

Introduction

La **génétique** (du gr. ou lat. *genesis*, naissance, création) est la **science qui étudie les caractères héréditaires, leur support physique, leurs mécanismes d'expression et leurs mécanismes de transmission au fil des générations de cellules ou d'individus**.

On peut y placer diverses sous-disciplines, par exemple :

- la **génétique classique** (parfois dite **mendélienne**, en référence à l'Autrichien Johan Gregor MENDEL – 1822-1884 – dont les travaux furent précurseurs en la matière) : **étude de la transmission des caractères au fil des générations d'individus**.
- la **génétique moléculaire** (ou **biologie moléculaire**, selon de nombreux auteurs) : **étude des mécanismes moléculaires et cellulaires permettant le codage, l'expression, la régulation et la transmission de l'information génétique**.
- la **génétique du développement** : **étude du déterminisme génétique du développement des organismes**.
- la **génétique des populations** : **étude de la dispersion des caractères héréditaires au sein des populations**.
- la **génétique évolutive** : **science de synthèse qui s'appuie sur les divers aspects de la génétique de manière à élucider les mécanismes génétiques de l'évolution biologique**.

Dans le **présent TD**, il s'agit de faire de la **biologie moléculaire** et d'utiliser les **outils techniques** présentés dans les **chapitres de génétique de première année** pour comprendre les **génomés**, tant dans leur **organisation** que leur **fonctionnement**.

Comment l'emploi d'outils d'étude du génome et de leur expression nous permet-il de comprendre l'organisation et la dynamique de l'information génétique ?

ENSEIGNEMENT DE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE (SVT)

°° SCIENCES DE LA VIE °°

>> Cours <<

TP ST F1

Étude des génomes et de leur expression ÉNONCÉS

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)

D'après S. FABRE (Lycée Chateaubriand)

Soit un fragment d'ADN de séquence suivante (seul l'un des brins est représenté)
5' CCGGTTAGCGATCGTTTAATGGGTGATCCCGGCCTGGACTGATCTGACATGGTGTCAGTCAGTTTCTC 3'

On réalise un séquençage de ce fragment d'ADN par la méthode de SANGER avec l'amorce oligonucléotidique simple brin suivante : 5' TCAGATCAGTCCAGG 3', dont l'extrémité 5' est radiomarquée au ^{32}P . Vous disposez en plus du brin matrice et de l'amorce, d'ADN polymérase, des quatre 2'-désoxyribonucléotides (dNTP) et d'un jeu des différents 2',3'-didésoxyribonucléotides (ddNTP).

1. **Schématisez** l'autoradiographie du gel de séquençage que vous devriez obtenir. Vous légendez précisément chacune des 4 pistes en indiquant à quel mélange réactionnel elle correspond. **Utilisez** une échelle un carreau pour une base.
2. **Reportez**, à droite, la séquence du brin synthétisé puis la séquence recherchée, en indiquant le sens de lecture des séquences établies.

Activité 2. Traitement informatique de séquences

D'après S. FABRE (Lycée Chateaubriand)

A. Identifier une séquence en interrogeant les banques de données

1. **Confrontez** la séquence X aux séquences des bases de données pour identifier ce qu'elle code. Pour cela, accédez au logiciel Blast sur le site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> et suivez les différentes étapes du tutoriel fourni.
2. À l'aide du site ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), **cherchez** le nombre d'ORF (phases ouvertes de lecture = séquences codantes potentielles) présents dans cette séquence. Pourquoi y-a-t-il six cadres de lecture possibles ?
3. Quel est l'ORF correspondant à la protéine effectivement produite dans les cellules, sachant que sa longueur est 239 AA ?

B. Comparer des séquences entre elles pour établir la structure d'un gène

Le gène CGRP humain est situé sur le chromosome 11. Il s'exprime dans les cellules C de la thyroïde où il code une hormone, la calcitonine, intervenant dans la régulation de la calcémie (hormone hypocalcémiant). Il s'exprime aussi dans de nombreux neurones du système nerveux central et périphérique où il code un neuromédiateur, le CGRP. Calcitonine et CGRP ont des rôles physiologiques différents. C'est donc l'exemple d'un gène qui code pour deux protéines différentes suivant le type de cellules où il s'exprime.

Comment cela est-il possible ?

On dispose de la séquence du gène, de celle de l'ARN pré-messager et des deux ARN messagers, celui présent dans les cellules thyroïdiennes, et celui présent dans les neurones (fichier CGRP.edi).

Dans le logiciel Anagène, **ouvrez** le fichier CGRP.edi. À l'aide de l'outil Dot plot (Menu traiter → graphique de ressemblance), **réalisez** les comparaisons deux à deux qui vous semblent pertinentes pour finalement proposer une explication au phénomène constaté.

NB : Alternatives à Anagène (logiciel payant disponible> aux TP du concours):

° En ligne :

- pour des comparaisons de séquences deux à deux : *Specialized Blast bl2Seq* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ou <http://www.uniprot.org/align/> (pour des séquences codantes ou protéiques),

- pour des alignements multiples : <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>

Cet outil très puissant permet aussi d'obtenir l'arbre phylogénétique déduit de la comparaison (onglet *Result summary* → *Phylogenetic tree*).

° Logiciel gratuit téléchargeable : *Geniegen*, très semblable à *Anagène*

Tutoriel disponible sur <http://accres.ens-lyon.fr/accres/logiciels/applications/geniegen/presentation-du-logiciel-geniegen>

Activité 3. Southern Blot

D'après PEYCRU et al. (2013)

Analyse d'un résultat de Southern blot (à partir du sujet ENS 2001)

Monsieur X consulte pour une faiblesse musculaire au niveau des jambes, surtout après effort. Il souffre aussi d'une vision double. Suite aux analyses médicales, une maladie mitochondriale est suspectée. L'analyse d'un prélèvement de tissu musculaire squelettique révèle une désorganisation importante des fibres musculaires, les myofibrilles étant remplacés par des mitochondries qui ont proliféré. À partir de biopsies musculaires, l'ADN cellulaire est purifié, digéré par l'endonuclease de restriction PvuII, soumis à une électrophorèse en gel d'agarose, transféré sur membrane de nitrocellulose et hybridé avec une sonde radioactive correspondant à l'ADN mitochondrial (ADNmt) total, selon la technique du Southern blot. La membrane a été autoradiographiée et les résultats sont donnés dans la figure TP12.7a. Des résultats identiques ont été obtenus en remplaçant PvuII par l'endonuclease NheI. La structure de l'ADNmt humain et les positions des sites de restriction pour 5 endonucléases sont données sur la figure TP12.7b.

Si vous ne le saviez pas, quels arguments vous permettraient de déduire de cette expérience que l'ADNmt est circulaire ? Comparez les résultats obtenus. Comment interprétez-vous vos observations ?

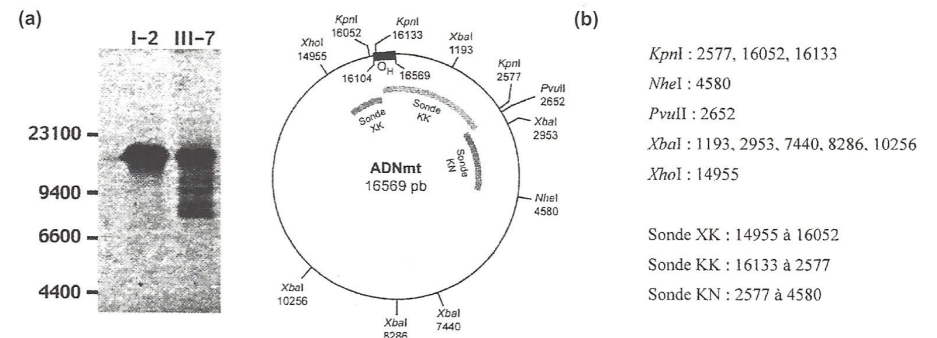


FIGURE TP12.7 Résultat d'un Southern blot (a) et structure de l'ADNmt (b).

(a) I2 est un individu sain. III-7 est le patient malade. À gauche : marqueurs de taille (pb). (b) l'ADNmt humain est un ADN double brin circulaire de 16 569 pb (paires de bases). Les sites de clivage de 5 endonucléases de restriction sont indiqués à droite de la carte.

Activité 4. Northern Blot

D'après PEYCRU et al. (2013)

Analyse d'un résultat de northern blot (d'après un extrait du sujet ENS 2009)

Les phospholipases C (PLC) sont des enzymes capables de faire le lien entre les phénomènes de signalisation au niveau des membranes et des éléments incluant la dynamique du cytosquelette donc la forme des cellules. Pour étudier la relation entre la croissance du tube pollinique et les PLC, des ADN complémentaires (ADNc) candidats au codage des PLC ont été obtenus dans une banque d'ADNc construite à partir de grains de pollen et de tubes polliniques chez la plante *Petunia inflata*. Ces ADNc ont été recherchés à l'aide d'une sonde obtenue par PCR. La sonde contient les régions codantes correspondant aux domaines très conservés chez *Arabidopsis thaliana*. Une seule catégorie de clones a été isolée avec cette méthode de criblage. Le clone contenant le plus grand insert code une PLC de taille complète : PLC1. L'expression du gène PLC1 est analysée par la technique du northern blot dont les résultats sont observés sur la figure TP12.8.

Expliquez dans quel but la technique du northern blot est utilisée. À quoi servent ici les bandes d'ARNr ? Décrivez les résultats obtenus sur la figure TP12.8.

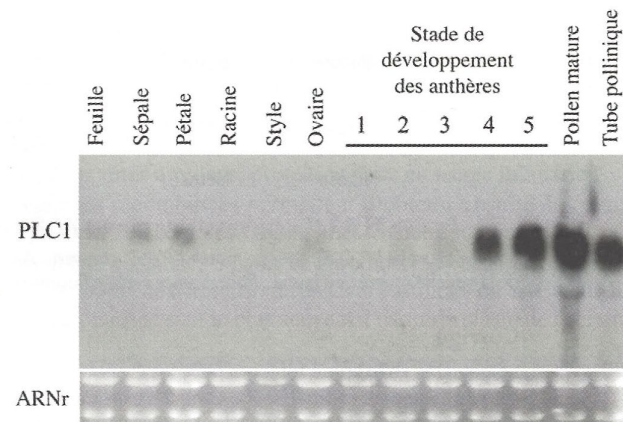


FIGURE TP12.8 Analyse par Northern blot du gène PLC1.

Vingt µg d'ARN total de *Petunia inflata* ont été isolés de chaque tissu indiqué en haut de la photographie (pour les anthères : 1 = développement des microspores dans la configuration en tétrade ; 2 = microspores uninucléées libres ; 3 = microspores binucléées ; 4 = microspores trinucléées ; 5 = pollen mature) ainsi qu'à partir de grains de pollen et de tubes polliniques. Ces ARN ont ensuite été chargés dans chaque puits. Les ARN ont été transférés sur une membrane de nylon et une sonde radiomarquée provenant de l'ADNc PLC1 a été utilisée pour la révélation. La coloration au bromure d'éthidium du gel (taches claires) montre les bandes correspondant aux ARNr.

Activité 5. Puce à ADN

D'après PEYCRU et al. (2013)

Étude du fonctionnement de l'opéron lactose grâce à une puce à ADN

Deux souches d'*Escherichia coli* sont testées pour étudier le fonctionnement de l'opéron lactose : la souche sauvage *l⁺P⁺O⁺Z⁺* et la souche mutante pour la séquence de contrôle σ . Le gène *I* code le répresseur *lac I*. *P* est le promoteur tandis que *O* est l'opérateur. Le gène *Z* code l'enzyme β galactosidase. Les souches sont cultivées dans des milieux soit riches en glucose, soit riches en lactose. Les ARNm sont ensuite extraits puis marqués par une molécule fluorescente : les ARNm de la souche sauvage sont marqués en vert tandis que ceux de la souche mutée sont marqués en rouge. Ainsi, une fluorescence jaune indiquera la présence des ARNm des deux souches. Ces ARNm sont mélangés puis placés sur la puce à ADN pour l'hybridation. L'ADN fixé sur la puce correspond aux gènes *lac I*, *Z* et *CRP* qui code la protéine CAP.

À partir des résultats obtenus (figure TP12.9), expliquez le fonctionnement de l'opéron et proposez une hypothèse explicative pour la souche porteuse du site σ .

I+P+O+Z+	I+P+o-Z+	lac I	Z	CRP
glucose	glucose	●	●	●
glucose	lactose	●	●	●
lactose	glucose	●	●	●
lactose	lactose	●	●	●

FIGURE TP12.9 Résultat d'une puce à ADN pour l'étude de l'opéron lactose.

Souche sauvage *l⁺P⁺O⁺Z⁺*, souche mutée *l⁺P⁺o-Z⁺* ; En vert : ARNm de la souche sauvage ; en rouge : ARNm de la souche mutée ; en jaune : fluorescence verte + fluorescence rouge ; en noir : aucun signal fluorescent.

Activité 6. Étude d'un *knock-out*

D'après *PERRIER, BEAUX et al. (2021)*

On étudie trois souches de cellules mésenchymateuses cancéreuses (cellules témoins et cellules de deux types de mutants K.O.). Les résultats sont présentés par la *figure 15.16*.

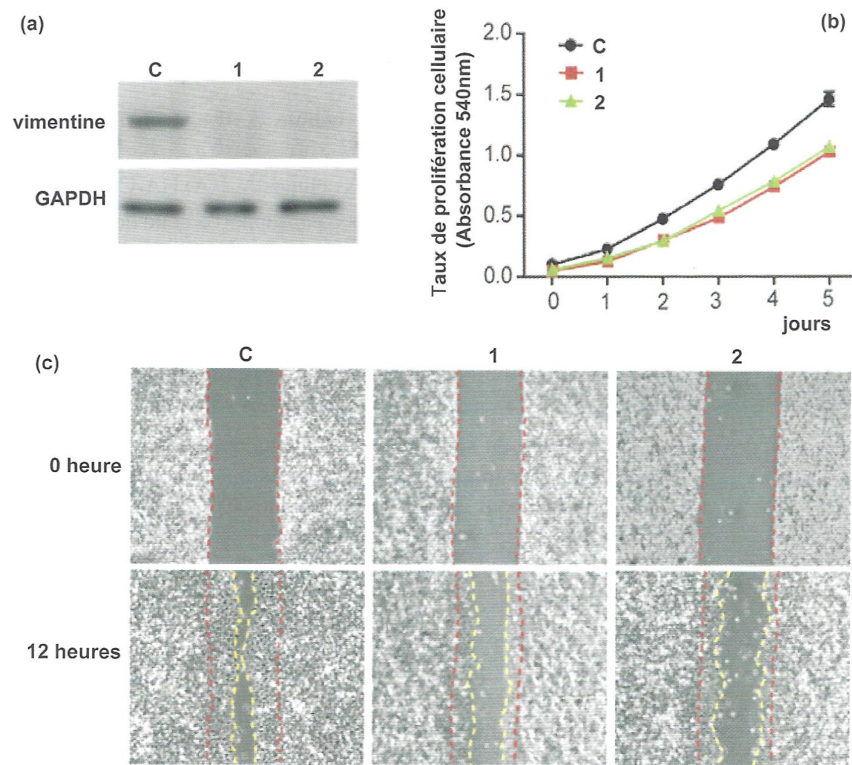


Figure 15.16 (a) Western blot permettant de quantifier la vimentine chez les souches c (contrôle), et des mutants KO (1 et 2) ; (b) prolifération des cellules de ces 3 souches ; (c) migration des 3 souches au bout de 12 h.

(D'après *Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation* Ching-Yi Liu, doi : 10.18632/oncotarget.3862).

- 1 Rappel les méthodes permettant d'obtenir des souches KO.
- 2 Analysez et interprétez les résultats de la *figure 15.16a*.
- 3 Mettez en relation ces informations avec celles apportées par les *figures 15.16b et c*. Certaines cellules présentent la capacité de se déplacer (phénotype migrateur) ou celle de former de nouvelles colonies cellulaires à distance de la culture initiale (phénotype invasif). La *figure 15.17* recense les effectifs de ces différents types dans des cultures soumises ou non à un traitement induisant la transition épithélium-mésenchyme (EMT).

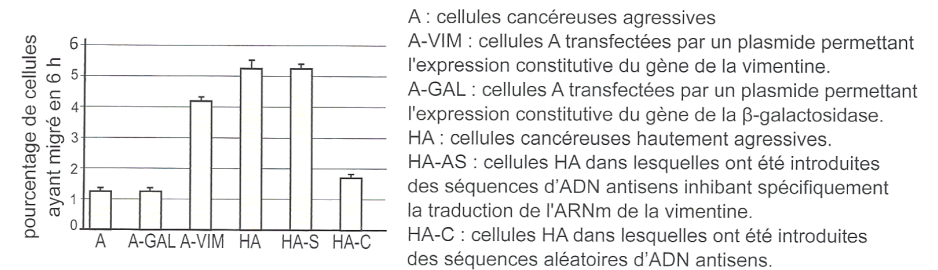


Figure 15.17 Mesure de la capacité migratoire de différentes cellules cancéreuses.

- 4 Comparez les résultats des cellules A, HA, A-GAL et A-VIM. Que pouvez-vous en déduire concernant la vimentine ?
- 5 Comparez les résultats des cellules A, HA, HA-C et HA-AS.
- 6 Qu'apporte cette expérience par rapport à celle de la *figure 15.16* ?

Activité 7. Emploi d'un gène rapporteur

D'après *DAUTEL et al. (2021)*

●○○
15 min.

L'étude d'un récepteur aux glucocorticoïdes

Les récepteurs aux glucocorticoïdes sont une famille de protéines régulant l'expression de certains gènes nucléaires. On s'intéresse à la structure et au fonctionnement du récepteur à un glucocorticoïde : la dexaméthasone. Dans cette étude, on génère des protéines chimères présentant certains domaines du récepteur à la dexaméthasone, fusionnés à la β -galactosidase, une enzyme produisant une molécule colorée visible en microscopie. Ces constructions sont ensuite introduites par transgénèse dans des cellules eucaryotes.

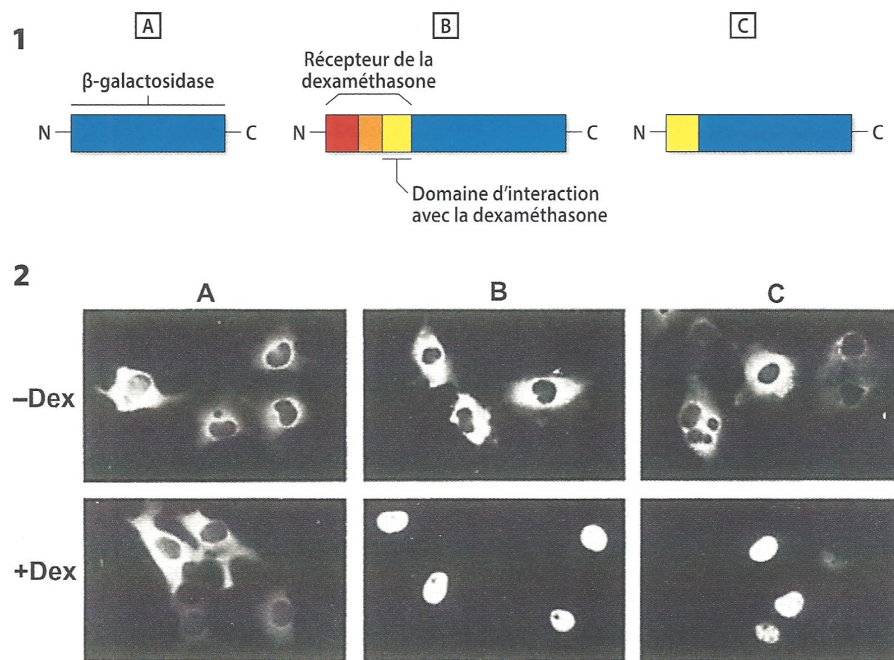


Figure A. La localisation cellulaire des protéines produites à partir du transgène, en présence ou absence de dexaméthasone. **1.** La structure des protéines chimères A, B et C utilisées dans l'expérience. **2.** L'observation au microscope à fluorescence de la localisation de protéines obtenues en absence (-Dex) ou présence (+Dex) de dexaméthasone.

Pistes d'exploitation

1. Figure A. Quel est l'effet de la dexaméthasone sur la localisation des récepteurs dans chaque cas ? Quel domaine permet le changement de localisation du récepteur ?

On cherche maintenant à savoir si le changement de localisation est suffisant pour activer le récepteur à la dexaméthasone. Pour ce faire, on génère une nouvelle protéine chimère contenant la séquence du récepteur et celle de la β-galactosidase, auxquelles on ajoute un domaine de localisation nucléaire.

Dans les conditions de l'expérience, le récepteur stimule lorsqu'il est activé la transcription du gène CAT, formant la protéine chloramphénicol acétyltransférase, qui catalyse la réaction suivante :

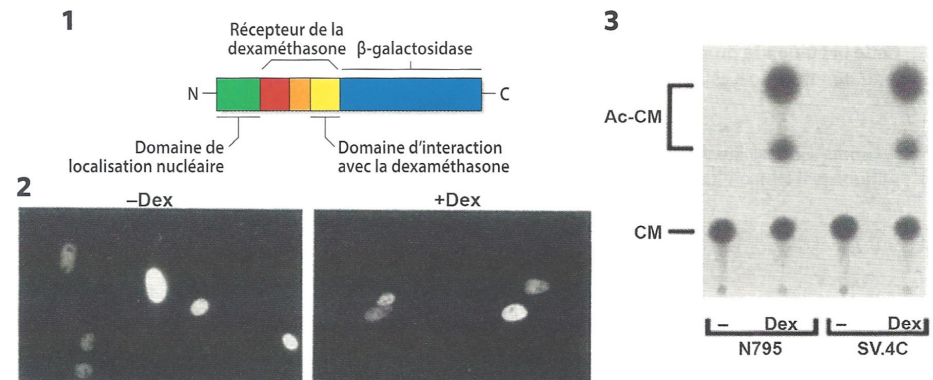
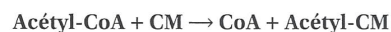


Figure B. La localisation et fonctionnement de la protéine chimère SV.4C. **1.** La structure de la protéine chimère obtenue. **2.** L'observation au microscope à fluorescence de la localisation de SV.4C en absence (-Dex) ou présence (+Dex) de dexaméthasone. **3.** La révélation par chromatographie de la présence de chloramphénicol (CM) et d'acétylchloramphénicol (Ac-CM) chez une cellule exprimant un récepteur normal (N795) ou la protéine chimère SV.4C, en présence (dex) ou absence (-) de dexaméthasone.

Pistes d'exploitation

2. Figure B. Quelle est la conséquence de l'ajout d'un domaine de localisation nucléaire sur la localisation du récepteur à la dexaméthasone ?

3. Figure B. La localisation nucléaire du récepteur à la dexaméthasone est-elle suffisante à sa fonction ?

Activité 8. Transgénèse et interférence ARN

D'après DAUTEL et al. (2021)

●●○
60 min.

Le contrôle des ravageurs par interférence à ARN

Le coton (*Gossypium hirsutum*) a pour principal ravageur la larve de noctuelle (*Helicoverpa armigera*). Pour lutter contre cette chenille, du coton transgénique exprimant une toxine bactérienne insecticide Bt a été produit et commercialisé. Cependant, les plantes OGM n'ont pas bien résisté aux ravageurs, probablement par sélection d'insectes résistants, aboutissant en 2002 à de très nombreux suicides d'agriculteurs en Inde. On cherche donc une autre méthode n'utilisant pas d'insecticides de synthèse, et qui seraient moins susceptible de sélectionner des résistances.

Dans cette étude des chercheurs proposent de créer un coton transgénique exprimant un ARN double brin qui pourrait créer une interférence avec un ARN de la chenille consommatrice du coton. Le gène ciblé (*hmg*) code une enzyme de synthèse de l'hormone juvénile, qui contrôle la croissance et la métamorphose de la chenille en papillon. L'effet attendu est un blocage du développement des chenilles.

Par analyse informatique, on détecte deux fragments différents du gène *hmg*, notés HMGi1 et HMGi2, susceptibles de pouvoir former par transcription des ARN interférents spécifiques de ce gène. Ils sont utilisés pour construire deux plasmides recombinés différents. Chaque plasmide contient un promoteur suivi d'un fragment du gène *hmg* dans le sens 5'-3' et le même promo-

teur suivi de la même séquence en sens inverse, ainsi qu'un gène de résistance à l'antibiotique kanamycine. Ce plasmide modifié est incorporé dans la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie a la propriété d'introduire des plasmides recombinés dans les cellules végétales.

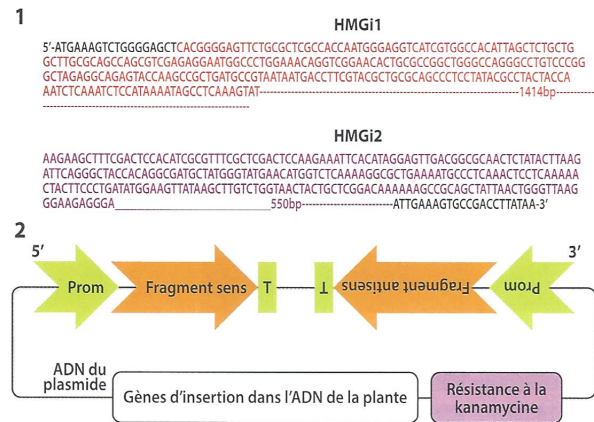


Figure A. 1. Les deux séquences du gène hmg utilisées. **2.** La structure des plasmides recombinés d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisés dans cette expérience pour transformer le coton. Les deux promoteurs sont reconnaissables par les ARN polymérases eucaryotes.

Pistes d'exploitation

1. Sachant que les ARN interférents sont formés à partir d'ARN double brins, expliquez la structure du plasmide recombiné.

Des cellules indifférenciées végétales sont mises en contact avec les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* renfermant les plasmides recombinés, puis ces cellules sont ensuite cultivées dans un milieu contenant de la kanamycine. Enfin, avec des ajouts d'hormones végétales, une plante entière transgénique est régénérée à partir des cellules végétales indifférenciées. On sait par ailleurs que les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* sont capables de transférer une partie de l'ADN de leur plasmide à l'ADN nucléaire de la plante.

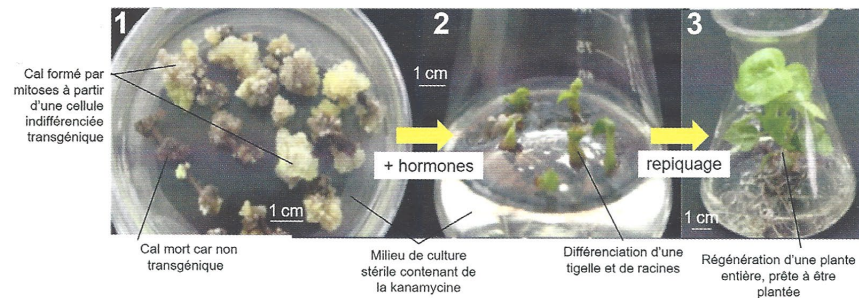


Figure B. Les étapes de la formation des plantes transgéniques, depuis la formation d'un amas de cellules indifférenciées (1) jusqu'à la formation de plantes (3).

Pistes d'exploitation

2. Pourquoi cultiver les cellules ayant été au contact avec les bactéries sur un milieu contenant un antibiotique ? Pourquoi mettre en contact les bactéries avec des cellules isolées et non une plante entière ?

Après extraction de l'ADN des jeunes plants de coton, une PCR est réalisée en utilisant des amorces correspondant soit au fragment HMGi1, soit au fragment HMGi2. L'ADN obtenu par PCR en amplifiant la zone située entre deux amorces est nommé un amplicon.

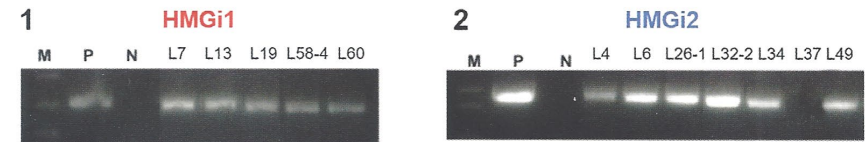


Figure C. Les amplicons obtenus par PCR en utilisant des amorces correspondant soit au fragment HMGi1 (1), soit au fragment HMGi2 (2), sur des plants de coton transgéniques identifiés par le code L + numéro. M est le marqueur de taille, P un fragment purifié de HMGi1 ou HMGi2, et N une PCR avec de l'ADN ne contenant aucun fragment HMG. On ne tiendra pas compte du fait que la migration en B se soit faite obliquement ; tous les fragments ont la même taille.

Pistes d'exploitation

3. Pourquoi les chercheurs réalisent-ils cette PCR sur les plantes ? Analysez les résultats obtenus et présentés dans la figure C.

À partir des plantes présentant un amplicon sur la figure C, les ARN sont extraits, et une rétrotranscription suivie d'une PCR (RT-PCR) est réalisée en utilisant les amorces correspondant aux ARN issus des fragments HMGi1 ou HMGi2.

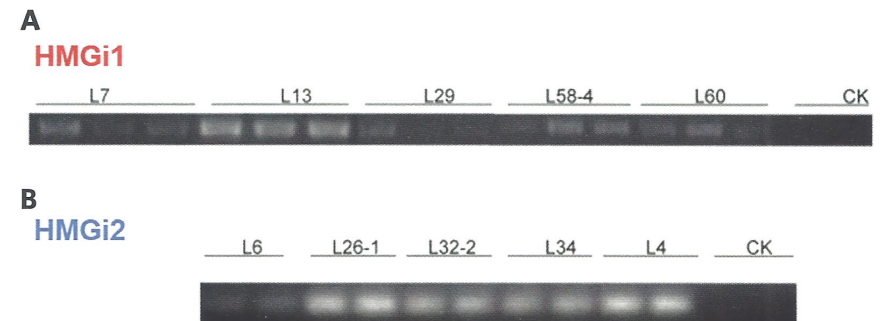


Figure D1. Les résultats de la RT-PCR sur les ARN des plants de coton transgéniques, en utilisant les amorces correspondant aux ARN issus des fragments HMGi1 ou HMGi2. **A et B.** Les gels montrant les bandes formées par les amplicons.

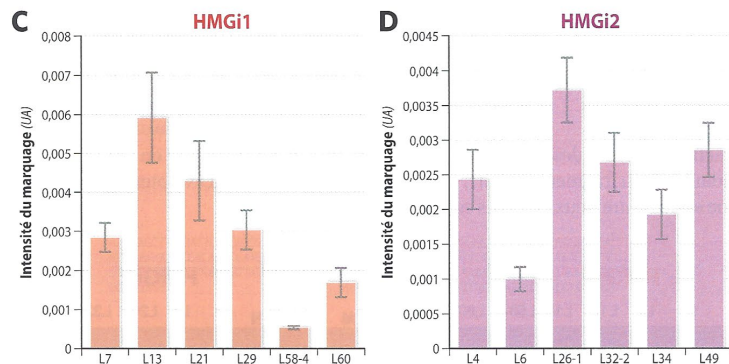


Figure D2. C et D. La quantification du marquage des bandes obtenues chez un même individu lors de 2 ou 3 expériences indépendantes, avec les amorces correspondant aux ARN issus des fragments HMGi1 (C) ou HMGi2 (D), en unités arbitraires (UA). Chaque plante est identifiée par le code L + numéro. CK est le témoin ayant reçu un plasmide sans séquence HMG.

Pistes d'exploitation

4. Pourquoi les chercheurs réalisent-ils une RT-PCR sur les plantes ayant produit un amplicon par PCR sur la figure C ?

5. Analysez les figures D1 et D2, et proposez des hypothèses pour expliquer la variabilité interindividuelle, sachant que tous les plants de coton sont de la même variété mais n'ont pas le même génotype.

Deux plants de coton transgénique nommés L13 et L26-1, ainsi qu'un coton transgénique sans fragment HMGR (CK), sont choisis pour nourrir les chenilles. Les chenilles sont ensuite prélevées et leur quantité de protéine HMG est mesurée.

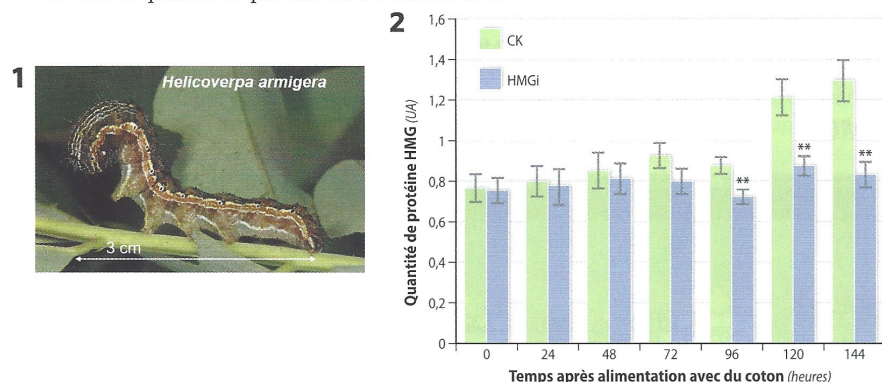


Figure E. 1. La chenille *Helicoverpa armigera*. **2.** La quantité de protéine HMG chez des chenilles (en unité arbitraires), nourries à partir du temps 0 avec du coton transgénique L13 et L26-1, ou transgénique sans fragment HMGR (CK). Les valeurs sont des moyennes (les valeurs pour L13 et L26-1 sont réunies) $\pm$ 4 écart-type. Deux astérisques indiquent une différence par rapport au témoin statistiquement significative.

Pistes d'exploitation

6. D'après les figures D1 et D2, pourquoi avoir choisi les deux plants de coton transgénique nommés L13 et L26-1 ?

7. Pourquoi le résultat de la figure E2 est-il étonnant ?

Le phénotype des chenilles nourries avec des cotons transgéniques HMGi ou CK est analysé. On étudie le taux de mortalité et, pour les chenilles survivantes, leur gain de masse, ainsi que leur métamorphose en chrysalide (avant transformation en papillon). L'hormone juvénile déclenche la mue et contrôle la formation de la cuticule, après chaque mue de la larve ou lors de la formation d'une chrysalide. Après une mue, la cuticule est souple, ce que permet un accroissement de taille, puis elle devient épaisse et opaque, assurant un rôle de protection.

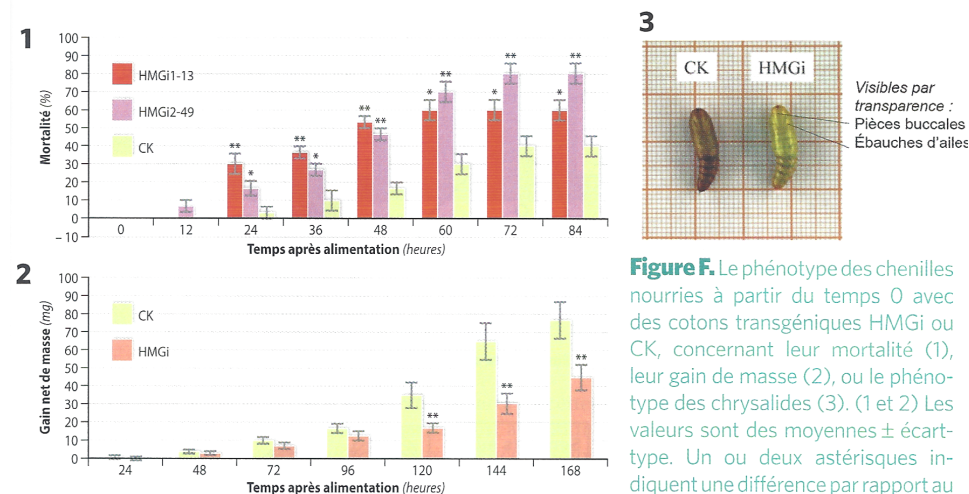


Figure F. Le phénotype des chenilles nourries à partir du temps 0 avec des cotons transgéniques HMGi ou CK, concernant leur mortalité (1), leur gain de masse (2), ou le phénotype des chrysalides (3). (1 et 2) Les valeurs sont des moyennes $\pm$ écart-type. Un ou deux astérisques indiquent une différence par rapport au témoin statistiquement significative.

En 1, HMGi1-13 désigne la plante L13 exprimant le fragment HMGi1 ; HMGi2-49 désigne la plante L49 exprimant le fragment HMGi2. En 2, HMGi désigne les résultats obtenus avec les deux types de plantes. En 3, les organes internes de la chrysalide HMGi sont visibles par transparence.

Pistes d'exploitation

8. Analysez la figure F pour déterminer les effets de l'alimentation des chenilles avec du coton transgénique HMGi. Ces effets étaient-ils prévisibles compte tenu du rôle de l'hormone juvénile ?

La transcription du gène de synthèse de la vitellogénine est contrôlée par l'hormone juvénile. La vitellogénine stimule la mise en place de réserves dans les œufs, qui permettront le développement embryonnaire aboutissant à la formation d'une petite chenille. Les chercheurs ont aussi constaté une forte réduction de la production de la vitellogénine chez les chrysalides provenant de chenilles nourries avec du coton HMGi.

9. Pourquoi les chercheurs pensent-ils que le choix du gène codant la protéine HMG est particulièrement pertinent pour cette stratégie de lutte contre les ravageurs ?

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

D'après SEGARRA et al. (2014)

(adapté à partir de l'épreuve de Biologie, concours ENS filière BCPST, session 2006)

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule impliquée dans le contrôle de la vasomotricité. Ces documents étudient le contrôle de la transcription du gène NOS, codant pour l'enzyme NO synthase (NOS). Cette enzyme catalyse la synthèse du monoxyde d'azote réalisée dans les cellules des parois des vaisseaux sanguins. En particulier, on cherche à déterminer l'influence de la concentration en dioxygène (O₂) dans le milieu sur la transcription du gène NOS. On définit alors 2 conditions :

- La condition de normoxie : condition de concentration « normale » en dioxygène, 70 % N₂, 20 % O₂, 5 % CO₂
- La condition d'hypoxie : 93 % N₂, 5 % O₂, 5 % CO₂.
- On sait que le diazote (N₂) n'a aucune influence sur les processus étudiés.

À l'aide des documents proposés, déterminez les modalités du contrôle de l'expression du gène NOS.

Influence de la concentration en dioxygène sur la transcription du gène NOS

On cultive des cellules extraites de la paroi de vaisseaux sanguins, dites cellules HUVEC, *in vitro*, à 37 °C soit en conditions de normoxie (témoin) soit en condition d'hypoxie, pendant 24 h. Puis les cellules sont lysées, leurs ARNm extraits et analysés (document 14.3a).

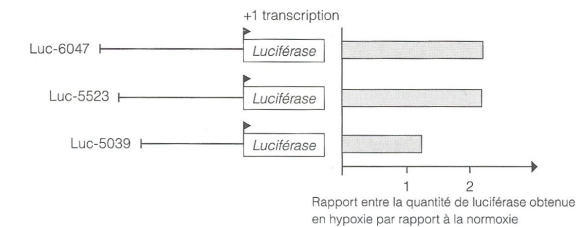
On réalise une transfection de cellules HUVEC, c'est-à-dire qu'on intègre à leur génome une construction comprenant les séquences suivantes (document 14.3b) :

- un gène rapporteur, le gène de la luciférase. Cette enzyme, en présence de son substrat permet l'émission de lumière : elle rend donc fluorescentes les cellules qui l'expriment. Par ailleurs, la fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'enzymes produites par les cellules.

Conditions expérimentales	Quantité d'ARNm NOS rapportée au témoin (=100%)
Normoxie (=témoin)	100 %
Hypoxie	200 %

Document 14.3a

Mesure de la quantité d'ARNm NOS produits dans des conditions d'hypoxie ou normoxie.



Document 14.3b

Étude de la région amont du gène NOS et de son rôle dans le contrôle de la transcription du gène NOS.

Étude du facteur de transcription HIF1 contrôlant l'expression du gène NOS et de la séquence d'ADN reconnue par HIF1

Dans les cellules HUVEC placées en hypoxie on détecte une protéine appelée HIF1 (*Hypoxia inducible Factor*). La protéine HIF1 se fixe spécifiquement sur une séquence d'ADN : 5' – TGTACGTG – 3'.

Par ailleurs, on a isolé un fragment d'ADN de 265 pb issu de la région mise en évidence dans le document précédent, il s'agit de la région –5515 à –5250 située en amont du gène NOS.

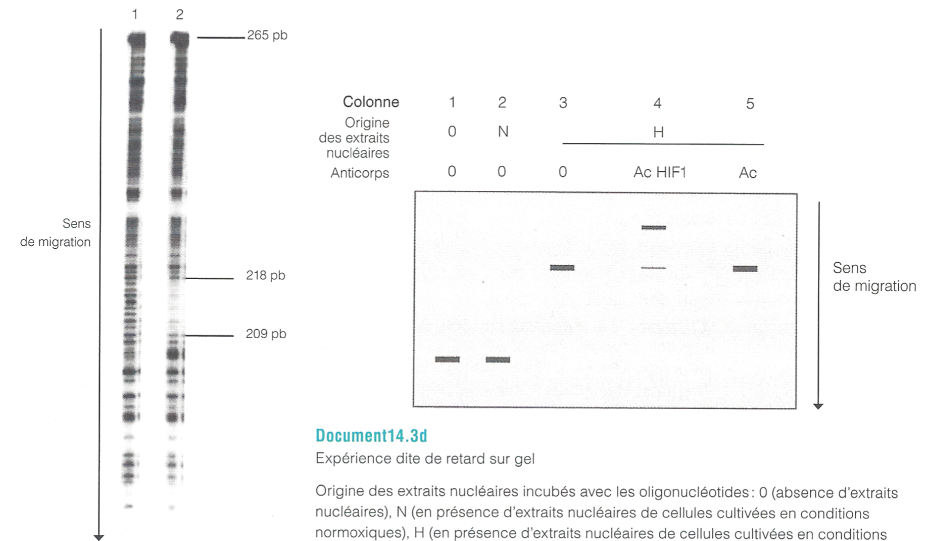
L'extrémité 3' d'un de ses brins est marquée radioactivement. Le fragment est soumis à la lyse par l'ADNase I, une endonucléase qui coupe aléatoirement l'ADN, générant ainsi des fragments de toutes les tailles (ici entre 1 pb et 265 pb) dans deux conditions (avec ou sans HIF-1). Les fragments sont ensuite séparés par une électrophorèse en conditions dénaturantes puis révélés par une autoradiographie (document 14.3c).

On utilise des oligonucléotides (très courts fragments d'ADN) fabriqués à partir du fragment de 265 pb étudié dans le document 14.3c dans la portion (220-200 pb). Ces oligonucléotides sont marqués radioactivement.

Les oligonucléotides sont incubés avec :

- des extraits nucléaires (des protéines extraites du noyau) issus des cellules HUVEC, cultivées en hypoxie ou en normoxie.
- des anticorps spécifiques de HIF1 (Ac HIF1) ou non (Ac).

On soumet alors les mélanges (oligonucléotides + extraits nucléaires + anticorps) à une électrophorèse en conditions non dénaturantes, qui est ensuite révélée grâce à une autoradiographie (document 14.3d).



Document 14.3c

Expérience dite de protection vis-à-vis de l'ADNase.

1 : sans HIF-1. 2 : avec HIF-1

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

D'après École de l'ADN (Nîmes)

Blouse et gants de protection obligatoires

Comment peut-on établir un diagnostic génétique à partir d'ADN digérés par des enzymes de restriction ?

Deux ADN sont analysés par digestion enzymatique, sous l'action d'endonucléases de restriction. Identifiez l'ADN pathologique, sachant que l'un des deux ADN est représentatif de la population saine, et que la pathologie au niveau génétique est causée par une perte d'ADN (une délétion).

Protocole de dépôt

Sur un gel d'électrophorèse (par paillasse) placé dans la cuve d'électrophorèse que vous remplirez de tampon (TBE : Tris, Borate, EDTA), vous réaliserez les dépôts suivants (un dépôt par puits) :

- ° 5 µL de marqueur de taille
- ° 20 µL d'ADN pathologique digéré par PstI
- ° 20 µL d'ADN sain digéré par PstI
- ° 20 µL d'ADN pathologique digéré par XhoI
- ° 20 µL d'ADN sain digéré par XhoI

Dans les petits puits, on pourra se contenter de 15 µL au lieu de 20 µL

Attention

- ° On réglera bien la micropipette sur le bon volume.
- ° On changera d'embout avant chaque dépôt (sinon tout est foutu...).
- ° On réalisera le dépôt en s'assurant que l'embout est dans le puits – car, si le dépôt est au-dessus, il s'échappera dans le tampon – mais sans toucher le fond – sinon le gel sera perforé par l'embout (figure ci-dessous).

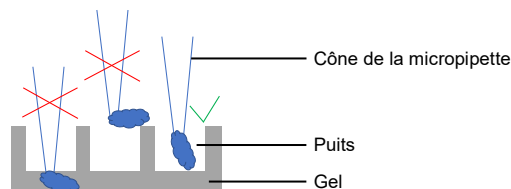


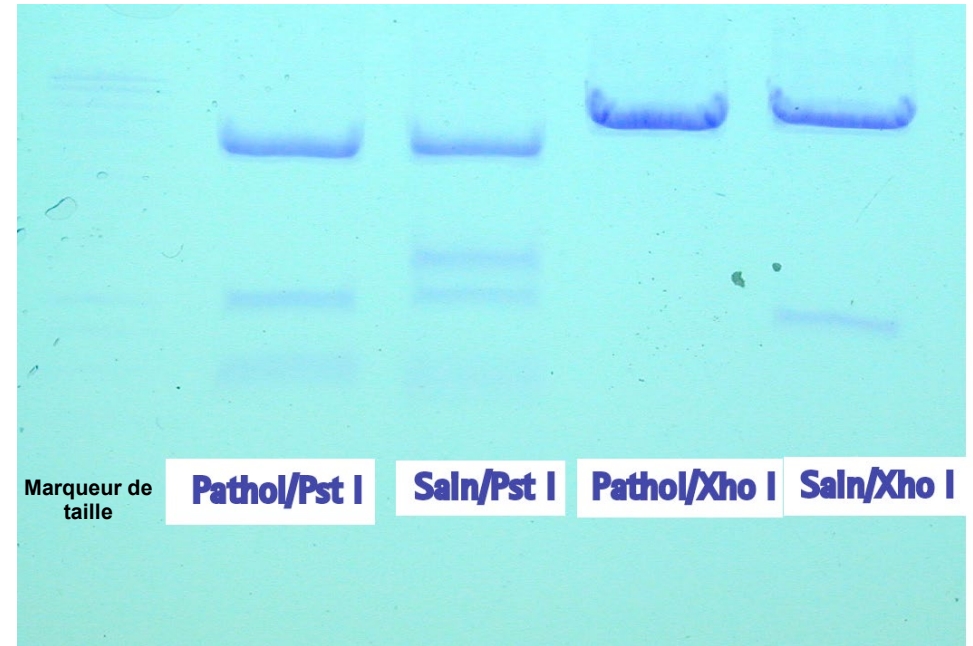
FIGURE. Comment bien déposer.

Protocole de migration

- ° Fermez la cuve et reliez-la à l'alimentation en respectant les polarités.
- ° Faites migrer 30 min à 130 V.

Protocole de révélation à l'Azure A

- ° Sortez le gel de la cuve et placez-le dans une cuve de décoloration.
- ° Plongez le gel pendant 3 min dans une solution d'Azure A (à 0,4 % et 20 % d'éthanol).
- ° Rincez deux fois le gel dans de l'éthanol à 70 % en remuant la cuve de décoloration pendant 5 minutes à chaque fois.
- ° Rincez abondamment à l'eau du robinet.
- ° Laissez dans l'eau une vingtaine de minutes puis observez les résultats.

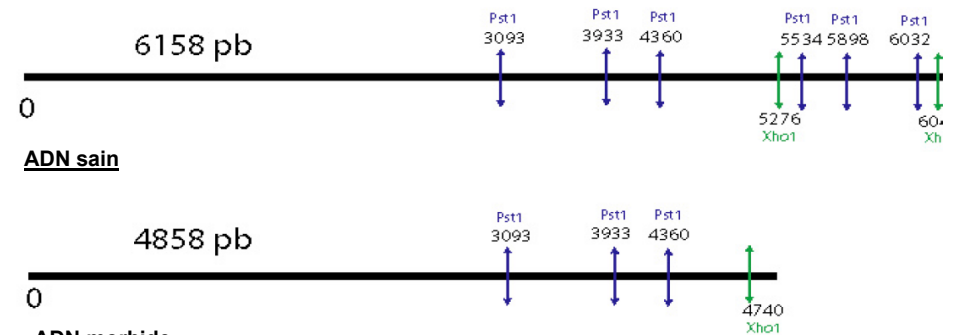


▲ FIGURE a. Exemple de gel obtenu.

Questions

- ° Analysez les résultats obtenus.
- ° Indiquez l'intérêt du recours à deux enzymes de restriction différentes.

Pour complément :



▲ FIGURE b. Carte de restriction des deux fragments d'ADN étudiés.

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 RAGUÉNÈS-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 (4^e 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.
- DENÈUD, 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.
- DENÈUD, J., C. GODINOT, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON & F. TEJEDOR (2013). *Biologie-Géologie BCPST-véto 1^{re} année*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- DENÈUD, 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, 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. DENÈUD, J. ROQUES, É. HAMARD-PÉRON & M. AIRAUD (2018). *Biologie*. Dunod, Paris.
- MEYER, S., C. REEB & R. 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).

- PEYCRU, P., D. GRANDPERRIN, C. PERRIER (dir.), B. AUGÈRE, J.-F. BEAUX, F. CARIU, 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. CARIU, 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. CLAUCÉ (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. MÈREAU (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 2023.
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
Introduction	1
Activité 1. Séquençage (méthode de SANGER)	2
Activité 2. Traitement informatique de séquences	2
Activité 3. Southern Blot	2
Activité 4. Northern Blot	3
Activité 5. Puce à ADN	3
Activité 6. Étude d'un knock-out	4
Activité 7. Emploi d'un gène rapporteur	4
Activité 8. Transgénèse et interférence ARN	5
Activité 9. Étude du contrôle de la transcription : cas du gène NO synthase	8
Activité 10. Électrophorèse d'ADN (TP) : diagnostic génétique	9
Références	10
Plan du TP	10

