

MASTER DE SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
MENTION BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

UE BMC401 : METHODES EN BIOLOGIE  
MOLECULAIRE ET CELLULAIRE  
Examen du 12 Décembre 2009

**Sujet de Génétique. Durée de l'épreuve : 1 heure maximum**

Depuis le début des années 1990, des souches de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques sont apparues et menacent de devenir un grave problème de santé publique. Dans le but de mieux comprendre ces mécanismes de résistance, on décide de réaliser le clonage du gène responsable de la résistance au Chloramphénicol chez une souche de salmonelles, *Salmonella typhimurium*.

**PARTIE 1:** L'étudiant responsable de ce projet décide de construire une banque d'ADN génomique (ADNg) de cette souche en utilisant le plasmide pUC19 comme vecteur de clonage (carte en annexe) et la souche bactérienne DH5 $\alpha$  d'*Escherichia coli* comme cellule hôte.

Pour cela, il suit la procédure suivante :

- Digestion partielle de l'ADNg de *S. typhimurium* par EcoRI
- Digestion de pUC 19 par EcoRI suivi d'un traitement à la phosphatase alcaline SAP
- Ligation

Avant de poursuivre l'expérience, une vérification de chaque réaction est effectuée comme en travaux pratiques, par électrophorèse sur gel d'agarose des dépôts suivants :

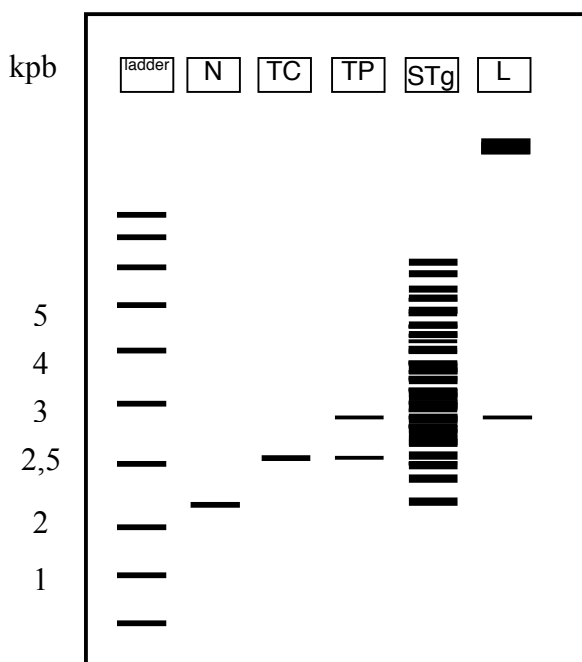
Piste N : plasmide pUC19 natif

Piste TC : pUC19 EcoRI SAP

Piste TP : pUC 19 EcoRI SAP + T4 ADN ligase

Piste STg : ADNg (*S. typhimurium*) EcoRI

Piste L : ADNg (*S. typhimurium*) EcoRI + pUC19 EcoRI SAP + T4 ADN ligase



**Figure 1:** Représentation du gel observé sous UV après coloration au Bet

La piste STg permet de visualiser la traînée (« smear ») attendue après digestion partielle d'un ADNg de grande taille (4,8 Mpb pour la bactérie *Salmonella typhimurium*).

- Q1/ Décrivez et interprétez ce que vous observez dans chacune des autres pistes de la figure 1.

Piste	Observation	Interprétation et conclusion
Ladder	10 bandes discrètes	Mélange de fragments d'ADN <u>db linéaires</u> de taille connue. Etalonnage du gel (pour les FIII uniquement).
N	1 bande discrète entre 2 et 2,5 kb	Migration plus rapide que 2686pb. Forme surenroulée négative (FI) de pUC19, plus compacte.
TC	1 bande discrète entre 2,5 et 3 kb	Taille correspondant au plasmide linéarisé (FIII). <u>Un seul</u> site EcoRI dans pUC19. Digestion efficace (complète).
TP	Deux bandes : 1 identique à TC	Mélange : FIII du plasmide non modifiée par la ligase donc 5'OH
	1 au dessus proche de 3kb	FIII modifiée par la ligase donc 5'P Recircularisation (FIr) SAP partiellement efficace
L	1 bande épaisse >>10kb	Concatémères donc ligase efficace
	1 proche de 3kb identique à TP	FIr comme dans TP (pour les mêmes raisons) donc ligase efficace

L'étudiant décide de poursuivre ; il transforme les bactéries DH5 $\alpha$  avec le contenu du tube L et étale 3/5ème des bactéries transformées sur milieu LBAX.

- Q2/ Dans l'intitulé de ce milieu, à quoi correspondent les initiales A et X ?

A= ampicilline= antibiotique.

X = X-Gal = substrat artificiel de la  $\beta$ -galactosidase.

- Q3/ Décrivez brièvement les raisons pour lesquelles on utilise un tel milieu pour l'étalement après transformation.

A pour sélection des transformants [ $amp^R$ ] : la souche initiale est sensible à l'ampicilline (cf génotype) et le gène de résistance est porté par le plasmide.

X pour observation des transformants [ $\beta gal+$ , bleu].

Précisez ce qui permet de déterminer la nature des plasmides présents dans les colonies bactériennes.

La couleur des colonies !

Si la colonie transformée contient un plasmide vide, elle sera de phénotype [ $\beta gal+$ , bleu] sur milieu X-Gal par le mécanisme d'  $\alpha$ -complémentation :

Le plasmide pUC19 contient une région responsable de la synthèse de la partie N-terminale de la  $\beta$ -galactosidase (peptide  $\alpha$ ), sous contrôle du promoteur/opérateur lac (P/O lacZ) de l'opéron lactose. La présence de pUC19 dans la cellule bactérienne permet donc la synthèse du peptide  $\alpha$ , dépourvu d'activité enzymatique, mais capable de s'associer avec la forme mutée de l'enzyme correspondant à la partie C-terminale de la  $\beta$ -galactosidase, présente dans la souche DH5 $\alpha$  (voir génotype).

L'activité de la  $\beta$ -galactosidase ainsi reconstituée est alors mise en évidence par l'utilisation du X-gal, qui fournit une coloration bleue à la colonie de bactéries lorsqu'il est métabolisé.

Si le plasmide contient un insert au site EcoRI, la synthèse du peptide  $\alpha$  n'est plus possible dans la cellule bactérienne. En conséquence, il ne peut y avoir d' $\alpha$ -complémentation et les transformants restent [ $\beta$ gal-] comme la souche DH5 $\alpha$  initiale. Le X-gal n'est pas métabolisé et les colonies sont [blanches].

Après incubation des boîtes sur la nuit à 37°C, l'étudiant obtient 10 000 colonies dont environ 60% sont bleues et 40% blanches.

- Q4/ Que pensez-vous de ces résultats ? Sont-ils cohérents avec vos conclusions précédentes (Q1) ?

Forte contamination de la banque (les colonies blanches) par des colonies contenant un plasmide vide (les colonies bleues).

Cohérent avec SAP peu efficace et recircularisation par ligase efficace (voir interprétation de la piste L).

PARTIE 2 : Avec les 2/5èmes de bactéries transformées restantes, l'étudiant souhaite réaliser un criblage fonctionnel du gène de résistance au chloramphénicol de *Salmonella typhimurium*.

- Q5/ Comment procède-t-il ?

Étalement de ces bactéries sur milieu LBAX (pour sélectionner les bactéries ayant reçu un plasmide avec insert) additionné de Chloramphénicol (pour sélectionner les inserts contenant le gène de résistance au chloramphénicol).

Cinquante colonies blanches sont obtenues. Après repiquage des bactéries et extraction des plasmides, un séquençage est effectué et révèle qu'ils contiennent tous un insert. Ces inserts se divisent en 2 catégories de taille : Type I (3300 pdb) et Type II (2303pdb) et possèdent tous une ORF commune. La figure 2 montre l'analyse de chaque type d'insert par la fonction ORF map du logiciel DNA Strider.

- Q 6/ Selon vous à quoi correspond cette ORF ?

Au gène de résistance au chloramphénicol de *Salmonella typhimurium*.

- Q 7/ Dans la figure 2 surlignez en couleur la (les) cds du ou des gène(s) putatif(s) de chaque insert. Une CDS commence par un  $5'ATG 3'$  et finit par un stop (voir feuille annexe).

Pour l'insert de type I sens B, représentez à l'échelle dans le cadre prévu à cet effet un schéma d'ADN double brins (orientés) sur lequel vous indiquerez la (les) cds en positionnant les éléments de régulation de la transcription et de la traduction ainsi que le sens de transcription. Voir feuille annexe.

L'analyse des cinquante plasmides du criblage fonctionnel montre que l'insert de type I est présent dans les deux sens de clonage, tandis que l'insert de type II n'est présent qu'en sens B.

- Q 8/ Comment expliquez-vous que le criblage fonctionnel puisse donner l'insert de type I dans les deux sens ?

Deux raisons exigées :

1) Clonage EcoRI dans EcoRI, non orienté.

2) Le sens d'insertion n'a pas d'influence sur l'expression de la résistance au chloramphénicol, ce qui démontre une expression de ce gène à partir de son propre promoteur dans l'insert de type I.

- Q 9/ Pourquoi l'insert de type II est-il toujours obtenu en sens B ?

Nous savons que le clonage est non orienté donc ce n'est pas un problème d'insertion. Pour observer un fragment dans l'expérience menée ici, il faut toutefois qu'il confère la résistance au chloramphénicol ! Si on observe la figure, l'insert de type II commence juste avant l'ATG donc on peut supposer l'absence du promoteur situé en amont, ce qui expliquerait la non-expression. En sens B, présence du promoteur P/OlacZ du plasmide (avec sens de transcription de droite à gauche), permettant une fusion transcriptionnelle, et donc l'expression du gène de résistance.

Comment le gène qu'il contient est-il exprimé en protéine ?

La transcription a lieu à partir du promoteur P/OlacZ du plasmide, transcrit de droite à gauche comme le gène de résistance.

La traduction commence :

- soit à l'ATG de lacZ, et dans ce cas, le gène de résistance au chloramphénicol doit être en phase avec cet ATG.
- soit à l'ATG même du gène de résistance au chloramphénicol.

#### Annexe : Carte du vecteur plasmidique pUC19

