



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 2013

**BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES**

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENIE GENETIQUE

SESSION 2013

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.

Souris KO : un exemple d'invalidation utilisé dans l'étude de la mucoviscidose.

En 2007, le prix Nobel de Médecine a été décerné aux chercheurs Mario Capecchi, Martin Evans et Oliver Smithies pour leurs travaux qui avaient conduit à l'obtention des premières souris transgéniques « Knock Out » (KO) dans les années 1990. Il s'agissait des premiers mammifères chez lesquels un gène était invalidé spécifiquement et de manière stable. Cette biotechnologie d'une nouvelle ère a ouvert un champ d'étude nouveau en médecine puisqu'il était dès lors possible d'étudier les effets d'un seul gène sur la physiologie de l'animal. Depuis, de très nombreuses souris KO ont été réalisées. Certaines ont servi d'animaux modèles pour l'étude des maladies génétiques comme la mucoviscidose.

1. Le gène *Cftr* et son expression (5,5 points)

La mucoviscidose est une maladie génétique monogénique consécutive à une mutation du gène *Cftr*. Ce gène code la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), une protéine canal perméable aux ions chlorure. Chez l'homme, le gène *Cftr* a été identifié sur le chromosome 7, il comprend 27 exons. La protéine CFTR est constituée de 1476 acides aminés.

1.1. Organisation des gènes eucaryotes

- 1.1.1. Présenter sous forme d'un schéma légendé l'organisation générale d'un gène eucaryote du type de *Cftr*, en précisant les différents signaux nécessaires à son expression.
- 1.1.2. Compléter ce schéma en représentant de façon simple l'ARN messager issu de la transcription, après maturation, ainsi que le polypeptide issu de la traduction. Indiquer l'orientation de chacune de ces molécules.

1.2. Mutations pathologiques du gène *Cftr* humain

Chez l'homme, plus de 200 mutations de *Cftr* ont été répertoriées. Deux d'entre elles, $\Delta F508$ et I511X, sont portées sur l'exon 10 de *Cftr*.

La séquence ci-dessous correspond aux codons 507 à 512 du transcrit mature du gène *Cftr*.

```
AUC UUU GGU GUU AUA AAA  
507 508 509 510 511 512
```

La mutation $\Delta F508$ est une délétion portant sur les trois nucléotides soulignés de la séquence nucléotidique.

- 1.2.1. Ecrire, sur la copie, la séquence nucléotidique déletée. À l'aide du code génétique représenté dans le **document 1**, traduire cette séquence en précisant le nom complet de chaque acide aminé. En déduire la conséquence de la délétion $\Delta F508$ sur la séquence peptidique.

La mutation I511X est une délétion portant sur le nucléotide encadré sur la séquence.

- 1.2.2. Déduire la conséquence de cette délétion ponctuelle sur la séquence peptidique.

2. Obtention de souris transgéniques invalidées pour l'exon 10 du gène *Cftr* (7,5 points)

Les souris KO pour l'exon 10 du gène *Cftr* (souris homozygotes *Cftr* $\Delta 10/\Delta 10$) sont obtenues à partir du croisement de souris homozygotes *Cftr* fl10neo/fl10neo et de souris productrices de recombinaison (souris homozygotes *Cre* +/+).

2.1 Construction des allèles *Cftr* fl10neo et *Cftr* $\Delta 10$

Le **document 2** décrit le principe d'obtention des allèles *Cftr* fl10neo et *Cftr* $\Delta 10$. Pour obtenir l'allèle *Cftr* fl10neo, un vecteur est nécessaire. Il porte l'exon 10 du gène *Cftr* associé à une cassette Néomycine. L'ensemble est encadré par deux sites LoxP ; il est alors qualifié de « floxé ». fl10neo peut ainsi être éliminé « à la demande » par une recombinaison Cre, afin de produire l'allèle invalidé $\Delta 10$.

2.1.1 A partir du **document 2a**, expliquer l'obtention de l'allèle *Cftr* fl10neo.

2.1.2 A l'aide des **documents 2a et 2b**, expliquer l'obtention de l'allèle *Cftr* $\Delta 10$

2.2 Obtention des souris transgéniques

La méthode suivie se compose des étapes suivantes :

- Transfection de cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES) par électroporation en présence du vecteur linéarisé contenant l'exon 10 floxé associé à une cassette Néomycine.
- Sélection des cellules ES recombinées par croissance sur milieu de culture contenant de la Néomycine et du Gancyclovir.
- Obtention de souris chimères par transfert de cellules ES sélectionnées dans un blastocyste puis implantation dans une mère porteuse.
- Croisement des souris chimères entre elles et obtention de souris homozygotes (*Cftr* fl10neofl10neo).
- Croisement avec des souris productrices de recombinaison (souris *Cre* +/+).
- Sélection des souris homozygotes *Cftr* $\Delta 10/\Delta 10$ dans la descendance.

2.2.1 Exposer le principe général de l'électroporation.

2.2.2 Expliquer l'intérêt des deux marqueurs de sélection décrits dans le **document 2**.

2.3 Criblage des souris homozygotes *Cftr* fl10neo/fl10neo

Le criblage a été effectué par Southern Blot.

Pour cette analyse, l'ADN génomique est extrait, digéré par l'enzyme *SphI*, puis les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose.

La sonde utilisée, pour identifier les différents allèles *Cftr*, est marquée radioactivement au ³²P. Elle est appelée « 3'probe ». Elle est représentée sur le **document 2a** ainsi que les sites « S » de restriction de l'enzyme *SphI*.

Le protocole de Southern blot mis en œuvre est résumé dans le **document 3**.

2.3.1 La séquence sonde 3'probe est comparée avec le logiciel BLAST à une banque génomique de souris. Expliquer l'intérêt de cette vérification.

2.3.2 Noter sur la copie la signification des repères 1 à 5 du montage de transfert présentés sur le **document 4**.

2.3.3. Préciser l'intérêt de la solution D utilisée à l'étape 1 du protocole (**document 3**).

Lors de l'étape 9 (**document 3**), la membrane est lavée dans des conditions de stringence croissante.

2.3.4. Identifier les conditions de stringence, et préciser le rôle de cette étape.

L'ADN de trois souris A, B et C a été analysé par Southern blot.

2.3.5. Caractériser ces trois génotypes à partir du **document 5**.

3. Etude du taux d'expression du gène de la recombinaison Cre par RT-qPCR (6 points)

Les souris homozygotes *Cre* $+/+$, possèdent le gène *Cre* sous contrôle d'un promoteur tissu-spécifique. Elles permettent après croisement avec des souris *Cftr* $\Delta 10/\Delta 10$, uniquement dans le tissu considéré. Le promoteur tissu-spécifique utilisé pour contrôler la recombinaison Cre est celui de la Villine. L'ARNm de la recombinaison Cre a été dosé dans différents tissus d'une souris *Pvilline-Cre* $+/+$ par RT-qPCR en temps réel.

3.1. Dosage des ARNm de la recombinaison Cre

Le **document 6** est le résultat d'une RT-qPCR faite à partir des extraits d'ARNm standardisés de trois tissus d'une même souris *Pvilline-Cre* $+/+$: le cerveau, l'intestin et le poumon. Il présente plusieurs courbes d'amplification.

- 3.1.1.** Décrire succinctement l'activité de la Transcriptase Inverse et préciser son utilité dans la technique de RT-PCR.
- 3.1.2.** Reporter sur la copie l'allure générale d'une courbe d'amplification. Identifier et commenter les différentes phases de cette courbe.
- 3.1.3.** Placer le cycle seuil (Ct) sur cette courbe et donner sa définition.
- 3.1.4.** Expliquer le lien entre la valeur du cycle seuil et le nombre initial de séquence cible.
- 3.1.5.** Analyser les résultats obtenus pour les ARNm du « gène de ménage » *hsp90* et pour les ARNm du gène *Cre* extraits des trois tissus, présentés dans le **document 6**.
Conclure sur l'expression « tissu-spécifique » du gène de la recombinaison Cre chez la souris *Pvilline-Cre* $+/+$.

3.2. Etude des souris *Cftr* $\Delta 10/\Delta 10$

Certains embryons ont été sacrifiés et l'ADN de différents tissus a été testé par la technique de Southern blot préalablement décrite avec la sonde 3'probe (**document 2**).

Décrire les résultats attendus (nombre de bande(s) et taille de la (des) bande(s) en kb) pour les cellules de cerveau, d'intestin et de poumon.

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 : Le code génétique

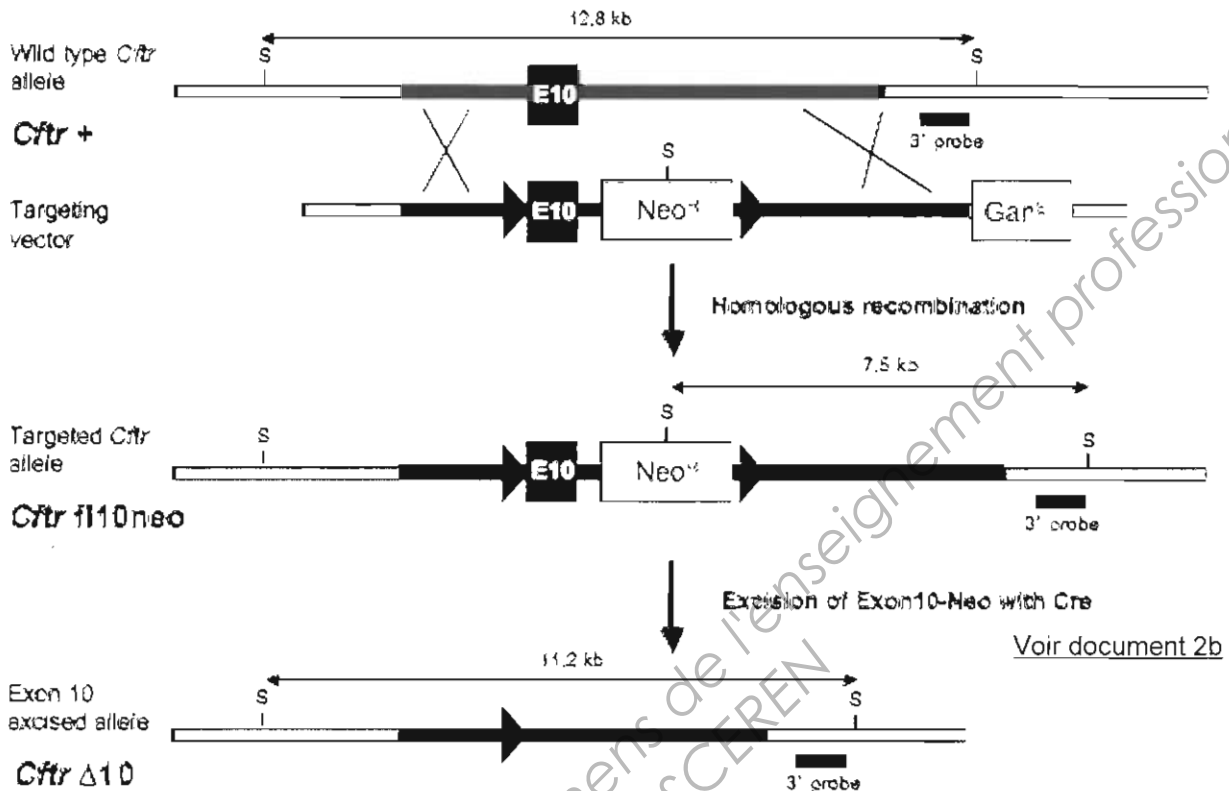
		nucléotide en n°2							
		U	C	A	G				
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	*	UGA	*	A
	UUG		UCG		UAG		UGG	Trp	G
C	CUU		CCU	Pro	CAU	His	CGU		U
	CUC	Leu	CCC		CAC		CGC	Arg	C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU		ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU		GCU	Ala	GAU	Asp	GGU		U
	GUC	Val	GCC		GAC		GGC	Gly	C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

* codon stop

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

Document 2 : Principe d'obtention des allèles *Cftr* fl10 neo et *Cftr* Δ10

Document 2a : Extraits de l'article de Drumm et al. : « Generation of the *Cftr* conditional null allele »

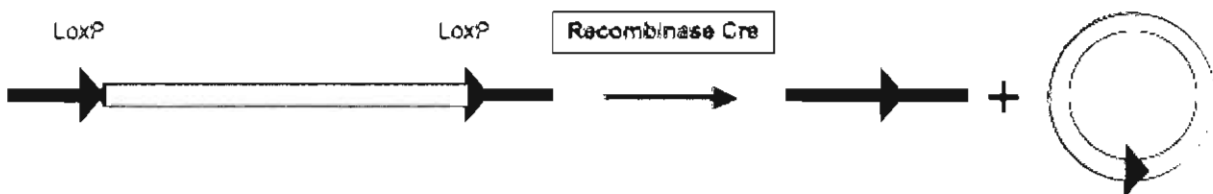


The wildtype *Cftr* allele contains exon 10 of *Cftr* (black box). The vector contains selectable markers for both positive (*Neo^R*: neomycin resistance cassette) and negative (*Gan^S*: herpes thymidine kinase gene, HTK, responsible of Gancyclovir sensitivity) selection of mouse embryonic stem (ES) cells. The targeting vector contains 2 *loxP* sites (triangles) that flank exon 10 and the *Neo^R* cassette. Both arms of the targeting vector have homologous sequence to *Cftr*.

S : site de restriction pour *SphI*.

Document 2b : Principe du système de recombinaison spécifique « Cre-LoxP »

Les sites *LoxP* sont des séquences de 30 nucléotides reconnues spécifiquement par une recombinaise phagique : la recombinaise Cre. La recombinaise Cre catalyse l'excision spécifique du fragment d'ADN floxé, c'est à dire encadré par deux sites *LoxP* orientés dans le même sens.

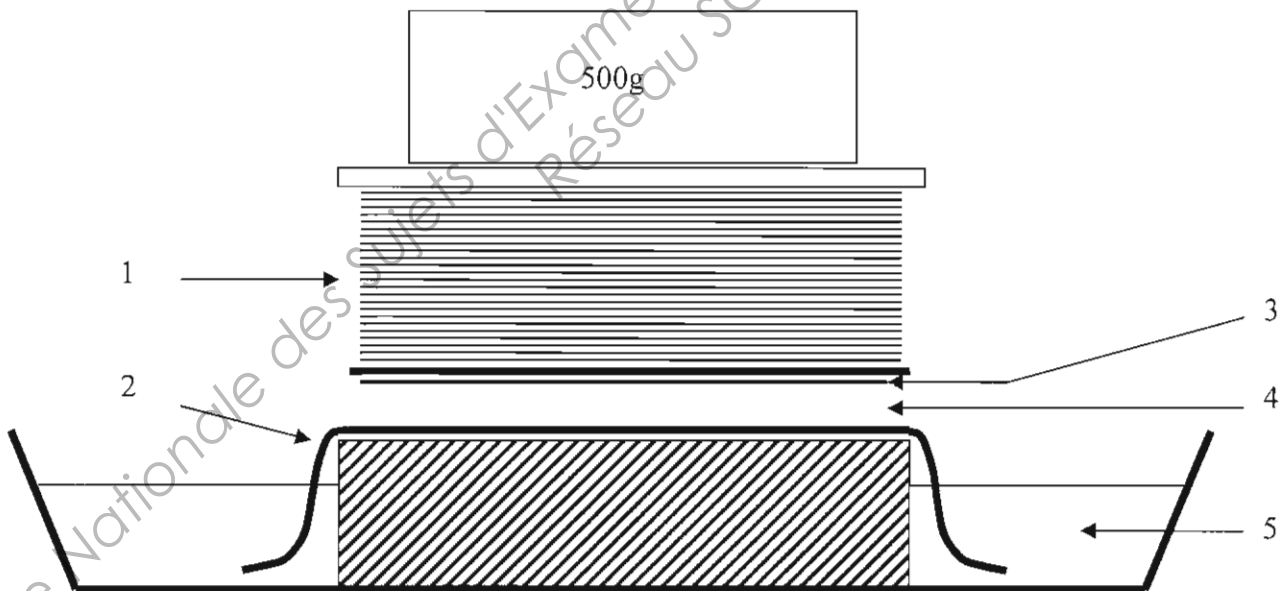


Document 3 : Southern Blot protocol

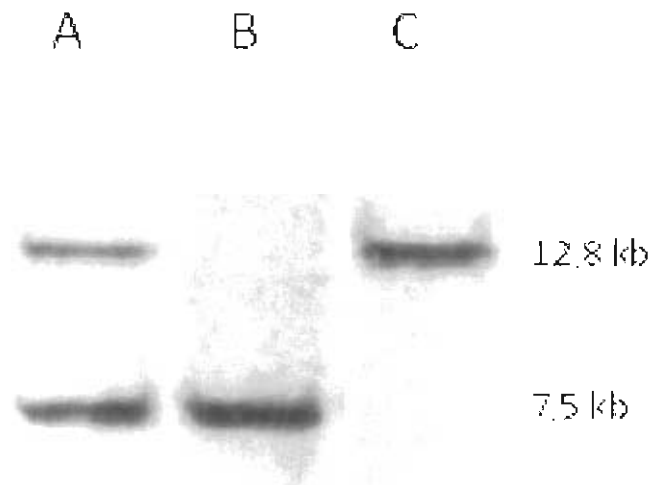
1. Wash the gel for 15 minutes at room temperature in solution D (0,2M NaOH ; 0,6 M NaCl).
2. Cut nylon membrane and two sheets of Whatman paper to the size of the gel. Pre-wet the membrane into 10X SSC.
3. Prepare a rectangular pyrex dish for transfer as described in **Document 5**. Add hybridization buffer (10X SSC) to the bottom of the pyrex dish. Allow the 10X SSC to wet the ends of the Whatman paper. Allow the DNA to transfer overnight.
4. Disassemble the transfer device.
5. Crosslink the DNA by UV irradiation.
6. Prehybridize the membrane in the hybridization buffer for at least 1 hour.
7. Add the denatured labeled probe to fresh hybridization buffer.
8. Hybridize in a hybridization oven overnight at 42 °C.
9. **The following day, wash the blot in:**
 - 2X SSC ; 0,1% SDS at room temperature for 15 minutes. Repeat.
 - 0.1X SSC ; 0,1% SDS at room temperature for 15 minutes. Repeat.
 - 0.1X SSC ; 0,1% SDS at 65 °C for 15 minutes. Repeat.
10. Wrap the washed membrane in plastic wrap, and place in a X-ray film cassette. Place x-ray film next to the wrapped membrane, and a single intensifying screen. Close the film cassette holder and store overnight to several days at -80 °C to expose the film.
11. Develop the exposed X-ray film.

20X SSC: 701,2 g NaCl and 352,8 g of sodium citrate into 4 liters of water. Adjust pH to 7,0.

Document 4 : Montage de transfert



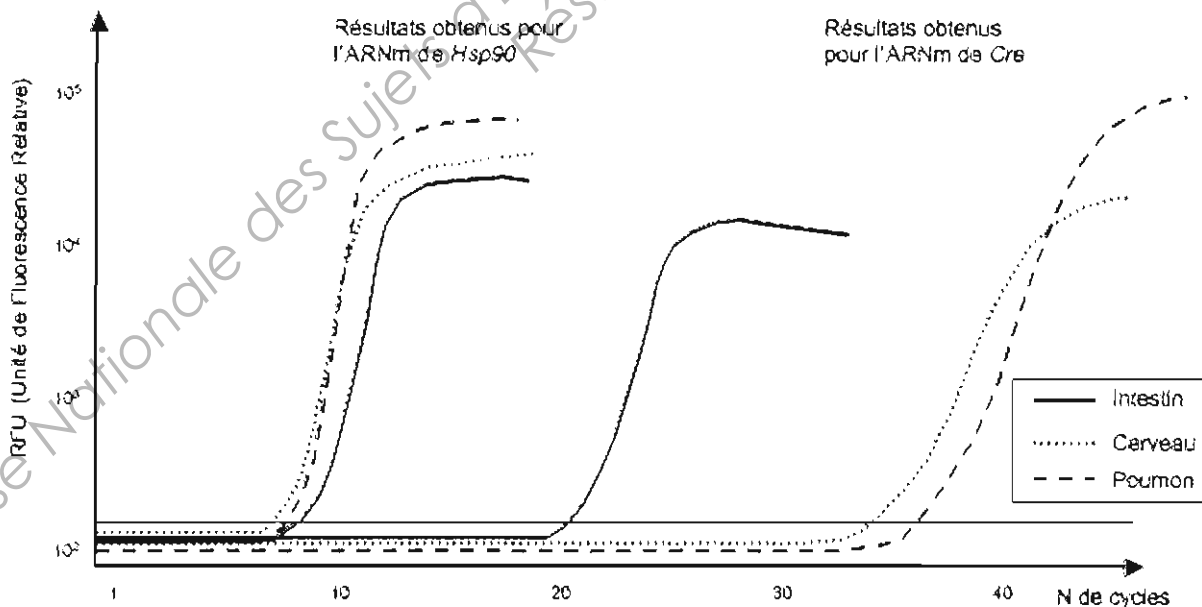
Document 5 : Analyse par Southern blot de l'ADN des souris A, B et C



Document 6 : Courbes d'amplification de RT-qPCR

Analyse portant sur les ARNm de poumon, de cerveau et d'intestin grêle d'une souris *Pvilline-Cre*^{+/+}.

Chaque courbe présentée est obtenue en moyennant les résultats de plusieurs courbes expérimentales. Les trois courbes de gauche concernent l'ARNm du gène *hsp90*, un « gène de ménage », servant de référence. Les trois courbes de droite concernent l'ARNm de la recombinase *Cre*.



Références bibliographiques :

- . Snouwaert et al. « An animal model for Cystic Fibrosis made by gene targeting », *Science*, 1992 August 21.
- . Hodges et al. « Generation of a conditional null allele for *Cfr* in mice », *Genesis*, 2009 July 16.