

## ANNEXES DE LA THÈSE CIFRE

Étude des facteurs influençant la conservation des racines de betteraves sucrières, et des changements physiologiques au cours du stockage en lien avec la qualité industrielle

---

Par Cécile ROQUES

Établissement : Université Lille Nord de France (Lille 1)

École doctorale : SMRE

(Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement)

Doctorat d'Ingénierie des Fonctions Biologiques (IFB)

Directeur de thèse : Patrice HALAMA

Co-encadrant : Bertrand Vandoorne

Jury :

- M. Alain BOUCHEREAU
- M. Patrice HALAMA
- M. Jean-Louis HILBERT
- M. Maurice NONUS
- M. Philippe SIMONEAU
- M. Bertrand VANDOORNE



Soutenue le : mardi 19 décembre 2017





## ANNEXES DE LA THÈSE CIFRE

Étude des facteurs influençant la conservation des racines de betteraves sucrières, et des changements physiologiques au cours du stockage en lien avec la qualité industrielle

---

Par Cécile ROQUES

Établissement : Université Lille Nord de France (Lille 1)

École doctorale : SMRE

(Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement)

Doctorat d'Ingénierie des Fonctions Biologiques (IFB)

Directeur de thèse : Patrice HALAMA

Co-encadrant : Bertrand Vandoorne

Jury :

- M. Alain BOUCHEREAU
- M. Patrice HALAMA
- M. Jean-Louis HILBERT
- M. Maurice NONUS
- M. Philippe SIMONEAU
- M. Bertrand VANDOORNE



Soutenue le : mardi 19 décembre 2017



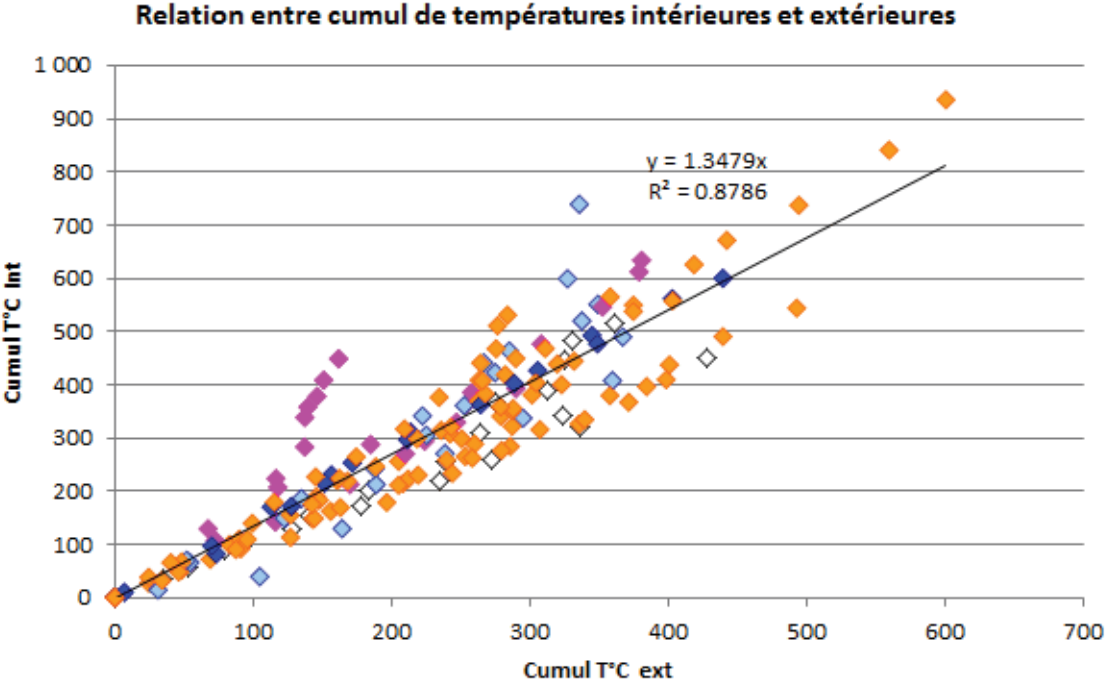
# Liste des annexes

---

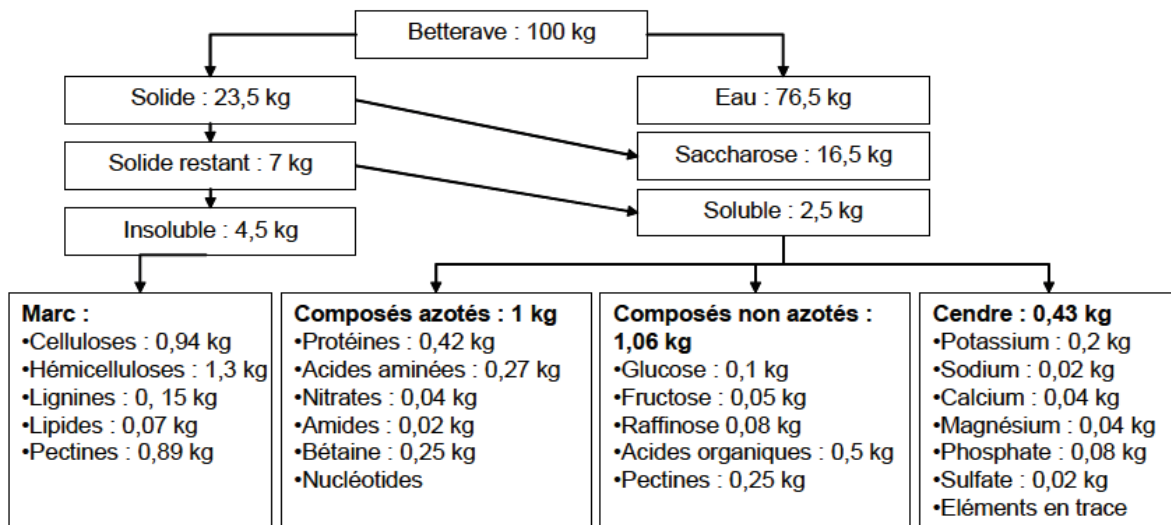
Annexe n°1 : Correspondance entre les cumuls de degrés jours intérieurs silo et extérieurs. ....	4
Annexe n°2 : Composition chimique moyenne d'une racine de betterave.....	5
Annexe n°3 : Recette planteur.....	6
Annexe n°4 : Photos d'arracheuses à betteraves.....	7
Annexe n°5 : Procédé industriel – Diffusion du saccharose à partir des cossettes.....	8
Annexe n°6 : Protocole de mise en place des silos conservation/variétés.....	9
Annexe n°7 : Corrélation entre l'indice de pourriture (notations par observation) et le taux de pourriture (poids des parties des racines malades (épluchées) / poids total).....	13
Annexe n°8 : Penefel automatique – Pénétrromètre utilisé pour les mesures de dureté de l'essai conservation/variétés.....	14
Annexe n°9 : Protocole de la méthode Van Soest pour l'extraction des fibres.....	15
Annexe n°10 : Photo de la chaîne Gallois (extraction du jus des râpures de racines).....	21
Annexe n°11 : Principe de l'analyse du glucose sur la chaîne d'analyse multi-cassettes du laboratoire agronomique de Tereos – Méthode TRINDER.....	22
Annexe n°12 : Principe du détecteur à indice de réfraction.....	23
Annexe n°13 : ANOVA : Décomposition de la variance - Calcul des proportions de variabilité dues aux facteurs significatifs.....	24
Annexe n°14 : Pertes de poids (pertes d'eau) – Essai conservation/variétés – Moyenne des 3 répétitions biologiques sur les 2 années pour les 4 dates de prélèvement.....	25
Annexe n°15 : Corrélations entre la concentration en marc et la résistance physique - Essai conservation/variétés année 2 – Par lieu et par date, pour les 3 variétés.....	26
Annexe n°16 : Concentration en hémicellulose en fin de stockage – Essai conservation/variétés - Année 2 – Site de Lillers.....	28
Annexe n°17 : Corrélation entre la résistance physique et la concentration en pectines le jour de la récolte – Essai conservation/variété - Année 1.....	29
Annexe n°18 : Travail de recherche sur les bénéfices d'un apport en potassium.....	30
Annexe n°19 : Corrélation entre la perte en sucre et le gain en marc – Essai conservation/variétés - Année 2.....	34
Annexe n°20 : Corrélation entre la concentration en hexoses et l'IP au cours du stockage (de 250°j int à 500°j int) - Essai conservation/variétés - Année 2 – Arrachage mécanique - Regroupement des 2 sites.....	35
Annexe n°21 : Corrélation entre le développement de pourriture et les concentrations en glucose ou fructose – Essai conservation/variétés et essai CLD d'Origny - Arrachage mécanique.....	36
Annexe n°22 : Photo du T25 Ultra Turrax (broyeur de laboratoire) utilisé pour le broyage des blocs de racines pour l'analyse des COV.....	39
Annexe n°23 : Chromatogrammes issus de la première phase d'optimisation de l'analyse des COV..	40
Annexe n°24 : Chromatogrammes issus de la seconde phase d'optimisation de l'analyse des COV : l'incubation.....	42
Annexe n°25 : Analyse des COV dans le temps – Année 1 – Problème d'échantillonnage à 250°j int (oxydation importante).....	43
Annexe n°26 : COV majoritaires des racines non dégradées (pas de pourriture apparente).....	44
Annexe n°27 : Schéma de la synthèse des n-butanol par <i>S. cerevisiae</i> – Métabolisme.....	45

Annexe n°28 : COV majoritaires au cours du stockage par variété – Année 2.....	46
Annexe n°29 : Concentrations en hexoses des deux états sanitaires testés dans l’analyse des COV....	47
Annexe n°30 : Protocols used for the metabolic analysis. ....	48
Annexe n°31 : Fiche technique de Serenade (1 <sup>ère</sup> page).....	54
Annexe n°32 : Fiche technique du BION 50 WG (1 <sup>ère</sup> page).....	55
Annexe n°33 : Travail de recherche sur les effets d’un apport en silicium.....	56
Annexe n°34 : Fiche technique de Siliforce (1 <sup>ère</sup> page).....	57
Annexe n°35 : Avis de l’ANSES sur le produit INCA (1 <sup>ère</sup> page).....	58
Annexe n°36 : Proposition de protocole pour les tests d’huiles essentielles sur les pathogènes des racines de betteraves sucrières.....	59
Annexe n°37 : Proposition de protocole pour la ventilation de silos sur site industriel.....	61
Annexe n°38 : Analyses de qualité industrielle - Protocole de l’épuration standardisée.....	63
Annexe n°39 : Protocoles des analyses en lien avec la qualité industrielle des racines.....	65

**Annexe n°1** : Correspondance entre les cumuls de degrés jours intérieurs silo et extérieurs.



**Annexe n°2 : Composition chimique moyenne d'une racine de betterave.**



[Schiweck et al., 1994]



### **Annexe n°3 : Recette planteur.**

Lorsqu'un camion arrive en usine, il est pesé avec son chargement de racines (poids plein). Un prélèvement d'environ 50 kg est effectué (échantillon) ; puis le camion décharge les racines sur la cour de stockage et est de nouveau pesé (poids vide). La différence entre ces deux poids donne le poids brut du chargement du camion (1).

Comme vu dans le mémoire, à partir des pesées brutes et lavées de l'échantillon, le poids de terre est estimé (2) ; et à partir de la pesée des parties malades des racines (obtenues par épiluchage de l'échantillon lavé), le poids de BNM (Betterave Non Marchande) est estimé (3). Ces deux poids sont additionnés, afin de représenter le pourcentage de déchets de l'échantillon (4). Ce pourcentage est appliqué au poids brut du camion, afin d'estimer le poids net lavé camion (5).

Avec la forfaitisation du collet (scalpage léger : davantage de matière mais le sucre est plus difficilement extractible au niveau du collet), une pénalité de 7 % est appliquée au poids net lavé camion, pour donner le poids net camion (6).

Pour ramener au sucre extractible, le poids à 16 est estimé pour déterminer la recette du planteur (7). Dans le cas de richesses élevées, le poids valeur, correspondant au barème de paiement Tereos, est appliqué.

$$(1) \text{ Poids brut camion (kg)} = \text{Poids camion plein} - \text{Poids camion vide}$$

$$(2) \text{ Terre (kg)} = \text{Poids échantillon brut} - \text{Poids échantillon lavé}$$

$$(3) \text{ BNM (kg)} = \text{Poids de betteraves malades}$$

$$(4) \text{ Déchet (\%)} = [(2) + (3)] / \text{poids brut de l'échantillon}$$

$$(5) \text{ Poids net lavé camion (kg)} = (1) - [(1)*(4)]$$

$$(6) \text{ Poids net camion (kg)} = (5) - [(5)*0,07]$$

$$(7) \text{ Poids à 16} = \text{Poids net camion} * \left( \frac{\text{Richesse (échantillon)} - 3}{13} \right)$$

**Annexe n° 4 : Photos d'arracheuses à betteraves.**



a) Automotrice MAXTRON 620 (Grimme)



b) Intégrale REXOR 630 (Grimme)

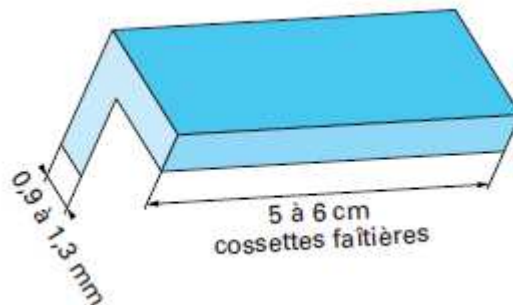
**Annexe n°5 : Procédé industriel – Diffusion du saccharose à partir des cossettes.**

$$\frac{\partial S_{jc}}{\partial t} = - D \cdot A_{jc} \cdot \frac{\partial C_{jc}}{\partial x}$$

Où :

- $\frac{\partial S_{jc}}{\partial t}$  est la masse de sucre qui diffuse par unité de temps et de jus cellulaire (kg/(sec.kg jus cellulaire))
- $D$  est le coefficient de diffusion (m<sup>2</sup>/sec)
- $A_{jc}$  est la surface d'échange par unité de jus cellulaire (m<sup>2</sup>/kg jc)
- $C_{jc}$  est la concentration en sucre (kg de sucre/kg de jc)
- $x$  est l'épaisseur de diffusion (m)

a) Théorie de la diffusion de Fick appliquée à la diffusion de saccharose des cossettes, utilisée en procédé sucrier [Decloux, 2002]



b) Schéma illustrant la forme idéale d'une cossette issue de coupes-racines [Decloux, 2002]



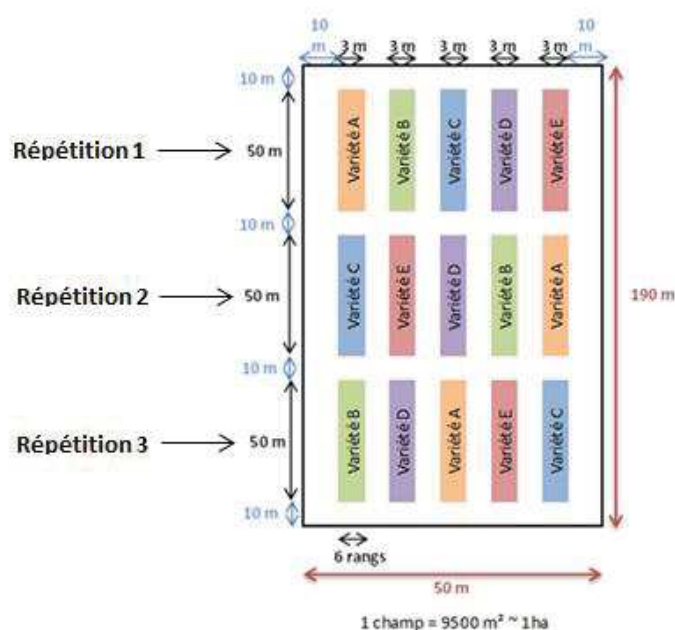
## ESSAIS CONSERVATION/VARIÉTÉS Récoltes et confection silos

29/09/2015

➤ Descriptif

Projet apparenté	Conservation variétés
<b>Objectifs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comprendre les changements physiologiques des racines au cours du stockage</li> <li>• Identifier des paramètres de sélection variétale pour le stockage de longue durée                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Déterminer des conditions de stockage optimales</li> </ul> </li> <li>• 2 champs de régions différentes : Lillers et Origny-Ste-Benoite                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 variétés</li> </ul> </li> </ul>
<b>Caractéristiques de l'essai</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 variété sélectionnée pour la constitution des silos sur site industriel – Semée dans le champ de l'expérimentation ou à proximité</li> <li>• 3 répétitions biologiques de chaque variété/champ (15 parcelles)</li> <li>• 2 conditions de stockage (1<sup>ère</sup> année) : chambre climatisée (arrachage manuel) et silo sur site industriel (arrachage mécanique)</li> <li>• Prélèvement des sacs en fonction du cumul de degré jour (200°j, 300°j, 400°j et 550°j).</li> </ul>

➤ Plan des parcelles expérimentales :



➤ Récolte :

○ **Semaine 43 pour Norrent-Fontes/Lillers :**

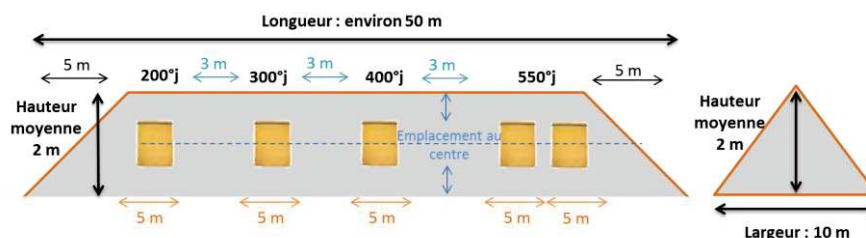
- 19/10/2015 : Récolte de la variété pour la confection du silo
  - ❖ Confection du lit de racines sur graviers (surface dure) sur le site de Lillers
  - ❖ Stockage du restant des racines de part et d'autre du lit de racines, pour recouvrement des sacs le 21/10/2015
- 20/10/2015 : Récolte des parcelles à Norrent-Fontes et confection des sacs

○ **Semaine 44 pour Lesquielles/Origny-Ste-Benoite :**

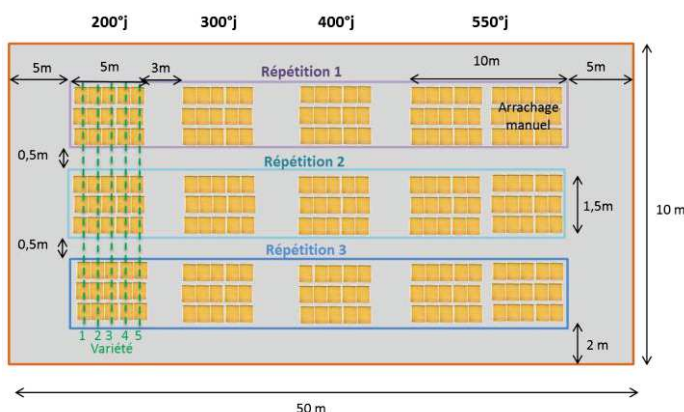
- 26/10/2015 : Récolte de la variété pour la confection du silo
  - ❖ Confection du lit de racines sur graviers (surface dure) sur le site d'Origny
  - ❖ Stockage du restant des racines de part et d'autre du lit de racines, pour recouvrement des sacs le 28/10/2015
- 27/10/2015 : Récolte des parcelles à Lesquielles et confection des sacs
- Silo de 500 t (voir les schémas ci-dessous) – Chargement direct au champ (récolte de la variété pour la confection des silos avec une machine de type intégrale)
- 225 sacs en silo avec 45 sacs/date de prélèvement à 200, 300 et 400°j ; 90 sacs à 550°j (arrachages mécanique + manuel) - 4 dates de prélèvement/site en fonction du cumul des températures (voir le rétro-planning des prélèvements en fin de document)

➤ Schémas d'un silo de stockage sur un site industriel (500 t)

**Vue en longueur et de face**



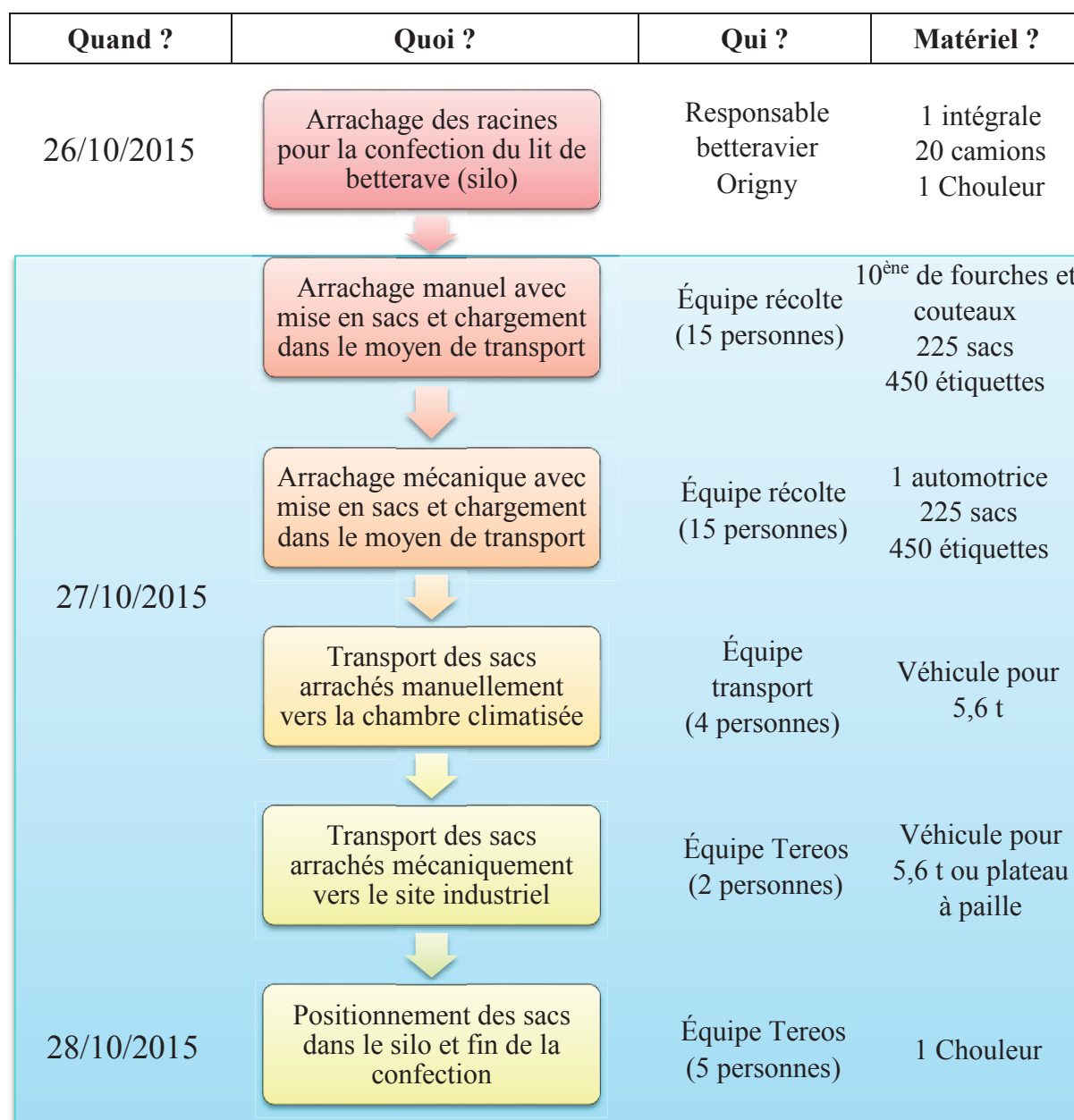
**Vue à l'intérieur du dessus**



➤ Proposition de procédure **Norrent-Fontes** (Lillers)

Quand ?	Quoi ?	Qui ?	Matériel ?
19/10/2015	Arrachage des racines pour la confection du lit de betterave (silo)	Responsable betteravier Lillers	1 intégrale 20 camions 1 chouleur
20/10/2015	Arrachage manuel avec mise en sacs et chargement dans le moyen de transport	Équipe récolte (15 personnes)	10 <sup>ème</sup> de fourches et couteaux 225 sacs 450 étiquettes
	Arrachage mécanique avec mise en sacs et chargement dans le moyen de transport	Équipe récolte (15 personnes)	1 automotrice 225 sacs 450 étiquettes
	Transport des sacs arrachés manuellement vers la chambre climatisée	Équipe transport (4 personnes)	Véhicule pour 5,6 t
	Transport des sacs arrachés mécaniquement vers le site industriel	Équipe Tereos (2 personnes)	Véhicule pour 5,6 t ou plateau à paille
	Positionnement des sacs dans le silo et fin de la confection	Équipe Tereos (5 personnes)	1 Chouleur

➤ Proposition de procédure **Lesquielles** (Origny)

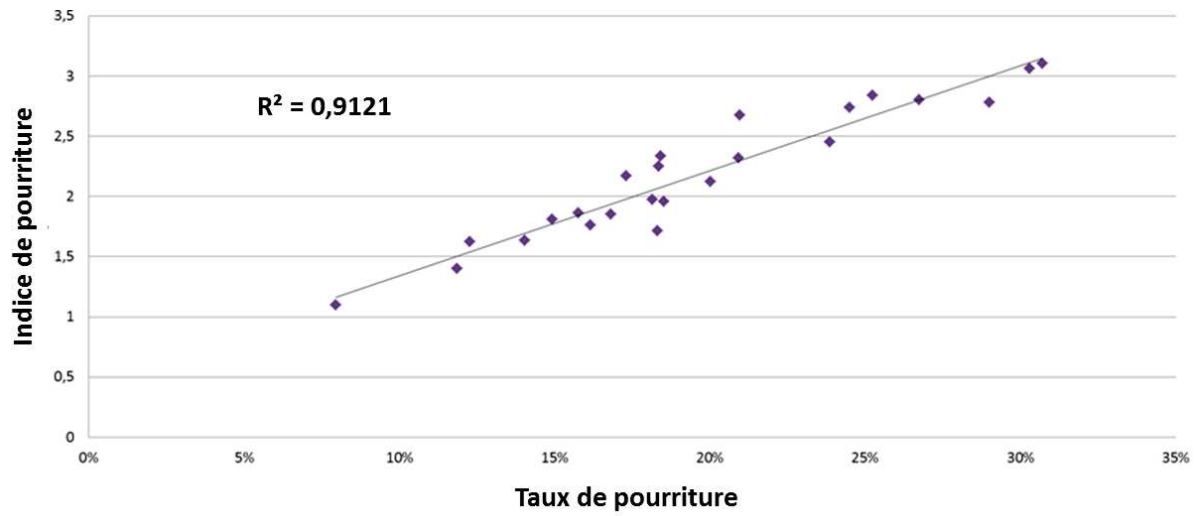


➤ Retro-planning des dates de prélèvement en silo en fonction des moyennes de températures 2010/2014

Octobre	Novembre				Décembre				Janvier				Février	
Sem. 43/Sem. 44	Sem. 45	Sem. 46	Sem. 47	Sem. 48	Sem. 49	Sem. 50	Sem. 51	Sem. 52	Sem. 53	Sem. 1	Sem. 2	Sem. 3	Sem. 4	
Récolte	200°j		200°j	300°j	300°j	400°j				400°j		550°j		550°j
Lillers/Origny	07-nov		17/20 nov			07/08 déc				08-janv	13-janv			Après le 31/01



**Annexe n°7 : Corrélation entre l'indice de pourriture (notations par observation) et le taux de pourriture (poids des parties des racines malades (épluchées) / poids total).**



Essai conservation variétés [Tereos, 2014].  
Stockage en grange jusqu'à un cumul minimal de 500°j.  
1 point ↔ 1 variété.



**Annexe n°8 : Penefel automatique – Pénétrömètre utilisé pour les mesures de dureté de l'essai conservation/varietés.**



## Annexe n°9 : Protocole de la méthode Van Soest pour l'extraction des fibres.

### **Technique de Van Soest pour la détermination des constituants pariétaux de végétaux**

#### **Principe**

L'échantillon est successivement soumis à l'action de détergents neutres puis acides, et finalement à l'action de l'acide sulfurique concentré, dans des conditions standards, censées solubiliser des produits assimilés aux diverses composantes pariétales.

Les pertes de poids, éventuellement corrigées, des teneurs en cendres permettent d'apprécier la composition pariétale des produits analysés.

Cette technique est, à l'origine, utilisée pour la détermination des valeurs nutritives des fourrages pour laquelle elle est très performante, et a fait l'objet de protocoles standardisés à base de filtrations suivies de lavage sur verre fritté avec vide contrôlé.

Dans le cas de composés en cours de compostage, la finesse des produits « broyés » et la forte charge minérale rendent le protocole expérimental difficile à utiliser par colmatage des filtres. Nous proposons donc un protocole expérimental basé sur la centrifugation suivie de lavages, par remise en suspension des résidus pour pallier les inconvénients de la technique par filtration.

#### **Matériels et produits :**

##### Matériels spécifiques

- Centrifugeuse de laboratoire, si possible réfrigérée avec pots coniques de 175 mL
- Agitateurs magnétiques chauffants (4 postes)
- Bouilloire électrique réservée à l'eau distillée (si possible sur socle amovible capacité 1 L)
- Agitateur de tubes à essais Vortex (optionnel) (Bioblock A94500)
- Étuve stabilisée à 40°C
- Étuve stabilisée à 105°C
- Balance (sensibilité de 0.1 mg)
- Jeu de 16 bouteilles à centrifuger en polyéthylène (ou verre) de capacité 175 mL à fond conique et adaptateurs adéquats (Bioblock A22445 et adaptateurs Bioblock A22448)
- Creusets en verre fritté porosité n°2 adaptables sur des tulipes « spéciales » et une fiole à vide de 500 ml
- Broyeur Cyclotec avec grille à mailles de 2 mm pour la préparation des résidus à traiter.
- Broyeur oscillant pour matériaux tendres ou durs (Rescht) avec bols de 25 mL et billes (optionnel : préparation des échantillons pour le dosage de C, N et cendres totales des résidus)

##### Réactifs

- Solution d'extraction au détergent neutre (**NDS**) : Sodium dodécyl sulfate (SDS C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaSO<sub>4</sub>S) (réf Sigma L5750) : dissoudre 30 g de SDS dans 400 mL d'eau tiède et les verser dans une fiole jaugée de 1 L. Peser séparément 18.61 g d'EDTA Na (réf Sigma ED2SS or eq), 6.81 de tétraborate de sodium décahydraté (Borax : réf : Merck 6308 or eq.)

et 4.56 g d'hydrogénophosphate de sodium (PO<sub>4</sub> HNa<sub>2</sub> Réf Merck 6579 ou éq.) dans un bêcher et ajouter 400 mL d'eau distillée. Dissoudre en chauffant légèrement, puis laisser tiédir et verser dans la fiole jaugée contenant le SDS en solution. Ajouter alors 10 mL de triéthylène glycol (réf : Aldrich T5-945-5 ; limite la formation de mousse) avant de compléter jusqu'au volume final avec de l'eau distillée. Le pH de cette solution doit être compris entre 6.9 et 7.1 (contrôler et réajuster éventuellement par NaOH). À utiliser dans les 2 semaines suivant la préparation en conservant la solution à température ambiante

- Solution d'extraction au détergent acide (ADS) : Solution de bromure de cetyltriméthyl ammonium (CTAB réf Sigma H5882) à 2% (poids/volume) dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M (1N) (réf : Merck 731 dilué à raison de 27.8 mL d'acide concentré /L de solution)
- Solution de dissolution de la cellulose (ADC) : solution d'acide sulfurique à 72% (24N). Placer dans un bêcher de 2 L environ 250 mL d'eau distillée et placer ce bêcher sur un agitateur magnétique dans une bassine contenant un bain de glace. Ajouter avec précautions 720 mL (correspondant à 1325g) d'acide sulfurique concentré (Merck 731) Laisser refroidir puis transférer dans une fiole jaugée de 1 L. Ajuster à 1 L avec de l'eau distillée en laissant refroidir entre deux ajouts. Homogénéiser.
- Papier pH : gamme 4.5 à 7.5 en rouleaux (réf : polylabo 09803) ou bandelettes gamme 6.0 à 8.1 ( réf : polylabo 27128).
- Acétone : de qualité DAB7 ou équivalent (réf : carlo Erba 400974)

### Mode opératoire pour des produits traités par filtration

Selon les objectifs d'analyse, prévoir 3 ou 6 répétitions pour chaque produit à analyser (Tableau).

Tableau du nombre « minimal » de répétitions par produit à prévoir pour l'application de la technique « Van-Soest »		
Objectif d'analyse	Nb rep	Analyses réalisées
C, N et cendres sur chaque fraction	6 + 2brut	Après extraction NDS : Une rép pour détermination humidité à 40° puis à 105° et cendres résiduelles après attaque NDS Une rép pour détermination de l'humidité à 40° et teneur en C et N total (CHN) du résidu Après extraction ADS Une rép pour détermination humidité à 40° puis à 105° et cendres résiduelles après attaque ADS Une rép pour détermination de l'humidité à 40° et teneur en C et N total (CHN) du résidu Après extraction ADL Une rép pour détermination humidité à 40° puis à 105° et cendres résiduelles après attaque ADS Une rép pour détermination de l'humidité à 40° et teneur en C et N total (CHN) du résidu Sur échantillon Brut : Une rép pour : Humidité à 40°C, puis à 105°C puis cendres totales Une rép pour : humidité à 40°C et C et N totaux (CHN)
Cendres seules sur chaque fraction	3 + 1brut	Après extraction NDS : Une rép pour détermination humidité à 40° puis à 105° et cendres résiduelles après attaque NDS Après extraction ADS Une rép pour détermination humidité à 40° puis à 105° et cendres résiduelles après attaque ADS Après extraction ADL Une rép pour détermination humidité à 40° puis à 105° et cendres résiduelles après attaque ADS Sur échantillon Brut : Une rép pour : Humidité à 40°C, puis à 105°C puis cendres totales

- Peser, à 0.1 mg près, les creusets filtrants de porosité 2, destinés à l'analyse. Ces creusets sont propres (ils ont éventuellement subis un passage au four à moufle à 550 °C, et un lavage « à contre-courant de l'utilisation normale » avec du HCl dilué, puis à l'eau distillée, et enfin à l'acétone, avant un séchage à l'étuve à 105°C). Ils sont numérotés de 1, 2, ...X au crayon à papier sur la partie dépolie, ou directement gravé sur le verre.
- Peser, à 0.1 mg près, entre 950 et 1050 mg de produit à analyser, préalablement broyé avec une granulométrie comprise entre 200 µm et 1 mm, une quantité de produit comprise

### Digestion NDS

- Placer le produit pesé dans un bêcher sans bec de 400 mL forme haute et ajouter 100 mL de réactif NDS (éprouvette). Mettre en place le « ballon réfrigérant » et mettre en route le chauffage (puissance moyenne). Surveiller la mise en route de l'ébullition (apparition de gouttes de condensation à la base du ballon réfrigérant). À partir du début de l'ébullition, décompter 1 heure exactement (minuteur). Le temps d'ébullition étant écoulé, retirer les bêchers de l'agitateur magnétique chauffant, et, à l'aide d'une tige de retrait magnétique, sortir le barreau magnétique et le rincer par un jet de pissette contenant de l'eau distillée très chaude. Recueillir les éventuels résidus dans le bêcher magnétique et le rincer par un jet de pissette contenant de l'eau distillée très chaude, en recueillant les éventuels résidus dans le bêcher de travail.
- Adapter un verre fritté (porosité 2) sur l'Erlen à vide par l'intermédiaire de la pipe de filtration et du joint en caoutchouc. Placer la totalité du liquide dans le fritté en tirant sous vide, de façon modérée d'abord, pour faciliter la filtration. Rincer à l'eau distillée très chaude (environ 400 à 500 mL d'eau sont nécessaires) jusqu'à disparition de l'aspect savonneux du filtrat (test « à la main »), et de la mousse apparente dans la pipe de filtration. A ce stade, laver le résidu par environ 50 à 100 mL d'acétone à la pissette.
- Placer les creusets filtrants à l'étuve à 40°C pendant une nuit. À la sortie de l'étuve, les placer quelques minutes dans un dessiccateur (garniture silica - gel) et les peser, à 0.1 mg près. Réserver (le/les) creuset(s) destiné(s) aux déterminations intermédiaires (cendres sur résidu NDS) et continuer la digestion progressive sur les creusets restants.

### Digestion ADS

- Dans les bêchers de 400 mL de forme haute, placer 100 mL (éprouvette) de réactif d'extraction ADS et mettre à chauffer jusqu'au début de l'ébullition. Mettre en place dans chacun des creusets filtrants, un petit agitateur magnétique « en croix » (réf polylabo 2001 : 10 41401 ou équivalent), et mettre le creuset en position « couchée » dans le bêcher. Laisser à ébullition « douce » pendant une heure exactement, en vérifiant bien que l'agitation est effective et que le « gâteau » est décollé du fritté.
- Le temps de digestion écoulé, saisir, avec une pince, le creuset filtrant, et en nettoyer les parois avec un ou plusieurs jets de pissette d'eau distillée bouillante. Mettre en place le creuset sur le support (voir l'extraction précédente), et procéder au lavage/séchage par de l'eau distillée bouillante et de l'acétone, de la même façon que précédemment.

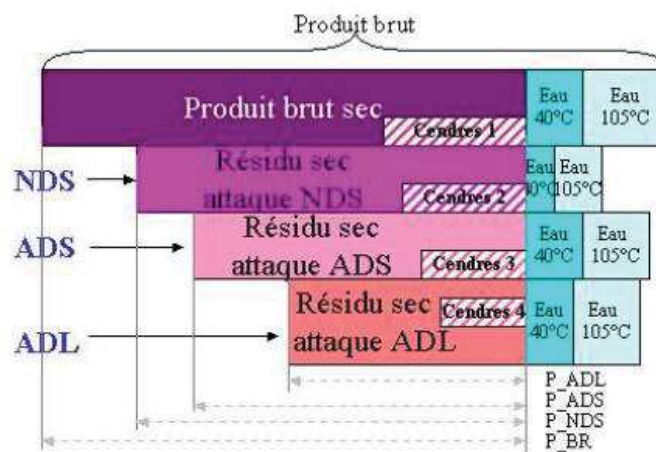
- Placer les creusets filtrants à l'étuve à 40°C pendant une nuit. À la sortie de l'étuve, les placer quelques minutes dans un dessiccateur (garniture silica - gel) et les peser, à 0.1 mg près. Réserver (le/les) creuset(s) destiné(s) aux déterminations intermédiaires (cendres sur résidu NDS) et continuer la digestion progressive sur les creusets restants.

### Digestion ADL

- Récupérer les creusets filtrants destinés à la dernière opération de digestion progressive et les placer dans un cristallisoir (on peut éventuellement en mettre plusieurs dans le même cristallisoir). Verser une quantité de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 24N (72%) suffisante, au-dessus de chaque résidu, et dans le cristallisoir, pour que le résidu baigne complètement dans l'acide 24N. Laisser en contact 3 heures à froid dans ces conditions, en brisant le gâteau à l'aide d'une tige de verre pour assurer une digestion la plus complète possible.
- Le temps de digestion écoulé, sortir les creusets du cristallisoir (pince), les rincer extérieurement à l'eau distillée (PORT DE LUNETTES DE PROTECTION OBLIGATOIRE), et les placer sur le dispositif de filtration déjà utilisé. Rincer abondamment à l'eau distillée jusqu'à pH neutre de l'eau de rinçage (papier pH). Enfin, rincer à l'acétone.
- Placer les creusets filtrants à l'étuve à 40°C pendant une nuit. À la sortie de l'étuve, les placer quelques minutes dans un dessiccateur (garniture silica - gel) et les peser, à 0.1 mg près. Déterminer l'humidité à 40°C, 105°C et la teneur en cendres résiduelles.

### Calculs

Éléments du calcul :



### Schéma théorique des diverses étapes de l'analyse

Les poids relevés lors des digestions successives correspondent au poids résiduel du produit sec (y compris les cendres qui y sont associées), augmentés du poids de l'eau résiduelle après passage à l'étuve à 40°C, puisque les différentes attaques sont effectuées sur des échantillons ayant passé « une nuit » en étuve ventilée à 40°C.



Les cendres sont partiellement solubilisées à chaque étape de la digestion. À chaque étape, l'humidité des échantillons (à 105°C) est déterminée sur une des prises d'essai qui servira aussi, après pesée, à la détermination de la teneur en cendres résiduelles.

On note « 0 » les divers poids correspondant à l'étape « produit brut », et H01 l'humidité correspondante par rapport au poids brut sec.

Etape	Répétition	Poids tare	Poids avec produit (40°C)	Poids Etuve 105°C	Poids four 550°C
	0	P001	P002	P003	P004
Echt brut prétraité <sup>2</sup>	1	P011	P012	Non pesé	Non pesé
Echt brut prétraité	2	P021	P022	Non pesé	Non pesé
Echt brut prétraité	3	P031	P032	Non pesé	Non pesé
Fin digestion NDS	1	P011	P112	P113	P114
Fin digestion NDS	2	P021	P122	Non pesé	Non pesé
Fin digestion NDS	3	P031	P132	Non pesé	Non pesé
Fin digestion ADS	1	Déjà sacrifié	Déjà sacrifié	Déjà sacrifié	Déjà sacrifié
Fin digestion ADS	2	P021	P222	P223	P224
Fin digestion ADS	3	P031	P232	Non pesé	Non pesé
Fin digestion ADL	1	Déjà sacrifié	Déjà sacrifié	Déjà sacrifié	Déjà sacrifié
Fin digestion ADL	2	Déjà sacrifié	Déjà sacrifié	Déjà sacrifié	Déjà sacrifié
Fin digestion ADL	3	P031	P332	P333	P334

Les cases marquées « non pesé » signifient que les échantillons n'ont pas été utilisés pour réaliser ces pesées, car ils doivent être utilisés pour la suite de l'analyse.

La répétition « 0 » sur l'échantillon brut est considérée « à part ». Elle sert à déterminer les cendres totales et l'humidité à 105°C du produit ayant séjourné en étuve à 40°C (base de départ pour les analyses).

## Résultats

Ils sont exprimés en termes de proportion par rapport au produit sec.

ECHANTILLON BRUT		
HBres	$(P002 - P003)/(P003 - P001)$	Humidité résiduelle 40-105°
CeBres	$((P004 - P001)/(P003 - P001))$	Cendres totales
APRES DIGESTION NDS : calcul de moyenne et écart type sur ResNDS (3 rep)		
HNDS	$(P112 - P113)/(P113 - P011)$	Humidité résiduelle 40-105
CeNDS	$(P114 - P011)/(P113 - P011)$	Cendres du résidu après NDS
ResNDS1	$(P113 - P011)/((P012 - P011) * (1/(1 + HBres)))$	Poids résidu NDS Sec répét 1
ResNDS2	$(P122 - P021) * (1/(1 + HNDS)) / ((P022 - P021) * (1/(1 + HBres)))$	Poids résidu NDS Sec répét 2
ResNDS3	$(P132 - P031) * (1/(1 + HNDS)) / ((P032 - P031) * (1/(1 + HBres)))$	Poids résidu NDS Sec répét 3
APRES DIGESTION ADS : calcul de moyenne et écart type sur ResADS (2 rep)		
HADS	$(P222 - P223)/(P223 - P021)$	Humidité résiduelle 40-105
CeADS	$(P224 - P021)/(P223 - P021)$	Cendres du résidu après ADS
ResADS2	$(P223 - P021)/((P022 - P021) * (1/(1 + HBres)))$	Poids résidu ADS Sec répét 2
ResADS3	$(P232 - P031)/((P032 - P031) * (1/(1 + HBres)))$	Poids résidu ADS Sec répét 3
APRES DIGESTION ADL		
HADL	$(P333 - P332)/(P333 - P031)$	Humidité résiduelle 40-105
CeADL	$(P334 - P031)/(P333 - P031)$	Cendres du résidu après ADS
ResADL	$(P333 - P031)$	Poids résidu ADL Sec répét 3

Les proportions de produit brut sec solubilisées à chaque étape du processus sont :

Eqvlt lignine	Eqvlt Cellulose	Eqvlt Hémi-cell.	Produit soluble	Observation
A = Res ADL	B = ResADS - ResADL	C = ResNDS - ResADS	D = 1-ResNDS	Somme = 1
A - CeADL	B - (CeADS-CeADL)	C - (CeNDS - CeADS)	D - (CeNDS)	Partie orga + CeBres = 1

## Références

- ❖ Goering H.K. et Van Soest P.J., 1970.- Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Handbook No. 379, 1-20.
- ❖ Kirk T.K., 1988.- Lignin determination. In : Methods in enzymology, Vol. 161, Biomass, Part B Lignin, pectin, and chitin. Academic Press, San Diego, California, 97-99.
- ❖ Robertson J.B., Van Soest P.J. et Torres P., 1972. - Substitution of filter paper for crucibles in the in vitro true digestibility determination. *J. Dairy Sci.* 55, 9, 1305-1307.
- ❖ Van Soest P.J., 1963.- Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 46, 5, 829-835.
- ❖ Van Soest P.J. et Wine R.H., 1968.- Determination of lignin and cellulose in acid -detergent fiber with permanganate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51, 4, 780-785.

**Annexe n°10 : Photo de la chaîne Gallois (extraction du jus des râpures de racines).**



**a) Balance proportionneuse**

L'échantillon de râpure est positionné sur le réceptacle prévu à cet effet (à gauche de la photo) ; et la juste quantité de sulfate d'aluminium est déversée dans le ballon : facteur de dilution de 4,71 (à droite de la photo). L'échantillon de râpure est ensuite transféré dans un bol avec le sulfate d'aluminium pour une étape d'extraction de 5 minutes.



**b) Chaîne Gallois**

Suite à l'étape d'extraction, le contenu des bols est déversé dans un filtre, positionné au-dessus d'un béccher pour collecter le filtrat à analyser (temps de filtration de 6 minutes).



**Annexe n°11 : Principe de l'analyse du glucose sur la chaîne d'analyse multi-cassettes du laboratoire agronomique de Tereos – Méthode TRINDER.**

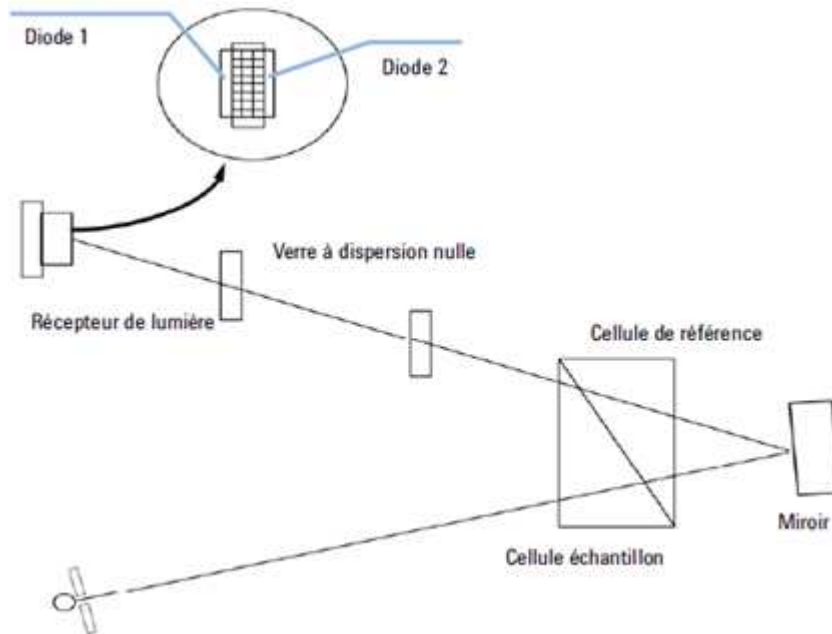
Le glucose est mesuré par la méthode enzymatique de TRINDER.

- 1) Il est oxydé en acide gluconique et en eau oxygénée par la glucose oxydase (GOD).
- 2) L'eau oxygénée est dégradée par une peroxydase (POD).
- 3) L'oxygène libéré réagit avec du phénol et de la 4-amino-phénazone → corps coloré rouge (quinoneimine rouge/violet).
- 4) La mono-imino-p-benzoquinone-4-phénazone est mesurée par colorimétrie à 505-520 nm.

Réaction :



## Annexe n°12 : Principe du détecteur à indice de réfraction.



Un rayon lumineux traverse la cuve à circulation, séparée diagonalement en cellules échantillon et de référence. À l'arrière de la cuve à circulation, un miroir réfléchit la lumière à travers la cuve et un verre à dispersion nulle, ce qui modifie la trajectoire du rayon lumineux vers le récepteur de lumière. Le récepteur de lumière est équipé de deux diodes. Celles-ci produisent un courant électrique proportionnel à la quantité de lumière qui l'atteint, donc proportionnel à la concentration de la molécule.

[Agilent Technologies, 2012].

**Annexe n°13 : ANOVA : Décomposition de la variance - Calcul des proportions de variabilité dues aux facteurs significatifs.**

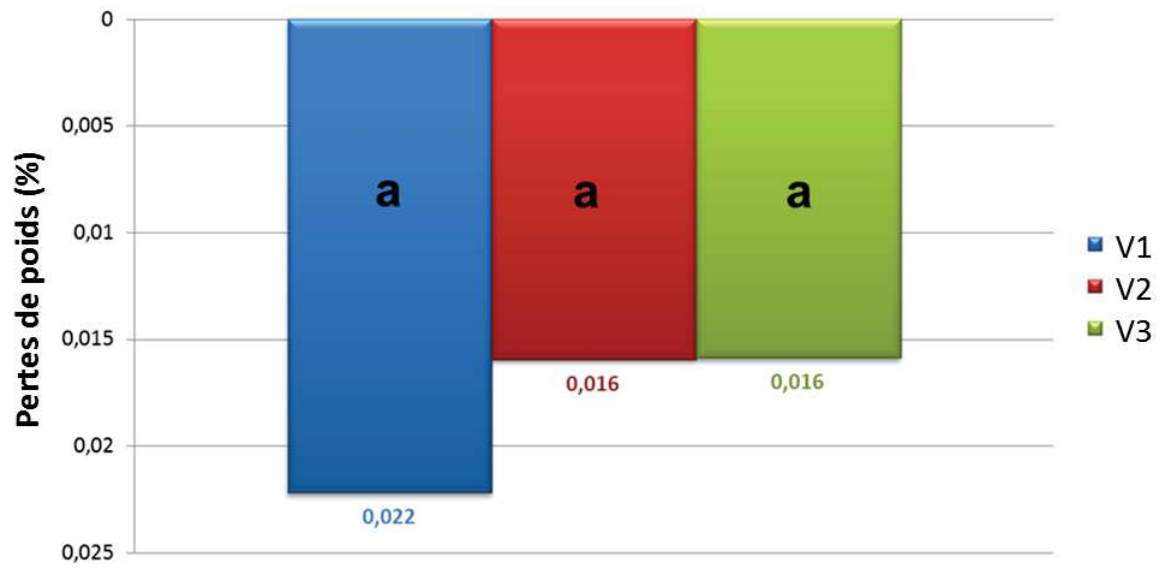
		Degré de liberté	Somme des carrés	Carrés moyens	Valeur F <sup>□</sup>	p-value <sup>□□</sup>	Significativité <sup>□□□</sup>
Facteurs	Lieu	1	97,51	97,51	542,09	< 2,2e-16	***
	Type d'arrachage	2	3,94	3,94	21,9	< 6,03e-06	***
	Durée de stockage	4	20,87	20,87	116,01	< 2,2e-16	***
	Variété	1	154,72	77,36	430,08	< 2,2e-16	***
	Répétition	2	0,83	0,83	4,59	0,03	*
Interactions	Lieu/Type d'arrachage	1	0,38	0,38	2,09	0,15	
	Lieu/Durée de stockage	4	4,34	4,34	24,13	< 2,2e-06	***
	Lieu/Variété	2	1,93	0,96	5,36	0,0056	**
	Durée de stockage/Variété	4	0,36	0,18	0,99	0,37	
	Durée de stockage/Type d'arrachage	4	0,11	0,11	0,63	0,43	
	Lieu/Répétition	2	0,02	0,02	0,13	0,72	
	Type d'arrachage/Variété	2	0,63	0,32	1,76	0,17	
Résidus	359	29,14	0,18				
<b>Total de la somme des carrés =</b>			<b>314,78</b>				
<b>Facteurs significatifs :</b>		Variété :	154,72/314,78	responsable de	49%	de la variabilité	
		Lieu :	97,51/314,78	responsable de	31%	de la variabilité	
		Durée :	20,87/314,78	responsable de	7%	de la variabilité	
		Durée/Lieu :	4,34/314,78	responsable de	1%	de la variabilité	
		Arrachage	3,94/314,78	responsable de	1%	de la variabilité	
		Lieu/Variété :	1,93/314,78	responsable de	1%	de la variabilité	

□ F : test de Fisher →  $S^2_{\max}/S^2_{\min}$ , parmi les k échantillons traités pour le facteur en question

□□ p-value : probabilité de retrouver la même valeur de F lorsque H0 est vraie (H0 : « Les moyennes de la variable quantitative sont égales »)

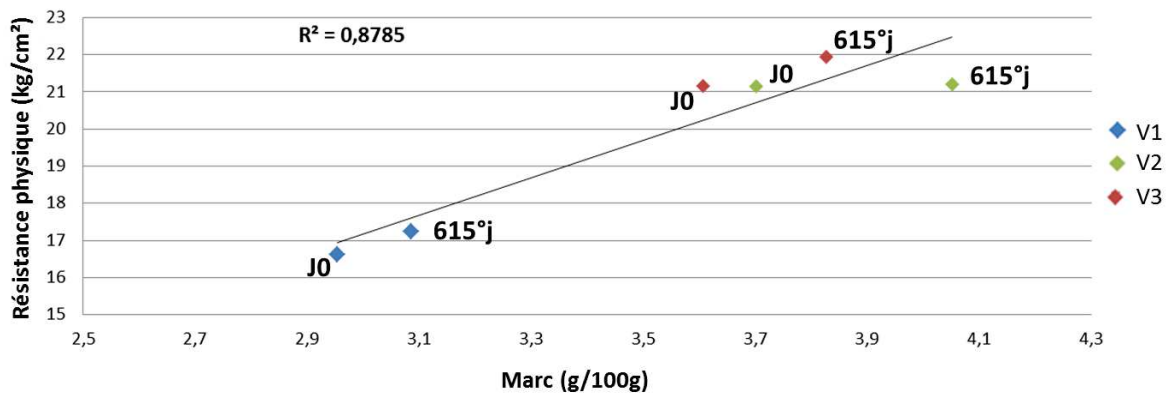
□□□ Codes de significativité : « \*\*\* » : 0 ; « \*\* » : 0,001 ; « \* » : 0,01 ; les facteurs responsables de moins de 0,5 % de la variabilité n'ont pas été pris en compte dans cette étude.

**Annexe n°14 : Pertes de poids (pertes d'eau) – Essai conservation/variétés – Moyenne des 3 répétitions biologiques sur les 2 années pour les 4 dates de prélèvement.**

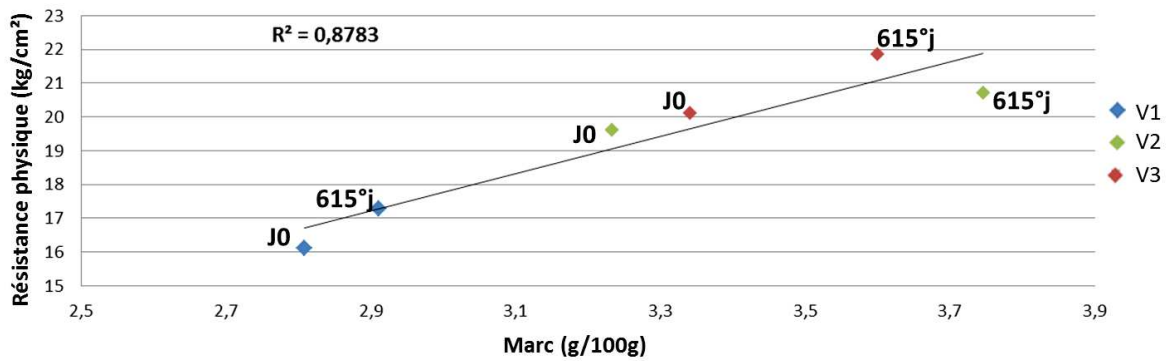


Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

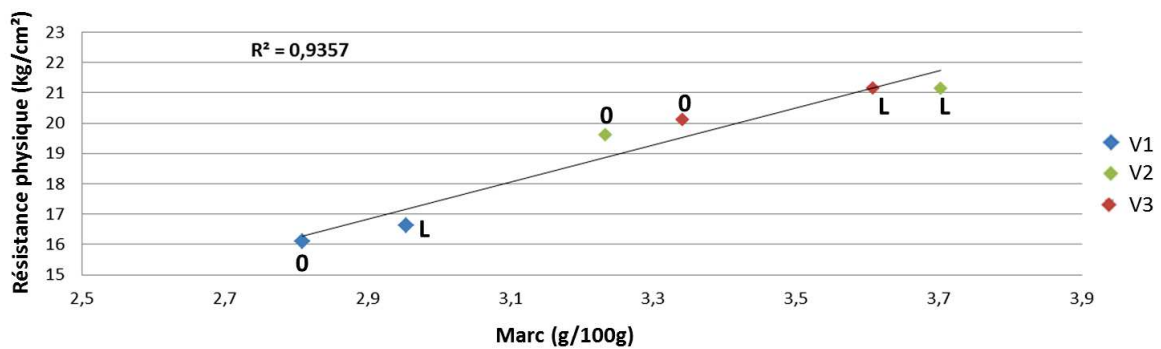
**Annexe n°15 : Corrélations entre la concentration en marc et la résistance physique - Essai conservation/variétés année 2 – Par lieu et par date, pour les 3 variétés.**



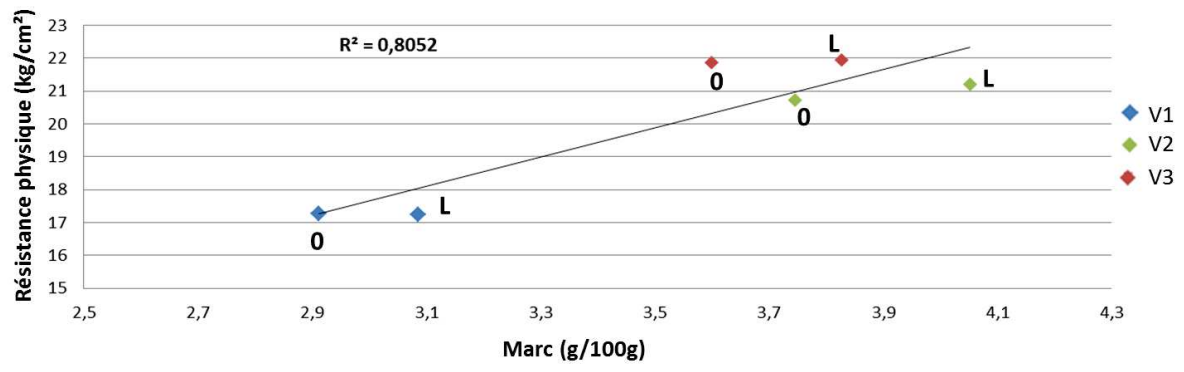
a) Site de Lillers – Jour de la récolte et fin de stockage.



b) Site d'Origny – Jour de la récolte et fin de stockage.

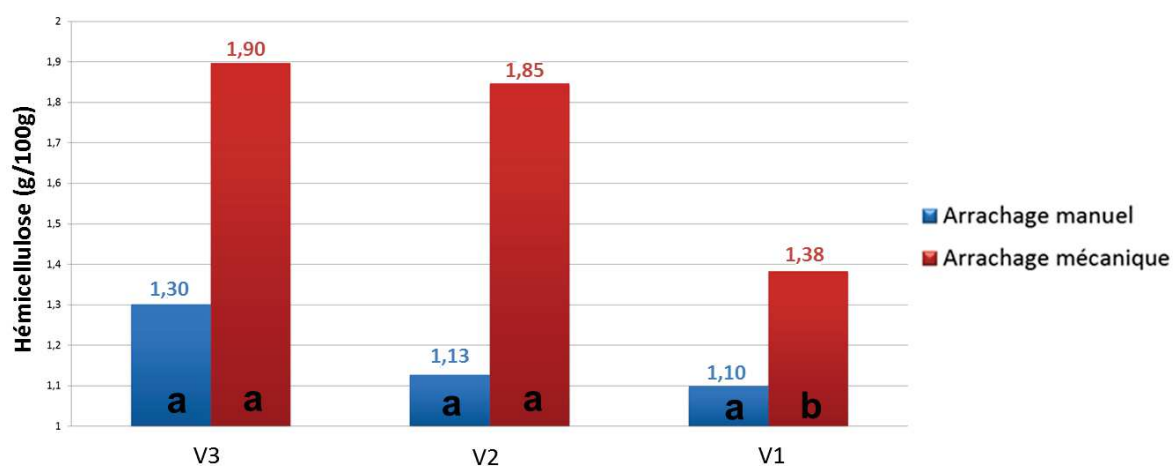


c) Le jour de la récolte – 2 sites.



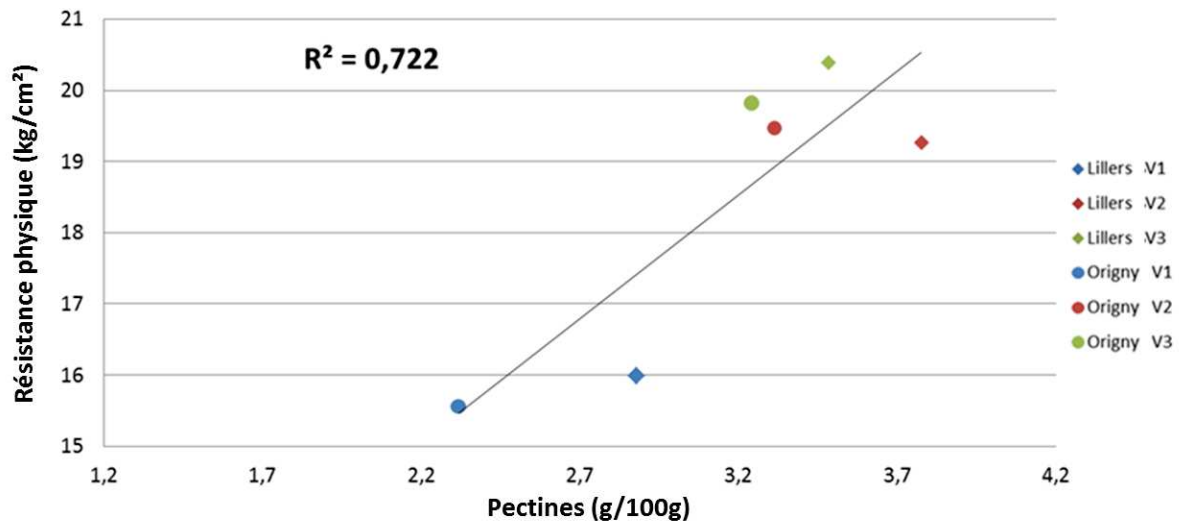
d) Fin de stockage – 2 sites.

**Annexe n°16 : Concentration en hémicellulose en fin de stockage – Essai conservation/variétés - Année 2 – Site de Lillers.**



Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

**Annexe n°17 : Corrélation entre la résistance physique et la concentration en pectines le jour de la récolte – Essai conservation/variété - Année 1.**



Remarque : L'effectif de racines défini pour les mesures de résistance physique était inférieur à celui de l'année 2, et la méthode d'analyse du marc (permettant d'obtenir les valeurs de pectines) était moins précise qu'en année 2.



## Annexe n°18 : Travail de recherche sur les bénéfices d'un apport en potassium.

### Intérêt d'un apport en potassium sur la conservation de la betterave



#### **I. Contexte**

- Comprendre l'action du potassium sur la betterave
- Identifier quels seraient les avantages d'un apport en potasse au champ pour la conservation de la betterave

#### **II. Recherche bibliographique**

Le potassium est un minéral majeur, indispensable au bon développement des plantes. Si l'ion  $K^+$  vient à manquer dans un sol, il est donc indispensable de combler le déficit par un apport potassique. Contrairement à d'autres cultures, la betterave peut se procurer l'ion  $K^+$  aisément grâce à la profondeur de sa racine.

Dans les pratiques culturales, on voit se développer l'usage d'apport en potasse afin de garantir le rendement et la qualité de certaines racines (betteraves rouges). Quelles seraient les conséquences d'une fertilisation potassique sur la conservation des racines de betterave sucrière pendant la période de stockage ?

Une recherche bibliographique a permis de regrouper plusieurs éléments de réponse, récapitulés dans le tableau n°1.

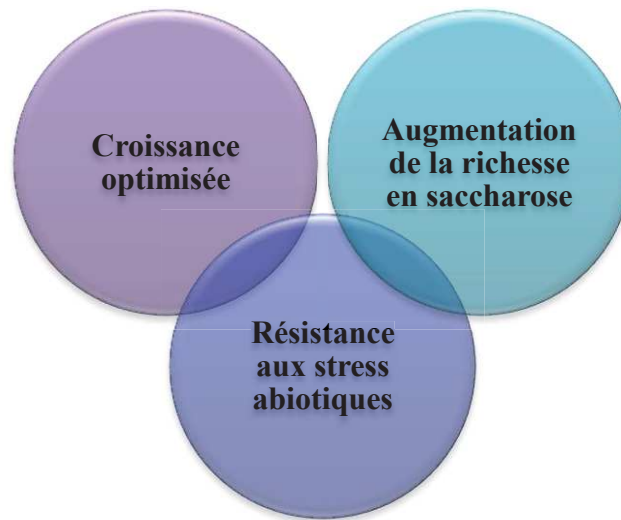
Chez la betterave sucrière, un apport en potassium aura des effets sur le long terme, avec des résultats mesurables 8 jours après le traitement. La teneur en potassium de la plante augmentera graduellement et pourra être doublée, voire triplée, avec une application de 10 mM.

#### **III. Intérêt pour la conservation des racines**

Les articles scientifiques suggèrent que l'augmentation de la concentration en potassium chez la betterave favorise le stockage du saccharose dans les racines en augmentant l'activité des pompes à protons qui alimentent le co-transport  $K^+$ / saccharose dans les vacuoles (voir la figure n°1). Si un apport en potassium augmente la concentration de saccharose dans les racines, cela signifie que les racines récoltées seront plus riches en entrée de stockage (voir la figure n°2). Les racines conserveront donc une quantité de saccharose plus importante en fin de stockage que sans apport de potassium, pour des conditions de stockage similaires.

Par ailleurs, d'autres articles mettent en évidence l'implication du potassium dans la protection des plantes face aux stress abiotiques comme le gel et la sécheresse. Le potassium maintient l'intégrité des membranes des cellules en participant à la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS :  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ). Il réduit l'activité de la NADPH oxydase, enzyme impliquée dans le transfert des électrons.

L'apport en potasse au champ pourrait être bénéfique à la conservation des racines de betteraves car :



#### **IV. Références**

**Conti T.R. and Geiger D.R.** (1982) Potassium nutrition and translocation in sugar beet, Plant Physiology, **70**, 168-172.

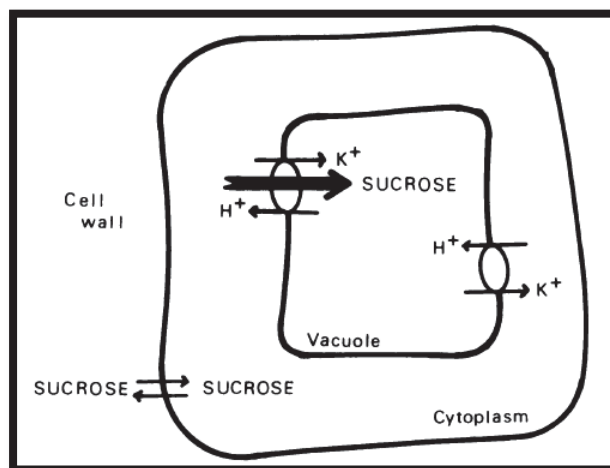
**Terry N. and Ulrich A.** (1973) Effects of potassium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet, Plant Physiology, **51**, 783-786.

**Saftner R.A. and Wyse R.E.** (1980) Alkali cation/sucrose co-transport in the root sink of sugar beet, Plant Physiology, **66**, 884-889.

**Cakmak I.** (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants, Journal Plant Nutrition and Soil Science, **168**, 521-530.

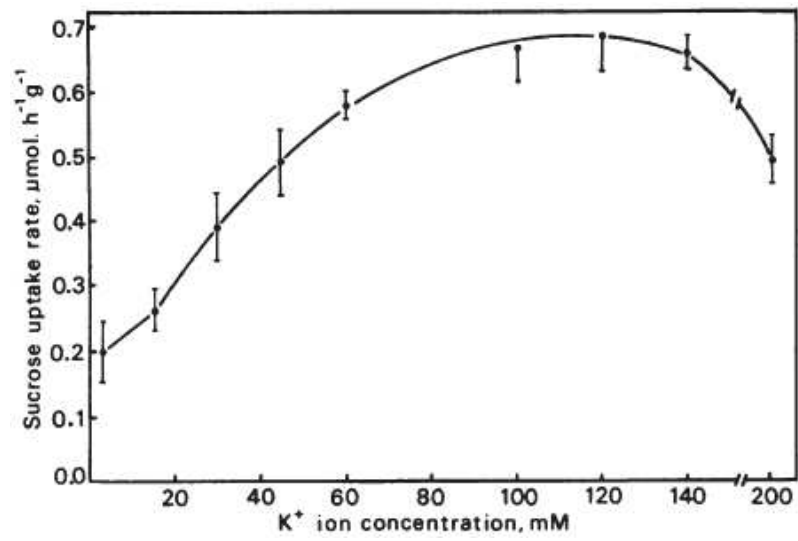
Déficience en $K^+$ (<0.5 mM)	Apport normal en $K^+$ (2 mM)	Augmentation $K^+$ (>10 mM)
Arrêt de l'expansion des feuilles	Contribution à la croissance et au développement foliaire	Accélération du développement foliaire : promotion de la division cellulaire et augmentation de l'expansion de la surface des feuilles
Diminution de la photosynthèse : fermeture des stomates, perte de chlorophylle (nécroses) et réduction de l'activité carboxylase (incorporation du $CO_2$ réduite)	Stimulation de la photosynthèse et régulation de la photo-respiration	Augmentation de l'activité photosynthétique : promotion des échanges gazeux et de l'incorporation du $CO_2$
Réduction de la synthèse des métabolites	Participation à la synthèse des métabolites : cofacteurs	Augmentation de l'apport en éléments carbonés aux feuilles en développement
Diminution de la teneur en saccharose dans la racine / Augmentation de la teneur en saccharose dans les feuilles	Transport des assimilats des feuilles jusqu'à la racine et stockage du saccharose dans les vacuoles des cellules de réserve de la racine via un co-transport	Augmentation de l'assimilation de saccharose dans les vacuoles de la racine ( $K^+$ à 95 mM : assimilation de saccharose 2 à 4 fois plus importante)

**Tableau n°1 : Récapitulatif des informations issues de la bibliographie.**



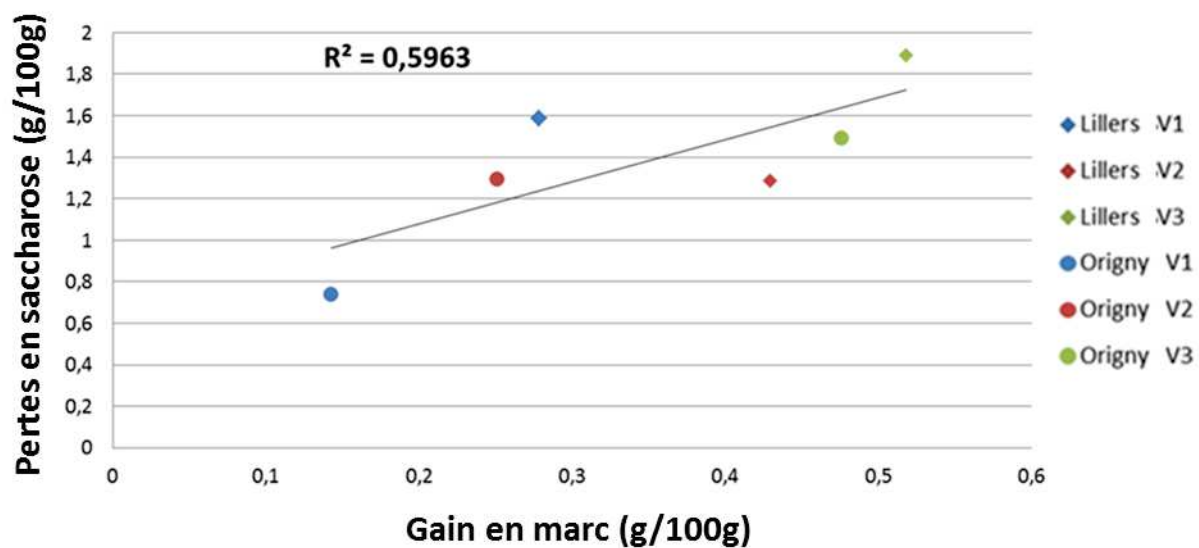
**Figure n°1 : Modèle du transport du saccharose dans la racine de betterave [Saftner and Wyse, (1980)].**

Le saccharose est conduit dans la vacuole grâce à un co-transport  $K^+$ /saccharose au niveau du tonoplaste. L'équilibre des cations est assuré par les pompes ioniques et les protéines de transport. Lorsqu'un ion  $K^+$  est transporté dans la vacuole pour le stockage du saccharose, l'équilibre interne de la cellule est ajusté par un échange avec un ion  $H^+$ .

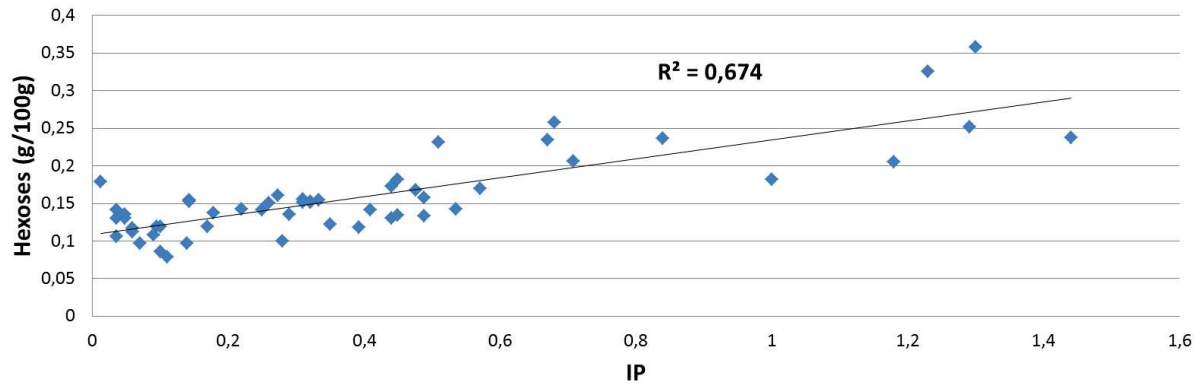


**Figure n°2** : Effet des concentrations en  $\text{K}^+$  sur le taux d'assimilation du saccharose dans la racine de betterave sucrière [Saftner and Wyse, (1980)].

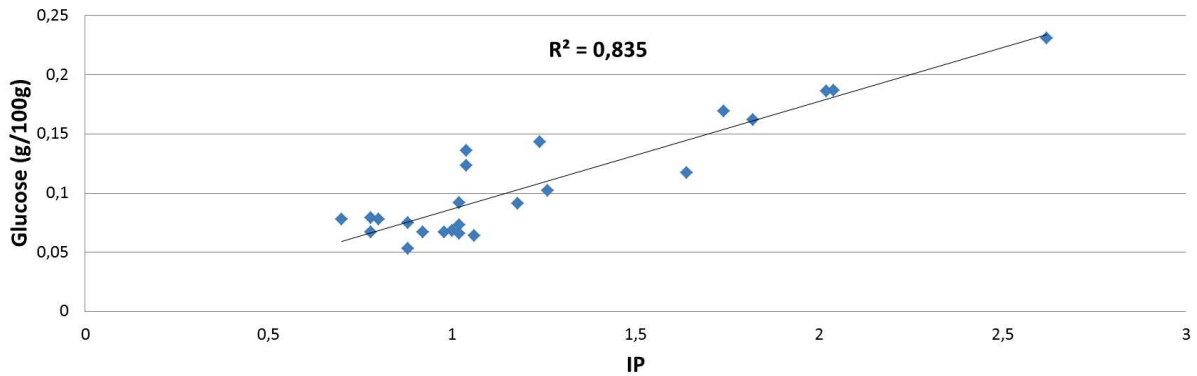
**Annexe n°19 : Corrélation entre la perte en sucre et le gain en marc – Essai conservation/variétés - Année 2.**



**Annexe n°20 : Corrélation entre la concentration en hexoses et l'IP au cours du stockage (de 250°j int à 500°j int) - Essai conservation/variétés - Année 2 – Arrachage mécanique - Regroupement des 2 sites.**

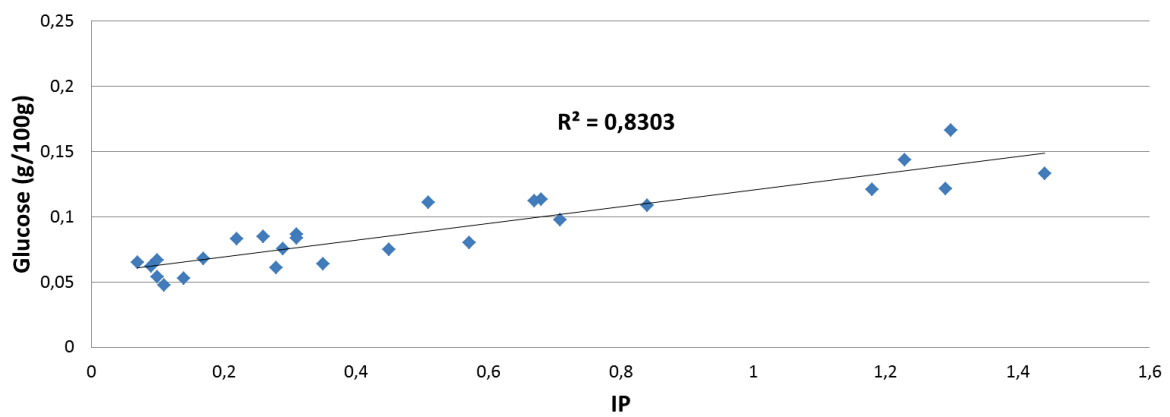


**Annexe n°21 : Corrélation entre le développement de pourriture et les concentrations en glucose ou fructose – Essai conservation/variétés et essai CLD d’Origny - Arrachage mécanique.**



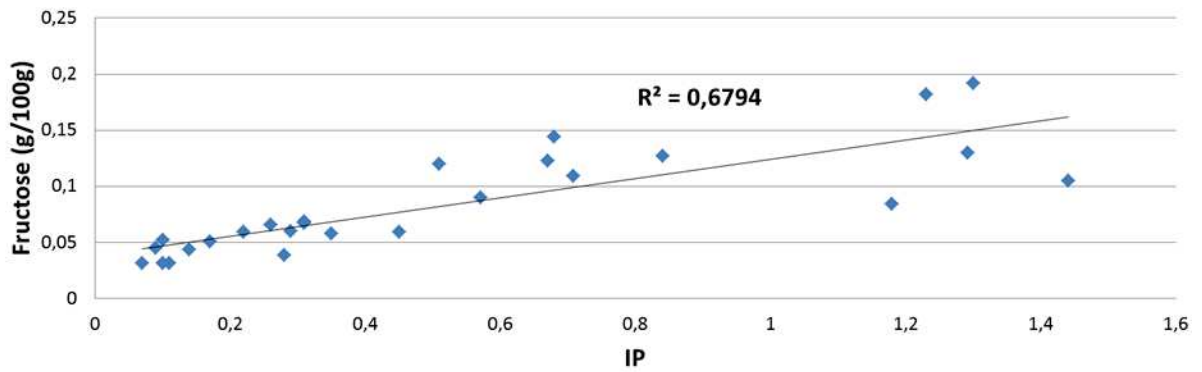
a) Glucose - Essai conservation/variétés - Année 1 – Lillers (site avec les IP les plus forts).

Résultats des prélèvements de 250°j et 730°j.



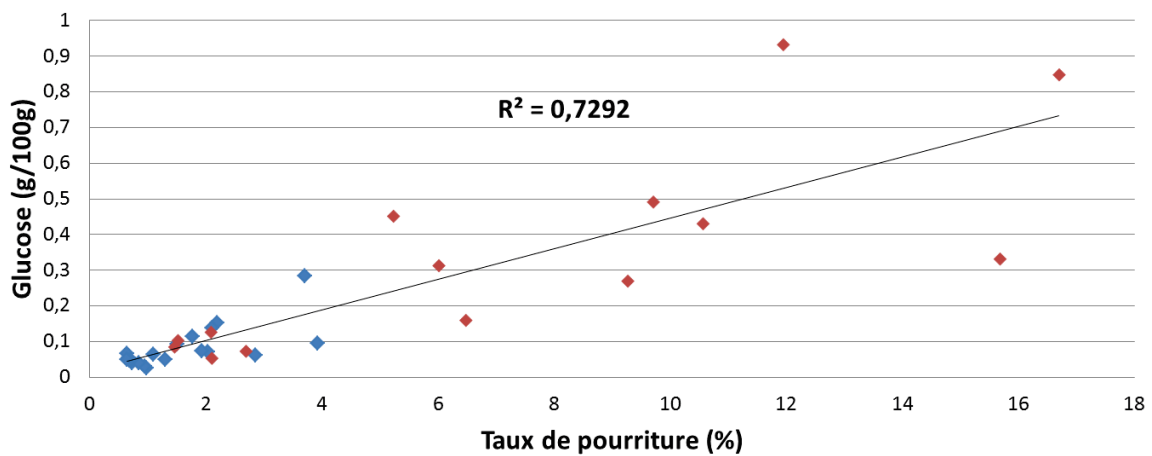
b) Glucose - Essai conservation/variétés - Année 2 – Origny (site avec les IP les plus forts).

Résultats des prélèvements de 250°j et 730°j.



c) Fructose - Essai conservation/variétés - Année 2 – Origny (site avec les IP les plus forts).

Résultats des prélèvements de 250°j et 730°j.

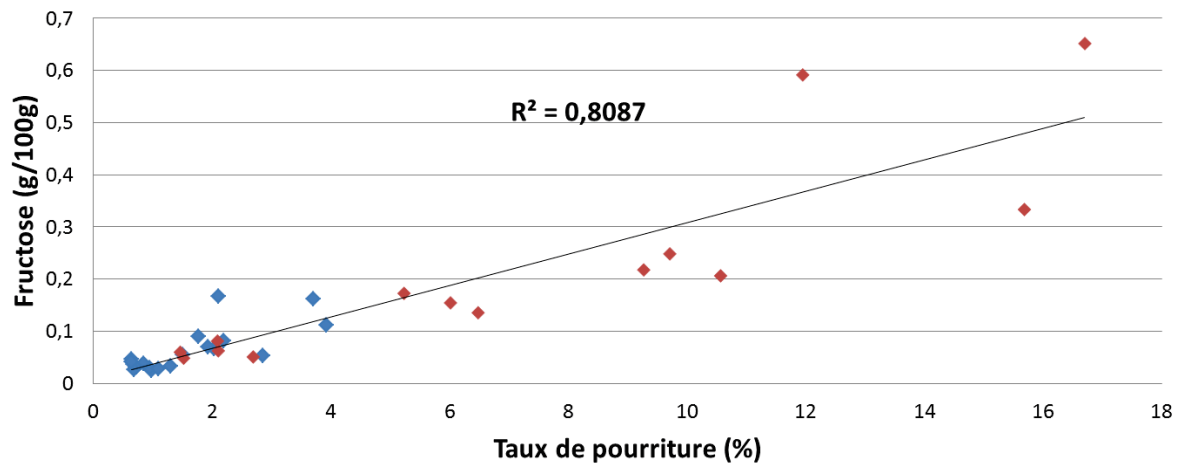


d) Glucose – Essai CLD d’Origny – Arrachage classique et agressif.

Arrachage classique ↔ losanges bleus.

Arrachage agressif ↔ losanges rouges.





e) Fructose – Essai CLD d’Origny – Arrachage classique et agressif.

Arrachage classique ↔ losanges bleus.

Arrachage agressif ↔ losanges rouges.

**Annexe n°22 : Photo du T25 Ultra Turrax (broyeur de laboratoire) utilisé pour le broyage des blocs de racines pour l'analyse des COV.**

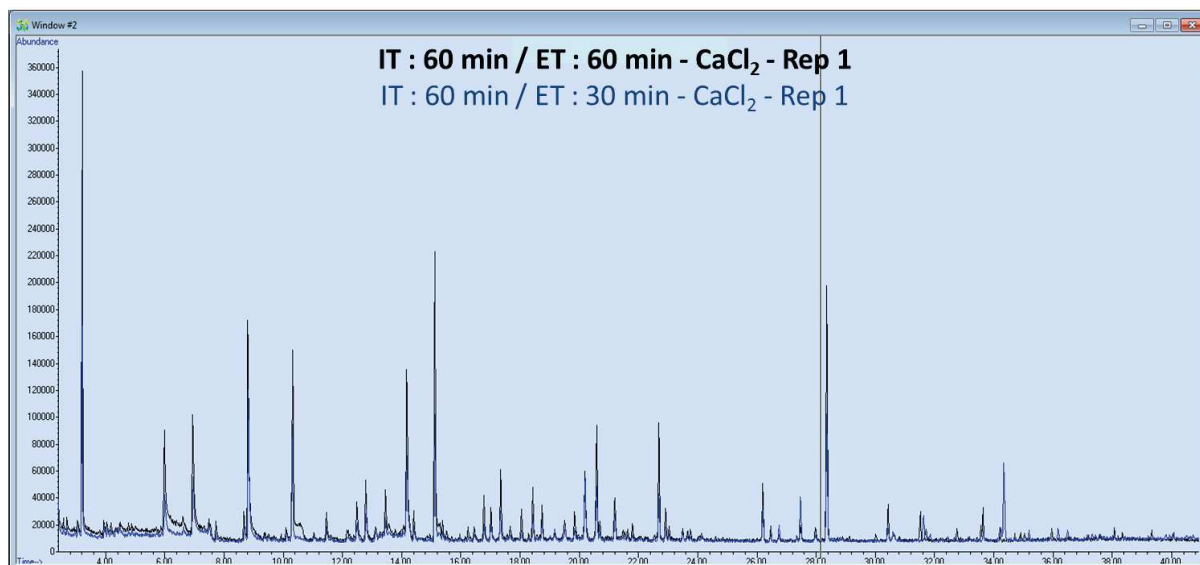


a) T25 digital Ultra Turrax  
[IKA].



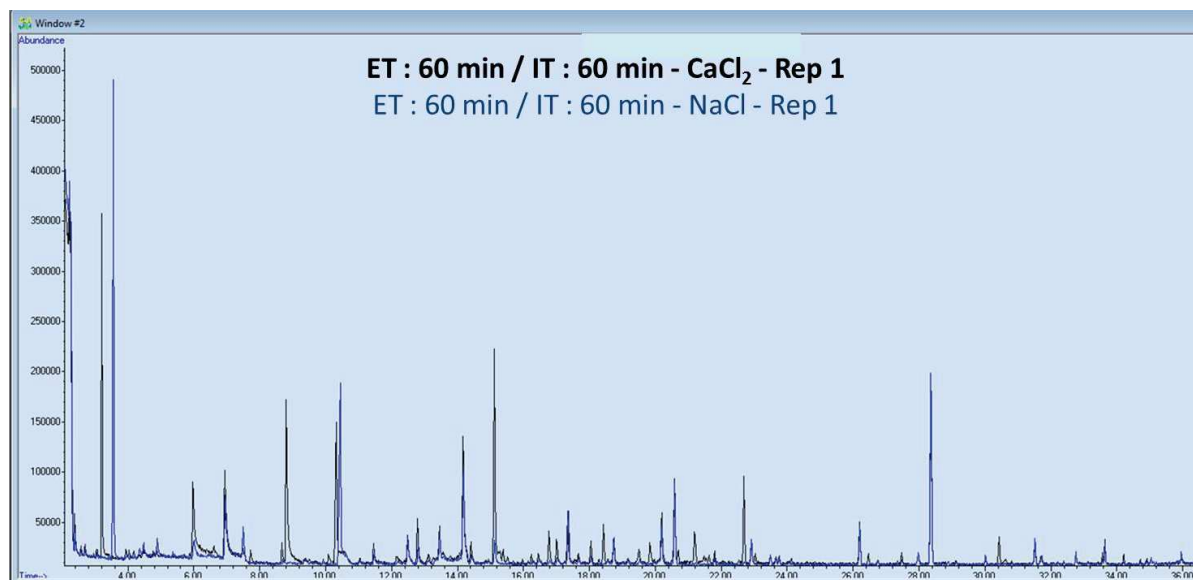
b) Échantillon de racines broyées.

**Annexe n°23 : Chromatogrammes issus de la première phase d'optimisation de l'analyse des COV.**



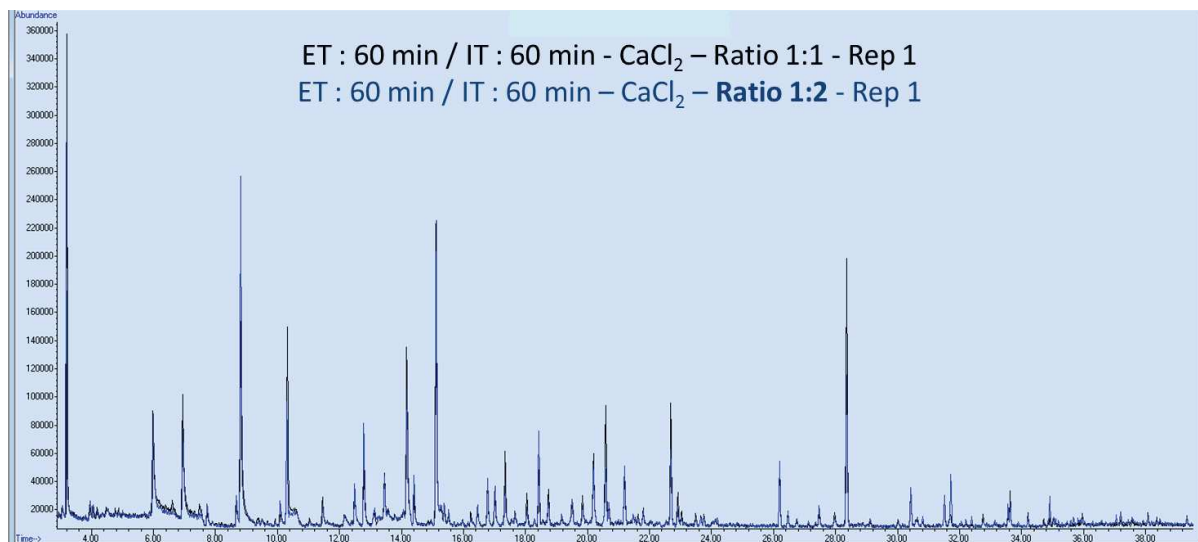
**a) Comparaison des temps d'extraction.**

Meilleure extraction avec un temps d'incubation (IT) de 60 minutes : pics plus élevés.



**b) Comparaison des deux solutions tampon.**

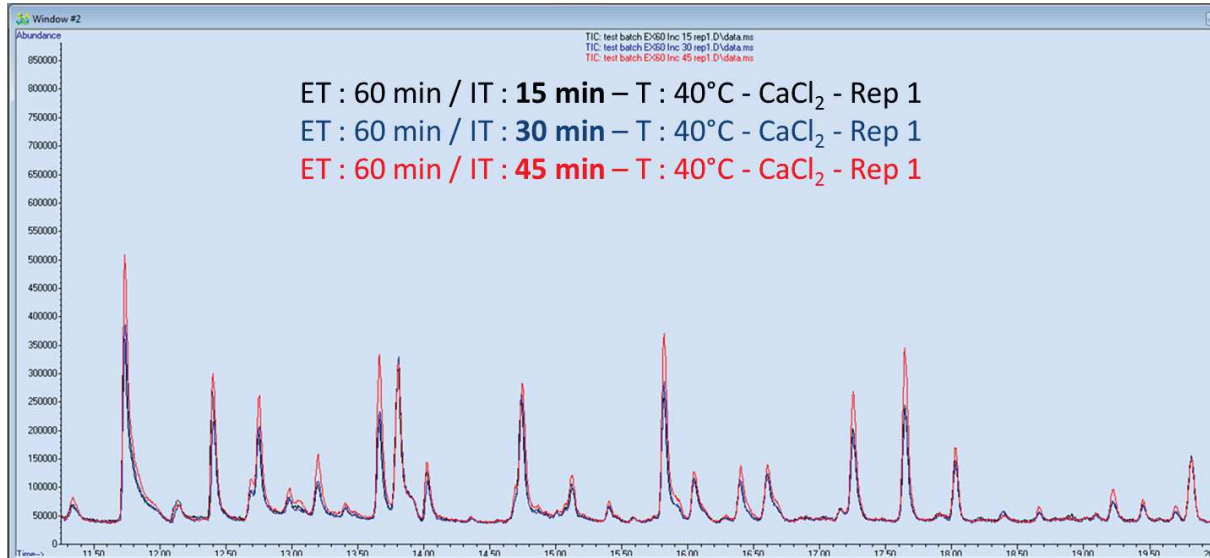
Meilleure extraction avec la solution de CaCl<sub>2</sub> : pics plus nombreux et plus élevés (quantité de COV détectée plus importante).



c) Comparaison des ratios échantillon/solution tampon.

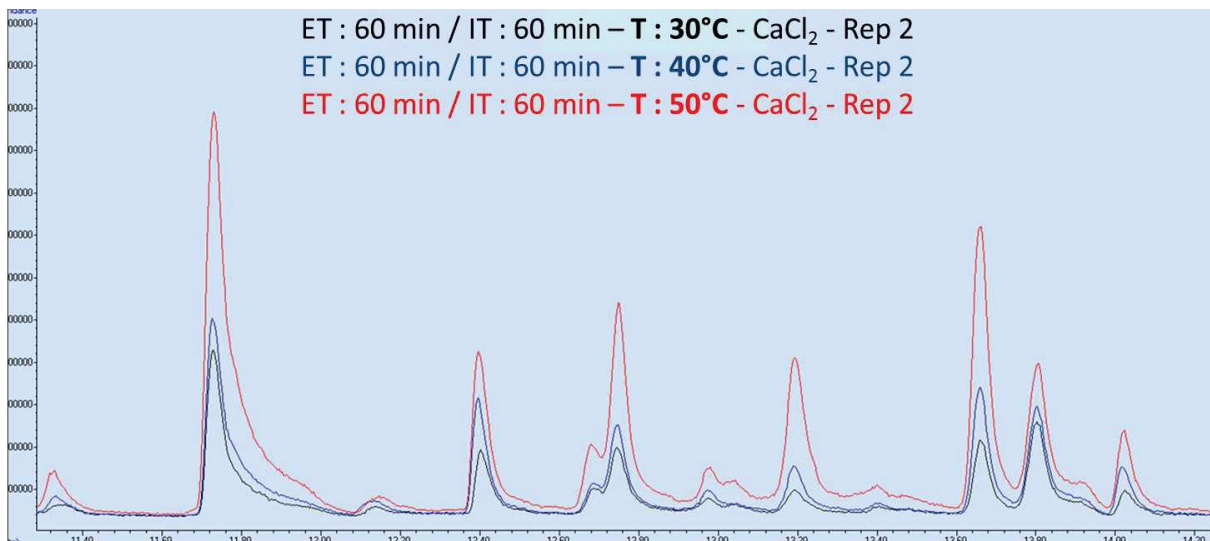
Extractions comparables → sélection du ratio 1:2 d'un point de vue pratique (facilité de prélèvement).

**Annexe n°24 : Chromatogrammes issus de la seconde phase d'optimisation de l'analyse des COV : l'incubation.**



**a) Optimisation de la durée d'incubation de l'échantillon.**

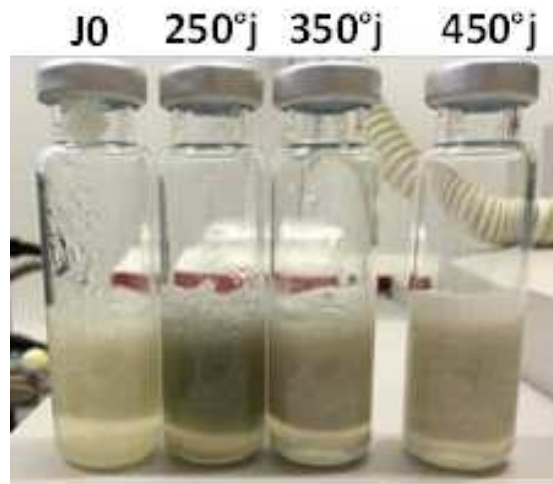
L'extraction semble optimale après 45 min d'incubation : pics plus élevés.



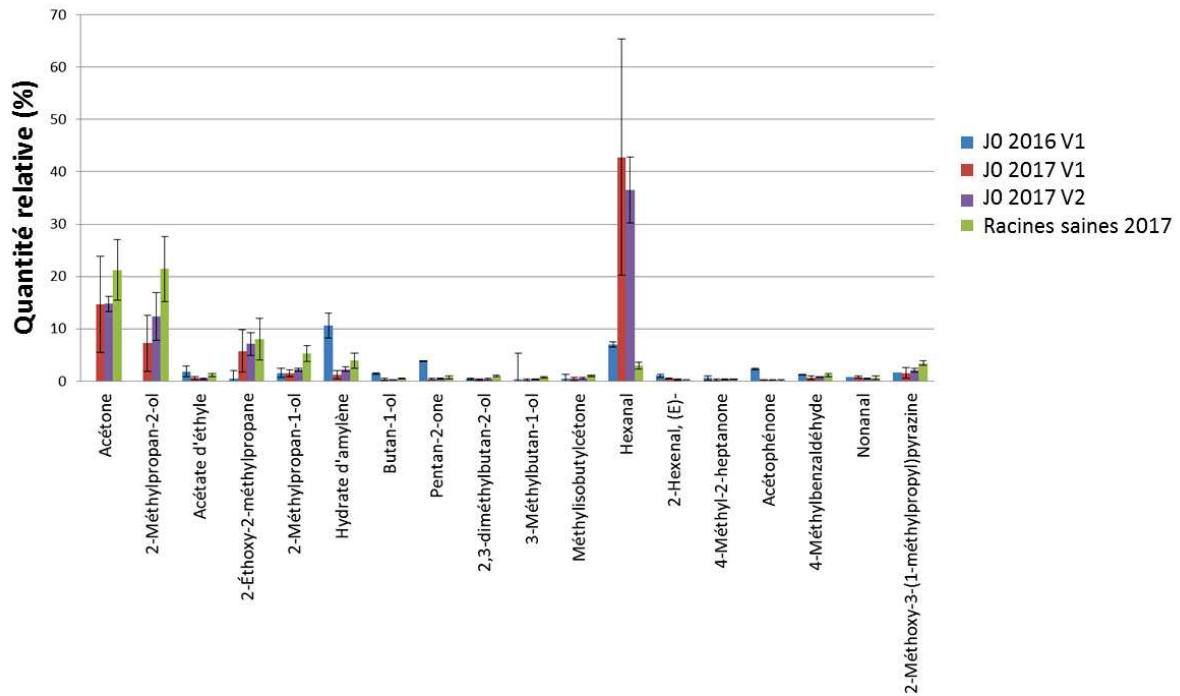
**b) Optimisation de la température d'incubation de l'échantillon.**

Pour un compromis entre la juste représentativité des COV et la quantité détectée, la température de 40°C semble optimale (risque d'oxydation à 50°C).

**Annexe n°25 : Analyse des COV dans le temps – Année 1 – Problème d'échantillonnage à 250°j int (oxydation importante).**

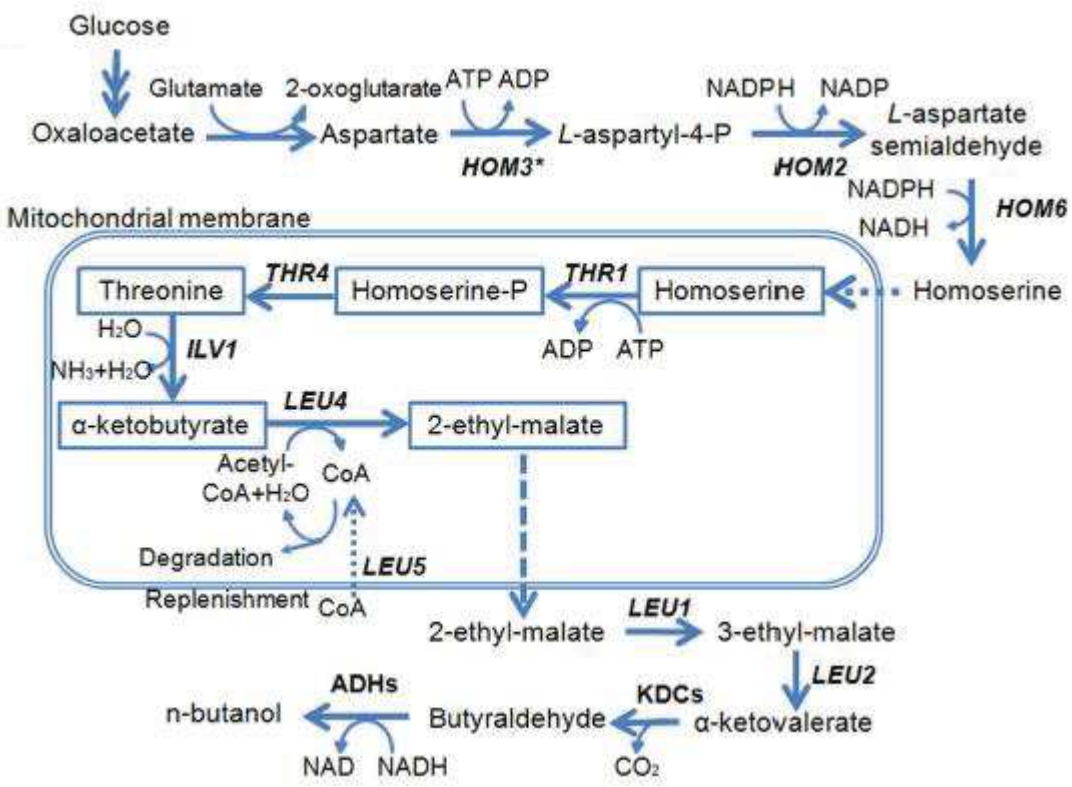


**Annexe n°26 : COV majoritaires des racines non dégradées (pas de pourriture apparente).**



Note : L'analyse des COV sur racines de betteraves est un projet nouveau. La méthode d'analyse a nécessité une intégration manuelle des pics résultant du chromatogramme. Pour ces raisons, les barres d'erreur ont été représentées sur les graphiques illustrant les résultats des analyses des COV. Elles représentent les écarts-types des mesures.

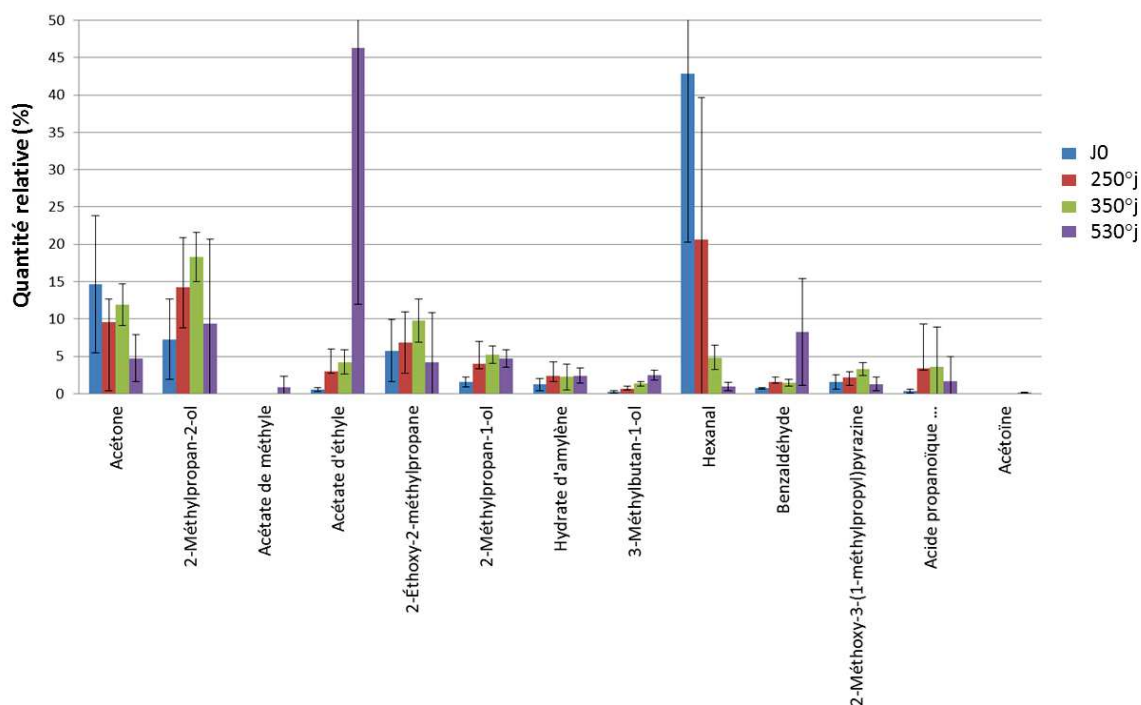
**Annexe n°27 : Schéma de la synthèse des n-butanol par *S. cerevisiae* – Métabolisme.**



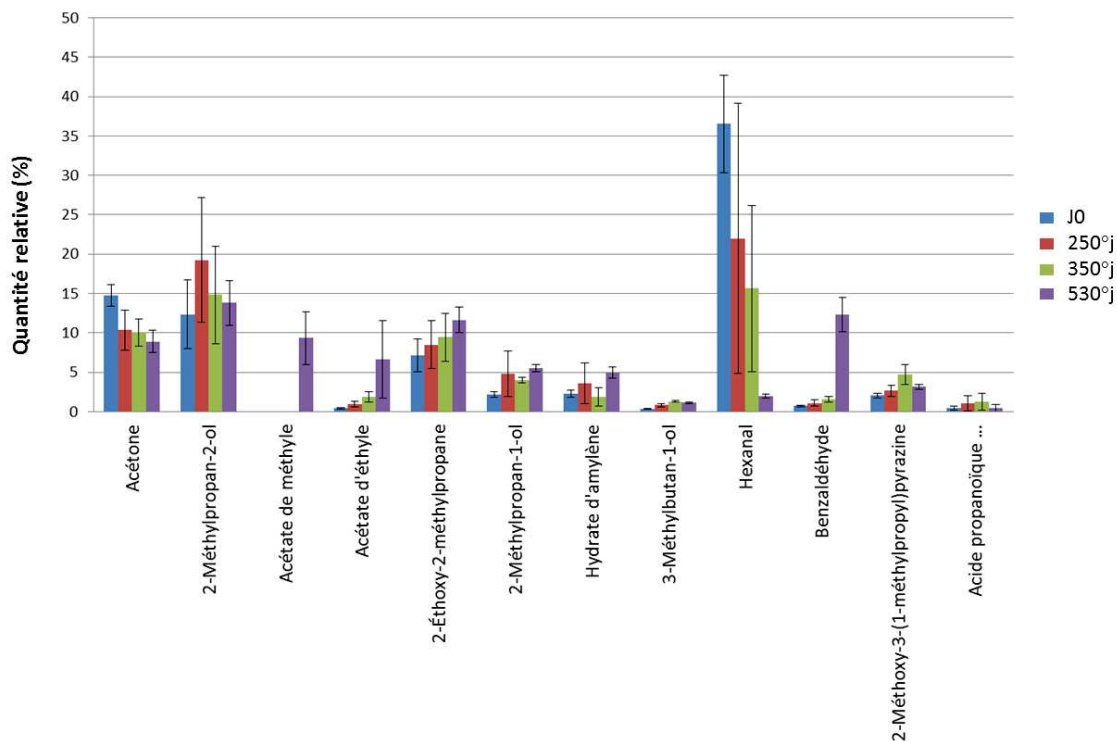
[Shi et al., 2016]



## Annexe n°28 : COV majoritaires au cours du stockage par variété – Année 2.



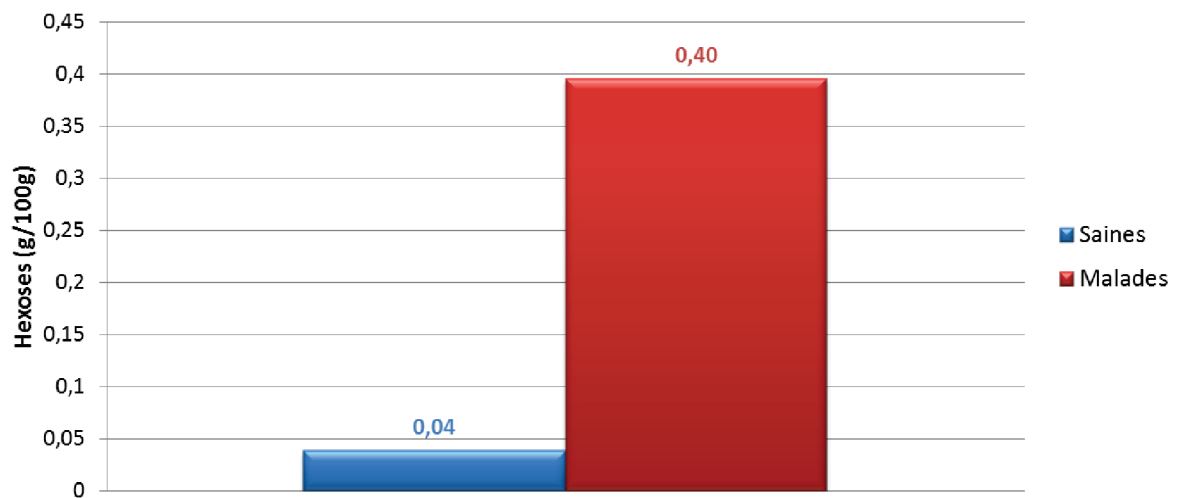
a) Variété 1.



b) Variété 2.

Note : - Acide propanoïque... ↔ 3-Hydroxy-2,4,4-triméthylpentyl, 2-méthylpropanoate  
 - Les barres d'erreur représentent les écarts-types des mesures.

**Annexe n°29 : Concentrations en hexoses des deux états sanitaires testés dans l'analyse des COV.**



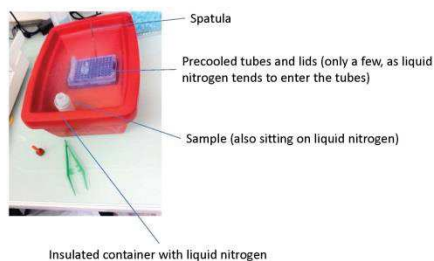
## Annexe n°30 : Protocols used for the metabolic analysis.

### a) Handling biological material

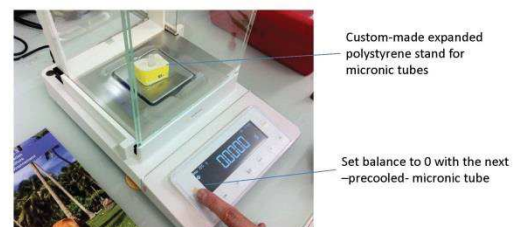
Enzymes are typically unstable and thus require careful handling of the biological material, from harvest to extraction and assay.

- **Harvesting samples.** This should be performed by shock freezing thin tissue slices into liquid nitrogen within seconds.
- **Transport.** Samples are transported in dedicated containers filled with liquid nitrogen or dry ice. The sender has to make sure that somebody will be able to take care of the samples at receipt.
- **Storage.** Samples should be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  or less
- **Grinding.** Samples should be ground at less than  $-60^{\circ}\text{C}$ .
- **Weighing aliquots.** Please follow the steps below!

#### Step 1



#### Step 2

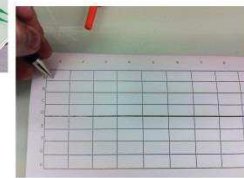
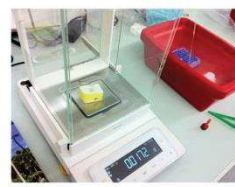


#### Step 3



Should take a couple of seconds!

#### Step 4



#### Step 5



Note that Guillaume (the guy on the pictures) did not wear gloves. He might have good reasons, but please, use your own security rules!

## b) Extraction of soluble enzymes

### Reagents

#### - Extraction Buffer 10X

- HEPES 500 mM
- MgCl<sub>2</sub> 100 mM
- EDTA 10 mM
- EGTA 10 mM
- Benzamidine 10 mM
- ε-Aminocaproic acid 10 mM
- 2.5% w/v BSA (protease free)

Put together these reagents in a 50 ml-Falcon tube and bring the volume to about 40 ml, adjust pH to 7.5 with KOH 10 M, then adjust the volume at 50 ml. Store at -20°C.

#### - Other

- Glycerol – 5X – As it.
- Triton-X100 10% v/v - 10X
- Leupeptin 2 mM - 100X - Freeze in liquid nitrogen and then store at -80°C
- PMSF 100 mM in isopropanol - 100X - Store at 4°C, protect from light, stable for 1 month
- DTT 500 mM - 1000X - Freeze in liquid nitrogen and then store at -80°C
- Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) - powder
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) – 10% w/v

### Protocol

In a Micronic tube, proceed as following

- #20 mg of fresh material - **keep frozen until the addition of the extraction buffer**
- A pinch of PVPP (#20 mg)
- **500 µl of Extraction Buffer**
  - 289.5 µl H<sub>2</sub>O
  - 100 µl Glycerol
  - 50 µl Extraction Buffer 10X
  - 50 µl Triton-X100
  - 50 µl PVP (only needed for phenol-rich material)
  - 5 µl Leupeptin
  - 5 µl PMSF
  - 0.5 µl DTT

Mix vigorously, on a vortex or shaker first, then on the Retsch mill at 20 Hz and 2 min. Centrifuge at 4,000 rpm (6,000 rpm for root samples) and at 4°C.

### c) Desalting of enzyme extracts

This step is necessary for the following enzymes: succinate dehydrogenase, cytochrome *c* oxidase, acid and neutral invertases (when sucrose is high)

#### Reagents

- **G25 medium coarse**
- **Desalting buffer:**
  - o Hepes/KOH 50 mM pH 7.5
  - o Triton-X100 or n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside 0.1% v/v

#### Other consumables

- **Filtration microplate:** 96-well filtration microplate (e.g., PD MultiTrap G-25; 600  $\mu$  per well)
- **Collection microplate:** standard polystyrene microplate

#### Protocol

- **G25 preparation**
  - o Fill each well with the dry gel (3 spoons)
  - o Cast filtration and collection microplates
  - o Add 500  $\mu$ l of desalting buffer
  - o Equilibrate with 100  $\mu$ l of desalting buffer then centrifuge 1 min at 800g and 4°C (2744 rpm in the Eppendorf centrifuge) – Repeat several times
- **Desalting**
  - o Add max 100  $\mu$ l extract on each well. For volume < 100  $\mu$ l, add a stacker volume of desalting buffer so that the total volume equals 100  $\mu$ l.
  - o Centrifuge the microplate at 800g and 4°C for 1 min
  - o Retrieve the extracts from the collection microplate

### d) Neutral Invertase

The extracts are prepared in BE Buffer. When sucrose content is high it is recommended to use a desalting step. The activity is usually low to average.

#### Reagents

- **Solutions**
  - o Hepes/KOH 0.25 M pH 7.5
  - o MgCl<sub>2</sub> M [RT]
  - o Sucrose M
  - o Triton X100 0.15%
  - o Hepes/KOH 1M pH 7.0, MgCl<sub>2</sub> 30mM,
  - o NADP<sup>+</sup> 20 mM
  - o ATP 100 mM
  - o G6PDH grade II (5  $\mu$ l suspension for one microplate )
  - o Hexokinase (60  $\mu$ l suspension for one microplate )
  - o Phosphoglucose isomerase (30  $\mu$ l suspension for one microplate)

Mix the three enzymes and remove the ammonium sulphate supernatant after 2 min at 13400 rpm  
Dissolve the pellet in 200 $\mu$ l of Hepes/KOH 50mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 30mM

#### Protocol

In a microplate pipette as following:

- **95  $\mu$ l Assay Mix:**
  - o 5  $\mu$ l Hepes/KOH 1M pH 7.5
  - o 0.2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 1M
  - o 2  $\mu$ l ATP 100mM
  - o 2  $\mu$ l NADP<sup>+</sup> 20mM
  - o 83  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

- 1  $\mu\text{l}$  Mix G6PDH / PGI / HK
- **2  $\mu\text{l}$  Sucrose M or H<sub>2</sub>O**
- 5  $\mu\text{l}$  extract

Mix, read the absorbance at 340 nm and at 25°C, until rate stabilises

### e) Sucrose Phosphate Synthase

Check the recovery of UDP!

**Citation:** John Lunn (the assay has been optimised for cereals).

#### Reagents

- **Assay Buffer 5X [-20°C]**
  - HEPES/KOH 0.25 M pH 7.5
  - MgCl<sub>2</sub> 50 mM
  - Triton X100 0.25% v/v
- **Additional reagents:**
  - UDP-Glucose 300 mM [-80°C]
  - Fructose-6P 50 mM [-80°C]
  - Glucose-6P 175 mM [-80°C]
  - HCl 0.5 M/0.1 M Tricine/KOH pH 9 [RT]
  - NaOH 0.5 M [RT]
  - NADH 60 mM in 60 mM NaOH [-80°C]
  - Phosphoenolpyruvate 200 mM
  - Lactate dehydrogenase 200 u.ml<sup>-1</sup> in 1X assay buffer (has to be fresh!)
  - Pyruvate kinase 500 u.ml<sup>-1</sup> in 1X assay buffer
  - UDP SD – 0-1-2-5 mM in extraction buffer

#### Protocol :

In a microplate pipette as following:

- 2  $\mu\text{l}$  extract (Final is **FW/1000**)
- 18  $\mu\text{l}$  **Assay Mix:**
  - 8  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O
  - 4  $\mu\text{l}$  Assay Buffer 5X
  - 2  $\mu\text{l}$  UDP-Glucose
  - 2  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (V<sub>blank</sub>) or Fructose-6P (V<sub>Sat</sub>)
  - 2  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (V<sub>blank</sub>) or Glucose-6P (V<sub>Sat</sub>)

Incubate for 40 min then stop with

- 20  $\mu\text{l}$  HCl 0.5 M/0.1 M Tricine/KOH pH 9

Then, add (immediately after storing at 4°C)

- 20  $\mu\text{l}$  of NaOH 0.5M
- 50  $\mu\text{l}$  of determination mix
  - 30.3  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O
  - 16  $\mu\text{l}$  assay buffer 5X
  - 0.7  $\mu\text{l}$  NADH
  - 1.5  $\mu\text{l}$  phosphoenolpyruvate
  - 1.5  $\mu\text{l}$  lactate dehydrogenase

Read the absorbance at 340 nm until stabilised, and then add

- 2  $\mu\text{l}$  of pyruvate kinase

## f) Sucrose Synthase

This assay has been optimised for maize. Check the recovery of UDP!

**Citation:** John Lunn

### Reagents

- **Assay Buffer 5X [-20°C]**
  - o Hepes/KOH 0.25 M pH 7.5
  - o MgCl<sub>2</sub> 50 mM
  - o Triton X100 0.25% v/v
- **Additional reagents:**
  - o UDP-Glucose 20 mM [-80°C]
  - o Fructose 200 mM [-80°C]
  - o HCl 0.5 M/0.1 M Tricine/KOH pH 9 [RT]
  - o NaOH 0.5 M [RT]
  - o NADH 60 mM in 60 mM NaOH [-80°C]
  - o Phosphoenolpyruvate 200 mM
  - o Lactate dehydrogenase 200 u.ml<sup>-1</sup> in 1X reaction buffer (has to be fresh!)
  - o Pyruvate kinase 500 u.ml<sup>-1</sup> in 1X reaction buffer
  - o UDP SD – 0-1-2-5 mM in extraction buffer

### Protocol

In a microplate pipette as following:

- 2 µl extract (Final is **FW/1000**)
- 18 µl **Assay Mix:**
  - o 10 µl H<sub>2</sub>O
  - o 4 µl Assay Buffer 5X
  - o 2 µl Fructose 200 mM
  - o 2 µl H<sub>2</sub>O (V<sub>blank</sub>) or UDP-Glucose 20mM (V<sub>Sat</sub>)

Incubate for 40 min then stop with

- 20 µl HCl 0.5 M/0.1 M Tricine/KOH pH 9

Then, add (immediately after storing at 4°C)

- 20 µl of NaOH 0.5M
- 50 µl of determination mix
  - o 30.3 µl H<sub>2</sub>O
  - o 16 µl assay buffer 5X
  - o 0.7 µl NADH
  - o 1.5 µl phosphoenolpyruvate
  - o 1.5 µl lactate dehydrogenase

Read the absorbance at 340 nm until stabilised, and then add

- 2 µl of pyruvate kinase

## g) Acid invertase

To measure the activity of the Cell Wall Invertase, the extraction buffer needs to include 250 mM sorbitol and extracts to be vigorously shaken (for example by casting Micronic tubes in the Retsch Mill and shaking for 5 min at full speed) before running the assay.

### Solutions

- **Assay mix 5X [-20°C]**

- Acetate/KOH 0.25 M pH 5

*When starting with the powder, calibrate first the pH of acetate and then add sucrose and triton X100!*

- Sucrose 100 mM
- Triton X100 0.15%

- **Determination: mix 5X [-20°C]**

- Hepes/KOH 1M pH 7.0, MgCl<sub>2</sub> 30mM, **dilute 1/10 before use**

- **Determination: additional reagents 100X [-80°C]**

- G6PDH grade II (Roche) 50 u.ml<sup>-1</sup> in 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl<sub>2</sub> [-80°C]
- NADP<sup>+</sup> 20mM
- ATP 100 mM
- Hexokinase (120 µl suspension dissolved in 200 µl Hepes/KOH 0.1M MgCl<sub>2</sub> 3mM, after centrifugation)
- Phosphoglucose isomerase (60 µl suspension dissolved in 200 µl Hepes/KOH 0.1M MgCl<sub>2</sub> 3mM, after centrifugation)

- **Standards 2X [-80°C]**

- Glucose 0-0.2-0.5-1 mM in extraction buffer. Not necessarily needed.

### Protocol

In a microplate pipette as following:

- 45 µl **Assay Mix:**
  - 10 µl assay mix 5X
  - 35 µl H<sub>2</sub>O
- 5 µl extract (**FW/50**)

Mix, incubate at 25°C for 5 **and** 40 min, then

- 30 µl Imidazole 4M pH7,6
- Mix, incubate at 98°C. for 10 min, then

Then

- **Determination Mix (100µl):**

- 15.5 ml Hepes/KOH 0.1M MgCl<sub>2</sub> 3mM
- 480 µl ATP
- 480 µl NADP
- 80 µl G6PDH (remove the ammonium sulphate supernatant after 2 min at 13400 rpm)

Mix, read the absorbance at 340 nm until stabilised (#5 min), then add

- 1 µl Hexokinase
- 1 µl Phosphoglucose isomerase

Enzyme can be added sequentially or together. Sequential addition allows to check whether the amount of glucose and fructose released by invertase are identical (they should be).



## Annexe n°31 : Fiche technique de Serenade (1<sup>ère</sup> page).

**SERENADE MAX est une préparation utilisable en agriculture conventionnelle ou en agriculture biologique, pour le contrôle de nombreuses maladies des plantes dues à des bactéries ou des champignons.**

**Conditionnement(s)**  
Sac 5 kg

**Fiche d'identité**

**Composition :**

**Formulation :** poudre mouillable

**Numéro AMM :** 2100162

**Détenteur d'homologation :** Bayer SAS  
Division Crop Science - 16, rue Jean-Marie  
Leclair - CS 90106 - 69266 Lyon Cedex 09  
France

**Substance Organique :** bacillus subtilis QST 713  
Teneur : 156,7g/kg  
Organisme : bactérie  
Mode d'action : Action fongistatique et fongitoxique par rupture des hyphes lors du contact à la surface des feuilles avec les champignons phytopathogènes. B. subtilis induit une réponse de résistance systémique chez les plantes, indiquée notamment par une production accrue de peroxydase.

**Description**

SERENADE MAX est une préparation à base de bactéries (Bacillus subtilis QST 713). Ces bactéries et les composés naturels qu'elles produisent lui confèrent une activité de stimulateur des défenses naturelles, préventive et à large spectre. SERENADE MAX doit être intégré à des programmes de traitement fongicides et/ou bactéricides, en alternance ou en association avec d'autres spécialités homologuées, après s'être assuré de leur compatibilité et de l'absence de phytotoxicité.

**Préparation**

**Préparation de la bouillie**

Avant de commencer le remplissage de la cuve pour préparer la bouillie avec SERENADE MAX, s'assurer qu'elle ne contient aucun résidu liquide ou solide d'un traitement précédent. SERENADE MAX peut être utilisé dans des volumes de bouillie de 100 à 1000 l d'eau à l'hectare. Verser SERENADE MAX dans la cuve du pulvérisateur empli au moins au tiers, le système d'agitation étant en fonctionnement. Compléter avec la quantité d'eau nécessaire. Attendre quelques minutes la mise en suspension complète du produit avant de réaliser la pulvérisation. L'agitateur doit rester en fonctionnement pendant le trajet et jusqu'à la fin de la pulvérisation afin d'assurer une agitation permanente, nécessaire pour maintenir le produit en suspension. Appliquer la bouillie immédiatement après sa préparation.

**Mélange et compatibilité**

Les mélanges doivent être mis en oeuvre conformément à la réglementation en vigueur. Pour connaître le détail pratique de cette mise en oeuvre, il est nécessaire de contacter au préalable le 0 800 25 35 45

**Traitement**

Voir en fin de fiche, après le Tableau des usages

**Précautions à prendre**

**Pour le stockage**

Ne pas stocker la préparation à une température supérieure à 40°C.  
- Conserver le produit dans son emballage d'origine, dans des locaux fermés à clé, à l'écart de tout aliment et boisson y compris ceux pour les animaux, et hors de portée des enfants. Les locaux doivent être frais et ventilés.

**Mesure de protection des individus**

Opérateur pendant le mélange/chargement  
- Gants en nitrile certifiés EN 374-3  
- Combinaison de travail en polyester 65 %/coton 35 % avec un grammage de 230 g/m<sup>2</sup> ou plus avec traitement déperlant  
- EPI partiel (blouse ou tablier à manches longues) de catégorie III et de type PB (3) à porter par-dessus la combinaison précitée  
- Protections respiratoires certifiées : demi-masque certifié (EN 140) équipé d'un filtre P3 (EN143) ou A2P3 (EN 14387)  
Usages plein champ:  
Pendant l'application - Pulvérisation vers le bas  
Si application avec tracteur avec cabine :  
- Combinaison de travail en polyester 65 %/coton 35 % avec un grammage d'au moins 230 g/m<sup>2</sup> avec traitement déperlant  
- Gants en nitrile certifiés EN 374-2 à usage unique, dans le cas d'une intervention sur le matériel pendant la phase de pulvérisation. Dans ce cas, les gants ne doivent être portés qu'à l'extérieur de la cabine et doivent être stockés après utilisation à l'extérieur de la cabine  
Si application avec tracteur sans cabine :  
- Combinaison de travail en polyester 65 %/coton 35 % avec un grammage d'au moins 230 g/m<sup>2</sup> avec traitement déperlant  
- Gants en nitrile certifiés EN 374-2 à usage unique, dans le cas d'une intervention sur le matériel pendant la phase de pulvérisation  
- En cas d'exposition aux gouttelettes pulvérisées, porter un demi-masque filtrant à particules (EN 149) ou un demi-masque (EN 140) équipé d'un filtre à particules P3 (EN 143)  
Pendant l'application - Pulvérisation vers le haut  
Si application avec tracteur avec cabine  
- Combinaison de travail en polyester 65 %/coton 35 % avec un grammage d'au moins 230 g/m<sup>2</sup> avec traitement déperlant  
- Gants en nitrile certifiés EN 374-2 à usage unique, dans le cas d'une intervention sur le matériel pendant la phase de pulvérisation. Dans ce cas, les gants ne doivent être portés qu'à l'extérieur de la cabine et doivent être stockés après utilisation à l'extérieur de la cabine  
Si application avec tracteur sans cabine :  
- Combinaison de protection de catégorie III type 4 avec capuche  
- Gants en nitrile certifiés EN 374-2 à usage unique pendant l'application et dans le cas d'une intervention sur le matériel pendant la phase de pulvérisation  
- En cas d'exposition aux gouttelettes pulvérisées, porter un demi-masque filtrant à particules (EN 149) ou un demi-masque (EN 140) équipé d'un filtre à particules A2P3 (EN 14387)  
Usages sous serre:

**PRODUITS POUR LES PROFESSIONNELS : UTILISEZ LES PRODUITS PHYTOPHARMACEUTIQUES AVEC PRÉCAUTION. AVANT TOUTE UTILISATION, LISEZ L'ÉTIQUETTE ET LES INFORMATIONS CONCERNANT LE PRODUIT.**

## Annexe n°32 : Fiche technique du BION 50 WG (1<sup>ère</sup> page).



syngenta.

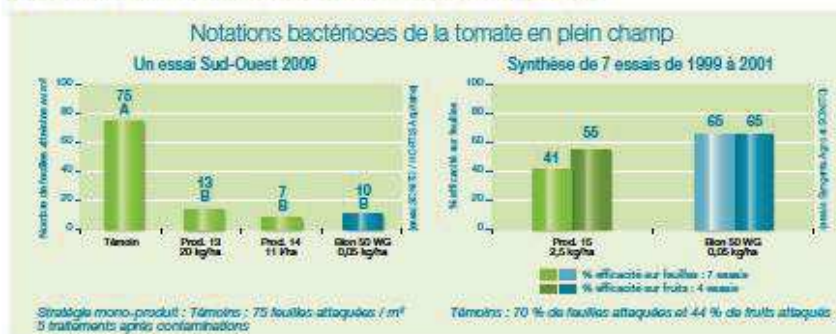
### Le Stimulateur des Défenses Naturelles de la plante (SDN)

Bion 50 WG, la solution pour une culture plus résistante et saine. Il permet d'assurer une récolte maximisée et de haute qualité.

#### Actif contre les bactérioses

- La substance active de Bion 50 WG, l'**acibenzolar-S-méthyl** est un analogue de l'**acide salicylique**, une substance naturellement produite par les plantes qui initie des réactions de défenses contre divers agresseurs. Stimulant les défenses naturelles, Bion 50 WG doit être appliqué en préventif dans le programme de protection.
- Bion 50 WG protège la production de tomates de plein champ contre les bactérioses (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) en rendant la plante plus résistante.

#### Résultats d'essais bactérioses 2009



#### Recommandations d'utilisation / Préconisations

- Dose : 0,05 kg/ha maximum par application.
- Nombre d'applications maximales : 6.
- Délai avant récolte : 3 jours.
- Assurer 4 applications successives.
- Garder une cadence de 7 à 10 jours entre les applications.
- Adapter le nombre d'applications en fonction de la pression de bactériose.
- Compléter et adapter les programmes de protection avec Bion 50 WG selon les recommandations régionales.

**Bion 50 WG représente une solution complémentaire de protection pour la culture de la tomate d'industrie avec une technologie prouvée qui active les réactions des défenses naturelles de la plante.**

## Annexe n°33 : Travail de recherche sur les effets d'un apport en silicium.

### Intérêt d'un apport en silicium pour la conservation de la betterave



#### **I. Contexte**

- Comprendre l'action du silicium sur la betterave
- Identifier quels seraient les avantages d'un apport en silicium au champ pour la conservation de la betterave

#### **II. Le silicium chez les plantes**

Dans la nature, le silicium est présent sous forme de silice ( $\text{SiO}_2$ - 50 à 400 g/kg de terre) et assimilé par les plantes sous forme d'acide silicique ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) ou de silicate ( $\text{Si}(\text{OH})_3\text{O}^-$ ).

Rôles du silicium	Mécanismes d'action	Bénéfices
Épaississement des structures cellulaires	Création de liaisons électrostatiques avec le calcium et les pectines des parois	Résistance aux chocs mécaniques
		Réductions des contaminations microbiologiques
Amélioration de l'utilisation de la lumière par la plante	Augmentation de la concentration en chlorophylle et de la Rubisco*	Réduction des pertes en eau
Stimulateur des défenses naturelles	Activation des chitinases** et peroxydases***	Augmentation de l'activité photosynthétique : ↗ production de saccharose
		Meilleure réactivité des défenses de la plante en cas de stress ou de maladies

\*Rubisco : Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase – Enzyme responsable de la synthèse des éléments carbonés

\*\*Chitinases : Enzymes de défense de la plante responsables de la dégradation des parois des champignons

\*\*\*Peroxydases : Enzymes de défense de la plante impliquées dans l'élimination des composés toxiques.

#### **III. Références bibliographiques**

Curry H.A. and Perry C.C. (2007) Silica in plants : Biological, Biochemical and Chemical studies, *Annals of Botany*, **100**, 1383-1389.

Ma J.F (2004) Role of Silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses, *Soil Science and Plant Nutrition*, **50**, 11-18.

Ma J.F. and Miyake Y. (2001) Chapter 2 Silicon as a beneficial element for crop plants, *Studies in Plant Science*, **8**, 17-39.

Ma J.F. and Yamaji N. (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants, *Trends in Plant Science*, **11**, 392-397.



## Annexe n°34 : Fiche technique de Siliforce (1<sup>ère</sup> page).



**SILIFORCE**  
protection & prevention  
*L'assurance naturelle pour votre récolte*

*Pour une meilleure et plus saine nutrition*

### SILIFORCE

**SILIFORCE** est un engrais liquide utilisable en pulvérisation et en fertigation composé de silicium 100% bio disponible. **SILIFORCE** répond aux normes CE concernant les engrais.  
**SILIFORCE** est utilisable en agriculture biologique conformément au règlement CE N° 2092/91 EECERT dossier n° 1694.

- Augmente la résistance aux états de stress biotiques et abiotiques
- Augmente la qualité et le rendement des récoltes

### CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT

- Se compose de silicium bio-disponible (Si)
- Synergie unique entre le silicium et le molybdène (Mo)
- engrais liquide utilisable en pulvérisation et en fertigation
- Compatible avec la plupart des engrais et des produits phytosanitaires
- Produit non toxique quelque soit la dose employée, produit respectueux de l'environnement
- Applicable sur toutes espèces et tous types de culture

### TECHNOLOGIE PROUVÉE

- Résultats positifs confirmés par plusieurs instituts de recherche internationaux
- Intensivement testé au travers d'essais pratiques dans de nombreux pays
- Les clients conviennent
  - **SILIFORCE** réduit de manière significative les effets négatifs des états de stress
  - **SILIFORCE** augmente de manière significative la qualité et le rendement



### LE RÔLE DU SILICIUM DANS LA RÉDUCTION DU STRESS ET DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA PLANTE

La fertilisation employant le silicium diminue l'impact négatif des états de stress comme la chaleur, la sécheresse, la salinité, les parasites et les maladies sur la qualité et le rendement. **SILIFORCE** contient une concentration élevée d'acide silicique stabilisé. L'acide silicique est la forme de silicium présentant la meilleure bio-disponibilité pour la plante. Une fois assimilé par les plantes, l'acide silicique est transporté par le système aux cellules des racines, des tiges, du feuillage et des fruits. Le silicium est alors stocké autour des membranes des cellules, créant ainsi une barrière mécanique qui renforce les parois cellulaires. Le silicium induit des mécanismes de défense naturelle qui permettent d'augmenter la récolte. Grâce à **SILIFORCE**, la fertilisation à l'aide du silicium sera appliquée dans le monde entier.

Le silicium réduit le stress et améliore la croissance des plantes de 3 manières originales :

1. Le silicium agit en tant que barrière physique au niveau des parois cellulaires.
2. Le silicium agit en tant que modulateur des réactions de défense métaboliques face aux situations de stress.
3. Le silicium améliore l'absorption des éléments nutritifs par les plantes.

Le silicium renforce les plantes en fournissant une protection naturelle. En effet, les cultures sont souvent exposées aux stress ; c'est précisément dans les conditions de stress que les avantages du silicium sont les plus évidents. L'impact du silicium sur le rendement et la qualité des récoltes est remarquable. D'autre part, le silicium présente un avantage supplémentaire : puisque les récoltes peuvent maintenant être protégées naturellement contre les états défavorables de stress, il est donc possible d'employer moins de produits phytosanitaires. Siliforce contribue ainsi aux pratiques agricoles soutenables.

[WWW.AGRO-SOLUTIONS.NL](http://WWW.AGRO-SOLUTIONS.NL)



Anses - Dossier n° 2013-1720 - INCA

Maisons-Alfort, le 19 MAI 2014

LE DIRECTEUR GENERAL

## AVIS

**de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,  
de l'environnement et du travail  
relatif à la demande d'extension d'usage de l'engrais foliaire azoté  
INCA, à base de nitrate de calcium et de nitrate de zinc  
de la société PLANT IMPACT plc**

*L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a notamment pour mission l'évaluation des dossiers de matières fertilisantes et supports de culture.*

*Les avis formulés par l'Agence comprennent :*

- l'évaluation des risques sanitaires que l'utilisation de ces produits peut présenter pour l'homme, l'animal ou l'environnement ;
- l'évaluation de leur efficacité sur les végétaux ainsi que celle de leurs autres bénéfices éventuels ;
- une synthèse de ces évaluations assortie de recommandations portant notamment sur leurs conditions d'emploi.

### PRESENTATION DE LA DEMANDE

L'Agence a accusé réception d'une demande d'extension d'usage du produit INCA déposée par la société PLANT IMPACT plc pour laquelle, conformément à l'article R.255-1-1 du Code rural et de la pêche maritime, l'avis de l'Anses est requis.

Le présent avis porte sur l'engrais azoté foliaire INCA à base de nitrate de calcium et de nitrate de zinc destiné à l'amélioration de l'assimilation et de la fixation du calcium (amélioration de la qualité des récoltes, du rendement, de la croissance des plants et augmentation de la durée de conservation des récoltes).

Cet engrais dispose d'une homologation (n° 1130004) et les cultures autorisées par la décision du 23 mai 2013 sont les cultures légumières, l'épinard, la carotte, le panais, la laitue et les cultures fruitières à la dose maximale de 1,5 L.ha<sup>-1</sup> à raison de 3 à 8 apports par an.

La demande présentée concerne l'extension de cette autorisation à la culture de pomme de terre à la dose maximale de 1,5 L.ha<sup>-1</sup> à raison de 1 à 3 apports par an.

Cet avis est fondé sur l'examen par l'Agence du dossier déposé pour cette matière fertilisante, conformément aux exigences du Code rural et de la pêche maritime, de l'arrêté du 21 décembre 1998 et du guide pour l'homologation des Matières Fertilisantes et Supports de Culture (Document Cerfa 50844#01) et sous réserve de l'utilisation du produit dans le respect des bonnes pratiques agricoles (BPA).

### SYNTHESE DE L'EVALUATION

L'avis présente une synthèse des éléments scientifiques essentiels qui conduisent aux recommandations émises par l'Agence et n'a pas pour objet de retracer de façon exhaustive les travaux d'évaluation menés par l'Agence.

**Annexe n°36 : Proposition de protocole pour les tests d'huiles essentielles sur les pathogènes des racines de betteraves sucrières.**



**PROTOCOLE**

**Interactions principes actifs HE / pathogènes de la betterave sucrière**



**Principes actifs à tester :**

Principes actifs	Coûts (Sigma-Aldrich)	Huiles essentielles correspondante	Informations sur le principe actif
<b>Carvone</b>	5 mL : 42€40 25 mL : 115€	Menthe	Homologué sur pommes de terre Composé synthétique disponible
<b>Thymol</b>	100 g : 39€90 500 g : 149€	Thym	Composé synthétique disponible
<b>Eugénol</b>	5 g : 29€50 100 g : 30€60 500 g : 115€	Girofle	Homologué sur pommes et poires Composé synthétique disponible
<b>Carvacrol</b>	30 mL : 29€90	Origan, Thym	Composé synthétique disponible
<b>Limonène</b>	100 mL : 35€07 500 mL : 48€57	Écorce d'orange	Utilisé comme fongicide en protection des plantes Composé synthétique disponible

**Principaux pathogènes de la racine de la betterave sur lesquels seraient testés les principes actifs :**

Pathogènes	Conditions de culture	Disponibilité à l'ISA
<b><i>B.cinerea</i></b>	Potato Dextrose Agar	1 souche
<b><i>R.solani</i></b>	PDA 20-25°C Obscurité ou dans des graines d'orge ou de millet stérilisées	À commander
<b><i>Fusarium oxysporum f.sp.betae</i></b>	PDA 1 ou 2 semaine sous lumière fluorescente	À commander
<b><i>Leuconostoc mesenteroides sp. Dextransicum</i></b>	Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker)	À commander



### **1. Interactions principes actifs/pathogènes**

- Tests sur mycélium (focaliser sur L. mesenteroïdes ?)
- Vaporisation des principes actifs (limités à 4)  
4 concentrations différentes (facteur 10) – 3 répétitions pour chaque concentration  
0,5 – 5 – 50 – 500 µg/mL
- 192 modalités (pour 4 pathogènes) ou 48 (si uniquement la bactérie)

### **2. Sélectionner le principe actif le plus efficace : CI50 la plus faible pour un maximum de pathogène**

### **3. Efficacité du principe actif sur racine**

- Sur racine saine – Inoculation avec un ou plusieurs pathogènes (en préventif ou en curatif ?)
- 6 concentrations différentes, facteur 4 – Répétées 5 fois

## Annexe n°37 : Proposition de protocole pour la ventilation de silos sur site industriel.



### ➤ Descriptif :

- Sur le site de Lillers, 60 000 t de betteraves seront ventilées avec 4 armoires de contrôle ↔ potentiellement, 4 ventilations différentes.
- Pas de témoin non-ventilé.  
Possibilité de sécher 1 tas avec de l'air sec (pause d'une résistance sur le ventilateur).
- 3 semaines de constitution.  
1<sup>er</sup> tas ventilé autour du 21-22/11.
- 800 gaines pleines / 800 perforées avec diamètre décroissant.  
Succession de non-perforés (début de ventilation, proche ventilateur) puis perforés.
- Chaulage sur l'intégralité des racines : au moment du gerbage, à l'extrémité de la grue pour éviter le blocage/encrassement du tapis.
- Racines issues d'un enlèvement à l'avaleur (moins de blessures, moins de manipulations).

### ➤ Objectifs :

- Déterminer l'efficacité de la ventilation sur la conservation de la qualité industrielle des racines.
- Comparer 3 systèmes de ventilation.

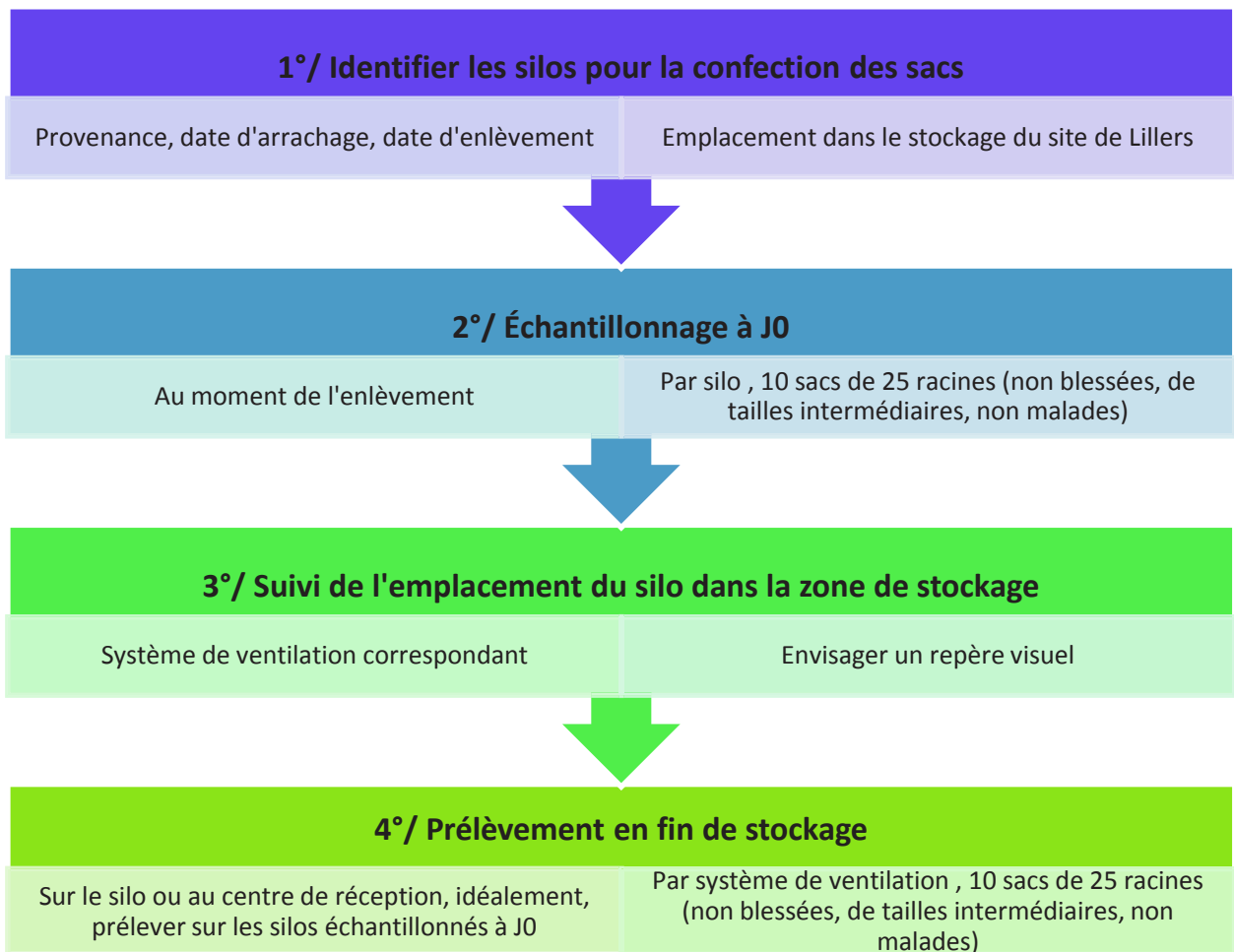
### ➤ Modalités de ventilation proposées [suite à des échanges avec M. Eric Colpaert, de la société Klim'Top] :

- Transformer l'un des tas en silo de référence :
  - 1°/ Sécher → ventiler dès que possible, lorsque  $T^{\circ}\text{C ext} < T^{\circ}\text{C int}$ .
  - 2°/ Maintenir à **12°C** → ventiler lorsque la  $T^{\circ}\text{C ext} < T^{\circ}\text{C int}$ , avec pour consigne 12°C.
- Stockage à 3°C :
  - 1°/ Sécher → ventiler dès que possible, lorsque  $T^{\circ}\text{C ext} < T^{\circ}\text{C int}$ .
  - 2°/ Refroidir → ventiler lorsque la  $T^{\circ}\text{C ext} < T^{\circ}\text{C int}$  avec une consigne de **3°C**.
- Séchage à l'air sec (avec résistance) et maintien à 12°C :
  - 1°/ Sécher → ventiler dès que possible, lorsque  $T^{\circ}\text{C ext} < T^{\circ}\text{C int}$  avec air **sec**.
  - 2°/ Refroidir → ventiler lorsque la  $T^{\circ}\text{C ext} < T^{\circ}\text{C int}$  avec une consigne de **3°C**.

→ **Prélèvement à J0 et en fin de stockage.**



➤ **Protocole :**



○ Mesures à effectuer à J0 et en fin de stockage :

- Pesée de sacs
- Richesse
- HPLC (Cécile)
- Qualité industrielle (Ciara)
- Analyses microbiologiques (Ciara)

## **Annexe n°38 : Analyses de qualité industrielle - Protocole de l'épuration standardisée.**

La méthode se décompose en deux étapes : l'extraction des jus par centrifugation et l'épuration normalisée.

### 1. L'extraction des jus par centrifugation

L'extraction débute par le lavage des racines. Elles sont ensuite découpées en lamelles puis passées dans une centrifugeuse ménagère. Le jus extrait est nommé jus de diffusion (JD).

Une partie du jus est utilisée pour la mesure de mannitol (méthode enzymatique), pH, °Brix et acides organiques/alcools.

1.6 L de jus extrait est ensuite congelé pour être épuré pendant l'inter-campagne (obtention de jus clairs).

### 2. L'épuration normalisée

L'épuration s'effectue sous agitation constante. Il faut vérifier l'alcalinité et la réactivité de la chaux avant de commencer l'essai. Le chaulage et la carbonatation permettent la coagulation des impuretés.

- On pré-chaule à 2.2 g de Ca(OH)<sub>2</sub>/L. La quantité à ajouter est calculée sur la base de l'alcalinité de la chaux :

Exemple : 1.6 L de jus à pré-chaulé avec une alcalinité de lait de chaux égal à 200 g Ca(OH)<sub>2</sub>/L → Quantité de Ca(OH)<sub>2</sub> à ajouter :  $\frac{1.6 \times 2.2}{200} * 1000 = 17,6$  mL .

Le jus est chauffé à 45°C. À l'aide d'une seringue, la chaux est progressivement ajoutée (8 additions successives espacées de 5 min). La durée de pré-chaulage est de l'ordre de 40 min (pH de 11,5).

- Le chaulage consiste à ajouter en une fois la chaux pour une concentration finale de 8 g Ca(OH)<sub>2</sub>/L (pH de 12,5). L'alcalinité de Ca(OH)<sub>2</sub> est vérifiée et la quantité supplémentaire à ajouter est calculée :  $\frac{17.6 \times 8}{2.2} - 17.6 = 46.4$  mL. Le jus est chauffé à 83°C.
- La carbonatation consiste à ajouter du CO<sub>2</sub>. Une bouteille de dioxyde de carbone est donc utilisée. C'est un débit de 42 L/h (niveau 45 sur le débitmètre) qui est utilisé pour le point de 1<sup>ère</sup> carbonatation (pH de 11,1-11,2). Le temps estimé de cette étape est de 10 min.

Réaction : Ca(OH)<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> → CaCO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O.

- S'ensuit la première filtration. Des filtres plissés sont utilisés et éliminent une partie des boues. Le jus clair 1 est ainsi obtenu (JC1).
- 100 ml de JC1 sont prélevés. Après refroidissement, les mêmes analyses que celles effectuées sur le JD sont effectuées, avec en plus : les sels de chaux, la filtrabilité et la coloration.
- Le reste du JC1 est chauffé à 90°C. Après 4 min à cette température, la seconde carbonatation est réalisée avec un débit de 31 L/h (35 sur le débitmètre). C'est un pH de 9,2-9,4 qui est visé. Le temps estimé pour cette étape est de 4 min.

- La seconde filtration est réalisée après 10 min à 90°C, pour obtenir le jus clair 2 (JC2). Trois filtres plissés remplis d'une cuillère à soupe de perlite sont utilisés. Un échantillon de 200 mL de ce jus est prélevé pour les mêmes analyses que le JC1.

## **Annexe n°39 : Protocoles des analyses en lien avec la qualité industrielle des racines.**

### **a) Dosage du D-Mannitol**

**Objectif :** Doser le D-Mannitol dans le jus de diffusion afin de mettre en évidence et d'anticiper un possible blocage au niveau des filtres de 2<sup>ème</sup> filtration. Le mannitol formé, principalement par des *Leuconostoc mesenteroides*, est un marqueur de la détérioration des betteraves, pouvant entraîner de multiples problèmes dans le process de fabrication du sucre. Le D-mannitol est dosé à l'aide d'un kit enzymatique.

#### **Matériels et réactifs**

- Spectrophotomètre réglé à 340 nm
- Cuves jetables de 1 cm, parafilm
- Fiole jaugée de 25 mL
- Pipettes de 2 mL, 5 mL, 10 mL
- Bécher
- Entonnoir
- Filtre papier, célite
- Kit enzymatique pour le dosage de D-Mannitol
- Réactif Carrez A ou n°1
- Réactif Carrez B ou N°2
- Solution titrée de soude NaOH 0.1N

#### **Mode opératoire**

-  Préparation des échantillons

Dans une fiole jaugée à 25 mL, mettre dans l'ordre :

- 10 mL de jus de diffusion pur (échantillon à stocker au réfrigérateur dès le prélèvement et jusqu'à l'analyse)
- 2 mL Réactif de Carrez A ou n°1
- 2 mL Réactif de Carrez B ou n°2
- 4 mL NaOH 0.1N

Compléter à 20 mL avec de l'eau déminéralisée

Agiter puis filtrer sur entonnoir avec filtre papier et célite. Recycler les 10 premiers mL

Utiliser le filtrat obtenu pour l'analyse

### Mesure/Analyse

Utiliser le kit du dosage D-Mannitol et des cuves à usage unique de 1 cm.

Introduction dans les cuves	Blanc	Etalon	Échantillon
<b>R1</b>	1000 µL	1000 µL	1000 µL
<b>R2</b>	200 µL	200 µL	200 µL
<b>Eau déminéralisée</b>	1000 µL	900 µL	800 µL
<b>Échantillon</b>	0 µL	100 µL	200 µL
<b>Couvrir avec du parafilm. Mélanger. Attendre 5 min. Faire le zéro à l'air puis placer la cuve contenant l'échantillon à lire la DO (DO1)</b>			
<b>R3</b>	20 µL	20 µL	20 µL
<b>Couvrir avec du parafilm. Mélanger. Attendre 5 min. Faire le zéro à l'air puis placer la cuve contenant l'échantillon à lire la DO (DO2)</b>			

NB : L'étalon est traité comme l'échantillon et permet d'assurer la validité de la mesure.

#### Expression des résultats :

$$\Delta DO = (DO2-DO1)_{\text{échantillon}} - (DO2-DO1)_{\text{blanc}}$$

C =  $\Delta DO \times 650,2$  et il est exprimé en mg/L

## b) Analyse des acides organiques par HPLC

### Préparation des solutions :

#### Phase mobile :

**Il est important de se munir de gants, de lunette de protection, de blouse, ainsi que de prélever l'acide sous la hotte, à cause de son effet très corrosif**

La phase mobile utilisée est une solution d'acide sulfurique à 0.003 mol/L.

- Disposer dans une fiole de 1L, 300 mL d'eau ultra-pure.
- Y ajouter 1.6 mL d'acide sulfurique concentré à 98%.
- Compléter au trait de jauge avec de l'eau ultra-pure puis homogénéiser.

Ici notre solution est à 0.03 mol/L, pour faciliter la préparation de la solution.

Pour avoir une concentration à 0.003 ;

- Prélever 50mL de la solution préparée ci-dessus dans une fiole de 500mL.
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultra-pure.
- Compléter la bouteille à cet effet au dessus de l'HPLC.

#### Solutions de calibrations :

Chaque solution est à conserver pendant 1 mois.

Les solutions de calibrations et de contrôles sont faites dans des fioles jaugées de 100mL.

#### Solution n°3 :

	Glucose	Fructose	Acide lactique	Glycérol	Acide acétique	Ethanol
Masse (g)	0,1	0,1	0,22	0,3	0,1	1,1
Concentration (g/L)	1	1	2,2	3	1	11

- Peser les masses précisément et les noter.
- Ajuster au trait de jauge à l'aide d'eau ultra-pure.

#### Solution n°2 :

- Laver une fiole de 100 mL à l'aide d'eau ultra-pure.
- Prélever 50 mL de la solution n°3.
- Ajuster au trait de jauge à l'aide d'eau ultra-pure

#### Solution n°1 :

- Laver une fiole de 100 mL à l'aide d'eau ultra-pure.
- Prélever 10 mL de la solution n°3.
- Ajuster au trait de jauge à l'aide d'eau ultra-pure.
- Une fois les solutions préparées, les masses devront être rentrées dans le fichier excel « Concentration calibration ».

Sur Feuil1, rentrer les masses de la solution 3, uniquement. Noter les valeurs des concentrations des calibrations.

Solution de contrôle :

	Glucose	Fructose	Acide lactique	Glycérol	Acide acétique	Ethanol
Masse (g)	0,05	0,05	0,11	0,20	0,05	0,50
Concentration (g/L)	0,50	0,50	1,10	2,00	0,50	5,00

- Peser les masses précisément et les noter.
- Ajuster au trait de jauge.

Une fois les solutions préparées, les masses devront être rentrées dans le fichier excel « Concentration calibration ».

Sur Feuil2, rentrer les masses de la solution de contrôle. Noter les valeurs des concentrations de la solution de contrôle.

Ces valeurs théoriques sont à noter à la suite du tableau du fichier « Suivi Contrôle Qualité HPLC », dans une nouvelle colonne en précisant Valeur théorique.

### c) Analyses complexométriques (sels de chaux)

**Objectif** : Mesurer les sels de chaux dans les jus sucrés avant (JF2) et après décalcification (JAE) ; contrôler les colonnes de décalcification/la dureté des eaux de chaudières (TH) ; déterminer la teneur en calcium des eaux d'alimentation des diffusions.

#### Matériels et réactifs

- Bol blanc ou Erlen
- Burette
- Système de refroidissement de l'échantillon (serpentin)
- Complexon faible (3.722g/L soit N/50) ou fort (7.444g/L soit N/25) encore appelé EDTA
- Réactif de Patton et Reeder
- Soude  $\approx$  2N

#### Mode opératoire

##### Préparation des échantillons

Il est nécessaire que l'échantillon soit refroidi avant l'analyse. Pour cela, verser l'échantillon dans l'entonnoir du système de refroidissement. Lorsqu'il reste environ  $\frac{1}{4}$  du volume dans l'entonnoir, placer la pipette graduée sous la sortie du serpentin et la laisser se remplir jusqu'à débordement.

##### Dosage (se référer au tableau ci-après)

Prendre un bol blanc ou un bécher propre rincé à l'eau déminéralisée, et y introduire la prise d'essai, préalablement refroidie.

Ajouter 2 à 3 mL de soude, et une dizaine de gouttes de réactif de Patton et Reeder. Si l'échantillon contient du calcium ou du magnésium, la solution prend une teinte violette

L'ordre d'addition des réactifs est important : verser goutte à goutte le complexon fort ou faible avec la burette (préalablement remise à zéro) tout en agitant jusqu'au changement de couleur de la solution, du violet au bleu-vert (ajouter lentement à l'approche du virage en agitant régulièrement).

Relever le volume de chute de burette.

#### Tableau de correspondance :

	Prise d'essai	Complexon à utiliser	Résultat
Eau d'alimentation des diffusions	28 mL	FORT	Chute de burette x 40 = mg CaO/L en Ml
Jus avant et après décalcification	56 mL	FAIBLE	Chute de burette x 10 = mg CaO/L en mL
Eau de chaudière (TH)	100 mL	FORT	Chute de burette x 2 = degré TH en mL ou 20 mg CaCO <sub>3</sub> /L
Solution de Calcium	40 mL	FORT	Chute de burette x 0.8 = mg Ca/L en mL
		FAIBLE	Chute de burette x 0.4 = mg Ca/L en mL



## d) Coloration : utilisation des spectrophotomètres

**Objectif** : Mesurer la coloration d'une solution et décrire un spectre de longueur d'onde d'amplitude caractéristique du spectrophotomètre. La coloration est exprimée en absorbance, c'est-à-dire en pourcentage de lumière absorbée par la solution, sous une longueur d'onde donnée et à travers un trajet optique de longueur donnée.


### Matériels et réactifs

- Libra S22, Cary 50 et Hach DR 2010
- Cuve jetable de 1 cm de longueur
- Cuve 10 cm
- Eau déminéralisée

### Mode opératoire

Les deux appareils suivants n'ont qu'une lampe au Xénon permettant de faire varier les longueurs d'ondes de 190 à 1100 nm.

#### Mise en service et lecture simple en absorbance

- Capot fermé et compartiment vide de cuves
- Interrupteur ON / OFF au dos
- Laisser l'appareil faire son Check-up
- Quand l'écran affiche :
  - Taper 1 au clavier
  - Puis à nouveau 1 "Absorbance"
  - Entrer la longueur d'onde voulue, exemple 420 nm avec le clavier
  - puis OK avec la touche
  - l'appareil demande la référence ( zéro )
  - selon le cas :
    - a) zéro air --> laisser le compartiment vide
    - b) zéro cuve de 1 cm --> placer une cuve de 1 cm avec eau déminéralisée
    - c) zéro cuve de 10 cm --> placer une cuve de 10 cm avec eau déminéralisée
  - Fermer le capot
  - Appuyer sur : 
  - L'appareil doit afficher 0.000 , sinon recommencer
  - Placer ensuite la cuve avec le produit à mesurer
  - Appuyer à nouveau sur la touche F3
  - L'appareil affiche l'absorbance, exemple 0.292

M E T ! I		
<input type="checkbox"/> Modes basiques		
<input type="checkbox"/> Applications		
<input type="checkbox"/> Méthode A		
<input type="checkbox"/> Méthode B		
<input type="checkbox"/> Méthode C		
Système	Accessoires	Luminosité

✚ Mesure :

- Appareil à 0
- Remplir la cuve sans faire de bulles puis fermer la trappe et noter l'absorbance du produit (en cas de dépassement de l'échelle, une dilution supplémentaire est nécessaire)

→ Dilution 10 pour les colorations bas produits :

- Mesurer 100 mL (fiole jaugée) de la dilution 1/5 poids/poids à la balance proportionneuse.
- Verser dans une fiole de 200 mL avec les eaux de rinçage puis compléter à 200 mL, agiter.
- Valeur à saisir dans PC Labor. Lecture colorimètre X2

Le système informatique calcule la coloration en % de brix et pour 1 de non sucre (si le brix et la pureté sont déjà saisis) :

$$\text{❖ Coloration \% bx} = 100\,000 \times \frac{\text{Absorbance}}{l \times c} \times \text{dilution} = \text{Unité ICUMSA}$$

où :  $l$  = longueur cuve (cm)  
 $c$  = brix volume (g/ml)

$$\text{❖ Coloration /INS} = \text{coloration} \times \text{Bx} \times \frac{1}{100-P}$$

Où :  $P$  = pureté du produit.

Dans le cas de sucre blanc, on travaille sur une dilution à 50 brix soit : 61,43 g % ml et avec une cuve de 10 cm.

$$\text{❖ Coloration} = 100\,000 \times \frac{\text{Absorbance}}{10 \times 61,43} = \text{unité ICUMSA}$$

et 7,5 unités ICUMSA = 1 point CEE

$$\text{coloration} = \frac{100\,000 \times \text{Absorbance}}{75 \times 61,43} = \text{Points CEE}$$

## e) Alcalinité (pH)

**Objectif :** Contrôler la quantité de chaux libre ou résiduelle des jus de sucrerie. L'alcalinité est mesurée sur le jus pré-chaulé, chaulé, jus trouble 1, jus trouble 2 et JAE (ou jus sulfité).

### Matériels

- Burette de titrage à zéro automatique graduée en 0,1 mL
- pHmètre titrimètre (ou phénolphtaleïne)
- Agitateur magnétique
- Pipette ou dosette de 20 mL
- Bêcher 150 mL
- Eau déminéralisée
- Acide chlorhydrique fort (0,714 N) et faible (0,0714 N)

### Mode opératoire

- Prélever le jus à analyser en relevant le pH du capteur en ligne s'il existe
- Filtrer lorsque cela est nécessaire
- Mettre 20 mL d'échantillon à l'aide d'une pipette ou d'une dosette dans un bêcher rincé à l'eau déminéralisée
- Y introduire un barreau aimanté en téflon
- Compléter avec environ 40 mL d'eau déminéralisée
- Placer le bêcher sur l'agitateur magnétique, y plonger l'électrode de pH
- Choisir l'électrovanne correspondant à l'acide voulu (fort ou faible)
- Vérifier le point de fin de titration en appuyant sur le bouton « end point », le pHmètre indique 8,00 sinon ajuster avec le bouton « end point » en haut à droite
- Mettre à zéro la burette
- Noter le pH
- Lancer la titration avec la touche « start »
- La titration est terminée lorsque le voyant vert « shut off » s'allume
- Relever la chute de burette en mL

## f) Mesure de la filtrabilité

**Objectif :** Évaluer la capacité des jus à être filtrés. La filtration d'un liquide chargé défini (composition, teneurs en boues, etc...) dans des conditions fixées (température, différence de pression) obéit, sous réserve d'écoulement laminaire et de non-compressibilité du « gâteau », à la loi :

$$q = \frac{1}{\alpha + F_k V}$$

avec  $q$  = débit instantané de liquide par unité de surface, l'instant  $t$

$V$  = volume de liquide déjà filtré à l'instant  $t$

$$(q = \frac{dV}{dt})$$

$\alpha$  = coefficient dépendant de la toile

$F_k$  = coefficient dépendant de la nature des boues proportionnelle à leur concentration

La mesure de la  $F_k$  ou vitesse de filtration en sucrerie est un repère ; elle est à faire sous vide à 65°C sur du jus carbonaté.

La comparaison des  $F_k$  mesurées sur jus de sortie 1<sup>ère</sup> carbonatation et sur jus carbonaté, reconstitué par mélange de boues de décanteur et de jus clair 1 (le mélange sera fait de telle façon que la chaux totale du jus carbonaté reconstitué soit le même que celle du jus initial) permet de se rendre compte des dégradations subies par les précipités (dégradations dues aux pompages et aux fermentations éventuelles).

### Principe

On mesure les temps nécessaires pour obtenir des volumes de filtrat fixés. La valeur du  $F_k$  est exprimée en seconde/cm.

### Matériels

- Microfiltre de 2 cm<sup>2</sup> de surface filtrante
- Pipette graduée (en mL) de 0 à 5 mL pour les jus filtrants moyennement
- Pipette graduée de 0 à 10 mL (de 2 en 2 mL) pour les jus filtrants très vite
- Bécher de forme basse de 300 mL
- Agitateur magnétique chauffant
- Système à 2 ampoules de mesure contenant du mercure ou un manostat permettant d'obtenir un vide de 40 cm de mercure au départ
- Chronomètre
- Papier filtre de densité moyenne dans lequel on découpera à l'emporte-pièce des rondelles de la dimension du microfiltre

### Mode opératoire

- Le jus carbonaté est prélevé dans un bécher et maintenu à 65°C sous agitation lente (note T°C = importante)

Munir le microfiltre de sa rondelle de papier filtre.

Régler le vide à 40 cm de mercure (appareil en mm : entre 420 et 450), plonger le filtre dans le bécher et ouvrir le robinet reliant la pipette graduée au vide.

Le chronomètre est déclenché lorsque le liquide clair passe au trait 1.

Les temps de passage sont notés de 1 à 2 mL, et de 5 à 6 mL dans le cas d'une filtration lente (cas de la plupart des échantillons testés), ou les temps de 0 à 2 mL, et de 9 à 10 mL dans le cas d'une filtration rapide.

Remarques :

- L'agitation doit empêcher le précipité de décanter, mais elle doit éviter de créer un tourbillon qui provoquerait une centrifugation.
- Pour éviter la formation de mousse, ajouter 1 goutte d'alcool au sommet de la burette.

### Expression des résultats

#### Calcul

Soit  $t_1$  le temps entre 1 et 2 mL et  $t_5$  entre 5 et 6 mL dans le 1<sup>ère</sup> cas

Ou  $t'_1$  le temps entre 0 et 2 mL et  $t'_5$  entre 9 et 10 mL dans le 2<sup>ème</sup> cas.

$$F_k = t_5 - t_1 \text{ ou } \frac{t'_5 - t'_1}{4}$$

#### Valeurs moyennes

Les valeurs moyennes du  $F_k$  se situent entre 1 et 3 sec/cm.

