

# BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

## BIOTECHNOLOGIES

### *BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET GÉNIE GÉNÉTIQUE*

Durée de l'épreuve : 2 heures  
Coefficient : 1

**Le sujet comporte 6 pages numérotées de 1/6 à 6/6**  
*L'usage d'un dictionnaire anglais/français est autorisé*  
*L'usage de la calculatrice est interdit*

#### **Sujets zéros du BTS biotechnologies : avertissement.**

Les sujets zéros ont été conçus par des professeurs enseignant en BTS et finalisés en commission de choix et d'élaboration de sujets. Contrairement aux sujets d'examens, ils n'ont pas été testés. Leur faisabilité pendant le temps imparti par un élève moyen n'a donc pas été vérifiée.

Il s'agit ici de montrer l'orientation et l'esprit dans lequel les sujets peuvent valider les connaissances et savoir-faire acquis lors de la formation des étudiants se préparant au BTS biotechnologies. Ces sujets ne constituent pas des « modèles » ; ils donnent l'orientation des sujets d'évaluation respectant les **définitions de l'épreuve**, et suivent les **préconisations** qui ont guidé leur élaboration (cf « Avertissement »).

Ces sujets sont à porter à la connaissance des étudiants en formation et à travailler avec eux à titre d'entraînement pour les épreuves terminales. Ils nécessitent que soient conjointement mobilisées les connaissances des élèves et leurs capacités à exploiter les documents associés.

# L'industrie papetière et la lignine

## Obtention de végétaux transgéniques à taux réduits en lignine

La production de pâte à papier, à partir de la cellulose issue des parois végétales, représente une industrie importante par les volumes de bois manipulés (essentiellement le peuplier et l'eucalyptus en France et Europe du Sud) et sa valeur économique.

Sa production nécessite la dégradation préalable de la lignine, un autre composant majeur des parois végétales, étroitement associée à la cellulose et dont l'extraction, coûteuse en énergie, requiert l'utilisation de produits chimiques chlorés extrêmement polluants.

L'utilisation de végétaux possédant une lignine plus aisément extractible, constitue donc un objectif essentiel pour l'industrie papetière afin d'accroître ses rendements et de réduire ses efflux polluants.

L'étude de différents enzymes impliqués dans la biosynthèse de la lignine, dont une orthodiphénol-O-Méthyl Transférases (OMT), a montré que la réduction de leur activité, dans des mutants naturels, pouvait entraîner une modification de la structure et de la composition de ce polymère dans ces végétaux.

Plusieurs entreprises de biotechnologies ont entrepris de cloner et d'étudier le gène de cet enzyme pour les espèces forestières, afin de pouvoir modifier son activité et de l'introduire dans des plantes transgéniques adaptées à l'industrie papetière.

Il s'agit :

- de cloner le gène équivalent à celui de l'OMT de Tabac et présent chez l'eucalyptus,
- d'étudier son expression et la régulation associée,
- d'élaborer une construction qui permette l'élaboration de plantes transgéniques,
- d'analyser les plantes transgéniques obtenues.

### 1. Clonage du gène d'OMT d'Eucalyptus (6,5 points).

Le gène d'OMT de Tabac est connu et sa séquence a été identifiée. La démarche choisie pour cloner le(s) gène(s) d'OMT d'Eucalyptus consiste à obtenir tout d'abord un ADN complémentaire (ADNc) puis de rechercher la séquence du gène complet à l'aide d'une banque génomique d'Eucalyptus.

#### 1.1 Obtention d'un clone d'ADNc d'OMT d'Eucalyptus par RT-PCR.

1.1.1 Donner la définition d'un ADNc.

1.1.2 À l'aide d'un schéma légendé, présenter les étapes qui permettent, dans une cellule eucaryote, de passer d'une séquence d'ADN à l'ARN messager mature correspondant.

Mentionner les différentes étapes, leurs caractéristiques et préciser leur localisation cellulaire.

La technique choisie par les laboratoires consiste à essayer de cloner le gène d'OMT d'Eucalyptus en réalisant une RT-PCR à partir d'ARN totaux extraits de feuilles d'eucalyptus (**document 1**) et d'amorces déduites des séquences d'OMT connues du Tabac.

1.1.3 À partir du **document 1**, élaborer un organigramme présentant les étapes de cette RT-PCR.

1.1.4 Justifier le choix de l'amorce antisens utilisée dans la première réaction.

## 1.2 Réalisation d'une PCR nichée (nested PCR).

Une seconde PCR, dite « nichée », est ensuite réalisée en utilisant comme ADN matrice les amplicons purifiés de l'expérience 1 et de nouvelles amorces, également dérivées des séquences du Tabac, mais plus internes à la séquence du gène que les précédentes (leur position est visualisée sur le **document 2**).

1.2.1 Préciser quel est l'intérêt de réaliser cette seconde PCR.

Les amorces utilisables pour cette deuxième PCR sont présentées dans le **document 2**.

1.2.2 À l'aide de la formule de Wallace  $T_m = 4 n_{(G+C)} + 2 n_{(A+T)}$ , calculer les  $T_m$  de chacune des amorces.

1.2.3 Choisir le(s) meilleur(s) couple(s) d'amorces utilisable(s) en justifiant brièvement la réponse.

1.2.4 Déterminer la température d'hybridation des amorces choisies. Justifier la réponse.

## 2. Expression de la séquence OMT d'Eucalyptus (5 points).

Le fragment obtenu en 1.2 a été séquencé. Cette séquence nucléotidique a été comparée aux séquences disponibles dans les bases de données en réalisant un BLAST (Basic Local Alignment Sequences Tool).

Cette séquence a ensuite été introduite dans un vecteur d'expression (pTAC) (**document 3**).

2.1 Donner le principe d'un BLAST et indiquer les paramètres permettant d'apprécier la qualité du résultat.

2.2 Présenter, à l'aide de schémas, l'étape d'élongation de la traduction de cet ARN messager (l'enzyme est cytosolique).

2.3 Indiquer le milieu à utiliser pour sélectionner les bactéries transformées par ce vecteur.

2.4 Expliquer comment l'expérimentateur peut reconnaître les clones bactériens possédant le vecteur recombiné contenant l'insert d'OMT. Justifier précisément la réponse.

## 3. Élaboration d'eucalyptus transgéniques dont l'activité OMT est modifiée (3,5 points).

La stratégie adoptée pour essayer de réduire l'activité OMT est une stratégie d'inactivation de gènes, appelée « stratégie antisens ». La première étape consiste en l'obtention, par la méthode d'agro-infection, d'eucalyptus transgéniques contenant un ADN OMT modifié.

3.1 Rappeler les particularités du métabolisme de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2 À l'aide d'un schéma légendé, présenter la structure du plasmide caractéristique de cette bactérie et les éléments moléculaires essentiels au transfert d'ADN.

Des fragments de feuilles d'Eucalyptus lacérées, sont mis en présence d'une culture d'Agrobactéries transformées par le plasmide recombinant pAeOMT (**document 4**). La sélection et le développement des plantules transgéniques sont alors réalisés.

**3.3** Le vecteur pAeOMT est qualifié de « binaire ». Justifier cette appellation.

**3.4** Préciser le rôle des éléments numérotés sur l'ADN-T de ce plasmide.

#### **4. Analyse des eucalyptus transgéniques (3 points).**

**4.1** Donner la définition d'une plante transgénique.

Dans la « stratégie antisens » réalisée ici, on espère que la séquence OMT insérée en orientation antisens conduira à un « transcrit antisens » qui provoquera la réduction de l'expression du gène OMT endogène et donc une diminution de l'activité OMT correspondante dans les plantes transgéniques.

Le **document 5** montre les résultats obtenus pour un échantillon de trois types de plantes transgéniques. L'activité GUS a également été mesurée dans ces plantes.

**4.2** Analyser les résultats de l'activité OMT pour ces différentes plantes.

**4.3** Proposer une explication de la variabilité de l'activité OMT dans ces plantes.

**4.4** Préciser l'intérêt d'évaluer l'activité GUS.

**4.5** Analyser les résultats de l'activité GUS.

**4.6** Conclure quant aux plantes les plus intéressantes pour l'industrie papetière.

<b>Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)</b>
--

## Document 1 : RT-PCR reaction with total eucalyptus RNA.


For first-strand cDNA synthesis, 10 µg of total eucalyptus RNA was heated at 65°C for 3 min, cooled on ice, and incubated in 50 µL of 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, containing 75 mM KCl, 1 mM DTT, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM of each dNTP in the presence of 40 pmol of an oligo(dT) primer (called antisense primer). After the addition of 20 U of AMV reverse transcriptase, the reaction mixture was incubated at 42°C for 2 hours. After the mixture was heated for 5 min at 95°C, the DNA was precipitated, washed with 70% ethanol and dissolved in 50 µL of sterile distilled water.

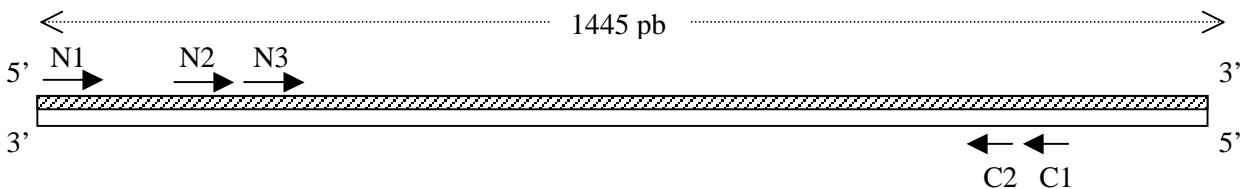
For amplification of cDNA, the PCR reaction was performed in 100 µL of buffer containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP and 0,8 µM sense N1 (see its sequence hereafter) and oligo(dT) primers. After 5 min of denaturation at 94°C, the solution was cooled and 5 U of Taq polymerase was added. Thirty cycles of amplification were carried out automatically with a step program (94°C 1 min ; 50°C 2 min ; 72°C 3 min) followed by a 15-min final extension.

**N1 sense primer** : 5' ATGCTGCACTCAAGACTGATGG 3'

## Document 2 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR.

Les amorces utilisées lors des différentes PCR sont repérées par les flèches orientées.

 Représente le brin codant de l'ADNc d'OMT de Tabac



Amorce	Complémentarité du brin	Type	Séquence
N1	non codant	sens	5' ATGCTGCACTCAAGACTGATGG 3'
N2	non codant	sens	5' TGCACATACATGCACTTCTATCG 3'
N3	non codant	sens	5' CGCTAGAGTATAGTCATACTAT 3'
C1	codant	antisens	5' TACGCTGACCTCCATGACAGTGG 3'
C2	codant	antisens	5' GTAATTTGCAGGTAGATCTACCG 3'

## Document 3 : Vecteur d'expression pTAC utilisé pour l'expression de l'ADNc d'OMT d'Eucalyptus.

T1T2 : terminateur de transcription bactérien

*Ptac* : promoteur hybride fort élaboré à partir des promoteurs *trp* et *lac* d'*E.coli*.

Ce promoteur est sous dépendance de la régulation par *lacI*.

f1 origin : origine de réplcation d'un phage filamenteux

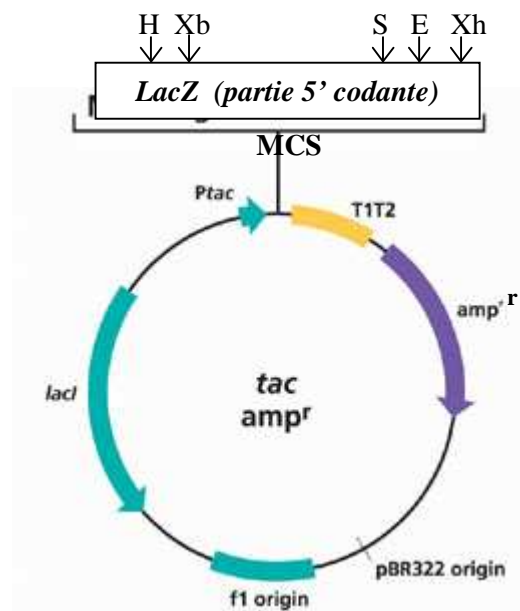
 : partie codante 5' du gène *lacZ*

sites de restriction uniques du SMC :

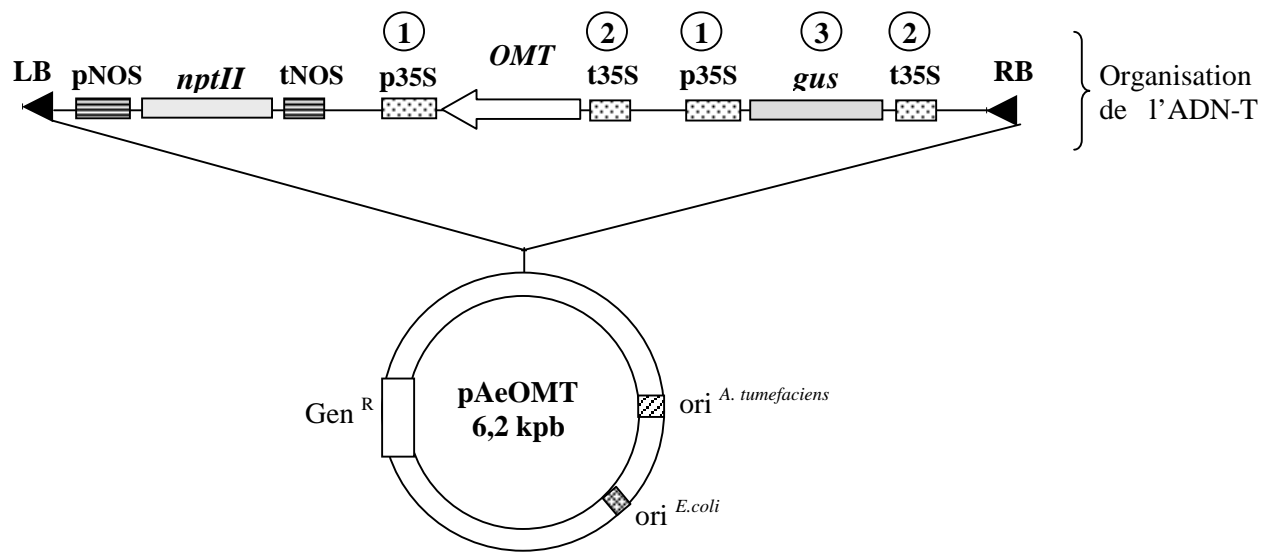
H (HindIII), Xb (XbaI), S (SalI), E (EcoRI), Xh (XhoI).

La séquence d'ADNc d'OMT d'Eucalyptus a été insérée entre les sites HindIII et XhoI

Les bactéries compétentes réceptrices sont de génotype *lacZAM15*



## Document 4 : Carte simplifiée du plasmide pAeOMT.



pX : promoteur du gène X

tX : terminateur du gène X

NOS : Nopaline synthétase (la nopaline est une opine)

35S : protéine 35S du Virus de la Mosaïque du Chou-Fleur (CaMV)

OMT : séquence codante de l'OMT d'eucalyptus insérée en orientation antisens en aval du promoteur p35S

*nptII* : gène de la néomycine phosphotransphérase (qui confère une résistance des cellules végétales à la kanamycine ajoutée dans les milieux de culture)

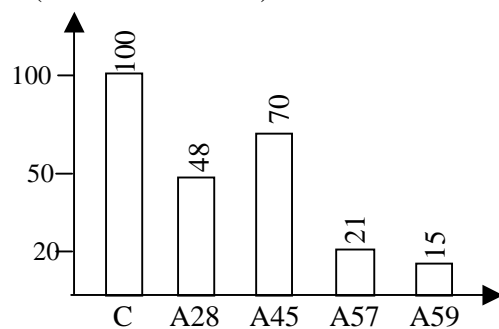
*gus* : gène de la glucuronidase ; l'activité de cet enzyme est facilement mesurable sur un extrait de protéines solubles, par spectrophotométrie du produit formé

Gen<sup>R</sup> : gène de résistance à la gentamycine.

## Document 5 : OMT and GUS activities in Eucalyptus transgenic plants.

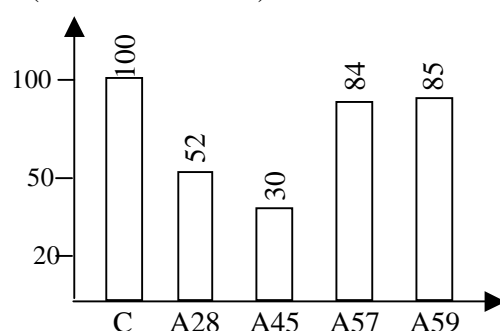
### I. Residual OMT activity

OMT residual activity  
(% of the control C)



### II. GUS activity

GUS activity  
(% of the control C)



OMT and GUS activities were measured on triplicates from the same transgenic plant. Young leaves have been cut, soluble proteins were extracted in appropriate buffers and enzymes assays were conducted with specific substrates. Activities are expressed as pourcentage of the control population values (C). Means of the triplicates for a transgenic plant are written on top of the histogram. The control population corresponds to 20 eucalyptus plant regenerated through transgenesis as the other plants but which have been transformed by a pAeOMT plasmid which does not contain any OMT sequence.