



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

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENIE GENETIQUE

SESSION 2015

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00

COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé : Dictionnaire français/anglais.

Tout autre matériel est interdit.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.

Ce sujet comporte 8 pages numérotées de 1/8 à 8/8.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2015
U2 Biologie moléculaire et génie génétique	Code : BOE2BMO	Page : 1 / 8

Amélioration de la résistance au stress hydrique de plantes par modifications génétiques

L'obtention de plantes tolérant mieux la sécheresse constitue un enjeu agronomique considérable.

Les recherches actuelles concernent différents transgènes susceptibles d'améliorer cette résistance, mais aussi des méthodes alternatives à l'utilisation de plantes génétiquement modifiées.

On se propose d'aborder quelques aspects de ces recherches.

1. Apport d'un transgène bactérien (7,5 points)

1.1. Clonage et caractérisation du gène *cspB* de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)

Le gène *cspB* de *B. subtilis* est un gène d'intérêt susceptible d'améliorer la résistance au stress hydrique de céréales.

Une banque du génome de *B. subtilis* a été constituée dans *Escherichia coli* (*E. coli*).

Pour cribler cette banque, on construit des oligonucléotides « dégénérés » à partir de la séquence de la protéine CspB. Pour être utilisés comme sondes, ces oligonucléotides sont ensuite marqués au phosphore 32.

- 1.1.1. Le code génétique est dit « dégénéré ». Préciser la signification de ce qualificatif.
- 1.1.2. Expliquer comment les oligonucléotides « dégénérés » peuvent être conçus à partir de la séquence protéique.

Le criblage de la banque est effectué après réplique des colonies d'*E. coli* sur une membrane de nylon et fixation de l'ADN génomique de *B. subtilis* hébergé par la bactérie. Le **document 1** présente le protocole de ce criblage.

- 1.1.3. Indiquer le rôle de l'étape « stringent washes »
- 1.1.4. Justifier les conditions utilisées lors de cette étape du protocole.

Les sondes oligonucléotidiques permettent de détecter, après hybridation, plusieurs clones positifs.

Le séquençage de l'insert d'un clone positif a conduit aux résultats exposés dans le **document 2**.

- 1.1.5. Donner la signification des sigles **rbs** et **ORF** figurant dans ce document.

Ce document comporte des informations obtenues par le logiciel BLAST.

- 1.1.6. Expliquer comment le logiciel BLAST a permis d'obtenir les informations présentées dans le **document 2**.

1.2. Transgénése médiée par *Agrobacterium tumefaciens* ou « agrofection »

Une société commercialise un maïs transgénique (MON 87460) rendu plus tolérant à la sécheresse par l'apport du gène *cspB* de *Bacillus subtilis*.

Ce maïs a été obtenu par « agrofection », selon le processus suivant :

- Transformation d'une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* « désarmée » (c'est-à-dire hébergeant le plasmide Ti dépourvu de sa région ADN-T) par un vecteur binaire contenant un ADN-T synthétique « chargé » avec le ou les transgène(s) d'intérêt.
- Introduction de la bactérie ainsi transformée dans l'espace intercellulaire de la plante.

1.2.1. Indiquer un avantage majeur de l'agrofection par rapport aux autres techniques de transfection des végétaux.

Le **document 3** présente le schéma général d'un vecteur binaire non encore « chargé » avec le transgène d'intérêt.

1.2.2. Préciser la composition et l'intérêt de la séquence « MCS ».

1.2.3. Indiquer les fonctions des séquences « Ori » d'une part, « LB » et « RB » d'autre part.

1.2.4. Rappeler la caractéristique essentielle d'un gène rapporteur.

2. Surexpression d'un transgène végétal (3 points)

L'expression des gènes de résistance à la déshydratation dans le riz est sous le contrôle de la séquence DRE (dehydration-responsive element).

Cette séquence est reconnue par un facteur de transcription DREB (DRE binding protein).

2.1. En prenant l'exemple du couple DRE-DREB, dégager en quelques phrases, **sans schéma**, le principe de l'intervention des séquences cis-régulatrices et des facteurs de transcription dans la modulation de l'expression des gènes eucaryotes.

Le facteur de transcription DREB est codé par le gène *dreb*. A partir des ARNm de ce gène, un ADNc a été synthétisé (ADNc *dreb*). Différentes lignées de riz ont été obtenues par transgénése additive en intégrant dans leur génome l'ADNc *dreb* placé derrière le promoteur constitutif fort du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur.

Le **document 4** montre le comportement de ces lignées face à un stress hydrique.

2.2. Indiquer l'intérêt de placer l'ADNc *dreb* derrière un promoteur fort.

2.3. Analyser les résultats obtenus puis détailler le lien entre la transgénése et ces résultats.

3. Mutagénèse aléatoire du gène *nfya5* et sélection des plantes résistantes à la sécheresse (8,5 points)

La mutagénèse chimique n'est pas considérée comme donnant naissance à des plantes génétiquement modifiées puisqu'aucune séquence d'ADN exogène n'a été intégrée dans le génome de la plante.

Elle consiste à mettre en contact des graines avec un agent mutagène, puis à sélectionner les plantes mutantes d'intérêt.

L'EthylMéthane Sulfonate (EMS), est un agent mutagène très utilisé, qui réagit avec la guanine pour former de la O-6-ethylguanine qui s'apparie préférentiellement avec une thymine lors de la réplication.

3.1 Montrer à l'aide d'un **schéma** comment l'EMS peut conduire à une transition $G : C \Rightarrow A : T$ au cours de la réplication.

3.2. Caractérisation de mutants par RT-qPCR

La caractérisation de la surexpression du gène ciblé s'effectue actuellement par RT-qPCR.

Les étapes de la RT-qPCR

Le **document 5** présente les étapes de l'analyse de l'expression d'un gène par RT-qPCR.

3.2.1. Indiquer l'intérêt du « DNase treatment » et le rôle des « random hexamers ».

Le **document 6** présente le résultat d'un contrôle en gel d'agarose de la qualité des ARN totaux.

3.2.2. Analyser l'électrophorégramme. Proposer une conclusion quant à la qualité de la préparation.

La qPCR est réalisée dans un thermocycleur comportant un module fluorimétrique qui permet de suivre en temps réel la cinétique de l'amplification en présence d'un fluorochrome dans le milieu réactionnel : le SYBR[®]Green.

3.2.3. Expliquer en quoi la fluorescence du SYBR[®]Green constitue un indicateur du déroulement, au cours du temps, de l'amplification lors d'une PCR (dite en temps réel).

3.2.4. - Représenter l'allure de la courbe d'amplification obtenue lors d'une PCR en temps réel.
- Positionner le cycle seuil (Ct) sur la courbe.
- Préciser l'évolution quantitative du Ct en fonction du nombre de copies initiales dans le milieu réactionnel.

Le choix d'un gène de référence

La quantification relative en RT-qPCR utilise un « gène de référence », généralement un « gène de ménage » tel que le gène codant la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

3.2.5. Indiquer la qualité recherchée pour un gène de référence.

Des mutants moins sensibles à la sécheresse

Le **document 7** présente le résultat d'une étude réalisée par RT-qPCR sur différentes lignées de la plante modèle *Arabidopsis* obtenues par mutagenèse du gène *nfya5*.

3.2.6. Analyser le document et proposer une explication aux résultats obtenus.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point) :

- justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire),
- clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture.

Document 1 : Protocole du criblage

Nylon transfer membranes were prehybridized in 5 x SSC 1% (weight/volume) blocking reagent for 1 h at 65°C. (1 x SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)

The probe was added to the prehybridization mix and hybridized for 5 h at 42°C.

Plaque transfer membranes hybridized with oligonucleotides were subjected to two **stringent washes** : one in 1x SSC 0.5% SDS for 5 min at room temperature and one in 0.2x SSC 0.1% SDS for 15 min at 65°C.

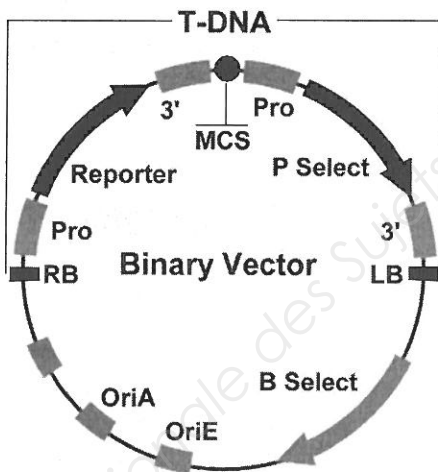
Filters were exposed to Kodak film.

Document 2 : Résultats du séquençage

The DNA sequence revealed that the *cspB* gene is 201 bp in length and encodes a protein of 67 amino acid residues. A strong potential **rbs** (AGGAGGA) is located 6 nucleotides upstream of the initiation codon AUG. The *cspB* **ORF** is followed by two hairpin loop structures similar to rho-independent terminators.

Sequence comparisons with EMBL database revealed 61% identity to the major cold shock protein of *E.coli* and 43% identity to conserved regions of eukaryotic DNA binding transcription factors.

Document 3 : Vecteur binaire non « chargé » avec le transgène d'intérêt



Pro = eucaryotic promoter

3' = 3' signal

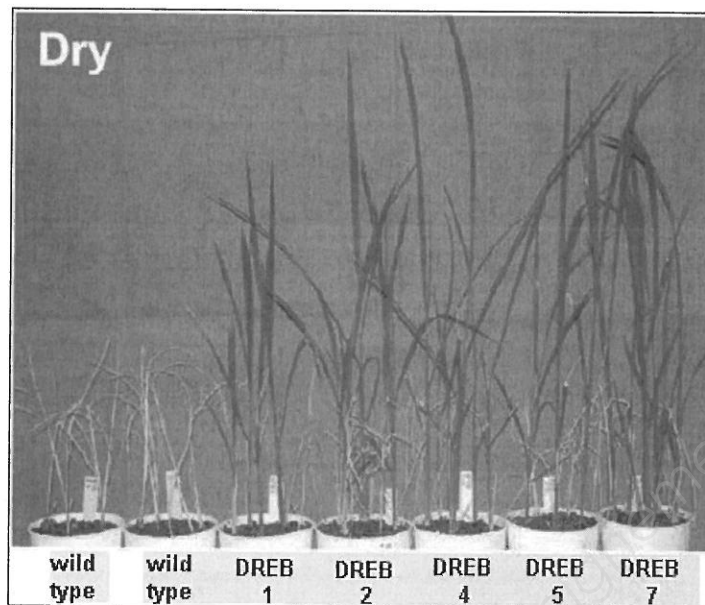
RB et LB : right et left border

reporter : reporter gene as GUS, LUC, GFP

P Select : plant selectable marker

B Select : bacterial selectable marker

Document 4 : Drought tolerance of transgenic rice plants



Les plantes ont été cultivées en pots contenant un mélange de terre et de vermiculite, à 28°C, sous lumière continue.

Ensuite les plantes âgées de 17 jours ont été cultivées 9 jours avec privation d'eau puis 13 jours avec hydratation.

Document 5 : Étapes de l'analyse de l'expression d'un gène par RT-qPCR

Total RNA was extracted using trizol reagent.

RNA quality analysis and quantification were performed by agarose-gel analysis and a spectrophotometer measurement, respectively.

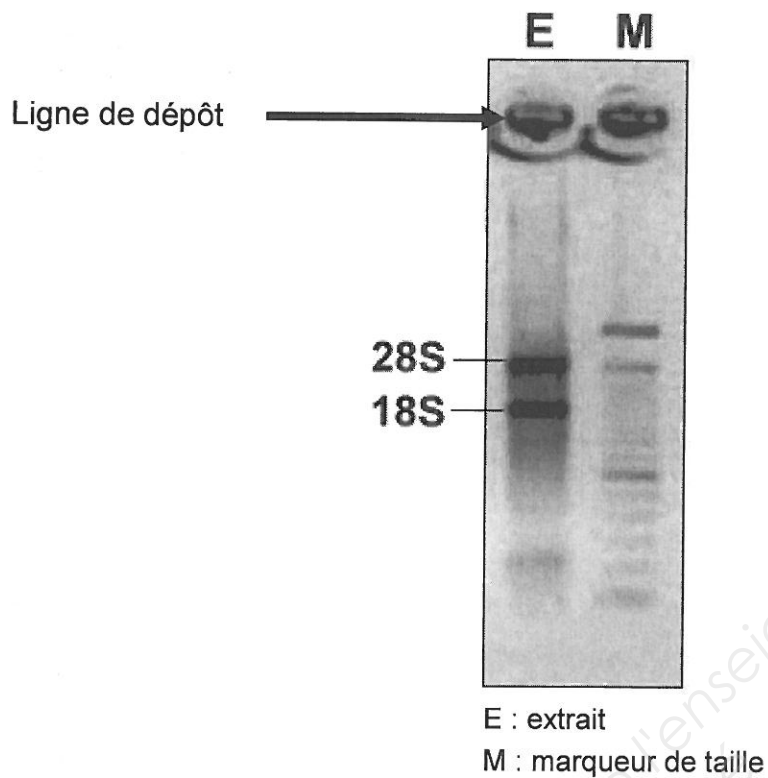
DNase treatment was done for preparation of DNA-free RNA prior to RT-qPCR.

First-strand cDNAs were synthesized by using **random hexamers**.

Real time polymerase chain reactions were performed in 96 well plates using SYBR Green to detect dsDNA (double strand) synthesis. The data were collected after the last (extension) phase.

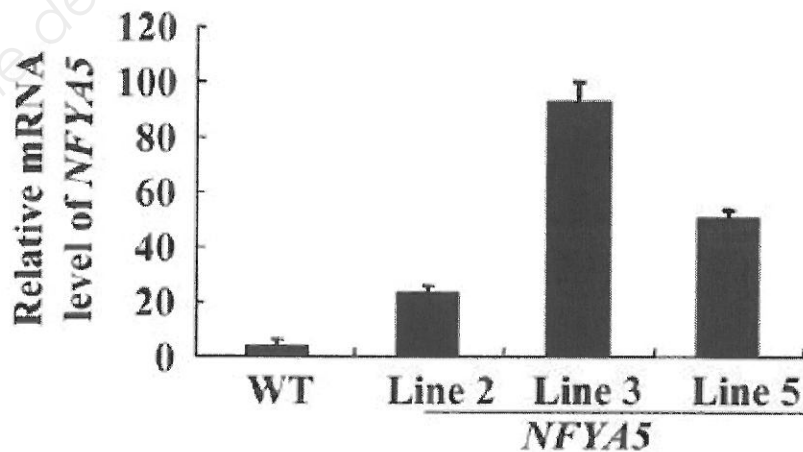
After the PCR reaction, raw fluorescence data generated in sequence detection was used for the calculation of cycle threshold (Ct) determination.

Document 6 : Agarose gel electrophoresis of total RNA extract



Document 7 : Résultat d'une étude réalisée par RT-qPCR sur différentes lignées d'*Arabidopsis* obtenues par mutagenèse

Étude sur différentes lignées après 14 jours de sécheresse



WT = Wild type : lignée sauvage d'*Arabidopsis*.