

L2 SV-SME-BIM
Examen de Biologie Moléculaire –Session1
 Calculatrices non autorisées. Documents non autorisés.

Partie Biologie moléculaire procaryote. Mme Latifi et Mme Jourlin-Castelli
 Ce sujet doit être rédigé sur une copie séparée. (Durée estimée 1H)

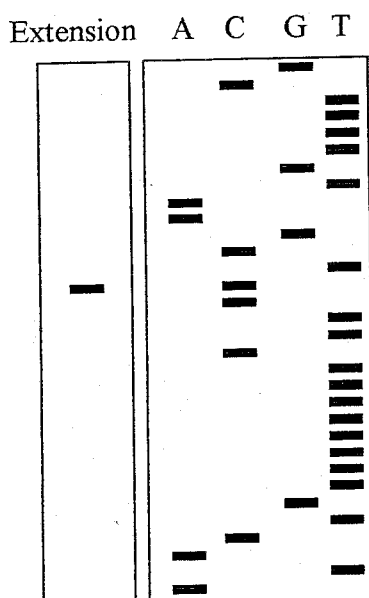
La protéine bactérienne Lrp est une protéine de régulation connue pour réguler l'expression de nombreux gènes. La régulation de l'expression du gène *lrp* veut être étudiée.

1^{ère} expérience :

Le promoteur de ce gène est recherché. Le site d'initiation de la transcription est déterminé par la méthode d'extension d'amorce en utilisant l'oligonucléotide suivant :

L1 : 5' ATCATGAAGATTACGGCGCG 3'

L'expérience d'extension d'amorce est réalisée à partir d'ARNs extraits de bactéries sauvages. Le même oligonucléotide est utilisé pour réaliser une réaction de séquence par la méthode de Sanger. Les deux réactions d'extension d'amorce et la réaction de séquence ont été chargées sur un gel. Le résultat est le suivant :



Positionner le site d'initiation de la transcription et positionner les séquences « -35 » et « -10 ».

La séquence du brin codant de la région d'ADN d'intérêt est donnée ci-dessous (le codon initiateur de *lrp* est indiqué en gras):

gcccatgagatccccatagttgttggcagacaatgggcaggattgtagggaatttacagacgtaaa
 aaaagagtatgacgattttgttaacaatttgtgcaatcggcagcatcgataagcaggtcaaattct
 cccgtcattatcacctctgctacttaaatttcccgcctttataagccgattaaatgatgaataaacg
 cccctgttaatgaatatctggcatgttgtactaaaaatcgatgttttgccttgacaatcccctggt
 gttttgcgaaaacattcgaggaagaaaaaaacagtatttcttatatgcgacataaccatgcatgtaa
 ataccatgtttaccgtgctagtgaatctacgtatggcgtggacagacgccattcgtgatgtcgat
 agctgccacaaggcaacggtcttctcacgtagaccaggcattgcgcgccgtgaatcttcatgat
 ttcggtctatcgtgacgggtagcgactctgaacagtgatgtttcagggtcagacaggagtagggaa
 ggaatacagagagacaataataatggttagatagcaagaagcgccctggcaaagatctcgaccgtat
 cgatcg

2^{ème} expérience :

Une fusion transcriptionnelle a été réalisée sur plasmide en clonant un fragment obtenu par PCR en amont du gène rapporteur *lacZ*. La PCR a été réalisée avec les oligonucléotides L2 (5' gcccatgagatcccatag 3') et L1. La fusion entre le produit PCR et le gène *lacZ* est réalisée à l'extrémité correspondant à L1. Le plasmide portant la fusion (appelé *plrp-lacZ*) est introduit dans la souche sauvage ainsi que dans une souche délétée du gène *lrp*. Un deuxième plasmide contenant le gène sauvage *lrp* a également été construit (appelé pLrp) puis introduit dans la souche délétée de *lrp* contenant le plasmide *plrp-lacZ*. Enfin le plasmide *plrp-lacZ* a été modifié de façon à remplacer la séquence cccc (souligné dans la séquence ci-dessus) par aaaa. Le plasmide résultant, appelé *plrp^{mut}-lacZ*, a été introduit dans la souche sauvage. L'activité β -galactosidase a ensuite été mesurée dans les différentes souches. Les résultats sont les suivants :

Souches	Activité β -galactosidase
Sauvage + <i>plrp-lacZ</i>	20
Mutant <i>lrp</i> + <i>plrp-lacZ</i>	100
Mutant <i>lrp</i> + <i>plrp-lacZ</i> + pLrp	5
Sauvage + <i>plrp^{mut}-lacZ</i>	95

Expliquer les résultats et proposer un modèle de régulation.

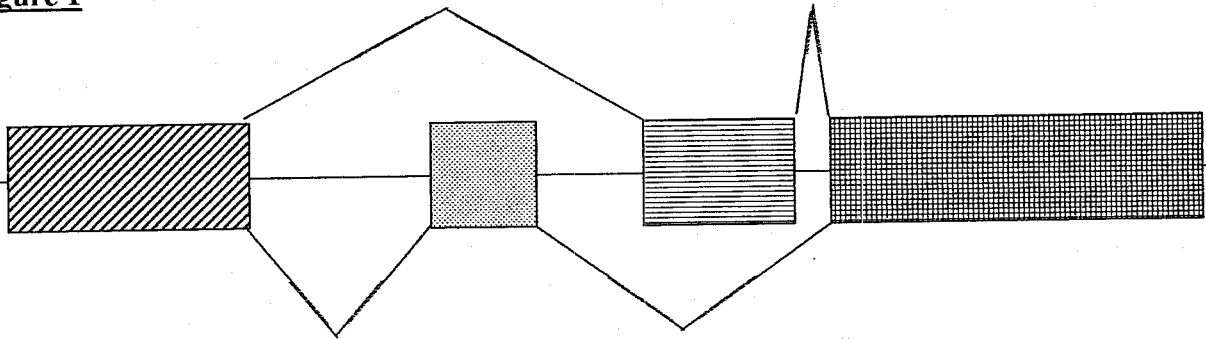
Partie Biologie Moléculaire Eucaryote (D. Aragnol et C. Maurel-Zaffran)

Ce sujet doit être rédigé sur une copie séparée. (Durée estimée 1H)

La clarté et la concision de votre rédaction seront prises en compte dans la notation.
Les questions sont, en grande partie, indépendantes les unes des autres.

Des éléments de structure du gène *trans* de drosophile sont donnés dans la figure 1. La taille donnée aux introns et aux exons est arbitraire.

Figure 1



Le gène *trans* code deux protéines de tailles différentes, appelées TRANS1 et TRANS2.

Les protéines TRANS1 et TRANS2 ont la même extrémité N-terminale. Elles ont également la même extrémité C-terminale.

Les exons 2 et 3 sont mutuellement exclusifs.

Au niveau du promoteur, une « boîte TATA » a été identifiée.

Question 1 : En utilisant les informations ci-dessus et ce que vous savez de la structure classique d'un gène eucaryote,

a) Complétez et légendez la figure 1, après l'avoir reproduite sur votre copie.

b) Représentez et légendez les messagers matures du gène *trans* le plus précisément possible.

Question 2 : En tenant compte des informations concernant les protéines TRANS1 et TRANS2, décrivez les contraintes qui en découlent concernant le cadre de lecture utilisé. En conséquence, quelles conditions doivent respecter les nombres de nucléotides n2 de l'exon 2 et n3 de l'exon 3 ?

TRANS1 et TRANS2 sont des facteurs de transcription. Ce sont des activateurs.

Question 3 :

a) Quelle est votre définition d'un facteur de transcription ?

b) Quelles sont les caractéristiques structurales classiques d'un activateur ?

c) Quels domaines de liaison à l'ADN connaissez-vous ?

Un ADN de séquence connue est utilisé pour réaliser des expériences d'empreinte à la DNaseI (footprinting) avec la protéine TRANS1 purifiée (figure 2, piste A), avec la protéine TRANS2 purifiée (figure 2, piste B). La piste C est un contrôle réalisé en absence de protéine.

Question 4 :

- a) Quelles conclusions tirez-vous des résultats montrés dans la figure 2 ?
 b) Quelles hypothèses pouvez-vous faire quant à l'organisation structurale des protéines TRANS1 et TRANS2?

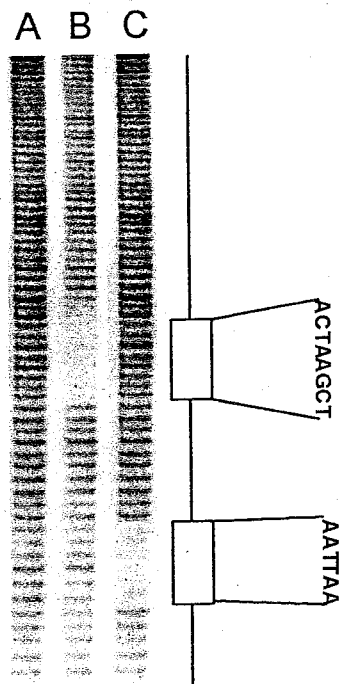


Figure 2

Question 5 : Quelles expériences réaliseriez vous pour montrer que l'ARNm codant TRANS1 n'est exprimé que chez la drosophile adulte, alors que l'ARNm codant TRANS2 n'est exprimé que chez l'embryon. Proposez un schéma légendé qui décrive les résultats de ces expériences.