

Viande de cheval ou viande de bœuf ?



Contexte : des échantillons de viande hachée destinée à la préparation de lasagnes au bœuf ont été prélevés dans une entreprise par un technicien de la DGCCRF. But de l'atelier : déterminer si ces viandes sont bien exclusivement d'origine bovine.

Objectifs :

- Extraire l'ADN d'une viande hachée destinée à la préparation de lasagnes « pur bœuf ».
- Amplifier l'ADN extrait par PCR spécifique de différentes espèces animales et végétales.
- Analyser les résultats par électrophorèse sur gel d'agarose.



1) Extraction d'ADN

L'ADN est localisé dans le noyau des cellules. Le but de l'extraction est de faire sortir l'ADN des cellules en « cassant » ces dernières.

a) Comment les cellules sont-elles lysées pour libérer l'ADN ?

Le SDS est un détergent qui :

- détruit les membranes de la cellule et du noyau ;
- permet de dissocier l'ADN des protéines.

b) Quel est le rôle de l'acétate de sodium et de l'éthanol ?

Ces réactifs permettent de précipiter l'ADN à basse température pour le séparer des constituants cellulaires donc le purifier.

c) Pourquoi utiliser de l'EDTA, des gants et de la glace ?

Ces conditions permettent de bloquer l'action des DNases qui sont des enzymes présentes sur la peau et qui sont capables de dégrader l'ADN.

d) Qu'est ce qu'apporterait une chromatographie sur colonne de silice ?

La silice fixe l'ADN et laisse passer les autres constituants cellulaires. L'ADN est ensuite « décroché » de la colonne avec un tampon spécial.

Cette étape permettrait une purification de l'ADN plus importante et nécessaire à l'étape de PCR suivante.

2) Amplification spécifique d'ADN par PCR

Objectifs : amplifier une séquence d'ADN spécifique d'une espèce animale par PCR.

a) Quels sont les rôles des réactifs et matériels intervenant dans une PCR ?

« Acteurs »	Rôles
ADN	Matrice présente ou non dans l'ADN extrait : produit recherché
Amorces	Petites séquence d'ADN simple brin qui fonctionnent par couple. Chaque couple d'amorce est spécifique de l'ADN d'une espèce animale ou végétale
Désoxyribonucléotides	Ce sont des « briques » constituant l'ADN et qui seront utilisées pour fabriquer de nouvelles molécules d'ADN
Taq polymérase	Enzyme capable de synthétiser de nouvelles molécules d'ADN et donc de « recopier » spécifiquement l'ADN reconnu par les amorces
Tampon	Permet d'obtenir un environnement adapté pour la synthèse d'ADN
Thermocycleur	Appareil permettant de chauffer les tubes à différentes températures selon un cycle particulier adapté à l'amplification d'ADN

b) Comment la PCR permet-elle d'amplifier spécifiquement l'ADN d'une espèce animale ou végétale ?

La PCR met en jeu un cycle :

- Dénaturation de l'ADN à 95°C : séparation des deux brins de la molécule d'ADN.
- Hybridation des amorces à une température entre 40 et 65°C en fonction des amorces : si l'ADN reconnu par les amorces est présent, les amorces vont se fixer dessus de façon spécifique car elles sont complémentaires de cet ADN.
- Elongation à 72°C : la Taq polymérase s'appuie sur les amorces pour synthétiser un nouveau brin d'ADN complémentaire du premier.

Un cycle permet de multiplier la quantité d'ADN par deux.

Une PCR est constituée de 30 cycles environ.

L'amplification de l'ADN permet de passer d'une molécule à plus d'un milliard.

La spécificité de l'amplification est donc due aux amorces dont chaque couple ne reconnaît que l'ADN d'une espèce animale ou végétale.

Sur nos essais, on utilise plusieurs couples d'amorces, chaque couple étant spécifique d'une espèce. La taille des ADN amplifiés est liée aux amorces utilisées et varie d'une espèce à l'autre.

c) Quel est l'intérêt d'obtenir plus d'1 milliard de molécules d'ADN identiques ?

Une molécule d'ADN est trop petite pour être visualisée. Avec plus d'un milliard de molécules, la quantité est suffisante pour voir l'ADN dans un gel.

3) Analyse de l'ADN amplifié par électrophorèse en gel d'agarose

Objectifs :

- séparer les fragments d'ADN amplifiés en fonction de leur taille
- déterminer l'espèce d'origine de l'ADN amplifié.

a) Pourquoi l'ADN est-il entraîné dans le gel par le courant électrique et vers quel pôle se déplace t'il ?

L'ADN est une molécule chargée négativement ce qui lui permet :

- d'être entraînée par un courant électrique
- de se déplacer vers l'anode, le pôle positif.

b) Pourquoi les fragments d'ADN les plus petits migrent le plus loin dans le gel ?

Le gel forme un filet dont les mailles freinent le déplacement de l'ADN.

Les molécules plus petites passent plus facilement entre les mailles, elles sont donc moins freinées et se déplacent plus vite donc plus loin dans le gel.

Les grosses molécules ont du mal à passer entre les mailles du gel, se déplacent moins vite donc moins loin.

c) Comment peut-on voir l'ADN dans le gel d'électrophorèse ?

Un réactif ajouté dans le gel se fixe à l'ADN et est capable d'émettre une lumière rose quand il est éclairé par des rayons ultraviolets.

d) Interpréter les résultats et conclure sur une éventuelle fraude concernant la viande hachée analysée.

L'analyse consiste à comparer les tailles des ADNs amplifiés dans les essais (hachés 1, 2...) par rapport aux témoins (ADNs provenant des différentes espèces testées : cheval, mouton...). Une bande d'ADN, observée dans un essai et présentant la même taille d'ADN qu'une espèce témoin, signifie que la viande testée contient de l'ADN correspondant à cette espèce.

Par exemple, le haché 1 présente deux bandes d'ADN :

- une bande à 271 pb correspondant à celle observée pour le témoin Bœuf,
- une bande à 212 pb correspondant à celle observée pour le témoin Porc.

Le haché 1 contient donc de l'ADN de bœuf et de l'ADN de porc. Cette viande est donc constituée en partie de viande de bœuf et en partie de viande de porc.

Viande hachée testée	faites le lien...	Interprétation : présence de...
Haché 1		bœuf + soja
Haché 2		bœuf + cheval
Haché 3		bœuf
Haché 4		bœuf + porc

Conclure sur une éventuelle fraude concernant les viandes hachées analysées :

Viande hachée testée	Conformité : + : conforme - : non conforme : fraude
Haché 1	-
Haché 2	-
Haché 3	+
Haché 4	-