

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET GÉNIE
GÉNÉTIQUE

Durée de l'épreuve : 2 heures
Coefficient : 1

Le sujet comporte 6 pages numérotées de 1/6 à 6/6
L'usage d'un dictionnaire anglais/français est autorisé
L'usage de la calculatrice est interdit.

Remarque importante :

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** » par une bonification maximale de deux points.

Étude de la structure, de l'expression et de la fonction du gène *bdnf*

Les neurotrophines sont une classe de protéines sécrétées par les cellules du système nerveux. Elles sont impliquées dans la survie et la différenciation des neurones au cours du développement.

Parmi les neurotrophines, le BDNF (brain derived neurotrophic factor ou facteur neurotrophique dérivé du cerveau) est l'objet d'intenses recherches. En effet, au delà de son rôle dans le développement de l'organisme, le BDNF semble impliqué dans de nombreuses pathologies du système nerveux. Les études récentes se sont plus particulièrement intéressées à la structure du gène *bdnf*, ainsi qu'à la régulation de son expression chez les rongeurs modèles en laboratoire.

1. Structure et expression du gène *bdnf* chez la souris (6 points)

1.1. Structure du gène *bdnf*

1.1.1. Donner la définition d'une séquence codante.

1.1.2. À l'aide d'un schéma légendé, représenter la structure d'un gène eucaryote en précisant les éléments nécessaires à son expression en protéine.

1.2. Expression du gène *bdnf*

La transcription du gène *bdnf* est suivie d'un épissage.

1.2.1. Préciser en quoi consiste l'épissage.

1.2.2. Présenter, sous forme de schéma(s), les étapes d'un épissage.

L'organisation du gène *bdnf* chez la souris et la représentation schématique de ses transcrits matures sont représentés sur le **document 1**.

1.2.3. À l'aide du **document 1**, nommer le processus qui est à l'origine de la diversité des transcrits matures produits à partir du gène *bdnf*. Justifier cette appellation.

1.2.4. Citer un autre mécanisme permettant d'augmenter la diversité des produits d'expression d'un gène.

1.2.5. À l'aide du **document 1**, déterminer le nombre de transcrits matures produits à partir du gène *bdnf*.

1.2.6. Présenter, dans un tableau, la taille des transcrits BDNF I, BDNF III et BDNF VII. Détailler le calcul pour le transcrit BDNF III en l'expliquant.

1.2.7. Déterminer le nombre de protéine(s) issue(s) de la traduction de ces ARN messagers. Justifier la réponse.

2. Mise en œuvre de l'étude de la régulation de l'expression du gène *bdnf* (8,5 points)

L'expression du gène *bdnf* a été étudiée chez la souris par RT-PCR.

2.1. Stratégie mise en œuvre.

2.1.1. Donner le principe de la RT-PCR.

2.1.2. Réaliser un organigramme présentant les principales étapes du protocole décrit dans le **document 2**.

2.2. Extraction des transcrits totaux :

Les ARN totaux sont extraits à l'aide d'un kit commercial (RNAagents total RNA isolation system) mentionné dans le **document 2** et dont la composition est décrite dans le **document 3**.

2.2.1. Expliciter le rôle des réactifs indiqués en gras dans le **document 3**.

2.2.2. Expliquer l'importance de l'utilisation de phénol acide dans le cadre de cette extraction.

2.3. Réaction de transcription inverse :

2.3.1. Préciser la nature des amorces utilisées pour cette transcription inverse dont le protocole est présenté dans le **document 2**.
Citer un autre type d'amorces susceptibles d'être utilisées pour cette étape.

2.3.2. La transcriptase inverse utilisée présente une activité RNase H⁻ (négative).
Rappeler l'activité enzymatique de la RNase H.

2.4. Réaction d'amplification par PCR :

2.4.1. Présenter, sous forme de schéma(s), le principe de la technique PCR.

2.4.2. Justifier la nécessité d'éliminer toute trace d'ADN lors de l'extraction des ARN dans le cadre d'une RT-PCR.

2.4.3. Rappeler les qualités des amorces nécessaires au bon fonctionnement d'une PCR.

3. Résultats de l'étude de la régulation de l'expression du gène *bdnf* (5,5 points)

Le **document 4** présente les résultats d'une des études par RT-PCR de l'expression du gène *bdnf*.

3.1. Intérêt de l'utilisation d'un gène contrôle.

3.1.1. Donner la propriété essentielle d'un gène de ménage.

Le gène *hprt* est un gène de ménage codant une enzyme intervenant dans le métabolisme des nucléotides.

3.1.2. Préciser les intérêts de l'utilisation du gène *hprt* dans cette expérience.

3.2. Analyse de l'expression du gène *bdnf*. (**document 4**)

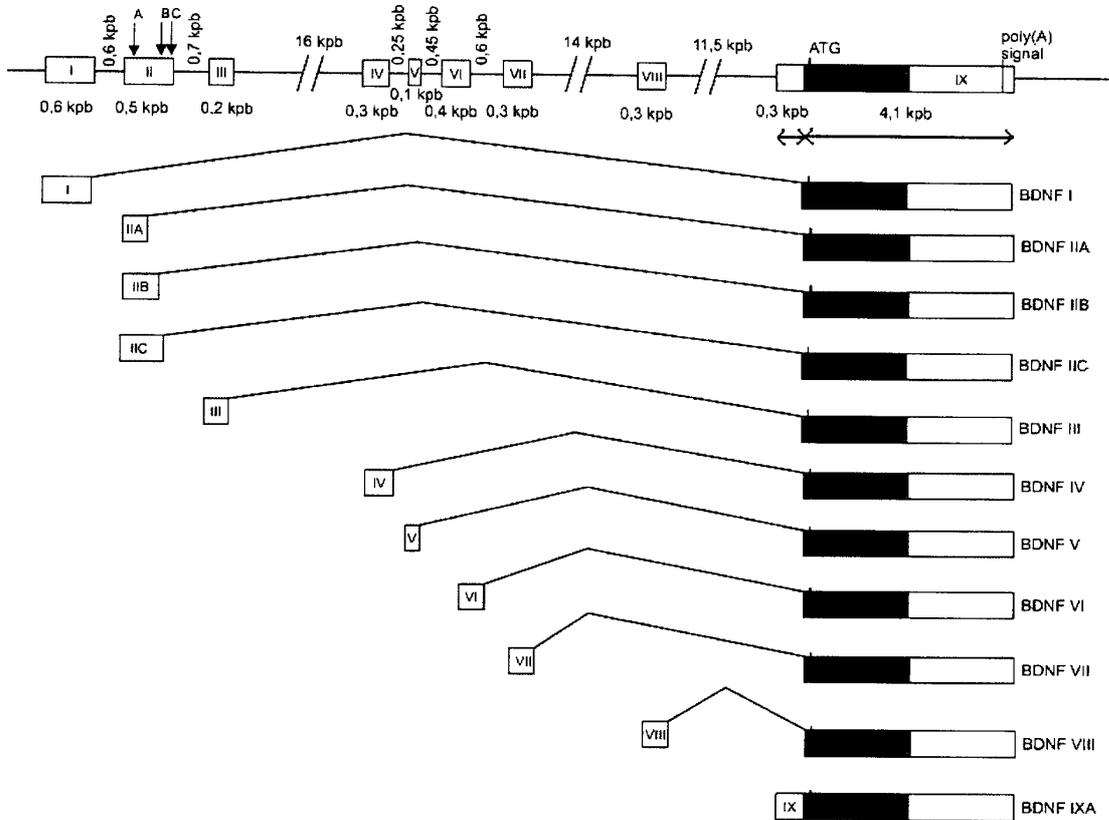
3.2.1. Analyser les résultats obtenus pour les produits de RT-PCR de *hprt*.

3.2.2. Analyser les résultats obtenus pour les produits de RT-PCR de BDNF I et analyser de même les produits de RT-PCR de BDNF V et BDNF VIII.

3.2.3. Conclure quant à l'expression du gène *bdnf* dans l'organisme.

BOE 2 BMO

Document 1 : Mouse *bdnf* gene structure.



The schematic representation of BDNF transcripts in relation to the gene is shown below the gene structure. Protein coding regions are shown as solid (black) boxes and untranslated regions are shown as open (white) boxes. Each of the eight 5' untranslated exons is spliced to the common 3' protein coding exon IX.

Document 2 : Protocole d'analyse de l'expression du gène *bdnf*.

RNA isolation, cDNA synthesis, RT-PCR

Total RNA from developing and adult mouse total brain regions and nonneuronal tissues was purified by RNAgents total RNA isolation system (Promega, USA) as recommended by the manufacturer. DNase treatment of total RNA was performed, followed by DNase inactivation.

Five micrograms of total RNA from different tissues was used for first strand synthesis using oligo(dT) and SuperScript III First-Strand synthesis system (Invitrogen, Carlsbad, CA). To analyse expression of BDNF transcripts, reverse primer specific for 3' BDNF coding exon and forward primers specific for 5' noncoding exons were used. cDNA was amplified in a total volume of 25 μ L. Because of relatively low expression levels of these mRNA, a robust HotstarTaq Master Mix kit (Qiagen, Chatsworth, CA) was used for cDNA amplification for 40-45 PCR cycles.

Document 3 : Descriptif des réactifs utilisés pour l'extraction des ARN totaux (*kit RNAgents total RNA isolation system*)

Solutions	Description et/ou composition
<i>Solution A</i>	- solution dénaturante qui lyse les cellules ou les tissus, dans des conditions qui inhibent rapidement les ribonucléases. - contient du thiocyanate de guanidium et du β-mercaptoéthanol .
<i>Solution B</i>	mélange de phénol acide et de chloroforme
<i>Solution C</i>	isopropanol

Les solutions A, B, C sont utilisées successivement lors de l'extraction des ARN cellulaires.

Document 4 : Analyse de l'expression du gène *bdnf* chez la souris.

Une réaction de RT-PCR semi-quantitative a été réalisée à partir des ARNm extraits de divers tissus de souris adulte. L'expression des gènes *bdnf* et *hpri* (hypoxanthine-phosphoribosyl-transférase) est étudiée dans le cerveau et différents organes périphériques. Les produits de chaque RT-PCR sont analysés par électrophorèse.

