Lycée Valentine LABBÉ
41 rue Paul DOUMER – BP 20226
59563 LA MADELEINE CEDEX
CLASSE PRÉPARATOIRE TB
(Technologie & Biologie)

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

Complément BIO6

TD Techniques de biologie moléculaire, génie génétique et biotechnologies

Activité 1. *Southern Blot*

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 myofilaments étant remplacés par des mitochondries qui ont proliféré. À partir de biopsies musculaires, l'ADN cellulaire est purifié, digéré par l'endonucléase 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'endonucléase 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 ?

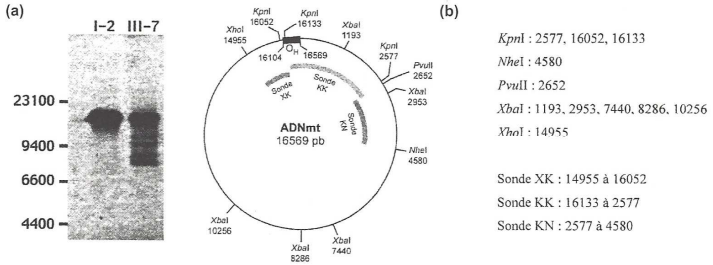


FIGURE TP12.7 Résultat d'un Southern blot **(a)** et structure de l'ADNmt **(b)**.
(a) I2 est un individu sain. III-7 est le patient malade. À gauche : marqueurs de taille (pb). **(b)** l'ADNmt humain est un ADN double brin circulaire de 16 569 pb (paires de bases). Les sites de clivage de 5 endonucléases de restriction sont indiqués à droite de la carte.

D'après PEYCRU *et al.* (2013)

Activité 2. *Northern Blot*

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.

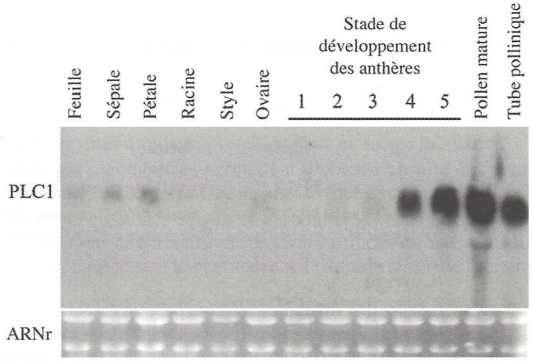


FIGURE TP12.8 Analyse par Northern blot du gène PLC1.
Vingt µg d'ARN total de *Petunia inflata* ont été isolés de chaque tissu indiqué en haut de la photographie (pour les anthères : 1 = développement des microspores dans la configuration en tétrade ; 2 = microspores uninucléées libres ; 3 = microspores 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.

D'après PEYCRU *et al.* (2013)

Activité 3. Puce à ADN

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 $I^+P^+O^+Z^+$ et la souche mutante pour la séquence de contrôle o^- 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 o^-.

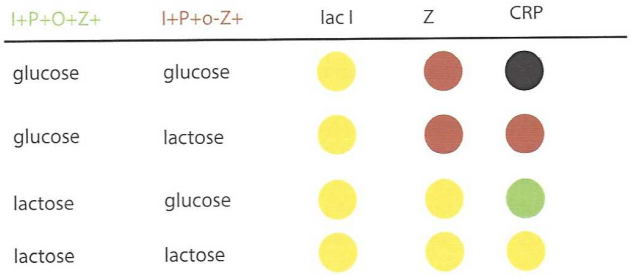


FIGURE TP12.9 Résultat d'une puce à ADN pour l'étude de l'opéron lactose.

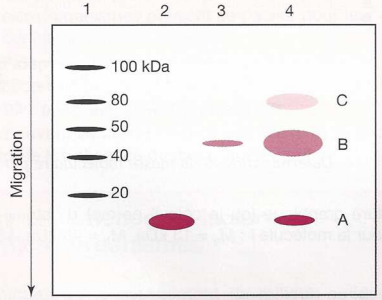
Souche sauvage $I^+P^+O^+Z^+$, souche mutée $I^+P^+o^-Z^+$; En vert : ARNm de la souche sauvage ; en rouge : ARNm de la souche mutée ; en jaune : fluorescence verte + fluorescence rouge ; en noir : aucun signal fluorescent.

D'après PEYCRU *et al.* (2013)

Activité 4. Électrophorèse sur blanc d'œuf

Identification et détermination de la taille des protéines du blanc d'œuf

La figure représente les résultats d'un SDS-PAGE réalisée à partir d'extraits de blanc d'œuf.



Électrophorèse de blanc d'œuf en conditions dénaturantes. Puits 1 : marqueurs de masses moléculaires ; puits 2 : lysozyme ; puits 3 : ovalbumine ; puits 4 : blanc d'œuf.

8.1 Rappelez le principe de l'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

8.2 Analysez le résultat obtenu.

8.3 Tracez la courbe représentant le logarithme de la masse moléculaire des marqueurs (en kDa) en fonction de leur distance de migration (en mm).

8.4 Déterminez la masse des molécules contenues dans le blanc d'œuf.

Conseils méthodologiques

En SDS-PAGE, la distance de migration des molécules est proportionnelle au logarithme de leur masse.

Les distances de migration sont les suivante :

d_{100} = 8 mm ;
d_{80} = 15 mm ;
d_{50} = 28 mm ;
d_{40} = 35 mm ;
d_{20} = 56 mm.

d_A = 68 mm ;
d_B = 32 mm ;
d_C = 14 mm.

D'après GODINOT *et al.* (2010)

Éléments de correction

A. Activité 1

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.

D'après PEYCRU *et al.* (2013)

B. Activité 2

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.

D'après PEYCRU *et al.* (2013)

C. Activité 3

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 o^- 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.

D'après PEYCRU *et al.* (2013)

D. Activité 4

8.1

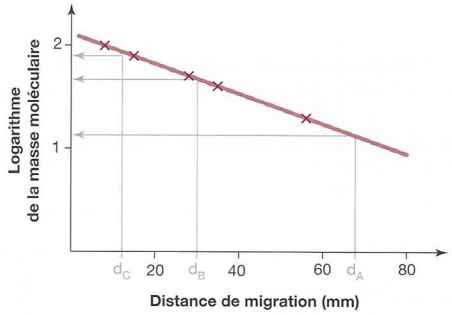
8.2 Les molécules mises en évidence ici sont des protéines. La figure 30 montre que l'électrophorèse de blanc d'œuf permet d'obtenir trois bandes, qui correspondent à trois protéines différentes. La protéine A migre à la même distance que le lysozyme, la protéine B à la même distance que l'ovalbumine. La protéine C ne correspond à aucun témoin, on ne peut pas l'identifier (il s'agit de la conalbumine). Par comparaison aux marqueurs de poids moléculaires, on peut néanmoins dire que sa taille est aux environs de 75 kDa. La bande B est la plus large. On en déduit que l'ovalbumine est la protéine la plus abondante du blanc d'œuf.

8.3 La figure représente le logarithme de la masse moléculaire *M* des marqueurs en fonction de leur distance de migration *d*. La modélisation mathématique de la courbe donne : $\log M = \frac{144 - d}{68}$.

Calculs préliminaires à l'établissement de la figure :

M (kDa)	log M	d_M (mm)
100	2	8
80	1,8	15
50	1,7	28
40	1,6	35
20	1,3	56

Tableau



Détermination de la masse moléculaire par électrophorèse.

8.4 La lecture graphique (ou le calcul) permet d'obtenir les masses M_i suivantes pour la molécule *I* : M_a = 13 kDa, M_b = 45 kDa, M_c = 80 kDa.

D'après GODINOT *et al.* (2010)

Références

ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER (2004). *Biologie moléculaire de la cellule. Quatrième édition.* Traduction de la quatrième édition américaine (2002) par F. LE SUEUR-ALMOSNI. Flammarion, Paris. Première édition américaine 1983 (1986 1e édition française).

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.* 2e édition (1e édition 2012), Dunod, Paris.

BREUIL, M. (2007). *Biologie 1re année BCPST-véto.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

BREUIL, M. (2009). *Biologie 2e année BCPST-véto.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

CAMPBELL, N. A. & J. B. REECE (2004). *Biologie.* De Boeck Université, Bruxelles, 2e édition (1e édition 1995).

[CAMPBELL, N. A.], J. B. REECE, L. A. URY, M. L. CAIN, S. A. WASSERAMN, P. V. MINORSKY, R. B. JACKSON (2012). *Campbell Biologie.* Adaptation française J. FAUCHER & R. LACHAÎNE. Pearson, Paris (4e edition).

DENŒUD, J., T. FERROIR, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON, M.-L. PONS & F. TEJEDOR (2011). *Biologie-Géologie BCPST-véto 2e année.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

DENŒUD, J., C. GODINOT, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON & F. TEJEDOR (2013). *Biologie-Géologie BCPST-véto 1e année.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

DENŒUD, J., C. GODINOT, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON, M.-L. PONS & F. TEJEDOR (2014). *Biologie-Géologie BCPST-véto 2e année.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

GODINOT, C., H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON & F. TEJEDOR (2010). *Biologie-Géologie 1re année BCPST-véto.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

LAFON, C. (2003). *La biologie autrement. 100 questions de synthèse.* Ellipses, Paris.

LATRUFFE, N. (dir.), F. BLEICHER-BARDETTI & J. VAMECQ (2014). *Biochimie. Tout le cours en fiches. Licence. PACES-UE1. CAPES.* Dunod, Paris.

LIZEAUX, C, D. BAUDE et collaborateurs (2012). *Sciences de la Vie et de la Terre Terminale S enseignement obligatoire.* Bordas, Paris.

MORÈRE, J.-L., R. PUJOL (coord.), J.-C. CALLEN, L. CHESNOY, J.-P. DUPONT, A.-M. GIBERT-TANGAPREGASSOM, G. RICOU, N. TOUZET (dir.) et colloborateurs (2003). *Dictionnaire raisonné de Biologie.* Frison-Roche, Paris.

PEYCRU, P. (dir.), J.-F. FOGELGESANG, D. GRANDPERRIN, B. AUGÈRE, J.-C. BAEHR, C. PERRIER, J.-M. DUPIN & C. VAN DER REST (2010*a*). *Biologie tout-en-un BCPST 1re année.* Dunod, Paris, 2e édition (2009), réimpression corrigée (2010) (1e édition 2006).

PEYCRU, P. (dir.), J.-C. BAEHR, F. CARIOU, D. GRANDPERRIN, C. PERRIER, J.-F. FOGELGESANG & J.-M. DUPIN (2010*b*). *Biologie tout-en-un BCPST 2e année.* Dunod, Paris, 2e édition (1e 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 1re année.* Dunod, Paris, 3e édition (1e 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 (2014). *Biologie tout-en-un BCPST 2e année.* Dunod, Paris, 3e édition (1e 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, 2e édition (1e édition 2010).

RICHARD, D. (dir.), P. CHEVALET, S. FOURNEL, N. GIRAUD, F. GROS, P. LAURENTI, F. PRADÈRE & T. SOUBAYA (2015). *Biologie. Tout le cours en fiches. Licence. CAPES. Prépas.* Dunod, Paris, 3e édition (1e édition 2010).

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

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

© 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 décembre 2015 (ATS Bio) • Dernière actualisation : janvier 2019.

Contact : Tanguy.Jean4@gmail.com

Adresse de téléchargement : http://tanguyjean.businesscatalyst.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.