

TD Biologie moléculaire GB3 UEF1

Partie 1- Outils d'étude de l'expression génique

Question 1 : analyse de l'expression d'un gène par northern blot

Vous avez identifié au cours d'un projet préliminaire deux gènes du xénope exprimés pendant la fécondation. Vous souhaitez préciser le profil d'expression de ces deux gènes (*CSI* et *FSI*). Vous utilisez une approche par northern blot.

- 1- Rappelez les étapes de la mise en œuvre d'un northern blot et de l'analyse par hybridation (précisez en particulier quelles précautions vous devez prendre pour choisir votre sonde).
- 2- La figure 1 montre les résultats de l'analyse par northern blot.
Expliquez à quoi sert l'utilisation de la sonde correspondant au gène *ACTa1* ?
Analyser les résultats obtenus et concluez quant au profil d'expression des gènes *CSI* et *FSI*.

Question 2 : analyse de l'expression d'un gène par northern blot cas plus complexe

Phytophthora parasitica est un organisme filamenteux pathogène d'un grand nombre d'espèces de plantes cultivées (ex tomate, tabac). Vous étudiez les mécanismes permettant à *P. parasitica* d'infecter son hôte et vous vous intéressez en particulier au gène *JOI*. Avant de démarrer une étude détaillée de la fonction de ce gène, vous souhaitez vérifier le profil d'expression de ce gène afin de vérifier s'il est bien exprimé au cours de l'infection de la plante hôte. Vous optez pour une analyse par northern blot.

La figure 2 montre les résultats de l'analyse après hybridation.

- Expliquez à quoi sert l'utilisation de la sonde correspondant à l'ARN 28S ?
Analyser les résultats obtenus et concluez quand au profil d'expression du gène *JOI*.

Question 3 (analyse de l'expression d'un gène par RT-PCR) :

Vous travaillez sur le mélanome (cancer de la peau) et essayez de comprendre les mécanismes moléculaires aboutissant au développement de ce type de tumeurs. Des analyses préliminaires ont montré que l'ensemble des patients atteints portaient une mutation dans l'un ou l'autre des gènes *MEL1* et *MEL2*. Ces gènes sont sans homologie avec les protéines connues dans les bases de données et vous démarrez donc votre étude par une analyse détaillée du profil d'expression des deux gènes. Vous recherchez en particulier l'expression de ces gènes dans des tissus tumoraux variés et des tissus de peau sains à différentes phases de développement. Pour cela vous travaillez sur des souris dont le développement de tumeur a été induit par une exposition prolongée aux rayons ultraviolets.

- 1- Une première analyse par northern blot n'a pas permis de détecter les transcrits correspondant aux deux gènes. Formulez des hypothèses pour expliquer ce résultat.
- 2- Afin de confirmer ou d'infirmer votre analyse vous tentez une analyse par RT-PCR.
Rappelez le principe de cette technique.
- 3- La figure 3 montre la position des oligonucléotides utilisés pour l'étude.
La figure 4 montre les résultats obtenus après RT-PCR.
Commentez les résultats
- 4- Quelles hypothèses quant à la fonction des gènes *MEL1* et *MEL2* pourriez vous formuler d'après ces résultats.

Question 4 Analyse de l'expression d'un gène par q-RT-PCR

Vous souhaitez analyser l'expression de deux gènes (A et B) d'un organisme filamenteux pathogène de plantes. Vous extrayez les ARN totaux issues de différentes conditions biologiques : mycélium, zoospores (unités infectieuses), tomates récoltées 3h après l'inoculation (pénétration par le pathogène dans l'hôte), tomates récoltées 4jours après l'inoculation (tomates malades très envahies). Vous analysez les échantillons par RT PCR quantitative en utilisant le gène C comme gène constitutif. Pour chaque échantillon trois réplicats techniques sont effectués. Les CT vous sont fournis.

Déterminez le niveau d'expression des gènes A et B en simple delta CT. Puis en double delta CT. Calculez à nouveau le niveau d'expression des gènes A et B en utilisant un deuxième gène constitutif (D). Quel contrôle manque t'il ?

	A	B	C	D
Myc	28.3	27.59	23.35	20.5
Myc	28.18	27.92	23.43	20.9
Myc	28.35	27.74	23.5	20.66
Zoo	28.04	N/A	22.98	28.46
Zoo	28.05	N/A	22.91	28.54
Zoo	28.5	N/A	22.93	28.75
tom3hai	22.64	N/A	26.8	23.61
tom3hai	22.84	N/A	26.93	23.34
tom3hai	22.96	N/A	26.64	23.53
tom4J	28.7	24.88	22.53	19.63
tom4J	29.26	25.04	22.28	19.55
tom4J	28.72	25.03	22.68	19.53

Question 5 (analyse de l'expression de gène/ utilisation de banques de cDNA) :

Dans votre travail sur le mélanome, vous décidez maintenant de mettre en œuvre une stratégie plus globale. Vous souhaitez identifier un ensemble de gènes intervenant dans la mise en place de la tumeur. Pour cela vous choisissez de construire des banques de cDNA issues de cellules saines (mélanocytes) et de cellules tumorales et de les comparer.

- 1- Expliquez comment vous procéderiez pour construire ces banques
- 2- Quelles approches pourraient vous permettre de trouver des gènes spécifiques des cellules tumorales ?