

Devoir de B.C.M.

Un plasmide dans lequel est inséré le gène codant pour un récepteur membranaire au neurotransmetteur GABA est transfecté dans des cellules eucaryotes. La cartographie de ce plasmide vous est donné en annexe 1. Le gène est inséré entre les séquences Eco R1 présenté sur le schéma.

1. Rappeler ce qu'est Eco R1. A quoi correspond cette séquence ?

P1 est un promoteur fort de transcription du gène Lac Z, gène codant pour la β -galactosidase de l'opéron lactose.

2. Qu'est-ce qu'un promoteur fort ? Indiquer ce qui le différencie d'un promoteur faible.

3. Préciser les premières étapes de la transcription en insistant sur le rôle de la sous-unité σ (sigma) de l'ARN polymérase.

4. Quel est le rôle de l'élément terminateur ? Comment agit-il ?

5. A quoi correspond le gène AMP^R ? Quelle conséquence cela impose t-il lorsque l'on veut amplifier ce plasmide chez une bactérie ?

On sait que pour obtenir la transcription du gène Lac Z, il faut ajouter au milieu du lactose.

6. Expliquer ce phénomène.

De plus, et même en présence de lactose, le milieu doit être dépourvu de glucose On sait par ailleurs qu'en présence de glucose, la concentration en AMPc, molécule se fixant à la protéine CAP, est faible.

7. Expliquer pourquoi en présence de glucose, la transcription de ce gène est impossible.

8. D'après vos connaissances sur la transcription des gènes, indiquer et expliquer une différence majeure entre les procaryotes et les eucaryotes concernant la maturation des ARN.

Avant l'étape de transfection, il a été vérifié que le plasmide contenait bien le gène du récepteur au GABA.

Pour cela, il a été réalisé une mini-prep d'ADN plasmidique a partir d'une suspension dense d'E. coli contenant à priori ce plasmide.

Une fois récupéré l'ADN plasmidique, on réalise la dilution suivante 10 μ L d'ADN dans 490 μ L d'eau pure. A partir de cette dilution, on réalise un spectre UV et l'on obtient les valeurs suivantes :

$$A_{260\text{nm}} = 0,290 \text{ UA} \qquad A_{280\text{nm}} = 0,145 \text{ UA}$$

9. Que représentent ces 2 valeurs d'absorbances ? Que peut-on en déduire ? Sachant qu'à l'une d'elle, on admet qu'à 1 UA correspond une concentration d'ADN de 50 μ g/mL, quelle est la concentration d'ADN obtenue ?

On réalise une digestion du plasmide. La digestion se fait au niveau des séquences Eco R1 et l'on a besoin de 1,5 μ g de plasmide.

10. Calculer le volume nécessaire de plasmide pour réaliser cette expérience.

Pour vérifier la présence et la taille du gène inséré, on fait migrer le résultat de la digestion sur gel d'agarose. On dispose de 3 puits dans le gel le premier dépôt sera pour de l'ADN plasmidique non digéré, le second pour l'ADN digéré et le troisième pour un marqueur de taille.

11. Rappeler le principe et l'intérêt de l'électrophorèse en gel d'agarose ainsi que le rôle d'un marqueur de taille.

Les résultats de la migration sont donnés dans le tableau suivant (les distances de migrations par

rapport au puits sont données en mm et la taille des morceaux d'ADN est donnée en pdb (paires de bases)).

Puit 1		Puit 2		Puit 3		
Bande observée	Distance de migration (mm)	Bande observée	Distance de migration (mm)	Bande observée	Distance de migration (mm)	Taille (pb)
1	10	1	15,5	1	5,5	23 130
		2	23	2	14,5	9 416
				3	16	6 557
				4	18	4 361
				5	22	2 322
				6	24	2 027
				7	27,5	994

12. Comment est mis en évidence la présence d'ADN dans le gel ? Expliquer.

13. Justifier la présence d'une seule bande et de 2 bandes pour les 2 premiers puits ;

14. Pour le puits 3, tracer sur papier millimétré la graphe distance de migration = fonction (log(taille en pdb)) avec comme échelle ordonnée 1cm = 1 mm de migration et abscisses 1 cm = 0,25 unité logarithmique. En déduire la taille des morceaux d'ADN ayant migres à partir du puits 2.

Le plasmide sans l'insert fait 7000 paires de bases.

15. Est-ce cohérent avec les résultats des puits 1 et 2 ? Justifier.

Le récepteur GABA est une protéine de 680 acides aminés.

16. D'après vos connaissances sur le code génétique permettant de relier la séquence nucléotidique aux acides aminés, peut-on penser que le morceaux d'ADN inséré est bien celui du gène codant pour ce récepteur ?

17. Quels sont les principaux acteurs du mécanisme de traduction ?

18. L'un d'entre eux est donné en annexe 2, légènder le schéma.

19. Quels sont ses principaux rôles lors de la traduction ?

20. Pourquoi un antibiotique comme la puromycine, qui présente une forte analogie avec l'extrémité 3' de cette molécule, peut-il bloquer la traduction ?

Le plasmide a été transfecté dans des cellules eucaryotes de type Cos. Celles-ci sont cultivées in vitro dans un milieu DME + 10% SVF (sérum de veau fœtal) + streptomycine.

21. D'après la composition du milieu donné en annexe 3, indiquer le rôle des constituants soulignés ainsi que ceux du SVF et de la streptomycine.

22. Proposer une méthode permettant de mettre en évidence les cellules qui sont capables d'exprimer le récepteur GABA.