



LE CLONAGE MOLECULAIRE

→ Principe appliqué au syndrome de Wolfram

!/ \ On suspecte un syndrome de Wolfram chez un enfant face à un tableau clinique suspect (diabète, atrophie optique, surdité, troubles neurologiques). C'est une maladie génétique autosomique récessive caus e par un dysfonctionnement de la protéine wolframine cod e par le gène WFS1 qui est alors mutée. Ce gène est composée de 8 exons (= séquence codante d'un gène), dont le premier se trouve avant le codon start.

Pour poser le diagnostic, on va **DANS UN PREMIER TEMPS** :

→ Réaliser 7 PCR-séquençage des 7 EXONS du gène après extraction de l'ADN de l'enfant malade. On n'amplifie, ni ne séquence le premier exon car étant avant le codon start, une mutation à son niveau n'aura pas de conséquence sur la protéine car il ne sera pas traduit (sauf exception, on va toujours du plus simple au plus compliqué à).

But ? Trouver les 2 mutations responsables de sa maladie.

 Probl me :

- on ne trouve qu'un seul allèle mutée (c.1672C>T) → l'allèle paternel. L'allèle maternel semble sain.
 - Or le syndrome de Wolfram étant une maladie autosomique récessive, **pour être malade l'individu doit avoir les deux allèles de son gène WFS1 mutés !**
- **Où est la mutation sur l'allèle maternel ?**

 Hypoth se :

N'ayant amplifié / séquencé dans un premier temps que les EXONS, cela suggère que la mutation maternelle se trouverait au niveau d'un **INTRON** (=s quence non codante et normalement excisée lors de la maturation de l'ARN par l'épissage).

On émet l'hypothèse que l'allèle maternelle présente un variant d'épissage suite à une mutation au niveau de l'intron ayant crée un site cryptique d'épissage (= site à l'origine de l'insertion anormale d'un ou d'une partie d'un intron, ou de l'excision anormale d'un ou d'une partie d'un exon au niveau de l'ARNm)

→ **Comment trouver la mutation sur l'allèle maternel ?**

 Solution : Si notre hypothèse est juste, il y aura forcément une **CONSEQUENCE SUR L'ARNm** qui sera alors plus long ou plus court. Donc  a ne sert à rien de faire une PCR-séquençage des introns du gène car d'une ce serait trop long avec une quantité pharaonique de donnée à traiter (séquence codante = que 5% du génome), et de deux comment distinguerai-t-on une mutation intronique silencieuse (= pas de conséquence sur l'ARNm et donc sur la protéine), de la mutation à l'origine du site cryptique d'épissage et donc de la maladie.

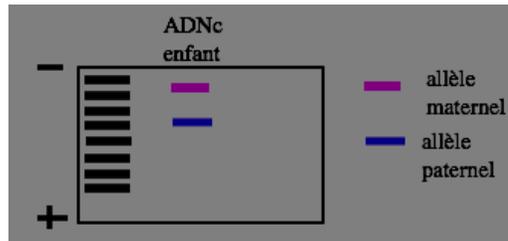
Le seul moyen de voir ce type de mutation est donc de travailler à partir de l'ARNm. Pour cela, on extrait l'ARN des cellules de notre enfant malade.

Or : on ne peut pas réaliser de PCR-séquençage directement sur l'ARNm (++ instable/fragile). Il faut repasser au niveau de l'ADN

Rôle de la Reverse Transcriptase : passage d'un ARNm simple brin à un ADNc simple brin. Cet ADNc est le strict complémentaire de l'ARNm.

→ Réalisation d'une PCR de cet ADNc

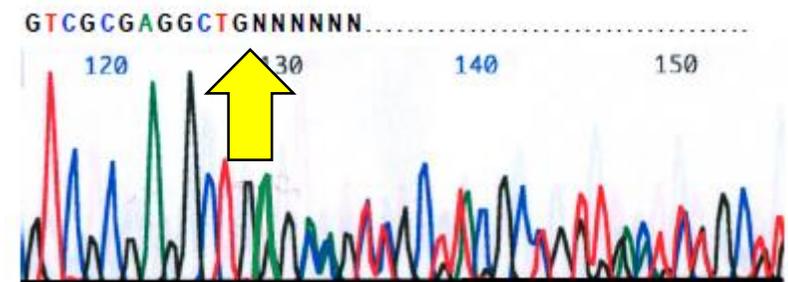
→ Réalisation d'une migration électrophorétique du gène WFS1 sous forme d'ADNc :



- ✓ 1 fragment de taille + importante (allèle maternel=ADNc muté)
- ✓ 1 fragment de taille normale (allèle paternel=ADNc normal).
- / ! \ L'allèle paternel est bien muté mais pas pour une mutation d'épissage (mutation ponctuelle c.1672C>T).
- ✓ L'allèle maternel migre moins loin car plus lourd.
- On est donc ici dans le cas où il y a eu insertion d'un intron au niveau de l'ARNm.
- ✓ L'enfant est **HETEROZYGOTE** pour la mutation intronique

→ Réalisation d'un séquençage de l'ADNc de l'enfant (= les 2 allèles) pour enfin trouver la mutation et avoir la séquence de l'intron inséré :

⊗ **Problème :** Le séquençage est ILLISIBLE ! On arrive à lire ce qui est commun aux 2 ADNc puis à partir de la jonction exon6/7, c'est le fouilli on n'arrive plus à déterminer quel nucléotide appartient à quel séquence.



→ Comment déterminer la séquence nucléotidique de ce morceau d'INTRON muté?

⊙ **Solution : LE CLONAGE MOLECULAIRE**

→ Il permet de séparer 2 populations et d'obtenir un grand nombre de copies identiques absolument purs d'une séquence d'ADN donnée

But ? Séparer ces deux allèles pour pouvoir les **séquencer individuellement**, et ainsi déterminer la séquence de l'insertion intronique > au niveau de l'allèle maternel

1) Préparation de l'ADN recombinant (=vecteur +insert)

- **DIGESTION** vecteur (plasmide) + insert (allèle maternel ou allèle paternel) par la même **enzyme de restriction** de façon à ce que l'insert s'hybride par complémentarité au plasmide.

- **LIGATION** par la **T4 DNA ligase** (enzyme qui permet de refermer le plasmide)

⚡ Malgré l'action préalable de la **phosphatase** sur le vecteur, il arrive qu'il se referme sans avoir intégré d'insert.

→ On obtient **3 types d'ADN recombinant** :

Plasmide avec ADNc maternel	Plasmide avec ADNc paternel	Plasmide sans insert
------------------------------------	------------------------------------	-----------------------------

2) Transformation bactérienne

Plasmides (avec ou sans insert) + Bactéries + choc thermique/électrique → **1 seul type d'ADN recombinant par bactérie**

🔴 Certaines bactéries n'auront pas intégré d'ADN recombinant.

→ On obtient **4 types de bactéries** :

Bactérie avec plasmide + insert maternel	Bactérie avec plasmide + insert paternel	Bactérie avec plasmide sans insert	Bactérie vide
--	--	---	---------------

3) Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens

Objectifs :

- se débarrasser des bactéries vides
- se débarrasser des bactéries ayant intégrés le plasmide **sans insert**

→ Sélection par Ampicilline :

On étale notre mélange de 4 types de bactéries sur une boîte de pétri contenant de l'ampicilline. Seules les bactéries ayant intégrées un plasmide prolifèrent, les bactéries vides meurent à cause de l'antibiotique.

Acteur : les vecteurs possèdent un gène de sélection, ici notre plasmide a un gène de résistance à l'antibiotique ampicilline

Résultat : **bactéries + plasmide** (avec insert **maternel/paternel** ou sans insert) = **prolifèrent** // **bactéries vides = meurent**

→ Sélection blanc/bleue :

Notre boîte de Pétri contient aussi du IPTG et du Xgal, ce qui va nous permettre de différencier les bactéries ayant intégrées un plasmide avec insert, de celles ayant intégrées un plasmide sans insert.

Acteur: **gène codant pour la B-galactosidase** (au niveau du site de multiclonaage=polylinker du plasmide) qui **dégrade le X-gal en un produit bleue**. Si l'insert est intégré = mise KO du gène = pas de produit bleue = colonies BLANCHES.

Résultat: **bactéries avec plasmide avec insert = BLANCHES** // **bactéries avec plasmide sans insert = BLEUES**

4) Amplification clonale + extraction + séquençage

On sélectionne donc les colonies blanches !!

Les colonies blanches sont la conséquence de la prolifération de **2 types de bactéries** :

Bactérie avec plasmide + insert maternel
Bactérie avec plasmide + insert paternel

☝ A ce stade, on ne distingue pas les colonies avec l'insert paternel, des colonies avec l'insert maternel = toutes les 2 blanches.

→ En revanche, on a bien séparé ces 2 populations ! En effet, 1 bactérie donnée n'intègre qu'un ADN recombinant, qui lui-même n'a intégré qu'un unique insert (1 des 2 allèles). Cette bactérie en proliférant va être l'origine d'une seule colonie, dite PURE.

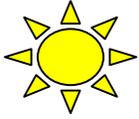


1 colonie = 1 type d'insert

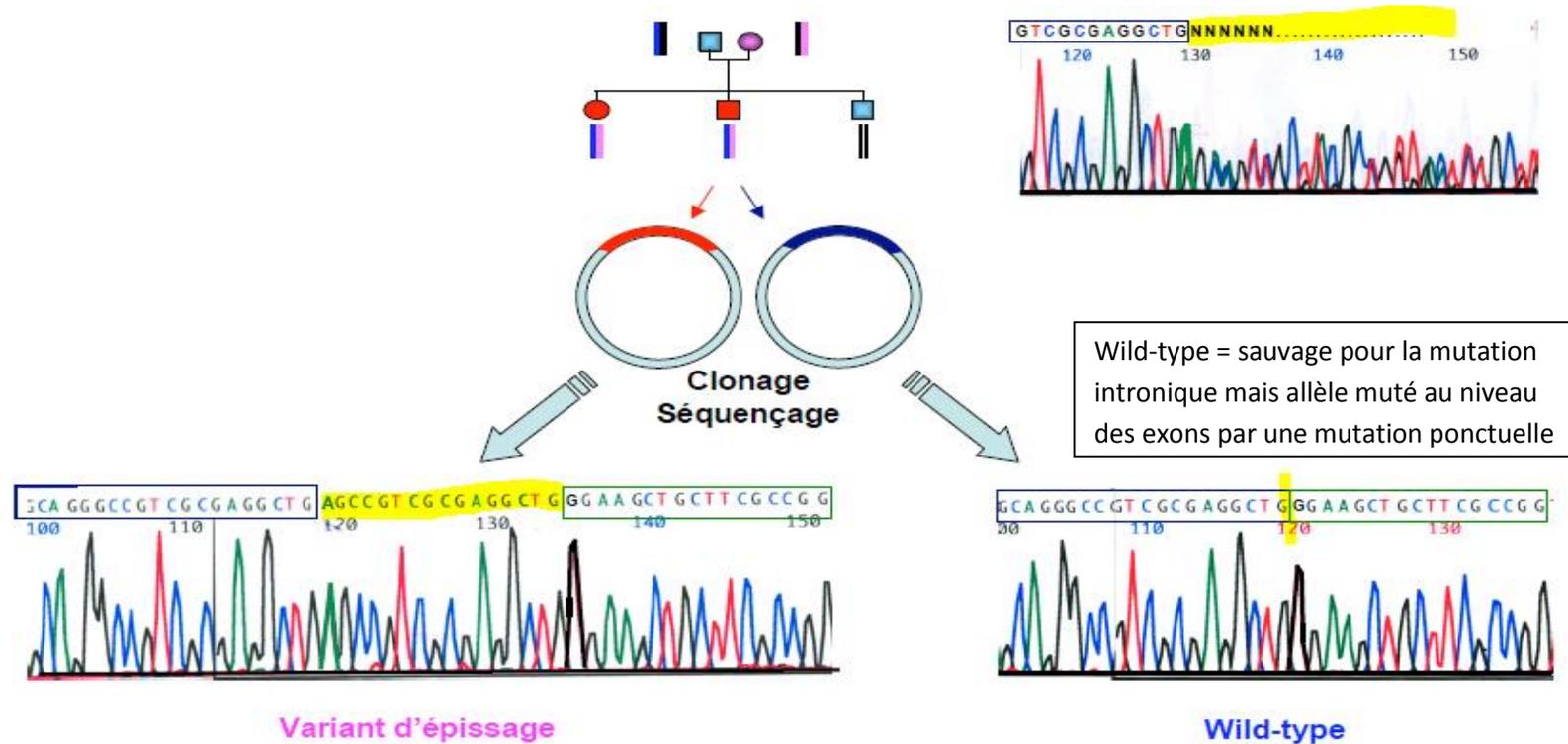
- **Amplification clonale** : on prélève minutieusement 1 colonie blanche par tube contenant un milieu de culture liquide avec ampicilline = multiplication des bactéries (incubation 16h à 37°C). On répète l'opération x fois de manière à être sûr d'avoir sélectionné au moins une fois chaque type de bactéries et donc chacun des 2 inserts car on est incapable de dire quel type de colonie on a prélevé. Puis on centrifuge chaque tube séparément pour récupérer les bactéries qui seront alors dans le culot.
- **Extraction de l'ADN recombinant en vue d'un séquençage** : Lyse alcaline des bactéries > Neutralisation > Précipitation de l'ADN plasmidique qui se trouve dans le surnageant ☹ (dans le culot c'est protéine + ADN bactérien).
- **Réalisation d'une carte de restriction** : on va digérer notre plasmide avec une enzyme de restriction pour vérifier qu'il a bien intégré l'insert (si sélection blanc-bleue non faite ou défectueuse...).

☝ Maintenant qu'on est bien sûr d'avoir récupéré des plasmides ayant intégrés les produits PCR = insert = ADNc papa ou maman, il va falloir savoir si c'est le produit PCR de l'allèle maternel ou paternel. Et on ne le sait qu'à l'étape du séquençage (on verra bien qu'un des 2 séquençages sera plus long = ADNc maman = variant d'épissage qui avait migré moins loin durant l'électrophorèse préalable car plus lourd = insertion intronique, et qu'un autre aura une jonction exon 6/exon 7 directe = ADNc papa = pas d'insertion = avait migré plus loin car plus léger).

- **SEQUENCAGE** : dénaturation de l'ADN recombinant car circulaire > hybridation de l'amorce spécifique au début de l'insert (1 seule amorce dans le séquençage ≠ PCR 2 amorces encadrant la région d'intérêt du gène) > séquençage (cycle dénaturation-hybridation-élongation comme pour la PCR)



Grâce au clonage, le séquençage est désormais LISIBLE > on a séparément la séquence de l'**allèle maternel** (ayant le **variant d'épissage**) et la séquence de l'**allèle paternel**. On a réussi à identifier la séquence nucléotidique de l'intron inséré (16 nucléotides en +).



Conclusion :

- ✓ Au départ = séquençage illisible car superposition allèle sauvage et variant d'épissage
- ✓ Après clonage = séparation des 2 produits PCR = 2 allèles de l'enfant (wild-type papa et variant d'épissage maman)
- ✓ On a pu grâce au clonage procéder à un séquençage des 2 allèles INDIVIDUELLEMENT
- ✓ On a obtenu 2 séquençage LISIBLES et on identifie très clairement la mutation = la partie de l'intron ajouté = variant d'épissage
- ✓ Tandis que dans le séquençage wild-type on retrouve une jonction exon6-exon7 directe