

SVF – Génomique structurale et fonctionnelle

TD – Les méthodes d'étude des génomes



Source : https://proteopedia.org/wiki/index.php/Image:GFP_mice.png

1. Les analyses de génomes

1.1. Les électrophorèses, des outils de routine en biochimie

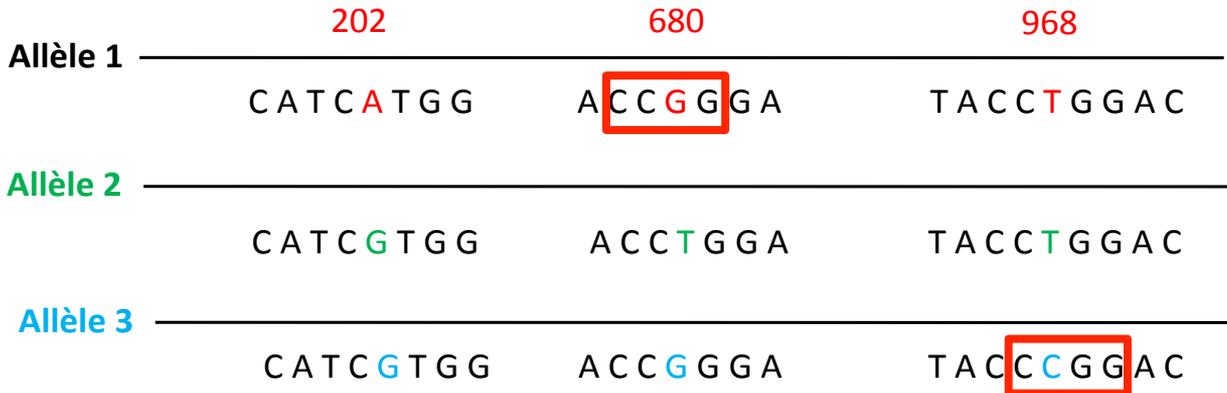
Exercice 1

Allèle 1	202	680	968
	CATC A TGG	ACC G GGA	TACCT T GGAC
Allèle 2	202	680	968
	CATC G TGG	ACCT T GGA	TACCT T GGAC
Allèle 3	202	680	968
	CATC G TGG	ACC G GGA	TACCC C GGAC

Nom de l'enzyme	Nombre de sites sur g6pda			Séquence palindromique (coupures à *)
	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	
Alu I	11	11	11	AG*CT TC*GA
Tha I	3	3	3	CG*CG GC*GC
Hae III	19	19	19	GG*CC CC*GG
Hha I	6	6	6	GCG*C C*GCG
Hpa II	7	6	8	C*CGG GGC*C

Exercice 1

Hpa II est l'enzyme la plus appropriée



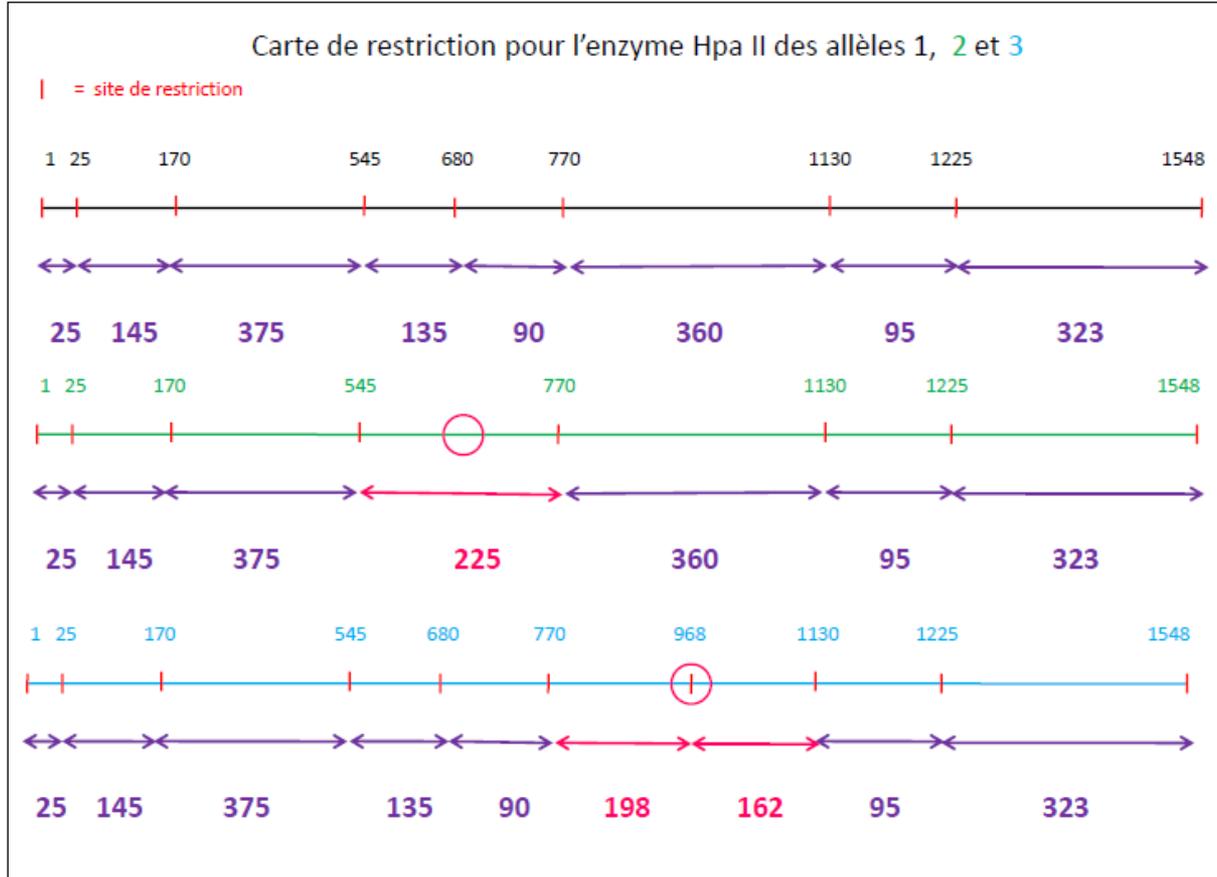
Hpa II coupe en 680

Hpa II ne coupe pas

Hpa II coupe en 968

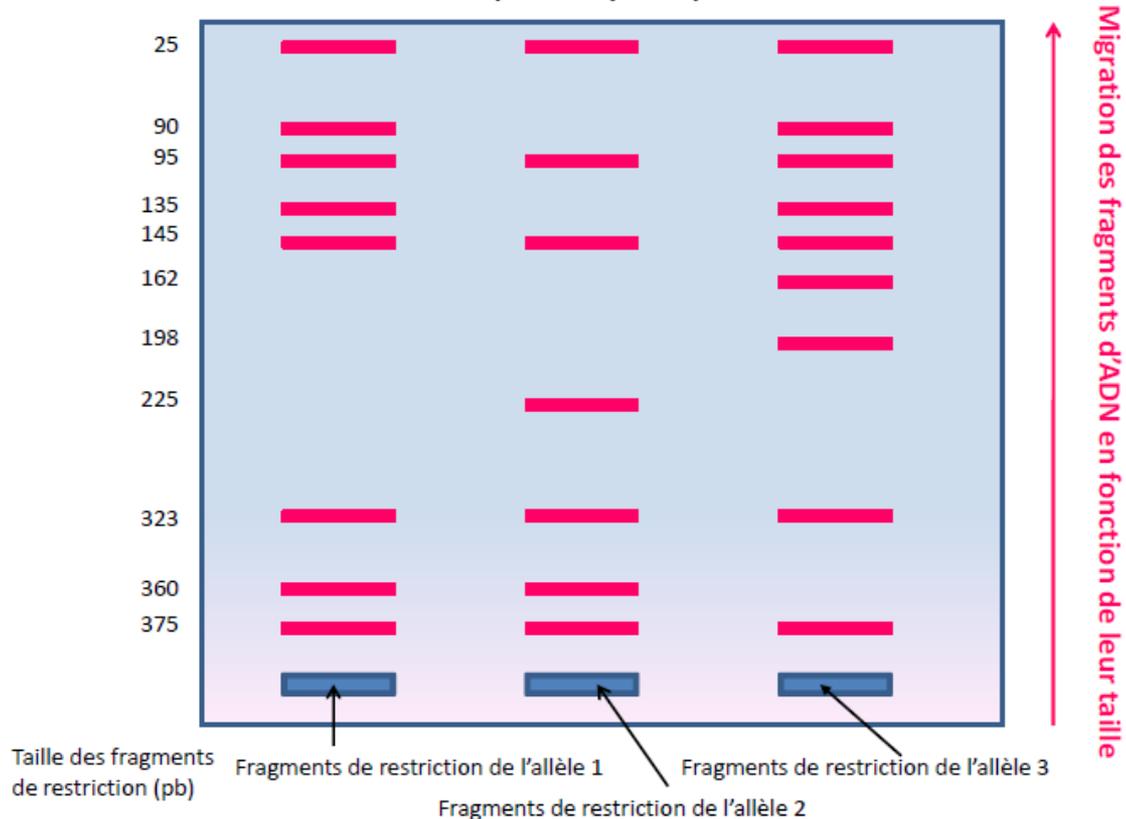
Exercice 1

Hpa II est l'enzyme la plus appropriée



Exercice 1

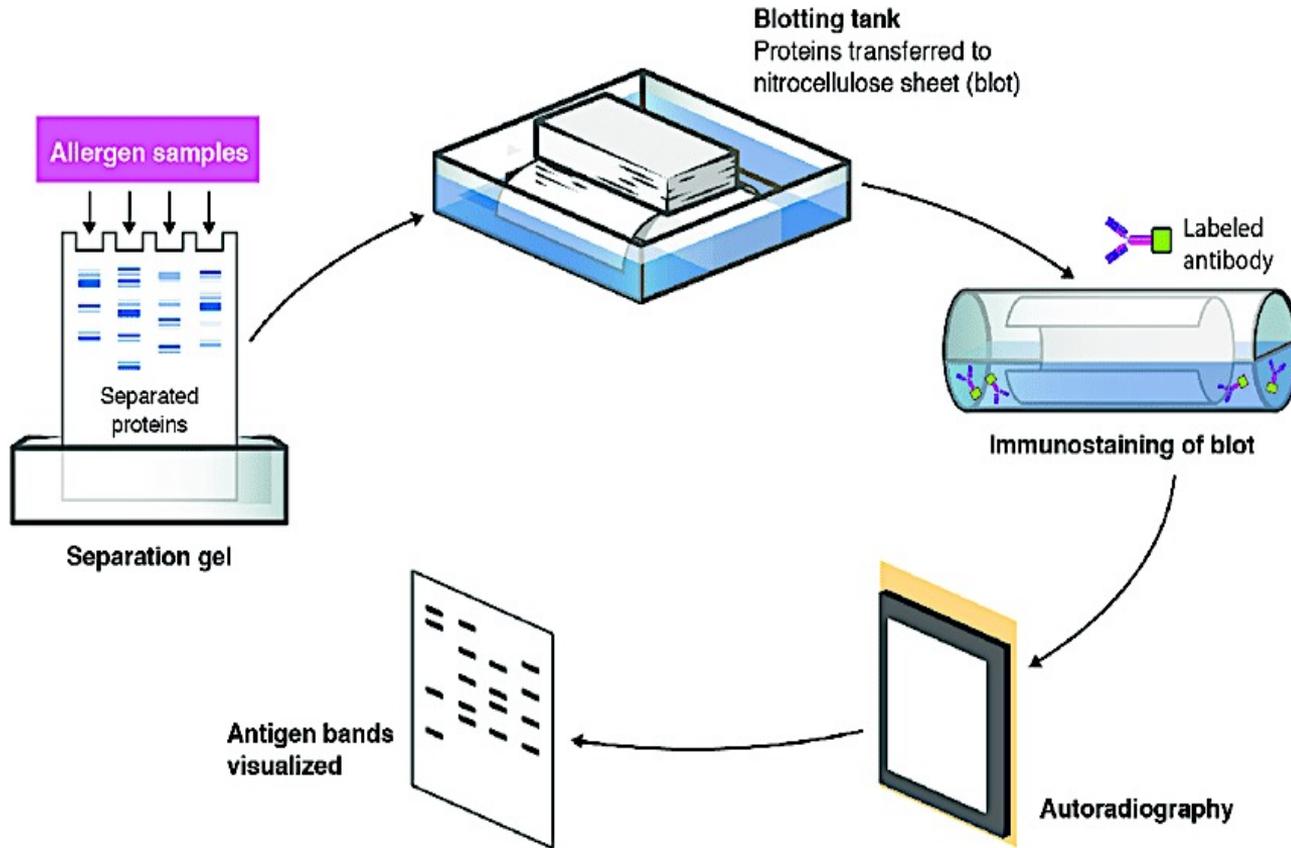
Electrophorèse des fragments de restriction obtenus après digestion des 3 allèles par l'enzyme Hpa II



1. Les analyses de génomes

1.2. Les blots et leur révélation

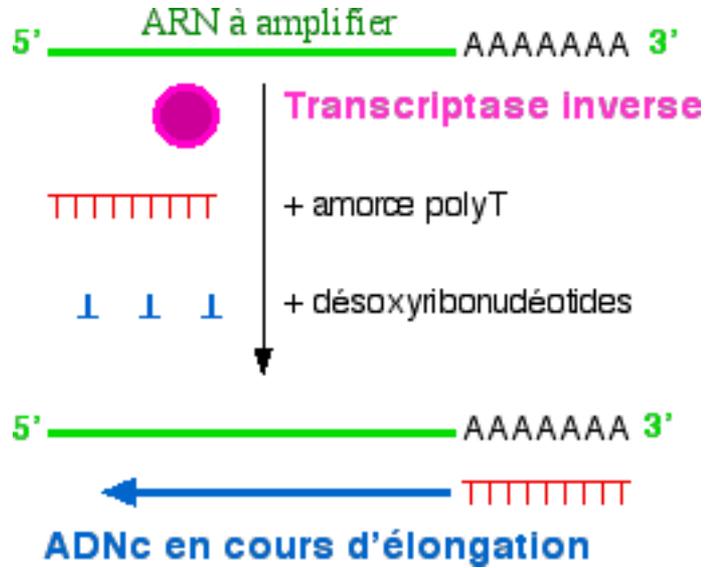
Rappel : le Western blot



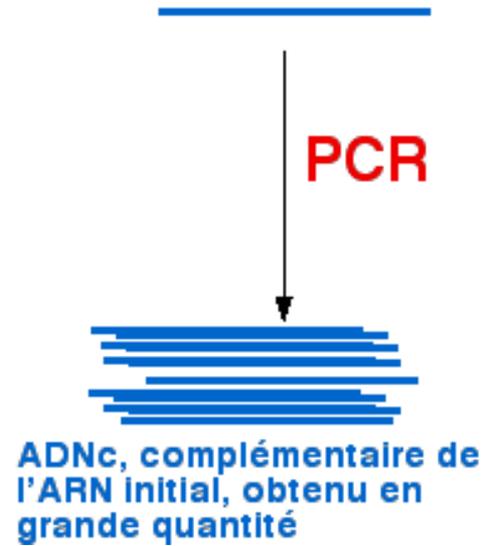
Réaliser une sonde d'ADNc

À partir de l'ARNm d'un gène ciblé

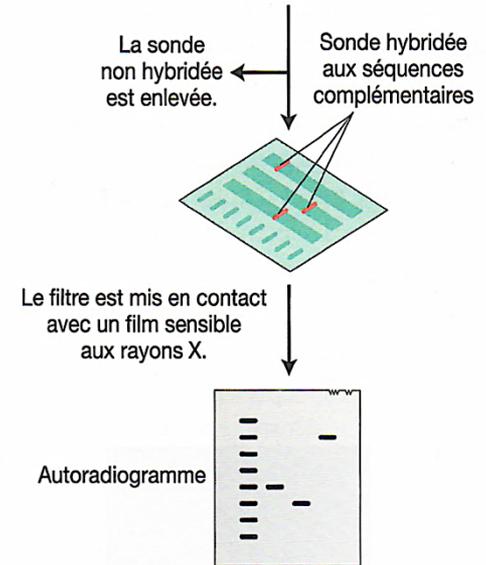
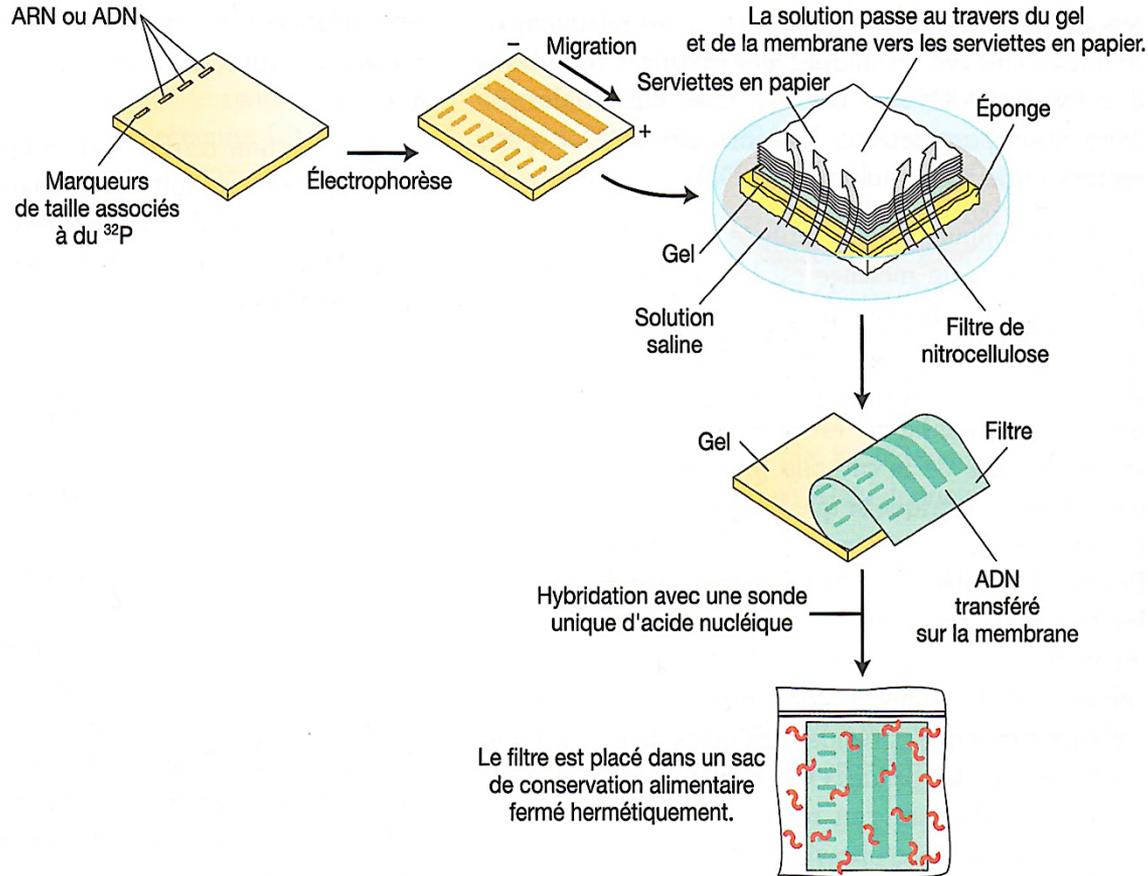
D'abord copie de l'ARN en ADNc par une reverse-transcriptase (RT)
Puis PCR



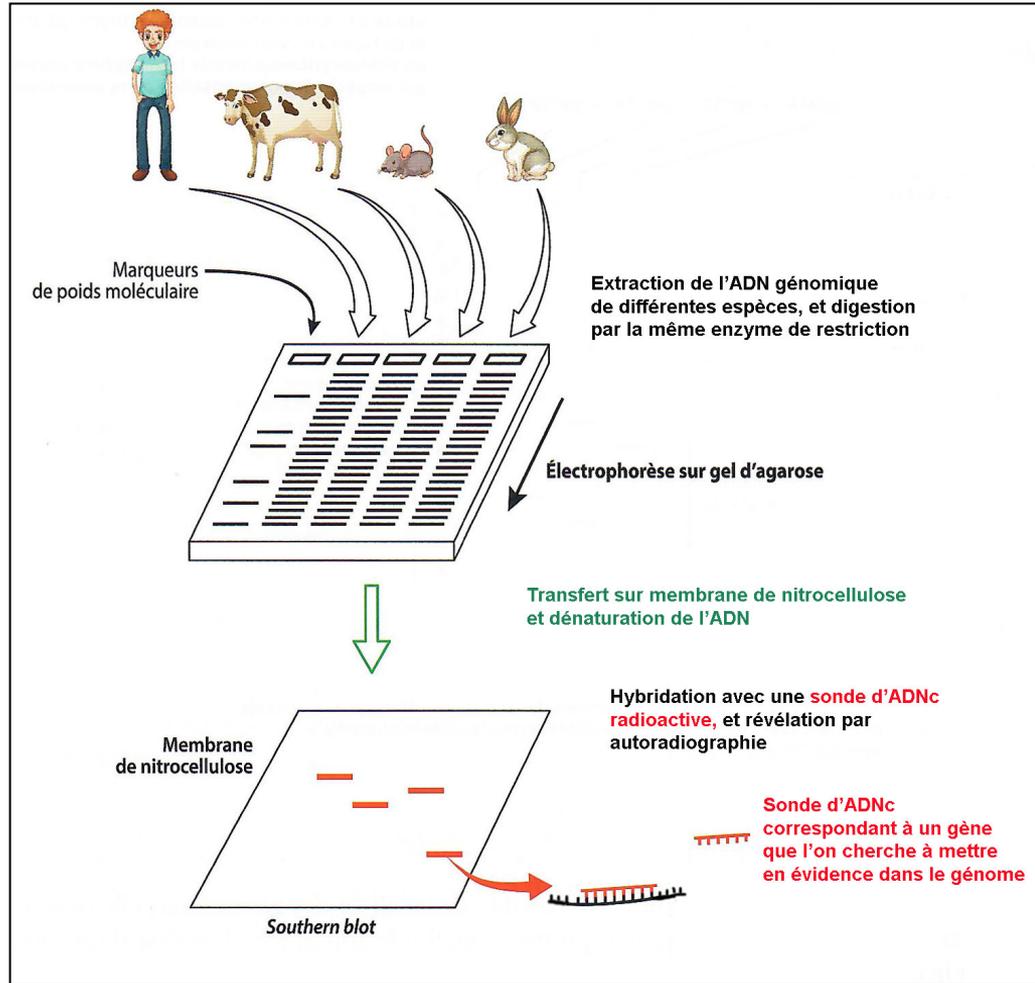
ADNc obtenu par transcription inverse



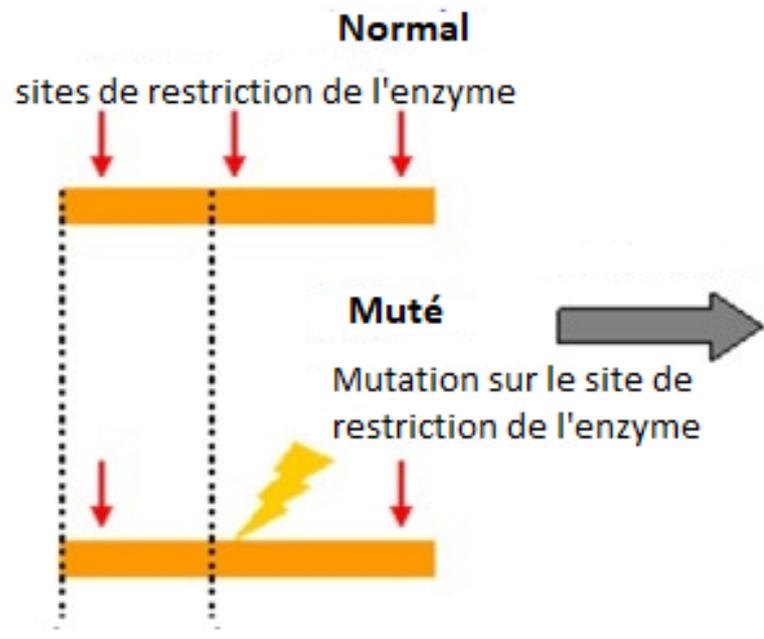
Le Southern (ADN) ou Northern (ARN) blot



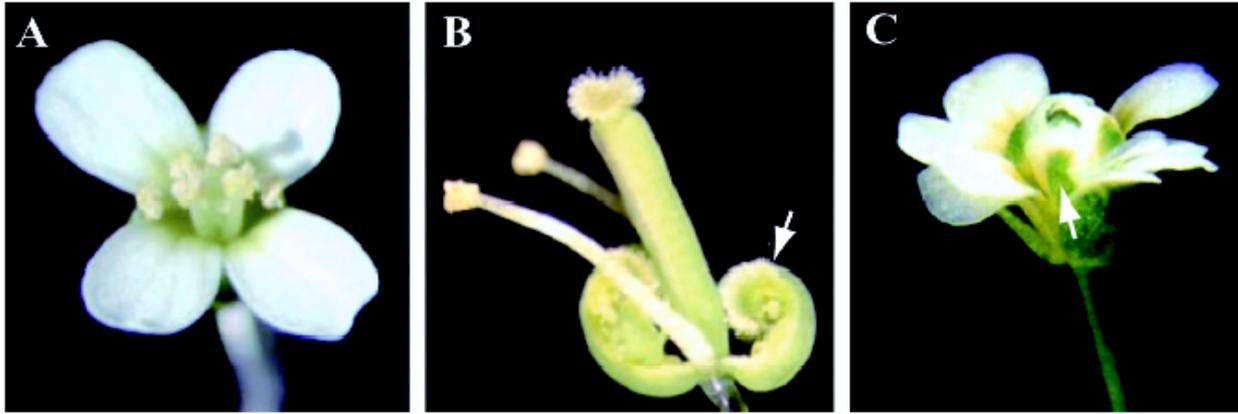
Utilisation pour identifier une séquence



Utilisation en RFLP



Exercice 2



Question 1 - Relier chacun des deux gènes aux pièces florales qu'il semble déterminer. Justifier.

Le mutant *apetala2* (sans protéine AP2) présente des fleurs n'ayant que des carpelles mais ni sépale ni pétale, et 2 étamines probables. Le gène *ap2* semble nécessaire à la formation des **pièces stériles** (pétales et sépales).

Le mutant *agamous* (sans protéine AG) présente des fleurs constituées uniquement de sépales et pétales. Le gène *ag* semble impliqué dans la formation des **pièces fertiles** (étamines et carpelles).

Exercice 2

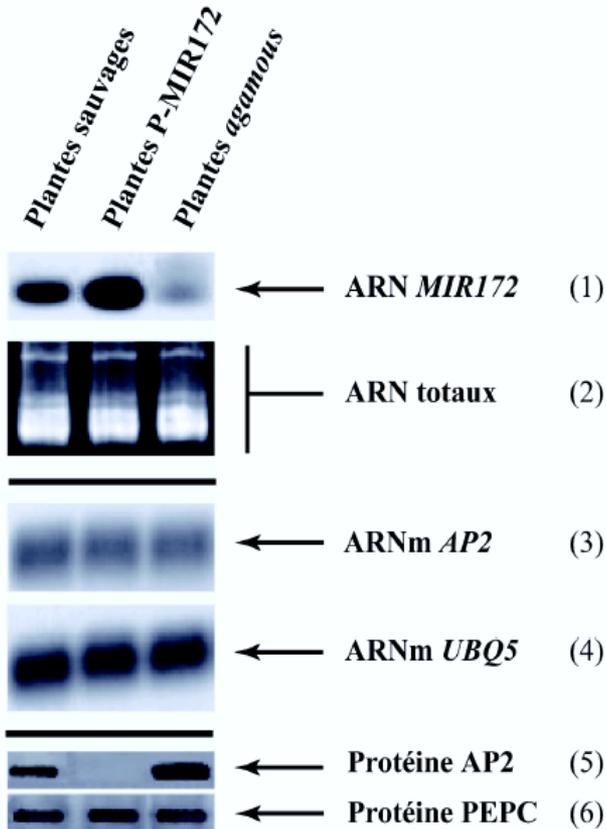
Question 2 - Proposer une hypothèse d'interaction entre l'expression des deux gènes.

Dans une fleur sauvage, *ag* ne s'exprime que dans les pièces fertiles alors que AP2 est présent seulement dans les pièces stériles. Quand on inactive *ap2*, alors AG est retrouvée partout. Quand on inactive *ag*, alors AP2 s'exprime partout.

Interprétation : *ag* et *ap2* sont deux gènes qui s'inhibent l'un l'autre. AG empêche l'expression de *ap2* dans les pièces fertiles et AP2 empêche l'expression de *ag* dans les pièces stériles.

Chacun de ces gènes donne l'identité des pièces florales : il s'agit de gènes du développement.

Exercice 2



Question 3 - Expliquer le rôle des pistes UBQ5 et PEPC.

Les pistes UBQ5 et PEPC sont les pistes validant les expressions, extractions et révélations des différents essais. Elles permettent de comparer quantitativement l'intensité des bandes obtenues et d'interpréter les différences comme significatives.

Exercice 2

Question 4 - Analyser et interpréter les gels obtenus.

Analyse des gels d'ARN

Plante surexprimant *mir* : la présence de l'ARN MIR172 est bien supérieure au témoin (ce qui valide l'expérience) mais les ARN totaux ne sont pas augmentés : seul *mir* est donc surexprimé. La quantité d'ARNm d'AP2 semble inchangée par rapport au témoin mais la protéine AP2 est absente. Le défaut de synthèse semble donc lié à l'étape de **traduction**.

Interprétation : le gène *mir* est transcrit en ARN MIR172 qui empêche la traduction de l'ARN d'AP2 en protéine AP2.

Exercice 2

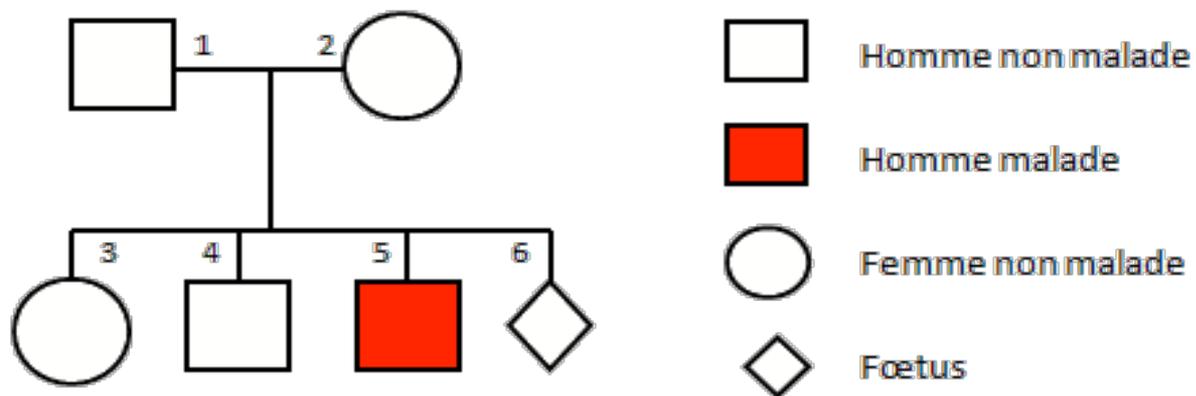
Question 4 - Analyser et interpréter les gels obtenus.

Analyse des gels protéiques

Plante *agamous* : sans la protéine AG exprimée dans la plante, l'ARN MIR172 est quasiment absent (mais pas les autres ARN). L'ARNm AP2 est de quantité identique au témoin mais la protéine AP2 est fortement présente, plus que sur le témoin.

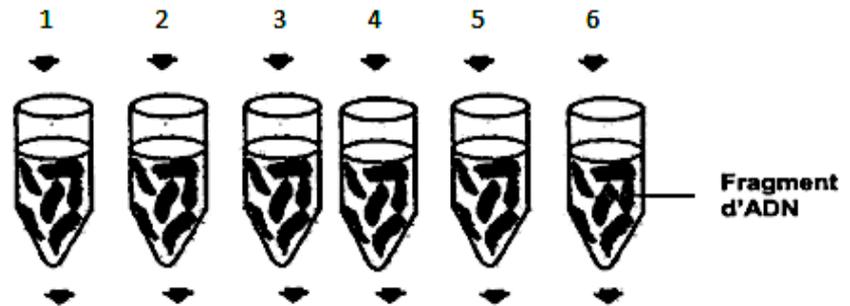
Interprétation : cela conforte notre hypothèse car sans ARN MIR172, la protéine AP2 semble davantage traduite. De plus, on peut aussi postuler que la protéine AG active la transcription du gène *mir*.

Exercice 3

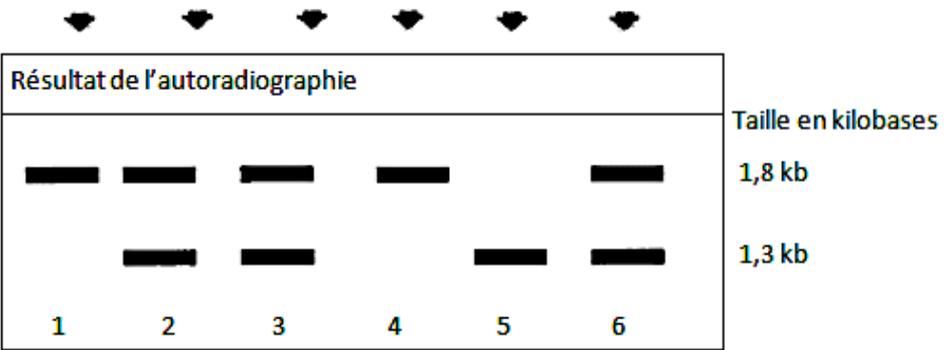


Exercice 3

Isolement et coupure de l'ADN génomique des individus 1, 2, 3, 4, 5 et 6 par une enzyme de restriction



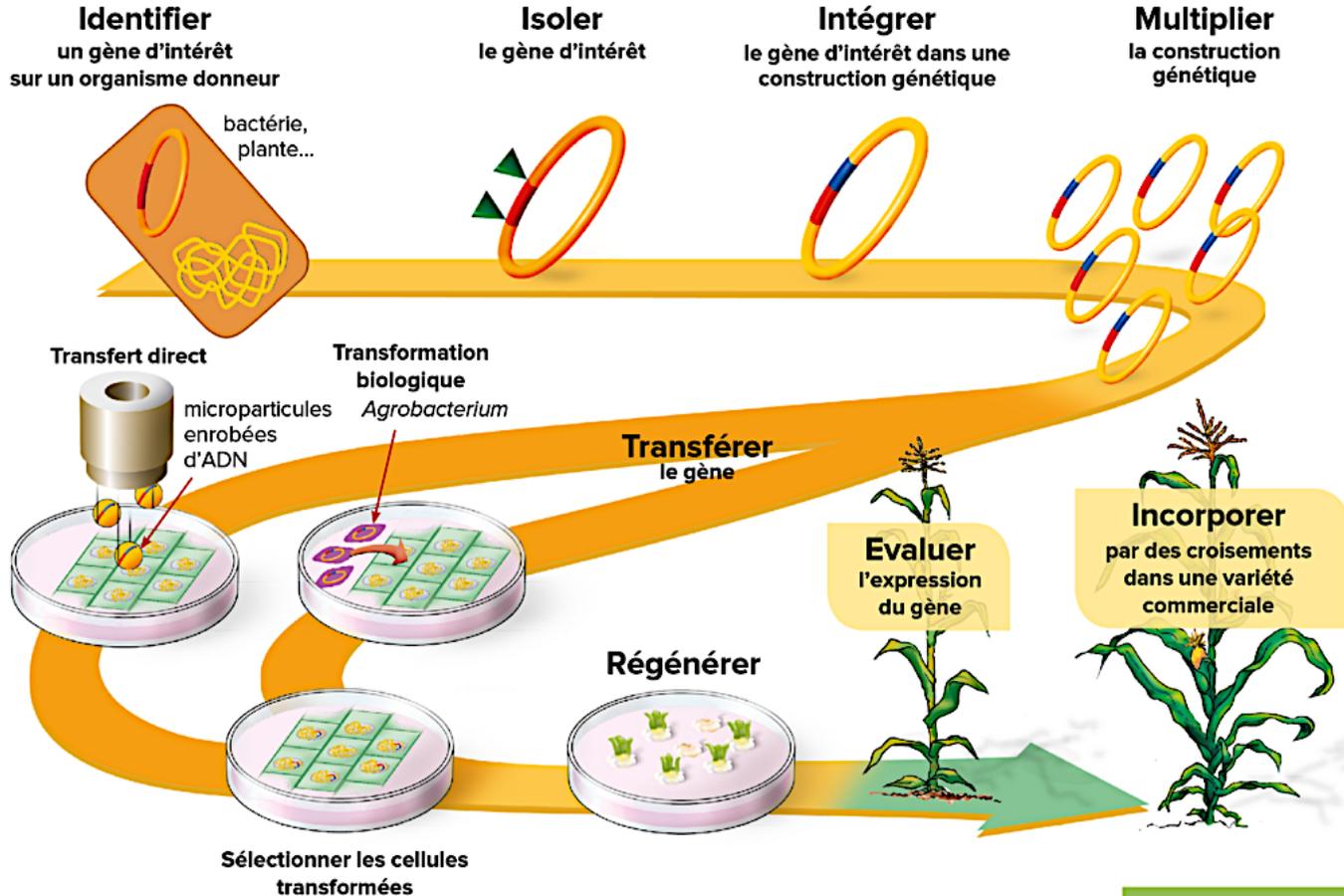
Electrophorèse des fragments de restriction et hybridation de ces fragments avec une sonde radioactive utilisée lors du diagnostique de la myopathie et suivie d'une autoradiographie



2. Transgénèses et mutagenèses

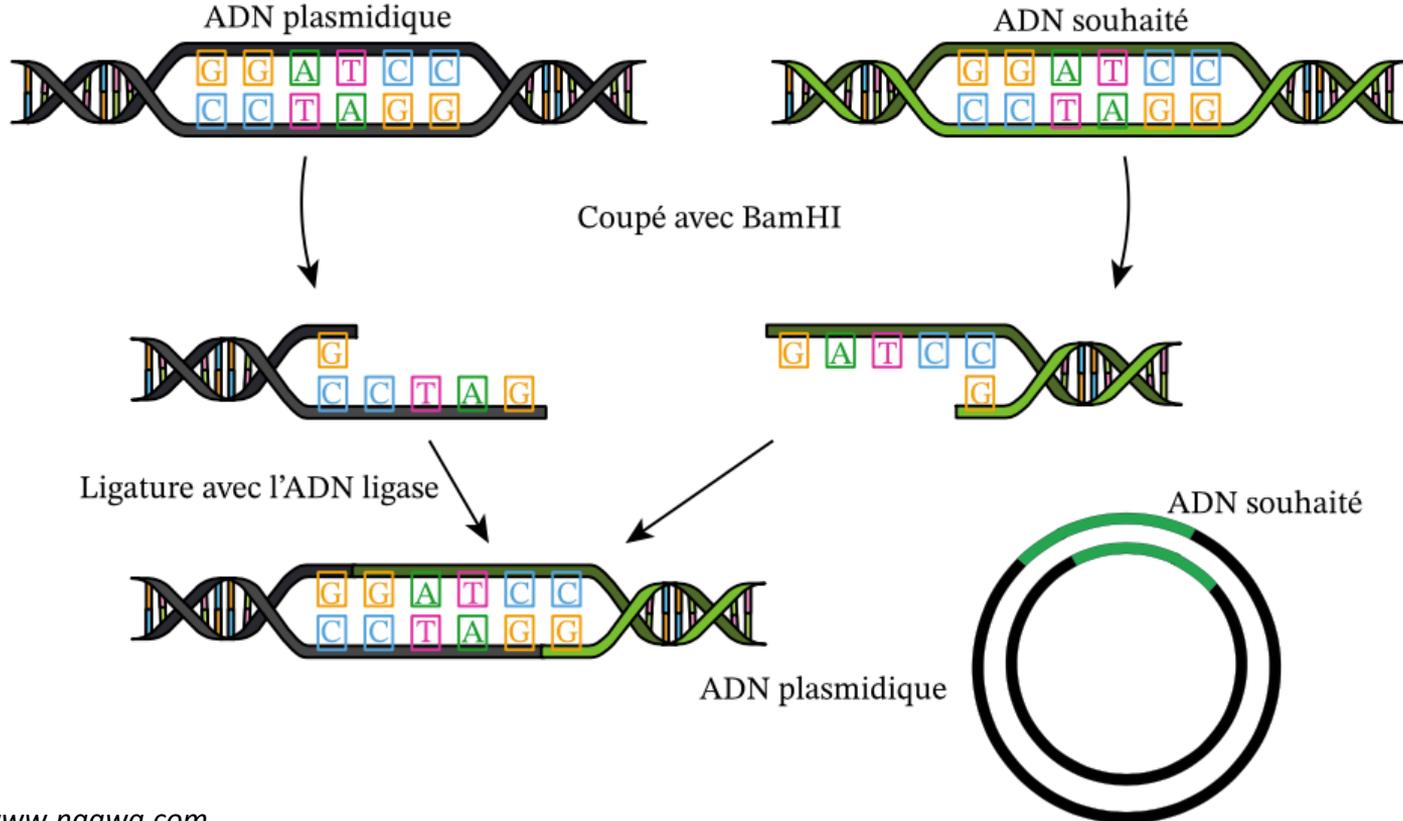
2.1. Les transgénèses

Les étapes de la transgénèse

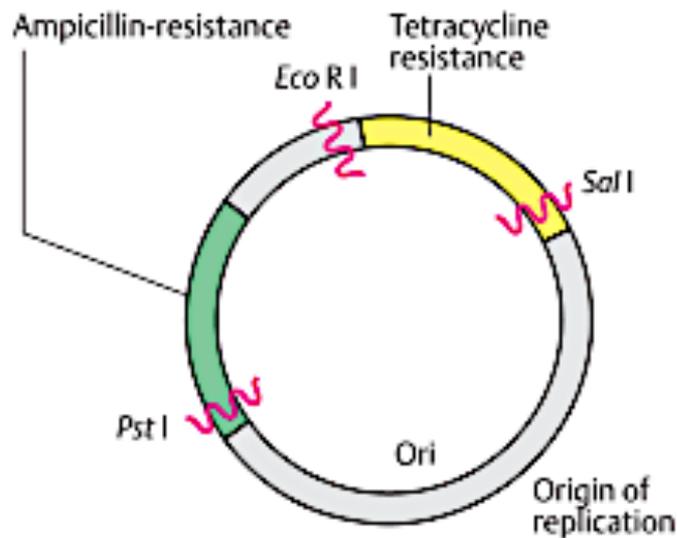


Les étapes de la transgénèse

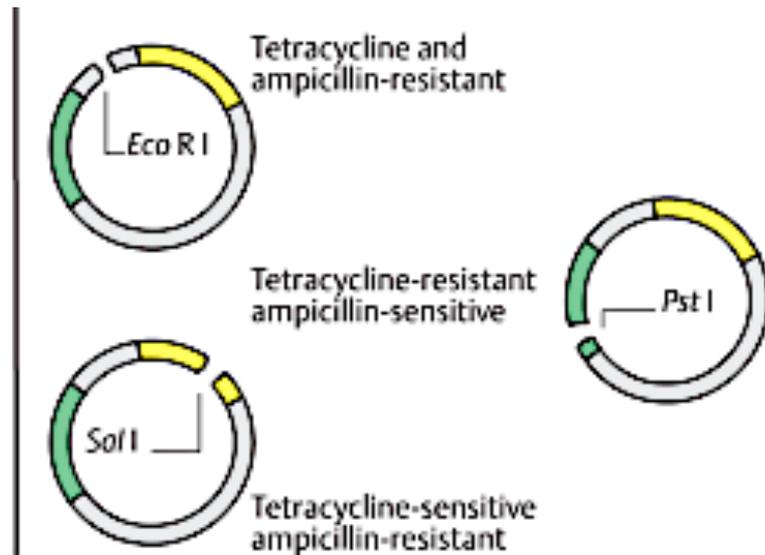
Insérer l'ADN dans un vecteur



Des plasmides astucieux

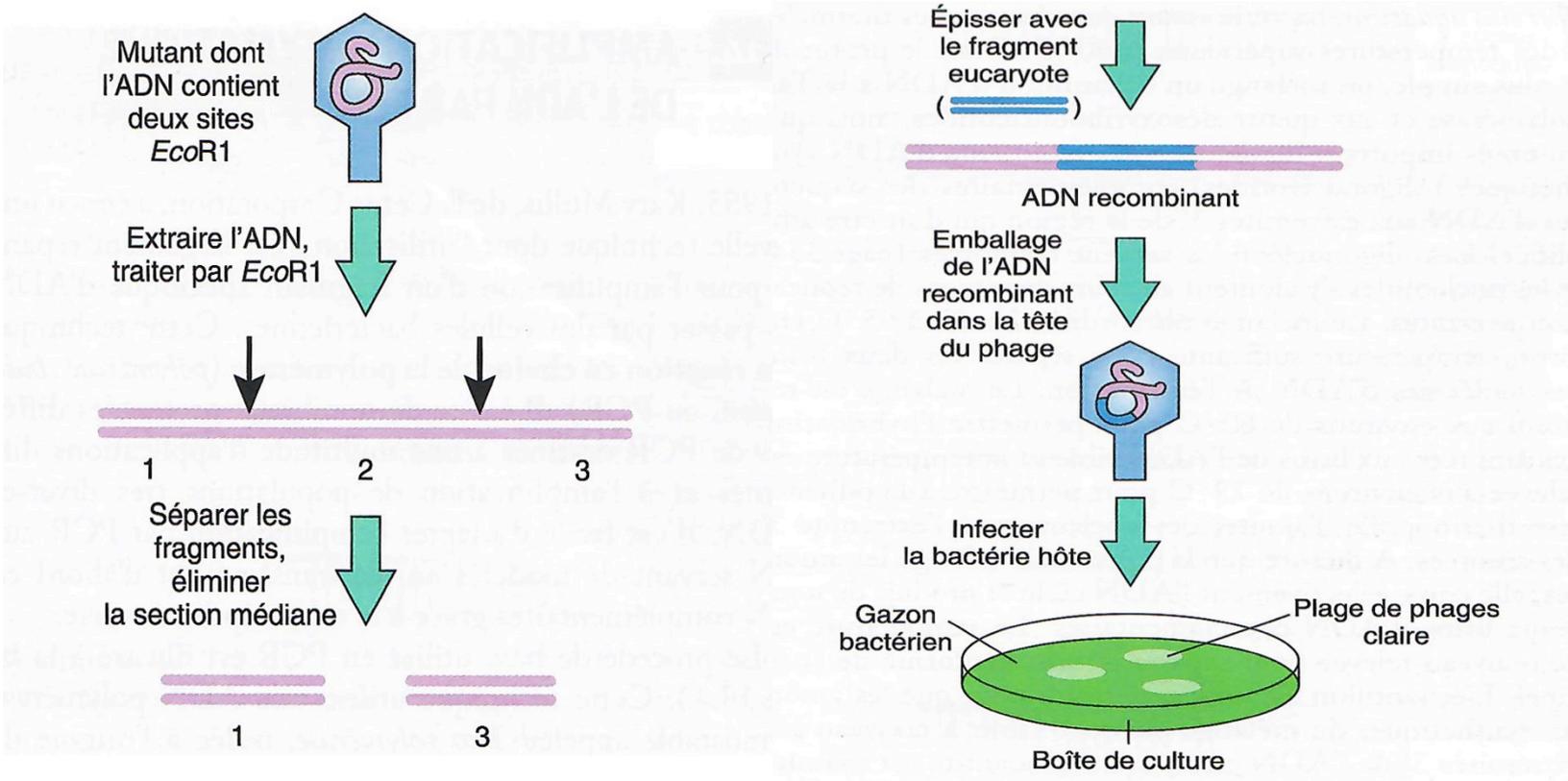


1. Genes for antibiotic resistance



2. Altered antibiotic resistance

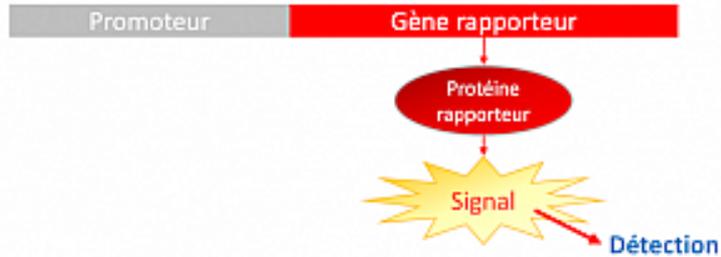
Les vecteurs viraux : le bactériophage



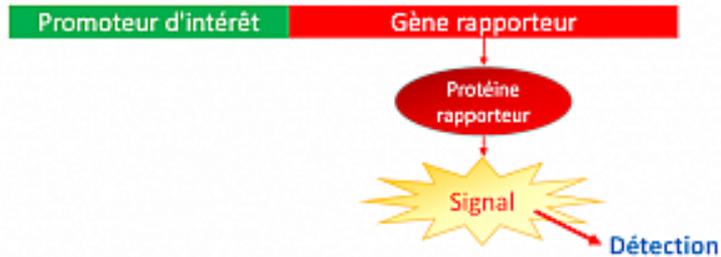
Des gènes rapporteurs



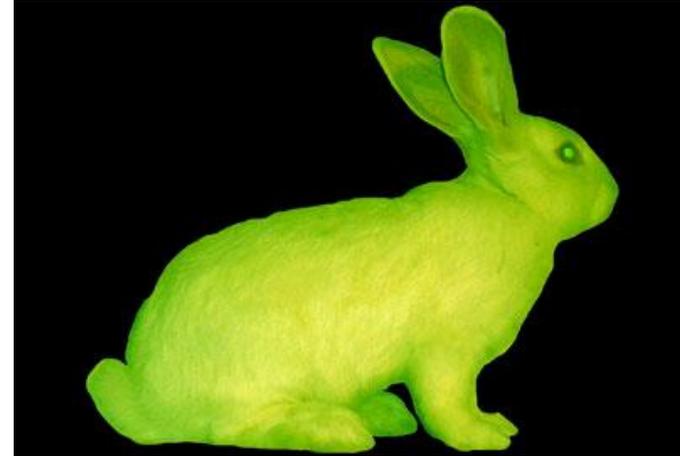
Le gène d'intérêt n'a aucun effet qui peut être facilement détecté et quantifié



Le produit du gène rapporteur génère un signal facile à détecter et à quantifier (luminescence, fluorescence, ou autres)



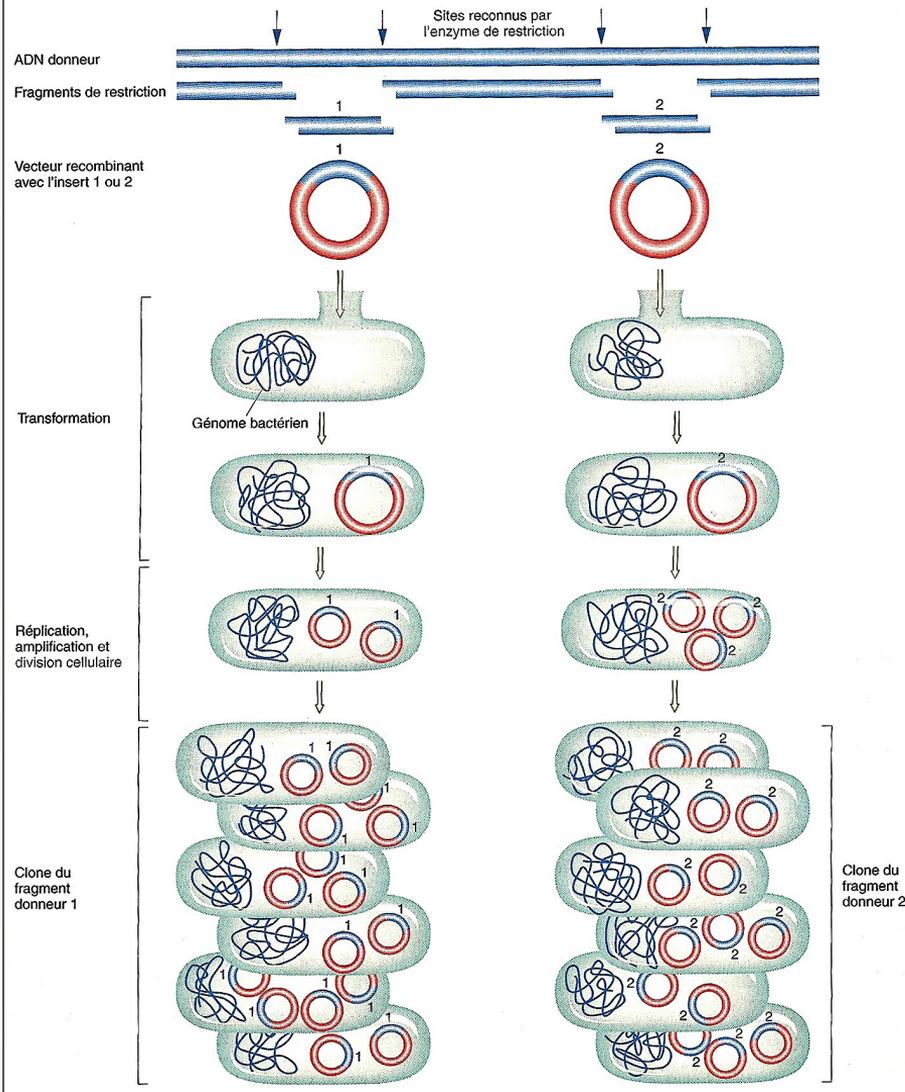
Si le gène rapporteur est placé sous le contrôle du promoteur du gène en question, il est facile de voir comment son expression change en réponse à diverses conditions



2. Transgénèses et mutagenèses

2.2. Les banques génomiques

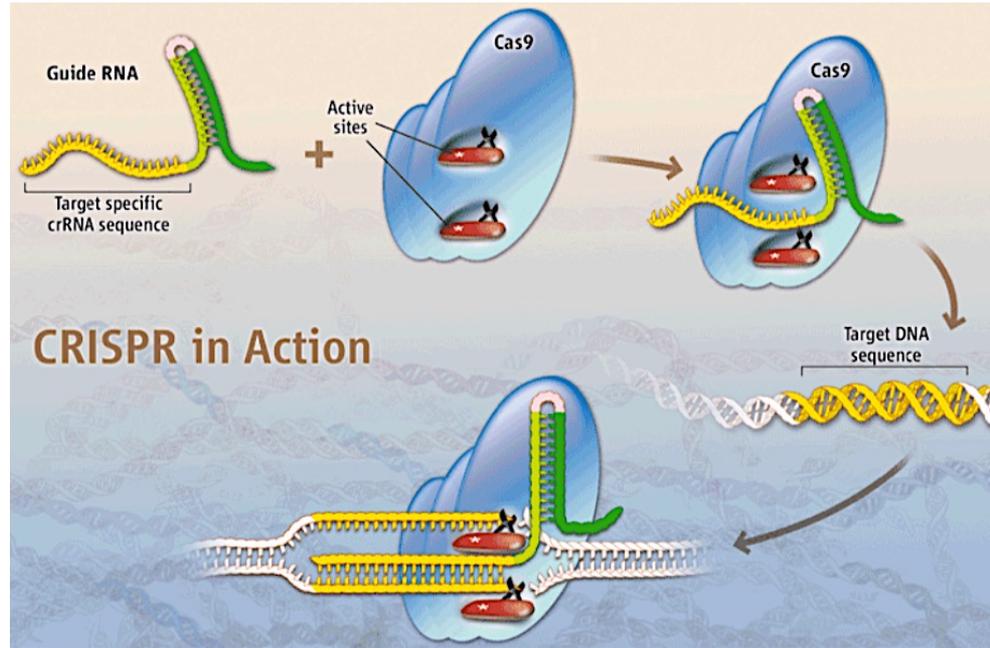
Les banques génomiques



2. Transgénèses et mutagenèses

2.3. Les mutagenèses dirigées

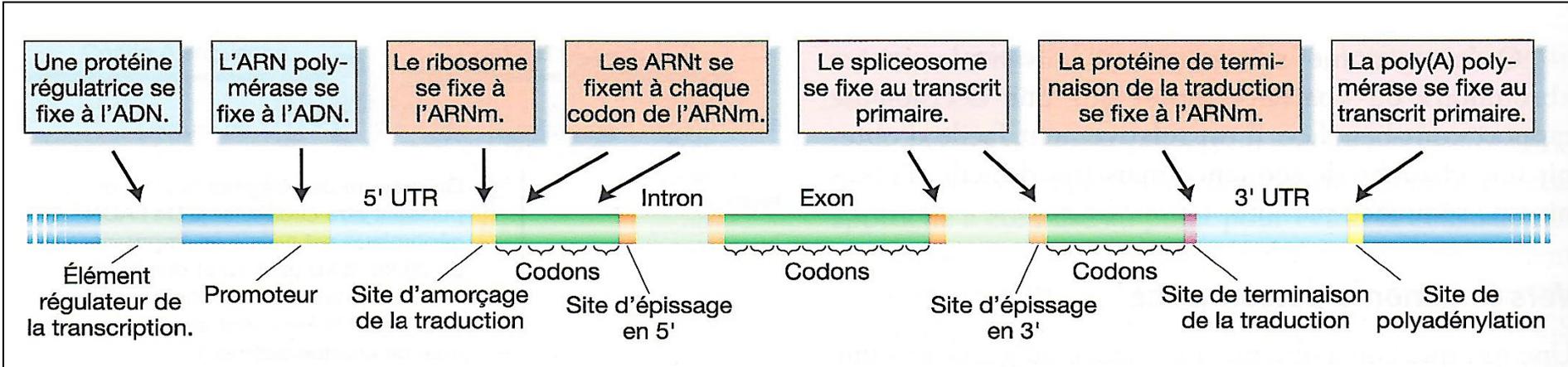
Le système CRISPR-Cas9



3. Les méthodes d'étude de l'expression génétique

3.1. Analyse de séquences de génomes

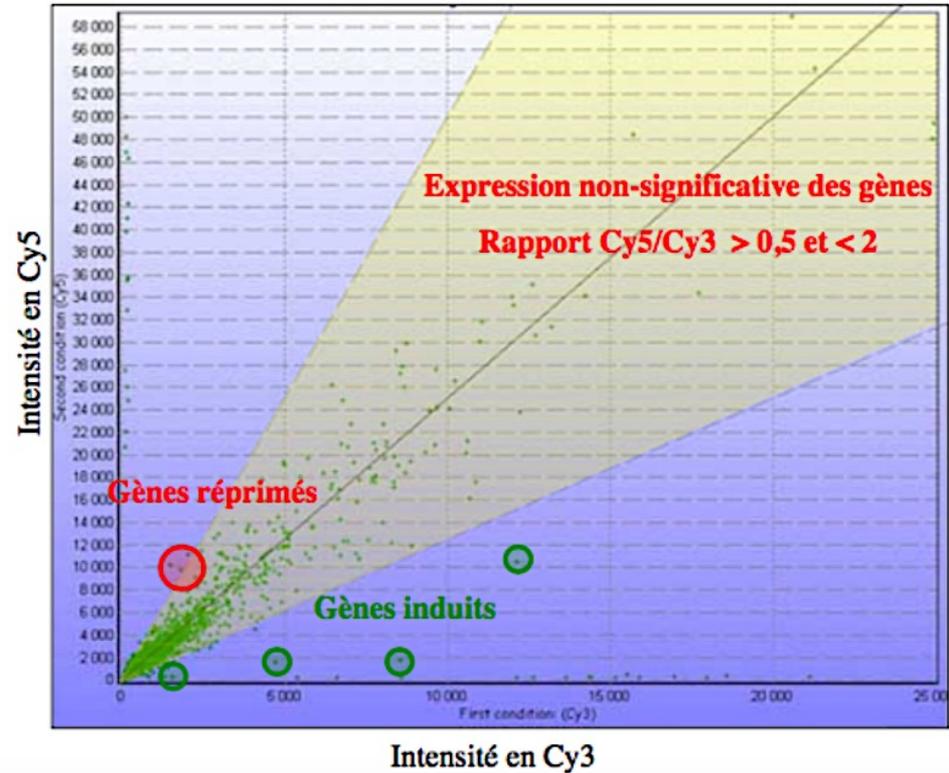
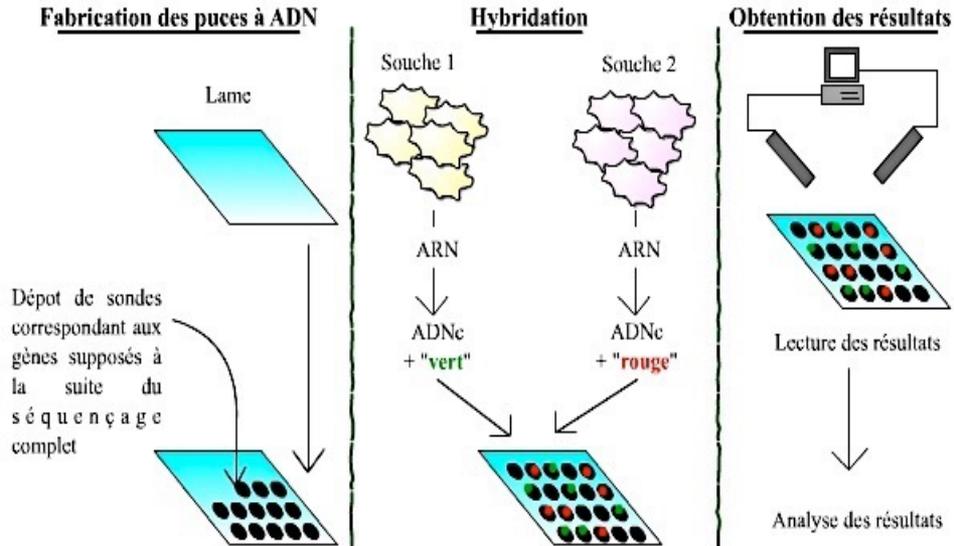
Les sites de références



3. Les méthodes d'étude de l'expression génétique

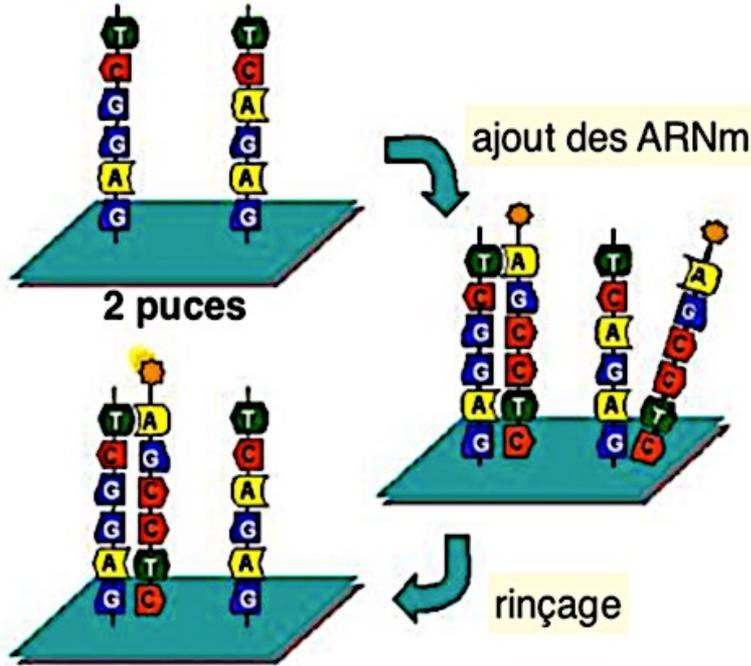
3.2. Les puces à ADN

Principe et résultats



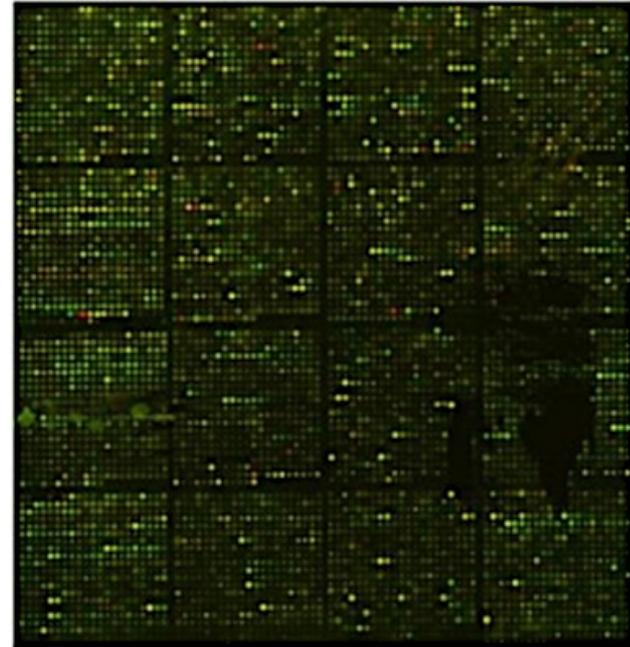
Les puces à ARNm

2 oligo-nucléotides
correspondant à 2 gènes

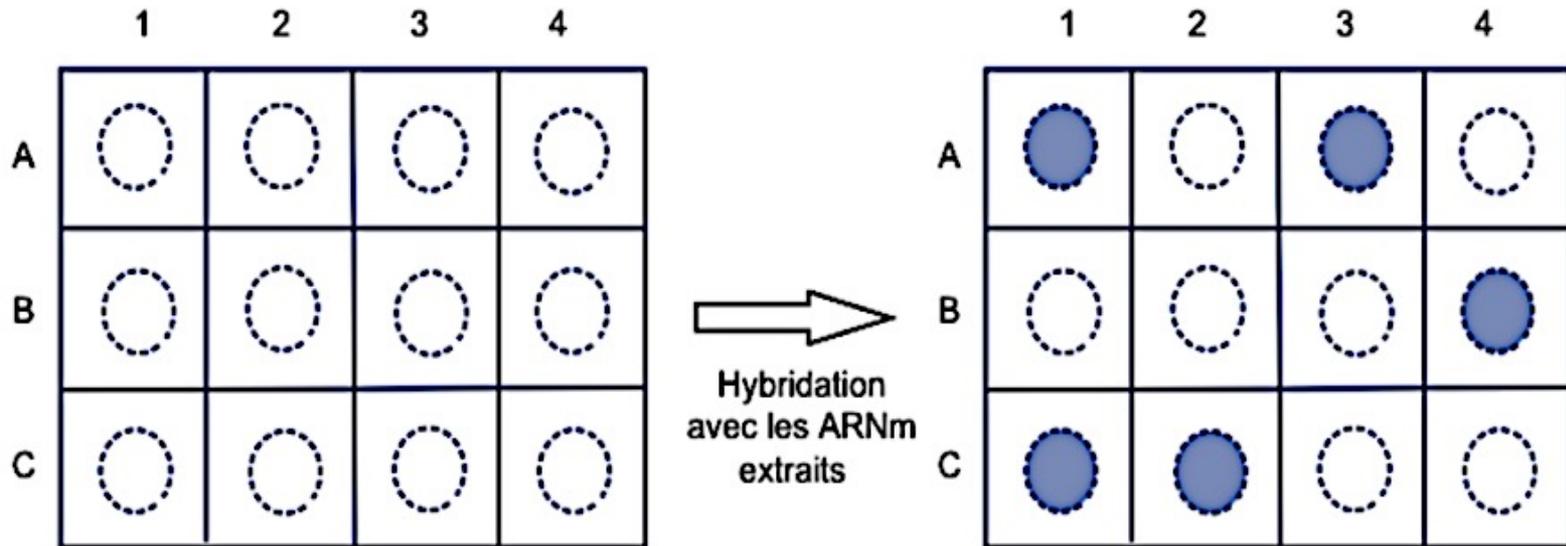


Seul le gène de gauche
est exprimé : il apparaît
une tâche fluorescente

16 000 oligonucléotides
ont été déposés



Les puces à ARNm

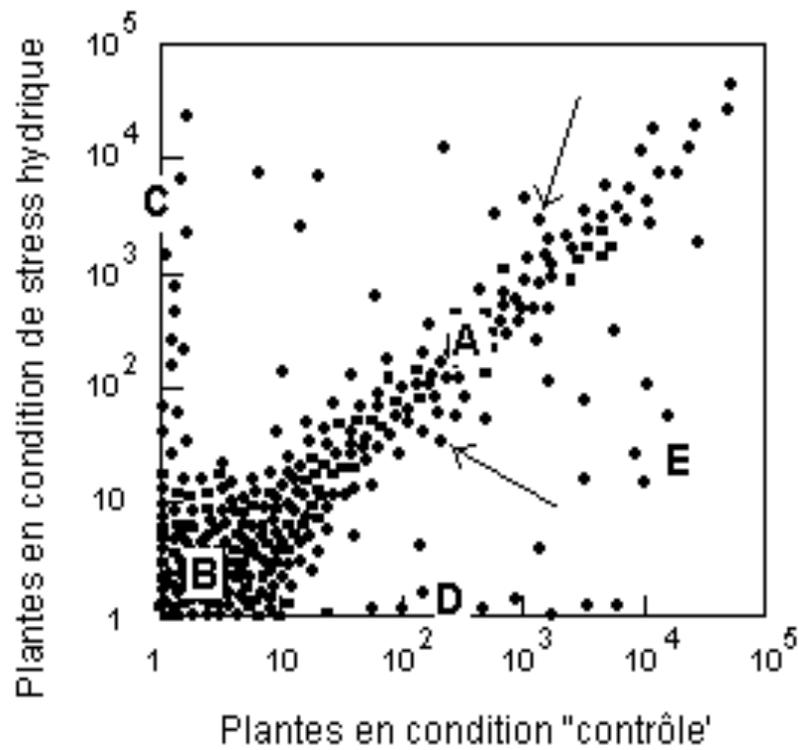
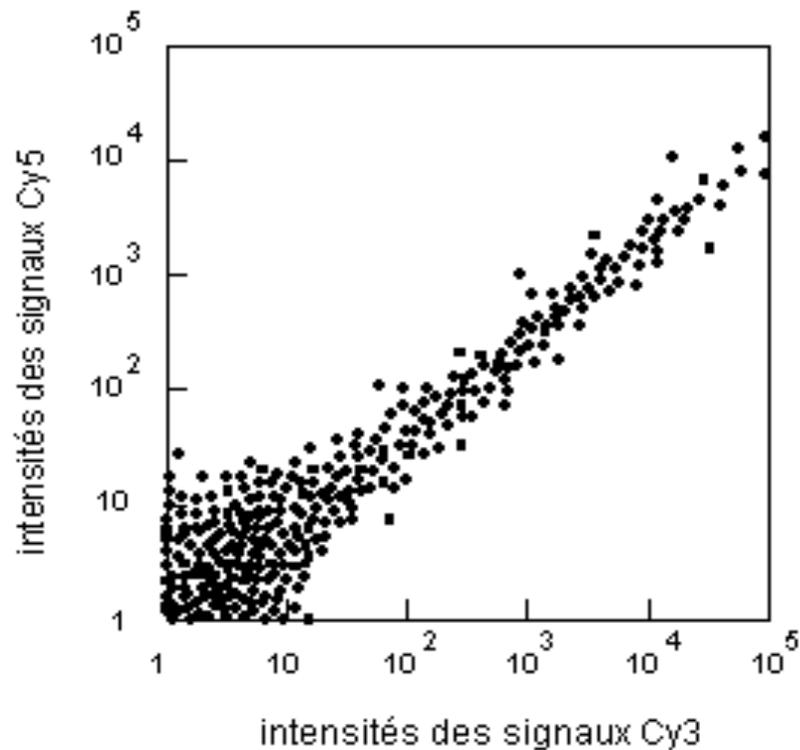


Puces de 12 oligonucléotides d'ADN

Les ARNm extraits s'hybrident aux
bio-puces A1,A3, B4, C1 et C2.

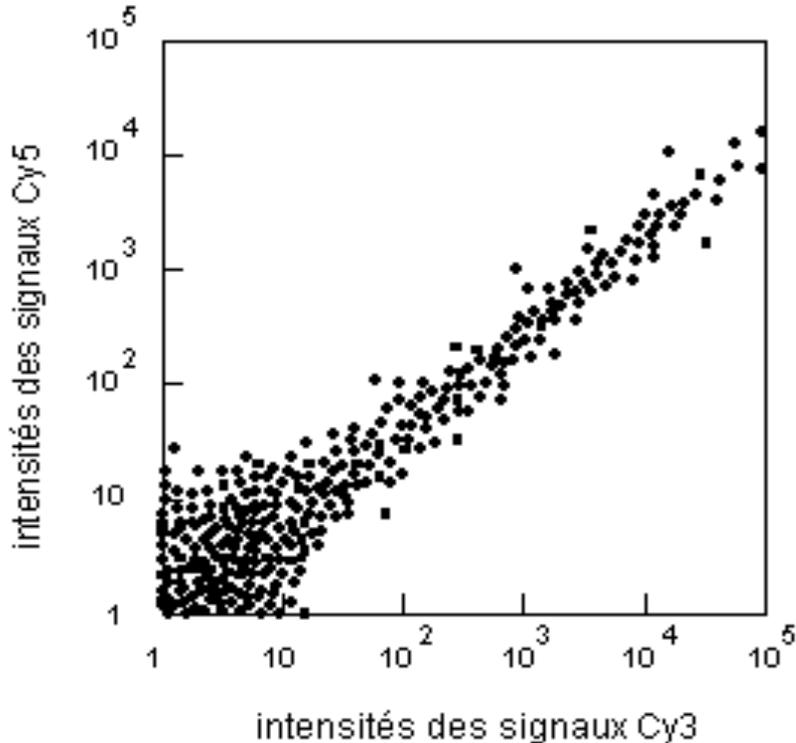
La cellule exprime donc les gènes fixés dans ces puces.

Exercice 4



Exercice 4

Chaque point correspond à un gène identifié

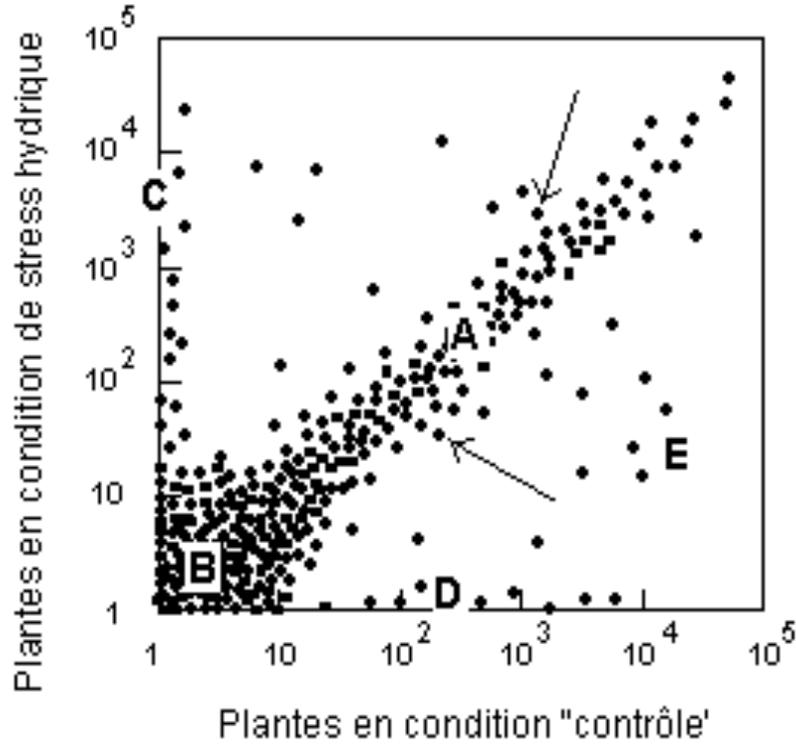


Faible résolution pour des intensités de signal inférieur à 10.

Intensité de fluorescence moins importante pour Cy5 que Cy3.

Seuls les spots en dehors de ce bruit de fond pourront être interprétés.

Exercice 4



A – expression génétique identique des gènes pour les 2 plants.

B – bruit de fond : gènes difficiles à distinguer.

C – gènes activés par le stress hydrique.

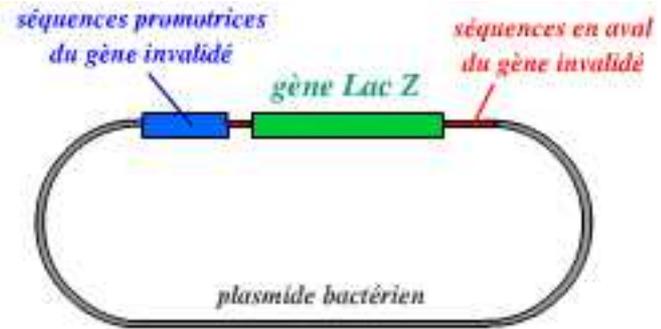
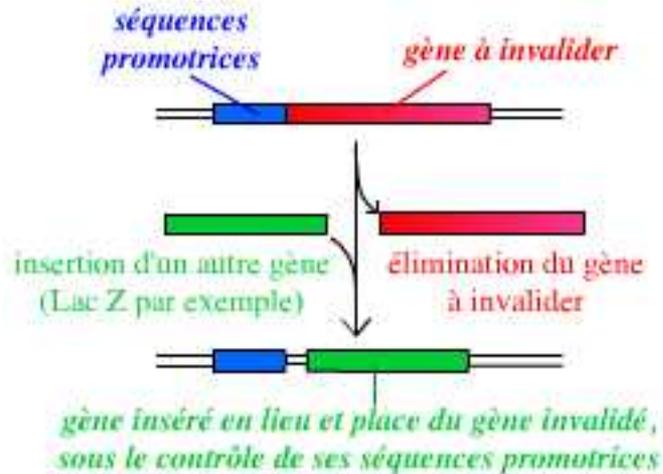
D – gènes inhibés par le stress hydrique.

E – gènes actifs mais moins en cas de stress hydrique.

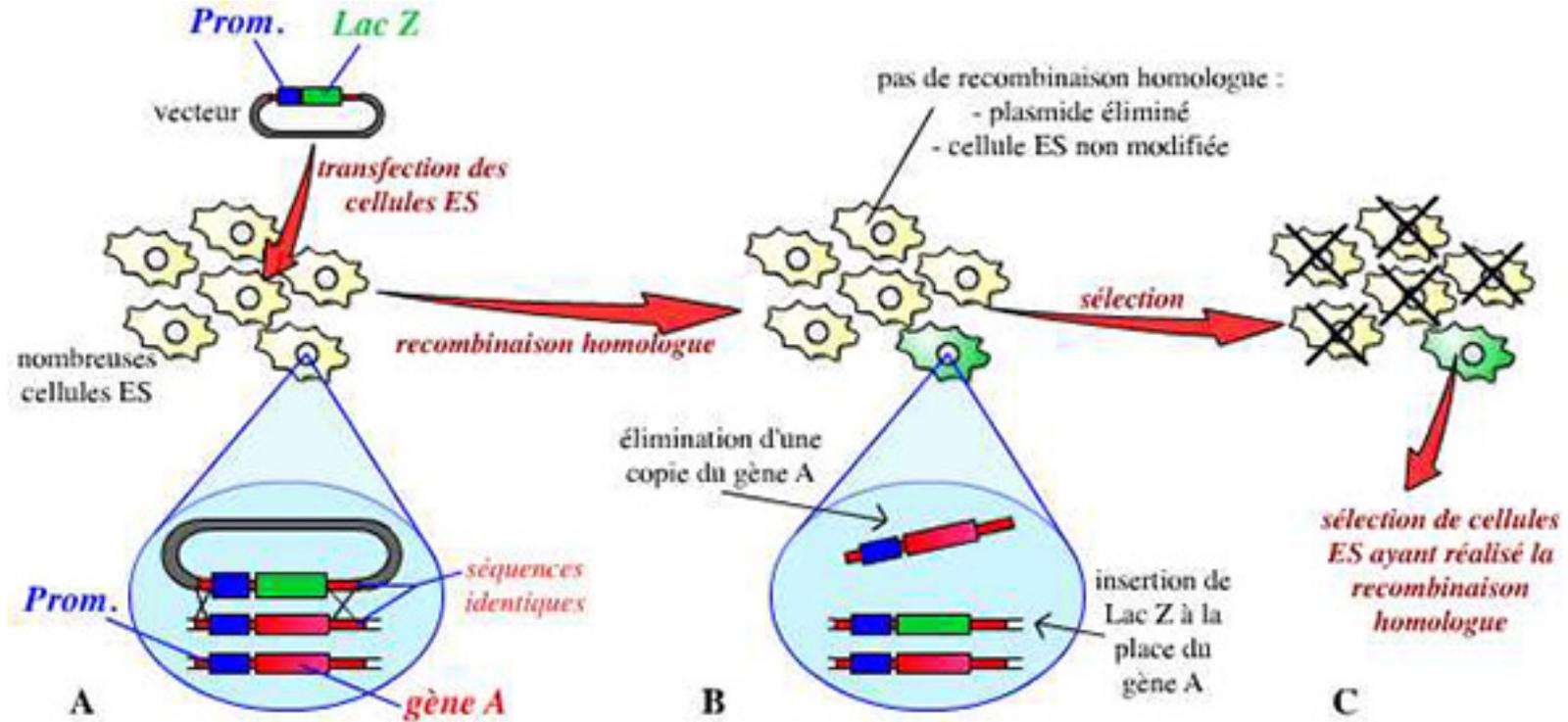
3. Les méthodes d'étude de l'expression génétique

3.3. Technique du knock-out

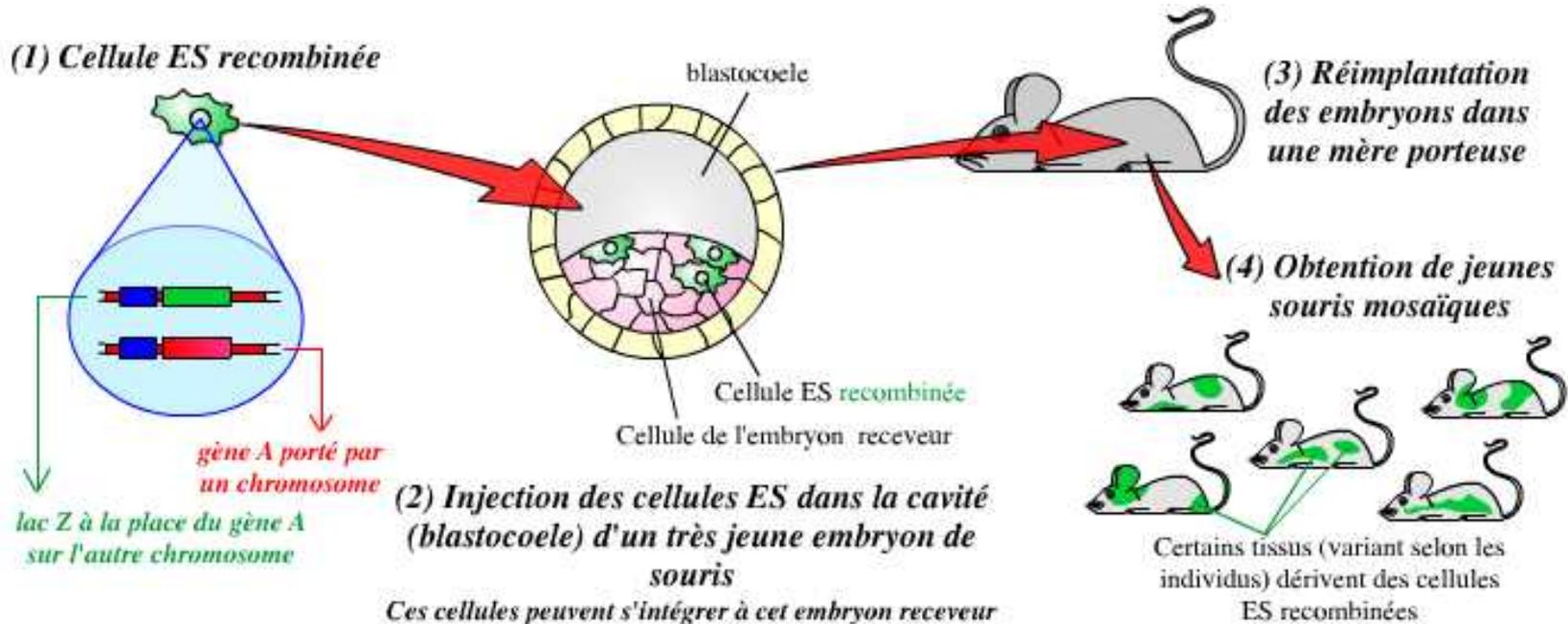
Principe : transgénése visant à remplacer le gène



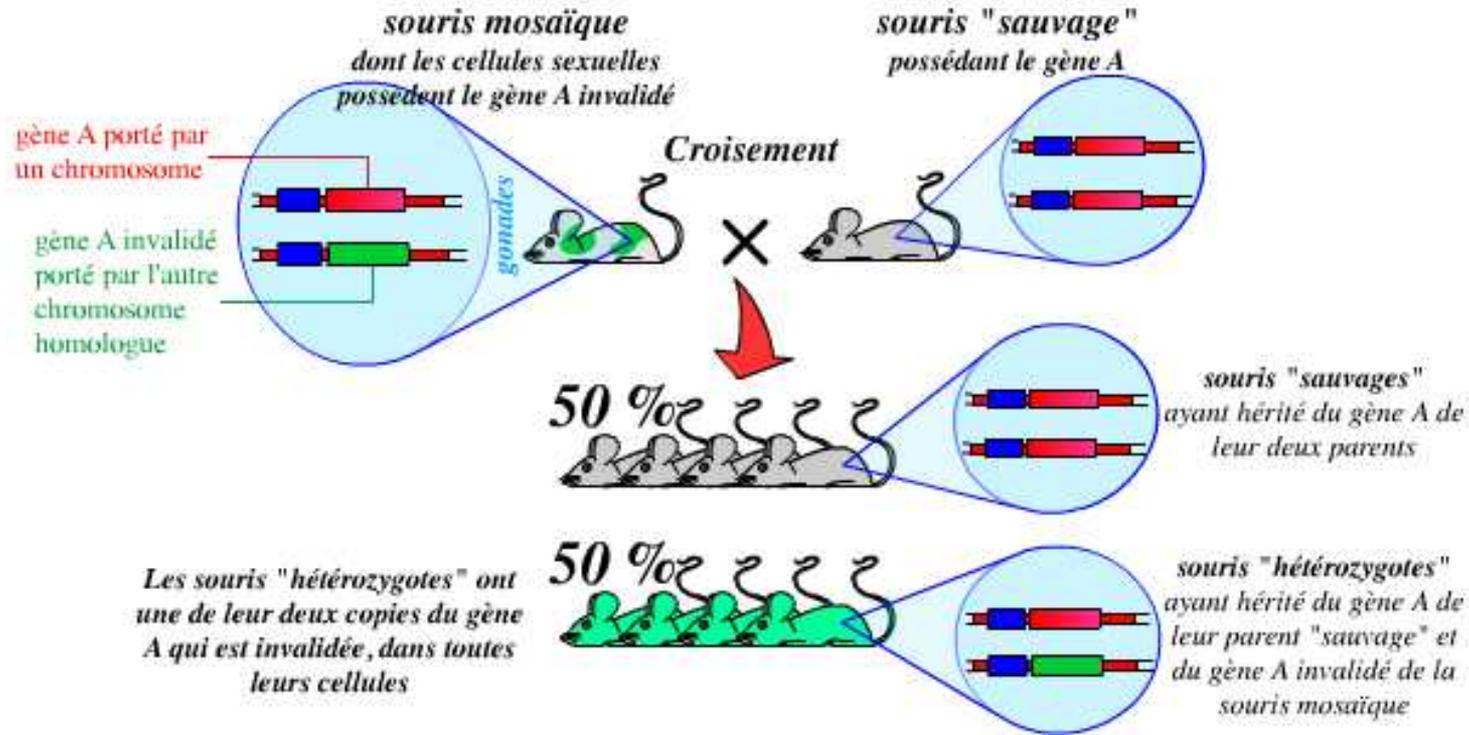
Principe : transgénése visant à remplacer le gène



Insertion dans une souris



Un gène rapporteur permet de cribler



Puis croisement des hétérozygotes pour avoir une lignée pure

Exercice 5



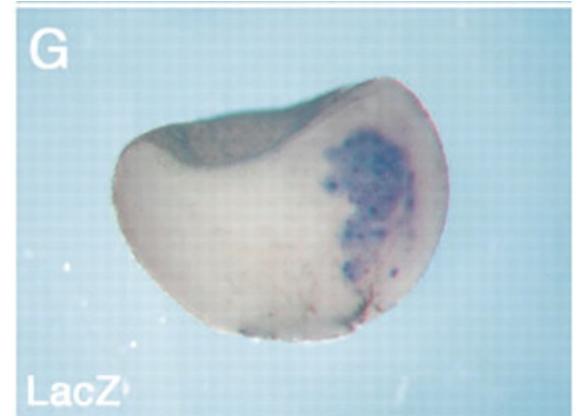
Témoin



Mutant knock-out pour *cerberus*



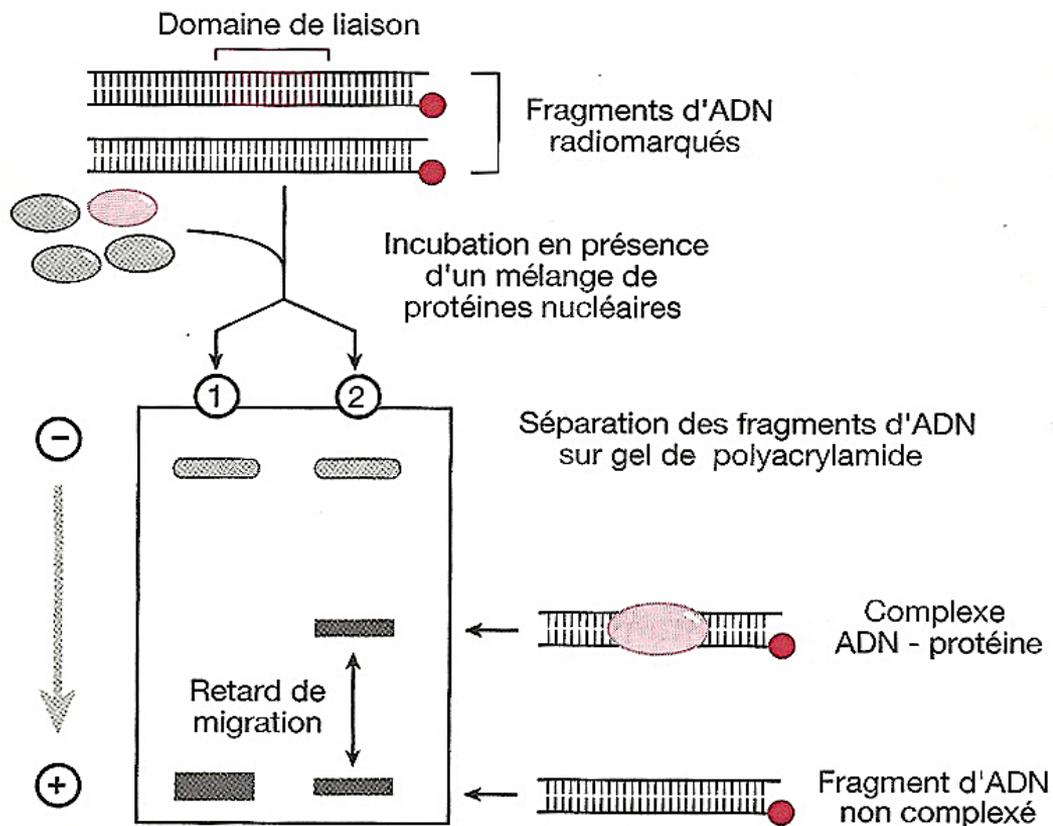
Bourgeon caudal avec injection d'ARNm codant pour le gène *cerberus* dans la partie antérieure ventrale et dans la partie postérieure ventrale



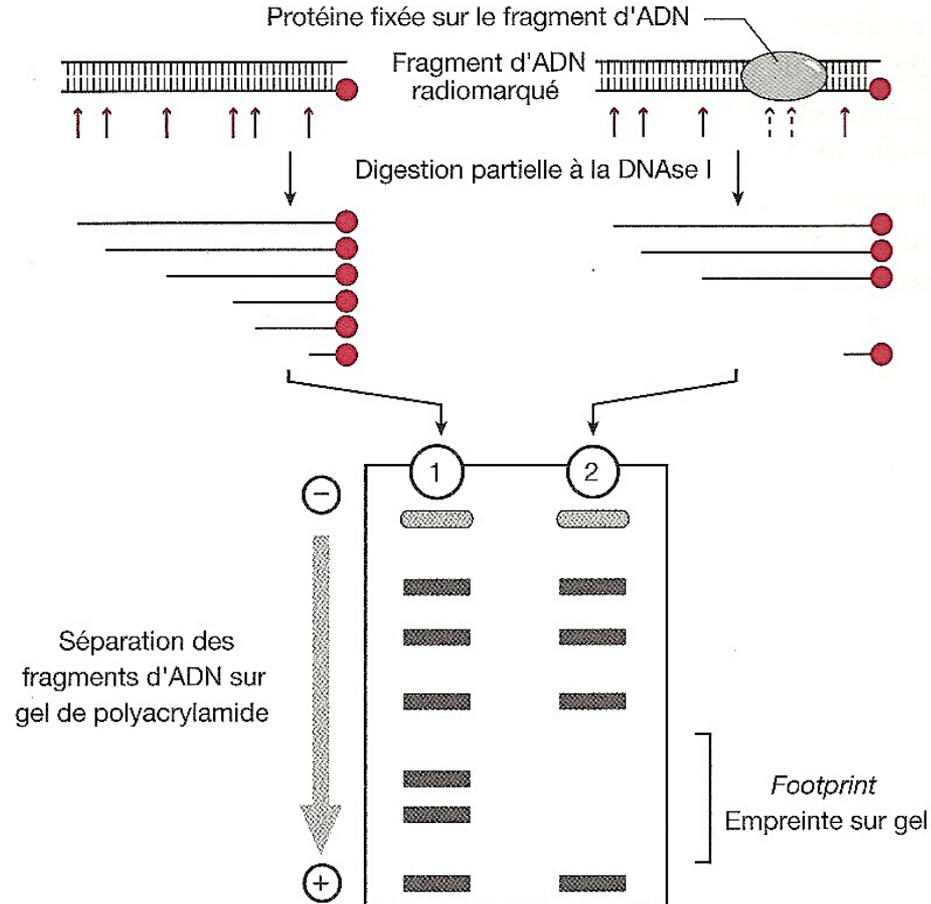
3. Les méthodes d'étude de l'expression génétique

3.4. Étude de l'interaction ADN-protéine

Le retard sur gel



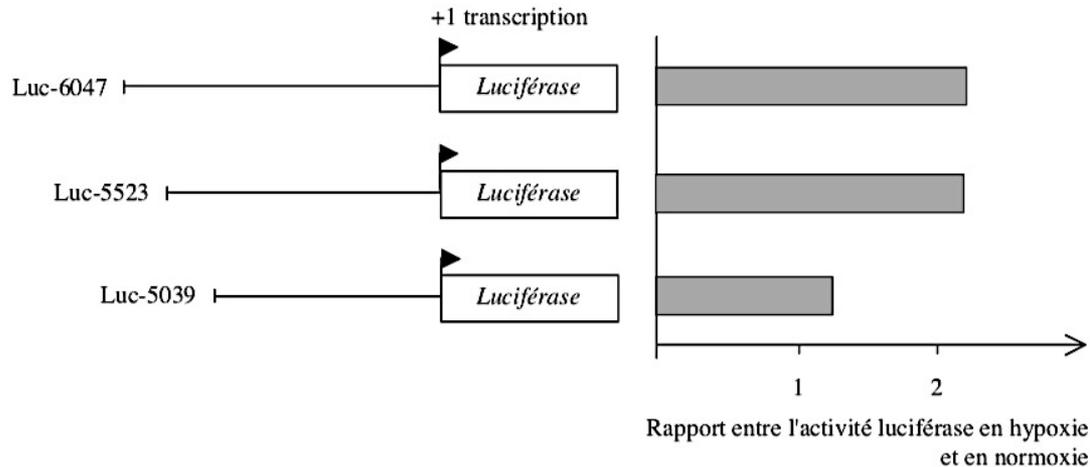
Le footprint = empreinte à la DNase



Exercice 6

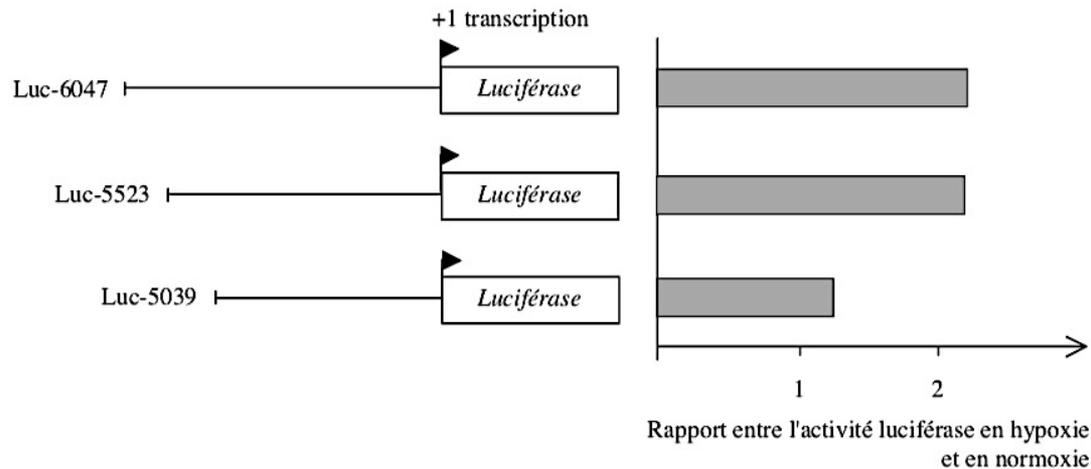
question 1 - Déduisez de cette observation la conséquence de l'hypoxie sur l'expression génétique.

L'hypoxie **active la transcription** du gène *nos*, dont la quantité d'ARNm est multipliée par 2 par rapport au témoin en normoxie.



Exercice 6

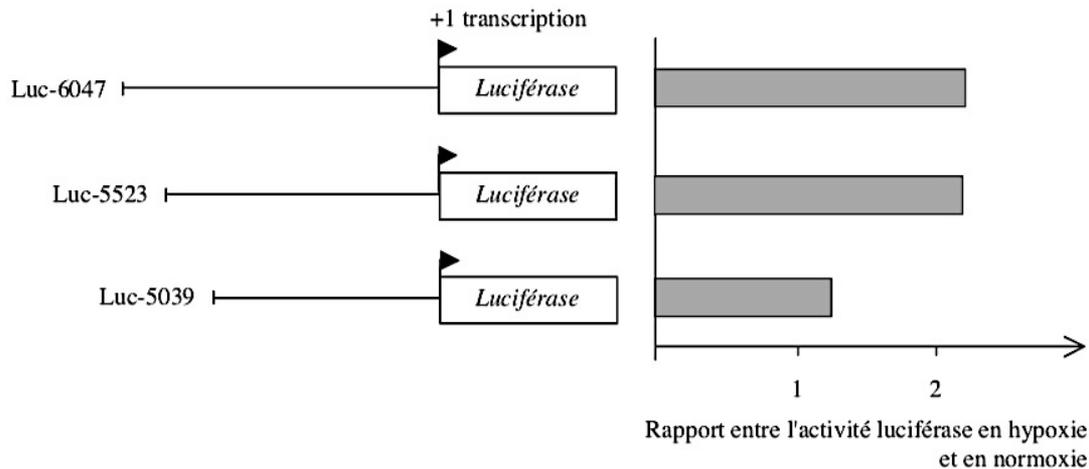
Question 2 - Nommez la fonction du gène de la luciférase et la construction génétique réalisée. Interprétez la valeur l'activité luciférase en hypoxie pour Luc-6047. Le gène de la luciférase est un **gène rapporteur**. La construction génétique est un **ADN mosaïque ou chimère**. Si l'activité luciférase est doublée pour Luc-6047, cela signifie que le gène de la luciférase a été activé par l'hypoxie : la région d'ADN en amont du gène a donc été le **lieu d'une activation de la transcription**.

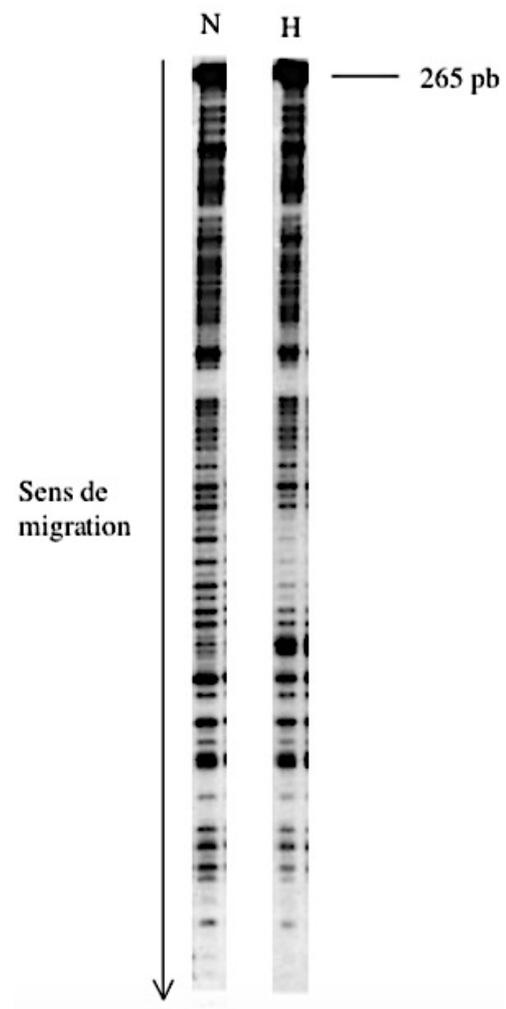


Exercice 6

Question 3 - Situez la séquence régulatrice du gène *nos* en justifiant votre réponse.

L'hypoxie ne provoque une hausse (x 2,3) de l'activité luciférase que pour Luc-6047 et Luc-5523. La séquence Luc-5039 n'induit qu'une faible hausse (x 1,2). La séquence d'activation serait donc située dans la sq **entre 5039 et 5523 pb** en amont du gène *nos*.





Exercice 6

Question 4 - Justifiez le choix de la séquence de 265 pb dans la région 5515 - 5250 pb en amont du gène *nos*.

Il s'agit de la portion d'ADN **suspectée comme étant régulatrice**.

Question 5 - Interprétez le gel obtenu.

Le gel montre l'absence de fragments entre 209 et 218 pb : l'ADN a donc été protégé par la présence d'une protéine présente uniquement dans le noyau des cellules en hypoxie mais pas en normoxie. **L'hypoxie induit donc l'apparition d'un facteur protéique qui se lie sur l'ADN** et pourrait activer le gène *nos*.

Exercice 6

Question 6 - Interprétez la distance parcourue sur le gel dans le puits 3 par rapport aux puits 1 et 2.

Les oligonucléotides sont de petite taille (20 pb) et migrent loin dans le gel. Il n'y a pas de changement pour les cellules en normoxie. Par contre, dans le puits 3, les oligonucléotides migrent moins loin : ils sont donc **alourdis**. Il existe donc **dans les cellules en hypoxie un composé qui se fixe sur les oligonucléotides et ralentit leur migration**. Ce composé est **absent en normoxie**.

Question 7 - Indiquez quel est l'intérêt des puits 4 et 5.

Les puits 4 et 5 permettent d'**identifier le composé présent en hypoxie et se liant aux oligonucléotides**. Ce composé est la **protéine nucléaire HIF1**, facteur de transcription reconnaissant spécifiquement une séquence présente dans les oligonucléotides.

Exercice 6

Question 8 - Précisez la position de la séquence de liaison par rapport au gène *nos*. HIF1 se lie à la séquence TACGTG qui est présente sur le fragment entre 209 et 218 pb, entre les nucléotides 209 et 214. Or ce fragment de 265 pb est lui-même situé à 5250 pb du site +11 du gène *nos*.

La séquence est donc située à $5250 + 209 = 5459$ pb du gène *nos* et s'étend sur 6 pb.

Origine des extraits nucléaires	0	N	H		
Anticorps	0	0	0	Ac HIF1	Ac

