



TUT'RENTREE 2020-
2021

GÉNÉTIQUE
PASS/LAS

**Digestion enzymatique,
séquençage, clonage
moléculaire et applications**



I/ Digestion enzymatique

Elle se fait par des enzymes de restriction.

Ce sont des ENDOnucléases bactériennes qui peuvent couper l'ADN de manière **reproductible** au niveau d'une séquence **spécifique.**

EcoRI

Escherichia coli R y13

E : initiale de l'espèce bactérienne

co : genre de la bactérie

R : souche

I : n° d'ordre de découverte de l'enzyme dans une même bactérie

PvuII (*Proteus vulgaris*)

BamHI (*Bacillus amyloliquefaciens H*)

HaeIII (*Haemophilus aegyptius*)

.....





Il existe 3 types d'enzymes de restriction. On s'intéressera qu'au type II.

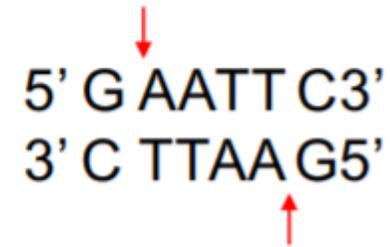
Les enzymes de type 2 :

-reconnaissent 4 à 8 paires de bases

-coupent au niveau de la séquence reconnue

-la séquence est **PALINDROMIQUE +++**

EcoRI



Deux enzymes reconnaissant la même séquence sont isoschizomères. +++

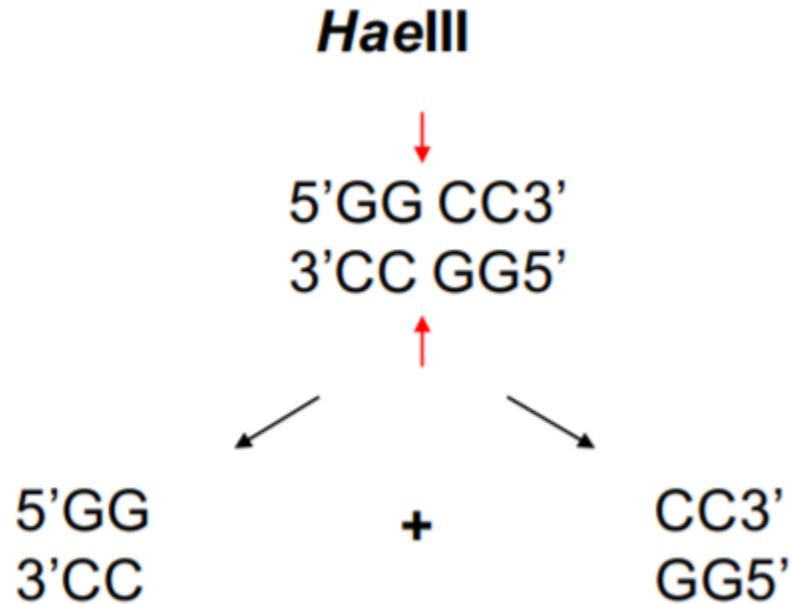




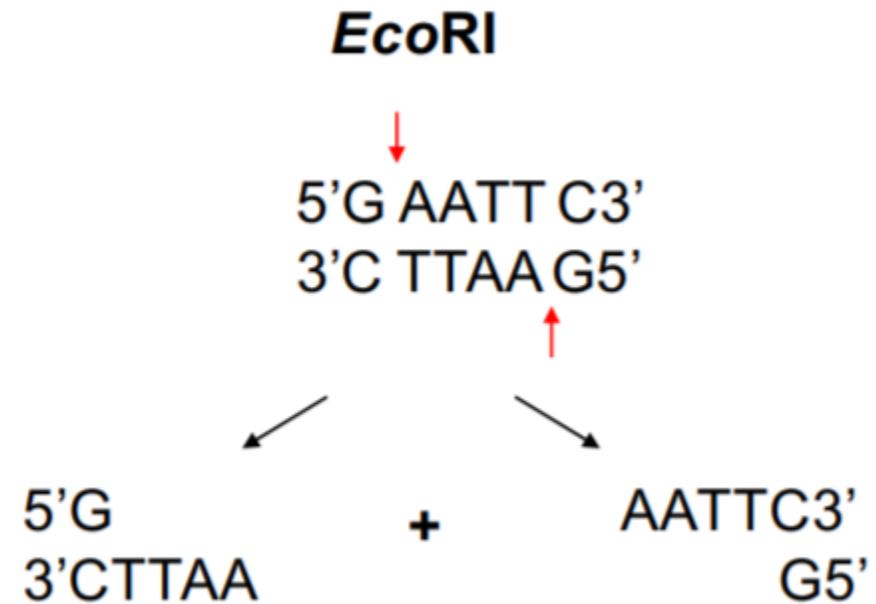
➤ **Enzymes de restriction de type II :**

- types de coupure

Coupures à bouts francs
(blunt ends)



Coupures à bouts cohésifs
(sticky ends)



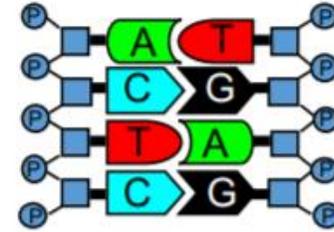


II/ Le séquençage de l'ADN

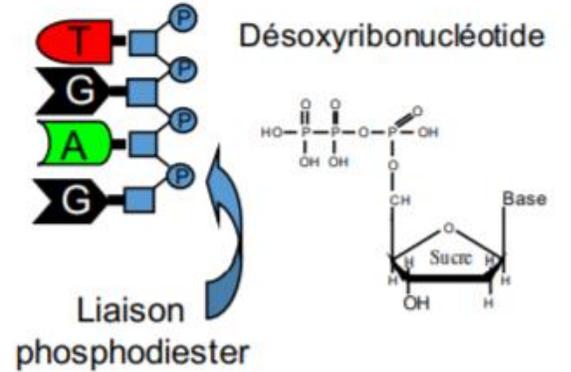
But : déterminer la succession des nucléotides qui le compose. +++



La double hélice d'ADN



2 Brins



Comment ? : en utilisant la méthode des Didésoxyribonucléotides ou méthode de Sanger

Principe : l'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire à la séquence étudiée à partir d'UNE amorce.



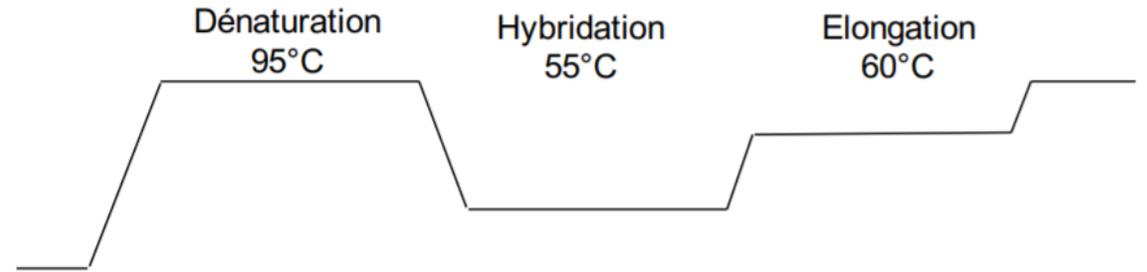
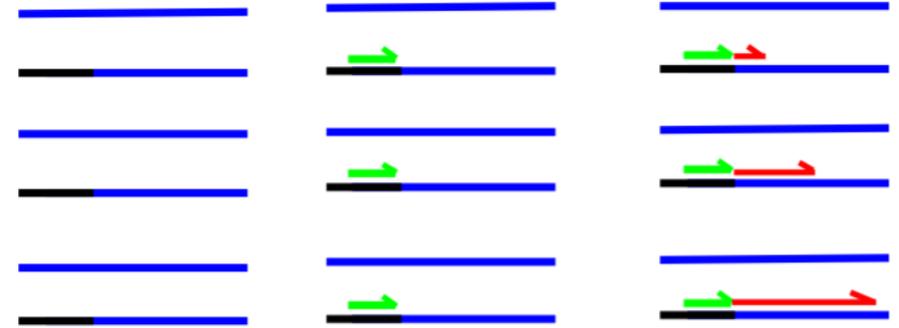
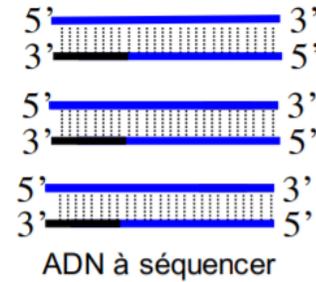


La synthèse se fait sur plusieurs cycles de 3 étapes :

- 1 Dénaturation à 95°C
- 2 Hybridation à 55°C
- 3 Elongation à 60°C

Ce sont les mêmes étapes que la PCR.

Les étapes:



Contrairement à la PCR, le séquençage n'utilise qu'UNE SEULE amorce. +++++





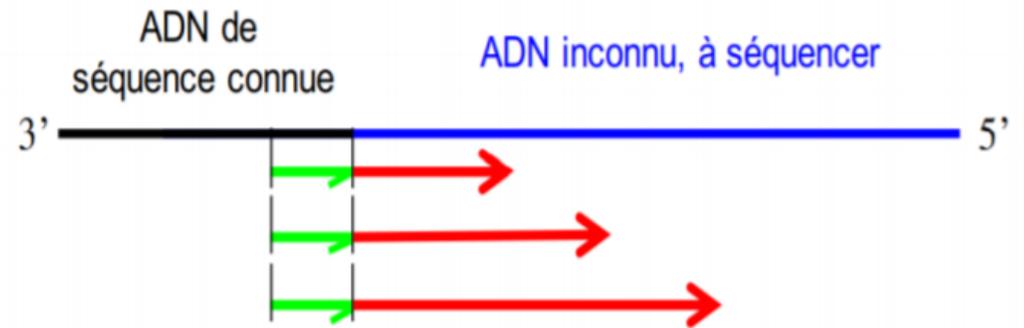
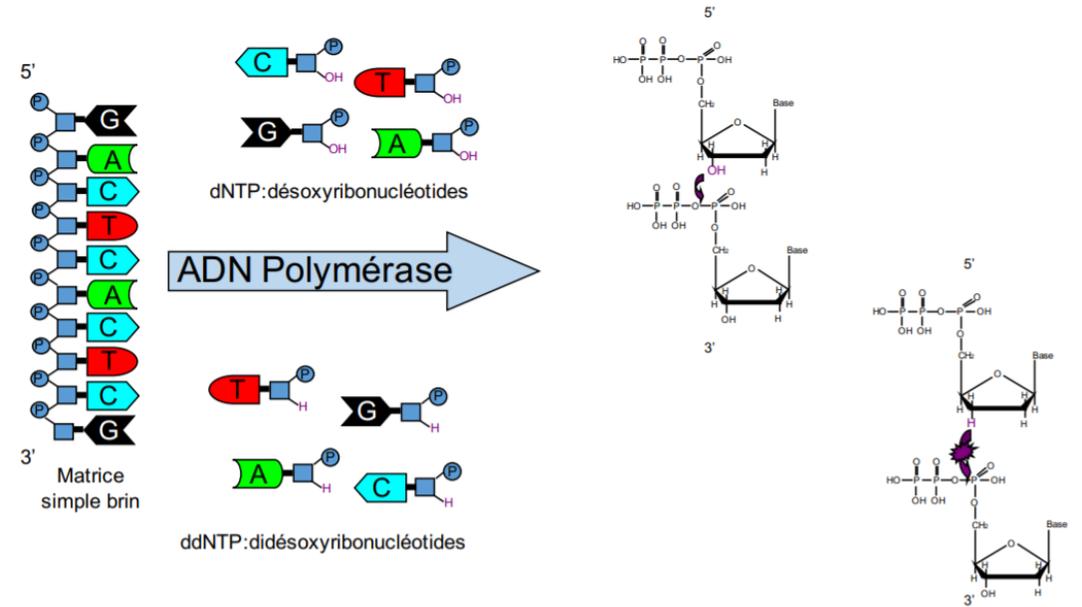
Dans un tube on ajoute :

- l'ADN à séquencer
- la Taq polymérase
- les dNTPs
- l'amorce
- les ddNTPs

Lors de la synthèse, la Taq polymérase va incorporer soit un dNTP soit un ddNTP.

En réalisant plusieurs cycles on obtient une multitude de fragments

Lorsque la Taq polymérase ajoute un ddNTP, la synthèse s'arrête. ++++



○ Pour réaliser le séquençage, on a 2 méthodes possibles:

1 La méthode Sanger

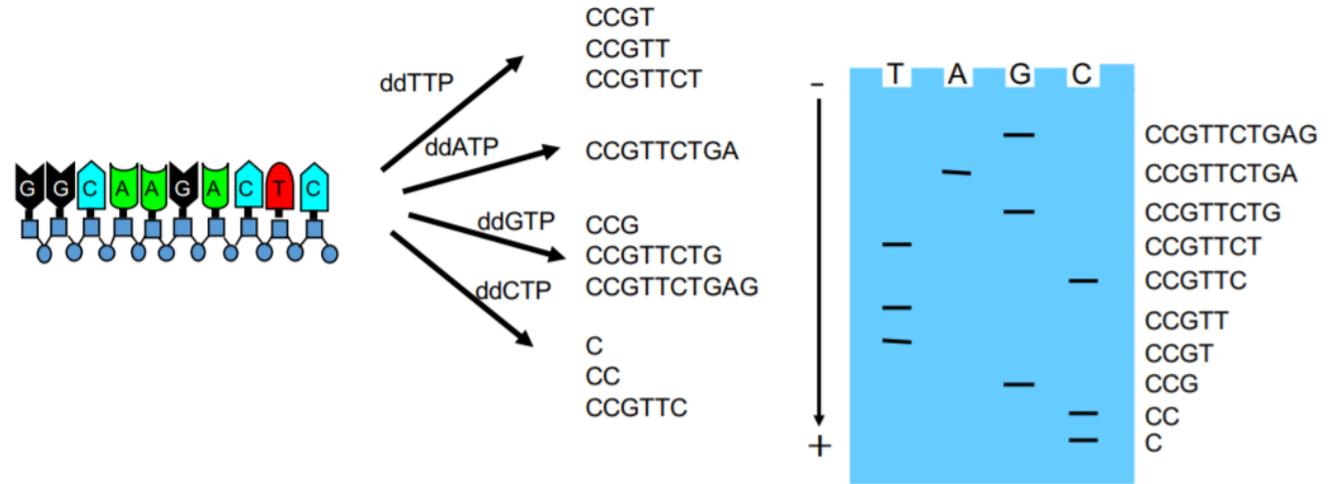
On effectue 4 réactions indépendantes dans 4 tubes contenant chacun :

-1 ddNTP (A, T, C ou G)

-les 4 dNTPs (A, T, C et G)

Les ddNTP sont radiomarqués.

Les produits synthétisés sont ensuite séparés par électrophorèse.



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

L'identité est reconnue grâce à la piste sur laquelle on fait migrer les produits. L'enchaînement est renseigné par la taille des fragments. ++

ATTENTION : le résultat de cette méthode nous donne la séquence COMPLEMENTAIRE à celle que l'on souhaite trouver. Pour connaître cette dernière on doit se souvenir du principe de complémentarité des bases.

+++++





2 La méthode automatisée

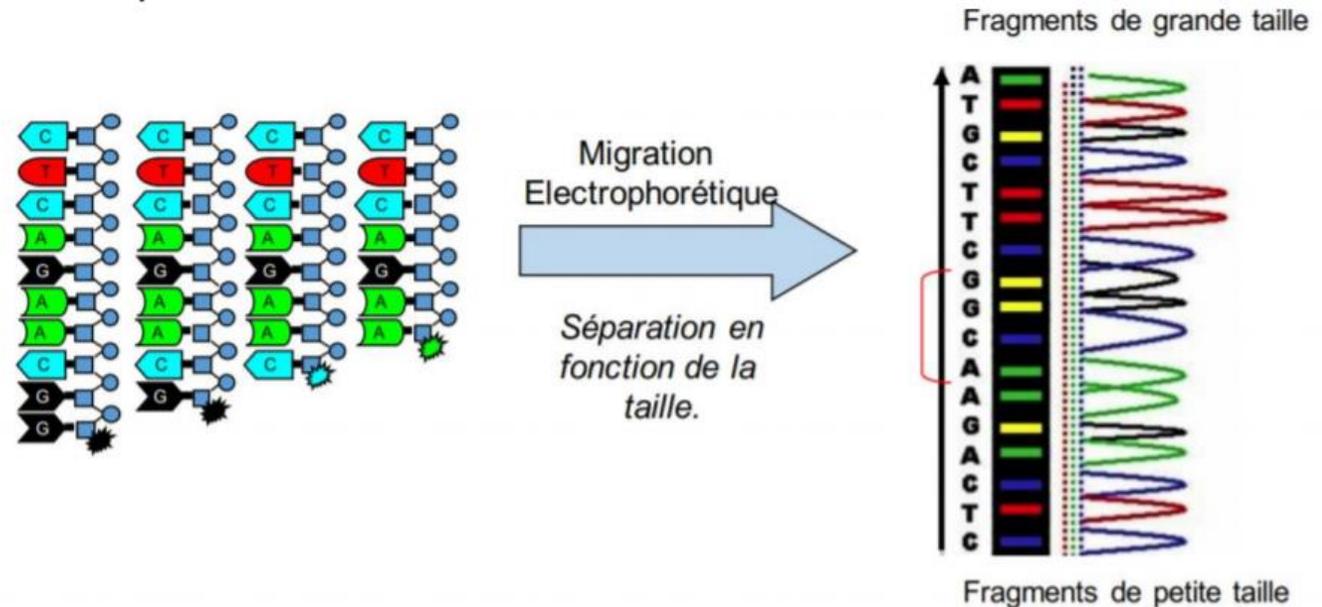
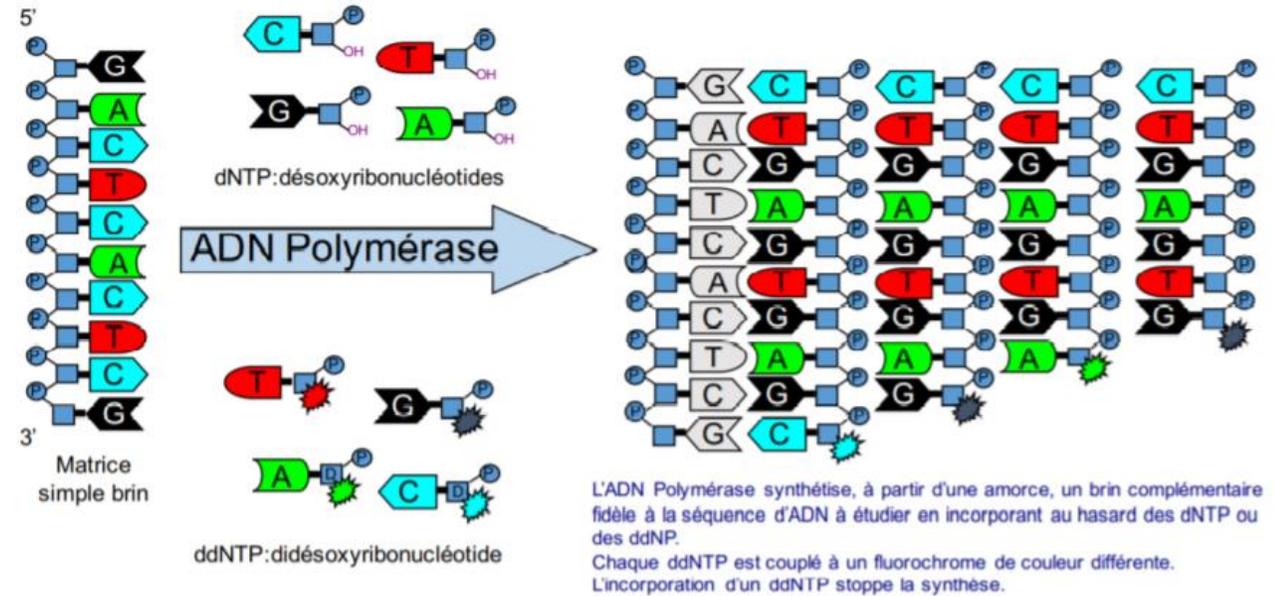
Avec l'utilisation de ddNTPs fluorescents, la méthode Sanger a été simplifiée et automatisée.

Chaque ddNTP est couplé à un fluorochrome de couleur différente.

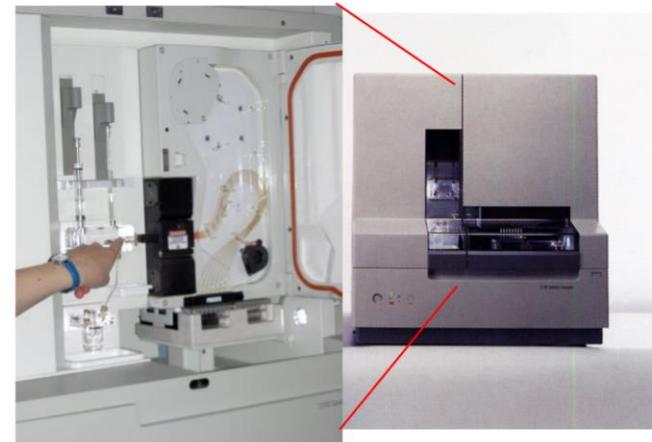
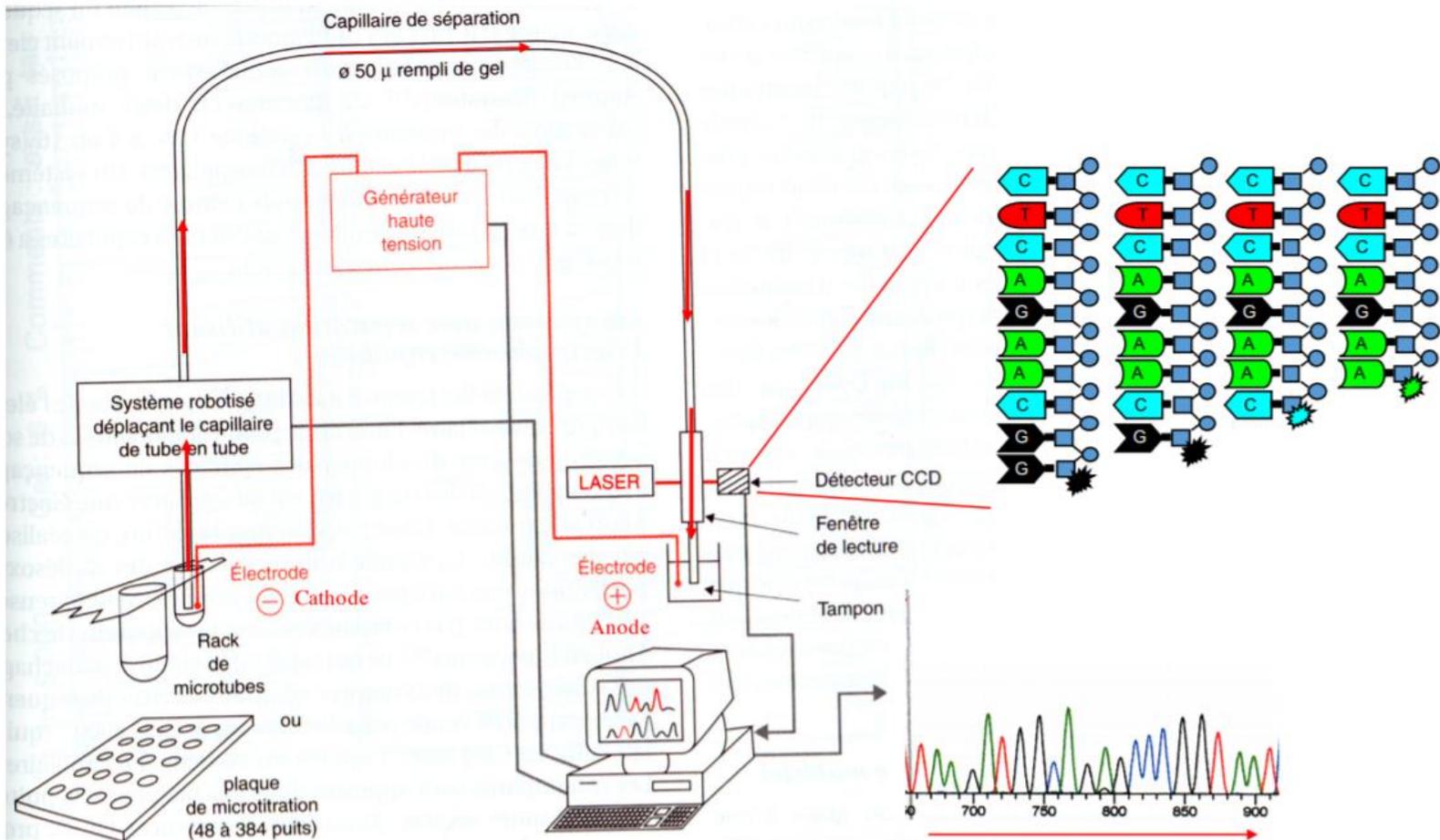
Ici les 4 ddNTPs sont ajoutés dans le même tube réactionnel. +++

Les produits synthétisés sont ensuite séparés en fonction de leur taille.

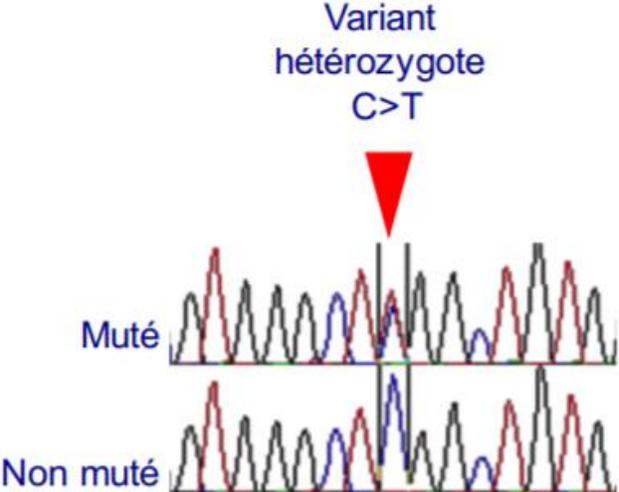
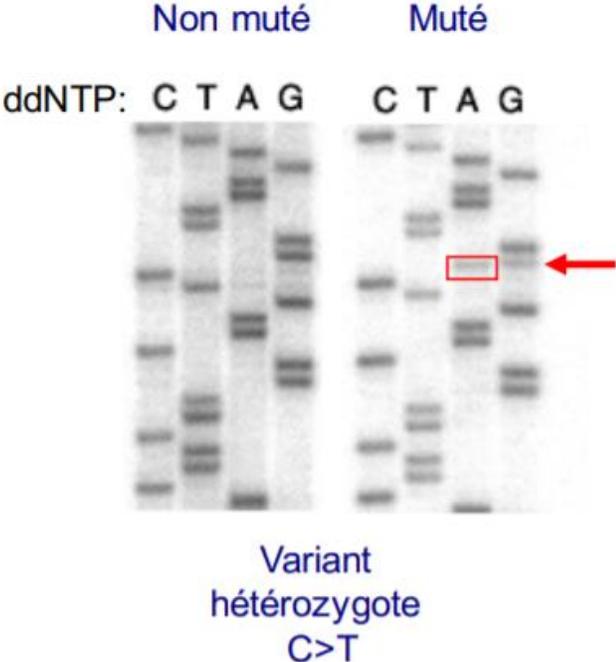
L'identité des nucléotides est retrouvée par la couleur et l'enchaînement par la taille.+++



Les séquenceurs automatiques.



Exemples de résultats





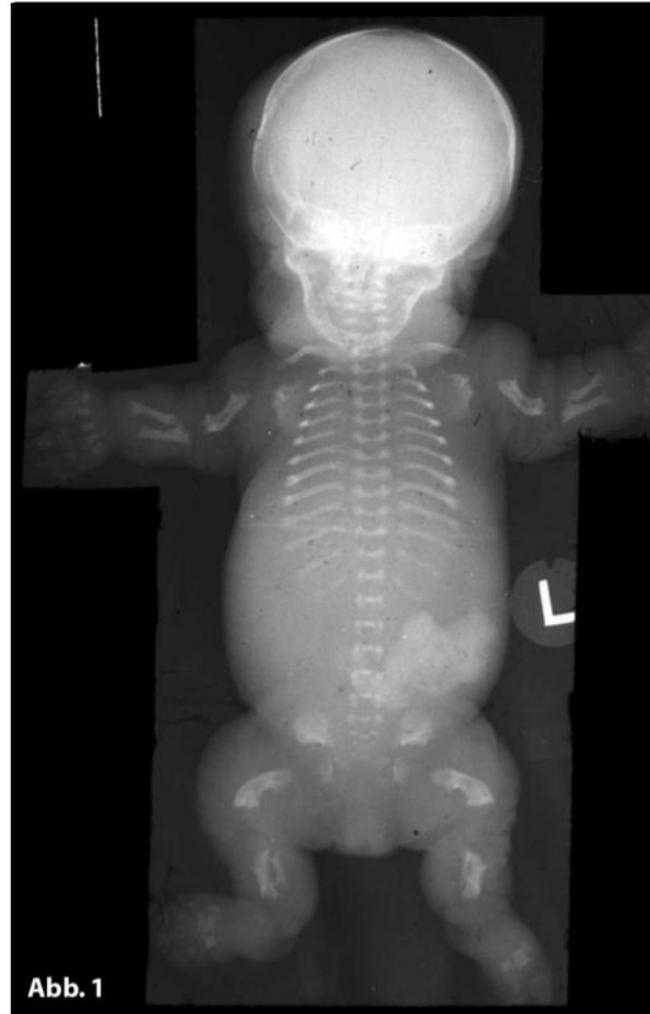
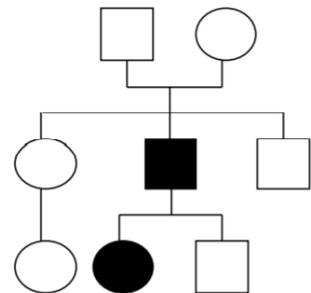
III/ Applications sur des maladies génétiques

A-L'achondroplasie

C'est une maladie **AUTOSOMIQUE DOMINANTE** touchant le tissu cartilagineux.

ATTENTION : 90% des enfants atteints ont leurs parents SAINS. C'est une néomutation. +++++

Les homozygotes ont généralement une forme plus grave.





Le gène responsable est le gène **FGFR3**.

→Ce gène code pour le **RECEPTEUR** d'un facteur de croissance fibroblastique.

Il s'exprime dans les chondrocytes.

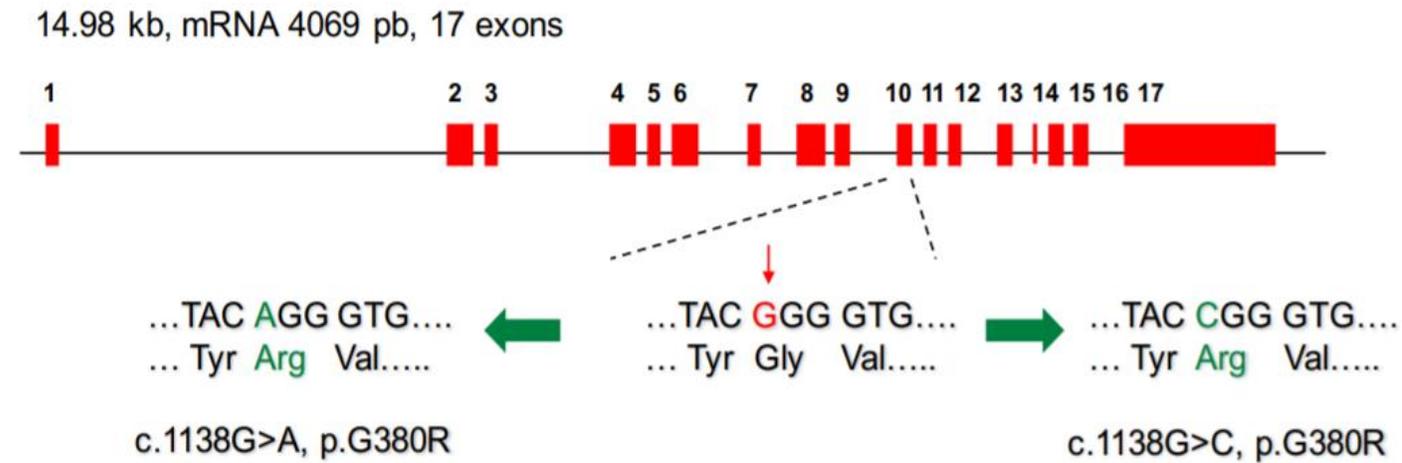
La mutation est TOUJOURS au même endroit :

Codon 380

Nucléotide 1138

→ Il existe 2 mutations possibles

- 1 Guanine remplacée par Adénine (G > A)
- 2 Guanine remplacée par Cytosine (G > C)



Dans les deux cas on a une substitution d'acide aminé :

Une GLYCINE est remplacée par une ARGinine. ++++

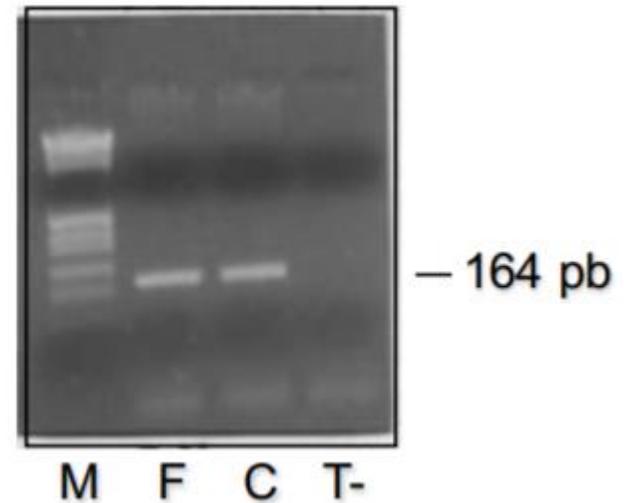
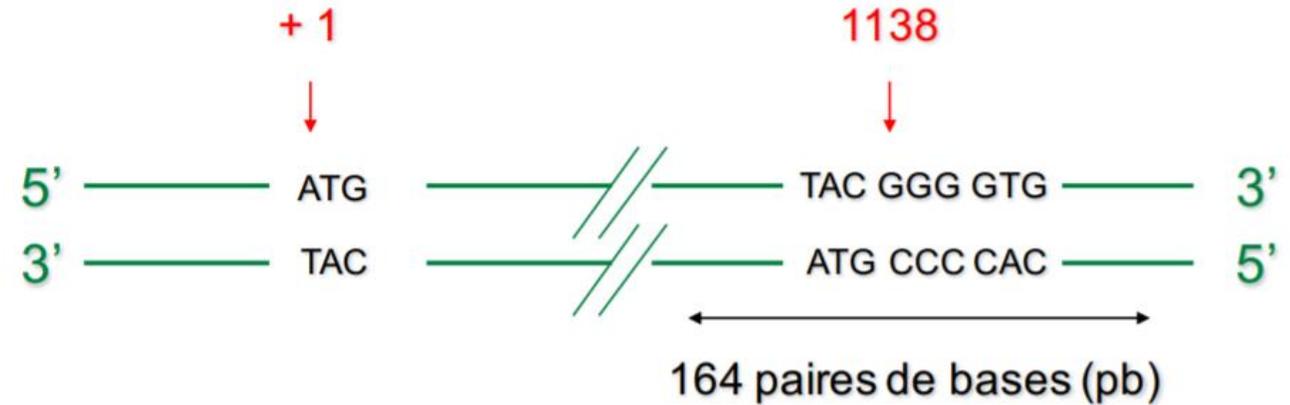




Devant une suspicion par échographie :

- 1** Extraction d'ADN à partir de cellules amniotiques
- 2** Amplification par PCR d'un fragment de 164 pb encadrant la position 1138
- 3** Vérification des amplicons sur gel

Gène *FGFR3*





4 Digestion des amplicons par

-Bfml pour G > A

-HpaII pour G > C

On appelle ça un PCR-RFLP. ++

5 Vérification par séquençage

ON NE PEUT PAS POSER DE
DIAGNOSTIC AVEC UNE SEULE
TECHNIQUE DE BIOLOGIE
MOLECULAIRE. ++++

Mutation c.1138G>A

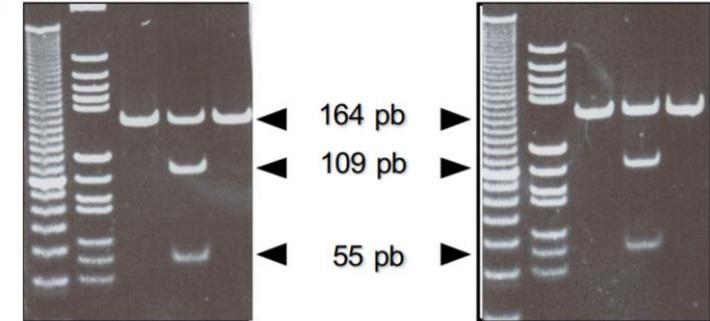
Mutation c.1138G>C

Bfml

HpaII

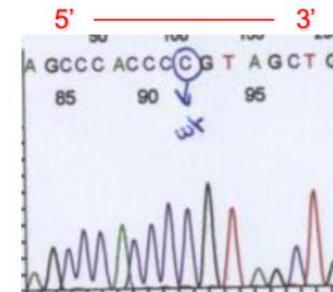
Sain	164 pb
Hétérozygote	164 + 109 + 55 pb
Homozygote	109 + 55 pb

Sain	164 pb
Hétérozygote	164 + 109 + 55 pb
Homozygote	109 + 55 pb



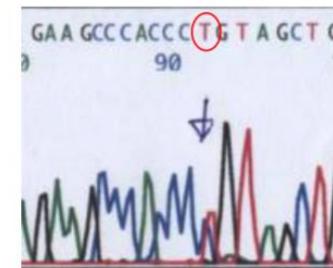
Wild-type

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



Mutation c.1138G>A
hétérozygote

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



B- Le syndrome de Wolfram

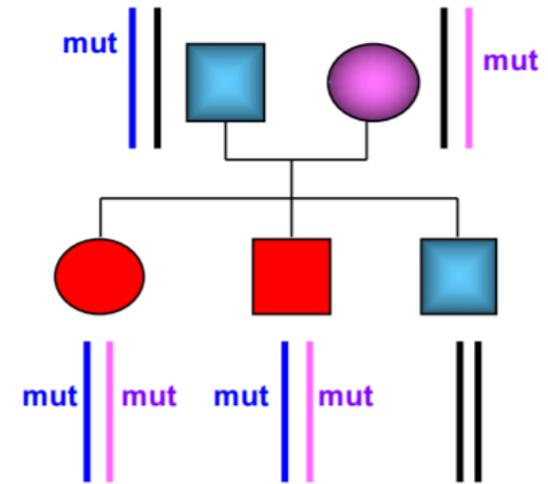
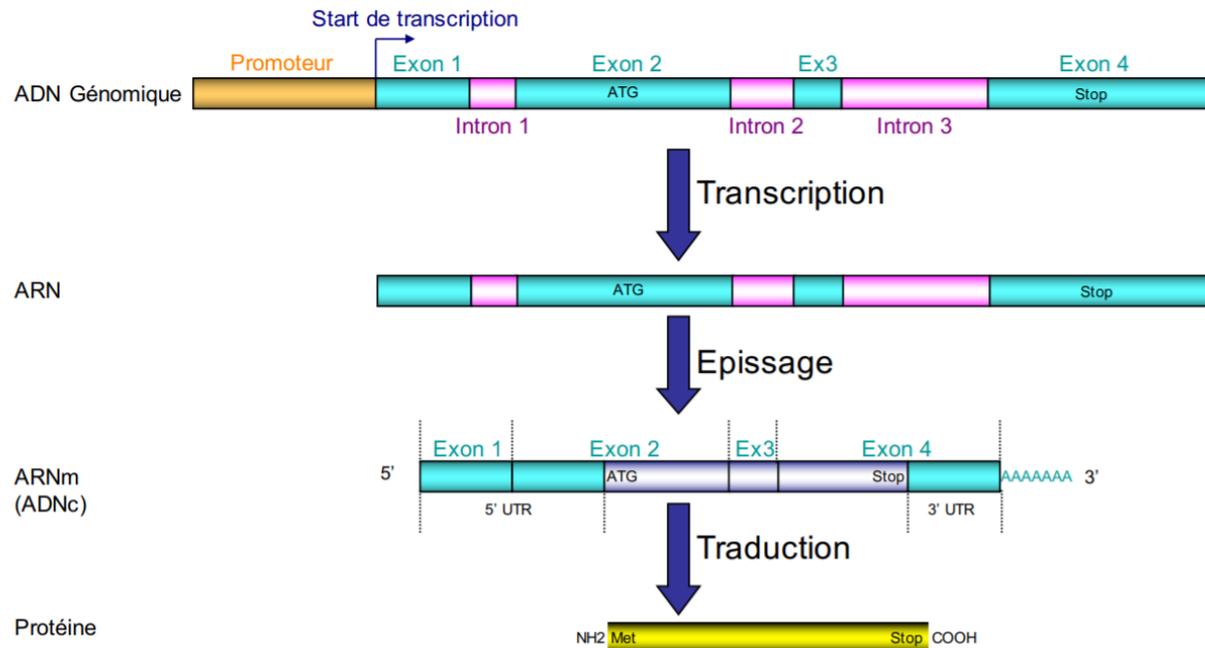
C'est une maladie **autosomique récessive +++**

Le gène responsable est le gène **WFS1** codant pour la wolframine.

Mais **on ne connaît pas la mutation. Elle peut se trouver n'importe où dans le gène. ++**

Le gène possède 8 exons. Le codon start ATG se trouve au 2^e exon.

L'EXON 1 N'EST PAS CODANT !!! ++++



Organisation et expression des gènes :

- la 1^{ère} ligne montre le gène
- en 5' on a le promoteur (orange). Ici se fixent des protéines pour démarrer la transcription
- les exons sont séparés par des introns non codants
- après transcription l'ARN est épissé : on vire les introns
- puis il est traduit en protéines

La traduction commence au codon Start ATG pas à l'exon 1 !!! +++

Tout ce qui est en amont n'est pas traduit.

La région après le codon Stop s'appelle la région 3'-UTR





Pour établir le diagnostic on va identifier le variant nucléotidique responsable du dysfonctionnement de la Wolframine.

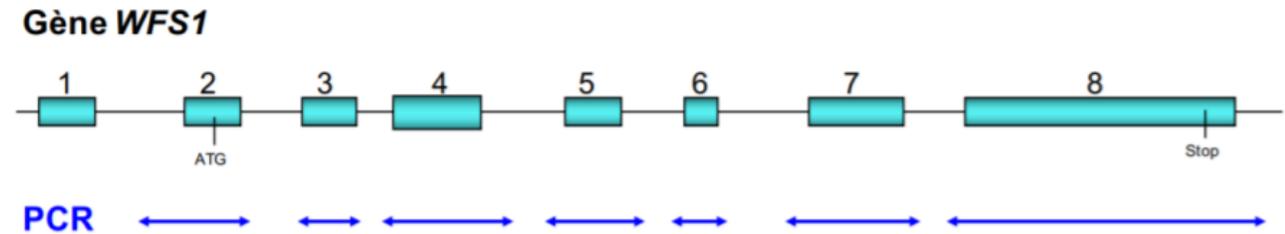
→On s'intéresse d'abord aux régions codantes car facilement interprétables.

On réalise 7 PCR pour amplifier les 7 exons codants (2 à 8)

Puis on séquence ces exons

Cependant 2 cas sont possibles après le séquençage :

PCR (exons + Jonctions intron/Exon) + Séquençage



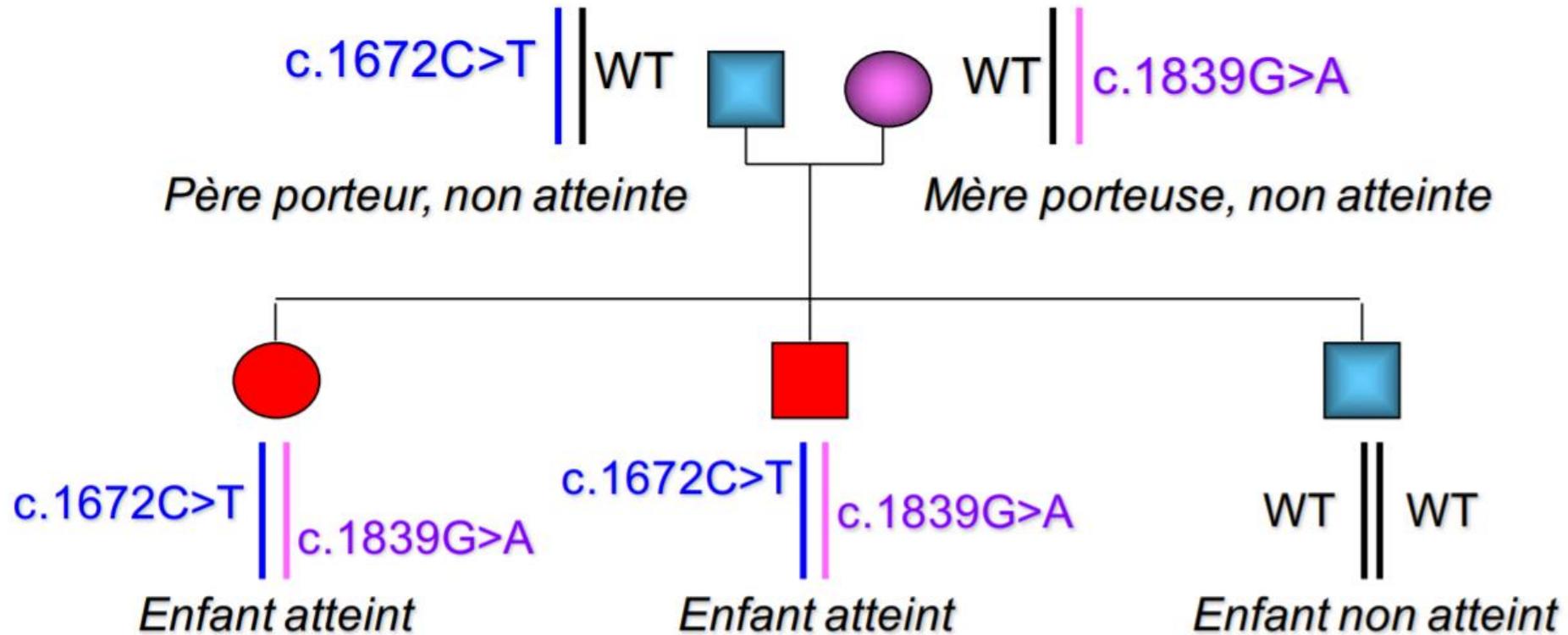
7 PCR différentes pour amplifier les exons

Séquençage des 7 PCR



① Les deux parents sont porteurs sains et hétérozygotes

Ils n'ont pas la même mutation et l'enfant atteint aura les deux allèles mutés de chaque parent. Il est HETEROZYGOTE COMPOSITE +++

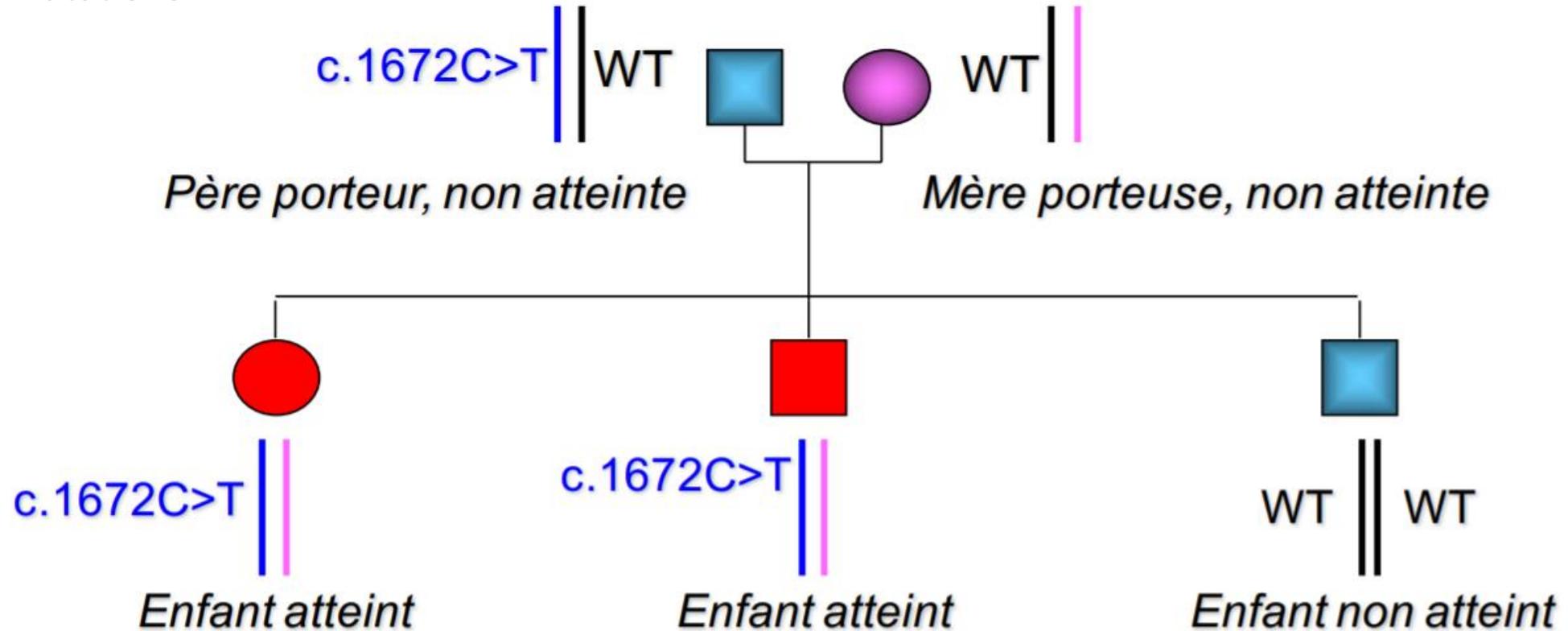


➤ Diagnostic de Syndrome de Wolfram



② On trouve une mutation hétérozygote chez le père mais pas chez la mère.

Pourtant cette pathologie est récessive. Pour être atteint il faut être porteurs de deux mutations.



- Une seule mutation identifiée après PCR et séquençage des régions codantes du gène *WFS1* = manque la 2ème mutation

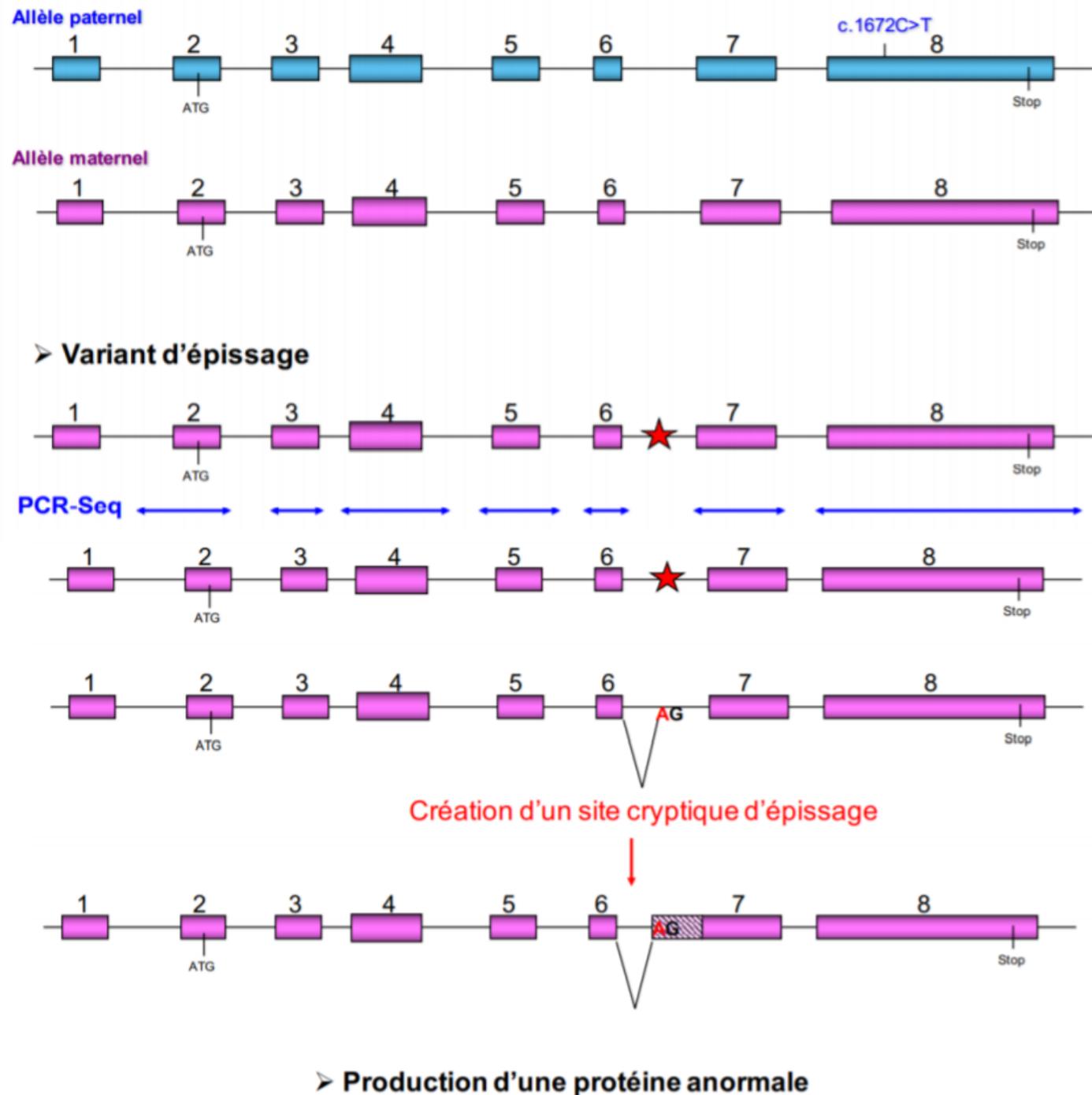




La raison est simple: on ne s'est pas intéressé aux introns.

Pourtant une mutation dans un intron peut avoir des conséquences sur l'épissage de notre ADN. On appelle ça un variant d'épissage.

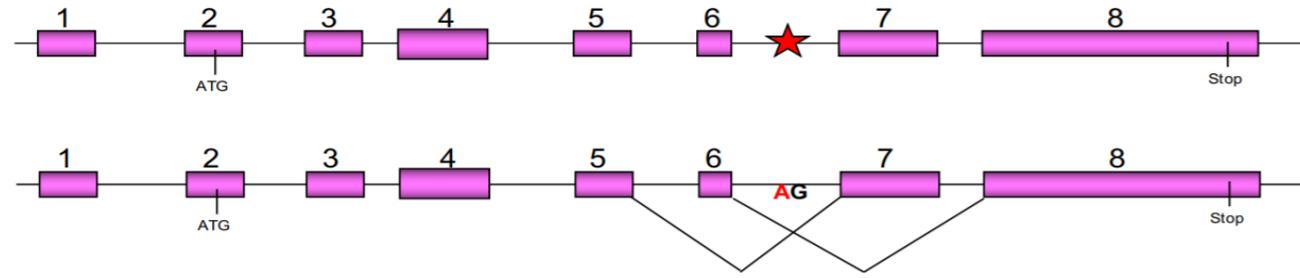
Ce variant peut créer un site cryptique d'épissage ce qui va perturber l'épissage de notre ARNm ce qui va conduire à la création d'une protéine anormale.



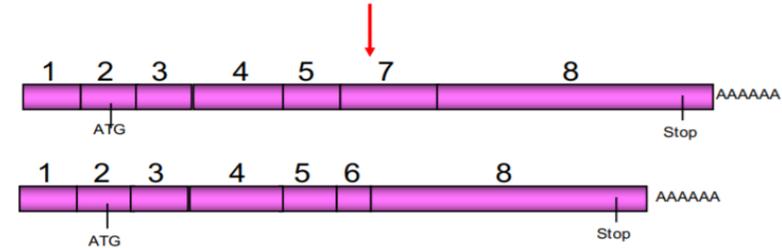


L'effet de ces variants ne se voit sur l'ARN messenger qu'après l'épissage.

Les ARNm ne peuvent pas être amplifier directement par PCR. +++ Ils doivent être copié sous forme d'ADN

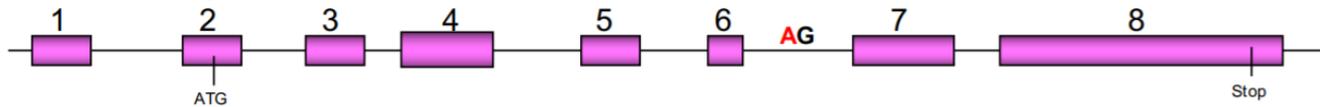


Modification d'un site d'épissage

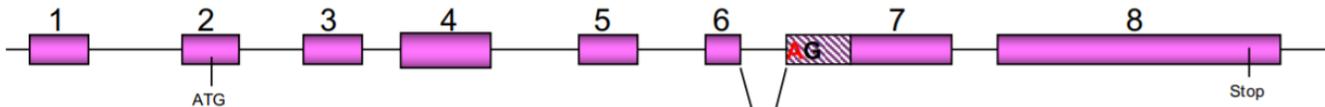


➤ Production d'une protéine anormale

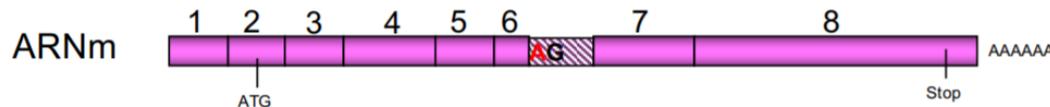
ADN Génomique



PCR-Seq



Epissage



Pour cela nous allons utiliser la transcription inverse. +++

Elle permet de synthétiser un brin d'ADN complémentaire à la séquence ARN





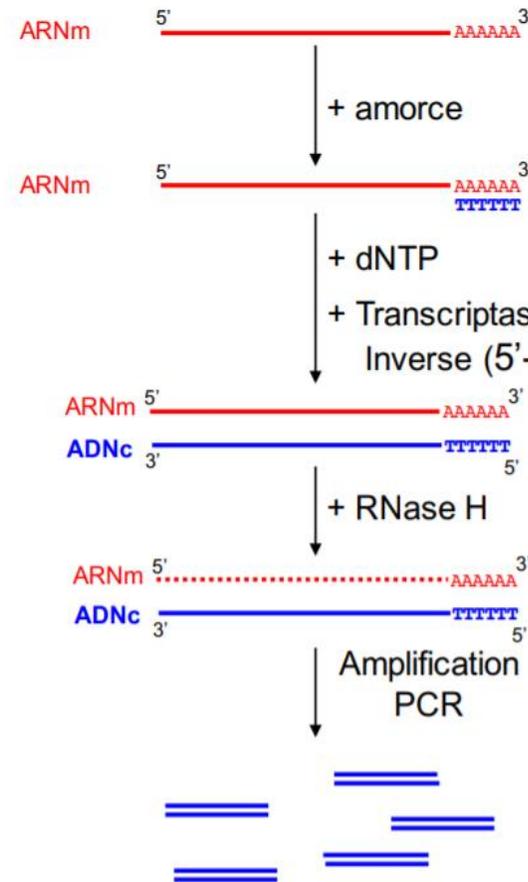
Pour réaliser la transcription inverse, nous avons besoin d'une enzyme VIRALE : la transcriptase inverse.

→ Cette enzyme synthétise un brin ADN à partir d'ARN en formant un hybride ADN/ARN. Elle possède une activité 5'-3' ADN polymérase à partir d'une amorce ADN hybridée sur de l'ARN.

L'ADNc est une copie ADN complémentaire à une séquence ARN. +++++

La RNase H dégrade les brins ARN lorsqu'ils sont hybridés sur de l'ADN.

L'ADNc peut être amplifié par PCR.



A partir d'une amorce ADN hybridée sur l'ARN

ADN polymérase qui synthétise un brin d'ADNc en prenant un ARN comme matrice pour former un hybride ADN:ARN.

Dégradation de l'ARN dans un hybride ADN:ARN



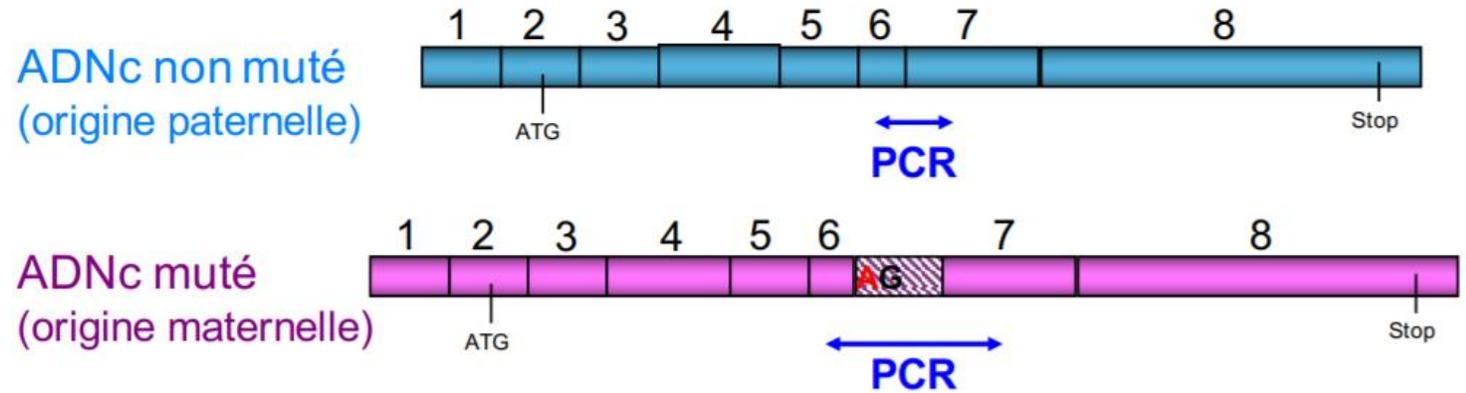


Ainsi nous pourrons enfin rechercher les variants d'épissage.

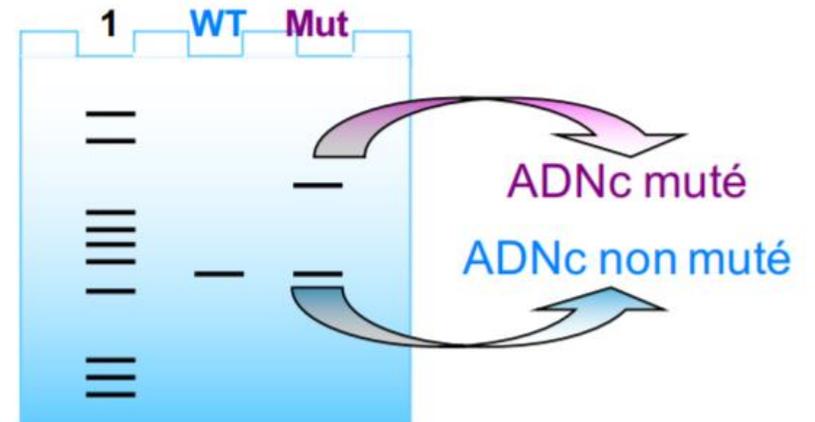
Ici on découvre un site cryptique d'épissage dans l'intron 6 de l'allèle maternel.

Pour le père on a un produit PCR à la taille attendue.

Chez la mère on a deux produits PCR différents :
- un identique au père
- l'autre plus grand qui correspond à l'allèle muté dont l'ARN a été mal épissé



Analyse des produits PCR après migration électrophorétique

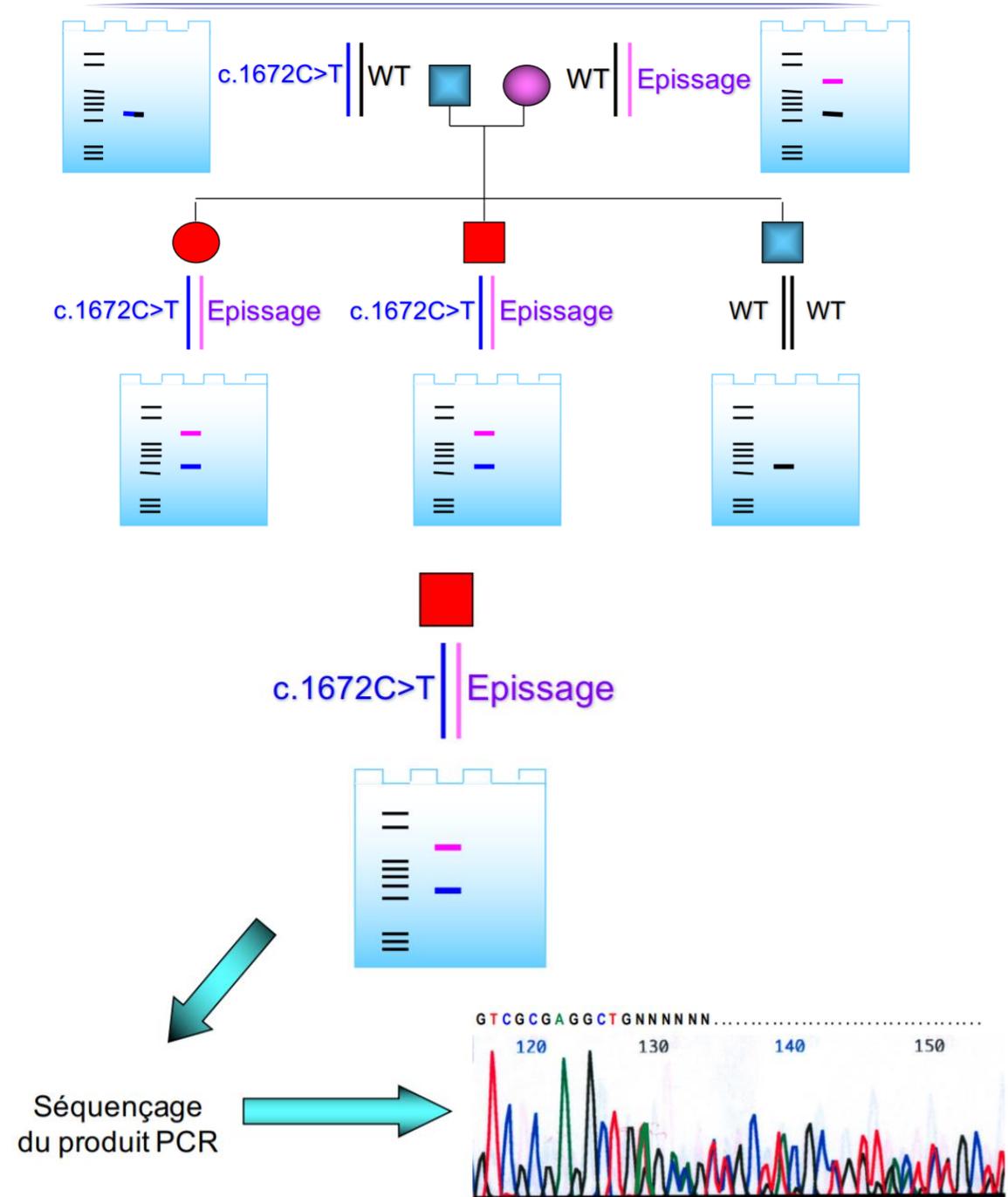




Il est maintenant possible de séquencer les produits PCR pour identifier le variant.

Cependant nos deux produits PCR sont mélangés et de taille différente. Du coup on se trouve avec un électrophorégramme illisible.

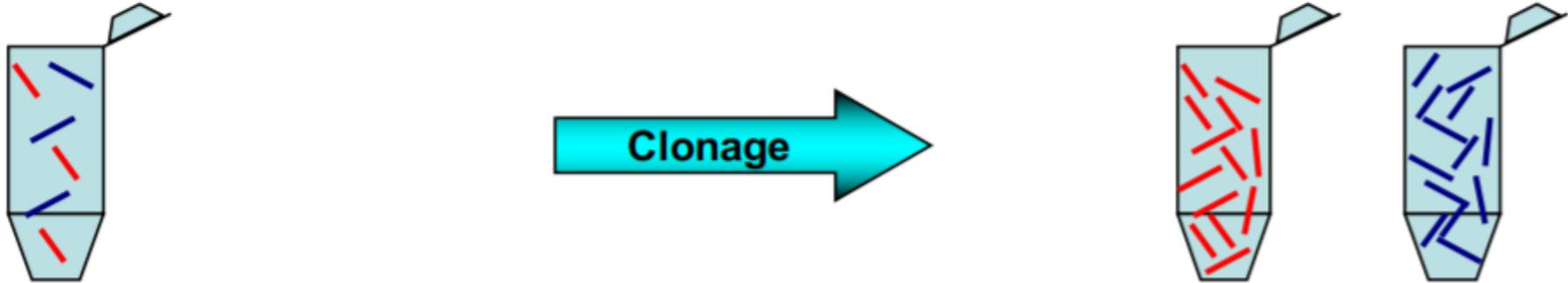
Pour résoudre ce problème il faut séparer nos deux produits PCR et les séquencer séparément. Pour cela on va utiliser le clonage moléculaire.



IV/ Le clonage moléculaire

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

++++



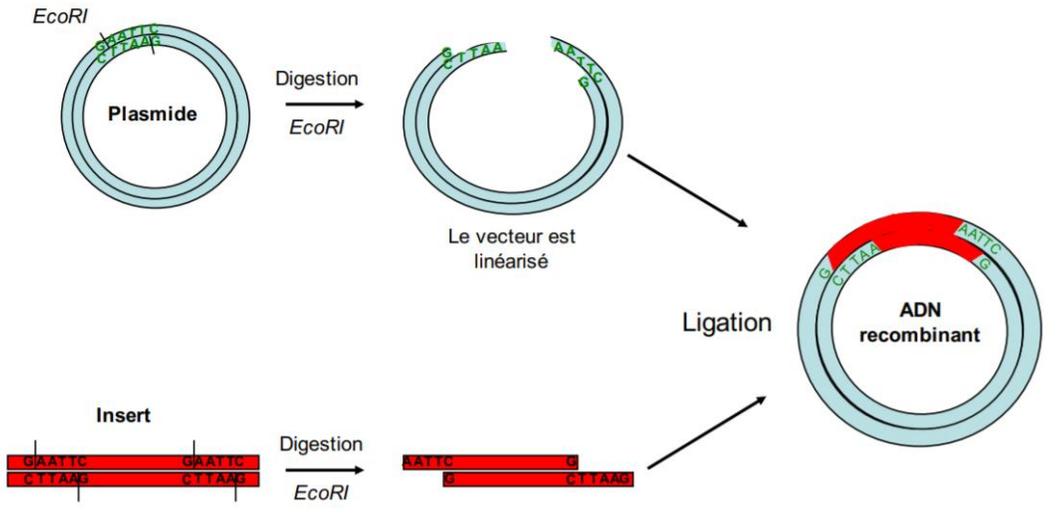
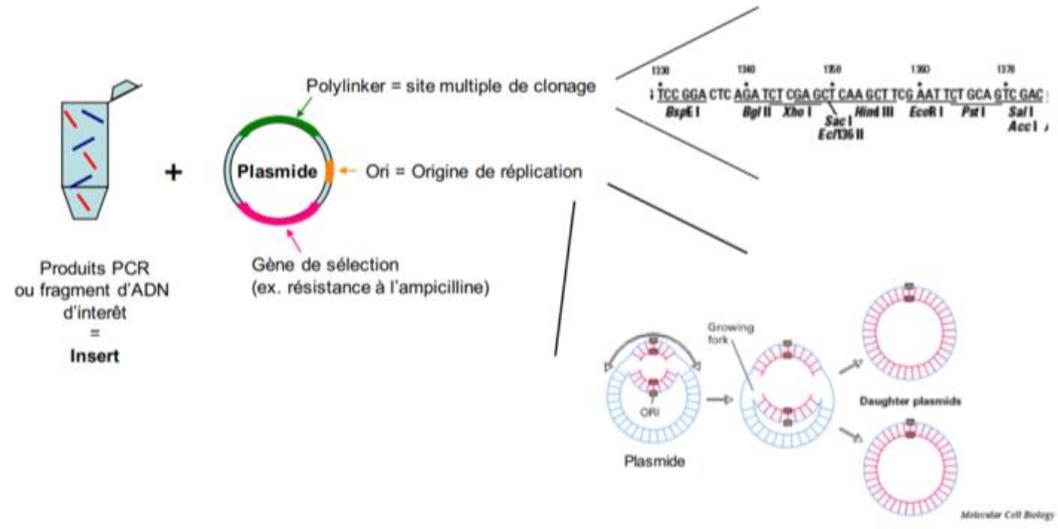
On divise le principe en 4 étapes :

- ➊ Introduction d'un fragment d'ADN (=insert) dans un vecteur
- ➋ Introduction de l'ADN recombinant dans un hôte : transformation bactérienne
- ➌ Amplification clonale et extraction de l'ADN
- ➍ Séquençage





1^{ère} étape:

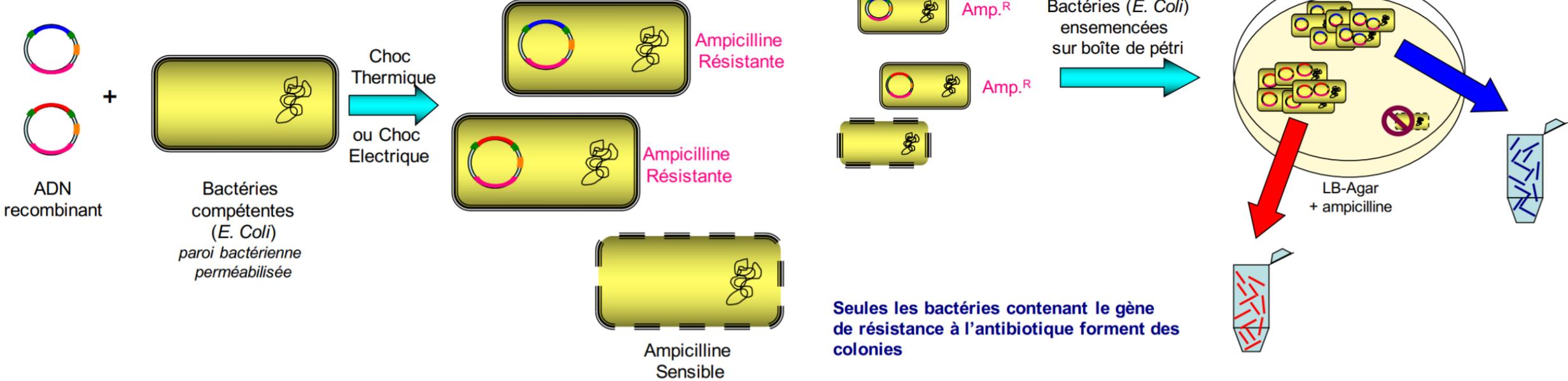


PLASMIDE + INSERT = ADN RECOMBINANT +++

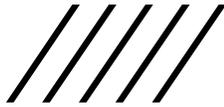




2^e étape :

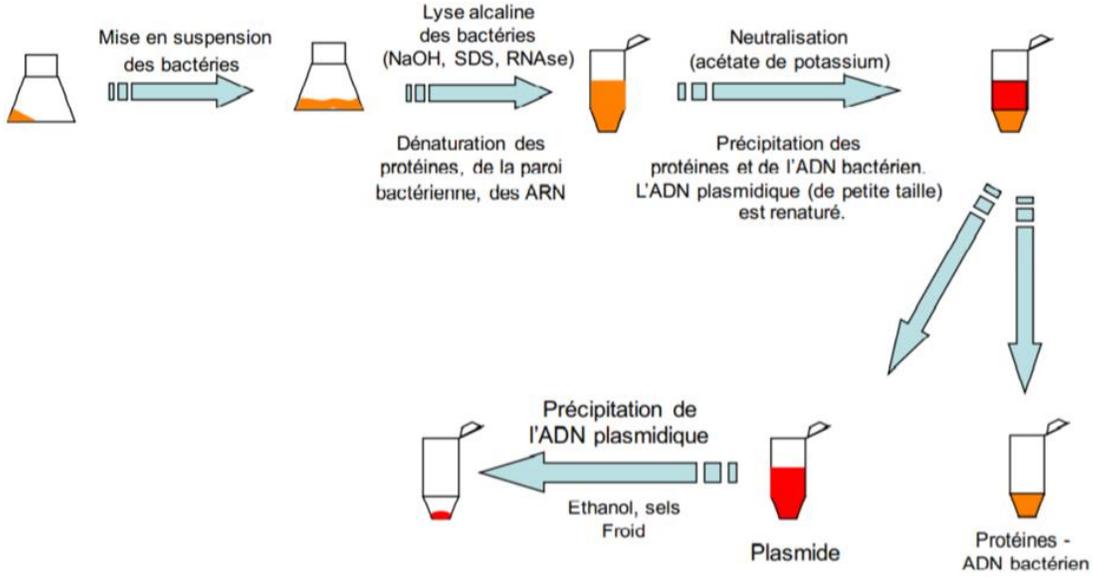


Seules les bactéries contenant le gène de résistance à l'antibiotique forment des colonies

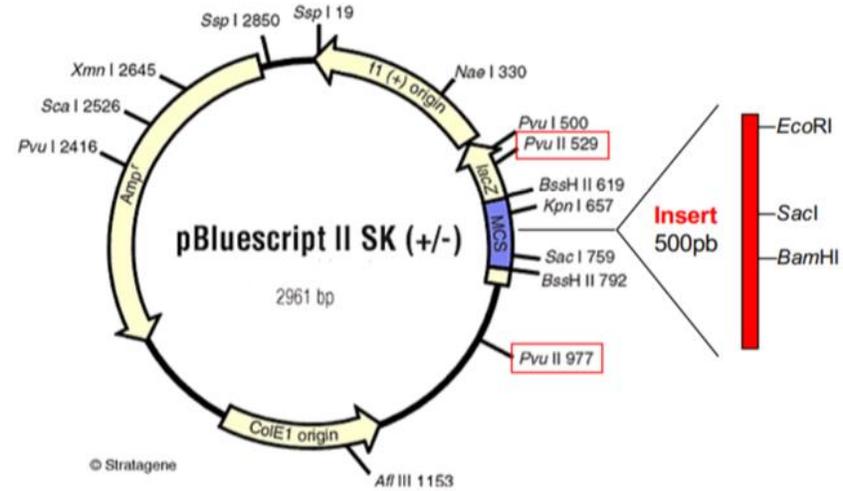




3^e étape:



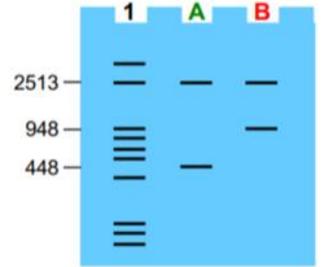
Les ADN recombinants purifiés sont analysés par digestion enzymatique: réalisation de sa carte de restriction.



Digestion PvuII:

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

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



1- Marqueur de taille





4^e étape:

