

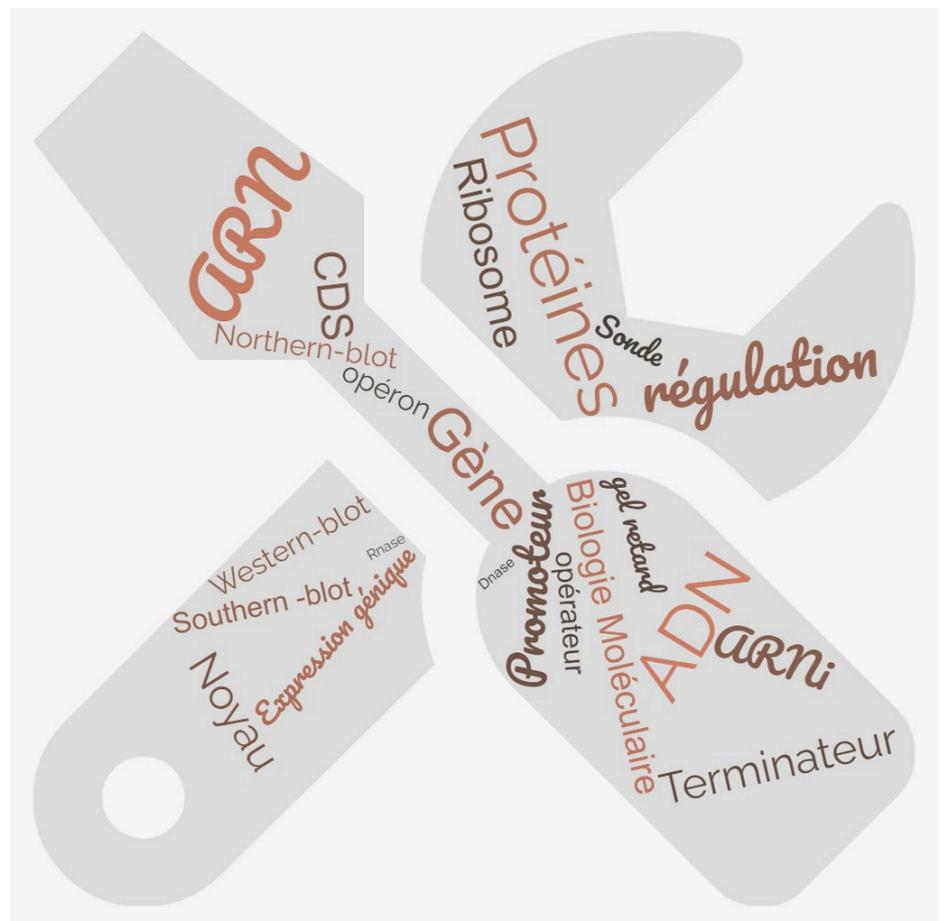
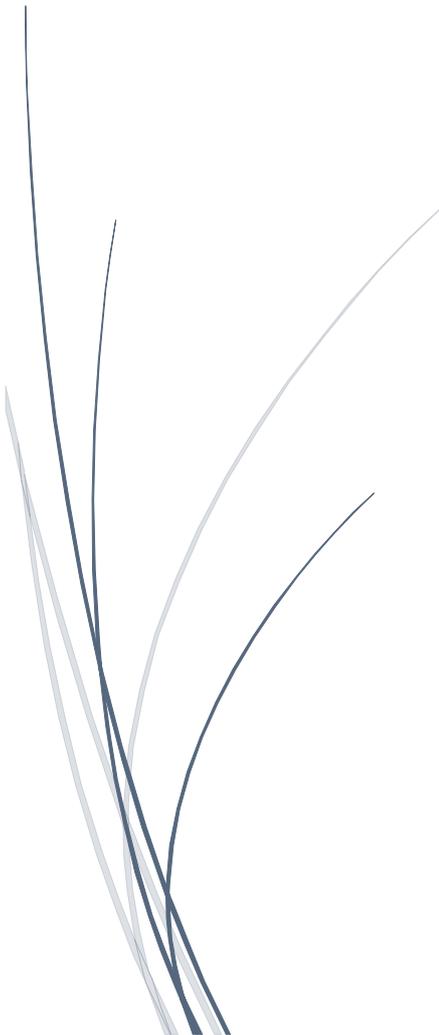
2024-2025

L3 UE OLSV301

Biologie Moléculaire des Génomes

Organisation, Maintien et Expression

Travaux Dirigés et Annexes des Techniques



Équipe enseignante :

<i>Intervenants</i>	<i>Courriel</i>
<i>Khaled Bouhouch</i>	<i>khaled.bouhouch@universite-paris-saclay.fr</i>
<i>Marie-Claire Daugeron</i>	<i>marie-claire.daugeron@universite-paris-saclay.fr</i>
<i>Daniel Gautheret</i>	<i>daniel.gautheret@universite-paris-saclay.fr</i>
<i>Aurore Gorlas</i>	<i>aurore.gorlas@universite-paris-saclay.fr</i>
<i>Pierre Grognet</i>	<i>pierre.grognet@universite-paris-saclay.fr</i>
<i>Nathalie Oestreicher</i>	<i>nathalie.oestreicher@universite-paris-saclay.fr</i>
<i>Christian Vélot</i>	<i>christian.velot@universite-paris-saclay.fr</i>

Responsables :

Daniel Gautheret

Nathalie Oestreicher

Quelques conseils pour la préparation et la résolution des exercices de travaux dirigés de l'UE Biologie Moléculaire

Chaque TD traitant de thématiques précises, il sera donc crucial de connaître au minimum les éléments de cours se reportant à ces thématiques, et de procéder à des recherches complémentaires le cas échéant. Le plus souvent, les TD abordent des expériences scientifiques effectuées par des chercheurs et publiées dans des revues scientifiques à comité de lecture. Les figures et les légendes, bien que simplifiées et traduites en français, reflètent fidèlement la façon dont les scientifiques ont publié leurs résultats. Il est à noter que les connaissances scientifiques à disposition, les approches adoptées et les techniques utilisées changent et évoluent au cours du temps mais la démarche scientifique reste la même.

L'aspect rédactionnel est essentiel dans l'analyse scientifique et peut être enrichi de schémas clairement légendés. Il requiert la maîtrise du vocabulaire scientifique adapté à la discipline étudiée.

Une analyse d'expérience se décline généralement de la façon suivante :

Sa description, son analyse et son interprétation, puis la formulation d'une conclusion et/ou d'hypothèses

I- Description des données observées avec les termes scientifiques adéquats.

Cette 1ère étape présuppose que vous identifiez et connaissiez la technique utilisée pour générer ces données. A savoir, le principe de la technique, ce qu'elle permet d'étudier, les contrôles qu'elle requiert et ses limites. Vous trouverez, dans l'annexe du polycopié, la description détaillée des différentes techniques de biologie moléculaire auxquelles font appel ces TDs. Des fiches détaillées concernant l'analyse de résultats de northern-blot, western-blot et de retard sur gel sont également disponibles sur eCampus dans l'espace dédié à cette UE. A l'issue de cette année, ces techniques doivent être parfaitement assimilées.

II- Interprétations quantitative et qualitative des données décrites avec identification des éléments référents.

Préférez pour cela du vocabulaire précis plutôt qu'approximatif (éviter les "peu, beaucoup, grand, gros, taches...") en utilisant la terminologie adéquate.

III- Formulation d'une conclusion ou d'une série d'hypothèses.

N'omettez pas de mentionner les restrictions éventuelles (incertitudes, contrôles manquants etc.) et d'indiquer, quand c'est possible, les expériences supplémentaires à envisager.

Soyez précis et réfléchissez au sens des termes que vous employez (par exemple, le terme "régule" doit absolument être contextualisé et explicite).

Il est indispensable que vous prépariez vos TDs avant d'assister et de participer aux séances. C'est le seul moyen d'en tirer le maximum de profit et d'acquérir de façon constructive les compétences dans notre discipline

Vous trouverez sur eCampus dans l'espace dédié à cette UE, une version du polycopié agrémentée de bulles d'aide pour chaque TD, ainsi qu'un exemple de TD corrigé.

Vous y trouverez également un sujet d'annale en version corrigée et des sujets à disposition pour vous entraîner.

Si la réussite à l'examen final reste bien sûr l'objectif à atteindre, vous devez avant tout prendre du plaisir.

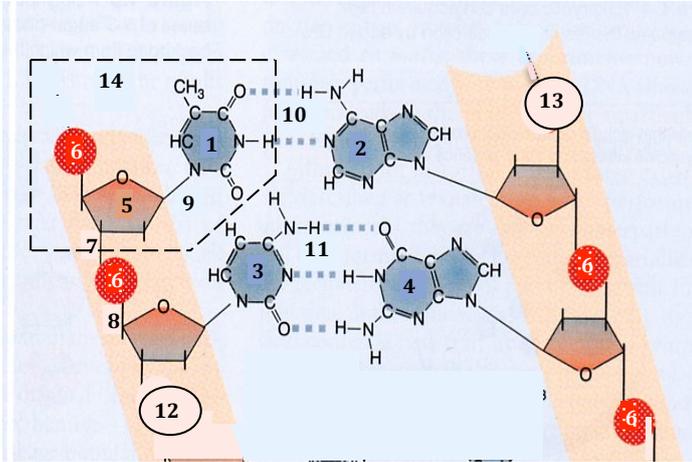
Si la résolution de ces TD nécessite bien évidemment un certain nombre de connaissances incontournables, c'est aussi très souvent une simple question d'observation et de déduction : ayez confiance en vos capacités d'analyse objective.

L'équipe enseignante

TD n°1 : QUIZZ (Révisions L2)

Structure des Acides Nucléiques et Réplication

Questions I :



I – 1 Orientez les chaînes nucléotidiques

I – 2 Donnez le nom des constituants de la molécule d'ADN en position :

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 14

I – 3 Donnez le nom des liaisons en position :

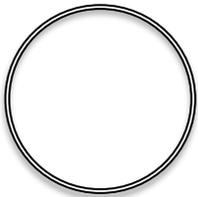
- | | |
|---|-----|
| 7 | 10 |
| 8 | 11 |
| 9 | 7+8 |

I – 4 Nommez les radicaux en position :

- 12
- 13

Questions II :

Sur le schéma ci-dessous, représentant le chromosome d'*Escherichia coli*, indiquez :



II – 1 : Les points d'origine et de terminaison de la réplication.

II – 2 : Le sens d'avancement de la (ou des) fourche(s) de réplication.

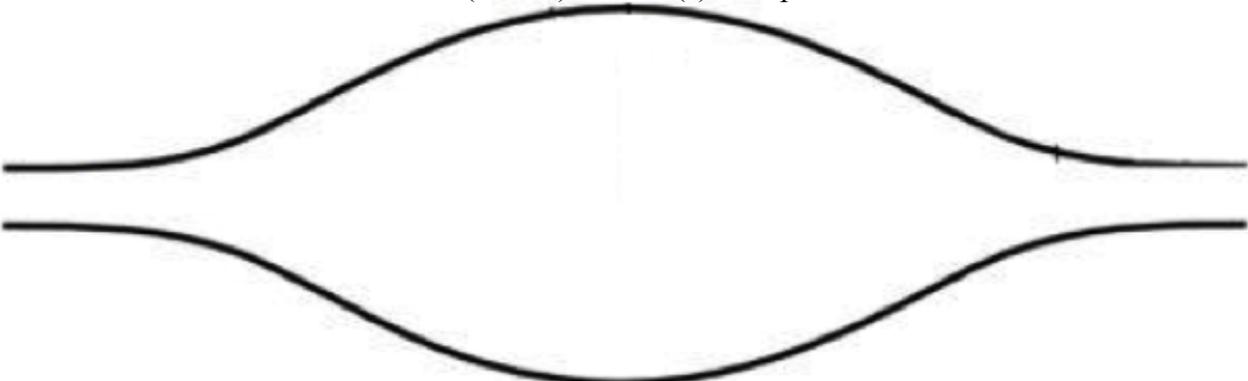
II – 3 : Dans la réalité, l'ADN chromosomique est sous quelle forme topologique ?

Sur le schéma ci-dessous, représentant une portion du chromosome d'*Escherichia coli* en cours de réplication, indiquez :

II – 4 : Les brins en cours de synthèse en distinguant les brins précoces et les brins tardifs. Indiquez également leur orientation (5'→3'), ainsi que celle des brins matrice.

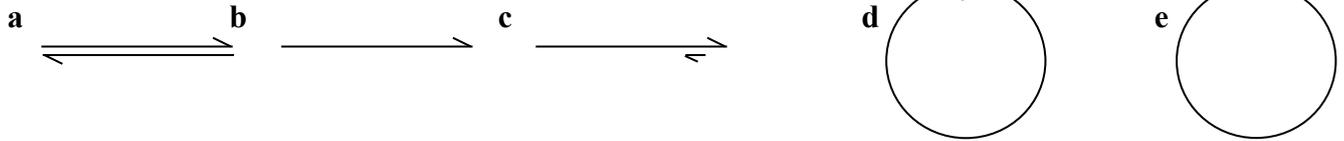
II – 5 : La (ou les) origine(s) de réplication.

II – 6 : Le sens d'avancement de la (ou des) fourche(s) de réplication.



Questions III :

III – 1 : À partir de quelle(s) molécule(s) ci-dessous, une ADN polymérase pourra-t-elle synthétiser le brin ADN complémentaire ?



III – 2 : Quelles sont les activités enzymatiques de l'ADN polymérase I ?

III – 3 : Quel est son rôle au cours de la réplication ?

III – 4 : Quelle est l'activité enzymatique de la ligase ?

III – 5 : Quel est son rôle dans la réplication ?

Transcription et traduction

Questions IV :

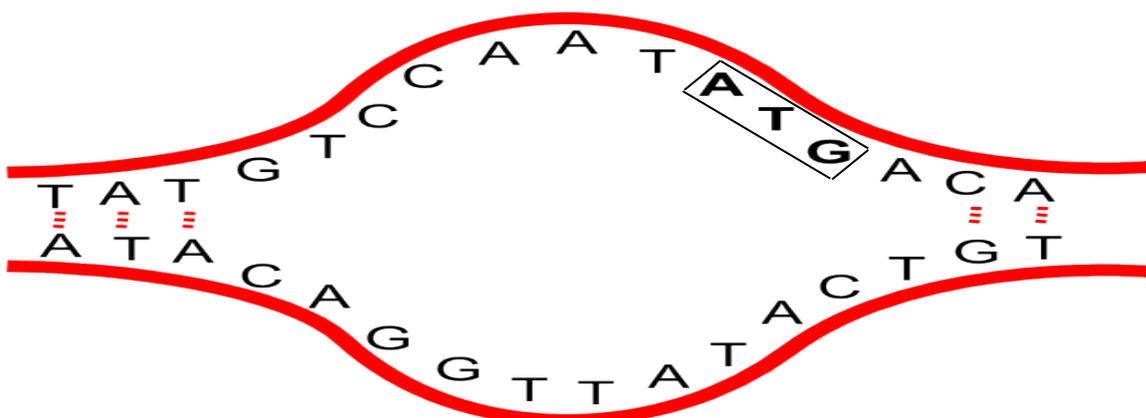
Le schéma ci-dessous représente un ADN double brin en cours de transcription et comprenant le début d'un cadre ouvert de lecture. Le codon ATG a été représenté en gras et encadré. Les pointillés indiquent l'appariement entre les bases.

IV – 1 : Donnez sur le dessin l'orientation 5' - 3' de chaque brin.

IV – 2 : Donnez (ci-dessous) la définition de « brin matrice » et identifiez-le sur le schéma.

IV – 3 : Dessinez le brin d'ARN transcrit occupant toute la partie non appariée de cette région, en donnant sa séquence.

IV – 4 : Indiquez les extrémités 5' et 3' de l'ARN et le sens de transcription.



Questions V :

Les questions 1, 2 et 3 concernent les deux schémas A et B ci-dessous, la question 4 uniquement le schéma B.

V – 1 : Indiquez sur l'ADN les signaux nécessaires à la transcription et représentez le (ou les) ARN(s) messenger(s) ainsi obtenu(s).

V – 2 : Indiquez sur le schéma du (ou des) ARNm(s) les signaux nécessaires à la traduction en protéine(s). Orientez la molécule d'ARNm en indiquant le 5' et le 3'.

V – 3 : Schématisez la (ou les) protéine(s) obtenue(s)

V – 4 : Indiquez sur le schéma du (ou des) ARN pré-messenger(s) les signaux nécessaires à sa (leur) maturation en messenger. Quelles sont ces modifications ?

A) Structure d'un opéron bactérien :

ADN

	cistron a	cistron b	cistron c	
--	------------------	------------------	------------------	--

↓ Transcription

ARN(s)

↓ Traduction

Protéine(s)

B) Structure d'un gène eucaryote :

ADN

	exon 1	intron 1	exon 2	
--	---------------	-----------------	---------------	--

↓ Transcription

ARN prémessenger

↓ Maturation

ARN messenger

↓ Traduction

Protéine(s)

TD n°2 : MÉTHODOLOGIE

Des chercheurs ont identifié dans la région promotrice du gène *nadA* d'*Aspergillus nidulans* un site de fixation putatif pour un activateur transcriptionnel impliqué dans sa régulation. Afin de vérifier la fonctionnalité de ce site *in vivo*, ils ont créé, à partir du vecteur plasmidique pR, les vecteurs pR-nad⁺ et pR-nad Δ 1 (Figure 1). Le premier contient la version sauvage du gène *nadA* alors que le second contient une version mutée où le site putatif de régulation a été délété. pR est un vecteur intégratif : une fois introduit dans les cellules du champignon il ne peut pas se répliquer de façon autonome, et ne pourra donc s'y maintenir qu'après intégration dans l'ADN chromosomique. Il contient la version sauvage du gène *argB* d'*A. nidulans*, nécessaire à la voie de biosynthèse de l'arginine. Le rôle du gène *argB* dans ce vecteur est double : d'une part il va servir de marqueur de sélection chez ce champignon, et d'autre part, il va permettre l'intégration chromosomique de ce vecteur au locus *argB* par recombinaison homologue.

Chacun de ces deux vecteurs a été introduit dans une souche d'*A. nidulans* par transformation. Les ADN génomiques des transformants ont ensuite été extraits puis analysés par la technique de Southern-blot, le but étant de sélectionner, pour chaque transformation, un transformant possédant une seule copie du vecteur (pR-nad⁺ ou pR-nad Δ 1), celle-ci devant être intégrée au locus *argB*.

Questions 1 :

- Sur quel critère les transformants ont-ils été sélectionnés ?
- Quelle devait donc être la particularité du milieu de sélection et de la souche réceptrice utilisée pour la transformation ?
- Pourquoi est-il important que les vecteurs pR-nad⁺ et pR-nad Δ 1 soient intégrés au même endroit (en l'occurrence le locus *argB*) et en même nombre de copies (en l'occurrence un seul exemplaire) dans les transformants sélectionnés ?

Questions 2 :

- Quels sont le but et le principe de la technique de Southern-blot ?
- Décrivez-en les différentes étapes

Dans la partie annexe, située à la fin de ce polycopié, trois techniques de marquage des acides nucléiques permettant l'obtention de sondes radioactives vous sont présentées : le marquage en extrémité 5', l'amorçage aléatoire et la PCR.

Questions 3 :

- Illustrez à l'aide d'un schéma le protocole expérimental pour chacune des deux premières techniques.
- Quelle est la différence en terme de marquage entre ces deux méthodes ?
- Quel type de marquage aurait votre préférence lors de la réalisation d'un Southern-blot (ou d'un northern-blot) ? Justifiez votre réponse.
- Dans le cas d'une sonde pour un Southern-blot (ou d'un northern-blot), que doit-elle subir avant d'être utilisée ?

Une expérience de Southern-blot, en utilisant une sonde correspondant au gène *argB* (sonde A), a donc été réalisée sur les ADN génomiques des transformants et de la souche réceptrice, après leur digestion soit par l'enzyme *EcoRI*, soit par l'enzyme *PstI*.

- Questions 4 :** En utilisant les cartes de restrictions indiquées Figure 2-A (locus *argB* de la souche réceptrice) et 2-B (intégration au locus *argB* du plasmide pR-nad+ ou Δ1), prédiiez le résultat attendu (nombre de bandes et leur taille) pour ce Southern-blot dans le cas :
- de la souche réceptrice (sans intégration du vecteur pR-nad) ;
 - d'un transformant porteur d'une intégration de pR-nad au locus *argB* ;
 - d'un transformant porteur d'une intégration de pR-nad en dehors du locus *argB* (intégration dite ectopique).

Figure 1 : Vecteurs pR-nad+ ou pR-nadΔ1.

Les gènes *nadA* et *argB*, provenant d'*A. nidulans* sont indiqués respectivement par une flèche grise ou noire, l'orientation du gène étant donnée par le sens de la flèche.

CAT: gène de résistance au chloramphénicol, fonctionnel uniquement chez *Escherichia coli*.

●: Position de l'origine de répliation du vecteur, fonctionnelle uniquement chez *E. coli*.

EcoRI et *PstI*: donnent la position des sites de restriction pour ces différentes enzymes sur le vecteur. Les sites *HindIII* n'ont pas été indiqués.

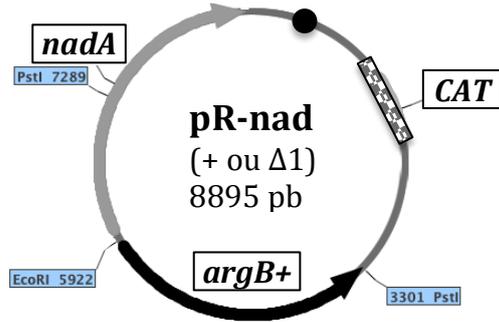
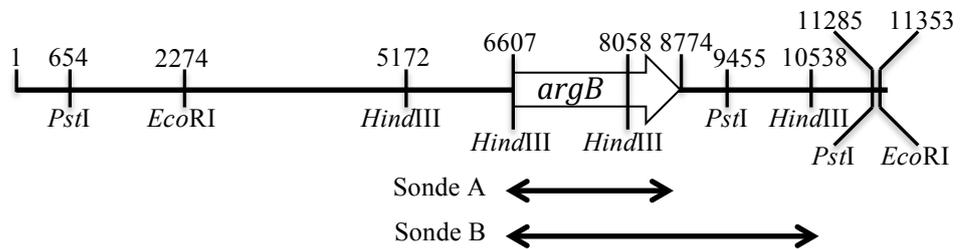


Figure 2-A: Région du chromosome III autour du Locus *argB* (souche réceptrice).

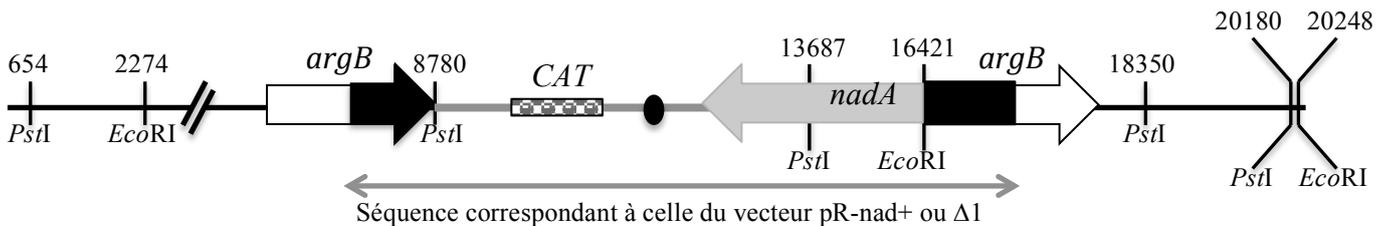


⇒ Gène *argB*, le sens de transcription est donné par celui de la flèche.

La position relative des sites de restriction pour les enzymes *EcoRI*, *HindIII* et *PstI* est indiquée sur le schéma.

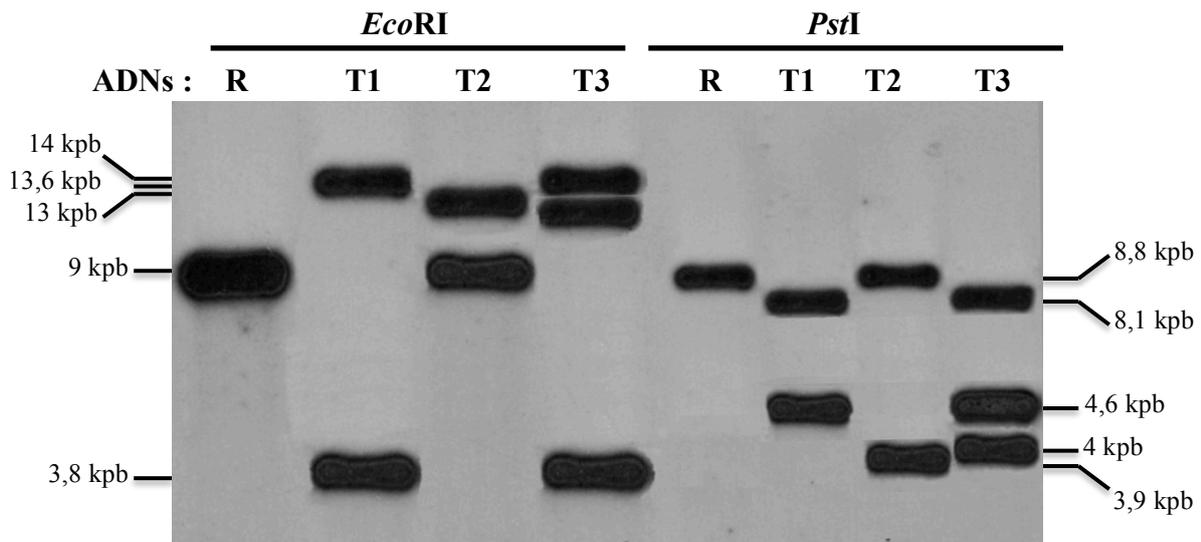
La sonde A correspond au fragment contenant le gène *argB* en entier (allant de 6607 à 8774), identique à celui porté par le vecteur. La sonde B correspond au fragment *HindIII* de 3931 pb (allant de 6607 à 10538).

Figure 2-B: Intégration au locus *argB* d'une seule copie du vecteur pR-nad+ ou Δ1.



Voir légendes Figures 1 et 2-A. Comme pour la Figure 1-A, les sites *HindIII* n'ont pas été représentés.

Figure 3 : Southern-blot effectué sur des ADNs génomiques digérés par *EcoRI* ou *PstI* et hybridés avec la sonde A



R : ADN extrait de la souche réceptrice ; T1, T2 et T3 : ADNs extraits de trois transformants obtenus avec le vecteur pR-nad⁺

Question 5 : En tenant compte de vos prédictions proposées en question 4, analysez le résultat du Southern-blot présenté Figure 3.

Question 6 : Schématisez le résultat attendu (taille et intensité des bandes) pour un Southern-blot réalisé sur la souche réceptrice, après une digestion de son ADN par *HindIII* en utilisant d'une part la sonde A et d'autre part la sonde B (représentées Figure 2A).

Avant l'introduction dans *A. nidulans* du vecteur pR-nad Δ 1, la délétion du site de régulation dans la région promotrice du gène *nadA* a été vérifiée par séquençage en utilisant la méthode de Sanger. Les produits des réactions de séquençage ont été chauffés 5 minutes à 100°C, puis déposés sur un gel de polyacrylamide contenant de l'urée en concentration finale de 6 mol/L. Après migration, une autoradiographie du gel a été réalisée.

Question 7 : En utilisant comme matrice, la séquence suivante : $3' \text{AATCGGGCATTCCAGTGCTAGTTGACTTGGACTCAGTGGCTTAATC} 5'$ et comme amorce, l'oligonucléotide : $5' \text{TTAGCCCGTAA} 3'$, expliquez le principe du séquençage de l'ADN selon la méthode de Sanger.

Questions 8 :

- Pourquoi avoir chauffé les échantillons avant leur dépôt sur le gel ?
- Pourquoi utiliser un gel de polyacrylamide et non un gel d'agarose ?
- Quel est le rôle de l'urée dans le gel de séquence ?

TD n°3 : TOPOLOGIE DE L'ADN

Problème 1

L'ADN surenroulé négativement (qui est la forme d'ADN rencontrée pour les plasmides, certains bactériophages et la quasi-totalité des chromosomes bactériens) possède une énergie potentielle qui peut être libérée pour modifier de diverses façons la géométrie de la double hélice.

Les exemples ci-dessous illustrent des utilisations possibles de cette énergie.

On considère un plasmide de 4320 pb dans les conditions standard (25°C ; pH 7,0 ; NaCl 0,1 M). Ce plasmide est surenroulé négativement, avec un vrillage (W_r) de -25 et un nombre d'enlacements (L_k) de 384. Il contient en outre une séquence répétée $(AT)_{34}$.

Question 1 : Déterminez la valeur de h_0 , nombre de paires de bases par tour d'hélice dans ces conditions physico-chimiques.

A- On relâche, dans les mêmes conditions standard, cet ADN plasmidique par une topoisomérase I. Celle-ci coupe transitoirement l'un des brins de l'ADN pour éliminer des contraintes, puis referme. Dans ce cas, l'énergie de la super-hélice est dissipée pour amener l'ADN dans un état de moindre énergie.

Question 2 : Donnez les valeurs de T_w , L_k et W_r après relaxation complète.

B- Toujours dans les conditions standard on ajoute au plasmide initial (surenroulé négativement) à la concentration de 30 μM (concentration en pb), du bromure d'éthidium (BET) à la concentration finale de 2,4 μM .

Questions 3 : En supposant d'une part que toutes les molécules de BET sont fixées à l'ADN (c'est-à-dire que la constante d'affinité du BET pour l'ADN du plasmide tend vers l'infini et que la concentration de BET est inférieure au seuil de saturation), et sachant d'autre part que chaque molécule de BET détord de 26° la double hélice d'ADN,

- a) calculez le nombre de molécules de BET incorporées par plasmide ;
- b) en déduire les nouvelles valeur de T_w , L_k et W_r .

Questions 4 :

- a) Sous quelle conformation se trouve cet ADN ?
- b) Quelle est la nouvelle valeur de h_0 ?

C- Toujours dans les conditions standard, on sépare les brins du plasmide initial au niveau de sa séquence $(AT)_{34}$ en présence d'une protéine qui stabilise l'ADN simple brin (SSB).

Question 5 : En supposant que la totalité de la séquence $(AT)_{34}$ n'est plus en double hélice, déterminez les valeurs de L_k , T_w et W_r .

Question 6 : Précisez ce à quoi a servi l'énergie de surenroulement dans ce cas, sachant que si l'on tente la même expérience à partir de l'ADN obtenu après action de la topoisomérase I (partie A), les deux brins ne se séparent pas.

Problème 2

Une série d'expériences a été menée sur un plasmide double brin fermé de 5607 pb et isolé à partir d'une culture bactérienne. À chaque fois, les produits de la réaction sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose (contenant ou non un intercalant, voir ci-dessous) (Figure 1). Les électrophorèses sont calibrées de telle sorte que les migrations des produits de réaction puissent être comparées à celle du plasmide natif n'ayant subi aucune réaction (puits A).

Expérience 1

Le plasmide est déposé sur un gel d'agarose contenant du BET en faible quantité (puits B).

Expérience 2

Le plasmide est incubé en présence d'une grande quantité de BET, puis une quantité limitante de DNase I est ajoutée au mélange. Au bout d'une heure de réaction (réaction complète), le BET et l'enzyme sont extraits par du phénol, l'ADN est précipité puis remis en suspension dans une solution de Tris-EDTA, et déposé sur un gel d'agarose (puits C).

Expérience 3

Le plasmide est incubé en présence d'une topoisomérase I pendant une heure (réaction complète) puis déposé sur un gel d'agarose (puits D).

Expérience 4

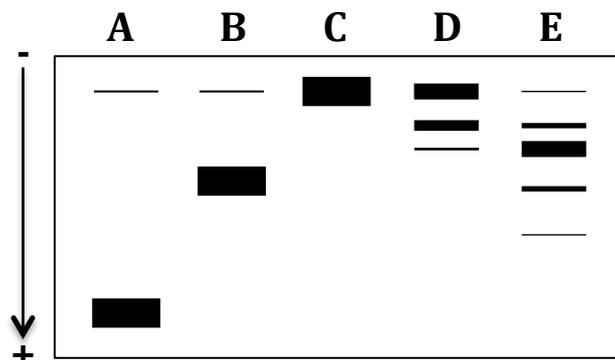
Le plasmide issu de l'expérience 3 (puits D) est déposé sur un gel d'agarose contenant du BET en faible quantité (puits E).

Expérience 5

L'ADN obtenu dans l'expérience 2 est incubé en présence d'une ligase. Les produits de la réaction sont comparables à ceux obtenus lors de l'expérience 3 (puits D). Si, après action de la ligase, l'ADN migre dans un gel comparable à celui utilisé lors de l'expérience 4, le profil obtenu est identique à celui observé dans le puits E.

Figure 1

Résultats des migrations de l'ADN plasmidique natif (A) et après chaque expérience (puits B à E).
La flèche indique le sens de migration.



Question 1 : Expliquez les profils électrophorétiques obtenus dans le puits A et après chacune de ces expériences.

TD n°4 : RÉPLICATION CHEZ LES EUCARYOTES

Étude de la polymérase α :

Chez *Escherichia coli*, l'enzyme responsable de la synthèse des amorces (la primase) a été mise en évidence en 1978, en étudiant la réplication du phage G4. Chez les eucaryotes, en absence, à cette époque, de système modèle de réplication virale, les chercheurs ont dû avoir recours à une autre stratégie.

Expérience 1

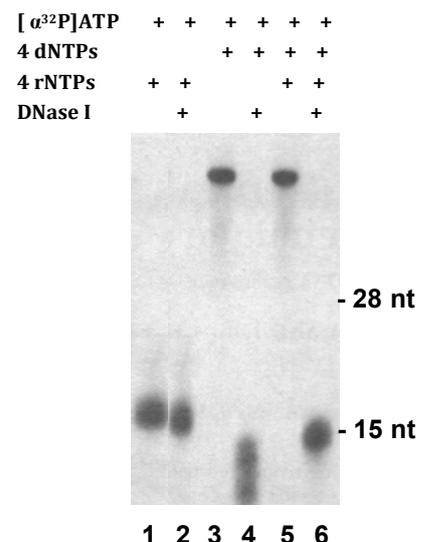
Une synthèse d'ADN a été réalisée en incubant de la polymérase α purifiée avec de l'ADN simple brin (ADN SS) du phage M13 en présence d' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et :

- soit les 4 rNTPs ;
- soit les 4 dNTPs ;
- soit les 4 rNTPs et les 4 dNTPs.

À la fin de la réaction, les produits obtenus ont été traités, ou non, à la DNase I, puis chauffés 5 minutes à 95°C avant d'être séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant de l'urée puis révélés par autoradiographie. Les résultats de l'autoradiogramme du gel sont présentés Figure 1.

Figure 1

Autoradiogramme après séparation sur gel de polyacrylamide/urée des produits synthétisés à partir d'ADN SS de M13 en présence de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (et digérés, ou non, par la DNase I). Les différents éléments contenus dans chacun des mélanges analysés sont indiqués par des + au-dessus des puits correspondants



Questions 1 :

- a) Quelle est l'activité enzymatique de la DNase I ?
- b) Quels sont donc les substrats de cette enzyme ?
- c) Pourquoi ajoute-t-on de l'urée dans le gel polyacrylamide ?

Questions 2 :

- a) Quelles explications peuvent rendre compte des résultats obtenus lorsque seuls les 4 rNTPs sont présents dans le milieu réactionnel (pistes 1 et 2) ?
- b) Quelles explications peuvent rendre compte des résultats obtenus lorsque seuls les 4 dNTPs sont présents dans le milieu réactionnel (pistes 3 et 4) ?
- c) Que pouvez-vous en déduire quant aux produits synthétisés en présence des 4 dNTPs et des 4 rNTPs (pistes 5 et 6) ? Indiquez leurs caractéristiques (taille, nature).
- d) Par conséquent, quelles sont les différentes activités enzymatiques de la polymérase α mises en évidence dans cette expérience ?

Expérience 2

L'ADN polymérase α est un complexe protéique multimérique composé de 4 sous-unités. L'étape finale de purification de cette enzyme, à partir d'extraits d'embryons de drosophile, est une sédimentation en gradient de glycérol. Les activités polymérase et primase des différentes fractions de ce gradient ont été mesurées. Les résultats de ces mesures sont présentés Figure 2.

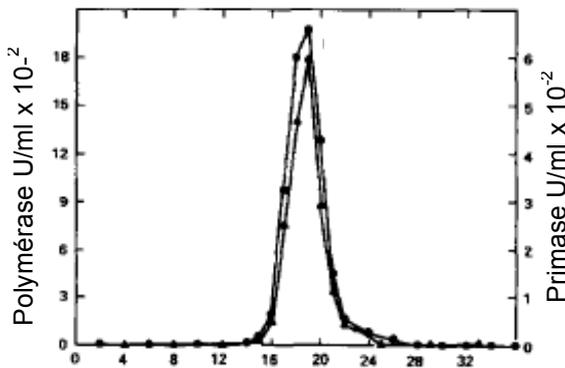


Figure 2

Mesures des activités polymérase (●) et primase (▲) dans les fractions du gradient de glycérol.

En abscisse sont indiqués les N° des fractions du gradient et en ordonnées les mesures d'activité enzymatique

Questions 3 :

- Rappelez le principe de la sédimentation en gradient.
- Que pouvez-vous déduire des résultats observés quant à la répartition des 2 activités au sein du gradient (Figure 2) ? Justifiez.
- Quelle technique utiliseriez-vous pour déterminer le contenu protéique des différentes fractions du gradient ?
- Afin de déterminer si les activités polymérase et primase sont séparables, quelle expérience supplémentaire feriez-vous ?

Étude de la télomérase :

La terminaison de la réplication chez les eucaryotes nécessite l'intervention de télomérases qui empêchent le raccourcissement des chromosomes à chaque cycle cellulaire.

Question 4 : Pourquoi cette problématique est-elle plus spécifique aux eucaryotes ?

Les télomérases sont des polymérases non conventionnelles qui synthétisent *de novo* l'ADN télomérique. Les télomérases sont qualifiées de ribonucléoprotéines car elles sont constituées de protéines et d'un ARN.

Afin d'étudier la fin de la réplication, plusieurs expériences se sont focalisées sur le fonctionnement de la télomérase chez le Protiste cilié *Tetrahymena thermophila*. Chez *Tetrahymena*, les télomères sont constitués de la répétition d'un motif TTGGGG. Deux modèles du fonctionnement enzymatique de la télomérase se sont opposés jusqu'au début des années 90 : le modèle processif et le modèle distributif illustrés, respectivement, sur les schémas a et b de la Figure 3.

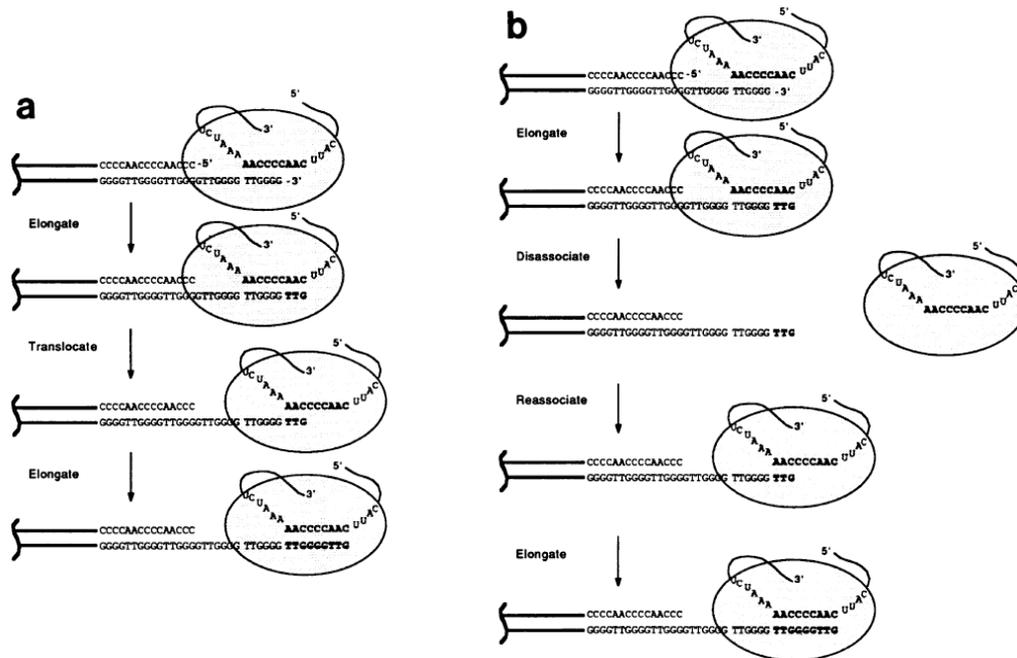


Figure 3

- a) Modèle processif de l'activité ADN-polymérase ARN-dépendante de la télomérase : la télomérase ne quitte pas l'extrémité chromosomique tant qu'elle n'a pas terminé tous les ajouts en tandem de la séquence télomérique.
- b) Modèle distributif de l'activité ADN-polymérase ARN-dépendante de la télomérase : la télomérase commence à mettre en place des ajouts en tandem de la séquence télomérique (deux premières lignes), puis quitte son extrémité chromosomique (3ème ligne) pour aller agir sur un autre chromosome (deux dernières lignes).

Expérience A

Afin de trancher entre ces deux modèles (processif ou distributif), une expérience d'élongation des substrats initiaux par la télomérase, en présence ou non d'oligonucléotides compétiteur, a été réalisée.

La télomérase est tout d'abord incubée pendant 2 min à température adéquate dans un mélange réactionnel contenant de l'oligonucléotide d(TTGGGG)₄ en excès, du [α^{32} P] dGTP et du dTTP. Au bout des 2 min, une fraction aliquote est prélevée pour analyse et le reste de la réaction est dilué 30 fois soit avec la solution 1, soit avec la solution 2. L'incubation est alors poursuivie. Des fractions aliquotes sont prélevées pour analyse après 3 min, 4 min et 10 min d'incubation.

- Solution 1 : 10 μ M dGTP, 10 μ M dTTP et un oligonucléotide d(TTGGGG)₄ en excès
- Solution 2 : 10 μ M dGTP, 10 μ M dTTP.

L'analyse des différents échantillons est faite par électrophorèse en gel d'agarose suivie d'une autoradiographie. Les résultats sont présentés Figure 4.

Questions 5 :

- a) Que signifie la notion de processivité et de distributivité pour le fonctionnement d'une enzyme ?
- b) Quelles molécules sont produites au cours de la première incubation de 2 min ? *Vous pouvez faire un schéma pour illustrer votre réponse.*
- c) Quelles molécules sont produites après dilution ? *En partant de votre schéma précédent, schématisez l'évolution des produits obtenus après dilution selon que votre enzyme serait distributive ou processive.*
- d) Que peut-on conclure de ces profils de migration quant à la processivité ou la distributivité de la télomérase ?

Figure 4

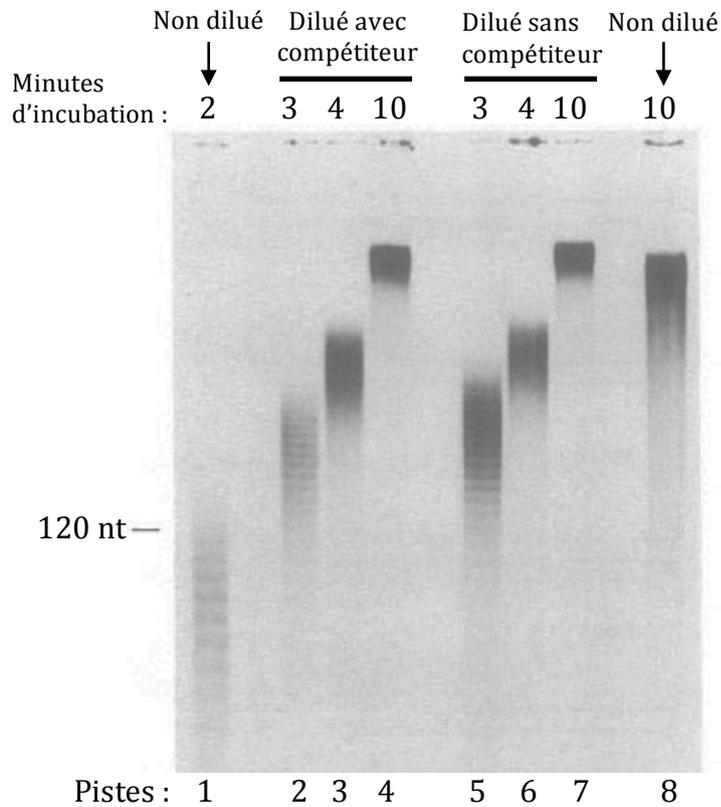
Autoradiographie après séparation sur gel d'agarose.

Piste 1 : produits obtenus après la première incubation de 2 min du mélange réactionnel.

Pistes 2, 3 et 4 : produits obtenus après dilution du mélange réactionnel dans la solution 1 (contenant l'oligonucléotide compétiteur), suivie d'une incubation de 3, 4 et 10 min.

Pistes 5, 6 et 7 : produits obtenus après dilution du mélange réactionnel dans la solution 2 (sans compétiteur) et son incubation pendant 3, 4 et 10 min.

Pistes 8 : produits obtenus après incubation du mélange réactionnel initial (non dilué) pendant 10 min.



Expérience B

La fixation de la télomérase à des oligonucléotides $d(\text{TTGGGG})_n$ a été étudiée en suivant l'élongation en présence de $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ et du ddGTP . Un tel mélange permet l'ajout de seulement 3 résidus : dT, dT et ddG au substrat. Les oligonucléotides $d(\text{TTGGGG})_2$, $d(\text{TTGGGG})_3$, $d(\text{TTGGGG})_4$ et $d(\text{TTGGGG})_8$ sont mélangés en quantité équimolaire. Les échantillons sont incubés durant différents temps puis analysés par électrophorèse sur gel de séquençage. Les résultats sont présentés Figure 5.

Questions 6 :

- Pourquoi le ddGTP arrête la réaction d'élongation ?
- Quelle est la résolution d'un gel de séquençage ?
- La télomérase se fixe-t-elle préférentiellement sur un type d'oligonucléotide ?
- Qu'apporte cette expérience par rapport à la précédente ?

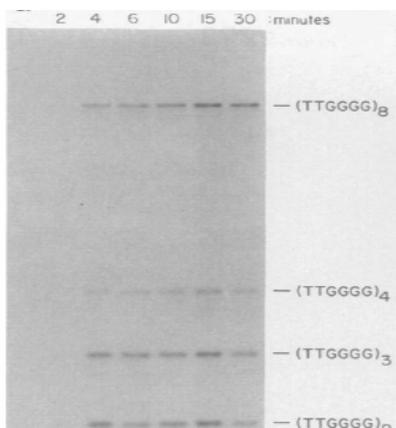


Figure 5

Les oligonucléotides $d(\text{TTGGGG})_2$, $d(\text{TTGGGG})_3$, $d(\text{TTGGGG})_4$ et $d(\text{TTGGGG})_8$ sont mélangés en quantité équimolaire, incubés avec la télomérase en présence de $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ et du ddGTP pendant 2, 4, 6, 10, 15 et 30 minutes. Les mélanges sont ensuite chargés sur un gel de séquençage. Au bout de 4 min, l'intensité (I) en niveau de gris pour les différents oligonucléotides est :

$$\begin{aligned} I [d(\text{TTGGGG})_2] &= 1,5 \times 10^5 \\ I [d(\text{TTGGGG})_3] &= 2,8 \times 10^5 \\ I [d(\text{TTGGGG})_4] &= 1,2 \times 10^5 \\ I [d(\text{TTGGGG})_8] &= 2,4 \times 10^5 \end{aligned}$$

TD n°5 : RÉPLICATION ET RÉPARATION

Radiolésions au niveau des fourches de réplication

Les rayonnements ultraviolets (UV) sont responsables de la grande majorité des effets délétères liés à l'exposition solaire en induisant différents types de lésions dans l'ADN. La plupart de ces radiolésions bloque la progression des ADN polymérasés répliquatives. Les cellules ont donc développé des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire leur permettant de réparer leur ADN avant que la réplication ou la division cellulaire ait lieu. Néanmoins, l'ADN contenant certains dommages touchant un seul brin (simple brin) peut être répliqué sans réparation préalable.

Questions 1 :

- a) Quels sont les principaux types de lésions simple brin engendrées par les rayons UV ?
- b) Quelles sont leurs conséquences sur la structure de l'ADN double brin ?

Les individus atteints du syndrome de *Xeroderma pigmentosum* (XP) présentent une hypersensibilité à la lumière du soleil et ont une prédisposition génétique au cancer de la peau induit par les UV. Contrairement aux formes classiques de XP déficientes pour la voie de réparation par excision de nucléotides (NER), les individus atteints de la classe variante de ce syndrome (appelée XPV) possèdent une voie NER fonctionnelle. Afin d'élucider les mécanismes responsables de la déficience spécifique à la forme XPV, des chercheurs ont mis au point un système d'étude *in vitro* permettant de tester la réplication d'une molécule d'ADN substrat contenant une lésion simple brin typiquement induite par les UV.

I- Construction des ADNs plasmidiques utilisés comme substrats dans le test *in vitro*.

Étape 1: un fragment d'ADN de 230 pb contenant l'origine de réplication du virus simien 40 (SV40) a d'abord été inséré dans le vecteur plasmidique pBS-KS (Figure 1), soit au site de restriction *SacI*, soit au site *KpnI*, générant, respectivement, le vecteur pBS-SVoriA ou pBS-SVoriB.

Étape 2: deux oligonucléotides de 30-mer et 38-mer (Figure 2) ont ensuite été mélangés et hybridés.

Étape 3: le fragment d'ADN résultant de l'étape 2 (suite à l'hybridation) a été inséré dans les vecteurs pBS-SVoriA et pBS-SVoriB préalablement digérés par les enzymes de restriction *PstI* et *HindIII*, générant respectivement le vecteur pBS-SVoriA30 ou pBS-SVoriB30.

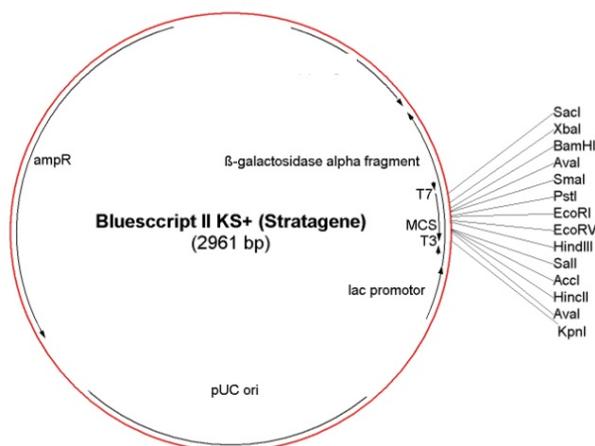


Figure 1 : Carte de restriction du vecteur plasmidique pBS-KS.

Sites de restriction de :

HindIII : A/AGCTT

KpnI : GGTAC/C

PstI : CTGCA/G

SacI : GAGCT/C

Figure 2 : Séquences des oligonucléotides utilisés dans la construction des vecteurs pBS-SVoriA30 et pBS-SVoriB30.

30-mer : 5'-CTCGTCAGCATCTTCATCATAACAGTCAGTG-3'
38-mer : 5'-AGCTCACTGACTGTATGATGAAGATGCTGACGAGTGCA-3'

Deux autres vecteurs (appelés pBS-SVoriA(CPD) et pBS-SVoriB(CPD)) ont été construits de la même façon, mais en utilisant une version de l'oligonucléotide de 30-mer contenant un dimère cyclobutanique de pyrimidines (CPD) au niveau des 2 thymines adjacentes soulignées dans la Figure 2.

Questions 2 :

- Schématisez les différentes molécules obtenues à chaque étape du protocole de construction des substrats d'ADN. En particulier, donnez la séquence du fragment d'ADN obtenu à l'étape 2.
- Quelles sont les caractéristiques de ses extrémités ?

Questions 3 :

- Schématisez la fourche de réplication à partir de l'ori SV40 (réplication bidirectionnelle).
- Sur quel brin matrice de la réplication, la fourche va-t-elle rencontrer la lésion CPD selon le type de vecteur pBS-SVoriA(CPD) ou pBS-SVoriB(CPD) ?

II- Test de réplication *in vitro* des substrats d'ADN :

Les substrats d'ADN ainsi obtenus ont été incubés avec des extraits cellulaires préparés à partir de fibroblastes, issus d'individus non malades ou de patients atteints du XP-V, dans un mélange réactionnel contenant :

- 40 mM de tampon Tris-phosphate (à pH 7,7) ;
- 7 mM de MgCl₂ ;
- 4 mM d'ATP, 200 µM de CTP, GTP et UTP ;
- 20 µM de [α -³²P] dCTP ;
- 100 µM de dATP, dGTP, dTTP et dCTP ;
- 10 mM de DTT (dithiothreitol) ;
- en présence ou non de 40 µg/ml de l'antigène T* de SV40.

Après incubation à 37°C pendant 1 heure, la réaction a été arrêtée par addition d'EDTA. Les mélanges ont ensuite été traités à la ribonucléase A de pancréas de bœuf pendant 5 min à 37°C, puis avec de la protéinase K pendant 1 heure en présence de SDS. L'ADN a enfin été purifié et remis en suspension dans un tampon Tris-HCl à pH 8. Les échantillons ont été divisés en 2 tubes, l'un traité avec l'endonucléase V** du phage T4, l'autre non, puis analysés par électrophorèse en gel d'agarose, suivie d'une exposition, révélation et autoradiographie. Les résultats de cette expérience sont présentés Figure 3.

* L'antigène T de SV40 contient un domaine qui interagit spécifiquement avec plusieurs séquences pentamériques présentes dans l'ori SV40 et possède une activité hélicase.

** L'endonucléase V du phage T4 introduit une coupure spécifique (simple brin) au niveau de la lésion CPD, mais uniquement sur de l'ADN double brin.

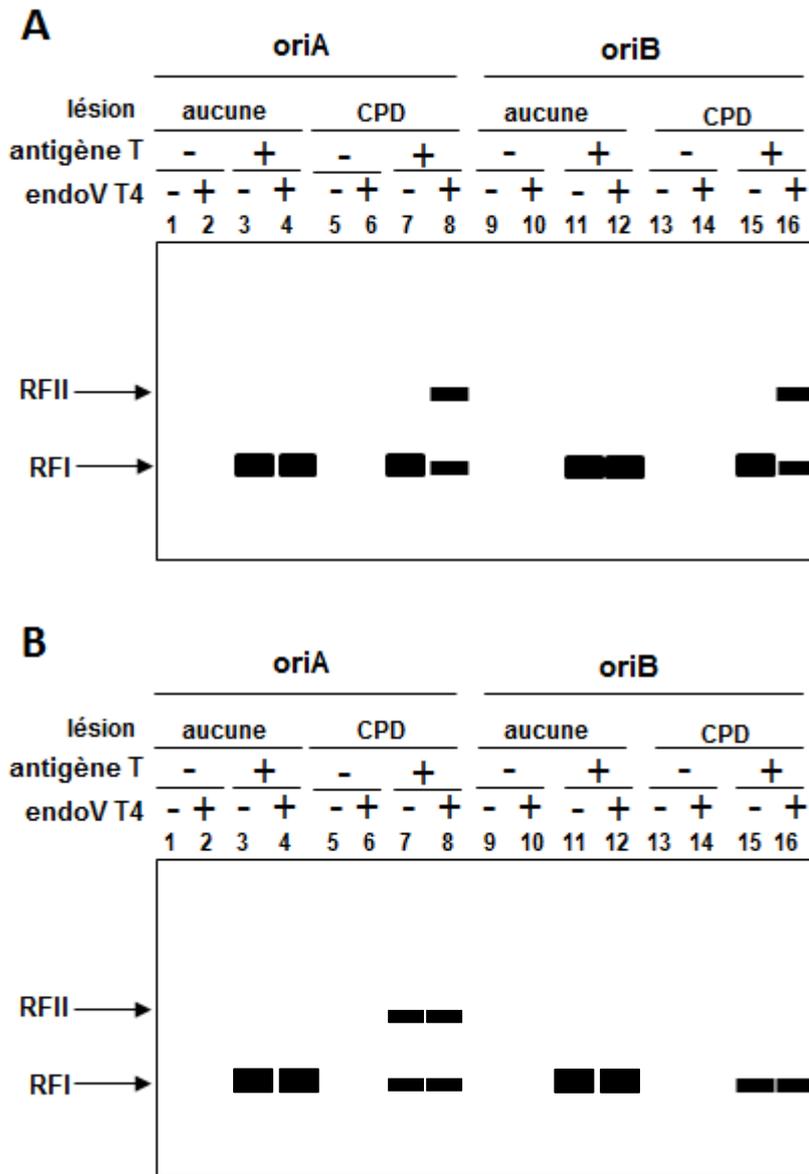


Figure 3 : Autoradiogramme du gel d'agarose réalisé pour analyser les produits issus du test de réplication *in vitro* effectué soit avec des extraits de fibroblastes issus d'individus non malades (**A**), soit avec des extraits de fibroblastes de patients atteints de XP-V (**B**). Les tests ont été réalisés soit en l'absence (puits 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 et 14), soit en présence de l'antigène T (puits 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 et 16). Les substrats utilisés étaient pBS-SVoriA30 (sans lésion; puits 1 à 4), pBS-SVoriA (CPD) (puits 5 à 8), pBS-SVoriB30 (sans lésion, puits 9 à 12) et pBS-SVoriB(CPD) (puits 13 à 16).

Questions 4 :

- Quels sont les rôles respectifs des différents composants du mélange réactionnel ?
- Pourquoi les produits de la réaction sont-ils traités à la ribonucléase A, puis à la protéinase K ?

Question 5 : Quel(s) mécanisme(s) veut-on tester dans cette expérience ?

Question 6 : Sachant que dans les conditions expérimentales utilisées, un seul cycle de réplication peut être effectué, schématisez les différentes molécules obtenues avec ces 4 vecteurs et estimez leur proportion dans le cas où la lésion CPD est répliquée, et dans le cas où elle ne l'est pas.

Questions 7 :

- a) Pourquoi traite-t-on la moitié des échantillons par l'endonucléase V de T4 ?
- b) Quel effet cette enzyme a-t-elle sur la forme des molécules présentes dans les mélanges réactionnels ?

Il est rappelé que RFI indique une forme circulaire surenroulée, tandis que RFII indique une forme circulaire relaxée (en raison de la cassure d'un seul brin : « *open circle* »).

Questions 8 :

- a) Que visualise-t-on sur l'autoradiogramme ?
- b) À quoi servent les expériences effectuées en l'absence d'antigène T ? Quelle information apportent-elles ?
- c) Sachant que dans ces tests, la réparation de la lésion CPD par le NER n'est pas possible (car trop lente par rapport au temps d'incubation), comment expliquez-vous les résultats observés en utilisant des extraits de fibroblastes issus d'individus non malades avec les substrats d'ADN contenant la lésion CPD ?

Questions 9 :

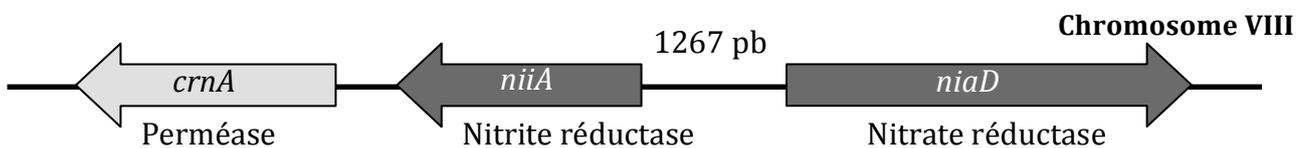
- a) Comparez les résultats obtenus en utilisant des fibroblastes de patients atteints de XP-V (Figure 3B) avec ceux obtenus en utilisant des fibroblastes d'individus non malades (Figure 3A).
- b) La position de la lésion CPD par rapport à ori SV40 a-t-elle un effet ? Comment l'expliquer ?
- c) D'après ces résultats, quelle activité est déficiente chez les individus atteints de la forme variante XP-V ?

TD n° 6 : RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE

Étude du catabolisme du nitrate chez *Aspergillus nidulans*

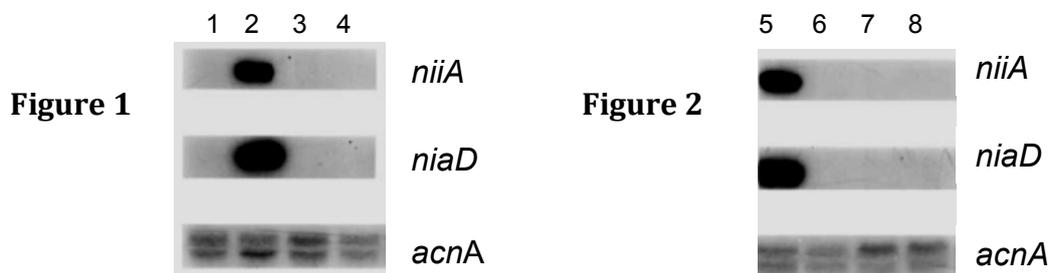
Chez les champignons filamenteux, dans un certain nombre de cas, des gènes impliqués dans une voie métabolique particulière sont regroupés dans une région chromosomique donnée : on dit qu'ils sont organisés en "cluster" (à ne pas confondre avec un opéron bactérien). Dans certains de ces clusters, des gènes peuvent être transcrits de manière divergente à partir d'un promoteur unique **bidirectionnel** qui permet leur contrôle transcriptionnel.

Les deux enzymes et la perméase impliquées dans l'utilisation du nitrate comme source d'azote chez le champignon *A. nidulans* sont codés par trois gènes organisés en "cluster" sur le chromosome VIII. Les deux enzymes, nitrate réductase et nitrite réductase sont codés respectivement par *niaD* et *niiA*, deux gènes adjacents. Ces gènes sont transcrits de manière divergente et sont séparés par une région de 1267 pb. Le gène codant la perméase, *crnA*, est en 3' du gène *niiA* et est transcrit dans la même direction que celui-ci. Deux régulateurs de l'expression des gènes *niaD* et *niiA* ont été identifiés : l'un codé par le gène *nirA*, l'autre par le gène *areA*.



A. Expression des gènes *niaD* et *niiA*

Les mycelia de *A. nidulans* (souche sauvage) ont été cultivés sur des milieux contenant comme source d'azote, soit de l'urée (source d'azote neutre : ni inductrice ni répressive) (1), soit du nitrate (2), soit à la fois du nitrate et de l'ammonium (3) soit de l'ammonium seul (4). Les ARN totaux ont été isolés et analysés par northern-blot en utilisant, comme sondes, une séquence du gène *niaD*, une séquence du gène *niiA* ou une séquence du gène *acnA* codant l'actine. Les résultats obtenus sont présentés Figure 1. Le northern-blot présenté Figure 2 a été réalisé à partir d'ARN totaux extraits d'une souche sauvage (5), de deux mutants *nirA* (perte totale de fonction du gène) (6 et 7) et d'un mutant *areA* (perte totale de fonction du gène) (8). Ces différentes souches ont été cultivées en présence de nitrate (c'est-à-dire dans les mêmes conditions que pour la piste 2 de la Figure 1).



Question 1 : Décrivez une méthode de marquage d'un fragment d'ADN pour fabriquer une sonde pour un northern-blot (ou un Southern-blot).

Question 2 : Quelles sont les étapes principales de la technique du northern-blot ?

Question 3 : Pourquoi une hybridation avec la sonde actine (*acnA*) a-t-elle été effectuée ?

Questions 4 :

- a) Analysez les résultats obtenus Figure 1.
- b) Que peut-on conclure sur les conditions d'expression des gènes *niaD* et *niiA* dans la souche sauvage ?

Questions 5 :

- a) Analysez les résultats présentés Figure 2.
- b) Que peut-on conclure sur le rôle des produits des gènes *nirA* et *areA* dans le contrôle de l'expression des gènes *niaD* et *niiA* ?

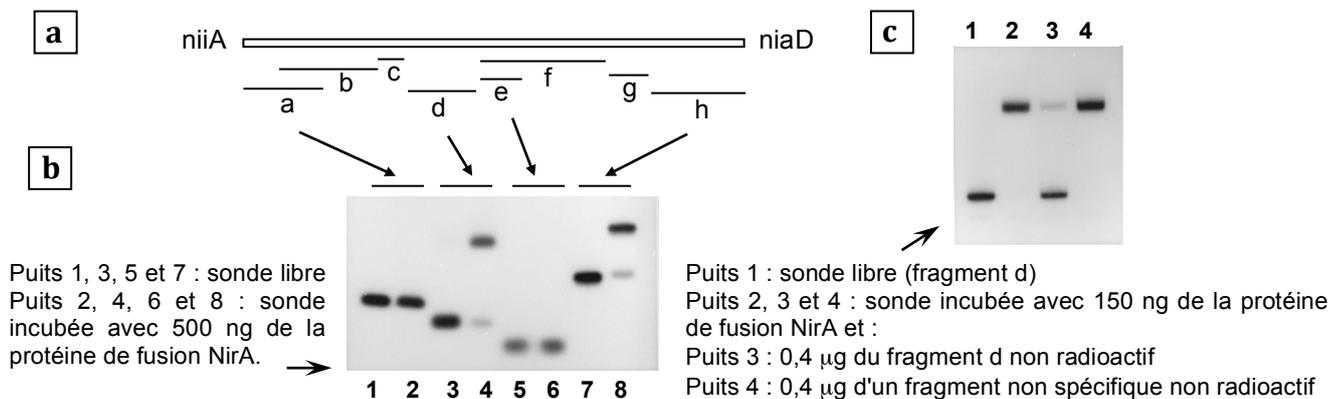
B. Identification *in vitro* des sites de liaison du facteur de transcription NirA dans la région intergénique *niaD-niiA*

Le gène *nirA* a été caractérisé sur le plan moléculaire. Ce gène de 5835 pb contient 4 introns et coderait un polypeptide de 892 acides aminés. Un motif putatif de fixation du zinc est présent dans la portion N-terminale de la protéine. La structure de ce motif permet de classer la protéine NirA dans la famille des protéines liant l'ADN.

Un peptide contenant le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription NirA (résidus 1 à 125) a été utilisé pour rechercher les sites de liaison de NirA dans la région intergénique *niaD-niiA* par des expériences de retard sur gel. Pour cela, la région intergénique a été subdivisée en différents fragments. Sur la Figure 3a est indiquée la position de certains des fragments utilisés dans ces expériences (a, b, c, d, e, f, g et h). Les différents fragments ont été marqués au ³²P, incubés en présence ou en absence du peptide NirA (1-125) et déposés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant. La Figure 3b correspond aux résultats obtenus avec 4 de ces fragments (a, d, e, h) après autoradiographie du gel. Les fragments b et g ont donné des résultats similaires à ceux obtenus avec les fragments d et h et les fragments c et f, des résultats similaires à ceux obtenus avec les fragments a et e.

La Figure 3c correspond au résultat d'une expérience de compétition. Pour chaque piste, 10 ng de fragment d, marqué au ³²P, ont été incubés en présence (puits 2, 3 et 4) ou en absence (puits 1) du peptide NirA (1-125). Dans le puits 3, le fragment d'ADN d non radioactif a été ajouté en excès au mélange réactionnel alors que dans le puits 4, c'est un fragment d'ADN non spécifique (de séquence différente de celle du fragment d, mais de même longueur) et non radioactif qui a été ajouté en excès.

Figure 3



- Question 6 :** Donnez le but et le principe d'une expérience de retard sur gel.
- Question 7 :** Analysez les résultats obtenus Figure 3b pour les différents fragments testés.
- Question 8 :** Analysez les résultats obtenus Figure 3c pour les différents mélanges d'incubation.
- Question 9 :** Qu'apporte l'expérience de la Figure 3c vis-à-vis des résultats précédents ? Était-elle, dans ce cas précis, vraiment indispensable ?
- Question 10 :** Sur un schéma de la région intergénique *niaD-niiA*, localisez les sites de fixation pour NirA mis en évidence par cette analyse, en tenant compte également des données du texte.

Les fragments qui ont répondu positivement à l'expérience de retard sur gel ont été utilisés pour des expériences d'empreinte *in vitro* (« Footprinting »). La Figure 4 correspond aux résultats obtenus avec le fragment d.

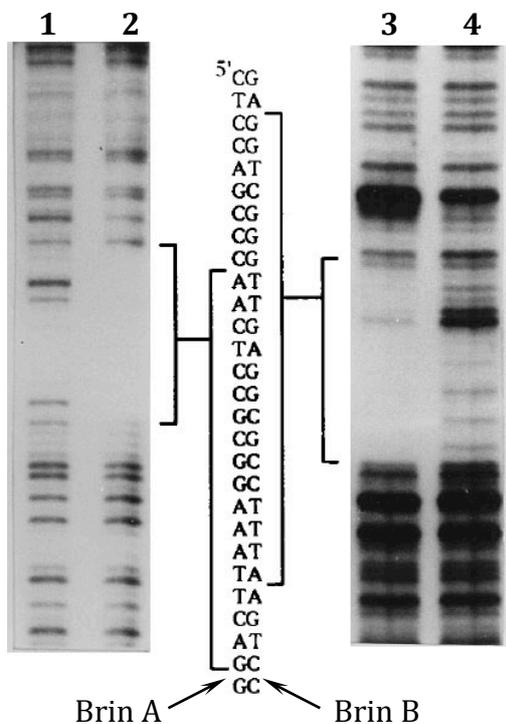


Figure 4

Puits 1 et 2 : "Brin A" (brin codant du gène *niiA*, mais non codant concernant le gène *niaD*).

Puits 3 et 4 : "Brin B" (brin codant du gène *niaD*, mais non codant concernant le gène *niiA*).

Puits 1 et 4 : Digestion à la DNase I de la sonde seule (fragment d).

Puits 2 et 3 : Digestion à la DNase I de la sonde (fragment d) incubée en présence du peptide NirA (1-125).

La fenêtre de protection pour chaque brin est indiquée entre les deux autoradiogrammes.

- Question 11 :** Donnez le principe d'une expérience d'empreinte *in vitro*.
- Question 12 :** Comment est-il possible de visualiser et de distinguer chacun des deux brins A et B ?

Ces expériences d'empreinte *in vitro*, en association avec d'autres méthodes de protection et d'interférence ont permis d'établir la séquence consensus du site de fixation de NirA : **CTCCGHGG** (où H représente soit A, C, ou T, mais jamais G).

TD n° 7 : RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUE

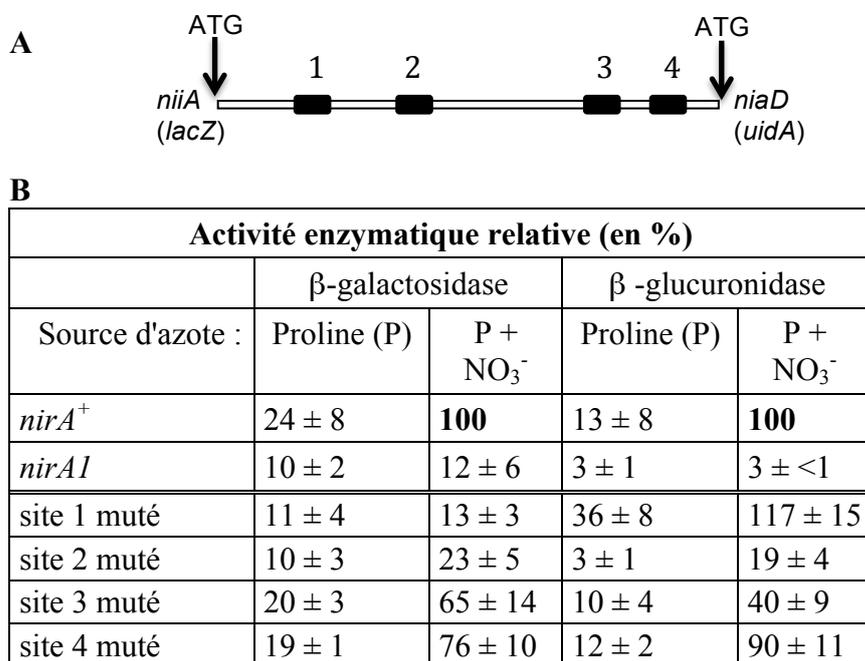
Étude du catabolisme du nitrate chez *Aspergillus nidulans* - Suite

A. Analyse *in vivo* de la fonctionnalité des sites de liaison du facteur de transcription NirA dans la région intergénique *niaD-niiA*.

Pour vérifier la fonctionnalité *in vivo* des sites précédemment identifiés, l'expérience suivante a été réalisée.

La région, comprise entre les deux ATG de *niaD* et *niiA*, a été introduite dans un vecteur plasmidique entre les cadres ouverts de lecture de deux gènes rapporteurs, le gène *uidA* (codant la β -glucuronidase) et le gène *lacZ* (codant la β -galactosidase). La construction ainsi obtenue a été intégrée en une seule copie dans le génome de deux souches d'*A. nidulans* : une souche *nirA*⁺ et une souche *nirA*⁻ (*nirA1*). Dans les deux cas, l'intégration a eu lieu au niveau du locus du gène *argB*. Quatre constructions similaires, mutées chacune sur un des sites putatifs de fixation de NirA (Figure 1A), ont été introduites de la même façon dans la souche *nirA*⁺ (toujours au locus *argB*). Les activités spécifiques β -galactosidase et β -glucuronidase ont été mesurées dans les extraits protéiques bruts issus des mycelia des différents transformants cultivés sur différentes sources d'azote : proline (P), source d'azote neutre (ni inductrice ni répressive), avec ou sans ajout de nitrate (NO₃⁻). Les activités répertoriées Figure 1B sont indiquées en pourcentage de l'activité de référence, c'est-à-dire celle de la souche sauvage (*nirA*⁺) contenant la construction non mutée et cultivée en condition d'induction (P+NO₃⁻).

Figure 1



Questions 1 :

- Quel est le rôle d'un gène rapporteur ?
- Les activités enzymatiques mesurées dans cette étude apportent-elles uniquement une information sur l'activité du promoteur de ces deux gènes ?
- Quel est l'intérêt d'intégrer ces différentes constructions toujours au même locus (en l'occurrence le gène *argB*) et en une seule copie ?

Questions 2 :

- Quelle est l'information apportée par l'utilisation de la souche *nirA1* ?
- Analysez les résultats pour la construction non mutée dans le cas des souches *nirA⁺* et *nirA1*.

Questions 3 :

- Analysez l'effet des mutations créées dans les sites de fixation putatifs de NirA.
- Ces expériences permettent-elles de conclure quant à la fonctionnalité de ces sites ?

B. Étude de l'état de la chromatine de la région intergénique *niiA-niaD*

L'état de la chromatine dans la région intergénique *niiA-niaD* a été étudiée dans les quatre conditions de culture présentées dans la partie A du TD n°6, en utilisant la nucléase micrococcale (MNase) qui fait des coupures double-brin uniquement sur de l'ADN non protégé par des protéines. Sur de la chromatine, cette nucléase coupe entre les nucléosomes, soit toutes les 200 pb environ.

Questions 4 :

- Qu'est-ce que la chromatine ?
- À quoi correspondent ces fragments de 200 pb ?

Une partie de cette analyse, réalisée chez la souche sauvage, est indiquée Figure 2.

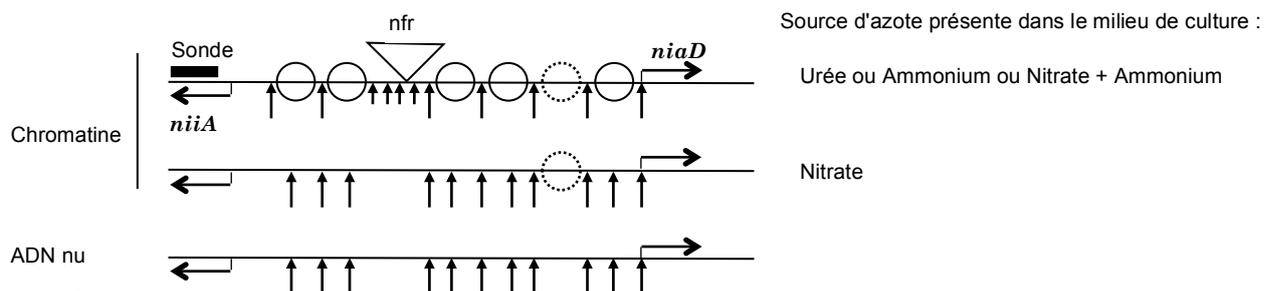


Figure 2

Les cercles en trait continu indiquent la position des nucléosomes. Le cercle en pointillés indique la position possible d'un nucléosome (position qui n'a pas pu être clairement établie en raison de l'absence de site pour la MNase dans cette région). Les grandes flèches indiquent les sites hypersensibles à la MNase et les petites flèches les sites moins sensibles. « nfr » signifie « *nucleosome free region* » (région dépourvue de nucléosome).

Question 5 : Comparez l'accessibilité à la MNase de la chromatine en fonction des différentes sources d'azote présentes dans les milieux de culture.

Question 6 : Commentez ces informations sur l'état de la chromatine à la lumière des résultats du northern-blot de la Figure 1 du TD n°6.

La Figure 3 récapitule les principaux résultats obtenus par ce type d'expérience chez la souche sauvage cultivée sur différentes sources d'azote ainsi que chez des mutants *nirA* et *areA* cultivés en présence de nitrate.

Question 7 : Analysez les données de la Figure 3 en comparant les profils des mutants avec ceux du sauvage.

Question 8 : Quel est le régulateur qui semble être le responsable du changement de l'état de la chromatine au locus *niiA-niaD* ?

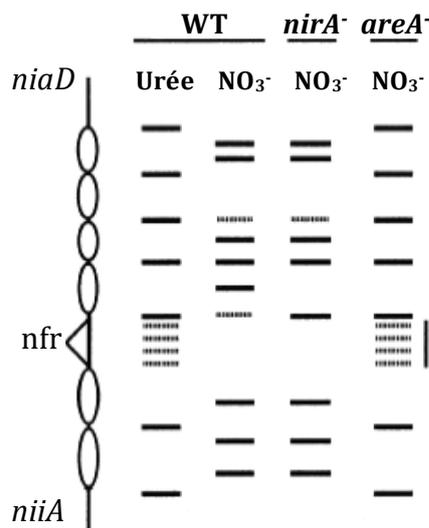


Figure 3 :

Représentation schématique des profils de digestion à la MNase de la région intergénique *niaD-niiA*, réalisée à partir :

- d'une souche sauvage (pistes WT), cultivée en présence d'urée ou en présence de nitrate (NO_3^-) comme seule source d'azote ;
- d'un mutant de perte de fonction du gène *nirA* (piste *nirA*), cultivé en présence de nitrate (seule source d'azote) ;
- d'un mutant de perte de fonction du gène *areA* (piste *areA*) cultivé en présence de nitrate (seule source d'azote).

Un trait continu représente une bande de forte intensité sur l'autoradiographie, un trait en pointillés, une bande de faible intensité.

Afin de mieux comprendre le rôle du régulateur AreA dans le phénomène précédemment décrit, des expériences de ChIP (*Chromatin ImmunoPrecipitation*) ont été réalisées.

Question 9 : Donnez brièvement le principe de la technique de ChIP.

Pour les besoins de cette expérience, une nouvelle souche d'*A. nidulans* a été construite. Dans cette souche, le gène *areA* endogène a été remplacé par un gène permettant l'expression d'une protéine AreA fusionnée à une étiquette, l'antigène de l'hémagglutinine. La protéine de fusion ainsi produite est notée AreA-HA. Des spores de cette souche ont été mises en culture dans un milieu minimum contenant de l'ammonium comme source d'azote. Le mycélium ainsi obtenu a été récupéré par filtration, soigneusement et abondamment rincé à l'eau stérile, puis réparti équitablement dans 4 fioles contenant le même milieu mais dépourvu de source d'azote (condition de "privation"). Pour trois d'entre elles, l'incubation à 37°C a été poursuivie pendant 10, 30 ou 120 min (selon la fiole). Les mycelia des 4 fioles ont été utilisés pour les expériences de ChIP, ainsi que pour la détermination du positionnement des nucléosomes dans la région intergénique *niaD-niiA* (expérience de digestion à la MNase).

Deux types de ChIP ont été réalisées :

- l'une permettant de suivre le taux relatif de fixation de la protéine AreA au niveau de la région intergénique ;
- l'autre permettant le suivi du taux relatif d'acétylation de l'histone H3 dans cette région.

Le suivi du taux d'acétylation de l'histone H3, ainsi que celui du positionnement des nucléosomes ont également été réalisés dans une souche dont le gène *areA* est inactivé.

L'ensemble des résultats est présenté Figure 4.

Question 10 : Pourquoi les auteurs de ce travail ont-ils dû construire une souche exprimant une protéine de fusion AreA-HA au lieu de la protéine sauvage ?

Il est rappelé que dans les expériences de ChIP (Figures 4B et 4D), ce qui est mesuré est la quantité d'ADN en interaction avec la protéine immunoprécipitée (contre laquelle est dirigé l'anticorps). Cette quantité d'ADN co-immunoprécipité est mesurée par la technique de PCR quantitative (qPCR).

Questions 11 : Au niveau de la région *niaD-niiA*, quel est l'effet de la privation en source d'azote :

- sur la fixation de la protéine AreA (Figure 4B) ;

- b) sur le changement de conformation de la chromatine par « dépôt » des nucléosomes (Figure 4C) ;
- c) sur l'acétylation de l'histone H3 (Figure 4D) ?

Question 12 : Que vous apportent les résultats obtenus à partir de la souche mutante *areA* ?

Question 13 : Que pouvez-vous conclure quant au rôle de la protéine AreA en condition de privation de source d'azote ?

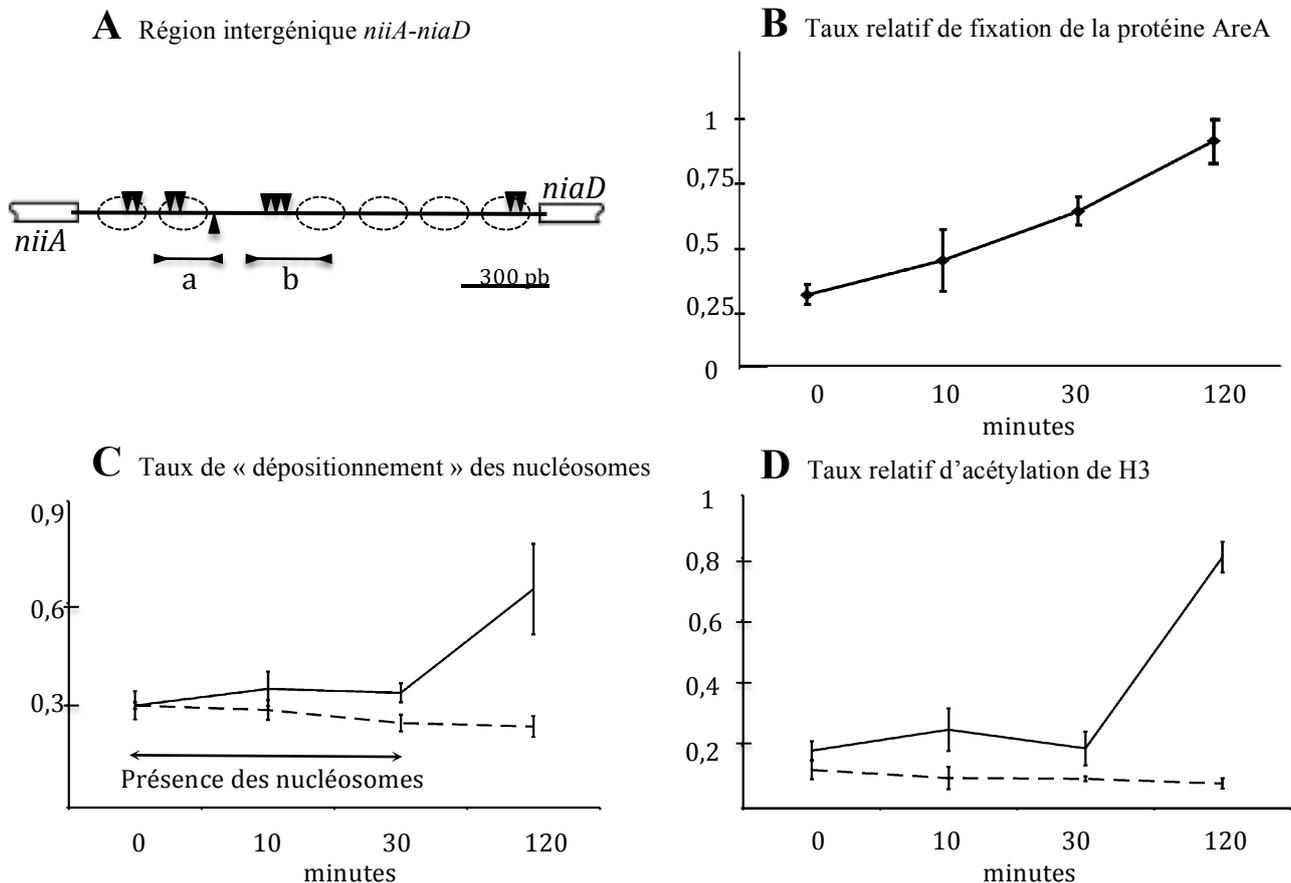


Figure 4 : Effets de la privation en source d'azote

A. Rappel de la structure de la région intergénique *niiA-niaD*. La position des 6 nucléosomes pouvant occuper cette région est indiquée en pointillés. Les triangles correspondent aux sites de fixation de la protéine AreA, ses sites de plus hautes affinités étant localisés dans la région dépourvue de nucléosome (« région nfr »). Les fragments amplifiés lors des différentes qPCR sont indiqués sous le schéma.

B. Suivi de la fixation d'AreA-HA sur ses sites dans la région intergénique *niiA-niaD* par la technique du ChIP. Les valeurs du graphe correspondent aux quantités de fragments d'ADN de la région d'intérêt contenu dans les fractions immunoprécipitées lors de la ChIP, rapportée à la quantité totale de ce même fragment présent dans l'échantillon au temps $t=0$. Ces quantités d'ADN ont été déterminées à l'aide d'une PCR quantitative (qPCR) en amplifiant le fragment b indiqué dans la légende de la partie A.

C. Suivi du « dépôt » des nucléosomes. La méthode utilisée est la même que celle de la Figure 1. « présence des nucléosomes » indique que les nucléosomes sont positionnés sur la région intergénique.

Note : pour les parties C et D, les résultats obtenus à partir de la souche *areA* sont indiqués par un trait discontinu.

D. Suivi de l'acétylation des histones H3 dans cette région intergénique. Deux expériences de ChIP ont été réalisées pour ce suivi : une première avec un anticorps dirigé contre les versions acétylées de l'histone H3 et une seconde avec un anticorps dirigé contre l'ensemble des histones H3 (acétylées ou non). Pour chaque temps, la valeur du graphe correspond à la quantité de fragment d'ADN de la région d'intérêt contenue dans la fraction immunoprécipitée lors de la première ChIP, rapportée à la quantité du même fragment contenue dans la fraction immunoprécipitée lors de la seconde ChIP. Là encore, ces quantités d'ADN ont été obtenues par qPCR en amplifiant le fragment a.

Exercice inspiré des articles suivants :

> P.J. Punt, J. Strauss, R. Smit, J.R. Kinghorn, C.A.M.J.J. van den Hondel and C. Scazzocchio, 1995, Mol. Cell. Biol., **15**, 5688-5699.

> M.I. Muro-Pastor, R. Gonzalez, J. Strauss, F. Narendja and C. Scazzocchio, 1999, EMBO J., **18**, 1584-1597.

> H. Berger, A. Basheer, S. Böck, Y. Reyes-Dominguez, T. Dalik, F. Altman and C. Scazzocchio, 2008, Molecular Microbiology **69**, 1385-1398.

TD n°8 : ANNALES Janvier 2019 – Partie TD uniquement

La bactérie *Escherichia coli* possède 2 protéines membranaires principales appelées porines (OmpF et OmpC) qui permettent la diffusion passive de petites molécules hydrophiles à travers la membrane externe (Figure 1). La différence majeure entre ces deux porines est le diamètre de leurs pores : celui de la protéine OmpF est de 1,2 nm tandis que celui d'OmpC est de 1,08 nm. Il en résulte ainsi un débit plus rapide de diffusion à travers OmpF qu'à travers à OmpC. La régulation de l'expression de ces gènes est complexe car diffère en fonction des conditions environnementales : température, pH ou encore l'osmolarité du milieu. Nous allons étudier ici l'effet de l'osmolarité du milieu.

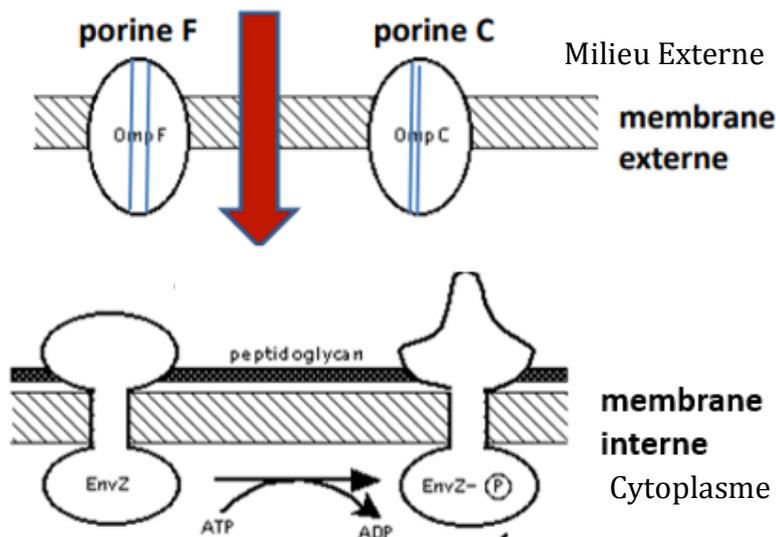


Figure 1 :

Les porines OmpF et OmpC de la membrane externe et la protéine EnvZ de la membrane interne d'*E. coli*.

E. coli étant une bactérie Gram-, sa membrane cytoplasmique (ou membrane interne) est protégée par une paroi de peptidoglycane, elle-même recouverte d'une seconde bicouche lipidique dite membrane externe.

I/ Expression des protéines OmpC et OmpF

Afin de comprendre cette régulation, la bactérie *E. coli* sauvage a été cultivée dans un milieu contenant 5mM de salicylate (correspondant à un milieu de forte osmolarité) ou sans salicylate (correspondant à un milieu de faible osmolarité). Les protéines ont ensuite été extraites et soumises à une analyse par western-blot. Trois anticorps (Ac) primaires ont été utilisés : l'un dirigé contre la protéine OmpC (notée C), le second contre la protéine OmpF (F) et le troisième (A) contre une protéine exprimée de façon constitutive dans ces conditions. Les résultats sont présentés Figure 2.

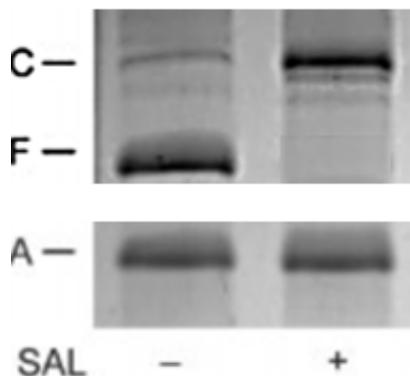


Figure 2 :

Western-blot. Panel du haut : révélation des Ac primaires C et F. Panel du bas : révélation de l'Ac primaire A.

(-) correspond à un milieu de culture à faible osmolarité et (+) correspond à un milieu de culture à haute osmolarité.

Question 1 : Rappelez brièvement les différentes étapes d'un western-blot.

Questions 2 :

- Quel est l'intérêt de l'anticorps primaire A ?
- Quelle information nous apporte-t-il ?

Questions 3 :

- Analysez les résultats présentés dans la Figure 2 pour la protéine OmpC.
- Même analyse pour la protéine OmpF.

Question 4 : Quels pourraient être les niveaux de régulation de l'expression des gènes *ompC* et *ompF* liés à l'osmolarité du milieu ?

Dans la suite de l'exercice (partie II et III) nous nous intéresserons plus particulièrement à la régulation de l'expression du gène *ompF*.

II/ Rôle de l'opéron *envZ-ompR* :

L'opéron constitué des cistrons *envZ* et *ompR* est impliqué dans la régulation de l'expression de *OmpC* et *OmpF*. La protéine EnvZ, qui est une protéine transmembranaire localisée dans la membrane interne d'*E. coli* (voir Figure 1), possède un domaine ayant une activité protéine kinase au niveau de sa portion cytoplasmique. Elle est responsable de la phosphorylation de la protéine OmpR. Plus l'osmolarité du milieu augmente et plus la concentration intracellulaire en protéine OmpR phosphorylée (notée OmpR-P) augmente. OmpR possède, quant à elle, un domaine de fixation à l'ADN. Ses capacités de fixation sur le promoteur du gène *ompF* ont été analysées en fonction de la concentration en forme phosphorylée.

Les expériences de retard sur gel présentées Figures 3 et 4 ont toutes été réalisées en utilisant comme ADN (marqué radioactivement sur toute sa longueur), le fragment allant de la position -100 à -40 en amont du +1 de transcription du gène *ompF*.

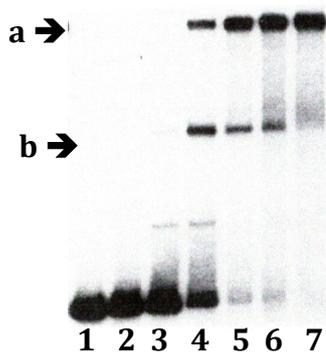


Figure 3 : Retard sur gel.

Piste 1 : Sonde libre (0,2 pmole)

Les échantillons déposés dans les pistes 2 à 7 contiennent en plus de la sonde: 25 ng d'OmpR non phosphorylée (piste 2) et pistes 3 à 7, respectivement 5, 15, 20, 25 et 30 ng de protéine OmpR phosphorylée (OmpR-P).

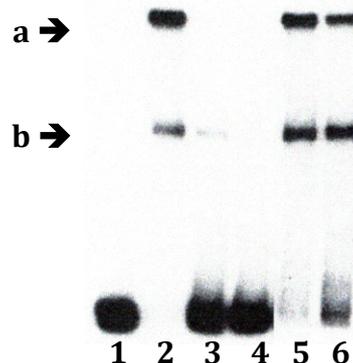
Figure 4 : Retard sur gel - suite.

Piste 1 : Sonde libre (0,2 pmole)

Les échantillons déposés dans les pistes 2 à 6 contiennent, en plus de la sonde, 25 ng de protéine OmpR-P (phosphorylée).

Pistes 3 et 4 : ajout en plus de 0,8 pmole (3) ou 1,6 pmole (4) du fragment -100 à -40 du gène *ompF*, mais non radioactif.

Pistes 5 et 6 : ajout en plus de 0,8 pmole (5) ou 1,6 pmole (6) d'un fragment de même longueur du gène *erA* non radioactif. Ce gène n'est pas osmorégulé.



Question 5 : L'ADN sonde utilisé pour ces retards sur gel a-t-il été marqué en présence de γ ^{32}P dATP ou α ^{32}P dATP ? Justifiez votre réponse.

Questions 6 : Analyse de la Figure 3.

- La forme non phosphorylée de OmpR est-elle capable de se lier à la région en amont du gène *ompF* ? Justifiez votre réponse.
- Même question pour la forme phosphorylée de OmpR.

- c) À priori combien de site de fixation pour la protéine OmpR sont présents dans le fragment -100 à -40 en amont du gène *ompF* ? Justifiez.
- d) Citez le nom de l'expérience qui permettrait d'identifier plus précisément la séquence des sites de fixation de la protéine OmpR (le détail du protocole n'est pas demandé).

Questions 7 : Analyse de la Figure 4.

- a) À quel type d'expérience correspondent les pistes 5 et 6 ?
- b) Quel est l'intérêt des pistes 3 et 4 ?
- c) Quelles informations vous apporte l'ensemble des résultats de la Figure 4

Lors d'expériences complémentaires réalisées avec un fragment d'ADN plus grand (allant de la région -400 à -40 en amont du gène *ompF*), il a été mis en évidence l'existence d'un site supplémentaire pour la protéine OmpR à la position allant de -380 à -360. La fixation de OmpR-P sur ce dernier site demande 10 fois plus de protéines (250 ng) comparée à celle nécessaire pour les sites plus en aval (région -100 à -40) et n'est obtenue qu'en présence d'une forte osmolarité du milieu (5 mM salicylate). De plus, la protéine OmpR fixée sur ce site va interagir avec les protéines OmpR fixées dans la région aval entraînant ainsi une courbure de l'ADN (Figure 5).

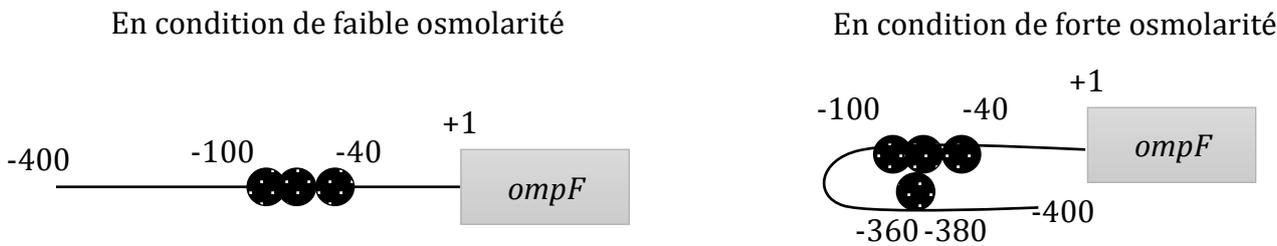


Figure 5 :

Représentation schématique de la conformation de la région en amont du gène *ompF*, en fonction des conditions d'osmolarité du milieu. La protéine OmpR-P est représentée par un rond noir avec des points blancs.

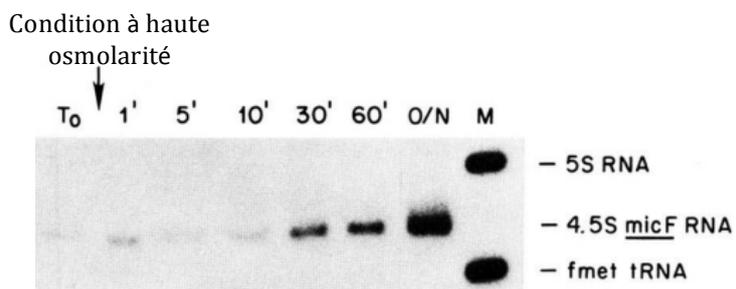
Question 8 : D'après votre analyse du western-blot effectuée en Q3-b, quel pourrait être la conséquence de ces deux conformations de la région en amont du gène *ompF* sur son expression transcriptionnelle ?

III/ Rôle de *micF*

Le gène *micF* et le gène *ompC* sont transcrits de façon divergente à partir d'une région promotrice commune. Ils sont donc régulés de façon similaire. Le gène *micF* permet la synthèse d'un petit ARN de 93 nucléotides. À partir d'une culture d'*E. coli* réalisée en milieu riche, des prélèvements ont été effectués avant (T_0) et à 1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min ou au bout d'une nuit (O/N) après qu'une forte augmentation de l'osmolarité a été effectuée. Puis les ARNs ont été extraits et analysés par northern-blot. La sonde utilisée correspond à un oligonucléotide complémentaire de l'ARN *micF* (Figure 6).

Figure 6 :

Northern-blot. La même quantité d'ARN a été déposée dans chaque puits. M = Marqueur de taille, correspondant à l'ARN 5S et à l'ARNt initiateur (fmet)



TD n°9 : RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUE

Protéines Lap des cellules de mammifères

Le gène *lap* des mammifères est un gène sans intron qui est transcrit sous forme d'un seul ARN messenger. Ce gène comprend trois cadres ouverts de lecture possibles, tous dans la même phase, et ne différant donc que par leur extrémité 5', c'est-à-dire par la position de l'ATG initiateur. En d'autres termes, le cadre ouvert de lecture le plus long comprend trois ATG en phase dans sa partie 5'.

Questions 1 :

- a) Des chercheurs ont, à l'époque, utilisé une seule technique pour démontrer que le gène *lap* n'a pas d'introns et qu'il est transcrit en un seul ARNm. Laquelle ?
- b) Donnez-en le principe et montrez à l'aide de schémas comment cette technique permet effectivement d'identifier les jonctions exon/intron d'un gène et de déterminer son (ou ses) site(s) d'initiation de transcription.

Dans le but de savoir lequel des trois codons ATG est utilisé comme codon initiateur de la traduction du gène *lap*, plusieurs constructions ont été réalisées dans un vecteur d'expression où différents ADNc du gène *lap* ont été placés sous la dépendance d'un promoteur fort et constitutif (le promoteur CMV) (Figure 1A). Des expériences de western ont ensuite été réalisées à partir d'extraits de cellules en culture transfectées avec ces différentes constructions. Les résultats sont présentés Figure 1B.

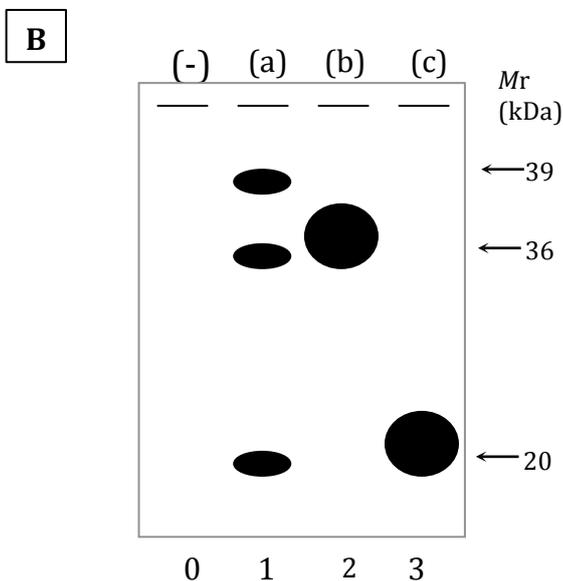
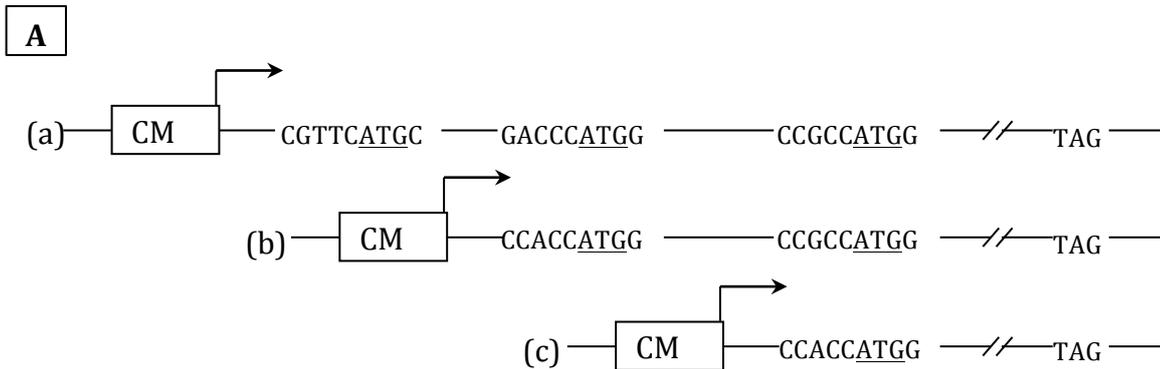


Figure 1

A. Constructions utilisées pour transfecter les cellules en culture. La boîte CMV indique un promoteur fort et constitutif. La flèche indique le sens de la transcription. (a) : promoteur CMV + région 5'UTR et cadre ouvert de lecture à partir du 1er ATG ; (b) : promoteur CMV + région 5'UTR et cadre ouvert de lecture à partir du 2ème ATG ; (c) : promoteur CMV + région 5'UTR et cadre ouvert de lecture à partir du 3ème ATG.

B. Western blot. Les protéines synthétisées dans les cellules transfectées par les constructions indiquées (pistes 1 à 3) ont été analysées par western avec un anticorps dirigé contre la protéine LAP. Puits 0 : protéines provenant de cellules transfectées avec le vecteur d'expression parental (dépourvu de toute construction).

La même quantité de protéines totales a été déposée dans tous les puits. Il est précisé que les trois protéines ont une demi-vie identique.

Question 2 : Rappelez le but et le principe du western-blot en précisant les principales étapes.

Questions 3 :

- Que pouvez-vous conclure des résultats obtenus piste 0 de la Figure 1B ?
- Que peut-on déduire des résultats de la piste 1, notamment du point de vue de la capacité relative de chacun des 3 ATG à initier la traduction ?
- Les résultats obtenus pistes 2 et 3 vous permettent-ils de confirmer ces conclusions ?
- Compte-tenu des séquences des constructions décrites Figure 1A, quelles hypothèses pouvez-vous émettre pour expliquer l'ensemble de ces résultats ?

Dans le but de confirmer ces hypothèses, différentes mutations ont été introduites, par mutagenèse dirigée, sur la construction la plus longue (a) (Figure 2A). Chacune des constructions de départ (a, b et c), et des versions mutées ainsi obtenues (d à h) a été introduite par transfection dans des cellules en culture à partir desquelles des expériences de western-blot ont été à nouveau effectuées (Figure 2B).

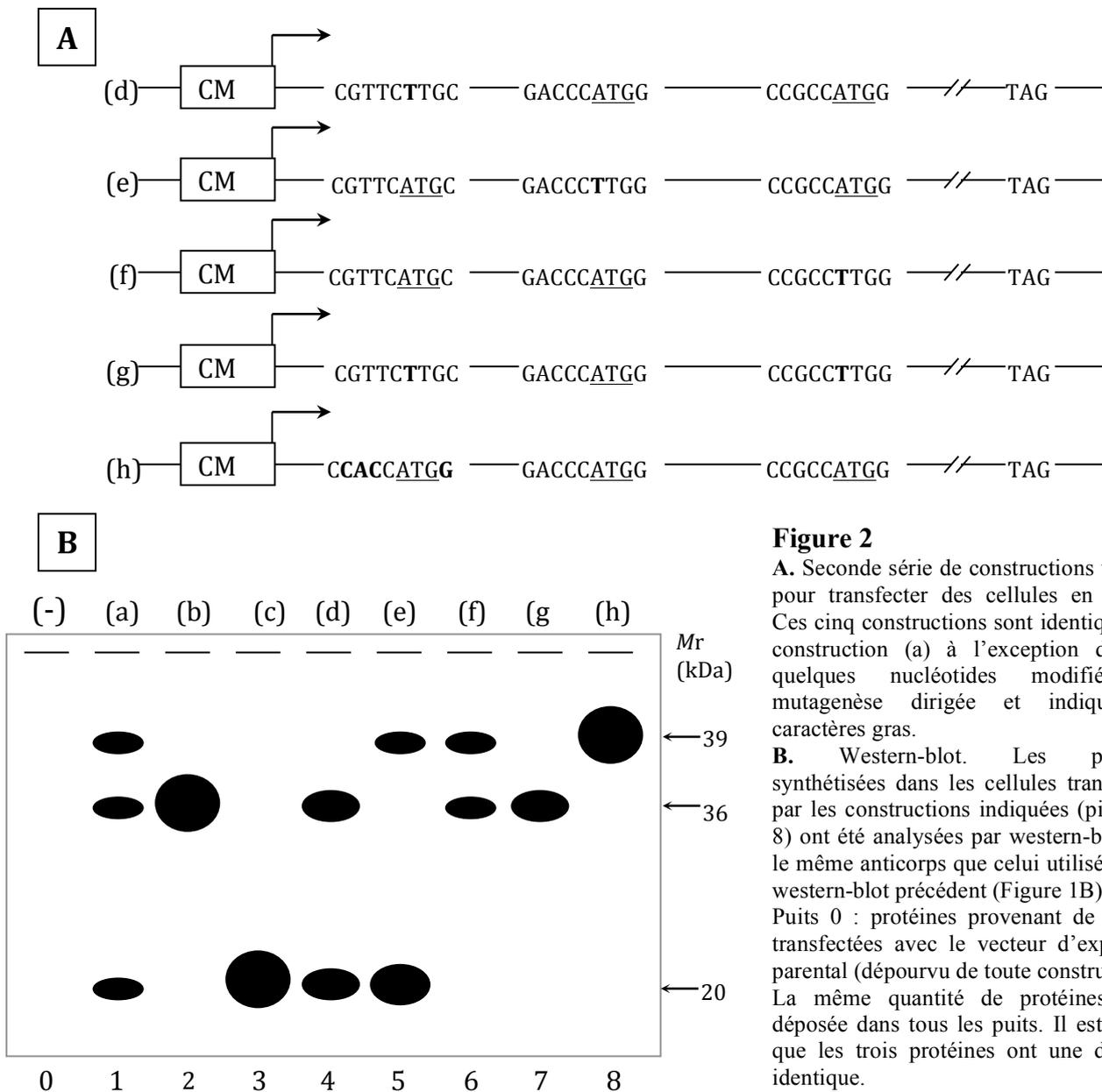


Figure 2

A. Seconde série de constructions utilisées pour transfecter des cellules en culture. Ces cinq constructions sont identiques à la construction (a) à l'exception d'un ou quelques nucléotides modifiés par mutagenèse dirigée et indiqués en caractères gras.

B. Western-blot. Les protéines synthétisées dans les cellules transfectées par les constructions indiquées (pistes 1 à 8) ont été analysées par western-blot avec le même anticorps que celui utilisé pour le western-blot précédent (Figure 1B).

Puits 0 : protéines provenant de cellules transfectées avec le vecteur d'expression parental (dépourvu de toute construction). La même quantité de protéines a été déposée dans tous les puits. Il est précisé que les trois protéines ont une demi-vie identique.

Question 4 : Comment les séquences des constructions (d) à (h) obtenues après mutagenèses dirigées de la construction (a) permettent-elles de rendre compte des résultats obtenus pour les pistes 4 à 8 ?

Le gène *lap* est connu pour être nécessaire au contrôle de l'expression du gène de l'albumine. Pour élucider le rôle des différents produits traductionnels du gène *lap*, une construction rapporteuse où le gène bactérien codant la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) a été placé sous le contrôle du promoteur du gène de l'albumine, a été introduite dans le génome des cellules hébergeant chacune des huit constructions décrites Figures 1A et 2A. L'activité CAT est révélée en incubant du chloramphénicol radioactif dans des extraits des cellules transfectées. Les formes acétylées et non acétylées du chloramphénicol sont séparées par chromatographie en couche mince et révélées par autoradiographie. Les résultats sont présentés Figure 3.

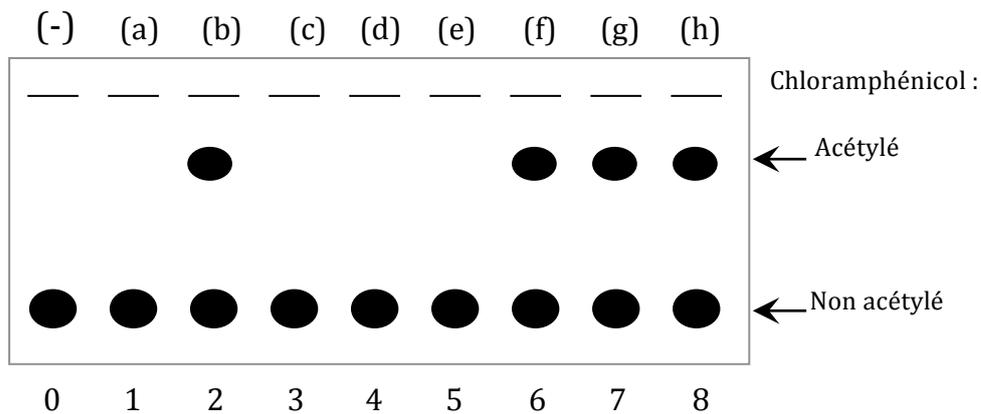


Figure 3

Analyse de l'activité CAT. Le gène CAT, placé sous le contrôle du promoteur du gène de l'albumine, a été introduit dans les cellules hébergeant les constructions indiquées (pistes 1 à 8). L'activité CAT est révélée en incubant les extraits de ces cellules en présence de chloramphénicol radioactif. Puits 0 : extraits de cellules transfectées par la construction rapporteuse mais n'hébergeant aucune « construction LAP ».

Question 5 : Que reflète l'activité chloramphénicol transacétylase dans ces expériences ?

Questions 6 :

- Que peut-on conclure de l'expérience témoin (piste 0) ?
- Qu'observez-vous pour les autres pistes ?
- Que pouvez-vous conclure sur l'activité biologique des protéines de 39, 36 et 20 kDa ?

Pour rendre compte de l'ensemble des résultats, on est amené à postuler l'existence de deux domaines fonctionnels dans les protéines de 39 et 36 kDa.

Questions 7 :

- Quels sont ces domaines ?
- Où les situeriez-vous ?

Question 8 : Comment pouvez-vous expliquer les résultats obtenus lorsque la protéine de 20 kDa est exprimée ?

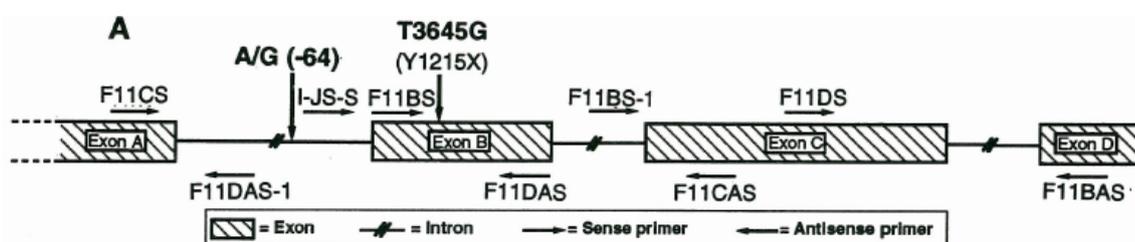
Question 9 : En supposant que vous disposiez des protéines de 39 (ou 36) et 20 kDa purifiées, quelles expériences proposeriez-vous pour vérifier la réponse faite question 8 (plusieurs réponses sont possibles). Schématisez les résultats attendus si votre réponse à la question 8 est exacte.

TD n°10 : ÉPISSAGE

Étude moléculaire du Syndrome de Marfan

Le syndrome de Marfan (MFS) est un syndrome héréditaire affectant le tissu conjonctif, provoqué par des mutations touchant le gène fibrillin-1 (*FBNI*). Le produit du gène *FBNI* est une glycoprotéine de 350-kDa fixant le calcium et qui constitue le composant principal des microfibrilles de 10-12 nanomètres de la matrice extracellulaire. Les manifestations classiques du MFS concernent principalement les systèmes cardiovasculaires, oculaires et squelettiques.

Différentes analyses des ADNc de *FBNI* issus de différents individus malades et non malades ont été réalisées. Ces expériences reposent sur l'analyse par RT-PCR de différentes portions de l'ARNm de *FBNI* (plus de 10000 nts). La Figure 1A est une représentation schématique d'une portion de l'ADN génomique *FBNI* qui a été plus particulièrement étudiée (allant de l'extrémité 3' de l'exon A à l'extrémité 5' de l'exon D). Les amorces utilisées dans les différentes expériences décrites ultérieurement sont également schématisées.



B

```

3562 (Exon A)
^
GCC TTG AAG GGA GAA GGC TGG GGA GAC CCC TGC GAG CTC TGC CCC ACG GAA CCT
Ala Leu Lys Gly Glu Gly Trp Gly Asp Pro Cys Glu Leu Cys Pro Thr Glu Pro
GAT G gtatgtctgtcatctgcattctctctgggccatgcagggtgcagactggccatgatgtaagtaa
Asp G
gactgtaggccttaaacacagtaacacaatttaatttaattgaagtctaattagaatgttcattaaaaat
tattttatctcaggagcttggtagttattttcttttaattatgtcatgaatcacagatgccaaggagta
gacacacatcttagggagtctcgttaataaactctctctggttctgggctgtttttccatcatttat
caatatacagcagcatgtagcaattttctacctcaaaaat ctgtggagaagcttgaatgaattgctattg
3620 (Exon B)
^
ttctatctattaatgagtgctccaccacag AG GCC TTC CGC CAG ATA TGT CCT TAG GGA
lu Ala Phe Arg Gln Ile Cys Pro TyL Gly
AGT GGG ATC ATC GTG GGA CCT GAT TCA GCA GTT G gtcagttgctctgtctggat
Ser Gly Ile Ile Val Gly Pro Asp Asp Ser Ala Val A
tctcagcatttctcagttatctcaatctgcttctctctctagttattcttatttttccatctatctctgga
aaattaagtgtactttttgtcccttcatttagatagaattatattattgcatattagataatctttt
gattaaacactgaaatgatcataatttatcttccagtttaaaaaaaccttgttattcactattttttttc
3686 (Exon C)
^
tcttgcttaag AT ATG GAC GAA TGC AAA GAA CCC GAT GTC TGT AAA CAT GGA CAG
sp Met Asp Glu Cys Lys Glu Pro Asp Val Cys Lys His Gly Gln
TGC ATC AAT ACA GAT GGT TCC TAT CGC TGC GAG TGT CCC TTT GGT TAT ATT CTA
Cys Ile Asn Thr Asp Gly Ser Tyr Arg Cys Glu Cys Pro Phe Gly Tyr Ile Leu
GCA GGG AAT GAA TGT GTA G gtgagtaataagttttctccataggaactttacaattaaaaa
Ala Gly Asn Glu Cys Val A
ttaa.....-2 kb .....atagaataaaaggtattatctcattcatcatgttttggcacattctctg
3803 (Exon D)
^
gtttcttgtag AT ACT GAT GAA TGT TCT GTT GGC AAT CCT TGT GGA AAT GGA ACC
sp Thr Asp Glu Cys Ser Val Gly Asn Pro Cys Gly Asn Gly Thr
TGC AAG AAT GTG ATT GGA GGT TTT GAA TGC ACC TGC GAG GAG...
Cys Lys Asn Val Ile Gly Gly Phe Glu Cys Thr Cys Glu Glu

```

Figure 1

A. Représentation schématique de la région entre l'exon A et l'exon D de l'ADN génomique du gène *FBNI*.

B. Séquence nucléotidique de cette région d'ADN génomique amplifiable par les amorces F11CS et F11BAS. Les séquences correspondant aux exons sont données en lettres majuscules et celles des introns en lettres minuscules. L'amorce F11CS s'hybride dans l'exon A, 58 pb en amont de l'extrémité 3' de cet exon, et l'amorce F11BAS à 86 pb en aval de l'extrémité 5' de l'exon D. Taille des autres exons en pb : B = 66 pb ; C = 117 pb.

L'analyse par RT-PCR de cette région a été faite avec les amorces F11CS et F11BAS (voir Figure 1) et les résultats de ces analyses réalisées à partir de fibroblastes d'individus non malade (Mo) et malade (MS-7) sont présentés Figure 2.

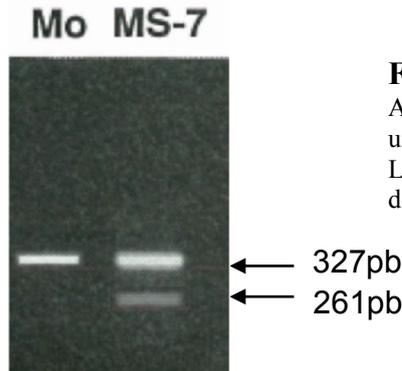


Figure 2

Analyse des produits de RT-PCR par électrophorèse sur un gel d'agarose 2% coloré au BET. Les tailles précises des fragments amplifiés ont été déterminées par séquençage.

Questions 1 :

- a) Rappelez le principe de la RT-PCR.
- b) Quel(s) type(s) d'information apportent les analyses par RT-PCR ?

Question 2 : Commentez les résultats obtenus.

Le séquençage de chacun des produits purifiés a été réalisé avec l'amorce F11BAS et une portion de ce séquençage est représentée à la Figure 3.

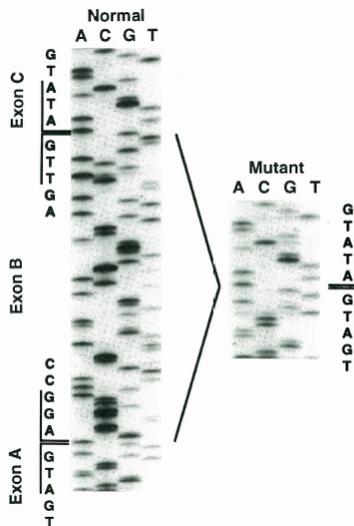


Figure 3

Autoradiogramme du gel de séquence des produits d'amplification d'individus non malade (« Normal ») et malade (« Mutant »).

Question 3 : Analysez les résultats obtenus.

Question 4 : Quel type d'anomalie est ainsi révélé ?

Pour déterminer les raisons de cette anomalie détectée, une région de 3 kpb de l'ADN génomique d'un patient « MS-7 » et d'individus non malades a été amplifiée (amorces F11CS et F11BAS), et les produits PCR ont été séquencés. Les résultats obtenus révèlent que seul le patient « MS-7 » présente une mutation unique : une substitution T/G pour un allèle à la position +26 de l'exon B.

Question 5 : En vous aidant du tableau I qui vous est donné en annexe, quelles peuvent être les éventuelles conséquences de cette mutation ?

Il a été démontré que peu de protéines tronquées sont synthétisées car les eucaryotes utilisent une voie particulière de contrôle de la qualité des ARNm : la voie NMD (*Nonsense-mRNA-Decay*). Les auteurs ont voulu déterminer si, dans le cas présent, la voie NMD est impliquée. Pour ce faire, ils ont donc réalisé les expériences suivantes : les fibroblastes d'un sujet « contrôle » homozygote (TAT/TAT) ou d'un sujet porteur de la mutation (TAT/TAG) ont été incubés avec l'anisomycine (100 mg/ml) — qui est un inhibiteur du NMD — pendant 0, 1H, 2H ou 4H. Une amplification par RT-PCR est ensuite réalisée à partir d'ARNs extraits de ces échantillons avec tout d'abord l'amorce F11-BAS puis avec le jeu d'amorces F11-CS et F11-BAS. Les ADN amplifiés sont traités par l'enzyme de restriction *Bsu36 I* dont le site de reconnaissance est le suivant :



où "N" représente un nucléotide quelconque
« / » les point de coupe

Question 6 : Dans quel but ces digestions sont-elles réalisées ?

Question 7 : Pour quelles raisons les analyses sont faites sur l'ADNc amplifié par PCR et non sur l'ARNm directement ?

Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis transférés sur une membrane qui est ensuite incubée avec la sonde F11-DAS. Après exposition et révélation, les résultats sont présentés Figure 4.

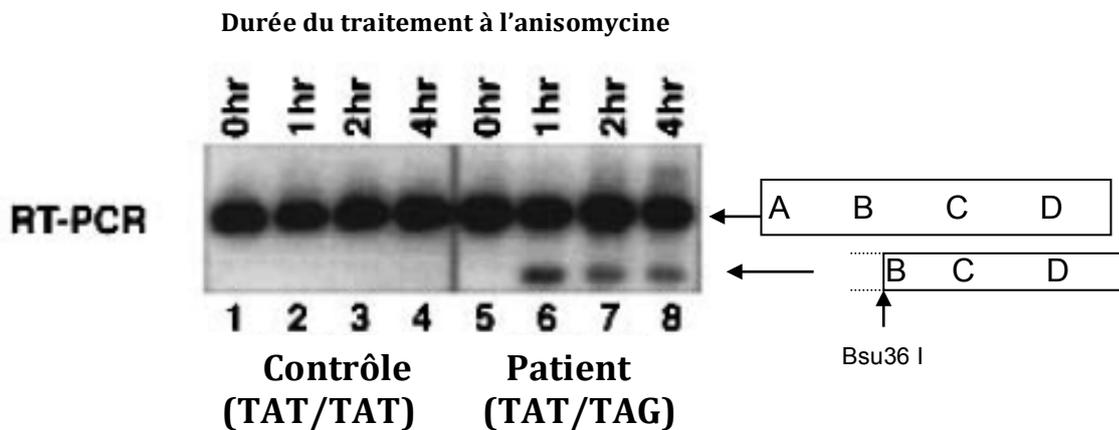


Figure 4 : Autoradiographie du gel d'agarose.

Question 8 : À quelle population d'ARNm s'intéresse-t-on en utilisant l'amorce F11DAS comme sonde ?

Question 9 : À quoi correspondent les deux bandes révélées sur l'autoradiographie ?

Question 10 : Quelles informations complémentaires apportent ces expériences ?

Les ARNm extraits préalablement ont été analysés par la technique de protection à la RNase. Une ribosonde radiomarquée qui s'étend de la région F11DAS à F11BAS a été utilisée et les résultats obtenus sont présentés Figure 5.

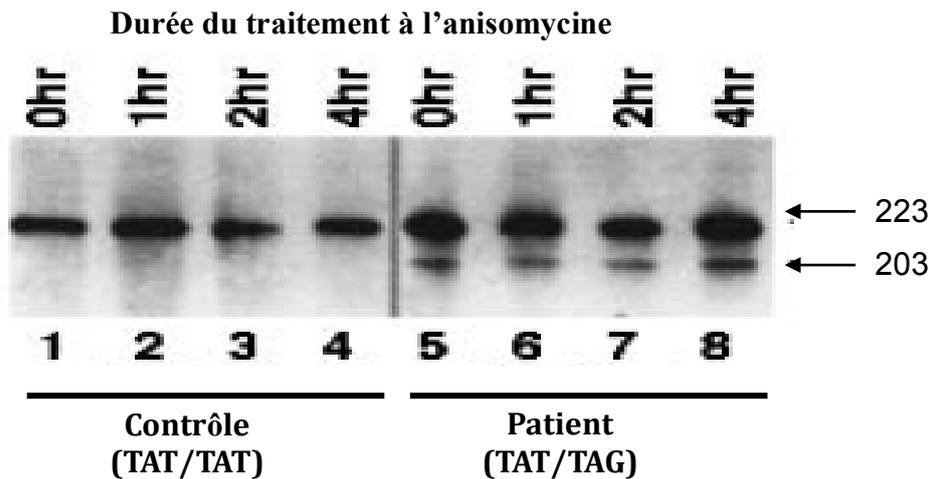


Figure 5 : Autoradiographie du gel d'acrylamide dénaturant.

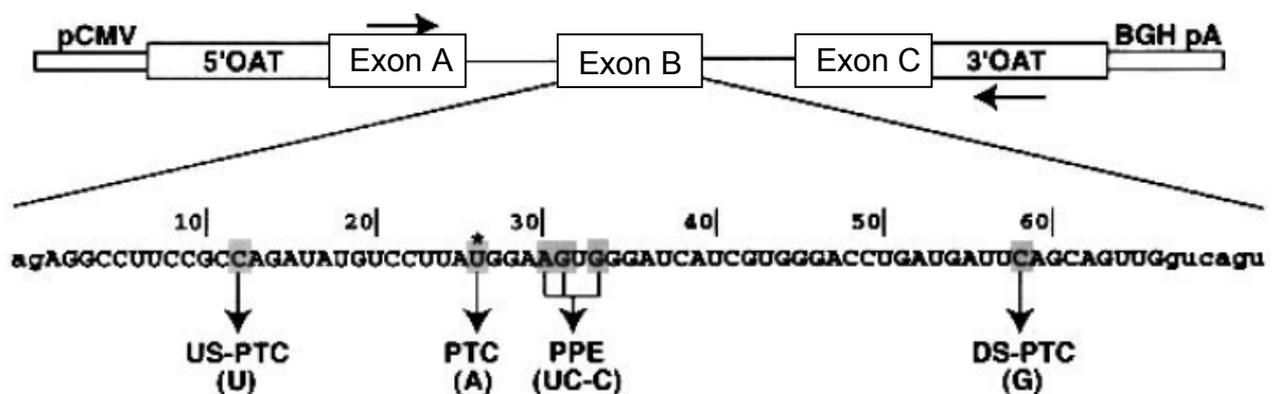
Questions 11 :

- a) À quoi correspondent les deux bandes ainsi révélées ?
- b) Le traitement à l'anisomycine altère-t-il le mécanisme du saut d'exon ?

Afin de compléter cette étude, différentes constructions plasmidiques ont été introduites séparément dans les fibroblastes humains pour exprimer différentes versions, sauvage et mutées, de la portion de l'ARNm contenant les exons A, B et C. Les ARN totaux de ces fibroblastes sont extraits et des RT-PCR sont ensuite réalisées et analysées sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. La Figure 6 présente les différentes mutations introduites et la Figure 7 présente les résultats des RT-PCR correspondantes.

Questions 12 :

- a) Dans quel but ces différentes versions mutées ont-elles été construites ?
- b) Comment pouvez-vous interpréter ces résultats ?



Mutations : I II III IV

Figure 6

Représentation schématique des constructions utilisées pour produire les différents ARNm : elles diffèrent au niveau de l'exon B aux positions indiquées sur le schéma. Les mutations I, II et IV conduisent à des mutations non-sens, c'est-à-dire à l'introduction de codon stop prématuré. Les mutations III correspondent à une mutation silencieuse (ser:ser) et une mutation faux-sens (gly:arg) dans la région PPE (*polypurine rich element*) qui se trouve vers la position +26.

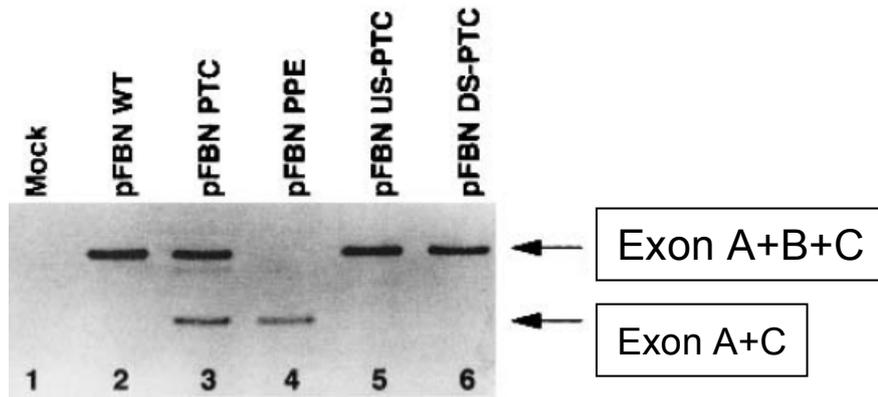


Figure 7

Gel d'agarose. Échantillons RT-PCR analysés provenant des fibroblastes non transfectés (Mock) (1) ; transfectés (2-6) et conduisant à la production d'ARNm normal (2), mutant II (3), mutant III (4), mutant I (5) et mutant IV (6).

Annexe :

1 ^{er} nucléotide (en 5')	2 ^e nucléotide				3 ^e nucléotide (en 3')
	U	C	A	G	
U	Phe:F	Ser:S	Tyr:Y	Cys:C	U
	Phe:F	Ser:S	Tyr:Y	Cys:C	C
	Leu:L	Ser:S	STOP	STOP	A
	Leu:L	Ser:S	STOP	Trp:W	G
C	Leu:L	Pro:P	His:H	Arg:R	U
	Leu:L	Pro:P	His:H	Arg:R	C
	Leu:L	Pro:P	Gln:Q	Arg:R	A
	Leu:L	Pro:P	Gln:Q	Arg:R	G
A	Ile:I	Thr:T	Asn:N	Ser:S	U
	Ile:I	Thr:T	Asn:N	Ser:S	C
	Ile:I	Thr:T	Lys:K	Arg:R	A
	Met:M	Thr:T	Lys:K	Arg:R	G
G	Val:V	Ala:A	Asp:D	Gly:G	U
	Val:V	Ala:A	Asp:D	Gly:G	C
	Val:V	Ala:A	Glu:E	Gly:G	A
	Val:V	Ala:A	Glu:E	Gly:G	G

Tableau du code génétique

TD n°11 : RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUE

Mécanisme de régulation traductionnelle de l'accumulation de la protéine humaine p53 suite à des lésions de l'ADN

La protéine humaine p53 est un suppresseur de tumeur qui inhibe la transformation cellulaire, d'une part en arrêtant la prolifération cellulaire, et d'autre part en induisant l'apoptose. Cette protéine est trouvée mutée dans plus de la moitié des cancers humains. L'inactivation de la voie de p53 joue un rôle majeur dans le processus d'oncogenèse. Dans les cellules normales, le taux de p53 est relativement bas et la protéine est inactive. Par contre, après exposition des cellules à un stress génotoxique (causant des dommages de l'ADN), la protéine p53 est activée et son taux au sein de la cellule est augmenté. Les lésions de l'ADN peuvent être causées par des rayonnements ionisants, des rayonnements UV ou des composés chimiques.

Expérience 1

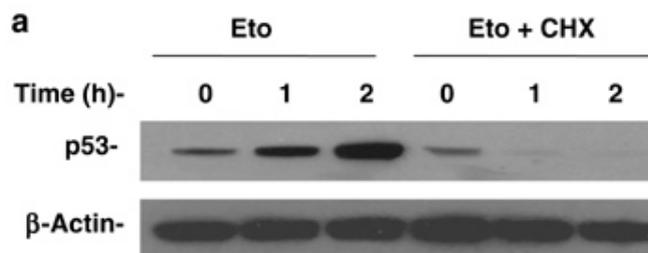
L'effet de l'étoposide sur le taux de p53 a été étudié dans des cellules humaines en culture. Cet agent chimique induit des cassures double-brins de l'ADN.

Les cellules sont lysées après différentes conditions de culture indiquées Figure 1 et des quantités égales de protéines totales sont déposées sur un gel d'acrylamide (SDS-PAGE). Après transfert sur membrane, les protéines p53 et β -actine sont révélées par western-blot (Figure 1).

Question 1 : Quels sont les différents mécanismes possibles permettant l'accumulation d'une protéine dans une cellule en réponse à un stimulus ?

Figure 1

Western-blot sur des extraits protéiques issus de cellules humaines préalablement traitées par l'étoposide seul (Eto) ou avec la cycloheximide (+CHX), un inhibiteur de l'élongation protéique.



Questions 2 :

- a) Pourquoi les auteurs ont-ils révélé l'actine au cours de cette expérience ?
- b) Décrivez puis analysez les résultats présentés Figure 1.

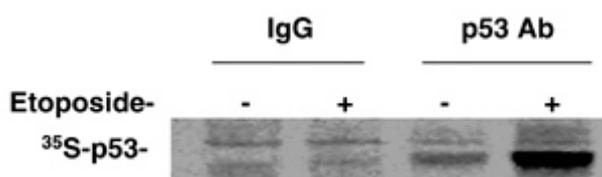
Question 3 : Quelle(s) hypothèse(s) privilégiez-vous pour expliquer l'effet de l'étoposide sur le niveau d'accumulation de la protéine p53 dans les cellules humaines ?

Expérience 2

Les chercheurs ont mesuré le taux de p53 nouvellement synthétisée. Pour cela, des cellules humaines ont été incubées, après traitement à l'étoposide, avec de la ^{35}S -méthionine (radiomarquée) pendant 20 minutes. Puis les protéines totales ont été extraites et des expériences d'immunoprécipitation (voir annexe) ont été réalisées à l'aide soit d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine p53, soit d'un anticorps contrôle (IgG). Après migration sur un gel de polyacrylamide, les protéines marquées ont été révélées par autoradiographie (Figure 2).

Figure 2

Autoradiographie des immunoprécipités de p53 dans des extraits cellulaires totaux.

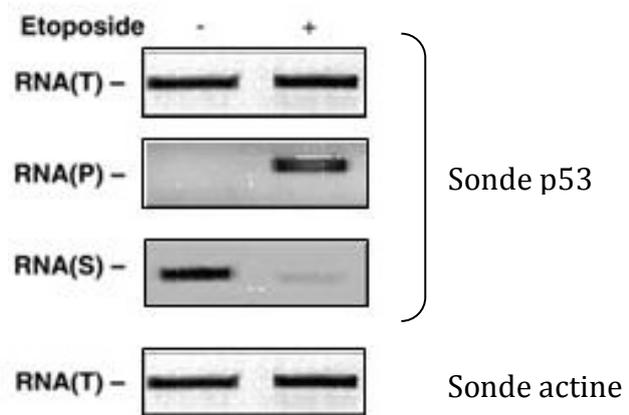


Expérience 3

Dans un deuxième temps, le taux d'ARNm de p53 a été estimé par northern-blot sur différentes fractions cellulaires : ARN total [RNA(T)], ARN cytoplasmique [RNA(S)] et ARN contenu dans les polyribosomes [RNA(P)]. Les résultats sont présentés Figure 3.

Figure 3

Northern-blot sur différentes fractions cellulaires d'ARN.



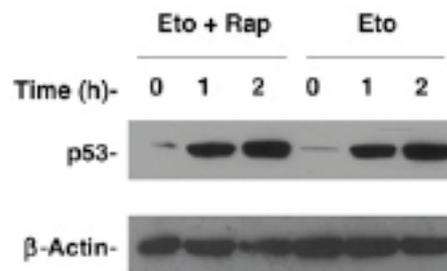
Question 4 : Décrivez puis analysez les résultats présentés Figures 2 et 3. Les données présentées sur ces Figures vous permettent-elles de confirmer la (ou les) hypothèse(s) émise(s) lors de la question 3 quant à l'effet de l'étoposide ? Justifiez votre réponse.

Expérience 4

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'étoposide sur le taux d'accumulation de p53, les auteurs ont testé l'effet de la rapamycine sur des cellules humaines en culture préalablement traitées par l'étoposide. Cet agent chimique inhibe la phosphorylation de la protéine 4E-BP1 et permet d'augmenter son association avec la protéine eIF-4E. Le protocole utilisé est identique à celui de l'expérience 1. Les résultats obtenus sont présentés Figure 4.

Figure 4

Western-blot sur des extraits protéiques issus de cellules humaines préalablement traitées par l'étoposide (Eto) en présence ou non de rapamycine (Rap).



Question 5 : Chez les eucaryotes, quelle est la caractéristique de l'extrémité 5' des ARNm ?

Question 6 : Rappelez le rôle des protéines suivantes : eIF-4E, eIF-4G et 4E-BP1.

Questions 7 :

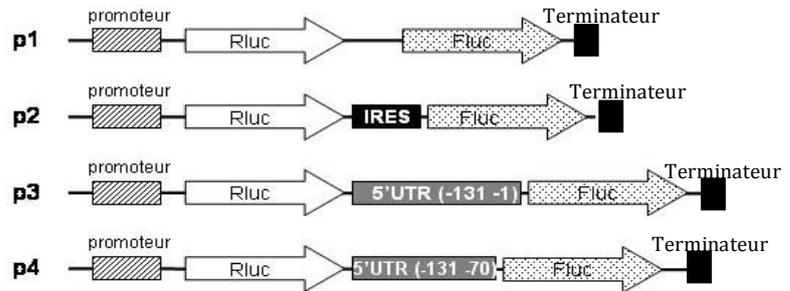
- Quelles sont les informations apportées par l'expérience présentée Figure 4 ?
- Quelle précision peut-on apporter quant au rôle de l'étoposide sur le taux d'accumulation de la protéine p53 ?
- Quelle hypothèse pouvez-vous émettre sur la régulation de la traduction de la protéine p53 après traitement à l'étoposide ?

Expérience 5

Différentes constructions plasmidiques ont été réalisées dans un système bicistronique (p1) présenté Figure 5. Ce vecteur d'expression contient les régions codantes (CDS) de "Renilla luciferase" (Rluc) et de "Firefly luciferase" (Fluc) séparés par une courte séquence et sous le contrôle du même promoteur. Ces deux CDS codent deux enzymes luciférases qui catalysent des réactions différentes entraînant l'émission de lumière à des longueurs d'onde distinctes (550 nm pour Fluc et 480 nm pour Rluc). Ainsi, grâce à un luminomètre, il est possible de détecter et de quantifier l'accumulation relative de ces deux enzymes en présence de leurs substrats spécifiques.

Figure 5

Constructions utilisées.



Les autres constructions réalisées (Figure 5) sont les suivantes :

- vecteur 2 (p2) contenant la séquence IRES du virus de l'Encéphalomyocardite (EMCV) insérée avant la séquence de Fluc ;
- vecteur 3 (p3) contenant la région 5'UTR (-131 à -1) de l'ARNm de p53 insérée en amont de Fluc ;
- vecteur 4 (p4) contenant une partie de la région 5'UTR de l'ARNm de p53, allant de la position -131 à -70, insérée en amont de Fluc.

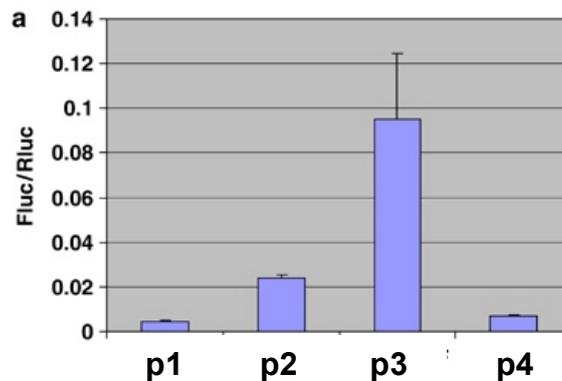
Questions 8 :

- Quel est l'intérêt d'utiliser le vecteur p1 pour réaliser ces différentes constructions ?
- Qu'est-ce qu'un IRES ?
- Dessinez le (ou les) ARNm et la (ou les) protéine(s) obtenus à partir des constructions p1 et p2 en montrant les éléments nécessaires à la traduction chez les eucaryotes.

Les quatre constructions ont été introduites par transfection dans des cellules humaines en culture. Les activités enzymatiques de Rluc et de Fluc ont été mesurées grâce à un luminomètre sur les extraits cellulaires des lignées transfectées. Le rapport des taux de Fluc/Rluc a été par la suite estimé pour chacune des lignées transfectées. Les résultats sont présentés Figure 6.

Figure 6

Rapport Fluc/Rluc estimé dans les extraits cellulaires issus des lignées transfectées avec les différentes constructions.



Questions 9 :

- Quelle(s) information(s) nous apportent les constructions p1 et p2 ?
- Qu'en est-il pour les constructions p3 et p4 ?
- Que pouvez-vous conclure de l'ensemble de ces résultats ?

TD n° 12 : PETITS ARNs

Exemple de régulation par un petit ARN bactérien : RyhB

Le fer est l'un des éléments les plus abondants sur terre et est essentiel pour pratiquement tous les organismes. Toutefois, en conditions aérobie, le fer est extrêmement toxique car il catalyse la formation de radicaux libres qui peuvent endommager les cellules. Pour empêcher cette toxicité, la bactérie *Escherichia coli* régule la capture et le stockage du fer, selon la disponibilité en fer dans l'environnement.

Chez *E. coli*, lorsque le niveau de fer intracellulaire dépasse un certain seuil, l'expression des gènes de capture du fer est réprimée par la protéine Fur (*Ferric uptake regulator*). Lorsque la concentration en fer passe en dessous d'un certain seuil, Fur devient inactive. Dans son rôle de répresseur, Fur fonctionne en se fixant sur une séquence spécifique de la région promotrice des gènes ou opérons cibles. De plus, Fur est capable de réguler positivement plusieurs gènes dont certains codent des protéines à centre Fe/S, comme les gènes de l'opéron *sdhCDAB* codant la succinate déshydrogénase. Pour étudier le mécanisme de cette régulation positive, des chercheurs ont réalisé les expériences suivantes.

1^{ère} expérience :

Ils ont commencé par isoler 17 petits ARN non-codants d'*E. coli* transcrits à partir de gènes différents. En amont du gène de l'un de ces ARN, nommé RyhB, une séquence spécifique reconnue par le répresseur Fur a été identifiée. Différentes souches d'*E. coli* mutantes ont été construites (Δfur [*fur*⁻] ; $\Delta rhyB$ [*rhyB*⁻] et $\Delta fur\Delta rhyB$ [*fur*⁻/*rhyB*⁻]) ainsi qu'une souche d'*E. coli* portant un vecteur (pAT) pouvant surproduire ou non RyhB. Ces différentes souches ont été testées pour leur capacité à croître sur un milieu contenant du succinate comme source de carbone. Les résultats sont décrits dans le Tableau I.

souches	Croissance sur milieu minimum+ glucose	Croissance sur milieu minimum + Succinate
sauvage	++++	+++
<i>E. coli</i> /pAT	++++	+++
<i>E. coli</i> /pAT-ryhB ⁺	+++	-
$\Delta rhyB$	++++	+++
Δfur	+++	-
$\Delta fur \Delta rhyB$	++++	+++

Tableau I : Les différentes souches sont cultivées en milieu minimum (M63) contenant comme source de carbone du glucose ou du succinate. pAT : vecteur multicopie et répliatif chez *E. coli* (vecteur vide) ; pAT-ryhB⁺ : vecteur pAT contenant le gène *RyhB* sous contrôle d'un promoteur constitutif ; +++ : croissance ; - : pas de croissance.

Question 1 : Interprétez les résultats obtenus.

2^{ème} expérience :

Afin de déterminer plus précisément le rôle de Fur dans la régulation de transcription de *RyhB*, des analyses par des expériences de northern-blot ont été réalisées. Les souches d'*E. coli* mutantes Δfur , $\Delta rhyB$ et $\Delta fur\Delta rhyB$ sont cultivées en milieu riche (LB) jusqu'en phase exponentielle de croissance et un chélateur du fer est ajouté ou non pendant 15 min. Un échantillon de culture est prélevé et les ARN totaux sont extraits et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Un northern-blot a ensuite été réalisé avec des sondes spécifiques de *RyhB* ou de *sdhCDAB* (Figure 1).

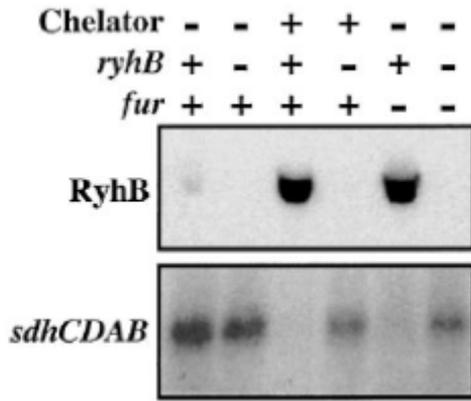


Figure 1

Northern-blot à partir d'ARN prélevés dans différentes cultures de mutants d'*E. coli*, en présence ou en absence de chélateur du Fer. La sonde utilisée correspond à un oligonucléotide complémentaire à l'ARNm *sdhD* ou à l'ARN RyhB.

Question 2 : Quel témoin manque-t-il sur ce northern-blot ?

Question 3 : Analysez et interprétez les résultats obtenus.

Question 4 : En vous aidant du schéma représenté Figure 2 ci-dessous, quelles hypothèses feriez-vous pour expliquer la disparition des ARN de *sdhCDAB* en présence de l'ARN RyhB.

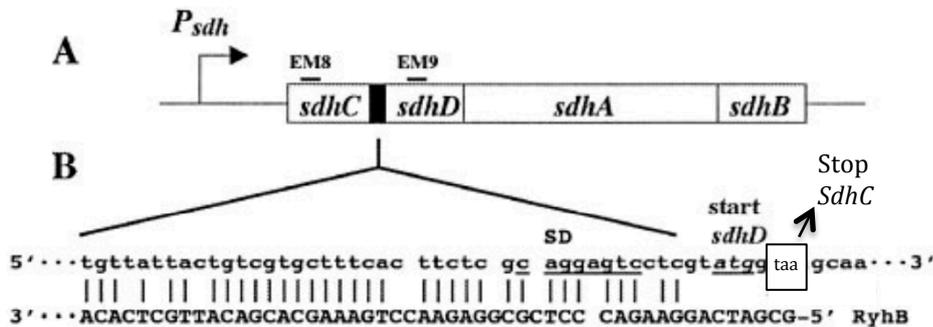


Figure 2

A. Schéma de l'opéron *sdhCDAB*. **B.** Région de complémentarité entre l'opéron *sdhCDAB* et RyhB. Le site de fixation du ribosome (SD) pour *sdhD* est souligné. Le codon initiateur de *sdhD* est indiqué en italique et souligné, le codon stop de *sdhC* est entouré.

3^{ème} expérience :

Les petits ARN bactériens régulent le plus souvent de multiples transcrits. L'expression de la superoxyde dismutase codée par *sodB* est connue pour être régulée positivement par Fur. Des expériences de northern-blot sont réalisées pour déterminer si l'expression de ce gène est dépendante de RyhB (Figure 3).

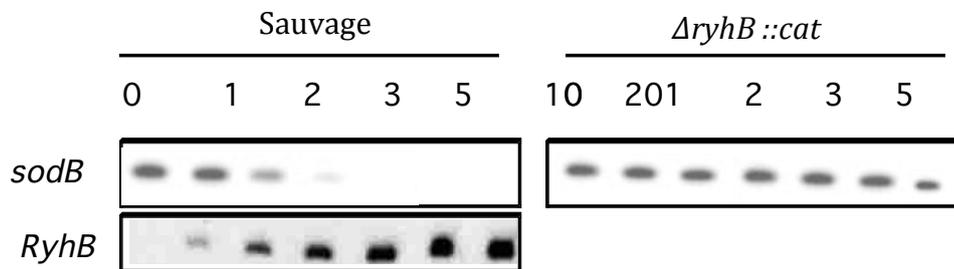


Figure 3

Analyse par northern-blot d'ARN extraits des souches sauvage ou $\Delta ryhB$ avec une sonde *sodB* ou *RyhB*. Les cellules sont cultivées à 37°C jusqu'à une DO_{600} de 0.4. Un chélateur du fer est ajouté, et les ARN d'échantillons prélevés aux temps indiqués (min) sont extraits et analysés par northern-blot. La même quantité d'ARN totaux a été déposée dans chaque puits.

Question 5 : Interprétez ces résultats. Que concluez-vous sur la régulation du gène *sodB* ?

4^{ème} expérience :

Chez *E. coli*, la dégradation des ARNm est généralement déclenchée par un clivage endoribonucléique et les produits résultant de cette action sont alors dégradés par des endo- et des exo-ribonucléases. La RNase E est le plus souvent impliquée dans cette première étape, mais dans certains cas la RNase III peut réaliser le clivage. Le gène *rne* codant la RNase E (endoribonucléase) est un gène essentiel ; cependant, les chercheurs disposent d'un mutant thermosensible *rne^{ts}*.

La stabilité des transcrits *sodB* est déterminée par des expériences de northern-blot avec une sonde *sodB* à partir des ARN extraits d'une souche sauvage, d'une souche mutante *rnc* (RNase III-) et d'une souche *rne^{ts}* incubée plusieurs minutes à température restrictive après traitement à la rifampicine (Figure 4).

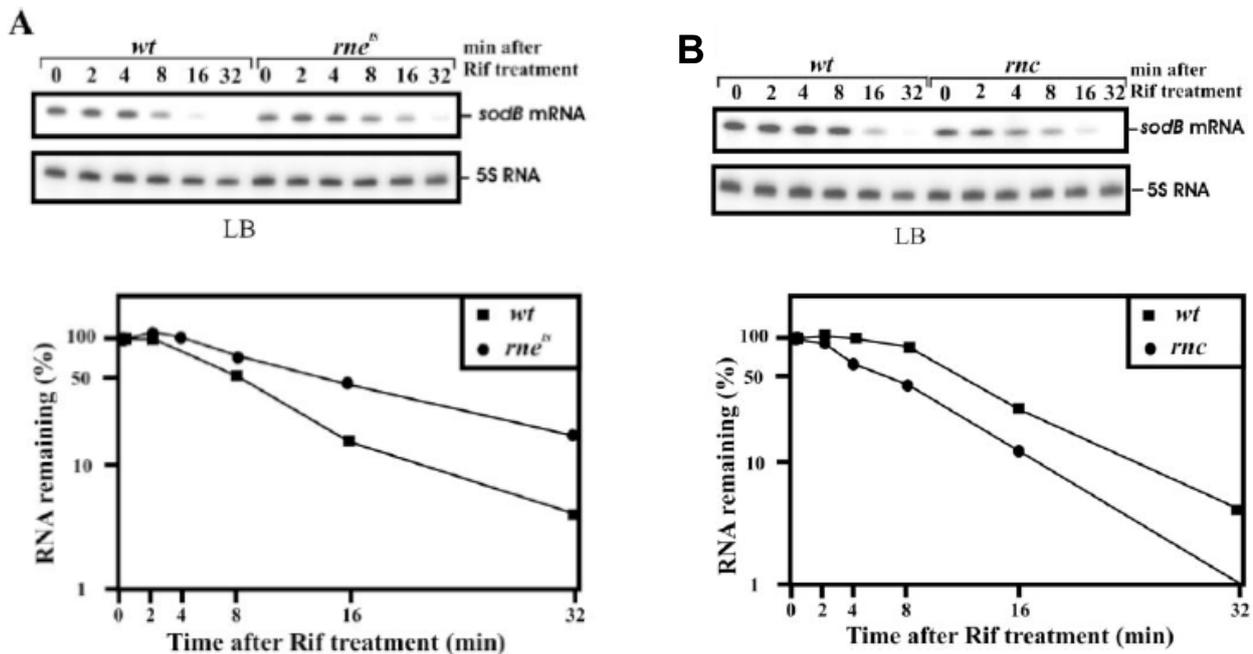


Figure 4

Expérience de northern-blot. Les souches sont cultivées à 37°C. Elles sont alors incubées à 44°C pendant 10 min avant l'addition de la rifampicine. À différents temps, des échantillons sont prélevés, les ARN sont extraits et analysés par northern-blot à l'aide d'une sonde *sodB*. Les graphes montrent le taux relatif d'ARN pour chaque temps déterminé par quantification des autoradiogrammes correspondants.

Question 6 : Définissez un mutant thermosensible.

Question 7 : Quel est l'effet de la rifampicine et quel est l'intérêt d'ajouter cet antibiotique ?

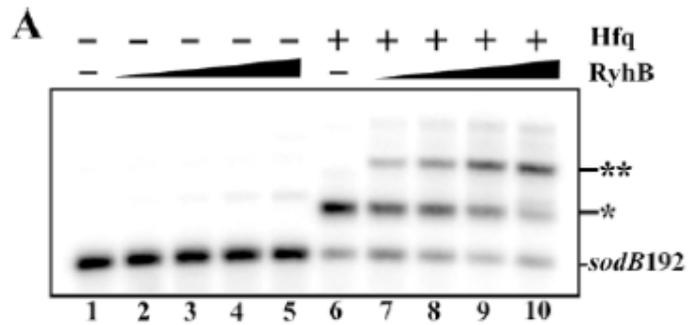
Question 8 : Commentez les résultats obtenus.

5^{ème} expérience :

Un autre acteur de ce mécanisme de régulation est la protéine Hfq. Pour étudier son rôle, des expériences de retard sur gel sont effectuées en présence d'une portion de l'ARN *sodB192* (qui correspond à la région 5'UTR composée de 56 nts et des 136 premiers nts de la séquence codante), de l'ARN RyhB et de la protéine Hfq (Figure 5).

Figure 5

L'ARN *sodB192* (-56 à +136) radiomarqué est incubé seul ou avec des quantités croissantes de RyhB en absence (puits 1 à 5) ou en présence (puits 6 à 10) de la protéine Hfq. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide non dénaturant et révélés par autoradiographie.



Questions 9 :

- À quoi correspondent les bandes mentionnées par * et ** ?
- Commentez les résultats obtenus Figure 5.
- Qu'en concluez-vous quant au rôle de la protéine Hfq ?

6^{ème} expérience :

Pour vérifier le rôle de la RNase E, des expériences *in vitro* sont réalisées en présence de l'ARN *sodB192*, de la RNase E et de la protéine Hfq (Figure 6).

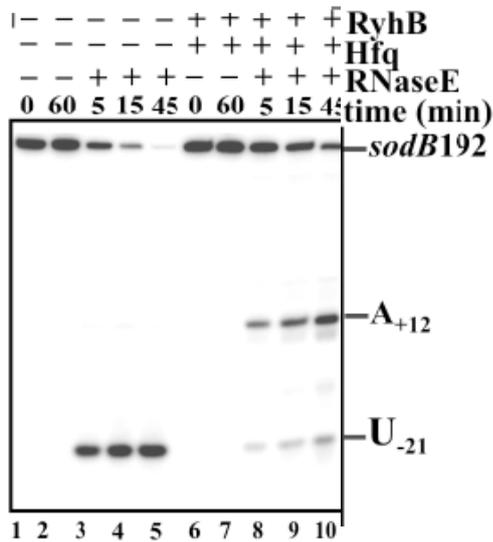


Figure 6

La région 5'UTR de l'ARN *sodB* (*sodB192*) est radiomarquée à son extrémité 5' et incubée à 37°C avec la RNase E en présence ou absence de la protéine Hfq et de l'ARN RyhB. Des fractions aliquotes sont prélevées aux temps indiqués et analysées sur gel de polyacrylamide dénaturant. Après révélation, le résultat est présenté sur l'autoradiographie ci-contre.

Questions 10 :

- À quoi correspondent les molécules *sodB192*, *A₊₁₂* et *U₋₂₁* visualisées ?
- Commentez la Figure 6. En déduire l'effet de l'ARN RyhB

Des expériences indiquent que la dégradation du petit ARN RyhB est indépendante de la RNase E mais dépendante d'une autre endoribonucléase, la RNase III.

Question 11 : Sur le schéma représenté Figure 7 (page suivante), indiquez quelle RNase est impliquée dans chaque coupure (indiquée par une flèche).

Question 12 : À l'aide des schémas représentés Figures 7 et 8 (page suivante), proposez un modèle de dégradation des ARNm de *sodB* et de RyhB en présence ou non de fer.

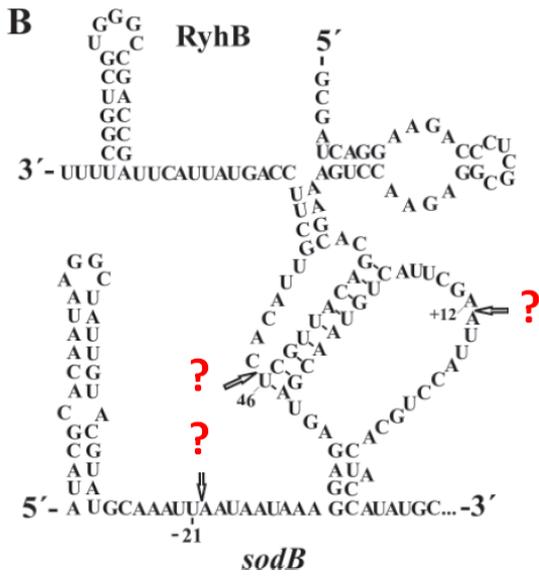
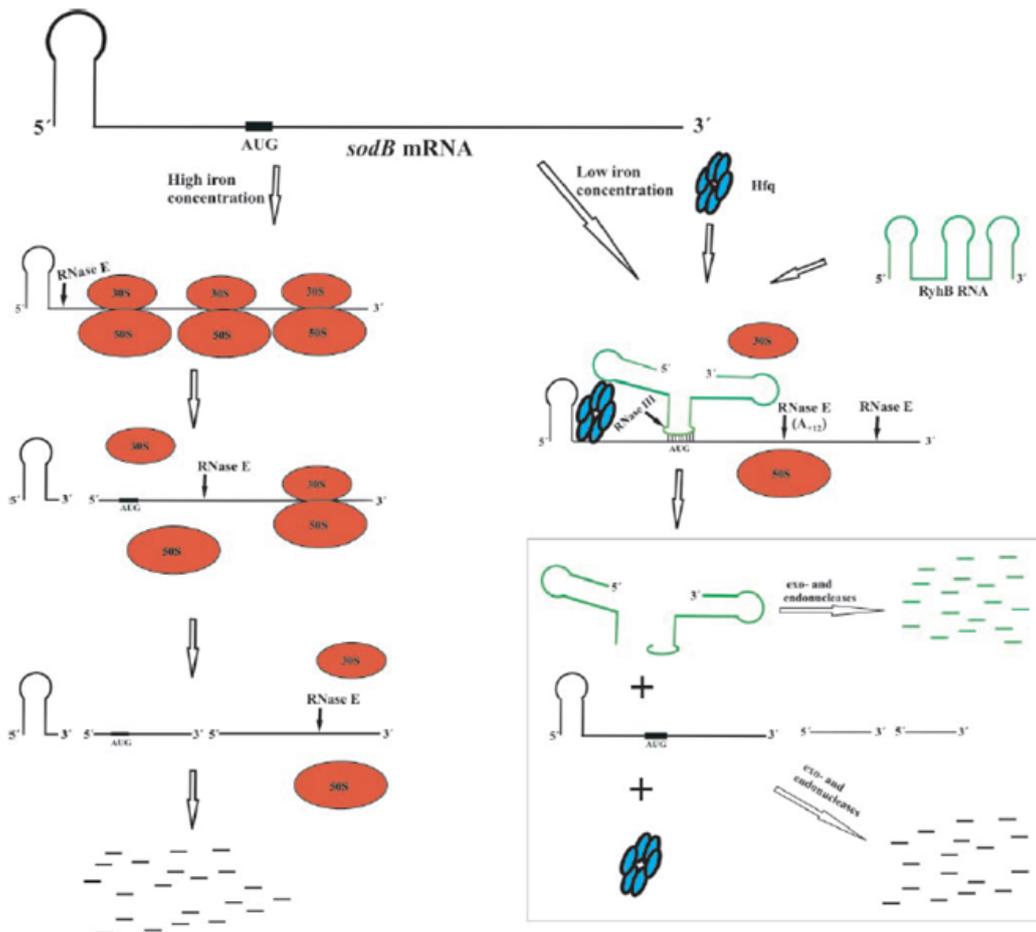


Figure 7
Interaction de l'ARNm *sodB* avec le petit ARN RyhB

Figure 8
Modèle de régulation du gène *sodB* par le petit ARN RyhB



TD n° 13 : RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUES CHEZ LES PROCARYOTES

Exemple de l'opéron tryptophane chez *Escherichia coli*

Le tryptophane est un acide aminé constituant des protéines. Alors qu'il n'est pas synthétisé par l'homme qui doit le trouver dans son alimentation, les bactéries sont capables, en revanche, de pousser sur un milieu dépourvu de tryptophane. La biosynthèse de cet acide aminé nécessite quatre enzymes codées par les gènes de structure *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* et *trpA* (les deux derniers codant les deux sous-unités d'une même enzyme) organisés en opéron (Figure 1). Cette voie de biosynthèse est contrôlée par des mécanismes fins de régulation que l'on retrouve dans d'autres voies de biosynthèse des acides aminés (histidine, phénylalanine...). Le but est ici d'en comprendre le principe.

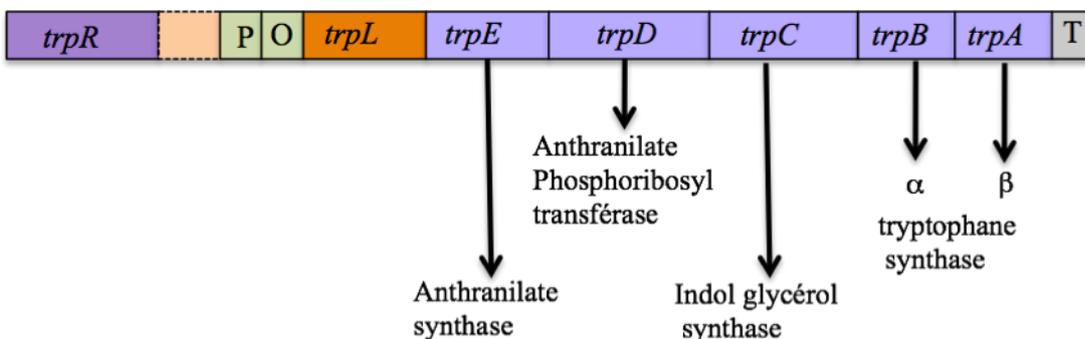


Figure 1 Organisation de l'opéron tryptophane.

Les noms des enzymes codées par les gènes de la voie de biosynthèse sont indiqués sous les gènes correspondants. *P* = promoteur ; *O* = Opérateur ; *T* = Terminateur.

Questions 1 :

- Définissez ce qu'est un opéron.
- Schématisez les produits de transcription et de traduction.
- Mentionnez sur le schéma les signaux de traduction.

Un autre gène, *trpR*, localisé en amont, intervient dans la régulation de l'expression de l'opéron tryptophane.

La bactérie *E. coli* sauvage, ainsi qu'une souche mutante dont le gène *trpR* a été inactivé ($\Delta trpR$), ont été cultivées jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance sur un milieu pourvu ou non de tryptophane (50 $\mu\text{g/ml}$). Les ARN ont été extraits et soumis à une analyse par northern-blot en utilisant deux sondes D et M. La sonde D correspond à une partie de la séquence du gène *trpD*. La sonde M correspond à une séquence du gène constitutif *murF* sans rapport avec l'opéron tryptophane (et situé dans une toute autre région du chromosome bactérien). Les résultats sont présentés Figure 2A.

Des extraits protéiques ont également été préparés à partir de ces cultures et les activités spécifiques des enzymes de la voie de biosynthèse du tryptophane ont été mesurées. Les résultats de l'activité de la tryptophane synthase sont reportés Figure 2B.

Question 2 : Quel est l'intérêt de l'hybridation avec la sonde M ?

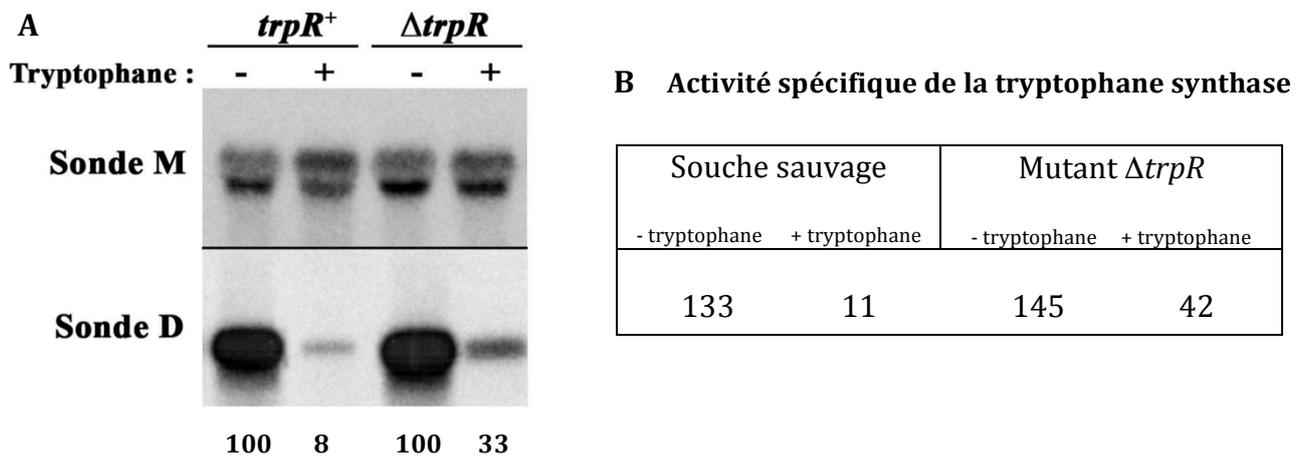


Figure 2

A. Northern-blot : panel du haut : révélation de l'hybridation avec la sonde M ; panel du bas : avec la sonde D. Les valeurs indiquées sous l'autoradiogramme correspondent aux intensités relatives des bandes obtenues avec la sonde D, exprimées en pourcentage de celles obtenues chez la souche sauvage en absence de tryptophane (100%). B. Activité spécifique de la tryptophane synthase exprimée en unités arbitraires.

Questions 3 :

- À partir des résultats présentés Fig. 2A, quel rôle attribuez-vous au produit du gène *trpR* et dans quelle condition ?
- La régulation par le tryptophane est-elle totalement dépendante de la présence de *trpR* ?

Question 4 : Les résultats des activités enzymatiques présentés Fig. 2B vous apportent-ils des informations supplémentaires ?

Une nouvelle expérience de northern-blot a été réalisée sur des ARNm issus de la souche sauvage et du mutant Δ *trpR* cultivés en absence ou en présence de tryptophane, en utilisant cette fois-ci la sonde L. Cette dernière correspondant à la séquence *trpL* de fonction inconnue (Fig.1). La sonde M est, quant à elle, utilisée dans chaque northern-blot. Les autoradiogrammes sont présentés Figure 3A et B.

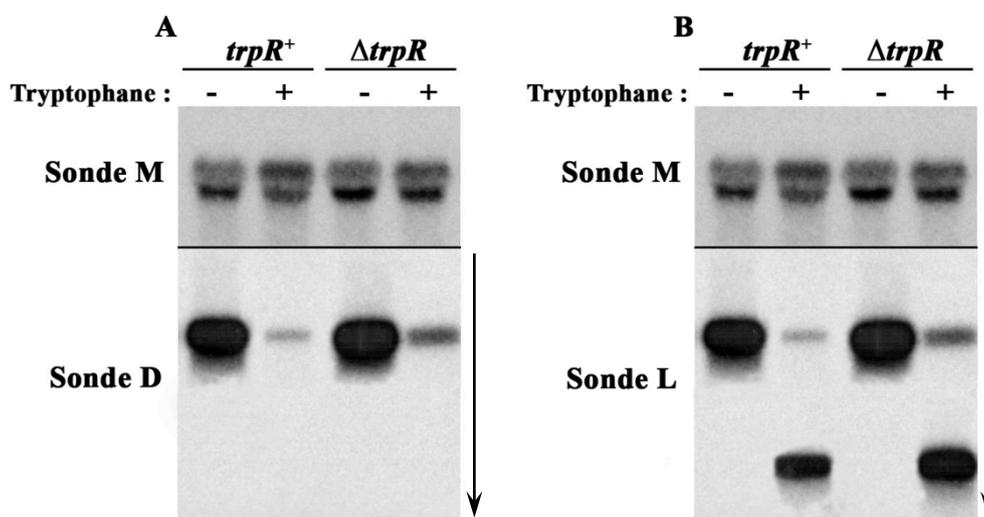


Figure 3

A. Hybridation avec les sondes M et D (voir Figure 2A). La flèche indique le sens de migration. B. La même membrane a été déshybridée, puis ré-hybridée avec la sonde L.

Question 5 : Analysez les résultats présentés Figure 3B.

Question 6 : Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre pour expliquer ces résultats ?

Le séquençage du transcrit de petite taille (Figure 4) a révélé qu'il correspond au début du transcrit polycistronique de l'opéron tryptophane.

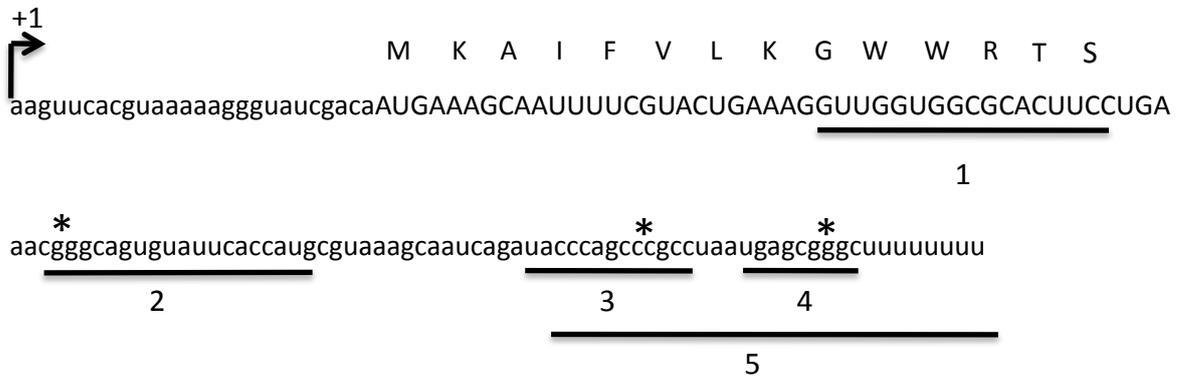


Figure 4

Séquence du transcrit de petite taille révélé par le second northern-blot (Figure 3B). Les séquences 1, 2, 3 et 4 ont été soulignées car elles sont susceptibles d'établir des structures secondaires. Les mutations ponctuelles ultérieurement décrites dans le texte sont indiquées par des *.

Question 7 : Quel rôle fonctionnel peut-on attribuer à la séquence écrite en majuscules ?

Questions 8 :

- Donnez les différentes structures secondaires possibles de cet ARN (impliquant les séquences 1, 2, 3 et 4).
- Quel est le rôle fonctionnel possible de la séquence 5 ? Et à quelle condition ?

Des mutations ponctuelles ont été introduites dans la région L chez une souche mutante *ΔtrpR*. Nous analyserons en particulier les effets d'une mutation simple et de plusieurs mutations combinées.

- mutation 1 : AUG ---> AUA
- mutation 2 : AAA--->UCC (K-->S) ; GCA--->CGC (A-->N) ; AUU--->GUU (I-->V) ;
 UUC--->CCU (F-->P) ; GUA--->CGC (V-->N)
- mutation 3 : UGG--->GCA (W-->A) ; UGG--->GCA (W-->A)
- mutation 4 : mutations 2 + mutations 3

Des expériences de northern-blot ont été réalisées sur les ARNs issus de ces mutants cultivés en absence ou présence de tryptophane. Dans le tableau I sont indiquées, pour chaque souche et dans chaque condition, les quantités du petit ARNm. Celles-ci sont exprimées en pourcentage de celle obtenue en présence de tryptophane dans la souche de référence *ΔtrpR* (100 %).

Tableau I

Présence du petit ARNm chez les différents mutants indiqués cultivés en absence ou présence de tryptophane.
nd : non détectable

<i>souche</i>	<i>Petit ARNm</i>	
	<i>+trp</i>	<i>-trp</i>
$\Delta trpR$	100	nd
$\Delta trpR+1$	100	100
$\Delta trpR+2$	100	nd
$\Delta trpR+3$	100	100
$\Delta trpR+4$	100	100

Question 9 : Quelles informations vous apportent les résultats obtenus avec les mutants suivants :

- a) $\Delta trpR+1$;
- b) $\Delta trpR+2$;
- c) $\Delta trpR+3$;
- d) $\Delta trpR+4$?

Question 10 : En tenant compte des structures secondaires décrites précédemment et des résultats de la question 10, proposez un mécanisme de régulation expliquant l'apparition du petit ARNm :

- a) uniquement en présence de tryptophane chez les mutants $\Delta trpR$ et $\Delta trpR+2$;
- b) en présence et en absence de tryptophane chez les mutants $\Delta trpR+1$, $\Delta trpR+3$ et $\Delta trpR+4$.

Dans le but de confirmer le mécanisme proposé, d'autres mutations, représentées par une étoile (*) et affectant les différentes structures secondaires (Figure 4), ont été introduites dans la souche $\Delta trpR$. L'accumulation du petit ARNm a été estimée chez ces différents mutants après culture en absence ou en présence de tryptophane.

Question 11 : En vous appuyant sur le modèle proposé, quels seront, selon vous, les résultats obtenus ? Complétez le tableau ci-dessous en indiquant la présence du petit ARNm par "+" et son absence par "-".

Mutation (contexte $\Delta trpR$)	Boucle déstabilisée	Résultats attendus	
		-Trp	+Trp
2*	2-3		
3*	2-3 ; 3-4		
2*+3*	3-4		

NB : 2*+3* permet de restaurer la formation de la boucle 2-3.

TD N° 14 : RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNÉRIQUE

Exemple de l'homéostasie du fer dans les cellules de mammifères

L'homéostasie du fer, dans les cellules de mammifères, est maintenue par la régulation coordonnée de l'expression de deux gènes codant deux protéines clés : le récepteur à la transferrine et la ferritine. La transferrine est une glycoprotéine sérique qui peut fixer deux ions ferriques, et qui est reconnue par un récepteur situé à la surface des cellules endothéliales. L'entrée du fer dans la cellule se produit par un processus d'endocytose des complexes ternaires (récepteur à la transferrine-transferrine-ions ferriques). Une fois à l'intérieur de la cellule, le fer, après avoir été libéré des vésicules d'endocytose, est soit utilisé directement, soit stocké grâce à la ferritine, un complexe protéique formé de 24 sous-unités identiques et qui constitue un véritable réservoir à fer pouvant contenir jusqu'à 4500 ions ferriques.

La régulation coordonnée de l'expression des gènes du récepteur à la transferrine et de la ferritine dépend de la disponibilité en fer. Lorsque la cellule est carencée en fer, elle synthétise beaucoup de récepteur à la transferrine mais pas de ferritine (captage et pas de stockage), et inversement, lorsque le fer est en excès, la cellule fabrique beaucoup de ferritine et peu de récepteur à la transferrine (stockage et peu de captage).

I. Des chercheurs se proposent d'étudier plus précisément la régulation de l'expression du gène de la ferritine.

Question 1 : Quels sont les différents niveaux de régulation possibles de la synthèse de la ferritine ?

Dans un vecteur plasmidique contenant le gène entier codant la ferritine (promoteur, 5'UTR, CDS et 3'UTR), les chercheurs ont d'abord remplacé la CDS de la ferritine par celle du gène bactérien codant la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) (Figure 1, construction A). D'autres constructions, dérivées de cette construction, ont ensuite été obtenues en remplaçant :

- 1) le promoteur du gène de la ferritine par celui du gène de l'actine β (Figure 1, construction B) ;
- 2) la région 3'UTR du gène de la ferritine par celle du gène de l'actine β (Figure 1, construction C) ;
- 3) la région 5'UTR du gène de la ferritine par celle du gène de l'actine β (Figure 1, construction D).

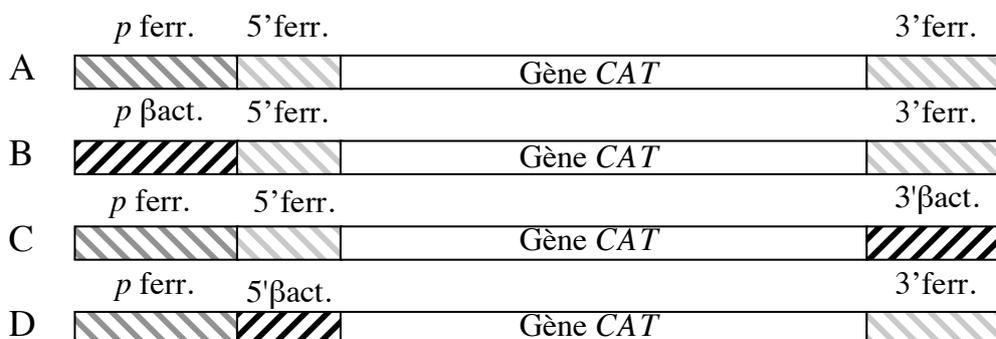


Figure 1 - Constructions rapporteuses

p ferr. : promoteur du gène de la ferritine ; *p beta.* : promoteur du gène de l'actine β ; *5' ferr.* et *3' ferr.* : respectivement, régions 5'UTR et 3'UTR du gène de la ferritine ; *5' beta.* et *3' beta.* : respectivement, régions 5'-UTR et 3'-UTR du gène de l'actine β .

Questions 2 :

- Qu'appelle-t-on les régions 5'UTR et 3'UTR d'un gène ?
- Comment peut-on déterminer précisément, pour un gène donné, la jonction entre son promoteur proprement dit et sa région 5'UTR ?

Chacune de ces 4 constructions a été introduite par transfection dans des cellules de mammifère en culture. L'activité CAT a été révélée à partir des extraits protéiques des cellules transfectées cultivées en situation de carence ou d'excès de fer. Les résultats sont présentés Figure 2.

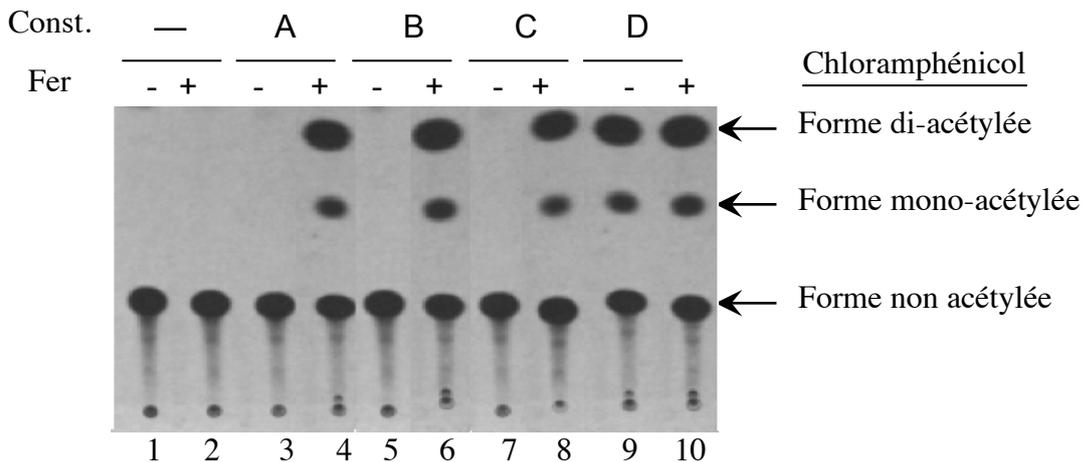


Figure 2 - Analyse de l'activité CAT

Les extraits protéiques ont été préparés à partir des cellules de mammifère non transfectées (puits 1 et 2) ou transfectées par les constructions indiquées (puits 3 à 10), et cultivées en situation de carence (-) ou d'excès (+) de fer. L'activité CAT est révélée en incubant ces extraits avec du chloramphénicol radioactif. Les formes acétylées et non acétylées du chloramphénicol sont séparées par chromatographie et révélées par autoradiographie.

Questions 3 :

- Que représente l'activité CAT ?
- Que peut-on conclure de l'expérience témoin (puits 1 et 2) ?

Questions 4 :

- Interprétez l'ensemble des résultats.
- Vous permettent-ils de préciser le (ou les) niveau(x) possible(s) de régulation de l'expression du gène de la ferritine ? Justifiez.

II. Parallèlement, une autre équipe de chercheurs a montré qu'une protéine particulière, appelée IRP (pour *Iron Response Protein*), est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes ayant un rôle dans le métabolisme du fer.

Des expériences de retard de migration sur gel ont alors été réalisées avec un fragment d'ARN, obtenu par transcription *in vitro* en présence de ribonucléosides triphosphates radiomarqués, et correspondant à la région 5'-UTR du gène de la ferritine. Cette sonde ARN a alors été incubée en absence ou en présence d'extraits protéiques cytosoliques obtenus à partir de cellules de mammifères (fibroblastes) cultivées en situation de carence ou d'excès de Fer, ainsi qu'en absence ou présence d'un excès d'ARN compétiteur spécifique (S) ou non spécifique (NS). Après incubation, chaque échantillon a été déposé sur un gel non dénaturant. Après révélation, l'autoradiographie du gel est présentée Figure 3.

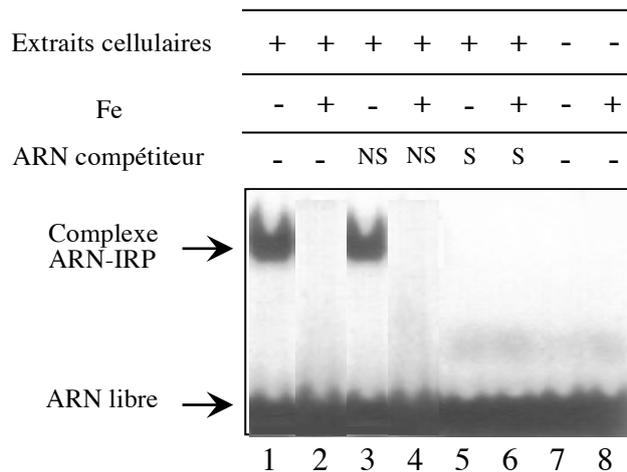


Figure 3 - Autoradiogramme du gel de retard de migration

Un fragment d'ARN radiomarqué correspondant à la région 5'-UTR du gène de la ferritine a été incubé seul (pistes 7 et 8) ou avec des extraits protéiques cytoplasmiques (pistes 1 à 6) issus de cellules de mammifères cultivées en situation de carence (-) ou d'excès (+) de fer, et en absence (pistes 1 et 2) ou en présence d'ARN compétiteur non spécifique (NS : pistes 3 et 4) ou spécifique (S : pistes 5 et 6). Une fraction aliquote de chaque réaction a été soumise à une électrophorèse sur gel non dénaturant. Après migration, une autoradiographie a été réalisée. La protéine responsable du retard de migration sur le gel a pu être identifiée comme étant bien IRP

Question 5 : Quel phosphate (α , β ou γ) était porteur du phosphore radioactif dans les ribonucléosides radiomarqués lors de la transcription *in vitro* réalisée pour fabriquer la sonde ?

Questions 6 :

- Quel est le but de ces expériences ?
- À quoi correspondent respectivement les ARN compétiteurs spécifique et non spécifique ?
- Quel est l'intérêt d'ajouter ces ARN (spécifique et non spécifique) dans ces expériences ?

Questions 7 :

- Que concluez-vous de ces expériences ?
- Comment expliquer alors l'absence de synthèse de ferritine dans des cellules carencées en fer ?
- En conclure le niveau probable de régulation du gène de la ferritine.
- Quelle(s) expérience(s) complémentaire(s) pourrai(en)t être réalisée(s) pour confirmer votre hypothèse ?

III. La séquence nucléotidique de la sonde ARN utilisée dans les expériences précédentes vous est donnée ci-dessous. Le site de fixation de la protéine IRP y a été précisément identifié et a été appelé IRE (pour *Iron Responsive Element*) : il correspond à la portion grisée.

5'-GGGAGACAGUUUCCUGUUCAACAGUGCUUGAACAGAACUC-3'

Questions 8 :

- a) Que représentent les deux séquences soulignées ?
- b) À quelle structure secondaire peuvent-elles conduire ?
- c) Quelle hypothèse peut-on alors émettre quant à la fixation de IRP sur l'IRE ?

Question 9 : Quelles expériences proposeriez-vous pour confirmer ou infirmer cette hypothèse ?

La séquence IRE (présente en un seul exemplaire dans la région 5'UTR du gène de la ferritine), sur laquelle se fixe donc la protéine IRP — et uniquement dans une situation de carence en fer —, est présente en 5 exemplaires dans la région 3'UTR du gène du récepteur à la transferrine. Des expériences de retard sur gel avec cette région 3'UTR ont confirmé que la protéine IRP se fixe bien sur ces éléments IRE de l'ARNm du gène du récepteur à la transferrine.

Question 10 : Sachant que le gène du récepteur à la transferrine est régulé de façon inverse à celui de la ferritine (c'est-à-dire très exprimé en situation de carence en fer et peu exprimé en situation d'excès de fer ; cf. introduction), expliquez à l'aide de deux schémas (l'un représentant une situation de carence en fer, et l'autre une situation d'excès de fer) comment les mêmes éléments *trans*- et *cis*-régulateurs (c'est-à-dire, respectivement, IRP et IRE) permettent une régulation coordonnée, et inversée, des gènes de la ferritine et du récepteur à la transferrine. Quel est alors, selon vous, le (ou les) niveau(x) de régulation possible(s) du gène du récepteur à la transferrine ?

La protéine IRP s'est en fait avérée être la même chaîne polypeptidique que celle de l'enzyme aconitase intervenant dans le cycle de Krebs (conversion du citrate en isocitrate). L'aconitase est une enzyme à noyau Fer-Soufre (où quatre cystéines chélatent trois ou quatre atomes de Fer). Les deux fonctions de cette protéine (aconitase et IRP) sont exclusives l'une de l'autre : en excès de Fer (noyau 4Fe-4S), elle fonctionne en aconitase alors qu'en carence de Fer (noyau 3Fe-4S), elle fonctionne en IRP.

Question 11 : Sachant que le rôle du Cycle de Krebs est de fournir le pouvoir réducteur (sous forme de NADH et de FADH₂) nécessaire à la chaîne respiratoire, et que l'un des intermédiaires du cycle de Krebs, le succinyl-CoA, est le précurseur de l'hème, expliquez "l'intérêt" pour la cellule d'une telle bi-fonctionnalité au sein de la protéine impliquée directement dans l'homéostasie du fer.