



**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 SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES

U2 Biologie moléculaire et génie génétique

SESSION 2018

DUREE DE L'EPREUVE : 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 1/9 à 9/9.

BTS Biotechnologies		Session 2018
U2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique	BOE2BMO	1 / 9

CRISPR/Cas9, un outil de modification de l'ADN génomique

Le système CRISPR/Cas9 est à l'origine, un système bactérien de protection contre l'infection phagique, qui détruit l'ADN exogène viral. Ses particularités le rendent intéressant comme outil du génie génétique notamment pour réaliser la modification ciblée de séquences choisies de l'ADN génomique d'organismes procaryotes ou eucaryotes.

1. Fonctionnement de l'outil CRISPR/Cas9 (2 points)

L'outil CRISPR/Cas9 repose sur l'action de deux composantes moléculaires : l'ARN guide et l'enzyme Cas9.

Le document 1 présente le mode de fonctionnement de cet outil.

- 1.1 Expliquer le rôle de l'ARN spécifique dans l'ARN guide.
- 1.2 Indiquer le type d'enzyme auquel appartient Cas9 puis préciser le type de liaison covalente clivé par ce type d'enzyme.
- 1.3 Désigner le processus par lequel la coupure double brin de l'ADN génomique cible est réparée dans la cellule hôte.

2. Production des composantes de l'outil CRISPR/Cas9 au laboratoire de génie génétique (9,5 points)

Le document 2 présente des extraits du manuel d'utilisation du coffret «GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit» commercialisé par le fournisseur Invitrogen™. Ce coffret contient un vecteur plasmidique qui permet la production des deux composantes de l'outil CRISPR/Cas9, l'ARN guide et l'enzyme Cas9, dans les cellules eucaryotes cibles.

La première étape consiste à construire le vecteur permettant la synthèse de l'ARN guide, spécifique de la séquence d'ADN génomique cible.

Un oligonucléotide double brin est inséré dans la cassette d'expression de l'ARN guide présentée dans le document 2.

- 2.1 Expliquer le rôle du promoteur U6 et du terminateur Pol III. Schématiser et orienter l'ARN produit.
- 2.2 Expliquer, à partir de la carte du vecteur « GeneArt® CRISPR Nuclease OFP Reporter », l'intérêt des extrémités utilisées dans ce cas précis.

Le vecteur recombinant est ensuite introduit dans des cellules bactériennes par transformation par choc thermique.

- 2.3 Rappeler les étapes clés à réaliser pour la transformation des bactéries *E. coli* et indiquer un milieu gélosé permettant de sélectionner les colonies de transformants.

Après la vérification de la qualité des clones obtenus par séquençage, une minipréparation d'ADN plasmidique est effectuée à partir des clones recombinés. L'ADN plasmidique est ensuite transfecté dans les cellules eucaryotes cibles.

BTS Biotechnologies		Session 2018
U2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique	BOE2BMO	2 / 9

- 2.4 Citer deux méthodes de transfection des cellules eucaryotes animales puis présenter succinctement leur principe.
- 2.5 A partir de la carte du vecteur, identifier les séquences qui permettent l'expression de Cas9 dans une cellule eucaryote et rappeler leur rôle.
- 2.6 Schématiser la protéine de fusion orientée, produite à partir du vecteur dans les cellules eucaryotes. Expliquer l'importance de la séquence NLS pour l'activité de Cas9.
- 2.7 Préciser comment repérer les cellules transfectées exprimant cette protéine de fusion.

3. Mise au point de l'outil CRISPR/Cas9 pour modifier l'ADN génomique du ver *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (6,5 points)

L'utilisation de l'outil CRISPR/Cas9 pour la modification de l'ADN génomique des cellules du nématode *C. elegans* nécessite plusieurs étapes de mise au point. Les chercheurs ont notamment testé l'efficacité d'une insertion ciblée (Knock-in) du gène codant la protéine fluorescente verte (« green fluorescent protein » ou GFP) dans le gène d'une protéine musculaire du ver, NMY-2.

Le document 3 présente la stratégie de modification de l'ADN génomique du ver.

- 3.1 Expliquer les étapes de l'insertion ciblée du gène *gfp* dans le gène *nmy-2* de *C. elegans*.

La vérification de l'intégration correcte du gène *gfp* dans le gène *nmy-2* de *C. elegans* est réalisée sur trois lignées de cellules de vers par génotypage.

La première étape du génotypage consiste en l'extraction de l'ADN génomique des vers selon le protocole fourni dans le document 4.

- 3.2 Expliquer le rôle des réactifs indiqués en gras dans le protocole d'extraction de l'ADN génomique.

La deuxième étape du génotypage consiste en une PCR.

Les résultats obtenus pour le génotypage réalisé sur les vers A, B et C, avec les amorces de PCR 1, 2, 3 ou 4, sont présentés dans le document 5.

- 3.3 Estimer la taille de chaque amplicon produit par PCR à partir des ADN extraits des vers A, B et C. Interpréter les résultats et identifier le ou les vers possédant la construction finale attendue *nmy-2 :: gfp*.

L'efficacité de la technologie CRISPR/Cas9 est comparée à une simple transfection de l'ADN *gfp :: nmy-2* par biolistique. La protéine de fusion NMY-2 - GFP est observée en microscopie optique au même stade du développement embryonnaire de *C. elegans*. Les clichés sont présentés dans le document 6.

- 3.4 A partir de l'analyse des images, conclure quant à l'efficacité de l'outil CRISPR/Cas9 dans cette expérience.

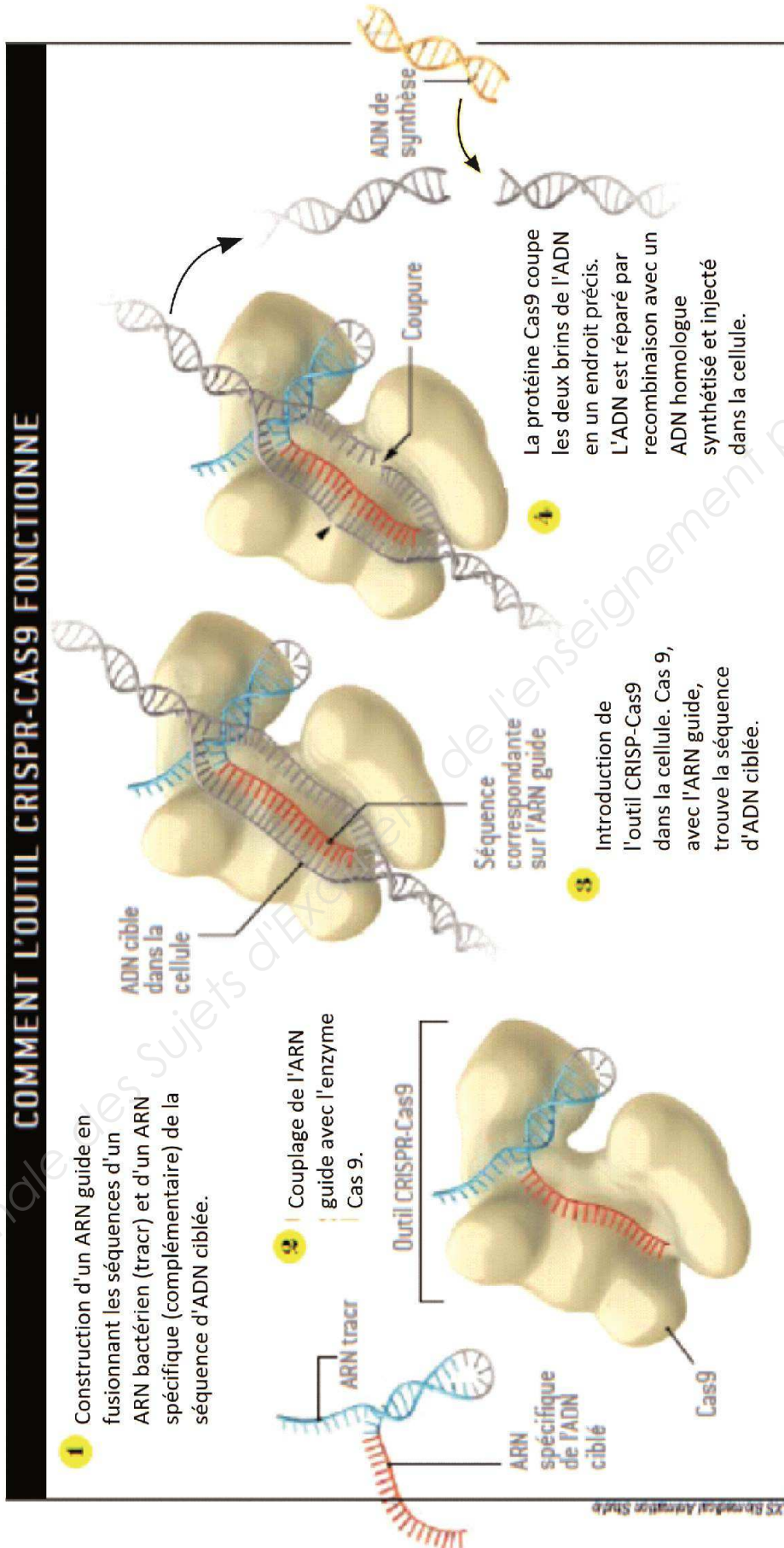
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)

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

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

BTS Biotechnologies		Session 2018
U2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique	BOE2BMO	3 / 9

Document 1 : Fonctionnement de l'outil CRISPR/Cas9

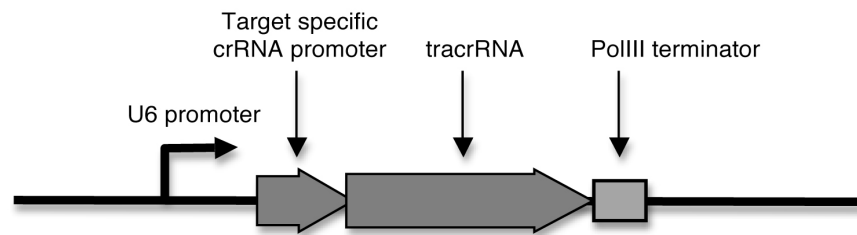


CHARPENTIER Emmanuelle, KALDY Pierre. CRISPR/Cas9, l'outil qui révolutionne la génétique. *Pour la Science*, 2015, n° 456, page 29.

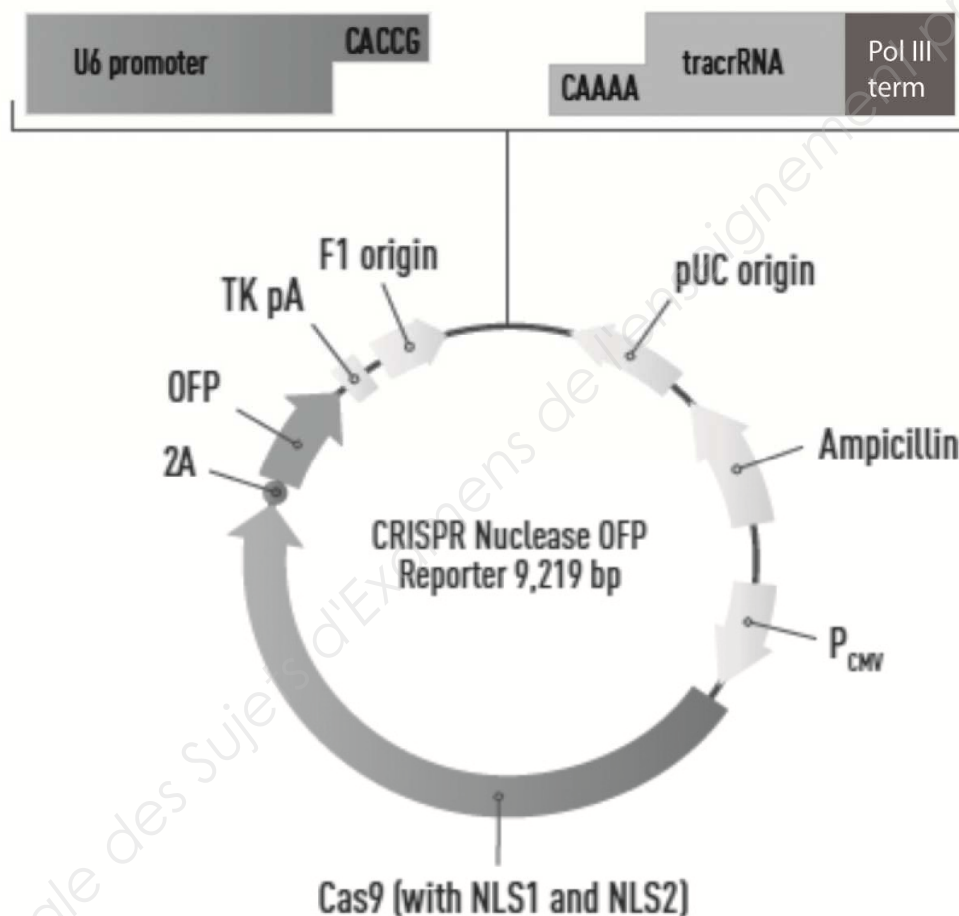
BTS Biotechnologies		Session 2018
U2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique	BOE2BMO	4 / 9

Document 2 : Extraits du manuel d'utilisation du coffret "GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit" du fournisseur Invitrogen™

Cassette d'expression de l'ARN guide



Carte du vecteur "GeneArt® CRISPR Nuclease OFP Reporter"



Légende :

P_{CMV} = promoteur provenant du cytomégalo virus

2A : séquence codant le peptide 2A. Site de clivage par une protease.

OFP = gène codant une protéine fluorescente orange

TK pA = séquence de polyadénylation du gène de la thymidine kinase

U6 promoter = promoteur provenant du gène de type III U6

Pol III term = terminateur spécifique de l'ARN polymérase III

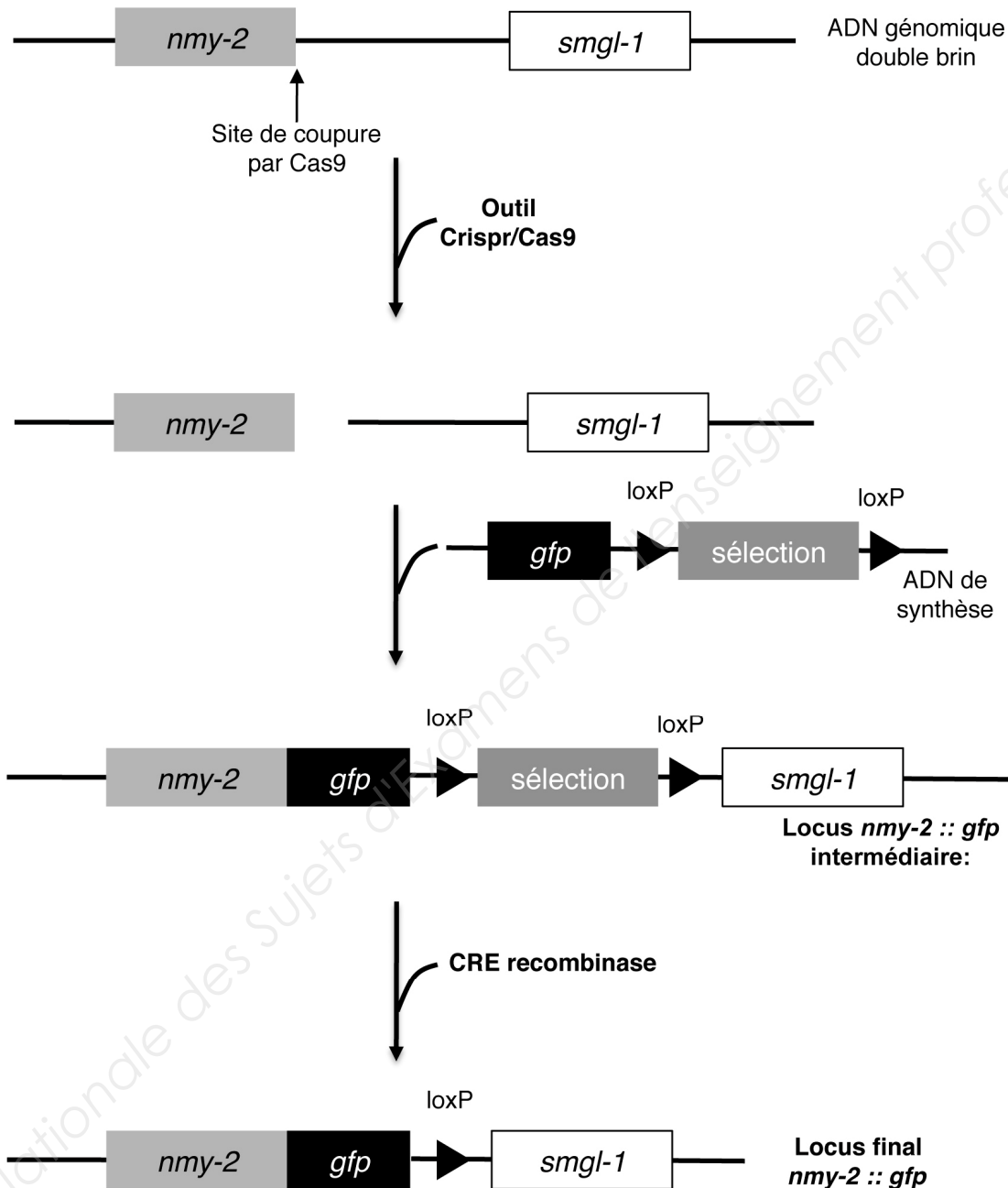
NLS = séquence de localisation nucléaire

LIFE TECHNOLOGIES. GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit. Manuel technique. 2014, pages 2, 3 et 13.

BTS Biotechnologies		Session 2018
U2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique	BOE2BMO	5 / 9

Document 3 : Modification de l'ADN génomique de *C. elegans* par l'outil CRISPR/Cas9

La stratégie de modification consiste à insérer le gène *gfp* dans le gène *nmy-2* de *C. elegans* pour obtenir le locus *nmy-2 :: gfp*.



Légende :

gfp : gène codant la GFP

sélection : gène de sélection des vers hébergeant la construction génétique

lox P : site de coupure par une enzyme, la Cre recombinase

BTS Biotechnologies		Session 2018
U2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique	BOE2BMO	6 / 9

Document 4 : Protocole d'extraction de l'ADN génomique du ver *C. elegans*

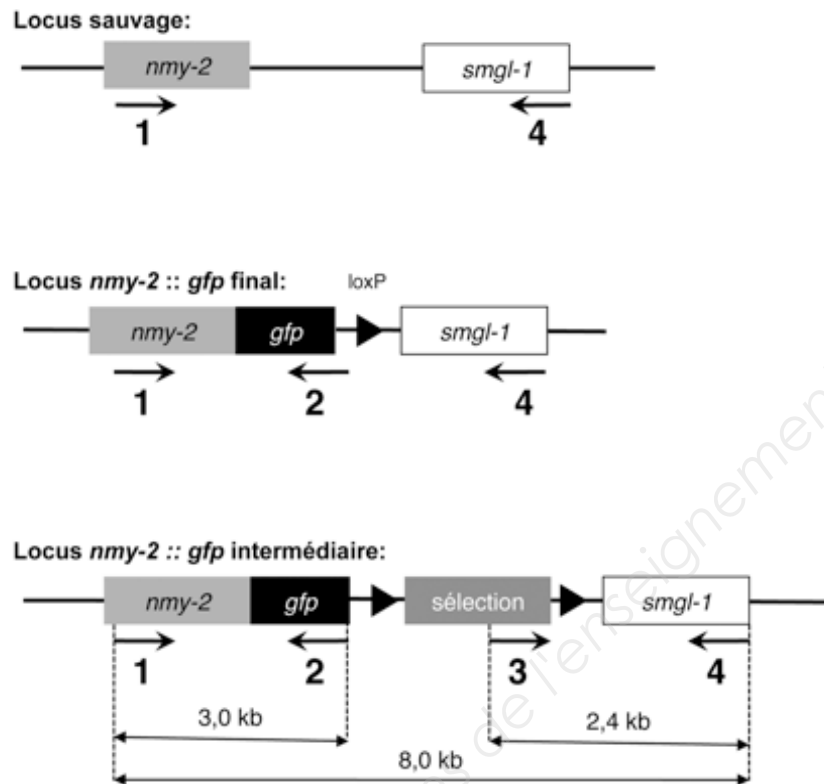
- 1 Collect worms from a recently starved plate into a glass conical tube by rinsing off with 3 mL of H₂O. Use glass since worms will stick to plastic.
- 2 Wash worms twice with H₂O to get rid of bacteria, then transfer to an Eppendorf tube using a 1 mL glass pipette.
- 3 Spin, remove as much liquid as possible and freeze.
- 4 Thaw worm pellet and add 200 µL TENSKB (50 mmol.L⁻¹ Tris pH 7,5 ; 10 mmol.L⁻¹ **EDTA** ; 100 mmol.L⁻¹ NaCl ; 0,5% SDS ; 0,05 mg.mL⁻¹ proteinase K ; 0,5% β-mercapto-ethanol).
- 5 Resuspend by inverting and place at 60 °C until carcasses dissolve (1-2 hours), mixing by inverting tube every 30 minutes.
- 6 Dilute to 400 µL with H₂O. Extract with equal volume **phenol/chloroform**. Mix by vigorous shaking by hand rather than vortexing to reduce the shearing of DNA. Spin 5 minutes and remove supernatant gently with a cut off 1000 µL Eppendorf pipette tip.
- 7 CHCl₃ extract once.
- 8 Ethanol precipitate by adding 40 µL of 3 mol.L⁻¹ sodium acetate (pH 5,2-6,0) and 1 mL of **ethanol 100 % (v/v)**. Spin 10 minutes at 4 °C at full speed in microfuge.
- 9 Wash pellet with 70 % ethanol to remove salts.
- 10 Re-suspend in 100 µL TE. Add 0,5 µL 10 mg.mL⁻¹ RNase. Incubate 30 minutes at 37 °C.

D'après LISSEMORE JL and col.. Isolation of C. elegans genomic DNA and detection of deletions in the unc-93 gene using PCR. Biochem Mol Biol Educ. 2005, May;33(3):219-26.

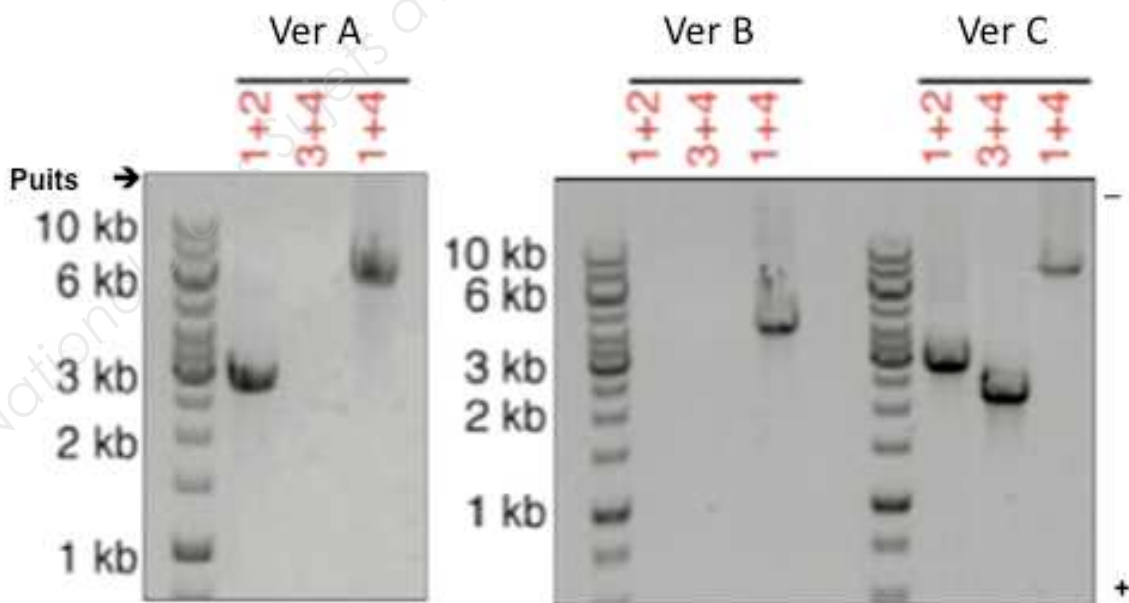
BTS Biotechnologies		Session 2018
U2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique	BOE2BMO	7 / 9

Document 5 : PCR lors du génotypage des vers A, B et C

Positionnement des amorces de PCR pour le génotypage des vers



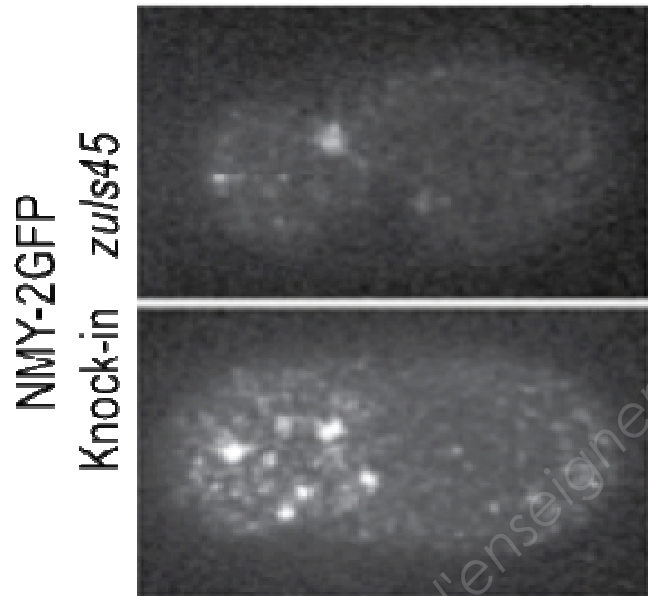
Photographies des gels d'électrophorèse obtenus après migration des produits de PCR du génotypage



Taille des bandes du marqueur (en pb) : 1000 ; 1500 ; 2000 ; 2500 ; 3000 ; 3500 ; 4000 ; 5000 ; 6000 ; 8000 ; 10000

BTS Biotechnologies		Session 2018
U2 Biologie Moléculaire et Génie Génétique	BOE2BMO	8 / 9

Document 6 : Microphotographies optiques d'embryons de deux souches de *C. elegans* au même stade de développement.



- *zuls45* : Souche de *C. elegans* exprimant la protéine de fusion NMY-2 – GFP après transfection d'un vecteur d'expression par biolistique.
- Knock-in : Souche de *C. elegans* modifiée par l'outil CRISPR/Cas9

DICKINSON DJ, WARD JD, REINER DJ, GOLDSTEIN B. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods.* 2013 Oct ;10(10):1028-34.