

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

Option : ANABIOTEC

Durée : 180 minutes

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

Le sujet comporte **14** pages

L'annexe A est à rendre avec la copie après avoir été numérotée

SUJET

Le piment dans tous ses états

Le piment (*Capsicum annuum*) est une plante cultivée pour ses fruits riches en capsaïcine, un composé chimique produisant une sensation de chaleur plus ou moins intense en bouche. Cette molécule est d'une grande importance dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, elle est utilisée non seulement pour son goût piquant, mais aussi pour ses propriétés médicinales, notamment pour ses effets analgésiques, anti-inflammatoires et antiseptiques. La capsaïcine est également employée dans les produits cosmétiques, comme des crèmes de soins.

Un fournisseur industriel spécialisé dans la production de cultures et d'extraits végétaux à haute valeur ajoutée, comme des herbes aromatiques et des plantes médicinales, a décidé de se diversifier en cultivant le piment afin d'en extraire la capsaïcine. La demande pour cette molécule de la part des différentes industries citées précédemment est en effet croissante.

L'industriel a retenu le piment *Capsicum chinense* originaire d'Amérique du Sud. Deux variétés ont été choisies : le habanero et le bhut jolokia (variété hybride) qui sont connues pour leur teneur élevée en capsaïcine.

Afin de valider le choix de la variété à produire, cet industriel a commandé auprès de votre laboratoire de recherche agronomique plusieurs études sur ce produit.

Vous êtes technicien au sein de ce laboratoire et vous devez mettre en place :

- la production en culture in vitro (CIV) de ces deux variétés de piment ;
- l'extraction et le dosage de la capsaïcine ;
- la détermination de l'effet bactériostatique de la capsaïcine.

1- Production de plants de piments avec des concentrations en capsaïcine élevées (4 points)

Afin de produire des plants de piments, des essais de culture in vitro (CIV) vont être mis en place pour les deux variétés.

La culture in vitro de piment, permettant d'obtenir des cellules ou des tissus végétaux à des fins de recherche et de production, s'avère être une technique d'avenir pour la production de composés d'intérêt, comme la capsaïcine. En effet, cette méthode permet de cultiver des tissus de piment dans un milieu contrôlé, pour optimiser la production de métabolites secondaires telle que la capsaïcine, tout en évitant les contraintes liées aux conditions de culture en plein champ. C'est aussi une technique délicate qui nécessite des précautions spécifiques pour garantir les chances de réussite. Le **document 1** présente les règles de base pour la CIV ainsi qu'un protocole spécifique aux piments en vue de la production de capsaïcine.

1.1- Proposer, à partir du **document 1**, un schéma des différentes étapes depuis la préparation des explants jusqu'à l'analyse de la capsaïcine. Ce schéma pourra prendre la forme d'un diagramme.

Le laboratoire de culture végétale est composé de différentes salles et zones :

- Zone de réception et salle de stockage.
- Salle de stérilisation.
- Salle de préparation des milieux de culture.
- Zone de manipulation stérile.
- Salle de culture.

L'**annexe A** présente le plan du laboratoire de culture in vitro.

Vous devez préparer l'organisation spatiale et temporelle de votre laboratoire pour permettre la réalisation de l'ensemble de ces étapes. Vous devez également proposer de positionner les emplacements pour l'autoclave, la hotte à flux laminaire, les armoires pour la CIV.

1.2- Compléter l'**annexe A** (à rendre avec la copie après avoir été numérotée) en positionnant les différentes salles, zones, matériels, équipements ainsi que les différents flux.

Vous procédez aux premières étapes de la culture in vitro :

- collecte et préparation des explants ;
- inoculation des explants sur le premier milieu de culture (type Murashige et Skoog).

1.3- Décrire les précautions nécessaires à la réussite de la première étape (collecte et préparation des explants).

2- Dosage de la capsaïcine par HPLC sur les deux variétés de piment (6 points)

Après avoir développé la culture des plants de piments, vous cherchez à connaître la variété présentant le taux le plus élevé de capsaïcine.

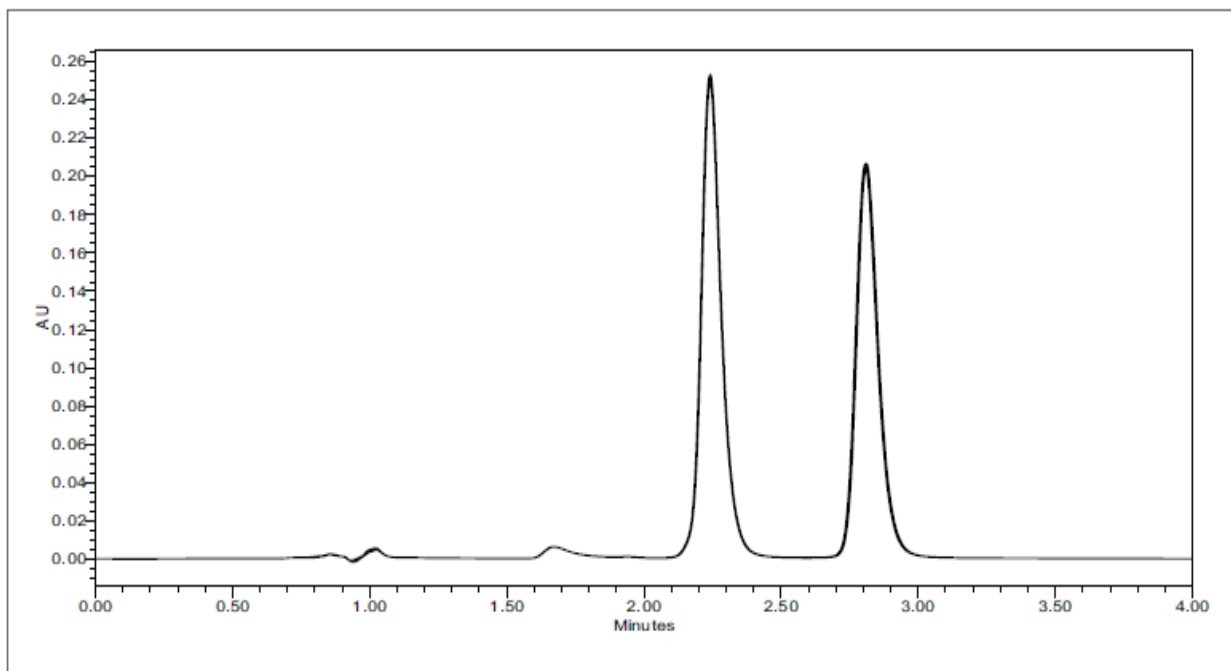
Vous avez choisi de doser cette molécule par HPLC sur le piment habanero et sur le piment bhut jolokia. Le **document 2** décrit les conditions de l'analyse.

2.1- Présenter les conditions de stockage de vos échantillons après extraction.

2.2- Décrire votre démarche pour conduire cette analyse permettant de doser la capsaïcine en identifiant les différentes étapes et en listant le matériel et les solutions nécessaires.

Vous avez injecté une quantité appropriée de chaque échantillon dans l'injecteur HPLC.

Vous obtenez le chromatogramme ci-dessous pour l'échantillon de piment habanero :



Source : https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_Analysis-of-Capsaicin-and-Dihydrocapsaicin-in-Chili-Peppers-Using-Altus-HPLC-012226_01.pdf

2.3- Identifier le pic correspondant à la capsaïcine à l'aide du **document 3** en justifiant votre réponse.

Vous voulez identifier si l'une des variétés possède une teneur moyenne en capsaïcine significativement plus élevée.

Pour cela, vous réalisez des dosages (exprimés en $\mu\text{g/g}$ de piment) sur 25 prélèvements de piment habanero et 25 prélèvements de piment bhut jolokia.

On admet que les teneurs en capsaïcine des deux types de piment sont des variables aléatoires qui suivent des lois normales de même variance.

Deux tests statistiques différents de comparaison de moyennes ont été réalisés avec le logiciel de statistiques R au seuil de risque 5 % (**document 4**).

2.4- Déterminer si l'une des variétés possède une teneur moyenne en capsaïcine plus élevée, puis en déduire, éventuellement, la variété à produire. Vous vous appuyerez sur au moins un des deux tests proposés en justifiant votre choix.

La teneur moyenne de capsaïcine du piment de habanero est de 1 536 en $\mu\text{g/g}$ et celle du piment de bhut jolokia de 1 330 en $\mu\text{g/g}$ (exprimée en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche de piment).

2.5- À partir de l'échelle de Scoville ci-dessous, déterminer le niveau de piquant pour confirmer la variété à privilégier.

Extrait de la norme des piments forts (niveaux de piquants), (Source : CODEX STAN 307-2011)

NIVEAU DE PIQUANT	UNITÉS SUR L'ÉCHELLE DE SCOVILLE	TENEUR TOTALE EN CAPSAÏCINE (en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche)
DOUX	900 - 1999	60 - 133
MOYEN	2000 – 19 999	134 – 1333
PIQUANT	20 000 – 100 000	1334 – 6600
TRÈS PIQUANT	> 100 000	> 6600

3- Détermination de l'effet bactériostatique de la capsaïcine (10 points)

Afin de valoriser son extrait, l'industriel a également commandité une étude sur la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de la capsaïcine.

3.1- Justifier la nécessité de déterminer l'effet bactériostatique dans cette étude.

La capsaïcine est préalablement extraite des piments à l'aide de solvants appropriés.

Pour déterminer l'effet bactériostatique de la capsaïcine, on utilise habituellement des souches bactériennes et fongiques spécifiques, comme par exemple *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ou des levures comme *Candida albicans*. Les méthodes de détermination de la CMI peuvent s'appuyer sur des méthodes en milieu liquide ou en milieu solide.

Des dilutions en série de la capsaïcine sont préparées pour déterminer la concentration à laquelle la croissance des microorganismes est inhibée.

Les résultats sont analysés en observant l'absence de croissance microbienne.

Vous envisagez de mettre en œuvre la technique de détermination en milieu solide présentée dans le **document 5**.

3.2- Indiquer les avantages et inconvénients de cette méthode en milieu solide.

3.3- À partir du protocole fourni, réaliser un plan de contrôle sur le mode opératoire en effectuant une analyse des dangers pour chaque étape à l'aide de la méthode des 5M.

3.4- Déterminer la quantité de milieu liquide et solide de Mueller-Hinton nécessaire dans le protocole pour les trois germes précités.

3.5- Proposer une méthode alternative.

3.6- Indiquer les mesures préventives à appliquer afin de limiter les risques biologiques possibles liés à la mise en œuvre du protocole de détermination de la CMI.

3.7- Classer les déchets générés à l'issue de cette manipulation en fonction de leur traitement.

Vous obtenez les résultats suivants pour les différents germes testés :

Légende : + = culture - = absence de culture

Boite	Concentration en capsaïcine en µg/g	Culture <i>E coli</i>	Culture <i>Staph aureus</i>	Culture <i>Candida albicans</i>
T1	1536	-	-	-
T2	768	-	-	-
T3	384	-	-	-
T4	192	-	-	-
T5	96	-	-	-
T6	48	-	+	-
T7	24	-	+	-
T8	12	+	+	+
T9	6	+	+	+
T10	3	+	+	+
Témoin	0	+	+	+

3.8- Proposer à l'industriel une concentration d'usage de capsaïcine qui permet de valoriser ses propriétés.

Liste des documents

DOCUMENT 1 : La Culture In Vitro

DOCUMENT 2 : Conditions de l'analyse sur l'appareil HPLC

DOCUMENT 3 : Tableau des valeurs de capsaïcinoïdes dans un piment

DOCUMENT 4 : Document de statistiques

DOCUMENT 5 : Détermination de la CMI en milieu solide

DOCUMENT 1 : La Culture In Vitro

Sources : <https://blog.vegenov.com/2020/03/culture-in-vitro-retour-aux-bases>,
<https://hal.inrae.fr/hal-02728368/document>

Culture In Vitro, retour aux bases

La culture in vitro est une technique importante en production végétale, notamment pour les espèces à multiplication végétative. Elle permet la production en quantité de jeunes plants et garantit la circulation de matériel végétal sain.

Qu'est-ce que la Culture In Vitro ?

Son principe repose sur la totipotence cellulaire végétale, une caractéristique propre aux végétaux. Certaines cellules végétales différenciées peuvent revenir à un stade indifférencié. Elles ont alors les mêmes qualités que les cellules embryonnaires et peuvent régénérer, dans les conditions adéquates, une nouvelle plante identique à la plante mère.

La technique de Culture In Vitro consiste donc à placer en conditions artificielles et contrôlées des organes de plantes, parfois très petits, afin de reproduire plus vite ou en plus grande quantité des plantes mères.

Une fois enracinés, les plants peuvent être acclimatés en serre. Cela consiste à les sortir de la culture in vitro, les placer dans du terreau horticole et les adapter progressivement aux conditions de culture normales, plus sèches et avec une intensité lumineuse plus importante qu'en laboratoire.

La phase d'acclimatation des jeunes plants prend quelques jours à quelques semaines.

Protocole de culture in vitro du piment pour la production de capsaïcine.

1. Collecte et préparation des explants :

- Utiliser des graines de piment ou des segments de tissus comme explants.
- Laver les explants avec de l'eau stérile contenant quelques gouttes de détergent doux.
- Désinfecter les explants en les immergeant dans une solution d'hypochlorite de sodium (1-2 %) pendant 10-15 minutes, suivie de plusieurs rinçages avec de l'eau distillée stérile.

DOCUMENT 1 (suite et fin)

2. Préparation du milieu de culture :

- Utiliser un milieu de culture standard comme MS (Murashige et Skoog) enrichi en :
 - Saccharose (3 %).
 - Régulateurs de croissance :
 - Cytokinines pour favoriser la multiplication cellulaire.
 - Auxines pour la différenciation et l'organogenèse.
- Ajuster le pH du milieu à 5,8 avant l'autoclavage (121 °C, 15 minutes).

3. Culture in vitro :

Cette étape dure 1 à 2 semaines :

- Inoculer les explants sur le milieu préparé dans des boîtes de Pétri ou des tubes de culture.
- Incuber à une température de 25 ± 2 °C, avec une photopériode de 16 heures de lumière artificielle.

4. Induction de la production de capsaïcine :

- Une fois les cultures bien établies, les transférer dans un milieu spécifique sous éclairage conçu pour favoriser la production de capsaïcine. Cela peut inclure :
 - Ajout de précurseurs comme l'acide vanillique ou l'acide férulique (0,1 à 0,5 mM).
 - Ajout d'éliciteurs (= phytostimulant) tels que : Méthyljasmonate (10-50 µM), Acide salicylique (10-50 µM), Chitosane (0,1%)

Cette étape dure 2 à 4 semaines.

5. Extraction de la capsaïcine :

Récolter le piment.

Le broyer avec de l'éthanol (solvant d'extraction).

Filtrer et décanner la solution obtenue.

6. Analyse de la capsaïcine :

- Analyser la quantité de capsaïcine produite en utilisant des méthodes analytiques comme :
 - HPLC (détecteur UV à 280 nm).
 - Spectrométrie de masse si une quantification précise est requise.

DOCUMENT 2 : Conditions de l'analyse sur l'appareil HPLC

Source : <https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APPAnalysis-of-Capsaicin-and-Dihydrocapsaicin-in-Chili-Peppers-Using-Altus-HPLC-01222601.pdf>

1. Préparation de l'échantillon :

Extraction de la capsaïcine : Méthode par infusion en utilisant comme solvant l'éthanol. Elle est suivie d'une filtration et d'une décantation.

2. Préparation des standards :

- Dissoudre la capsaïcine standard (purifiée) dans un solvant comme l'acétonitrile pour obtenir une solution mère avec une concentration connue.
- Préparer plusieurs solutions diluées pour tracer une courbe d'étalonnage couvrant la gamme de concentrations de 1 à 100 ppm.

3. Conditions chromatographiques HPLC :

- Colonne : Utiliser une colonne C18 de 150 mm x 4,6 mm, 5 µm.
- Phase mobile : mode isocratique : Phase A : Eau (35 %), Phase B : Méthanol (65 %).
- Débit : 1 mL/min.
- Boucle d'échantillonnage : 10 µL.
- Température de la colonne : 25°C.
- Détection : Utiliser un détecteur UV à 280 nm pour la capsaïcine.

4. Injection de l'échantillon et des standards :

- Injecter une quantité appropriée de l'échantillon dans l'injecteur HPLC, au préalable filtré via des filtres à 0,45 µm. Enregistrer les chromatogrammes obtenus et intégrer les pics.

5. Quantification et calculs :

- Détermination de la droite d'étalonnage.
- Concentration (en mg/g) : concentration de capsaïcine dans l'échantillon à partir de l'intégration du pic et des résultats de la courbe d'étalonnage.

Précautions à prendre :

- Préparer les échantillons et standards dans des conditions propres pour éviter toute contamination. Vérifier régulièrement l'état de la colonne et du système HPLC pour assurer une performance optimale.
- La capsaïcine peut se dégrader si elle est exposée à la lumière ou à des températures élevées, donc manipuler et stocker les échantillons avec précaution.

DOCUMENT 3 : Tableau des valeurs de capsaïcinoïdes dans un piment

Source : d'après wikipédia (https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89chelle_de_Scoville)
Document élaboré pour les besoins de l'épreuve

Capsaïcinoïdes	Concentration typique
Capsaïcine (8-méthyl-N-vanillyl-6-nonénamide)	69.00 %
Dihydrocapsaïcine (8-Méthyl-N-vanillylnonamide)	22.00 %
Nordihydrocapsaïcine (7-Méthyl-N-vanillyloctamide)	7.00 %
Homodihydrocapsaïcine (9-Méthyl-N-vanillyldécamide)	1 %

DOCUMENT 4 : Document de statistiques

Source : logiciel R (adapté pour les besoins de l'épreuve)

Test de comparaison de deux moyennes pour des échantillons appariés :

Paired t-test

data: habanero and bhut jolokia

$t = 3.9467$, $df = 24$, $p\text{-value} = 0.0003014$

alternative hypothesis: true mean difference is greater than 0

95 percent confidence interval:

59.1261 Inf

sample estimates:

mean difference

204.371

Test de comparaison de deux moyennes pour des échantillons indépendants :

Welch Two Sample t-test

data: habanero and bhutjolokia

$t = 3.3729$, $df = 48$, $p\text{-value} = 0.0007396$

alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0

95 percent confidence interval:

52.47033 Inf

sample estimates:

mean of habanero mean of bhutjolokia

1526.439

1322.068

DOCUMENT 5 : Détermination de la CMI en milieu solide

Source : Extraits de la norme ISO 20776-1:2019

Exemple d'application pour Staphylococcus aureus (le même protocole est réalisé pour E. coli et Candida albicans)

Définition : La CMI (concentration minimale inhibitrice) est la plus faible concentration en substance inhibant la croissance visible d'une souche donnée.

1- Réalisation d'une gamme de dilution de la capsaïcine

On réalise une gamme de capsaïcine (X) de concentrations décroissantes par dilutions successives de raison 1/2 à partir d'une solution mère de capsaïcine

Introduire 1 mL de diluant (Mueller Hinton : MH) dans chaque tube T₂ à T₁₀

Introduire 1 mL de solution mère de capsaïcine (SM) dans les tubes T₁ et T₂.

Réaliser une série de dilutions en cascade au ½ : distribuer 1mL de T₂ dans T₃ puis 1mL de T₃ dans T₄

Rejeter 1 mL du dernier tube de la série. On a ainsi préparé une série avec le même volume du milieu de culture liquide.

2- Transfert de chaque dilution dans une boîte de Petri vide

Transférer en boîte de Petri (90 mm) 1mL de chaque dilution (solution fille) de capsaïcine dans les boîtes (T₁ à T₁₀) et 1 mL de diluant (bouillon MH) dans la boîte témoin.

3- Addition du milieu gélosé

Verser 9 mL de gélose Mueller Hinton en surfusion dans chaque boîte, homogénéiser, laisser solidifier. Chaque boîte présente un volume final de 10mL. On a donc réalisé une dilution 1/10ème supplémentaire de chaque dilution de l'agent antimicrobien.

4- Préparation de l'inoculum bactérien en bouillon Mueller Hinton

Utiliser une souche pure isolée de *Staphylococcus aureus* sur un milieu non sélectif, incubée 18 à 24h à 37°C.

Réaliser une suspension bactérienne en bouillon Mueller Hinton d'un trouble équivalent 0.5 Mac Farland (10⁸ UFC.mL⁻¹)

DOCUMENT 5 (suite et fin)

Transférer 20 µl de suspension bactérienne dans 20 ml de bouillon Mueller Hinton. On obtient ainsi une suspension bactérienne en Mueller Hinton de 10^6 UFC.mL⁻¹

5- Ensemencement des géloses contenant la capsaïcine

Déposer un spot de 5 µL de l'inoculum bactérien dilué au centre de chaque boîte.

6- Incubation des boîtes 18 à 24h à 37°C.

7- Lecture

Après incubation, on examine les boîtes de Petri à l'œil nu. On recherche la présence de colonies au niveau des spots pour toutes les boîtes de la gamme par comparaison avec une boîte témoin qui n'a pas été ensemencée.

(+ : culture ; - : absence de culture).

La CMI correspond à la dernière boîte sans croissance visible présentant la plus forte dilution (ou la plus faible concentration) de l'agent antimicrobien.

NOM :

EXAMEN :

(EN MAJUSCULES)

Spécialité ou Option :

Prénoms :

EPREUVE :

Date de naissance :

Centre d'épreuve :

Date :

N° ne rien inscrire

ANNEXE A (à compléter, numéroté et à rendre avec la copie)

N° ne rien inscrire

