

A- Le génome d'un bactériophage à ADN double brin a été isolé et sa séquence nucléotidique a été déterminée (5000 paires de bases). Afin d'avoir plus de renseignements sur la structure de son génome, l'ADN du bactériophage est digéré par plusieurs enzymes de restriction et les fragments obtenus sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose suivi d'une coloration au bromure d'éthidium (pistes 1-5, figure 1).

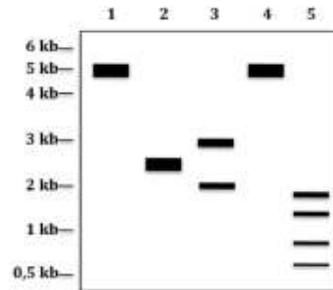


Figure 1: Electrophorèse en gel d'agarose des fragments de restriction obtenus après digestion de l'ADN du bactériophage. Piste 1: témoin, ADN non digéré ; piste 2: EcoRI ; piste 3: BamHI; piste 4: HindIII ; et piste 5: PvuII. NB : Tous les fragments obtenus sont présents sur le gel.

- Que pouvez-vous dire sur la structure de ce génome ? Justifiez votre réponse en interprétant tous les résultats expérimentaux obtenus à l'issue des différentes réactions de digestion effectuées.

- Donnez le nombre de fragment(s) que l'on obtiendrait lors des doubles digestions décrites dans le tableau ci-dessous :

Enzymes de restriction	Nombre de fragments obtenus
<i>Eco RI + Bam HI</i>	?
<i>Bam HI + Hind III</i>	?
<i>Eco RI + Pvu II</i>	?

Tableau 1 : Doubles digestions du génome du bactériophage.

B- Vous voulez faire un clonage du fragment d'ADN « oriC » de E.coli (245 pb) dans le plasmide pB (6 kpb) à la place de l'origine de répllication (Ori) de pMB1 voir figure1.

I- Obtention du fragment d'ADN « oriC » :

La séquence ADN d'intérêt est isolée et amplifiée par la technique de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) à partir d'une préparation d'ADN génomique de *E.coli*. La séquence de la région de l'ADN contenant l'oriC est connue et donnée dans la figure 1. Le produit de PCR obtenu est soumis à une double hydrolyse par les enzymes de restriction HindIII et EcoRI.

Q1: Donner la séquence du couple d'amorces (15 nucléotides) nécessaire à l'amplification par PCR de la totalité du fragment d'ADN oriC, donné en figure 1.

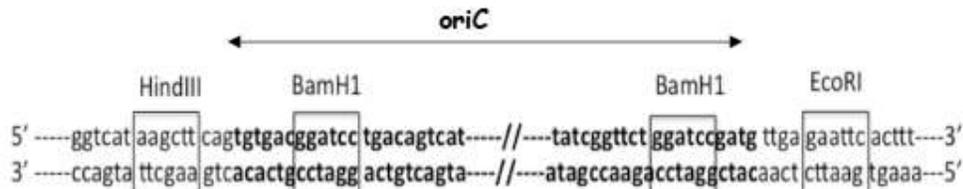


Figure 1 : séquence partielle du génome de coli, la partie en gras correspond à **OriC**

II- Obtention et sélection d'un plasmide recombinant pB-oriC :

L'étape suivante consiste à insérer le fragment d'ADN oriC, amplifié et hydrolysé dans le plasmide pB, figure 2. Le plasmide pB a été préalablement hydrolysé par les mêmes enzymes de restriction (HindIII et EcoRI) et le plus grand fragment obtenu a été purifié.

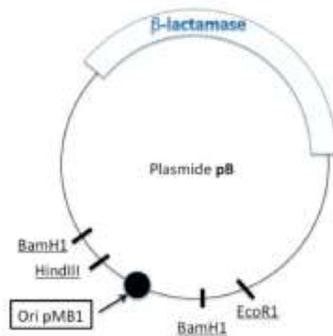


Figure 2 : carte partielle du plasmide pB.

Le produit de PCR hydrolysé et le grand fragment du plasmide pB sont alors mélangés et incubés en présence de l'ADN ligase du bactériophage T4 dans une solution tampon adéquate. Les produits de la réaction de ligation sont utilisés pour transformer des bactéries compétentes. Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu gélosé sélectif sur lequel seules les bactéries transformées peuvent croître et se multiplier en formant des colonies isolées.

Q2 : Définir les termes suivants :
Bactéries compétentes
Bactéries transformées

Q3: Quel agent de sélection est utilisé dans le milieu gélosé lors des étalements des bactéries transformées ? Justifier votre réponse.

III- Etude *in vitro* de la réplication : rôle des protéines DnaA

Le plasmide recombinant pB-oriC est utilisé comme matrice pour des études *in vitro* de synthèse d'ADN.

Expérience 1 :

On effectue un test *in vitro* de synthèse d'ADN (figure 3) en présence du plasmide recombinant pB-oriC et de quantités variables de protéine DnaA. La même expérience est effectuée en présence du plasmide pB. Les résultats sont présentés sur la figure 3.

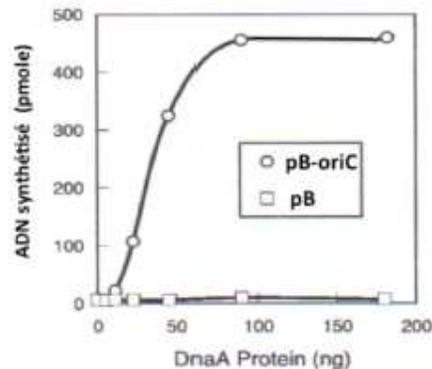


Figure 3 : test *in vitro* de synthèse d'ADN. Le milieu d'incubation contient l'ADN polymérase I, les 4 dNTP, la primase DnaG, les 4 rNTP, DnaB, le tampon adéquat, en présence du plasmide recombinant pB-oriC (O) ou du plasmide pB (□) et de quantités variables de protéine DnaA

Q4 : Interpréter ces résultats en faisant ressortir le rôle de la protéine DnaA dans ces conditions expérimentales

Expérience 2 :

Le plasmide pB-oriC est purifié. Ce plasmide peut exister sous plusieurs formes (FI, FII et FIII) qui ont été analysées par électrophorèse en gel d'agarose (figure 4A).

Q5 : Préciser la structure de ces formes et justifier leur migration par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 4 A).

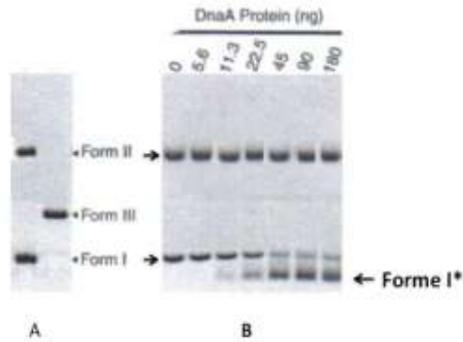


Figure 4 : électrophorèse sur gel d'agarose des différentes formes du plasmide pB-oriC (A). FI et FII du plasmide pB-oriC sont incubées **uniquement** en présence de quantités croissantes de protéine DnaA (B)

La protéine DnaA est incubée **uniquement** avec un mélange FI et FII du plasmide pB-oriC. Les résultats sont présentés sur la figure 4B.

Q6 : DnaA a-t-elle le même comportement vis à vis de la forme FI et de la forme FII ? Justifier.

Q7 : Compte tenu de la migration de la Forme I* (FI*), quelles sont les caractéristiques topologiques de la forme FI* par rapport à la forme FI.