BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES

Epreuve E3 - Unité U33

Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse

CALCULATRICE INTERDITE

Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyses

Calculatrice interdite

LA LUTTE CONTRE LES VIRUS PATHOGÈNES DE LA VIGNE

L'élaboration du vin, produit de consommation voué à l'exportation, fait l'objet de contrôles extrêmement rigoureux. Ils interviennent notamment pour :
-le choix des cépages cultivés,
-la lutte contre les agents phytopatogènes,
-la sélection des souches de microorganismes impliquées dans le processus de vinification.
Nous nous intéresserons aux infections virales de la vigne et aux techniques de lutte contre les virus impliqués.

1- Étude microscopique de la cellule végétale. (8 points)

L'inoculation d'un virus dans une plante saine, qu'elle se fasse par voie directe ou par le biais d'un vecteur animal, nécessite toujours une blessure préalable de la paroi de la cellule végétale.
Le **document 1** présente deux micrographies de cellule végétale.

1.1- Nommer et exposer le principe de la technique microscopique ayant permis d'obtenir cette image (la préparation de l'échantillon n'est pas demandée).

1.2- Légender le document 1.

2- Création de plantes génétiquement modifiées. (13 points)

Les virus pathogènes de la vigne sont à l'origine de diminutions considérables de la quantité et de la qualité des récoltes. De plus, au contraire des champignons ou des bactéries, ils échappent à la lutte chimique.
Il est possible d'induire chez une espèce végétale, une résistance à un virus en introduisant dans le génome de la plante des gènes de ce virus.
Cette technique est une voie à l'étude pour la protection contre la maladie du court-noué de la vigne, due au grapevine fanleaf virus (GFLV), transmis à la plante par un ver nématode.

2.1- Le GFLV appartient au genre *Nepovirus* de la famille des *Comoviridae.* Il s'agit d'une particule virale à symétrie icosaédrique, non enveloppée. Le génome est constitué de deux brins d'ARN(+) linéaires, chacun associé par leur extrémité 5' à une protéine VPg, intervenant dans le cycle de multiplication du virus.

2.1.1- Que signifie l'expression ARN(+) ? Justifier la réponse.

2.1.2 - Réaliser un schéma légende de la structure d'une particule de GFLV.

2.2- Un gène codant une protéine structurale du virus a été isolé, puis inséré dans un plasmide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens.* Après co-culture de la bactérie en présence de cellules permettant la régénération de pieds de vigne entiers, il est possible d'obtenir des plantes transformées dont on teste ensuite la résistance au virus.

2.2.1 - Définir un plasmide. Expliquer pourquoi il constitue un bon vecteur de clonage.

2.2.2 - Détailler les étapes suivantes du clonage du gène viral :

- construction du plasmide recombinant,
- introduction du plasmide dans la bactérie,
- sélection des clones transformés.

3 - Détection d'une infection d'un plant de viane par le GFLV. (39 points)

La détection d'une virose dans les plants de vigne est extrêmement importante en particulier lors de la sélection des cépages utilisés.
Deux méthodes peuvent être mises en œuvre :
-Test immunologique : ELISA.
-Test moléculaire : RT-PCR.

3.1- Test immunoloqiaue de détection du GFLV. (18 points)

Les tests immunologiques de mise en évidence du GFLV nécessitent l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre certains antigènes de surface du virus. Le document 2 présente un protocole d'obtention des anticorps monoclonaux.

3.1.1- Réaliser un schéma légende de la structure d'un anticorps. Localiser et nommer le site de fixation de l'antigène.

3.1.2 - Quelles sont les caractéristiques des lymphocytes B et des cellules myélomateuses utilisées dans l'étape 2 du document 2 ?

3.1.3- Compléter le document 2 et commenter l'étape 3 à l'aide des données du document 3.

3.1.4- On utilise un test de détection ELISA de type sandwich.
Schématiser les étapes du principe de cette méthode appliquée à la détection du GFLV dans un broyât de feuille de vigne, sans extraction complémentaire.

3.2- Test moléculaire de détection : RT-PCR. (17 points)

3.2.1- Donner la signification du sigle RT-PCR. Exposer le principe générai de cette méthode.

3.2.2- Le document 4 représente le protocole de réalisation technique.

3.2.2.1- Expliquer le rôle des étapes 1, 2 et 3 en précisant notamment les actions respectives de l'EDTA et du SDS.

3.2.2.2- Préciser le rôle des hexamères introduits dans le milieu réactionnel lors de l'étape 9 du document 4.

3.2.3- Pour détecter le GFLV dans un plant de vigne, on procède à l'amplification du gène codant la polymérase virale (position 4629-5345). La séquence partielle de ce gène est présentée dans le document 5.

3.2.3.1- Compléter le document 5 en écrivant la séquence du brin d'ADN complémentaire.

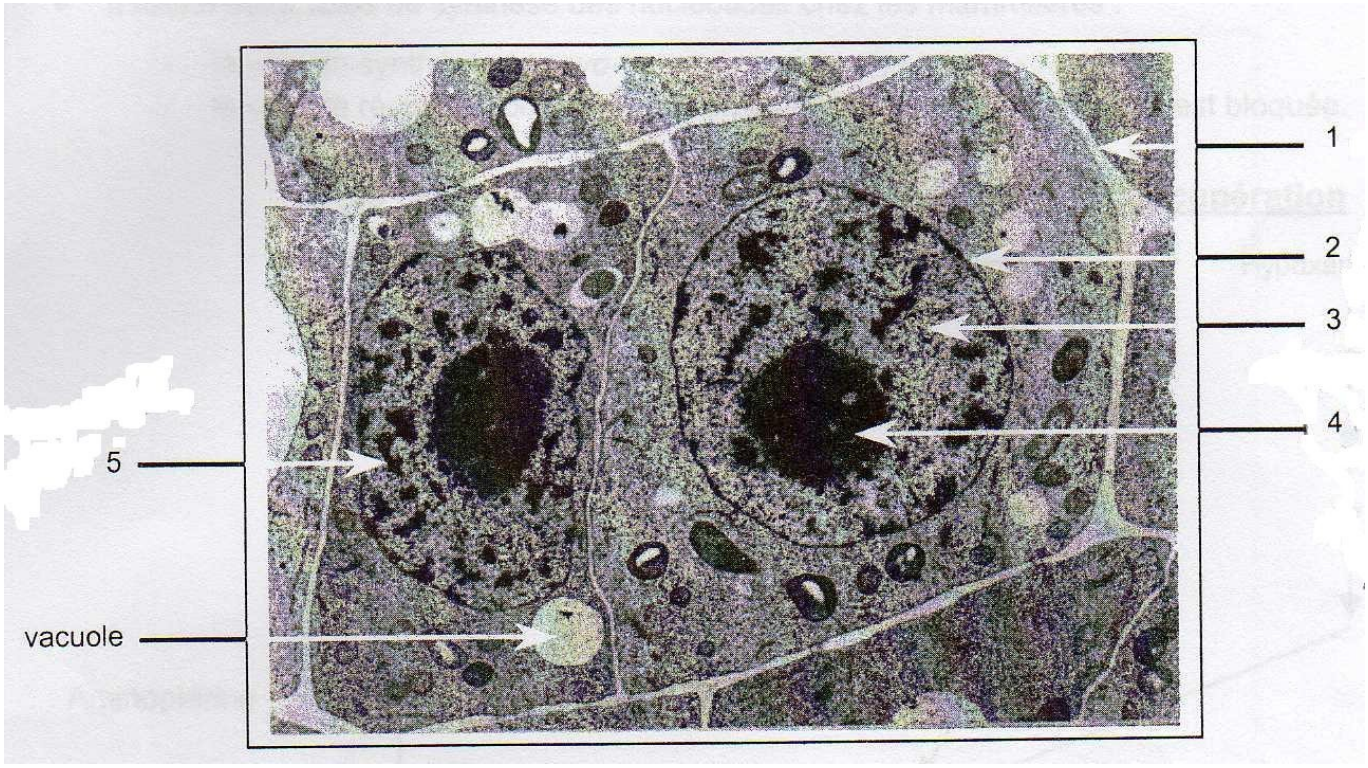
3.2.3.2- Le choix du couple d'amorces est essentiel pour l'amplification. Le document 6 propose deux couples d'amorces. Choisir celui permettant d'effectuer l'amplification de la séquence cible. Positionner chacune des amorces choisies sur le document S.

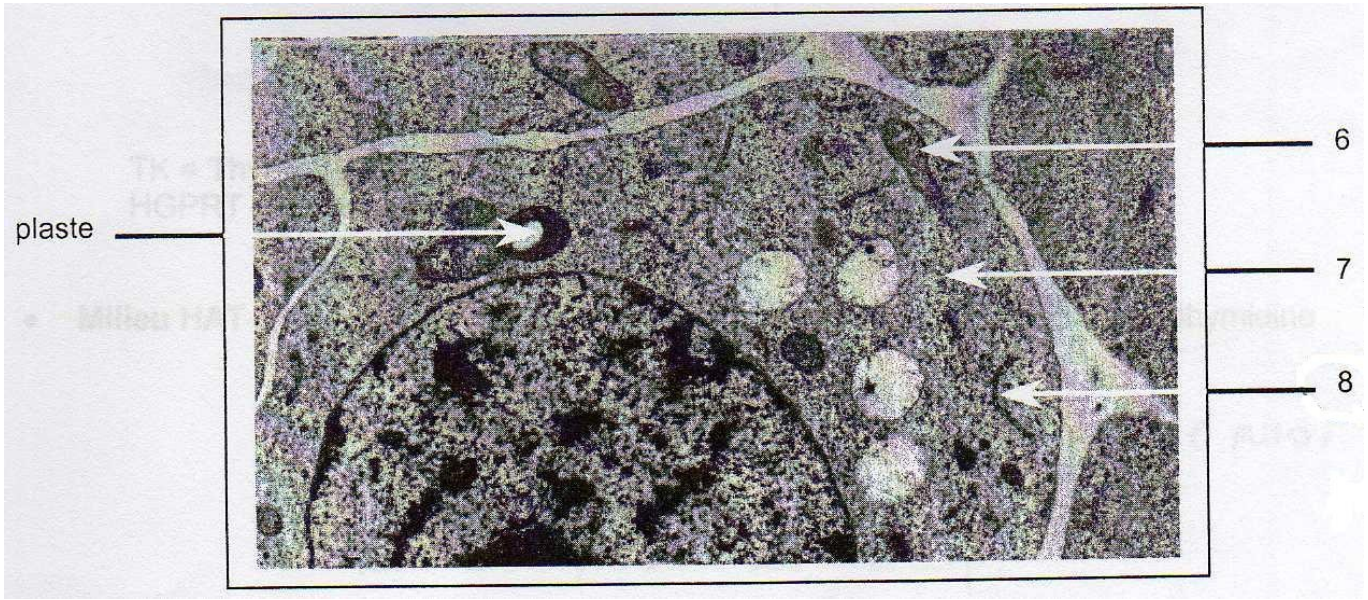
3.2.4- Schématiser le déroulement d'un cycle de PCR.

3.3- Comparaison des deux méthodes. (4 points)

Donner les principaux avantages et inconvénients des deux méthodes utilisées.

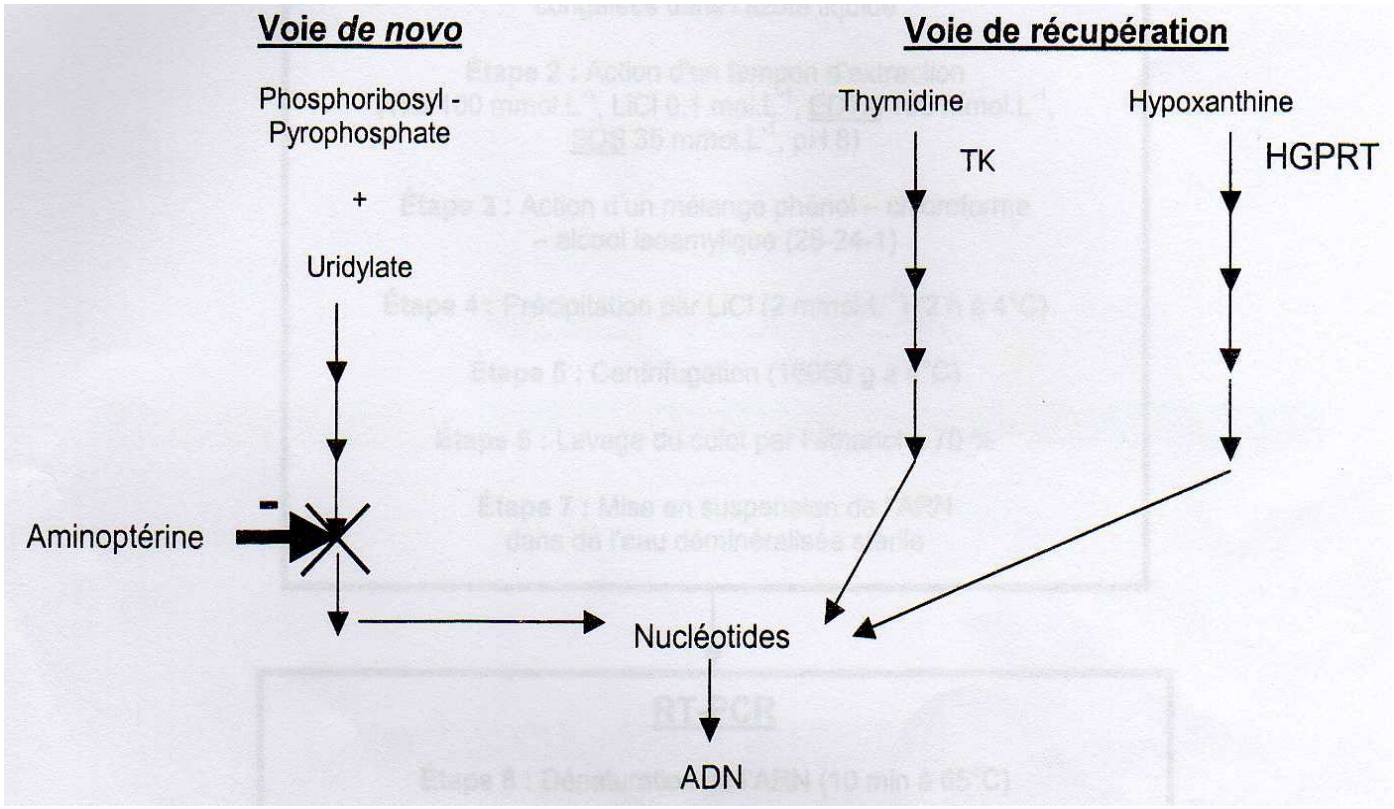
DOCUMENT 1 : MICROGRAPHIES DE CELLULE VÉGÉTALE (A: x8000 et B: x140001)





DOCUMENT 3 : VOIES DE SYNTHESE DES NUCLEOTIDES CHEZ LES MAMMIFERES

Il existe deux voies de synthèse des nucléotides chez les mammifères :
-la voie de synthèse de *novo*
-la voie de récupération qui se met en place lorsque la voie de *novo* est bloquée.



TK = Thymidine Kinase
HGPRT = Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase

Milieu HAT = Milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine

DOCUMENT 4 : PROTOCOLE DE DETECTION DU GFLV PAR RT-PCR

Echantillon : Feuille de vigne

EXTRACTION DE L'ARN VIRAL

Étape 1 : Broyage dans un mortier des feuilles congelées dans l'azote liquide

Étape 2 : Action d'un tampon d'extraction
(Tris 100 mmol.L"^{1}, LiCl 0,1 mol.L"^{1}, EDTA 100 mmol.L"^{1},
SDS 35mmol.L"^{1},pH8)

Étape 3 : Action d'un mélange phénol - chloroforme - alcool isoamylique (25-24-1)

Étape 4 : Précipitation par LiCl (2 mmol.L"^{1}) (2 h à 4°C)

Étape 5 : Centrifugation (16000 g à 4°C)

Étape 6 : Lavage du culot par l'éthanol à 70 %

Étape 7 : Mise en suspension de l'ARN dans de l'eau déminéralisée stérile

RT-PCR

Étape 8 : Dénaturation de l'ARN (10 min à 65°C)

Étape 9 : Ajout au mélange réactionnel de la rétrotranscriptase (RT)
et d'un mélange d'hexamères (45 min à 42°C).

Étape 10 : Ajout au mélange réactionnel de :
Amorces à 1 /µmol.L"^{1}
Taq polymérase à 0,05 U
Tampon PCR 10X
Mix de dNTP
$MgCl_2$
Eau distillée

Étape 11 : 1 min à92°C

Étape 12 : 1 min à 55°C

Étape13: 20s à 72°C

Étape 14 : retour à l'étape 10 (34 fois)

Étape 15 : Détection des produits de PCR par électrophorèse
sur gel d'agarose à 0,1 % de bromure d'éthydium
(20min, 100V)