



SERVICES CULTURE ÉDITIONS
RESSOURCES POUR
L'ÉDUCATION NATIONALE

**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel**

session 2011

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

**ÉPREUVE E3 – UNITÉ U33
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE**

SESSION 2011

Durée : 2 heures

Coefficient : 3

Calculatrice non autorisée.

**Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 8 pages, numérotées de 1/8 à 8/8.**

UN ORGANISME GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉ : LE MAÏS Bt

Un texte concernant la mention obligatoire d'étiquetage des organismes génétiquement modifiés (OGM), a été mis en place par la commission européenne à Bruxelles. En Europe, les aliments génétiquement modifiés doivent mentionner, dans leur étiquetage, la présence d'OGM si la teneur est supérieure à 1%.

Il est donc nécessaire de tester les aliments et les récoltes pour identifier ceux qui contiennent des génomes génétiquement modifiés. On se propose d'étudier quelques étapes clés liées à l'obtention et la détection des OGM.

1 - Obtention d'un maïs transgénique (22 points)

1.1 - Le document 1 représente un schéma de l'ultrastructure d'une cellule végétale.

1.1.1 - Légender sur votre copie (n° 1 à 14) le document 1.

1.1.2 - Quels éléments présents dans la cellule végétale sont absents de la cellule animale ?

1.2 - Donner la définition d'un organisme génétiquement modifié.

1.3 - Le document 2 montre les étapes nécessaires pour transformer des cellules végétales de maïs par un gène Bt. Ce gène contrôle la fabrication d'une protéine toxique pour un insecte ravageur, la pyrale. Le document 3 présente le vecteur utilisé au cours de la transgénèse.

1.3.1 - Obtention de cellules végétales du maïs.

1.3.1.1 - Définir le cal.

1.3.1.2 - Quelle propriété des cellules végétales permet d'obtenir le stade cal.

1.3.1.3 - Quelles phytohormones est-il nécessaire d'ajouter au milieu de culture pour obtenir le stade cal ? En quelle proportion sont-elles apportées ?

1.3.2 - Obtention du vecteur de transfert.

1.3.2.1 - Qu'appelle-t-on un vecteur de transfert ?

1.3.2.2 - Quel est le rôle de la séquence « ori » du plasmide ?

1.3.2.3 - Le gène Bt est introduit dans l'ADN-T au niveau du site de clonage. Expliquer le principe de cette insertion.

1.3.3 - Le document 4 montre l'organisation de l'ADN-T du plasmide modifié.

1.3.3.1 - Quels sont les rôles du promoteur et du terminateur d'un gène ?

1.3.3.2 - Pourquoi n'utilise-t-on pas les promoteurs et terminateurs natifs du gène d'intérêt (Bt) dans la plante recombinée ?

1.3.3.3 - Quel critère de sélection permet de valider les différentes étapes de la création du maïs Bt ? Justifier.

2 - Détection des plants OGM : Obtention du réactif anticorps pour la technique ELISA (15 points)

La technique ELISA (enzyme - linked immunosorbent assay) permet une identification des protéines produites dans les récoltes par les plantes génétiquement modifiées. Ce test est basé sur l'utilisation d'anticorps spécifiques de la protéine recherchée. Dans le cas du maïs Bt, la toxine n'est exprimée que dans les parties vertes de la plante.

2.1 - Obtention des sérums. Deux types de sérums peuvent être utilisés, des sérums polyclonaux obtenus par immunisation de lapins et sérums monoclonaux obtenus par la technique des hybridomes.

2.1.1 - Définir les termes « polyclonaux » et « monoclonaux ».

2.1.2 - Lors du protocole d'immunisation d'un lapin, il est possible d'associer la protéine d'intérêt à un adjuvant.

2.1.2.1 - Quel est son rôle ? Citer un adjuvant couramment utilisé.

2.1.2.2 - Plusieurs injections de la protéine d'intérêt sont réalisées à 0, 10, 20 et 70 jours. Représenter graphiquement l'évolution du taux des anticorps, obtenus au cours des différentes injections. Préciser les classes des anticorps synthétisés.

| | | |
|---|---------------|--------------|
| BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES | | Session 2011 |
| Nom de l'épreuve : Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse | Code : BAE3BC | Page : 2/8 |

2.1.3 - L'obtention d'anticorps monoclonaux nécessite deux types cellulaires.

2.1.3.1 - Quelles sont les deux cellules impliquées ?

2.1.3.2 - Indiquer les principales caractéristiques de l'hybridome obtenu.

2.1.3.3 - Présenter succinctement la méthode de sélection des hybridomes.

2.2 - La technique ELISA doit cependant être réservée aux produits agricoles bruts (fruits, légumes) ou obtenus par des transformations "douces". Quelle en est la raison ?

2.3 - Dans le cas du maïs Bt cette technique ne peut plus être utilisée si les échantillons analysés proviennent exclusivement des grains de maïs ? Justifier votre réponse.

3 - Détection des séquences d'ADN par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) (23 points)

La PCR est une méthode de détection, basée sur l'analyse de l'ADN. Elle permet d'obtenir une détection sur l'ensemble du génome. Elle est moins dépendante des conditions de traitement thermique et chimiques de l'échantillon analysé car l'ADN est une molécule relativement stable.

Le protocole du **document 5** montre le déroulement de la technique de PCR.

3.1. - Citer les trois étapes thermiques définissant un cycle d'amplification. En déduire le principe de la PCR.

3.2. - Le kit contient un jeu d'amorces pour détecter des séquences spécifiques des OGM et un jeu d'amorces qui identifient l'ADN végétal qu'il soit ou non dérivé d'OGM (**document 6**).

3.2.1 - Quelle est la nature biochimique des amorces ? Quel est leur rôle ?

3.2.2 - Quelle(s) amorce(s) permet(tent) de détecter les séquences spécifiques de l'OGM ? Justifier.

3.2.3 - Un jeu d'amorces permet de valider l'extraction de l'ADN. Quel en est l'intérêt ?

3.3 - À la fin de la PCR, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 %.

3.3.1 - Expliquer de manière rédigée le principe de l'électrophorèse d'ADN.

3.3.2 - Justifier le choix de l'acrylamide par rapport à l'agarose.

3.3.3 - Quel est le rôle des marqueurs de poids moléculaires dans l'électrophorèse ?

3.4 - Le **document 7** montre les résultats obtenus sur des chips de maïs.

3.4.1 - Analyser les résultats obtenus pour les couloirs 1, 5, 6. Justifier la présence des différents fragments.

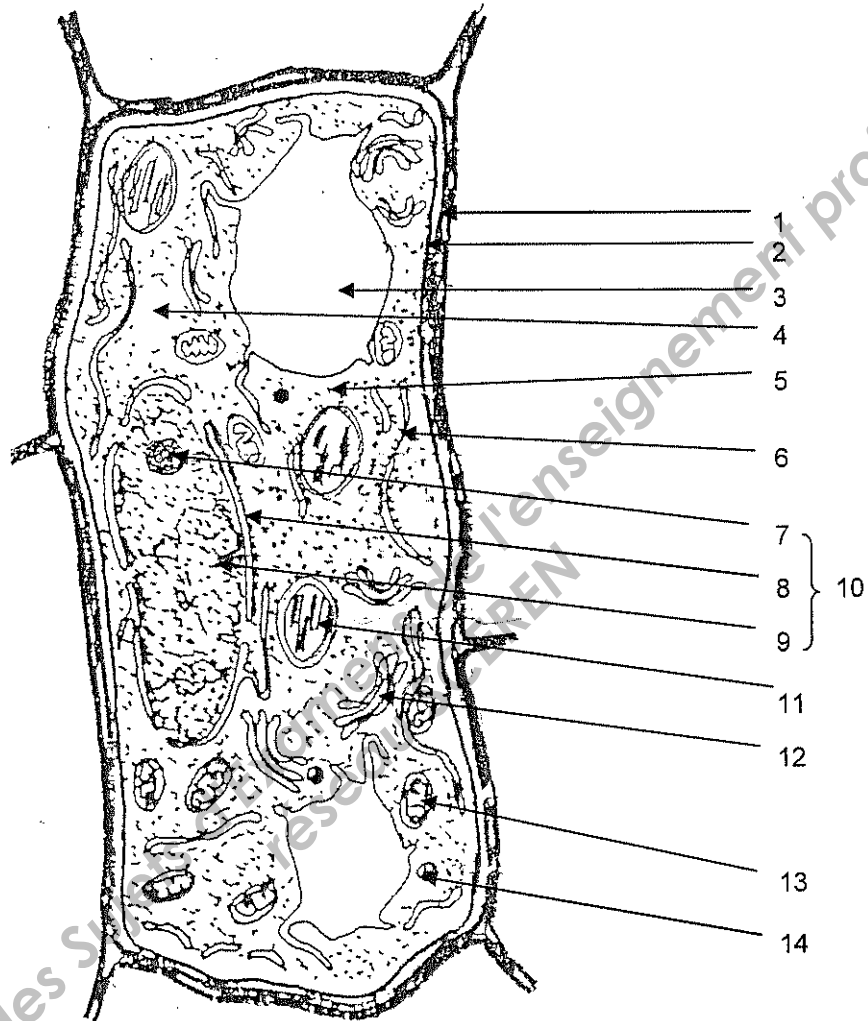
3.4.2 - Le couloir 2 permet de vérifier la non contamination lors de la manipulation. Pourquoi ?

3.4.3 - Les résultats obtenus pour l'aliment analysé sont-ils exploitables ? Justifier.

3.4.4 - L'aliment analysé est-il génétiquement modifié ? Justifier votre réponse.

3.4.5 - Pour quelle raison est-il précisé, dans le mode d'emploi du kit, que celui-ci ne permet d'identifier que 85 % des OGM ?

DOCUMENT 1 : ULTRASTRUCTURE DE LA CELLULE VÉGÉTALE



Base Nationale des Spécialités de l'Enseignement Professionnel

DOCUMENT 2 : CRÉATION DU MAÏS TRANSGÉNIQUE Bt

Isolement d'un gène Bt à partir de la bactérie *Bacillus thuringiensis*. Ce gène contrôle la fabrication d'une protéine toxique pour un insecte ravageur : la pyrale



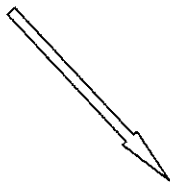
Introduction du gène Bt et d'un gène de résistance à la kanamycine dans un plasmide Ti désarmé au niveau de la zone ADN-T



Sélection et répllication du plasmide chez *E.coli*



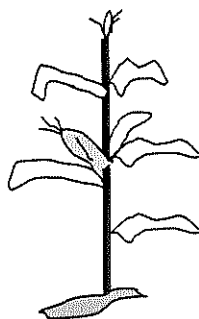
Transfert du plasmide modifié par conjugaison dans *Agrobacterium tumefaciens*
Sélection des bactéries transformées



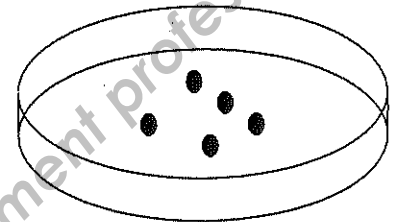
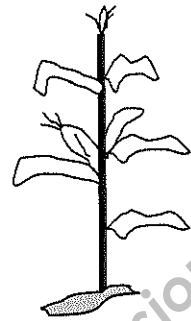
Infection des cellules de cal par *Agrobacterium tumefaciens* transformée



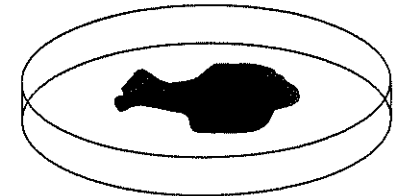
Identification des cellules végétales transformées sur un milieu sélectif et mise en culture *in vitro*.



Obtention d'une plante génétiquement modifiée



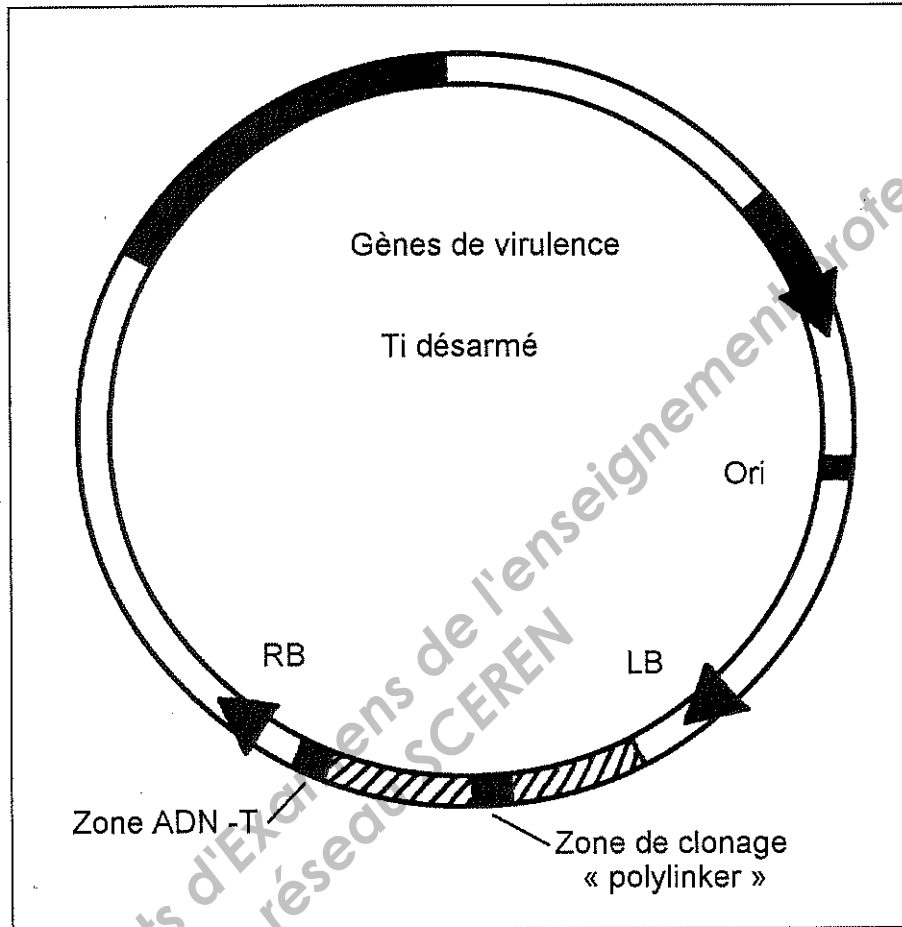
Développement du cal



Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Niveau SCEREN

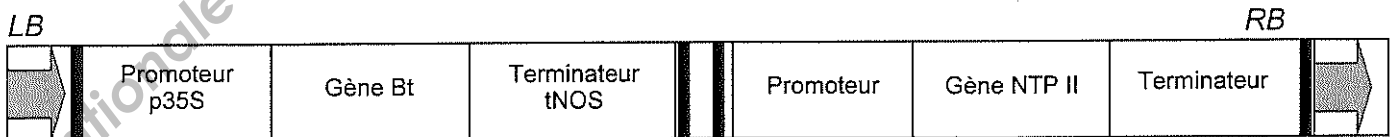
DOCUMENT 3 :

Les souches sauvages d'*Agrobacterium tumefaciens* provoque la maladie du collet.
 On utilise pour la transgénèse une souche *Agrobacterium tumefaciens* modifiée qui héberge un plasmide Ti désarmé c'est-à-dire dont les gènes responsables de la maladie du collet ont été ôtés.
 Le plasmide Ti est utilisable comme vecteur de transfert par la propriété de la zone ADN-T : toute séquence d'ADN insérée entre les bordures RB et LB est transférable à une cellule végétale avec l'implication de la zone virulence.



Où ?

DOCUMENT 4 : SÉQUENCE DE L'ADN-T



Gène Bt : gène codant pour la protéine toxique pour la pyrale

Gène NTP II : gène de résistance à la kanamycine

Zone de clonage

p35S (*) : promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur

tNOS (*) : terminateur du gène de la nopaline synthétase (NOS) d'*Agrobacterium tumefaciens*

(*) promoteur et/ou terminateur utilisés pour la construction de la plupart des OGM.

DOCUMENT 5 : PRÉPARATION DES RÉACTIONS DE PCR Kit GMO Investigator - référence 166 - 2500EDU - BIO-RAD

Matériel :

- Solution d'amplification :
 - dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
 - tampon
 - Taq polymerase
- Amorces d'OGM
- Amorces de PSII de plante
- ADN contrôle OGM positif
- ADN contrôle non OGM
- ADN à tester
- Bain de glace
- Tubes de PCR, adaptateurs de PCR
- Micropipette à volume ajustable de 2 à 20 μ L
- Cônes

Protocole :

- 1- Numérotter les tubes de PCR de 1 à 6. Les numéros doivent correspondre à la teneur de tube suivante :

| Numéro tube | Solution d'amplification | Amorces | ADN |
|-------------|--------------------------|------------------------------|--|
| 1 | 20 μ L | 12 μ L amorces de plante | 20 μ L d'ADN d'aliment de contrôle non OGM |
| 2 | 20 μ L | 12 μ L amorces d'OGM | 20 μ L d'ADN d'aliment de contrôle non OGM |
| 3 | 20 μ L | 12 μ L amorces de plante | 20 μ L d'ADN d'aliment à tester |
| 4 | 20 μ L | 12 μ L amorces d'OGM | 20 μ L d'ADN d'aliment à tester |
| 5 | 20 μ L | 12 μ L amorces de plante | 20 μ L d'ADN d'aliment de contrôle OGM positif |
| 6 | 20 μ L | 12 μ L amorces d'OGM | 20 μ L d'ADN d'aliment de contrôle OGM positif |

- 2- Placer chaque tube dans un adaptateur de microtube sans bouchon, sur la glace.
- 3- Ajouter 20 μ L de solution d'amplification indiquée dans le tableau, dans chaque tube de PCR. Boucher les tubes.
- 4- Ajouter 12 μ L de la solution d'amorce indiquée dans le tableau, dans chaque tube de PCR. Boucher les tubes.
- 5- Ajouter 20 μ L de l'ADN indiqué dans le tableau, dans chaque tube de PCR. Mélanger par pipetage, boucher les tubes.
- 6- Placer les tubes dans le thermocycleur réglé à 4°C.
- 7- Le programme d'amplification est le suivant :

| Étape | Cycle | Température | durée |
|---------------|-------|-------------|-----------|
| Initiale | 1 | 94°C | 2 min |
| Amplification | 40 | 94°C | 1 min |
| | | 59°C | 1 min |
| | | 72°C | 2 min |
| Finale | 1 | 72°C | 10 min |
| Maintien | 1 | 4°C | Indéfinie |

DOCUMENT 6 : SÉQUENCES GÉNIQUES AMPLIFIÉES

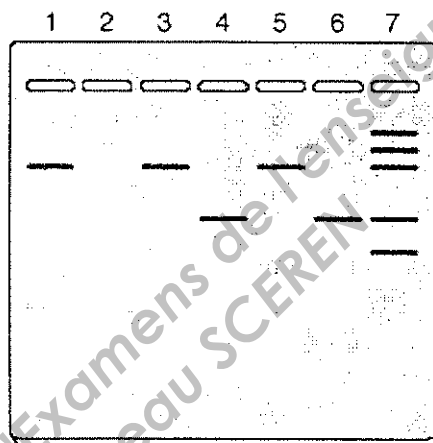
Les gènes insérés en génie génétique n'utilisent qu'un petit nombre de séquences régulatrices pour contrôler l'expression des gènes insérés dans les récoltes OGM.

Deux séquences régulatrices les plus courantes sont le promoteur p35S du virus de la mosaïque du chou fleur et/ou le terminateur de la nopaline synthase (tNOS) de *Agrobacterium tumefaciens*.

| Amorces | Taille de l'amplicon |
|---|----------------------|
| Fragment du promoteur p35S | 203 pb |
| Fragment du terminateur tNOS | 225 pb |
| Fragment du gène du chloroplaste du photosystème II | 455 pb |

pb = paire de base

DOCUMENT 7 : RÉSULTATS DE LA PCR : Kit GMO Investigator - Aliment testé : chips de maïs



Légende du gel :

- Couloir 1 : Contrôle non OGM avec amorces de plante
- Couloir 2 : Contrôle non OGM avec amorces d'OGM
- Couloir 3 : Aliment à tester avec amorces de plante
- Couloir 4 : Aliment à tester avec amorces d'OGM
- Couloir 5 : Contrôle OGM positif avec amorces de plante
- Couloir 6 : Contrôle OGM positif avec amorces d'OGM
- Couloir 7 : Marqueurs de poids moléculaires de PCR (1000, 700, 500, 200, 100 pb)

Rq : Le kit GMO Investigator permet d'identifier 85 % des récoltes génétiquement modifiées actuellement approuvées dans le monde entier.