



TriphosphatE, Yanousa,
Nucléodrey

TUT'RENTREE

S2 2020-2021

UE 11 : méthodes d'étude et
d'analyse du génome



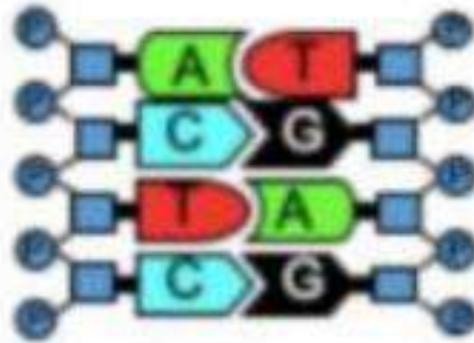
Chapitre 2 : Séquençage Sanger et application

◇ I/Séquençage Sanger

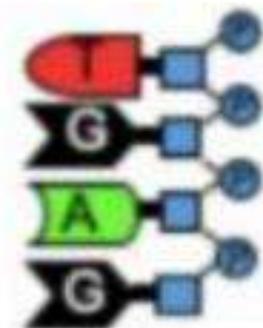
But du séquençage : déterminer la succession des nucléotides qui le composent. +++



La double hélice d'ADN

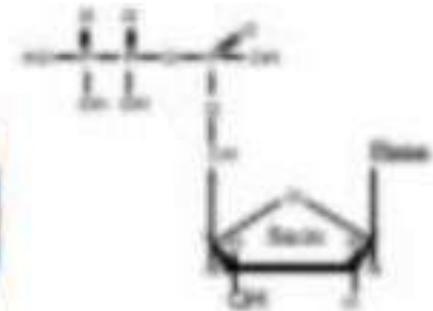


2 Brins



Liaison
phosphodiester

Désoxyribonucléotide



A] Principe

- ◇ Le principe est basé sur l'utilisation de di-désoxyribonucléotides (ddNTPs)(méthode de Sanger)
- ◇ **Elle reste la méthode de référence malgré les nouvelles technologies. +++**
- ◇ Le séquençage utilise les mêmes types d'amorces que pour la PCR. ++ Cependant **UNE SEULE** est utilisée



B] Etapes

- ◇ Les étapes du séquençage sont les mêmes que celles de la PCR. +++

L'ADN polymérase synthétise, à partir d'UNE amorce, un brin complémentaire fidèle à la séquence d'ADN étudiée grâce à des cycles successifs de 3 étapes : dénaturation, hybridation, élongation +++

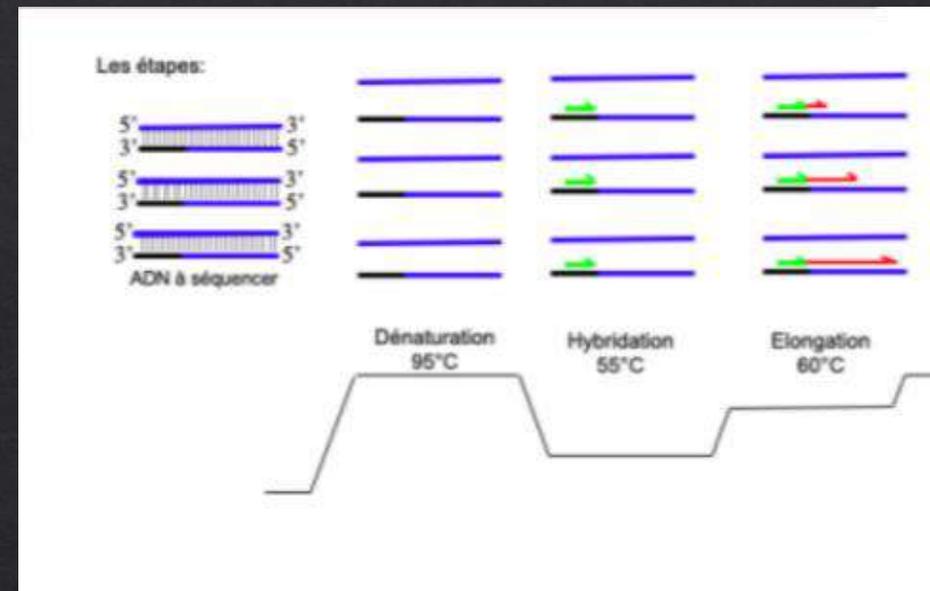
Explications

◇ On ajoute dans notre tube :

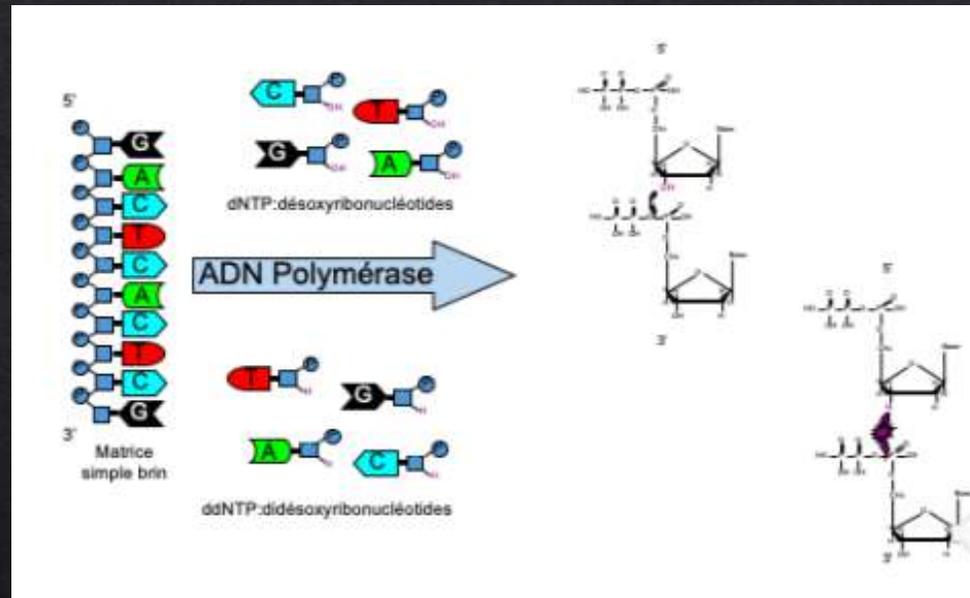
- L'ADN à séquencer
- La Taq polymérase
- L'amorce (une seule) spécifique du brin que l'on veut séquencer. (Si on veut en séquencer deux de brins alors il faut que les deux amorces soient dans 2 tubes différents)
- Les dNTPs
- Des tampons

Nous allons avoir ensuite des variations successives de température en 3 étapes :

- Dénaturation à 95°C
- Hybridation à 55°C
- Elongation à 60°C

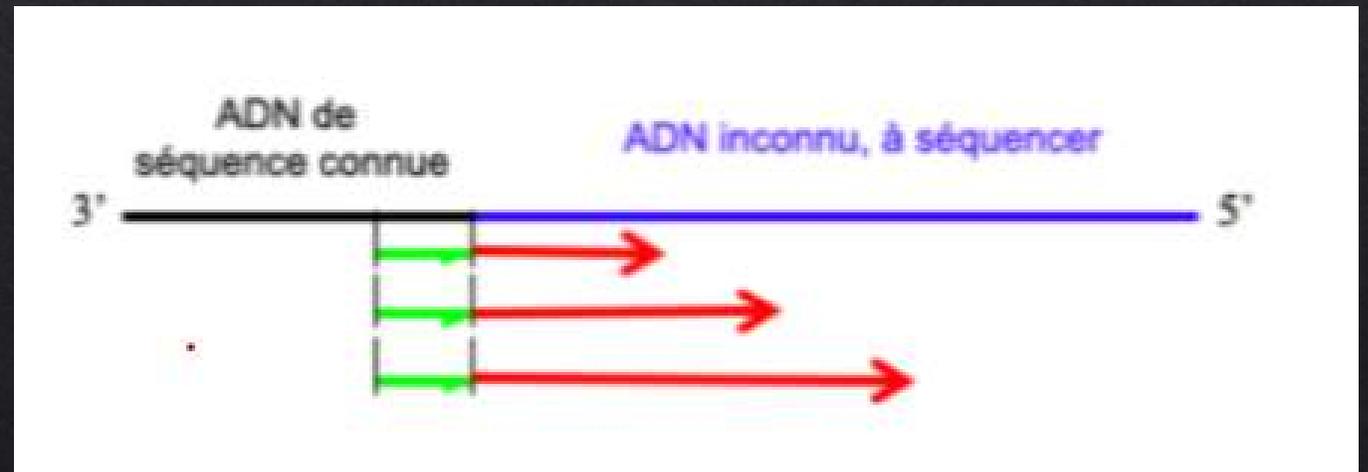


- ◇ L'autre particularité du séquençage est l'utilisation des ddNTPs.
- ◇ Ces derniers sont incorporés au hasard avec les dNTPs mais arrête la synthèse lors de leur incorporation.



C]Cycles successifs

- ◇ On va réaliser plusieurs cycles en parallèle de synthèse d'ADN.
- ◇ Sachant que l'incorporation se fait au hasard, on obtiendra de multiples fragments de diverses tailles.



D] Histoire

◇ Dans la méthode Sanger, on réalise 4 réactions indépendantes dans 4 tubes différents.

◇ Chaque tube contenait :

- un type de ddNTP (A, T, C ou G)

- les 4 types de dNTP (A, T, C et G)

- l'amorce

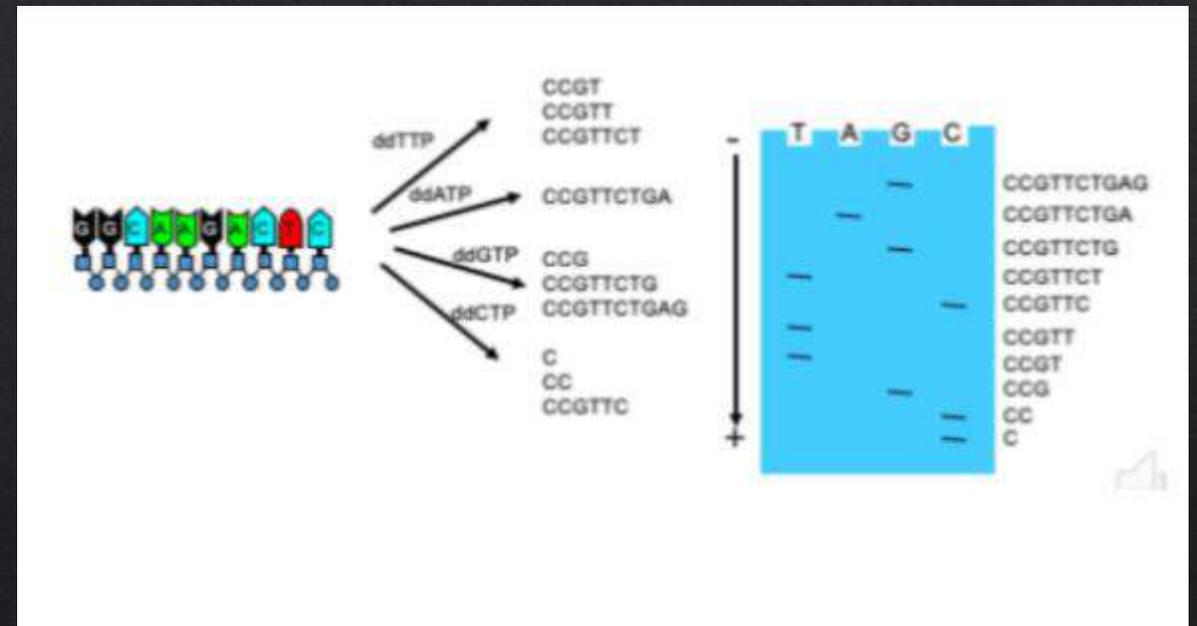
▣ l'ADN polymérase

▣ Le fragment d'ADN

Les fragments obtenus ils sont ensuite séparés sur un gel par électrophorèse.

Plus le fragment d'ADN est lourd moins il migre. +++

On lit donc la séquence dans le sens INVERSE de la migration. +++++



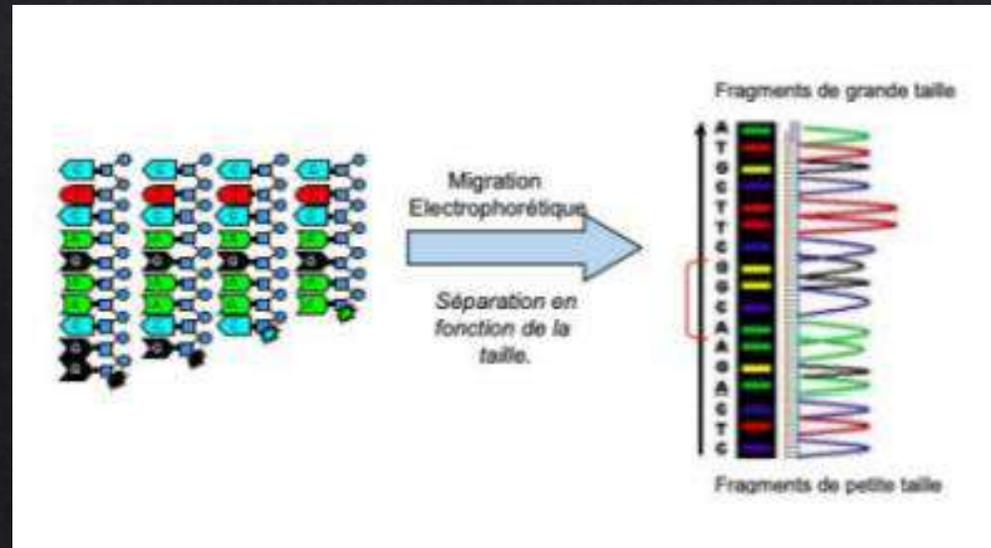
L'ADN est chargé négatif. Donc la migration se fait du pôle - au pôle +

Points importants

- ◇ L'identification du nucléotide se fait en fonction de la piste sur laquelle les fragments migrent. L'enchaînement des nucléotides est apporté par la taille des fragments. +++
- ◇ La séquence lue sur le gel n'est PAS la séquence recherchée. C'est la séquence complémentaire. Pour trouver la séquence recherchée il faut donc raisonner par complémentarité des bases. +++++

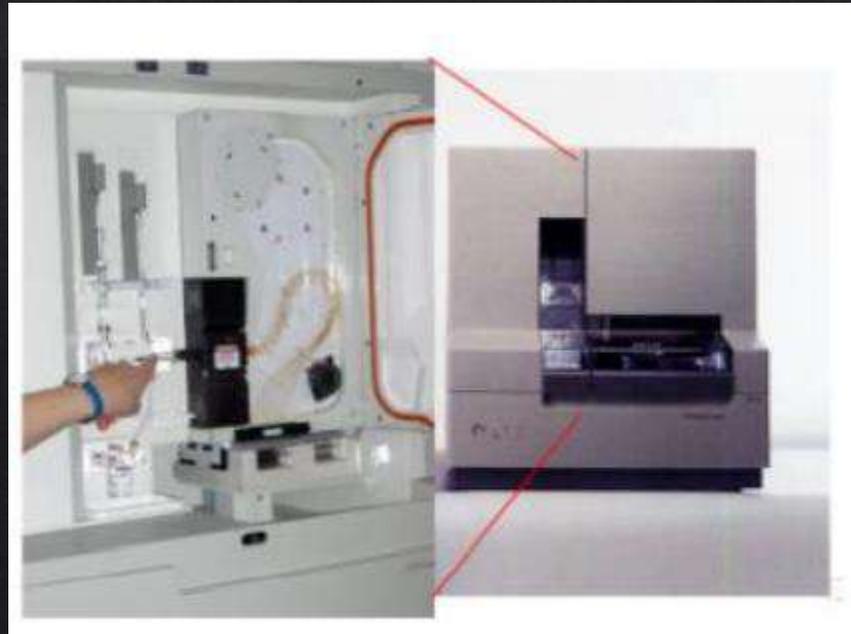
E] Méthode automatisée

- ◇ De nos cette méthode à été simplifiée et automatisée par l'utilisation de ddNTPs fluorescents. ++
- ◇ Chaque ddNTP est couplé à un fluorochrome
- ◇ Les 4 ddNTPs sont ajoutés dans le même tube réactionnel. Grâce à un code couleur on pourra savoir quel nucléotide à été incorporé.
- ◇ Les fragments sont ensuite séparés par migration électrophorétique.



F] Séquenceurs automatiques

- ◆ La migration est l'identification des nucléotides fluorescents se fait dans des « séquenceurs automatiques » dans lesquels on retrouve des capillaires.
- ◆ Chaque capillaire correspond à un gel d'agarose, donc à une migration électrophorétique
- ◆ Les fragments passent ensuite devant une caméra qui va lire le fluorophore.



Comment ça marche ?

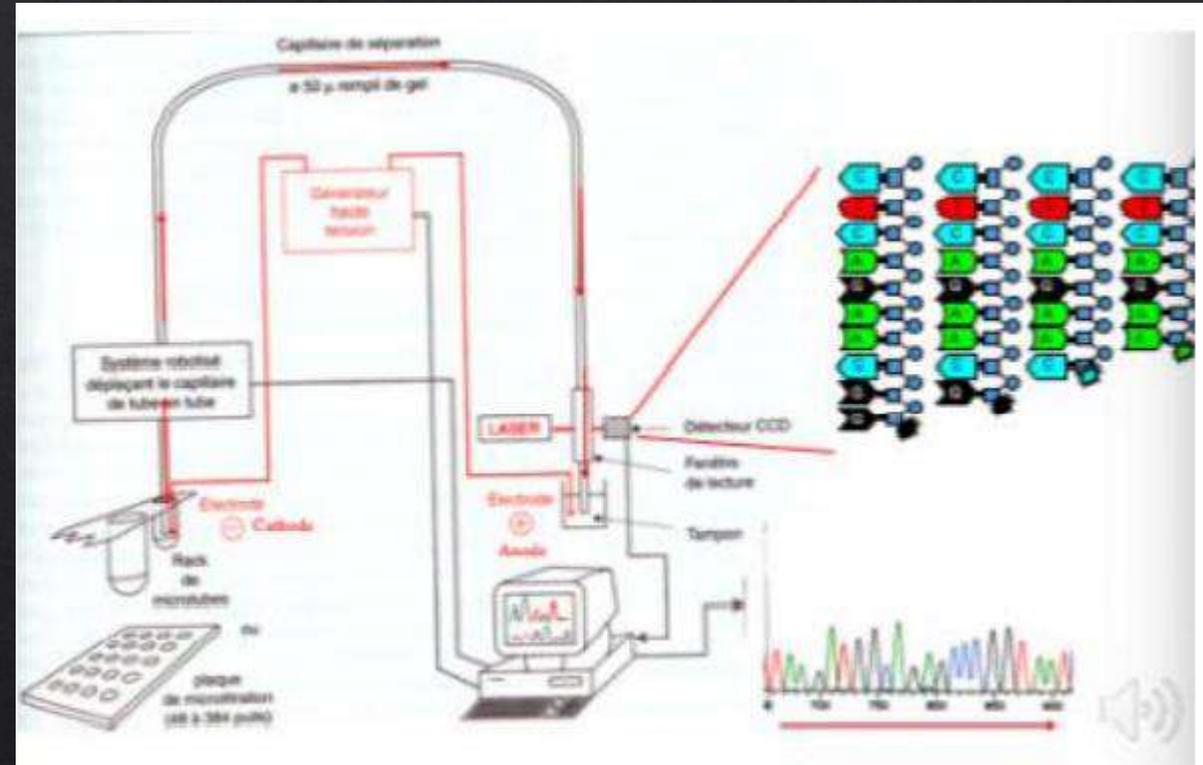
La machine trempe ses 2 extrémités dans un tampon avec 2 électrodes : une cathode et une anode.

La migration se fait de la cathode vers l'anode. +++

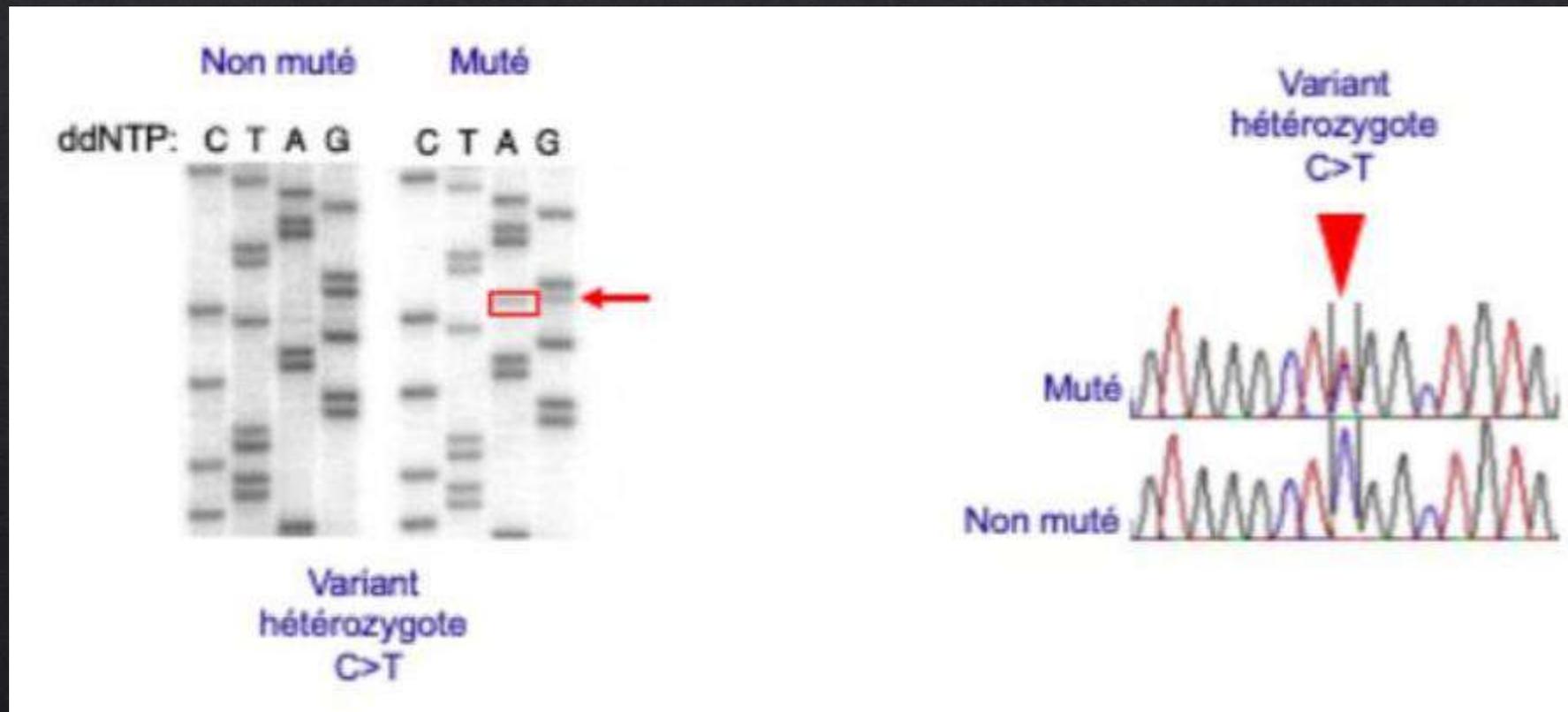
A gauche nous avons les tubes injectés dans ces capillaires. Les préparations vont migrer dans un champ électrique.

Les préparations vont ensuite passer devant une caméra qui va identifier le fragment et la couleur du fragment qui passe.

Par traitement informatique, la séquence apparaît sous forme d'un électrophorégramme.



G]Exemple de résultats Entraînez-vous ;)



II/ Application

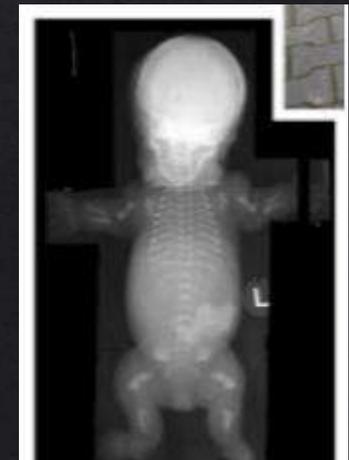
◇ A] Définition de l'achondroplasie

Maladie rare qui reste néanmoins la plus fréquente des chondrodysplasie (1/15000)

On évoque le diagnostic sur des signes d'appel échographiques (taille des fémures)

ATTENTION : L'ECHOGRAPHIE NE PERMET PAS DE FAIRE LE DIAGNOSTIC!!! IL NE FAIT QUE L'EVOQUER. SEULE LA BIOMOL PERMET DE CONFIRMER!

+++++++



B] Signes cliniques

D'autres signes sont à connaître :

- Petite taille
- Membres courts
- Hyerlordose
- Mains courtes
- Macrocéphalies
- Dysmorphies faciales
- Intelligence normale +++
- Complication neurologique

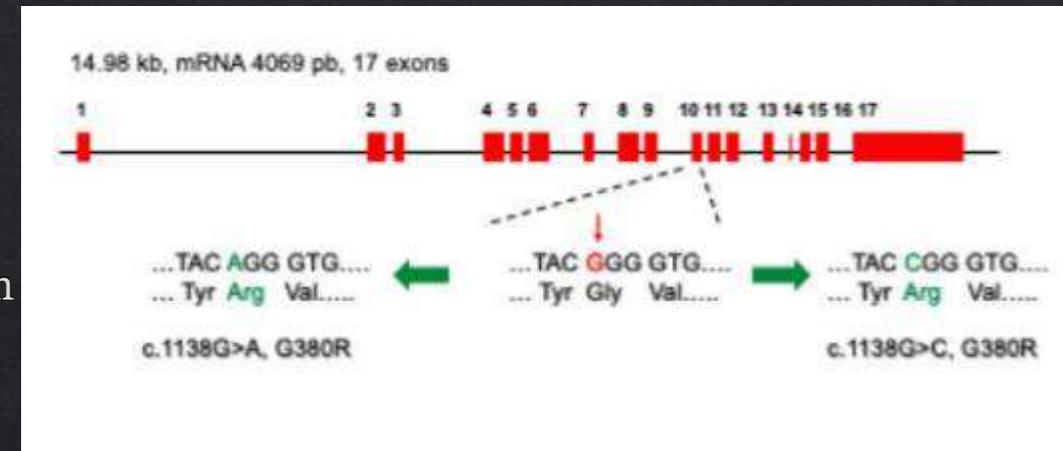


C] Transmission

- ◇ Maladie autosomique DOMINANTE ++++
- ◇ Cependant 90% des personnes atteintes ont leur parents non atteints ++++
- ◇ Néomutation au stade embryonnaire dans la majorité des cas.

D] Génétique

- ◇ Il se passe quoi exactement ? :’(
- ◇ Le gène impliqué est le gène FGFR3 qui code pour un RECEPTEUR de facteur de croissance fibroblastique.
- ◇ Ici c’est toujours la même anomalie qui est responsable de la maladie. Ce qui en fait un cas simple en terme de diagnostic.
- ◇ C’est toujours le codon 380 qui est muté.
- ◇ La mutation correspond à une substitution d’un nucléotide en position 1138.
- ◇ Deux mutations sont possibles :
 - Guanine remplacée par une Adénine : 1338G>A
 - Guanine remplacée par une Cytosine : 1338G>C
- ◇ Dans les 2 cas on a une Glycine qui est remplacée par une Arginine.



E] Diagnostic

◇ Voici les différentes étapes d'acheminement au diagnostic :

① Prélèvement amniotique :

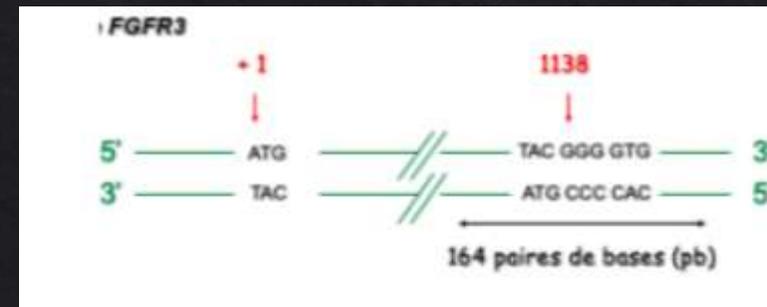
On prélève quelques mL de liquide amniotique dans lequel on retrouve des cellules amniotiques

② Extraction d'ADN des cellules fœtales :

Voir la technique d'extraction avec votre Yanou adorée <3

③ Amplification par PCR :

Amplification d'un fragment de 164 pb

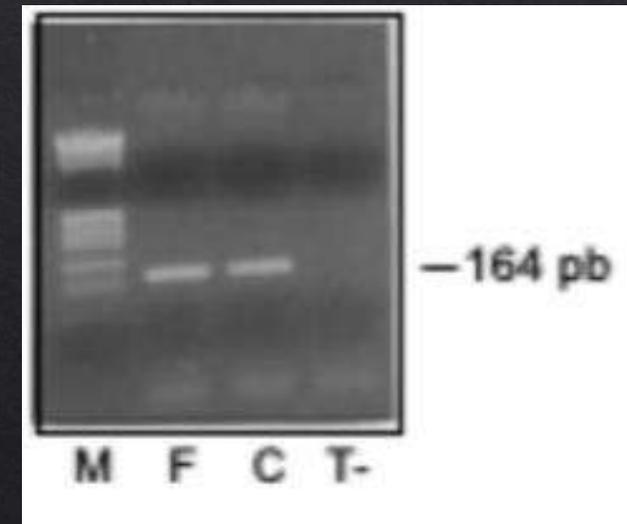


④ Vérification des amplicons sur gel :

On vérifie que la PCR a bien fonctionné. Sur la photo ci-contre, on observe 4 pistes :

- M : marqueur moléculaire
- F : amplicon d'ADN fœtal
- C : amplicon d'ADN contrôle non muté sur la région étudiée
- T : témoin négatif

Les fragments originaux font 164 pb.



5 Digestion enzymatique :

Les résultats étant bons, on réalise une digestion enzymatique pour savoir s'il y a mutation et laquelle.

Dans ce cas on utilise 2 enzymes de restrictions :

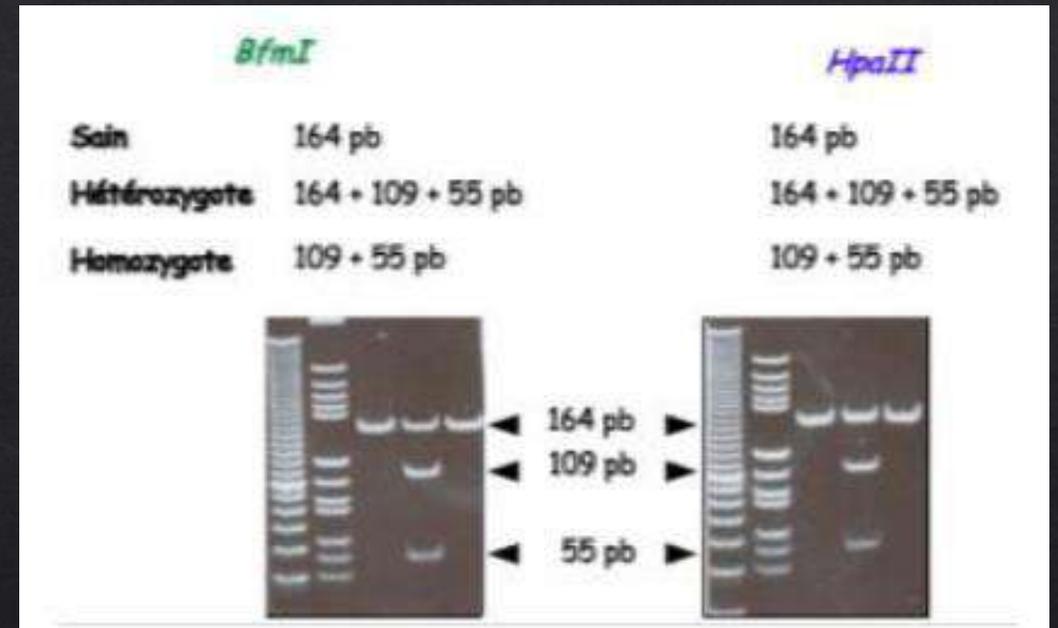
- Bfml qui coupe s'il y a la mutation G>A

- Hpall qui coupe s'il y a la mutation G>C

6 Analyse de la digestion :

La digestion est analysée sur un gel par électrophorèse. Sur l'image ci-contre on retrouve :

- la colonne marqueur de poids moléculaire
- une piste avec un fragment d'ADN de 164 pb (ADN foetal non digéré)
- une piste avec un marquage différent. C'est l'ADN foetal après digestion.
- la dernière colonne est de l'ADN sain ayant subi la digestion



7 Vérification par séquençage :

En biomol quand il s'agit d'établir un diagnostic, on essaie toujours d'avoir une technique de confirmation du résultat.

L'image montre la séquence de la région où il y a eu la mutation. La séquence inscrite sur la machine est représentée en rouge à gauche. On l'a lue de droite à gauche.

Le nucléotide entouré en rouge représente la mutation. C'est une Thymine. Par complémentarité on en déduit qu'une Adénine est présente à cette position. On a donc une mutation G>A.

