

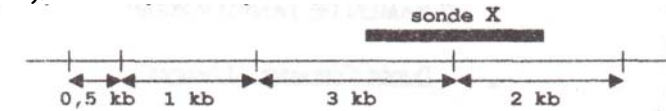


# TRAVAUX DIRIGES BIOLOGIE MOLECULAIRE MODULE 32 - SV5

## T.D 1

### A-

On utilise une sonde X pour hybrider une membrane où ont été transférés les fragments de restriction obtenus par digestion de l'ADN génomique par l'enzyme SstI (les traits verticaux représentent les sites de coupure pour l'enzyme SstI).



Quel est le profil obtenu après révélation ? :

A	B	C	D	E	tailles
—		—	—		5 kb
					4 kb
	—		—	—	3 kb
	—		—	—	2 kb
—				—	1 kb
—				—	0,5 kb

### B-

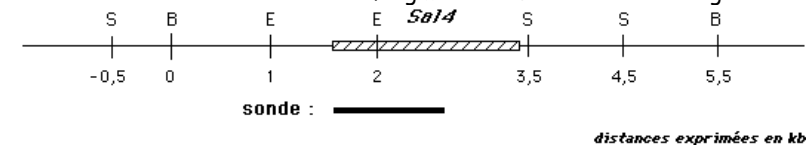
On réalise la carte de restriction d'un fragment amplifié par PCR avec les enzymes de restriction EcoRI, BamHI, XbaI et NcoI. Les tailles des fragments

E	B	N	X	E-X	E-N	X-N
0,4	1,8	0,8	0,3	0,3	0,4	0,3
1,4		1	1,5	0,4	1	0,7
				1,1		0,8

Donner la carte de restriction du fragment amplifié par PCR.

### C-

On donne la carte de restriction du fragment d'ADN environnant le gène *Sal4* :



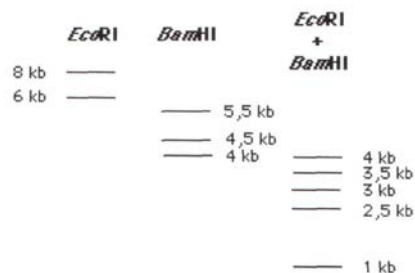
On réalise une hybridation moléculaire de type Southern de l'ADN de la façon suivante:

3 échantillons d'ADN génomique sont respectivement digérés par les trois enzymes de restriction *Eco* RI (E), *Bam* HI (B) et *Sst* I (S). Après électrophorèse et transfert sur membrane de nylon, l'ADN est hybridé avec une sonde correspondant à une partie du gène *Sal4* symbolisée sur le schéma ci-dessus en trait gras au dessous.

Schématisez ce que l'on voit sur l'autoradiogramme après révélation ?

#### D-

Un plasmide (6 kb) contenant un gène M clone (8 kb) (appelé pBM1) est digéré par les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI. Après migration et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium, on obtient les profils de restriction suivants:



Donner la carte de restriction du plasmide recombinant pBM1.

#### E-

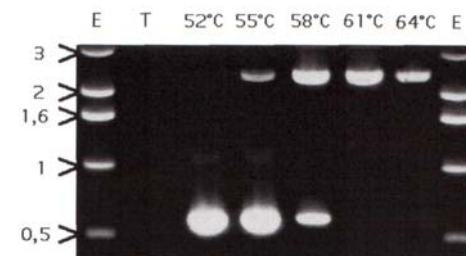
- Vous décidez d'amplifier la totalité du gène (d'une longueur d'environ 2,3 kb) en utilisant les amorces suivantes:

5' -GAGAAGGGTGGTGGTTTCTGTG-3'

5' -GGTGTAGTGGTTAGCACTCTGG-3'

Calculez les températures de fusion de ces amorces. Décrivez les conditions d'amplification de séquence (températures de différents paliers, durées approximatives des différentes étapes, nombre de cycles...) que vous allez programmer sur votre thermocycleur (appareil d'amplification de séquences) pour réaliser l'amplification.

Afin de bien étudier le comportement de vos amorces, vous réalisez des amplifications dans 5 conditions différentes en faisant varier la valeur de la température d'hybridation d'amorce: 52°C, 55°C, 58°C, 61°C et 64°C. Vous faites migrer le produit des réactions d'amplification de séquence sur un gel d'agarose et obtenez le résultat suivant:

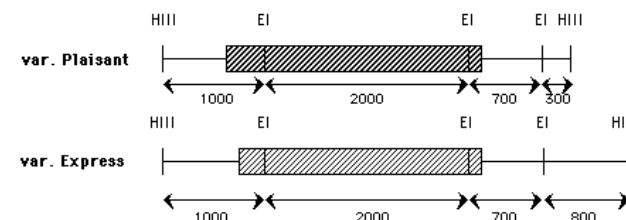


Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% . E: échelle de poids moléculaire (Les tailles des bandes sont données en kb ). T : échantillon témoin négatif: la réaction de PCR a été réalisée en mettant tous les composants nécessaires à la réaction sauf l'ADN matrice à amplifier.

Commentez ce résultat.

#### F :

Le gène NPQ a été isolé chez deux variétés d'orge (*Hordeum vulgare*, var. Plaisant et var. Express) dans un fragment d'ADN génomique limité par des sites *Hind*III (HIII). La carte de restriction de ces fragments est la suivante:



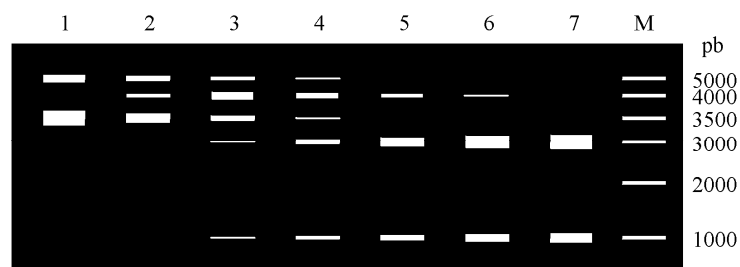
Dans les deux cas, un fragment *Eco* RI( EI) de 2000 pb contient la presque totalité du gène. Il a été sous-cloné et séquencé pour les deux variétés. Il apparaît par séquençage que les deux séquences présentent 92% d'homologie entre elles. Nous nous proposons d'analyser le polymorphisme RFLP de ces deux variétés en utilisant le gène NPQ comme sonde. Les ADN génomiques des deux

variétés ont été digérés d'une part par *Eco* RI et d'autre part par *Hind* III puis séparés sur un gel d'agarose. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, l'ADN a été hybridé par le fragment *Eco* RI de 2000 pb de la variété Plaisant, marqué radioactivement.

- 1- Donnez le profil d'hybridation obtenu.
- 2- Quelles hypothèses permettent d'expliquer ce type de polymorphisme?

### G :

Un ADN plasmidique purifié sur gradient de chlorure de césium est non digéré (piste 1) ou digéré pendant 1 heure à 37°C, avec des concentrations croissantes d'enzyme de restriction *Bam*H1 (pistes 2 à 7). Les différentes digestions sont analysées par fractionnement en électrophorèse sur gel d'agarose (100ng d'ADN déposé / piste) N.B. : M = marqueurs de taille ADN linéaire

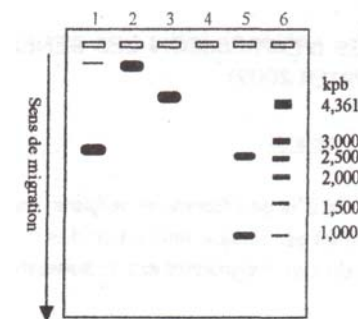


- 1- Quel est le sens de migration de ce gel ?
- 2- Comment peut-on révéler ces différents fragments d'ADN ?
- 3- Que traduisent les différences de fluorescence observées dans les pistes 1 et 7 ?
- 4- Interprétez les résultats de ces différentes digestions enzymatiques.
- 5- Quelle est la taille du plasmide ?

## T.D 2

### A-

Le plasmide pJLB a été extrait et purifié puis traité par différentes enzymes (voir légende de la figure ci-après). L'analyse des produits obtenus est réalisée après électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans du tampon Tris-Borate-EDTA pH 8,3 et incubation du gel dans une solution de Bromure d'Ethidium (BEt).



Piste 1 : pJLB natif

Piste 2 : pJLB traité par une enzyme responsable de l'hydrolyse d'une liaison phosphodiester d'un seul des deux brins de l'ADN

Piste 3 : pJLB traité par l'endonuclease de restriction *Eco*RI. (Le site *Eco*RI est unique dans la séquence du pJLB).

Piste 4 : Hydrolyse totale de pJLB par la DNaseI.

Piste 5 : pJLB traité par l'endonuclease de restriction *Bam*HI.

Piste 6 : marqueur de taille exprimé en kilo paire de bases (kpb).

- 1) L'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée à partir de 1 mL de culture bactérienne à  $10^9$  cellules/mL. Sachant qu'il y a 100 plasmides par bactérie, donner le nombre de copies de plasmide obtenu après extraction (nous considérons que le rendement d'extraction est de 100%).
- 2) Dans le cas de la migration sur gel d'agarose des acides nucléiques, donner le(s) critère(s) de migration et le(s) critère(s) de séparation de l'ADN.
- 3) Préciser le principe de la visualisation de l'ADN par le Bromure d'Ethidium (BEt).
- 4) Identifier les formes majoritaires présentes dans les pistes 1 à 4. Pourquoi observe-t-on une bande supplémentaire en haut de la piste 1 ?
- 5) Piste 6, un mélange équimoléculaire de fragments linéaires d'ADN de différentes tailles a été déposé. Pourquoi l'intensité des bandes colorées décroît-elle ?
- 6) À l'aide du marqueur de taille piste 6, estimer la taille des fragments de restriction. Quelle est la taille du plasmide pJLB natif. Combien y a-t-il de sites pour *Bam*HI sur le plasmide pJLB ?

**B-****RFLP :**

On s'intéresse à une portion d'ADN présentant 4 sites de coupure par l'enzyme de restriction *EcoR* I, selon la carte de restriction représentée sur le schéma ci-contre (taille en pb).

1. On dispose des amorces pour amplifier spécifiquement un fragment de 1100 pb incluant les 4 sites de coupure de A à D. On soumet l'ADN amplifié à l'action de *EcoR* I et on analyse les fragments par électrophorèse.

a- Donner le nom de la technique d'amplification et rappeler son principe.

b- Positionner sur le gel d'électrophorèse I ci-contre les fragments obtenus lorsque les 4 sites de coupure sont présents (P1) et dans l'hypothèse où le site C a disparu (P2).

c- Comment peut-on révéler ces fragments dans cette situation ?

2. La totalité de l'ADN est soumise à l'action de *EcoR* I et les fragments sont analysés par la technique du southern blot. La révélation est assurée soit par une sonde radioactive  $x^*$ , soit par une sonde radioactive  $y^*$ , qui reconnaissent spécifiquement la portion d'ADN d'intérêt comme indiqué sur le schéma.

a- Rappeler les étapes du southern blot

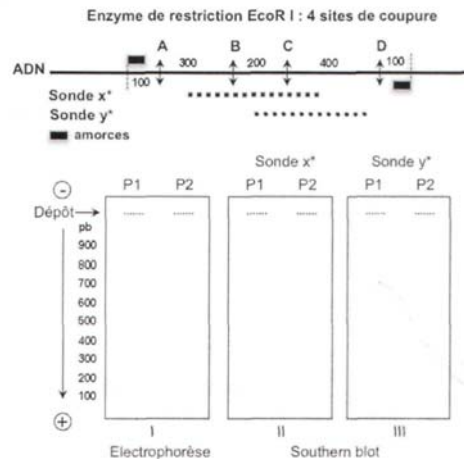
b- Préciser les conditions à respecter pour que l'hybridation avec les sondes  $x^*$  ou  $y^*$  ait lieu.

c- Comme pour la question 1-b, positionner sur le schéma de southern blot II les fragments révélés par autoradiographie avec la sonde  $x^*$  lorsque les 4 sites de coupure sont présents (P1) et dans l'hypothèse où le site C a disparu (P2).

d- Même question avec la sonde  $y^*$  (autoradiogramme III).

**C-**

On désire répliquer un ADN linéaire double brin A dont la séquence est la suivante :



A : brin 1 5'-AATTCGGATA.....CTGCATTAGC-3'

brin 2 3'-TTAAGCTAT .....GACGTAATCG-5'

On dispose de 4 oligonucléotides(6) dont les séquences sont:

oligo 1: 5' -GCTAATGC-3'

oligo 3: 5' -AATTCGGA-3'

oligo 2: 5' -TCCGAATT-3'

oligo 4: 5' -GCATTAGC-3'

Dans une 1<sup>ère</sup> étape, on chauffe à 90°C cet ADN en présence notamment d'un large excès de 2 oligonucléotides, puis on refroidit le mélange.

1) Quel couple d'oligonucléotides allez-vous choisir parmi les 4 cités ci-dessus pour permettre la réplification de cet ADN ? Justifier votre réponse à l'aide de schémas.

2) Décrire les phénomènes physico-chimiques qui peuvent se produire dans ces conditions, à 90°C et au cours du refroidissement.

Dans une 2<sup>e</sup> étape, on ajoute au milieu réactionnel les réactifs permettant la réplification.

3) Que faut-il ajouter au mélange pour qu'il y ait réplification ?

4) Représenter schématiquement la réaction de polymérisation.

5) Quel est le premier nucléotide incorporé lors de la réplification du brin 1.

**D-**

Séquençage d'un ADN par la technique de Sanger

a. Expliquez en quelques lignes le principe de la technique.

b. Le séquençage d'un ADN monobrin est effectué par la technique de Sanger, avec une amorce sens. En examinant le schéma représentant une partie de l'autoradiogramme du gel de migration, écrire :

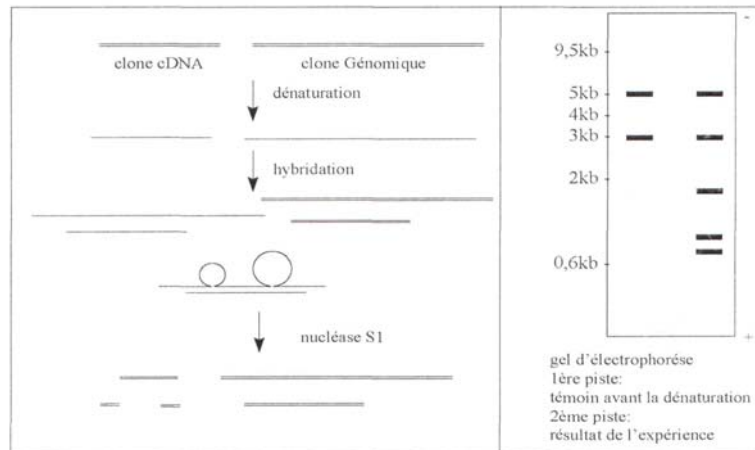
• la séquence nucléotidique lue directement sur ce schéma du film.

• la séquence réelle du segment d'ADN monobrin correspondant.



**E-**

On se propose d'étudier deux segments d'ADN (clone cDNA et clone génomique). Analysez la figure ci-dessous et interprétez les résultats obtenus du profil électrophorétique.



Un ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction Eco RI et HindIII. Les produits de la digestion avec les enzymes seuls ou ensembles ont été déposés sur un gel d'électrophorèse puis transféré sur nitrocellulose. A la suite d'une hybridation avec une sonde, on observe une seule bande. Interprétez la figure 1.

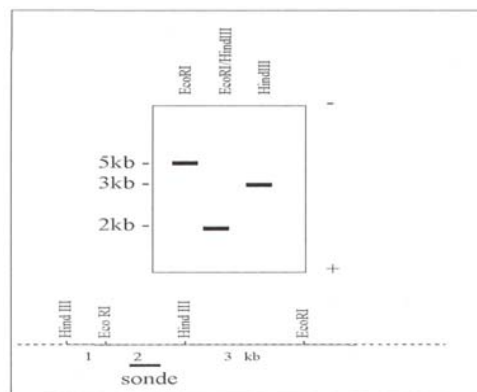


Figure 1

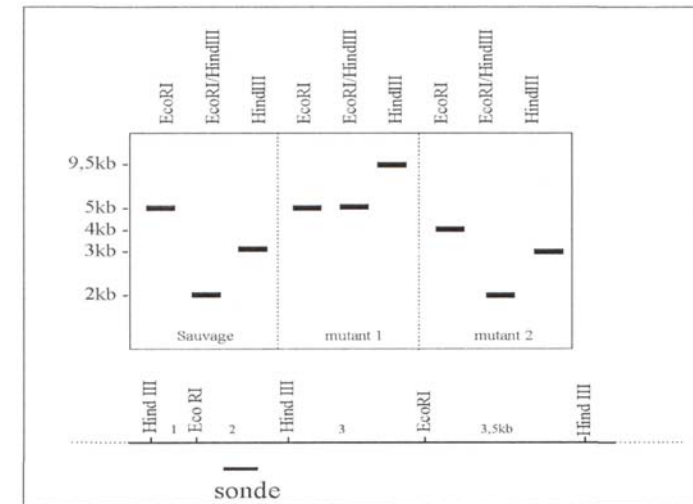


Figure 2

Exemple d'utilisation de la technique de Southern pour détecter des mutations. Définissez les deux mutants en interprétant les résultats de la figure 2.

### T.D 3

#### A-

Le fer est un élément essentiel à la survie et la croissance de la plupart des organismes vivants. En effet, ce métal joue un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques comme le transport de l'oxygène moléculaire et les phénomènes d'oxydoréduction dans la respiration. Les vertébrés, donc l'homme, ont des besoins relativement importants en fer, en particulier pour la constitution de leurs hémoprotéines (myoglobine, hémoglobine...). Paradoxalement, le fer **libre** est toxique, en raison de la faible solubilité de l'hydroxyde ferrique qui peut former des précipités intracellulaires. En conséquence, la biodisponibilité de ce métal doit être strictement contrôlée, sous peine de provoquer des désordres métaboliques graves (anémie, hémochromatose, cirrhose, diabète...). Pour résoudre ce problème, les cellules séquestrent leur fer à l'intérieur d'une protéine spécialisée : la **ferritine**. Cette protéine soluble est en réalité un oligomère composé d'un grand nombre de sous-unités. Ces sous-unités s'assemblent spontanément pour former une coquille autour d'un noyau d'hydroxyde ferrique pouvant contenir jusqu'à 4500 atomes de fer, sous forme cristalline. La concentration de cette protéine est en outre asservie à la concentration de fer présente dans l'organisme.

I- Mise en évidence du contrôle de l'expression de la ferritine par le fer.

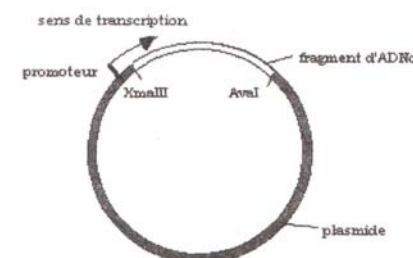
1-1 On a isolé un ADN complémentaire (ADNc) bicaténaire correspondant à TARN messager mature codant pour une sous-unité de la ferritine humaine, longue de 183 acides aminés. Cet ADNc est composé de 920 paires de bases (pb).

a- On soumet l'ADNc linéaire de la ferritine à des digestions par une ou plusieurs endonucléases de restriction. On détermine la taille des fragments obtenus après digestion au moyen d'une électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats obtenus sont les suivants :

	Désignation des enzymes de restriction ajoutées seules ou en combinaison				
	<i>AvaI</i>	<i>SacI</i>	<i>XmaIII</i>	<i>AvaI</i> + <i>SacI</i>	<i>SacI</i> + <i>XmaIII</i>
Tailles des	770	620	830	470	620
fragments	150	300	90	300	210
en					
pb				150	90

A l'orientation du fragment près, déterminez sur l'ADNc les positions respectives des sites de coupure des trois enzymes de restriction utilisées.

b- On effectue une digestion complète de l'ADNc linéaire par *XmaIII* et *AvaI*. On sépare les fragments obtenus par électrophorèse sur gel. On isole le plus grand fragment résultant de cette double digestion et on l'insère dans un plasmide d'expression, immédiatement en aval d'un promoteur de transcription eucaryote. L'orientation de l'insertion est la suivante :



Lorsque le plasmide recombinant ci-dessus est introduit dans des cellules animales, on détecte l'expression de ferritine humaine complète.

Orientez et positionnez approximativement le cadre ouvert de lecture correspondant à la ferritine sur la carte des sites de coupure des endonucléases de restriction établie au I-1-a. Précisez en particulier les bornes entre lesquelles doit se trouver le codon de démarrage de la traduction de la ferritine.

1-2 On s'intéresse à la régulation de la biosynthèse de la ferritine humaine. On réalise en parallèle deux cultures de cellules humaines : l'une sur un milieu de culture dépourvu de fer et l'autre, sur un milieu additionné d'une forte concentration de fer, sous forme de citrate ferrique. On récolte ensuite les cellules de chaque culture et on extrait les protéines, d'une part, et les ARN messagers, d'autre part.

On mesure les concentrations relatives de ferritine présentes dans chacune des deux cultures. On mesure également les quantités relatives de l'ARNm correspondant à la ferritine. On obtient les résultats suivants (normalisés à la quantité présente dans la culture sans fer).

	Culture sans fer	Culture avec fer
ARNm	1	1
Ferritine	1	30



Quel(s) mécanisme(s) peut-on proposer *a priori* pour expliquer une modulation de la concentration de ferritine par le fer ?

1-3 On insère dans le plasmide d'expression décrit à la question I-1-b, différents fragments de l'ADNc correspondant à la ferritine. On s'arrange pour que l'orientation des fragments soit toujours telle que le brin d'ADNc transcrit à partir du promoteur de transcription corresponde bien au brin transcrit du gène de la ferritine. Les plasmides obtenus sont introduits dans des cellules animales et celles-ci sont cultivées en présence ou en absence de fer, comme à la question précédente. On mesure alors les quantités relatives de ferritine humaine produites par ces cellules. On obtient les résultats suivants, pour les différents fragments d'ADNc étudiés. Les quantités sont normalisées à la quantité présente pour l'ADNc entier, dans la culture sans fer.

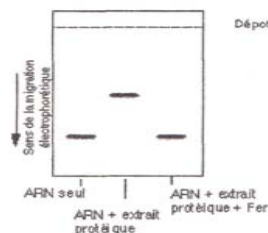
	Culture sans fer	Culture avec fer
ADNc entier	1	30
Plus grand fragment XmaIII-AvaI	30	30
Fragment XmaIII de 830 pb	30	30
Fragment AvaI de 770 pb	1	30

Déterminez la région de l'ADNc dirigeant la régulation de l'expression de la ferritine.

## II - Mécanisme de régulation de l'expression de la ferritine par le fer

On marque radioactivement un fragment d'ARN synthétique correspondant à la région 5' de l'ARNm de la ferritine humaine. Ce fragment est mélangé aux protéines extraites de cellules humaines et l'ensemble est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide qui sépare les molécules en fonction de leur taille. Cette électrophorèse est réalisée dans une solution tamponnée, proche des conditions physiologiques du cytoplasme. Dans une seconde expérience, le fragment d'ARN est mélangé à l'extrait protéique préalablement additionné de fer.

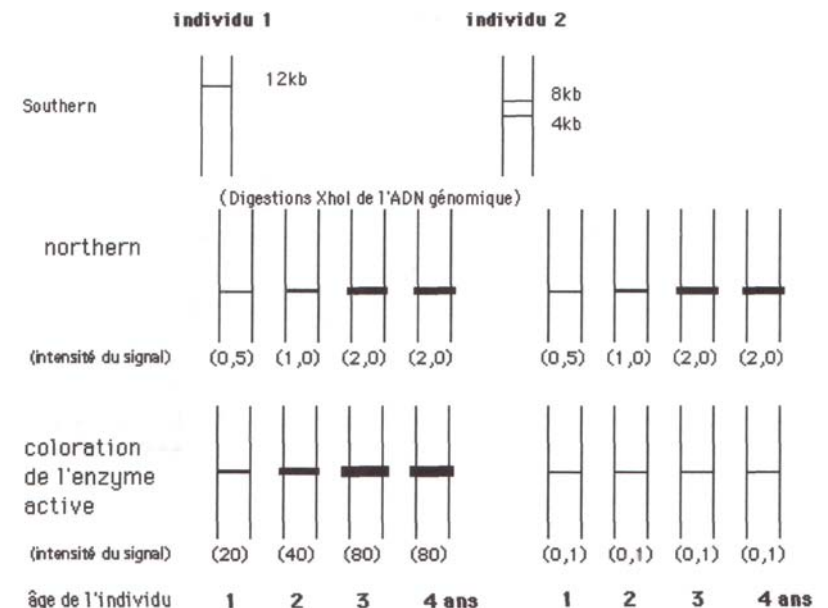
On dépose les deux mélanges sur le gel, ainsi que le fragment d'ARN seul, comme témoin. L'autoradiographie du gel permettant de détecter les positions des ARN radiomarqués est montrée ci-dessous :



En admettant que l'ARN ne subit pas de modification chimique au cours de l'expérience, donnez une interprétation des différences de migration. Proposez, comme conclusion générale, le mécanisme de régulation de l'expression de la ferritine par le fer.

## B-

Deux enfants sont examinés pour l'expression d'un gène (DYS) qui code pour une enzyme importante dans le développement musculaire. Les résultats des études du gène et de son produit sont donnés ci-dessous:



Pour l'individu 2, l'activité enzymatique à chaque stade est très basse et peut seulement être estimée approximativement à 0,1 unité à 1,2, 3 et 4 ans.

a- Pour les deux individus, dessinez un graphique représentant l'expression du gène au cours du développement.

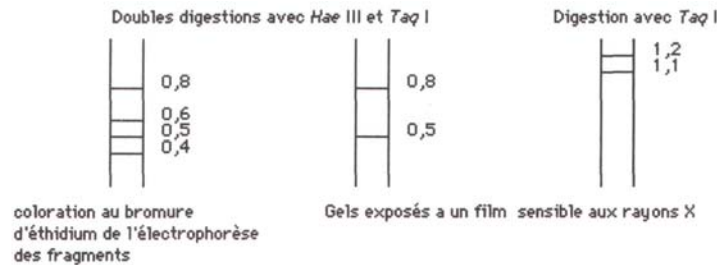
b- Comment proposez-vous d'expliquer le très faible taux d'enzyme active pour l'individu 2? (La dégradation de l'enzyme est seulement une possibilité).

c- Comment interprétez-vous le résultat de l'hybridation moléculaire de type Southern?

Les clones génomiques et l'ADNc d'une enzyme phosphatase ont été isolés. D'après les résultats suivants, les caractéristiques structurales du gène et de son transcrit peuvent être déterminées.

#### Carte de l'ADNc

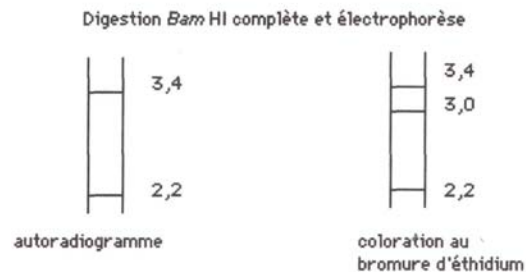
Le fragment d'ADNc a été retiré du plasmide et ses extrémités ont été marquées au  $^{32}\text{P}$ . Il a ensuite été digéré par des enzymes de restriction. Les analyses donnent les résultats suivants:



Déterminez la carte de l'ADNc.

#### Carte de l'ADN génomique:

Le fragment d'ADN génomique est extrait d'un clone de phage lambda par digestion *Eco* RI, puis ses extrémités sont marquées au  $^{32}\text{P}$ . Il a ensuite été digéré par des enzymes de restriction. Les analyses donnent les résultats suivants:



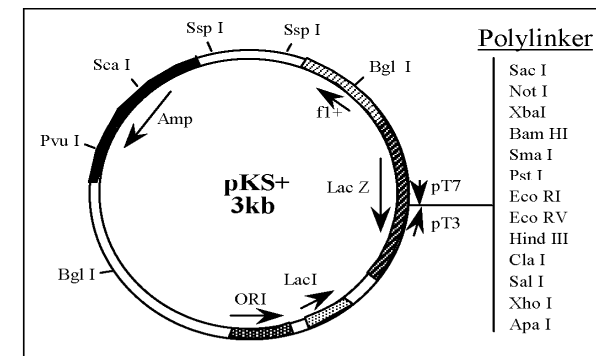
- Dessinez la carte génomique du fragment, en positionnant les sites de restriction.
- Quelle part du gène représente le fragment génomique de 3,0 kb?

- Une sonde d'ADNc marquée hybride avec les fragments génomiques de 3,4 et 2,2 kb. Le fragment *Taq*/de 1,2 kb hybride avec le fragment génomique de 3,4 kb. Si le gène de la phosphatase est présent en simple copie, à quel(s) fragment(s) génomique(s) s'hybridera le fragment *Taq*/de 1,1 kb?

#### T.D 4

##### A-

Un ADNc de 1,5Kb codant la protéine Myc chez la souris a été cloné au site *Eco*RI du vecteur pKS ci-dessous. Après ligation, on transforme des bactéries compétentes sensibles à l'ampicilline par le produit de cette ligation puis on étale les transformants sur un milieu plus ampicilline, X-gal et IPTG. NB : Cet ADNc ne contient pas de site *Xho*I



On prépare l'ADN plasmidique à partir de 2 colonies blanches **A et B**. Les plasmides de ces 2 colonies sont utilisés comme matrices de transcription pour synthétiser *in vitro* 2 sondes ARN marquées au  $^{32}\text{P}$ . Les **sonde 1 et 2** correspondent à la transcription à partir du promoteur T7 respectivement : de la matrice **A et B** linéarisée par *Xho*I. Une expérience de Northern est effectuée sur des ARNm purifiés des cellules de souris avec chacune des 2 sondes.

**Résultats** : sonde 1: une bande de 2Kb, sonde 2: pas d'hybridation

1- Rappeler le principe de la sélection blanc / bleu. Les résultats des Northern vous permettent de formuler une hypothèse quand à la structure des plasmides A et B.

On décide d'effectuer une transcription avec le promoteur T7 suivie d'une traduction *in vitro* de cet ADNc, afin d'étudier la séquence codant pour cette protéine X.

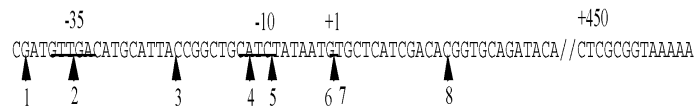


2- Dans la suite logique de la Q1)- : quel plasmide A ou B utiliseriez-vous pour effectuer cette transcription/traduction *in vitro*? Et pourquoi?

3- Pourquoi a-t-on linéarisé les deux plasmides par XhoI ?

### B-

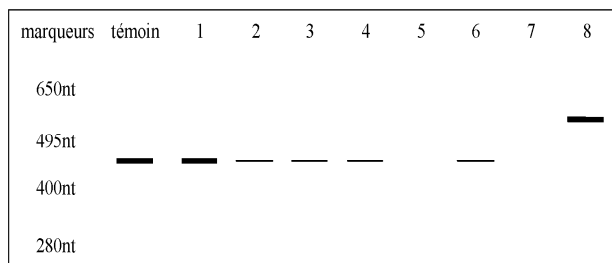
Par des techniques de génie génétique, nous avons réussi à isoler un fragment d'ADN génomique procaryote contenant la séquence codante d'une petite protéine. Ce fragment a été séquencé en totalité (voir figure).



Mutations : 1) insertion de 6 nucléotides; 2) G→A; 3) insertion de 8 nucléotides 4) A→G 5) délétion de AAT; 6) A→G; 7) A→T ou C; 8) insertion de 50 nucléotides.

L'analyse de la structure de cette séquence est effectuée par mutagenèse dirigée. Les ARN synthétisés (transcription *in vitro*) sont isolés. Ils sont concentrés par précipitation puis marqués au phosphore 32 avant d'être déposés sur un gel d'acrylamide.

Après migration, le gel est séché puis les ARN sont visualisés par autoradiographie. Nous obtenons ainsi les résultats suivants :



D'après vos connaissances et les résultats obtenus, donnez le rôle des différentes séquences impliquées dans le mécanisme d'initiation de la transcription.

### C-

On se propose d'établir la carte de restriction d'un plasmide avec les enzymes PstI et EcoRV.

1- Quelle est la propriété principale de reconnaissance des enzymes de restriction ?

2- Comment nomme-t-on les extrémités obtenues ?

3- Quelle est la probabilité théorique de trouver un site de coupure de l'ADN par PstI ou EcoRV en supposant que la composition et la répartition des bases soient aléatoires ?

4- La digestion du plasmide par PstI et EcoRV donne les résultats suivants :

Enzymes utilisées	Taille des fragments en Kpb				
EcoRV	4.2	3.4			
PstI	3.6	2.7	1.3		
EcoRV + PstI	2.2	2	1.4	1.3	0.7

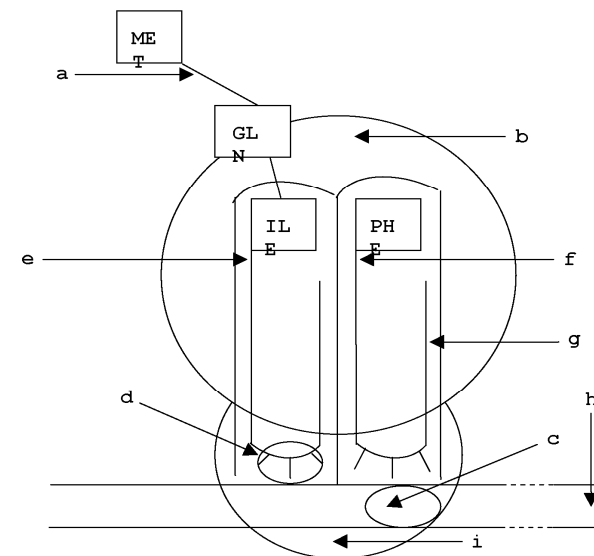
Etablir la carte de restriction de ce plasmide sachant que les sites de restriction pour PstI et EcoRV sont respectivement les suivants :

PstI : CTGCA /G

EcoRV : GAT/ATC.

### D:

Le schéma ci-après représente une étape de l'élongation d'une chaîne protéique d'eucaryotes.

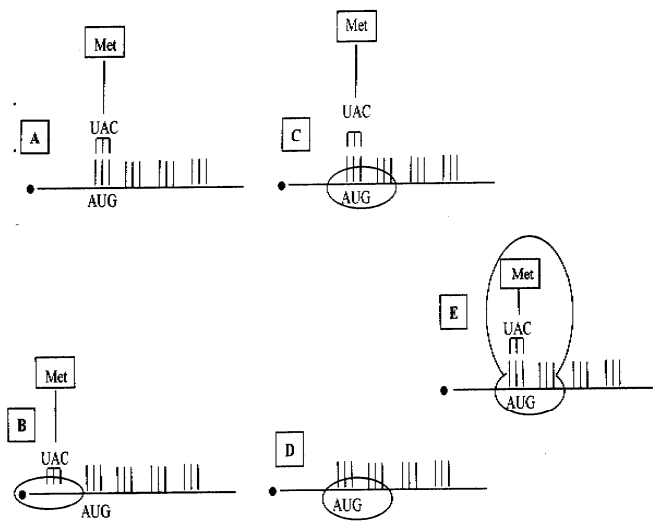


Ecrire le nom de chacune des zones désignées par une flèche en choisissant dans la liste ci-dessous :

- |                      |                             |
|----------------------|-----------------------------|
| - Cistron            | - Site A                    |
| - Codon              | - Site P                    |
| - ADN                | - Poly d T                  |
| - Histone            | - Aminoacyl ARNt synthétase |
| - Liaison peptidique | - Facteur d'élongation EF   |
| - Extrémité 5' ARNm  | - Séquence CCA des ARNt     |
| - Sous-unité 40 S    | - Poly A                    |
| - Sous-unité 60 S    | - Anti-codon                |
| - Extrémité 3' ARNm  |                             |

**E :**

Soient les schémas A à E suivants concernant certaines étapes de l'initiation de la synthèse protéique :



- 1- indiquer le (les) schéma(s) concerné(s) dans l'initiation de la synthèse d'une chaîne protéique.
- 2- indiquer le (les) schéma(s) correspondant(s) à la première étape de cette initiation.
- 3- indiquer le (les) schéma(s) correspondant(s) à une étape intermédiaire de cette initiation.

- 4- indiquer le (les) schéma(s) correspondant(s) à la dernière étape de cette initiation.

**F:**

Vous devez construire un plasmide recombinant en insérant un fragment d'ADN "BC" dans le plasmide p203. Pour cela, vous disposez :

- du fragment d'ADN "BC" obtenu après digestion par l'enzyme *Bam*HI
- du plasmide p203 qui porte un gène de résistance pour l'ampicilline et présente un site unique pour l'enzyme *Eco*R V.

Les sites de restriction reconnus par les enzymes *Bam*HI et *Eco*R V sont :

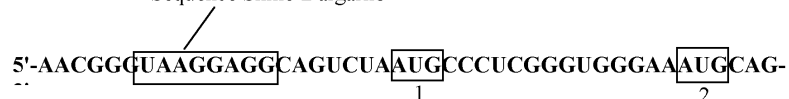
- pour *Bam*HI : 5'-G/GATCC-3'
- pour *Eco*R V : 5'-GAT/ATC-3'

- 1- Donnez la séquence des extrémités générées par *Bam*HI et par *Eco*R V, en précisant l'orientation 5' et 3'. De quel type sont les extrémités générées. Le fragment "BC" et le plasmide digéré par *Eco*R V sont incubés dans un rapport molaire insert/vecteur de 1/1 en présence d'ATP et d'ADN ligase du bactériophage T4.
- 2- Quels sont les produits de cette incubation ? Justifiez.  
  
Dans une autre expérience, vous incubez, dans un premier temps, le fragment "BC" en présence d'une ADN polymérase et des 4 dNTPs.
- 3- Quel est le résultat de cette expérience ?
- 4- Quelle ADN polymérase devez-vous utiliser et pourquoi ?  
Après la réaction précédente (question 3), vous incubez le fragment d'ADN obtenu, avec le plasmide digéré par *Eco*R V, en présence de l'ADN ligase de T4, dans un rapport molaire insert/vecteur de 1/1.
- 5- Représentez les différentes formes de molécules obtenues à l'issue de cette réaction.
- 6- Dans le cas du plasmide recombinant, précisez la séquence nucléotidique aux deux jonctions insert/plasmide.
- 7- Est-il possible de « ressortir » le fragment inséré de ce plasmide recombinant en utilisant, l'enzyme *Bam*HI ? L'enzyme *Eco*R V ? Justifiez votre réponse.  
Le mélange de ligation, obtenu à la question 5, est utilisé pour transformer des bactéries compétentes. Les bactéries transformées sont étalées sur une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif gélosé + ampicilline, puis la boîte est mise à l'incubateur à 37°C sur la nuit.
- 8- Quelles sont les molécules ainsi sélectionnées parmi celles obtenues après ligation (voir question 5). Justifiez votre réponse.  
Une proportion importante de vecteur circularisé sur lui-même est observée.
- 9- Comment cela a-t-il été mis en évidence ?
- 10- Proposez des modifications dans le protocole de préparation du plasmide, ou dans le protocole de la ligation pour limiter ce phénomène (plusieurs possibilités sont envisageables).

**T.D 5**

**A:**

Un ARN messager procaryote a la séquence suivante :  
Séquence Shine-Dalgarno



- 1- Quel est le rôle de la séquence Shine-Dalgarno ?
- 2- Lequel des deux triplets AUG (n°1 ou 2) est reconnu comme codon d'initiation ?
- 3- Le triplet AUG (n°2) code t-il pour une méthionine dans le peptide synthétisé ? Justifiez vos réponses.

**B :**

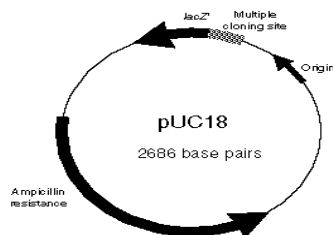
Afin de cloner un segment d'ADN circulaire double brin dans le site multiple de clonage du plasmide pUC18, on réalise les opérations suivantes :

- traitement de l'ADN à cloner avec l'enzyme de restriction EcoRI ;
- traitement du plasmide pUC18 (voir figure ci-dessous) avec le même enzyme ;
- incubation de l'ADN à cloner et du plasmide traités par EcoRI en présence de ligase de T4 et d'ATP.

On répète la même expérience avec les enzymes de restriction suivantes : BamHI, XbaI et HindIII.

Les plasmides obtenus après traitement sont incubés en présence d'une souche d'E.coli **Amp<sup>s</sup>, LacZ<sup>-</sup>**. Les bactéries sont ensuite cultivées sur une gélose contenant de l'ampicilline, de l'IPTG et X-gal.

Tous les types de colonies cultivant sur le milieu Amp-IPTG-X-gal sont isolés et leur ADN plasmidique extrait sous forme superenroulée. L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de déterminer la taille de chaque plasmide.



Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau suivant :

Enzymes utilisés	Type de colonie	Taille de l'ADN plasmidique en Kpb
EcoRI	A : bleue	2.69
	B : blanche	3.00
	C : blanche	3.28
XbaI	A : bleue	2.69
HindIII	A : bleue	2.69
	B : blanche	2.92
	C : blanche	2.81
	D : blanche	3.24
Aucune	A : bleue	2.69

- 1- Quel est le rôle de l'ampicilline au cours de ces expériences ?
- 2- A quoi correspond une colonie bleue ? Une colonie blanche ?
- 3- Quel est l'intérêt de réaliser une expérience sans utiliser d'enzyme de restriction ?
- 4- Déterminer la taille de l'ADN inséré dans chaque cas.
- 5- Quel est la taille du segment de l'ADN circulaire concerné ?
- 6- Comment interpréter le résultat obtenu avec l'enzyme de restriction XbaI ?

**C:**

Une amorce (primer) de 30 pb s'hybride avec la partie 3' d'un fragment d'ADN de 300 pb comme indiqué.



- 1- Quelle sera la longueur (en bases) des produits d'extension d'amorce si on mélange ces ADN avec l'ADN polymérase, le tampon nécessaire à son fonctionnement et chacun des mélanges de nucléotides suivants:

a) les 4 dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

b) dGTP, dATP, dCTP, ddTTP

- 2- Pour réaliser une expérience de PCR, vous avez à disposition les 3 amorces suivantes (1, 2 et 3). Indiquez l'endroit où ces amorces s'hybrident avec le brin A et le brin B de l'ADN ci-dessous. Indiquez la direction de synthèse de l'ADN.
- 3- Quelle est la séquence du produit PCR formé en utilisant les amorces 1 et 2 ? en utilisant les amorces 1 et 3 ? Justifiez votre réponse.

Amorce 1: 5'-GTTC-3'    Amorce 2: 5'-GCCC-3'    Amorce 3: 5'-AATA-3'

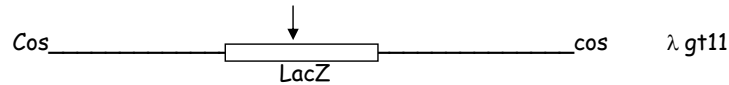
Brin A: 5' -ACTTCGTTGCGCCGGGGCTCGATCGATATTTGGAAT-3'

Brin B: 3' -TGAAGCAAGCGGCCCGAGCTAGCTATAAACCTTA-5'

**T.D 6****A-**

**I-** On dispose d'un cDNA de 2825pb obtenu à partir d'une lignée cellulaire humaine AC31, cloné dans le vecteur  $\lambda$  gt11 au site EcoRI. (Voir schéma)

EcoRI



Des bactéries infectées par les phages au préalable encapsidés in vitro sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant IPTG et Xgal.

Après 15h à 38°C, on distingue sur les boîtes des plages bleues et des plages blanches.

**Question1 :** expliquez et interprétez ce résultat.

**II-** L'insert de 2825pb est cloné dans un vecteur sous le contrôle d'un promoteur phagique Psp6. Après linéarisation du vecteur recombinant, celui-ci est incubé en présence de l'ARN polymérase Psp6 et des 4 XTP.

**Question 2 :** a) Quelle expérience a été réalisée ?

b) Quelle est la taille de la molécule obtenue à l'issue de cette incubation sachant que la linéarisation du vecteur recombinant a eu lieu à la position 2825 ?

Le produit de l'incubation précédente est incubé (piste 2) ou non (piste 1) dans un système de traduction in vitro en présence de  $^{35}\text{S}$  Met. Les protéines synthétisées sont analysées en SDS-PAGE. Résultats figure 1.

**Question 3 :** Qu'en concluez vous sachant que l'analyse de la séquence du cDNA montre qu'il y a ATG à la position 224 et TGA (non sens) à la position 2774 de ce cDNA. Le poids moléculaire moyen d'un acide aminé est de 110Da.

**III-** Une expérience de NORTHERN est réalisée à partir d'une préparation d'un ARN polyA de cellules humaines AC31 en utilisant comme sonde le cDNA de 2825pb marqué au  $^{32}\text{P}$  en 5'. Résultats figure 2.

**Question 4 :**

a) Donnez un schéma permettant d'expliquer cette expérience.

b) Proposez une méthode pour marquer radioactivement la sonde au  $\gamma^{32}\text{P}$  en 5'.

c) D'après les résultats de la figure 2, que pouvez vous conclure sur la technique qui a été utilisée pour la préparation du cDNA de départ.

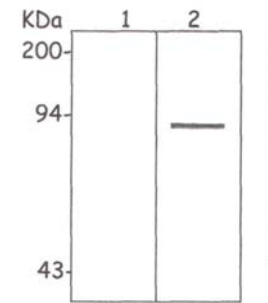


Figure 1

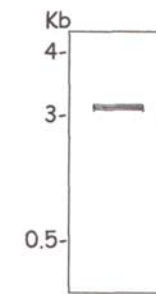


Figure 2

**B :**

On clone dans un vecteur pTD (figure 1), un fragment d'ADN génomique de 9 Kpb obtenu par digestion EcoRI du phage  $\lambda$  dont la carte est donnée dans la figure 2.

1) Décrire brièvement les différentes étapes de ce clonage.

2) Combien obtient-on de plasmides recombinants différents ? Pourquoi ?

3) Donner les tailles des fragments obtenus par digestion des plasmides recombinants par les enzymes de restriction suivantes : EcoRI, BamHI, SalI, BamHI + SalI

Figure 1

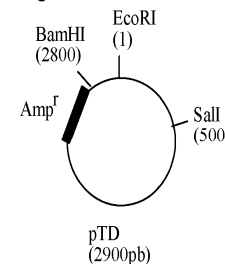
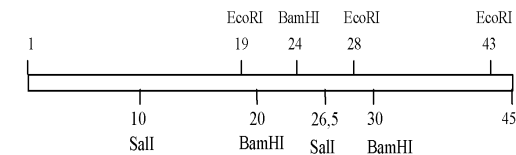


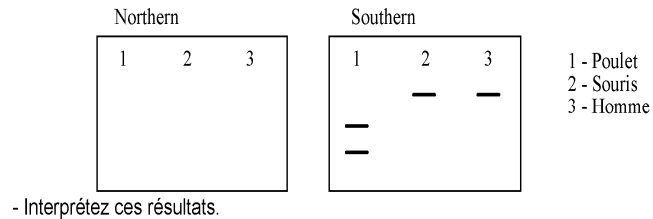
Figure 2

**C :****Northern / Southern**

Afin de mettre en évidence, la présence d'un gène et son expression dans des cellules de différents organismes, on se propose de synthétiser une sonde

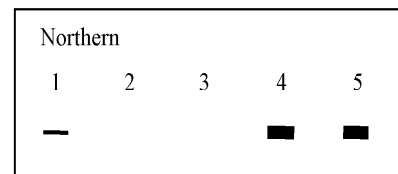
moléculaire d'une longueur de 20 nucléotides, correspondant à une partie d'une séquence codante de ce gène. Les hybridations ont été réalisées à 45°C.

1 - On synthétise tout d'abord une sonde correspondant au brin sens, que l'on utilise dans des expériences de Southern et de Northern blotting. Les profils d'autoradiographie obtenus sont représentés ci-dessous.



2 - On synthétise ensuite une sonde correspondant au brin antisens, que l'on utilise dans une expérience de Northern blotting pour étudier l'expression de ce gène dans les cellules de différents tissus d'un même organisme. Les profils d'autoradiographie obtenus sont représentés ci-dessous.

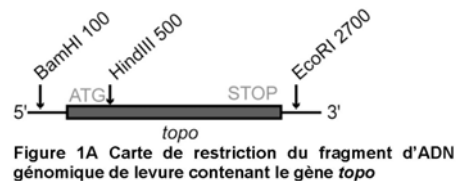
- 1- cellules hépatique
- 2 - Cellules nerveuses
- 3 - Erythrocytes (Globules rouges)
- 4 - Cellules embryonnaires
- 5 - Cellules de moelle osseuse



- a- Interprétez ces résultats. (Répondez au verso)  
b- Que peut-on suggérer quant à la fonction de ce gène ? (Répondez au verso)

D :

Un fragment d'ADN génomique de levure de 2800 pb, contient la séquence codante (CDS) d'un gène (*topo*) codant une topoisomérase. En vue d'exprimer cette enzyme dans la bactérie *E.coli*, sa séquence codante est clonée dans le vecteur plasmidique pBM203.



BamHI	5'-G/GATCC-3'
HindIII	5'-A/AGCTT-3'
EcoRI	5'-G/AATTC-3'

Figure 1C sites de restriction

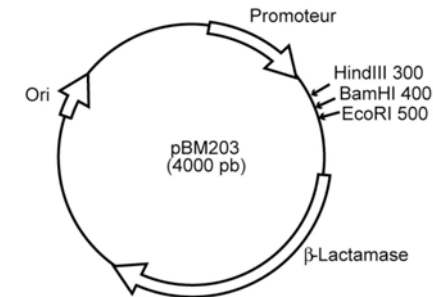


Figure 1B Carte de restriction du plasmide pBM203

Question 1 :

A l'aide des figures ci-dessus, mentionner les endonucléases de restriction permettant l'insertion du gène *topo* dans le vecteur plasmidique pBM203? Justifier. Quel est le type d'extrémités générées ?

Question 2 :

Le fragment d'ADN génomique et le vecteur pBM203 digérés sont alors mélangés et mis en présence de l'ADN ligase du bactériophage T4. Quelles sont les différentes molécules obtenues à l'issue de cette ligation ?

Question 3 :

Positionner et numéroté, si besoin, les sites de restriction HindIII, EcoRI et BamHI sur le schéma du plasmide recombinant dans la feuille réponse. Indiquer la taille du plasmide recombinant.

Des bactéries compétentes sont transformées avec le mélange obtenu après ligation, puis étalées sur un milieu gélosé nutritif contenant de l'ampicilline. A la suite de cette transformation, des clones bactériens ont été isolés. Après mise en culture de chacun de ces clones en milieu liquide puis lyse des bactéries, l'ADN plasmidique est purifié, digéré par l'endonucléase HindIII puis soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium et l'ADN visualisé sous rayonnement UV. Le profil de digestion obtenu pour deux des clones bactériens ainsi que pour le plasmide pBM203 natif est illustré figure 3.

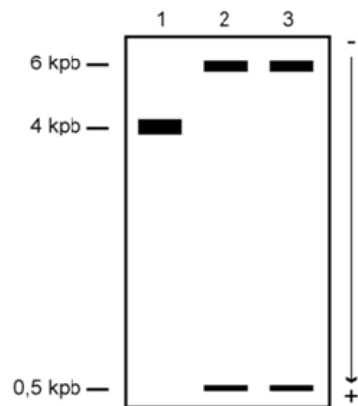


Figure 3: Electrophorèse sur gel d'agarose en conditions natives des fragments de restrictions obtenus après digestion par *Hind*III du plasmide pBM203 natif (piste 1) ou des plasmides issus des clones 1 et 2 (pistes 2 et 3). La taille des fragments obtenus est indiquée à gauche du gel. Le sens de migration est indiqué à droite du gel.

**Question 4 :**

Les profils de restriction obtenus, sont-ils ceux attendus pour les plasmides natifs et recombinants? Justifier.

**Question 5 :**

Ces clones permettent-ils de produire la topoisomérase de levure dans un système bactérien? Justifier.

La topoisomérase exprimée dans un système bactérien est purifiée et son activité testée à l'aide d'un substrat d'ADN plasmidique pBR322 natif (le nombre de superenroulement  $W = 20$ ). Ce plasmide est mis en présence ou non de topoisomérase dans un milieu réactionnel contenant ou non de l'ATP (2,5mM), de la camptothécine (inhibiteur spécifique des topoisomérases de type I) ou de la daunorubicine (inhibiteur spécifique des topoisomérases de type II). Chaque produit réactionnel est ensuite analysé sur un gel d'agarose soumis à une électrophorèse. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium et l'ADN visualisé sous rayonnement UV (Fig.4).

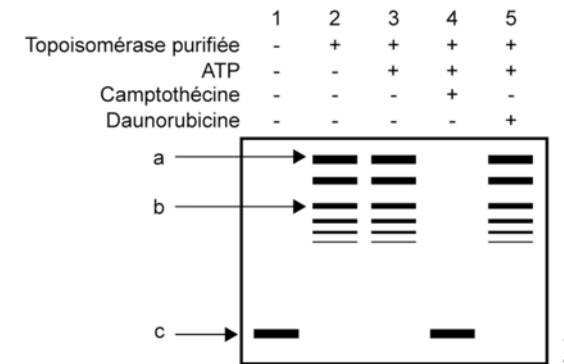


Figure 4: Electrophorèse sur gel d'agarose en conditions natives, de l'ADN plasmidique pBR322. (+) : présence, (-) : absence des différents réactifs indiqués. Le sens de migration est indiqué à droite du gel.

**Question 6 :**

Pour chaque piste, nommer et décrire les formes des espèces moléculaires (a, b, c) visualisées. Préciser pour chacun des cas la valeur de  $W$ .

**Question 7 :**

Compte-tenu de ces résultats, donner et justifier le type de topoisomérase qui a été clonée ainsi que son mode d'action.

**E :**

Un fragment d'ADN est inséré au niveau d'un site *Hind*III du plasmide pBR322. La carte de restriction de ce plasmide non recombinant est présentée sur la figure 1.

Les produits de digestion enzymatique du plasmide recombinant sont analysés après électrophorèse sur gel d'agarose (figure 2). L'ADN du plasmide recombinant a été coupé par les enzymes *Eco*RI (puits 1), *Cla*I (puits 2) et *Pst*I (puits 3). Le puits T montre les produits de digestion du plasmide pBR322 non recombinant digéré par l'enzyme *Eco*RI.

1. De combien de paires de bases est constitué le fragment d'ADN inséré dans le vecteur pBR322 ?

2. Positionner les sites de restriction *Cla*I et *Pst*I de ce fragment sur un schéma.



On a pratiqué la double digestion du plasmide recombinant par les deux enzymes de restriction *Cla*I et *Pst*I.

3. Quelle sera la taille (en pb) des fragments produits de cette digestion ? Combien de bandes distinctes seront visualisées sur un gel d'agarose après une électrophorèse ?
4. Schématiser la carte de restriction du plasmide recombinant.
5. Pourquoi n'a-t-on pas inséré le fragment d'ADN au niveau du site *Pst*I de pBR322 ?

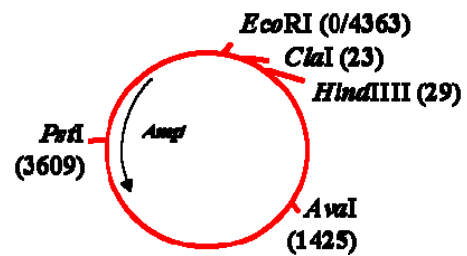


Figure 1. Le plasmide pBR322 linéaire est constitué de 4363 paires de bases.

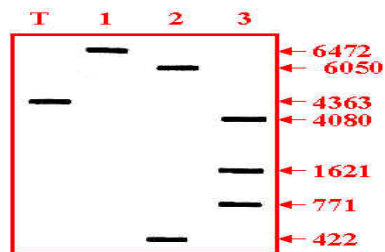


Figure 2