

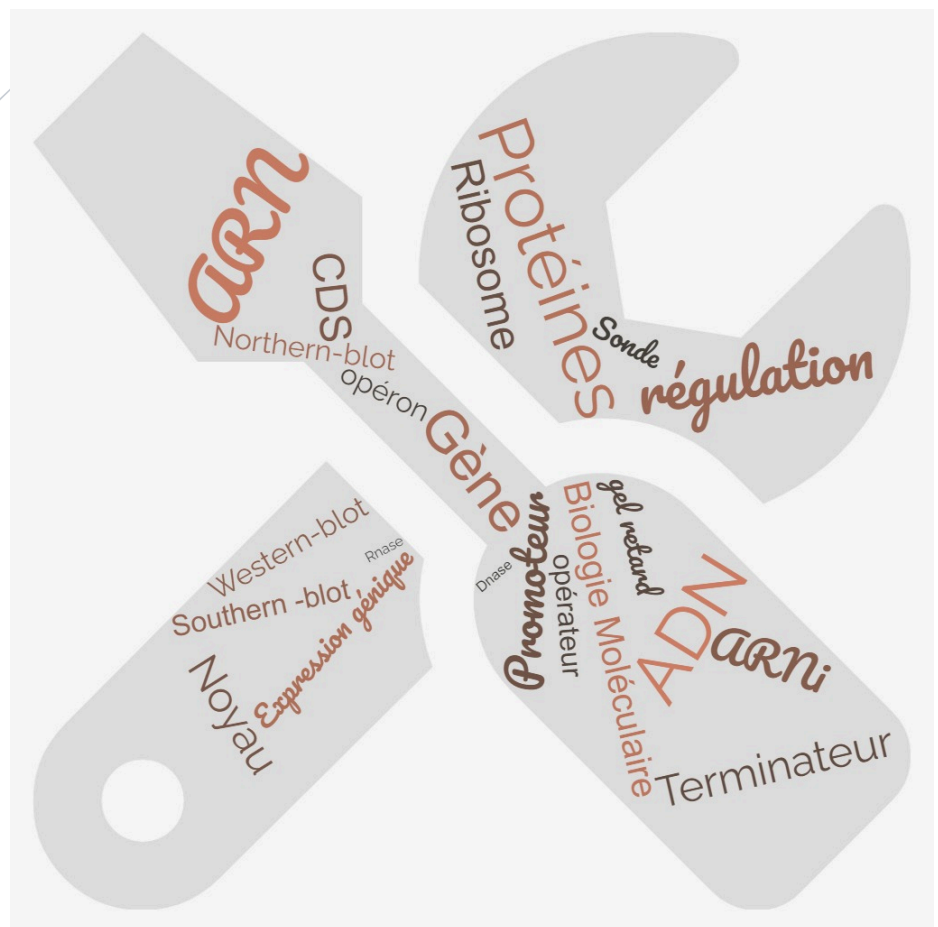
2024-2025

L3 UE OLSV301

Biologie Moléculaire des Génomes

Organisation, Maintien et Expression

Textes de Travaux Dirigés **avec Bulles d'aide**
Hormis le TD 1 (quizz) et le TD 8 (sujet d'annale)



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 (Fig 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 plasmides 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 ?

La réponse aux questions 1a et 1b est dans l'énoncé ci-dessus. Concernant la particularité de la souche, vous devez donner une partie de son génotype et de son phénotype, en étant très précis. Pour la question 1c, réfléchissez à la particularité de l'organisation du génome d'un eucaryote au sein du noyau.

Voir les annexes en fin de poly de TD pages 62-63

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 poly, trois techniques de marquages des acides nucléiques permettant l'obtention de sondes radioactives vous sont présentées : le marquage en extrémité 5', l'amorçage aléatoire et la PCR.

*Voir le poly d'annexe pages 60-61
Attention seuls le marquage en 5' et l'amorçage aléatoire sont demandés*

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.

d) 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 Fig 2-A (locus *argB* de la souche réceptrice) et 2-B (intégration au locus *argB* du plasmide pR-nad⁺ ou Δ1), prédisez le résultat attendu (nombre et taille de bandes) pour ce Southern-blot dans le cas :

a) de la souche réceptrice (sans intégration du vecteur pR-nad) ;

Utilisez la Fig 2-A

b) d'un transformant porteur d'une intégration de pR-nad au locus *argB* ;

Utilisez la Fig 2-B

Conseil : Pour répondre à ces questions, il faut dans un premier temps repérer sur les cartes de restriction présentées en Fig 2-A ou 2-B tous les sites de restrictions présents reconnus par l'enzyme *EcoRI* – le mieux est de représenter sous la carte tous les fragments générés par une digestion *EcoRI*. Puis parmi ces différents fragments vous devez identifier ceux qui sont chevauchant avec la sonde A (donc hybridable avec cette sonde), et qui seront par conséquent visibles sur l'autoradiographie. Enfin, en utilisant les coordonnées présentes sur la carte, vous devez calculer la taille des fragments révélés par la sonde A. Pour la digestion par l'enzyme *PstI* : il suffit de refaire ce travail mais en utilisant les sites *PstI*

c) d'un transformant porteur d'une intégration de pR-nad en dehors du locus *argB* (intégration dite ectopique).

Ce transformant est porteur du locus argB sauvage, mais également d'une copie de pR intégrée ailleurs dans le génome, donc d'une autre copie du gène argB (reconnue par la sonde A).

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

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

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

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

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

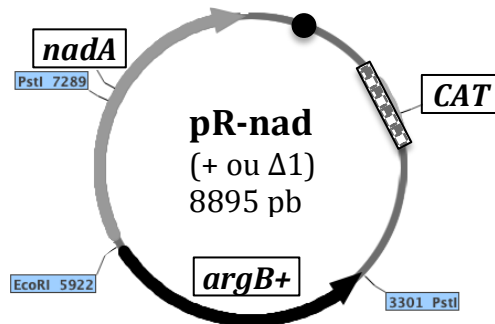
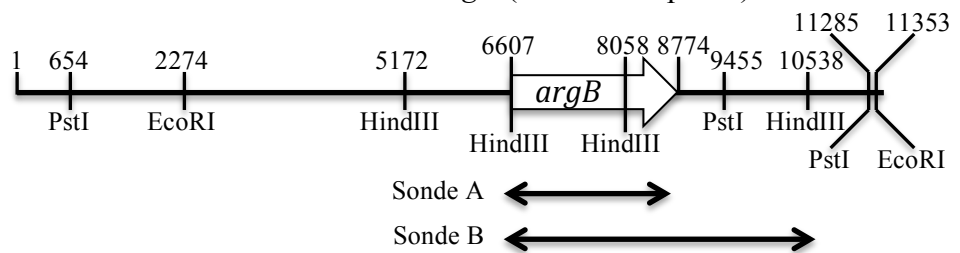


Figure 2-A: Région du chromosome III autour du Locus *argB* (souche réceptrice).

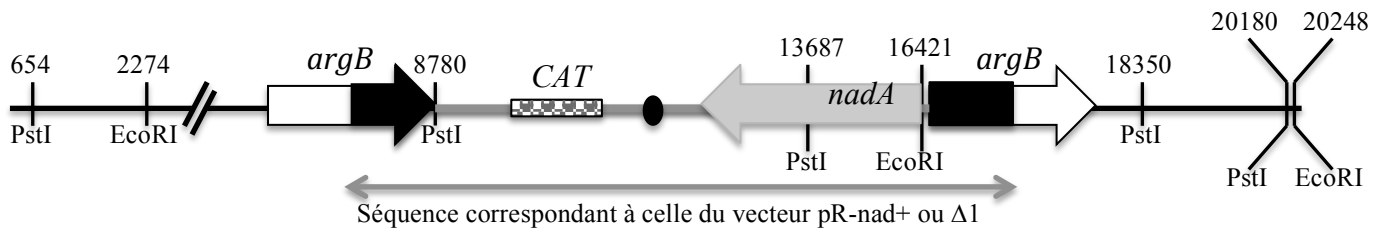


→ Gène *argB*, le sens de transcription est donné par celui de la flèche.

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

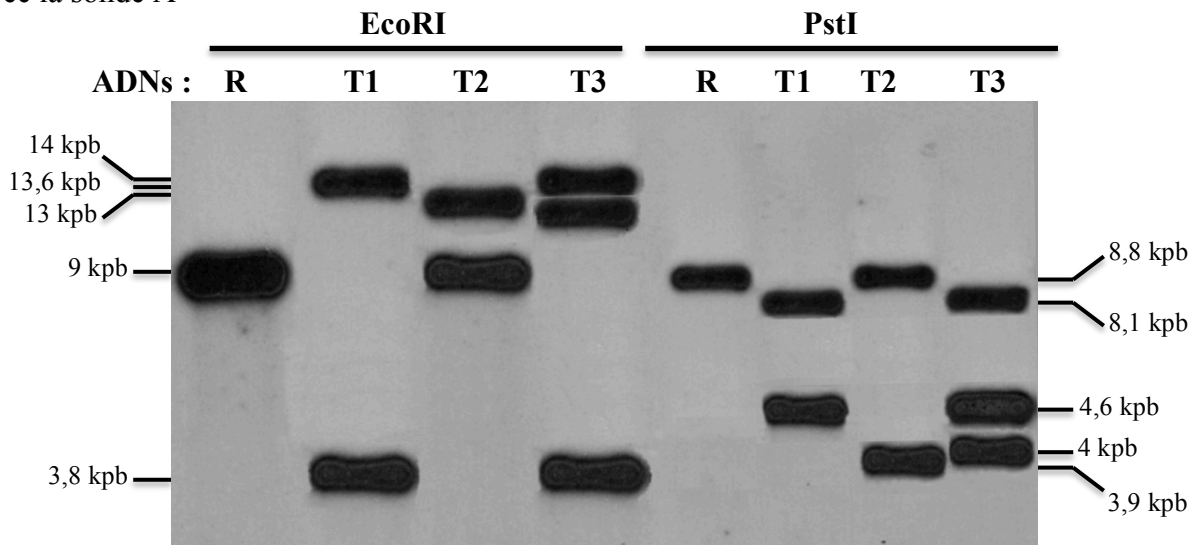
La sonde A correspond au fragment contenant le gène *argB* en entier (allant de 6607 à 8774), identique à celui porté par le plasmide. La sonde B correspond au fragment *HindIII* de 3931 pb (allant de 6607 à 10538).

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

Grâce à la question 4 vous avez établi un profil d'hybridation attendu avec la sonde A sur des ADN génomiques digérés par *EcoRI* ou par *PstI* dans le cas : de la souche sauvage (c'est-à-dire de la souche réceptrice non transformée) (Q4a), d'un transformant ayant une copie du vecteur intégrée au locus *argB* (Q4b) et d'un transformant ayant une copie ectopique (Q4c). Pour répondre à la question 5, il vous suffit de comparer les résultats observés (nombre de bandes et taille de celles-ci) sur la figure 3 pour chaque transformant avec les prédictions de Q4 afin d'identifier le type de transformant (ectopique ou locus *argB*...). Conseils : 1) Vérifier avec le profil de la souche réceptrice (Souche R) vos prédictions proposées en Q4a. 2) Pour chaque transformant, analysez les deux digestions en parallèle, autrement dit analysez pour la souche T1 la digestion par *EcoRI* et *PstI*, comparez les résultats observés avec vos prédictions Q4 pour identifier le type de transformant. Puis passez à la souche suivante.

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).

Procéder comme à la Q4 pour établir le nombre de bandes attendues et leur taille. Concernant l'intensité des bandes visualisées, pour une sonde et des ADN cibles provenant d'un même organisme, l'intensité de la bande va dépendre de la taille de l'homologie entre la sonde et le fragment cible, autrement dit de la région commune entre les 2 ADN. Vous devez résumer votre prédiction en schématisant le résultat théorique de l'autoradiographie.

Avant l'introduction dans *A. nidulans* du plasmide pR-nad Δ 1, la délétion du site de régulation dans la région promotrice du gène *nadA* a été vérifiée par séquence en utilisant la méthode de séquençage 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.

Voir les annexes pages 66-67

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

Voir les annexes pages 66-67

Questions 8 :

- a) Pourquoi avoir chauffé les échantillons avant leur dépôt sur le gel ?
- b) Pourquoi utiliser un gel de polyacrylamide et non un gel d'agarose ?
- c) 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.

Quelques rappels concernant les grandeurs caractérisant les molécules d'ADN circulaire :

Lk = nombre d'enlacements (nombre de fois qu'un brin passe devant l'autre, et toujours dans le même sens) ;

Tw = nombre de tours d'hélice ; $Tw = N/h_0$ où N est le nombre de paires de bases en double hélice et h_0 le nombre de paires de bases par tour d'hélice (pas de l'hélice) ;

Wr = nombre de surenroulements.

$Lk = Tw + Wr$; Tw est toujours positif ; Wr peut être négatif ou positif.

Si les deux brins restent intacts (non coupés) : $Lk = Cste \Rightarrow$ si Tw augmente, Wr diminue et inversement ;

Si au moins un des deux brins est coupé (mécaniquement ou par action d'une topoisomérase), Lk varie mais Tw reste constant \Rightarrow Lk et Wr varient dans le même sens.

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 (Wr) de -25 et un nombre d'enlacements (Lk) 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.

h_0 est déterminé par les paramètres physico-chimiques. Si ces derniers changent, h_0 varie (et donc Tw varie).

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 Tw, Lk et Wr après relaxation complète.

On vous demande 3 valeurs. En connaître une vous suffit pour accéder aux deux autres. Il faut donc rechercher laquelle de ces trois grandeurs n'a pas changé. Or on vous dit que les conditions physico-chimiques n'ont pas changé, donc h_0 n'a pas changé. Et une topoisomérase n'agit pas sur le nombre de paires de bases en double hélice (N)...

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

Attention ! Ici, on serait tenté de penser que h_0 reste inchangé car les conditions physicochimiques sont les mêmes. Mais il faut lire jusqu'au bout. On incorpore du BET qui détord l'ADN...

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.

Il s'agit là de connaître la quantité de molécules de BET incorporées par molécule de plasmide, c'est-à-dire par 4320 pb. Soit on calcule le nombre de molécule de BET incorporées par pb (BET/pb) et on multiplie par 4320, soit on calcule tous les combien de pb il y a une molécule de BET incorporée (pb/BET), et on divise 4320 par ce nombre. Dans les deux cas, faites l'équation aux dimensions pour vérifier que vous tombez bien sur un nombre de molécules de BET par plasmide. Les grandeurs qui nous sont données pour « BET » et « pb » sont des concentrations. Or nous voulons des quantités. Mais nous n'avons pas besoin de connaître le volume car celui-ci est le même pour les molécules de BET et celles de plasmide (et donc de pb). Le rapport des concentrations est donc ici égal au rapport des quantités.

b) En déduire les nouvelles valeur de T_w , L_k et W_r .

Ici, il n'y a pas d'action de topoisomérase. Vous devez donc en déduire le paramètre qui reste inchangé. On vous dit que chaque molécule de BET détord de 26° , ce qui signifie que l'incorporation du BET résulte en une diminution du nombre de tours d'hélice : T_w diminue et il vous faut calculer de combien.

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 $(\text{AT})_{34}$ en présence d'une protéine qui stabilise l'ADN simple brin (SSB).

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

On suppose donc que cette région $(\text{AT})_{34}$ est entièrement dénaturée...

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.

Par ailleurs, réfléchissez bien sur le niveau d'énergie de chacun des deux topoisomères : l'initial (le plasmide surenroulé de départ dont vous avez calculé les paramètres L_k , T_w et W_r à la question 1) et le final (où les deux brins sont séparés sur la région $(\text{AT})_{34}$). Sachant que toutes les molécules se trouvent sous cette dernière forme topoisomérique, en quoi la présence des protéines SSB est essentielle dans cette expérience ? En déduire sous quelle proportion serait chacun des deux topoisomères en question en l'absence des protéines SSB.

Problème 2

Une série d'expériences a été menée sur un plasmide double brin fermé de 5607 pb isolé à partir d'une culture bactérienne. A 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).

Vous ne devez pas perdre de vue ce que vous avez appris à la question 3 du problème précédent, à savoir que le BET détord. Ainsi, la comparaison du profil de migration de la piste B avec celui de la piste A doit vous permettre de démontrer que le surenroulement du plasmide est bien un surenroulement négatif.

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).

Il est rappelé que la DNase I est une endonucléase qui fait des coupures simple brin sur de l'ADN double brin (elle coupe aléatoirement l'un ou l'autre des deux brins). Si on la laisse agir longtemps (même en quantité limitante), elle va donc complètement (ou grandement) dégrader l'ADN double brin (le découper en petits morceaux). D'après le topoïsomère présent piste C, déduisez le nombre de coupures qu'a subi chaque molécule de plasmide. Comment la présence du BET en excès peut-il expliquer cela ?

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).

La topoisomérase I fait une coupure sur un brin permettant d'enlever à chaque fois un supertour puis referme, et elle recommence. Il nous est précisé que la réaction est complète. Cela signifie que, a priori, pour chaque molécule de plasmide, tous les supertours ont été enlevés. On s'attend donc à obtenir 100% de molécules relaxées ($Wr = 0$). Or, puits D, on a bien une bande majoritaire correspondant à $Wr = 0$, mais on observe également deux autres bandes : une de densité intermédiaire correspondant à $|Wr| = 1$ (soit $Wr = +1$, soit $Wr = -1$, soit encore un mélange des deux), et une de densité encore plus faible correspondant à $|Wr| = 2$ (soit $Wr = +2$, soit $Wr = -2$, soit encore un mélange des deux).

Vous pouvez émettre plusieurs hypothèses expliquant la formation de ces topoïsomères correspondant aux deux bandes en question. L'une de ces hypothèses conduirait (respectivement pour la bande intermédiaire et celle du bas) à $Wr = +1$ et $Wr = +2$, une autre hypothèse conduirait respectivement à $Wr = -1$ et $Wr = -2$, et une troisième hypothèse conduirait à 50% +1 / 50% -1 pour la bande intermédiaire et 50% +2 / 50% -2 pour la bande du bas. Quelles sont ces trois hypothèses ? L'expérience suivante va vous permettre de trancher entre les trois.

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).

Le BET est ici en quantité limitée. Toutes les molécules de BET vont donc se fixer mais en se répartissant équitablement sur toutes les molécules de plasmide. En effet. Il est rappelé que d'après la loi d'action de masse, il découle que toutes les molécules de plasmide vont subir le même traitement. Autrement dit, toutes vont fixer la même quantité de BET, et donc être détordues de la même manière (et non pas certaines qui fixeraient beaucoup de BET au détriment d'autres qui n'en fixeraient pas).

Par ailleurs, on constate que l'intensité de la 1^{ère} bande de la piste D (celle correspondant à $Wr = 0$) correspond à celle de la 3^{ème} bande de la piste E ($|Wr| = 2$). Or on sait que le BET détord et donc fait diminuer Tw ($TW_E < TW_D$). Donc, étant donné que Lk reste constant ($Lk_E = Lk_D$) puisque qu'il n'y a pas eu de coupure des brins entre l'expérience 3 (puits D) et l'expérience 4 (puits E), on en déduit que $Wr_E > Wr_D$. Par conséquent, pour toutes les molécules de la 3^{ème} bande du puits E, vous devez pouvoir en déduire la valeur algébrique de Wr .

Toutes les molécules de plasmide ayant subi le même sort, on peut donc affirmer que celles correspondant à la bande intermédiaire et à la bande du bas du puits D ont vu leur Wr varier avec la même amplitude et dans le même sens que pour celles de la bande majoritaire du puits D. Sachant cela et observant que l'intensité de la bande intermédiaire du puits D correspond à la somme des intensités des 2^{ème} et 4^{ème} bandes du puits E et que l'intensité de la bande du bas du puits D correspond à la somme des intensités des 1^{ère} et 5^{ème} bandes du puits E, vous devez être en mesure de donner les valeurs algébriques de Wr pour chacune des bandes du puits E et ainsi trancher entre les trois hypothèse que vous avez émises à l'issue de l'expérience précédente.

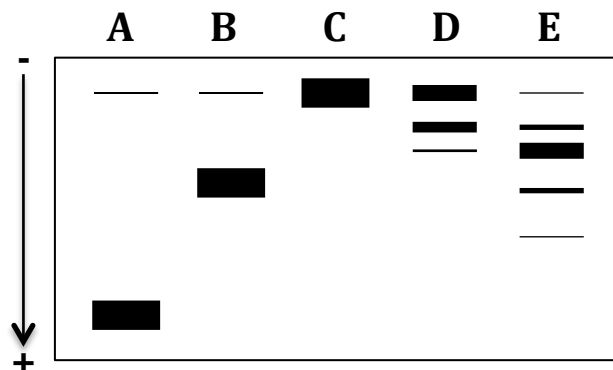
Expérience 5

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.

Cette expérience doit vous permettre de confirmer les conclusions de l'expérience précédente, à savoir l'hypothèse retenue pour expliquer l'apparition de la bande intermédiaire et de la bande du bas du puits D.

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 EUKARYOTES

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.

Chez les eucaryotes, la seule polymérase présente en permanence au niveau de la fourche de réplication, et donc susceptible de contenir l'activité primase, est la polymérase α .

Expérience 1

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

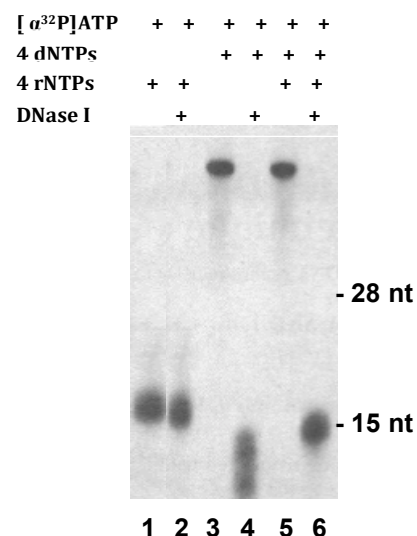
- soit les 4 rNTPs ;
- soit les 4 dNTPs ;
- soit les 4 rNTPs et les 4 dNTPs.

Il est rappelé que les rNTPs sont les substrats d'une activité ARN polymérase ; les dNTPs sont les substrats d'une activité ADN-polymérase ; l' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ est un rNTP et ne peut donc être utilisé que par une activité ARN polymérase : par conséquent, si on obtient un produit de synthèse radio-marqué (visible en autoradiographie), c'est que la fabrication de ce produit a mis en jeu une activité ARN-polymérase.

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 :

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

Questions 2 :

- Quelles explications peuvent rendre compte des résultats obtenus lorsque seuls les 4 rNTPs sont présents dans le milieu réactionnel (piste 1 et 2) ?
- Quelles explications peuvent rendre compte des résultats obtenus lorsque seuls les 4 dNTPs sont présents dans le milieu réactionnel (pistes 3 et 4) ?
- 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).
- 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 l'ADN polymérase α , à partir d'extraits d'embryons de drosophile, est une étape de sédimentation en gradient de glycérol. Les activités ADN-polymérase et primase des différentes fractions de ce gradient ont été mesurées. Les résultats sont présentés Figure 2.

Il est précisé que la méthode de purification utilisée ici est une méthode douce qui permet de maintenir associées les différentes sous-unités.

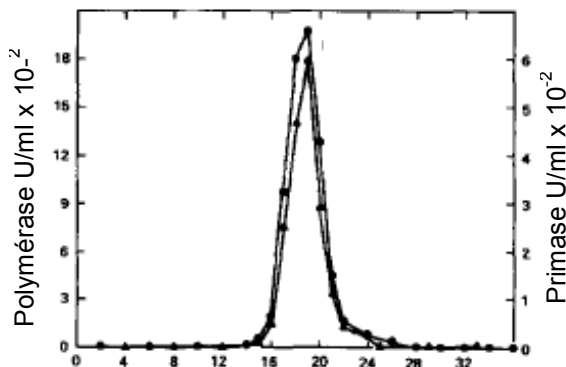


Figure 2

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 ?

- d) 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 ?

Il est rappelé que les chromosomes eucaryotes sont linéaires alors que le chromosome bactérien est circulaire.

Faites un schéma de la réplication de l'extrémité des chromosomes avec le brin avancé et le brin retardé pour comprendre en quoi la réplication des extrémités pose problème sur un brin (le brin retardé) et en quoi l'absence de l'activité télomérase permettant d'y remédier résulterait en un raccourcissement progressif des chromosomes au fur et à mesure des divisions cellulaires (et donc des réplications).

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.

Il est rappelé que la télomérase est un complexe ribonucléoprotéique formé de deux sous-unités (cf. cours C. Vélot) :

- 1) *La sous unité protéique ou TERT (Telomerase reverse transcriptase) qui possède donc une activité ADN-polymérase ARN-dépendante qui lui permet, en utilisant comme matrice l'ARN contenu dans la télomérase, d'allonger le télomère (le brin débordant) pour le rendre encore plus débordant en ajoutant un grand nombre de fois en tandem la séquence télomérique (ici TTGGGG) ;*
- 2) *La sous-unité ARN ou TERC (Telomerase RNA component) qui est en partie complémentaire de la séquence télomérique, et qui va servir de matrice à la sous-unité TERT.*

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.

Le fait de s'intéresser au caractère processif ou distributif de la télomérase peut sembler anodin mais ce n'est pas le cas. Par exemple, dans les cancers, où par définition les cellules se multiplient sans cesse, les activités télomérases sont réveillées et exacerbées. Ainsi, malgré le grand nombre de divisions cellulaires successives, les chromosomes ne raccourcissent pas, et les cellules sont en quelque sorte immortelles (elles ne rentrent pas en sénescence). Par conséquent, l'une des stratégies pour tenter de vaincre les cancers est de bloquer les télomérases des cellules cancéreuses. Or selon que cette activité de transcription inverse est distributive ou processive, les stratégies pour tenter de la bloquer ne seront pas les mêmes.

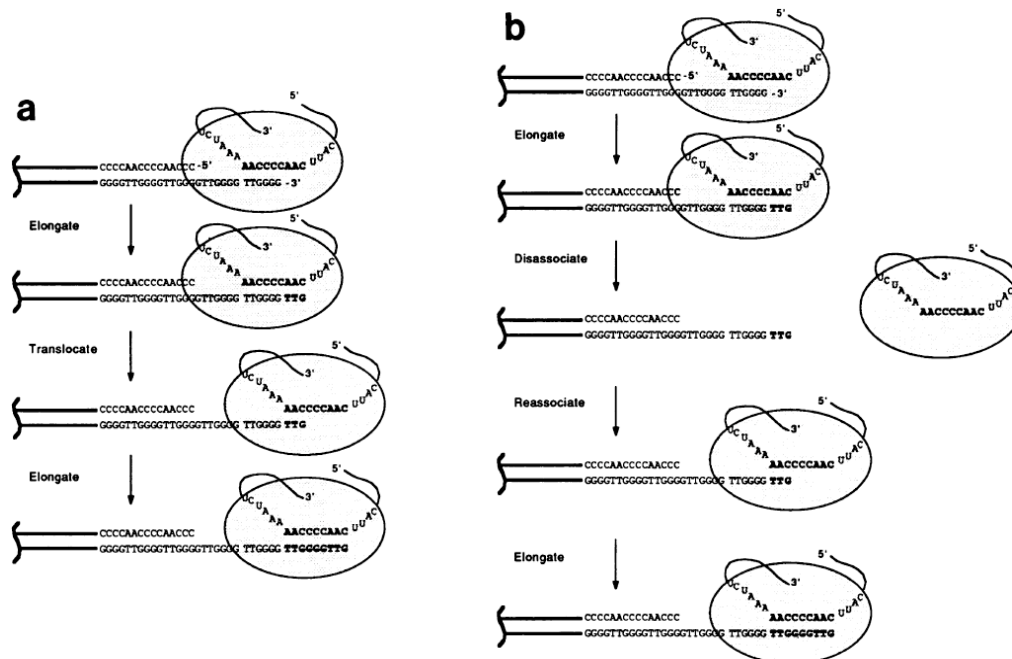


Figure 3

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 du mélange 1, soit avec du mélange 2 et l'incubation est poursuivie. Des fractions aliquotes sont alors prélevées pour analyse après 3 min, 4 min et 10 min d'incubation.

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

Figure 4

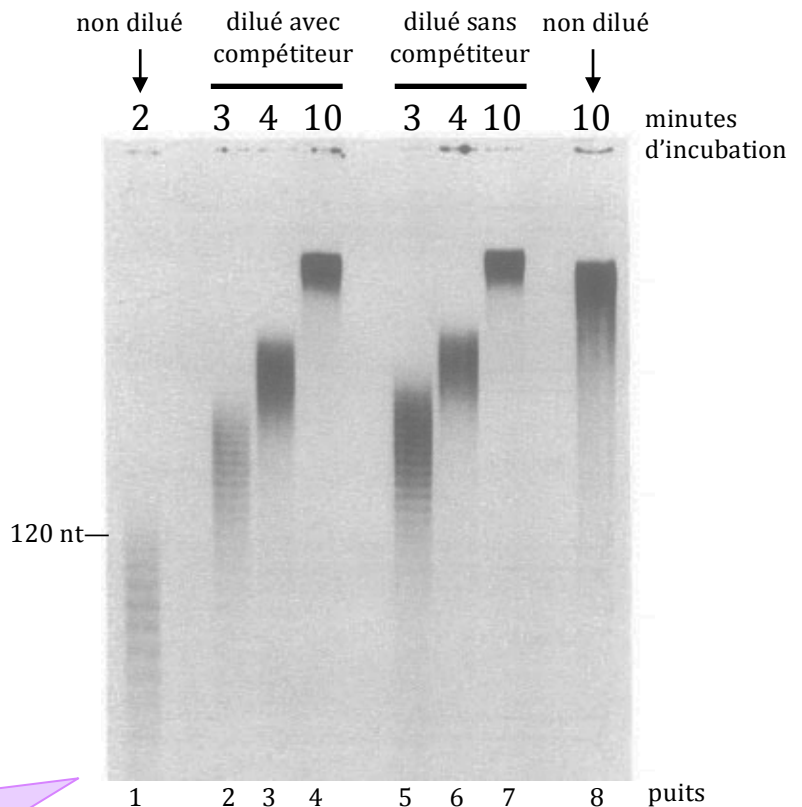
Autoradiographie après séparation sur gel d'agarose.

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.

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



Avant de diluer dans les solutions 1 ou 2, les 2 min d'incubation laissent le temps à la télomérase de commencer l'ajout d'un certain nombre d'exemplaires de la séquence télomérique TTGGGG. Les dGTP et dTTP présents dans les solutions 1 et 2 sont froids (non radio-marqués), et comme la dilution du mélange réactionnel initial dans ces solutions est de 30 fois, le dGTP radio-marqué (du mélange initial) devient, après dilution, très minoritaire devant le dGTP froid. Autrement dit, à partir du moment où le mélange réactionnel initial a été dilué (dans les solutions 1 ou 2), la télomérase va utiliser essentiellement du dGTP froid. Par conséquent les molécules marquées observées sur l'autoradiographie après dilution ne peuvent être que des produits d'élongation des molécules déjà fabriquées avant dilution.

Questions 5 :

a) Que signifie la notion de processivité et de distributivité pour le fonctionnement d'une enzyme ?

Voir la Figure 3

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 ?

Dans la solution 2, la télomérase ne peut que continuer à allonger ce qu'elle avait déjà commencé avant dilution, c'est-à-dire $d(TTGGGG)_n$ radio-marqué (et donc augmenter la valeur de n).

Dans la solution 1, elle a le choix entre a) continuer à allonger ce qu'elle avait déjà commencé avant dilution ($d(TTGGGG)_n$ radio-marqué) ou b) allonger $d(TTGGGG)_4$ (non marqué) qui joue le rôle de compétiteur et qui de plus se retrouve en excès par rapport à $d(TTGGGG)_n$ du fait de la dilution. Dans le cas a), il n'y a pas de compétition possible. Dans le cas b), il peut y avoir compétition c'est-à-dire allongement de $d(TTGGGG)_4$ au détriment de l'allongement de $d(TTGGGG)_n$ qui ne sera alors plus ou peu allongé.

L'analyse de la Figure 4 doit vous permettre de dire si, a priori, nous sommes dans le cas a) (processivité) ou dans le cas b) (distributivité).

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.

Dans le commentaire précédent, il est dit « L'analyse de la Figure 4 doit vous permettre de dire si, a priori, nous sommes dans le cas a) (processivité) ou dans le cas b) (distributivité) ».

Pourquoi « a priori » ?

Tout simplement car les résultats de l'expérience précédente (Figure 4) peuvent s'expliquer autrement que par le caractère processif ou distributif. En effet, il y a une différence entre le compétiteur, à savoir $d(\text{TTGGGG})_4$ et les molécules déjà allongées pendant les deux premières minutes de l'expérience (avant dilution), à savoir $d(\text{TTGGGG})_n$: c'est la longueur des molécules (n est supérieur à 4). Et rien ne nous dit que la télomérase a la même affinité pour ces molécules, autrement dit qu'elle est insensible à la longueur de son substrat. Si tel n'était pas le cas, cela biaiserait les résultats de l'expérience précédente.

L'expérience A ne pourra donc être conclusive que si l'on démontre par ailleurs que l'affinité de la télomérase pour ses substrats est indépendante de leur longueur (du nombre de répétitions n de la séquence télomérique). C'est le but de l'expérience B.

Figure 5

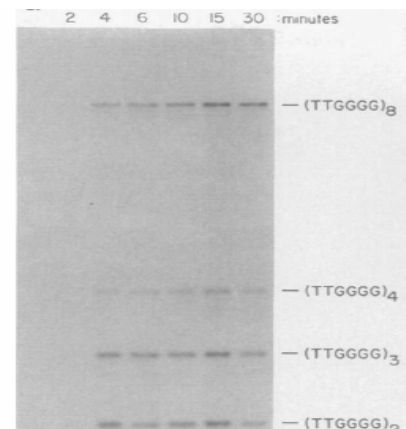
Les oligonucléotides $d(\text{TTGGGG})_2$, $d(\text{TTGGGG})_3$, $d(\text{TTGGGG})_4$ et $d(\text{TTGGGG})_8$ sont mélangés en quantité équimolaire, incubés avec la télomérase en présence de $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ et du ddGTP pendant 2, 4, 6, 10, 15 et 30 minutes. Les mélanges sont ensuite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

$$I [d(\text{TTGGGG})_2] = 1,5 \times 10^5$$

$$I [d(\text{TTGGGG})_3] = 2,8 \times 10^5$$

$$I [d(\text{TTGGGG})_4] = 1,2 \times 10^5$$

$$I [d(\text{TTGGGG})_8] = 2,4 \times 10^5$$



Dès lors qu'un ddGTP est incorporé, l'élongation s'arrête. Par conséquent, la télomérase de Tetrahymena, qui est censée ajouter TTGGGG un grand nombre de fois ne pourra ici ajouter que TTG une fois (elle ne dispose dans cette expérience que de ddGTP et non de dGTP).

Mais le but ici n'est plus, comme dans l'expérience précédente, d'étudier l'activité transcriptase inverse de la télomérase, mais simplement son affinité pour des substrats de longueurs différentes.

Or le fait d'ajouter seulement TTG suffit à obtenir des molécules marquées (visibles en autoradiographie). Et on est certain que toutes les molécules marquées le seront de la même manière (seulement par deux dTTP). Par conséquent, les différences d'intensité de marquage, s'il y en a, entre les substrats de différentes longueurs, ne pourront pas s'expliquer par le fait qu'un substrat, après réaction, contiendrait plus $d[\alpha^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ qu'un autre, mais par le fait que plus d'exemplaires de ce substrat se sont vus ajouter TTG , ce qui indiquerait donc une plus grande affinité de la télomérase pour le substrat en question.

Questions 6 :

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

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 polymérase 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.

Question 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.

*Il est précisé que ce fragment de 230 pb a été obtenu avec des extrémités compatibles à savoir soit des extrémités digérées *SacI* soit des extrémités digérées *KpnI*.*

*Important : Dessinez les deux vecteurs ainsi obtenus à cette étape en indiquant sur votre schéma la position des sites pour les enzymes *SacI*, *KpnI*, *PstI* et *HindIII*.*

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.

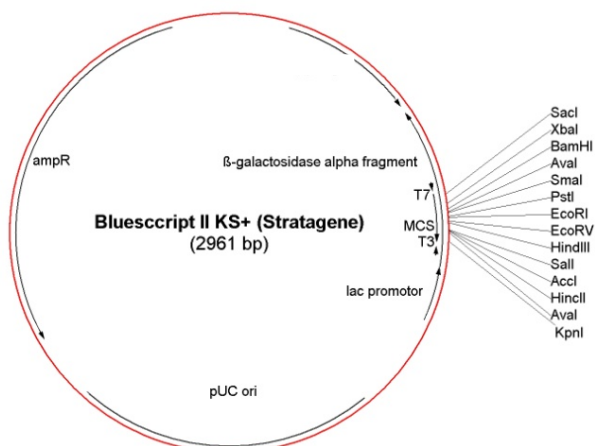


Figure 1 : Carte de restriction du vecteur plasmidique pBS-KS.

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 un oligonucléotide de 30-mer contenant un dimère cyclobutanique de pyrimidines (CPD) au niveau des 2 thymines adjacentes soulignées dans la Figure 2.

Question 2 : a) 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.
b) Quelles sont les caractéristiques de ses extrémités ?

a) Faites attention à l'orientation des oligonucléotides lors de leur hybridation (utilisez par exemple les deux TT soulignés pour chercher leur complémentaire sur le second oligonucléotide).
b) Comparez leurs extrémités avec les sites de restriction des enzymes citées dans le texte. Schématisez les extrémités du vecteur digéré.

Question 3 : a) Schématisez la fourche de réplication à partir de l'ori SV40 (réplication bidirectionnelle).
b) 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) ?

b) La lésion est sur un seul brin (cf. oligo 30-mer), regardez bien les constructions réalisées, les positions des sites de restriction les uns par rapport aux autres ainsi que par rapport à l'origine de réplication SV40 .

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.

- Question 4 :** a) Quels sont les rôles respectifs des différents composants du mélange réactionnel ?
b) Pourquoi les produits de la réaction sont-ils traités à la ribonucléase A, puis à la protéinase K ?

** 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.*

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

En quoi la lésion CPD peut-elle affecter la réplication complète du vecteur ?

- 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.

Pour les quatre vecteurs et les deux situations considérées (réplication translésionnelle ou non), schématisez le résultat de la réplication en utilisant une couleur différente pour le brin néo-synthétisé et en plaçant correctement la lésion.

La réplication peut-elle se faire entièrement, partiellement ou pas du tout ?

- Question 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 ?

En considérant les vecteurs issus d'un cycle de réplication de la question 6 : existe-t-il des vecteurs qui diffèrent par la présence de la lésion mais que vous ne pourrez pas distinguer par électrophorèse ?

Relisez bien les propriétés de l'endonucléase V et remémorez-vous vos cours et TD sur la topologie des ADN circulaires.

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 »).

Question 8 :

- a) Que visualise-t-on sur l'autoradiogramme ?
b) A quoi servent les expériences effectuées en l'absence d'antigène T ? Quelle information apportent-elles ?
c) Analysez la Figure 3A.
d) 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 ?

a) Identifiez grâce à l'énoncé ce qui est radio-marqué dans l'expérience.

b) Rappel : « L'antigène T de SV40 contient un domaine qui interagit spécifiquement avec plusieurs séquences présentes dans l'ori SV40 et possède une activité hélicase ». A quelle étape cette activité intervient-elle ? Que se passe-t-il en son absence ?

c-d) Comparez les résultats observés à vos prédictions faites en question 6.

- Question 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 ?

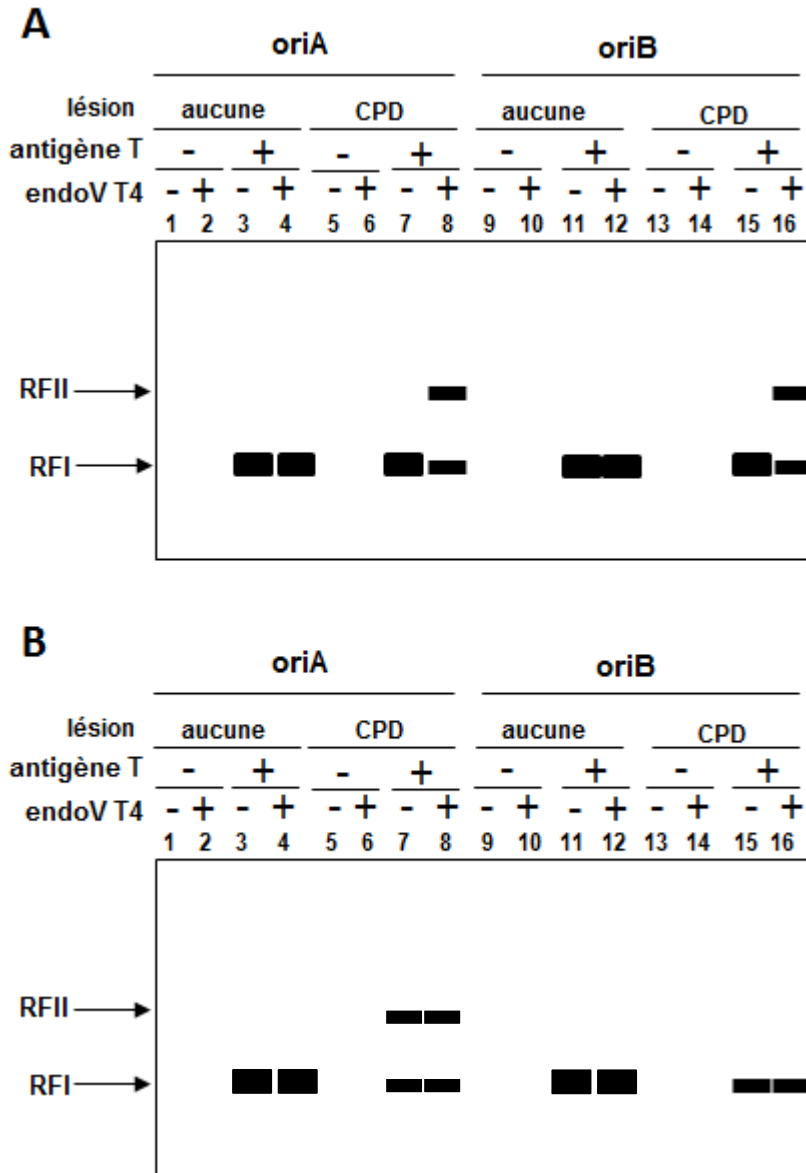


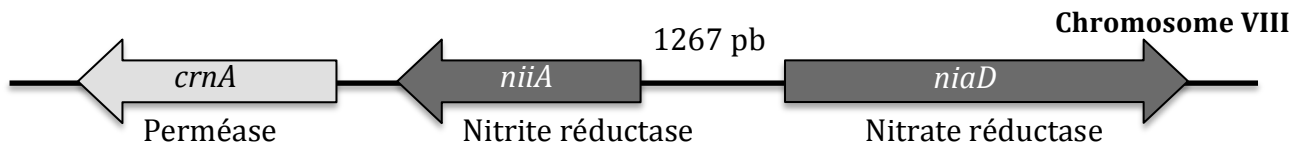
Figure 3 : Autoradiogramme du gel d'agarose réalisé pour analyser les produits issus du test de réplication *in vitro* effectué soit avec des extraits de fibroblastes issus d'individus non malades (A), soit avec des extraits de fibroblastes de patients atteints de XP-V (B). Les tests ont été réalisés 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).

TD n° 6 : RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNÉRIQUE

Étude du catabolisme du nitrate chez *Aspergillus nidulans*

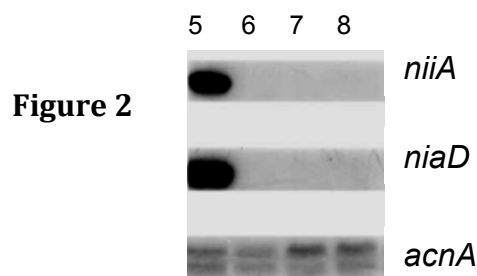
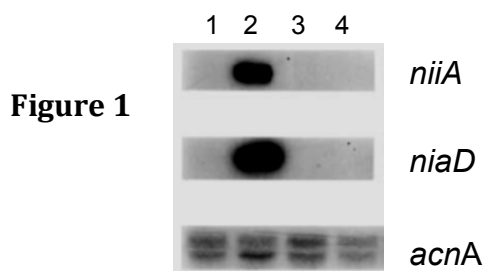
Chez les champignons filamenteux, dans un certain nombre de cas, des gènes impliqués dans une voie métabolique particulière sont regroupés dans une région chromosomique donnée : on dit qu'ils sont organisés en "cluster" (à ne pas confondre avec un opéron). Dans certains de ces clusters, quelques gènes sont 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 par deux gènes adjacents, *niaD* et *niiA*, respectivement. 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).

Voir Annexe fin du poly pages 60-61

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

Voir Annexe fin du poly pages 62-63 ainsi que la fiche Technique-Northern sur eCampus

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

Voir Annexe fin du poly pages 62-63 ainsi que la fiche Northern-Application sur eCampus

Questions 4 : a) Analysez les résultats obtenus Figure 1.

Voir la fiche Northern-Application sur eCampus. N'oubliez pas d'analyser en premier le témoin de charge puis les ARNm correspondants aux gènes d'intérêt. Attention au vocabulaire employé (on ne parle pas de tache, mais d'ARNm ici !) – soyez précis et rigoureux

b) Que peut-on conclure sur les conditions d'expression des gènes *niaD* et *niiA* dans la souche sauvage ?

Ici nous attendons des hypothèses sur les différents niveaux de régulation possibles de l'expression de *niaD* et de *niiA* en accord avec les résultats de la Fig 1. Surtout gardez en mémoire les limites de l'analyse d'un northern-blot !

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* ?

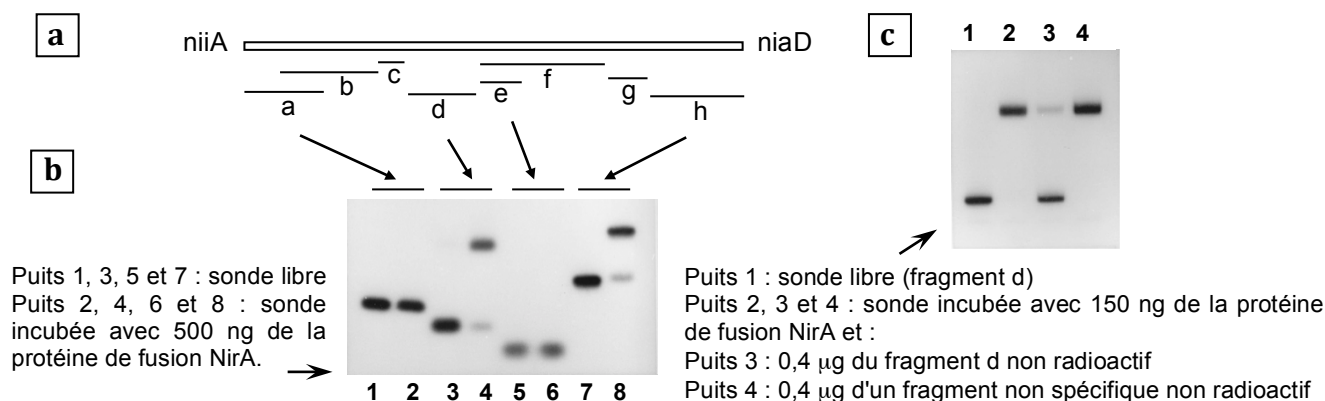
B. Identification *in vitro* des sites de liaison du facteur de transcription NirA dans la région intergénique *niaD-niiA*

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



Questions 6 : Donnez le but et le principe d'une expérience de retard sur gel.

Voir Annexe fin du poly pages 74-75

Question 7 : Analysez les résultats obtenus Figure 3b pour les différents fragments testés.

Voir Annexe fin du poly pages 74-75 ainsi que la fiche Retard sur gel – Application sur eCampus

Question 8 : Analysez les résultats obtenus Figure 3c pour les différents mélanges d'incubation.

Il s'agit ici d'une expérience de compétition. Afin de comprendre le principe (et pour cela vous pouvez vous aider de schéma), essayez de répondre aux questions suivantes. 1) Si dans le mélange Sonde+protéine on ajoute en excès le même fragment que la sonde mais non radioactif, conserve-t-on le retard ? (N'oubliez pas que la visualisation s'effectue via une autoradiographie et donc uniquement par la révélation des molécules radiomarquées). 2) Si on pose l'hypothèse que l'interaction entre la protéine et la sonde est spécifique, le fait d'ajouter dans le mélange Sonde+protéine un excès d'un fragment quelconque (totalement différent en séquence de la sonde) et non radioactif va-t-il affecter la formation du complexe sonde-protéine ? (conserve-t-on le retard ?). 3) Même question mais en partant de l'hypothèse que l'interaction entre la sonde et la protéine n'est pas spécifique. Puis analysez la Figure 3c en vous aidant de vos prédictions.

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.

Faites le bilan/synthèse (N'oubliez pas les 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.

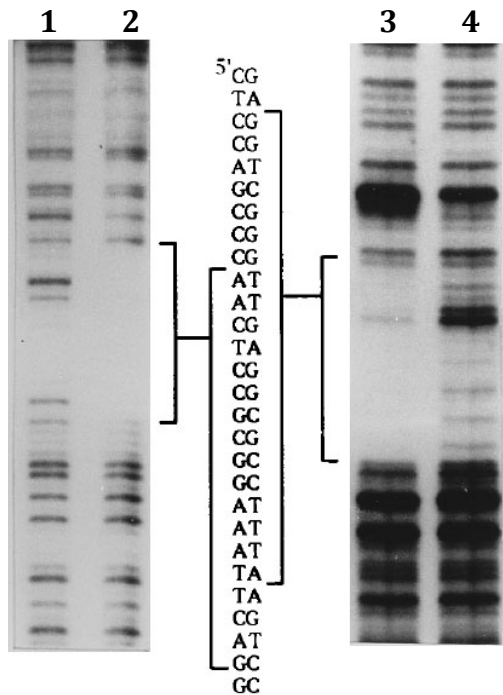


Figure 4

Puits 1 et 2 : "Brin A" (brin codant le gène *niiA*, non codant pour *niiD*).

Puits 3 et 4 : "Brin B" (brin codant le gène *niiD*, non codant pour *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.

Voir Annexe fin du poly page 75

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 ?

Avant de répondre à la question 12, essayez de répondre aux questions suivantes. 1) Par quelle technique de marquage obtient-on une molécule d'ADN porteuse uniquement d'un atome radioactif par brin ? - les techniques de marquage de sonde sont données en annexe pages 60-61.
 2) A partir de cette molécule double brin porteuse de 2 atomes radioactifs, imaginez un moyen simple - en utilisant des outils de BM simples - vous permettant d'obtenir une molécule double brin avec UN seul atome radioactif (un seul brin marqué sur les deux).

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 GÉNÉRIQUE

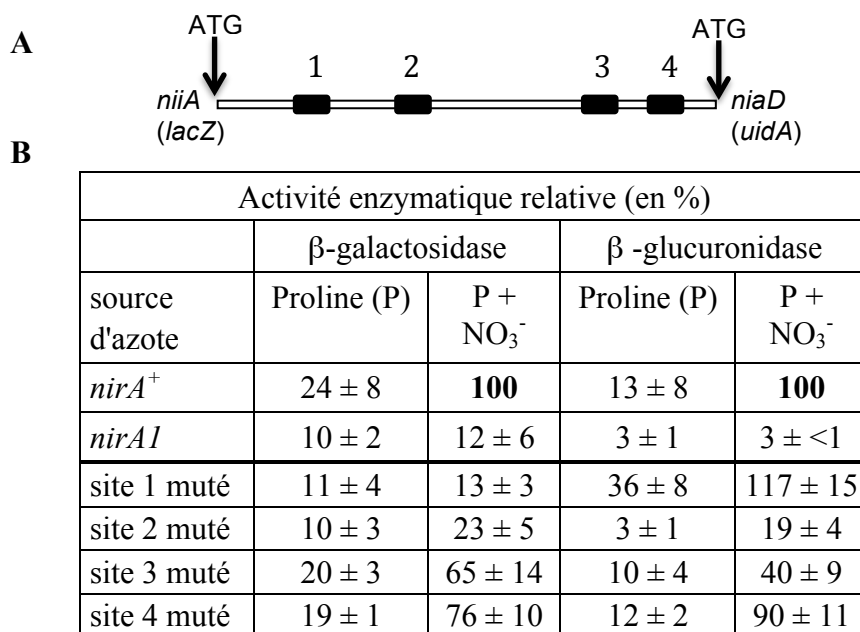
Étude du catabolisme du nitrate chez *Aspergillus nidulans* - Suite

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 b-glucuronidase) et le gène *lacZ* (codant la b-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 b-galactosidase et b-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



Voir Annexe fin du poly page 82

- 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 ?

Attention : Observez bien la façon dont la construction rapporteuse a été réalisée. Quelles sont les séquences issues des gènes *niaD* et *niiA* qui ont été conservées, et ayant potentiellement un rôle dans la régulation de leur expression ?

Vu en TD 2

c) 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 : a) Quelle est l'information apportée par l'utilisation de la souche *nirA1* ?

Rappel du TD 6 : NirA est un activateur transcriptionnel des gènes *niiA* et *niaD*, actif en présence de nitrate dans le milieu (nitrate est le co-inducteur de ce catabolisme). Conseils : une analyse ne consiste pas à répéter les données numériques sans aller plus loin ! Pensez à en tirer une interprétation et une conclusion. Par exemple : la construction est-elle fonctionnelle et rend-elle bien compte de la régulation attendue de NirA sur ces 2 promoteurs dans ces conditions de culture ?

Questions 3 : a) Analysez l'effet des mutations créées dans les sites de fixation putatifs de NirA.
b) Ces expériences permettent-elles de conclure quant à la fonctionnalité de ces sites ?

Pensez à comparer les différents résultats avec ceux de la souche sauvage et du mutant. Ne vous limitez pas uniquement aux données numériques, mais argumentez et surtout concluez !

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.

Voir Annexe fin du poly page 76 : *attention, la technique de protection à la MNase est la seule technique du poly d'annexe que vous n'avez pas besoin de retenir.*

Questions 4 : a) Qu'est ce que la chromatine ?
b) À quoi correspondent ces fragments de 200 pb ?

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

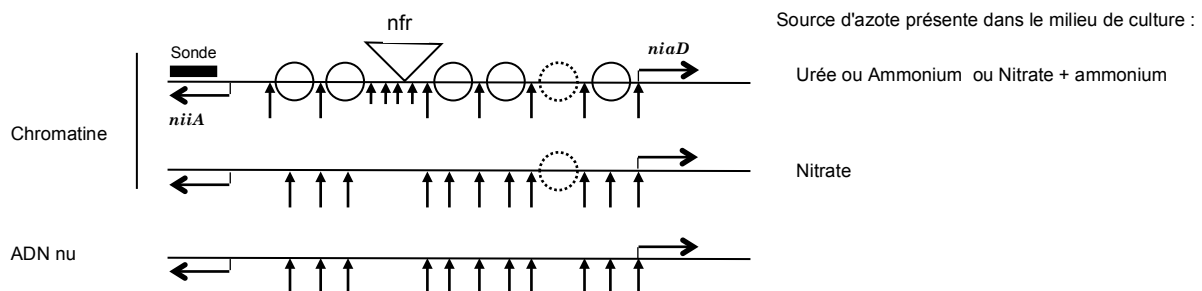


Figure 2

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.

C'est-à-dire présence ou absence de nucléosome dans la région intergénique en fonction des sources d'azote présentes.

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.

Ici nous cherchons à savoir s'il existe ou non une corrélation entre l'état de la chromatine dans la région intergénique et le taux de transcription des gènes *niiA-niaD*.

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.

Explication de la figure 3 :

Chaque bande représente un fragment obtenu par digestion par la MNase. Dans le cas d'un ADN en association avec des nucléosomes, cette coupure aura lieu uniquement au niveau de la région d'ADN située entre deux nucléosomes (région hypersensible). Par contre, sur l'ADN nu (ou dépourvu de nucléosome) la coupure peut avoir lieu ailleurs sur l'ADN. Par exemple, quand on observe le profil pour la souche sauvage cultivée en présence d'urée (sous-entendu en absence de nitrate) nous voyons que les sites de coupure sont uniquement localisés entre les nucléosomes, indiquant la présence de ces derniers sur l'ADN de la région intergénique. En présence de nitrate, par contre, les sites sont situés à l'intérieur des positions des nucléosomes suggérant leur absence sur l'ADN.

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

Schéma indiquant la position des nucléosomes

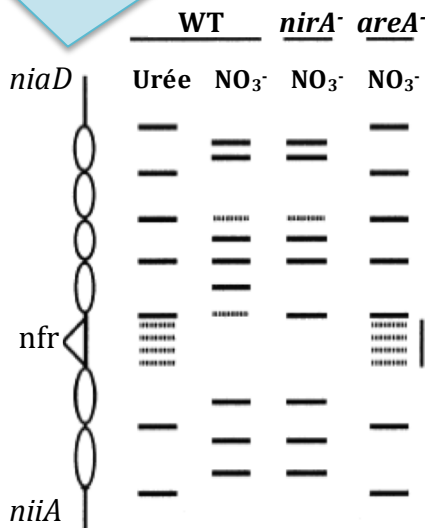


Figure 3

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 (NO₃⁻) 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.

Voir Annexe fin du poly page 77 et la technique de ChIP sur eCampus

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 ?

Problématique directement reliée au principe de la ChIP

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 :

a) sur la fixation de la protéine AreA (Figure 4B) ?

b) sur le changement de conformation de la chromatine par "dépositionnement" des nucléosomes (Figure 4C) ?

c) sur l'acétylation de l'histone H3 (Figure 4D) ?

Observez bien la cinétique pour déterminer l'ordre des événements

Avant de répondre, voir les explications données sur la figure 4.

Pour la Q11 c) attention, il est rappelé que seuls les ADNs en interaction avec des nucléosomes, donc avec une histone H3, seront précipités lors de cette expérience de ChIP.

Conseil : faites attention à la chronologie des événements.

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

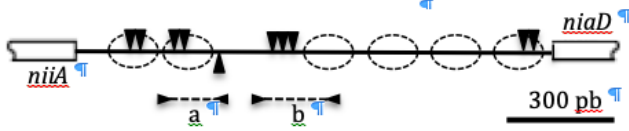
Question 13 : Que pouvez-vous conclure quant au rôle de la protéine AreA en condition de privation de source d'azote ?

Observez bien la cinétique pour déterminer l'ordre des événements

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

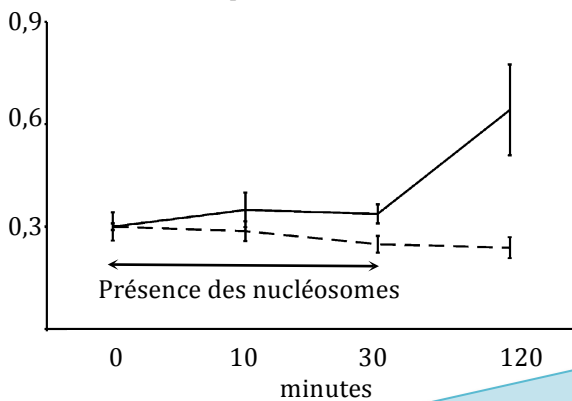
Rappel de la structure de la chromatine en absence de nitrate

A Région intergénique *niaA-niaD*



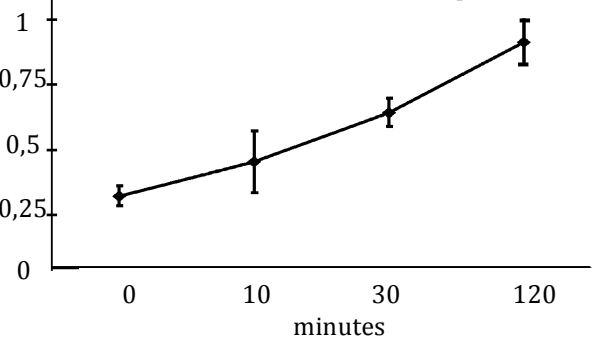
Suivi de la présence ou non des nucléosomes dans la région intergénique en utilisant la technique vue en Fig 3

C Taux de "dépositionnement" des nucléosomes

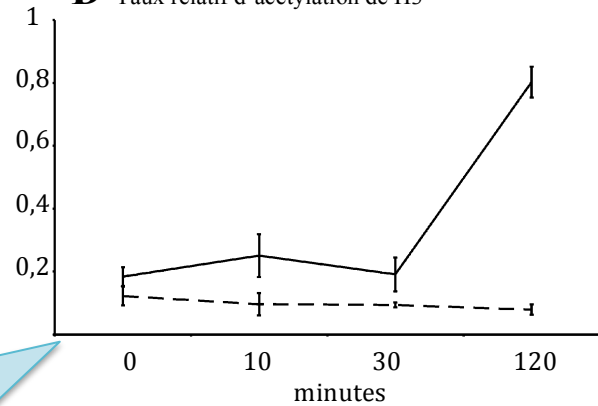


Ordonnée : Rapport entre la quantité de fragment b immunoprécipité (car fixé à AreA) et la quantité totale de fragment b présent

B Taux relatif de fixation de la protéine AreA



D Taux relatif d'acétylation de H3



Ordonnée : Rapport entre la quantité de fragment b en interaction avec des histones H3 acétylées et la quantité de fragment b en interaction avec toute histone H3 (acétylées ou non).

A. Rappel de la structure de la région intergénique *niaD-niaA*. 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 *niaD-niaA* 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 "dépositionnement" 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 contenu dans la fraction immunoprécipitée lors de la première ChIP, rapportée à la quantité du même fragment contenu 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. Altmann and C. Scazzocchio, 2008, Molecular Microbiology **69**, 1385-1398.

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 messager. 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'.

Qu'est ce qu'un cadre ouvert de lecture et la phase de lecture ?

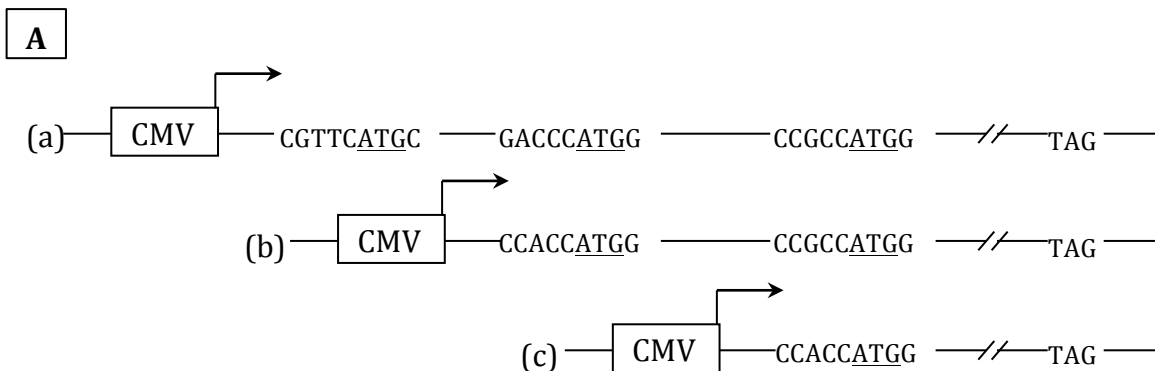
Questions 1 : a) Des chercheurs ont, à l'époque, utilisé une seule technique pour démontrer que le gène *lap* n'a pas d'introns et qu'il est transcrit en un seul ARNm. Laquelle ?

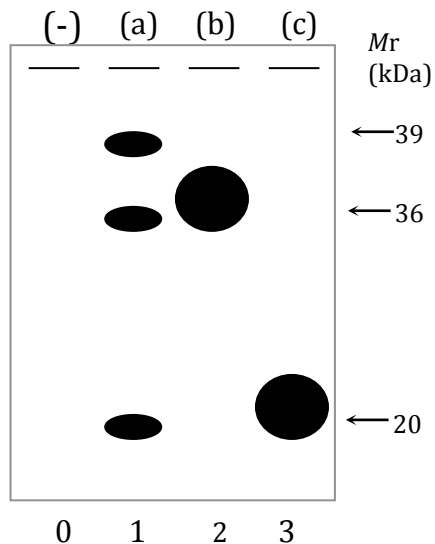
Voir le poly d'annexe page 70

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.

Pour construire votre réflexion et bien assimiler cette technique. 1) Récapitulez les composants majeurs du mélange réactionnel. 2) Quelle est l'activité de l'enzyme utilisée ? 3) Quelles doivent être les caractéristiques de la sonde utilisée ? (Profitez-en pour revoir comment faire ce type de sonde). 4) Quelles sont les différentes étapes du protocole ? Indiquez bien leur chronologie et leur fonction. Distinguez bien le cas de l'identification de la présence d'un intron de celui de la détermination d'un +1 de transcription. N'oubliez pas de faire des schémas.

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



B**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 en précisant les principales étapes.

Voir le poly d'annexe page 64. Un western blot vous donne une information qualitative (taille des protéines) et quantitative (intensité des bandes reflétant la quantité de protéines). Le dernier paragraphe de la légende est important pour l'aspect quantitatif.

Questions 3 : a) Que pouvez-vous conclure des résultats obtenus piste 0 de la Figure 1B ?

A quoi correspond cette piste ?

b) 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 ?

Combien de protéines différentes observez-vous ? Les 3 ATG sont-ils utilisés ?

Quelles sont les proportions relatives de chaque protéine ? Les 3 ATG sont-ils utilisés avec la même efficacité ? Attention pour répondre à cette dernière question, connaître les modalités de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes peut être utile. Toutes les informations sur ce sujet sont dans votre cours.

c) Les résultats obtenus pistes 2 et 3 vous permettent-ils de confirmer ces conclusions ?

Pour chaque construction, soyez très attentifs au contexte nucléotidique dans lequel est situé chaque ATG (figure 1A). N'oubliez pas qu'on étudie ici un organisme eucaryote.

d) 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).

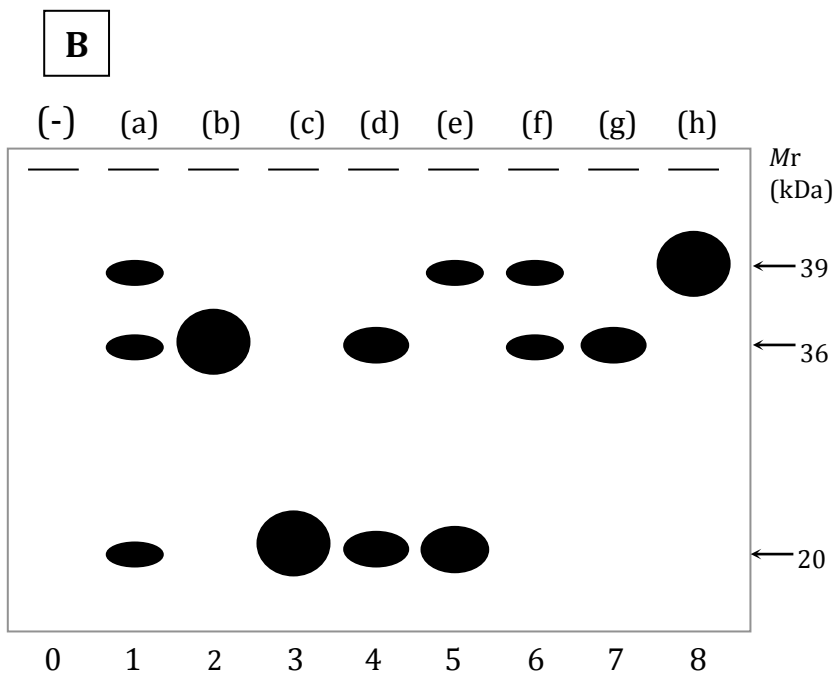
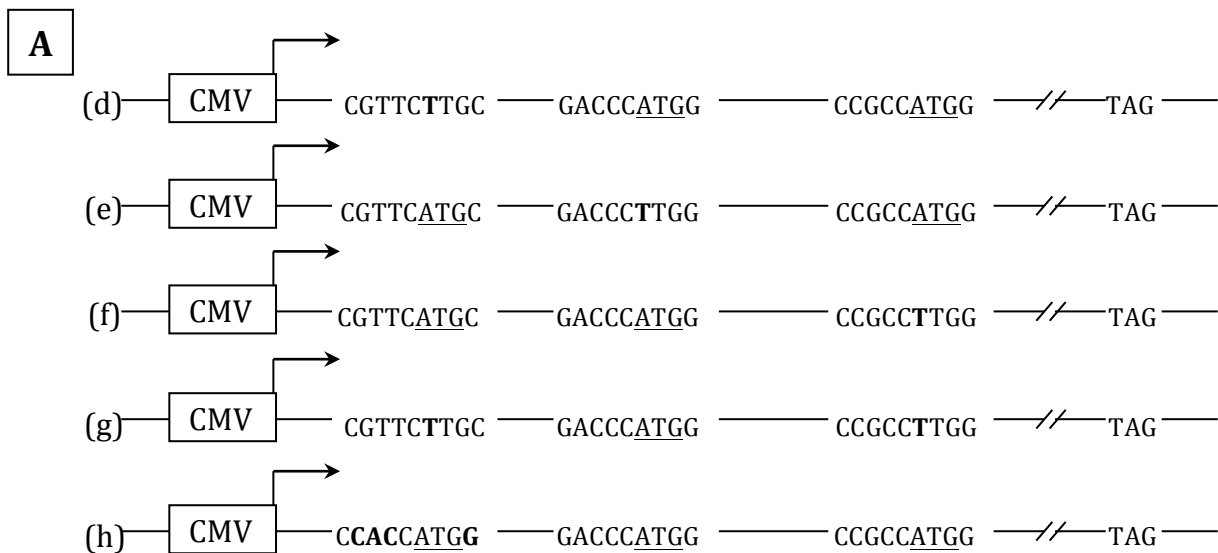


Figure 2

A. Seconde série de constructions utilisées pour transfecter des cellules en culture. Ces cinq constructions sont identiques à la construction (a) à l'exception de 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 mutagenèse dirigées de la construction (a) permettent-elles de rendre compte des résultats obtenus pour les pistes 4 à 8 ?

Nous vous proposons une façon de procéder. En prenant en compte le ou les éléments que vous avez mentionnés en Q3d, indiquez au-dessus des ATG des différentes constructions, le pourcentage d'utilisation prédit et donc le résultat de western blot attendu. Comparez ensuite ce résultat théorique avec celui obtenu expérimentalement et présenté dans la figure 2B.

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.

Pour bien visualiser l'expérience, schématisez la construction rapporteuse présente dans les cellules transfectées avec une des huit constructions (a à h) permettant de produire une ou plusieurs protéine(s) Lap.

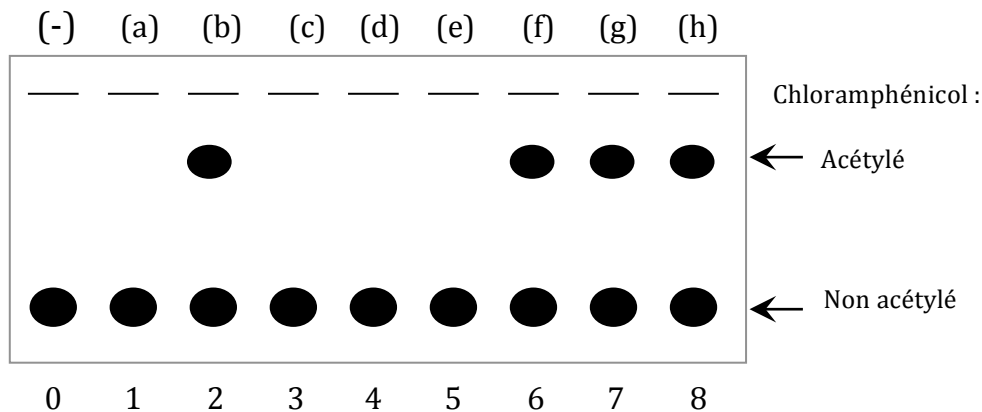


Figure 3

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 : a) Que peut-on conclure de l'expérience témoin (piste 0) ?
b) Qu'observez-vous pour les autres pistes ?

Il s'agit ici d'une analyse purement qualitative. Afin d'établir une corrélation entre la production des protéines Lap et l'activité CAT, comparez les figures 2 et 3. Pour cela, n'effectuez pas une analyse au cas par cas, longue et laborieuse :

- commencez par analyser les constructions ne produisant qu'une seule protéine Lap ;
- regroupez ensuite les constructions conduisant aux mêmes résultats dans la figure 3.

c) Que pouvez-vous conclure sur l'activité biologique des protéines de 39, 36 et 20 kDa ?

Dans la construction rapporteuse, quel est le seul élément provenant du gène de l'albumine ? Quelle est donc potentiellement la fonction des protéines Lap ?

Quelle(s) protéine(s) exerce(nt) une régulation positive ? négative ? Laquelle ou lesquelles impose(nt) son (leur) action ?

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 : a) Quels sont ces domaines ?
b) Où les situeriez-vous ?

Souvenez-vous que les 3 protéines Lap proviennent de la traduction d'un même cadre de lecture de l'ARNm en commençant par différents codons AUG en phase. Elles ont donc des parties C-ter communes mais diffèrent dans leur partie N-ter.

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.

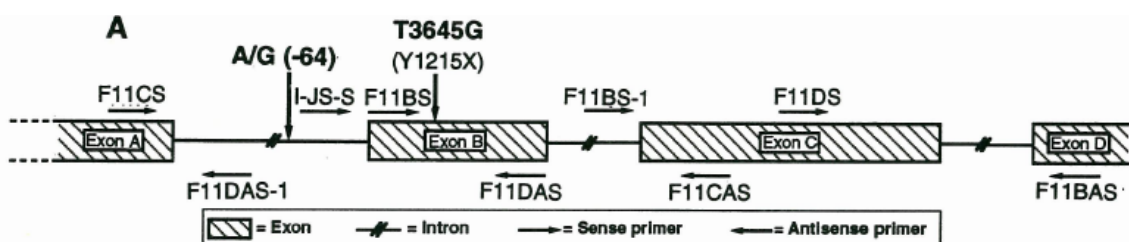
Quelles expériences permettent de mettre en évidence une interaction protéine-ARN ; une activation transcriptionnelle ; un effet de compétition ? Reportez-vous au poly d'annexes ainsi qu'aux précédents TDs.

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 de 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 gtatgtctgtcattctgcatttctctctgggccaatgcagggtgcagactggccaatgatgtaagtaa
Asp G
gactgtaggccctaaagacagtaacacaatttaatttaattgtaagtetaataggaaatgttcattaaaaat
tattttatctcaggagcttggtatgttattttcttttaattatgtcatgaatcacagatgcccaaggagta
gacacaacatcttagggagctctgtaaaataactctctctgtttctgggctgtttttccatcatttat
caatatgcacagcatgtagcaattttctacctcaaaaat cttgtggagaagcttgaatgaattgctattg
^
3620 (Exon B)
ttctatctattaatgagtgtctccaccacag AG GCC TTC CGC CAG ATA TGT CCT TA GGA
lu Ala Phe Arg Gln Ile Cys Pro Tyr Gly
AGT GGG ATC ATC CTG GGA CCT GAT GAT TCA GCA GTT G gtcagttgctctgtctggat
Ser Gly Ile Ile Val Gly Pro Asp Ser Ala Val A
tctcagcatttctcagttattctcaatctgcttctctctctagttattcttatttttctccatctatcttggg
aaattaagtgtacttttttggccctcatttagatagcaattatattattgcatattagataatctttt
gattaaacactgaaatgatcataatttatcttcacgttttaaaaaataccttctgtattcactattttttt
^
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 gtgagtaataagttttctccataggaactttacaataaaaa
Ala Gly Asn Glu Cys Val A
ttaa.....~2 kb .....atagaataaaaggtattatctcattcatcatgttttggacacattctctg
^
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 CTG 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 malades (Mo) et malade (MS-7) sont présentés Figure 2.

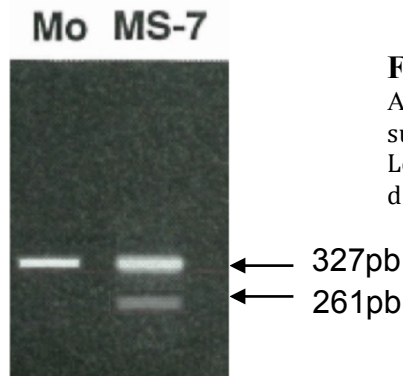


Figure 2

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.

Voir poly d'annexes page

b) Quel(s) type(s) d'information apportent les analyses par RT-PCR ?

Question 2 : Commentez les résultats obtenus.

Quel est le degré de ploïdie chez l'être humain ? Analysez qualitativement les produits de la RT-PCR en comparant les fragments amplifiés obtenus à partir de fibroblastes d'individus non malade (Mo) et malade (MS-7). Interprétez

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.

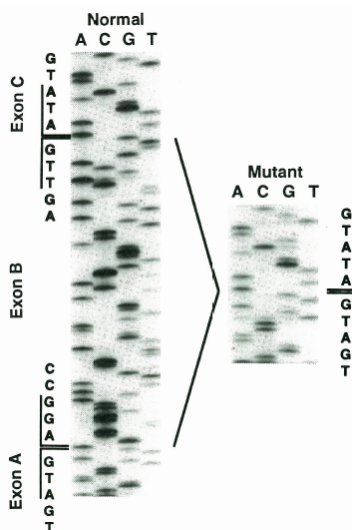


Figure 3

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 ?

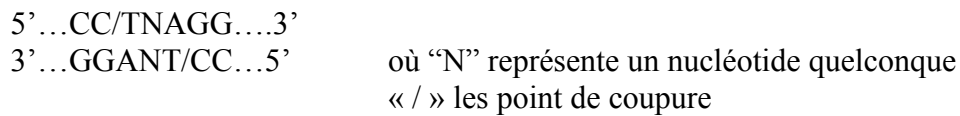
Comparez les séquences obtenues à partir de fibroblastes d'individus non malade (normal) et malade (mutant). Proposez des hypothèses pour expliquer l'origine de l'anomalie observée.

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 :



Le NMD est un mécanisme de surveillance co-translationnelle des ARNm chez les eucaryotes. Si un ARNm présente un codon stop prématuré, il sera reconnu et dégradé (voir cours). Chez l'individu malade, une mutation non-sens sur l'un des allèles du gène FBN1 introduit un stop prématuré, l'ARNm fabriqué à partir de cet allèle sera-t-il dégradé par NMD ?

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

*Comparez la séquence du site *Bsu36I* avec la séquence normale et la séquence mutée du gène FBN1 ?*

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.

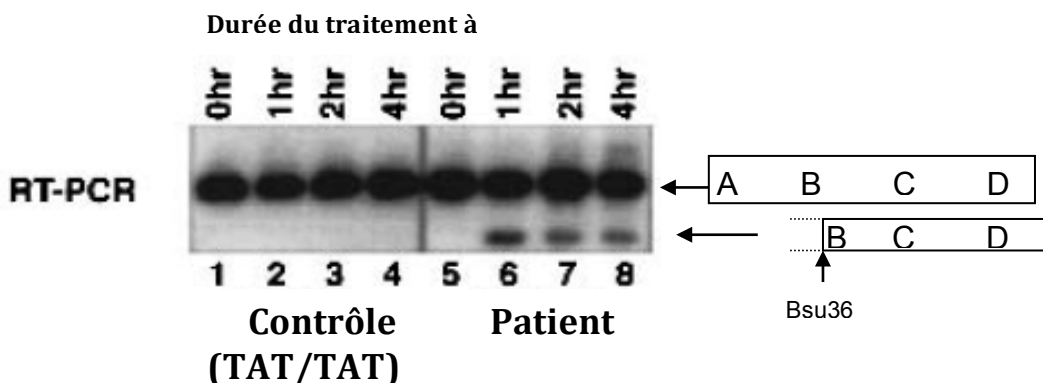


Figure 4 : Autoradiographie du gel d'agarose.

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

Rappelez-vous que dans les fibroblastes de l'individu malade, trois types d'ARNm sont synthétisés à partir du gène *FBN1* : ARNm sauvage, ARN porteur de codon stop prématuré et ARNm avec un saut d'exon. Lequel des trois est-il visé par cette expérience ?

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

Question 10 : Quelles informations complémentaires apportent ces expériences ?

Analysez les résultats de la RT-PCR après hybridation avec la sonde en tenant compte du traitement à l'anisomycine (comparez le temps 0h aux autres), de la digestion par l'enzyme de restriction (quel est l'ARNm ciblé par cette digestion ?). Quel est l'ARNm ciblé par l'hybridation avec la sonde F11-DAS ? Comparez les profils obtenus chez l'individu malade à ceux de l'individu non malade.

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.

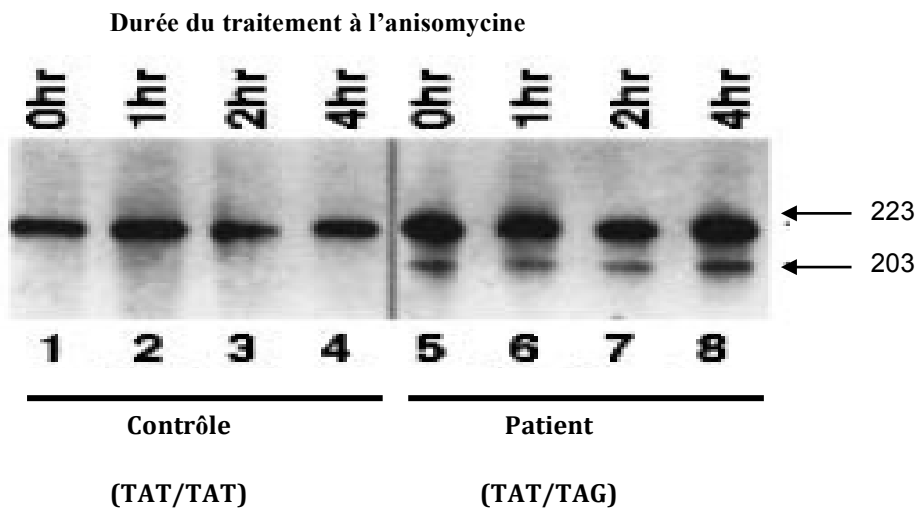


Figure 5 : Autoradiographie du gel d'acrylamide dénaturant.

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 ?

La technique de « protection à la RNase » correspond à la technique « cartographie à la nucléase S1 » du poly d'annexes page 71.

Faites un schéma illustrant les exons du ADNc du gène *FBN1*, version sauvage et version mutée avec saut d'exon. A quoi correspond la ribosonde utilisée (allant de F11DAS à F11BAS)? sur quelle portion de l'ADNc s'hybride-t-elle ? s'hybride-t-elle de la même manière sur les deux ADNc ? Analysez l'autoradiogramme de la figure 5 en comparant les bandes obtenues chez le malade (patient) et le non malade (contrôle) et en donnant l'effet de l'anisomycine.

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 analysés 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.

Comment expliquer le saut d'exon dans cet ARN muté ? Deux hypothèses sont possibles :

- la nature de la mutation, codon stop prématuré, qui va déclencher au moment de l'épissage le saut d'exon ;
- la position de la mutation dans l'exon B chez le patient MS-7 pourrait affecter une séquence impliquée dans l'épissage.

Questions 12 : a) Dans quel but ces différentes versions mutées ont-elles été construites ?

b) Comment pouvez-vous interpréter ces résultats ?

Pour répondre à ces questions il faut se remémorer les séquences nécessaires pour identifier les introns lors du processus de l'épissage. Regardez si les mutations introduites modifient les séquences d'identification des introns et analysez l'effet de chaque mutation sur la rétention ou l'excision de l'exon B. Interprétez.

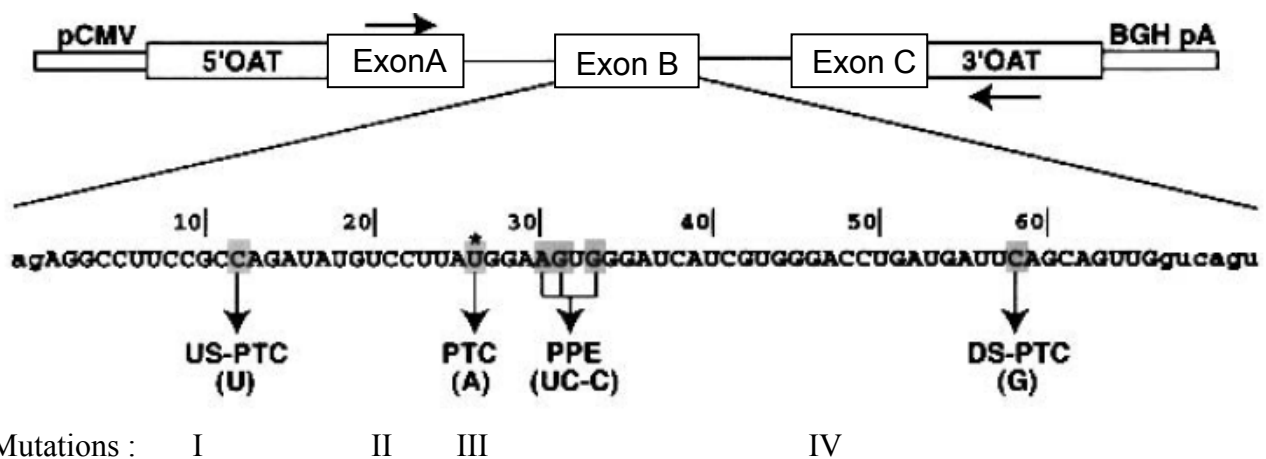


Figure 6

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.

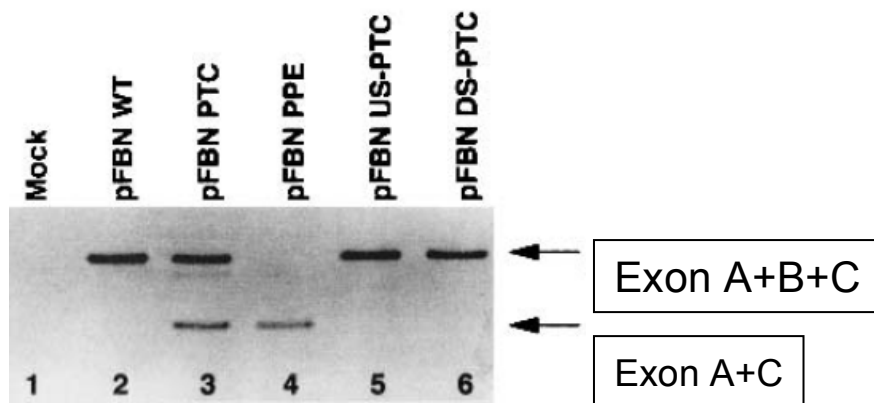


Figure 7

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).

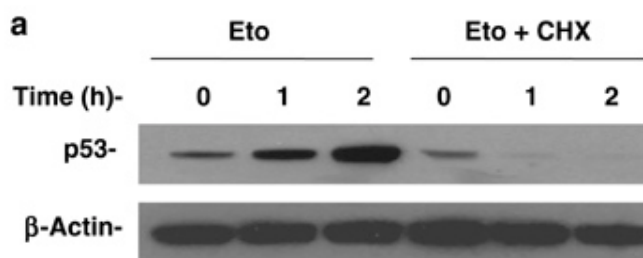
L'étoposide est un alcaloïde dérivé des podophyllotoxines (action antiméiotique et cytolytique) de la mandragore. L'étoposide inhibe l'entrée en mitose (prophase) des cellules tumorales, par action sur la topoisomérase II, qui ne peut ressouder les cassures d'ADN double brin.

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

Récapitulez, de façon ordonnée et en les nommant, les différentes étapes de l'expression génique (de l'ADN jusqu'à la protéine) chez les eucaryotes à l'aide d'un schéma légendé. Indiquez ensuite les étapes fréquemment soumises à régulation. Enfin, explicitez pour celles-ci les types de régulations envisageables.

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.



Question 2 : a) Pourquoi les auteurs ont-ils recherché à révéler l'actine par western-blot ?
b) Décrivez puis analysez les résultats présentés Figure 1.

Identifiez la technique utilisée. Que permet-elle de visualiser et de mesurer ? Peut-on comparer directement les différentes pistes ? Revoyez pour cela les notions de témoin et de normalisation. La quantité de p53 visualisée reflète-t-elle seulement la synthèse de p53 ou faut-il prendre en compte un autre élément ? Revoyez pour cela le concept d'accumulation. Commencez par analyser l'effet de l'étoposide (CHX) puis ensuite l'effet de l'étoposide et du cycloheximide (Eto+CHX), quelles informations obtenez-vous ? Formulez clairement une conclusion.

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 ?

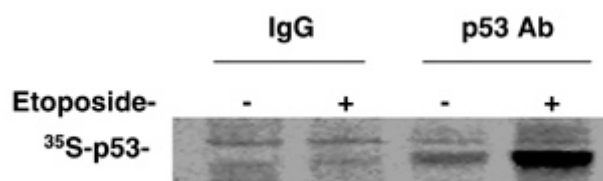
Connaissant le mode d'action du cycloheximide et à l'aide de vos réponses aux questions précédentes, listez le(s) niveau(x) de régulation les plus probables.

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 ³⁵S-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.

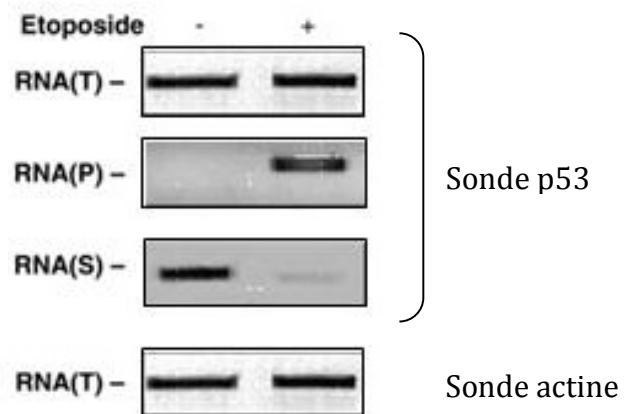


Expérience 3

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.

Analyse de la figure 2

Que permet de marquer la méthionine S35 ? Pourquoi utilise-t-on un temps de marquage court ? Pourquoi procéder à une immunoprécipitation (voir poly d'annexe page 80) ? Que permet l'anticorps contrôle ? Quelle précision obtient-on quant à l'effet de l'étoposide sur P53 ?

Analyse de la figure 3

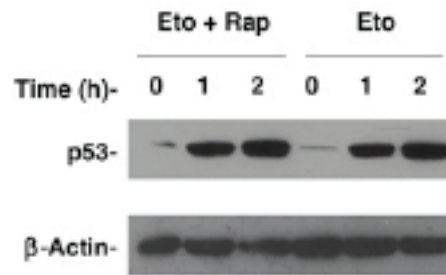
Pourquoi le northern-blot est-il réalisé sur différentes fractions cellulaires ? Quelle est la différence entre ARN cytoplasmiques et ARN contenus dans les polyribosomes ?

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.

Revoyez en détail vos cours sur la traduction chez les eucaryotes et attardez-vous plus particulièrement sur l'étape d'initiation. Existe-t-il différentes modalités possibles d'initiation de la traduction chez les eucaryotes ?

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 ?

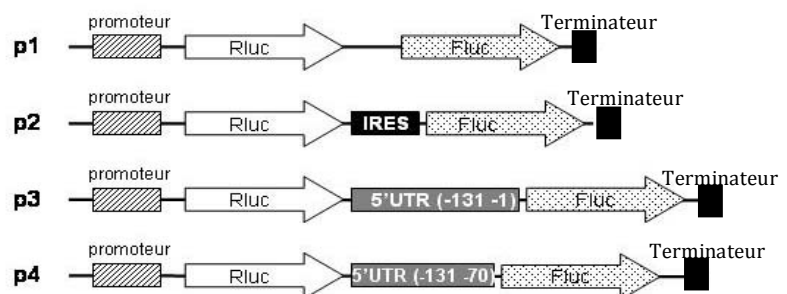
Quelle étape est bloquée par la rapamycine ? La rapamycine a-t-elle un effet sur l'accumulation de p53 ?

Expérience 5

Différentes constructions plasmidiques ont été réalisées dans un système dicistronique (p1) présenté Figure 5. Ce vecteur d'expression contient les régions codantes (CDS) de "Renilla luciférase" (Rluc) et de "Firefly luciférase" (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 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'encephalomyocarditis (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 :

- a) Quel est l'intérêt d'utiliser le vecteur p1 pour réaliser ces différentes constructions ?
- b) Qu'est-ce qu'un IRES ?
- c) 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.

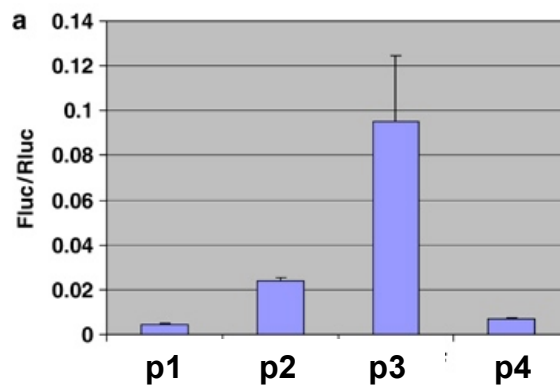
Remémorez-vous le processus canonique de l'initiation de la traduction eucaryote, déduisez son impact sur la traduction de Rluc et sur la traduction de Fluc dans P1.

Prédire l'effet de l'IRES sur la traduction de Rluc et sur la traduction de Fluc dans P2.

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 :

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

Comparez l'effet de l'IRES à celui des séquences 5'UTR de p53. Qu'en concluez-vous ?

Appuyez-vous sur les données présentées dans la figure 6. Vous pouvez faire une conclusion générale sous la forme d'un schéma clairement légendé ou d'un paragraphe écrit.

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 aérobies, 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^-] ; $\Delta ryhB$ [$ryhB^-$] et $\Delta fur\Delta ryhB$ [$fur^-/ryhB^-$]) 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.

De tels clusters fer-soufre se trouvent dans diverses métalloprotéines telles que ferrédoxines, la NADH déshydrogénase, la succinate déshydrogénase, la nitrogénase, l'aconitase...

Signification de RyhB:

R : RNA

y : unknown function

h : the gene was found in the ten-minute-interval section of the *E. coli* map

B : one of two RNA genes identified in this interval

Fur: Ferric uptake regulation protein

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

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.

Comparez la croissance de la souche sur les deux milieux

Comparez la croissance des souches transformées par rapport à celle de la souche sauvage

RyhB régule-t-il l'opéron *sdhCDAB* ? Si oui, comment ?

Quelles relations peut-on avoir entre RyhB, Δfur , l'opéron *sdhCDAB* et la croissance sur succinate ?

Il est utile de comparer ces résultats aux informations sur *ryhB* et *fur* données dans l'introduction

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 , $\Delta ryhB$ et $\Delta fur \Delta ryhB$ 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 électrophorèse sur gel d'agarose. Un northern-blot a ensuite été réalisé avec des sondes spécifiques de RyhB ou de *sdhCDAB* (Figure 1).

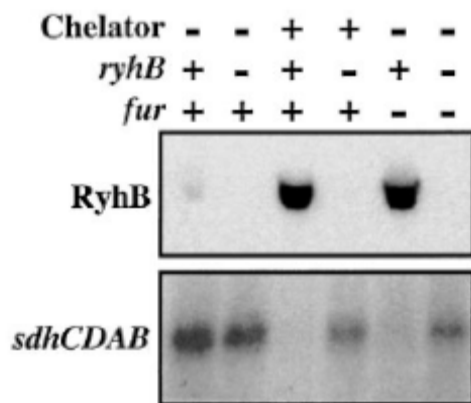


Figure 1

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?

Le but de ce northern-blot est de comparer la quantité d'ARN *RyhB* ou celle de l'ARNm du *sdhCDAB* dans différentes conditions. Peut-on faire cette comparaison en évaluant juste les signaux observés sur la figure ?

Question 3 : Analysez et interprétez les résultats obtenus.

Analysez la quantité d'ARN *RyhB* en présence ou en absence de *Fur* ou du chélateur du Fer. Comment *Fur* régule-t-il *RyhB* et dans quelle condition ?

Analysez la quantité d'ARNm du *sdhCDAB* en présence ou en absence de *RyhB* ou de *Fur*. *RyhB* régule-t-il *sdhCDAB* ?

Attention: « chélateur+ » signifie absence de fer

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*.

Quelles sont les conséquences possibles de la fixation de l'ARN *RyhB* sur l'ARNm du *sdhCDAB* ?

Voir cours "Régulation par les ARN". Lequel des mécanismes est possible ici? Tenir compte des résultats de la figure 1 sur le niveau d'ARNm.

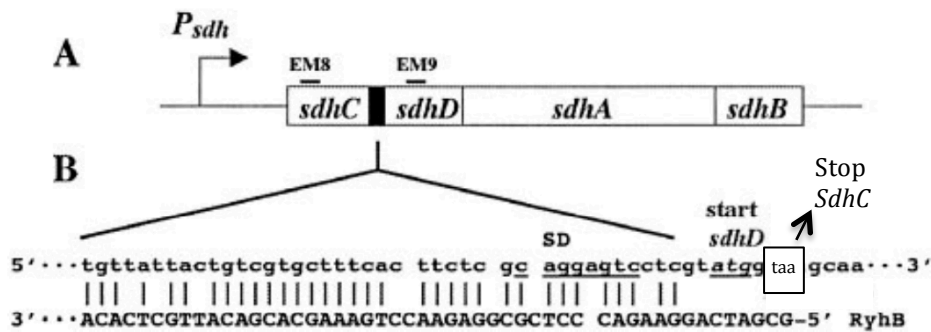


Figure 2

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).

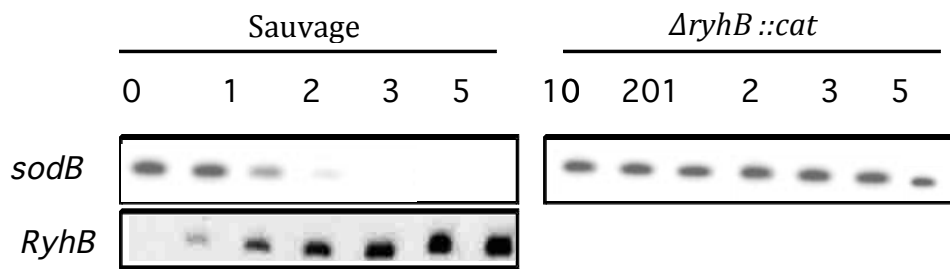


Figure 3

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* ?

Superoxyde dismutase = métalloprotéine qui catalyse la réaction : $2 O_2^- + 2H^+ \Rightarrow H_2O_2 + O_2$
 L'anion superoxyde (O_2^-) est une espèce réactive de l'oxygène (ROS). Il est très toxique car il réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour donner le radical hydroxyle ($\bullet OH$) responsable de l'oxydation des différents constituants cellulaires (ADN, protéines, lipides). Un excès d' O_2^- conduit donc à des dégâts liés à la surproduction de $\bullet OH$.
 La réaction catalysée par la superoxyde dismutase nécessite des ions du fer comme cofacteur. Donc en présence de fer, la cellule se protège avec l'enzyme superoxyde dismutase afin de diminuer la quantité de ROS.
 Analysez la quantité de l'ARNm *sodB* en présence ou en absence de RyhB ou du Fer.

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).

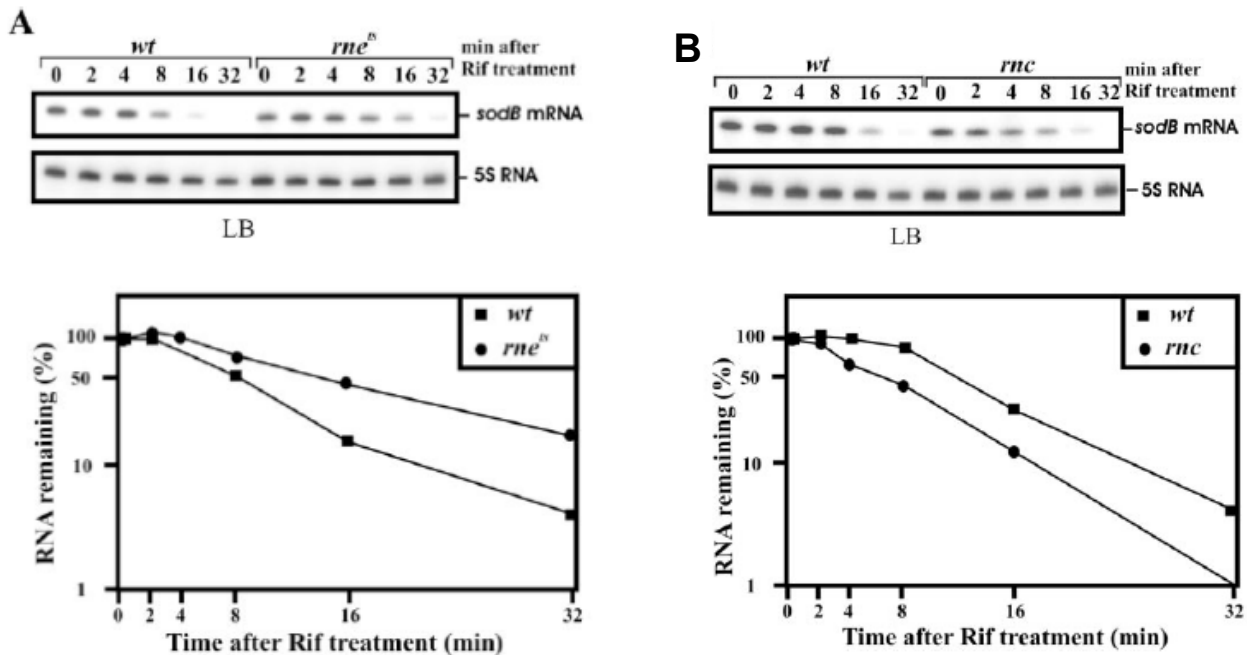


Figure 4

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 complémentaire à *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 ?

Quel est le processus cellulaire et l'étape touchés par cet antibiotique ?

Question 8 : Commentez les résultats obtenus.

RNase E: une endoribonucléase qui clive l'ARN simple brin dans des régions riches en A et U

RNase III: une endoribonucléase qui reconnaît et clive l'ARN double brin

Analysez le profil d'accumulation de l'ARNm du *sodB* dans la souche sauvage puis comparez ce profil à ceux observés dans la souche *rnc* (RNase III) et dans la souche *rne^{ts}* incubée plusieurs minutes à température restrictive après traitement à la rifampicine.

Une fois compris les gels du haut, on peut les oublier et se concentrer sur les courbes.

Pour bien interpréter, passez d'une dégradation d'ARN à une activité de l'enzyme.

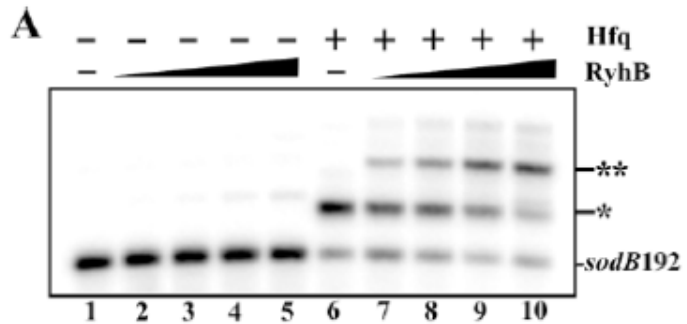
Dégradation+ => activité +

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 présence (puits 6 à 10) ou en absence (puits 1 à 5) de la protéine Hfq. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide non dénaturant et révélés par autoradiographie.



- Questions 9 :** a) À quoi correspondent les bandes mentionnées par * et ** ?
 b) Commentez les résultats obtenus Figure 5.
 c) Qu'en concluez-vous quant au rôle de la protéine Hfq ?

Hfq est une protéine thermostable et abondante. Elle se lie préférentiellement aux régions riches en AU et non structurées de l'ARN et agit comme un chaperon à ARN afin de faciliter les appariements ARN-ARN. Elle est nécessaire à la régulation de la traduction et de la stabilité des ARNm, eux-mêmes contrôlés par des petits ARN non codants.

En tenant compte de la présence ou de l'absence de RyhB ou de Hfq, analysez séparément les puits 1, les puits de 2 à 5, les puits 6 et les puits de 7 à 10.

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).

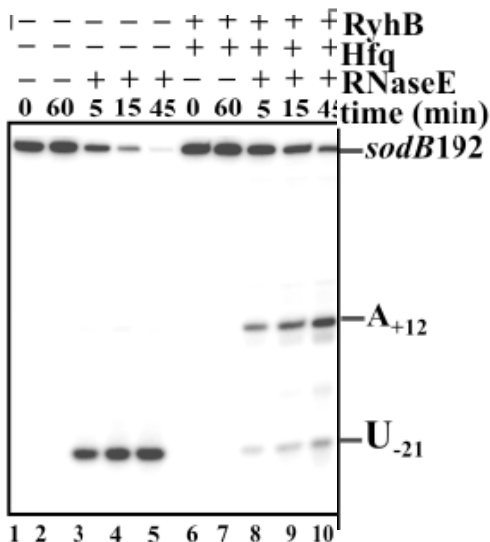


Figure 6

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

*En tenant compte de la présence ou de l'absence de RNaseE, analysez séparément les puits 1 et 2, les puits de 3 à 5, les puits 6 et 7, et les puits de 8 à 10. Le profil de clivage pourrait-il changer suite à la fixation de la sonde *sodB192* sur RyhB ?*

*Aidez-vous de la Figure 7 pour repérer les positions sur *sodB*.*

Par rapport à quoi numérote-t-on les positions positivement ou négativement ?

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.

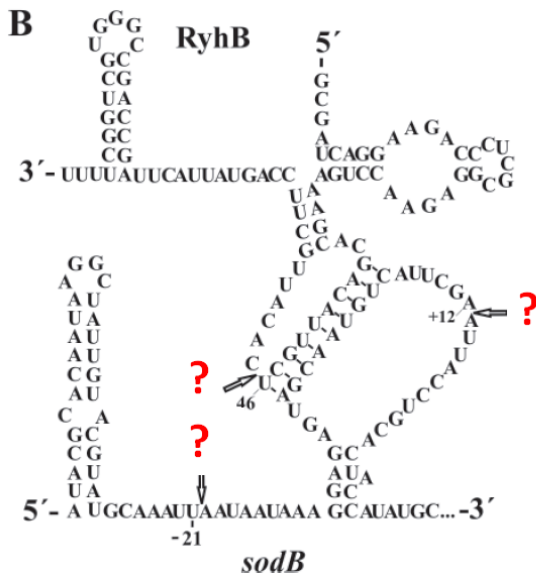


Figure 7
Interaction de l'ARNm *sodB* avec le petit ARN RyhB

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

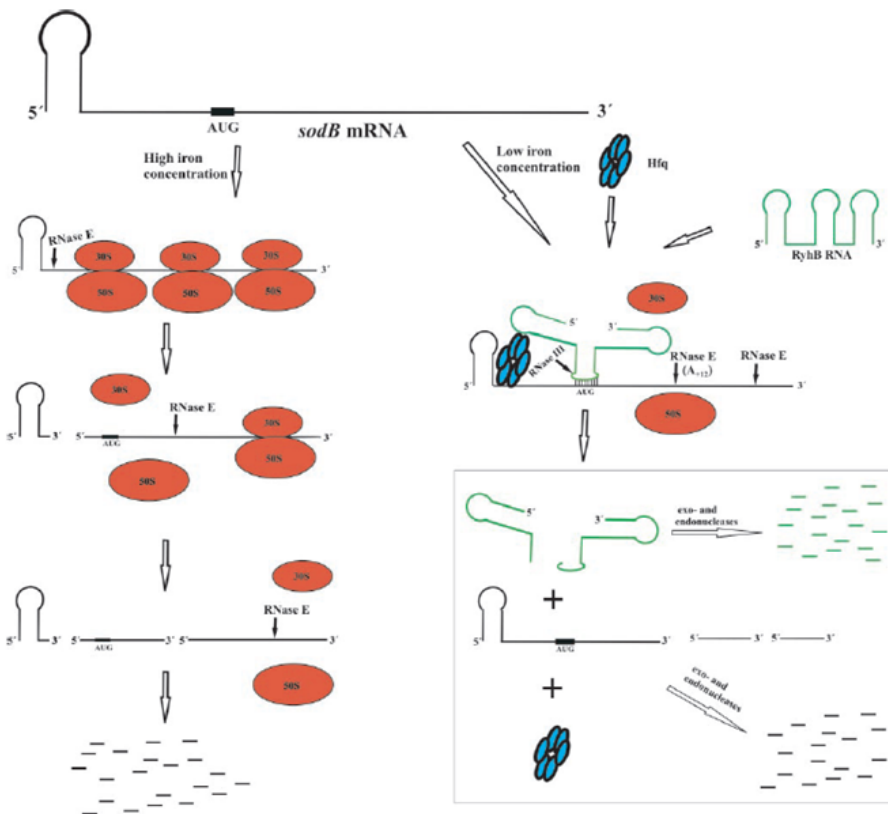


Figure 8
Modèle de régulation du gène *sodB* par le petit ARN RyhB

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

Ici il s'agit seulement de reporter vos conclusions des différentes parties du TD.

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.

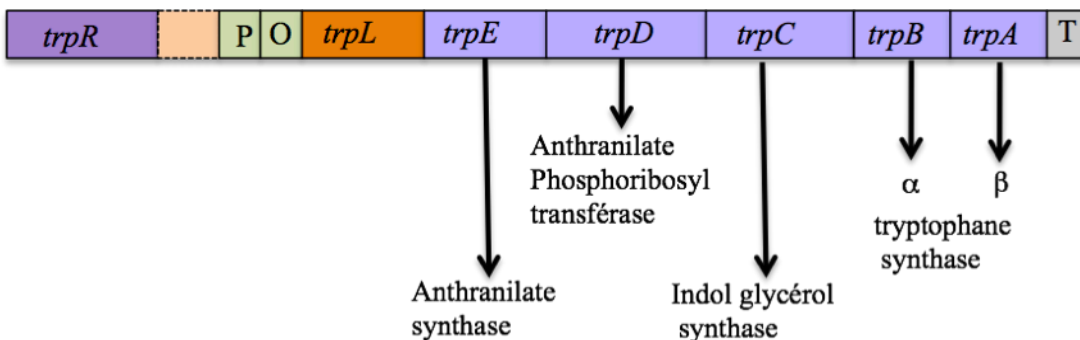


Figure 1 - Organisation de l'opéron tryptophane.

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 : a) Définissez ce qu'est un opéron.

b) Schématisez les produits de transcription et de traduction.

c) Mentionnez sur ce schéma les signaux de traduction.

Pour répondre à cette question, cherchez les informations dans votre cours et /ou un ouvrage de BM traitant de ce sujet. Profitez-en pour revoir :

- la définition d'un promoteur et des différents termineurs bactériens (rôles, séquences, structures, facteurs protéiques impliqués...), d'un cistron ;
- combien d'ARN différents sont produits à partir d'un opéron (schématisez le (les) en indiquant les signaux de traduction) ;
- combien de protéines différentes seront produites (orientez les).

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 ?

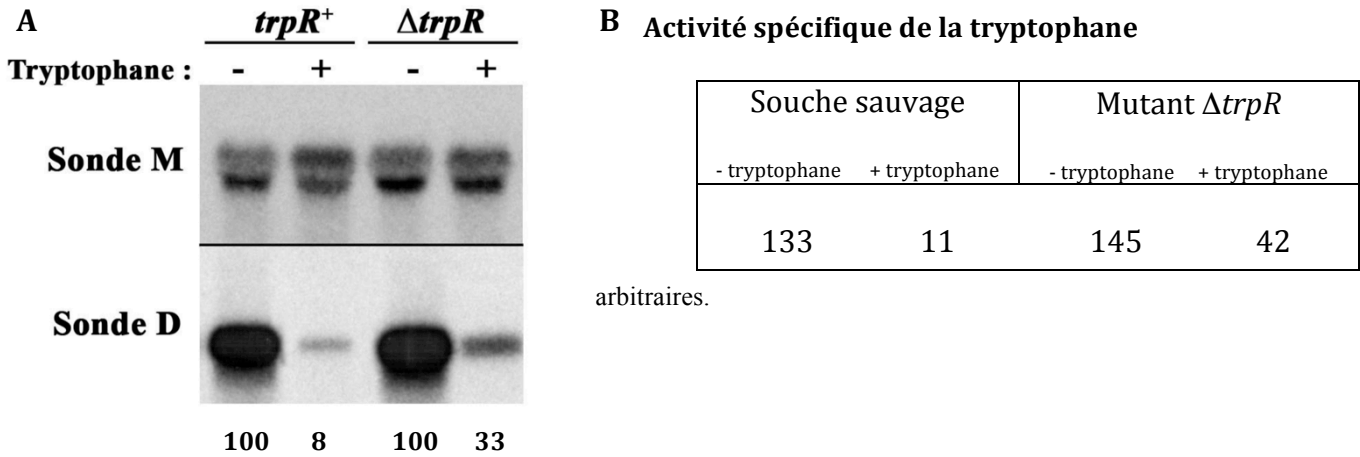


Figure 2

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 : a) À partir des résultats présentés Fig. 2A, quel rôle attribuez-vous au produit du gène *trpR* et dans quelle condition ?

Quelles informations nous apporte un northern blot ? Que vont révéler les différentes sondes utilisées ? Décrivez les résultats du northern avec le vocabulaire approprié sans oublier les contrôles.

- *Quel est l'effet du tryptophane dans un contexte sauvage ? Sa présence impacte-t-elle positivement ou négativement l'accumulation du transcrit ?*
- *La délétion du gène *trpR* a-t-elle un effet ? De quelle amplitude ? Dans quelles conditions ?*

b) 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 ?

Comparez les amplitudes des différentes variations pour conclure.

Une nouvelle expérience de northern 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. Les autoradiogrammes sont présentés Figure 3A et B.

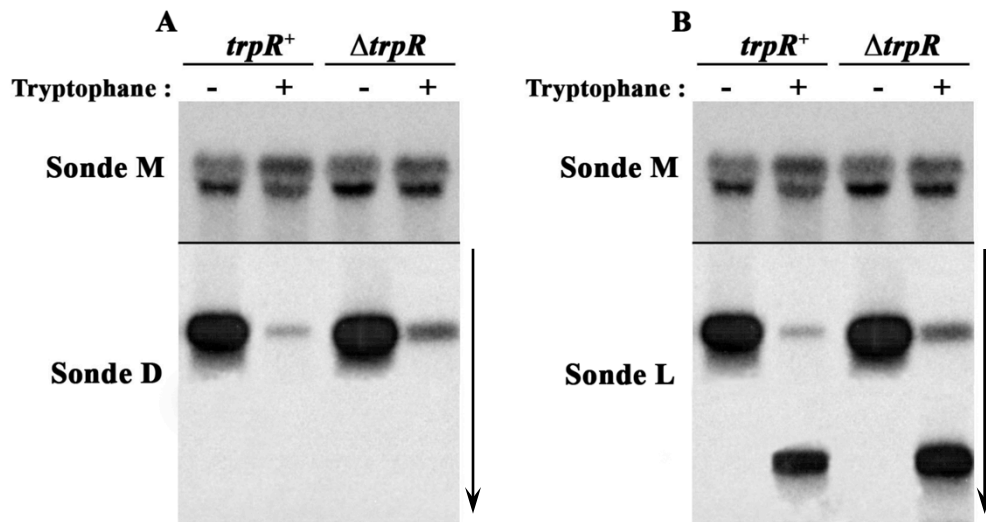


Figure 3- A. Hybridation avec les sondes M et D (voir Figure 2A). La flèche indique le sens de migration. B. La même membrane a été déshybridée, puis ré-hybridée avec la sonde L.

Question 5 : Analysez les résultats présentés Figure 3B.

Indiquez quel est l'élément révélé par l'utilisation de la nouvelle sonde L et non visible avec la sonde D.

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

A l'aide de votre schéma d'ARN établi en Q1, positionnez les zones d'appariement des sondes D et des sondes L et indiquez à quoi pourrait correspondre ce nouvel élément. Par quels mécanismes pourrait-il apparaître dans la cellule ? A quels niveaux se situerait cette régulation ?

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

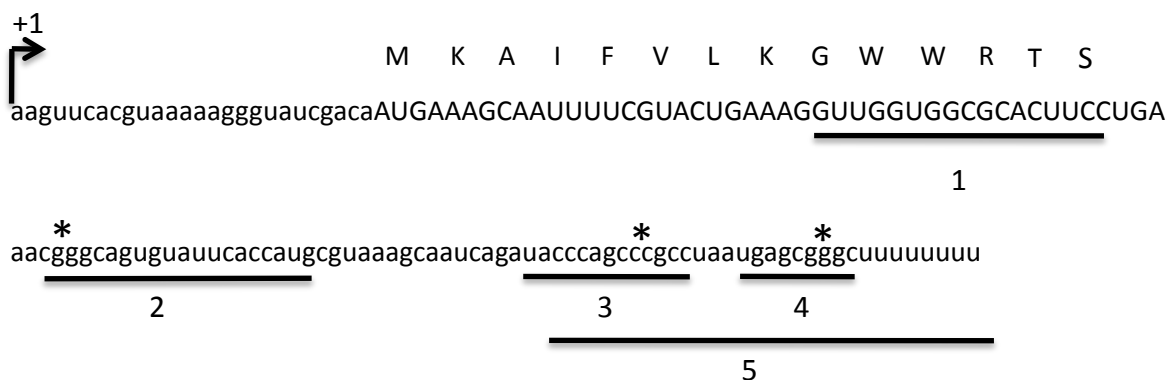


Figure 4 - Séquence du transcrit de petite taille révélé par le second northern (Figure 3). Les séquences 1, 2, 3 et 4 ont été soulignées car elles sont susceptibles d'établir des structures secondaires. Les mutations ponctuelles ultérieurement décrites dans le texte sont indiquées par des *.

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

- Quelles sont les bornes de la séquence présentée en majuscules ? De quoi s'agit-il ?
 - A quoi correspond la séquence située au-dessus de celle en majuscules ? De quoi s'agit ? Pour rappel, dans la nomenclature à une lettre des acides aminés, W signifie tryptophane.
 Formulez des hypothèses fonctionnelles sur l'effet de cette séquence.

Questions 8: a) Donnez les différentes structures secondaires possibles de cet ARN (impliquant les séquences 1, 2, 3 et 4).

Vous devez identifier deux structures alternatives impliquant des appariements. Nous vous précisons que la séquence 2 peut s'apparier avec les séquences 1 ou 3 et la séquence 3 peut s'apparier avec les séquences 2 ou 4. Nommez la structure particulière formée par chaque appariement.

b) Quel est le rôle fonctionnel possible de la séquence 5 ? Et à quelle condition ?

Rappelez-vous les définitions que vous avez données en Q1 concernant les différents éléments d'un opéron (promoteur, terminateur, cistron...).

Pour aller plus loin dans votre réflexion et mieux comprendre l'expérience suivante, repositionnez trpL pour chacune de ces 2 structures alternatives. Que pourrait-il se passer lors de la traduction de ce cistron ? Quel sera l'impact sur la structure de la région ? Quel sera l'impact selon qu'il y a ou non du tryptophane disponible ?

Des mutations ponctuelles ont été introduites dans la région L chez une souche mutante $\Delta trpR$. 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 $\Delta trpR$ (100 %).

On utilise la souche $\Delta trpR$ pour exclure la régulation exercée par TrpR et se focaliser sur la régulation liée à la région trpL.

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) $\Delta trpR+4$

Identifiez bien les conséquences traductionnelles attendues de chaque mutation (1, 2, 3 ou 4). Puis observez si cela induit un changement par rapport à la souche sans mutation et en absence de tryptophane. Le petit ARN est-il présent ? Si oui, l'est-il en quantités équivalentes ? Concluez.

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

N'oubliez pas que chez les bactéries, la transcription et la traduction sont concomitantes.

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.

Il est vivement conseillé ici de faire un schéma resituant tous les acteurs décrits

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).

Là encore, ce petit paragraphe peut se résumer par un schéma distinguant les deux situations : carence en fer et excès de fer.

Et pour bien saisir toute la subtilité de ces deux régulations coordonnées, il est important de s'attacher à ce qui pourrait être perçu comme un détail (et qui ne l'est pas) : « captage et pas de stockage » (en carence de fer) d'une part, et « stockage et peu de captage » (en excès de fer), d'autre part.

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 ?

Attention, lisez bien la question : on vous parle des niveaux de régulation de la synthèse de la protéine

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).

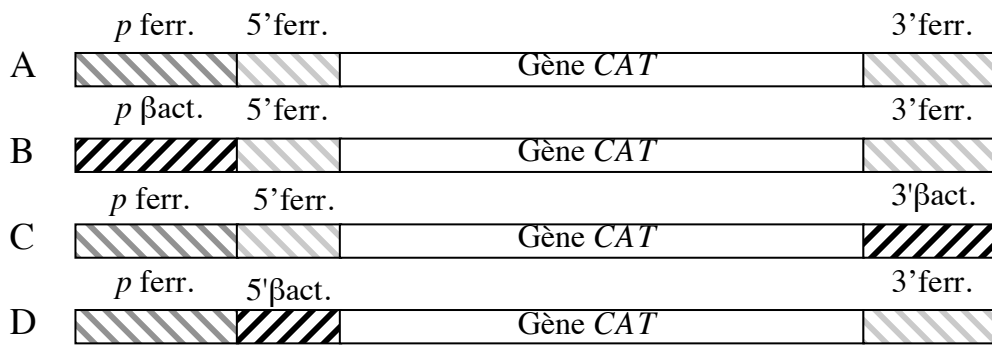


Figure 1 - Constructions rapporteuses

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

Nous vous encourageons à regarder les informations relatives aux constructions rapporteuses en annexe du poly de TD

La construction A possède tous les éléments potentiels de régulation de l'expression du gène de la ferritine. C'est une construction contrôle où l'expression du gène CAT doit être régulée par la disponibilité en fer comme l'est le gène de la ferritine lui même. Les autres constructions ont pour but de déterminer le (les) élément(s) du gène de la ferritine responsable(s) de sa régulation.

Questions 2 :

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

A quoi correspond la jonction entre un promoteur et la région 5'UTR ? La technique qui vous est demandée est décrite dans la partie Annexes du poly TD.

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.

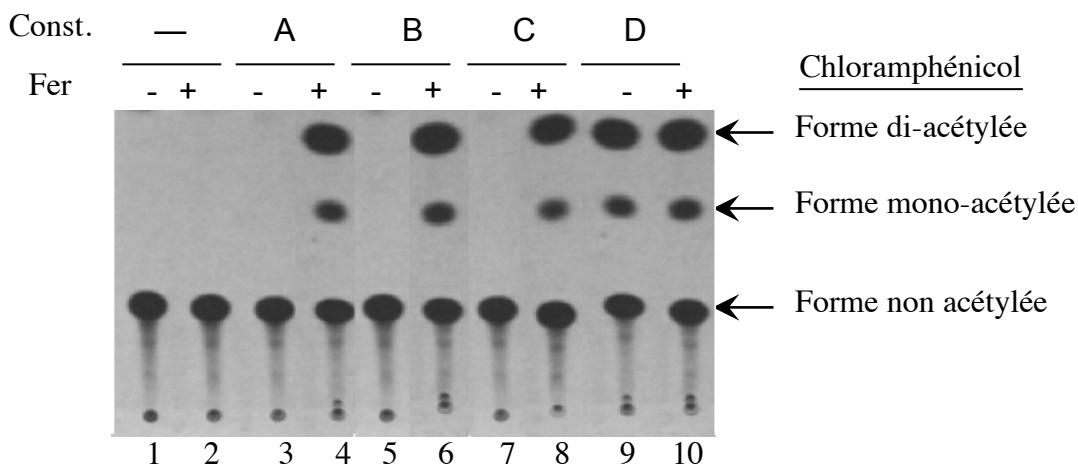


Figure 2 - Analyse de l'activité CAT

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 :

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

Questions 4 :

- a) Interprétez l'ensemble des résultats.

Vérifiez d'abord que la construction A reflète bien la régulation attendue, et recherchez quelle(s) autre(s) construction(s) donne(nt) une régulation altérée.

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

La région 5'UTR peut être impliquée dans différents niveaux de régulation de l'expression d'un gène. Lesquels ?

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.

Les résultats présentés Figure 2 vous ont permis d'identifier l'élément cis-régulateur du gène de la ferritine. La protéine IRP s'avère ici être un régulateur de l'homéostasie du fer et donc potentiellement un élément trans-régulateur d'au moins un des deux gènes clés de cette homéostasie.

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.

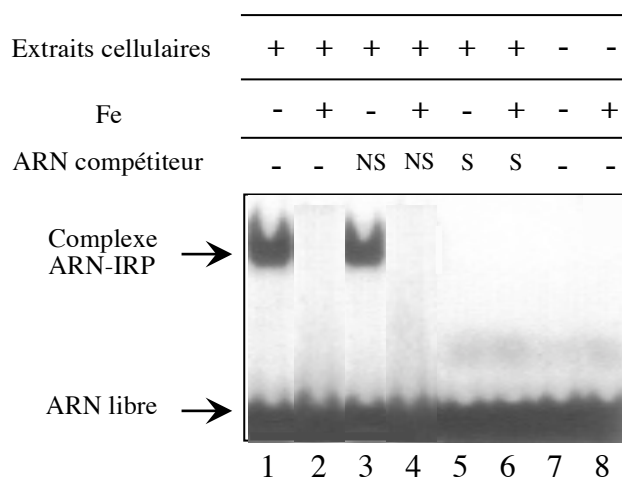


Figure 3 - Autoradiographie des gels de retard de migration

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 ?

La sonde est ici un ARN (et non un ADN) qui est marqué lors de sa synthèse (transcription *in vitro*).

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 ?

Vous pouvez vous reporter au TD n°6

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 :**
- Que représentent les deux séquences soulignées ?
 - À quelle structure secondaire peuvent-elles conduire ?
 - 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 ?

Cette expérience (ou ces expériences) doit (doivent) vous permettre de savoir si, pour la reconnaissance de l'IRE par l'IRP, c'est seulement la séquence primaire de l'IRE qui est importante, ou si c'est seulement sa structure secondaire, ou encore les deux.

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 comme 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.

Il est rappelé que la chaîne respiratoire correspond à un transfert d'électrons assuré par une succession de transporteurs dont certains sont des cytochromes. L'accepteur final des électrons est l'oxygène (alors réduit en eau) dont l'acheminement nécessite de l'hémoglobine, laquelle contient, comme son nom l'indique, de l'hème.