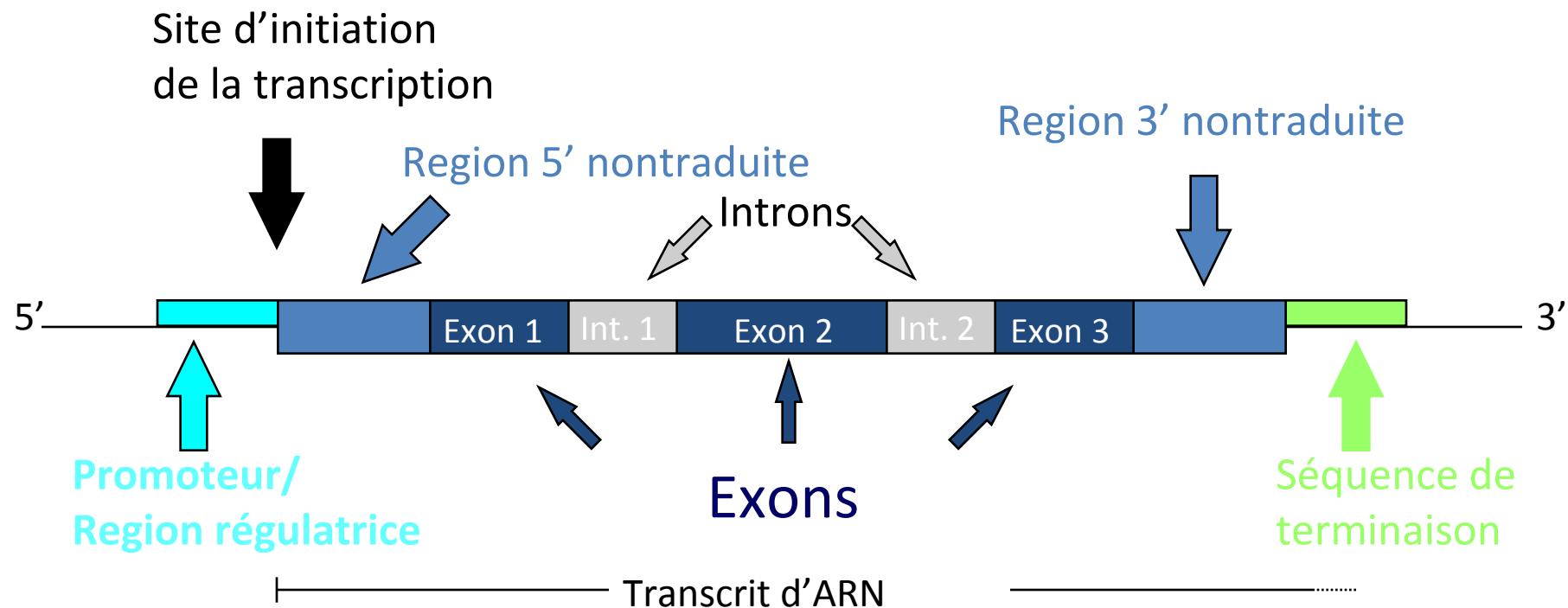


Expression du Génome

I- Transcriptome

Les Gènes



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

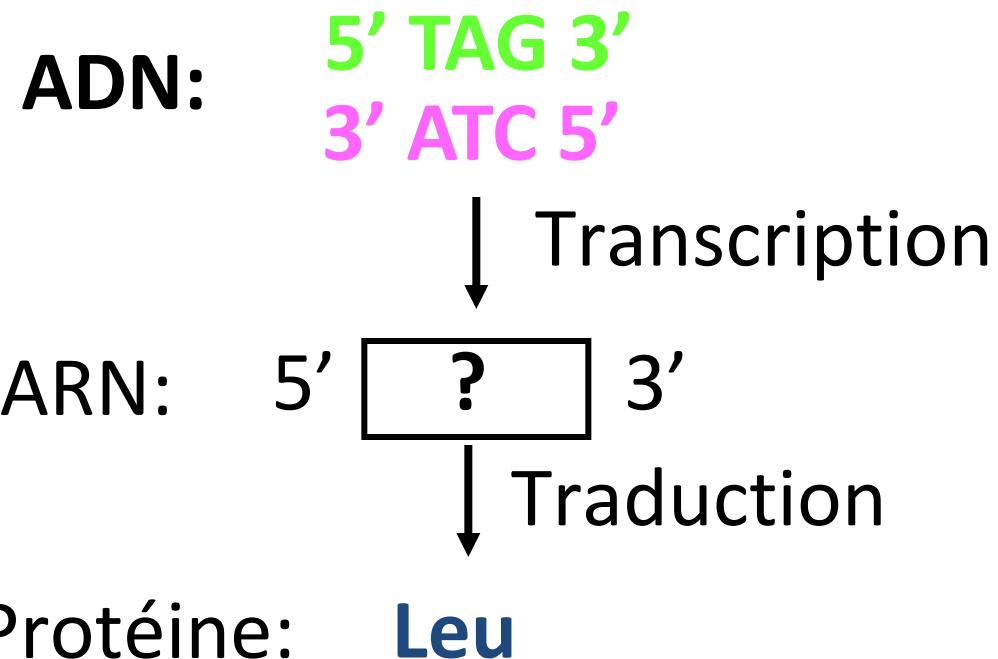
Codant

- 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

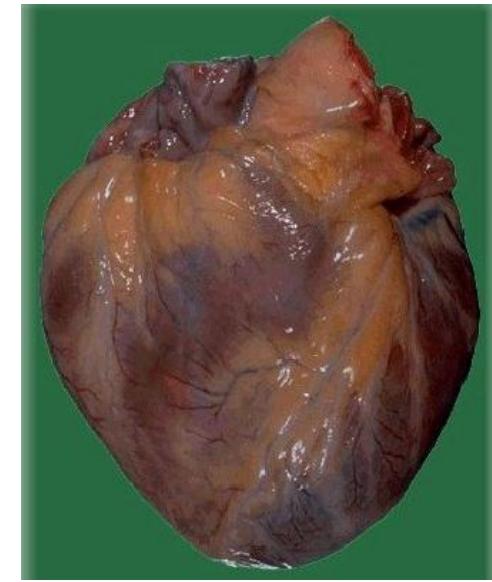
- Brin non Codant
- Brin négatif
- Brin anti sens
- Brin matrice
- Brin dont la séquence est **complémentaire** à celle de l'ARN transcrit

Codant Vs Non-codant



Code génétique: CUA = Leu

UAG = Arrêt



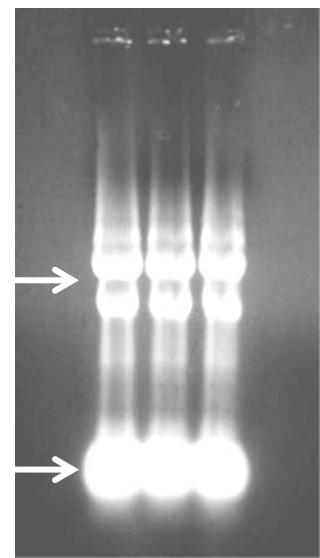
Est-ce qu'une Séquence Code pour un Transcript?

- Analyse d'hybridations Northern :
- RT-PCR

Comparaison des Méthodes

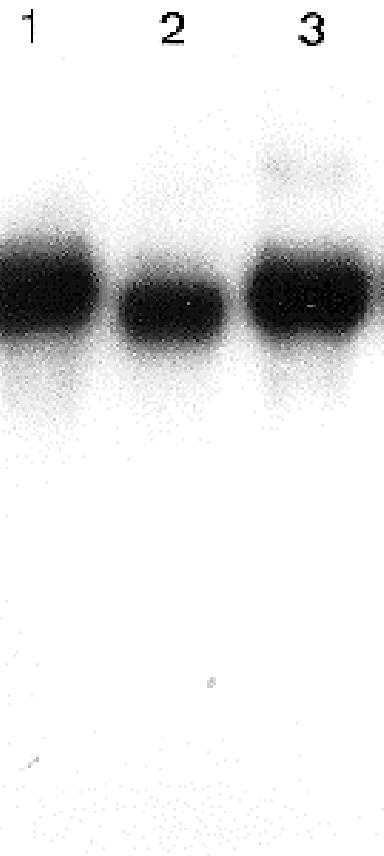
Analyse Northern

- 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

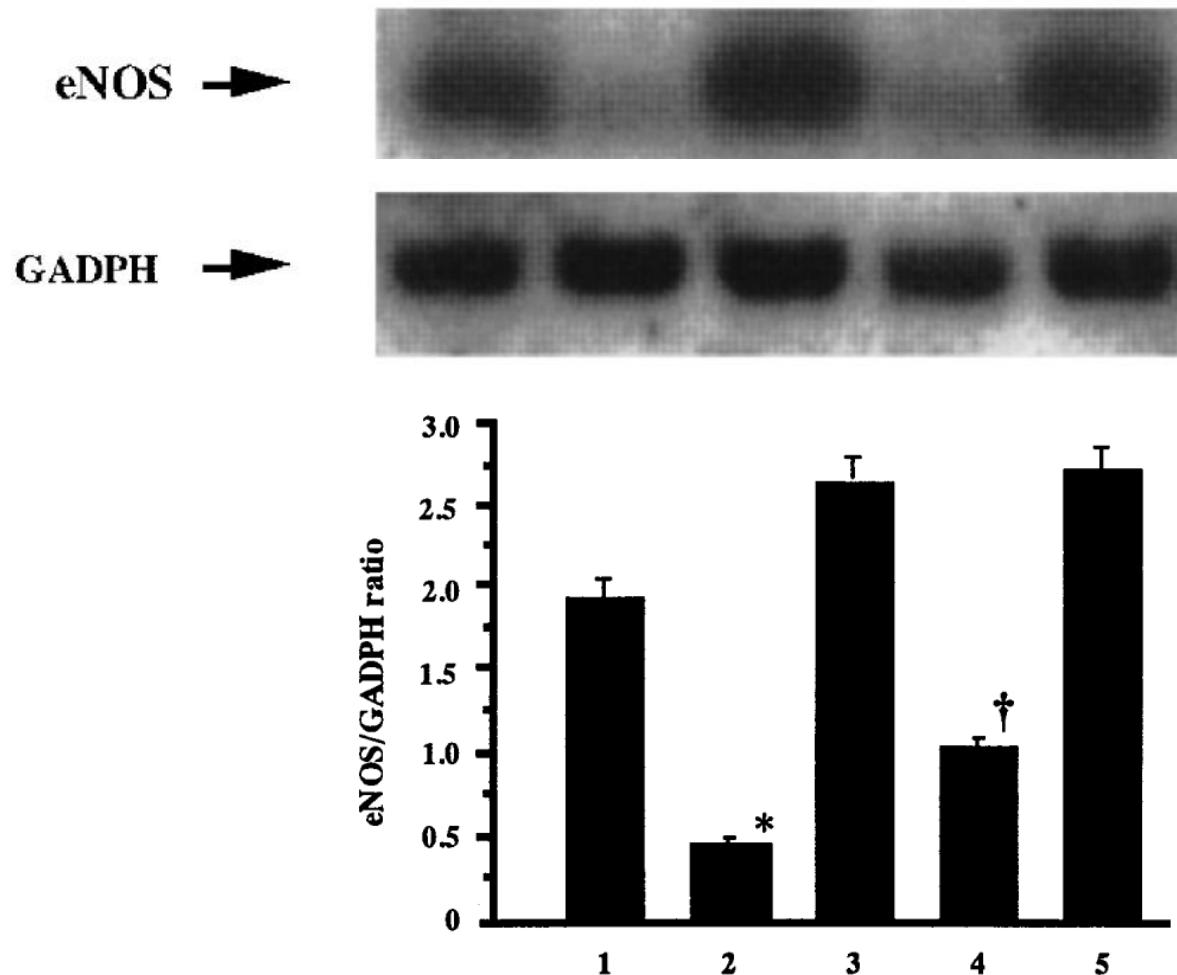
- Nécessite une sonde
 - Hybridation = la sonde possède
 - La séquence est exprimée
 - Intensité du signal d'hybridation
 - Nombre de signaux d'hybridation
 - Possiblement nombre de gènes



Hybridation Northern

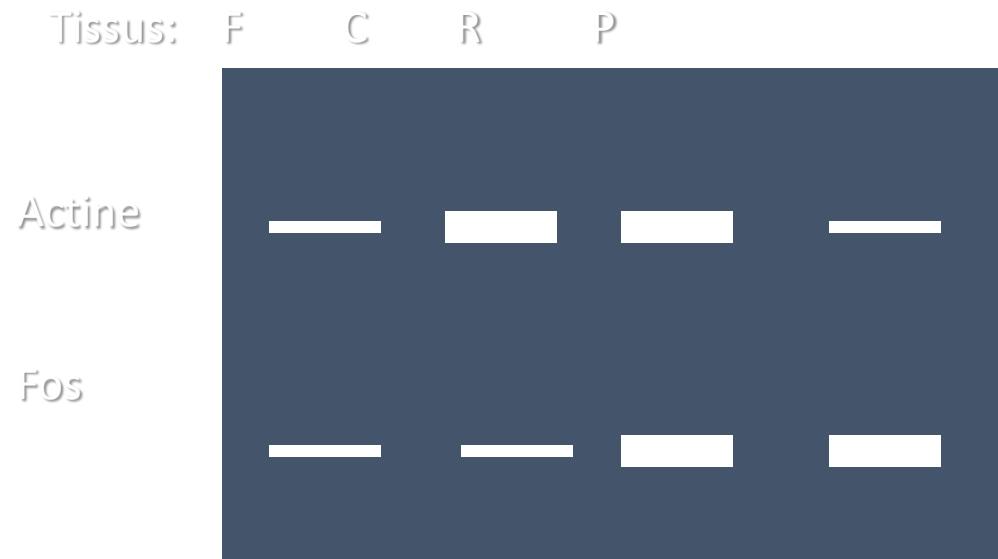
- Permet de comparer la quantité relative d'un transcrit
 - Sensibilité faible
 - Requiert un témoin interne
 - Gène dont l'abondance est constante sous les différentes conditions examinées
 - Témoin pour les variations de la quantité d'ARN chargé
 - Utilise des gènes domestiques :
 - Gènes qui assurent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

La Normalisation



Problème

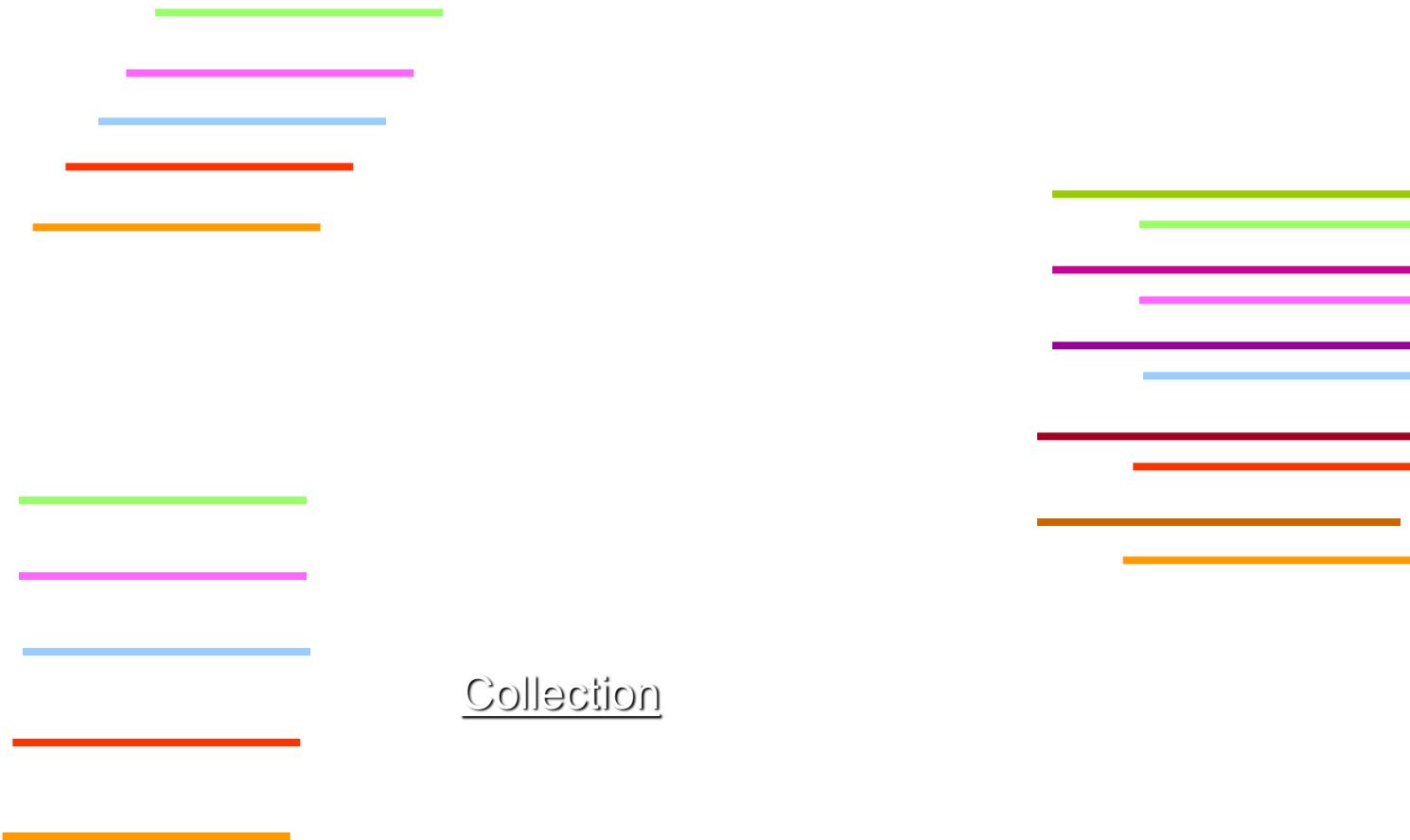
- Un Northern d'ARN isolé de différents tissus a été sondé avec le gène Fos et le gène domestique actine. Expliquer les résultats obtenus



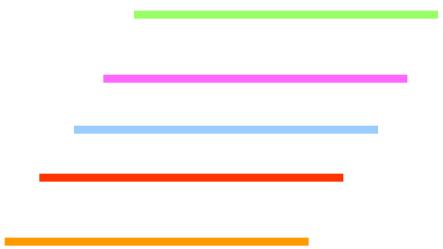
RT-PCR

- Permet 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

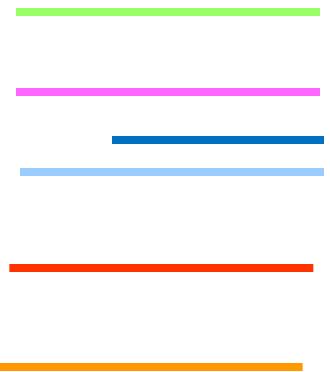
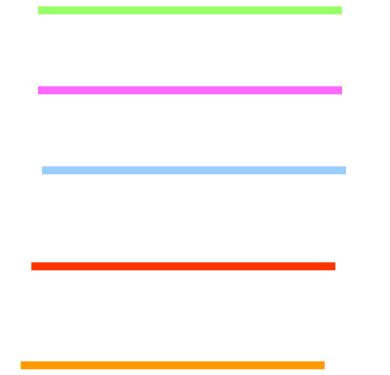
Réaction de Transcriptase Inverse Gène Non-Spécifique



Réaction de Transcriptase Inverse Gène Spécifique

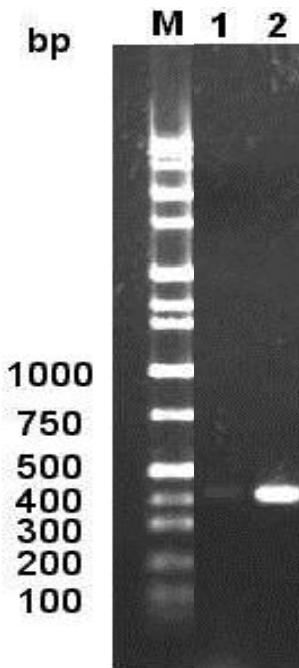


un

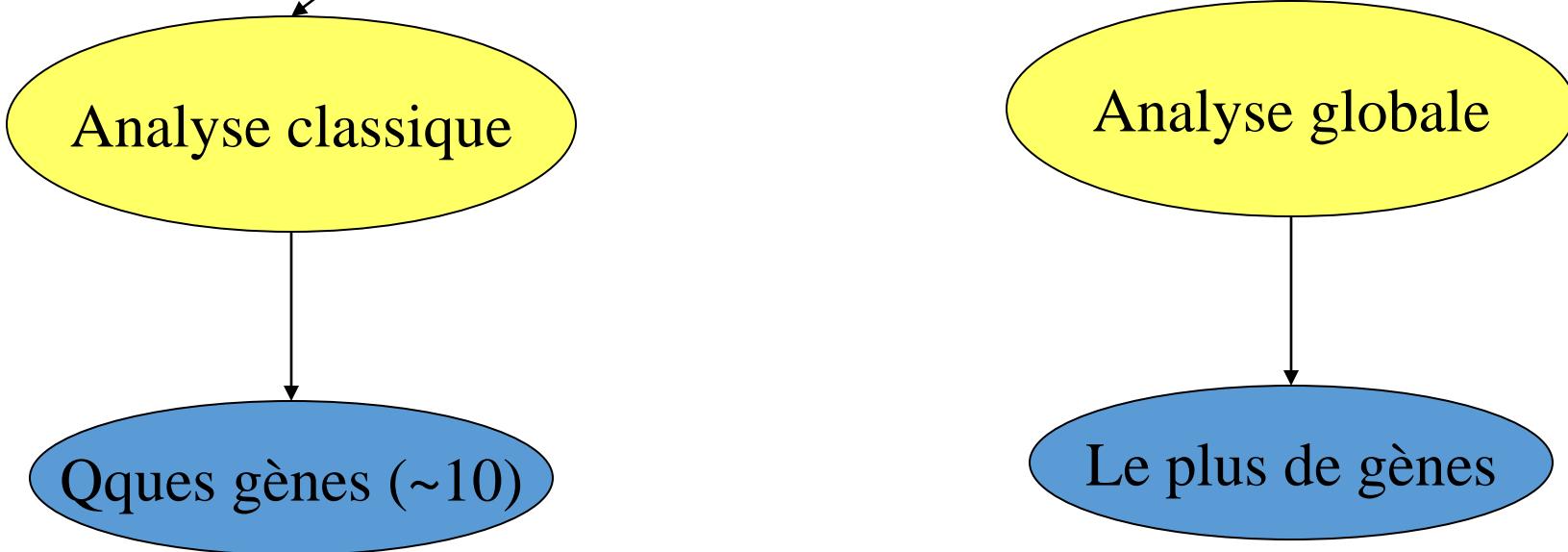


RT-PCR

- La séquence doit être connue pour la conce 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

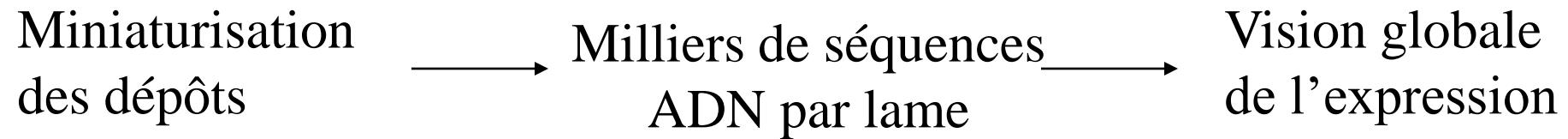


- Northern blot
- PCR quantitative

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

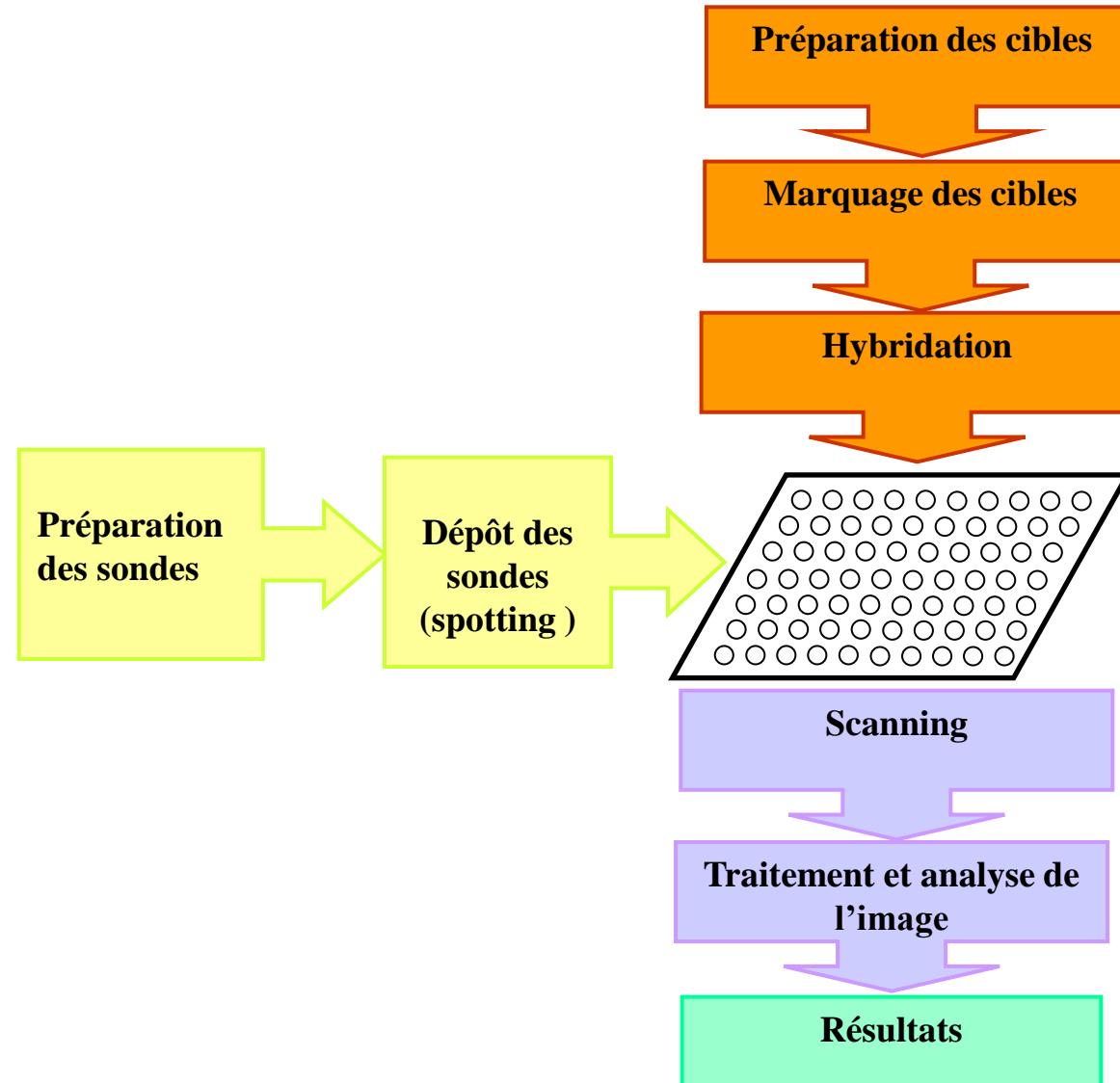
Les microarrays ou puces à ADN ou DNA chips

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



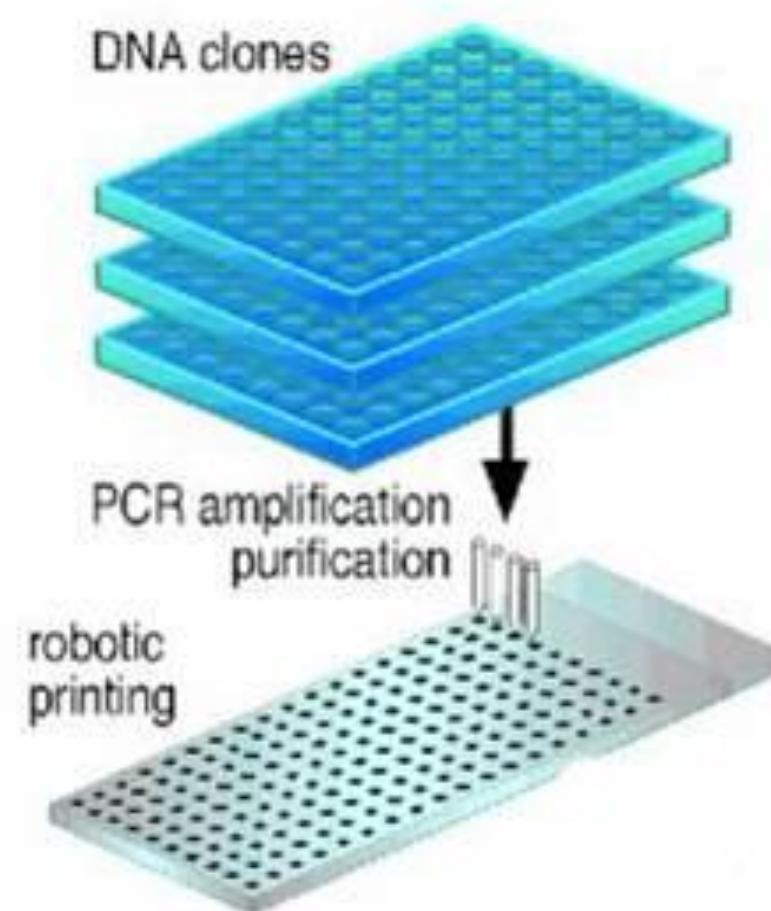
Les sondes: ADNc, oligonucléotides ou ADN génomique

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

1- Dépôt des
ADN sur la lame



2- Séchage
12H



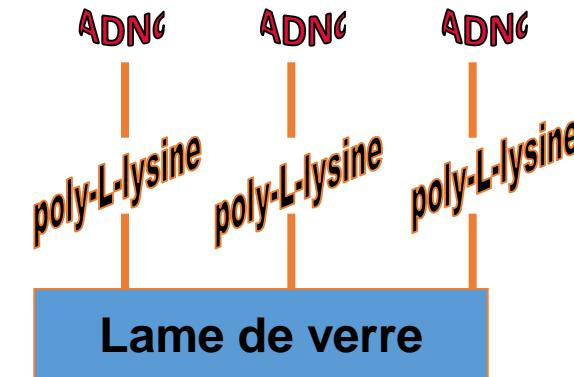
3- Fixation des ADN par cuisson à 80°C et/ou exposition aux UV



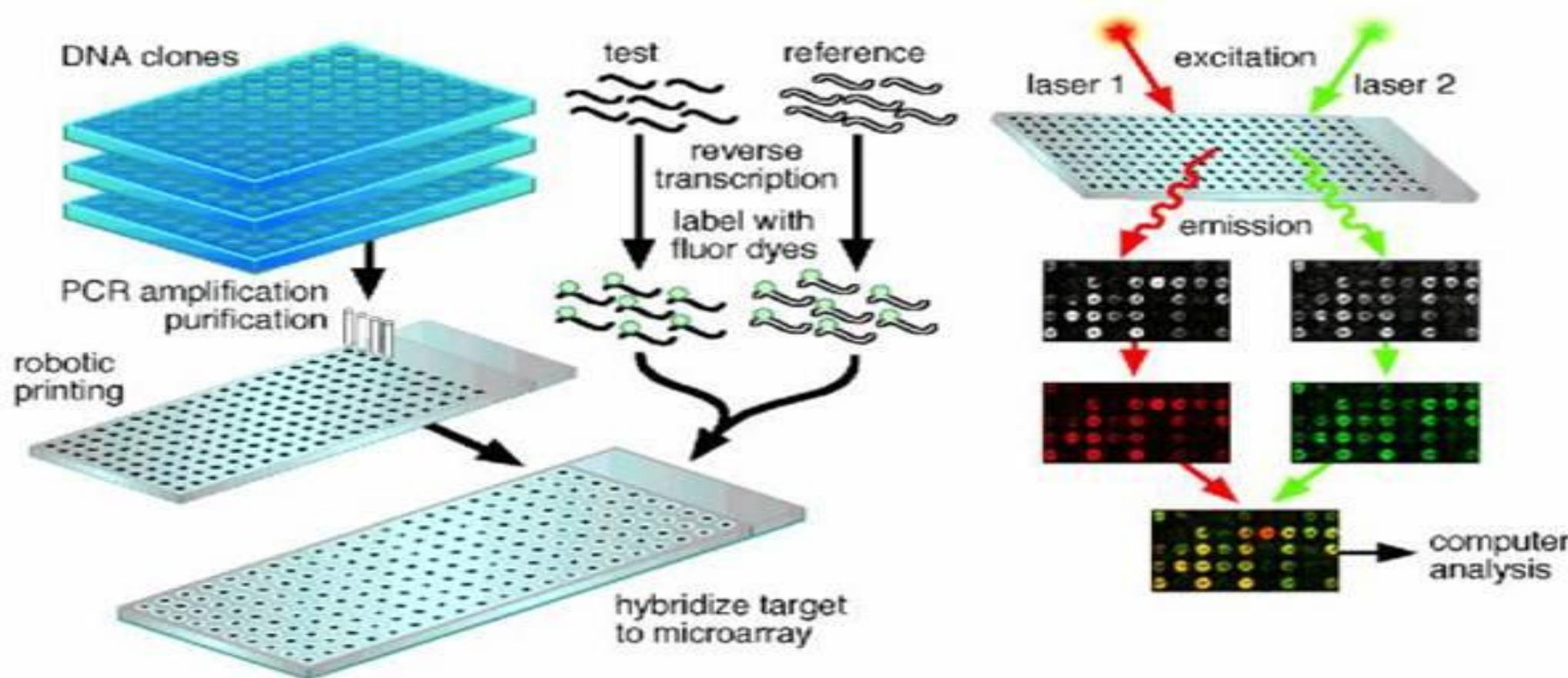
4- Lavage pour retirer les ADN non liés



5-Dénaturation des ADN fixés à la plaque

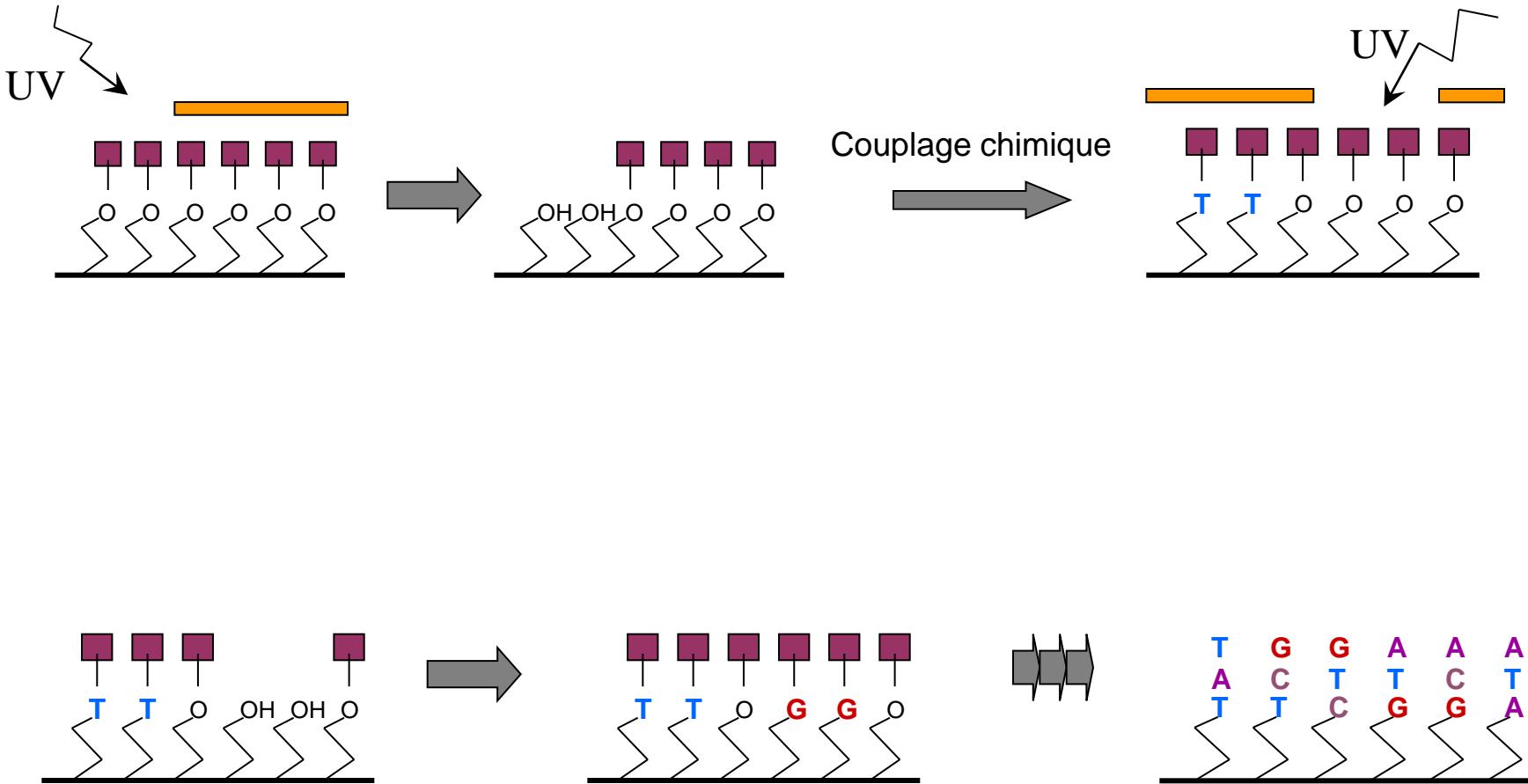


Aperçu général de l'utilisation de la puce à ADNc



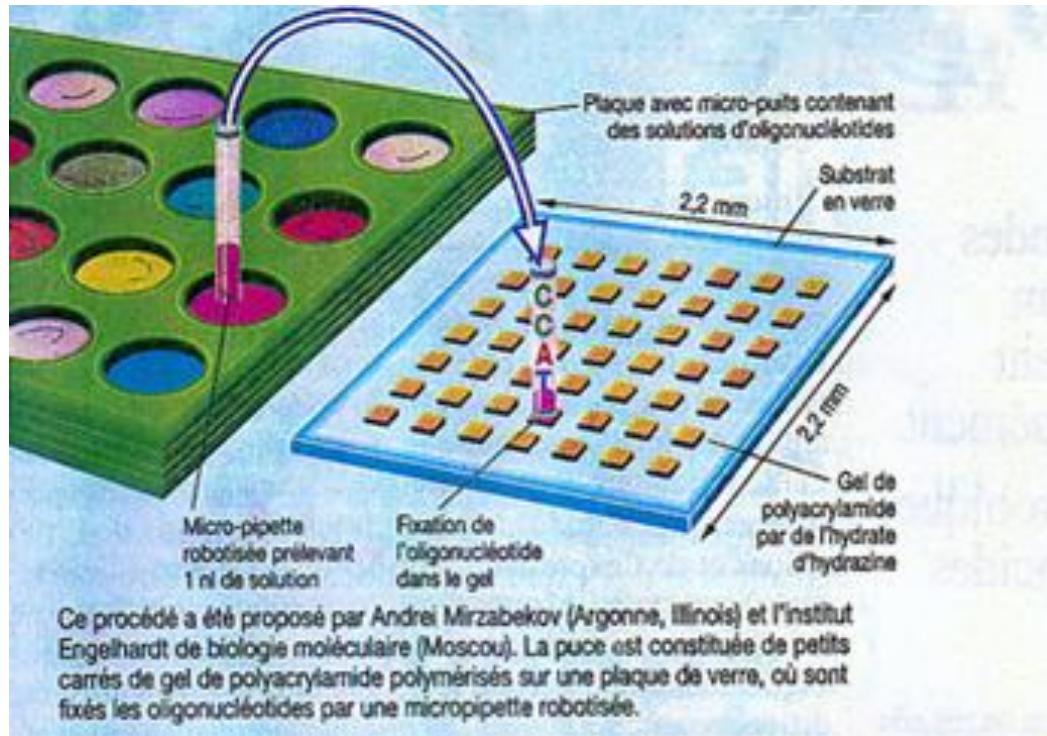
Synthèse *in situ* des oligos

(technique « on chip » d'Affymetrix)



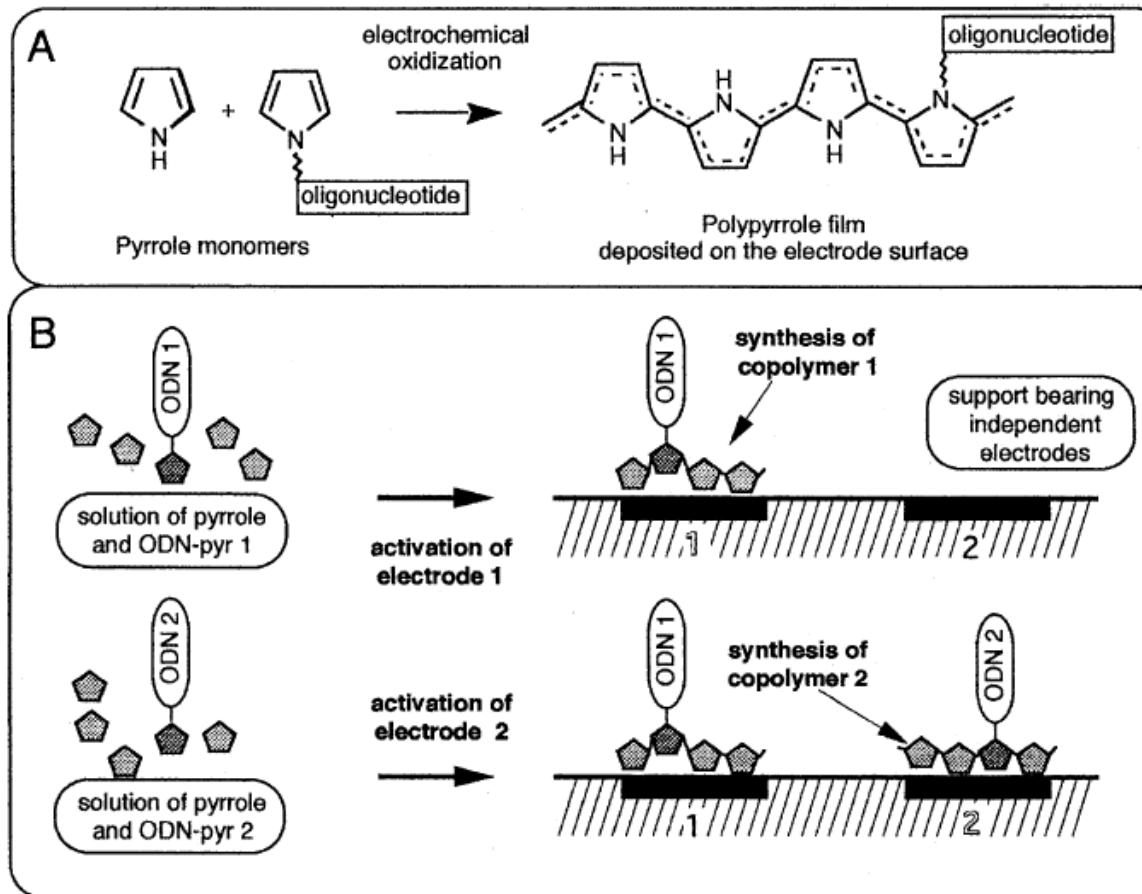
Fixation d'oligonucléotides pré synthétisés

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

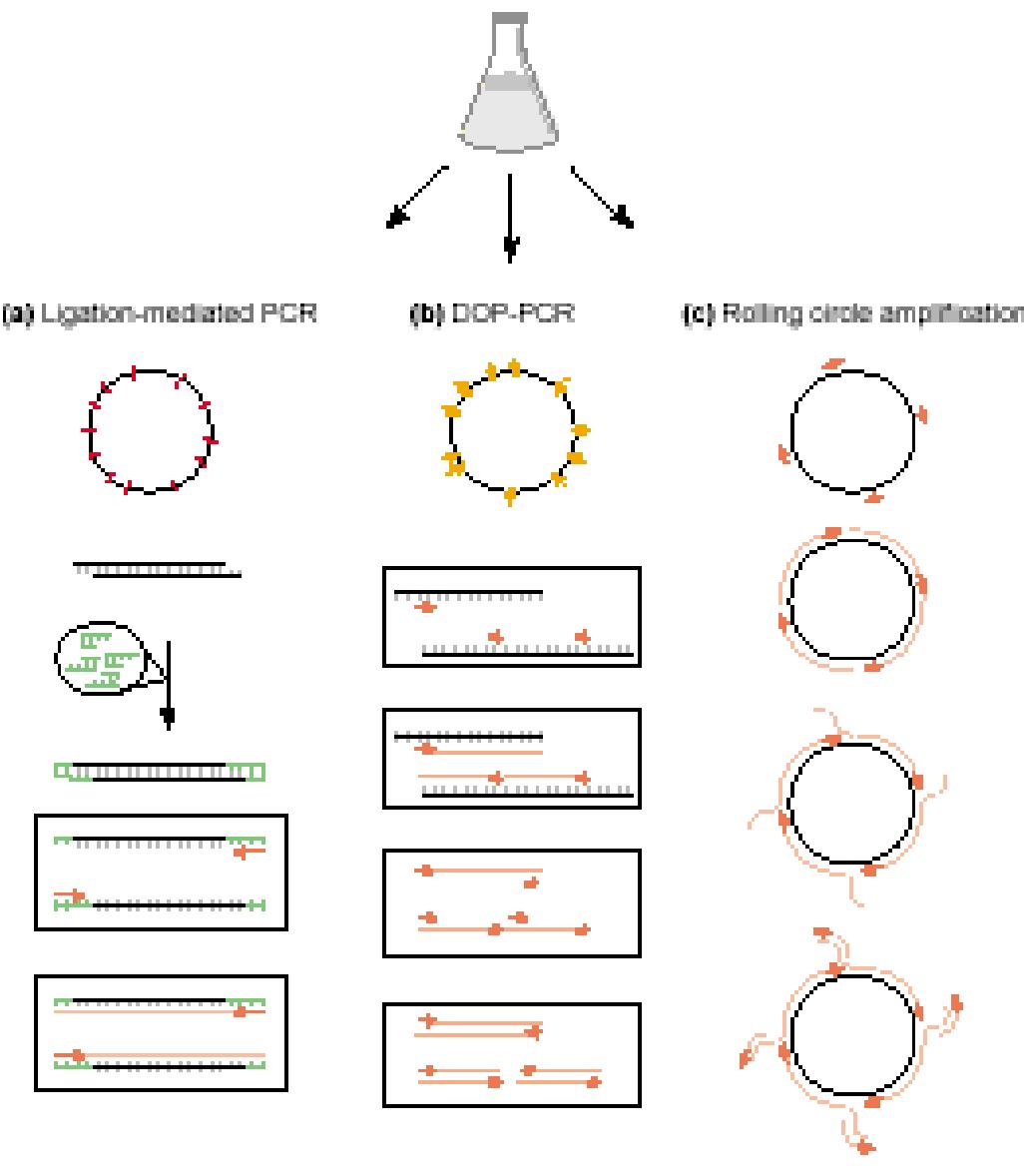


Fixation d'oligonucléotides pré-synthétisés

→ Par adressage électrochimique



Fabrication des puces à ADNg



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^{ème} 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

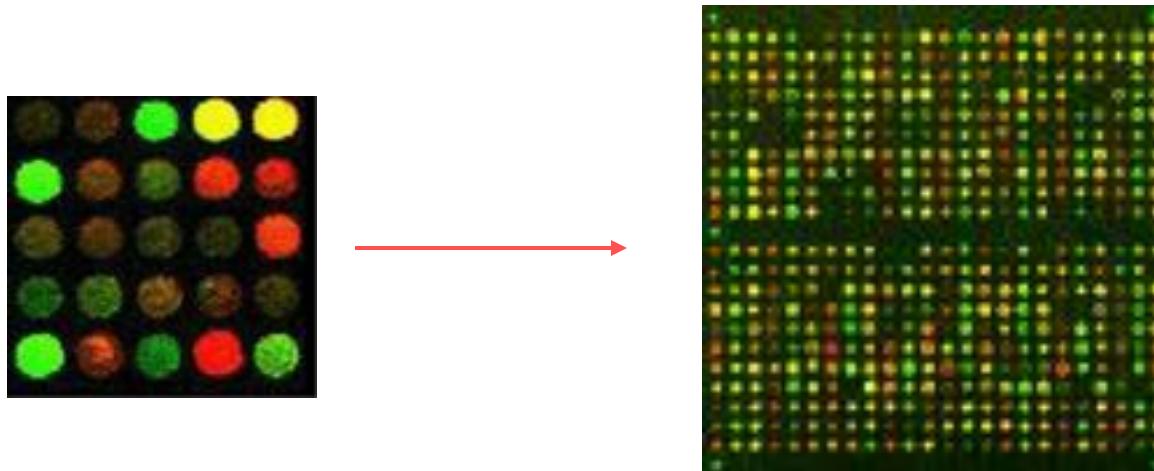
Hybridation sonde/cible:

→ 65°C pendant la nuit

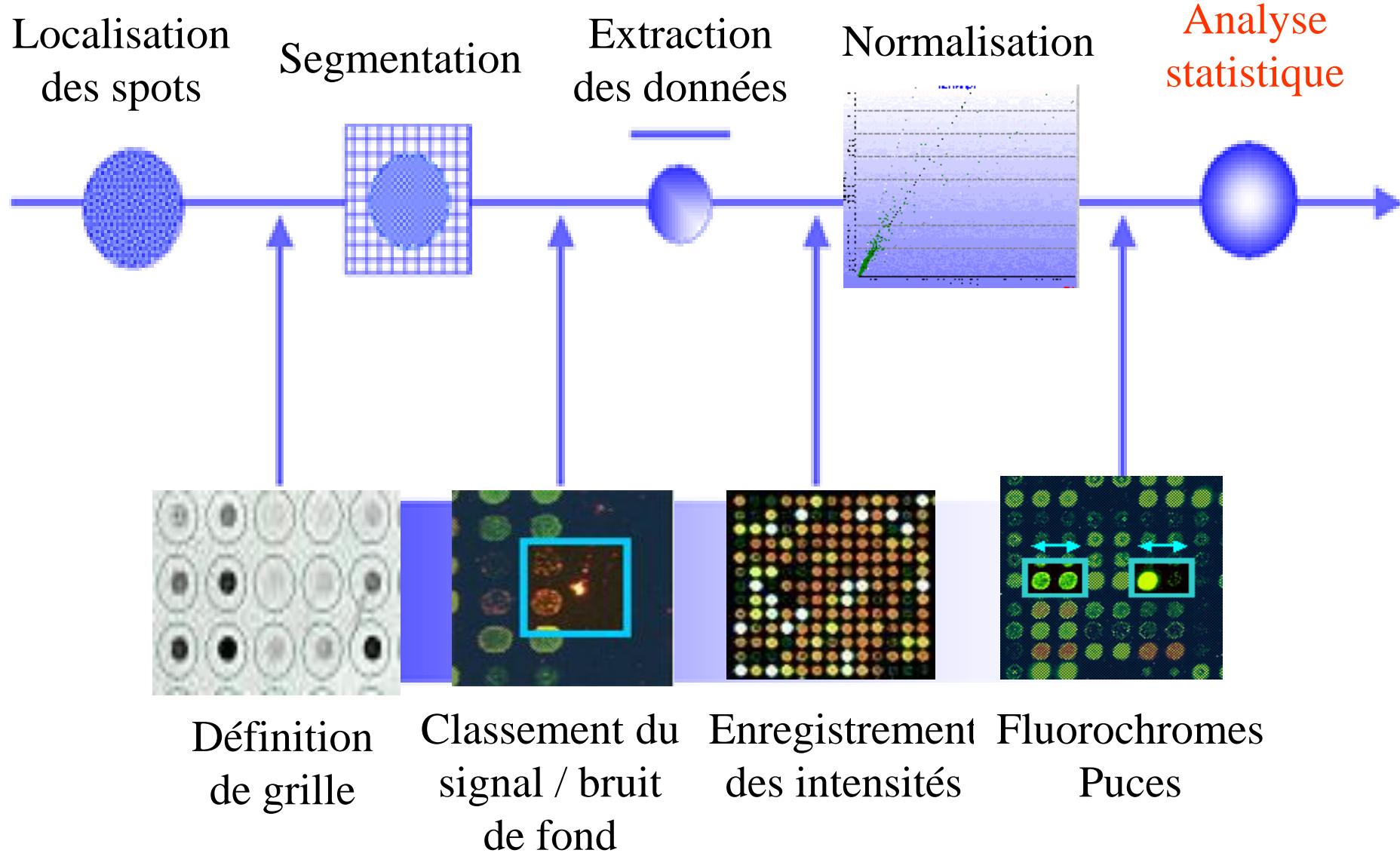
Scanning:

→ des lasers excitent les fluorochromes qui émettent des rayonnements

→ les rayonnements sont transmis pour finalement former une image.



Traitement de l'image



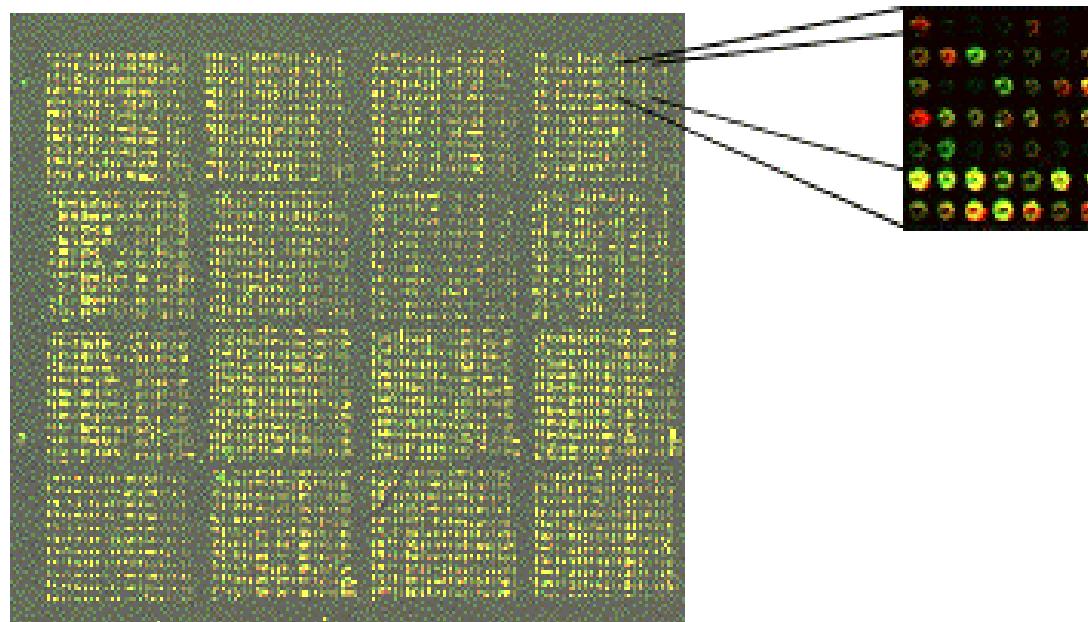
Traitement de l'image

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

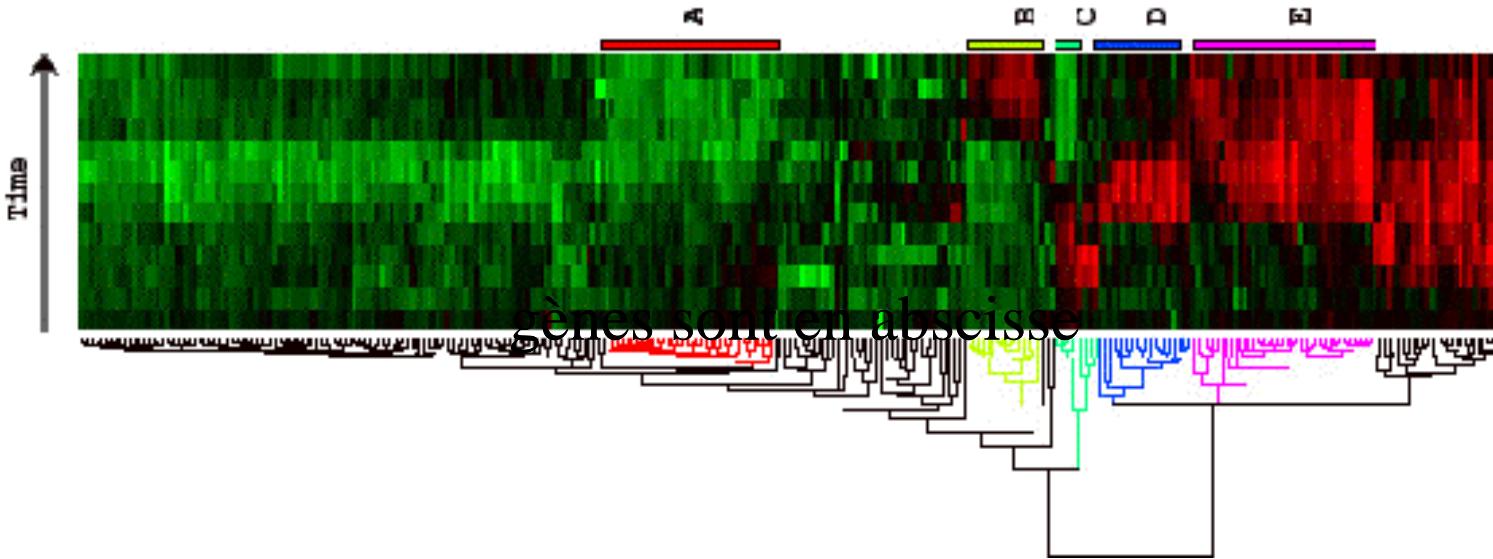
Analyse des données des puces à ADN

- Dégager des profils d'expressions de gènes co-exprimés
- Rouge sur-expression
- Verte 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 graines

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 manqués 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 hybrides permettant le séquençage de petits blocs

A | C | A | G | A | T

Brin à séquencer

A | C | A | G

C | A | G | A

A | G | A | T

Sondes chevauchantes
marquées

- Reconstitution du brin d'ADN par traitement informatique

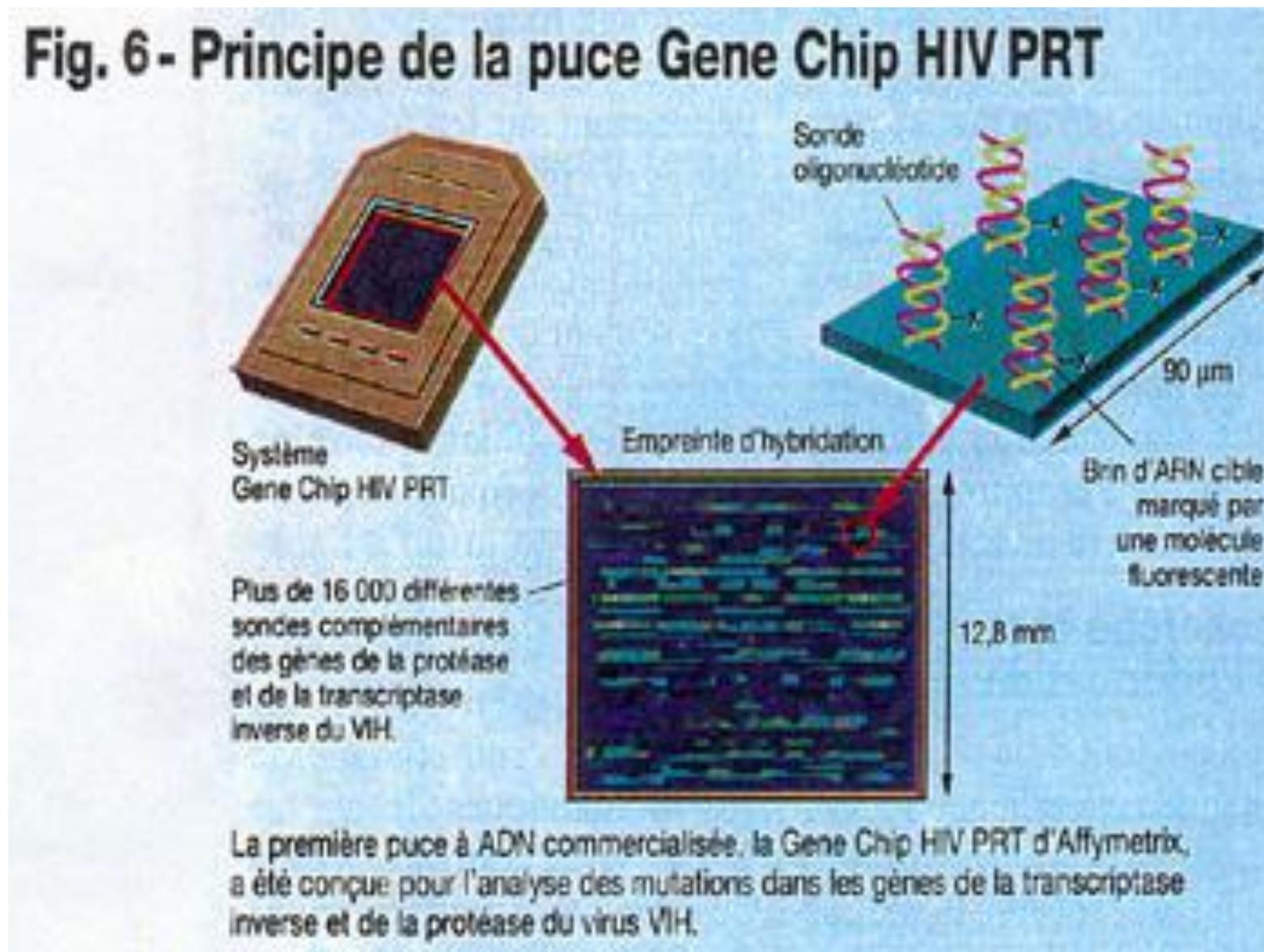
Applications

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



Avantages / Limites des puces à oligonucléotides

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

→ Puce Affymetrix :

puce à haute densité (+)

oligos courts (-)

→ Puce à oligos présynthétisés:

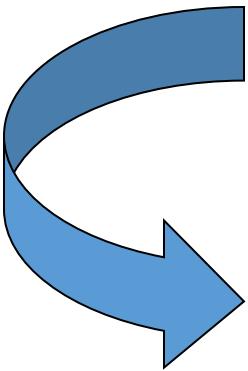
puce à faible densité (-)

oligos longs (+)

→ Coûteux (-)

Applications des puces à ADNg

- 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