

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR**  
**BIOTECHNOLOGIES**

***BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET***  
***GÉNIE GÉNÉTIQUE***

Durée de l'épreuve : 2 heures  
Coefficient : 1

**Le sujet comporte 7 pages numérotées de 1/7 à 7/7**  
***L'utilisation d'un dictionnaire Anglais/Français est autorisée.***  
***L'utilisation d'une calculatrice est interdite.***

**Remarque importante :**

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** » par la prise en compte d'une valeur d'un point sur vingt dans le barème.

# Les méganucléases : outils de recherche et de thérapie génique

Une société française de biotechnologie est spécialisée dans la production d'enzymes de restriction « à façon » : les méganucléases. Elles sont dérivées d'une endonucléase appelée I-Cre I et hautement spécifiques de très grands sites.

## 1. Propriétés de la nucléase I-Cre I (8 points).

La nucléase I-Cre I a été découverte en étudiant le gène codant l'ARNr du chloroplaste de *Chlamydomonas eugameto*. Dans la séquence de l'unique intron de ce gène, a été détecté un ORF qui code l'endonucléase I-Cre I ; ce gène a été cloné et exprimé dans *E. coli*.

1.1 Donner la signification des termes suivants :

- ORF ;
- ARNr ;
- Intron.

1.2 Représenter à l'aide d'un schéma légendé les éléments nécessaires à l'expression d'un gène eucaryote. Préciser le rôle de chacun d'eux.

1.3 Le **document n° 1** présente un extrait de la fiche technique des enzymes AsiS I et I-Cre I.

1.3.1 L'endonucléase AsiS I reconnaît une séquence palindromique de huit paires de bases commençant par 5'GCGAT, le site de clivage est situé après T.

Donner :

- la séquence complète de ce site ;
- les deux fragments obtenus après hydrolyse.

1.3.2 À l'aide du **document n°1**, proposer une définition générale de l'unité d'activité pour une enzyme de restriction.

1.3.3 D'après le **document n°1**, indiquer si l'enzyme I-Cre I est à coupure rare ou fréquente.

En déduire l'intérêt de fournir le plasmide pGPS2 avec l'enzyme I-Cre I.

1.3.4 Calculer la concentration massique de la BSA 100X fournie.

1.3.5 Proposer un mode opératoire précis de double digestion par AsiS I et I-Cre I de pGPS2 dans un volume de réaction de 50  $\mu$ L en une heure à 37°C.

Justifier ces choix.

1.4 La carte de restriction du plasmide pGPS2 linéarisé par *Not* I est donnée dans le **document n° 2**.

Schématiser le résultat de la séparation par électrophorèse des fragments obtenus après digestion totale de pGPS2 (linéarisé par *Not* I) par :

- AsiS I seule ;
- I-Cre I seule ;
- AsiS I et I-Cre I.

Indiquer la taille des fragments obtenus et nommer les électrodes.

## 2. Criblage de mutants de la nucléase I-Cre I (5 points)

Sur la nucléase I-Cre I, quatre motifs protéiques responsables de la reconnaissance de séquences spécifiques de l'ADN ont été identifiés. La séquence nucléique codant pour l'un d'entre eux, composé de huit acides aminés (SKTRKTTS), a été mutée pour obtenir des protéines variantes dans leur spécificité de reconnaissance.

2.1 Le gène de I-Cre I a été synthétisé en incluant les mutations à tester puis a été cloné dans un vecteur d'expression de levure.

Le **document n° 3** présente un échantillon des différentes modifications testées.

2.1.1 Traduire la séquence de l'oligonucléotide **n° 4** en séquence protéique avec le code à une lettre, en utilisant le code génétique (**document n° 4**) ; préciser l'orientation de l'oligonucléotide n° 4 et du peptide codé.

2.1.2 Préciser l'utilité de l'« *accession number* » donné dans le **document n° 3**.

2.1.3 Le codon UUA code la leucine. Proposer un exemple de codon dérivé de UUA différent par une seule base dans chacun des cas suivants :

- mutation non sens ;
- mutation faux sens ;
- mutation silencieuse.

Justifier le choix de chacun de ces exemples.

2.2 Criblage des variants.

Pour ce criblage, le test d'activité des enzymes modifiées est présenté dans le **document n° 5**.

Des levures sont cotransfectées avec d'une part un vecteur d'expression de l'enzyme mutante, et d'autre part par un vecteur dont la construction simplifiée est représentée dans le **document n° 5**. L'activité de I-Cre I peut induire une recombinaison homologue dans les cellules de levures.

2.2.1 Expliquer à l'aide d'un schéma légendé le processus de recombinaison homologue.

2.2.2 Expliquer le principe du test présenté dans le **document n° 5**.

2.2.3 Indiquer comment sont visualisées les colonies positives.

## 3. Production de la nucléase I-Cre I modifiée (6 points)

Pour tester les variants efficaces, le gène codant I-Cre I modifiée a été amplifié par PCR en ajoutant un *linker* pour *Eco* RI juste avant le codon d'initiation et un *linker* *Sal* I en aval du codon stop (**document n° 6**). Le produit d'amplification, digéré par ces deux enzymes, a été cloné dans un vecteur d'expression de la série pGex-4T présenté dans le **document n° 7**.

3.1 Résumer en une ou deux phrases, sans schéma, le principe de la PCR.

3.2 Donner précisément la composition qualitative d'un milieu réactionnel (aucune justification n'est demandée).

## BOE2BMO

- 3.3 Préciser les trois températures usuellement utilisées dans un cycle de PCR. Justifier ces valeurs de température.
- 3.4 Les enzymes *Eco* RI et *Sal* I sont incompatibles :
- définir le terme « incompatibles » ;
  - montrer l'intérêt majeur de l'utilisation de ces deux enzymes pour le sous clonage de I-Cre I.
- 3.5 Expliquer pour quelles raisons le traitement par la phosphatase alcaline du vecteur ouvert par *Eco* RI et *Sal* I est inutile dans ce cas.
- 3.6 Parmi les trois vecteurs de la série pGex-4T présentés dans le **document n° 7**, seul pGex-4T-1 est utilisable pour produire la nucléase I-Cre I modifiée. Expliquer pourquoi.
- 3.7 Définir les rôles des trois éléments désignés par une étoile sur le **document 7**.
- 3.8 Dans ce contexte, préciser le rôle de l'IPTG.

**Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition (1 point)**

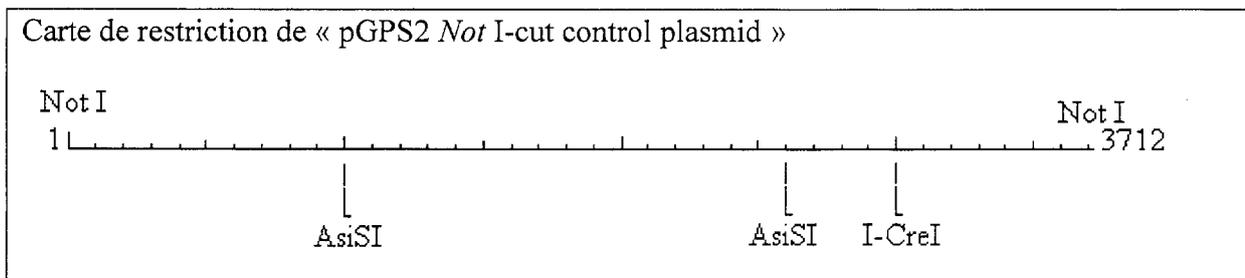
## Document n° 1

## Extraits de la fiche technique des enzymes AsiS I et I-Cre I

Enzyme	AsiS I	I-Cre I
	5'...GCGAT_____	5'...CGTAACTATAACGGTCCTAAGGTTAGCGAA. 3'...GCATTGATATTGCCAGGATTCATCGCTT.
<u>Unit Definition</u>	One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1 µg of pXba linearized in 1 hour at 37°C in a total reaction volume of 50 µL.	One unit is defined as the amount of enzyme required to cleave 1 µg of pGPS2 <i>Not</i> I-linearized Control Plasmid in 1 hour at 37°C in a total reaction volume of 50 µL.
Reagents Supplied:	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Buffer 4 Red (10X)</li> <li>➤ BSA (100X)</li> <li>➤ AsiS I 1U/µL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Buffer I-Cre I (10X)</li> <li>➤ BSA (100X)</li> <li>➤ I-Cre I 1U/µL</li> <li>➤ pGPS2 <i>Not</i> I-cut control plasmid 100 ng/µL</li> </ul>
Reaction Conditions:	1X Buffer 4 red 1X 100 µg/ml BSA Incubate at 37°C.	1X Buffer I-Cre I 1X 100 µg/ml BSA Incubate at 37°C.
Buffers	Activity %	
1 Blue	50	10
2 Green	100	50
3 Yellow	100	50
4 Red	100	50
I-Cre I	25	100

When using a buffer other than the optimal (supplied) Buffer, it may be necessary to add more enzyme to achieve complete digestion.

## Document n° 2



## Document n° 3

## Séquences nucléotidiques des motifs variants de I-Cre I

N°	Access number	Séquence nucléotidique
wild type	CAA26008	<b>tcgaagacgcgtaaaacaacttct</b>
1	DM199304	tcaaaacgtcgtgagacagtttgg
2	DM199305	ccaaactgtctcgagacagtttgg
3	DM199306	tcaaaacgtcgtacgacgttttga
4	DM199307	tcgggacgtcgtacgacgtccga
5	DM199308	tcggaacgtcgtacgacgttccga
6	DM199309	tcggtacgtcgtacgacgtaccga

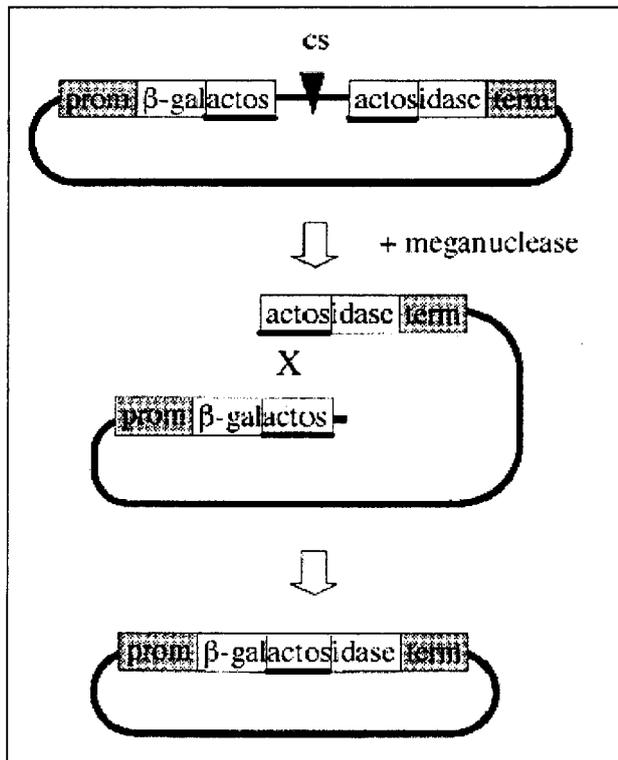
Document n° 4

Code génétique

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

Codes à une lettre et à trois lettres pour les acides aminés :

A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V  
Ala Arg Asn Asp Cys Gln Glu Gly His Ile Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp Tyr Val



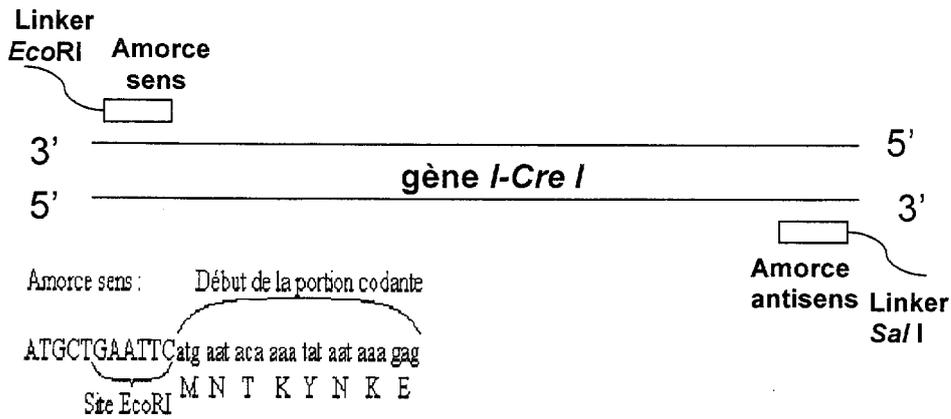
Document n° 5  
Functional test of I-Cre I

In yeast, and mammalian cells, DNA cleavage between two direct repeats is known to induce a very high level of homologous recombination between the repeats. The recombination pathway, often referred to as single-strand annealing (SSA), removes one repeat unit and all intervening sequences.

We thus constructed a SSA reporter vector, with two truncated, non-functional copies of the bacterial LacZ gene and an I-Cre I cut site (cs) within the intervening sequence, in a yeast plasmid. Cleavage of the cut site should result in a unique, functional LacZ copy that can be detected by X-gal staining.

Document n° 6

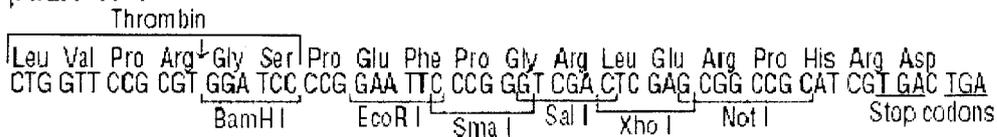
Schéma de la stratégie d'amplification de l'insert à cloner



Document n° 7

Vecteurs d'expression de la série pGex-4T

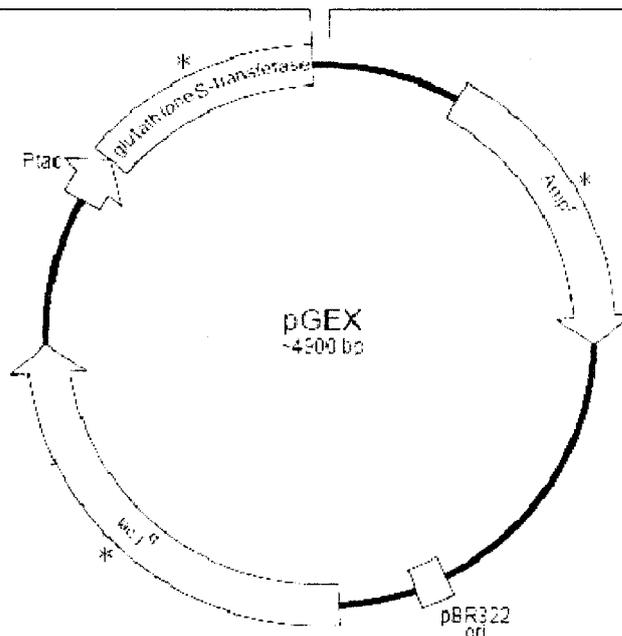
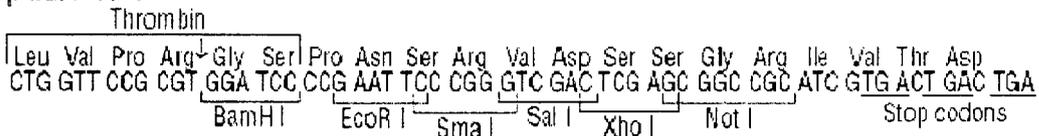
pGEX-4T-1



pGEX-4T-2



pGEX-4T-3



Ptac : promoteur hybride entre Plac et Ptrp