

Repère : BCFTU

SESSION 2003

Durée : 4 H

Page : 0/11

Coefficient : 4

**BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOCHIMISTE**

**EPREUVE E5 - UNITE U51
ETUDE D'OPERATIONS TECHNIQUES**

EPREUVE E5. UNITE U51.
ETUDE D'OPERATIONS TECHNIQUES

LES MYCOTOXINES

Calculatrice autorisée

Les mycotoxines, substances toxiques produites par des champignons, ont, selon les cas, des effets immunodépresseurs, hémorragiques, toxiques envers le foie, les reins ou le système nerveux, oestrogénomimétiques, ainsi que, à plus long terme, des effets mutagènes et cancérigènes. Elles sont susceptibles d'être présentes dans de très nombreux aliments d'origine végétale, mais aussi dans les produits d'origine animale (lait, viande ...) et sont très résistantes même à la cuisson.

PREMIERE PARTIE : L'OCHRATOXINE A ET LES MOISSURES PRODUCTRICES

(30 points).

L'ochratoxine A, produite par les moisissures *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium viridicatum*, est très toxique. Elle constitue un contaminant fréquent des céréales, du café, des fruits secs. Elle représente un risque important pour la santé humaine, ce qui justifie le développement de méthodes de dosages simples et précises. De plus, elle peut engendrer des risques technologiques ; par exemple, dans le process de la bière, elle a un effet sur la fermentation. Sa formule est présentée dans le document 1.

1-1) Identification des moisissures.

Elle repose essentiellement sur des critères morphologiques macroscopiques et microscopiques, en particulier la structure des hyphes et l'organisation de l'appareil sporifère.

Deux structures cellulaires de moisissures sont représentées dans le document 2.

1-1-1) Qu'appelle-t-on un hyphe ?

1-1-2) Quels sont les deux types d'hyphes pouvant être observés chez les moisissures ?

1-1-3) Etude des structures des moisissures n° 1 et n° 2.

1-1-3-1) Indiquer sur la copie les légendes des éléments désignés a, b, c, d, e, f, g, h.

1-1-3-2) A quel genre de moisissure appartient chacun des appareils sporifères schématisés ?

1-1-4) Le milieu Malt-Agar, dont la composition est donnée dans le document 3, est d'utilisation courante pour la culture des moisissures.

Préciser le rôle de chacun des constituants et l'importance de la valeur du pH.

1-1-5) L'altération des céréales stockées est généralement due à des moisissures et rarement à des bactéries.

Proposer une explication.

1-2) Action de l'ochratoxine A sur la croissance des levures.

1-2-1) Plusieurs méthodes permettent de quantifier une population de micro-organismes.

1-2-1-1) Exposer le principe de la méthode opacimétrique.

1-2-1-2) Enoncer les étapes du protocole.

1-2-2) On étudie l'influence de la concentration en ochratoxine A sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.

Les résultats expérimentaux sont reportés dans le document 4.

Proposer le protocole expérimental permettant de réaliser cette étude sachant que l'on dispose d'une solution mère d'ochratoxine A à 2 mg.cm^{-3} (détails des étapes de mesure d'absorbance et de numération des cellules viables exclus).

Donnée : le volume final de la culture est de 100 cm^3 .

1-2-3) On vérifie les résultats obtenus par opacimétrie en effectuant une numération en hématimètre. Un volume de $0,1 \text{ cm}^3$ d'échantillon de la culture témoin est ajouté à $0,9 \text{ cm}^3$ d'eau physiologique stérile.

Le résultat de la numération est de 84 levures pour 10 rectangles en cellule de Malassez.

Calculer le nombre de levures par cm^3 de culture témoin.

Conclure.

Caractéristiques de la cellule de Malassez :

Longueur du quadrillage : 2,5 mm

Profondeur : 0,2 mm

Largeur du quadrillage : 2 mm

Nombre de rectangles : 100

1-2-4) Le test de viabilité est effectué dans les conditions suivantes : un volume de $0,5 \text{ cm}^3$ de culture est dilué dans $0,5 \text{ cm}^3$ de solution de bleu de méthylène tamponnée à pH 4 (bleu de Funk). Le mélange est monté en cellule de Malassez. 200 micro-organismes sont comptés ; certains apparaissent bleus, d'autres non colorés.

- Expliquer la différence de coloration observée.

- Calculer le résultat du test de viabilité (en % de cellules viables) pour la culture contenant $5 \mu\text{g}$ d'ochratoxine A. cm^{-3} sachant que 12 cellules sont colorées en bleu.

1-2-5) Analyser qualitativement l'action de l'ochratoxine A sur la culture de *Saccharomyces cerevisiae*.

1-3) Action de l'ochratoxine A sur la fermentation alcoolique.

Le bioréacteur contenant $1,5 \text{ dm}^3$ de milieu Sabouraud est inoculé avec une préculture de levures.

1-3-1) Indiquer sur la copie le nom des organes du bioréacteur notés de 1 à 8 dans le document 5. Préciser le rôle des éléments n° 3, 6 et 8.

1-3-2) Quel est l'ordre de grandeur du rapport à respecter entre volume de préculture à inoculer et volume de milieu de culture ? Pourquoi est-il nécessaire de respecter ce rapport ?

1-3-3) Quelles sont les précautions à prendre lors du prélèvement pour assurer la qualité des résultats ?

1-3-4) Les résultats de la fermentation sont donnés dans le document 6. Indiquer l'effet de l'ochratoxine A sur la production d'éthanol.

DEUXIEME PARTIE : EXTRACTION DE L'OCRATOXINE A – PURIFICATION DES ECHANTILLONS (11 points).

Avant le dosage de l'ochratoxine A dans les aliments, on procède à des étapes d'extraction puis de purification sur colonne d'immunoaffinité. Les réactifs utilisés et le mode opératoire appliqué sont donnés dans le document 7.

2-1) Trois composés organiques sont utilisés dans cette manipulation : l'acétonitrile (formule chimique donnée dans le document 7), l'heptane et le méthanol.

2-1-1) Ecrire la formule chimique semi-développée et classer par ordre de polarité croissante les trois composés.

2-1-2) Expliquer le rôle de l'acétonitrile et de l'heptane dans l'étape d'extraction.

Donnée : l'ochratoxine A est un composé moyennement polaire.

2-2) A partir du mode opératoire, nommer et résumer les différents temps de la chromatographie d'immunoaffinité.

- 2-3)** A partir des informations du document 7, démontrer que le volume de filtrat d'extraction V_F à prélever pour préparer la solution qui sera injectée dans la colonne de purification doit être de 2 cm^3 .

TROISIEME PARTIE : DOSAGE DE L'OCHRATOXINE A PAR DEUX METHODES DIFFERENTES (39 points)

3-1) Dosage par méthode immunoenzymatique.

L'utilisation du test RIDASCREEN Fast Ochratoxine A permet de détecter et de doser cette toxine de façon rapide et précise.

Le document 8 rassemble la liste des réactifs de ce kit, le protocole du test et l'exploitation des résultats.

3-1-1) Principe du test.

- 3-1-1-1)** Expliquer le principe des différentes étapes de ce test par des schémas légendés et commentés.
- 3-1-1-2)** Préciser, en justifiant la réponse, de quel type de méthode immunoenzymatique il s'agit.
- 3-1-1-3)** Indiquer le sens de variation de l'absorbance lue au spectrophotomètre en fonction de la teneur en ochratoxine A de l'échantillon testé.

3-1-2) Conjugué.

- 3-1-2-1)** Donner la définition d'un conjugué et citer deux exemples précis de conjugués utilisés dans des techniques immunologiques mais non immunoenzymatiques.
- 3-1-2-2)** Quel est, dans le cas présent, le rôle des 2 composants du substrat-chromogène ? Justifier le terme chromogène.

3-1-3) Témoin.

- 3-1-3-1)** Pourquoi l'absorbance du témoin contre l'air doit-elle être inférieure à 0,200 ?
- 3-1-3-2)** Comment qualifier ce témoin ? Pourquoi règle-t-on le zéro du spectrophotomètre sur ce puits ?

3-1-4) Exploitation des résultats.

Expliquer ce que représente le pourcentage P, d'après le principe du test.

3-1-5) Limite de détection du test.

La limite de détection du test RIDASCREEN^R Fast Ochratoxine A est de $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

- 3-1-5-1)** Donner une définition de la limite de détection.
- 3-1-5-2)** Quelle serait la valeur approximative du pourcentage P d'un échantillon contenant moins de $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d'ochratoxine A ? Justifier la réponse.

3-1-6) Etude de la spécificité du test.

La spécificité du test RIDASCREEN est établie par contrôle des réactions croisées avec les toxines suivantes :

- Ochratoxine A	100 %
- Ochratoxine C	44 %
- Ochratoxine B	14 %
- Ochratoxine α	0,1 %

- 3-1-6-1)** Quel réactif du kit est essentiellement concerné par cette étude de spécificité ? Justifier.
- 3-1-6-2)** Expliquer le terme de réaction croisée.
- 3-1-6-3)** Dans le cadre d'une simple détection de l'ochratoxine A, comment qualifier les résultats correspondant au pourcentage de 44 pour l'ochratoxine C ? Justifier.

3-2) Dosage par méthode de chromatographie liquide haute performance.

Cette méthode est applicable pour des concentrations supérieures à $3 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Le dosage s'effectue par étalonnage externe. La préparation des solutions étalons et les conditions chromatographiques sont données dans le document 9. Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans le document 10.

- 3-2-1)** Expliquer le principe de la détection par fluorimétrie et préciser la valeur de la longueur d'onde excitatrice à utiliser dans ce dosage.
- 3-2-2)** L'absorbance contre le blanc de la solution mère étalon, préparée selon les indications du document n° 9 est égale à 0,280 dans une cuve de 1 cm de trajet optique.
- 3-2-2-1)** Calculer la concentration molaire exacte de la solution étalon mère d'ochratoxine A préparée, puis en déduire sa concentration massique.
- 3-2-2-2)** Comment préparer 10 cm^3 de solution fille à exactement $0,4 \mu\text{g.cm}^{-3}$?
- 3-2-2-3)** Calculer les concentrations massiques en ochratoxine A des 3 solutions étalons X, Y et Z.
- 3-2-3)** Reporter dans un tableau les aires et les concentrations massiques des solutions étalons. Donner l'équation du graphe aire = f(concentration massique).
- 3-2-4)** Un essai a été effectué avec extraction-purification selon le protocole décrit dans le document 7 à partir d'une masse m pesée de blé moulu de 9,9864 g. Le chromatogramme obtenu à partir d'une injection de la solution d'élution est donné dans le document 10. Il est rappelé que les 5 cm^3 de solution d'élution proviennent de m/10.
- 3-2-4-1)** Déterminer la teneur en ochratoxine A dans l'échantillon de blé testé et rendre le résultat sachant que le coefficient de variation obtenu en répétabilité avec cette méthode est de 8 %.
- 3-2-4-2)** Conclure sachant que la teneur maximale admissible (TMA) en ochratoxine A dans les céréales est de $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$.