

UE11 – Méthodes d'étude et d'analyse du génome



Tut' Rentrée Cours 2 Techniques de clonage

I. Le clonage moléculaire

Le **séquençage** de l'ADN est la détermination de la succession des nucléotides qui le compose. Il nous permet de **lire la séquence** d'ADN et de connaître la position de chaque nucléotide de ce variant.

On peut ainsi **identifier** une mutation et **diagnostiquer** une éventuelle pathologie en séquençant directement la séquence du **gène concerné**.

Mais il existe certains cas où le résultat de ce séquençage est dans un premier temps **ininterprétable** et nécessitera l'utilisation de techniques complémentaires comme le **clonage moléculaire**, pour pouvoir tirer des **conclusions** et poser un **diagnostic**.

C'est ce qu'il peut se passer dans le cas de **certaines** patients atteints du **syndrome de Wolfram**.

A. Cas du syndrome de Wolfram

Les patients atteints présentent :

- **Une atrophie optique**
- **Une surdité**
- **Des troubles neurologiques** plus ou moins associés qui démarrent chez les enfants de façon précoce.
- **Un diabète insipide** (caractérisé par une élimination excessive d'urine. Le terme « **diabète insipide** » remonte à l'Antiquité, quand les médecins goûtaient les urines pour faire un diagnostic : l'urine très diluée du **diabète insipide** n'était ni sucrée ni salée).



Le gène responsable est **WFS1** qui **code** pour la **wolframine**, une protéine dont la fonction exacte est inconnue, elle a un rôle dans le **flux calcique**.

Il existe **deux types de mutations** du gène WFS1 :

- mutation par **substitution**
- **variant d'épissage**

La transmission du syndrome de Wolfram est autosomique récessive

Remarque : l'achondroplasie est une maladie autosomique dominante.

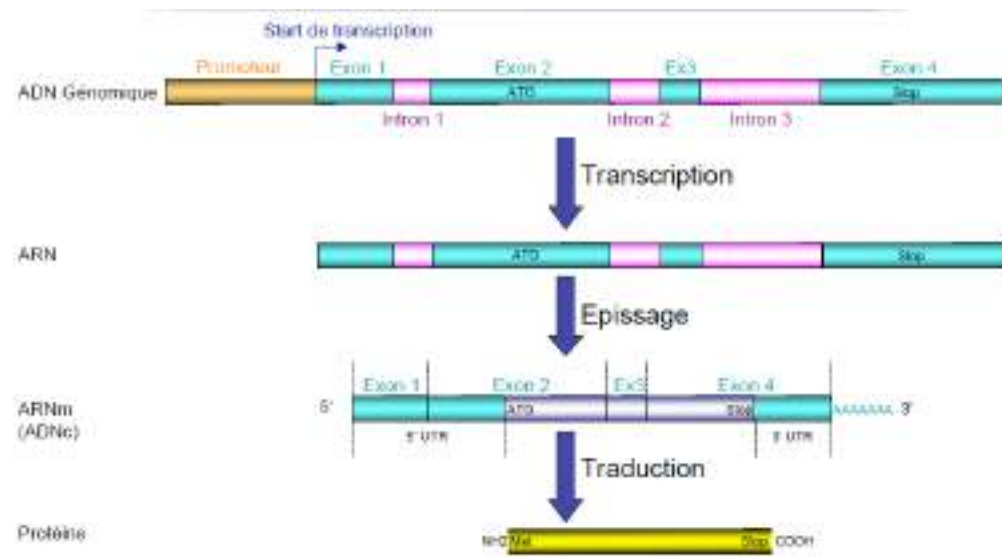
Rappel : - Dans le noyau, les gènes sont transcrits en ARN

- Les ARN sont ensuite maturés en ARNm après épissage
- Les ARNm sont exportés dans le cytoplasme
- Dans le cytoplasme, les ARNm sont traduits en protéines

1. Organisation d'un gène :

- Il y a une région **promotrice** (en amont), un codon **START** qui détermine la position du premier exon du gène, puis une succession d'**exons** et d'**introns**.
- La **traduction** de l'ARNm se fait à partir de l'**AUG** mais ce dernier n'est **pas forcément** situé dans les premiers nucléotides de l'**exon 1** !

En **amont** de ce codon il y a la région **5' UTR** et en **aval** du codon **STOP** il y a la région **3' UTR**. Ce sont des régions non codantes impliquées dans la **traduction** ou dans la **stabilité** de l'ARNm.



Pour faire un diagnostic, on séquence les **exons**. Nous ne sommes en règle générale pas encore capables d'interpréter des **variants** situés dans les **introns** ou dans les **régions 5'UTR/3'UTR**.

On ne séquence que les EXONS !

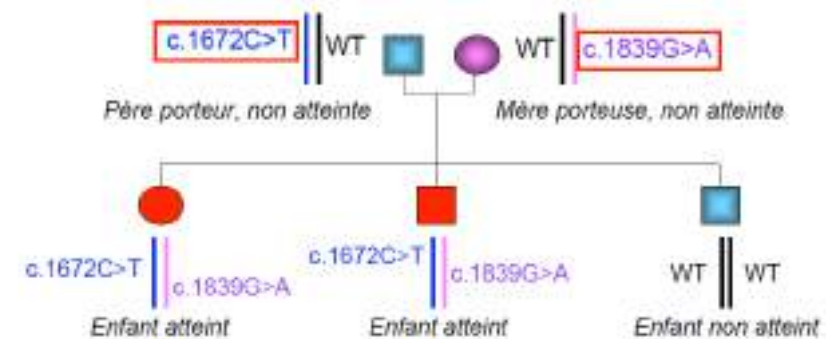
2. Recherche de mutations dans un gène :

Pour **diagnostiquer** le syndrome de Wolfram, il faut amplifier par PCR et séquencer les **exons** du gène WFS1 et éventuellement les **jonctions intron/exon** qui sont relativement bien caractérisées. On va cibler dans le gène les régions qui nous intéressent !

Le génome humain est **complètement séquencé** aujourd'hui, il est entièrement connu. On compare donc toujours nos résultats à une **séquence de référence**.

Remarque : les **mutations** dans les premiers nucléotides d'un **exon** ou d'un **intron** sont susceptibles de **modifier l'épissage** et donc la protéine !

3. Exemples de résultats : Famille A



Père : porteur de la **mutation 1672C>T** à l'état **hétérozygote**.

Mère : porteuse de la **mutation 1839G>A** à l'état **hétérozygote**.

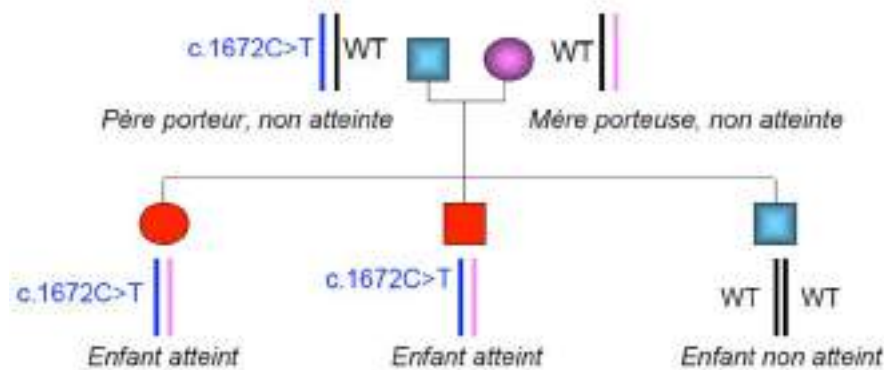
Enfants atteints : ce sont des **hétérozygotes composites**, c'est-à-dire qu'ils ont **deux allèles mutés différents**, deux variants hétérozygotes. Ils produiront donc au final **deux protéines anormales** codées par WFS1 et sont donc **atteints** du syndrome de Wolfram.

Diagnostic possible, cas le plus simple : mutation par substitution dans un EXON !

Dans ce cas précis on a réussi à identifier les variants pathogènes en séquençant les **exons** du gène **WFS1** car les mutations ponctuelles du père et de la mère sont situées dans un exon.

On peut donc poser un **diagnostic** de syndrome de Wolfram !

4. Exemples de résultats : Famille B



Père : porteur de la **mutation 1672C>T** à l'état **hétérozygote**.

Mère : a priori **aucune anomalie** n'a été trouvée après séquençage.

Le syndrome de Wolfram étant une pathologie **autosomique récessive**, il faut **deux allèles mutés** pour développer la maladie. Or, les enfants sont atteints, et on n'a identifié que la mutation du père, le séquençage des exons de la mère n'a révélé aucune mutation.

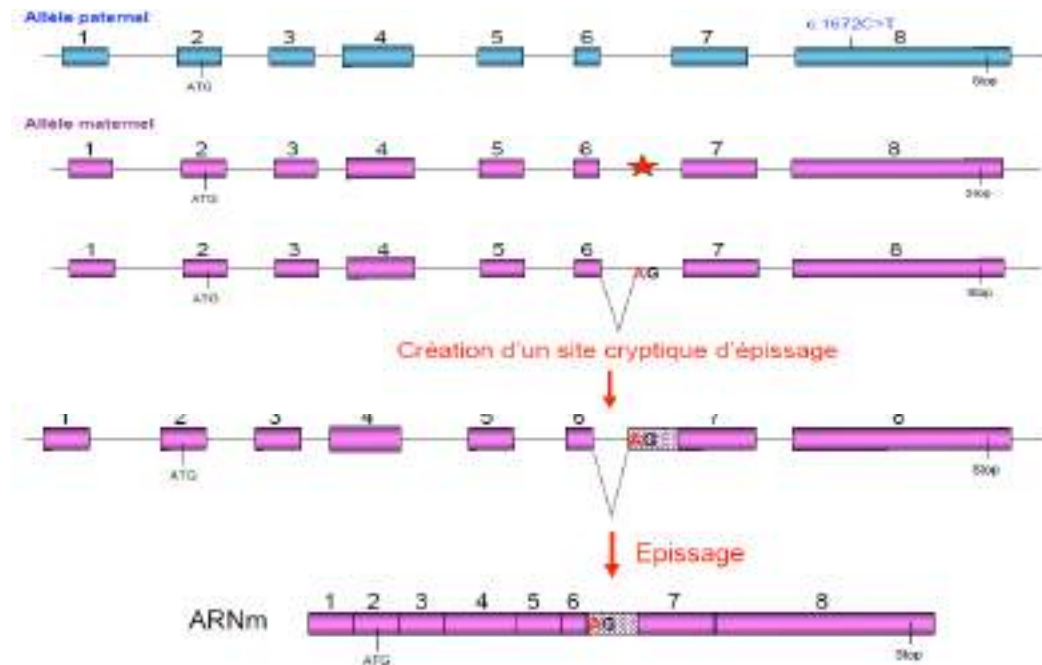
Remarque : le séquençage ne permet que de séquencer les **exons**, une mutation survenant dans un **intron** passera **inaperçue** !

L'hypothèse serait donc que le variant est présent dans les **régions introniques** du gène **WFS1**, car en amplifiant et en séquençant uniquement les exons **rien n'a été détecté** !

Mais alors que s'est-il passé ? Au milieu de l'intron, il y a eu création d'un **site cryptique d'épissage AG**: une variation de la séquence nucléotidique a créé un **site accepteur**.

Cette région qui était alors considérée comme un intron va **devenir codante** et modifier la jonction exon 6 / exon 7 de l'ARNm.

Ce dernier va être **rallongé** par une petite séquence, et cela aura forcément des **conséquences** lors de la **traduction**, donnant ainsi une **protéine (wolframine)** différente et anormale, **non fonctionnelle**.



5. Comment identifier les variants d'épissage ?

Pour identifier le variant d'épissage, on pourrait très bien **séquencer le génome complet** (et non pas que les exons comme on l'a fait jusqu'à présent). Mais le séquençage serait très long et de ce fait peu efficace.

L'autre possibilité est de travailler à partir des **ARNm** afin de séquencer directement ce qui est vraiment **exprimé chez le patient**, ce qui est plus rapide et plus logique.

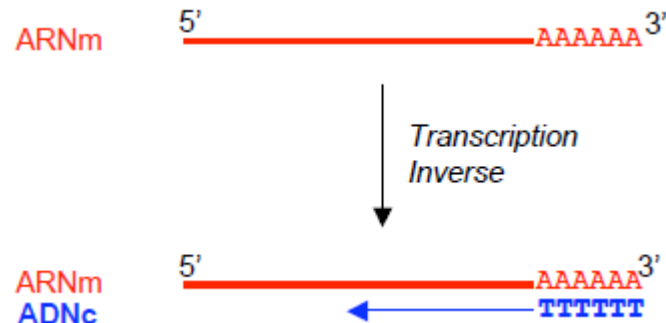
Étapes de l'identification des variants d'épissage :

- **1ère étape** : étude des ARNm : **transcriptase inverse**
 - mutation au niveau d'un **intron**
 - mutation détectée seulement à partir d'un **ARNm**

- utilisation d'une **transcriptase inverse** car les ARNm ne peuvent pas être amplifiés directement par PCR
- Copie de l'ARNm sous forme d'ADN

Transcriptase inverse :

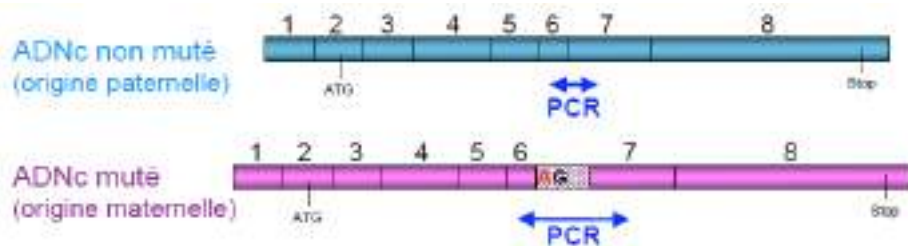
- **ADN polymérase** qui synthétise un brin d'ADN complémentaire (**ADNc**) en prenant un **ARN** comme **matrice** pour former un **hybride ADN/ARN**
- Activité **5'-3' polymérase** à partir d'une amorce d'ADN hybridée sur l'ARN
- Enzyme d'origine **virale**



Remarque : les **enzymes de restriction** et la **Taq polymérase** sont d'origine **bactérienne** !

Remarque 2 : un **ADNc** est une copie **complémentaire** de l'**ARNm** en **version ADN** !

- **2ème étape :** recherche de variants d'épissage : **électrophorèse**



Si on reprend l'exemple de la famille B, on a au niveau des allèles parentaux :

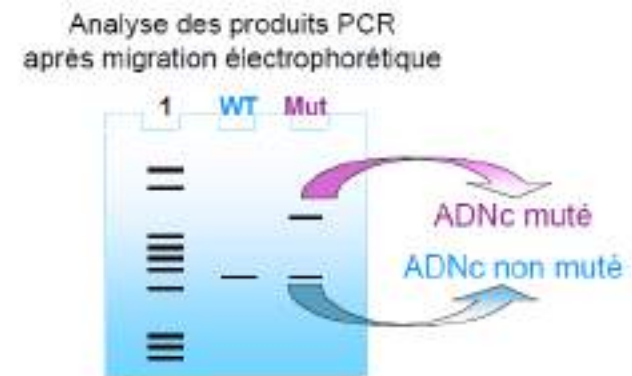
Allèle paternel : au niveau de l'épissage **rien n'a changé**.

Allèle maternel : entre l'exon 6 et l'exon 7, il y a eu rajout d'une **partie supplémentaire** après l'épissage.

Une fois qu'on a obtenu notre **ADNc** à partir des ARNm issus de la transcription du gène WFS1 grâce à la transcriptase inverse, on va devoir **amplifier** notre matériel génétique par **PCR**.

Lors de la PCR, on met une amorce sur l'exon 6 et une seconde sur l'exon 7. On analyse ensuite les produits PCR obtenus sur gel en faisant une **électrophorèse**.

On s'attend à obtenir un **fragment plus important** pour l'**ADNc** d'origine **maternelle** à cause de la présence du **variant d'épissage** qui **rallonge** la séquence de l'**ARNm**.



Concernant la migration électrophorétique ci-dessus :

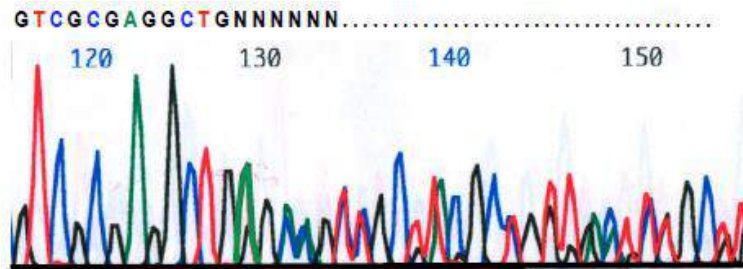
Piste WT (Wild Type) : correspondrait à la situation du **père**. La **mutation ponctuelle** 1672C>T au niveau de son exon 8 ne **modifie pas** la **taille** du fragment PCR car il s'agit juste d'une **substitution** de base.

Allèle maternel : correspondrait à la situation de la **mère** et des deux **enfants atteints** (le brin muté est plus lourd et migre moins loin).

○ **3ème étape** : identification de la mutation : **séquençage**

Si on veut identifier le variant d'épissage, on va faire un **séquençage** des produits PCR obtenus précédemment.

Mais on n'a pas d'autre choix que de séquencer nos **deux allèles simultanément** car les produits PCR sont mélangés !



A partir de la jonction exon6 / exon 7 (~ position 130) la séquence devient **illisible**, on a une **superposition** de **deux signaux**.

Ceci est dû au fait qu'on a un **mélange** de nos deux produits PCR de taille différente (à cause du variant d'épissage qui est plus long et qui décale la suite de la séquence). Ainsi, on a une **superposition** de la séquence de l'allèle paternel et de l'allèle maternel.

Il va donc falloir **séparer les deux populations** pour pouvoir les **séquencer individuellement** et déterminer le changement nucléotidique au niveau de l'intron. Pour cela, on va faire du **clonage moléculaire** !

B. Principe du clonage

Le but du clonage est d'obtenir un **grand nombre** de **copies identiques** et **absolument pures** d'une séquence donnée d'ADN.



Pour cela, on va utiliser des **vecteurs** (ADN circulaire double brin) dans lesquels on va insérer à chaque fois un seul fragment d'ADN appelé **insert** (notre produit PCR d'origine paternelle ou maternelle).

Ces vecteurs sont ensuite introduits dans des **bactéries**.

Le clonage moléculaire ne se fait qu'avec des cellules procaryotes (bactéries) !

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**.

C. Préparation de l'ADN recombinant

1. Vecteurs :

ADN recombinant = vecteur + insert

Un vecteur est un **ADN circulaire double brin** capable de **réplication autonome** indépendante de l'ADN de la cellule hôte. Il permet l'insertion d'un **fragment d'ADN étranger** et il possède des **gènes de sélection** conférant un avantage à la bactérie et permettant ainsi de **sélectionner** les cellules hôtes ayant **intégré ce vecteur** !



Le plasmide est un type de vecteur !

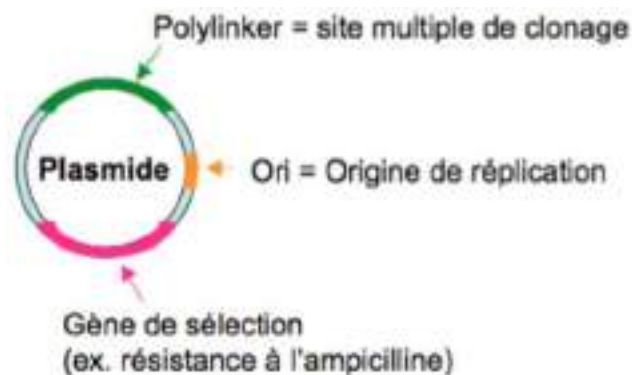
Il existe deux grandes catégories de vecteurs :

- Vecteurs de **CLONAGE** = **isoler** physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et **amplifier** le nombre de copies de cet ADN
- Vecteurs d'**EXPRESSION** = **transférer** un gène dans une cellule hôte **eucaryote** et regarder son niveau d'expression et sa localisation dans la cellule !

2. Clonage dans un plasmide :

Pour être considéré comme un vecteur, le plasmide doit avoir :

- **Polylinker** ou **site multiple de clonage** : courte séquence **parfaitement** connue où peuvent agir différentes enzymes de restriction également connues. On les utilise pour couper l'ADN plasmidique et y insérer le produit PCR.
- **Origine de réplication** : permet une réplication du vecteur **indépendante** de la réplication de la bactérie.
- **Gène de sélection** : il faut pouvoir donner à la bactérie un avantage. Il s'agit généralement d'un gène de **résistance à un antibiotique** (ampicilline). De ce fait, dans un milieu avec un antibiotique, uniquement les bactéries ayant intégré un vecteur pourront se multiplier.

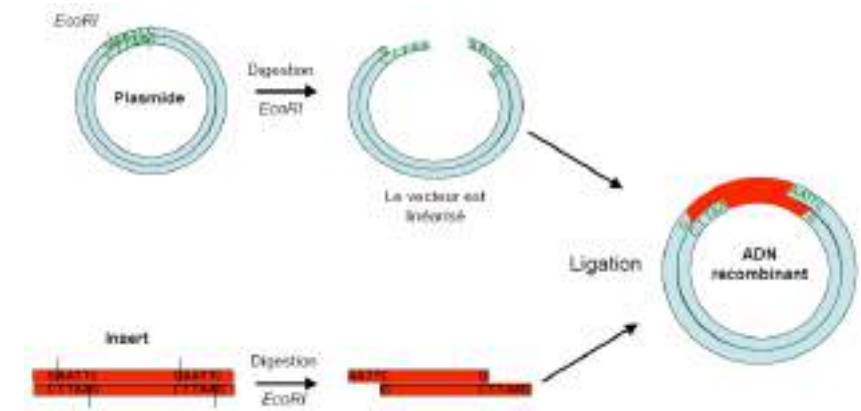


3. Préparation du vecteur et de l'insert :

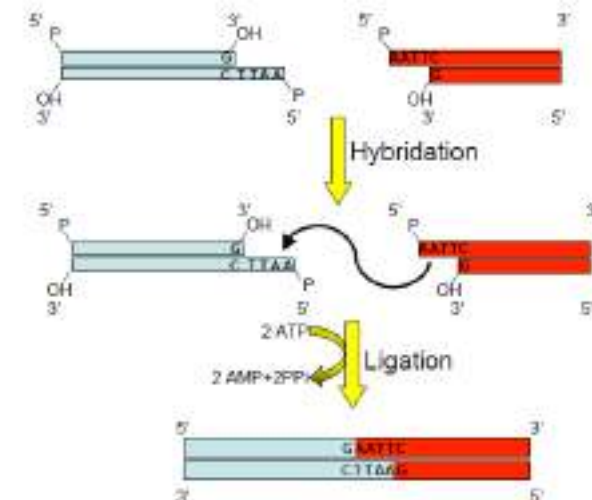
Le vecteur et l'insert doivent être digérés par les mêmes **enzymes de restriction**.

L'idée est d'avoir une **correspondance** entre les extrémités de l'insert et du vecteur pour **faciliter l'insertion**.

Ainsi, en mettant le vecteur et l'insert ensemble et en rajoutant une ligase, on va pouvoir insérer notre fragment PCR dans le vecteur !

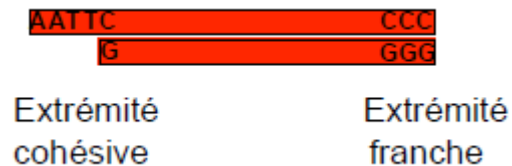


La **T4 DNA ligase** est l'enzyme qui catalyse la formation d'une liaison **phosphodiester** entre deux fragments d'ADN grâce à l'utilisation d'ATP.

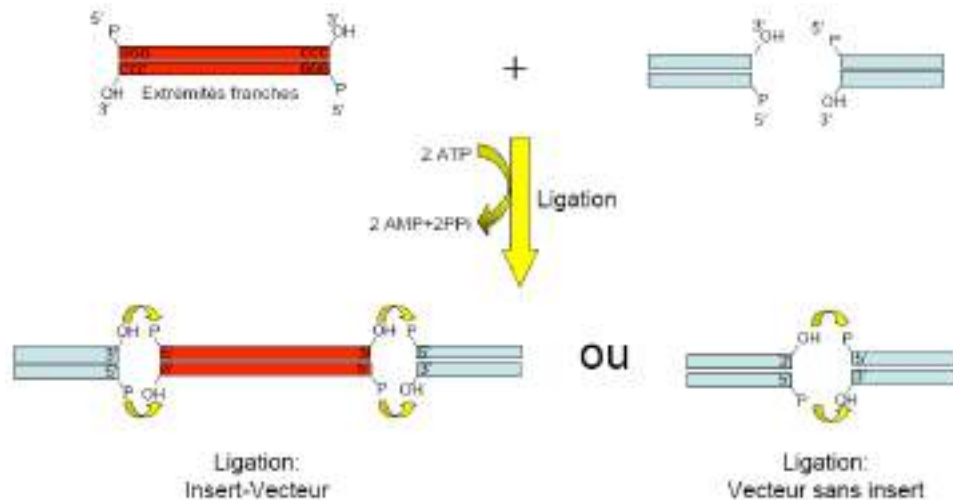


Plusieurs enzymes de restriction peuvent agir au niveau du **polylinker**.
Suivant la stratégie utilisée, on peut être amené à travailler avec :

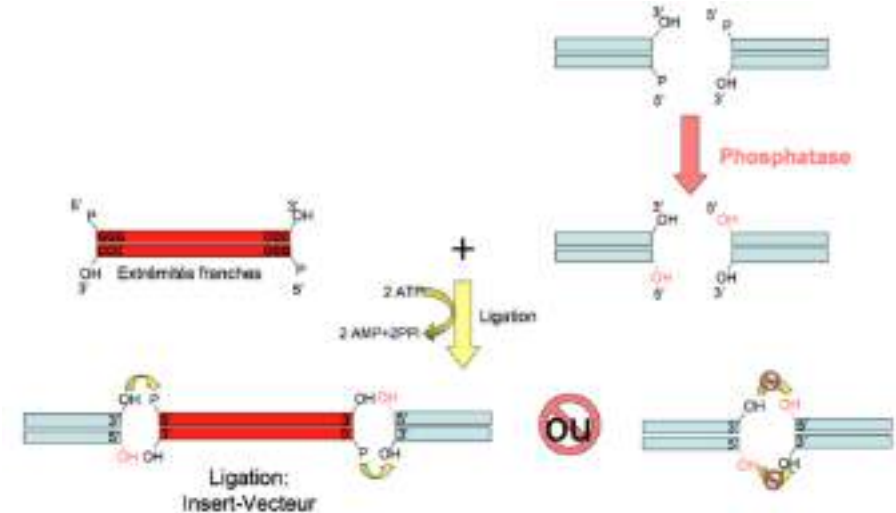
- des extrémités **cohésives** (les deux brins du plasmide et de l'insert ne sont pas coupés exactement l'un en face de l'autre, un brin demeure légèrement plus long que l'autre et la coupure a un aspect « en biseau »)
- des extrémités **franches** (les deux brins sont coupés l'un en face de l'autre au nucléotide près, la coupure est franche et nette, bien droite)



Lorsqu'on a des extrémités franches, le vecteur (= plasmide) aura tendance à se refermer sur lui-même **avant d'avoir intégré l'insert** ! Autrement dit, la T4 DNA ligase va recréer une liaison phosphodiester sans qu'il y ait d'insert.



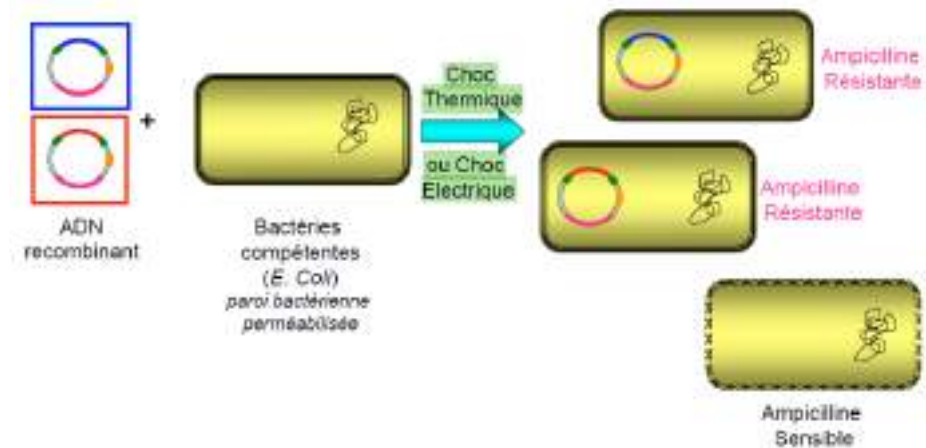
Pour éviter ça, avant la ligation, une étape **facultative** de **déphosphorylation** est nécessaire dans ce cas-là. Une **phosphatase** catalyse le retrait du phosphate à l'extrémité 5' du vecteur, empêchant ainsi la liaison phosphodiester de se former sans l'insert.



Remarque : si on a des extrémités **cohésives**, cette étape de déphosphorylation n'est **pas nécessaire**.

D. Introduction du vecteur dans une cellule hôte

A ce stade, nous avons réussi à produire un **ADN recombinant**, c'est-à-dire un **plasmide** contenant un **insert** (ADN complémentaire) d'origine paternelle **ou** maternelle.



Pour faciliter l'entrée des ADN recombinants dans les bactéries, on **perméabilise leur paroi** grâce à un **choc thermique ou électrique**. On s'arrange pour qu'il y ait **un seul ADN recombinant par bactérie**.

Introduction d'ADN dans une cellule bactérienne = TRANSFORMATION

Introduction d'ADN dans une cellule eucaryote = TRANSFECTION

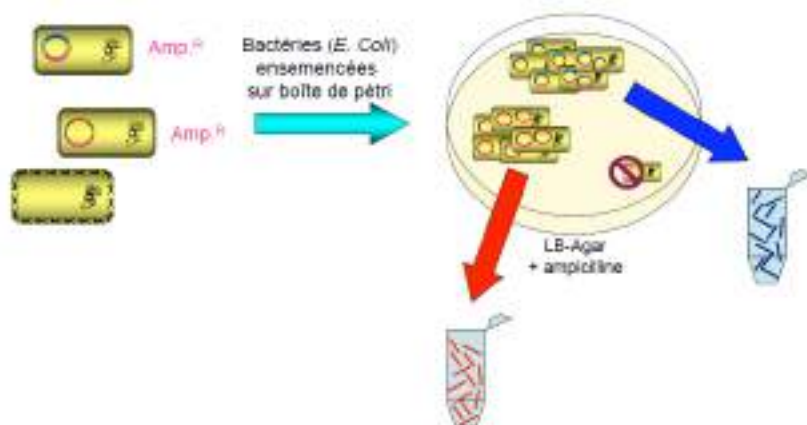
Dans le mélange, on retrouve :

- des bactéries ayant intégré l'ADN recombinant avec l'ADNc **paternel**
- des bactéries ayant intégré l'ADN recombinant avec l'ADNc **maternel**
- des bactéries **sans ADN recombinant** qui sont donc **sensibles à l'ampicilline**, vu que le gène de résistance est situé dans l'ADN recombinant...

E. Sélection des clones bactériens

Sur les boîtes de pétri sur lesquelles on a étalé les bactéries, on a mis de l'**ampicilline** dans le milieu pour ne garder que les bactéries ayant incorporé un **ADN recombinant**, et donc le **gène de résistance**.

Seules les bactéries contenant le gène de résistance à l'antibiotique forment des colonies.



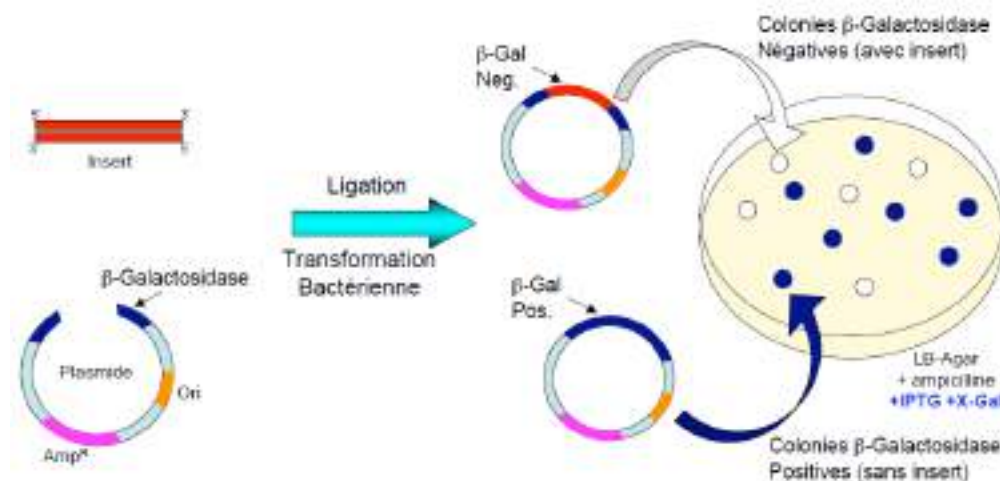
Si on repique dans un tube différent la colonie du haut ou celle du bas et qu'on extrait l'ADN, on aura réussi à **séparer** nos deux ADNc d'origine paternelle et maternelle !

Sélection Blanc / Bleu :

Même après l'étape de **déphosphorylation**, ou même dans des conditions optimales, on aura toujours des cas où le **vecteur se referme sur lui-même**. Il existe une solution pour sélectionner rapidement uniquement les bactéries qui ont **intégré un vecteur AVEC insert** !

L'ampicilline permet de sélectionner les bactéries ayant intégré un vecteur avec ou sans insert

La sélection Blanc / Bleu permet de sélectionner les bactéries ayant intégré un vecteur avec insert uniquement



Le **polylinker** est placé dans le gène qui code pour la **bêta-galactosidase**. A partir du moment où on va intégrer l'insert au niveau du polylinker, le gène de la bêta-galactosidase (*en bleu*) ne va **plus être fonctionnel** puisqu'il sera **coupé en deux** à cause de l'insert !

Par contre, les bactéries qui ont un vecteur qui s'est refermé sur lui-même (**sans insert**) auront une **bêta-galactosidase fonctionnelle**.

Si on ajoute dans le milieu de l'**IPTG** (agent qui induit l'expression de la bêta-galactosidase) et le substrat incolore **X-Gal**, l'hydrolyse de ce substrat va pouvoir donner une **coloration bleue**. On aura donc un **mélange** de colonies **blanches** et de colonies **bleues**.

Sur la boîte de pétri, on va donc **repiquer/garder uniquement** les colonies **blanches**, autrement dit celles qui ont une bêta-galactosidase non fonctionnelle à cause de la présence de l'**insert** !

Maintenant parmi ces colonies blanches, il va falloir trouver laquelle a l'insert d'origine paternelle et laquelle a l'insert d'origine maternelle.

F. Amplification des clones bactériens

On repique une colonie, que l'on met en culture dans un milieu **liquide** de culture adapté à la croissance bactérienne, et toujours en présence d'**ampicilline**.

Les bactéries vont **se multiplier** et par la même occasion **amplifier** notre **ADN recombinant**.

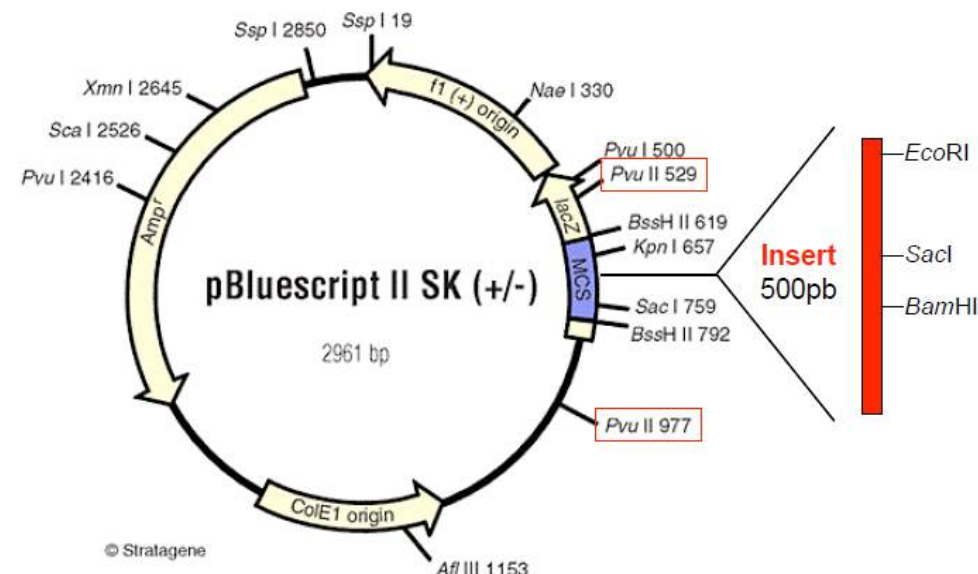
S'en suit ensuite une **lyse** des bactéries pour récupérer l'**ADN plasmidique**.

On va pouvoir récupérer en **grande quantité** l'ADN recombinant, donc le produit PCR, et on va pouvoir travailler dessus.

Cartes de restriction :

On réalise des **cartes de restriction** pour vérifier si l'insert qu'on a récupéré est bon, ou du moins s'il est de la **bonne taille**.

Les cartes de restrictions sont des documents sur lesquels on retrouve la **séquence bien caractérisée d'un plasmide** : on connaît la position précise des **sites de coupure** de telle ou telle **enzyme de restriction**.



On veut savoir dans cet exemple si l'ADN recombinant récupéré à partir des bactéries contient notre insert de **500 pb**.

Les ADN recombinants purifiés vont donc être **analysés** par digestion enzymatique, et la **carte de restriction** réalisée.

L'**enzyme de restriction** utilisée est Pvu II : elle coupe en position 529 et 977.

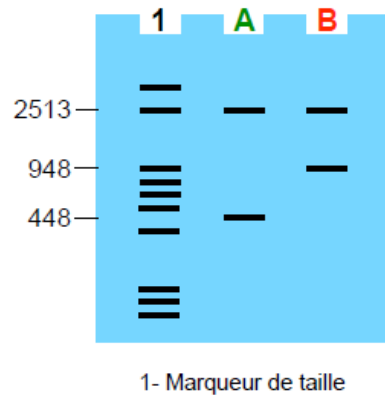
En fonction de la **taille des produits de gestion** retrouvés sur le gel de l'**électrophorèse**, on saura si on a un plasmide **avec insert** ou un plasmide **sans insert** !

La digestion par Pvu II génère deux fragments, un petit et un grand. Selon la présence ou non de l'insert, la taille du fragment sera différente.

- Dans le cas d'un plasmide **sans insert** (piste A) on retrouve :
 - Un **petit fragment** de $977 - 529 = 448$ pb
 - Un **grand fragment** de $2961 - 448 = 2513$ pb

○ Dans le cas d'un plasmide **avec insert** (piste B) on retrouve :

- Un **petit fragment** de $977 - 529 + 500 = \mathbf{948}$ pb
- Un **grand fragment** de $2961 - 448 = \mathbf{2513}$ pb



La **taille** des produits de digestion nous permet donc de déterminer la **présence** ou non de l'**insert** dans le plasmide !

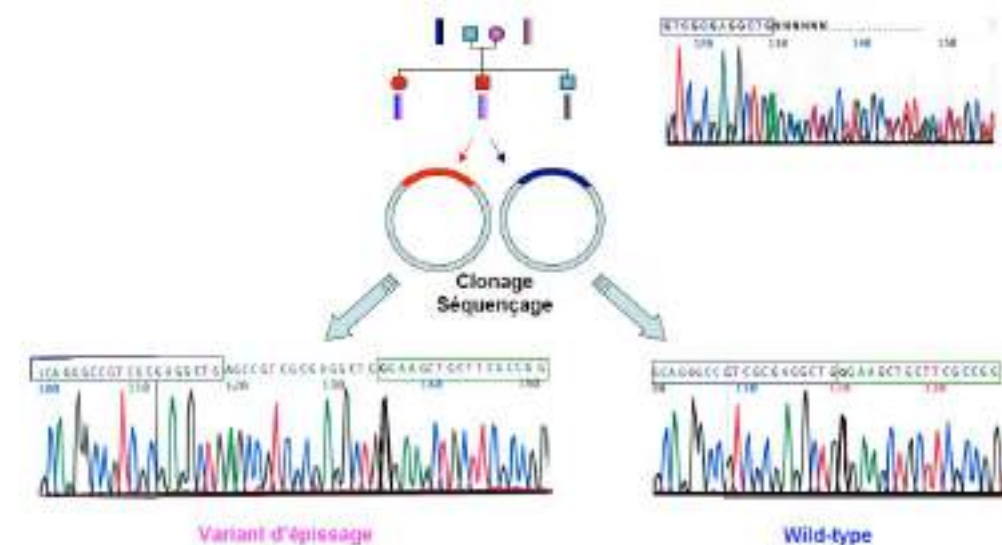
Pour la suite de l'étude, dans cet exemple précis, on ne garderait que les plasmides ayant généré un **fragment à 948 pb** (piste B), car ce sont eux qui ont **intégré un insert** !

G. Séquençage des fragments d'ADN pur

Tout à l'heure on avait un **mélange de variants** différents (un d'origine paternelle et un d'origine maternelle), d'où un **séquençage illisible**. Maintenant que les ADN recombinants sont **purifiés** et **isolés**, on va pouvoir les **séquencer individuellement** !

En réalisant le séquençage, on arrive à déterminer :

- **Pour l'allèle maternel** : présence d'un variant d'épissage entre l'exon 6 et l'exon 7, dont la séquence peut être parfaitement déterminée.
- **Pour l'allèle paternel** : jonction exon 6 / exon 7 normale.



Pour en revenir au cas de la famille B, on voit que les enfants sont bien **atteints du syndrome de Wolfram** car ils ont hérité de l'allèle paternel porteur d'une **mutation sur l'exon 8**, et de l'allèle maternel porteur d'un **variant d'épissage**.

II. Le clonage d'expression

Avec l'arrivée du **NGS** (*Next Generation Sequencing*) on peut maintenant séquencer facilement tout l'**exome** (l'ensemble des exons de tous les gènes connus) dont on arrive à déterminer les **variants** et les **modifications**.

On peut donc se demander quel est le **caractère pathogène** de ce nouveau variant ? Il y a encore énormément d'autres techniques qui doivent se mettre en place pour nous permettre d'**interpréter** la **pathogénicité** d'un variant !

Dans l'étude d'une **protéine mutante** (comme la *wolframine*) on peut faire du **clonage d'expression** pour étudier artificiellement dans les cellules l'**expression** de cette protéine.

Les **vecteurs d'expression** vont pouvoir être exprimés dans les cellules **eucaryotes**, contrairement aux vecteurs de **clonage** qui sont réservés aux cellules **procaryotes**.

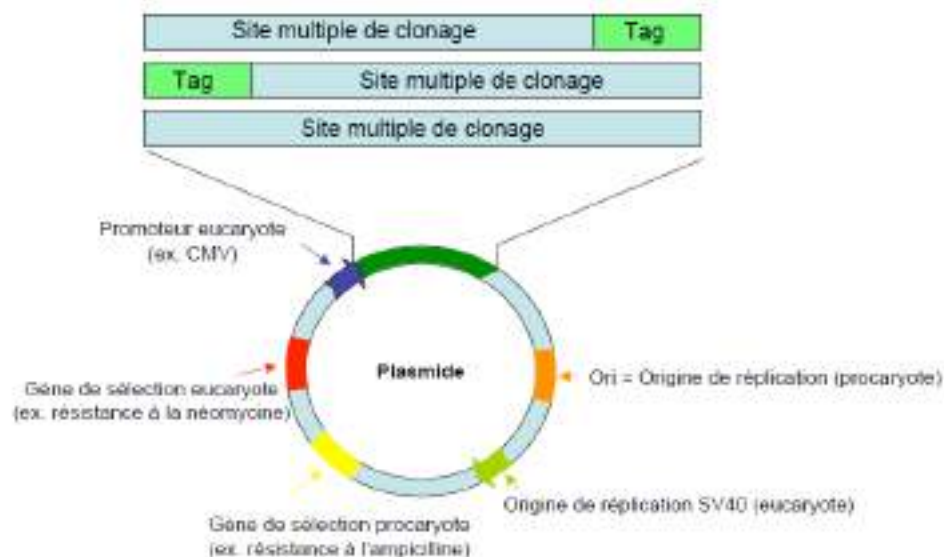
L'assemblage de l'ADN recombinant se fait de la même façon qu'avec les vecteurs de clonage : une enzyme de restriction ouvre le plasmide pour l'insertion d'un fragment d'ADNc.

La multiplication se fait dans un premier temps dans une **bactérie** (mais l'expression se fera dans une cellule eucaryote ensuite attention), d'où la nécessité d'avoir :

- Un **polylinker** ou **site multiple de clonage**
- Une **origine de réplication PROCARYOTE**
- Un **gène de sélection PROCARYOTE**

Puis dans un second temps les vecteurs d'expression seront isolés et intégrés dans des cellules **eucaryotes** pour se multiplier et **s'exprimer**, d'où la nécessité d'avoir **en plus** (contrairement à un vecteur de clonage) :

- Une **région promotrice EUCARYOTE**
- Une **origine de réplication EUCARYOTE**
- Un **gène de sélection EUCARYOTE**



Protéines de fusion :

Le **vecteur d'expression** permet à une cellule eucaryote de **surexprimer** une protéine d'intérêt.

Notre protéine va s'exprimer a priori dans tel ou tel compartiment (mitochondrie, REG...).

Une fois la protéine surexprimée, il est nécessaire de pouvoir **la suivre** :

- soit il existe des **anticorps** (réaction Ag/Ac)

Mais si c'est une protéine qu'on ne connaît pas, ou si on n'a pas d'Ac spécifiques, on utilise d'autres outils tel que le marquage de la protéine :

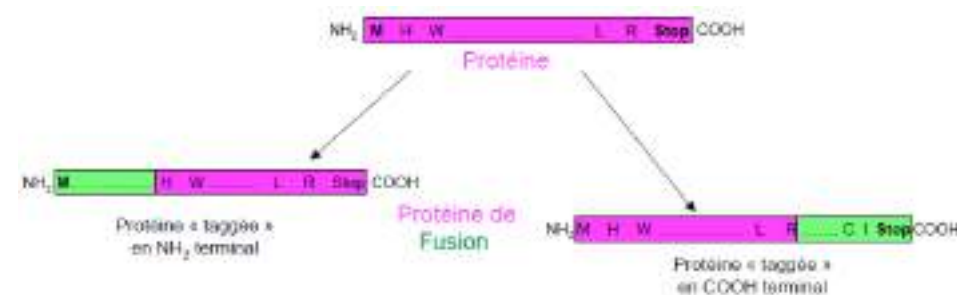
- soit il faut utiliser des **étiquettes** (Tag)

L'étiquette ou **Tag** est une répétition de petites séquences définies greffée en **N-term** ou **C-term** qui peut :

- soit être reconnu par un **anticorps** spécifique (petit peptide)
- soit être **fluorescent** (GFP, YFP)

On génère ce qu'on appelle des **protéines de fusion** : on synthétise la protéine d'intérêt directement avec à son extrémité N-term ou C-term un petit peptide ou une protéine fluorescente.

Grâce à ces étiquettes on va pouvoir voir si le variant a un **impact** sur la protéine et surtout sa **localisation** intracellulaire !



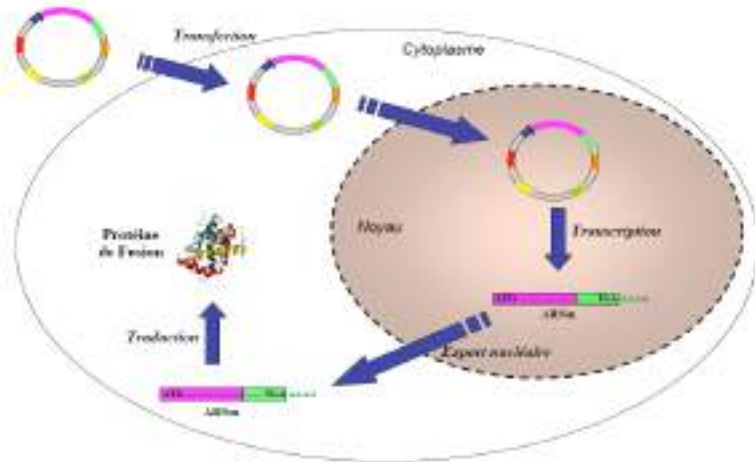
Protéine de fusion = ADNc d'intérêt + étiquette

Transfection des cellules eucaryotes :

L'ADN **exogène** d'intérêt préparé est transféré dans une cellule **eucaryote** pour être **surexprimé** par la machinerie cellulaire : on parle de **transfection**.

Différentes techniques sont utilisées :

- Réactifs **chimiques** (*phosphate de calcium, liposomes*)
- Méthodes **physiques** (*électroporation, micro-injection dans la cellule*)
- Utilisation de **particules virales** (*infection*)



Southern-Blot :

Etude de l'**expression** de l'ADN sur gel d'**agarose** dénaturant.

Si la **localisation** des acides nucléiques (ADN et ARN) ne présente aucun intérêt pour nous, il est en revanche très utile de savoir où se répartissent nos **protéines mutantes** dans la cellule !

Localisation des protéines :

On va ainsi avoir recours à des techniques de **microscopie à fluorescence** nous permettant de visualiser ces protéines :

- soit **directement** grâce à une étiquette, un **Tag fluorescent** (protéines taguées GFP par exemple)
- soit **indirectement** grâce à l'**immunofluorescence** (la protéine est révélée après fixation d'un Ac couplé à un marqueur fluorescent, la réaction Ag-Ac permet de révéler la protéine)

Les trois techniques de « Blot » permettent de faire des études d'expression pour les protéines, l'ARN et l'ADN

Les études de localisation utilisant des Tag fluorescents ou de l'immunofluorescence concernent uniquement les protéines

III. Les études d'expression et de localisation

On peut étudier quelles **protéines** ou quels **acides nucléiques** (ADN et ARN) vont être **exprimés** par une cellule, sans s'intéresser à leur **localisation**.

Northern-Blot :

Etude d'**expression** de l'ARN sur gel d'**agarose** dénaturant.

Western-Blot :

Etude d'**expression** des **protéines** sur gel d'**acrylamide** dénaturant.



filaments de tubuline : vert / mitochondries : rouge / noyau : bleu

En combinant ces différentes approches, on peut vérifier la **localisation** de la protéine et avoir une idée de la **pathogénicité** du variant.