



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 MOLÉCULAIRE ET GÉNIE GÉNÉTIQUE

SESSION 2016

DUREE : 2h00
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français, tout autre matériel est interdit.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 9 pages numérotées de 1/9 à 9/9.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2016
Biologie moléculaire et génie génétique	BOE2BMO	Page : 1/9

L'interférence à ARN

Le processus d'interférence à ARN est un mécanisme naturel de défense de l'organisme (contre les attaques virales par exemple). La découverte et la compréhension de ce mécanisme ont permis d'en faire un outil de biologie moléculaire de plus en plus utilisé.

Le processus d'interférence à ARN est déclenché par la présence d'un ARN double brin dans la cellule. Cet ARN bicaténaire est découpé en présence d'une ribonucléase en petits fragments double brin appelés « siRNA » (small interfering RNA). Un complexe multiprotéique dégrade le brin sens du « siRNA » tandis que le brin anti-sens s'hybride avec un ARN messager de séquence complémentaire. L'ARN messager cible est alors hydrolysé par le complexe multiprotéique.

Une équipe de recherche utilise la technique d'interférence à ARN dans le cadre de l'étude des encéphalopathies épileptiques précoces chez l'être humain. Un défaut de l'enzyme glutamine synthétase pourrait être impliqué. Afin d'étudier les conséquences de l'absence de cette enzyme, une technique d'inhibition de la production de glutamine synthétase est mise en œuvre.

1. Recherche de la séquence de l'ARN messager (1 point)

La première étape consiste à concevoir la séquence d'un « siRNA ». Pour cela la séquence de l'ARN messager de la glutamine synthétase du rat (*Rattus norvegicus*) est recherchée.

1.1 Indiquer un portail de bioinformatique pouvant être utilisé.

1.2 Proposer, de manière, ordonnée les mots clés à saisir pour la recherche à partir de ce portail.

2. Construction d'un vecteur d'expression contenant la séquence du « siRNA » (7 points)

Une fois choisie, la séquence nucléotidique du « siRNA » est synthétisée puis doit être insérée dans un vecteur d'expression.

Le vecteur utilisé est le plasmide mU6Pro dont la carte est présentée dans le **document 1**.

2.1 A partir de ce document, justifier l'appellation "vecteur d'expression".

Le plasmide mU6Pro est obtenu par maxipréparation selon le protocole du **document 2**.

2.2 Exposer les événements moléculaires qui ont lieu au cours des étapes 3 et 4 de ce protocole.

2.3 Indiquer le rôle de la colonne utilisée à partir de l'étape 6.

L'ADN plasmidique obtenu est soumis à une digestion double par les endonucléases de restriction *Bbs* I et *Xba* I suivie d'une électrophorèse préparative en gel d'agarose. Le résultat obtenu est présenté dans le **document 3**.

2.4 Indiquer l'électrode vers laquelle migrent les produits de digestion. Argumenter la réponse à l'aide de la structure de l'ADN.

2.5 Identifier les deux bandes présentes sur la photographie du gel.
Expliquer le raisonnement.

A partir de ce gel, le produit de digestion nécessaire à la construction du vecteur recombinant est purifié.

2.6 Lister les étapes techniques permettant cette purification.

Après purification, la solution d'ADN obtenue est dosée par spectrophotométrie d'absorption.

2.7 Préciser la longueur d'onde choisie pour la mesure et rappeler l'élément constitutif des nucléotides responsable de la propriété optique permettant la mesure.

La séquence nucléotidique du « siRNA » a une taille de 60 paires de bases et possède à ses extrémités les sites de restriction des endonucléases *Bbs* I et *Xba* I. Cette séquence, sous forme d'ADN double brin, est insérée dans le vecteur purifié grâce à l'activité d'une enzyme appelée ligase.

2.8 Montrer en quoi l'utilisation de ces deux enzymes de restriction permet d'améliorer l'efficacité d'insertion.

2.9 Ecrire le produit de la réaction catalysée par la ligase présentée dans le **document 4**.
Nommer la liaison formée.

3. Transformation de cellules bactériennes et vérification des clones (3 points)

Le vecteur recombinant est introduit dans des cellules bactériennes par transformation. Les bactéries transformées sont étalées sur des boîtes de milieu nutritif contenant de l'ampicilline. Un certain nombre de colonies est ainsi obtenu, après culture.

A partir de chaque colonie une minipréparation d'ADN plasmidique est effectuée et la qualité des clones vérifiée par hydrolyse enzymatique puis séquençage.

Le séquençage est réalisé par la méthode de Sanger automatisée. La composition qualitative du mélange réactionnel est la suivante :

- ADN à séquencer
- amorce
- Taq polymérase
- 4 dNTPs
- 4 ddNTPs marqués par quatre fluorochromes différents
- tampon approprié
- eau

3.1 Rappeler la signification du sigle "ddNTP" et préciser la particularité structurale de cette molécule.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2016
Biologie moléculaire et génie génétique	BOE2BMO	Page : 3/9

3.2 A l'aide de schémas détaillés, exposer le principe du séquençage de Sanger automatisé à partir des séquences nucléotidiques suivantes :

matrice à séquencer : 5' – A C T T G C C A A G G A T C T – 3'

amorce : 5' – A G A T C C – 3'

4. Transfection de cellules nerveuses de rat et expression en « siRNA » (1 point)

L'ADN plasmidique des clones transformés est transfecté dans des cellules nerveuses de rat où le gène de la glutamine synthétase est naturellement exprimé.

4.1 Citer deux méthodes de transfection.

Le vecteur est exprimé dans les cellules transfectées : la séquence de l'insert, présentée dans le **document 5**, est transcrite en « siRNA ». La séquence sens de l'insert est fournie

4.2 Analyser cette séquence pour en déduire la structure secondaire de l'ARN formé.

5. Quantification de l'expression du gène de la glutamine synthétase dans les cellules transfectées (6 points)

La technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR), présentée dans le **document 6** est fondée sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent émis par un fluorochrome, le SYBR®Green.

5.1 Expliquer les propriétés du SYBR®Green nécessaires à la réalisation de la PCR quantitative.

5.2 Préciser l'étape du cycle de PCR pendant laquelle le signal fluorescent est mesuré.

La qPCR permet de quantifier la concentration initiale en ADN. A cette fin, on réalise une gamme d'étalons de concentrations croissantes en ADN. Le **document 6** présente les courbes d'amplification obtenues pour trois concentrations en ADN en double essai.

5.3 A l'aide du **document 6**, expliquer la méthode de détermination du cycle seuil (Ct). Déterminer la valeur du Ct pour chaque solution étalon d'ADN.

Le **document 6b** exprime l'évolution du cycle seuil en fonction de la concentration en ADN : $Ct = f(\log [ADN])$.

5.4 Expliquer la raison pour laquelle le coefficient directeur de la droite d'étalonnage est négatif en PCR quantitative.

En fin de réaction, pour chaque essai, une courbe de fusion est réalisée afin de déterminer la spécificité de l'amplification. Le résultat est donné dans le **document 6**.

5.5 Déterminer la T_m pour chacun des tests et conclure.

5.6 Expliquer pourquoi l'utilisation du SYBR®Green rend cette étape obligatoire.

Pour vérifier l'efficacité des « siRNA », les ARN des cellules transfectées sont extraits et les ADN complémentaires (ADNc) obtenus ensuite par réaction de transcription inverse. A

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2016
Biologie moléculaire et génie génétique	BOE2BMO	Page : 4/9

partir de ces ADNc une (qPCR) permet de quantifier l'expression du gène de la glutamine synthétase.

Une qPCR est réalisée sur l'ADNc du vecteur mU6pro GFP+ et sur les ADNc des trois constructions de « siRNA » : siRNA-Glu-A, siRNA-Glu-B, siRNA-Glu-C.

Le **document 7** présente les résultats de l'expression relative du gène de la glutamine synthétase (Glu) pour chaque transfection.

Une construction est considérée comme efficace lorsque celle-ci permet une extinction de l'expression du gène supérieure à 80 %.

5.7 Analyser les résultats du **document 7** pour en déduire la construction la plus efficace.

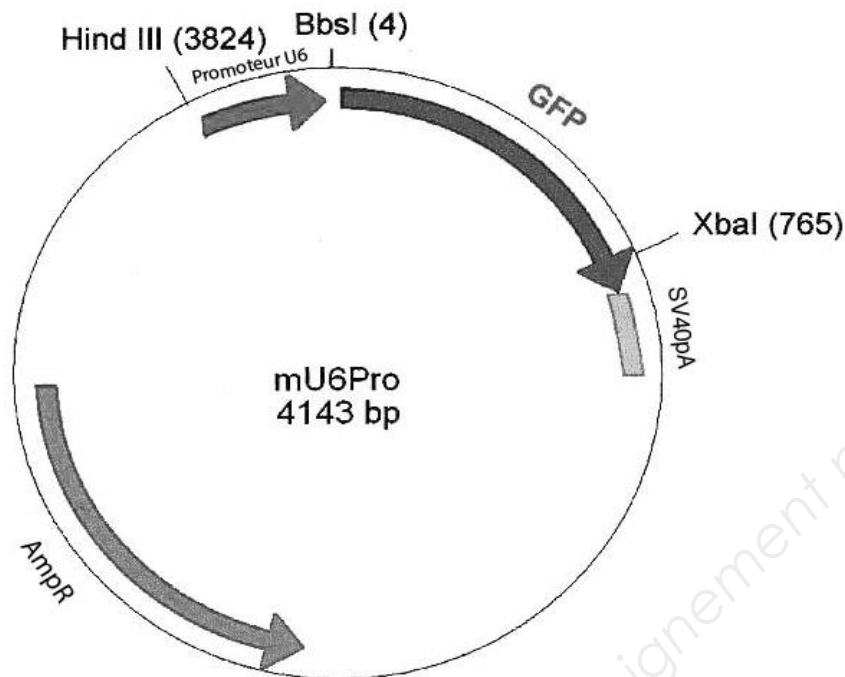
5.8 Proposer une technique permettant de vérifier l'impact de la diminution de la quantité d'ARNm au niveau protéique.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)

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 : Carte du vecteur mU6Pro

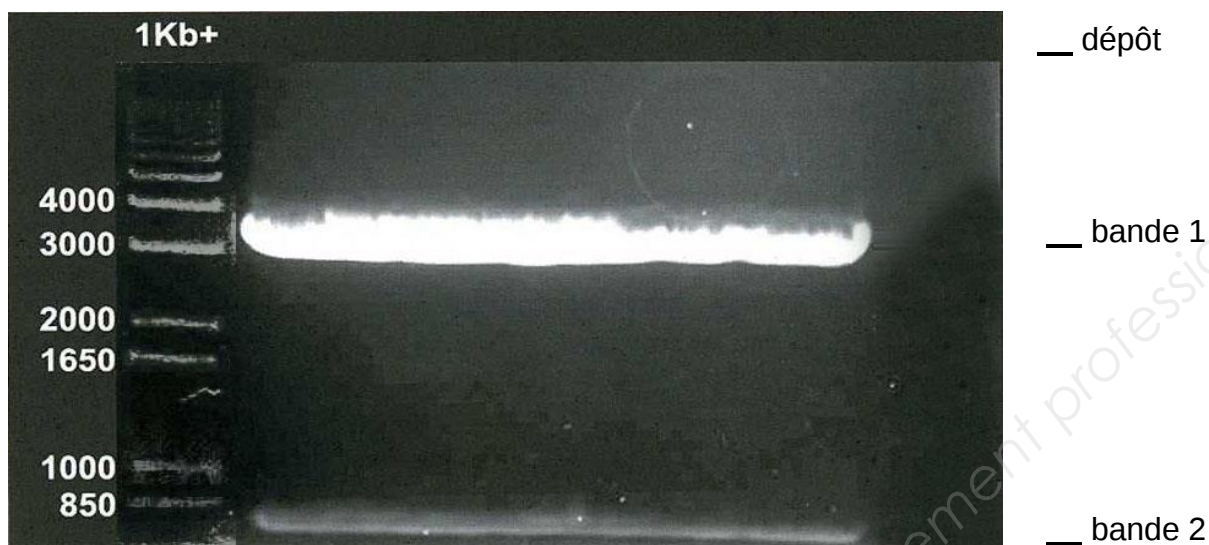


Document 2 : Protocol for plasmid DNA purification

(GeneJET Plasmid Maxiprep Kit - Thermo Scientific)

Step	Procedure
1	Grow up to 250 mL bacterial culture in LB medium to an OD ₆₀₀ of 2-3. Harvest the cells by centrifugation for 10 min at 5000 g. Discard the supernatant.
2	Resuspend pelleted cells in 6 mL of Resuspension Solution .
3	Add 6 mL of Lysis Solution (SDS, NaOH, pH 12) and mix gently by inverting the tube 4-6 times until the solution becomes viscous and slightly clear. Incubate for 3 min at room temperature.
4	Add 6 mL of Neutralization Solution (acetic acid, potassium acetate, pH 4,8) and mix immediately by inverting the tube 5-8 times. Centrifuge for 40 min at 5000 g.
5	Transfer the supernatant to a 50 mL tube. Add 6 mL of 96 % ethanol. Mix immediately by inverting the tube 5-6 times.
6	Transfer part of the sample (approximately 20 mL) to the column. Centrifuge for 3 min at 2000 g. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.
7	Repeat step 6 to process any remaining lysate through the column.
8	Add 8 mL of Wash Solution I to the column. Centrifuge for 2 min at 3000 g. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.
9	Add 8 mL of Wash Solution II to the column. Centrifuge for 2 min at 3000 g. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.
10	Repeat the column wash with Wash Solution II (step 10).
11	Centrifuge for 5 min at 3000 g. Discard the collection tube containing the flow-through.
12	Transfer the column to a fresh 50 mL collection tube. Add 1 mL of Elution Buffer . Incubate for 2 min at room temperature. Centrifuge for 5 min at 3000 g to elute plasmid DNA.

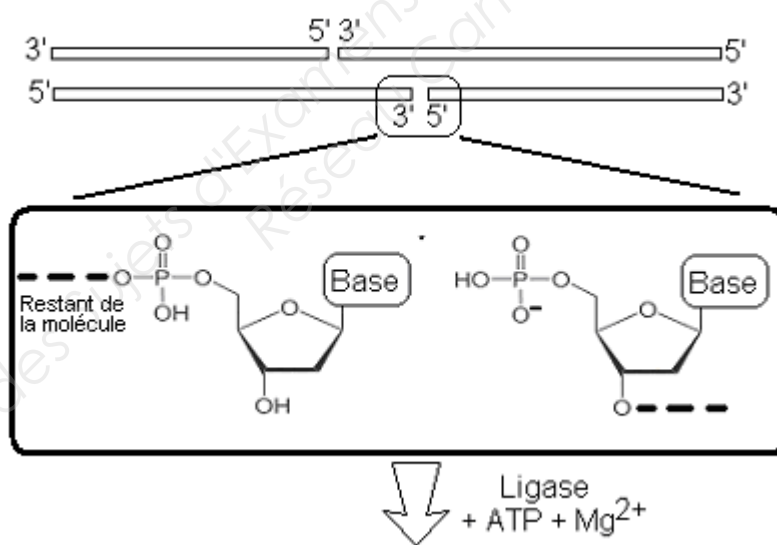
Document 3 : Photographie du gel après électrophorèse du vecteur mU6Pro hydrolysé par *BbsI* et *XbaI*



Tampon de migration : Tris Borate EDTA, pH 8

Marqueur de taille : 1kb + Ladder (Invitrogen), les tailles sont indiquées en pb.

Document 4 : Réaction de ligation entre deux polynucléotides



Document 5 : Séquence nucléotidique sens de l'insert (5' - 3')

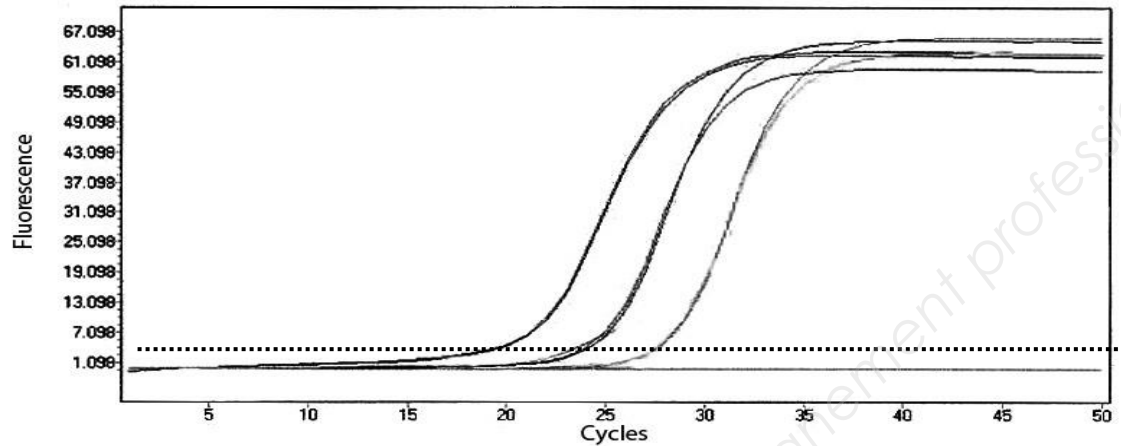
TTTGCAAGTTCCACTTGAACAAATTCAAGAGATTTGTTCAAGTGGGAACTTGCTTTTT

Les séquences soulignées sont des séquences inversées répétées.

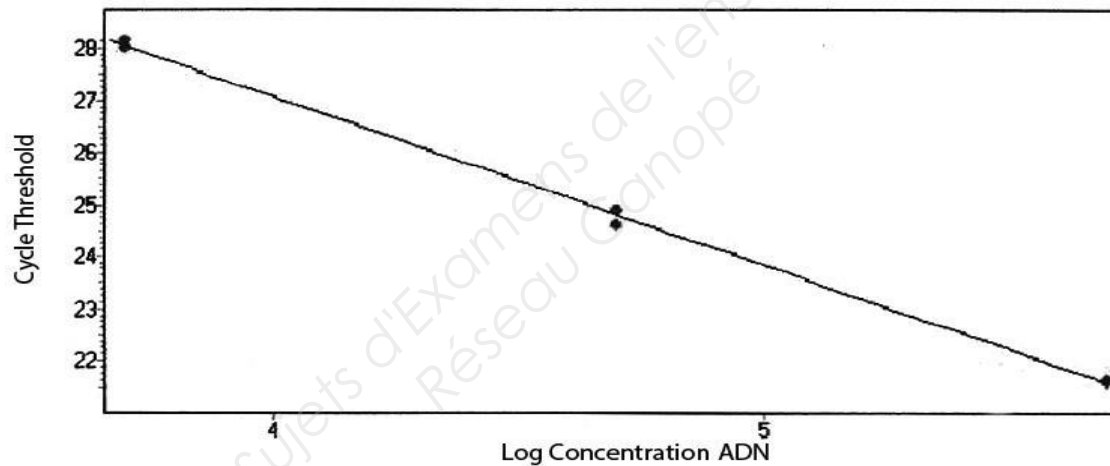
Document 6 : Le principe de la PCR quantitative par la méthode au SYBR®Green

Cette qPCR est réalisée à partir de 3 étalons réalisés en double essai.

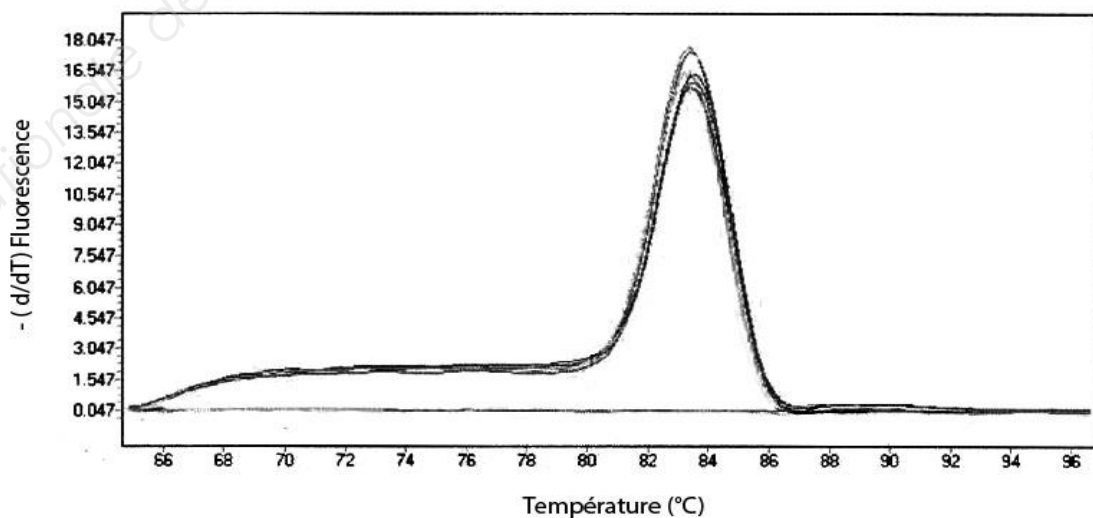
Document 6a : courbes d'amplification obtenues



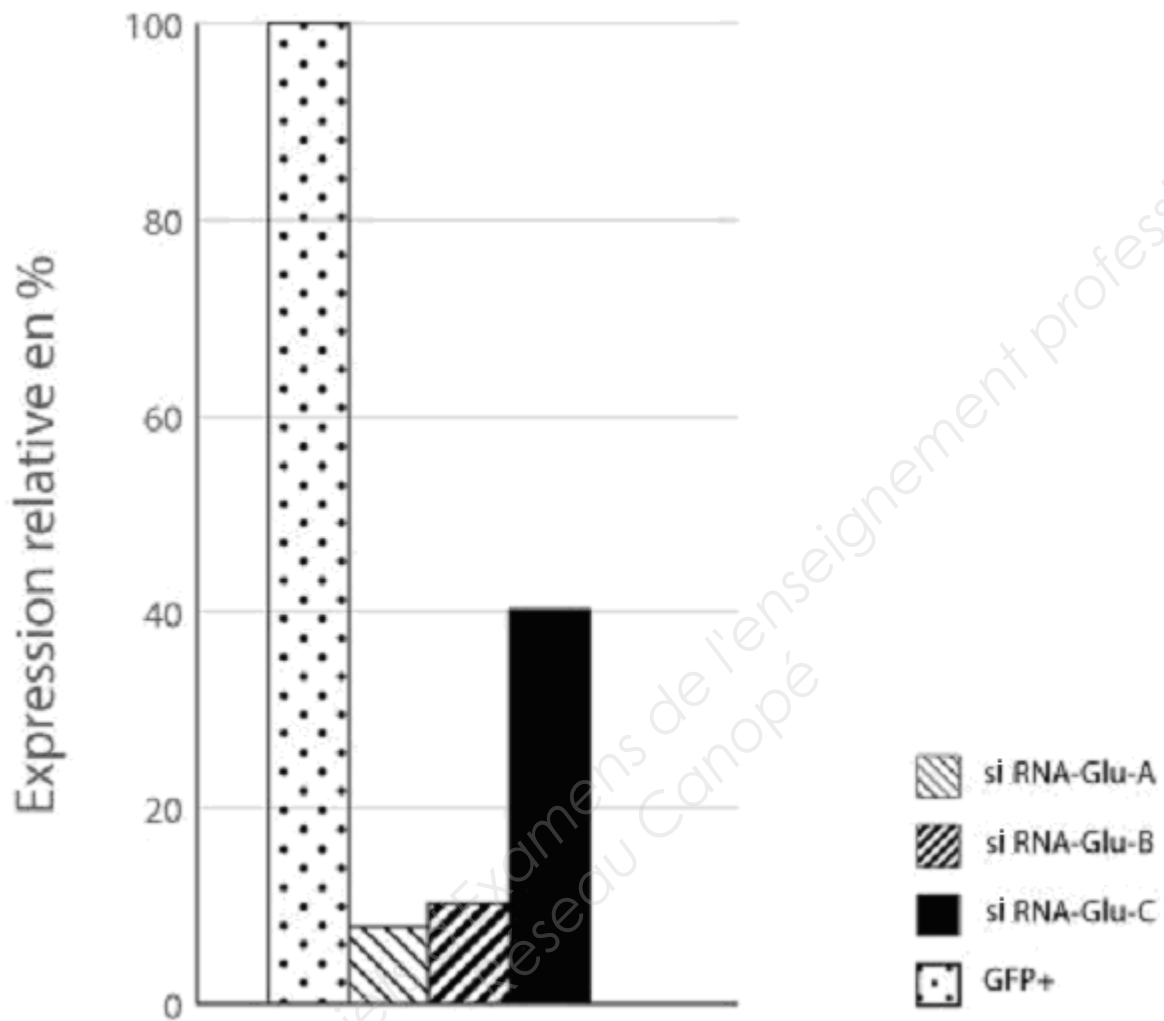
Document 6b : courbe d'étalonnage



Document 6c : courbes de fusion



Document 7 : Expression relative du gène de la glutamine synthétase après transfection avec différents shRNA



L'expression relative du gène de la glutamine synthétase est déterminée par rapport à un gène de ménage.