

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

**ÉPREUVE E3 – UNITÉ U33
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET
TECHNOLOGIES D'ANALYSE**

SESSION 2023

—————
Durée : 2 heures

Coefficient : 3
—————

Matériel autorisé :

- Dictionnaire anglais-français.

Tout autre matériel est interdit.

Capacités évaluées :

Mobilisation des connaissances de biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse dans le cadre de situations professionnelles	4 points
Qualités d'analyse	6 points
Aptitude à la réflexion et au raisonnement scientifique	6 points
Qualités de synthèse	3 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition	1 point

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 11 pages, numérotées de 1/11 à 11/11.

Intérêt de la production bio-industrielle de β -carotène

Le β -carotène, pigment de couleur rouge-orangé, se trouve naturellement dans de nombreux fruits et légumes.

Il est utilisé par les bio-industries comme colorant pour la fabrication de divers produits alimentaires, de médicaments et de produits cosmétiques. Par ailleurs, le β -carotène présente de nombreux avantages pour la santé grâce à ses activités anti-inflammatoire et anticancéreuse.

Afin de répondre aux besoins croissants des bio-industries, les entreprises de biotechnologie s'intéressent à une autre ressource naturelle de β -carotène, les microalgues.

1. Amélioration de la production naturelle de β -carotène chez *Dunaliella salina*

Un laboratoire de recherche tente d'améliorer la production de β -carotène par la microalgue *Dunaliella salina* en inactivant le gène de la β -carotène hydroxylase.

Pour cela, il s'appuie sur le système CRISPR-Cas9 parfois appelé « ciseaux moléculaires ».

1.1. Système CRISPR-Cas9

Le **document 1** présente le système CRISPR-Cas9.

- Q1.** Déterminer le rôle de l'ARN guide (ARNg).
- Q2.** Après avoir rappelé le mode d'action des enzymes de restriction, expliquer pourquoi le système CRISPR-Cas9 est plus adapté que ces enzymes pour réaliser des coupures d'ADN cible.

1.2. Création de plasmides recombinants

Trois plasmides recombinants ont été créés afin d'importer le système CRISPR-Cas9 dans la microalgue, *Dunaliella salina*.

Le **document 2** présente la composition des plasmides recombinants et de leur cible.

- Q3.** Repérer dans la carte du plasmide les éléments caractéristiques d'un vecteur d'expression.
- Q4.** Identifier les séquences exprimées du système CRISPR-Cas9.
- Q5.** Expliquer pourquoi chaque ARN guide est choisi pour cibler un exon et pas un intron.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2023
U33 – Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	Code : 23BAE3BC	Page : 2/11

1.3. Test *in vitro* du clivage du complexe ARNg-Cas9 sur l'ADN de *Dunaliella salina*

Le **document 3** présente le protocole et les résultats du test de clivage pour chaque complexe ARNg-Cas9.

- Q6.** Identifier les pistes d'électrophorèse correspondant à des contrôles et valider la manipulation.
- Q7.** Analyser l'ensemble des résultats obtenus pour chaque ARN guide et conclure sur l'efficacité *in vitro* de chaque ARN guide pour cibler le gène de la β -carotène hydroxylase.

1.4. Analyse de la production de β -carotène des mutants sélectionnés

Trois mutants ont été sélectionnés suite à la transfection de *Dunaliella salina* par les trois plasmides recombinants.

Le **document 4** présente les résultats d'analyse de la production de β -carotène.

- Q8.** Analyser l'ensemble des résultats obtenus et conclure sur l'efficacité des souches mutées par rapport à la souche sauvage de *D. salina*.

2. Exemple d'utilisation du β -carotène dans l'industrie pharmaceutique

Le cancer du foie est la 3^{ème} cause de mortalité par cancer. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer primitif du foie le plus courant. Comme il est difficile à détecter dans ses premiers stades, développer des stratégies de prévention pour en diminuer l'incidence est nécessaire. Pour cela, des substances actives présentant un effet cytotoxique ciblé sur les cellules cancéreuses sont recherchées.

Des essais *in vitro* de mesure de l'effet toxique du β -carotène isolé et purifié à partir de microalgues sont réalisés sur des cellules cancéreuses HepG2.

La lignée cellulaire HepG2 (Human Hepatocellular carcinoma) a été choisie comme modèle cellulaire car elle est issue d'un hépatocarcinome d'origine humaine. Ces cellules sont cultivées selon les conditions présentées dans le **document 5**.

- Q9.** Présenter les rôles des trois composants en gras dans le document 5.

Le **document 6** présente le protocole et les résultats des analyses de l'effet du β -carotène sur les cellules cancéreuses en culture :

- Les cellules HepG2 sont traitées avec différentes concentrations en β -carotène (0, 1, 5, 10 et 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) puis :
 - A. la viabilité des cellules est mesurée par le test de coloration au MTT ;
 - B. la morphologie des cellules est observée au microscope optique.

- Q10.** Déterminer la composition qualitative du puits de contrôle de culture cellulaire.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2023
U33 – Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	Code : 23BAE3BC	Page : 3/11

Q11. Indiquer le rôle de ce contrôle.

Q12. Analyser l'ensemble des résultats obtenus avec le test de coloration au MTT et l'observation de la morphologie cellulaire puis conclure sur l'effet cytotoxique du β -carotène sur les cellules HepG2.

À partir des effets observés précédemment, des expériences sont menées pour tester l'hypothèse que le β -carotène induit l'apoptose des cellules HepG2.

Q13. Décrire deux principales modifications morphologiques d'une cellule en apoptose.

Le niveau d'expression de deux protéines régulatrices de la voie intrinsèque apoptotique est mesuré par western blot. Les protéines Bax et Bcl-2 sont sélectionnées pour l'étude.

Bax est une protéine pro-apoptotique et Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique.

Le **document 7** présente les résultats de l'influence du β -carotène sur l'expression de ces deux protéines régulatrices ainsi que sur l'intensité d'apoptose des cellules HepG2.

Q14. Analyser les résultats obtenus pour montrer l'influence du β -carotène et formuler une hypothèse sur le mécanisme mis en jeu.

Q15. Récapituler l'ensemble des résultats de l'étude de la partie 2 pour conclure sur l'efficacité éventuelle du β -carotène sur le cancer du foie (CHC).

DOCUMENT 1 : Présentation du système CRISPR-Cas 9

Le système CRISPR-Cas9 a été découvert par deux chercheuses, Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, distinguées par un prix Nobel en 2020. Il dérive du système de défense de bactéries qui leur permet de se protéger des bactériophages. Il a été modifié afin d'en faire des « ciseaux moléculaires » : ces ciseaux vont hydrolyser l'ADN à des endroits précis pour inactiver, modifier ou ajouter des gènes afin de concevoir des organismes mutants.

Pour fonctionner, le système CRISPR-Cas9 a besoin de deux molécules clés :

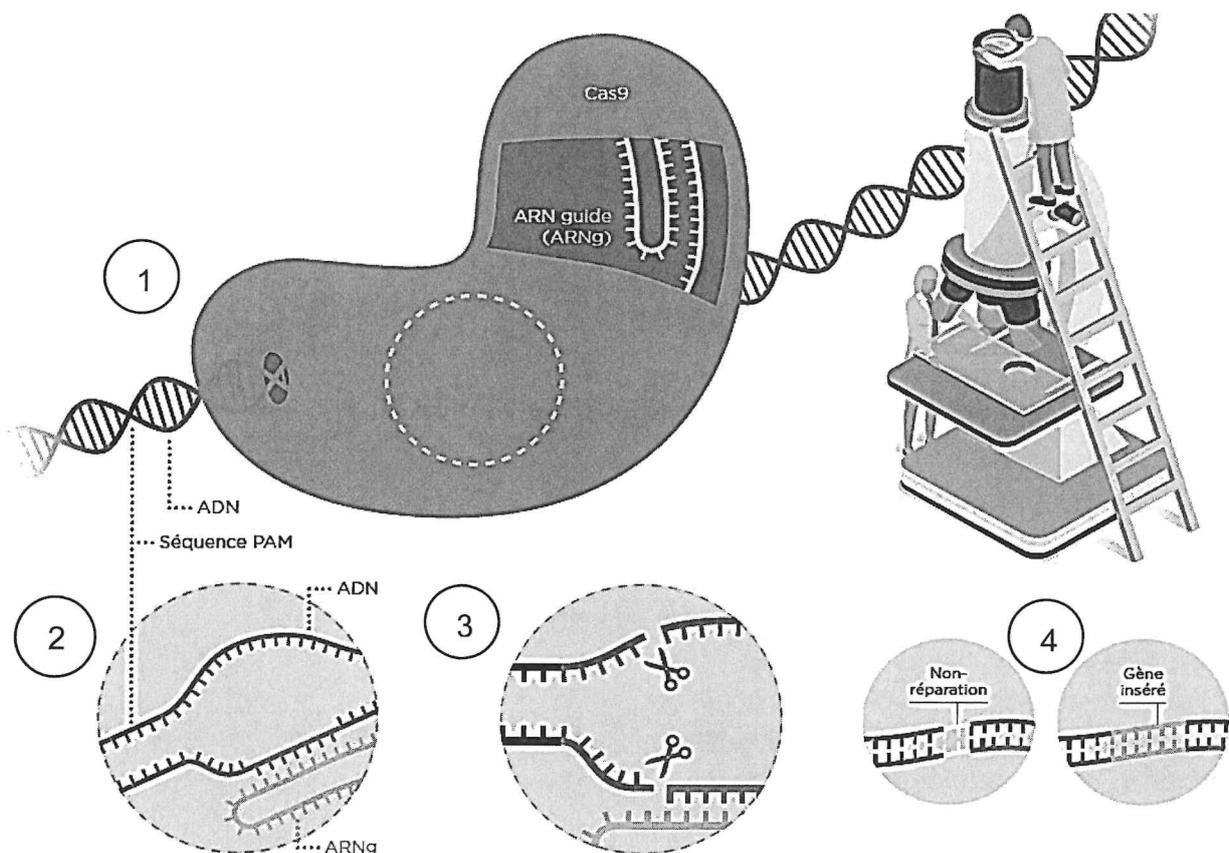
- une endonucléase, appelée Cas9 (*CRISPR associated protein 9*),
- un ARN guide, appelé ARNg (en anglais gRNA ou sgRNA = *single guide RNA*) obtenu par transcription de la séquence CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Regions*). Il comprend une séquence d'une vingtaine de nucléotides complémentaires à une portion d'un gène.

Les gènes permettant d'obtenir ces deux molécules sont insérés dans des vecteurs plasmidiques d'expression qui sont ensuite intégrés dans la cellule à transformer.

Le complexe ARNg-Cas9 parcourt l'ADN ①. Il s'arrête au niveau d'une séquence PAM (*Protospacer Adjacent Motif* : 5'-NGG-3'). La protéine Cas9 déroule l'ADN en aval de PAM, puis le système vérifie que l'ADN est bien complémentaire à l'ARN guide ② :

- Si ce n'est pas le cas, le système continue à parcourir l'ADN.
- S'il y a complémentarité, Cas9 hydrolyse simultanément les deux brins d'ADN cible avant PAM ③.

La cassure de l'ADN cible peut être réparée mais avec l'introduction de mutation ce qui provoque l'inactivation du gène ou bien l'ajout d'un gène à l'endroit de la cassure ④.



Source : Infographie « santé 2030 » provenant du site www.leem.org (Les entreprises du médicament).

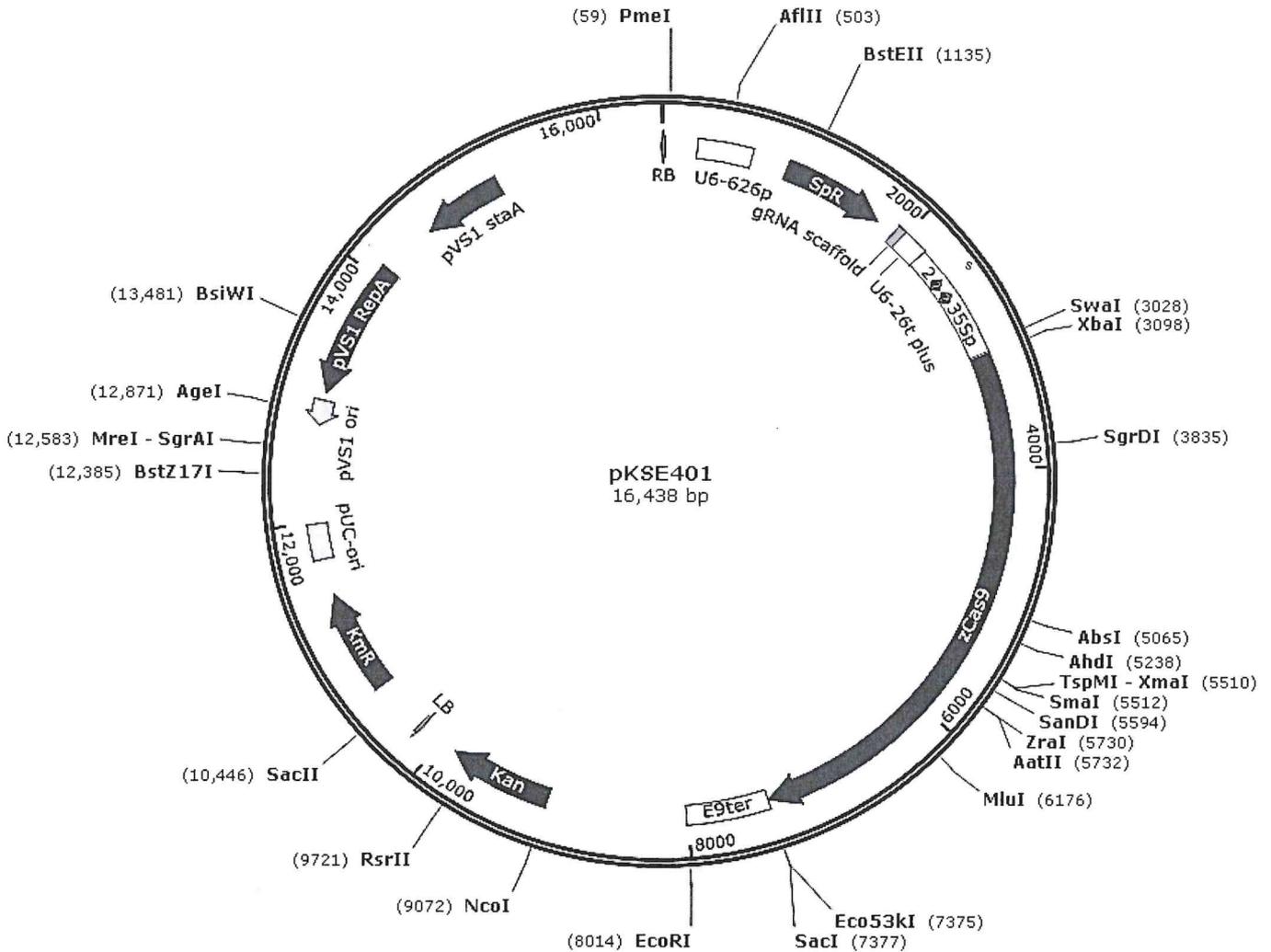
BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2023
U33 – Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	Code : 23BAE3BC	Page : 5/11

DOCUMENT 2 : Composition des plasmides recombinants et de leur cible

Les plasmides recombinants ont été créés à partir du plasmide pKSE401.

2-A Carte du plasmide pKSE401

Created with SnapGene®



pVS1 ori : origine de réplication chez *Pseudomonas*

pUC-ori : origine de réplication chez *E. coli*

Kan : gène de résistance à la kanamycine

KmR : gène de résistance à la kanamycine et à la néomycine

SpR : gène de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine

U6-626p, U6-26t : promoteurs eucaryotes

E9ter : séquence de terminaison de transcription

gRNA scaffold : architecture pour l'ARN guide

zCas9 : gène codant l'endonucléase Cas9

Source : Addgene plasmid # 62202 ; <http://n2t.net/addgene:62202>.

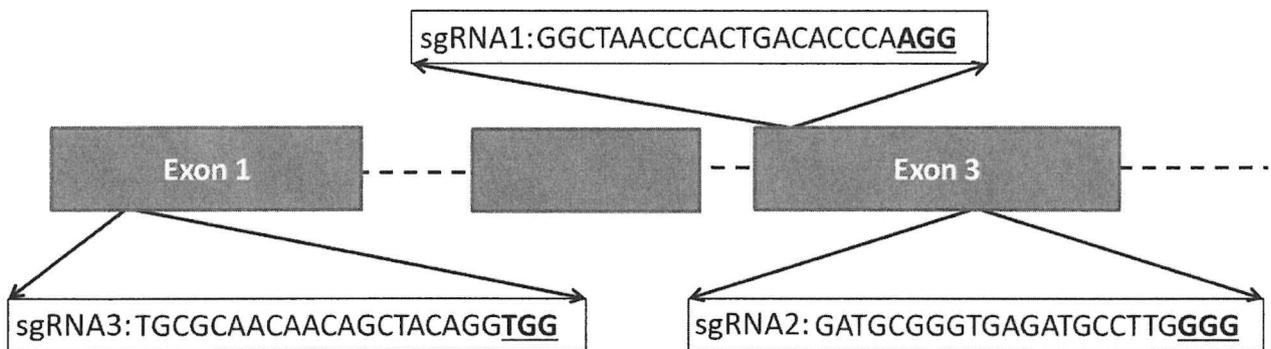
Suite du document 2 page suivante

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES	Session 2023
U33 – Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	Code : 23BAE3BC
	Page : 6/11

DOCUMENT 2 : (suite)

Trois plasmides recombinants sont créés afin de produire trois ARNg différents.

2-B Schéma représentant la cible des trois ARNg sur le génome de *D. salina*



- Les rectangles représentent les exons;
- les lignes en pointillés représentent les introns ;
- les nucléotides en gras et soulignés représentent les séquences PAM.

- pKSE401-sgRNA1 produit un ARNg qui cible l'exon 3 de la β-carotène hydroxylase.
- pKSE401-sgRNA2 produit un ARNg qui cible l'exon 3 de la β-carotène hydroxylase.
- pKSE401-sgRNA3 produit un ARNg qui cible l'exon 1 de la β-carotène hydroxylase.

Adapté de Hu, Lina et al. "CRISPR/Cas9-induced β-carotene hydroxylase mutation in *Dunaliella salina* CCAP19/18." *AMB Express* vol. 11,1 83. 7 Jun. 2021.

DOCUMENT 3 : Test de clivage du système ARNg-Cas9

Protocole simplifié :

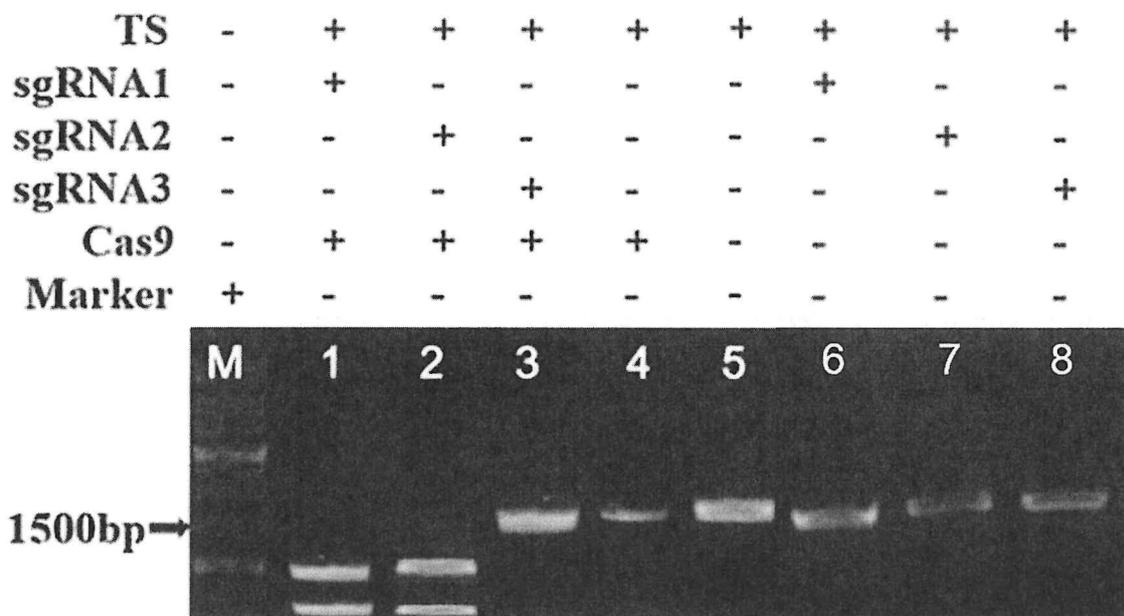
- Chaque ARNg est produit par transcription *in vitro* puis purifié.
- Une séquence de 1643 pb de l'ADN cible est amplifiée par PCR à partir du génome de *Dunaliella salina*.
- Le complexe ARNg-protéine Cas9 est pré-assemblé en tube stérile à 37 °C pendant 15 minutes.
- 400 ng de produit de PCR de l'ADN cible sont ajoutés au mélange ARNg-Cas9 ; l'ensemble est incubé pendant 1 heure à 37 °C.
- La réaction est arrêtée par chauffage à 65 °C pendant 10 minutes.
- Les fragments d'ADN sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 %.

Tests de clivage de l'ADN cible pour chaque ARNg :

Composition des milieux réactionnels et gel d'électrophorèse obtenu.

+ : Présence du composant dans la réaction.

- : Absence du composant dans la réaction.



Légende :

- TS : Produit PCR de l'ADN cible provenant du génome *D. salina* (Taille 1643 pb).
- sgRNA : ARNg (ARN guide).
- Cas9 : Protéine Cas 9 (endonucléase).

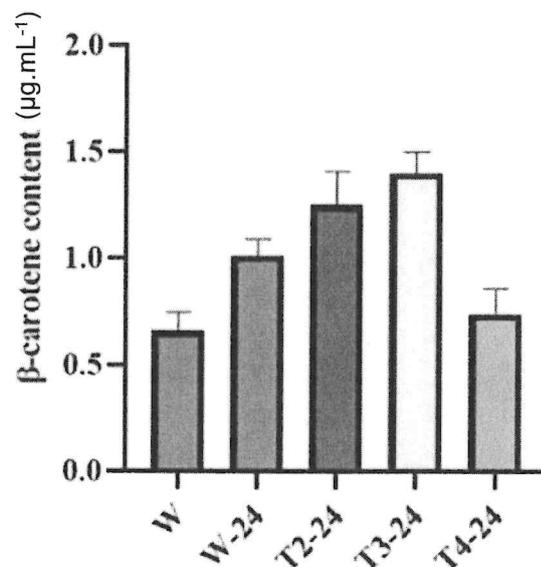
Source : Hu, Lina et al. "CRISPR/Cas9-induced β -carotene hydroxylase mutation in *Dunaliella salina* CCAP19/18." *AMB Express* vol. 11,1 83. 7 Jun. 2021.

DOCUMENT 4 : Résultats d'analyse de la production en β -carotène des mutants sélectionnés

Chaque souche, sauvage et mutée de *D. salina*, a été placée en condition de stress lumineux pendant 24 heures (condition de production optimale) avant de déterminer la teneur en β -carotène.

Légende :

- W = Souche sauvage de *D. salina*
- T2/T3/T4 = Souche mutante de *D. salina*
- 24 = 24 heures de traitement sous haute lumière



Source : Hu, Lina et al. "CRISPR/Cas9-induced β -carotene hydroxylase mutation in *Dunaliella salina* CCAP19/18." *AMB Express* vol. 11,1 83. 7 Jun. 2021.

DOCUMENT 5 : Conditions de culture des cellules HepG2

The cells were cultured in a Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% **heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)**, **penicillin** ($100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) and **streptomycin** ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and non-essential amino acids.

Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5 % CO_2 .

The HepG2 cells at passages between 35 and 42 were used for the experiment.

Source : Kavalappa, et al. " β -carotene isolated from the marine red alga, *Gracillaria* sp. potently attenuates the growth of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells" *Journal of Functional Foods*, vol. 52, Elsevier BV, Jan. 2019.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2023
U33 – Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	Code : 23BAE3BC	Page : 9/11

DOCUMENT 6 : Analyse de l'effet du β -carotène sur la viabilité et la morphologie des cellules HepG2

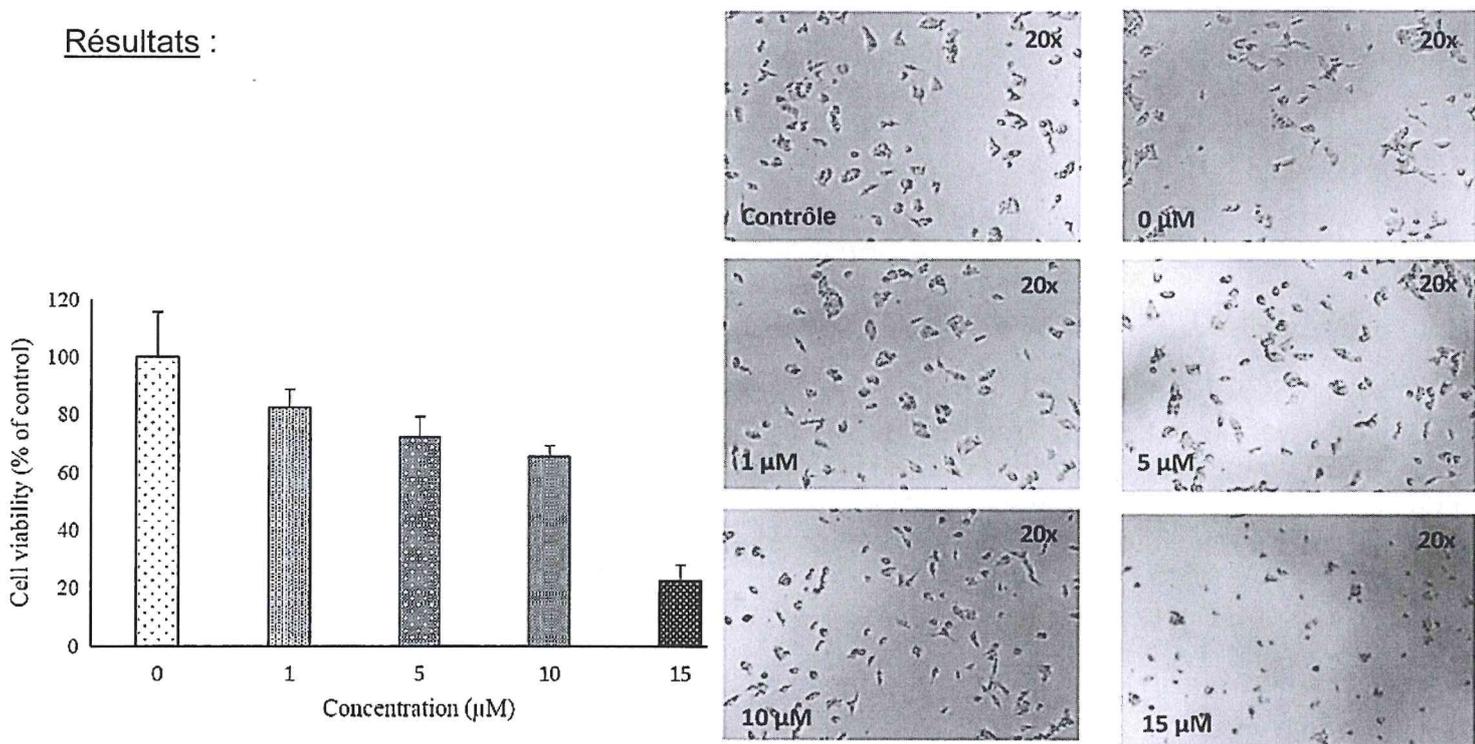
La prolifération des cellules HepG2 est évaluée par le test de coloration au MTT. Les cellules vivantes réduisent le sel de tétrazolium (MTT) de couleur jaune en cristaux de formazan de couleur violette. L'absorbance par puits est mesurée après dissolution de ces cristaux.

Protocole :

- Les cellules sontensemencées (100 μ L/puits) dans une plaque à 96 puits à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules \cdot mL $^{-1}$ pendant 24 heures.
- Le milieu est remplacé par un milieu frais sans sérum contenant du β -carotène à différentes concentrations en utilisant de l'éthanol (1% v/v) comme solvant puis la plaque est à nouveau incubée pendant 24 heures.
- 10 μ L de réactif MTT sont ajoutés à chaque puits et la plaque est incubée à 37°C pendant 3 heures.
- Les cristaux de formazan obtenus sont dissous avec 100 μ L de DMSO sous agitation à 37°C pendant 30 minutes.
- L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 570 nm à l'aide d'un lecteur de plaque.

Un contrôle cellulaire est réalisé en parallèle des cellules traitées.

Résultats :



Source : Kavalappa, et al. " β -carotene isolated from the marine red alga, *Gracillaria* sp. potently attenuates the growth of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells" *Journal of Functional Foods*, vol. 52, Elsevier BV, Jan. 2019.

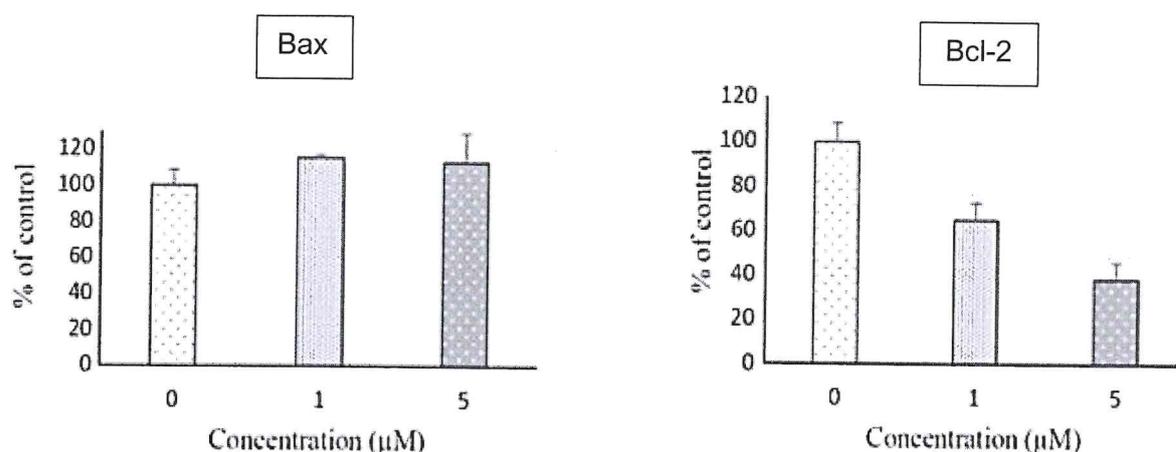
BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2023
U33 – Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	Code : 23BAE3BC	Page : 10/11

DOCUMENT 7 : Effet du β -carotène sur l'expression des deux marqueurs d'apoptose et sur l'apoptose des cellules HepG2

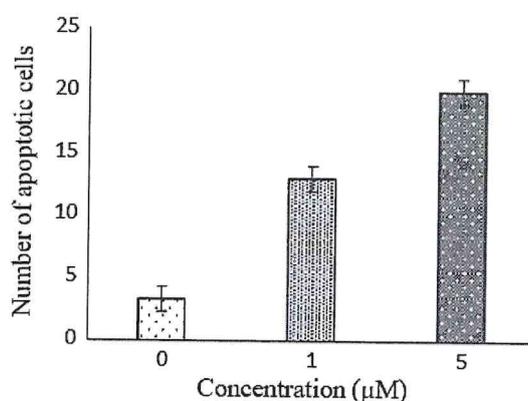
Les protéines des cellules HepG2 traitées avec le β -carotène (1 et 5 μM ($=\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)) ont été extraites et l'expression protéique de Bax et Bcl-2 est détectée par la technique du western blot. La β -actine correspond à une protéine de contrôle dont l'expression est constante dans tous les types cellulaires.



Résultats du western blot pour la protéine de contrôle et pour chaque protéine régulatrice à différentes concentrations en β -carotène (0, 1 et 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).



Expression de chaque protéine à différentes concentrations en β -carotène (0, 1 et 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) rapportée à l'expression du contrôle.



Influence du β -carotène à différentes concentrations (0, 1 et 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) sur le nombre de cellules apoptotiques.

Source : Kavalappa, et al. " β -carotene isolated from the marine red alga, *Gracillaria* sp. potently attenuates the growth of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells" *Journal of Functional Foods*, vol. 52, Elsevier BV, Jan. 2019.

