

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
EXAMEN No 1
Mme VERDIER

Conditions d'examens

Documents

Autorisés

X

Non autorisés

Calculatrice

X

Non autorisée

4 opérations autorisée
tout type autorisée

Remarques particulières

Etre concis et clair.

Question 1 (temps conseillé 50 min) :

Rôles et modes de fonctionnement des polymérases dans le maintien de l'information génétique et la synthèse protéique. (Décrire les différentes polymérases, leur spécificité et schématiser leur mode d'action dans la machinerie cellulaire).

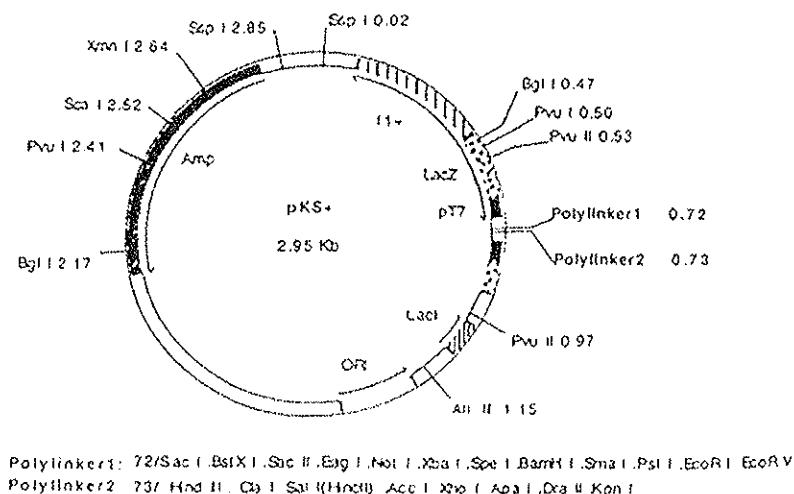
Question 2 (temps conseillé 20 min) :

Décrire les mécanismes de maturation de l'ARNm chez les cellules eucaryotes.

Exercice 3 (temps conseillé 50 min) :

Un ADNc de 1.5kb codant pour le gène X de souris a été cloné dans le site EcoRI du vecteur pKS (fig1). 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 complété en ampicilline, X-gal et IPTG. (rappel : le gène lacZ code pour la β galactosidase ; Test de dosage blanc/bleu: la β galactosidase transforme le substrat X-Gal en un produit bleu brillant).

1/ Comment sélectionner les bactéries contenant un plasmide recombinant ? Combien de plasmides recombinants peut-on obtenir à la suite de ce clonage ?



On prépare l'ADN plasmidique à partir de 2 colonies A et B. Les plasmides de ces 2 colonies sont utilisés comme matrice pour synthétiser 2 sondes ARN marquées au ^{32}P .

Sonde1 : transcription à partir du promoteur T7 sur la matrice A linéarisée par XhoI (cet ADNc ne contient pas de site XhoI).

Sonde2 : transcription à partir du promoteur T7 sur la matrice B linéarisée par XhoI

Une expérience de Northern est effectuée sur des ARNm purifiés de cellules murines avec chacune des 2 sondes.

Résultats :

Sonde 1 : une bande de 2kb

Sonde 2 : pas d'hybridation

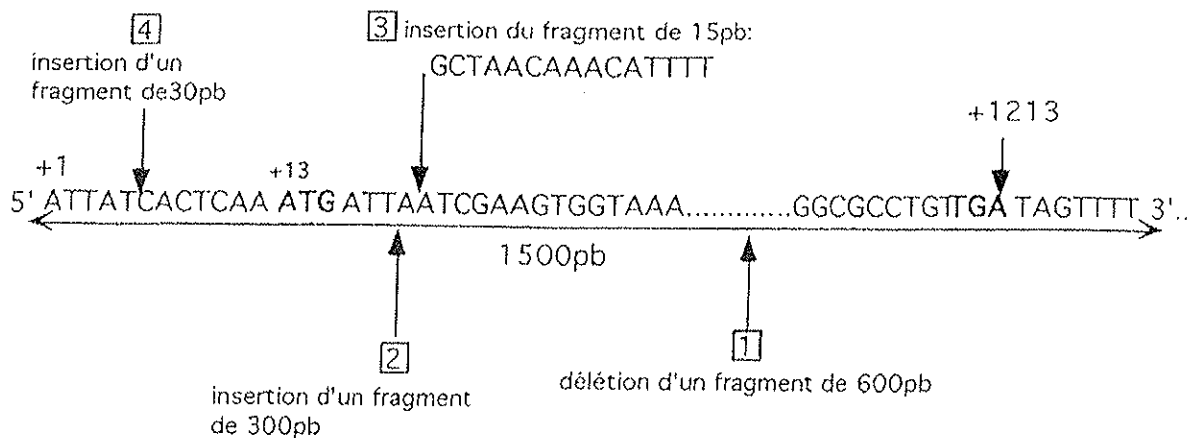
2/ Interprétez ces résultats.

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

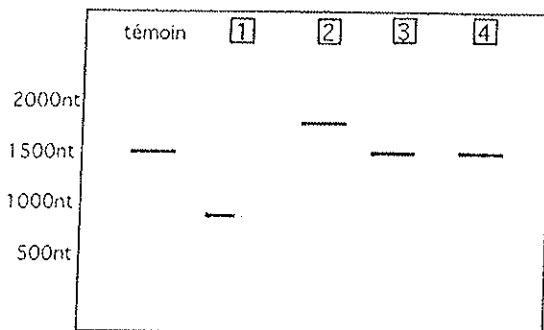
3/ Quel plasmide A ou B utiliseriez vous pour effectuer cette transcription/traduction *in vitro* ? et pourquoi ?

Un des 2 plasmides est donc utilisé pour effectuer dans un premier temps de la transcription *in vitro* à partir du promoteur T7, après digestion du plasmide par XhoI. L'analyse de la séquence de l'ADNc du gène X est effectuée par mutagenèse par insertion ou délétion, 4 types de délétions ou d'insertions ont été testés (fig 2).

Fig 2 : Séquence de l'ADNc cloné et modifications :

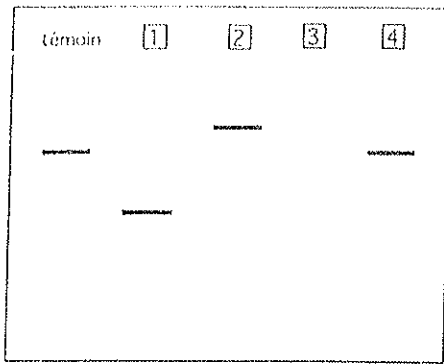


Les ARNs obtenus sont concentrés et marqués au phosphore ^{32}P avant d'être déposés sur un gel d'acrylamide. Les ARNs sont visualisés par autoradiographie.



4/ Interprétez ces résultats.

Les ARN obtenus dans chacun de ces 5 cas ont été utilisés pour effectuer une traduction *in vitro* dans un lysat de réticulocytes en présence de ^{35}S méthionine, ainsi que les 19 autres acides aminés non radioactifs. Les produits protéiques sont déposés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS, et révélés par autoradiographie. On obtient les résultats suivants :



5/ Interprétez ces résultats dans chacun des 4 cas et comparez les résultats de la transcription et de la traduction *in vitro*

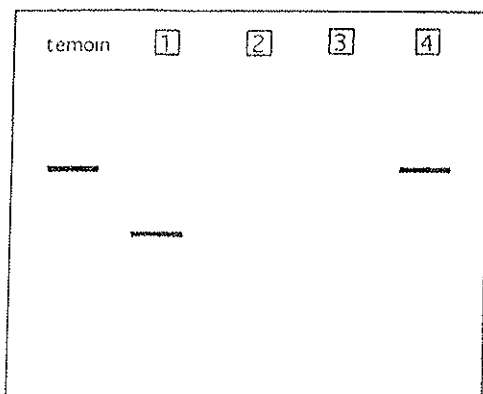
6/ Peut-on calculer la taille de la protéine attendue en sachant que la masse molaire moyenne d'un acide aminé = 100 Daltons ?

La même traduction *in vitro* a été effectuée mais, cette fois, sans acide aminé radioactif à partir des 5 mêmes matrices. Les produits protéiques ont été déposés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS, puis transférés sur une membrane et détectés par différents anticorps couplés à une enzyme

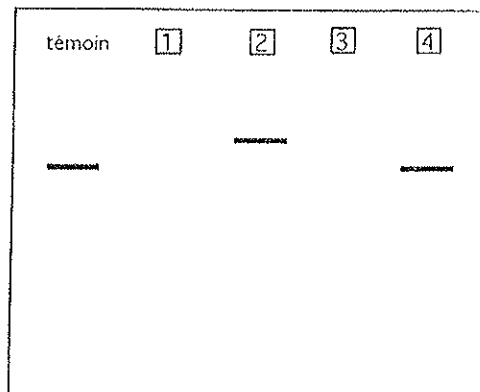
Anticorps 1 : dirigé contre la moitié NH₂ terminale de la protéine X.

Anticorps 2 : dirigé contre la moitié CO terminale de la protéine X.

Les résultats des Western blotting en utilisant ces 2 anticorps sont présentés ici, après révélation en présence du substrat de l'enzyme couplé à l'anticorps.



Anticorps n°1



Anticorps n°2

7/ Interprétez les résultats