

ENSEIGNEMENT DE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE (SVT)
°° SCIENCES DE LA VIE °°
>> Cours <<

TP SV F1

Étude des génomes et de leur expression

ÉLÉMENTS DE CORRECTION

Objectifs du TP (programme)

Capacités exigibles

- Réaliser et analyser les résultats d'une électrophorèse d'ADN.
- Interpréter l'organisation des génomes à partir des résultats de séquençage.
- Exploiter les données de séquençage pour réaliser des alignements de séquences et comparer les séquences.
- Analyser des résultats issus d'expériences de transgénèse ou de mutagenèse.
- Analyser et interpréter des résultats expérimentaux utilisant les techniques de *Southern blot*, *Northern blot*, *Western blot*, hybridation *in-situ* ou de puce à ADN.
- Identifier et justifier les témoins de charge des blots.

Méthodes et techniques mises en œuvre

- Exploiter des méthodes d'étude de l'organisation des génomes.
 - réalisation et exploitation d'une électrophorèse d'ADN ;
 - réalisation et exploitation d'une comparaison de séquences à l'aide de logiciels ;
 - exploitation de données utilisant la méthode du Southern blot.
- Exploiter des données utilisant des méthodes d'étude de l'expression des génomes.
 - transgénèse, mutagenèse dirigée et aléatoire ;
 - northern blot, hybridation *in situ*, utilisation de gène rapporteur, western blot, puce à ADN, PCR et RTPCR

Liens importants

- BCPST1. SV F. [Chapitres de génétique]
- BCPST1. SV D. Organisation fonctionnelle des molécules du vivant
- BCPST1. SV C. La cellule dans son environnement
- BCPST2. SV H. Mécanismes du développement

Activité 1. Séquençage (méthode de SANGER)

(!) Il convient d'expliciter un raisonnement, et non simplement de donner une réponse !

L'amorce dont nous disposons est la suivante :
5' TCAGATCAGTCCAGG 3'

Elle se fixe sur la **séquence proposée** qui doit être **recopiée** dans le **sens 3' → 5'** pour comprendre :
3' CTCCTTTGACTGACTGTGGTACAGTCTAGTCAGGTCCGGGCCCTAGTGGGTAATTTGCTAGCGATTGGGC 5'

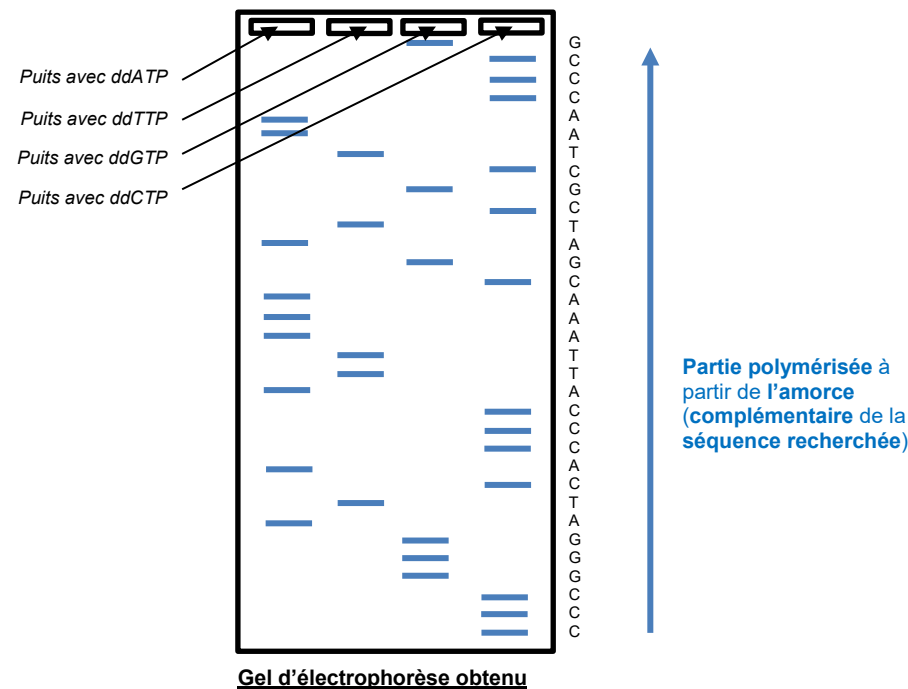
On peut alors **fixer (hybrider) l'amorce** sur cette séquence :

5' TCAGATCAGTCCAGG 3'
3' CTCCTTTGACTGACTGTGGTACAGTCTAGTCAGGTCCGGGCCCTAGTGGGTAATTTGCTAGCGATTGGGC 5'

La **polymérisation par l'ADN polymérase** a ensuite lieu **en 3'** à partir de l'amorce ; voilà le **brin néosynthétisé** en **rouge** :

5' TCAGATCAGTCCAGG **CCCGGGATCACCCATTAACGATCGCTAACCCG** 3'
3' CTCCTTTGACTGACTGTGGTACAGTCTAGTCAGGTCCGGGCCCTAGTGGGTAATTTGCTAGCGATTGGGC 5'

C'est cette séquence qui sera « lue » sur le **gel d'électrophorèse** obtenu par la **méthode de SANGER**, la **polymérisation** pouvant être **stoppée** à tout moment par un **ddNTP** (radiomarké).



Activité 3. Southern Blot

D'après PEYCRU et al. (2013)

Corrigé

Les enzymes PvuII et NheI n'ont qu'un site de restriction qui n'est pas le même pour les deux. Dans le cas d'un ADN linéaire, cela aurait produit pour chacune de ces deux enzymes 2 fragments. Ici, pour l'individu sain I-2, une seule bande est visible après le Southern blot donc, comme ces 2 enzymes ne coupent pas sur le même site de restriction, il n'y a qu'un seul fragment d'ADN et ce n'est possible que si l'ADN est circulaire : il ne l'est plus une fois coupé sur un seul site.

Contrairement à l'individu sain, l'individu III-7 présente 5 bandes après le Southern blot : 5 fragments de restriction. Les enzymes PvuII et NheI ont donc reconnu chacune 5 sites de restriction au lieu d'un seul. Hypothèse explicative : accumulation de mutations qui ont fait apparaître 5 sites de restriction au lieu d'un seul.

Activité 4. Northern Blot

D'après PEYCRU et al. (2013)

Corrigé

Le northern blot permet de suivre la transcription du gène PLC1. Si la sonde reste fixée sur la membrane de nylon, donc si on observe une tache foncée, alors le gène PLC1 a été transcrit. Chaque puits reçoit l'ARN total donc entre autres des ARNr : les révéler permet de s'assurer que le prélèvement des ARN totaux a bien été correctement réalisé. On observe des bandes noires à partir du stade 4 du développement des anthères, dans le pollen mature et dans les tubes polliniques mais pratiquement pas dans les autres structures du végétal : le gène PLC1 semble coder une phospholipase C qui s'accumule dans les derniers stades de formation du grain de pollen et entre en jeu dans la formation à partir du grain de pollen mûr d'un tube pollinique. Or, ce dernier correspond à un changement de forme de la cellule lui permettant de s'insérer dans le style et d'atteindre un ovule. La PLC1 interviendrait dans la signalisation après reconnaissance entre grain de pollen et stigmate à l'origine de la réorganisation du cytosquelette autorisant la formation du tube pollinique.

Activité 5. Puce à ADN

D'après PEYCRU et al. (2013)

Corrigé

Le gène lac I s'exprime toujours pour les 2 souches (couleur jaune) : il n'est pas induit. Le répresseur est donc toujours synthétisé. Le gène Z s'exprime uniquement lorsque la souche sauvage est dans un milieu riche en lactose (couleur jaune donc les ARNm des 2 souches s'expriment dans un milieu riche en lactose, couleur rouge dans un milieu riche en glucose donc seul l'ARNm de la souche mutée sont présents) : il est induit en présence de lactose. Par contre, il est toujours exprimé chez la souche mutée : l'induction ne se réalise plus. Le gène *CRP* n'est pas exprimé lorsqu'une souche est dans un milieu riche en glucose (noir = signal éteint lorsque les 2 souches sont dans un milieu riche en glucose par exemple). Le gène *CRP* a une expression bien contrôlée pour les deux souches. Le site O n'intervient pas dans le contrôle du gène *CRP*. Le site σ possède une séquence qui n'est plus reconnue par le répresseur pourtant synthétisé : le répresseur ne peut donc plus inhiber la transcription du gène Z qui s'exprime quel que soit le milieu : il n'y a plus de contrôle négatif par le répresseur.

Activité 6. Étude d'un knock-out

D'après PERRIER, BEAUX et al. (2021)

1. Cette méthode consiste à invalider un gène d'intérêt en le remplaçant par une version non fonctionnelle au sein du génome de l'organisme étudié. Plusieurs méthodes de mutagenèse ciblée permettent d'obtenir ces mutants ; celle qui utilise un plasmide comme vecteur ou celle qui recrute des complexes enzymatiques dont CRISPR-Cas9, afin de substituer les allèles par recombinaison.

2. La figure 15.16a montre que les souches 1 et 2 ne synthétisent pas la protéine vimentine, qui est un composant du cytosquelette.

3. Les souches 1 et 2 ont formé un tiers de moins de cellules par rapport à la souche C. Elles ont également un phénotype migrateur limité sur la figure (c) comparativement à la souche C ; elles migrent plus lentement lors de la colonisation d'un milieu vierge sur une période de 12 heures. On peut donc postuler que la vimentine favoriserait ces processus (division, migration).

4. Les cellules cancéreuses hautement agressives HA migrent 5 fois plus que les cellules cancéreuses A peu agressives (5,5% contre un peu plus de 1%). Une forte capacité migratoire est donc corrélée à une augmentation de l'agressivité des tumeurs.

L'introduction du plasmide VIM dans les cellules A (qui ne produisent pas naturellement la vimentine) augmente leur capacité de migration sans pour autant qu'elle égale celle des cellules HA. L'introduction du plasmide GAL est sans effet (témoin négatif des effets de la transgénèse). La vimentine est donc nécessaire pour augmenter les capacités migratoires des cellules cancéreuses.

5. À l'inverse, l'inhibition de la traduction des ARNm codant la vimentine dans les cellules HA réduit leur taux de migration au niveau de celui des cellules A. Les cellules HA-C sont des témoins de l'absence d'effet du transfert de courtes séquences d'ADN. La vimentine est donc suffisante pour conférer de fortes capacités migratoires aux cellules cancéreuses HA.

6. On retrouve ici (bien que sur des souches cellulaires différentes) une méthode classique d'étude du rôle d'une protéine : comparaison du phénotype de cellules mutantes et sauvages (figure 15.16) puis étude des effets d'une expression ectopique du gène codant la protéine (résultats des cellules A de la figure 15.17) et d'une diminution de cette expression (résultats des cellules HA de la figure 15.17). L'expérience de la figure 15.17 permet en outre d'établir un lien entre expression du gène de la vimentine, augmentation des capacités migratoires et agressivité des cellules cancéreuses.

Activité 7. Emploi d'un gène rapporteur

D'après DAUTEL et al. (2021)

1. La β -galactosidase seule est toujours retrouvée dans le cytosol, il s'agit du témoin. Lorsque la β -galactosidase est associée au récepteur à la dexaméthasone, on observe que la β -galactosidase et donc le récepteur, se situe dans le cytoplasme en absence de dexaméthasone, et dans le noyau en présence de dexaméthasone. On en déduit que le récepteur possède un domaine entraînant sa translocation nucléaire en présence de dexaméthasone. Lorsque la β -galactosidase est associée uniquement au domaine d'interaction à la dexaméthasone, cette localisation nucléaire est également observée en présence de dexaméthasone : ce domaine est donc suffisant pour entraîner la translocation dans le noyau en présence de dexaméthasone.

2. SV.4C présente une localisation nucléaire peu importe la présence de dexaméthasone. Le domaine ajouté à la protéine est suffisant pour entraîner une localisation nucléaire constitutive.

3. Chez les cellules exprimant une protéine sauvage, le produit de la réaction catalysée par CAT, à savoir l'acétylCM, n'est observé qu'en présence de dexaméthasone. On peut supposer qu'en absence de dexaméthasone, le récepteur ne peut pas entrer dans le noyau et ainsi stimuler la transcription de CAT. Cependant chez les cellules exprimant SV.4C, qui présentent un récepteur constitutivement nucléaire, on observe également la nécessité de dexaméthasone pour la formation d'acétylCM. Ainsi, en absence de dexaméthasone, le récepteur ne peut pas stimuler l'expression du gène CAT, même s'il est dans le noyau.

Activité 8. Transgénèse et interférence ARN

D'après DAUTEL et al. (2021)

1. À partir de ce plasmide, comme les deux promoteurs sont reconnus par les polymérases, les deux séquences sont transcrites. Comme une des séquences est insérée en sens inverse, on obtiendra deux ARN ayant des séquences complémentaires, donc susceptibles de s'associer en un ARN double brin.

2. L'antibiotique tuera toutes les cellules végétales n'ayant pas reçu le plasmide car elles seront sensibles à la kanamycine. On sélectionne ainsi uniquement les cellules ayant reçu le plasmide contenant le gène de résistance à la kanamycine. On sélectionne ainsi les plantes ayant bien incorporé les plasmides recombinés. Si on mettait les bactéries au contact d'une plante entière, elle ne transformerait (au mieux) que quelques cellules en surface, et on obtiendrait ainsi une plante chimère qui ne posséderait pas le transgène dans toutes ces cellules. Son effet sur les chenilles serait donc très variable et difficile à évaluer.

3. L'antibiotique permet de savoir que le plasmide est entré dans les bactéries, mais on ne sait pas quel fragment du plasmide s'est réellement intégré au génome de la plante. Il faut donc vérifier sur chacune des plantes si elles renferment ou non le fragment HMG. Une bande similaire à celle du témoin positif P permet de dire que les plantes possèdent bien le transgène. C'est le cas pour toutes celles qui ont été testées ici, sauf la plante L37. N est un témoin négatif vérifiant la spécificité de l'amplification.

4. Une RT-PCR sert à analyser la quantité d'un ARN précis. La PCR de la figure C permet de savoir si les plantes ont bien reçu un gène HMGi, mais pas si ce gène s'exprime chez ces plantes. Seule une amplification spécifique des ARNm codés par les gènes HMGi permettra de le savoir.

5. Les individus testés ici ont bien intégré le transgène, comme on peut le voir sur la figure C. Sur les gels ou sur les graphiques, on voit nettement que la quantité d'ARN HMGi est très différente d'un individu à l'autre, mais stable chez un même individu (la bande est similaire dans les 2 ou 3 répétitions et les écarts-types sont réduits). Une première hypothèse est que les insertions de l'ADN de la bactérie dans le génome de la plante sont différentes d'un individu à l'autre. Des fragments d'un des promoteurs ou des deux promoteurs pourraient manquer dans certaines lignées, ce qui réduirait la transcription. Plus les promoteurs seraient réduits et plus la transcription serait basse. La seconde hypothèse est que ce gène de synthèse de l'hormone soit lui-même contrôlé par d'autres gènes (ce qui est très probable) et que les divers individus n'aient pas les mêmes allèles pour ces gènes régulateurs.

6. Les cotons L13 et L26-1 sont ceux qui transcrivent le plus fortement les fragments HMGi1 et HMGi2 respectivement. Ce sont donc les meilleurs candidats pour tester l'effet des ARNi sur les chenilles.

7. La consommation de coton transgénique n'exprimant pas d'ARNi est le témoin (CK), et montre une augmentation de 75 % de la quantité de HMG en 144h. Cependant, si la chenille consomme du coton produisant des ARNi (figure D), cette augmentation de la quantité de HMG

est stoppée (figure E). Cela montre que toute nouvelle synthèse de cette protéine est bloquée. Un blocage de la synthèse protéique par des ARNi n'est pas surprenant, mais les ARNi sont connus pour agir dans les cellules qui les produisent. Quand une chenille ingère des feuilles de coton, on s'attend à ce qu'elle en digère complètement le contenu, acides nucléiques compris, et les absorbe sous forme de nucléotides. Ils ne devraient donc avoir aucun effet sur la chenille, ce qui n'est pas le cas puisque la synthèse de protéine HMG est bloquée (figure E2). Il semble que les petits ARN interférents non seulement ne sont pas digérés mais passent dans l'organisme de la chenille, et ensuite dans les cellules productrices de l'hormone juvénile. C'est un transfert horizontal d'ARN !

8. Avec les deux types d'ARNi, les chenilles ont des taux de mortalité nettement supérieurs au témoin, dès 24h (figure F1). Cet effet est deux fois plus marqué avec l'ARNi HMGi2-49 qu'avec HMGi1-13. Ce n'est pas la quantité d'ARN qui explique cette différence, car sur la figure D2-C et D2-D, l'individu L13 synthétise deux fois plus d'ARN que la plante L49. On peut supposer que les ARN de type HMGi2 seraient moins dégradés par la digestion, ou seraient davantage absorbés par la chenille, ou pénétreraient mieux dans les cellules endocrines productrices d'hormone juvénile.

Cette mortalité pourrait être due à l'arrêt de la synthèse de cuticule, ou une cuticule trop fine. La cuticule protège la larve de la déshydratation, des blessures et des pathogènes. Une cuticule absente ou trop fine entraînerait la mort d'un grand nombre de larves. La figure F2 montre que les larves survivantes mangeant du coton avec ARNi ont un gain de poids qui n'est que la moitié du témoin. On peut supposer que ces larves muent plus rarement, ce qui limite leur accroissement de taille, et donc de poids. La figure F3 montre qu'avec une alimentation en coton exprimant des ARNi, les chrysalides ont une taille et une morphologie normales, mais que leur cuticule est tellement fine que les organes sont visibles par transparence. Ces chrysalides sont potentiellement plus fragiles, et pourraient subir des dommages mécaniques, ou l'attaque de pathogènes. Pour chacun des résultats de la figure F, la réduction de la quantité d'hormone juvénile par des ARNi de type HMGi peuvent expliquer les résultats.

9. Les papillons qui se formeront à partir des chenilles ayant consommé du coton HMGi auront moins de vitellogénine et devraient donc pondre des œufs ayant moins de réserves. Si ces réserves sont insuffisantes, le développement embryonnaire échoue ; sinon ce seront de très petites chenilles qui éclosent. Elles pourraient être moins viables que des chenilles de taille normale. Ce gène est particulièrement intéressant car il réduit la viabilité des chenilles et des chrysalides, ainsi que la fertilité des papillons. De plus, ce ne sont pas les insectes qui ont été modifiés, mais les plantes. On ne touchera donc que la population de noctuelle qui s'attaque au coton, sans toucher les autres populations. Le fait de ne pas avoir de très forte mortalité (maximum 50 % pour HMGi2-49 figure F1) est un inconvénient à court terme pour la sauvegarde de la récolte de coton, mais c'est un avantage à long terme car on sélectionne moins fortement les résistances. Les noctuelles se nourrissant sur d'autres plantes et les celles qui sont sensibles mais ont survécu, en se croisant avec les noctuelles résistantes, réduisent l'effet de la sélection [voir BCPST 2].

Activité 9. Étude du contrôle de la transcription : cas du gène NO synthase

D'après SEGARRA et al. (2014)

Document 14.3a

En conditions d'hypoxie, la quantité d'ARNm *NOS* produits est 2 fois plus grande qu'en conditions de normoxie. Donc une faible concentration en dioxygène active la transcription du gène *NOS*.

La concentration en dioxygène contrôle la transcription du gène *NOS*: le **dioxygène inhibe l'expression du gène *NOS***.

Il est possible d'identifier la séquence de contrôle de la transcription du gène *NOS*.

Document 14.3b

Un gène rapporteur a la propriété d'avoir un produit de traduction facilement repérable et quantifiable. La séquence codante de ce gène rapporteur est placée en aval d'une séquence de contrôle de la transcription, et c'est cette séquence qui est l'objet d'étude. Ici, estimer la quantité de luciférase produite permet de savoir si la région associée à un effet sur la transcription du gène rapporteur et par conséquent du gène *NOS*. En règle générale, un gène rapporteur permet pour la séquence régulatrice placée en amont :

- d'identifier précisément sur une grande séquence les sites de liaisons exacts des protéines sur l'ADN,
- de mesurer le taux de transcription,
- d'isoler les facteurs activateur ou répresseur,
- de localiser le tissu d'expression...
- Région Luc-5039, la synthèse de luciférase est quasiment identique en hypoxie ou normoxie *donc* cette région n'a pas d'effet dans le contrôle de la transcription du gène *NOS* associé aux conditions de dioxygène.
- Régions Luc-5523 et Luc-6047, la synthèse de luciférase est 2 fois plus élevée en conditions d'hypoxie *donc* ces 2 régions contiennent une séquence qui contrôle la transcription du gène *NOS*, sous l'effet des variations de concentration en dioxygène.

En combinant les différents résultats, c'est la séquence comprise entre -5523 et -5039 qui participe au contrôle de la transcription du gène *NOS*. Vu sa position par rapport au +1, il s'agit probablement d'une séquence enhancer.

Le facteur de transcription HIF1 se fixe sur la séquence enhancer située entre -5515 et -5250 du gène *NOS*. HIF1 se fixe en amont du promoteur.

Document 14.3c

La technique utilisée est celle de l'empreinte à l'ADNase (décrite dans l'encart 14.4).

Dans la colonne 1, on observe les fragments de toutes les tailles générés par la digestion par l'ADNase I (de 265 pb à 1 pb)

Dans la colonne 2, on remarque une zone sans bande : les fragments de 217 pb à 210 pb n'apparaissent pas. L'ADNase I n'a en fait pas pu digérer cette petite zone car la protéine HIF1 s'y est fixée. **On localise ainsi la séquence TGTACGTG de fixation de HIF1.**

Document 14.3d

La technique de retard sur gel est utilisée afin de mettre en évidence une interaction entre une séquence d'ADN et un facteur de transcription supposé se fixer sur cette séquence. Les étapes et le principe du protocole sont présentés ci-dessous (document 14.3e).

Colonne 1 : c'est le témoin, on obtient ainsi la distance de migration référence de l'oligonucléotide.

Colonne 2 : en normoxie, c'est-à-dire en absence de HIF1, la distance de migration est identique.

Colonne 3 : en hypoxie, c'est-à-dire en présence de HIF1, la distance de migration est plus faible. L'électrophorèse est réalisée en conditions non dénaturantes, les interactions protéines-ADN sont donc conservées. On peut faire l'hypothèse que HIF1 s'est fixée sur l'oligonucléotide ralentissant ainsi sa migration.

Colonne 4 : en présence d'un anticorps anti-HIF1 la migration est encore plus faible, l'assemblage oligonucléotide-HIF1-Ac est encore plus encombrant et migre encore moins loin.

Colonne 5 : on n'observe pas de ralentissement accru de la migration comme dans la colonne 4.

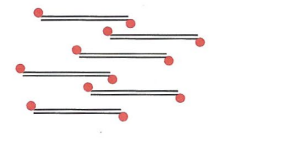
On déduit de tous ces résultats que HIF1 se fixe bien sur la région isolée, et que cette fixation est spécifique.

En conditions d'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 se fixe sur une séquence reconnue située entre -5523 et -5039 en amont du +1 de la transcription : il agit probablement en se fixant sur cette séquence enhancer et active la transcription du gène *NOS*.

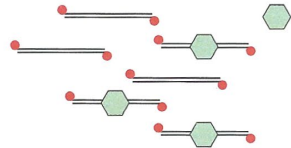
Références

- ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER (2004). *Biologie moléculaire de la cellule. Quatrième édition*. Flammarion, Paris. Traduction de la quatrième édition américaine (2002) par F. LE SUEUR-ALMOSNI. Première édition américaine 1983 (1986 1^{re} édition française).
- ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER (2008). *Molecular Biology of the Cell. Fifth Edition*. 1st edition 1983. Garland Science, New York (NY), USA & Abingdon, UK.
- ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, D. MORGAN, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER (2015). *Molecular Biology of the Cell. Sixth Edition*. 1st edition 1983. Garland Science, New York (NY), USA & Abingdon, UK.
- ALBERTS, B., D. BRAY, K. HOPKIN, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER (2015). *Essential Cell Biology. Fourth Edition*. 1st edition 1998. Garland Science, New York (NY), USA & Abingdon, UK.
- and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains
- BERTHET, J. (2006). *Dictionnaire de Biologie*. De Boeck Université, Bruxelles (Belgique).
- BOUJARD, D. (dir.). B. ANSELME, C. CULLIN & CÉLINE RAGUÉNÉS-NICOL (2015). *Biologie cellulaire et moléculaire. Tout le cours en fiches. Licence. PACES. CAPES*. 2^e édition (1^{re} édition 2012), Dunod, Paris.
- BREUIL, M. (2007). *Biologie 1^{re} année BCPST-véto*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- BREUIL, M. (2009). *Biologie 2^e année BCPST-véto*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- CALLEN, J.-C. (2005). *Biologie cellulaire. Des molécules aux organismes*. Dunod, Paris, 2^e édition (1^{re} édition 1999).
- CAMPBELL, N. A. & J. B. REECE (2004). *Biologie*. De Boeck Université, Bruxelles, 2^e édition (1^{re} édition 1995).
- [CAMPBELL, N. A.], J. B. REECE, L. A. URY, M. L. CAIN, S. A. WASSERMAN, P. V. MINORSKY, R. B. JACKSON (2012). *Campbell Biologie*. Adaptation française J. FAUCHER & R. LACHAÎNE. Pearson, Paris (4e édition).
- CLARK, D. P., N. J. PAZDERNIK & M. R. MCGEEHEE (2019). *Molecular Biology*. Third edition. Academic Press, Cambridge (MA), USA, Elsevier, Amsterdam.
- COOPER, G. M. (2019). *Cell. A Molecular Approach*. 8th edition, Sinauer / Oxford University Press, Oxford (GB).
- DAUTEL, O. (dir.). A. PROUST, M. ALGRAIN, C. BORDI, A. HELME-GUIZON, F. SAINTPIERRE, M. VABRE & C. BOGGIO (2017). *Biologie Géologie BCPST 1^{re} année*. Vuibert, Paris.
- DAUTEL, O. (dir.). C. BORDI, F. SAINTPIERRE, M. ALGRAIN-PITAVY, M. QUERTINIEZ, A. PROUST, M. VABRE A. HELME-GUIZON & B. MOLLIER (2019). *Biologie Géologie BCPST 2^e année*. Vuibert, Paris.
- DAUTEL, O. (dir.). M. ALGRAIN-PITAVY, C. BORDI, A. HELME-GUIZON, B. MOLLIER, A. PROUST, M. QUERTINIEZ, F. SAINTPIERRE & M. VABRE (2021). *Prépas scientifiques BCPST 1^{re} année. Biologie Géologie. Tout-en-un*. Vuibert, Paris.
- DENÉUD, J., T. FERROIR, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON, M.-L. PONS & F. TEJEDOR (2011). *Biologie-Géologie BCPST-véto 2^e année*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- DENÉUD, J., C. GODINOT, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON & F. TEJEDOR (2013). *Biologie-Géologie BCPST-véto 1^{re} année*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- DENÉUD, J., C. GODINOT, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON, M.-L. PONS & F. TEJEDOR (2014). *Biologie-Géologie BCPST-véto 2^e année*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- GODINOT, S., C. H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON & F. TEJEDOR (2010). *Biologie-Géologie 1^{re} année BCPST-véto*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- HARRY, M. (2008). *Génétique moléculaire et évolutive*. Maloine, Paris, 2^e édition (1^{re} édition 2001).
- HARTL, D. L. & E. W. JONES (2003). *Génétique. Les grands principes*. Traduction E. DEQUIER, S. DUHARCOURT, D. JUTIER, A. LE ROUZIC, G. PAHLAVAN & N. SERRANO. Dunod, Paris, 3^e édition.
- LAFON, C. (2003). *La biologie autrement. 100 questions de synthèse*. Ellipses, Paris.
- LATRUFFE, N. (dir.). F. BLEICHER-BARDETTI, B. DUCLOS & J. VAMECQ (2014). *Biochimie. Tout le cours en fiches. Licence. PACES-UE1. CAPES*. Dunod, Paris.
- LELIÈVRE, É., J. DENÉUD, J. ROQUES, É. HAMARD-PÉRON & M. AIRAUD (2018). *Biologie*. Dunod, Paris.
- MEYER, S., C. REEB & B. BOSDEVEIX (2008). *Botanique. Biologie et physiologie végétales*. Maloine, Paris, 2^e édition (1^{re} édition 2004).
- MORÈRE, J.-L., R. PUJOL (coord.), J.-C. CALLEN, L. CHESNOY, J.-P. DUPONT, A.-M. GIBERT-TANGAPREGASSOM, G. RICOU, N. TOUZET (dir.) et collaborateurs (2003). *Dictionnaire raisonné de Biologie*. Frison-Roche, Paris.
- PERRIER, C. & J.-F. BEAUX (dir.). A. BOUFFIER, L. BOUGEOIS, P. CARRÈRE, T. DARRIBÈRE, J. DÉMARET-NICOLAS, A. EMOND, S. MAURY, O. MONNIER, T. SOUBAYA, A. VERGNAUD & A. WOEHRLÉ (2021). *Biologie-Géologie BCPST 1. Tout-en-un*. Dunod, Malakoff (F).
- PEYCRU, P. (dir.), J.-F. FOGELGESANG, D. GRANDPERRIN, B. AUGÈRE, J.-C. BAEHR, C. PERRIER, J.-M. DUPIN & C. VAN DER REST (2010a). *Biologie tout-en-un BCPST 1^{re} année*. Dunod, Paris, 2^e édition (2009), réimpression corrigée (2010) (1^{re} édition 2006).
- PEYCRU, P. (dir.), J.-C. BAEHR, F. CARIU, D. GRANDPERRIN, C. PERRIER, J.-F. FOGELGESANG & J.-M. DUPIN (2010b). *Biologie tout-en-un BCPST 2^e année*. Dunod, Paris, 2^e édition (1^{re} édition 2007).
- PEYCRU, P., D. GRANDPERRIN, C. PERRIER (dir.), B. AUGÈRE, T. DARRIBÈRE, J.-M. DUPIN, C. ESCUYER J.-F. FOGELGESANG, & C. VAN DER REST (2013). *Biologie tout-en-un BCPST 1^{re} année*. Dunod, Paris, 3^e édition (1^{re} édition 2006).

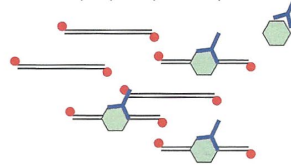
Lot A : molécule d'ADN radiomarquée



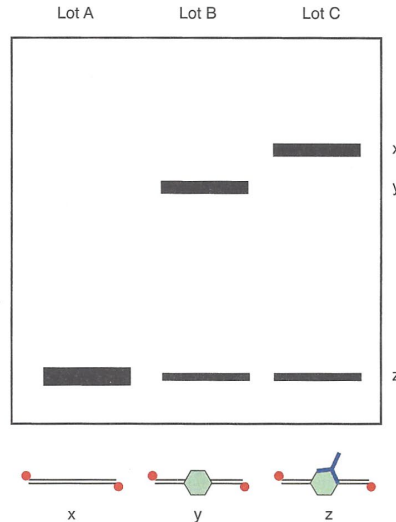
Lot B : molécule d'ADN radiomarquée
+ protéine supposée se lier à l'ADN



Lot C : molécule d'ADN radiomarquée
+ protéine supposée se lier à l'ADN
+ anticorps spécifique de la protéine



Électrophorèse : sens de migration ↓



Document 14.3e

Principe d'une expérience de retard sur gel

Activité 10. Électrophorèse d'ADN (TP) : diagnostic génétique

D'après École de l'ADN (Nîmes)

° Pour chaque **enzyme de restriction** : un **fragment de plus** dans le cas de l'**individu sain** par rapport à l'**individu malade**

→ un **site de restriction** a donc **disparu** sous l'effet de la **délétion** à l'origine de la **pathologie**.

° L'intérêt de **deux enzymes** se justifie par le **contrôle des résultats** afin de réellement **confirmer** une **anomalie génétique** et permet, à l'aide de la **carte de restriction** de l'ADN sain, d'affiner la détermination de la **position de la délétion**. **Ce travail était ici bien difficile à effectuer ici de manière expérimentale compte tenu de la faiblesse d'expression du marqueur de taille.**

PEYCRU, P., D. GRANDPERRIN, C. PERRIER (dir.), B. AUGÈRE, J.-F. BEAUX, F. CARIOU, P. CARRÈRE, T. DARRIBÈRE, J.-M. DUPIN, C. ESCUYER, J.-F. FOGELGESANG, S. MAURY, É. QUÉINNEC, E. SALGUEIRO & C. VAN DER REST (2014). *Biologie tout-en-un BCPST 2^e année*. Dunod, Paris, 3^e édition (1^{re} édition 2007).

PEYCRU, P., D. GRANDPERRIN, C. PERRIER (dir.), B. AUGÈRE, T. DARRIBÈRE, J.-M. DUPIN, C. ESCUYER, J.-F. FOGELGESANG, & C. VAN DER REST (2017). *Biologie tout-en-un BCPST 1^{re} année*. Dunod, Paris, 4^e édition (1^{re} édition 2006).

PEYCRU, P., D. GRANDPERRIN, C. PERRIER (dir.), B. AUGÈRE, J.-F. BEAUX, F. CARIOU, P. CARRÈRE, T. DARRIBÈRE, J.-M. DUPIN, C. ESCUYER, J.-F. FOGELGESANG, S. MAURY, É. QUÉINNEC, E. SALGUEIRO & C. VAN DER REST (2018). *Biologie tout-en-un BCPST 2^e année*. Dunod, Paris, 3^e édition (1^{re} édition 2007).

RAVEN, P. H., G. B. JOHNSON, J. B. LOSOS, S. S. SINGER (2007). *Biologie*. De Boeck, Bruxelles.

RICHARD, D. (dir.), P. CHEVALET, S. FOURNEL, N. GIRAUD, F. GROS, P. LAURENTI, F. PRADÈRE & T. SOUBAYA (2012). *Biologie. Tout le cours en fiches. Licence. CAPES. Prépas*. Dunod, Paris, 2^e édition (1^{re} édition 2010).

SAINTPIERRE, F., C. BORDI (dir.), M. ALGRAIN, Y. KRAUSS, I. MOLLIÈRE & H. CLAUCE (2017). *Mémento Biologie BCPST 1^{re} et 2^e années*. Vuibert, Paris.

SAINTPIERRE, F., C. BORDI (dir.), M. ALGRAIN-PITAVY, A. DENIS, L. GERAY & I. MOLLIÈRE (2021). *Mémento Biologie BCPST 1^{re} et 2^e années*. Vuibert, Paris, 2^e édition (1^{re} édition 2017).

SEGARRA, J. (dir.), É. CHAUVET, C. COLSON-PROCH, M. HUILLE, M. LABROUSSE, F. LOUET, F. METZ & E. PIÈTRE (2014). *Biologie BCPST 1^{re} année*. Ellipses, Paris.

SEGARRA, J., E. PIÈTRE (dir.), G. BAILLY, O. CHASSAING, D. FAVRE, T. JEAN, F. METZ & C. MEUNIER (2015). *Biologie BCPST 2^e année*. Ellipses, Paris.

TAGU, D., S. JAUBERT-POSSAMAI & A. MÉREAU (dir.) (2018). *Principes des techniques de biologie moléculaire et génomique*. 3^e édition revue et augmentée, Quae, Versailles (F).

VIGNAIS, P. (2001). *La Biologie des origines à nos jours. Une Histoire des idées et des hommes*. « Grenoble Sciences », EDP Sciences, Les Ulis.

VIGNAIS, P. (2006). *Science expérimentale et connaissance du Vivant. La Méthode et les concepts*. « Grenoble Sciences », EDP Sciences, Les Ulis.

© Tanguy JEAN. Les textes et les figures originales sont la propriété de l'auteur. Les figures extraites d'autres sources restent évidemment la propriété des auteurs ou éditeurs originaux.

Document produit en mars 2022 • Dernière actualisation : février 2024.

Contact : Tanguy.Jean4@gmail.com

Adresse de téléchargement : <https://www.svt-tanguy-jean.com/>



Ces données sont placées sous licence *Creative Commons Attribution – Pas d'Utilisation commerciale 4.0 CC BY NC* qui autorise la reproduction et la diffusion du document, à condition d'en citer explicitement la source et de ne pas en faire d'utilisation commerciale.

Plan du TP

Objectifs du TP (programme)	1
Activité 1. Séquençage (méthode de SANGER)	1
Activité 3. <i>Southern Blot</i>	2
Activité 4. <i>Northern Blot</i>	2
Activité 5. Puce à ADN	2
Activité 6. Étude d'un <i>knock-out</i>	2
Activité 7. Emploi d'un gène rapporteur	3
Activité 8. Transgenèse et interférence ARN	3
Activité 9. Étude du contrôle de la transcription : cas du gène NO synthase	4
Activité 10. Électrophorèse d'ADN (TP) : diagnostic génétique	5
Références	5
Plan du TP	6