

Exercice n°1 :

Les adenovirus sont des virus constitués d'une capsid protéique enveloppant un génome ADN de 30 à 40Kpb suivant les virus et responsables chez l'homme de pathologies telles que : pharyngites, pneumonies, conjonctivites.

Lors de l'infection, certaines protéines de la capsid se lient spécifiquement à certaines protéine membranaires des cellules cibles (récepteurs) et injectent leur génome dans ces cellules, génome dédié à se répliquer et s'exprimer.

Dans l'exercice, une souche virale est "devenue" résistante aux antiviraux auxquels elle était sensible auparavant (ie : une résistance est apparue dans la population de virus).

Note 1 : Les antiviraux en question ciblent une des protéines de la capsid virale.

Pour comprendre l'origine de cette résistance, la souche en question est mise en culture et amplifiée pour pouvoir isoler et séquencer le fragment EcoRI de 9Kpb (hachuré sur figure 2).

Pour ce faire, on veut dans un premier temps l'insérer par clonage dans le vecteur pTP (figure1).

Note2 : il est possible de purifier des fragments d'ADN directement à partir d'un gel agarose

Note 3 : Les sites de restriction sont présentés au dessous ou au dessus de la séquence pour faciliter la lecture

figure 1

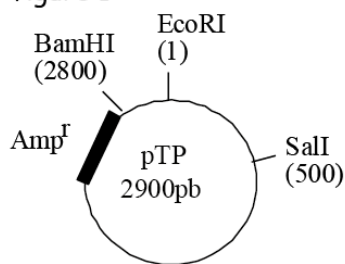
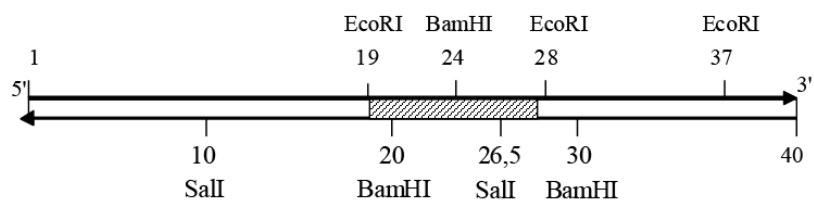


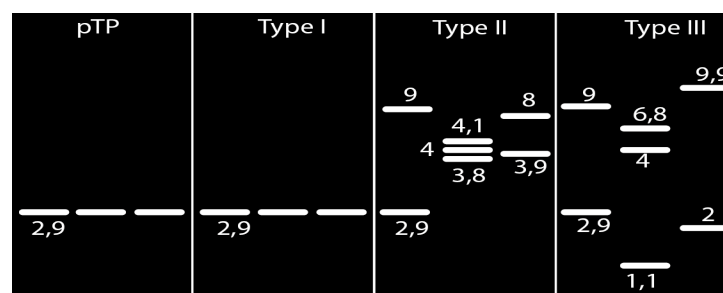
figure 2



Q1) Décrire brièvement les différentes étapes du clonage (sans modifications du vecteur et en purifiant le fragment d'ADN de 9Kpb).

Dans le but de les caractériser, une vingtaine de clones indépendants Amp^R sont isolés et analysés : l'ADN plasmidique est purifié et digéré par les enzymes de restriction EcoRI, BamHI, SalI. Les produits obtenus sont fractionnés, dans cet ordre, sur gel agarose 1%, coloré au BET. 3 types de clones sont obtenus.

Les résultats sont présentés figure 3 ci-contre (valeurs=tailles en Kpb)



Q2)- Analysez cette figure et indiquez à quoi correspondent ces différents clones.

Q3)- Lors du clonage, on obtient sur les 36 clones testés : 5 de type 2 et 29 de type 1. Pourquoi un si faible taux ? Comment y remédier?

Exercice n°2

On étudie l'expression du gène x porté sur un fragment d'ADN de 1500 pb (Figure 1).

Question 1) Pour étudier l'expression du gène x, on voudrait le cloner sous le contrôle d'un promoteur inducible (pLac) dans le plasmide pExp (Figure 2). Décrivez le plus précisément possible les étapes qui permettent ce clonage et qui permettront d'étudier l'expression du gène x.

Question 2) Si on isole les ARNm produits par le plasmide que vous venez de construire (gène x sous contrôle de plac) quelle taille d'ARNm attendez vous ?

Question 3) Si on isole les protéines produites à partir du plasmide que vous venez de construire (gène x sous contrôle de plac) quelle taille de protéine attendez vous ?

Figure 1: carte génétique du fragment d'ADN portant le gène x

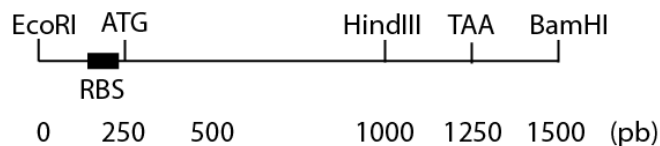
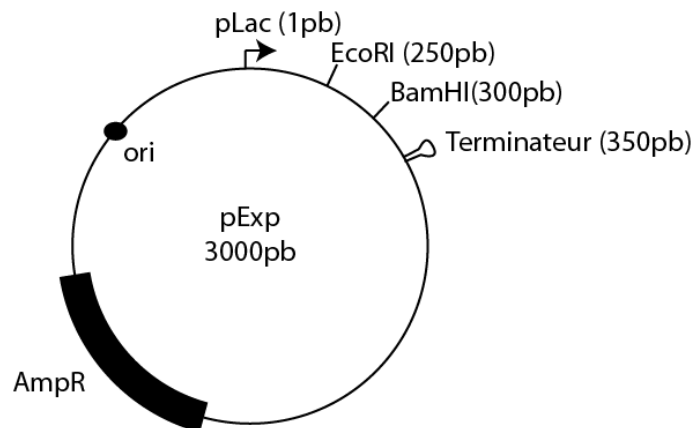


Figure 2: carte génétique du plasmide d'expression



Légende Figure 1 :

EcoRI, HindIII, BamHI : sites de restriction
RBS : site de fixation des ribosomes
ATG : codon initiateur
TAA : codon stop
Pb : paire de base

Légende Figure 2:

EcoRI, BamHI : site de restriction
pLac : promoteur de l'operon lactose
ori : origine de réplication du plasmide
AmpR : gène de 1200pb codant l'enzyme betalactamase (392 acides aminés) qui dégrade l'antibiotique Ampiciline
Terminateur : terminateur de transcription
Pb : paire de base
1 acide aminé pèse en moyenne 110 g.mol^{-1}

Exercice n° 3

Dans le but de purifier une nouvelle enzyme d'intérêt, on veut cloner le gène qui la code dans un plasmide de type pPROD qui se réplique dans *E. coli*. Sur la figure ci-jointe, vous trouverez la séquence du fragment d'ADN contenant le gène codant l'enzyme d'intérêt (Fragment I) ainsi que la carte du plasmide pPROD.

Question 1) Décrivez le plus précisément possible le moyen par lequel vous construiriez le plasmide permettant de produire l'enzyme chez *E. coli*.

On a obtenu plusieurs clones d'*E. coli* contenant le plasmide supposé modifié. On digère alors les ADN plasmidiques (A, B et C) purifiés à partir de ces clones par différentes enzymes de restriction. Plusieurs types de plasmides sont observés (tableau, pb = paire de base).

digestion plasmides	KpnI (pb)	EcoRI (pb)	NdeI -HindIII (pb)
A	≈3000	≈3000	≈3000
B	≈400 + ≈3000	≈200 + ≈3200	≈100 + ≈3300
C	≈400 + ≈3000	≈200 + ≈3200	≈300 + ≈3100

Question 2) Dessinez les cartes des différents plasmides et expliquez à quoi ils correspondent.

Après une culture des bactéries (en milieu riche contenant du lactose) contenant les plasmides B et C, on fait une extraction des ARNm. Ces ARNs sont séparés par électrophorèse dénaturante sur gel (permet de déplier les ARNm qui migrent alors en fonction de leur taille). Le gel est révélé en utilisant le fragment I marqué radioactivement et dénaturé. Une bande est révélée dans chacune des pistes où les ARNm ont été déposés (aussi bien pour A que pour B) et correspond à un ARNm d'environ 500 nucléotides.

Question 3) Vous attendiez-vous à ce résultat? (expliquer pourquoi)

Question 4) Quelle est la masse moléculaire attendue pour l'enzyme d'intérêt?

Dans le but d'étudier la localisation de cette protéine *in vivo*, on voudrait maintenant la fusionner à la GFP (Green Fluorescent Protein) (Fusion Traductionnelle), c'est à dire réaliser une séquence où les 2 protéines feront partie du même cadre ouvert de lecture.

Question 5) En partant du plasmide construit précédemment, décrivez précisément les étapes d'insertion de la séquence de la GFP et dessinez la carte du plasmide attendu.

Donnez notamment les séquences des amorces utilisées; vous prendrez Gly-Ser-Gly-Gly comme séquence "linker" entre le fragment 1 et la GFP.

Question 6) Quelle est la masse moléculaire attendue pour cette protéine de fusion?

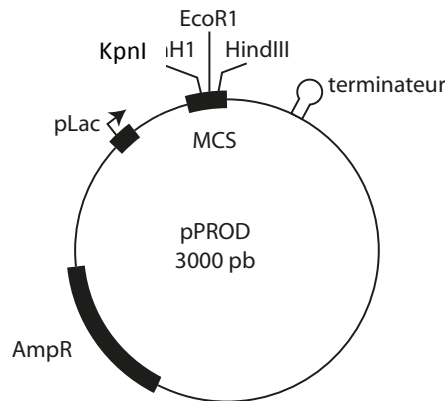
Figures Exercice 3

Toutes les séquences sont écrites de 5' vers 3'

Séquence Fragment I:

001- agg tac caa ata att ttg ttt aac ttt aag aag gag gat ata cat atg agc
052- gat aaa att att cac ctg act gac gac agt ttt gac acg gat cta ctc aaa
103- gcg gac ggg gcg atc ctc gtc gat ttc tgg gca gag tgg tgc ggt ccg tgc
254- aaa atg atc gcc ccg att ctg gat tat atc gct gac gaa tat cag ggc aaa
205- ctg acc gtt gca aaa ctg aac gaa ttc caa aac cct ggc act gcg ccg aaa
256- tat ggc atc cgt ggt atc ccg act ctg ctg ctg ttc aaa aac ggt gaa gtg
307- gcg gca acc aaa cct gat ccg cat atg cgg ccg cac tcg agc acc acc acc
358- acc acc act gag atc cgg ctg cta tca aag ccc gaa agg aag ctg gat ccg
409- taa tgg agc tcc gtc gac aag gta ccc ttg ctg ctg cca

Plasmide:



Rappel :

codon d'initiation: ATG
codon stop: TAA
site de fixation du ribosome: AGGAGGA
site de clonage multiple (MCS):

BamHI:	GGATCC
EcoRI:	GAATTC
HindIII:	AAGCTT
KpnI:	GGTACC
NdeI:	CATATG

Un acide aminé pèse environ 110 Dalton (g/mol)

Séquence GFP (753pb)

atgaacacctatgaacagattaacaaagtgaaaaaaattctgcgcaaacatctgaaaaacaacctgattggcacctata
tggttggcagcggcgtggaaagcggcctgaaaccgaacagcgcgatctggattttctgggtgggtgagcgaaccgctgac
cgatcagagcaaagaaattctgattcagaaaattcgcccgattagcaaaaaaattggcgataaaagcaacctgcgctat
attgaactgaccattattattcagcaggaaatgggtgccgtggaaccatccgccgaaacaggaattttatttatggcgaat
ggctgcaggaactgtatgaacagggctatatattccgcagaaagaactgaacagcgcgatctgaccattatgctgtatcaggc
gaaacgcaaaaaacaaacgcattttatggcaactatgatctggaagaactgctgccggatattccggttagcgatgtgcgc
cgcgcgattatggatagcagcgaagaactgattgataactatcaggatgatgaaaccaacagcattctgaccctgtgcc
gcatgattctgaccatggataccggcaaaattattccgaaagatatctgcgggcaacgcgggtggcggaaagcagcccgct
ggaacatcgcgaaacgcattctgctggcggtgcgcagctatctgggcgaaaacattgaatggaccaacgaaaacgtgaac
ctgaccattaactatctgaacaaccgcctgaaaaaactgtaa

- Aucun des sites de restriction utilisés n'est présent dans cette séquence -

		seconde base du codon							
		U		C		A		G	
première base du codon	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
		AUG	Ile	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

Exercice n°4 : PCR

Pour réaliser la réaction de PCR, l'ADN polymérase thermorésistante "Taq polymerase" issue de *Thermus aquaticus* est couramment utilisée. Cette enzyme, très efficace pour l'amplification d'ADN, a le désavantage de générer un taux de mutation non négligeable. Pour pallier à cet inconvénient, des chercheurs ont décidé de produire une ADN polymérase thermorésistante issue d'une archées des sources chaudes : *Thermococcus litoralis*, en espérant qu'elle sera plus fidèle que la Taq lors de la polymérisation de l'ADN. Une banque d'ADNc de *T. litoralis* a été criblée en utilisant des sondes ADN correspondant à différentes régions de l'ADNc de la Taq polymérase. Un clone ADNc (ADNc cloné dans un vecteur) est isolé et sa séquence de 2430pb déterminée. Des éléments de cette séquence sont présentés ci-dessous.

```

      130                               1012                               2430
      :                               :                               :
TGACGCATG CGA TAT CTA AAG / / A TTA TCT AGA GAT // GT ACA CGT TCA CAG TAAGGCTAGACTTCGGGATAG
      start                               stop

```

Amorces A :

A = 5'-CCTAGGACTGCGTACGCTATAGAT- 3'

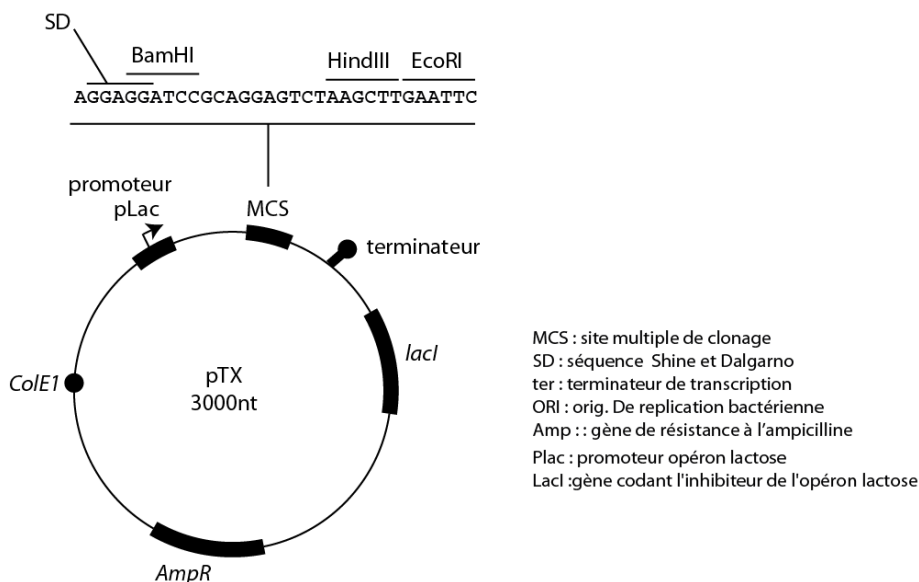
A1= 5'-GGATCCACGCATGCGATATCTA-3'

A2= 5'-ATCTATAGCGTACGCAGTCTTAGG-3'

Amorce B :

B= 5'-GGATCCCGAAGTCTAGCCTTACTG- 3'

Pour produire et purifier chez *E.coli* la protéine correspondant à cette séquence codante, on a choisit de "récupérer" une région de l'ADNc obtenu, de l'insérer dans le vecteur d'expression pTX (ci-dessous) et d'analyser les clones obtenus.



Note : la protéine LacI se fixe sur pLac et réprime la transcription à partir de ce promoteur

Etape 1 : On désire amplifier le cadre de lecture de cet ADNc pour le cloner ensuite dans le vecteur pTX au niveau du site de clonage multiple MCS.

Q1) Choisissez le couple d'amorce vous permettant de réaliser cette étape. Justifier.

Q2) Schématisez en donnant sa taille exacte, la molécule obtenue après PCR puis clonage.

Etape 2 : Fragment PCR et vecteur pTX sont digérés par des enzymes de restriction adéquates, les enzymes éliminés et les ADN digérés mélangés en présence de ligase. Le produit de réaction

obtenu sert à transformer des bactéries sensibles à l'ampicilline, ensuite étalées sur boîte de gélose (boîte de Pétri) en présence d'ampicilline.

Q3) Que cherche t'on à obtenir ?

Etape 3 : Ces clones de bactéries pris au hasard sur la boîte, sont mis en culture et l'ADN plasmidique en est extrait puis testé par digestion avec les enzymes de restriction HindIII et BamHI, et séparation des fragments par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Après coloration BET, on retrouve toujours deux types de résultats : les clones de type1, qui libèrent deux fragments d'environ 3000nt et 2300nt, et ceux de type 2 qui donnent une seule bande à 3000nt.

Note : sur ce gel, les fragments inférieurs à 100 nt sont invisibles

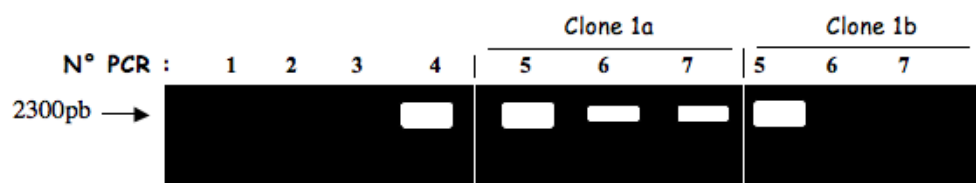
Q4) Analysez ces résultats, et indiquez quel est le clone d'intérêt

Etape 4 : Différents clones de type 1 sont mis en culture liquide en présence d'Ampicilline et d'IPTG (analogue du lactose, répresseur de l'action de la protéine LacI). Après centrifugation, les culots bactériens obtenus sont fractionnés en : "fraction ADN plasmidique" (fract. ADN) et : "fraction protéique" (fract.prot).

On réalise ensuite différentes PCR (voir conditions de réaction dans le tableau ci-dessous ; ADNc = le clone d'ADNc issu de la banque *T.litoralis*). Les produits de réaction sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et le gel coloré au BET est montré. Deux types de résultats sont observés, notés clone1a et clone 1b.

	PCR 1	PCR 2	PCR 3	PCR 4	PCR 5	PCR 6	PCR 7
Amorce A	-	+	+	+	+	+	+
Amorce B	-	+	+	+	+	+	+
dNTP	+	+	+	+	+	+	+
Tampon	+	+	+	+	+	+	+
Enzyme	Taq pol	Taq pol	-	Taq pol	Taq pol	Fract Prot	Fract Prot
ADN	ADNc	-	ADNc	ADNc	Fract ADN	ADNc	Fract ADN

Gel d'agarose 1% coloré au BET



Q5) Analysez les résultats et conclure quant à la nature du clone 1

Q6) Qu'aurait-on obtenu en faisant une PCR (conditions n°5) sur le clone de type 2 ? Pourquoi ?

Q7) Quelles expériences supplémentaires utiliseriez-vous pour conclure quant à la qualité de l'enzyme de *T.litoralis* ?

Exercice 5 : Variations sur la PCR

On réalise des expériences de PCR sur un fragment de 10Kpb de séquence connue, en faisant varier plusieurs paramètres : différents couples d'oligonucléotides, T_m , taille des oligos. La séquence d'une partie de ce fragment de 10Kpb est montrée Figure 1.

En utilisant les 4 oligonucléotides P1 à P4, les 6 expériences possibles de PCR sont réalisées sur ce fragment dans les conditions standard. Les produits sont analysés sur gel agarose 2% coloré au BET et montrés Figure 2a.

Q1)- Indiquez les différents constituants que vous devez mettre dans le milieu pour réaliser ces expériences de PCR. Lesquels doit-on mettre en très large excès ?

Q2)- Rappelez brièvement le principe de la réaction de PCR en insistant sur les points déterminants : séquence, orientation des amorces, T_m (température de $\frac{1}{2}$ dénaturation).

Q3)- Analysez les résultats de la Figure 2a.

La même expérience est réalisée en utilisant des 'mini-oligos' de séquence correspondant aux régions soulignées des oligos P1 à P4 (même orientation). Les résultats sont présentés Figure 2b.

Q4)- Analysez les résultats de la Figure 2b, comparez avec ceux de la Figure 2a. Conclure.

Figure 1

5' -GACTACCTTGCCGGGTAAACCAGCCGAAATTGCACGGTGGCAAC... /
 /...CTGCATCGTTATCCGAAATATTAAGCGTACCGTTAACTCCAGATAGTCCCGGTAGCGGCCCG
 TAAGGT-3'

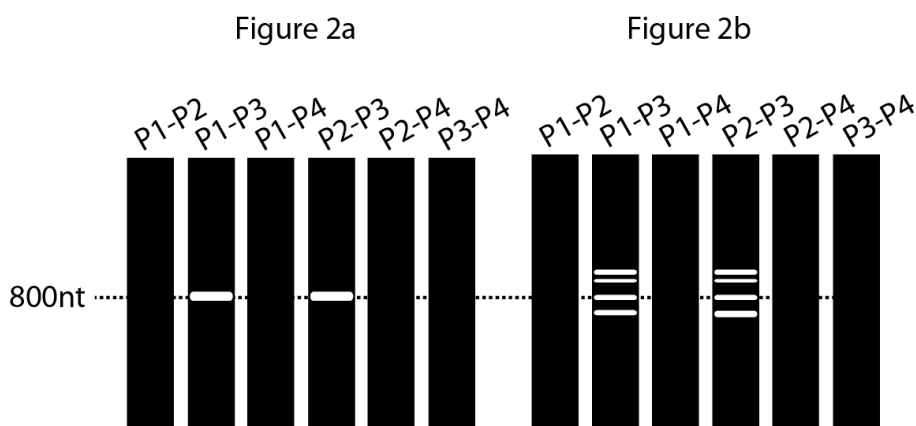
P1: 5' -CTACCTTGCCGGGTAA-3'

P2: 5' -CCTTGCCGGGTAAACC-3'

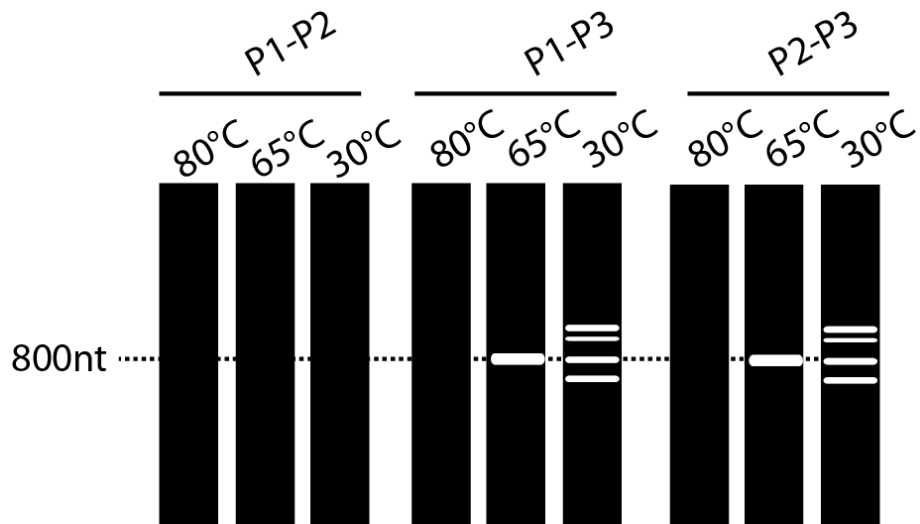
P3: 5' -CTTACGGGCCGCTACC-3'

P4: 5' -GTCCCGGTAGCGGCCCGTA-3'

Figure 2 : Séparation des molécules d'ADN en fonction de leur taille par gel électrophorèse. Le gel d'agarose est coloré avec du BET pour que l'ADN apparaisse en blanc sur fond noir)



Pour chaque couple d'oligos, le T_m idéal est de 65°C, on réalise des PCR (sur le même fragment) avec les couples P1-P2, P1-P3 et P2-P3 à 3 T_m différents, les résultats sont présentés figure 3.



Q5)- Analysez les résultats de la figure 3, vous semblent ils cohérents avec les données théoriques du T_m ? Pourquoi réaliser la PCR entre P1 et P2?

On effectue une PCR sur le fragment avec le couple d'oligo P5-P6 ci-dessous.

On obtient les résultats de PCR P1-P3 Fig2a

Q6)- Repérez la séquence de ces oligos, faites un schéma de la réaction. Indiquez l'intérêt d'utiliser des oligos ayant une telle structure en vue de réaliser des expériences de clonage.

P5: 5'-GGATCCCTACCTTGCCGGGTAA-3' P6: 5'AAGCTTCTTACGGGCCGCTACC-3'

Exercice 6

On voudrait étudier la régulation de 2 gènes, *ompF* et *dps*, par la protéine associée au nucléoïde (NAP) Fis.

Pour cela, on veut réaliser une fusion transcriptionnelle, c'est à dire la fusion des régions promotrices des gènes d'intérêt avec un gène rapporteur, *lacZ*, codant la β -galactosidase.

Q1- En vous servant de la séquence de *ompF* et de la carte du plasmide pFus, décrivez les étapes du clonage, et notamment les séquences des amorces que vous utiliserez, en justifiant le fragment amplifié. Dessinez la carte du plasmide obtenu.

Figure 1A: Séquence de *ompF*

```

-390   CGATCATCCTGTTACGGAATATTACATTGCAACATTTACGCGCAAAACTAATCCGCATTCTTAT
-328   TCGCGATTAGTTTTTTCTTAGCTAATAGCACAATTTTCATACTATTTTTTGGCATTCTGGATGTC
-266   TGAAAGAAGATTTTGTGCCAGGTCGATAAAGTTTCCATCAGAAACAAAATTTCCGTTTAGTTAAT
-204   TTAAATATAAGGAAATCATATAAATAGATTAAAATTGCTGTAAATATCATCACGTCTCTATGGAA
-142   ATATGACGGTGTTCACAAAGTTCCTTAAATTTTACTTTTGGTTACATATTTTTTCTTTTGAAC
-80    CAAATCTTTATCTTTGTAGCACTTTCACGGTAGCGAAACGTTAGTTTGAATGGAAAGATGCCTGC
-18    AGACACATAAAGACACCAAACTCTCATCAATAGTTCCGTAAATTTTTATTGACAGAACTTATTGA
+45    CGGCAGTGGCAGGTGTCATAAAAAAACCAGGAGGATAATAAATAatgATGAAGCGCAATATTCT
+107   GGCAGTGATCGTCCCTGCTCTGTTAGTAGCAGGTACTGCAAACGCTGCAGAAATCTATAACAAAG
+169   ATGGCAACAAAGTAG...//...TTGCTGTGGGTATCGTTTACCAGTTCTaa
+1239
  
```

GGTAGC: Boites -35, -10 et +1 de transcription

AGGAGGA: RBS

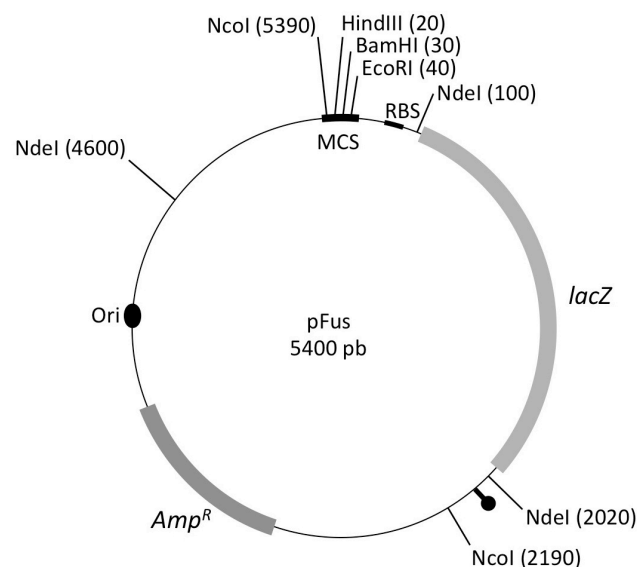
atg, taa: Codons start et stop

Les positions des nucléotides sont données en fonction du +1 de transcription

Sites de restriction:

BamHI :	GGATCC
EcoRI :	GAATTC
HindIII :	AAGCTT
NcoI :	CCATGG
NdeI :	CATATG

Figure 1B: Carte du plasmide pFus



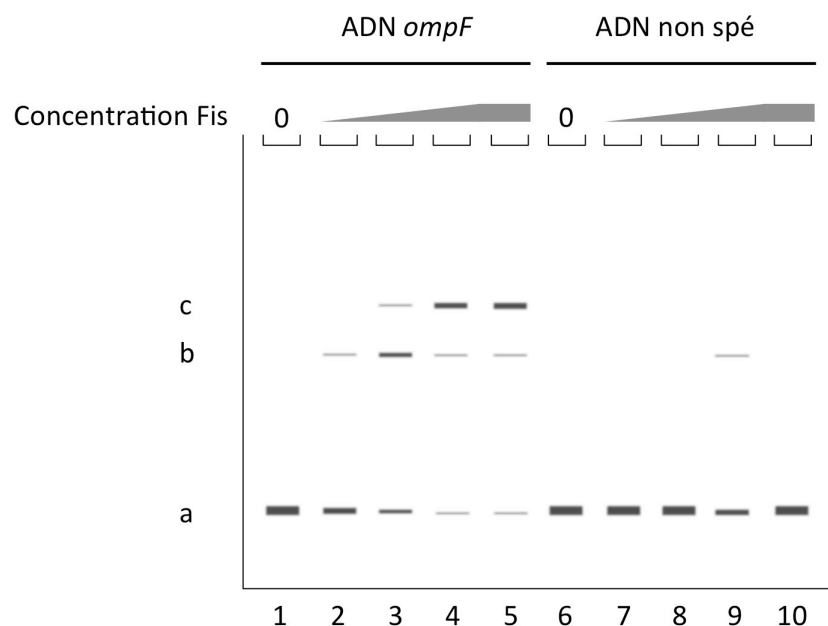
Q2- Donnez le nombre et les tailles des fragments attendus en digérant soit avec NcoI, soit avec NdeI, suivant que le fragment a été intégré ou non dans le plasmide pFus.

Une fusion transcriptionnelle est également réalisée en utilisant la région promotrice de *dps*. Les 2 plasmides obtenus sont chacun transformés dans une souche *E. coli* sauvage (MG1665) et une souche délétée pour le gène *fis* (MG1665 Δfis). Pendant la croissance, des échantillons sont prélevés, les protéines extraites et l'activité β -galactosidase dosée. Les résultats sont présentés dans le tableau 1. L'activité est donnée en fonction de l'activité de base détectée dans MG1665 pour chacun des deux promoteurs.

Fusion	MG1665	MG1665 Δfis
<i>pompF-lacZ</i>	1	0,2
<i>pdps-lacZ</i>	1	10

Q3- Quel est le rôle de Fis dans l'expression de ces deux gènes?

Pour voir si la régulation est directe, on veut maintenant étudier la fixation de Fis sur la région promotrice de *ompF*. Pour cela, la protéine Fis est purifiée et incubée soit avec le fragment PCR obtenu en 1 (ADN *ompF*), soit avec un autre fragment de la même taille ne contenant pas de région régulatrice (ADN non spé), marqués au ^{32}P , puis la réaction est déposée sur un gel d'acrylamide 8% non dénaturant. Le résultat du gel est schématisé sur la Figure 2.



Q4- A quoi attribuez-vous les bandes a, b et c des puits 1 à 4 et 6 à 9?

Q5- Combien de sites de fixation de Fis sur *pompF* sont mis en évidence?

Les puits 5 et 10 viennent de réactions contenant la même quantité de protéine que les puits 4 et 9, mais on y a en plus ajouté le fragment ADN non spé froid (non marqué au ^{32}P) en grande quantité.

Q6- Quelle est l'utilité de ces puits? Cela confirme-t-il les conclusions de la question 5?

Exercice 7

Votre équipe de recherche travaille sur la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, une bactérie du sol et pathogène des plantes qui utilise un système de sécrétion de type IV (T4SS) pour transférer son ADN dans les cellules hôtes. La protéine VirB8 vient d'être identifiée comme un facteur de virulence important pour la mise en place du T4SS et vous voulez caractériser l'expression de ce gène.

Pour caractériser le site d'initiation de la transcription, vous voulez réaliser une expérience d'extension d'amorce.

Figure 1: séquence de *virB8* (693pb)

```

1  gcaaggccc attgcaatat tgatgaacac accgactgaa tagaataaaa ccaatcgcct
61 attctatttta cagttaaacac taacactaac acatcgccat atgaaatgct agtggcgcg
121 gaaagcctgg ccgagcacta taaggaagta gaagcctttc aaaccgcgcg agcgaaatcg
181 gcgcgacgtc tctccaaaat cattgcagct gtcgcggcta tcgcgatttt ggggaatggt
241 gctcaagcgt tcgctatagc taccatggtg ccggtgagca ggcttgtgcc cgtatatcta
301 tggatacggc cggacggcac cgttgacagc gaggtgtcta tctcgcgatt gcctgcaact
361 caagaggagg ccgtcgttaa cgcttcattg tgggagtacg ttcgcctgcg tgagagttaa
421 gatgccgata ccgctcagta cgcctacgac ctagtatcga acttcagtgc cccaacagtg
481 cgccaggatt accagcaatt cttcaactat cccaatccca gttcgcctca agtcattctt
541 ggcaaacgcg gcaggggtgga ggtcgagcac atcgcttcaa atgatgtaac tccaagcacg
601 cagcaaattc gctataaaag gaccctcgtc gttgacggca aaatgcctgt ggtgagtacg
661 tggaccgcga cagttcgcta cgaaaagggtg accagcttgc ccggcagatt gagattgacc
721 aaccgggcag gtctgggtgt caccctcctat cagacctcgg aagataccgt ttcaaacgta
781 ggccaggggc caccatgacg agaaaagcac ttttcatttt agcatgttta tttgccgctg
  
```

Q1) A partir de la séquence du gène, dessinez l'amorce qui vous permettra de réaliser cette expérience.

Q2) Vous obtenez le résultat montré en Figure 2; positionner le +1 de transcription ainsi que les boîtes -35 et -10.

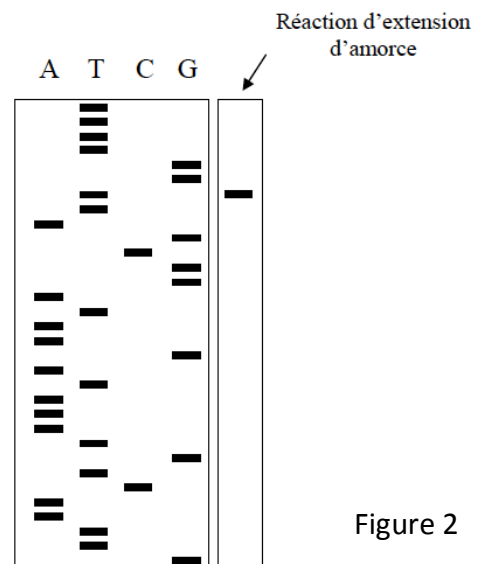


Figure 2

Pour étudier la transcription de ce gène dans différentes conditions, vous allez effectuer un Northern blot.

Q3) Rappelez les principales étapes nécessaires à la réalisation de cette expérience.

Ce Northern blot est réalisé dans plusieurs conditions: à une température de croissance normale de 25°C, et en condition de choc thermique à 33°C. Trois contextes génétiques sont utilisés: la souche sauvage (wt), une souche délétée pour le gène *hspL* ($\Delta hspL$), une pour le gène *pTi132* ($\Delta 132$) et une pour le gène *pTi133* ($\Delta 133$), tous suspectés de participer à l'expression de VirB8. Les résultats sont montrés dans la Figure 3A. (M: marqueur de taille)

Q4) Pourquoi observe-t-on une bande à 1400b? Que pouvez-vous conclure de ce blot?

Afin de préciser les rôles des protéines HspL, pTi132 et pTi133, on réalise maintenant dans les mêmes conditions et avec les mêmes souches un Western blot avec un anticorps anti-VirB8 (Figure 3B)

Q5) La protéine fait-elle la taille attendue?

Q6) Proposez un rôle pour HspL, pTi132 et pTi133 dans la régulation de l'expression de VirB8.

Figure 3

