

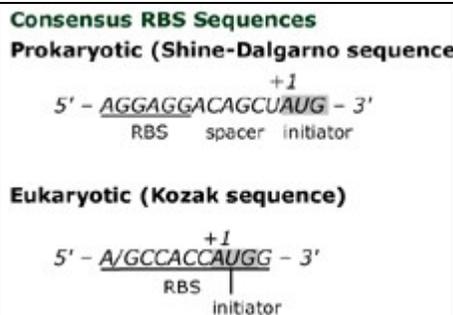
Correction du sujet de Biologie moléculaire et génie génétique de juin 2009

Etude de la structure, de l'expression et de la fonction du gène bdnf

1.1.1 Définition d'une séquence codante :

La séquence codante correspond sur l'ADN à la séquence de l'ARN messenger mature, elle comprend la séquence 5'UTR (*untranslated region* : région non traduite en 5' de l'ARNm), les exons, et la région 3'UTR.

1.1.2 Schéma légendé de la structure d'un gène eucaryote représentant les éléments nécessaires à son expression en protéine

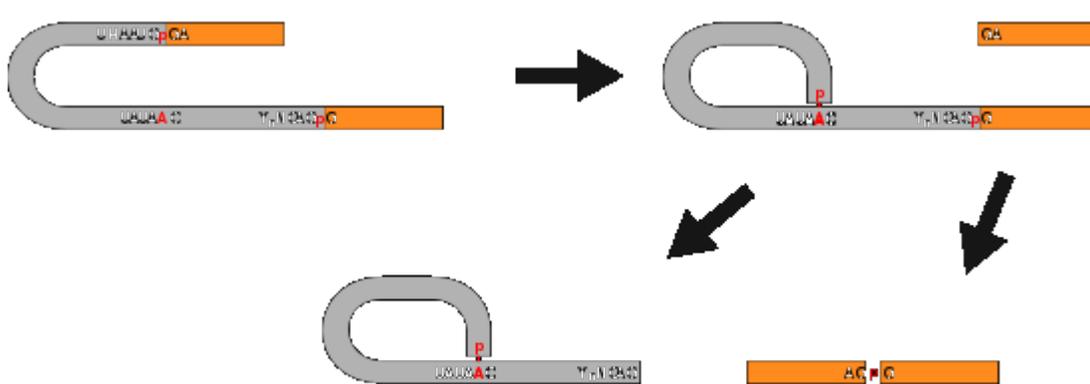


Il faut représenter de gauche (5') à droite (3'), une ou plusieurs **séquences cis-régulatrices** (**RE** = *responsive element*), un **promoteur**, la **séquence RBS** située à proximité du premier exon (appelée séquence de **Kozak** chez les eucaryotes cf. schéma ci-contre), des **introns** intercalés entre les **exons**, un **site de polyadénylation**, et enfin un **site de terminaison**.

1.2.1. Qu'est ce que l'épissage ?

C'est une des phases de la maturation de l'ARN pré-messager (transcrit primaire), lors de laquelle les introns sont épissés ; c'est-à-dire éliminés de la séquence de l'ARN messenger mûré.

1.2.2. Les étapes de l'épissage :



Les extrémités de l'intron sont reconnues par les éléments du **spliceosome** composé de protéines et d'ARNs ; les **snurps** (small nuclear ribonucléoprotéines) participent à la circularisation (ou formation d'une structure en lasso) de l'intron et à son hydrolyse pendant que les deux extrémités des exons sont assemblées par transfert. Le schéma, même très simplifié montre le spliceosome et la boucle, puis les exons assemblés.

1.2.3. Document 1 :

Le document présente un cas d'**épissage alternatif**, dans les différents cas, se sont des exons différents qui sont épissés et les autres sont éliminés comme des introns.

1.2.4. Autre mécanisme de diversité :

La recombinaison des éléments de gènes pour la **construction des gènes d'anticorps**, la présence d'éléments mobiles dans le génome (rétrovirus et **transposons**) peut provoquer des modifications de la composition des gènes (par addition ou délétions d'exons).

1.2.5.

Le document 1 nous montre qu'il existe 9 exons épissés alternativement dont un l'est de trois manières différentes (le deuxième), cela fait donc 11 transcrits possibles.

1.2.6. Taille de certains transcrits

Nom du transcrit	Taille en kpb (kilo paire de bases)
I	4,7
III	4,3
VII	0,3 + 4,1 = 4,4

1.2.7. Nombre de protéines résultant de la traduction de ces 11 transcrits différents :

Une seule protéine est obtenue par transcription de tous ces transcrit, car la partie variable de ceux-ci n'est pas traduite en protéine ; c'est un 5'UTR (*untranslated terminal region*).

2.1.1. Principe de la RT-PCR

C'est une technique qui permet d'amplifier spécifiquement par PCR un fragment de la séquence d'une ADN complémentaire d'un ARN messager, obtenu par transcription inverse à l'aide d'une transcriptase inverse ou ADN polymérase ARN dépendante.

2.1.2. Organigramme décrivant le protocole du document 2

- Purification des ARN totaux
- Hydrolyse des ADN par des Dnases et inactivation des Dnases
- Transcription inverse des ARN messagers (avec l'amorce poly dT et le kit ...)
- Amplification spécifique de l'ADNc de bdnf par PCR

2.2.1. Rôle des réactifs indiqués en gras dans le document 3

B-mercaptoéthanol : c'est un thiol qui sert d'agent réducteur des ponts disulfures de cystines en deux cystéines, il contribue à dénaturer les protéines dont les RNases.

Chloroforme : c'est un solvant très apolaire et plus dense que l'eau ; il forme donc une phase apolaire inférieure dans laquelle se solubilisent les lipides et peptides hydrophobes. A l'interface entre les deux phases précipitent les substances amphiphiles comme les protéines dénaturées et les phospholipides.

2.2.2 Importance de l'utilisation du phénol acide dans cette extraction :

Le phénol est un agent dénaturant des protéines. A pH acide les histones sont encore plus basiques (chargées positivement) qu'à pH neutre et sont donc plus fortement liées à l'ADN chromosomique. Lors de l'extraction l'ADN est copécipité à l'interface avec les histones.

2.3.1. Nature des amorces utilisées pendant la RT

Les amorces utilisées sont spécifiques des queues polyA des ARN messagers eucaryotes, ce sont des oligonucléotides d'ADN poly dT.

On pourrait aussi utiliser des poly dT ancrés ; c'est-à-dire possédant dans leur séquence à l'extrémité 5' une base A ou G ou C. Ou bien, des hexanucléotides, mais l'ADNc résultant serait incomplet du côté de sa séquence 5'.

2.3.2. Activité enzymatique de la RNase H

C'est une endo ribo nucléase spécifique des hétéro duplexe ADN/ARN, elle n'hydrolyse que l'ARN.

2.4.1. Schéma de la PCR

Cf. cours ; il faut représenter au moins les trois premiers cycles pour voir apparaître une séquence cible complète (au troisième cycle), préciser les températures et le nom de chacune des étapes d'un cycle, préciser que cela se répète n fois et orienter (5' 3') les molécules, sans oublier de préciser l'enzyme, son cofacteur et son co-substrat (dNTP).

2.4.2. Nécessité d'éliminer toute trace d'ADN pour la RT-PCR

S'il reste de l'ADN chromosomique, il y a un risque qu'il puisse servir de matrice pour la PCR et fausse les résultats ; on risque d'amplifier le gène et pas le produit (ARNm) du gène.

2.4.3. Qualités des amorces de PCR

- Spécifique : leur taille doit avoisiner ou dépasser les 20 bases
- Ne possèdent pas de longues séquences complémentaires intra ou inter chaînes, sinon cela pourraient les empêcher de s'hybrider à leur ADN cible ;
- Doivent être complémentaires de chacun des brins de l'ADN cible et orientée coté 3' vers l'intérieur de la séquence cible ;
- Avoir une Tm et %GC proche pour qu'il y ait la même proportion d'amorces hybridées sur chacun des deux brins à amplifier.

3.1.1. Propriété essentielle d'un gène de ménage

Un gène de ménage ou housekeeping gene doit s'exprimer dans toutes les cellules (ubiquitaire) et à un même niveau.

3.1.2. Intérêt de hprt dans cette expérience

Ce gène de ménage permet de normaliser les résultats, c'est un étalon pour l'expression des protéines cellulaires quelle que soit le type cellulaire étudié.

3.2.1. Analyse des résultats de RT-PCR de hprt

Hprt est exprimé dans tous les types cellulaires à un niveau comparable, cela confirme que c'est un gène de ménage.

3.2.2. Analyse des résultats de RT-PCR de BDNF I, V et VIII

- BDNF I s'exprime dans plusieurs types cellulaires du cerveau, mais pas dans les autres organes
- BDNF V s'exprime peu dans le cerveau et beaucoup plus dans les autres organes, surtout dans le cœur
- BDNF VIII s'exprime dans presque tous les organes étudiés sauf dans le testicule.

3.2.3. Conclusion quant à l'expression de BDNF dans l'organisme

BDNF s'exprime dans tous les organes mais dans certains organes on ne trouve que certains transcrits : on ne trouve que BDNF VIII dans le testicule, BDNF I n'est trouvé que dans le cerveau.