



Enseignement de Licence - UE EN189 Epreuve de Travaux Dirigés

Année 2014-2015 - 1ère Session (janvier 2015)

Durée : 1 heure 30

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 numéroter les questions.

Bacillus thuringiensis est une bactérie Gram-positive qui peut former des spores, et est pathogène des insectes. Elle produit une grande variété de toxines spécifiquement actives contre les formes larvaires. Au moins 15 gènes sont impliqués dans la virulence de cette bactérie, dont ceux codant les phospholipases C tels que le gène *plcA*. En laboratoire, cette virulence se manifeste à la fin de la phase végétative dans des cellules cultivées sur milieu riche (MR), alors qu'elle est absente dans des cellules cultivées sur un milieu pauvre induisant la sporulation (M_{Sp}).

Question 1 - Quels sont les différents niveaux de régulation possibles de l'expression des gènes de virulence chez *B. thuringiensis* ?

Dans le but de préciser le (ou les) niveau(x) de régulation de ces gènes, des chercheurs ont cultivé une souche sauvage de *B. thuringiensis* en milieu MR et en milieu M_{Sp}. A partir des cellules de ces deux cultures, ils ont alors réalisé une expérience de northern en utilisant deux sondes radioactives : l'une correspondant au gène *plcA* et l'autre au gène *tmcA*, connu pour être non régulé, quelles que soient les conditions de culture. Les résultats de ce northern sont présentés Figure 1. Des résultats analogues ont été obtenus pour les autres gènes impliqués dans la virulence de cette bactérie.

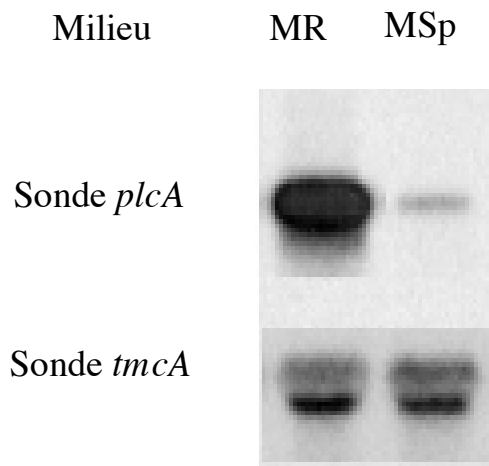


Figure 1 : Expériences de northern.

Elles ont été réalisées à partir de cellules de *B. thuringiensis* cultivées en milieu riche (MR) et en milieu pauvre induisant la sporulation (M_{Sp}).

Questions 2 - a) Pour réaliser cette expérience, quelles molécules les chercheurs ont-ils extrait des cellules de *B. thuringiensis* issues des deux cultures ?

b) Concernant les sondes, de quel type de molécule s'agit-il ?

c) Décrivez une technique de marquage pour obtenir une sonde radioactive utilisable lors d'une expérience de northern.

Question 3 - Donnez les grandes étapes d'une expérience de northern

Question 4 - Pourquoi les auteurs ont-ils utilisé une sonde correspondant au gène *tmcA* ? Quelle information vous apporte-t-elle ?

Question 5 - Au regard de la Figure 1, pouvez-vous préciser le (ou les) niveau(x) de régulation de l'expression des gènes de virulence de *B. thuringiensis* ? Justifiez votre réponse en utilisant les données présentées.

Un mutant de *B. thuringiensis*, chez lequel aucune induction de l'expression des gènes de virulence sur milieu MR n'est observée, a été isolé. Ce mutant est affecté à un seul locus qui a été appelé *plcR* (pour "*plc* Regulator"). Par une approche non décrite ici, des chercheurs ont entrepris de cloner la version sauvage de ce gène. Ils ont ainsi isolé un fragment d'ADN génomique (insert A1) correspondant au locus *plcR*. Cet insert, de 1,7 kpb, a été séquencé et s'est avéré contenir deux cadres ouverts de lecture : un grand (appelé orf1) codant une protéine putative de 285 acides aminés, et un petit (appelé orf2) codant un peptide putatif de 48 acides aminés (appelé PcR2). Le résultat de ce séquençage ainsi que les séquences en acides aminés déduites de orf1 et orf2 vous sont donnés Figure 2. La protéine putative codée par l'orf1 (appelée PlcR1) s'avère présenter toutes les caractéristiques d'un activateur transcriptionnel, et notamment des motifs caractéristiques d'un domaine de fixation à l'ADN. Par ailleurs, tous les gènes *plc* ont révélé la présence dans leur promoteur d'une séquence particulière pour laquelle les auteurs ont émis l'hypothèse qu'elle correspond au site de fixation de l'activateur PlcR1.

```
- 514                                     GAICTTGGCCATATACTTTATAGTTTTTATATGT
- 480 TTGTGCAAGCGAACTTCGGTTTGATTTTCTTTGTTTCTTTATTTGTAGTTGGAAATCTACATTTTTTCCAGTAGTGAAGTGTCTTGTGTTGAGCTTTACGGGGCTTTACCTCACCTT
- 360 TPAATACTTTTAGCAATATTTTCTTCGATCATTGAGGTTGTGTTAATTTCCGATGTTAAACCGAGGCTGAGCGATTCAACTTTTACTTCACCTTTGTCCAATTTTGTAGCATG
- 240 AATAGCTTCTGTTGATAAAGGATAAAGAACCGAATGTAACGAAAGCACTGGGAAGTTTTCTATAATTCATCTATAACACTCCTAATCTATTATATATATGTGAGATGGATTGTATGAAA
- 120 AATTTGCCGGATTTATATATATTATGCATTATTCATATCAAAAATTGTCGAATTCACATTATTGTAGTGGTATGACAACTTAAAAAATTAGATTGTTATAATGGGATGGTGAGTAAGT
      ↓
  1  ATG CAA GCA GAG AAA TTA GGA AGT GAA ATT AAG AAA ATT AGA GTG TTG AGA GGA TTA ACA CAA AAA CAG TTA TCC GAG AAC ATA TGT CAT CAA TCG GAA GTA ACC AGA ATT GAA TCG GGT
    Met gln ala glu lys leu gly ser glu ile lys lys ile arg val leu arg gly leu thr gln lys gln leu ser glu asn ile cys his gln ser glu val ser arg ile glu ser gly
121  GCA GTA TAC CCA AGT ATG GAT ATA TTG CAA GGT ATT GCA GCA AAA TTA CAA ATT CCC ATT ATT CAT TTT TAT GAG GTA CTC ATT TAT TCG GAT ATT GAA AGA AAA AAA CAG TTT AAA GAT
    ala val tyr pro ser met asp ile leu gln gly ile ala ala lys leu gln ile pro ile ile his phe tyr glu val leu ile tyr ser asp ile glu arg lys lys gln phe lys asp
241  CAA GTC ATT ATG CTT TGT AAG CAA AAA AGA TAT AAA GAA ATT TAT AAT AAA GTA TGG AAT GAG CTG AAA AAG GAA GAA TAT CAT CCT GAA TTC CAG CAA TTT CTT CAA TGG CAA TAT TAT
    gln val ile met leu cys lys gln lys arg tyr lys glu ile tyr asn lys val trp asn glu leu lys lys glu glu tyr his pro glu phe gln gln phe leu gln trp gln tyr tyr
361  GTA GCT GCT TAC GTA TTG AAA AAA GTC GAT TAC GAA TAT TGT ATT TTA GAA TTA AAG AAA TTG CTC AAT CAA CAA TTG ACA GGA ATA GAT GTA TAT CAG AAT CTT TAT ATT GAA AAC GCA
    val ala ala tyr val leu lys lys val asp tyr glu tyr cys ile leu glu leu lys lys leu leu asn gln gln leu thr gly ile asp val tyr gln asn leu tyr ile glu asn ala
481  ATT GCA AAC ATT TAT GCT GAA AAT GGC TAT TTG AAG AAG GGT ATT GMT TTA TTT GAA CAA ATA TTA AAA CAA TTA GAG GCA TTG CAT GAT AAT GAA GAA TTT GAC GTG AAG GTA AGG TAT
    ile ala asn ile tyr ala glu asn gly tyr leu lys lys gly ile asp leu phe glu gln ile leu lys gln leu glu ala leu his asp asn glu glu phe asp val lys val arg tyr
601  AAT CAT GCA AAA GCA TTA TAC TTA GAT AGT CGA TAT GAA GAA TCA CTT TAT CAA GTA AAT AAA GCG ATT GAA ATA TCA TGC CGA ATT AAT AGT ATG GCA TTA ATT GCA CAG CTA TAT TAT
    asn his ala lys ala leu tyr leu asp ser arg tyr glu glu ser leu tyr gln val asn lys ala ile glu ile ser cys arg ile asn ser met ala leu ile gly gln leu tyr tyr
721  CAA AGA GGT GAA TGC CTA AGG AAG TTG GAG TAT GAA GAG GCA GAG ATT GAA GAT GCA TAT AAG AAG GCA AGT TTC TTT TTT GAT ATA TTA GAA ATG CAT GCA TAT AAA GAA GCG CTT GTA
    gln arg gly glu cys leu arg lys leu glu tyr glu glu ala glu ile glu asp ala tyr lys lys ala ser phe phe phe asp ile leu glu met his ala tyr lys glu ala leu val
841  AAT AAA ATC AGC AGA TAAACAACCTAAAAAGTGGATATGCATAATGCATACAATGTGAATAAATTTTCATGATATATATAAAGTAAAAAATGTGGGTGATGGAAT  ATG AAG AAA TTA CTT
    asn lys ile ser arg ***                                     met lys lys leu leu
962  ATT GGT AGT TTA TTA ACG TTA GCA ATG GCA TGG GGT ATT TCA TTA GGT GAT ACA GCA TTT GAG AAA AGT CAA ATA ATT TCT CAT AAT GAT CAA GAG GTA CAA GTA GCT GCA GAT TTA CCT
    ile gly ser leu leu thr leu ala met ala trp gly ile ser leu gly asp thr ala phe glu lys ser gln ile ile ser his asn asp gln glu val gln val ala ala asp leu pro
1082 TTT GAG TTT TAAAAAACAACCGCCTTATTAGACGGTTGTTTTTTATGGAGTAACATCCAACGCTCTTACTAGAAACAGGTTTGCTAATAAAGAATCCCTTGAATGTGATC
    phe glu phe ***
```

Figure 2 : Séquence nucléotidique de l'insert A1 et séquences en acides aminés déduites de orf1 et orf2.
Cet insert s'est avéré contenir une seule unité de transcription dont le site d'initiation est indiqué par une flèche courbée. Les séquences soulignées d'un simple trait ou de flèches inversées font l'objet des questions 6.

- Questions 6 - a)** À quoi peuvent correspondre les deux séquences soulignées d'un simple trait ?
b) À quoi peuvent correspondre celles soulignées de flèches inversées ?

- Questions 7 - a)** Disposant de la protéine PlcR1 purifiée, quelle expérience – autre que l’empreinte à la DNase I (ou “footprinting”) – feriez-vous pour prouver l’hypothèse des auteurs ?
b) Donnez-en succinctement le principe.
c) Précisez les contrôles nécessaires pour s'assurer de la spécificité de la fixation en question.

Dans le but d'élucider le rôle précis de chacun des deux ORF de *plcR*, les auteurs ont d'abord construit une fusion rapporteuse *plcA-lacZ* où le promoteur du gène *lacZ* de *E. coli* (codant la β -galactosidase) a été remplacé par le promoteur du gène *plcA*. Une copie de cette fusion a été introduite par transformation dans le génome du mutant de *B. thuriangiensis* mentionné précédemment. Après avoir vérifié qu'aucune activité β -galactosidase n'est détectée chez ce mutant hébergeant la fusion *plcA-lacZ* et cultivé sur milieu riche, cette souche a été transformée par un vecteur contenant l'une des quatre versions suivantes de l'insert A1 : 1) l'insert A1 de 1,7 kbp tel qu'isolé précédemment (c'est-à-dire le locus *plcR* sauvage) ; 2) l'insert A1 avec une délétion dans l'orf1 ; 3) l'insert A1 avec une délétion dans l'orf2 ; l'insert A1 avec 15 mutations faux-sens dans l'orf2. L'activité β -galactosidase a été mesurée dans les extraits protéiques de chacun de ces quatre transformants après culture en milieu riche. Les résultats sont donnés Figure 3.

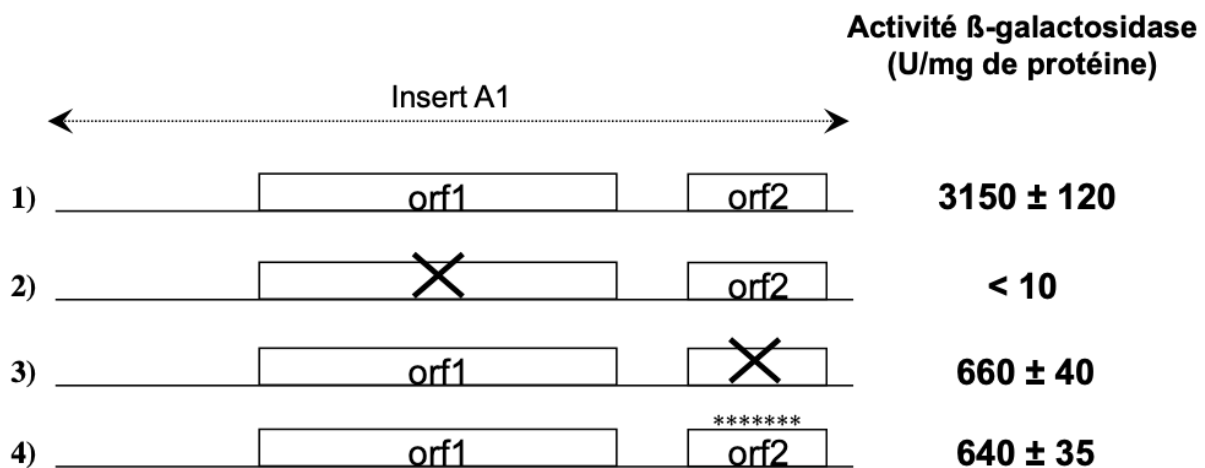


Figure 3 : Analyse des régions de l'insert A1 responsables de l'expression de la fusion *plcA-lacZ*.

La souche de *B. subtilis* hébergeant la fusion *plcA-lacZ* a été transformée avec les vecteurs contenant les fragments d'ADN génomiques indiqués, et l'activité β -galactosidase a été mesurée sur les extraits des transformants correspondants après culture en milieu riche. Une croix (constructions 2 et 3) indique la destruction de l'orf correspondant. La succession d'étoiles au dessus de l'orf2 dans la construction 4 indique la présence des 15 mutations faux sens.

- Questions 8 - a)** Les protéines ont-elles été extraites en condition native ou dénaturante ? Justifiez.
b) Que va refléter l'activité spécifique de la β -galactosidase dans cette expérience ?

Question 9 - Que concluez-vous des résultats obtenus avec les trois premières constructions ?

Question 10 - Quelle information supplémentaire vous apportent les résultats obtenus avec la construction 4 quant au rôle de l'orf2 dans la régulation de l'expression de *plcA* ?

Question 11 - Quelles hypothèses pouvez-vous émettre quant au rôle possible du peptide codé par orf2 (PlcR2) dans le contrôle de l'expression des gènes *plc* par PlcR1 ?

Des expériences non détaillées ici ont permis de montrer qu'une délétion de l'orf2 au locus *plcR* n'avait aucune conséquence sur la quantité de protéine PlcR1 accumulée.

Question 12 - Ces données vous permettent-elles de préciser la réponse donnée à la question 12 ? Expliquez.

Enfin, des expériences d'empreintes à la DNase I sur le promoteur du gène *plcA* ont été réalisées. Elles sont présentées Figure 4.

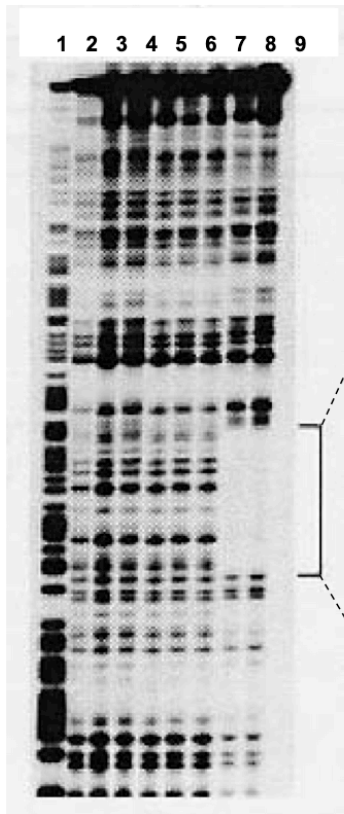


Figure 4 : Empreintes à la DNase I dans la région promotrice de *plcA*.

Piste 1 : réaction de séquence de Maxam et Gilbert

Piste 2 : absence de protéine

Piste 3 : 0,1 µg de PlcR1

Piste 4 : 10 µg de PlcR1

Piste 5 : 20 µg de PlcR2

Piste 6 : 0,1 µg de PlcR1 et 10 µg de PlcR2

Piste 7 : 0,1 µg de PlcR1 et 20 µg de PlcR2

Piste 8 : 10 µg de PlcR1 et 10 µg de PlcR2

Piste 9 : 10 µg de PlcR1 et 20 µg de PlcR2

Questions 13 - a) Donnez le principe général de ce type d'expériences (sans rentrer dans les détails).

b) Pourquoi la technique d'amorçage au hasard ("random priming") n'est-elle pas appropriée pour le marquage radioactif du fragment d'ADN utilisé (ici, le promoteur *plcA*) dans ces expériences ?

c) Comment une telle sonde (utilisable dans une expérience d'empreinte) peut-elle être générée ?

Questions 14 - Interprétez les résultats obtenus.