



SERVICES CULTURE ÉDITIONS
RESSOURCES POUR
L'ÉDUCATION NATIONALE

**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel**

session 2011

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENIE GENETIQUE

SESSION 2011

DURÉE DE L'ÉPREUVE : 2h
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français
- l'utilisation de la calculatrice est interdite

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 2011
Biologie moléculaire et génie génétique	Code sujet : BOE2BMO	Page : 1/9

Les vecteurs plasmidiques

Les plasmides bactériens naturels ont été utilisés à l'origine pour construire les premiers plasmides artificiels utilisés en génie génétique.

Le plasmide pBR322 constitue un jalon historique dans cette élaboration.

Il a été créé en 1977 au Mexique par Bolivar et Rodriguez à partir des plasmides pColE1 d'*Escherichia coli* et pSC101 de *Salmonella enterica*.

Ensuite, des vecteurs de clonage et d'expression artificiels plus performants ont pu être conçus à partir de pBR322.

Par ailleurs, les plasmides ont constitué des modèles d'étude, dans le domaine de la réplication et de son contrôle chez les procaryotes. Ces études ont également permis de découvrir l'existence des ARN antisens.

1. Le plasmide pBR322 (10,5 points)

1.1. La séquence et la carte du plasmide pBR322

La séquence complète de pBR322 et les annotations correspondantes sont référencées dans la banque de données GenBank sous le numéro d'accèsion J01749.

Le **document 1** fournit un extrait des annotations de cette séquence.

Le **document 2** présente quelques enzymes de restriction utilisables dans le cadre d'un clonage.

1.1.1. Définir les termes « brin codant » et « brin transcrit » d'un gène.

Pour le gène *bla*, expliciter la notion de « *complement* » (ou « *reverse complement* ») figurant dans le **document 1** et préciser si la séquence du fichier GenBank correspond au brin codant ou au brin transcrit de ce gène.

1.1.2. Le promoteur du gène *bla* est qualifié de promoteur « fort » « constitutif ».

Après avoir rappelé la fonction d'une séquence d'ADN promotrice, préciser les notions de promoteur fort et de promoteur constitutif.

1.1.3. Schématiser le plasmide pBR322 à partir des données du **document 1**, en y figurant les séquences fonctionnelles orientées ainsi que la position des sites de coupure par les enzymes de restriction répertoriées dans le **document 2**.

Le **document 3** présente le code utilisé pour désigner deux bases azotées ayant un paramètre en commun.

1.1.4. Nommer sur la copie les deux bases concernées dans chacun des cas présentés dans le tableau du **document 3**.

1.1.5. Pour le traitement informatique de séquences, on utilise souvent le format FASTA. Donner les caractéristiques de ce format.

1.1.6. Le site de restriction *Sa* I (dont la séquence est donnée dans le **document 2**) peut être qualifié de « palindromique ». Expliciter cette notion à partir de cet exemple.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2011
Biologie moléculaire et génie génétique	Code sujet : BOE2BMO	Page : 2/9

1.1.7. Le **document 2** précise pour ce site *Sal I* : « Cleavage affected by C methylation ».
Préciser en quoi consiste cette caractéristique.

1.1.8. Les sites de restriction *BamH I* et *Bgl II* sont dits « compatibles ».
Représenter, en utilisant deux couleurs différentes et en écrivant les séquences concernées, la réassociation de deux fragments d'ADN hydrolysés respectivement par *BamH I* et *Bgl II*.

1.2. Le plasmide pBR322, vecteur de clonage

Un clonage dans pBR322 nécessite :

- de « digérer » vecteur et ADN source par les enzymes *BamH I* et *Sal I*,
- de procéder à la ligature de l'insert et du vecteur,
- de transformer une souche appropriée d'*Escherichia coli* avec le produit de cette ligature,
- de sélectionner les bactéries transformées,
- de repérer (d'identifier) les bactéries transformées et recombinées, c'est-à-dire possédant un plasmide avec insert.

1.2.1. Citer les deux intérêts majeurs de la double digestion du vecteur et de l'insert par les enzymes *BamH I* et *Sal I*.

Le **document 4** présente les activités des enzymes de restriction dans différents tampons commerciaux.

1.2.2. Choisir un tampon pour réaliser une double digestion *BamH I* – *Sal I* en une seule étape. Justifier ce choix et préciser les conditions opératoires liées à l'utilisation de ce tampon.

Historiquement, le repérage des clones recombinés était effectué par une méthode « de repiquage (ou réplique) des clones ». De nos jours, ce repérage est plus fréquemment réalisé par PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne).

1.2.3. Dans le cadre de la procédure de clonage définie ici, présenter la logique du repérage par PCR en précisant une des manières de choisir la localisation des amorces et le résultat attendu lors de l'analyse de l'amplicon en gel d'agarose.

La préparation d'un stock de plasmide recombiné purifié commence par une étape d'extraction par lyse alcaline. Le **document 5** décrit l'étape cruciale de cette extraction.

1.2.4. À partir des indications de ce document, relever les précautions à respecter pour cette étape et les justifier.

2. Les plasmides pUC18 et pEGFP-C (3,5 points)

Les plasmides pUC18 et pEGFP-C sont deux exemples de vecteurs plus perfectionnés que le plasmide pBR322.

Le **document 6** présente la carte du vecteur pUC18.

- 2.1. Expliquer les deux rôles de la région 146-469 dans le cadre d'un clonage.
- 2.2. Ce vecteur est aussi un vecteur d'expression.
Préciser les séquences directement en amont du gène lacZalpha, qui ne sont pas représentées dans le **document 6** et qui permettent une expression inductible de ce gène.

Le vecteur pEGFP-C est un vecteur navette permettant la synthèse de protéines étiquetées dans des cellules de mammifères. Sa carte est fournie dans le **document 7**.

- 2.3. Justifier que ce vecteur est un vecteur navette.
- 2.4. Donner les rôles respectifs des séquences P_{CMV} et SV40 polyA.
- 2.5. Préciser en quoi consiste l'étiquetage de la protéine synthétisée. Citer un intérêt possible de cet étiquetage.

3. La réplication des plasmides (5 points)

3.1. La réplication du plasmide pColE2

Le plasmide naturel pColE1 d'*Escherichia coli*, présente une réplication unidirectionnelle de type θ (théta), initiée à partir d'une origine de réplication unique. La synthèse d'ADN est continue sur un brin et discontinue sur l'autre brin. Cette synthèse est catalysée essentiellement par l'ADN polymérase III ; elle nécessite l'action préalable d'une primase.

- 3.1.1. - Préciser l'action de la primase et le produit résultant de cette action.
- Pourquoi l'action préalable de la primase est-elle indispensable ?

- 3.1.2. L'ADN polymérase III possède une activité 3'→5' exonucléase.
Préciser en quoi consiste cette activité et indiquer son intérêt.

3.2. Le contrôle de la réplication du plasmide pColE2

Le nombre de copies du plasmide pColE2 présent dans les cellules bactériennes varie peu, ce qui implique une régulation au niveau de l'initiation de la réplication.

Cette initiation nécessite la fixation d'une protéine REP sur une séquence d'ADN spécifique (ori). La fréquence d'initiation de la réplication est donc déterminée par la quantité de protéine REP disponible.

La région du plasmide pColE2 nécessaire à l'initiation de sa réplication est schématisée dans le **document 8**.

Pour déterminer expérimentalement s'il existe une interaction entre un ARN particulier de 115 nucléotides, l'ARN I, et la partie 5' de l'ARN messager du gène *rep* (205 nucléotides), on réalise une étude cinétique avec ces ARN purifiés au préalable.

Le principe de l'expérience et son résultat sont présentés dans le **document 9**.

3.2.1. - Interpréter le résultat de cette expérience.
- Conclure.

3.2.2. Traduire et expliciter les termes en gras dans la phrase suivante : « *Trans-acting antisense RNAs permit the silencing of specific genes by pairing to mRNA molecules* ».

3.2.3. En utilisant les réponses aux questions 3.2.1 et 3.2.2, proposer une explication moléculaire du contrôle de la réplication qui conduit à la limitation du nombre de copies du plasmide pColE2 dans les cellules d'*E.coli*.

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

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
réseau SCEREN

Document 1 : Extrait des annotations de la séquence J01749

LOCUS SYNBR322 4361 bp DNA circular SYN 30-SEP-2008
 DEFINITION Cloning vector pBR322, complete sequence.
 ACCESSION J01749
 COMMENT The ampicillin resistance gene (amp-r) is a penicillin beta-lactamase. Promoter P1 is for the beta-lactamase gene. P1 is artificially created by the ligation of two different DNA fragments to create pBR322. P2 is in the same region as P1, but it is on the opposite strand and initiates transcription in the direction of the tetracycline resistance gene.

FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..4361 organism = "Cloning vector pBR322"
 promoter complement(27..33) ="promoter P1"
 promoter 43..49 ="promoter P2"
 gene 86..1276 gene="tet"
 product="tetracycline resistance protein"
 rep origin 2535
 gene complement(3293..4153) gene="bla"
 product="beta-lactamase"

Document 2 : Extrait de la carte de restriction du plasmide pBR322

Enzyme	Site de restriction et de coupure	Position de coupure dans pBR322
<i>Bam</i> H I	G/GATCC	375
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	none
<i>Eco</i> R V	GAT/ATC	187
<i>Sal</i> I	G/TCGAC (Cleavage affected by C methylation)	651

Document 3 : Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences (extraits)

Single Letter Code	Justification du code	Noms des deux bases concernées
R	Bases avec noyau puRique	
Y	Bases avec noyau pYrimidique	
W	Bases interagissant faiblement (<i>Weak</i>)	
S	Bases interagissant fortement (<i>Strong</i>)	

Document 4 : Activités d'enzymes de restriction dans différents tampons

Enzyme	A	B	C	D	E	H	Multi-Core
<i>Bam</i> H I	75-100%	75-100%	75-100%	50-75%	75-100%	100%	50-75%
<i>Bgl</i> II	10-25%	25-50%	75-100%	100%	25-50%	75-100%	100%
<i>Eco</i> R V	10-25%	25-50%	50-75%	100%	25-50%	50-75%	100%
<i>Sal</i> I	<10%	10-25%	25-50%	100%	<10%	25-50%	25-50%

Remarque : la température d'incubation pour toutes ces enzymes est de 37°C.

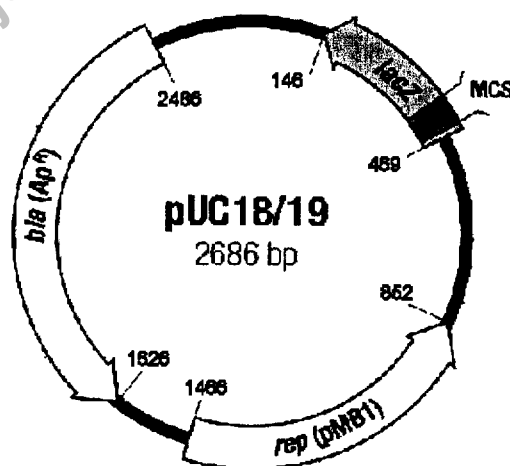
Document 5 : Cell lysis in Alkaline extraction protocol (Extraits)

Lyse the resuspended cells by adding 200 µL of the Lysis Buffer. Immediately mix the contents by gentle inversion (6-8 times) until the mixture becomes clear and viscous. Do not vortex. Harsh mixing will shear genomic DNA, resulting in chromosomal DNA contamination in the final recovered plasmid DNA. Do not allow the lysis reaction to exceed 5 minutes.

Prolonged alkaline lysis may permanently denature supercoiled plasmid DNA that may render it unsuitable for most downstream applications.

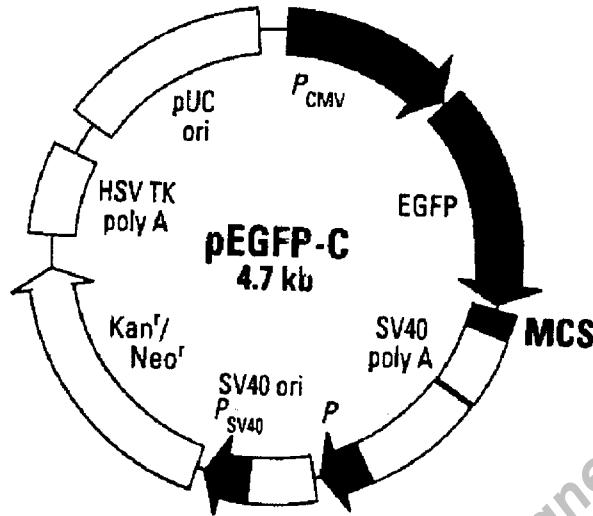
...
Composition of Lysis Solution S2 : NaOH 200 mM ; SDS 1%

Document 6 : pUC18 Map



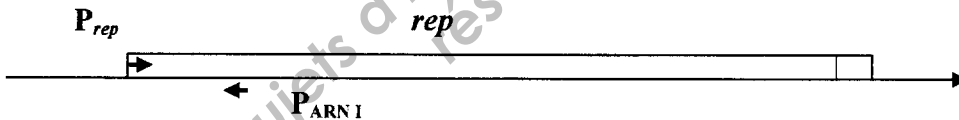
lacZ représente plus exactement le gène « *lacZ alpha* »

Document 7 : Mammalian expression vectors pEGFP-C



SV40 : Simian Virus 40
 CMV : CytomégaloVirus
 EGFP : human codon-optimized gene coding for enhanced Green Fluorescent Protein which produces fluorescence 35 times more intense than wild-type GFP.

Document 8 : Schéma de la région rep du plasmide pColE2



Le promoteur P_{rep} dirige la synthèse de l'ARN messager *rep* codant la protéine REP.
 Le promoteur $P_{ARN I}$ dirige la synthèse de l'ARN messager ARN I dont la séquence est le complément réverse de l'extrémité 5' de l'ARN messager *rep*.

Document 9 : Mise en évidence de l'interaction entre l'ARN I et l'ARNm *rep.*

0 0.5 1 2 5 10



L'ARN I marqué au ^{32}P (115 nucléotides) et la partie 5' de l'ARN *REP* non marqué (205 nucléotides) sont mis en présence et puis déposés en gel de polyacrylamide après un temps d'incubation variant de 0 à 10 minutes.

Le document ci-contre représente le résultat de l'autoradiographie du gel de polyacrylamide à 8% (m/v) après migration.

La zone de dépôt se situe en haut du gel.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
réseau SCEREN