Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV©

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :
www.formav.co/explorer

SESSION 2020
Métropole

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR AGRICOLE

E5 LABORATOIRE

Option : ANABIOTEC

Durée : 180 minutes

Matériel(s) et document(s) autorisé(s) : **calculatrice**

Le sujet comporte 15 pages

NB : les documents et le contexte ont été modifiés pour les besoins de l'épreuve

---

SUJET

Les bienfaits et les risques de la consommation de graines germées : le cas du fenugrec

Vous êtes technicien(ne) au sein du laboratoire d'une entreprise qui produit des graines germées utilisées comme aliment. L'entreprise souhaite diversifier sa production en développant un nouveau produit : les graines germées de fenugrec, une plante herbacée qui est utilisée à des fins alimentaires. Plusieurs sites internet vantent les mérites et les bienfaits de sa consommation **(document 1).** Votre mission au laboratoire consiste à mettre en place et réaliser les analyses de contrôle de la qualité sanitaire et nutritionnelle de ce nouveau produit, à savoir :

- Confirmation de la validation d'une méthode alternative par rapport à la méthode de référence pour la recherche de *Escherichia coli* O157:H7.
- Dosage du fer par spectrométrie d'absorption atomique.

PARTIE 1 (12 points)

En Europe, en 2011, plusieurs milliers de personnes ont été intoxiquées et 47 sont décédées, suite à la consommation de graines germées de fenugrec contaminées par *Escherichia coli* O157:H7.

Compte tenu de ces accidents, une surveillance ciblée des *E. coli* dites entérohémorragiques (ECEH) est nécessaire. En effet, ces souches provoquent des diarrhées sanglantes et produisent une puissante toxine à l'origine du syndrome hémolytique et urémique (SHU).

1. Proposer un plan de contrôle par rapport au risque sanitaire lié à la présence de *E. coli* O157:H7. Vous limiterez le plan aux deux seules étapes « Trempage en eau chlorée » et « Conditionnement et stockage » (**document 5**).

2. Préciser, en justifiant votre réponse, la façon dont le risque biologique doit être géré au laboratoire compte tenu de l'appartenance de ces souches à la classe 3.

La recherche d'*E. coli* O157:H7 peut se faire selon deux méthodes : la méthode de référence et la méthode alternative.

3. Préciser le rôle des principales étapes de chaque méthode et justifier pourquoi le laboratoire envisage d'utiliser la méthode alternative (**documents 2, 3 et 4**).

4. Afin de confirmer ce choix, on souhaite comparer les résultats de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence. Pour cela, le laboratoire a procédé à un dénombrement en double de *E. coli* sur 11 prélèvements de graines germées.

Le tableau suivant récapitule les résultats obtenus au terme de cette analyse en UFC/g de graine. (Nombre de colonies suspectes)

Prélèvement n°	Méthode de référence	Méthode alternative
1	5	4
2	6	5
3	5	5
4	4	6
5	4	4
6	4	4
7	5	4
8	6	6
9	5	7
10	4	5
11	7	5

On note X_1 la variable aléatoire prenant pour valeurs le nombre de colonies suspectes en UFC/g de graines obtenues à l'aide de la méthode de référence.

On note X_2 la variable aléatoire prenant pour valeurs le nombre de colonies suspectes en UFC/g de graines obtenues à l'aide de la méthode alternative.

Les distributions des variables aléatoires X_1 et X_2 ne sont pas connues.

4.1 Choisir, en justifiant, le test statistique à effectuer pour déterminer si les résultats de la méthode alternative ne sont pas significativement différents de ceux de la méthode de référence **(document 6).**

4.2. Déterminer, à l'aide du test statistique choisi, au seuil de risque de première espèce 0,05, si les résultats de la méthode alternative ne sont pas significativement différents de ceux de la méthode de référence. Conclure quant au choix de l'entreprise.

PARTIE 2 (8 points)

Une des caractéristiques du fenugrec est sa richesse en fer.

Le fournisseur de la matière première (graines de Fenugrec) garantit une teneur minimale en fer de 35,5 mg / 100 g.

Vous devez déterminer la teneur d'un échantillon de 5 g de graine par la technique d'absorption atomique selon le protocole du **document 7.**

5. Justifier l'utilisation de l'eau déminéralisée ultra pure pour la préparation des échantillons et de la gamme étalon.

6. Justifier le choix de cette méthode pour doser le fer en expliquant son principe.

7. Identifier les étapes pré-analytiques, analytiques, post-analytiques de la méthode.

8. Préciser les précautions de sécurité à prendre pour l'utilisation du spectromètre d'absorption atomique **(document 8).**

Le résultat de votre analyse est présenté dans le tableau ci-dessous en mg pour 5 grammes de graines :

Répétition 1	Répétition 2
1,8	1,9

9. Conclure quant à la conformité ou non avec les données fournisseur.

Liste des documents joints :

Document 1 : le fenugrec (sources www.bonneplante.com; www.mr-ginseng.com)

Document 2 : Méthode de référence NF EN ISO 16654 pour la recherche de *E. coli* O157:H7 *(*Document élaboré à partir d'extraits des données des fournisseurs)

Document 3 : Méthode alternative RAPID'*E.coli* O157:H7 *(*Document élaboré à partir d'extraits des données des fournisseurs)

Document 4 : Réactifs microbiologiques utilisés et principes pour les deux méthodes de détection de *E. coli* O157:H7 *(*Document élaboré à partir d'extraits des données des fournisseurs)

Document 5 : Diagramme de production de graines germées de fenugrec (Document élaboré pour les besoins de l'épreuve)

Document 6 : Tests de comparaison de 2 moyennes de 2 populations (Échantillons de petites tailles)

Document 7 : Dosage du fer par absorption atomique

Document 8 : Pictogrammes de sécurité de l'acétylène

DOCUMENT 1

Le fenugrec

(sources www.bonneplante.com; www.mr-ginseng.com)

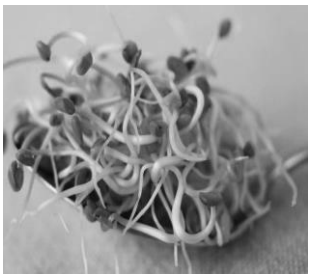
Le fenugrec est une plante herbacée de la famille des Fabaceae, section des protéagineux. Il est utilisé principalement comme plante médicinale et condimentaire.

Plusieurs sites internet vantent les mérites et les bienfaits de la consommation de graines germées crues comme le fenugrec. En plus de ses **propriétés** apéritives (ouvrir l'appétit), digestives et tonifiantes, on attribue au **fenugrec** le pouvoir de combattre les infections et inflammations des voies respiratoires, de faciliter l'accouchement et la lactation, de soigner les blessures cutanées, les douleurs rhumatismales, etc.

Plant de Fenugrec



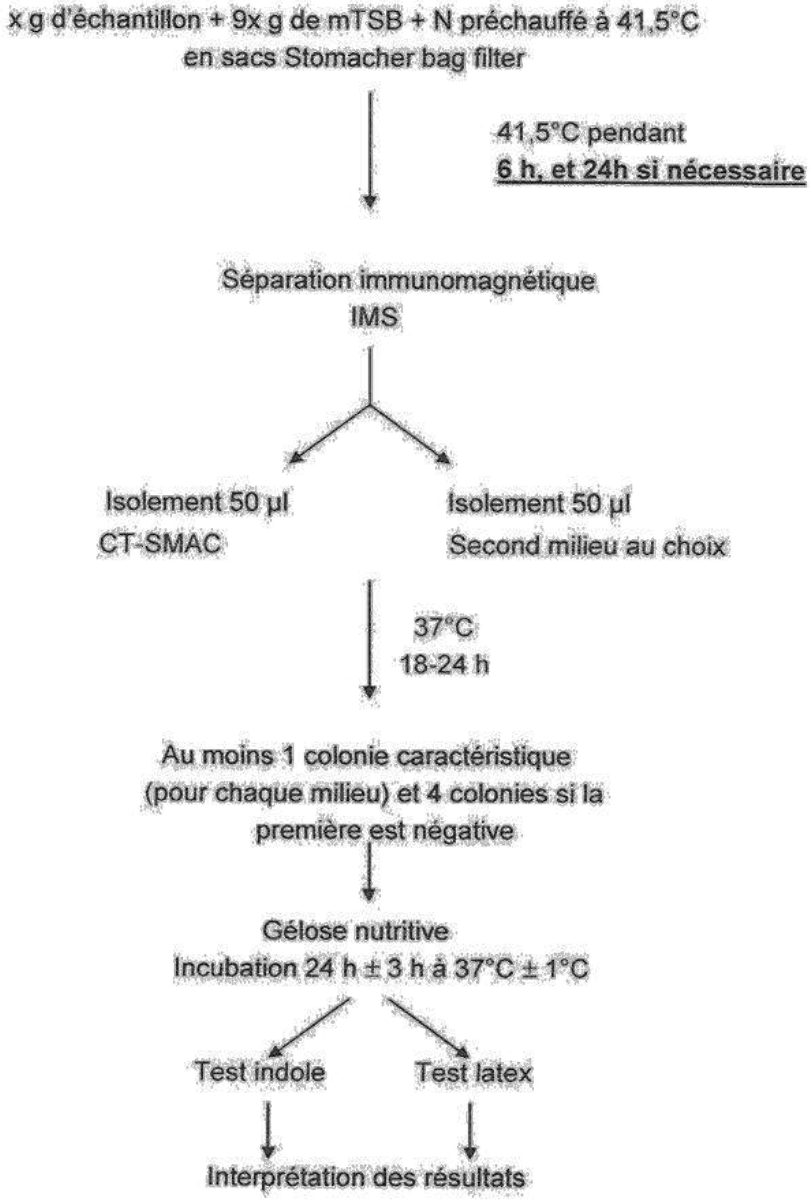
Graines de fenugrec germées





DOCUMENT 2

Méthode de référence NF EN ISO 16654 pour la recherche de *E. coli* O157:H7



Document élaboré à partir d'extraits des données du fournisseur.

DOCUMENT 3

Méthode alternative RAPID'*E. coli* O157:H7

xg ou ml de produit

↓

Dilution au 1/10 en milieu m TSB supplémenté en novobiocine
préchauffé à 41,5°C,
en sac Stomacher à filtre

↓

Incubation 16 h à 24 h à 41,5°C

↓

Séparation immunomagnétique

↓

Isolement de 50 µl sur gélose RAPID'*E. coli* O157:H7

↓

24 h ± 2 h à 37°C

↓

Lecture des géloses : colonies suspectes bleu nuit sans halo

↓

Isolement de 1 à 3 colonies suspectes sur TCS

↓

Test latex avec l'antisérum O157, ou avec les antisérums O157 et H7, si ces deux derniers sont disponibles.

Pour une identification complémentaire des colonies positives concernant les antigènes flagellaires, et pour une éventuelle caractérisation des facteurs de pathogénicité, il convient d'envoyer les cultures à un laboratoire expert.

Document élaboré à partir d'extraits des données du fournisseur.

DOCUMENT 4

Réactifs microbiologiques utilisés et principes pour les deux méthodes de détection de *E. coli* O157:H7

Document élaboré à partir d'extraits des données des fournisseurs.

TRYPTONE SOJA MODIFIÉ (BOUILLON) (mTSB) / OXOID LABORATOIRES / (extrait de la fiche milieu)

Milieu pour l'enrichissement sélectif des *Escherichia coli* O157 dans les échantillons alimentaires et les faeces.

COMPOSITION

Hydrolysat trypsique de caséine

Peptone de soja

Chlorure de sodium

Hydrogénophosphate de dipotassium

Glucose

Sels biliaires

pH 7,4 ± 0,2

500 grammes permettent de préparer 15 litres de milieu

SUPPLEMENT novobiocine 2 ml / litre de milieu.

RAPID' E.Coli 2™ Agar Dehydrated (Gélose) - Milieu chromogénique sélectif Bio-Rad®

Milieu chromogénique sélectif pour dénombrer directement les *Escherichia coli*.

Principe :

RAPID'E.coli 2 est un milieu chromogénique sélectif pour dénombrer directement les *Escherichia coli* et les autres coliformes dans les produits destinés à l'alimentation humaine.

Le principe du milieu repose sur la mise en évidence simultanée de deux activités enzymatiques :

- la β-D-Glucuronidase (GLUC) et la β-D-Galactosidase (GAL).

Le milieu contient deux substrats chromogéniques :

■ un substrat spécifique de la GAL qui entraîne la coloration bleue des colonies positives pour cette enzyme.

■ un substrat spécifique de la GLUC qui entraîne la coloration rose des colonies positives pour cette enzyme.

Les coliformes (GAL+/GLUC-) forment des colonies bleues à vertes.
Les *E.coli* (GAL+/GLUC+) forment des colonies violettes à roses.

Principaux avantages :

■ Une seule boîte pour le dénombrement direct des *E.coli* et coliformes.

■ Résultats complets en moins de 24 heures.

■ Pas de confirmation requise.

■ Deux réactions chromogéniques pour une specificité élevée.

■ Résultats fiables (certification NF VALIDATION et AOAC-RI, validation NordVal).

TCS Milieu de culture déshydraté Difco™ : Gélose trypticase soja (digestion de soja-caséine).

Milieu déshydraté pour l'isolement, la détection et la culture d'une grande variété de microorganismes.

Test d'agglutination au latex pour l'identification d'*E. coli* O157.

Particules de latex bleues sensibilisées par des anticorps de lapin dirigés contre l'antigène somatique O157.

Principe:

Le test met en évidence par agglutination de particules de latex sur carte les souches d'*E. coli* possédant l'antigène O157. Il est préférable d'utiliser parallèlement à ce test la gélose Mac Conkey au sorbitol (CM0813). Les souches d'*E. coli* O157:H7 ne fermentent pas le sorbitol et donnent donc des colonies incolores sur ce milieu, contrairement à la majorité des autres souches d'*E. coli* qui fermentent le sorbitol et donnent des colonies roses caractéristiques. La gélose Mac Conkey au sorbitol permet une première orientation. Les colonies qui ne fermentent pas le sorbitol, peuvent alors être testées avec le réactif au latex pour confirmer leur appartenance au sérogroupe O157 et donc leur aptitude à produire une véro-cytotoxine.

Mac Conkey - Sorbitol (CT-SMAC base) - Gélose

- Pour l'isolement et la différenciation du sérotype O157:H7 d'*Escherichia coli* à partir de lait, de viande de bœuf et autres produits alimentaires.

Composition

Tryptone Peptone pepsique de viande

D-Sorbitol

Sels biliaires

Chlorure de sodium

Rouge neutre

Cristal violet

Céfixime

Tellurite de potassium

Agar-agar

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.

Supplément Céfixime - Tellurite (CT - SMAC)

Description

80 % des souches d'*Escherichia coli* sont sorbitol (+) et approximativement 95 % des souches sont glucuronidase (+). La plupart des *E. coli* O157 ne sont ni capables de fermenter le sorbitol, ni capables de couper la liaison avec le chromogène BCIG.

Lorsqu'on utilise la gélose Mac Conkey au sorbitol seule (SMAC), les *E. coli* O157 apparaissent de couleur paille (caractère sorbitol négatif) et les *E. coli* sorbitol (+) apparaissent en rose/rouge. Cependant, des tests de confirmation doivent être effectués pour éliminer les *E. coli* sorbitol (-) et glucuronidase (+).

L'addition d'un chromogène (BCIG) à 0,1 g/l. dans la gélose SMAC réduit le nombre de colonies suspectes[3].

Lorsqu'on utilise la gélose SMAC + BCIG, les *E. coli* O157 apparaîtront de couleur jaune paille ou jaune clair par rapport aux souches d'*E. coli* ß-glucuronidase (+) qui peuvent apparaître bleu-vert ou pourpres[2].

Les autres espèces de germes Gram (-) peuvent croître sur SMAC avec BCIG mais peuvent être aisément différenciées par l'apparence des colonies.

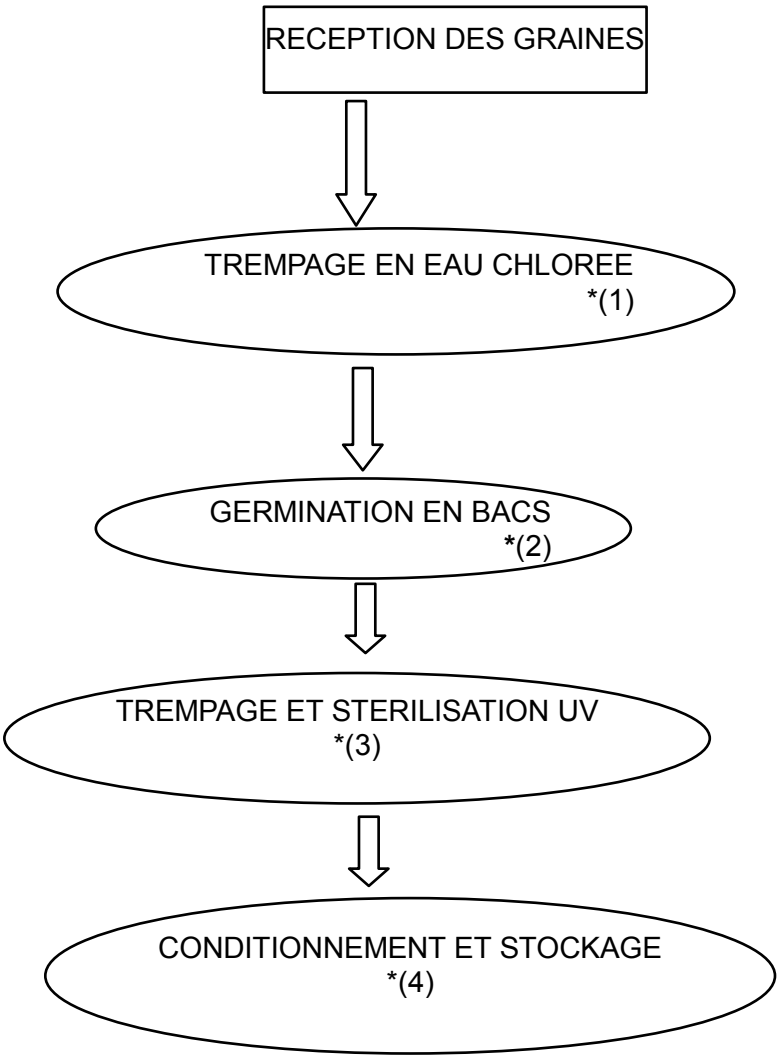
<u>DOCUMENT 4</u> (suite et fin)

Séparation IMS (immunomagnétique) Dynabeads®

Dynabeads® anti - *E. coli* O157 est conçu pour une concentration rapide et sélective d'*E. coli* O157 directement à partir d'une aliquote pré-enrichie utilisant une séparation immunomagnétique (IMS). Dynabeads® anti - *E. coli* O157 réagit avec toutes les souches d'*E. coli* O157, y compris les isolats pathogènes et non pathogènes, fermentant le sorbitol et non fermentant. Les *E. coli* O157 sont simplement incubés avec une partie aliquote de l'échantillon pré-enrichi et les anticorps enduits sur les billes se lieront spécifiquement à la bactérie cible. Les complexes perles-bactéries sont ensuite séparés en appliquant un champ magnétique.

DOCUMENT 5

Diagramme de production de graines germées de fenugrec



Document élaboré pour le besoin de l'épreuve.

*(1) Eau chlorée à 2,5 % de chlore actif, contact de 5 minutes avec les végétaux pour une désinfection qui permet de réduire de 2 puissances de 10 la flore aérobie.

*(2) Les graines germent dans des grands bacs. 22 kg de graines sont placés dans le germoir. Elles sont arrosées toutes les quatre heures grâce à un cycle d'arrosage programmé. Les températures de la pièce (22°C) et de l'eau du réseau (21°C) sont les paramètres importants. La germination dure 6 jours en moyenne.

*(3) Une fois la germination effectuée, les alvéoles des germoirs sont vidées. Les jeunes pousses sont ensuite trempées dans de l'eau à 3 °C, stérilisées aux UV. Elles sont ensuite rincées et séchées.

*(4) Une fois lavées et séchées, les graines germées sont conditionnées en barquettes à la main. Les barquettes sont ensuite stockées à 21°C avant d'être expédiées.

DOCUMENT 6

Tests de comparaison de 2 moyennes de 2 populations (Échantillons de petites tailles)

<table>
<tr><td rowspan="2">Échantillons appariés</td><td>Normalité</td><td>$T = \dfrac{\overline{D}}{\dfrac{S_D}{\sqrt{n-1}}}$

T suit la loi de Student à n – 1 ddl</td></tr>
<tr><td>Non normalité</td><td>X: variable aléatoire qui associe le nombre de différence positive ou négative

X suit la loi binomiale $B\left(n, \dfrac{1}{2}\right)$

$P(X = k) = \binom{n}{k}\left(\dfrac{1}{2}\right)^n$</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Échantillons indépendants</td><td>Variances des populations connues</td><td>$U = \dfrac{\overline{X_1} - \overline{X_2}}{\sqrt{\dfrac{\sigma_1^2}{n_1} + \dfrac{\sigma_2^2}{n_2}}}$

U suit la loi normale centrée réduite N (0 ; 1)</td></tr>
<tr><td>Variances des populations inconnues mais supposées égales</td><td>$T = \dfrac{\overline{X_1} - \overline{X_2}}{S\sqrt{\dfrac{1}{n_1} + \dfrac{1}{n_2}}}$ avec $S^2 = \dfrac{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$

T suit la loi de Student $n_1 + n_2 - 2$ à ddl</td></tr>
<tr><td>Non normalité</td><td>Test de Mann-Whitney</td></tr>
</table>

DOCUMENT 7

Dosage du fer par absorption atomique

(extrait du protocole adapté de la méthode OIV-MA-BS-31)

1. PRINCIPE

Le fer est dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique à l'aide d'une flamme air-acétylène oxydante, en utilisant une lampe à cathode creuse au fer, à la longueur d'onde de 248,3 nm.

2. APPAREILLAGE

Verrerie :

Fioles jaugées 50, 100 ml (classe A). Pipettes jaugées 1, 2, 3, 4, 10, 50 ml (classe A). Bécher 250 ml (classe A).

Spectrophotomètre (exemple de réglage du modèle VARIAN 575).

Flamme air-acétylène oxydante, débits : air : 7,5L/min C_2H_2 : 3,5 L/min.

Lampe à cathode creuse au fer ; longueur d'onde : 248,3 nm, fente (slit) : 0,5 nm, intensité de la lampe : 5 m A.

3. RÉACTIFS

Eau déminéralisée ultra pure résistivité 18,2 MΩ.m.(par ex. Milli-Q).

Solution mère à 1 g/L de Fer : (par ex.Titrisol Merck).

Solution à 100 mg/L de Fer. Placer 10 ml de la solution mère dans une fiole de 100 ml, compléter au volume avec l'eau déminéralisée.

Gamme d'étalonnage : 2, 4, 6, 8 mg/L de Fer. Placer successivement 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 ml de la solution à 100 mg/L de Fer dans 4 fioles de 50 ml, compléter au volume avec l'eau déminéralisée.

4. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

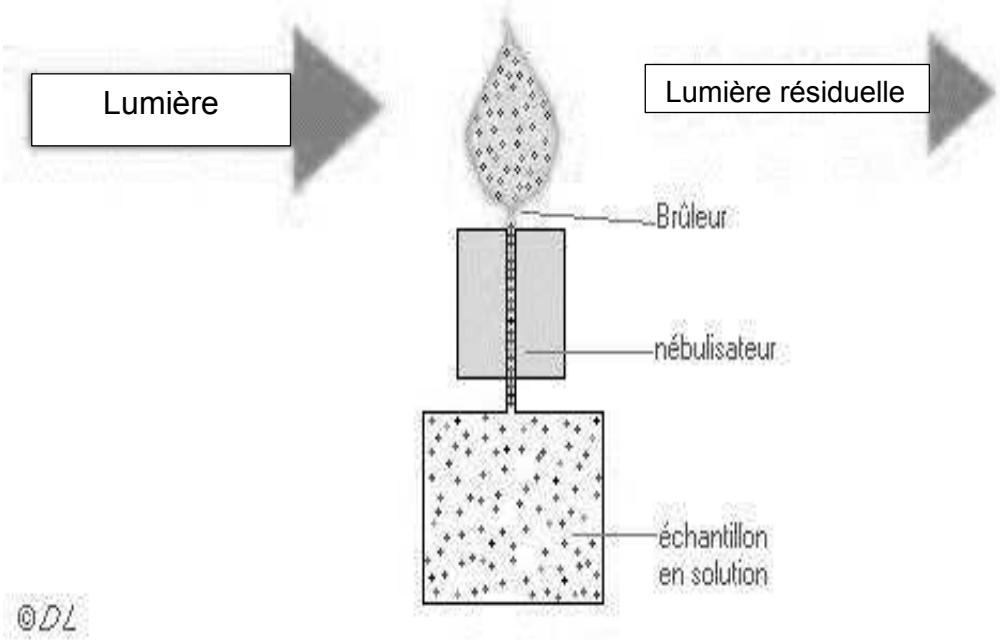
Extraction du fer : peser 5 grammes de graines broyées, ajouter 50 ml d'eau déionisée. Agiter pendant 24h, centrifuger 10 min à 3600 tours / minutes. Récupérer le surnageant. Évaporer au bain-marie jusqu'à environ 10 ml. Laisser refroidir puis transvaser le concentrat dans une fiole de 50 ml; rincer le bécher et compléter au volume avec l'eau déminéralisée. Une dilution dans l'eau déminéralisée n'est nécessaire que si la concentration en Fer est supérieure à 8 mg/l.

5. DÉTERMINATION.

Présenter successivement les solutions d'étalonnage, les échantillons. Relever les absorbances correspondantes.

Établir la droite d'étalonnage absorbances = f (concentration en mg/L de Fer) par la méthode des moindres carrés. Déduire la concentration en Fer (mg/l) en tenant compte d'une éventuelle dilution.

DOCUMENT 7 (suite et fin)



DOCUMENT 8

Pictogrammes de sécurité de l'acétylène





Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.