

**Repère :** BCFTU

**SESSION 2005**

**Durée : 4 H**

**Page : 0/15**

**Coefficient : 4**

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR  
BIOCHIMISTE**

**ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES**

**ÉPREUVE E5. UNITÉ U51.****ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES****LA POMME DE TERRE**

L'utilisation d'un dictionnaire anglais-français et de la calculatrice est autorisée.

**PREMIÈRE PARTIE : L'AMIDON, CONSTITUANT MAJEUR DE LA POMME DE TERRE**

(26 points).

**1-1) Détermination de la teneur en amidon des tubercules de pommes de terre (16 points).**

La teneur en amidon conditionne le choix de la variété de pomme de terre utilisée pour l'alimentation.

Le dosage enzymatique de l'amidon dans la pomme de terre se déroule en deux étapes :

**1<sup>ère</sup> étape** : dispersion de l'amidon par le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Une masse  $m$  de tubercule de pomme de terre finement broyé a été pesée et traitée par le DMSO en suivant le mode opératoire du document n° 1.

**2<sup>ème</sup> étape** : dosage de l'amidon présent dans la solution d'essai.

La technique utilisée est décrite dans le document n° 2.

**1-1-1)** A quel type de méthode enzymatique se rapporte la technique détaillée dans le document n° 2 ?

**1-1-2)** Une variante de cette technique consiste à doser le glucose obtenu après l'hydrolyse de l'amidon par la méthode à la glucose-oxydase.

Donner le principe de cette méthode : indiquer les équations de réactions mises en jeu (formules développées non exigées). S'agit-il d'une méthode en UV ? Justifier.

**1-1-3)** Le tubercule de pomme de terre analysé contient très peu de sucres réducteurs et la quantité de glucose libre est négligeable par rapport à la quantité d'amidon.

Indiquer la composition de l'essai "glucose libre" qui aurait pu être réalisé et le mode opératoire correspondant.

**1-1-4)** Calcul de la concentration massique en amidon de la solution d'essai ( $\rho$  en g/L).

**1-1-4-1)** La formule à utiliser est donnée dans le document n° 2.

- Préciser les valeurs de  $V$  et  $d_0 v$ . En déduire par le calcul la valeur de  $\varepsilon$ .

- Justifier la valeur de la masse molaire  $M$  (162 g/mol).

**Données** : C = 12    O = 16    H = 1    (g/mol)

**1-1-4-2)** Calculer  $\rho$ , d'après les résultats expérimentaux obtenus :

**Témoin** :             $A_1 = 0,121$              $A_2 = 0,115$

**Essai amidon** :     $A_1 = 0,136$              $A_2 = 0,452$

**1-1-5)** Déterminer le pourcentage d'amidon en grammes pour 100 grammes de tubercule de pomme de terre, sachant que la masse  $m$  de tubercule traité est de 122,6 mg.

**1-2) Utilisation de l'amidon pour la production d'éthanol (10 points).**

Des études ont été réalisées pour produire de l'éthanol, comme biocarburant, à partir de l'amidon de pomme de terre.

La fermentation de l'amidon et du maltose par une souche de *Klebsiella oxytoca* P<sub>2</sub> a été effectuée dans des bioréacteurs de laboratoire de 2 litres.

**1-2-1) Protocole de fermentation.**

Dans quatre fermenteurs contenant du bouillon de Luria, on introduit un substrat :

- soit du maltose (concentration finale 50 g/L),
- soit de l'amidon soluble (concentration finale 10, 20 ou 40 g/L),

sous un volume final de 1,2 L.

Les conditions de fermentation sont les suivantes : anaérobiose, pH 6,0, température 30°C, agitation à 100 rpm.

**1-2-1-1)** A  $t = 0$ , un volume  $V$  de préculture est ajouté dans chaque fermenteur de façon à obtenir une biomasse initiale de 0,033 mg/mL.

Sachant que la préculture présente une absorbance corrigée de 1,2 UA à 600 nm, quelle est la valeur du volume  $V$  ajouté ?

**Donnée :** à 1,0 unité d'absorbance corrigée à 600 nm correspond une biomasse de 0,33 mg/mL.

**1-2-1-2)** Pour maintenir le pH à 6,0 durant la fermentation, une régulation est installée.

Une seule pompe péristaltique étant disponible par fermenteur, quel apport doit-on privilégier pour maintenir le pH constant ? Justifier.

**1-2-2) Résultats.**

**1-2-2-1)** 10 mL de milieu de culture sont prélevés toutes les 12 heures. Les dosages de l'éthanol et des glucides résiduels sont effectués après centrifugation. Pourquoi doit-on centrifuger le milieu avant d'effectuer les dosages ?

**1-2-2-2)** Fermentation du maltose.

Les résultats obtenus avec le maltose sont représentés sur le document n° 3. Calculer le rendement de conversion obtenu en g d'éthanol produit par g de maltose consommé après 36 heures de fermentation. Comparer cette valeur au rendement maximum théorique de 53 %. Conclure.

**1-2-2-3)** Production d'éthanol à partir de l'amidon.

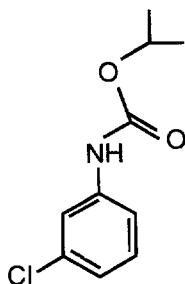
Les résultats obtenus sont portés sur les graphes du document n° 4.

Afin d'exploiter ces résultats, compléter le tableau en annexe (document n° 5 à rendre avec la copie).

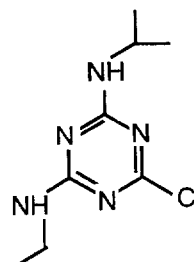
Quelle condition de fermentation (durée et concentration en amidon) semble la plus intéressante sur le plan industriel pour produire de l'éthanol à partir d'amidon ?

## **DEUXIÈME PARTIE : DÉTECTION ET DOSAGE D'UN ANTIGERMINATIF DANS LES POMMES DE TERRE (18 points).**

Cette détection est effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). L'antigerminatif le plus utilisé est le chlorprophame (ou CIPC). Son dosage par CPG se fait par la méthode de l'étalon interne. Il s'agit ici de l'atrazine.



Chlorprophame  
ou CIPC



Atrazine

La teneur des pommes de terre en chlorprophame doit être **inférieure à 5 mg par kg** (norme imposée aux producteurs).

**2-1)** Dans le document n° 6 est rapporté le schéma simplifié d'un chromatographe en phase gazeuse. Donner la signification des repères 1 à 5 de ce schéma.

**2-2)** Les conditions utilisées en CPG pour le dosage du CIPC sont les suivantes :

**injection** : injecteur à vaporisation directe dit "à septum" ; volume injecté : 0,5  $\mu$ L

**colonne** : type "megabore" 1701 (colonne semi-capillaire ayant les caractéristiques des colonnes capillaires)

- caractéristiques :
  - polarité intermédiaire
  - film de polycyanopropylphénylléthylsiloxane ; épaisseur 1,2  $\mu$ m
  - longueur de la colonne : 30 m ; diamètre interne : 0,53 mm
- conditions d'utilisation :
  - température initiale 40°C
  - température finale 250°C
  - gradient de température 10°C/min

**détecteur** : NPD

**2-2-1)** Définir le terme "colonne capillaire".

**2-2-2)** Le schéma du document n° 7 (a) reflète l'évolution d'un facteur caractéristique entre deux pics adjacents dans un chromatogramme.

Quel est ce facteur ? Quel est, parmi les trois cas signalés, celui qui permettra le plus facilement l'analyse quantitative ? Pourquoi ?

**2-2-3)** Quel est l'intérêt du gradient de température en CPG ?

**2-2-4)** Les caractéristiques du détecteur NPD utilisé ici sont indiquées dans le document n° 7 (b).

Pourquoi le choix de celui-ci est-il judicieux dans la recherche décrite ?

**2-3)** Le dosage du CIPC se fait par la méthode de l'étalon interne. La technique d'extraction du CIPC éventuellement présent dans les pommes de terre est décrite dans le document n° 8. L'étalon interne utilisé est l'atrazine. On considère que la totalité du CIPC et de l'atrazine est extraite et se retrouve dans les 10 mL de solution S (voir mode opératoire).

**2-3-1)** Qu'appelle-t-on "étalon interne" ? Quelles doivent être ses propriétés ?

**2-3-2)** La courbe d'étalonnage (document n° 9) a été établie en injectant successivement 0,5  $\mu$ L de chacune des solutions étalons suivantes dans les mêmes conditions que la solution S :

Solutions étalons n°	1	2	3	4
Concentration massique en CIPC en $\mu$ g par mL d'isooctane	5	10	15	20
Concentration massique en atrazine en $\mu$ g par mL d'isooctane	3,2	3,2	3,2	3,2

A l'aide du document n° 8, justifier la concentration massique en atrazine choisie pour ces solutions étalons.

**2-3-3)** Le chromatogramme du document n° 10 a été réalisé après extraction du CIPC dans les pommes de terre entières. Le pic n° 1 correspond au CIPC, le pic n° 2 correspond à l'atrazine (étalon interne).

**2-3-3-1)** Le temps de rétention relatif (TRR) du CIPC, en prenant comme référence l'étalon interne, doit être compris entre 0,82 et 0,86 si les conditions sont correctes. Calculer ce TRR et conclure.

**2-3-3-2)** A partir de la courbe d'étalonnage et des aires des pics 1 et 2, calculer la teneur en CIPC des pommes de terre en mg/kg. Comparer à la norme.

**TROISIÈME PARTIE : MALADIES DE LA POMME DE TERRE (36 points)****3-1) Détection des maladies virales (18,5 points).**

La pomme de terre est sensible à un grand nombre de virus.

Des méthodes immunologiques peuvent être utilisées pour diagnostiquer ces infections virales puisque de nombreux virus sont immunogènes et permettent de préparer des anticorps spécifiques chez l'animal.

**3-1-1)** Différents laboratoires ont préparé des anticorps dirigés contre le virus Y (Potato Virus Y : PVY). Des sérums polyclonaux ont été obtenus chez le lapin. Des anticorps monoclonaux ont été préparés par la technique classique résumée dans le document n° 11.

**3-1-1-1)** Préciser les caractéristiques des cellules tumorales utilisées.

**3-1-1-2)** Quel est le rôle du polyéthylène glycol ?

**3-1-1-3)** Quel est le but de la mise en culture en milieu HAT ?

**3-1-2)** Trois anticorps monoclonaux (AC1, AC2 et AC3) ont été obtenus par cette méthode.

On a déterminé l'affinité de ces anticorps (ou de leurs fragments Fab) sur différentes souches de virus Y : Y<sup>O</sup>, Y<sup>N</sup>, Y<sup>C</sup>.

Les résultats obtenus sont les suivants (affinités en L/mol).

Virus	Anticorps			
	AC1	Fab (de AC1)	AC2	AC3
Y <sup>O</sup>	$4,3 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^7$	$8,5 \cdot 10^6$
Y <sup>N</sup>	$1,4 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^2$	$8,3 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^3$
Y <sup>C</sup>	$3,2 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^5$	$5,2 \cdot 10^2$

**3-1-2-1)** Expliquer les différences de résultats obtenus avec l'anticorps AC1 et le fragment Fab correspondant.

**3-1-2-2)** Préciser quel est l'anticorps le plus spécifique de Y<sup>O</sup>.

**3-1-3)** Les anticorps obtenus peuvent être utilisés pour détecter les virus par une méthode immunoenzymatique réalisée à partir d'extraits de tubercules ou de feuilles.

Le protocole utilisé est présenté dans le document n° 12.

**3-1-3-1)** Faire un schéma légendé du complexe moléculaire formé en fin de réaction lors d'un test positif et en déduire à quel type de méthode immunoenzymatique appartient ce test de dépistage.

**3-1-3-2)** Expliquer pourquoi la phosphatase alcaline a été couplée à la streptavidine. Présenter les avantages de ce couplage.

**3-1-3-3)** Indiquer les objectifs de l'étape n° 2 du protocole (saturation).

**3-1-3-4)** Donner la composition d'un témoin permettant d'estimer le "bruit de fond".

**3-2) Assainissement par culture in vitro (5,5 points).**

**3-2-1)** Expliquer pourquoi la culture de méristème in vitro permet de récupérer des plants de pomme de terre sains à partir de plants contaminés par le virus Y.

**3-2-2)** La première étape de cette technique consiste à immerger des morceaux de tubercule dans une solution de gibbérelline. Justifier cette étape.

**3-2-3)** La culture nécessite l'utilisation successive de 3 milieux de culture PDT<sub>1</sub>, PDT<sub>2</sub> puis PDT<sub>3</sub> dont la composition est donnée dans le document n° 13.

Commenter et justifier la composition en phytohormones des milieux PDT<sub>2</sub> et PDT<sub>3</sub>.

**3-3) Identification de bactéries phytopathogènes (12 points).**

Certains bacilles Gram négatif appartenant au genre *Pectobacterium* (anciennement *Erwinia*) sont responsables chez la pomme de terre de maladies telles que la « jambe noire » ou pourriture noire. Dans les zones tempérées, la manifestation de la maladie de la jambe noire est causée par la bactérie *Pectobacterium carotovora subsp. atroseptica*, dont le développement est favorisé par un climat frais et humide. Dans les zones tropicales et subtropicales, la jambe noire peut aussi être provoquée par les bactéries *Pectobacterium carotovora subsp. carotovora* et *Pectobacterium chrysanthemi*. Suite aux mesures visant à prévenir, diagnostiquer et éradiquer cette maladie en France, des protocoles permettant d'isoler et d'identifier ces bactéries ont été mis au point. Historiquement, les méthodes de microbiologie classique furent les premières à être utilisées.

**3-3-1) Isolement et mise en évidence des bactéries responsables.**

Le document n°14 présente le protocole d'isolement des *Pectobacterium* sur milieu CVP.

**3-3-1-1)** Quel caractère est utilisé pour mettre en évidence ce genre bactérien sur le milieu CVP ? Préciser le nom du substrat utilisé et l'aspect des colonies recherchées.

**3-3-1-2)** Un autre composé semble jouer un rôle important dans ce milieu. Indiquer son nom et son rôle probable.

**3-3-2) Après isolement, l'identification passe par la vérification de l'appartenance à la famille des *Enterobacteriaceae*.**

**3-3-2-1)** Donner les caractères de cette famille.

**3-3-2-2)** Indiquer les tests et milieux permettant de vérifier ces caractères. Après avoir donné succinctement leur principe, préciser les conditions d'incubation pour les milieux de culture.

**3-3-3) L'identification de l'espèce peut se faire soit à partir d'une galerie traditionnelle, soit en utilisant une microgalerie API 20 E.**

**3-3-3-1)** Sur quel principe de l'identification bactérienne reposent les galeries API ?

**3-3-3-2)** Sachant que pour chaque taxon connu, des tables donnent la fréquence d'apparition des caractères observés, expliquer comment à partir d'un profil obtenu il est possible d'identifier une espèce avec détermination d'un pourcentage d'identification.

**3-3-4) Aujourd'hui, l'identification des *Pectobacterium* impliqués dans le pourrissement des pommes de terre ne s'effectue plus uniquement par des techniques de microbiologie classique. La connaissance des séquences des différents gènes impliqués dans les propriétés biochimiques de ces bactéries a permis d'utiliser les outils de la biologie moléculaire.**

Parmi les techniques de biologie moléculaire utilisées couramment, en citer une permettant d'identifier avec précision les bactéries recherchées. Justifier le choix en schématisant les grandes lignes de l'analyse proposée.