



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.**

**Campagne 2012**

# BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR

## BIOTECHNOLOGIES

### **BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENIE GENETIQUE**

---

**SESSION 2012**

---

DUREE DE L'EPREUVE : 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 7 pages numérotées de 1/7 à 7/7.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2012
Biologie moléculaire et génie génétique	BOE2BMO	Page : 1/7

# Un système double hybride chez la levure

La société Invitrogen commercialise le système « *Hybrid Hunter™ Yeast Two-Hybrid System* » permettant de détecter d'éventuelles interactions entre deux protéines chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le principe général du système repose sur l'utilisation de deux vecteurs :

- **pHybLex/Zeo** qui permet de sous-cloner le gène codant pour une protéine d'intérêt X appelée « appât »,
- **pYESTrp2** qui permet de sous-cloner un gène Y ou une banque d'ADNc codant pour une protéine Y, appelée « proie » pouvant éventuellement interagir avec la protéine X.

## 1. Le vecteur pHybLex/Zeo (4 points)

pHybLex/Zeo est un « vecteur de clonage » et d'expression et un vecteur navette. La carte de ce vecteur est présentée dans le **document 1a**.

1.1. Définir l'expression soulignée et justifier cette appellation à l'aide des informations extraites du **document 1a**.

Dans son site multiple de clonage (MCS), le vecteur pHybLex/Zeo possède 9 sites de restriction.

1.2. Définir une enzyme de restriction.

1.3. Citer les propriétés qui caractérisent généralement un site de restriction.

1.4. Nommer les deux types de coupures effectuées par les enzymes de restriction.

Présenter un exemple dans chaque cas en précisant les produits de digestion obtenus.

1.5. Définir un promoteur fort.

## 2. Le vecteur pYESTrp2 (4 points)

Le vecteur pYESTrp2 permet de sous-cloner les nombreux ADNc d'une banque d'ADNc. La carte de ce vecteur est présentée dans le **document 1b**.

2.1. À partir du **document 1b**, démontrer que ce vecteur est un vecteur navette et un vecteur d'expression.

2.2. Préciser les rôles des séquences « NLS » et « V5 epitope » de ce vecteur.

- 2.3. Indiquer la signification du sigle « ADNc » et en donner une définition.
- 2.4. À l'aide d'un schéma légendé, présenter le principe d'une technique d'obtention d'un ADNc (double brin).
- 2.5. Lister la succession des principales étapes opératoires nécessaires à la constitution d'une banque d'ADNc par clonage dans un vecteur plasmidique.

### 3. Recherche d'interactions de protéines par la méthode double hybride (8 points)

La protéine LexA joue un rôle central dans le système double hybride, dont le principe est indiqué dans le **document 2**.

- 3.1. Préciser la fonction *in vivo* de la protéine LexA.  
Schématiser sa structure en faisant apparaître les domaines essentiels à son activité.
- 3.2. Citer un exemple de motif protéique assurant une interaction avec l'ADN.

Des protéines de fusion sont obtenues à partir des vecteurs pHybLex/Zeo et pYESTrp2.

- 3.3. Rappeler la définition d'une protéine de fusion.  
Schématiser la protéine de fusion obtenue à partir de chacun des deux vecteurs. (**Document 2**).

Le **document 2** indique : "*a library of cDNA encoding potential interactors is cloned in frame with the B42 AD*".

- 3.4. Donner la signification d'un « clonage en phase »

Les levures cotransformées par les deux vecteurs sont sélectionnées et criblées sur un milieu adapté.

Le gène *lacZ* codant la  $\beta$ -galactosidase est utilisé comme gène rapporteur dans la levure cotransformée par les deux vecteurs. Ce gène *lacZ* provient de l'opéron lactose d'*Escherichia coli*.

Une solution de X-Gal est incorporée dans le milieu de sélection des levures cotransformées.

- 3.5. Indiquer les caractéristiques du milieu qui permettent de sélectionner uniquement les levures cotransformées par ces deux vecteurs. Justifier.
- 3.6. Représenter l'organisation générale de l'opéron lactose à l'aide d'un schéma légendé.

- 3.7. Préciser les intérêts fonctionnels d'un opéron bactérien.
- 3.8. Définir un gène rapporteur.
- 3.9. Définir une séquence « enhancer ». (**Document 2**)
- 3.10. Indiquer la couleur des colonies de levure lorsque les protéines X et Y interagissent.  
Justifier par un schéma explicatif.

#### 4. Analyse des protéines de fusion (3 points)

Une étape importante lors de la réalisation d'un criblage double hybride consiste à vérifier l'expression des protéines de fusion chez les levures transformées. Dans ce but, les protéines sont séparées par SDS-PAGE, puis analysées par Western-blot. Le **document 3** présente un exemple de résultats obtenus.

Northern-blot et Western-blot sont des techniques historiquement dérivées du Southern-blot.

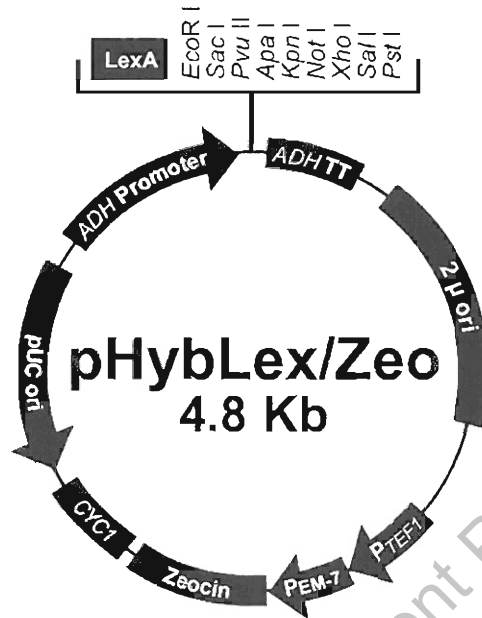
- 4.1. Rappeler dans chaque cas la nature des molécules analysées.  
Citer les trois étapes communes à ces trois techniques.
- 4.2. Analyser et interpréter les résultats du **document 3b**. Conclure.
- 4.3. Proposer deux anticorps primaires permettant de vérifier par western-blot l'expression de chacune des protéines de fusion chez les levures cotransformées.

#### 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

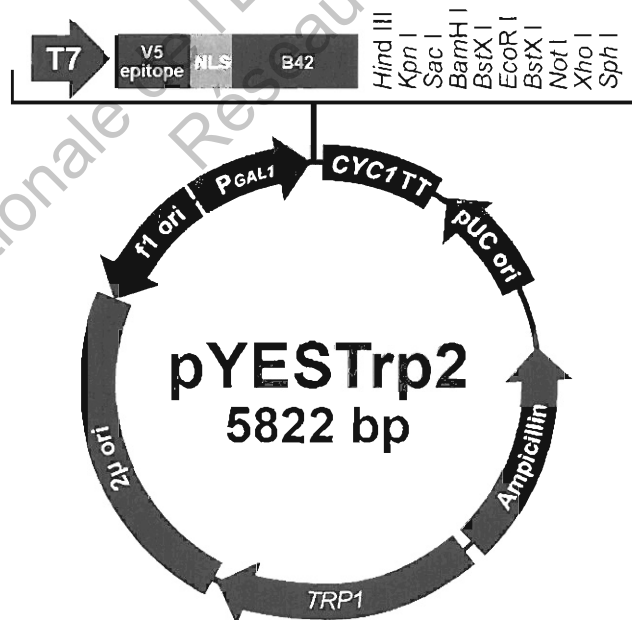
**Document 1**

**Document 1a : cartographie simplifiée du vecteur pHybLex/Zeo**



LexA : LexA DNA Binding Domain open reading frame  
 ADH TT : ADH Transcription Terminator  
 PEM-7, PTEF1 : promoters  
 CYC1 : CYC1 Transcription Termination region

**Document 1b : cartographie simplifiée du vecteur pYESTrp2**



PGAL1 : GAL1 promoter region  
 NLS : Nuclear localization signal  
 B42 : activation domain  
 CYC1 TT : CYC1 Transcription Termination  
 TRP1 : gene of the tryptophan synthesis

## Document 2 : The Hybrid Hunter™ Yeast Two-Hybrid System

The Hybrid Hunter™ Yeast Two-Hybrid System exploits the fact that transcription factors like LexA are composed of two domains, a DNA binding domain (DBD) and a domain involved in transcriptional activation (AD).

In The Hybrid Hunter™ Yeast Two-Hybrid System, two separate hybrid proteins are constructed:

- a known gene, X, is cloned into pHybLex/Zeo (**document 1a**) and expressed as a fusion protein LexA DBD/protein X known as the "bait". Zeocin resistance gene in this vector can be used for selection in both *S.cerevisiae* and *E.coli*.
- a second gene, Y, or a library of cDNA encoding potential interactors is **cloned in frame** with the B42 AD in the vector pYESTrp2 (**document 1b**) to give by translation the fusion protein B42 AD/protein Y known as the "prey".

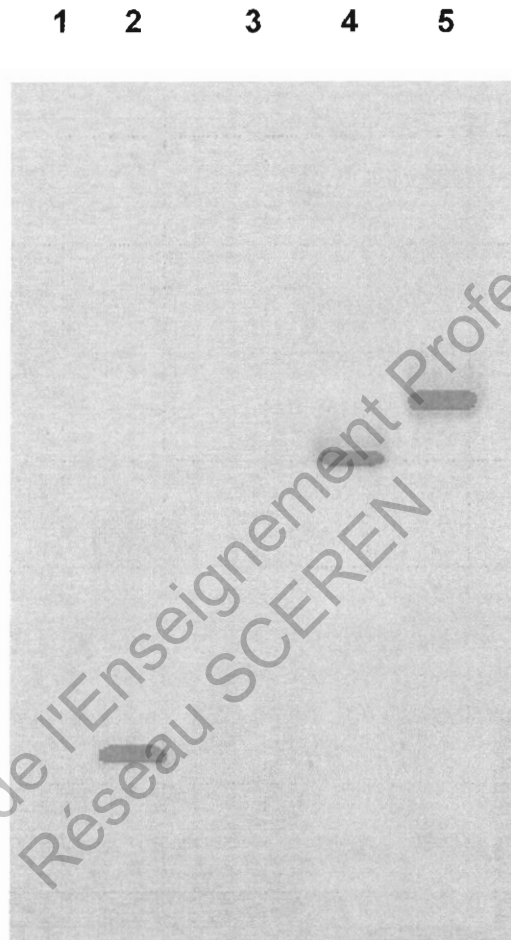
These two vectors are transformed into a yeast strain that contains the reporter gene *lacZ*. Upstream this reporter is located the LexA DNA binding site that acts as an **enhancer** sequence.

If protein X doesn't interact with protein Y, there is no expression of the reporter.

If protein X interacts with protein Y in the nucleus, this will bring the activation domain (AD) together with the DNA-binding domain (DBD) to reconstitute transcriptional factor LexA and result in expression of the reporter gene. Positive interactions can thus be detected by a screening for  $\beta$ -galactosidase expression.

### Document 3 : Analyse des protéines de fusion

Les protéines ont été extraites des levures transformées, séparées par électrophorèse SDS-PAGE, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Celle-ci a été révélée avec un anticorps anti épitope V5.



#### **WESTERN-BLOT**

Révélation avec anticorps anti V5

#### Légende

**Piste 1** : extrait de levures transformées par pHybLex/Zeo

**Piste 2** : extrait de levures transformées par pYESTrp2

**Piste 3** : extrait de levures transformées par pHybLex/Zeo exprimant la protéine X

**Piste 4** : extrait de levures transformées par pYESTrp2 exprimant une protéine Y1 d'un clone 1

**Piste 5** : extrait de levures transformées par pYESTrp2 exprimant une protéine Y2 d'un clone 2