

Enseignement de L3

UE de Biologie Moléculaire (DLSV303)

Épreuve de Biologie Moléculaire - 2nde session – Juin 2020

Durée 2 heures

Documents Interdits

ATTENTION : Les questions de cours sont à rédiger sur des copies d'examen séparées de l'exercice de TD. **Chaque étudiant doit rendre impérativement 2 copies, même si l'une des deux est une copie blanche. N'oubliez pas de reporter votre numéro d'anonymat sur la deuxième copie !**

Questions de cours (8 points) :

Chaque question demande une réponse concise dans un français correct.

Question 1

Les ADN-polymérase, ARN-polymérase et l'ADN-ligase sont toutes des enzymes dont le rôle est de faire des liaisons phosphoesters.

Pourquoi les ADN- et ARN-polymérase sont-elles ATP-indépendantes alors que l'ADN-ligase est ATP-dépendante ?

Question 2

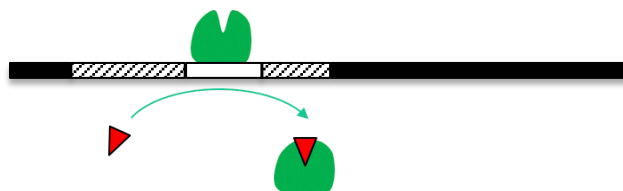
Pour une molécule d'ADN circulaire, le nombre d'enlacements (Lk) est égal à la somme du nombre de tours d'hélice (Tw) et du nombre de surenroulements (Wr) : $Lk = Tw + Wr$.

Lesquels de ces paramètres sont-ils affectés par l'action :

- a) d'une topoisomérase ?
- b) d'une hélicase ?

Question 3

Le schéma ci-dessous présente un facteur protéique fixé sur un promoteur. Le triangle est un ligand de ce facteur. Selon la nature du facteur, on peut avoir des effets opposés sur l'expression du gène. Expliquez lesquels.



Question 4

Le schéma ci-dessous présente un fragment de gène comprenant 3 exons.



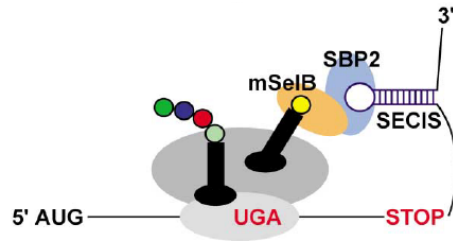
Quel serait l'effet sur la phase de lecture d'un saut de l'exon central? Pourquoi?

Question 5

Pourquoi l'unité de transcription d'un gène ne peut-elle commencer par un intron?

Question 6.

La figure ci-dessous présente un système de régulation de la terminaison de traduction. Expliquez ce qui se passe au niveau du codon UGA et l'effet de cette action sur la traduction.



Question 7

Dans le schéma ci-dessus, que se passerait-il si l'élément SECIS n'était pas présent?

Question 8

Quel est l'effet d'un dérapage répliatif dans une séquence microsatellite?

SUJET DE TD (13 points/20) :

Première partie : Rôle du produit du gène *X* dans le contrôle des voies de biosynthèse des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il a été mis en évidence que de nombreuses enzymes appartenant à différentes voies de biosynthèse d'acides aminés présentent une augmentation de leur activité en condition de carence en acides aminés. Ceci est le cas, par exemple, de l'arginosuccinate lyase (produit du gène *ARG4*), de la tryptophane synthétase (produit du gène *TRP5*), et de l'imidazole-glycérol-phosphate-déshydratase (codée par le gène *HIS3*), enzymes impliquées respectivement dans les voies de biosynthèse de l'arginine, du tryptophane et de l'histidine. Il apparaît donc qu'il existe, chez cet organisme, une régulation généralisée des voies de biosynthèse des acides aminés. Le gène *X*, que nous allons étudier dans les expériences décrites ci-dessous, intervient dans cette régulation.

Expérience 1 :

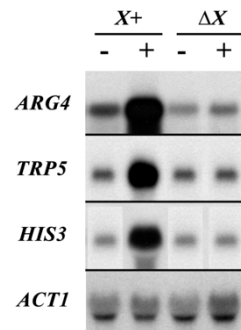
Une souche sauvage de *S. cerevisiae* (notée X^+) et une souche dont le gène *X* a été inactivé (notée ΔX) ont été cultivées en présence ou en absence de 3-amino-1, 2, 4- triazole (3AT). Le 3AT bloque la synthèse de l'histidine, ce qui mime une condition de carence en acides aminés. Un northern-blot a été réalisé et hybridé avec des sondes issues des gènes *ARG4*, *TRP5* et *HIS3*. Une quatrième sonde a été également utilisée, correspondant au gène de l'actine (gène *ACT1*), dont l'expression n'est pas influencée par la présence du 3AT. L'autoradiogramme est présenté Figure 1.

Figure 1 :

Autoradiogramme du northern-blot après hybridation avec les sondes marquées au phosphore 32 correspondant aux gènes *ARG4*, *TRP5*, *HIS3* et *ACT1*.

- : Culture en absence de 3AT.

+ : Culture en présence de 3AT.



Question 1 : Pour réaliser les sondes de ce northern, quelle technique serait la plus adaptée : le marquage en extrémité 5' ou l'amorçage aléatoire ? Pourquoi ?

Question 2 : Quel est l'intérêt de l'hybridation avec la sonde *ACT1* ? Quelle(s) information(s) vous apporte-t-elle dans cette analyse ?

Question 3 : Analysez les résultats obtenus dans le cas de la souche sauvage (X^+). À quel(s) niveau(x) de régulation agirait la carence en acide aminé pour les gènes *ARG4*, *TRP5* et *HIS3* ? D'autres niveaux de régulation pourraient-ils être également impliqués ?

Question 4 : Analysez les résultats obtenus dans le cas de la souche ΔX . Le produit du gène *X* intervient-il positivement ou négativement dans cette régulation ? Justifiez votre réponse.

Expérience 2 :

La protéine Xp, codée par le gène *X*, possède, entre-autre, un domaine de fixation à l'ADN. Un peptide correspondant à ce domaine a été synthétisé et purifié. Il a ensuite été utilisé lors d'expériences de retard sur gel, effectuées sur les promoteurs des gènes *ARG4*, *TRP5* et *HIS3*. L'autoradiogramme est présenté Figure 2.

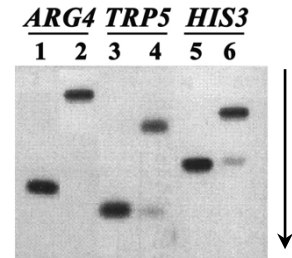
Figure 2 :

Des fragments d'ADN correspondant aux régions promotrices des gènes *ARG4*, *TRP5* et *HIS3* ont été radiomarqués au phosphore 32, puis mis ou non en contact avec le domaine de fixation à l'ADN de la protéine Xp.

Puits 1, 3 et 5 : dépôt de 10 ng de chaque fragment seul.

Puits 2, 4 et 6 : dépôt de 10 ng de chaque fragment en présence de 100 ng du peptide issu de Xp.

Le nom du gène correspondant au fragment utilisé est indiqué en haut des puits. La flèche indique le sens de migration.



Question 5 : Analysez les résultats obtenus.

Question 6 : Quelles expériences supplémentaires faudrait-il réaliser afin de prouver que Xp se fixe de façon spécifique sur ces promoteurs ? Décrivez-les succinctement.

Grâce à des expériences de chromatographie sur colonne d'affinité, il a été mis en évidence une interaction physique entre la protéine Xp et l'ARN polymérase II.

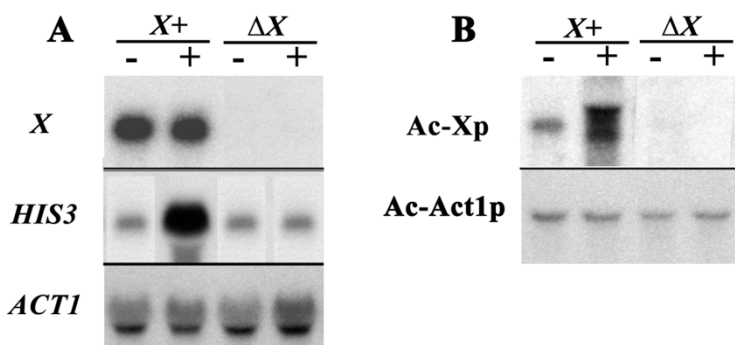
Question 7 : En utilisant cette information ainsi que les données des expériences 1 et 2, quelles conclusions pouvez-vous proposer concernant le rôle et la fonction de la protéine Xp dans cette régulation ?

Seconde partie : Régulation de l'expression du gène *X*.

Expérience A :

La souche sauvage et la souche ΔX ont été cultivées en présence ou en absence de 3AT, puis des échantillons d'ARNs et de protéines ont été extraits afin de réaliser d'une part un northern-blot et d'autre part un western-blot. La membrane de northern a été hybridée avec les sondes *X*, *HIS3* et *ACT1* (Figure 3A), et celle de western a été mise en contact avec un anticorps primaire reconnaissant soit Xp (Ac-Xp) soit l'actine (Ac-Act1p) (Figure 3B).

Figure 3 :



Légende :

A) Northern-blot, hybridé avec les sondes radioactives issues des gènes *X*, *HIS3* et *ACT1*.

B) Western-blot, révélé soit avec l'anticorps primaire Ac-Xp soit Ac-Act1p. Ces deux anticorps issus du rat ont ensuite été eux-mêmes détectés par des anticorps de chèvre anti-anticorps de rat et couplés à une enzyme impliquée dans une réaction chimique libérant des photons.

+ et - indiquent que la culture a été effectuée respectivement avec ou sans 3AT.

Question 8 : Analysez les résultats du northern-blot (Figure 3A). Pourquoi avoir hybridé également cette membrane avec la sonde *HIS3* ?

Question 9 : Les anticorps dirigés contre la protéine Xp sont-ils bien spécifiques ? Pourquoi ?

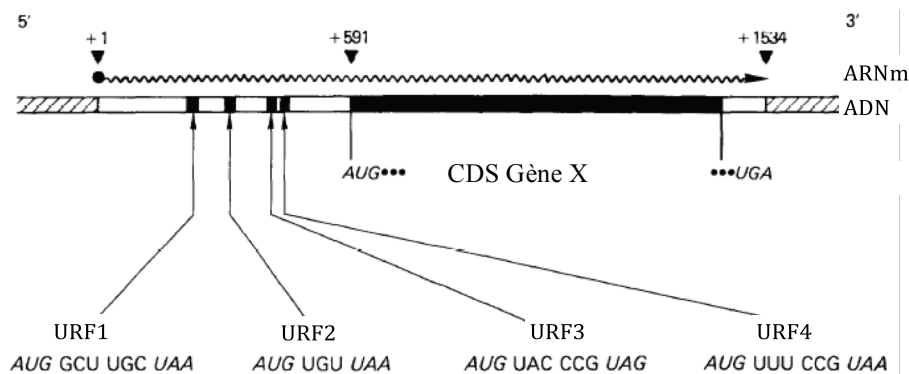
Question 10 : Analysez les résultats du western-blot (Figure 3B).

Question 11 : D'après l'ensemble de ces résultats, que pouvez-vous conclure concernant le(s) niveau(x) de régulation du gène *X* par la carence en acide aminés ?

Expérience B :

L'analyse de la séquence de la région transcrite du gène *X* révèle une région 5' UTR très longue, ce qui est assez inhabituel chez *S. cerevisiae*. Dans ce 5' UTR, 4 petites phases ouvertes de lecture, notées URF1 à URF4 (URF pour Upstream open Reading Frame), ont été mises en évidence (Figure 4). Il a été démontré que l'initiation de la traduction est possible pour chacun des AUG des 4 URFs (aucun ne conduisant à la synthèse de la protéine Xp), les AUG de URF1 et URF4 étant les plus efficaces.

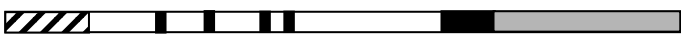
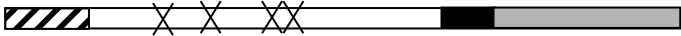
Figure 4 :



La région génomique, l'ARNm et la phase ouverte de lecture (CDS) correspondant au gène *X* sont présentés dans la partie supérieure de ce schéma. La position des URF dans la région 5' UTR est indiquée par de petits rectangles noirs, et leur séquence indiquée en dessous du schéma. Il est rappelé que les codons UGA, UAA et UAG sont des codons stop.

Le cadre de lecture du gène *X* à partir du codon 56 (+756) a été remplacé par la phase ouverte de lecture du gène *lacZ* d'*Escherichia coli* (codant la β -galactosidase). Deux constructions ont été réalisées : la première (notée URFs-X-LacZ) contient le 5' UTR sauvage avec ses 4 URFs fonctionnelles. Par contre, la seconde construction (appelée Δ URFs-X-LacZ) porte une mutation inactivant chacun des AUG pour chacune des 4 URFs. Chacune de ces deux constructions a été introduite (séparément) dans une souche sauvage et l'activité spécifique de la β -galactosidase a été déterminée après culture des levures en présence ou non de 3AT (Tableau I). Il a été vérifié que chacune de ces constructions permet une accumulation identique de l'ARNm *lacZ*.

Tableau I :

Nom de la construction	URF				X			Culture - 3AT	Culture + 3AT
	P _X	1	2	3 4	AUG	56	LacZ		
URFs-X-LacZ								10 ± 0,8	105 ± 10
ΔURFs-X-LacZ								740 ± 45	750 ± 35

P_X : Promoteur de X, représenté par un rectangle avec des hachures obliques. Les URF sauvages et l'ORF de X sont indiquées par des rectangles noirs. L'élimination des URF par mutation de leurs codons AUG est symbolisée par des croix. Le gène *lacZ* est symbolisé par un rectangle gris. Les deux dernières colonnes donnent l'activité spécifique de la β-galactosidase, exprimée en nmole de produit apparu/min/mg de protéines.

Question 12 : Quel est le rôle du gène *lacZ* dans cette expérience ?

Question 13 : Pourquoi est-il important de vérifier que ces constructions n'influencent pas le niveau d'ARNm *lacZ* accumulés ?

Question 14 : Les résultats obtenus avec la construction URFs-X-LacZ sont-ils en accord avec ceux présentés Figure 3 ? Justifiez.

Question 15 : En comparant les données avec celles de la construction URFs-X-LacZ, analysez les résultats obtenus pour la construction ΔURFs-X-LacZ, et ceci dans les deux conditions.

Question 16 : En déduire les rôles que peuvent jouer les quatre URFs dans la régulation de l'expression du gène X, et par voie de conséquence dans la régulation généralisée de la voie de biosynthèse des acides aminés.