

# **Biologie Moléculaire & Génétique (BMG)**

Cours Stéphane Deschamps

## ***GENES ET CONTRÔLE DE L'EXPRESSION GENETIQUE***



# INTRODUCTION



**Un gène permet de connaître l'heure de votre mort**

**N'IMPORTE QUOI !!!....**

«Le gène permet trois types de combinaisons des nucléotides: adénine-adénine (A-A), adénine-guanine (A-G) et guanine-guanine (G-G)», explique le Huffington Post.



**MOTHERBOARD  
TECH BY VICE**

**Des chercheurs ont découvert des gènes "zombies" qui s'activent après la mort**

**BUZZ..  
TRES RACOLLEUR !!!....MAIS Y A DU VRAI !**



Des gènes morts-vivants ? Certains gènes peuvent rester actifs pendant plusieurs jours après la mort

Après la mort, des gènes reviennent à la vie pendant quarante-huit heures

- 1 – « Le gène de la maladie X ou du comportement Y n'existe pas »
- 2 – « Il n'y a pas de causalité simple entre un gène et un phénotype.. »
- 3 – « Tout organisme est une rencontre entre l'inné (le génotype) et l'acquis (l'environnement) ».. »



votre puce à ADN nous dira si vous êtes prédisposé à certaines maladies. Nos techniciens de laboratoire tentent d'isoler le gène "disposé à travailler de longues heures pour une rémunération minime"

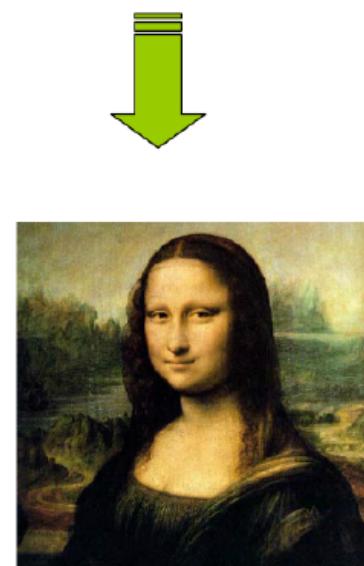
«Rien n'est sans les gènes mais tout n'est pas dans les gènes». J.Louis Serre

## Facteurs environnementaux



... TAGTACGATAGCA  
TAGATATATTAGAGAG  
ATAGATATAGATATGG  
ATAGACCGATAGACGAT  
GATAGACAGATATGAA  
GAATACAGATAGAGAG  
AGATAACATGCGCG..... .

Information linéaire  
virtuelle (le génome)



Structure 3D matérielle  
(le phénotype)

(Stress, Habitudes alimentaires, Environnement utérin, Activités physiques et socio-culturelles...)

**GENES ET EXPRESSION GENETIQUE**

**METHODES D'ETUDES DE EXPRESSION GENETIQUE**

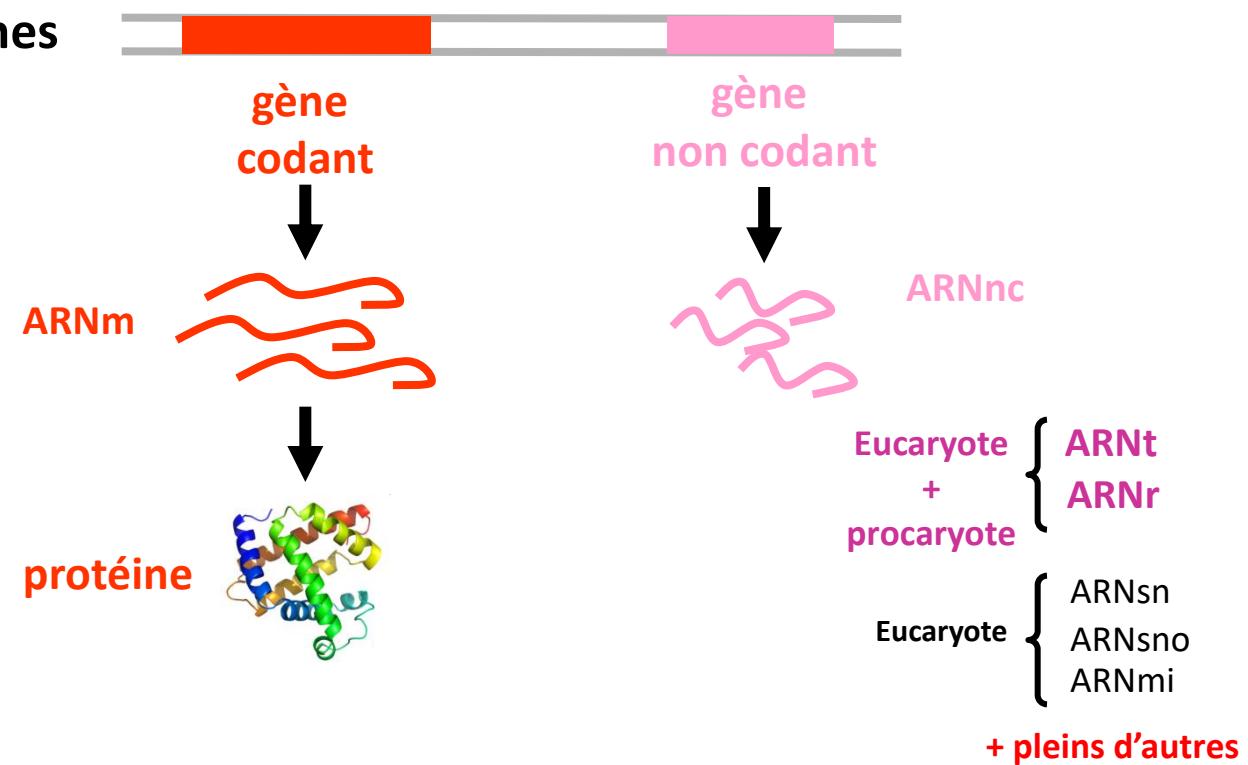
**CONTRÔLE DE EXPRESSION GENETIQUE**

## 1. Gènes codants et non-codants

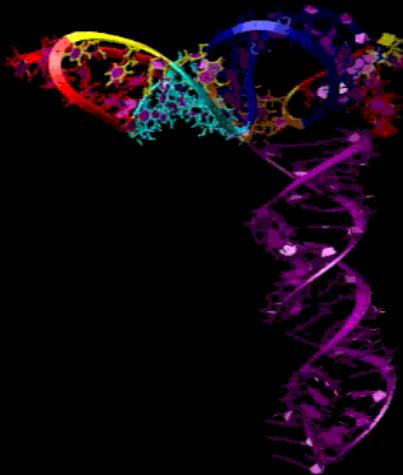
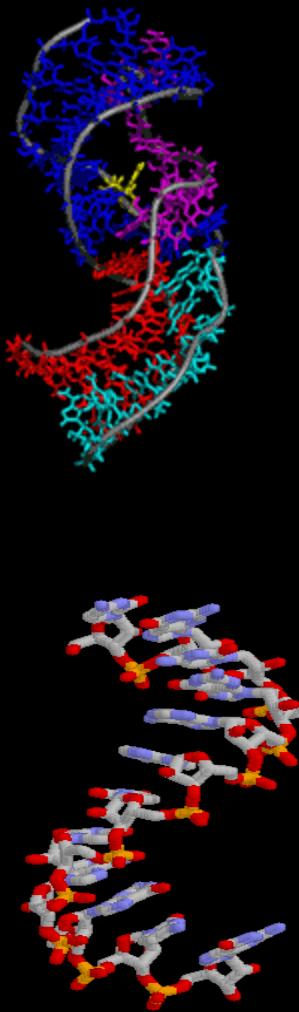


**GENE** : Séquence d'ADN qui sert à programmer la synthèse d'un ARN qui possède au moins une fonction cellulaire.

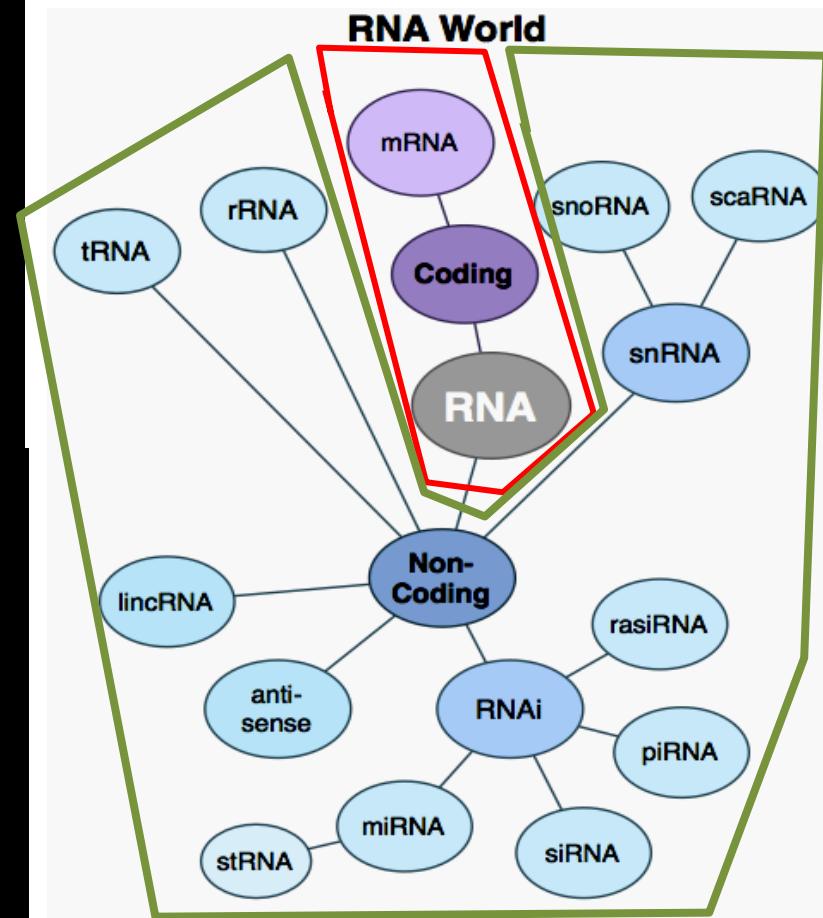
### Deux classes de gènes



# Fascinating world of RNAs



1-2%



## des ARN non codant

**rRNA (ARN ribosomiques)**

**tRNA (ARN de transfert)**

**4.5S & 7S RNA (Signal Recognition Particles)**

**snRNA** – Pre-mRNA splicing

**snoRNA** – rRNA modification

**siRNA** – small interfering RNA

**mi-RNA - microRNA**

**gRNA** – guide RA in RNA editing

**Telomerase RNA** – primer for telomeric DNA synthesis

**tmRNA** is a hybrid molecule, half tRNA, half mRNA

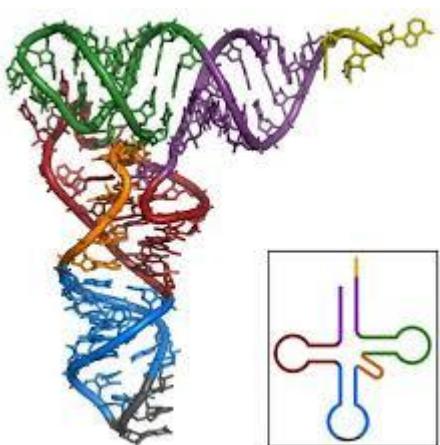
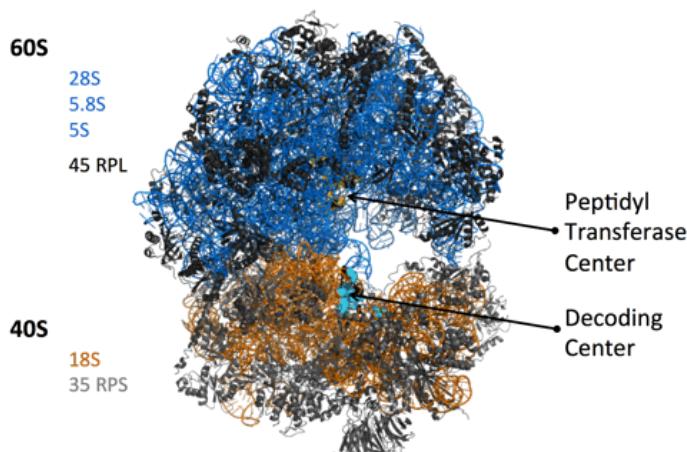
**lncRNA --- ex. Xist:** The X chromosome silencing is  
mediated by Xist

**shRNA** (small heterochromatic RNAs )

**LNA** Locked Nucleic Acid

**piRNA** Piwi-interacting RNA

# Quelques grandes fonctions cellulaires des ARN non codant



**rRNA (ARN ribosomiques)**

**tRNA (ARN de transfert)**

**4.5S & 7S RNA (Signal Recognition Particles)**

**snRNA** – Pre-mRNA splicing

**snoRNA** – rRNA modification

**siRNA** – small interfering RNA

**mi-RNA - microRNA**

**gRNA** – guide RNA in RNA editing

**Telomerase RNA** – primer for telomeric DNA synthesis

**tmRNA** is a hybrid molecule, half tRNA, half mRNA

**lncRNA --- ex. Xist:** The X chromosome silencing is mediated by Xist

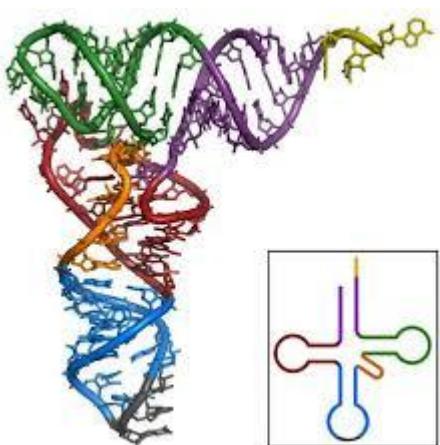
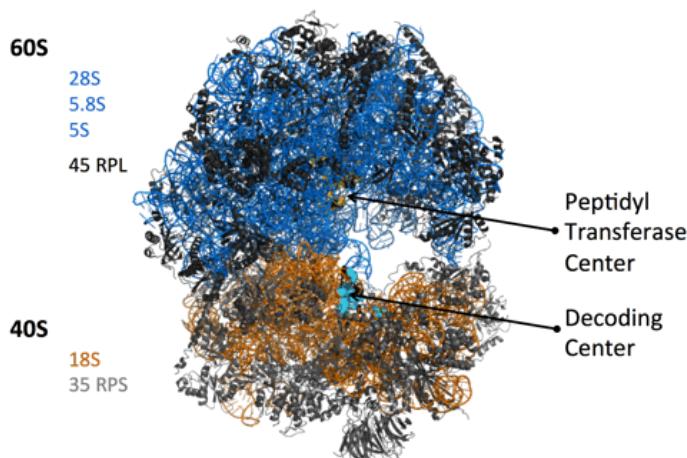
**shRNA (small heterochromatic RNAs )**

**LNA Locked Nucleic Acid**

**piRNA Piwi-interacting RNA**

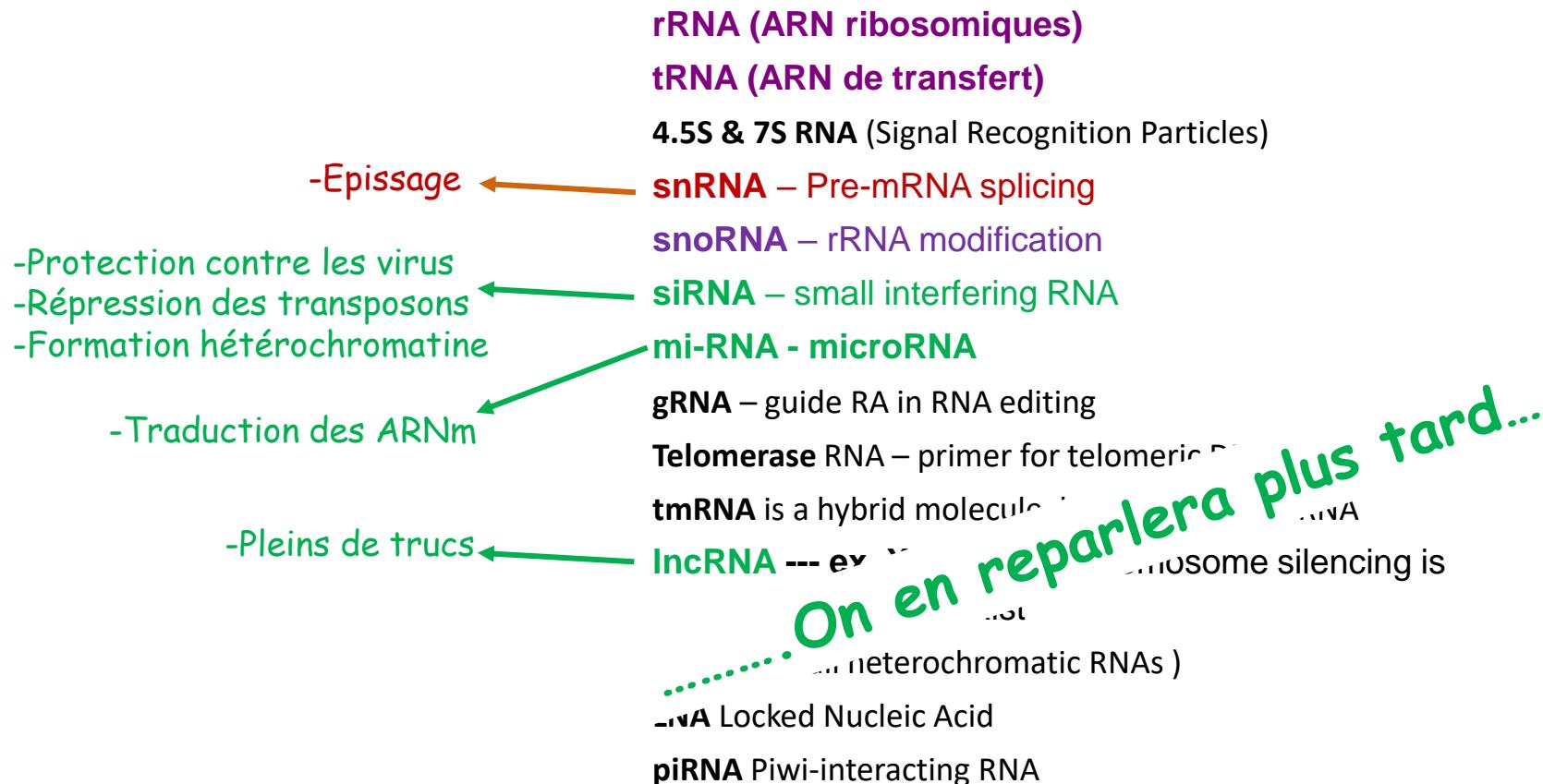
Structure et fonction des ribosomes  
-Traduction

# Quelques grandes fonctions cellulaires des ARN non codant



- Structure et fonction des ribosomes  
-Traduction
- rRNA (ARN ribosomiques)**  
**tRNA (ARN de transfert)**  
4.5S & 7S RNA (Signal Recognition Particles)  
snRNA – Pre-mRNA splicing  
**snoRNA – rRNA modification**
- siRNA – small interfering RNA  
mi-RNA - microRNA  
gRNA – guide RNA in RNA editing  
Telomerase RNA – primer for telomeric DNA synthesis  
tmRNA is a hybrid molecule, half tRNA, half mRNA  
**lncRNA --- ex. Xist:** The X chromosome silencing is mediated by Xist  
shRNA (small heterochromatic RNAs )  
LNA Locked Nucleic Acid  
piRNA Piwi-interacting RNA

# Quelques grandes fonctions cellulaires des ARN non codant



De nombreux **ARN non codant** interviennent dans le contrôle de l'expression génétique à tous les niveaux

**DONC !!!**

**Chez les eucaryotes de nombreux gènes sont non-codants  
.....mais sont nécessaires !!!**

**Le nombre de gènes non codants identifiés augmente tout  
le temps !!...**

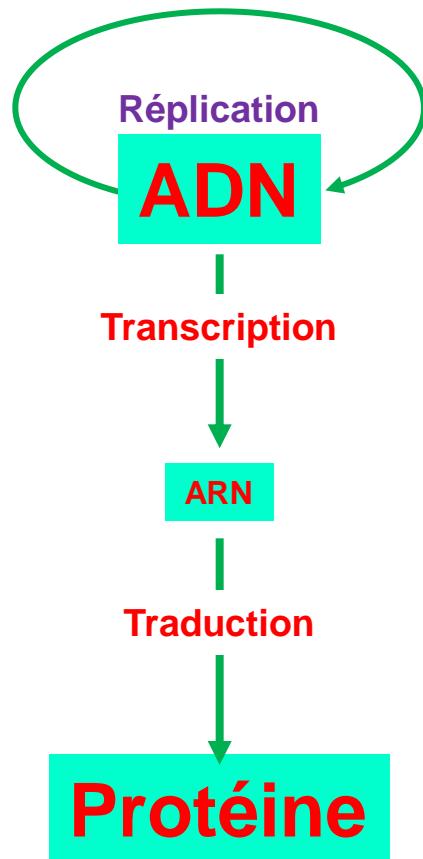
**La part du gène transcrit apparaît de plus en plus  
grande !!..40%, +??.**

**La définition du gène se complique !!....**

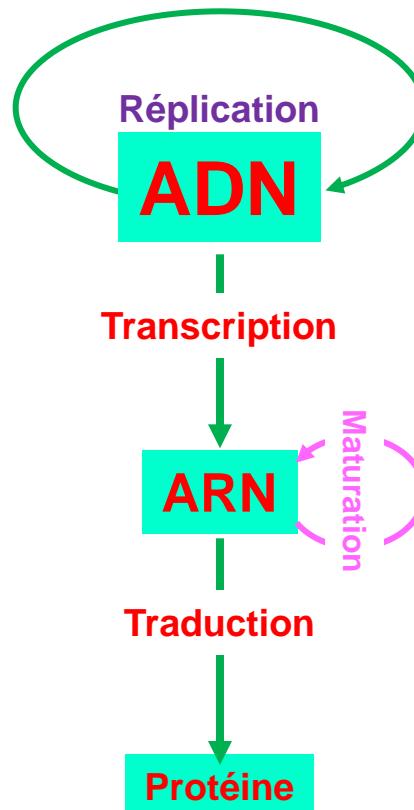


# Le "dogme central" de la biologie moléculaire (actuel)

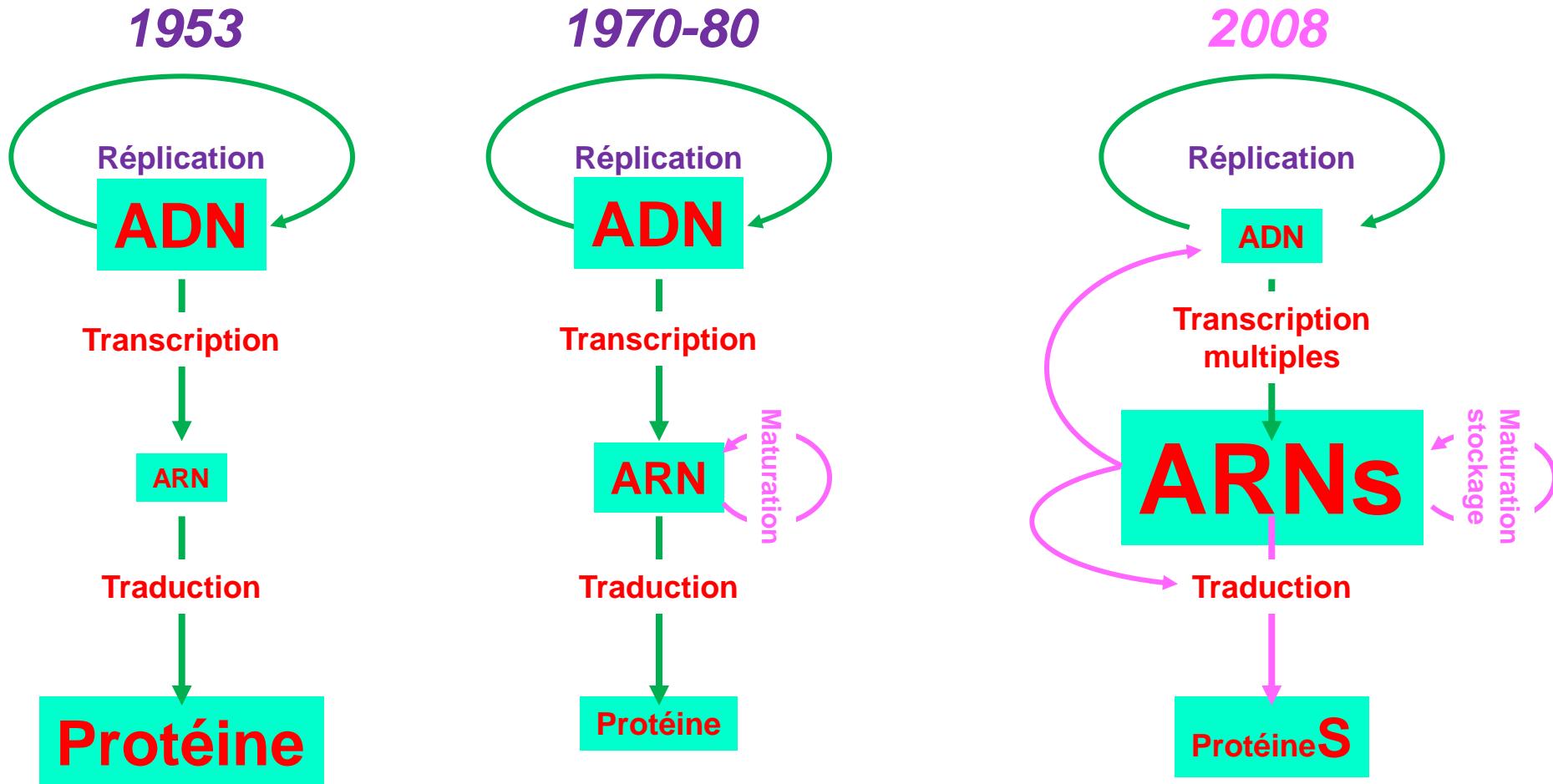
1953



1970-80

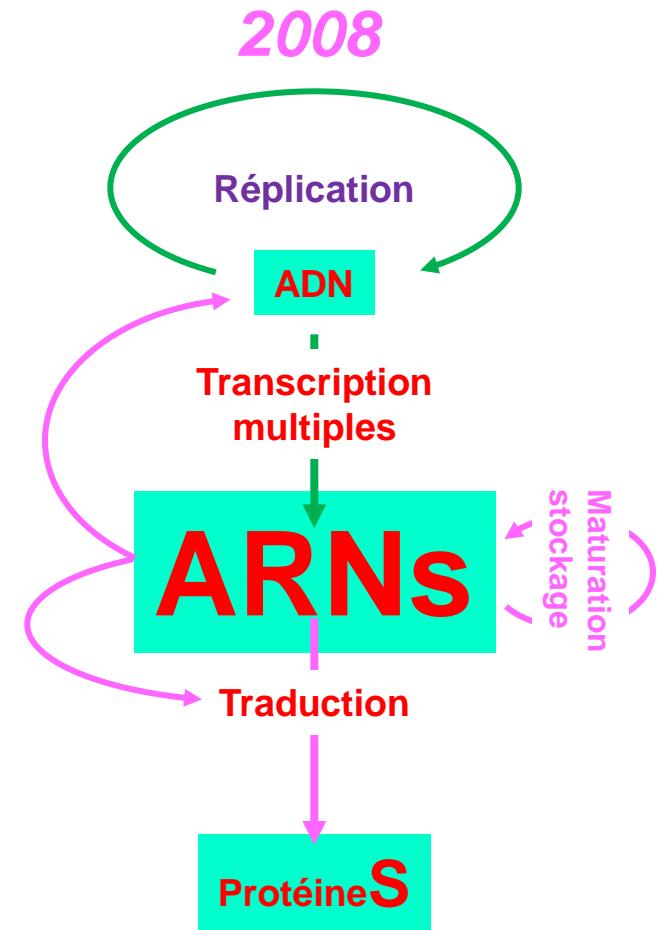


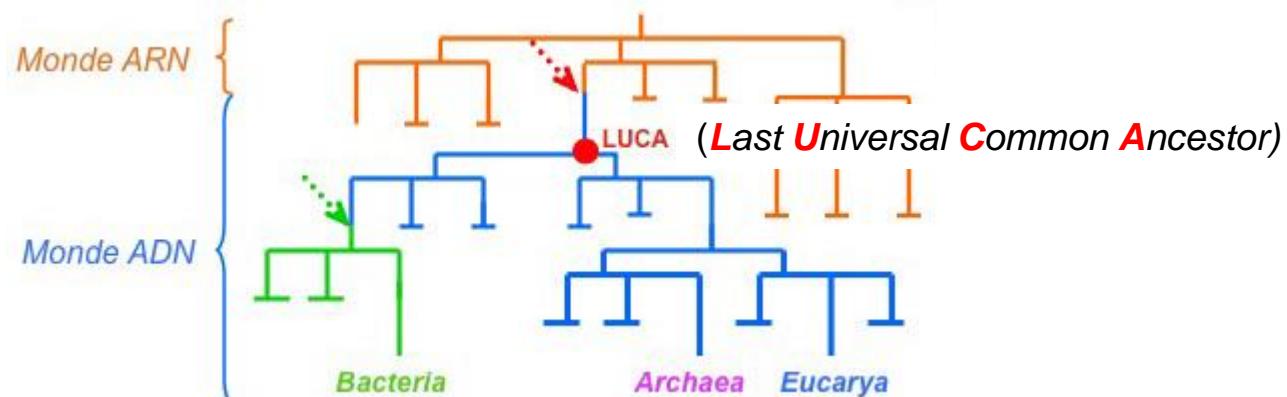
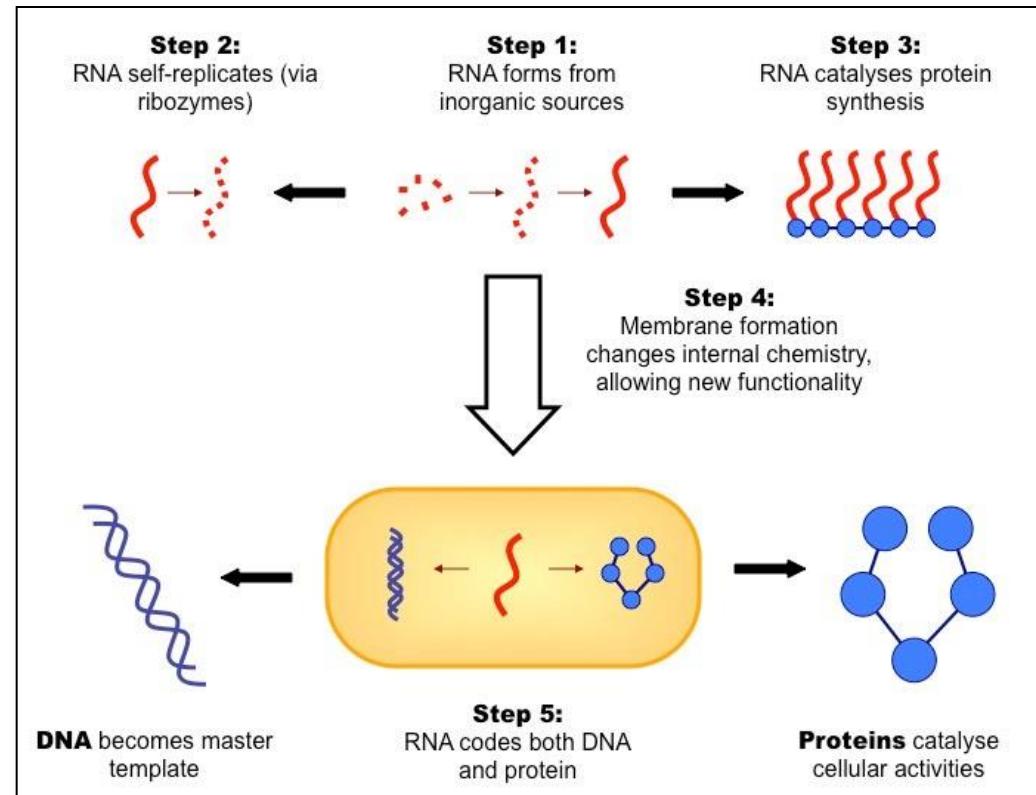
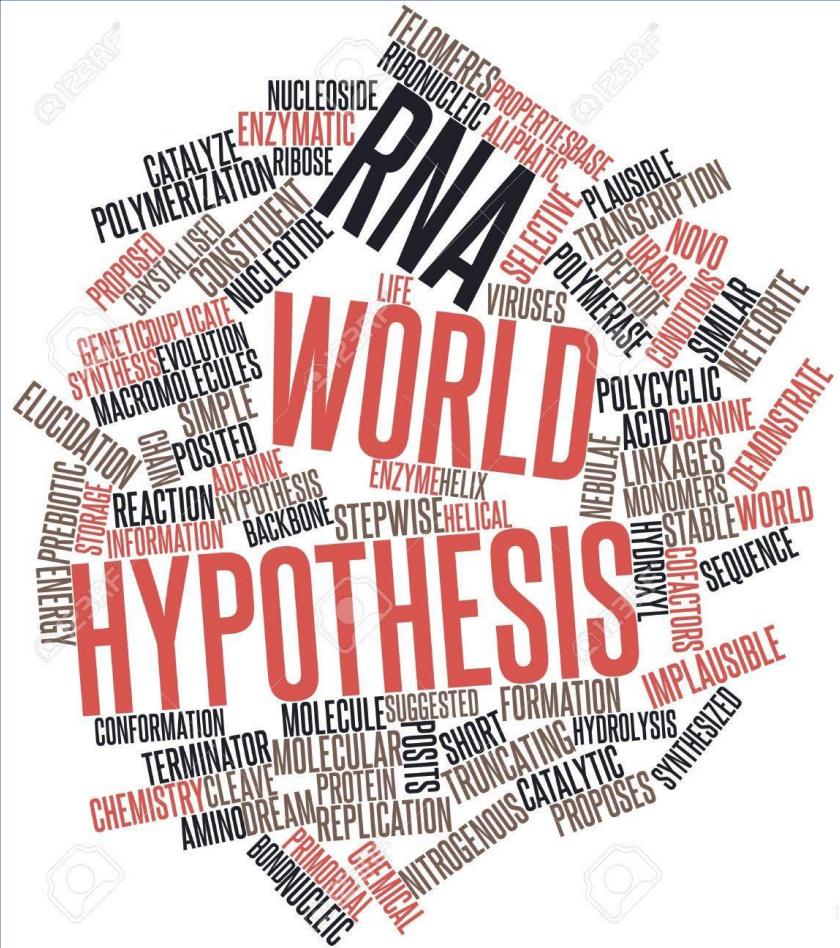
# Le "dogme central" de la biologie moléculaire (actuel)





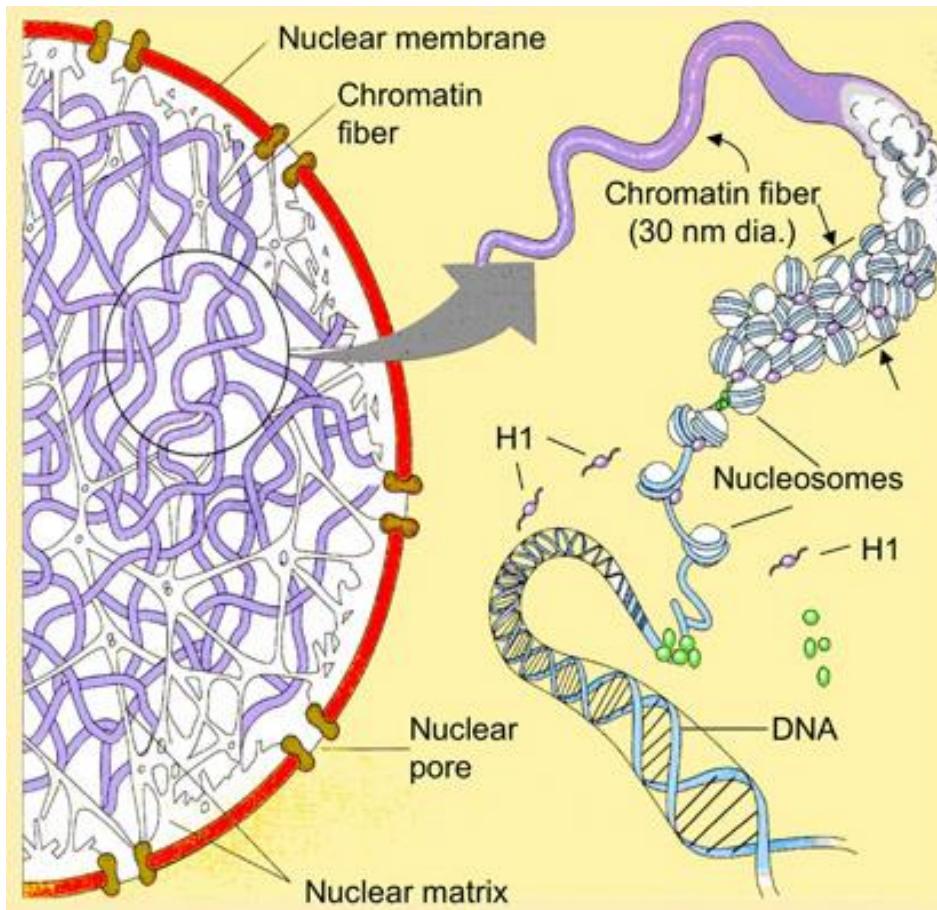
# Le "dogme central" de la biologie moléculaire (actuel)



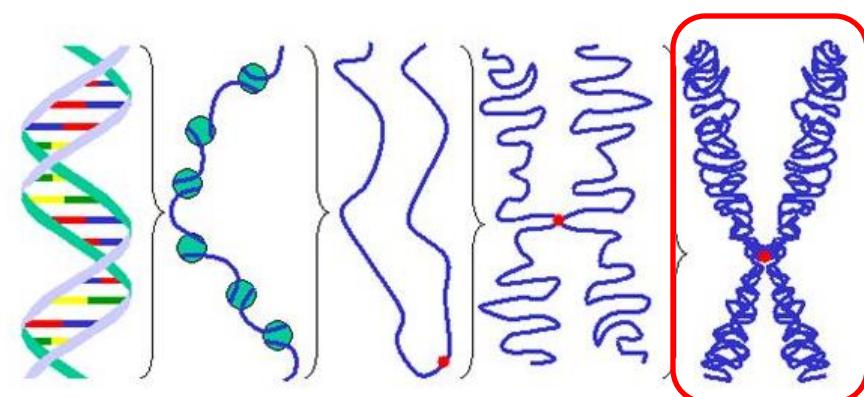


## 2. Gènes et génome

Re - Rappels...vite fait....

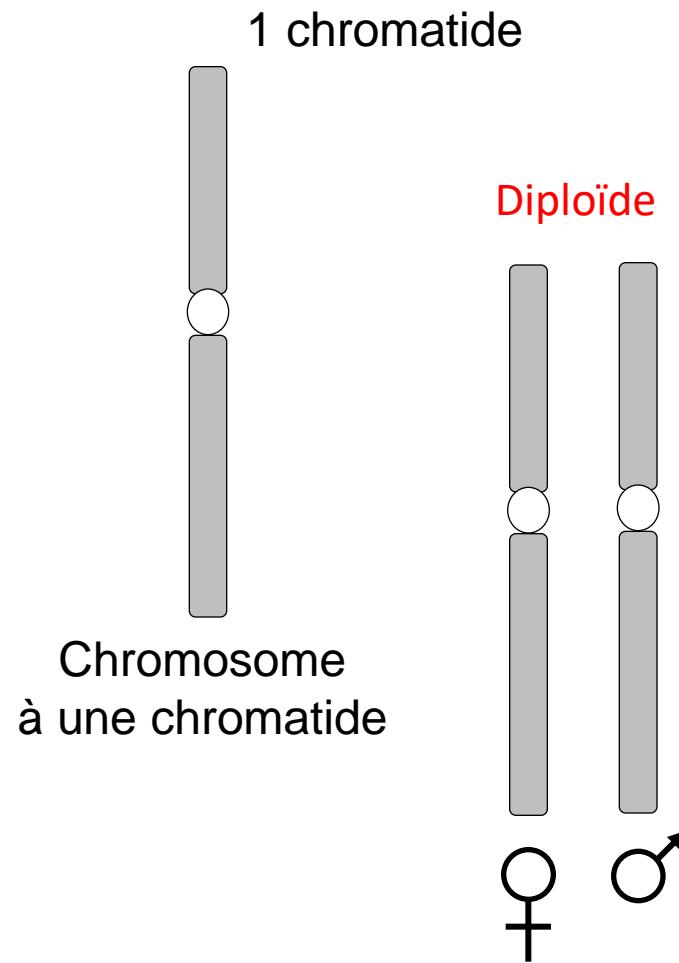
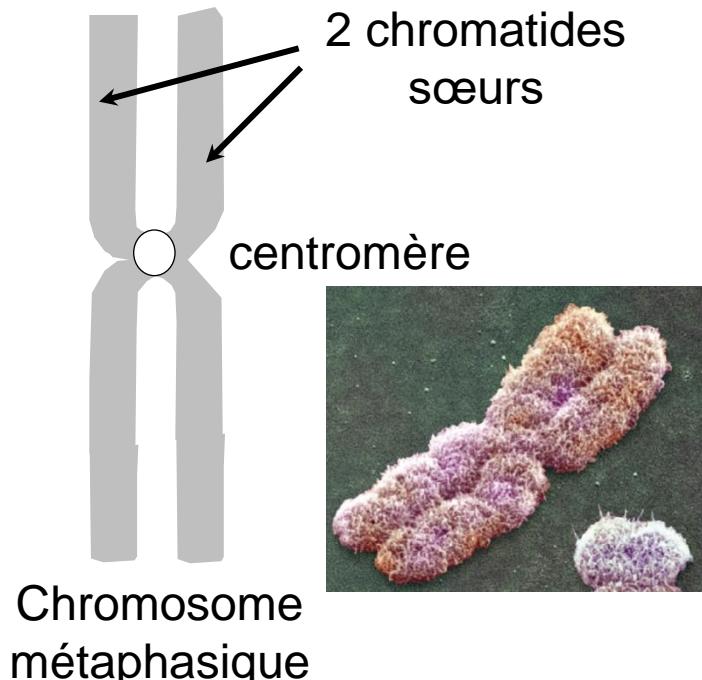


Un chromosome eucaryote  
=  
une molécule d'ADN double brin  
linéaire



Un chromosome métaphasique  
2 chromatides sœurs

## Re - Rappels...vite fait....

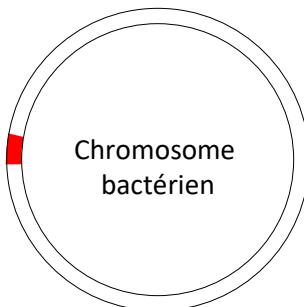


## Localisation chromosomique précise !

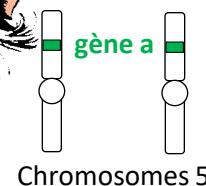
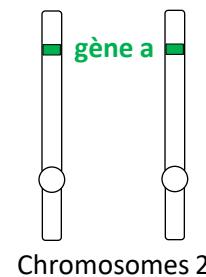
Haploïde



gène a

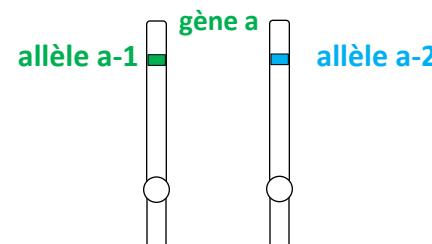


Diploïde



Un gène donné est présent à un endroit précis (**locus**) sur les deux chromosomes homologues ....dans toutes les cellules des individus d'une espèce donnée.

Le locus d'un même gène est différent entre 2 espèces.



Un gène peut exister sous plusieurs formes = allèles.



3X



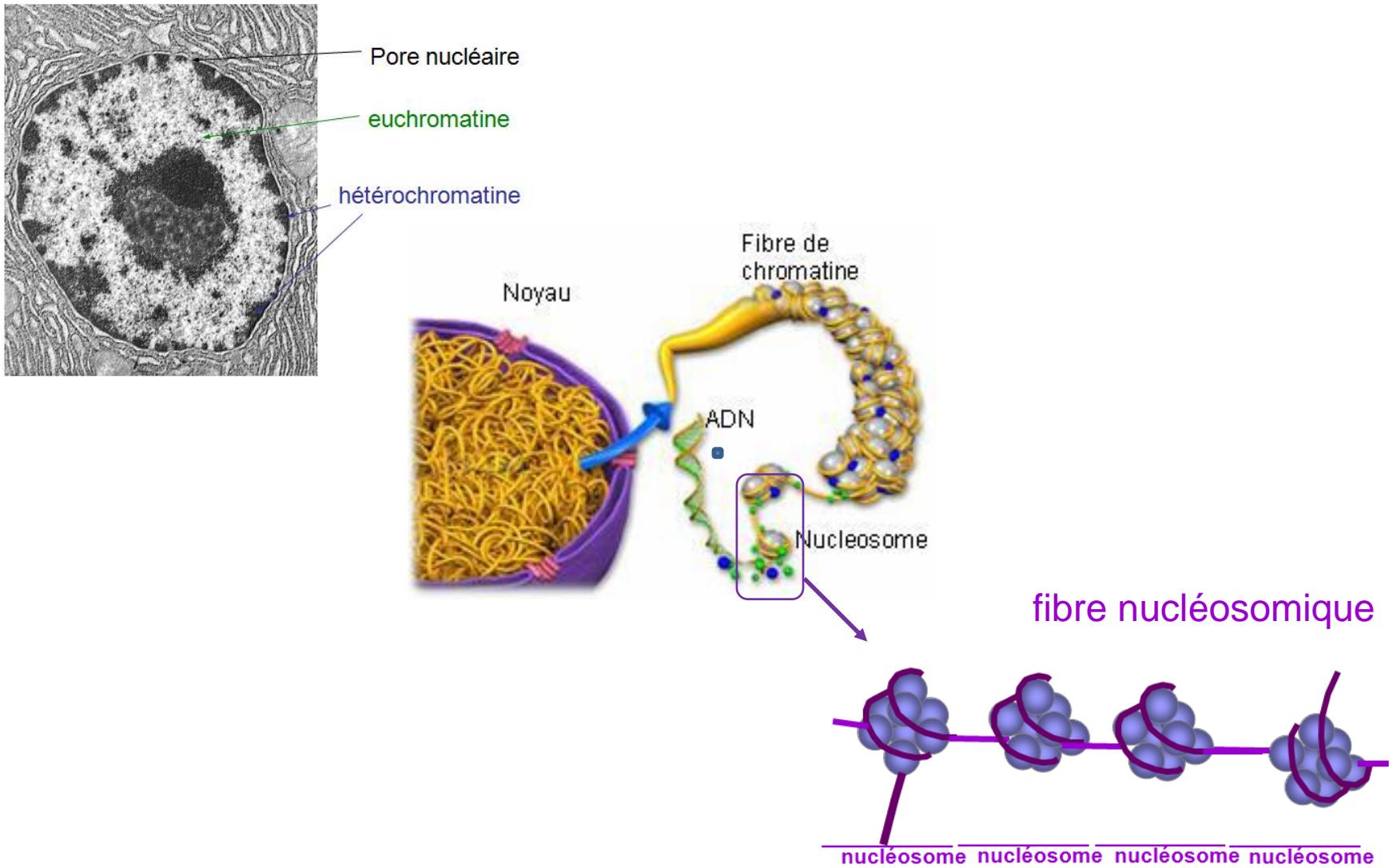
4X



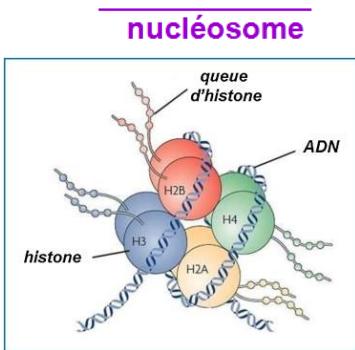
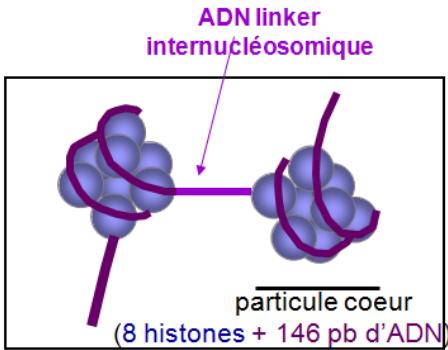
8X

**polyploïdes**: plusieurs exemplaires du génome / cellule.  
(total ou partiel / rare chez les animaux plus fréquent chez les plantes)

## Re - Rappels...vite fait....



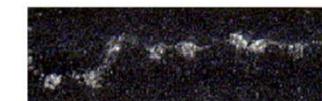
# Re - Rappels...vite fait....



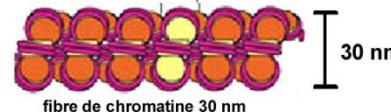
**ADN double brin**



**Fibre nucléosomique:  
Euchromatine**

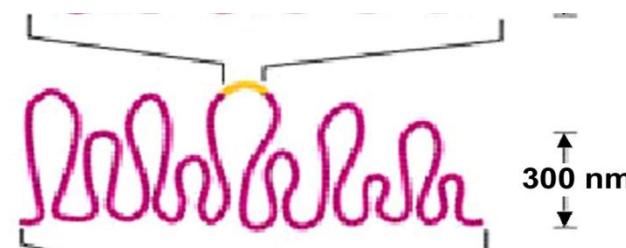


**Solénoïde:**



**Hétérochromatine**

portion de  
chromosome  
sous forme  
décondensée



DONC !!!.....



Dans un organisme donné...

Toutes les cellules contiennent le même génome  
donc les mêmes gènes....mais.....

...Tous les gènes ne sont pas exprimés dans toutes les cellules.

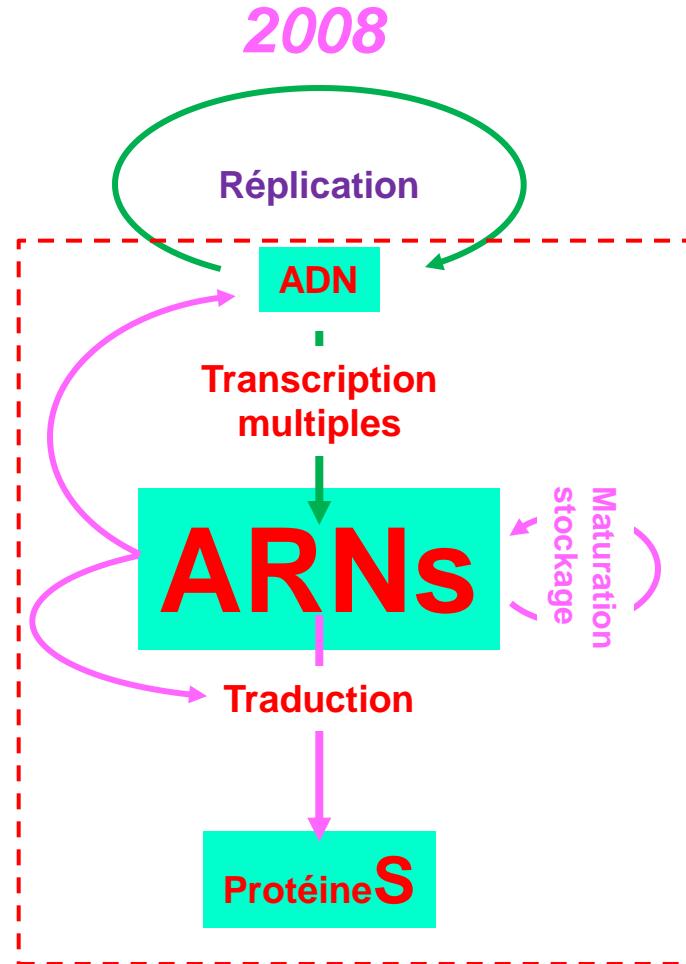


L'expression de chaque gène dépend du type cellulaire et du contexte physiologique de la cellule à un instant t.....

....Expression des gènes.....

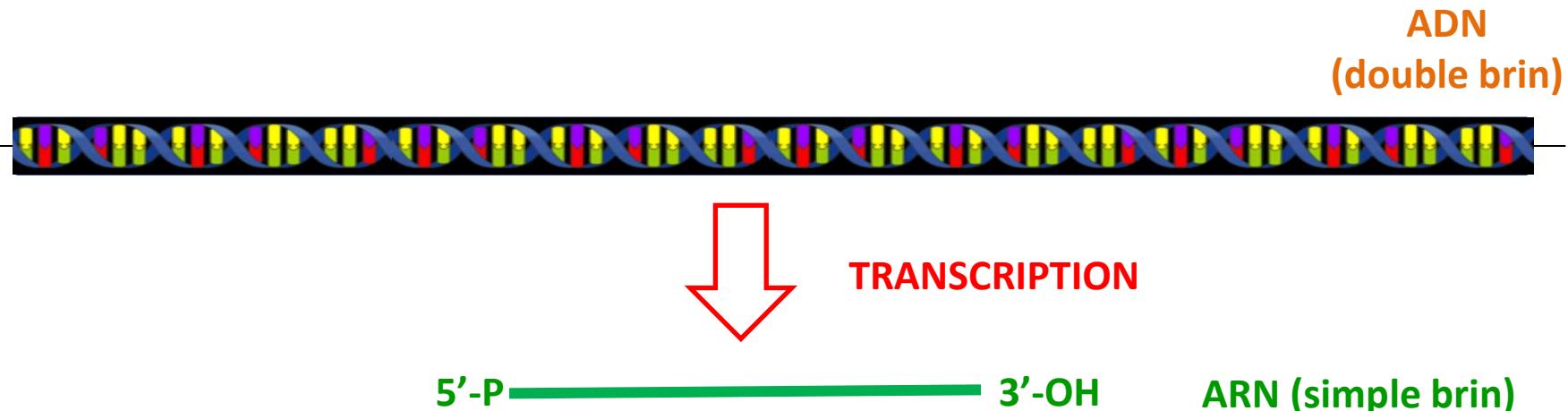
*C'est pas simple !!*

*Pour comprendre, il y a .....*



.....Ce qui doit être déjà en partie aquis !!!.....

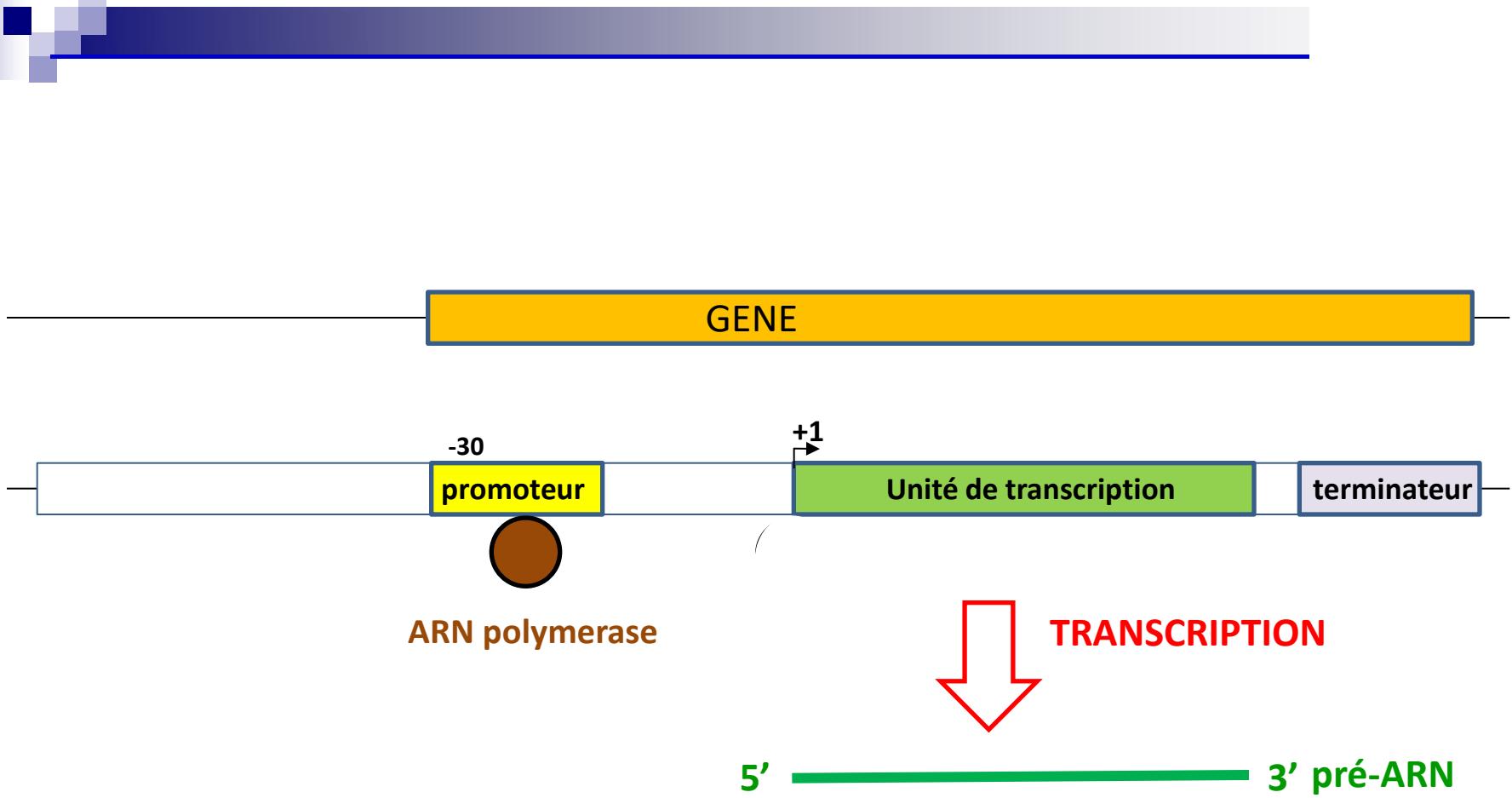
### 1. La transcription



L'ARN polymérase transforme l'information contenue dans l'ADN (db) en une molécule d'ARN simple brin (GAUC).

- L'ADN est lu de son **extrémité 3'-OH** vers son **extrémité 5'-P**
- La synthèse de l'ARN se fait de son **extrémité 5'-P** vers son **extrémité 3'-OH**

Seule **une partie de la séquence du gène** est utilisée pour la transcription = **unité de transcription**.



Les séquences **promotrices** et **terminateurs** vont déterminer le début et la fin de la transcription de **l'unité de transcription**.

### 2. Maturation des ARN.

***La « Maturation » d'un ARN***

=

***l'ensemble des modifications post-transcriptionnelles que subit l'ARN***

### 2. Maturation des ARN.

#### a. Les ARN messagers eucaryotes

**Modifications post-transcriptionnelles (nucléaires)**

- Epissage
- Addition de la coiffe en 5'
- Polyadénylation en 3'

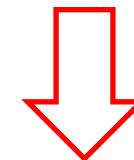
# Les gènes eucaryotes sont dits « morcelés »

Modifications post-transcriptionnelles (nucléaires)

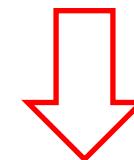
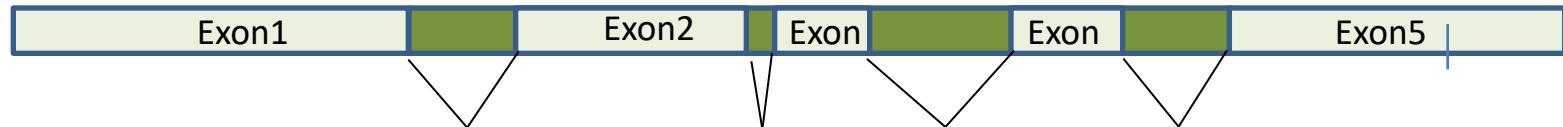
-Epissage

-Addition de la coiffe en 5'

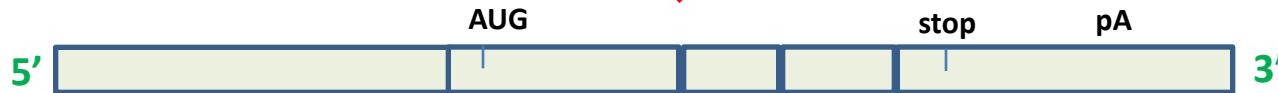
-Polyadénylation en 3'



TRANSCRIPTION



Epissage

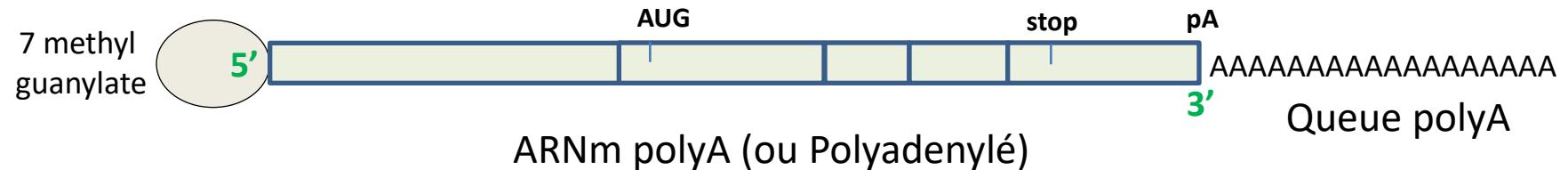
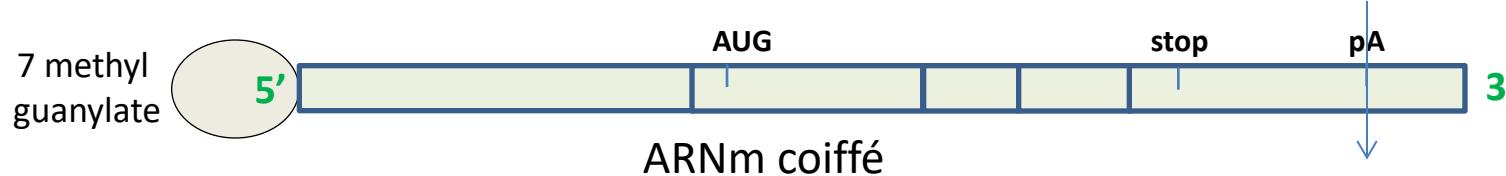


## Modifications post-transcriptionnelles (nucléaires)

-Epissage

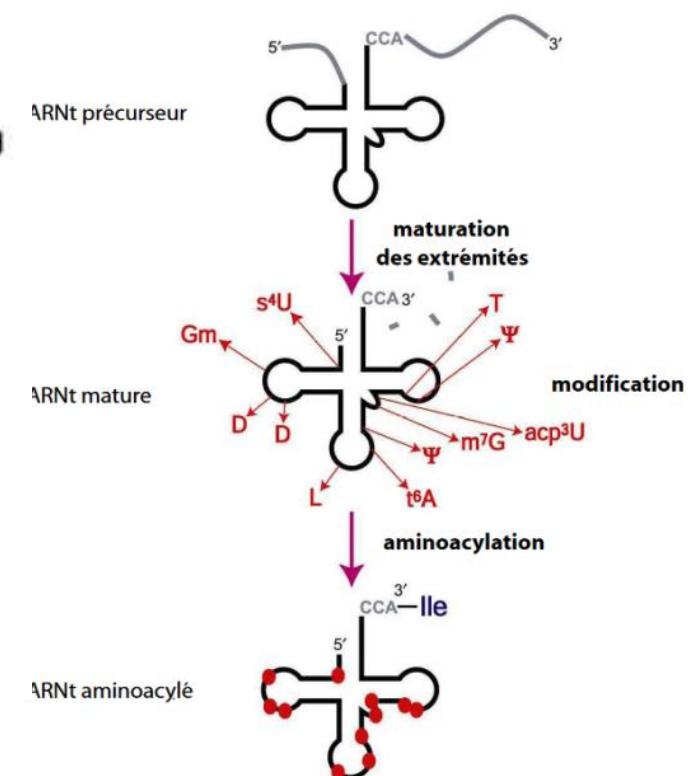
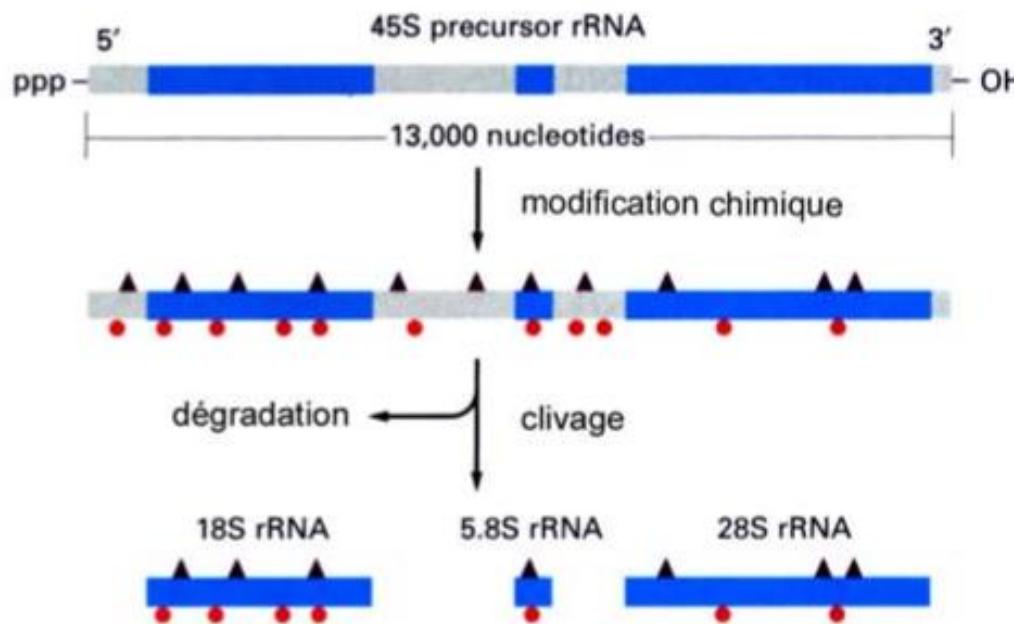
-Addition de la coiffe en 5'

-Polyadénylation en 3'



### 2. Maturation des ARN.

#### b. Les ARN non codants - ex ARNr et ARNt



Ne pas apprendre



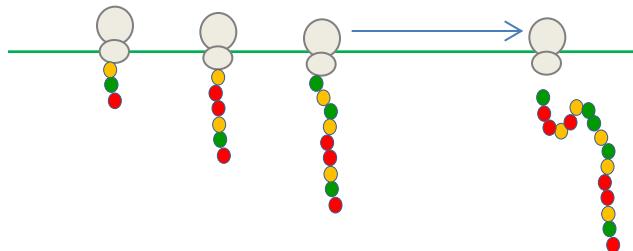
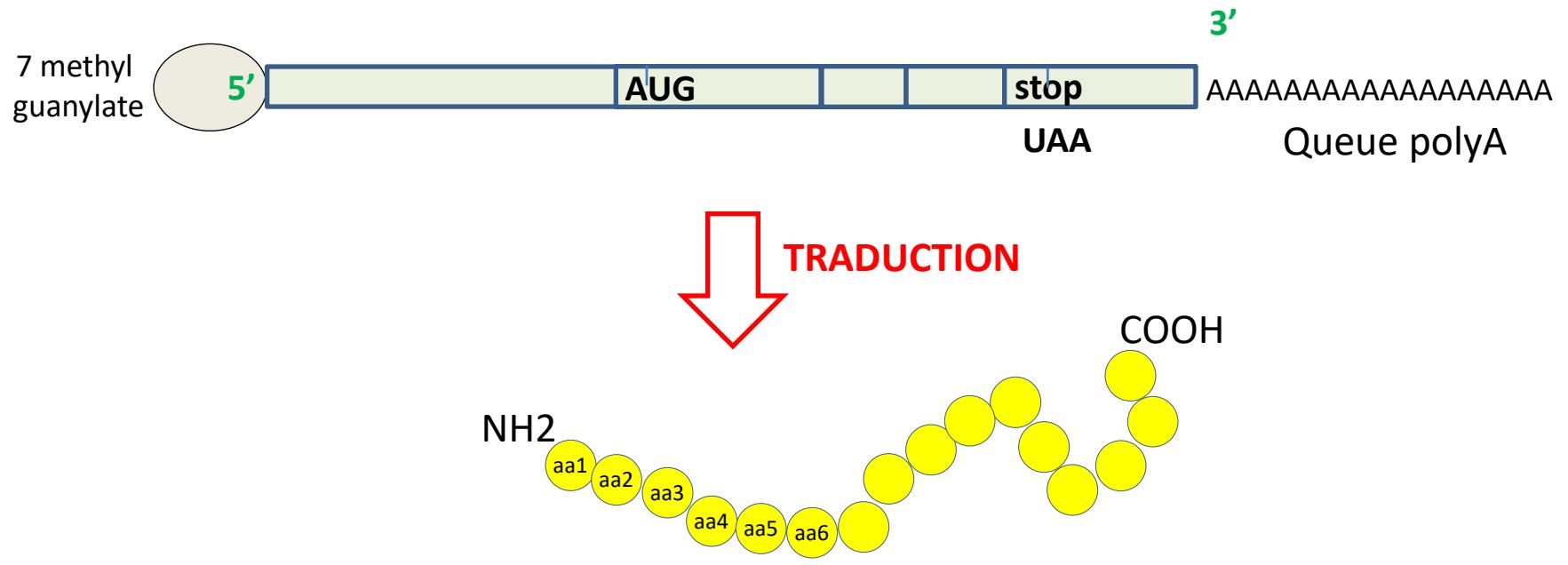
### 3. La traduction des ARNm.



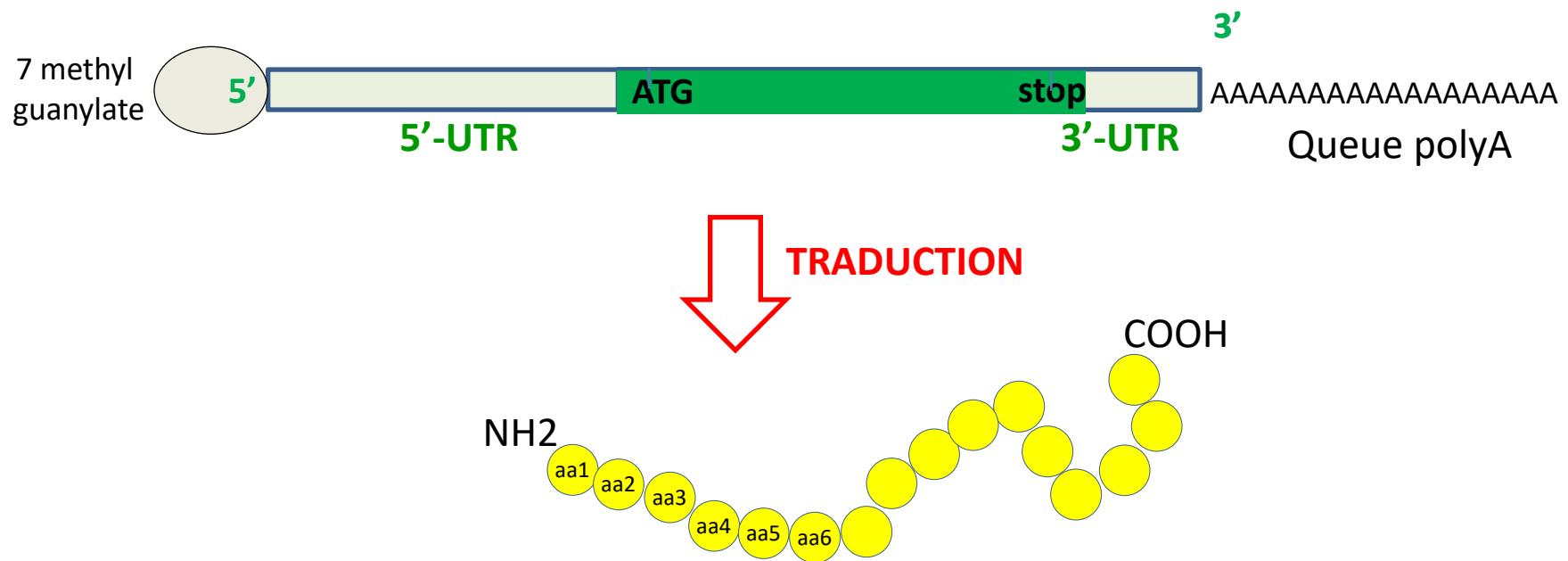
Seuls les ARN messagers sont traduits !!

### 3. LA TRADUCTION des ARN messagers.

L'ARN messager mature sort du noyau (via les pores nucléaires) et passe dans le cytoplasme pour y être traduit



**Le ribosome** transforme l'information contenue dans l'ARNm en une protéine (succession d'acides aminés)  
- il commence au codon **AUG, lit codon (3 nt)**  
**après codon** et termine au premier codon **Stop rencontré**.



Seule **une partie de la séquence de l'ARN** est utilisée pour la traduction = **cadre de lecture ouvert**. (**ORF** = Open Reading Frame).

Il est entouré des séquences **5' et 3'UTR**. (**Séquences régulatrices**)



**FIN CM – « DISTANCIEL » - 1**

## **Biologie Moléculaire & Génétique (BMG)**

Cours Stéphane Deschamps

### ***GENES ET CONTRÔLE DE L'EXPRESSION GENETIQUE***



**CM – « Présentiel » - 2**

## IV. CONTRÔLE DE L'EXPRESSION D'UN GENE

### 1. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE = CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION

- A. Séquences régulatrices et facteurs protéiques
- B. Epigénétique et épigénome

### 2. REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE

- A. Epissage alternatif
- B. Polyadénylation et coiffe

### 3. REGULATION TRADUCTIONNELLE ET POST-TRADUCTIONNELLE

- A. Stockage / Dégradation ....ou traduction
- B. Stockage / Dégradation ....ou fonction

## V. LES ARN NON CODANTS.....

- 1. LES SiRNA (Small interferant ARN)
- 2. LES miRNA (micro ARN)
- 3. LES ARN Inc (ARN long non codant)

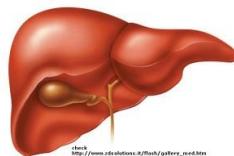
## VI. CONCLUSION



**Cellule type1**  
**Condition a**

GENE ADH

ADH  
Alcool  
DesHydrogenase



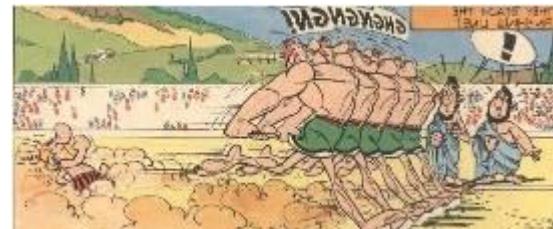
**Cellule type1**  
**Condition b**

GENE ADH



**Cellule type 2**  
**Condition b**

GENE ADH



**Cellule type1**  
**Condition a**

GENE MYO



**Cellule type1**  
**Condition b**

GENE MYO

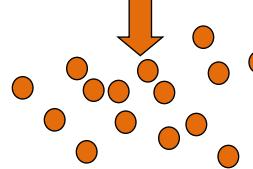


**Cellule type 2**  
**Condition b**

GENE MYO



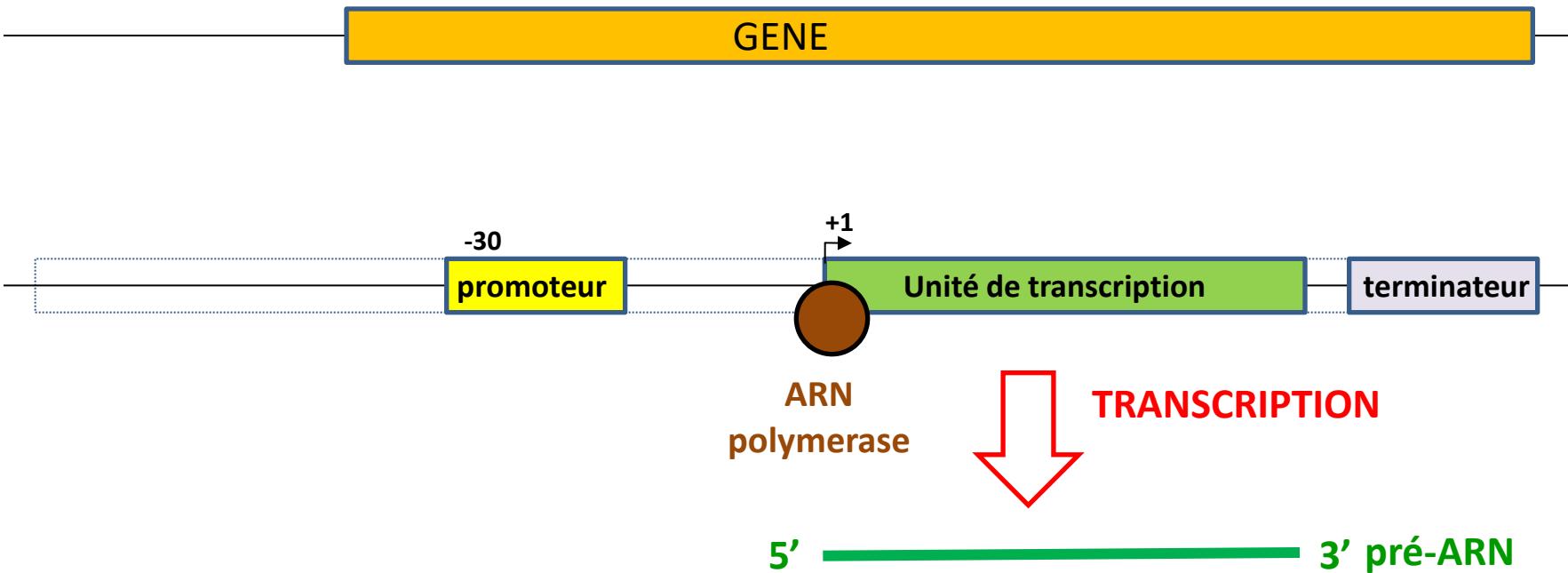
**MYOSINE**



## IV. CONTRÔLE DE L'EXPRESSION D'UN GENE

### 1. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE = CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION

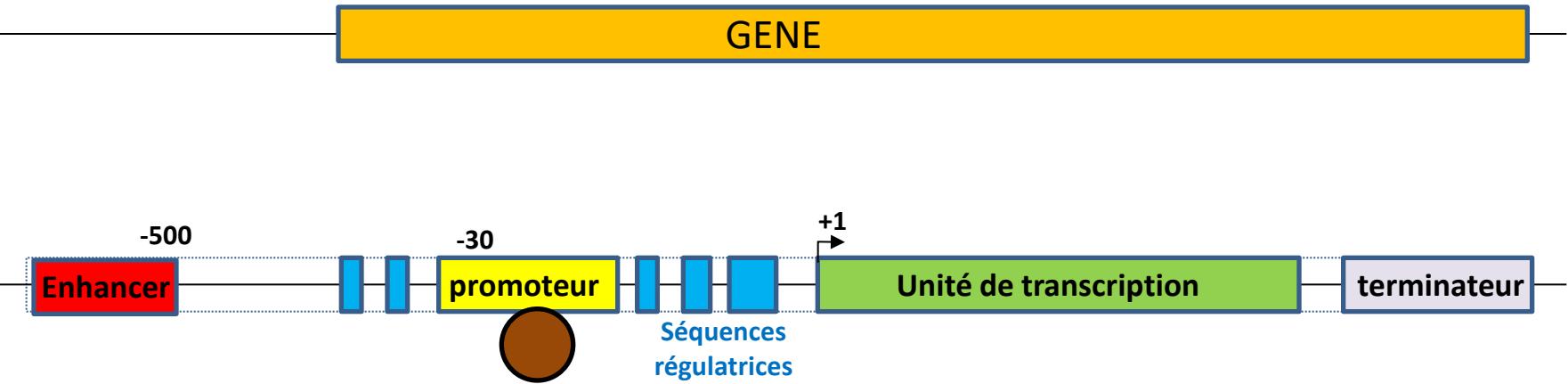
#### A. Séquences régulatrices et facteurs protéiques



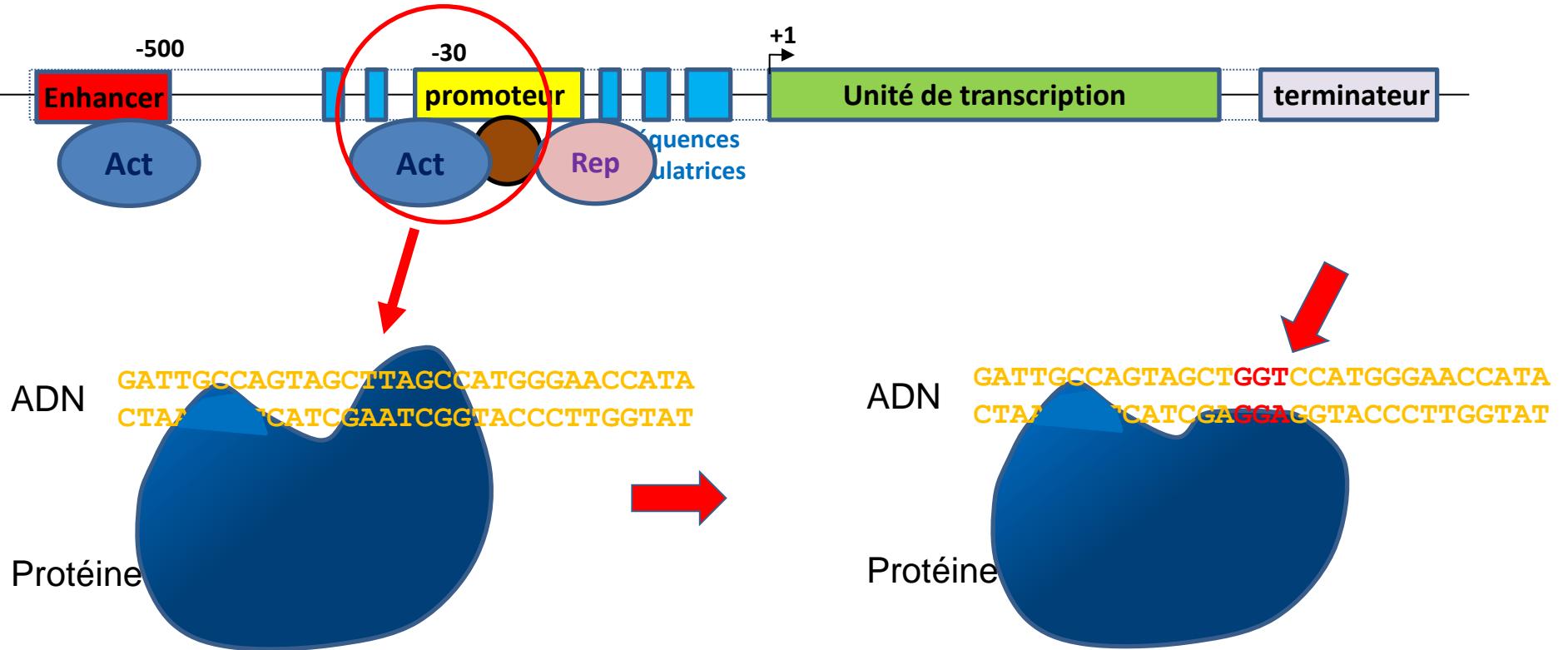
Les séquences **promotrices** et **terminateurs** vont déterminer le début et la fin de la transcription de **l'unité de transcription**.

## 1. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE = CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION

L'efficacité de la transcription est contrôlée

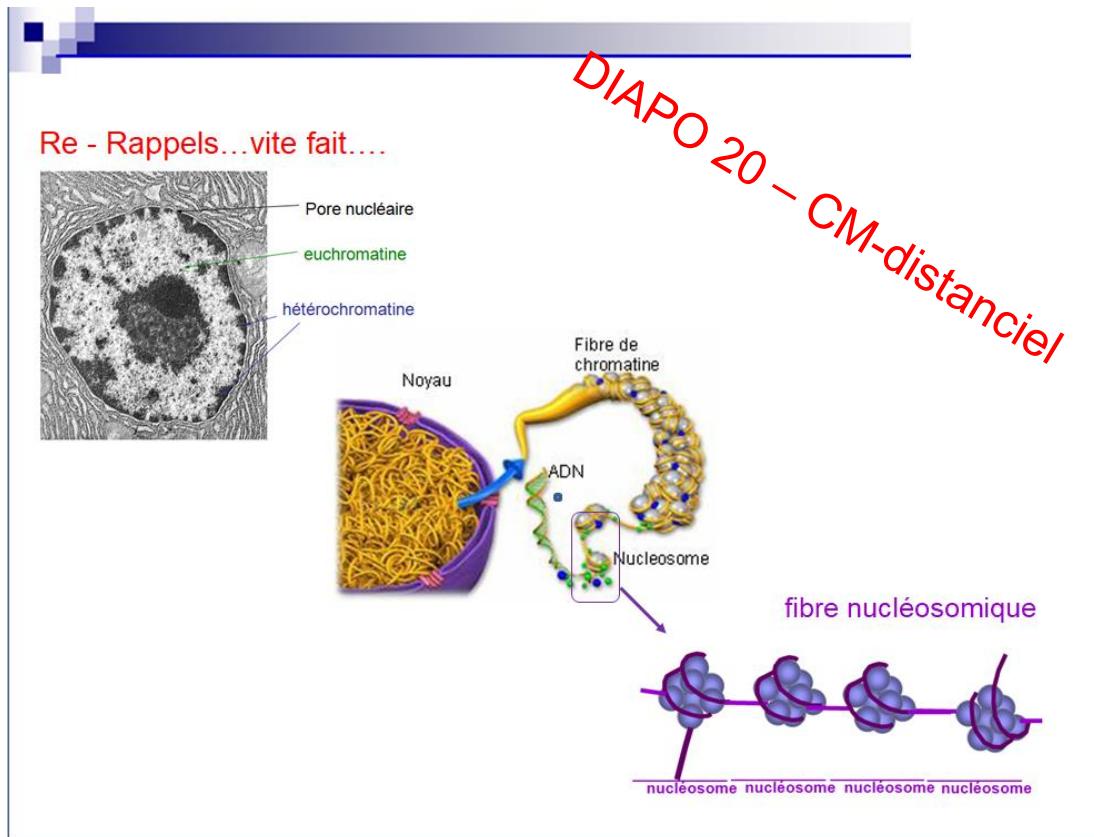


# 1. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE = CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION



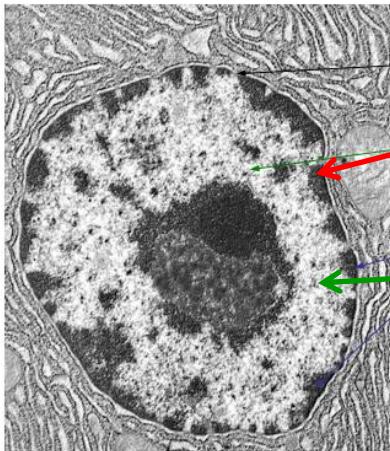
## 1. CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION = REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

### B. Epigénétique et épigénome



Les histones sont impliqués dans la compaction de la chromatine

Plus la chromatine est compacte, moins l'ADN est accessible



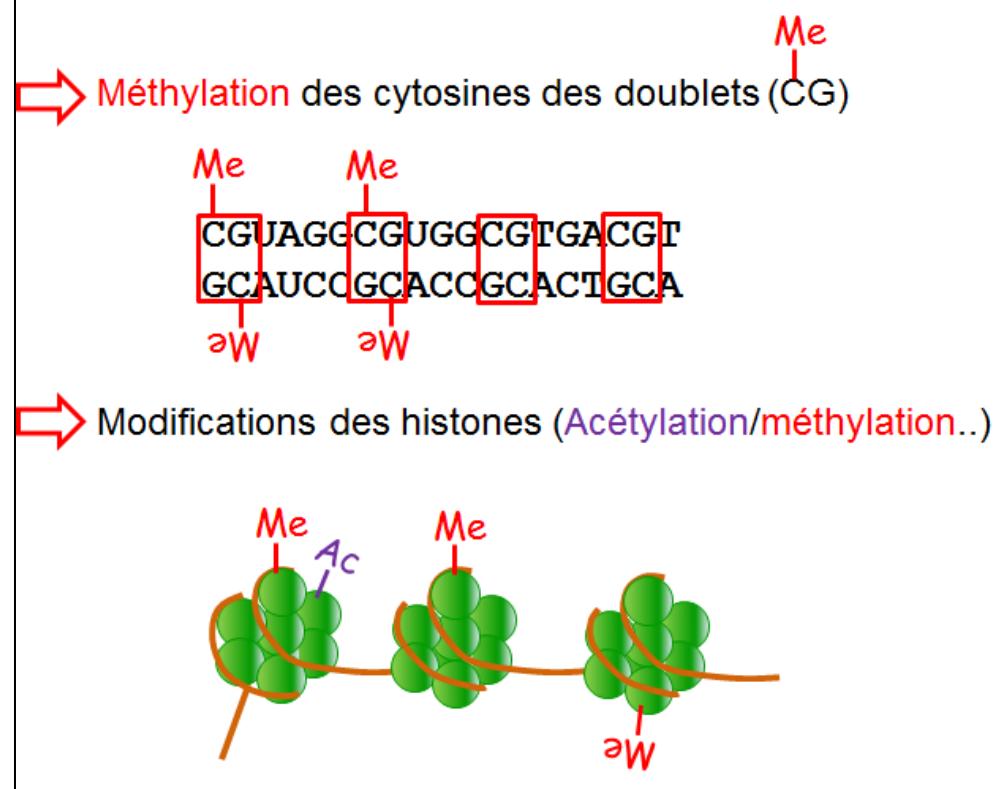
### Hétérochromatine

= Chromatine compactée = gènes inactifs

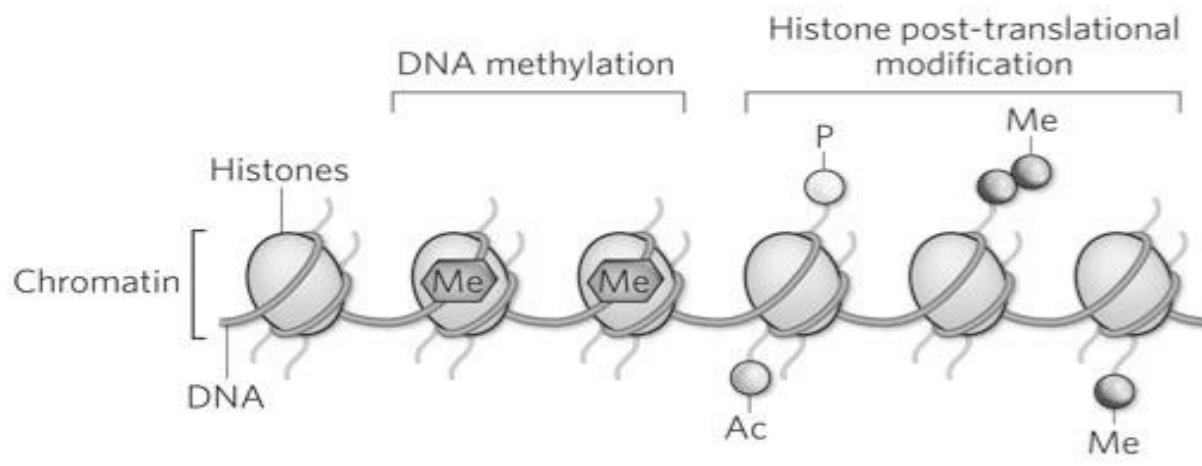
### Euchromatine

= Chromatine décompactée = gènes potentiellement actifs

### marques épigénétiques

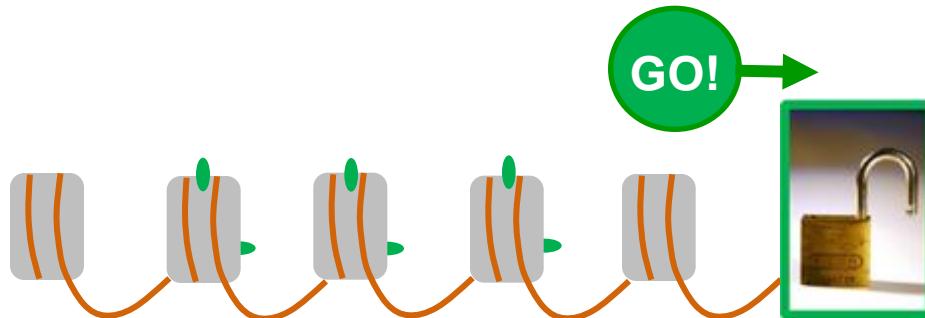


## IV. CONTRÔLE DE L'EXPRESSION D'UN GENE

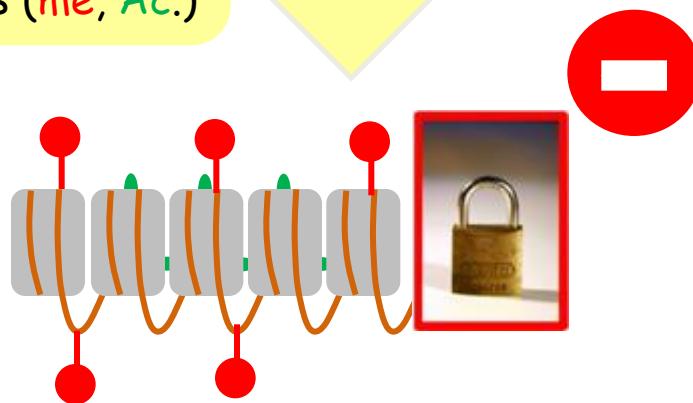


Pourquoi?

## EXEMPLE METHYLATION CG



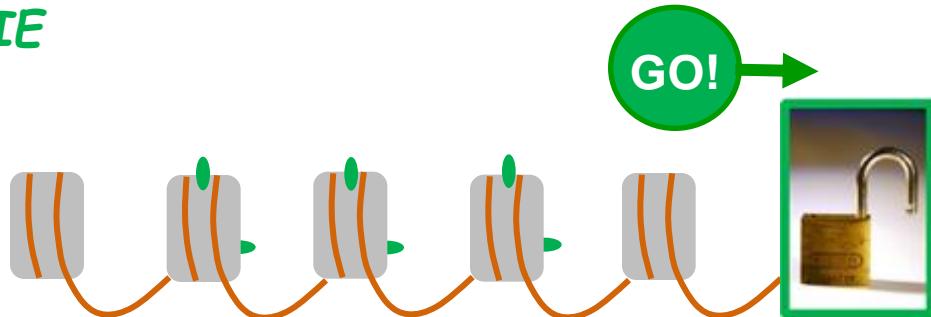
TRANSCRIPTION EFFICACE  
(GENE ACTIF)



PAS TRANSCRIPTION  
(GENE INACTIF)

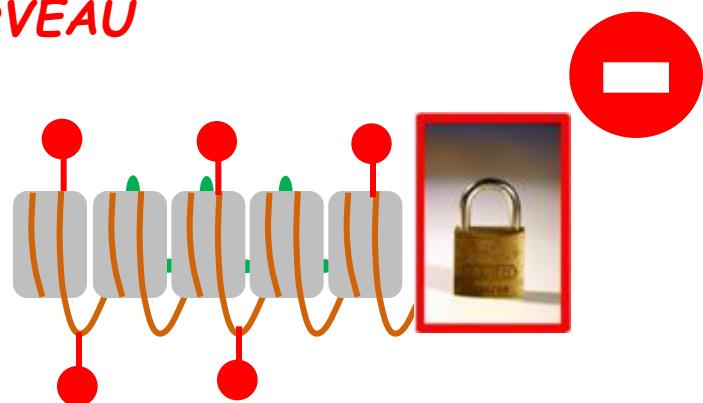
Réversibles  
Héritables en mitose

**FOIE**



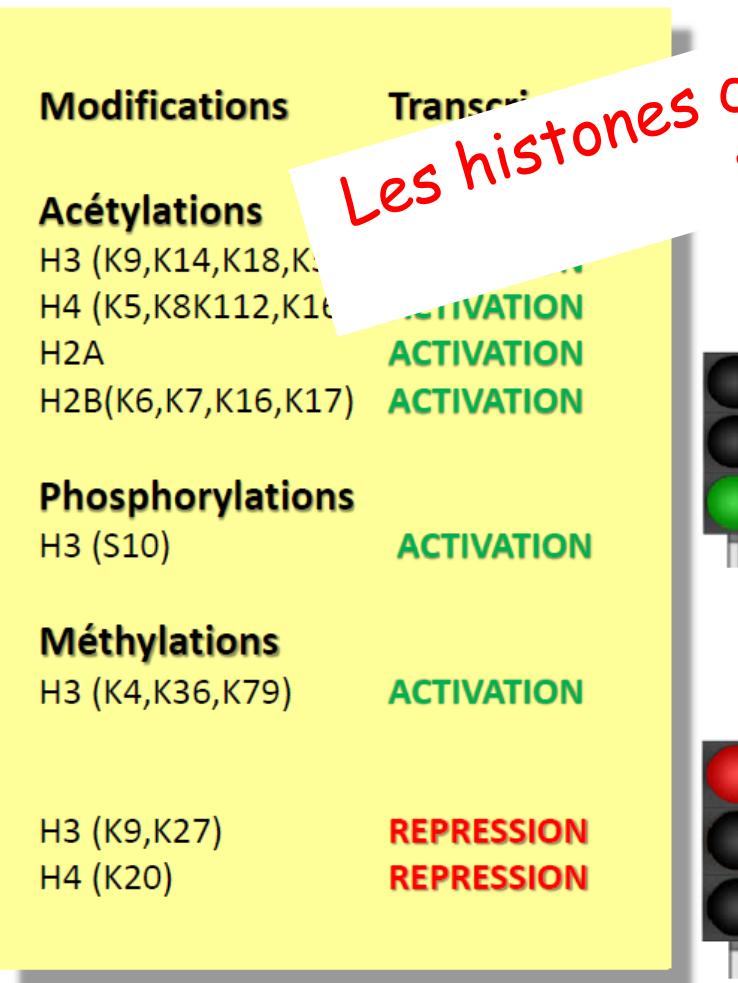
TRANSCRIPTION EFFICACE  
**(GENE G ACTIF)**

**CERVEAU**



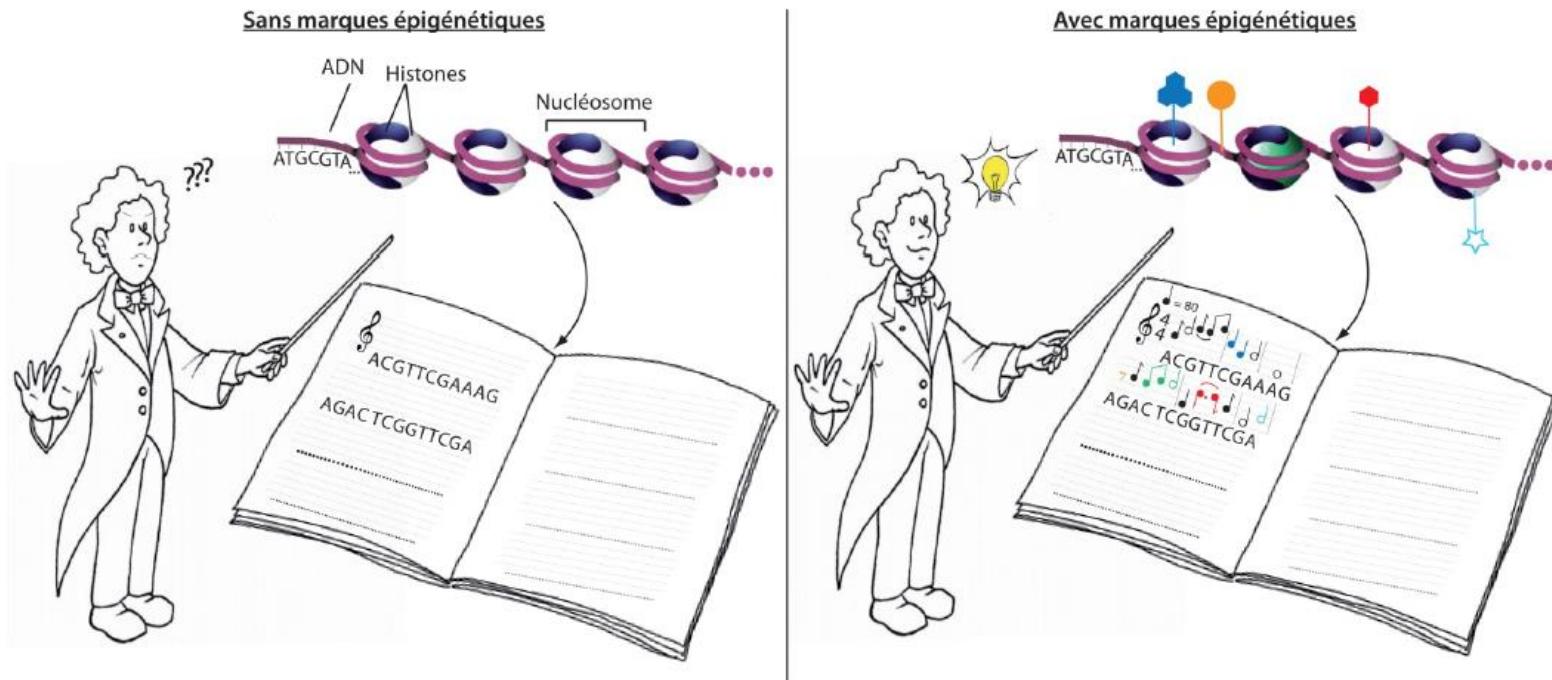
PAS TRANSCRIPTION  
**(GENE G INACTIF)**

# Le code des histones



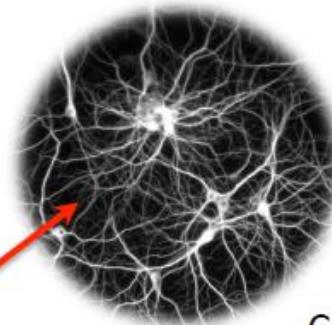
Kourarides et al, Epigenetics (CSH press)



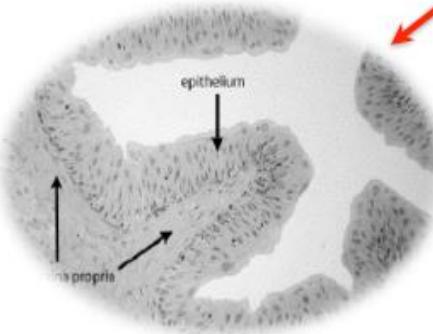


Si l'on compare la séquence d'ADN aux notes de la partition d'une symphonie, l'épigénétique constitue les nuances, les altérations, ou le rythme qui permet au chef d'orchestre de comprendre comment la partition doit être lue

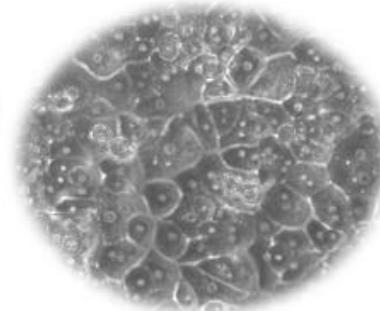
*Armelle Corpet et Geneviève Almouzi. Sciences et Avenir (déc. 2006).*



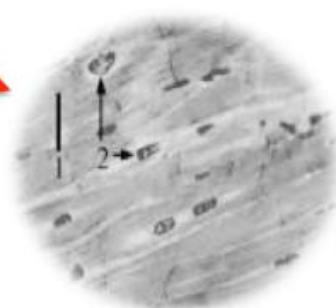
Cerveau



Intestin



Foie



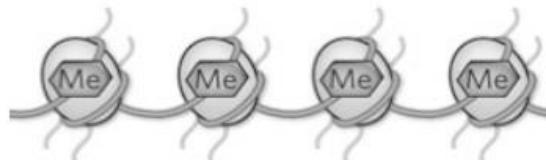
Muscle

# Effet épigénétique du stress ou de la bientraitance

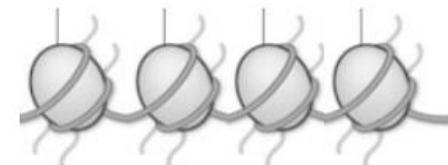
Le gène GAD (Glutamic Acid Decarboxylase) s'exprime dans les neurones GABAergic; il est sous exprimé dans certains désordres psychiatriques comme la schizophrénie.



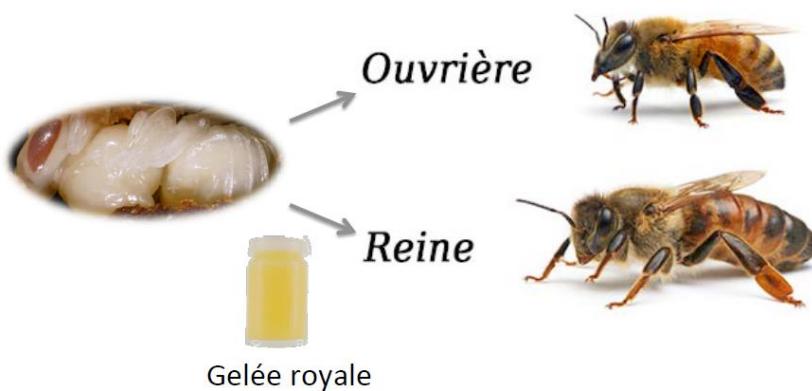
Souris nées de mères stressées  
pendant la grossesse



Souris bien traitées par la mère



La reine des abeilles et les ouvrières proviennent de la même larve



La gelée royale modifie l'épigénome



# Developmental Origins of Health And disease (DOHAD)



Exposition intra-utérine et/ou période périnatale



Altération épigénétique (?)



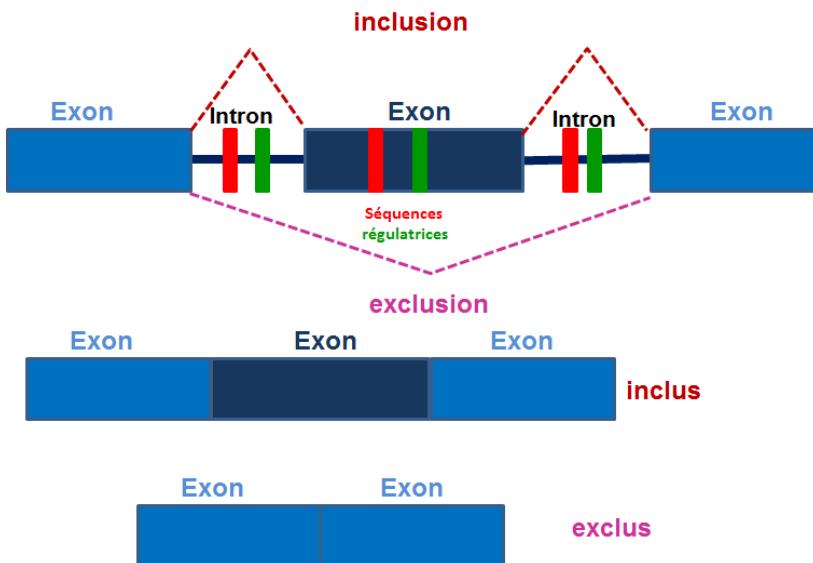
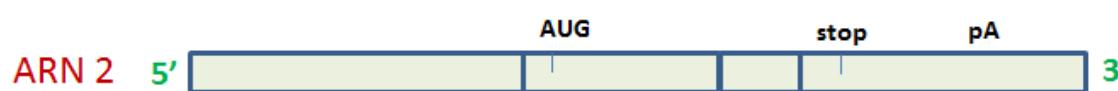
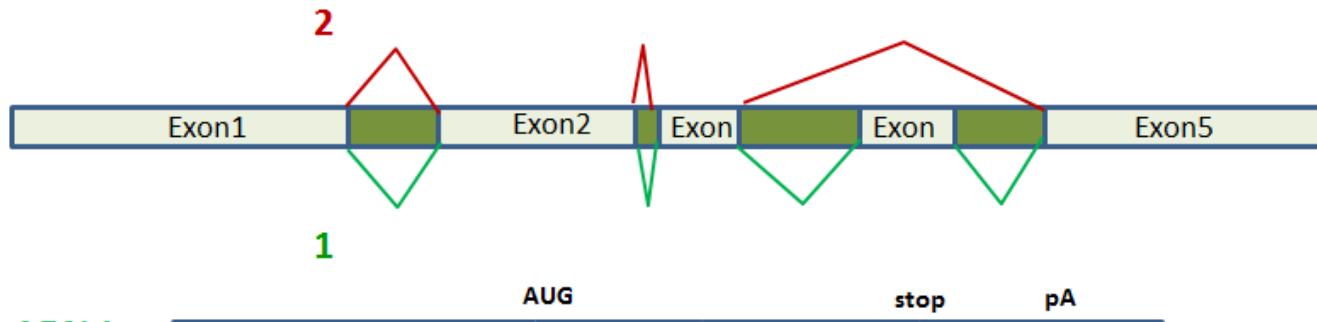
«Programmation » physiologique et/ou comportementale à l'âge l'adulte



Risque de développer des maladies cardiovasculaires, du diabète, des maladies psychiatriques à l'âge adulte

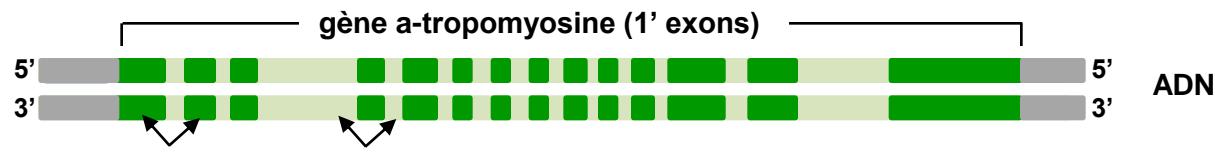
## 2. REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE

### A. Epissage alternatif

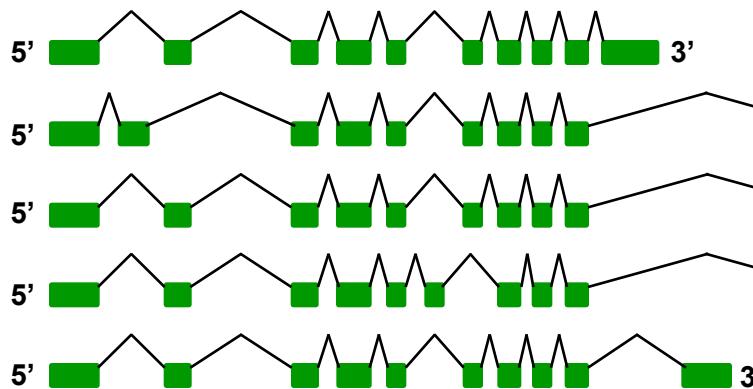


# Un gène ~~en~~ des ARNs

Exemple de la tropomyosine



Transcription & épissage alternatif



ARNm du muscle strié

ARNm du muscle lisse

ARNm du fibroblaste isoforme 1

ARNm du fibroblaste isoforme 2

ARNm du cerveau

# Le gène Dscam peut (théoriquement) générer 38 016 ARNm différents !!!



95 exons alternativement épissés  
(événements mutuellement exclusifs)

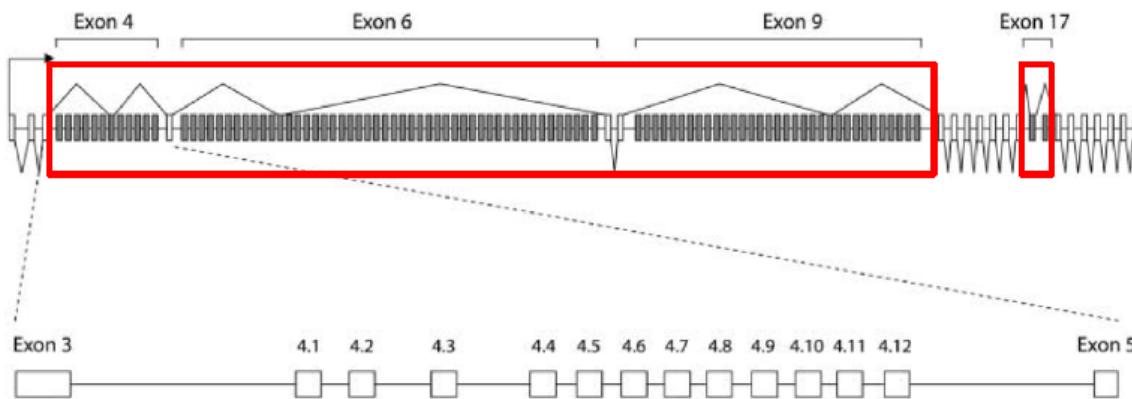
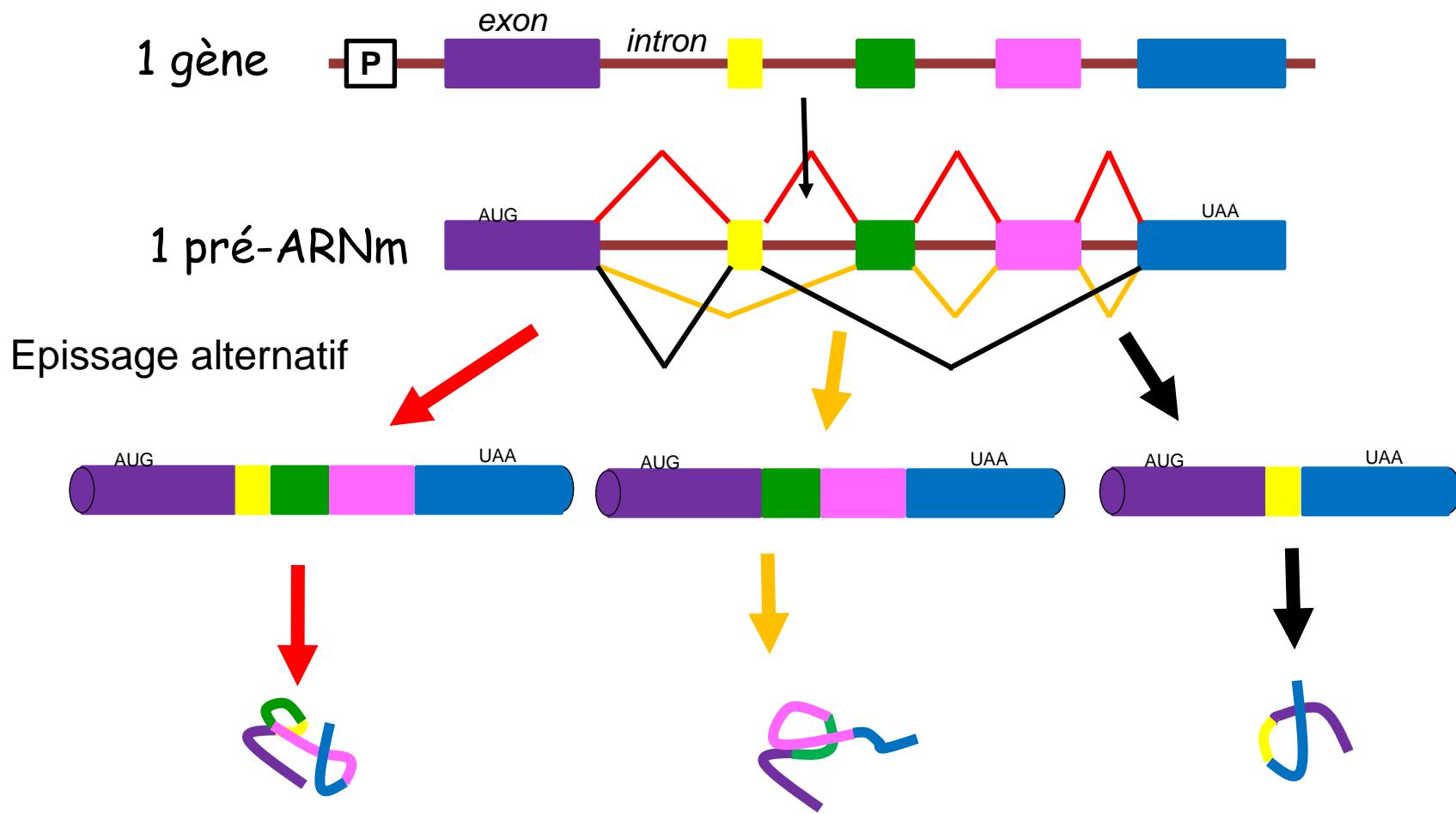


FIGURE 1.—Organization of the *D. melanogaster Dscam* gene. The *D. melanogaster Dscam* gene contains 115 exons spanning ~60,000 bp. Twenty exons are constitutively spliced (open boxes) and 95 exons are alternatively spliced (shaded boxes). The alternatively spliced exons are organized into four clusters (exons 4, 6, 9, and 17) that contain 12, 48, 33, and 2 alternative exons each. The exons within each cluster are alternatively spliced in a mutually exclusive manner. The exon 4 cluster is enlarged to depict the relative spacing of the 12 exon 4 variants in this region.

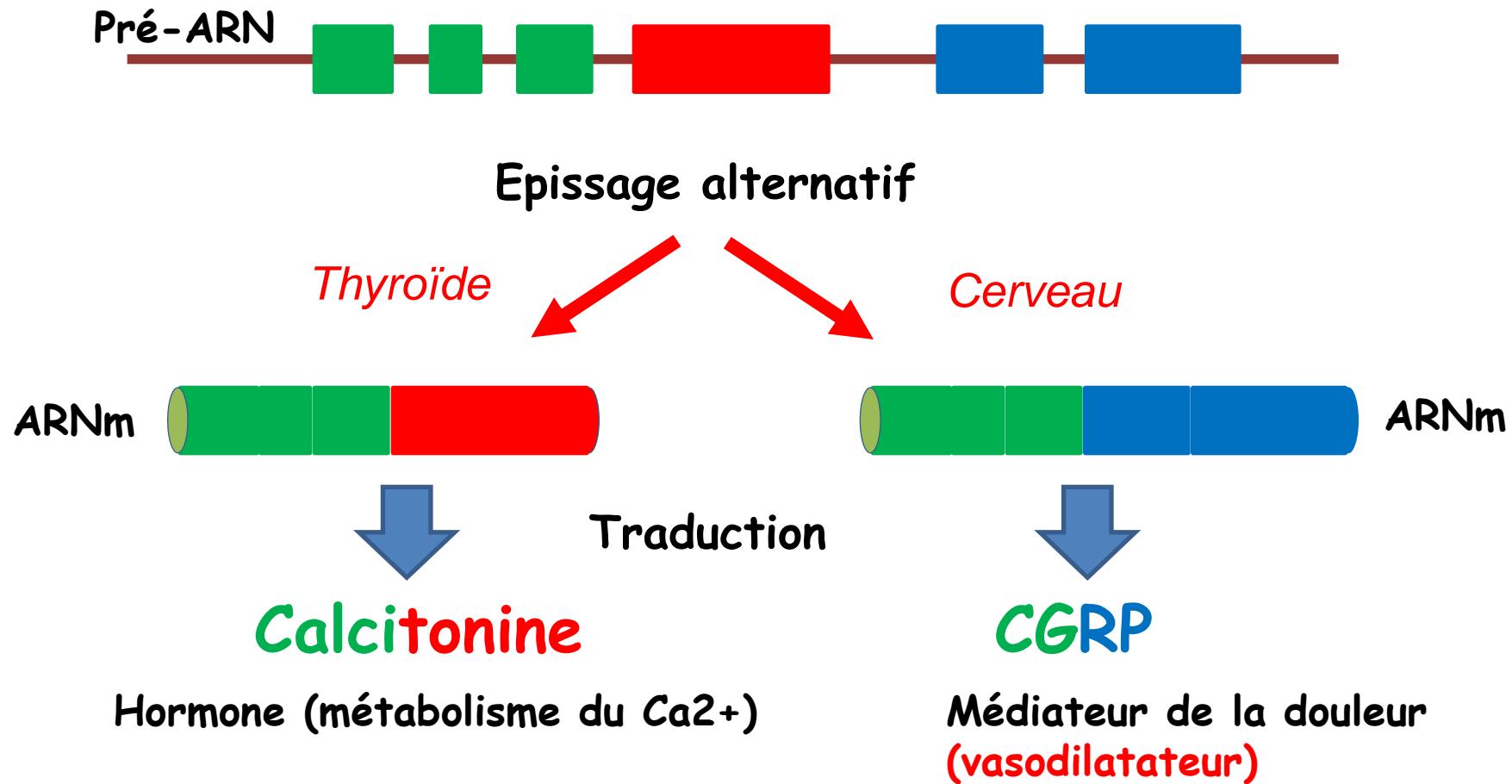
Genetics 159: 599–608 (October 2001)

Le gène Dscam (Down syndrome cell adhesion molécule) produit un récepteur requis pour la migration et la connections des neurones (drosophile)

Un gène ~~ne~~  
~~des~~ protéines

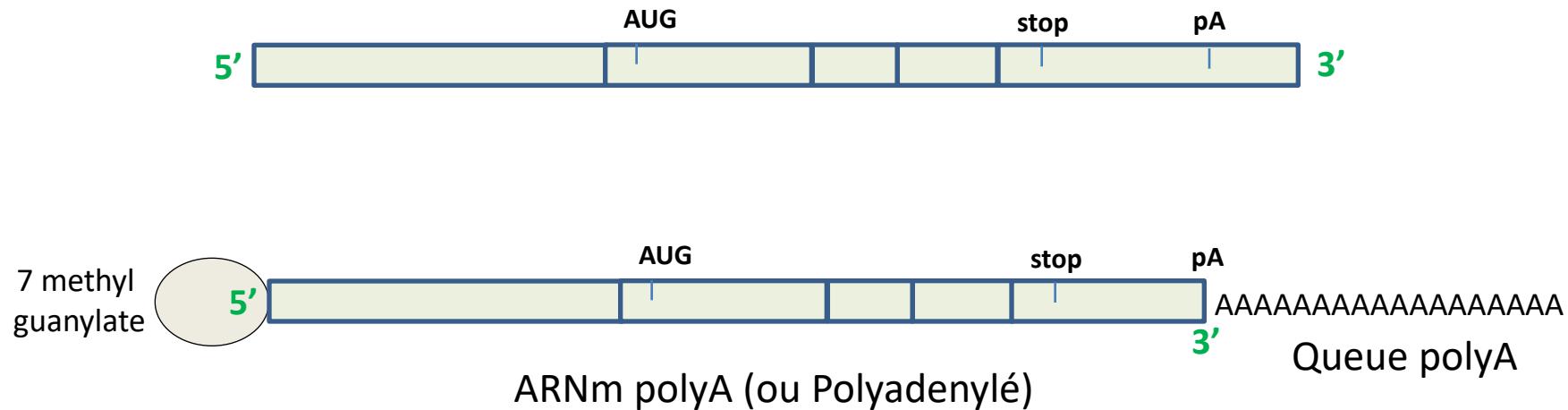


# Un gène....mais 2 protéines aux fonctions différentes



## 2. REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE

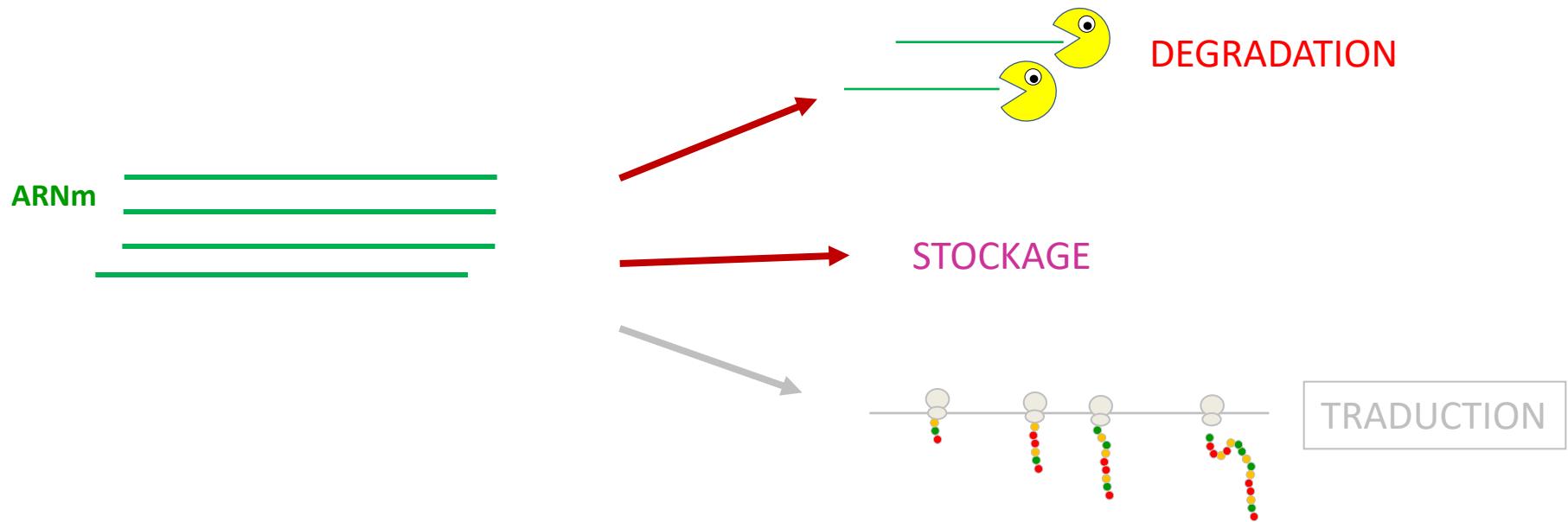
### B. Polyadénylation et coiffe

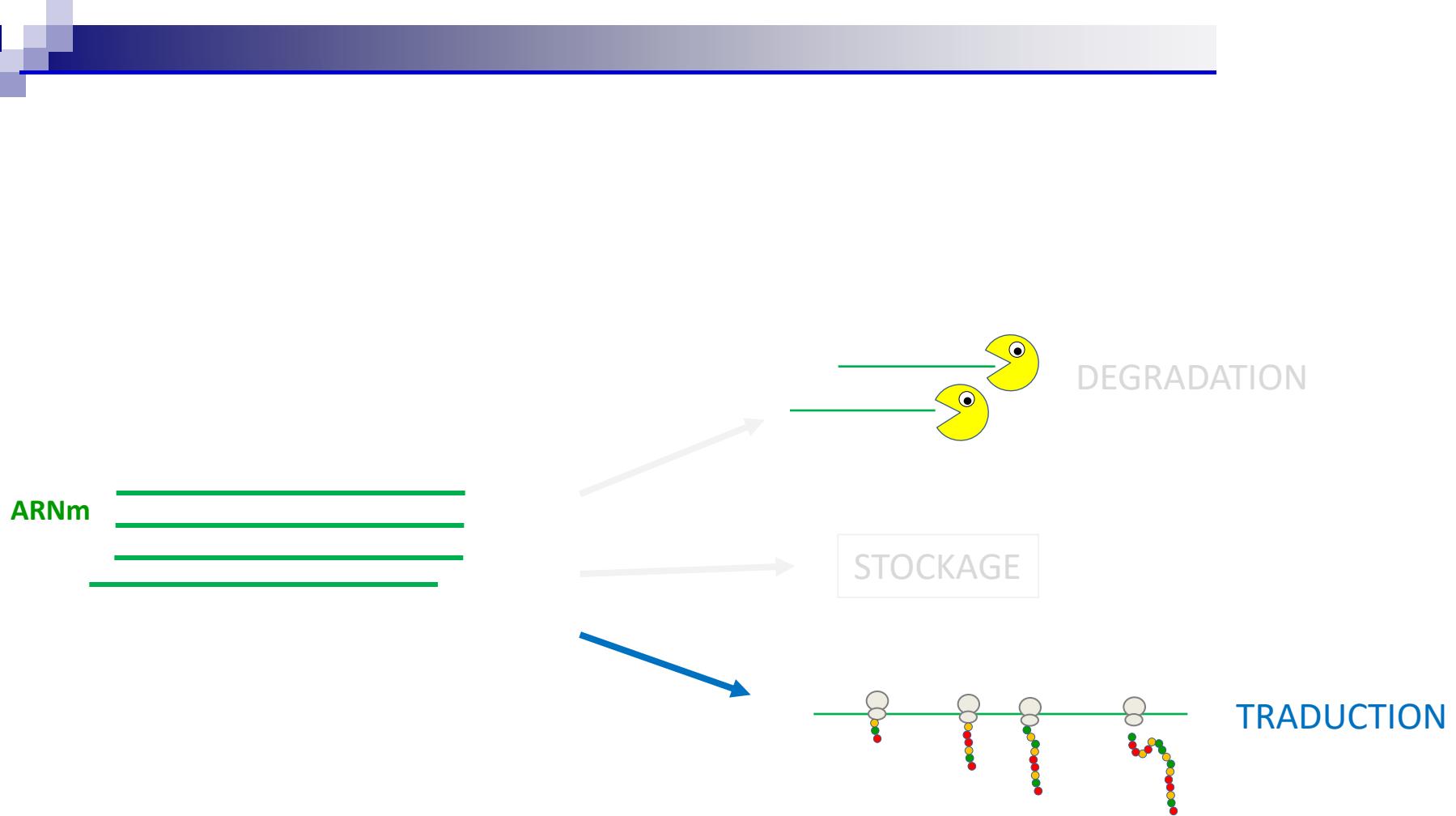


RÔLES??

### 3. REGULATION TRADUCTIONNELLE ET POST-TRADUCTIONNELLE

#### A. Stockage / Dégradation ....ou traduction

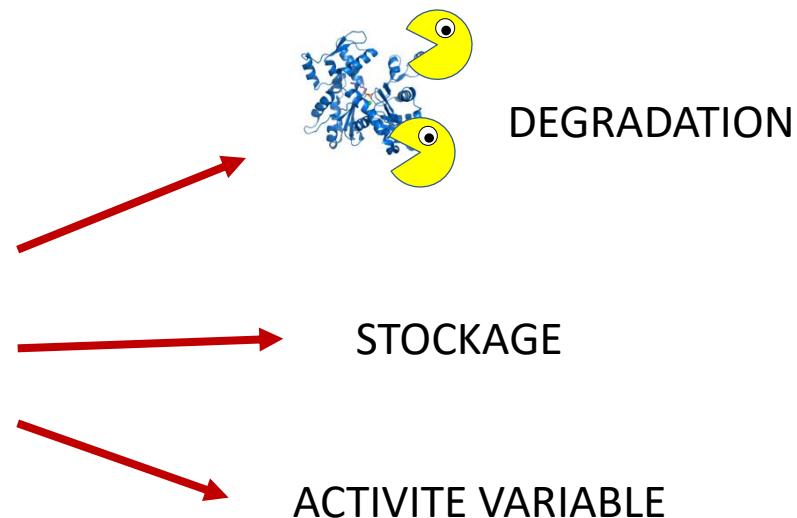
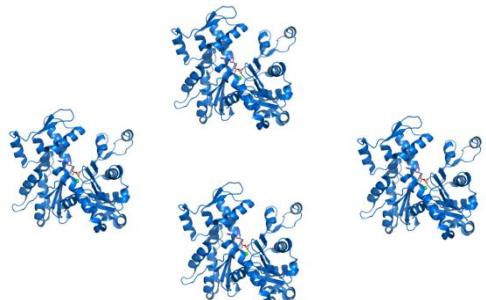




### 3. REGULATION TRADUCTIONNELLE ET POST-TRADUCTIONNELLE

#### B. Stockage / Dégradation ....ou fonction

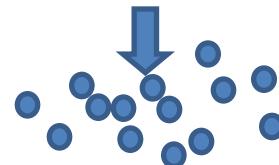
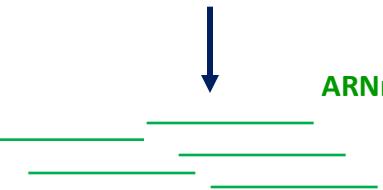
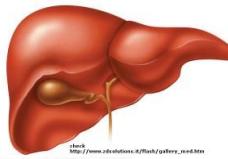
protéines



# REGULATION QUANTITATIVE ET QUALITATIVE D'UN ARN CELLULAIRE (TRANSCRIPTIONNEL- POST-TRANSCRIPTIONNEL- TRADUCTIONNEL)



Cellule type 1  
Condition b

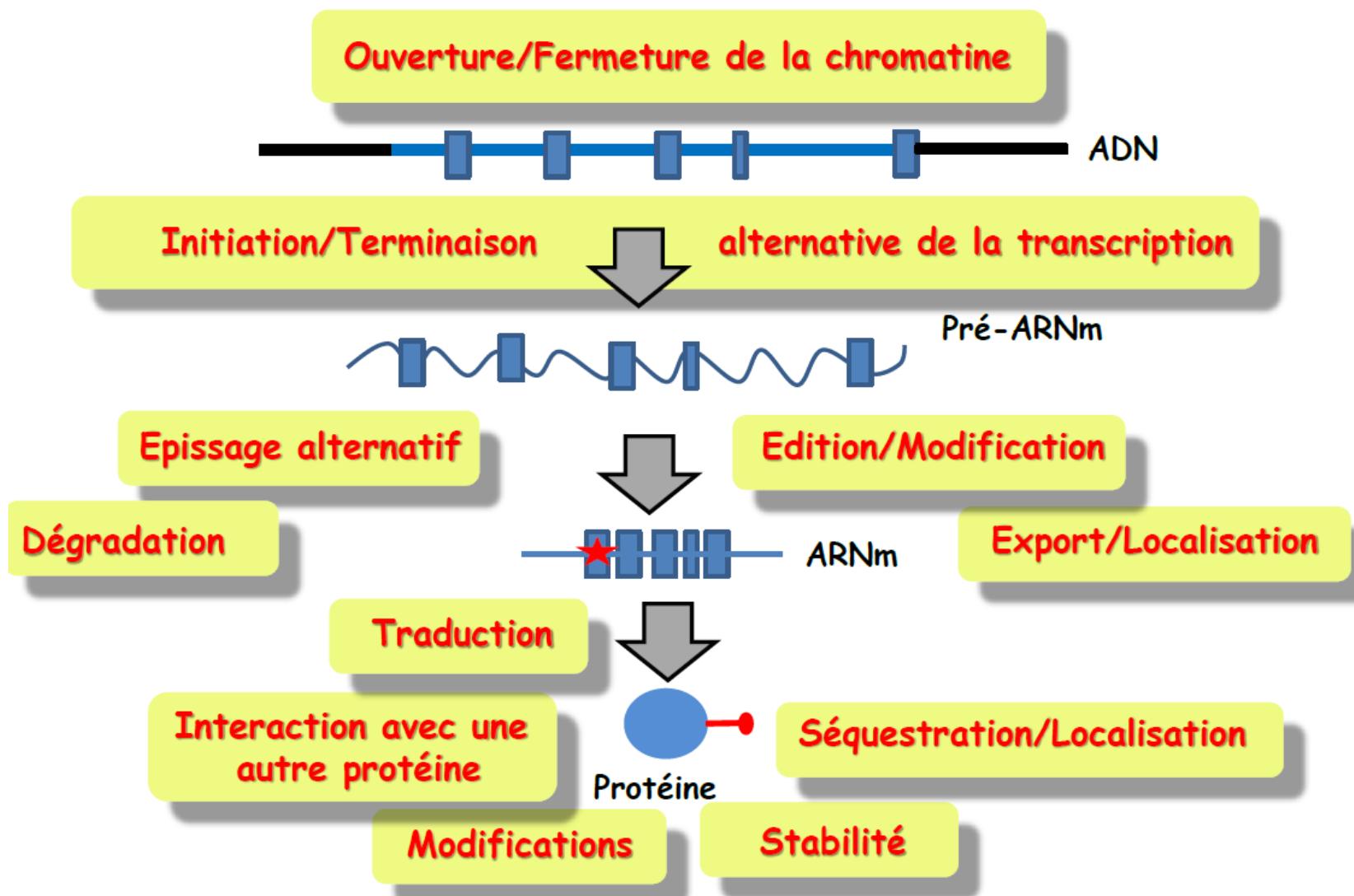


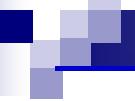
Cellule type 2  
Condition b



ARNm

# Régulation de l'expression des gènes



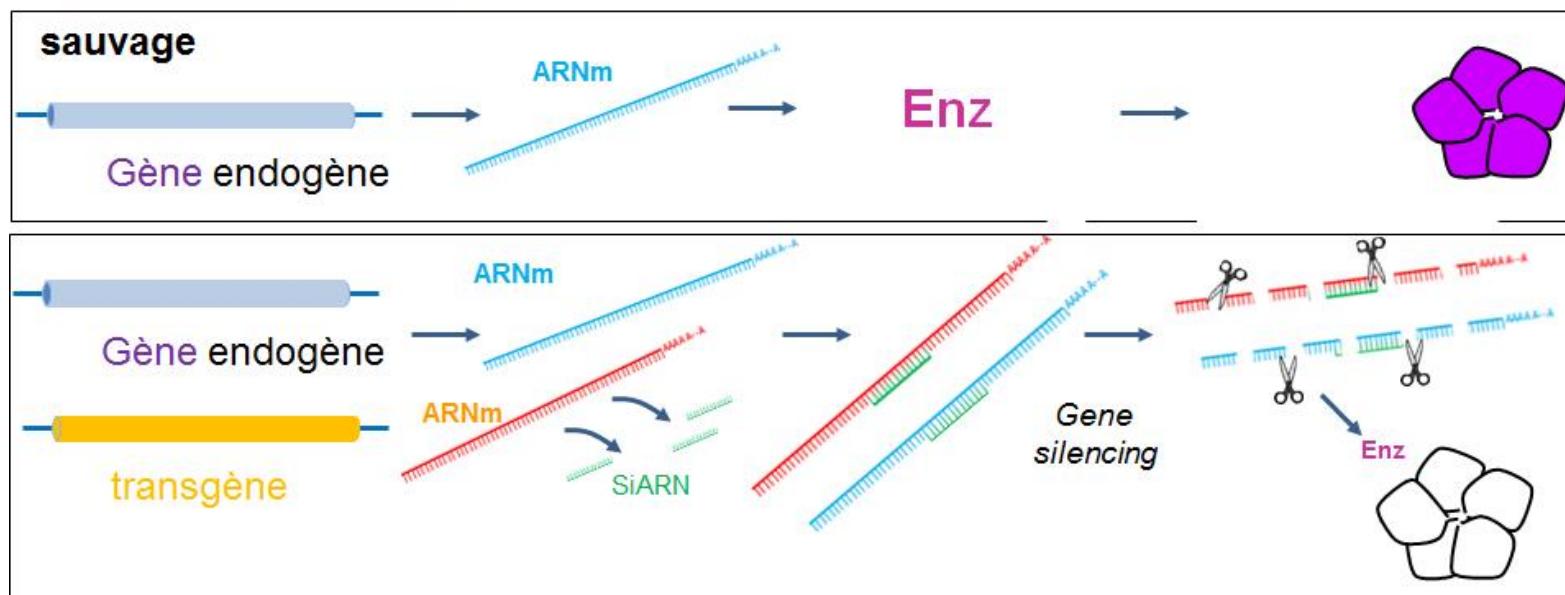
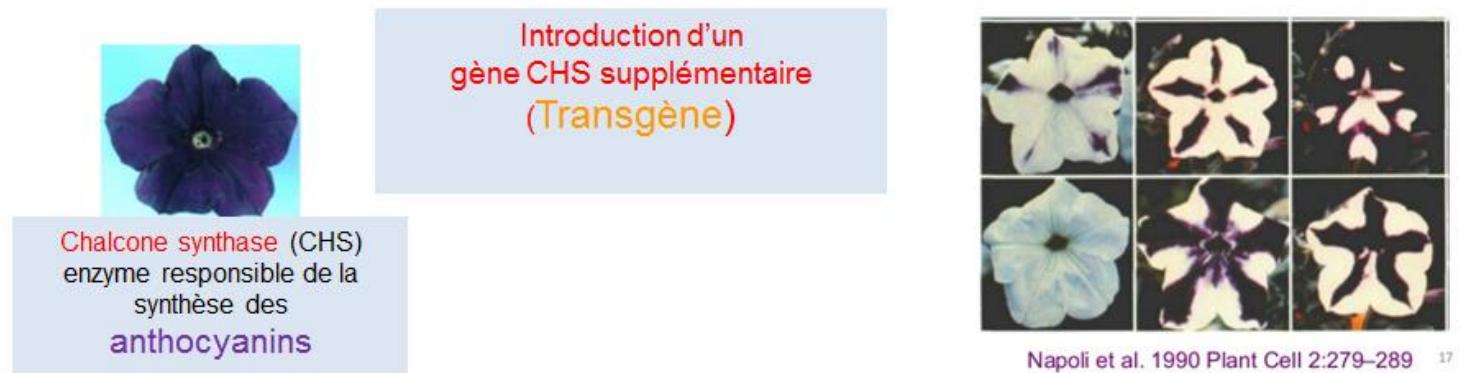


## V. LES ARN NON CODANTS.....

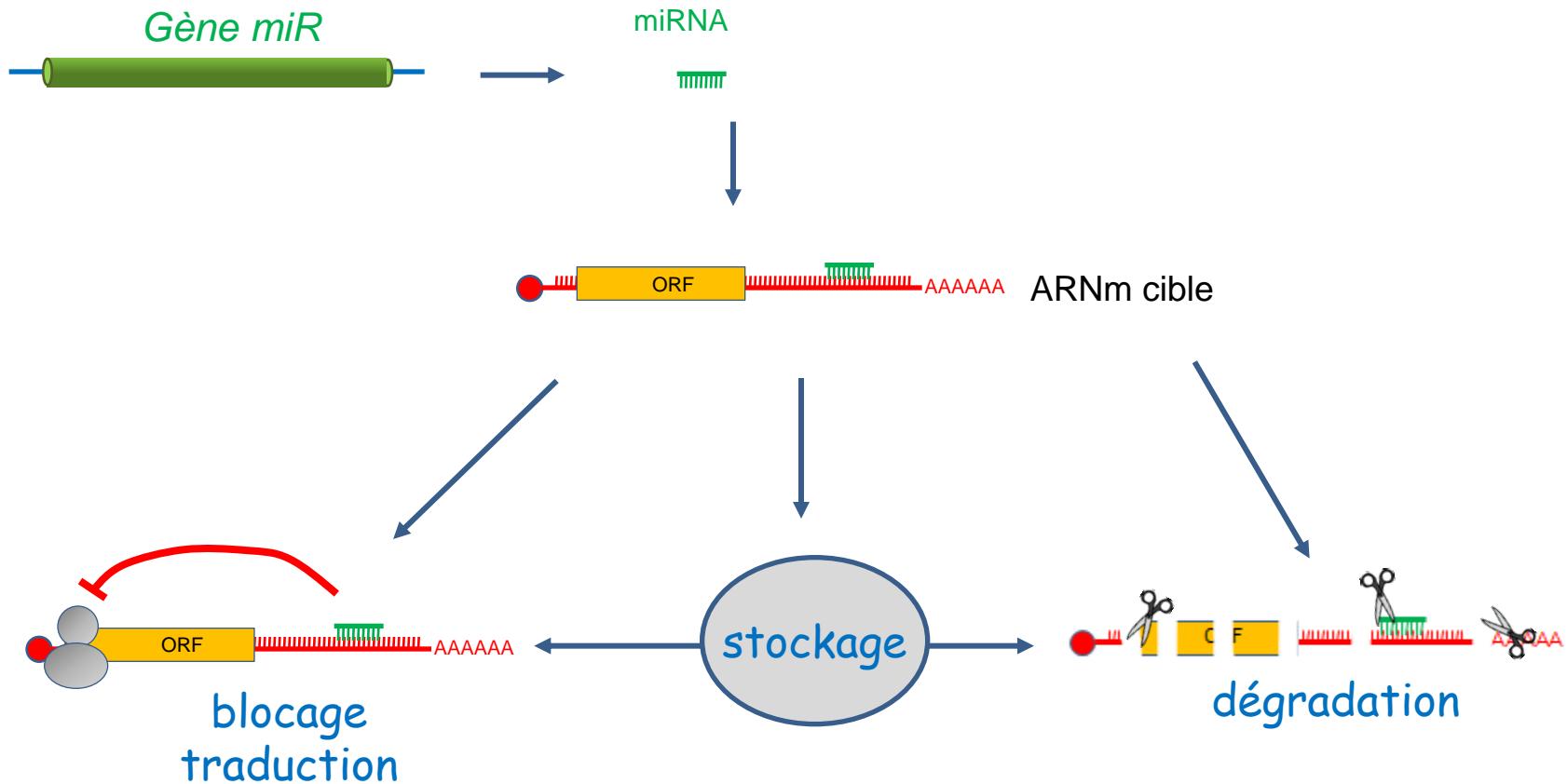
---

## 1. LES SiRNA (SMALL INTERFERANT ARN)

### Identification chez le pétunia



## 2. LES miRNA (micro ARN)





Des petits ARN (20-25 nt) interagissent avec des ARNm cibles et empêchent leur traduction.

Si RNA (origine essentiellement exogène) ----→ dégradation de l'ARNm

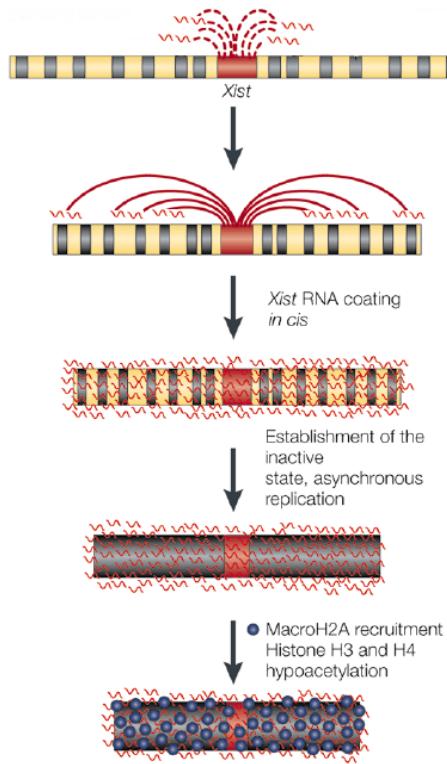
miRNA (synthétisés à partir de gènes cellulaires

---→ dégradation de l'ARN et/ou le blocage de la traduction (stockage)

On parle d'ARN interférants

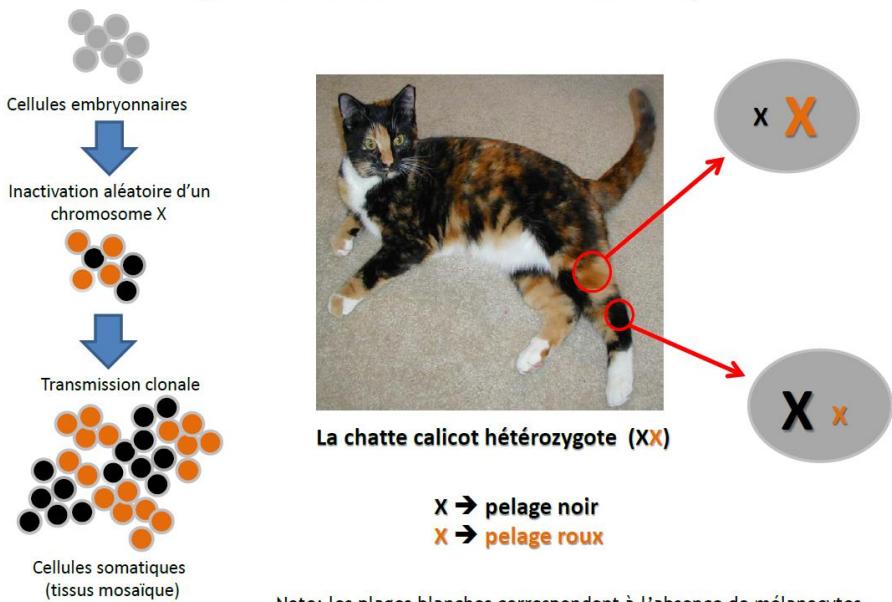
## 3. LES ARN Inc (ARN long non codant)

**Un exemple : Le gène Xist et l'inactivation du chromosome X**



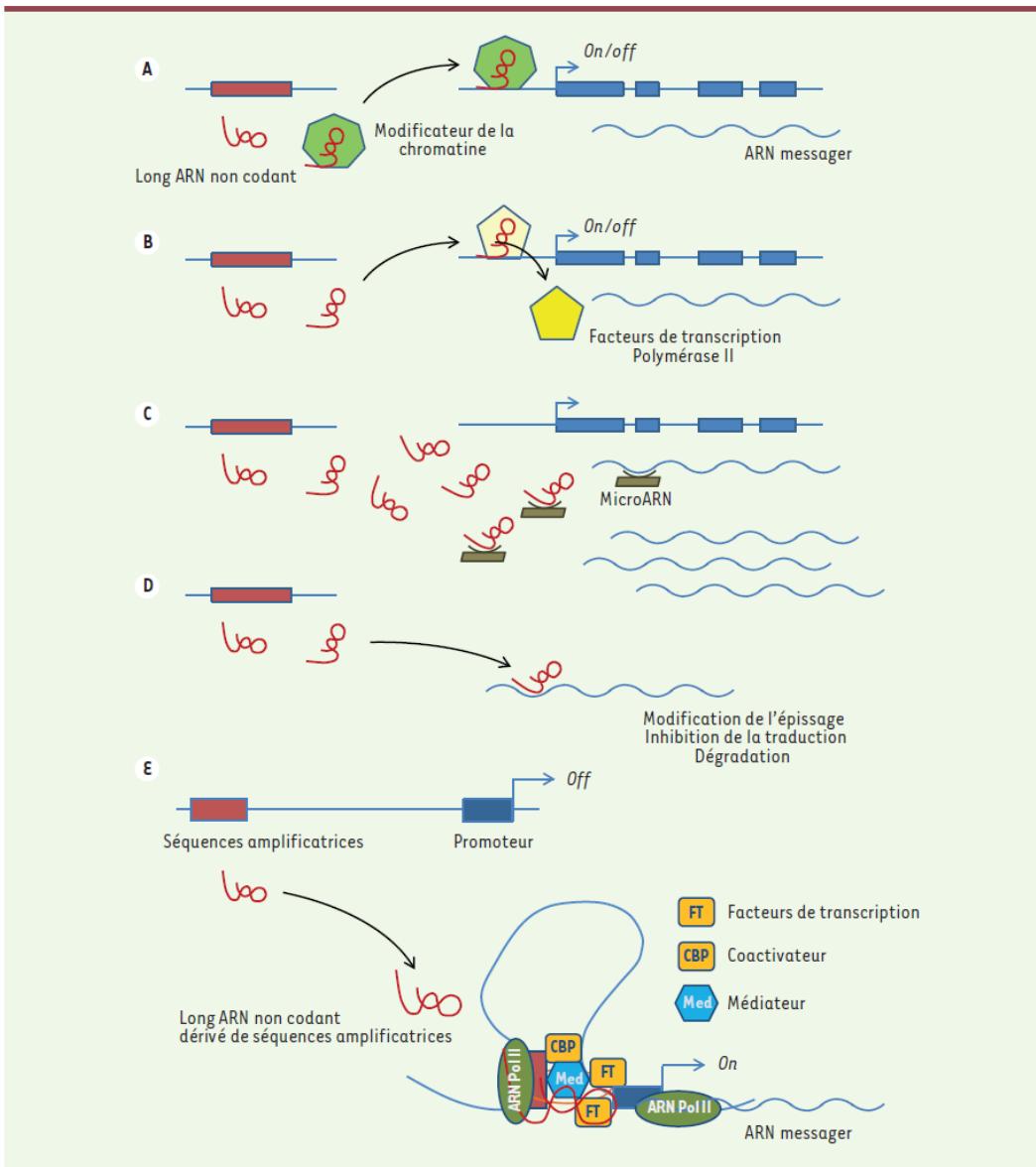
Nature Reviews Genetics 2, 59-67 (January 2001)

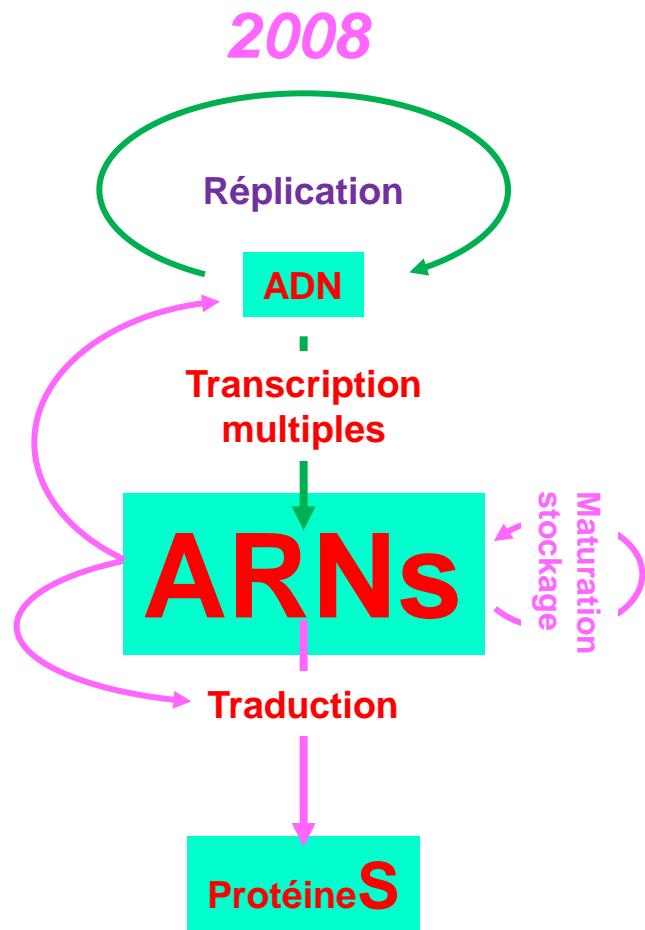
**Inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X  
(notion de mosaïcisme cellulaire)**

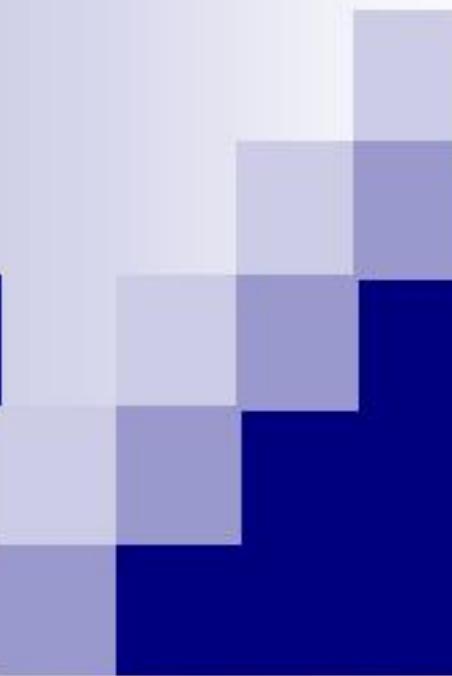


L'ARN Xist est responsable de l'inactivation d'un chromosome X chez la femme.

Note: les plages blanches correspondent à l'absence de mélanocytes.







# **Biologie Moléculaire & Génétique (BMG)**

Cours Stéphane Deschamps

## ***GENES ET CONTRÔLE DE L'EXPRESSION GENETIQUE***



# INTRODUCTION

## I. QU'EST CE QU'UN GENE

1. Gènes codants et non-codants
2. Gènes et génome

## II. EXPRESSION DES GENES

1. La transcription
2. Maturation des ARN.
  - a. Les ARN messagers eucaryotes
  - b. Les ARN non codants - ex ARNr et ARNt
3. La traduction des ARNm.

## III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. Détection des ARN.
  - a. Le northern blot
  - b. La RT-PCR
  - c. Autres méthodes
2. Détection des protéines.
3. Hybridation *in situ* et immunohistochimie

# INTRODUCTION

1- «Le gène de la maladie X ou du comportement Y n'existe pas »

2- «Il n'y a pas de causalité simple entre un gène et un phénotype...»

3- «Tout organisme est une rencontre entre l'inné (le génotype) et l'acquis (l'environnement)»

**«Rien n'est sans les gènes mais tout n'est pas dans les gènes».** J.Louis Serre

Facteurs environnementaux



(Stress, Habitudes alimentaires, Environnement utérin, Activités physiques et socio-culturelles...)

... TAGTACCGATAGCA  
TAGATATATTAGAGAG  
ATAGATATAGATATGG  
ATAGACGATAGACGAT  
GATAGACAGATATGAA  
GAATACAGATAGAGAG  
AGATAACATGCGCG.....

Information linéaire virtuelle (le génome)



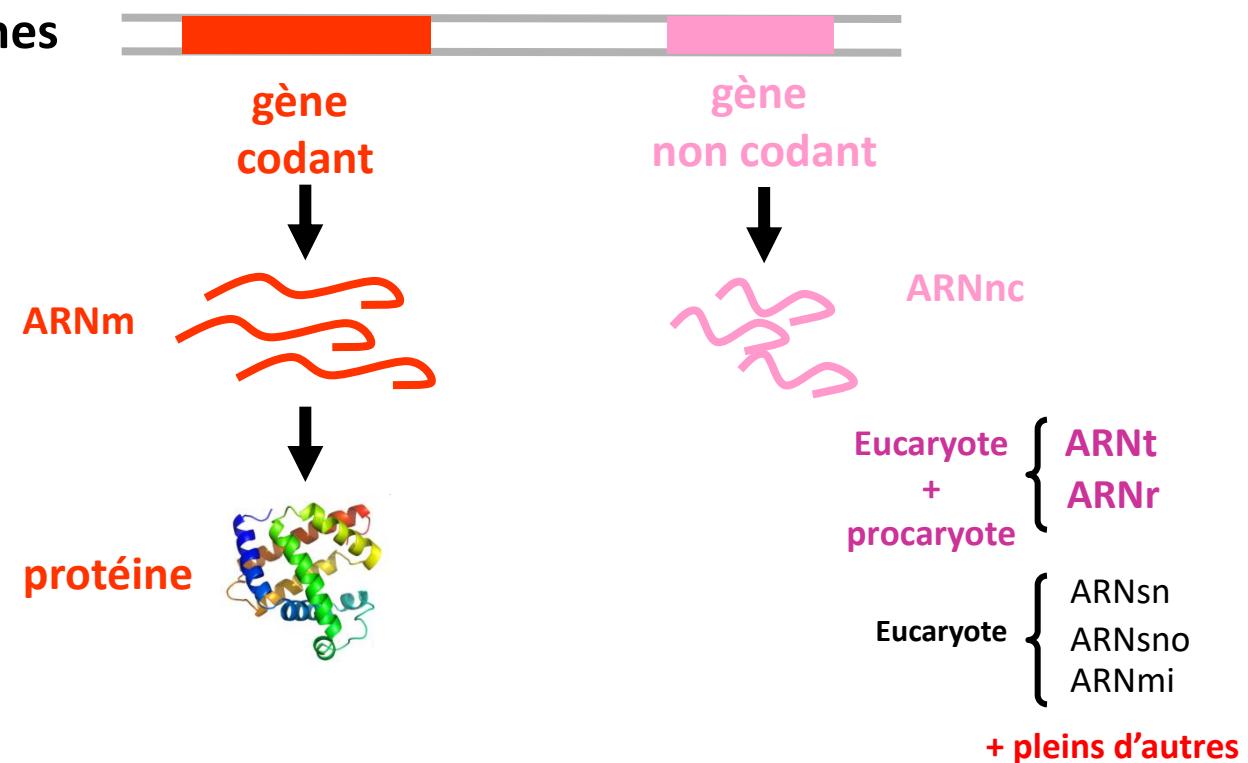
Structure 3D matérielle (le phénotype)

## 1. Gènes codants et non-codants

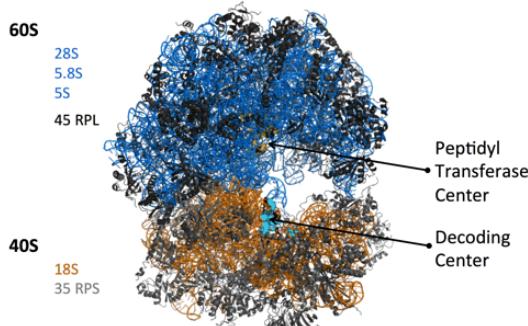


**GENE** : Séquence d'ADN qui sert à programmer la synthèse d'un ARN qui possède au moins une fonction cellulaire.

### Deux classes de gènes



# Quelques grandes fonctions cellulaires des ARN non codant



- Epissage
- Protection contre les virus
- Répression des transposons
- Formation hétérochromatine
- Traduction des ARNm

- Pleins de trucs

Structure et fonction des ribosomes

-Traduction

rRNA (ARN ribosomiques)

tRNA (ARN de transfert)

4.5S & 7S RNA (Signal Recognition Particles)

snRNA – Pre-mRNA splicing

snoRNA – rRNA modification

siRNA – small interfering RNA

mi-RNA - microRNA

gRNA – guide RA in RNA editing

Telomerase RNA – primer for telomeric DNA synthesis

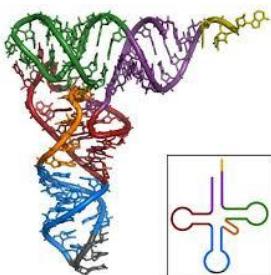
tmRNA is a hybrid molecule, half tRNA, half mRNA

lncRNA --- ex. Xist: The X chromosome silencing is mediated by Xist

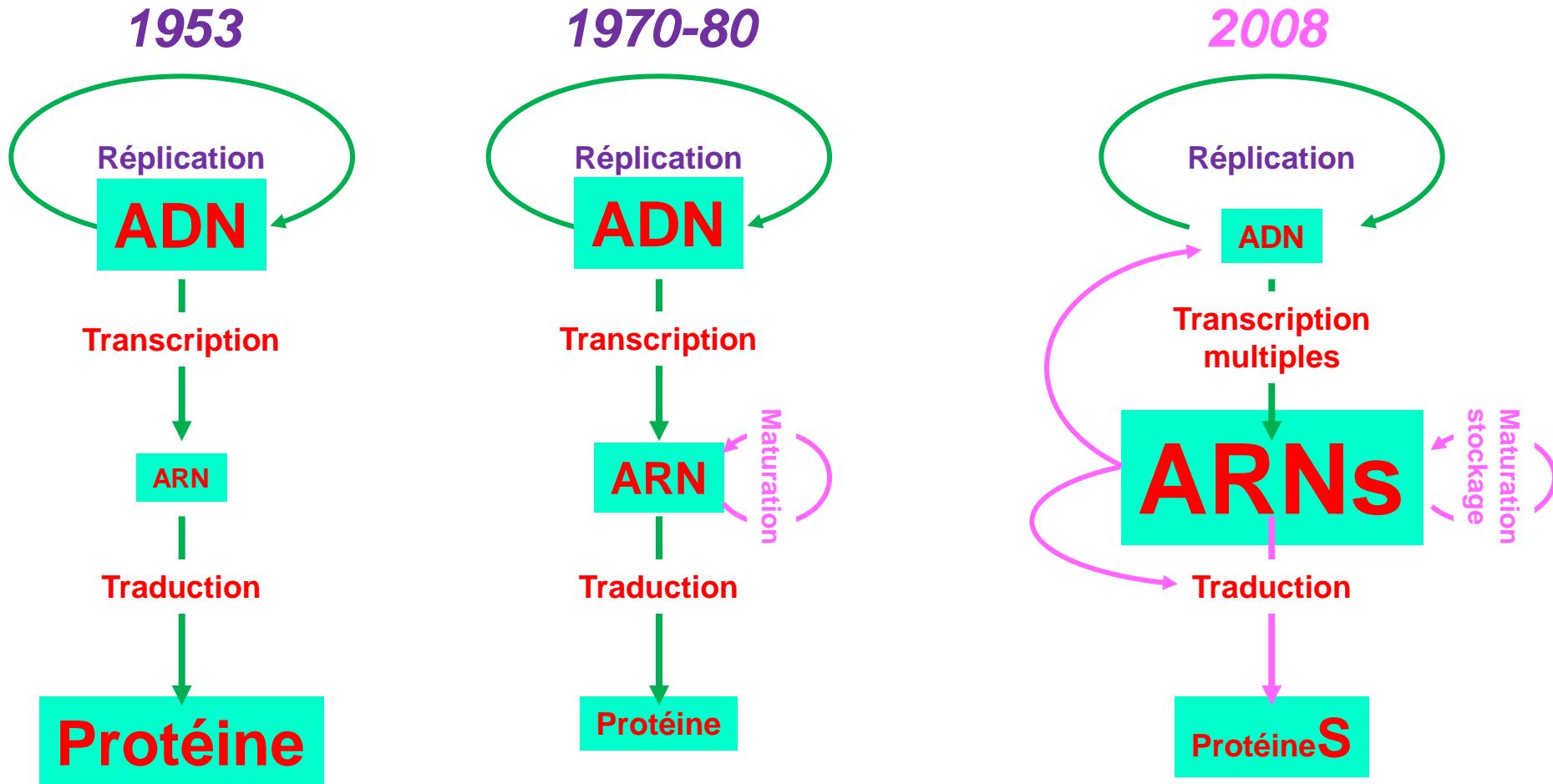
shRNA (small heterochromatic RNAs )

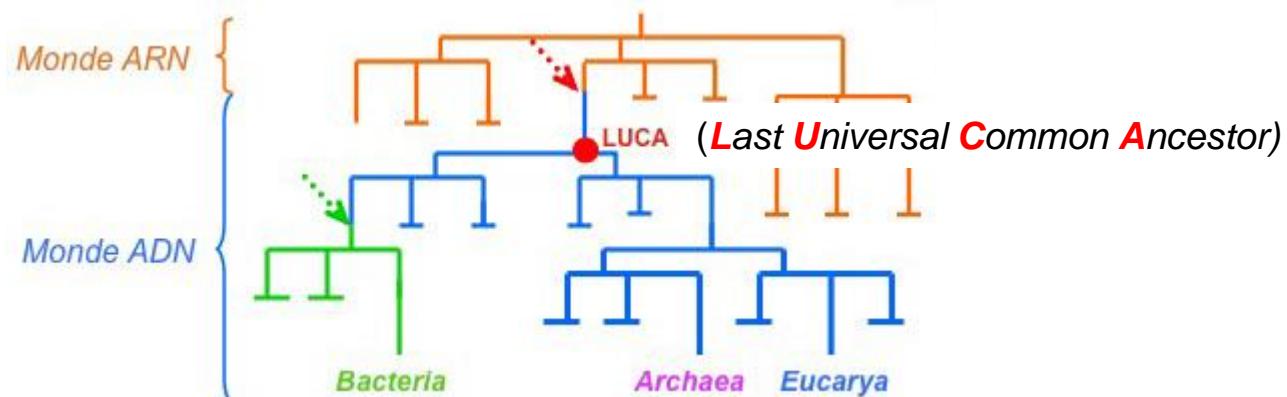
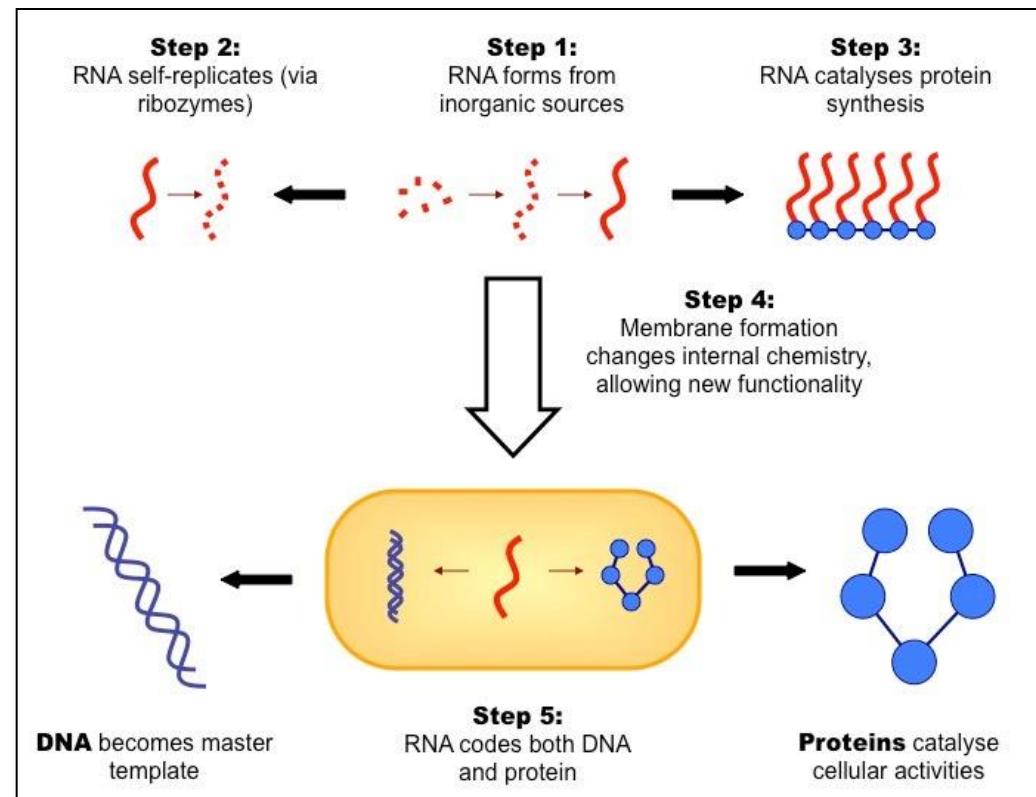
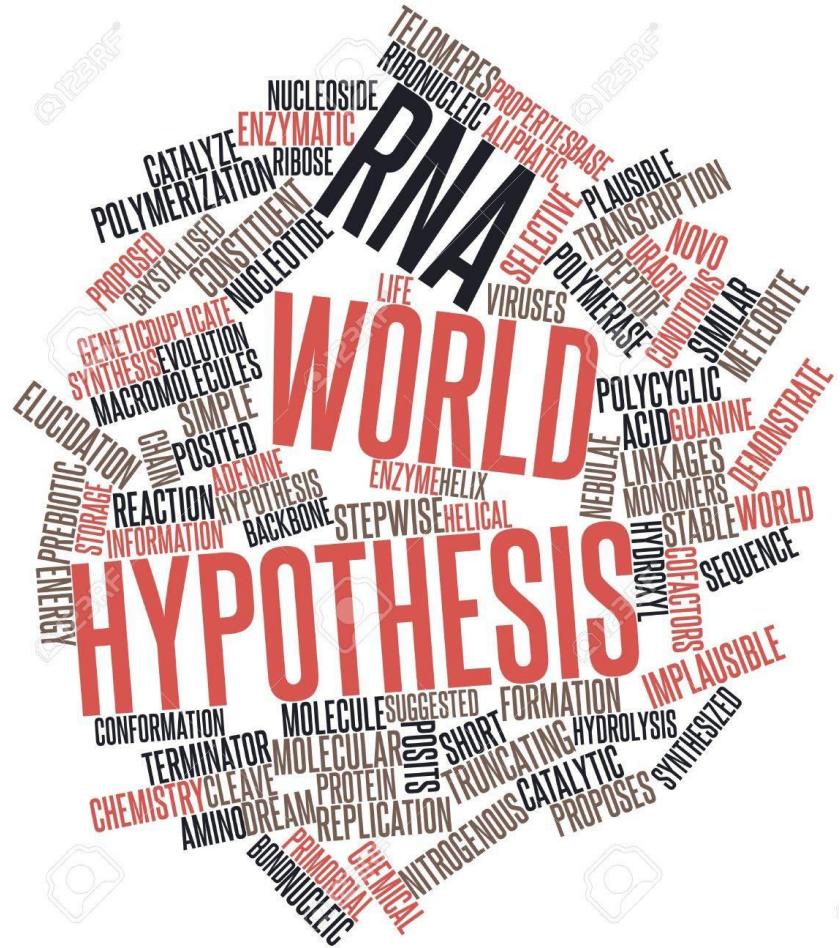
LNA Locked Nucleic Acid

piRNA Piwi-interacting RNA



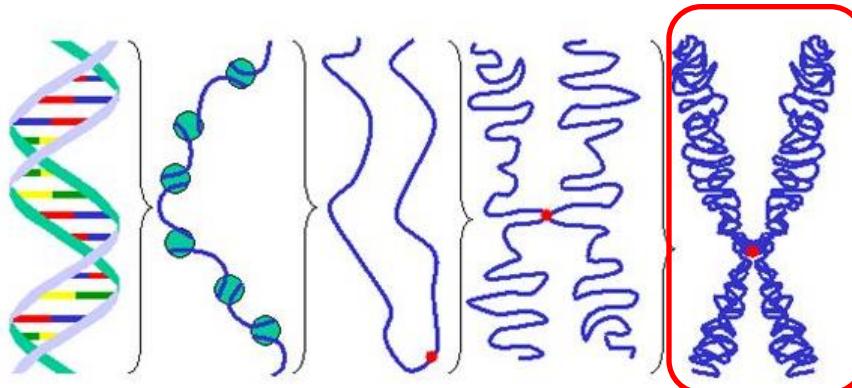
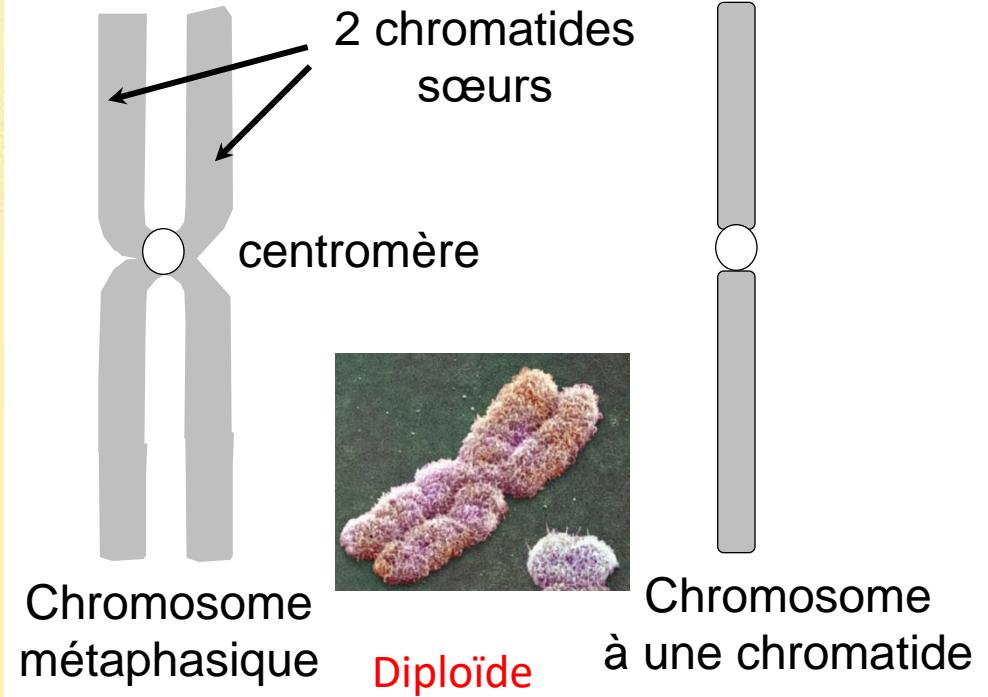
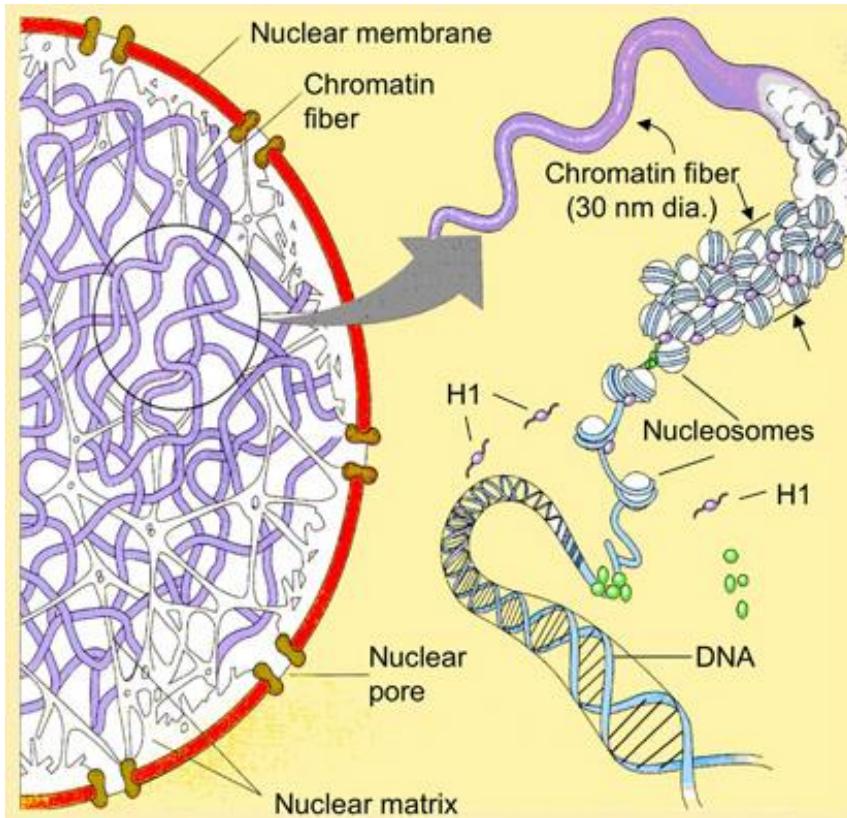
# Le "dogme central" de la biologie moléculaire (actuel)





# I. QU'EST CE QU'UN GENE

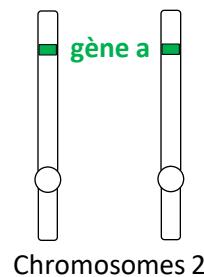
## 2. Gènes et génome



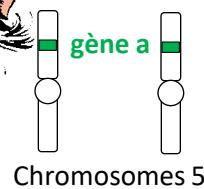
Haploïde



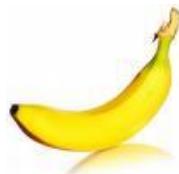
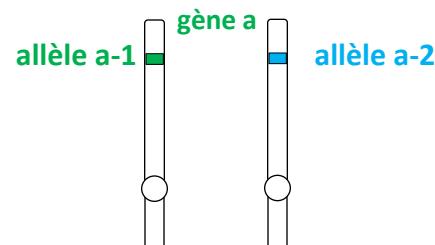
Diploïde



Un gène donné est présent à un endroit précis (**locus**)



Le locus d'un même gène est différent entre 2 espèces.



3X

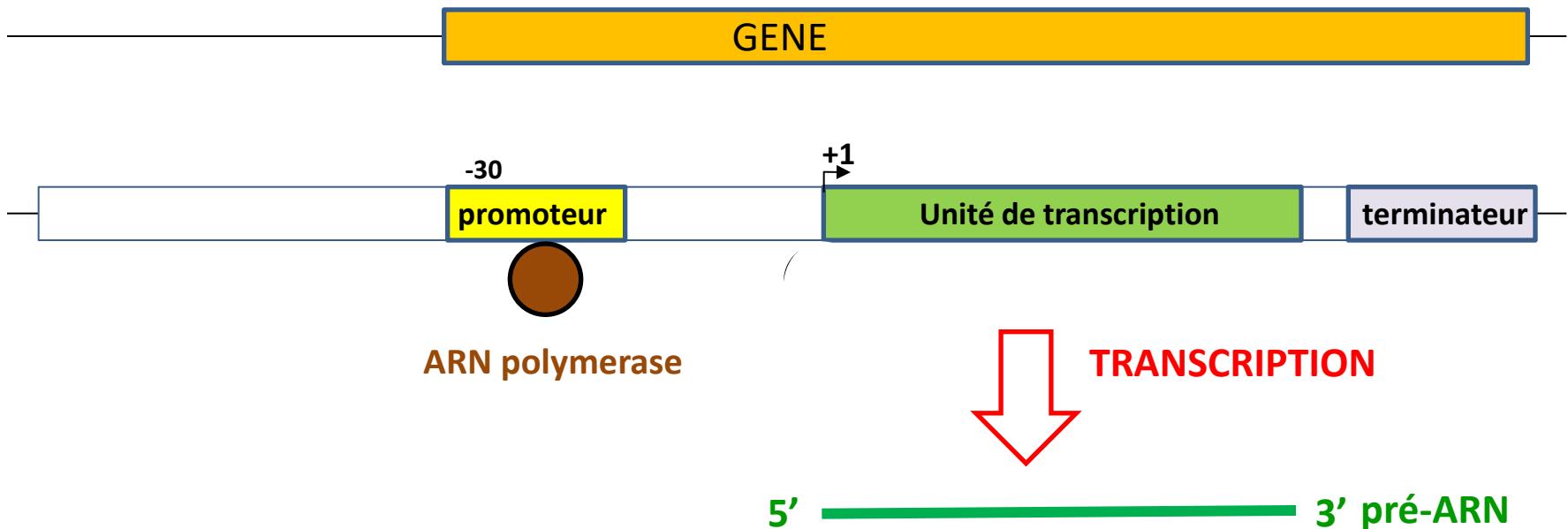


4X



8X

**polyploïdes:** plusieurs exemplaires du génome / cellule.  
(total ou partiel / rare chez les animaux plus fréquent chez les plantes)



### L'ARN polymérase

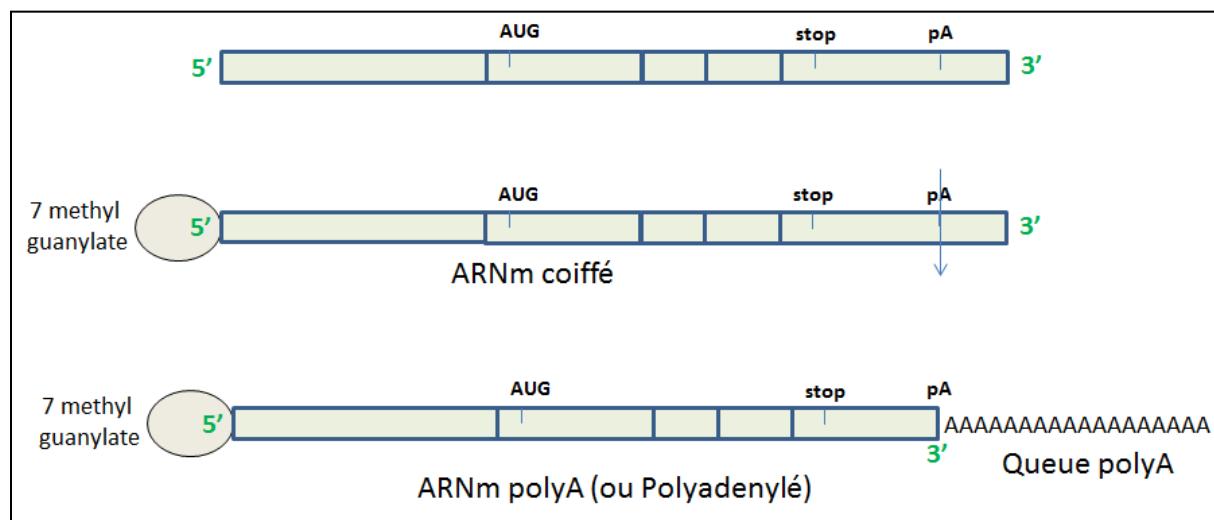
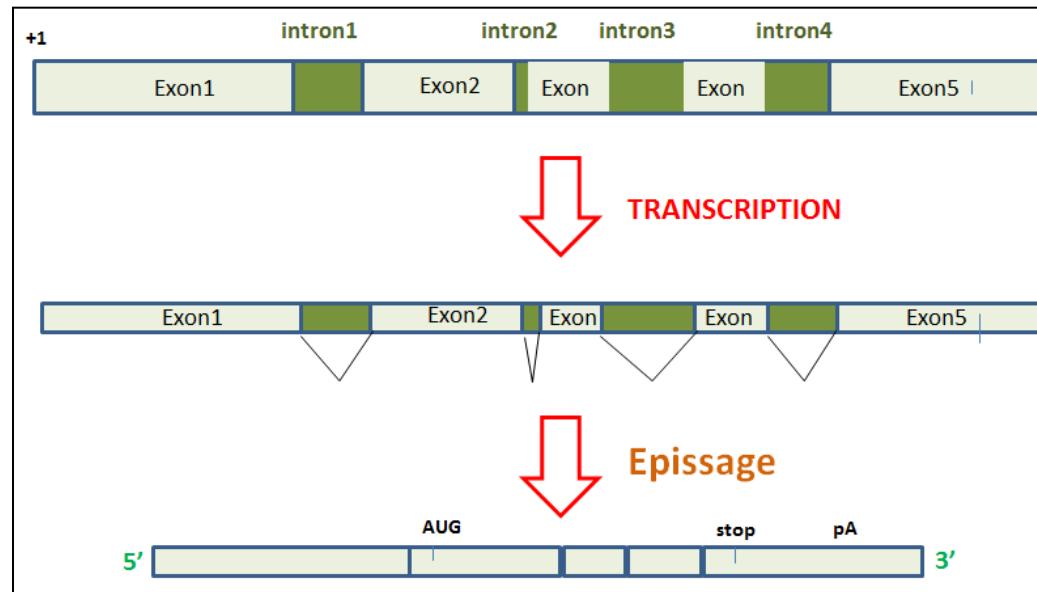
Synthèse ARN complémentaire

Unité de transcription.

Les séquences **promotrices** et **terminateurs**

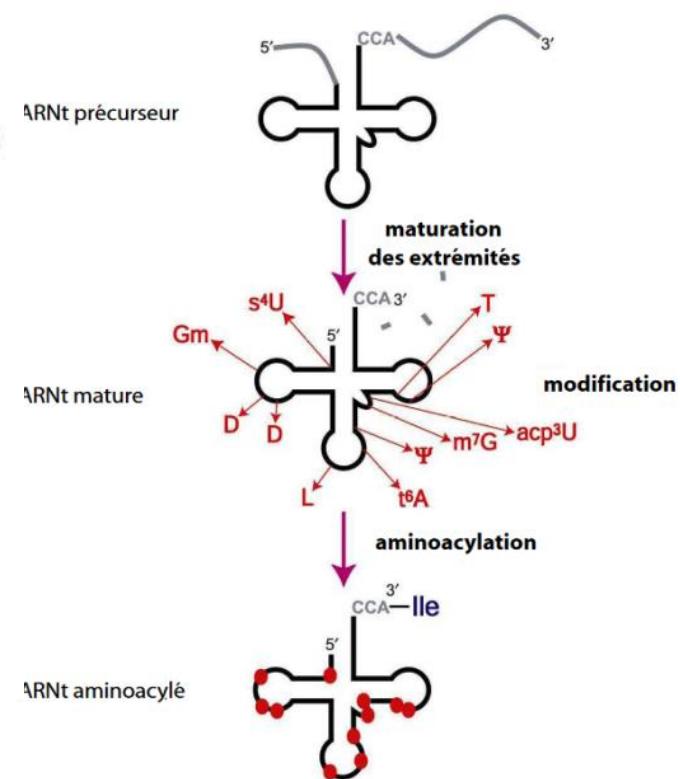
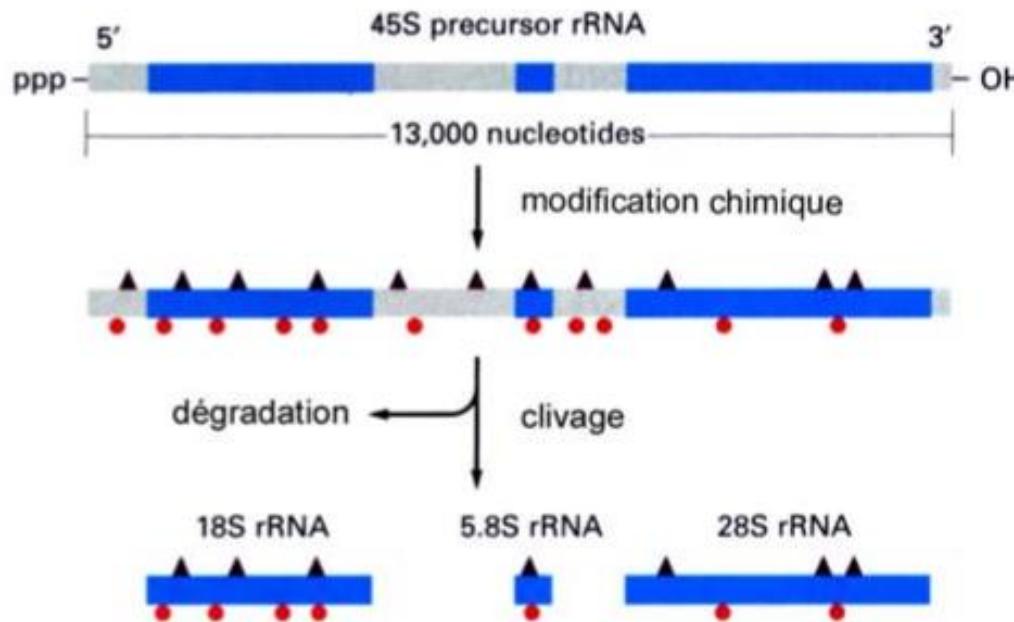
### 2. Maturation des ARN.

#### a. Les ARN messagers eucaryotes

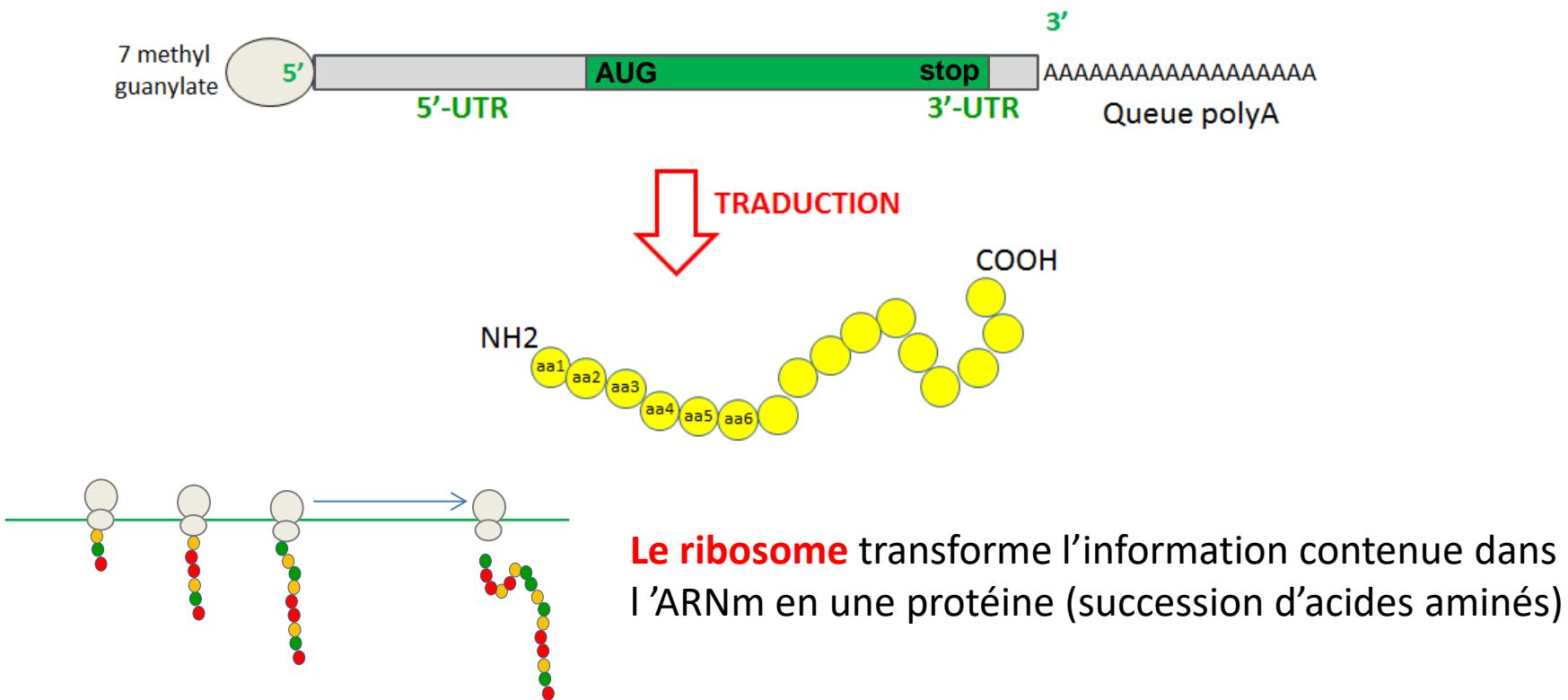


### 2. Maturation des ARN.

#### b. Les ARN non codants - ex ARNr et ARNt



### 3. La traduction des ARNm.



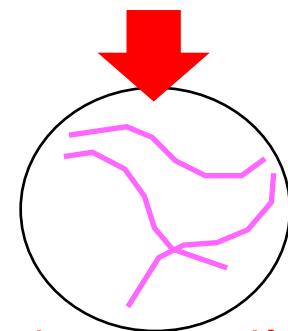
**cadre de lecture ouvert.** (ORF = Open Reading Frame) & Séquences 5' et 3'UTR.

#### 1. Détection des ARN.

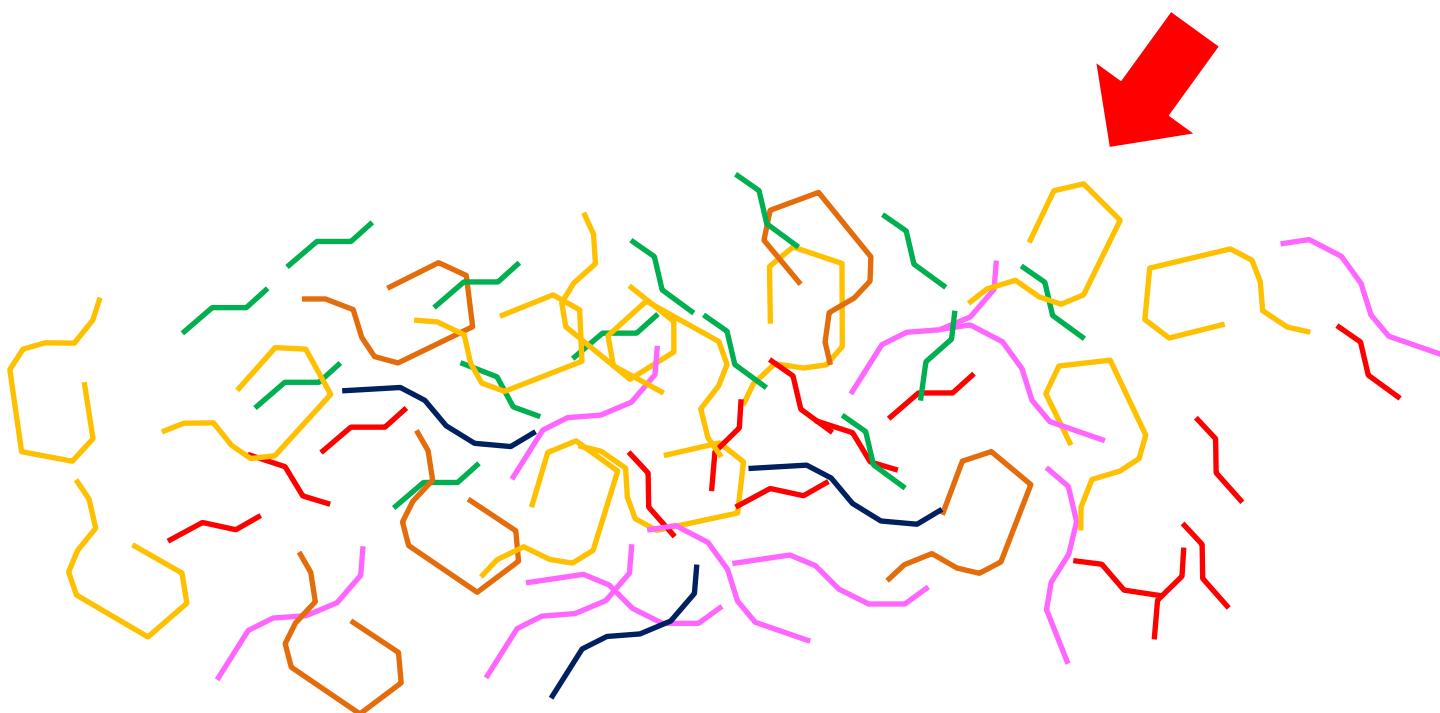
ETUDIER L'EXPRESSION D'UN GENE !!

Comment mettre en évidence un ARN particulier  
(un ensemble de molécules identiques)  
au sein d'une populations d'ARN différents ?

Ceux là !!.....

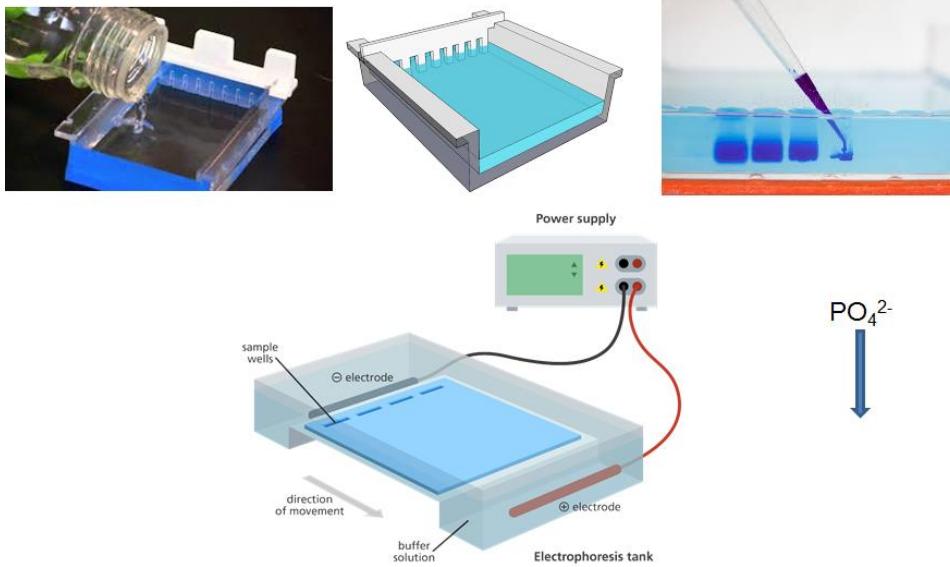
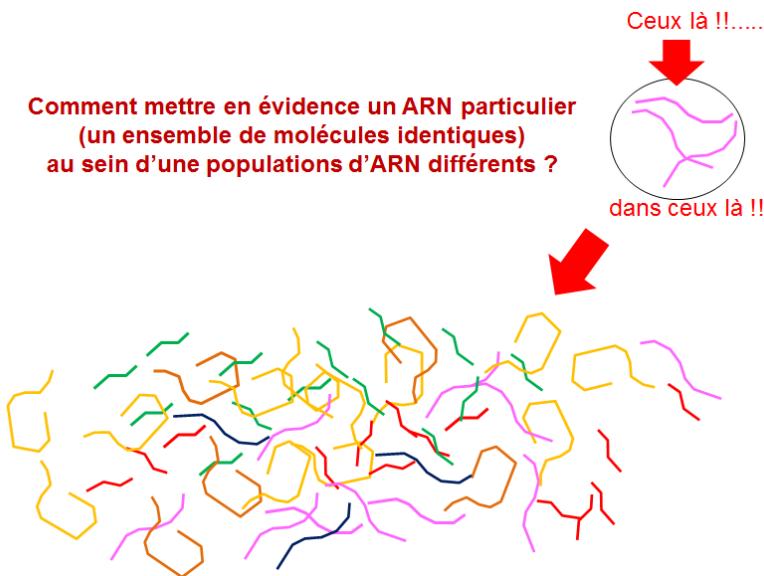


dans ceux là !!



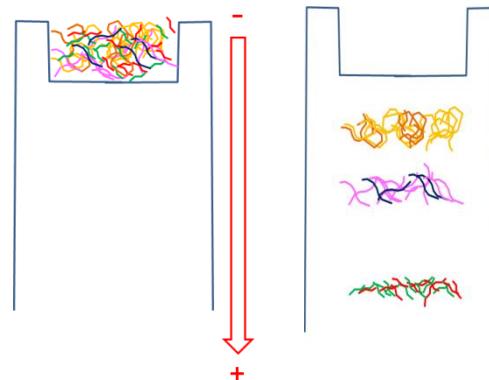
## 1. Détection des ARN.

Comment mettre en évidence un ARN particulier  
(un ensemble de molécules identiques)  
au sein d'une populations d'ARN différents ?



### Northern blot

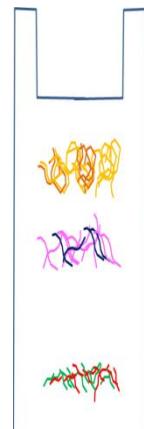
1. Préparation des ARN
2. Séparation des ARN en fonction de leur taille  
Electrophorèse en gel d'agarose
3. Transfert sur membrane
4. Hybridation avec une sonde complémentaire marquée
5. Révélation du marquage



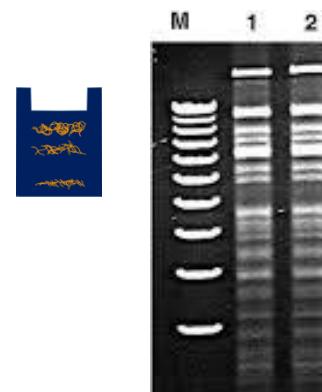
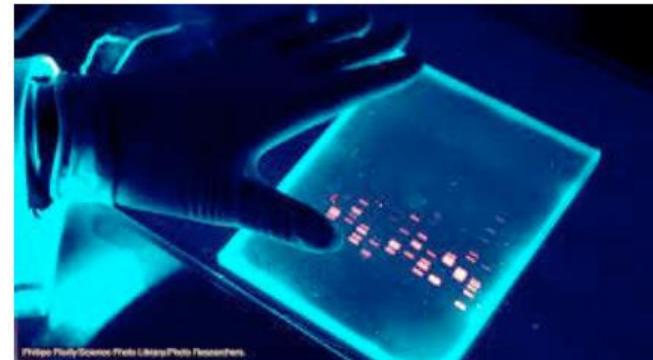
### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



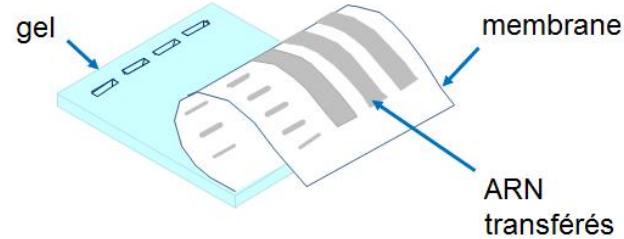
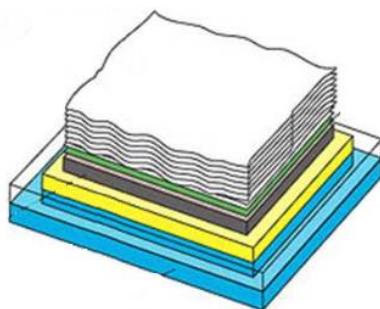
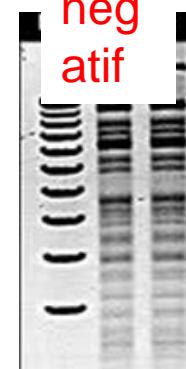
Fragile !!...



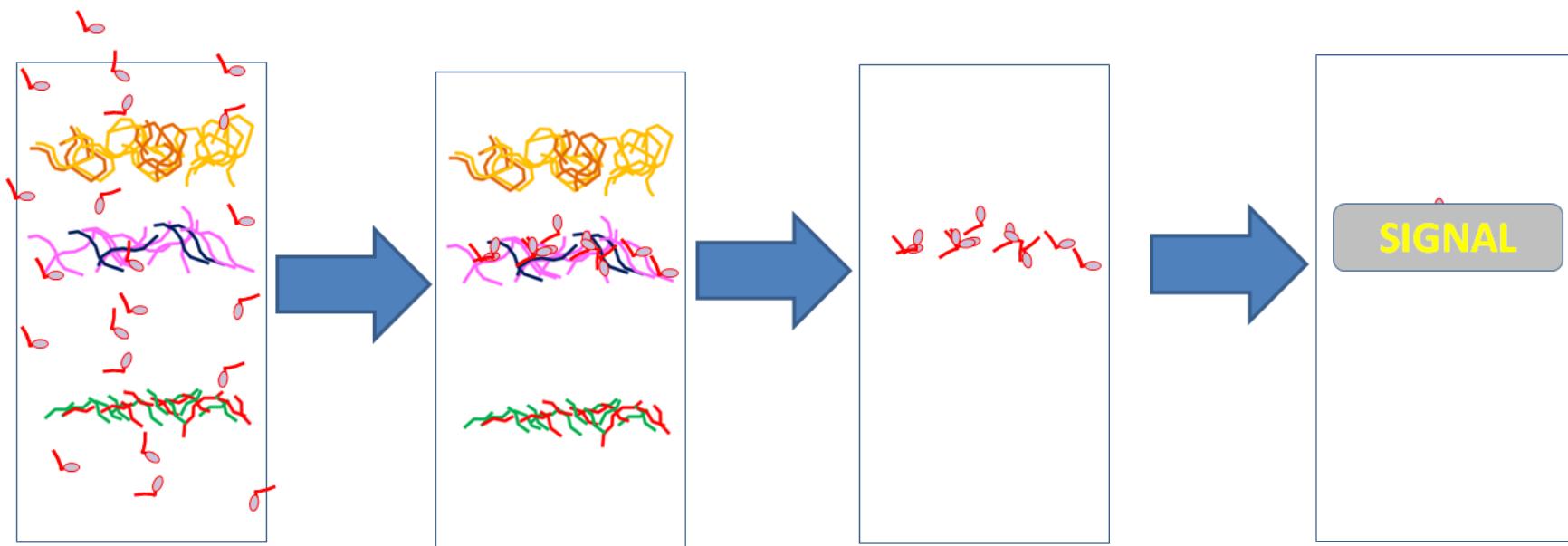
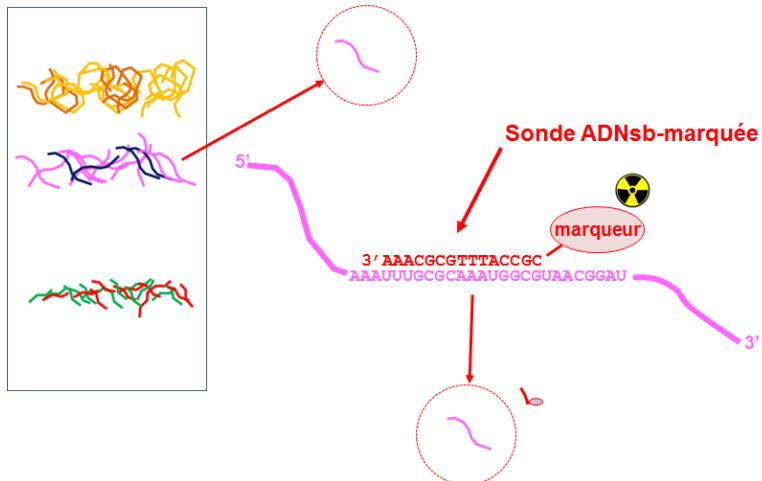
Coloration  
**(BET)**



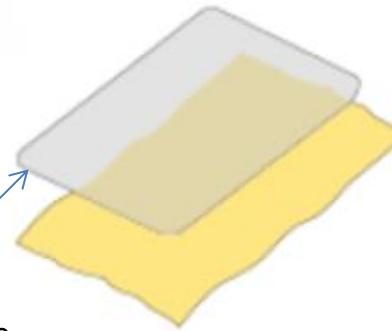
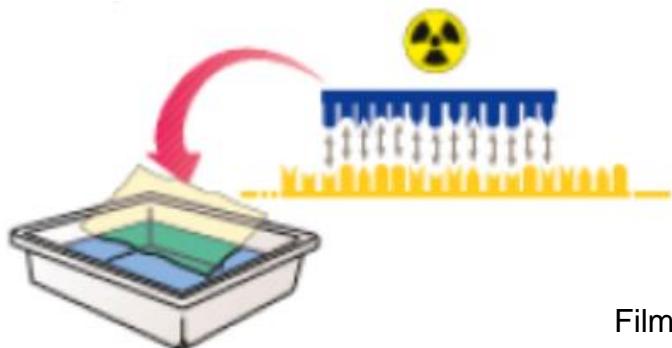
nég  
atif



### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

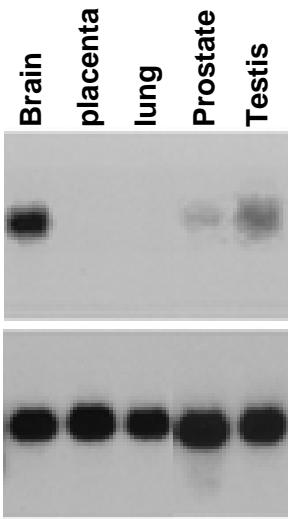


### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



Développement photographique

Baek et al,  
Biochem. J 2003



mRNA PAST

mRNA  $\beta$ -actin



- Taille des ARN
- Quantitatif



- Quantité importante d'ARN
- Technique lourde - ARN instables

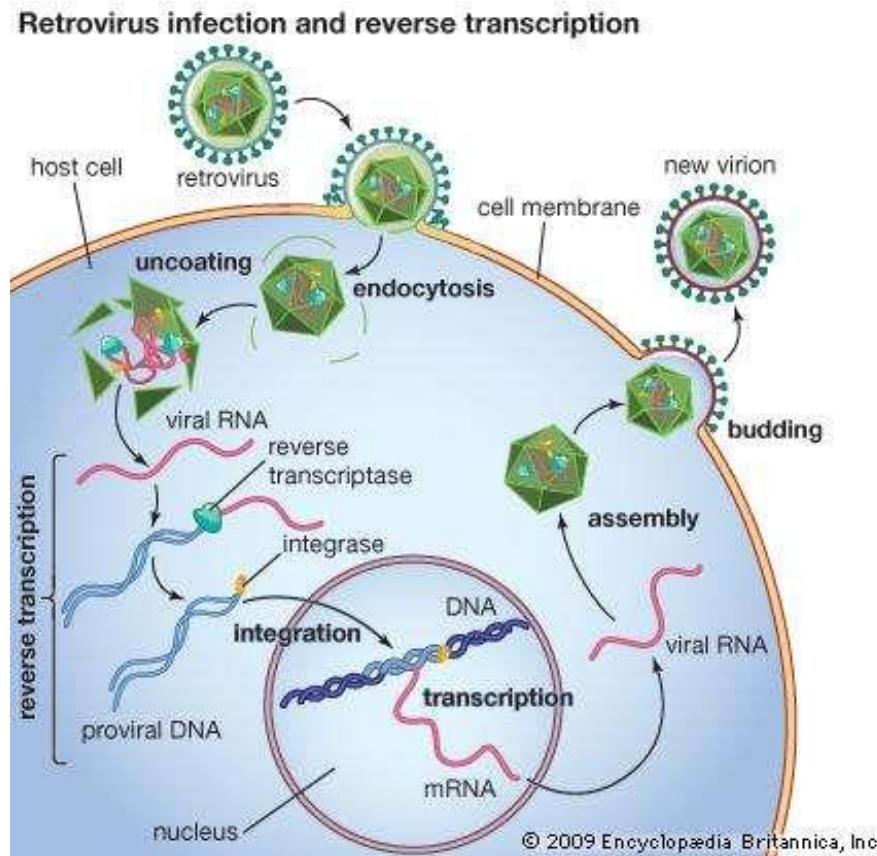
On l'utilise de moins en moins

#### 1. Détection des ARN. Northen blot et RT-PCR b. La RT-PCR

Retro T ranscription – P olymerisation C hain R eaction

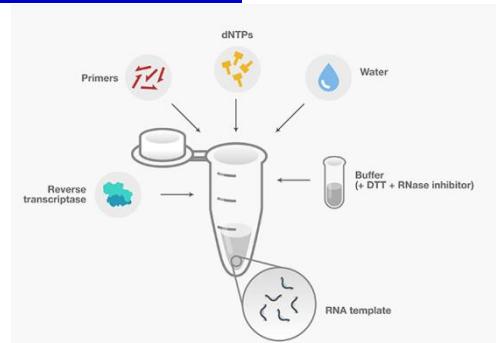
Retro-Transcription des ARN suivie d'une amplification des ADNc par PCR

##### La rétro-transcriptase



### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

#### La rétro-transcriptase



ARN 3' -UAAUGCAUGGCCAU-----AAUCGAUGGACCAUGAC-5'

3' -UAAUGCAUGGCCAUUAAGGCCGAU-----AAUCGAUGGACCAUGAC-5'  
5'-**CGTACCG**-3'

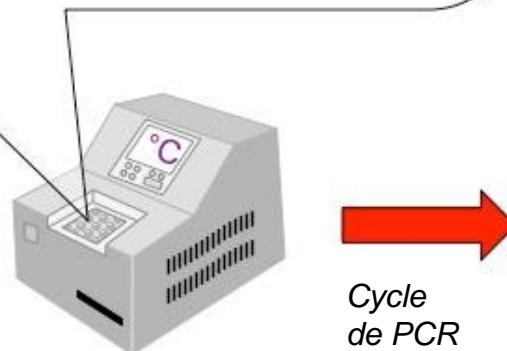
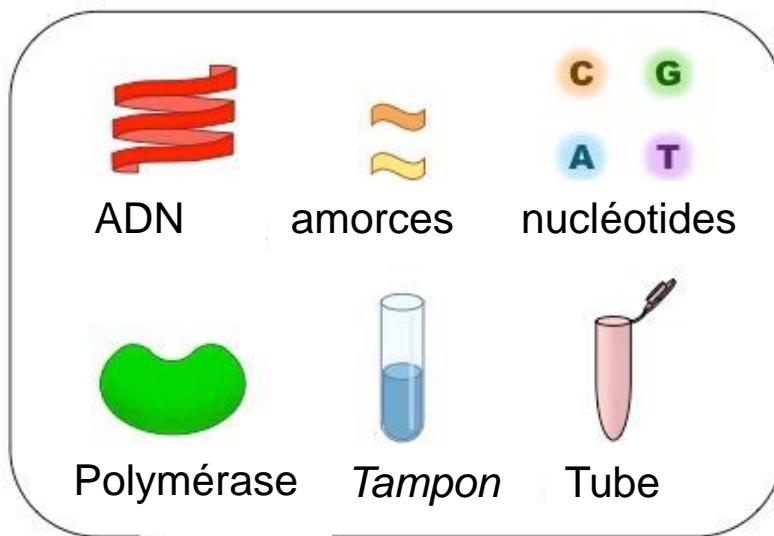
3' -UAAUGCAUGGCCAUUAAGGCCGAU-----AAUCGAUGGACCAUGAC-5'  
5'-**CGTACCGGT**A→etc...

3' -UAAUGCAUGGCCAUUAAGGCCGAU-----AAUCGAUGGACCAUGAC-5'  
5'-**CGTACCGGT**AATTCCGGCTA-----TTAGCTACCT→etc...-3'

ADNc 5'-**CGTACCGGT**AATTCCGGCTA-----TTAGCTACCTGGTACTG-3'

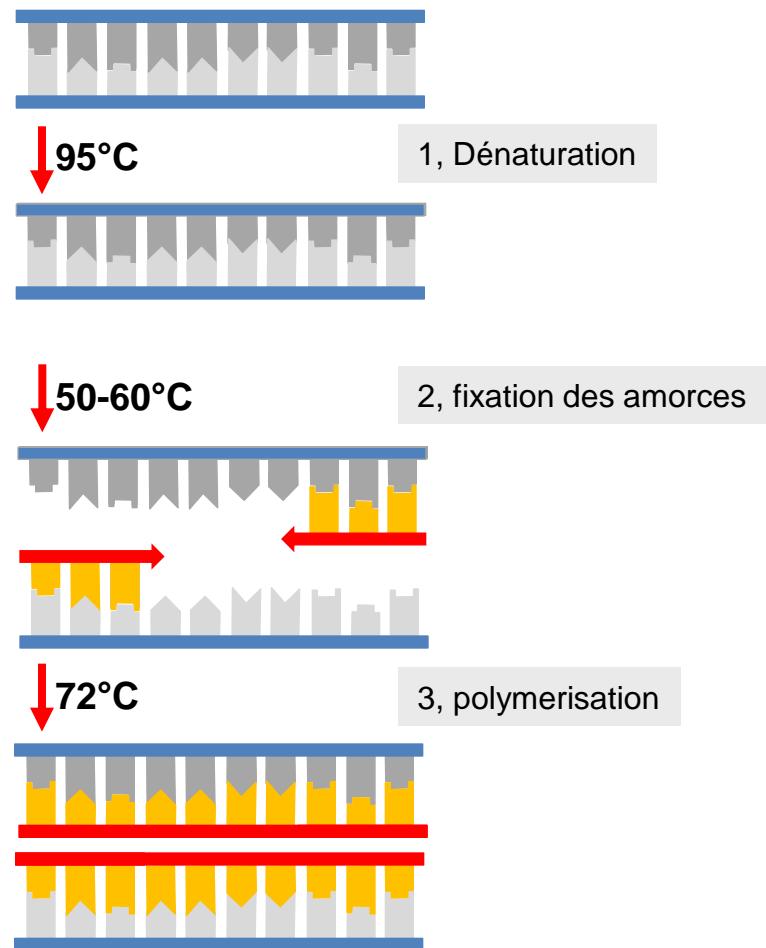
### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

#### PCR (composants)



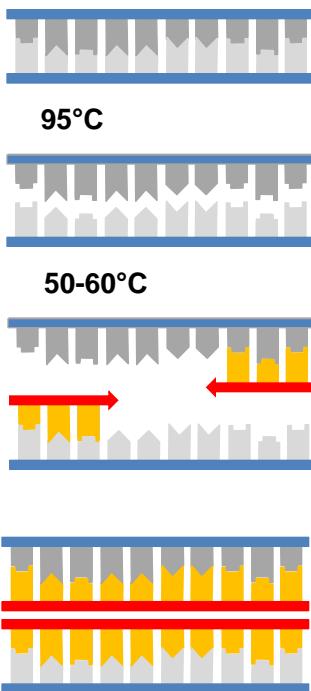
*Thermocycleur*

#### PCR ( un cycle)

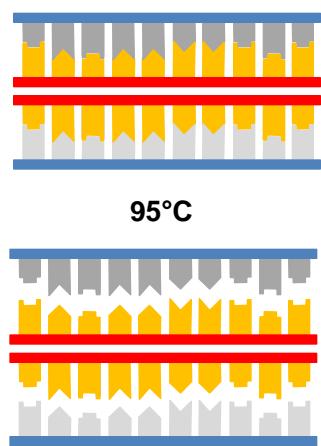


### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

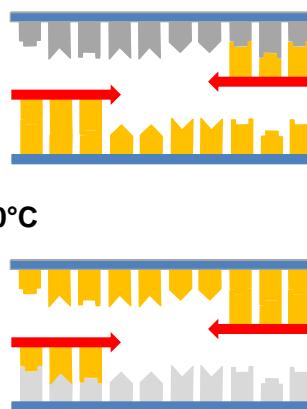
PCR ( un cycle)



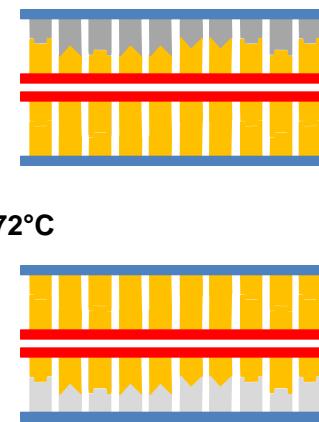
PCR ( 2 cycles)



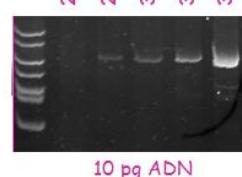
50-60°C



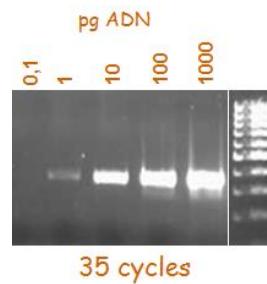
72°C



Nbre cycles  
26 28 30 32 35

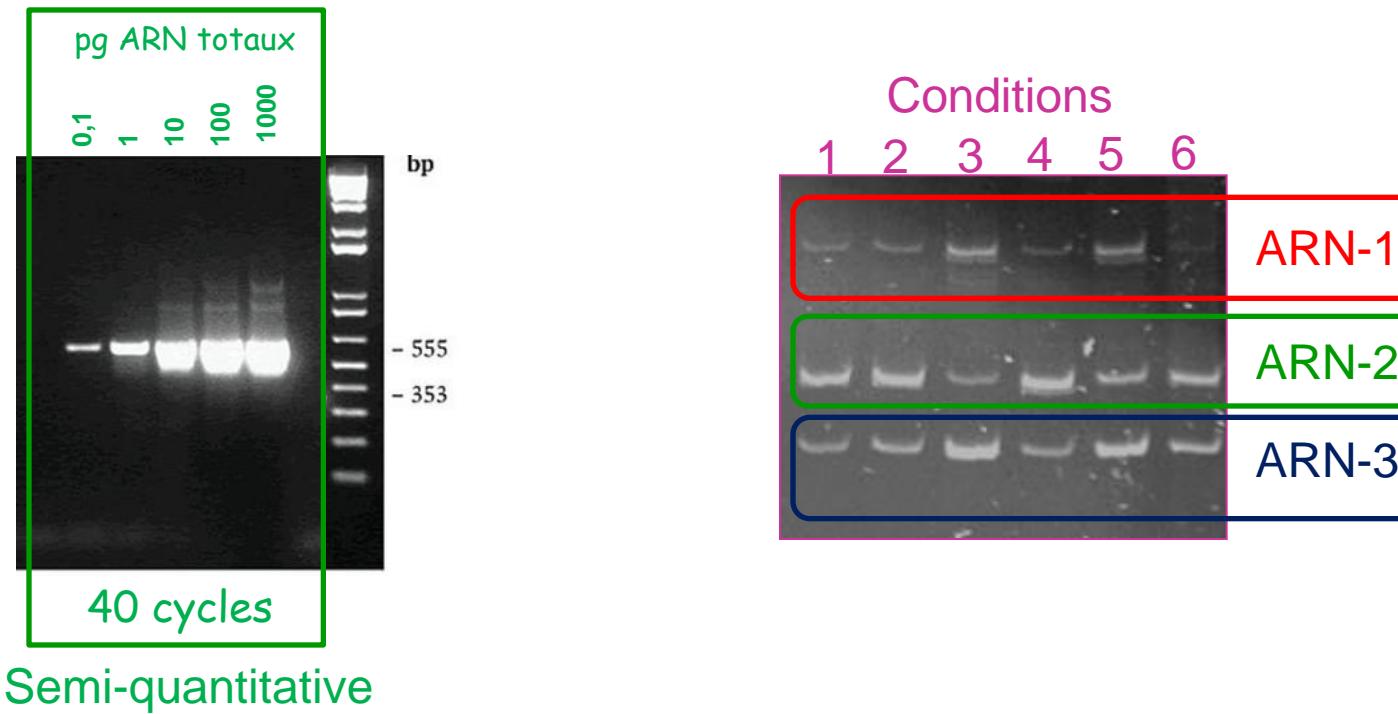


Plus je fais de cycles....



Plus j'ai de matériel au départ...

### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



#### 1. Détection des ARN.

##### c. Autres méthodes - la qRT-PCR



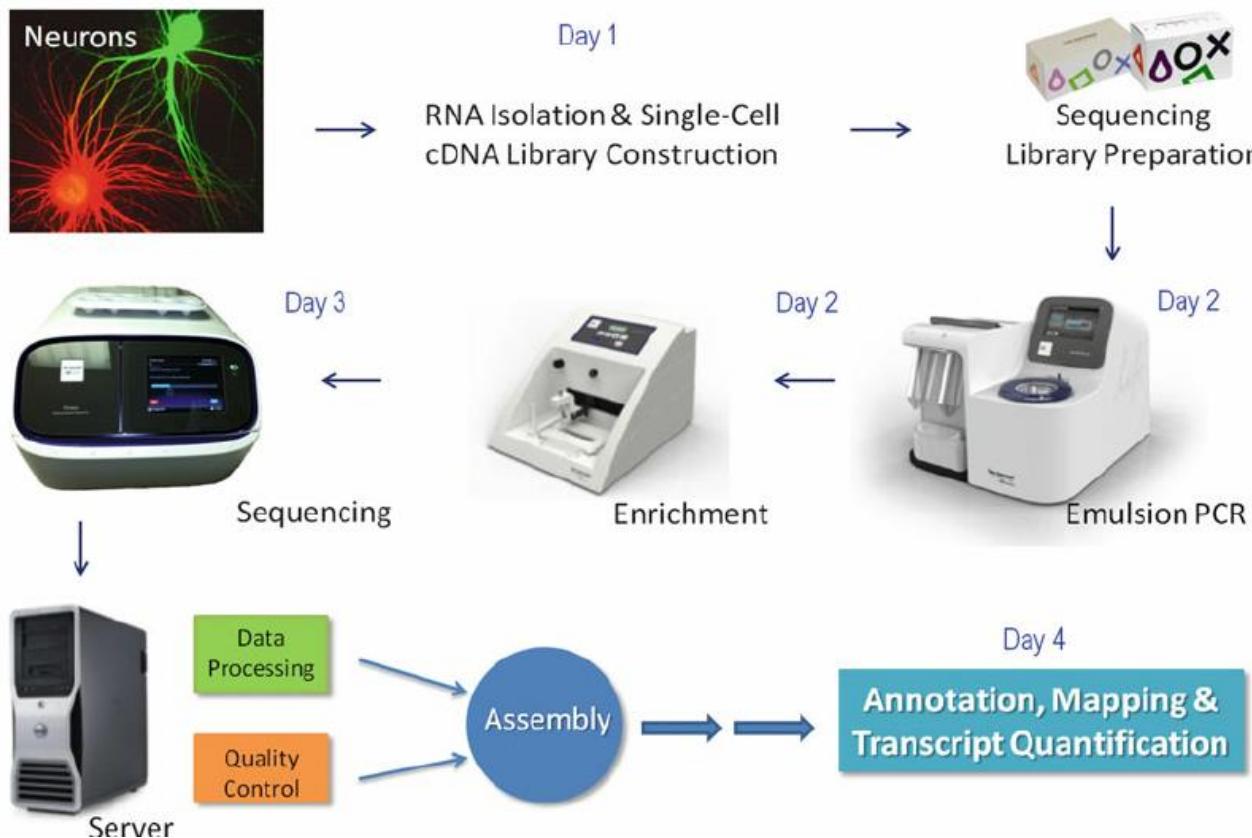
Plaque 384 puits

#### 1. Détection des ARN.

##### c. Autres méthodes - Le RNAseq

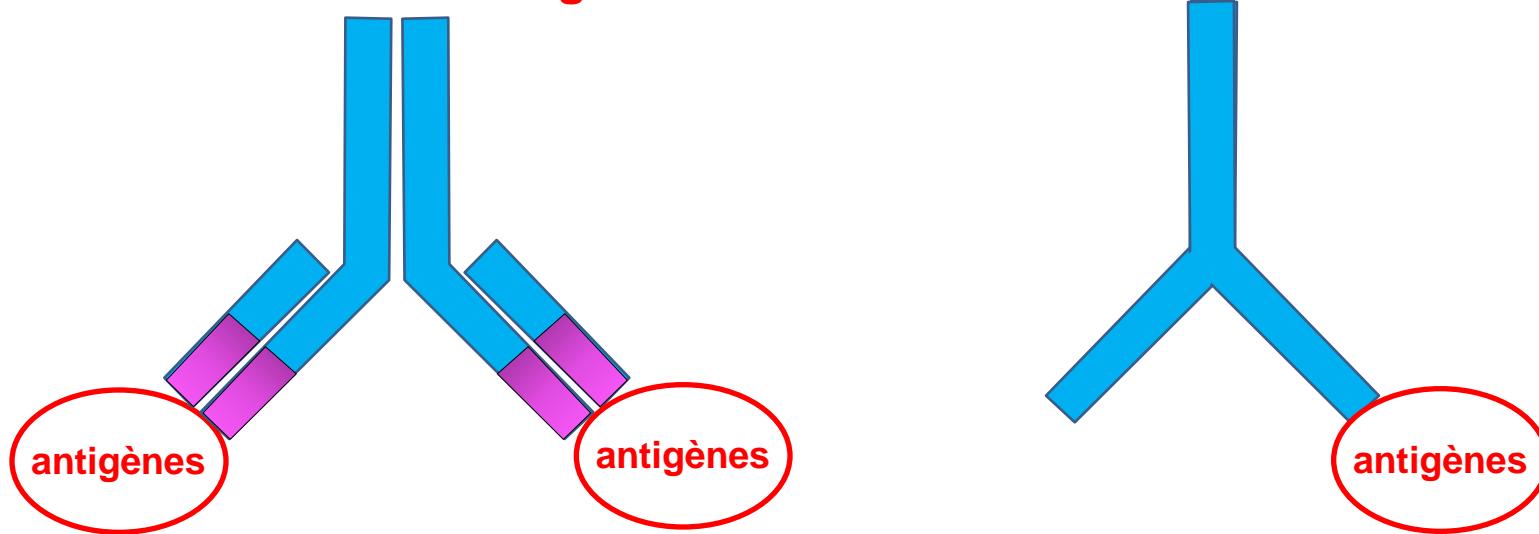


#### Experimental Workflow for RNA-seq

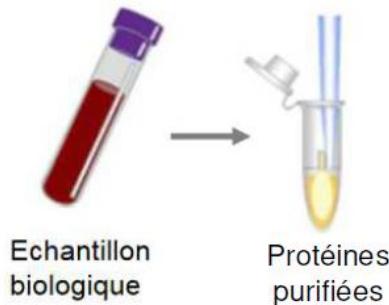


#### 1. Détection des Protéines. a. Le western-blot

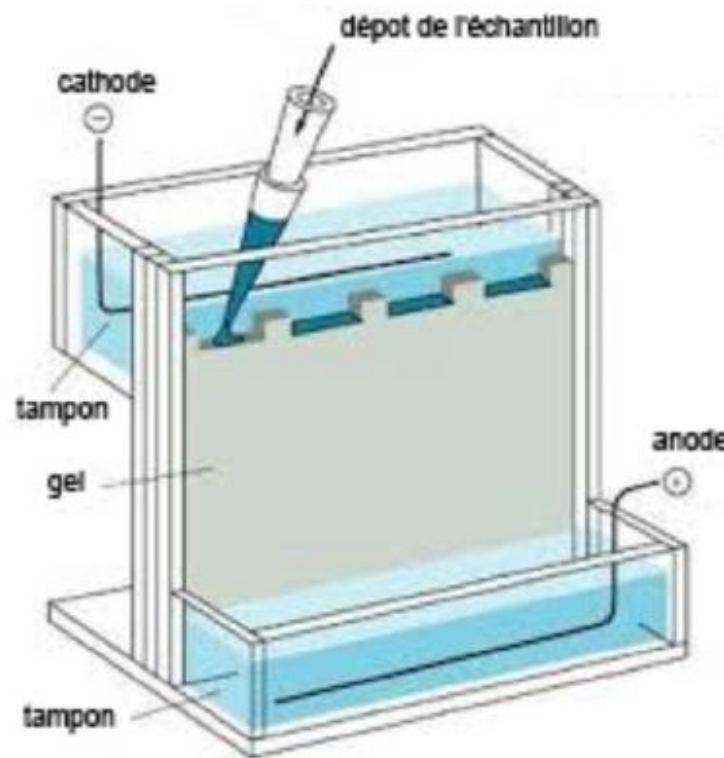
Les anticorps sont produits par l'organisme  
– il reconnaissent des antigènes



### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



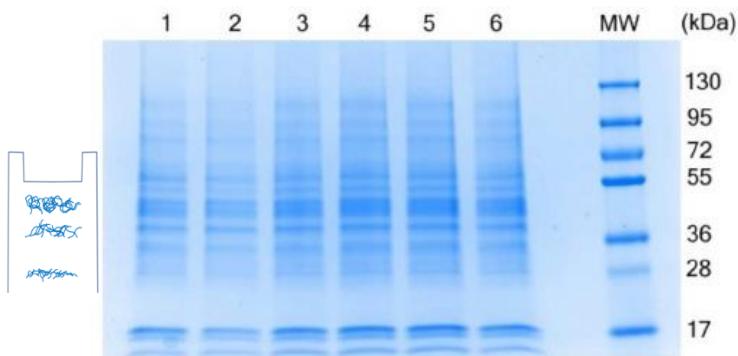
Préparation des protéines



Séparation des protéines (en fonction de leurs tailles)  
par électrophorèse sur **gel de polyacrylamide**

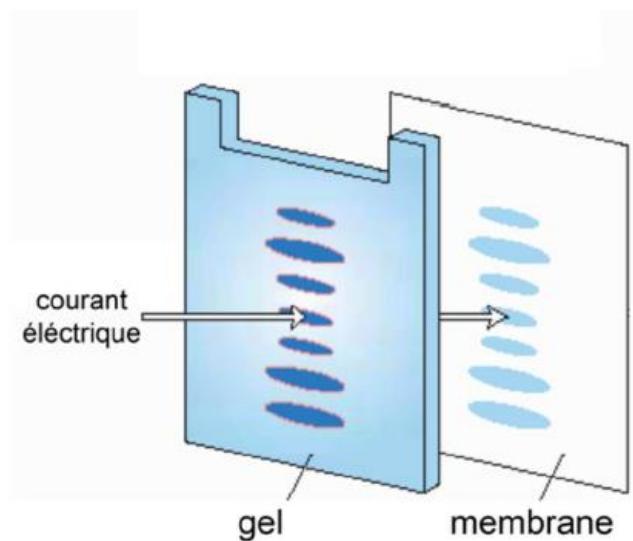
SDS (déturgent  $-$ )

### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



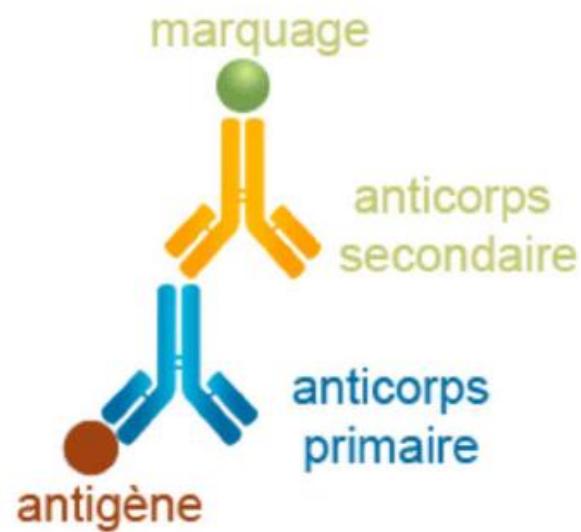
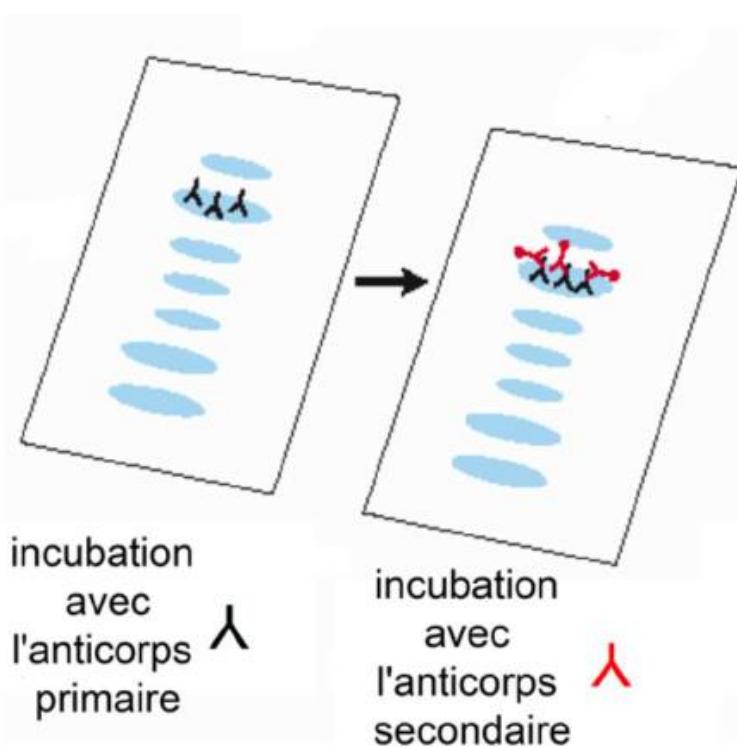
séparation des protéines en fonction  
de leur masse moléculaire

Coloration des protéines ([Bleu de Commassie](#))



Transfert des protéines sur membrane

### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

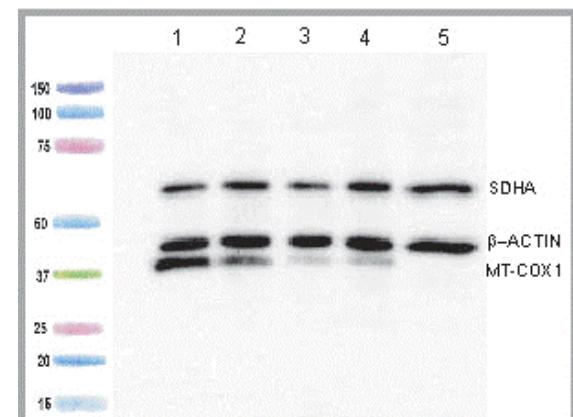
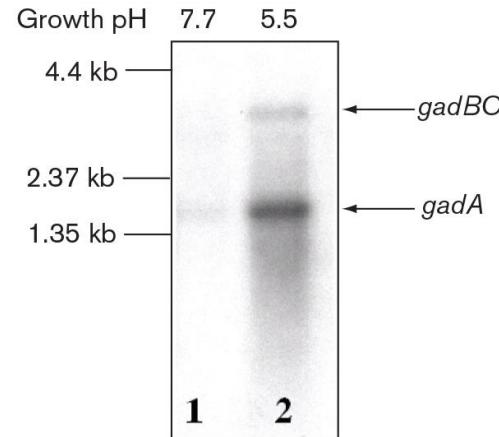
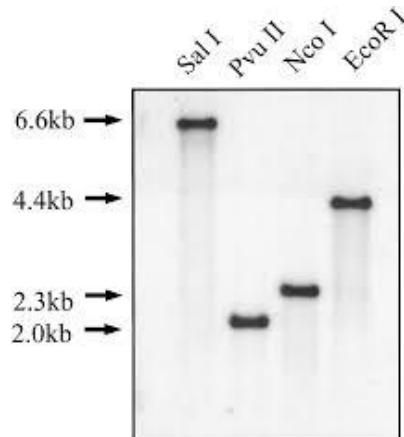


## SOUTHERN

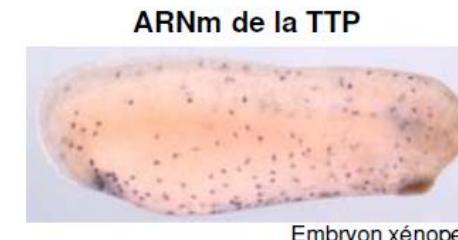
## NORTHERN

## WESTERN

	SOUTHERN	NORTHERN	WESTERN
Digestion			
Séparation sur gel de? (en fonction de la taille)			
Transfert sur			
Hybridation avec			
Révélation du marquage			



#### Utilisation de sonde ADN pour détecter des ARN *in vivo*



#### Utilisation d'anticorps pour détecter des protéines *in vivo*

