

Analyse du Transcriptome

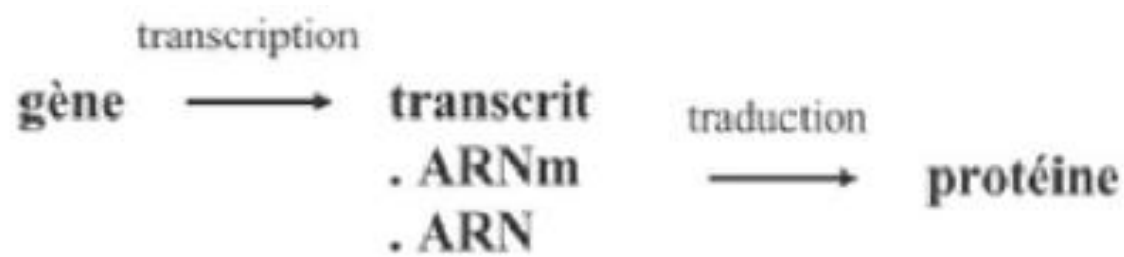
Pourquoi détecter les acides nucléiques et mesurer l'expression des gènes?

L'étude de l'expression des gènes permet d'apprécier le statut dans lequel se trouve la cellule et ses réponses fonctionnelles.

Analyser l'expression des gènes

Historiquement, techniques
d'hybridation utilisant sondes
(Northern-blot, Southern-blot)

.... Aujourd'hui la Biologie
moléculaire moderne repose
essentiellement sur la PCR
(Polymerase Chain Reaction)



Études
molécule par
molécule



Caractérise
un individu
(voire une espèce)

Caractérisent une cellule donnée
dans une situation donnée

Étude
globale

Blotting: pour ARN (*Northern blot*) et ADN (*Southern blot*). Après migration sur gel d'agarose, les acides nucléiques sont transférés et immobilisés sur un support inerte (nitrocellulose / nylon) sur lequel on hybride la sonde

!!!! Blotting: transfert

Hybridation d'ARN sur Membrane

Northern Blot

➤ Procédure:

- ✓Extraction d'ARN
- ✓Electrophorèse
- ✓Transfert
- ✓Hybridation, lavage, révélation

➤ Application:

- ✓Analyse de l'expression d'un gène (qualitative, quantitative)

Electrophorèse sur gel dénaturant?

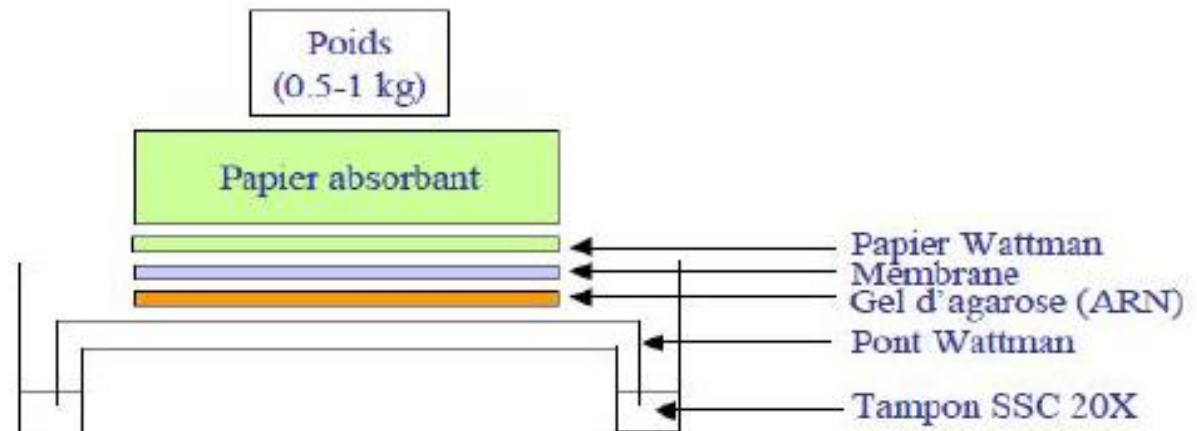
- RNA can form many different secondary structures which affect its mobility in an electrical field if it is not maintained in a denatured state.
- Formaldehyde is used to keep the RNA denatured



Northern Blot

Principe

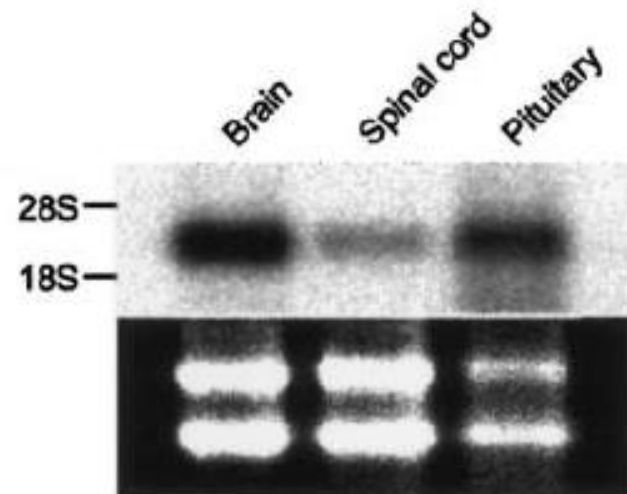
1. Séparation des ARN sur gel par électrophorèse
2. Transfert des ARN sur membrane (capillarité)



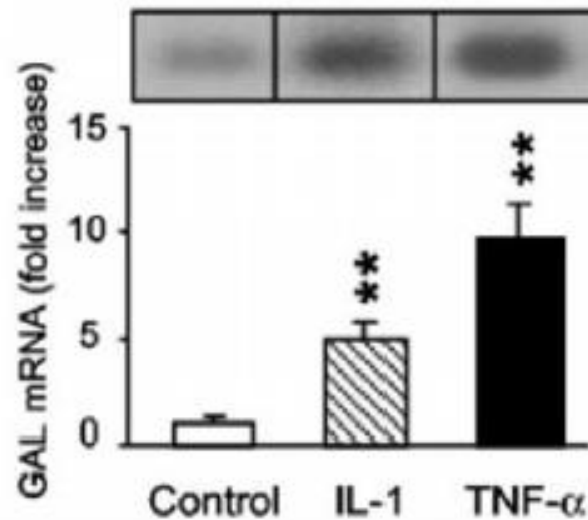
3. Hybridation de la membrane avec une sonde spécifique du gène d'intérêt

Applications du Northern blot

Qualitative



Quantitative





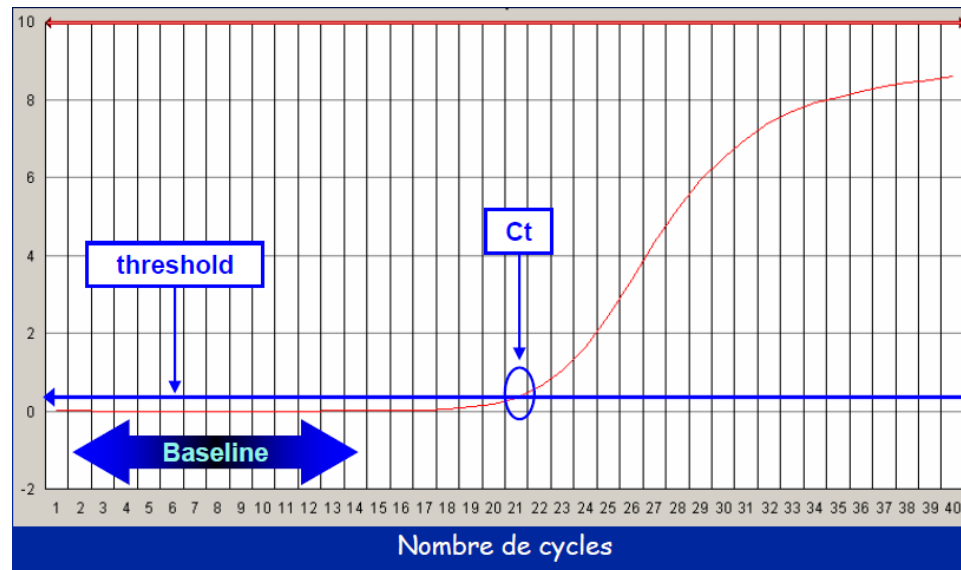
La PCR quantitative en temps réel Q-RT-PCR



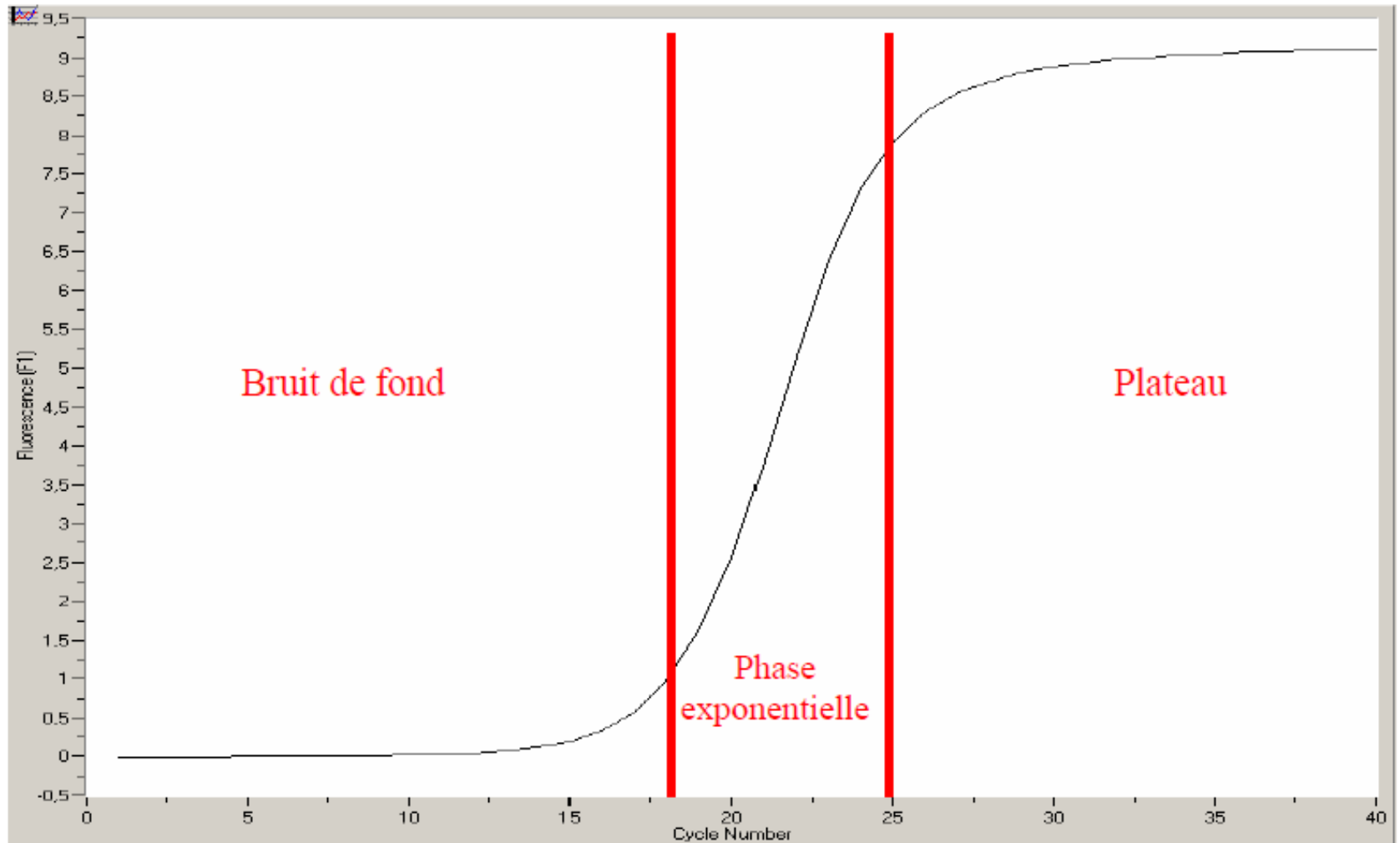
La PCR en temps réel pour la mesure de l'expression des gènes

Mesurer l'«expression d'un gène» = mesurer l'abondance des transcrits produits par ce gène à un instant donné

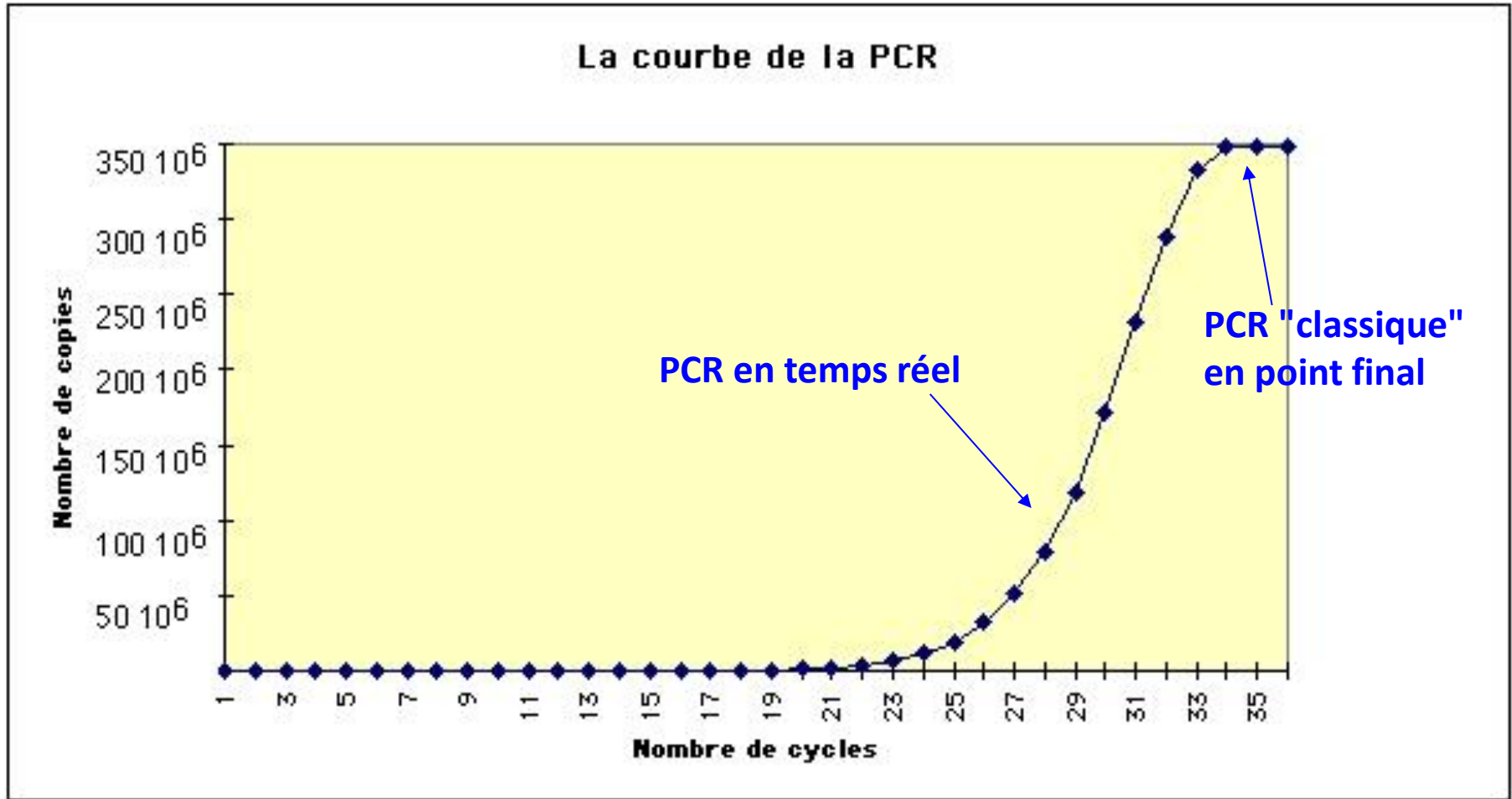
• La PCR quantitative en temps réel (Q-RT-PCR) couple une RT-PCR classique à une méthode de quantification fluorescente. La cinétique de quantification est basée sur la détection « en temps réel » d'un **signal fluorescent** dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de produit PCR généré au cours de l'amplification. La quantification du signal repose sur le concept de « **threshold cycle** » (Ct).



Cinétique de la PCR

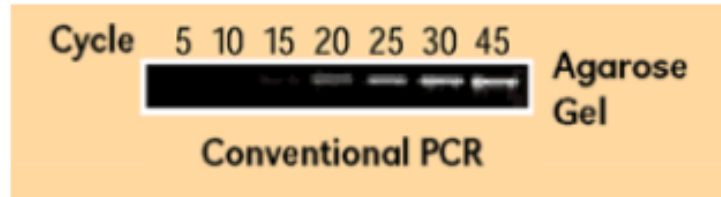


PCR conventionnelle versus en temps réel

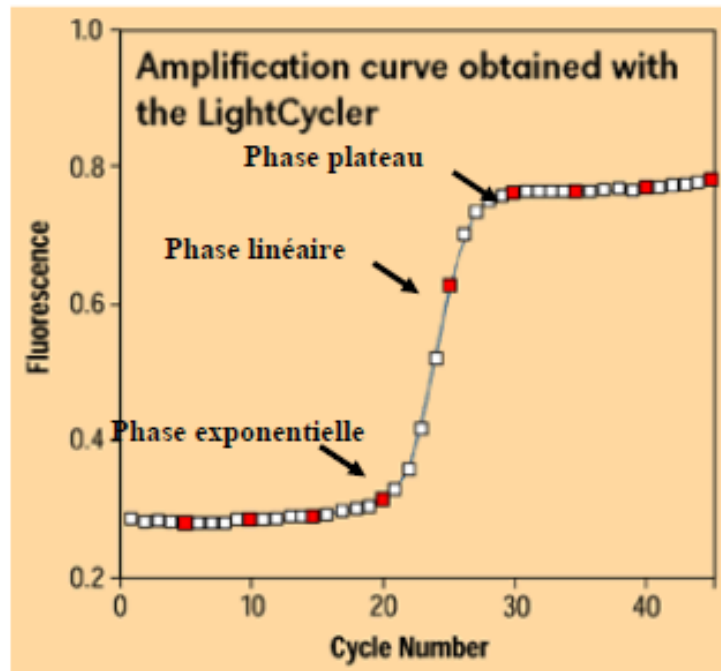


- Haute précision pendant la phase exponentielle
- Variabilité importante à la phase plateau

PCR conventionnelle versus PCR quantitative



Analyse en point final



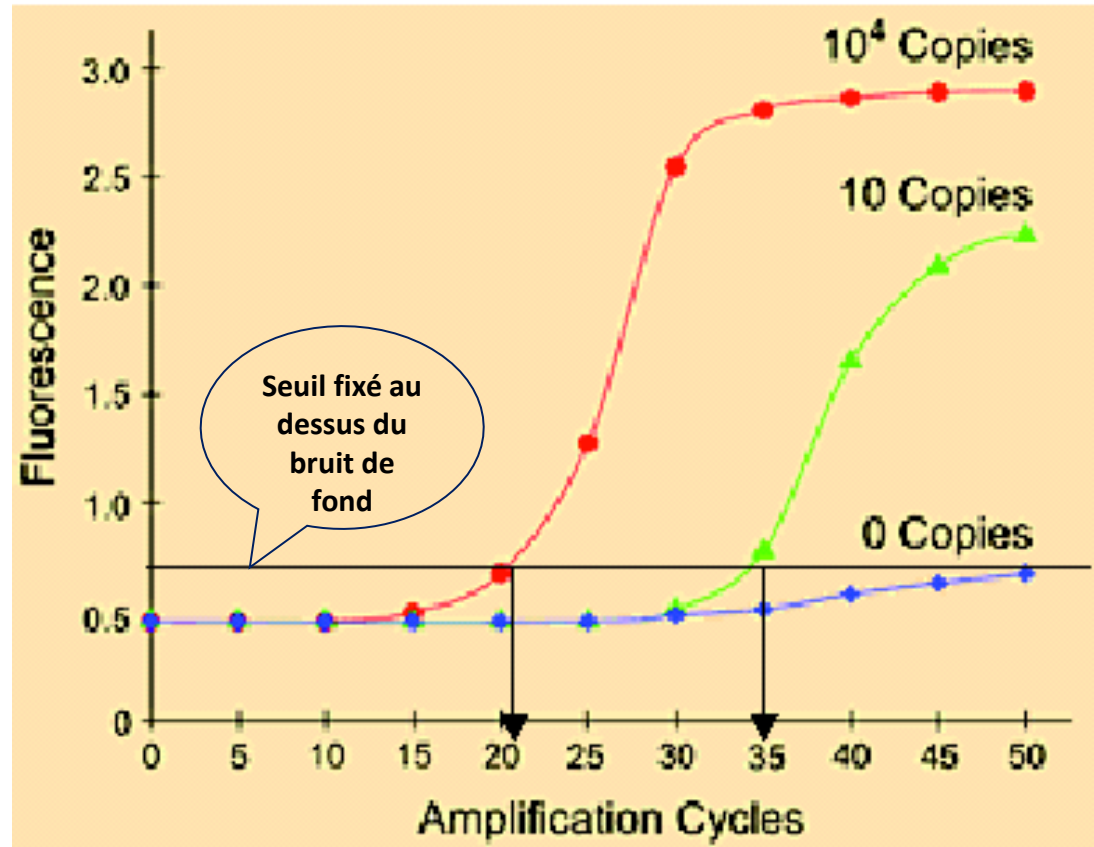
Analyse dynamique de la PCR quantitative

-haute précision pendant la phase exponentielle

-variabilité importante à la phase plateau

PCR en temps réel - Quantification

Ct (Cycle threshold) =
nombre de cycle
d'amplification
nécessaire pour obtenir
un signal fluorescent
statistiquement
significatif par rapport au
bruit de fond (valeur
seuil).



➡ Plus le Ct est petit, plus l'échantillon est concentré

Les chimies en PCR en temps réel

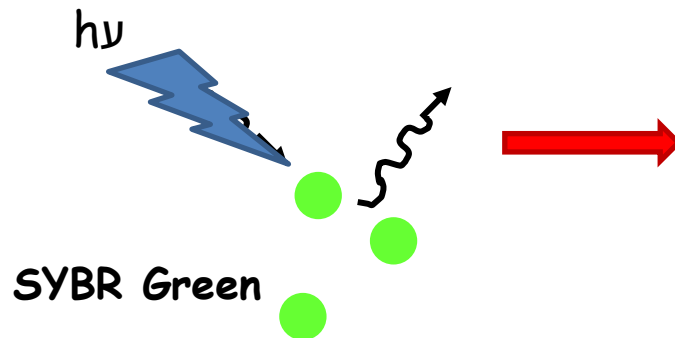


- Basées sur la fluorescence
 - Après l'absorbance de certaines longueurs d'ondes de la lumière (excitation), le fluorophore émet de la lumière à une longueur d'onde plus grande (émission)
 - La fluorescence est proportionnelle au produit amplifié
- 2 chimies couramment utilisées:
 - SYBR[®] Green I
 - Sondes TaqMan[®]

Principe du SYBR Green I

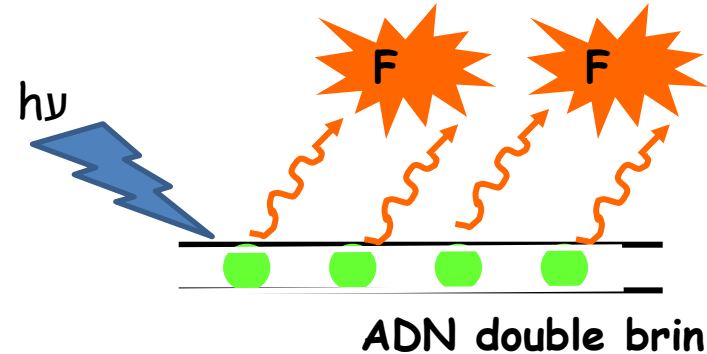
= Agent intercalant dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin

Avant amplification



Le SYBR Green en solution émet peu de fluorescence

Après amplification



Durant l'élongation, il se fixe sur l'ADN double brin naissant, entraînant une augmentation de la fluorescence

L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation

SYBR Green Advantage - Inconvénients

Avantage

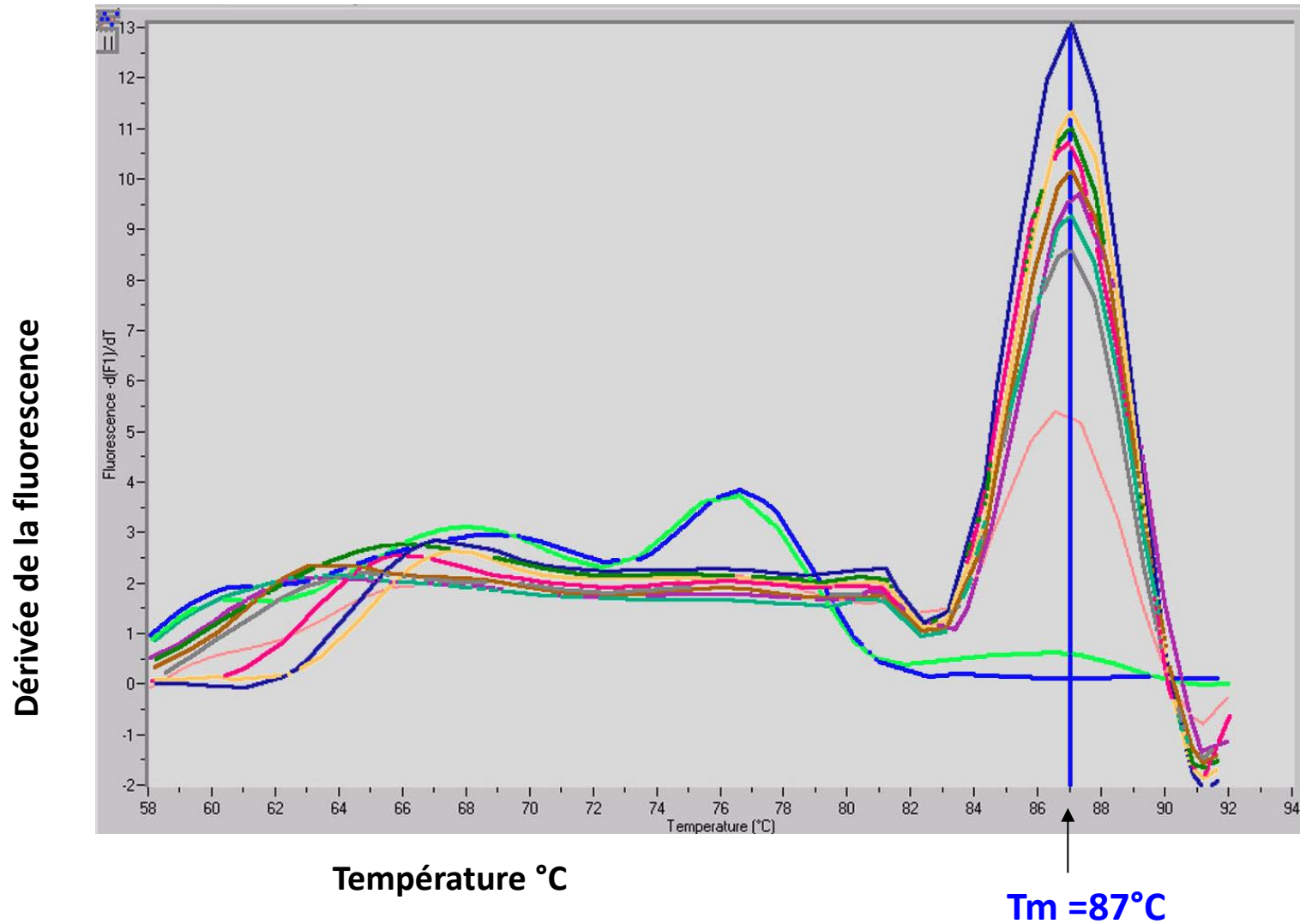
- Economique
- Facile d'utilisation
- Pas d'expertise particulière pour le design de sondes fluorescentes
- Non affecté par des mutations de l'ADN cible (qui affectent l'hybridation des sondes spécifiques)

Inconvénients

- La spécificité repose entièrement sur les amorces
- Faux positifs, surestimation de la quantification (le SYBRgreen se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin y compris des produits non spécifiques ex : dimères d'amorces, mauvais appariements)

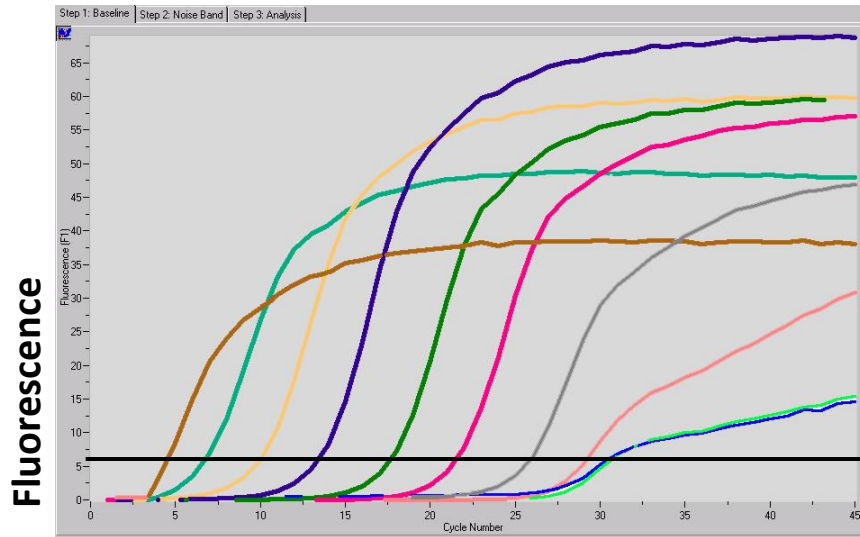
👉 Analyse de la courbe de fusion indispensable

Analyse de la courbe de fusion



SYBR Green

Courbe d'amplification

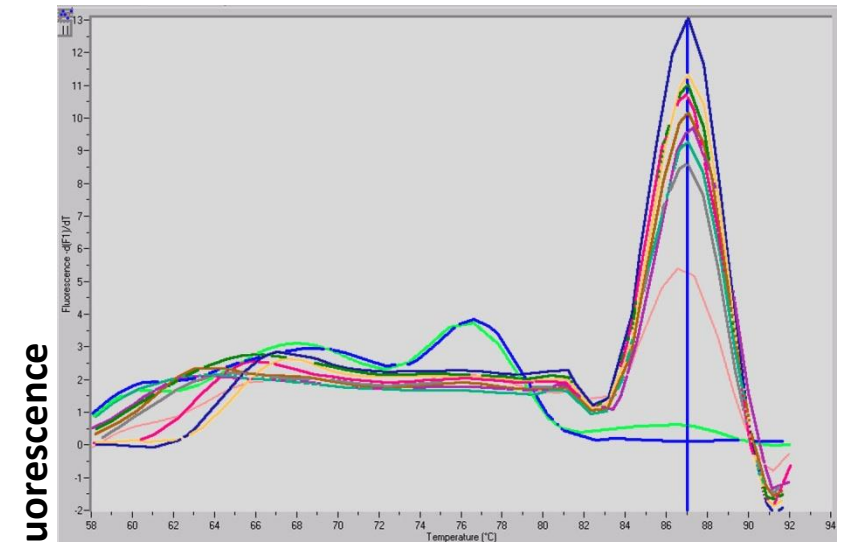


Nombre de cycles



Ct : quantification

Courbe de fusion



Fluorescence

Température °C



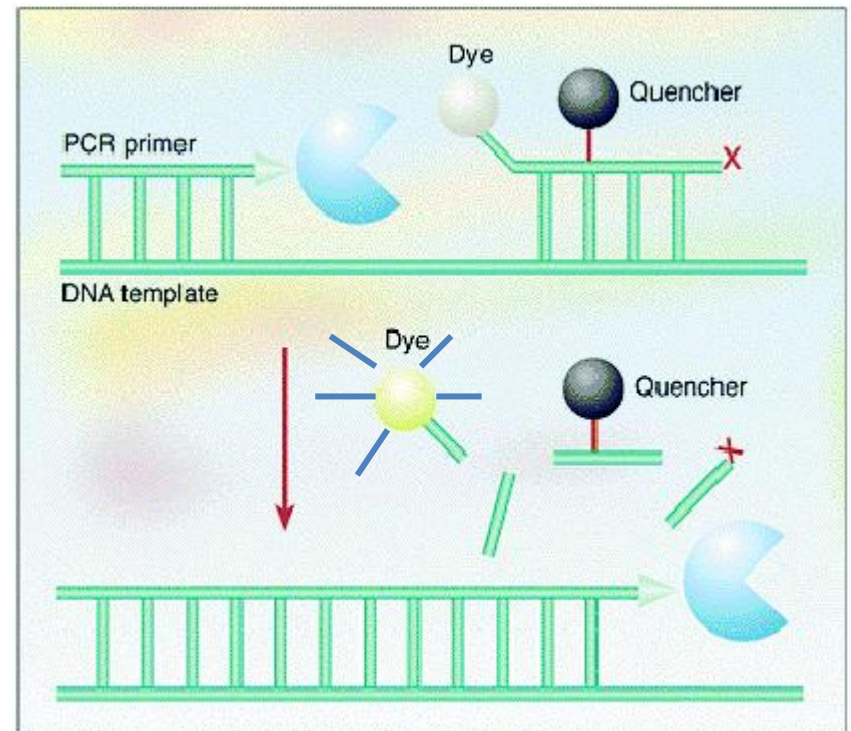
**Tm : spécificité du produit
d'amplification**

Sondes Taqman - Principe

Hybridation d'une sonde spécifique

Composition de la sonde

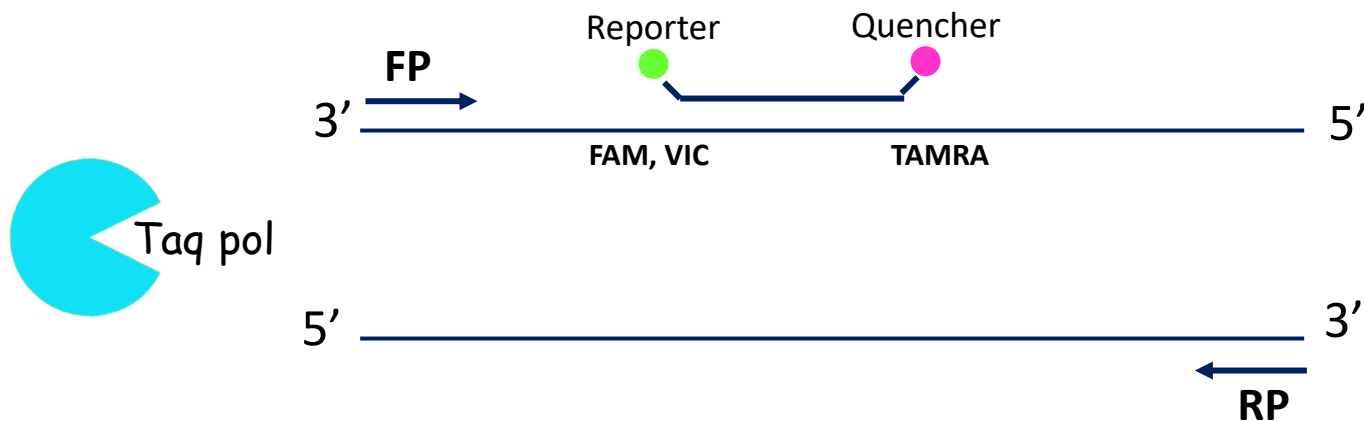
- Fluorochrome émetteur (reporter) en 5'
Ex : FAM 6-carboxy-fluorescein
- Fluorochrome suppresseur (quencher) en 3'
ex : TAMRA 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
→ pas d'émission de fluorescence



Sondes Taqman - Principe

Cette méthode repose sur deux principes :

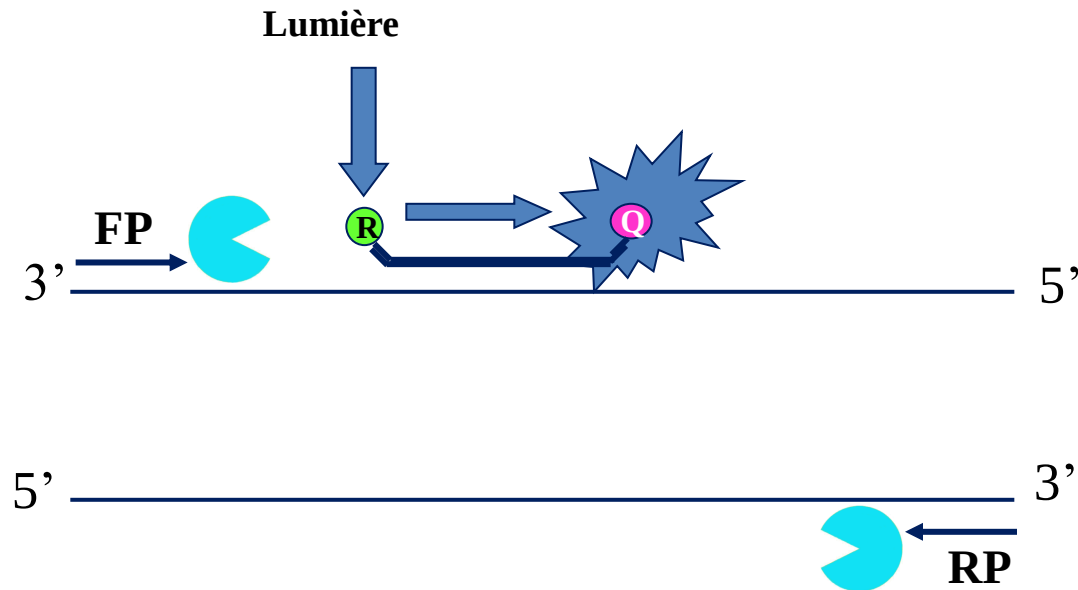
- la technologie FRET (fluorescence resonance energy transfer)
- l'activité 5'-exonucléase de la Taq Pol



La fluorescence émise par le reporter est absorbée par le quencher

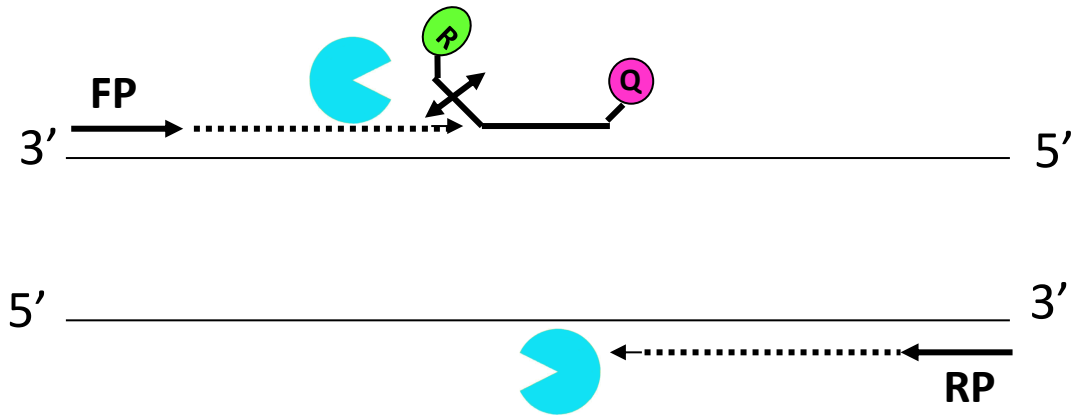
- ☞ Spécificité des amorces pour la PCR
- ☞ Spécificité de l'hybridation de la sonde TaqMan

Sondes Taqman - Principe

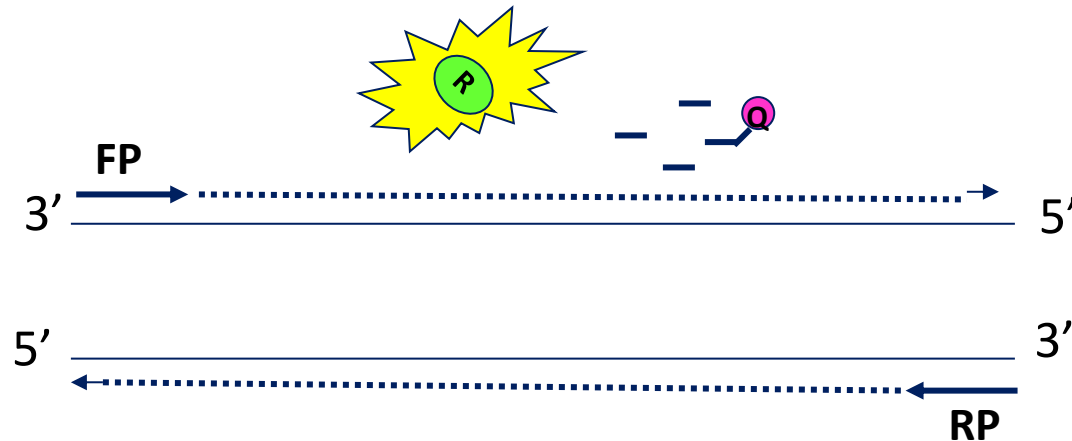


- FRET (fluorescence resonance energy transfer) depuis le *reporter* (haute énergie) vers le *quencher* (faible énergie),

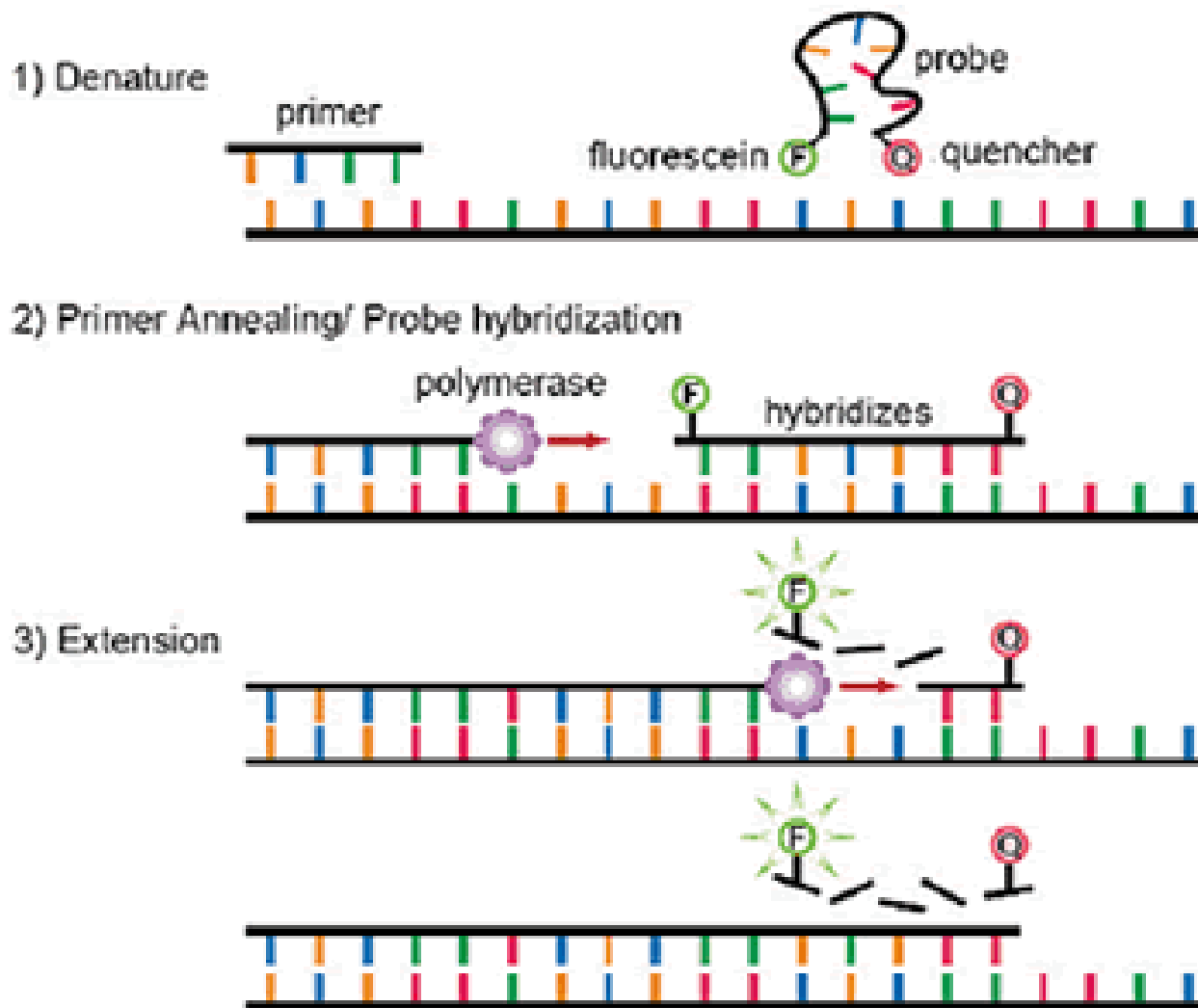
➔ pas de signal fluorescent émis par le reporteur quand la sonde est intacte



- au cours de l'élongation catalysée par la Taq Pol l'activité 5' nucléase coupe la sonde → libération du reporter



- lorsque la polymérisation est complétée, pour chaque molécule d'ADN synthétisée un reporteur émet de la fluorescence.



👉 La fluorescence est proportionnelle aux taux d'hydrolyse de la sonde hybridée donc à la quantité de produit d'amplification

Sondes Taqman

Avantage :

- Spécificité accrue

 - Spécificité des primers pour la PCR

 - Spécificité de l'hybridation de la sonde TaqMan

- Possibilité de multiplexage avec des sondes portant des fluorochromes différents

Inconvénient :

- Impossibilité de réaliser des courbes de fusion