

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE**1ère partie : Etude d'opérations techniques****ANALYSES DE LABORATOIRE : FILIERE BETTERAVE**

Nous nous proposons d'aborder autour du thème de la betterave quelques aspects des apports du laboratoire dans :

- * l'étude des maladies virales de la betterave,
- * le dosage des produits élaborés par la betterave,
- * la valorisation des mélasses et leur contrôle microbiologique.

1. - ETUDE D'UNE MALADIE VIRALE DE LA BETTERAVE (23 points)

La qualité des betteraves peut baisser lorsqu'elles sont parasitées par certains virus dont le virus de la Rhizomanie de la betterave (BNYVV : Beet Necrotic Yellow Vein Virus).

Les laboratoires "Sanofi Phyto-Diagnostics" ont élaboré un protocole de mise en évidence du virus BNYVV.

Le contenu de la trousse de diagnostic ainsi que le protocole proposé sont donnés dans les documents 1a, 1b, 1c.

- 1.1. Schématiser les étapes de la manipulation indiquées sur le document 1a.
En déduire le type d'immunodosage utilisé.
- 1.2. Justifier le rôle des composants n° 1, 2, 10 de la trousse (document 1b).
- 1.3. Justifier les consignes données dans le document 1c, paragraphe "plan de plaque".
Dégager l'intérêt des deux types de témoins.
- 1.4. Pourquoi l'eau distillée seule ne convient-elle pas au lavage des plaques (document 1a) ?

- 1.5. En immuno-enzymologie le choix de l'enzyme est important.
- 1.5.1. D'après la composition de la trousse (document 1b), quel est l'enzyme marqueur ?
- 1.5.2. Citer deux autres exemples d'enzymes utilisables comme marqueurs en immuno-enzymologie.
- 1.5.3. Quelles précisions liées au choix du test enzymatique faut-il apporter au document 1c pour la lecture des plaques et l'exploitation quantitative des résultats ?
- 1.6. Dans le document 1c, on détermine le seuil de discrimination par une mesure de bruit de fond.
- Comment réalise-t-on cette mesure ?
 - Représente-t-elle "la limite de détection" ou "la sensibilité de la méthode" ? Justifier la réponse.

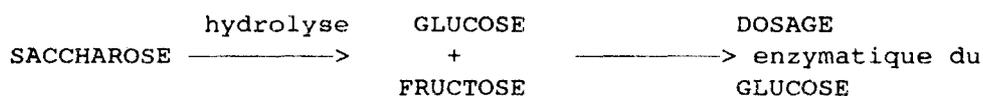
2 - LA BETTERAVE SOURCE DE GLUCIDES (35 points)

Le planteur est rétribué en partie en fonction de la teneur en sucre des betteraves. Celle-ci est traditionnellement déterminée par polarimétrie, mais ce type de dosage donne des résultats erronés si les betteraves ont subi des dégradations lors de leur stockage.

C'est pourquoi des méthodes enzymatiques sont de plus en plus utilisées.

2.1. Quelques aspects des méthodes de dosage enzymatique du saccharose.

Toutes les méthodes peuvent se résumer par le schéma suivant :



- 2.1.1. Trois méthodes enzymatiques peuvent être utilisées pour doser le glucose en agro-alimentaire :
- * méthode à la glucose-oxydase/peroxydase,
 - * méthode à l'hexokinase/glucose-6-P-déshydrogénase,
 - * méthode à la glucose-déshydrogénase.
- 2.1.1.1. Ecrire l'enchaînement des réactions intervenant dans ces dosages (aucune formule chimique développée n'est exigée).
- 2.1.1.2. Pour exprimer le résultat on peut utiliser :
- soit l'absorbance obtenue avec un étalon,
 - soit le coefficient linéique molaire d'un produit.
- Comparer ces deux procédés.
- 2.1.2. A partir du document 2, discuter l'importance de la spécificité de la méthode à la glucose-déshydrogénase dans le cas du dosage du saccharose dans les betteraves.

2.2. Méthode manuelle du dosage du glucose par la glucose-déshydrogénase : (document 3).

2.2.1. Préciser le rôle de la mutarotase dans ce dosage.

2.2.2. Donner la composition des cuves "témoin" qui permettent de lire les absorbances A(T) et A(BT).

2.2.3. Déterminer la valeur du facteur f permettant de calculer la concentration en glucose c dans l'échantillon en mmol.dm^{-3} .

Données : $c = f [A(T) - A(BT)]$

$$\xi_{\text{NADH à 340 nm}} = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$$

2.2.4. La méthode de dosage mise au point est soumise à plusieurs contrôles de qualité.

2.2.4.1. Donner la définition des critères suivants :

- exactitude,
- répétabilité.

2.2.4.2. Pour évaluer ces deux critères, une série de 40 dosages est effectuée sur le même échantillon dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus figurent ci-dessous :

| | |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Valeur de référence du contrôle | 0,92 mmol.dm^{-3} |
| Nombre de dosages | 40 |
| Valeur moyenne obtenue | 0,89 mmol.dm^{-3} |
| Ecart-type | 0,02 mmol.dm^{-3} |

Calculer :

- le degré d'inexactitude relatif de la méthode,
- le coefficient de variation de la méthode.

2.2.4.3. Préciser pour ce dosage les facteurs qui peuvent modifier l'exactitude.

2.3. Automatisation de la méthode en point final.

Le protocole précédent est adapté sur analyseur de transfert.

Au cours de la programmation, le technicien doit introduire différents paramètres.

Sachant que l'analyse comportera un échantillon contrôle ayant les caractéristiques suivantes :

- concentration cible = 1,22 mmol.dm^{-3}
- écart-type = 0,03 mmol.dm^{-3}

compléter la fiche (document 4) et la joindre à la copie.

Justifier le temps d'incubation et la température choisie.

2.4. Dosage par méthode cinétique.

Le dosage du glucose par la glucose-déshydrogénase (document 3) est adaptable en méthode cinétique non linéaire en temps fixé.

Quels sont les paramètres expérimentaux qui devraient être modifiés ? Justifier les réponses.

3 - VALORISATION D'UN SOUS-PRODUIT DE LA BETTERAVE : LA MELASSE (22 points)

La mélasse résiste bien à l'envahissement microbien, pour peu qu'elle soit stockée à l'abri de l'air. Par contre, une fois diluée, elle constitue un bon milieu de culture.

La mélasse diluée au 1/10 peut alors servir de milieu de culture pour produire de la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*).

L'opération se déroule en aérobiose.

Une fermentation pilote en continu est lancée, afin de tester l'intérêt de ce mode de valorisation.

- 3.1. Expliquer la bonne conservation de la mélasse non diluée, dont la composition partielle figure sur le document 5a.
Citer un exemple d'aliment se conservant de cette manière.
- 3.2. La régulation de cette culture continue utilise une mesure opacimétrique. Justifier le choix et préciser les limites de l'opacimétrie.
- 3.3. La teneur en biomasse sèche du milieu sortant du fermenteur est de $9,7 \text{ g.dm}^{-3}$. Le document 5b indique la composition chimique partielle de cette levure.
 - 3.3.1. Calculer le rendement brut R1 de cette fermentation. R1 est exprimé en grammes de matière organique sèche de levure formée par gramme de saccharose dans le milieu de culture (mélasse diluée au 1/10).
 - 3.3.2. Calculer le rendement azoté R2 de cette fermentation. R2 est exprimé en grammes d'azote fixé dans la biomasse par gramme d'azote dans le milieu de culture. On admettra que 6,1 g de matière organique azotée contiennent 1 g d'azote.
 - 3.3.3. A la lumière des résultats précédents, quelle hypothèse formuler pour améliorer le rendement brut de la fermentation ?

3.4. Contrôle microbiologique du moût de fermentation.

Après quelques jours de fonctionnement apparaît une baisse sensible de R1 et R2, associée à une forte augmentation de l'acidité du moût. Une contamination bactérienne est suspectée. Deux types de dénombrements bactériens sont alors entrepris :

- un dénombrement en gélose MRS additionnée d'actidione,
- un dénombrement en gélose PCA additionnée d'actidione.

La composition des deux bases gélosées figure sur le document 6.

Toutes les géloses sontensemencées par inclusion dans la masse de 1cm^3 de chacune des dilutions. Les essais sont réalisés en double. Après incubation, les résultats suivants sont obtenus :

| dilution testée | | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|--------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| nombre de colonies | géloses MRS + actidione | NC | NC | NC | 428 | 61 | 4 |
| | | NC | NC | NC | 392 | 52 | 8 |
| par boîte | géloses PCA + actidione | 33 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 28 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Donnée : NC = non comptable

- 3.4.1. Quel est le rôle de l'actidione ajoutée dans les milieux ?
- 3.4.2. Quelle est la flore dénombrée sur chacun des deux types de milieux ? Justifier.
- 3.4.3. Exprimer le résultat de chacun des dénombrements.
- 3.4.4. Quelle serait la nature du contaminant responsable de la baisse des rendements ?

Comment confirmer de façon simple son identité ?

DOCUMENT 1 A

Tests Immuno-enzymatiques pour la détection des maladies des plantes

*Détection du virus de la Rhizomanie de la Betterave
Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV)*

PROTOCOLE

1. Fixation des anticorps:

Reconstituer les anticorps en ajoutant 1 ml d'eau distillée au lyophilisat, agiter, et conserver à +4°C.

Au moment de l'emploi: pour une plaque, diluer 200 µl d'anticorps dans 21 ml de solution de fixation (tampon Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 9.6).

Déposer 200 µl de cette préparation dans chaque puits, et incuber 2 à 4 heures à +37°C, ou une nuit à +4°C.

Laver les plaques avec le tampon PBS Tween.

2. Dépôt des échantillons:

Déposer 200 µl d'extrait dans chaque puits, et incuber 2 à 3 heures à +37°C, ou une nuit à +4°C.

Laver les plaques avec le tampon PBS Tween.

3. Dépôt du conjugué:

Reconstituer les anticorps conjugués en ajoutant 1 ml d'eau distillée au lyophilisat, agiter, et conserver à +4°C.

Au moment de l'emploi: pour une plaque, diluer 200 µl d'anticorps dans 21 ml de solution de conjugué (tampon PBS Tween Albumine pH 7.4).

Déposer 200 µl de cette préparation dans chaque puits, et incuber 2 à 3 heures à +37°C.

Laver les plaques avec le tampon PBS Tween.

4. Dépôt du substrat:

Au moment de l'emploi: pour une plaque, dissoudre 2 tablettes de 4-nitrophenylphosphate SANOFI dans 21 ml de solution de substrat (tampon diéthanolamine pH 9.8).

Déposer 200 µl de cette préparation dans chaque puits et incuber 30 minutes à 2 heures à la température du laboratoire (voir la fiche de spécificité pour l'interprétation des résultats). La réaction peut être stoppée par addition de 50 µl de NaOH 1M dans chaque puits.

N.B: Les réactifs réhydratés ont une durée de vie de 1 mois environ. Pour allonger leur durée de conservation, utiliser pour leur réhydratation 1 ml d'un mélange volume/volume d'eau distillée et de glycérol, et conserver à -20°C.

Détection du virus de la Rhizomanie de la Betterave
Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV)

LA TROUSSE DE DIAGNOSTIC CONTIENT :

- 1 - Anticorps de coating
ou
Plaques précoatées
- 2 - Anticorps conjugués
- 3 - Témoins positifs lyophilisés
= extraits de plantes infectées
- 4 - Témoins négatifs lyophilisés
= extraits de plantes saines
- 5 - Solution de fixation
- 6 - Solution de conjugué
- 7 - Solution de substrat
- 8 - Solution de lavage
- 9 - Solution de broyage
ou
Composants du tampon de broyage
- 10 - Substrat 4-nitrophénylphosphate
- 11 - Plaques de microtitration

DOCUMENT 1 C

Préparation des échantillons

Le tampon de broyage est le tampon PBS-Tween-PVP Xi standard.

Les échantillons seront broyés dans le rapport 1g/4 à 5 ml de tampon.

Témoins

Le témoin positif SANOFI reconstitué peut être dilué 5 fois dans le tampon de broyage avant l'emploi.

Témoins négatifs : la détermination du bruit de fond nécessite l'utilisation de témoins sains frais, de même nature et préparés identiquement aux échantillons à tester.

De manière générale, il est conseillé :

- 1) de placer un témoin positif sur chaque plaque pour s'assurer qu'aucune erreur n'a été commise au cours du test.
- 2) de préparer plusieurs extraits sains différents, et non de répéter le dépôt d'un même extrait sur la plaque, afin d'éprouver la variabilité du bruit de fond et établir ainsi le seuil de discrimination entre échantillons sains et infectés (cf § "Interprétation"). Il est également souhaitable de ne pas grouper ces dépôts sur la plaque.

Plan de plaque : consignes.

Les puits de bordure des plaques ne seront utilisés que moyennant certaines précautions (couverture de la plaque et incubation au bain marie ou en incubateur...).

Une colonne sera employée pour faire le "blanc" (témoin tampon).

Comme il est conseillé ci-dessus, plusieurs témoins sains doivent être répartis sur la plaque : nous conseillons de placer au moins 6 témoins différents.

Enfin, il est souhaitable de répéter au moins une fois le dépôt des échantillons à tester.

Modalités de lecture et interprétation

- Faire les lectures à 30 min, 1h, 2h d'incubation du substrat. Le suivi de la cinétique de la réaction jusqu'à 4 ou 5 heures d'incubation du substrat permet dans certains cas de discriminer des échantillons faiblement positifs.

Dans les conditions d'emploi préconisées, un extrait de feuille infecté au 1/5 ainsi que le témoin positif SANOFI donnent une D.O. supérieure à 1 après 1 heure d'incubation du substrat.

Interprétation : le seuil de discrimination peut être établi de différentes façons. Nous conseillons :

- soit de le fixer à 2 fois le bruit de fond,
- soit de le calculer comme suit : seuil = $x + 3s$, où x représente le bruit de fond et s son écart-type.

DOCUMENT 2

(D'après Diagnostica MERCK)

SPECIFICITE DE LA GLUCOSE-DESHYDROGENASE ENVERS LES GLUCIDES

Activité envers le glucose = 100.

Le tableau indique les substances à activités $\geq 0,1$.
Concentrations au début du test : 160 mmol.dm^{-3} de glucide ; $1,4 \text{ mmol.dm}^{-3}$ de NAD ; $0,63 \text{ mmol.dm}^{-3}$ de tampon Tris, pH 7,6.

Mesure de la variation d'absorbance à 340 nm pendant 3 minutes.

| <u>Substrat</u> | <u>Activité</u> |
|--------------------------|-----------------|
| Désoxy-2-glucose | 120 |
| β -D-glucose | 100 |
| D-glucosamine | 31 |
| D-xylose | 15 |
| D-mannose | 8 |
| Amino-6-désoxy-6-glucose | 6 |
| Cellobiose | 1 |
| D-ribose | 0,8 |
| Lactose | 0,7 |
| Désoxy-2-ribose | 0,1 |

Les composés suivants ne réagissent pratiquement pas (0,03 à 0 % du métabolisme du glucose) : galactose, désoxy-2-galactose, fructose, talose, thioglucose, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, N-acétyl-2-glucosamine, N-méthyl-2-glucosamine, N-benzyl-2-glucosamine, arabinose, delta-lactone de l'acide glucuronique, tréhalose, saccharose. On obtient la même spécificité en utilisant le NADP comme coenzyme.

DOCUMENT 3

GLUCOSE GDH (D'après Diagnostica ROCHE)

Méthode :

Test enzymatique U.V. avec glucose déshydrogénase (GDH)

Principe :

La concentration en NADH formé est déterminée par la mesure de l'absorbance à 340 (334, 365) nm.

Coffret :

| | | | |
|--|---------------------------------------|-------------|---|
| R1 Coenzyme-enzymes pour 3 x 100 ml | GDH mutarotase NAD ⁺ | > > > | 0,45 kU 9 U 0,18 mmol par flacon |
| R2 Tampon 3 x 100 ml | NaCl phosphate | | 0,15 mmol/l 0,12 mmol/l pH 7,6 (25°C) |

Les réactifs non ouverts sont stables entre +2 et +8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur les étiquettes.

Réactifs :Solution de travail :

Dissoudre le contenu d'un flacon R1 dans le contenu d'un flacon R2 et bien mélanger.

Stabilité : 12 semaines entre +2 et +8°C.

Comme réactif supplémentaire, utiliser de la solution de NaCl 154 mmol/l (0,9 %).

Mode opératoire :

| | T | BT |
|---------------------|---------|---------|
| Echantillon | 10 µl | 10 µl |
| Solution de NaCl | - | 1000 µl |
| Solution de travail | 1000 µl | - |

Bien mélanger et incuber 10 minutes à la température ambiante.

Dans les 30 minutes qui suivent, mesurer A(T) et A(BT) par rapport à des témoins appropriés.

Données :

T = test

BT = blanc test

A = absorbance

Photomètre à filtre : Hg 334 nm ou Hg 365 nm

Spectrophotomètre : 340 nm

Cellule de mesure : 1 cm de trajet optique

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

Concours Section
ou ou Spécialité :
Examen ou Option (éventuellement)

NOM :
(en majuscules)

Prénoms :

Académie d'inscription : N° d'inscription :

Nature ou repère de l'épreuve :

Repère : DBM 5

SESSION 1995

Durée : 4 H

Page : 12/14

Coefficient : 4

DOCUMENT 4

A RENDRE AVEC LA COPIE

PROGRAMMATION DE L'ANALYSEUR AUTOMATIQUE

Longueur d'onde (nm)
Volume échantillon (μ l)
Volume réactif (μ l)
Temps d'incubation (min)
Température
(0 : ambiante ; 1 : 25°C ; 2 : 30°C ; 3 : 37°C)
Blanc échantillon (0 : oui ; 1 : non)
Contrôle (0 : oui ; 1 : non)
Concentration contrôle > à (mmol/l)
Concentration contrôle < à (mmol/l)
Etalon (0 : oui ; 1 : non)
Coefficient
Unité (0 : mmol/l ; 1 : g/l)

DOCUMENT 5

DOCUMENT 5a**COMPOSITION PARTIELLE DE LA MELASSE DE BETTERAVE A SUCRE**
(exprimée en grammes par dm³ de mélasse)

| | |
|-----------------------------|----------|
| Saccharose | 450 |
| Autres molécules organiques | 190 |
| Azote total (Kjeldahl) | 14 |
| Cendres | 100 |
| pH de la mélasse | pH 6 à 7 |

DOCUMENT 5b**COMPOSITION DE LA LEVURE DE BOULANGERIE**
(exprimée en grammes pour cent grammes de levure sèche)

| | |
|-------------------------------|----|
| Protides et acides nucléiques | 49 |
| Lipides | 3 |
| Glucides | 36 |
| Autres molécules organiques | 1 |
| Cendres | 11 |

DOCUMENT 6
(d'après "Institut Pasteur production")

GELOSE M.R.S.

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)

| | |
|---|------|
| Peptone bactériologique | 10 |
| Extrait de viande | 8 |
| Extrait de levure | 4 |
| Acétate de sodium | 5 |
| Phosphate bipotassique | 2 |
| Citrate d'ammonium | 2 |
| Sulfate de magnésium 7 H ₂ O | 0,2 |
| Sulfate de manganèse 4 H ₂ O | 0,05 |
| Glucose | 20 |
| Tween 80 | 1 ml |
| Agar | 10 |

pH = 6,2 (environ)

GELOSE STANDARD POUR DENOMBREMENT (P.C.A.)

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)

| | |
|----------------------------------|-----|
| Hydrolysate tryptique de caséine | 5 |
| Extrait de levure | 2,5 |
| Glucose | 1 |
| Agar | 9 |

pH = 7 (environ)