

# Digestion enzymatique, séquençage, clonage moléculaire et applications

## I/Digestion enzymatique

Il existe des enzymes de restriction qui sont des ENDOnucléases bactériennes, qui coupent notre ADN double brin de manière reproductible et spécifique sur une séquence spécifique.

Il existe 500 enzymes différents répertoriées en 3 types. On se concentrera sur les enzymes de type II.

Les enzymes de restriction de type II :

- reconnait 4 à 8 paires de bases ;
- coupe l'ADN au niveau de la séquence reconnue.

EcoRI	5' G AATT C3'
	3' C TTAA G5'

-la séquence est palindromique. +++ (identique dans les deux sens)

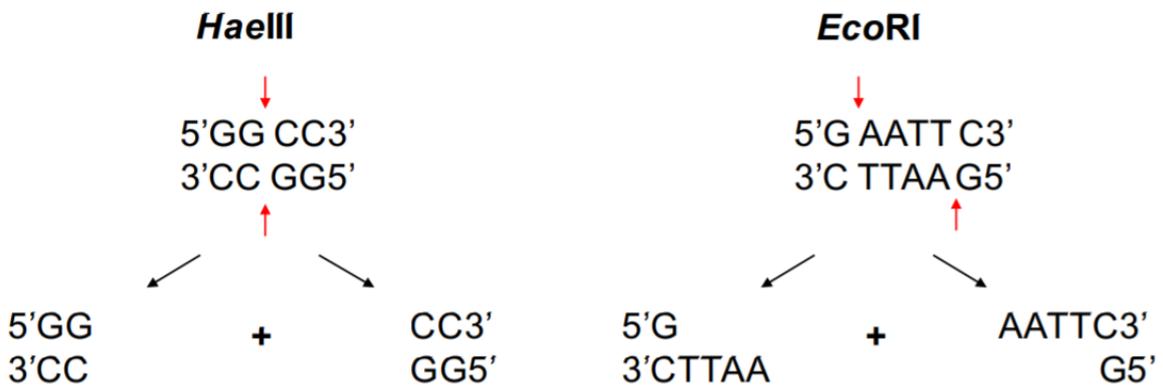
Deux enzymes reconnaissant la même séquence sont dites isoschizomères. ++

Il y a 2 types de coupures différentes :

*Le tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite*

**Coupsures à bouts francs**  
(blunt ends)

**Coupsures à bouts cohésifs**  
(sticky ends)

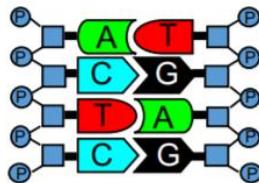


## II/Le séquençage de l'ADN

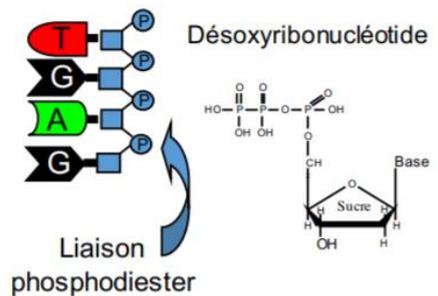
**Le but du séquençage de l'ADN est de déterminer la succession des nucléotides qui le compose. +++**



La double hélice d'ADN



2 Brins



Pour cela on utilise la méthode **des DI-désoxyribonucléotides** (ddNTPs) ou méthode de **Sanger**. Cette méthode reste la référence malgré les nouvelles technologies.

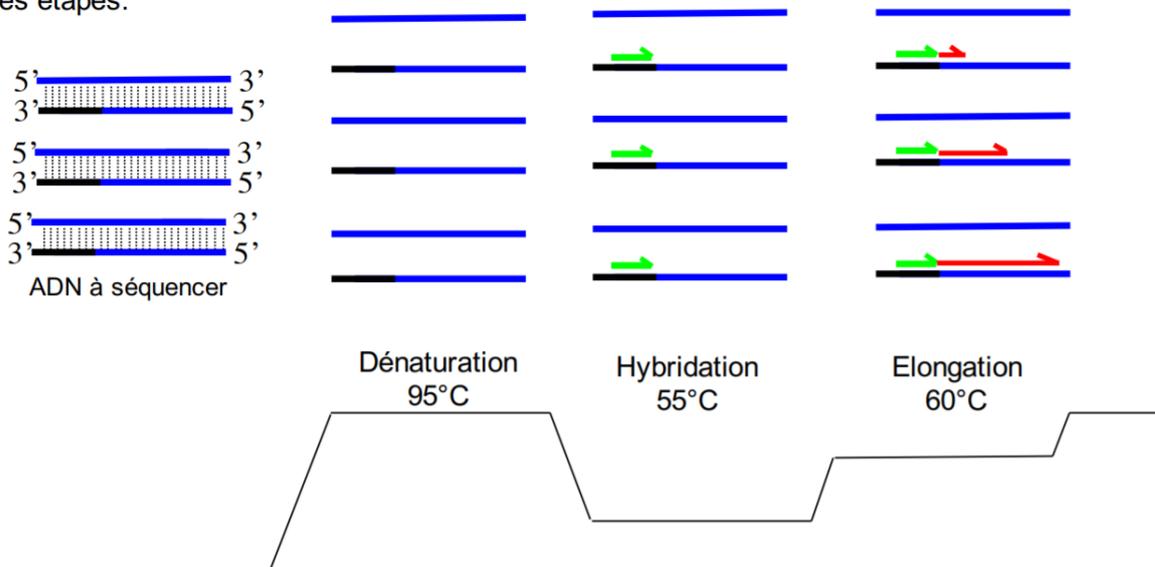
Le tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite



L'ADN Polymérase synthétise, à partir d'UNE amorce, un brin complémentaire à la séquence d'ADN à étudier grâce à des cycles successifs de 3 étapes :

- ① Dénaturation à 95° pour séparer les 2 brins
- ② Hybridation à 50° où l'unique amorce se lie au brin
- ③ Elongation à 60°

Les étapes:



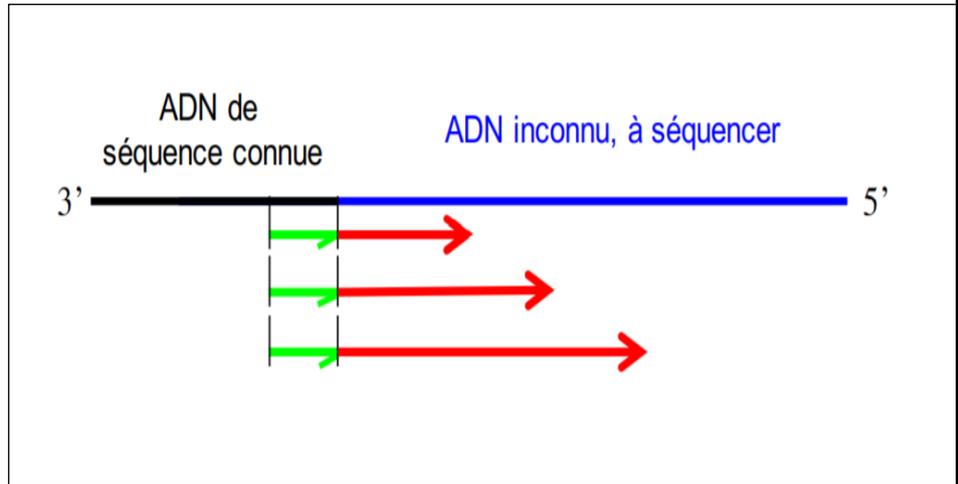
Ce sont les mêmes étapes que le PCR.

**ATTENTION : Le séquençage n'utilise qu'UNE SEULE amorce contrairement au PCR. +++++**

Dans un tube on mélange :

*Le tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite*

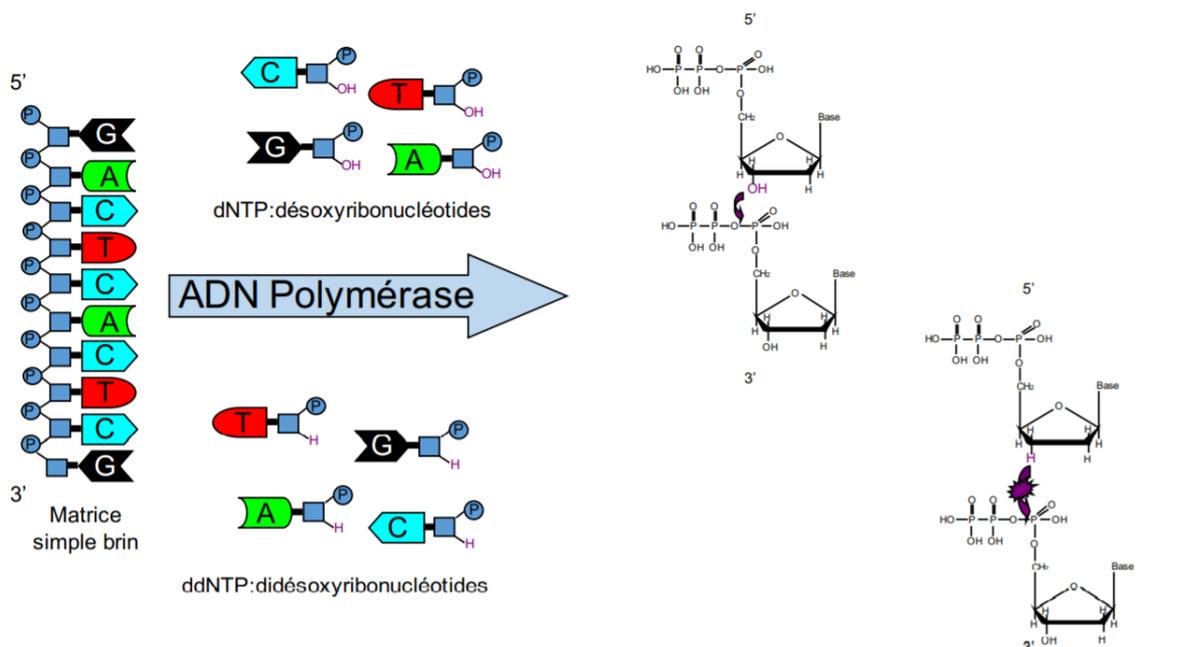
- L'ADN à séquencer
- La Taq polymérase
- L'amorce
- Des **ddNTPS ++**
- Des nucléotides



L'ADN polymérase, en synthétisant le brin complémentaire, va incorporer au hasard soit un dNTP soit un ddNTP.

**Quand elle ajoute un ddNTP la synthèse s'arrête** car il n'y a plus de groupe -OH disponible (cf biomol ☺). Le OH est remplacé par un H. Ainsi il est impossible de faire une liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant.

**L'incorporation d'un ddNTP stoppe la synthèse. +++**



L'incorporation de dNTPs ou de ddNTPS est aléatoire et nous allons réaliser plusieurs cycles.

On se retrouve alors avec une multitude de fragments de taille différente.

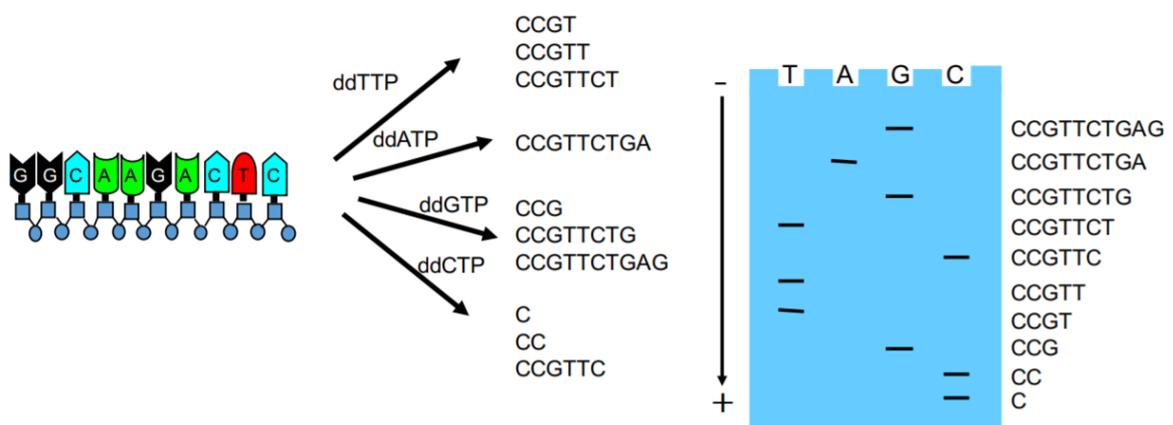
Pour réaliser le séquençage on a 2 méthodes :

### ① La méthode Sanger (1977)

Cette méthode consiste à effectuer 4 réactions indépendantes dans 4 tubes différents contenant chacun 1 type de ddNTP (A, T, C ou G) et les 4 types de dNTPs (A, T, C, et G).

Chaque tube contient ce qu'il faut pour faire la synthèse.

Les produits synthétisés sont ensuite 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.

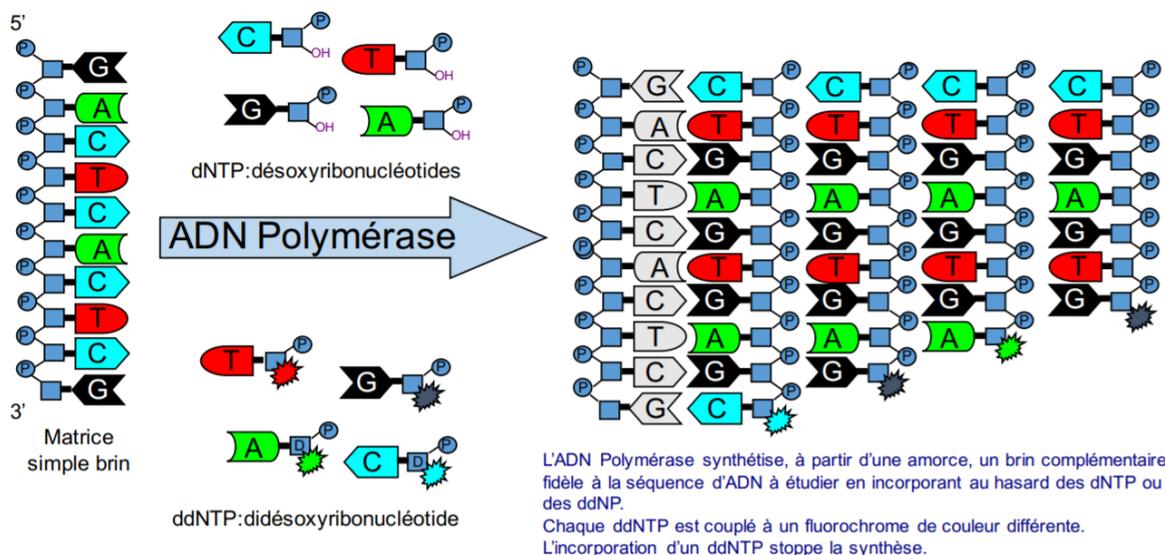
**ATTENTION : Le résultat de cette méthode nous donner la séquence COMPLEMENTAIRE de celle qu'on souhaite trouver. Pour connaître la séquence recherchée on doit utiliser le principe de complémentarité des bases. +++**

## 2 La méthode automatisée

Grâce à l'utilisation de ddNTPs fluorescents, la méthode Sanger a été simplifiée et automatisé.

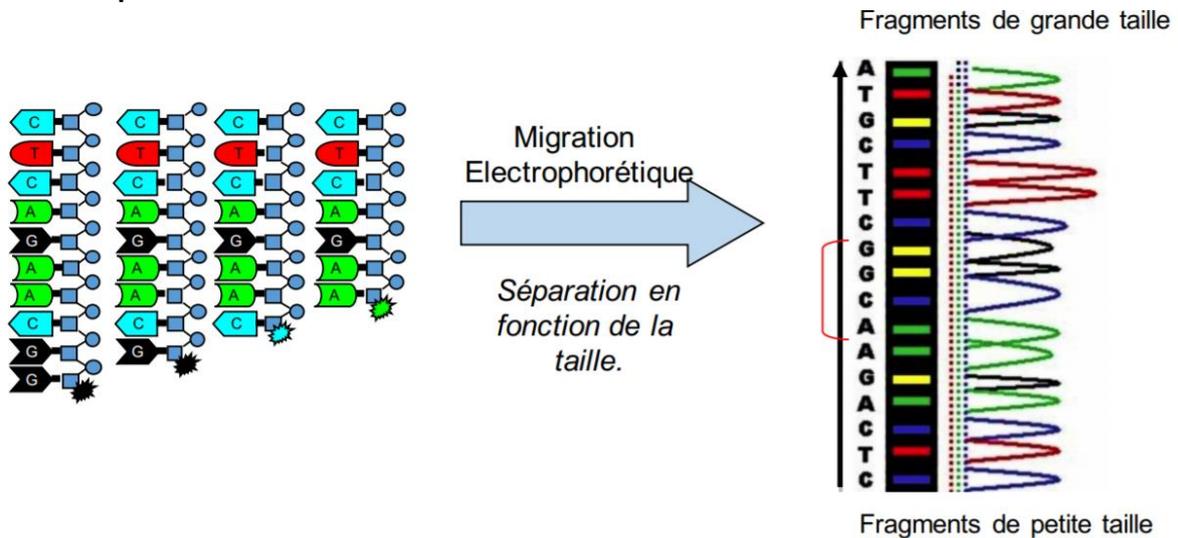
Chaque ddNTP est couplé à un fluorochrome de couleur différente.

**Ici, les 4 ddNTPS sont ajoutés dans le MEME tube réactionnel. +++**



Le tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite

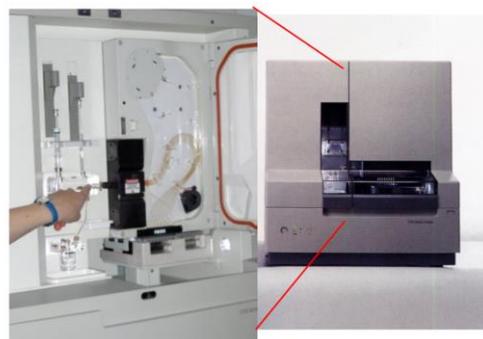
Les produits synthétisés sont à nouveau séparés par électrophorèse en fonction de leur taille.



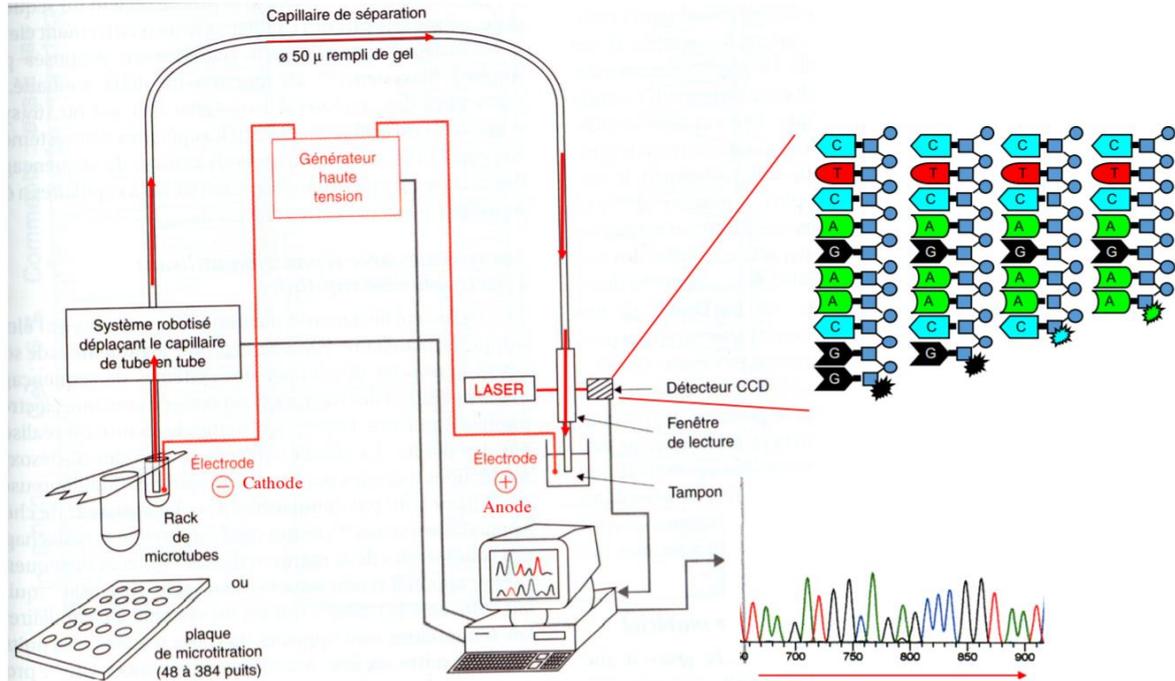
**L'identité des nucléotides est retrouvée par la couleur et l'enchaînement par la taille. +++**

Aujourd'hui il existe des séquenceurs automatiques qui utilisent une caméra identifiant la couleur du fluorochrome et donc le nucléotide par un laser. Avec un traitement informatique la séquence est retrouvée sous forme d'un

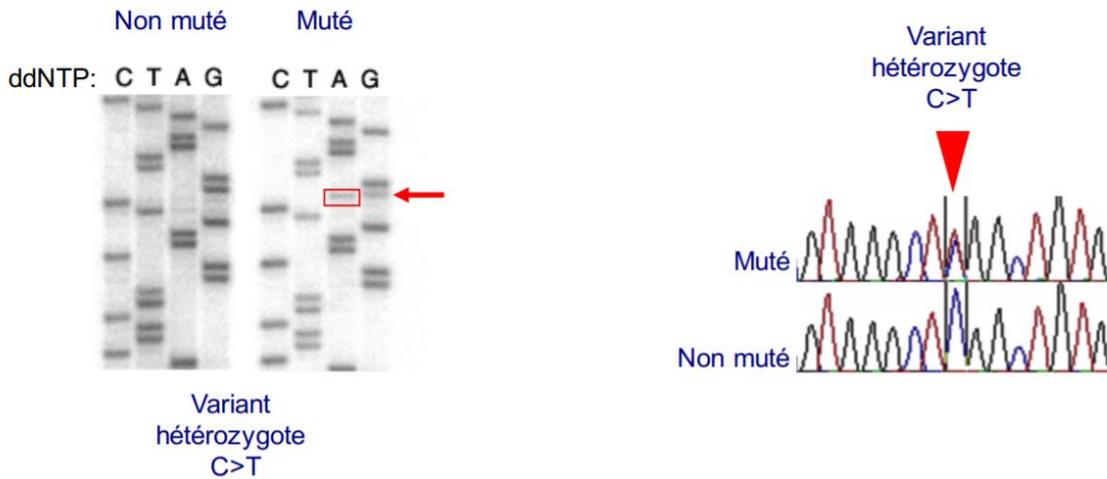
électrophorégramme.



Le tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite



EXEMPLE :



### III/ Application sur des maladies génétiques

#### A-L'achondroplasie

Le tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite

Cette maladie est la plus fréquente des chondrodysplasie

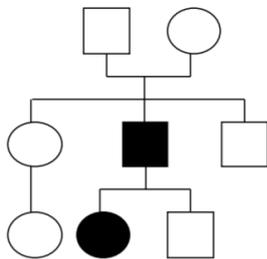


(1/15000)

Une chondrodysplasie est une maladie touchant le tissu cartilagineux.

C'est une maladie **AUTOSOMIQUE DOMINANTE MAIS 90% des enfants atteints ont leurs parents SAINS. C'est une NEOMUTATION. +++++**

Les formes sont plus graves chez les patients homozygotes.



Le gène responsable est FGFR3, qui code pour le RECEPTEUR d'un facteur de croissance fibroblastique.

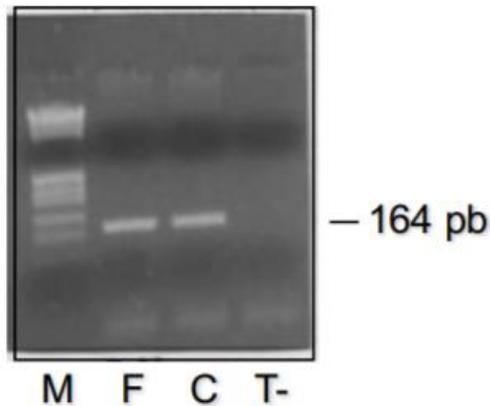
Ce gène s'exprime normalement dans les chondrocytes et régule la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse.

On a 2 mutations possibles du gène FGFR3 :

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



-Vérification des amplicons sur gel



M= marqueur de poids moléculaire  
 F= foetus  
 C= individu de contrôle  
 T- = témoin négatif

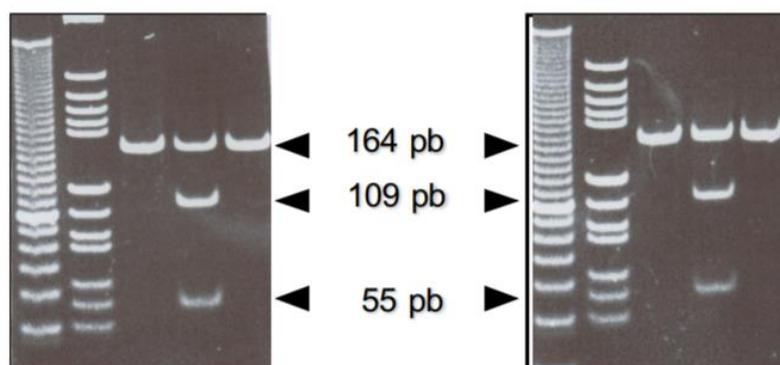
-Digestion des amplicons par des endonucléases :

→ Bfml coupe si G > A

→ HpaII coupe si G > C

→ **Si en présence des deux il n'y a pas de coupures :  
 séquence sauvage soit PAS DE MUTATIONS. ++**

	Mutation c.1138G>A	Mutation c.1138G>C
	<i>Bfml</i>	<i>HpaII</i>
<b>Sain</b>	164 pb	164 pb
<b>Hétérozygote</b>	164 + 109 + 55 pb	164 + 109 + 55 pb
<b>Homozygote</b>	109 + 55 pb	109 + 55 pb

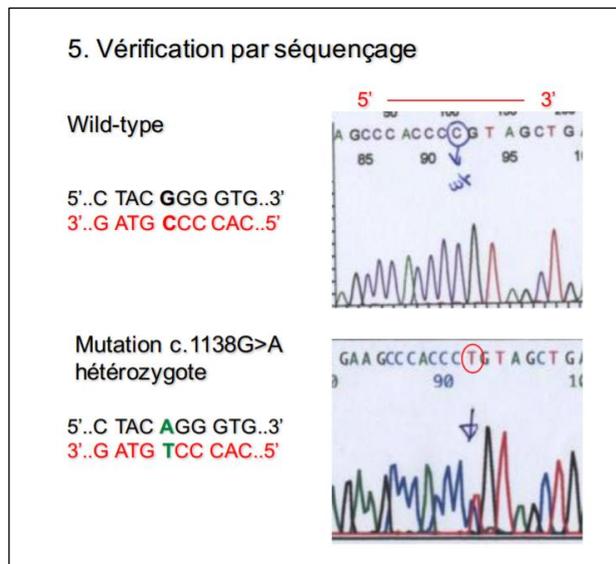


**On appelle ça une PCR-RFLP. +++**

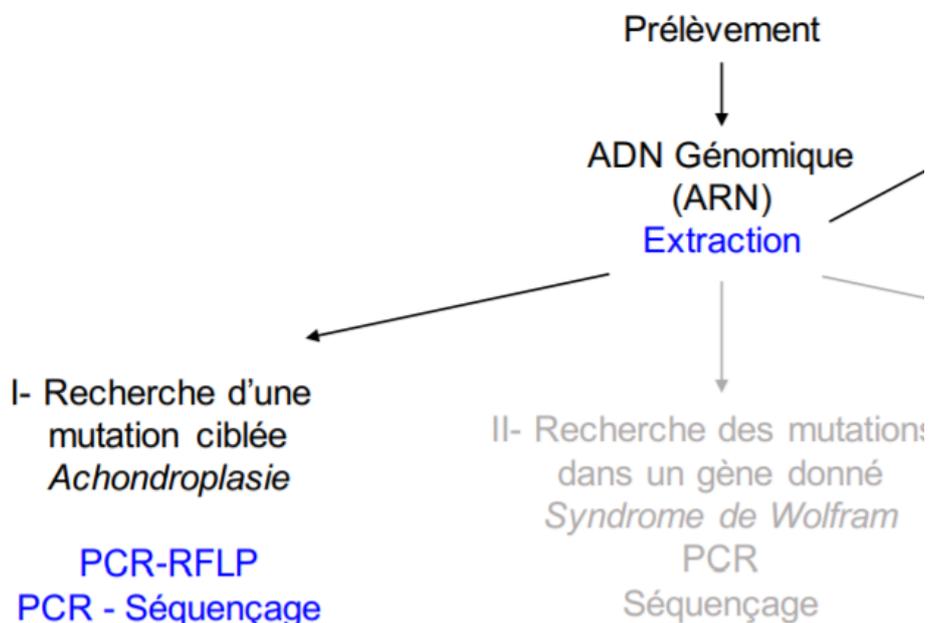
## -Vérification par séquençage

**On ne pose pas de diagnostic avec une seule méthode de biomol. +++++**

On fait alors un séquençage du gène FGFR3 pour être sur de la mutation.



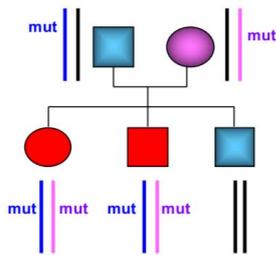
A SAVOIR +++



## B- Le syndrome de Wolfram

**Ici on ne connaît pas la mutation. Elle se trouve dans le gène WFS1 mais de manière aléatoire. ++**

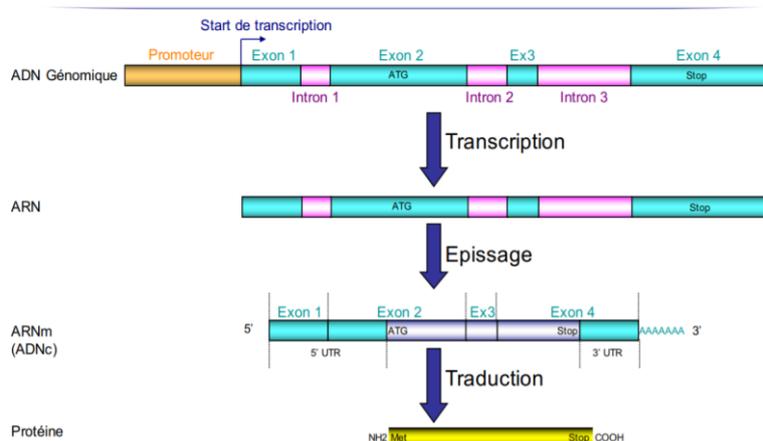
## C'est une maladie autosomique récessive. +++



Le gène WFS1 possède 8 exons.

Le codon start ATG se trouve dans l'exon 2. **L'exon 1 n'est pas codant. +++++**

Ce gène code pour la wolframine servant à réguler le flux calcique.



Organisation d'un gène :

La 1<sup>ère</sup> ligne représente le gène.

En 5' on a le promoteur permettant la fixation des protéines démarrant la transcription en ARN.

Les exons sont séparés par des introns, régions non codantes.

Après transcription on a une copie du gène en ARN.

L'ARN est ensuite épissé, on retire les introns.

Puis il est traduit en protéines.

## ATTENTION : La traduction commence au codon start donc pas au 1<sup>er</sup> exon. +++

Tout ce qui est en amont du codon ATG n'est pas traduit car non codant.

La région après le codon STOP sera la région 3'-UTR

## La traduction part du codon start et s'arrête au codon stop.

+++++

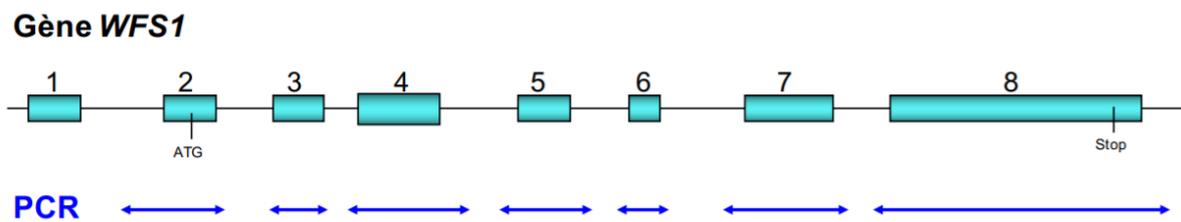
On revient sur notre gène WFS1 :

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

On s'intéresse d'abord aux régions codantes (les exons 2 à 8) car facilement interprétables.

On réalise donc 7 PCR pour amplifier tous ces exons.

PCR (exons + Jonctions intron/Exon) + Séquençage



**7 PCR différentes pour amplifier les exons**

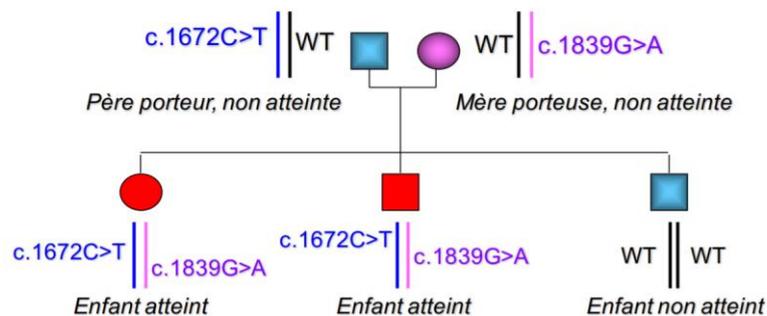
**Séquençage des 7 PCR**

Enfin on séquence les 7 exons.

Cependant 2 cas sont possibles :

- 1 Les deux parents sont porteurs sains et hétérozygotes.**

Ils n'ont pas la même mutation. L'enfant atteint aura les deux allèles mutés de chaque parent. L'enfant est hétérozygote

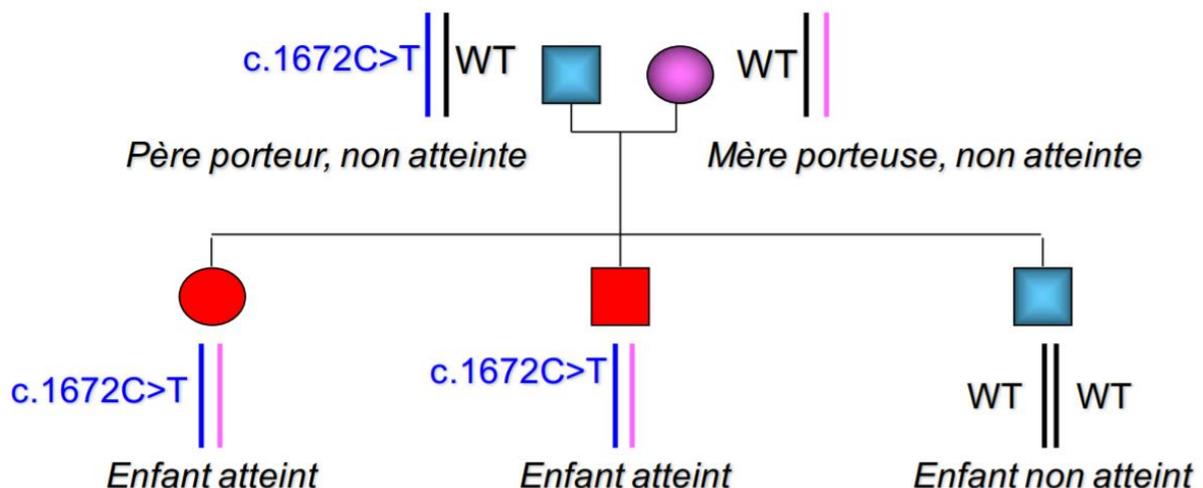


➤ Diagnostic de Syndrome de Wolfram

composite. +++

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

Les enfants atteints portent la mutation du père mais on ne trouve rien chez la mère.

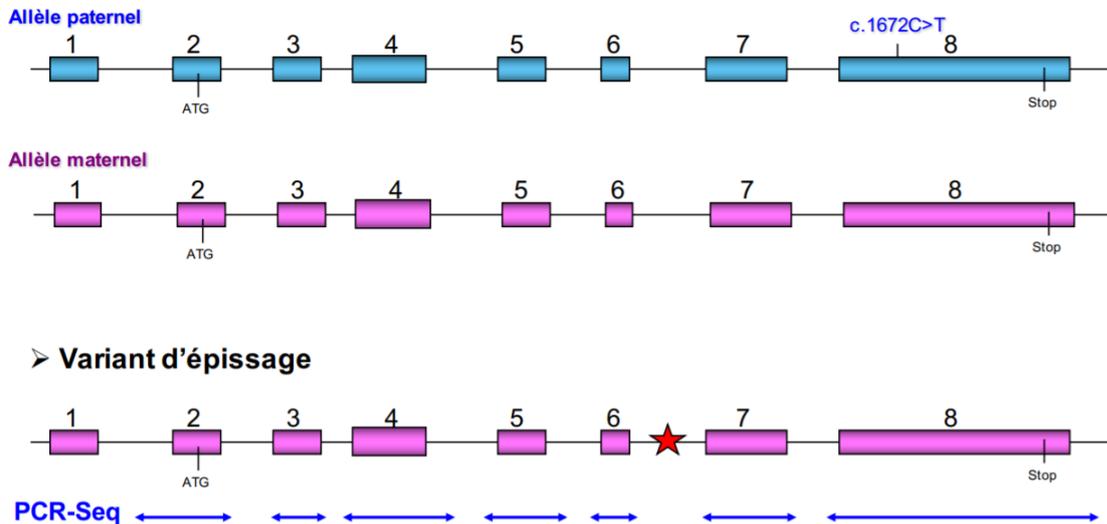


➤ Une seule mutation identifiée après PCR et séquençage des régions codantes du gène *WFS1* = manque la 2ème mutation

Pourtant le syndrome de Wolfram étant une pathologie récessive il faut que les enfants soient porteurs de deux mutations.

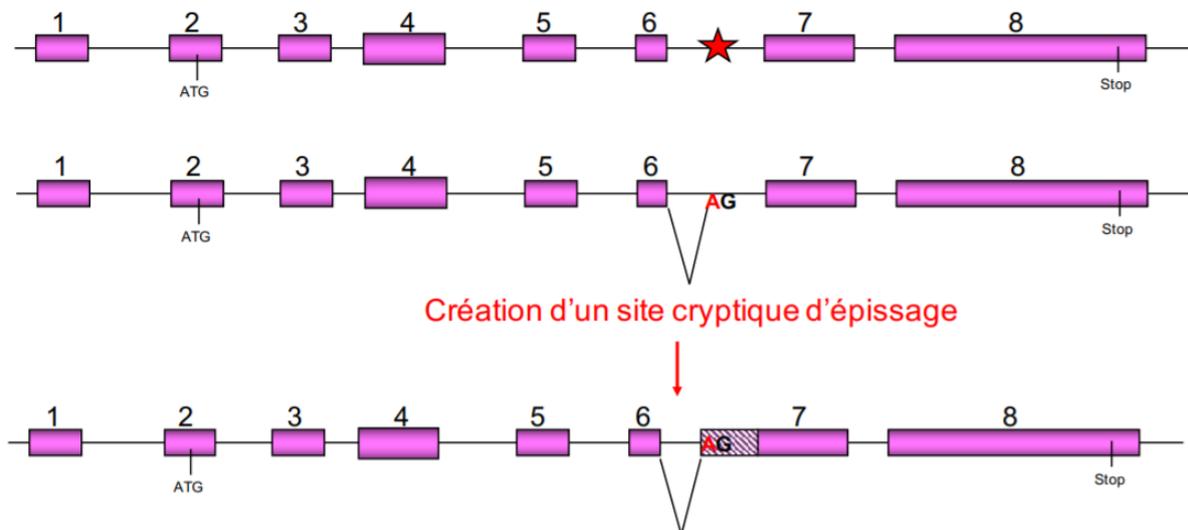
## COMMENT EST-CE POSSIBLE ??? o\_O

En fait on ne s'est pas vraiment intéressé aux régions introniques. Du coup on n'a pas pu détecter un variant se trouvant dans un intron.



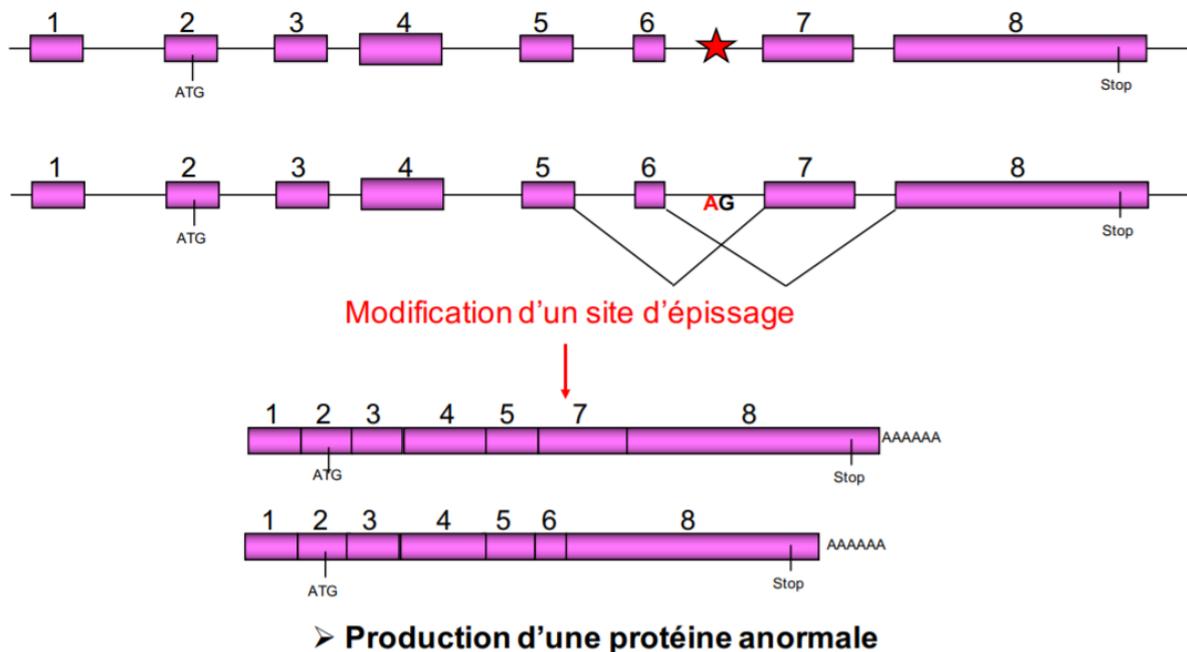
Pourtant cette mutation dans un intron peut avoir des conséquences sur l'épissage de notre ARNm. On appelle ça un variant d'épissage.

Ce variant peut créer des sites cryptiques d'épissage.



➤ **Production d'une protéine anormale**

Ainsi l'épissage de notre ARNm va être perturbé ce qui va conduire à la production d'ARNm mature défectueux produisant in fine protéine anormale.



L'effet de ces variants ne se voit que sur les ARNm après l'épissage.

**Les ARNm ne peuvent pas être directement amplifiés par PCR. +++** Ils doivent être copiés sous forme d'ADN.

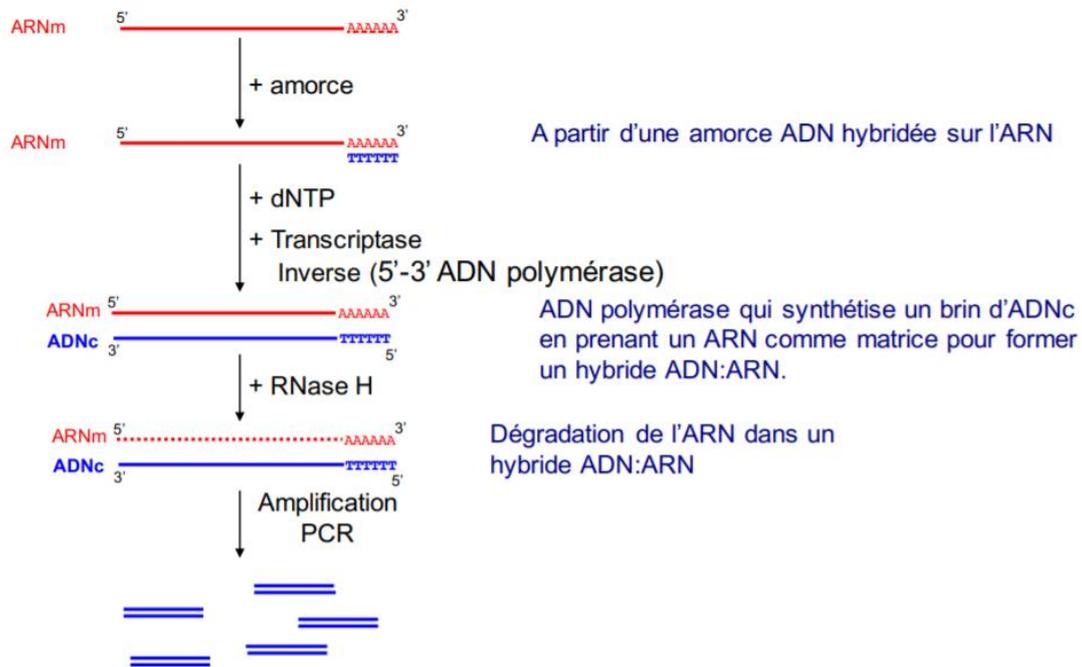
**La transcription inverse synthétise un brin complémentaire nommé ADNc. +++**

Pour cela on utilise une enzyme VIRALE : **la transcriptase inverse +++**. Elle copie un fragment d'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 à de l'ARN.

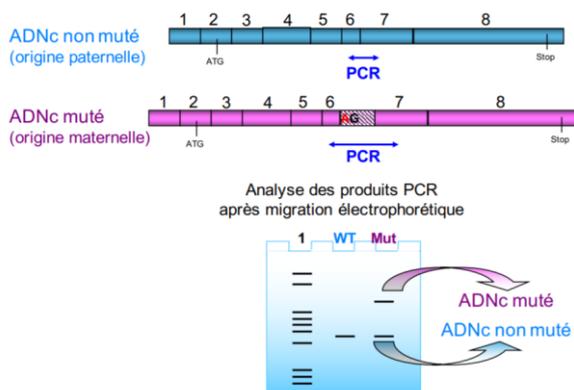
**L'ADNc est une copie ADN d'une séquence ARN. ++++**

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

On obtient un brin d'ADN complémentaire à la séquence ARNm étudiée. Cet ADN peut être amplifié par PCR.



Ainsi nous pourrons enfin rechercher les variants d'épissage.



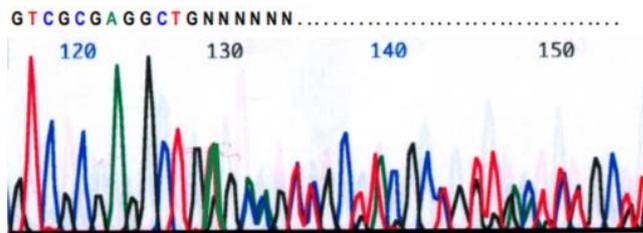
Ici on découvre un site cryptique d'épissage dans l'intron 6 chez l'allèle maternel.

Pour l'allèle paternel on obtient un produit PCR à la taille attendue.

Cependant, on a 2 produits PCR pour la mère : l'un identique au père et l'autre plus grand qui correspond à l'allèle muté qui a eu un épissage anormal.

Maintenant il est possible de séquencer l'ADNc pour essayer d'identifier ce variant.

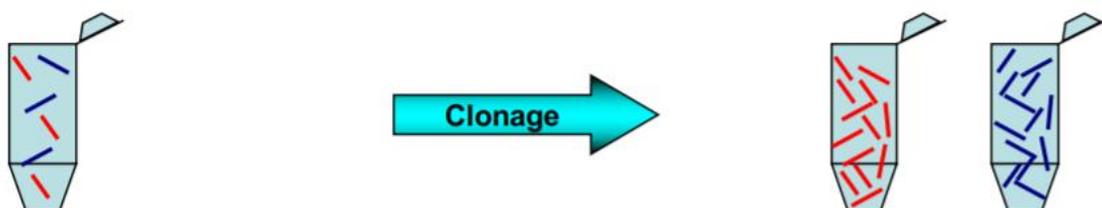
Cependant nos deux produit PCR étant mélangés on se retrouve avec un électrophorégramme illisible puisque les deux produits PCR ont des tailles différentes.



Le seul moyen de résoudre ce problème est de séparer ceux deux produits pour les séquencer séparément. Pour cela on utilisera le clonage moléculaire.

## IV/Le clonage moléculaire

Le principe du clonage moléculaire est d'obtenir un grand nombre de copies identiques absolument pures d'une séquence ADN. +++ En séparant les produits PCR et en les amplifiant séparément.



Le principe est divisé en 4 étapes :

**1** Introduction d'un fragment d'ADN (=insert) dans un vecteur.

Un vecteur est un ADN circulaire double brin de taille réduite qui peut se répliquer de manière indépendante.

Il existe 2 types de vecteurs :

-vecteurs de clonage qui isolent un fragment d'ADN pour l'amplifier. On les trouve dans les **procaryotes**.

-vecteurs d'expression qu'on trouve dans une cellule hôte **eucaryote**.

Il existe différents vecteurs. Nous nous intéresser au plasmide.

Les plasmides contiennent :

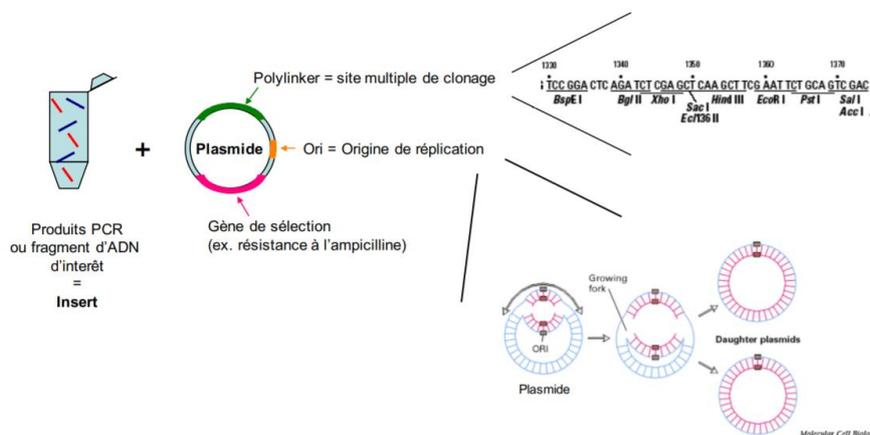
-Un polylinker = site multiple de clonage

→ On y trouve des séquences reconnues par des enzymes de restriction permettant d'ouvrir le plasmide pour introduire l'insert.

-Une origine de réplication pour la réplication indépendante

-Un gène de sélection permettant à la cellule qui a ingéré le plasmide de résister à un antibiotique.

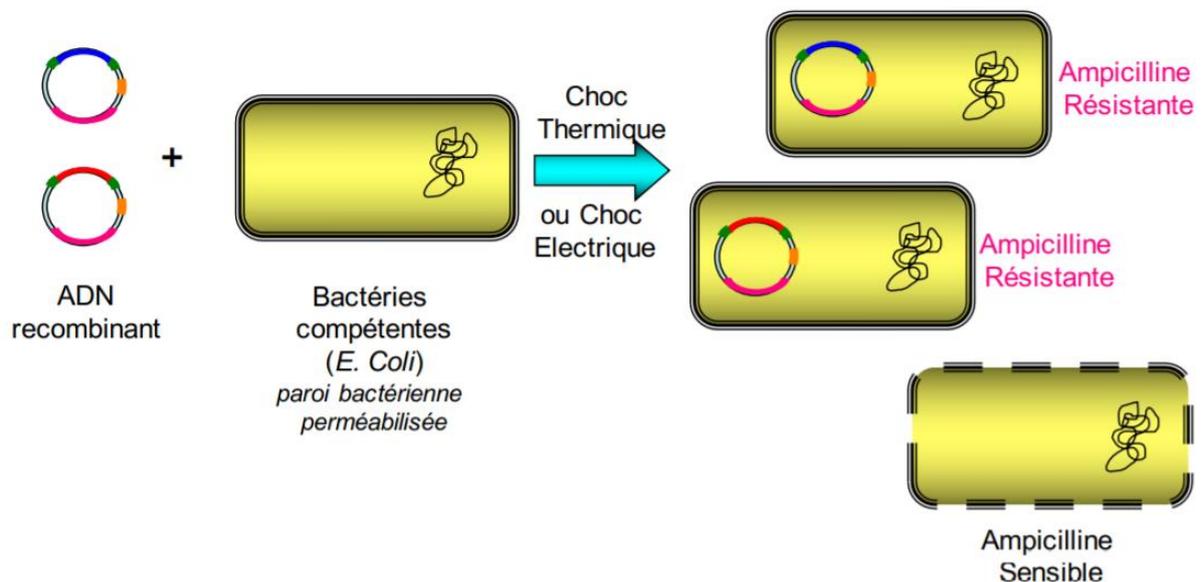
**PLASMIDE + INSERT DONNE L'ADN RECOMBINANT. +++**



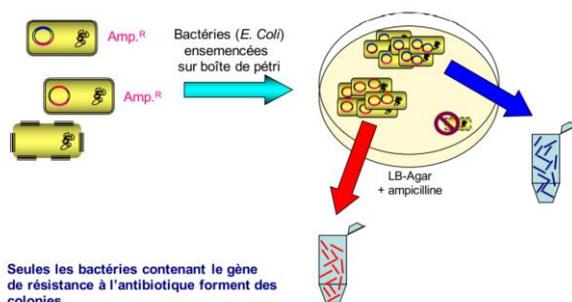
## ② Introduction de l'ADN recombinant dans un procaryote : TRANSFORMATION BACTERIENNE et amplification

On mélange l'ADN recombinant avec les bactéries et on applique un choc thermique ou électrique pour faire rentrer l'ADN dedans. On introduit **UN SEUL ADN recombinant par bactérie.**

Puis on sélectionne les bactéries ayant ingéré l'ADN recombinant en ajoutant un antibiotique. Ainsi seules les bactéries possédant le gène de sélection appartenant au plasmide pourront se développer.

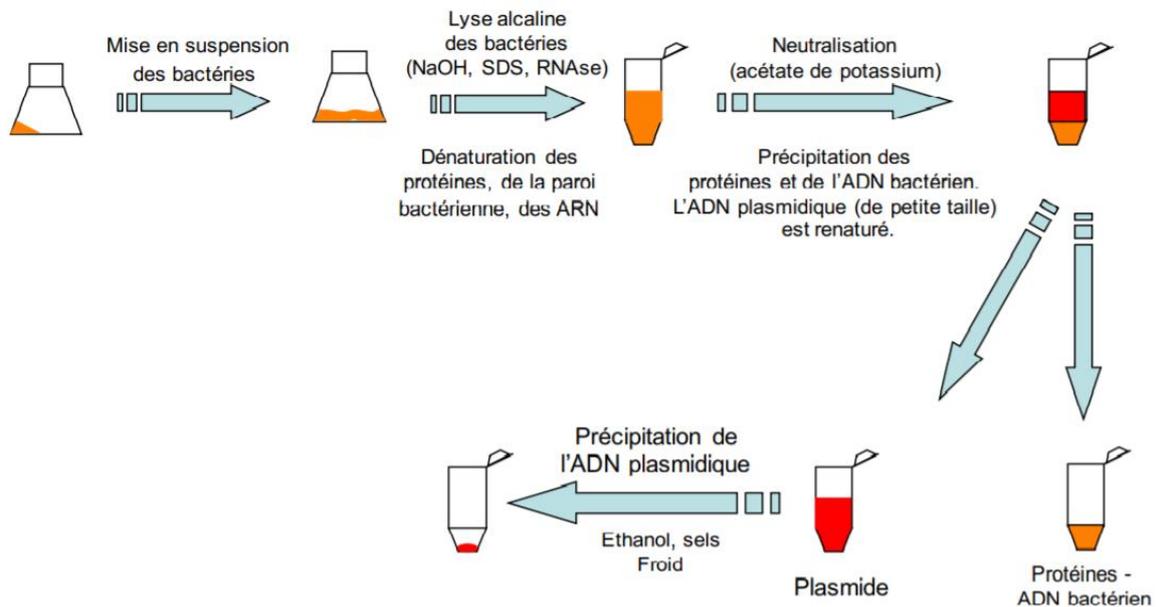


Les bactéries développées formeront des colonies.



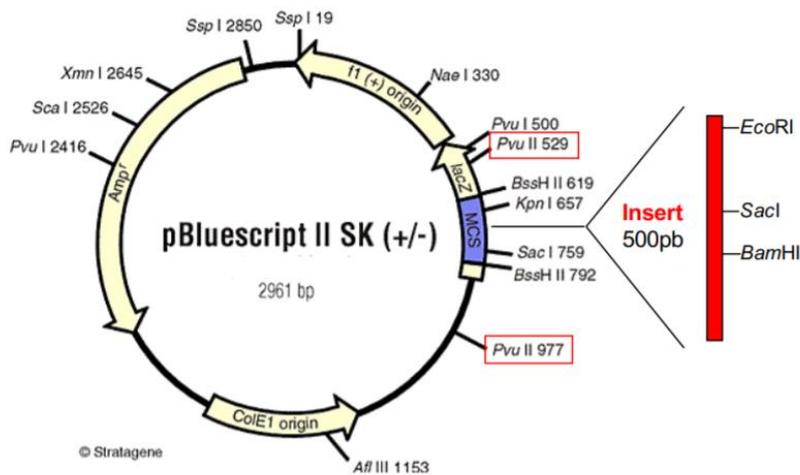
### 3 Extraction de l'ADN recombinant

On extrait l'ADN recombinant avec la méthode suivante.



Une fois l'ADN recombinant purifié on vérifie s'il correspond à celui qui nous intéresse grâce à une carte de restriction.

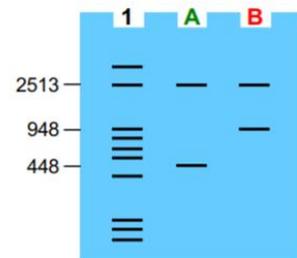
Les ADN recombinants purifiés sont analysés par digestion enzymatique: réalisation de sa carte de restriction.



#### 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 Séquençage de l'insert

On effectue un séquençage Sanger pour déterminer le variant d'épissage.

