

Université Mohamed Khider-Biskra
 Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
 Département des Sciences de la Nature et de la Vie

GÉNIE GÉNÉTIQUE
Série 05

Exercice 01

Un premier travail est réalisé sur l'ADN double brin schématisé ci-dessous (figure 1). Pour ce travail, vous disposez de deux sondes : une sonde X de 250 pb et une sonde Y de 200 pb. Pour chacune de ces sondes, différents Southern-blots sont réalisés (voir questions 1, 2 et 3).

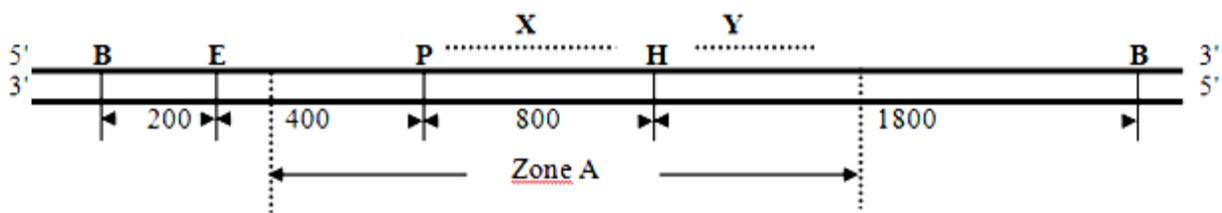
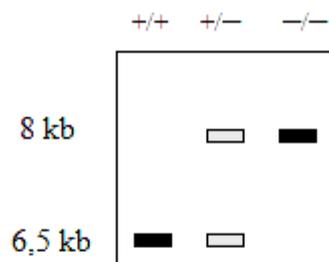


Figure 1

Les distances ci-dessus sont exprimées en pb, B : site de restriction BamHI; E : site de restriction EcoRI; H : site de restriction HindIII; P : site de restriction PstI

1. Quel(s) résultat(s) devriez-vous obtenir en digérant l'ADN simultanément, par l'enzyme BamHI, HindIII et EcoRI et en utilisant la sonde X?
2. Quel(s) résultat(s) devriez-vous obtenir en digérant l'ADN simultanément, par l'enzyme BamHI, HindIII et EcoRI et en utilisant la sonde Y?
3. Représentez une sonde qui vous permettrait de visualiser tous les fragments obtenus après la digestion enzymatique par les 3 enzymes (BamHI, HindIII et EcoRI) simultanément.
4. proposez deux stratégies permettant d'amplifier la région A.

Un southern-blot est ensuite réalisé en digérant de l'ADN génomique de 3 patients par l'enzyme de restriction EcoRI et en utilisant une sonde A1 (figure 2). Cette représentation permet d'observer l'existence d'un site de restriction EcoRI polymorphe.



- : absence du site polymorphe ; + : présence du site polymorphe

Figure 2

5. Représenter un fragment d'ADN (localisation des sites de restriction polymorphes ou non, positionnement sur ce fragment d'ADN de la sonde A1) permettant d'expliquer ces 3 résultats.

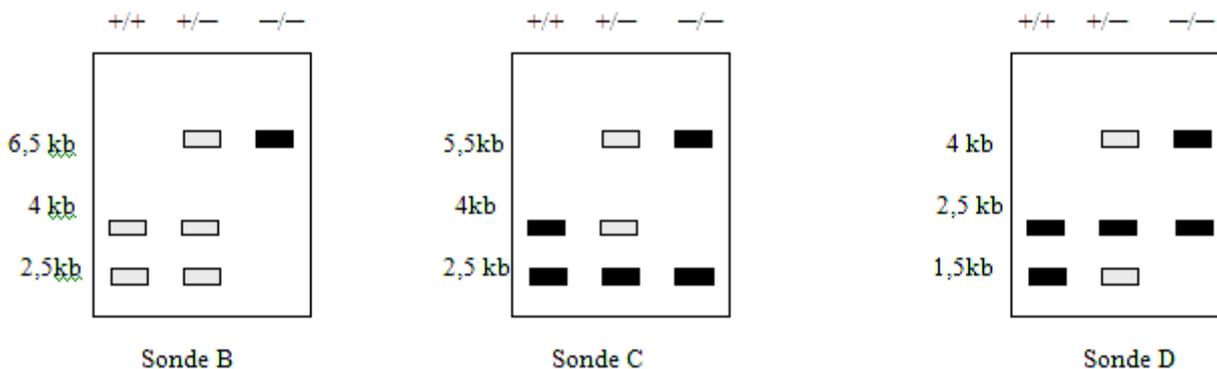


Figure 3

6. Même question, mais la sonde utilisée est la sonde B (Figure 3).
7. Même question, mais la sonde utilisée est la sonde C (Figure 3).
8. Même question, mais la sonde utilisée est la sonde D (Figure 3).
9. Une étude est réalisée sur un individu de sexe masculin. Une séquence d'ADN localisée sur le chromosome X présente 2 sites EcoRI polymorphes proche l'un de l'autre : E1 et E2 (figure4). Après digestion avec l'enzyme EcoRI et hybridation avec la sonde E, quels fragments pourront être visualisés dans les cas suivants : a) sites E1 et E2 absents; b) sites E1 et E2 présents ; c) site E1 présent et E2 absent ; d) sites E1 absent et E2 présent.

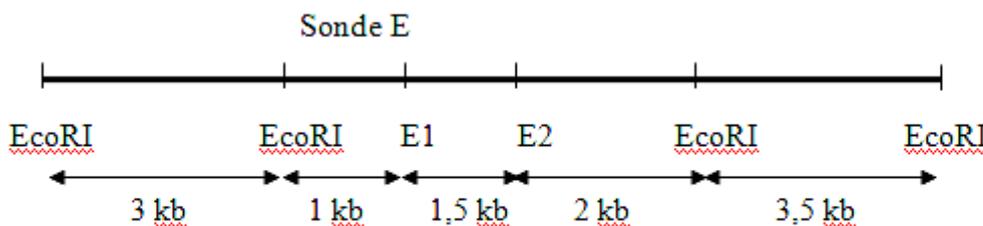


Figure 4

Exercice 2: La protéine Myoser est codée par un gène de 2400 nt, dont son ARNm est de 1300 nt. Ce gène est impliqué dans l'atrophie (affaiblissement) des muscles striés chez une souche de souris appelée Mdx (souche mutante). Pour déterminer l'origine de ce phénotype, l'expression du gène Myoser est étudiée par Northern blot et par Western blot avec différents tissus de souris contrôles (témoins) et de souris Mdx (Figure 5).

1. Analyser et interpréter les résultats obtenus dans les expériences de Western Blot par rapport aux résultats de Northern Blot.
2. Est-ce que la taille de l'ARNm Myoser, chez les souris contrôles, est en accord avec la structure du gène Myoser (sachant que la queue poly A de l'ARNm est de 200 nt) ?

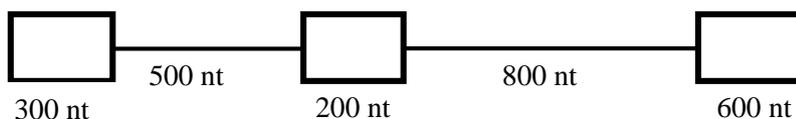


Figure 1 : Structure schématique du gène Myoser. Les **exons** sont représentés par des **boîtes** et les **introns** par des **traits**. nt: nucléotides

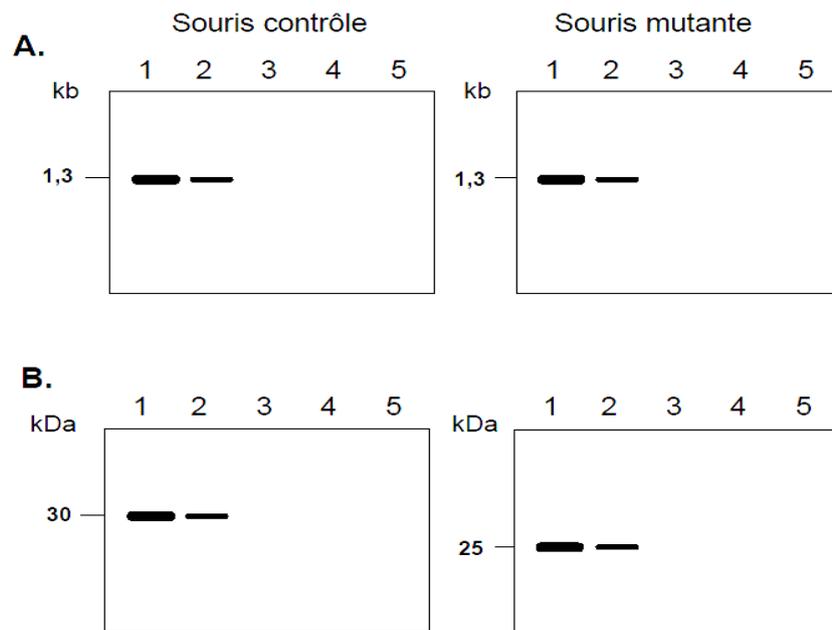


Figure 5 : A : Analyse par Northern blot. **B:** Analyse par Western blot. Piste 1: muscle squelettique, piste 2: Cœur, piste 3: foie, Piste 4: cerveau, piste 5: estomac. **Remarque :** des quantités équivalentes des extraits d'ARN sont déposés dans les 5 puits, la même chose pour les extraits protéiques.

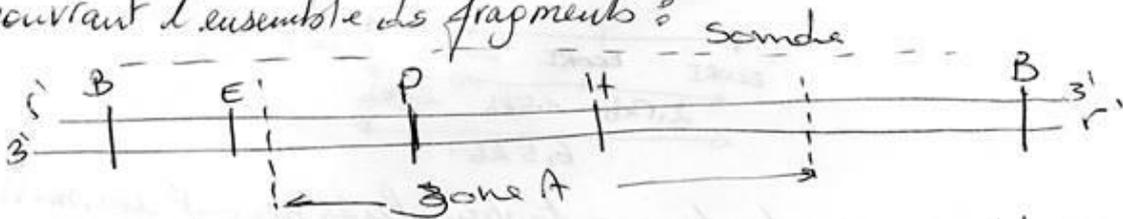
Corrigé type

Exercice 1

1- L'utilisation de la sonde X après avoir réalisé la triple digestion Bam HI / EcoRI / Hind III devrait permettre la mise en évidence d'un fragment de 1200 pb.

2- L'utilisation de la sonde Y après avoir réalisé la double digestion Bam HI / EcoRI devrait permettre la mise en évidence d'un fragment de 3000 pb.

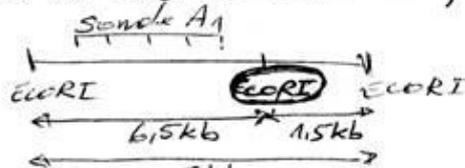
3- Pour voir tout les fragments, il est nécessaire d'utiliser une sonde recouvrant l'ensemble des fragments :



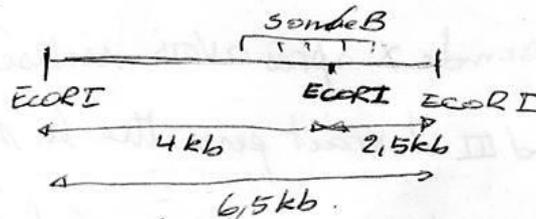
4- Pour amplifier la région A, les 2 stratégies envisageables sont :

- Soit une amplification PCR en utilisant 2 amorces encadrant la région A (amplification *in vitro*).
- Soit de digérer le fragment par Bam HI et EcoRI puis de sous-cloner le fragment obtenu dans un plasmide lui-même préalablement digéré par ces enzymes. Après sélection du plasmide recombinant contenant la région d'intérêt, la région A sera amplifiée grâce à l'amplification du plasmide recombinant à l'aide d'une culture bactérienne (amplification *in vivo*).

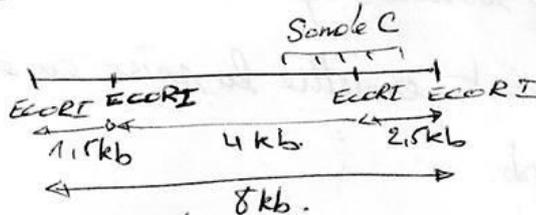
5- Le site EcoRI polymorphe est indiqué en italique dans la figure ci-dessous. Un patient hétérozygote possède un allèle⁻ (bande de 8 kb) au sein duquel le site polymorphe est absent et un allèle⁺ (bande de 6,5 kb) au sein duquel le site polymorphe est présent :



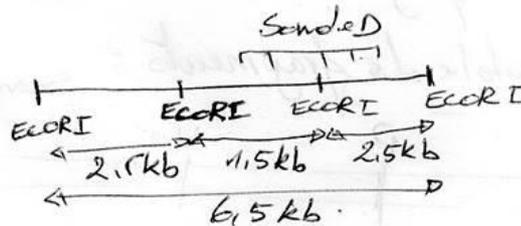
6. Voir la figure suivante :



7. Voir la figure suivante :



8. Voir la figure suivante :



9. Selon les cas, les fragments visualisés seront les suivants :

cas	Fragments visualisés
a	2 fragments de longueur = 4,5 kb et 3 kb.
b	3 fragments de longueur = 3 kb, 1,5 kb et 1 kb
c	2 fragments de longueur = 3 kb, 2,5 kb
d	3 fragments de longueur = 3,5 kb, 3 kb et 1 kb

Exercice 2

1. Analyse et interprétation

Analyse Western blot : la protéine Myosin a une masse moléculaire de 30 kDa chez les souris contrôles. En accord avec l'expression de l'ARN Myosin elle n'est présente que dans le muscle strié squelettique et le coeur et en quantité plus importante dans ce premier. Chez les souris Mdx, la protéine Myosin s'accumule en quantité similaire dans les deux tissus cependant sa masse moléculaire est réduite de 5 kDa.

L'ARNm Myosin a une taille de 1,3 kb (300nt+200nt+600nt+200nt=1300nt), l'ARNm Myosin a une taille de 1,3 kb.

L'analyse du Northern blot suggère que le gène Myosin est transcrit spécifiquement dans le muscle strié squelettique et le coeur. Le phénotype de souris Mdx n'est pas dû à une absence de transcription de ce gène

dans les deux tissus concernés. L'analyse du Western blot suggère que le gène Myoser s'exprime spécifiquement dans le muscle strié squelettique et le cœur pour donner une protéine active de 30 kDa. Chez la souris Mdx, **la protéine ne faisant plus que 25 kDa il** y a une perte d'information qui doit la rendre non fonctionnelle. Le phénotype Mdx pourrait être du à **la perte** de fonction de la protéine Myoser.