

UE : **EXPRESSION DES GENES ET BIOSYNTHESE DES PROTEINES**

Ecrit Notions de cours **sujet de M. H. Becker**

Durée **1 heure 30 minutes**

Enseignant référent : **Pr. H. Becker**

L'usage des téléphones portables est interdit pendant toute la durée des épreuves, y compris lors de la préparation des épreuves orales. Les appareils doivent impérativement être éteints pendant les épreuves. Ils ne peuvent donc pas être utilisés comme chronomètre ou calculatrice. Aucune calculatrice n'est autorisée pendant toute la durée de l'épreuve.

N° d'anonymat :

Des chercheurs s'intéressant à l'initiation de la traduction chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 viennent de séquencer l'ARNt^{Méthionine} initiateur (ARNt_i^{Met}) de cet organisme dont la séquence est présentée ci-dessous.

5' CGCGGGGUGGAGCAGUCUGGDAGCUCGUCGGGCUCAUAACCCGAAGAUCGUUGGTΨCAAUCCAGC
CCCCGCAACCA3'

Q1 : Sur la base de la séquence ci-dessus et de la structure secondaire consensus des ARNt dessinez la structure en feuille de trèfle de l'ARNt_i^{Met} de *P. aeruginosa* PAO1, sachant que cet ARNt possède un nucléotide 17a dans la boucle du D et 5 nucléotides dans la boucle variable. Vous symboliserez les paires de bases de la façon suivante : A-U, G-C. (9 points).

Ces chercheurs poursuivent leurs investigations en étudiant la formylation du méthionyl-ARNt^{Méthionine} initiateur (Met-ARNt_i^{Met}) chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et veulent la comparer à la formylation du Met-ARNt_i^{Met} effectuée chez *Escherichia coli*.

Pour se faire, ils veulent créer une souche de *P. aeruginosa* PAO1 délétée du gène *fnt*, codant pour la méthionyl-tRNA formyltransferase (MTF). Il génèrent donc un plasmide, *pfnt::Gm^R* dépourvu d'origine de répllication et contenant le gène *fnt* disrupté par le gène *Gm^R* codant la résistance à la gentamycine. Dans ce plasmide, les 500 paires de bases en 5' et 3' du gène *fnt* encadrent le gène *Gm^R*. Ils transforment une souche sauvage de *P. aeruginosa* PAO1 et étalent les bactéries transformées sur un milieu LB contenant 200 µg/L/mL de Gentamycine. Après 12 h de croissance, ils prélèvent 2 colonies et vérifient la présence du gène *fnt* par PCR sur colonie en utilisant des amorces correspondant au 30 nucléotides situés en 5' (sens) et complémentaires au 30 derniers nucléotides situés 3' (anti-sens) de *fnt*. Après migration sur gel d'agarose 0,8 % ils obtiennent le profil électrophorétique décrit dans la Fig. 1 ci-dessous.

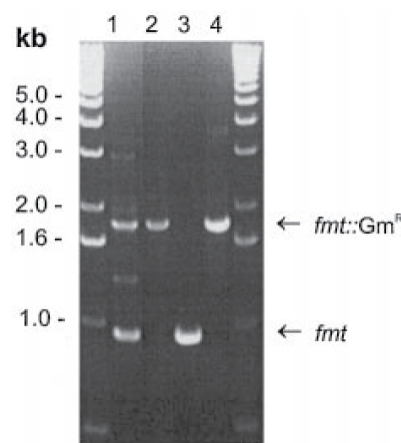


Fig. 1: vérification, par PCR sur colonies (pistes 1 et 2), de la disruption chromosomique du gène *fnt* de *P. aeruginosa* PAO1. piste. La piste 3 correspond à une PCR sur l'ADN génomique de *P. aeruginosa* PAO1 en utilisant les mêmes amorces que pour la PCR sur colonies.

Q2 : Expliquez à quoi est due la différence du profil électrophorétique des colonies 1 et 2 ? (1 point)

Q3 : A votre avis, comment s'est faite la disruption du gène *fnt* dans *P. aeruginosa* PAO1 ? (0,5 point)

Q4 : La piste 4 est un contrôle, à votre avis comment a-t-il été obtenu ? (0,5 point)

Ayant obtenu la souche de *P. aeruginosa* PAO1 délétée du gène *fnt* (PAO1 MTF mutant) ils se procurent auprès de collaborateurs la souche d'*E. coli* JM101 délétée du gène *fnt* (JM101 MTF mutant) et analysent le temps de génération de ces souches lorsqu'elles ont été transformées avec une série de plasmides qu'ils ont créés pour cette étude et qui sont décrits dans le **Tableau 1** ci-dessous.

Plasmide	Bactérie destinataire	Gène exprimé
pUCP26	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Aucun (plasmide vide)
pUCP26/ <i>P. aeruginosa</i> MTF	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	MTF <i>P. aeruginosa</i>
pACTN	<i>E. coli</i> JM101	Aucun (plasmide vide)
pACTN/ <i>E. coli</i> MTF	<i>E. coli</i> JM101	MTF <i>E. coli</i>
pACTN/ <i>P. aeruginosa</i> MTF	<i>E. coli</i> JM101	MTF <i>P. aeruginosa</i>

Tableau 1 : Les plasmides pUCP26 et pACTN possèdent comme gène rapporteur la résistance à la tétracycline. Les gènes clonés dans ce plasmide sont sous dépendance du promoteur *Lac*.

Ils transforment les souches de *P. aeruginosa* PAO1 ou PAO1 MTF mutant avec les plasmides pUCP26 ou pUCP26/*P. aeruginosa* MTF et la souche JM101 MTF mutant avec pACTN, pACTN/*E. coli* MTF ou pACTN/*P. aeruginosa* MTF et mesurent le temps de génération des souches transformées (**Fig. 2** ci-dessous) puisque la vitesse de croissance d'une souche est proportionnelle à l'efficacité de sa synthèse protéique.

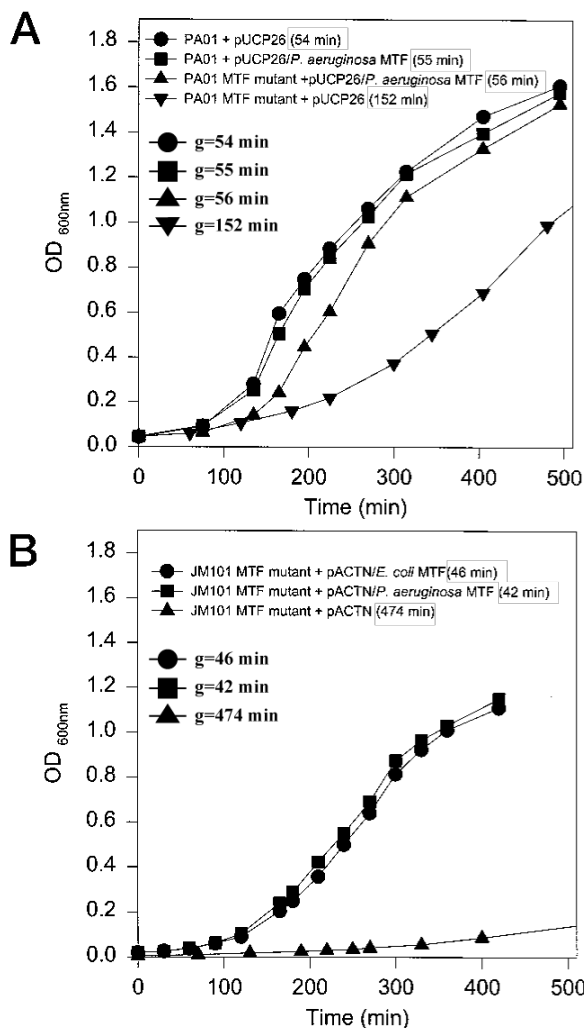


Fig. 2: Phénotype de croissance des souches de *P. aeruginosa* PAO1 sauvage et FMT mutant et d'*E. coli* JM101 FMT mutant. A. Les souches de *P. aeruginosa* PAO1 transformées avec les plasmides décrits dans le **Tableau 1** ont été cultivées à 37 °C en présence de 60 µg/mL de tétracycline et de 1 mM d'IPTG. **B.** Les souches d'*E. coli* JM101 MTF Mutant transformées avec les plasmides décrits dans le **Tableau 1** ont été cultivées à 37 °C en présence de 60 µg/mL de tétracycline et de 1 mM d'IPTG. **A. et B.** Des aliquotes aux temps indiqués ont été prélevées pour en mesurer la DO_{600 nm}. Le temps de génération (g) de chaque souche est indiqué.

Q5 : En comparant les temps de génération des souches, que déduisez-vous de la Fig. 2A ? Justifiez. (1 point)

Q6 : En comparant les temps de génération des souches, que déduisez-vous de la Fig. 2B ? Justifiez (1 point)

Q7 : En comparant les Figs. 2A et 2B quelle hypothèse pouvez-vous émettre concernant l'initiation de la traduction chez *P. aeruginosa* et *E. coli*. (2 points)

Puis les chercheurs mesurent l'activité de formylation des extraits des souches de *P. aeruginosa* PAO1 sauvage et **PAO1 MTF mutant**. Pour cela ils préparent les 2 extraits : ils récupèrent 1,2 mL de culture de chaque souche en phase exponentielle de croissance et induite en présence de 1 mM d'IPTG. Ils centrifugent ces 1,2 mL, récupèrent le culot et lysent les cellules culottées. Le lysat est ensuite centrifugé à 105000 X g et chacun des deux surnageant est mélangé à 3 volumes de tampon de conservation. Ils mesurent la concentration en protéines de ces extraits et les stockent à -20 °C.

Pour mesurer l'activité de formylation, ils aminoacylent, pendant 30 min à 37 °C, l'ARNt_i^{Met} de *P. aeruginosa* PAO1 en présence d'un tampon d'amination contenant de la L-[¹⁴C]Méthionine (Met) radioactive et d'un excès de méthionyl-ARNt synthétase (MetRS) de *P. aeruginosa* PAO1 préalablement purifiée. Après ces 30 min de réaction d'amination ils répartissent ce milieu réactionnel dans 6 tubes différents auxquels ils rajoutent du N¹⁰-formyltetrahydrofolate et des aliquotes de chacun des 2 extraits précédemment préparés (donc 12 tubes en tout) contenant 0, 0,25 µg, 0,5 µg, 1 µg, 2,5 µg et 5 µg de protéines. Après 10 min d'incubation ils rajoutent à ces tubes du sulfate de cuivre (CuSO₄) qui hydrolyse la liaison ester du [¹⁴C]Met-ARNt_i^{Met} mais pas du f[¹⁴C]Met-ARNt_i^{Met} car la formylation du NH₂ de la Met protège la liaison ester du clivage par CuSO₄. Ils précipitent ensuite les aminoacyl-ARNt contenus dans chaque tube, comptent la radioactivité de chaque tube et obtiennent la Fig. 3

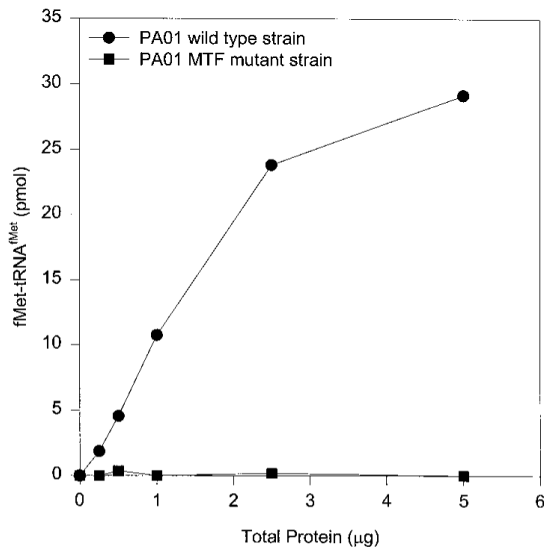
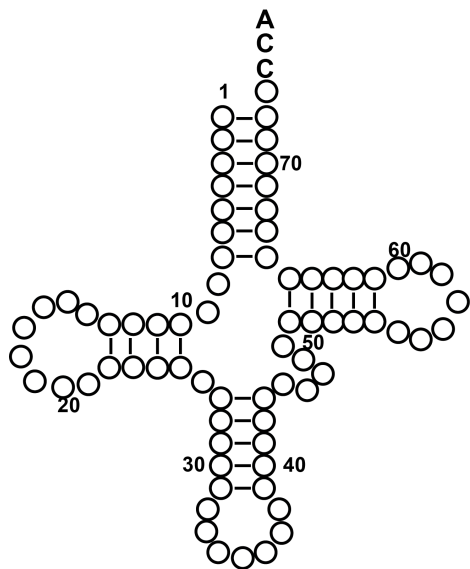


Fig. 3: Activité de formylation du Met-tRNA_i^{Met} par les extraits obtenus à partir de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 sauvage et de *P. aeruginosa* PAO1 FMT mutant. Les extraits ont été préparés comme indiqué ci-dessus à partir des souches de *P. aeruginosa* PAO1 sauvage (●) et de *P. aeruginosa* PAO1 FMT mutant (■) transformées avec le vecteur pUCP26 vide (cf **Tableau 1**). La quantité de f[¹⁴C]Met-tRNA_i^{Met} produite par 0,25 - 5 µg de chacun de ces 2 extraits a été déterminée comme indiqué ci-dessus.

Q8 : Par rapport à l'hypothèse que vous avez émise en répondant à la question Q6, cette expérience vous permet-elle d'affirmer que votre hypothèse était juste ? Justifiez. (1 point)

Q9 : Faites un schéma de l'expérience de mesure de l'activité de formylation du [¹⁴C]Met-tRNA_i^{Met} par les 2 extraits (4 points)



Structure consensus en feuille de trèfle des ARNt