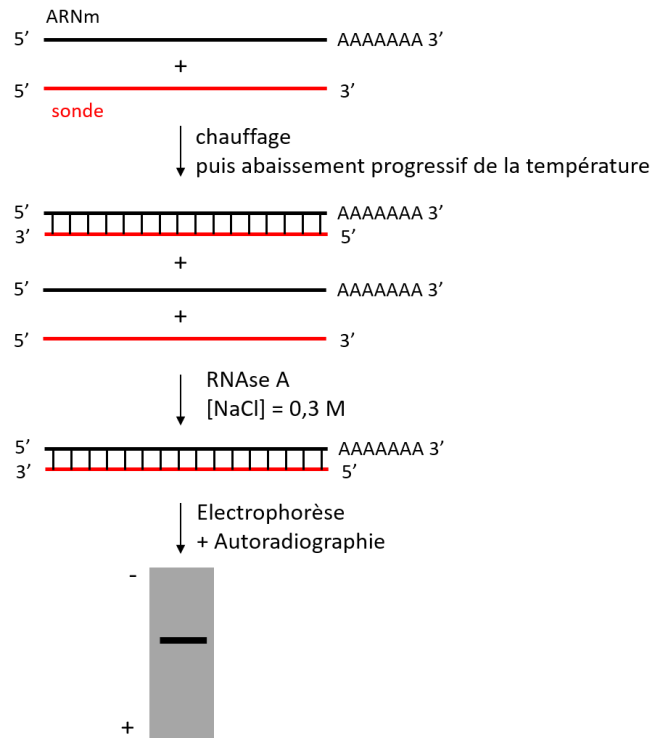


B- ANALYSE DES ARN MESSAGERS PAR PROTECTION À LA RIBONUCLÉASE A

1- a-



b- Les molécules d'ARN « sonde », marquées radioactivement, doivent s'hybrider à toutes les molécules d'ARN antiparallèles et complémentaires. Les molécules d'ARN sondes doivent donc être ajoutées en excès par rapport aux ARNm dont il est complémentaire : dans ces conditions, toutes les ARN cibles seront hybridés.

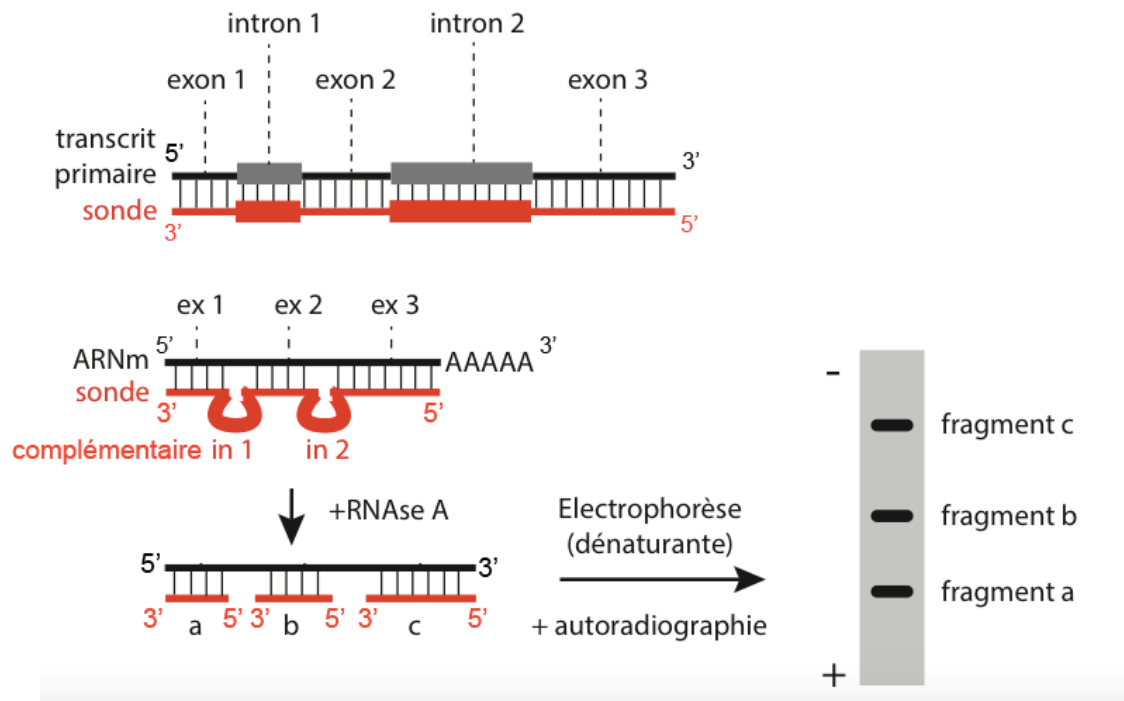
Remarque : il faut également s'assurer que l'ARN « sonde » ne forme pas de structures secondaires stables dans les conditions expérimentales utilisées et que cette sonde soit spécifique (c'est-à-dire qu'elle ne peut s'hybrider stablement que sur l'ARNm d'intérêt)

2- a- Le fait d'obtenir 3 fragments radioactifs après le traitement à la RNase A (et non 1 seul fragment de 4000 bases) indique qu'il y a 2 portions internes de la sonde qui ont été hydrolysées.

➔ Cela montre que la sonde ne s'est pas hybridée sur toute sa longueur sur l'ARNm correspondant au gène étudié (les 2 portions de la sonde hydrolysées par la RNase A étaient sous forme « simple brin »)

➔ Il y a donc 2 portions sur le transcrit primaire (= ARN avant maturations, ici épissage) qui ne sont pas présentes dans l'ARNm mature. Le transcrit primaire comporte donc 2 introns qui sont épissés lors de la maturation de l'ARNm (et donc 3 exons). Cette technique permet donc de révéler les épissages effectivement réalisés (cellules eucaryotes).

Interprétation :



Remarques :

- Les parties de la sonde hydrolysée sont complémentaires des introns du transcrit primaire
- Toujours penser à écrire où se situent les extrémités 5' et 3' de chaque molécules
- L'ARNm (en noir) est séparé des portions de sondes hybridées car l'électrophorèse est dénaturante. Bien que présentes, on ne voit pas les molécules d'ARNm après l'autoradiographie car ces molécules ne sont pas marquées radioactivement.
- Si l'intensité de marquage radioactif de chaque fragment est proportionnelle à sa taille, cela indique qu'il n'y a qu'un seul type d'ARNm correspondant au gène d'intérêt dans les cellules de foie.
- La queue polyA de l'ARNm est hydrolysée par la RNase A car la sonde ne s'hybride pas avec (structure absente du transcrit primaire).

b- La taille cumulée des 3 fragments de sonde obtenus correspond à la taille cumulée des exons soit $500+735+962=2197$ bases.

c- L'ARN messager comporte donc 3 exons et 2 introns. La taille cumulée des introns épissés est donc de $4000-2197=1803$ bases.

NB : les unités sont bien des « bases » et non pas des « paires de bases » car les ARN sont des molécules.

- 3- La disparition du fragment de 735 bases indique que la sonde ne s'est pas hybridée sur l'exon correspondant. Cet exon est donc absent de l'ARNm dans les cellules intestinales, qui ne contient donc que les deux exons correspondant aux fragments de 500 et 962 bases.

Il s'agit d'un épissage alternatif (= épissage différentiel) par rapport à l'épissage observé dans les cellules de foie. L'ARNm mature généré dans les cellules intestinales ne contient que deux des trois exons présents dans le transcrit primaire. L'exon de 735 bases est en position

centrales central qui est épissé dans ce cas (on ne peut pas déduire la position relative des autres exons de 500 et 962 bases). En effet, d'après le cours, il faut toujours des séquences en amont et en aval des exons pour que la réaction d'épissage puisse se dérouler.

- 4- Si l'intensité de marquage n'est pas proportionnelle à la taille des fragments, cela suggère qu'il existe différentes formes épissées d'ARNm avec un nombre d'exon variable.

On peut imaginer que dans les cellules de rate coexistent les 2 types d'ARNm observés en 2- et 3- (résultant des deux épissages alternatifs différents), dans des proportions variables.

Dans ce cas, l'intensité de chaque fragment correspond à la somme des intensités des fragments générés à partir de chaque type d'ARNm.

L'intensité de la bande à 735 bases est plus faible que celle des deux autres bandes ce qui indique que l'ARNm contenant l'exon central est en quantité plus faible que l'ARNm ne contenant que les exons 1 et 3.

