

A- QCM en ligne

B- CONSTRUCTION D'UN VECTEUR POUR L'EXPRESSION D'UNE PROTÉINE RECOMBINANTE

Sur papier libre, vous répondrez aux questions posées ci-dessous (4 pages maximum).

Rappel : toute réponse doit être argumentée.

La Stathmine est une protéine exprimée dans le cytoplasme de la plupart des cellules eucaryotes où elle semble jouer un rôle important pour l'architecture de la cellule.

1- Un ADNc (copie d'ADN double-brin complémentaire d'un ARN messager) codant pour la Stathmine humaine a été isolé. Une partie de la séquence du brin non transcrit de cet ADNc vous est donnée à la page suivante (bases 1 à 540). La séquence est orientée de 5' à gauche vers 3' à droite et la correspondance en acide aminé pour les trois phases de lecture possibles est indiquée sous la séquence de l'ADN.

a- Indiquer sur la séquence de l'ADNc où se trouvent situées les bornes (codon de démarrage et codon STOP) du cadre ouvert de lecture de la Stathmine, en précisant comment vous les avez identifiées.

b- Quels sont les quatre résidus d'acides aminés N-terminaux et les quatre résidus d'acides aminés C-terminaux de la Stathmine ?

c- Quel est exactement le nombre total de résidus d'acides aminés de la Stathmine ?

d- Sachant que le poids moléculaire moyen d'un résidu d'acide aminé est 110 D, quel est le poids moléculaire approximatif de la Stathmine ?

2- Pour mieux comprendre la fonction de la Stathmine à l'intérieur des cellules de souris, on fait produire par ces cellules une Stathmine recombinante fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein), une protéine de 26 kDa capable d'émettre un signal fluorescent intense après excitation à 495 nm. La « protéine de fusion » (on dit aussi « protéine chimérique ») est une protéine artificielle composée de deux domaines correspondant chacun à l'une des deux protéines d'intérêt et reliés entre eux par une liaison peptidique. Si elle est correctement repliée, la protéine de fusion possèdera les propriétés combinées des deux protéines d'origine.

Que pourrait-on apprendre de l'observation du signal fluorescent dans des cellules exprimant la protéine de fusion ?

3- Pour produire cette protéine de fusion dans les cellules de souris, il convient d'assembler les séquences codant pour la Stathmine d'une part et la GFP d'autre part afin de réaliser un ADN recombinant codant une protéine de fusion. Il existe deux manières distinctes d'assembler ces séquences.

a- Faire un schéma correspondant à ces deux possibilités en indiquant précisément dans chaque cas où se situent les codons ATG (codant la méthionine initiatrice) et STOP de la GFP et de la Stathmine.

b- Selon la manière d'assembler ces séquences, obtiendra-t-on la même protéine après traduction ? Expliquer en faisant un schéma de la protéine de fusion obtenue dans chaque cas.

4- Une fois l'ADN recombinant obtenu, il doit être inséré dans un plasmide (on dit aussi « vecteur ») d'expression permettant sa transcription et sa traduction dans les cellules de souris. Au préalable, pour disposer de suffisamment de vecteur pour réaliser l'expérience dans les cellules de souris, il est nécessaire d'amplifier le vecteur dans le colibacille.

a- Quel(s) élément(s) doit(ven)t-être présent(s) pour permettre la transcription et la traduction de l'ADN recombinant dans les cellules de souris ?

b- Quel(s) élément(s) doit(ven)t-être présent(s) pour permettre l'amplification du plasmide dans le colibacille ?

c- Faire un schéma légendé du plasmide que l'on souhaite ainsi construire sur lequel figure les différents éléments mentionnés.

5- On introduit le vecteur d'expression ainsi construit dans une cellule de souris (cette opération porte le nom de « transfection » pour une cellule eucaryotes, le terme « transformation » étant généralement réservé aux cellules procaryotes).

Faire un schéma d'une cellule transfectée par ce vecteur et indiquer les différentes étapes (et où elles s'effectuent dans la cellule) menant à l'expression de la protéine de fusion.

```

1      11      21      31      41      51      61      71      81      91      101      111
5'-TGTCGCTTGTCTTCTATTCCACCATGGCTTCTTCTGATATCCAGGTGAAAGAACTGGAGAAAGCGTGCCCTCAGGCCAGGCTTTTGAGCTGATTCTCAGCCCTCGGTCAAAAGAAATCTGTTCC
  C R L S S I H H G F F . Y P G E R T G E A C L R P G F . A D S Q P S V K R I C S
  V A C L L F T M A S S D I Q V K E L E K R A S G Q A F E L I L S P R S K E S V P
  S L V F Y S P W L L L I S R . K N W R S V P Q A R L L S . F S A L G Q K N L F Q

121     131     141     151     161     171     181     191     201     211     221     231
AGAATTCCCCCTTTCCCTCCAAAGAAGAAGGATCTTTCCTGGAGGAAATTCAGAAAGAAATTAAGAGCTGCAGAAAGAAAGACGCAAGTCCCATGAAGCTGAGGTCTTGAAGCAGCTGGC
R I P P F P S K E E G S F P G G N S E E I R S C R R K T Q V P . S . G L E A A G
E F P L S P P K K K D L S L E E I Q K K L E A A E E R R K S H E A E V L K Q L A
N S P F P L Q R R R I F P W R K F R R N . K L Q K K D A S P M K L R S . S S W L

241     251     261     271     281     291     301     311     321     331     341     351
TGAGAAACGAGAGCAGCAGAGAAAGAAGTGCTTCAGAAGGCAATAGAAGAGAAACAACCTTCAGTAAATGGCAGAAAGAGAACTGACCCACAAAATGGAAGCTAATAAAGAGAACCGAGA
. E T R A R E R S A S E G N R R E Q Q L Q . N G R R E T D P Q N G S . . R E P R
E K R E H E K E V L Q K A I E E N N N F S K M A E E K L T H K M E A N K E N R E
R N E S T R K K C F R R Q . K R T T T S V K W Q K R N . P T K W K L I K R T E R

361     371     381     391     401     411     421     431     441     451     461     471
GGCACAATGGCTGCCAACTGGAACGTTTGGCAGAGAGGATAAGCACATTGAAGAAGTGCGGAAGAACAAAGAAATCCAAAGACCCCTGCTGACGAGACTGAAGCTGACTAATTTGTTCT
G T N G C Q T G T F A R E G . A H . R S A E E Q R I Q R P C . R D . S . L I C S
A Q M A A K L E R L R E K D K H I E E V R K N K E S K D P A D E T E A D . F V L
H K W L P N W N V C E R R I S T L K K C G R T K N P K T L L T R L K L T N L F .

481     491     501     511     521     531
GAGAACTGACTTTCTCCCATCCCTTCCTAAATATCCAAAGACTGTACTGGCCAGTGTC
E N . L S P H P L P K Y P K T V L A S V
R T D F L P I P F L N I Q R L Y W P V S
E L T F S P S P S . I S K D C T G Q C

```

Code des acides aminés à une lettre
(voir Fig.VI.8 du polycopié du cours)

6- On extrait de manière non dénaturante les protéines de cellules de souris quelques heures après transfection du vecteur. Lorsqu'on analyse ces extraits par des expériences de filtration sur gel, un signal fluorescent est détecté dans une seule fraction éluant à une masse moléculaire apparente d'environ 85 kDa. Lorsqu'on analyse ces extraits par des expériences d'électrophorèse SDS-PAGE, un signal fluorescent est détecté dans une bande unique migrant à une masse moléculaire apparente d'environ 42 kDa. On précise qu'aucun signal fluorescent n'est détecté si on analyse un extrait de cellules de souris non transfectées.

Que peut-on conclure quant à la structure de la protéine de fusion ? Justifier précisément.