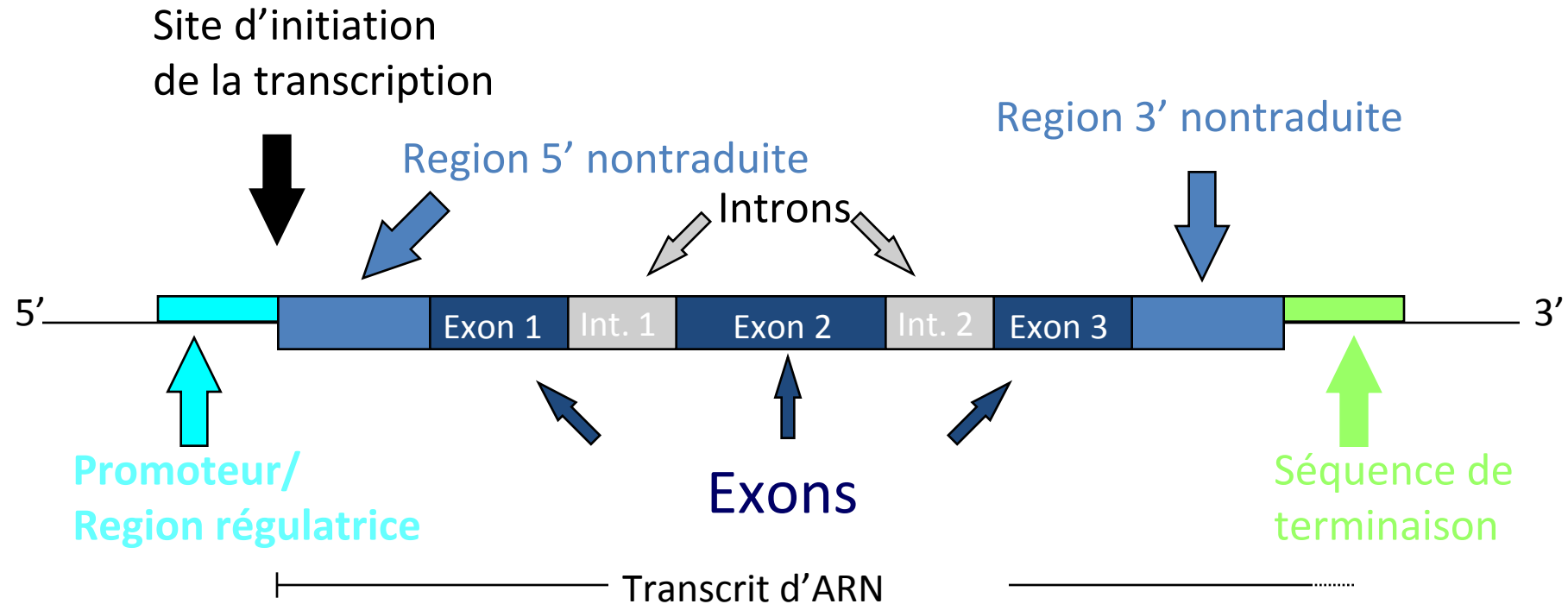


# **Expression du Génome**

## **I- Transcriptome**

# Les Gènes



Seulement un des deux brins d'un gène est codant!

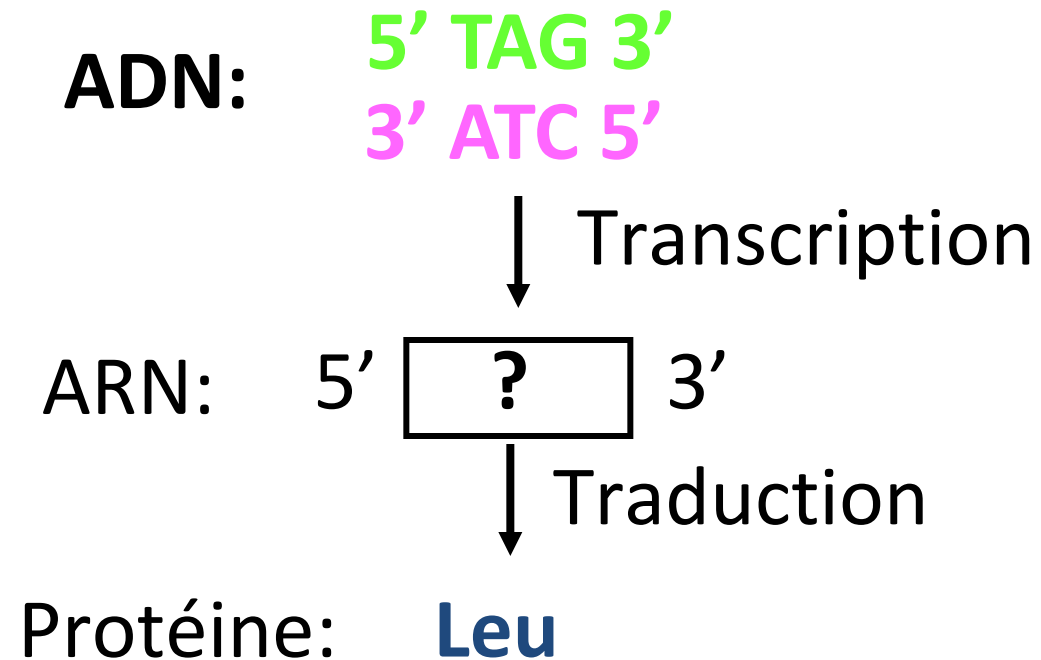
# Codant

- Brin Codant
- Brin positif
- Brin sens
- Brin complémentaire à la matrice
- Brin dont la séquence est la même que celle de l'ARN transcrit
- Brin sur lequel se retrouve le promoteur

# Non Codant

- Brin non Codant
- Brin négatif
- Brin anti sens
- Brin matrice
- Brin dont la séquence est **complémentaire** à celle de l'ARN transcrit

# Codant Vs Non-codant



Code génétique: CUA = Leu  
UAG = Arrêt



# Est-ce qu'une Séquence Code pour un Transcrit?

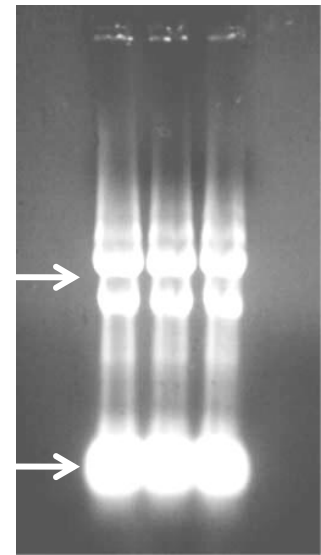
- Analyse d'hybridations Northern :
- RT-PCR

# Comparaison des Méthodes



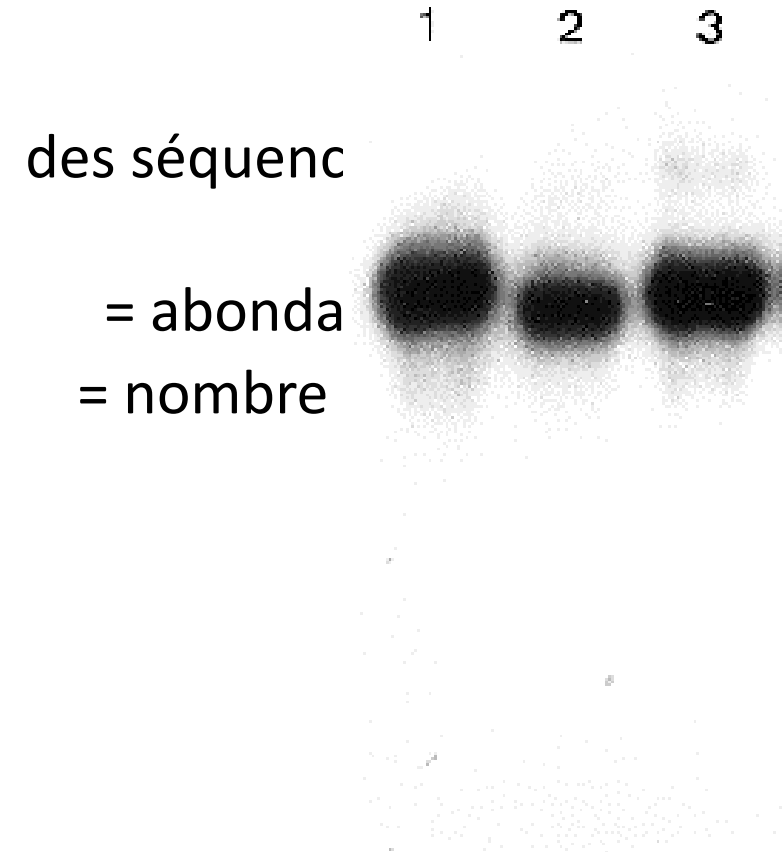
# Analyse Northern

- Isoler l'ARN total de cellules ou d'un tissu
- Séparer les ARN d'après leurs grosseurs sur gel d'agarose dénaturant
  - Formaldéhyde + Formamide
- Hybridation avec une sonde complémentaire



# Hybridation Northern

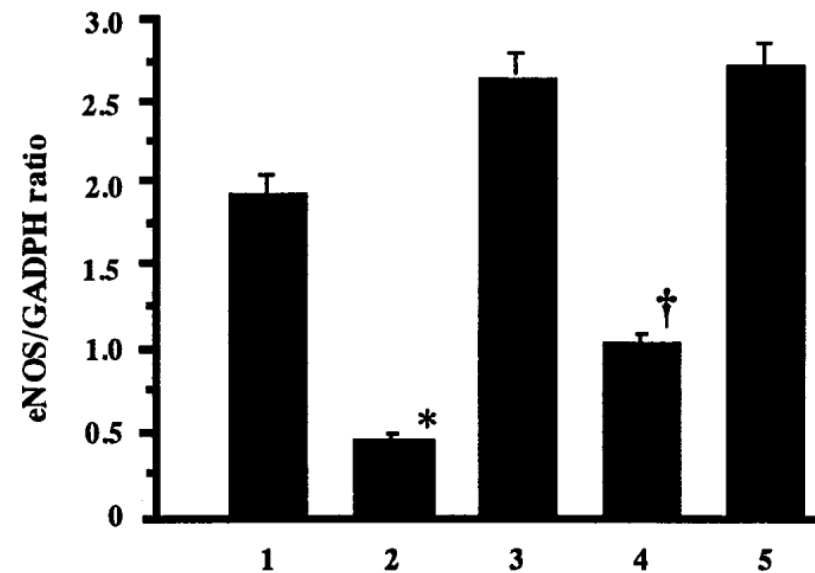
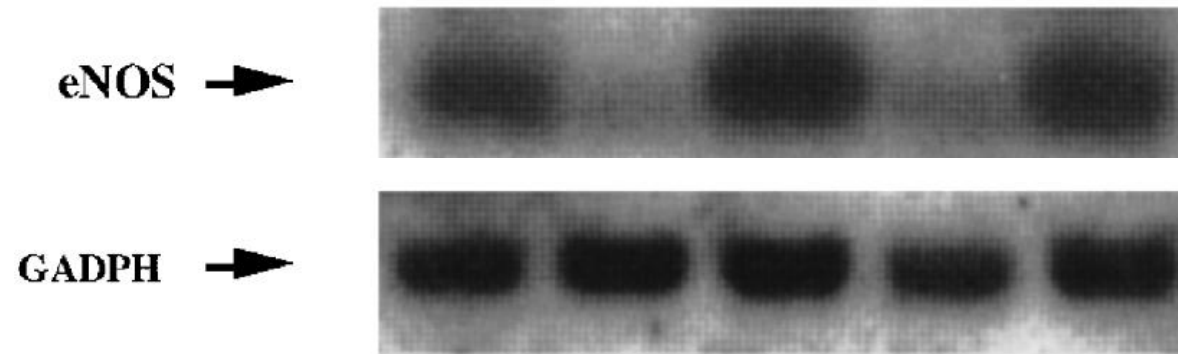
- Nécessite une sonde
  - Hybridation = la sonde possède
    - La séquence est exprimée
  - Intensité du signal d'hybridation
  - Nombre de signaux d'hybridation
    - Possiblement nombre de gènes



# Hybridation Northern

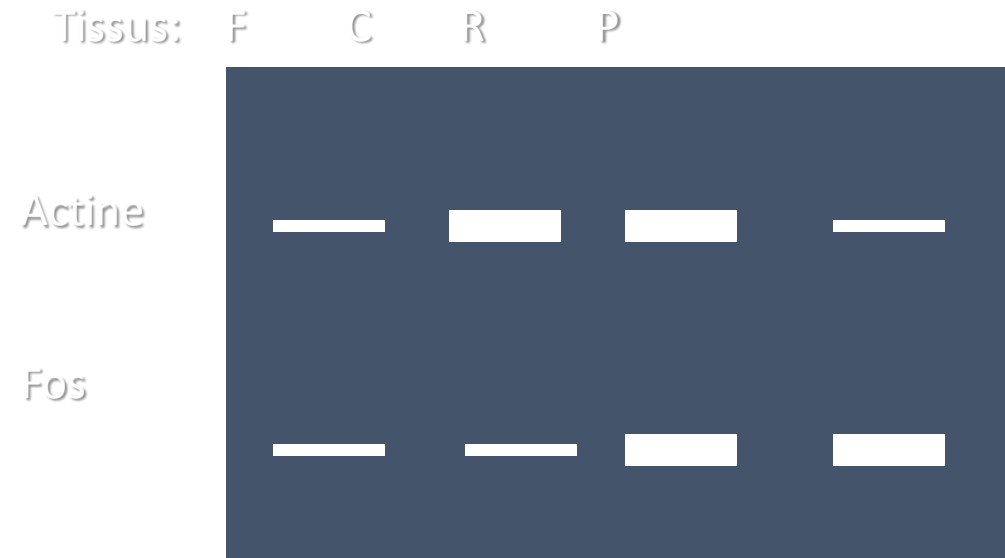
- Permet de comparer la quantité relative d'un transcrit
  - Sensibilité faible
  - Requiert un témoin interne
    - Gène dont l'abondance est constante sous les différentes conditions examinées
      - Témoin pour les variations de la quantité d'ARN chargé
    - Utilise des gènes domestiques :
      - Gènes qui assurent les fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules
      - Expression constitutive

# La Normalisation



# Problème

- Un Northern d'ARN isolé de différents tissus a été sondé avec le gène Fos et le gène domestique actine. Expliquer les résultats obtenus

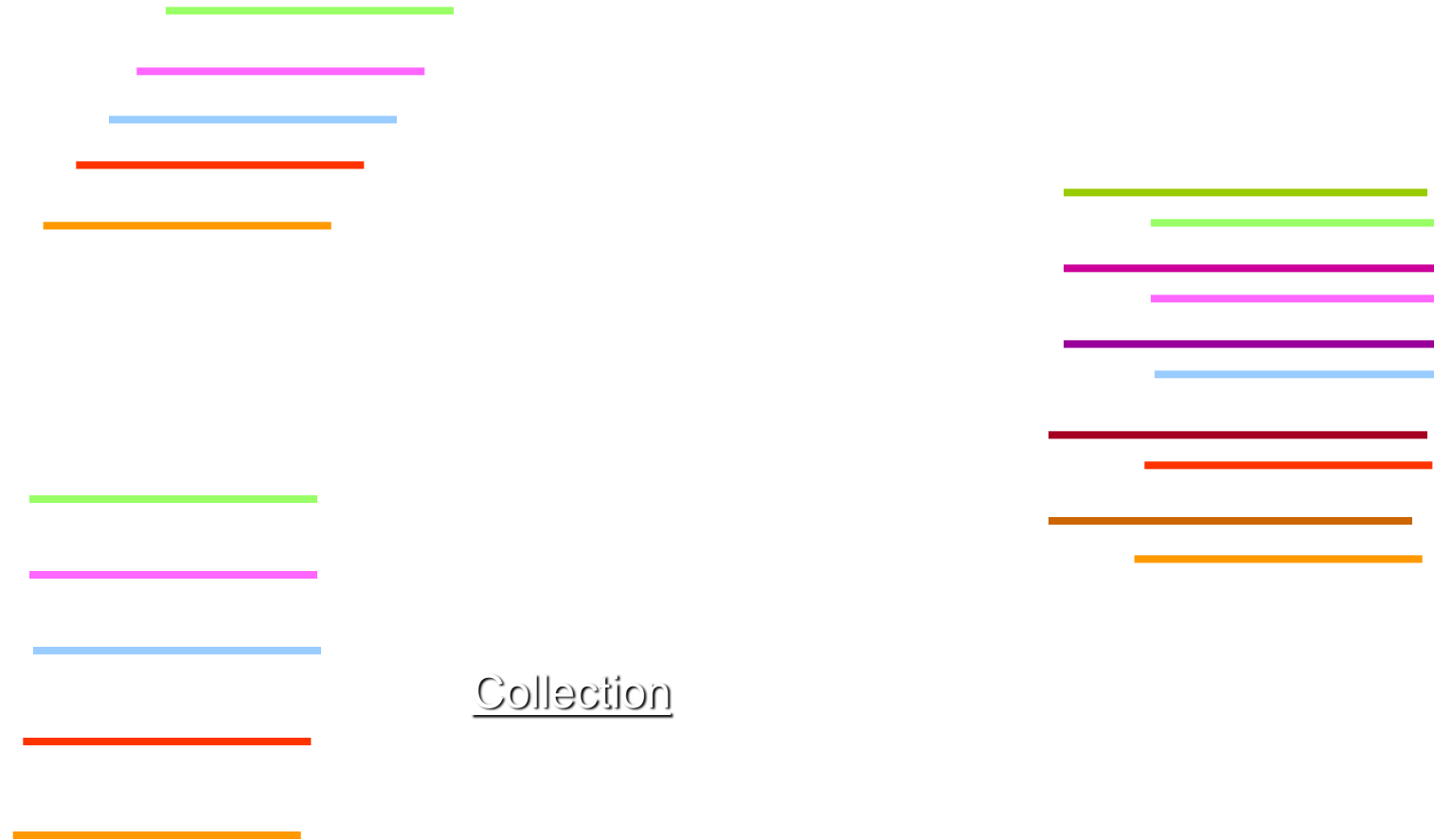


# RT-PCR

- Permetts d'amplifier une séquence d'ARN
  - Isoler l'ARN total de cellules ou d'un tissu
  - Transcrire les ARN en ADNc avec transcriptase inverse
  - Amplifier par PCR la séquence d'intérêt

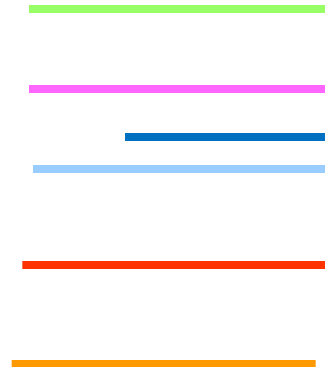
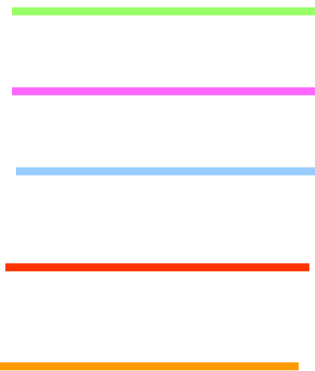
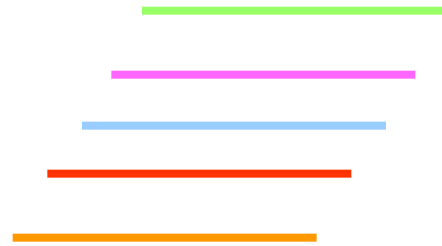
# Réaction de Transcriptase Inverse

## Gène Non-Spécifique



# Réaction de Transcriptase Inverse

## Gène Spécifique



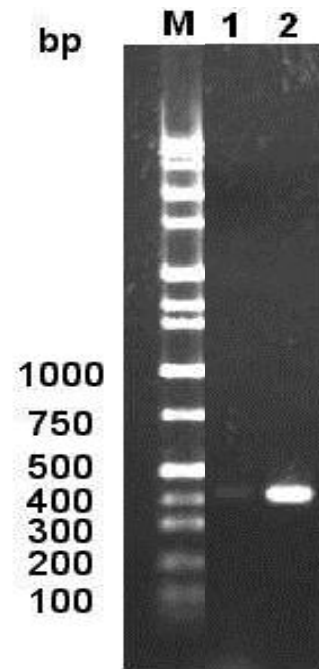
un





# RT-PCR

- La séquence doit être connue pour la conception d'amorces
  - Produit d'amplification =
    - Les séquences des amorces font partie d'un gène
    - La séquence est exprimée
  - Intensité du produit d'amplification =  
abondance relative
  - La taille du produit d'amplification n'est pas égale à la taille du transcrit



# Étude de l'expression

```
graph TD; A[Étude de l'expression] --> B[Analyse classique]; A --> C[Analyse globale]; B --> D[Qques gènes (~10)]; C --> E[Le plus de gènes]; D --- F["• Northern blot<br>• PCR quantitative"]; E --- G["• Puces à ADN<br>• SAGE<br>• cDNA-AFLP<br>• DD-RT-PCR"]
```

Analyse classique

Qques gènes (~10)

- Northern blot
- PCR quantitative

Analyse globale

Le plus de gènes

- Puces à ADN
- SAGE
- cDNA-AFLP
- DD-RT-PCR

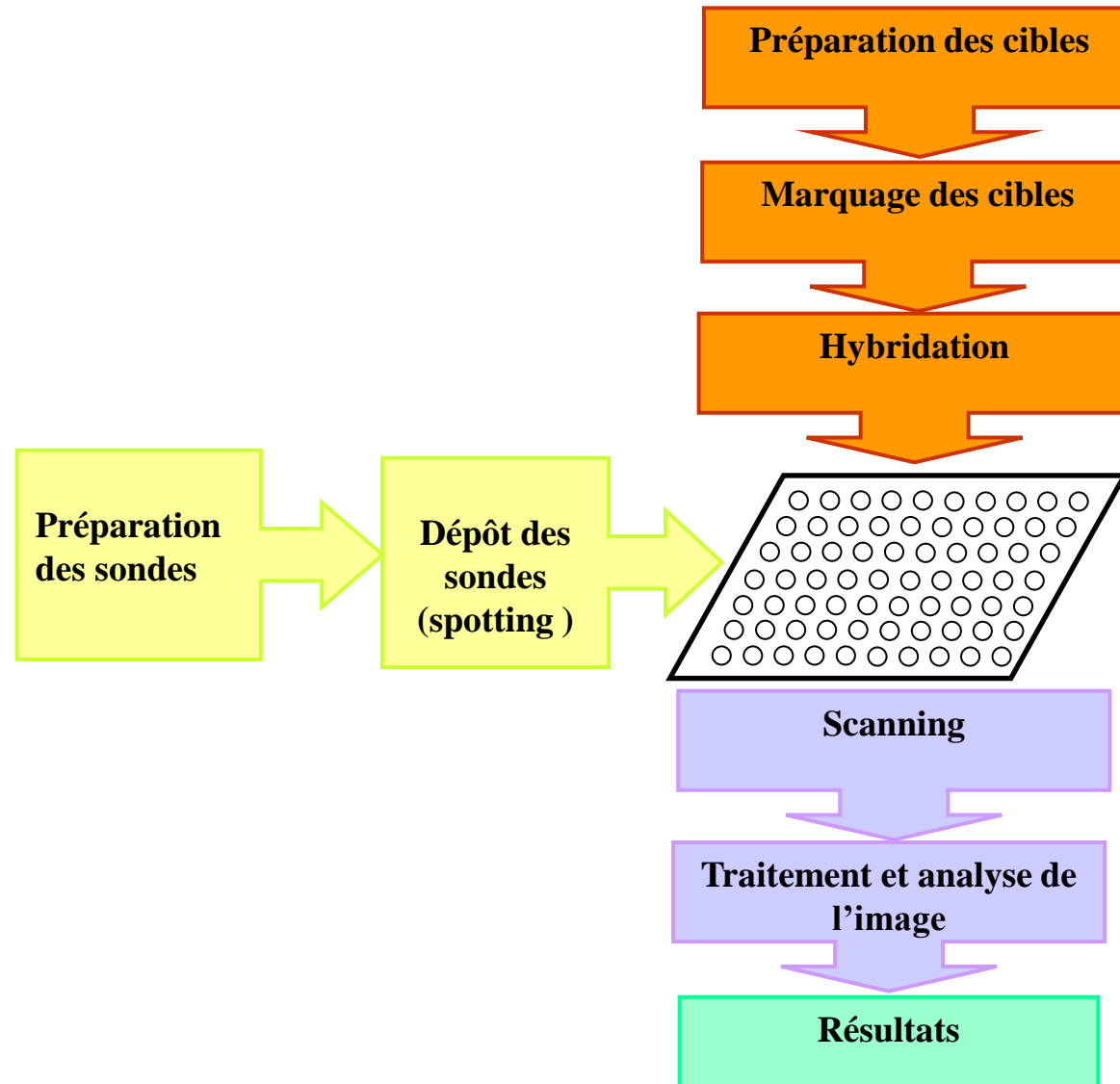
# Les microarrays ou puces à ADN ou DNA chips

Technique pluridisciplinaire: μélectronique, chimie des Ac Nucléiques  
analyse d'image et la bioinformatique



Les sondes: ADNc, oligonucléotides ou ADN génomique

# Principe des puces à ADN

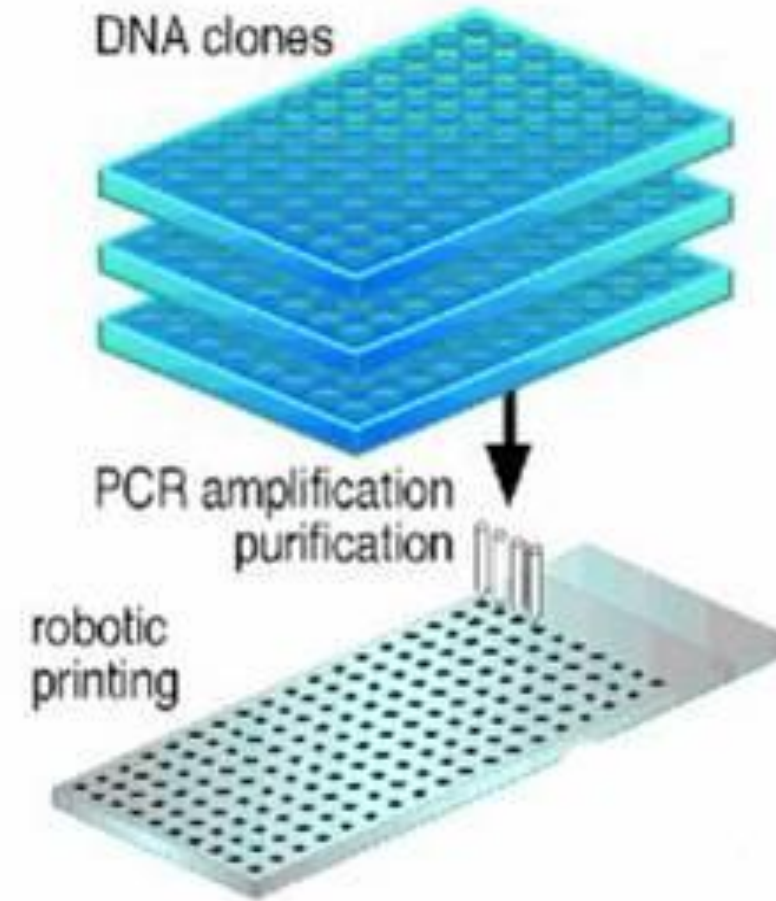


# Fabrication des puces à ADNc

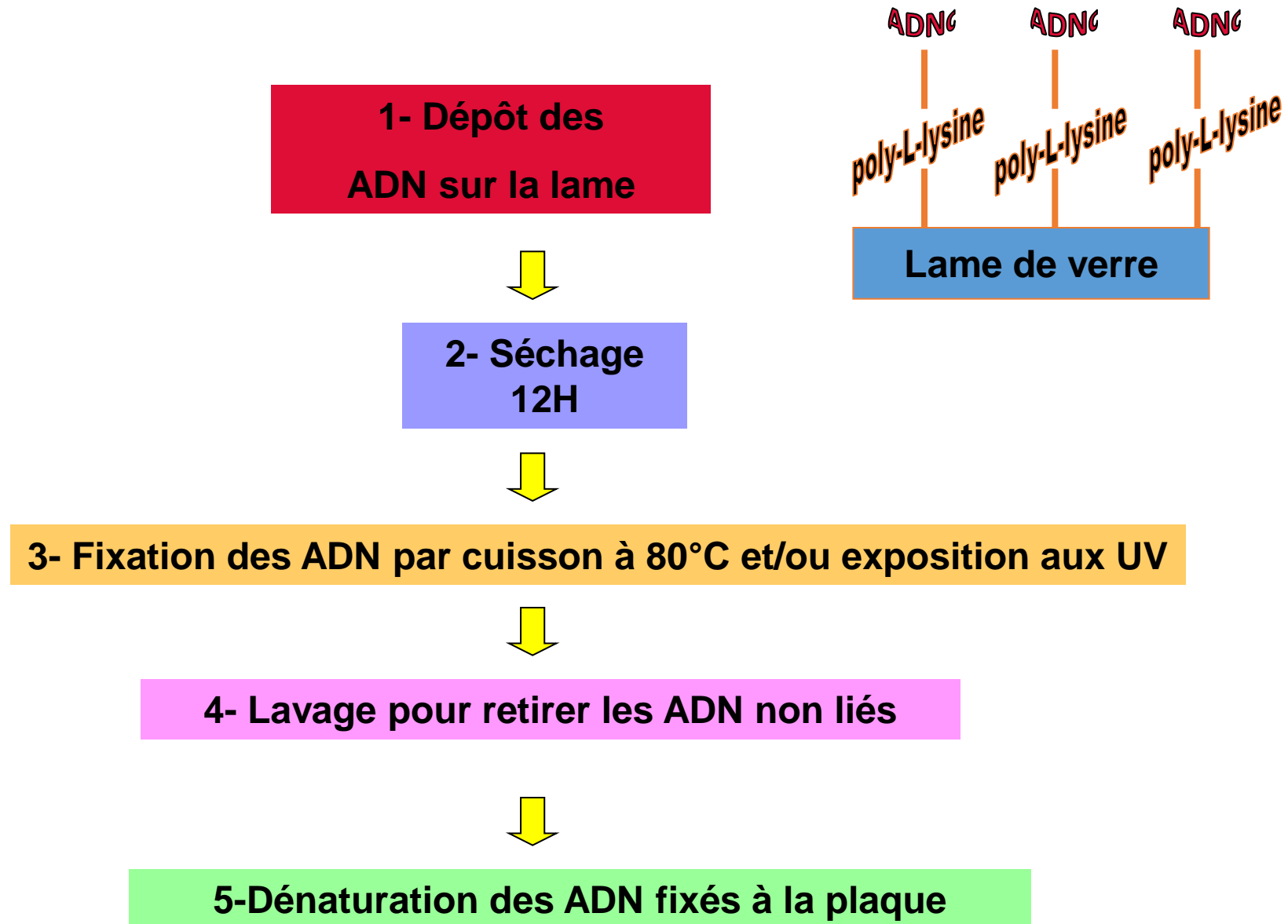
- ADNc des banques d'EST  
amplifiés par PCR



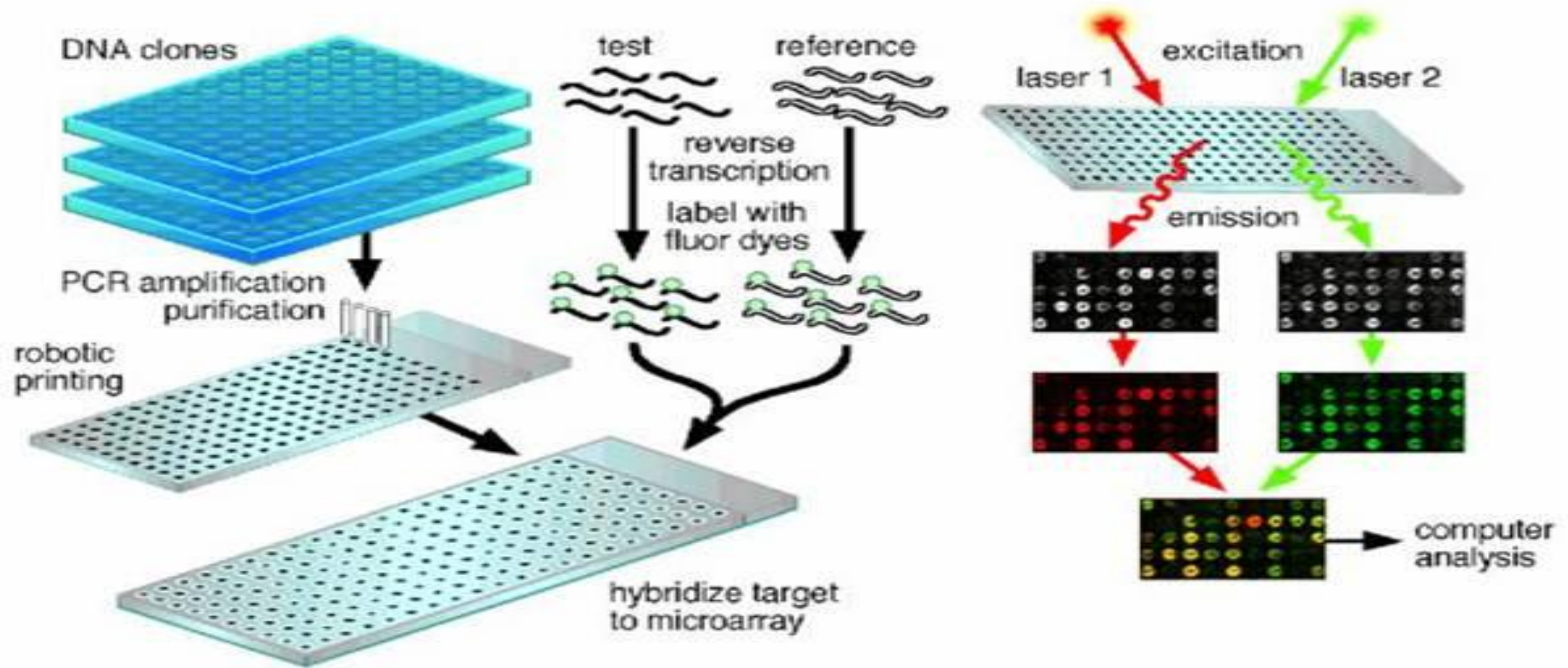
- Dépôt sur lame de verre  
robot



# Mode de fixation des sondes au support

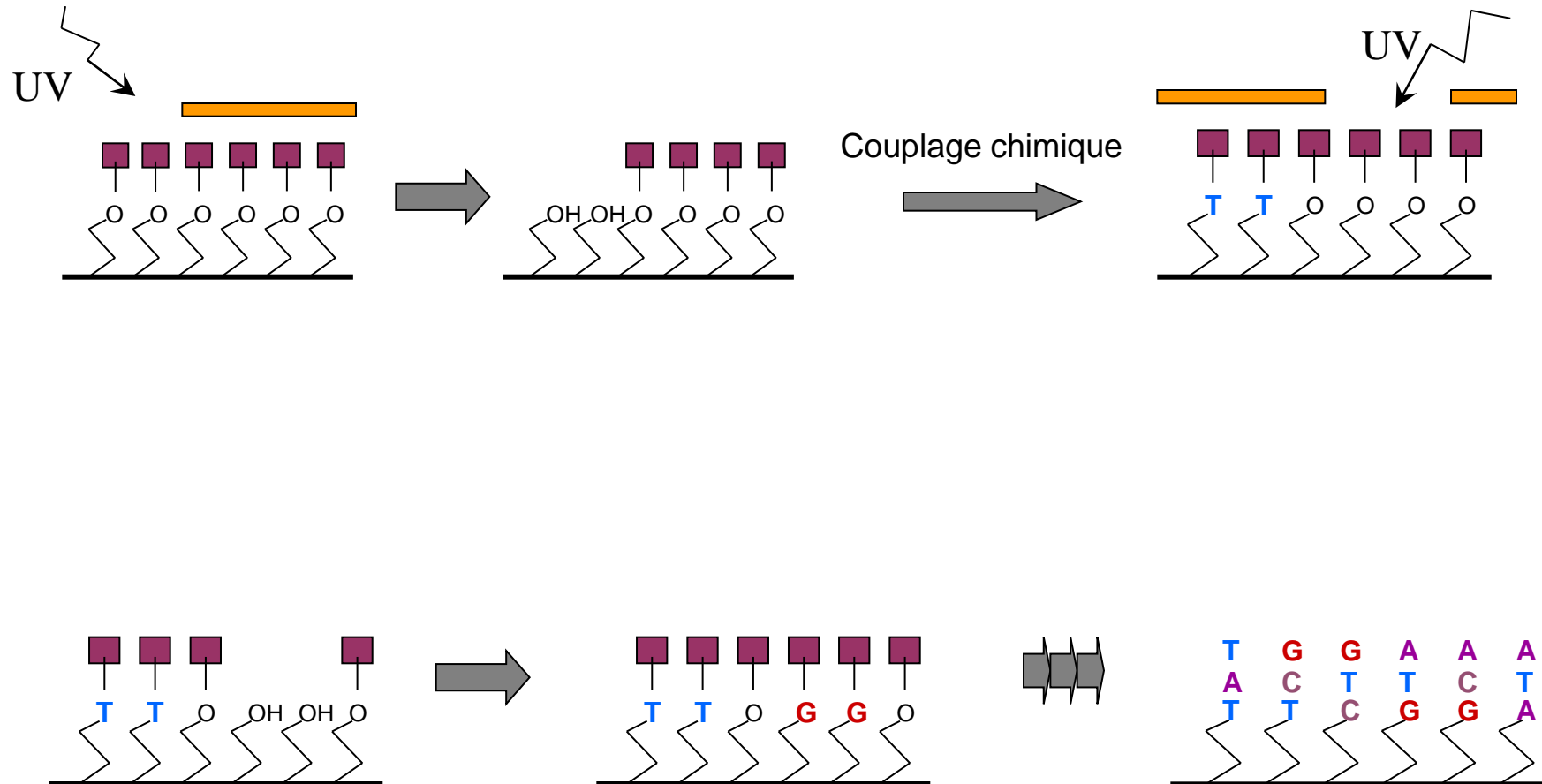


# Aperçu général de l'utilisation de la puce à ADN



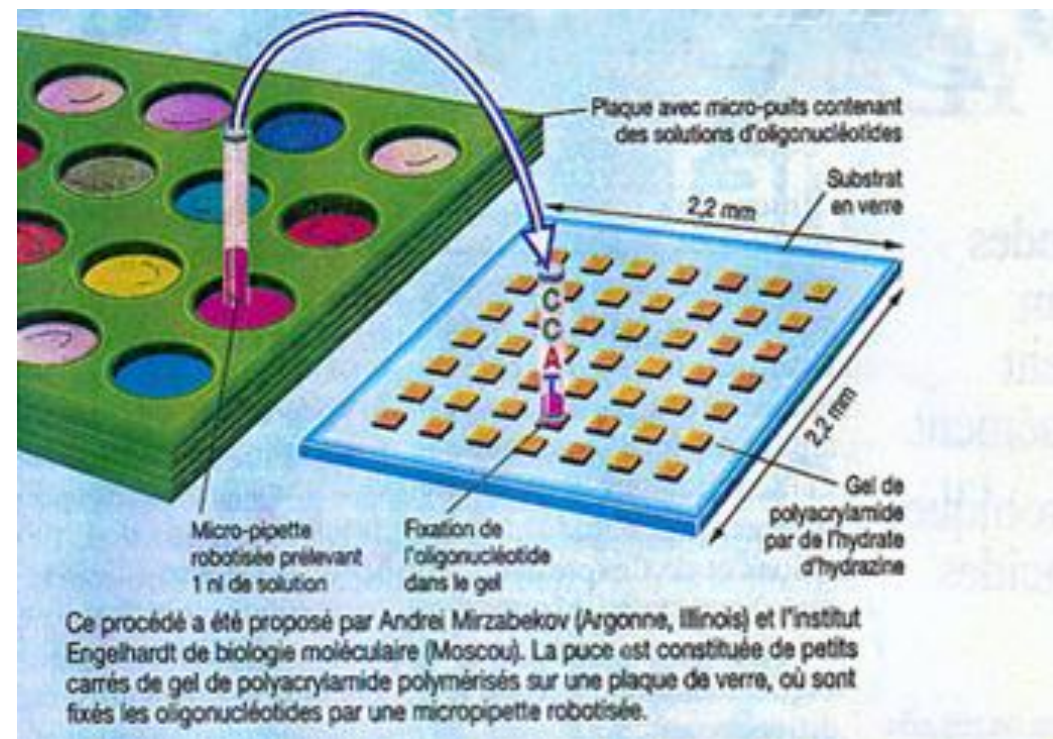


# Synthèse *in situ* des oligos (technique « on chip » d'Affymetrix)



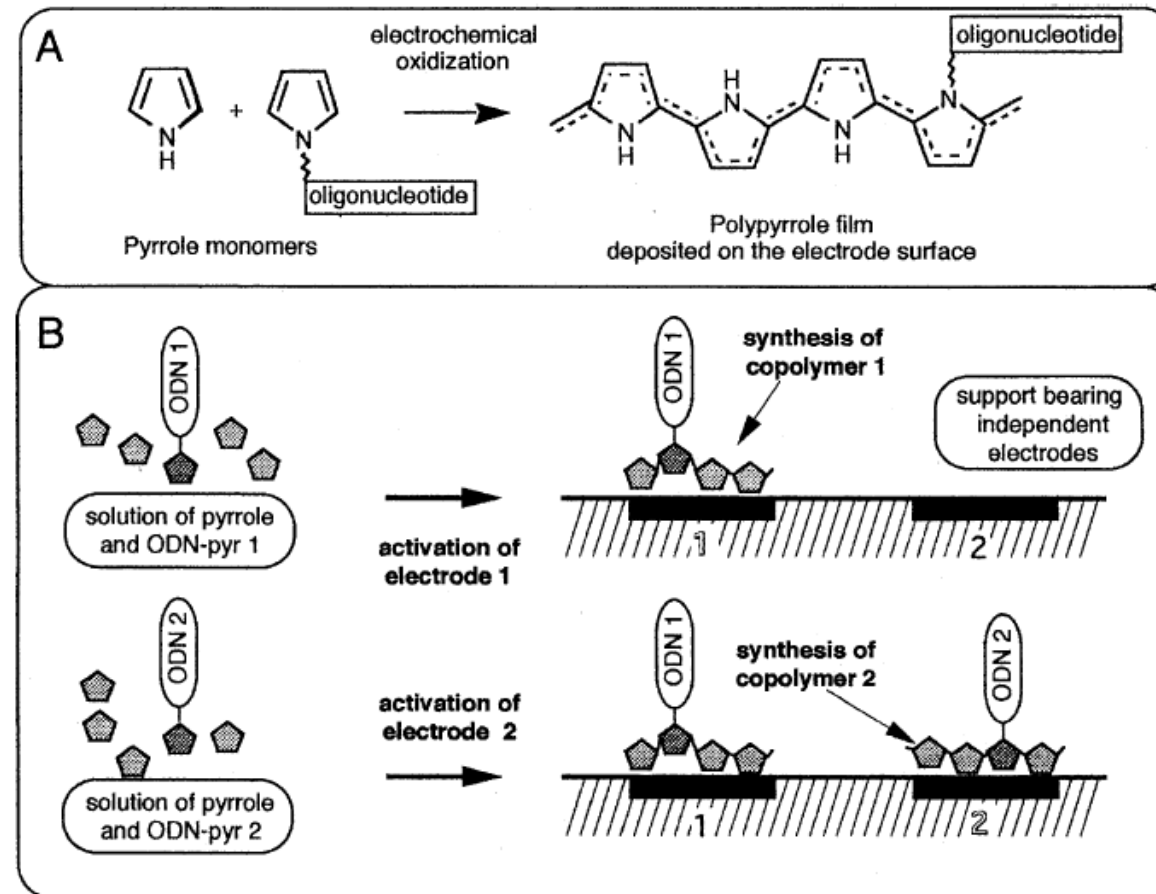
# Fixation d'oligonucléotides pré synthétisés

→ par adressage mécanique (technique de jet d'encre)



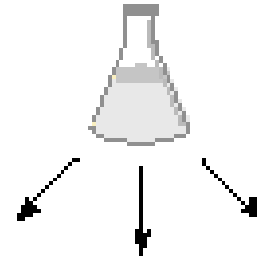
# Fixation d'oligonucléotides pré synthétisés

→ Par adressage électrochimique

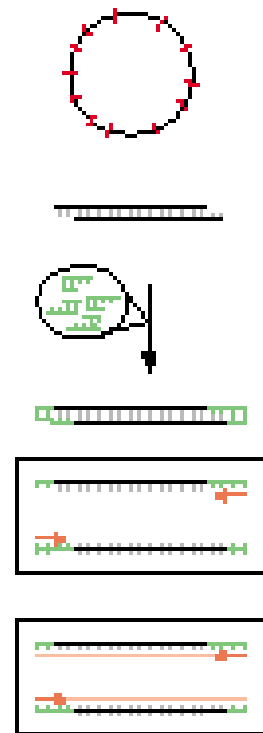


# Fabrication des puces à ADN

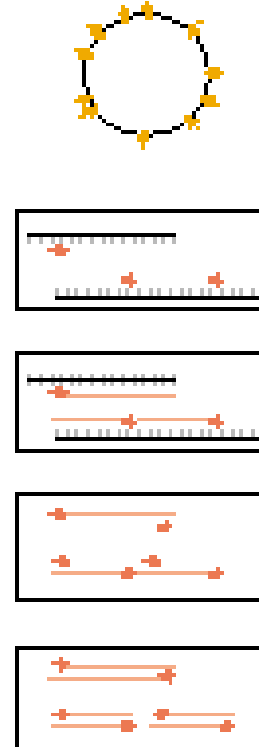
---



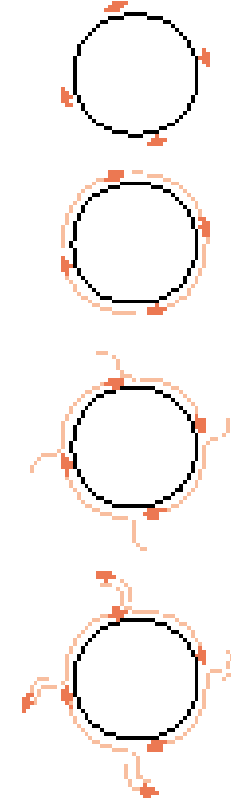
(a) Ligation-mediated PCR



(b) DOP-PCR



(c) Rolling circle amplification



# Marquage des cibles

**Marqueurs utilisés:** cyanines fluorescentes **Cy3** et/ou **Cy5**

**Cibles: ADNc ou ADNg**

→ différents marquages possibles

# Marquage des cibles

## Marquage direct:

- ADNc: RT des ARNm avec dCTP marqué au Cy3 ou Cy5
- ADNg: dénaturation puis synthèse brin complémentaire avec fragment de Klenow avec dCTP marqué au Cy3 ou Cy5

## Marquage indirect de l'ADNg:

- dénaturation puis synthèse brin complémentaire avec fragment de Klenow avec aminoallyl-dUTP

2<sup>ème</sup> étape: ajout de N-succinimidyl-Cy3 (Cy5)

- échange groupements aminoallyl / Cy3 (Cy5)

## Avantages du marquage indirect:

plus homogène et plus intense

évite d'utiliser une enzyme → évite biais

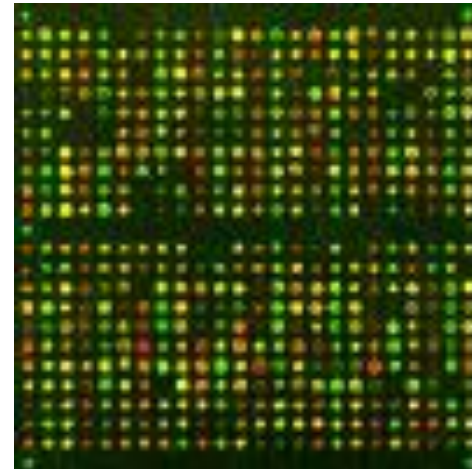
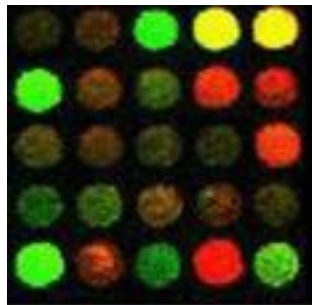
## Hybridation sonde/cible:

→ 65°C pendant la nuit

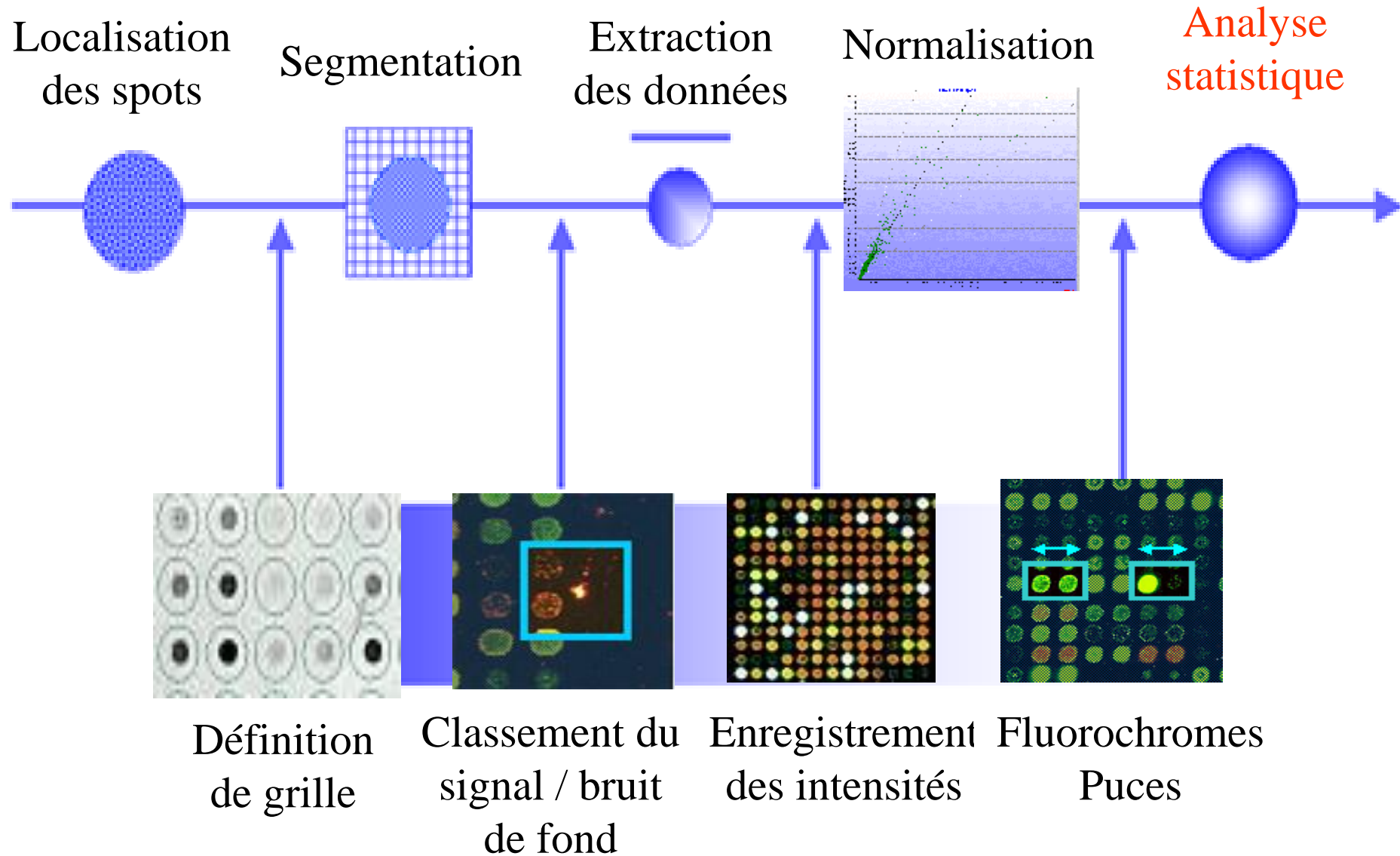
## Scanning:

→ des lasers excitent les fluorochromes qui émettent des rayonnements

→ les rayonnements sont transmis pour finalement former une image.



# Traitement de l'image





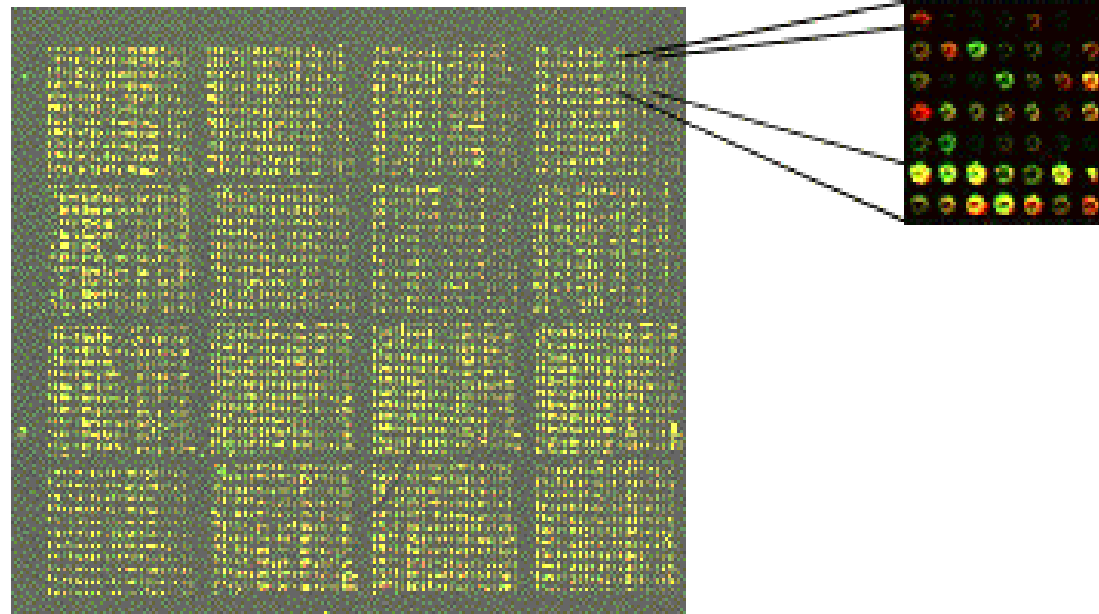
# Traitement de l'image

## Normalisation

- **Fluorochromes** : méthode dye-swap :
  - Inversion de Cy3 et Cy5 pour normaliser leur incorporation
- **Puces** : utilisation de valeurs témoins inchangés :
  - gène ubiquitaire
  - référence externe
  - normalisation en masse

# Analyse des données des puces à ADN

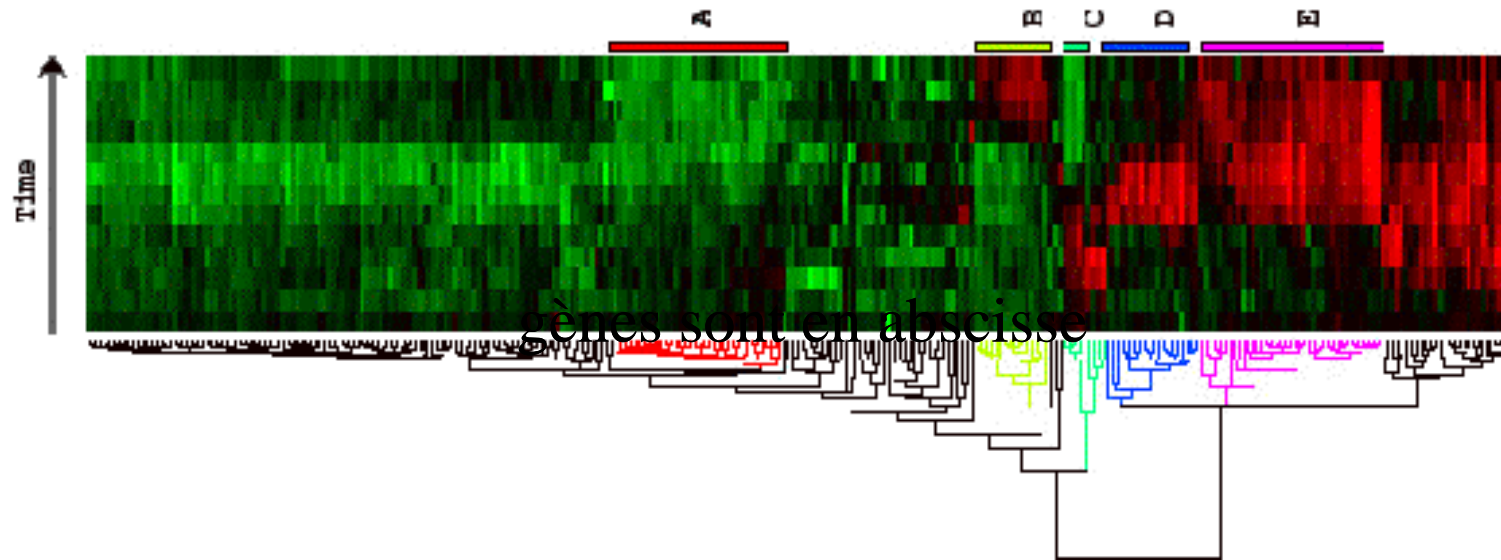
- Dégager des profils d'expressions de gènes co-exprimés
- Rouge  $\rightarrow$  sur-expression
- Verte  $\rightarrow$  sous-expression



- **Logiciels** ScanAlyse, GenePix ou ImaGene utilisés pour détecter les gènes ayant une **expression différentielle**
- **Tests statistiques:** reproductibilité des manipulations  
acquisition de données robustes et fiables  
Analyse de variance sur un min de 3 répétitions  
variance doit  $\longrightarrow 0$ 
  - **test statistique de Student** sur les intensités de signaux  
But: estimation des **variances et moyennes des intensités** en Cy3 et Cy5 calculées par les différents logiciels
  - **test ANOVA** estimer la reproductibilité des résultats

- analyses de données par des algorithmes

- méthode de classification hiérarchique d'Eisen
- But: analyser des profils d'expression



- - clusters A, B, C, D et E = des gènes ayant des profils d'expression similaires.
- Autres algorithmes utilisés, carte de Kohonen, algorithme d'apprentissage supervisés...

# Applications des puces à ADNc

- **Etude du transcriptome par l'analyse de l'expression différentielle d'un ensemble de gènes impliqués dans différents processus comme:**

le maintien du rythme circadien

la résistance des plantes aux maladies

les réponses aux stress environnementaux

le développement du fruit et de la graine

la signalisation dans la morphogénèse

l'assimilation azotée....

- **Déterminer le nombre de copies de gènes**
- **rechercher des gènes dont les profils d'expression sont proches et soumis aux mêmes circuits de régulation**
- **étudier les différents génomes dont les séquences sont disponibles tels que ceux:**
  - d'Arabidopsis thaliana,*
  - de la tomate,
  - du riz,
  - du blé,
  - du maïs
  - de la fraise,
  - de l'orge,
  - du peuplier...

# Exemples d'étude récents chez les plantes

- **activité de différents gènes codant des protéines P450 :**
  - dans des plantes de différents âges
  - entre les tissus d'une même plante
  - sous différents stress : salin, osmotique, température, pathogène, UV, chimique
- **étudier des champignons pathogènes de plantes**
- **étudier les réponses des différentes voies métaboliques aux différents signaux**
  - environnementaux : nutriments, lumières, températures, attaque de pathogènes
  - de développement

# Avantages et limites

1ère technique appliquée des puces avec 2 avantages majeurs :



- **robuste** car couramment utilisée



- **analyse parallèle de l'expression différentielle de plusieurs gènes**



Un inconvénient majeur: **banques d'ADNc incomplètes**, des gènes peuvent manquer sur les puces car :

- soit ils n'ont pas pu être conservés dans les banques d'ADNc ou d'EST
- soit le génome modèle qui a servi à l'élaboration de la banque ne possédait pas certains gènes spécifiques appartenant à d'autres génotypes.

ex : étude du génome d'un champignon pathogène: la souche servant à l'élaboration de la banque ne possède pas tous les gènes des différentes souches sauvages ou vice versa.

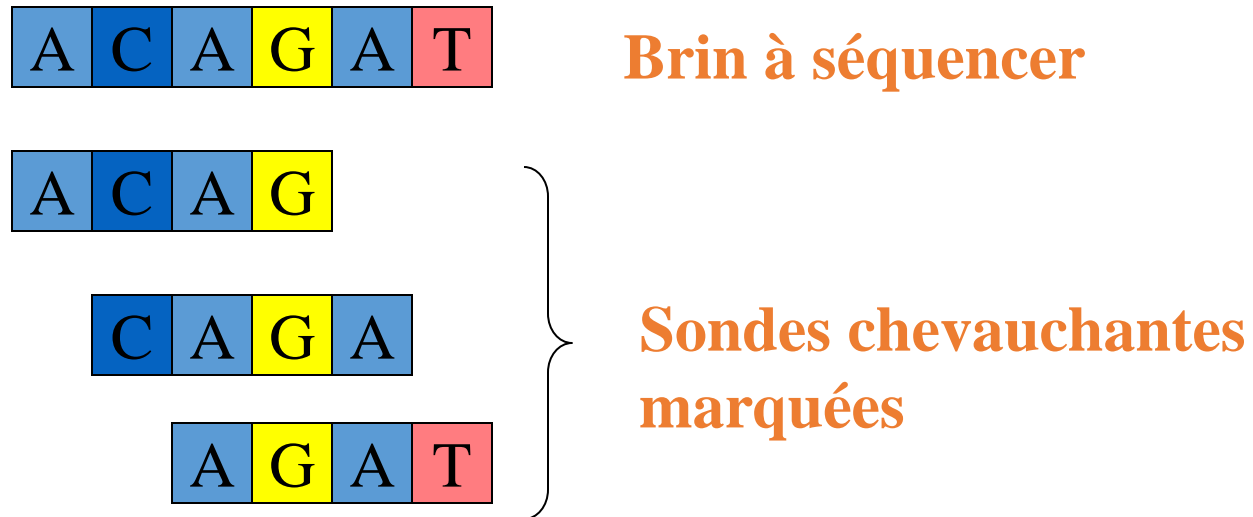


# Applications

## Puce à oligonucléotides

- **Séquençage par hybridation**

- Utilisation de sondes chevauchantes s'hybridant à la matrice
- Détection des sondes hybridées permettant le séquençage de petits blocs



- Reconstitution du brin d'ADN par traitement informatique

# Applications

## Puce à oligonucléotides

- **Détection de polymorphisme :**

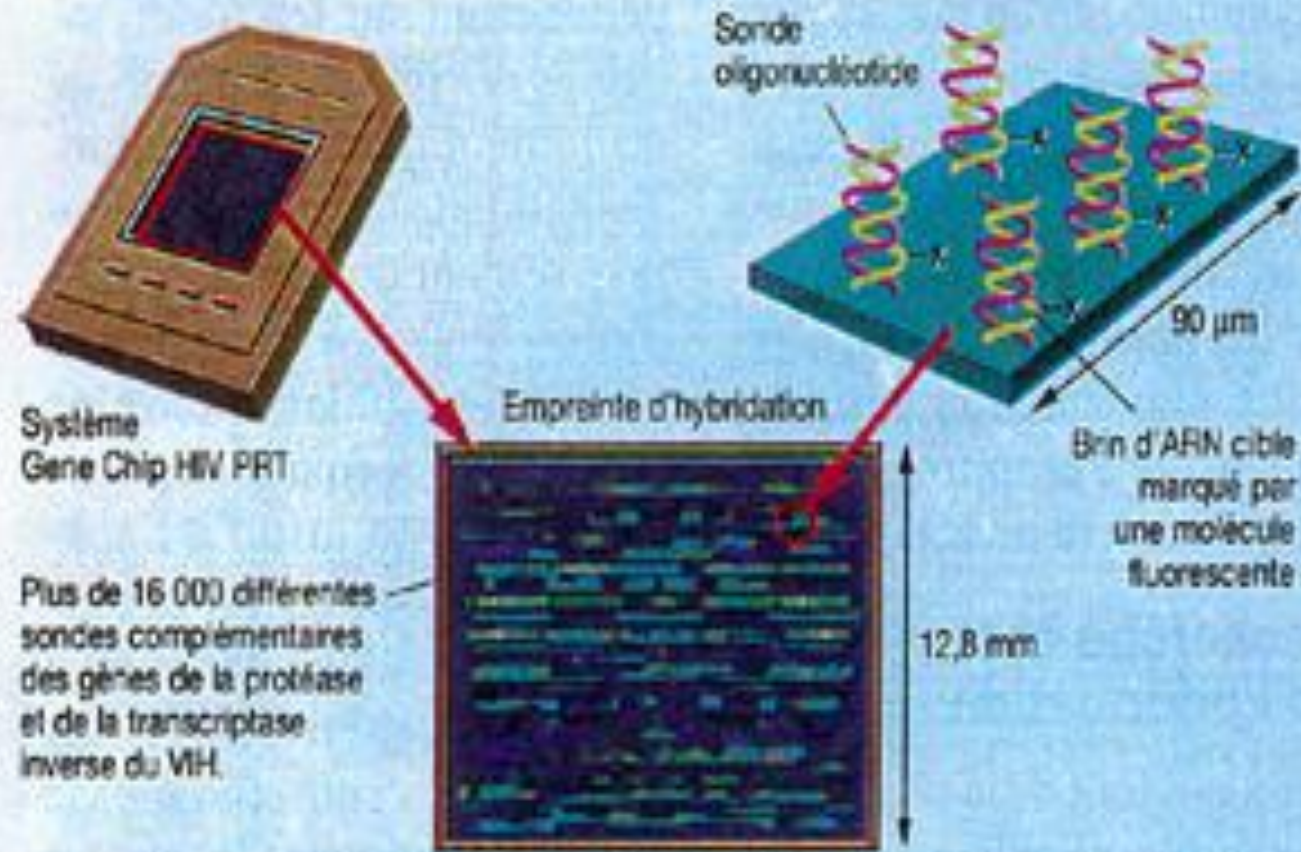
- Séquence sauvage + sondes couvrant l'ensemble des mutations potentielles (substitution, délétion, addition):

- Trois sondes pour les substitutions potentielles en position centrale.
    - Trois sondes pour les insertions de 1 nucléotide en position centrale
    - Cinq sondes pour des délétions en position centrale.

- Comparaison des sondes hybridées

# Applications

**Fig. 6 - Principe de la puce Gene Chip HIV PRT**



La première puce à ADN commercialisée, la Gene Chip HIV PRT d'Affymetrix, a été conçue pour l'analyse des mutations dans les gènes de la transcriptase inverse et de la protéase du virus VIH.

# Avantages / Limites des puces à oligonucléotides

→ 1 pré-requis : séquence connue (+ / -)

→ Puce Affymetrix :

puce à haute densité (+)

oligos courts (-)

→ Puce à oligos présynthétisés:

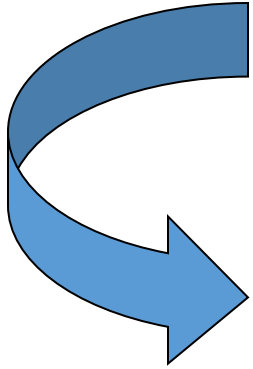
puce à faible densité (-)

oligos longs (+)

→ Coûteux (-)

# Applications des puces à ADN

- Étude de l'expression (ADNc)
- La CGH (comparative genomic hybridization) :
  - absence/présence de gènes
  - nombre de copie de gènes (délétions, duplications)



Diagnostics, phylogénie, évaluation de la pathogénicité...

## Avantages limites des Puces à ADNg

Avantages: • accès à la totalité de l'information génétique (exons et introns, promoteurs...)  
• délétions, duplication (nombre de copies)

Limites: • technique coûteuse (séquençage, matériel)  
• résolution de l'analyse (taille insert, distance génétique)  
• séquences répétées