

EXERCICE 1 : manipulation sur le Chironome et exercice de génétique

1.1. Manipulation : extraction des glandes salivaires de Chironome, coloration et montage.

- Poser une larve sur une lame de verre et la laver dans la solution de NaCl. Tirer sur la tête avec une pince en retenant le reste du corps de l'animal avec une autre pince. Le tube digestif est encadré par glandes salivaires gélatineuses et translucides.
Si les glandes salivaires sont restées dans le corps, presser le corps de l'arrière vers l'avant pour les faire sortir
- Transférer les glandes sur une lame portant une goutte d'acide acétique à 45%. Laisser agir 2 minutes. Eliminer l'acide avec le papier filtre. Porter les glandes dans une petite goutte d'acéto-orceïne en attente sur une lamelle ; laisser agir 10 minutes.
- Eliminer le colorant en excès et recouvrir par une lamelle
- Ecraser légèrement en " tapotant " avec un doigt ou la gomme d'un crayon pour dissocier les cellules de la glande.

Observer sous le microscope

Présenter la préparation aux examinateurs.

Dessiner et décrire les éléments colorés en rouge.

1.2. Etude d'une mutation létale chez la Drosophile

Une mutation x, létale récessive, se trouve sur le chromosome 3. On cherche à la localiser par rapport aux locus des gènes e, st, et ca du chromosome 3.

Le tableau 1 présente les mutations utilisées. Elles sont toutes portées par le chromosome 3.

Tableau 1 : nomenclature des mutations utilisées :

allèle mutant	phénotype associé	état dominant ou récessif
e	ebony = corps blanc	récessif
st	scarlet = oeil rouge brillant	récessif
ca	claret = oeil rubis (rouge brique mat)	récessif
Sb	stubbled = soies courtes	dominant
Pr	prickly = soies courtes	dominant
Tb	tubby = abdomen trapu	dominant
x	mutation létale étudiée	récessif

remarque : les doubles mutants st ca ont les yeux orange clair

1.2.1: cartographie des locus des gènes e, st et ca.

On croise

- des femelles hétérozygotes à quatre locus du chromosome 3 : l'un de leurs chromosomes porte les allèles récessifs e, st, ca et x ; l'autre chromosome 3 porte les allèles sauvages dominants aux quatre locus cités . Ces femelles ont été obtenues de la même façon et ont toutes le même génotype.

avec

- des mâles hétérozygotes à cinq locus du chromosome 3 : l'un de leur chromosome porte les mutations e, st, ca et la mutation Pr (soies courtes, dominante), l'autre porte les allèles sauvages correspondants et la mutation Tb (abdomen trapu). Ces mâles ne portent pas la mutation x. Ces mâles ont été obtenus de la même façon et ont tous le même génotype.

On rappelle qu'il n'y a pas de crossing-over chez le mâle de la Drosophile.

Le tableau 2 donne le résultat du dénombrement des catégories phénotypiques des individus obtenus qui sont à soies courtes et abdomen normal (on a donc éliminé les individus de la descendance à soies normales et abdomen trapu).

Tableau 2 : Effectifs dans la descendance :

Catégories phénotypiques	effectifs
e st ca	945
+ + +	1047
e st +	443
+ + ca	399
+ st +	345
e + ca	369
e + +	163
+ st ca	155
nombre total de mouches	3866

1.2.1.a. Schématiser le croisement et l'analyse réalisés en représentant le génotype des individus pour les marqueurs considérés.

1.2.1.b. Pourquoi, dans l'analyse de la descendance, sélectionne-t-on les individus à soies courtes et abdomen normal et élimine-t-on ceux à soies normales et abdomen trapu ? Quel est l'intérêt de ce croisement et de l'analyse réalisée ?

1.2.1.c. Positionner les loci st, e et ca sur une carte génétique, déterminer les distances génétiques qui les séparent.

1.2.2: caractérisation de la mutation létale x

Pour chaque catégorie du tableau 2, on prélève 50 mâles que l'on croise chacun avec une femelle de la souche S_x , hétérozygote à six locus du chromosome 3 : l'un des chromosomes porte les allèles récessifs e, st, ca et x ; l'autre chromosome 3 porte les allèles sauvages dominants à ces quatre locus, et les mutations dominantes Sb et Tb (soies courtes et corps trapu). On précise que la souche S_x est particulière : il ne peut pas y avoir de recombinaisons lors de la méiose entre les deux chromosomes 3 homologues.

On observe pour chacun des mâles considérés, la capacité à produire des descendants autres que ceux à soies courtes (Sb et Pr). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 3.

Tableau 3 : nombre de mâles dont la descendance (autre que à soies courtes) est viable ou non.

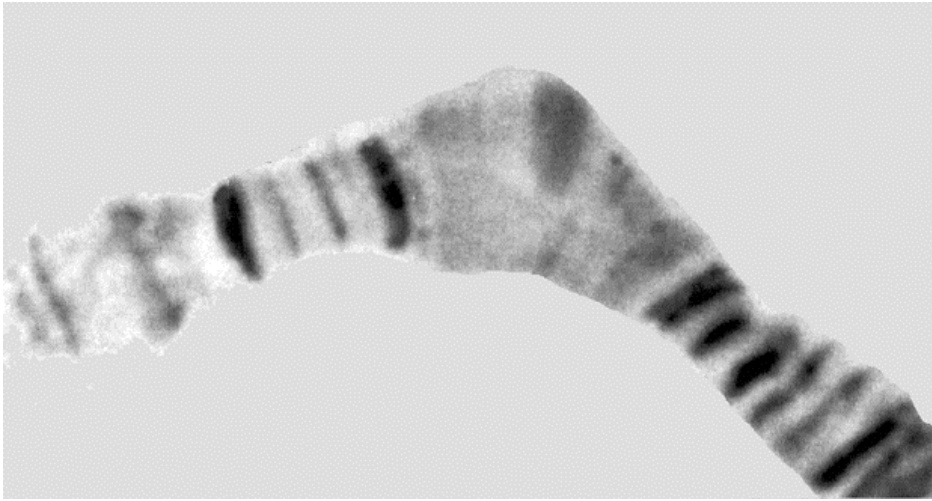
(+ = obtention de descendants viables, - = pas de descendants observés)

catégorie	descendance	résultat
e st ca	+	5
	-	45
+ + +	+	47
	-	3
e st +	+	7
	-	43
+ + ca	+	48
	-	2
+ st +	+	22
	-	28
e + ca	+	27
	-	23
e + +	+	24
	-	26
+ st ca	+	25
	-	25

1.2.2.a. Schématiser le croisement et son intérêt. Pourquoi élimine-t-on les descendants à soies courtes ?

1.2.2.b. Localiser, en le justifiant, la mutation x de façon relative par rapport aux mutations e, ca et st. On ne cherchera pas à déterminer de distances génétiques.

Après écrasements de glandes salivaires de larves de drosophiles possédant la mutation x, préparées comme dans la partie 1.1 de l'exercice, l'observation du chromosome 3 révèle une région représentée sur la microphotographie ci-dessous.



1.2.2.c. Réaliser un schéma explicatif de cette microphotographie et formuler une hypothèse quant à la nature cytologique de la mutation x.

EXERCICE 2 : Étude cinétique de la β -galactosidase d'*Escherichia coli*

L'activité de la β -galactosidase est déterminée *in vitro* par la mesure de la vitesse d'hydrolyse d'un substrat artificiel, l'ONPG (orthonitrophenyl-b-D-galactopyranoside) en galactose (incolore) et orthonitrophénol.

La β -galactosidase agit à pH 7.5.

En solution aqueuse, l'orthonitrophénol possède les propriétés d'un acide faible et peut se dissocier en ion orthonitrophénate conférant une coloration jaune à la solution (pic d'absorption à la lumière de longueur d'onde 420 nm).



La quantité d'orthonitrophénol libérée par l'enzyme sera déterminée par une simple mesure d'absorbance à 420 nm ($A_{420\text{nm}}$).

2.1. Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse de réaction

L'activité d'une préparation purifiée de β -galactosidase, à une concentration C_e en mg de protéine par mL de tampon TS, est mesurée en fonction du temps d'incubation avec son substrat, l'ONPG, dans le tampon TS, et ce pour différentes dilutions de la solution-mère d'enzyme.

Le milieu réactionnel (10 mL) contient le tampon TS, le substrat et la β -galactosidase à différentes concentrations ($0,5C_e$, $0,25C_e$ et $0,125C_e$). La réaction est amorcée par addition de l'enzyme et, en fonction du temps, des fractions aliquotes de 1 mL sont retirées de chaque tube et transférées dans des tubes à hémolyse contenant 1 mL de Na_2CO_3 à une concentration 1M.

Le choix des concentrations en substrat autorise l'utilisation de la loi de Beer-

$$\text{Lambert : } \mathbf{A = \epsilon \cdot l \cdot C}$$

A = absorbance

l = longueur de la cuve traversée par le faisceau (= 1 cm)

C = concentration de la substance (en mol.L^{-1})

ϵ = coefficient d'extinction molaire. Pour l'ion orthonitrophénate, $\epsilon = 4750 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

2.1.1. Quels intérêts présente l'addition du Na_2CO_3 avant la lecture de l'absorbance ?

2.1.2 Compléter le protocole de préparation des 3 dilutions d'enzyme qui vont être testées, en remplissant les cases vides du tableau 1.

tableau 1 :

	Dilution d'enzyme n°1	Dilution d'enzyme n°2	Dilution d'enzyme n°3
concentration finale de l'enzyme	0,50 C _e	0.25 C _e	0.125 C _e
Volume de la solution d'ONPG	2 mL	2 mL	2 mL
Volume de solution-mère d'enzyme (concentration C _e)			
Volume de tampon TS			
Volume réactionnel total	10 mL	10 mL	10 mL

2.1.3. Le tableau 2 ci-dessous indique les absorbances obtenues pour les différentes concentrations d'enzyme.

tableau 2 :

	0,50 C _e	0.25 C _e	0.125 C _e
t = 0 min	~ 0	~ 0	~ 0
t = 5 min	0,18	0,09	0,04
t = 10 min	0,35	0,18	0,09
t = 15 min	0,52	0,27	0,13
t = 20 min	0,69	0,36	0,17
t = 30 min	0,88	0,53	0,26
t = 40 min	0,99	0,68	0,35

Représenter l'évolution de l'absorbance A_{420nm} en fonction du temps d'incubation pour les 3 concentrations utilisées d'enzyme.

papier millimétré

2.1.4. Ecrire la relation qui relie l'absorbance à la vitesse de réaction.

2.1.5. Exploiter et commenter les résultats obtenus.

2.2. Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de réaction - Action d'un effecteur.

Le milieu réactionnel (1mL), contient l'enzyme et des concentrations variables d'ONPG ($5 \cdot 10^{-5} < [S] < 5 \cdot 10^{-3}$). Un effecteur A est rajouté ou non suivant les cas, à différentes concentrations.

Rédigez de façon claire et précise. Répondez dans les cadres prévus. Vous pouvez, en le signalant, utiliser exceptionnellement le verso des feuilles pour compléter certaines réponses. Ne séparez pas les feuilles de l'énoncé

Au bout de 10 minutes on rajoute 1ml de Na_2CO_3 à 1M. On mesure l'absorbance à 420 nm.

Le tableau3 ci-dessous indique les absorbances obtenues.

tableau 3 : Absorbance à 420 nm

concentration ONPG [S]		$5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	10^{-4} M	$2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	10^{-3} M	$5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
n° réaction	Acondition						
1	sans effecteur	0.08	0.13	0.21	0.28	0.33	0.39
2	effecteur A à la concentration Y	0.04	0.07	0.15	0.21	0.27	0.38
3	effecteur A à la concentration 2 Y	0.03	0.05	0.10	0.16	0.23	0.36

2.2.1. Déterminer graphiquement les paramètres les paramètres cinétiques de la réaction (K_m et V_m) en absence d'inhibiteur.

papier millimétré

**2.2.2. En considérant l'influence des deux concentrations d'effecteur sur la cinétique précédente, définir l'action de cet effecteur. Donner les paramètres cinétiques de cet effecteur (K_i) aux concentrations données sachant que $Y = 2 \cdot 10^{-4} \text{ Mol.L}^{-1}$
Conclure.**