

## Sujet d'Annale

### Enseignement de L3 — UE Biol. 374 (Biologie Moléculaire)

Année 2011-2012 - 1<sup>ère</sup> session – 2<sup>nd</sup> semestre

#### Partie I : Épreuve de Travaux Dirigés

-----  
Durée : 1 H 00  
-----

*Il vous est demandé de faire des réponses concises, dans un français correct, tant du point de vue de l'orthographe que de la syntaxe, et de bien faire apparaître le numéro de la question avant chaque réponse.*

-----

Le champignon filamenteux *Aspergillus nidulans*, comme d'autres microorganismes, est capable d'utiliser un grand nombre de sources de carbone dont l'acétate. Les gènes nécessaires à l'utilisation de l'acétate (appelés *acu*) sont soumis, au niveau transcriptionnel, à deux voies de régulation antagonistes : une voie d'induction spécifique impliquant l'activateur FacB (codé par le gène *facB*), et une voie de répression générale impliquant le répresseur CreA (codé par le gène *creA*). La voie d'induction spécifique nécessite la présence d'acétate dans le milieu de culture. La voie de répression générale (appelée répression catabolique carbonée), quant à elle, s'exerce en présence de glucose, source de carbone préférée du champignon.

Des chercheurs ont identifié un nouveau mutant d'*A. nidulans* incapable d'utiliser l'acétate comme source de carbone (*acu*<sup>-</sup>). La mutation touche un gène non encore caractérisé, qui a été appelé *acuX*. La version sauvage (non mutée) de ce gène a alors été clonée, et les chercheurs en question se proposent d'étudier sa régulation afin de savoir s'il partage le même profil d'expression que les autres gènes *acu*.

Pour ce faire, ils ont placé le cadre ouvert de lecture du gène *lacZ* d'*E. coli* sous la dépendance du promoteur et de la région 5'-UTR du gène *acuX* (fusion *acuX-lacZ*). Cette fusion a été réalisée dans un vecteur intégratif contenant par ailleurs le gène *argB* d'*A. nidulans*, nécessaire à la biosynthèse de l'arginine. Le vecteur résultant a été appelé pXZB (Figure 1). Le rôle de *argB* sur ce vecteur est double : non seulement il est utilisé comme marqueur de sélection chez *A. nidulans*, mais il permet l'intégration chromosomique du vecteur au locus *argB* (par recombinaison homologe).

pXZB a été introduit par transformation dans différentes souches isogéniques d'*A. nidulans* mutées dans le gène *argB* (*argB*<sup>-</sup>, c'est-à-dire auxotrophes envers l'arginine, et donc nécessitant cet acide aminé dans le milieu de culture) et différant par les allèles *facB* et *creA* : une souche sauvage pour ces deux gènes (*facB*<sup>+</sup> *creA*<sup>+</sup>), une souche mutée dans le gène *facB* (*facB*<sup>-</sup> *creA*<sup>+</sup>), et une souche mutée dans le gène *creA* (*facB*<sup>+</sup> *creA*<sup>-</sup>). Pour chacune de ces trois souches, après sélection des transformants, les chercheurs n'en ont finalement retenu qu'un seul contenant une seule copie de la fusion *acuX-lacZ* intégrée au locus *argB*.

L'activité β-galactosidase a été mesurée à partir des extraits protéiques bruts de chacun de ces trois transformants après qu'ils ont été cultivés en milieu liquide en présence de l'une des trois

sources de carbone suivantes : acétate, glucose, ou fructose (source de carbone neutre, c'est-à-dire ni inductrice, ni répressive). Les résultats sont compilés Table 1.

- Questions 1 - a)** Qu'appelle-t-on la région 5'-UTR d'un gène ?  
**b)** Où se situe t-elle par rapport à la "TATA box" et au +1 de traduction ?  
**c)** Fait-elle partie de la région transcrite ?

- Questions 2 - a)** Quel est le rôle ici du gène *lacZ* ?  
**b)** Que représente l'activité  $\beta$ -galactosidase mesurée dans cette étude ?

**Question 3-** Pourquoi est-il important que dans chacune des souches, la fusion *acuX-lacZ* soit intégrée au même endroit (en l'occurrence le locus *argB*) et en le même nombre de copies (en l'occurrence un seul exemplaire) ?

- Questions 4- a)** Sur quel critère les transformants ont-ils été sélectionnés ?  
**b)** Quelle devait donc être la particularité du milieu de sélection ?

**Questions 5- a)** A quelle technique les chercheurs ont-ils eu recours pour déterminer chez les transformants le nombre et le site d'intégration de la fusion *acuX-lacZ* ?  
**b)** En préciser les principales étapes.

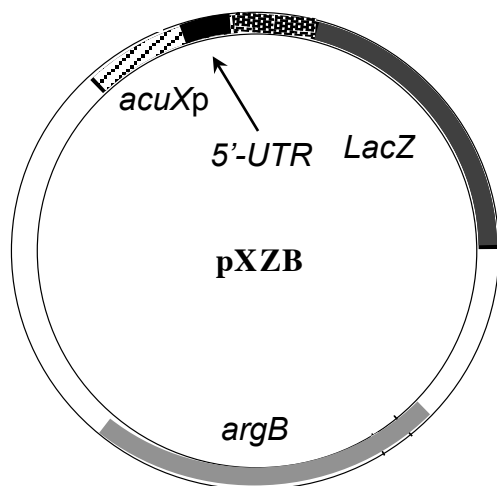
**Question 6-** Après culture des transformants en présence des différentes sources de carbone, les protéines ont-elles été extraites en condition native ou dénaturante ? Justifiez.

**Questions 7- a)** Interprétez les résultats obtenus avec la souche *facB<sup>+</sup> creA<sup>+</sup>*. Qu'en concluez-vous quant au profil d'expression du gène *acuX* ?  
**b)** D'après ces résultats, quels sont les différents niveaux de régulation possibles de l'expression du gène *acuX* ? Justifiez.

**Questions 8- a)** Quelles informations supplémentaires vous apportent les résultats obtenus avec les deux autres souches (*facB<sup>-</sup> creA<sup>+</sup>* et *facB<sup>+</sup> creA<sup>-</sup>*) ?  
**b)** Ces résultats vous permettent-ils de préciser votre hypothèse quant au niveau de régulation de l'expression du gène *acuX* ? Justifiez.

**Questions 9- a)** Quelle technique utiliseriez-vous pour montrer que FacB et/ou CreA se fixe(nt) sur la région d'*acuX* fusionnée à *lacZ* ?  
**b)** En décrire le principe.  
**c)** Quel(s) contrôle(s) effectueriez-vous pour montrer que cette (ces) fixation(s) est (sont) spécifique(s) de ce fragment d'ADN ?

**Questions 10- a)** Quelle technique utiliseriez-vous pour préciser, au sein de ce fragment, la (les) séquence(s) sur la(les)quelle(s) se fixent ces protéines ?  
**b)** En décrire le principe (vous pouvez vous aider d'un schéma).  
**c)** Cette technique nécessite que le fragment d'ADN en question soit marqué radioactivement : doit-il l'être sur toute sa longueur ou seulement à une extrémité ?  
**d)** Décrivez alors la technique de marquage utilisée.



**Figure 1** : Vecteur pXZB utilisé pour intégrer la fusion *acuX-lacZ* au locus *argB* d'*A. nidulans*.

Ce vecteur est dit intégratif car il n'a pas d'origine de réplication lui permettant de se répliquer de façon autonome chez *A. nidulans*, et ne peut donc se maintenir chez ce champignon qu'en s'intégrant à son génome.

*acuXp* : promoteur de *acuX* ; 5'-UTR : région 5'-UTR de *acuX* ; *lacZ* : cadre ouvert de lecture du gène *lacZ* d'*E. coli* ; *argB* : gène *argB* d'*A. nidulans*.

Source de carbone	Souche		
	<i>facB</i> <sup>+</sup> <i>creA</i> <sup>+</sup>	<i>facB</i> <sup>-</sup> <i>creA</i> <sup>+</sup>	<i>facB</i> <sup>+</sup> <i>creA</i> <sup>-</sup>
Fructose	2900 ± 170	2750 ± 210	3000 ± 140
Acétate	5500 ± 240	2940 ± 180	4890 ± 260
Glucose	1400 ± 120	1730 ± 170	2840 ± 230

**Table 1** : Activités spécifiques β-galactosidase. Les valeurs sont données en unités (dites « Miller ») / mg de protéines. Elles résultent de six expériences indépendantes.

## Partie II : Questions de Cours

A rendre sur feuille séparée

-----  
Durée : 1 H 00  
-----

Toutes les questions sont notées sur 1 pour un total de 10. Essayez de répondre au plus de questions possibles. Ne perdez pas de temps à répondre trop en détail à une question au détriment des autres. Une fois que vous avez répondu brièvement à toutes les questions que vous pensez connaître, vous pouvez revenir sur certaines d'entre-elles pour les approfondir. Je pourrais dans ce cas mettre 2/1 à une question (ou même 3 si la réponse est très bonne et complète). La note maximum restera toutefois 10/10 !

- 1) Dessiner la formule d'un dNTP avec la numérotation des carbones du ribose et des phosphates (si vous connaissez la formule de l'une des quatre bases, c'est encore mieux).
- 2) Pourquoi toutes les ADN polymérases utilisent des dNTP 5' triphosphate ?
- 3) Pourquoi la réplication est-elle semi-conservative ? Dessinez une fourche de réplication.
- 4) A quoi servent les télomères chez les eucaryotes ?
- 5) Une publication vient de sortir (mars 2012) qui met en évidence un recyclage de l'ADN polymérase sur le brin retardé (*lagging*) pour la synthèse des fragments d'Okazaki chez la bactérie *Bacillus subtilis*. En quoi ce résultat contredit ce que nous avons vu en cours chez *Escherichia coli* ?
- 6) Quelles sont les protéines qui interviennent dans l'initiation de la réplication chez les archées, les bactéries et les eucaryotes ?
- 7) Parmi ces protéines, quelles sont celles qui sont homologues, quelles sont celles qui sont des analogues fonctionnels ?
- 8) Quelle est la différence entre protéines homologues et analogues fonctionnels ?
- 9) Quelle est la différence entre une topoisomérase et une hélicase ?
- 10) Quelle réaction catalyse la gyrase des bactéries ?

**La partie cours ne sera pas abordée en TD !**