

UE 11 : Analyse moléculaire du matériel génétique

Fiche 1 tut rentrée

I/ Clonage moléculaire

But : Obtenir un grand nombre de copies identiques absolument **pures** d'une séquence donnée d'ADN. Permet donc de **séparer 2 populations d'ADN** (*ADNc WT et ADNc muté = les 2 allèles de la mère*)

Principe :

- 1- Intégrer un fragment d'ADN (=Insert) dans un vecteur
- 2- Introduire le vecteur dans une cellule hôte (bactéries)
- 3- Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens
- 4- Obtenir un fragment d'ADN **PUR** en grande quantité pour le séquencer

1) Préparation de l'ADN recombinant

→ **ADN recombinant = vecteur + insert**

Vecteur =

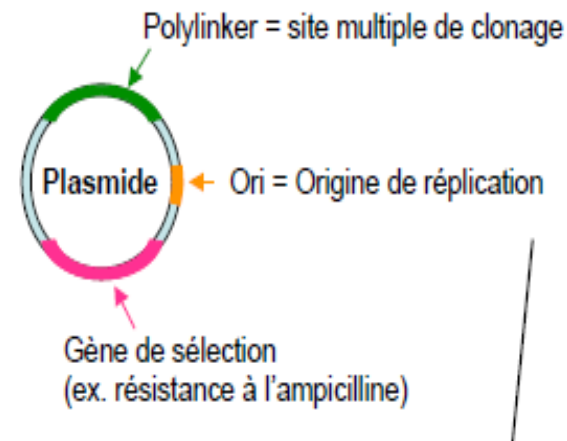
- ✓ ADN circulaire double brin capable de réplication autonome indépendante de l'ADN de la cellule hôte (= réplication épisomale)
- ✓ ADN de taille réduite qui permet l'insertion d'un fragment d'ADN étranger
- ✓ ADN qui possède des gènes de sélection permettant de sélectionner les cellules hôtes qui ont intégré le vecteur

2 grandes catégories de vecteurs :

- ✓ **les vecteurs de clonage** : destinés à **ISOLER** physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et à amplifier le nombre de copies de cet ADN (que nous allons détailler ci-après).
- ✓ **les vecteurs d'expression** : destinés à transférer un gène dans une cellule hôte eucaryote pour étudier la pathogénicité d'une mutation, par exemple.

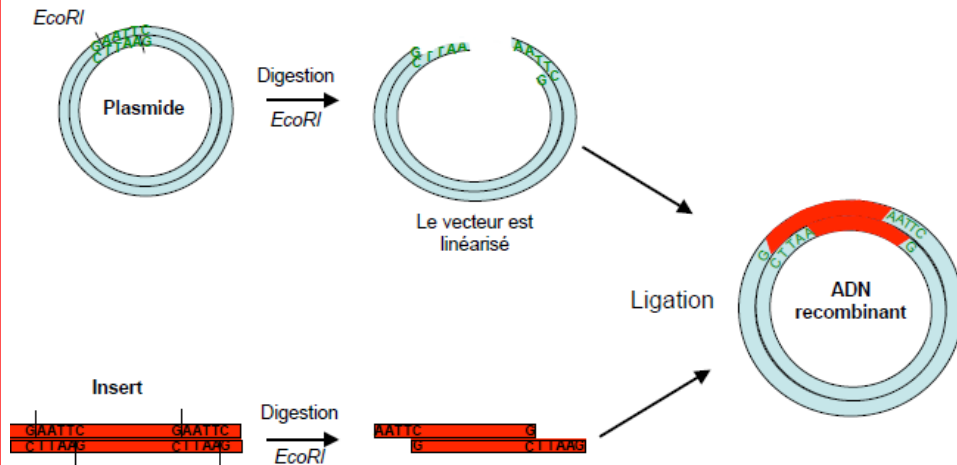
☛ **Ils existent différents vecteurs qui varient en fonction de la taille de l'insert qu'on souhaite y insérer.**

3 caractéristiques du vecteur :



Site de multiclonaage = polylinker dont on connaît parfaitement la séquence, « on sait où coupe précisément chaque enzyme de restriction »
Origine de réplication = qui lui permet de se multiplier dans la bactérie et indépendamment de celle-ci
Gène de sélection = de résistance à un antibiotique

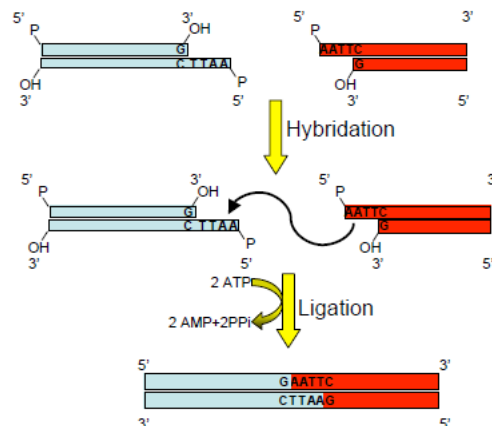
→ préparation du vecteur (ici un plasmide) + de l'insert digérés par des enzymes de restrictions



→ Ligation vecteur + insert par la **T4 DNA ligase**

- l'ADN n'est pas fait pour être simple brin ; hybridation par complémentarité lorsque le vecteur ET l'insert présentent des extrémités cohésives (contraire d'extrémités franches), et ceux avant l'action de la ligase.

- de préférence, on utilise le même type d'enzymes de restrictions sur le vecteur et sur l'insert pour avoir les mêmes extrémités franches ou cohésives

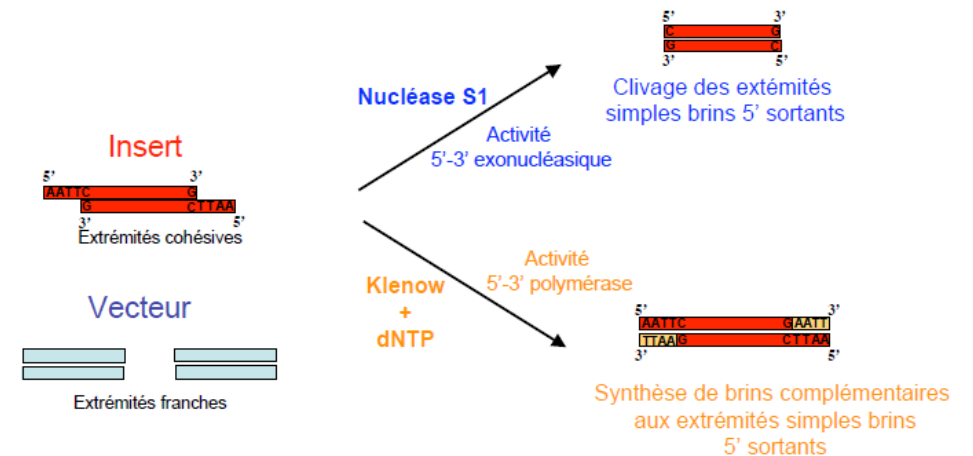


Problème : La ligase referme indifféremment le vecteur avec ou sans insert

Solutions : Étape de déphosphorylation du P en 5' nécessaire avant la ligation de fragments d'ADN clivés par des d'enzymes de restriction qui génèrent des extrémités franches

But : que la ligase n'est plus le choix entre refermer le vecteur sur lui-même ou avec l'insert,

→ Stratégie de clonage si le vecteur et l'insert ne présente pas le même type d'extrémités : (action de la **nucléase S1** ou la **Klenow + dNTP**)

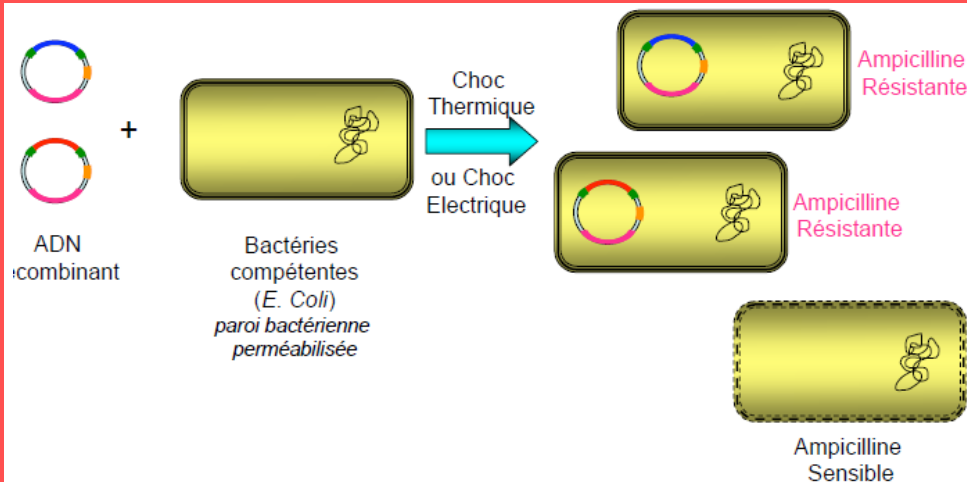


Au final : on considère qu'un seul produit PCR a été incorporé dans le vecteur
 > soit l'allèle sauvage (WT)
 > soit l'allèle muté (variant d'épissage)

2) Introduire le vecteur dans une cellule hôte

Si la cellule hôte est une bactérie, on appelle ça une **TRANSFORMATION** :
 → PERMÉABILISATION de la membrane par choc thermique, électrique, ou chimique

Au final : on obtient des bactéries avec un seul type d'ADN recombinant = un seul produit PCR et également des bactéries non transformées (n'ayant pas intégré de plasmides et qui sont par conséquent sensibles à l'antibiotique)



3) Sélection des clones bactériens (1) :

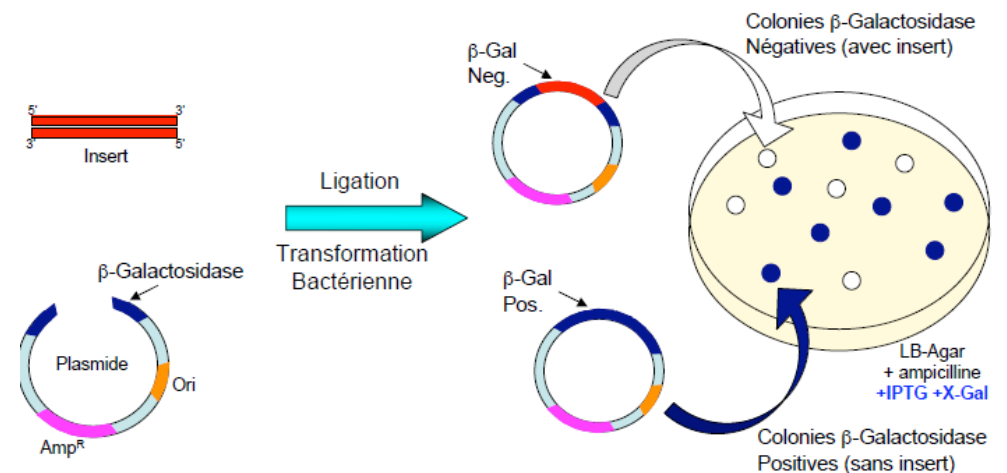
- ✓ Étalement sur boîte de pétri contenant une gélose (=substance nutritive) et un antibiotique (*ex : ampicilline*)
- ✓ L'antibiotique permet de discriminer les bactéries ayant intégrées notre ADN recombinant (vecteur + insert) des autres
- ✓ En effet, le vecteur possède un gène de résistance à l'antibiotique

Au final : seul les bactéries ayant intégrées notre vecteur avec ou sans insert pourra proliférer et faire des colonies

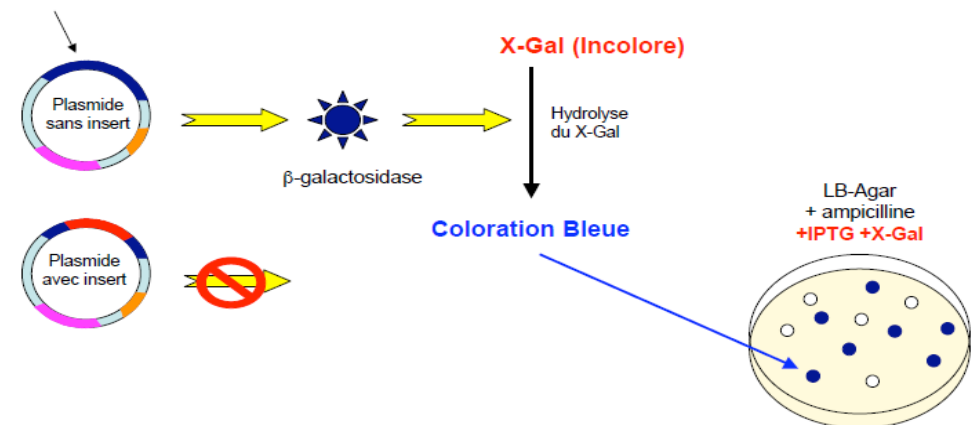
Problème : on n'a jamais 100 % d'insertion de l'insert, certains vecteurs se sont refermés sans l'insert malgré l'étape de déphosphorylation.

Solution : sélection blanc-bleue

- ✓ Polylinker en plein milieu d'un gène qui code pour la **B-Galactosidase**
- ✓ Si insertion de l'insert = coupure du gène en 2 = pas d'expression de la B-Galactosidase
- ✓ Si le vecteur se referme sur lui-même = gène de l'enzyme continue = expression de la B-Galactosidase



IPTG : Induit l'expression de la β-galactosidase

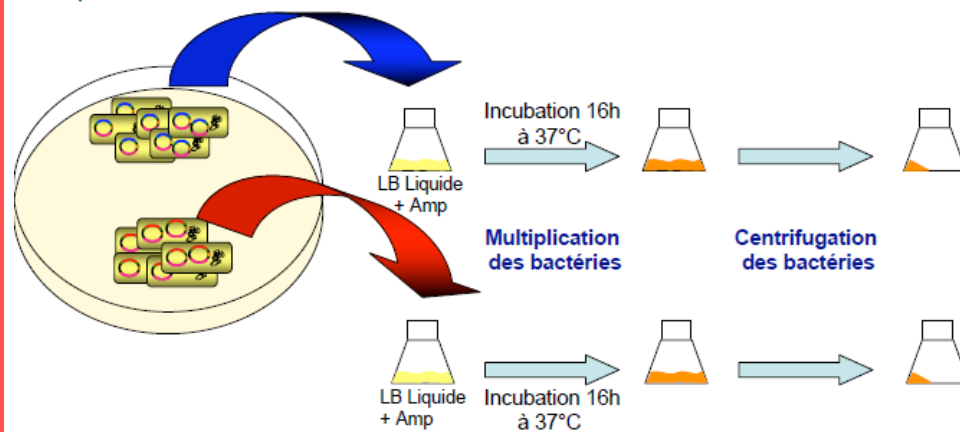


AVEC INSERT	SANS INSERT
gène B-Galactosidase inactivé	gène B-Galactosidase fonctionnel
X-Gal incolore non hydrolysé	X-Gal incolore hydrolysé colorant le milieu en bleu
= COLONIES BLANCHES	COLONIES BLEUES

3) Amplification clonale des clones bactériens (2) :

→ Chaque colonie est mise en culture dans un milieu liquide de culture afin de récupérer l'ADN pure dans chaque tube et l'amplifier par prolifération bactérienne.

Une colonie est mise en culture dans un milieu liquide de culture adapté à la croissance bactérienne



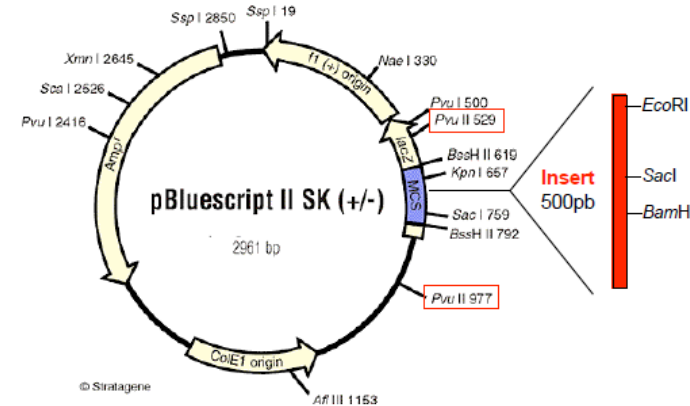
4) Séquençage des fragments d'ADN PURE :

- ✓ On obtient un fragment d'ADN pur en grande quantité qu'on va pouvoir séquencer individuellement
- ✓ Pour cela, on procède d'abord à :
 - à l'extraction de l'ADN recombinant
 - les ADN recombinants purifiés sont analysés par digestion enzymatique = réalisation de sa **CARTE DE RESTRICTION** afin de **VERIFIER QUE LE PLASMIDE CONTIENT L'INSERT.**

Carte de restriction = cartographie d'un vecteur dont on connaît parfaitement la séquence

MCS = site de multiclonaage = polylinker = lieu d'insertion de l'insert

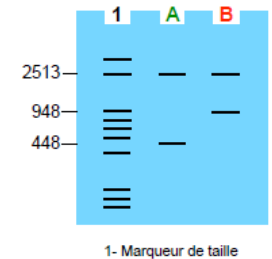
Les ADN recombinants purifiés sont analysés par digestion enzymatique: réalisation de sa carte de restriction.



Digestion PvuII:

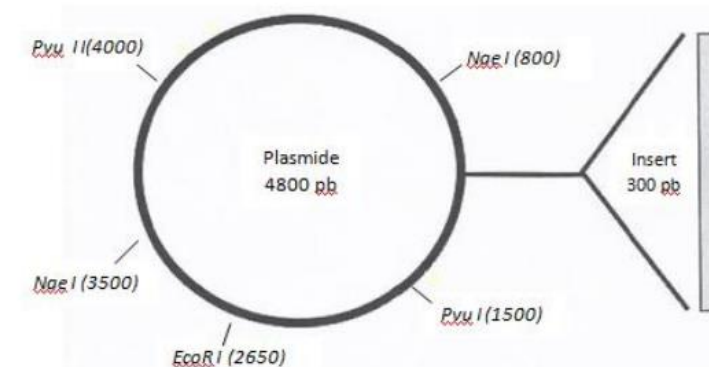
A- Plasmide sans insert:
977-529 = 448 bp

B- Plasmide avec insert:
977-529 = 448 bp
+ 500bp = 948bp



Application sous forme de QCM :

QCM 1 : Vous réalisez une carte de restriction pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert. La carte de restriction est schématisée ci-dessous.



Après digestion enzymatique avec l'enzyme Nae I, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose ? Donner la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide avec insert : 2700pb + 2100pb
- B) Plasmide avec insert : 2700pb + 2400pb
- C) Plasmide sans insert : 3000pb + 2100pb
- D) Plasmide sans insert : 2700pb + 2400pb
- E) Aucune de ces réponses n'est correcte

Méthode de résolution :

Taille du fragment entre Nae I et Nae I sans l'insert :

$$3500 - 800 = 2700 \text{ pb}$$

Taille du reste du plasmide :

$$4800 - 2700 = 2100 \text{ pb}$$

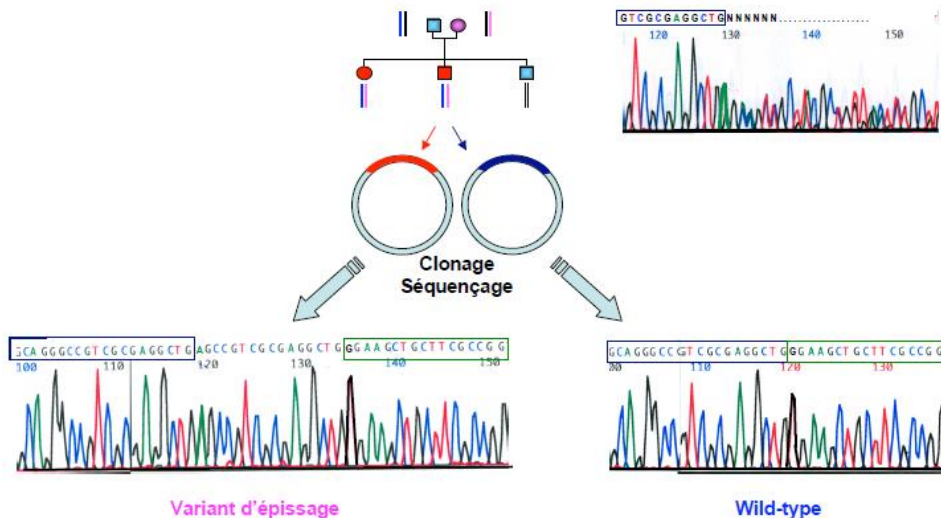
Taille du premier fragment avec l'insert :

$$2700 + 300 = 3000 \text{ pb}$$

Correction : E

Plasmide avec insert : 3000pb + 2100pb

Plasmide sans insert : 2700pb + 2100pb

→ Vérification de l'insert par séquençage :CONCLUSION :

- ✓ Au départ, on avait un séquençage illisible car superposition du séquençage de l'allèle sauvage et du variant d'épissage
- ✓ Après clonage, on a séparé nos 2 produits PCR qui venaient des 2 allèles de la mère (WT=sauvage et variant d'épissage=muté)
- ✓ Après séquençage de nos allèles, on a identifié très clairement la partie de l'intron insérée = variant d'épissage = impact sur l'ARNm et donc sur la protéine
- ✓ Donc une mutation dans une région introniques peut avoir un impact sur la protéine qui est alors dysfonctionnelle
- ✓ Tandis que dans le séquençage wild type on retrouve la jonction exon6-exon7 (pas d'intron inséré entre ces 2 exons)