

**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 **17** pages

Les annexes A et B sont à rendre avec la copie après avoir été numérotées

SUJET

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

Suivi des cyanobactéries dans une eau de baignade

Les cyanobactéries se développent principalement en été dans des plans d'eaux comme des lacs, des étangs et certains cours d'eau. Ces proliférations provoquent un changement de la couleur de l'eau et parfois une odeur nauséabonde. L'élévation de la concentration des cyanobactéries aboutit à une augmentation de la matière organique, donc de la biomasse, présente dans l'eau. Les cyanobactéries sont susceptibles de produire des cyanotoxines pouvant induire une toxicité de l'eau aboutissant à une interdiction de baignade (voir **document 1**).

Avec le réchauffement climatique, la présence de cyanobactéries est observée de plus en plus fréquemment dans les eaux douces. Les Agences Régionales de Santé (ARS) préconisent un suivi des eaux récréatives au cours de la période estivale.

Dans le cadre du contrôle de routine, un épisode de multiplication excessive de cyanobactéries dans les eaux du Lac Bleu a été détecté. Une stratégie de surveillance a été mise en place par l'ARS.

Vous êtes technicien(ne) dans le laboratoire de santé publique au sein duquel vous êtes amené(e) à réaliser des prélèvements hebdomadaires sur une durée de 7 semaines.

Vous êtes chargé(e) du suivi des paramètres liés au développement de cyanobactéries observé dans le Lac Bleu, pour cela, vous réaliserez les analyses suivantes :

- Dénombrement des cyanobactéries.
- Dosage de la chlorophylle « a ».
- Quantification d'une cyanotoxine : la microcystine.

PARTIE 1 : Dénombrement des cyanobactéries par comptage direct (2 points)

Le suivi de la population en cyanobactéries est réalisé par comptage direct en cellule de Nageotte (voir **document 2**).

1.1. Justifier l'utilisation du Lugol.

Les résultats des différents prélèvements sont les suivants :

Semaine	1	2	3	4	5	6	7
Nombre de cyanobactéries observées par bande	10	12	8	5	2	3	2
Nombre de cyanobactéries calculées par mL	$8,0 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$

La semaine 1, vous avez déterminé un nombre de $8,0 \cdot 10^5$ cyanobactéries par mL d'eau.

1.2. Présenter les différentes étapes du mode opératoire et les modalités de calcul vous ayant permis d'obtenir 10 cyanobactéries par bande.

PARTIE 2 : Dosage de la chlorophylle « a » (8 points)

La chlorophylle est un pigment vert présent chez tous les végétaux ainsi que chez les cyanobactéries.

On différencie plusieurs types de chlorophylle : « a », « b », « c » et « d ». Mais, seule la chlorophylle « a » se retrouve dans tout le règne végétal. Son dosage permet donc d'évaluer la quantité de biomasse et de cyanobactéries présentes dans les milieux aquatiques, et en particulier dans les eaux de baignade.

Ainsi, la surveillance des eaux de baignade peut être couplée à un suivi de la concentration en chlorophylle « a » dans ces eaux.

Votre laboratoire réalise le dosage de la chlorophylle « a » par la méthode spectrophotométrique dans le domaine de l'UV-visible, qui est une méthode de référence (Norme NF T 90-117).

Cette méthode nécessite une étape de filtration puis une étape d'extraction préalables.

Elle implique également une étape supplémentaire d'acidification de l'échantillon afin d'obtenir la concentration exacte en chlorophylle « a » seule.

La ou les longueur(s) d'onde d'absorption d'une molécule dépend(ent) des caractéristiques de la structure de sa chaîne carbonée (voir **document 3**).

2.1 Justifier, à l'aide des **documents 3 et 4**, la possibilité de doser les pigments chlorophylliens en spectrophotométrie dans le domaine du visible.

Le spectre d'absorption des chlorophylles « a » et « b » est présenté dans le **document 5**.

2.2. Préciser et justifier le choix de la longueur d'onde à régler sur le spectrophotomètre pour le dosage spécifique de la chlorophylle « a ».

Les résultats obtenus par cette technique sont présentés dans le **document 6**.

Pour réaliser ce dosage, une gamme étalon a été préparée. Cette gamme est constituée de 6 solutions étalons de concentration en masse en chlorophylle « a » respectivement égale à : 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 $\mu\text{g. L}^{-1}$.

L'absorbance de ces 6 solutions étalons a été mesurée sur le spectrophotomètre et la droite étalon obtenue est présentée dans le **document 7**.

La semaine 1, le dosage a été réalisé sur un échantillon d'eau du lac, préalablement diluée au $\frac{1}{2}$.

L'absorbance moyenne obtenue est $A = 0,51$.

2.3 Déterminer la concentration en masse en chlorophylle « a » dans l'eau du lac pour la semaine 1.

Dans le but de prendre une décision rapide sur le terrain, votre laboratoire a souhaité utiliser une autre méthode pour déterminer la concentration en chlorophylle « a » du Lac Bleu. C'est ainsi que le laboratoire s'est tourné vers l'utilisation d'une sonde fluorimétrique : la sonde FluoroProbe (produite par la société bbe Moldaenke, Allemagne). Cette sonde est en effet facilement transportable et utilisable *in situ*.

Pour valider ce choix, le laboratoire vous a chargé de comparer les concentrations en masse de chlorophylle « a » obtenues par cette méthode sur le terrain avec celles déterminées par la méthode spectrophotométrique.

Ainsi, 9 prélèvements ont été réalisés dans le Lac Bleu ; chaque prélèvement a été analysé avec chacune des deux méthodes.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

Prélèvement n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Méthode spectrophotométrique Concentration en masse ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	9,5	6,8	13,7	6,8	9,0	8,3	10,3	5,3	8,0
Méthode avec sonde fluorimétrique Concentration en masse ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	7,3	5,9	10,8	8,4	8,5	9,0	11,5	6,1	8,5

On suppose que les populations de mesures sont distribuées chacune suivant une loi normale. Le but est de déterminer, au risque de première espèce α de 5 %, s'il existe une différence significative entre ces deux méthodes de mesure. Vous pourrez vous appuyer sur les **documents 8 et 9**.

2.4. Déterminer, en justifiant votre réponse, le test statistique approprié à la problématique.

2.5. Mettre en œuvre le test cité et conclure sur la possibilité d'utiliser la sonde FluoroProbe.

PARTIE 3 : Semi-quantification d'une cyanotoxine : microcystine (8 points)

Les eaux de baignade présentant une multiplication de cyanobactéries sont susceptibles de contenir des cyanotoxines, notamment la microcystine. Elles sont principalement libérées lors de la mort des cyanobactéries. Aussi, l'ingestion d'eau lors de la baignade représente un risque sanitaire.

Lorsque le dénombrement des cyanobactéries met en évidence que le seuil de 10^5 cyanobactéries par mL est franchi, l'évaluation de la quantité de cyanotoxines doit être réalisée. Deux méthodes moléculaires sont possibles : la PCR quantitative (quantification absolue) ou la PCR classique (méthode semi-quantitative).

La méthode de PCR classique semi-quantitative suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée dans le cadre de votre surveillance.

Une extraction des acides nucléiques est réalisée, suivie d'une PCR permettant de mettre en évidence la présence de la microcystine spécifique des cyanobactéries.

La séquence partielle du gène de la microcystine ainsi que les amorces (oligonucléotides) permettant d'amplifier une partie de cette séquence d'ADN sont présentées dans l'**annexe A**.

Le produit d'amplification (ou amplicon) attendu a une taille de 67 paires de bases (pb).

Le produit d'amplification débute au 227^{ème} nucléotide de la séquence de microcystine.

Sur l'**annexe A** (à rendre avec la copie après avoir été numérotée),

3.1. Situer les 2 amorces « sens » et « antisens » sur la séquence de microcystine en les coloriant ou en les entourant d'une couleur différente pour l'amorce « sens » et l'amorce « antisens » (préciser la légende choisie).

3.2. Souligner le produit d'amplification (amplicon).

La PCR est conduite dans un appareil appelé thermocycleur, selon le programme décrit en **annexe B**.

3.3. Légender, sur l'**annexe B** (à rendre avec la copie après avoir été numérotée), les 6 étapes dans les encadrés prévus à cet effet et préciser l'information nécessaire dans l'encadré grisé.

3.4. Justifier les différentes durées et températures indiquées à chacune des étapes.

Les produits d'amplification sont visualisés à l'aide d'une électrophorèse en gel d'agarose.

3.5. Préciser l'objectif de cette technique d'électrophorèse.

Le protocole de préparation du gel d'agarose indique une concentration en agarose de 2 % en TAE 1X (Tampon Tris-Acétate-EDTA).

3.6. Justifier le choix de la concentration en agarose utilisée pour l'expérimentation en cours.

Les résultats du gel d'électrophorèse sont présentés dans le **document 10**.

3.7. Justifier l'utilisation des 3 témoins : Q, TA et TE.

Le **document 10** présente, dans la première piste, une bande équivalente à $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcystine.

3.8. Interpréter les résultats obtenus au cours des 7 semaines.

PARTIE 4 : Bilan des suivis de surveillance (2 points)

4.1. Interpréter, en vous appuyant sur le **document 11**, l'ensemble des résultats obtenus à l'issue des différentes analyses menées sur les 7 semaines du suivi.

4.2. Conclure en proposant une consigne hebdomadaire à respecter à destination des usagers du Lac Bleu.

LISTE DES DOCUMENTS

DOCUMENT 1 : Affiche à l'attention des baigneurs, proposée par l'ARS du Loir-et-Cher

DOCUMENT 2 : Dénombrement des cyanobactéries par comptage direct

DOCUMENT 3 : Évolution de la longueur d'onde (λ en nm) d'absorption de molécules insaturées en fonction de la structure de la chaîne carbonée

DOCUMENT 4 : Formule topologique des molécules de chlorophylle « a » et « b »

DOCUMENT 5 : Spectre d'absorption des molécules de chlorophylle « a » et « b »

DOCUMENT 6 : Résultats du dosage hebdomadaire de la chlorophylle « a » par spectrophotométrie UV-visible réalisé sur 7 semaines

DOCUMENT 7 : Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration en masse en chlorophylle « a » dans la gamme étalon

DOCUMENT 8 : Variables aléatoires de quelques tests statistiques

DOCUMENT 9 : Fonctions de répartition

DOCUMENT 10 : Résultat de l'électrophorèse en gel d'agarose (suivi sur 7 semaines)

DOCUMENT 11 : Schéma décisionnel du programme de surveillance des zones de baignade et de loisirs nautiques

DOCUMENT 1

Affiche à l'attention des baigneurs, proposée par l'ARS du Loir-et-Cher (41)



BAIGNADE : SOYEZ VIGILANT !

Des micro-organismes, appelés cyanobactéries, colonisent parfois le fond des rivières, l'été voire en début d'automne. Elles forment à la surface des cailloux des plaques (biofilms) de couleur vert/brun foncé, qui peuvent se détacher et s'accumuler sur les bords (flocs, amas ressemblant à des algues). Elles peuvent être à l'origine d'intoxications mortelles pour les chiens.

Pour éviter les risques, il est important de connaître les précautions de bon sens à mettre en œuvre, simples et dont chacun a la responsabilité. Reconnaître les symptômes d'une intoxication permet également d'adapter votre comportement.

PRÉCAUTIONS à prendre vis-à-vis DES CYANOBACTÉRIES EN RIVIÈRES ?

Attention aux enfants !

- Ne pas se baigner en dehors des sites autorisés et surveillés
- Éviter d'ingérer de l'eau
- Ne pas jouer avec des bâtons ou galets ayant été immergés ou avec des dépôts d'algues, ne pas les porter à la bouche
- Prendre une douche après la baignade
- Ne pas pratiquer des activités de loisirs (canoë, activités nautiques...) dans des zones où des amas d'algues sont accumulés



Attention aux animaux domestiques ! (risque de mortalité canine)

- Tenir les chiens en laisse
- Ne pas les laisser accéder à la rivière / zone de baignade où des amas d'algues sont accumulés



SYMPTÔMES D'UNE INTOXICATION AUX TOXINES DE CYANOBACTÉRIES ?

Après une baignade : irritation (de la peau, des yeux...),
ou boutons...

En cas d'ingestion : tremblements, fièvre,
douleurs abdominales,
douleurs musculaires, nausées,
vomissements...

Consulter rapidement un médecin



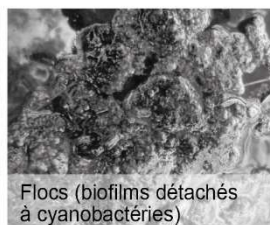
Après avoir bu l'eau de la rivière,
ou joué avec des bâtons ou des galets,
ou mangé des algues :

tremblements des pattes arrière, perte d'équilibre, état
anxieux, nausées, yeux globuleux, bave...

Consulter sans délai un vétérinaire, en ayant récupéré si possible les éventuelles vomissures



Biofilms à cyanobactéries



Flocs (biofilms détachés
à cyanobactéries)



Pour plus d'informations :
DDCSPP de Loir-et-Cher : ddcspp@loir-et-cher.gouv.fr
02 54 90 97 90
Agence régionale de santé : 02 38 77 32 10
Centre-Val de Loire
Site Internet des services de l'État en Loir-et-Cher
<http://www.loir-et-cher.gouv.fr>



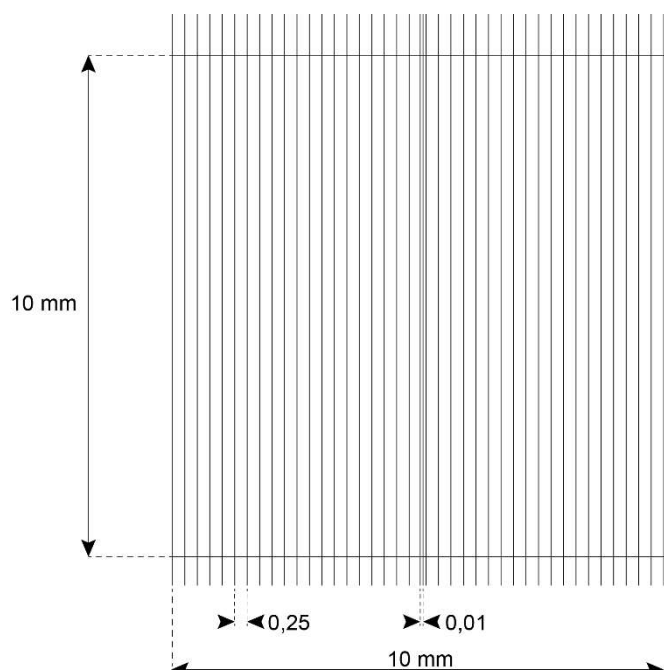
DOCUMENT 2

Dénombrement des cyanobactéries par comptage direct

- Préparation de l'échantillon d'eau

Les échantillons d'eau sont directement prélevés sur le terrain. Ils sont préservés à l'aide d'une solution de Lugol. Ce réactif conserve les fines structures des cellules et colore les cellules améliorant leur visibilité au microscope.

- Description de la cellule de Nageotte



Quadrillage total constitué de 40 bandes.

Chaque bande a un volume de 1,25 μ L.

Dimensions d'une bande : Longueur : 10 mm ; largeur : 0,25 mm ; Profondeur : 0,50 mm.

- Utilisation de la cellule de Nageotte

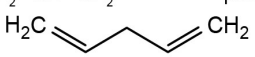
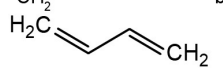
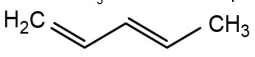
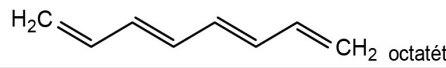
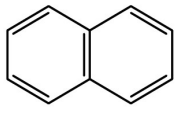
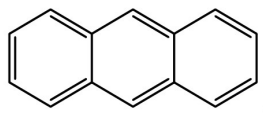
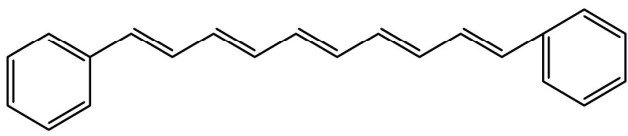
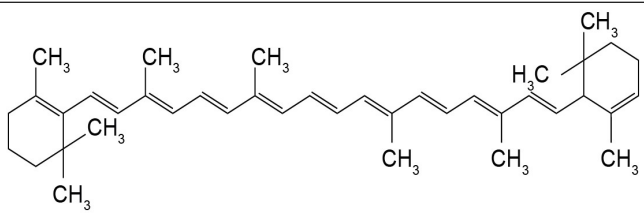
On dépose entre cellule et lamelle l'échantillon d'eau, pur ou dilué, pour remplir la chambre.

Le comptage est réalisé au microscope à l'objectif 40.

L'échantillon d'eau sera dilué si le nombre de cyanobactéries dépasse 20 par bande.

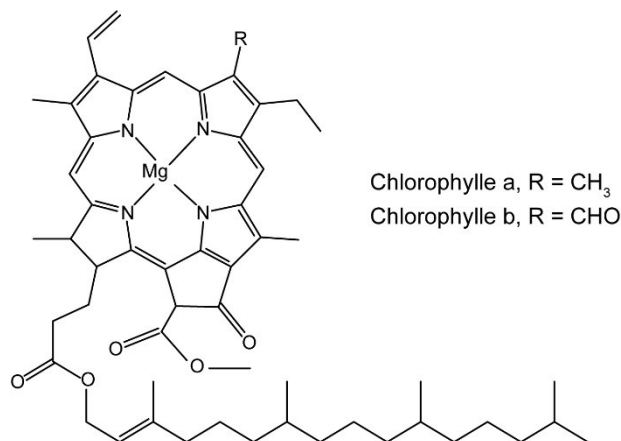
DOCUMENT 3

Évolution de la longueur d'onde (λ en nm) d'absorption de molécules insaturées en fonction de la structure de la chaîne carbonée

Molécule	λ absorbée (nm)
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ penta-1,4-diène 	165
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ buta-1,3-diène 	220
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$ penta-1,3-diène 	220
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$  octatétra-1,3,5,7-ène	305
 naphtalène	315
 anthracène	380
 1,10-diphényldécapenta-1,3,5,7,9-ène	425
 β -carotène	450

DOCUMENT 4

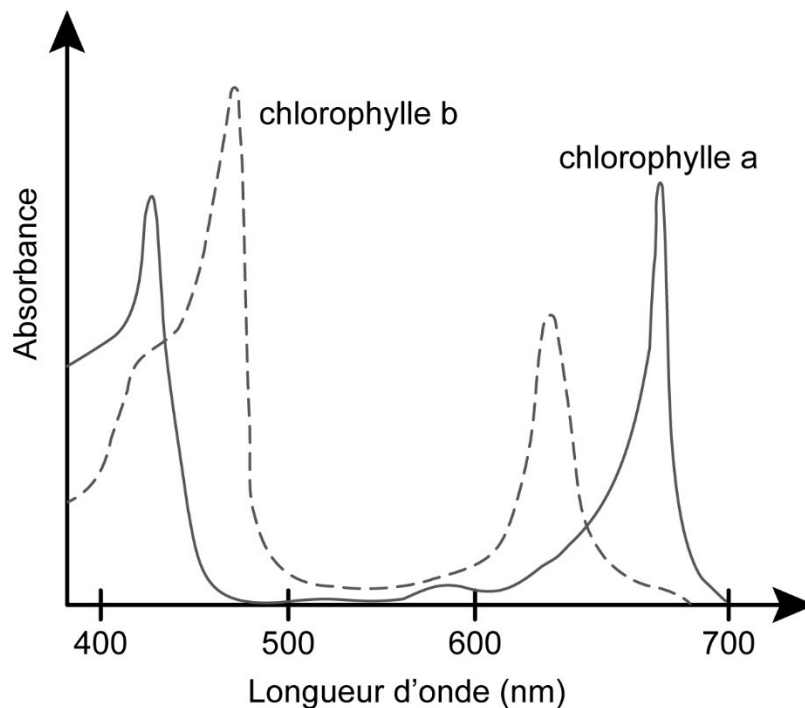
Formule topologique des molécules de chlorophylle « a » et « b »



Source : Roussille - 2009 - Rapport de stage - Comparaison de trois méthodes analytiques (sonde fluorométrique, spectroscopie UV-visible et HPLC) pour le dosage de la chlorophylle « a » dans les eaux de trois lacs

DOCUMENT 5

Spectre d'absorption des molécules de chlorophylle « a » et « b »



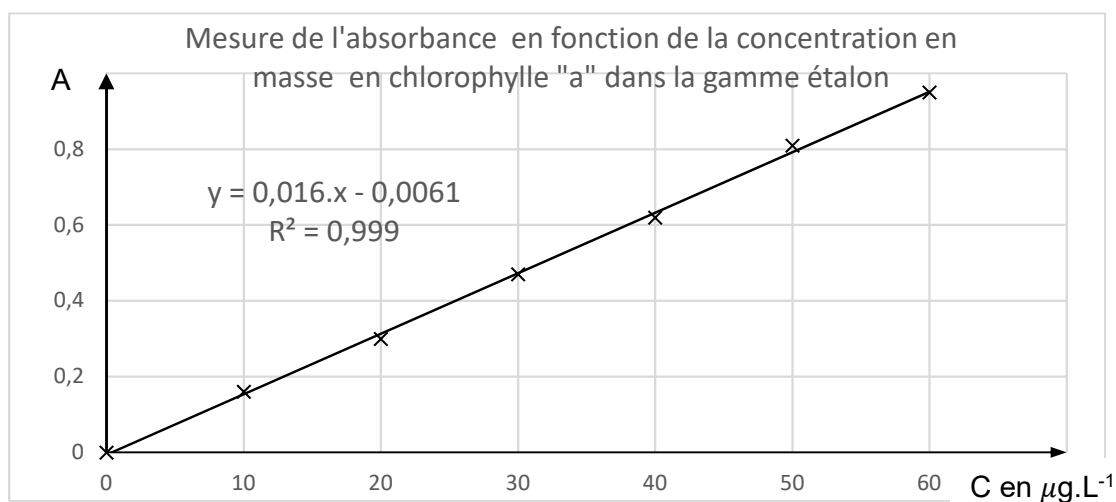
Source : L'alchimie du vide - Interactions lumière-matière en chimie physique – Thomas Ebbesen - Wikiversité

DOCUMENT 6

Résultats du dosage hebdomadaire de la chlorophylle « a » par spectrophotométrie UV-visible réalisé sur 7 semaines

Semaine	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Concentration en masse ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Calcul à réaliser	63,5	74,2	67,6	54,9	31,2	8,2

DOCUMENT 7

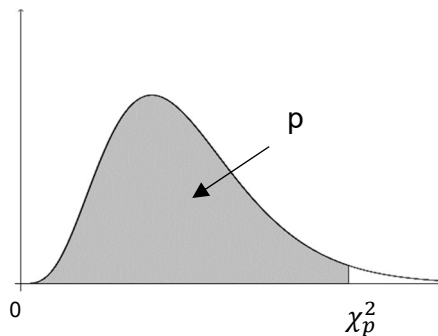


DOCUMENT 8

Variables aléatoires de quelques tests statistiques

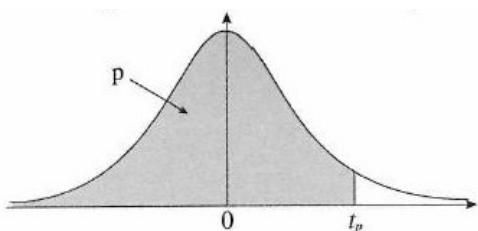
Moyenne	Test de conformité	$T = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{S}{\sqrt{n-1}}}$ <p>T est distribuée selon la loi de Student à n-1 degrés de liberté.</p>
	Comparaison	$T = \frac{\bar{D}}{\frac{S_d}{\sqrt{n-1}}}$ <p>T est distribuée selon la loi Student à n-1 degrés de liberté</p>
		$T = \frac{\bar{X}_1 -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

DOCUMENT 9



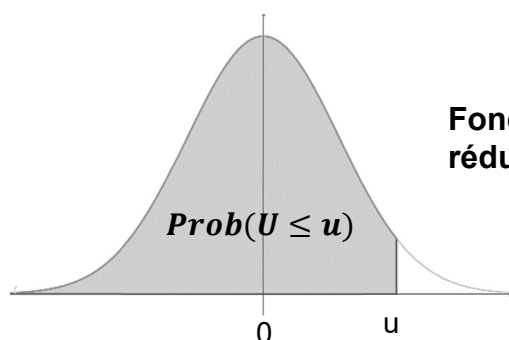
Fonction de répartition d'une variable du Khi2 (χ^2) à k degrés
Valeurs χ_p^2 telles que $prob(\chi^2 \leq \chi_p^2) = p$

$k \backslash p$	0,005	0,025	0,05	0,1	0,90	0,95	0,975	0,995
12	3,07	4,40	5,23	6,30	18,55	21,03	23,34	28,30
13	3,57	5,01	5,89	7,04	19,81	22,36	24,74	29,82
14	4,07	5,63	6,57	7,79	21,06	23,68	26,12	31,32
15	4,60	6,26	7,26	8,55	22,31	25,00	27,49	32,80



Fonction de répartition d'une variable de Student à k degrés de liberté.
Valeurs t_p telles que $Prob(T \leq t_p) = p$

$k \backslash p$	0,90	0,95	0,975	0,995	0,999	0,9995
8	1,40	1,86	2,31	3,36	4,50	5,04
9	1,38	1,83	2,26	3,25	4,30	4,78
10	1,37	1,81	2,23	3,17	4,14	4,59
11	1,36	1,80	2,20	3,11	4,02	4,44
12	1,36	1,78	2,18	3,05	3,93	4,32

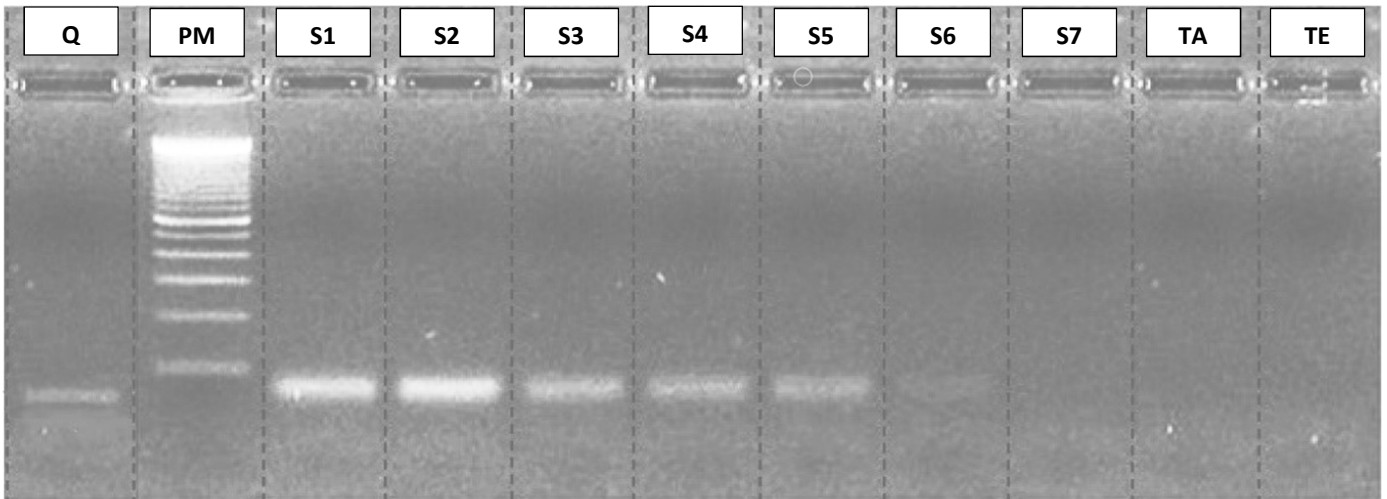


Fonction de répartition de la loi normale centrée réduite

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

DOCUMENT 10

Résultat de l'électrophorèse en gel d'agarose (suivi sur 7 semaines)



Pistes

Q : bande équivalente à 25 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de microcystine

PM : marqueur de poids moléculaire

S1 à S7 : PCR des prélèvements des semaines 1 à 7

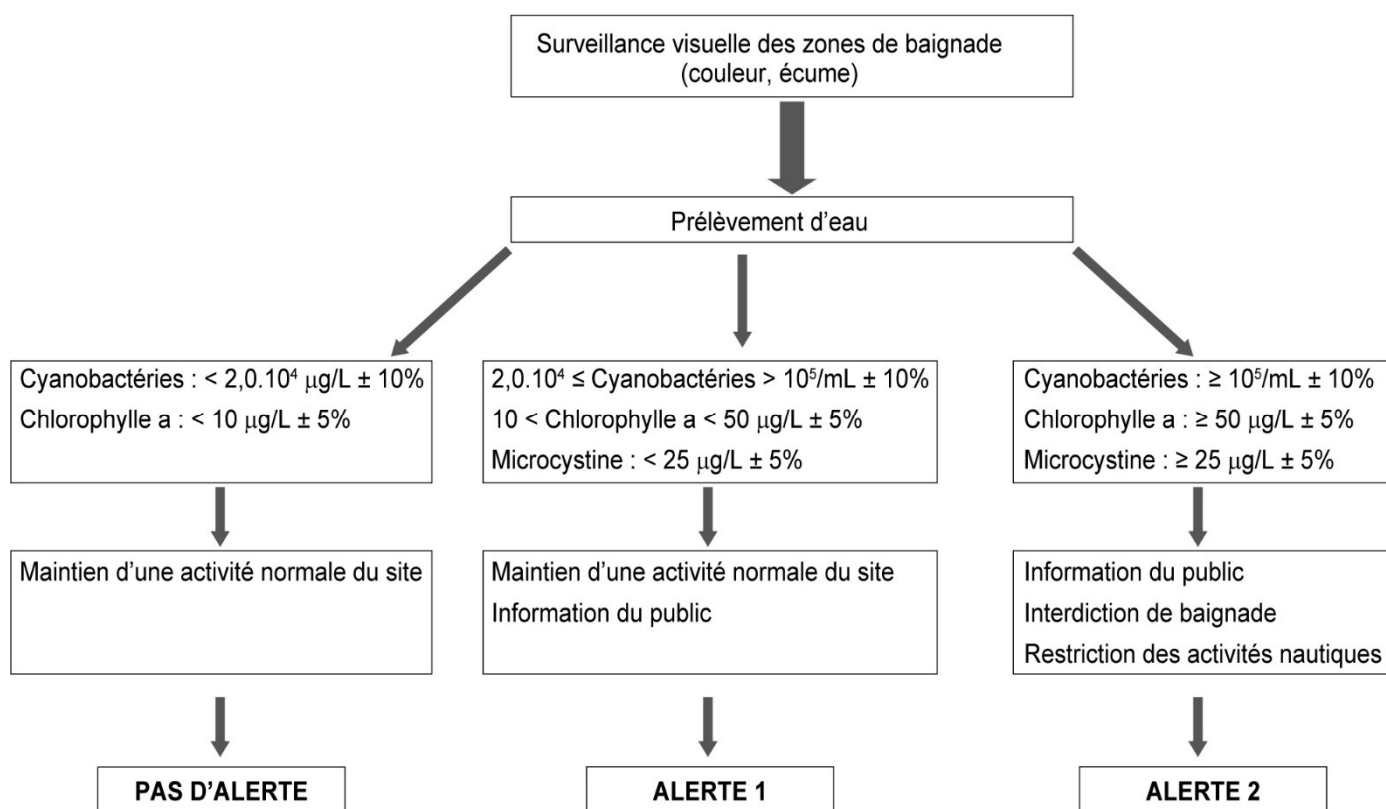
TA : PCR sans amorce

TE : PCR sur eau ultra pure

DOCUMENT 11

Schéma décisionnel du programme de surveillance des zones de baignade et de loisirs nautiques

(Document élaboré à l'aide des ressources du rapport ANSES ERCA2015SA0207Ra)



Chaque niveau d'alerte est déclenché dès que l'un des paramètres dépassent le seuil défini.

La surveillance sera maintenue jusqu'à obtention de résultats conformes pour les trois paramètres.

NOM :

EXAMEN :

(EN MAJUSCULES)

Prénoms :

Spécialité ou Option :

Date de naissance :

EPREUVE :

Centre d'épreuve :

Date :

N° ne rien inscrire

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

N° ne rien inscrire

Partie 3 :

Séquences nucléotidiques utiles pour la PCR

Séquence partielle de microcystine

La police de référence utilisée, Courier New, permet que chaque caractère occupe le même espace, ainsi une ligne compte toujours 50 caractères.

La séquence représentée est dans le sens 5' → 3'

5'
 GAAATCATCTTGCGCTATGTCACCTACGCTACCTTCGCTGGCGACGGCAG
 TGTTCTCGATGATCGTTGCTTAAATGGTCTTCGCGAAACCTATGTAGCTT
 TAGGAGTACCTGGAGCTTCCGTAGCTGCTGGCGTAAGCAAATGAAAGAA
 GCTGCTTTGTCCATCGCTAACGATCGCAACGGTGTACCCCCGGCGATTG
 CAGTGCTTTAATGTCTGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCGCTG
 CTGTGCGCTAGTCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAAACCGTAGGAACTTAT
 TGCAAGATTATTGGGAGATACCAAACAATGAAAACCCCCCTTACCGAAGC
 CGTAGCAGCCGCTGATTCTCAAGGTCGTTTCTTAAGCAGCACCGAAATCC
 AAGTTGCTTTCGGTTCGTTTTCGTCAAGCTTCTGCCAGCCTCACCGCCGCT
 AAAGCTTTAACCGAAAAAGCTAGTTCTTTGATCTCCGGTGCCGCTCAAGC
 CGTATAACAAGTACCCCTACACCACCCAAATGCAAGGGGCTAACTTTG
 GGCGGACCAACGCGGTAAAGAGAAATGCGCTCGCGACATCGGTTACTACC
 TCCGCATGGTGACCTACTGC
 3'

Présentation des amorces

Amorce « sens » : 5' – GCTACTTCGACCGCGCC - 3'

Amorce « antisens » : 5' – TCCTACGGTTTAATTGAGACTAGCC - 3'

Extrait de Kurmayer & Kutzemberger – 2003 - *Applied and Environmental Microbiology*

(Légende de couleur à préciser par le candidat)

NOM :

EXAMEN :

(EN MAJUSCULES)

Spécialité ou Option :

Prénoms :

EPREUVE :

Date de naissance :

Centre d'épreuve :

Date :

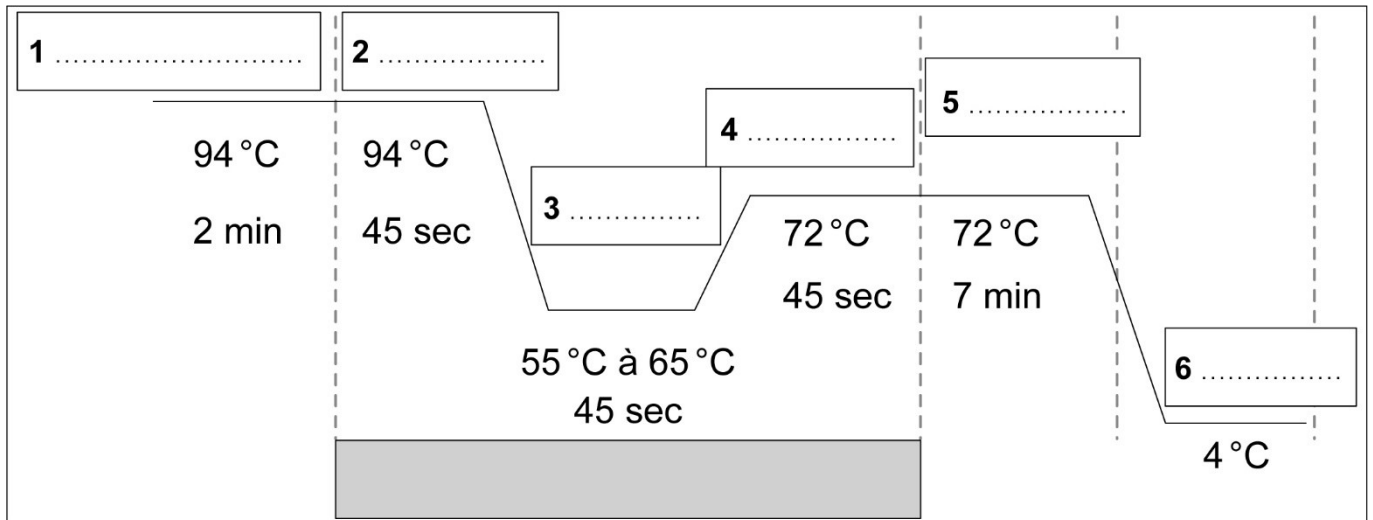
N° ne rien inscrire

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

N° ne rien inscrire

Partie 3 (suite) :

Schéma représentant les différentes étapes de la PCR



Source : <https://geneticeeducation.co.in/polymerase-chain-reaction-pcr/>
consulté le 22/11/2022