

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET
GÉNIE GÉNÉTIQUE

Durée de l'épreuve : 2 heures
Coefficient : 1

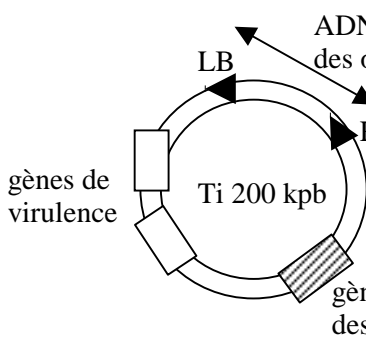
CORRIGÉ ET BARÈME

L'industrie papetière et la lignine

Obtention de végétaux transgéniques à taux réduits en lignine

Questions	CORRIGÉ	Barème
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition		2 points
1.		6,5 points
1.1		3 points
1.1.1	Un ADNc ou ADN complémentaire correspond à la séquence en desoxynucléotides complémentaire de la séquence d'ARNm codante.	0,5 pt
1.1.2	<p style="text-align: center;">Transcription (via une ARN polymérase ADN dépendante)</p> <p style="text-align: center;">ARN pré-messager = transcrit primaire</p> <p style="text-align: center;">G [diagram] AAAAA { addition d'une coiffe en 5' polyadénylation en 3'</p> <p style="text-align: center;">G [diagram] AAAAA épissage = élimination des introns et raccordement ordonné des exons</p> <p style="text-align: center;">cytoplasme G [diagram] AAAAA ARN messenger mature</p>	1 pt
1.1.3	<p style="text-align: center;">ARNm</p> <p style="text-align: center;">↓ linéarisation</p> <p style="text-align: center;">ARNm</p> <p style="text-align: center;">↓ transcription inverse</p> <p style="text-align: center;">ADNc sb</p> <p style="text-align: center;">↓ arrêt transcription inverse</p> <p style="text-align: center;">ADNc sb</p> <p style="text-align: center;">↓ purification (alcool précipitation)</p> <p style="text-align: center;">ADNc sb</p> <p style="text-align: center;">↓ PCR</p> <p style="text-align: center;">ADNc db amplifié</p>	1 pt
1.1.4	La plupart des ARNm eucaryotes sont polyadénylés. On peut donc espérer qu'une amorce oligo(dT) s'hybride en 3' de tous les ARN messenger extraits. Les ARN non polyadénylés ne s'hybrideront pas et l'ADNc correspondant ne sera donc pas amplifié.	0,5 pt
1.2		3,5 points
1.2.1	Cette seconde PCR utilise des amorces internes à la première séquence amplifiée ; la succession de deux PCR augmente la spécificité de l'amplification	0,5 pt

1.2.2	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amorce</th> <th>T_m (°C)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>N1</td> <td>4 (6+5) + 2 (6+5) = 66</td> </tr> <tr> <td>N2</td> <td>4 (3+7) + 2 (6+7) = 66</td> </tr> <tr> <td>N3</td> <td>4 (4+4) + 2 (7+7) = 60</td> </tr> <tr> <td>C1</td> <td>4 (6+7) + 2 (5+5) = 72</td> </tr> <tr> <td>C2</td> <td>4 (6+4) + 2 (6+7) = 66</td> </tr> </tbody> </table>	Amorce	T _m (°C)	N1	4 (6+5) + 2 (6+5) = 66	N2	4 (3+7) + 2 (6+7) = 66	N3	4 (4+4) + 2 (7+7) = 60	C1	4 (6+7) + 2 (5+5) = 72	C2	4 (6+4) + 2 (6+7) = 66		1 pt (2 erreurs => 0)
Amorce	T _m (°C)														
N1	4 (6+5) + 2 (6+5) = 66														
N2	4 (3+7) + 2 (6+7) = 66														
N3	4 (4+4) + 2 (7+7) = 60														
C1	4 (6+7) + 2 (5+5) = 72														
C2	4 (6+4) + 2 (6+7) = 66														
1.2.3	<p>Il faut associer une amorce sens et une amorce antisens de sorte que leurs T_m soient proches et de façon à obtenir l'amplicon de la taille la plus grande possible.</p> <p>L'amorce N1 a déjà été utilisée (pour la première PCR) ; pas de GC clamp et T_m trop élevé pour C1 ; N3 a un T_m trop bas et pas de GC clamp. N2 doit donc être utilisée avec l'amorce C2.</p>		1,5 pt												
1.2.4	T _H = T _m le plus bas - 5°C = 66-5 = 61°C.		0,5 pt												
2.			5 points												
2.1	Un BLAST correspond à l'alignement d'une séquence donnée (ADNc nouveau) avec celles contenues dans une base de données de séquences nucléotidiques. La qualité du résultat est appréciée par le score (>200) et par le e-value (<10 ⁻¹⁰).		1 point												
2.2			1,5 point												
2.3	Le vecteur porte un gène de résistance amp ^R ; les colonies doivent être sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline.		0,5 point												
2.4	<p>Le SMC est inclus dans la phase codante du gène <i>lacZ'</i>, lui-même sous contrôle du promoteur <i>ptac</i> inductible par un β-galactoside (IPTG ou analogue). Il faut donc cultiver les bactéries dans un milieu + IPTG afin d'induire le fonctionnement du promoteur.</p> <p><i>lacZ'</i> code pour le peptide α de la β-galactosidase (processus d'alpha-complémentation protéique) ; les bactéries compétentes réceptrices doivent donc être [lac⁻] mais synthétiser le peptide complémentaire du peptide alpha (souche lacZΔM15 ou équivalente).</p>		2 points												

	Lorsqu'un insert est intégré dans le SMC, la séquence du gène <i>lacZ'</i> est interrompue. Aucune β -galactosidase fonctionnelle n'est synthétisée. Les clones sont [β -gal']. Tout substrat métabolisable chromogène (le X-Gal par exemple) de cet enzyme n'est plus hydrolysé. Les colonies demeurent blanches. Si par contre le SMC n'est pas interrompu (absence d'insert), les colonies seront bleues. En principe, tous les clones blancs contiennent donc un vecteur muni de l'insert OMT.	
3.		3,5 points
3.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> métabolise (synthèse et dégradation) des dérivés d'acides-amino, les opines, et possède un plasmide Ti qui code pour des hormones végétales (auxine et cytokinine).	0,5 point
3.2	 <p>ADN-T (20 kpb) porteur des gènes de synthèse des opines et des hormones végétales</p> <p>LB</p> <p>RB</p> <p>bordures droite et gauche = courtes séquences répétées directes essentielles au transfert de l'ADN-T</p> <p>gènes de virulence</p> <p>Ti 200 kpb</p> <p>gènes du catabolisme des opines</p>	1 point
3.3	Le plasmide pAeOMT porte deux origines de réplication qui permettent son amplification dans deux types bactériens : <i>A. tumefaciens</i> ou <i>E.coli</i> .	0,5 point
3.4	Les bordures (1 et 2) délimitent la portion d'ADN à transférer dans le génome des cellules végétales. (4 et 5) sont des signaux de transcription forts (promoteur et terminateur d'un virus eucaryote). La cassette <i>gus</i> , sous dépendance des mêmes signaux de transcription que le transgène antisens sert de rapporteur (3).	1,5 point
4.		3 points
4.1	Une plante transgénique est un végétal dont le génome est modifié de façon stable par les moyens du génie génétique (intégration d'un ADN recombinant).	0,5 point
4.2	Les activités OMT sont exprimées en pourcentage de l'activité des plantes témoins. On mesure donc des activités OMT résiduelles. On s'aperçoit que les plantes analysées présentent une réduction de leur activité OMT ; l'effet antisens est donc observé. Il est plus ou moins important selon les plantes : entre 85% (A57, A59) et 30% (A45) de réduction.	0,5 point
4.3	L'ADN-T porteur du gène OMT s'intègre de manière aléatoire dans le génome de la plante. Son expression possible et l'intensité de celle-ci dépendent de l'environnement génomique du site d'intégration.	0,5 point
4.4	La cassette <i>gus</i> est sous dépendance des mêmes signaux de transcription que le transgène antisens voisin (cf 3.4). La détection d'une activité GUS et son niveau informent donc sur la présence et le niveau d'expression du transgène OMT voisin.	0,5 point
4.5	L'activité GUS dans chacune des plantes est le reflet direct du taux d'expression du gène <i>gus</i> ; elle donne donc une indication du niveau de la transcription de cette partie de l'ADN, donc de la transcription possible de l'antisens OMT voisin. Les pourcentages d'activité GUS sont effectivement le reflet des pourcentages de réduction de l'activité OMT. Le gène <i>gus</i> semble jouer parfaitement son rôle.	0,5 point
4.6	Les plantes les plus intéressantes pour l'industrie papetière sont celles qui ont une activité OMT très réduite, soient A57 et A59.	0,5 point