

UE11

Méthodes d'analyse du génomique

Tut' Rentrée 2017

1



Présentation de la matière

- Une UE **spécifique** enseignée aux 5 filières (*Ne cherchez pas la logique...*)
- Enseignée par le professeur **Bannwarth** et le professeur **Paquis**
- **Trois** cours de 2h, **ronésés** 🎉

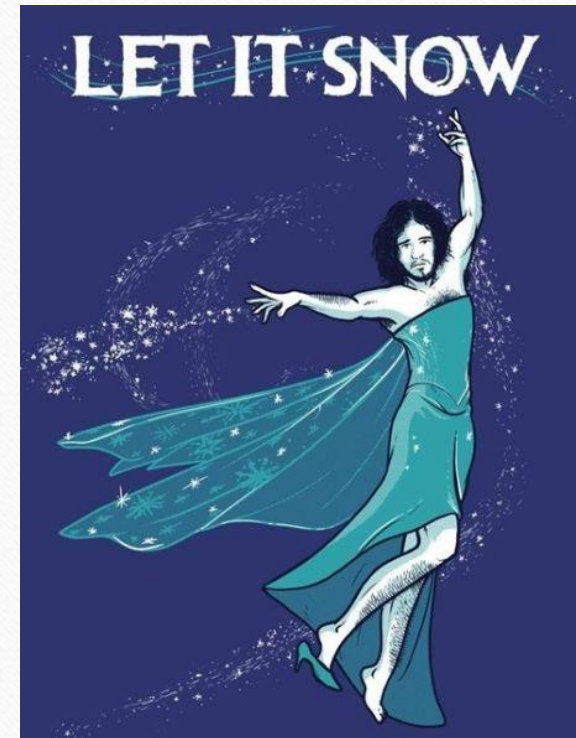
- Tout ça pour **8 QCMs** en **10 minutes**, avec une valeur de **20 points**

A quoi ça sert, en vrai ?

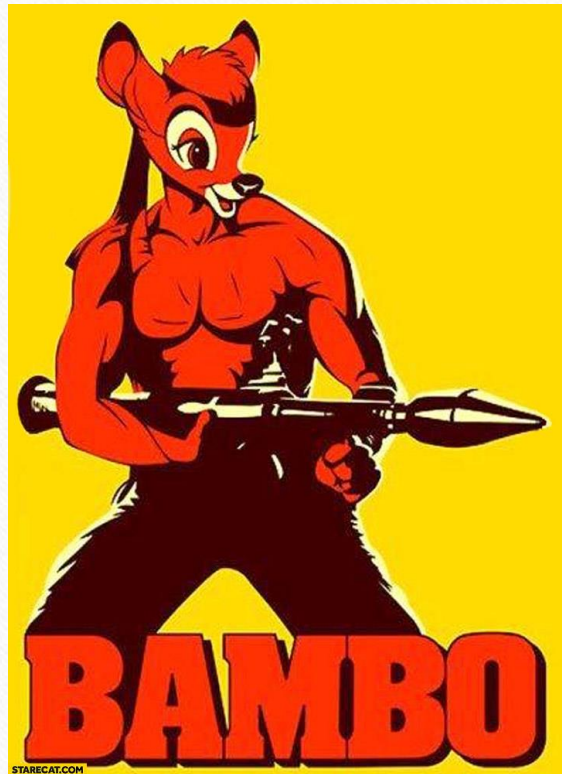
- ✓ Connaître les principales **techniques** de Biologie Moléculaire
- ✓ Comprendre les **applications** en génétique **médicale** :
 - Le diagnostic **positif**
 - Le diagnostic **prénatal**
 - Le diagnostic **pré-symptomatique**

Le plan de ce cours passionnant

- Les principales techniques d'analyse moléculaires
- La recherche de mutation ciblée
- Le séquençage de l'ADN
- Le clonage moléculaire
- Le clonage d'expression
- L'étude d'expression



I Principales techniques d'analyse moléculaire



Extraction de l'ADN et de l'ARN

L'ARN est bien plus difficile à étudier

Il est plus **instable**, très sensible aux **RNAses A**, et peu utilisé en routine.

Il est principalement utilisé pour déterminer **l'expression d'un gène**



L'ADN :

1. Prélèvement de sang sous **EDTA** (Anticoagulant)
Jamais avec de l'héparine (inhibition des enzymes utilisées)
2. **Lyse des GR** avec une solution hypotonique
(Les GR, anucléés, ne contiennent pas d'ADN)
3. Récupération des Globules **blancs** dans une **solution de détergeant et de protéinase K**
→ Destruction des protéines entourant l'ADN
4. Extraction au **phénol-chloroforme** qui élimine les protéines dégradées
5. Précipitation de l'ADN par **l'éthanol à froid**
Obtention d'une **méduse** d'ADN

Amplification par PCR

Cycles répétés de trois étapes qui permettent d'obtenir une **grande quantité** d'ADN

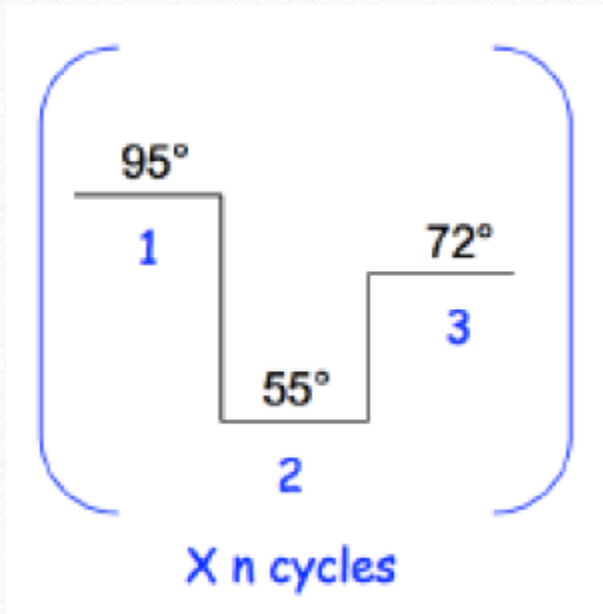
Processus **spécifique, très sensible**, donc sujet à un fort risque de **contamination**

On obtient **2^n ADN** au bout de **n cycles**

Prérequis :

- La **Taq Polymérase**, ADNp d'origine **bactérienne, résistante à la chaleur**
- Une **borne d'amont** et une **borne d'aval** de la région à étudier (de 18 à 20 nucléotides)
- L'ADN du patient, des amorces, des dNTP, un tampon, etc...
- Un **circuit monodirectionnel** (pour éviter les contaminations)

Etapes de la PCR



1. Dénaturation



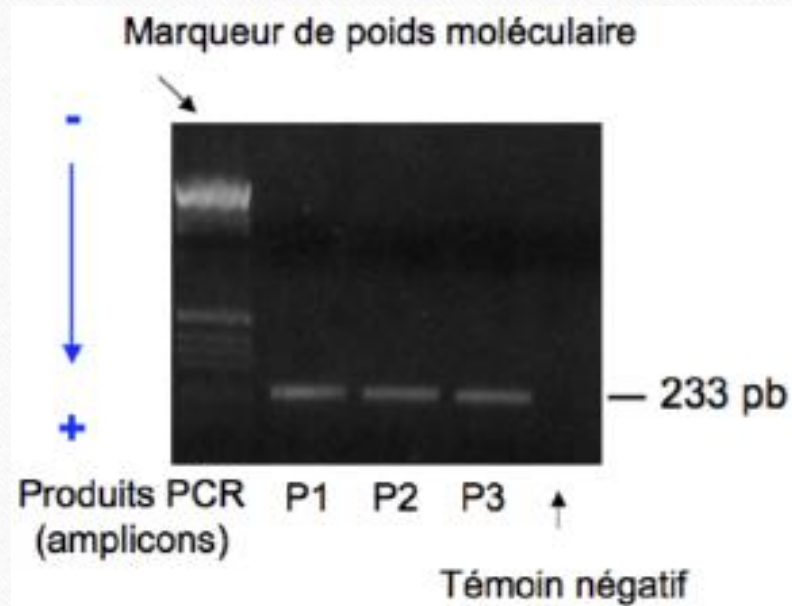
2. Hybridation d'amorces



3. Elongation

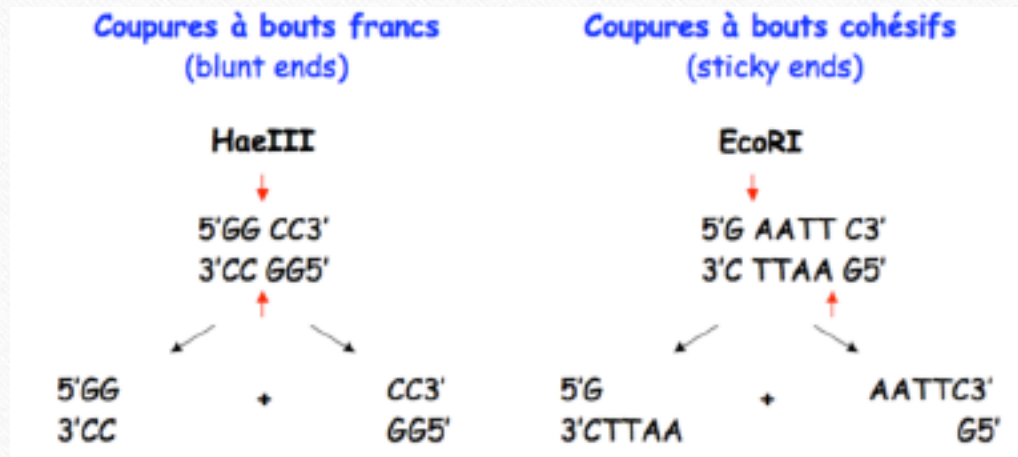


Electrophorèse sur gel



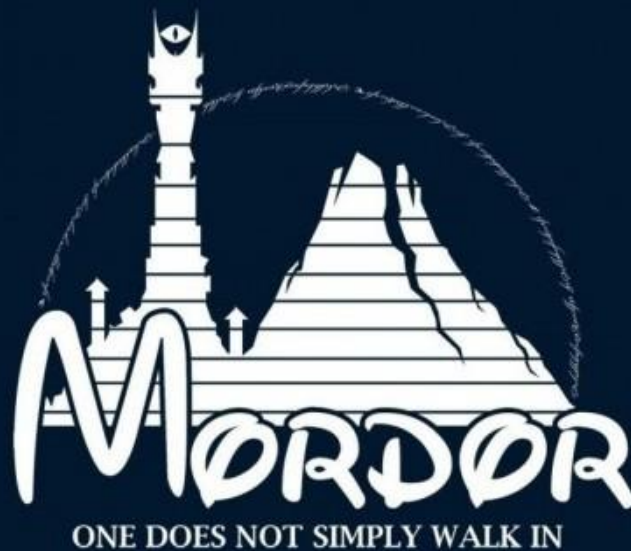
- Permet **l'analyse** des produits d'amplification (vérifie également l'absence de contamination)
- **Sépare** les molécule d'ADN en fonction **de leur taille / masse** sur un gel d'agarose / acrylamide (sa concentration joue sur la vitesse de migration)
- Ce gel est parcouru par un **courant électrique** Les molécules iront du **pôle négatif** (la cathode) vers le **pôle positif** (l'anode)
- La visualisation se fait sous lumière **UV** par **coloration au bromure d'éthidium BET** (toxique, nécessite une protection)

Digestion enzymatique



- Utilisation d'enzymes de restriction, d'origine bactérienne, qui coupent au milieu de l'ADN double brin
- Nous n'étudions que les enzymes de type 2, les **endonucléases**
- Cette coupure est **reproductible** et **spécifique** d'une séquence nucléotidique, dite **palindromique** (ANNA / KAYAK)
- Elle peut être à bouts **francs** ou **cohésifs**

II Recherche de mutation ciblée



L'achondroplasie

Caractéristiques :

- Petite taille
- Membres courts
- Hyperlordose
- Mains courtes
- Macrocéphalie
- Front haut
- Ensellure nasale marquée
- **Intelligence normale ++**
- Complications neurologiques (myélopathie)



- La plus fréquente des **chondrodysplasie**
- Le diagnostic est évoqué par le **signe d'appel échographique « fémurs courts »**
- C'est une maladie à **transmission autosomique dominante**
- Pourtant, **90%** des cas apparaissent de parents sains : l'achondroplasie apparaît principalement de **mutation de novo**
- La forme homozygote (pour la mutation) est l'atteinte la plus grave pour la maladie

L'origine de l'achondroplasie



- Le gène responsable est le gène **FGFR3**
- Il code pour un **récepteur de facteur de croissance fibroblastique**
Il régule la formation osseuse
- La mutation se fait **toujours au même endroit**, avec deux variantes de mutation
Le nucléotide 1138, une **guanine** est remplacé par une **adénine** ou une **cytosine**
- Ainsi, la glycine d'origine est remplacée par une **Arginine** (mutation faux-sens)

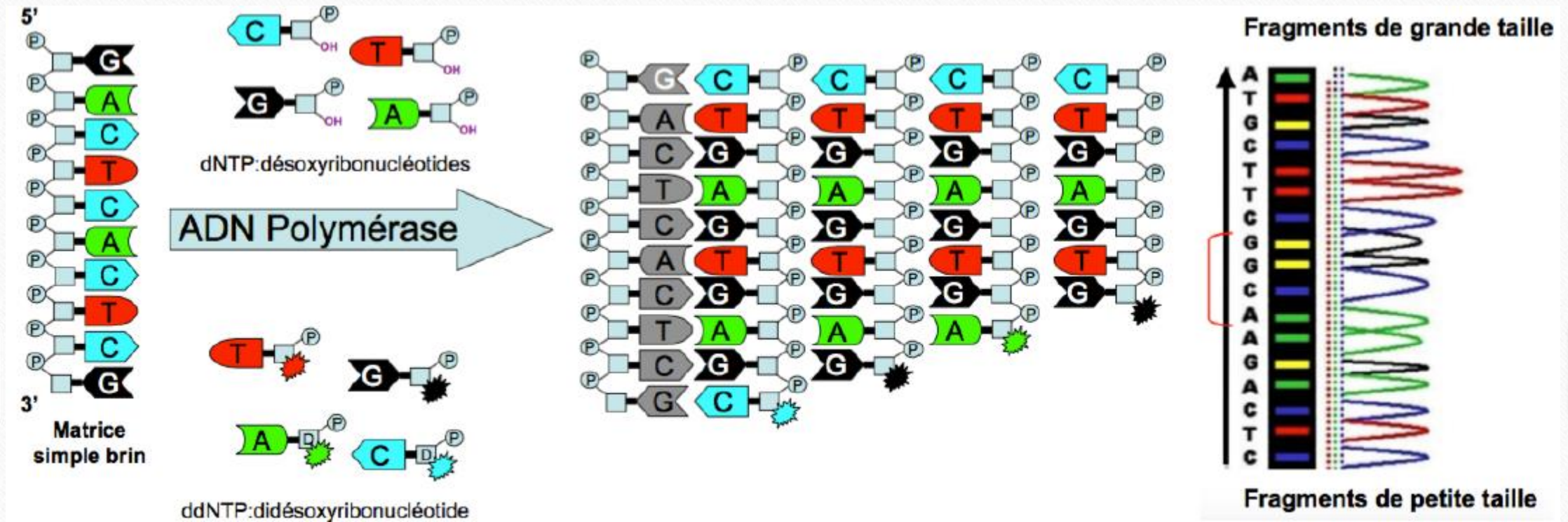
III Séquençage de l'ADN

- Le but est de **déterminer la succession de nucléotides** composant l'ADN afin de **vérifier un diagnostic**
- La méthode de référence est l'utilisation de **di-désoxyribonucléotides ddNTP**, dite **méthode de Sanger**
- Le principe est la **synthèse d'un brin complémentaire** à la séquence d'ADN étudiée, à partir d'une **amorce**

Déroulement du séquençage

La méthode originelle de Sanger nécessitait 4 tubes différents avec dans chacun un seul type de ddNTP coloré

- **Trois étapes** se succèdent en **cycles** :
Dénaturation / Hybridation / Elongation
- Chaque cycle incorpore un dNTP (classique) ou un ddNTP (qui **interrompt** la synthèse)
- La méthode automatisée permet la présence dans un même tube de **4 ddNTPs différents** colorés de façon spécifique par des fluorochromes
- Se trouve également dans le tube une **ADN polymérase**, une **amorce**, des **dNTPs** et le fragment d'ADN à étudier



Les produits synthétisés sont séparés par **électrophorèse** en fonction de leur taille

Cela permet la **lecture** de la séquence nucléotidique

IV Clonage moléculaire

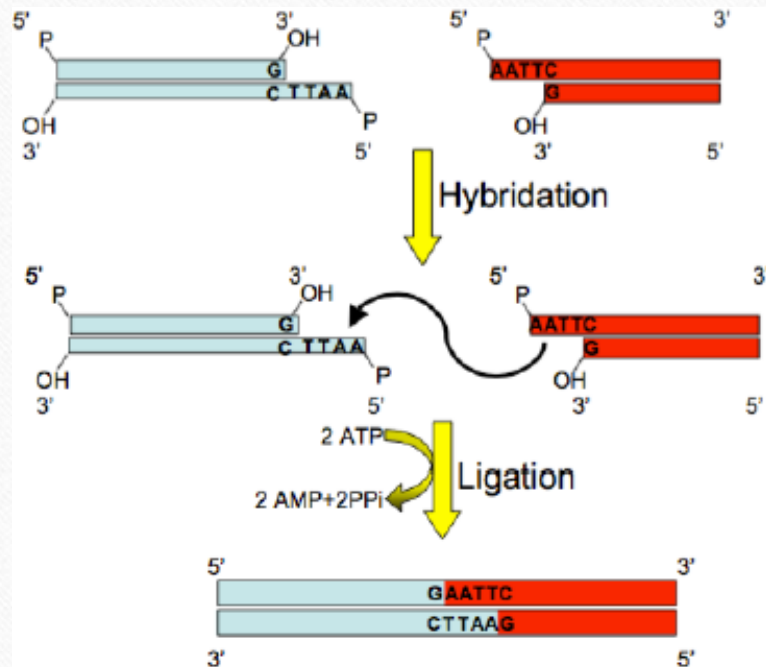
- Le but du clonage moléculaire est d'obtenir un **grand nombre** de copies **pures** d'une séquence d'ADN, grâce à **4 étapes** :
 - La **préparation de l'ADN recombinant** (Vecteur + Insert)
 - L'**introduction du vecteur dans la cellule hôte**
 - La **sélection, l'isolement et l'amplification des clones bactériens**
 - L'**obtention de l'ADN recombinant en plus grande quantité**

Préparation de l'ADN recombinant

- Le vecteur :
 - **ADN circulaire double brin** qui se réplique de **manière autonome**
 - **Permet l'insertion** d'un fragment d'ADN **étranger** (l'insert)
- Le plasmide : le vecteur recombiné
 - ✓ **Un polylinker** : site multiple de clonage
 - ✓ **Une origine de réplication** : permet une multiplication indépendante de la bactérie
 - ✓ **Un gène de sélection** : souvent de résistance à un ATB

Vecteur de clonage	Vecteur d'expression
Isoler physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et amplifier le nombre de copies de cet ADN	Transférer un gène dans une cellule hôte eucaryote

Préparation du vecteur et de l'insert

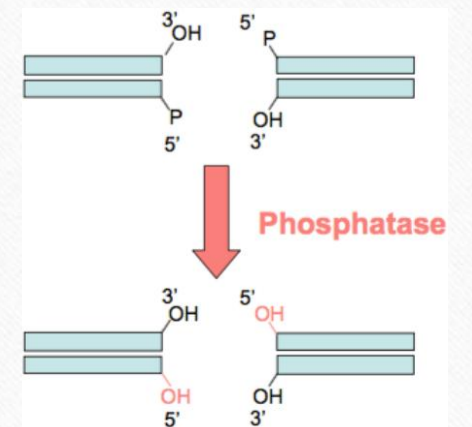


✓ Digestion du vecteur et de l'insert par une même **enzyme de restriction**

✓ **Ligation** par la **T4 DNA ligase** : formation d'une liaison **phosphodiester**

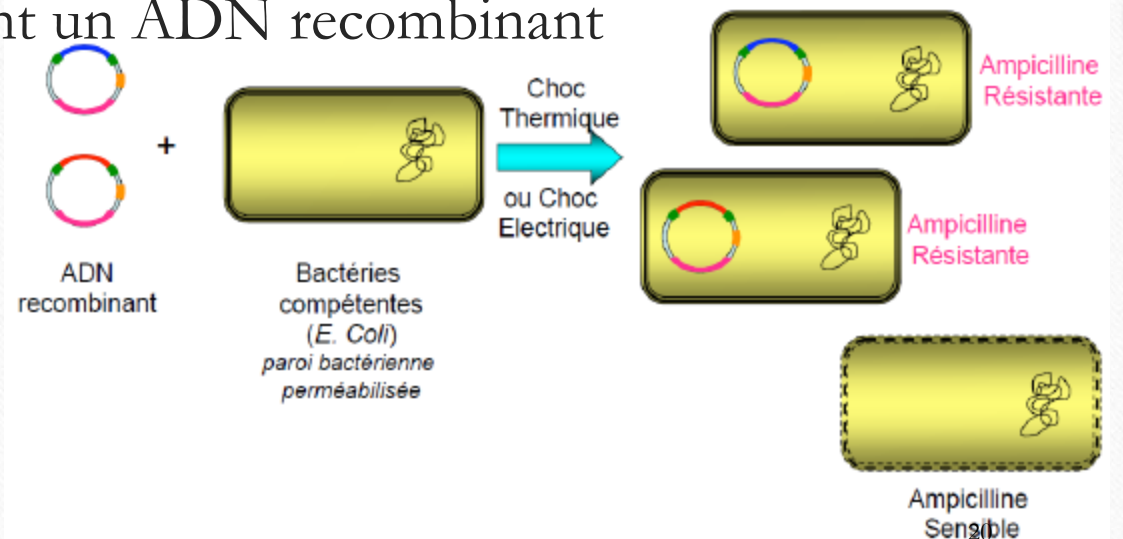
✓ Etape de **déphosphorylation** : Si les fragments d'ADN ont des extrémités **franches**, la ligase peut éventuellement refermer le vecteur **avec ou sans insert**

Une **phosphatase** va alors retirer les **P en 5'** de chaque extrémité



Introduction du vecteur dans une cellule hôte : transformation bactérienne

- Afin que le plasmide rentre dans la bactérie, il faut **perméabiliser sa membrane** : on utilisera un **choc thermique, électrique ou chimique**
- Au final, **certaines** bactéries porteront un ADN recombinant



Sélection des clones bactériens

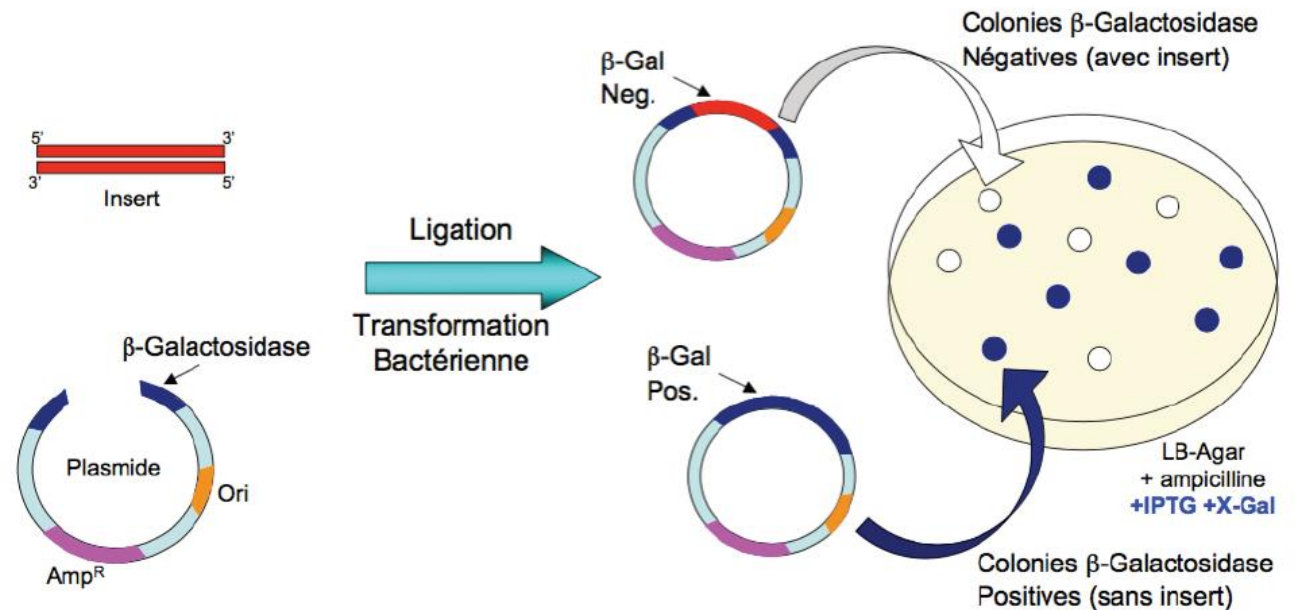
- Les bactéries sont étalées dans une boîte de pétri (gélose) avec un **antibiotique**
- Ainsi, **seules** les bactéries ayant **intégré l'ADN recombinant** (qui porte un gène de résistance) survivront à l'antibiotique
- Seules les bactéries ayant intégré le vecteur (**avec ou sans insert**) pourront proliférer
- Il faut maintenant sélectionner les vecteurs **qui ont intégrés** l'insert

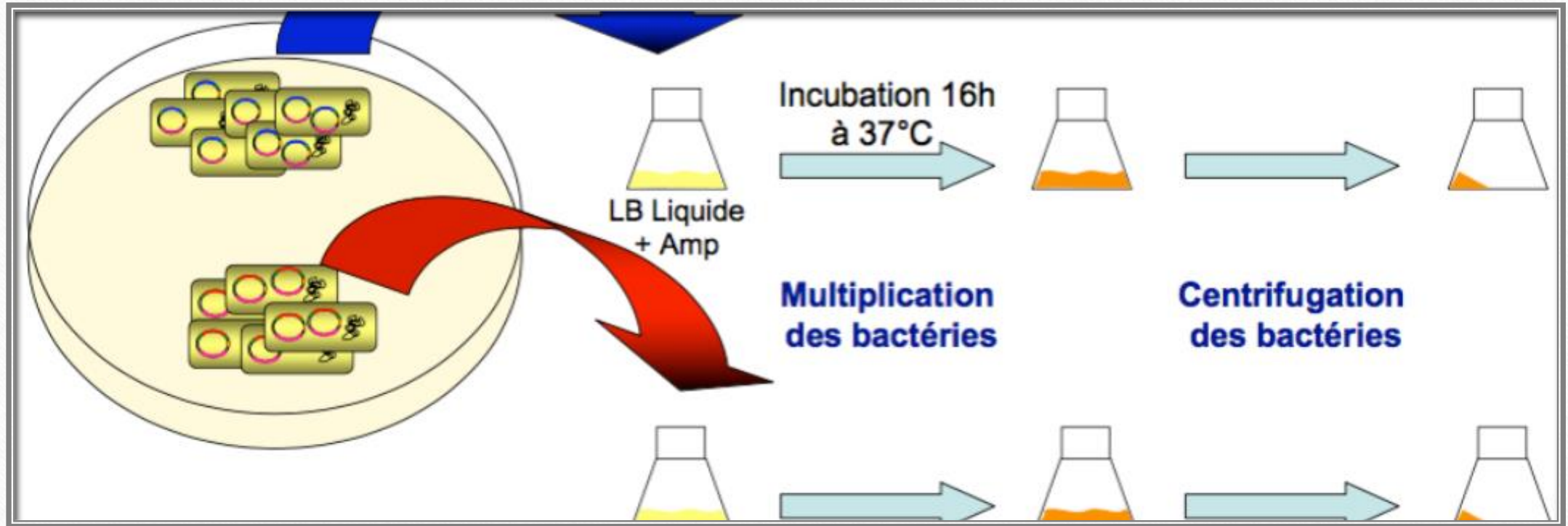
La sélection blanc/bleu

Le vecteur porte un gène codant pour la β -Galactosidase

C'est dans ce gène que va s'insérer l'insert

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



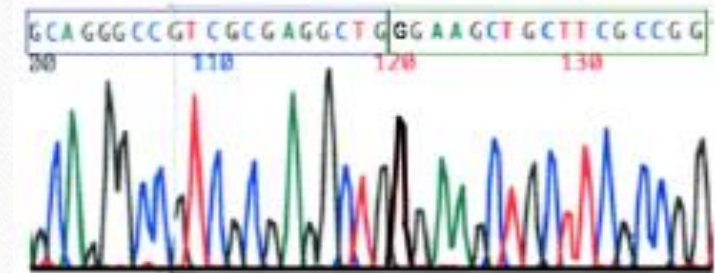


Amplification des clones bactériens

Chaque colonie est mise en culture dans un milieu adapté à la croissance bactérienne, **toujours en présence d'antibiotique** → Grande quantité de fragments d'ADN pur

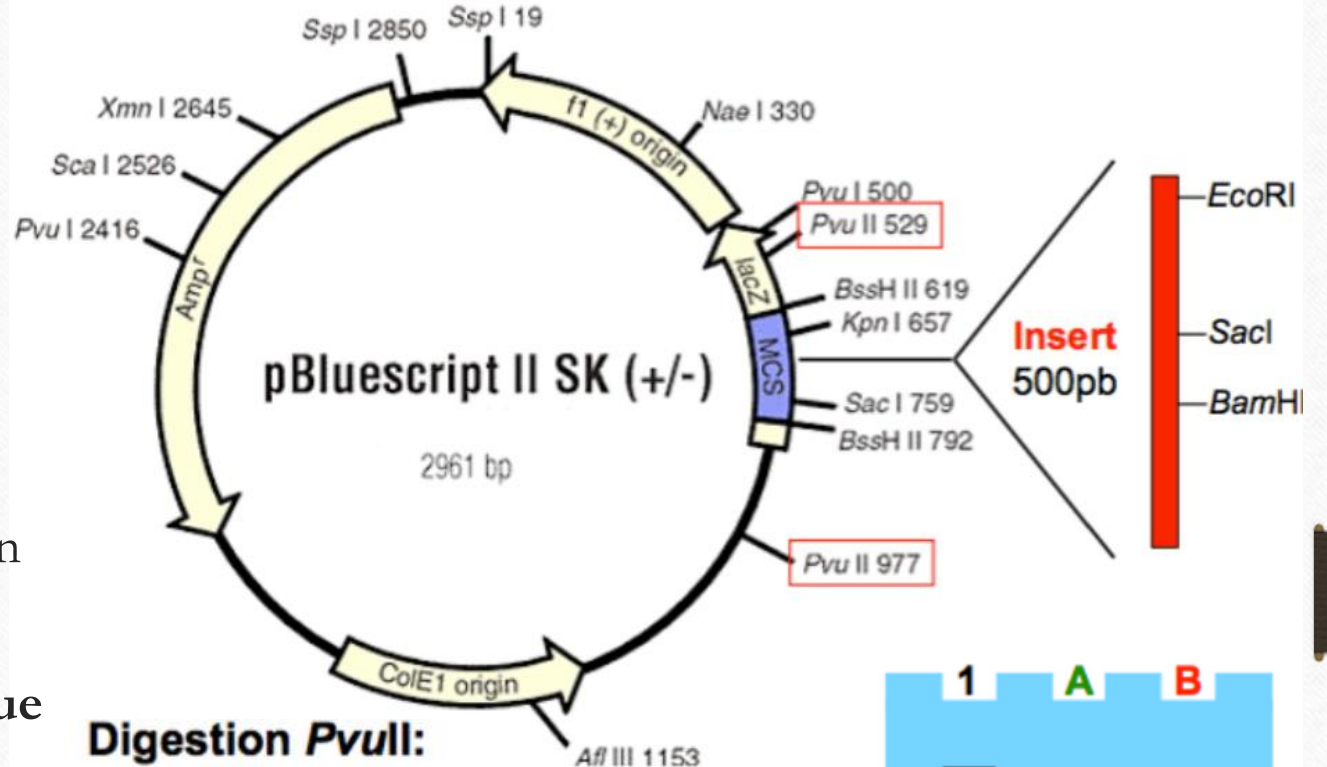
Séquençage des fragments d'ADN

- 1) Lyse des bactéries pour récupérer l'ADN recombinant
- 2) Réalisation d'une **carte de restriction** : analyse des ADN recombinants par **digestion enzymatique** afin de **vérifier que le plasmide contient bien l'insert**
- 3) Vérification de chaque insert par **séquençage**



Un exemple de carte de restriction

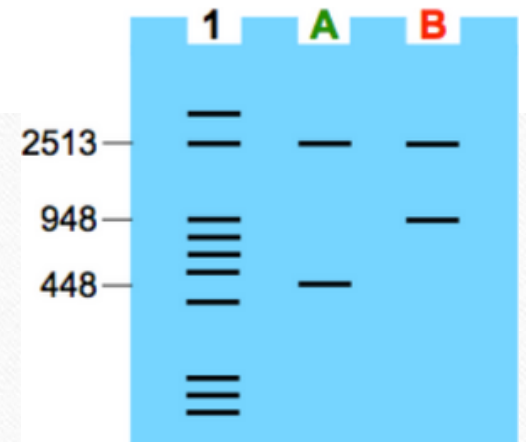
Un même enzyme de restriction coupe en deux points du plasmide
Cela donne des fragments de taille connue



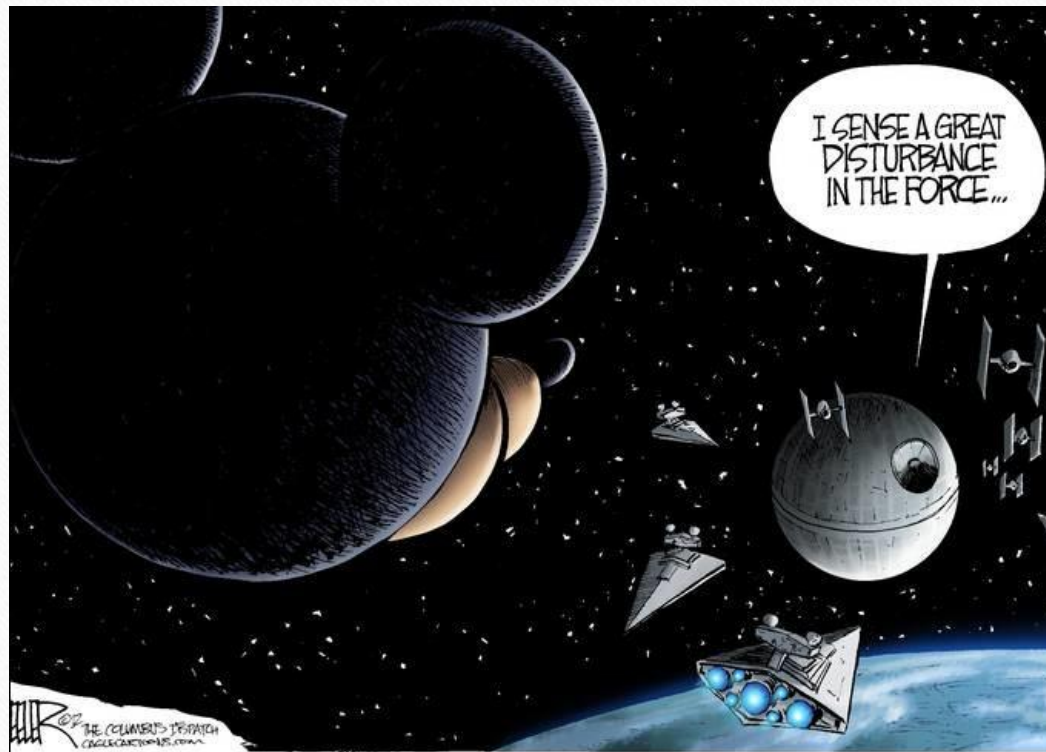
Digestion PvuII:

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

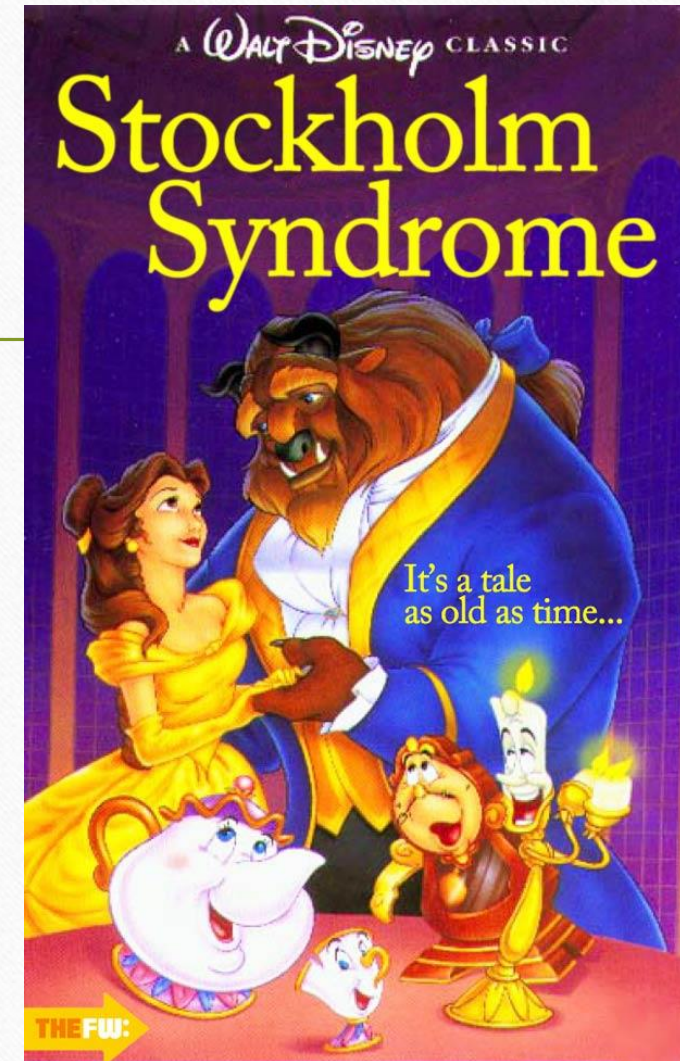
B- Plasmide avec insert:
977-529 = 448 bp
+ 500bp = 948bp



V Clonage d'expression



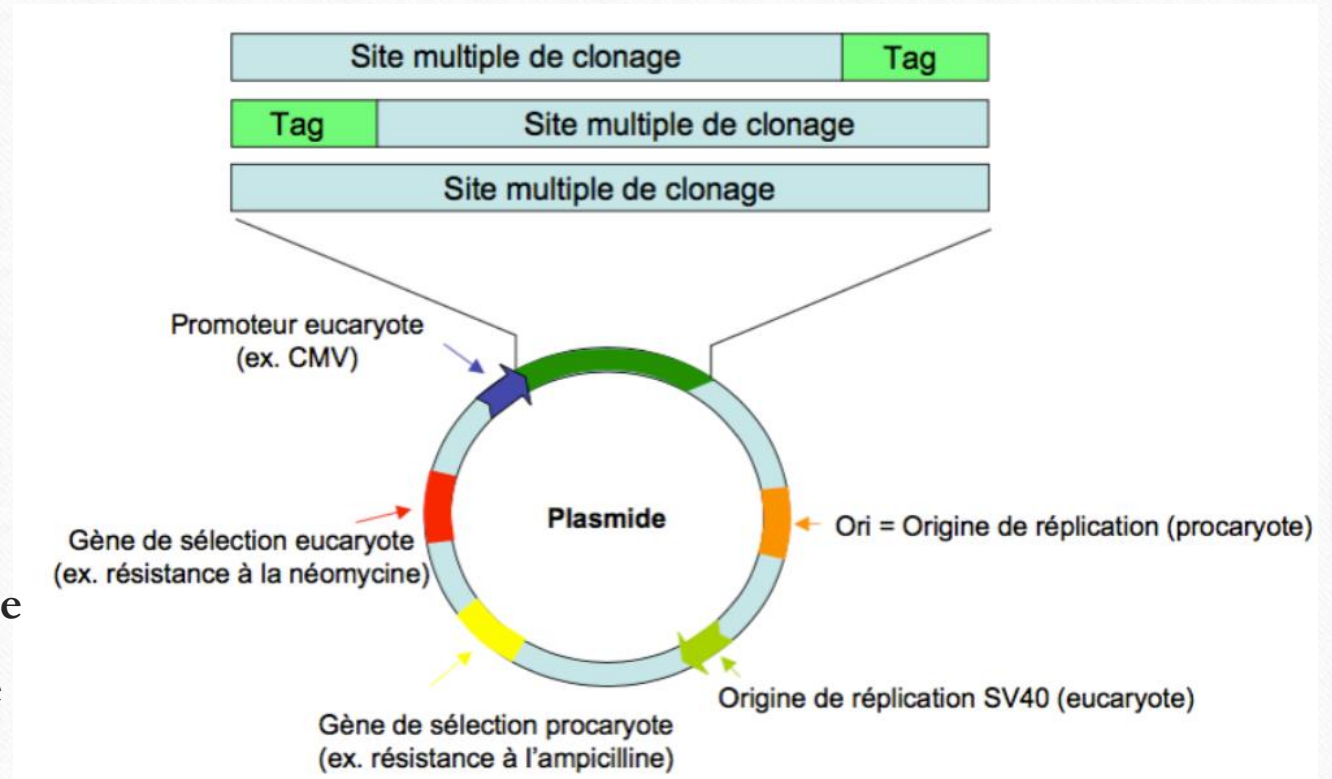
DISNEY ACQUIRES "STAR WARS"



Vecteur d'expression eucaryote

Les plasmides utilisés contiennent :

- Un **site multiple de clonage**
- Une **origine de réplication procaryote**
- Une **origine de réplication eucaryote**
- Un **gène de sélection procaryote**
- Un **gène de sélection eucaryote**
- Un **promoteur eucaryote**

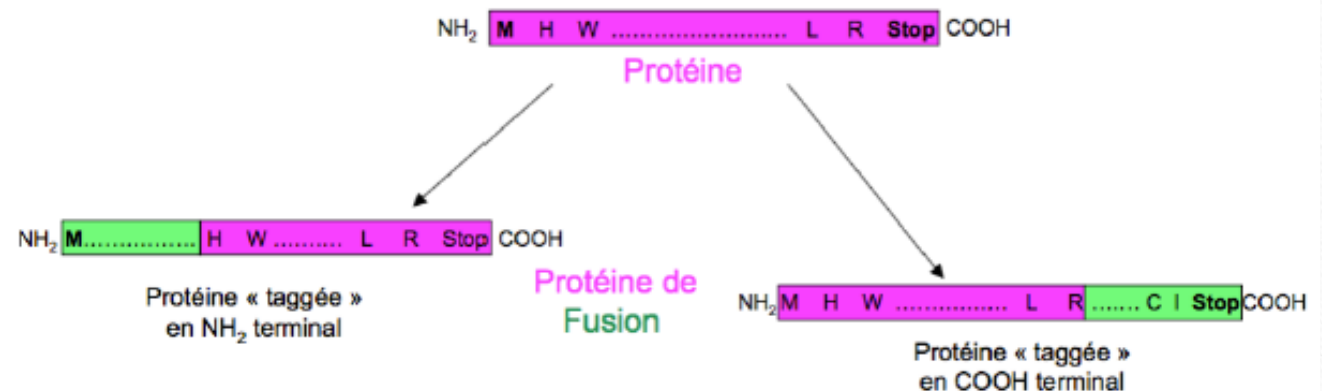


Protéine de fusion :

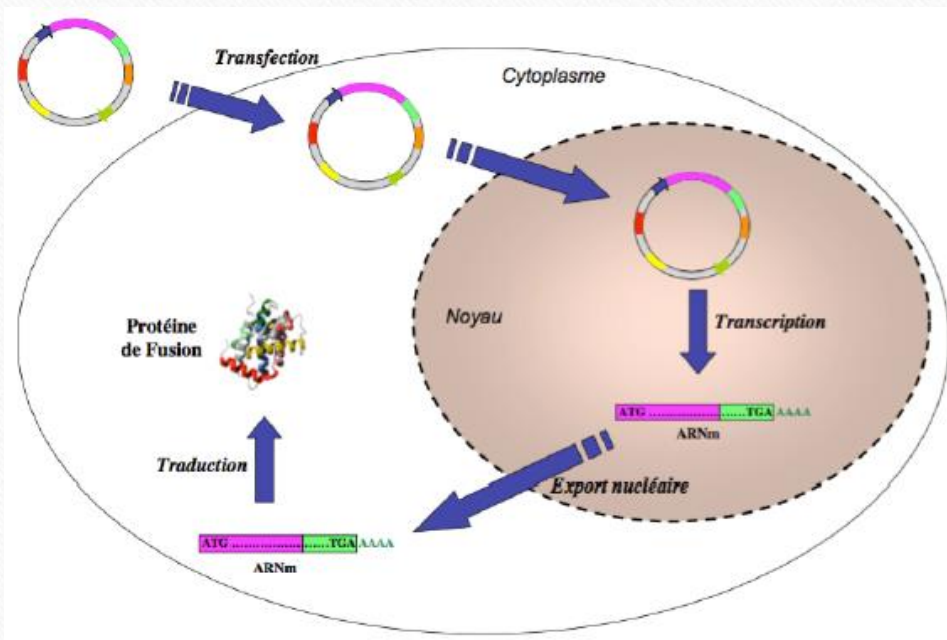
Une fois la protéine surexprimée, il est nécessaire de pouvoir la suivre grâce à des **anticorps** ou une **étiquette**

- L'**étiquette**, ou « **Tag** » est une répétition de **petites séquences définies** greffées en **C-term** ou **N-term**
- Ces Tag peuvent être **reconnus par un anticorps**, ou être **fluorescents**

Protéine de fusion = ADNc d'intérêt + étiquette

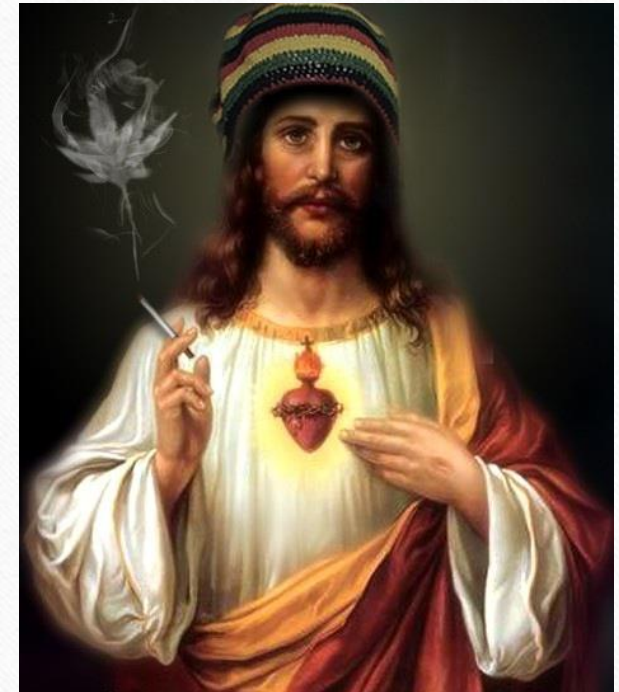


Transfection des cellules eucaryotes



- **Transfert dans une cellule eucaryote** d'un ADN exogène, et **surexpression** de cet ADN par la cellule
- Sont utilisables des réactifs **chimiques**, des méthodes **physiques** ou des **particules virales**
- **NB :**
 - *Transformation* → *Cellule bactérienne*
 - *Transfection* → *Cellule eucaryote*

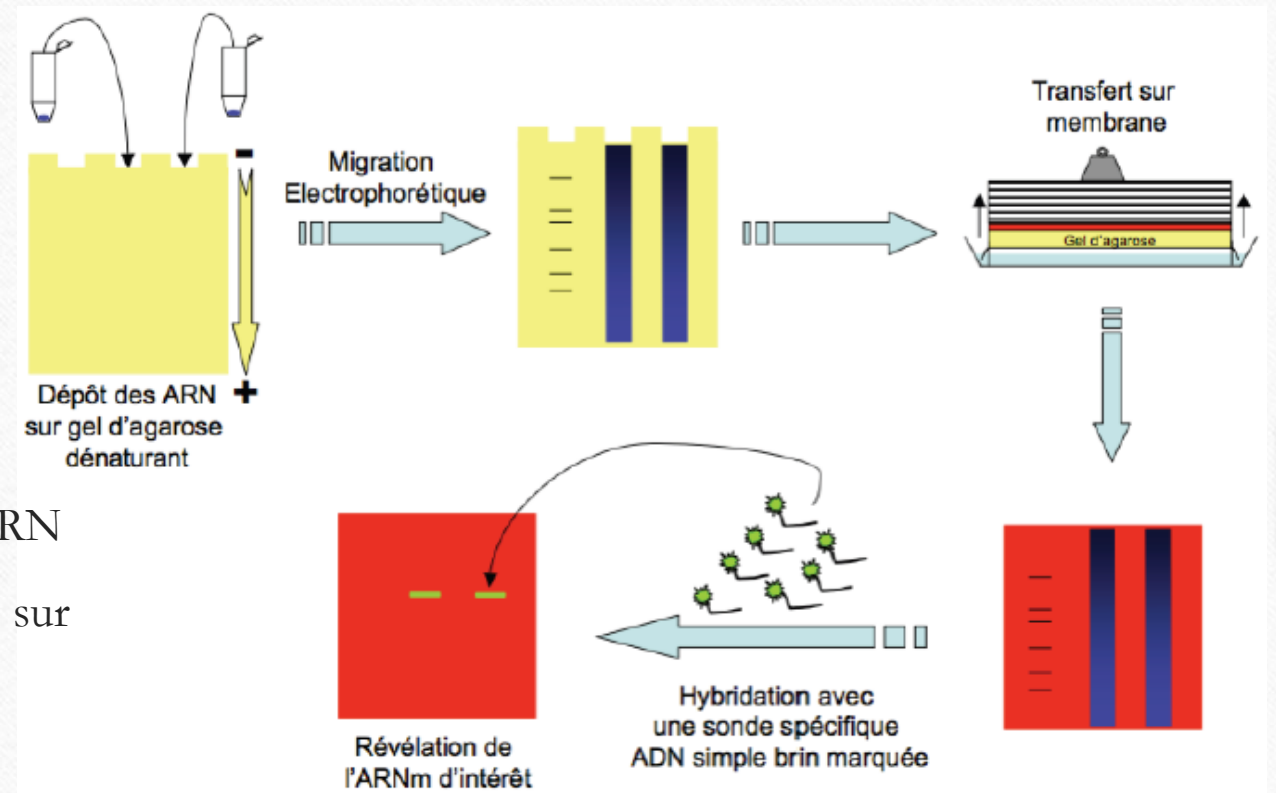
VI Etudes d'expression



Etude de l'ARN

Utilisation du Northern-Blot :

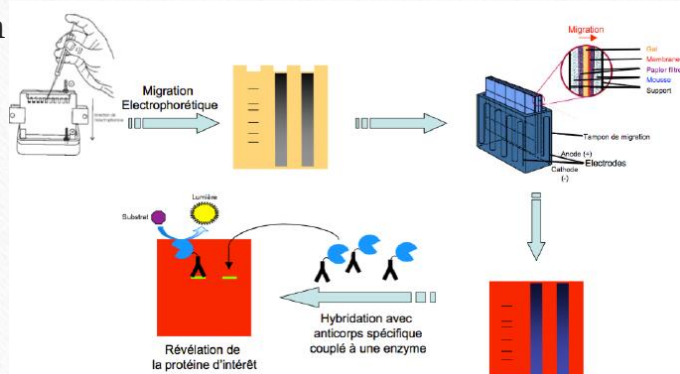
- 1) Lyse des cellules / tissus et purification de l'ARN
- 2) Séparation des ARN en fonction de leur taille, sur un **gel d'agarose dénaturant** par migration électrophorétique
- 3) Transfert des ARN sur une **membrane**
- 4) Révélation des ARN d'intérêts après **hybridation d'une sonde complémentaire marquée**



Expression et localisation des protéines

Le **Western-Blot**, spécifique aux protéines, est semblable au Northern-Blot pour l'ARN

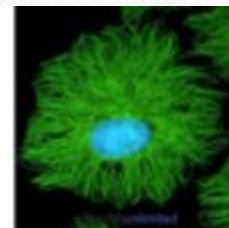
La différence réside dans l'utilisation d'un gel d'**acrylamide** lors de l'électrophorèse, et d'**anticorps spécifiques** lors de la révélation



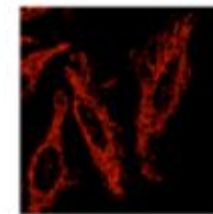
- L'étude de la **localisation** se fait grâce à l'**immunofluorescence** : visualisation des protéines au niveau de la **cellule**

- La visualisation se fait :

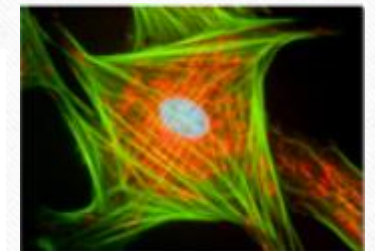
- Soit directement par **microscopie à fluorescence** après un **tag GFP** de la protéine #*Biocell tmtc*
- Soit après **fixation d'anticorps** couplés à des **marqueurs fluorescents**



Marquage : Réseau des filaments de tubuline (Vert), Noyau (Bleu)



Marquage : Réseau des mitochondries (Rouge)



Quelques QCMs

La légende dit que ceux qui répondront juste auront des Schokobons



QCM 1 : A propos de l'extraction de l'ADN et de l'ARN

- A) L'extraction d'ADN nécessite un prélèvement de sang sous anticoagulant, généralement de l'héparine
- B) Les globules rouges, inutilisables par leur absence de noyau, seront lysés par une solution hypotonique
- C) La solution de protéinase K permet de dégrader les protéines qui protègent l'ADN de la cellule
- D) L'ARN est très instable, et permet surtout l'étude de l'expression d'un gène
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

QCM 1 : A propos de l'extraction de l'ADN et de l'ARN

- A) L'extraction d'ADN nécessite un prélèvement de sang sous anticoagulant, généralement de l'héparine
- B) Les globules rouges, inutilisables par leur absence de noyau, seront lysés par une solution hypotonique
- C) La solution de protéinase K permet de dégrader les protéines qui protègent l'ADN de la cellule
- D) L'ARN est très instable, et permet surtout l'étude de l'expression d'un gène
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

QCM 2 : A propos de l'achondroplasie

- A) C'est une chondrodysplasie due à une mutation à transmission autosomique dominante
- B) Pourtant, dans 90% des cas, la mutation apparaît de novo, et se déclare chez un enfant avec des parents sains
- C) Le signe d'appel échographique est celui dit des « fémurs courts »
- D) Cependant, dans l'achondroplasie, l'intelligence reste normale
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

QCM 2 : A propos de l'achondroplasie

- A) C'est une chondrodysplasie due à une mutation à transmission autosomique dominante
- B) Pourtant, dans 90% des cas, la mutation apparaît de novo, et se déclare chez un enfant avec des parents sains
- C) Le signe d'appel échographique est celui dit des « fémurs courts »
- D) Cependant, dans l'achondroplasie, l'intelligence reste normale
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

QCM 3 : A propos de la digestion enzymatique

- A) Les enzymes de restriction utilisées sont d'origine virale
- B) Elles coupent au milieu de l'ADN simple brin, elles sont ainsi appelées endonucléases
- C) La coupure est reproductible et spécifique, au milieu d'une séquence palindromique
- D) Elle peut être à bout francs ou cohésifs
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

QCM 3 : A propos de la digestion enzymatique

- A) Les enzymes de restriction utilisées sont d'origine virale
- B) Elles coupent au milieu de l'ADN simple brin, elles sont ainsi appelées endonucléases
- C) La coupure est reproductible et spécifique, au milieu d'une séquence palindromique
- D) Elle peut être à bout francs ou cohésifs
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

QCM 4 : A propos des études d'expression

- A) L'étude de l'ARN utilise la technique du Southern-Blot afin d'étudier l'ARN
- B) Les ARN sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose dénaturant
- C) Les protéines sont révélées grâce à des anticorps spécifiques
- D) La technique spécifique aux protéines est là celle du Northern-Blot
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

QCM 4 : A propos des études d'expression

- A) L'étude de l'ARN utilise la technique du Southern-Blot afin d'étudier l'ARN
- B) Les ARN sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose dénaturant
- C) Les protéines sont révélées grâce à des anticorps spécifiques
- D) La technique spécifique aux protéines est là celle du Northern-Blot
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Exemple d'électrophorèse

Le gel suivant correspond à l'analyse d'un produit d'amplification obtenu à partir de l'ADN de 2 patients différents.



- 1 : patient A
2 : patient B
3 : témoin négatif
Rappel : le témoin négatif permet de vérifier l'absence de contamination lors de la PCR
+

A) La taille du produit d'amplification obtenu à partir du patient A est supérieure à celle du produit d'amplification obtenu à partir du patient B

B) La taille du produit d'amplification obtenu à partir du patient A est inférieure à celle du produit d'amplification obtenu à partir du patient B

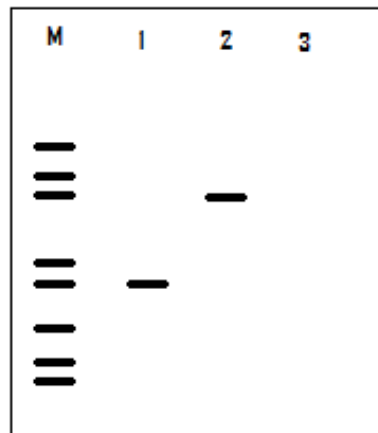
C) Il y a absence de contamination

D) La migration électrophorétique permet une séparation des fragments d'ADN en fonction de leur poids moléculaire

E) Aucune de ces réponses n'est correcte

Exemple d'électrophorèse

Le gel suivant correspond à l'analyse d'un produit d'amplification obtenu à partir de l'ADN de 2 patients différents.



- 1 : patient A
2 : patient B
3 : témoin négatif
Rappel : le témoin négatif permet de vérifier l'absence de contamination lors de la PCR
+

A) La taille du produit d'amplification obtenu à partir du patient A est supérieure à celle du produit d'amplification obtenu à partir du patient B

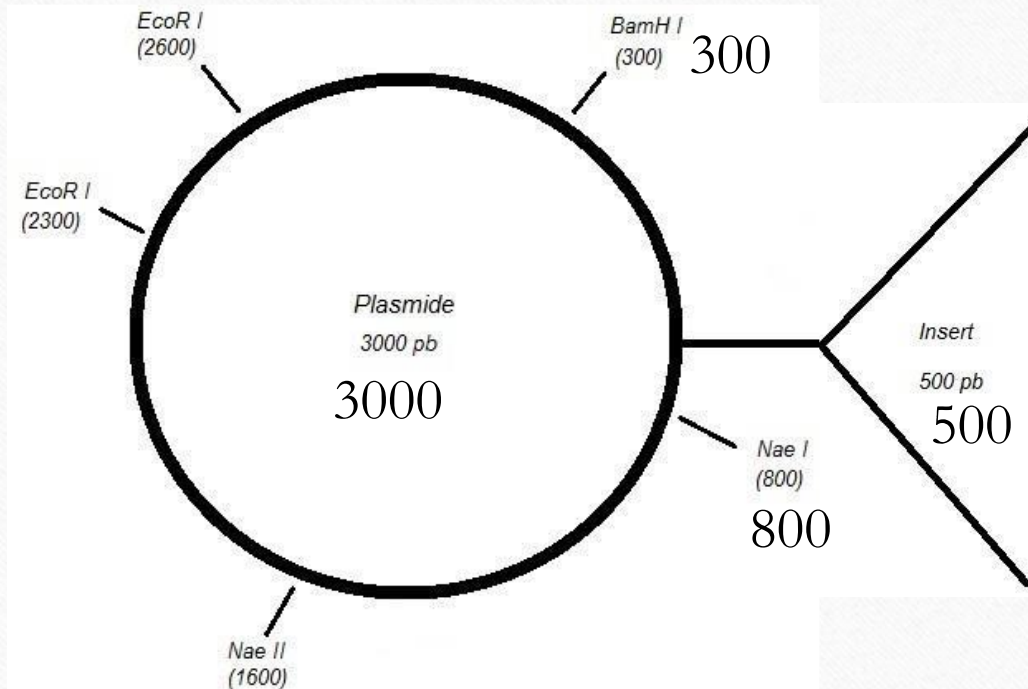
B) La taille du produit d'amplification obtenu à partir du patient A est inférieure à celle du produit d'amplification obtenu à partir du patient B

C) Il y a absence de contamination

D) La migration électrophorétique permet une séparation des fragments d'ADN en fonction de leur poids moléculaire

E) Aucune de ces réponses n'est correcte

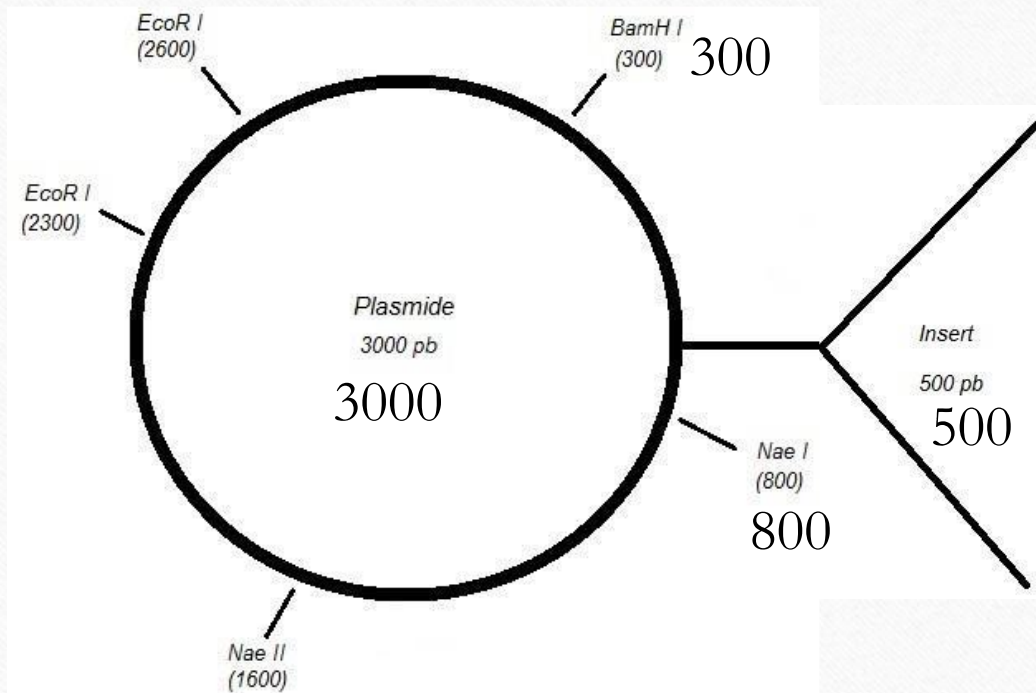
Exemple de carte de restriction (1)



Après digestion enzymatique avec les enzymes Nae I et BamH I, quels sont les fragments que l'on pourra obtenir après une migration sur gel électrophorétique ?

- A) Plasmide sans insert : 1300 pb + 1700 pb
- B) Plasmide avec insert : 2750 pb + 750 pb
- C) Plasmide sans insert : 2500 pb + 500 pb
- D) Plasmide avec insert : 1800 pb + 1700 pb
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

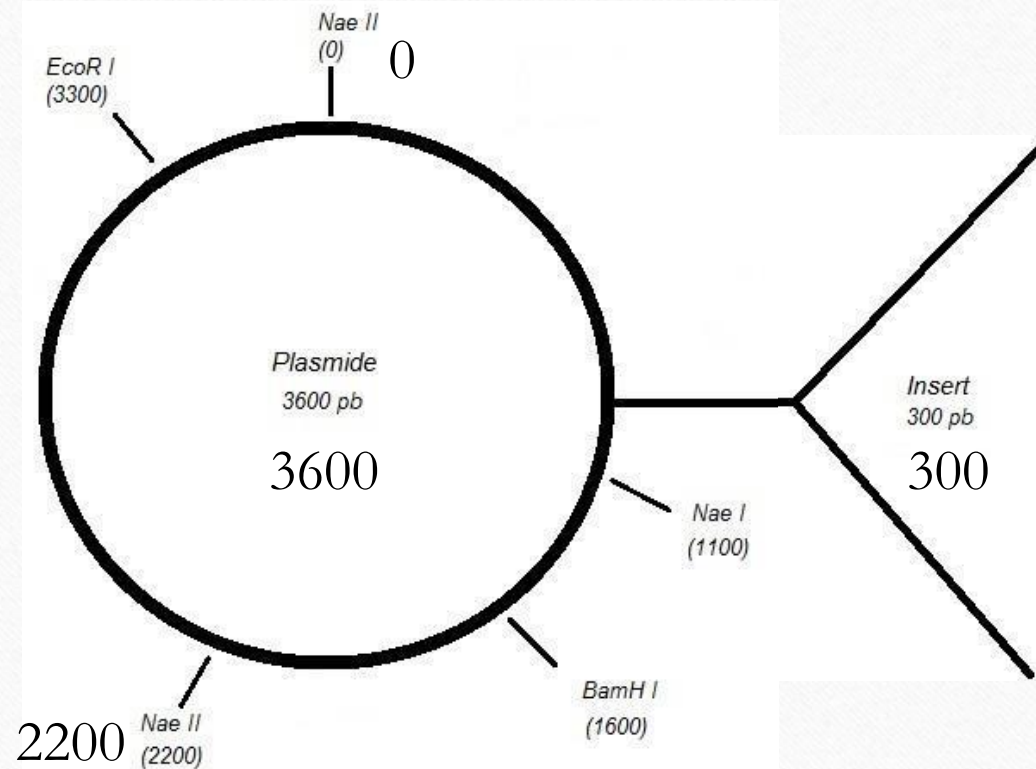
Exemple de carte de restriction (1)



Après digestion enzymatique avec les enzymes Nae I et BamH I, quels sont les fragments que l'on pourra obtenir après une migration sur gel électrophorique ?

- A) Plasmide sans insert : 1300 pb + 1700 pb
- B) Plasmide avec insert : 2750 pb + 750 pb
- C) Plasmide sans insert : 2500 pb + 500 pb
- D) Plasmide avec insert : 1800 pb + 1700 pb
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

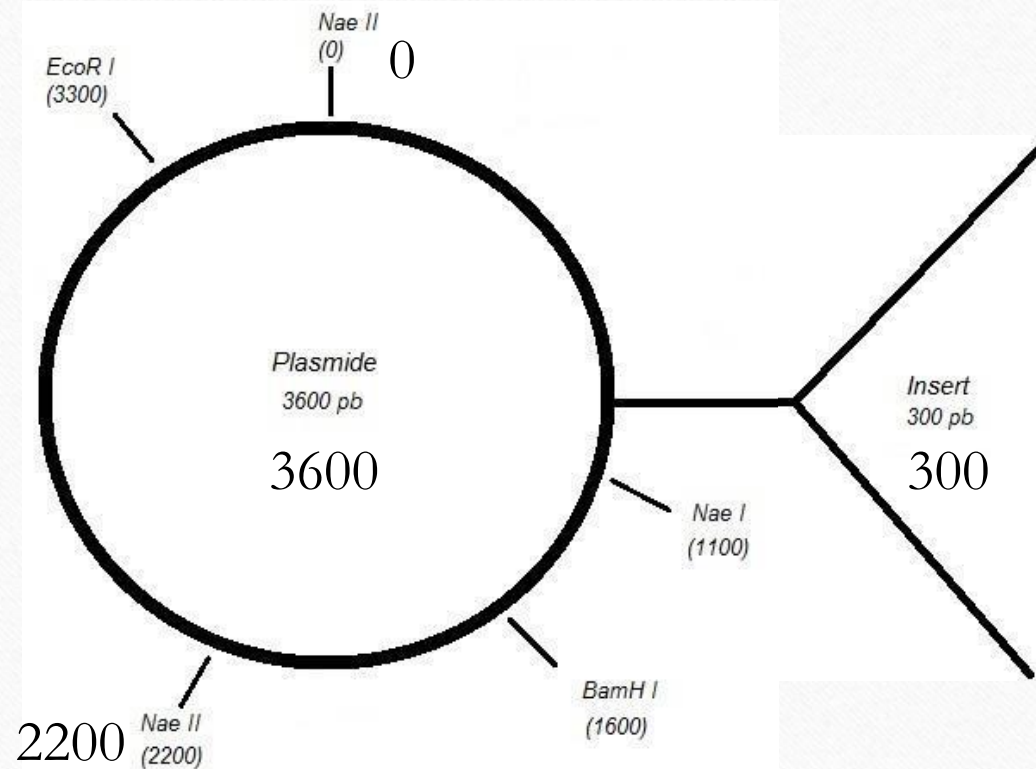
Exemple de carte de restriction (2)



Après digestion enzymatique avec l'enzyme *Nae II*, quels sont les fragments que l'on pourra obtenir après une migration sur gel électrophorétique ?

- A) Plasmide sans insert : 2200 pb + 1400 pb
- B) Plasmide avec insert : 2500 pb + 1400 pb
- C) Plasmide sans insert : 2200 pb + 1700 pb
- D) Plasmide avec insert : 2500 pb + 1700 pb
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

Exemple de carte de restriction (2)



Après digestion enzymatique avec l'enzyme *Nae II*, quels sont les fragments que l'on pourra obtenir après une migration sur gel électrophorétique ?

- A) Plasmide sans insert : 2200 pb + 1400 pb
- B) Plasmide avec insert : 2500 pb + 1400 pb
- C) Plasmide sans insert : 2200 pb + 1700 pb
- D) Plasmide avec insert : 2500 pb + 1700 pb
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses