

Techniques de biologie moléculaire : Puce à ADN

Objectif : l'étude du transcriptome
= déterminer le niveau d'expression de milliers de gènes simultanément.

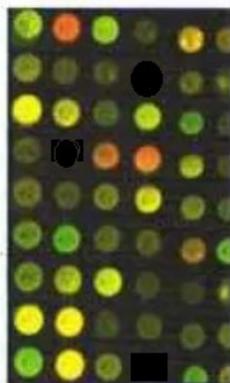
Schéma du principe d'une puce à ADN

Principe : On extrait des ARN(1). A partir de ces ARN, on produit des ADN complémentaires (ADNc) simple brin marqués (par ex avec un fluorochrome)(2). On incube ces ADNc avec une puce à ADN (= support rigide où sont collés de courts fragments d'ADN (spécifiques d'un gène) dans des puits côtes à côtes: les ADNc s'hybrident avec la séquence d'ADN complémentaire (3). On rince et on mesure l'intensité du marquage.

RQ : On peut comparer 2 transcriptomes différents en marquant 2 lots d'ADNc avec 2 marqueurs différents (par ex un fluorochrome vert et un rouge).

Exercice 1

une puce à ADN correspondant au génome humain est incubée avec des ADNc marqué en vert, produits à partir des ARN extraits d'un tissu cancéreux, et des ADNc marqué en rouge, produits à partir des ARN extraits d'un tissu sain.



Signalez :

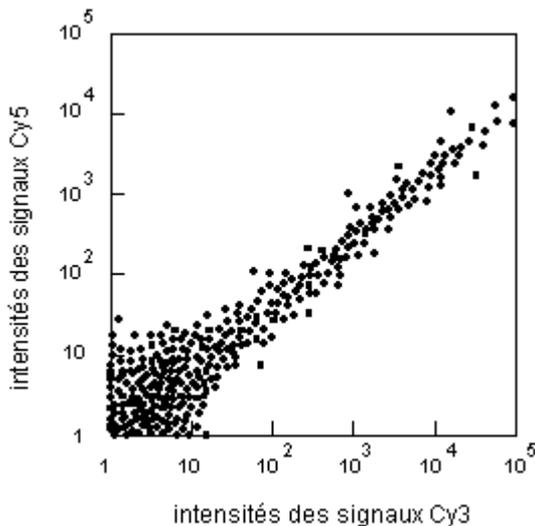
- (1) un gène ne s'exprimant ni dans le tissu sain ni dans le tissu cancéreux
- (2) un gène ne s'exprimant que dans un tissu sain
- (3) un gène ne s'exprimant que dans un tissu cancéreux
- (4) un gène s'exprimant dans les tissus sains et cancéreux.

Quels gènes conseillez vous d'étudier pour comprendre les mécanismes de cancérisation ?

Exercice 2 :

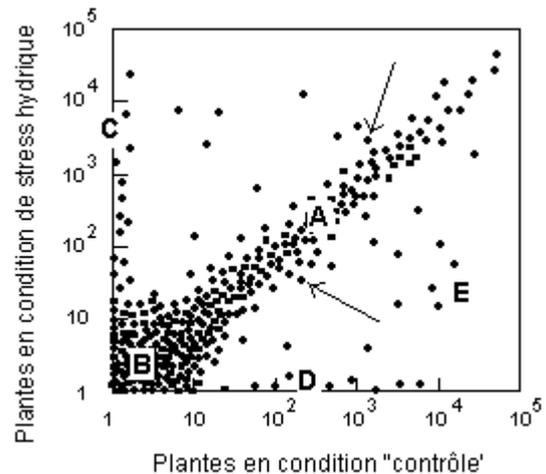
On utilise une puce à ADN fabriquée à partir d'un ensemble de gènes du Pois, et on cherche à comparer le niveau d'expression de ces gènes dans deux conditions de culture différentes, stress hydrique et condition normale (docB). Au préalable, on a réalisé une expérience dans laquelle on compare les signaux détectés lors de l'hybridation de cette puce par deux ensembles d'ADNc, marqués par deux fluorochromes différents (Cy3 et Cy5), mais synthétisés à partir d'un même échantillon initial d'ARNm extrait dans des cellules de pois en conditions normales (docA). L'intensité de la fluorescence de chaque spot sur la puce permet de construire les graphiques A et B.

- 1) Analyser et commenter les résultats de l'expérience présentée dans le doc A. Quel est son intérêt ?
- 2) Analyser et commenter les résultats de la comparaison des deux traitements (B). Quelles conclusions tirez-vous :
 - du profil d'expression des gènes qui se trouvent dans les zones A, B, C, D et E ?
 - profil d'expression des deux gènes signalés par des flèches ?
- 3) Par quel(s) type(s) d'expérience(s) pourrait-on prolonger cette étude ?



Document A Comparaison de l'intensité des signaux mesurés sur une puce à ADN.

A partir du même extrait d'ARNm à partir d'une plante témoin, deux synthèses d'ADNc sont réalisées, mais hybridées avec deux fluorochromes différents (Cy3 et Cy5). Chaque point correspond à un puits de la puce à ADN.



Document B Comparaison de l'intensité des signaux mesurés sur une puce à ADN.

Deux synthèses d'ADNc sont réalisées, l'une à partir d'une plante témoin, l'autre à partir d'une plante placée en conditions de stress hydrique, et les ADNc correspondant sont hybridés avec des fluorochromes différents. Chaque point correspond à un puits de la puce à ADN.