

UE11

Méthode d'étude et d'analyse du génome



Plans et Rappels

Cours 1 :

I- Analyse du matériel génétique

1- Extraction de l'ADN

2- Extraction de l'ARN

3- PCR

4- Digestion enzymatique

II- Biologie moléculaire et génétique médicale

- L'achondroplasie

Cours 2 :

III. Séquençage : méthode Sanger, et séquenceurs automatiques

A. Principe

B. Méthode Sanger

C. Méthode Automatique

D. Exemple et lecture de résultat

IV. Applications en génétique médicale : le syndrome de Wolfram

A. 1ère étape : Exploration de WFS1

B. Séquençage de l'ARNm

C. Clonage Moléculaire

D. Transformation : introduction du vecteur dans une bactérie

E. Sélection, Isolement, amplification, extraction

F. Carte de Restriction

RAPPEL : primers = amorces = oligonucléotides

III. Séquençage de l'ADN

A. Principe

On ne pose pas de diagnostic avec UNE seule technique de biologie moléculaire il faut toujours vérifier avec une deuxième.

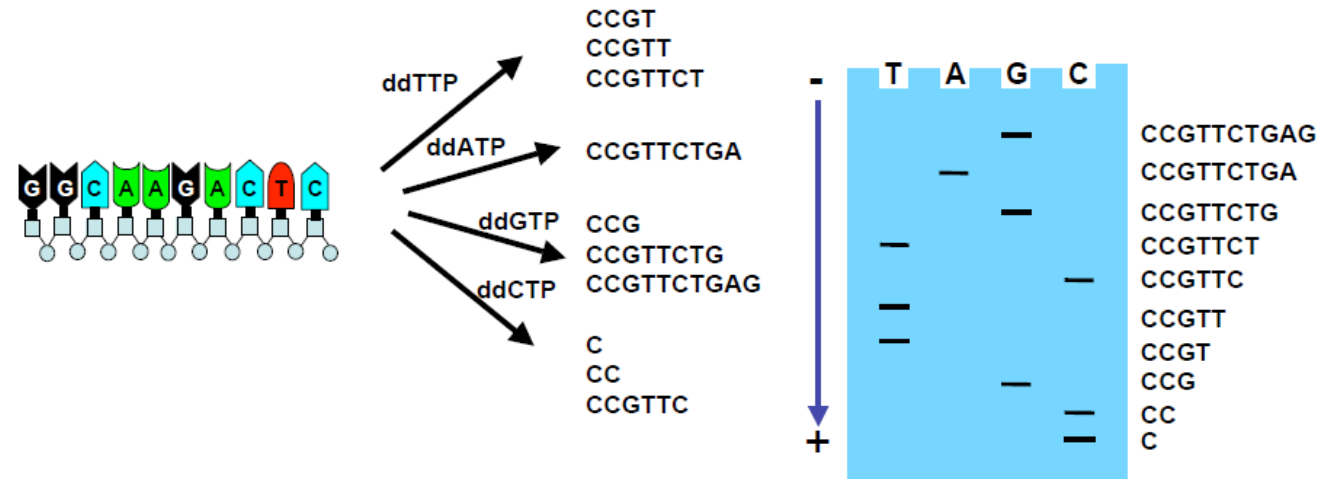
Le séquençage détermine la succession de nucléotides d'une séquence d'intérêt

- Nous permet de **lire la séquence** d'ADN et de connaître la position de chaque nucléotide.
- On peut **identifier** une mutation et **diagnostiquer** une éventuelle pathologie en séquençant directement la séquence du **gène concerné**.

-> **LA METHODE de référence** est la méthode de Sanger aussi appelée **méthode enzymatique des didésoxyribonucléotides (ddNTPs)**

B. La méthode de Sanger

- **4 réactions indépendantes** 4 tubes différents contenant chacun **un seul ddNTP** (A, T, C ou G)
- **En même temps dans 4 tubes :**
 - le fragment d'ADN du patient à séquence
 - une seule amorce
 - une ADN polymérase
 - les 4 types de dNTP et un type de ddNTP radiomarké.



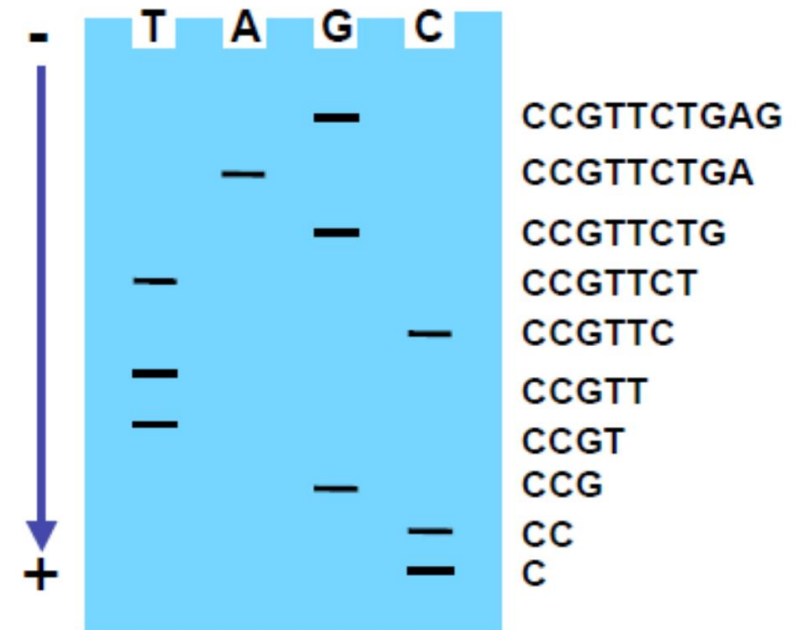
Chaque tube contient un seul type de ddNTP (A, T, C OU G) ET les quatre types de dNTP (A, T, C ET G)

- On **répétait plusieurs fois** les étapes de séquençages « dénaturation/hybridation/élongation » (les même qu'en PCR)
- On obtenait à la fin un **mélange de produits** génères de **différentes tailles**.
- On mettait ensuite ces quatre tubes à **migrer sur un gel**, pour **séparer** les produits synthétisés en fonction de leur **taille** par **migration électrophorétique**.

- Pour **déterminer la séquence** du fragment, il faut lire le gel **de bas en haut**, c'est-à-dire du plus **petit** au plus **grand** des fragments !

Important !

- L'**ordre de lecture** est déterminé par la **taille des fragments**
- La **nature des nucléotides terminateurs de chaîne** (ddNTP) de la **piste de migration** en question !



On regarde sur quelle piste est le fragment qui a **migré le plus loin**, cela signifie qu'il a **incorporé un ddNTP dès le départ** et que le ddNTP qu'il a incorporé correspond au **tout premier nucléotide de la séquence** ! Si ce fragment est sur la piste des **ddCTP**, cela signifie que le **premier nucléotide** de la **séquence lue sur le gel** est une **cytosine** !

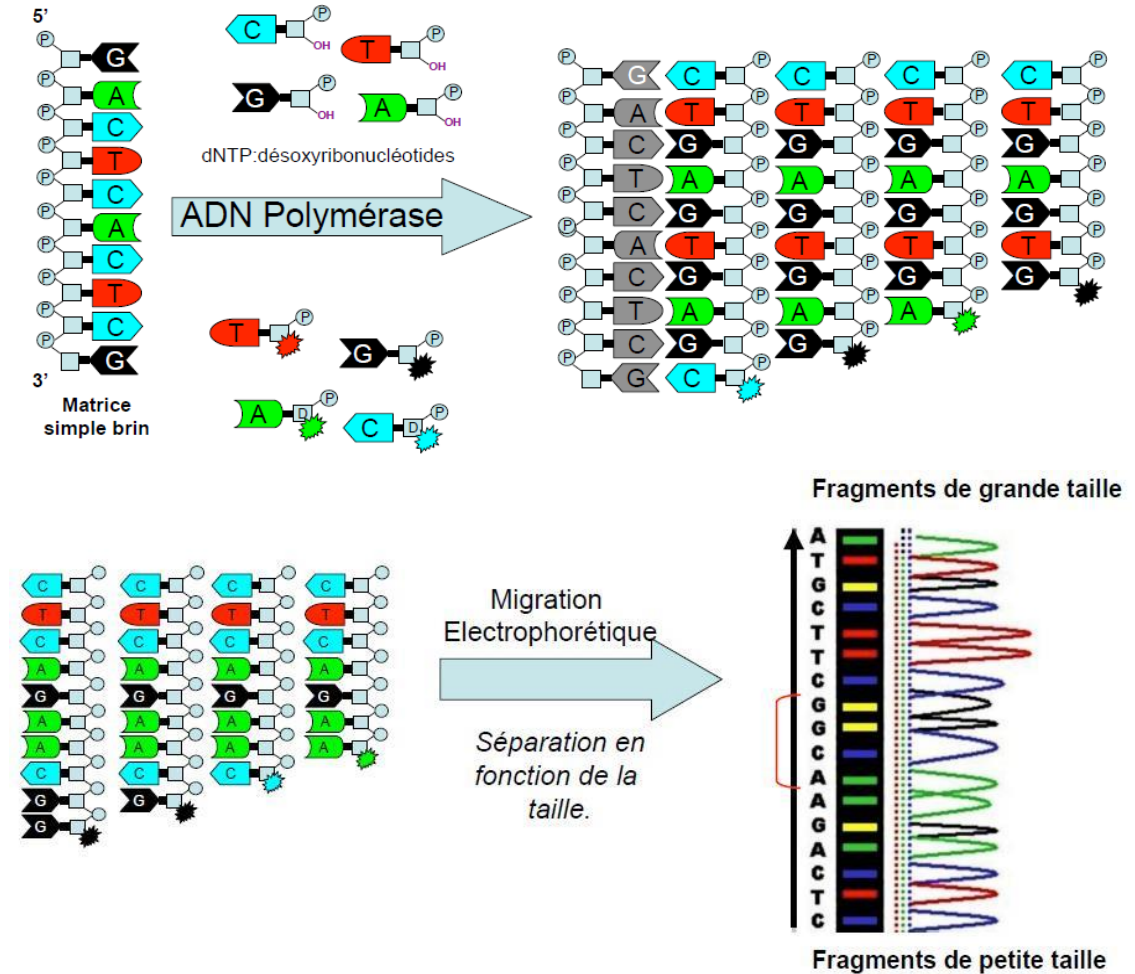
Cette méthode **longue** et **peu efficace** (lecture de 100 à 200 pb pour 2 /3 jours de travail) était tout de même très performante jusque dans les années 90. Depuis, des sociétés se sont mises à fabriquer des **séquenceurs automatisés**.

C. Méthode automatisé

- **Séquenceurs automatiques** : plus qu'une seule réaction Les 4 **ddNTPs** sont **mélangés** dans le même tube réactionnel car chaque nucléotides est couplé à un **fluorochrome** de couleur **différente** pour les identifier.

- Ces produits sont ensuite **séparés** selon leurs **taille** par **migration électrophorétique** dans un **automate**

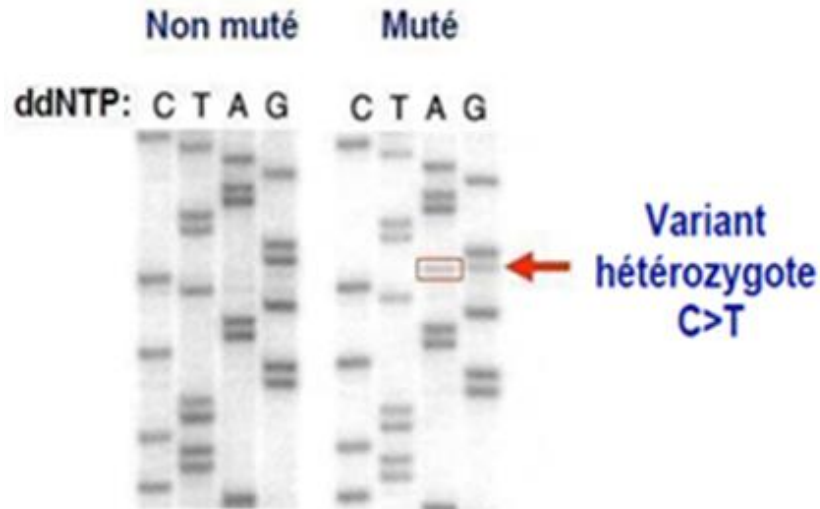
- Puis les fragments passent devant une **caméra laser** qui va **détecter** et **lire** la couleur de chaque fragment, permettant ainsi d'**identifier le nucléotide** incorporé dans la séquence.



ATTENTION: Il ne faut pas oublier que la séquence du brin lu sur le gel est **complémentaire** du brin séquencé du patient: Si on lit un « A » sur le gel, on a un « T » dans la séquence d'origine.

D. Exemple et lecture de Résultats

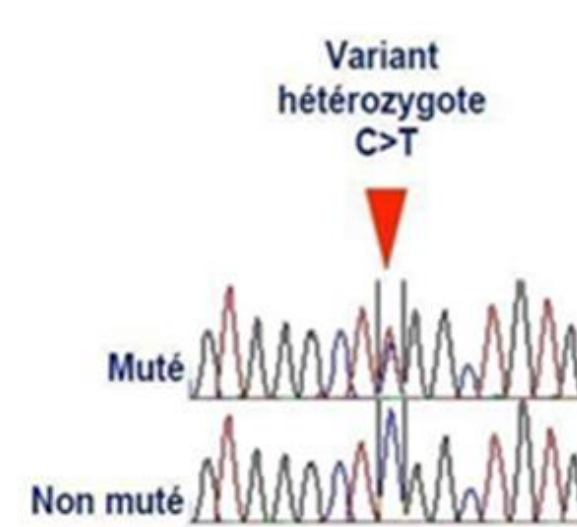
En séquençage Sanger :



- On lit le gel de bas en haut : 5'-ACTTCTT...-3' (non muté).
 - Flèche : **deux produits de migrations** dans **deux puits différents** mais **de même taille**
- > Variant hétérozygote C>T

Le patient a un allèle sain (avec le nucléotide C) et un allèle muté (substitution de C en T).

En séquençage automatique :



Au niveau du triangle on remarque une **superposition** de **deux pics de couleur différente** au niveau de la **même position** nucléotidique

-> On met en évidence le même **mélange de « C » et de « T »** (**variant hétérozygote**).

Questions!



IV. Applications en génétique médicale : le syndrome de Wolfram

Syndrome de Wolfram :

- Diabète, atrophie optique, surdité, troubles neurologiques variables
- Pathologie **autosomique RECESSIVE** ++
- Gène responsable : **WFS1**. 8 exons, dont le 1^{er} est non codant (ATG se situe sur le 2^{ème})
- Code pour la **wolframine** protéine dont la fonction est inconnue -> Rôle dans le flux calcique : communication entre le Réticulum endoplasmique et la mitochondrie.

A.1ère étape : Exploration de WFS1

- **Séquençage ininterprétable ?**

-> besoin de **techniques complémentaires**, pour pouvoir tirer des conclusions et poser un diagnostic !

C'est le cas de **certains patients** atteints du **syndrome de Wolfram**, cette maladie peut être due à une variation d'épissage des exons

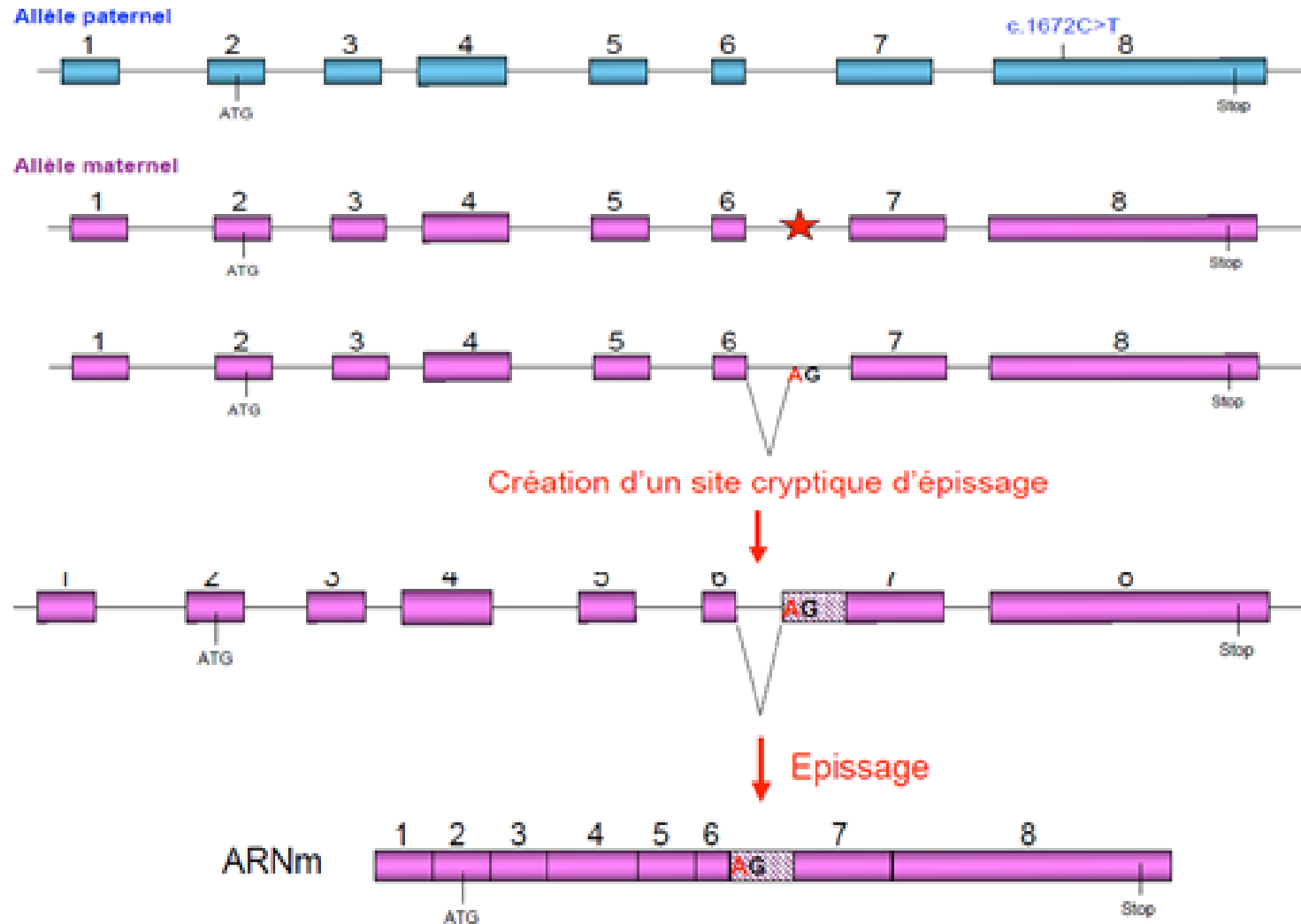
- On peut dans ce cas étudier l'**ARNm**, -> Extraction puis PCR

Mais L'ADN polymérase peut amplifier seulement de l'ADN.

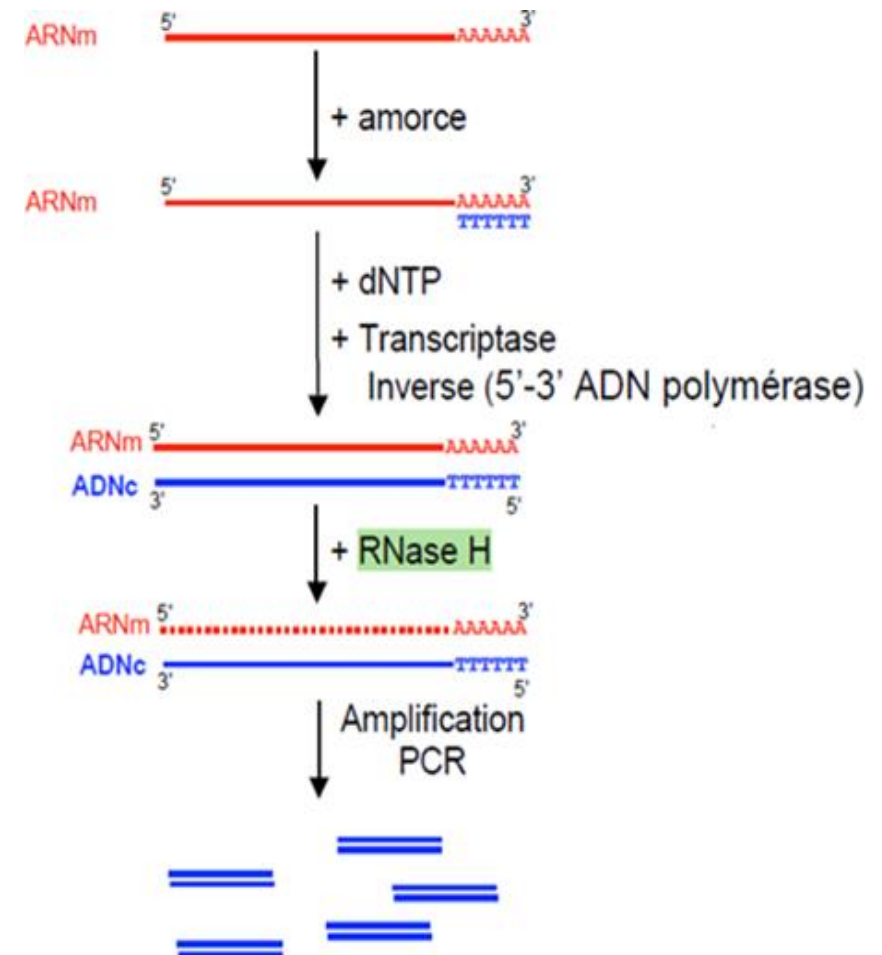
-> On utilise une **transcriptase inverse**, d'origine **virale**, qui copie de l'**ARNm** sous forme d'**ADNc simple brin**, qui pourra être amplifié

ATTENTION !! Séquence rajoutée à l'amorce

Variant d'épissage



Transcriptase inverse



B. Séquençage de l'ARNm

- Séquençage :

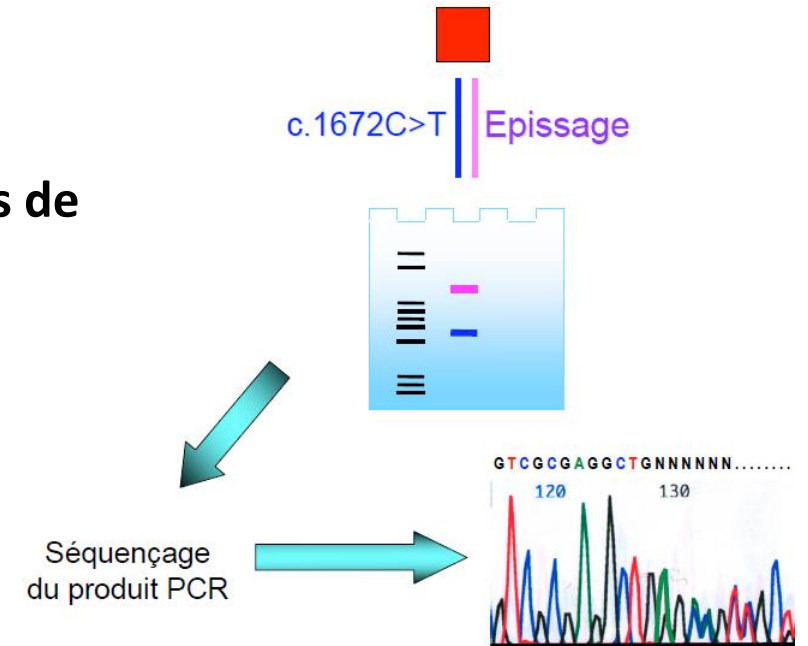
On s'attend à obtenir un **fragment plus long** pour l'ADNc car un **variant d'épissage rallonge** la séquence de l'ARNm.

Or on a du séquencer les **deux allèles simultanément** car on a extrait tous les ARNm de la cellule !

- Résultats :

A partir de la jonction exon6 / exon 7 la séquence devient **illisible en cas de variation épigénétique**, on a une **superposition de deux signaux**.

Que faire pour séparer les ARNm correspondant aux 2 allèles ? **Clonage Moléculaire**



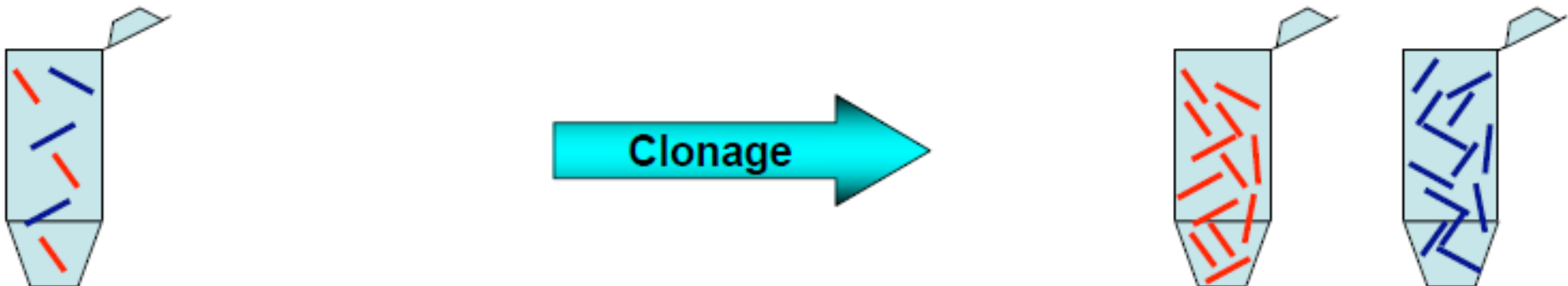
C. Clonage Moléculaire

- Le but du clonage est d'obtenir un **grand nombre** de **copies identiques** et **absolument pures** d'une séquence donnée d'ADN.
- Sépare deux population de gènes différent -> permet de séquencer indépendamment 2 allèles.
- Pour ce faire, on va utiliser des **vecteurs** (ADN circulaire double brin) dans lesquels on va insérer à chaque fois un seul fragment d'ADN appelé **insert**.
- Ces vecteurs sont ensuite introduits dans des **bactéries**.

Le clonage moléculaire ne se fait qu'avec des procaryotes !

ON PARLE DE TRANSFORMATION

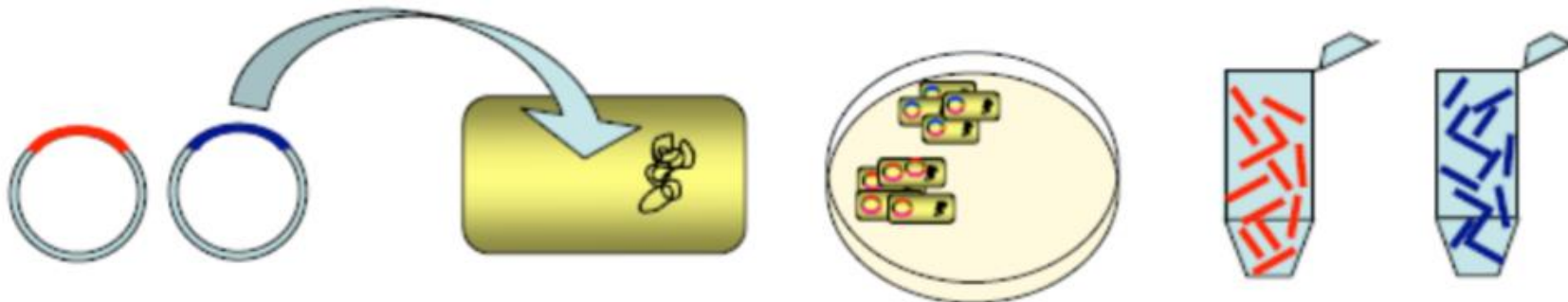
Si on intègre l'insert dans une cellule eucaryote on parle de TRANSFECTION



a) Principe

- **4étapes :**

1. Intégrer un fragment d'ADN (=Insert) dans un **vecteur** : on crée un **ADN recombinant (=vecteur +insert)**.
2. On introduit ces vecteurs dans la **cellule hôte** (bactérie) = **transformation bactérienne**
3. On **cultive** les bactéries sur une boîte de Pétri (**amplification**) + **antibio (sélection)**
4. On « **repique** » : on prélève des bactéries de chaque colonie pure et on les met chacune dans des **tubes différents** (on a **isolé** les 2 populations)



b) Vecteur

✓ ADN circulaire double brin

✓ capable de **réplication autonome** indépendante de l'ADN de la cellule hôte (=réplication épisomiale).

Il permet l'insertion d'UN **fragment d'ADN étranger (insert)**!

On distingue plusieurs **types de vecteurs**.

☐ En fonction des techniques que l'on veut utiliser

Vecteurs de clonage : pour **isoler** et **amplifier** un fragment d'ADN (ce qu'on utilise ici)

Vecteurs d'expression : pour transférer un gène dans une **cellule eucaryote** afin que la cellule **exprime ces protéines**, on pourra **observer** si la mutation qui influe la position d'une protéine dans la cellule, etc...

☐ En fonction de la **taille des inserts à étudier**,

Ex: vecteurs de clonages, les **vecteurs plasmidiques** peuvent contenir un insert de **maximum 20 kb** (kilo bases) si on
Au-delà -> vecteurs à partir de levures.

-> Ici un plasmide est suffisant

Plasmide

La séquence du plasmide est connue, ils sont commercialisés, on a :

- ✓ Un **polylinker (site multiple de clonage)** : courte **séquence connue** où il y a de nombreux **sites pour des enzymes de restriction** qui seront digérés afin d'introduire l'insert.
- ✓ Une **origine de répllication** : permet une **réplication indépendante** du chromosome de la cellule hôte
- ✓ Un **gène de sélection** : Il en existe plusieurs, mais le plus courant apporte une résistance à l'Ampicilline (antibio), donc On étale les bactéries sur une boîte de Pétri avec de l'Ampicilline -> seules celles avec le gène et donc le plasmide se multiplient

Plasmide = polylinker + origine de Réplication + gène de sélection

Remarque : les **ARNm** ne peuvent être introduits directement dans un vecteur, ils doivent être « **copiés** » sous forme d'ADN.

c) Création de l'ADN Recombinant

On coupe :

Même enzymes de restriction digèrent le vecteur (polylinker) et l'insert grâce à la séquence rajoutée PCR -> correspondance insert/vecteur. 3 stratégies de clonages :

- extrémités **franches** (SmaI) : 2 brins coupés l'un en face de l'autre (coupure franche, bien droite).

Problème : Or ici, le vecteur (= plasmide) aura tendance à se refermer sur lui-même **avant d'avoir intégré l'insert!**

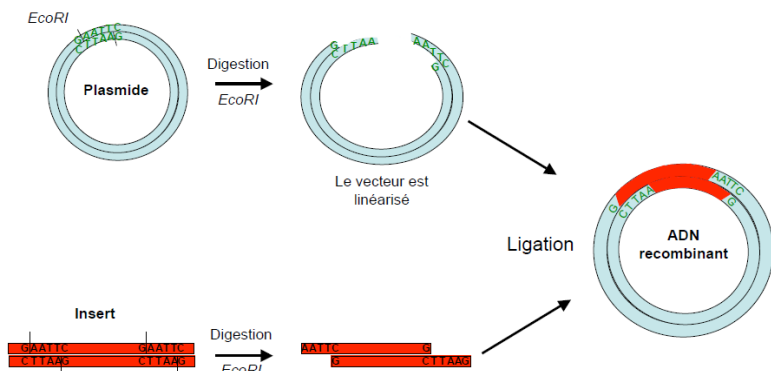
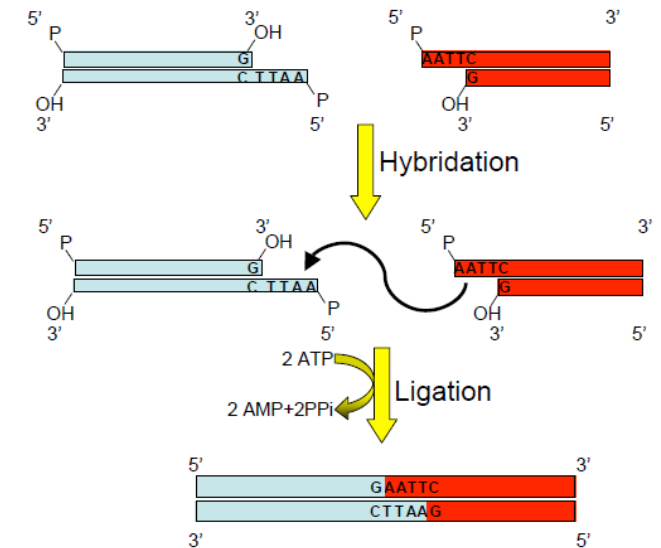
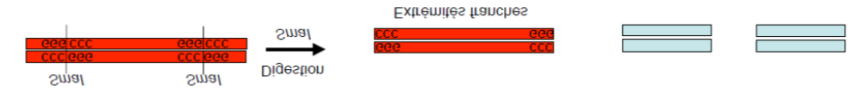
- extrémités **cohésives** (EcoRI) : les deux brins pas coupés exactement l'un en face de l'autre -> un brin plus long que l'autre (aspect « en biseau »)

Avantage : les bases complémentaires entre l'insert et le plasmide s'hybrident spontanément par liaisons hydrogènes

- Les deux à la fois : étape en + de déphosphorylation

On colle :

Une ligase (**T4 DNA ligase**), on peut insérer l'insert dans le vecteur.



D. Transformation : introduction du vecteur dans une bactérie

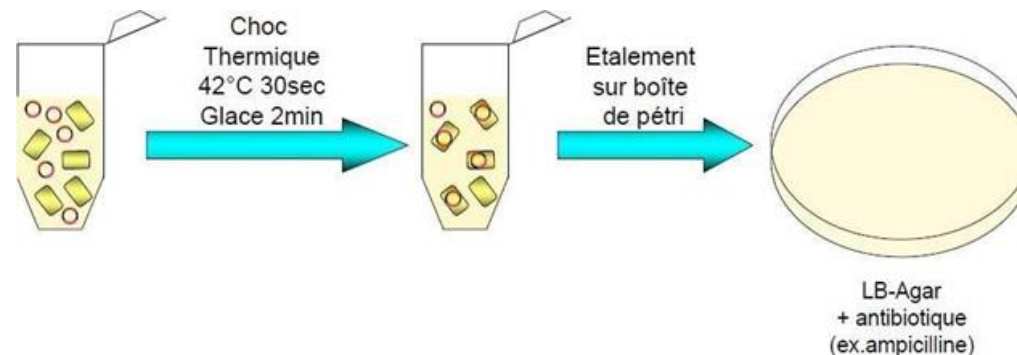
Conclusion du clonage moléculaire :

A ce stade, nous avons réussi à produire un **ADN recombinant**

On se retrouve avec **un seul produit PCR dans un vecteur** : 2 molécules ne pouvant pas s'insérer dans le vecteur.

-> On a **isolé UN produit PCR**, (que ce soit le maternel ou paternel on ne sait pas encore mais c'était pas le but, on verra plus tard en séquençant).

Pour faciliter l'entrée des ADN recombinants dans les bactéries, on **perméabilise leur paroi** grâce à un **choc thermique ou électrique** : on les rend **COMPETENTES**

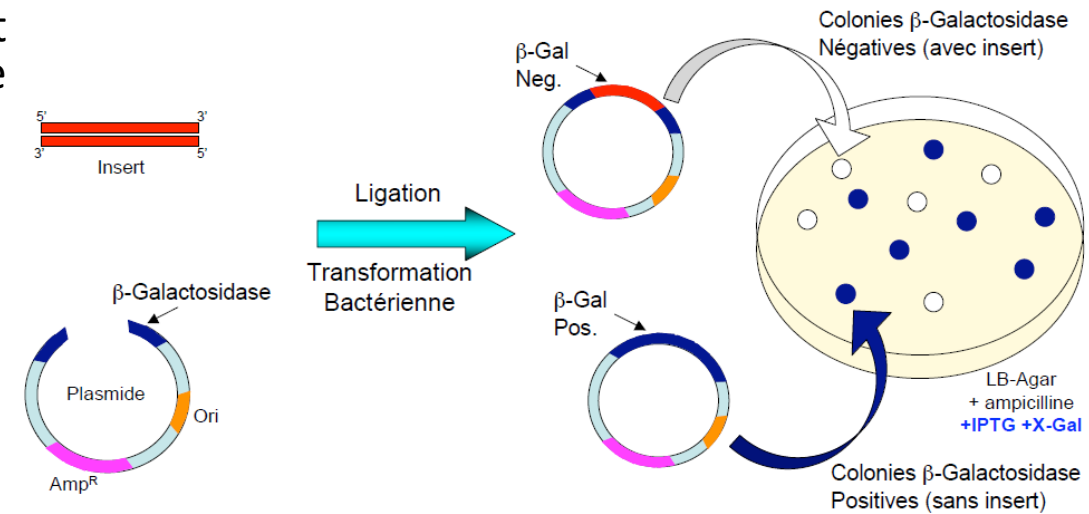
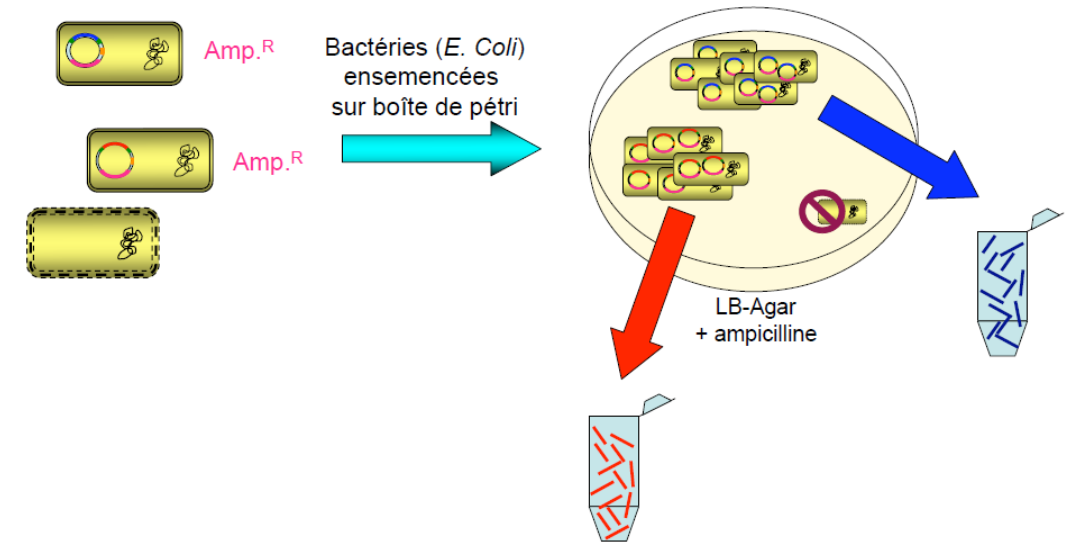


E. Sélection, isolement, amplification, extraction

a) Sélection

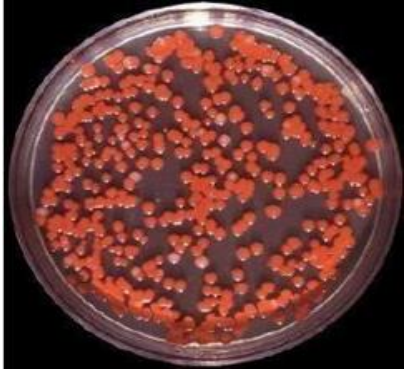
- **Par un antibiotique:** Sur les boîtes de pétri, on a mis de l'**ampicilline**
BUT : ne garder que les bactéries ayant le **gène de résistance** -> les **bactéries ayant intégrées le plasmide**
- **Sélection Blanc / Bleu :** Le **polylinker** est placé dans le gène qui code pour la **bêta-galactosidase**.
- Intégration de l'insert au niveau du polylinker -> gène de la **β -galactosidase** (en bleu) **coupé en deux** à cause de l'insert -> **plus fonctionnel**
- Si on ajoute dans le milieu de l'**IPTG** (induit la beta galactosidase) et le substrat incolore **X-Gal**, l'hydrolyse de X-Gal va pouvoir donner une **coloration bleue**.

AVEC INSERT	SANS INSERT
Gène bêta-galactosidase inactivé	Gène bêta galactosidase activé
X-Gal incolore non hydrolysé	X-Gal hydrolysé colorant le milieu en bleu
COLONIES BLANCHES	COLONIES BLEUES



b) Isolement et amplification

- On récupère uniquement les colonies blanches -> milieu liquide à 37° pendant une nuit avec de l'ampicilline
-> multiplication de notre ADN d'intérêt



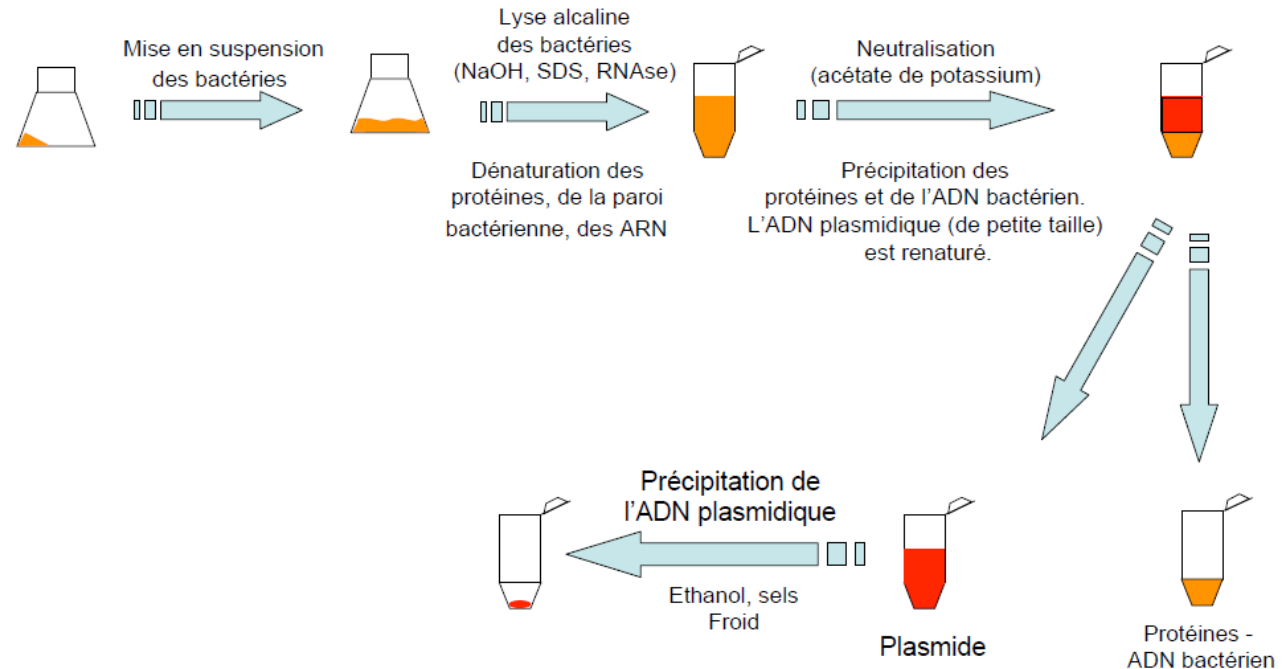
Un seul « point » = une colonie ~~pas à une bactérie!~~

UNE SEULE bactérie est à l'origine de toute une colonie (multiplication) -> la même population

Une bactérie = un ADN Recombinant = Un insert = ADNc paternel OU maternel

- Ensuite on fait :

- une **centrifugation**
- une **lyse alcaline** des bactéries
- une **neutralisation**
- L'ADN plasmidique en suspension est **récupéré**
- On le fait **précipiter** en rajoutant de l'**éthanol froid** et des **sels** -> **méduse d'ADN**.





Extraction de l'ARN



Comprendre le Séquençage



Comprendre le clonage
moléculaire



Clonage PUIS séquençage

**PAUSE PIPI 5
min**

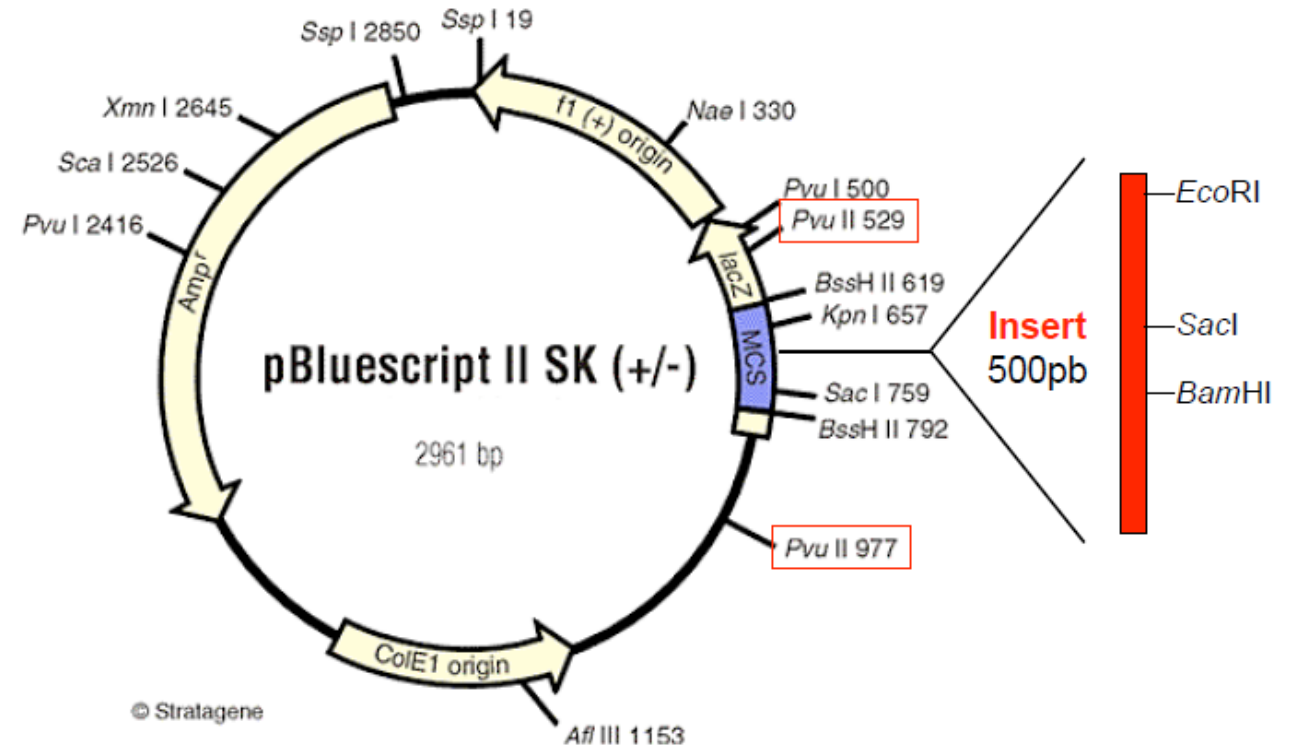
**MAINTENANT ON SE REVEILLE CAR
VOICI LA PARTIE LA PLUS
IMPORTANTE DU COURS**

F. Carte de Restriction

Schémas avec la **séquence complète du plasmide** et les **sites de restriction**.

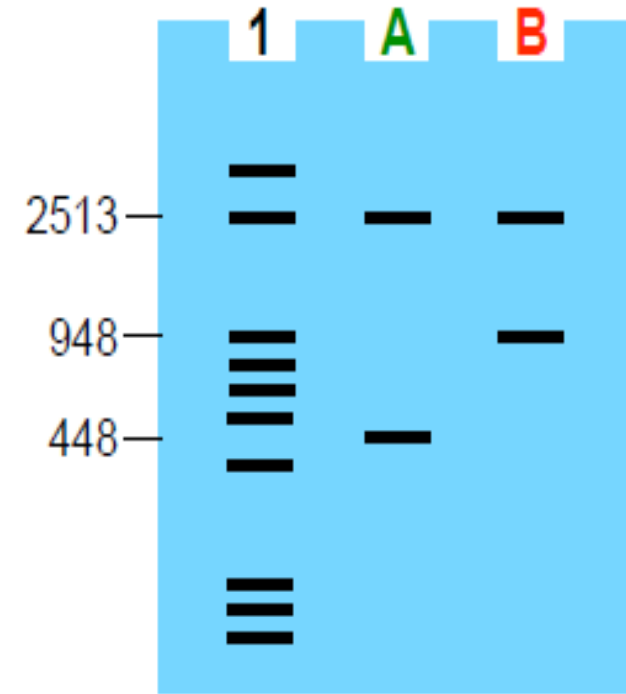
On va alors **digérer le plasmide** en plusieurs morceaux avec différentes enzymes de façon à **vérifier qu'il y a bien l'insert** et qu'il est bien de la **bonne taille**

On fait migrer les morceaux sur gel d'électrophorèse : en fonction de la taille on sait si l'insert est présent ou non



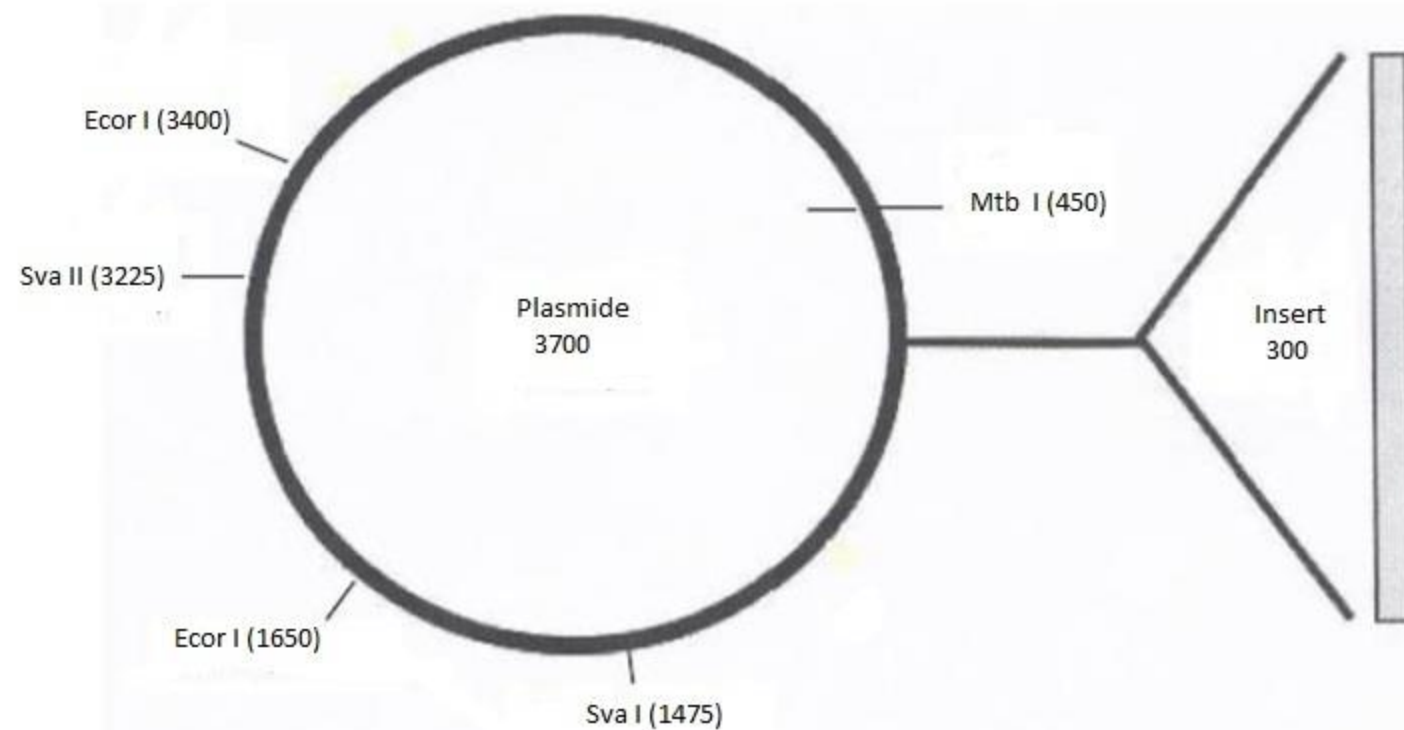
- Dans le cas d'un plasmide **sans insert** (piste A) on retrouve :
 - Un **petit fragment** de $977 - 529 = 448$ pb
 - Un **grand fragment** de $2961 - 448 = 2513$ pb
- Dans le cas d'un plasmide **avec insert** (piste B) on retrouve :
 - Un **petit fragment** de $977 - 529 + 500 = 948$ pb
 - Un **grand fragment** de $2961 - 448 = 2513$ 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 notre cas de Wolfram on ne garderait que les plasmides ayant généré un **fragment à 948 pb** (piste B), car ce sont eux qui ont **intégré un insert** !
- On va donc récupérer ces plasmides, en **extraire l'insert** qu'ils contiennent et le **séquencer isolément** pour déterminer s'il s'agit de l'ADN et **identifier la mutation intronique** à l'origine du problème d'épissage ! Nous pourrions de cette façon **identifier la mutation** qui nous faisait défaut et ...

Conclure à un diagnostic de syndrome de Wolfram !



1- Marqueur de taille

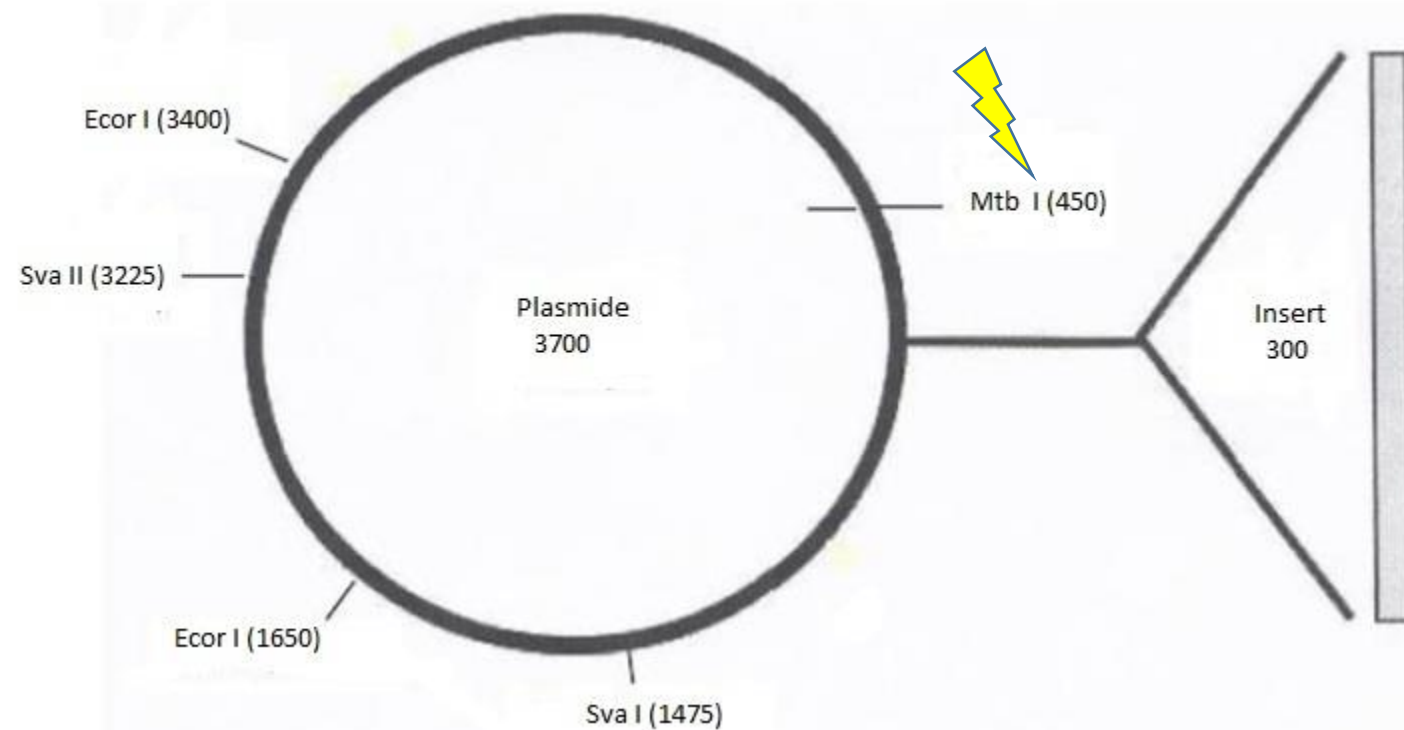
QCM 1: Vous réalisez une carte de restriction pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert. La carte de restriction est schématisée ci-dessous.



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

- A) Plasmide sans insert : 450 pb + 3250 pb
- B) Plasmide sans insert : 300 pb + 3700 pb
- C) Plasmide avec insert : 450 pb + 3550 pb
- D) Plasmide avec insert : 3550 pb + 450 pb
- E) Les propositions A, B, C, D sont fausses.

QCM 1: Vous réalisez une carte de restriction pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert. La carte de restriction est schématisée ci-dessous.



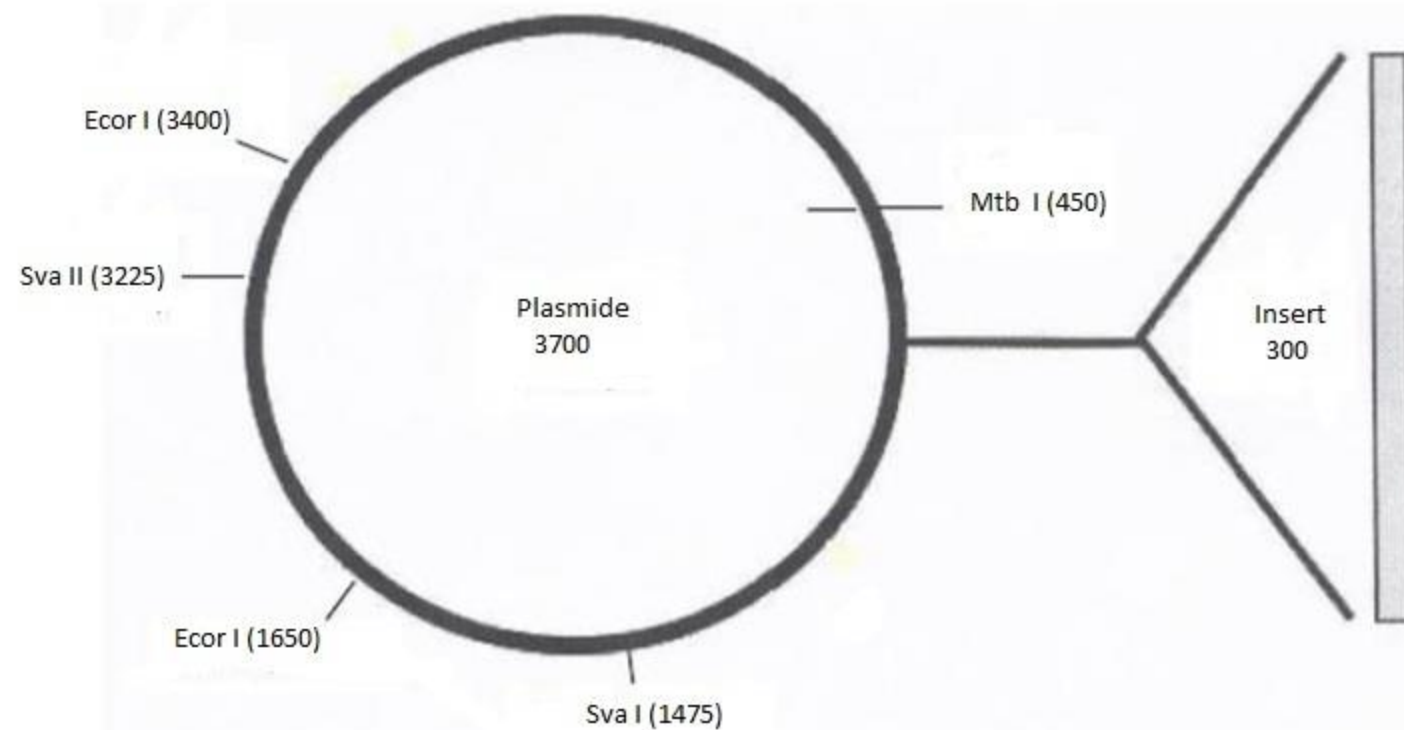
Après digestion enzymatique avec l'enzyme Mtb I , quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose ? Donnez la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide sans insert : 450 pb + 3250 pb
- B) Plasmide sans insert : 300 pb + 3700 pb
- C) Plasmide avec insert : 450 pb + 3550 pb
- D) Plasmide avec insert : 3550 pb + 450 pb
- E) Les propositions A, B, C, D sont fausses.**

Plasmide sans insert: 3700 pb

Plasmide avec insert: 4000 pb

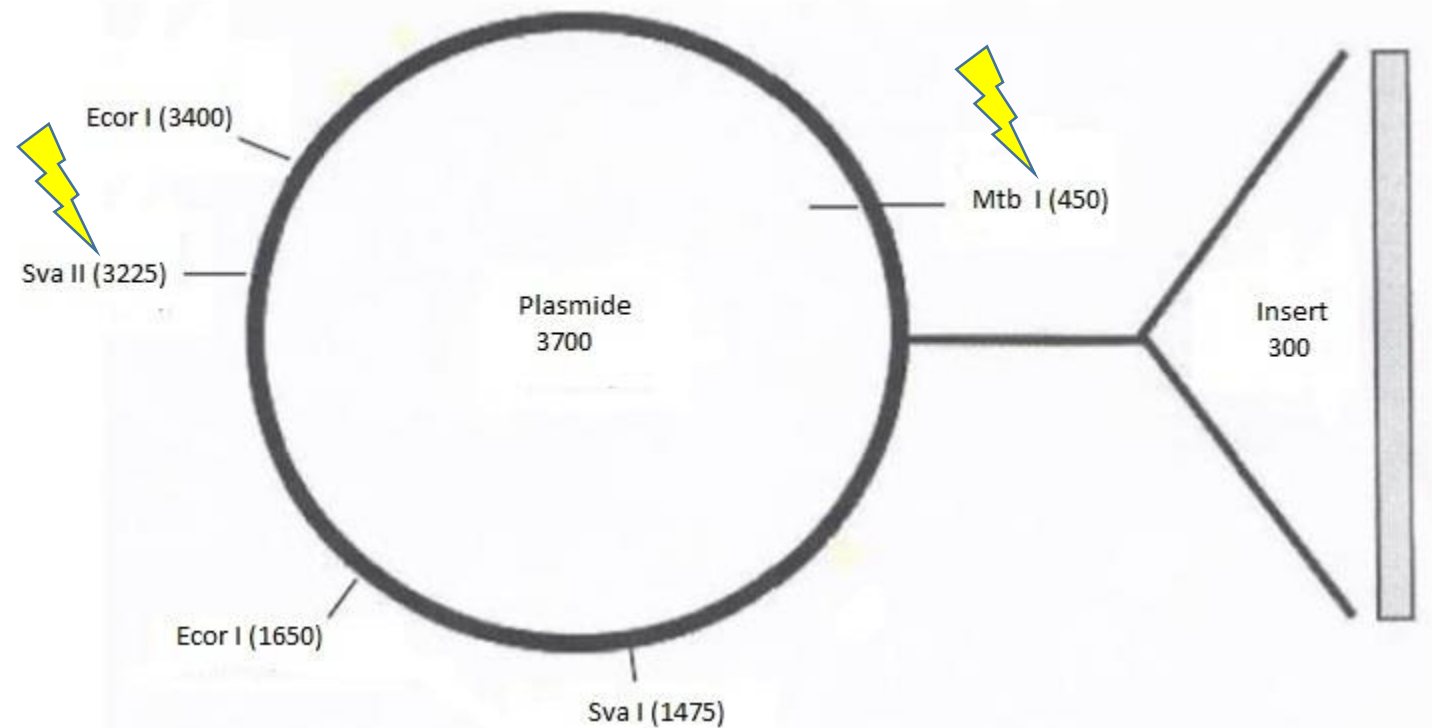
QCM 2 : Vous réalisez une carte de restriction pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert. La carte de restriction est schématisée ci-dessous.



Après digestion enzymatique avec l'enzyme Mtb I et Sva II, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose ? Donnez la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide sans insert : 1225 pb + 2475 pb
- B) Plasmide sans insert : 925 pb + 2775 pb
- C) Plasmide avec insert : 2775 pb + 1225 pb
- D) Plasmide avec insert : 3075 pb + 925 pb
- E) Les propositions A, B, C, D sont fausses.

QCM 2 : Vous réalisez une carte de restriction pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert. La carte de restriction est schématisée ci-dessous.



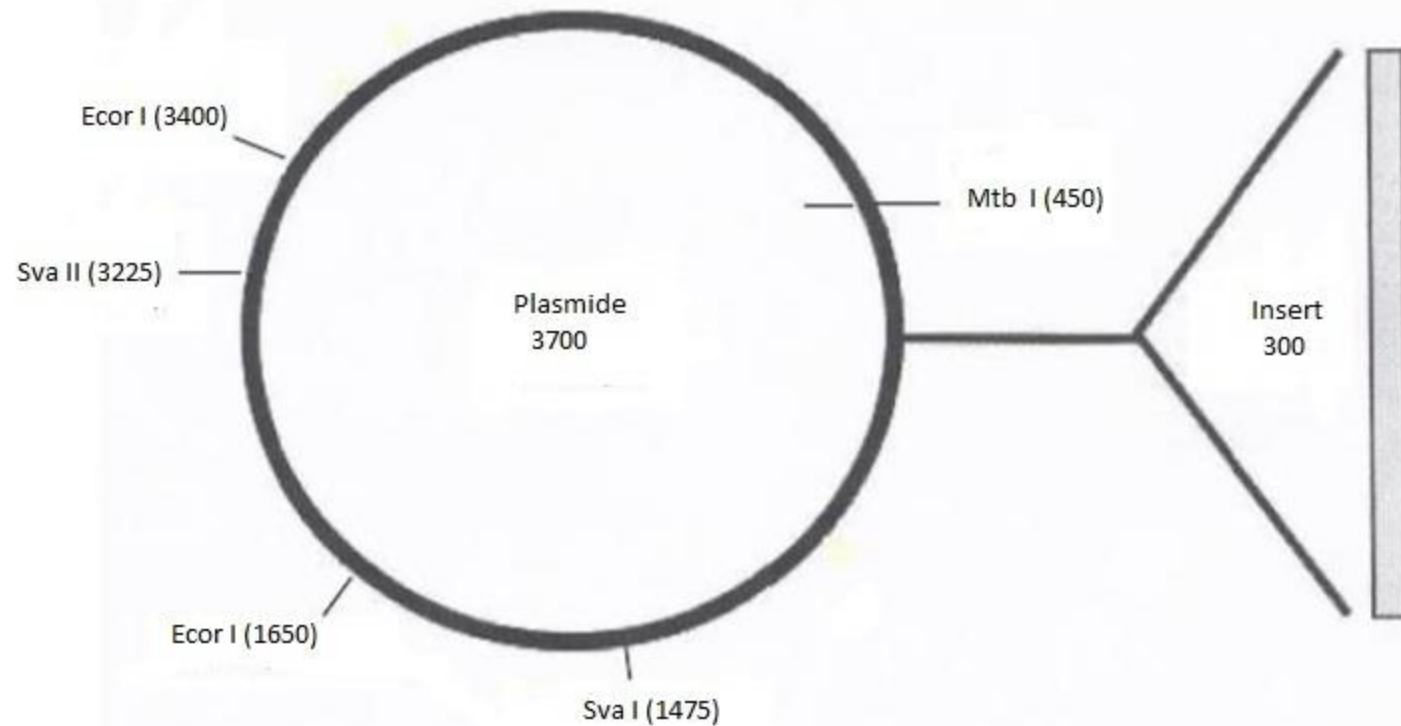
Après digestion enzymatique avec l'enzyme Mtb I et Sva II, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose ? Donnez la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide sans insert : 1225 pb + 2475 pb
- B) Plasmide sans insert : 925 pb + 2775 pb**
- C) Plasmide avec insert : 2775 pb + 1225 pb
- D) Plasmide avec insert : 3075 pb + 925 pb**
- E) Les propositions A, B, C, D sont fausses.

Plasmide sans insert: - $3225 - 450 = 2775$ pb
- $3700 - 2775 = 925$ pb

Plasmide avec insert: - $2775 + 300 = 3075$ pb
- 925 pb

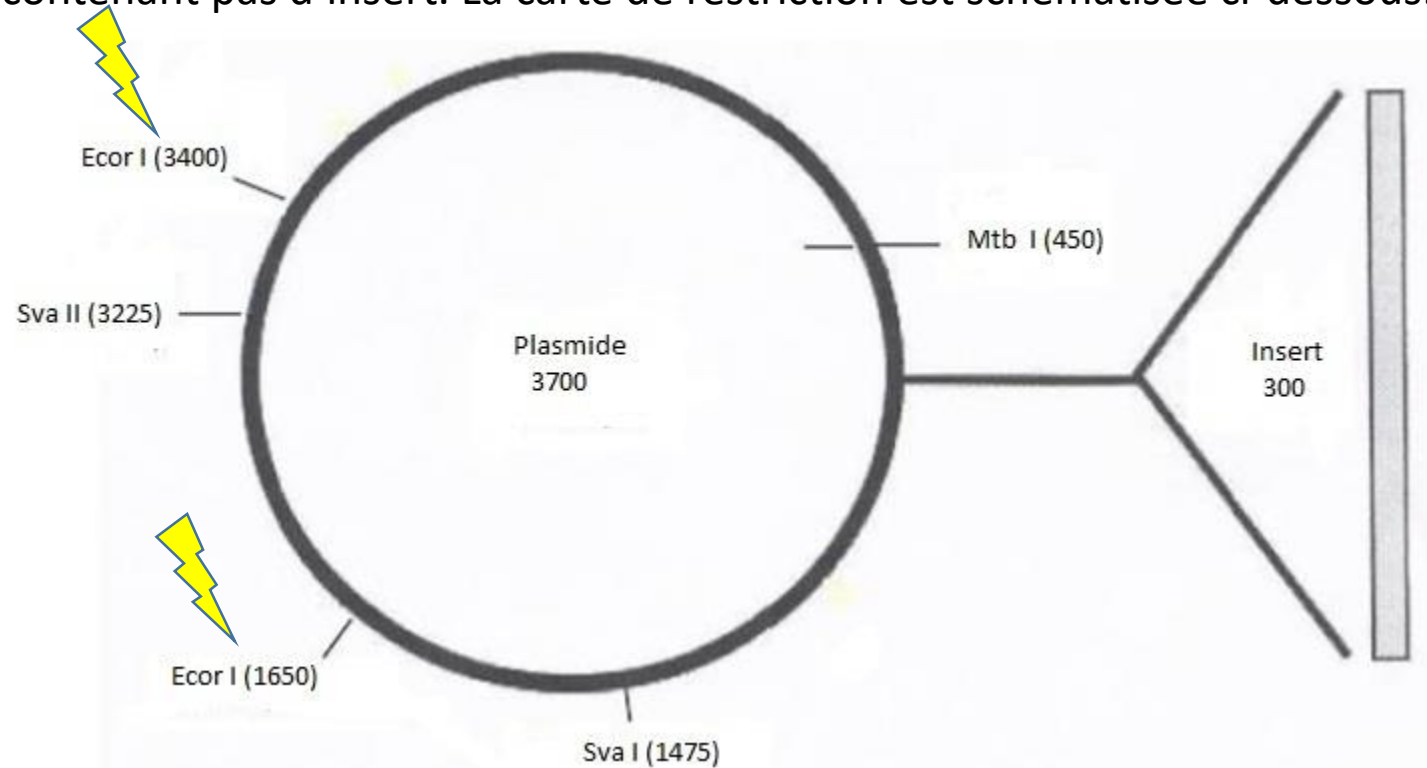
QCM 3 : Vous réalisez une carte de restriction pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert. La carte de restriction est schématisée ci-dessous.



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

- A) Plasmide sans insert : 1750 pb + 2250 pb
- B) Plasmide sans insert : 1650 pb + 2050 pb
- C) Plasmide avec insert : 2250 pb + 1750 pb
- D) Plasmide avec insert : 1750 pb + 1950 pb
- E) Les propositions A, B, C, D sont fausses.

QCM 3 : Vous réalisez une carte de restriction pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert. La carte de restriction est schématisée ci-dessous.



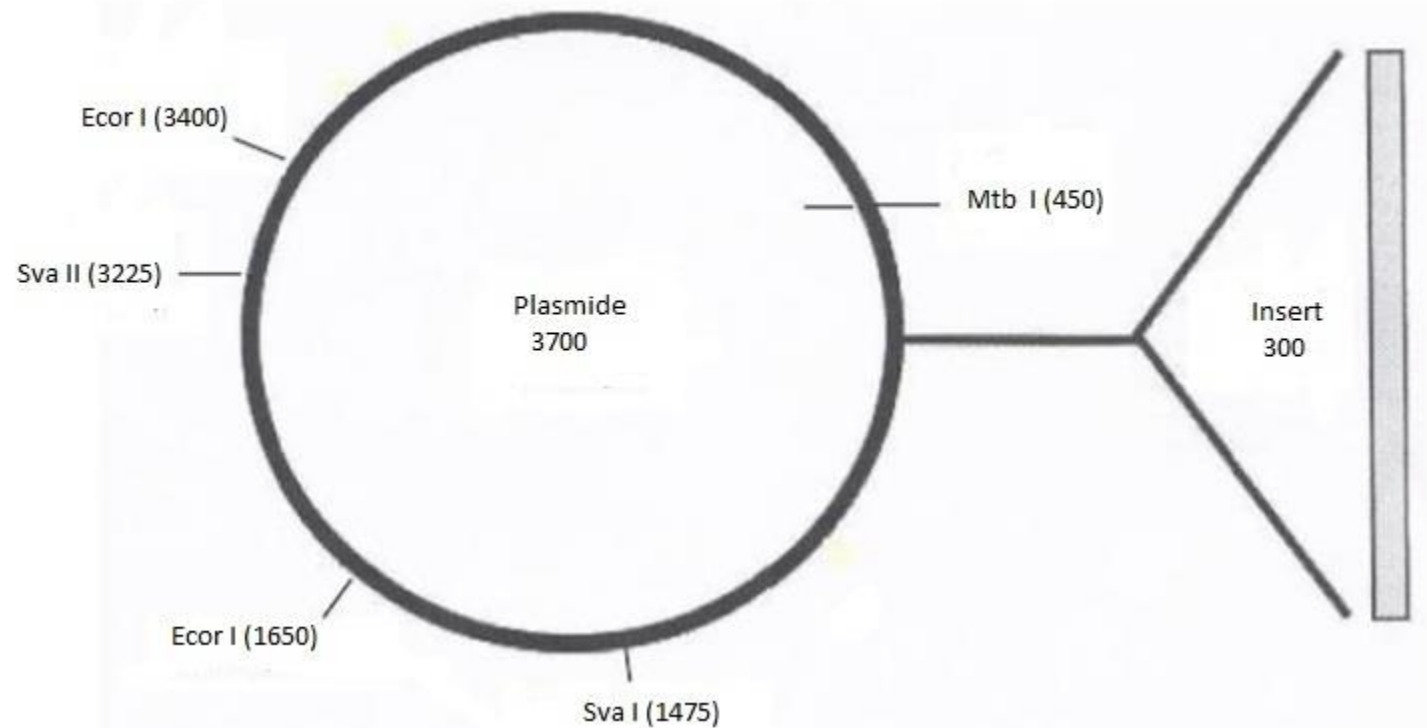
Après digestion enzymatique avec l'enzyme Ecor I, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose ? Donnez la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide sans insert : 1750 pb + 2250 pb
- B) Plasmide sans insert : 1650 pb + 2050 pb
- C) Plasmide avec insert : 2250 pb + 1750 pb**
- D) Plasmide avec insert : 1750 pb + 1950 pb
- E) Les propositions A, B, C, D sont fausses.

Plasmide sans insert: - $3400 - 1650 = 1750$ pb
- $3700 - 1750 = 1950$ pb

Plasmide avec insert: - $1950 + 300 = 2250$ pb
- 1750 pb

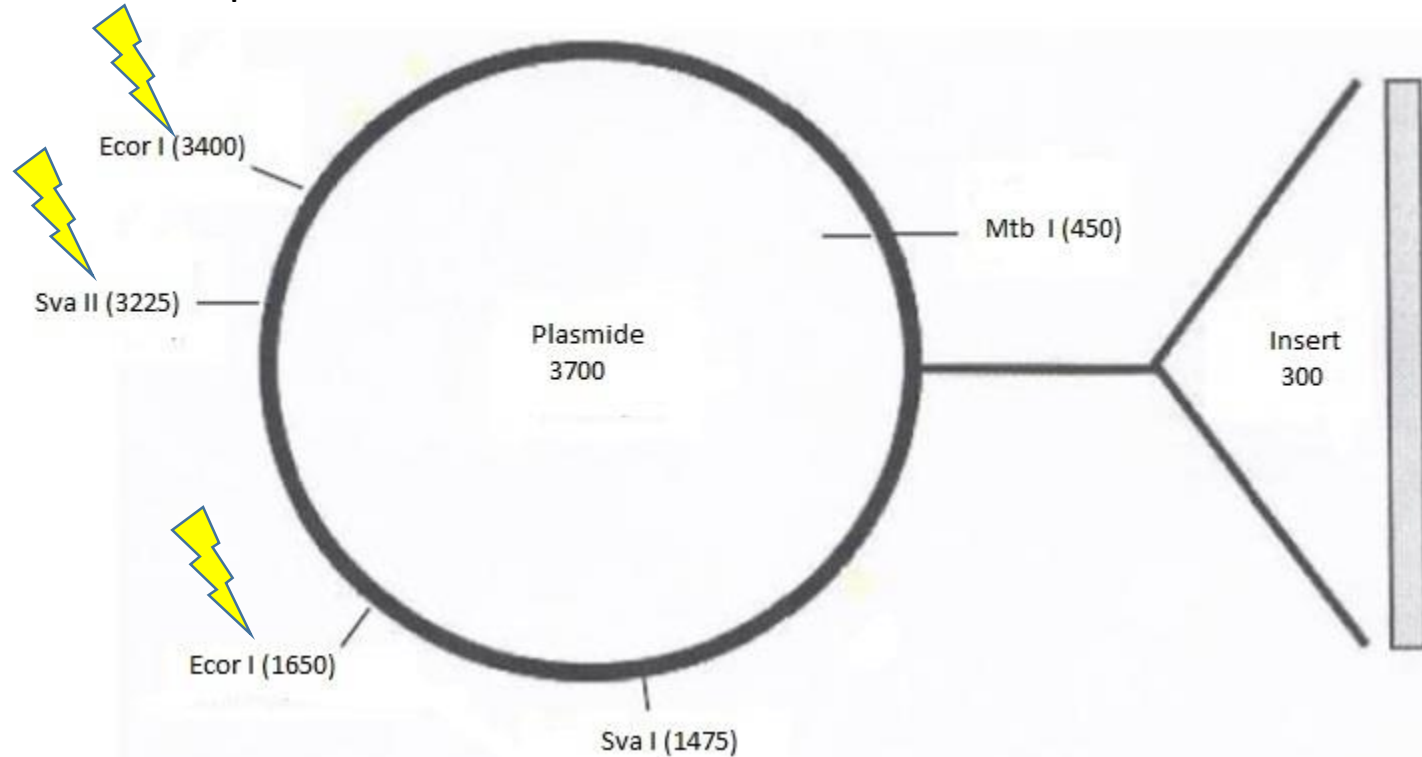
QCM 4 : Vous réalisez une carte de restriction pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert. La carte de restriction est schématisée ci-dessous.



Après digestion enzymatique avec l'enzyme Ecor I et Sva II, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose ? Donnez la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide avec insert : 1950 pb + 1575 pb + 175 pb
- B) Plasmide avec insert : 1650 pb + 1575 pb + 175 pb
- C) Plasmide sans insert : 2250 pb + 1575 pb + 175 pb
- D) Plasmide sans insert : 1950 pb + 1575 pb + 175 pb
- E) Les propositions A, B, C, D sont fausses.

QCM 4 : Vous réalisez une carte de restriction pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert. La carte de restriction est schématisée ci-dessous.



Après digestion enzymatique avec l'enzyme Ecor I et Sva II, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose ? Donnez la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide avec insert : 1950 pb + 1575 pb + 175 pb
- B) Plasmide avec insert : 1650 pb + 1575 pb + 175 pb
- C) Plasmide sans insert : 2250 pb + 1575 pb + 175 pb
- D) Plasmide sans insert : 1950 pb + 1575 pb + 175 pb**
- E) Les propositions A, B, C, D sont fausses.

Plasmide sans insert: - $3400 - 3225 = 175$ pb
- $3225 - 1650 = 1575$ pb
- $3700 - 175 - 1575 = 1950$ pb

Plasmide avec insert: - $1950 + 300 = 2250$ pb
- 1575 pb
- 175 pb

Récap technique pour résoudre la carte de restriction:

- Entourer sur la feuille les enzymes mentionnées dans l'énoncé (attention au site de restriction dans l'insert !!) -> on repère le nombre de fragment obtenu (élimine déjà des réponses)

Premièrement **on ne se préoccupe pas encore de l'insert !**

- On répond aux **questions « fragments sans insert »**

En commençant la **lecture de plasmide** de gauche à droite (**sens inverse des aiguilles d'une montre**)

Soustrayez le premier niveau de coupure (correspondant au chiffre indiqué à l'endroit de la coupure) **au second** -> vous avez la taille de chaque fragment

Faites cela de manière à **revenir au point de départ**

- Pour répondre aux **questions « fragment avec insert »**

Ajoutez ensuite le nombre de paire de base de l'insert (indiqué dans l'énoncé) au fragment dans lequel il se situe sur le plasmide

Connaissant la taille du fragment sans vous faites le calcul : $\text{taille fragment sans insert} + \text{taille insert} = \text{taille fragment avec insert}$

Récap technique pour résoudre la carte de restriction:

Des tuteurs de l'année dernière 😊

- 1) Commencez par s'occuper des fragments du plasmide **sans** insert
- 2) Calculez le ou les fragments **ne** passant **pas** par le départ du plasmide
- 3) Calculez la **somme** de ces fragments avant de soustraire le résultat au nombre **total** de pb du plasmide → ainsi vous trouverez la somme du dernier fragment **passant** par le départ du plasmide
- 4) Vous avez les fragments du plasmide **sans** insert, il vous reste donc à ajouter le nombre de pb de **l'insert** au fragment auquel il s'insère → vous avez les fragments du plasmide **avec** insert



FIN !

