

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR AGRICOLE
E7-1 ANALYSES ET CONTRÔLES**

Option : ANABIOTEC

Durée : 180 minutes

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

Le sujet comporte **20** pages

SUJET

Les documents et le contexte ont été adaptés pour les besoins de l'épreuve.

Authentification de l'origine et des conditions de production d'un foie gras

Les exigences des consommateurs ne cessent d'évoluer. Outre la qualité nutritionnelle et sanitaire des produits, les consommateurs souhaitent aussi être rassurés sur l'origine géographique (produit local, national, AOP (Appellation d'Origine Protégée), IGP (Indication Géographique Protégée) et les modes de production, en particulier ceux sous signe officiel de qualité (Label Rouge, Bio...).

Une entreprise de foie gras du Sud-Ouest fabrique des produits à base de foie gras de canard et souhaite maintenant diversifier sa production en proposant du foie gras d'oie IGP Sud-Ouest. Vous êtes technicien au sein du laboratoire interne de cette entreprise et vous êtes chargé :

- De contrôler les conditions de fabrication du foie gras d'oie cuit et de vérifier la qualité et la stabilité de ce nouveau produit.
- De vérifier qu'il n'y a pas de mélange entre canard et oie sachant que ces deux produits sont transformés en alternance sur la même ligne de fabrication.
- De participer à la sélection d'un nouveau fournisseur pour les foies d'oie crus.

PARTIE 1 : Vérification des conditions de production (7 points)

La méthode HACCP a été mise en place pour assurer la sécurité sanitaire de la fabrication du foie gras d'oie cuit. Un point critique (CCP) a été identifié par rapport au danger microbiologique *Clostridium botulinum*, à savoir l'étape de cuisson. À l'aide des **documents 1, 2, et 3** :

- 1.1. Justifier le choix de *Clostridium botulinum* comme danger microbiologique.
- 1.2. Justifier le choix du CCP.
- 1.3. Établir un plan de contrôle pour l'étape concernée par le CCP, en précisant la technique proposée et la fréquence du contrôle.
- 1.4. Déterminer les causes possibles de la présence de *Clostridium botulinum*, à l'aide d'une méthode adaptée.
- 1.5. Proposer les actions correctives à apporter en cas de présence de cette bactérie.

Pour vérifier l'efficacité du barème de stérilisation lors de l'étape de cuisson, vous contrôlez la stabilité des produits appertisés selon la norme NF V 08-401 donnée dans le **document 4**.

- 1.6. Justifier la nécessité du contrôle de stabilité des produits appertisés.

PARTIE 2 : Suspicion de contamination inter-échantillons (5 points)

Les foies gras de volaille sont riches en triglycérides dont les proportions d'acide gras « insaturés » sont élevées.

Néanmoins, ils se distinguent par une composition variable en acide gras de types oléiques et linoléiques. Cela permet de distinguer les foies d'oie et de canard.

Vous devrez interpréter une analyse de l'échantillon de foie gras d'oies permettant de conclure sur la suspicion de contamination des foies d'oie par des foies de canard. La méthode d'analyse actuellement utilisée au laboratoire est la chromatographie en phase gazeuse. Un extrait du mode opératoire est présenté dans le **document 5**.

Le **document 6** présente les résultats attendus des chromatogrammes de l'analyse d'échantillons de foie gras d'oies et de canards, les conditions d'analyse de la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la courbe d'étalonnage (Aire du pic = f(% acide oléique)) et enfin le critère de dépistage d'une éventuelle contamination des foies d'oies par des foies de canards.

- 2.1. Justifier l'utilisation de solvants organiques afin d'extraire les lipides du produit.
- 2.2. Identifier dans le mode opératoire du **document 5**, l'étape d'extraction des lipides en précisant le numéro de l'étape.

2.3. Préciser les équipements de protections individuelles nécessaires lors de l'étape d'extraction par solvant.

Dans l'étape 3.2 du mode opératoire, une ampoule à décanter est utilisée.

2.4. Schématiser la en précisant la position de la phase organique et de la phase aqueuse.

On donne les densités de quelques liquides :

Liquide pur	Eau	Hexane	Isopropanol
densité	1,00	0,65	0,79

2.5. Justifier, à l'aide du **document 6**, l'intérêt de travailler avec des paliers de température, dans la méthode d'analyse par CPG.

L'analyse de l'échantillon suspect de foie gras en CPG, selon une méthode d'étude identique à celle utilisée pour établir la droite étalon, donne une **Aire**(échantillon) du pic égale à $4,4 \times 10^6$.

2.6. À partir de l'équation de la droite d'étalonnage, déterminer le pourcentage en acide oléique présent dans l'échantillon.

2.7. Conclure sur la suspicion de contamination dans le cas de cet échantillon.

PARTIE 3 : Mise en place d'une nouvelle technique d'analyse (5 points)

Vous êtes chargé de faire un rapport à votre supérieur hiérarchique dans le but de mettre en place une nouvelle technique destinée à vérifier l'absence de croisement de foies d'oies et de canards entre deux productions successives (on rappelle que les deux produits sont fabriqués sur la même ligne de production). En effet, la législation indique que les produits bénéficiant de l'appellation « foie gras d'oie » ne doivent pas contenir plus de 1 % de foie provenant d'autres espèces.

Les 2 méthodes pressenties par le laboratoire sont la PCR quantitative (en temps réel) et la technique ELISA-sandwich présentées dans les **documents 7, 8 et 9**. À partir de ceux-ci :

3.1. Justifier le choix de ces 2 méthodes en vous appuyant sur leur principe.

3.2. Schématiser les différentes étapes de ces 2 méthodes.

3.3. Mettre en évidence la finalité de chaque étape pour ces 2 méthodes.

Finalement le directeur du laboratoire a fait le choix de la technique PCR quantitative.

3.4. Mettre en évidence les critères de choix de cette méthode.

3.5. Identifier le risque majeur pouvant fausser les résultats lors de la réalisation de la technique PCR.

3.6. En déduire les précautions à prendre.

PARTIE 4 : Critère de choix d'un fournisseur (3 points)

Dans le but de lancer la nouvelle production de foies gras d'oies, l'entreprise veut faire un choix parmi deux fournisseurs A et B. Une première commande de 2 000 foies a donc été passée avec chacun des deux fournisseurs A et B.

Un échantillon de 150 foies a été prélevé de façon aléatoire et simple dans le lot envoyé par le fournisseur A. On a constaté que 25 d'entre eux présentent des anomalies par rapport au cahier des charges.

Un échantillon de 100 foies a été prélevé de façon aléatoire et simple dans le lot envoyé par le fournisseur B. On a constaté que 14 d'entre eux présentent des anomalies par rapport au cahier des charges.

On note :

F_1 : La variable aléatoire qui à tout échantillon de taille n_1 issu de la livraison du fournisseur A associe sa proportion de foies gras présentant des anomalies.

F_2 : La variable aléatoire qui à tout échantillon de taille n_2 issu de la livraison du fournisseur B associe sa proportion de foies gras présentant des anomalies.

À l'aide des **documents 10** et **11** :

4.1. Mettre en place un test statistique permettant de déterminer, au vu des deux échantillons, si la proportion de foies gras présentant des anomalies dans la livraison du fournisseur A est supérieure à celle de la livraison du fournisseur B. On choisit un risque de première espèce α de 0,05.

4.2. Conclure quant au choix du fournisseur d'après les résultats obtenus.

LISTE DES DOCUMENTS

Document 1 : Fiche *Clostridium botulinum*

Document 2 : Diagramme de fabrication du foie gras d'oie

Document 3 : Arbre de décision HACCP

Document 4 : Extrait de la norme NF V 08-401 contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés (méthode de référence)

Document 5 : Technique de dosage des acides gras totaux dans le foie gras

Document 6 : Temps de rétention et composition centésimale en acide oléique et linoléique dans un foie gras d'oie et un foie gras de canard, conditions d'analyse en CPG, droite d'étalonnage, critère de dépistage

Document 7 : Éléments relatifs aux méthodes utilisées pour l'identification des espèces animales

Document 8 : Protocole mise en œuvre PCR quantitative

Document 9 : Extrait du protocole de mise en œuvre du test ELISA sandwich « Spéciation viandes et produits crus »

Document 10 : Variables aléatoires de quelques tests statistiques

Document 11 : Fonctions de répartition

Clostridium neurotoxinogènes

Caractéristiques et sources des *Clostridium botulinum* et des *Clostridium* neurotoxinogènes

Principales caractéristiques microbiologiques

Les *Clostridium botulinum* sont des bacilles à Gram positif, anaérobies stricts et sporulés. Les souches de *C. botulinum* sont très hétérogènes d'après leurs caractères cultureux, biochimiques et génétiques et elles sont divisées en quatre groupes (Groupe I à IV). À quelques exceptions près, chaque souche produit un seul type de toxine botulique. Les toxines botuliques se divisent en 7 types (A à G) selon leurs propriétés immunologiques, chacune étant neutralisée par un sérum spécifique. De plus, selon leurs séquences en acides aminés, des sous-types sont identifiés dans chaque type de toxine botulique. Les toxines sont détruites après 10 min à 100 °C ou 30 min à 80 °C.

Sources du danger

Le réservoir de *C. botulinum*, comme des autres *Clostridium* est l'environnement : sol, poussière, sédiments marins ou d'eau douce, eaux souillées, lisiers, et occasionnellement le contenu digestif de l'Homme et des animaux asymptomatiques. Le botulisme est une maladie humaine et animale mais il n'y a pas de transmission directe documentée entre un animal atteint de botulisme et l'Homme. Le botulisme animal concerne essentiellement les oiseaux et les bovins et est le plus souvent dû aux types C ou D.

Voies de transmission

La maladie n'est pas transmissible entre individus, mais résulte le plus souvent d'ingestion d'un aliment contaminé. Deux formes de botulisme peuvent être distinguées selon le mode de contamination :

- L'intoxication botulique est due à l'ingestion de toxine botulique préformée dans un aliment. C'est la forme la plus fréquente chez l'adulte.
- Le botulisme par blessure est causé par l'inoculation des spores de *C. botulinum* dans une plaie.

DOCUMENT 1 (suite et fin)

Maladie humaine d'origine alimentaire

Nature de la maladie

Le botulisme se caractérise par des paralysies flasques, symétriques, sans atteinte du système sensoriel. Les types de botulisme A, B et E sont les plus fréquents chez l'Homme. La gravité des signes cliniques dépend de la quantité de toxine botulique absorbée et du type de toxine, le botulisme de type A étant le plus grave avec insuffisance respiratoire d'installation plus rapide et plus sévère que dans les autres types de botulisme.

Relations dose-effet

La toxine botulique est à ce jour considérée comme le poison le plus puissant qui existe. La toxine botulique A est la plus active. La dose létale chez un homme adulte est estimée à 100 ng – 1 µg par voie parentérale et 70 µg par voie orale (1 µg par kg).

Les effets sont fonction de la concentration en toxine ou de la teneur en bactéries/spores de *C. botulinum*. Plus la quantité de toxine ingérée est élevée, plus la maladie est d'apparition rapide et sévère. En général, l'ingestion unique de quelques grammes d'aliment contenant de la toxine botulique est suffisante pour déclencher un botulisme.

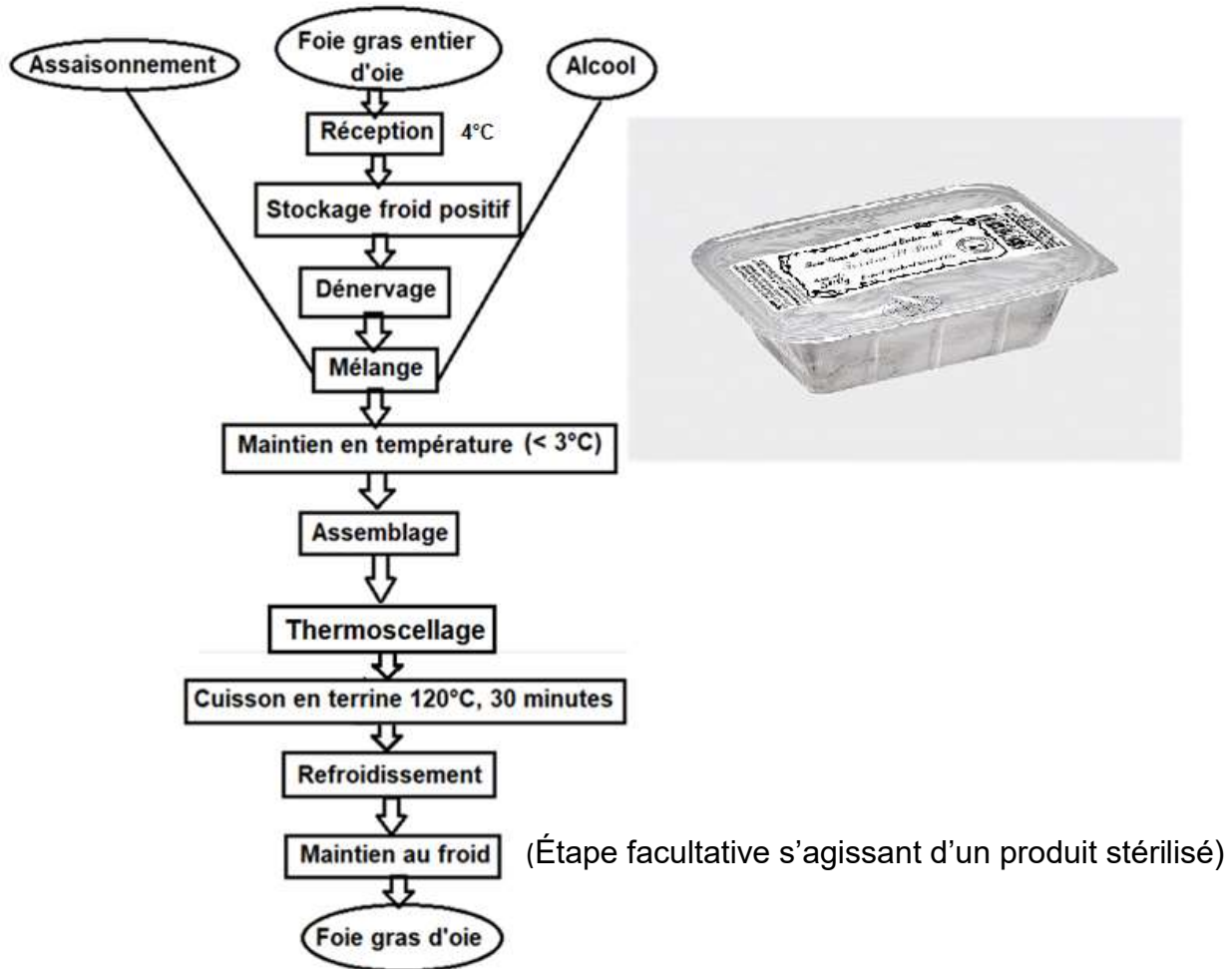
Rôle des aliments

Principaux aliments à considérer

Les matières premières alimentaires sont contaminées par des bactéries/spores de *Clostridium neurotoxigenes* à partir de l'environnement. Certaines denrées peuvent être contaminées par l'intermédiaire d'épices ou de condiments (poivre, ail, etc.). Les conditions de préparation et de conservation des denrées déterminent ensuite une éventuelle germination des spores, la croissance des bactéries ainsi que la toxinogénèse. La présence de toxine botulique dans les aliments manufacturés peu acides est souvent due à un défaut de maîtrise du procédé (contrôle de la température de cuisson/stérilisation ou de la température de conservation, contrôle insuffisant du pH et de l'eau, fuites de l'emballage). La toxine botulique est stable dans les aliments sur une longue période.

Source : <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=fiche+anes+clostridium+perfringens>

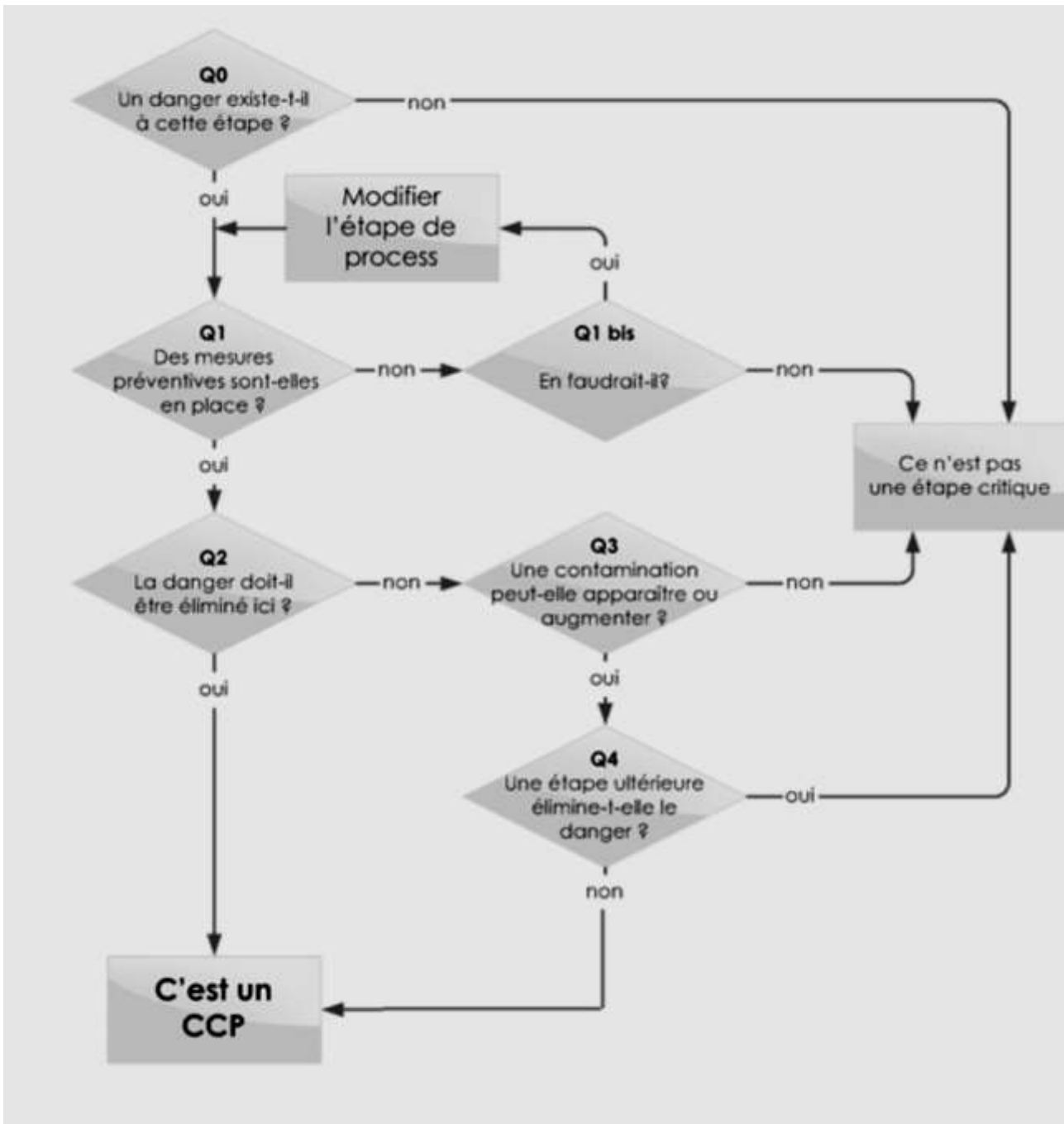
DOCUMENT 2 : Diagramme de fabrication du foie gras d'oie



Le barème de cuisson/stérilisation (30' à 120°C) permet de détruire les spores de *Clostridium botulinum*

Source : Document élaboré pour les besoins de l'épreuve

DOCUMENT 3 : Arbre de décision HACCP



Source : d'après Codex alimentarius

DOCUMENT 4 : Extrait de la norme NF V 08-401 contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés (méthode de référence)

L'analyse microbiologique des conserves ne peut évidemment pas concerner toutes les boîtes fabriquées...

Un échantillonnage doit donc être réalisé dans un lot de produits fabriqués. Cinq boîtes sont prélevées.

Elles subissent d'abord un examen de l'aspect extérieur. L'ensemble des caractéristiques notées est relevé.

Le contrôle de stabilité peut alors être entrepris avec :

- Une boîte de conserve à la température du laboratoire (25 °C environ).
- Deux boîtes étuvées à 32 °C jusqu'à 21 jours avec examen quotidien (recherche de bombage ou de fuites).
- Deux boîtes étuvées à 55 °C jusqu'à 7 jours avec examen quotidien (sauf pour les conserves de pH > 4,5, à l'exclusion des tomates).

Les examens sont entrepris ensuite, 24 heures après la sortie de l'étuve, par comparaison des différentes boîtes du même lot :

- Examen de l'aspect extérieur avec notamment la recherche de déformation de l'emballage.
- Examen du produit (odeur, couleur...) mais sans goûter (sauf pour les boîtes incubées à 55 °C).
- Mesure du pH au pHmètre.
- Examen microscopique à partir d'une goutte de produit liquide, ou en application directe d'un produit solide sur une lame.

Divers ensemencements peuvent être réalisés pour la recherche de germes sporulés thermophiles, soit Bacillus, soit Clostridium.

Source : extrait de Microbiologie alimentaire, Christiane Joffin et Jean-Noël Joffin, édition 2010

DOCUMENT 5 : Technique de dosage des acides gras totaux dans le foie gras

1. Objectifs

L'objectif de cette méthode est de permettre l'extraction et la transformation des lipides totaux d'un échantillon de foie gras afin de réaliser une analyse de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

2. Principe

Les lipides à extraire de l'échantillon doivent être séparés des autres constituants comme les glucides ou les protéines. Grâce à l'utilisation de solvants organiques tels que l'hexane, l'isopropanol ou le pentane, mis en contact avec l'échantillon, les lipides vont être extraits des autres constituants par la formation de deux phases.

Une fois les lipides isolés du mélange, des réactions chimiques de saponification, puis de méthylation vont être réalisées afin d'obtenir des esters méthyliques, qui sont facilement analysables en chromatographie en phase gazeuse.

3. Extrait du mode opératoire

L'échantillon de foie gras est broyé (broyat) et mis en solution par ajout d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique.

3.1 Ajout de 4 mL d'un mélange hexane / isopropanol à la solution aqueuse préparée à partir d'un broyat de foie gras. La solution est ensuite centrifugée (1 100 g, 10 min) et la phase organique est prélevée et transférée dans une ampoule à décanter. Cette étape est répétée sur la phase aqueuse avec 2 mL du mélange d'hexane / isopropanol pour récupérer les lipides résiduels n'ayant pas été extraits.

3.2 À l'aide d'une ampoule à décanter, un lavage est effectué en ajoutant 2 mL de solution aqueuse de chlorure de sodium (Na^+, Cl^-) à la phase organique contenant les lipides et le mélange de solvant hexane / isopropanol. Après décantation, la phase organique est récoltée.

3.3 Une suite de réactions chimiques permet de libérer les acides gras des triglycérides sous la forme d'ester méthylique. Les esters méthyliques obtenus sont alors solubilisés dans l'hexane et peuvent être analysés en chromatographie phase gazeuse.

4. Présentation des résultats

Les esters méthyliques issus des acides gras sont analysés en chromatographie en phase gazeuse. La détection est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique de flamme. On obtient alors un chromatogramme avec lequel on peut identifier et quantifier les acides gras de l'échantillon par étude des temps de rétention et des aires des pics.

Source : Document élaboré pour les besoins de l'épreuve

DOCUMENT 6 : Temps de rétention et composition centésimale en acide oléique et linoléique dans un foie gras d'oie et un foie gras de canard, conditions d'analyse en CPG, droite d'étalonnage, critère de dépistage

Temps de rétention (minutes)	Acide gras	% acide gras attendu dans le foie gras d'oie ($\pm 1\%$)	% acide gras attendu dans le foie gras de canard (Barbarie) ($\pm 1\%$)
9,5	Acide oléique C18 :1	58	48
12	Acide linoléique C18 :2	0,8	1,2

Conditions de l'analyse de la chromatographie en phase gazeuse

Colonne : Rxi®-XLB, 30m, 0,25mm ID, 0,25 μm (cat.# 13723)

Échantillon : extrait de foie

Solvant ; Hexane

Volume injecté : 1 μL splitless

Température d'injection : 300°C

Température du four : 40°C (palier de 2 min) puis montée à 240°C à 30°C/min (palier de 2 min) puis montée à 340 °C à 10°C/min (palier 5 min).

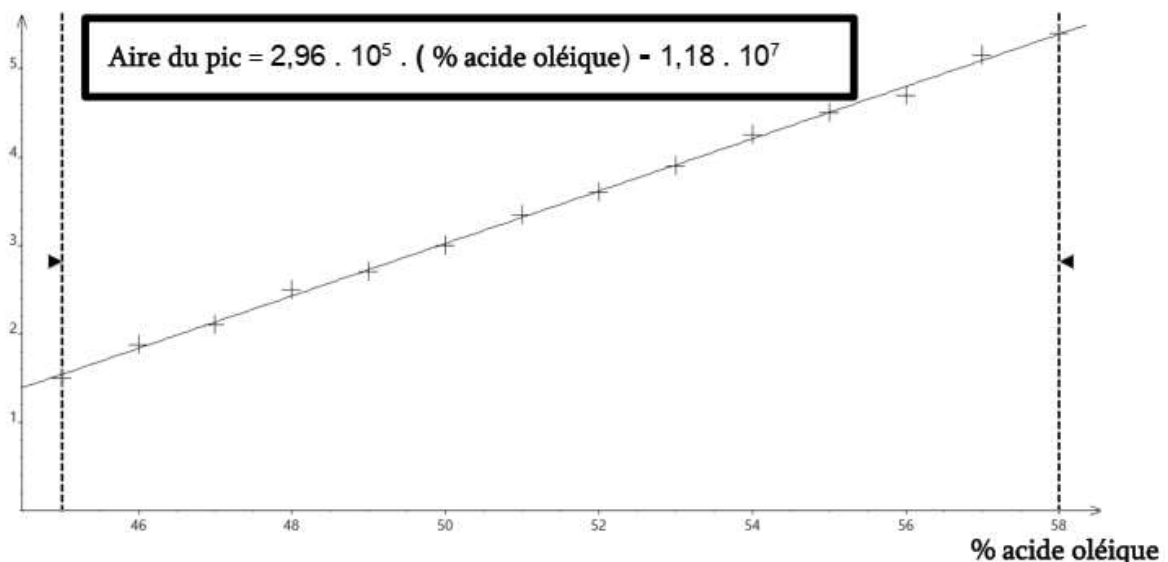
Gaz vecteur : He à flux constant

Détecteur : spectrophotomètre

Fabricant : Shimadzu

La droite d'étalonnage (Aire du pic = f (% acide oléique))

Aire du pic



Critère de dépistage de contamination croisée entre les produits

Il y a un risque de contamination croisée si % acide oléique < 56%

Sources : Document élaboré pour les besoins de l'épreuve

DOCUMENT 7 : Éléments relatifs aux méthodes utilisées pour l'identification des espèces animales

Méthode	Méthode ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)	Méthode PCR en "temps réel" (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) - semi quantitative
Principe de la méthode	<p>La méthode ELISA permet de savoir si une protéine (antigène) recherchée est présente. Les tests ELISA sont de type :</p> <ul style="list-style-type: none"> - « Sandwich » : la couleur développée est proportionnelle à la quantité de molécules à détecter présente dans l'échantillon ; - « Compétition » directe ou indirecte : la couleur développée est inversement proportionnelle à la quantité de molécules à détecter présente dans l'échantillon. <p>Par ailleurs, la détection de l'antigène peut se faire via des anticorps polyclonaux, ou monoclonaux.</p> <p>C'est une méthode qui fonctionne sur des temps courts et qui est relativement simple. Elle permet suivant les espèces de mettre en évidence une espèce animale dans des produits complexes pour une concentration de l'ordre de 1%.</p>	<p>La PCR en temps réel repose sur le même principe de base que la PCR en point final mais sa particularité repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR en point final). Des marqueurs fluorescents se fixent soit sur l'ADN double brin (cas des agents intercalants type "Sybr green") soit sur une séquence d'ADN précise (cas des sondes). Ces marqueurs ne fluorescent qu'une fois fixés à l'ADN. La fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR.</p>
Méthode qualitative	oui	oui

Méthode	Méthode ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)	Méthode PCR en temps réel (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) - semi quantitative
Méthode pertinente sur matrice crue ou transformée ? (jusqu'à quel degré de transformation est ce sensible ?)	<p>Moindre fiabilité sur les produits cuits en fonction de la transformation: le chauffage peut modifier la conformation de la protéine et de ce fait modifier la détectabilité de celle-ci. Si la protéine est thermostable cela n'a pas trop d'impact. Après une stérilisation à 120°C/20mn, le seuil de 1% de cheval est toujours détectable. Par contre, les 1^{ers} résultats obtenus sur des conserves montrent des résultats divergents entre PCR et ELISA (cheval non détecté par ELISA)</p>	<p>OUI car l'ADN est solide, la méthode est donc efficace même sur un produit cuit</p>
Méthode quantitative	<p>Uniquement si on se réfère à un standard fourni par le client. Dans ce cas, il est nécessaire d'analyser plusieurs standards pour construire une courbe étalon permettant de calculer une concentration. Le dosage est assuré via un couplage avec une enzyme permettant de faire un dosage colorimétrique.</p>	<p>Semi -quantitative, il faut disposer d'un référent fourni par l'opérateur pour pouvoir disposer d'un rapport de quantité (% d'ADN étranger identifié par rapport à la quantité totale d'ADN).</p>

DOCUMENT 7 (suite et fin)

Nom de la méthode	Méthode ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)	Méthode PCR en "temps réel" (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) - semi quantitative	Nom de la méthode	Méthode ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)	Méthode PCR en temps réel (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) - semi quantitative
Limite de détection (LOD)	La LOD est déterminée de façon déductive : ce n'est donc pas un seuil de détectabilité. Certains fournisseurs de kits donnent une LOD qui ne prend pas en compte d'effet matrice. De ce fait, cette LOD apparaît plus faible que celles d'autres fournisseurs qui ont pris en compte cet effet (la LOD peut alors être appelée LLA).	- forte sensibilité: des seuils de détection (entre 0,1 et 1%) de l'ADN présent dans l'échantillon	Avantages	- Preuve directe de la présence de la protéine recherchée - Le kit ELISATEK annonce une sensibilité de 1% en conditions expérimentales, Tests ELISA sont souvent utilisés en première intention pour faire un screening de tous les échantillons. PCR temps réel peut venir en seconde intention pour la confirmation de résultats douteux et en 1ère intention pour les produits appertisés.	- forte sensibilité, des seuils de détection entre 0,1 et 1% de l'ADN présent dans l'échantillon - ADN très stable et résistant aux procédés de fabrication
Limite de quantification LOQ	1% avec le kit ELISATEK	Variable selon les appareils; nécessite de réaliser des essais.	Inconvénients	- Réactions croisées avec d'autres protéines plus ou moins éloignées de l'Antigène recherché - Moindre fiabilité sur les produits cuits - Effet process à étudier pour le maîtriser - Effet matrice à étudier pour le maîtriser	Forte sensibilité. Sensible aux conditions environnementales. Le résultat fournit une proportion d'ADN présent dans l'échantillon. La proportion d'ADN n'est pas forcément corrélée à la proportion en masse car les ADN ciblés (ADN mitochondrial) ne sont pas présents en quantité égale dans tous les tissus.
Coûts	Un kit ELISA vaut environ entre 300 et 500€, permettant de traiter 96 échantillons ET témoins. Le coût par échantillon dépend du nombre d'échantillons traités et de celui des répétitions.	Coût moyen d'environ 100€ pour une recherche d'espèce.	Détail	Environ 5H pour le kit ELISA en comptant la préparation de l'échantillon et l'extraction des protéines.	Extraction d'ADN : 0,5 à 1 jour selon la méthode utilisée. Analyse par PCR : 3 heures.

Source : ANIA / Charte de lutte contre la fraude sur l'espèce de viande. Version 2 novembre modifié pour les besoins de l'épreuve.

<https://www.ania.net/alimentation-sante/charte-lutte-contre-fraude-viande>

DOCUMENT 8 : Exemple de protocole de mise en œuvre PCR quantitative

1. Préparation du tampon TAE :

Diluer 100 mL de TAE 10X dans 900 mL d'eau distillée pour obtenir 1L de TAE 1X (pH=8,3)

Annoter ce flacon TAE 1X

Conserver ce flacon à + 4°C

2. Préparation des réactifs :

Préparer les réactifs de PCR en diluant avec de l'eau stérile selon le tableau suivant :

	Volume initial	Volume d'eau à ajouter	Volume final
Tampon de réaction (bouchon bleu)	100 µL	100 µL	200 µL
MgCl ₂ (bouchon jaune)	100 µL	100 µL	200 µL
Amorces de PCR (bouchon noir)	10 µL	40 µL	50 µL
Désoxyribonucléotides (bouchon violet)	10 µL	90 µL	100 µL
Taq polymérase (bouchon vert)	10 µL	NE PAS DILUER	10µL
ADN génomique de phage lambda (bouchon incolore)	10 µL	30 µL	40 µL

3. Mise en œuvre de la réaction de PCR :

Laisser les réactifs décongeler à température ambiante (ne pas utiliser de bain-marie pour la décongélation).

Préparer le mélange de PCR (au dernier moment) sur de la glace pilée dans un microtube prévu à cet effet et selon l'ordre et les quantités indiquées dans ce tableau :

Tampon de réaction (bouchon bleu)	5 µL
MgCl ₂ (bouchon jaune)	5 µL
Amorces de PCR (bouchon noir)	5 µL
Désoxyribonucléotides (bouchon violet)	5 µL
Taq polymérase (bouchon vert)	1 µL
ADN génomique de phage lambda (bouchon incolore)	4 µL
Total	25 µL

Homogénéiser le contenu du tube en aspirant et refoulant très délicatement, à l'aide d'une micropipette.

Lors du mélange et de l'homogénéisation, éviter autant que possible de faire des bulles car celles-ci nuisent à la bonne réussite de la réaction de PCR.

DOCUMENT 8 (suite et fin)

Donner un rapide tour de centrifugeuse pour faire retomber tout le liquide au fond du tube et éliminer les éventuelles bulles.

4. Programmation du thermocycleur :

Programmer le thermocycleur (suivre les indications du constructeur) de façon à entrer le programme suivant :

Étapes	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	240 secondes	1
Dénaturation	95 °C	30 secondes	30
Hybridation	54-66°C	30 secondes	
Élongation	72°C	135 secondes	
Terminaison	72°C	600 secondes	1

Allumer si besoin le chauffage du couvercle (suivre les indications du constructeur).

Quand la machine indique que le couvercle est chaud, mettre les microtubes dans la machine et lancer le programme.

Source : Document élaboré pour les besoins de l'épreuve

DOCUMENT 9 : Extrait du protocole de mise en œuvre du ELISATEK™ test ELISA

sandwich « Spéciation viandes et produits crus », Ref. 6DT2023 VOLAILLES

(poulet/dinde/canard/oie) - 96 puits

1/ PRINCIPE

Les tests d'identification des espèces animales de la gamme BOKITS sont des tests immuno-enzymatiques, utilisant des anticorps anti-albumine, spécifique de chaque espèce animale.

Les échantillons de viande crue sont hachés, puis les protéines solubles en sont extraites par une solution saline. Cet extrait dilué est déposé dans un puits de la microplaque, tapissée d'anticorps anti-albumine purifiés. Après un temps d'incubation, les substances non fixées sont éliminées par lavage. La quantité de protéine spécifique fixée sur le puits de la plaque est déterminée par une réaction impliquant dans un premier temps un anticorps couplé à la peroxydase. Après incubation, l'excès de conjugué est éliminé par aspiration et lavage ; l'activité de la peroxydase fixée est déterminée par l'addition du substrat TMB qui développe une coloration bleue en présence de l'enzyme. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration initiale en protéine (spécifique de l'espèce) de l'extrait. Une estimation qualitative des espèces animales présentes peut être effectuée par lecture visuelle ou en utilisant un lecteur de microplaque.

Les échantillons d'abats (cœur, foie, reins...) se comportent de la même manière que les viandes. Sérum et plasma sont détectés à la concentration de $1/10^6$ dans le Diluant. Caséine et poudre de petit lait (solution à 1%) donnent des réactions positives avec le test « bœuf ». L'albumine bovine est détectée jusqu'à 50 ng/mL. L'adultération du lait (vache, mouton) peut être détectée jusqu'à un niveau d'environ 1% ou moins. Le jaune d'œuf (de poule) est fortement positif avec le test « poulet », tandis que le blanc d'œuf donne un résultat significativement moins fort. Un rapport de validation est disponible sur demande, avec toutes les informations détaillées sur les réactions croisées.

Limites de détection : < ou =1 % de l'espèce recherchée

2/ PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET EXTRACTION

Peser 1 g de viande et le placer dans un tube à essais gradué ou une éprouvette. Compléter jusqu'à 10 ml avec une solution saline (9 g/l de chlorure de sodium dans de l'eau distillée ou désionisée) pour réaliser l'extraction des échantillons de viande.

Mélanger vigoureusement à la main ou à l'aide d'un agitateur. Il est également possible de mixer/stomacher ce mélange de viande et de solution saline. Laisser reposer 10 à 15 minutes.

Un surnageant limpide doit apparaître au-dessus de la couche stabilisée (viande). Dans certains cas, un liquide trouble peut apparaître. Préparer une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de cet extrait en ajoutant 0,1 mL de l'extrait à 0,9 mL de Diluant fourni dans le coffret. L'extrait dilué est alors prêt pour le test.

DOCUMENT 9 (suite et fin)

3/ PROTOCOLE

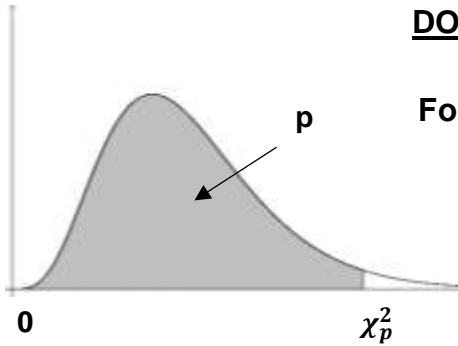
1. Sortir tous les réactifs de leur boîte et les laisser revenir à température ambiante (18-22°C) avant de commencer les tests.
2. Préparer les extraits de viande et le matériel nécessaire ; les réactifs RMS control, Conjugués, Substrat TMB, et solution STOP sont déjà prêts ; les agiter par retournements successifs (ne pas secouer).
3. Déposer 100 µL des témoins (témoin POSITIF = espèce recherchée; témoin NEGATIF = diluant du Kit) et de chacun des extraits dilués des échantillons dans les puits appropriés, à l'aide d'une micropipette.
4. Couvrir la plaque et la placer sur un agitateur orbital pendant 10 minutes à température ambiante ou, après une légère agitation manuelle, laisser incuber sur la paillasse pendant 20 minutes.
5. À la fin de l'incubation, vider les puits. Pour plus de précision, on peut aspirer leur contenu à l'aide d'une pipette ou d'un laveur de microplaque. Remplir soigneusement les puits avec la solution de lavage diluée et vider comme précédemment. Répéter ces opérations deux fois de plus et vider et sécher le bord des puits.
6. Distribuer 50 µL de conjugué anti-espèce dans chaque puits de la barrette correspondante. Agir de même pour toutes les espèces recherchées.
7. Couvrir la plaque et la placer sur un agitateur orbital pendant 15 minutes à température ambiante ou, après une légère agitation manuelle, laisser incuber sur la paillasse pendant 20 minutes.
8. À la fin de la période d'incubation, laver les puits 5 fois comme indiqué dans le § 5.
9. À l'aide d'une micropipette, distribuer 100 µL de substrat TMB dans les puits.
10. Couvrir la plaque incuber sur agitateur orbital pendant 10 minutes à température ambiante ou, sur la paillasse pendant 10 à 20 minutes.
- 11a. Lecture visuelle (qualitative): placer la plaque de micro-titration sur un support blanc et comparer l'intensité de la coloration. Les échantillons qui présentent une coloration bleue identique ou plus foncée que le témoin positif sont jugés positifs. Les échantillons qui présentent une coloration moins intense que le témoin positif ou pas de coloration sont négatifs.
- 11b. Ajouter 50 µL de solution STOP dans tous les puits. Couvrir la plaque et la placer sur un agitateur orbital pendant 10 minutes à température ambiante ou, après une légère agitation manuelle, laisser incuber sur la paillasse pendant 10 minutes. La lecture au spectrophotomètre doit alors être réalisée dans les 10 minutes.
- 12 Utiliser un lecteur de microplaque équipé d'un filtre à 450 nm. Faire le blanc sur le contrôle NEGATIF, puis mesurer et noter la D.O. de chacun des échantillons et des témoins.

Source : Protocole ELISATEK modifié pour les besoins de l'épreuve.

DOCUMENT 10 : Variables aléatoires de quelques tests statistiques

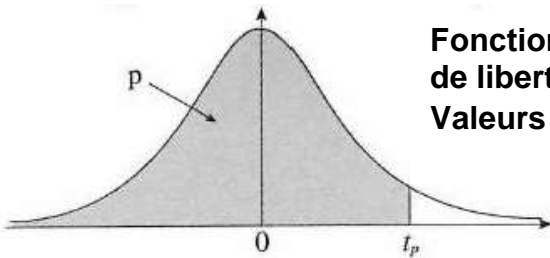
Moyennes	Conformité	$T = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{S}{\sqrt{n-1}}}$ <p>T est distribuée selon la loi de Student à n-1 degrés de liberté.</p>
	Comparaison	$T = \frac{\bar{D}}{\frac{S_d}{\sqrt{n-1}}}$ <p>T est distribuée selon la loi Student à n-1 degrés de liberté</p>
		$T = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\left(\frac{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}\right) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$ <p>T est distribuée selon la loi Student à n₁+n₂-2 degrés de liberté</p>
Variances	Conformité	$K = \frac{nS^2}{\sigma^2}$ <p>K est distribuée selon la loi du Chi2 (χ^2) à n-1 degrés de liberté</p>
Proportion	Conformité	$U = \frac{F - \pi}{\sqrt{\frac{\pi(1-\pi)}{n}}}$ <p>U est distribuée selon la loi normale centrée réduite</p>
	Comparaison	$U = \frac{F_1 - F_2}{\sqrt{p(1-p)\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad \text{avec } p = \frac{n_1 f_1 + n_2 f_2}{n_1 + n_2}$ <p>U est distribuée selon la loi normale centrée réduite</p>

DOCUMENT 11 : Fonctions de répartition



Fonction de répartition d'une variable du Khi2 (χ^2) à k degrés
Valeurs χ_p^2 telles que $prob(\chi^2 \leq \chi_p^2) = p$

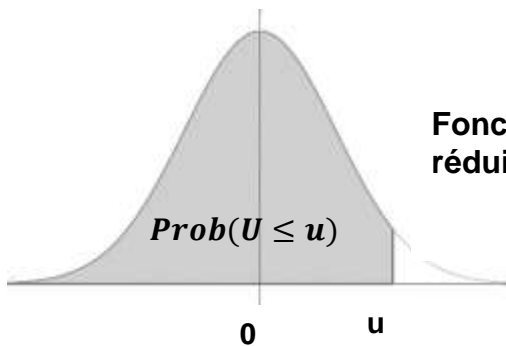
k \ p	0,005	0,025	0,05	0,1	0,90	0,95	0,975	0,995
50	27,99	32,36	34,76	37,69	63,17	67,50	71,42	79,49
100	67,33	74,22	77,93	82,36	118,50	124,34	129,56	140,17
150	109,14	117,98	122,69	128,28	172,58	179,58	185,80	198,36
250	196,16	208,10	214,39	221,81	279,05	287,88	295,69	311,35



Fonction de répartition d'une variable de Student à k degrés de liberté.

Valeurs t_p telles que $Prob(T \leq t_p) = p$

k \ p	0,90	0,95	0,975	0,995	0,999	0,9995
10	1,37	1,81	2,23	3,17	4,14	4,59
50	1,30	1,68	2,01	2,68	3,26	3,50
100	1,29	1,66	1,98	2,63	3,17	3,39
150	1,29	1,66	1,98	2,61	3,15	3,36
250	1,28	1,65	1,97	2,60	3,12	3,33



Fonction de répartition de la loi normale centrée réduite

u	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
1,6	0,9452	0,9463	0,9474	0,9484	0,9495	0,9505	0,9515	0,9525	0,9535	0,9545
1,7	0,9554	0,9564	0,9573	0,9582	0,9591	0,9599	0,9608	0,9616	0,9625	0,9633
1,8	0,9641	0,9649	0,9656	0,9664	0,9671	0,9678	0,9686	0,9693	0,9699	0,9706
1,9	0,9713	0,9719	0,9726	0,9732	0,9738	0,9744	0,9750	0,9756	0,9761	0,9767