

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR AGRICOLE E7-1 ANALYSES ET CONTRÔLES

Option : ANABIOTEC

Durée : 180 minutes

Matériel(s) et document(s) autorisé(s) : **Calculatrice**

Le sujet comporte 11 pages

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

SUJET

ÉTUDE DE L'IMPACT DE L'ALIMENTATION SUR LE TRACTUS DIGESTIF DE LA TRUITE

La truite est un poisson carnivore qui peut être nourri en élevage avec des aliments d'origine animale. Cependant, aujourd'hui, on introduit de plus en plus de produits végétaux dans son alimentation.

Le laboratoire de recherche, dans lequel vous êtes technicien(ne), étudie l'impact de ce changement alimentaire sur les modifications enzymatiques dans l'appareil digestif des poissons.

Un premier objectif de recherche est de vérifier la capacité d'adaptation enzymatique de la truite suite à ce changement alimentaire.

Des travaux antérieurs ont montré que plusieurs gènes étaient impliqués dans la synthèse d'enzymes nécessaires pour la dégradation de protéines apportées par l'alimentation à base de végétaux. Dans le **document 1** sont présentées schématiquement les différentes étapes de la synthèse d'une enzyme.

Le laboratoire travaille actuellement sur l'ARN messager (ARNm) correspondant à l'enzyme d'intérêt EV. Le gène EV a été séquencé.

PARTIE 1 : ÉTUDE DES ARN MESSAGERS (10 points)

1.1 À partir du **document 1**, expliquer l'intérêt de travailler sur les ARNm.

1.2 Pour le laboratoire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté des ARN messagers extraits par méthode spectrophotométrique en ultraviolet. Il possède pour cela des spectrophotomètres traditionnels à cuve, mais il envisage l'achat d'un nanodrop (spectrophotométrie micro-volume), actuellement prêté par le fournisseur. Vous devez étudier l'opportunité de l'utilisation de ce matériel.

À partir des **documents 2 et 3** :

1.2.1 Identifier les différentes étapes du dosage des ARNm par spectrophotométrie micro-volume (nanodrop).

1.2.2 Préciser, en justifiant, les avantages de la technique nanodrop par rapport à la technique traditionnelle en sachant que la préparation des extraits d'ARNm est identique.

- 1.2.3** Donner les précautions à prendre pendant l'étape de l'extraction des ARNm.
- 1.2.4** Pendant les étapes de préparation des extraits d'ARNm, les tubes doivent être maintenus dans de la glace durant toutes les opérations. Expliquer pourquoi.
- 1.2.5** Justifier l'intérêt des étapes 1 et 2 réalisées lors de la quantification des acides nucléiques par spectrophotométrie micro-volume (nanodrop).
- 1.3.** Pour doser les acides nucléiques, vous réalisez au préalable un spectre d'absorption présenté dans le **document 4**. Expliquer l'intérêt de ce spectre.
- 1.4.** Pour la mesure au spectrophotomètre nanodrop, les extraits d'ARNm nécessitent une dilution préalable au dixième. Expliquer pourquoi.
- 1.5.** Pour estimer l'expression des gènes des enzymes digestives, il est nécessaire de réaliser la rétro-transcription des ARNm extraits, dont le principe général est donné dans le **document 5**.

La rétro-transcription est réalisée par une transcriptase reverse dans des conditions spécifiques : concentration et pureté optimales des ARNm. La concentration doit être comprise entre $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

- 1.5.1** Justifier l'étape de rétro-transcription.
- 1.5.2** Sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à $40 \mu\text{g}$ d'ARNm par mL de solution, déterminer la concentration des 4 échantillons d'ARN testés issus du lot N°2 (voir partie 3). Les différents résultats obtenus sont donnés dans le tableau ci-dessous.

| Numéro d'échantillon ARN | Facteur de dilution | A (Absorbance à 260 nm) | Pureté ($R = A_{260} / A_{280}$) * |
|--------------------------|---------------------|----------------------------|---|
| 1 | 10 | 0,33 | 1,9 |
| 2 | 10 | 0,28 | 1,5 |
| 3 | 10 | 0,55 | 2 |
| 4 | 10 | 0,38 | 1,8 |

* Le rapport A_{260} / A_{280} doit être compris entre 1,7 et 2,1.

- Si $R > 2,1$: Contamination par de l'ADN
- Si $R < 1,7$: Contamination par des protéines

- 1.5.3** À partir des résultats de concentration et de pureté obtenus ou calculés, indiquer la décision à prendre pour chaque extrait avant la rétro-transcription.

PARTIE 2 : QUANTIFICATION DU GÈNE CODANT POUR L'ENZYME EV (5 points)

On réalise une rétro transcription puis une PCR quantitative en temps réel afin d'étudier l'expression des gènes dans l'appareil digestif des truites à partir des ARNm extraits (**document 5**).

- 2.1.** Justifier le choix du laboratoire d'utiliser la PCR quantitative en temps réel plutôt qu'une PCR conventionnelle.
- 2.2.** Identifier le risque majeur pouvant fausser les résultats lors de la réalisation de la technique PCR conventionnelle, en déduire les précautions à prendre.
- 2.3.** Le mix d'amplification est composé de :
- Taq polymérase et son tampon.
 - Amorces sens et anti-sens.
 - Nucléotide: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
 - Eau ultra pure.

Expliquer le rôle de chaque constituant du mélange.

PARTIE 3 : ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'ALIMENTATION SUR L'EXPRESSION D'UN GÈNE (5 points)

Pour étudier l'influence du type d'alimentation sur l'expression du gène codant pour l'enzyme EV, on a mesuré les concentrations d'ARN messagers impliqués sur des truites.

Vous avez obtenu des résultats sur trois lots de truites ayant reçu une alimentation différente :

- un 1^{er} lot de 8 truites a reçu une alimentation d'origine animale ;
- un 2^{ème} lot de 8 truites a reçu une alimentation d'origine végétale ;
- un 3^{ème} lot de 8 truites a reçu une alimentation d'origine animale et végétale.

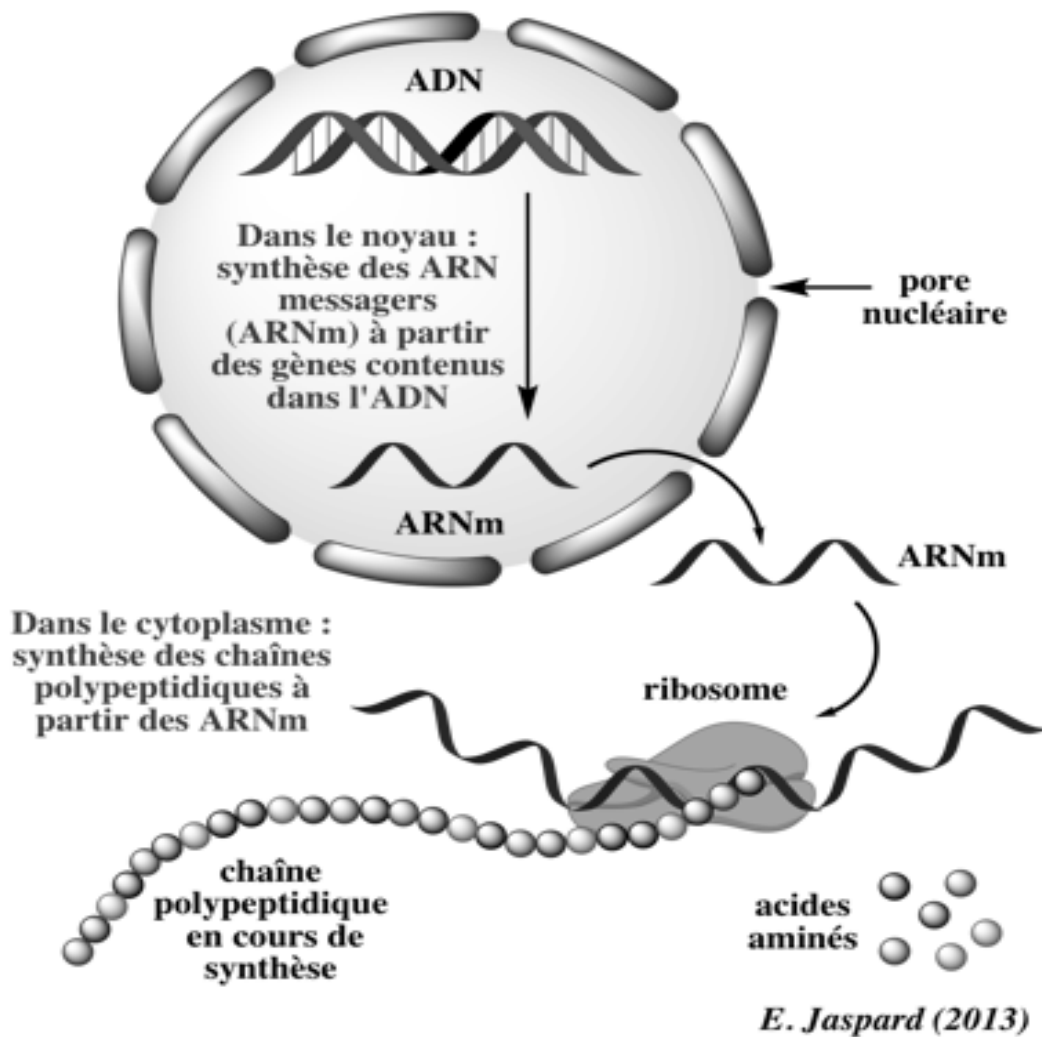
Ces résultats ont permis de réaliser le tableau d'analyse de variance (ANOVA) présenté ci-dessous :

| Sources de variation | Sommes des carrés des écarts | Degrés de liberté | Carrés moyens | f_{obs} |
|----------------------|------------------------------|-------------------|---------------|-----------|
| Factorielle | 1,4631 | 2 | 0,7316 | 20,61 |
| Résiduelle | 0,7459 | 21 | 0,0355 | |
| Totale | 2,209 | 23 | | |

- 3.1. Après avoir justifié l'utilisation d'un test d'analyse de variance, rappeler les conditions requises pour réaliser ce test.
- 3.2. On suppose que ces conditions sont vérifiées. En vous appuyant sur le **document 6**, réaliser ce test au seuil de risque de 5 %, puis interpréter les résultats.
- 3.3. Au vu des résultats statistiques, conclure sur l'impact de l'alimentation végétale sur l'expression de l'enzyme EV chez la truite.

DOCUMENT 1

Schéma de synthèse d'une enzyme



DOCUMENT 2

Dosage des ARN totaux par spectrophotomètre micro-volume (NanoDrop)

1- Préparation des Tissus :

Les poissons ont été euthanasiés grâce à un anesthésique concentré et disséqués rapidement, sur une plaque de verre glacée, afin de préserver au mieux les tissus. Sur chaque truite, deux organes sont prélevés :

- **L'estomac** est d'abord ouvert, vidé de son contenu, puis nettoyé au sérum physiologique (NaCl à 9 ‰). C'est l'estomac entier qui est prélevé et enfin congelé dans de l'azote liquide. Cet organe est prélevé car des enzymes digestives y sont présentes.
 - **L'intestin entier**, qui est ouvert, vidé de son contenu et nettoyé de la même façon que l'estomac. Il est ensuite prélevé puis congelé dans de l'azote liquide. L'intestin a été prélevé car des hormones et enzymes digestives y sont présentes.
- Tous les échantillons ont été stockés à - 80°C dans de l'azote liquide jusqu'à leur analyse.

2- Préparation des extraits d'ARN issus des tissus :

Préalablement nettoyé avec un inhibiteur de RNase et de l'éthanol, afin d'éviter toutes dégradations des ARN par les RNases, le tissu est mis en tube, maintenu dans de la glace et traité de la façon suivante :

- *Ajouter une solution* de Trizol reagent (1mL de Trizol pour 50 à 100 mg d'échantillon) afin d'assurer la lyse cellulaire et donc une libération de tous les composants cellulaires mais aussi d'assurer une protection immédiate des ARN, car c'est un inhibiteur de RNase.

Le Trizol est un mélange de phénol et d'isothiocyanate de guanidine (**document 3 : Éléments de la Fiche de sécurité**).

- *Mélange* échantillon / Trizol : broyer grâce au broyeur – homogénéiser.
- *Phase de séparation* entre l'ADN, les protéines et les ARN :
 - ✓ Ajouter aux échantillons un volume de chloroforme (200 µL de CHCl₃ pour 1mL de Trizol).
 - ✓ Agiter manuellement (15 secondes, jusqu'à l'obtention d'une solution de couleur rose (lait-fraise)).
 - ✓ Centrifuger 15 minutes à 12 000 g et à 4°C.

Le chloroforme permet de faciliter la séparation des phases et donc une purification de tous les autres composants cellulaires extraits.

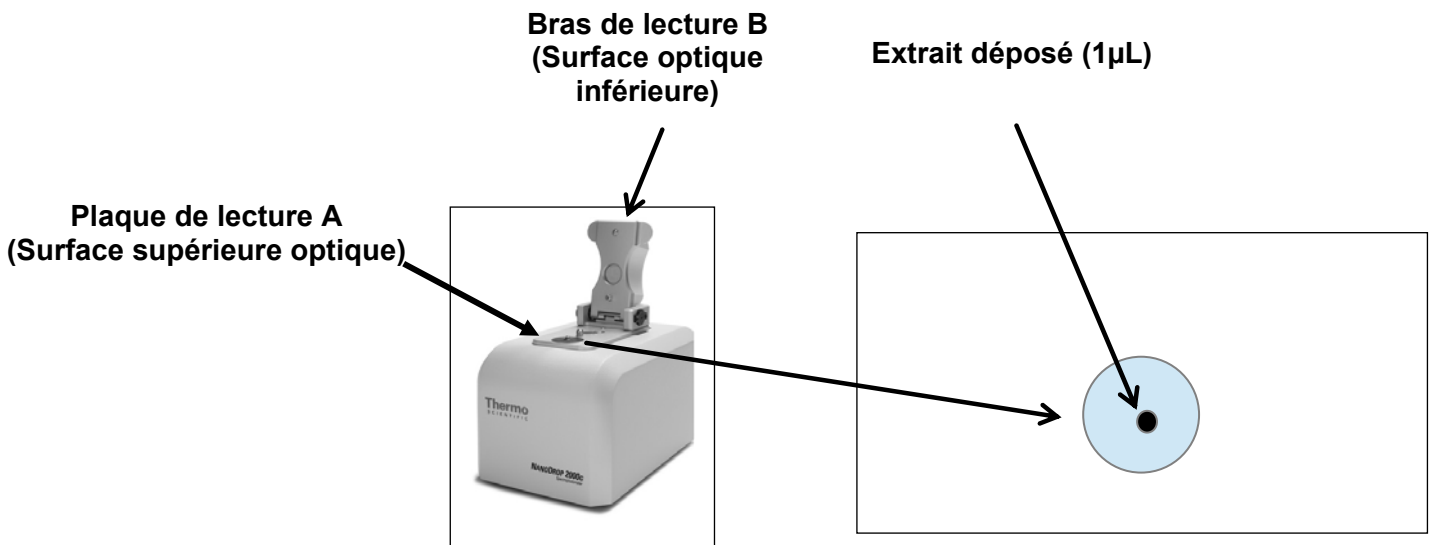
- *Récupérer les ARN* dans la phase aqueuse du tube (phase supérieure).
- *Précipiter les ARN* : ajouter un volume d'isopropanol (500 µL de C₃H₈O pour 1mL de Trizol) dans la phase aqueuse récupérée.
Formation d'un culot au fond du tube d'ARN : centrifuger pendant 10 minutes à 12 000 g. Les restes contenus dans le tube sont éliminés par renversement et par aspiration grâce à une aiguille et une trompe à vide.
- *Extrait d'ARN constitué pour analyse* : sécher le culot avec la trompe à vide puis le dissoudre dans de l'eau stérile. La quantité d'eau ajoutée dépend de la taille du culot : pour un culot bien visible, ajouter environ 75 à 100 µL d'eau.

DOCUMENT 2 (suite)

3- Quantification des ARN par spectrophotométrie microvolume (NanoDrop en mode piédestal)

La méthode permet de mesurer les absorbances, donc les concentrations. Le système utilise une longueur des trajets plus courte, ce qui permet une large gamme de mesures de concentration d'acides nucléiques. Cela ne nécessite plus d'effectuer des dilutions et l'on peut réduire le volume d'échantillon requis pour l'analyse spectroscopique des acides nucléiques. On admet que la concentration de l'échantillon est correcte lorsqu'elle est comprise entre 100 et 1500 ng/ μ L. L'appareil permet aussi d'estimer la pureté de l'échantillon en faisant le rapport A260 / A280.

Présentation du Système spectrophotométrique Nanodrop utilisé : un échantillon de faible volume (1 μ L) est déposé sur la plaque de lecture (A) puis le bras de lecture est abaissé pour procéder à la mesure (B). Le trajet optique est de l'ordre du millimètre.



ÉTAPES DU PROTOCOLE

- Nettoyer les surfaces optiques (supérieure et inférieure) du système spectrophotomètre micro-volume par pipetage de 2 à 3 μ L d'eau déminéralisée propre sur la surface inférieure optique.
- Fermer le bras de levier et s'assurer que la surface optique supérieure vient en contact avec l'eau déminéralisée. Soulever le bras de levier et essuyer les surfaces optiques avec un chiffon propre, sec, non pelucheux.
- Ouvrir le logiciel et sélectionner l'application des acides nucléiques (ARN ou ADN). Déposer 1 μ L de tampon avec une micro-pipette calibrée pour effectuer un essai à blanc sur la surface inférieure optique. Abaisser le bras de levier et sélectionner « vierge » dans l'application des acides nucléiques.
- Une fois l'essai à blanc terminé, nettoyer les deux surfaces optiques avec un chiffon propre, sec, non pelucheux, essuyer.
- Répartir 1 μ L d'échantillon d'acides nucléiques testé sur la partie inférieure optique et fermer le bras de levier. Parce que la mesure est indépendante du volume, l'échantillon a seulement besoin de combler le fossé entre les deux surfaces optiques pour une mesure à prendre.
- Sélectionner « mesure » dans le logiciel d'application. Le logiciel calcule automatiquement la concentration d'acides nucléiques et leur degré de pureté. Temps de réponse de moins de 5 à 10 secondes. Examiner le spectre obtenu. Un échantillon d'acide nucléique typique a un profil très caractéristique.
- Pour évaluer avec précision la qualité des échantillons, l'appareil permet d'évaluer, en même temps que l'analyse, la présence de contaminants associés à la technique de séparation (ou d'isolement) préalable. Le logiciel recalcule alors les concentrations en déduisant les erreurs dues à la présence de contaminants. Pour cela, des ratios sont déterminés ; sachant que les acides nucléiques absorbent à 260 nm, les protéines à 280 nm et la solution Trizol reagent à 230 nm.

DOCUMENT 3

ÉLÉMENTS DE LA FICHE TECHNIQUE DE SÉCURITÉ DU TRIZOL REAGENT

1. Identification de la substance/mélange et de la société/entreprise

Identification de la substance/formulation

| | |
|-----------------|----------------|
| Code du produit | 15596026 |
| Nom du produit | TRIZOL REAGENT |

2. Identification des dangers

GHS - Classification

Mention d'avertissement

Danger



Danger pour la santé

| | |
|---|---------------|
| Toxicité aiguë par voie orale | Catégorie 3 |
| Toxicité épidermique aiguë | Catégorie 3 |
| Acute Inhalation Toxicity - Dusts and Mists | Catégorie 2 |
| Corrosion et/ou iritation de la peau | Catégorie 1 B |
| Lésion/iritation grave des yeux | Catégorie 1 |
| Toxicité systémique sur un organe cible précis (exposition répétée) | Catégorie 2 |

| | |
|--------------|--------------------------|
| Mutagénicité | Catégorie mutagène n°. 2 |
|--------------|--------------------------|

Dangers physiques

non dangereux

Mentions de danger

H330 - Mortel par inhalation

H301 - Toxique en cas d'ingestion

H311 - Toxique par contact cutané

H314 - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves

H341 - Susceptible d'induire des anomalies génétiques

H373 - Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée

H412 - Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme

DOCUMENT 3 (suite)

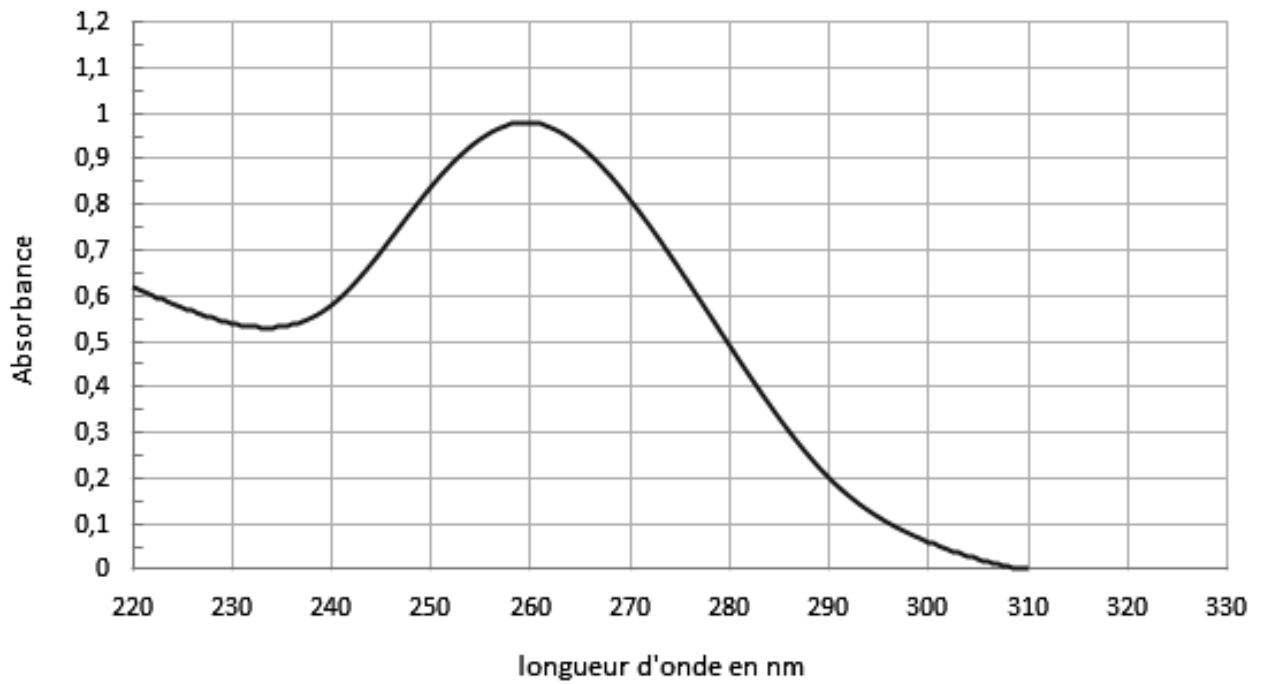
12. INFORMATIONS ÉCOLOGIQUES

| | |
|---------------------------------|--|
| Effets écotoxicologiques | Nocif pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique |
| Mobilité | see log Pow |
| Biodégradation | Intrinsèquement biodégradable. |
| Bioaccumulation | Pas d'information disponible |

| Nom Chimique | Freshwater Algae Data | Water Flea Data | Freshwater Fish Species Data | Microtox Data | log Pow |
|----------------------------|--|--|------------------------------|---------------|------------|
| Phenol 108-95-2 | Pseudokirchneriella subcapitata EC50=46.42 mg/L (96 h) Pseudokirchneriella subcapitata EC500.0188 - 0.1044 mg/L (96 h) Desmodesmus subspicatus EC50187 - 279 mg/L (72 h) | Daphnia magna EC504.24 - 10.7 mg/L (48 h) Daphnia magna EC5010.2 - 15.5 mg/L (48 h) | | | logPow1.47 |

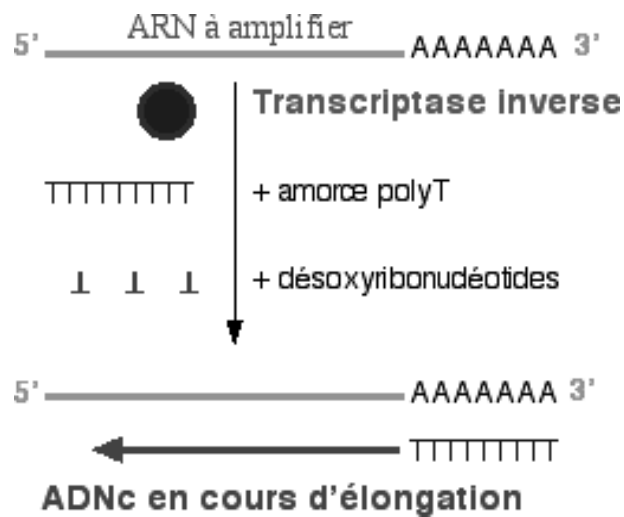
DOCUMENT 4

SPECTRE D'ABSORPTION DES ACIDES NUCLÉIQUES

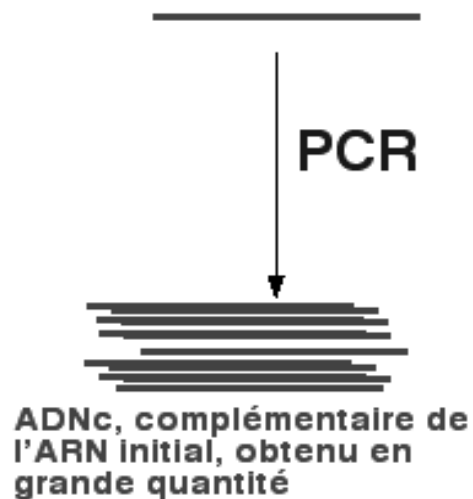


DOCUMENT 5

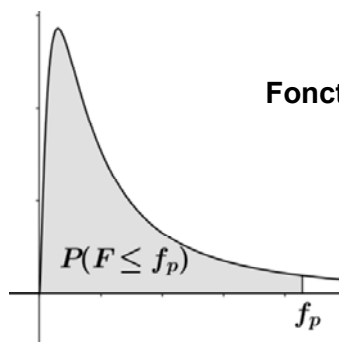
Transcription inverse suivie d'une amplification par PCR



ADNc obtenu par transcription inverse



DOCUMENT 6



Fonction de répartition d'une variable F de Fisher-Snedecor

à k_1 et k_2 degrés de liberté

Valeurs f_p telles que $P(F \leq f_p) = 0,95$

| $k_2 \backslash k_1$ | 1 | 2 | 3 | 4 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 30 |
|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | 161 | 200 | 216 | 225 | 248 | 248 | 249 | 249 | 249 | 249 | 250 |
| 2 | 18,5 | 19,0 | 19,2 | 19,2 | 19,4 | 19,4 | 19,5 | 19,5 | 19,5 | 19,5 | 19,5 |
| 3 | 10,1 | 9,55 | 9,28 | 9,12 | 8,66 | 8,65 | 8,65 | 8,64 | 8,64 | 8,63 | 8,62 |
| 4 | 7,71 | 6,94 | 6,59 | 6,39 | 5,80 | 5,79 | 5,79 | 5,78 | 5,77 | 5,77 | 5,75 |
| 20 | 4,35 | 3,49 | 3,10 | 2,87 | 2,12 | 2,11 | 2,10 | 2,09 | 2,08 | 2,07 | 2,04 |
| 21 | 4,32 | 3,47 | 3,07 | 2,84 | 2,10 | 2,08 | 2,07 | 2,06 | 2,05 | 2,05 | 2,01 |
| 22 | 4,30 | 3,44 | 3,05 | 2,82 | 2,07 | 2,06 | 2,05 | 2,04 | 2,03 | 2,02 | 1,98 |
| 23 | 4,28 | 3,42 | 3,03 | 2,80 | 2,05 | 2,04 | 2,02 | 2,01 | 2,01 | 2,00 | 1,96 |
| 24 | 4,26 | 3,40 | 3,01 | 2,78 | 2,03 | 2,01 | 2,00 | 1,99 | 1,98 | 1,97 | 1,94 |
| 25 | 4,24 | 3,39 | 2,99 | 2,76 | 2,01 | 2,00 | 1,98 | 1,97 | 1,96 | 1,96 | 1,92 |
| 30 | 4,17 | 3,32 | 2,92 | 2,69 | 1,93 | 1,92 | 1,91 | 1,90 | 1,89 | 1,88 | 1,84 |