



**LE RÉSEAU DE CRÉATION
ET D'ACCOMPAGNEMENT PÉDAGOGIQUES**

**Ce document a été mis en ligne par le Réseau Canopé
pour la Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

Ce fichier numérique ne peut être reproduit, représenté, adapté ou traduit sans autorisation.

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET GÉNIE GÉNÉTIQUE

SESSION 2017

DURÉE DE L'ÉPREUVE : 2 h 00
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 8 pages numérotées de 1/8 à 8/8.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2017
Biochimie moléculaire génie génétique	BOE2BMO	Page : 1/8

Les enzymes TALEN : des outils pour agir spécifiquement sur les gènes

Depuis la découverte des enzymes de restriction, la manipulation *in vitro* des séquences d'ADN a permis d'immenses progrès dans la compréhension des mécanismes génétiques. De nouveaux outils plus performants sont apparus récemment comme les méganucléases, les protéines à doigts de zinc, les CRISPR-Cas9 nucléases, et les TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*). Toutes ces enzymes sont des endonucléases spécifiques, dont le site de liaison à la séquence d'ADN reconnue (*binding domain = BD*) peut être adapté en fonction des besoins. Plusieurs méthodes basées sur la PCR ont été élaborées pour faciliter la construction de ce domaine de liaison. Les enzymes TALEN (N pour nucléase) sont obtenues par modification d'une protéine bactérienne nommée TALE (*Transcription Activator-Like Effector*).

1. Etude de quelques caractéristiques de la protéine TALE (6 points)

La protéine TALE est produite naturellement chez certaines bactéries phytopathogènes du genre *Xanthomonas*. Sa séquence codante est contenue dans un opéron, dont l'expression est activée lorsque la bactérie adhère sur la paroi d'une cellule végétale (document 1). Cet opéron contient trois ORF (*open reading frame*), dont l'un code la protéine TALE. Le numéro d'accèsion (accession number) X8975444 a été attribué à la séquence du gène de la protéine TALE.

1.1 Indiquer l'intérêt d'associer un « accession number » à une séquence.

1.2 Représenter un opéron par un schéma annoté en faisant apparaître les séquences nécessaires à la transcription et à la traduction des 3 protéines. Sur le schéma de l'opéron, **délimiter** un ORF.

1.3 À partir du document 1a, **décrire** les étapes du mécanisme d'action de la protéine TALE. **Justifier** le nom donné à cette protéine (Transcription Activator-Like-Effector).

1.4 À partir du document 1b, **présenter** les particularités du domaine de liaison à l'ADN de la protéine TALE. **Déterminer** la longueur de la séquence d'ADN reconnue par la protéine TALE. **Comparer** cette longueur avec celle généralement reconnue par une enzyme de restriction de type II et **conclure** sur la spécificité de la protéine TALE.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2017
Biochimie moléculaire génie génétique	BOE2BMO	Page : 2/8

2. La création du domaine de liaison sur mesure par PCR (7 points)

Les caractéristiques du domaine de fixation à l'ADN de la protéine TALE en font un outil intéressant en génie génétique. Pour cela, son domaine de liaison à l'ADN a été fusionné à celui responsable du clivage de l'ADN en présence de l'enzyme de restriction Fok I. La protéine de fusion obtenue est appelée TALEN.

Le document 2 présente les différentes étapes de la construction d'un domaine de liaison à l'ADN d'une protéine TALEN. Chaque module de liaison à une base azotée est assemblé au suivant dans un ordre déterminé par la nature des amorces de PCR utilisées (document 2a).

2.1 Expliquer comment la PCR permet d'incorporer des séquences non spécifiques à l'extrémité d'un amplicon.

2.2 A partir du document 2a, **dresser** la liste des enzymes à site palindromique et des groupes d'enzymes à sites compatibles. **Indiquer** la particularité du positionnement du site de coupure de l'enzyme Bsal.

Le document 2b présente les étapes du clonage ordonné médié par PCR. Le site de restriction Bsal a été ajouté aux extrémités 5' de chaque amorce.

Les nucléotides N correspondent à une séquence choisie et différente pour chaque amorce.

Chaque amplicon est ensuite digéré par Bsal et purifié avant l'étape de ligature. La purification du produit de digestion est réalisée par une électrophorèse préparative combinée à une chromatographie sur colonne de silice.

2.3 Préciser l'intérêt de la purification avant ligature dans ce contexte. **Présenter** les étapes d'extraction et de purification d'un produit de digestion.

2.4 À partir du document 2b, **expliquer** en quoi ce clonage permet d'ordonner les modules dans la construction finale.

2.5 Argumenter l'intérêt de réaliser un clonage ordonné dans le contexte d'utilisation de la protéine TALE.

3. Utilisation des enzymes TALEN pour l'invalidation de gènes (5 points)

Le vecteur de clonage contenant l'ADN codant la protéine de fusion TALEN obtenue est introduit dans des organismes procaryotes cultivés sur milieu sélectif pour en produire des quantités importantes. Les vecteurs recombinés sont obtenus à partir de ces cellules et utilisés pour transférer des cellules eucaryotes en culture.

Le document 3a présente le vecteur utilisé pour le clonage de la protéine TALEN.

- 3.1** A partir du document 3a, **argumenter** le choix du type cellulaire utilisé pour produire le vecteur recombinant. **Expliquer** le rôle du gène *ccdB* dans la sélection des recombinants. **Indiquer** les éléments du vecteur qui permettent l'expression du gène codant la protéine TALEN dans une cellule eucaryote.

Deux protéines TALEN différentes sont utilisées (document 3b), pour couper un locus contenant un gène de fonction inconnue (document 4). Deux vecteurs TALEN sont introduits dans des cellules embryonnaires (cellules ES, Embryonic Stem) de souris en culture.

- 3.2** A l'aide des documents 3b et 4, **expliquer** la conséquence moléculaire de la fixation des deux protéines TALEN sur le gène d'intérêt.

Après action des protéines TALEN sur le génome, le système NHEJ va réparer le génome.

- 3.3** **Evaluer** les conséquences pour le gène d'intérêt de l'action du système NHEJ.

- 3.4** **Discuter** de l'intérêt de l'utilisation des protéines TALEN en génie génétique.

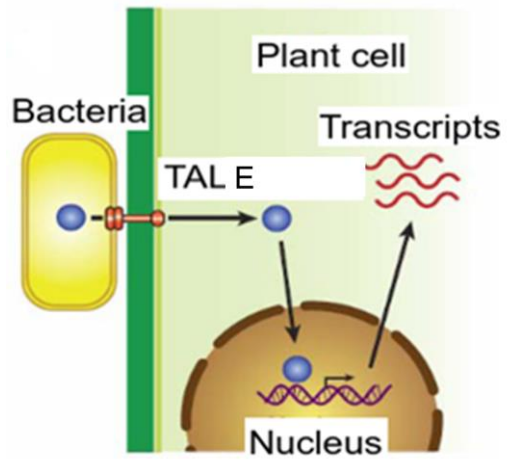
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)

Justesse et rigueur de l'expression écrite : orthographe, grammaire, vocabulaire.

Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture, y compris les schémas et légendes.

Document 1 : mode d'action et caractéristiques de la protéine TALE

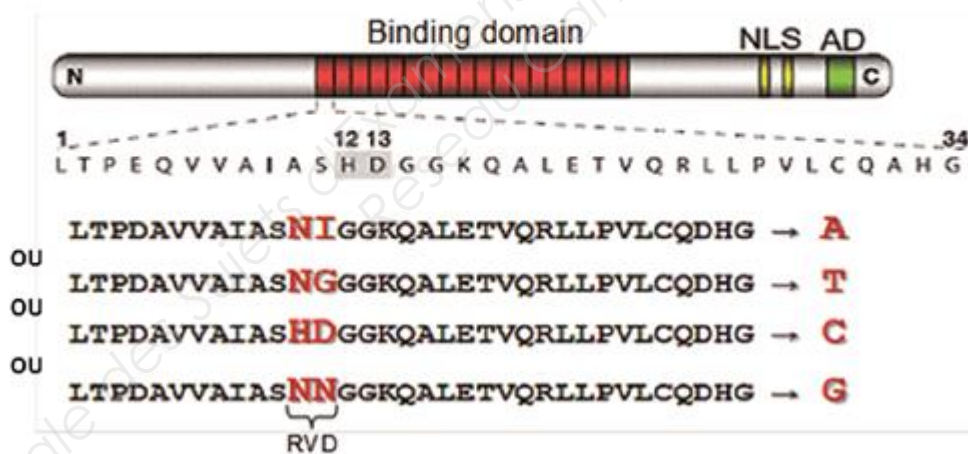
1a. Étapes du mécanisme d'action de la protéine TALE *in vivo*



1b. Caractéristiques moléculaires des différentes TALE

Identification of TALE and code cracking

TALE: **T**ranscription **A**ctivator-**L**ike **E**ffector



AD : activator domain

NLS : Nuclear Localisation Signal

RVD : repeat variable di-residue

→ : interagit avec

La protéine TALE est constituée dans sa partie centrale de micro-domaines similaires, répétés entre 18 et 22 fois, sous la forme de modules de 34 acides aminés très conservés.

Document 2 : une méthode de construction d'un gène codant pour une protéine TALE

2.a. Enzymes de restriction

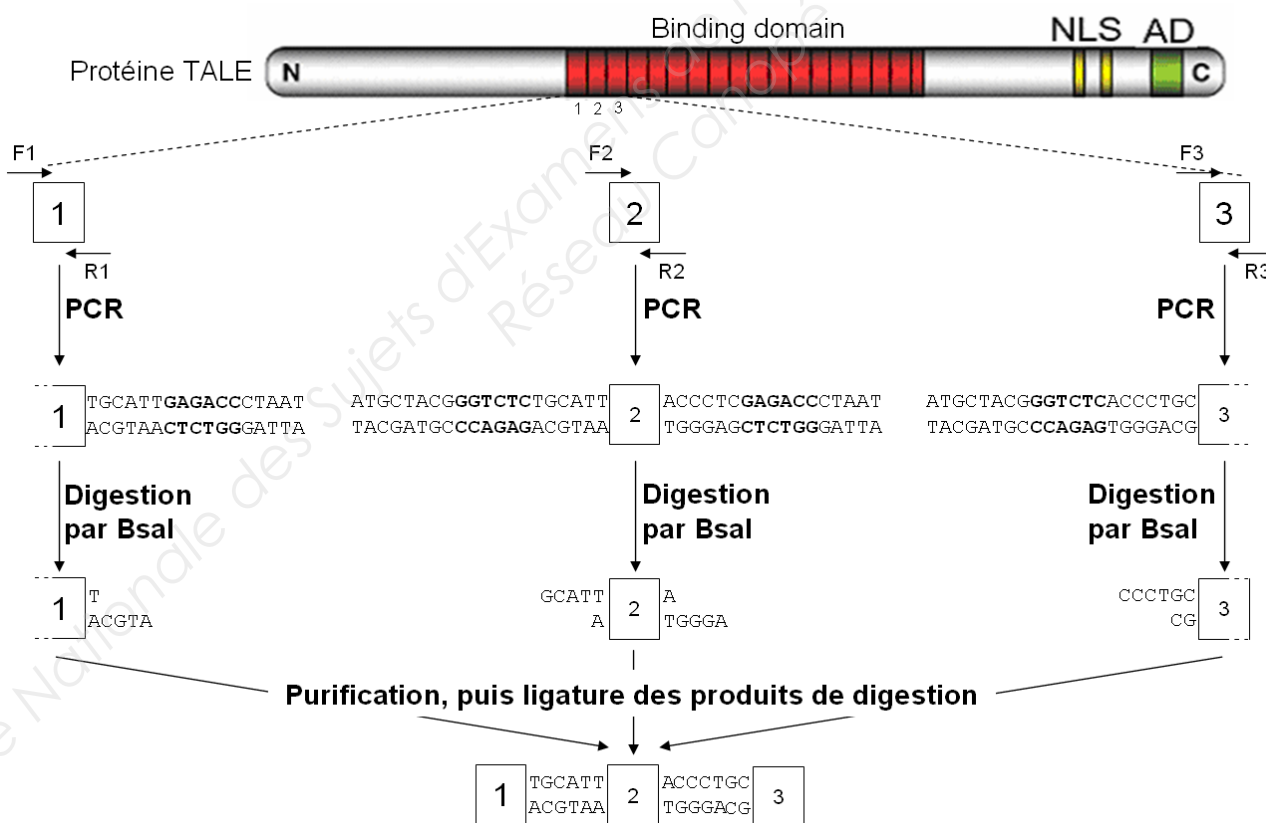
Nom	Site d'hydrolyse	Séquence débordante
AoxI	/GGCC	5' -GGCC
NotI	GC/GGCCGC	5' -GGCC
EcoRI	G/AATTC	5' -AATT
HhaI	GCG/C	CG-3'
FokI	GGATGNNNNNNNNN/NNNN CCTACNNNNNNNNNNNNN/	5' -NNNN
BsaI	GGTCTCN/NNNN CCAGAGNNNNN/	5' -NNNN

2.c. Séquences 5' de quelques amorces utilisées dans le document 2.b

Nom de l'amorce (<i>primer</i>)	Séquences de la partie 5' non spécifique
R1 (amplicon 1)	5'ATTAG <u>GGTCTCA</u> /ATGCA _{3'}
F2 (amplicon 2)	5'ATGCTACGG <u>GTCTCT</u> /GCATT _{3'}
R2 (amplicon 2)	5'ATTAG <u>GGTCTCG</u> /AGGGT _{3'}
F3 (amplicon 3)	5'ATGCTACGG <u>GTCTCA</u> /CCCTGC _{3'}

La partie soulignée de chaque séquence d'amorce désigne les sites respectivement reconnus et coupés par l'enzyme BsaI

2.b. Première étape : construction par PCR, digestion, puis ligature d'une séquence d'ADN codant des domaines de liaison d'une protéine TALE à un ADN



La séquence des modules 1 ; 2 ; et 3 code un des quatre micro-domaines de liaison à une des quatre bases (**document 1.b**).

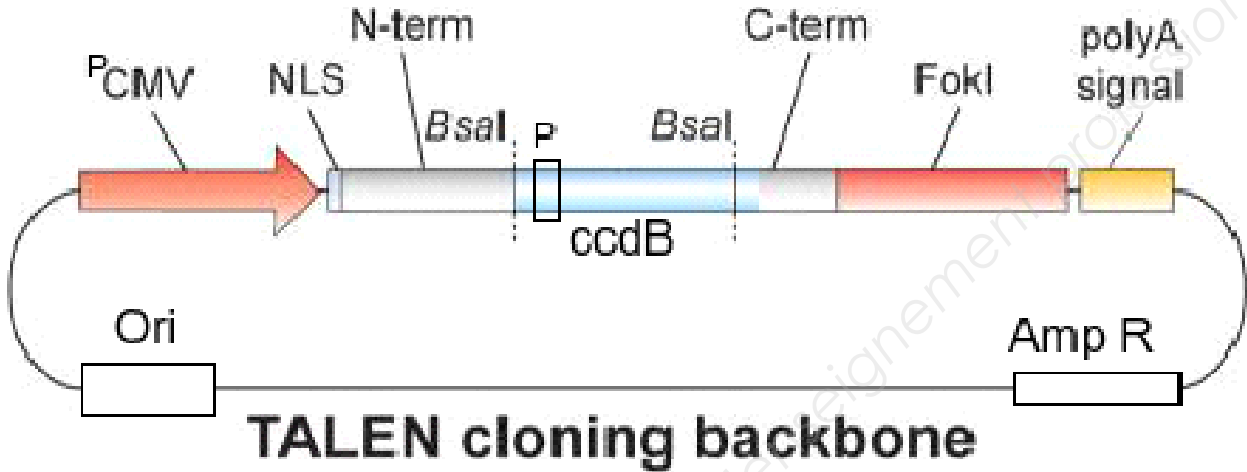
Les amplicons sont obtenus par PCR en présence de couples d'amorces F pour forward et R pour reverse (**document 2.c**). Ils sont digérés par l'enzyme de restriction BsaI.

Les produits de digestion, après purification, sont ligaturés dans un seul tube réactionnel.

Document 3 : production et utilisation des enzymes TALEN

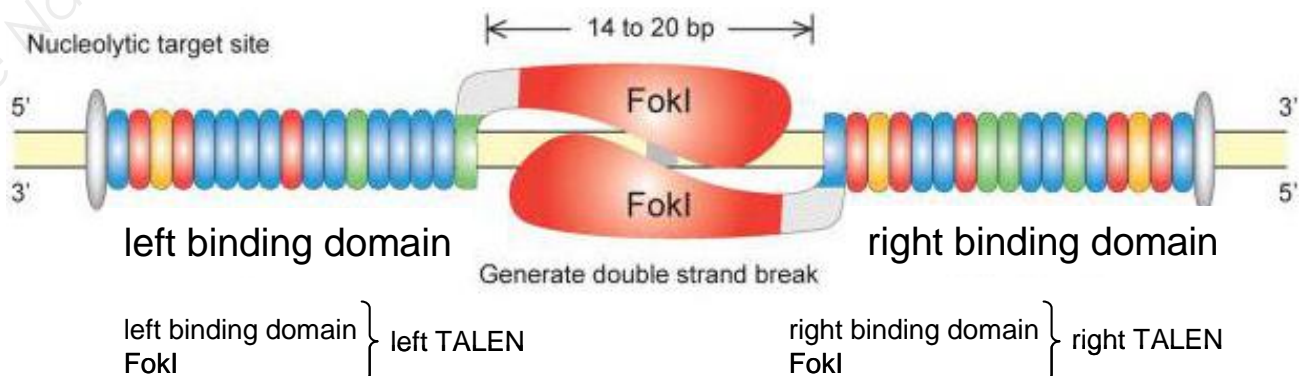
Une fois que la séquence d'ADN codant la séquence protéique d'intérêt est construite (de 18 à 22 modules codant chacun pour 34 acides aminés), elle est clonée dans le vecteur représenté ci-dessous. Des sites spécifiques conçus pour l'enzyme Bsal permettent d'orienter correctement l'insert au sein de ce vecteur.

3.a. Vecteur de clonage

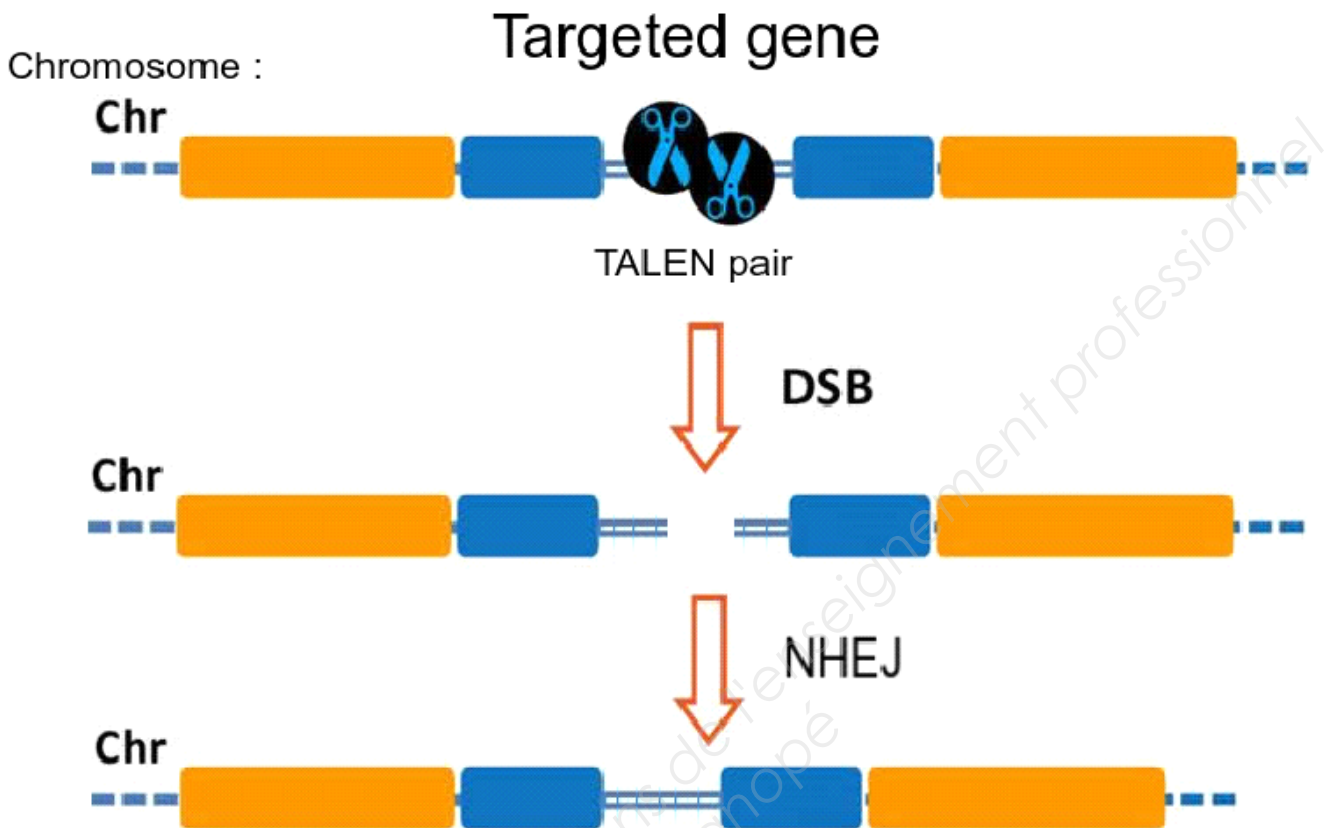


- NLS = Nuclear localisation signal
- P = promoteur
- CMV = cyto-mégalo-virus
- Bsal, FokI = endonucléases de restriction (voir **document 2.a**)
- ccdB : gène dont l'expression est létale chez *E. coli* wt (*wildtype*)
- ori = pBR322 ori
- Amp R = *beta lactamase gene*.

3.b. Interaction entre le complexe protéique constitué de deux protéines TALEN et la séquence cible du génome



Document 4 : Invalidation d'un gène d'intérêt par utilisation de deux protéines TALEN



DSB : *double strand break*

NHEJ : *Non Homologous End Joining* (système de réparation des cassures double brin d'une molécule d'ADN)