

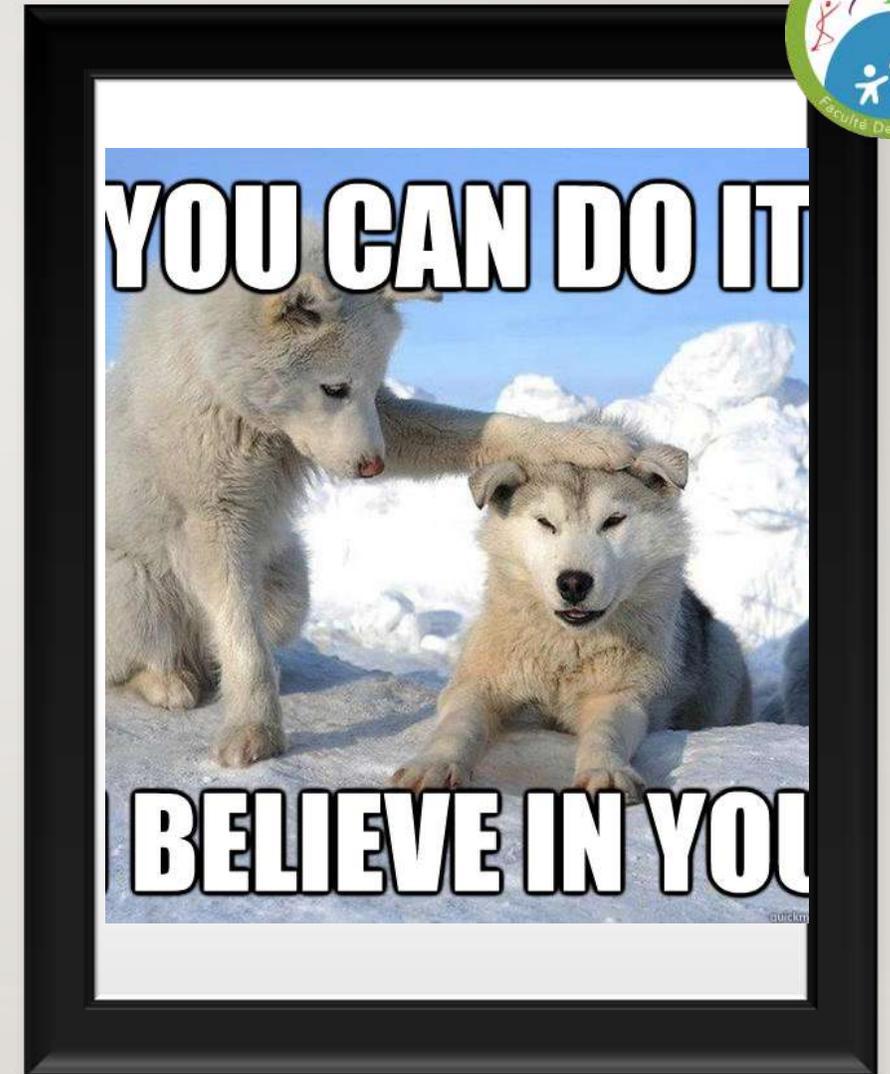
LE TUTORAT NIÇOIS PRÉSENTE :

LE RETOUR DE LA GÉNÉTIQUE

Avec les incroyables : Tagada, Quiche Lawrence et Stabilo'drey

Au programme :

- Séquençage
- Analyse d'un gène en PCR + séquençage
- Clonage moléculaire
- Séquençage Haut Débit (dans une autre diapo 😊)



PLAN



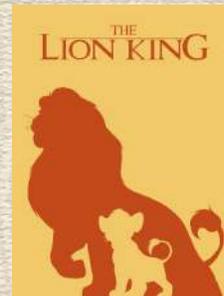
I – Séquençage

- 1) Principes
- 2) Ancienne Méthode : Méthode Sanger
- 3) Méthode automatisée



II – Recherche de mutation dans un gène entier : ex du Syndrome de Wolfram

- 1) Cas « classique »
- 2) Cas d'une mutation non détecté chez 1 des 2 parents



III – Clonage moléculaire

- 1) ADN recombinant
- 2) Introduction du vecteur + Sélection des clones
- 3) Résultats
- 4) Cartes de restrictions



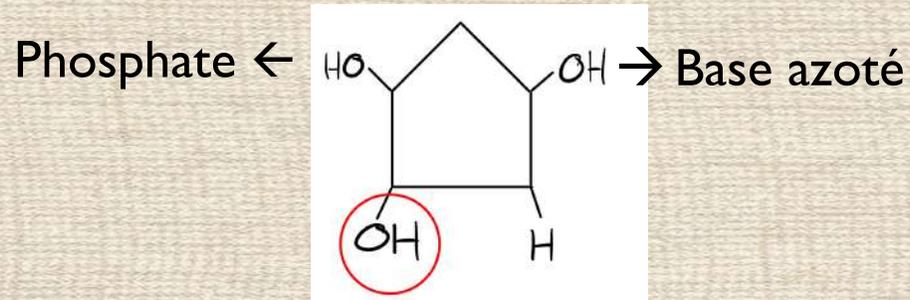
I – Séquençage



I – Séquençage : Principes

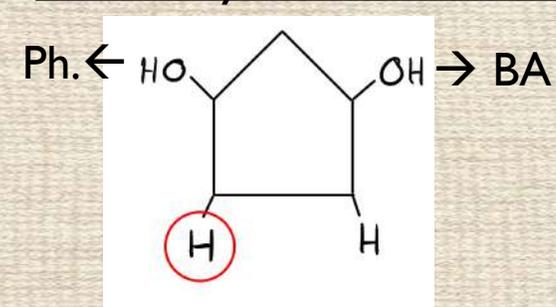
- C'est quoi le séquençage ?? → Déterminer la succession de nucléotides qui compose un fragment d'ADN ++
- Étapes similaires à la PCR : Dénaturation / Hybridation / Elongation
- **!** Présence de **DDNTPs** = **didésoxyribo-nucléotides** **!**

Désoxyribo-nucléotide



Liaison possible avec un autre DNTP

Didésoxyribo-nucléotide



Pas de nouvelle liaison possible
→ Impose la fin de la synthèse

- Répétition de ce processus sur de nombreux brins → processus aléatoire : tantôt DNTPs et des fois DDNTPs
- A la fin : très nombreux fragments de tailles différentes

I – Séquençage : Méthode automatisée

++ I même réaction dans I seul tube MAIS les DDNTPs sont fluorescents ++

- Chaque types de DDNTPs à une couleur différentes :
T → Rouge / A → Vert / G → Noir / C → Bleu
- Lecture de la séquence effectué dans une machine
 - Un champs électrophorétique → migration en fonction de la taille → **POSITION**
Caméra → Enregistre la couleur émise → **NOM**

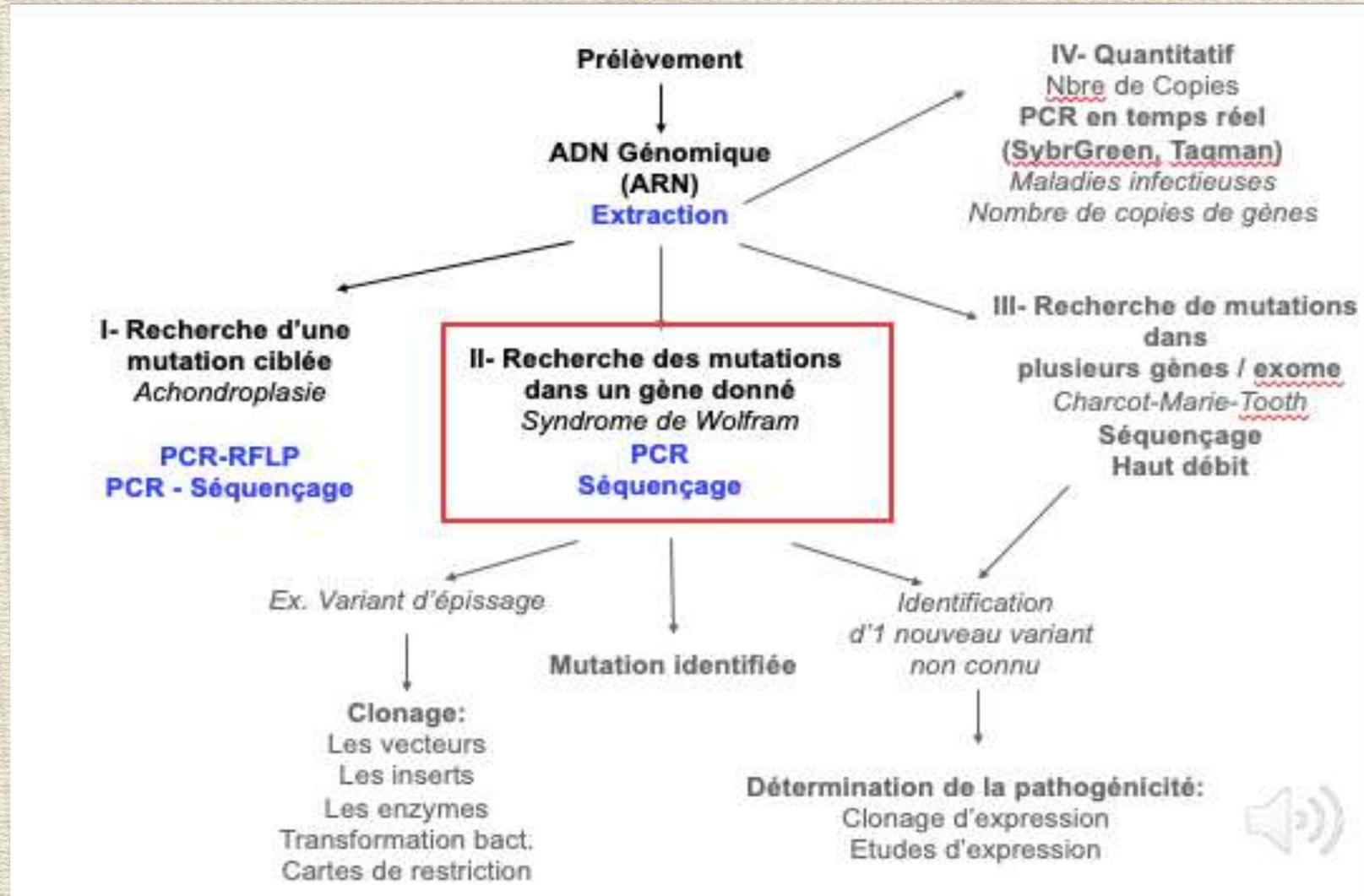


Méthode
Sanger

Méthode
automatisée

II – Recherche de mutation dans un gène entier : ex du Syndrome de Wolfram

II – Mutation sur un gène entier : Syndrome de Wolfram



II – Mutation sur un gène entier : Cas classique

- Syndrome de Wolfram : Maladie autosomique **récessive**
- Gène WFS1 → 8 exons

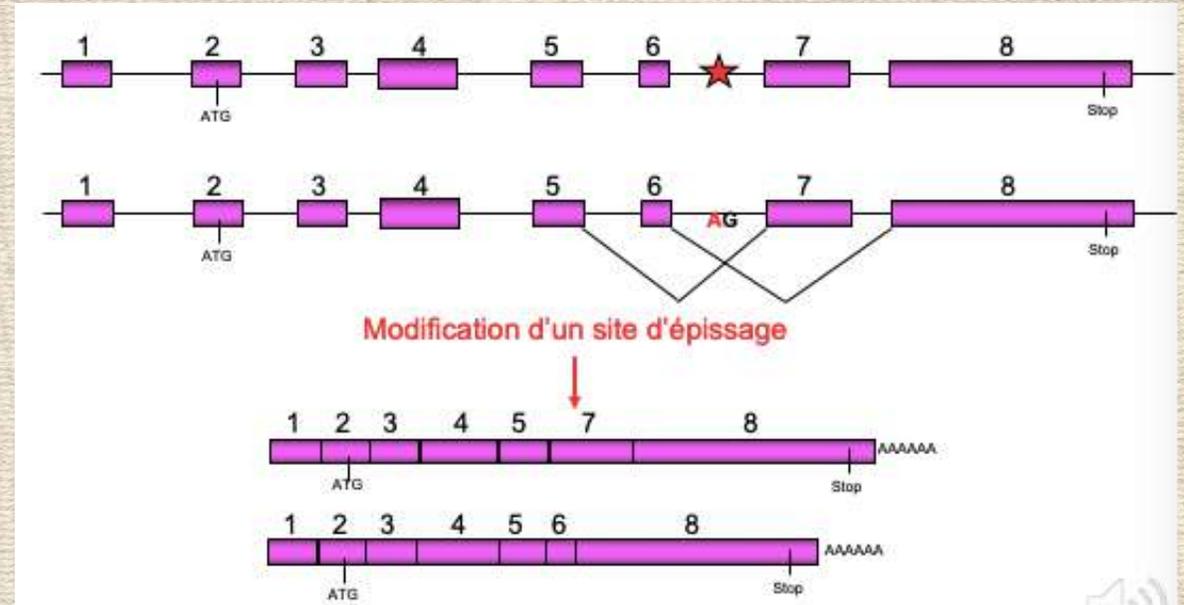
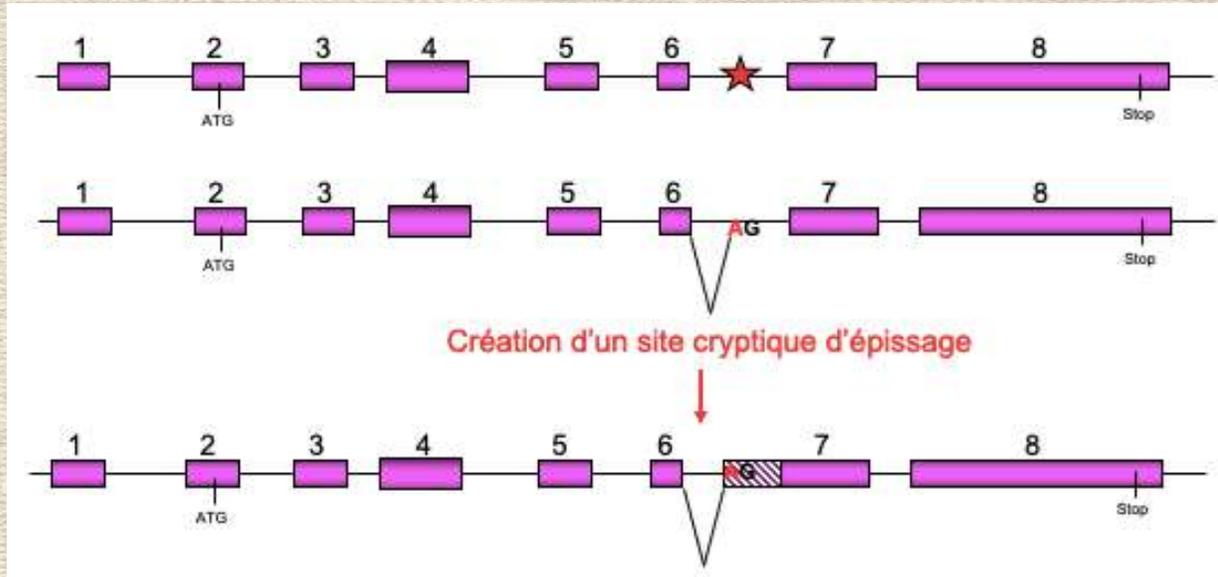
Petite aparté importante :
La traduction commence au codon **START** et s'arrete au codon **STOP**
ET NON PAS au début et à la fin de l'ARNm

- On réalise des PCR seulement sur les exons (ici 7 PCR de l'exon 2 à 8 car ATG est sur le codon 2)
- Ici on est dans un cas classique
 - Les enfants sont malade → on recherche la mutation chez les parents
 - Chaque parents possède une mutation du gène à l'état hétérozygote (=porteur sains)
 - Les enfants ont hérités des gènes mutés et sont donc malade

II – Mutation sur un gène entier : Cas un peu plus relou

- 2e cas → Les enfants sont malade MAIS la mutation n'est pas détecté chez l des 2 parents : Impossible cas maladie autosomique récessive
- Mais comment c'est possible ???
 - On a fait une PCR uniquement sur les exons car normalement les introns ne sont pas présents dans l'ARNm mature et donc n'ont pas d'impact sur la protéine
- MAIS il existe des variant d'épissage : dans certains cas une mutation sur un intron peut donner :
 - Un site cryptique d'épissage
 - Une modification des sites accepteur et donneur

Ce qu'il faut retenir : Une mutation sur un intron peut modifier la maturation de l'ARNm et donc modifier la protéine



II – Mutation sur un gène entier : Cas un peu plus relou

Ok c'est bien gentil mais maintenant on fait comment ???

- Il faut travailler directement sur l'**ARNm**
- Petit soucis : on ne peut réaliser une PCR que sur une séquence d'ADN
- Il faut créer une séquence d'ADN à partir d'ARN → ADN Complémentaire ou ADNc qui est la copie conforme de l'ARNm
- Utilisation d'une enzyme : **Transcriptase Inverse**
 - ↳ Présente chez les rétrovirus
- Résultats après réalisation d'une PCR puis d'une électrophorèse : on observe 2 tailles différentes d'ADN
 - ↳ 1 brin court = gène sans la mutation
 - ↳ 1 brin plus long = permet de déduire qu'il y a création d'un site cryptique d'épissage

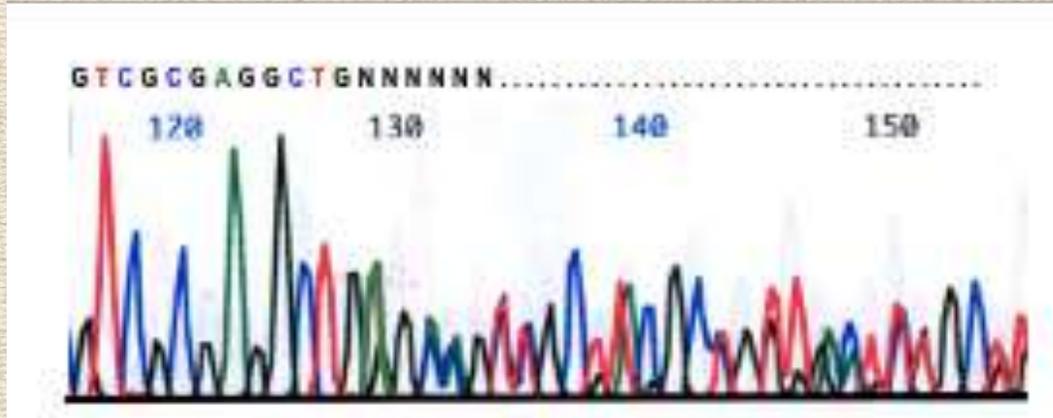
→ **MUTATION**



III – Clonage moléculaire

III – Clonage moléculaire

- Confirmation d'une mutation → Mais on se sait pas où ni comment elle est
- On séquence nos produit PCR



Toi à l'exam blanc
quand t'essaye de
te rappeler de tes
cours

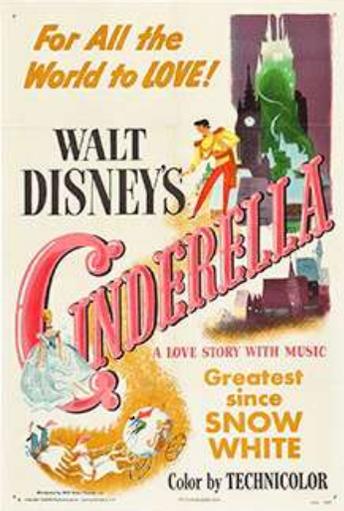
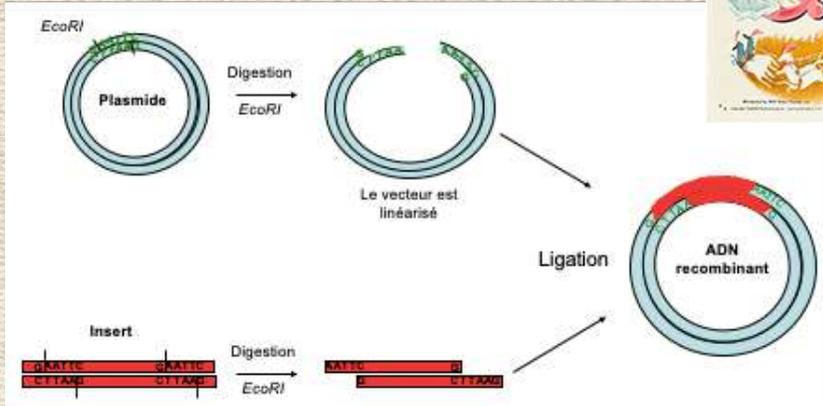
- Superposition des 2 séquences → ILLISIBLE
- Il faut séparer les 2 produits PCR pour lire correctement → CLONAGE

III – Clonage moléculaire : ADN Recombinant

- Comment ça marche : Insérer notre séquence d'ADN dans une bactérie
- Pour cela → il faut intégrer notre ADN dans un autre ADN circulaire double brin

++ Petit point terminologie ++
Notre séquence d'ADN = Insert
ADN circulaire = Vecteur
Insert + Vecteur = ADN recombinant

- Le vecteur doit avoir 3 caractéristiques +++ :
 - Une origine de réplication (Ori)
 - Un gène de sélection
 - Un polylinker



III – Clonage moléculaire : Introduction du vecteur + Sélection des clones

→ ADN recombinant prêt

- Pour faire rentrer ADN recombinant dans la bactérie → Choc thermique ou choc électrique
- On met les bactéries dans un milieu nutritionnel ET **en présence d'un antibiotique**

• FORMATION DE COLONIES

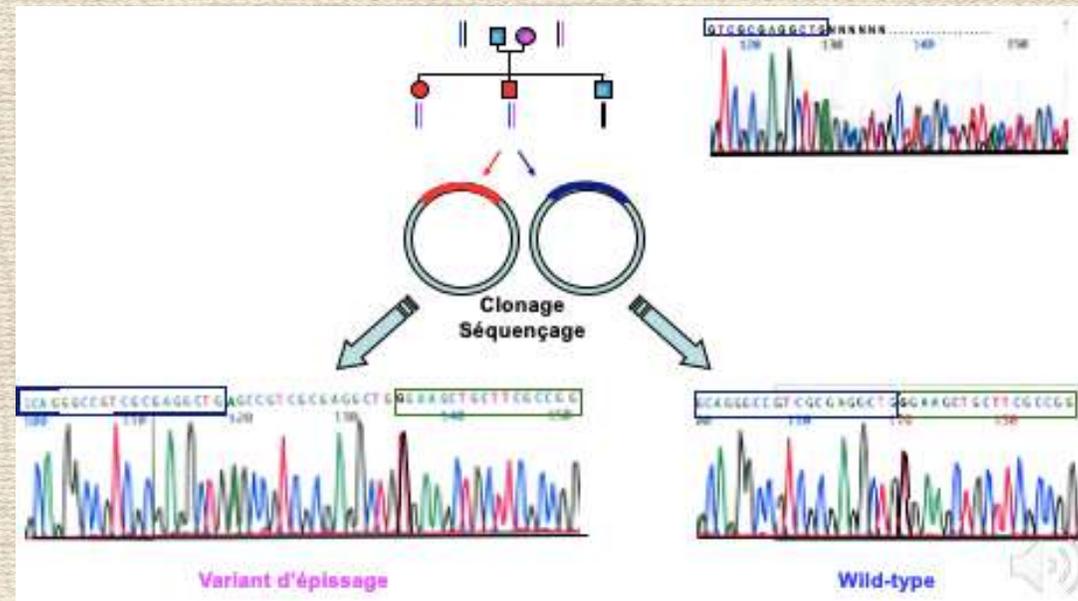
- ↳ 1 colonie = 1 bactérie à l'origine
- ↳ donc 1 colonie = 1 clone unique
- **sélection bactérienne**



Quand tu te concentre pour écouter mais que t'as décroché à la 4^e diapo

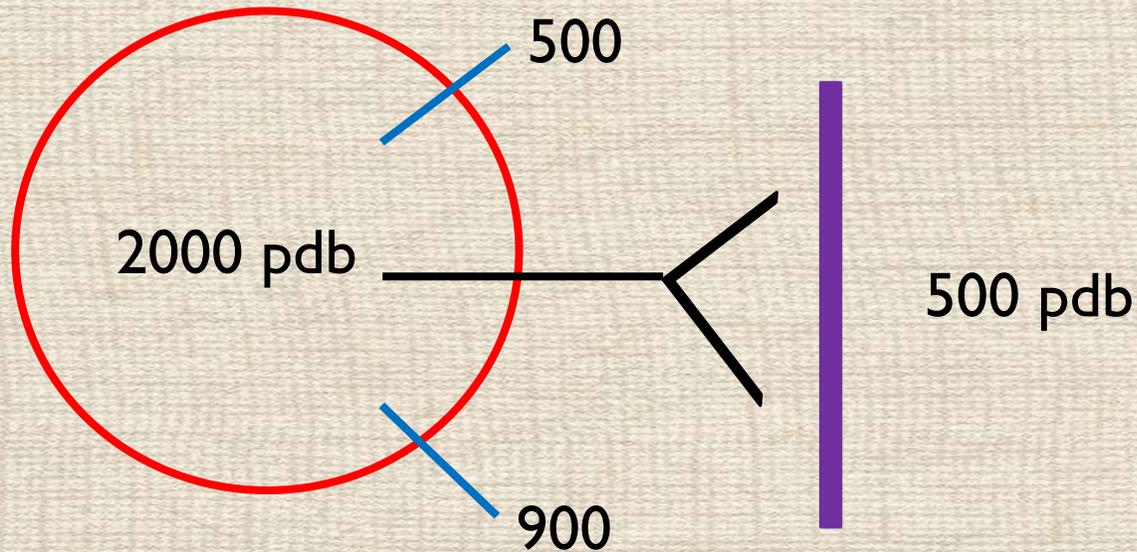
III – Clonage moléculaire : Résultats

- Récupération de notre ADN recombinant
- 2 séquençages → 2 lectures indépendantes des 2 différentes séquences



→ **Clonage indispensable pour la détermination du variant**

III – Clonage moléculaire : Cartes de restrictions

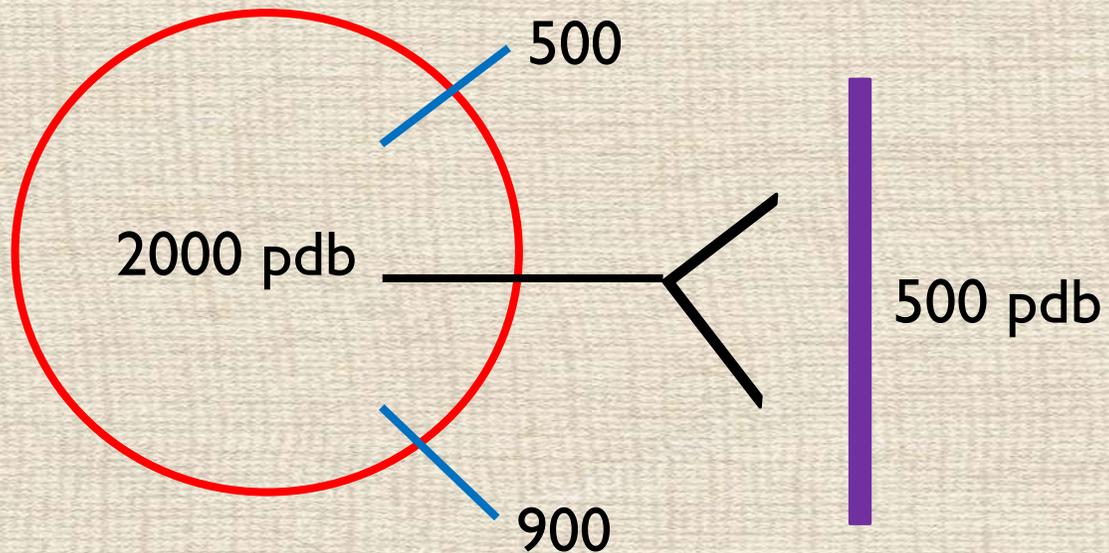


QCM type :

Donner la taille de chaque morceau après digestion enzymatique avec ET sans insert ?

-  Insert
-  Vecteur
-  Enzymes de restriction

III – Clonage moléculaire : Cartes de restrictions



Sans Insert :

$$900 - 500 = 400$$

$$2000 - 400 = 1600$$

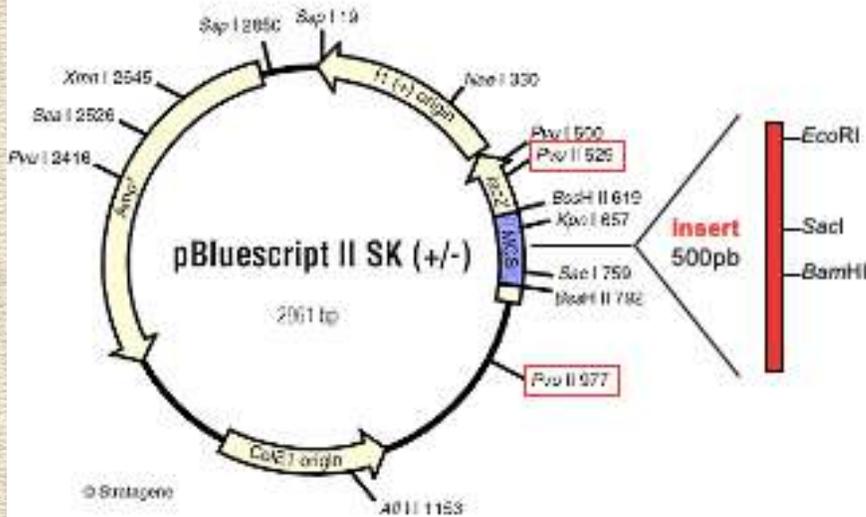
Avec Insert :

$$900 - 500 + \mathbf{500} = 900$$

$$2500 - 900 = 1600$$

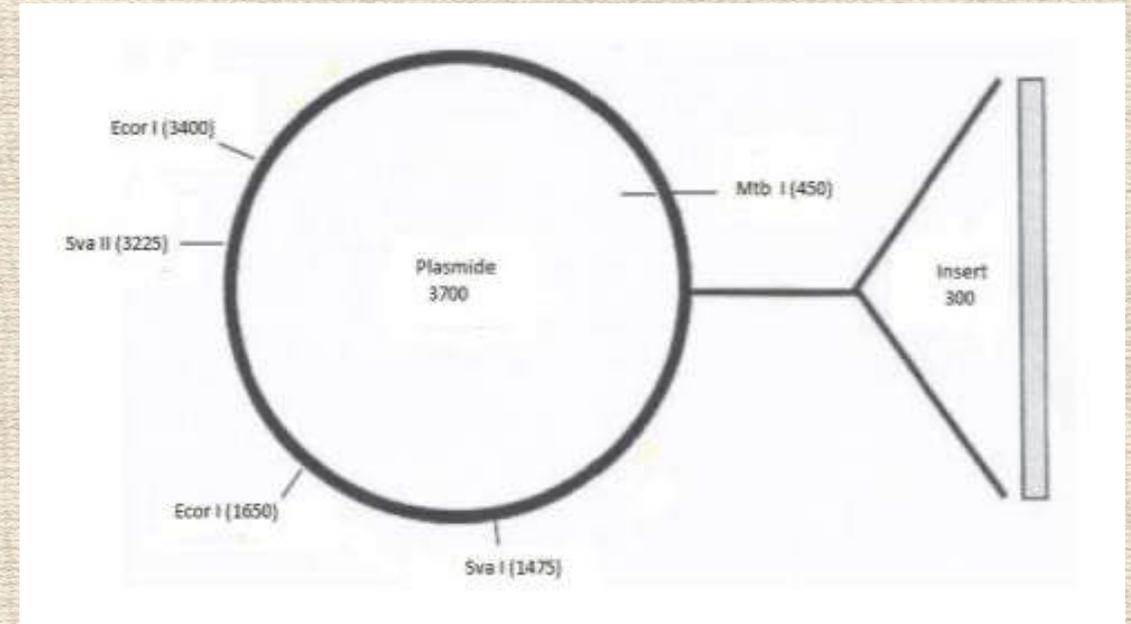
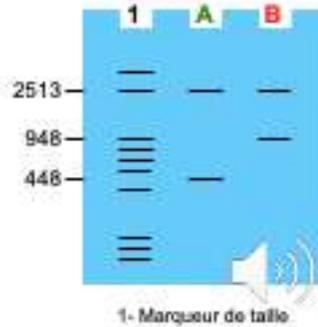
III – Clonage moléculaire : Cartes de restrictions

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





Et c'est parti pour les QCM !!!!

QCM I : A propos du séquençage, indiquez la ou les bonne(s) réponse(s) :

- A) Il est nécessaire d'avoir des DDNTPs lors de la réaction, ils ont un groupement OH supplémentaire par rapport aux DNTPs
- B) Dans l'ancienne méthode, sur une électrophorèse, le sens de lecture se fait de bas en haut
- C) Il n'est pas obligé de réaliser une PCR avant un séquençage
- D) Dans la séquence automatisée, la caméra permet de connaître la position du nucléotide
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Réponses



QCM I : B

A) Faux : Il y a un groupement OH en moins

B) Vrai

C) Faux : Si !! Obliger pour avoir un grand nombre de fragment d'ADN

D) Faux : La caméra permet de connaître le nom du nucléotide.

C'est le champs électrophorétique qui permet de connaître la position

E) Faux

QCM 2 : Lors d'une recherche de mutation dans un gène donné, indiquez la ou les bonne(s) réponse(s) :

- A) On peut effectuer une PCR-RFLP
- B) Le syndrome de Wolfram est une maladie autosomique récessive
- C) Une modification d'un site accepteur ou donneur peut entraîner la perte d'un exon entier
- D) On réalise une PCR sur le brin d'ARNm
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Réponses

QCM 2 : BC

- A) Faux : On fait une PCR-RFLP lorsqu'on a une mutation ciblée. Ici on fait une PCR + séquençage
- B) Vrai
- C) Vrai
- D) Faux : Sur l'ADNc ! Pas de PCR sur de l'ARN
- E) Faux

QCM 3 : A propos du clonage moléculaire, indiquez la ou les bonne(s) réponse(s) :

- A) Le vecteur représente notre ADN circulaire double brin
- B) Le polylinker est le site qui permet au vecteur d'avoir une réplication autonome et indépendante de l'ADN de la bactérie hôte
- C) Les bactéries sont étalés sur une boîte de pétris contenant uniquement un antibiotique spécifique
- D) L'antibiotique permet de distinguer les bactéries qui ont ingérer uniquement le vecteur de celles qui ont ingérer l'ADN recombinant
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Réponses

QCM 3 :A

A) Vrai

B) Faux : le polylinker c'est le site où vient s'insérer l'insert

C) Faux : pas uniquement, ils sont aussi dans un milieu nutritif pour grandir (je sais c'est batard mais c'est pour que vous fassiez attention au « uniquement »)

D) Faux : ça permet de distinguer les bactéries qui ont ingéré le vecteur de celles qui n'ont rien ingéré du tout

E) Faux



C'est fini pour cette partie !!!
Maintenant faites place à la NGS
(promis après c'est fini)