

## UE11 : Principales techniques de biologie moléculaire (Partie 2)

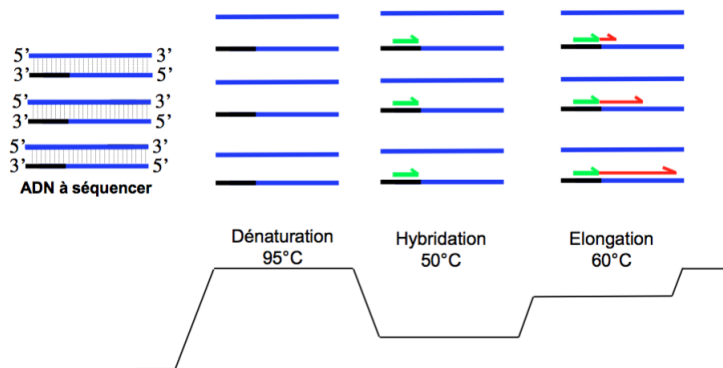
### I. Séquençage de l'ADN

**But** : Déterminer la **succession des nucléotides** qui composent l'ADN

**Méthode de référence** : **Méthode de SANGER** = Méthode enzymatique des **di-désoxyribonucléotides (ddNTP)**

**Principe** :

- **Synthèse d'un brin complémentaire** fidèle à la séquence d'ADN à étudier, **à partir d'une amorce**, par l'ADN polymérase
- Cycles successifs (30 à 35 cycles) : **dénaturation (95°C)**, **hybridation (50°C)**, **élongation (60°C)**



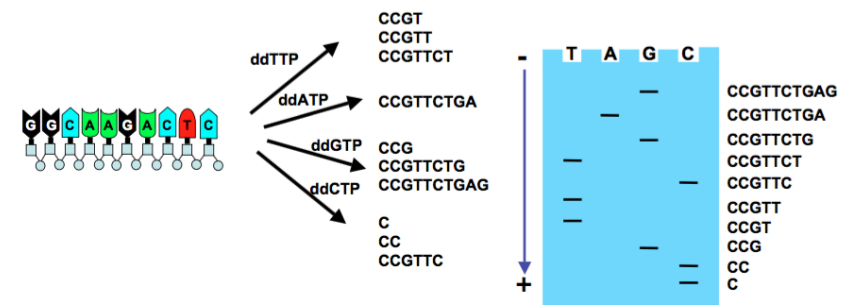
- Elongation d'**un seul brin** → Utilisation d'**un seul primer (différence avec la PCR)**
- **Incorporation au hasard d'un dNTP ou d'un ddNTP** par l'ADN polymérase
- Incorporation d'un **ddNTP** = **Arrêt de la synthèse**

**Au final** : Obtention en grand nombre de fragments d'ADN de **tailles différentes**

### A. Méthode de Sanger (1977)

→ **4 réactions indépendantes** contenant chacune **un seul ddNTP (A, T, C ou G) radiomarqué**

Dans chaque tube, on retrouve donc : **4 dNTP (A, T, C et G) + 1 ddNTP radiomarqué + amorce + polymérase + fragment d'ADN à séquencer**

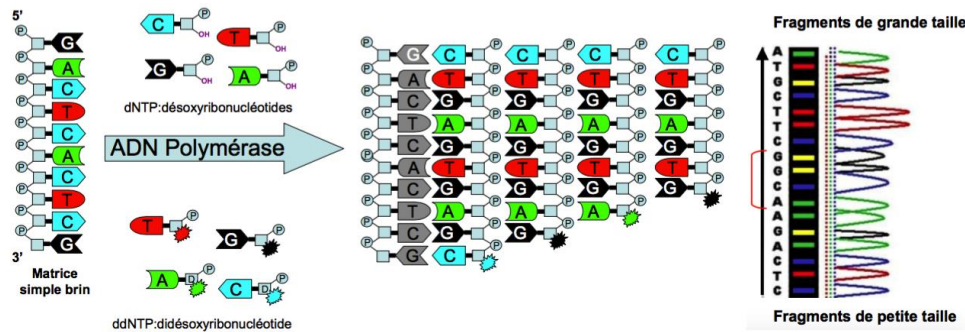


Les produits synthétisés sont **séparés**, en fonction de leur **taille**, par **migration électrophorétique**.

→ Méthode **extrêmement longue** et **pas très performante** ⇒ *Lecture entre 100 et 200 pb seulement, pour 2/3 jours de travail*

### B. Méthode automatisée

→ Couplage de chaque ddNTP à un **fluorochrome de couleur différente** permettant l'**ajout des 4 ddNTP dans le même tube réactionnel**



Les produits synthétisés sont **séparés**, en fonction de leur **taille**, par **migration électrophorétique**. Et en fonction de la **couleur des fragments** détectée, on sait de quel nucléotide il s'agit.

### Séquenceurs automatiques : Séquenceurs capillaires

- Migration électrophorétique dans de petits capillaires remplis de gel d'agarose
- **Utilisation en routine** en laboratoire de génétique
- Présence d'une caméra laser qui va identifier les fluorochromes et qui va détecter en premier les molécules les plus petites
- Système beaucoup **plus rapide** et **plus performant**

## II. Applications en pathologies

→ Recherche de **mutations dans un gène**

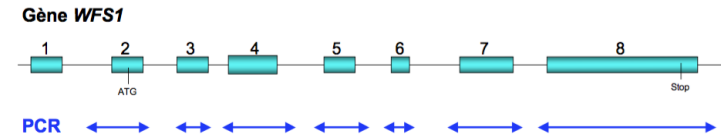
### ❖ SYNDROME DE WOLFRAM

- Transmission **autosomique récessive**
- 2 types de mutation : **mutation par substitution** ou présence d'un **variant d'épissage**

Tableau clinique : Diabète, atrophie optique, surdité, troubles neurologiques

Gène responsable : **WFS1**

- 8 exons
- Codon ATG dans le 2<sup>ème</sup> exon
- **Wolframine** = Fonction peu connue, rôle dans le flux calcique

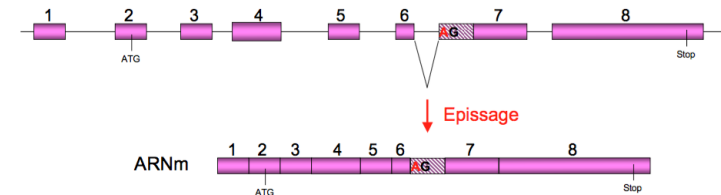


*Rappel* : Les gènes sont formés d'exons séparés par des introns (non codants).

- Transcription = ADN → ARN
- Maturation de l'ARN = Elimination des introns (épissage) + ajout d'une queue poly-A
- Traduction = ARNm → Protéine

→ Une mutation survenant à *n'importe quelle étape de ce processus* peut donc générer une **protéine anormale** et par conséquent une **pathologie**.

➤ **Variant d'épissage** : Création d'un **site cryptique d'épissage**

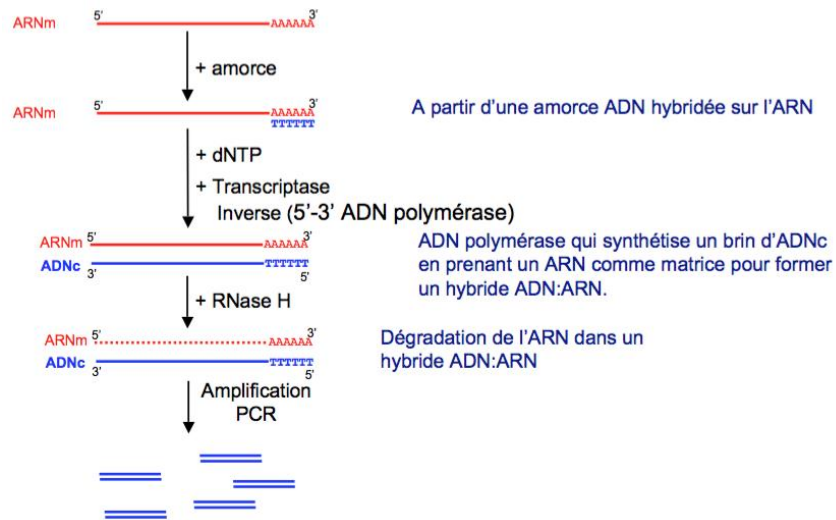


- Mutation au niveau d'un **intron**
- Mutation détectée seulement en travaillant **à partir de l'ARNm**
- Extraction de l'ARNm au phénol chloroforme **ACIDE** ++
- Utilisation d'une **Transcriptase Inverse** car les ARNm ne peuvent pas être amplifiés directement par PCR ⇒ « Copie » de l'ARNm sous forme d'ADN

➤ **Transcriptase Inverse** :

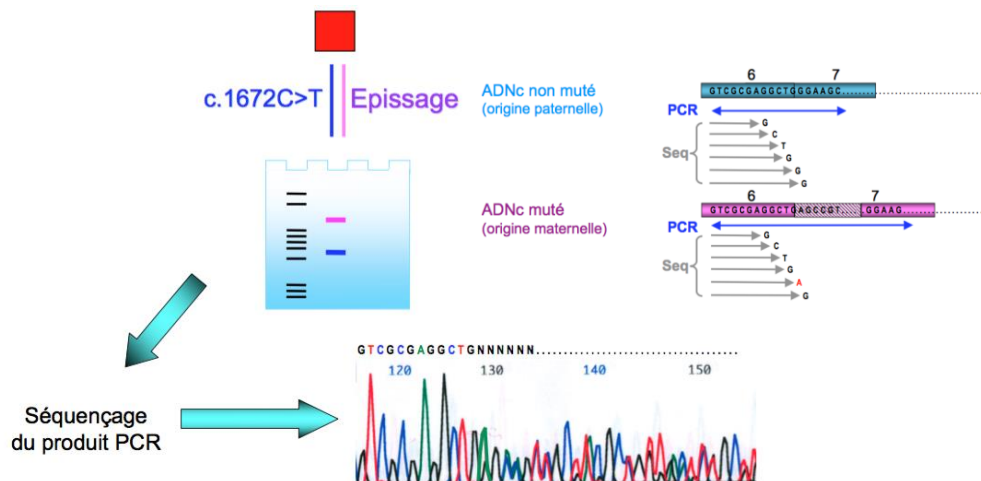
- Enzyme d'**origine virale**
- ADN polymérase qui synthétise un brin d'**ADN complémentaire (ADNc)** en prenant un **ARN** comme **matrice** pour former un **hybride ADN/ARN**
- **Activité 5'-3' polymérase** à partir d'une **amorce d'ADN** hybridée sur l'ARN

*Remarque* : **ADNc = Copie ADN d'une séquence ARN**



**Remarque :** À la fin de la transcription inverse, la **copie d'ADN simple brin** peut aller **directement** en PCR sans passer par l'étape de dénaturation.

Identification de la mutation :



• Analyse des produits PCR après migration électrophorétique : L'**ADNc muté** (en rose) **migre moins loin** car il est **plus lourd** (⇒ présence du **variant d'épissage**).

• Séquençage du produit PCR : **Illisible** (à cause de la **superposition** des séquences de l'allèle d'origine paternelle et de l'allèle d'origine maternelle)

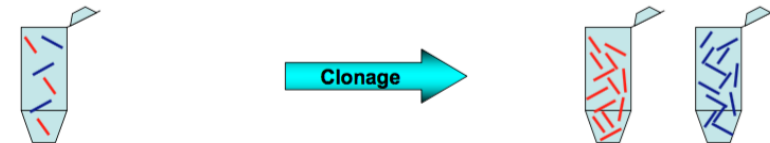
Niavlys

Le Tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

→ Nécessité du **clonage moléculaire** pour séparer les 2 allèles pour pouvoir les **séquencer isolément**

### III. Clonage moléculaire

**But :** Obtenir un grand nombre de **copies identiques absolument pures** d'une séquence donnée d'ADN



Etapes :

1) **Préparer l'ADN recombinant** (= **vecteur** + **insert**)

*Remarque :* Il existe différents inserts et différents vecteurs (en fonction de la taille des inserts à étudier).

2) **Introduire le vecteur dans une cellule hôte** (⇒ **bactéries**)

3) **Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens**

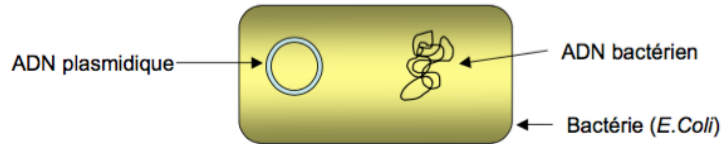
4) **Obtenir un ADN recombinant pur en grande quantité**



### C. Préparation de l'ADN recombinant

#### 1. Vecteurs

- **ADN circulaire double brin** capable de **réplication autonome indépendante** de l'ADN de la cellule hôte (*réplication épisomale*)
- ADN de taille réduite qui permet l'**insertion d'un fragment d'ADN étranger**
- ADN qui possède des **gènes de sélection** permettant de sélectionner les cellules hôtes qui ont intégré le vecteur



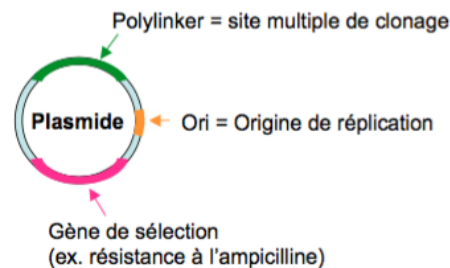
## 2 grandes catégories :

- **Vecteurs de clonage** = Destinés à **isoler** physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et à **amplifier** le nombre de copies de cet ADN
- **Vecteurs d'expression** = Destinés à **transférer un gène dans une cellule hôte eucaryote**

## 2. Clonage dans un plasmide (= un vecteur)

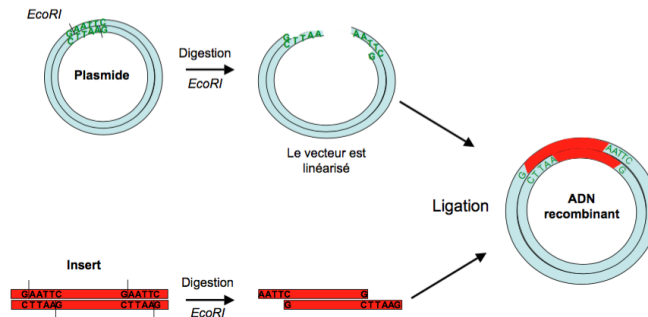
### 3 caractéristiques du plasmide :

- **Polylinker** (ou **site multiple de clonage**) = Séquence parfaitement connue
- **Origine de réplication** = Permet de se multiplier dans la bactérie et indépendamment de celle-ci
- **Gène de sélection** = Gène de résistance à un antibiotique



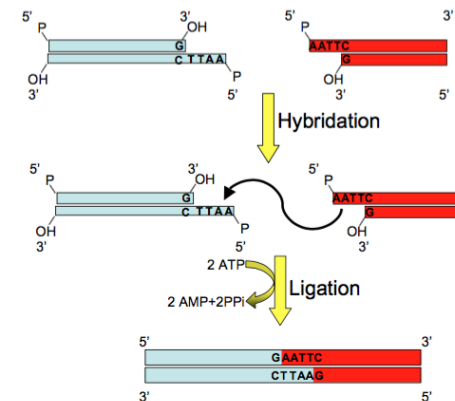
## 3. Préparation du vecteur et de l'insert

→ Digestion par des **enzymes de restriction** :



## 4. Ligation du vecteur et de l'insert

→ Utilisation de la **T4 DNA ligase** = Enzyme catalysant la **formation d'une liaison phosphodiester** entre un 3'-OH et un 5'-Phosphate en présence d'ATP et d'ions divalents (= *liaison covalente entre deux molécules d'ADN*)



*Remarque : L'ADN n'est pas fait pour être simple brin. Donc, pour un vecteur et un insert présentant des extrémités cohésives, il y a une **étape d'hybridation par complémentarité** avant l'action de la ligase.*

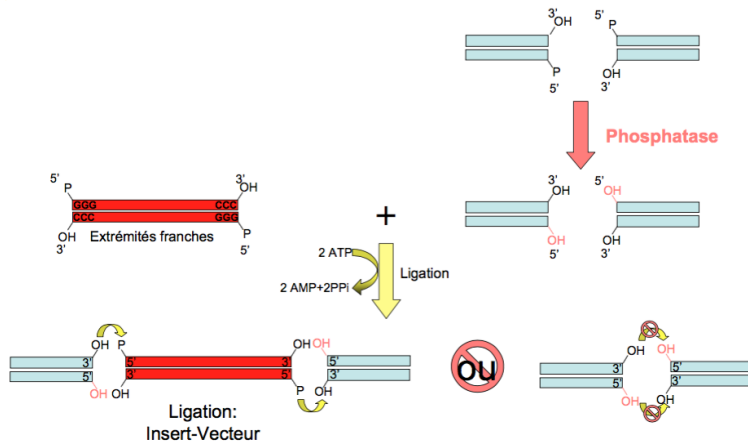
## 5. Etape de déphosphorylation

**Problème** : La ligase referme indifféremment le vecteur **avec ou sans insert**.

**Solution** : Nécessité d'une **étape de déphosphorylation avant la ligation** de fragments d'ADN clivés par des enzymes de restriction qui génèrent des **extrémités franches**

→ Utilisation d'une **phosphatase** = Enzyme qui catalyse le **retrait du phosphate** en 5'

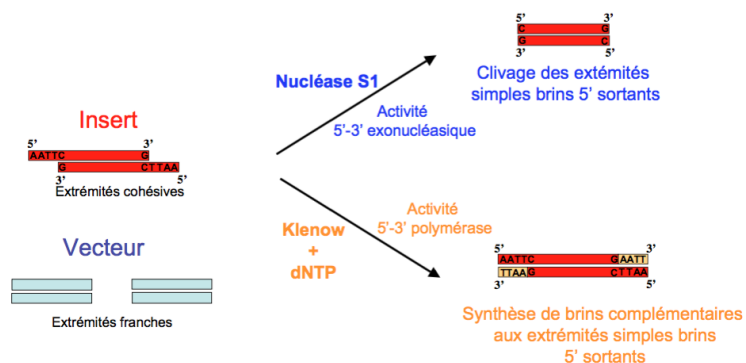
But : La ligase n'a **plus le choix** entre refermer le vecteur sur lui-même ou avec l'insert.



## 6. Stratégies de clonage

De préférence, on utilise le même type d'enzymes de restriction sur le vecteur et sur l'insert pour avoir les mêmes extrémités franches ou cohésives.

Cependant, il peut arriver que l'on ne puisse pas utiliser les mêmes enzymes pour le vecteur (*pour lequel on a un grand nombre d'enzymes utilisables*) et pour l'insert. On a donc recours à une **stratégie de clonage** car le vecteur et l'insert ne présentent **pas le même type d'extrémités** :

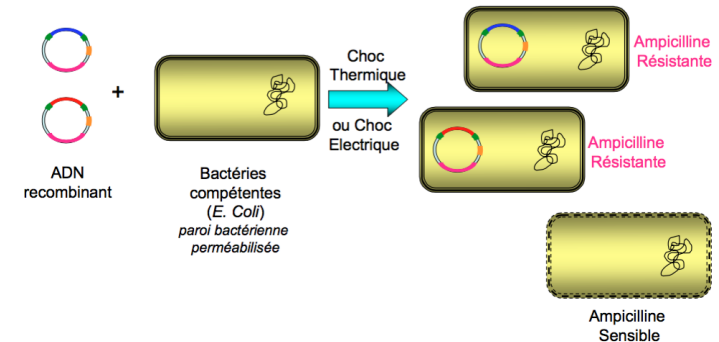


Au final : On considère qu'**un seul produit PCR** a été incorporé dans chaque vecteur :

- Soit l'**ADNc d'origine paternelle** (*non muté pour le variant d'épissage*)
- Soit l'**ADNc d'origine maternelle** (*présentant le variant d'épissage*)

## D. Introduction du vecteur dans une cellule hôte

→ **TRANSFORMATION bactérienne**



Au final : On obtient des **bactéries avec un seul type d'ADN recombinant** (*càd avec un seul produit PCR*) et aussi des **bactéries non transformées** (*càd n'ayant pas intégré le plasmide et par conséquent sensibles à l'antibiotique*).

## E. Sélection des clones bactériens

→ Etalé sur une boîte de pétri contenant une **gélose** (= *substance nutritive*) et un **antibiotique** (*ex : ampicilline*)

→ Discrimination, grâce à l'antibiotique, des **bactéries ayant intégré l'ADN recombinant** (*présence du gène de sélection*) des autres

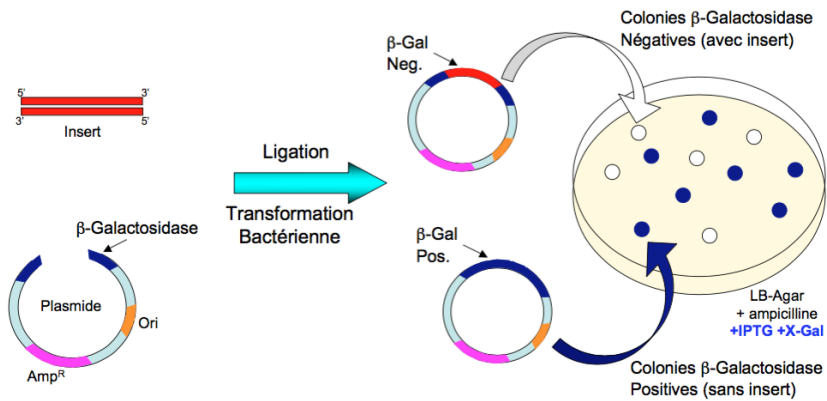
Au final : **Seules les bactéries ayant intégré le vecteur avec ou sans insert pourront proliférer et former des colonies.**

Problème : Certains vecteurs se referment tout de même **sans l'insert malgré l'étape de déphosphorylation**. → *On a jamais 100% d'insertion de l'insert.*

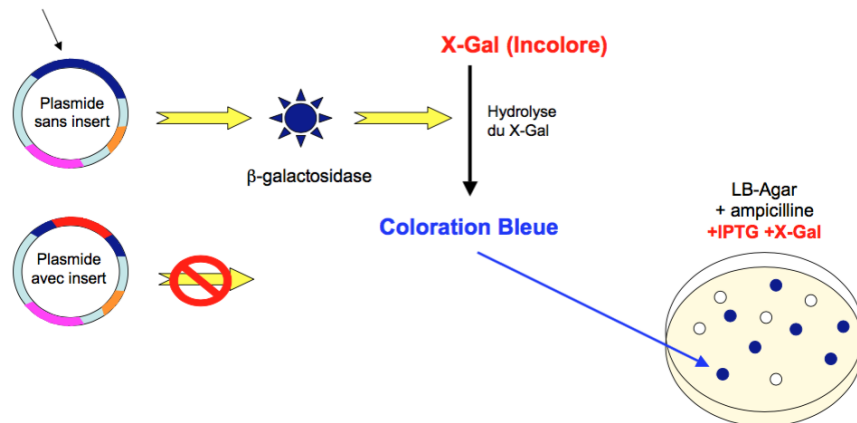
Solution : **Sélection Blanc/Bleu**

→ Polylinker en plein milieu d'un gène codant pour la  **$\beta$ -galactosidase**

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

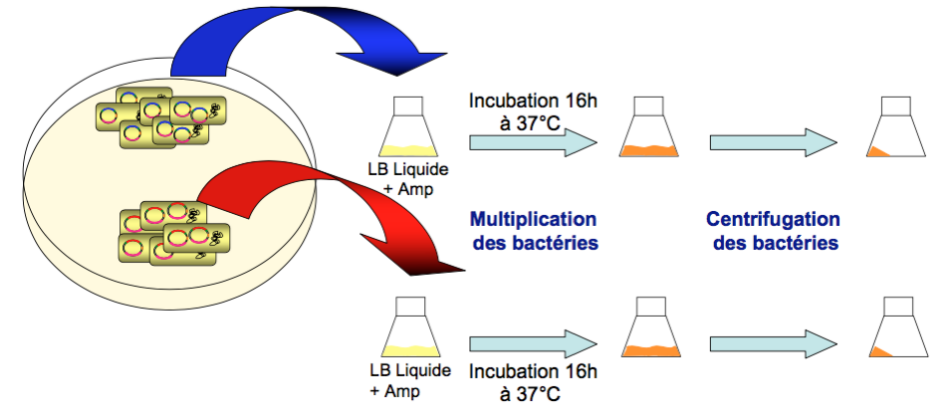


**IPTG** : Induit l'expression de la β-galactosidase



### F. Amplification clonale des clones bactériens

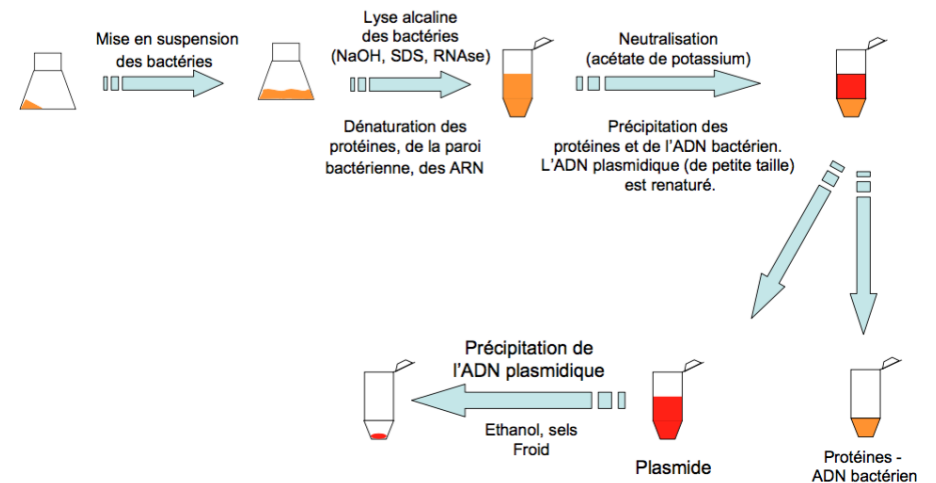
Chaque colonie est mise en culture dans un **milieu liquide de culture adapté à la croissance bactérienne**, et toujours en présence d'ampicilline.



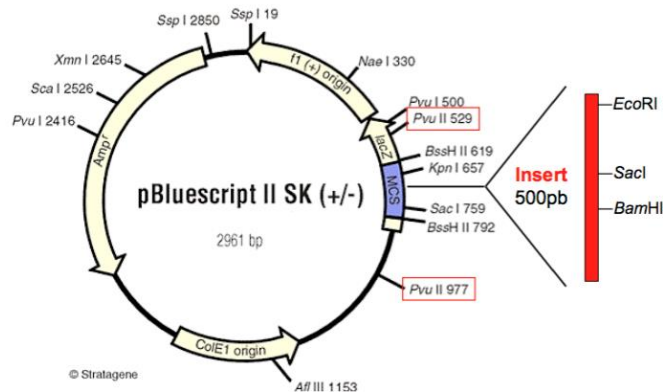
### G. Séquençage des fragments d'ADN pur

On a obtenu un **fragment d'ADN pur** en grande quantité qu'on va pouvoir séquencer individuellement.

→ **Lyse des bactéries afin de récupérer l'ADN recombinant** :

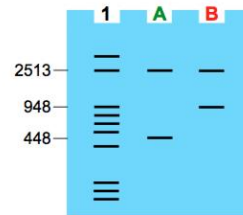


→ **Réalisation de la carte de restriction** = Analyse des ADN recombinants purifiés par **digestion enzymatique** afin de **vérifier que le plasmide contient bien l'insert**



**Digestion PvuII:**

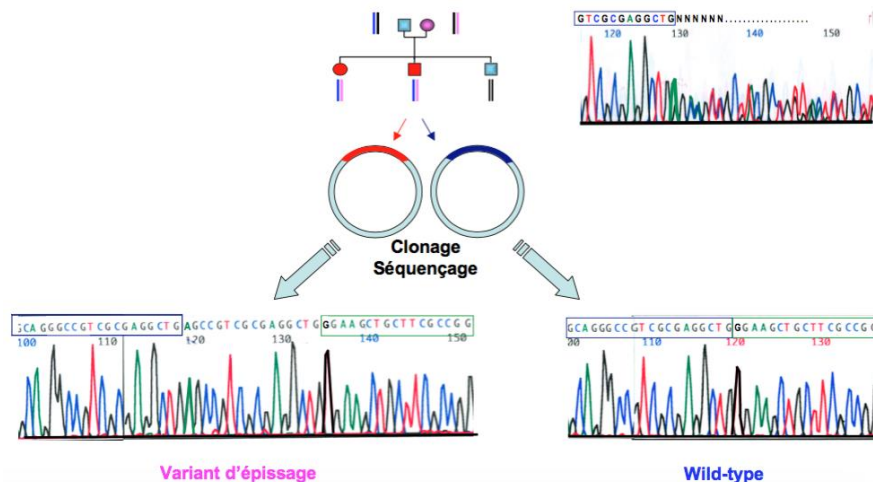
- A- Plasmide sans insert:  
977-529 = 448 bp
- B- Plasmide avec insert:  
977-529 = 448 bp  
+ 500bp = 948bp



1- Marqueur de taille

*Remarque :* Le MCS (= site multiple de clonage ou polylinker) est le lieu d'insertion de l'insert.

→ **Vérification de chaque insert par séquençage :**



Au départ : On avait un séquençage **illisible** car il y avait une superposition du séquençage de l'allèle sauvage et du variant d'épissage.

Après clonage : On a séparé nos 2 produits PCR (*allèle sauvage et allèle avec le variant d'épissage*).

Après séquençage : On a identifié très clairement la partie de l'intron insérée (= *variant d'épissage*) → Impact sur l'ARNm et donc sur la protéine  
Quant au séquençage de l'allèle WT, on retrouve bien la jonction Exon 6 / Exon 7.

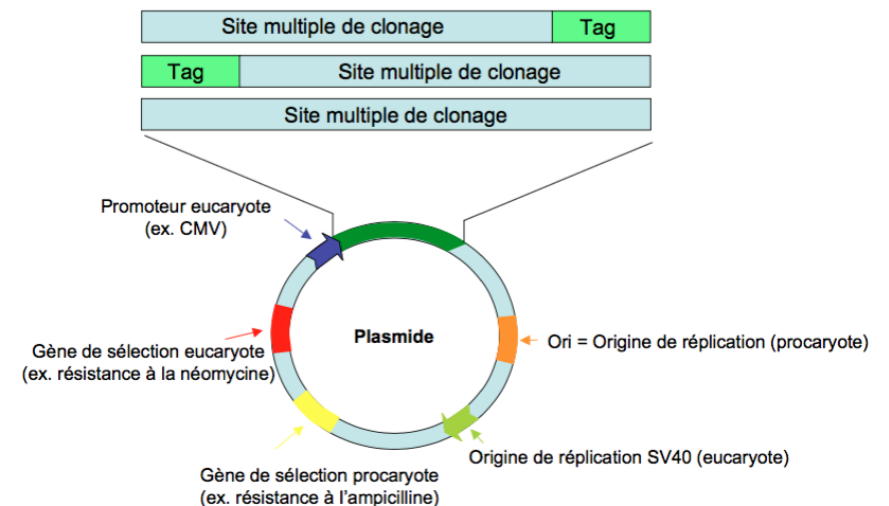
Conclusion : **Une mutation dans une région intronique peut avoir un impact sur la protéine qui devient alors anormale.**

## IV. Clonage d'expression

### A. Vecteurs d'expression eucaryotes

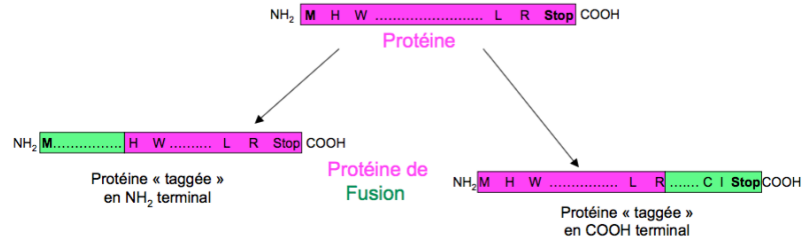
Les plasmides utilisés contiennent :

- Un **site multiple de clonage** avec un « **Tag** » en 5' ou en 3'
- Une **origine de réplication procaryote**
- Une **origine de réplication eucaryote**
- Un **gène de sélection procaryote**
- Un **gène de sélection eucaryote**
- Un **promoteur eucaryote**



## B. Notion de protéines de fusion

Protéine de fusion = ADNc d'intérêt + étiquette



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

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

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

Ces « Tag » peuvent :

- Soit être **reconnus par un anticorps**
- Soit être **fluorescents**

◆ Comment greffer une étiquette ?

→ En N-term :

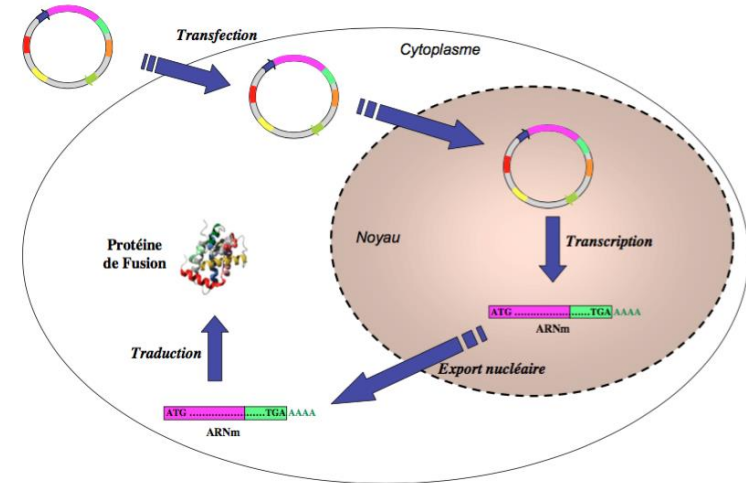
- Il faut couper le codon Start
- Avoir une étiquette qui commence par le codon Start

→ En C-term :

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

## C. Transfection des cellules eucaryotes

→ **Transfert dans une cellule eucaryote** d'un ADN exogène puis **surexpression** de cet ADN par la machinerie basale



Plusieurs techniques :

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

Exemple de la transfection par phosphate de calcium :

- Mélange de l'ADN avec une solution de chlorure de calcium puis ajout à un tampon phosphate goutte à goutte
- Formation d'un précipité de phosphate de calcium qui se lie à l'ADN
- Pénétration du précipité dans la cellule (*endocytose ou phagocytose*)

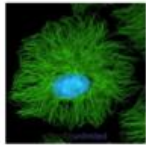
## D. Etude de la localisation des protéines

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

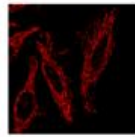
Technique :

- Transfection des cellules (ensemencées sur une lamelle en verre) avec le plasmide d'intérêt
- Fixation et perméabilisation des cellules
- Visualisation des protéines directement en **microscopie à fluorescence** (*ex : protéines taggées GFP*) ou révélation et visualisation

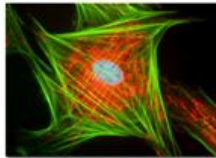
des protéines après **fixation d'un anticorps couplé à un marqueur fluorescent** (réaction antigène-anticorps)



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



Marquage :  
Réseau des mitochondries (Rouge)



## V. PCR en temps réel

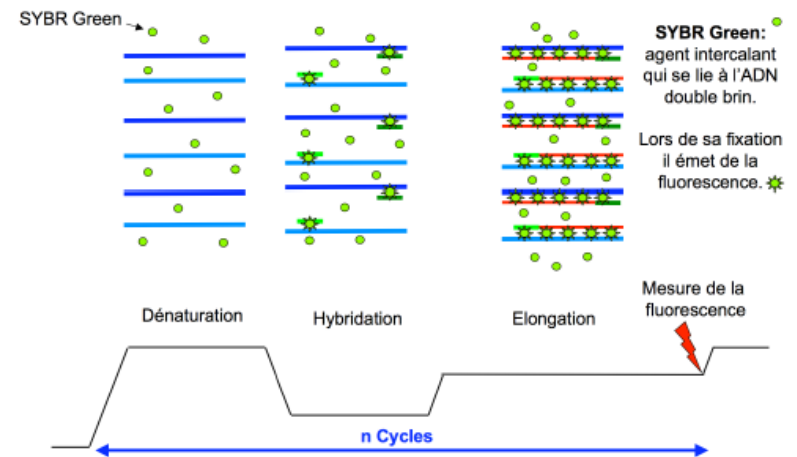
### A. Principe

La PCR en temps réel utilise le même principe que la PCR classique : **dénaturation** (95°C), **hybridation** (50°C), **élongation** (60/72°C, en fonction de l'enzyme utilisée)

Cependant elle va permettre de mesurer la quantité de produits PCR générés, **en temps réel** ++.

PCR Classique	PCR en temps réel
Mesure de la quantité d'ADN après 35-40 cycles	Mesure de la quantité de fluorescence <b>directement après chaque cycle</b> grâce à un <b>thermocycleur</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Utilisation de l'agent intercalant <b>SYBR Green</b> qui va émettre une fluorescence à partir du moment où elle est fixée.</li> </ul>

*Remarque* : Donc plus on a de produits générés, plus il y a de SYBR Green incorporé et plus il y aura de fluorescence mesurée.

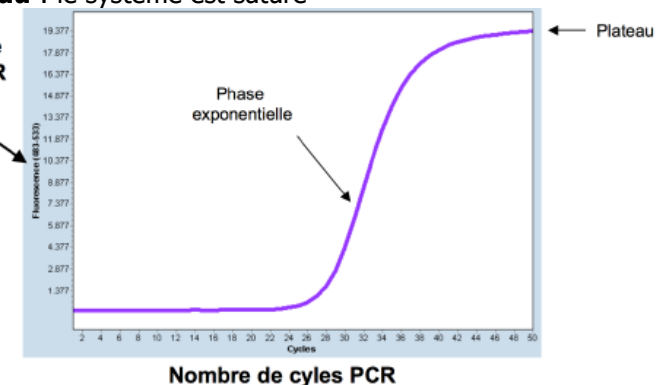
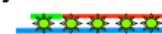


### B. PCR Quantitative

La fluorescence émise ne va pas être détectée immédiatement, on va alors distinguer 3 phases durant cette PCR :

- **Phase de plateau** : la quantité de fluorescence générée n'est pas suffisante pour être détectée
- **Phase exponentielle** : les produits PCR sont générés exponentiellement jusqu'à saturation du système
- **Phase de plateau** : le système est saturé

Intensité de Fluorescence = Quantité de produit PCR synthétisé.



Plus on a d'ADN au départ, moins il faudra de cycles pour commencer à observer la fluorescence → Point d'inflexion plus rapide (et inversement ++).

### C. Sonde TaqMan

C'est une 2<sup>nd</sup> technique de PCR en temps réel, où l'on **rajoute une 3<sup>e</sup> sonde** (simple brin) dans la réaction.

- **Sonde TaqMan = quencher + fluorophore** (respectivement en 5' et 3').

Le quencher a pour rôle d'éteindre la fluorescence du fluorophore.

- Si fluorophore et quencher **proches** → **Aucune fluorescence ++**
- S'ils sont séparés → Fluorescence

Comment sont-ils séparés ?

**Taq Polymérase** : **Activité exonucléasique 5'-3'** + activité polymérase 5'-3'

A l'élongation, la Taq Polymérase va dégrader la sonde TaqMan hybridée, ce qui provoque éloignement du quencher et du fluorophore, et donc apparition de la fluorescence.

