



SESSION 2017

**CAPET INTERNE
ET CAER**

**Section : BIOTECHNOLOGIES
Option : BIOCHIMIE – GENIE BIOLOGIQUE**

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

**Durée : 6 heures
Coefficient : 2**

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

Le sujet comporte 14 pages.

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

Extrait de la définition de l'épreuve

NOR : MENH1310121A

Épreuve pratique d'admission

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

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

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

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

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

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

Conseils du jury :

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

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

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

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

Dans le contexte du **contrôle qualité dans l'industrie alimentaire**, les activités technologiques proposées doivent permettre de développer des compétences du programme.

Ressources documentaires proposées dans le sujet

Documents d'aide à la contextualisation

- Fiche documentaire 1: Article de l'Usine Nouvelle sur le lancement de Danio ®
Fiche documentaire 2 : Principales méthodes de dosage des protéines mises en œuvre au laboratoire d'enseignement
Fiche documentaire 3 : Détermination de la teneur en protéines par mesure de l'azote total par la méthode de Kjeldahl
Fiche documentaire 4 : Recherche et dénombrement de coliformes dans les produits laitiers

Fiches techniques et modes opératoires

- Protocole 1 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de Folin-Lowry
Protocole 2 : Détermination de la teneur en protéines par mesure de l'azote total par la méthode de Kjeldahl
Protocole 3 : Recherche et dénombrement de coliformes par ensemencement dans la masse en double couche
Protocole 4 : Orientation en vue de l'identification d'un contaminant par l'étude des caractères morphologiques et enzymatiques
Protocole 5 : Dosage du gluten par technique ELISA

Aide-mémoire de métrologie

Echantillons mis à disposition

- Suspension de Danio ® , **notée P** pour le dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry
Minéralisat de Danio ® , **noté M** pour la mesure de l'azote total par la méthode de Kjeldahl
Suspension de Danio ® , **notée D** pour le dénombrement de coliformes
Isolement sur gélose EMB à partir de Danio ® , **noté EMB**, en vue de l'identification d'un contaminant
Extrait protéique obtenu à partir du Danio ® , **noté EX** pour le dosage du gluten par technique ELISA

Ressources sur support numérique

Fiches et documents techniques

- Fiches techniques de composition des milieux de culture
- Fiches de données de sécurité
- Démarche dichotomique d'orientation en vue de l'identification d'une bactérie
- Protocole d'utilisation du distillateur semi-automatique Gerhardt – Vapodest

Logiciels : suite bureautique libre office, régressi

Programmes du cycle terminal de STL biotechnologies : MI, CBSV, Biotechnologies, ETLV.

Site 3RB : site du réseau ressources risques biologiques

Ressources documentaires à disposition dans le laboratoire

Prévention des risques chimiques : Mention de Danger et Conseils de Prudence

Liste des ouvrages scientifiques et technologiques disponibles

Précis de biochimie. Harper

Dictionnaire des techniques de microbiologie. CRDP

Les produits laitiers (2° Éd.). TEC et DOC

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

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

Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. FLAMMARION

Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. EDUCAGRI

Aliments et boissons - Filières et produits. CRDP

Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. CRDP

Microbiologie alimentaire. Les fermentations alimentaires. TEC et DOC

Microbiologie. DUNOD (initiation à la ..)

Microbiologie. PRESCOTT

Danone lance les yaourts grecs en France mais ne peut les appeler ni "yaourt", ni "grec"

Par Adrien Cahuzac - Publié le 02 octobre 2013, à 14h00

► Produits alimentaires, Danone



© Danone

Le groupe laitier Danone va proposer en France, début 2014, une préparation laitière hyperprotéinée baptisée Danio. Il tente ainsi de reproduire l'immense succès des "yaourts grecs" aux Etats-Unis.

C'était murmuré depuis plusieurs mois. Danone lance en France une offre d'encas hyperprotéinés à l'image des yaourts grecs qui font actuellement fureur aux Etats-Unis. Baptisés Danio, ils arriveront dans les rayons des magasins français en janvier 2014. "C'est un nouveau segment qui n'existe pas encore en France, mais qui répond à une réelle attente des consommateurs en matière de snacking", explique Olivier Delamea, le directeur général de Danone Produits Frais. Selon lui, "les Français consomment de plus en plus en dehors des trois repas

principaux. 80 % d'entre eux snackent au cours de la journée".

12% DE PROTÉINES ET 0 % DE MATIÈRE GRASSE

Dix-huit mois ont été nécessaires à Danone pour mettre au point sa nouvelle recette et lancer Danio, déjà expérimentée avec succès en Grande-Bretagne depuis début 2013. "Elle est issue d'une base de yaourt qui contient trois fois plus de protéines qu'un yaourt classique. Il faut 3 litres de lait pour faire un kilo de Danio contre 1 litre de lait pour un kilo de yaourt classique", détaille Olivier Delamea. Pour des raisons réglementaires, Danio ne pourra pas revendiquer l'appellation "yaourt" ni "grec", comme c'est le cas aux Etats-Unis. En France, la définition officielle impose que le terme "yaourt" soit utilisé uniquement pour un lait fermenté par le développement des bactéries lactiques thermophiles Lactobacillus et Streptococcus thermophilus devant êtreensemencées simultanément. Quant à l'appellation de "grec", la justice britannique a fait condamner début 2013 la marque américaine Chobani à enlever ce terme de ses produits, expliquant qu'un yaourt grec ne pouvait être fabriqué qu'en Grèce.

Danio se présentera sous la forme de pots coniques de 150 grammes, contenant 12 % de protéines, déclinés sous plusieurs recettes : 0 % ou 2,4 % de matière grasse, accompagnées de 6 coulis de fruits au choix.

FABRICATION EN NORMANDIE

Pour lancer sa nouvelle offre, le groupe français a investi "plusieurs millions d'euros", dans une nouvelle ligne de production dédiée, située dans son usine du Pays de Bray, à Ferrières-en-Bray (Seine-Maritime). L'investissement concerne à la fois le process de cette préparation, qui utilise une technologie spécifique de séparation et concentration, à la manière des fromages blancs, et le conditionnement en pots individuels coniques.

Pour commercialiser Danio, Danone va s'essayer à de nouveaux circuits de distribution. Outre les grandes surfaces classiques, il entend s'implanter également dans les stations-services, les cinémas et les salles de sport, pour mieux cibler la clientèle des "25 à 40 ans", à qui se destine en priorité cette offre d'encas.

Le groupe reste prudent en matière d'ambition commerciale. Olivier Delamea ne parle que "d'un objectif pour Danone de 10 à 13 % à terme", sur le marché du snacking.

Lancé aux Etats-Unis en 2007, à l'initiative d'un immigré d'origine turque, Hamdi Ulukaya et sa marque Chobani, le segment des yaourts hyperprotéinés connaît un succès sans précédent. La catégorie pèse aujourd'hui plus de 40 % d'un marché américain du yaourt estimé à 7,3 milliards de dollars en 2012, selon l'institut Packages Facts. Depuis, la catégorie a essaimé en Grande-Bretagne fin de 2012, avec le lancement des yaourts Chobani puis Danio. En France, seule la PME Michel et Augustin a lancé au début de l'année 2013 un yaourt hyperprotéiné, mais de manière plus confidentielle.

Adrien Cahuzac

Source : **CAHUZAC ADRIEN, PRODUITS ALIMENTAIRES DANONE**, 2013, Disponible sur : www.usinenouvelle.com , consulté le 10 / 04 / 2017

Fiche documentaire 2 : Principales méthodes de dosage des protéines mises en œuvre au laboratoire d'enseignement

Les protéines peuvent être dosées :

- Indirectement par **détermination de la concentration massique en azote (méthode de Kjeldahl)** et utilisation d'un coefficient de conversion tenant compte de la teneur en azote des acides aminés constitutifs des protéines de l'échantillon. Cette méthode est la **méthode officielle de référence**.
- Directement par spectrophotométrie et/ou autres méthodes.

Les méthodes spectrophotométriques reposent sur la formation d'un complexe coloré entre le réactif utilisé et les protéines. Quelques exemples sont présentés ci-dessous.

- La méthode du **biuret** repose sur la formation d'un complexe coloré violet entre les liaisons peptidiques et les ions cuivre II (Cu^{2+}), en milieu alcalin, du réactif de Gornall. Cette méthode est peu spécifique et présente une limite de quantification inférieure comprise entre 1 et 20 mg. La mesure de l'absorbance s'effectue à 540 nm.
- La méthode de **Lowry** repose sur la formation d'un complexe coloré bleu entre les protéines et le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique). La réaction colorée est précédée d'une action de sels de cuivre, en milieu basique, sur la liaison peptidique. Cette méthode est peu spécifique et présente une limite de quantification inférieure comprise entre 5 et 10 μg . La mesure de l'absorbance s'effectue de 600 à 750 nm. Elle ne suit pas rigoureusement la relation de Beer-Lambert, la linéarité de la réponse n'est obtenue que pour des concentrations inférieures à 10 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.
- La méthode de **Bradford** repose sur la formation, en milieu acide, d'un complexe coloré bleu avec le bleu de Coomassie. Cette méthode est relativement spécifique et présente une limite de quantification inférieure comprise entre 2 et 5 μg . La mesure de l'absorbance s'effectue à 595 nm.

Autres méthodes applicables au dosage des protéines :

- Méthode de **Christian-Warburg** : La plupart des protéines renfermant de la tyrosine (λ_{max} voisin de 280 nm), la mesure de l'absorption à 280 nm constitue une méthode extrêmement rapide pour estimer la concentration protéique d'une solution. Cette technique présente l'avantage de ne pas détruire les protéines, elle est notamment utilisée pour repérer ou doser les protéines en sortie de colonne lors d'un fractionnement par chromatographie.
- Méthode opacimétrique : Cette méthode repose sur la mesure de la lumière transmise à travers une solution protéique.
- Méthodes immunologiques : immunodiffusion, immunoprécipitation et immunoenzymologie.

Fiche documentaire 3 : Détermination de la teneur en protéines par mesure de l'azote total par la méthode de Kjeldahl

Cette méthode comprend trois étapes essentielles :

- minéralisation des matières organiques,
- distillation de l'ammoniac formé,
- dosage de l'ammoniac distillé.

1. Principe

L'azote à doser est transformé en sulfate d'ammonium par minéralisation en milieu acide et oxydant (acide sulfurique concentré), à chaud, en présence de catalyseur.

Le minéralisat est alcalinisé pour déplacer l'ammoniac (NH_3) que l'on distille.

A la sortie de l'appareil à distiller, l'ammoniac est piégé dans une solution d'acide borique en excès.

Le sel formé (dihydrogénoborate d'ammonium) est décomposé par un acide fort, en présence d'un indicateur coloré tel le réactif de Groak. Ce dernier associe une solution d'acide borique au réactif de Tashiro qui est un indicateur de pH, violet en milieu acide et vert en milieu basique.

2. Equations

2.1. Minéralisation



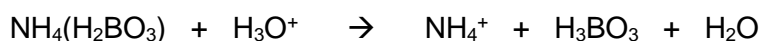
2.2. Déplacement de l'ammoniac



2.3. Fixation de l'ammoniac par l'acide borique



2.4. Dosage de l'ammoniac par un acide fort



Fiche documentaire 4 : Recherche et dénombrement de coliformes dans les produits laitiers

Parmi les analyses microbiologiques effectuées sur les produits laitiers tels que les yaourts, on retrouve la recherche et le dénombrement des coliformes. En cas de recherche positive, la nature de ces derniers (coliforme totaux, coliformes thermotolérants ou *E. coli*) signe l'origine possible de la contamination et son niveau de gravité.

Dénombrement de micro-organismes en milieu solide

1. Nombre de boîtes de Pétri par dilution

Pour les méthodes de dénombrement en microbiologie des aliments, une boîte par dilution doit être utilisée, pour les laboratoires qui fonctionnent sous assurance qualité selon les principes de l'ISO 17025. Si une seule dilution est réalisée ou si un laboratoire ne fonctionne pas sous assurance qualité, alors deux boîtes par dilution doivent être utilisées selon l'ISO 8199.

2. Calcul et expression des résultats

Le calcul du nombre d'UFC par mL ou par g de produit, consiste à faire la moyenne pondérée du nombre de colonies obtenues sur deux dilutions successives dont l'une, au moins, présente un minimum de 10 colonies. Ce calcul est valable dans le cas où le rapport du nombre de colonies entre les deux dilutions est cohérent avec le facteur de dilution.

Le dénombrement des colonies est réalisé sur des boîtes présentant :

- moins de 300 UFC pour un milieu non sélectif,
- moins de 150 UFC pour un milieu sélectif.

Il convient de retenir deux boîtesensemencées à l'aide de dilutions successives dont l'une des deux présente au moins 10 UFC.

Equation aux grandeurs :

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot d \cdot 1,1}$$

Avec :

N = concentration en UFC par mL

$\sum C$ = somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues

V = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte en mL

d = dilution correspondant à la première boîte retenue (inoculum le moins dilué).

Exprimer le résultat en écriture scientifique, avec deux chiffres significatifs.



Rapporter le résultat comme la concentration en micro-organismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).

Source : d'après **AFNOR, NORME NF EN ISO 7218**, Octobre 2007
Disponible sur sagaweb.afnor.org, consulté le 10 / 04 / 2017

Protocole 1 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de Folin-Lowry

1. Matériels spécifiques, réactifs et gestion des déchets

- Suspension de Danio ® , **notée P** préparée comme suit : pesée exacte de 1,50 g de Danio ® introduite dans une fiole jaugée de 500 mL complétée avec de l'eau physiologique
- Solution étalon de sérum albumine bovine à 5,00 g.L⁻¹, **notée Etalon SAB**
- Etalon de contrôle de protéines à 0,300 g.L⁻¹, **notée EC**
- Eau physiologique

- Solution de Lowry (contenant une solution alcaline de sulfate de cuivre)	 SGH09	Attention	H410	P273
- Réactif de Folin dilué au 1/2	 SGH05	Danger	H314	P280, P305 +P351 + P338, P310

- Les réactifs non contaminés seront récupérés dans les récipients d'origine, pour une utilisation ultérieure.
- Les effluents du dosage seront récupérés dans un bidon approprié, étiqueté en blanc « déchets divers ».

2. Pratique opératoire

Préparation de la solution étalon

A partir d'une solution de SAB à 5,00 g.L⁻¹ de protéine, préparer une solution étalon de SAB à 0,25 g.L⁻¹ de protéine.

Réalisation de la gamme d'étalonnage

	Témoin réactif	1	2	3	4	5
Volume de solution de SAB à 0,25 g.L ⁻¹ de protéine (mL)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Volume d'eau physiologique (mL)	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,0
Volume de solution de Lowry (mL)	5,0					
Mélanger le contenu des tubes Laisser au repos pendant 10 min						
Volume de réactif de Folin dilué au 1/2 (mL)	0,5					
Attendre 30 min Lire l'absorbance à 650 nm						

Réalisation de l'ensemble des tubes dans les mêmes conditions

- Etalon de contrôle
- Suspension de Danio ® , **notée P** : réaliser le dosage sur une prise d'essai de 0,5 mL.

Réaliser, si besoin, un témoin échantillon permettant d'éliminer la possible opalescence de la suspension de Danio ® .





Données : Intervalle d'acceptabilité pour l'étalon de contrôle : [0,280 ; 0,320] g.L⁻¹

$s_r = 0,25$ g pour 100 g de Danio ®
 $u_c = 0,40$ g pour 100 g de Danio ®

Protocole 2 : Détermination de la teneur en protéines par mesure de l'azote total par la méthode de Kjeldahl

1. Matériels spécifiques, réactifs et gestion des déchets

- Distillateur semi-automatique Gerhardt – Vapodest (Protocole d'utilisation fourni dans le dossier numérique et à disposition à côté de l'appareil)
- Matras de minéralisation
- Fiole d'Erlenmeyer de 250 mL

- Hydroxyde de sodium, solution concentrée exempte de carbonates, d = 1,33	 SGH05	Danger	H290-H314	P280-P305 + P351 + P338-P310
- Solution d'acide chlorhydrique à 0,100 mol.L ⁻¹	 SGH05	Attention	H290	
- Réactif de Groak	 SGH02	Danger	H225	P210
- Minéralisat de Danio ® , noté M	 SGH05	Danger	H314	P280-P305 + P351 + P338-P310

- Les réactifs non contaminés seront récupérés dans les récipients d'origine, pour une utilisation ultérieure.
- Les effluents du dosage seront neutralisés avant élimination à l'évier.

2. Pratique opératoire

2.1. Minéralisation

La minéralisation a déjà été réalisée en plaçant dans le matras de minéralisation :

- Danio ® 0,600 g
- catalyseur 3 g environ
- H₂SO₄ concentré 10 mL

Le **minéralisat M** est présenté dans le matras de minéralisation.

2.2. Entraînement de l'ammoniac à la vapeur d'eau (→ Avec l'aide d'un examinateur)

- Placer le matras de minéralisation dans l'appareil semi-automatique de distillation
- Placer une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL contenant environ 40 mL de réactif de Groak pour recevoir le distillat. Ajouter éventuellement de l'eau distillée pour que l'allonge trempe dans le liquide.
- Programmer un ajout de : 40 mL d'eau distillée
50 mL d'hydroxyde de sodium concentré
- Programmer un temps de distillation de 4 minutes

2.3. Dosage direct de l'ammoniac

Doser l'ammoniac distillé et fixé par le réactif de Groak par la solution d'acide chlorhydrique.

Données :

- L'azote représente environ 16 % en masse des protéines du Danio ® . On négligera l'azote non protéique
- Masse molaire atomique de l'azote = 14 g.mol⁻¹
- u_c = 0,20 g d'azote pour 100 g de Danio ®

Protocole 3 : Recherche et dénombrement de coliformes par ensemencement dans la masse en double couche

1. Matériels spécifiques, réactifs

- Pipettes graduées de 1 mL
- Vortex
- 3 boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre

- 10 mL de suspension de Danio®, **notée D**. Cette suspension a été préparée comme suit :
 - Introduire 10 g de Danio® dans un flacon contenant 90 mL d'eau peptonée
 - Homogénéiser à l'aide de billes de verre stériles préalablement introduites dans le flacon
- 3 tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile
- 3 tubes de 12 mL de gélose DCL (fiche technique fournie dans le dossier numérique) en surfusion à 55 °C
- 3 tubes de 5 mL de gélose DCL en surfusion à 55 °C

2. Recherche et dénombrement des coliformes en milieu solide (Normes NF ISO 5541-2)

- Réaliser les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} de la suspension de Danio®, **notée D**, à l'aide des tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile.
- Pour chacune des dilutions, répartir 1 mL de suspension diluée au fond d'une boîte de Petri stérile.
- Verser 12 mL de gélose DCL en surfusion à 55 °C.
- Homogénéiser délicatement.
- Laisser solidifier.
- Verser 5 mL de gélose DCL en surfusion à 55 °C.
- Laisser solidifier.
- Incuber selon les recommandations de la fiche technique DCL fournie dans le dossier numérique.

Donnée :

Critère de qualité : le Danio® ne doit pas présenter plus de 10 coliformes par gramme

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

Protocole 4 : Orientation en vue de l'identification d'un contaminant par l'étude des caractères morphologiques et enzymatiques

Les analyses microbiologiques quantitatives peuvent être complétées par l'identification des contaminants. Seules les premières étapes de la démarche seront réalisées : la coloration de Gram et le test enzymatique. Elles permettront d'orienter l'identification du contaminant (Démarche dichotomique d'orientation en vue de l'identification d'une bactérie).

1. Matériel et réactifs

Isolement sur gélose EMB (fiche technique fournie dans le dossier numérique) à partir du Danio ®, noté EMB.

2. Description d'une colonie suspecte

- Repérer une colonie suspecte.
- Proposer une orientation.

3. Confirmation de l'orientation

- A partir d'une colonie suspecte, réaliser une coloration de Gram (fiche technique fournie par le centre).
- Réaliser le test enzymatique permettant d'orienter l'identification (fiche technique « Tests enzymatiques » fournie par le centre).





Protocole 5 : Dosage du gluten par technique ELISA

Le dosage de l'allergène est réalisé par technique ELISA grâce à un anticorps monoclonal dirigé contre les gliadines, protéines constitutives du gluten.

1. Matériels spécifiques, réactifs et gestion des déchets

- Barrette sensibilisée avec 100 µL d'anticorps monoclonal dirigé contre les gliadines, **notée T**
- Barrette pour réaliser les dilutions, **notée D**
- Cadre de barrette
- Parafilm
- Ravier pour lavages
- Agitateur de microplaques
- Lecteur de microplaques (**fiche technique fournie par le centre**)

- Tampon PBS + Tween à 0,1 % en pissette, **noté PBS Tween**
- Tampon PBS : 2 mL, **noté PBS**
- Solution étalon de gliadines à 0,200 µg.mL⁻¹ : 300 µL, **notée GLD**
- Anticorps anti-gliadines couplé à une peroxydase, dilué en PBS : 1 mL, **noté Conjugué**

<ul style="list-style-type: none"> - O-phénylène diamine en tampon citrate et en présence d'H₂O₂, préparé extemporanément: 2 mL, noté Substrat, à demander à l'examinateur 	 SGH06  SGH08  SGH09		H301- H312 + H332- H317- H319- H341- H351- H371- H410	P260-P273-P280- P301 + P310-P305 + P351 + P338-P501
<ul style="list-style-type: none"> - Solution d'arrêt H₂SO₄ à 2 mol.L⁻¹ : 1 mL 	 SGH05	Danger	H314	P280-P305 + P351 + P338-P310

- Extrait protéique obtenu à partir du Danio ®, **noté EX** : 200 µL
 L'extrait protéique, EX a été obtenu de la façon suivante :
 - pesée de 1,00 g de Danio ®,
 - ajout de 10 mL de solution aqueuse d'éthanol à 40 % (v/v),
 - agitation 4 fois 30 secondes au vortex puis centrifugation 10 minutes à 3 000 g,
 - prélèvement du surnageant,
 - dilution du surnageant au 1/50.

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

2. Pratique opératoire

2.1. Préparation de la gamme d'étalonnage

A partir de la solution étalon de gliadines, préparer une gamme de dilution géométrique de raison $\frac{1}{2}$, allant de 1/1 à 1/64 en tampon PBS :

- Introduire 200 μL de solution étalon de gliadines dans la cupule A1 de la barrette D.
- Introduire 100 μL de tampon PBS dans les cupules A2 à A7 de la barrette D.
- Transférer 100 μL du contenu de la cupule A1 à la cupule A2 de la barrette D.
- Homogénéiser par aspiration – refoulement.
- Transférer 100 μL du contenu de la cupule A2 à la cupule A3 de la barrette D.
- Homogénéiser par aspiration – refoulement.
- Reproduire les deux dernières étapes jusqu'à la cupule A7 de la barrette D.

2.2. Dosage des gliadines

- Rejeter le contenu des cupules sensibilisées et égoutter les puits sur papier absorbant.
- Laver 3 fois avec 200 μL de tampon PBS –Tween.
- Déposer 50 μL de chacune des cupules de la gamme de dilution préparée pour l'étalonnage dans les puits A1 à A7.
- Déposer 50 μL de tampon PBS dans les puits B1 et B2.
- Déposer 50 μL de l'extrait protéique EX à doser en double exemplaire, dans les puits B3 à B4.
- Incuber 20 minutes à température ambiante sous agitation.
- Rejeter le contenu des cupules et laver 3 fois avec 200 μL de tampon PBS –Tween.
- Déposer 50 μL de conjugué dans chacune des cupules A1 à A7 et B1, B3 et B4.
- Déposer 50 μL de tampon PBS dans B2.
- Incuber 20 minutes à température ambiante sous agitation.
- Rejeter le contenu des cupules et laver 3 fois avec 200 μL de tampon PBS –Tween.
- Déposer 50 μL de substrat dans les cupules A1 à A7 et B1 à B4 et laisser agir 1 min 30 (jusqu'à apparition d'une coloration).
- Ajouter 20 μL de solution d'arrêt H_2SO_4 dans chacune des cupules.
- Lire rapidement les absorbances au lecteur de microplaques à 490 nm (le blanc est réalisé sur l'air).

Données :

- Ecart type de répétabilité (s_r) de la technique ELISA : 0,025 unité d'absorbance
- La concentration massique de gluten dans l'échantillon correspond à 2 fois la concentration massique de gliadines déterminée.
- Un aliment est considéré « sans gluten » pour une proportion de gluten inférieure à 20 μg de gluten par gramme d'aliment.

Aide mémoire de métrologie

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

Vérification de la bonne exécution de la procédure

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

On effectue, dans la même série de mesurages :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 valeurs mesurées y_1 et y_2 s_r est l'écart-type de répétabilité

2 valeurs mesurées

$|y_1 - y_2| \leq 2,8 s_r$

oui

non

2 valeurs mesurées

non compatibles entre elles

Recommencer la manipulation

compatibles entre elles

Valeur retenue = $\frac{y_1 + y_2}{2}$

Guide pour l'expression du résultat de mesure

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

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

- si le premier chiffre significatif est 1, 2 ou 3 : garder deux chiffres significatifs ;
- si le premier chiffre significatif est 4 ou plus : garder un chiffre significatif.

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

Expression du résultat de mesure :

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