

AGREGATION
DES
SCIENCES DE LA VIE
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
Concours externe 2002

Epreuves d'admission

Travaux pratiques d'option

Candidats du secteur A
durée totale 6 heures.

Date : samedi 15 juin 2002

Nom :

Prénom :

Ce livret contient 14 pages de texte numérotées

Répondez directement sur les feuilles dans les espaces prévus à cet effet. Même en cas de non réponse, rendez la totalité des feuilles en indiquant vos nom, prénom et numéro de salle en tête de chaque feuille.

L'épreuve est constituée de 3 exercices indépendants appliqués à l'étude de l'expression d'une enzyme bactérienne, la β -galactosidase d'*Escherichia coli* :

- ◆ Exercice 1 (travail expérimental)
barème : 28 / 40
durée conseillée : 4h30
- ◆ Exercice 2 : Régulation de l'expression des activités β -galactosidase et lactose perméase
barème : 6 / 40
durée conseillée 45 min
- ◆ Exercice 3 : Interactions ADN - protéines
barème : 6 / 40
durée conseillée 45 min

Attention: l'accès aux appareils est programmé ; vous disposez de plages horaires fixes pour les mesures d'absorbance et les centrifugations ; suivez les consignes données page 2 et commencez les exercices 2 et 3 dès que possible.

**AVANT DE RENDRE VOTRE COPIE, VERIFIEZ QUE VOUS AVEZ BIEN INDIQUE VOS
NOM, PRENOM ET NUMERO DE SALLE EN TETE DE CHAQUE FEUILLE**

EXERCICE 1. ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE SYNTHÈSE DE LA β -GALACTOSIDASE PAR DES BACTÉRIES

(3 heures de travail expérimental proprement dit réparti sur les 4h30 selon un planning distribué à chaque candidat et indiquant les plages horaires d'accès au matériel: spectrophotomètres et centrifugeuse)

Chaque candidat dispose de prélèvements de cultures de 2 souches d'*Escherichia coli* isogéniques: une souche de type sauvage (WT) et une souche mutante (*lacI*A ou *lacI*B), du fait d'une mutation dans un gène nommé *lacI*.

Pour chaque souche, la culture a été réalisée en présence ou non d'un analogue du lactose non métabolisé par les bactéries, l'IPTG (iso-propyl-thio-galactoside).

Les prélèvements de 2 mL de chacune de ces 4 cultures ont été effectués à différents temps ; t_0 , correspond au moment de remise en culture après addition ou non d'IPTG.

Ces prélèvements ont été conservés sur glace, ce qui assure la conservation des propriétés étudiées ci-dessous.

MATÉRIEL:

- 32 tubes Eppendorf de 1,5 mL
- 110 tubes "cristal" de 5 mL
- 11 cuves de 2 mL pour spectrophotomètre
- 1 becher avec de l'eau de javel
- 1 pipette automatique (Pipetman) de 0 à 1000 μ L (P1000) (graduation: 075 correspond à 750 μ L)
- 1 boîte de cônes bleus pour P1000
- 1 pipette automatique (Pipetman) de 0 à 200 μ L (P200) (graduation: 075 correspond à 75 μ L)
- 1 boîte de cônes jaunes pour P200
- 1 calculette
- 1 marqueur encre indélébile
- spectrophotomètres (accès selon un planning qui sera distribué)
- centrifugeuse Eppendorf (accès selon un planning qui sera distribué)
- papier absorbant (à côté des spectrophotomètres)

SOLUTIONS:

sur glace:

- 8 prélèvements de la culture WT - IPTG (série WT1)
- 4 prélèvements de la culture WT + IPTG (série WT2)
- 4 prélèvements de la culture *lacI* (A ou B) - IPTG (série A1 ou B1)
- 4 prélèvements de la culture *lacI* (A ou B) + IPTG (série A2 ou B2)
- solution de BSA à 1 mg/mL
- 40 mL de réactif de Bradford prêt à l'emploi (B)
- 7 mL de solution d'ONPG à 0,4% (ONPG)
- 25 mL de tampon Z (Z)

à température ambiante:

- 15 mL de milieu LB (LB) (milieu de croissance des bactéries)
- 2 mL de tampon de lyse (TL)
- 10 mL d'eau distillée stérile (H_2O)
- 15 mL de Na_2CO_3 1M (Na_2CO_3)

Ne jamais oublier d'identifier vos tubes

PLANNING D'ORGANISATION DE L'EXERCICE 1

Attention: l'accès aux appareils est programmé: vous disposez de plages horaires fixes pour les mesures d'absorbance et les centrifugations; suivez les consignes ci-dessous et commencez les exercices 2 et 3 dès que possible.

1. Préparation d'extraits bactériens (§ 1.2.1. page 5)

- transférer 1 mL de chaque prélèvement dans un tube Eppendorf de 1,5 mL
- centrifuger
- remettre en suspension le culot dans du tampon de lyse

2. Croissance des bactéries (§ 1.1. page 3)

- transférer 0,5 mL de chaque prélèvement de la culture WT1 dans des tubes
- prendre les mesures d'absorbance à 600 nm

3. Pendant les 20 min de fin d'incubation des extraits:

- identifier les 36 tubes de 5 mL pour les dosages de protéines (§ 1.2.2. page 5)
- identifier les 33 tubes de 5 mL pour les dosages de β -galactosidase (§ 1.2.3. page 7)

4. Préparation d'extraits bactériens (§ 1.2.1. page 5)(suite)

- centrifuger
- transférer les extraits dans des tubes Eppendorf

5. Dosage des protéines dans les extraits (§ 1.2.2. page 5)

- transférer les échantillons dans les tubes
- ajouter le réactif de Bradford
- laisser incuber 5 min
- prendre les mesures d'absorbance à 595 nm

6. Vous disposez d'1h40 avant l'accès au spectrophotomètre pour les mesures d'absorbance à 420 nm. Pendant la première heure: répondre aux questions 1.1.2., 1.1.3., 1.1.4., 1.2.2.2. et voir les exercices 2 et 3

7. Dosage de l'activité β -galactosidase dans les extraits (§ 1.2.3. page 7)

- transférer les échantillons dans les tubes
- ajouter 180 μ L d'eau stérile
- ajouter le tampon Z
- ajouter l'ONPG à 0,4%
- laisser incuber 30 min
- ajouter le Na_2CO_3
- prendre les mesures d'absorbance à 420 nm

8. Pendant le temps qui reste, répondre aux questions 1.2.4.1., 1.2.4.2. et 1.5.; terminer les exercices 2 et 3 si nécessaire.

1.1. Croissance des bactéries

La croissance bactérienne sera étudiée pour la souche sauvage en absence d'IPTG (série WT1). Il a été vérifié que les différentes souches étudiées présentent des courbes de croissance similaires entre elles et en présence ou non d'IPTG.

Vous disposez de 8 prélèvements effectués avant et après le t_0 .

La concentration d'une culture est estimée d'après son absorbance à 600 nm. Une unité de A_{600nm} lors de la croissance exponentielle des bactéries correspond approximativement à une concentration de 5×10^8 cellules/mL.

- Transférer 0,5 mL de chacun des 8 prélèvements dans un tube de 5 mL.
- Ajouter 1,5 mL de milieu LB.
- Préparer un tube "blanc" contenant 2 mL de milieu LB
- Toutes les mesures d'absorbance à 600 nm seront effectuées en même temps. Porter vos tubes à côté du spectrophotomètre, transférer à tour de rôle leur contenu dans une cuve de spectrophotomètre et mesurer l'absorbance à 600 nm (A_{600nm}). Utiliser la même cuve pour toutes les mesures. Après chaque mesure, vider le contenu de la cuve dans le tube correspondant à la mesure et éliminer le liquide restant dans la cuve en retournant celle-ci sur du papier absorbant.

1.1.1. Rassembler vos résultats dans le tableau 1.

Tableau 1 : A_{600nm}

A_{600nm} du LB:

temps après la mise en culture (h min)	0	1h	2h (t_0)	3h30 (t_1)	5h (t_2)	6h30 (t_3)	8h	10h
souche WT								

1.1.2. Évaluer la concentration bactérienne (bactéries/mL)

temps après la mise en culture (h min)	0	1h	2h (t_0)	3h30 (t_1)	5h (t_2)	6h30 (t_3)	8h	10h
souche WT								

1.1.3. Porter les résultats (courbe de croissance) sur papier millimétré : bactéries/mL = f(temps).

1.1.4. Commenter la courbe de croissance : préciser les différentes phases et ce qu'elles représentent; commenter le choix du t_0 , moment d'addition de l'IPTG et début des mesures d'activité β -galactosidase; déterminer le temps de génération.

1.2. Mesure de l'activité β -galactosidase

1.2.1. Préparation d'extraits bactériens

- Pour les deux souches cultivées et dans les 2 conditions de culture (avec et sans IPTG), transférer 1 mL de chacun des prélèvements (t_0 , t_1 , t_2 et t_3) dans un tube Eppendorf.
- Centrifuger 1 min à 15 000 tours/min.
- Jeter les surnageants dans un bécher contenant de l'eau de Javel.
- Remettre en suspension chaque culot dans 100 μ L de tampon de lyse ; bien mélanger par 5 - 6 "aspiration-refoulement" successifs avec la pipette automatique. **Attention à changer de cône lors du passage d'un tube au suivant.**
- Laisser 15 min à température ambiante.
- Ajouter 300 μ L d'eau distillée stérile.
- Centrifuger 5 min à 15 000 tours/min.
- À l'aide de la pipette automatique, transférer 300 μ L de chaque surnageant (extrait bactérien) dans un tube Eppendorf. Placer les tubes sur glace.

1.2.2. Dosage des protéines dans les extraits bactériens

La méthode dite de Bradford (Anal. Biochem., 1976, **72**, 248-254) qui sera utilisée est une méthode colorimétrique dans laquelle un colorant, le bleu de Coomassie G250, de couleur brune en milieu acide (absorption à 465 nm), devient bleu en se fixant quantitativement aux protéines (absorption à 595 nm). La réaction est quasi-instantanée et se mesure à 595 nm. Le dosage est extrêmement simple et particulièrement sensible (jusqu'à 1 μ g de protéines).

Un dérivé commercialisé du réactif de Bradford sera utilisé: Bio-Rad Protein Reagent.

- Pour chacun des 16 extraits préparer 2 tubes avec 10 μ L d'extrait.
- Pour la gamme étalon de BSA (sérum albumine bovine à 1 mg/mL) préparer 3 tubes avec respectivement 10, 20 et 40 μ L de solution.
- Ne pas oublier un contrôle négatif (40 μ L d'eau distillée).
- À chaque tube, ajouter 1 mL de réactif B (Bio-Rad Protein Reagent prêt à l'emploi c'est-à-dire dilué au 1/5 dans de l'eau distillée).
- Laisser au moins 5 min à température ambiante (la coloration est stable pendant au moins 1 heure).
- Toutes les mesures d'absorbance à 595 nm seront effectuées en même temps. Porter vos tubes à côté du spectrophotomètre, transférer à tour de rôle leur contenu dans une cuve de spectrophotomètre et mesurer l'absorbance à 595 nm (A_{595nm})(utiliser 1 cuve pour le contrôle négatif et la gamme puis 1 cuve pour chaque type de culture soit 5 cuves au total). Après chaque mesure, vider le contenu de la cuve dans le tube correspondant à la mesure et éliminer le liquide restant dans la cuve en retournant celle-ci sur du papier absorbant.

1.2.2.1. Rassembler vos résultats dans le tableau 2.

Tableau 2: A_{595nm}

A_{595nm} du contrôle négatif:

	IPTG	t_0	t_1	t_2	t_3
souche WT	-	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L
	+	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L
souche mutante (préciser la souche) <i>lac i ...</i>	-	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L
	+	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L	10 μ L 10 μ L
solution de BSA à 1 mg/mL		10 μ L 20 μ L 40 μ L			

1.2.2.2. En déduire la concentration protéique de chaque extrait (tableau 3)

Tableau 3 : concentration protéique (mg/mL)

	IPTG	t_0	t_1	t_2	t_3
souche WT	-				
	+				
souche mutante (préciser la souche) <i>lac i ...</i>	-				
	+				

1.2.3. Dosage de β -galactosidase dans les extraits bactériens

La β -galactosidase est une enzyme qui hydrolyse les β -D-galactosides. Le dosage de l'activité est effectué par la mesure de l'hydrolyse de l'orthonitrophényl- β -D-galactoside (ONPG) incolore. L'orthonitrophénol libéré après hydrolyse de l'ONPG est jaune et peut être mesuré par son absorption à 420 nm.

- Pour chaque extrait préparer 2 tubes avec 20 μ L d'extrait.
- Ne pas oublier un contrôle négatif (eau distillée).
- Ajouter à chaque tube 180 μ L d'eau distillée.
- Ajouter à chaque tube 750 μ L de tampon Z.
- Ajouter 200 μ L de solution d'ONPG à 0,4% dans du tampon Z.

- Au bout de 30 minutes, ajouter 450 μL de 1 M Na_2CO_3 .
- Toutes les mesures d'absorbance à 420 nm seront effectuées en même temps. Porter vos tubes à côté du spectrophotomètre, transférer à tour de rôle leur contenu dans une cuve de spectrophotomètre et mesurer l'absorbance à 420 nm ($A_{420\text{nm}}$) (utiliser 1 cuve pour le contrôle négatif puis 1 cuve pour chaque type de culture soit 5 cuves au total). Après chaque mesure, vider le contenu de la cuve dans le tube correspondant à la mesure et éliminer le liquide restant dans la cuve en retournant celle-ci sur du papier absorbant.

1.2.3.1. Rassembler vos résultats dans le tableau 4.

Tableau 4 : $A_{420\text{nm}}$

$A_{420\text{nm}}$ du contrôle négatif:

	IPTG	t_0	t_1	t_2	t_3
souche WT	-	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL
	+	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL
souche mutante (préciser la souche) <i>lac i ...</i>	-	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL
	+	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL	20 μL 20 μL

1.2.4. Détermination de l'activité spécifique

- Calculer l'activité spécifique AS de la β -galactosidase dans les différents échantillons selon:

$$\text{A.S.} = \frac{A_{420 \text{ nm}}}{0,0045} \times \frac{1}{\text{temps}} \times \frac{1}{\text{mg.prot.}}$$

- 0,0045 est la valeur du coefficient d'extinction molaire du produit obtenu par action de la β -galactosidase sur l'ONPG.
- Les mg de protéines sont à déterminer en fonction du volume utilisé pour le dosage de la β -galactosidase.

1.2.4.1. Rassembler vos résultats dans le tableau 5.

Tableau 5 : activité spécifique de la β -galactosidase

	IPTG	t_0	t_1	t_2	t_3
souche WT	-				
	+				
souche mutante (préciser la souche) <i>lac i ...</i>	-				
	+				

1.2.4.2. Reporter vos résultats sur papier millimétré.

1.2.5 Commentaires

1.2.5.1. Que vous indiquent vos résultats concernant l'effet de l'IPTG sur l'activité β -galactosidase?

1.2.5.2. Que pouvez-vous conclure sur l'effet de la mutation du gène *lacI*?

1.2.5.3. Une mesure de la teneur en ARN messager de la β -galactosidase indiquerait une parfaite corrélation entre cette teneur et la valeur de l'activité spécifique de la β -galactosidase. Quelles conclusions pouvez-vous en tirer?

EXERCICE 2. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES ACTIVITÉS β -GALACTOSIDASE ET LACTOSE PERMÉASE

Le tableau ci-dessous donne la valeur des activités β -galactosidase et lactose-perméase d'*Escherichia coli* K12 en présence ou non d'IPTG, chez différentes souches soit haploïdes soit partiellement diploïdes (/).

La β -galactosidase est codée par le gène *lacZ* et la perméase par le gène *lacY*. Les gènes *lacZ* et *lacY* sont organisés en opéron. Les mutants *lacI⁻* et *lacO^c* ont été isolés par la coloration bleue des colonies sur un milieu Xgal en absence de lactose ou d'IPTG: cette coloration révèle l'expression de la β -galactosidase; dans les mêmes conditions les colonies de la souche sauvage sont blanches.

Les résultats sont donnés en activité enzymatique spécifique (unités arbitraires).

génotype	activité β -galactosidase		activité perméase	
	- IPTG	+ IPTG	- IPTG	+ IPTG
<i>lacI⁺ lacZ⁺ lacY⁺</i>	0,2	300	0,05	40
<i>lacI⁻ lacZ⁺ lacY⁺</i>	300	300	6	6
<i>lacI⁺ lacZ⁻ lacY⁺ / lacI⁻ lacZ⁺ lacY⁺</i>	0,2	300	0,05	40
<i>lacI⁺ lacO^c lacZ⁺ lacY⁺</i>	300	300	6	6
<i>lacI⁺ lacO^c lacZ⁺ lacY⁻ / lacI⁺ lacO⁺ lacZ⁻ lacY⁺</i>	300	300	0,05	6
<i>lacI⁺ lacO^c lacZ⁻ lacY⁺ / lacI⁺ lacO⁺ lacZ⁺ lacY⁻</i>	0,2	300	6	6

2.1. Analysez ces résultats. Quelles conclusions pouvez-vous en tirer?

2.2. Pouvez-vous classer les souches que vous avez étudiées pour leur activité β -galactosidase (exercice 1) dans l'un de ces génotypes? Si oui, lequel? (justifiez votre réponse)

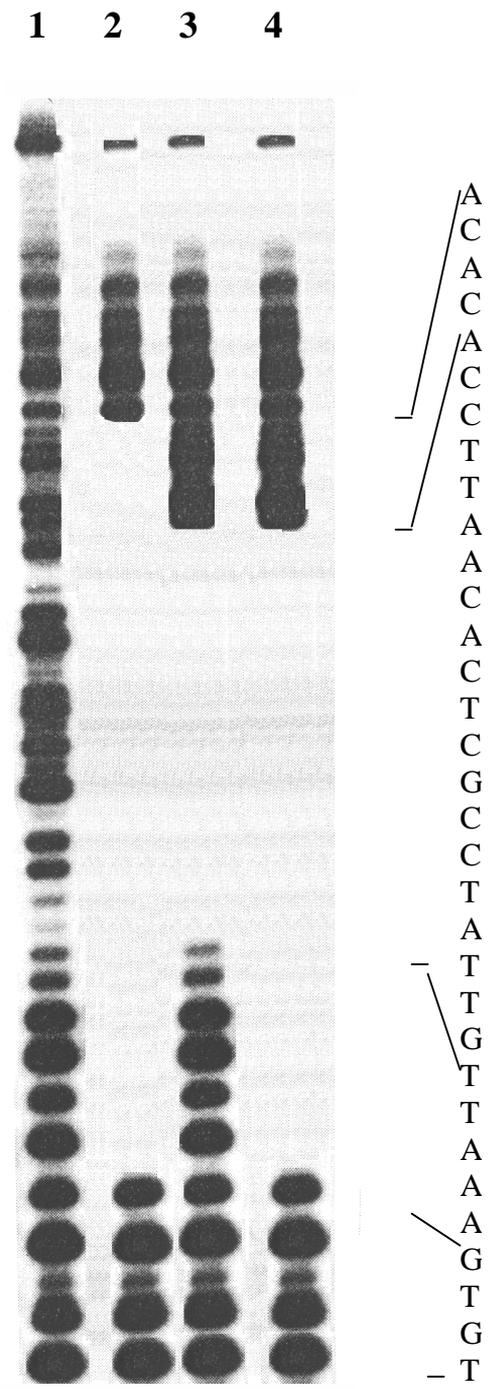
2.3. Établissez, à partir des données dont vous disposez, un schéma récapitulatif de la régulation de l'opéron *lacZ-lacY* d'*E. coli*

2.4. Cette régulation présente-t-elle un intérêt pour les bactéries? Si oui, lequel?

EXERCICE 3. INTERACTIONS ADN - PROTÉINES

3.1. Expérience d'empreinte à la DNase I ("footprinting") réalisée avec l'ARN polymérase et la protéine LacI, individuellement ou en compétition, sur la région chromosomique d'*E. coli* située entre les gènes *lacI* et *lacZ*.

Pour cette expérience, la région d'ADN située en amont du gène spécifiant la β -galactosidase d'*E. coli* a été marquée radioactivement, incubée en présence de protéine (selon les indications) puis soumise à une digestion par la Dnase I.

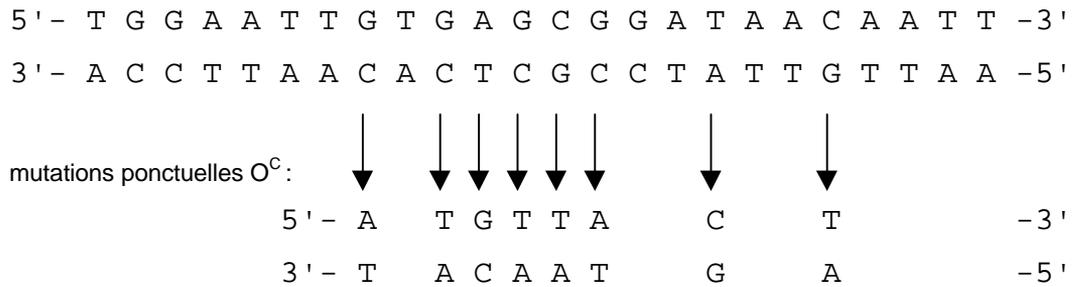


Légende:
 1: sans protéine ajoutée
 2: + ARN polymérase
 3: + protéine LacI
 4: + protéine LacI puis addition d 'ARN polymérase

Analysez cette expérience et concluez.

3.2. IDENTIFICATION DE MUTATIONS O^c

La séquence d'une partie de la région d'ADN utilisée pour l'expérience d'empreinte à la DNase I est donnée ci-dessous. Différentes mutations ponctuelles associées à différents mutants de phénotype O^c ont été identifiées et sont précisées sous la séquence nucléotidique de la région concernée (W. Gilbert et al. 1976, *Control of ribosome synthesis*, Ed. Kjeldgaard, N.O. and Maaloe O., Academic Press).



Que vous apportent ces données complémentaires sur la nature des mutants O^c?