

Annales L2

Biochimie S4

Sommaire

Partie Dardel : page 3

- Sujet « L'extinction du chromosome X » : page 4
- Correction « L'extinction du chromosome X » : page 8

- Sujet « Hélicase et réparation de l'ADN » : page 13
- Correction « Hélicase et réparation de l'ADN » : page 17

- Sujet « L'ADN primase » : page 22
- Correction « L'ADN primase » : page 27

- Sujet « Virus du Sarcome de Kaposi et ARN non-codant » : page 32
- Correction « Virus du Sarcome de Kaposi et ARN non-codant » : page 36

- Sujet « Le virus de la grippe » : page 40
- Correction « Le virus de la grippe » : page 45

- Sujet « L'ADN polymérase I d'E. coli » : page 50
- Correction « L'ADN polymérase I d'E. coli » : page 57

- Sujet « Auto-immunité et régulation des gènes » : page 64
- Correction « Auto-immunité et régulation des gènes » : page 71

- Sujet « Réparation par excision du nucléotides chez les mammifères » : page 78
- Correction « Réparation par excision du nucléotides chez les mammifères » : page 84

- Sujet « Télomères et Télomérase » : page 90
- Correction « Télomères et Télomérase » : page 97

- Sujet « CRISPR / Cas9 » : page 104
- Correction « CRISPR / Cas9 » : page 112

- Sujet « Structure de la chromatine chez les bactéries » : page 120
- Correction « Structure de la chromatine chez les bactéries » : page 127

- Sujet « Polyadénylation des ARNm Eucaryotes » : page 134

Partie Sari : page 139

- Sujet session 1, 2010-2011 : page 140
- Correction session 1, 2010-2011 : pages 147

- Sujet session 1, 2013-2014 : page 154
- Correction session 1, 2013-2014 : page 164

- Sujet session 1, 2016-2017 : page 174
- Correction session 1, 2016-2017 : page 184

- Sujet session 1, 2018-2019 : page 194
- Correction session 1, 2018-2019 : page 203

- Sujet session 1, Eval1, 2019-2020 : page 213
- Correction session 1, Eval1, 2019-2020 : page 217

- Sujet session 1, Eval2, 2019-2020 : page 219
- Correction session 1, Eval1, 2019-2020 : page 225



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Partie Dardel

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com
Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

L'extinction du chromosome X Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

L'extinction ou *silencing* du chromosome X

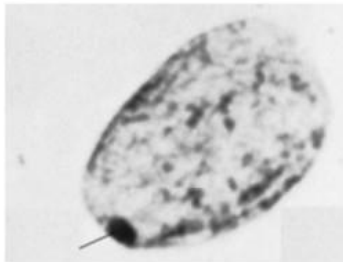
Les différentes parties du problème sont indépendantes.

Il est recommandé de lire attentivement l'énoncé

Les photocopies et notes de cours sont autorisés

Chez les mammifères, le sexe est déterminé par la présence de deux chromosomes X (XX) chez les femelles (♀), contre un chromosome X et un chromosome Y (XY) chez les individus mâles (♂).

Dans le cas des cellules femelles adultes (XX), un seul des deux chromosomes X est actif, l'autre est inactif, ne donnant lieu à pratiquement aucune transcription. Ce chromosome « éteint » forme un agrégat condensé dans le noyau, appelé « corpuscule de Barr », visible par des techniques de microscopie.



Corpuscule de Barr visible dans le noyau (indiqué par le trait)

Ces corpuscules de Barr ne sont observés que dans des cellules prélevées chez les femmes, et ce test cytogénétique a d'ailleurs été utilisé pour vérifier le sexe d'athlètes engagés aux Jeux Olympiques.

I Le mécanisme d'extinction

On s'interroge sur la raison de cette extinction d'un des deux chromosomes X chez la femme :

- En l'absence de ce mécanisme d'extinction de la transcription, quelle serait la conséquence pour l'expression comparée d'un gène situé sur le chromosome X chez un homme et chez une femme ?
- Dans ces conditions, selon vous, pourquoi l'évolution a-t-elle produit un tel mécanisme d'extinction?

II Le gène XIST

Chez la femme, dans chaque cellule, on a donc un chromosome X actif (noté X_a) et un chromosome X inactif (celui qui forme le corpuscule de Barr, noté X_i). L'inactivation n'est cependant pas totale et un petit nombre de gènes échappe à l'extinction sur le chromosome X_i .

Par une cartographie génétique, on a pu localiser la région responsable de l'inactivation sur une zone précise du chromosome X lui-même. Un gène, appelé XIST, a été précisément localisé dans cette région et fait partie de ceux qui échappent à l'extinction sur le chromosome X_i . Pour cette raison, on suspecte qu'il joue un rôle important dans ce mécanisme.

On est parvenu à isoler un fragment d'ADNc (ADN complémentaire obtenu par transcription inverse de l'ARN messager) correspondant à ce gène XIST. La séquence de l'ADN double brin est indiquée ci-après:

```
5' CTTTCTGTATGAATAAACTTTCTGTAAGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'
3' GAAAGACATACTTATTTTGAAAGACATTCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 5'
```

- a) En examinant les caractéristiques particulières de cette séquence, indiquez à quelle région de l'ARNm elle correspond, en précisant le(s) signal(aux) caractéristique(s) que vous pouvez y trouver.
- b) On veut synthétiser un oligonucléotide ADN marqué radioactivement pour détecter *in situ* les ARN messagers par hybridation. Parmi les 3 séquences possibles suivantes, laquelle choisiriez vous ? Expliquez pourquoi vous éliminez les deux autres séquences.

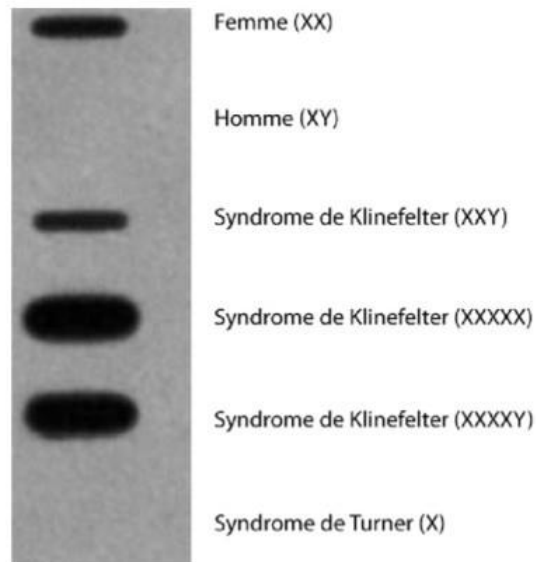
- O1 CTTTCTGTATGAATAAACTTTCTGTAAGCT
 O2 TACTTACAGAAAGTTTTATTTCATACAGAAAG
 O3 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

III Expression du gène XIST dans différentes cellules

En utilisant l'oligonucléotide sonde sélectionné (question précédente), on effectue par hybridation une quantification des ARN correspondants dans différentes cellules.

On utilise des cellules d'homme (XY) ou de femme (XX) sains, ainsi que des cellules prélevées chez des patients atteints d'anomalies chromosomiques, qui ont un nombre aberrant de chromosomes sexuels : Syndrome de Turner ou les malades ont un seul chromosome sexuel (X), syndrome de Klinefelter, où les malades ont au contraire un ou plusieurs chromosomes X surnuméraires (XXY, XXXY, XXXXY...). Chez ces patients portant plus d'un chromosome X, un seul est actif (X_a), tous les autres sont inactifs (X_i).

On extrait l'ensemble des ARN totaux de chaque type cellulaire, dont on dépose une quantité identique sur un filtre. Par hybridation des ARN avec l'oligonucléotide sonde radioactif, on peut déterminer la quantité d'ARN correspondant au gène XIST après autoradiographie. Le résultat de cette autoradiographie est indiqué sur la figure ci-dessous:



Attention : ceci n'est pas une électrophorèse, chaque position correspond à un dépôt d'ARN total provenant du type cellulaire indiqué dans la légende à droite.

- a) Interprétez les résultats de cette expérience d'hybridation quantitative
 b) A votre avis, quel(s) chromosome(s) (X_a , X_i , Y) exprime(nt) le gène XIST

IV Localisation de l'ARN XIST

L'ARN correspondant au gène XIST est un transcrit de 14 kilobases coiffé en 5' et qui subit un épissage d'introns et polyadénylation en 3'. En effectuant une hybridation *in situ* sur des cellules femelles (XX), on constate que celui-ci est localisé exclusivement dans le noyau des cellules femelles.

a) Pourquoi ce résultat est-il surprenant ?

b) L'analyse de la séquence de l'ARN XIST montre qu'il ne contient aucune phase ouverte de lecture pouvant coder pour une protéine, ce qui est également surprenant. Dans le noyau, on trouve ce transcrit XIST fortement associé au corpuscule de Barr. Imaginez une explication simplifiée de l'extinction du chromosome X par l'ARN XIST.

V Structure de l'ARN XIST

L'ARN XIST contient une séquence très conservée, répétée plusieurs fois :



a) Montrez que cette séquence peut former une courte structure en tige-boucle.

Cette séquence est essentielle au mécanisme d'extinction du chromosome X, ce que l'on peut montrer par délétion ou mutation dans le gène XIST, on cherche donc à préciser son rôle

On fixe de manière covalente un oligonucléotide ARN contenant cette courte séquence sur des billes de résine. Ces billes sont mises en présence d'un extrait nucléaire de cellules féminines (XX). Après lavage, on montre que les billes greffées avec l'ARN ont fixé spécifiquement une protéine de 120 kD.

b) Quelle est la fonction de la tige boucle de l'ARN XIST ?

c) Quel(s) pourrai(en)t-être le(s) rôle(s) de cette protéine dans l'extinction du chromosome X ?



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

L'extinction du chromosome X Correction

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

L'extinction ou *silencing* du chromosome X

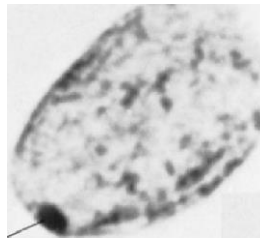
Les différentes parties du problème sont indépendantes.

Il est recommandé de lire attentivement l'énoncé

Les photocopies et notes de cours sont autorisées

Chez les mammifères, le sexe est déterminé par la présence de deux chromosomes X (XX) chez les femelles (♀), contre un chromosome X et un chromosome Y (XY) chez les individus mâles (♂).

Dans le cas des cellules femelles adultes (XX), un seul des deux chromosomes X est actif, l'autre est inactif, ne donnant lieu à pratiquement aucune transcription. Ce chromosome « éteint » forme un agrégat condensé dans le noyau, appelé « corpuscule de Barr », visible par des techniques de microscopie.



Corpuscule de Barr visible dans le noyau (indiqué par le trait)

Ces corpuscules de Barr ne sont observés que dans des cellules prélevées chez les femmes, et ce test cytogénétique a d'ailleurs été utilisé pour vérifier le sexe d'athlètes engagés aux Jeux Olympiques.

I Le mécanisme d'extinction

On s'interroge sur la raison de cette extinction d'un des deux chromosomes X chez la femme :

a) En l'absence de ce mécanisme d'extinction de la transcription, quelle serait la conséquence pour l'expression comparée d'un gène situé sur le chromosome X chez un homme et chez une femme ?

Reponse : Le nombre de copies de chaque gène situé sur le chromosome X est **double** chez une femme. Ceci conduirait à la surexpression de l'ensemble des gènes correspondants.

b) Dans ces conditions, selon vous, pourquoi l'évolution a-t-elle produit un tel mécanisme d'extinction ?

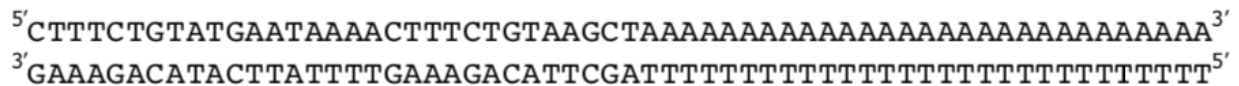
Reponse : Cette augmentation d'expression pourrait provoquer des déséquilibres métaboliques dans les processus dans lesquels sont impliqués les produits de ces gènes. L'extinction de la transcription d'un des deux chromosomes X chez la femme permet de maintenir le **même niveau d'expression, indépendamment du sexe de l'individu**. Cela évite donc les risques de déséquilibre métabolique.

II Le gène XIST

Chez la femme, dans chaque cellule, on a donc un chromosome X actif (noté X_a) et un chromosome X inactif (celui qui forme le corpuscule de Barr, noté X_i) - L'inactivation n'est cependant pas totale et un petit nombre de gènes échappent à l'extinction sur le chromosome X_i.

Par une cartographie génétique, on a pu localiser la région responsable de l'inactivation sur une zone précise du chromosome X lui-même. Un gène, appelé **XIST**, a été précisément localisé dans cette région et fait partie de ceux qui échappent à l'extinction sur le chromosome X_i. Pour cette raison, on suspecte qu'il joue un rôle important dans ce mécanisme.

On est parvenu à isoler un fragment d'ADNc (ADN complémentaire obtenu par transcription inverse de l'ARN messager) correspondant à ce gène XIST. La séquence de l'ADN double brin est indiquée ci-après:



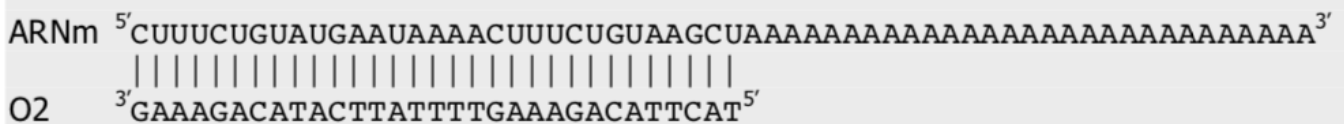
a) En examinant les caractéristiques particulières de cette séquence, indiquez à quelle région de l'ARNm elle correspond, en précisant le(s) signal(aux) caractéristique(s) que vous pouvez y trouver.

Réponse : Cette région correspond à la queue poly-A de l'ARN. Elle contient une longue série de A en 3'. Celle-ci est précédée par la séquence AATAAA sur le brin du haut, qui correspond au signal de polyadénylation caractéristique AAUAAA sur l'ARNm.

b) On veut synthétiser un oligonucléotide ADN marqué radioactivement pour détecter *in situ* les ARN messagers par hybridation. Parmi les 3 séquences possibles suivantes, laquelle choisiriez vous ? Expliquez pourquoi vous éliminez les deux autres séquences.

- O1 CTTTCTGTATGAATAAAACTTTCTGTAAGCT
- O2 TACTTACAGAAAGTTTTATTCATACAGAAAG
- O3 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Réponse : La séquence de l'ARN messager correspond au brin du haut de la figure ci-dessus (celui qui contient la séquence AATAAA et le poly-A. Pour s'hybrider à l'ARN messager, l'oligonucléotide doit être **complémentaire** de l'ARNm. Ceci permet d'éliminer O1 qui correspond au même brin que l'ARNm (et pas au brin complémentaire). O3 est bien complémentaire de la queue poly-A, en revanche, il n'est en rien spécifique de l'ARN Xist. Il peut en effet s'hybrider à tous les ARNm cellulaires qui, par principe, sont porteurs d'une queue poly-A. Il reste l'oligo O2, qui est bien complémentaire de l'ARNm Xist, dans la partie avant la queue poly-A :



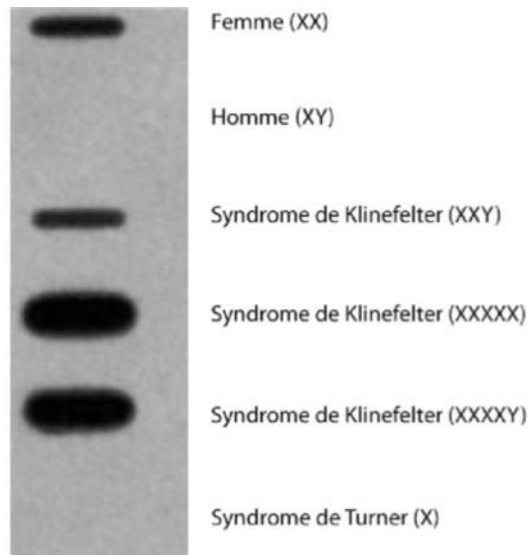
(O2 est inversé par rapport à la séquence ci-dessus, pour prendre en compte l'anti-parallélisme des 2 brins)

III Expression du gène XIST dans différentes cellules

En utilisant l'oligonucléotide sonde sélectionné (question précédente), on effectue par hybridation une quantification des ARN correspondants dans différentes cellules.

On utilise des cellules d'homme (XY) ou de femme (XX) sains, ainsi que des cellules prélevées chez des patients atteints d'anomalies chromosomiques, qui ont un nombre aberrant de chromosomes sexuels : Syndrome de Turner ou les malades ont un seul chromosome sexuel (X), syndrome de Klinefelter, où les malades ont au contraire un ou plusieurs chromosomes X surnuméraires (XXY, XXXY, XXXXY...). Chez ces patients portant plus d'un chromosome X, un seul est actif (X_a), tous les autres sont inactifs (X_i).

On extrait l'ensemble des ARN totaux de chaque type cellulaire, dont on dépose une quantité identique sur un filtre. Par hybridation des ARN avec l'oligonucléotide sonde radioactif, on peut déterminer la quantité d'ARN correspondant au gène XIST après autoradiographie. Le résultat de cette autoradiographie est indiqué sur la figure ci-dessous:



Attention : ceci n'est pas une électrophorèse, chaque position correspond à un dépôt d'ARN total provenant du type cellulaire indiqué dans la légende à droite.

a) Interprétez les résultats de cette expérience d'hybridation quantitative

Réponse : On remarque que la quantité de radioactivité observée varie suivant le nombre de chromosome X. Comme on a déposé des quantités **identiques** d'ARN totaux, cela traduit une variation de la transcription du gène Xist en fonction du nombre de chromosomes X suivant le schéma suivant :

- Un seul chromosome X (homme, syndrome de Turner) => pas de transcription de Xist
- 2 chromosomes X (femme, Klinefelter XXY) => transcription normale
- 3 chromosomes X ou plus (Klinefelter XXXY, XXXXY) => transcription augmentée

La transcription semble proportionnelle au nombre de chromosomes X, à partir du second

b) A votre avis, quel(s) chromosome(s) (X_a , X_i , Y) exprime(nt) le gène XIST

Réponse : L'homme, qui a un chromosome Y et un chromosome X actif (X_a), n'exprime pas l'ARN Xist. Ce n'est donc ni le Y ni le X_a qui produisent Xist. Ceci colle avec le schéma observé ci-dessus : Les femmes et les patients atteints du syndrome de Klinefelter ont un ou plusieurs X_i et expriment d'autant plus Xist qu'ils ont de chromosomes X_i . A l'inverse, les hommes et les patients atteints du syndrome de Turner n'ont pas de X_i et n'expriment pas Xist.

IV Localisation de l'ARN XIST

L'ARN correspondant au gène XIST est un transcrite de 14 kilobases coiffé en 5' et qui subit un épissage d'introns et polyadénylation en 3'. En effectuant une hybridation *in situ* sur des cellules femelles (XX), on constate que celui-ci est localisé exclusivement dans le noyau des cellules femelles.

a) Pourquoi ce résultat est-il surprenant ?

Réponse : Après maturation et épissage, on s'attend à trouver l'ARN Xist dans le cytoplasme, où a normalement lieu la traduction des ARN messagers.

b) L'analyse de la séquence de l'ARN XIST montre qu'il ne contient aucune phase ouverte de lecture pouvant coder pour une protéine, ce qui est également surprenant. Dans le noyau, on trouve ce transcrite XIST fortement associé au corpuscule de Barr. Imaginez une explication simplifiée de l'extinction du chromosome X par l'ARN XIST.

Réponse : Xist n'est pas un ARNm, puisqu'il ne peut coder pour une protéine. Sa localisation nucléaire, associé au chromosome X_i , suggère qu'il pourrait participer au blocage de la transcription à partir du X_i . Ce blocage pourrait être direct, par une interaction Xist-chromosome, ou indirect, via le recrutement d'un ou plusieurs facteurs (par exemple, des protéines) sur le chromosome éteint. Ce

blochage aboutissant *in fine* à empêcher le recrutement de l'ARN polymérase sur le chromosome X_i. Ce processus semble se dérouler en *cis* : le chromosome X_i exprime Xist qui vient éteindre la transcription autour de son propre gène.

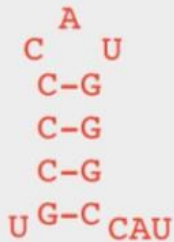
V Structure de l'ARN XIST

L'ARN XIST contient une séquence très conservée, répétée plusieurs fois :



a) Montrez que cette séquence peut former une courte structure en tige-boucle.

Réponse :



Cette séquence est essentielle au mécanisme d'extinction du chromosome X, ce que l'on peut montrer par délétion ou mutation dans le gène XIST, on cherche donc à préciser son rôle

On fixe de manière covalente un oligonucléotide ARN contenant cette courte séquence sur des billes de résine. Ces billes sont mises en présence d'un extrait nucléaire de cellules féminines (XX). Après lavage, on montre que les billes greffées avec l'ARN ont fixé spécifiquement une protéine de 120 kD.

b) Quelle est la fonction de la tige boucle de l'ARN XIST ?

Réponse : La fonction de la tige boucle est probablement de se lier à la protéine de 120 kD.

c) Quel(s) pourrai(en)t-être le(s) rôle(s) de cette protéine dans l'extinction du chromosome X ?

Réponse : Cette protéine, en « couvrant » le chromosome X_i, pourrait contribuer à la condensation du chromosome, pourrait bloquer le recrutement de l'ARN polymérase.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Hélicase et réparation de l'ADN Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Hélicase et réparation de l'ADN

Les photocopies et notes de cours sont autorisés

I-Les hélicases

Les hélicases sont des enzymes qui «débobinent» les deux brins de la double hélice d'ADN. Elles se fixent sur l'un des deux brins qu'elles «tirent» au travers d'un sillon ou d'un trou situé sur leur surface.

- a) Citez trois mécanismes cellulaires dans lesquels interviennent des hélicases.
- b) Toutes les hélicases connues ont besoin d'ATP ou de GTP pour exercer leur fonction. A votre avis, pourquoi ?

II-Le gène *uvrD* et les UV

Le gène *uvrD* d'*Escherichia coli* a été identifié comme conférant un phénotype accru de sensibilité de ces bactéries aux rayonnements UV.

- a) Quelle est le principal type de lésion de l'ADN induit par l'exposition au UV ?
- b) Comment ce type de lésion est-il normalement réparé ?
- c) Les bactéries sont plus sensibles aux UV si immédiatement après l'irradiation, on les met dans l'obscurité complète. Pourquoi ?

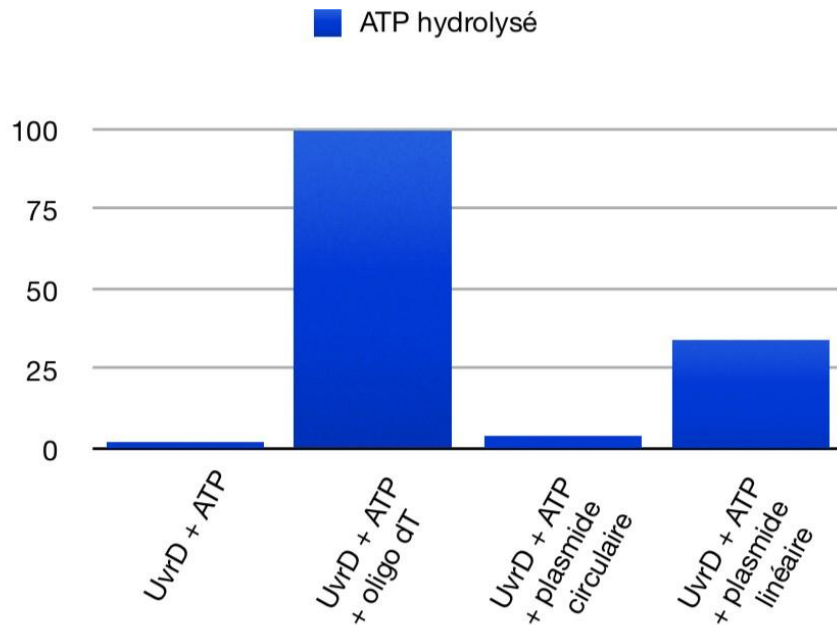
Une mutation dans le gène *uvrD* induit un phénotype accru de sensibilité aux UV, uniquement lorsque les bactéries sont remises dans le noir après irradiation, mais pas si on les laisse à la lumière.

- d) Pourquoi cela-suggère-t-il que la protéine codée par le gène *uvrD* n'intervient pas dans le mécanisme normal de réparation des lésions induites par les UV ?
- e) Par quel(s) autre(s)mécanisme(s) de réparation ces lésions aux UV pourraient être réparées ? Au vu de ce que vous savez sur les mécanismes de réparation de l'ADN, quel rôle pouvez vous proposer pour UvrD dans la réparation de l'ADN ?

III-Activité ATPasique d'UvrD

Le gène *uvrD* a été cloné et code une protéine de poids moléculaire 75 kD (appelée UvrD). L'analyse de sa séquence en acide aminé suggère que cette protéine pourrait être une hélicase ATP-dépendante. La protéine UvrD a été purifiée et on réalise l'expérience suivante pour tester sa capacité à utiliser l'ATP.

- a) On incube une quantité fixe d'UvrD en présence d'ATP radioactif et de différents ADN. On mesure la quantité d'ATP hydrolysé au bout de 30 min. Les résultats sont indiqués sur le tableau suivant :



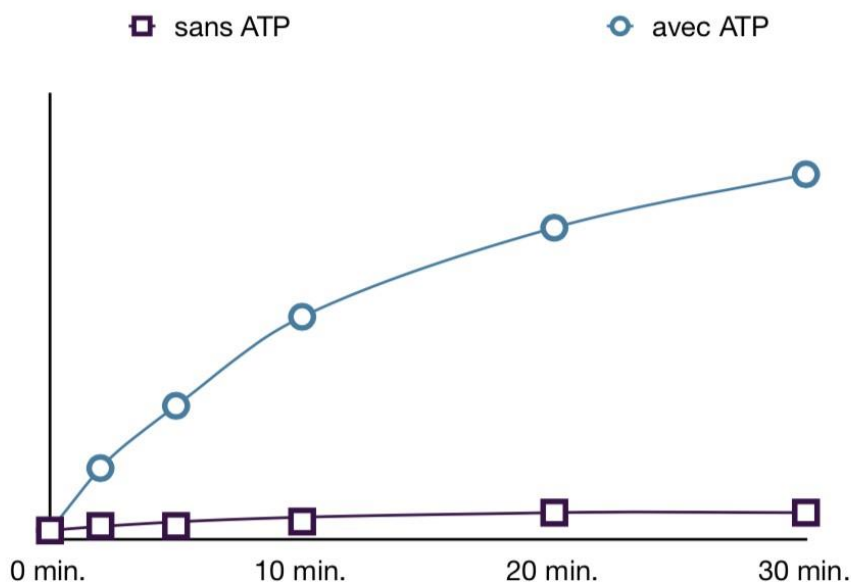
Pour quelle raison UvrD n'hydrolyse pas l'ATP en l'absence d'ADN ?

- b) Interprétez le résultat de cette expérience. Pourquoi il n'y a pratiquement pas d'ATP hydrolysé en présence d'un ADN plasmidique circulaire alors qu'il y en a en présence d'un ADN plasmidique linéaire ? à votre avis, pourquoi l'activité en présence d'ADN synthétique oligo-dT (constitué uniquement de désoxythymidines) est plus importante qu'avec le plasmide linéaire ?

IV-Activité hélicase d'UvrD

Pour mesurer l'activité hélicase d'UvrD, on utilise un substrat constitué d'un fragment d'ADN **double-brin**, marqué radioactivement au phosphore ^{32}P .

On incube ce fragment d'ADN marqué avec UvrD, en présence d'une nucléase spécifique de l'ADN **simple-brin**, qui ne clive l'ADN que lorsqu'il n'est pas apparié en duplex. On mesure alors la libération de mono-nucléotides marqués au ^{32}P en fonction du temps. On obtient les résultats suivants, avec et sans ATP :





Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Hélicase et réparation de l'ADN Correction

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Hélicase et réparation de l'ADN

Les photocopies et notes de cours sont autorisés

I-Les hélicases

Les hélicases sont des enzymes qui «débobinent» les deux brins de la double hélice d'ADN. Elles se fixent sur l'un des deux brins qu'elles «tirent» au travers d'un sillon ou d'un trou situé sur leur surface.

a) Citez trois mécanismes cellulaires dans lesquels interviennent des hélicases.

Réponses possibles : réplication, réparation, recombinaison (réponses plus spécifiques possibles : réparation des mésappariements (MMR), réparation par excision de (NER)).

Barème : 2 points si les trois. 1 point si 2 sur 3.

b) Toutes les hélicases connues ont besoin d'ATP ou de GTP pour exercer leur fonction. A votre avis, pourquoi ?

Réponse: pour fournir de l'énergie pour séparer les brins et pour avancer sur le brin d'ADN (moteur moléculaire).

Barème : 1 point

II-Le gène *uvrD* et les UV

Le gène *uvrD* d'*Escherichia coli* a été identifié comme conférant un phénotype accru de sensibilité de ces bactéries aux rayonnements UV.

a) Quelle est le principal type de lésion de l'ADN induit par l'exposition au UV ?

Réponse: dimères de pyrimidine ou de thymine.

Barème : 2 points

b) Comment ce type de lésion est-il normalement réparé ?

Réponse: Réparation directe par la CPD-photolyase.

Barème : 2 points

c) Les bactéries sont plus sensibles aux UV si immédiatement après l'irradiation, on les met dans l'obscurité complète. Pourquoi ?

Réponse: La CPD-photolyase est activée par la lumière. Elle a besoin de photons pour son activité. A l'obscurité elle est inactive, donc la réparation directe est impossible.

Barème : 2 points

d) Une mutation dans le gène *uvrD* induit un phénotype accru de sensibilité aux UV, uniquement lorsque les bactéries sont remises dans le noir après irradiation, mais pas si on les laisse à la lumière. Pourquoi cela suggère-t-il que la protéine codée par le gène *uvrD* n'intervient pas dans le mécanisme normal de réparation des lésions induites par les UV ?

Réponse: Si UvrD était impliqué dans le mécanisme normal (lumière-dépendant) les mutants UvrD devraient être sensibles aux UV, y compris lorsqu'ils sont exposés à la lumière post-irradiation

Barème : 2 points

e) Par quel(s) autre(s) mécanisme(s) de réparation ces lésions aux UV pourraient être réparées ? Au vu de ce que vous savez sur les mécanismes de réparation de l'ADN, quel rôle pouvez vous proposer pour UvrD dans la réparation de l'ADN ?

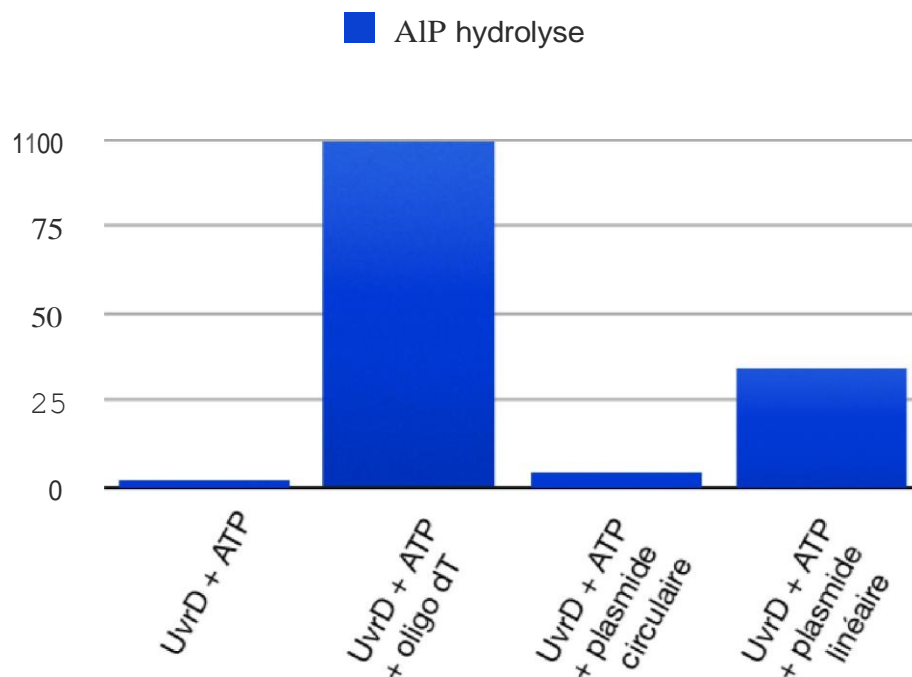
Reponse: Les dimere de thymine sont des lesions etendues (2 bases), deformantes. Le seul autre mecanisme possible est la reparation par excision de nucleotides (NER).

Bareme: 2 points. (1 point seulement si d'autres mecanismes - BER, MMR sont evoques)

111-Activite ATIPasique d'UvrD

Le gene *uvrD* a ete clone et code une proteine de poids moleculaire 75 kD (appelee UvrD). IL'analyse de sa sequence en acide amine suggere que cette proteine pourrait etre une helicase ATP-dependante. la proteine UvrD a ete purifiee et on realise !'experience suivante pour tester sa capacite a utiliser l'ATP.

a) On incube une quantite fixe d'UvrD en presence d'ATIP radioactif et de differents AON. On mesure la quantite d'ATIP hydrolyse au bout de 30 min. Les resultats sont indiques sur le tableau suivant :



Pour quelle raison UvrD n'hydrolyse pas l'ATP en !'absence d'ADN?

Reponse: L'ATIP est requis pour avancer sur l'ADN et fondre les duplexes. En !'absence d'ADN, !'hydrolyse d'ATP est inutile et conduirait a une dissipation futile d'energie

Bareme : ; point

b) Interpretz le resultat de cette experience. Pourquoi ii n'y a pratiquement pas d'ATP hydrolyse en presence d'un AON plasmidique circulaire alors qu'il yen a en presence d'un AON plasmidique lineaire ? a votre, avis, pourquoi l'activite en presence d'ADN synthetique oligo-dT (constitue uniquement de desoxythymidines) est plus importante qu'avec le plasmide lineaire?

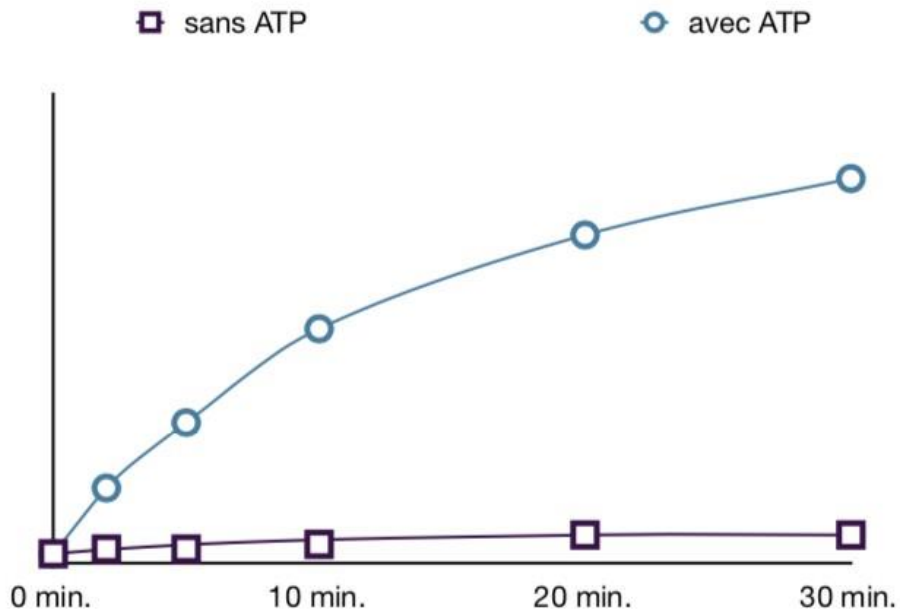
Reponse: Si UvrD est une helicase, elle doit se fixer sur son ADN substrat en «s'enfilant» sur un brin. Sur un AON circulaire, ii n'y a pas d'extremite par laquelle l'helicase peut se fixer, d'ou !'absence d'activite sur cette molecule. LOligo-dT est simple brin, la progression d'une helicase est plus facile que sur un duplexe ou ii faut fondre des paires de bases.

Bareme : 2 points

IV-Activité hélicase d'UvrD

Pour mesurer l'activité hélicase d'UvrD, on utilise un substrat constitué d'un fragment d'ADN **double-brin**, marqué radioactivement au phosphore ^{32}P .

On incube ce fragment d'ADN marqué avec UvrD, en présence d'une nucléase spécifique de l'ADN **simple-brin**, qui ne clive l'ADN que lorsqu'il n'est pas apparié en duplex. On mesure alors la libération de mono-nucléotides marqués au ^{32}P en fonction du temps. On obtient les résultats suivants, avec et sans ATP :



a) Pourquoi est-il nécessaire d'ajouter la nucléase spécifique de l'ADN simple-brin à la réaction pour révéler l'activité hélicase.

Réponse: La nucléase simple brin ne peut couper l'ADN qu'après action de l'hélicase. Elle révèle l'activité car elle permet de cliver l'ADN après ouverture qui, sinon, se ré-hybriderait après le passage de l'hélicase.

Barème : 2 points.

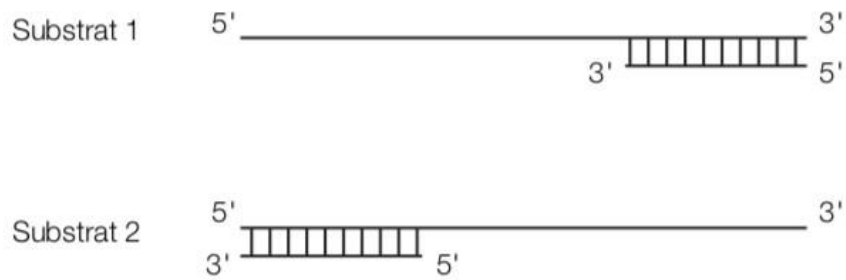
b) Interprétez les résultats. En quoi démontrent-ils qu'UvrD est bien une hélicase ?

Réponse: L'absence d'activité en l'absence d'ATP montre que la nucléase simple-brin seule n'est pas active sur le double brin (contrôle). La libération de mono-nucléotides en présence d'ATP montre l'apparition de d'ADN simple-brin et donc révèle la présence d'une activité hélicase.

Barème : 2 points.

V-Sens de progression d'UvrD

Pour tester l'activité d'UvrD, on utilise maintenant les deux substrats synthétiques représentés sur le schéma ci-dessous, qui sont partiellement simple-brin et partiellement double-brin (les extrémités 5' et 3' sont indiquées) :



L'activité d'UvrD, mesurée avec le test de la question IV est **trois fois plus importante** sur le substrat 1 que sur le substrat 2.

a) Que peut-on en conclure sur le sens de progression de l'hélicase UvrD ($5' \rightarrow 3'$ ou $3' \rightarrow 5'$) ? Justifier votre réponse.

Réponse: Les hélicases lient l'ADN simple-brin qu'elles «tirent» au travers d'un trou ou d'un sillon pour séparer le duplexe en aval. Elles rentrent donc plus facilement par le côté simple-brin des substrats et progressent donc ensuite le long jusqu'à atteindre la partie double-brin. L'activité plus forte sur le substrat 1 suggère un sens de progression $5' \rightarrow 3'$.

Barème: 2 points pour une réponse justifiée, 0 sinon (1 chance sur deux de tomber juste au hasard)

b) Pourquoi est-il logique que l'hélicase ait un sens de progression défini sur l'ADN ?

Réponse: Si l'hélicase n'a pas de sens de progression défini, l'ouverture des brins ne peut se faire correctement (elle avance tantôt dans un sens, tantôt dans l'autre)

Barème: 2 points



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

L'ADN primase Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

L'ADN primase

*Les documents et notes de cours sont autorisés
Les réponses sont à inscrire dans les cadres prévus sur l'énoncé*

L'ADN primase est l'enzyme qui fabrique les amorces **ARN** qui sont utilisées lors du processus de **réplication de l'ADN**. Elle utilise des ribonucleotides triphosphate (NTP = ATP, GTP, CTP et UTP) pour synthétiser un court segment d'ARN complémentaire du brin d'ADN répliqué. Ce court segment d'ARN est ensuite allongé en AON par l'ADN polymérase.

On trouve une enzyme possédant cette activité AON primase dans toutes les cellules vivantes et on s'intéresse à son mécanisme d'action.

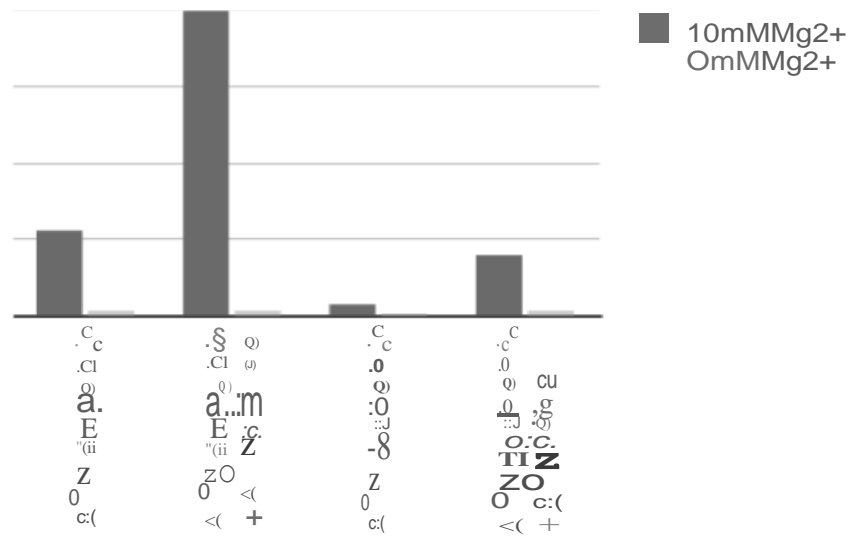
- 1) Dans les différentes espèces où cela a été testé (*Escherichia coli* levure, nematode...) l'inactivation du gène codant pour l'AON primase est létale.
- Pourquoi ce résultat pouvait-il être attendu?
 - Si l'inactivation n'avait pas été létale, quelle aurait pu être l'interprétation ?

- 2) Formellement l'ADN primase est une ARN-polymérase. La longueur moyenne des amorces qu'elle synthétise est d'environ 10 nucléotides. Peut-on dire qu'il s'agit d'une enzyme processive? Pourquoi?

- 3) L'ADN primase est une enzyme peu fidèle, qui fait des erreurs de nucléotide avec un taux d'environ 1 mauvaise incorporation de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} contre 10^{-7} pour l'ADN polymérase. En vous référant au mécanisme de réplication de l'ADN, expliquez pourquoi un tel taux d'erreur est sans conséquence pour la cellule.

4) Dans la suite, on s'intéresse à l'ADN primase des mammifères. On teste son activité sur différents substrats. Pour cela, on incube l'ADN primase purifiée avec des NIP marqués au 3'p, avec de l'ADN simple brin ou de l'ADN double brin comme substrat, en présence ou en l'absence d'ADN hélicase purifiée.

On quantifie la quantité d'ARN radioactif formé par comptage. Les résultats sont résumés ci-dessous :



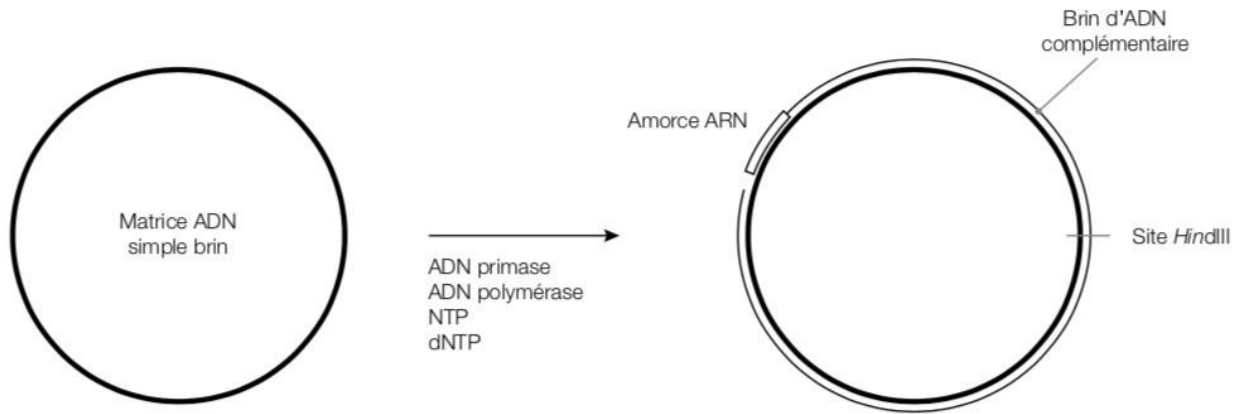
Interprétez ces résultats :

- Quel est le substrat préféré de l'ADN primase ?
- Quel est le rôle de l'ADN hélicase ?
- Pourquoi les ions magnésium sont-ils importants ?

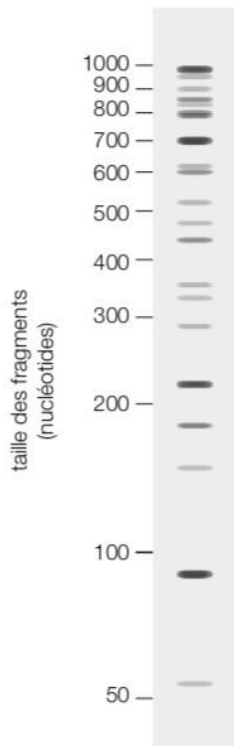
5) On s'intéresse à la spécificité éventuelle de l'ADN primase pour la séquence nucléotidique de l'ADN substrat. Pour cela, on réalise une expérience de réplication d'un brin d'ADN *in vitro* avec un ADN simple brin circulaire comme matrice, que l'on incube en présence de Mg²⁺ avec les éléments suivants :

- L'ADN primase
- L'ADN polymérase
- Les 4 ribonucleotides triphosphate (ATP, GTP, CTP et UTP), marqués au 3'p
- Les 4 desoxyribonucleotides triphosphate (dATP, dGTP, dCTP et dTTP), non marqués.

Dans ces conditions, on obtient l'amorçage par l'ADN primase et l'allongement de l'amorce par l'ADN polymérase. La réaction suit donc le schéma ci-dessous :



Le produit de la réaction est un ADN partiellement double-brin, avec une partie en ARN, laquelle est marquée au ^{32}P . On élimine ensuite les nucléotides, la primase et la polymérase. L'acide nucléique est soumis à une coupure par l'enzyme de restriction *HindIII* qui possède **un seul site de coupure** dans la séquence de l'ADN circulaire utilisé comme matrice.



Les produits de la réaction après coupure par *HindIII* sont analysés par électrophorèse **en conditions dénaturantes** (les duplexes d'acides nucléiques sont dissociés) et révélés par autoradiographie. La taille des fragments radioactifs obtenus est calibrée au moyen de fragments d'ADN de taille connue.

Le résultat est indiqué sur la figure à gauche, que l'on souhaite interpréter pour déterminer la spécificité de reconnaissance de l'ADN primase, c'est à dire les sites où elle démarre la synthèse de l'amorce.

a) Combien de bandes radioactives s'attendrait-on à voir sur l'autoradiographie si il y avait un site **unique** de démarrage sur l'ADN circulaire matrice ?

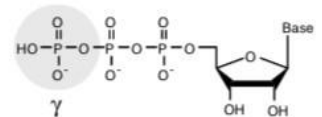
b) Qualitativement qu'attendrait-on sur l'autoradiographie, si le démarrage se produisait de manière **parfaitement aléatoire** sur l'ADN matrice ? Qu'en concluez-vous ?

c) Quelle est la fréquence **moyenne** des sites de démarrage de l'ADN primase sur la matrice d'ADN utilisée ?

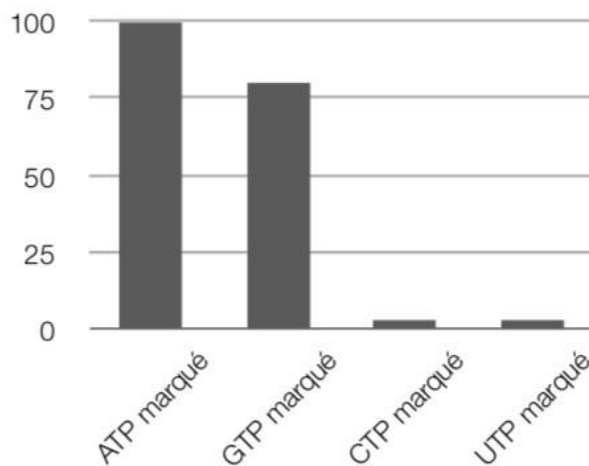
d) Quel est l'intérêt de l'étape de digestion par *HindIII* dans cette expérience ci-dessus ?



1) On cherche à préciser le résultat de l'expérience précédente. Pour cela, on réalise plusieurs expériences de synthèse d'amorce en présence d'un ADN simple-brin matrice et de magnésium. Dans ces expériences, on l'ajoute trois des quatre NTP non-marqués, tandis que le quatrième est marqué au ^{32}P sur son phosphate γ (voir schéma ci-contre).

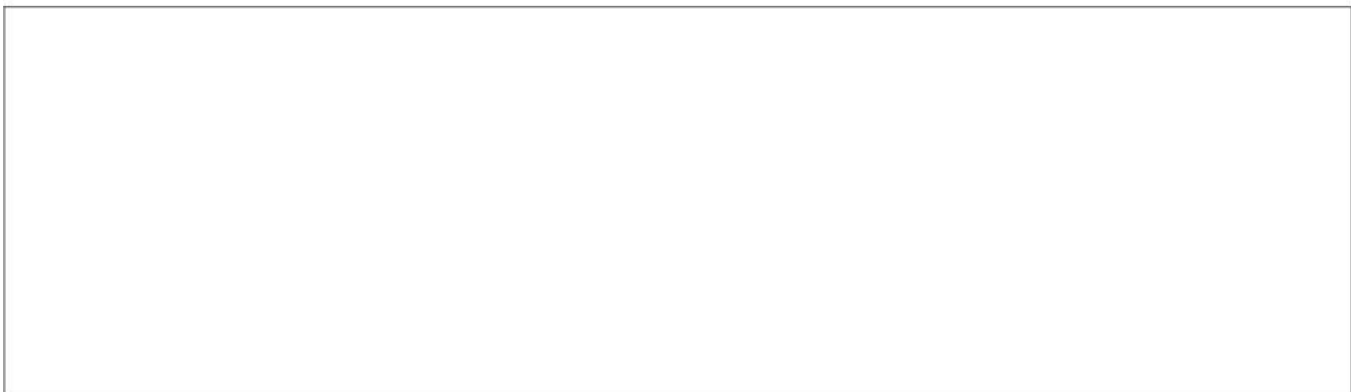


On quantifie ensuite la quantité d'amorce ARN radioactive formée dans chaque cas. Les résultats sont indiqués ci-dessous.



a) A l'issue de la réaction, où trouve-t-on du phosphate radioactif dans l'ARN synthétisé par la primase ?

b) Que pouvez-vous conclure sur la spécificité de l'ADN primase ?





Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

L'ADN primase Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

L'ADN primase

Les documents et notes de cours sont autorisés
Les réponses sont à inscrire dans les cadres prévus sur l'énoncé

L'ADN primase est l'enzyme qui fabrique les amorces **ARN** qui sont utilisées lors du processus de **réplication de l'ADN**. Elle utilise des ribonucléotides triphosphate (NTP = ATP, GTP, CTP et UTP) pour synthétiser un court segment d'ARN complémentaire du brin d'ADN répliqué. Ce court segment d'ARN est ensuite allongé en ADN par l'ADN polymérase.

On trouve une enzyme possédant cette activité ADN primase dans toutes les cellules vivantes et on s'intéresse à son mécanisme d'action.

- 1) Dans les différentes espèces où cela a été testé (*Escherichia coli*, levure, nématode...), l'inactivation du gène codant pour l'ADN primase est létale.
 - a) Pourquoi ce résultat pouvait-il être attendu ?
 - b) Si l'inactivation n'avait pas été létale, quelle aurait pu être l'interprétation ?

a) La primase est indispensable à la réplication de l'ADN : pas de primase => pas d'amorces ARN, pas de fragments d'Okazaki, pas de réplication. Si il n'y a pas de réplication de l'ADN, il n'y a pas non plus de division cellulaire.

b) Dans l'hypothèse où l'inactivation du gène de la primase n'aurait pas été létale, la synthèse des amorces d'ARN étant indispensable à la réplication, cela suggérerait qu'il existe un autre gène de primase ou une autre enzyme capable de synthétiser les amorces, ce qui compenserait l'inactivation de la primase

- 2) Formellement, l'ADN primase est une ARN-polymérase. La longueur moyenne des amorces qu'elle synthétise est d'environ **10 nucléotides**. Peut-on dire qu'il s'agit d'une enzyme processive ? Pourquoi ?

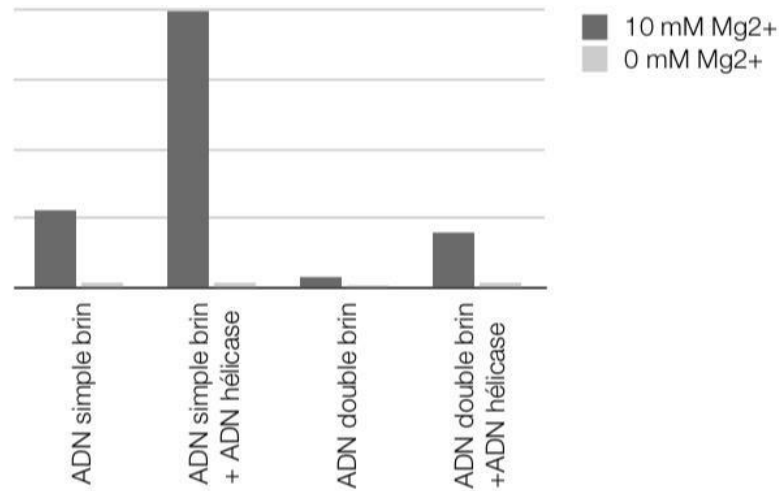
On dit qu'une polymérase est processive quand sa constante $k_{pol} \gg k_{off}$ (cf poly page 25), la processivité P étant le rapport de ces deux constantes. Dans ces conditions $P \gg 1$. Or P est aussi égal à la longueur moyenne $\langle L \rangle$ des fragments synthétisés. Ici $P = \langle L \rangle = 10$, c'est donc une processivité faible. Les polymérases répliquatives ont des processivités considérables ($> 100\ 000$)

- 3) L'ADN primase est une enzyme peu fidèle, qui fait des erreurs de nucléotide avec un taux d'une mauvaise incorporation de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} , contre 10^{-7} pour l'ADN polymérase. En vous référant au mécanisme de réplication de l'ADN, expliquez pourquoi un tel taux d'erreur est sans conséquence pour la cellule.

L'amorce synthétisée par la primase qui sert à débiter les fragment d'Okazaki est en ARN. Elle est éliminée ensuite et remplacée par de l'ADN. Si il y a des erreurs dans la séquence de l'amorce, c'est donc sans conséquence puisque celle-ci ne se retrouve *in fine* dans le brin synthétisé.

- 4) Dans la suite, on s'intéresse à l'ADN primase des mammifères. On teste son activité sur différents substrats. Pour cela, on incube l'ADN primase purifiée avec des NTP marqués au ^{32}P , avec de l'ADN simple brin ou de l'ADN double brin comme substrat, en présence ou non d'ADN hélicase purifiée.

On quantifie la quantité d'ARN radioactif formé par comptage. Les résultats sont résumés ci-dessous :



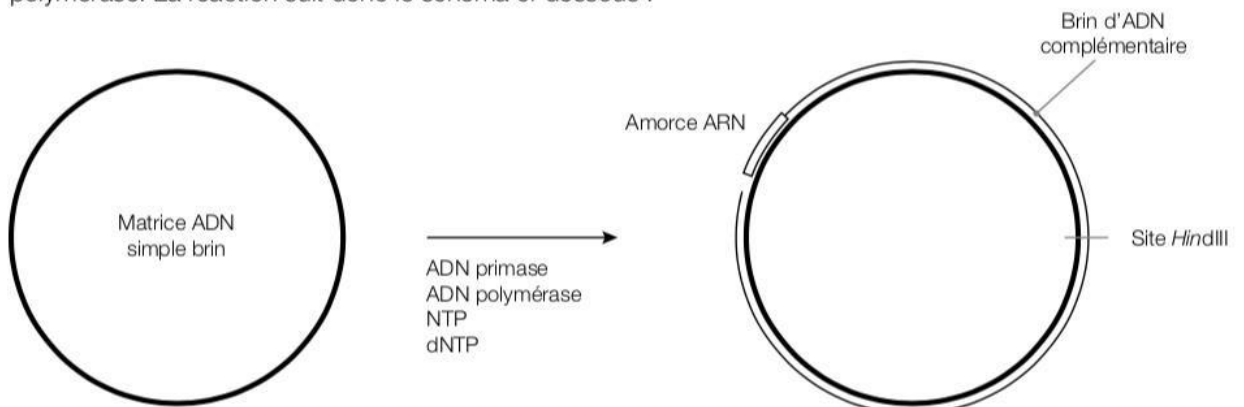
Interprétez ces résultats :

- Quel est le substrat préféré de l'ADN primase ?
- Quel est le rôle de l'ADN hélicase ?
- Pourquoi les ions magnésium sont importants ?

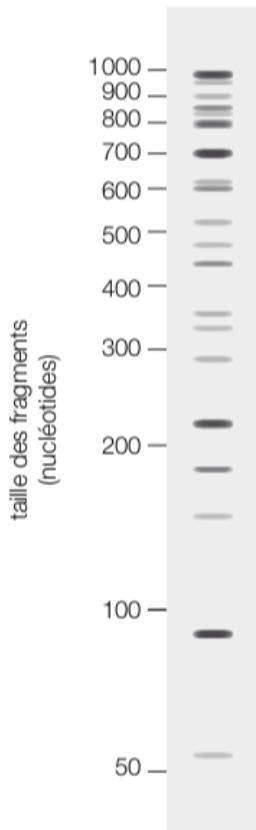
- Le substrat préféré de la primase est l'**ADN simple brin** : on observe aucune activité sur l'ADN double-brin seul.
- Le rôle de l'ADN hélicase est de séparer les deux brins d'une région d'ADN en duplex, ce qui permet de transformer ce dernier en ADN simple brin. L'augmentation d'activité observée sur le simple brin peut être interprétée de deux manières : soit l'hélicase stimule l'activité de la primase, soit elle fait fondre des éventuelles structures secondaires sur l'ADN simple brin (soit les deux...).
- Les ions magnésium agissent comme contre-ions des phosphates dont ils neutralisent les charges. Ceci peut intervenir soit au niveau des triphosphates des NTP utilisés par la primase, soit au niveau du substrat ADN.

- 5) On s'intéresse à la spécificité éventuelle de l'ADN primase pour la séquence nucléotidique de l'ADN substrat. Pour cela, on réalise une expérience de réplication d'un brin d'ADN *in vitro*, avec un ADN **simple brin circulaire** comme matrice, que l'on incube en présence de Mg²⁺ avec les éléments suivants :
- L'ADN primase
 - L'ADN polymérase
 - Les 4 ribonucleotides triphosphate (ATP, GTP, CTP et UTP), **marqués** au ³²P
 - Les 4 désoxyribonucleotides triphosphate (dATP, dGTP, dCTP et dTTP), **non marqués**.

Dans ces conditions, on obtient l'amorçage par l'ADN primase et l'allongement de l'amorce par l'ADN polymérase. La réaction suit donc le schéma ci-dessous :



Le produit de la réaction est un ADN partiellement double-brin, avec une partie en ARN, laquelle est marquée au ³²P. On élimine ensuite les nucléotides, la primase et la polymérase. L'acide nucléique est soumis à une coupure par l'enzyme de restriction *HindIII* qui possède **un seul site de coupure** dans la séquence de l'ADN circulaire utilisé comme matrice.



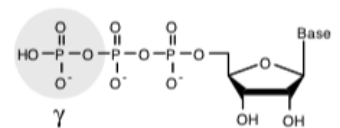
Les produits de la réaction après coupure par *Hind*III sont analysés par électrophorèse **en conditions dénaturantes** (les duplexes d'acides nucléiques sont dissociés) et révélés par autoradiographie. La taille des fragments radioactifs obtenus est calibrée au moyen de fragments d'ADN de taille connue.

Le résultat est indiqué sur la figure à gauche, que l'on souhaite interpréter pour déterminer la spécificité de reconnaissance de l'ADN primase, c'est à dire les sites où elle démarre la synthèse de l'amorce.

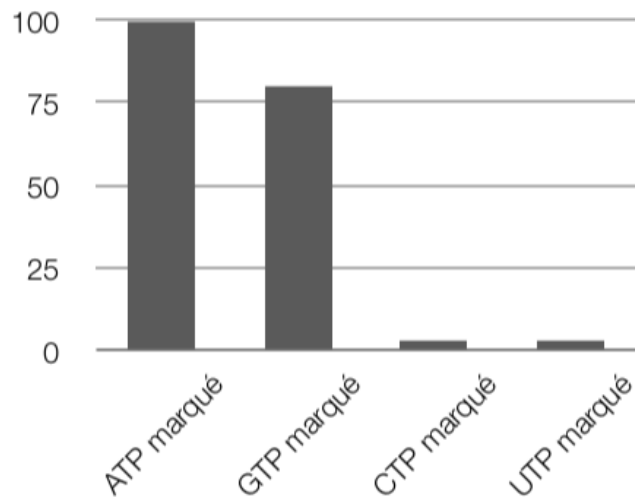
- Combien de bandes radioactives s'attendrait-on à voir sur l'autoradiographie si il y avait un site **unique** de démarrage sur l'ADN circulaire matrice ?
- Qualitativement qu'attendrait-on sur l'autoradiographie, si le démarrage se produisait de manière **parfaitement aléatoire** sur l'ADN matrice ? Qu'en concluez-vous ?
- Quelle est la fréquence **moyenne** des sites de démarrage de l'ADN primase sur la matrice d'ADN utilisée ?
- Quel est l'intérêt de l'étape de digestion par *Hind*III dans cette expérience ci-dessus ?

- Si il y avait un site unique de démarrage, alors la réplication débiterait toujours au même endroit. La coupure *Hind*III s'effectuant également à un site précis, on n'observerait qu'un seul fragment radioactif.
- Si le démarrage était parfaitement aléatoire, la distribution de la taille des fragments devrait aussi être parfaitement aléatoire, c'est à dire former une trainée continue sur le gel. Le fait qu'on observe des bandes distinctes indique que le démarrage de la polymérisation par l'ADN primase s'effectue à des sites spécifiques. Le fait qu'il y ait de nombreuses bandes sur l'autoradiographie indique que ces sites sont multiples.
- On observe environ 20 fragments sur la zone de 1000 nucléotides analysée par l'expérience, ce qui suggère que la fréquence moyenne des sites de démarrage est de 1 tous les 50 nucléotides (1000 / 20).
- La digestion par *Hind*III permet de fournir un point de référence fixe pour analyser la position des sites de démarrage.

- 6) On cherche à préciser le résultat de l'expérience précédente. Pour cela, on réalise plusieurs expériences de synthèse d'amorce en présence d'un ADN simple-brin matrice et de magnésium. Dans ces expériences, on l'ajoute trois des quatre NTP non-marqués, tandis que le quatrième est marqué au ^{32}P sur son phosphate γ (voir schéma ci-contre).



On quantifie ensuite la quantité d'amorce ARN radioactive formée dans chaque cas. Les résultats sont indiqués ci-dessous.



- a) A l'issue de la réaction, où trouve-t-on du phosphate radioactif dans l'ARN synthétisé par la primase ?
- b) Que pouvez-vous conclure sur la spécificité de l'ADN primase ?

Lors de la polymérisation les deux derniers phosphates (β et γ) de chaque NTP sont éliminés. Le traceur radioactif est donc éliminé. Le seul phosphate γ qui persiste est celui qui est porté par le premier nucléotide de l'amorce.

La primase semble démarrer sur une purine (A ou G), avec une préférence pour le A, puisqu'on ne retrouve pas de radioactivité dans l'amorce quand c'est le CTP ou l'UTP qui sont marqués, ce qui indique qu'on ne trouve pas d'amorce démarrant par un C ou un U.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Virus du Sarcome de Kaposi et ARN non-codant Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Virus du Sarcome de Kaposi et ARN non-codant

*Les documents et notes de cours sont autorisés
Les réponses sont à inscrire dans les cadres prévus sur l'énoncé*

Le sarcome de Kaposi est une pathologie opportuniste qui frappe les patients atteints du SIDA. C'est un cancer de la peau causé par un virus à ADN de la famille de l'herpès, appelé HHV-8. Ce virus a deux phases, une phase latente, où le virus est peu transcrit et une phase lytique où la transcription virale est très active et conduit à la production de nouveaux virus.

Lors de la phase lytique, on constate l'accumulation très forte d'un ARN du virus **dans le noyau**. Cet ARN est **polyadénylé en 5'** et **coiffé en 3'**, il n'est pas épissé et ne code pour aucune protéine. On l'appelle **ARN PAN** (pour PolyAdénylé & Nucleaire). Son rôle semble être de s'associer aux snRNP de la cellule infectée et d'agir sur l'épissage des ARNm viraux.

On s'intéresse aux mécanismes permettant l'accumulation de l'ARN PAN viral dans le noyau où il peut représenter jusqu'à 80% des ARN nucléaires lors de l'infection.

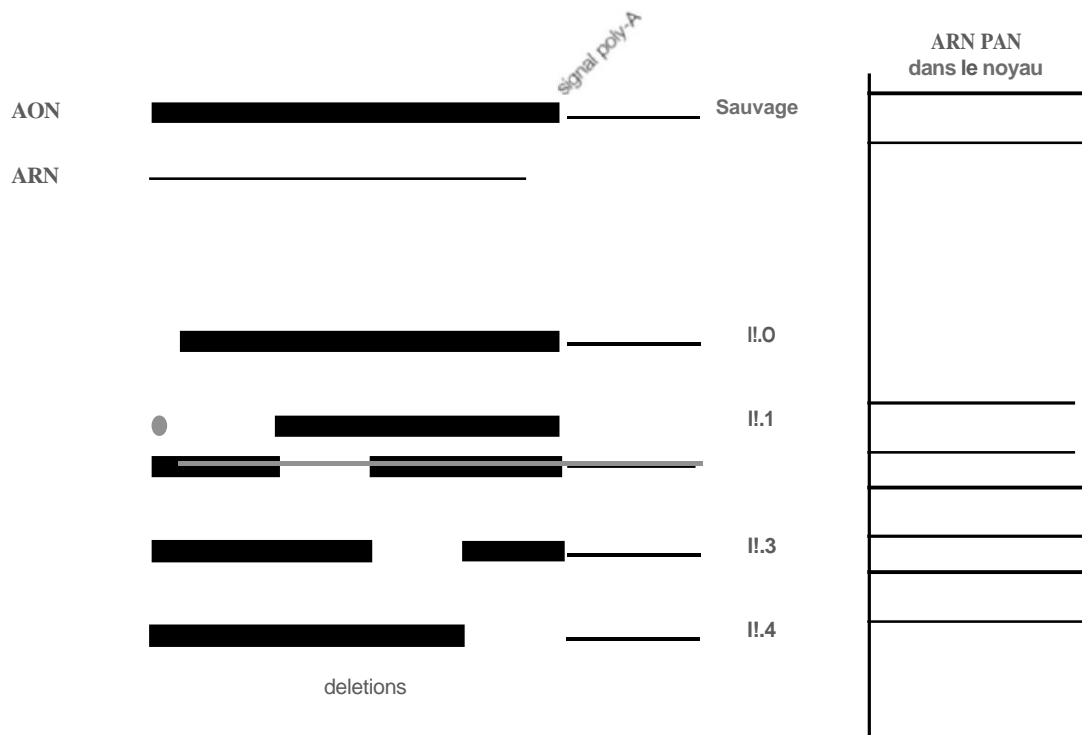
- 1) De manière générale, quel que soit l'organisme, il y a **deux** grands processus antagonistes qui vont contrôler le niveau d'un ARN donné en régime stationnaire. Quels sont ces deux grands processus ?

- 2) On mesure la durée de vie de l'ARN PAN dans les cellules infectées. Cette durée de vie est de plus de 24 h, alors que la durée de vie d'un ARNm standard est de l'ordre de 10-15 min.

- a) Quelle est à votre avis la cause principale d'accumulation de l'ARN PAN dans les cellules infectées ?
b) Quel type d'expérience feriez vous pour mesurer la durée de vie d'un ARN dans une cellule ?

- 3) On cherche à comprendre les raisons de la stabilité de l'ARN PAN. Pour cela, on effectue des constructions comportant diverses délétions dans le gène codant pour cet ARN, qui sont ensuite transfectées dans des cellules. Après incubation, on mesure alors la quantité d'ARN PAN dans leur noyau.

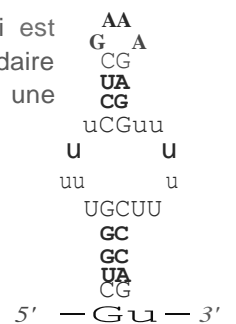
Le résultat est indiqué sur la figure ci-après :



La quantité d'ARN s'accumulant dans le noyau est indiquée par l'histogramme à droite, pour les 5 constructions déletées (60, 61, 62, 63, 64) et pour la construction non-déletée (sauvage) qui sert de témoin.

- Ouel est l'explication la plus logique de la perte d'ARN PAN pour la construction 60?
- Que peut-on conclure pour les autres deletions?

- L'analyse effectuée grâce aux délétions permet d'identifier une zone de l'ARN PAN qui est responsable de sa stabilité exceptionnelle. On effectue une prédiction de structure secondaire de cette zone avec un programme informatique. Le résultat indiqué ci-contre montre une grande boucle interne et une petite boucle terminale :



En quoi la boucle terminale peut-elle favoriser cette structure?

- On veut comprendre le rôle de la structure secondaire ci-dessus. Pour cela on fait une expérience de digestion ménagée par une ribonucléase. On effectue cette digestion soit sur l'ARN PAN entier, soit sur un

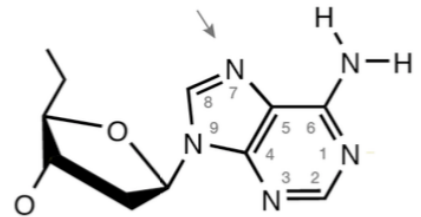
court oligonucléotide ARN correspondant juste à la structure dessinée à la question précédente.

Dans le cas de l'ARN-PAN entier, la structure ci-dessus est entièrement résistante à l'action de la nucléase. Dans le cas de l'oligonucléotide ARN, la structure ci-dessus est digérée au niveau de la boucle interne.

- a) Quelle type de séquence nucléotidique pourrait interagir avec la boucle interne ?
- b) Qu'est ce que cette expérience suggère sur la structure de l'ARN PAN entier ?

- 5) On incube l'oligonucléotide ARN court contenant la structure ci-dessus avec un second oligonucléotide ARN composé de 6 A consécutifs : 5'-AAAAAA-3'. On constate que les deux s'associent. On teste alors la réactivité des adénines de ce second oligonucléotide vis à vis d'un agent alkylant qui réagit avec la position N7 des adénines.

On constate que les adénines de l'oligonucléotide 5'-AAAAAA-3' sont protégées de l'action de l'agent alkylant lorsqu'elles sont associées à l'oligonucléotide contenant la structure secondaire (schéma de la question 4), alors qu'elles sont réactives dans l'oligonucléotide seul.



- a) Quel(s) type(s) d'appariement font intervenir la position N7 des adénines ?
- b) Quel(s) type(s) de structures d'acides nucléiques pourrai(en)t expliquer l'interaction des deux oligonucléotides et la protection des adénines contre l'agent alkylant ?

- 6) La dégradation des ARN dans le noyau commence par leur déadénylation (digestion de la queue poly(A) par des exonucléases). Proposez un mécanisme expliquant la stabilité de l'ARN-PAN



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Virus du Sarcome de Kaposi et ARN non-codant Correction

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Virus du Sarcome de Kaposi et ARN non-codant

Les documents et notes de cours sont autorisés
Les réponses sont à inscrire dans les cadres prévus sur l'énoncé

Le sarcome de Kaposi est une pathologie opportuniste qui frappe les patients atteints du SIDA. C'est un cancer de la peau causé par un virus à ADN de la famille de l'herpès, appelé HHV-8. Ce virus a deux phases, une phase latente, où le virus est peu transcrit et une phase lytique où la transcription virale est très active et conduit à la production de nouveaux virus.

Lors de la phase lytique, on constate l'accumulation très forte d'un ARN du virus **dans le noyau**. Cet ARN est **polyadénylé en 5'** et **coiffé en 3'**, il n'est pas épissé et ne code pour aucune protéine. On l'appelle **ARN PAN** (pour PolyAdénylé & Nucleaire). Son rôle semble être de s'associer aux snRNP de la cellule infectée et d'agir sur l'épissage des ARNm viraux.

On s'intéresse aux mécanismes permettant l'accumulation de l'ARN PAN viral dans le noyau où il peut représenter jusqu'à 80% des ARN nucléaires lors de l'infection.

- 1) De manière générale, quel que soit l'organisme, il y a **deux** grands processus antagonistes qui vont contrôler le niveau d'un ARN donné en régime stationnaire. Quels sont ces deux grands processus ?

La quantité totale d'ARN est déterminée d'une part par son **taux de synthèse**, c'est à dire son niveau de transcription, et d'autre part par son **taux de dégradation**. C'est le rapport entre production et destruction qui détermine la concentration d'ARN en régime stationnaire.

- 2) On mesure la durée de vie de l'ARN PAN dans les cellules infectées. Cette durée de vie est de plus de 24 h, alors que la durée de vie d'un ARNm standard est de l'ordre de 10-15 min.

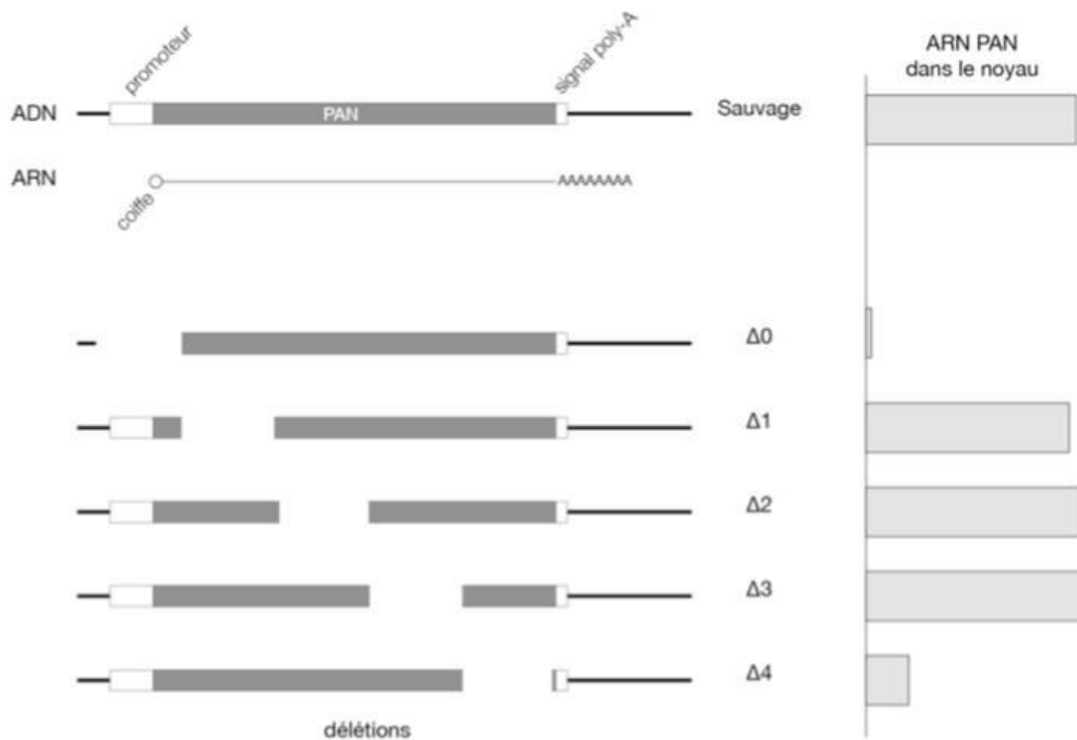
- a) Quelle est à votre avis la cause principale d'accumulation de l'ARN PAN dans les cellules infectées ?
b) Quel type d'expérience feriez vous pour mesurer la durée de vie d'un ARN dans une cellule ?

a) C'est la stabilité de cet ARN, c'est à dire sa **faible vitesse de dégradation**.

b) On fait une expérience de type «*pulse-chase*», c'est à dire un marquage radioactif pendant une durée très brève (au ^{32}P), le *pulse*, suivi d'une période de culture en l'absence de radioactivité (la *chasse* ou *chase* en anglais), où on suit la disparition progressive de la radioactivité incorporée dans l'ARN pendant le *pulse*. La vitesse de disparition de la radioactivité correspond à la durée de vie de l'ARN marqué dans la cellule.

- 3) On cherche à comprendre les raisons de la stabilité de l'ARN PAN. Pour cela, on effectue des constructions comportant diverses délétions dans le gène codant pour cet ARN, qui sont ensuite transfectées dans des cellules. Après incubation, on mesure alors la quantité d'ARN PAN dans leur noyau.

Le résultat est indiqué sur la figure ci-après :



La quantité d'ARN s'accumulant dans le noyau est indiquée par l'historgramme à droite, pour les 5 constructions délétées ($\Delta 0$, $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 4$) et pour la construction non-délétée (sauvage) qui sert de témoin.

- Quel est l'explication la plus logique de la perte d'ARN PAN pour la construction $\Delta 0$?
- Que peut-on conclure pour les autres délétions ?

- Dans la construction $\Delta 0$, il n'y a plus de promoteur. L'explication la plus simple est que l'ARN PAN n'est plus transcrit.
- Les constructions $\Delta 1$ à $\Delta 3$ ont un taux d'accumulation d'ARN dans le noyau comparable au sauvage, on peut donc en conclure que les régions délétées correspondantes ne sont pas impliquées dans la stabilité de l'ARN PAN. En revanche, dans la construction $\Delta 4$, on constate une baisse sensible de l'accumulation de l'ARN PAN. On en conclut que **la région 3' terminale de l'ARN PAN est importante pour sa stabilité**, car c'est elle qui est délétée dans la construction $\Delta 4$.

- L'analyse effectuée grâce aux délétions permet d'identifier une zone de l'ARN PAN qui est responsable de sa stabilité exceptionnelle. On effectue une prédiction de structure secondaire de cette zone avec un programme informatique. Le résultat indiqué ci-contre montre une grande boucle interne et une petite boucle terminale :

En quoi la boucle terminale peut-elle favoriser cette structure ?



La boucle terminale (GAAA) est du type GNRA, c'est une **tétraboucle hyperstable** qui est donc de nature à favoriser cette structure.

- On veut comprendre le rôle de la structure secondaire ci-dessus. Pour cela on fait une expérience de digestion ménagée par une ribonucléase. On effectue cette digestion soit sur l'ARN PAN entier, soit sur un court oligonucléotide ARN correspondant juste à la structure dessinée à la question précédente.

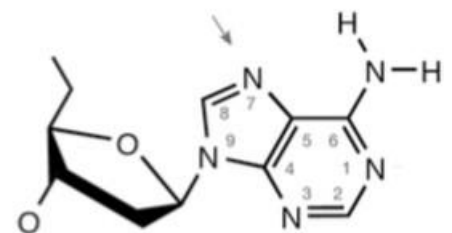
Dans le cas de l'ARN-PAN entier, la structure ci-dessus est entièrement résistante à l'action de la nucléase. Dans le cas de l'oligonucléotide ARN, la structure ci-dessus est digérée au niveau de la boucle interne.

- Quelle type de séquence nucléotidique pourrait interagir avec la boucle interne ?
- Qu'est ce que cette expérience suggère sur la structure de l'ARN PAN entier ?

La boucle interne ne contient que des U, d'un coté comme de l'autre. On peut raisonnablement imaginer que ces séquences interagisse avec une séquence composée de A, par exemple la queue poly-A de l'ARN mature. On peut donc supposer que, dans l'ARN entier, la queue poly-A se replie et s'apparie avec les uridines cette boucle, ce qui permettrait de former une sorte de pseudonœud au niveau de l'extrémité 3' de l'ARN PAN.

- On incube l'oligonucléotide ARN court contenant la structure ci-dessus avec un second oligonucléotide ARN composé de 6 A consécutifs : 5'-AAAAAA-3'. On constate que les deux s'associent. On teste alors la réactivité des adénines de ce second oligonucléotide vis à vis d'un agent alkylant qui réagit avec la position N7 des adénines.

On constate que les adénines de l'oligonucléotide 5'-AAAAAA-3' sont protégées de l'action de l'agent alkylant lorsqu'elles sont associés à l'oligonucléotide contenant la structure secondaire (schéma de la question 4), alors qu'elles sont réactives dans l'oligonucléotide seul.



- Quel(s) type(s) d'appariement font intervenir la position N7 des adénines ?
- Quel(s) type(s) de structures d'acides nucléiques pourrai(en)t expliquer l'interaction des deux oligonucléotides et la protection des adénines contre l'agent alkylant ?

a) Les positions N7 des adénines interviennent dans les appariements Hoogsteen ou reverse Hoogsteen, mais pas dans les appariements Watson-Crick.

b) La présence de paires Hoogsteen ou reverse-Hoogsteen évoque la présence de triplets de bases, par exemple U-A-U, où le A forme d'une part un appariement Watson-Crick avec un U et d'autre part un appariement (reverse-)Hoogsteen avec l'autre U (cf poly, figure 1-12).

- La dégradation des ARN dans le noyau commence par leur déadénylation (digestion de la queue poly(A) par des exonucléases). Proposez un mécanisme expliquant la stabilité de l'ARN-PAN

Le masquage de la queue poly-A par la structure avec la boucle interne riche en U pourrait empêcher l'action des RNAses. La structure en triplex formée est très stable et stabiliserait fortement l'ARN PAN dans le noyau.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Le Virus de la Grippe Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

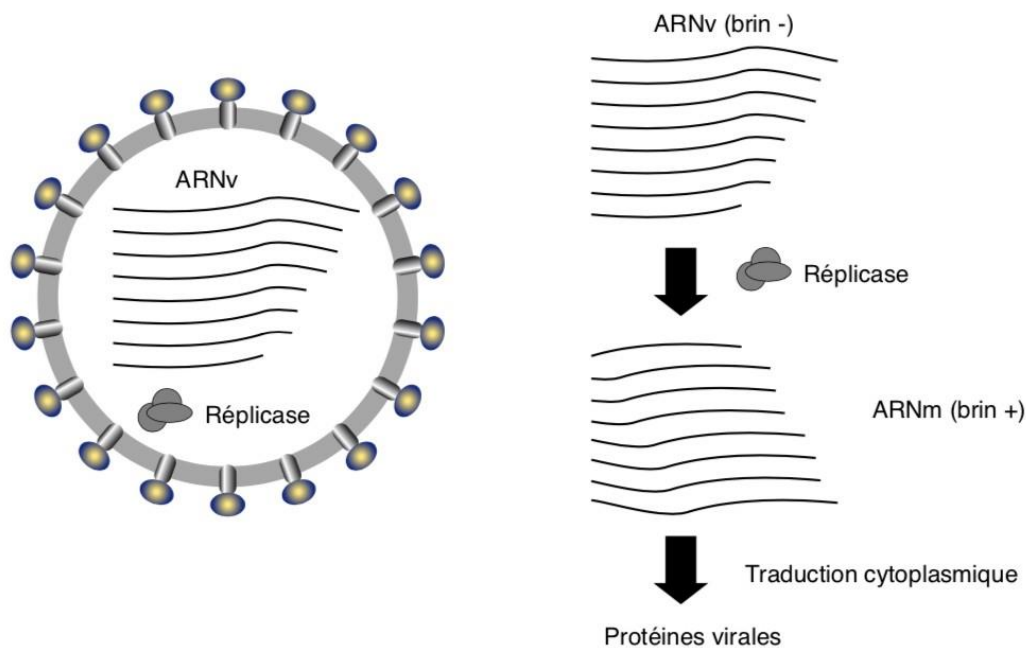
Le Virus de la Grippe

*Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé*

La grippe saisonnière annuelle est causée par le virus influenza A. Ce virus a la particularité d'avoir un **génom**e **segmenté**, composé de **8 différents ARN** simple brin encapsidés ensemble dans la particule virale (les segments génomiques, appelés **ARNv**).

Le virus de la grippe est de plus un virus à **ARN négatif**, c'est à dire que les 8 ARN viraux encapsidés ne sont pas directement codants, mais sont **complémentaires des ARN messagers viraux** qui permettent de produire les différentes protéines virales.

La réplication virale nécessite donc d'abord la réplication de ces 8 ARNv (brin -) en ARN messagers (brin +) qui permettront ensuite la production des différentes protéines virales. C'est la **réplicase** virale qui assure cette étape de réplication. La réplicase est une enzyme composée de trois sous-unités, codées par trois des segments du virus. Elle est présente à l'intérieur de la particule virale.



A gauche, la particule virale avec les 8 segments d'ARN viraux. Le virus contient également de la réplicase. A droite le processus de réplication dans la cellule infectée : la réplicase synthétise les ARNm viraux complémentaires des ARNv. Ils sont ensuite traduits en protéines par la machinerie cellulaire

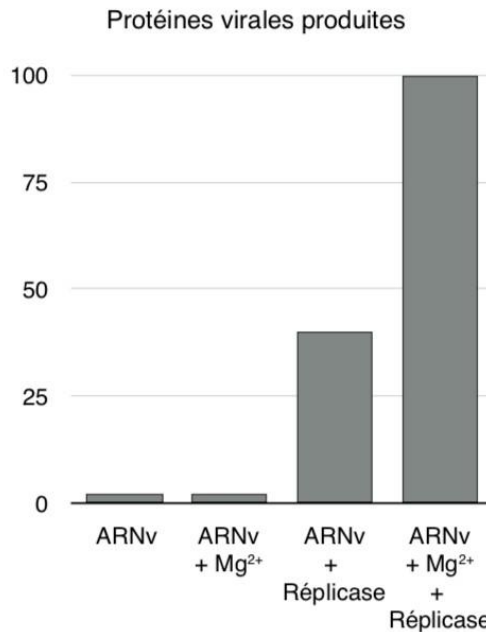
Le présent problème a pour objet d'étudier le mécanisme de synthèse et de traduction des ARNm du virus influenza A.

1) Quel peut-être l'intérêt pour le virus d'avoir un génome segmenté en 8 ARN indépendants ?

2) On élabore un système permettant d'analyser *in vitro* la synthèse des protéines virales. Ce système est constitué d'un lysat de cellules humaines (réticulocytes) contenant tous les composants nécessaires à la traduction (ribosomes, facteurs, ARNt, acides aminés, nucléotides...).

Dans ce système, on introduit les ARN viraux extraits d'une préparation de virus de la grippe et débarrassés des protéines virales. On ajoute éventuellement de la réplicase virale purifiée au système et du magnésium (Mg^{2+}) lors de l'incubation.

On quantifie les protéines virales synthétisées dans ce système, le résultat est indiqué ci-après :



Interprétez les résultats de cette expérience :

- a) Pourquoi n'a-t-on pas de protéines virales produites en l'absence de réplicase ?
- b) Quel peut-être le rôle du magnésium ?
- c) A votre avis, pourquoi trouve-t-on de la réplicase dans la particule virale ?

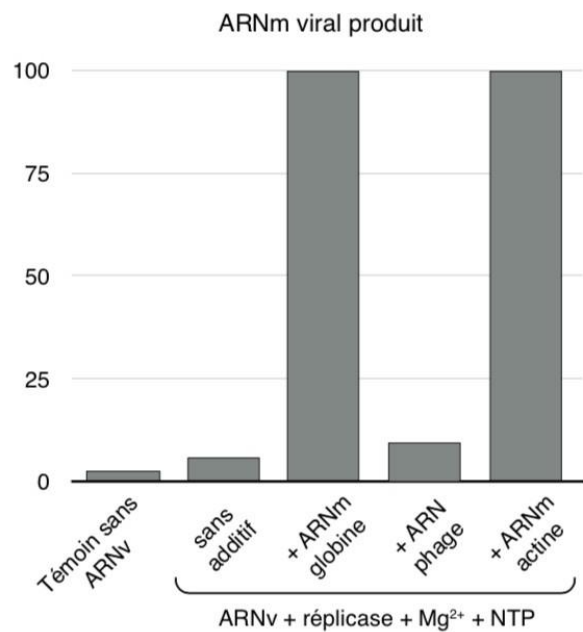
4) Quels sont les éléments indispensables que doit posséder un ARN messenger pour pouvoir être traduit ? A quel moment ces éléments sont ils introduits dans l'ARN ?
(question de cours appelant une réponse **synthétique**)

5) Les réticulocytes utilisés pour faire le lysat de traduction de la question 1) sont des cellules **dépourvues de noyau**. Les activités enzymatiques habituellement spécifiques du noyau sont donc **absentes** dans ce lysat. Que pouvez vous en conclure sur l'incorporation des éléments nécessaires à la traduction des ARN messagers viraux ?

6) On réalise à nouveau une expérience de traduction *in vitro* avec le lysat de réticulocytes, comme à la question 1). On ajoute des ARN_v, de la réplicase et du magnésium. Après incubation, on réalise une co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-eIF4E. On analyse alors les ARN présents dans le précipité, parmi ceux-ci on trouve les ARNm viraux. Que pouvez vous en conclure ? Pourquoi est-ce surprenant ? En quoi est-ce que ça explique en partie la production de protéines virales ?

7) Des expériences antérieures ont montré que la synthèse des ARNm du virus de la grippe est stimulée par la présence d'autres ARN. Pour analyser cet effet et comprendre le mécanisme de synthèse des ARNm viraux, on réalise l'expérience suivante :

On effectue une synthèse d'ARNm *in vitro*, sans recourir à un lysat, dans un système reconstitué composé uniquement d'ARN_v, de réplicase, de magnésium et des 4 NTP. On ajoute également à ce mélange différents autres ARN matures purifiés. Le résultat de l'expérience est indiqué sur le graphe ci-contre (à droite) :



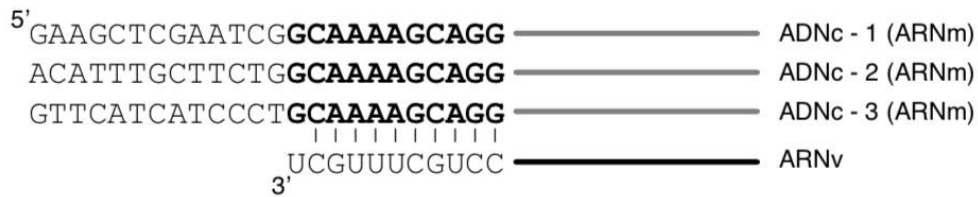
a) Quelle(s) caractéristique(s) structurale(s) est commune aux deux ARNm testés et absente dans l'ARN du phage (transcrit dans une bactérie).

b) Interprétez le résultat de cette expérience en proposant une explication à la stimulation observée de la synthèse des ARNm viraux pour deux des expériences

c) Comment feriez vous pour quantifier les ARN viraux produits dans ce test ?

(plusieurs réponses possibles, une seule me suffit)

8) On purifie des ARNm messagers viraux à partir de cellules infectées par le virus. A partir de ceux-ci on synthétise *in vitro* une collection d'ADN complémentaires que l'on séquence individuellement. Voici les séquences de plusieurs de ces ADNc au niveau de ce qui correspond à l'extrémité 5' de l'ARNm codant la neuraminidase (l'une des protéines de surface du virus).



On constate que ces ADNc portent tous une extension d'environ 13 nucléotides, au delà de l'extrémité 3' de l'ARNv complémentaire.

a) En tenant compte des observations réalisées aux questions précédentes, proposez un mécanisme expliquant la présence et l'origine de cette extension ? Pourquoi est-elle variable d'un ADNc isolé à l'autre ?

b) En quoi cela pourrait contribuer à l'expression des protéines du virus de la grippe ?

c) La réplicase virale possède une activité endonucléasique, capable de couper l'ARN simple brin, à quoi pourrait-elle servir dans ce mécanisme?

Question indépendante de ce qui précède

9) L'une des protéines du virus de la grippe interagit avec la protéine CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) dans le noyau et en bloque le fonctionnement normal. Quel est l'impact de ce mécanisme sur la cellule infectée et quel est l'avantage pour le virus ?



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Le Virus de la Grippe Correction

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

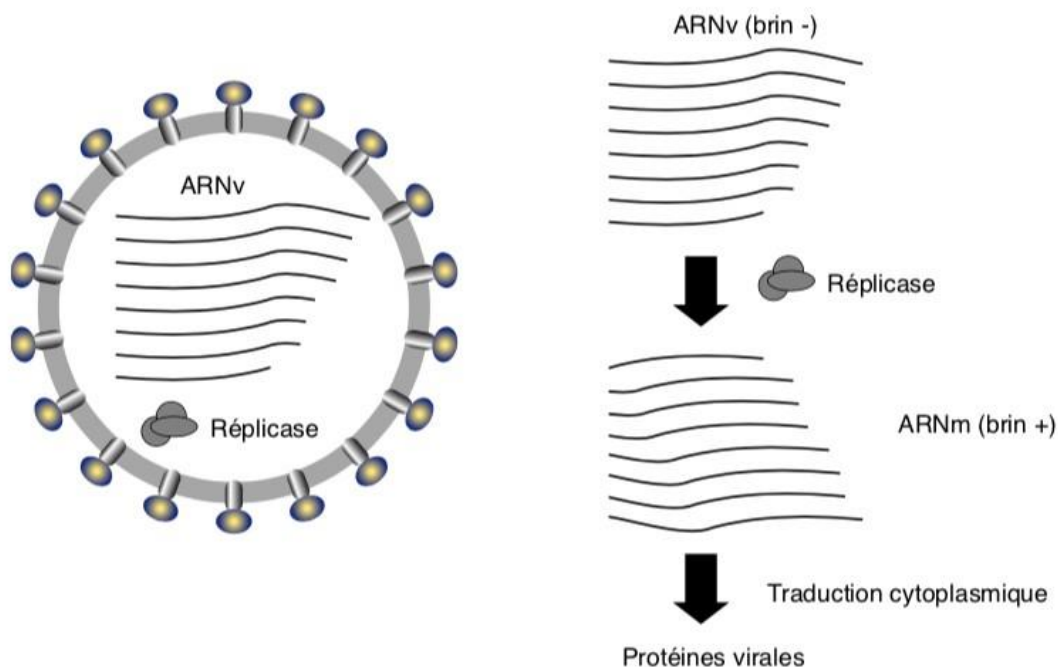
Le Virus de la Grippe

*Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé*

La grippe saisonnière annuelle est causée par le virus influenza A. Ce virus a la particularité d'avoir un **génom**e **segmenté**, composé de **8 différents ARN** simple brin encapsidés ensemble dans la particule virale (les segments génomiques, appelés **ARNv**).

Le virus de la grippe est de plus un virus à **ARN négatif**, c'est à dire que les 8 ARN viraux encapsidés ne sont pas directement codants, mais sont **complémentaires des ARN messagers viraux** qui permettent de produire les différentes protéines virales.

La réplication virale nécessite donc d'abord la réplication de ces 8 ARNv (brin -) en ARN messagers (brin +) qui permettront ensuite la production des différentes protéines virales. C'est la **réplicase** virale qui assure cette étape de réplication. La réplicase est une enzyme composée de trois sous-unités, codées par trois des segments du virus. Elle est présente à l'intérieur de la particule virale.



A gauche, la particule virale avec les 8 segments d'ARN viraux. Le virus contient également de la réplicase. A droite le processus de réplication dans la cellule infectée : la réplicase synthétise les ARNm viraux complémentaires des ARNv. Ils sont ensuite traduits en protéines par la machinerie cellulaire

Le présent problème a pour objet d'étudier le mécanisme de synthèse et de traduction des ARNm du virus influenza A.

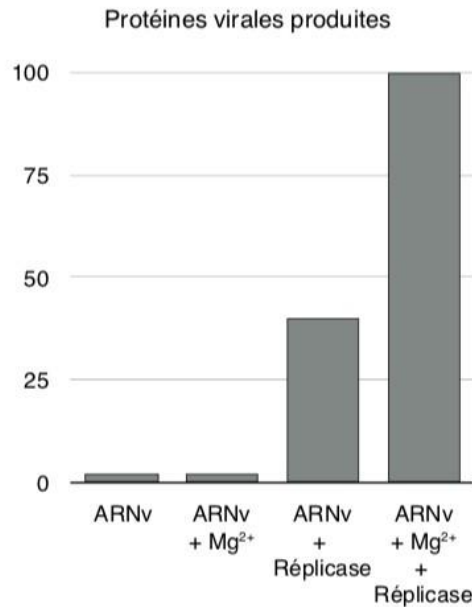
1) Quel peut-être l'intérêt pour le virus d'avoir un génome segmenté en 8 ARN indépendants ?

Le virus de la grippe effectue son cycle dans des cellules eucaryotes, les ARNm des cellules eucaryotes sont en principe monocistroniques (1 ARN => 1 protéine). En ayant 8 ARN indépendants, le virus peut ainsi facilement produire les différentes protéines virales de manière indépendante (chaque ARN permet de produire une protéine du virus) (2 points)

2) On élabore un système permettant d'analyser *in vitro* la synthèse des protéines virales. Ce système est constitué d'un lysat de cellules humaines (réticulocytes) contenant tous les composants nécessaires à la traduction (ribosomes, facteurs, ARNt, acides aminés, nucléotides...).

Dans ce système, on introduit les ARN viraux extraits d'une préparation de virus de la grippe et débarassés des protéines virales. On ajoute éventuellement de la réplicase virale purifiée au système et du magnésium (Mg^{2+}) lors de l'incubation.

On quantifie les protéines virales synthétisées dans ce système, le résultat est indiqué ci-après :



Interprétez les résultats de cette expérience :

- Pourquoi n'a-t-on pas de protéines virales produites en l'absence de réplicase ?
- Quel peut-être le rôle du magnésium ?
- A votre avis, pourquoi trouve-t-on de la réplicase dans la particule virale ?

a) Parce que les ARN viraux (ARNv) sont des ARN **négatifs** et pas des ARNm **positifs**. Il faut donc d'abord les répliquer pour produire les ARNm complémentaires, avant de pouvoir traduire ces derniers en protéines. Ceci nécessite l'intervention de la réplicase. **(2 points)**

b) Le magnésium est un **contre-ion** des phosphates présents dans les ARN et les nucléotides (NTP). Il est souvent nécessaire à l'activité des différentes enzymes agissant sur les acides nucléiques. **(1 point)**

c) La cellule que le virus infecte ne contient a priori pas de protéines virales et donc pas de réplicase. Si le virus n'apporte pas avec lui la réplicase, la réplication des ARNv négatifs en ARNm positifs n'est pas possible et la réplication virale ne peut avoir lieu **(1 point)**

- 4) Quels sont les éléments indispensables que doit posséder un ARN messager pour pouvoir être traduit ? A quel moment ces éléments sont ils introduits dans l'ARN ?
(question de cours appelant une réponse **synthétique**)

Une **coiffe** en 5' + Une **queue poly-A** en 3'. Ces deux éléments sont introduits **co-transcriptionnellement**, au moment de la synthèse de l'ARNm par l'ARN polymérase, **dans le noyau**. **(2 points)**

- 5) Les réticulocytes utilisés pour faire le lysat de traduction de la question 1) sont des cellules **dépourvues de noyau**. Les activités enzymatiques habituellement spécifiques du noyau sont donc **absentes** dans ce lysat. Que pouvez vous en conclure sur l'incorporation des éléments nécessaires à la traduction des ARN messagers viraux ?

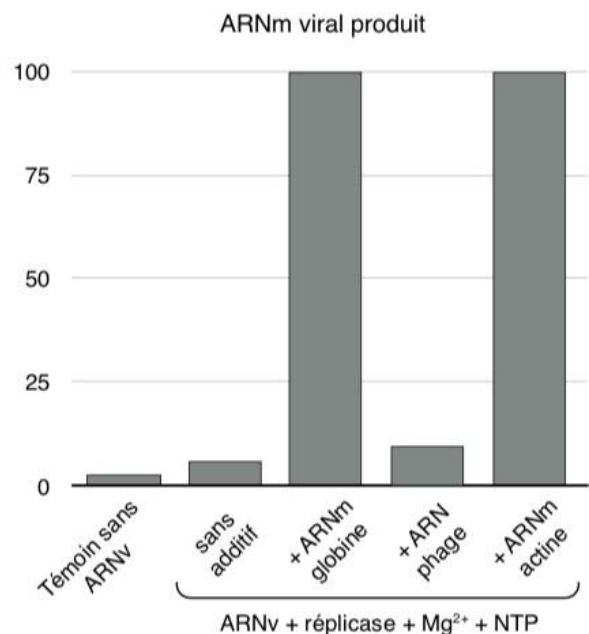
Les réticulocytes étant dépourvus de noyau, ils ne contiennent ni les enzymes nécessaires à l'incorporation de la coiffe (5'-triphosphatase, guanylyl-transférase, méthyl-transférase), ni celle qui permet la synthèse de queue poly-A (Poly-A polymérase). On s'attend donc à ce que les ARNm viraux synthétisés dans ces lysats soient **dépourvus de coiffe et de queue poly-A** (1 point)

- 6) On réalise à nouveau une expérience de traduction *in vitro* avec le lysat de réticulocytes, comme à la question 1). On ajoute des ARNv, de la réplicase et du magnésium. Après incubation, on réalise une co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-eIF4E. On analyse alors les ARN présents dans le précipité, parmi ceux-ci on trouve les ARNm viraux. Que pouvez vous en conclure ? Pourquoi est-ce surprenant ? En quoi est-ce que ça explique en partie la production de protéines virales ?

La co-immunoprécipitation des ARNm viraux par des anticorps anti-eIF4E indique que ces ARNm sont associés à eIF4E et donc qu'ils **contiennent une coiffe**, puisque eIF4E est la protéine de liaison à la coiffe. Ceci est surprenant dans la mesure où les activités enzymatiques correspondantes n'existent pas dans le lysat (*cf* ci-dessus) (2 points)

- 7) Des expériences antérieures ont montré que la synthèse des ARNm du virus de la grippe est stimulée par la présence d'autres ARN. Pour analyser cet effet et comprendre le mécanisme de synthèse des ARNm viraux, on réalise l'expérience suivante :

On effectue une synthèse d'ARNm *in vitro*, sans recourir à un lysat, dans un système reconstitué composé uniquement d'ARNv, de réplicase, de magnésium et des 4 NTP. On ajoute également à ce mélange différents autres ARN matures purifiés. Le résultat de l'expérience est indiqué sur le graphe ci-contre (à droite) :



a) Quelle(s) caractéristique(s) structurale(s) est commune aux deux ARNm testés et absente dans l'ARN du phage (transcrit dans une bactérie).

b) Interprétez le résultat de cette expérience en proposant une explication à la stimulation observée de la synthèse des ARNm viraux pour deux des expériences

c) Comment feriez vous pour quantifier les ARN viraux produits dans ce test ?

(plusieurs réponses possibles, une seule me suffit)

a) Les deux ARN purifiés qui sont ajoutés (globine & actine) sont des ARN **matures**. Ils sont donc coiffés et polyadénylés. L'ARN de phage, parce qu'il est transcrit dans une bactérie, n'est donc ni coiffé, ni polyadénylé. La différence est donc la présence d'une coiffe et d'une queue poly-A. (2 points)

b) L'expérience montre que la synthèse des ARNm viraux requiert la présence d'ARNm matures (donc coiffés et polyadénylés) dans le mélange réactionnel. **Ceci suggère que la synthèse des ARNm viraux par la réplicase pourrait nécessiter l'utilisation d'éléments de ces ARNm matures.** Comme on a vu à la question précédente que les ARNm viraux portent une coiffe, ceci suggère que la réplicase pourrait réutiliser la coiffe des de ces ARNm matures pour synthétiser les ARNm viraux. (2 points)

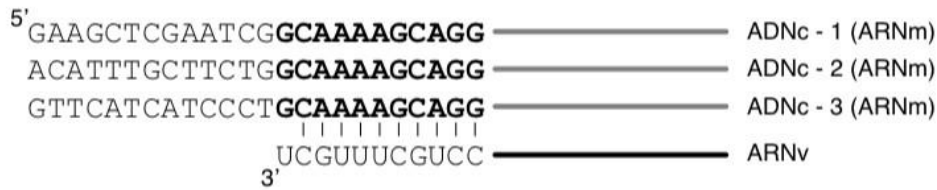
c) Possibilités (1 seule suffit) (1 point) :

Analyse par gel avec éventuellement un **marquage** par un NTP (radioactif, fluorescent), précipitation

Northern blot (hybridation) avec des oligonucléotides-sonde, complémentaires de la séquence des ARNm viraux

RT-PCR avec des amorces spécifiques des ARN viraux.

- 8) On purifie des ARNm messagers viraux à partir de cellules infectées par le virus. A partir de ceux-ci on synthétise *in vitro* une collection d'ADN complémentaires que l'on séquence individuellement. Voici les séquences de plusieurs de ces ADNc au niveau de ce qui correspond à l'extrémité 5' de l'ARNm codant la neuraminidase (l'une des protéines de surface du virus).



On constate que ces ADNc portent tous une extension d'environ 13 nucléotides, au delà de l'extrémité 3' de l'ARNv complémentaire.

- En tenant compte des observations réalisées aux questions précédentes, proposez un mécanisme expliquant la présence et l'origine de cette extension ? Pourquoi est-elle variable d'un ADNc isolé à l'autre ?
- En quoi cela pourrait contribuer à l'expression des protéines du virus de la grippe ?
- La réplicase virale possède une activité endonucléasique, capable de couper l'ARN simple brin, à quoi pourrait-elle servir dans ce mécanisme ?

- L'extension pourrait provenir des ARNm matures de la cellule**, puisqu'on a vu que l'utilisation de ceux-ci est nécessaire à la synthèse des ARNm viraux (question précédente). **(2 points)**
- Cette extension correspond à l'extrémité 5' des ARNm viraux. Si elle provient d'ARNm matures de la cellule infectée, **elle contient nécessairement la coiffe** de ces ARNm qui est précisément à l'extrémité 5'. La présence de la coiffe est un des facteurs qui permet la traduction de l'ARNm viral **(2 points)**
- L'activité endonucléasique de la réplicase pourrait permettre de **cliver les ARNm matures** de la cellule au niveau du 13^{ème} nucléotide et ainsi de **produire l'extension N-terminale** identifiée dans la figure ci-dessus. La réplicase utiliserait alors cette extension comme amorce pour synthétiser l'ARNm viral à partir de l'ARNv complémentaire. **(2 points)**

Question indépendante de ce qui précède

- 9) L'une des protéines du virus de la grippe interagit avec la protéine CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) dans le noyau et en bloque le fonctionnement normal. Quel est l'impact de ce mécanisme sur la cellule infectée et quel est l'avantage pour le virus ?

La protéine CPSF intervient dans la première étape du processus de polyadénylation des ARNm cellulaires. Si le virus bloque CPSF, il empêche la maturation des ARNm cellulaires et donc l'expression des protéines endogènes. Ainsi, la machinerie de traduction (ribosome, facteurs, ARNt...) peut être entièrement détournée au profit de la production des protéines du virus **(2 points)**



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

**L'ADN polymérase I d'E. coli
Sujet**

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

L'ADN polymérase I d'*E. coli*

Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé
Les quatre parties sont indépendantes (sauf la question IV-c)

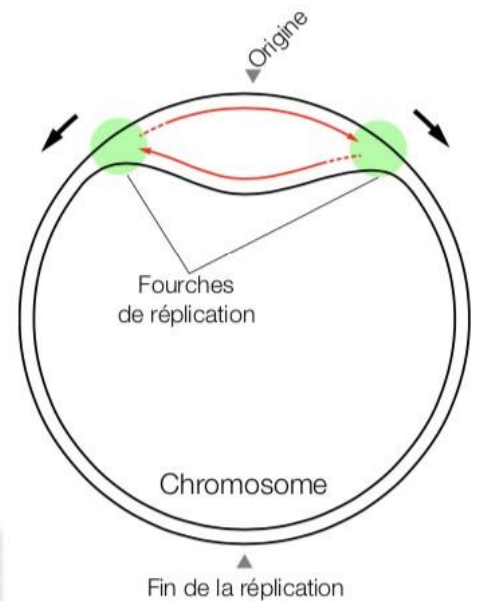
L'**ADN polymérase I** d'*Escherichia coli* est la première polymérase (ARN ou ADN) à avoir été isolée et caractérisée. Cette découverte a été faite en 1956 par Arthur Kornberg, trois ans seulement après celle de la structure de l'ADN. Kornberg obtiendra le prix Nobel pour ses travaux sur l'ADN polymérase et la synthèse de l'ADN en 1959.

Le présent problème a pour objet l'étude des propriétés de cette enzyme chez le colibacille et de son rôle dans la réplication et dans d'autres mécanismes cellulaires.

I- Réplication de l'ADN du colibacille

Le chromosome d'*E. coli* est **circulaire** et long d'environ 4×10^6 paires de bases. Sa réplication s'effectue de manière bidirectionnelle à partir d'**une seule** origine de réplication.

La réplication s'effectue donc via seulement **deux fourches de réplication** qui se déplacent en sens inverse et se rejoignent au point diamétralement opposé du chromosome (voir figure de droite).



I-a) Combien de molécules d'ADN polymérases répliquatives (intégrées au réplisome) sont nécessaires pour répliquer le chromosome bactérien ?

I-b) En conditions optimales, le temps de génération d'*E. coli* est de 20 minutes. Pendant ce laps de temps, la cellule doit dupliquer l'ensemble de son chromosome. Quelle est la vitesse de polymérisation (en nucléotides/seconde) nécessaire pour que les ADN polymérases répliquatives puissent réaliser cette étape dans le délai imparti.

I-c) Dans un test d'activité enzymatique réalisé dans des conditions physiologiques, la constante catalytique de l'ADN polymérase I, k_{pol} , est mesurée à $\sim 10 \text{ s}^{-1}$ et sa concentration à $\sim 500-1000$ molécules par cellules. Qu'en concluez vous sur la participation de l'ADN polymérase I à la réplication du chromosome ?

I-d) A quels autres mécanismes cellulaires vu dans le cours pourrait participer l'ADN polymérase I ?
(faites une réponse synthétique)

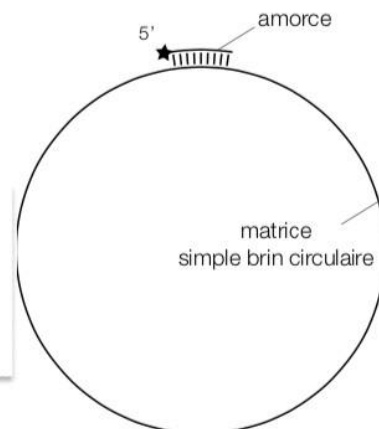
I-e) On isole un mutant non-sens dans le gène *polA* qui code l'ADN polymérase I. Ce mutant est viable et a une vitesse de croissance normale (temps de génération non-modifié). En revanche, sa sensibilité aux agents alkylants est considérablement augmentée.
Commentez ces deux observations (temps de génération, sensibilité)

II- Test d'activité de l'ADN polymérase I

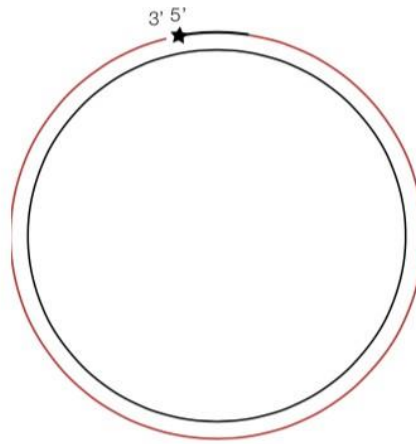
On teste l'activité de l'ADN polymérase I à l'aide d'un système reconstitué, composé d'un ADN circulaire simple brin (génome d'un phage) et d'un oligonucléotide synthétique servant d'amorce à la polymérase. L'ADN amorce est marqué radioactivement à son extrémité 5' (★ sur le schéma à droite).

Le mélange réactionnel contient, outre l'ADN circulaire et l'amorce, les quatre dNTP et la polymérase. On incube à 37°C pour permettre à la réaction de s'effectuer et on analyse les produits de la réaction par électrophorèse sur gel, puis autoradiographie.

II-a) Quelle(s) est (sont) les utilité(s) de l'amorce dans ce test ?



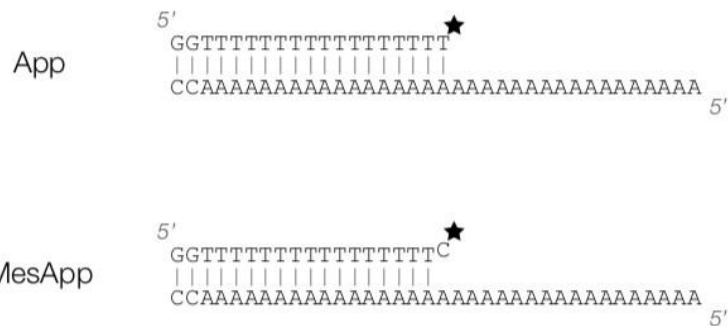
II-b) Dessinez le produit final de la réaction de polymérisation.



II-c) Le produit final n'est pas un ADN double-brin parfaitement circulaire, que faudrait-il ajouter au mélange réactionnel pour y parvenir ?

III- Activité sur des substrats imparfaits

Pour tester les autres activités de la polymérase, on prépare les deux substrats synthétiques suivants :



Ces deux substrats sont constitués d'un brin long, servant de matrice, et d'un brin court, servant d'amorce (en haut sur les schémas). Le premier, *App*, est parfaitement apparié sur toute la longueur de l'amorce, tandis que le second, *MesApp*, **se termine par un mésappariement sur le dernier nucléotide** en 3' de l'amorce.

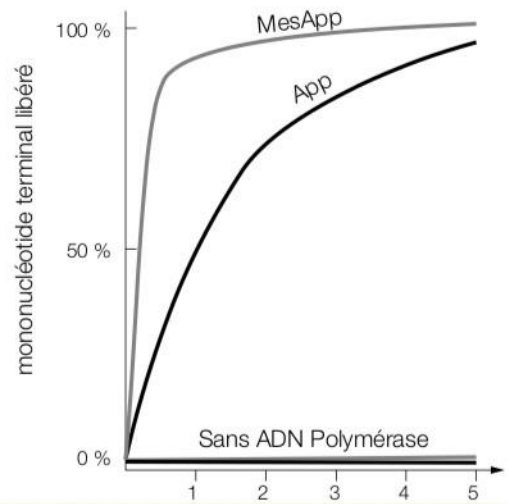
Le **dernier nucléotide** de chacune des deux amorces **est marqué** radioactivement.

III-a) Comment appelle-t-on une enzyme qui libère exclusivement des mononucléotides à partir d'un acide nucléique ?

On analyse la cinétique d'hydrolyse du dernier nucléotide de l'amorce. Pour cela, on incube chacun des deux substrats avec l'ADN polymérase I en l'absence de dNTP ou seul. On arrête la réaction avec de l'acide

concentré qui inactive l'enzyme et fait précipiter les brins d'ADN. On mesure le mononucléotide terminal libéré qui reste en solution par comptage radioactif.

On effectue également un contrôle sans ADN polymérase. Les résultats sont indiqués sur la figure ci-contre

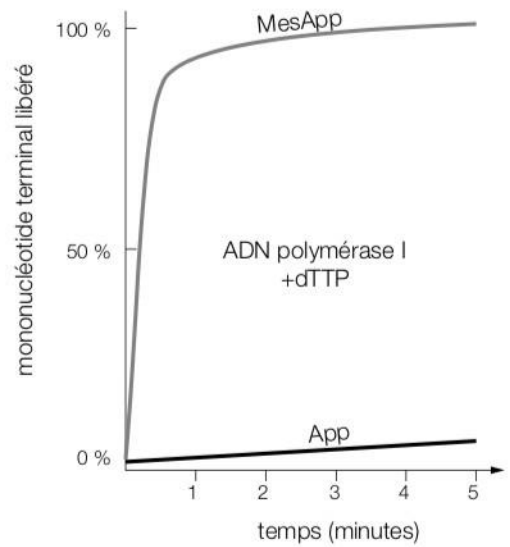


Interprétez les résultats de l'expérience

III-b) Quelle est l'utilité des contrôles sans ADN polymérase ?

III-c) Qu'est ce que la différence entre les deux substrats permet de conclure sur l'activité hydrolytique de l'ADN polymérase I ?

On refait la même expérience cette fois-ci en présence de dTTP. Les résultats sont indiqués dans la figure ci-contre. On rappelle que c'est la libération du nucléotide terminal radioactif de l'amorce qui est suivie dans cette expérience :



Dans les deux cas, on vérifie sur un gel qu'on a bien la **synthèse d'un duplex complet** à partir de chacun des deux substrats.

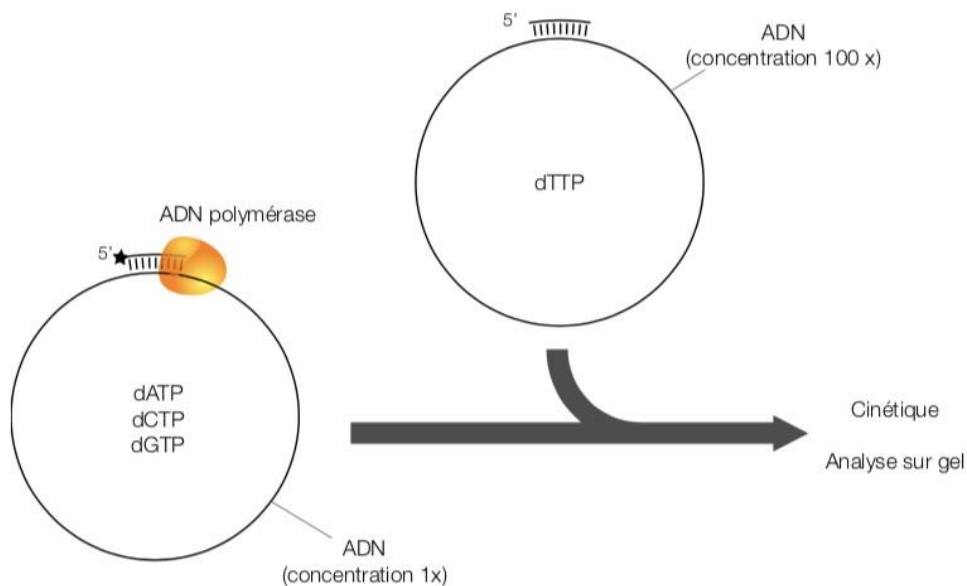
III-d) Interprétez le résultat de cette expérience et expliquez en particulier ce qui s'est passé dans le cas du substrat *MesApp* et qui a permis d'avoir un duplex complet.

III-e) Que pouvez vous en conclure sur les activités relatives d'hydrolyse et de polymérisation par l'ADN polymérase I ? Quelle est l'utilité de ces propriétés dans le contexte de la cellule et des mécanismes auxquels participe l'ADN polymérase I ?

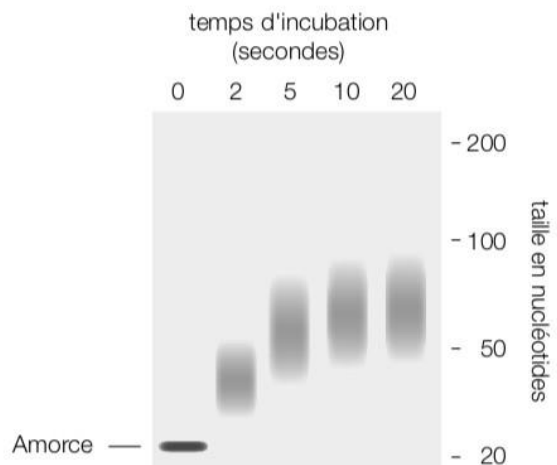
IV- Processivité de l'ADN polymérase I.

Pour analyser la processivité de l'ADN polymérase I, on réalise le test suivant :

- ▶ Dans un premier tube, on préincube l'ADN polymérase I en quantités stœchiométriques avec l'ADN matrice et l'**amorce marquée à son extrémité 5'**. On ajoute **seulement trois des quatre dNTP**. Dans ces conditions, **on préforme un complexe polymérase:ADN** (schéma ci-après, à gauche).
- ▶ Dans un second tube, on ajoute l'ADN substrat (matrice+amorce), dans lequel cette fois-ci **l'amorce n'est pas marquée** et le quatrième dNTP (celui qui est absent dans le premier tube). La concentration d'ADN substrat dans ce second tube est 100 fois celle de l'autre tube. **Il n'y a pas d'ADN polymérase dans ce second tube.**



On démarre la réaction en mélangeant le contenu des deux tubes. La réaction est stoppée à différents temps par ajout d'agents dénaturants. Les produits de la réaction sont analysés par électrophorèse sur gel, puis autoradiographie. Le résultat de cette autoradiographie est indiquée ci-contre.



IV-a) Commentez les résultats de cette expérience, en expliquant la variation de signal entre les différentes

pistes. Pourquoi préincuber avec la polymérase ? Pourquoi un excès de substrat dans l'autre tube ? A quoi sert la cinétique ?

IV-b) Quelle est la processivité de l'ADN polymérase I ?

IV-c) Au vu de vos réponses à la partie III, pourquoi est-il nécessaire de rajouter 3 des 4 dNTP dans le tube contenant initialement de l'ADN polymérase I ? Que ce serait-il passé si on avait mis les 4 dNTP dans l'autre tube et rien dans celui avec la polymérase ?



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

L'ADN polymérase I d'E. coli Correction

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

L'ADN polymérase I d'*E. coli*

Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé
Les quatre parties sont indépendantes (sauf la question IV-c)

L'**ADN polymérase I** d'*Escherichia coli* est la première polymérase (ARN ou ADN) à avoir été isolée et caractérisée. Cette découverte a été faite en 1956 par Arthur Kornberg, trois ans seulement après celle de la structure de l'ADN. Kornberg obtiendra le prix Nobel pour ses travaux sur l'ADN polymérase et la synthèse de l'ADN en 1959.

Le présent problème a pour objet l'étude des propriétés de cette enzyme chez le colibacille et de son rôle dans la réplication et dans d'autres mécanismes cellulaires.

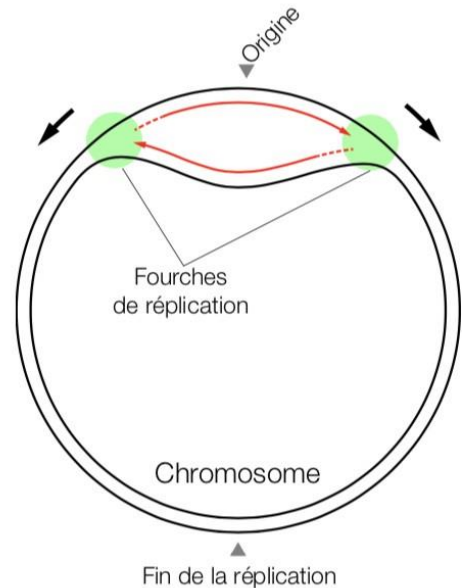
I- Réplication de l'ADN du colibacille

Le chromosome d'*E. coli* est **circulaire** et long d'environ 4×10^6 paires de bases. Sa réplication s'effectue de manière bidirectionnelle à partir d'**une seule** origine de réplication.

La réplication s'effectue donc via seulement **deux fourches de réplication** qui se déplacent en sens inverse et se rejoignent au point diamétralement opposé du chromosome (voir figure de droite).

I-a) Combien de molécules d'ADN polymérases répliquatives (intégrées au réplisome) sont nécessaires pour répliquer le chromosome bactérien ?

(1 point) **4 ADN polymérases.** Il y a 2 fourches de réplication et 2 polymérases par fourche (une pour le brin lent et une pour le brin rapide).



I-b) En conditions optimales, le temps de génération d'*E. coli* est de 20 minutes. Pendant ce laps de temps, la cellule doit dupliquer l'ensemble de son chromosome. Quelle est la vitesse de polymérisation (en nucléotides/seconde) nécessaire pour que les ADN polymérases répliquatives puissent réaliser cette étape dans le délai imparti.

(1 point) **environ 1600 par seconde.** Chacun des deux réplisomes réplique la moitié du génome, soit 2×10^6 paires de bases. Le temps de génération est de 1200 secondes (20 min x 60). La vitesse en nucléotides par seconde est donc $2 \times 10^6 / 1200$ soit environ 1666 par seconde (toute réponse entre 1000 et 2000 est acceptable)

I-c) Dans un test d'activité enzymatique réalisé dans des conditions physiologiques, la constante catalytique de l'ADN polymérase I, k_{pol} , est mesurée à $\sim 10 \text{ s}^{-1}$ et sa concentration à $\sim 500-1000$ molécules par cellules. Qu'en concluez vous sur la participation de l'ADN polymérase I à la réplication du chromosome ?

(1 point) **l'ADN polymérase I n'est pas une polymérase répliquative.** Sa vitesse est très insuffisante et sa concentration surabondante. C'est l'ADN polymérase III qui est l'enzyme répliquative chez *E. coli*.

- I-d) A quels autres mécanismes cellulaires vu dans le cours pourrait participer l'ADN polymérase I ?
(faites une réponse synthétique)

(1 point) Les différents mécanismes de réparation qui nécessitent une étape de polymérisation de l'ADN (MMR, BER, NER), les mécanismes de recombinaison. L'ADN polymérase I peut aussi combler les espaces laissés par les amorces ARN entre les fragments d'Okazaki. (2 réponses suffisent pour avoir les points)

- I-e) On isole un mutant non-sens dans le gène *polA* qui code l'ADN polymérase I. Ce mutant est viable et a une vitesse de croissance normale (temps de génération non-modifié). En revanche, sa sensibilité aux agents alkylants est considérablement augmentée.
Commentez ces deux observations (temps de génération, sensibilité)

(1 point) Le temps de génération est inchangé, ce qui confirme que l'ADN polymérase I n'est pas impliquée dans la réplication (si la réplication était altérée, on s'attendrait à un ralentissement de la croissance). Les agents alkylants induisent des dommages dans l'ADN (poly p.42), la sensibilité accrue à ces mutagènes indique que un ou des mécanismes de réparation sont affectés dans le mutant *polA*. Ceci confirme une implication probable de l'ADN polymérase I dans la **réparation** de l'ADN.

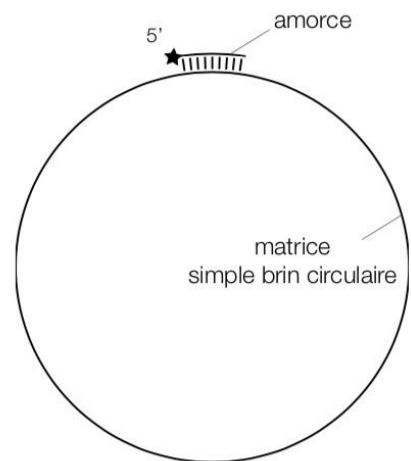
II- Test d'activité de l'ADN polymérase I

On teste l'activité de l'ADN polymérase I à l'aide d'un système reconstitué, composé d'un ADN circulaire simple brin (génomme d'un phage) et d'un oligonucléotide synthétique servant d'amorce à la polymérase. L'ADN amorce est marqué radioactivement à son extrémité 5' (★ sur le schéma à droite).

Le mélange réactionnel contient, outre l'ADN circulaire et l'amorce, les quatre dNTP et la polymérase. On incube à 37°C pour permettre à la réaction de s'effectuer et on analyse les produits de la réaction par électrophorèse sur gel, puis autoradiographie.

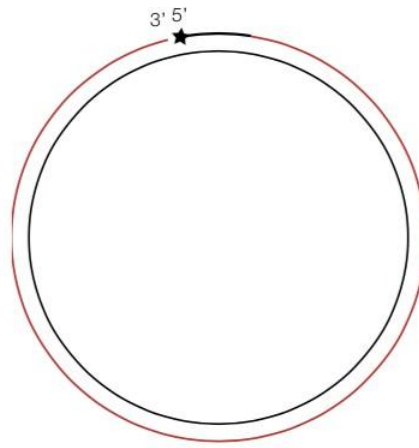
- II-a) Quelle(s) est (sont) les utilité(s) de l'amorce dans ce test ?

(2 points) L'amorce est d'abord indispensable pour que l'ADN polymérase fonctionne, puisque cette dernière a besoin d'un 3'-OH libre pour **allonger le brin** synthétisé. Elle permet de plus un **marquage sélectif de ce brin synthétisé**, puisque le brin matrice est non-radioactif.



- II-b) Dessinez le produit final de la réaction de polymérisation.

(1 point) voir schéma ci dessous

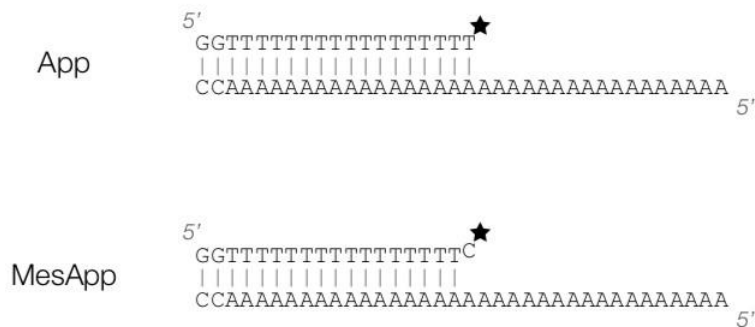


II-c) Le produit final n'est pas un ADN double-brin parfaitement circulaire, que faudrait-il ajouter au mélange réactionnel pour y parvenir ?

(1 point) de l'**ADN ligase** pour suturer les deux extrémités du cercle

III- Activité sur des substrats imparfaits

Pour tester les autres activités de la polymérase, on prépare les deux substrats synthétiques suivants :



Ces deux substrats sont constitués d'un brin long, servant de matrice, et d'un brin court, servant d'amorce (en haut sur les schémas). Le premier, *App*, est parfaitement apparié sur toute la longueur de l'amorce, tandis que le second, *MesApp*, **se termine par un mésappariement sur le dernier nucléotide** en 3' de l'amorce.

Le **dernier nucléotide** de chacune des deux amorces **est marqué** radioactivement.

On incube individuellement chacun de ces deux substrats avec l'ADN polymérase I, **en l'absence de tout dNTP**. Dans ces conditions, on observe la dégradation du substrat avec libération de mononucléotides.

III-a) Comment appelle-t-on une enzyme qui libère exclusivement des mononucléotides à partir d'un acide nucléique ?

(1 point). Une **exonucléase**. C'est une nucléase puisqu'elle hydrolyse un acide nucléique. Si c'était une endonucléase, la coupure interne libérerait des fragments d'ADN et pas des mononucléotides. Ce ne peut donc être qu'une exonucléase.

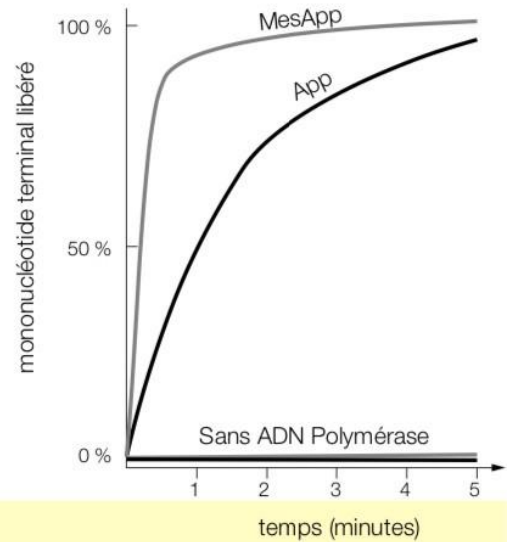
On analyse la cinétique d'hydrolyse du dernier nucléotide de l'amorce. Pour cela, on incube chacun des deux substrats avec l'ADN polymérase I en l'absence de dNTP ou seul. On arrête la réaction avec de l'acide

concentré qui inactive l'enzyme et fait précipiter les brins d'ADN. On mesure le mononucléotide terminal libéré qui reste en solution par comptage radioactif.

On effectue également un contrôle sans ADN polymérase. Les résultats sont indiqués sur la figure ci-contre

Interprétez les résultats de l'expérience

III-b) Quelle est l'utilité des contrôles sans ADN polymérase ?



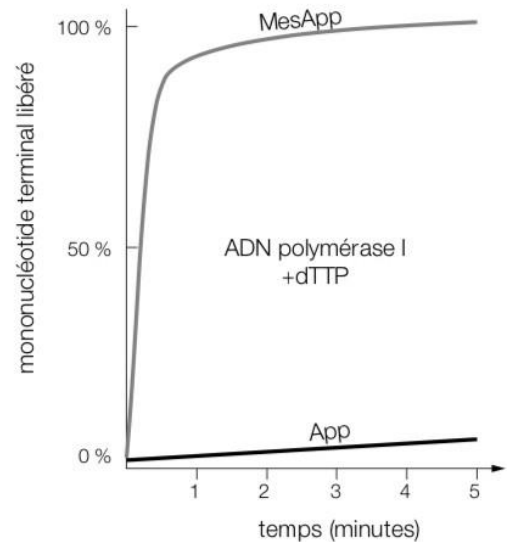
(1 point) Ces contrôles sont nécessaires pour vérifier que l'hydrolyse observée est bien **liée à l'ADN polymérase** et pas à une contamination de l'ADN par une autre hydrolase.

III-c) Qu'est-ce que la différence entre les deux substrats permet de conclure sur l'activité hydrolytique de l'ADN polymérase I ?

(2 points) L'ADN polymérase a une activité exonucléasique sensiblement plus importante sur le substrat mésapparié, puisque l'hydrolyse est plus rapide sur ce dernier.

On refait la même expérience cette fois-ci en présence de dTTP. Les résultats sont indiqués dans la figure ci-contre. On rappelle que c'est la libération du nucléotide terminal radioactif de l'amorce qui est suivie dans cette expérience :

Dans les deux cas, on vérifie sur un gel qu'on a bien la **synthèse d'un duplex complet** à partir de chacun des deux substrats.



III-d) Interprétez le résultat de cette expérience et expliquez en particulier ce qui s'est passé dans le cas du substrat MesApp et qui a permis d'avoir un duplex complet.

(2 points) La présence de dTTP, qui permet l'allongement du brin poly-dA de la matrice inhibe quasiment totalement l'activité exonucléasique de l'ADN polymérase sur le substrat apparié (pas d'hydrolyse du nucléotide terminal). En revanche, sur le nucléotide terminal du substrat mésapparié est complètement hydrolysé, comme en l'absence de dTTP.

Comme dans les deux cas, on observe la synthèse d'un duplex complet, cela signifie que la polymérase, après avoir excisé le nucléotide terminal mésapparié en reculant d'un cran ($3' \rightarrow 5'$), a repris la polymérisation normale dans la direction $5' \rightarrow 3'$. C'est logique, puisque après l'excision de ce nucléotide mésapparié, elle retrouve un substrat « normal », parfaitement apparié pour lequel l'autre expérience montre qu'il n'y a pas d'excision.

III-e) Que pouvez vous en conclure sur les activités relatives d'hydrolyse et de polymérisation par l'ADN polymérase I ? Quelle est l'utilité de ces propriétés dans le contexte de la cellule et des mécanismes auxquels participe l'ADN polymérase I ?

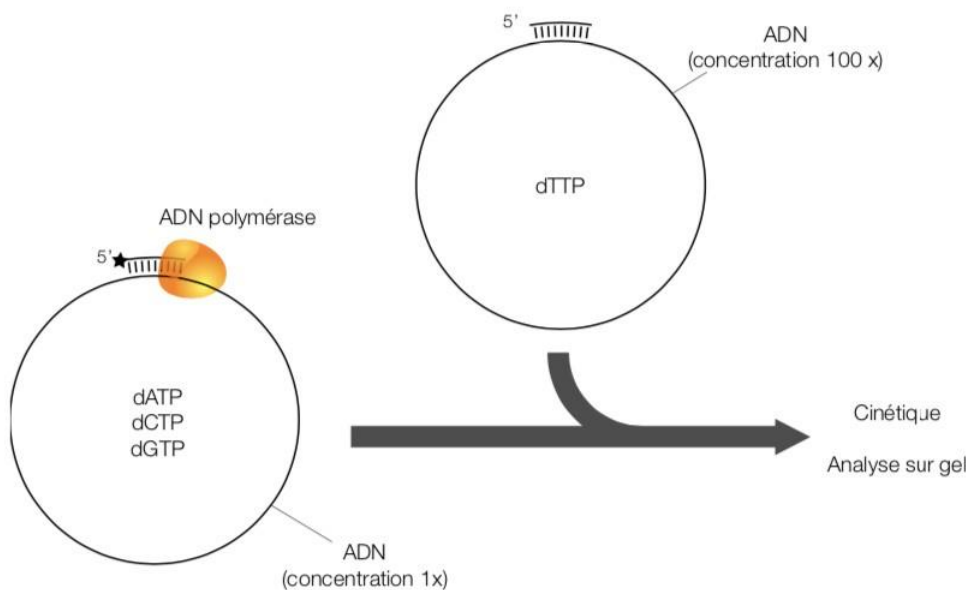
(2 points) En présence de dNTP, l'activité polymérase domine l'activité exonucléase, sauf lorsque le dernier nucléotide est mésapparié. Dans ce second cas (dernier nucléotide mésapparié), c'est l'activité exonucléase qui domine. (En l'absence de dNTP, la polymérisation ne peut avoir lieu, faute de substrat, et seule l'activité exonucléase est possible).

Cet équilibre des activités correspond à la fonction de **relecture** de la polymérase dans la cellule. Cela permet la **correction d'erreurs** d'incorporation de nucléotides. En cas d'erreur, la polymérase revient en arrière d'un cran pour corriger : élimination du mauvais nucléotide et re-synthèse.

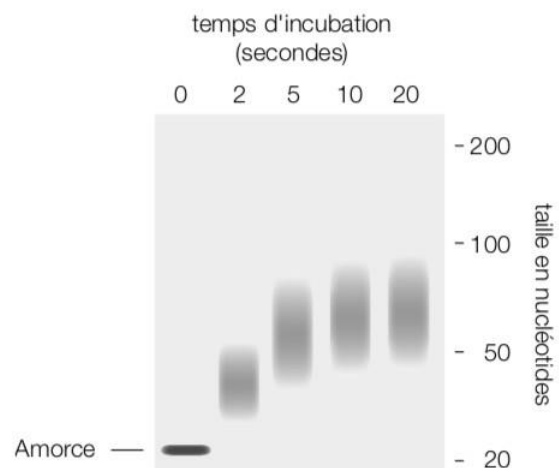
IV- Processivité de l'ADN polymérase I.

Pour analyser la processivité de l'ADN polymérase I, on réalise le test suivant :

- ▶ Dans un premier tube, on préincube l'ADN polymérase I en quantités stœchiométriques avec l'ADN matrice et l'**amorce marquée à son extrémité 5'**. On ajoute **seulement trois des quatre dNTP**. Dans ces conditions, **on préforme un complexe polymérase:ADN** (schéma ci-après, à gauche).
- ▶ Dans un second tube, on ajoute l'ADN substrat (matrice+amorce), dans lequel cette fois-ci **l'amorce n'est pas marquée** et le quatrième dNTP (celui qui est absent dans le premier tube). La concentration d'ADN substrat dans ce second tube est 100 fois celle de l'autre tube. **Il n'y a pas d'ADN polymérase dans ce second tube.**



On démarre la réaction en mélangeant le contenu des deux tubes. La réaction est stoppée à différents temps par ajout d'agents dénaturants. Les produits de la réaction sont analysés par électrophorèse sur gel, puis autoradiographie. Le résultat de cette autoradiographie est indiquée ci-contre.



IV-a) Commentez les résultats de cette expérience, en expliquant la variation de signal entre les différentes

pistes. Pourquoi préincuber avec la polymérase ? Pourquoi un excès de substrat dans l'autre tube ? A quoi sert la cinétique ?

(3 points) Lorsqu'on mélange les contenus des deux tubes, on a tout ce qu'il faut pour permettre la polymérisation ADN matrice, amorce, polymérase et les quatre dNTP. Avant, la polymérase ne peut allonger l'amorce que jusqu'au premier T, puisqu'il n'y a pas de dTTP dans son tube.

La préincubation sert à **pré-fixer la polymérase sur l'ADN substrat**, prête à démarrer. Au moment du mélange ($t=0$), la polymérisation démarre immédiatement, allongeant le brin synthétisé à partir de l'amorce radioactive. En fonction de sa processivité $\langle L \rangle$, la polymérase va se dissocier de manière aléatoire après avoir polymérisé environ L nucléotides.

Ensuite elle va se réassocier de manière aléatoire avec un substrat disponible dans le mélange. Comme il y a un large excès de substrat non-marqué (provenant du second tube), statistiquement elle va se fixer majoritairement sur ce dernier. L'allongement à partir de l'amorce non-marquée ne donne pas de signal sur l'autoradiographie.

L'excès de substrat dans le second tube est là pour **piéger la polymérase qui s'est détachée** du substrat ADN radioactif avec lequel elle a été préincubée. On n'observe ainsi qu'un cycle de polymérisation et la longueur du substrat synthétisé correspond à un tour de synthèse sans dissociation.

Dans la cinétique, on observe d'abord un allongement du brin jusqu'à 5 à 10 secondes de réaction, après, la longueur plafonne, parce que la polymérase s'est détachée et n'allonge plus le brin initial. La cinétique sert à s'assurer qu'on a bien atteint le plateau où toutes les polymérases se sont dissociées.

IV-b) Quelle est la processivité de l'ADN polymérase I ?

(2 points) **Processivité ≈ 50** . La longueur des fragments obtenus plafonne vers une moyenne à 70 nucléotides (voir gel). L'amorce ayant une longueur initiale d'environ 20 nucléotides, la polymérase a synthétisé environ 50 nucléotides additionnels avant de se décrocher, soit une processivité d'environ 50.

Incidemment, on vérifie que cette longueur moyenne de 50 nucléotides est bien atteinte après 5 secondes de réaction, ce qui correspond bien à la vitesse de 10 nucléotides/seconde évoquée à la question I-c).

IV-c) Au vu de vos réponses à la partie III, pourquoi est-il nécessaire de rajouter 3 des 4 dNTP dans le tube contenant initialement de l'ADN polymérase I ? Que ce serait-il passé si on avait mis les 4 dNTP dans l'autre tube et rien dans celui avec la polymérase ?

(2 points) Si on n'ajoute pas du tout de dNTP dans le tube où il y a l'ADN polymérase, celle-ci va hydrolyser l'amorce (question III-b). En ajoutant 3 des 4 dNTP, on s'assure que même si la polymérase est bloquée sur le premier T (absence de dTTP), elle ne va pas dégrader l'amorce, puisqu'en cas d'hydrolyse 3' \rightarrow 5' du dernier nucléotide A, G ou C, elle peut le repolymériser aussitôt.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Auto-immunité et régulation des gènes Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Auto-immunité et régulation des gènes

Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé

Les différentes parties du problème sont indépendantes

Chez les mammifères, la réponse immunitaire de long terme passe par la formation de **lymphocytes B mémoire**, cellules dormantes qui, en cas de deuxième exposition à leur antigène spécifique, sont capables de proliférer et se différencier très rapidement en cellules productrices d'anticorps.

Lors de l'exposition initiale à l'antigène, la formation de ces cellules mémoire nécessite l'activation des lymphocytes B spécifiques par des lymphocytes T. Cette activation ne se produit en principe que lorsque l'antigène est exogène et est inhibée sinon, ce qui évite une reconnaissance du « soi » par le système immunitaire.

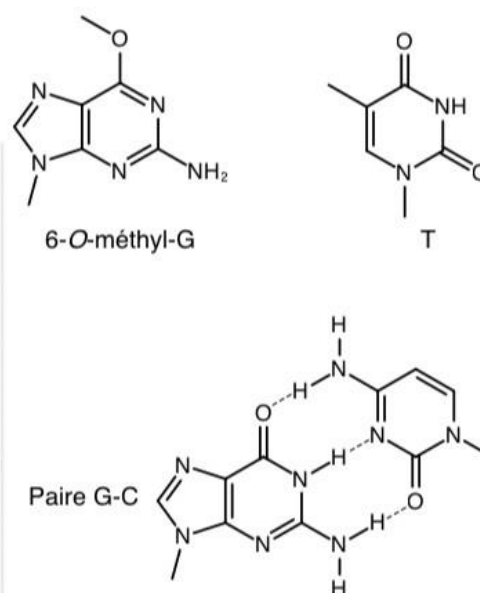
Dans le cas des maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux ou le diabète de type I, cette activation des cellules B par les cellules T est dérégulée, ce qui aboutit à la production d'auto-anticorps.

Dans ce problème, on veut comprendre de le mécanisme de cette régulation de l'activation des cellules B par les cellules T.

I- Induction chimique de mutants chez la souris

Pour étudier les maladies auto-immunes et identifier les gènes impliqués, on veut développer un modèle chez la souris. Dans ce but, on induit des mutations qui pourraient altérer la réponse immunitaire et provoquer une maladie auto-immune. On traite donc des souris avec des composés mutagènes. Le mutagène choisi, une nitroso-urée, est un alkylant puissant qui induit principalement la méthylation des guanosines et la formation de 6-O-méthyl-guanosine.

I-a) La 6-O-méthylguanosine s'apparie avec les thymidines (T), plutôt que les cytidines (C). En vous appuyant sur la structure du T et du 6-O-méthyl-G (ci-contre), dessinez un schéma d'appariement entre eux comportant au moins deux liaisons hydrogènes.



I-b) Cet appariement est-il isostère des appariements G-C et A-T ? Pourquoi ?

I-c) Dans l'optique d'obtenir des souches de souris comportant un taux de mutations suffisant, pourquoi ce mutagène est-il plus adapté par exemple que l'irradiation UV qui induit des dimères de thymine ?
(plusieurs réponses possibles, une seule réponse raisonnable suffit)

I-d) Les 6-O-méthylguanosines sont réparées par un mécanisme direct, par le biais l'action d'une enzyme dédiée, la méthylguanosine méthyltransférase. Compte-tenu de l'effet de cette lésion sur l'ADN, quelle interprétation pourrait-on donner au fait que l'Évolution a sélectionné un mécanisme direct plutôt qu'un mécanisme générique de type « réparation par excision de base » pour réparer cette lésion.

II- Un modèle animal de maladie inflammatoire auto-immune

On fait se reproduire entre elles différentes lignées des souris traitées à la nitroso-urée, et on recherche dans leur progéniture des souris présentant un phénotype de maladie auto-immune : inflammation, hypertrophie des organes lymphoïdes (ganglions, rate, thymus)... On identifie ainsi une lignée qui présente des symptômes proches du lupus chez l'homme. Les souris correspondantes sont appelées *sanroque* (*san* en abrégé) et le phénotype de syndrome auto-immun est récessif (c'est à dire observé chez les souris *san/san*)

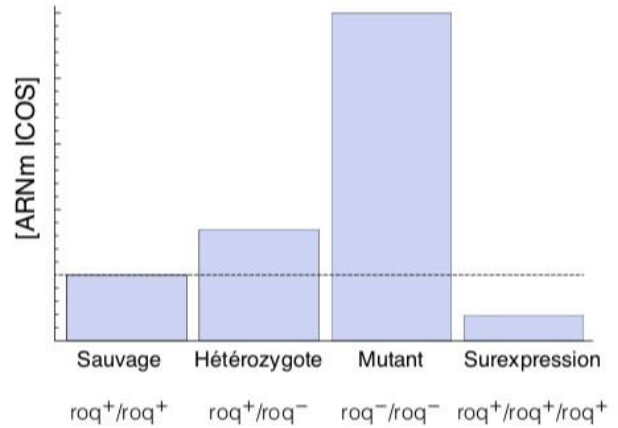
L'analyse des propriétés immunologiques de cette lignée montre que son principal phénotype est la surexpression d'une protéine présente à la membrane des lymphocytes T, appelée ICOS (*inducible costimulator*). Cette protéine est directement impliquée dans l'activation des lymphocytes B et leur transformation en cellule mémoire.

II-a) Chez les souris mutantes, on observe à la fois une augmentation de la protéine ICOS et une augmentation de l'ARNm codant la protéine ICOS. Proposez deux mécanismes moléculaires pouvant expliquer la cette variation de la production de la protéine ICOS.

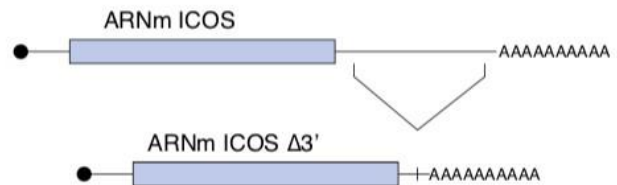
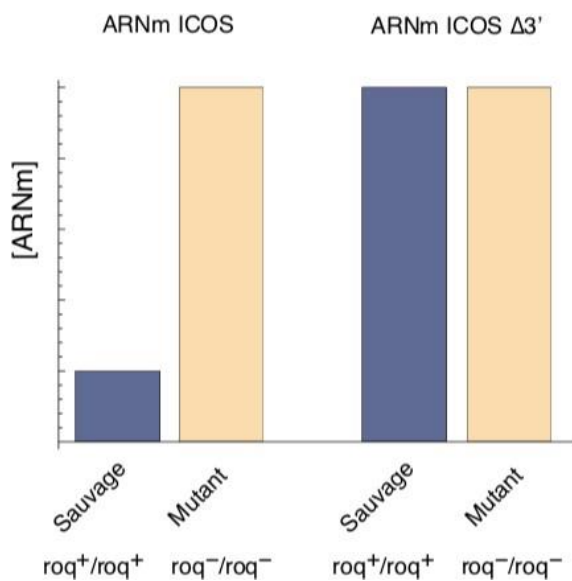
Il-b) Par cartographie génétique puis séquençage génomique, on localise la mutation associée au phénotype d'auto-immunité. La mutation est localisée dans un locus codant une protéine inconnue, distinct de celui codant la protéine ICOS. La protéine associée est appelée **Roquine** (en lien avec la mutation *sanroque*) et le gène correspondant *roq*.

On analyse la quantité d'ARNm pour la protéine ICOS dans différentes cellules : sauvage, hétérozygote, mutante, et transfectée par un plasmide **surexprimant la Roquine**.

Commentez les résultats représentés sur la figure ci-contre.



Il-c) La structure de l'ARNm codant le co-activateur ICOS, dont l'expression est augmentée chez le mutant est indiquée ci-dessous (à droite). Celui-ci se caractérise par une assez grande région 3'-non traduite (3'-UTR). On effectue une construction où la région 3'-UTR est déléetée ($\Delta 3'$), dont on compare le profil d'expression à celui du gène ICOS sauvage. Les résultats sont indiqués ci-dessous :

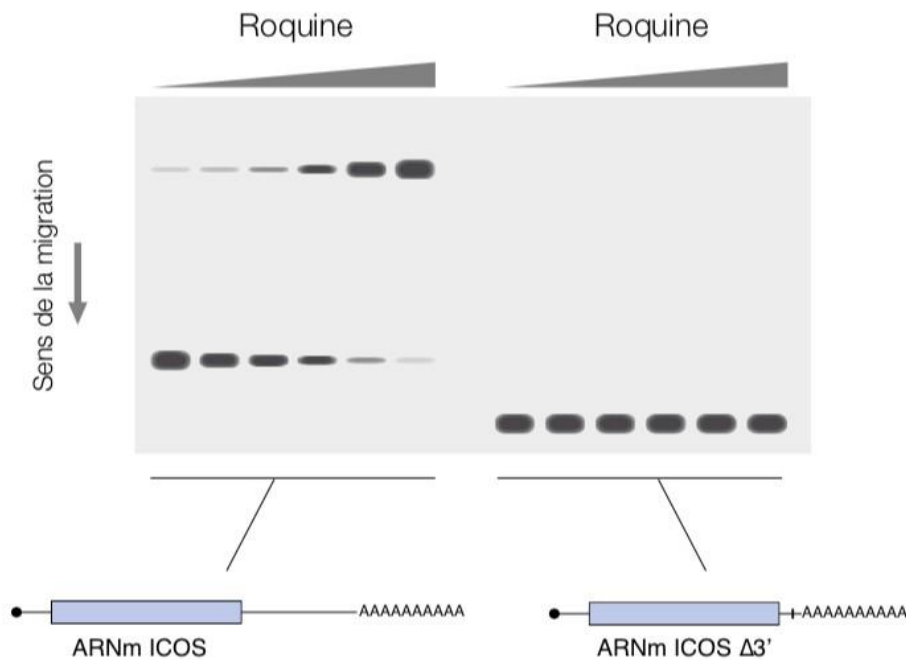


Commentez le résultat de cette expérience : quel peut être le rôle de la Roquine et de la région 3'-UTR de l'ARNm de ICOS sur l'expression de cette dernière ?

III- Roquine et ARN

On purifie la protéine Roquine. L'analyse de sa séquence en acides aminés montre des ressemblances avec de nombreuses protéines fixant l'ARNm.

III-a) On veut étudier les propriétés de la Roquine, pour cela, on effectue une expérience de retard sur gel, soit avec l'ARNm de ICOS, soit avec l'ARNm de ICOS délété dans la région 3'-UTR ($\Delta 3'$). Cette expérience est réalisée avec des ARNm marqués radioactivement. Des quantités croissantes de Roquine sont ajoutées à chaque ARNm, la migration est effectuée en conditions non-dénaturantes et le gel est révélé par autoradiographie. Les résultats sont présentés sur la figure ci-dessous :



Commentez les résultats de cette expérience

III-b) Pour identifier très précisément les motifs d'ARN en interaction avec la Roquine, on réalise une expérience de SELEX.

On fixe de manière covalente la Roquine sur des billes de résine et on effectue plusieurs cycles de sélection d'ARN à partir d'une banque combinatoire.

Rappelez très brièvement les étapes du SELEX et la caractéristique des ARN qui sont obtenus après plusieurs cycles.

III-c) Pour identifier très précisément les motifs d'ARN en interaction avec la Roquine, on réalise une expérience de SELEX.

On fixe de manière covalente la Roquine sur des billes de résine et on effectue plusieurs cycles de sélection d'ARN à partir d'une banque combinatoire.

Rappelez très brièvement les étapes du SELEX et la caractéristique des ARN aptamères qui sont obtenus après plusieurs cycles.

III-d) On détermine les séquences nucléotidiques d'un échantillon des aptamères obtenus après SELEX contre la Roquine. On retrouve dans ces séquences un motif partiellement conservé, les séquences correspondantes sont listées ci-dessous (les nucléotides strictement conservés sont en gras) :

Aptamère 1	GUUUUCUGUGAAAAC
Aptamère 2	GUUUUCUAUGAAA AU
Aptamère 3	AGUUUCUGUGAAACU
Aptamère 4	CUUUUCUGUGAAAAG
Aptamère 5	GUAUUCUAUGAAUAC

En quoi la comparaison de ces différentes séquences permet d'affirmer qu'elles forment une structure secondaire conservée ?

III-e) Dessinez cette structure pour l'aptamère 1.

III-f) Avec les mêmes billes sur lesquelles on a immobilisé la Roquine, on recherche des ligands de cette protéine dans un extrait cellulaire, par une expérience de co-précipitation. On identifie que la Roquine fixe Caf-1, une « déadénylase », enzyme spécialisée dans l'hydrolyse de la queue poly(A) des ARNm. Proposez un mécanisme expliquant l'inhibition de l'expression du co-activateur ICOS par la Roquine.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

**Auto-immunité et régulation des gènes
Correction**

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Auto-immunité et régulation des gènes

Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé

Les différentes parties du problème sont indépendantes

Chez les mammifères, la réponse immunitaire de long terme passe par la formation de **lymphocytes B mémoire**, cellules dormantes qui, en cas de deuxième exposition à leur antigène spécifique, sont capables de proliférer et se différencier très rapidement en cellules productrices d'anticorps.

Lors de l'exposition initiale à l'antigène, la formation de ces cellules mémoire nécessite l'activation des lymphocytes B spécifiques par des lymphocytes T. Cette activation ne se produit en principe que lorsque l'antigène est exogène et est inhibée sinon, ce qui évite une reconnaissance du « soi » par le système immunitaire.

Dans le cas des maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux ou le diabète de type I, cette activation des cellules B par les cellules T est dérégulée, ce qui aboutit à la production d'auto-anticorps.

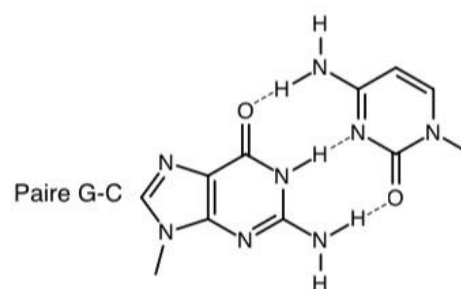
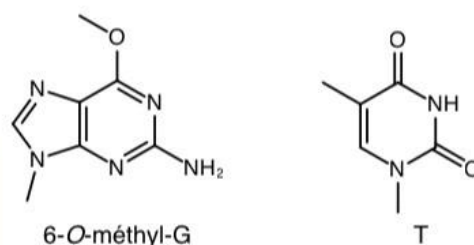
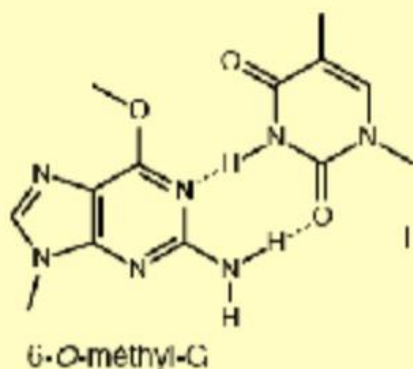
Dans ce problème, on veut comprendre de le mécanisme de cette régulation de l'activation des cellules B par les cellules T.

I- Induction chimique de mutants chez la souris

Pour étudier les maladies auto-immunes et identifier les gènes impliqués, on veut développer un modèle chez la souris. Dans ce but, on induit des mutations qui pourraient altérer la réponse immunitaire et provoquer une maladie auto-immune. On traite donc des souris avec des composés mutagènes. Le mutagène choisi, une nitroso-urée, est un alkylant puissant qui induit principalement la méthylation des guanosines et la formation de 6-O-méthyl-guanosine.

I-a) La 6-O-méthylguanosine s'apparie avec les thymidines (T), plutôt que les cytidines (C). En vous appuyant sur la structure du T et du 6-O-méthyl-G (ci-contre), dessinez un schéma d'appariement entre eux comportant au moins deux liaisons hydrogènes.

(2 points)



I-b) Cet appariement est-il isostère des appariements G-C et A-T ? Pourquoi ?

(1 point) **Oui**, il est isostère de A-T et G-C. Le 6-O-méthyl-G exactement occupe la même position que le A dans une paire A-T ou le T la même position que le C dans une paire G-C, cf la comparaison des deux schémas de la page précédente

I-c) Dans l'optique d'obtenir des souches de souris comportant un taux de mutations suffisant, pourquoi ce mutagène est-il plus adapté par exemple que l'irradiation UV qui induit des dimères de thymine ? (*plusieurs réponses possibles, une seule réponse raisonnable suffit*)

(2 points) Lors de la réplication, présence de 6-O-méthyl-G va très probablement induire l'incorporation de T en vis-à-vis dans le brin néosynthétisé, puisque la géométrie de cet appariement est isostère d'une paire normale. Cette erreur d'incorporation va conduire à une transition d'une paire G-C vers une paire A-T (mutation).

La présence d'un dimère de thymine non-réparé va en revanche conduire à un blocage de la réplication au niveau de cette lésion déformante et non à une mutation.

I-d) Les 6-O-méthylguanosines sont réparées par un mécanisme direct, par le biais l'action d'une enzyme dédiée, la méthylguanosine méthyltransférase. Compte-tenu de l'effet de cette lésion sur l'ADN, quelle interprétation pourrait-on donner au fait que l'Évolution a sélectionné un mécanisme direct plutôt qu'un mécanisme générique de type « réparation par excision de base » pour réparer cette lésion.

(2 points) Si elles ne sont pas réparées suffisamment vite et suffisamment efficacement, ces lésions sont très mutagènes, du fait de la possibilité de former des appariements géométriquement très proches des appariements Watson-Crick canoniques (isostères). Leur conséquence est probablement plus délétère qu'une lésion qui bloque la réplication tant qu'elle n'est pas réparée.

Ceci pourrait expliquer l'émergence de ce mécanisme de réparation direct plus « couteux »

II- Un modèle animal de maladie inflammatoire auto-immune

On fait se reproduire entre elles différentes lignées des souris traitées à la nitroso-urée, et on recherche dans leur progéniture des souris présentant un phénotype de maladie auto-immune : inflammation, hypertrophie des organes lymphoïdes (ganglions, rate, thymus)... On identifie ainsi une lignée qui présente des symptômes proches du lupus chez l'homme. Les souris correspondantes sont appelées *sanroque* (*san* en abrégé) et le phénotype de syndrome auto-immun est récessif (c'est à dire observé chez les souris *san/san*)

L'analyse des propriétés immunologiques de cette lignée montre que son principal phénotype est la surexpression d'une protéine présente à la membrane des lymphocytes T, appelée ICOS (*inducible costimulator*). Cette protéine est directement impliquée dans l'activation des lymphocytes B et leur transformation en cellule mémoire.

II-a) Chez les souris mutantes, on observe à la fois une augmentation de la protéine ICOS et une augmentation de l'ARNm codant la protéine ICOS. Proposez deux mécanismes moléculaires pouvant expliquer la cette variation de la production de la protéine ICOS.

(2 points / 1 par mécanisme) L'augmentation de la protéine ICOS est corrélée à une augmentation de la concentration de son ARNm. Ceci peut être expliqué par deux mécanismes non-exclusifs :

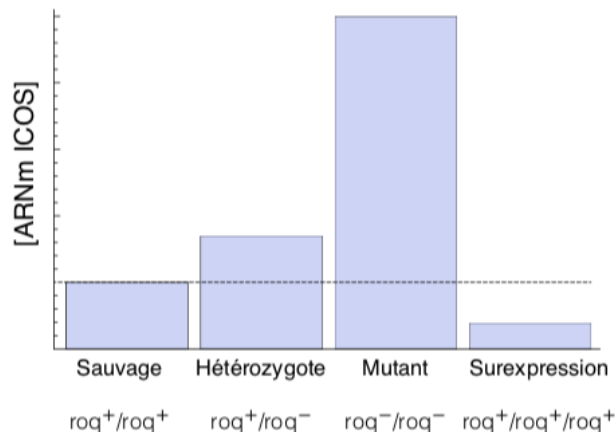
(i) Ca peut être un effet transcriptionnel, c'est à dire une **augmentation de la transcription de l'ARNm** à partir du promoteur du gène (activation d'un facteur de transcription, augmentation de l'efficacité du promoteur...);

- (ii) Ca peut être un effet sur la **stabilité de son ARNm** qui peut être augmentée chez le mutant. Ceci conduit aussi à une augmentation de la concentration d'équilibre de l'ARNm sans qu'il soit nécessaire qu'il y ait une augmentation de la transcription.

- II-b) Par cartographie génétique puis séquençage génomique, on localise la mutation associée au phénotype d'auto-immunité. La mutation est localisée dans un locus codant une protéine inconnue, distinct de celui codant la protéine ICOS. La protéine associée est appelée **Roquine** (en lien avec la mutation *sanroque*) et le gène correspondant *roq*.

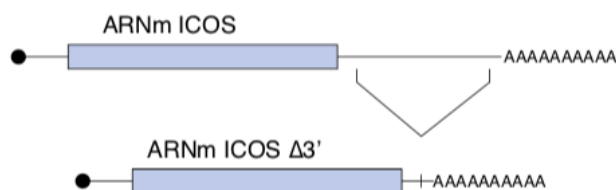
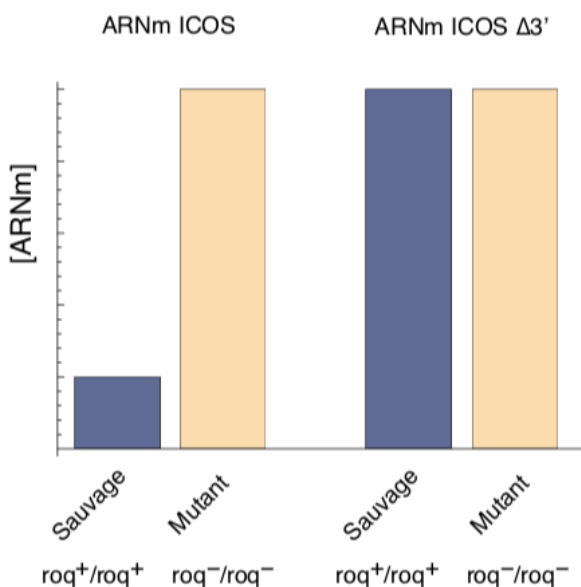
On analyse la quantité d'ARNm pour la protéine ICOS dans différentes cellules : sauvage, hétérozygote, mutante, et transfectée par un plasmide **surexprimant la Roquine**.

Commentez les résultats représentés sur la figure ci-contre.



(2 points) Le graphe montre que **la concentration de l'ARNm codant la protéine ICOS semble inversement corrélée à celle de la protéine Roquine**. La concentration est légèrement augmentée dans les souris hétérozygotes qui n'ont qu'un allèle fonctionnel et très augmentée chez le variant homozygote qui ne produit plus de Roquine fonctionnelle. Elle est en revanche diminuée chez la souris transfectée qui surproduit la Roquine.

- II-c) La structure de l'ARNm codant le co-activateur ICOS, dont l'expression est augmentée chez le mutant est indiquée ci-dessous (à droite). Celui-ci se caractérise par une assez grande région 3'-non traduite (3'-UTR). On effectue une construction où la région 3'-UTR est déléetée ($\Delta 3'$), dont on compare le profil d'expression à celui du gène ICOS sauvage. Les résultats sont indiqués ci-dessous :



Commentez le résultat de cette expérience : quel peut être le rôle de la Roquine et de la région 3'-UTR de l'ARNm de ICOS sur l'expression de cette dernière ?

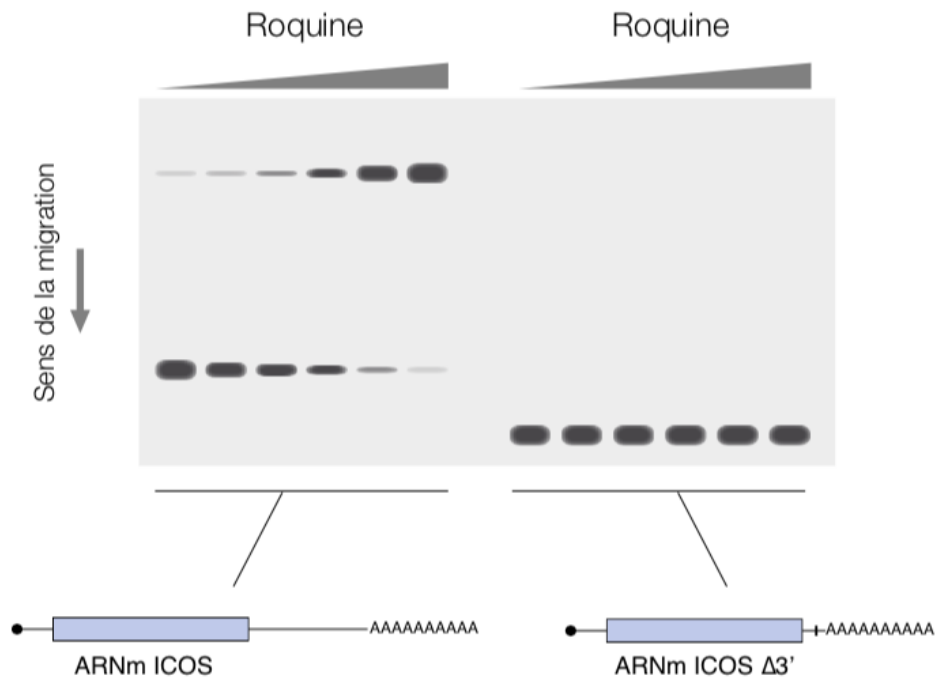
(2 points) L'expérience montre variant délété dans le 3'-UTR devient insensible à la régulation par la Roquine.

La Roquine pourrait agir sur la stabilité de l'ARNm de ICOS via une interaction directe ou indirecte avec son 3'-UTR (réponse (ii) de la question II-a ci-dessus). Chez le variant $\Delta 3'$, cette interaction n'est plus possible, d'où la perte de la régulation.

III- Roquine et ARN

On purifie la protéine Roquine. L'analyse de sa séquence en acides aminés montre des ressemblances avec de nombreuses protéines fixant l'ARNm.

III-a) On veut étudier les propriétés de la Roquine, pour cela, on effectue une expérience de retard sur gel, soit avec l'ARNm de ICOS, soit avec l'ARNm de ICOS délété dans la région 3'-UTR ($\Delta 3'$). Cette expérience est réalisée avec des ARNm marqués radioactivement. Des quantités croissantes de Roquine sont ajoutées à chaque ARNm, la migration est effectuée en conditions non-dénaturantes et le gel est révélé par autoradiographie. Les résultats sont présentés sur la figure ci-dessous :



Commentez les résultats de cette expérience

(2 points) L'expérience montre que l'addition de Roquine induit un retard de migration de l'ARNm ICOS, mais pas de l'ARNm ICOS délété dans le 3'-UTR. Ceci confirme que la Roquine se fixe directement au 3'-UTR de l'ARNm ICOS (NB : l'interaction aurait aussi pu être indirecte, au travers d'un autre facteur présent dans la cellule)

III-b) Pour identifier très précisément les motifs d'ARN en interaction avec la Roquine, on réalise une expérience de SELEX.

On fixe de manière covalente la Roquine sur des billes de résine et on effectue plusieurs cycles de sélection d'ARN à partir d'une banque combinatoire.

Rappelez très brièvement les étapes du SELEX et la caractéristique des ARN qui sont obtenus après plusieurs cycles.

(2 points - Question de cours, cf poly page 100) Les étapes du SELEX sont les suivantes :

- (i) Synthèse d'un pool d'oligonucléotide ADN dégénéré comportant une séquence promotrice
- (ii) Transcription *in vitro* d'un pool d'ARN à partir de ces oligonucléotides ADN
- (iii) Sélection par affinité sur les billes de résine avec le ligand immobilisé
- (iv) Éluion des ARN retenus
- (v) RT-PCR des ARN sélectionnés en ADN

On peut répéter ces étapes plusieurs fois. Enfin, on clone et on séquence ces ADN, pour identifier leur séquence spécifique.

Les ARN sélectionnés, appelés aptamères, ont en général une **affinité élevée pour le ligand immobilisé**, ici la Roquine.

III-c) Pour identifier très précisément les motifs d'ARN en interaction avec la Roquine, on réalise une expérience de SELEX.

On fixe de manière covalente la Roquine sur des billes de résine et on effectue plusieurs cycles de sélection d'ARN à partir d'une banque combinatoire.

Rappelez très brièvement les étapes du SELEX et la caractéristique des ARN aptamères qui sont obtenus après plusieurs cycles.

III-d) On détermine les séquences nucléotidiques d'un échantillon des aptamères obtenus après SELEX contre la Roquine. On retrouve dans ces séquences un motif partiellement conservé, les séquences correspondantes sont listées ci-dessous (les nucléotides strictement conservés sont en gras) :

Aptamère 1	GUUUUCUGUGAAAAC
Aptamère 2	GUUUUCUAUGAAA AU
Aptamère 3	AGUUUCUGUGAAACU
Aptamère 4	CUUUUCUGUGAAAAG
Aptamère 5	GUAUUCUAUGAAUAC

En quoi la comparaison de ces différentes séquences permet d'affirmer qu'elles forment une structure secondaire conservée ?

(2 points) On remarque que la région centrale et en particulier les deux zones conservées UUUCU . GAA peuvent former un début de structure en tige-boucle par appariement des régions soulignées. Les variations de part et d'autre de cette région centrale sont systématiquement des co-variations qui préservent l'existence d'appariements de bases (G-C, G-U ou AU) au sein d'une région en hélice.

Voir aussi le schéma ci après

III-e) Dessinez cette structure pour l'aptamère 1.

(1 point)

```
      G
     U  U
    C-G
    U-A
    U-A
    U-A
    U-A
    G-C
```


- III-f) Avec les mêmes billes sur lesquelles on a immobilisé la Roquine, on recherche des ligands de cette protéine dans un extrait cellulaire, par une expérience de co-précipitation. On identifie que la Roquine fixe Caf-1, une « déadénylase », enzyme spécialisée dans l'hydrolyse de la queue poly(A) des ARNm. Proposez un mécanisme expliquant l'inhibition de l'expression du co-activateur ICOS par la Roquine.

(2 points) La Roquine se fixe dans la région 3'-UTR de l'ARNm du co-activateur ICOS, probablement sur une structure en tige-boucle analogue à celle identifiée grâce à l'approche SELEX.

Elle recrute ensuite la déadénylase Caf-1 qui va vraisemblablement hydrolyser la queue poly(A) de l'ARNm ICOS auquel elle est fixée. Ceci abolit la traduction (plus de formation de pseudocercle) et conduit probablement à la dégradation de l'ARNm.

Sans queue poly(A), l'extrémité 3' de l'ARNm ICOS n'est en effet plus protégé par la fixation de PABP, ce qui le rend vulnérable à l'attaque par des exonucléases.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Réparation par excision du nucléotides chez les mammifères Correction

Les annales reprises par l'association Amical Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Réparation par excision de nucléotides chez les mammifères

*Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé*

La réparation par excision de nucléotides (**voie NER** : *nucleotide excision repair*) est l'un des mécanismes importants de réparation de lésions dans l'ADN. C'est un mécanisme complexe, conservé dans l'évolution, qui fait intervenir un certain nombre de facteurs protéiques importants. Pour la plupart de ces facteurs, la perte de fonction à la suite d'une mutation conduit à des phénotypes d'hypersensibilité aux UV et, chez l'homme, à des pathologies appelées Xeroderma Pigmentosum (XP). Pour cette raison, plusieurs de ces facteurs sont appelés XPA, XPB, XPC...

Le présent problème a pour objet d'étudier le rôle de certaines de ces protéines dans la réparation mécanisme.

- 1) L'irradiation UV de l'ADN conduit à la formation dimères de pyrimidines par formation d'un cycle cyclobutane. Chez la plupart des espèces vivantes, bactéries, plantes ou animaux, cette lésion de l'ADN est réparée par un mécanisme direct, faisant appel à une activité photolyase, ainsi qu'évoqué dans le cours.

Les mammifères placentaires¹, et en particulier l'homme, constituent une exception et n'ont pas de photolyase. Chez l'homme, les dimères de thymines sont réparés par **excision de nucléotides**.

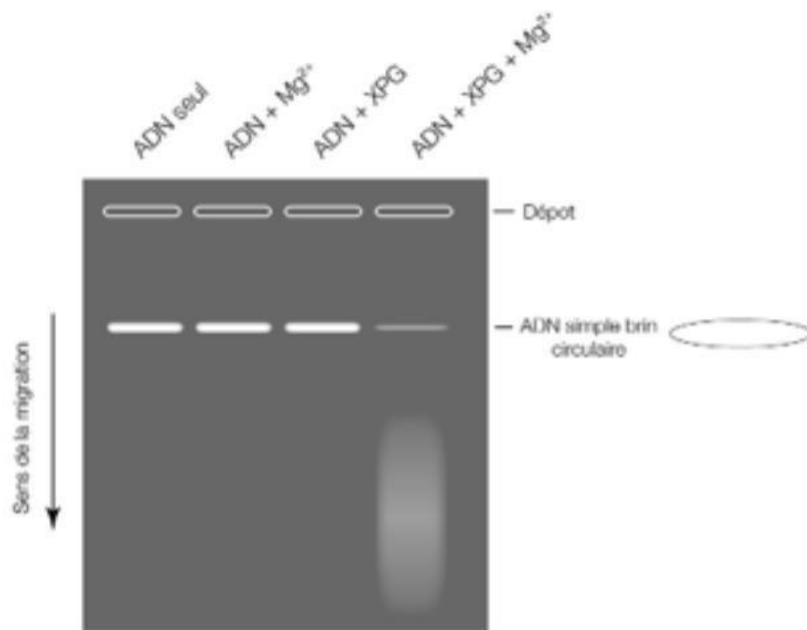
- a) Pourquoi la voie de réparation par **excision de base** ne permet pas de réparer les dimères de thymine ?
- b) Pourquoi la voie NER est elle la mieux adaptée à la réparation de ce type de lésion ?
- c) En quoi cette spécificité des mammifères placentaires explique le phénotype de sensibilité aux UV des patients déficients dans l'un des facteurs de la voie NER ?

- 2) On veut caractériser l'activité de la protéine XPG dans le mécanisme NER. Pour cela on purifie à homogénéité la protéine XPG recombinante et on analyse son activité *in vitro* sur des substrats ADN. Dans un premier temps, on utilise un substrat ADN simple brin circulaire².

On incube cet ADN en présence de la protéine XPG. Après incubation, la protéine est éliminée par extraction. L'ADN est alors analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. Les molécules d'ADN présentes dans le gel sont révélées par coloration au bromure d'éthidium. Le résultat est montré ci-après.

¹ On trouve en revanche une activité photolyase chez les mammifères marsupiaux (kangourou, koala...).

² On peut pour cela utiliser certains phages (M13, phiX174, fd), dont le génome est constitué d'un ADN simple brin circulaire



Interprétez le résultat de cette expérience :

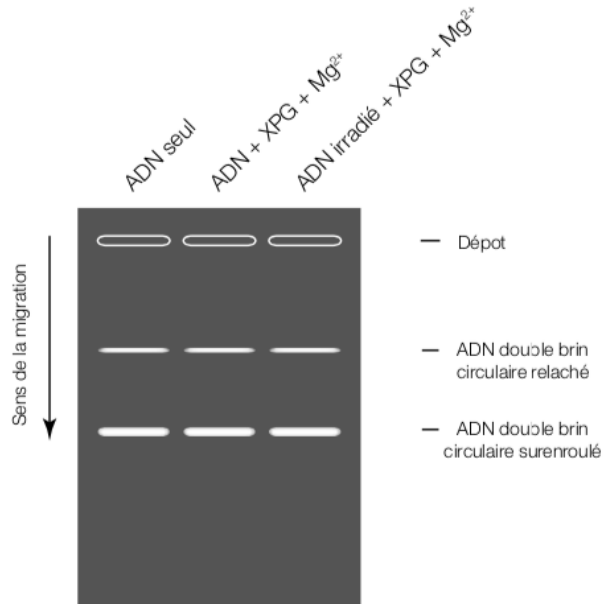
- Quelle est l'action d'XPG sur l'ADN simple-brin circulaire ?
- Quel est le rôle du magnésium ?
- Pourquoi observe-t-on une «trainée» sur la piste droite du gel ?
- Quel peut-être l'intérêt d'utiliser un substrat ADN simple-brin circulaire plutôt que linéaire ?

3) On réalise le même type d'expérience, cette fois-ci avec des substrats ADN circulaires double-brin surenroulés et relâchés. Pour tester l'influence éventuelle de dimères de pyrimidines, on effectue également l'expérience avec de l'ADN irradié aux UV, dans des conditions qui conduisent à la formation de ces lésions.

Les conditions d'incubation (concentrations, durée...) sont identiques à celle de l'expérience précédente avec l'ADN simple-brin. Les résultats sont figurés ci-contre.

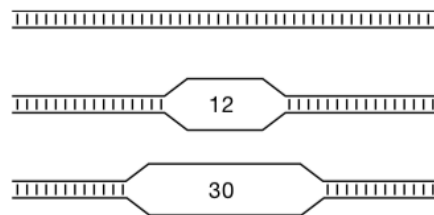
a) Interprétez cette expérience et concluez sur la spécificité de substrat de XPG.

b) Compte-tenu de cette spécificité, quelle action **enzymatique** préalable est nécessaire pour que XPG puisse agir sur l'ADN endommagé dans le contexte du mécanisme de réparation par excision de nucléotides ? Quels sont les facteurs qui sont responsables de cette action dans la voie NER ?

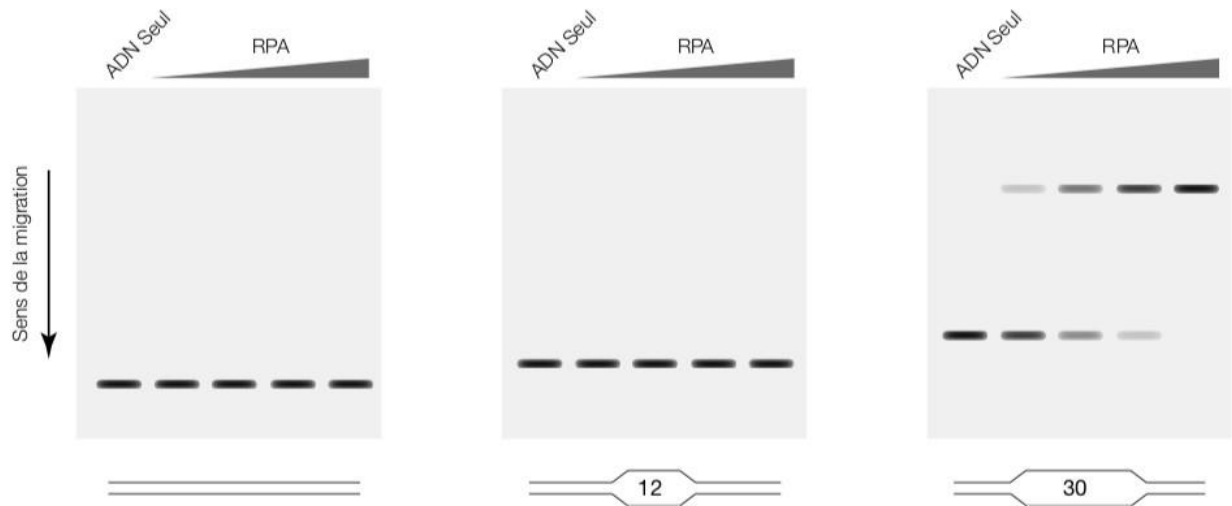


4) Un facteur clé de la réparation par excision de nucléotides est la protéine RPA ou *replication protein A*. Elle intervient non-seulement dans la réparation par excision de nucléotides, mais aussi dans la réplication et la recombinaison, deux autres mécanismes faisant intervenir l'ADN.

On s'intéresse donc à l'interaction avec l'ADN de la protéine RPA. Pour cela, on synthétise trois substrats ADN synthétiques, chacun composé de deux oligonucléotides partiellement ou totalement appariés. Le premier est un duplex parfaitement complémentaire. Les deux autres comportent une boucle interne non-appariée, soit de 12 nucléotides, soit de 30 nucléotides, suivant le schéma ci-dessous :



On étudie ensuite la fixation de RPA sur ces différents ADN, par une expérience de retard sur gel. Les oligonucléotides sont marqués radioactivement, puis incubés avec la protéine RPA purifiée. Les complexes éventuellement formés sont analysés par électrophorèse en conditions **non-dénaturantes**, puis révélés par autoradiographie. Les résultats pour les trois substrats ADN sont indiqués sur la figure ci-dessous. Pour chaque expérience, on a utilisé des concentrations croissantes de RPA de gauche à droite (symbolisée par le triangle gris), pour une concentration fixe d'ADN.



a) Interprétez ces expériences : quelle est la spécificité de RPA ?

b) Quelle caractéristique spécifique de la réparation par excision de nucléotides pourrait être expliquée par cette propriété de RPA ?

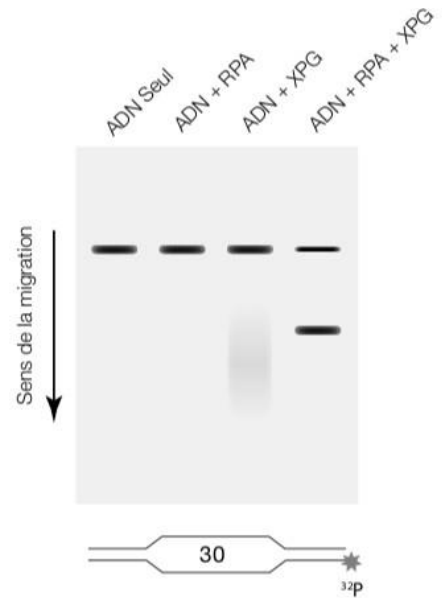
5) La protéine RPA est souvent trouvée au sein d'assemblages protéiques et on s'intéresse donc aux facteurs de la réparation qui pourraient former des **interactions directes** avec elle. On dispose de RPA et de chacun des facteurs suivants purifiés individuellement : XPA, XPB, XPC, XPD, XPG, XPF/ERCC1.

a) Quelle type d'expérience feriez vous pour identifier si RPA interagit directement avec certains de ces facteurs ?

b) Pourquoi est-il important d'utiliser des facteurs purifiés et en particulier de s'assurer qu'il n'y a pas d'ADN dans cette expérience ?

6) L'expérience précédente montre que, parmi les protéines listées (XPA, XPB, XPC, XPD, XPG, XPF/ERCC1), RPA s'associe directement seulement à XPA et XPG.

On réalise alors une expérience pour analyser l'action combinée de XPG et RPA sur l'ADN. On utilise le substrat ADN avec la boucle interne de 30 nucléotides de la question 4) que l'on marque radioactivement sur l'un des deux oligonucléotides à son extrémité 5'. On incube ensuite avec XPG et/ou RPA. Les protéines sont éliminées par extraction et les produits ADN de la réaction sont analysés par électrophorèse puis autoradiographie. Les résultats sont présentés ci-contre.



a) Interprétez cette expérience : quel est le rôle de l'association RPA/XPG dans le processus ?

b) XPA, l'autre protéine qui interagit avec RPA, se fixe directement sur la lésion de l'ADN. En quoi la combinaison de ces fonctions de XPA, XPG et RPA contribue à la précision de la réparation par excision de nucléotides ?



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Réparation par excision du nucléotides chez les mammifères Correction

Les annales reprises par l'association Amical Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Réparation par excision de nucléotides chez les mammifères

Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé

La réparation par excision de nucléotides (**voie NER** : *nucleotide excision repair*) est l'un des mécanismes importants de réparation de lésions dans l'ADN. C'est un mécanisme complexe, conservé dans l'évolution, qui fait intervenir un certain nombre de facteurs protéiques importants. Pour la plupart de ces facteurs, la perte de fonction à la suite d'une mutation conduit à des phénotypes d'hypersensibilité aux UV et, chez l'homme, à des pathologies appelées Xeroderma Pigmentosum (XP). Pour cette raison, plusieurs de ces facteurs sont appelés XPA, XPB, XPC...

Le présent problème a pour objet d'étudier le rôle de certaines de ces protéines dans la réparation mécanisme.

- 1) L'irradiation UV de l'ADN conduit à la formation dimères de pyrimidines par formation d'un cycle cyclobutane. Chez la plupart des espèces vivantes, bactéries, plantes ou animaux, cette lésion de l'ADN est réparée par un mécanisme direct, faisant appel à une activité photolyase, ainsi qu'évoqué dans le cours.

Les mammifères placentaires¹, et en particulier l'homme, constituent une exception et n'ont pas de photolyase. Chez l'homme, les dimères de thymines sont réparés par **excision de nucléotides**.

- a) Pourquoi la voie de réparation par **excision de base** ne permet pas de réparer les dimères de thymine ?
- b) Pourquoi la voie NER est elle la mieux adaptée à la réparation de ce type de lésion ?
- c) En quoi cette spécificité des mammifères placentaires explique le phénotype de sensibilité aux UV des patients déficients dans l'un des facteurs de la voie NER ?

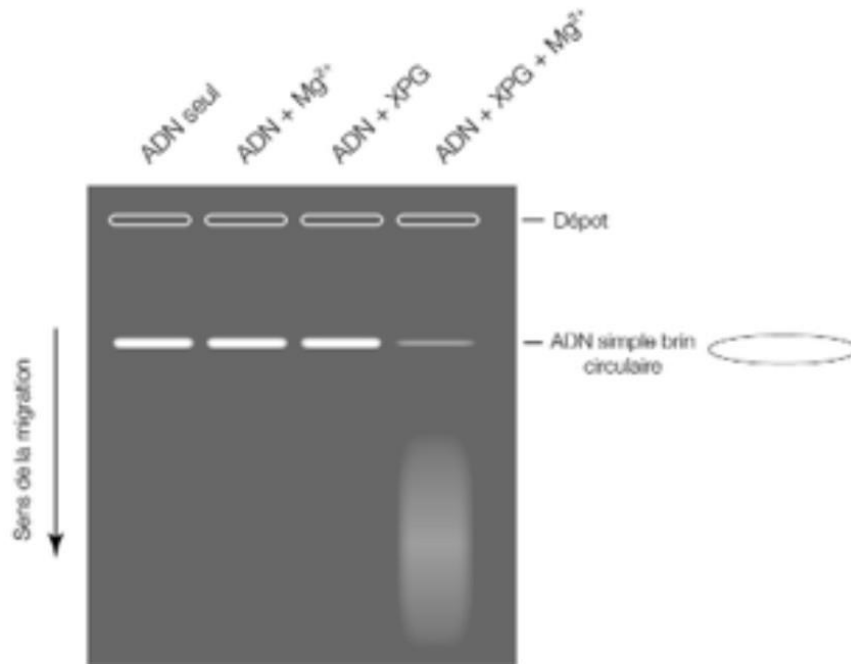
a) La réparation par excision de base ne répare que les dommages limités à **une seule** base, pas les lésions étendues. Les dimères de pyrimidines sont une lésion étendue sur deux bases consécutives. **(1 point)**

b) La voie NER permet précisément de réparer les lésions étendues et déformantes localisées sur un des deux brins. **(2 points)**

c) En l'absence de photolyase, à part la NER, il n'y a pas d'autre mécanisme de réparation des dimères de pyrimidines induits par les UV. Cette absence de redondance explique le phénotype de sensibilité aux UV associé aux mutations dans les gènes des facteurs de la voie NER. **(1 point)**

- 2) On veut caractériser l'activité de la protéine XPG dans le mécanisme NER. Pour cela on purifie à homogénéité la protéine XPG recombinante et on analyse son activité *in vitro* sur des substrats ADN. Dans un premier temps, on utilise un substrat ADN simple brin circulaire².

On incube cet ADN en présence de la protéine XPG. Après incubation, la protéine est éliminée par extraction. L'ADN est alors analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. Les molécules d'ADN présentes dans le gel sont révélées par coloration au bromure d'éthidium. Le résultat est montré ci-après.



Interprétez le résultat de cette expérience :

- Quelle est l'action d'XPG sur l'ADN simple-brin circulaire ?
- Quel est le rôle du magnésium ?
- Pourquoi observe-t-on une «trainée» sur la piste droite du gel ?
- Quel peut-être l'intérêt d'utiliser un substrat ADN simple-brin circulaire plutôt que linéaire ?

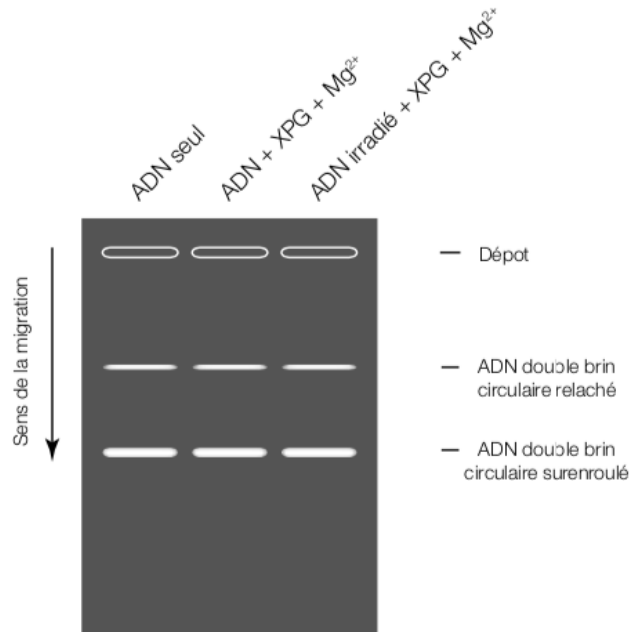
- XPG est **une nucléase qui clive l'ADN simple brin circulaire** en présence de Mg^{2+} , ceci se manifeste par la diminution d'intensité de la bande correspondant à l'ADN intact et par l'apparition de fragments de taille plus petite (qui migrent plus vite). **(1 point)**
- Le Mg^{2+} est un **contre-ion des phosphates** de l'ADN, c'est un co-facteur essentiel à la plupart des enzymes agissant sur les acides nucléiques. **(1 point)**
- La présence d'une trainée indique la présence d'une multitude de fragments de l'ADN initial, résultant des coupures de l'ADN simple brin initial. Ceci suggère que **la coupure par XPG est peu ou pas spécifique** et peut se produire à de multiples endroits. **(2 points)**
- L'ADN circulaire n'a pas d'extrémités 5' ou 3' libres. Ceci indique que XPG est une **endonucléase** et pas une exonucléase qui ne s'attaquerait qu'aux extrémités. **(1 point)**

3) On réalise le même type d'expérience, cette fois-ci avec des substrats ADN circulaires double-brin surenroulés et relâchés. Pour tester l'influence éventuelle de dimères de pyrimidines, on effectue également l'expérience avec de l'ADN irradié aux UV, dans des conditions qui conduisent à la formation de ces lésions.

Les conditions d'incubation (concentrations, durée...) sont identiques à celle de l'expérience précédente avec l'ADN simple-brin. Les résultats sont figurés ci-contre.

a) Interprétez cette expérience et concluez sur la spécificité de substrat de XPG.

b) Compte-tenu de cette spécificité, quelle action **enzymatique** préalable est nécessaire pour que XPG puisse agir sur l'ADN endommagé dans le contexte du mécanisme de réparation par excision de nucléotides ? Quels sont les facteurs qui sont responsables de cette action dans la voie NER ?

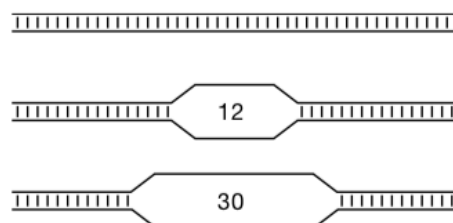


a) L'expérience ne permet de visualiser aucune différence entre les pistes et donc ne met en évidence aucune action de XPG sur l'ADN double brin, qu'il soit relâché ou surenroulé. Ceci est vrai même en présence de dimères de pyrimidines dans l'ADN (ADN irradié). XPG est donc **une endonucléase spécifique de l'ADN simple brin**, sans action sur le double-brin. (2 points)

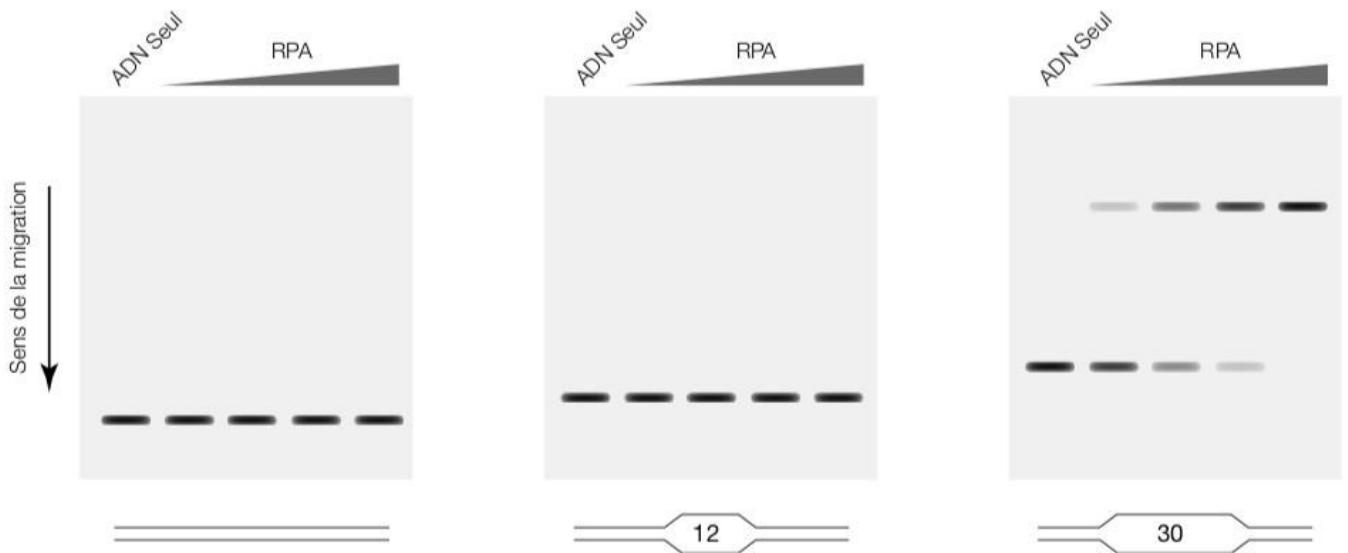
b) L'ADN génomique est bien évidemment double-brin. Pour permettre l'action de XPG, il faut donc en séparer les brin au préalable, ce qui est réalisé par des **hélicases** à ADN. Les deux hélicases impliquées dans la réparation par excision de nucléotides sont les facteurs **XPB** et **XPD**. (1 point)

4) Un facteur clé de la réparation par excision de nucléotides est la protéine RPA ou *replication protein A*. Elle intervient non-seulement dans la réparation par excision de nucléotides, mais aussi dans la réplication et la recombinaison, deux autres mécanismes faisant intervenir l'ADN.

On s'intéresse donc à l'interaction avec l'ADN de la protéine RPA. Pour cela, on synthétise trois substrats ADN synthétiques, chacun composé de deux oligonucléotides partiellement ou totalement appariés. Le premier est un duplex parfaitement complémentaire. Les deux autres comportent une boucle interne non-appariée, soit de 12 nucléotides, soit de 30 nucléotides, suivant le schéma ci-dessous :



On étudie ensuite la fixation de RPA sur ces différents ADN, par une expérience de retard sur gel. Les oligonucléotides sont marqués radioactivement, puis incubés avec la protéine RPA purifiée. Les complexes éventuellement formés sont analysés par électrophorèse en conditions **non-dénaturantes**, puis révélés par autoradiographie. Les résultats pour les trois substrats ADN sont indiqués sur la figure ci-dessous. Pour chaque expérience, on a utilisé des concentrations croissantes de RPA de gauche à droite (symbolisée par le triangle gris), pour une concentration fixe d'ADN.



a) Interprétez ces expériences : quelle est la spécificité de RPA ?

b) Quelle caractéristique spécifique de la réparation par excision de nucléotides pourrait être expliquée par cette propriété de RPA ?

a) On ne constate de retard induit par RPA que dans le cas de l'ADN contenant une boucle interne de 30 nucléotides (panneau de droite). RPA ne se fixe pas sur l'ADN double-brin (pas de retard à droite), ni sur une région simple brin de taille réduite (boucle de 12 nucléotides, au centre). On peut en conclure que RPA se lie probablement aux régions d'ADN simple brin de taille minimale comprise entre 13 et 30 nucléotides. (2 points)

b) Dans la réparation par la voie NER, le brin d'ADN excisé possède une taille caractéristique entre 17 et 32 nucléotides, puisque les excisions se font 15 à 24 nucléotides en amont et 2 à 8 nucléotides en aval de la lésion. Cette longueur semble très proche de celle nécessaire à la fixation de RPA (entre 13 et 30 nucléotides). La longueur de la région d'ADN simple brin fixée par RPA pourrait ainsi conditionner la taille de la zone excisée lors de la réparation. (2 points)

5) La protéine RPA est souvent trouvée au sein d'assemblages protéiques et on s'intéresse donc aux facteurs de la réparation qui pourraient former des **interactions directes** avec elle. On dispose de RPA et de chacun des facteurs suivants purifiés individuellement : XPA, XPB, XPC, XPD, XPG, XPF/ERCC1.

a) Quelle type d'expérience feriez vous pour identifier si RPA interagit directement avec certains de ces facteurs ?

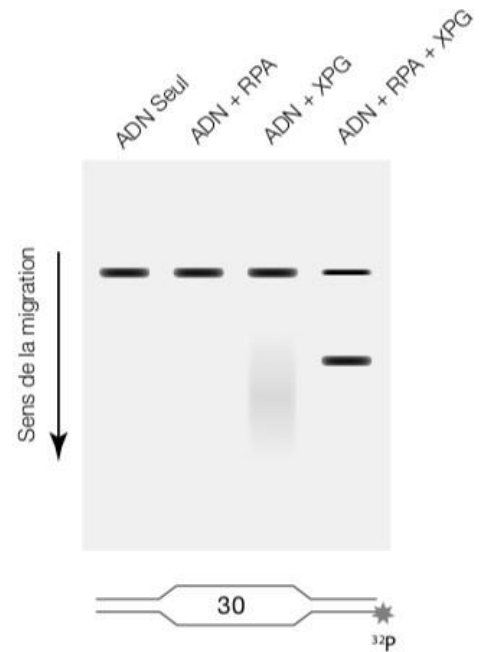
b) Pourquoi est-il important d'utiliser des facteurs purifiés et en particulier de s'assurer qu'il n'y a pas d'ADN dans cette expérience ?

a) **Co-Immunoprécipitation** (vu en cours). Autres possibilités : cross-link, techniques physiques (fluorescence, résonance plasmonique de surface, RMN...). (1 point)

b) XPG et RPA sont des protéines interagissant toutes les deux l'ADN ainsi qu'on l'a vu dans les questions précédentes. L'observation d'un complexe en présence d'ADN ne serait pas probant, car il pourrait s'agir d'un complexe ternaire, où RPA et XPG seraient simultanément liés à la même molécule d'ADN, sans qu'il y ait une **interaction directe** entre les deux, ainsi qu'on cherche à le démontrer ici. (2 points)

6) L'expérience précédente montre que, parmi les protéines listées (XPA, XPB, XPC, XPD, XPG, XPF/ERCC1), RPA s'associe directement seulement à XPA et XPG.

On réalise alors une expérience pour analyser l'action combinée de XPG et RPA sur l'ADN. On utilise le substrat ADN avec la boucle interne de 30 nucléotides de la question 4) que l'on marque radioactivement sur l'un des deux oligonucléotides à son extrémité 5'. On incube ensuite avec XPG et/ou RPA. Les protéines sont éliminées par extraction et les produits ADN de la réaction sont analysés par électrophorèse puis autoradiographie. Les résultats sont présentés ci-contre.



a) Interprétez cette expérience : quel est le rôle de l'association RPA/XPG dans le processus ?

b) XPA, l'autre protéine qui interagit avec RPA, se fixe directement sur la lésion de l'ADN. En quoi la combinaison de ces fonctions de XPA, XPG et RPA contribue à la précision de la réparation par excision de nucléotides ?

a) RPA seul n'a pas d'activité sur l'ADN. En l'absence de RPA, on voit que XPG effectue quelques coupures non-spécifiques dans l'ADN, probablement au niveau de la boucle interne de 30 nucléotides, puisque XPG est spécifique de l'ADN simple-brin, comme vu plus haut. Cela se traduit par l'apparition d'une trainée faible de fragments dans la troisième piste en partant de la gauche. **(2 points)**

En présence de RPA, on observe une efficacité de coupure par XPG nettement augmentée. D'autre part cette coupure devient spécifique, puisqu'on n'observe plus qu'un seul fragment bien défini (piste de droite). L'association RPA/XPG permet donc (i) d'augmenter sensiblement l'activité endonucléolytique de XPG et (ii) de positionner le point de coupure par XPG de manière précise par rapport à la « bulle » de réparation dans l'ADN.

b) XPA se fixant sur la lésion de l'ADN, recrute et positionne RPA. RPA sert à maintenir ouverte (simple-brin) une région de 15 à 30 nucléotides autour de cette lésion. RPA recrute ensuite XPG en aval de la lésion pour permettre la coupure précise du brin endommagé du côté 3'. **(2 points)**



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Téломères et Télomérase Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Téломères et Télomérase

Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé

Les différentes parties du problème sont indépendantes

Les **téломères** sont des structures particulières que l'on trouve à l'extrémité des chromosomes eucaryotes et qui les protègent de la dégradation et de réarrangements.

Les téломères sont constitués de **répétitions d'un motif court**, riche en G sur un brin appelé brin « G » et riche en C sur le brin complémentaire, appelé brin « C ». La séquence exacte de ce motif varie suivant les espèces.

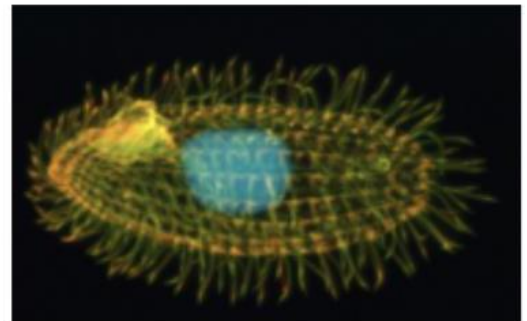
Le présent problème a pour objet l'étude de la réplication et de la synthèse des téломères et de la télomérase, l'enzyme qui effectue cette synthèse.

Les téломères des chromosomes eucaryotes ont été d'abord étudiés chez un organisme modèle unicellulaire, *Tetrahymena thermophila* (photo à droite), appartenant à la famille des ciliés (espèces proches de paramécie, recouvertes de cils natatoires).

Les téломères de *Tetrahymena* sont constitués de l'hexanucléotide TTGGGG, répété un très grand nombre de fois :



et de la séquence complémentaire sur l'autre brin d'ADN



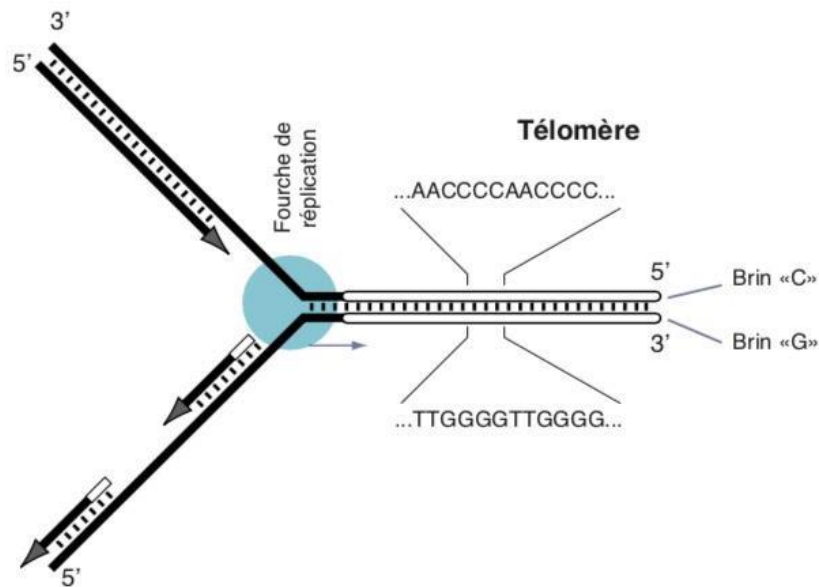
I- Réplication classique de l'ADN et téломères

La réplication classique de l'ADN au niveau de fourche de réplication est assurée par le réplisome.

I-a) Quelles sont les protéines nécessaires à la réplication associées au sein du réplisome ?

I-b) Quelle étape préliminaire est requise pour que l'ADN polymérase répliquative puisse démarrer la synthèse des fragments d'Okazaki

I-c) La figure ci-après montre schématiquement une fourche de réplication arrivant au niveau d'un téломère, avec l'indication des extrémités 5' et 3' des brins d'ADN, des séquences télomériques et du brin « G » et du brin « C » définis dans l'introduction.



La réplication complète de l'un des deux brins du télomère par le réplisome pose problème. De quel brin s'agit-il (brin « C » ou brin « G ») ? Pourquoi ?

I-d) Quelles structures particulières peut former l'ADN du brin « G » et en quoi cela peut interférer avec le processus de réplication classique ?

I-e) En l'absence d'autres processus de synthèse des télomères, à quoi peut-on s'attendre pour l'extrémité des chromosomes à l'issue de divisions cellulaires successives ?

II- Télomérase et activité de synthèse des télomères

Dans un **extrait nucléaire** de *Tetrahymena*, on recherche une enzyme capable de synthétiser les télomères.

Pour cela, on utilise un substrat synthétique ci-dessous, composé de 4 répétitions du motif TTGGGG, et **marqué radioactivement** à son extrémité 5'.



On l'incube en présence de l'extrait et de différents mélanges de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP).

A l'issue de l'incubation, les protéines sont éliminées et les produits de la réaction sont analysés par électrophorèse sur gel dénaturant, révélée par autoradiographie. Le résultat de l'expérience est indiqué ci-contre (à droite).

Interprétez le résultat de cette expérience en répondant aux questions ci-après



II-a) Quels nucléotides (dNTP) sont nécessaires à l'allongement du substrat?

11-b) La synthèse observée montre un comportement périodique répétitif. Quelle est la longueur caractéristique de cette périodicité ? À quelle propriété du télomère pouvez-vous relier cette longueur caractéristique ? Que pouvez-vous en conclure sur la nature de la séquence synthétisée ?

11-c) Expliquez la bande supplémentaire unique observée dans la piste avec seulement du dTTP ajoutée (« T »). En quoi cela corrobore-t-il votre réponse à la question précédente sur la nature de la séquence synthétisée ?

On réalise une deuxième expérience de contrôle dans les mêmes conditions, mais avec d'autres substrats marqués, en présence des **quatre dNTP** et de l'extrait nucléaire. On regarde si on obtient un allongement répétitif du substrat, comme dans l'expérience précédente.

Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-après (++, synthèse efficace ; + synthèse limitée ; - pas de synthèse) :

Substrat	Synthèse
5'-*TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG-3'	++
5'-*TTGGGGTTGGGG-3'	+
5'-*TTGGGG-3'	
5'-* CCCCCAACCCCAACCCCAACCCCAA-3'	

II-d) Que pouvez-vous en conclure sur la spécificité de substrat de l'enzyme responsable de cette synthèse ?

II-e) Cette synthèse utilise-t-elle le substrat comme brin matrice, à l'instar du mécanisme classique de réplication de l'ADN ? Justifiez votre réponse.

III- La télomérase

En utilisant le test d'activité utilisé dans la partie précédente, on réalise la purification l'enzyme responsable de l'allongement des télomères au moyen plusieurs étapes chromatographiques. Cette enzyme est appelée **télomérase**. Elle est composée de 8 sous-unités protéiques auxquelles on trouve systématiquement associé **un ARN non-codant**, long de 159 nucléotides.

III-a) Cet ARN est fortement associé à la télomérase : il n'est pas possible de le dissocier avec des traitements non-dénaturants. De plus, l'incubation de la télomérase purifiée en présence une ribonucléase abolit son activité. Que peut-on en conclure ?

Cet ARN est très structuré, à l'exception d'une région simple-brin qui comporte la séquence suivante, conservée chez les autres ciliés ayant un télomère de séquence répétée 5'-TTGGGG-3' :

5'-...CAACCCCAA...-3'

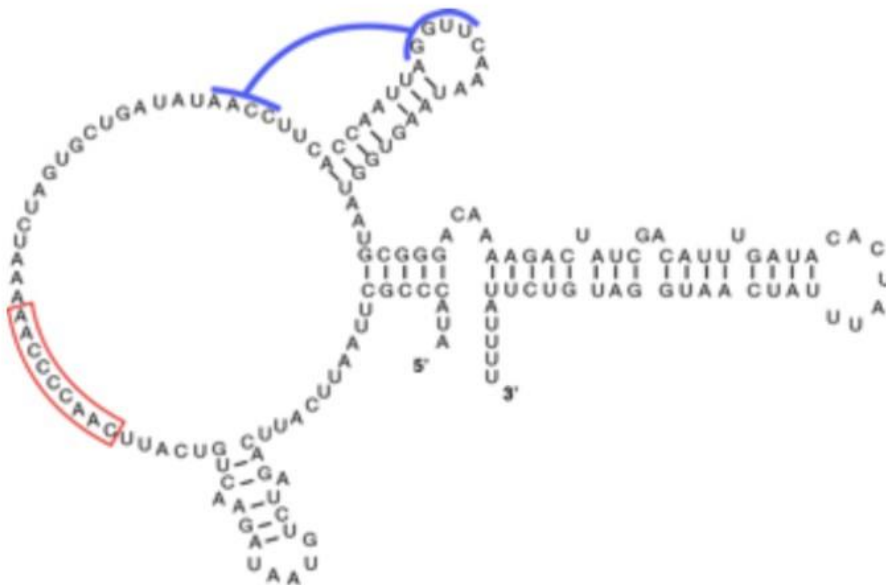
III-b) Quelle peut être la fonction de cette région de l'ARN dans le mécanisme d'action de la télomérase ?

III-c) Parmi les huit sous-unités protéiques de la télomérase, deux présentent des homologies de séquence avec celles des transcriptases inverses. Proposez un mécanisme d'action pour cette enzyme tenant compte de cette observation.

III-d) Vous disposez du gène codant l'ARN associé à la télomérase. Proposez une expérience permettant de démontrer votre proposition de la question précédente (question ouverte).

IV- Structure de l'ARN associé à la télomérase

La structure de l'ARN de la télomérase de *Tetrahymena* est donnée sur la figure suivante. La séquence de la région simple-brin conservée évoquée à la partie précédente est encadrée (en bas à droite).



La prédiction de structure prévoit de plus un appariement entre la séquence de la boucle située en haut et la grande boucle interne simple-brin (reliées par le trait épais sur la figure).

IV-a) Comment appelle-t-on ce type de structure ?

On examine la séquence de la région correspondante de cet ARN chez des espèces de ciliés voisines. Celles-ci sont indiquées ci-dessous (les régions prédites pour former l'appariement en question sont soulignées) :

Tetrahymena (référence) ...AACCUUCACCAAUUAGGUU...
Tetrahymena borealis ...UACCUUCACCAAUUAGGUA...
Tetrahymena capricornis...UGCCUUAACUACUUAGGUA...

Paramecium tetraurelia ...GAGUAUUGCUAC---AUUC...

IV-b) En quoi cette analyse comparative confirme ou infirme la prédiction d'appariement ? Justifiez votre réponse.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

L2 Semestre 4

Biochimie

**Téломère et Télomérase
Correction**

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Téломères et Télomérase

Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé

Les différentes parties du problème sont indépendantes

Les **téломères** sont des structures particulières que l'on trouve à l'extrémité des chromosomes eucaryotes et qui les protègent de la dégradation et de réarrangements.

Les téломères sont constitués de **répétitions d'un motif court**, riche en G sur un brin appelé brin « G » et riche en C sur le brin complémentaire, appelé brin « C ». La séquence exacte de ce motif varie suivant les espèces.

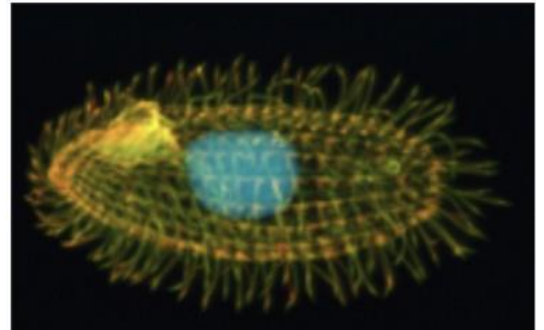
Le présent problème a pour objet l'étude de la réplication et de la synthèse des téломères et de la télomérase, l'enzyme qui effectue cette synthèse.

Les téломères des chromosomes eucaryotes ont été d'abord étudiés chez un organisme modèle unicellulaire, *Tetrahymena thermophila* (photo à droite), appartenant à la famille des ciliés (espèces proches de paramécie, recouvertes de cils natatoires).

Les téломères de *Tetrahymena* sont constitués de l'hexanucléotide TTGGGG, répété un très grand nombre de fois :

5'...TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG...-3'

et de la séquence complémentaire sur l'autre brin d'ADN



I- Réplication classique de l'ADN et téломères

La réplication classique de l'ADN au niveau de fourche de réplication est assurée par le réplisome.

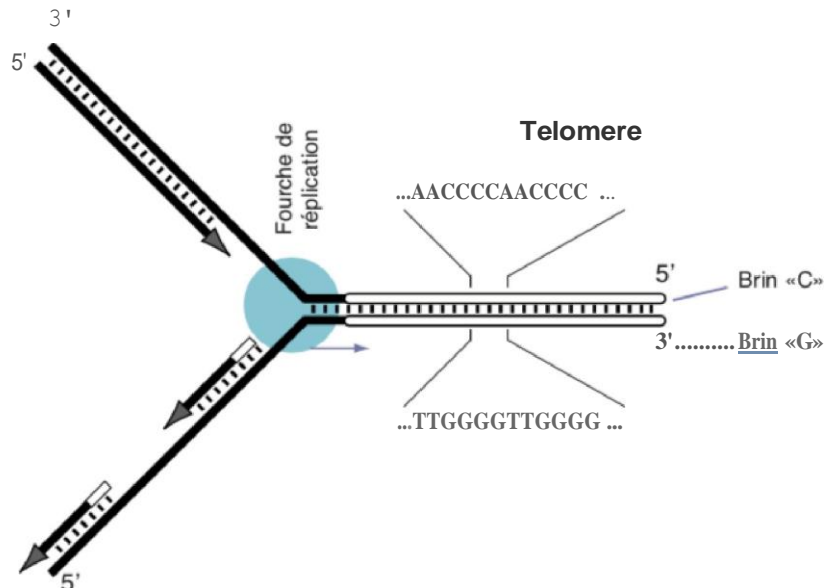
I-a) Quelles sont les protéines nécessaires à la réplication associées au sein du réplisome ?

(1 point) Le réplisome contient **5** types de protéines : (i) les ADN polymérases répliquatives, (ii) l'hélicase, (iii) la primase, (iv) les clamps et (v) le chargeur de clamp.

I-b) Quelle étape préliminaire est requise pour que l'ADN polymérase répliquative puisse démarrer la synthèse des fragments d'Okazaki

(1 point) Il faut d'abord que la primase synthétise une **amorce ARN**. L'ADN polymérase ne peut qu'allonger un brin à partir d'une extrémité 3'-OH.

I-c) La figure ci-après montre schématiquement une fourche de réplication arrivant au niveau d'un téломère, avec l'indication des extrémités 5' et 3' des brins d'ADN, des séquences télomériques et du brin « G » et du brin « C » définis dans l'introduction.



La replication complete de l'un des deux brins du telomere par le replisome pose probleme. De quel brin s'agit-il (brin « C » ou brin « G ») ? Pourquoi ?

(2 points : 1 pour le bon brin et l'autre pour l'explication) La replication du brin « C » ne pose pas de problemes, l'ADN potymerase qui synthetise le brin rapids va aller jusqu'a l'extremite du chromosome et fera une synthese comple1e. En revanche, **la replication du brin « G » pose probleme**. Le synthese du brin complementaire tout au bout du chromosome necessite d'abord la synthese d'une amorce par la primase pour pouvoir demarrer un frag'l7ent d'Okazaki. Si la primase ne démarre pas justs a l'extremite du chromosome, le brin complementaire du brin « G » sera incomplet et ii sera raccourci du cote 5".

1-d) Quelles structures particulieres peut former l'ADN du brin« G » et en quoi cela peut interferer avec le processus de replication classique ?

(1 points) Le brin« G » peut former des structures en **tetrades** (quadruplex de G). Les tetrades pourraient bloquer le recrutement de la primase.

1-e) En l'absence d'autres processus de synthese des telomeres, à quoi peut-on s'attendre pour l'extremite des chromosomes à l'issue de divisions cellulaires successives?

(1 point) Aun **raccourcissement progressif** du telomere, dont on va perdre un petit segment à chaque replication.

11-Telomerase et activite de synthese des telomeres

Dans un **extrait nucleaire** de *Tetrahymena*, on recherche une enzyme capable de synthetiser les telomeres.

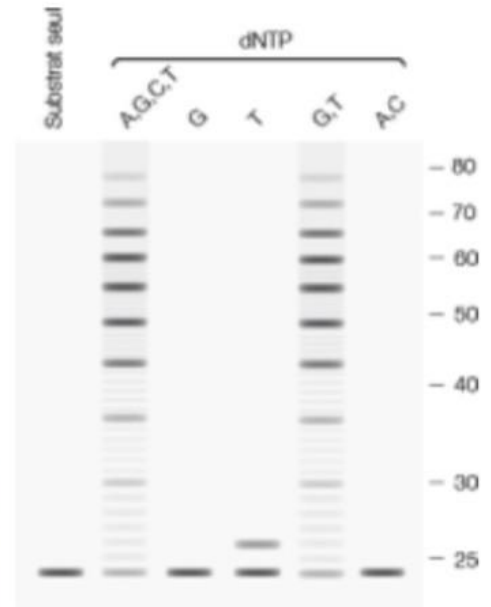
Pour cela, on utilise un substrat synthetique ci-dessous, compose de 4 repetitions du motif TTGGGG, et **marque radioactivement** à son extremite 5'.

5'-*TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG-3'

On l'incube en presence de l'extrait et de differents melanges de desoxyribonucleotides triphosphate (dNTP).

A l'issue de l'incubation, les protéines sont éliminées et les produits de la réaction sont analysés par électrophorèse sur gel dénaturant, révélée par autoradiographie. Le résultat de l'expérience est indiqué ci-contre (à droite).

Interprétez le résultat de cette expérience en répondant aux questions ci-après



II-a) Quels nucléotides (dNTP) sont nécessaires à l'allongement du substrat ?

(1 point) Il faut **du G et du T** (dGTP et dTTP). On a un allongement complet lorsqu'on ajoute seulement ces deux nucléotides, identique à celui qu'on obtient en ajoutant les quatre. Le G ou le T seul ne donnent pas d'allongement complet, les deux sont donc nécessaires.

II-b) La synthèse observée montre un comportement périodique répétitif. Quelle est la longueur caractéristique de cette périodicité ? A quelle propriété du télomère pouvez vous relier cette longueur caractéristique ? Que pouvez en conclure sur la nature de la séquence synthétisée ?

(2 points) Dans les pistes [A,G,C,T] et [G,T], on observe un motif périodique avec **une bande plus intense tous les 6 nucléotides**. Cette longueur correspond à celle du motif télomérique répété : TTGGGG. Si on relie ceci au fait que les 2 nucléotides nécessaires à l'allongement sont le G et le T (question précédente), on peut en conclure que la séquence synthétisée à partir du substrat est bien la séquence télomérique : TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG...

II-c) Expliquez la bande additionnelle unique observée dans la piste avec seulement du dTTP ajouté (« T »). En quoi cela corrobore-t-il votre réponse à la question précédente sur la nature de la séquence synthétisée ?

(1 point) La bande observée correspond à un allongement de deux nucléotides, nécessairement **deux T**, puisque c'est le seul nucléotide ajouté dans la réaction. Ce sont les deux premiers T du motif télomérique TTGGGG. L'allongement ne peut continuer au delà, puisque la réaction ne contient pas de G (dGTP). C'est cohérent avec l'explication précédente

On réalise une deuxième expérience de contrôle dans les mêmes conditions, mais avec d'autres substrats marqués, en présence des **quatre dNTP** et de l'extrait nucléaire. On regarde si on obtient un allongement répétitif du substrat, comme dans l'expérience précédente.

Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-après (++, synthèse efficace ; + synthèse limitée ; - pas de synthèse) :

Substrat	Synthèse
5'-★TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG-3'	++
5'-★TTGGGGTTGGGG-3'	+
5'-★TTGGGG-3'	-
5'-★CCCCAACCCCAACCCCAACCCCAA-3'	-

11-d) Que pouvez-vous en conclure sur la spécificité de substrat de l'enzyme responsable de cette synthèse ?

(1 point) L'enzyme est capable d'allonger le substrat à partir de **deux répétitions au moins** du motif télomérique et plus efficacement avec un plus grand nombre de répétition. Elle n'allonge pas un motif unique ou la séquence complémentaire

11-e) Cette synthèse utilise-t-elle le substrat comme brin matrice, à l'instar du mécanisme classique de répllication de l'ADN? Justifiez votre réponse.

(2 points) **Non.** Sinon la séquence synthétisée serait complémentaire du substrat (TTGGGG)₄ et contiendrait donc des A et des C. Or on n'observe aucun allongement lorsqu'on rajoute du C et du A (dATP et dCTP). On n'observe non plus aucun allongement lorsqu'on utilise un substrat (CCCCAA)₄ correspondant au brin complémentaire.

La synthèse ne se fait donc pas en utilisant le substrat comme brin matrice

III- La télomérase

En utilisant le test d'activité utilisé dans la partie précédente, on réalise la purification l'enzyme responsable de l'allongement des télomères au moyen plusieurs étapes chromatographiques. Cette enzyme est appelée **télomérase**. Elle est composée de 8 sous-unités protéiques auxquelles on trouve systématiquement associé **un ARN non-codant**, long de 159 nucléotides.

III-a) Cet ARN est fortement associé à la télomérase: il n'est pas possible de le dissocier avec des traitements non-dénaturants. De plus, l'incubation de la télomérase purifiée en présence d'une ribonucléase abolit son activité. Que peut-on en conclure?

(2 points) Que la télomérase active pourrait être une **ribonucléoprotéine** (ou particule ribonucléo-protéique) constituée d'un ARN et de protéines, comme les snRNP du spliceosome.

Cet ARN est très structuré, à l'exception d'une région simple-brin qui comporte la séquence suivante, conservée chez les autres ciliés ayant un télomère de séquence répétée 5'-TTGGGG-3'

5'-... CAACCCCAA... -3'

111-b) Quelle peut être la fonction de cette région de l'ARN dans le mécanisme d'action de la télomérase?

(2 points) Cette séquence d'ARN est localement complémentaire de la répétition télomérique :

```
...TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG._  
  |||||  
  AACCCCAAC
```

Elle pourrait donc servir de **matrice** à la synthèse des répétitions télomériques

111-c) Parmi les huit sous-unités protéiques de la télomérase, deux présentent des homologies de séquence avec celles des transcriptases inverses. Proposez un mécanisme d'action pour cette enzyme tenant compte de cette observation.

(2 points) Dans l'hypothese formulee a la question precedente, l'ARN de la telomerase sert de matrice a la synthese de la sequence telomerique. La telomerase doit donc polymeriser de l'ADN (telomerique) a partir d'ARN. C'est typiquement le type de reaction catalysee par une transcriptase inverse qui **polymerise de l'ADN a partir d'une matrice d'ARN**.

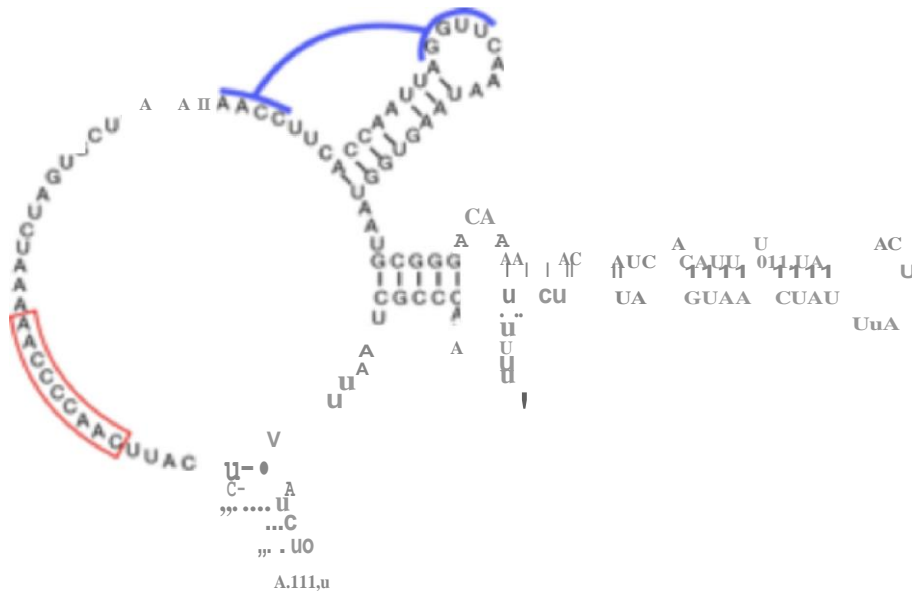
111-d) Vous disposez du gene codant l'ARN associe a la telomerase. Proposez une experience permettant de demontrer votre proposition de la question precedente (question ouverte).

(2 points) La reponse la plus simple (mais d'autres sont possibles) :

Effectuer une mutagenese dirigee sur la sequence supposee jouer le role de " matrice " : CMCCCCM, purifier la telomerase contenant cet ARN modifie pour voir si 9a modifie la sequence d'ADN telomerique synthetisee par l'enzyme mutante.

IV- Structure de l'ARN associe a la telomerase

La structure de l'ARN de la telomerase de *Tetrahymena* est donnee sur la figure suivante. La sequence de la region simple-brin conservee evoquee a la partie precedents est encadree (en bas a droite).



La prediction de structure prevoit de plus un appariement entre la sequence de la boucle situee en haut et la grande boucle internes simple-brin (reliees par le trait epais sur la figure).

IV-a) Comment appelle-t-on ce type de structure ?

(1 point) **Un pseudonoeud**

On examine la sequence de la region correspondante de cet ARN chez des especes de cilies voisines. Celles-ci sont indiquees ci-dessous (les regions predites pour former l'appariement en question sont soulignees):

Tetrahymena (reference) ...AACCUUCACCAAUUAGGUU...
Tetrahymena borealis ...UACCUUCACCAAUUAGGUA...
Tetrahymena capricornis ...UGCCUUAACUACUUAGGUA...

Paramecium tetraurelia ...GAGUAUUGCUAC---AUUC...

IV-b) En quoi cette analyse comparative confirme ou infirme la prédiction d'appariement ? Justifiez votre réponse.

(1 point) On observe des **covariations** entre les nucléotides de la première zone soulignée et ceux de la seconde zone soulignée. Chaque fois qu'on change un nucléotide dans la première, on a le nucléotide complémentaire dans la seconde. **Les appariements de bases sont conservés**, quelle que soit l'espèce on peut toujours former l'appariement. La structure de l'ARN est donc conservée, même si les nucléotides varient.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

CRISPR / Cas9 Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

CRISPR / Cas9

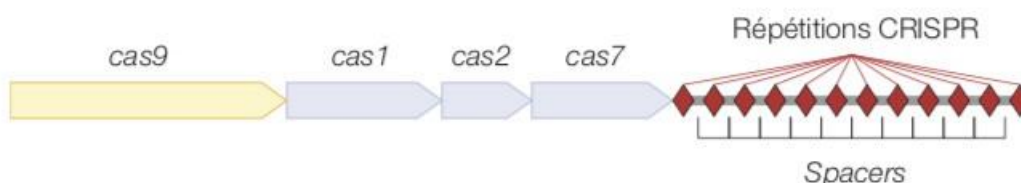
Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé

Le système CRISPR / Cas9 est un outil utilisé dans l'ingénierie des génomes pour introduire sélectivement des coupures dans les chromosomes à des sites spécifiques. Ces coupures sont ensuite utilisées pour induire des délétions, des insertions ou des remplacements ciblés dans le génome.

Présent dans l'ADN génomique des bactéries, le système CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) est à l'origine un système de défense contre les infections par des bactériophages. Il est composé d'une série de séquences répétées courtes (~30 paires de bases), régulièrement espacées par des segments de séquence unique appelés *spacer* (elles aussi longues d'environ 30 paires de bases),.

Immédiatement en amont de ce cluster de séquences répétées, on trouve plusieurs gènes codant des protéines dont la séquence ressemble à celles d'enzymes du métabolisme des acides nucléiques (nucléases, intégrases, recombinases...). Ces protéines sont appelées Cas, pour *CRISPR-associated*.

Dans ce problème, on s'intéresse au mécanisme de fonctionnement du système CRISPR du streptocoque A. Cas9 est l'une des protéines associées au cluster CRISPR chez cette espèce (schéma ci-dessous).



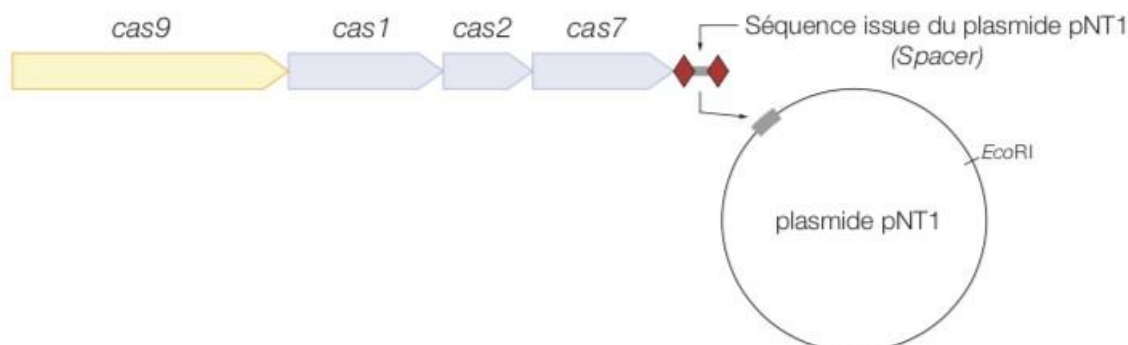
I- Rôle des spacers

L'analyse de la séquence des spacers entrelacés entre les répétitions CRISPR montre qu'il s'agit de séquences uniques, dont la plupart sont identiques à des segments de séquence de virus bactériophages infectant le streptocoque, ou bien à des segments de séquence de plasmides de streptocoque.

On constate que les souches de streptocoque qui portent un spacer CRISPR correspondant à un virus donné sont **spécifiquement résistantes à l'infection par ce virus**.

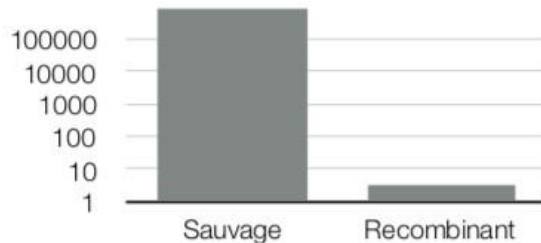
Pour comprendre le mécanisme de résistance, on réalise l'expérience suivante :

On construit une souche recombinante de streptocoque avec une région CRISPR/Cas simplifiée, ne contenant qu'**un seul spacer**, correspondant à la séquence d'un plasmide appelé pNT1. L'organisation modifiée est indiquée ci-dessous :



I-a) On dispose initialement de deux souches de streptocoque, (i) la souche sauvage, dont la région CRISPR ne contient pas de *spacer* homologue au plasmide pNT1, et (ii) la souche recombinante décrite ci-dessus, avec le *spacer* venant du plasmide pNT1. On essaye d'introduire le plasmide pNT1 par électroporation dans les deux souches, on mesure l'efficacité en testant la résistance à l'antibiotique chloramphénicol dont le gène est porté par pNT1. On mesure le nombre de colonies résistantes, et donc portant le plasmide, apparaissant dans chaque cas.

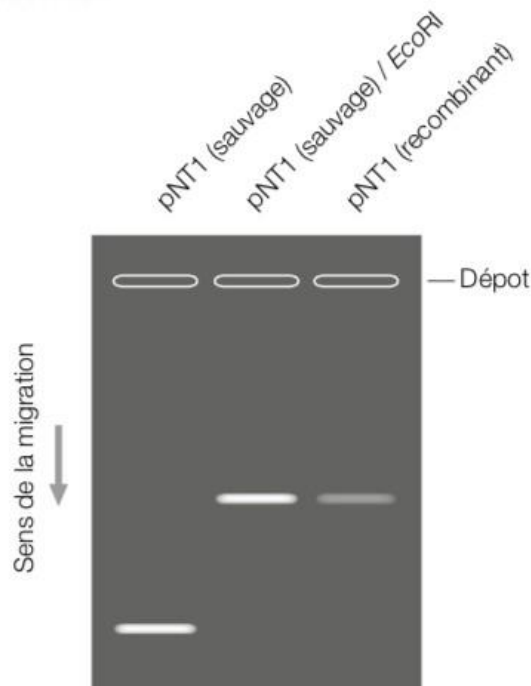
Le résultat de l'expérience est donné ci-dessous (échelle logarithmique):



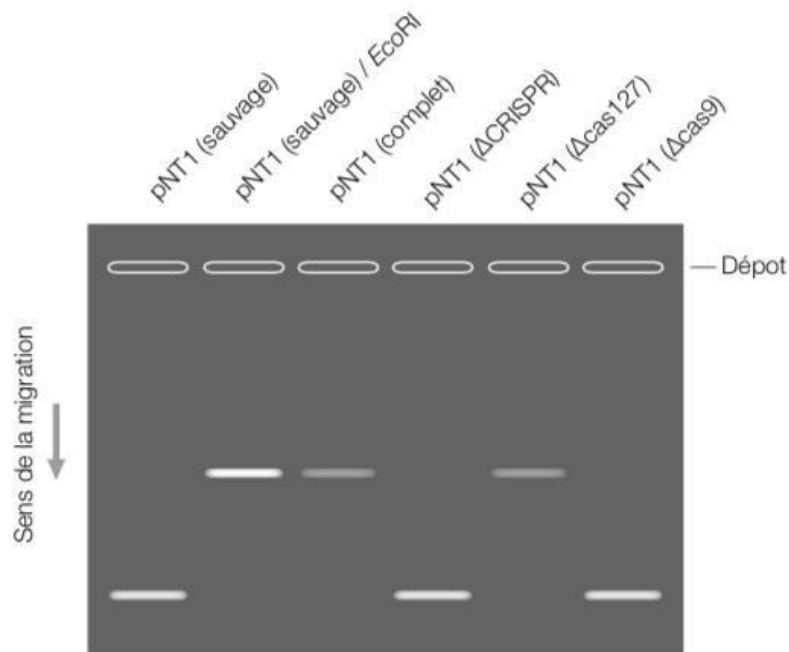
Interprétez le résultat de l'expérience. Quel est l'intérêt d'avoir réduit la région CRISPR à un seul *spacer* ?

I-b) On veut comprendre l'effet observé, pour cela purifie l'ADN du plasmide pNT1 **après introduction** dans les deux souches. On l'analyse directement par électrophorèse sur gel d'agarose. Comme témoin dans l'expérience, on analyse également l'ADN de pNT1 extrait de la souche sauvage, digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* qui possède **un site unique** de reconnaissance dans le plasmide (*cf* figure page précédente).

Le résultat du gel est indiqué ci dessous :



Interprétez le résultat de l'expérience, expliquez en particulier pourquoi l'efficacité de transformation par pNT1 dans la souche recombinante est réduite. A votre avis, pourquoi l'intensité de la bande avec pNT1 extrait de la souche recombinante est plus faible ?



Il-a) Interprétez le résultat de cette expérience. Qu'est ce qui est nécessaire et suffisant pour l'action sur le plasmide pNT1 par le système CRISPR/Cas ?

Il-b) La protéine Cas9 co-purifie systématiquement avec deux ARN différents de longueurs respectives 40 et 75 nucléotides (nt). Citez au moins un exemple de complexe ribonucléoprotéique associant de manière stable ARN(s) et protéine(s).

Il-c) On séquence les deux ARN associés à Cas9, le plus long (75 nt) correspond à un transcrit issu de la région immédiatement en amont des gènes *cas*, le second plus court, appelé ARNcr (cr pour CRISPR), (40nt) correspond à la séquence du *spacer* pNT1 et une partie de la séquence répétée.

Quel pourrait être le rôle de ce second ARN dans l'activité de Cas9 ?

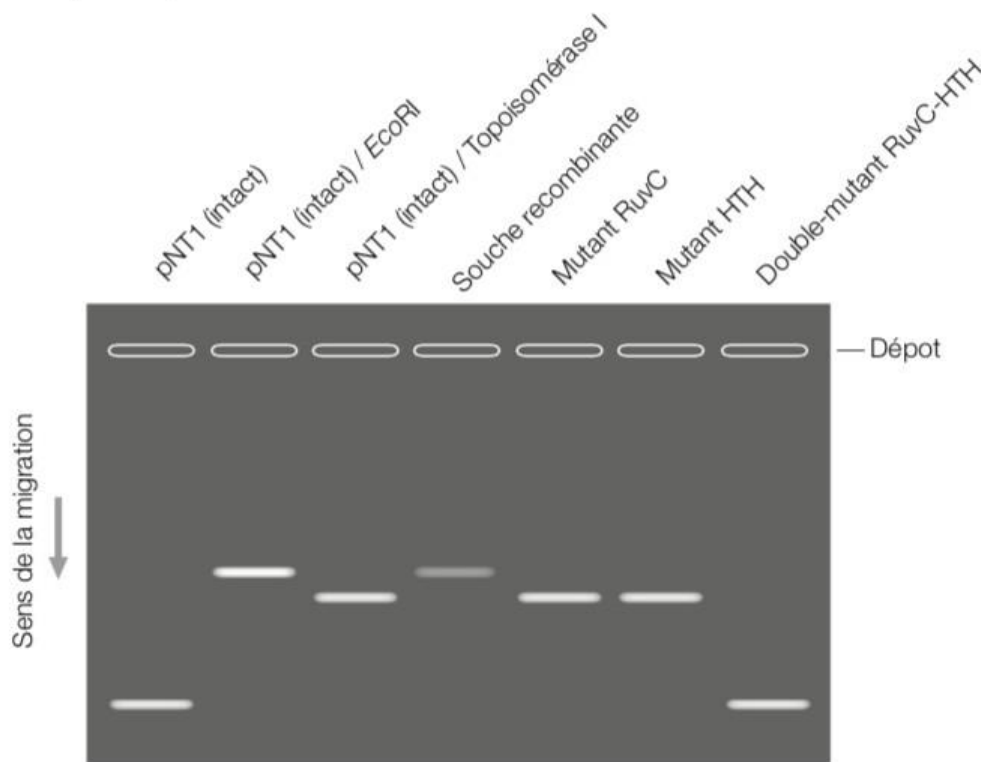
II-d) La séquence de Cas9 est composée de **deux domaines** présentant des homologies : l'un avec RuvC, la **résolvase** des jonctions de Holliday, et l'autre avec une famille d'**endonucléases** appelée HNH (car leur site actif contient deux histidines, H, et une asparagine, N).



Pour analyser le rôle de ces deux domaines, on construit des mutants de Cas9 ciblant les **résidus catalytiques** de ces deux domaines : un mutant du domaine RuvC, un mutant du domaine HNH et un double mutant RuvC/HNH.

On réalise ensuite l'expérience de transformation par le plasmide pNT1 dans ces trois mutants, dans sa souche recombinante initiale (comme aux questions I-b et II-a). On analyse les résultats par électrophorèse sur gel d'agarose.

Comme contrôles, on utilise du pNT1 intact purifié à partir de la souche sauvage (sans *spacer* CRISPR spécifique de pNT1), du pNT1 intact digéré par *EcoRI* qui possède un site unique dans le plasmide, et du pNT1 traité par la **topoisomérase I**.



Pourquoi l'ADN de pNT1 traité par la topoisomérase I migre-t-il différemment de l'ADN initial ? À quelle forme correspond-il ?

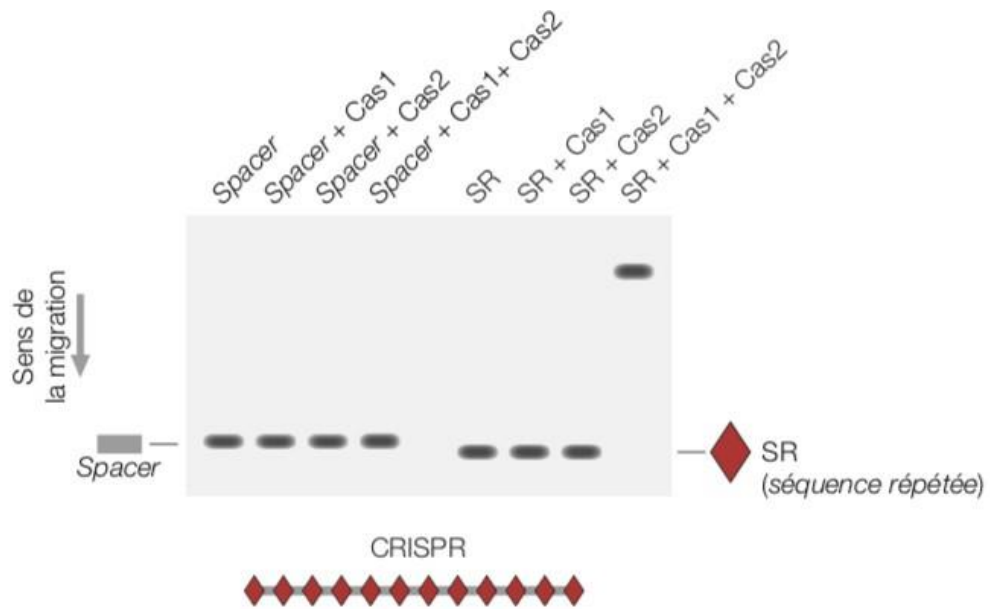
- II-e) Interprétez les résultats de l'expérience. En particulier, les deux domaines RuvC et HTH de Cas9 sont-ils impliqués dans l'activité de la protéine ? Proposez une explication à l'apparition d'une forme différente de l'ADN dans les mutants simples (domaine RuvC ou HTH)

III- Les autres protéines Cas

- III-a) On s'intéresse au rôle des protéines Cas1 et Cas2 dont la séquence présente des similitudes avec des protéines fixant l'ADN double brin. On veut analyser leur capacité à lier les éléments de la région CRISPR, répétitions et *spacer*. On réalise donc des expériences de retard sur gel avec Cas1 et Cas2 purifiées.

Pour cela, deux oligo-nucléotides ADN double-brin sont **marqués radioactivement**, l'un correspondant à la séquence répétée (SR), l'autre au *spacer* correspondant à la séquence du plasmide pNT1 (*spacer*). Ils sont incubés en présence de Cas1, de Cas2 ou d'un mélange équimolaire des deux. Le mélange est séparé par électrophorèse en conditions non-dénaturantes et le résultat est analysé par **autoradiographie**.

Le résultat est indiqué sur la figure suivante :



Interprétez le résultat de cette expérience. Quelle hypothèse pourrait-on formuler sur les interactions des protéines Cas1 et Cas2 ?

III-b) Quel pourrait être le rôle de Cas1 et Cas2 dans le mécanisme d'immunité aux infections par des bactériophages (question ouverte)



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

CRISPR / Cas9 Correction

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

CRISPR / Cas9

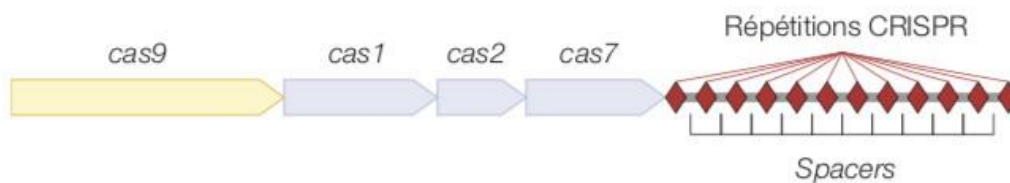
Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé

Le système CRISPR / Cas9 est un outil utilisé dans l'ingénierie des génomes pour introduire sélectivement des coupures dans les chromosomes à des sites spécifiques. Ces coupures sont ensuite utilisées pour induire des délétions, des insertions ou des remplacements ciblés dans le génome.

Présent dans dans l'ADN génomique des bactéries, le système CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) est à l'origine un système de défense contre les infections par des bactériophages. Il est composé d'une série de séquences répétées courtes (~30 paires de bases), régulièrement espacées par des segments de séquence unique appelés *spacer* (elles aussi longues d'environ 30 paires de bases),.

Immédiatement en amont de ce cluster de séquences répétées, on trouve plusieurs gènes codant des protéines dont la séquence ressemble à celles d'enzymes du métabolisme des acides nucléiques (nucléases, intégrases, recombinases...). Ces protéines sont appelées Cas, pour *CRISPR-associated*.

Dans ce problème, on s'intéresse au mécanisme de fonctionnement du système CRISPR du streptocoque A. Cas9 est l'une des protéines associées au cluster CRISPR chez cette espèce (schéma ci-dessous).



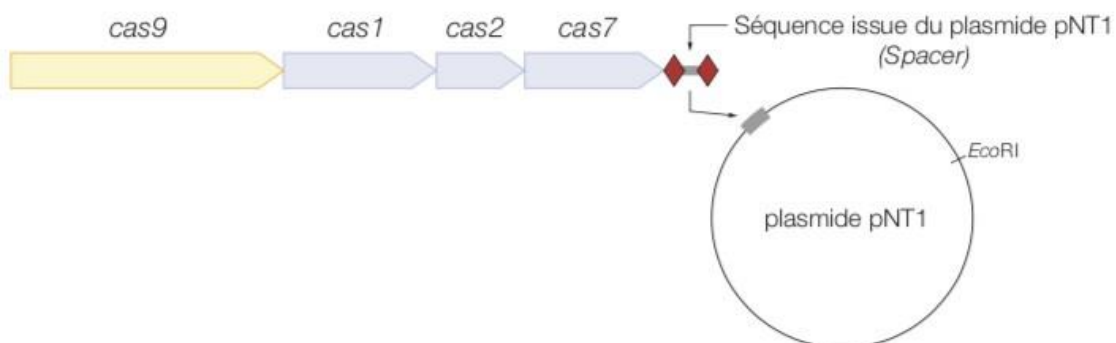
I- Rôle des spacers

L'analyse de la séquence des spacers entrelacés entre les répétitions CRISPR montre qu'il s'agit de séquences uniques, dont la plupart sont identiques à des segments de séquence de virus bactériophages infectant le streptocoque, ou bien à des segments de séquence de plasmides de streptocoque.

On constate que les souches de streptocoque qui portent un spacer CRISPR correspondant à un virus donné sont **spécifiquement résistantes à l'infection par ce virus**.

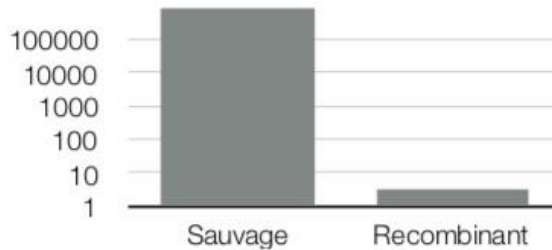
Pour comprendre le mécanisme de résistance, on réalise l'expérience suivante :

On construit une souche recombinante de streptocoque avec une région CRISPR/Cas simplifiée, ne contenant qu'un **seul spacer**, correspondant à la séquence d'un plasmide appelé pNT1. L'organisation modifiée est indiquée ci-dessous :



I-a) On dispose initialement de deux souches de streptocoque, (i) la souche sauvage, dont la région CRISPR ne contient pas de *spacer* homologue au plasmide pNT1, et (ii) la souche recombinante décrite ci-dessus, avec le *spacer* venant du plasmide pNT1. On essaye d'introduire le plasmide pNT1 par électroporation dans les deux souches, on mesure l'efficacité en testant la résistance à l'antibiotique chloramphénicol dont le gène est porté par pNT1. On mesure le nombre de colonies résistantes, et donc portant le plasmide, apparaissant dans chaque cas.

Le résultat de l'expérience est donné ci-dessous (échelle logarithmique):



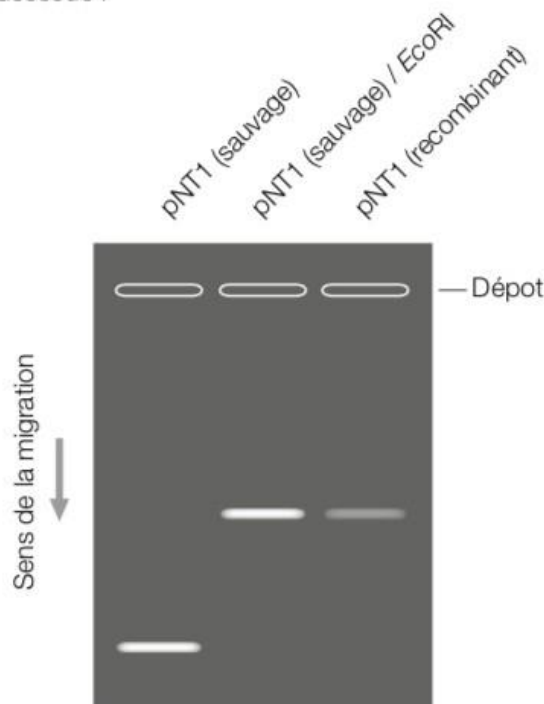
Interprétez le résultat de l'expérience. Quel est l'intérêt d'avoir réduit la région CRISPR à un seul *spacer* ?

(2 points) Le nombre de colonies résistantes (donc portant le plasmide) est réduit de 5 ordres de grandeur ($\sim 10^5$) dans la souche recombinante. Ceci indique que la présence du *spacer* provenant de pNT1 dans la région CRISPR permet de contre-sélectionner son maintien dans la souche recombinante.

Le fait d'avoir réduit la région à un seul *spacer* permet de supposer qu'il s'agit d'un effet direct de celui-ci, et pas de celui d'un autre des *spacers* dans le cas d'une région en comportant plusieurs.

I-b) On veut comprendre l'effet observé, pour cela purifie l'ADN du plasmide pNT1 **après introduction** dans les deux souches. On l'analyse directement par électrophorèse sur gel d'agarose. Comme témoin dans l'expérience, on analyse également l'ADN de pNT1 extrait de la souche sauvage, digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* qui possède **un site unique** de reconnaissance dans le plasmide (*cf* figure page précédente).

Le résultat du gel est indiqué ci dessous :



Interprétez le résultat de l'expérience, expliquez en particulier pourquoi l'efficacité de transformation par pNT1 dans la souche recombinante est réduite. A votre avis, pourquoi l'intensité de la bande avec pNT1 extrait de la souche recombinante est plus faible ?

(2 points) La forme du plasmide extraite de la souche recombinante est différente de celle extraite de la souche sauvage, ce qui indique que l'une des deux a subi une modification. La forme extraite de la souche recombinante co-migre avec la forme linéarisée (ADN linéaire), obtenue par coupure du plasmide par *EcoRI* qui possède un site unique dans pNT1.

Ceci suggère que **le plasmide présent dans la souche recombinante a subi une coupure et est linéaire** au lieu d'être circulaire, comme dans la souche sauvage.

La bande est moins intense car **le plasmide étant coupé, sa réplication doit être inhibée**. Ceci explique aussi le faible taux de colonies résistantes à la question précédente.

I-c) A votre avis, pourquoi l'ADN de pNT1 issu de la souche sauvage migre plus vite quand il n'est pas digéré par *EcoRI* ?

(2 points) Parce qu'il est **circulaire** et probablement **surenroulé négativement**. Le topoisomère d'ADN est alors plus compact et migre plus vite. L'ADN linéaire est au contraire complètement relâché.

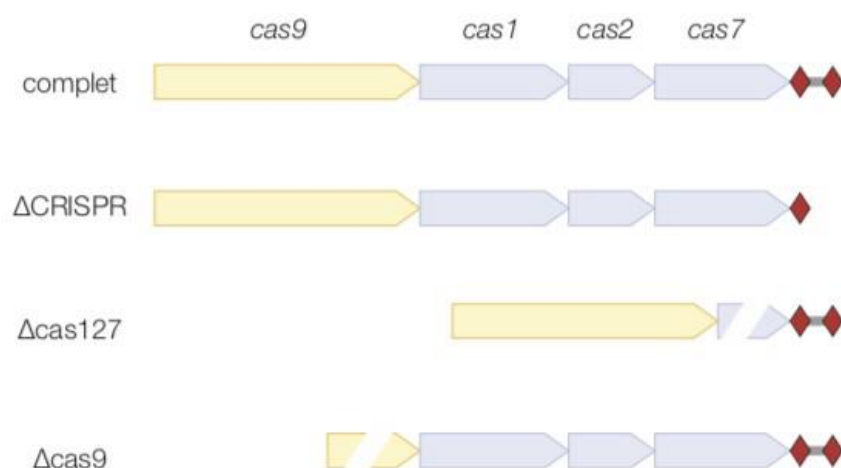
I-d) Si on digère le plasmide pNT1 extrait de la souche recombinante par *EcoRI*, à quoi pourrait-on s'attendre ?

(2 points) L'ADN extrait de la souche recombinant est linéaire, ce qui signifie qu'il a subi une coupure unique. En le digérant par *EcoRI* qui possède également un site unique, on s'attend à avoir une **seconde coupure**.

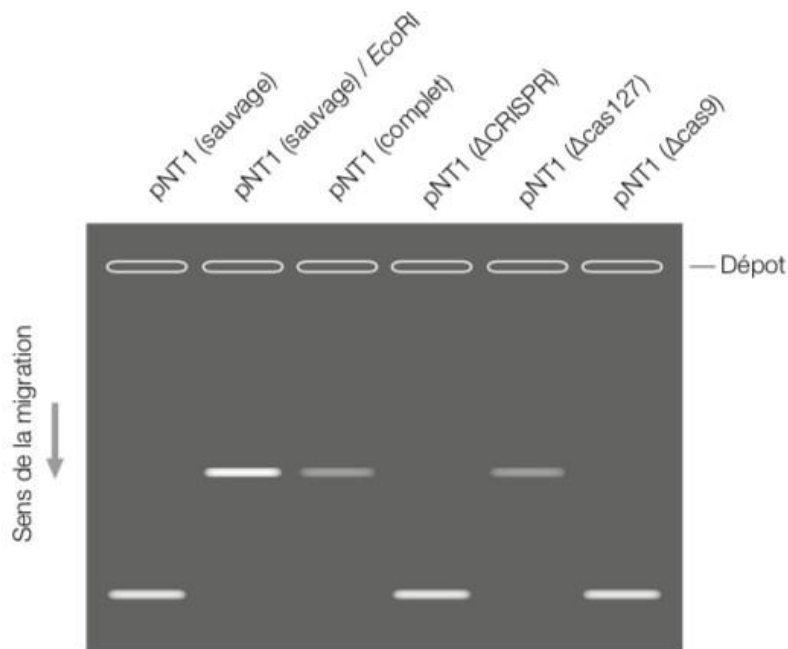
Si la première coupure dans la souche recombinante se produit à un site bien défini, on aura alors deux fragments bien définis après coupure par *EcoRI*, et donc **deux bandes sur le gel**.

II- Rôle de la protéine Cas9

On veut comprendre le rôle des protéines Cas dans le processus. Pour cela, on effectue plusieurs délétions dans la région CRISPR/Cas de la souche recombinante, suivant le schéma indiqué ci-dessous :



On transforme ces différentes souches par le plasmide pNT1, on purifie l'ADN du plasmide contenu dans les cellules et on analyse les produits sur gel comme précédemment. Le résultat est indiqué ci-dessous.



II-a) Interprétez le résultat de cette expérience. Qu'est ce qui est nécessaire et suffisant pour l'action sur le plasmide pNT1 par le système CRISPR/Cas ?

(2 points) Les trois premières pistes à gauche reprennent l'expérience de la question I-b).

Sur les pistes de droite, on voit que si le *spacer* CRISPR (Δ CRISPR) ou le gène codant la protéine Cas9 (Δ cas9) sont délétés, on retrouve le phénotype de la souche sauvage (ADN circulaire non-coupé, abondant).

En revanche, dans le cas de la délétion des gènes codant Cas1, Cas2 et Cas7 (Δ cas127), on conserve le phénotype de la souche recombinant avec restriction (coupure) du plasmide pNT1

Ceci indique que le **spacer CRISPR et la protéine Cas9 sont tous les deux nécessaires** au mécanisme de restriction du plasmide pNT1. En revanche, les protéines Cas1, Cas2 et Cas7 n'ont pas l'air impliquées dans cette étape.

II-b) La protéine Cas9 co-purifie systématiquement avec deux ARN différents de longueurs respectives 40 et 75 nucléotides (nt). Citez au moins un exemple de complexe ribonucléoprotéique associant de manière stable ARN(s) et protéine(s).

(2 points) Plein de réponses possibles, vues dans le cours (une seule suffit) :

- Le ribosome (et ses sous-unités).
- Les snRNP du spliceosome (U1, U2, U4, U5 ou U6)
- La ribonucléase P
- La télomérase
- Les ARNm eucaryotes coiffés et polyadénylés (avec les protéines PABP et eIF4E...)
- ...

II-c) On séquence les deux ARN associés à Cas9, le plus long (75 nt) correspond à un transcrit issu de la région immédiatement en amont des gènes *cas*, le second plus court, appelé ARNcr (cr pour CRISPR), (40nt) correspond à la séquence du *spacer* pNT1 et une partie de la séquence répétée.

Quel pourrait être le rôle de ce second ARN dans l'activité de Cas9 ?

(2 points) Cet ARN correspond au *spacer* CRISPR. On a vu à la question II-a) que le *spacer* est nécessaire à la restriction (coupure) du plasmide pNT1. Sa séquence correspond à un fragment de celle de pNT1.

Il pourrait donc s'agir d'un **ARN « guide »** qui permettrait de cibler un site spécifique du plasmide pNT1 (par appariement ARN:ADN avec ce dernier)

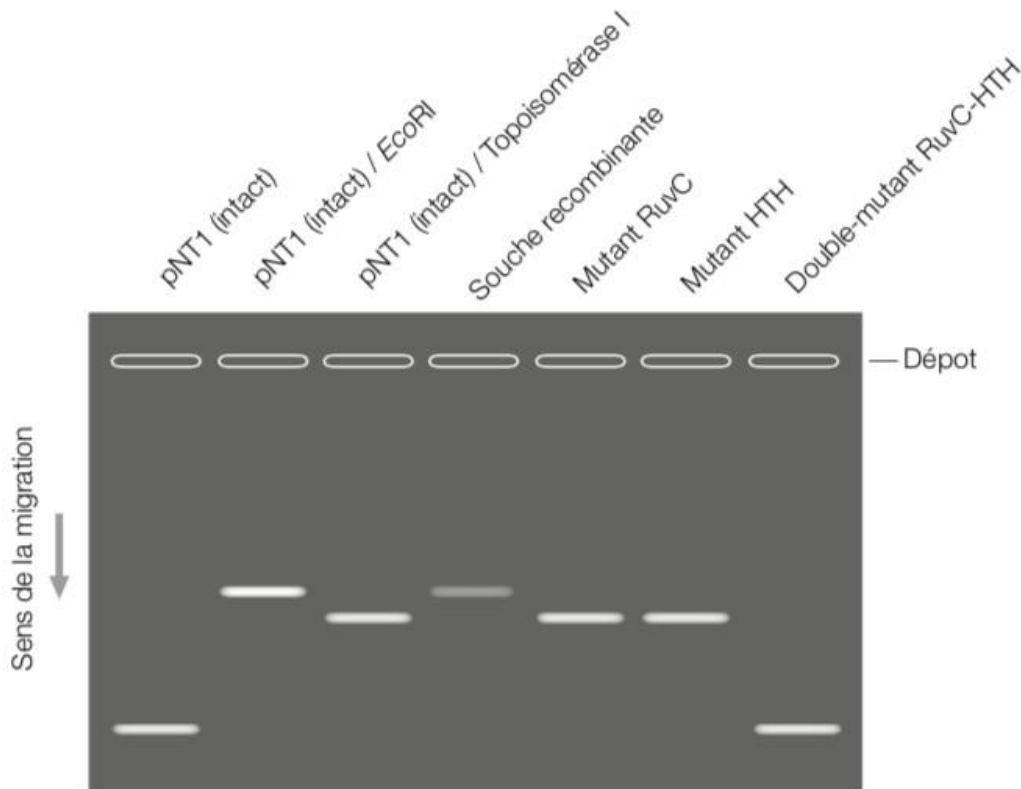
II-d) La séquence de Cas9 est composée de **deux domaines** présentant des homologies : l'un avec RuvC, la **résolvase** des jonctions de Holliday, et l'autre avec une famille d'**endonucléases** appelée HNH (car leur site actif contient deux histidines, H, et une asparagine, N).



Pour analyser le rôle de ces deux domaines, on construit des mutants de Cas9 ciblant les **résidus catalytiques** de ces deux domaines : un mutant du domaine RuvC, un mutant du domaine HNH et un double mutant RuvC/HNH.

On réalise ensuite l'expérience de transformation par le plasmide pNT1 dans ces trois mutants, dans sa souche recombinante initiale (comme aux questions I-b et II-a). On analyse les résultats par électrophorèse sur gel d'agarose.

Comme contrôles, on utilise du pNT1 intact purifié à partir de la souche sauvage (sans *spacer* CRISPR spécifique de pNT1), du pNT1 intact digéré par *EcoRI* qui possède un site unique dans le plasmide, et du pNT1 traité par la **topoisomérase I**.



Pourquoi l'ADN de pNT1 traité par la topoisomérase I migre-t-il différemment de l'ADN initial ? À quelle forme correspond-il ?

(2 points) L'ADN intact (piste de gauche) correspond à un plasmide extrait d'une souche sauvage de bactérie. Il est donc **surenroulé** négativement et donc compact. L'ADN coupé par *EcoRI* est linéaire. L'activité de la topoisomérase I est de relâcher le surenroulement, le produit de la réaction est donc de l'**ADN circulaire relâché** qui migre plus lentement que l'ADN circulaire surenroulé (ADN initial).

- II-e) Interprétez les résultats de l'expérience. En particulier, les deux domaines RuvC et HTH de Cas9 sont-ils impliqués dans l'activité de la protéine ? Proposez une explication à l'apparition d'une forme différente de l'ADN dans les mutants simples (domaine RuvC ou HTH)

(3 points) Dans le double mutant RuvC-HTH de Cas9 (piste de droite) on n'a plus aucune restriction du plasmide pNT1 : on retrouve l'ADN intact. Ceci indique que l'activité des domaines RuvC et/ou HTH sont nécessaires à l'activité de restriction de Cas9.

Les mutants simples RuvC et HTH ont un comportement intermédiaire et similaires entre eux : l'ADN du plasmide présent dans ces mutants semble être de l'ADN circulaire relâché (comme celui produit par la topoisomérase I).

On a vu que la restriction du plasmide pNT1 résulte de sa coupure qui produit de l'ADN linéaire. Pour produire de l'ADN linéaire à partir d'un ADN circulaire, il faut en **couper chacun des deux brins**. Si on ne coupe qu'un des deux brins, on obtient un ADN circulaire relâché (un brin reste circulaire, l'autre est linéaire, ils restent appariés mais il n'y a plus de contrainte topologique du fait de la coupure).

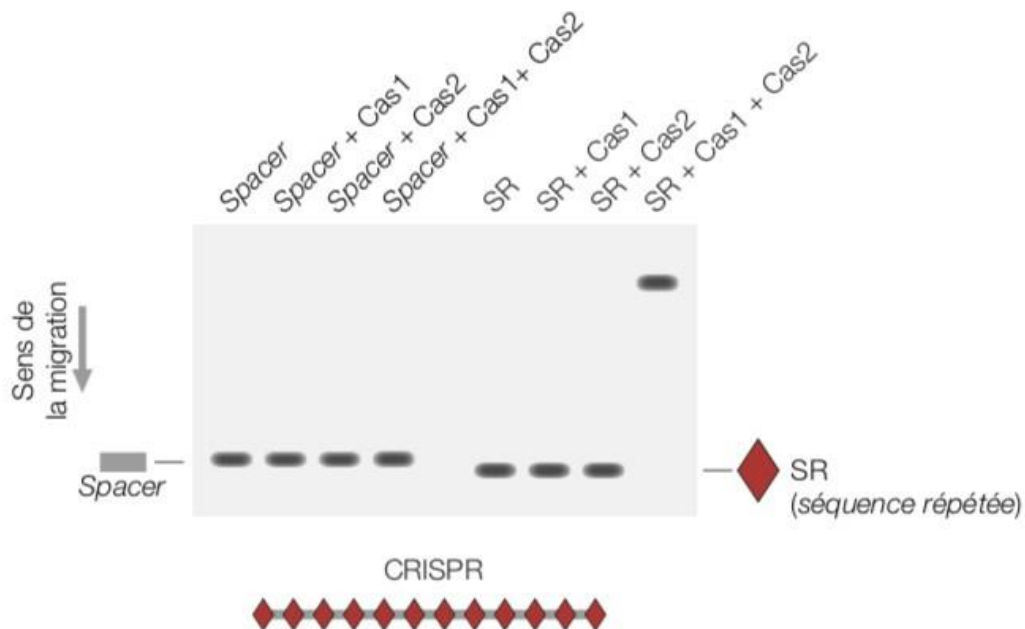
On peut donc proposer que **chacun des domaines, RuvC et HTH coupe l'un des deux brins du plasmide pNT1 ciblé**. Lorsque les deux sont fonctionnels, les deux brins sont coupés et on obtient un ADN linéaire. Lorsque l'un seul des deux est fonctionnels, **on obtient un ADN avec un seul brin coupé, qui reste circulaire, mais devient relâché**.

III- Les autres protéines Cas

- III-a) On s'intéresse au rôle des protéines Cas1 et Cas2 dont la séquence présente des similitudes avec des protéines fixant l'ADN double brin. On veut analyser leur capacité à lier les éléments de la région CRISPR, répétitions et *spacer*. On réalise donc des expériences de retard sur gel avec Cas1 et Cas2 purifiées.

Pour cela, deux oligo-nucléotides ADN double-brin sont **marqués radioactivement**, l'un correspondant à la séquence répétée (SR), l'autre au *spacer* correspondant à la séquence du plasmide pNT1 (*spacer*). Ils sont incubés en présence de Cas1, de Cas2 ou d'un mélange équimolaire des deux. Le mélange est séparé par électrophorèse en conditions non-dénaturantes et le résultat est analysé par **autoradiographie**.

Le résultat est indiqué sur la figure suivante :



Interprétez le résultat de cette expérience. Quelle hypothèse pourrait-on formuler sur les interactions des protéines Cas1 et Cas2 ?

(2 points) Il s'agit d'une expérience de retard sur gel. On obtient un retard que dans un seul cas, la piste de droite : avec la séquence répétée SR et les deux protéines Cas1 et Cas2. On peut donc en conclure que Cas1 avec Cas2 forment un complexe avec la séquence répétée.

Le fait qu'il n'y ait pas de retard avec seulement Cas1 ou Cas2 suggèrent que les deux protéines agissent conjointement. Par exemple parce qu'elles forment un complexe et que c'est le complexe qui est fonctionnel.

III-b) Quel pourrait être le rôle de Cas1 et Cas2 dans le mécanisme d'immunité aux infections par des bactériophages (question ouverte)

(2 points) Cas1 et Cas2 se fixent à l'ADN des séquences répétées entre les *spacers* CRISPR. Ils ne sont pas nécessaires pour le mécanisme de restriction (coupure) d'ADN exogènes.

Les régions CRISPR naturelles contiennent le plus souvent un grand nombre de répétitions SR entrecoupées de spacers qui sont la mémoire des infections virales antérieures.

Cas1 et Cas2 pourraient être par exemple impliqués dans l'acquisition de nouveaux *spacers* aux cours d'infections et donc dans un élargissement de la « mémoire immunitaire » des bactéries. En se fixant à la séquence SR, ces protéines pourraient permettre l'insertion d'une nouvelle répétition *spacer*-SR.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Structure de la chromatine chez les bactéries
Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Structure de la chromatine chez les bactéries

*Les documents et notes de cours sont autorisés
Faites des réponses synthétiques dans les cadres prévus sur l'énoncé*

Chez les bactéries, la plupart des ADN sont sous forme circulaire : chromosomes, plasmides..., ce qui impose des contraintes topologiques sur les différents processus cellulaires dans lesquels est impliqué l'ADN.

Dans ce problème, on s'intéresse à la structure de la chromatine bactérienne et à ses interactions possibles avec ces différents processus.

I- Protéines de la chromatine chez *E. coli*

Il n'y a pas de noyau dans les cellules bactériennes (procaryotes), pourtant, comme chez les cellules eucaryotes, le chromosome bactérien est aussi largement compacté au travers de l'association à des protéines spécifiques. Cette organisation condensée associant chromosome(s) et protéines spécifiques s'appelle la **chromatine**.

I-a) La chromatine eucaryote possède un élément architectural spécifique qui est absent chez les bactéries. Quel-est-il ? (*question de culture générale*)

On s'intéresse aux protéines associées au chromosome bactérien. Pour identifier les principales protéines qui se lient à l'ADN, on effectue une extraction de l'ADN total d'*Escherichia coli*. Cet ADN purifié et débarrassé de ses protéines est fragmenté et fixé par pontage covalent sur des billes de résine chromatographique.

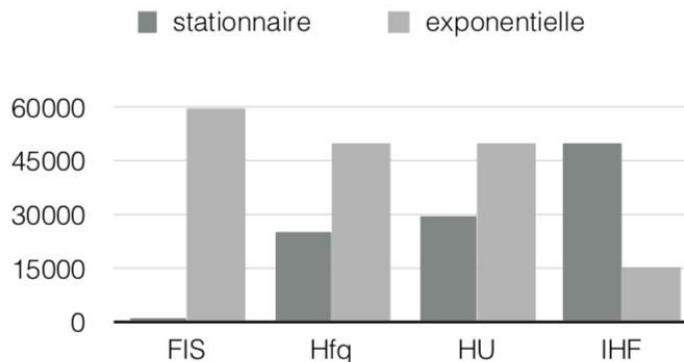
On réalise ensuite un extrait protéique total à partir de cellules d'*Escherichia coli* en phase de croissance exponentielle. On incube ensuite cet extrait total avec cette résine-ADN. La résine est ensuite lavée avec du tampon pour éliminer l'extrait. Puis les protéines qui ont été retenues sur la résine-ADN sont éluées par lavage avec une solution saline concentrée (2M NaCl).

On identifie quatre protéines principales se fixant à la résine-ADN : elles sont appelées **FIS, Hfq, HU** et **IHF**. Les séquences de chacune de ces quatre protéines sont particulièrement riches en résidus Lysine et Arginine.

I-b) Qu'est ce que cette composition en acides aminés suggère sur le mode d'interaction entre ces protéines et l'ADN ?

I-c) Par quel processus physique le lavage à 2M NaCl permet de les décrocher de la résine-ADN ?

On réalise ensuite une expérience pour déterminer la concentration intracellulaire précise de ces 4 protéines à l'aide d'anticorps spécifiques. On réalise la même expérience en parallèle à partir d'extraits de cellules en phase stationnaire (quiescentes) et de cellule en phase exponentielle (croissance rapide). Le résultat (en molécules/cellules) est indiqué ci-dessous :



En cumulé, environ 100 000 à 200 000 copies de ces protéines de la chromatine sont présentes dans chaque cellule, suivant les conditions de croissance. Le génome d'*E. coli* est long d'environ 4×10^6 pb.

I-d) Calculez l'espacement moyen entre ces protéines sur le chromosome (en paires de bases). Que pouvez vous en conclure (par exemple, en comparant à ce que vous savez de l'organisation de la chromatine eucaryote) ?

II- Fonctions de la protéine FIS

Parmi les quatre protéines identifiées à la partie précédente, la protéine FIS est remarquable en ce que sa présence dans la chromatine semble être spécifique de la phase de croissance exponentielle des cellules.

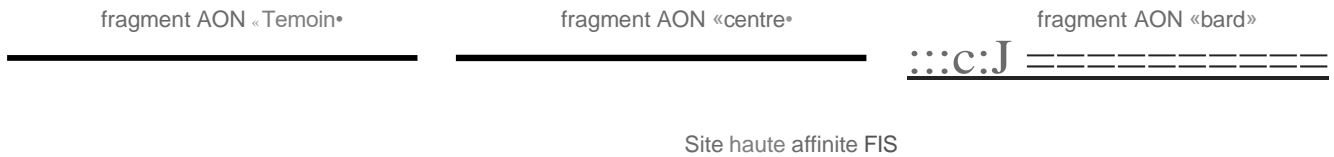
La protéine FIS a initialement été identifiée comme un facteur nécessaire à l'intégration ou à l'inversion de certains éléments d'ADN mobiles (transposons, bactériophages) dans le chromosome bactérien (son nom vient de là : *Factor for Integration/inversion Stimulation*).

Si elle se fixe un peu partout sur l'ADN de manière indépendante de la séquence nucléotidique, on a identifié des **sites de haute affinité** sur les extrémités de ces éléments mobiles. La séquence d'un de ces sites de haute affinité, long d'une trentaine de nucléotide est indiquée ci-après (on a séparé la séquence en blocs de 10 nucléotides, pour faciliter la lecture) :

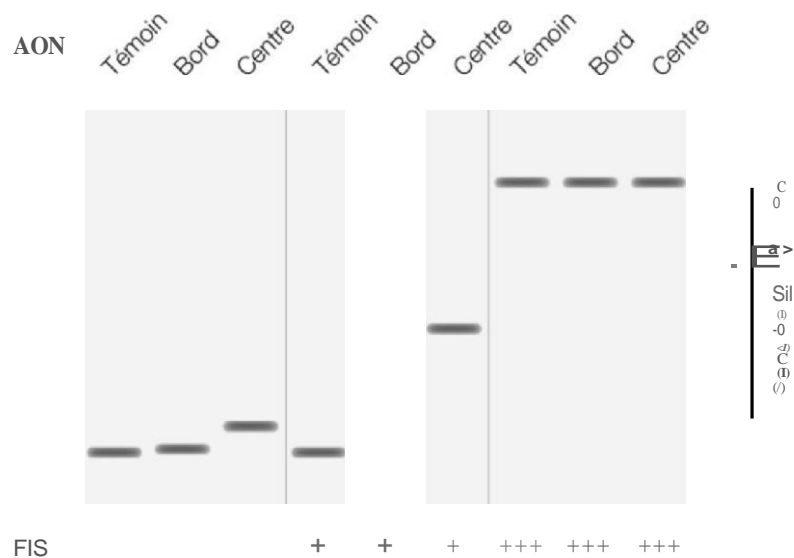
AAATTTGTTT AAATTTGAGC AAATTTCTGG

II-a) Remarquez la répétition d'un motif dans cette séquence. Qu'est ce que la périodicité et la nature du motif vous suggèrent quant à la structure particulière de l'ADN correspondant?

On introduit le motif ci-dessus dans un segment d'ADN plus grand. On réalise deux constructions de même longueur (-1000 paires de bases), l'une où le site de haute affinité est au centre du fragment d'ADN, l'autre où il est proche du bord du fragment. On utilise également un fragment d'ADN témoin de même longueur sans site de haute affinité (*cf.* schéma ci-dessous) :



A partir de ces trois fragments marqués radioactivement à leur extrémité, on réalise une expérience de retard sur gel en conditions natives avec la protéine FIS purifiée. Après électrophorèse et révélation par autoradiographie, on obtient le résultat suivant :



11-b) Dans la partie gauche du gel, on a fait migrer les trois fragments d'ADN seuls, sans la protéine FIS. Expliquez leurs migrations légèrement différentes, bien qu'ils soient exactement de la même longueur ?

11-c) Dans la partie centrale du gel, les fragments d'ADN ont été incubés avec la protéine FIS, à une concentration suffisante pour la fixation sur le site de haute affinité, mais inférieure à celle pour la fixation sur d'autres sites.

Interprétez le résultat, en particulier, expliquez, pourquoi l'effet de « retard » est bien plus grand sur le fragment ADN « centre » que sur le fragment ADN « bord ».

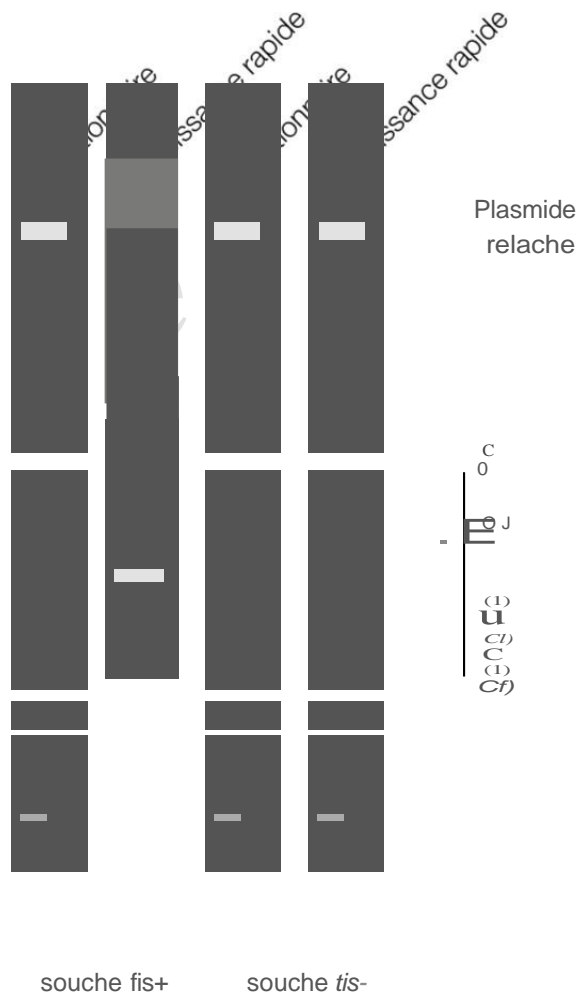
II-d) Quel type de séquence d'ADN la protéine FIS semble-t-elle préférer et quelle influence a-t-elle sur cette séquence lorsqu'elle se fixe dessus?

II-e) Dans la partie droite du gel, on a ajouté une quantité saturante de FIS par rapport à l'ADN. Interprétez le résultat et proposez une explication du fait que les migrations des 3 fragments redeviennent identiques.

III- FIS et topologie de l'ADN

On s'intéresse à la topologie (surenroulement) de l'ADN dans les bactéries, en fonction de la concentration intracellulaire de FIS. Pour cela, on utilise des souches d'*E. coli* contenant un petit plasmide. A partir des cellules, on extrait l'ADN du plasmide dans des conditions douces qui préservent son état de surenroulement.

On analyse les topoisomères du plasmide sur un gel d'agarose. Deux souches différentes sont utilisées, une souche *fis*⁻, dans lequel le gène codant la protéine FIS est inactivé, et une souche sauvage (*fis*⁺), où FIS est fonctionnelle. On teste le surenroulement du plasmide, d'une part en phase de croissance rapide (exponentielle) et d'autre part en phase stationnaire (cellules quiescente). Le résultat de l'analyse est indiqué ci-après.



III-a) Interpretez le resultat de cette experience, en integrant aussi les donnees de la figure de la question 1-d. Quel est l'influence de FIS sur l'etat de l'ADN?

111-b) Proposez deux mecanismes possible par lesquels la proteine FIS pourrait agir sur l'etat de l'AON dans la cellule : un mecanisme direct et un mecanisme indirect (*question en partie ouverte*).

III-c) Quels sont les deux processus principaux impliquant l'ADN qu'on s'attend à voir beaucoup plus actifs en phase exponentielle qu'en phase stationnaire ?

III-d) Quel peut être l'intérêt physiologique des mécanismes de régulation de l'état de l'ADN par FIS ?



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Structure de la chromatine chez les bactéries Correction

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Structure de la chromatine chez les bacteries

Les documents et notes de cours sont autorises
Faites des reponses synthetiques dans les cadres prevus sur l'enonce

Chez les bacteries, la plupart des AON sont sous forme circulaire : chromosomes, plasmides ... , ce qui impose des contraintes topologiques sur les differents processus cellulaires dans lesquels est implique l'ADN.

Dans ce probleme, on s'interesse à la structure de la chromatine bacterienne et à ses interactions possibles avec ces differents processus.

I- Proteines de la chromatine chez *E. coli*

Il n'y a pas de noyau dans les cellules bacteriennes (procaryotes), pourtant, comme chez les cellules eucaryotes, le chromosome bacterien est aussi largement compacte au travers de l'association à des proteines specifiques. Cette organisation condensee associant chromosome(s) et proteines specifiques s'appelle la **chromatine**.

1-a) La chromatine eucaryote possede un element architectural specifique qui est absent chez les bacteries. Quel-est-il ? (*question de culture genera/e*)

(1 point) Le **nucleosome** (histones+ADN)

On s'interesse aux proteines associees au chromosome bacterien. Pour identifier les principales proteines qui se lient à l'ADN, on effectue une extraction de l'ADN total d'*Escherichia coli*. Cet AON purifie et debarrasse de ses proteines est fragmente et fixe par pontage covalent sur des billes de resine chromatographique.

On realise ensuite un extrait proteique total à partir de cellules d'*Escherichia coli* en phase de croissance exponentielle. On incube ensuite cet extrait total avec cette resine-ADN. La resine est ensuite lavee avec du tampon pour eliminer l'extrait. Puis les proteines qui ont ete retenues sur la resine-ADN sont eluees par lavage avec une solution saline concentree (2M NaCl).

On identifie quatre proteines principales se fixant à la resine-ADN : elles sont appelees **FIS, Hfq, HU et IHF**. Les sequences de chacune de ces quatre proteines sont particulierement riches en residus Lysine et Arginine.

1-b) Qu'est ce que cette composition en acides amines suggere sur le mode d'interaction entre ces proteines et l'ADN?

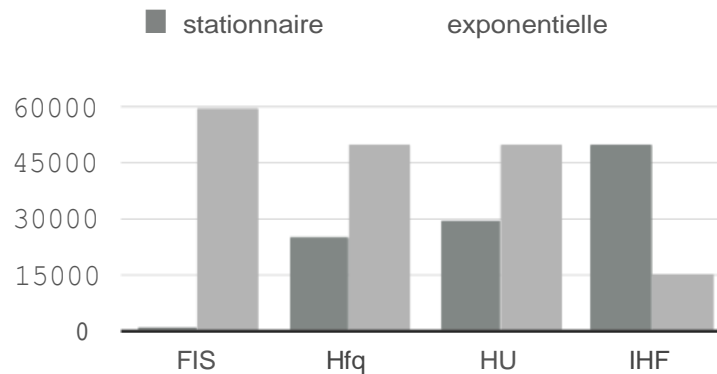
(2 points) Les residus Lysine et Arginine sont basiques et donc charges positivement à pH physiologique. Ils sont souvent impliquees dans des **interactions electrostatiques** avec les groupements phosphates de l'ADN, charges negativement (voir cours, chapitre 1, page 11).

1-c) Par quel processus physique le lavage à 2M NaCl permet de les decrocher de la resine-ADN ?

(2 points) Les ions Na⁺ et Cl⁻ vont interagir avec les groupements charges de l'ADN et des proteines en question, les solvater et la force ionique correspondante va **faire écran aux interactions electrostatiques**. Ceci va conduire au

decrochage de l'ADN des proteines immobilisees. Ce processus est analogue a ce qui se passe dans la chromatographie d'echange d'ions quand on augmente la force ionique

On realise ensuite une experience pour determiner la concentration intracellulaire precise de ces 4 proteines a l'aide d'anticorps specifiques. On realise la meme experience en parallels a partir d'extraits de cellules en phase stationnaire (quiescentes) et de cellule en phase exponentielle (croissance rapide). Le resultat (en molecules/cellules) est indique ci-dessous :



En cumule, environ 100 000 a 200 000 copies de ces proteines de la chromatins sont presentes dans chaque cellule, suivant les conditions de croissance. Le genome d'E. coli est long d'environ 4×10^6 pb.

1-d) Calculez l'espace moyen entre ces proteines sur le chromosome (en paires de bases). Que pouvez vous en conclure (par exemple, en comparant a ce que vous savez de l'organisation de la chromatine eucaryote) ?

(2 points) Avec 100 000 a 200 000 copies ($1-2 \times 10^5$) pour une longueur de 4×10^6 pb, ça fait un espace de **20 a 40 nucleotides** entre deux de ces proteines.

Cette **densite est tres elevee**, elle est comparable a ce qu'on trouve chez les eucaryotes :

Un nucleosome tous les -150 nucleotides, avec 8 histones par nucleosome, soit une densite de l'ordre d'une proteine tous les 15-20 nucleotides (cette derniere discussion quantitative sur les nucleosomes/histones n'est pas demandee)

II- Fonctions de la proteine FIS

Parmi les quatre proteines identifiees a la partie precedents, la proteine FIS est remarquable en ce que sa presence dans la chromatins semble etre specifique de la phase de croissance exponentielle des cellules.

La proteine FIS a initialement ete identifiees comme un facteur necessaire a l'integration ou a l'inversion de certains elements d' AON mobiles (transposons, bacteriophages) dans le chromosome bacterien (son nom vient de la : *factor for Integration/Inversion S..timulation*).

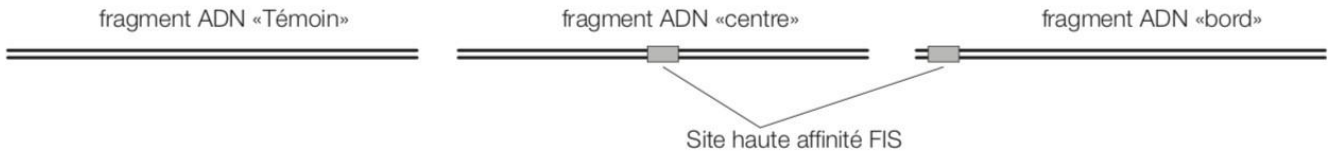
Si elle se fixe un peu partout sur l'ADN de maniere independante de la sequence nucleotidique, on a identifie des **sites de haute affinite** sur les extremités de ces elements mobiles. La sequence d'un de ces sites de haute affinite, long d'une trentaine de nucleotide est indiquee ci-apres (on a separe la sequence en blocs de 10 nucleotides, pour faciliter la lecture) :

AAATTTGTTT AAATTTGAGC AAATTTCTGG

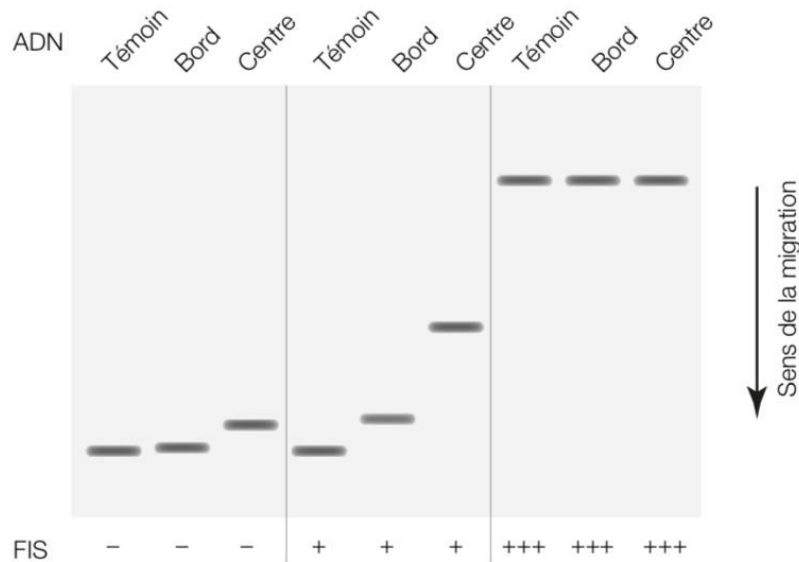
II-a) Remarquez la repetition d'un motif dans cette sequence. Qu'est ce que la periodicite et la nature du motif vous suggerent quant a la structure particuliere de l'ADN correspondant?

(2 points) On remarque le motif AAATTT qui est répété trois fois, **tous les 10 nucléotides**. Ce motif est riche en A/T et se répète avec la périodicité de l'hélice d'ADN. Ceci suggère que le motif correspondant pourrait être une **séquence d'ADN courbe**.

On introduit le motif ci-dessus dans un segment d'ADN plus grand. On réalise deux constructions de même longueur (~1000 paires de bases), l'une où le site de haute affinité est au centre du fragment d'ADN, l'autre où il est proche du bord du fragment. On utilise également un fragment d'ADN témoin de même longueur sans site de haute affinité (cf. schéma ci-dessous) :

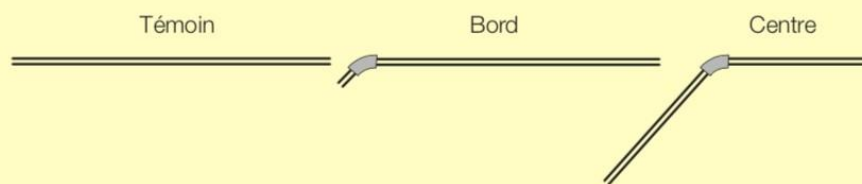


A partir de ces trois fragments marqués radioactivement à leur extrémité, on réalise une expérience de retard sur gel en conditions natives avec la protéine FIS purifiée. Après électrophorèse et révélation par autoradiographie, on obtient le résultat suivant :



II-b) Dans la partie gauche du gel, on a fait migrer les trois fragments d'ADN seuls, sans la protéine FIS. Expliquez leurs migrations légèrement différentes, bien qu'ils soient exactement de la même longueur ?

(2 points) Si le motif correspondant au site de haute affinité de FIS est bien une **séquence courbe**, il peut **ralentir la migration** du fragment d'ADN total **en changeant sa forme** et donc son comportement de reptation dans le gel. Si il est situé au centre, l'ADN se recourbe au milieu, donnant une structure en coude. Ceci qui ralentit plus sa migration que si il est à une extrémité où ça affecte moins sa forme :



II-c) Dans la partie centrale du gel, les fragments d'ADN ont été incubés avec la protéine FIS, à une concentration suffisante pour la fixation sur le site de haute affinité, mais inférieure à celle pour la fixation sur d'autres sites.

Interprétez le résultat, en particulier, expliquez, pourquoi l'effet de « retard » est bien plus grand sur le fragment ADN « centre » que sur le fragment ADN « bord ».

(2 points) L'apparition d'un retard sur gel dans les deux fragments « centre » et « bord » et pas avec le témoin montre que **FIS se fixe spécifiquement sur son site de haute affinité** mais pas sur le témoin sans site.

L'effet plus grand sur le fragment « centre » suggère une **modification de la forme de cet ADN** dans le gel.

II-d) Quel type de séquence d'ADN la protéine FIS semble-t-elle préférer et quelle influence a-t-elle sur cette séquence lorsqu'elle se fixe dessus?

(2 points) On vient de voir que FIS se fixe donc **sur les séquences courbes**.

La modification de la forme de l'ADN observée dans le gel suggère que FIS **augmente la courbure** quand il est lié à son le site de haute affinité.

II-e) Dans la partie droite du gel, on a ajouté une quantité saturante de FIS par rapport à l'ADN. Interprétez le résultat et proposez une explication du fait que les migrations des 3 fragments redeviennent identiques.

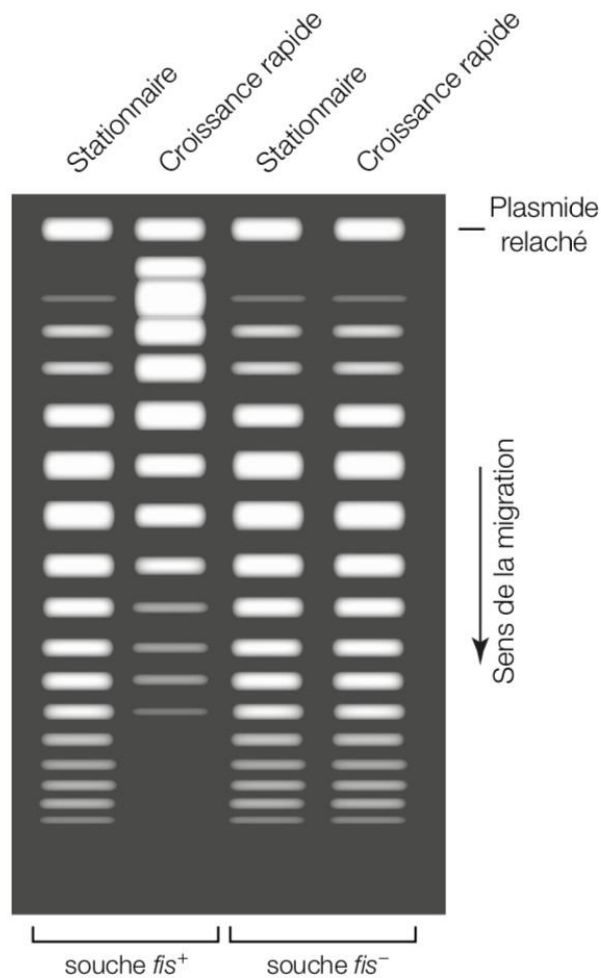
(2 points) En conditions saturantes, **FIS se fixe de manière indépendante de la séquence. Il couvre toute la longueur de l'ADN** (une protéine tous les 20 à 40 nucléotides, cf question I-d).

C'est pour cette raison que le retard observé est bien plus grand. Dans ces conditions, **tous les fragments d'ADN fixent la même quantité de protéine FIS**, ne subissent donc plus de déformations différenciées et sont donc retardés de la même manière.

III- FIS et topologie de l'ADN

On s'intéresse à la topologie (surenroulement) de l'ADN dans les bactéries, en fonction de la concentration intracellulaire de FIS. Pour cela, on utilise des souches d'*E. coli* contenant un petit plasmide. A partir des cellules, on extrait l'ADN du plasmide dans des conditions douces qui préservent son état de surenroulement.

On analyse les topoisomères du plasmide sur un gel d'agarose. Deux souches différentes sont utilisées, une souche *fis*⁻, dans lequel le gène codant la protéine FIS est inactivé, et une souche sauvage (*fis*⁺), où FIS est fonctionnelle. On teste le surenroulement du plasmide, d'une part en phase de croissance rapide (exponentielle) et d'autre part en phase stationnaire (cellules quiescente). Le résultat de l'analyse est indiqué ci-après.



III-a) Interprétez le résultat de cette expérience, en intégrant aussi les données de la figure de la question I-d. Quel est l'influence de FIS sur l'état de l'ADN ?

(2 points) La protéine FIS est principalement présente pendant la phase de croissance exponentielle rapide (question I-d). Elle est peu présente en phase stationnaire et, par définition, absente dans une souche *fis*⁻.

On observe que **dans les conditions où FIS est présente** (croissance rapide, *fis*⁻), **le surenroulement de l'ADN est moins important**. Cet effet est bien lié à FIS, puisqu'il est aboli dans le mutant *fis*⁻.

III-b) Proposez deux mécanismes possible par lesquels la protéine FIS pourrait agir sur l'état de l'ADN dans la cellule : un mécanisme direct et un mécanisme indirect (*question en partie ouverte*).

(2 points) (*deux réponses parmi les suivantes suffisent*).

La protéine FIS pourrait agir directement en **se liant aux enzymes qui modifient le surenroulement** de l'ADN : topoisomérases, gyrase... et en modifiant leur activité.

FIS pourrait également agir en **inhibant la fixation de ces enzymes sur l'ADN**, par un processus de compétition.

En se liant à l'ADN, FIS pourrait agir en **modifiant la géométrie de l'hélice**, induisant un changement du pas de l'hélice (~10 pb/tour) et donc de la topologie globale du duplex.

De manière indirecte, FIS pourrait **agir sur le niveau d'expression des gènes codant les topoisomérases et la gyrase**, par exemple en se liant à leur promoteur de transcription (puisque FIS est une protéine liant l'ADN).

III-c) Quels sont les deux processus principaux impliquant l'ADN qu'on s'attend à voir beaucoup plus actifs en phase exponentielle qu'en phase stationnaire ?

(1 point) La **réplication de l'ADN** (nécessaire à la division des cellules en croissance) et la **transcription de l'ADN en ARN** (nécessaire à la production des protéines indispensables au fonctionnement des cellules)

La traduction des protéines est aussi plus active, mais elle n'implique pas l'ADN.

III-d) Quel peut être l'intérêt physiologique des mécanismes de régulation de l'état de l'ADN par FIS ?

(2 points) **Réplication et transcription nécessitent l'ouverture de l'ADN** pour s'effectuer. La modification sélective de l'état de surenroulement de l'ADN pendant la phase de croissance exponentielle pourrait abaisser l'énergie permettant l'ouverture de l'ADN et donc faciliter la réplication de l'ADN et la production active des ARN.

Pendant la phase stationnaire, l'ADN est davantage surenroulé, ce qui correspondrait à une forme plus condensée et moins active de la chromatine bactérienne.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Biochimie

L2 Semestre 4

Polyadénylation des ARNm eucaryotes Sujet

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

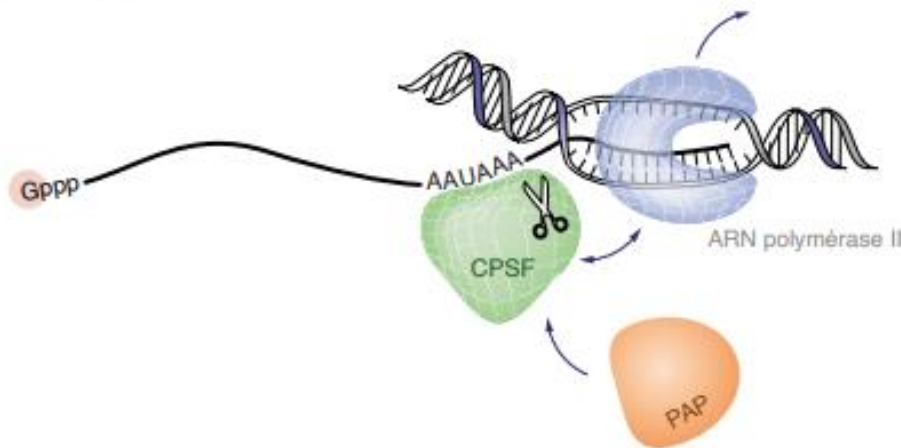
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Polyadénylation des ARNm eucaryotes

(épreuve 2021)

Chez les eucaryotes, la transcription des ARN messagers s'arrête lorsque l'ARN polymérase II rencontre le signal de polyadénylation AAUAAA. Un complexe spécifique, CPSF (pour *cleavage and polyadenylation specificity factor*) reconnaît cette séquence sur l'ARNm en cours de synthèse et déclenche : (i) la coupure du pré-ARNm ; (ii) le détachement de l'ARN polymérase de l'ADN (iii) le recrutement de la poly-(A) polymérase (PAP) qui va synthétiser la queue poly-(A), selon le schéma ci-dessous, vu dans le cours :



L'objet de ce problème est d'étudier la machinerie de terminaison de la transcription, ses composants et son mécanisme chez les mammifères.

I - La poly-(A) polymérase

On décide de purifier la poly-(A) polymérase (PAP) pour pouvoir reconstituer un test de terminaison/polyadénylation *in vitro*.

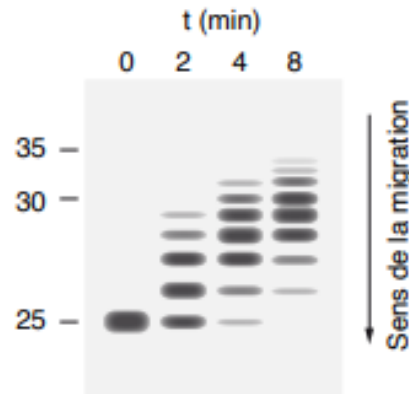
- 1) On réalise un fractionnement subcellulaire à partir de cellules mammifères (thymus de veau), quelle fraction utiliseriez vous pour isoler la poly-(A) polymérase : la fraction nucléaire ou la fraction cytoplasmique ? Pourquoi ?
- 2) Lors de la purification de la PAP, on décide d'utiliser une étape de purification par chromatographie d'affinité. Quel ligand proposeriez vous de fixer sur la résine chromatographique pour retenir la PAP ?

(Question ouverte, plusieurs réponses possibles, une seule suffit)

On teste l'activité de la PAP purifiée, en l'absence d'autres facteurs. On réalise une réaction de synthèse *in vitro*. On incube pour cela la PAP purifiée, de l'ATP et un oligo-ARN synthétique composé de 25 A et marqué radioactivement à son extrémité 5' :

5' - *AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA - 3'

Après quelques minutes d'incubation, on arrête la réaction et on sépare les produits par électrophorèse en conditions dénaturantes et on révèle par autoradiographie. Le résultat est indiqué sur la figure ci-contre (le point à t=0 correspond à l'oligo-A initial). La longueur des produits en nucléotides est indiquée à gauche du gel.



- 3) Interprétez l'expérience et expliquez succinctement ce qui se passe.
- 4) Dans les conditions de cette expérience, la PAP vous paraît-elle être une polymérase processive ? Expliquez pourquoi.
- 5) La vitesse de réaction vous paraît-elle correspondre aux besoins de la polyadénylation *in vivo* ? Justifiez. Que pouvez vous en conclure ?

II - Le facteur CPSF

On purifie le facteur CPSF à partir des mêmes cellules mammifères. On analyse le facteur purifié par électrophorèse en présence de SDS (conditions dénaturantes). Sur le gel, on observe 4 bandes protéiques en quantités approximativement stœchiométriques, de tailles 160, 100, 73 et 30 kDa.

- 1) On veut s'assurer que les quatre polypeptides ainsi révélés font bien partie du complexe protéique CPSF et ne sont pas un contaminant de la purification, sans rapport avec CPSF. Quelle méthode utiliseriez vous pour le démontrer ? (*Question ouverte, plusieurs réponses possibles, une seule suffit*) On appelle ces quatre sous-unités de CPSF : CPSF-160, CPSF-100, CPSF-73 et CPSF-30. On identifie les gènes correspondant à ces quatre protéines qui sont très conservés chez tous les eucaryotes.
- 2) La délétion de l'un ou l'autre de ces quatre gènes est létale à l'état homozygote, chez la levure comme chez les mammifères. Expliquez ce qui pourrait se passer dans ces mutants et l'origine de la létalité.
- 3) On cherche à déterminer quelles sous-unités de CPSF sont responsables de la reconnaissance du signal de polyadénylation AAUAAA. Pour cela, on produit individuellement dans *E. coli* les quatre protéines CPSF-160, CPSF-100, CPSF-73 et CPSF-30 sous forme recombinante. On réalise alors une expérience de retard sur gel avec un oligonucléotide ARN synthétique contenant ce signal AAUAAA et marqué radioactivement.

5' - *AACCUCCAAUAAACAAC - 3' On teste les différentes sous-unités de CPSF seules ou en combinaison pour leur capacité à se lier à cet ARN. Le résultat de l'expérience, révélé par autoradiographie est indiqué ci-après :

Interprétez le résultat de cette expérience et le rôle des différentes sous-unités de CPSF impliquées dans la fixation du signal de polyadénylation sur l'ARN.

- 4) Compte-tenu de ce que vous savez des fonctions cellulaires de CPSF, quel(s) pourrai(en)t être le(s) rôle(s) des autres sous-unités de CPSF ? Proposez une expérience pour le tester ? (*Question ouverte*)

Reconstitution de la polyadénylation des ARN *in vitro* Pour étudier le mécanisme de terminaison de la transcription, on reconstitue un système de polyadénylation *in vitro* en utilisant quatre différents ARN synthétiques substrats de même longueur, avec ou sans coiffe (l'ARN **A** ci-dessous porte une coiffe en 5'). Ces ARN sont marqués radioactivement par de l'uridine tritiée (tous les **U** - **en rouge** -sont marqués) :

- A** GpppAGCCAGUUCUAUUUUUAAGCGGAGGCAACCCGCUCCAAUAAAACAACGAUCUA^{3'}
B 5'AGCCAGUUCUAUUUUUAAGCGGAGGCAACCCGCUCCAAUAAAACAACGAUCUA^{3'}
C 5'AGCCAGUUCUAUUUUUAAGCGGAGGCAACCCGCUCCAAGAAAACAACGAUCUA^{3'}
D 5'AGCCAGUUCUAUUUUUAAGCUGUUUGGGGGUAACCCCAAAUAAAACAACGAUCUA^{3'}

On incube brièvement chacun de ces ARN en présence de CPSF, de PAP et d'ATP et on analyse les produits de la réaction par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes. On révèle par autoradiographie. Les résultats sont indiqués ci-dessous.



- 1) À quoi peut correspondre l'ARN plus court dans les pistes **A** et **B** ? Quelle est l'influence de la présence de la coiffe en 5' ?
- 2) Que se passe-t-il dans les pistes **C** et **D** ? Pourquoi est-ce plus surprenant pour la piste **D** ?
- 3) Pour l'ARN **D** dont la séquence est rappelée ci-dessous, on pense que la présence d'une structure en tige-boucle sur l'ARN au niveau du site de polyadénylation pourrait interférer avec la réaction.

- D** 5'AGCCAGUUCUAUUUUUAAGCUGUUUGGGGGUAACCCCAAAUAAAACAACGAUCUA^{3'}

Dessinez ci-dessous cette structure secondaire de l'ARN ④. Quelle particularité de cette structure pourrait la rendre très stable ? Comment cela peut interférer avec la réaction globale de polyadénylation ?



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales

Partie Sari

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2010-2011

Session 1 – S4
Sujet

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

Problème 1 : Ingénierie des protéines (durée estimée 30 minutes)

Chez l'homme l'insuline est formée par maturation de la préproinsuline ; après coupure du peptide signal, on obtient la proinsuline. La proinsuline elle même est ensuite clivée en 3 peptides B, C et A (de N-terminal vers C-terminal) L'insuline mature est formée par les chaînes A et B reliées entre elles par deux ponts disulfure, comme indiqué sur la figure 1

PréProinsuline

Peptide signal

Chaîne B

MALWMRLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

Chaîne C

Chaîne A.

Insuline

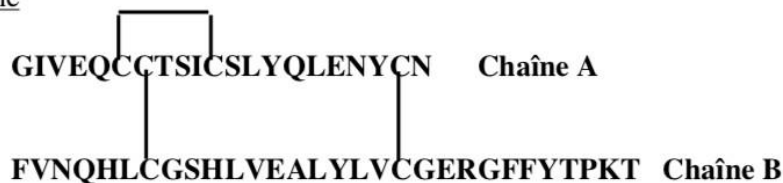
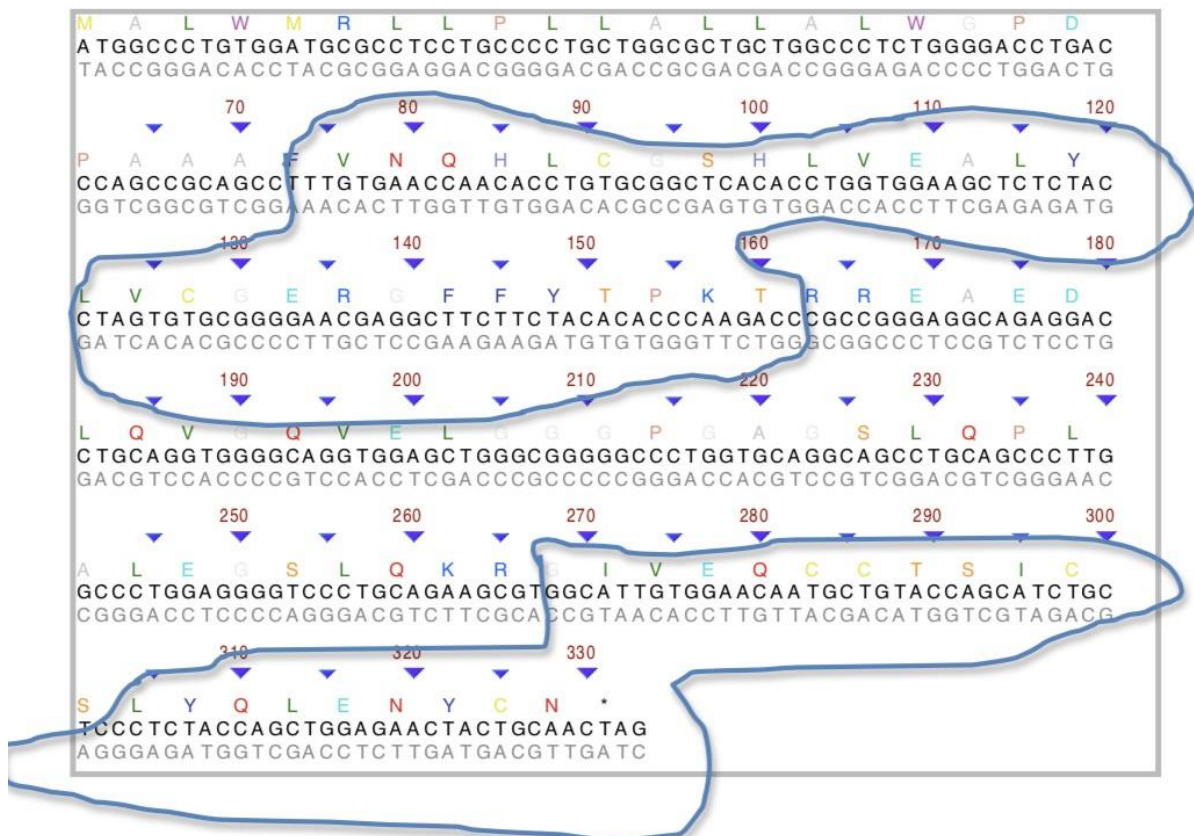


Figure 1 : Maturation de l'insuline humaine. Séquence de la préproinsuline, les acides aminés qui se retrouvent dans l'insuline mature sont en gras. Les ponts disulfures sont indiqués par des traits



A l'aide des documents précédents, répondez aux questions suivantes :

1-Sur la figure 2 repérez les séquences codantes des chaînes A et B de l'insuline (soulignez ou surlignez)

Pour produire de l'insuline humaine recombinante dans *E coli*, il faut exprimer séparément les deux chaînes A et B puis reconstituer l'ensemble *in vitro*. On vous demande de réaliser un montage d'expression permettant d'exprimer la **chaîne B** de l'insuline humaine dans le vecteur pET23 en utilisant les sites de restriction **BamH1** et **Hind3**. (*attention le plasmide est numéroté dans le sens inverse du promoteur*). On fera l'hypothèse que l'ADN correspondant à la chaîne B ne comprend ni le site BamH1 ni le site Hind3.

2M Donnez la séquence des deux oligonucléotides (amorces) de 25 nucléotides chacun que vous utiliserez en PCR, (calculez aussi les Tm).

3-Proposez un programme de PCR permettant l'amplification désirée

4-Résumez en quelques lignes les étapes qui restent à accomplir après la PCR pour terminer le clonage

Pour vérifier si les deux ponts disulfures interchaînes sont nécessaires pour obtenir une insuline active, vous décidez de muter la cystéine en position 7 de la chaîne B de l'insuline.

5- Quel acide aminé vous paraît le plus raisonnable pour muter cette cystéine (justifiez votre réponse en 3-4 lignes) ?

6- Expliquez en quelques lignes (ou par un schéma) la méthode qui vous permettra de fabriquer le plasmide contenant la mutation (on ne vous demande pas nécessairement la séquence des amorces correspondantes)

Problème 2 : PROTEINES (durée estimée 30 minutes)
Répondez aux questions dans les cadres prévus

A/ Décrire la structure des boucles dans les protéines et précisez leurs rôles. (3 lignes)

QUESTION DE COURS

B/ Décrivez la structure de la clé grecque.

QUESTION DE COURS

C : Purification des protéines.

Deinococcus radiodurans est une bactérie capable de survivre en présence de fortes doses de rayons γ . En essayant de purifier pour la première fois un enzyme induit par les rayons γ et impliqué dans la stabilisation de l'ADN, un chercheur a obtenu les résultats indiqués dans le tableau suivant.

ETAPES	Volume (ml)	Protéine totale (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique	Rendement (%)	Facteur de Purification
1-Extrait cellulaire	250	20 000	4 000 000			
2-Chromatographie échangeuse d'ions	50	300	5 000 000			
3-Chromatographie d'affinité	20	50	3 500 000			
4- Chromatographie d'exclusion	35	40	2 800 000			

1-Remplissez le tableau et indiquez les unités de l'activité spécifique

2-Qu'a t'il pu se passer au cours de l'étape 2 pour observer une augmentation de l'activité totale ?

3-Donnez le principe de la chromatographie d'affinité.

QUESTION DE COURS

4-Quelle est l'étape de la purification la plus efficace ?(justifiez votre réponse)

5-Quelle donnée vous permet de penser que la protéine est sans doute pure ?

Quelle technique proposeriez-vous pour vérifier la pureté de la protéine ? (1 ligne)

6-Quels sont le(s) désavantage(s) à pratiquer la dernière étape de chromatographie ?

Quelle donnée cette étape de chromatographie vous permet-elle de déterminer ? (en théorie)



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2010-2011

Session 1 – S4
Correction

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

Problème 1 : Ingénierie des protéines (durée estimée 30 minutes)

Chez l'homme l'insuline est formée par maturation de la préproinsuline ; après coupure du peptide signal, on obtient la proinsuline. La proinsuline elle-même est ensuite clivée en 3 peptides B, C et A (de N-terminal vers C-terminal) L'insuline mature est formée par les chaînes A et B reliées entre elles par deux ponts disulfure, comme indiqué sur la figure 1

PréProinsuline

Peptide signal **Chaîne B**
MALWMRLLPLLALLLWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
RREAEDLQVGGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN
 Chaîne C **Chaîne A.**

Insuline

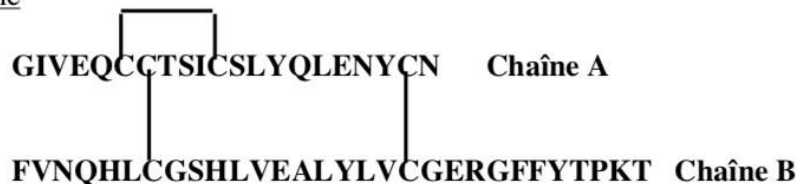


Figure 1 : Maturation de l'insuline humaine. Séquence de la préproinsuline, les acides aminés qui se retrouvent dans l'insuline mature sont en gras. Les ponts disulfures sont indiqués par des traits

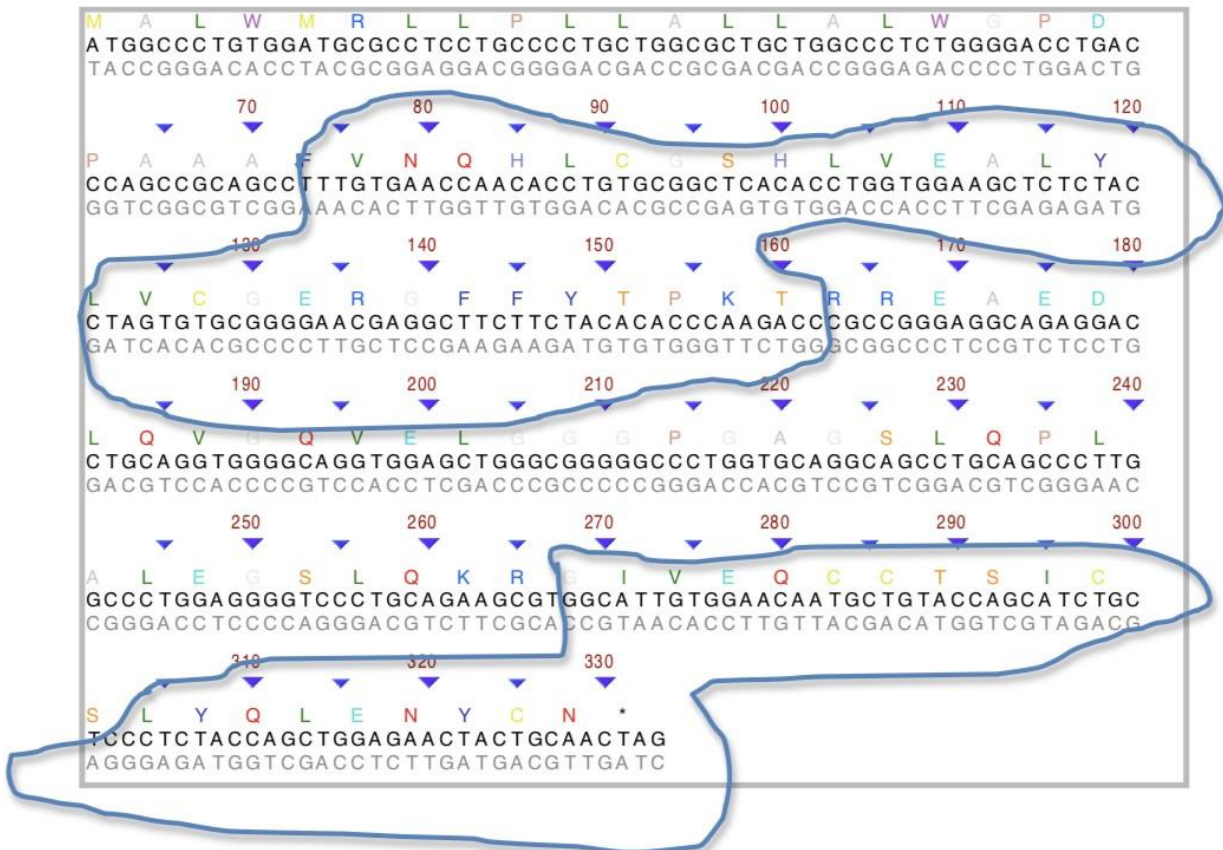


Figure 2 : Phase ouverte de lecture correspondant à la préproinsuline humaine

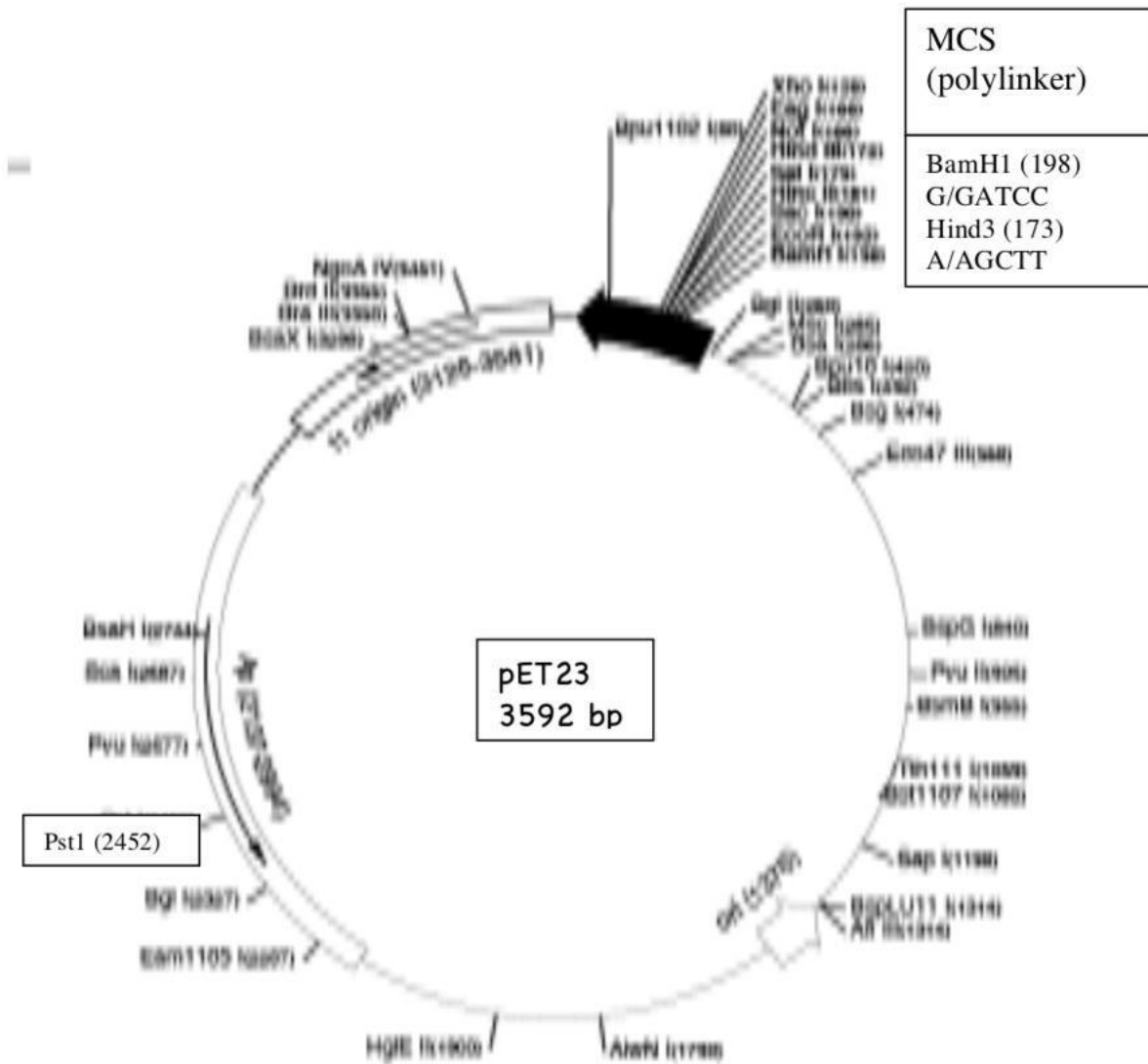


Figure 3 : Carte du vecteur d'expression pET23. Le polylinker est indiqué ainsi que les séquences coupées par les enzymes BamH1 et Hind3 .

TTT phe F	TCT ser S	TAT tyr Y	TGT cys C
TTC phe F	TCC ser S	TAC tyr Y	TGC cys C
TTA leu L	TCA ser S	TAA OCH Z	TGA OPA Z
TTG leu L	TCG ser S	TAG AMB Z	TGG trp W
CTT leu L	CCT pro P	CAT his H	CGT arg R
CTC leu L	CCC pro P	CAC his H	CGC arg R
CTA leu L	CCA pro P	CAA gln Q	CGA arg R
CTG leu L	CCG pro P	CAG gln Q	CGG arg R
ATT ile I	ACT thr T	AAT asn N	AGT ser S
ATC ile I	ACC thr T	AAC asn N	AGC ser S
ATA ile I	ACA thr T	AAA lys K	AGA arg R
ATG met M	ACG thr T	AAG lys K	AGG arg R
GTT val V	GCT ala A	GAT asp D	GGT gly G
GTC val V	GCC ala A	GAC asp D	GGC gly G
GTA val V	GCA ala A	GAA glu E	GGA gly G
GTG val V	GCG ala A	GAG glu E	GGG gly G

Figure 4 : Le code génétique

A l'aide des documents précédents, répondez aux questions suivantes :

1-Sur la figure 2 repérez les séquences codantes des chaînes A et B de l'insuline (soulignez ou surlignez)

Pour produire de l'insuline humaine recombinante dans *E coli*, il faut exprimer séparément les deux chaînes A et B puis reconstituer l'ensemble *in vitro*. On vous demande de réaliser un montage d'expression permettant d'exprimer la **chaîne B** de l'insuline humaine dans le vecteur pET23 en utilisant les sites de restriction **BamH1** et **Hind3**. (*attention le plasmide est numéroté dans le sens inverse du promoteur*). On fera l'hypothèse que l'ADN correspondant à la chaîne B ne comprend ni le site BamH1 ni le site Hind3.

2-Donnez la séquence des deux oligonucléotides (amorces) de 25 nucléotides chacun que vous utiliserez en PCR, (calculez aussi les Tm).

SENS

ggg GGA TCC ATG TTT GTG AAC CAA C (attention penser à ajouter un ATG)

les nucleotides soulignés sont ceux qui s'hybrident pour la 1ere amplification en PCR : ceux qu'on utilise pour calculer la Tm = 36°C

REVERSE :

Gcg AAG CTT CTA GGT CTT GGG TGT G

Tm = 40°C

3-Proposez un programme de PCR permettant l'amplification désirée

94°C 2min puis (94°C 30sec-36°C 1min-72°C 15sec)*25 et 1 à 2min 72°C

4-Résumez en quelques lignes les étapes qui restent à accomplir après la PCR pour terminer le clonage

digérer PCR par BAMH1 et HIND3

Digérer vecteur pET par BAMH1 et Hind3

Mélanger ligase + ATP + Vecteur digéré+PCR digérée (15 min à 25°C) utilisez un aliquote du mélange de ligation pour transformer des bactéries E coli (par électroporation par exemple) . faire pousser les bactéries une nuit à 37°C en présence d'ampicilline sur des boites de pétri.

Isoler quelques colonies , les faire pousser en milieu liquide et analyser l'ADN plasmidique obtenu (miniprep + digestion par restriction)

Pour vérifier si les deux ponts disulfures interchaînes sont nécessaires pour obtenir une insuline active, vous décidez de muter la cystéine en position 7 de la chaîne B de l'insuline.

5- Quel acide aminé vous paraît le plus raisonnable pour muter cette cystéine (justifiez votre réponse en 3-4 lignes) ?

CYSteine se mute facilement en serine : TGC en TCC et R = CH₂SH en R = CH₂OH

6- Expliquez en quelques lignes (ou par un schéma) la méthode qui vous permettra de fabriquer le plasmide contenant la mutation (on ne vous demande pas nécessairement la séquence des amorces correspondantes)

On utilise un oligonucléotide sens de 25mer qui correspond à la séquence avec la mutation en son centre. On utilise comme oligo reverse le complémentaire exact de l'oligo sens. On amplifie par PCR la totalité du plasmide, avec une KOD POLYMERASE (rapide et fidèle) l'amplification ici sera de 4 minutes pour permettre copie de tout le plasmide.

Quand la PCR est terminée on ajoute au mélange l'enzyme DPN1 qui va digérer spécifiquement l'ADN méthylé (donc l'ADN parental et pas l'ADN amplifié)

On utilise un aliquote du mélange de PCR/DPN1 pour transformer des bactéries par électroporation. On vérifie les clones positifs après culture en présence d'ampicilline par miniprep et séquençage par exemple

Problème 2 : PROTEINES (durée estimée 30 minutes)

Répondez aux questions dans les cadres prévus

A/ Décrire la structure des boucles dans les protéines et précisez leurs rôles. (3 lignes)

QUESTION DE COURS

B/ Décrivez la structure de la clé grecque.

QUESTION DE COURS

C : Purification des protéines.

Deinococcus radiodurans est une bactérie capable de survivre en présence de fortes doses de rayons γ . En essayant de purifier pour la première fois un enzyme induit par les rayons γ et impliqué dans la stabilisation de l'ADN, un chercheur a obtenu les résultats indiqués dans le tableau suivant.

ETAPES	Volume (ml)	Protéine totale (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de Purification
1-Extrait cellulaire	250	20 000	4 000 000	200	100	1
2-Chromatographie échangeuse d'ions	50	300	5 000 000	16 666	125	83
3-Chromatographie d'affinité	20	50	3 500 000	70 000	87	350
4- Chromatographie d'exclusion	35	40	2 800 000	70 000	70	350

1-Remplissez le tableau et indiquez les unités de l'activité spécifique

2-Qu'a t'il pu se passer au cours de l'étape 2 pour observer une augmentation de l'activité totale ?

On a sans doute éliminé un inhibiteur

3-Donnez le principe de la chromatographie d'affinité.

QUESTION DE COURS

4-Quelle est l'étape de la purification la plus efficace ?(justifiez votre réponse)

Attention ci la réponse est la chromato d'affinité, en fait le facteur 83 observé après échangeuse d'ions est du à l'élimination d'un inhibiteur plus qu' à la purification en elle même. (j'ai compté bon les deux réponses ,échangeuse d'ion ou affinité)

5-Quelle donnée vous permet de penser que la protéine est sans doute pure ?

L'étape de purification finale ne sert à rien on n'augmente pas l'activité spécifique

Quelle technique proposeriez-vous pour vérifier la pureté de la protéine ? (1 ligne)

Electrophorèse SDS PAGE ou bien Spectrométrie de masse

6-Quels sont le(s) désavantage(s) à pratiquer la dernière étape de chromatographie ?

On ne gagne rien en activité mais on perd de la protéine puisque passe de 50mg à 40 mg de protéine purifiée

Quelle donnée cette étape de chromatographie vous permet-elle de déterminer ? (en théorie)

Elle permet de mesurer la masse relative de la protéine native. On peut étalonner la colonne d'exclusion avec des marqueurs de taille et estimer la taille de la protéine purifiée native, s'utilise surtout si la protéine est multimérique. Le gel SDS PAGE va donner la taille des monomères et la chromatographie d'exclusion la taille de la protéine multimérique



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2013-2014

Session 1 – S4
Sujet

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

DUREE DE L'EPREUVE 1 heure 30.

CALCULATRICE AUTORISEE

L'épreuve comprend 3 sujets de 30 minutes chacun . Sujet 1 Bio mol et Sujet 2 Protéines sous forme de cahier réponse, vous devez répondre dans les espaces prévus à cet effet. Sujet3 : F Dardel à composer sur une feuille d'examen

SEULES LES NOTES DE COURS (POLY) DU PR DARDEL SONT AUTORISEES

SUJETS 1 ET 2 :

Les sujets 1 et 2 concernent l'expression dans la levure et la purification de l'ATPase membranaire SERCA. M. JIDENKO et al , Protein Expression and Purification 48 (2006)32-42;

La protéine SERCA est une ATPase transmembranaire de **109 kDa** qui se trouve dans le réticulum des cellules du muscle squelettique et qui transporte le calcium (Ca^{2+} -ATPase). Le but de cette étude est de mettre au point un système d'expression hétérologue qui permette la purification d'une protéine fonctionnelle pour pouvoir la cristalliser et déterminer sa structure tridimensionnelle.

SUJET 1 Bio Mol : Clonage et expression de la protéine SERCA (30 minutes)

Les pages 2 et 3 contiennent les figures , les questions sont en pages 4 et 5

SUJET 2 Protéines : Purification et caractérisation de la protéine SERCA (30 minutes)

Pages 6 à 9

LOCUS RATCTA 3457 bp mRNA linear
 DEFINITION Rattus norvegicus calcium transporting ATPase mRNA, complete cds.
 ACCESSION M99223
 VERSION M99223.1 GI:203644
 KEYWORDS calcium transporting ATPase.
 SOURCE Rattus norvegicus ORGANISM Rattus norvegicus

5'UTR 1..165
 gene 166..3150
 /gene="SERCA"
 CDS 166..3150
 /gene="SERCA"
 /codon_start=1
 /product="calcium transporting ATPase"
 /protein_id="AAA40991.1"

A:

```

1 tggggtcaga acttcgtgga aaggagaaga atctgggggg ggcaagcaag aaaaaggaag
61 gagcccaggt taacaggcag gtggatacac tgaagaagtc cccccacaag tgagaggccc
121 ctaagaagga atacatcacc ccctggcccc caagaagga gcagaatgga ggccgcacac
181 tccaagtcca cagaggaatg tttgtcctat tttgggggtga gcgagaccac aggccttacc
241 ccagaccaag ttaagcggca tctggaaaaa tacggcccca atgagctccc tgctgaggaa
-----
2881 accatcgaga tgtgcaacgc cctcaacagc ctgtctgaga accagtcctt actgcggatg
2941 cgcacctggg tgaacatctg gcttctcggg tccatctgcc tgtccatgtc cctccacttc
3001 ctcatcctct atgttgacc cctgccgatg atcttcaagc tccgggcctt ggactttacc
3061 cagtggctca tggtcctcaa gatctcactt ccagtcatcg ggctagatga gcttctcaag
3121 ttcattgctc ggaactatct ggagggataa ccacccccct cctccatgtc tttgaaccgt
  
```

B : Traduction=

```

001 MEAAHSKSTE ECLSYFGVSE TTGLTPDQVK RHLEKYGPNE LPAEEGKSLW ELVVEQFEDL
061 LVRILLLAAC ISFVLAWFEE GEETVTAFVE PFVILLILIA NAIVGVWQER NAENAIEALK
121 EYEPENMGKVIY RADRSVQRI KARDIVPGDI VEVAVGDKVP ADIRILSIKS TTLRVDQSIL
181 TGESVSVIKH TDPVPDPRAV NQDKKNMLFS GTNIAAGKAV GIVATTGVST EIGKIRDQMA
241 ATEQDKTPLQ QKLDEFGEQL SKVISLICVA VWLINIGHFN DPVHGGSWFR GAIYYFKIAV
301 ALAVAAIPEG LPAVITTCCLA LGTRMAKKN AIVRSLPSVE TLGCTSVICS DKTGTLTTNQ
361 MSVCKMFIID KVDGDICSLN EFSITGSTYA PEGEVLKNDK PVRAGQYDGL VELATICALC
421 NDSSLDFNET KGVYEKVGEA TETALTTLVE KMNVFNTEVR SLSKVERANA CNSVIRQLMK
481 KEFTLEFSRD RKSMSVYCSP AKSSRAAVGN KMFVKGAPEG VIDRCNYVRV GTTRVPLTGP
541 VKEKIMSVIK EWGTGRDTRL CLALATRDTP PKREEMVLDD SAKFMEYEMD LTFVGVVGMML
601 DPPRKEVTGS IQLCRDAGIR VIMITGDNKG TAI AICRRIG IFSNEEVAD RAYTGREFDD
661 LPLAEQREAC RRACCFARVE PSHKSKIVEY LQSYDEITAM TGDGVNDAPA LKKAIEIGIAM
721 GSGTAVAKTA SEMVLADDNF STIVAAVEEG RAIYNNMKQF IRYLISSNVG EVVCIFLTAA
781 LGLPEALIPV QLLWVNLVTD GLPATALGFN PPDLDIMDRP PRSPKEPLIS GWLFFRYMAI
841 GGYVGAATVG AAAWWFLYAE DGPHVSYHQL THFMQCTEHN PEFDGLDCEV FEAPEPMTMA
901 LSVLVTIEMC NALNSLSENQ SLLRMPPWVN IWLLGSICLS MSLHFLILYV DPLPMIFKLR
961 ALDFTQWLMV LKISLPVIGL DELLKFIARN YLEG
  
```

Figure 1 : Données récupérées du NCBI concernant le cDNA de l'ATPase SERCA .

A : La séquence présentée ici concerne uniquement la partie 5 ' et 3 ' du cDNA, pour faciliter la lecture une partie e la séquence a été omise , les nucléotides enlevés sont indiqués par des traits. 2

B : La séquence primaire correspond en revanche à la traduction exacte et totale du cDNA.

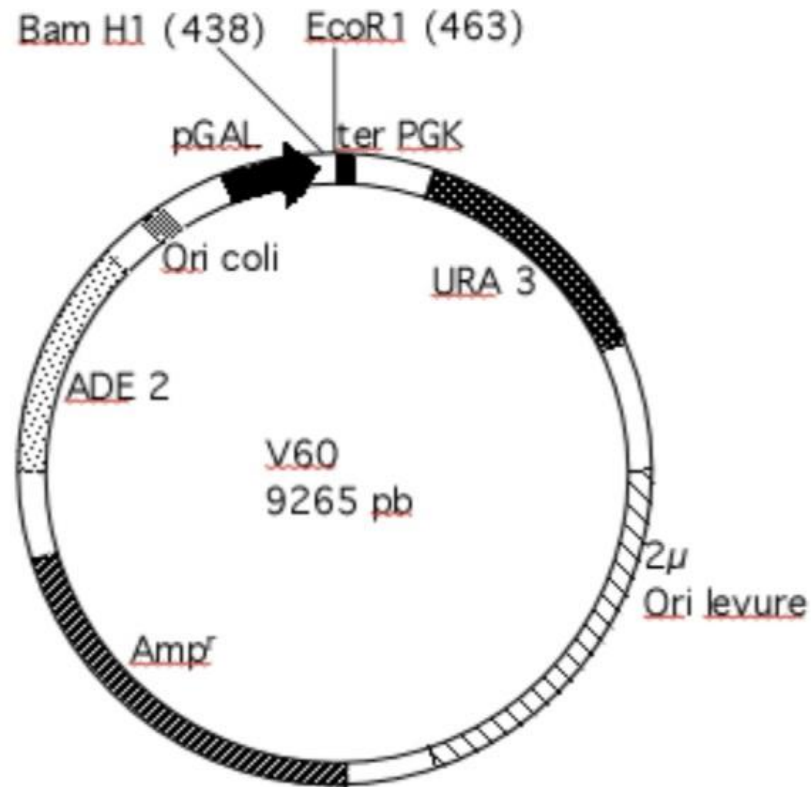


Figure 2 Carte du vecteur navette coli/Saccharomyces V60

CODE GENETIQUE

TTT F	TCT S	TAT Y	TGT C
TTC F	TCC S	TAC Y	TGC C
TTA L	TCA S	TAA *	TGA *
TTG L	TCG S	TAG *	TGG W
CTT L	CCT P	CAT H	CGT R
CTC L	CCC P	CAC H	CGC R
CTA L	CCA P	CAA H	CGA R
CTG L	CCG P	CAG Q	CGG R
ATT I	ACT T	AAT N	AGT S
ATC I	ACC T	AAC N	AGC S
ATA I	ACA T	AAA K	AGA R
ATG M	ACG T	AAG K	AGG R
GTT V	GCT A	GAT D	GGT G
GTC V	GCC A	GAC D	GGC G
GTA V	GCA A	GAA E	GGA G
GTG V	GCG A	GAG E	GGG G

Figure 3 : Code génétique

1- De quelle espèce provient la protéine SERCA ?

2- Sur la séquence du cDNA de la figure1 entourez le codon START et le codon STOP

3- Quelle est la taille en paire de bases de la phase ouverte de lecture (ORF) ?

Les chercheurs décident d'exprimer la protéine SERCA dans la levure de boulangerie *S. cerevisiae* au moyen du vecteur d'expression V60 (figure 2)

4- Quelle est la raison principale qui a poussé les chercheurs à travailler dans la levure ? (1 seule réponse SVP)

5- Expliquez à quoi sert le gène URA3 présent sur le plasmide V60 et quelle caractéristique doit avoir la levure hôte qui sera utilisée pour l'expression hétérologue

Le plasmide V60 possède un MCS restreint avec deux sites de restrictions utilisables pour le clonage. Le site BamH1 (**G/GATCC**) proche du promoteur GAL et le site EcoR1 (**G/AATTC**), un peu plus loin (figure 2). Pour faciliter la future purification de la protéine SERCA, les chercheurs décident de cloner SERCA dans V60 en ajoutant une étiquette **de 4 Histidines en C terminal** de la protéine.

6- Proposez la séquence des oligonucléotides amorces (et calculez les T_m) pour la PCR qui vous permettra d'obtenir la séquence codante de la protéine SERCA avec son étiquette (HIS) ..

A

B

7- Donnez le programme PCR associé qui vous permettra d'amplifier la séquence voulue

8- Quelles étapes reste t'il à accomplir pour produire la protéine SERCA dans la levure?

Sujet 2 : PROTEINE SERCA (30 minutes)

2 litres de levures, exprimant la protéine SERCA avec une étiquette poly-histidines, sont cultivées 36 heures à 30°C, on ajoute ensuite le galactose et la culture se poursuit 18 heures. Après centrifugation à basse vitesse on récupère le culot de cellules . Le culot cellulaire est repris dans 200ml de tampon TRIS 50mM pH7,4 en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et les cellules sont lysées à 4°C avec des ultrasons. On procède ensuite à partir du lysat cellulaire aux centrifugations différentielles (figure 1) :

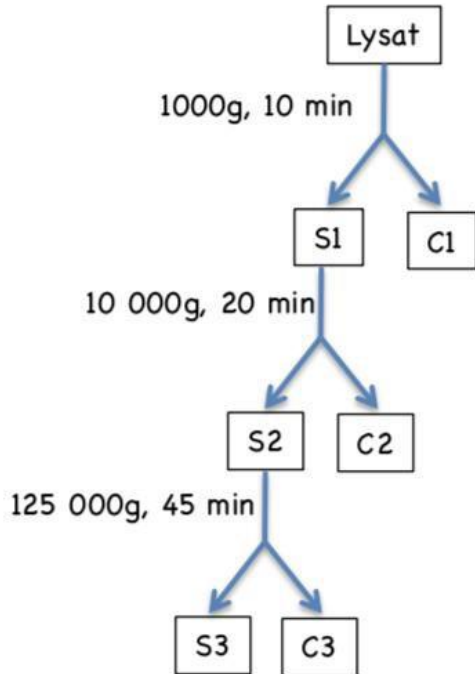


Figure 1 : Centrifugations différentielles
S : surnageant , C = culot

1- Indiquez brièvement le contenu théorique des fractions suivantes :

Un gel SDS pages est réalisé sur 5µg de protéines de chacune des fractions, suivit par un western blot réalisé avec un anticorps Anti-SERCA (figure 2)

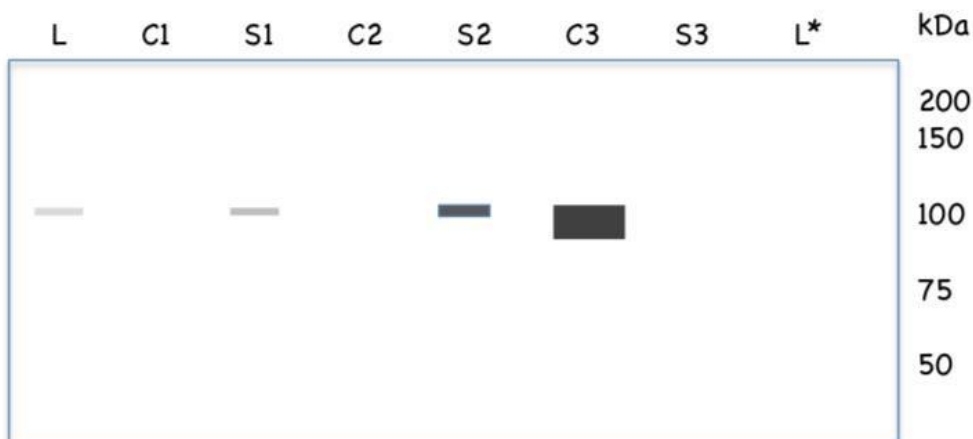


Figure 2 :Western blot des fractions L : Lysat, C: culot, S : surnageant
L* : lysat de levures non transformées

2- Les résultats de la figure 2 vous paraissent ils corrects? Justifiez votre réponse

Le culot C3 est ensuite solubilisé dans du tampon TRIS en présence de détergent et une dernière centrifugation à 125 000g permet de récupérer une fraction soluble (surnageant) contenant la protéine SERCA. La purification se fait en deux étapes, la première au moyen d'un chromatographie IMAC (Nickel) et la seconde au moyen d'une chromatographie d'exclusion S200. Toutes les étapes ont lieu en présence de tampon TRIS 50mM pH7,4, NaCl 0,1M, MgCl₂ 10mM et de détergent mais en absence de calcium et d'ATP. Le protocole suivi permet d'obtenir une protéine SERCA pure.

La purification est suivie en mesurant l'activité enzymatique avec le même tampon en présence de calcium (CaCl₂ 0,1mM), la réaction démarre en ajoutant l'ATP 1mM. Le calcium étant en excès, la mesure d'activité se fait en mesurant l'hydrolyse de l'ATP (et pas la libération de calcium)

3- Complétez le tableau de purification ci dessous.

Fractions	Protéines totales (mg)	Activité spécifique ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Activité totale ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	Rendement (%)	Facteur purification
S1	3900	0,02			
S2	2400	0,03			
S3	1800	0			
C3	600	0,1			
C3solubilisé	590	0,1			
IMAC	100	0,45			
S200	80	0,5			

4-Expliquez le fonctionnement de la chromatographie d'exclusion S200 (vous pouvez faire un dessin)

Question de cours

La protéine SERCA est une enzyme transmembranaire capable de transporter le calcium à travers la membrane quand elle hydrolyse l'ATP. l'enzyme recombinante est capable de transporter le calcium aussi efficacement que l'enzyme musculaire. Le calcium se fixe sur l'enzyme à proximité d'un tryptophane et il est possible de mesurer la fixation du calcium en mesurant la variation de fluorescence du tryptophane : **le tryptophane fluoresce en absence de calcium** et il ne fluoresce pas quand le calcium est fixé (quenching de fluorescence). Les chercheurs utilisent la fluorescence du TRP pour mesurer le K_d du calcium pour SERCA dans deux conditions. Conditions A : en présence d'un analogue non hydrolysable de l'ATP qui mime la fixation de l'ATP au site actif de l'enzyme. Conditions B : En absence d'ATP. Les résultats sont présentés sur la figure 3.

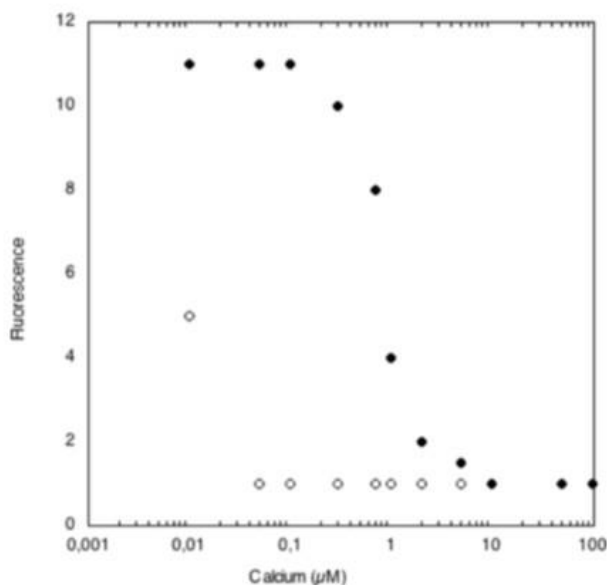


Figure 3 : mesure du K_d du calcium pour SERCA.

Les concentrations de calcium sont en échelle log . Les ronds noirs correspondent à la fluorescence du tryptophane en l'absence d'ATP (conditions A). Les ronds blancs à la fluorescence du tryptophane en présence d'ATP (conditions B)

5-D'après la figure 3 estimez les Kd du calcium pour la protéine SERCA liée à l'ATP et pour la protéine SERCA en absence d'ATP

La figure 4 représente la structure tridimensionnelle obtenue après cristallisation de la protéine SERCA recombinante en absence d'ATP.

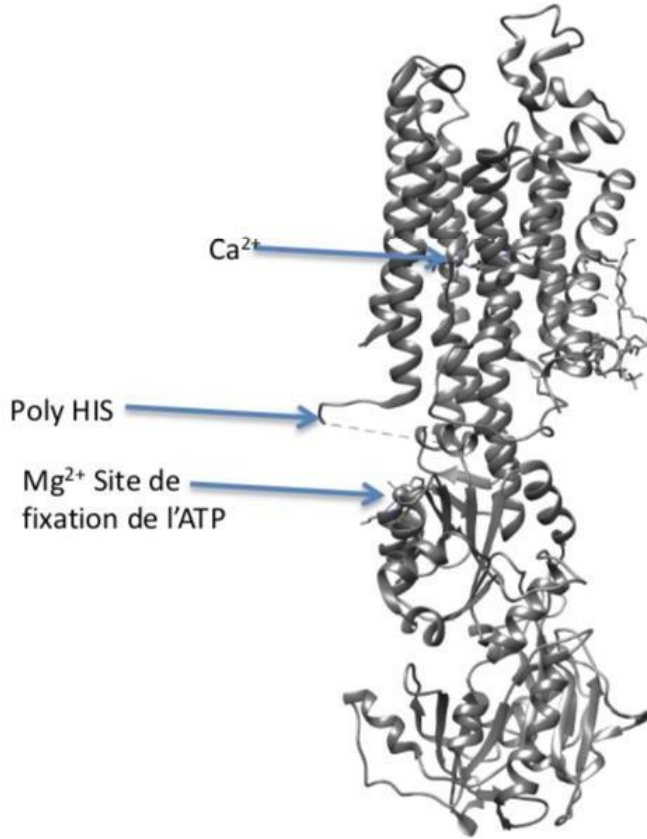


Figure 4 : Structure 3D de la protéine SERCA sans ATP

6- Sur la figure 4 tracez la position de la membrane

7- Quel(s) changement(s) attendez vous au niveau de la structure de SERCA au cours de la fixation et l'hydrolyse de l'ATP .



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2013-2014

Session 1 – S4
Correction

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

DUREE DE L'EPREUVE 1 heure 30.

CALCULATRICE AUTORISEE

L'épreuve comprend 3 sujets de 30 minutes chacun . Sujet 1 Bio mol et Sujet 2 Protéines sous forme de cahier réponse, vous devez répondre dans les espaces prévus à cet effet. Sujet3 : F Dardel à composer sur une feuille d'examen

SEULES LES NOTES DE COURS (POLY) DU PR DARDEL SONT AUTORISEES

SUJETS 1 ET 2 :

Les sujets 1 et 2 concernent l'expression dans la levure et la purification de l'ATPase membranaire SERCA. M. JIDENKO et al , Protein Expression and Purification 48 (2006)32-42;

La protéine SERCA est une ATPase transmembranaire de **109 kDa** qui se trouve dans le réticulum des cellules du muscle squelettique et qui transporte le calcium (Ca²⁺-ATPase). Le but de cette étude est de mettre au point un système d'expression hétérologue qui permette la purification d'une protéine fonctionnelle pour pouvoir la cristalliser et déterminer sa structure tridimensionnelle.

SUJET 1 Bio Mol : Clonage et expression de la protéine SERCA (30 minutes)

Les pages 2 et 3 contiennent les figures , les questions sont en pages 4 et 5

SUJET 2 Protéines : Purification et caractérisation de la protéine SERCA (30 minutes)

Pages 6 à 9

LOCUS RATCTA 3457 bp mRNA linear
 DEFINITION Rattus norvegicus calcium transporting ATPase mRNA, complete cds.
 ACCESSION M99223
 VERSION M99223.1 GI:203644
 KEYWORDS calcium transporting ATPase.
 SOURCE Rattus norvegicus ORGANISM Rattus norvegicus

5'UTR 1..165
 gene 166..3150
 /gene="SERCA"
 CDS 166..3150
 /gene="SERCA"
 /codon_start=1
 /product="calcium transporting ATPase"
 /protein_id="AAA40991.1"

A:

```

1 tggggtcaga acttcgtgga aaggagaaga atctgggggg ggcaagcaag aaaaaggaag
61 gagcccaggt taacaggcag gtggatacac tgaagaagtc cccccacaag tgagaggccc
121 ctaagaagga atacatcacc ccctggcccc caagaagga gcagaaatgga ggccgcacac
181 tccaagtcca cagaggaatg tttgtcctat tttgggggtga gcgagaccac aggccttacc
241 ccagaccaag ttaagcggca tctggaaaaa tacggcccca atgagctccc tgctgaggaa
-----
2881 accatcgaga tgtgcaacgc cctcaacagc ctgtctgaga accagtcctt actgcggatg
2941 cgcacctggg tgaacatctg gcttctcggg tccatctgcc tgtccatgtc cctccacttc
3001 ctcatcctct atgttgacc cctgccgatg atcttcaagc tccgggacct ggactttacc
3061 cagtggctca tggtcctcaa gatctcactt ccagtcatcg ggctagatga gcttctcaag
3121 ttcattgctc ggaactatct ggagggataa ccacccccct cctccatgtc tttgaaccgt
  
```

B : Traduction=

```

001 MEAAHSKSTE ECLSYFGVSE TTGLTPDQVK RHLEKYGPNE LPAEEGKSLW ELVVEQFEDL
061 LVRILLLAAC ISFVLAWFEE GEETVTAFVE PFVILLILIA NAIVGVWQER NAENAIEALK
121 EYEPENMGKVIY RDRKSVQRI KARDIVPGDI VEVAVGDKVP ADIRILSIKS TTLRVDQSIL
181 TGESVSVIKH TDPVPDPRV NQDKKNMLFS GTNIAAGKAV GIVATTGVST EIGKIRDQMA
241 ATEQDKTPLQ QKLDEFGEQL SKVISLICVA VWLINIGHFN DPVHGGSWFR GAIYYFKIAV
301 ALAVAAIPEG LPAVITTCCLA LGTRMAKKN AIVRSLPSVE TLGCTSVICS DKTGTLTTNQ
361 MSVCKMFIID KVDGDICSLN EFSITGSTYA PEGEVLKNDK PVRAGQYDGL VELATICALC
421 NDSSLDFNET KGVYEKVGEA TETALTTLVE KMNVFNTEVR SLSKVERANA CNSVIRQLMK
481 KEFTLEFSRD RKSMSVYCSP AKSSRAAVGN KMFVKGAPEG VIDRCNYVRV GTTRVPLTGP
541 VKEKIMSVIK EWGTGRDTRL CLALATRDTP PKREEMVLDD SAKFMEYEMD LTFVGVVGMML
601 DPPRKEVTGS IQLCRDAGIR VIMITGDNKG TAI AICRRIG IFSENEVAD RAYTGREFDD
661 LPLAEQREAC RRACCFARVE PSHKSKIVEY LQSYDEITAM TGDGVNDAPA LKKAIEIGIAM
721 GSGTAVAKTA SEMVLADDNF STIVAAVEEG RAIYNNMKQF IRYLISSNVG EVVCIFLTAA
781 LGLPEALIPV QLLWVNLVTD GLPATALGFN PPDLDIMDRP PRSPKEPLIS GWLFFRYMAI
841 GGYVGAATVG AAAWWFLYAE DGPHVSYHQL THFMQCTEHN PEFDGLDCEV FEAPEPMTMA
901 LSVLVTIEMC NALNSLSENQ SLLRMPPWVN IWLLGSICLS MSLHFLILYV DPLPMIFKLR
961 ALDFTQWLMV LKISLPVIGL DELLKFIARN YLEG
  
```

Figure 1 : Données récupérées du NCBI concernant le cDNA de l'ATPase SERCA .

A : La séquence présentée ici concerne uniquement la partie 5 ' et 3 ' du cDNA, pour faciliter la lecture une partie e la séquence a été omise , les nucléotides enlevés sont indiqués par des traits. 2

B : La séquence primaire correspond en revanche à la traduction exacte et totale du cDNA.

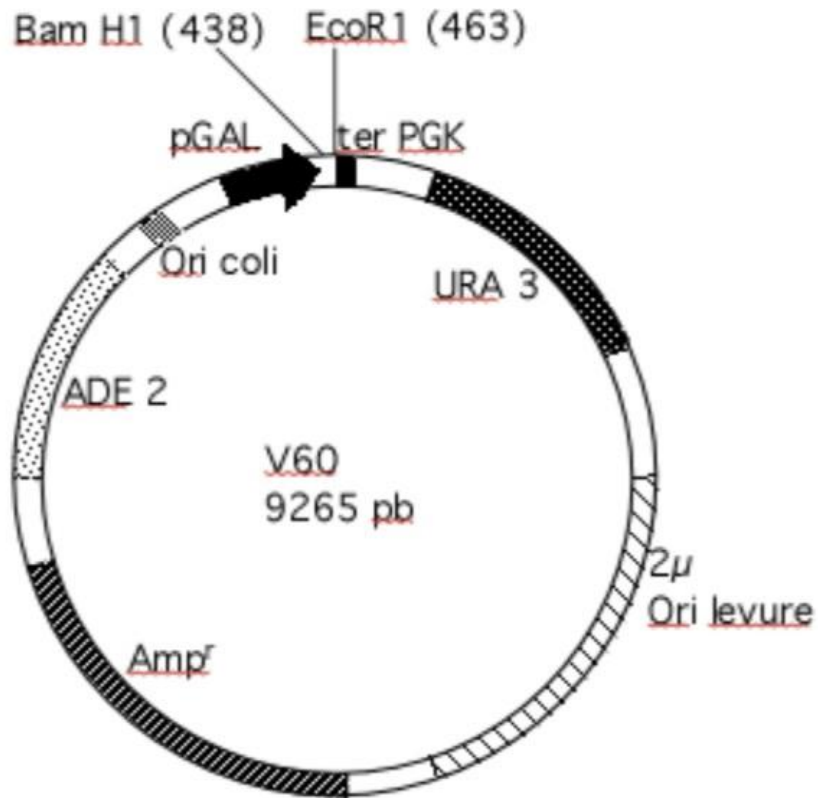


Figure 2 Carte du vecteur navette coli/Saccharomyces V60

CODE GENETIQUE

TTT F	TCT S	TAT Y	TGT C
TTC F	TCC S	TAC Y	TGC C
TTA L	TCA S	TAA *	TGA *
TTG L	TCG S	TAG *	TGG W
CTT L	CCT P	CAT H	CGT R
CTC L	CCC P	CAC H	CGC R
CTA L	CCA P	CAA H	CGA R
CTG L	CCG P	CAG Q	CGG R
ATT I	ACT T	AAT N	AGT S
ATC I	ACC T	AAC N	AGC S
ATA I	ACA T	AAA K	AGA R
ATG M	ACG T	AAG K	AGG R
GTT V	GCT A	GAT D	GGT G
GTC V	GCC A	GAC D	GGC G
GTA V	GCA A	GAA E	GGA G
GTG V	GCG A	GAG E	GGG G

Figure 3 : Code génétique

1- De quelle espèce provient la protéine SERCA ?

Rattus norvegicus

2- Sur la séquence du cDNA de la figure1 entourez le codon START et le codon STOP

Mis en rouge

3- Quelle est la taille en paire de bases de la phase ouverte de lecture (ORF) ?

2985bp

Les chercheurs décident d'exprimer la protéine SERCA dans la levure de boulangerie *S. cerevisiae* au moyen du vecteur d'expression V60 (figure 2)

4- Quelle est la raison principale qui a poussé les chercheurs à travailler dans la levure ? (1 seule réponse SVP)

5- Expliquez à quoi sert le gène URA3 présent sur le plasmide V60 et quelle caractéristique doit avoir la levure hôte qui sera utilisée pour l'expression hétérologue

4) Protéine du réticulum (membranaire pas de réticulum dans E coli)

5) Marqueur d'auxotrophie le gène *ura3* code pour la 3ème protéine nécessaire à la synthèse de l'uracile il faut utiliser une levure *ura-* qui est incapable de synthétiser son uracile , si on cultive la levure en absence d'uracile elle ne survivra que si elle est transformée par v60 qui va restaurer sa capacité à produire l'uracile et donc lui permet de survivre.

Le plasmide V60 possède un MCS restreint avec deux sites de restrictions utilisables pour le clonage. Le site BamH1 (G/GATCC) proche du promoteur GAL et le site EcoR1 (G/AATTC), un peu plus loin (figure 2). Pour faciliter la future purification de la protéine SERCA, les chercheurs décident de cloner SERCA dans V60 en ajoutant une étiquette **de 4 Histidines en C terminal** de la protéine.

6- Proposez la séquence des oligonucléotides amorces (et calculez les Tm) pour la PCR qui vous permettra d'obtenir la séquence codante de la protéine SERCA avec son étiquette (HIS)₄.

A : AMORCE SENS DE 24 NUCLEOTIDES :

gcgGGATCCatggaggccgcacac

Seule partie rouge hybride à étape 1 de pcr : 10x4 +5x2 = 50°C

B : AMORCE REVERSE DE 40 NUCLEOTIDES :

On veut a la fin

ggaactatctggagggaCACCACCACCACtaaGAATTCc1amp
HIS Stop : donc

REV = gcgGAATTCttaGTGGTGGTGGTgtccctccagatagttc

Seul partie rouge hybride à l' étape 1 : 8gc et 8at = 8x4 +8x2 = 48°

(ok pour n'importe quel codon HIS)

7- Donnez le programme PCR associé qui vous permettra d'amplifier la séquence voulue

94°2min-(94° 30sec-48° 1min-72°3min)*25 puis 5 min à 72°

8- Quelles étapes reste t'il à accomplir pour produire la protéine SERCA dans la levure?

1) Construction du vecteur recombinant

- Digérer PCR et V60 par BamH1/EcoR1

- Vecteur digéré +pcr digérée avec ligase + ATP Mg++

2) Transformation d' E coli (electroporation ou autre) par mélange de ligation et culture solide avec ampicilline

3) Sélection des clones et purification du plasmide V60-ATPase

4) Transformation de S cerevisiae et culture en absence d'uracile

Sujet 2 : PROTEINE SERCA (30 minutes)

2 litres de levures, exprimant la protéine SERCA avec une étiquette poly-histidines, sont cultivées 36 heures à 30°C, on ajoute ensuite le galactose et la culture se poursuit 18 heures. Après centrifugation à basse vitesse on récupère le culot de cellules .

Le culot cellulaire est repris dans 200ml de tampon TRIS 50mM pH7,4 en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et les cellules sont lysées à 4°C avec des ultrasons. On procède ensuite à partir du lysat cellulaire aux centrifugations différentielles (figure 1) :

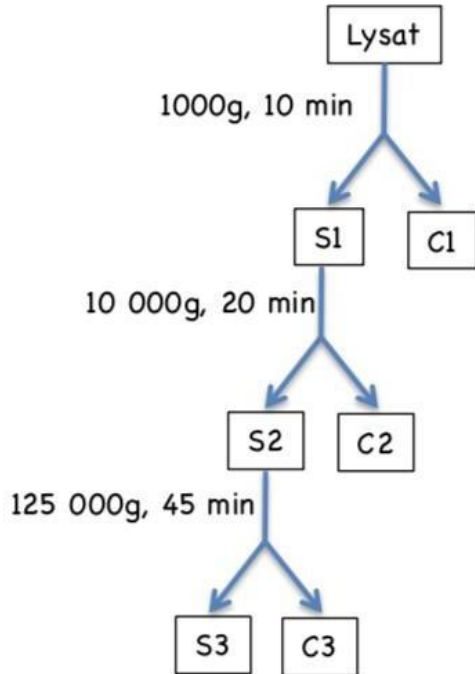


Figure 1 : Centrifugations différentielles
S : surnageant , C = culot

1- Indiquez brièvement le contenu théorique des fractions suivantes :

C1 : débris cellulaires + noyaux

C2 : essentiellement mitochondries

C3 : microsomes (RE + golgi)

S3 : cytosol

Un gel SDS pages est réalisé sur 5µg de protéines de chacune des fractions, suivit par un western blot réalisé avec un anticorps Anti-SERCA (figure 2)

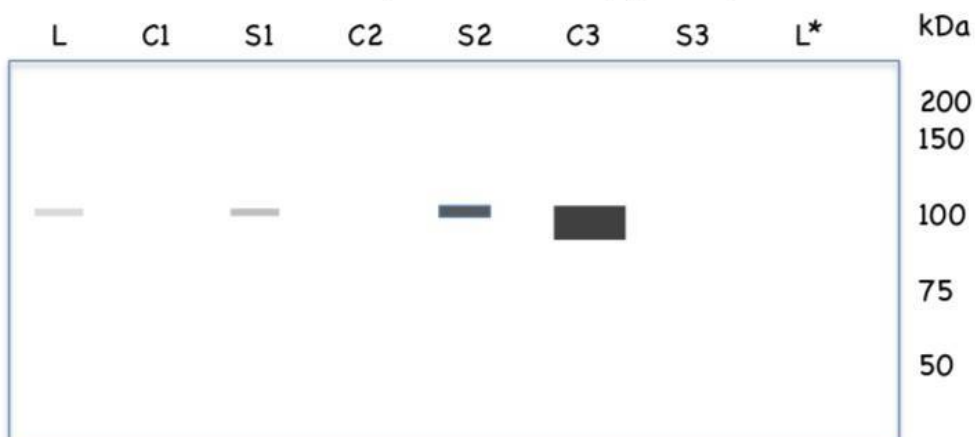


Figure 2 :Western blot des fractions L : Lysat, C: culot, S : surnageant
L* : lysat de levures non transformées

2- Les résultats de la figure 2 vous paraissent ils corrects? Justifiez votre réponse

Oui pas d'ATPase dans lysat de levures non transformées on détecte ATPase dans lysat de départ, S1, S2 et C3 = la concentration d'ATPase augment au fur et à mesure qu'on enrichit en réticulum L'ATPases du réticulum se retrouve en grande quantité dans c3 c'est normal pour une protéine du RE

Le culot C3 est ensuite solubilisé dans du tampon TRIS en présence de détergent et une dernière centrifugation à 125 000g permet de récupérer une fraction soluble (surnageant) contenant la protéine SERCA. La purification se fait en deux étapes, la première au moyen d'une chromatographie IMAC (Nickel) et la seconde au moyen d'une chromatographie d'exclusion S200. Toutes les étapes ont lieu en présence de tampon TRIS 50mM pH7,4, NaCl 0,1M, MgCl₂ 10mM et de détergent mais en absence de calcium et d'ATP. Le protocole suivi permet d'obtenir une protéine SERCA pure.

La purification est suivie en mesurant l'activité enzymatique avec le même tampon en présence de calcium (CaCl₂ 0,1mM), la réaction démarre en ajoutant l'ATP 1mM. Le calcium étant en excès, la mesure d'activité se fait en mesurant l'hydrolyse de l'ATP (et pas la libération de calcium)

3- Complétez le tableau de purification ci dessous.

Fractions	Protéines totales (mg)	Activité spécifique ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Activité totale ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	Rendement (%)	Facteur purification
S1	3900	0,02	78	100	1
S2	2400	0,03	72	92	1,5
S3	1800	0	0	0	0
C3	600	0,1	60	77	5
C3solubilisé	590	0,1	59	75	5
IMAC	100	0,45	45	58	22,5
S200	80	0,5	40	51	25

4-Expliquez le fonctionnement de la chromatographie d'exclusion S200 (vous pouvez faire un dessin)

Question de cours

La protéine SERCA est une enzyme transmembranaire capable de transporter le calcium à travers la membrane quand elle hydrolyse l'ATP. l'enzyme recombinante est capable de transporter le calcium aussi efficacement que l'enzyme musculaire. Le calcium se fixe sur l'enzyme à proximité d'un tryptophane et il est possible de mesurer la fixation du calcium en mesurant la variation de fluorescence du tryptophane : **le tryptophane fluoresce en absence de calcium** et il ne fluoresce pas quand le calcium est fixé (quenching de fluorescence). Les chercheurs utilisent la fluorescence du TRP pour mesurer le K_d du calcium pour SERCA dans deux conditions. Conditions A : en présence d'un analogue non hydrolysable de l'ATP qui mime la fixation de l'ATP au site actif de l'enzyme. Conditions B : En absence d'ATP. Les résultats sont présentés sur la figure 3.

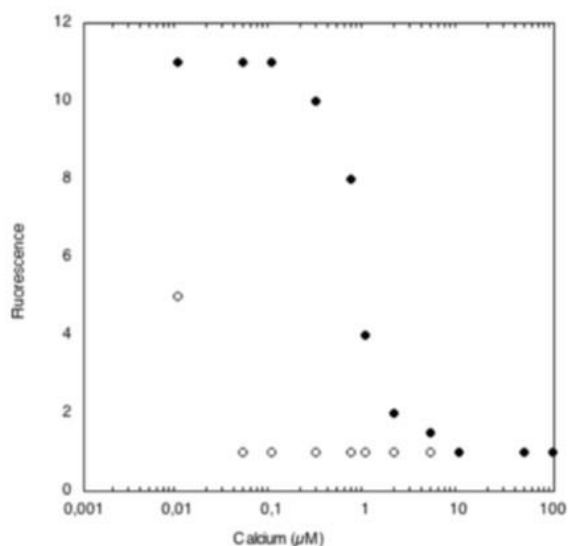


Figure 3 : mesure du K_d du calcium pour SERCA.

Les concentrations de calcium sont en échelle log . Les ronds noirs correspondent à la fluorescence du tryptophane en l'absence d'ATP (conditions A). Les ronds blancs à la fluorescence du tryptophane en présence d'ATP (conditions B)

5-D'après la figure 3 estimez les K_d du calcium pour la protéine SERCA liée à l'ATP et pour la protéine SERCA en absence d'ATP

Kd environ 10nM avec ATP et μ M en absence d'ATP

La figure 4 représente la structure tridimensionnelle obtenue après cristallisation de la protéine SERCA recombinante en absence d'ATP.

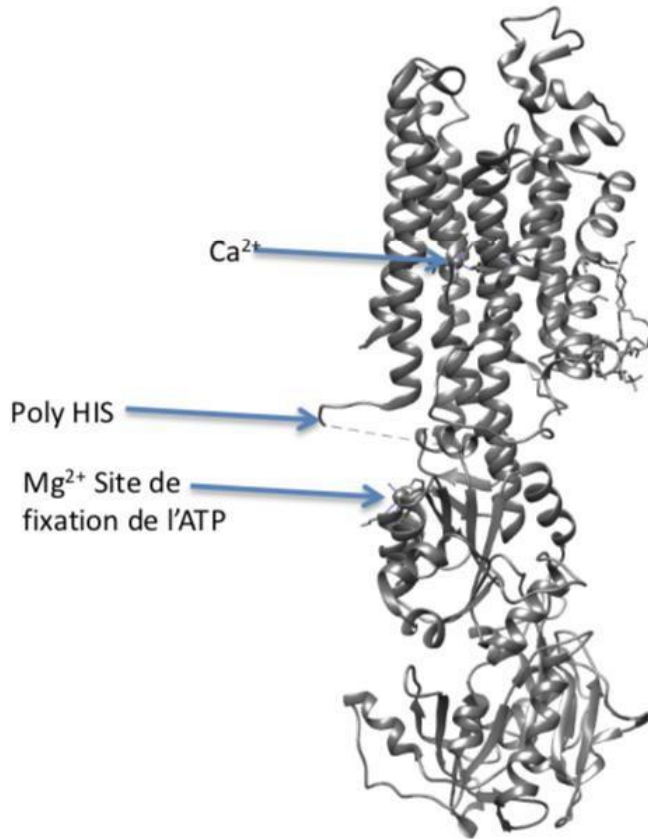


Figure 4 : Structure 3D de la protéine SERCA sans ATP

6- Sur la figure 4 tracez la position de la membrane : **on a des hélices transmembranaires il faut tracer une membrane perpendiculaire à la structure qui laissait un peu de globulaire à l'extérieur de la membrane, et un peu du tonneau à l'extérieur (en fait la membrane commence à mi-tonneau et s'arrête vers poly his.**

7- Quel(s) changement(s) attendez vous au niveau de la structure de SERCA au cours de la fixation et l'hydrolyse de l'ATP .

En présence d'ATP le Ca^{2+} a une forte affinité, quand l'ATP est hydrolysé on attend un changement de conformation qui modifie le tonneau pour libérer le calcium (c'est un transporteur)



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2016-2017

Session 1 – S4
Sujet

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Année 2016-2017 NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude

L2 Semestre 2 SESSION INITIALE DUREE de l'épreuve 1H30-calculatrices autorisées.

L'épreuve comporte 3 parties, de valeurs égales et chacune de durée estimée à 30 minutes.
Partie 1 Biologie moléculaire , partie 2 Protéines , la partie 3 est le sujet du Pr DARDEL

PARTIE 1 + 2 : D'après Hossain M.B, Oshima T, Hirose S, Wang J, Tokumoto T (2015) Expression and Purification of Human Membrane Progesterone Receptor α (mPR α). PLoS ONE 10(9): e0138739.

La Progesterone est une hormone stéroïde produite par les ovaires, elle engendre de nombreux effets physiologiques médiés par les récepteurs nucléaires à la progesterone. Les chercheurs ont récemment identifié un nouveau type de récepteur, les récepteurs à la progestine, qui sont des récepteurs membranaires. Ils sont impliqués dans la maturation des Oocytes en réponse à la liaison de la progesterone.

PARTIE 1 : Clonage et expression du récepteur mPR α dans la levure (30 minutes)

Les chercheurs décident d'exprimer le mPR α dans la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* sous forme de protéine recombinante avec une étiquette poly-histidine en utilisant le plasmide V60 schématisé ci-dessous. Le séquence primaire de la protéine mPR α est donnée page suivante.

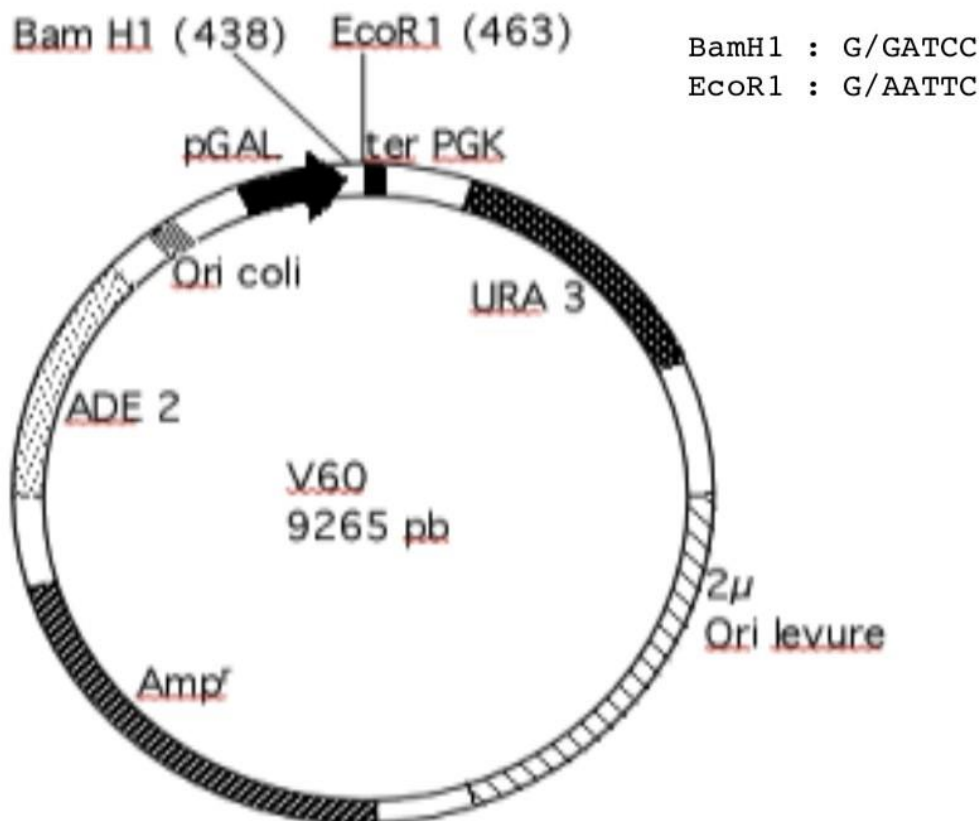


Figure 1 : Carte du vecteur navette V60

ATG ACG ACC GCC ATC TTG GAG CGC CTG AGC ACC CTG TCG GTC AGC GGG CAG CAG CTG CGC < 60
 M T T A I L E R L S T L S V S G Q Q L R 20

CGC CTG CCC AAG ATC CTG GAG GAT GGG CTT CCC AAG ATG CCT TGC ACT GTC CCA GAA ACG < 120
 R L P K I L E D G L P K M P C T V P E T 40

GAT GTG CCC CAG CTC TTC CGG GAG CCT TAC ATC CGC ACC GGC TAC CGC CCC ACG GGG CAC < 180
 D V P Q L F R E P Y I R T G Y R P T G H 60

GAG TGG CGC TAC TAC TTC TTC AGC CTC TTT CAG AAA CAC AAC GAG GTG GTC AAC GTC TGG < 240
 E W R Y Y F F S L F Q K H N E V V N V W 80

ACC CAT TTA CTG GCA GCC CTG GCC GTC CTC TTG CGA TTC TGG GCC TTT GCC GAG GCT GAG < 300
 T H L L A A L A V L L R F W A F A E A E 100

GCC TTG CCA TGG GCG TCT ACC CAC TCC CTG CCT CTG CTC CTC TTC ATC CTG TCG TCA ATC < 360
 A L P W A S T H S L P L L L F I L S S I 120

ACT TAC CTC ACC TGC AGC CTT CTG GCC CAC CTG CTG CAG TCC AAG TCA GAG CTC TCC CAC < 420
 T Y L T C S L L A H L L Q S K S E L S H 140

TAC ACC TTC TAC TTT GTG GAC TAT GTT GGC GTG AGC GTT TAC CAA TAT GGC AGT GCT TTG < 480
 Y T F Y F V D Y V G V S V Y Q Y G S A L 160

GCT CAT TTC TTC TAC AGC TCT GAC CAG GCC TGG TAT GAC CGG TTC TGG CTT TTC TTC TTG < 540
 A H F F Y S S D Q A W Y D R F W L F F L 180

CCA GCA GCT GCC TTC TGT GGC TGG TTA TCT TGT GCT GGC TGT TGC TAT GCC AAA TAT CGT < 600
 P A A A F C G W L S C A G C C Y A K Y R 200

TAC CGG AGG CCT TAT CCA GTC ATG AGG AAG ATC TGT CAA GTG GTG CCA GCA GGT CTG GCT < 660
 Y R R P Y P V M R K I C Q V V P A G L A 220

TTT ATC CTA GAC ATC AGC CCT GTG GCA CAC CGT GTG GCG CTC TGT CAC CTG GCT GGC TGC < 720
 F I L D I S P V A H R V A L C H L A G C 240

CAG GAG CAA GCA GCC TGG TAC CAC ACC CTC CAG ATC CTC TTC TTC CTG GTT AGC GCT TAT < 780
 Q E Q A A W Y H T L Q I L F F L V S A Y 260

TTC TTC TCC TGC CCC GTG CCT GAG AAG TAC TTC CCG GGT TCC TGT GAC ATC GTG GGC CAT < 840
 F F S C P V P E K Y F P G S C D I V G H 280

GGG CAT CAG ATC TTC CAT GCA TTT CTG TCC ATC TGT ACG CTC TCC CAG CTG GAG GCC ATC < 900
 G H Q I F H A F L S I C T L S Q L E A I 300

CTC CTG GAC TAC CAG GGG CGG CAG GAG ATC TTC CTG CAG CGC CAT GGA CCC CTA TCT GTC < 960
 L L D Y Q G R Q E I F L Q R H G P L S V 320

CAC ATG GCC TGC CTC TCC TTC TTC TTC CTG GCT GCC TGC AGT GCT GCC ACC GCA GCC CTT < 1020
 H M A C L S F F F L A A C S A A T A A L 340

CTG AGG CAC AAA GTC AAG GCC AGA CTG ACC AAG AAA GAT TCC TGA < 1065
 L R H K V K A R L T K K D S * 354

Figure 2 : Séquence primaire de mPR α

La protéine mPR α humaine utilisée ici est une protéine transmembranaire localisée dans la membrane plasmique et la membrane du reticulum des cellules ovariennes (pas dans la membrane nucléaire) qui peut être schématisée comme suit :

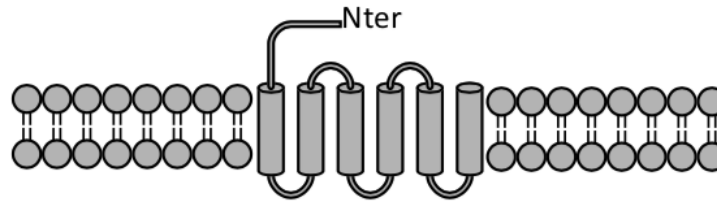


Figure3 : Schéma de la protéine mPR α

Ci-dessous, le code génétique

TTT F	TCT S	TAT Y	TGT C
TTC F	TCC S	TAC Y	TGC C
TTA L	TCA S	TAA *	TGA *
TTG L	TCG S	TAG *	TGG W
CTT L	CCT P	CAT H	CGT R
CTC L	CCC P	CAC H	CGC R
CTA L	CCA P	CAA Q	CGA R
CTG L	CCG P	CAG Q	CGG R
ATT I	ACT T	AAT N	AGT S
ATC I	ACC T	AAC N	AGC S
ATA I	ACA T	AAA K	AGA R
ATG M	ACG T	AAG K	AGG R
GTT V	GCT A	GAT D	GGT G
GTC V	GCC A	GAC D	GGC G
GTA V	GCA A	GAA E	GGA G
GTG V	GCG A	GAG E	GGG G

Figure 4: Code génétique

A partir des données en votre possession et de vos connaissances répondez aux question suivantes dans les espaces laissés libres

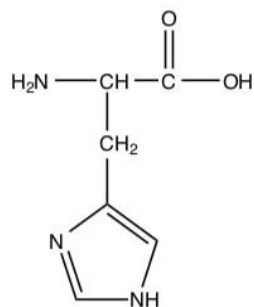
QUESTION 1 : Pour quelle raison principale est il logique de choisir d'exprimer mPR α dans la levure plutôt que dans la bactérie ?

QUESTION 2 : Quel(s) type(s) de *Saccharomyces cerevisiae* devez vous utiliser pour parvenir à exprimer mPR α avec le vecteur V60 ? Justifiez votre réponse

QUESTION 3 : Vous voulez ajouter une étiquette poly histidine a la protéine mPR α . D'après la figure 3 quel est l'endroit le plus judicieux pour placer l'étiquette poly histidine ? (justifiez votre réponse)

QUESTION 4 : On admettra que la phase codante de mPR α ne contient ni site BamH1 ni site EcorR1. Détaillez la PCR qui vous permettra de cloner mPR α avec une étiquette de 6 Histidines dans le vecteur V60

QUESTION 5 : Dessinez la formule de l'histidine



QUESTION 6 : Résumez les étapes qui restent à accompli après la PCR pour obtenir la construction voulue (le plasmide V60-mPR α dans *Saccharomyces cerevisiae*)

PARTIE 2 PROTEINE mPR α (30 minutes) Cette partie est indépendante de la partie 1

On rappelle les données communes aux deux parties (ne pas lire si vous avez démarré par la partie 1).

Les chercheurs sont parvenus à exprimer mPR α dans la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* sous forme de protéine recombinante avec une étiquette poly-histidine

La protéine mPR α humaine utilisée ici est une protéine transmembranaire localisée dans la membrane plasmique et le réticulum des cellules ovariennes (pas dans la membrane nucléaire) qui peut être schématisée comme suit :

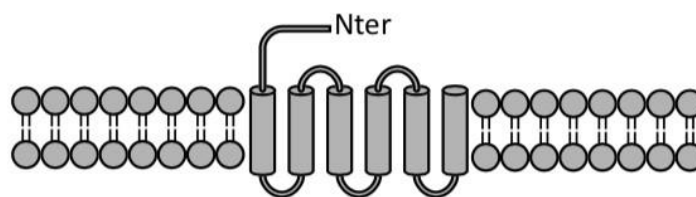


Figure 3 : Schéma de la protéine transmembranaire mPR α

La protéine recombinante possède une étiquette polyhistidine en plus de la protéine sauvage

Fractionnement cellulaire des levures exprimant mPR α :

Les culots de levure exprimant mPR α sont resuspendus dans 80ml de tampon 50 mM sodium phosphate, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5% glycerol, pH 7.4 à 4°C.

Ils sont ensuite broyés avec un sonicateur avant d'être soumis plusieurs centrifugations selon le schéma ci dessous. Chaque fraction est analysée pour sa capacité à lier la progesterone.

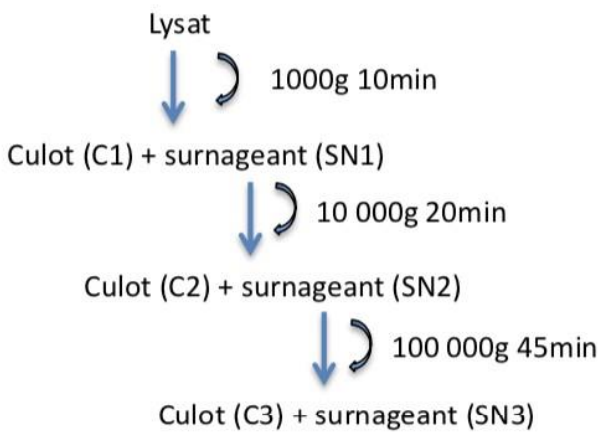


Figure 5 : Schéma des centrifugations

Composition	Fraction	Liaison Pg
Broyat cellulaire	Lysat	+
Noyaux, debris membrane	C1	-
Cytosol +mitochondries +reticulum +golgi	SN1	+
mitochondries	C2	-
Cytosol + reticulum + golgi	SN2	+
Reticulum +golgi	C3	+++
cytosol	SN3	-

Tableau 1: Capacité des différentes fractions à lier la progesterone.

Question 1 : pourquoi doit on rester à 4°C à partir du moment ou on a broyé les levures?

Question 2 : Complétez le tableau 1 en explicitant la composition des fractions.(2-3 mots)

Question 3 : Dans quel compartiment cellulaire se trouve mPR α exprimée dans la levure ?

Question 4 : Ce résultat est il surprenant ?

Purification de mPR α recombinante.

La fraction capable de lier la progestérone est préparée à une concentration de protéine de 10mg/ml dans un tampon MACAO-triton : 50 mM TRIS-HCl, NaCl 0,5M, 1 mM PMSF, 5% glycerol, pH 7.4 à 4°C contenant du Triton à 0,01%.

Après avoir agité le mélange pendant 1 heure, une dernière centrifugation à 100 000g est réalisée, le culot est mis à la poubelle et :

les 20ml de surnageant sont déposées sur une colonne de Ni-NTA Agarose et la fraction A collectée.

On ajoute ensuite sur la colonne 50 ml de tampon MCACO-triton, la fraction B est collectée

On ajoute sur la colonne 50 ml de tampon MCACO-triton contenant de l'imimidazole à 20mM, la fraction C est collectée

On ajoute enfin 50 ml de tampon MCACO-triton contenant de l'imimidazole à 300 mM, la fraction D est collectée

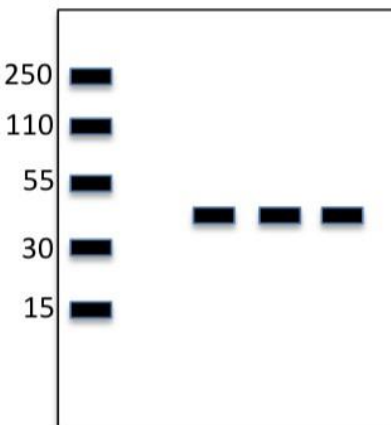
Question 5 : A quoi sert le triton ?

Question 6 : A priori dans quelle fraction attendez-vous la protéine mPR α ? justifiez votre réponse

La fraction contenant la protéine mPR α est ensuite déposée sur une colonne de sephadex G200, elle est éluée sous forme de deux pics 1 et 2. Après calibration de la colonne G200, le pic1 migre comme une protéine d'environ 80 kD et le pic2 comme une protéine d'environ 40 kDa.

La figure suivante schématise le gel SDS-Page obtenu avec les fractions obtenues après le colonne de Ni-NTA et des fractions 1 et 2 issues de la sephadex G200.

kD Mw NiNTA 1 2



Question 7: A quoi correspondent les Pics 1 et 2?

Figure 6 : gels SDS-PAGE
NiNTA : mPR α sortie NiNTA
1 : Pic 1 G200
2 : Pic2 G200

Question 8: complétez le tableau de purification ci dessous .

fraction	Protéines (mg)	Act Spé : nmol Pg liée/mg	Activité totale	Facteur purif.	Rendement (%)
Lysat	1250	1	1250	1	100
Fraction + triton	1000	1	1000	2	80
Ni NTA	70	10	700	10	56
G200 pic1	25	0	0	-	-
G200 pic2	25	20	500	20	40

Tableau 2 : tableau de purification de mPR α recombinante

Question 9 : D'après le tableau 2 et la figure 6, à quoi correspond la fraction la plus active de mPR α recombinante ?

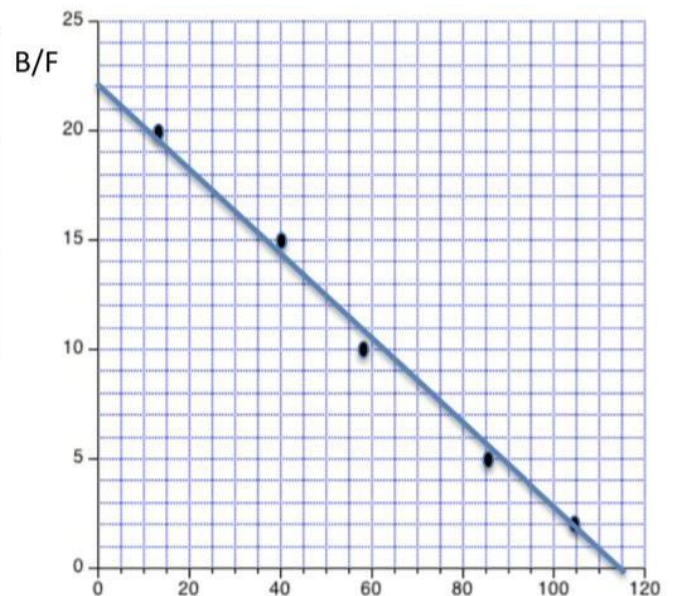
Question 10 : A partir des données du tableau 3 tracez la représentation de Scatchard et calculez le Kd de mPR α recombinante pour la progesterone.

Pg liée (nM)	105	85	63	40	13
Pg libre (nM)	52,5	17	6,3	2,67	0,65
Lié/libre	2	5	10	15	20

Tableau 3 : valeurs de concentration de progesterone.

Données obtenues en utilisant de la progesterone radioactive et 1 quantité non précisée de mPR α . vous n'avez donc pas a calculer le nombre de sites

On représente Lie/libre = B en fonction de lié = B





Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2016-2017

Session 1 – S4
Correction

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Année 2016-2017 NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude

L2 Semestre 2 SESSION INITIALE DUREE de l'épreuve 1H30-calculatrices autorisées.

L'épreuve comporte 3 parties, de valeurs égales et chacune de durée estimée à 30 minutes.

Partie 1 Biologie moléculaire , partie 2 Protéines , la partie 3 est le sujet du Pr DARDEL

PARTIE 1 + 2 : D'après Hossain M.B, Oshima T, Hirose S, Wang J, Tokumoto T (2015) Expression and Purification of Human Membrane Progesterin Receptor α (mPR α). PLoS ONE 10(9): e0138739.

La Progesterone est une hormone stéroïde produite par les ovaires, elle engendre de nombreux effets physiologiques médiés par les récepteurs nucléaires à la progestérone. Les chercheurs ont récemment identifié un nouveau type de récepteur, les récepteurs à la progestine, qui sont des récepteurs membranaires. Ils sont impliqués dans la maturation des Oocytes en réponse à la liaison de la progestérone.

PARTIE 1 : Clonage et expression du récepteur mPR α dans la levure (30 minutes)

Les chercheurs décident d'exprimer le mPR α dans la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* sous forme de protéine recombinante avec une étiquette poly-histidine en utilisant le plasmide V60 schématisé ci-dessous. Le séquence primaire de la protéine mPR α est donnée page suivante.

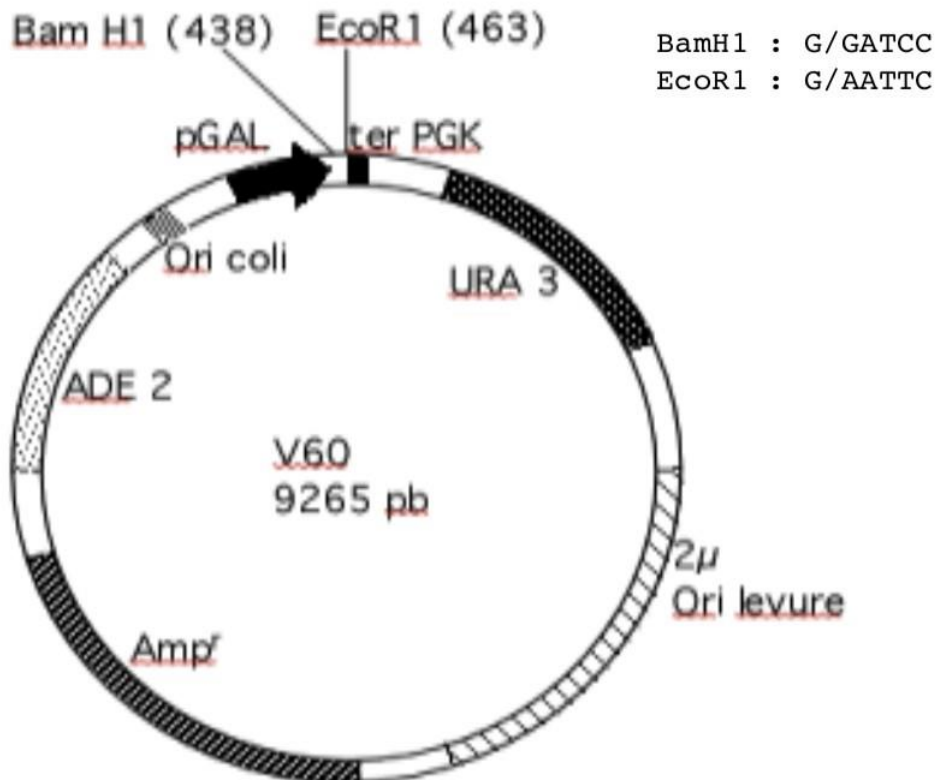


Figure 1 : Carte du vecteur navette V60

ATG ACG ACC GCC ATC TTG GAG CGC CTG AGC ACC CTG TCG GTC AGC GGG CAG CAG CTG CGC < 60
 M T T A I L E R L S T L S V S G Q Q L R 20

CGC CTG CCC AAG ATC CTG GAG GAT GGG CTT CCC AAG ATG CCT TGC ACT GTC CCA GAA ACG < 120
 R L P K I L E D G L P K M P C T V P E T 40

GAT GTG CCC CAG CTC TTC CGG GAG CCT TAC ATC CGC ACC GGC TAC CGC CCC ACG GGG CAC < 180
 D V P Q L F R E P Y I R T G Y R P T G H 60

GAG TGG CGC TAC TAC TTC TTC AGC CTC TTT CAG AAA CAC AAC GAG GTG GTC AAC GTC TGG < 240
 E W R Y Y F F S L F Q K H N E V V N V W 80

ACC CAT TTA CTG GCA GCC CTG GCC GTC CTC TTG CGA TTC TGG GCC TTT GCC GAG GCT GAG < 300
 T H L L A A L A V L L R F W A F A E A E 100

GCC TTG CCA TGG GCG TCT ACC CAC TCC CTG CCT CTG CTC CTC TTC ATC CTG TCG TCA ATC < 360
 A L P W A S T H S L P L L L F I L S S I 120

ACT TAC CTC ACC TGC AGC CTT CTG GCC CAC CTG CTG CAG TCC AAG TCA GAG CTC TCC CAC < 420
 T Y L T C S L L A H L L Q S K S E L S H 140

TAC ACC TTC TAC TTT GTG GAC TAT GTT GGC GTG AGC GTT TAC CAA TAT GGC AGT GCT TTG < 480
 Y T F Y F V D Y V G V S V Y Q Y G S A L 160

GCT CAT TTC TTC TAC AGC TCT GAC CAG GCC TGG TAT GAC CGG TTC TGG CTT TTC TTC TTG < 540
 A H F F Y S S D Q A W Y D R F W L F F L 180

CCA GCA GCT GCC TTC TGT GGC TGG TTA TCT TGT GCT GGC TGT TGC TAT GCC AAA TAT CGT < 600
 P A A A F C G W L S C A G C C Y A K Y R 200

TAC CGG AGG CCT TAT CCA GTC ATG AGG AAG ATC TGT CAA GTG GTG CCA GCA GGT CTG GCT < 660
 Y R R P Y P V M R K I C Q V V P A G L A 220

TTT ATC CTA GAC ATC AGC CCT GTG GCA CAC CGT GTG GCG CTC TGT CAC CTG GCT GGC TGC < 720
 F I L D I S P V A H R V A L C H L A G C 240

CAG GAG CAA GCA GCC TGG TAC CAC ACC CTC CAG ATC CTC TTC TTC CTG GTT AGC GCT TAT < 780
 Q E Q A A W Y H T L Q I L F F L V S A Y 260

TTC TTC TCC TGC CCC GTG CCT GAG AAG TAC TTC CCG GGT TCC TGT GAC ATC GTG GGC CAT < 840
 F F S C P V P E K Y F P G S C D I V G H 280

GGG CAT CAG ATC TTC CAT GCA TTT CTG TCC ATC TGT ACG CTC TCC CAG CTG GAG GCC ATC < 900
 G H Q I F H A F L S I C T L S Q L E A I 300

CTC CTG GAC TAC CAG GGG CGG CAG GAG ATC TTC CTG CAG CGC CAT GGA CCC CTA TCT GTC < 960
 L L D Y Q G R Q E I F L Q R H G P L S V 320

CAC ATG GCC TGC CTC TCC TTC TTC TTC CTG GCT GCC TGC AGT GCT GCC ACC GCA GCC CTT < 1020
 H M A C L S F F F L A A C S A A T A A L 340

CTG AGG CAC AAA GTC AAG GCC AGA CTG ACC AAG AAA GAT TCC TGA < 1065
 L R H K V K A R L T K K D S * 354

Figure 2 : Séquence primaire de mPR α

La protéine mPR α humaine utilisée ici est une protéine transmembranaire localisée dans la membrane plasmique et la membrane du reticulum des cellules ovariennes (pas dans la membrane nucléaire) qui peut être schématisée comme suit :

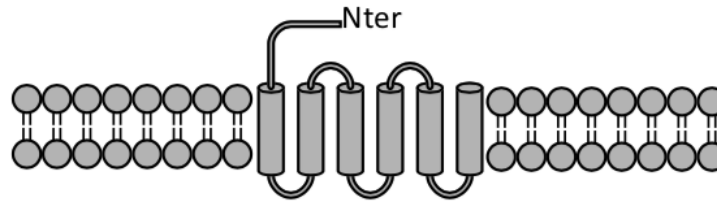


Figure3 : Schéma de la protéine mPR α

Ci-dessous, le code génétique

TTT F	TCT S	TAT Y	TGT C
TTC F	TCC S	TAC Y	TGC C
TTA L	TCA S	TAA *	TGA *
TTG L	TCG S	TAG *	TGG W
CTT L	CCT P	CAT H	CGT R
CTC L	CCC P	CAC H	CGC R
CTA L	CCA P	CAA Q	CGA R
CTG L	CCG P	CAG Q	CGG R
ATT I	ACT T	AAT N	AGT S
ATC I	ACC T	AAC N	AGC S
ATA I	ACA T	AAA K	AGA R
ATG M	ACG T	AAG K	AGG R
GTT V	GCT A	GAT D	GGT G
GTC V	GCC A	GAC D	GGC G
GTA V	GCA A	GAA E	GGA G
GTG V	GCG A	GAG E	GGG G

Figure 4: Code génétique

A partir des données en votre possession et de vos connaissances répondez aux questions suivantes dans les espaces laissés libres

QUESTION 1 : Pour quelle raison principale est-il logique de choisir d'exprimer mPR α dans la levure plutôt que dans la bactérie ?

Parce que la protéine est transmembranaire et située dans la membrane plasmique et la membrane du réticulum dans les cellules humaines. Les bactéries ont une membrane plasmique mais pas de réticulum endoplasmique alors que les levures sont des eucaryotes qui possèdent bien les deux types de membrane.

QUESTION 2 : Quel(s) type(s) de *Saccharomyces cerevisiae* devez-vous utiliser pour parvenir à exprimer mPR α avec le vecteur V60 ? Justifiez votre réponse

Le vecteur V60 possède 2 marqueurs de sélection : URA3 et ADE2. URA3 restaure l'auxotrophie pour l'uracile et ADE2 l'auxotrophie pour l'adénine.

ON peut donc utiliser seulement 3 types de levure pour exprimer mPR α :

- 1- Une levure Ade-
- 2- Une levure Ura-
- 3- Une levure à la fois ade- et ura-

Il faudra cultiver les levures transformées par V60-mPR α en absence d'adénine et/ou d'uracile pour exercer une pression de sélection qui permettra de conserver le plasmide dans la levure

QUESTION 3 : Vous voulez ajouter une étiquette poly histidine a la protéine mPR α . D'après la figure 3 quel est l'endroit le plus judicieux pour placer l'étiquette poly histidine ? (justifiez votre réponse)

Le plus logique est de placer l'étiquette poly-HIS en N-ter. En effet la partie N-ter de la protéine sort de la membrane alors que la partie C-ter est enfouie dans la membrane. Ajouter une queue poly-HIS en C-ter risquerait de perturber l'insertion de la partie C-ter dans la membrane alors qu'une modification en N-ter ne devrait pas perturber le repliement dans la membrane

QUESTION 4 : On admettra que la phase codante de mPR α ne contient ni site BamH1 ni site EcorR1. Détaillez la PCR qui vous permettra de cloner mPR α avec une étiquette de 6 Histidines dans le vecteur V60

4-1 Séquence du primer SENS de 45 nucléotides :

gcgGGATCCatgCACCACCACCACCACacgaccgccatcttg
BamH1 M H H H H H H T T A I L

4-2 Tm du primer sens :

compter seulement le codons TTAIL

$9 \times 4^\circ + 6 \times 2^\circ = 48^\circ\text{C}$ (compté bon aussi si on avait ajoute 8° pour ATG)

4-3 Séquence du primer reverse de 27 nucléotides :

gcgGAATTCTcaggaatctttcttggt
EcoR1 *

4-4 Tm du primer sens

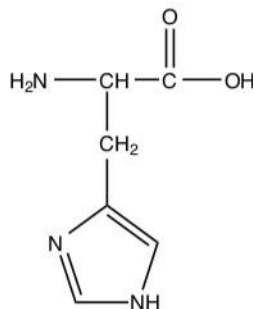
Compter à partir du stop inclus

$4^\circ \times 7 + 2^\circ \times 11 = 50^\circ\text{C}$

4-5 : programme PCR qui permettra d'amplifier la séquence désirée :

94° 2min (94° 30s- 48° 1min- 72° 1min30sec) \times 25 puis 2min à 72°

QUESTION 5 : Dessinez la formule de l'histidine



QUESTION 6 : Résumez les étapes qui restent à accompli après la PCR pour obtenir la construction voulue (le plasmide V60-mPR α dans *Saccharomyces cerevisiae*)

1) Construction du plasmide recombinant

- Le produit PCR purifié est digéré par BamH1/EcoR1
- V60 est digéré par BamH1/EcoR1
- Ligation: PCR digérée + V60 digérée incubés avec ligase + ATP

2) Transformation d'E.coli par le mélange de ligation

- Transformer des bactéries compétentes avec le mélange de ligation
- Cultiver E coli sur boite de pétri en présence d'ampicilline

3) Extraction de l'ADN plasmidique

- le lendemain purifier le plasmide V60-mPR α

4) Transformation de levures avec le plasmide V60-mPR α et culture des levures transformées et expression de la protéine recombinante

- Transformer levure par électroporation avec le plasmide V60-mPR α
- Cultiver les levures transformées en absence d'uracile et/ou d'adénine
- Induire l'expression de la protéine recombinante avec du galactose (promoteur pGAL)

PARTIE 2 PROTEINE mPR α (30 minutes) Cette partie est indépendante de la partie 1

On rappelle les données communes aux deux parties (ne pas lire si vous avez démarré par la partie 1).

Les chercheurs sont parvenus à exprimer mPR α dans la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* sous forme de protéine recombinante avec une étiquette poly-histidine

La protéine mPR α humaine utilisée ici est une protéine transmembranaire localisée dans la membrane plasmique et le réticulum des cellules ovariennes (pas dans la membrane nucléaire) qui peut être schématisée comme suit :

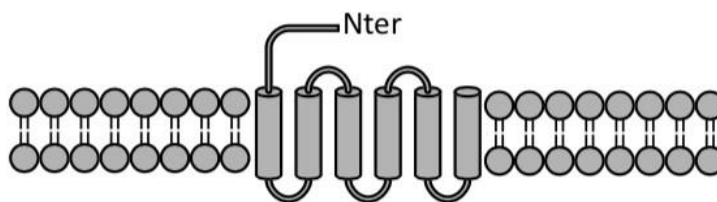


Figure 3 : Schéma de la protéine transmembranaire mPR α

La protéine recombinante possède une étiquette polyhistidine en plus de la protéine sauvage

Fractionnement cellulaire des levures exprimant mPR α :

Les culots de levure exprimant mPR α sont resuspendus dans 80ml de tampon 50 mM sodium phosphate, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5% glycerol, pH 7.4 à 4°C.

Ils sont ensuite broyés avec un sonicateur avant d'être soumis plusieurs centrifugations selon le schéma ci dessous. Chaque fraction est analysée pour sa capacité à lier la progesterone.

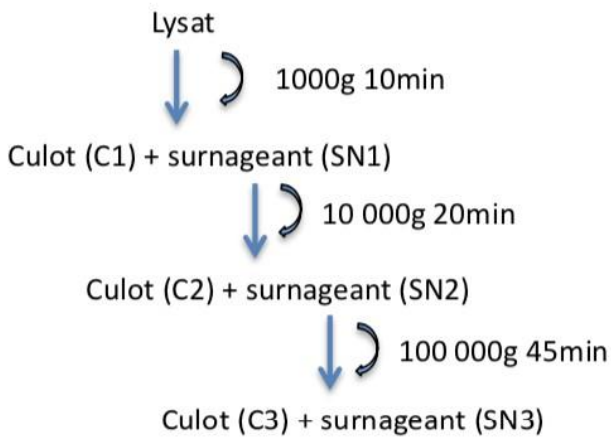


Figure 5 : Schéma des centrifugations

Composition	Fraction	Liaison Pg
Broyat cellulaire	Lysat	+
Noyaux, debris membrane	C1	-
Cytosol +mitochondries +reticulum +golgi	SN1	+
mitochondries	C2	-
Cytosol + reticulum + golgi	SN2	+
Reticulum +golgi	C3	+++
cytosol	SN3	-

Tableau 1: Capacité des différentes fractions à lier la progesterone.

Question 1 : pourquoi doit on rester à 4°C à partir du moment ou on a broyé les levures?
pour ralentir la protéolyse (les protéases sont ralenties à froid)

Question 2 : Complétez le tableau 1 en explicitant la composition des fractions.(2-3 mots)

Question 3 : Dans quel compartiment cellulaire se trouve mPR α exprimée dans la levure ?
dans la membrane du réticulum (et ou du golgi)

Question 4 : Ce résultat est il surprenant ?

Oui et non

Non parce que mPR α est une protéine située dans la membrane du réticulum chez l'homme

RQ : on attendrait aussi son expression dans la membrane plasmique comme chez l'homme et ce n'est pas le cas ici (rien dans culot1).

!Purification de mPRa recombinante.

La fraction capable de lier la progesterone est preparée à une concentration de protéine de 10mg/ml dans un tampon MACAO-triton: 50 mM TRIS-HCl, NaCl 0,5M, 1 mM PMSF, 5% glycerol, pH 7.4 à 4°C contenant du Triton à 10,01%.

Après avoir agité le mélange pendant 1 heure, une dernière centrifugation à 100 000g est réalisée, le culot est mis à la poubelle et :

les 20ml de surnageant sont déposés sur une colonne de Ni-NTA Agarose et la fraction A collectée.

On ajoute ensuite sur la colonne 50 ml de tampon MCAC0-triton, la fraction B est collectée

On ajoute sur la colonne 50 ml de tampon MCAC0-triton contenant de l'imimidazole à 20mM, la fraction C est collectée

On ajoute enfin 50 ml de tampon MCAC0-triton contenant de l'imimidazole à 300 mM, la fraction D est collectée

Question 5: A quoi sert le triton?

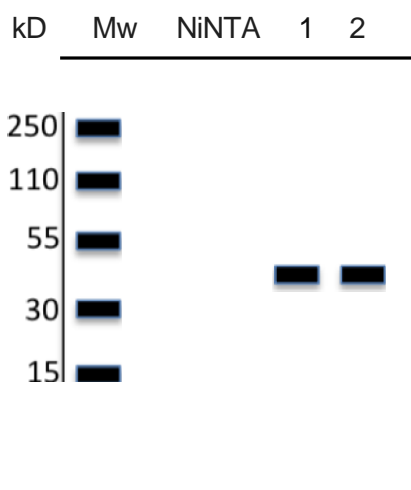
C'est un détergent qui permet de solubiliser les protéines membranaires

Question 6: A priori dans quelle fraction attendez-vous la protéine mPRa? justifiez votre réponse

Dans la fraction D puisque la protéine a une étiquette polyhistidine

La fraction contenant la protéine mPRa est ensuite déposée sur une colonne de sephadex G200, elle est éluée sous forme de deux pics 1 et 2. Après calibration de la colonne G200, le pic 1 migre comme une protéine d'environ 80 kDa et le pic 2 comme une protéine d'environ 40 kDa.

La figure suivante schématise le gel SDS-Page obtenu avec les fractions obtenues après la colonne de Ni-NTA et des fractions 1 et 2 issues de la sephadex G200.



Question 7: A quoi correspondent les pics 1 et 2?

Les 3 fractions NiNTA, sephadex 1 et 2 correspondent à un monomère de mPRa sur un gel SDS-PAGE (environ 40kDa) qui est donc en conditions dénaturantes.

Le pic 1 est donc un dimère mPRa et le pic 2 un monomère. Le dimère est un dimère non covalent. La protéine purifiée existe donc en équilibre entre une forme monomérique et une forme dimérique après la purification sur NiNTA.

Figure 6 : gels SDS-PAGE

NiNTA: mPRa sortie NiNTA

1 : Pic 1 G200

2: Pic2 G200

Question 8: complétez le tableau de purification ci dessous .

fraction	Protéines (mg)	Act Spé : nmol Pg liée/mg	Activité totale	Facteur purif.	Rendement (%)
Lysat	1250	1	1250	1	100
Fraction + triton	1000	1	1000	2	80
Ni NTA	70	10	700	10	56
G200 pic1	25	0	0	-	-
G200 pic2	25	20	500	20	40

Tableau 2 : tableau de purification de mPR α recombinante

Question 9 : D'après le tableau 2 et la figure 6, à quoi correspond la fraction la plus active de mPR α recombinante ?

C'est le pic2 donc la protéine mPR α sous forme monomérique (le dimère ne lie pas la progesterone)

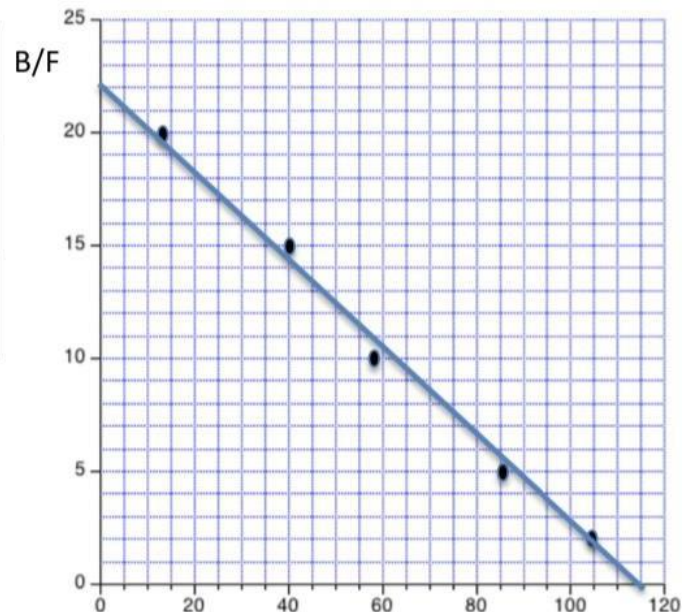
Question 10 : A partir des données du tableau 3 tracez la représentation de Scatchard et calculez le Kd de mPR α recombinante pour la progesterone.

Pg liée (nM)	105	85	63	40	13
Pg libre (nM)	52,5	17	6,3	2,67	0,65
Lié/libre	2	5	10	15	20

Tableau 3 : valeurs de concentration de progesterone.

Données obtenues en utilisant de la progesterone radioactive et 1 quantité non précisée de mPR α . vous n'avez donc pas a calculer le nombre de sites

On représente Lie/libre = B en fonction de lié = B



B

Pente = $-1/K_d$

$K_d = 5,2 \text{ nM}$



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2018-2019

Session 1 – S4
Sujet

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris



Année 2018-2019 NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude

L2 Semestre 2 SESSION INITIALE DUREE de l'épreuve 1H30-calculatrices autorisées.

Partie 1 : Purification de Dépolymérase (durée conseillée 15 minutes)

D'après NA Azami et al , PEP, 155 (2019) 35-42

On recherche des moyens de lutter contre la pollution liée aux matières plastiques. Des chercheurs malais ont isolé une nouvelle souche bactérienne à Penang : *Burkholderia cepacia* DP1 (DP1). DP1 est capable de dégrader du plastique et ils cherchent à isoler et caractériser l'enzyme responsable de cette dégradation.

Pour suivre cette dégradation, ils utilisent un plastique le P3HB (poly(3hydroxy butyrate)) : des billes de PH3B sont placées en suspension à 0,16% dans du tampon phosphate et on suit l'activité de dépolymérisation en mesurant la baisse de turbidité de la solution à 650nm. Une unité de P3HB depolymérase est définie comme la décroissance de 0,001 unité de DO à 650nm par minute.

Protocole de purification :

1-La souche DP1a pu être cultivée dans 4L de milieu de culture pendant 38 heures à 37°C.

2-Centrifugation 8000 g 15 minutes

3-récupération du culot de bactéries dans 400 ml de tampon Tris 20mM pH7,75 en présence d'inhibiteurs de protéases à 4°C.

4-Sonication 5 minutes à 4°C

5-Centrifugation du lysat à 15000 G pendant 20 minutes à 4°C

6-Dépôt du surnageant sur une première colonne dont on récupère les fractions actives.

7- Ultrafiltration des fractions actives (amicon cut of 30kD)

8-colonne de purification N°2 = sephadex G75.

QUESTION 1 : A quel type de chromatographie correspond la sephadex G75 ? (expliquez le mode de fonctionnement avec un dessin si vous préférez)

(question de ...)

Les résultats de la première chromatographie sont présentés dans la figure suivante :

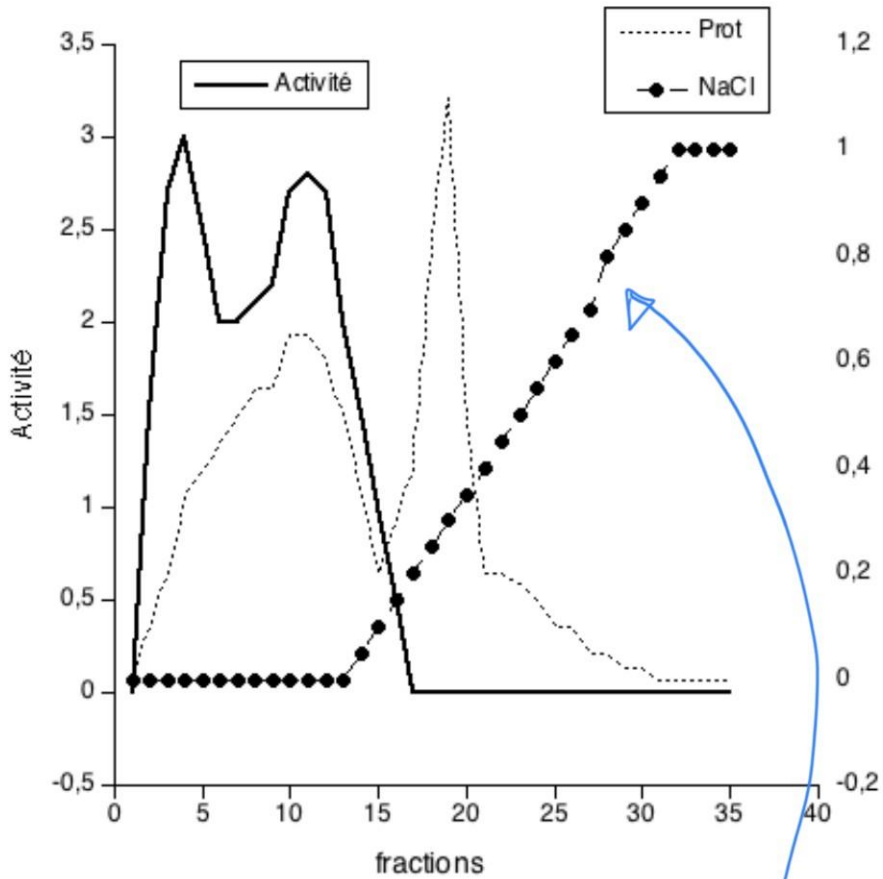


Figure 1 : profil d'élution de la colonne 1 : l'activité enzymatique correspond au trait plein, la concentration de protéine aux trait pointillé et la concentration en NaCl aux ronds noirs.

Question 2 : Au vu des résultats présentés , quelle type de chromatographie a été utilisée pour la colonne 1 (justifiez votre réponse)

Question 3 : finissez de remplir le tableau de purification ci-dessous

Étape	Volume (ml)	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique ()	Facteur de purification	Rendement ()
LYSAT	40	2000	400			
COLONNE 1	50	1800	100			
ULTRAFILTRATION	2	1800	100			
Sephadex G75	3	1000	4			

Question 4 : A votre avis, quelle a été l'utilité de l'ultrafiltration ? (Justifiez votre réponse)

Question 5 : Proposez une expérience qui vous permettrait de vérifier si la protéine est pure a l'issu de ce protocole (il y a plusieurs réponses possible, merci de n'en proposer qu'une seule)

Partie 2 : Clonage de DP1 (durée conseillée 30 minutes)

La dépolymérase a été purifiée à partir de la bactérie DP1 et le sequencage du genome de DP1 a été entrepris. Les données concernant DP1 figurent ci-dessous.

LOCUS MH708897 1467 bp DNA linear BCT 04-NOV-2018
 DEFINITION *Burkholderia cepacia* strain DP1 poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene, complete cds.

CDS 1..1467
 /note="P3HB"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase"
 /protein_id="AY089594.1"

ORIGIN

1	atgcaactgc	tttccggacg	ccagtggcga	tggettgtcg	gtttcttcgc	tgcgctcgca
61	acgacttccg	tattggccgc	ggcactccg	ggcccagggg	catggagcgc	gcagcagaca
121	tgggccgcgg	attcggtgaa	cggcggcaac	ctgactggct	attattactg	gcccgcgagc
181	cagccgacga	caccgaatgg	ccagcgagcg	ctgatactgg	tggtgcatgg	ttgccttcag
241	accgcgtctg	gcgacgtgat	cgacagcagc	agcgcctgcc	gtttcaactg	gaaggcgata
301	gcggatcagt	acggcgcaat	cacctctggc	cccaacgcga	cgggcaactg	gtacagcaac
361	cactgctggg	attacgcgaa	cacttccccg	agccgcagtg	cggggcatgt	cggcgtattg
421	ctggatctcg	tgaatcgttt	tgtctcgaac	tcgcaatatg	cgattgatcc	gaatcagggtg
481	tacgtcaccg	gcctgtcgtc	cggcgggtgg	atgacgatgg	tactgggctg	tatcgcaccg
541	gatgttttcg	ccgggatcgg	catcaacgcc	gggccgccgc	cgggcacgac	gacctcgcaa
601	atcagctatg	tcccgagcgg	ctacacggcg	acgacggcgg	cgaaccagtg	caaggcctgg
661	gcccggctcca	acgcgggcaa	attcgcgacc	cagatcgcgg	gcgcggctctg	ggggacgtcg
721	gactacacgg	tcgcgcaagc	ctacggcccc	cttgacacgg	cggctttccg	tattctctac
781	ggcggcacat	tttcccaagg	aacaaaggtg	acgattccgg	gtgggggaac	gaacacgccg
841	tactccgaca	gcagcggaaa	ggtacggacg	cacgagatct	cggtgaccgg	catgtcgcac
901	gcgtggcccc	ccgggtcggg	cggcaagaac	tcgaactatg	tggatgcgac	ccacatcaac
961	tatccgggtg	ttctgatgga	ctactgggtc	aagaataatc	tgcgttcggg	gtcggggccg
1021	acgcaatccg	gctccgcgcc	gaccgggctg	gcagtggcag	gtacgacca	gacgtcgcac
1081	tctcttttcg	ggaacgccgt	tgcggggcga	agcagctaca	acgtctatcg	caatggcagc
1141	aaggtcggct	cgcccggtgc	cgcaagctac	accgatgcgg	ggctgatcgc	agggacgacc
1201	tattcgtatt	ccgtctcggg	aatcgatccg	agcgcagggg	agagcgcaca	gtcttcgctg
1261	gtgtcggcga	cgacacaatc	gagcttcgcc	tgcaccgaga	cgacggccac	gaattacgcg
1321	cacgtgcagg	ccggccgtgc	gcatgattcc	agcggcacgg	cctatgcgaa	cgggtcgaac
1381	cagagcatgg	gactggacaa	cgtcttctat	tcgaacactt	tggcgcagac	gtcggccggg
1441	tactacgtca	tcggcattgg	tccctaa			

PROTEINE

1	mqlsgrqwr	wlvghfaala	ttsvlaavtp	gpgtwsaqq	waadsvnggn	ltgyyywpas
61	qpptpngqra	lilvlhgclq	tasgdvidss	saagfnwkai	adqygaiila	pnatgnvysn
121	hcwdyantsp	srsaghvgvl	ldlvnrfrvs	sqyaidpnqv	yvtglssggg	mtmvlgciap
181	dvfagigina	gpppgtttsq	isyvpsgyta	ttaanqckaw	agsnagkfat	qiagavwgts
241	dytvaqaygp	ldtaafriyl	ggftsqgktv	tipgggtntp	ysdssgkvrt	heisvtgmsh
301	awpagsggkn	snyvdathin	ypvflmlywv	knnlrsvsgp	tqsgsaptgl	avagttqtsi
361	slswnavaga	ssynvyrnsg	kvgsvsasy	tdagliagtt	ysysvseidp	sagesaqsss
421	vsattqssfa	ctettatnya	hvqagrahds	sgtayangsn	qsmgldnvfy	sntlaqtsag
481	yyvigigp					

CAC CAC CAC CAC CAC CAC

Figure 2 : phase ouverte de lecture de DP1 et sequence primaire

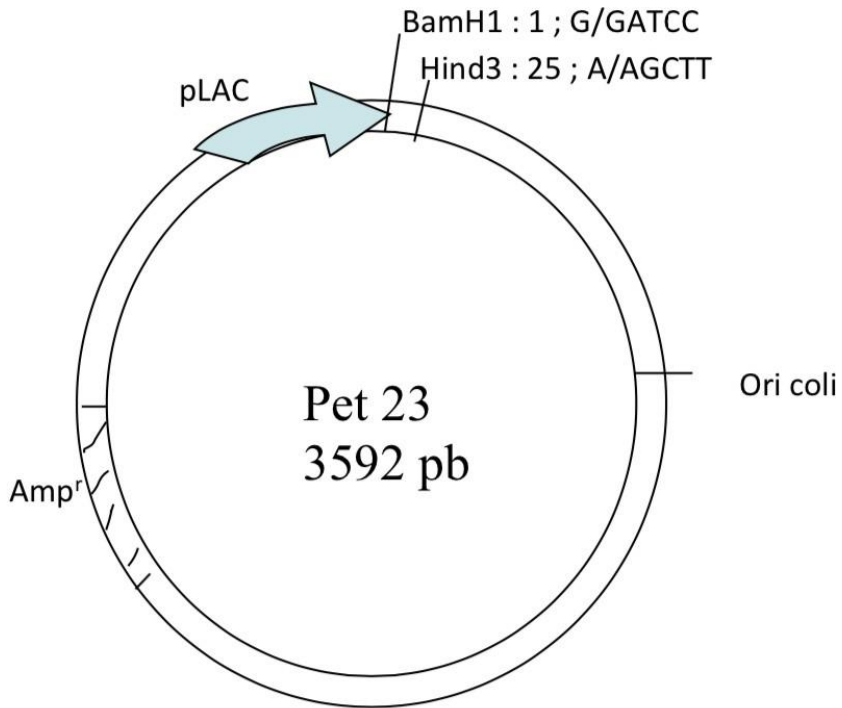


Figure 3: carte simplifiée du vecteur d' expression Pet23

TTT F	TCT S	TAT Y	TGT C
TTC F	TCC S	TAC Y	TGC C
TTA L	TCA S	TAA *	TGA *
TTG L	TCG S	TAG *	TGG W
CTT L	CCT P	CAT H	CGT R
CTC L	CCC P	CAC H	CGC R
CTA L	CCA P	CAA Q	CGA R
CTG L	CCG P	CAG Q	CGG R
ATT I	ACT T	AAT N	AGT S
ATC I	ACC T	AAC N	AGC S
ATA I	ACA T	AAA K	AGA R
ATG M	ACG T	AAG K	AGG R
GTT V	GCT A	GAT D	GGT G
GTC V	GCC A	GAC D	GGC G
GTA V	GCA A	GAA E	GGA G
GTG V	GCG A	GAG E	GGG G

Figure 4: le code génétique

Après avoir identifié la phase ouverte de lecture de DP1, les chercheurs décident de surexprimer cette protéine dans E coli au moyen du plasmide pET23 (Figure 3) en utilisant les deux sites de restriction indiqués. Pour faciliter la purification de DP1 recombinante, ils décident d'ajouter une étiquette de 6 histidines à la protéine DP1 à son extrémité C-terminale.

Question 6 : Donnez la séquence de l'amorce sens (24 nucléotides) et de l'amorce reverse (42 nucleotides) qui vous permettront d'effectuer le PCR pour le clonage.

Question 7 : Proposez le programme PCR associé

Question 8 : Précisez la suite des étapes qui seront nécessaires à l'expression de SDP1 dans E.coli

Pour parvenir à exprimer une grande quantité de DP1, les chercheurs cultivent les bactéries transformées à 37°C pendant 3 heures en présence d'IPTG (1mM)

Question 9 : Expliquez le rôle de l'IPTG (vous pouvez faire un dessin si vous préférez)

Question 10 : donnez la structure des 3 premiers acides aminés de DP1

Partie 3 : Récepteur β -adrenergique (indépendant de partie 1 et 2)

Dans le cœur, les effets des catecholamines (norepinephrine, epinephrine, dopamine) sont médiés par un récepteur β -adrenergique .

On a préparé un homogénat de ventricules de coeur de bœuf. Les chimistes ont préparé une résine de sepharose sur laquelle est greffée la Norepinephrine; la schéma de la résine est donné en figure 5.

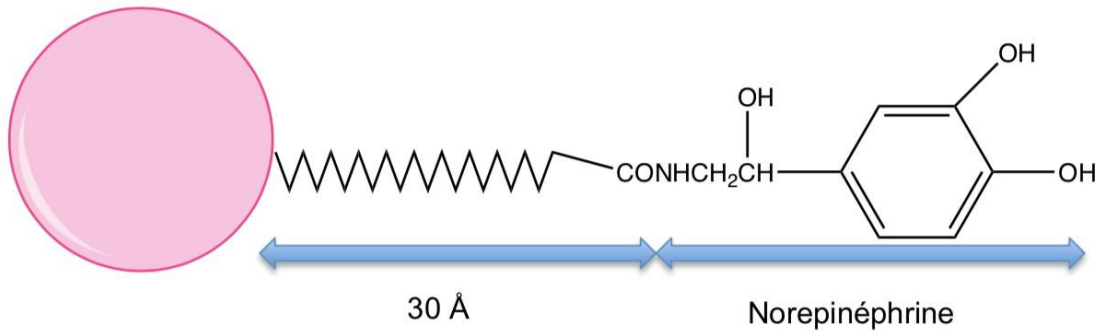


Figure 5 : Structure de la sepharose-norepinephrine

Question 10 : expliquez comment cette résine peut être utilisée pour purifier le récepteur β -adrenergique en une seule étape (vous pouvez faire un dessin) .

Le récepteur purifié (40 nM) est incubé avec des concentrations variables de norepinephrine marquée au ^3H . Après 10 minutes d'incubation on précipite les protéines avec de l'acide, on centrifuge les protéines précipitées et on mesure la radioactivité contenue dans le surnageant et dans le culot.

On considère qu'une incubation de 10 minutes est suffisante pour lier la norepinephrine à son récepteur. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2.

Culot	$2 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	$10 \cdot 10^3$	$18 \cdot 10^3$	$26 \cdot 10^3$	$34 \cdot 10^3$
Surnageant	$23 \cdot 10^3$	$49 \cdot 10^3$	$147 \cdot 10^3$	$360 \cdot 10^3$	$867 \cdot 10^3$	$2615 \cdot 10^3$

Tableau 2 : mesure de la radioactivité de chacune des incubations réalisées avec des concentrations croissantes de norepinephrine pour une concentration fixe de récepteur (40 nM). Une radioactivité mesurée à 10^3 cpm correspond à une concentration de norepinephrine de 1 nM.

Question 11 : Complétez le tableau et tracez la représentation de Scatchard correspondante (ci dessous)

Question 12 : Calculez le K_d et le nombre de sites du récepteur pour la norepinephrine



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2018-2019

Session 1 – S4
Correction

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Année 2018-2019 NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude

L2 Semestre 2 SESSION INITIALE DUREE de l'épreuve 1H30-calculatrices autorisées.

Partie 1 : Purification de Dépolymérase (durée conseillée 15 minutes)

D'après NA Azami et al, PEP, 155 (2019) 35-42

On recherche des moyens de lutter contre la pollution liée aux matières plastiques. Des chercheurs malais ont isolé une nouvelle souche bactérienne à Penang : *Burkholderia cepacia* DP1 (DP1). DP1 est capable de dégrader du plastique et ils cherchent à isoler et caractériser l'enzyme responsable de cette dégradation. Pour suivre cette dégradation, ils utilisent un plastique le P3HB (poly(3hydroxy butyrate)) : des billes de PH3B sont placées en suspension à 0,16% dans du tampon phosphate et on suit l'activité de dépolymérisation en mesurant la baisse de turbidité de la solution à 650nm. Une unité de P3HB depolymérase est définie comme la décroissance de 0,001 unité de DO à 650nm par minute.

Protocole de purification :

1-La souche DP1a pu être cultivée dans 4L de milieu de culture pendant 38 heures à 37°C.

2-Centrifugation 8000 g 15 minutes

3-récupération du culot de bactéries dans 400 ml de tampon Tris 20mM pH7,75 en présence d'inhibiteurs de protéases à 4°C.

4-Sonication 5 minutes à 4°C

5-Centrifugation du lysat à 15000 G pendant 20 minutes à 4°C

6-Dépôt du surageant sur une première colonne dont on récupère les fractions actives.

7- Ultrafiltration des fractions actives (amicon cut of 30kD)

8-colonne de purification N°2 = sephadex G75.

QUESTION 1 : A quel type de chromatographie correspond la sephadex G75 ? (expliquez le mode de fonctionnement avec un dessin si vous préférez)

(question de cours)

Il s'agit d'une chromatographie d'exclusion qui permet de séparer les macromolécules sur la base de leur taille.

Une G75 correspond à un volume d'exclusion de 75000 Da

c'est à dire qu'une protéine globulaire de plus de 75 kDa ne va pas pouvoir entrer dans les canaux des billes de chromatographie et va être éluée rapidement de la colonne.

Des macromolécules plus petites vont entrer dans les canaux, suivre un chemin plus long et être éluées plus tard.

Les résultats de la première chromatographie sont présentés dans la figure suivante :

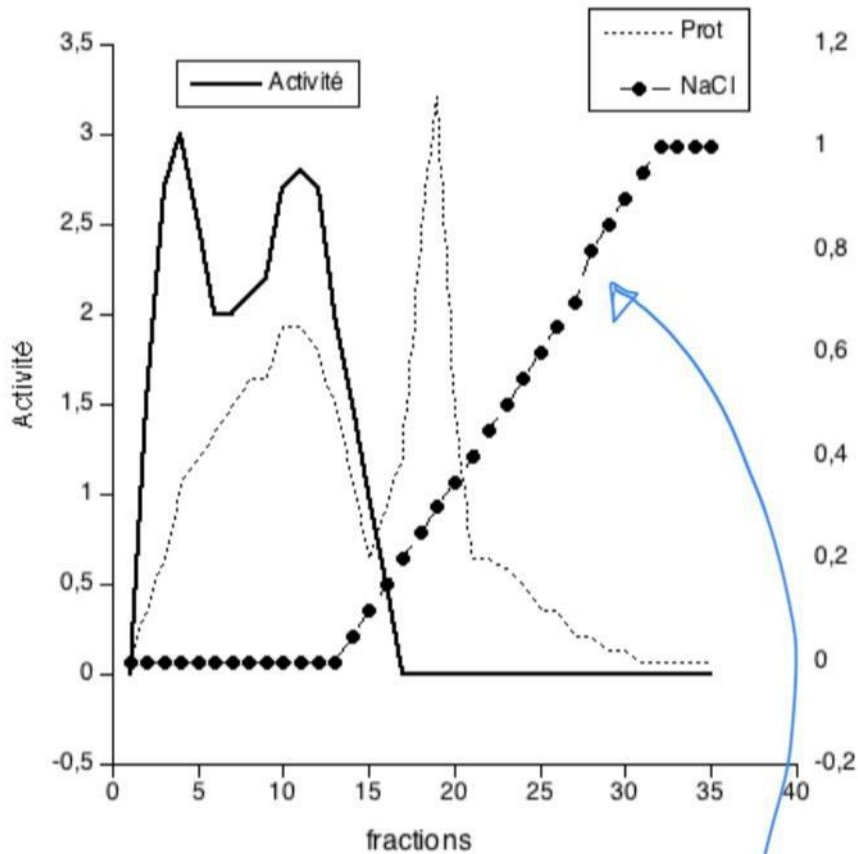


Figure 1 : profil d'élution de la colonne 1 : l'activité enzymatique correspond au trait plein, la concentration de protéine aux trait pointillé et la concentration en NaCl aux ronds noirs.

Question 2 : Au vu des résultats présentés , quelle type de chromatographie a été utilisée pour la colonne 1 (justifiez votre réponse)

(Ce qui est important pour répondre à cette question c'est de voir qu'on utilise un gradient de sel: NaCl)

Les protéines sont séparées en deux fractions : une première fraction active éluee en absence de NaCl et une deuxième inactive éluee en présence de NaCl - Les protéines ont été séparées grâce à un gradient de sel. Il s'agit donc d'une chromatographie échangeuse d'ions

(les données ne permettent pas de dire si c'est échangeuse de cations ou d'anions).

Question 3 : Finissez de remplir le tableau de purification ci dessous

Etape	Volume (ml)	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
LYSAT	40	2000	400	5	1	100
COLONNE 1	50	1800	100	18	3,6	90
ULTRAFILTRATION	2	1800	100	18	3,6	90
Sephadex G75	3	1000	4	250	50	50

Question 4 : A votre avis, quelle a été l'utilité de l'ultrafiltration? (justifiez votre réponse)

La seule utilité ici c'est de réduire le volume et donc de concentrer l'échantillon (pas de purification)

Question 5 : Proposez une expérience qui vous permettrait de vérifier si la protéine est pure à l'issu de ce protocole (il y a plusieurs réponses possible merci de n'en proposer qu'une seule)

si on admet que la protéine est un monomère :

- gel SDS Page → on attend 1 bande à la taille attendue

- spectrométrie de masse → 1 seule tache

Partie 2 : Clonage de DP1 (durée conseillée 30 minutes)

La dépolymérase a été purifiée à partir de la bactérie DP1 et le séquençage du genome de DP1 a été entrepris. Les données concernant DP1 figurent ci-dessous.

LOCUS MH708897 1467 bp DNA linear BCT 04-NOV-2018

DEFINITION *Burkholderia cepacia* strain DP1 poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene, complete cds.

CDS 1..1467
 /note="P3HB"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase"
 /protein_id="AY089594.1"

ORIGIN

```

1 atgcaactgc tttccggacg ccagtggcga tggcttgtcg gtttcttcgc tgcgctcgca
61 acgacttccg tattggccgc ggtcaactccg ggcccagga catggagcgc gcagcagaca
121 tgggcccgcg attcggtgaa cggcggcaac ctgactggct attattactg gcccgcgagc
181 cagccgacga caccgaatgg ccagcgagcg ctgatactgg tgttgcatgg ttgccttcag
241 accgctctcg gcgacgtgat cgacagcagc agcgtgccg gtttcaactg gaaggcgata
301 gcgatcagc acggcgcaat catcctggcg cccaacgcga cgggcaactg gtacagcaac
361 cactgctggg attacgcgaa cacttccccg agccgcagtg ccgggcatgt cggcgattg
421 ctggatctcg tgaatcgttt tgtctcgaac tcgcaatatg cgattgatcc gaatcagggtg
481 tacgtcaccg gcctgtcgtc cggcgtggc atgacgatgg tactgggctg tctgcaccg
541 gatgttttcg ccgggatcgg catcaacgcc gggccgcccg ccggcacgac gacctcgcaa
601 atcagctatg tcccagcgg ctacacggcg acgacggcg cgaaccagtg caaggcctgg
661 gccggtcca acgcggcaa attcgcgacc cagatcgccg gcgcggtctg ggggacgtcg
721 gactacacgg tcgcgcaagc ctacggcccg cttgacacgg cggctttccg tattctctac
781 ggcggcacat tttcccaagg aacaaagggt acgattccgg gtgggggaac gaacacgccg
841 tactccgaca gcagcgaaa ggtacggacg cacgagatct cggtgaccgg catgtcgcac
901 gcgtggcccc ccgggtcggg cggcaagaac tcgaactatg tggatgcgac ccacatcaac
961 taccgggtgt ttctgatgga ctactgggtc aagaataatc tgcgttcggt gtcggggccg
1021 acgcaatccg gctccgcgcc gaccgggctg gcagtggcag gtacgacca gacgtcgatc
1081 tctctttcgt ggaacgccgt tgcggggcga agcagctaca acgtctatcg caatggcagc
1141 aaggctcggc cgtccgtgtc cgcaagctac accgatgcgg ggctgatcgc agggacgacc
1201 tattcgtatt ccgtctcggg aatcgatccg agcgcagggg agagcgccca gtcttcgctg
1261 gtgtcggcga cgacacaatc gagcttcgcc tgcaccgaga cgacggccac gaattacgcg
1321 caggtgcagg ccggccgtgc gcatgattcc agcggcacgg cctatgcgaa cgggtcgaac
1381 cagagcatgg gactggaaa cgtcttctat tcgaacactt tggcgcagac gtcggccggg
1441 tactacgtca tcggcattgg tccctaa
    
```

PROTEINE

```

1 mqlsgrqwr wlvgffaala ttsvlaavtp gpgtwsaqqt waadsvnggn ltgyyywpas
61 qpttpngqra lilvlhgclq tasgdvidss saagfnwkai adqygaiila pnatgnvysn
121 hcwdyantsp srsaghvgl ldlvnrfvsn sqyaidpnqv yvtglssggg mtmvlgciap
181 dvfagigina gpppgttsq isyvpsgyta ttaanqckaw agsnagkfat qiagavwgts
241 dytvaqaygp ldtaafriily ggtsfggtkv tipgggtntp ysdssgkvrt heisvtgmsh
301 awpagsggkn snyvdathin ypvflmdyvw knnlrsvsgp tqsgsaptgl avagttqtsi
361 slswnavaga ssynvyrngs kvgsvsasy tdagliagtt ysysvseidp sagesaqsss
421 vsattqssfa ctettatnya hvqagrahds sgtayangsn qsmgldnvfy sntlaqtsag
481 yyvigigp
    
```

CAC CAC CAC CAC CAC CAC

Figure 2 : phase ouverte de lecture de DP1 et sequence primaire

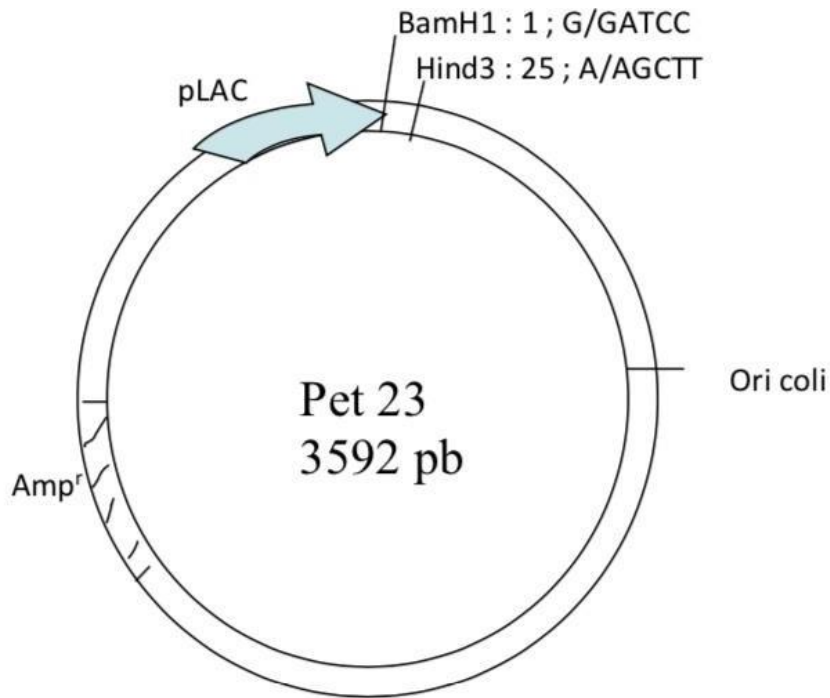


Figure 3: carte simplifiée du vecteur d' expression Pet23

TTT F	TCT S	TAT Y	TGT C
TTC F	TCC S	TAC Y	TGC C
TTA L	TCA S	TAA *	TGA *
TTG L	TCG S	TAG *	TGG W
CTT L	CCT P	CAT H	CGT R
CTC L	CCC P	CAC H	CGC R
CTA L	CCA P	CAA Q	CGA R
CTG L	CCG P	CAG Q	CGG R
ATT I	ACT T	AAT N	AGT S
ATC I	ACC T	AAC N	AGC S
ATA I	ACA T	AAA K	AGA R
ATG M	ACG T	AAG K	AGG R
GTT V	GCT A	GAT D	GGT G
GTC V	GCC A	GAC D	GGC G
GTA V	GCA A	GAA E	GGA G
GTG V	GCG A	GAG E	GGG G

Figure 4: le code génétique

Après avoir identifié la phase ouverte de lecture de DP1, les chercheurs décident de surexprimer cette protéine dans E coli au moyen du plasmide pET23 (Figure 3) en utilisant les deux sites de restriction indiqués. Pour faciliter la purification de DP1 recombinante, ils décident d'ajouter une étiquette de 6 histidines à la protéine DP1 à son extrémité C-terminale.

Question 6 : Donnez la séquence de l'amorce sens (24 nucléotides) et de l'amorce reverse (42 nucleotides) qui vous permettront d'effectuer le PCR pour le clonage.

Amorce sens : $ggg - \text{GGATCC} - \text{ATGCAA CTG CTT TCC} \text{ 3'OH}$
BamH₁ T_m

T_m : $7 \times 4 = 28 + 8 \times 2 = 16 \Rightarrow \underline{\underline{44^\circ C}}$

Amorce reverse :

$5' cgg - \text{AAGCTT} - \text{TAA} - \text{GTG-GTG-GTG-GTG-GTG-GTG} \text{ ggg acc aatgcc}$
HindIII stop His T_m

T_m : $(8 \times 4) + (4 \times 2) = \underline{\underline{42^\circ C}}$
32 8

Question 7 : Proposez le programme PCR associé :

$2' @ 94^\circ C \rightarrow \left\{ \begin{array}{l} 1' @ 94^\circ C \rightarrow 1' @ 42^\circ C \rightarrow 1' 30'' @ 74^\circ C \end{array} \right\} \times 25$
 $\rightarrow 5' @ 74^\circ C$

Question 8 : Précisez la suite des étapes qui seront nécessaires à l'expression de DP1 dans E coli.

- ADN de PCR digéré par BamH₁ / Hind 3
- pet 23 digéré par BamH₁ / Hind 3
- ligation pet 23 digéré + PCR digéré avec ATP et ligase
- Transformation E coli avec mélange de ligation par électroporation
- Laisser pousser bactéries transformées la nuit avec Ampicilline
- Vérifier les plasmides des bactéries transformées.

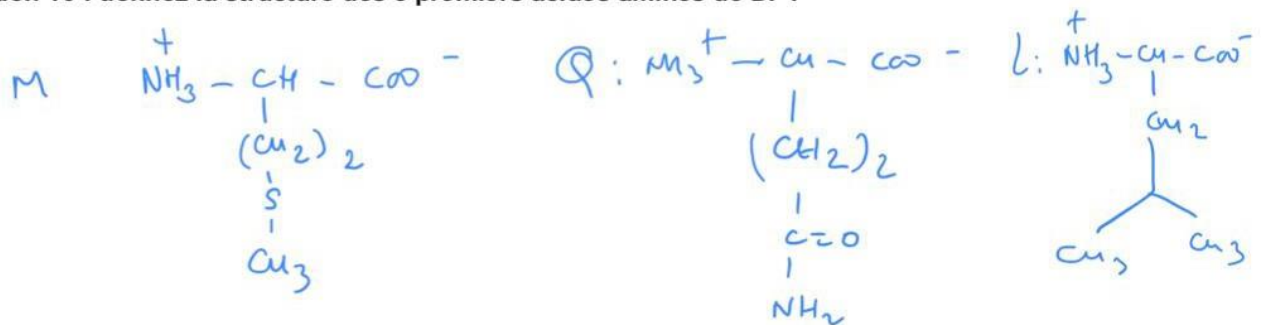
Pour parvenir à exprimer une grande quantité de DP1, les chercheurs cultivent les bactéries transformées à 37°C pendant 3 heures en présence d'IPTG (1mM)

Question 9 : Expliquez le rôle de l'IPTG (vous pouvez faire un dessin si vous préférez)

Question de cours.

IPTG est un inducteur gratuit, il se fixe sur le répresseur (de l'opéron lactose) qui bloque le promoteur LAC. Quand l'IPTG est fixé sur le répresseur celui-ci se détache du promoteur et libère la place pour la RNA polymérase. L'IPTG est un analogue du lactose qui n'est pas hydrolysé par la β galactosidase, il reste donc présent pendant les 3 heures et permet une production constante de l'ARN messager de la dépolymérase

Question 10 : donnez la structure des 3 premiers acides aminés de DP1



Partie 3 : Récepteur β -adrenergique (indépendant de partie 1 et 2)

Dans le cœur, les effets des catecholamines (norepinephrine, epinephrine, dopamine) sont médiés par un récepteur β -adrenergique .

On a préparé un homogénat de ventricules de cœur de bœuf. Les chimistes ont préparé une résine de sepharose sur laquelle est greffée la Norepinephrine; la schéma de la résine est donné en figure 5.

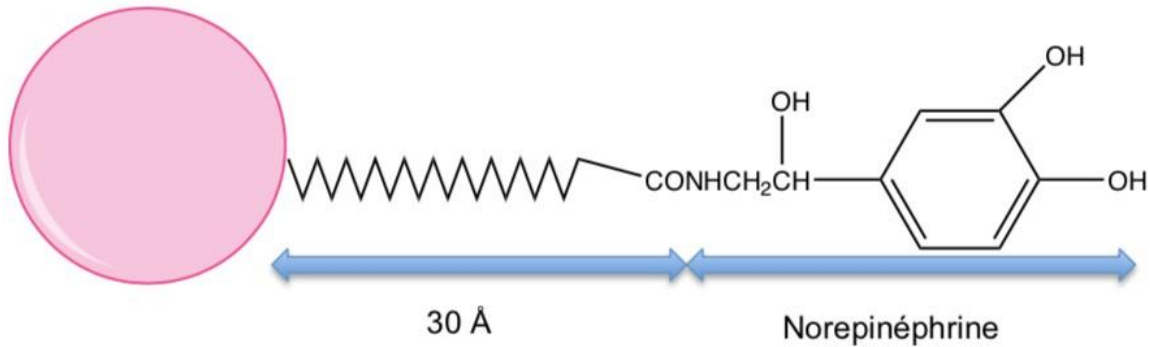


Figure 5 : Structure de la sepharose-norepinephrine

Question 10 : expliquez comment cette résine peut être utilisée pour purifier le récepteur β -adrenergique en une seule étape (vous pouvez faire un dessin) .

Il s'agit d'une chromatographie d'affinité, le ligand du récepteur, la norepinephrine, est greffé sur un support. Le récepteur qui a une forte affinité pour la norepinephrine va se fixer selectivement sur la résine. On pourra ainsi le purifier en 1 étape. Pour éluer le récepteur de la colonne on peut utiliser de la norepinephrine libre.

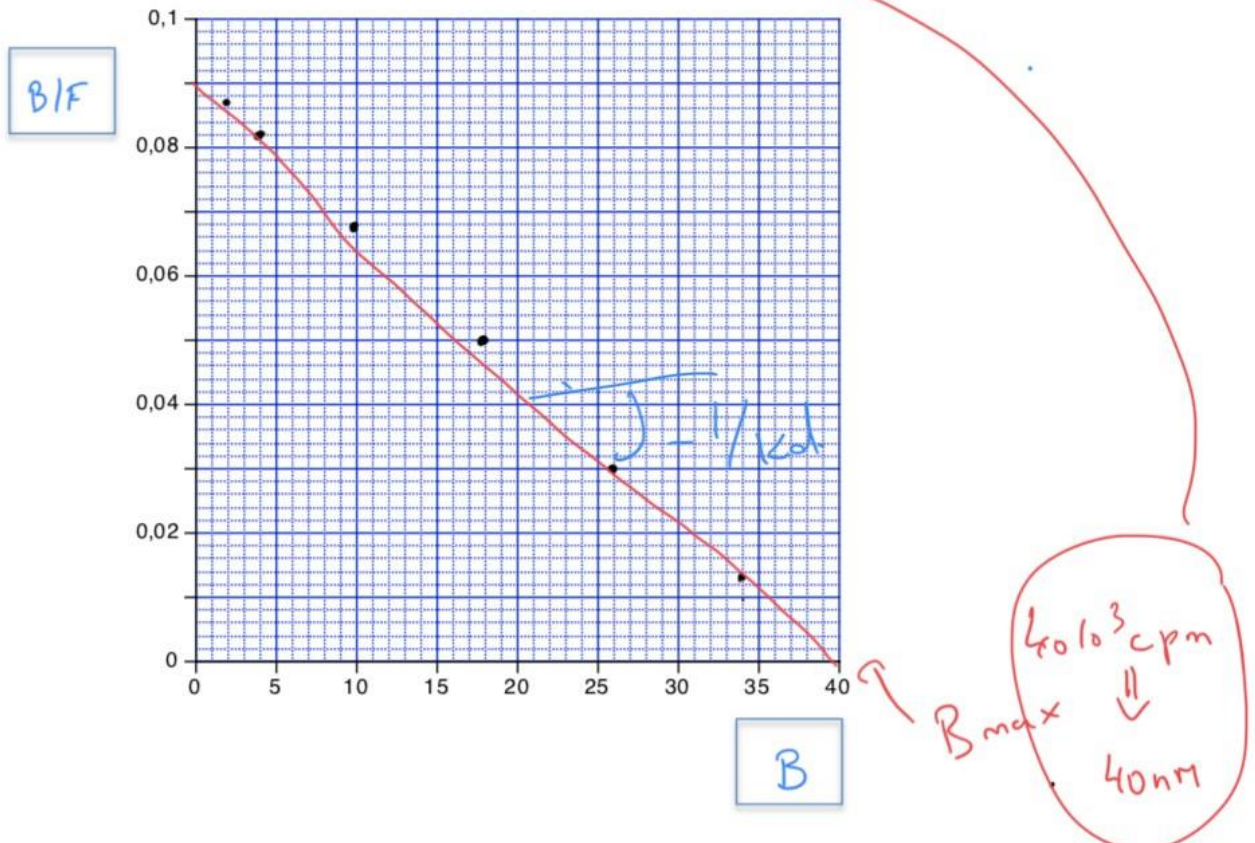
Le récepteur purifié (40 nM) est incubé avec des concentrations variables de norepinephrine marquée au 3H. Après 10 minutes d'incubation on précipite les protéines avec de l'acide, on centrifuge les protéines précipitées et on mesure la radioactivité contenue dans le surnageant et dans le culot.

On considèrera qu'une incubation de 10 minutes est suffisant pour lier la norépinephrine à son récepteur. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2.

Culot = Lié = B	2 10 ³	4 10 ³	10 10 ³	18 10 ³	26 10 ³	34 10 ³
Surnageant = Libre = F	23 10 ³	49 10 ³	147 10 ³	360 10 ³	867 10 ³	2615 10 ³
B/F	0,087	0,082	0,068	0,05	0,03	0,013

Tableau 2 : mesure de la radioactivité de chacune des incubation réalisées avec des concentration croissante de norepinephrine pour une concentration fixe de récepteur (40 nM). Une radioactivité mesurée à 10³ cpm correspond à une concentration de norepinephrine de 1 nM.

Question 11 : Complétez le tableau et tracez la représentation de Scatchard correspondante (ci dessous)



Question 12 : Calculez le Kd et le nombre de site du récepteur pour la norepinephrine

40 nM de Récepteur et $B_{max} = 40 \text{ nM} \Rightarrow$ 1 SITE
 $K_d \approx 45 \text{ nM}$



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2019-2020

Session 1 – Eval 1 – S4
Sujet

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Epreuve à distance, documents autorisés Durée de composition 15 minutes

DEFINITION Homo sapiens ace2 mRNA, complete cds.

ORGANISM [Homo sapiens](#)

source 1..2599

chromosome="X" /map="Xp22 »

[gene](#) 1..2599 /gene="ace2"

[CDS](#) 55..2472

```

tttttagtct agggaaagtc attcagtgga tgtgatcttg gctcacaggg gacgatgtca 61
agctcttcct ggctccttct cagccttggt gctgtaactg ctgctcagtc caccattgag 121
gaacaggcca agacatTTTT ggacaagttt aaccacgaag ccgaagacct gttctatcaa 181
agttcacttg cttcttgga ttataacacc aatattactg aagagaatgt ccaaaacatg 241
aataacgctg gggacaaatg gtctgccttt ttaaaggaac agtccacact tgcccaaatg 301
tatccactac aagaaattca gaatctcaca gtcaagcttc agctgcaggc tcttcagcaa 361
aatgggtcct cagtgtctctc agaagacaag agcaaacggt tgaacacaat tctaaataca 421
atgagacca tctacagtac tggaaaagtt tgtaaccag ataatccaca agaatgctta 481
ttacttgaac caggtttgaa tgaataatg gcaaacagtt tagactaca tgagaggctc 541
tgggcttggg aaagctggag atctgaggtc ggcaagcagc tgaggccatt atatgaagag 601
tatgtggtct tgaaaaatga gatggcaaga gcaaatcatt atgaggacta tggggattat 661
tggagaggag actatgaagt aaatggggt gatggctatg actacagccg cggccagttg 721
attgaagatg tggaaacatac ctttgaagag attaaacat tatatgaaca tcttcatgcc 781
tatgtgaggg caaagttgat gaatgcctat ccttcctata tcagtccaat tggatgcctc 841
cctgctcatt tgcttgggtga tatgtggggt agatTTTtTgga caaatctgta ctctttgaca 901
gttccctttg gacagaaacc aaacatagat gttactgatg caatgggtgga ccaggcctgg 961
gatgcacaga gaatattcaa ggaggccgag aagttctttg tatctgttgg tcttcctaata 1021
atgactcaag gattctggga aaattccatg ctaacggacc caggaaatgt tcagaaagca 1081
gtctgccatc ccacagcttg ggacctgggg aaaggcgact tcaggatcct tatgtgcaca 1141
aagtgacaa tggacgactt cctgacagct catcatgaga tggggcatat tcagtatgat 1201
atggcatatg ctgcacaacc tttctgcta agaaatggag ctaatgaagg attccatgaa 1261
gctgttgggg aaatcatgtc actttctgca gccacacta agcatttaa atccattggg 1321
cttctgtcac ccgattttca agaagacaat gaaacagaaa taaacttct gctcaaaca 1381
gcactcacga ttgttgggac tctgccattt acttacctgt tagagaagtg gaggtggatg 1441
gtctttaaag gggaaattcc caaagaccag tggatgaaaa agtgggtgga gatgaagcga 1501
gagatagttg ggggtgggtgga acctgtgcc catgatgaaa catactgtga ccccgcatct 1561
ctgttccatg tttctaataga ttactcattc attcgatatt acacaaggac cctttacca 1621
ttccagtttc aagaagcact ttgtcaagca gctaaacatg aaggccctct gcacaaatgt 1681
gacatctcaa actctacaga agctggacag aaactgttca atatgctgag gcttggaaaa 1741
tcagaaccct ggaccctagc attggaaaat gttgtaggag caaagaacat gaatgtaagg 1801
ccactgctca actactttga gcccttattt acctggctga aagaccagaa caagaattct 1861
tttgtgggat ggagtaccga ctggagtcca tatgcagacc aaagcatcaa agtgaggata 1921
agcctaaaat cagctcttgg agatagagca tatgaatgga acgacaatga aatgtacctg 1981
ttccgatcat ctgttgcata tgctatgagg cagtactttt taaaagtaaa aaatcagatg 2041
attctttttg gggaggagga tgtgcgagtg gctaatttga aaccaagaat ctctttaat 2101
ttctttgtca ctgcacctaa aaatgtgtct gatatcattc ctagaactga agttgaaaag 2161
gccatcagga tgtcccgag ccgatcaat gatgctttcc gtctgaatga caacagccta 2221
gagtttctgg ggatacagcc aacacttgg cctcctaacc agccccctgt tccatattgg 2281
ctgattgttt ttggagttgt gatgggagtg atagtggttg gcattgtcat cctgatcttc 2341
actgggatca gagatcggaa gaagaaaaat aaagcaagaa gtggagaaaa tccttatgcc 2401
tccatcgata ttagcaaagg agaaaataat ccaggattcc aaaacactga tgatgttcag 2461
acctcctttt agaaaaatct atgtttttcc tcttgagggtg attttgttgt atgtaaatgt 2521
taatttcatg gtatagaaaa tataagatga taaaaatatc attaaatgtc aaaactatga 2581
ctctgttcag aaaaaaaaa //

```

Figure 1 : sequence extraite du mRNA de ACE2

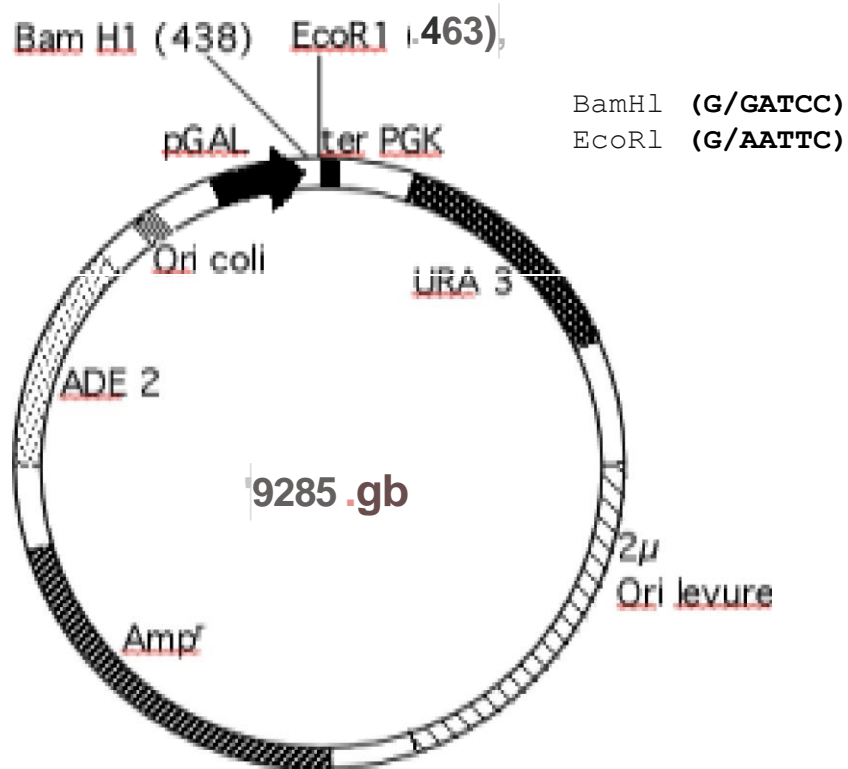


Figure 2 Carte du vecteur navette coli/ Saccharomyces V60

CODE GENETIQUE

TTT F	TCT S	TAT Y	TGT C
TTC F	TCC S	TACY	TGC C
TTA L	TCA S	TAA *	TGA *
TTG L	TCG S	TAG*	TGG W
CTT L	CCT P	CAT H	CGT R
CTC L	CCC P	CAC H	CGC R
CTA L	CCA P	CAA H	CGA R
CTG L	CCG P	CAG Q	CGG R
ATT I	ACT T	AAT N	AGT S
ATC I	ACC T	AAC N	AGC S
ATA I	ACA T	AAA K	AGAR
ATG M	ACG T	AAG K	AGG R
GTT V	GCT A	GAT D	GGT G
GTC V	GCC A	GAC D	GGC G
GTA V	GCA A	GAA E	GGA G
GTG V	GCG A	GAGE	GGG G

Figure 3 Code genetique

Repondez aux questions suivantes sur une feuille libre, une seule page svp. A la fin de l'epreuve, prenez une photo, convertissez en format pdf et deposez votre travail sur moodle dans l'activite depot de devoir correspondant.

Les chercheurs decident d'exprimer le recepteur ACE2 dans la levure *S.cerevisice* URA3-, a l'aide du vecteur V60.

Question 1 : Donnez les amerces (primers) SENS et REVERSE de 25 nucleotides chacun qui permettent de cloner la phase ouverte de lecture de ACE2 dans VGO. Vous preciserez les TM de chaque amorce

Question 2 : Ecrivez le programme PCR qui vous permettra d'amplifier cette phase ouverte de lecture

Question 3 : Pour exprimer le recepteur ACE2 dans la levure vous devez ajouter du galactose dans le milieu de culture. Quel autre parametre est important au niveau de la composition du milieu de culture pour vous assurer que le plasmide V60-ACE2 est bien replique a chaque division cellulaire? (justifiez votre reponse)



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2019-2020

Session 1 – Eval 1 – S4
Correction

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Examen 1 de biochimie

1) Amorce sens : 5' GCG GATCC ATG TCA
AFC TCT TCC T 3'

Amorce antisens : 5' GCG GAATTC CTA
ATA TCG ATG GAGG 3'

T_m sens : $9 \times 2 + 7 \times 4 = 46^\circ\text{C}$

T_m antisens : $9 \times 2 + 7 \times 4 = 46^\circ\text{C}$

2) - 2 min 94°C
- 1 min 94°C
- 30 sec 46°C
- 72°C 2 min 30
- 72°C 5 min
} x 25

3) Pour pouvoir exprimer ACE2 dans la levure, il faut ne pas mettre d'uracile et d'AMP car la levure ne va pas utiliser le plasmide pour produire de l'uracile lié à la présence du gène ADE2 et URA3. Il faut que la levure soit URA^o ou ADE2^o ou URA^o/ADE2^o



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2019-2020

Session 1 – Eval2 – S4
Sujet

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

L2 Semestre 4 - EPREUVE DE BIOCHIMIE - SA04M050

Durée= 15 min – Calculatrices autorisées

INTRODUCTION

L'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (**ECA2**) humaine est une glycoprotéine multifonctionnelle au rôle clé dans la régulation de la pression sanguine. Cette métallopeptidase transmembranaire catalyse la conversion de l'hormone vasoconstrictrice **angiotensine 2** en heptapeptide vasodilatateur **angiotensine (1-7)** dans plusieurs organes et vaisseaux. Des études récentes ont révélé qu'ECA2 sert également de **récepteur cellulaire au SARS-CoV2**, coronavirus responsable de la pandémie actuelle Covid-19. Un excès d'angiotensine 2 est détecté dans le plasma des patients de ce syndrome respiratoire. Ce devoir présente deux stratégies possibles pour réguler les effets délétères de l'angiotensine 2 chez ces patients.

Les deux parties sont indépendantes.

PARTIE 1 - PURIFICATION d'ECA2 SOLUBLE RECOMBINANTE

Des chercheurs proposent de produire l'ECA2 humaine recombinante soluble (ECA2S) pour le traitement des formes sévères du Covid-19.

ECA2S= ECA2 soluble= ECA2 sans partie transmembranaire.

Question 1 (aléatoire): ECA2S est exprimée avec un système baculovirus/cellules d'insectes et purifiée. Complétez le tableau de purification ci-dessous (lettres en rouge). [Les valeurs n'étaient pas identiques pour tout le monde.](#)

Etapes de purification	Volume total (ml)	Activité totale (u)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique	Facteur de Purification	Rendement (%)
Surnageant de casse	50	119	279		1	100
Ni-NTA	9,8	34,5	2,7			

Question 2: Comment éluer ECA2S de la phase NiNTA? Cochez la ou les solutions possibles. Veuillez choisir au moins une réponse :

Avec de l'imidazole 5mM

Avec de l'imidazole 200mM

Avec de l'EDTA 0,5M

En augmentant le pH

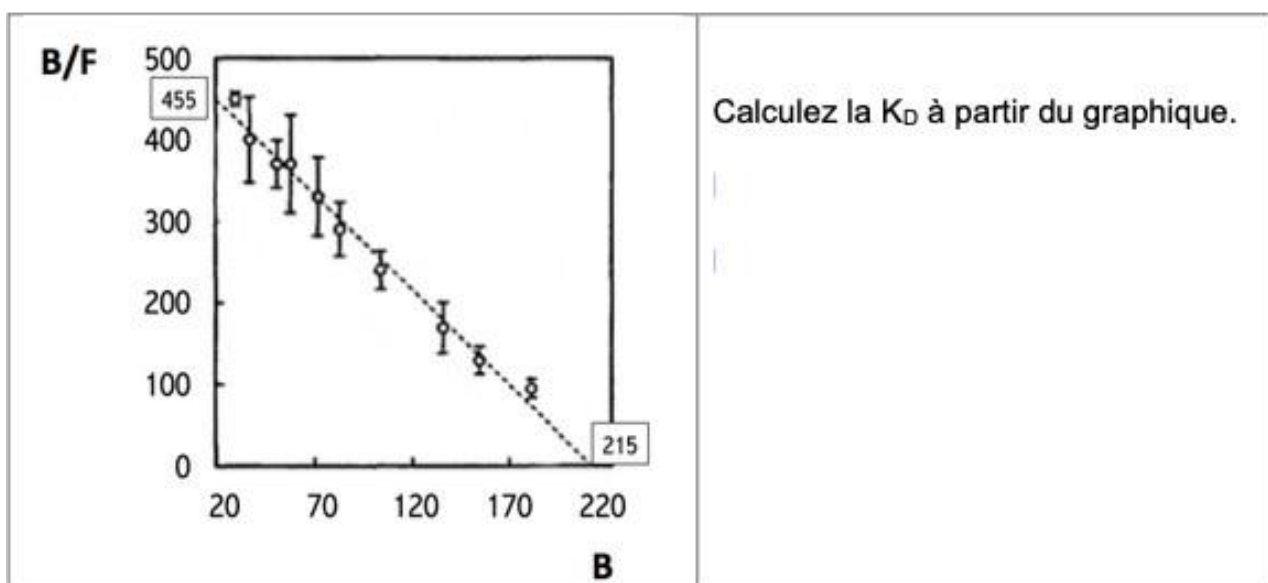
En diminuant le pH

PARTIE 2 – RECEPTEURS A L'ANGIOTENSINE 2

Une autre stratégie consiste à bloquer les récepteurs à l'angiotensine 2.

Question 3 : Calcul de la K_D de l'angiotensine 2

Des chercheurs souhaitent démontrer la présence de récepteurs à l'angiotensine 2 dans les poumons. Pour ce faire, ils étudient la fixation spécifique de l'angiotensine 2 marquée à l'iode 125 sur une préparation membranaire de poumons de rats. Les résultats obtenus permettent de tracer la représentation graphique ci-dessous. **B**= (radioligand lié) en fmol/mg, **F**= (radiologand libre) en nM.



Question 4 : Que pouvez-vous déduire du graphe précédent?

Veillez choisir au moins une réponse :

Il y a une seule population de récepteurs à l'angiotensine 2 dans les poumons

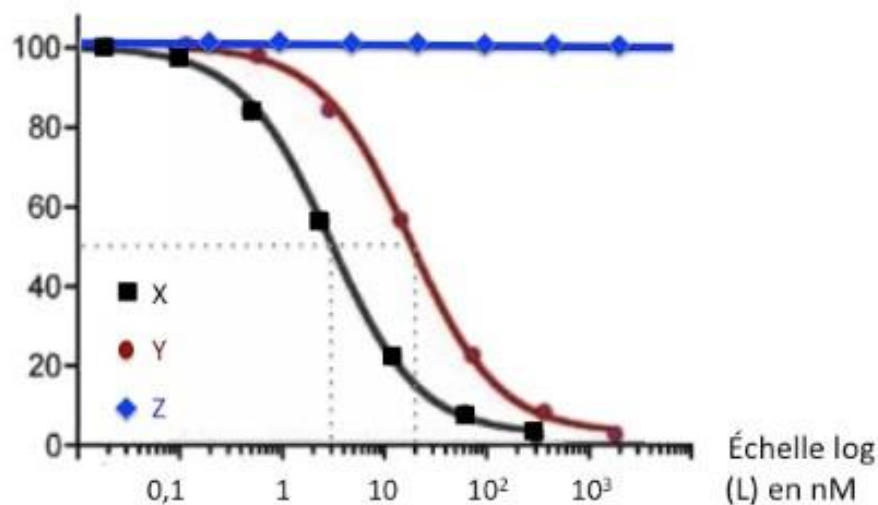
Les sites de fixation du ligand sont indépendants

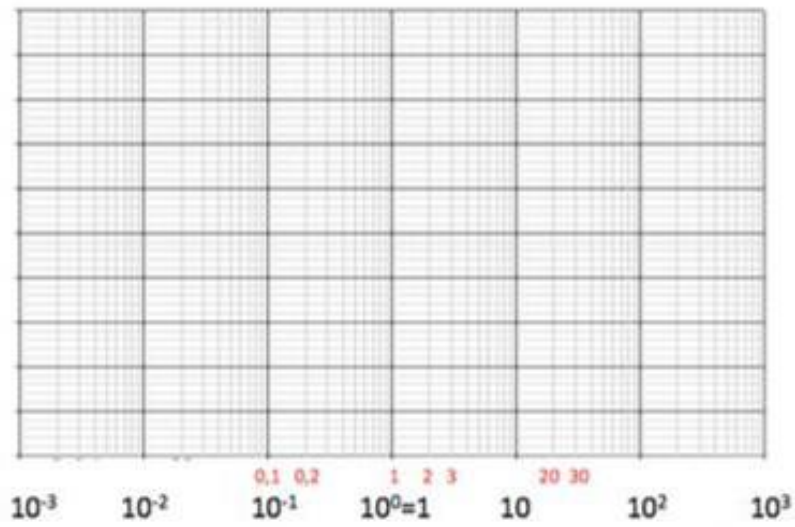
Les sites de fixation du ligand ne sont pas indépendants (liaison coopérative)

Question 5 (aléatoire): CI50 et Ki

L'angiotensine 2 peut stimuler deux types de récepteurs: AT1R et/ou AT2R.. Les chercheurs testent plusieurs antagonistes: 50 μ g de préparation membranaire de poumon sont incubés avec 0,5 nM d'angiotensine 2 radiomarquée et des concentrations croissantes de trois molécules: X, Y et Z. X et Y= antagonistes d'AT1R, Z= antagoniste spécifique d'AT2R, de bonne affinité pour son récepteur

% de liaison spécifique





Le papier semi-log comprend ici sur l'abscisse plusieurs log séparés par des traits épais.
 Dans un log il y a plusieurs sous-graduations, visibles en trait grisé.
 Par exemple si l'on veut placer le point $0,02 = 2 \times 10^{-2}$, il faut se placer dans la décade du 10^{-2} sur le premier trait grisé.

Question 6 : Type de récepteurs à l'angiotensine 2

A déduire du graphe ci-dessus:

Quel(s) type(s) de récepteur(s) lie(nt) l'angiotensine 2 dans les poumons de rat?

Veuillez choisir une réponse :

AT1R

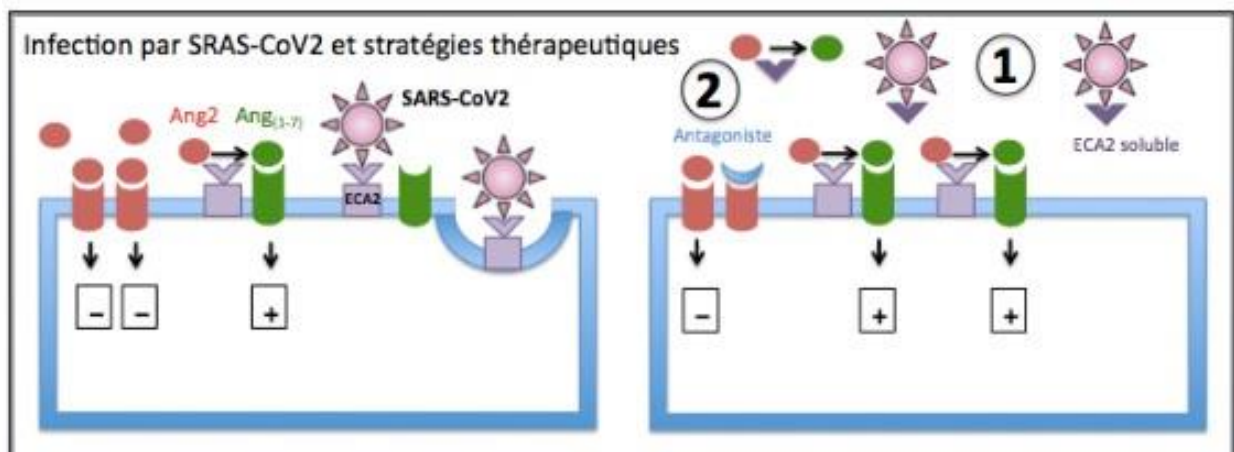
AT2R

AT1R et AT2R

BILAN: ECA2, ANGIOTENSINE 2 ET COVID-19

L'examen est terminé.

ECA2 soluble et les antagonistes des récepteurs d'Ang 2 sont deux stratégies de traitement du Covid-19 envisagées (parmi beaucoup d'autres: plus de 500 essais cliniques dans le monde).





Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2019-2020

Session 1 – Eval 2 – S4
Correction

Biochimie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris



L2 Semestre 4 - EPREUVE DE BIOCHIMIE - SA04M050

Durée= 15 min – Calculatrices autorisées

INTRODUCTION

L'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (**ECA2**) humaine est une glycoprotéine multifonctionnelle au rôle clé dans la régulation de la pression sanguine. Cette métallopeptidase transmembranaire catalyse la conversion de l'hormone vasoconstrictrice **angiotensine 2** en heptapeptide vasodilatateur **angiotensine (1-7)** dans plusieurs organes et vaisseaux. Des études récentes ont révélé qu'ECA2 sert également de **récepteur cellulaire au SARS-CoV2**, coronavirus responsable de la pandémie actuelle Covid-19. Un excès d'angiotensine 2 est détecté dans le plasma des patients de ce syndrome respiratoire. Ce devoir présente deux stratégies possibles pour réguler les effets délétères de l'angiotensine 2 chez ces patients.

Les deux parties sont indépendantes.

PARTIE 1 - PURIFICATION d'ECA2 SOLUBLE RECOMBINANTE

Des chercheurs proposent de produire l'ECA2 humaine recombinante soluble (ECA2S) pour le traitement des formes sévères du Covid-19.
ECA2S= ECA2 soluble= ECA2 sans partie transmembranaire.

Question 1 (aléatoire): ECA2S est exprimée avec un système baculovirus/cellules d'insectes et purifiée. Complétez le tableau de purification ci-dessous (lettres en rouge). [Les valeurs n'étaient pas identiques pour tout le monde.](#)

Etapes de purification	Volume total (ml)	Activité totale (u)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (u/mg)	Facteur de Purification	Rendement (%)
Surnageant de casse	50	119	279	0,4	1	100
Ni-NTA	9,8	34,5	2,7	12,8	30,0	29

A= U/mg

B= 0,4

C= 30

D=12,8

E= 29

Question 2: Comment éluer ECA2S de la phase NiNTA? Cochez la ou les solutions possibles. Veuillez choisir au moins une réponse :

- Avec de l'imidazole 5mM
- Avec de l'imidazole 200mM
- Avec de l'EDTA 0,5M
- En augmentant le pH
- En diminuant le pH

Elution classique par Imidazole en excès mais d'autres solutions possibles

EDTA chélate les ions Ni^{2+} et décroche la queue polyhistidine

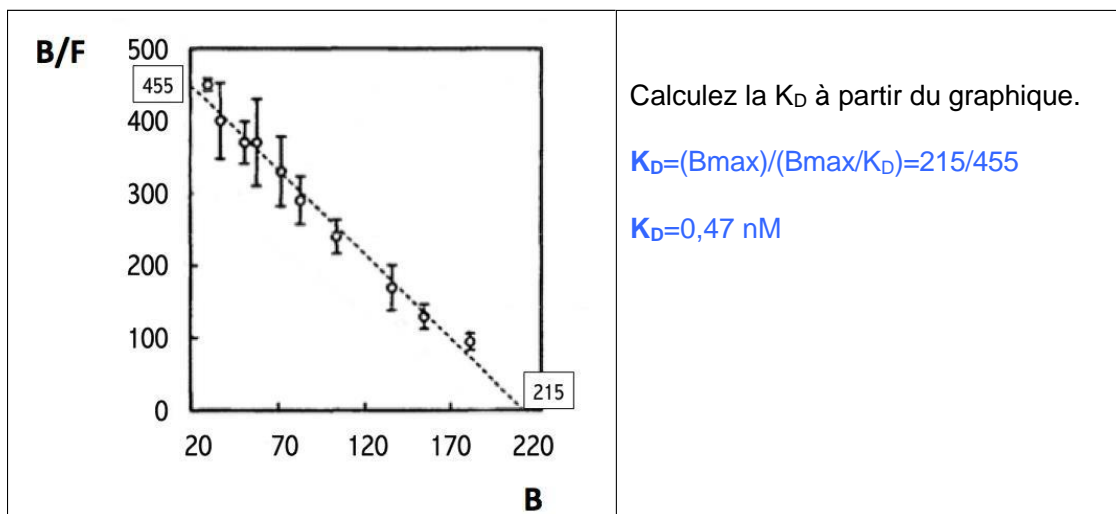
En diminuant le pH, un azote du noyau imidazole de l'histidine capte un proton (il n' y a plus de doublet électronique libre pour chélater les ions Ni^{2+})

PARTIE 2 – RECEPTEURS A L'ANGIOTENSINE 2

Une autre stratégie consiste à bloquer les récepteurs à l'angiotensine 2.

Question 3 : Calcul de la K_D de l'angiotensine 2

Des chercheurs souhaitent démontrer la présence de récepteurs à l'angiotensine 2 dans les poumons. Pour ce faire, ils étudient la fixation spécifique de l'angiotensine 2 marquée à l'iode 125 sur une préparation membranaire de poumons de rats. Les résultats obtenus permettent de tracer la représentation graphique ci-dessous. **B**= (radioligand lié) en fmol/mg, **F**= (radioligand libre) en nM.



Question 4 : Que pouvez-vous déduire du graphe précédent?

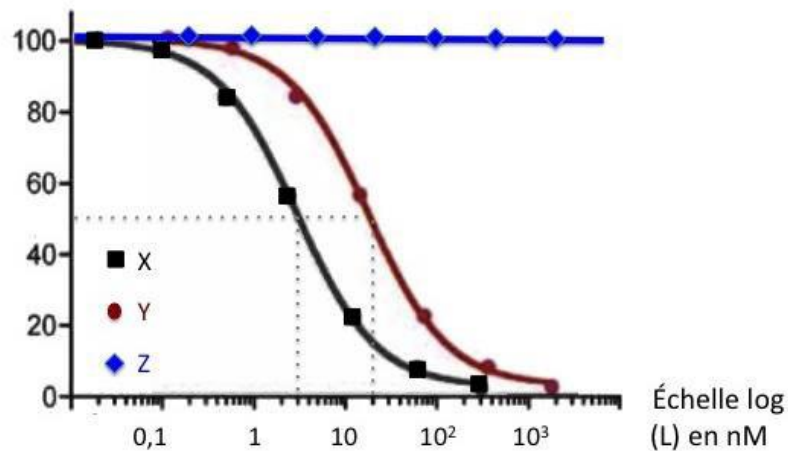
Veillez choisir au moins une réponse :

- Il y a une seule population de récepteurs à l'angiotensine 2 dans les poumons
[une seule droite= une seule population de récepteurs avec la même KD](#)
- Les sites de fixation du ligand sont indépendants ([Scatchard linéaire](#))
- Les sites de fixation du ligand ne sont pas indépendants (liaison coopérative)
[Scatchard non linéaire si coopératif](#)

Question 5 (aléatoire): CI_{50} et K_i

L'angiotensine 2 peut stimuler deux types de récepteurs: AT1R et/ou AT2R.. Les chercheurs testent plusieurs antagonistes: 50 μ g de préparation membranaire de poumon sont incubés avec 0,5 nM d'angiotensine 2 radiomarquée et des concentrations croissantes de trois molécules: X, Y et Z. X et Y= antagonistes d'AT1R, Z= antagoniste spécifique d'AT2R, de bonne affinité pour son récepteur

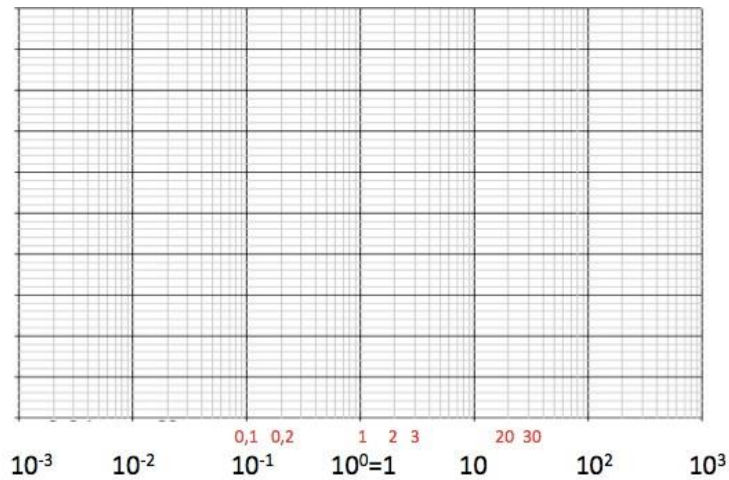
% de liaison spécifique



Les valeurs n'étaient pas les mêmes pour tout le monde (question aléatoire)

Ici, $CI_{50}(X) = 3$ nM $CI_{50}(Y) = 20$ nM

Il s'agit d'une échelle semi-log (voir complément de cours sur Moodle). Les grands traits de la graduation positionnent les logs. Les décades de concentrations sont affichées pour faciliter la lecture directe, sans calcul.



Le papier semi-log comprend ici sur l'abscisse plusieurs log séparés par des traits épais. Dans un log il y a plusieurs sous-graduations, visibles en trait grisé. Par exemple si l'on veut placer le point $0,02 = 2 \times 10^{-2}$, il faut se placer dans la décade du 10^{-2} sur le premier trait grisé.

Equation de Cheng-Prusoff reliant l'IC50 à la K_i .

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + (L^*)/K_D}$$

Il fallait utiliser la K_D de l'angiotensine 2 calculée précédemment.

On pouvait remarquer que $(L^*) = K_D$ donc $K_i = IC_{50}/2$ (même unité que la IC_{50} en nM)

Antagoniste le plus affin = celui qui a la IC_{50} la plus basse (3nM)

K_i de l'antagoniste le plus affin = $3/2 = 1,5$ nM

Question 6 : Type de récepteurs à l'angiotensine 2

A déduire du graphe ci-dessus:

Quel(s) type(s) de récepteur(s) lie(nt) l'angiotensine 2 dans les poumons de rat?

Veillez choisir une réponse :

- AT1R
- AT2R
- AT1R et AT2R

Il s'agit d'une expérience de déplacement. L'antagoniste d'AT2R ne déplace pas l'angiotensine radiomarquée donc l'angiotensine 2 n'est pas fixée sur des récepteurs AT2R. Les deux antagonistes d'AT1R déplacent le radioligand par compétition: Ang2 se fixe bien sur AT1R.

La réponse correcte est : AT1R

BILAN: ECA2, ANGIOTENSINE 2 ET COVID-19

L'examen est terminé.

ECA2 soluble et les antagonistes des récepteurs d'Ang 2 sont deux stratégies de traitement du Covid-19 envisagées (parmi beaucoup d'autres: plus de 500 essais cliniques dans le monde).

