Corrigé du sujet d'examen de janvier 2011

Enseignement de L3 de Biologie Moléculaire

Année 2011-2012 - 1ère session

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.

En bleu = corrigé (= réponse attendue) ; **en orange des informations supplémentaires (non attendues lors de l'examen) ; en vert des conseils**

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*$^-$). 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 homologue).

pXZB a été introduit par transformation dans différentes souches isogéniques d'*A. nidulans* mutées dans le gène *argB* (*argB*$^-$, 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*$^+$ *creA*$^+$), une souche mutée dans le gène *facB* (*facB*$^-$ *creA*$^+$), et une souche mutée dans le gène *creA* (*facB*$^+$ *creA*$^-$). 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 ?

a) La région 5'UTR (UTR pour « UnTranslated Région ») est la région qui est située à l'extrémité 5' de l'ARNm, allant du +1 de transcription, jusqu'au codon AUG.
b) Elle est donc localisée après la TATA box, qui est située dans la région promotrice et avant le +1 de traduction.
c) Autrement dit il s'agit de la région en 5' qui est transcrite et non traduite.

Chez les Eucaryotes, la région 5'UTR contient juste en amont de l'AUG une partie de **la séquence de Kozak** (5' $^{A}/_{G}$ CC AUG GG 3'). Cette séquence a une forte affinité pour la petite sous-unité ribosomique et va donc l'arrêter au niveau du codon d'initiation lors de son scanning de l'ARNm (au moment de l'initiation de la traduction).
Par contre chez les Procaryotes, la région 5'UTR contient la séquence RBS (Ribosome Binding Site) dite aussi séquence de Shine-Dalgarno, qui va s'hybrider par complémentarité de séquence avec la région 3' de l'ARN 16S contenu dans la petite sous-unité ribosomique, également au moment de l'initiation de la traduction. Le RBS doit être localisé 4 à 9 nucléotides en amont de l'AUG, de cette façon l'AUG est positionné correctement vis-à-vis des sites du ribosome.

Questions 2- a) Quel est le rôle ici du gène *lacZ* ?
Le gène *lacZ* est utilisé ici en tant que gène rapporteur, c'est-à-dire un gène permettant indirectement de visualiser l'expression, voire de mesurer le taux d'expression, d'un gène d'intérêt (ici *acuX*).

Questions 2- b) Que représente l'activité β-galactosidase mesurée dans cette étude ?
Attention avant de répondre à ce type de question concernant les constructions rapporteuses. Il faut en effet toujours analyser la façon dont elles sont construites en repérant toutes les séquences qui sont conservées par rapport au gène étudié. En effet, outre la région promotrice, les régions 5' et/ou 3' UTR peuvent être impliquées dans la régulation de l'expression du gène étudié. Donc bien analyser comment est réalisée la construction rapporteuse. Si seule la région promotrice du gène étudié est conservée alors nous aurons accès à sa régulation transcriptionnelle. Par contre si les régions 5' et/ou 3' UTR sont également conservées, alors il pourra s'y ajouter des régulations sur la stabilité de l'ARNm et/ou son taux de traduction. Donc **prudence.**

Ici nous avons le promoteur de *acuX* (donc la régulation transcriptionnelle - si elle existe - peut affecter l'expression du rapporteur) mais également la région 5'UTR d'*acuX*. Or les régions 5' UTR peuvent être impliquées dans des régulations post-transcriptionnelles en jouant sur la stabilité de l'ARNm et/ou traductionnelle en jouant sur l'initiation de la traduction. Donc ici il ne faut pas se précipiter en parlant uniquement de la région promotrice. Ainsi toute variation d'activité ß-galactosidase en fonction des paramètres étudiés permettra d'affirmer que le gène acuX est régulé selon ces conditions mais cela ne permettra pas en revanche de préciser à quel niveau de l'expression se fait cette régulation.

La mesure de l'activité de la β-galactosidase est proportionnelle à la quantité d'enzyme β-galactosidase accumulée dans le champignon. Elle va donc être le reflet de l'activité du promoteur du gène *acuX*, mais également de celle de la région 5'UTR d'*acuX*.

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) ?
Le but de cette expérience est de comparer l'activité des régions régulatrices (promoteurs + 5'UTR) gouvernant l'expression du gène rapporteur en fonction de l'activité des deux régulateurs CreA et FacB. Or il faut être sûr qu'aucun élément extérieur ne vienne perturber l'expression du gène rapporteur.
Il est évident que si une souche contient plusieurs copies du rapporteur, elle présentera, comparativement à une souche contenant une seule copie, un taux plus important de β-galactosidase sans que cela soit dû à une activité plus importante des éléments d'expression du gène testé.
Concernant la position de l'intégration, il faut que la construction soit effectivement intégrée au même endroit dans le génome pour éviter **les effets de position** dus à des états différents de la chromatine. En effet, chez les eucaryotes, l'état de la chromatine peut varier d'une région à l'autre des chromosomes, et cet état a une influence directe sur l'expression des gènes. Ainsi, l'intégration de la construction rapporteuse dans un même locus (en l'occurrence le gène *argB*) pour toutes les souches étudiées nous permet de mettre cette construction dans un même environnement au niveau de la chromatine, et donc de nous affranchir de ce problème. Toute variation d'expression du gène rapporteur (et donc du gène d'intérêt) ne sera donc imputable qu'aux paramètres que les expérimentateurs ont eux-mêmes choisi de faire varier.

Questions 4- **a)** Sur quel critère les transformants ont-ils été sélectionnés ?
b) Quelle devait donc être la particularité du milieu de sélection ?
La souche réceptrice est mutée au niveau du gène *argB*. Elle est donc auxotrophe vis-à-vis de l'arginine, ce qui signifie qu'elle a besoin qu'on lui fournisse cet acide aminé dans le milieu de culture. Or le plasmide intégratif qui porte la construction rapporteuse porte également la version sauvage du gène *argB*.
Par conséquent, une souche transformée (qui aura intégré ce vecteur dans son ADN génomique) possédera un gène *argB* fonctionnel, et ne sera donc plus auxotrophe vis-à-vis de l'arginine, mais prototrophe.
Les transformants pourront donc être sélectionnés sur un milieu minimum (dépourvu d'arginine). Seuls les transformants pourront pousser, alors que les cellules non transformées ne le pourront pas.
Surtout il est interdit de parler de milieu riche sans arginine (ou de milieu complet sans arginine) car cela est impossible : on ne peut rien retirer au milieu riche étant donné que celui-ci est fait à base d'extrait de levure (des levures lyophilisées, puis broyées) et d'hydrolysat de protéines, et contient donc forcément de l'arginine.

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.
Il s'agit de la **technique de Southern-blot**.
Étapes dans la réalisation d'un Southern-blot :
- Digestion des ADN génomiques par des enzymes de restriction.
- Migration électrophorétique en gel d'agarose.

Le but est ici de séparer les fragments en fonction de leur taille. Attention, la digestion d'un ADN génomique par une enzyme de restriction génère des milliers de fragments. Si le gel contient du bromure d'éthidium, l'observation du gel sous UV après migration révélera un « smear » et non des bandes bien individualisées.

- Dénaturation de l'ADN dans le gel (après migration) par trempage du gel dans de la soude.

Le but est ici de dénaturer tous les fragments d'ADN afin qu'ils soient hybridables avec une sonde (l'hybridation entre un acide nucléique cible et une sonde requiert que les 2 molécules soient sous forme simple brin).

- Transfert sur une membrane de Nylon ou de nitrocellulose.

Transfert par capillarité en présence d'une solution saline concentrée, ou grâce à un courant électrique, puis fixation covalente sur la membrane grâce à des UV (Cross linking). Pourquoi cette étape ? Pour deux raisons : 1) la fragilité du gel d'agarose (les étapes d'hybridation puis de lavages nécessitent une agitation constante à laquelle le gel ne résisterait pas) ; 2) la température d'hybridation (une hybridation entre deux séquences 100% homologues doit être réalisée à 65°C afin d'éviter des hybridations entre des séquences de moindre homologie, ce qui entraînerait la fonte du gel d'agarose).

- Hybridation avec une sonde, qui a été au préalable dénaturée.

Cette sonde représente un ADN (par exemple le gène *lacZ* ou le gène *argB*) qui a été marqué soit radioactivement soit avec des nucléotides porteurs d'un motif antigénique, lequel sera alors reconnu par un anticorps associé à une enzyme donc l'activité est détectable (réaction produisant un précipité coloré sur la membrane, ou avec émission de photon – dans ce cas, la détection s'effectue par autoradiographie, comme pour la radioactivité). Bien évidemment la sonde doit être dénaturée pour qu'elle soit en mesure de s'hybrider avec la séquence cible.

- Lavage de la membrane afin d'éliminer les sondes qui ne sont pas en interaction spécifique avec les ADNs complémentaires.

- Révélation de la sonde.

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.

Il faut à tout prix que les protéines soient extraites sous leur forme native étant donné qu'il va falloir effectuer un dosage de l'activité β-galactosidase. Cet enzyme doit conserver sa structure afin de conserver son activité enzymatique.

Questions 7- a) Interprétez les résultats obtenus avec la souche *facB*$^+$ *creA*$^+$. Qu'en concluez-vous quant au profil d'expression du gène *acuX* ?

Surtout, ayez la mémoire de l'exercice : n'oubliez pas que nous avons vu plus haut que l'activité spécifique de la β-galactosidase est le reflet de l'accumulation de cet enzyme dans le mycélium en culture, et par conséquent nous rapporte le taux d'expression du gène *lacZ*, et donc indirectement du gène d'intérêt *acuX*.

Avant de faire l'analyse, il est important de bien repérer les conditions de culture.

La culture réalisée en présence de fructose nous donne le niveau basal d'expression de la construction, car le fructose ne constitue une source de carbone ni inductrice ni répressive pour ce système. Elle va nous nous permettre de connaître le taux **de référence**, et ainsi de savoir s'il y a ou non induction ou répression dans les deux autres conditions.

En présence d'une source de fructose, l'activité spécifique de la β-galactosidase est de 2900 unités Miller, ce qui correspond au niveau d'expression basal, c'est-à-dire en l'absence d'induction et/ou de répression.

En condition d'induction pour les gènes impliqués dans l'utilisation de l'acétate, c'est-à-dire en présence d'acétate, l'activité spécifique de la β-galactosidase double quasiment par rapport à la condition neutre, passant à une valeur de 5500 unités Miller. Donc l'acétate permet d'augmenter la quantité de β-galactosidase **accumulée** dans la cellule. On assiste bien à un phénomène d'induction.

En condition de répression pour les gènes impliqués dans l'utilisation de l'acétate, c'est-à-dire en présence de glucose, l'activité spécifique de la ß-galactosidase est réduite de plus de la moitié, passant à une valeur de 1400 unités Miller. Donc le glucose permet de diminuer la quantité de ß-galactosidase **accumulée** dans la cellule. On assiste bien à un phénomène de répression.

Bilan : D'après ces résultats, l'expression du gène *acuX* (dont le promoteur et la région 5'-UTR sont fusionnés en amont du gène *lacZ* dans la construction rapporteuse) est bien soumise à une induction par l'acétate et à une répression par le glucose. Donc, le gène *acuX* semble avoir un profil d'expression similaire à celui des autres gènes *acu* impliqués dans l'utilisation de l'acétate comme source de carbone.

Questions 7- b) D'après ces résultats, quels sont les différents niveaux de régulation possibles de l'expression du gène *acuX* ? Justifiez.

Étant donné que les éléments de *acuX* présents dans la fusion avec la phase ouverte de lecture du gène lacZ comprennent et le promoteur et la région 5'-UTR, on ne peut pas exclure que nous ayons :

- une régulation transcriptionnelle (c'est-à-dire variation du taux de transcription du gène à partir du promoteur *acuX*) ;
- une régulation post-transcriptionnelle (stabilité de l'ARNm), du fait de la présence de la région 5'UTR).
- une régulation traductionnelle (toujours en raison de la présence de la région 5'-UTR de *acuX*) (par exemple, si une protéine se fixe dans cette région, elle peut bloquer le passage du ribosome avant qu'il n'atteigne l'AUG) ;
- un mélange de deux ou des trois régulations.

Questions 8- a) Quelles informations supplémentaires vous apportent les résultats obtenus avec les deux autres souches (*facB*$^-$ *creA*$^+$ et *facB*$^+$ *creA*$^-$) ?

- **En l'absence de FacB**, on conserve l'effet répressif du glucose sur l'expression du gène *lacZ*, mais on perd l'induction par l'acétate de, puisque nous observons un niveau d'activité spécifique de la β-galactosidase équivalent à celui obtenu en condition neutre (fructose). Par conséquent, nous pouvons conclure que l'induction de l'expression du gène *acuX* par l'acétate passe par FacB.
- **En l'absence de CreA**, on conserve toujours l'effet inductif de l'acétate sur l'expression du gène *lacZ*, mais on perd en revanche la répression par le glucose puisque nous observons un niveau d'activité spécifique de la β-galactosidase équivalent à celui obtenu en condition neutre (fructose). Par conséquent, nous pouvons conclure que la répression de l'expression du gène *acuX* par le glucose nécessite le répresseur CreA.

Questions 8- b) Ces résultats vous permettent-ils de préciser votre hypothèse quant au niveau de régulation de l'expression du gène *acuX* ? Justifiez.

Nous avons mis en évidence :

- d'une part que le gène *acuX* est bien soumis à l'induction par l'acétate, et que cette induction nécessite la présence de l'activateur transcriptionnel FacB ;
- d'autre part que le gène *acuX* est bien soumis à la répression par le glucose, et que cette répression nécessite la présence du répresseur transcriptionnel CreA.

Nous avons donc bien à faire à une régulation transcriptionnelle. De plus les valeurs obtenues pour les activités spécifiques de la β-galactosidase chez les mutants *facB*- et *creA*- sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec la souche sauvage en milieu neutre. Ceci indique qu'il n'y a pas d'autres niveaux de régulation supplémentaires au niveau de la stabilité de l'ARNm et de sa traduction. Ceci dit, cela n'exclut pas un potentiel niveau de régulation au niveau de la protéine AcuX elle-même. Autrement dit, en conclusion :

D'après les résultats présentés, le gène *acuX* est **au moins*** soumis aux facteurs FacB et CreA, c'est-à-dire à une régulation transcriptionnelle en réponse à la présence d'acétate et/ou de glucose.

* : Pourquoi ce « au moins » car il faudrait également analyser le rôle de la région 3'UTR, qui pourrait aussi influencer la régulation du gène *acuX* à des niveaux post-transcriptionnels (stabilité, traduction), sans oublier que nous pouvons avoir également des régulations post-traductionnelles de la protéine AcuX, régulations, qui ici restent inaccessibles en raison de la technique expérimentale utilisée.

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* ?

Certes nous avons mis en évidence que *acuX* est sous le contrôle des régulateurs CreA et FacB, mais il est peut-être possible qu'il s'agisse d'un effet indirect avec une cascade d'événements (c'est-à-dire que CreA et FacB ne se fixent peut-être pas directement sur le promoteur d'*acuX*). D'où cette question.

La technique **de retard sur gel** (ou EMSA) permettrait de répondre à cette question.

Questions 9- b) En décrire le principe.

Le principe est le suivant :

On isole le fragment d'ADN correspondant au promoteur *acuX*, puis ce fragment est radiomarqué afin d'être détectable. On sépare en deux lots le fragment marqué. Le premier lot est utilisé tel quel, il correspondra à notre témoin dit « sonde libre », qui permettra de visualiser la migration du fragment seul (migration en fonction de la taille du fragment). Dans le second lot de sonde, on ajoute soit la protéine régulatrice en entier soit un polypeptide qui contient uniquement le domaine de fixation du régulateur analysé. Les deux mélanges réactionnels sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide, **non dénaturant** et soumis en parallèle à une migration électrophorétique. Après la migration le gel est mis en contact avec un film autoradiographique, afin de visualiser les bandes correspondant aux fragments d'ADN sonde.

Si l'ADN n'a pas fixée la protéine (ou le polypeptide) alors il va migrer dans le gel en fonction de sa taille : il migrera au même niveau que le fragment de la sonde libre.

Par contre, si le fragment a fixé la protéine, alors son encombrement sera fortement augmenté en raison de la présence de la protéine. Il migrera moins loin que la sonde libre : il y aura un retard de migration.

Questions 9- c) Quel(s) contrôle(s) effectueriez-vous pour montrer que cette (ces) fixation(s) est (sont) spécifique(s) de ce fragment d'ADN ?

Il faut vérifier que la fixation de la protéine est bien séquence spécifique et qu'il ne s'agit pas simplement d'une fixation non spécifique (cas ou la protéine a juste de l'affinité pour de l'ADN, quelle que soit sa séquence).

Pour cela il faut faire **une expérience de compétition**. Le point de départ est le même que pour une expérience de retard sur gel : on marque radioactivement la séquence correspondant à la région promotrice, mais cette fois-ci la sonde est répartie dans quatre tubes.

- 1) et 2) Les deux premiers tubes sont identiques à ceux d'une expérience de gel retard classique : un tube contenant la sonde seule (témoin « sonde libre ») et un tube contenant la sonde et la protéine (témoin « retard »).
- 3) Le tube n°3 correspond à **notre témoin de compétition** : on ajoute au mélange sonde + protéine, le même fragment que celui correspondant à la sonde mais non radioactif et surtout mis en excès (on parle de compétiteur spécifique). Le but est ici de s'assurer de la quantité de compétiteur nécessaire pour titrer la protéine. En effet ici quelle que soit la spécificité de la protéine vis-à-vis de la sonde, on s'attend à perdre le retard car les fragments du promoteur non radioactif mis en excès vont titrer la protéine, qui ne sera plus disponible pour aller se fixer sur les molécules de sonde (mêmes fragments mais radioactifs). Pour rappel : seule la sonde, seule ou complexée avec la protéine sera visible sur l'autoradiographie, un complexe protéine-fragment non radioactif ne sera

pas visualisé. Si l'excès du compétiteur spécifique est suffisant alors le retard sera perdu (100% de la sonde reste libre par manque de protéine).

- 4) Le tube n°4 correspond à l'expérience de compétition proprement dite : on ajoute en excès un fragment d'ADN quelconque mais de même taille (dit compétiteur non spécifique), qui n'est en rien relié à la séquence de la sonde et qui n'est pas radioactif. Il est mis dans les mêmes quantités que le compétiteur spécifique du tube 3. Il y a alors deux résultats possibles :

soit la fixation de la protéine est séquence spécifique, et alors la présence – même en excès — du compétiteur non spécifique ne modifiera pas l'interaction entre la protéine et la sonde (sa cible) : on conserve le retard ;

soit nous avons une fixation non séquence spécifique, et la protéine se fixera avec la même affinité sur la sonde et sur les fragments non marqués ; toutefois, ces derniers étant en excès, la fixation sera plus probable sur le compétiteur, la sonde ne sera pas fixée (rencontre moins probable car en faible quantité par rapport au compétiteur) et ne sera plus retardée dans sa migration.

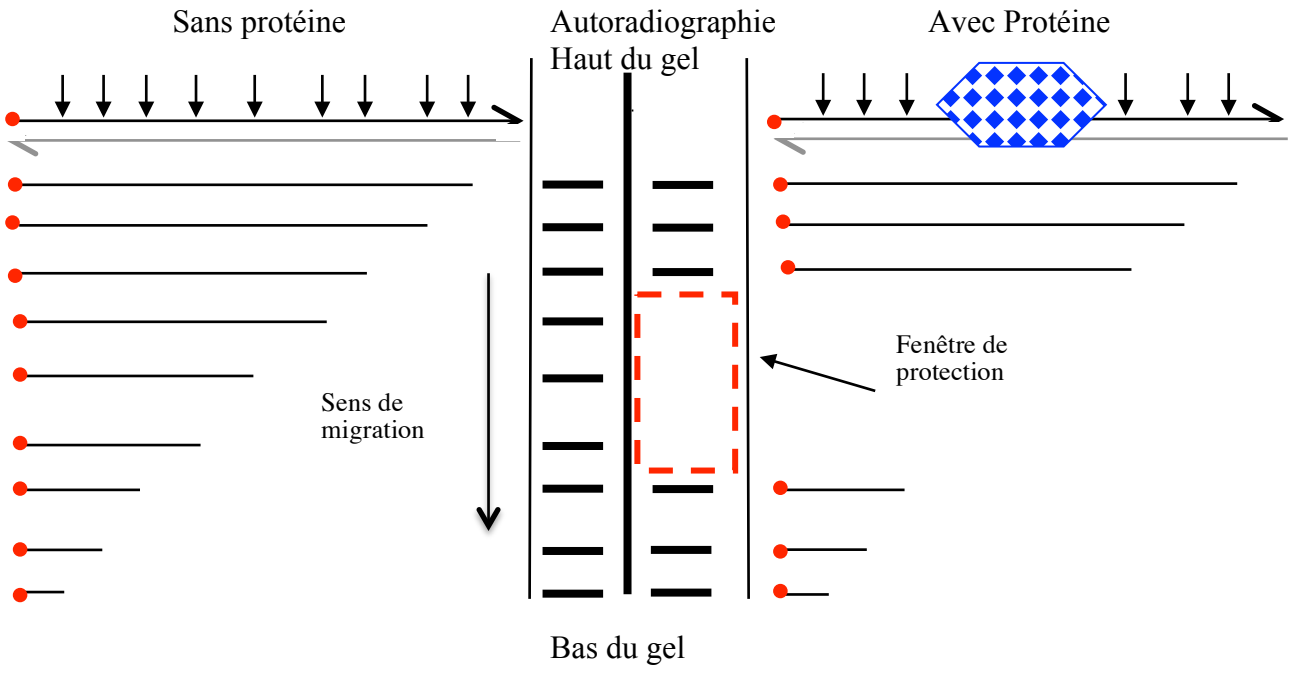
Questions 10- a) Quelle technique utiliseriez-vous pour préciser, au sein de ce fragment, la (les) séquence(s) sur la(les)quelle(s) se fixent ces protéines ?

La technique d'empreinte à la DNase 1.

Questions 10- b) En décrire le principe (vous pouvez vous aider d'un schéma).

Marquage d'un fragment d'ADN sur une seule extrémité (●)(on verra plus loin comment). Puis on sépare la quantité de fragment obtenu en deux tubes : dans l'un, le fragment est incubé avec la protéine d'intérêt, dans l'autre non. Puis les deux lots sont mis en présence de DNase I. La DNase I coupe les liaisons phosphoester à l'intérieur d'une molécule d'ADN, et ceci de façon aléatoire (avec néanmoins des sites préférentiels après des nucléotides pyrimidiques). Le point important ici est que la réaction de digestion par la DNase I est réalisée **dans des conditions ménagées de façon à ce que statistiquement, une seule coupure soit introduite par molécule d'ADN**. Mais sur l'ensemble des molécules présentes dans la réaction, TOUS les sites potentiels seront digérés. La présence de la protéine sur l'ADN rend les sites inaccessibles à la DNase I. On procède ensuite à la séparation sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante. La protection de l'ADN vis-à-vis de la DNase 1 par la protéine fixée va résulter en une fenêtre de protection dans le profil des bandes visualisées sur l'autoradiographie du gel.

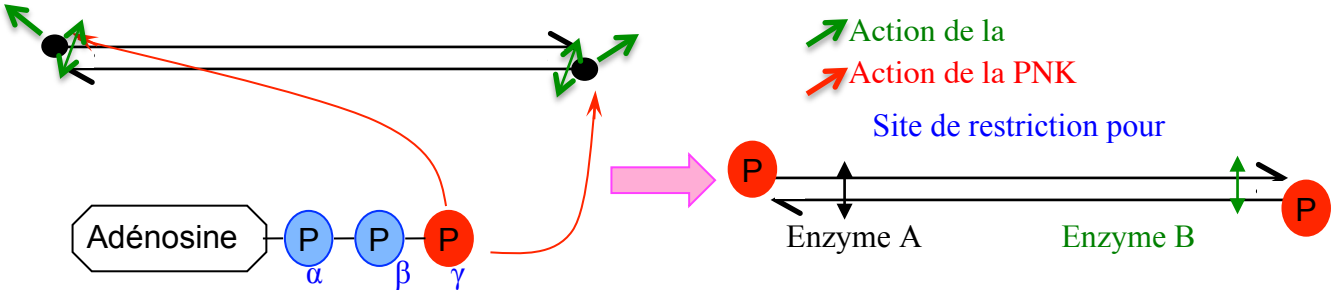
Ici on a marqué le brin supérieur, donc c'est celui, qui va être révélé (des coupures auront lieu sur l'autre brin mais les produits de ces coupures ne seront pas visibles sur l'autoradiogramme).



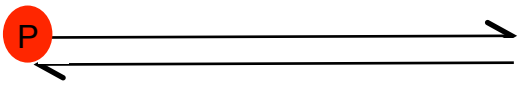
Rappel : seuls les fragments radioactifs sont représentés sur le schéma car ce seront les seuls visibles sur l'autoradiogramme!

Questions 10- 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 ?
Non, il faut qu'il soit marqué en extrémité et uniquement sur un brin. Dans le cas contraire, nous obtiendrions des fragments marqués de toutes les tailles possibles, et plus aucune empreinte ne serait visible

Questions 10- d) Décrivez alors la technique de marquage utilisée.
La technique utilisée va marquer indifféremment les deux extrémités 5'. Ce marquage consiste à faire agir d'abord une phosphatase qui ôte les groupements phosphate en 5', puis la polynucléotide kinase (PNK), qui ajoute un groupement phosphate en 5' à partir du phosphate γ de l'ATP. Ainsi, si on utilise du dATP [γ-^{32}P] en présence de PNK, le phosphate transféré sera radiocatif.



Mais attention le fragment est marqué sur les 2 brins. Il faut alors ensuite éliminer l'une des extrémités marquées en faisant agir soit l'enzyme de restriction B (pour n'avoir que le brin supérieur marqué), soit l'enzyme de restriction A (pour n'avoir que le brin inférieur marqué), et purifier le grand fragment.



Cela implique donc que le fragment à marquer initialement possède à chaque extrémité un site de restriction unique (non présent ailleurs sur le fragment)

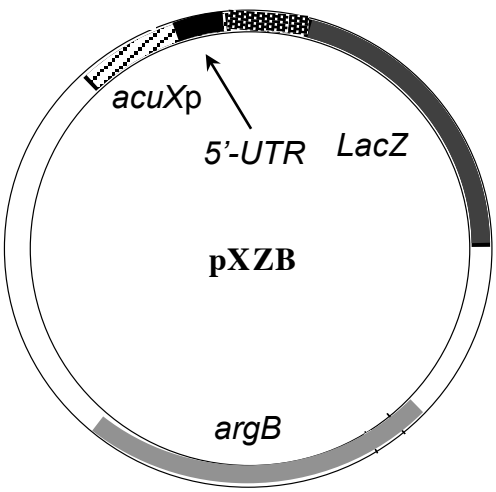


Figure 1 : Vecteur pXZB utilisé pour intégrer la fusion *acuX-lacZ* au locus *argB* d'*A. nidulans*.
Ce vecteur est dit intégratif car il n'a pas d'origine de réplication lui permettant de se répliquer de façon autonome chez *A. nidulans*, et ne peut donc se maintenir chez ce champignon qu'en s'intégrant à son génome.
*acuX*p : 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*.

	Souche		
Souce de carbone	***facB*$^+$ *creA*$^+$**	***facB*$^-$ *creA*$^+$**	***facB*$^+$ *creA*$^-$**
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 ?