

Tutorats 4 et 5

Techniques de détection et d'analyse des acides nucléiques

Caractérisation moléculaire du gène *moody* et de ces mutations chez la drosophile

Contexte biologique

L'effet de l'abus de drogue et notamment de la cocaïne est bien étudié et documenté chez les mammifères. La cocaïne agit en empêchant la recapture présynaptique d'un certain nombre de neuromédiateurs, en particulier la dopamine. Ce faisant, elle augmente la présence et donc l'effet de la dopamine dans les synapses au niveau du système limbique, ce qui engendre un effet euphorisant très important.

De manière surprenante, la cocaïne produit sur le comportement de la drosophile des effets similaires à ceux observés chez les mammifères. La drosophile (petite mouche du vinaigre, outils de prédilection du généticien) est un excellent modèle en biologie parce que les outils de génétique et de biologie moléculaire sont très nombreux et très performants et aussi parce que des tests de comportement peuvent être réalisés facilement et à grande échelle. C'est pour ces raisons qu'une équipe de chercheurs, a entrepris différentes mutagenèses chez la drosophile pour isoler des mutants ayant un comportement altéré vis-à-vis de l'absorption de cocaïne. Le but ultime de cette mutagenèse est d'identifier de nouvelles molécules impliquées dans les troubles comportementaux dues à la consommation de psychostimulants.

Application : caractérisation moléculaire du gène *moody* et de ces mutations chez la drosophile

A l'issue des mutagenèses et de travaux complémentaires, un groupe de 4 mutants a attiré l'attention de cette équipe de chercheurs. En effet, ces 4 mutants montrent à l'état homozygote une sensibilité accrue à la cocaïne par rapport aux mouches sauvages (aucun phénotype n'est décelable chez les mouches hétérozygotes). Le chercheur chargé de l'étude a montré par des tests génétiques que ces 4 mutants affectent le même gène. Il a nommé ce gène *moody* et cherche maintenant à caractériser de manière moléculaire ce gène et les 4 mutations qui altèrent sa fonction.

I) Organisation moléculaire du gène *moody*

Dans un premier temps des ADNc spécifiques du gène *moody* ont été isolés à partir d'une banque d'ADNc. Certains ADNc ont été séquencés et ont permis, après comparaison de séquences, de prédire l'organisation génomique du gène (figure 1A).

- 1) Avec quels types de séquences ont été effectuées les comparaisons de séquences pour pouvoir en déduire la structure intron-exon du gène *moody* ? Justifiez votre réponse.
- 2) Quelles informations pouvez-vous tirer de la figure 1A quant à l'organisation intron-exon du gène *moody* ?

II) Analyse des mutations du gène *moody*

Plusieurs expériences ont été nécessaires pour caractériser moléculairement les mutations affectant le gène *moody*.

La nature moléculaire de chacune des mutations est décrite ci-dessous :

- EP est une mutation provoquée par l'insertion d'un transposon de 8 kb (élément transposable : élément d'ADN mobile dans le génome) dans l'exon RB-1.
- Δ17 est une grande délétion enlevant la totalité du gène *moody*.
- Δ4 est une délétion d'environ 1 kb enlevant l'ensemble de l'exon 4 (969 nucléotides).
- P3 est une mutation ponctuelle dans l'exon 3.

1) Les expériences de Southern blot

Une partie des expériences a consisté à effectuer des Southern blots (figure 4 et 5). Pour réaliser ces expériences, de l'ADN génomique est extrait à partir de mouches sauvages ou à partir de mouches mutantes (homozygotes ou hétérozygote) pour l'une ou l'autre des 4 mutations du gène *moody*. Ces différents ADN sont ensuite digérés par l'enzyme EcoRI. Les Southern blots sont réalisés puis hybridés avec des sondes. Les sondes sont radioactives et ont été synthétisées par la méthode d'extension d'amorces aléatoires (figure 6). Deux types de sondes ont été utilisés pour les hybridations : l'une correspond à l'ADNc du transcrit RA et l'autre à l'ADNc du transcrit RB.

- a) Reportez de façon schématique dans la figure 1B le résultat des expériences de Southern Blot avec l'une et l'autre des sondes en vous aidant des éléments donnés dans la figure 1A.
- b) Pourquoi l'hybridation est-elle aussi réalisée sur de l'ADN de mouche sauvage +/+ ? Justifiez votre réponse.
- c) Est-il nécessaire de faire cette analyse sur des animaux hétérozygotes ? Pourquoi ? Dans quel cas serait-il nécessaire de faire cette analyse sur des animaux hétérozygotes ? Pourquoi ?
- d) Est-ce que l'expérience de Southern blot est adaptée pour l'analyse de la mutation P3 ? Quelle serait l'expérience la plus adaptée à la détection d'une telle mutation ?

2) Les expériences de Northern blot

De l'ARNm est extrait de tête (H) ou de corps (B) de mouches sauvages +/+ et de mouches homozygotes pour les différents mutants *moody*. Ces ARNm sont utilisés pour des analyses en Northern blot. La sonde utilisée correspond à de l'ADN de l'exon 4 du gène *moody*. La même membrane est déhybridée puis réhybridée avec une sonde correspondant à l'ADNc du gène de la tubuline. Une partie des résultats est présentée figure 1C.

- a) En général, quand on s'intéresse à un gène pourquoi réalise-t-on des expériences de Northern blots ? En d'autres termes, quelles informations peuvent apporter ce type d'expérience (voir figure 7 et 8)?
- b) A quoi sert l'hybridation avec l'ADNc de la tubuline ?
- c) Analysez et commentez les résultats des pistes du contrôle sauvage (figure 1C).
- d) Analysez et commentez les résultats des pistes du mutant EP (figure 1C). Que déduisez-vous de l'analyse de ces résultats? Est ce que cela est compatible avec la nature de la mutation EP? Justifiez votre réponse.
- e) Complétez les résultats obtenus pour les mutants $\Delta 17$, $\Delta 4$ et P3 dans la figure 1C (sans oublier de justifier).
- f) Quelle sonde utiliseriez-vous dans ce type d'expérience si vous ne vouliez détecter que le transcrit RB ?

III) Caractérisation de deux autres transcrits du gène moody : moody- α et moody- β

Deux autres transcrits ont été découverts après le séquençage de plusieurs ADNc. La différence entre ces transcrits réside dans un épissage alternatif au niveau du 4^{ième} intron (figure 1D).

- a) Quelle est la conséquence de cet épissage alternatif ?
- b) Quelles expériences feriez-vous pour analyser la distribution des protéines Moody- α et Moody- β chez les individus sauvages et les individus mutants ?
- c) Analysez et complétez (en justifiant) l'expérience de western blot (figure 1E, voir aussi figure 9) ?

IV) Projet industriel

Sur la base des outils et/ou techniques abordés dans ce tutorat, proposez une application à retombées industrielle et économique.