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

Année universitaire 2013-2014

L2 - "BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GÉNÉTIQUE 1"

3ème épreuve
Biologie Moléculaire
(note/15 ; durée : 50 min)
Lundi 06 janvier 2014

- Lisez **très attentivement** le sujet.
- Les réponses doivent être rédigées directement sur le sujet dans les cases prévues à cet effet.
- Indiquez votre section **visiblement** sur chacune des copies d'anonymat.

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

****

1ère partie : mise en évidence de mutants de la réplication

Des expériences ont été réalisées afin d'identifier des protéines impliquées dans la réplication. Pour cela, des mutants bactériens d'*E. coli* ont été générés aléatoirement par incubation des bactéries dans un milieu contenant de la 5-Bromodésoxyuridine (5-BrdU).

Deux clones mutants bactériens ont été isolés (mutant 2 et mutant 3). On admettra que le traitement au 5-BrdU a permis d'obtenir deux clones bactériens indépendants (mutant 2 et 3), chacun étant muté de manière unique dans un gène différent. Ces mutants, ainsi que la souche d'*E. coli* sauvage (WT), ont été cultivés dans un milieu nutritif complet en présence de [^{3}H]-thymidine à 30°C pendant 10 min puis à 40°C pendant 40 min. A différents temps, un échantillon de chaque culture est prélevé et la quantité de [^{3}H]-thymidine incorporée (pmoles) est alors mesurée. Les résultats sont présentés dans la figure 1 ci-dessous.

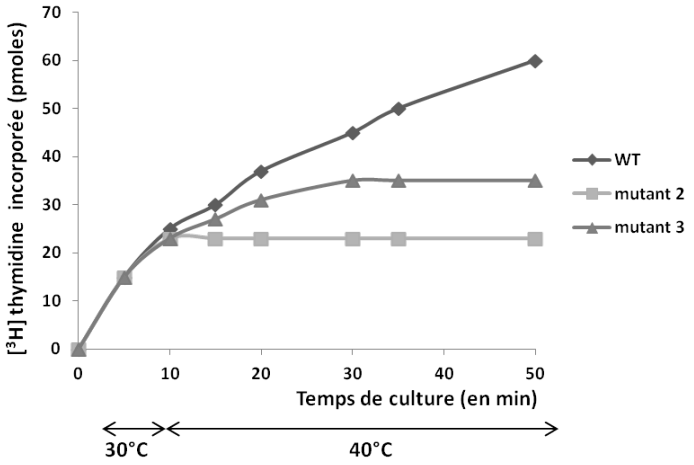


Figure 1 : quantité de [^{3}H]-thymidine incorporée au cours du temps de culture à 30°C puis à 40°C dans la souche sauvage (WT) et les mutants 2 et 3.

Question 1 : quelle est l'activité mesurée dans cette expérience ? Justifier

Incorporation de [^{3}H]-thymidine spécifique de l'ADN donc mesure d'une activité de polymérisation de l'ADN.

Question 2 : de manière générale, comment appelle-t-on ce type de mutant ?
Décrire les résultats obtenus avec le mutant 2 et le mutant 3 par rapport au WT à 30°C et à 40°C.
Comment expliquer la différence de profil obtenu entre le mutant 2 et le mutant 3 ?
Quelle précision apporte ces profils sur la fonction des protéines mutées chez les mutants 2 et 3 ?

Pour plsu d'examens visiter: https://biologie-maroc.com

type de mutant : **L'activité des mutants 2 et 3 est sensible à la température. Ce sont des mutants thermosensibles**
résultats obtenus :
A 30°C : Pour les deux mutants, même cinétique d'incorporation de la [^{3}H]-thymidine que le WT ; Cette incorporation proportionnelle au temps de culture.
A 40°C : Le WT montre toujours une cinétique d'incorporation de la [^{3}H]-thymidine proportionnelle au temps (mais plus lente qu'à 30°C) ;
Le mutant 3 présente un arrêt de l'incorporation de la [^{3}H]-thymidine au bout de 10 min ; Le mutant 2 présente un arrêt immédiat de cette incorporation .
Profil mutant 2 et mutant 3 : Les mutants 2 et 3 sont donc des mutants thermosensibles de réplication ;
la réparation étant un phénomène mineur en terme d'incorporation de la [^{3}H]-thymidine.
Explication de la différence de profil: Mutant 3 : Seules les élongations en cours se terminent, pas de nouvelles initiations.
Mutant 2 : les élongations en cours sont interrompues immediatement.
fonction des protéines mutées :
Mutant 3 : Mutation d'un gène impliqué dans l'initiation de la réplication.
Mutant 2 : Mutation d'un gène impliqué dans l'élongation de la réplication.

2ème partie : étude du mutant 3

Afin d'identifier la protéine dont l'activité a été altérée chez le mutant 3, des extraits protéiques de la souche sauvage et de ce mutant ont été utilisés pour réaliser une expérience dont les résultats sont présentés dans la figure 2 ci-dessous. On rappelle qu'un seul gène est muté dans le mutant 3.
Chacune des fractions protéiques est incubée dans une solution tampon appropriée en présence d'ADN plasmidique, d'un mélange de nucléotides dont l'un est radiomarqué (CTP, GTP, ATP et [α–^{32}P]UTP) ainsi qu'en absence ou en présence de rifampicine, un inhibiteur spécifique de l'ARN polymérase. Les différents mélanges réactionnels sont incubés à 30°C pendant 10 min puis à 40°C pendant 50 min. Tout au long de l'expérience, à différents temps, un échantillon de chaque mélange réactionnel est prélevé afin d'évaluer la quantité de radioactivité associée au plasmide. Les résultats sont présentés figure 2.

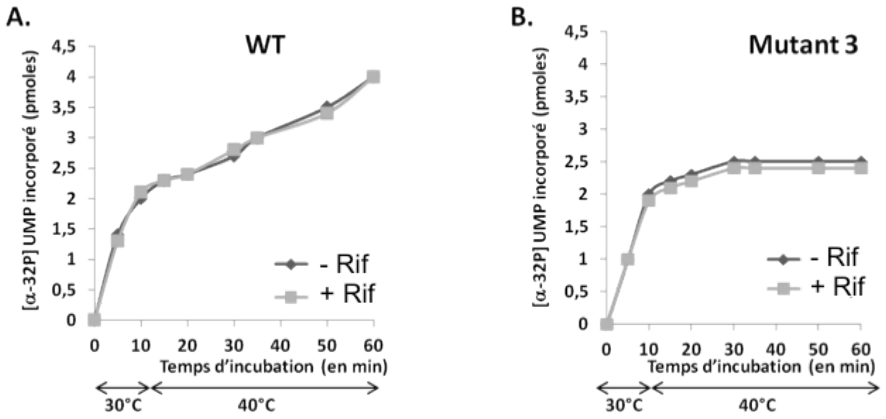


Figure 2 : quantité de [α–^{32}P] UMP incorporée au cours du temps dans un milieu réactionnel sans (- Rif) ou avec rifampicine (+ Rif), comprenant un vecteur plasmidique et la fraction protéique issue de la souche sauvage (WT) ou du mutant 3.
A- Expérience réalisée en présence de la fraction protéique issue de la souche sauvage (WT)
B- Expérience réalisée en présence de la fraction protéique issue du mutant 3

Question 3 : quelle est l'activité mesurée dans cette expérience ?

L'[α^{32}P]-UTP va être incorporé dans l'ARN. On mesure donc une activité de synthèse d'ARN (ou transcription au sens large)

Question 4 : d'après cette expérience, quel pourrait être le nom de la protéine dont le gène est muté chez le mutant 3 ? Justifier en commentant brièvement la figure 2.

Pour plsu d'examens visiter: https://biologie-maroc.com

figure 2 : **Chez le WT et chez le Mutant 3, la synthèse d'ARN est identique avec ou sans Rifampicine.**

A 30°C : Cinétique d'incorporation de [α^{32}P] UTP proportionnelle au temps de culture, chez le WT et chez le Mutant 3.

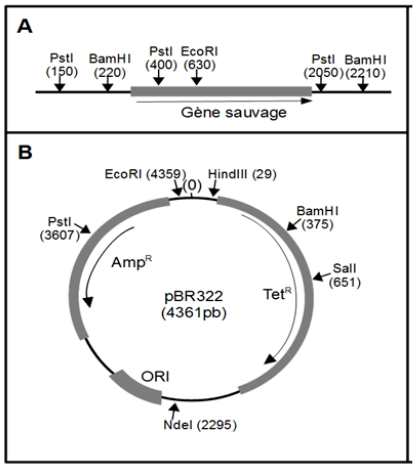
A 40°C : Le WT montre toujours une cinétique d'incorporation de [α^{32}P] UTP proportionnelle au temps de culture (mais plus lente qu'à 30°C) ; Le mutant 3 présente un arrêt quasi immédiat de l'incorporation de [α^{32}P] UTP.

nom de la protéine : **Cette synthèse d'ARN n'est donc pas réalisée par l'ARN polymérase (sensible à la rifampicine), et pourrait être due à l'activité primase qui synthétise les amorces ARN lors de la réplication.**

Figure 3 :
A- Schéma du fragment obtenu après PCR sur l'ADN génomique de la souche WT. La position des sites d'hydrolyse par les enzymes de restriction indiquées est notée entre parenthèses. La flèche « gène sauvage » correspond à l'intégralité du gène déficient dans le mutant 3 (promoteur et partie transcrite).
B- Carte de restriction du plasmide pBR322.
Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline ;
Tet^R : gène de résistance à la tétracycline.

3ème partie : expérience de sauvetage fonctionnel

La version sauvage du gène codant la protéine proposée à la question 4 est amplifiée par PCR afin d'être réintroduite dans la souche mutante. Le fragment obtenu, ainsi qu'un plasmide appelé pBR322, sont hydrolysés par une/des enzyme(s) de restriction adéquate(s) puis incubés en présence de ligase. Le schéma du fragment de PCR obtenu, et la carte de restriction du plasmide pBR322 sont représentés figure 3 (A et B).



Question 5 : indiquer l'(les) enzyme(s) de restriction qu'il faut utiliser pour hydrolyser le plasmide pBR322 et le fragment de PCR afin de construire un vecteur recombinant capable d'effectuer cette expérience de sauvetage.

Il faut utiliser BamHI : présente de part et d'autre du gène à cloner et présente en site unique dans le vecteur dans un gène non essentiel à la vie de la bactérie. On ne peut utiliser PstI et EcoRI : présentes dans le gène que l'on veut cloner.

La souche WT et la souche mutante 3 sont ensuite transformées par le vecteur recombinant pRecomb (contenant la version sauvage du gène étudié) ou le plasmide pBR322.

Quatre types de clones ont été sélectionnés pour être analysés :

- Souche WT non transformée (WT)
- Souche WT transformée avec le plasmide pBR322 (WT+pBR322)
- Mutant transformé avec le plasmide pBR322 (Mut+pBR322)
- Mutant transformé avec le plasmide recombinant (Mut+pRecomb)

Question 6 : quel sera le phénotype de chacun de ces quatre types de clones vis-à-vis des milieux de sélection décrits dans le tableau 1 (remplir le tableau 1 joint dans l'annexe) ?

Cf Annexe, Tableau 1

Pour plsu d'examens visiter: https://biologie-maroc.com

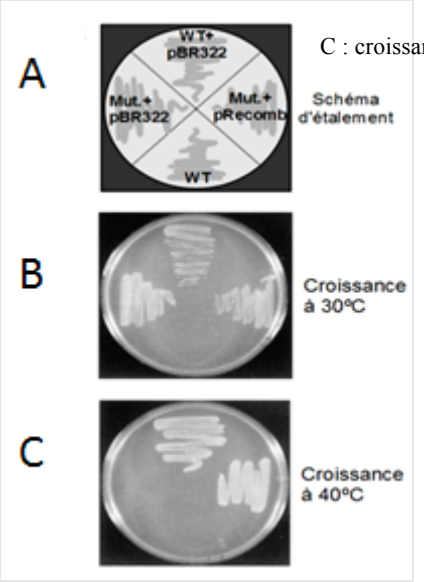
Figure 4 : test de croissance des quatre types de bactéries étudiées :

A : schéma d'étalement
WT non transformée.
WT + pBR322
Mutant 3 + pBR322 (Mut + pBR322)
Mutant 3 + plasmide recombinant (Mut + pRecomb).

B : croissance à 30°C

C : croissance à 40°C

Les quatre types bactériens décrits ci-dessus sont finalement étalés de manière identique sur deux boîtes de milieu gélosé contenant de l'ampicilline afin de réaliser un test de croissance. Une boîte est incubée à 30°C, l'autre boîte est incubée à 40°C. Au bout de 24 heures, les deux boîtes sont photographiées et présentées Figure 4B et 4C.



Question 7 : reporter les résultats expérimentaux de la figure 4 dans le tableau 2 (Cf annexe).

Cf Annexe, tableau 2

Question 8 : l'expérience de sauvetage fonctionnel a-t-elle été concluante ? Justifier votre réponse.

Le sauvetage fonctionnel est concluant :
Le Mutant 3 transformé par pBR322 recombinant pousse à 40°C ; il se comporte donc comme un WT.

Pour plsu d'examens visiter: https://biologie-maroc.com

Symbole d'anonymat :……

Annexe au sujet de Biologie Moléculaire (à rendre avec votre copie)

Tableau 1

	Phénotype vis-à-vis du milieu Tétracycline	**Phénotype vis-à-vis du milieu Ampicilline**
WT	Sensible	Sensible
WT +pBR322	Résistant	Résistant
Mutant +pBR322	Résistant	Résistant
Mutant+pRecomb	Sensible	Résistant

Tableau 2

	Phénotype vis-à-vis du milieu Ampicilline	**Croissance de la culture à 30°C sur milieu Ampicilline**	**Croissance de la culture à 40°C sur milieu Ampicilline**
WT	Sensible	Non	Non
WT +pBR322	Résistant	Oui	Oui
Mutant +pBR322	Résistant	Oui	Non
Mutant+pRecomb	Résistant	Oui	Oui

Pour plsu d'examens visiter: https://biologie-maroc.com