

BIOLOGIE MOLECULAIRE

(SV5 - M32 - Examen session normale 2015)

Durée de l'épreuve : 1h30

A- Le génome d'un bactériophage à ADN double brin a été isolé et sa séquence nucléotidique a été déterminée (5000 paires de bases). Afin d'avoir plus de renseignements sur la structure de son génome, l'ADN du bactériophage est digéré par plusieurs enzymes de restriction et les fragments obtenus sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose suivi d'une coloration au bromure d'éthidium (pistes 1-5, figure 1).

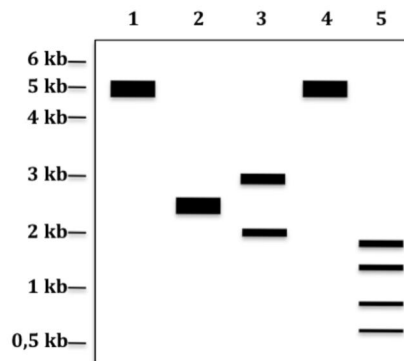


Figure 1: Electrophorèse en gel d'agarose des fragments de restriction obtenus après digestion de l'ADN du bactériophage. Piste 1: témoin, ADN non digéré ; piste 2: EcoRI ; piste 3: BamHI; piste 4: HindIII ; et piste 5: PvuII. NB : Tous les fragments obtenus sont présents sur le gel.

- Que pouvez-vous dire sur la structure de ce génome ? Justifiez votre réponse en interprétant tous les résultats expérimentaux obtenus à l'issue des différentes réactions de digestion effectuées.

- Donnez le nombre de fragment(s) que l'on obtiendrait lors des doubles digestions décrites dans le tableau ci-dessous :

Enzymes de restriction	Nombre de fragments obtenus
<i>Eco RI + Bam HI</i>	?
<i>Bam HI + Hind III</i>	?
<i>Eco RI + Pvu II</i>	?

Tableau 1 : Doubles digestions du génome du bactériophage.

B- Vous voulez faire un clonage du fragment d'ADN « oriC » de E.coli (245 pb) dans le plasmide pB (6 kpb) à la place de l'origine de réplication (Ori) de pMB1 voir figure1.

I- Obtention du fragment d'ADN « oriC » :

La séquence ADN d'intérêt est isolée et amplifiée par la technique de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) à partir d'une préparation d'ADN génomique de E.coli. La séquence de la région de l'ADN contenant l'oriC est connue et donnée dans la figure 1. Le produit de PCR obtenu est soumis à une double hydrolyse par les enzymes de restriction HindIII et EcoRI.

Q1: Donner la séquence du couple d'amorces (15 nucléotides) nécessaire à l'amplification par PCR de la totalité du fragment d'ADN oriC, donné en figure 1.

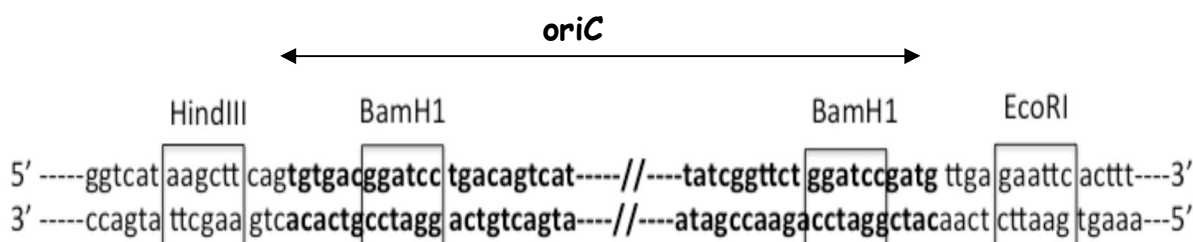


Figure 1 : séquence partielle du génome de coli, la partie en gras correspond à OriC

II- Obtention et sélection d'un plasmide recombinant pB-oriC :

L'étape suivante consiste à insérer le fragment d'ADN oriC, amplifié et hydrolysé dans le plasmide pB, figure 2. Le plasmide pB a été préalablement hydrolysé par les mêmes enzymes de restriction (HindIII et EcoRI) et le plus grand fragment obtenu a été purifié.

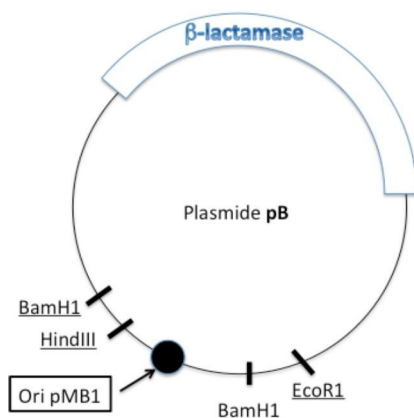


Figure 2 : carte partielle du plasmide pB.

Le produit de PCR hydrolysé et le grand fragment du plasmide pB sont alors mélangés et incubés en présence de l'ADN ligase du bactériophage T4 dans une solution tampon adéquate. Les produits de la réaction de ligation sont utilisés pour transformer des bactéries compétentes. Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu gélosé sélectif sur lequel seules les bactéries transformées peuvent croître et se multiplier en formant des colonies isolées.

Q2 : Définir les termes suivants :

Bactéries compétentes
Bactéries transformées

Q3: Quel agent de sélection est utilisé dans le milieu gélosé lors des étalements des bactéries transformées ? Justifier votre réponse.

III- Etude *in vitro* de la réplication : rôle des protéines DnaA

Le plasmide recombinant pB-oriC est utilisé comme matrice pour des études *in vitro* de synthèse d'ADN.

Expérience 1 :

On effectue un test *in vitro* de synthèse d'ADN (figure 3) en présence du plasmide recombinant pB-oriC et de quantités variables de protéine DnaA. La même expérience est effectuée en présence du plasmide pB.

Les résultats sont présentés sur la figure 3.

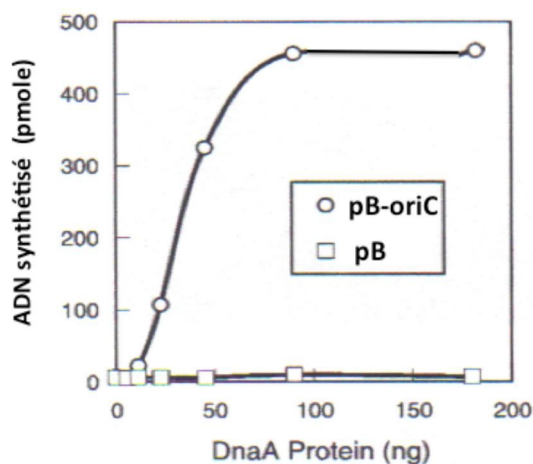


Figure 3 : test *in vitro* de synthèse d'ADN. Le milieu d'incubation contient l'ADN polymérase I, les 4 dNTP, la primase DnaG, les 4 rNTP, DnaB, le tampon adéquat, en présence du plasmide recombinant pB-oriC (○) ou du plasmide pB (□) et de quantités variables de protéine DnaA

Q4 : Interpréter ces résultats en faisant ressortir le rôle de la protéine DnaA dans ces conditions expérimentales

Expérience 2 :

Le plasmide pB-oriC est purifié. Ce plasmide peut exister sous plusieurs formes (FI, FII et FIII) qui ont été analysées par électrophorèse en gel d'agarose (figure 4A).

Q5 : Préciser la structure de ces formes et justifier leur migration par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 4 A).

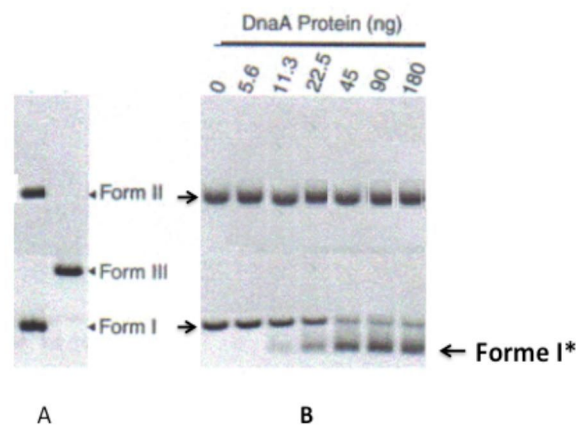


Figure 4 : électrophorèse sur gel d'agarose des différentes formes du plasmide pB-oriC (A). FI et FII du plasmide pB-oriC sont incubées uniquement en présence de quantités croissantes de protéine DnaA (B)

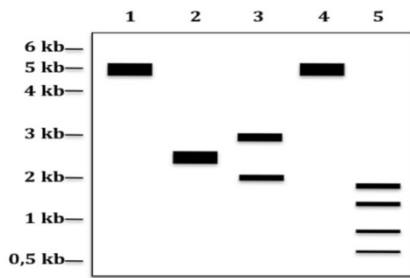
La protéine DnaA est incubée uniquement avec un mélange FI et FII du plasmide pB-oriC. Les résultats sont présentés sur la figure 4B.

Q6 : DnaA a t-elle le même comportement vis à vis de la forme FI et de la forme FII ? Justifier.

Q7 : Compte tenu de la migration de la Forme I* (FI*), quelles sont les caractéristiques topologiques de la forme FI* par rapport à la forme FI.

CORRECTION EXAMEN SESSION NORMALE 2015

Exercice 1 :



- 3 points** 1- EcoRI : 1 sites → 2 fragments de 2500 pb
 BamHI : 1 sites → 2 fragments 2000 pb et 3000 pb.
 HindIII : pas de site.
 PvuII : 3 sites → 4 fragments 600 pb , 900 pb , 1600 pb et 1900 pb.

3 points 2-

Enzymes de restriction	Nombre de fragments obtenus
<i>Eco RI + Bam HI</i>	3
<i>Bam HI + Hind III</i>	2
<i>Eco RI + Pvu II</i>	5

Exercice 1 :

2points Q1 : 5' AAAGTGAATTCTCAA 3'
 5' GGTCATAAGCTTCAG 3'

2points Q2 : Bactéries compétentes = bactéries capables d'être transformées par le plasmide.
 Bactéries transformées = bactéries qui ont reçu le plasmide.

2points Q3 : l'ampicilline, car le plasmide utilisé pour le clonage renferme le gène de résistance à cet antibiotique.

2points Q4 : - avec plasmide Pb pas de synthèse de DNA en présence de quantités croissantes de DnaA.
 - avec plasmide recombinant Pb-oriC, synthèse d'ADN en présence de quantités croissantes de DnaA.

La protéine DnaA a un rôle dans la synthèse d'ADN.

2points Q5 : FI = forme superenroulée migre le plus vite (condensée).
 FII = Forme circulaire relachée qui migre le moins vite.
 FIII = Forme linéaire migre entre les deux (entre FI et FII).

2points Q6 : - sur Forme II (forme relachée) : DnaA n'a aucun effet.
 - sur Forme I : la molécule migre plus vite que FI normale en présence de DnaA. DnaA transforme FI en FI* en fonction de sa concentration.

2points Q7 : Forme I* est plus condensée que FI. Conclusion : DnaA crée des superenroulements supplémentaires.



BIOLOGIE MOLECULAIRE

(SV5 - M32 - Examen session rattrapage 2015)

Durée de l'épreuve : 1h30

A- La séquence d'un ADN bicaténaire, correspondant à un gène, est partiellement reportée ci-dessous.

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

- 1) Proposer différentes appellations pour définir ce brin.
- 2) Ecrire la séquence et l'orientation du second brin de ce fragment.
- 3) Quelle forme (mono ou bicaténaire) de l'ADN est reconnue par les enzymes de restriction.
- 4) Sur une représentation détaillée de l'enchaînement de deux nucléotides d'un brin d'ADN « du site *BamHI* » dont les bases seront représentées par les lettres correspondantes, indiquer (à l'aide d'une flèche) quelle liaison est rompue sous l'action de l'enzyme *BamHI*.
- 5) Soient les enzymes de restriction *BamHI*, *Pst I*, *Xho I* et *Mbo I* dont les sites reconnus sont :
BamHI : 5' G/GATCC 3' ; *Pst I* : 5' CTGCA/G 3' ; *Xho I* : 5' C/TCGAG 3' ; *Mbo I* : 5' /GATC 3'.
Recopier la séquence de l'ADN et encadrer les sites de restriction en indiquant la position des coupures.
- 6) Combien de fragments sont obtenus après digestion du fragment d'ADN par chacune de ces enzymes ?
- 7) Pour chaque enzyme, écrire les séquences des extrémités des molécules d'ADN digérées et préciser le type d'extrémités obtenu.

B- On procède dans la boucle de l'anticodon des tARN, à l'excision d'un oligonucléotide et à son remplacement (substitution) par un autre oligonucléotide de synthèse et de séquence connue.

Une telle expérience a été faite sur le tARN de phénylalanine (tARN^{phe}) de *E. coli*.

Ainsi que l'indique la figure 1, on excise le tétranucléotide GpApApA et on le remplace, selon les expériences, par le tétranucléotide indiqué.

La figure 1 représente l'expérience dans laquelle le tétranucléotide de substitution est : UpCpApA

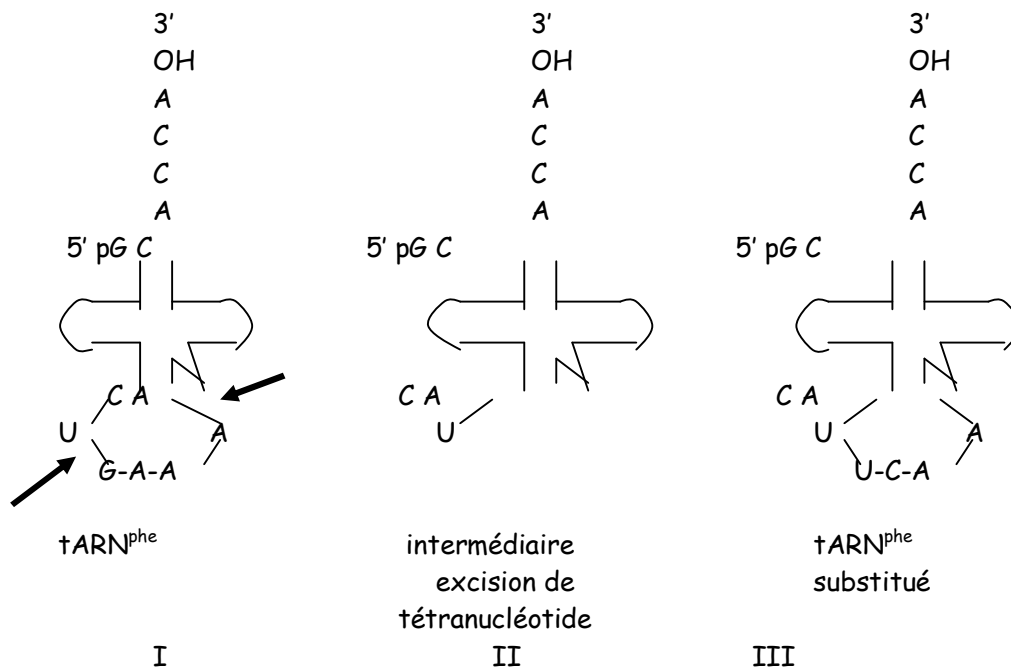


Figure 1

Expérience I :

1) Le tétranucléotide de substitution inséré est : UpCpApA

Question : Quelle est la nature de ce tARN ainsi modifié ? Quel rôle peut-il jouer ?

2) On dispose d'un polyribonucléotide de synthèse dont la séquence messagère qui nous intéresse est la suivante :



On utilise un système de synthèse de protéines in vitro comportant les sous-unités ribosomiques, tous les facteurs d'initiation, d'élongation, de terminaison et des cofacteurs nécessaires ainsi que les tARN chargés comme il est indiqué :

a) On utilise les tARN normaux et chargés pour les 20 acides aminés.

Question : Quel est le polypeptide synthétisé ?

b) On utilise, sauf pour la phénylalanine, les tARN normaux et chargés pour les 19 acides aminés. Les tARN^{phe} chargés sont remplacés par les tARN^{phe} substitué comme décrit en 1 et chargé (forme III).

Question : Quel est le polypeptide synthétisé ?

c) On utilise les tARN normaux et chargés pour ces 20 acides aminés plus les tARN^{phe} substitué comme en 1 et chargé en quantité équimoléculaire aux tARN^{phe} normaux et chargés.

Expérience II :

On utilise la phénylalanine synthétase de E. coli. Avec cette enzyme, on étudie la charge in vitro par la phénylalanine du tARN^{phe} modifié ou non et ceci en fonction de la force ionique.

La figure 2 résume les résultats obtenus avec :

Le tARN ^{phe} non modifié (forme I)	—●—●—
le tARN ^{phe} substitué selon 1 par : GpApApG (forme III)	—Δ—Δ—
le tARN ^{phe} substitué selon 1 par : ApApApC (forme III)	—□—□—
l'intermédiaire de la figure 1 (forme II)	—○—○—

Question : Interprétez ces résultats. Pour discuter, on considérera que la concentration de KCl normalement utilisée est de 0.15M. Tirez de vos interprétations une conclusion quant au rôle de la boucle de l'anticodon dans les fonctions du tARN.

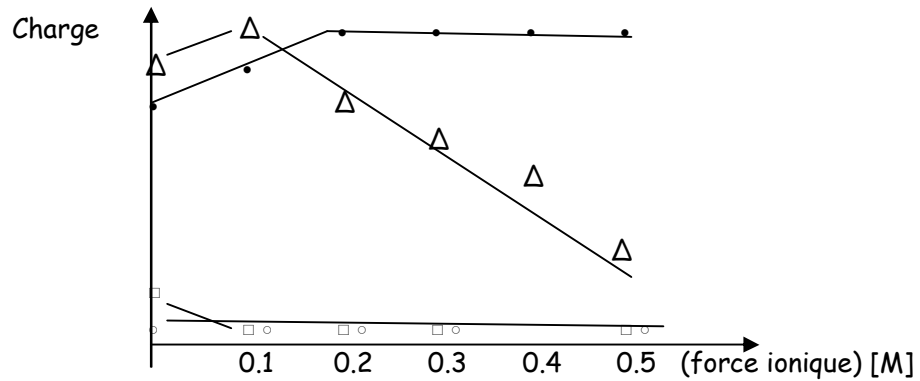


Figure 2

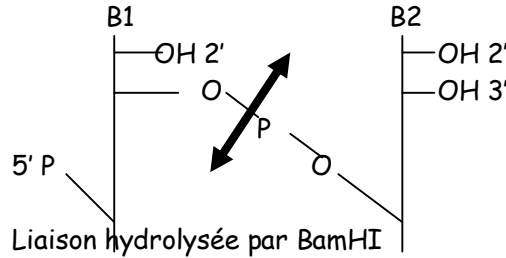
		Deuxième lettre									
		U		C		A		G			
Première lettre	U	UUU	Phénil-	UCU	sérine	UAU	tyrosine	UGU	cystéine	U	Troisième lettre
		UUC	alanine	UCC		UAC	UGC	C			
		UUA	leucine	UCA		UAA	codons	UGA	codon stop	A	
		UUG		UCG		UAG	stop	UGG	tryptophane	G	
	C	CUU	leucine	CCU	proline	CAU	histidine	CGU	arginine	U	
		CUC		CCC		CAC	CGC	C			
		CUA		CCA		CAA	glutamine	CGA		A	
		CUG		CCG		CAG	CGG	G			
	A	AUU	isoleucine	ACU	thréonine	AAU	asparagine	AGU	sérine	U	
		AUC		ACC		AAC	AGC	C			
		AUA	méthionine	ACA		AAA	lysine	AGA	arginine	A	
		AUG		ACG		AAG	AGG	G			
	G	GUU	valine	GCU	alanine	GAU	acide	GGU	glycine	U	
		GUC		GCC		GAC	aspartique	GGC		C	
		GUA		GCA		GAA	acide	GGA		A	
		GUG		GCG		GAG	glutamique	GGG		G	

CORRECTION D'EXAMEN SESSION RATTRAPAGE 2015

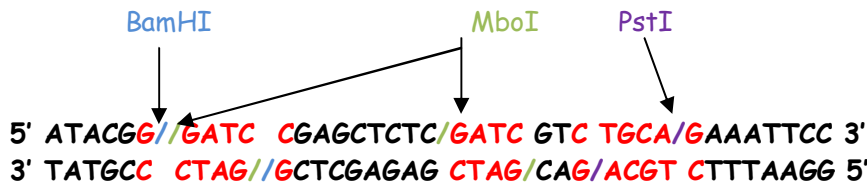
Exercice 1 :

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

- 1) Simple brin sens ou antisens 1p
- 2) **3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'** 1p
- 3) Forme bicaténaire. 1p
- 4) 1p



- 5) 1.5p



- 6) BamHI : deux fragments 1p
 MboI : Trois fragments
 PstI : deux fragments
 XhoI : pas de site

- 7) BamHI : G OH3' 1.5p
 CCTAG 5'P
 MboI : C OH3' et G OH3'
 G CTAG 5'P C CTAG 5'P
 PstI : CTGCA OH3'
 G 5'P

Exercice 2 :

Expérience I :

- 1) C'est un phe^{tRNA} muté au niveau de l'anticodon qui peut reconnaître le codon stop UGA et incorporer la phe. 2p
 Il peut jouer le rôle de suppresseur de mutations non sens UGA.
- 2) a- (NH₂)Met-Leu-Met-Phe-Thr-Tyr(COOH) 2p
 b- (NH₂)Met-Leu-Met(COOH) 2p
 c- (NH₂)Met-Leu-Met(COOH) et 2p
 (NH₂)Met-Leu-Met-Phe-Thr-Tyr-Phe-Gly-Glu(COOH)

Expérience II : Dans les conditions de 0.15M KCl, 4p

Avec - Le tARN^{phe} non modifié (forme I), l'acide phe aminé est chargé

- le tARN^{phe} substitué selon 1 par : GpApApG (forme III), l'acide aminé phe est chargé.
- le tARN^{phe} substitué selon 1 par : ApApApC(forme III), pas de charge.
- l'intermédiaire de la figure 1 (forme II), pas de charge.

Conclusion : Aminoacyl-synthétase est spécifique à l'anticodon pour effectuer la charge de l'acide aminé sur son ARNt correspondant.

www.goodprepa.tech