

# UE1 Bases fondamentales et méthodologiques en Biologie Cellulaire et Moléculaire

## Sujet 1 C Gautier-Courteille (1h 20pts)

Répondez aux questions de façon structurée et synthétique.

### Question 1

Vous cherchez à caractériser l'expression de 2 gènes distincts Xnrt1 et Xnrt2 impliqués dans le développement embryonnaire du cerveau de la souris.

En première analyse vous réalisez des expériences de **RT-PCR quantitatives en temps réel** en utilisant la chimie Sybr Green sur le cerveau embryonnaire entier de souris et obtenez les résultats suivants :

|                           | Ct GAPDH | Ct Xnrt1 | Ct Xnrt2 |
|---------------------------|----------|----------|----------|
| Valeur 1 de l'échantillon | 19,56    | 29,75    | 22,34    |
| Valeur 2 de l'échantillon | 19,55    | 29,79    | 22,39    |
| Valeur 3 de l'échantillon | 19,58    | 29,74    | 22,33    |

- Qu'est ce que le Ct (threshold cycle) ? à quoi sert il? (4lignes)
- A votre avis à quoi correspondent les valeurs 1,2,3 ? Quel est leur intérêt ? (2 lignes)
- Pourquoi est il important de mesurer le Ct de GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) (2 lignes)
- Interprétez les résultats obtenus quant à l'expression des gènes Xnrt1 et Xnrt2 dans l'embryon de souris. (3 lignes)

Vous désirez ensuite détecter par **hybridation in situ** l'expression de ces 2 gènes sur une coupe histologique de cerveau de souris. Ceci afin de déterminer la localisation tissulaire et cellulaire de chacun des ces deux gènes. Vous disposez des réactifs suivants :

- Sonde ARN Sens Xnrt1 marquée à la DIG
- Peroxydase Biotinylée
- Sonde ARN Anti-Sens Xnrt1 marquée à la DIG
- Anticorps Anti-DIG marqué à la Phosphatase alcaline
- Sonde ARN Anti-sens Xnrt1 marquée à la Fluorescéine
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DAB
- Anticorps Anti-DIG marqué à la Biotine
- Anticorps anti-Fluorescéine marqué à la Biotine
- Sonde ARN Anti-Sens Xnrt2 marquée à la Biotine

- j) Avidine
- k) Sonde ARN Sens Xnrt1 marquée à la Fluorescéine
- l) NBT/BCIP
- m) Sonde ARN Sens Xnrt2 marquée à la DIG
- n) Phosphatase alcaline biotinylée
- o) Sonde ARN Anti-Sens Xnrt2 marquée à la DIG

- En vous basant sur les résultats obtenus par **RT-PCR quantitative**, quels réactifs choisiriez vous au sein de cette liste pour visualiser de façon optimale et différencier sur la même coupe histologique l'expression des ces deux gènes? La détection des deux types d'ARN doit se faire de façon concomitante et non successive. Vous ne pouvez utiliser qu'une seule fois chaque réactif. Il est conseillé d'illustrer votre réponse pour chaque gène à l'aide d'un **schéma**.

- Quels contrôles négatifs développeriez vous afin de vous assurer de la spécificité des marquages obtenus? (2 lignes)

- Au cours du protocole d'hybridation in situ, après avoir fait agir vos sondes ARN spécifiques de Xnrt1 et Xnrt2 vous devez réaliser des lavages afin d'éliminer tout ce qui ne s'est pas fixé spécifiquement. Pour augmenter la stringence de vos lavages comment feriez vous varier les 2 paramètres suivants : Température et Concentration en sels (type Na+) de la solution de rinçage? Il vous est demandé d'argumenter votre réponse. (4 lignes)

## Question 2

- Quel est l'intérêt de la technique d'Hybridation in situ dans le cadre du dépistage du cancer du col de l'utérus par rapport aux examens histomorphologiques traditionnels? (5 lignes)

- Dans un cadre plus général, en anatomo-pathologie, quels sont les autres avantages que peut conférer la technique d'hybridation in situ par rapport à l'immunohistochimie? (4 lignes)