

A- QCM en ligne

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

*Sur papier libre, vous répondrez aux questions posées ci-dessous (4 pages maximum),
Rappel : toute réponse doit être argumentée.*

La ribonucléase A (RNase A) est une endonucléase qui hydrolyse les liaisons phospho-diester de l'ARN. A de faibles concentrations en sel, elle coupe l'ARN simple-brin ou double-brin. En revanche, à des salinités élevées ($[NaCl] > 0,2 \text{ M}$), elle n'est plus capable d'hydrolyser l'ARN double-brin.

Cette propriété de l'enzyme est utilisée pour mesurer l'abondance des messagers d'un gène à partir d'ARN messagers extraits de différents tissus. Le principe du test est le suivant : on mélange aux ARNs messagers de la cellule, un fragment d'ARN simple-brin (appelé « sonde »), marquée radioactivement sur toute sa longueur au P^{32} et complémentaire du transcrit primaire du gène d'intérêt. On dénature le mélange par chauffage puis on permet aux ARNs retrouver leurs structures en laissant doucement redescendre la température. On fait ensuite agir la RNase A en présence de $0,3 \text{ M NaCl}$. On fait enfin migrer les produits de cette réaction dans un gel d'électrophorèse dans des conditions où les liaisons hydrogènes entre bases sont détruites (conditions dénaturantes). La migration sur gel permet de se débarrasser des nucléotides radioactifs éventuels. On révèle la présence de radioactivité par autoradiographie.

1- a- Schématiser les différentes étapes de l'expérience réalisée en faisant l'hypothèse que l'ARNm résulte de la transcription d'un gène sans intron. Combien de bande(s) radioactive(s) observera-t-on?

b- Quelle est la condition nécessaire pour que le signal radioactif obtenu soit proportionnel à la quantité du transcrit d'intérêt dans le tissu ?

2 - Le transcrit primaire du gène qui nous intéresse mesure 4000 bases. On prépare une sonde radioactive exactement complémentaire du transcrit primaire. On admettra que ce gène ne possède qu'un seul type de transcrit mature dans les cellules de foie. Lorsque l'on réalise la protection à la RNase A à l'aide de cette sonde et à partir d'ARN messagers du foie, on obtient trois fragments radioactifs respectivement longs de 500, 735 et 962 bases. L'intensité du marquage radioactif de chaque fragment est proportionnelle à sa taille.

a- Faire un schéma des molécules en présence à chaque étape de l'expérience pour expliquer l'obtention de trois fragments radioactifs.

b- Quelle est la taille de l'ARN messenger d'intérêt ?

c- En vous appuyant sur vos réponses précédentes, en déduire combien l'ARN pré-messenger (ou transcrit primaire) comporte d'exons et d'introns, et quelle est la taille totale des séquences épissées.

3 - En partant cette fois-ci de cellules intestinales, on observe non plus trois fragments, mais seulement deux. Ils sont respectivement longs de 500 et 962 bases.

Expliquer cette différence et en déduire les positions relatives des exons les uns par rapport aux autres.

4- Dans les cellules de la rate, on observe à nouveau les 3 fragments de 500, 735 et 962 bases, mais cette fois l'intensité du marquage des bandes n'est pas toujours proportionnelle à la taille. On constate en effet que l'intensité de la bande à 735 est nettement plus faible que celle des deux autres bandes. Proposer un scénario compatible avec cette observation.