



Ce document a été mis en ligne par l'organisme [FormaV®](#)

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :

www.formav.co/explorer

CORRIGE

Ces éléments de correction n'ont qu'une valeur indicative. Ils ne peuvent en aucun cas engager la responsabilité des autorités académiques, chaque jury est souverain.

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR

BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENIE GENETIQUE

SESSION 2012

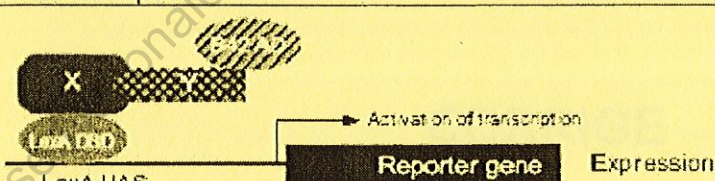
DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

CORRIGE

Ce corrigé comporte 4 pages numérotées de 1/4 à 4/4.

Un système double hybride chez la levure

N°	Réponse	Points
1.	Le vecteur pHybLex/Zeo	8 points
1.1	- Vecteur de clonage : se multiplie en un grand nombre d'exemplaires identiques par réplication d'où une amplification de l'insert Présence de l'origine de réplication pUC ori, du gène de sélection des bactéries transformées (zeocin), d'un MCS pour l'insertion	2
1.2	Endonucléase qui clive chacun des deux brins d'un ADN bicaténaire au niveau d'un site spécifique appelé site de restriction.	1
1.3	Palindromique, (symétrique), 4 à 6 pb	1
1.4.	- coupure franche (ex GGG ∇ CCC) - coupure cohésive 3' sortante (ex CTGCA ∇ G) ou coupure cohésive 5' sortante (ex G ∇ AATTC)	2
1.5.	Promoteur : site de fixation de l'ARN polymérase pour l'initiation de la transcription. Fort : permet un taux de transcription élevé.	2
2.	Le vecteur pYESTrp2	8 points
2.1.	Le phagemide pYESTrp2 est, comme pHybLex/Zeo, un vecteur - navette : marqueurs de sélection des transformés : résistance à l'ampicilline pour les bactéries et gène TRP –marqueur d'auxotrophie- pour la levure), origines de réplication (pUC ORI chez les bactéries et 2 μ ori chez les levures), - d'expression car un promoteur PGal1 et un terminateur CYC1TT de part et d'autre du MCS où est sous-cloné le gène	2
2.2.	NLS : Séquence de localisation nucléaire => étiquette adressant la protéine de fusion dans le noyau. V5 epitope : étiquette qui sera reconnue par un anticorps anti-V5, permettant une confirmation de l'expression ou une localisation aisée de la protéine de fusion.	1
2.3.	- Acide désoxyribonucléique complémentaire - Copie ADN d'un ARNm mature sans intron dont le premier brin est obtenu par transcription inverse	1
2.4.	- Synthèse du premier brin amorçage (oligo dT ou amorçage aléatoire), transcriptase inverse, dNTPs - Elimination du brin d'ARN - Synthèse du deuxième brin amorçage (spécifique ou universel) ADN polymérase, dNTPs	2
2.5.	- Extraction des ARN messagers - Synthèse d'ADNc - Ajout de sites de restriction (par exemple en utilisant des « linkers » synthétiques) - Insertion dans un vecteur : digestions de l'ADNc et du vecteur, ligature - Transformation de bactéries hôtes - Sélection des clones transformants	2

3.	Principe de la recherche d'interactions de protéines par la méthode double hybride	15 points
3.1.	LexA : facteur de transcription, protéine qui recrute l'ARN polymérase au niveau d'un promoteur pour démarrer la transcription au bon endroit (site +1) et dans le bon sens. - domaine de liaison à l'ADN : LexA DBD - domaine de transactivation : LexA AD	2
3.2.	Fermeture éclair à leucine, doigts de zinc, hélice tour hélice, hélice boucle hélice	1
3.3.	Protéine hybride composée de plusieurs protéines différentes formant une seule chaîne polypeptidique, après ligature des ORF correspondantes. Protéine fusion $\text{NH}_2\text{-X/LexA-COOH}$ dans le pHybLex/Zeo Protéine fusion $\text{NH}_2\text{-V5 épitope-NLS-B42AD-Y-COOH}$ dans le pYESTrp2	2
3.4.	Clonage en phase, c'est-à-dire sans rupture (décalage) du cadre de lecture, de manière à conserver les codons des deux ORF fusionnées	1
3.5.	Milieu de culture pour levures dépourvu de tryptophane et additionné de Zéocine. Selon les marqueurs de sélection correspondant à chaque plasmide.	1
3.6.	Gène régulateur i, répresseur Lac Promoteur Lac, unique, Opérateur Lac, contrôlé par le répresseur Gènes de structure Z, Y, A ARN polycistronique (Ensemble de gènes placés sous le contrôle d'un seul promoteur et d'un régulateur. Ces gènes sont transcrits en un seul ARNm polycistronique.)	3
3.7.	Expression concertée des différents gènes nécessaires à une voie métabolique Economie car adaptation instantanée aux conditions de milieu (opéron « allumé » uniquement si le substrat est disponible dans le milieu par exemple).	1
3.8.	Gène permettant de détecter et de mesurer l'activité d'éléments cis ou trans de régulation de la transcription car codant pour une protéine facilement détectable et quantifiable, le plus souvent par son activité enzymatique.	1
3.9	Enhancer : séquence régulatrice, site de fixation d'une protéine activatrice de la transcription	1
3.10	 Si les protéines X et Y interagissent, le gène rapporteur Lac Z est trans-activé. La β-galactosidase ainsi exprimée hydrolyse le XGal en produit bleu qui précipite au niveau des colonies de levures.	2
4	Analyse des protéines de fusion	7 points
4.1.	- Molécules analysées : Western blot : protéines Northern blot : ARN Southern blot : ADN	3 (1,5)

	- Etapes : 1. Electrophorese 2. Transfert sur membrane 3. Detection spécifique	(1,5)
4.2.	L'Ac utilisé est dirigé contre l'épitope V5. Seules les protéines portant ce motif seront reconnues. Absence de bandes dans les pistes 1 et 3. Les pistes 2, 4, 5 présentent une bande. La spécificité de l'Ac est avérée. La piste 2 correspond au plasmide « vide », et montre donc la protéine V5-B42. Les pistes 4 et 5 contiennent les protéines V5-B42 fusionnées avec une protéine « proie » de taille différente. Les protéines de fusion sont donc bien exprimées et correctement élaborées.	3
4.3.	Ac anti LexA DBD ou anti X Et Ac anti V5 (Ac anti Y impossible car Y n'est pas connu et est variable)	1

sur 40 points, à diviser par 2 pour obtenir une note sur 20

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire) : 1 point	
1 point	0 point
Peu de fautes (maxi 3 à 5 par page), les termes scientifiques usuels sont correctement orthographiés.	Très nombreuses fautes d'orthographe et/ou de grammaire (au moins 10 par page), des erreurs pour l'orthographe des termes scientifiques usuels.
Vocabulaire adapté, pas de contre-sens.	Vocabulaire inadapté, contre-sens.
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture : 1 point	
1 point	0 point
Copie présentée de façon soignée, facilitant le travail de lecture du correcteur (texte et schémas).	Copie « bâclée », lecture fastidieuse liée à un manque de soin apporté au traitement des questions (textes et schémas).
Lecture fluide, texte facilement compréhensible.	Formulations non claires nécessitant une relecture.