

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage



L2 - "BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GÉNÉTIQUE 1"

1^{ère} épreuve
Biologie Moléculaire
(note/20 ; durée : 1h)
Vendredi 26 octobre 2012

- Lisez **très attentivement** le sujet.
- Les réponses à la question de cours doivent être rédigées sur une copie d'anonymat et les réponses aux exercices doivent être rédigées sur la feuille réponse.
- Indiquez votre section **visiblement** sur chacune des copies.

L'utilisation de documents, de calculatrice et de téléphone portable est interdite.

Nous vous rappelons que toute tentative de fraude (téléphone portable ou autre) peut conduire au passage devant une commission disciplinaire avec pour sanction, l'interdiction de passer le moindre examen ou concours de la fonction publique (permis de conduire, ...etc...) pendant une durée minimale de 5 ans.

Exercices (durée conseillée : 40 min)

Important : les 3 parties peuvent être traitées de façon indépendante

Partie I : Condensation de nucléotides

On donne un mélange de ddATP et de dCTP.

Question 1 :

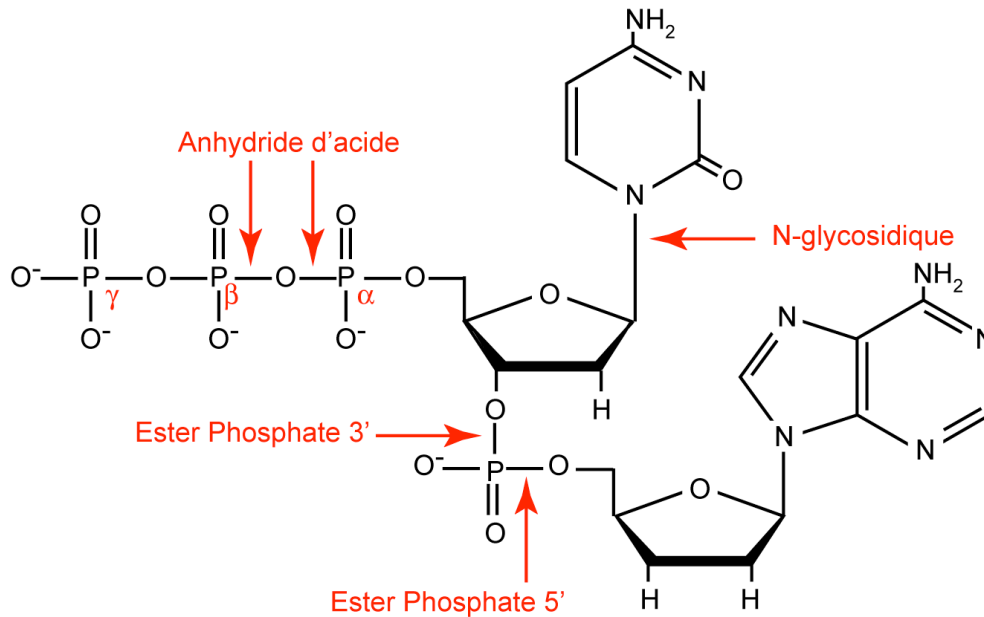
Donner le résultat de la condensation de ces deux nucléotides afin de former un dinucléotide (la formule développée est demandée). Justifier le produit obtenu.. La structure des deux bases azotées Adénine et Cytosine est donnée ci-dessous.

Résultat de la condensation : dCddA

Justification : le ddATP ne possède pas de groupement OH en 3', il n'y aura donc pas la formation de liaison ester-phosphate en 3' de ce nucléotide

Question 2 :

Indiquer sur ce dinucléotide la position d'une liaison anhydride d'acide, d'une liaison ester-phosphate et N-glycosidique. Nommer les groupements phosphates selon la nomenclature officielle.



Partie II : Clonage d'un gène *topo*

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.

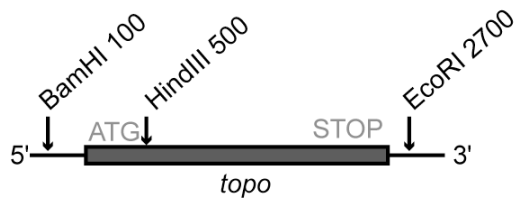


Figure 1A Carte de restriction du fragment d'ADN génomique de levure contenant le gène *topo*

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

Figure 1C Séquence des sites de restriction

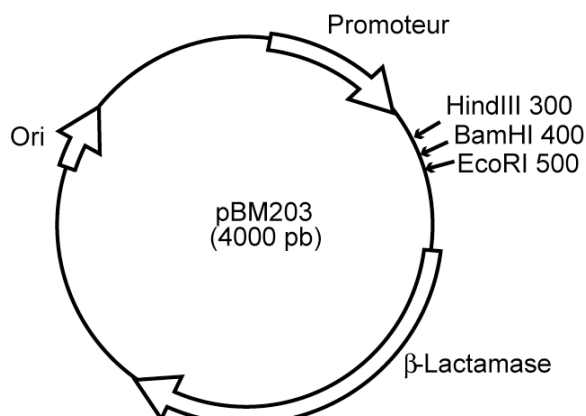


Figure 1B Carte de restriction du plasmide pBM203

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 ?

Endonucléases permettant l'insertion : BamHI + EcoRI

Justification : Les extrémités générées sont compatibles. L'orientation de l'insert permet la transcription (même orientation que le promoteur) puis traduction de la protéine, une coupure par *HindIII* aurait entraîné la perte de l'ATG.

Type d'extrémités générées : extrémités cohésives 3' rentrantes et/ou 5' sortantes

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 ?

Multimères d'inserts

Multimères de plasmides

Multimères de plasmides recombinants avec multimères de plasmides et/ou multimères d'inserts

Plasmide recombinant contenant la séquence codante du gène *topo* en monomère.

Le plasmide recombinant attendu est représenté dans la figure 2 ci-dessous.

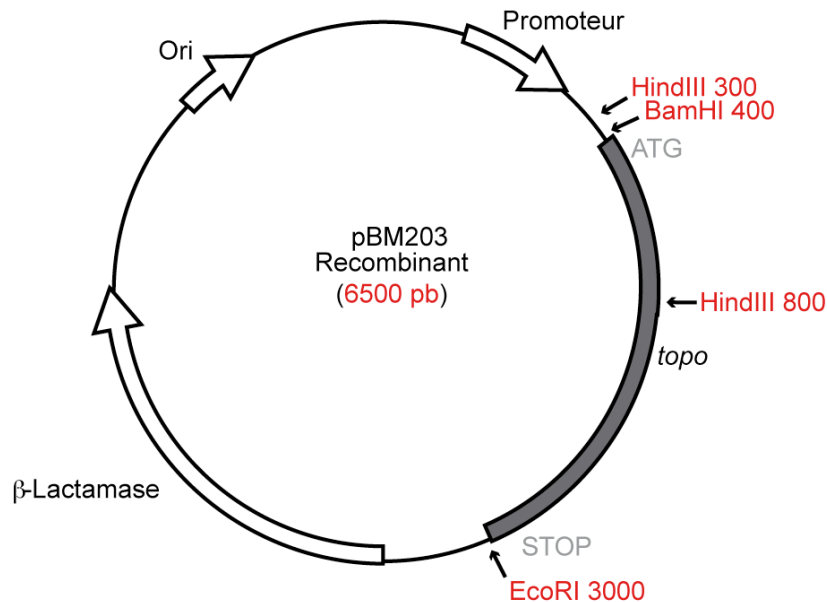


Figure 2 : Plasmide recombinant contenant le gène *topo*

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.

Chaque site avec numérotation

Taille du plasmide recombinant 6500 pb

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.

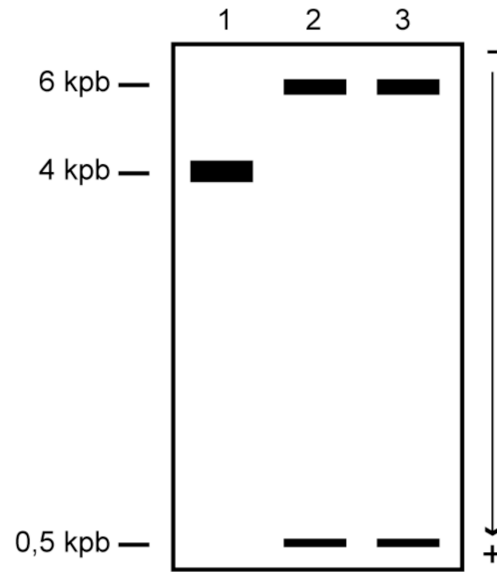


Figure 3: Electrophorèse sur gel d'agarose en conditions natives des fragments de restrictions obtenus après digestion par HindIII du plasmide pBM203 natif (piste 1) ou des plasmides issus des clones 1 et 2 (pistes 2 et 3). La taille des fragments obtenus est indiquée à gauche du gel. Le sens de migration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

Question 4 :

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

Les profils sont ceux attendus.

Plasmide natif : 1 seul site HindIII donc linérisation du vecteur (4000pb)

Plasmide recombinant : 2 sites HindIII (position 300 et 800) donc 2 fragments d'ADN de taille 500pb et 6 kpb.

Question 5 :

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

Oui puisque la séquence codante du gène topo est orientée dans le même sens que la séquence du promoteur en amont. Cela permet la transcription du gène topo

Partie III: Mise en évidence de l'activité de la topoisomérase exprimée dans un système bactérien

La topoisomérase exprimée dans un système bactérien est purifiée et son activité testée à l'aide d'un substrat d'ADN plasmidique pBR322 (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).

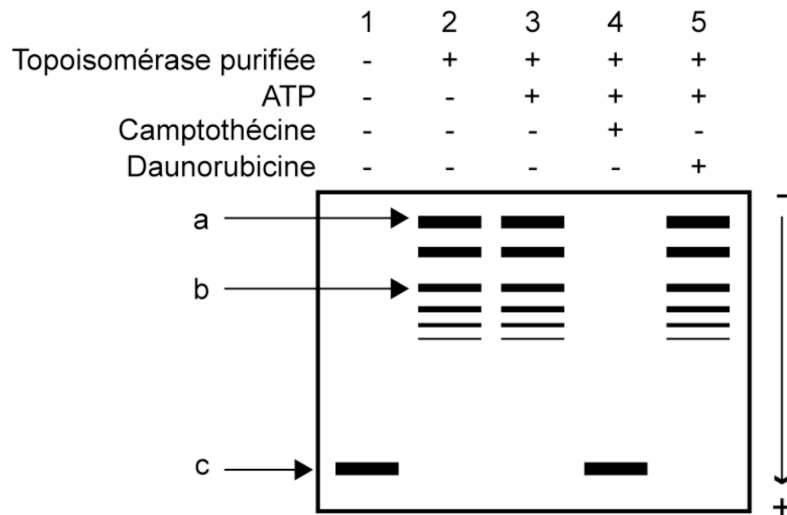


Figure 4: Electrophorèse sur gel d'agarose en conditions natives, de l'ADN plasmidique pBR322. (+) : présence, (-) : absence des différents réactifs indiqués. Le sens de migration est indiqué à droite du gel.

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.

a : Flr, plasmide circulaire, double brin, relâché et fermé, $W=0$

b : Topoisomère, plasmide circulaire, double brin, fermé, superenroulé mais moins que le plasmide natif, conformation d'ADN consécutive à l'action d'une topoisomérase ($W=-2$)

c : FI, plasmide recombinant natif, circulaire, double brin, superenroulé, double brin fermé, $W=-20$

Question 7 :

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

Type de topoisomérase : I.

Son activité ne nécessite pas d'ATP et est inhibée par un inhibiteur spécifique, la camptothécine.

Mode d'action de la topoisomérase I : Enzyme qui relâche les supertours négatifs en l'absence d'ATP. Cette modification de la topologie de l'ADN s'effectue grâce à l'hydrolyse de la liaison phosphoester d'un seul brin d'ADN par un mécanisme de transestérification

Mode de fonctionnement séquentiel.