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Homogénéiser, boucher avec du papier aluminium.
- Porter à ébullition sur la plaque chauffante (degré de chauffe réglé à 12). Laisser 10 minutes exactement à ébullition douce (baisser le degré de chauffe à 4).
- Enlever la fiole d'Erlenmeyer de la plaque chauffante et ajouter $V_o = 20,0 \text{ mL}$ d'oxalate de sodium ($2 \text{ Na}^+_{(\text{aq})} + \text{C}_2\text{O}_4^{2-}_{(\text{aq})}$) à $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Attendre la décoloration.

Doser l'excès d'oxalate avec la solution de permanganate de potassium à environ $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant que la solution est encore chaude jusqu'à persistance d'une coloration rose pâle pendant environ 30 secondes. Attention, cette coloration est très pâle.

Afin de bien la visualiser, comparer la couleur à une fiole contenant de l'eau pure.

Noter V_E le volume versé, réajuster la burette à zéro.

2.2. Témoin « matière organique » et étalonnage (à réaliser de façon consécutive, dans la même fiole d'Erlenmeyer)

Témoin « matière organique »

- Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, introduire une prise d'essai de 100,0 mL d'eau déminéralisée
- Ajouter 20 mL d'acide sulfurique à 2 mol.L⁻¹ avec le distributeur.
- Homogénéiser et ajouter V_p = 20,0 mL de permanganate de potassium (K⁺_(aq) + MnO₄⁻_(aq)) à environ 2 mmol.L⁻¹.
- Homogénéiser, boucher avec du papier aluminium.
- Porter à ébullition sur la plaque chauffante (degré de chauffe réglé à 12). Laisser 10 minutes exactement à ébullition douce (baisser le degré de chauffe à 4).
- Enlever la fiole d'Erlenmeyer de la plaque chauffante
- Ajouter V_o = 20,0 mL d'oxalate de sodium (2 Na⁺_(aq) + C₂O₄²⁻_(aq)) à 5,0 mmol.L⁻¹. Attendre la décoloration.
- Verser le permanganate de potassium jusqu'à l'apparition de la coloration rose pâle pendant 30 s.
- **Relever la valeur du volume V_T** (habituellement faible). **Ne pas réajuster la burette à zéro.**
- Conserver la solution obtenue, notée S.

Etalonnage de la solution de permanganate

- Ajouter 20,0 mL de la solution d'oxalate de sodium à la solution S.
- Réchauffer la solution obtenue à environ 80°C (degré de chauffe à 4) puis enlever la fiole d'Erlenmeyer de la plaque chauffante.
- Verser le permanganate de potassium jusqu'à l'apparition de la coloration rose pâle pendant 30 s.
- **Relever la valeur du volume V_s obtenu.**

Exploitation des résultats

$$\text{Indice de permanganate (IP)} = 16 (V_E - V_T) / V_S \quad \text{en mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$$

avec V_E, V_T et V_S en mL.

Métrologie :

$$\begin{aligned} sr &= 0,05 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \\ u_c &= 0,20 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \end{aligned}$$

Donnée :

IP est à peu près égal à 1,25 x COT (carbone organique total)

Protocole 2 : réalisation du dénombrement des micro-organismes revivifiables

1. Matériels et réactifs

- ✓ Echantillon : **eau D**
- ✓ 3 tubes de 9 mL d'eau peptonée stérile
- ✓ 8 tubes de 12 mL de gélose PCA en surfusion à 55 °C
- ✓ 8 tubes de 5 mL de gélose PCA en surfusion à 55 °C
- ✓ 8 boîtes de Pétri stériles
- ✓ Pipettes graduées stériles de 1 mL
- ✓ Systèmes d'aspiration

2. Mode opératoire

2.1. Réalisation des dilutions

A partir de l'échantillon d'eau à analyser, réaliser des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} à l'aide des tubes de 9 mL d'eau peptonée stérile.

2.2. Dénombrement des micro-organismes revivifiables selon la norme AFNOR ISO 6222

Tester, par ensemencement dans la masse de gélose PCA et en double essai, l'échantillon d'eau à analyser et les dilutions réalisées à partir de cet échantillon :

- répartir 1 mL de suspension au fond d'une boîte de Pétri stérile ;
- verser 12 mL de gélose PCA en surfusion à 55°C ;
- homogénéiser délicatement ;
- laisser solidifier ;
- verser 5 mL de gélose PCA en surfusion à 55°C ;
- laisser solidifier ;
- incuber selon la norme décrite dans la fiche documentaire 3, **indiquer la température d'incubation sur les boîtes.**

A la demande des candidats, des résultats peuvent leur être fournis, si la manipulation a été menée jusqu'à l'incubation.

3. Expression des résultats

Il est souhaitable de noter les résultats d'un tel dénombrement de colonies avec des limites de confiance à 95 %, qui peuvent être obtenues en appliquant les équations suivantes :

C_s est l'estimation du nombre d'ufc ou de pfc dans le volume de référence V_s d'échantillon;

Z est la somme de toutes les colonies dénombrées dans les boîtes ou sur les membranes provenant des dilutions d_1, d_2, \dots, d_i , ou obtenues dans les volumes séparés de prise d'essai (échantillon ou dilution);

V_s est le volume de référence choisi pour exprimer la concentration de micro-organismes dans l'échantillon;

V_{tot} est le volume total calculé d'échantillon d'origine inoculé dans les boîtes dénombrées. V_{tot} est soit la somme des volumes séparés de prise d'essai (échantillon ou dilution), soit calculé par l'Équation (2):

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i) \quad (2)$$

$$C_s \pm IC \text{ à } 95 \% = \left(\frac{Z \pm 2\sqrt{Z}}{V_{tot}} \right) \times V_s = \left(\frac{Z}{V_{tot}} \pm \frac{2\sqrt{Z}}{V_{tot}} \right) \times V_s \quad (3)$$

2) Si $Z < 20$, l'effet de l'asymétrie croissante de la loi de Poisson sur les limites de confiance est plus ou moins pris en compte en ajoutant les petites corrections de l'Équation (4):

$$IC \text{ à } 95 \% \text{ sup. et inf.} = \left(\frac{Z + 2 \pm 2\sqrt{Z+1}}{V_{tot}} \right) \quad (4)$$

Protocole 3 : dosage des microcystines de type ADDA dans l'eau par méthode ELISA en microplaque

Principe du test

Il s'agit d'une méthode immunoenzymatique ELISA de type sandwich permettant la détection des microcystines de type ADDA (une classe de microcystines contenant un ADDA, qui est un acide β -aminé inhabituel) et de quelques molécules proches. Il est basé sur la reconnaissance spécifique de ces différentes molécules par un pool d'anticorps.

Les microcystines sont retenues par des anticorps monoclonaux de souris anti-microcystines adsorbés sur les cupules de barrette. D'autres anticorps monoclonaux de souris anti-microcystines, couplés à la PAL (conjugué) forment un complexe avec les microcystines de l'échantillon. L'ajout d'un substrat chromogène de l'enzyme permet de quantifier les microcystines dans l'échantillon.

Le développement de la couleur est arrêté après un temps défini et son intensité est mesurée grâce à un lecteur de microplaque spectrophotométrique. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration en microcystines.

La concentration des microcystines est déterminée grâce une courbe d'étalonnage réalisée en parallèle.

Procédure du dosage

1. Matériel et réactifs

- ✓ Eau à analyser : **eau EL**
- ✓ Pipettes automatiques avec cônes adaptés, pipettes molles compte-gouttes
- ✓ Parafilm, feuilles de papier filtre, chronomètre
- ✓ 4 tubes à hémolyse
- ✓ Ravier pour lavages
- ✓ Poubelles DASRI, gants
- ✓ Agitateur de microplaque
- ✓ Lecteur de microplaque avec filtre à 405 nm
- ✓ Barrette de 8 cupules sensibilisées par des Ac monoclonaux anti-microcystines
- ✓ Cadre porte-barrette
- ✓ Solution étalon de microcystines à $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ (C1)
- ✓ Sérum étalon négatif (T-)
- ✓ PBS : tampon diluant de la solution étalon
- ✓ PBS tween : solution de lavage des cupules
- ✓ Conjugué (Conj) : solution d'Ac anti-microcystines conjugué à la PAL
- ✓ pNPP : solution de substrat chromogène de l'enzyme (**à demander aux examinateurs 15 minutes avant usage**)
- ✓ Solution d'arrêt (NaOH, 2 mol.L^{-1} , **Corrosif** voir FDS)

Les déchets issus des lavages doivent être traités comme des DASRI et versés dans des récipients de collecte adaptés.

2. Mode opératoire

2.1. Dilution de l'étalon de microcystines

- Annoter 4 tubes à hémolyse.
- Préparer dans ces tubes 4 solutions étalon par dilution de la solution étalon C1 de microcystines à $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ selon le tableau suivant :

	C2	C3	C4	C5
Tampon PBS en μL	200	200	200	200
Étalon C1 en μL	200	-	-	-
Redistribuer	-	200	200	200
Jeter	-	-	-	200
Facteur de dilution	2	4	8	16

2.2. Réaction immunologique

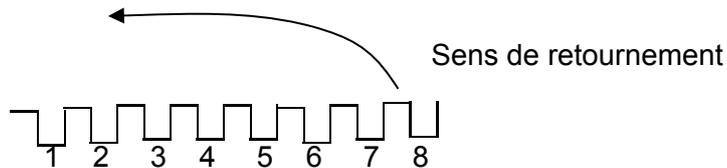
- Laver 1 fois toutes les cupules de la barrette sensibilisée en PBS-Tween (250 µL de liquide de lavage par cupule, 30s de contact)
- Repérer l'encoche sur la barrette afin de la placer sur le cadre porte-barrette avec le puits A en haut et le puits H en bas.
- Remplir les cupules avec 50 µL de chacune des solutions indiquées selon le tableau suivant :

Puits	A	B	C	D	E	F	G	H
Solution	Eau à analyser	Eau à analyser	C1	C2	C3	C4	C5	T-

- Recouvrir et incuber 20 minutes à température ambiante sous agitation.

▫ Lavages

- Réaliser 3 lavages successifs avec du PBS –Tween
- Vider les cupules en retournant la barrette du puits 8 vers le puits 1 pour éviter les contaminations. au dessus d'un bac d'eau de Javel.



Tapoter les cupules sur un papier absorbant.

▫ Ajout du conjugué

- Distribuer 50 µL de conjugué anti microcystines-PAL dans les cupules.
- Incuber 20 minutes à température ambiante sous agitation.

▫ Lavages

- Réaliser 3 lavages successifs avec du PBS –Tween comme précédemment.

2.3. Révélation

- Ajouter dans les puits 50 µL de pNPP (**à demander aux examinateurs 15 minutes avant usage**).
- Laisser la réaction se développer quelques minutes, ce temps devra être exactement le même pour chaque cupule.
- Ajouter 20 µL de solution d'arrêt dans toutes les cupules en respectant le même ordre de distribution que lors du dépôt du substrat.

2.4. Lecture

Mesurer rapidement les absorbances à 405 nm contre T- (cupule H).

3. Résultats

	Eau à analyser	Eau à analyser	C1	C2	C3	C4	C5	T-
Concentration en microcystines en µg.L ⁻¹								
A à 405 nm								

4. Validation de la méthode

- absorbance de C5 > 0,05
- absorbance du C1 ≥ 1
- rapport (A étalon C1 / A étalon C5) > 5,0

5. Exploitation

Tracer $A_{405\text{ nm}} = f(\rho \text{ en } \mu\text{g.L}^{-1})$ puis déterminer graphiquement la teneur en microcystines de l'eau à analyser.

sr = 0,2 µg.L⁻¹

Protocole 4 : recherche des *Rotavirus* par électrophorèse des produits de RT-PCR

1. Matériel et réactifs

- ✓ Produit d'amplification de la RT-PCR à partir d'une eau : **PCR**
- ✓ Marqueur de taille noté « MqT »
- ✓ Contrôle positif noté « C+ »
- ✓ Agarose en poudre spécial biologie moléculaire
- ✓ Tampon d'électrophorèse TAE 50X (Tris-acétate-EDTA concentré 50 fois) noté « TAE »
- ✓ Tampon de charge 6X noté « Tc »
- ✓ Portoir de coulage du gel
- ✓ Cuve d'électrophorèse et générateur
- ✓ Câbles de branchement
- ✓ Gants thermiques
- ✓ Fiole d'Erlenmeyer de 100 mL et éprouvette graduée
- ✓ P10 et cônes effilés adaptés
- ✓ Four micro-onde

2. Préparation du gel d'agarose à 2 %

- Peser environ 0,5 g d'agarose dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 mL.
- Préparer, en éprouvette graduée, 25 mL de Tampon TAE 1X à partir de TAE 50X.
- Préparer le portoir de coulage du gel avec 2 plaques obturantes et un peigne (**opération déjà réalisée**)
- Dissoudre l'agarose avec les 25 mL de TAE 1X en chauffant au four à micro-onde, la fiole d'Erlenmeyer jusqu'à ébullition.
- Couler le gel refroidi à environ 50 °C dans le portoir de coulage. Eliminer les bulles d'air avec la pointe d'un cône effilé.
- Laisser prendre en masse environ 20 minutes.
- Enlever les plaques obturantes et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Retirer délicatement le peigne.
- Le couvrir du tampon de migration fourni.

3. Réalisation des dépôts et migration électrophorétique

- Mélanger directement les 20 µL de marqueur de taille, de contrôle positif et de produit d'amplification de la RT-PCR avec 4 µL de tampon de charge.
- Déposer 10 µL des échantillons dans les puits, en réalisant deux dépôts distincts de l'échantillon.
- Brancher la cuve d'électrophorèse sur le générateur.

A la demande des candidats, des résultats (photo du gel après migration) peuvent leur être fournis si la manipulation a été menée jusqu'à la migration.

4. Exploitation des résultats

Le kit utilisé en amont de l'électrophorèse permet de réaliser une RT-PCR avec des amorces spécifiques du gène codant la protéine VP6 des *Rotavirus* et permettant l'amplification d'un fragment de 382 paires de bases (pb).

Aide mémoire de métrologie

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

Vérification de la bonne exécution de la procédure

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

On effectue, dans la même série de mesurages :

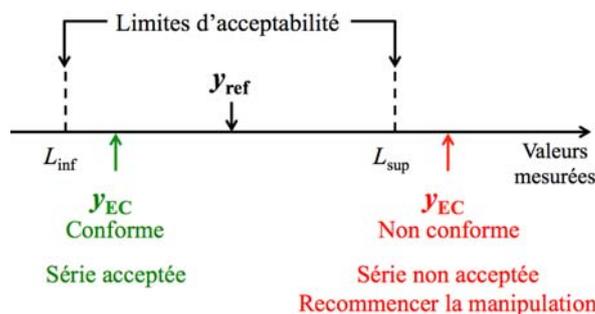
- un essai sur un étalon de contrôle ; la valeur mesurée obtenue est notée y_{EC} .
- un ou deux essais sur chacun des échantillons à doser.

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

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

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

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



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

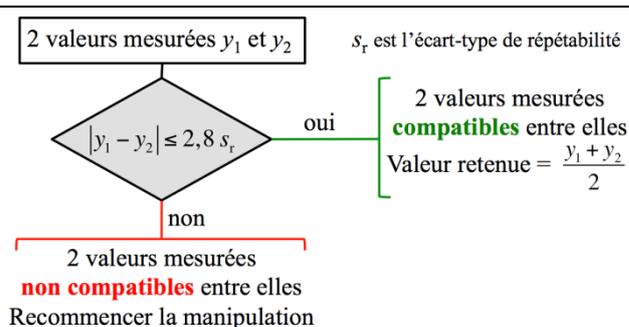
- la valeur mesurée n'est **pas exacte** donc **non conforme** : l'exécution de la procédure de mesure n'est pas satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées de toute la série **ne sont pas acceptées** ; il faut rechercher l'origine de la mauvaise exactitude avant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

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

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

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

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



Guide pour l'expression du résultat de mesure

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

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

- avec un chiffre significatif si le premier chiffre de la valeur numérique est > 4
- avec deux chiffres significatifs si le premier chiffre est 1, 2, 3 ou 4.

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

Expression du résultat de mesure :

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