

Travail à faire en monôme ou binôme. A la fin du TP, envoyer par mail à alain.denise@lri.fr un fichier (en format OpenOffice, LaTeX ou pdf) contenant les résultats de vos expérimentations. Ils pourront être donnés en partie sous forme de copies d'écran commentées.

On sait maintenant qu'aux vingt acides aminés « classiques » on peut en ajouter deux : la Sélénocystéine et la Pyrrolysine. La pyrrolysine, le « 22^{ème} acide aminé », est présente dans des gènes de certaines *archae* méthanogènes (. Une particularité de cet acide aminé est que son codon est aussi un codon stop : UAG. Dans les CDS (Coding DNA sequences) considérés, il y a donc un codon stop UAG en phase. Au cours de la traduction, ce codon peut soit être considéré comme un codon stop « normal » par la machinerie de traduction, auquel cas la traduction s'arrête là, soit considéré comme codant pour une pyrrolysine, auquel cas celle-ci est incorporée dans le peptide en cours de construction et la traduction continue jusqu'au stop suivant.

Selon certains auteurs, une structure secondaire particulière en 3' du codon UAG favoriserait, dans ces *archae*, l'incorporation de la pyrrolysine. Cette hypothèse a été testée dans A. Théobald-Dietrich, R. Giegé, J. Rudinger-Thirion, *Evidence for the existence in mRNA of a hairpin element responsible for ribosome dependant pyrrolysine insertion into proteins*, Biochimie 87 (2005) 813-817. Dans ce travail, une structure en épingle à cheveux a été déterminée en combinant des expériences de *probing* et des alignements manuels des sites considérés. La figure ci-dessous résume les résultats du *probing*.

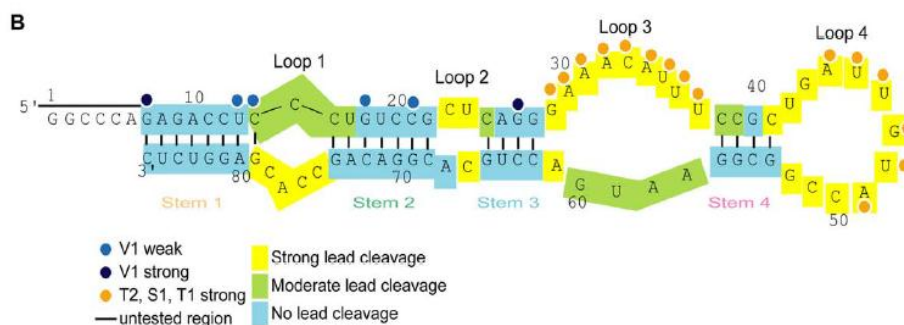


Fig. 1. Probing of PYLIS transcript. (A) Autoradiogram of 12% denaturing polyacrylamide gels from probing experiments on 5'-labeled PYLIS transcript. Probing experiments with Pb^{2+} are in the left part, those with nucleases T1, T2, V1 and S1 are in the right part. Final concentrations of Pb^{2+} are indicated in mM. Control incubations (C) were run in parallel. Lane-S1 checks the effect of $ZnCl_2$ present in nuclease S1 buffer. Lanes AH represent alkaline ladders and lanes G denaturing nuclease T1 ladders. Numbering defines the position of G residues. The double-stranded regions are highlighted in colors. Spontaneous degradations are indicated by d. (B) Summary of the probing experiments displayed on the PYLIS sequence. Nucleotides cut by nucleases S1, T1 and T2 are indifferently indicated by orange dots whereas those cut by nuclease V1 are indicated by blue dots. Yellow areas correspond to residues strongly cut by Pb^{2+} , green areas to nucleotides moderately cut by Pb^{2+} . Regions resistant to Pb^{2+} cleavage are in blue.

(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). Les deux sont basés sur l'algorithme de Zucker, avec quelques variantes et extensions. Tronquez les cinq séquences pour ne garder que la zone intéressante trouvée précédemment et repliez-les avec l'un ou l'autre programme. Comparez les résultats, visuellement, à la structure recherchée. Regardez aussi éventuellement les structures sous-optimales et les autres types de résultats proposés par ces programmes.

3. Comparaison de structures. Pour comparer plus objectivement les structures obtenues à la structure recherchée, utilisez NestedAlign (<http://nestedalign.lri.fr>) ou RNAForester (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnaforester/submission.html>). Évaluez ainsi la distance des structures prédites à la structure réelle.
4. Prédiction ab initio, suite. Même chose que la question 2 avec MC-Fold (<http://www.major.iric.ca/MC-Pipeline/>), qui prend en compte d'éventuelles liaisons non canoniques dans la prédiction. Attention dans ce cas le délai de réponse peut être très long. Laissez la fenêtre du calcul en cours ouverte et rafraîchissez-la de temps en temps.
5. Prédiction comparative, le retour. Avec les séquences tronquées, essayez à nouveau CARNAC, puis RNASHAPES (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnashapes/submission.html>), RNAalifold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/alifold.cgi>), LocARNA (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/LocARNA.cgi>). Notez que RNAalifold requiert que les séquences soient préalablement alignées, par exemple avec CLUSTAL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).
6. Prédiction comparative, encore. Remplacez les deux séquences de *M. acetivorans* par celles –ci :

>Chimere1

```
UAGGGCCAGAGACCUCGAGUGACCUGACCGAAAUAUUUGGACUGACUGCGCCGGUC  
CAAUGAGGUCCAGUCACUCCCACGAGGUCUCGCAACUAAACG
```

>Chimere2

```
UAGGGCCAGAGACCUCGUGUGAGCUGAGCGAAAUAUUUCCACUGACUGCGCCGGUG  
GAAUGAGCUCCACUCACACCCACGAGGUCUCGCAACUAAACG
```

et relancez les programmes de la question précédente. Que remarquez-vous ?
Comment l'expliquez-vous ?

7. Sites PYLIS aléatoires. GenRGenS est capable d'engendrer des séquences structurées, en utilisant des grammaires non contextuelles. Lisez la documentation (<http://www.lri.fr/~genrgens/manual/GRGs-manual-html>) et inspirez-vous notamment de l'exemple donné en <http://www.lri.fr/~genrgens/manual/GRGs-manual-html/node5.html#SECTION00543000000000000000> pour engendrer des séquences dont la structure prédite est proche de celle du site PYLIS.