

EPREUVE E5. UNITE U51.
ETUDE D'OPERATIONS TECHNIQUES

EVALUATION DE LA FRAICHEUR DU POISSON

Calculatrice autorisée

La sécurité alimentaire est une question d'actualité : on a pu le constater récemment au travers « d'affaires » qui ont défrayé la chronique (« vache folle », pollution à la dioxine, boissons gazeuses suspectes ...).

Dans la filière des produits de la mer, la fraîcheur du poisson est une qualité essentielle ; elle peut se définir comme suit : un poisson frais a des caractères qui sont le plus proche possible de ceux qu'il possède à l'état vivant.

Divers critères permettent d'évaluer la fraîcheur du poisson. Ils doivent être quantifiés par des méthodes d'analyse rapides et fiables.

PREMIERE PARTIE : ETUDE D'OPERATIONS TECHNIQUES

1) Evaluation de la fraîcheur du poisson : l'examen bactériologique (20 points).

1-1) Evolution de la charge microbienne au cours de l'entreposage du poisson.

Au cours de l'entreposage du poisson, à température ambiante, les dénombrements des flores suivantes ont été réalisés :

- FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale,
- FPAT : Flore Psychrotrophe Aérobie Totale,
- coliformes totaux,
- coliformes thermotolérants ou fécaux.
- staphylocoques.

L'évolution de ces flores en fonction du temps de décomposition du poisson est représentée dans le document n° 1.

1-1-1) Définir les termes mésophile et psychrotrophe.

1-1-2) Après avoir défini le terme « coliformes », différencier coliformes totaux et coliformes thermotolérants.

1-1-3) Les coliformes thermotolérants sont des indicateurs représentatifs de l'état sanitaire d'un produit alimentaire.

1-1-3-1) Quelle signification donner à la présence de coliformes thermotolérants dans un produit alimentaire ?

Pourquoi leur recherche est-elle préférée à celle des coliformes totaux ?

1-1-3-2) Les coliformes thermotolérants ne sont pas les seuls microorganismes utilisés en microbiologie alimentaire comme indicateurs reflétant l'état hygiénique d'un produit.

Présenter trois critères ou propriétés que doit posséder un bon indicateur.

1-1-4) Les dénombrements des flores présentées dans le document n° 1 ont été réalisés par incorporation dans la masse (ou en profondeur) avec coulage en surface d'une deuxième couche de milieu.

1-1-4-1) Indiquer les différentes étapes de la technique en respectant la chronologie des opérations.

1-1-4-2) Justifier l'apport d'une deuxième couche de milieu en surface avant incubation.

1-1-5) Commenter les courbes obtenues dans le document n° 1.

1-2) Impédancemétrie.

L'impédancemétrie ou variation d'impédance repose sur le principe suivant :

- les microorganismes en se développant transforment les molécules constitutives du milieu de culture en molécules plus petites, de charge électrique plus élevée, ce qui entraîne une augmentation de la conductance ;
- ces modifications sont mesurées entre deux électrodes plongées dans le milieu de culture ;
- on définit le temps de détection (Td) comme l'intervalle de temps qui s'écoule entre l'ensemencement du milieu et la brusque augmentation de conductance.

1-2-1) Le tableau ci-dessous indique le nombre de coliformes thermotolérants par gramme de poisson (obtenu par la méthode du NPP = nombre le plus probable) en fonction du temps de détection.

| Td (heures) | Ln N (N = nombre de coliformes thermotolérants par gramme de poisson) |
|----------------|--|
| 2 | 20,65 |
| 3 | 18,26 |
| 4 | 15,87 |
| 5 | 13,49 |
| 6 | 11,10 |
| 7 | 8,70 |
| 8 | 6,33 |
| 9 | 3,91 |

- Donner l'équation de la droite de régression $\ln N = f(Td)$.
- Déterminer la valeur du coefficient de corrélation.
- Conclure.

1-2-2) En déduire le nombre de coliformes thermotolérants présents dans l'échantillon analysé dans le document n° 2.

1-2-3) Quel intérêt présente cette méthode par rapport à celle présentée en 1.1.4. ?

2) Evaluation de la fraîcheur du poisson : le dosage de l'ABVT (22 points).

On nomme ABVT (Azote Basique Volatil Total) l'ensemble formé par l'ammoniac et les amines volatiles produit lors de la dégradation protéique de la chair de poisson.

2-1) La méthode de référence de détermination de l'ABVT (décision de la Commission Européenne du 08/03/1995-95/149/CE) est exposée dans le document n° 3.

C'est une méthode par distillation, s'apparentant à la méthode de KJELDAHL directe, sans minéralisation préalable.

2-1-1) On procédera à l'analyse du document n° 3 en répondant au questionnaire suivant, concernant :

2-1-1-1) L'étape 6.1. :

- Quel est le rôle de l'acide perchlorique ?
- Que contiennent le filtrat et le précipité ?
- Sous quelle forme sont l'ammoniac et les amines (formule générale $R-NH_2$) ? (Justifier en écrivant les équations des réactions).

2-1-1-2) L'étape 6.2. :

- Quel est le rôle de la soude ? (Justifier en écrivant les équations des réactions).
- Quel est le rôle de l'entraînement à la vapeur ?
- A quoi sert l'acide borique ?
- Ecrire les équations du titrage par l'acide chlorhydrique.

2-1-1-3) L'étape 6.4. :
Quel est le rôle de l'essai à blanc ?

2-1-2) A partir de l'analyse précédente, exposer le principe de la détermination de l'ABVT sous forme d'un plan distinguant les différentes étapes.

2-1-3) Le document n° 3 indique que la manipulation de l'acide perchlorique est dangereuse. Un extrait de la fiche toxicologique figure dans le document n° 4.

2-1-3-1) Donner la signification des deux pictogrammes.

2-1-3-2) Quelles sont les précautions individuelles à prendre, au laboratoire, dans la manipulation de ce produit ?

2-1-4) Les outils de calcul :

2-1-4-1) Etablir la formule littérale permettant de calculer l'ABVT et établir une équation aux dimensions pour obtenir l'ABVT en gramme d'azote par gramme de poisson.

2-1-4-2) L'annexe II de la directive européenne donne la formule simplifiée suivante :

$$ABVT(mg / 100g) = \frac{(V_1 - V_0) 28}{m}$$

V_1 (mL) = volume de solution d'acide chlorhydrique 0,01 mol. L⁻¹ utilisé pour le dosage de l'échantillon.

V_0 (mL) = volume de solution d'acide chlorhydrique 0,01 mol. L⁻¹ utilisé pour l'essai à blanc.

m (g) = masse d'échantillon.

Démontrer cette formule simplifiée.

Données : $M(N) = 14 \text{ g.mol}^{-1}$.

On supposera que la masse volumique du poisson haché est 1 g.mL⁻¹.

2-1-4-3) Que représente la valeur « 2mg/100 g » citée au paragraphe 6.3 de l'annexe II de la directive européenne ?

2-2) Une étude de dégradation contrôlée du poisson a été menée dans le but d'étudier les variations de l'ABVT.

Le protocole et les résultats de cette étude sont donnés dans le document n° 5.

2-2-1) Calculer les valeurs moyennes de l'ABVT, en mg/100g, dans les prélèvements aux différents temps de l'étude.

Présenter les résultats sous forme de tableau.

2-2-2) Analyser ces résultats.

3) Evaluation de la fraîcheur du poisson : le dosage de l'histamine (38 points).

L'histamine est le produit de la décarboxylation de l'histidine. Elle est responsable de troubles plus ou moins graves avec des symptômes ressemblant à ceux d'une allergie. Le seuil de tolérance chez les sujets sensibles est de 10 mg d'histamine pour 100 g de poisson.

Il existe de nombreuses méthodes de dosage de l'histamine dont :

- des méthodes par chromatographie liquide haute performance,
- des méthodes immunoenzymatiques.

3-1) Dosage de l'histamine par chromatographie liquide haute performance :

- 3-1-1)** Quels sont les facteurs qui justifient l'expression haute performance ?
- 3-1-2)** La phase stationnaire est une colonne Kromasil® 5 µm, C18, 250x4,6 mm. S'agit-il d'une chromatographie de partage en phase normale ou en phase inverse ? Justifier.
- 3-1-3)** L'élution est réalisée en gradient binaire eau-acétonitrile.
Qu'est-ce qu'une élution en gradient ?
Quel est le paramètre modifié dans le gradient présenté sur le **document n° 6** ?
- 3-1-4)** A l'aide des **documents n° 6 et 7**, justifier l'ordre d'élution pour la putrescine et la cadavérine.
- 3-1-5)** La méthode de dosage utilise un étalonnage externe.
Donner le principe d'un dosage utilisant l'étalonnage externe.
Indiquer son principal inconvénient.
- 3-1-6)** La préparation des échantillons avant injection, nécessite :
- une extraction,
 - une dérivation précolonne par le chlorure de dansyle,
 - la récupération du dérivé dansylé.
- Ces étapes préparatives sont présentées sur le **document n° 8**.
Le contrôle du rendement de ces étapes préparatives nécessite la réalisation d'échantillons supplémentés en histamine à 50 et 100 mg.kg⁻¹.
- 3-1-6-1)** Calculer la concentration en histamine dans les échantillons injectés en µg.mL⁻¹ (les aires des pics obtenus et l'équation de la régression linéaire sont données dans le **document n° 9**).
- 3-1-6-2)** Calculer la masse d'histamine en mg par kg de poisson.
Données :
- Voir document n° 7 : volume injecté.
 - Voir document n° 8 : étapes préparatives.
 - Masse volumique de l'échantillon broyé : 1 g.mL⁻¹.
- 3-1-6-3)** Déterminer le rendement pour chaque échantillon supplémenté.
- 3-1-6-4)** Conclure.

3-2) Détection et dosage de l'histamine selon une méthode immunoenzymatique.

On utilise un kit du commerce. La composition du test et le protocole figurent en annexe dans le **document n° 10**.

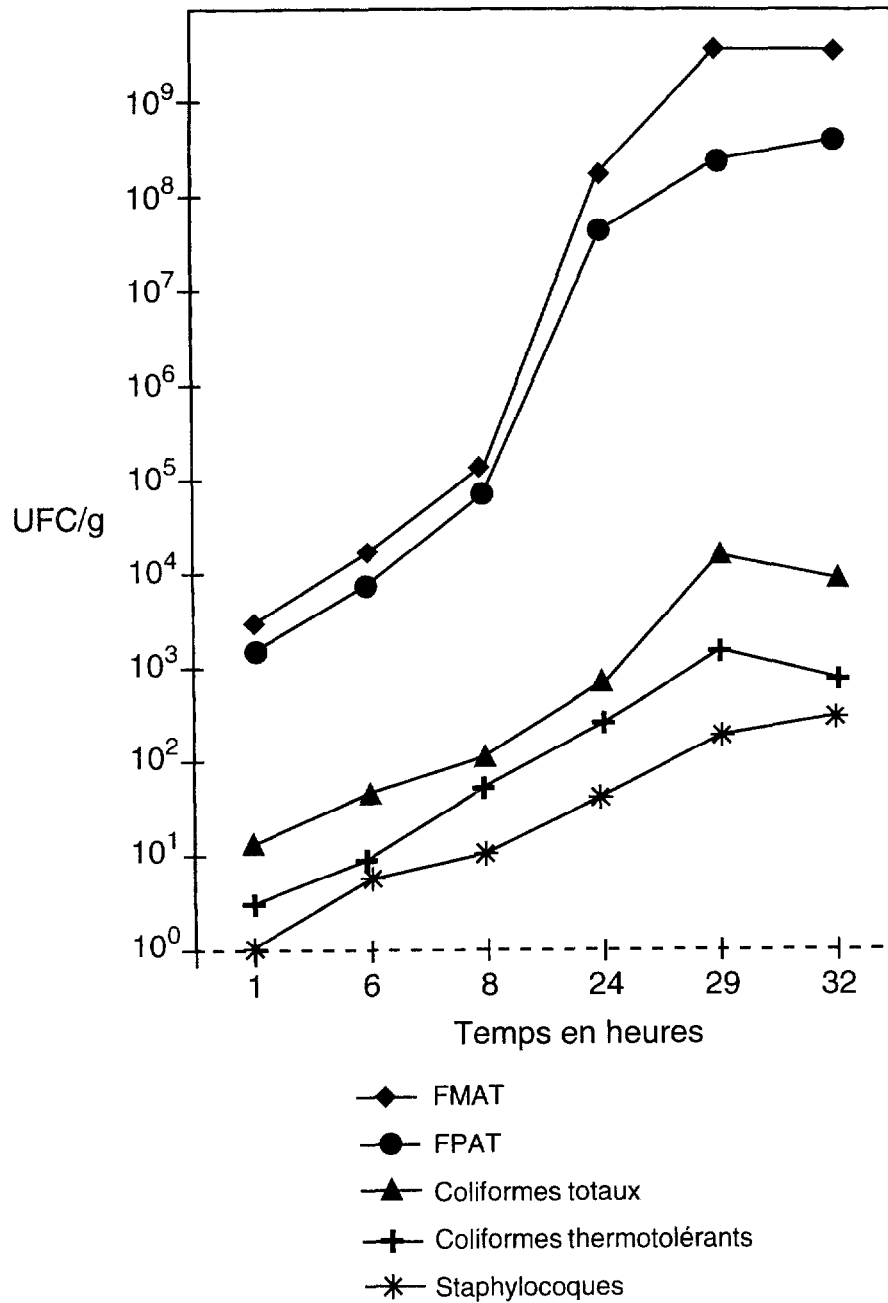
L'analyse de daurades « fraîches » récupérées à l'étal d'un poissonnier est conduite comme suit :

- prélèvement, broyage et homogénéisation d'un échantillon représentatif de poisson puis pesée de 2 g du broyat obtenu dans un tube à centrifuger,
- ajustement à 10 mL avec le tampon, suivi d'une agitation durant 30 min,
- centrifugation 10 min à 3000 g, à 4°C, puis élimination de la couche de graisse,
- dilution d'une aliquote de la phase aqueuse au 1/10 avec le tampon de dilution.

Cette dilution de l'aliquote est utilisée pour réaliser les essais correspondant à deux échantillons de poisson E et F, à raison de 50 µL par puits.

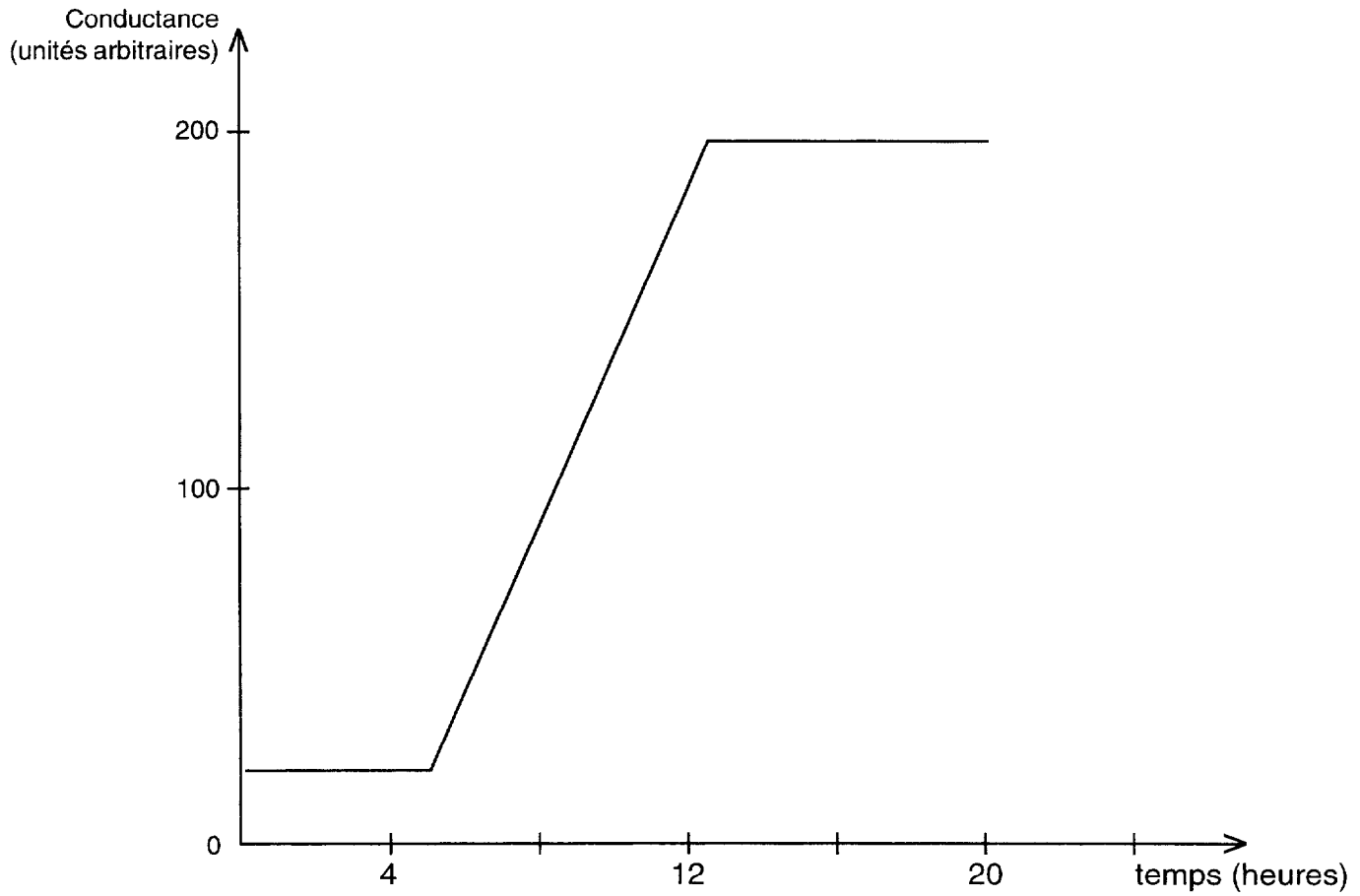
Les résultats d'absorbance figurent dans le tableau du **document n° 11**. Gamme et essais sont réalisés en double.

- 3-2-1)** En utilisant une représentation symbolique des anticorps et des antigènes mis en jeu, schématiser les étapes c, d, e, f et g du test correspondant au document n° 10 et en souligner les aspects importants pour la réussite du dosage.
En déduire le principe de la technique et la nommer.
- 3-2-2)** On utilise les plaques dont les puits sont sensibilisés avec de l'histamine. L'histamine à doser est présente en solution (étalons et échantillons).
En quoi consiste la sensibilisation ?
- 3-2-3)** On pourrait théoriquement utiliser des anticorps anti-histamine marqués. Ce n'est pas le cas dans le kit correspondant au document n° 10.
Expliquer à l'aide de schémas et nommer les deux techniques ainsi utilisables.
Quels sont les avantages du procédé utilisé dans le kit correspondant au document n° 10 ?
- 3-2-4)** Compléter le tableau du document n° 11, à rendre avec la copie.
- 3-2-5)** Réaliser sur papier millimétré la représentation graphique $P = f(\log C)$. Commenter l'allure de cette courbe, dans l'optique d'une exploitation quantitative.
- 3-2-6)** Déterminer la concentration d'histamine dans les échantillons de poisson analysés. Exprimer ces résultats en $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les traduire en $\mu\text{g.kg}^{-1}$.
Donnée : Formule de conversion : $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ correspond à $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$.
Commenter la validité des résultats obtenus.

DOCUMENT N° 1

Evolution, à température ambiante, de la charge microbienne exprimée en unité formant colonies par gramme (UFC/g) en fonction du temps de décomposition du poisson.

DOCUMENT N° 2



Evolution, en fonction du temps, de la conductance du milieu de culture inoculé avec un gramme de poisson.

DOCUMENT N° 3DECISION DE LA COMMISSION
du 8 mars 1995

fixant les valeurs limites en azote basique volatil total (ABVT) pour certaines catégories de produits de la pêche et les méthodes d'analyse à utiliser.

Article premier

Les produits de la pêche non transformés appartenant aux catégories d'espèces visées à l'annexe I sont considérés comme impropres à la consommation humaine lorsque, l'évaluation organoleptique révélant un doute sur leur fraîcheur, le contrôle chimique montre que les limites suivantes en ABVT sont dépassées :

- 1) 25 milligrammes d'azote/100 grammes de chair pour les espèces visées au point A de l'annexe I ;
- 2) 30 milligrammes d'azote/100 grammes de chair pour les espèces visées au point B de l'annexe I ;
- 3) 35 milligrammes d'azote/100 grammes de chair pour les espèces visées au point C de l'annexe I.

ANNEXE I**CATEGORIES D'ESPECES POUR LAQUELLE UNE VALEUR D'ABVT EST FIXEE****A. *Sebastes sp.***

Helicolenus dactylopterus
Sebastichtys capensis

B. Espèces appartenant à la famille des PLEURONECTIDAE (à l'exception du flétan : *Hippoglossus sp.*)**C. *Salmo salar***

Espèces appartenant à la famille des MERLUCIDAE
Espèces appartenant à la famille des GADIDAE

ANNEXE II**DETERMINATION DE LA TENEUR EN BASES AZOTIQUES VOLATILES (ABVT) CHEZ LES POISSONS ET LES PRODUITS A BASE DE POISSON : UNE PROCEDURE DE REFERENCE.****1. Objet et champ d'application.**

La présente méthode décrit une procédure de référence permettant d'identifier la teneur en azote des bases azotiques volatiles (azote basique volatil total : ABVT) chez les poissons et produits à base de poisson. Cette procédure s'applique aux teneurs d'ABVT comprises entre 5 mg/100 g et 100 mg/100 g.

2. Définition.

Par teneur en ABVT, il faut entendre la teneur en azote des bases azotiques volatiles déterminée par la procédure décrite. Elle s'exprime en mg/100 g.

3. Brève description.

Les bases azotiques volatiles sont extraites d'un échantillon à l'aide d'une solution d'acide perchlorique. Après alcalinisation, l'extrait est soumis à une distillation par la vapeur et les constituants basiques volatils sont absorbés par un récepteur acide. La teneur en ABVT est déterminée par titrage des bases absorbées.

4. Produits chimiques.

Sauf indication contraire, utiliser des produits chimiques convenant comme réactifs. L'eau utilisée doit être soit distillée, soit déminéralisée, et au moins de la même pureté. Sauf indication contraire, il faut entendre par « solution » une solution aqueuse.

4.1. Solution d'acide perchlorique = 6 g/100 mL.

4.2. Solution de soude caustique = 20 g/100 mL.

4.3. Solution d'acide chlorhydrique 0,01 mol/L.

DOCUMENT N° 3 (SUITE)

Note : avec un appareil de distillation automatique, le titrage doit se faire avec une solution standard d'acide chlorhydrique 0,01 mol/L

4.4. Solution d'acide borique = 3 g/100 mL

4.5. Agent anti-moussant au silicone.

4.6. Solution de phénolphtaléine = 1 g/100 mL d'éthanol à 95 %.

4.7. Solution indicateur (*Tashiro Mixed Indicator*)

Dissoudre 2 g de rouge de méthyle et 1 g de bleu de méthylène dans 1000 mL d'éthanol à 95 %.

5. Instruments et accessoires

5.1. Un *hachoir à viande* qui donne un hachis de poisson suffisamment homogène.

5.2. *Mélangeur* très rapide, nombre de tours compris entre 8000 min⁻¹ et 45 000 min⁻¹.

5.3. *Filtre plissé* de 150 mm de diamètre, à filtrage rapide.

5.4. *Burette* de 5 mL, graduée jusqu'à 0,01 mL.

5.5. *Appareil pour distillation à la vapeur* (schéma : voir le **document n° 3 bis**).

Cet appareil doit pouvoir régler différentes quantités de vapeur et en produire une quantité constante en une période de temps donnée. Il doit être conçu de telle sorte que pendant l'adjonction de substances alcalinisantes les bases libres ne puissent s'échapper.

6. Exécution.

Avertissement : lors de la manipulation d'acide perchlorique, qui est très corrosif, prendre les précautions et les mesures de prévention nécessaires.

Dans toute la mesure du possible, les échantillons doivent être préparés conformément au point 6.1. aussi rapidement que possible après leur arrivée.

6.1. Préparation de l'échantillon

Hacher soigneusement l'échantillon à analyser dans un hachoir à viande conforme au point 5.1. Peser précisément 10 g ± 0,1 g de l'échantillon haché dans un récipient approprié, mélanger à 90,0 mL de solution d'acide perchlorique conforme au point 4.1., homogénéiser pendant 2 minutes dans un mélangeur conforme au point 5.2., puis filtrer.

L'extrait ainsi obtenu peut être conservé pendant au moins 7 jours à température comprise entre 2 et 6°C.

6.2. Distillation à la vapeur

Mettre 50,0 mL de l'extrait obtenu conformément au point 6.1. dans un appareil de distillation à la vapeur conforme au point 5.5. Pour vérifier une dernière fois si l'alcalinisation de l'extrait est suffisante, ajouter plusieurs gouttes de phénolphtaléine conforme au point 4.6. Après avoir ajouté quelques gouttes d'agent anti-moussant au silicone, ajouter à l'extrait 6,5 mL de solution de soude caustique conforme au point 4.2. et commencer immédiatement la distillation à la vapeur.

Régler la distillation à la vapeur de telle sorte qu'il soit produit environ 100 mL de distillat en l'espace de 10 minutes. Submerger le tube de sortie du distillat dans un récepteur contenant 100 mL d'une solution d'acide borique conforme au point 4.4., à laquelle 3 à 5 gouttes de la solution indicateur décrite au point 4.7. ont été ajoutées. Au bout de 10 minutes précises, la distillation est terminée. Enlever le tube de sortie du distillat du récepteur et le rincer à l'eau. Déterminer les bases volatiles contenues dans la solution du récepteur par titrage par une solution standard d'acide chlorhydrique conforme au point 4.3.

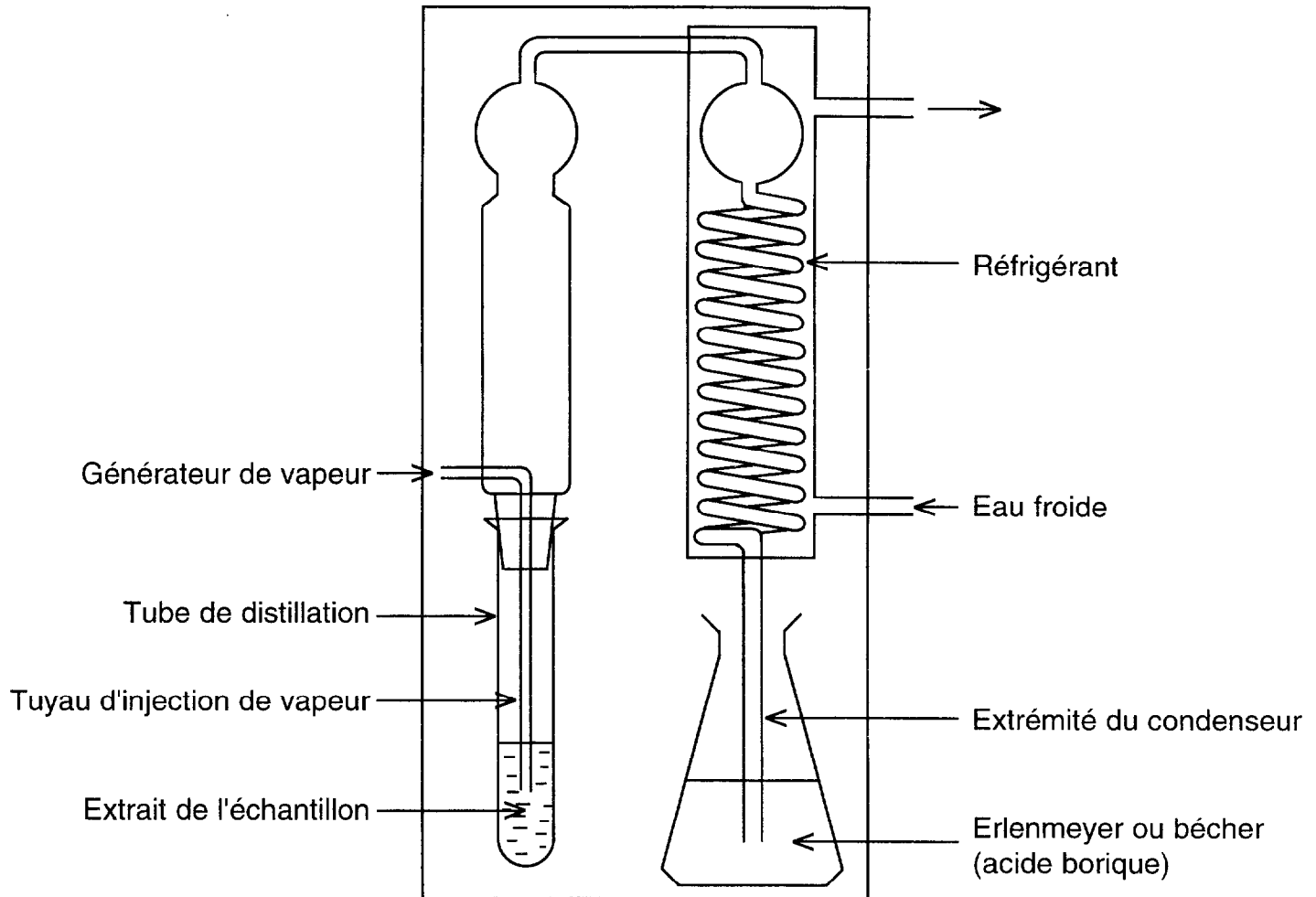
Le pH du point final doit être de 5,0 ± 0,1.

6.3. Titrage.

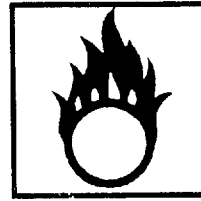
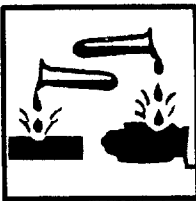
Les analyses doivent être effectuées en double. La méthode appliquée est correcte, si la différence entre les deux analyses ne dépasse pas 2 mg/100 g.

6.4. Essai à blanc.

Effectuer un essai à blanc conformément au point 6.2. A la place de l'extrait, utiliser 50,0 mL de solution d'acide perchlorique conforme au point 4.1.

DOCUMENT N° 3bis**APPAREIL DE DISTILLATION A LA VAPEUR****DOCUMENT N° 4**

Extrait de la fiche toxicologique INRS n° 141



ACIDE PERCHLORIQUE ... ($\geq 50\%$)

- R5 - Danger d'explosion sous l'action de la chaleur.
- R6 - Favorise l'inflammation des matières combustibles.
- R35 - Provoque de graves brûlures.
- S23 - Ne pas respirer les vapeurs / aérosols.
- S26 - En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
- S36 - Porter un vêtement de protection approprié.

DOCUMENT N° 5

L'étude de la dégradation contrôlée de la chair de poisson a été menée sur 108 échantillons appartenant à 5 espèces différentes de poisson de la catégorie B citée dans l'annexe I de la directive européenne.

1. Protocole de dégradation contrôlée :

Les échantillons sont prélevés au port, au moment de leur débarquement des bateaux.

Les prélèvements sont acheminés au laboratoire dans une glacière à +4°C et stockés jusqu'au moment de l'analyse.

Ils sont ensuite exposés à la température ambiante, afin de favoriser leur décomposition pendant 32 heures.

On procède au dosage de l'ABVT dans les divers prélèvements, ceci à différents temps.

2. Le dosage de l'ABVT :

2.1 Le protocole : (voir méthode de référence dans la directive européenne du 08/03/1995).

2.2 Les résultats bruts :

| Temps t (heures) | V' moyen * (mL) | Coefficient de variation (%) |
|---------------------|--------------------|---------------------------------|
| 1 | 5,80 | 1,43 |
| 5 | 6,20 | 2,14 |
| 8 | 7,09 | 3,46 |
| 24 | 11,74 | 30,96 |
| 29 | 21,74 | 9,97 |
| 32 | 22,36 | 5,12 |

Pour obtenir V' moyen, on a procédé de la manière suivante :

(1) à un temps t donné, pour chacun des 108 échantillons dosés, on a calculé la différence $V = V_1 - V_0$.

(2) on a ramené cette valeur à une masse « standard » de 10,0 g de poisson ; soit V', la valeur ainsi corrigée.

(3) ensuite, on a procédé au calcul de la moyenne des valeurs V' obtenues au temps t.

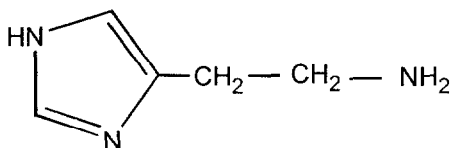
DOCUMENT N° 6 :**LE GRADIENT BINAIRE EAU – ACÉTONITRILE :**

| Temps en minutes | % des solutions | | |
|------------------|-----------------|-----|-------------------------|
| | Acétonitrile | Eau | |
| 0 | 60 | 40 | Gradient |
| 6 | 75 | 25 | |
| 8 | 75 | 25 | |
| 13 | 95 | 5 | |
| 20 | 95 | 5 | |
| 20,01 | 60 | 40 | Retour à l'état initial |
| 30 | 60 | 40 | |

LES SOLVANTS :

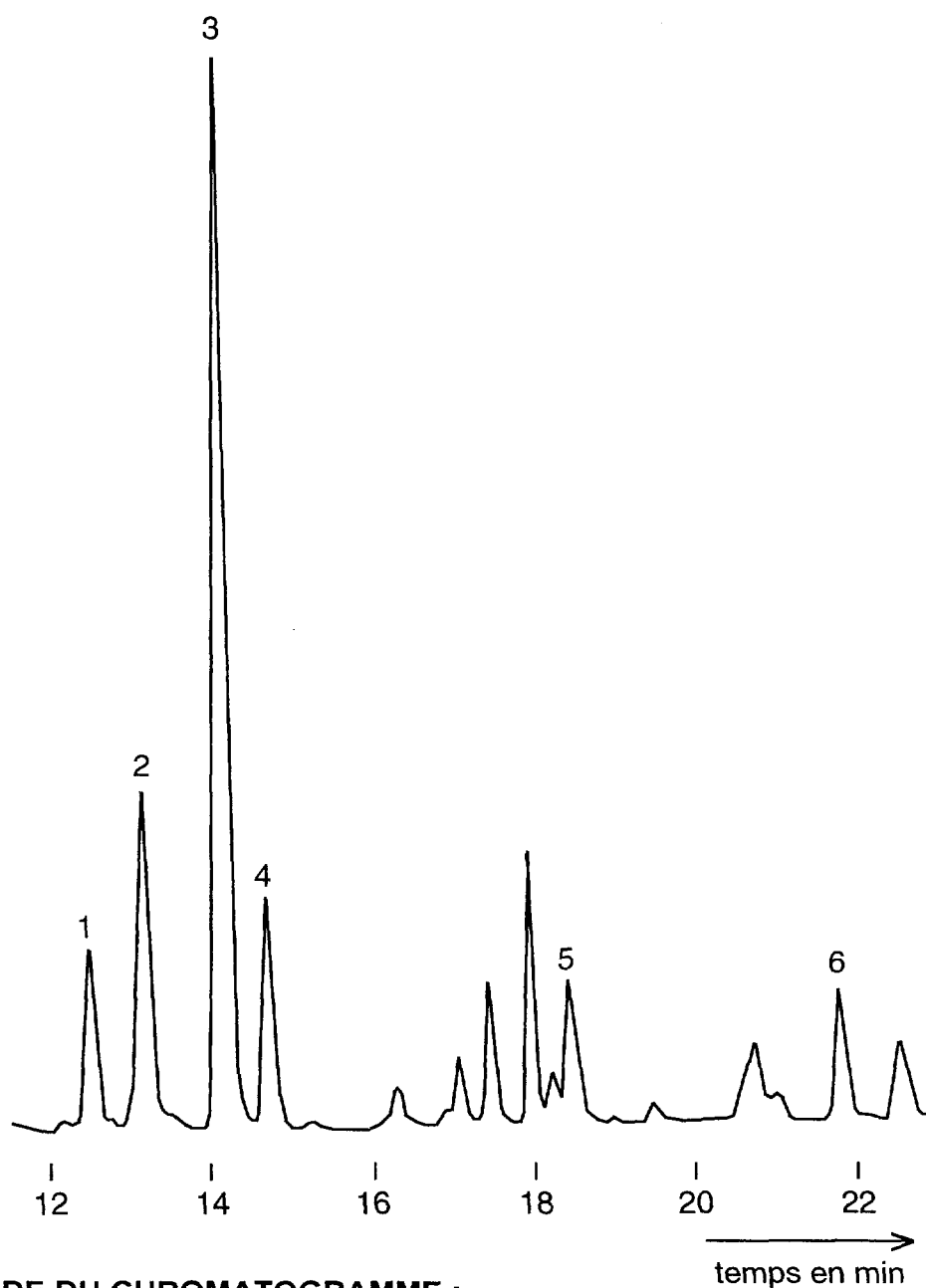
| Solvant | Constante diélectrique à 20°C (CD) |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| Eau | 80,2 |
| Acétonitrile (CH ₃ CN) | 37,5 |

FORMULES DES AMINES :

| Amine | Formule |
|------------|--|
| Cadavérine | H ₂ N – (CH ₂) ₅ – NH ₂ |
| Putrescine | H ₂ N – (CH ₂) ₄ – NH ₂ |
| Histamine |  |

DOCUMENT N° 7**CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES :**

- ◆ Colonne : Kromasil® 5 µm, C18, 250 x 4,6 mm.
- ◆ Phase mobile : gradient binaire eau – acétonitrile (voir **document n° 6**).
- ◆ Débit : 1 mL.min⁻¹.
- ◆ Pression : 90 bars.
- ◆ Détection UV à 254 nm des dérivés dansylés des amines (voir **document n° 8**).
- ◆ Volume injecté : 20 µL.

**LEGENDE DU CHROMATOGRAMME :**

1 : 1,3-diaminopropane

2 : putrescine

3 : cadavérine

4 : histamine

5 : spermidine

6 : spermine

DOCUMENT N° 8**NOTION D'ECHANTILLON SUPPLEMENTE OU METHODE DES AJOUTS DOSES :**

Cette méthode consiste à ajouter une quantité connue d'un constituant à doser, ici l'histamine, à un milieu supposé en contenir, puis à doser la solution ainsi obtenue.

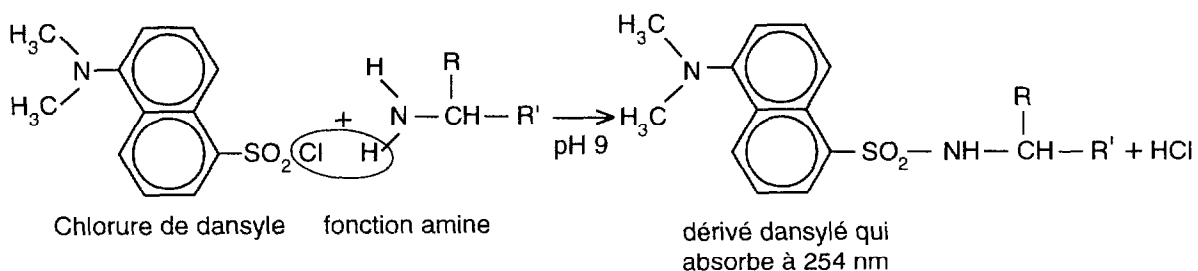
ETAPES PREPARATIVES :**1^{ère} étape : extraction**

| Echantillon supplémenté à 50 mg.kg ⁻¹ | Echantillon supplémenté à 100 mg.kg ⁻¹ |
|---|---|
| Peser 5 g d'échantillon préalablement broyé exempt d'histamine après contrôle par CCM | |
| Ajouter 2,5 mL d'une solution d'histamine à 0,1 mg.mL ⁻¹ | Ajouter 0,5 mL d'une solution d'histamine à 1 mg.mL ⁻¹ |
| Ajouter 7,5 mL de solution d'acide perchlorique à 0,2 mol.L ⁻¹ | Ajouter 9,5 mL de solution d'acide perchlorique à 0,2 mol.L ⁻¹ |
| Homogénéiser | |
| Centrifuger à 2500 g pendant 20 minutes à 2°C | |

2^{ème} étape : dérivation par le chlorure de dansyle

Prélever 100 µL de surnageant et ajouter :

- 40 µL de solution de 1,3-diaminopropane à 25 µg.mL⁻¹ (contrôle de la reproductibilité des temps de rétention).
- 200 µL de carbonate de sodium saturé (neutralise l'acide perchlorique).
- 400 µL de chlorure de dansyle.
- Agiter, boucher et placer dans un bain thermostaté à 60°C.
- Ajouter 100 µL de solution de proline (pour neutraliser l'excès de chlorure de dansyle).
- Agiter, laisser reposer.

Dérivation par le chlorure de dansyle**3^{ème} étape : récupération du dérivé dansylé**

- Ajouter 500 µL de toluène.
- Agiter vigoureusement puis laisser décanter.
- Transvaser la phase organique.
- Evaporer le toluène sous azote.
- Reprendre le résidu sec par 300 µL d'acétonitrile et filtrer sur filtre 0,2 µm.

DOCUMENT N° 9**ETALONNAGE EXTERNE :**

| | | | | | | |
|---------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Concentration | 5 | 10 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| Aire du pic | 34 872 | 74 619 | 170 562 | 373 331 | 510 794 | 716 989 |

Equation de la régression linéaire : $Y = aX + b$ $a = 14,0870 \cdot 10^{-5}$ $b = \text{négligeable}$ $r = 0,9887$
 $a =$ coefficient directeur de la droite
 $b =$ ordonnée à l'origine
 $Y =$ concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
 $X =$ aire des pics en unité arbitraire
 $r =$ coefficient de corrélation

ECHANTILLONS SUPPLEMENTES :

| | | |
|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Echantillon supplémenté à | 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ |
| Aire du pic | 26 975 | 54 660 |

DOCUMENT N° 10**PRINCIPAUX ELEMENTS COMPOSANT LE KIT :**

- Barrettes à fond plat sensibilisées par de l'histamine.
- Anticorps de classe IgG anti-histamine et anticorps de lapin anti-IgG marqués à la peroxydase.
- Substrat ; révélateur chromogène ; solution stop (acide sulfurique).
- Solution étalons d'histamine :

| Etalon 1 | Etalon 2 | Etalon 3 | Etalon 4 | Etalon 5 | Etalon 6 |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 1350 $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 4050 $\mu\text{g.L}^{-1}$ |

PRINCIPALES ETAPES DE LA REALISATION DU TEST :

- a) Ouvrir le sachet d'emballage transversalement et sortir le nombre de barrettes nécessaire, ainsi que le cadre. Les autres barrettes sont conservées dans le sachet avec le déshydratant entre + 2° et + 8°C.
- b) Installer sur le cadre un nombre suffisant de puits pour traiter tous les étalons et les échantillons en double. Repérer les positions des étalons et des échantillons.
- c) Ajouter 50 μL de chaque solution étalon ou échantillon dans chaque puits (2 puits par cas).
- d) Ajouter 50 μL d'anticorps anti-histamine dans chaque puits. Mélanger doucement et incuber 1 h à température ambiante.
- e) Vider les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement (3 fois) contre du papier absorbant pour retirer tout le liquide des puits. Remplir les puits avec 250 μL de tampon de lavage et vider à nouveau la plaque. Répéter l'opération 2 fois.
- f) Ajouter 100 μL de conjugué dans chaque puits. Agiter délicatement et incuber 30 min à température ambiante.
- g) Vider les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement (3 fois) contre du papier absorbant pour retirer tout le liquide des puits. Remplir les puits avec 250 μL de tampon de lavage et vider à nouveau la plaque. Répéter l'opération 2 fois.
- h) Distribuer 50 μL de substrat et 50 μL de chromogène dans chaque puits. Mélanger doucement et incuber 30 min à température ambiante, à l'abri de la lumière.
- i) Ajouter 100 μL de solution stop à chaque puits. Bien mélanger et mesurer l'absorbance à 450 nm (faire le blanc sur l'air). Lire dans l'heure suivant l'arrêt de la réaction.

Eviter la lumière directe pendant les étapes d'incubation. Couvrir la plaque de microtitration.

DANS CE CADRE

Académie : _____ Session : _____

Examen ou Concours _____ Série* : _____

Spécialité/option* : _____ Repère de l'épreuve : _____

Épreuve/sous-épreuve : _____

NOM : _____

(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms : _____ N° du candidat

Né(e) le : _____ (le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

NE RIEN ÉCRIRE

* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

Repère : BCFTU

SESSION 2001

Durée : 4 H

Page : 17/17

Coefficient : 4

DOCUMENT N° 11

(à joindre à la copie)

Tableau des résultats d'absorbance (unités d'absorbance) :

| | Étalons | | | | | | Echantillons | |
|------------------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | E | F |
| A1 (1 ^{er} essai) | 1,732 | 1,491 | 1,275 | 0,893 | 0,579 | 0,408 | 1,428 | 0,968 |
| A2 (2 ^{ème} essai) | 1,680 | 1,470 | 1,282 | 0,912 | 0,565 | 0,422 | 1,404 | 0,942 |
| Moyenne des absorbances | 1,706 | 1,480 | 1,279 | 0,902 | 0,572 | 0,415 | 1,416 | 0,955 |
| Pourcentage d'absorbance P | | | | | | | | |
| C ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | | | | | | | | |
| log C | | | | | | | | |

N.B. : détermination du pourcentage d'absorbance P.

Les valeurs moyennes des absorbances obtenues pour chacun des étalons et des échantillons sont divisées par la valeur d'absorbance moyenne du premier étalon ($0 \mu\text{g.L}^{-1}$) et multipliées par 100 ; on obtient alors des valeurs exprimées en pourcentages.