



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](http://www.formav.co/explorer)

**BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR**  
**BIOTECHNOLOGIES**

***U2 Biologie moléculaire et génie génétique***

---

**SESSION 2019**

---

DUREE DE L'EPREUVE : 2h  
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 10 pages numérotées de 1/10 à 10/10.

|   |         |              |
|---|---------|--------------|
| BTS BIOTECHNOLOGIES                         |         | Session 2019 |
| U.2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique | BOE2BMO | Page : 1/10  |

# ÉTUDE *IN VITRO* DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE D'UNE VERSION MUTÉE DU RÉCEPTEUR DE L'HORMONE THYROÏDIENNE TR $\alpha$ 1

L'émergence du séquençage à haut débit a permis, entre autres, la découverte chez l'être humain d'un nouveau type de résistance à l'hormone thyroïdienne. Celle-ci est attribuée à des mutations du facteur de transcription TR $\alpha$ 1 dont l'activité est dépendante de l'hormone thyroïdienne, dont il est le récepteur nucléaire.

Les patients atteints de cette pathologie présentent un phénotype similaire à ceux atteints d'hypothyroïdie : petite taille due à un retard de croissance osseuse, constipation, visage rond et plat, macrocéphalie et défauts du développement neurologique (A.Tylki-Szymanska, *JMG Online First* 2015).

Différentes lignées de souris incorporant des mutations du gène codant TR $\alpha$ 1 ont été construites. La lignée murine TR $\alpha$ 1CR1 porte une mutation au niveau de l'hélice  $\alpha$ 12 de la protéine TR $\alpha$ 1. Cette lignée est utilisée dans cette étude dans le but d'analyser *in vitro* l'activité transcriptionnelle du récepteur TR $\alpha$ 1.

## 1. Extraction des ARN totaux de cœurs de souris (3 points)

Les ARN totaux de la lignée mutée (TR $\alpha$ 1CR1) sont purifiés à partir des cœurs de souris dans lesquels les récepteurs aux hormones thyroïdiennes sont fortement exprimés. Le coffret NucleoSpin® est utilisé selon le protocole présenté dans le **document 1**.

1.1. Expliquer le rôle des réactifs utilisés lors de la lyse (étape 2 du protocole).

La purification qui suit l'étape de lyse s'effectue par chromatographie à l'aide d'une mini-colonne.

1.2. Identifier le type de chromatographie mise en jeu.

Une purification des ARN polyA+ est ensuite réalisée à partir des solutions d'ARN totaux obtenues.

1.3. Expliquer l'intérêt de cette étape.

1.4. Proposer une méthode adaptée pour la purification des ARN polyA+.

## 2. Transcription inverse et amplification par PCR (3,5 points)

Une étape de transcription inverse est réalisée à partir des ARN purifiés précédemment, en présence d'amorces aléatoires, de dNTPs et de transcriptase inverse.

2.1. Expliquer en quoi la transcriptase inverse est une ADN polymérase particulière.

A l'issue de l'étape de transcription inverse, des amorces spécifiques sont utilisées pour amplifier par PCR la partie 3' du cadre ouvert de lecture (ORF) du récepteur TR $\alpha$ 1 muté. Le **document 2** présente la séquence de l'ORF du récepteur TR $\alpha$ 1 et la position des séquences cibles des amorces sens et anti-sens encadrant la séquence codant pour l'hélice  $\alpha$ 12.

|   |         |              |
|---|---------|--------------|
| BTS BIOTECHNOLOGIES                         |         | Session 2019 |
| U.2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique | BOE2BMO | Page : 2/10  |

- 2.2. Identifier le format de séquence utilisé et rappeler les caractéristiques de ce type de format.
- 2.3. Écrire sur la copie la séquence des amorces sens et anti-sens, en les orientant, selon la convention d'écriture.

La PCR est réalisée en mode « Touch Down ». Le programme du thermocycleur est présenté dans le **document 2**.

- 2.4. Expliquer l'intérêt des étapes 2 et 3, caractéristiques d'une PCR « Touch Down ».

### 3. Clonage du produit de PCR dans le vecteur pGEM-T (5,5 points)

Le produit de PCR est directement cloné dans le vecteur pGEM-T, présenté dans le **document 3** en présence d'ADN ligase T4. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, le produit de ligature est mis en présence de bactéries JM109 compétentes pour une transformation.

- 3.1. Expliquer pourquoi le vecteur pGEM-T est particulièrement adapté au clonage de produits de PCR amplifiés par la Taq polymérase.

Le vecteur pGEM-T permet un criblage « Blanc / Bleu » des clones recombinés basé sur le principe de l' $\alpha$ -complémentation. Le génotype de la souche JM109 est présenté dans le **document 3**.

- 3.2. Dégager la caractéristique génétique de cette souche, indispensable à la réalisation de l' $\alpha$ -complémentation.
- 3.3. Proposer une composition pour le milieu de culture utilisé lors du criblage des clones recombinés dans le cadre de cette manipulation. Argumenter ce choix.
- 3.4. Expliquer ou schématiser le principe détaillé du criblage visuel «Blanc / Bleu».

### 4. Obtention d'un vecteur d'expression du récepteur muté TR $\alpha$ 1CR1 (2 points)

Le vecteur d'expression pSG5/TR $\alpha$ 1 présenté dans le **document 4**, contient une version sauvage du gène TR $\alpha$ 1. Il est digéré par les enzymes *EcoR* I et *Bgl* II afin de remplacer la séquence sauvage par la séquence mutée. Cette séquence portant la mutation CR1 affectant l'hélice  $\alpha$ 12 est obtenue par double digestion (*EcoR* I et *Bgl* II) d'un vecteur d'amplification pGEM-T recombiné, sélectionné et vérifié. Après ligature, on obtient le vecteur d'expression pSG5/TR $\alpha$ 1CR1.

- 4.1. Repérer les éléments indispensables à l'expression du gène codant TR $\alpha$ 1 chez un organisme eucaryote. Expliquer leur rôle.
- 4.2. Identifier les éléments permettant d'attribuer au vecteur pSG5/TR $\alpha$ 1 la qualité de vecteur navette. Argumenter.

|   |         |              |
|---|---------|--------------|
| BTS BIOTECHNOLOGIES                         |         | Session 2019 |
| U.2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique | BOE2BMO | Page : 3/10  |

## 5. Etude de l'activité transcriptionnelle des récepteurs sauvages et mutants (4 points)

L'hormone thyroïdienne T3 est capable de moduler l'expression de très nombreux gènes cibles via sa fixation sur son récepteur TR $\alpha$ 1. Le **document 5** présente l'activité transcriptionnelle de TR $\alpha$ 1. Celle-ci nécessite la formation d'un complexe TR $\alpha$ 1-TRE.

Afin de tester les conséquences de la mutation CR1 sur l'activité transcriptionnelle du récepteur TR $\alpha$ 1, des cellules épithéliales humaines HEK 293 sont co-transfectées par deux plasmides :

- pSG5/TR $\alpha$ 1 exprimant la version sauvage ou mutée du récepteur à l'hormone T3 ;
- pTRE-luc exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle d'un élément régulateur TRE enhancer.

Après co-transfection, les cellules sont incubées en présence d'hormone T3 pendant 24 h, puis le niveau d'expression de la luciférase est évalué par luminométrie à 560 nm. Les principes et résultats sont présentés dans le **document 5**.

- 5.1. Présenter les caractéristiques d'un gène rapporteur.
- 5.2. Expliquer comment l'hormone T3 permet de moduler l'expression de certains gènes.
- 5.3. Analyser les résultats obtenus en lien avec la structure des plasmides utilisés.
- 5.4. Proposer deux fonctions possibles de l'hélice  $\alpha$ 12.

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

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

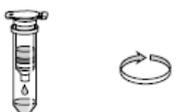
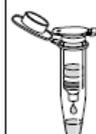
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

## Document 1 : Extrait de la fiche technique du kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel).

### The basic principle

One of the most important aspects in the isolation of RNA is to prevent degradation during the isolation procedure. With the **NucleoSpin® RNA** methods, cells are lysed by incubation in a solution containing large amounts of chaotropic ions. The RA1 lysis buffer immediately inactivates RNases – which are present in virtually all biological materials – and creates appropriate binding conditions which favor adsorption of RNA to the silica membrane. Contaminating DNA, which is also bound to the silica membrane, is removed by an rDNase solution which is directly applied onto the silica membrane during the preparation (RNase-free rDNase is supplied with the kit). Simple washing steps with two different buffers remove salts, metabolites and macromolecular cellular components. Pure RNA is finally eluted under low ionic strength conditions with RNase free H<sub>2</sub>O (supplied).

| Component          | Hazard contents   | GHS symbol   | Hazard phrases      | Precaution phrases  |
|--------------------|---|--|---------------------|---|
| Inhalt             | Gefahrstoff   | GHS-Symbol   | H-Sätze             | P-Sätze   |
| rDNase, RNase-free | rDNase, lyophilized<br><i>rDNase, lyophilisiert</i><br>CAS 9003-98-9                    | <br>DANGER<br>GEFAHR    | 317, 334            | 261, 280,<br>302+352,<br>304+340,<br>333+313,<br>342+311, 363 |
| RA1                | guanidinium thiocyanate<br>30–60 %<br><i>Guanidinthiocyanat 30–60 %</i><br>CAS 593-84-0 | <br>WARNING<br>ACHTUNG | 302, 412,<br>EUH031 | 260, 273,<br>301+312, 330                                     |

|   |                               |   |   |  |  |
|---|-------------------------------|---|---|--|--|
| 1 | Homogenize sample             |    | 30 mg   |  |  |
| 2 | Lyse cells                    |    | 350 µL RA1<br>3.5 µL β-mercaptoethanol<br>Mix   |  |  |
| 3 | Filtrate lysate               |    | 11,000 x g,<br>1 min  |  |  |
| 4 | Adjust RNA binding conditions |   | 350 µL 70 % ethanol<br>Mix  |  |  |
| 5 | Bind RNA                      |    | Load sample<br>11,000 x g,<br>30 s  |  |  |
| 6 | Desalt silica membrane        |    | 350 µL MDB<br>11,000 x g,<br>1 min  |  |  |
| 7 | Digest DNA                    |  | 95 µL DNase reaction mixture<br>RT, 15 min  |  |  |
| 8 | Wash and dry silica membrane  |  | 1 <sup>st</sup> wash 200 µL RAW2<br>2 <sup>nd</sup> wash 600 µL RA3<br>3 <sup>rd</sup> wash 250 µL RA3<br>1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup>  11,000 x g,<br>30 s<br>3 <sup>rd</sup>  11,000 x g,<br>2 min |  |  |
| 9 | Elute highly pure RNA         |  | 60 µL RNase-free H <sub>2</sub> O<br>11,000 x g,<br>1 min   |  |  |

## Document 2 : Amplification par PCR de la partie 3' de l'ORF du récepteur TR $\alpha$ 1.

### Séquence de l'ORF du récepteur sauvage TR $\alpha$ 1 de souris.

```
>gi|928589392:519-1997 Mus musculus thyroid hormone receptor alpha
(TR $\alpha$ 1), transcript variant 1
ATGGAACAGAAGCCAAGCAAGGTGGAGTGTGGGTCAGACCCAGAGGAGAACAGTGCCAGGTCACCAGATGGAA
AGCGAAAAAGAAAGAACGGCCAATGTCCCCTGAAAAGCAGCATGTCAGGGTATATCCCTAGTTACCTGGACAA
AGACGAGCAGTGTGTCGTGTGGGGACAAGGCCACCGGTTATCACTACCGCTGTATCACTTGTGAGGGCTGC
AAGGGCTTCTTTCCGCGCACAATCCAGAAGAATCTCCATCCCACCTATTCCCTGCAAGTATGACAGCTGCTGTG
TCATCGACAAGATCACCCGGAATCAGTGCCAGCTGTGCCGCTTCAAGAAGTGCATTGCTGTGGGCATGGCCAT
GGACTTGGTTCTAGATGATTCGAAGCGGGTGGCCAAACGCAAGCTGATTGAGCAGAACCAGGGAGAGGAGGCGA
AAGGAGGAGATGATTCGCTCACTGCAGCAGCGACCAGAGCCACTCCTGAAGAGTGGGACCTGATACATGTTG
CTACAGAGGCCCATCGCAGCACTAACGCCCAGGGCAGCCATTGGAAACAGAGGGCGAAAATTCCCTGCCGGATGA
CATTGGCCAGTCACCTATTGTCTCCATGCCGACGGAGACAAGGTAGACCTAGAGGCCTTCAGCGAGTTTACC
AAGATCATCACCCCGGCCATCACGCGGTGGTGGACTTTGCCAAAAAACTGCCCATGTTCTCCGAGCTGCCTT
GCGAATTCGACCAGATCATCCTCCTGAAGGGCTGCTGCATGATCATGTCCCTGCGGGCAGCTGTCCGCTACGA
CCCTGAGAGTGACACCCTGACCCTGAGTGGGGAGATGGCGGTTAAGCGGGAACAGCTCAAGAATGGTGGCTTG
GGTGTGGTCTCTGACGCCATCTTTGAACTGGGCAAGTCACTCTCTGCCTTTAACCTGGATGACACGGAAGTGG
CTCTGCTGCAGGCTGTGCTGCTAATGTCAACAGACCGCTCCGGCCTGCTGTGCGTGGACAAGATCGAGAAGAG
TCAGGAGGCCTACCTGCTGGCGTTTGGACTACGTCAACCACCGCAAACACAACATTCCGCACTTCTGGCCC
AAGCTGCTGATGAAGGAGAGAGAAGTGCAGAGTTCGATTCTGTACAAGGGGGCAGCGGCAGAAGGCCGGCCGG
GCGGGTCACTGGGCGTCCACCCGGAAGGACAGCAGCTTCTCGGATCATGTTGTTTCAGGGTCCGCAGGTCCGGC
AGCTTGAGCAGCAGCTTAAGGTGAAGCGGGAAGTCTCCGAGGGCCGGTCTTTCAGCACCAGAGCCGAAGAGC
CCGCAGCAGCGTCTCCTGGAGCTGCTCCACCGAAGCGGAGTTCTCCATTCCTGAGCGGTCTGTGGGGAAGATC
TCGACAGCAGGGCGAGCTCCCTGAGCTCCTCCTCTGACACGGAGGACACGGAGGTCTGCGAGGAC
CAGGCAGGCAAGGCAGCCTCTCCCTGA
```

#### Données :

Les sites *EcoRI* (GAATTC) et *BglII* (AGATCT) apparaissent en gras.

La position de l'amorce sens (FWD) est soulignée par une ligne pointillée.

La position de l'amorce anti-sens (REV) est soulignée par un double trait.

L'outil « Tm calculator » fournit les données suivantes :

Amorce sens Tm = 64,6 °C    Amorce anti-sens Tm = 62,2 °C

Température d'hybridation recommandée : 57,2 °C

#### Programme du thermocycleur :

|         |               |             |
|---------|---------------|-------------|
| Étape 1 | 95 °C : 3 min |             |
| Étape 2 | 95 °C : 30 s  | } 9 cycles  |
|         | 68 °C : 30 s  |             |
|         | 72 °C : 30 s  |             |
| Étape 3 | 95 °C : 30 s  | } 24 cycles |
|         | 58 °C : 30 s  |             |
|         | 72 °C : 30 s  |             |
| Étape 4 | 72 °C : 5 min |             |

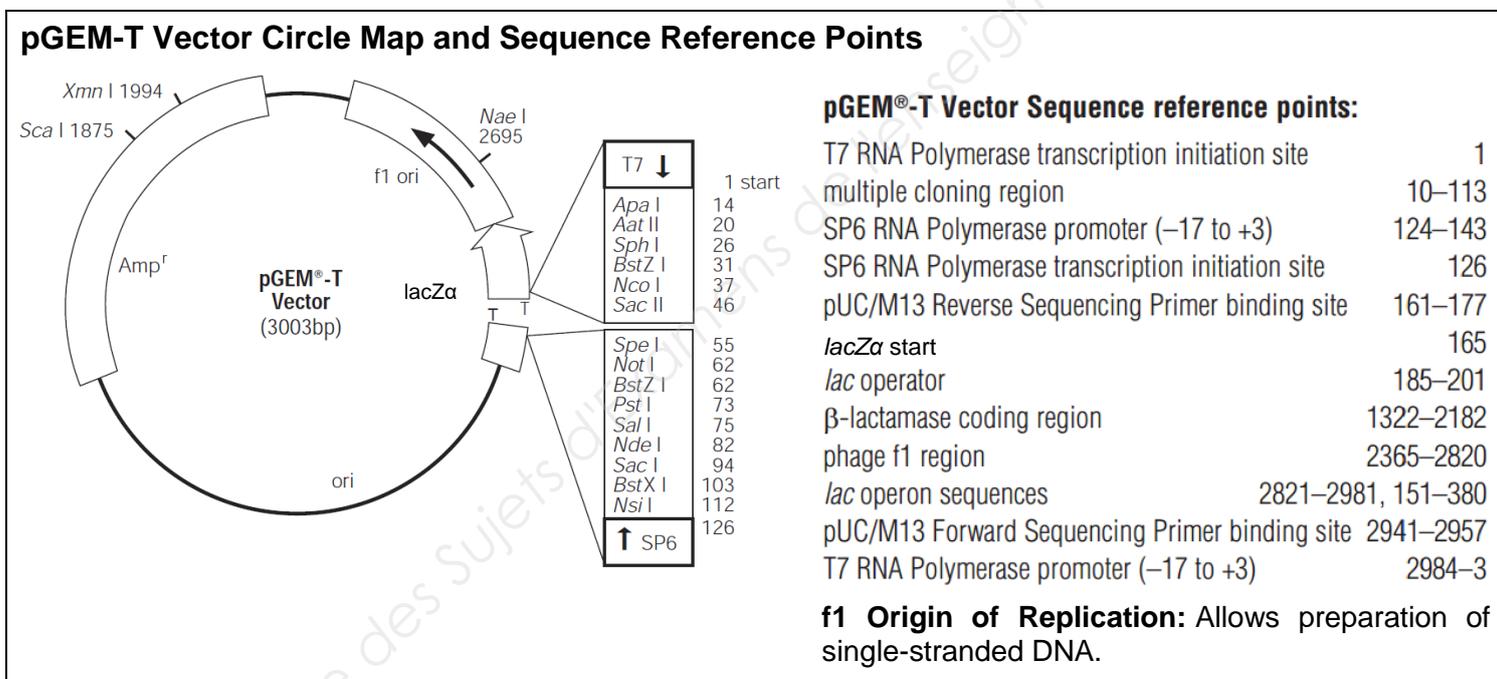
## Document 3 : Extrait de la fiche technique du système pGEM-T (Promega™).

### pGEM®-T Vector Systems

The pGEM®-T Vector Systems are convenient systems to clone PCR products. The pGEM®-T Vector is prepared by cutting the pGEM®-5Zf(+) Vector with EcoRV and adding a 3' terminal thymidine to both ends. These single 3'-T overhangs at the insertion site greatly improve the efficiency of ligation of a PCR product into the plasmid by preventing recircularization of the vector and providing a compatible overhang for ligation of PCR products generated by thermostable polymerases that add a single deoxyadenosine, in a template-independent fashion, to the 3'-ends of amplified fragments.

### Features - Benefits

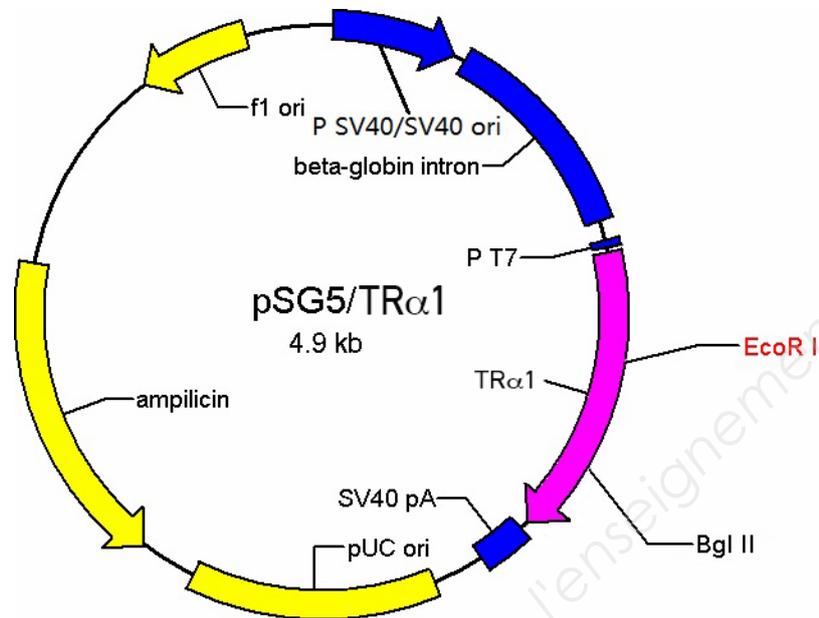
- **Rapid Ligation:** The provided 2X Rapid Ligation Buffer allows reactions to be completed in 1 hour at room temperature.
- **Blue/White Screening:** T7 and SP6 RNA polymerase promoters flank a multiple cloning region within the  $\alpha$ -peptide coding region for  $\beta$ -galactosidase. Insertional inactivation of the  $\alpha$ -peptide allows recombinant clones to be directly identified by color screening on indicator plates.



**Table 1. Genotypes of *E. coli* Competent Cells Offered by Promega.**

| Strain         | Genotype   |
|----------------|--|
| BL21(DE3)pLysS | F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hdsS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , $\lambda$ (DE3), pLysS, Cm <sup>r</sup>  |
| HB101          | F <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>hdsS20</i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> ( <i>str<sup>r</sup></i> ), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i>     |
| JM109          | <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hdsR17</i> ( <i>r<sub>k</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>k</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), [F <sup>'</sup> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>lacZΔM15</i> ] |
| Pro 5-alpha    | <i>fhuA2</i> , $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> ), U169, <i>phoA</i> , <i>glnV44</i> , $\phi$ 80, $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15, <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hdsR17</i>  |

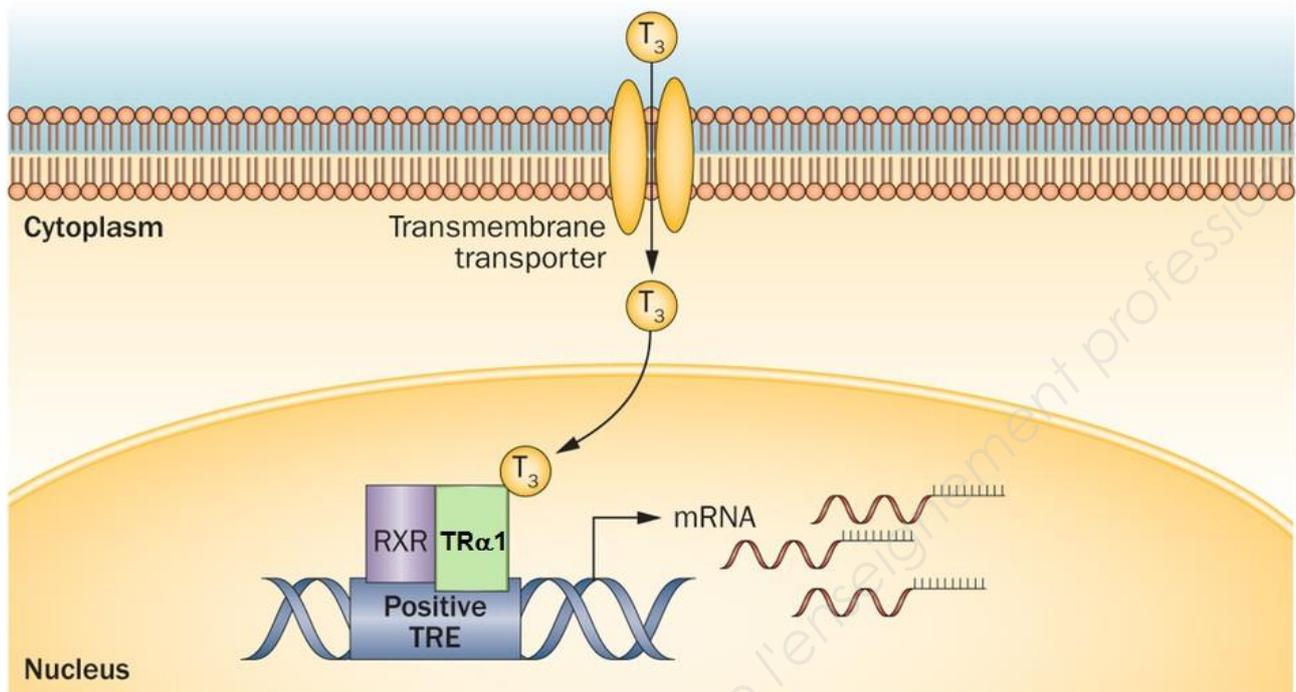
**Document 4 : Vecteur d'expression pSG5/TR $\alpha$ 1 (d'après Addgene™)**



| Feature                                      | Nucleotide Position |
|--|---------------------|
| SV40 promoter and SV40 origin of replication | 28-366              |
| $\beta$ -globin intron                       | 395-967             |
| T7 promoter                                  | 1022-1040           |
| EcoR I                                       | 1043                |
| BamH I                                       | 1049                |
| Bgl II                                       | 1055                |
| SV40 polyA signal                            | 1069-1202           |
| pUC origin of replication                    | 1342-2009           |
| ampicillin resistance ( <i>bla</i> ) ORF     | 2160-3017           |
| f1 origin of ss-DNA replication              | 3587-3893           |

**Document 5 : Modulation de l'activité transcriptionnelle par le couple T<sub>3</sub>/TR $\alpha$ 1, *in vivo* et *in vitro*.**

**5A : Molecular model of T<sub>3</sub> target genes activation**



Gene regulation by T<sub>3</sub> hormone is achieved through activation of the Thyroid Hormone receptor (TR $\alpha$ 1). Heterodimeric RXR/TR $\alpha$ 1 complex can bind to thyroid hormone response elements (TRE) in DNA. In the presence of T<sub>3</sub> hormone, a conformational change in TR $\alpha$ 1 occurs permitting activation of target genes.

## 5B : Mesure de l'activité luciférase dans les cellules HEK 293 transfectées, en présence d'hormone T3.

Les cellules ont été systématiquement co-transfectées par :

- le vecteur pTRE-luc exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle d'un élément régulateur TRE enhancer,
- et **un** vecteur d'expression pSG5,
  - soit le vecteur pSG5 vide (pSG5),
  - soit le vecteur pSG5 exprimant le récepteur TR $\alpha$ 1 sauvage (pSG5/TR $\alpha$ 1),
  - soit le vecteur pSG5 exprimant le récepteur muté (pSG5/TR $\alpha$ 1CR1).

