

Méthode d'étude et d'analyse du génome UE11

Objectifs :

- * Connaître les principales techniques de Biologie Moléculaire
- * Comprendre ses applications en génétique médicale

Les principales techniques de Biologie Moléculaire

- * Analyse à partir du support de l'information génétique (ADN ou ARN) de n'importe quelle cellule nucléée (qqes mg suffisent)
- * Techniques très sensibles -> risque de contamination élevé

I-Extraction d'ADN à partir de sang

- Prélèvement de sang sous EDTA
- Lyse des GR (solution hypotonique)
- Centrifugation, récupération et suspension des GB dans un mélange détergent + protéinases K
- Extraction** au phénol-chloroforme : séparation ADN (phase aqueuse) / protéines restantes par solubilité différentielle
- Précipitation** à l'éthanol 95° froid (+ sel) : apparition d'une méduse d'ADN, lavée à l'éthanol 70° et conservée (DNAtèque)

II-Extraction d'ARN

ARN très sensibles aux RNases A : + délicate, - utilisée

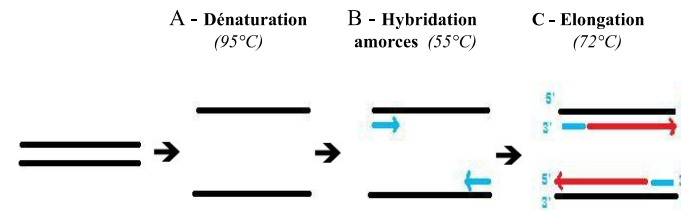
- Homogénéisation des cellules / du tissu dans un tampon qui inhibe les RNases endogènes, dénature les acides nucléiques et dégradent les protéines
- Extraction par précipitation différentielle entre ARN et ADN

Extraction des ARNpolyA :

- Passage des ARN dans une colonne d'oligo-dT
- Elution
- Précipitation à l'alcool éthylique absolu froid

III-Amplification par PCR

Objectifs : Obtention en grande qtt d'une région d'ADN à étudier (fragment double brin) : 2ⁿ molécules au bout de n cycles



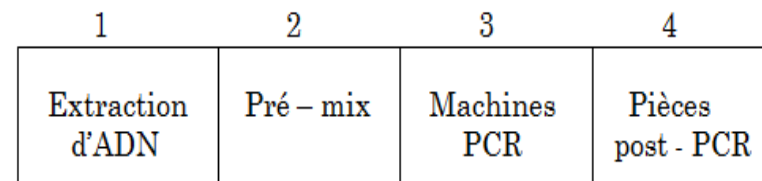
Remarques :

- * Il n'est pas nécessaire de connaître la séquence de la région à étudier : la connaissance de celles des bornes d'amont et d'aval suffisent
- * Une amorce est un oligonucléotide simple brin, de 10-20 nucléotides
- * L'élongation se fait grâce à une ADN polymérase thermostable

Dans l'automate : ADN du patient, amorces, désoxyribonucléotides, Taq Polymérase, tampon (MgCl₂)

Technique très sensible :

- * Risque de contamination élevé
- * Circuit mono-directionnel



Quelque soit la mutation (G>A ou G>C)

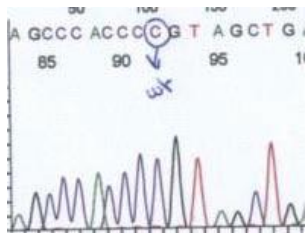
- * Si sain : 164 pb
- * Si malade hétérozygote : 164 + 55 + 109
- * Si malade homozygote : 55 + 109

Remarques :

Si l'une ou l'autre des enzymes coupe le fragment de 164pb, c'est que l'individu est malade.
A partir du nombre de fragments, on sait s'il y a mutation ou non mais on ne sait pas laquelle !

5. Vérification par séquençage

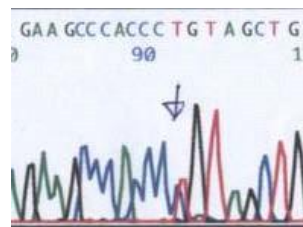
Séquencer : connaître la succession des nucléotides sur la séquence étudiée



Type sauvage :

5' ... TAC GGG GTG ... 3'
3' ... ATG CCC CAC ... 5'

^



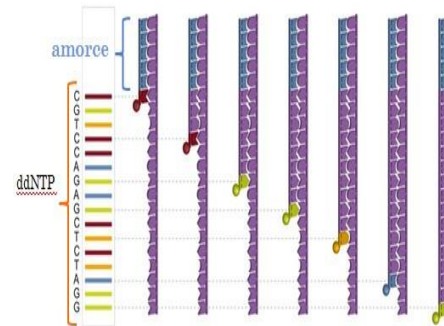
Mutation G>A : *

5' ... TAC AGG GTG ... 3'
3' ... ATG TCC CAC ... 5'

On séquence le brin complémentaire ! +++

* Au niveau de la position 1138, on obtient 2 pics superposés car le sujet est hétérozygote

Méthode enzymatique des di-désoxynucléotides (Méthode de Sanger)



L'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire (à partir d'une **amorce**) en incorporant au hasard des dNTP ou des ddNTP.

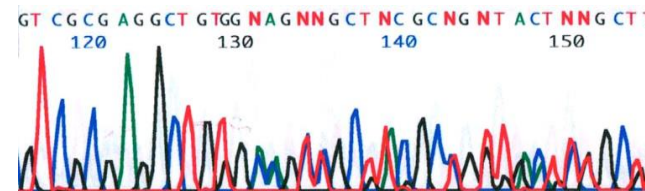
Les ddNTP sont couplés à un fluorochrome (chacun de couleur différente) et leur incorporation stoppe l'**élongation** du nouveau brin.

n cycles successifs pour obtenir toutes les tailles de brins :

- 1- Dénaturation
- 2- Hybridation des amorces
- 3- Synthèse du brin complémentaire (incorporation dNTP ou ddNTP)

On peut alors lire les ddNTP (terminateurs de chaîne) par ordre de taille croissante des brins obtenus (aujourd'hui, séquenceur automatique qui détecte les fluorochromes).

Problème au niveau du séquençage d'un individu hétérozygote :



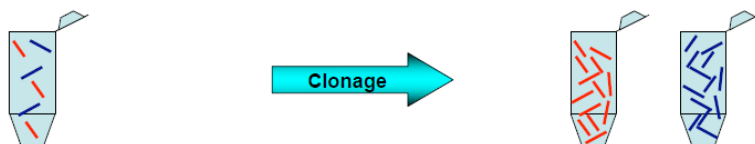
séquence le brin complémentaire de l'allèle sain ou le l

Selon si on séquence le brin complémentaire de l'allèle sain ou le brin complémentaire de l'allèle malade, pour une taille de brin donnée, on va avoir 2 ddNTP différentes au niveau des nucléotides subissant une mutation -> superposition de pics de couleurs différentes -> séquence illisible.

Le clonage moléculaire

Objectifs : Permet d'obtenir une grande quantité de **copies identiques** absolument **pures** d'une séquence donnée d'ADN.

→ Permet la séparation de la population **mutée** et de la population **saine**



4 grandes étapes :

1-Préparer l'ADN recombinant (vecteur + insert)

VECTEUR =

- * ADN circulaire double brin, capable de se répliquer de façon **autonome** (= répllication épisomale)
- * De **petite taille**, permettant l'insertion d'un fragment d'ADN étranger (**INSERT**)
- * Possède des **gènes de sélection** permettant de différencier les cellules hôtes ayant intégrées le vecteur.



ADN **plasmidique** (extra-K) \neq ADN chromosomique **bactérien**

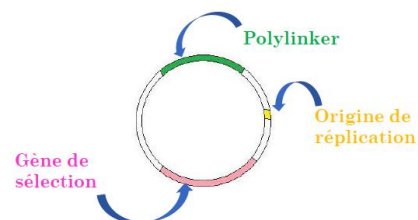


2 grandes catégories de vecteur :

-> **VECTEUR DE CLONAGE** = destiné à isoler physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et à amplifier le nombre de copies de cet ADN

-> **VECTEUR D'EXPRESSION** = destiné à transférer un gène dans une cellule hôte eucaryote

Il existe différents types de vecteurs en fonction de leur **taille** (utilisés selon la taille des inserts) ; le + petit étant le **plasmide** (dont on parlera le +).



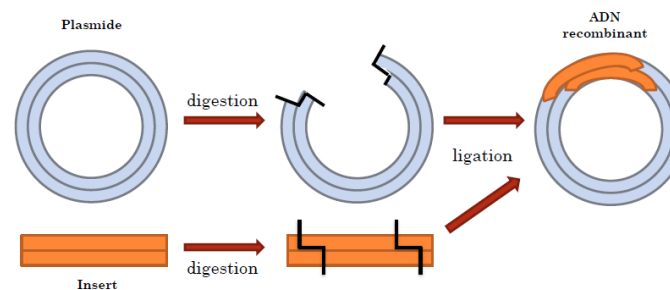
3 zones :

- * 1 origine de répllication
- * 1 site polylinker (là où les enzymes de restriction vont couper)
- * 1 gène de sélection (le + souvent, gène de résistance à un ATB : l'ampicilline)

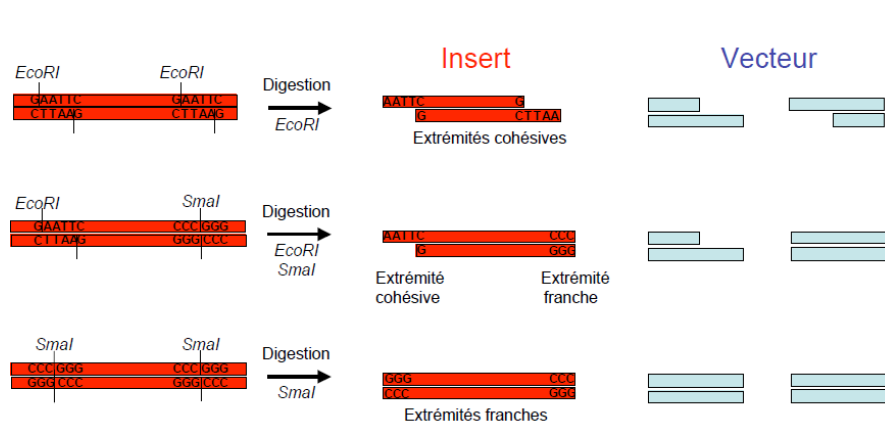
INSERT = fragment d'ADN que l'on veut copier

- Soit produit par PCR
- Soit produit par une reverse transcriptase

Pour que les extrémités du vecteur et de l'insert soient **compatibles**, il faut qu'ils soient digérés par la **même enzyme de restriction**.



En fonction des enzymes de restriction :



Dans le cas des **bords cohésifs**, l'appariement vecteur – insert est **facilité** par la **complémentarité**

Avant la ligation: Il y a une simple **hybridation** entre les bouts cohésifs de l'insert et ceux du vecteur c'est-à-dire la formation de liaisons hydrogènes entre leurs bases complémentaires.

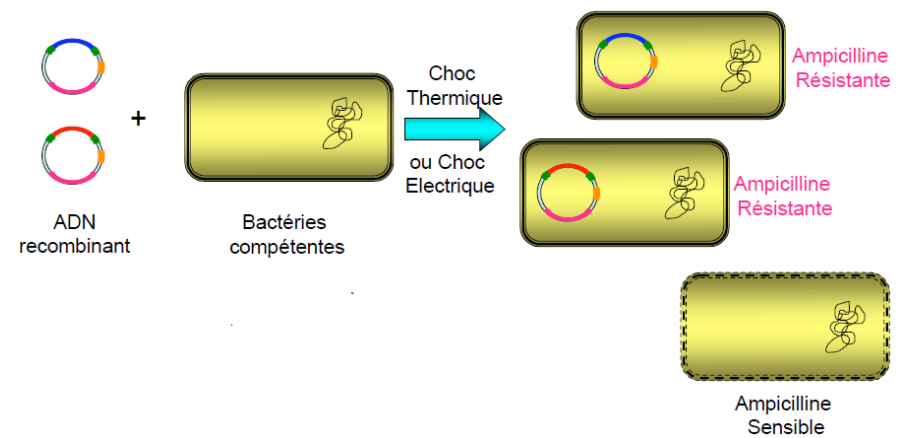
La **ligation** est la formation d'une **liaison phosphodiester** (liaison covalente) entre les extrémités 3'OH et 5' Phosphate de l'insert et du vecteur en présence d'ATP et d'ions divalents : l'enzyme qui catalyse cette liaison est la **T4 DNA ligase**.



La ligase n'intervient pas dans l'hybridation !

2- Introduire l'ADN recombinant dans une cellule hôte

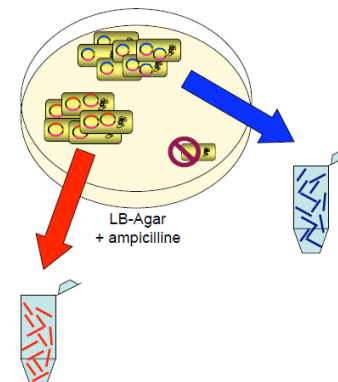
En général, on introduit l'ADN recombinant dans une bactérie : on parle de **transformation bactérienne**.



Les bactéries sont ensuite étalées sur une boîte de Pétri avec gel d'Agar et un ATB.

3- Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens

Seules les bactéries ayant intégrées l'ADN recombinant et donc le gène de résistance à l'ATB pourront survivre et formeront des colonies.



Parfois, certaines bactéries intègrent des vecteurs qui n'ont pas d'insert
Test à la Béta galactosidase pour vérifier

Le test à la bêta galactosidase :

Les vecteurs que l'on utilise possèdent leur polylinker au milieu du gène codant pour la **bêta galactosidase**

- Lorsque l'insert est intégré, le gène ne s'exprime pas
- Lorsque l'insert n'est pas intégré, le gène s'exprime

Lorsque le gène s'exprime, il y a production d'une enzyme dont le substrat est le X-gal (initialement incolore) qui **devient bleu** après action enzymatique

Donc les bactéries avec un vecteur **sans insert** vont se colorer en **bleu**

4-Obtenir un ADN recombinant pur en grande quantité

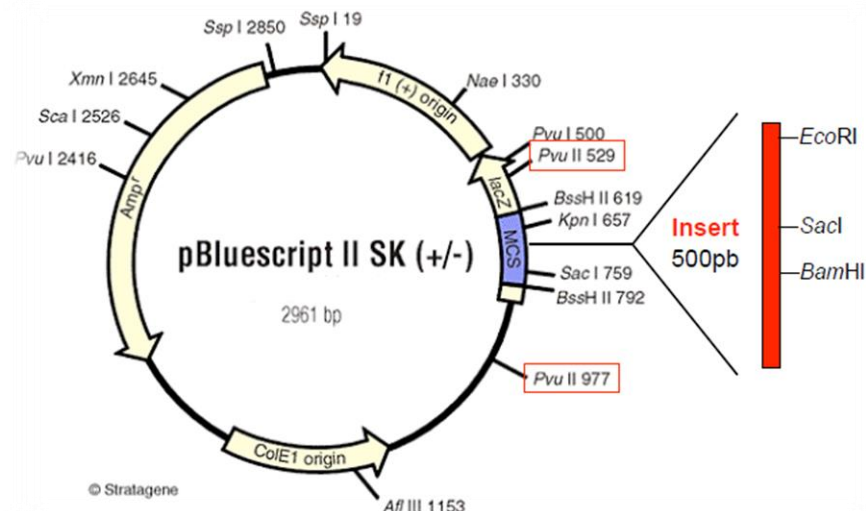
Chaque colonie est bien isolée avec un seul allèle :

1. On met chaque colonie dans un milieu liquide propice au développement des bactéries (mais toujours avec antibiotique)
2. Incubation à 37°C toute une nuit
3. Centrifugation
4. Mise en suspension
5. Lyse alcaline (dénaturation des protéines, paroi ...)
6. Neutralisation (pour stopper la lyse)
7. Précipitation de l'ADN plasmidique

Les cartes de restriction

Objectif : caractériser l'ensemble du plasmide et vérifier que l'on a bien l'insert

La carte de restriction est une cartographie des sites de clivages des enzymes de restriction sur le vecteur (ou ADN recombinant)



Application type concours :

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

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

Vérification de l'insert par séquençage

Après avoir **isoler** chaque allèle, on va pouvoir les **séquencer**

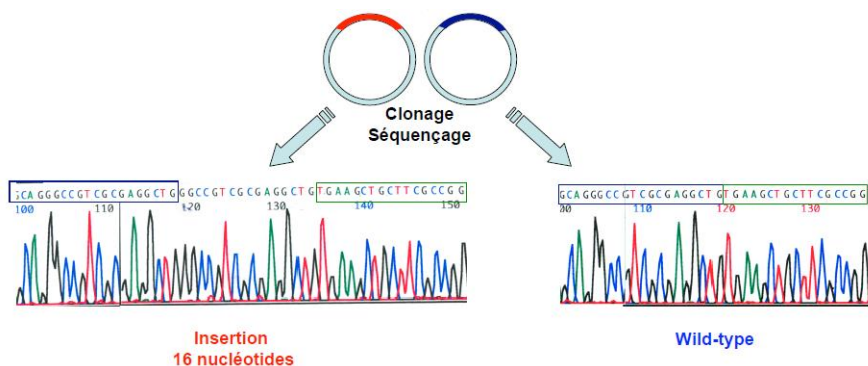
- Dans un tube, on met une amorce **avant l'insert**
- Dans un autre tube, on met l'amorce **après l'insert**

On a **deux réactions de séquençage indépendantes** qui nous permettent d'obtenir :

- ◇ Le complémentaire du brin 3'-5'
- ◇ Le complémentaire du brin 5'-3'

Le séquençage est lisible car on a pu **isoler** chaque allèle (évite la superposition)

Particulièrement pratique en cas **d'insertion** (ou **suppression**) de nucléotide



Pathogénicité d'une mutation

Avec le séquençage, parfois on découvre des variantes de certains gènes que l'on ne connaissait pas

On va alors définir le **caractère pathogène** (ou non) de cette variante :

- ✓ On étudie la **protéine** issue de ce variant
- ✓ On utilise des vecteurs d'expression (plasmide)
- ✓ On teste les protéines dans des cellules **eucaryotes**

Rappels :

- ✓ Chaque triplet de nucléotide code pour un acide aminé
- ✓ La séquence commence toujours par un triplet ATG
- ✓ La séquence s'arrête au codon stop

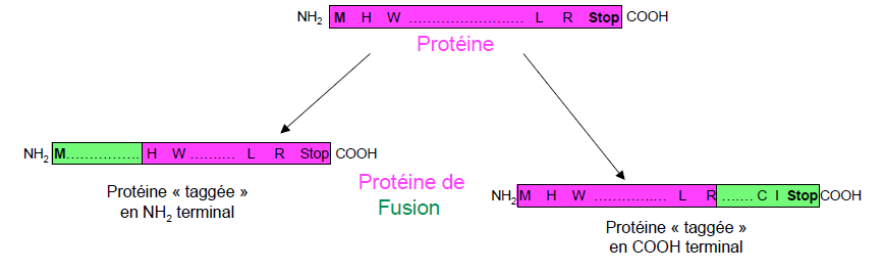
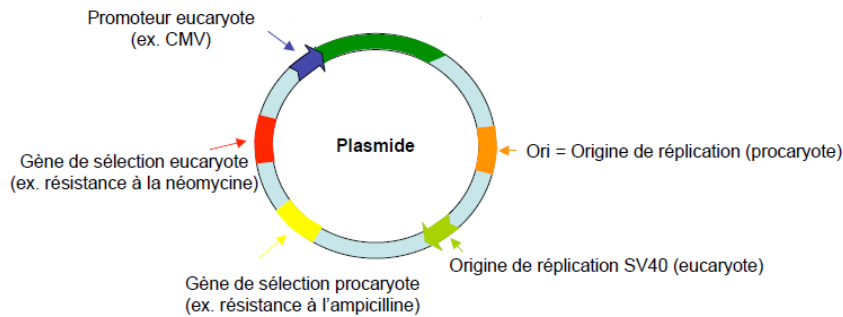


Un même acide aminé peut être codé par plusieurs triplets

1-Le clonage d'expression

Les plasmides utilisés contiennent :

- * Une origine de répllication procaryote
- * Le polylinker
- * Un gène de résistance à un antibiotique procaryote
- * Un gène de résistance à un antibiotique eucaryote
- * Une origine de répllication eucaryote
- * Un promoteur eucaryote dérivé du CMV



2-Transfection des cellules eucaryotes

Il s'agit de faire rentrer l'ADN recombinant dans une cellule eucaryote

Pour cela plusieurs méthodes :

- * Méthodes chimiques (les plus utilisées)
- * Méthodes physiques
- * Utilisation de particules virales

Méthodes chimiques :

→ Phosphate de sodium

L'ADN recombinant est mélangé à une solution de Chlorure de calcium. On ajoute ensuite un tampon au phosphate : il y a formation d'un précipité qui entoure l'ADN

→ Liposome

On mélange l'ADN avec des lipides : formation d'un complexe qui pénètre dans la cellule

Méthodes physiques :

→ Electroporation

Un envoi un choc électrique qui déstabilise un court instant la membrane cellulaire permettant à l'ADN de pénétrer dans la cellule

Notion de protéine de fusion :

Une fois la protéine surexprimée, il faut pouvoir la suivre :

- * Soit il existe déjà des anticorps
- * Soit il faut utiliser des « étiquettes »

Les étiquettes sont des « TAG » : répétitions de petites séquences bien définies que l'on greffe en C-term ou N-term de la protéine

Ces TAG peuvent :

- * Soit être reconnu par un anticorps
- * Soit être fluorescent

Comment greffer une étiquette ?

En N-Terminal :

- Il faut couper le codon ATG
- Avoir une étiquette commence par le codon ATG

En C-Terminal :

- Il faut enlever le codon stop
- Avoir une étiquette avec un codon stop

Les études d'expression

Après transfection dans des cellules eucaryotes, l'expression du gène d'intérêt portant la mutation à étudier est analysée.

1- Etude au niveau de l'ARN :

Expression -> **Northern-Blot**

2- Etude au niveau de la protéine :

Expression -> **Western-Blot**

Localisation intracellulaire -> Immunofluorescence

I-Etude de l'expression des ARN

Le **Northern-Blot** : Technique équivalente à celle du Southern-Blot pour les ARN

Technique :

- 1- Les cellules/tissus sont **lysés** et les **ARN purifiés**
- 2- Les ARN sont séparés, en fonction de leur taille, sur un gel d'agarose dénaturant par **migration électrophorétique**
- 3- Les ARN sont transférés sur une **membrane**
- 4- Les ARN d'intérêts sont **révélés** après hybridation d'une sonde complémentaire marquée

II-Extraction des ARN

Technique :

- 1- **Lyse** des cellules en présence de **Thiocyanate de guanidium + inhibiteur de ribonucléase** (Béta-mercaptoéthanol)
- 2- **Extraction** des ARN par ajout de **phénol acide**, de **chloroforme** et **centrifugation** à froid à haute vitesse.

La séparation des ARN et des ADN repose sur une précipitation différentielle en fonction du pH: en condition acide, les ARN restent en solution aqueuse, l'ADN et les protéines se trouvent à l'interphase

- 3- **Précipitation** des ARN par ajout d'**éthanol** absolu à froid

III-Etude de l'expression des protéines

Western-Blot : Technique équivalente à celle du Southern-Blot ou du Northern-Blot mais pour les **PROTEINES**.

Technique :

- 1- Les **cellules/tissus** sont **lysés** et les protéines dénaturées purifiées
- 2- Les protéines sont **séparées**, en fonction de leur masse, sur un gel d'**acrylamide** dénaturant.
- 3- Les protéines sont **transférées** sur une **membrane**.
- 4- La protéine d'intérêt est **révélée** grâce à un **Ac spécifique**

IV-Etude de la localisation des protéines

Immunofluorescence : Technique permettant de visualiser les protéines directement au niveau de la cellule

Technique :

- 1- Les cellules,ensemencées sur une lamelle en verre, sont **transfectées** avec le **plasmide** d'intérêt
- 2- Les cellules sont **fixées** et **perméabilisées**
- 3- Les protéines sont :
 - Soit **visualisées directement** en microscopie à fluorescence (protéines « taggées » GFP par exemple)
 - Soit **révélées et visualisées après fixation** d'un Ac couplé à un marqueur fluorescent (réaction Ag-Ac)