



Génétique

Séquençage + PCR
+ clonage moléculaire

"Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light." — Albus Dumbledore

PLAN

I) Séquençage ADN

II) Clonage moléculaire

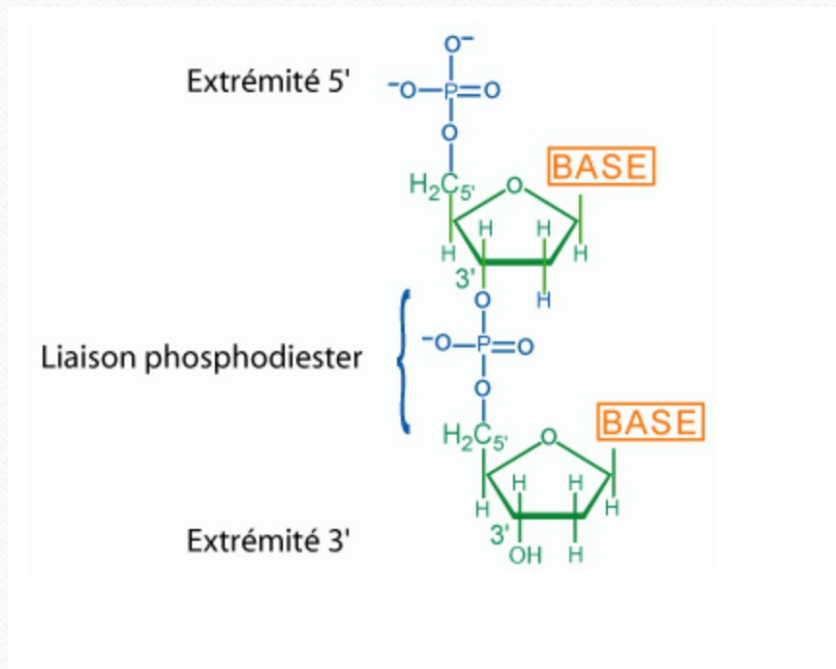
1. Le séquençage

Technique pour déterminer la succession des nucléotides qui composent le fragment d'ADN qu'on analyse



À partir d'une amorce !

L'ADN *rappel*



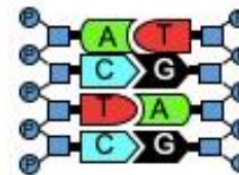
Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont composés de nucléotides

Formés de : un groupement phosphate, un sucre (pentose) et une base azotée (A, C, G, T)

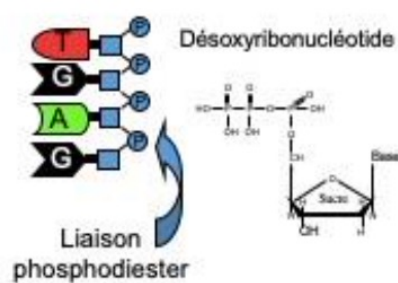
Liaisons phosphodiesters



La double hélice d'ADN



2 Brins



Les principes du séquençage Sanger

- Parmi les différentes méthodes de séquençage, le séquençage Sanger est la méthode de référence et la plus ancienne (1977)
- Sanger repose sur les **di-désoxynucléotides**
- 4 tubes différents sont utilisés

Contenu d'un tube:

L'ADN à séquencer

Taq polymérase : enzyme qui synthétise un brin complémentaire à partir d'une amorce dans le sens 5' – 3'

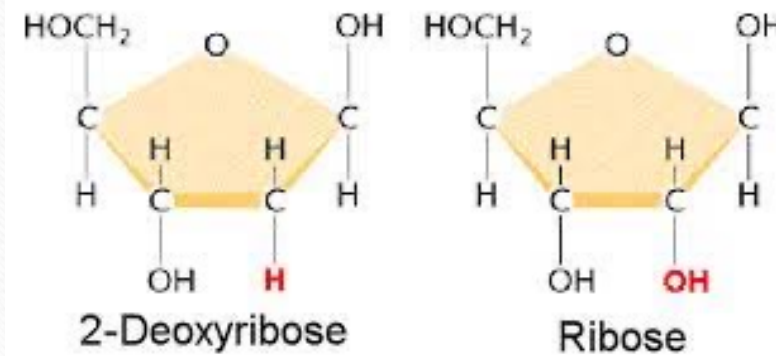
Une amorce

Les nucléotides avec mélange dNTPs et dDNTPs – 1 seul type de dDNTP par tube

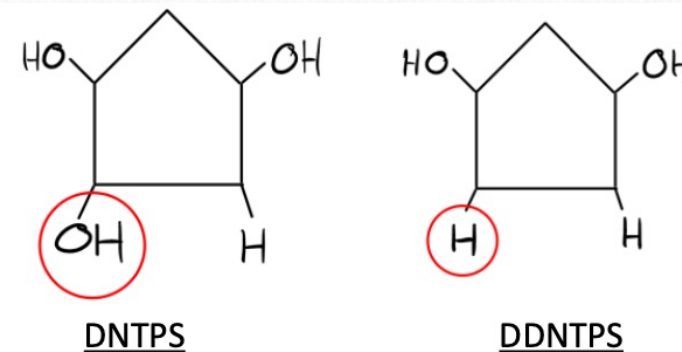
Les tampons

Différence entre dNTPs et ddNTPs

Le pentose de l'ADN est du 2' –
désoxyribose



Alors que le di-désoxyribose présente
seulement un H en 3'



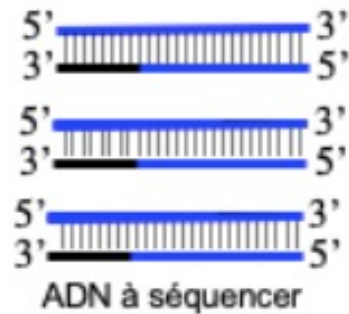
Étapes

Dénaturation à 95° C
du double brin d'ADN

Hybridation à
55°C – 1 seule
amorce pour le
brin codant

Élongation à
60° C grâce à
la Taq
Polymérase

Les étapes:



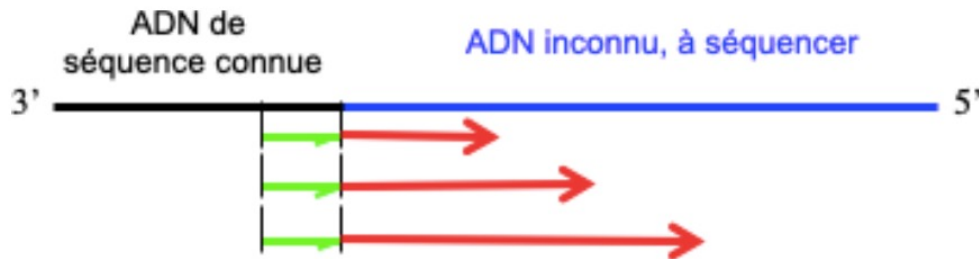
Dénaturation
95°C

Hybridation
55°C

Elongation
60°C



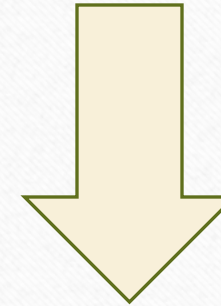
Cycles successifs



Utilisation aléatoire
de dNTPs ou
ddNTPs par la Taq
polymérase

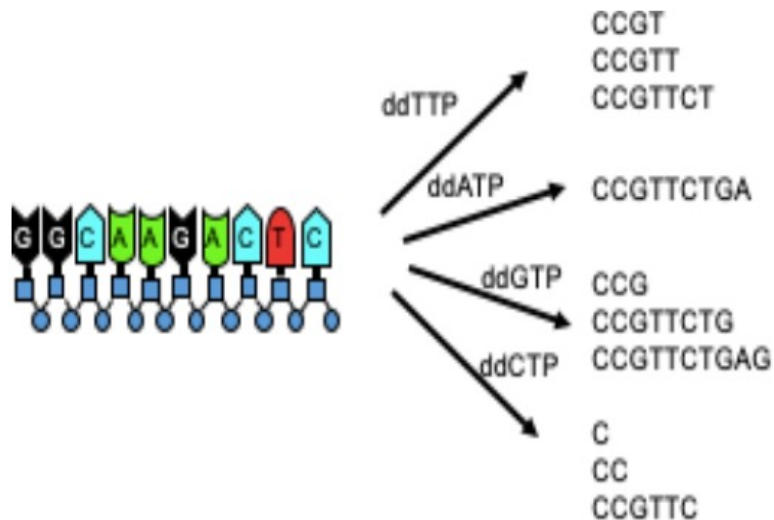
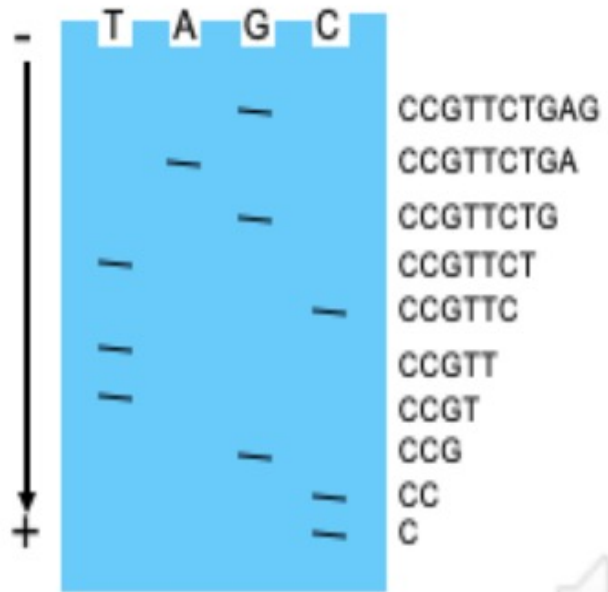
Si dNTP :
élongation continue

Si ddNTP :
élongation s'arrête



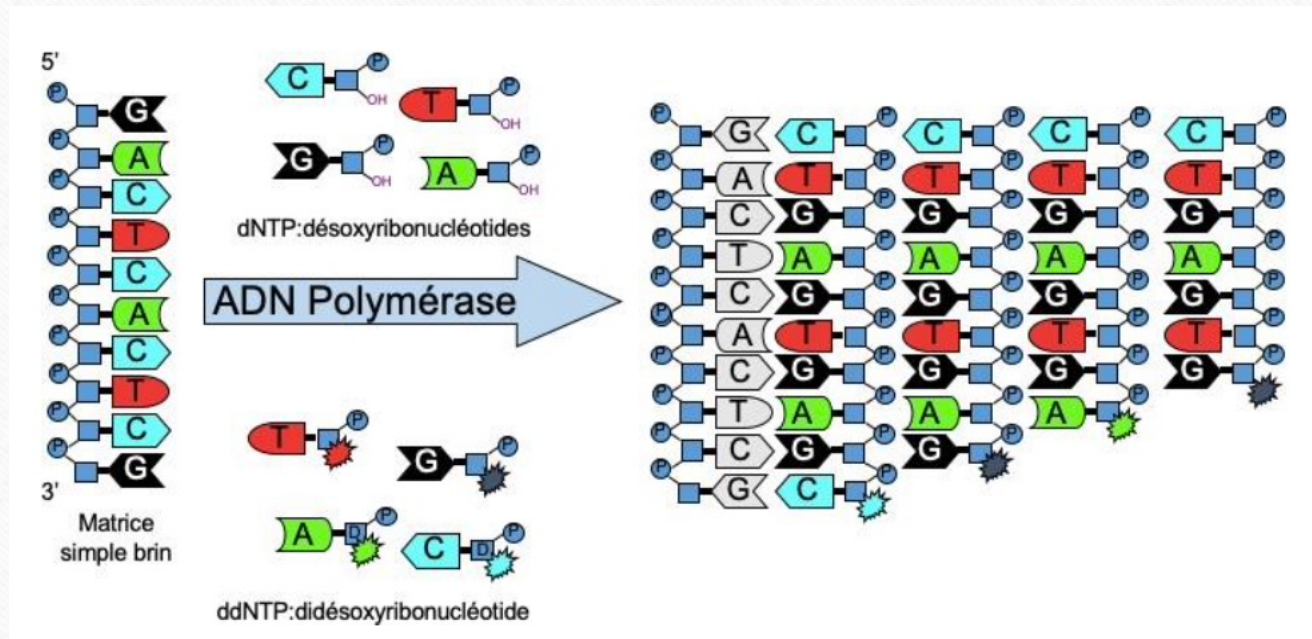
Après plusieurs cycles

Résultat : nombreux fragments d'ADN **complémentaire** de taille
différente



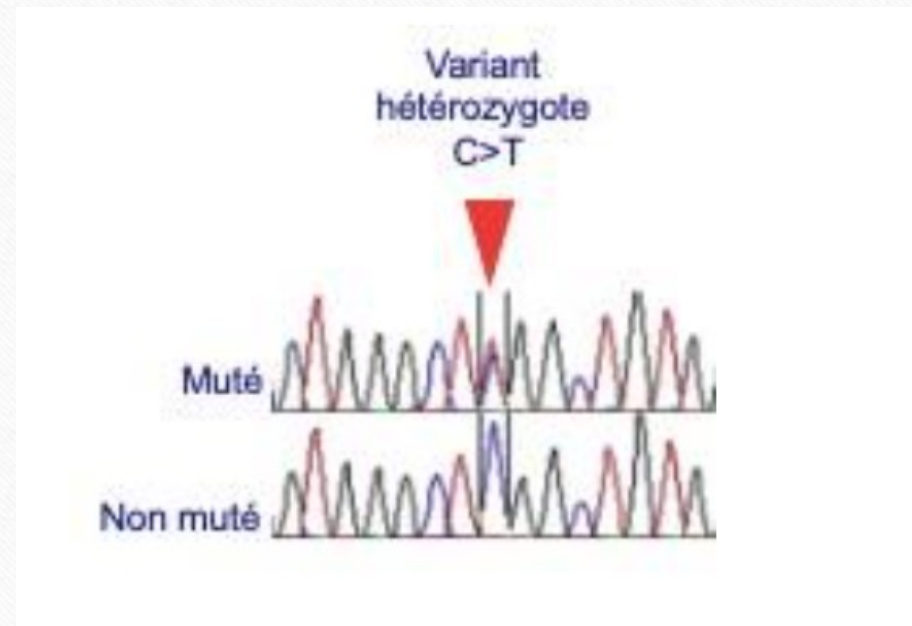
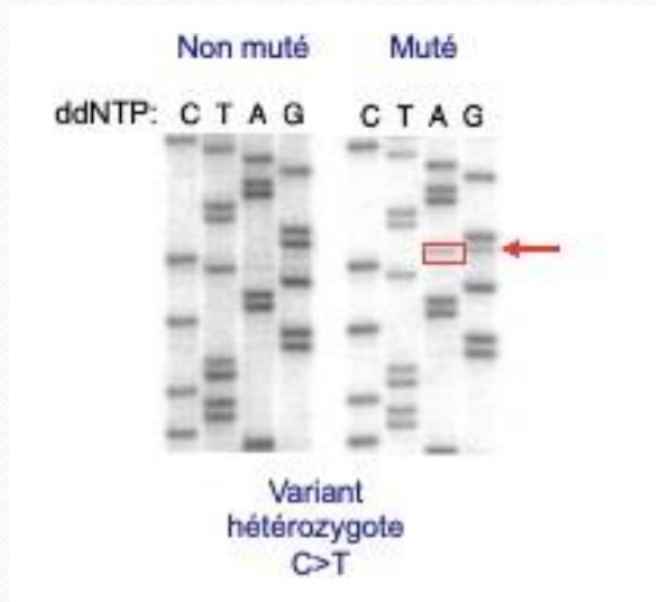
- Les fragments obtenus sont séparés par **electrophorèse sur gel d'agarose** - migration selon la taille
- 1ere méthode : 4 tubes avec un seul type de DDNTP par tube et tous les DNTPs
- À la fin on lit la séquence obtenue et on donne la complémentaire pour retrouver la séquence d'origine.
- Aujourd'hui un seul tube – utilisation **DDNTPs fluorescents** – la position est tjrs déterminée par la taille du fragment et la migration electrophorétique.
- **Couleur** → type de DDNTP / nucléotide

Méthode automatisée



Exemple de résultats

- Superposition de



Analyse d'un gène par PCR et séquençage Sanger

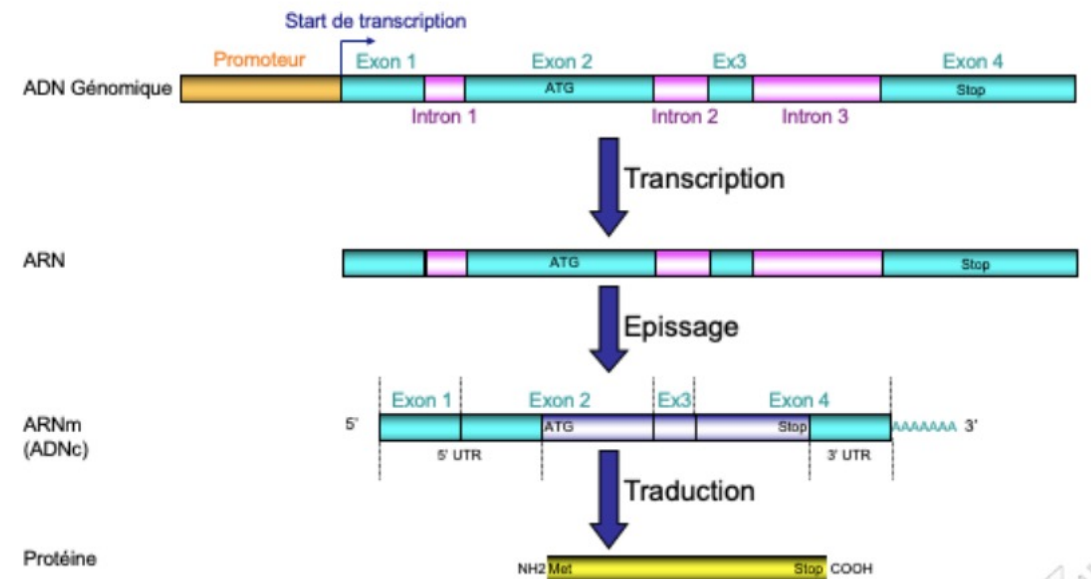
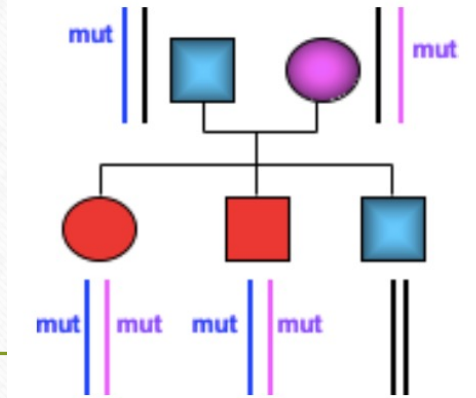
I) Etude de cas : le syndrome de Wolfram

Screen de la totalité d'un gène

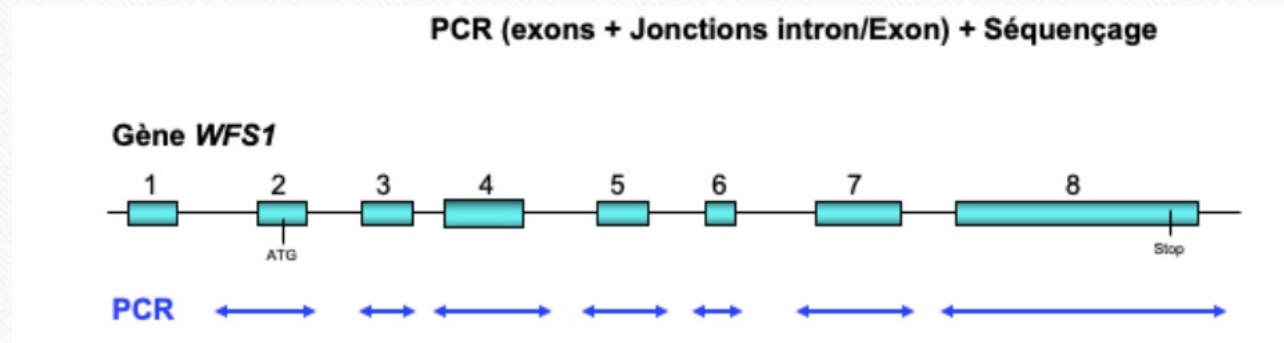
Maladie à transmission autosomique récessive
gène WFS1

associe d'un point de vue clinique

- Diabète
 - Surdité
 - Atrophie optique
 - Troubles neurologiques
- Le gène WFS1 : 8 exons
• l'ATG se trouve dans le 2e exon du gène
→ le 1er exon est non codant

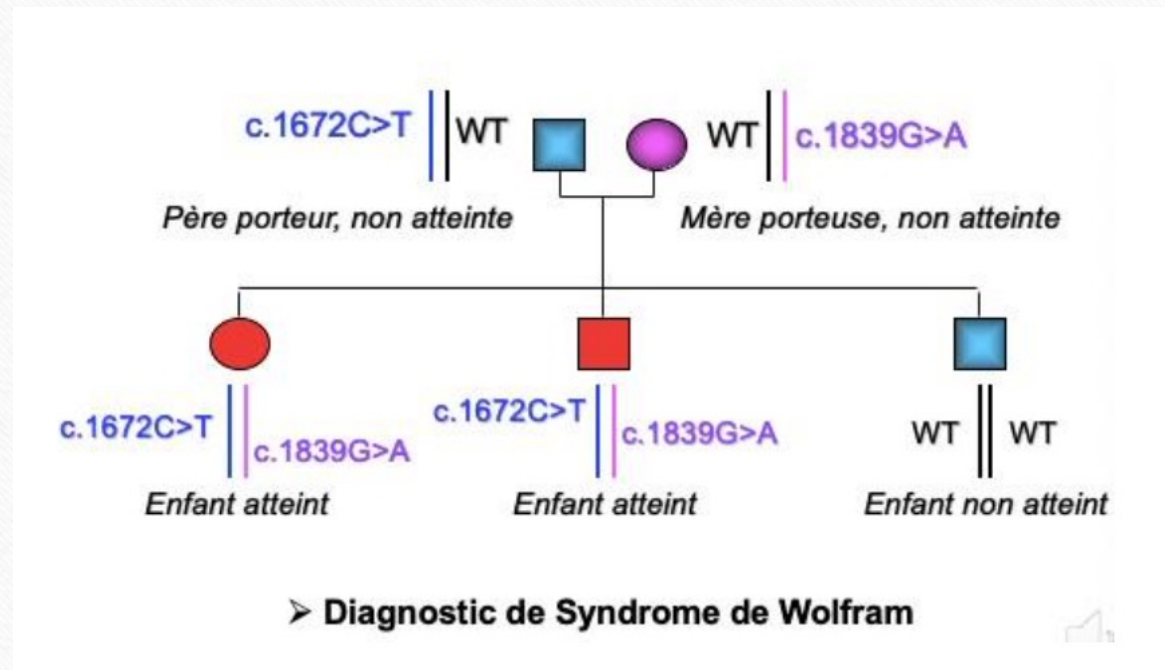


A. Recherche de mutations dans un gène

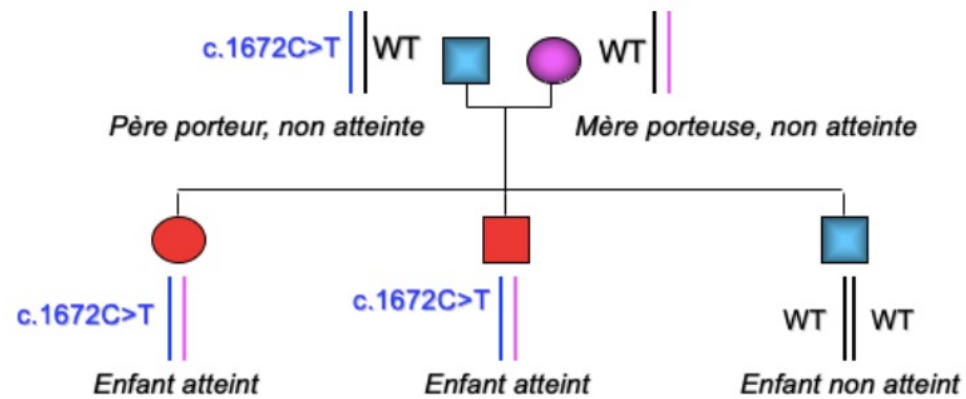


Interet pour les régions codantes - les exons – qu'on amplifie
→ 7 PCR des exons 2/3/4/5/6/7/8

Famille A : Cas simple



Famille B : cas plus compliqué



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

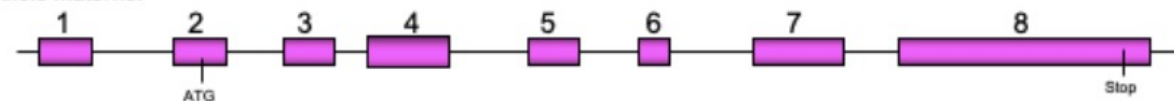
Hétérozygotes composites

Hypothèses

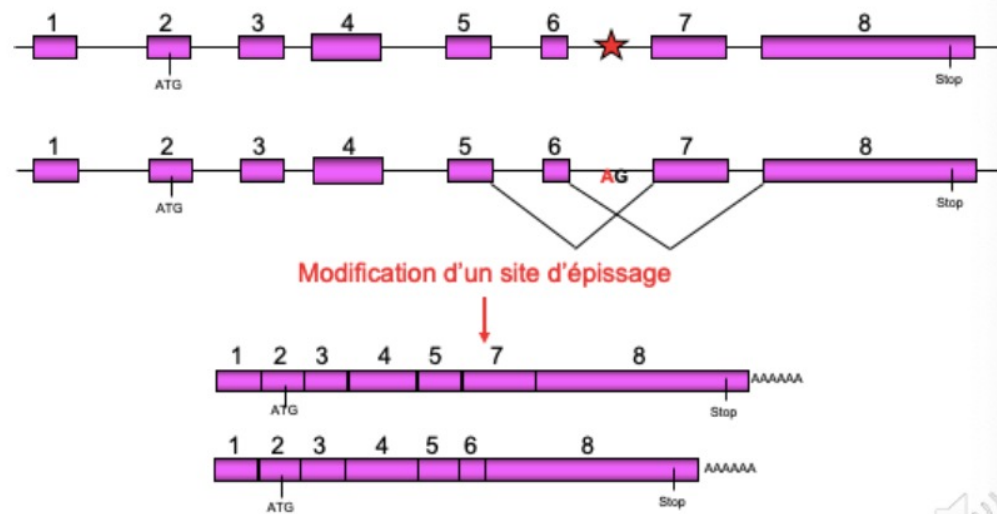
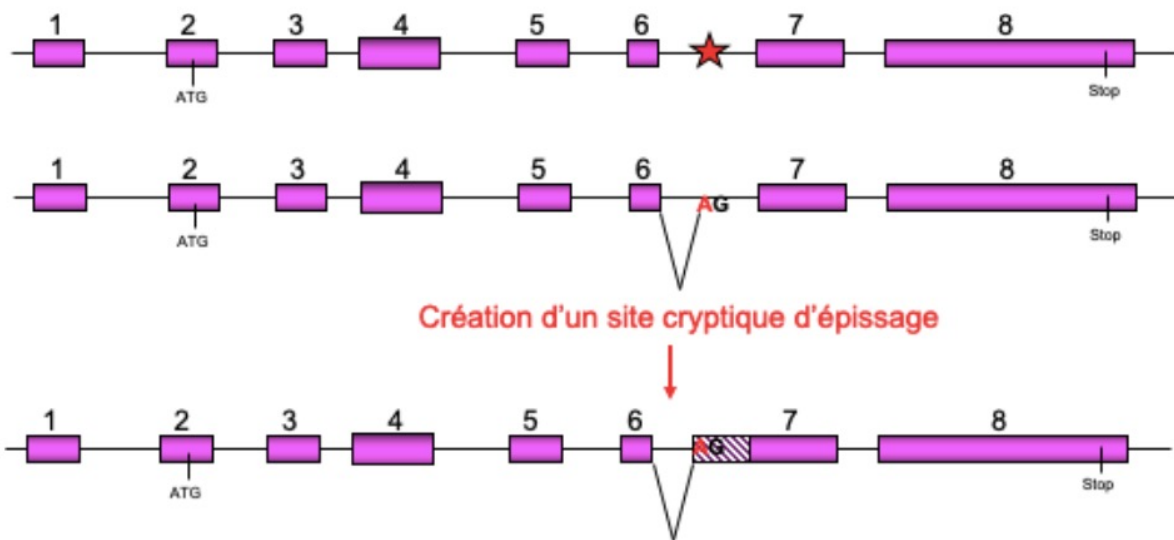
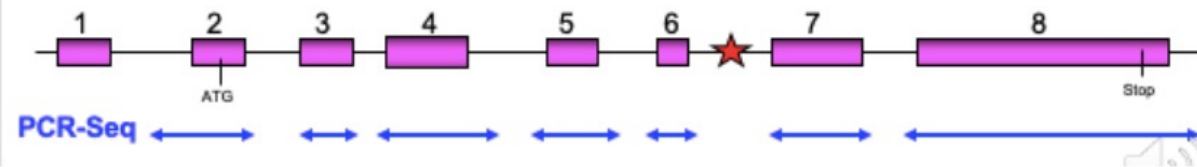
Allèle paternel



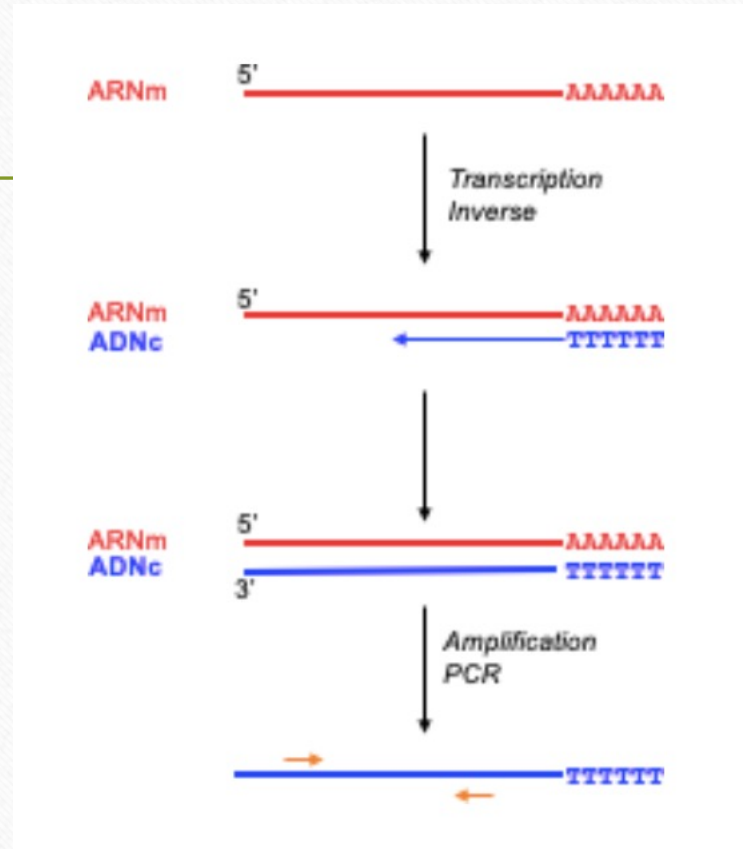
Allèle maternel



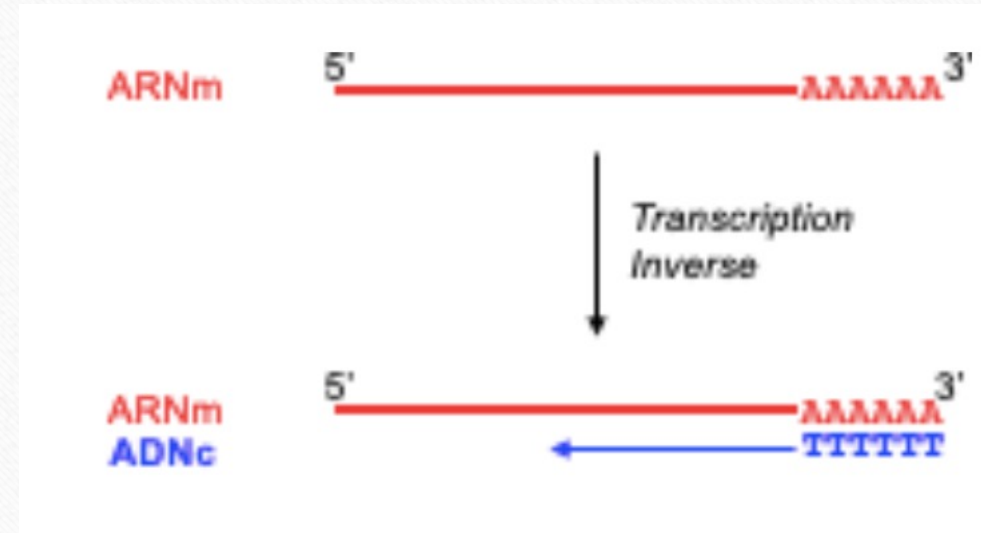
➤ Variant d'épissage



Étude des ARN messagers



Transcriptase inverse

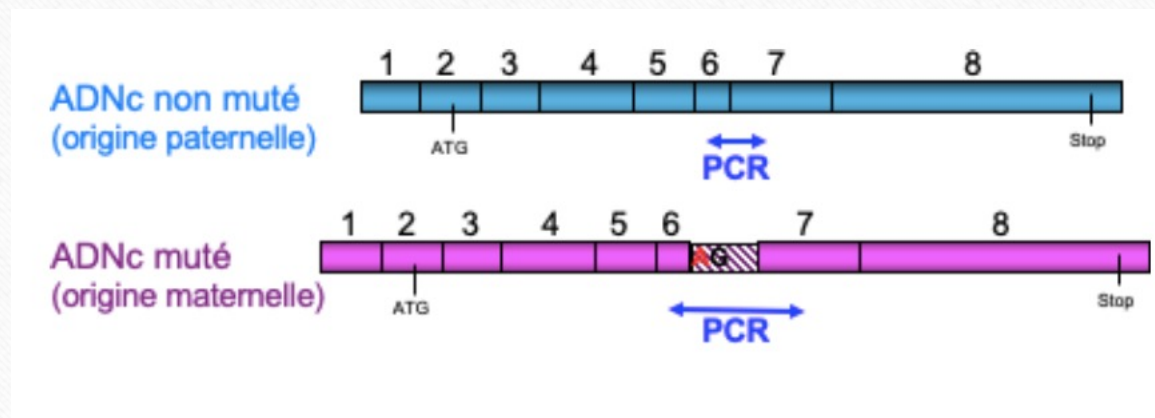


Transcriptase inverse → ADN simple brin complémentaire à ARNm

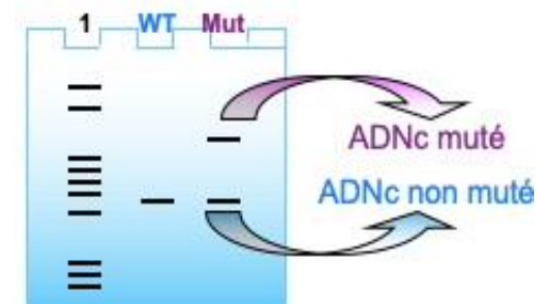
Activité 5' – 3' ADN polymérase

RNase H pour éliminer les brins d'ARN

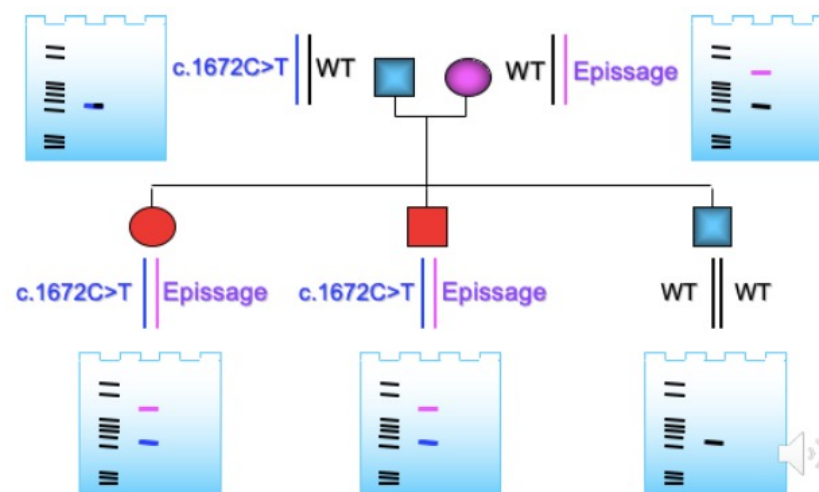
Recherche des variants d'épissage



Analyse des produits PCR
après migration électrophorétique

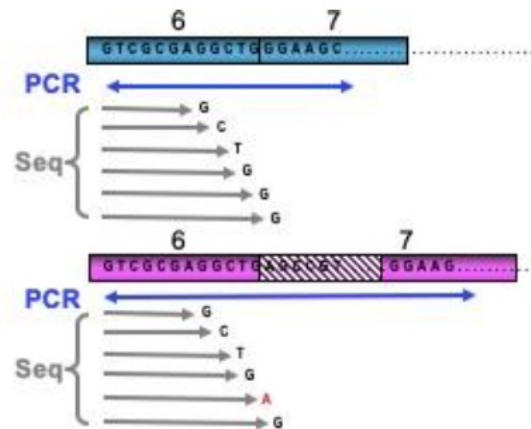


f. Famille B : Résultats

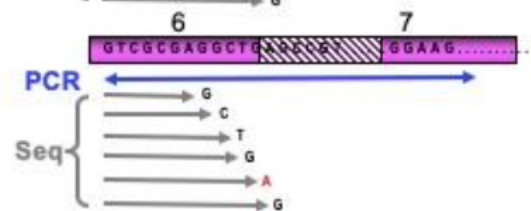


Okey okey but now faut identifier la mutation....

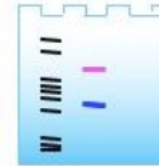
ADNc non muté
(origine paternelle)



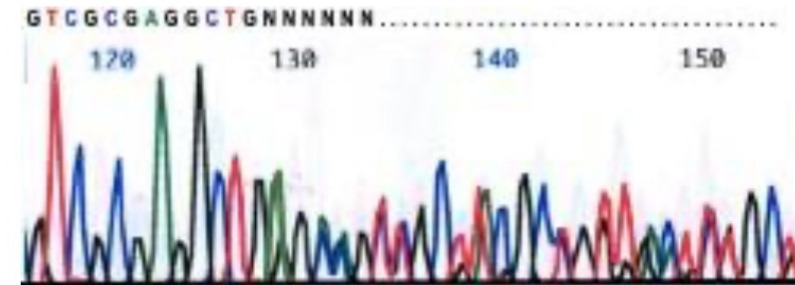
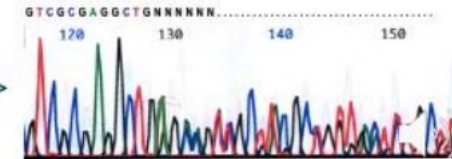
ADNc muté
(origine maternelle)



c.1672C>T | Epissage



Séquençage
du produit PCR



Le clonage moléculaire

Il permet d'obtenir un grand nombre de copies identiques absolument pures d'une séquence donnée d'ADN



Préparation de notre ADN recombinant (insert + vecteur)

Clonage dans un plasmide

Un Polylinker

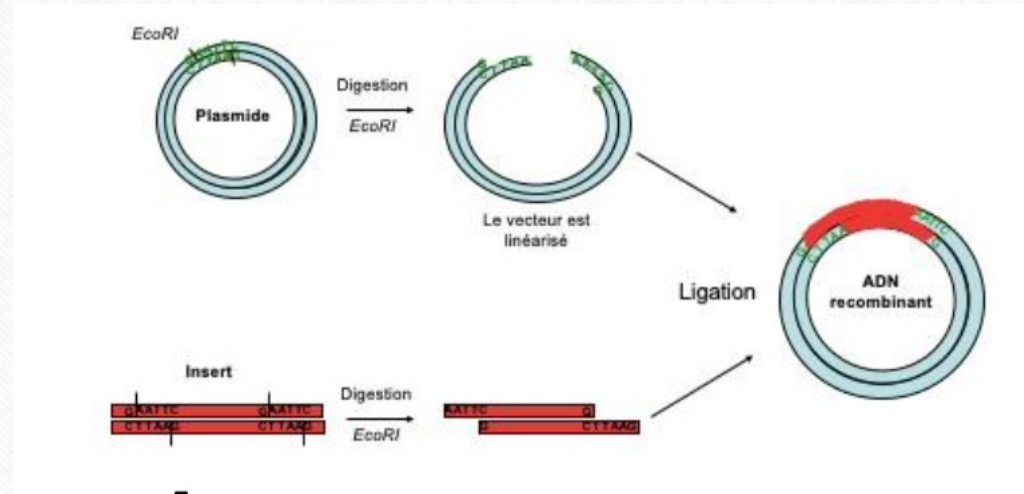
Une origine de réplication (Ori)

Un gène de sélection



Préparation du vecteur et de l'insert

- enzymes de restriction : endonucléases
- linéariser le vecteur
- libérer les extrémités 5' et 3' de l'ADN compatibles avec les extrémités libérées dans le vecteur.

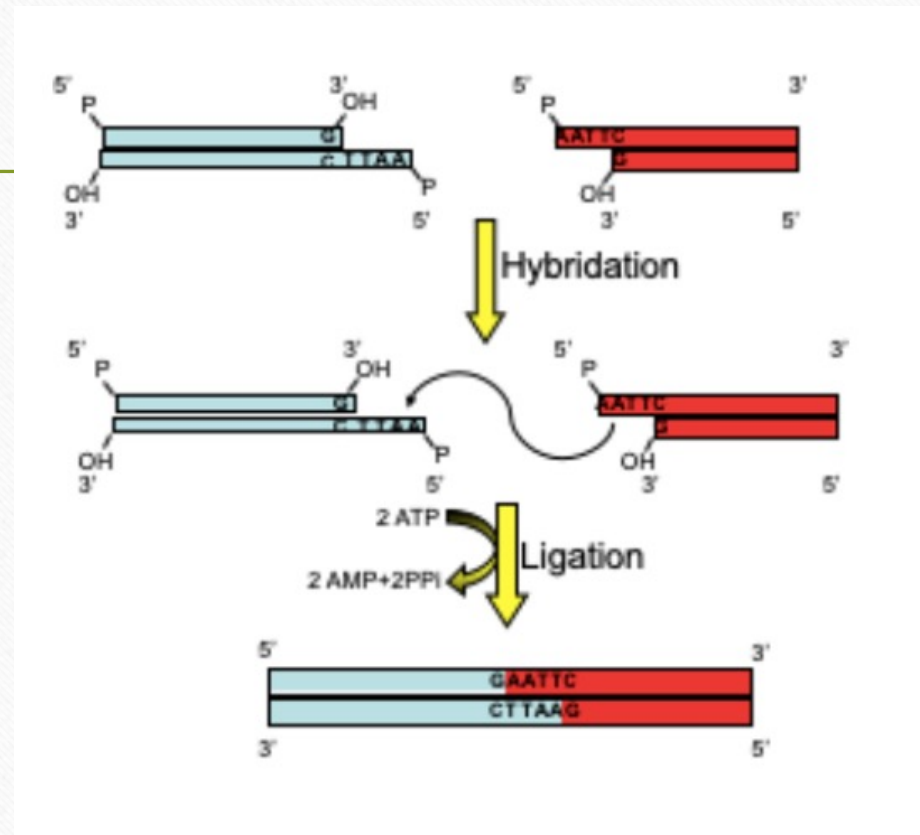


La ligation

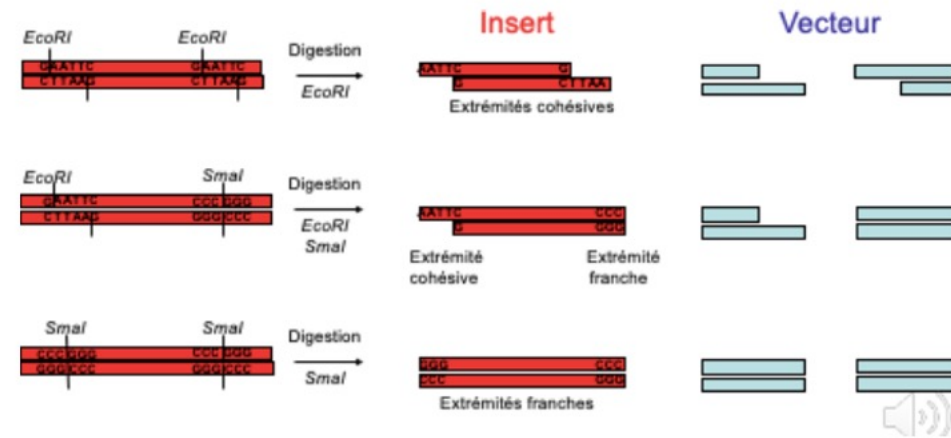
T4 DNA Ligase

liaison phosphodiester entre un 3' OH et un 5' P en présence d'ATP et d'ions divalents.

Après hybridation des extrémités cohésives par complémentarité des bases



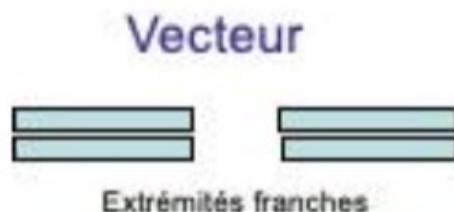
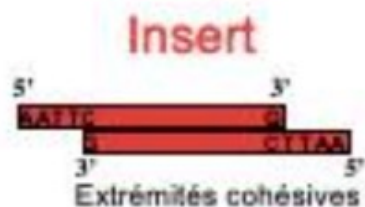
Les strategies de clonage



Extrémités cohésives

Extrémités différentes

Extrémités franches



Nucléase S1

Activité
5'-3' exonucléasique



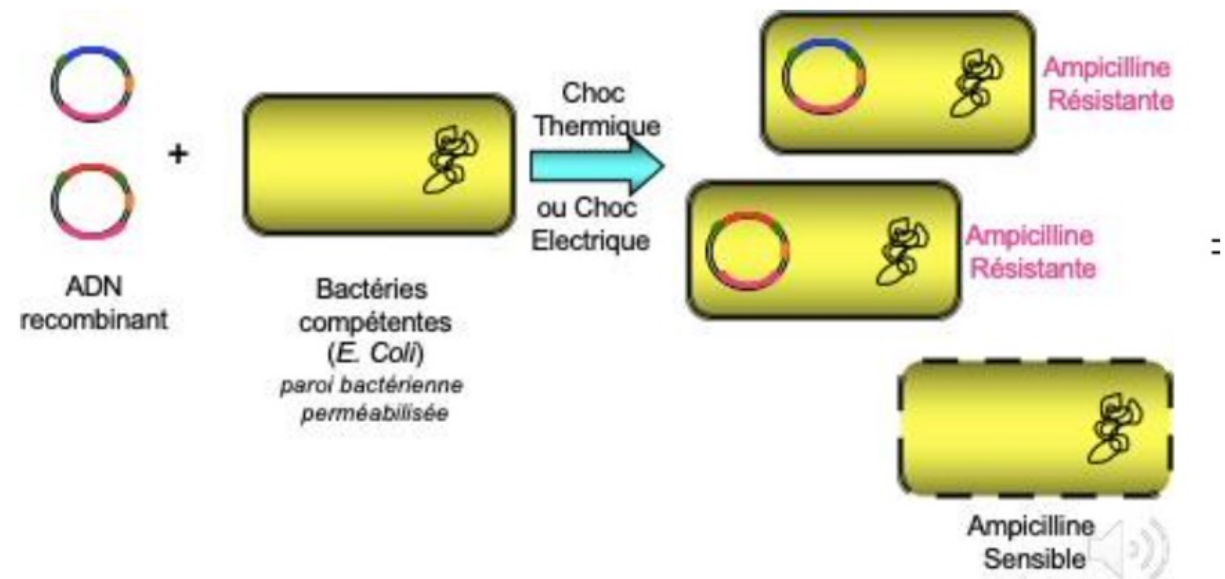
Klenow
+
dNTP

Activité
5'-3' polymérase



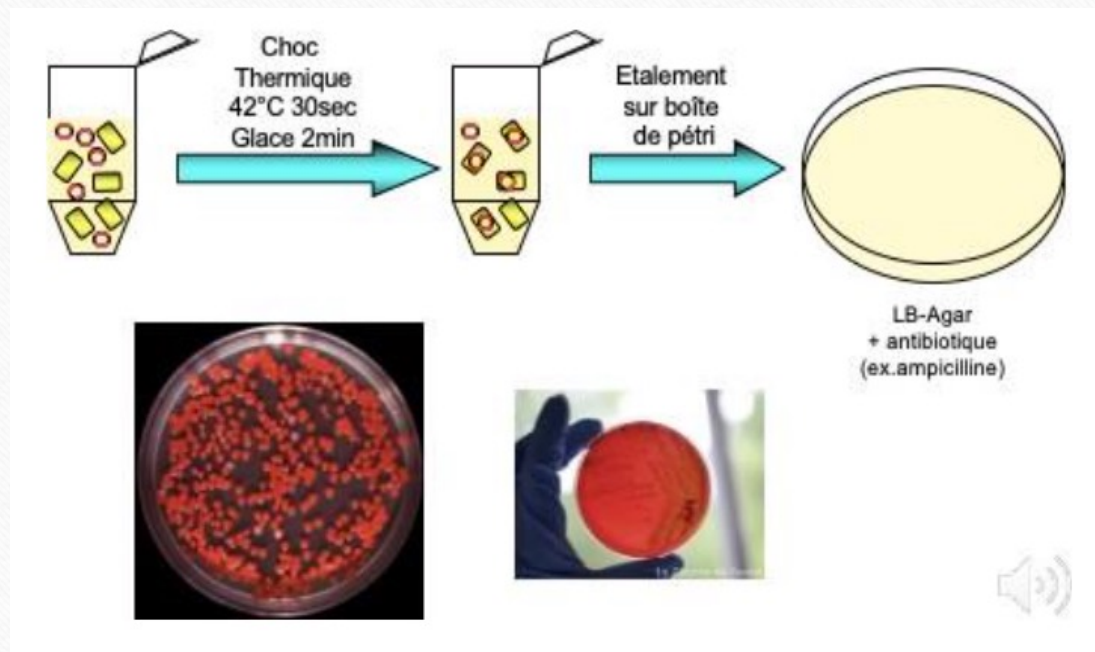
Introduction du vecteur dans la cellule hôte (bactérie)

Transformation bactérienne

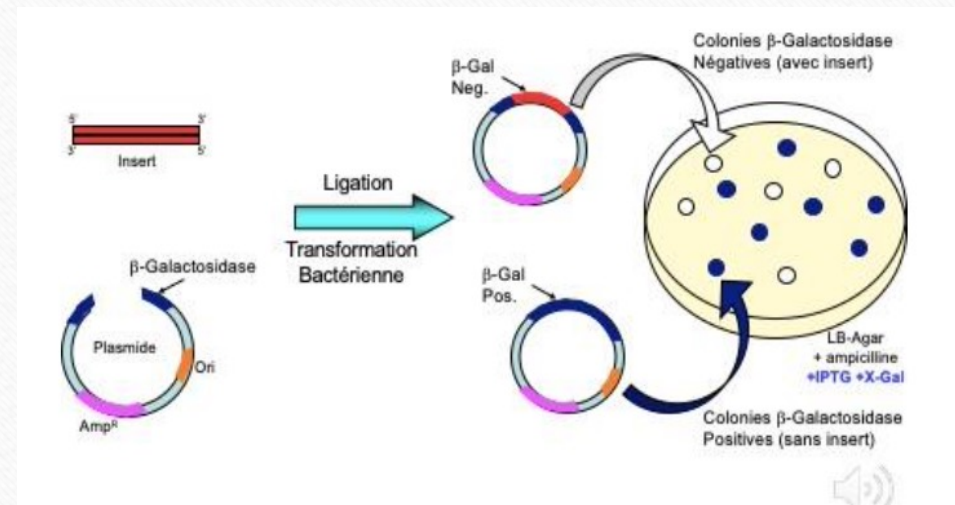


Etapes de la transformation bactérienne

Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens

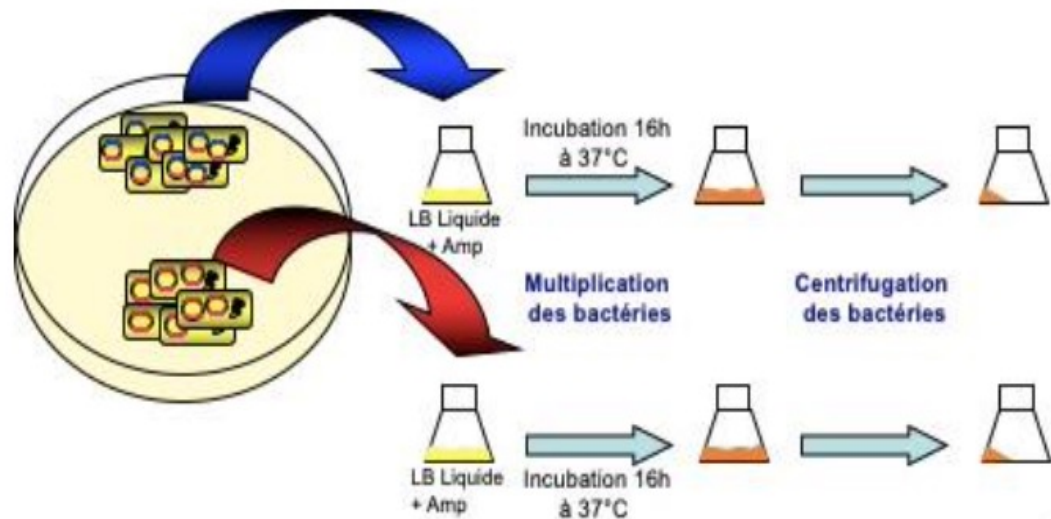


1 colonie (clone pur) correspond
à 1 bactérie



Sélection des bactéries ayant intégré le plasmide : grâce à la résistance à l'antibiotique

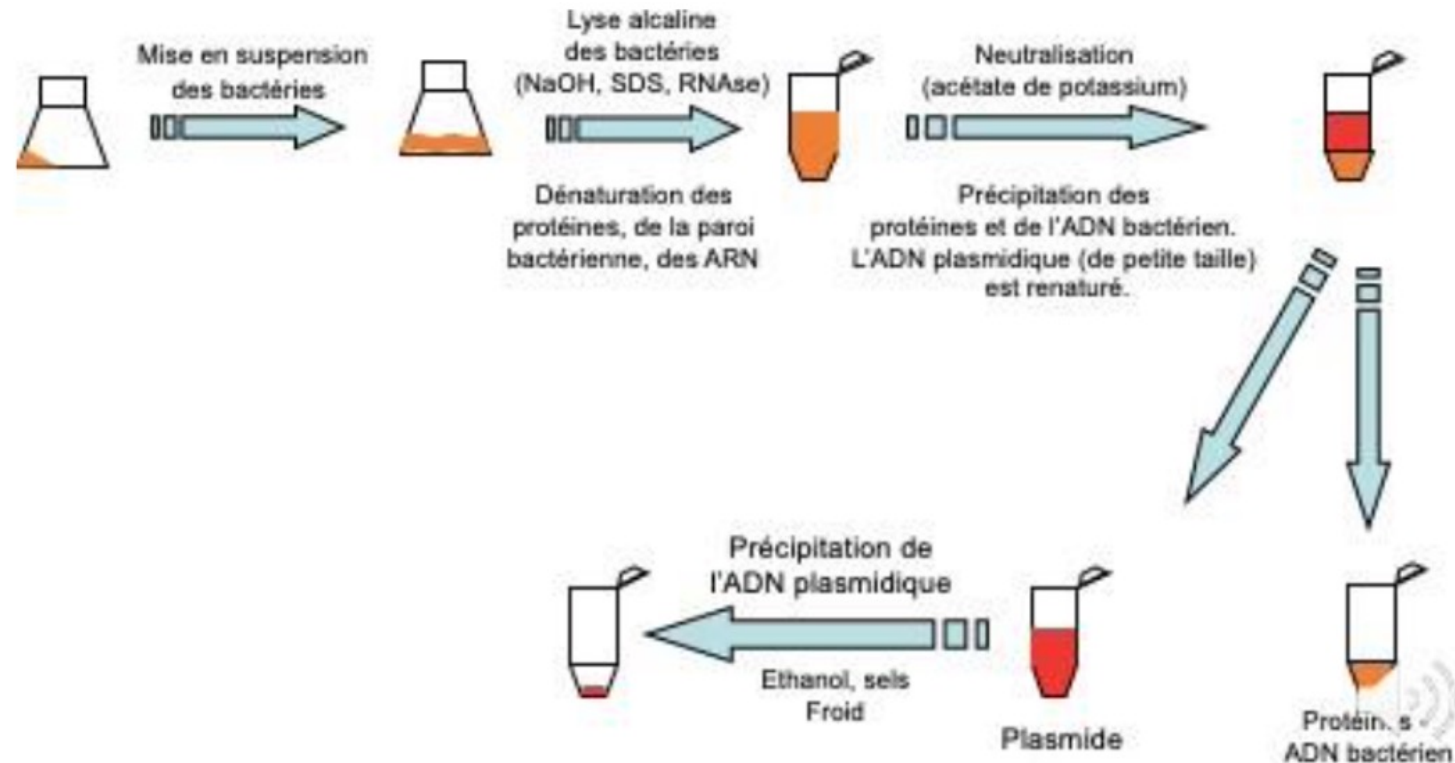
Sélection des bactéries ayant intégré l'insert : grâce à la sélection blanc / bleu de la B-Galactosidase



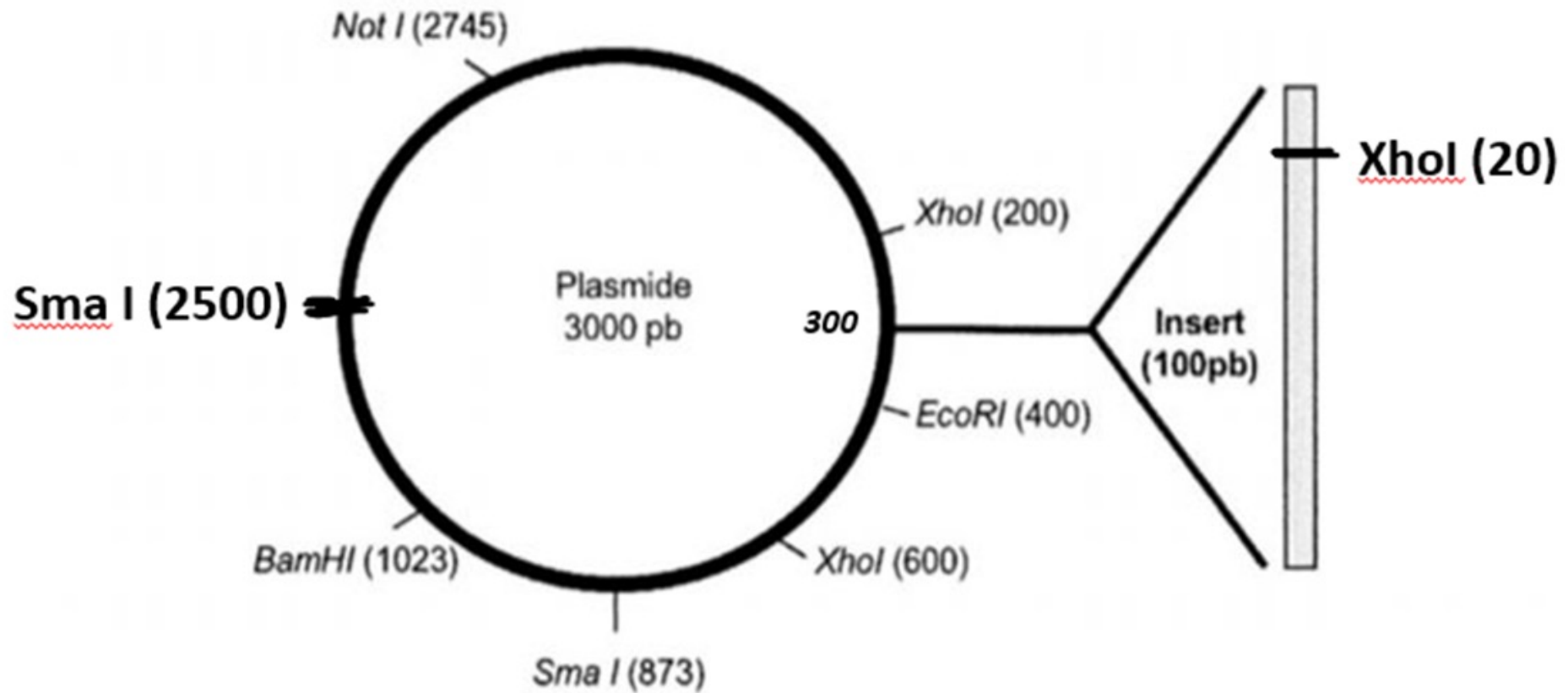
Et enfin on veut obtenir un ADN pur en grande quantité...

Extraction de l'ADN recombinant

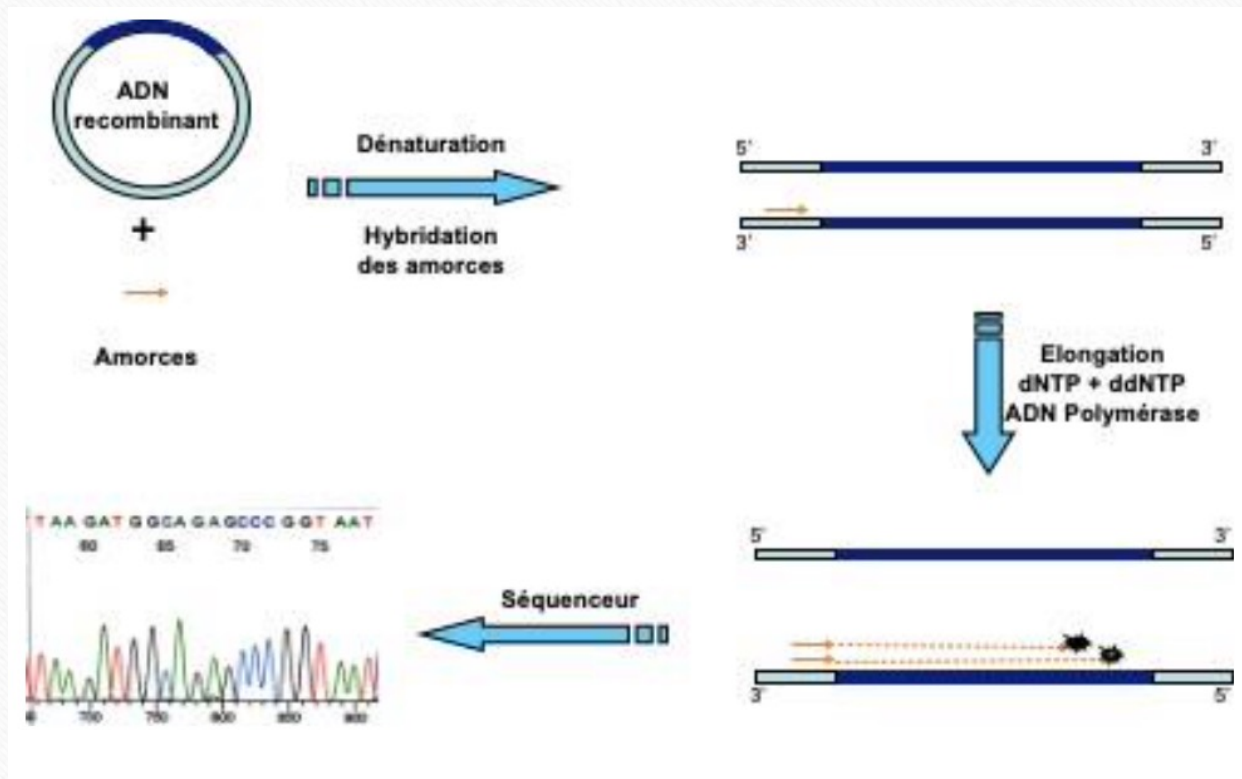
Après une étape de centrifugation, on va pouvoir récupérer le culot bactérien, c'est-à-dire les bactéries qui contiennent notre ADN d'intérêt.



Les cartes de restriction

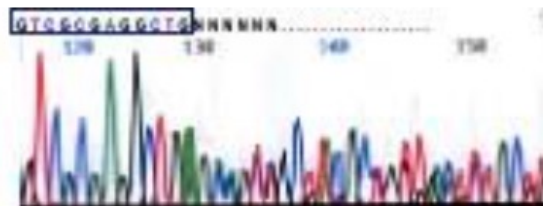
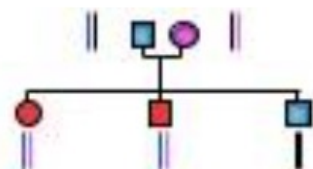


Vérification ADN recombinant par séquençage

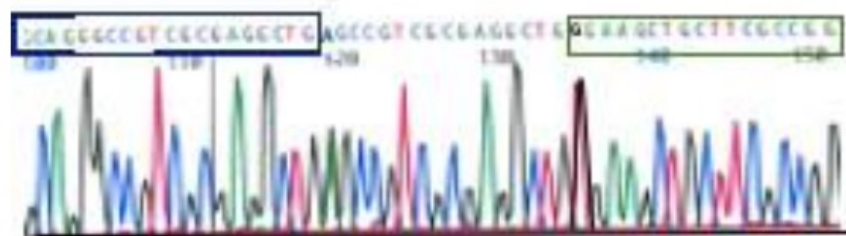


Séquencage Sanger :

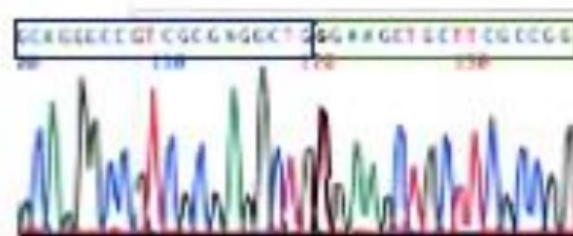
dénaturation, hybridation des amorces, élongation



Clonage
Séquençage



Variant d'épissage



Wild-type



QCM fun time

Activité

- **Couper ADN double brin**
- **Copier**
- **Coller**

Enzymes

- Polymérases (ADN polymérase)
- Exonucléases
- Ligases (T4 DNA ligase)
- Enzymes de restriction
- Endonucléases

QCM fun time

Activité

- Couper ADN double brin
- Copier
- Coller

Enzymes

- Polymérases (ADN polymérase)
- Exonucléases
- Ligases (T4 DNA ligase)
- Enzymes de restriction
- Endonucléases