

ISTM : 1^{ère} Année
EXAMEN PARTIEL 2005-06 : MICROBIOLOGIE GENIE GENETIQUE
Durée 2 heures

Partie 1: Questions de cours

- 1.1 Décrire, avec précision, la ou les expérience(s) et leur(s) auteur(s) ayant permis de démontrer que l'ADN est le support de l'information génétique.
- 1.2 Décrire précisément un mécanisme de réparation de l'ADN pour une mutation de type dimère de thymine.

Partie 2: Isolement de souches de *Escherichia coli* O157:H7

(d'après J.Y. Kim et al., J. Vet. Sci. (2005) 6(1), 7-19)

Escherichia coli est une souche bactérienne commensale du tube digestif. Le serotype O157:H7 correspond à une souche productrice de toxine(s) (deux toxines ressemblant à celle produite par les bactéries du genre *Shigella*, et codées par deux gènes : **stx1** et **stx2** ; et une toxine de type hémolysine produite par l'opéron **hly**) responsables de diarrhées sanglantes, et conduisant à des troubles hémolytiques engendrant des symptômes rénaux, nerveux et pancréatiques qui peuvent entraîner la mort du patient. Les souches qui produisent Stx2 sont plus virulentes. Un autre facteur de virulence est dû au gène **eae** qui code pour une intimine responsable de l'adhésion des bactéries sur les entérocytes chez les bactéries entéropathogènes.

Un mode fréquent de transmission est par voie alimentaire (TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective). La plupart des agents infectieux (bactéries et virus) responsables de TIAC conduisent aux mêmes types de symptômes intestinaux. Afin de porter le diagnostic d'infection à *E.coli* O157:H7, et de dégager des données épidémiologiques, les auteurs souhaitent caractériser ces souches à l'aide de l'outil PCR.

- 2.1 Dégager rapidement les avantages et les inconvénients d'une recherche des souches *E. coli* O157:H7 dans les selles, le sang ou les aliments, par PCR par rapport aux méthodes de cultures traditionnelles.
- 2.2 A l'aide de la séquence de l'opéron contenant les gènes **stx1** et **stx2** présentée dans la figure 1 ci-dessous :
- 2.2.1 Définir la séquence de deux oligonucléotides qui pourront être employés à une température de 58°C pour la phase d'hybridation, afin d'amplifier le gène **stx1**. Schématiser le sens de polymérisation en précisant les extrémités 5' et 3' de chaque fragment d'ADN.
- 2.2.2 Indiquer la taille du produit de PCR attendu.
- 2.2.3 Préciser les constituants à placer dans le tube de PCR et leur rôle.

Figure 1 : Séquences d'ADN de l'opéron contenant les cistrons codant pour Stx1(332-1279), et Stx2 (1289-1558) :

```

10      20      30      40      50      60      70
S) AATATTGTGT ATTTTTGTGA TSCAGGATG ACCCTGTAAC GAAGTTTGGC TAACAGCATT TTGCTCTACG

      80      90      100     110     120     130     140
AGTTTGGCAG CCTCCGCCAG TGGCTGGCTT TTTTATGTGC GTAACATCTT GTGTATCAAT AAATGTTGTT

      150     160     170     180     190     200     210
ATETACGTAC GTCAAAGTGT CGCATGAGAT CTCACCAGAT ATGTTAAGCT TCCAGCTCTC TTGGAATATG
      -35
      220     230     240     250     260     270     280
ATTATGATT TCATTACGTT ATGTTTACGT TTATCCGGTG CCGCGTAAAA CCGCTCTCTT CAGGGCGGTG
      -10
      290     300     310     320     330
AGGATGTCAA GAATATAGTT ATCGTATGGT GCTCAAGGAG TATTGTGTAA TATG AAA ATA ATT
      50
MET Lys Ile Ile -19

346     361     376     391
ATT TTT ACA GTG CTA ACT TTT TTC TTT GTT ATC TTT TCA GTT AAT GTG CTG GCG
Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe Ser Val Asn Val Val Ala - 1

406     421     436     451
AAG GAA TTT ACC TTA GAC TTC TCG ACT GCA AAG ACC TAT CTA GAT TCG CTG AAT
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn 18

466     481     496
GTC ATT CGC TGT GCA ATA GGT ACT CCA TTA CAG ACT ATT TCA TCA GGA GGT ACG
Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr 36

511     526     541     556
TCT TTA CTG ATG ATT GAT AGT GGC TCA GGG GAT AAT TTG TTT GCA GTT GAT CTC
Ser Leu Leu MET Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val 54

571     586     601
AGA GGG ATA GAT CCA GAC GAA GCG CGG TTT AAT AAT CTA CGG CTT ATT GTT GAA
Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu 72

616     631     646     661
CGA AAT AAT TTA TAT CTG ACA GGA TTT GTT AAC AGC ACA AAT AAT GTT TTT TAT
Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr 90

676     691     706     721
CGC TTT GCT GAT TTT TCA CAT GTT ACC TTT CCA GGT ACA ACA GCG GTT ACA TTC
Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu 108

736     751     766
TCT GGT GAC AGT AGC TAT ACC ACG TTA CAG CGT GTT GCA GGG ATC AGT CGT ACG
Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr 126

781     796     811     826
GGG ATG CAG ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT ACT TCT TAT CTG GAT TTA ATG TCG
Gly MET Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu MET Ser 144

841     856     871
CAT AGT GGA ACC TCA CTG ACG CAG TCT GTG GCA AGA GCG ATC TTA CCG TTT GTT
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala MET Leu Arg Phe Val 162

886     901     916     931
ACT GTG ACA GCT GAA GCT TTA CGT TTT CGG CAA ATA CAG AGC GGA TTT CGT ACA
Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr 180

946     961     976     991
ACA CTG GAT GAT CTC AGT GCG CGT TCT TAT GTA ATG ACT GCT GAA GAT GTT GAT
Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val MET Thr Ala Glu Asp Val Asp 198

1006     1021     1036
CTT ACA TFG AAC TCG GGA AGE TTC ACT AGC CTC CTG CCT GAC TAT CAT GGA CAA
Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln 216

1051     1066     1081     1096
GAC TCT GTT CGT GTA GGA AGA ATT TCT TTT GGA AGC ATT AAT GCA ATT CTG GGA
Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly 234

1111     1126     1141
AGC GTG CCA TTA ATA CTG AAT TGT CAT CAT GCA TCG CCA GTT CCG ACA ATG
Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg MET 252

1156     1171     1186     1201
GCA TCT GAT CAG TTT CCT TCT ATG TGT CCG GCA GAT GGA AGA GTC CGT CCG ATT
Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser MET Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile 270

1216     1231     1246     1261
ACG CAC AAT AAA ATA TTG TGG GAT TCA TCC ACT CTC CCG GCA ATT CTG ATG CCG
Thr His Asp Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu MET Arg 288

1276     1286     1303
AGA ACT ATT AGC ACT TCAAGGGGTA AA ACG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GCT GCA
Arg Thr Ile Ser Ser -30 MET Lys Lys Thr Leu Leu Ile Ala Ala -12

1318     1333     1348     1363
TGG CTT TCA TTT TTT TCA GCA AGT CCG CTG GCG ACC CCT GAT TGT GTA ACT GCA
Ser Leu Ser Phe Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala Thr Pro Asp Cys Val Thr Gly 7

1378     1393     1408     1423
AAG CTC GAG TAT ACA AAA TAT AAT GAT GAC GAT ACC TTT ACA GTT AAA GTG GGT
Lys Val Glu Tyr Thr Lys Tyr Asn Asp Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Gly 75

1438     1453     1468
GAT AAA GAA TTA TTT ACC AAC AGA TGG AAT CTT CAG TCT CTT CTT CTC ACT GCG
Asp Lys Glu Leu Phe Thr Asn Arg Trp Asn Leu Gln Ser Leu Leu Leu Ser Ala 43

1483     1498     1513     1528
GAA ATT ACC CCG ATG ACT GTA ACC ATT AAA ACT AAT CCG TCT CAT AAT GGA GGG
Gln Ile Thr Gly MET Thr Val Thr Ile Lys Thr Asn Ala Cys His Asn Gly Gly 61

1543     1553     1575     1583
CGA TTC ACC GAA GTT ATT TTT GGT TCACTCAGAA TAGCTCAGTG AAAATACCAG CCGGAG 3'
Gly Phe Ser Glu Val Ile Phe Arg
    
```

2.3 Les auteurs ont choisi de développer une PCR-multiplex, qui consiste à réaliser au sein d'un même tube plusieurs PCR différentes. Les auteurs définissent donc une paire d'oligonucléotides (chaque oligonucléotide a une vingtaine de nucléotides tel que la température d'hybridation de 58°C soit favorable pour chaque paire) pour chaque gène recherché spécifique de l'espèce E. coli: stx1 (614 pb),

stx2 (779 pb), eae (890 pb), hly (165 pb), H7 (625 pb). La taille de chacun des produits de PCR est indiquée entre parenthèses. Le jeu pour H7 reconnaît un gène codant pour une protéine du flagelle rencontrée dans les souches *E. coli* O157:H7.

- 145 2.3.1 Proposer des tubes contrôles (ADN matrices) pour mettre au point les conditions de PCR permettant de détecter les gènes correspondants des souches *E. coli*, et vérifier les PCR réalisées. pour la mise au point pour la routine.
- 145 2.3.2 Analyser les résultats de la Figure 2 i dessous, correspondant au résultat après électrophorèse en gel d'agarose baigné dans une solution de BET et exposition aux UV à 320 nm, des produits de PCR-multiplex 12 souches bactériennes.

Figure 2 : Résultat du gel d'électrophorèse traditionnel après exposition à 320nm, d'ADN issu de PCR-multiplex mélangés au BET :

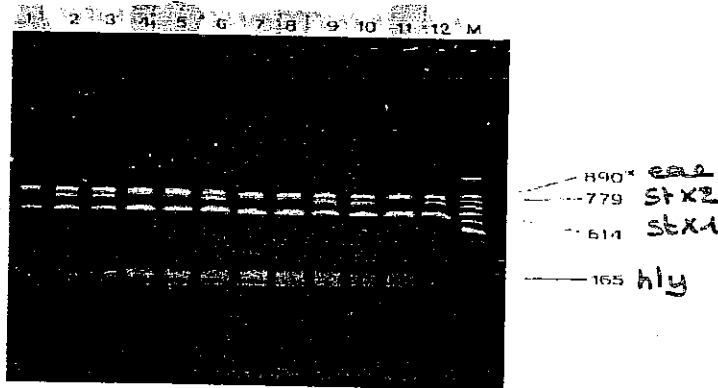


Fig. 2. Result of multiplex PCR assay for detection of the *Stx1* (614 bp), *Stx2* (779 bp), *eaeA* (890 bp), and *hlyA* (165 bp) genes in *E. coli* O157:H7 isolates. Lane 1. P010726-18; lane 2. P010726-21; lane 3. P010726-22; lane 4. P010726-23; lane 5. P010726-24; lane 6. P010726-25; lane 7. P010726-26; lane 8. E010205-13-2; lane 9. J010303-11-1; lane 10. O157-R1-3-2; lane 11. O157-C-1-2; lane 12. ATCC 43894 (a positive control); M. 100 bp DNA marker.

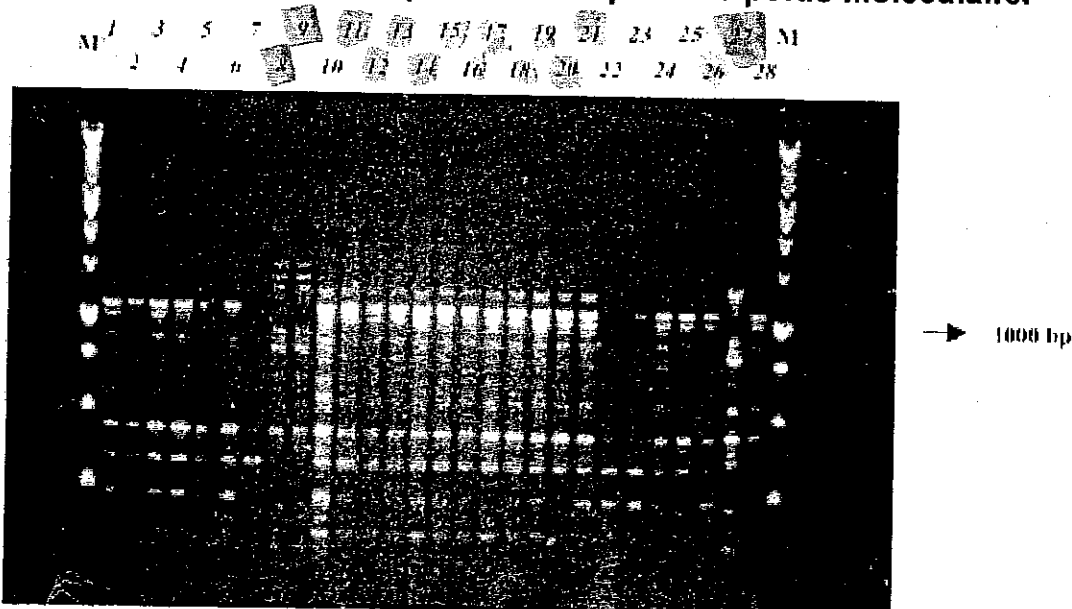
2.4 Les auteurs choisissent ensuite de réaliser une nouvelle PCR sur ADN, à l'aide de deux oligonucléotides de petite taille :

- CRA22 : CCGCAGCCAA
- CRA23 : GCGATCCCCA

Le résultat d'un gel d'électrophorèse des produits de PCR avec CRA22 et CRA23 (=PCR-RAPD), de différentes souches d'*E. coli*, est présenté dans la figure 3.

- 14 2.4.1 Combien de séquences génomiques d'*E. coli* sont reconnues par un oligonucléotide de 10 bases ?
- 14 2.4.2 Interpréter les résultats de la piste 25 : nombre de bandes, intensité relative des bandes.
- 14 2.4.3 Expliquer précisément au niveau moléculaire, les raisons des différences observées entre les pistes. En dégager le but de la technique utilisée par les auteurs.

Figure 3 : Résultat du gel d'électrophorèse traditionnel après exposition à 320nm, d'ADN issu de PCR-RAPD mélangés au BET : pistes 1 à 28 correspondent à des souches différentes. M correspond au marqueur de poids moléculaire.



2.5 Le résultat d'un dendrogramme à partir des données de RAPD-PCR des différentes souches de la figure 3, est présenté en figure 4.

- 2.5.1 Rappeler quel est le but de cette représentation en dendrogramme.
- 2.5.2 Indiquer quelles souches (numéro de piste de la figure 3) composent les groupes A, B, C, D, E identifiés sur le dendrogramme.
- 2.5.3 A l'aide de justifications, indiquer s'il est possible de relier entre eux ces différents groupes ? Si la réponse est positive, placer les liens qui vous paraissent possibles et justifier dans un court texte votre logique.

Figure 4 : Dendrogramme des 26 souches bactériennes d'après les données de RAPD-PCR correspondant à la figure 3.

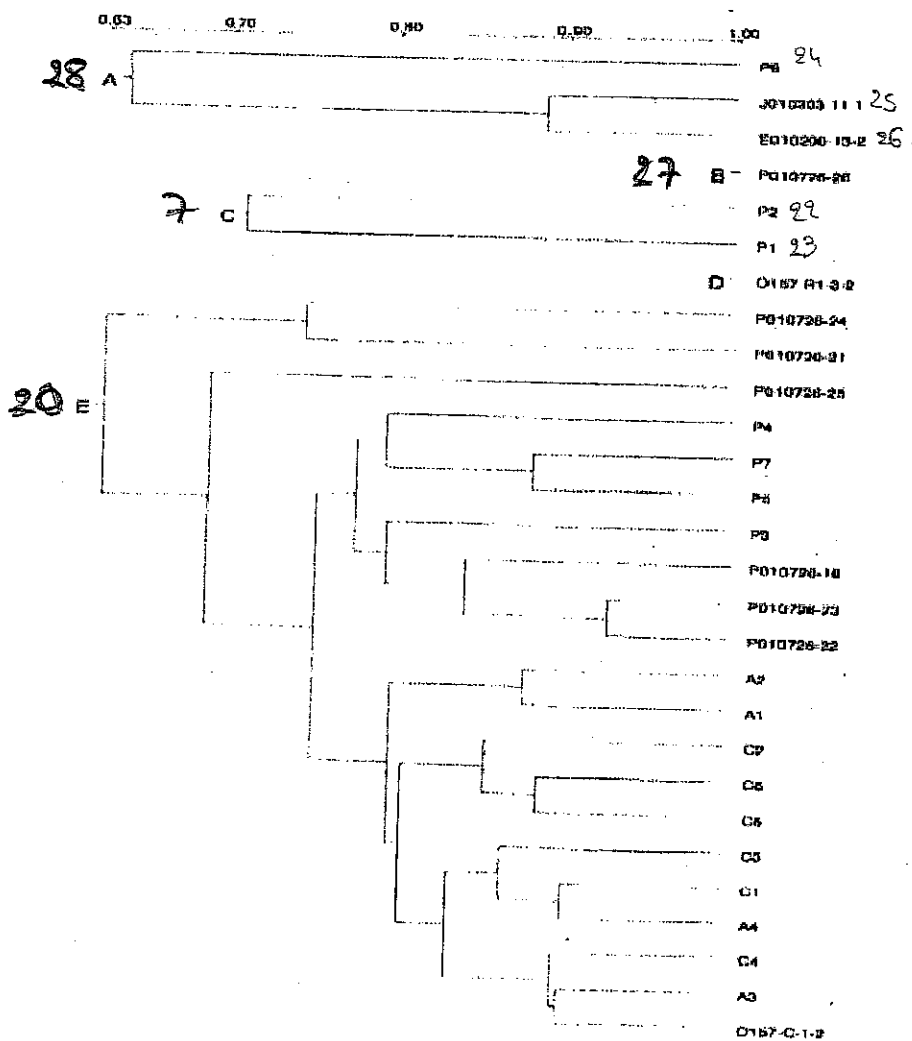


Fig. 4. The dendrogram constructed from RAPD data by UPGAMA method.

2.6 Proposer une autre méthode que la RAPD-PCR, qui soit comparable en terme de logique et de finalité scientifique.