

# 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

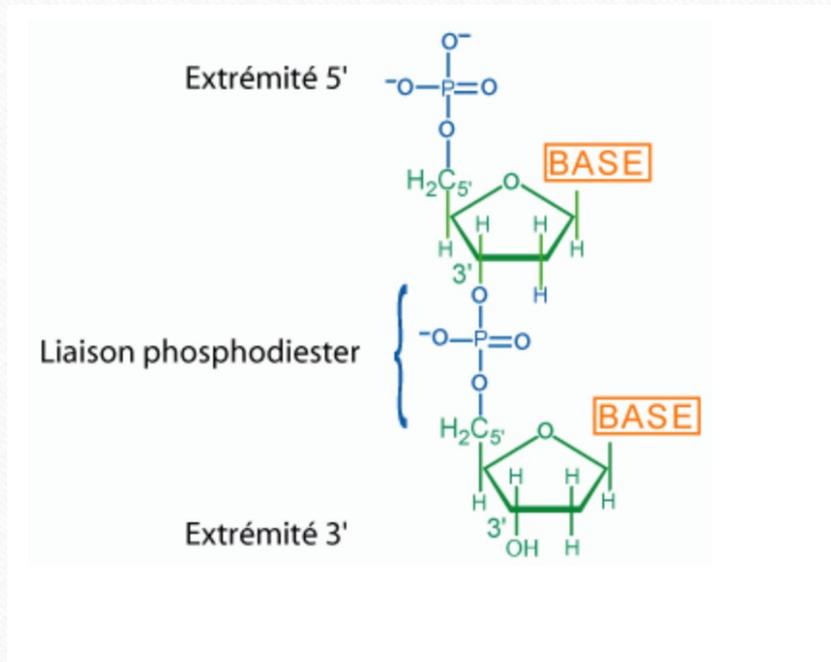
# 1. Le séquençage

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



À partir d'une amorce !

# L'ADN *rappel*



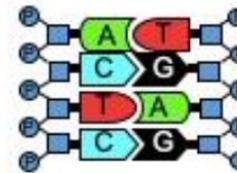
Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont composés de nucléotides

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

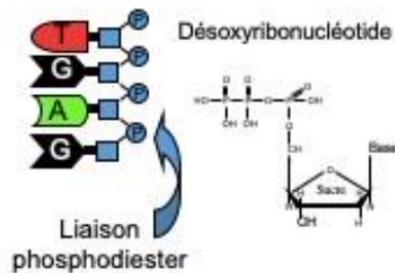
## Liaisons phosphodiester



La double hélice d'ADN



2 Brins



Liaison phosphodiester

# 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

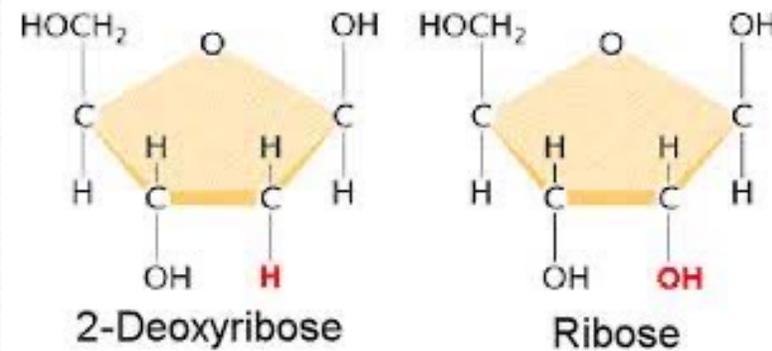
Les nucléotides avec mélange dNTPs et dDNTPs – 1 seul type de dDNTP par tube

Les tampons

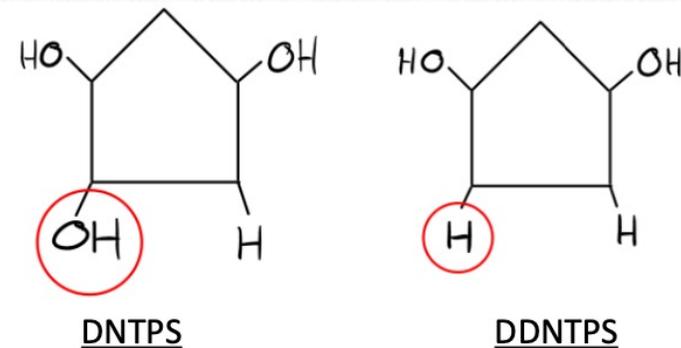
## Différence entre dNTPs et ddNTPs

---

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



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



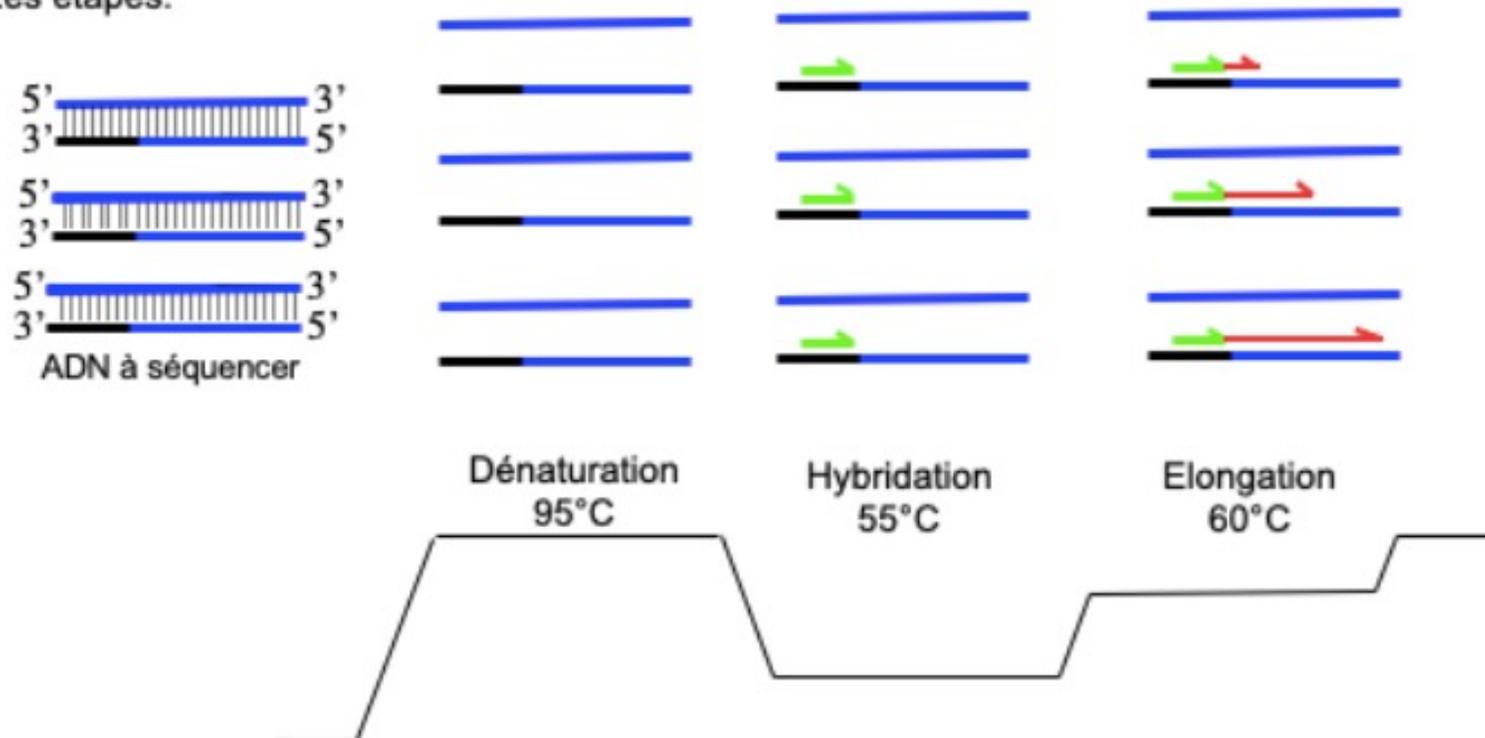
# Étapes

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:



## Cycles successifs



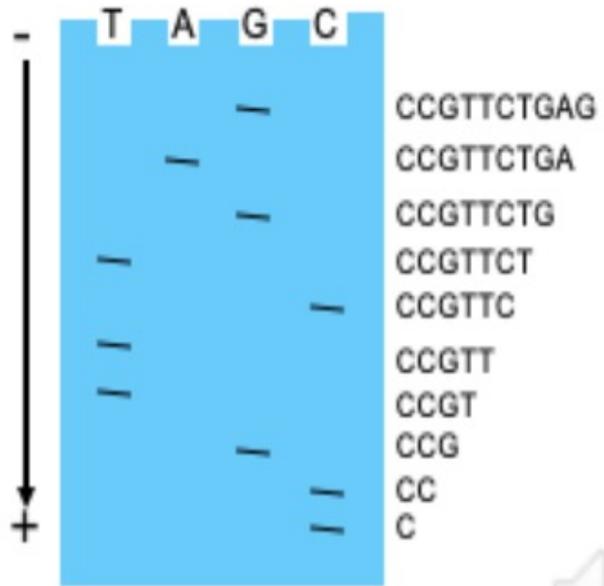
Utilisation aléatoire  
de dNTPs ou  
ddNTPs par la Taq  
polymérase

Si dNTP :  
élongation continue

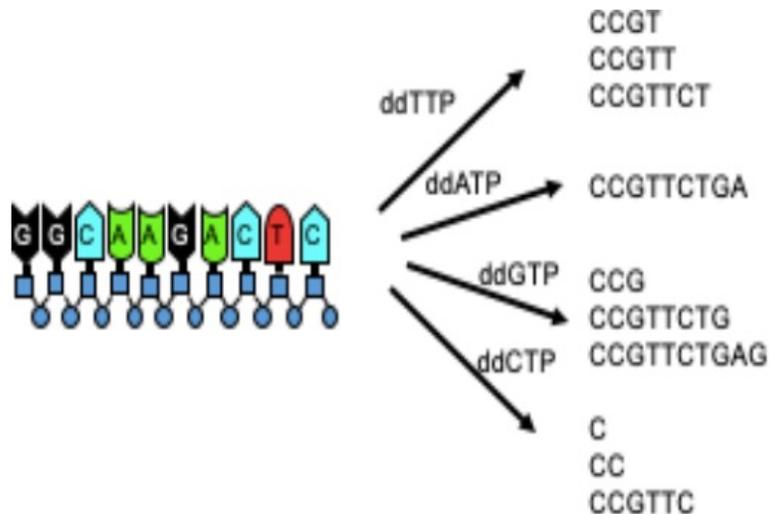
Si ddNTP :  
élongation s'arrête

Après plusieurs cycles

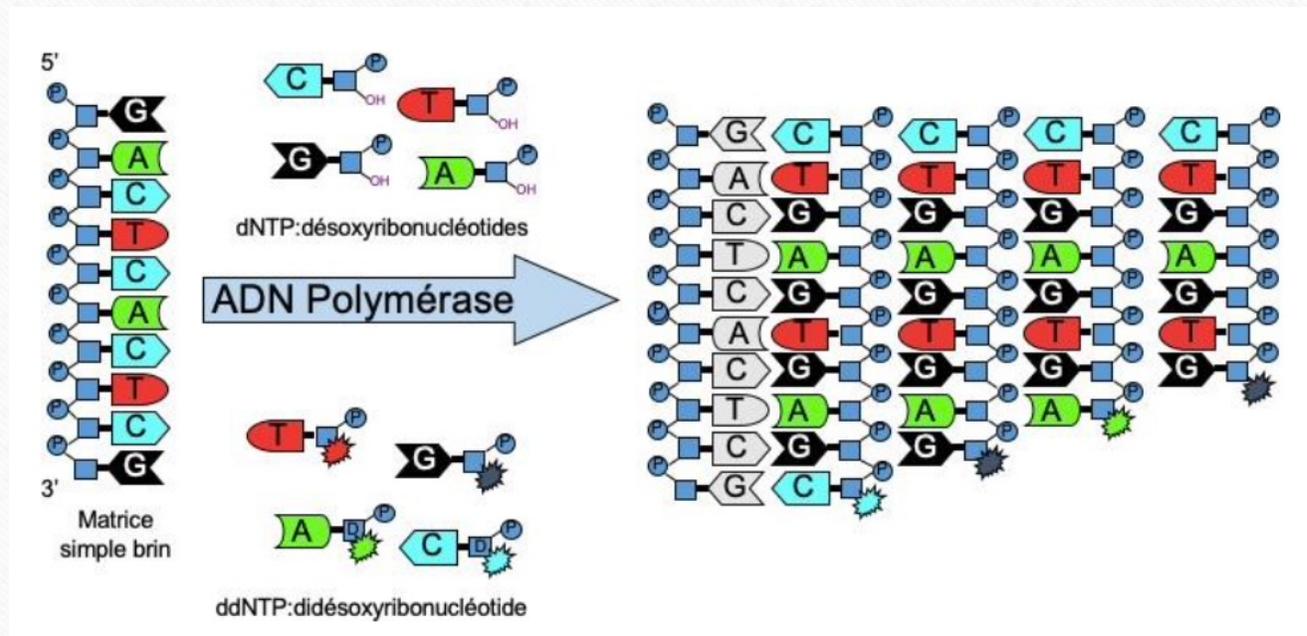
Résultat : nombreux fragments d'ADN **complémentaire** de taille  
différente



- 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

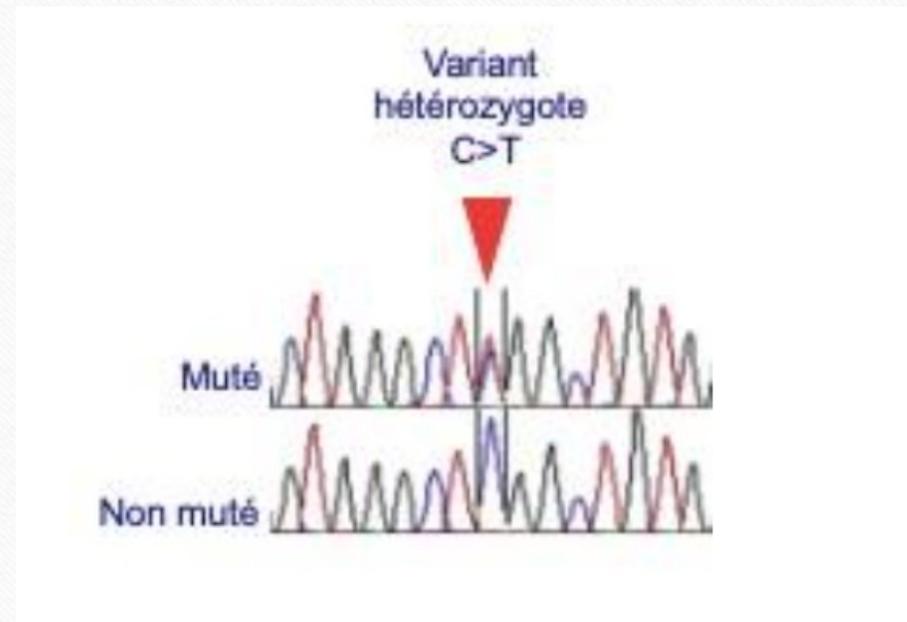
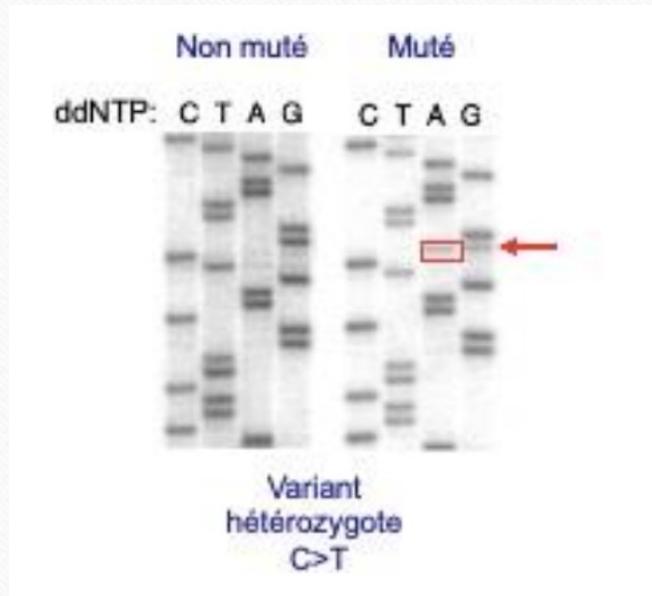


# Méthode automatisée



# Exemple de résultats

- Superposition de



# Analyse d'un gène par PCR et séquençage Sanger

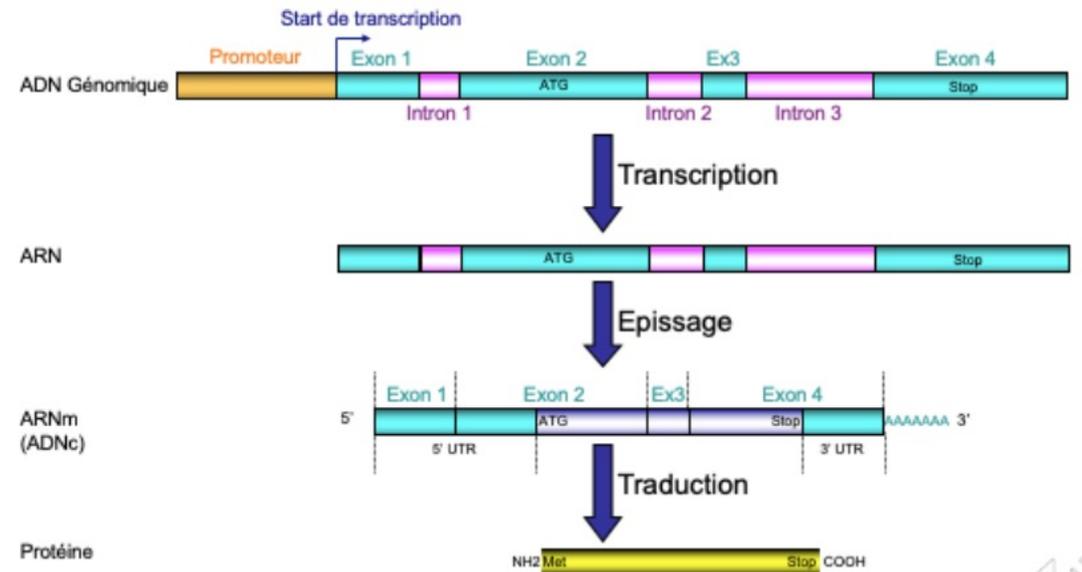
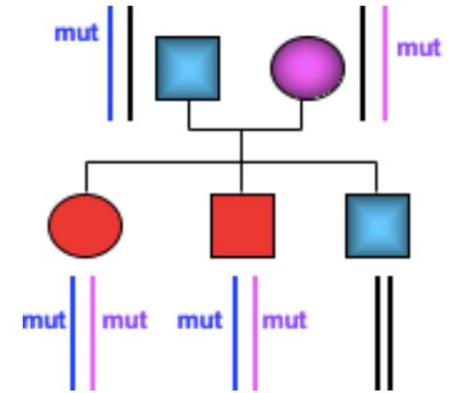
## I) Etude de cas : le syndrome de Wolfram

### Screen de la totalité d'un gène

Maladie à transmission autosomique récessive  
gène WFS1

associe d'un point de vue clinique

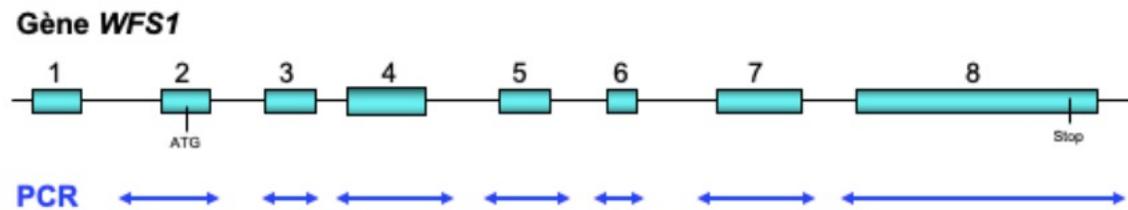
- Diabète
  - Surdité
  - Atrophie optique
  - Troubles neurologiques
- Le gène WFS1 : 8 exons  
• l'ATG se trouve dans le 2e exon du gène  
→ le 1er exon est non codant



## A. Recherche de mutations dans un gène

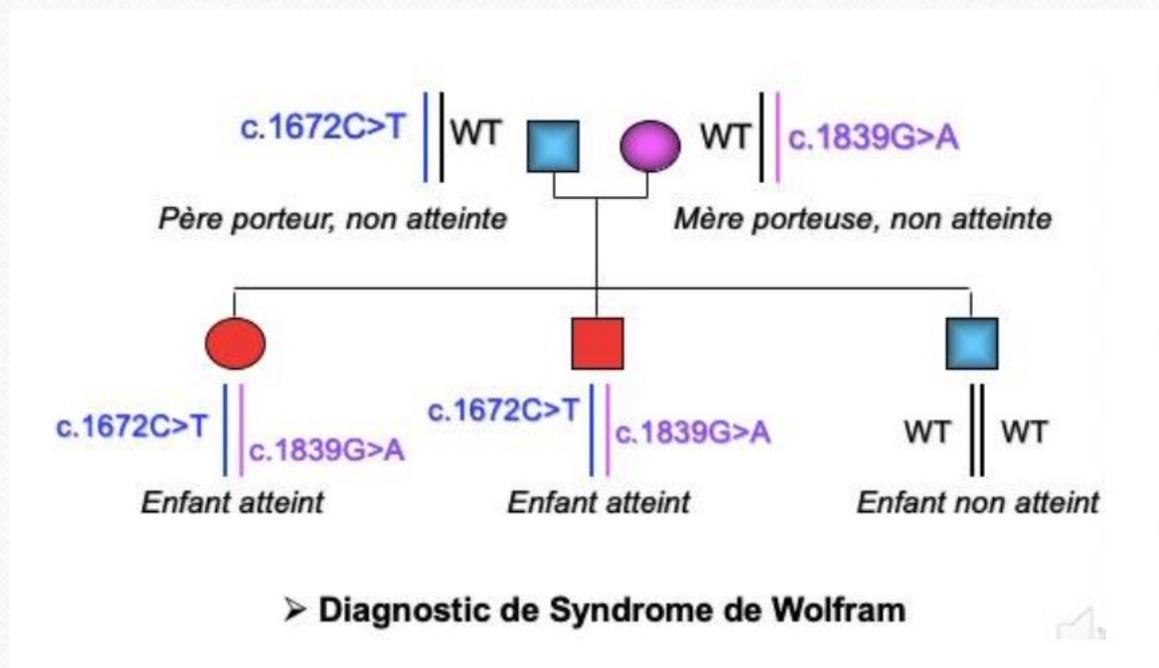
---

### PCR (exons + Jonctions intron/Exon) + Séquençage

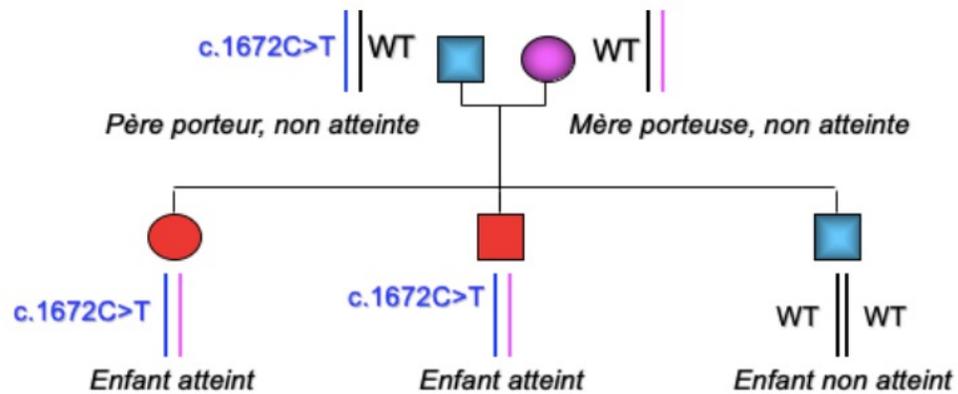


Interet pour les régions codantes - les exons – qu'on amplifie  
→ 7 PCR des exons 2/3/4/5/6/7/8

## Famille A : Cas simple



## Famille B : cas plus compliqué

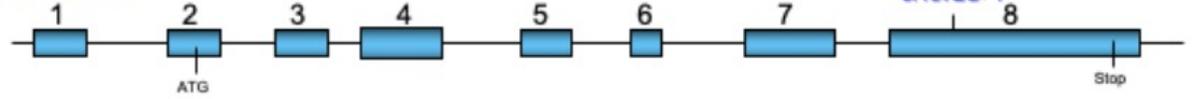


- Une seule mutation identifiée après PCR et séquençage des régions codantes du gène *WFS1* = manque la 2ème mutation 

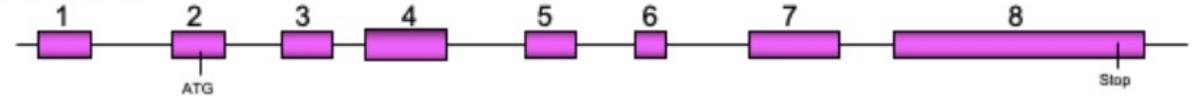
Hétérozygotes composites

# Hypothèses

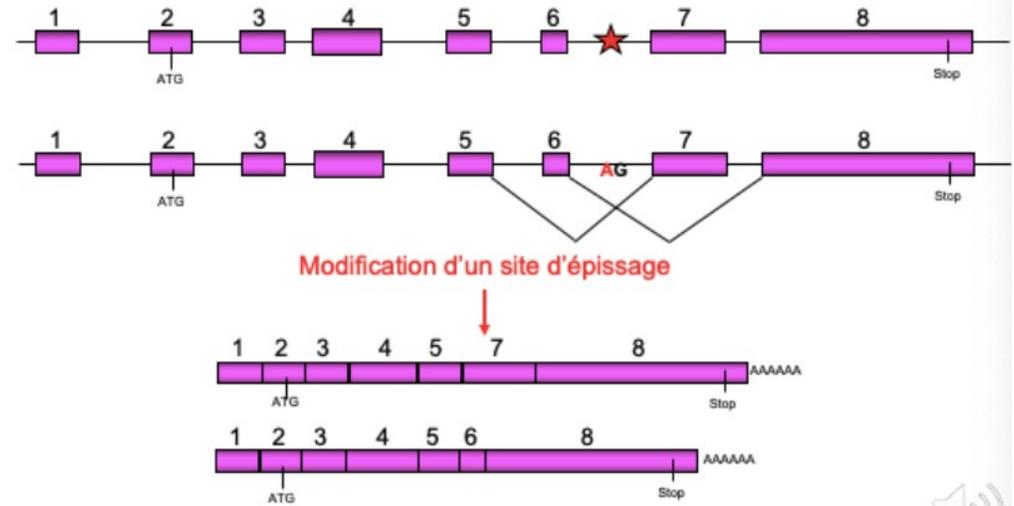
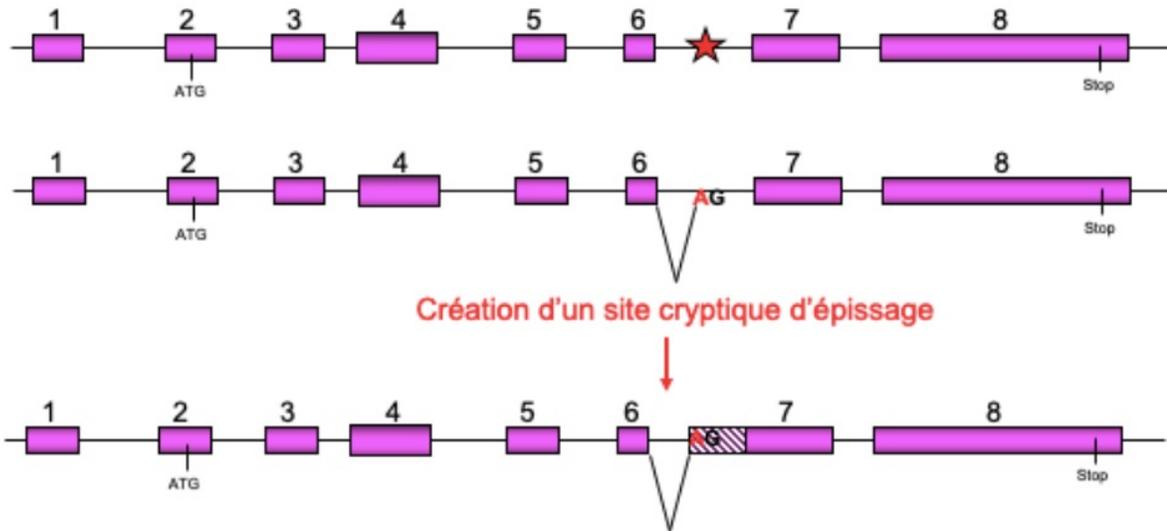
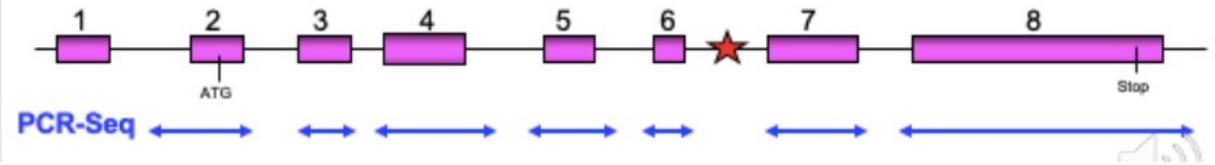
Allèle paternel



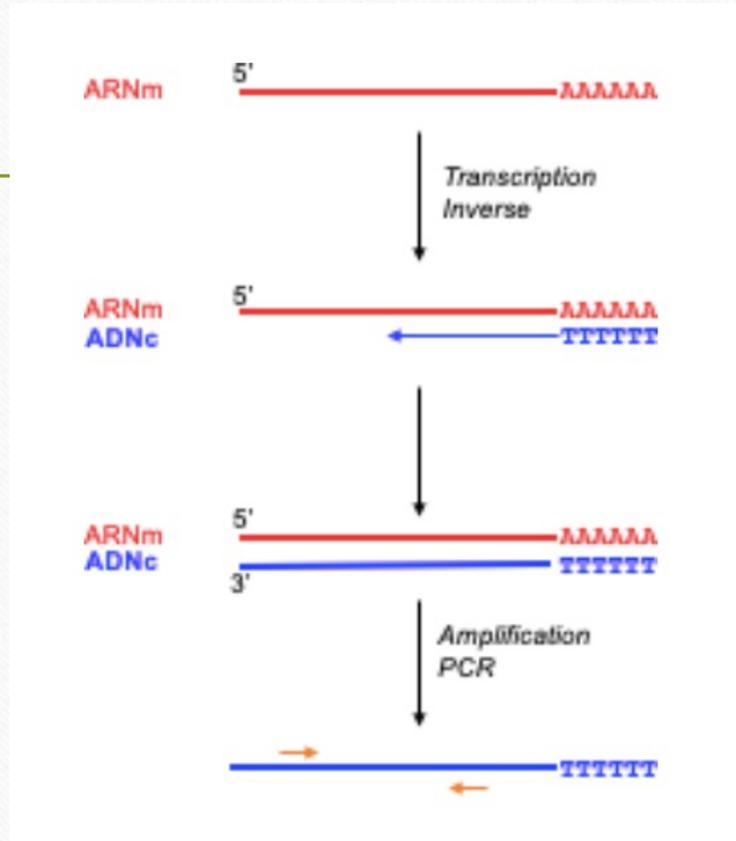
Allèle maternel



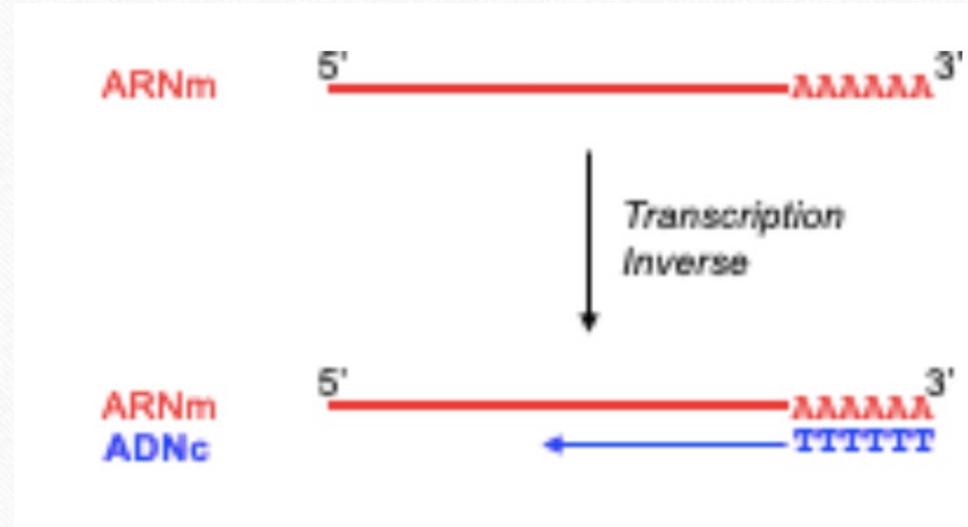
> Variant d'épissage



# Étude des ARN messagers



# Transcriptase inverse

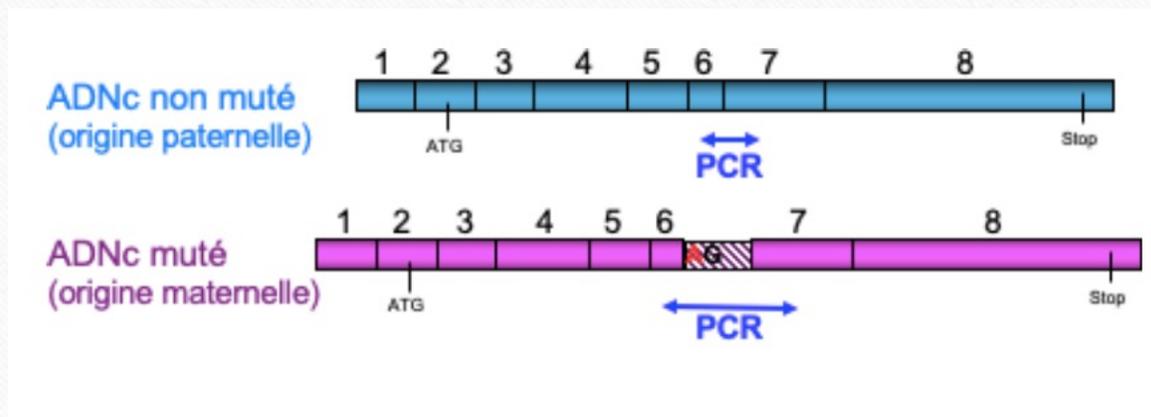


**Transcriptase inverse** → ADN simple brin complémentaire à ARNm

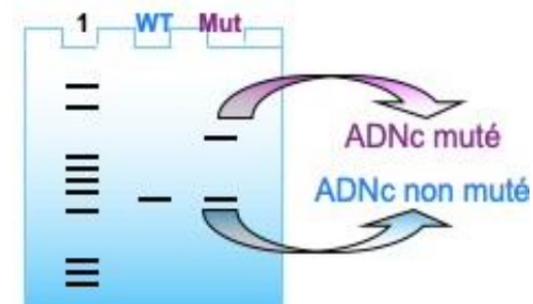
Activité 5' – 3' ADN polymérase

**RNase H** pour éliminer les brins d'ARN

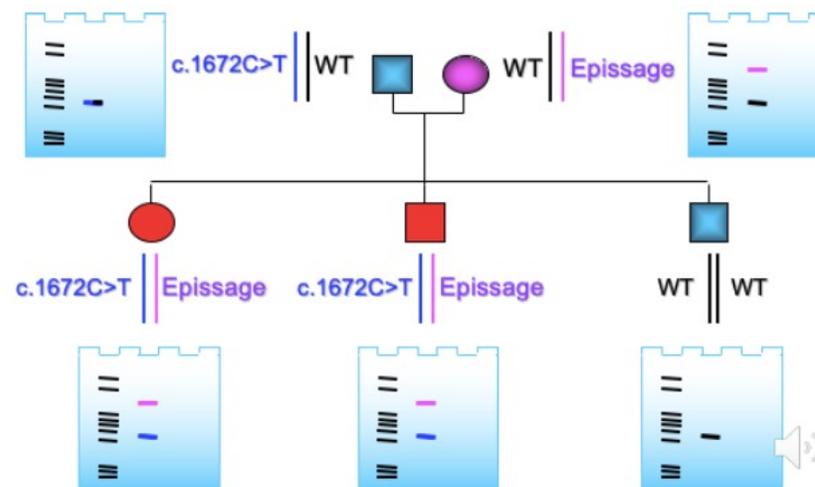
# Recherche des variants d'épissage



Analyse des produits PCR  
après migration électrophorétique

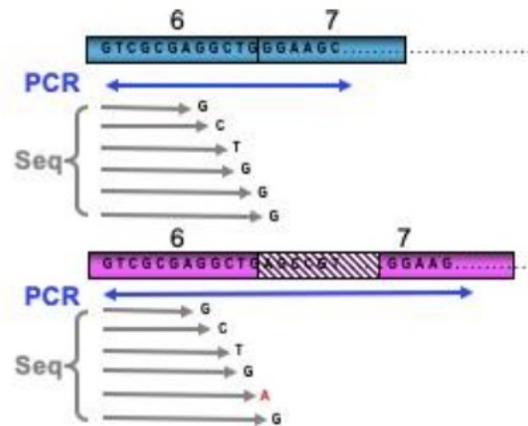


## f. Famille B : Résultats

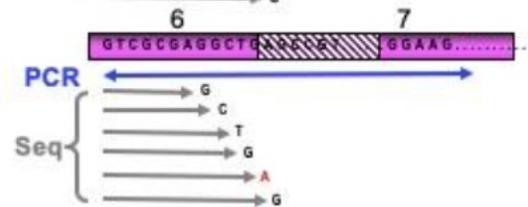


Okey okey but now faut identifier la mutation....

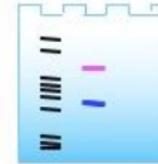
ADNc non muté  
(origine paternelle)



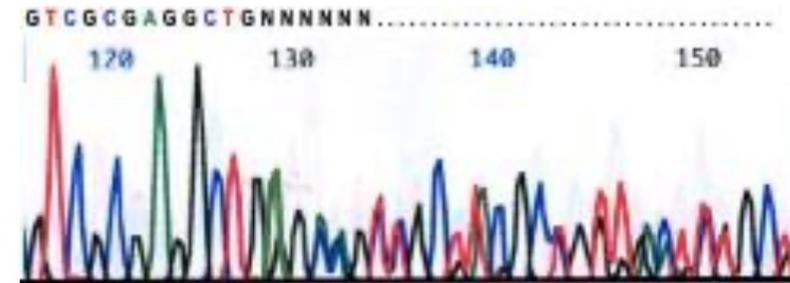
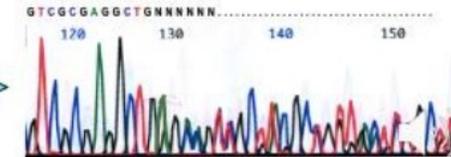
ADNc muté  
(origine maternelle)



c.1672C>T | Epissage

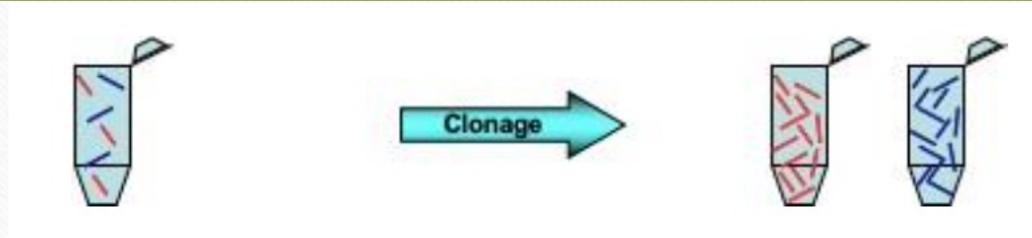


Séquençage  
du produit PCR



# Le clonage moléculaire

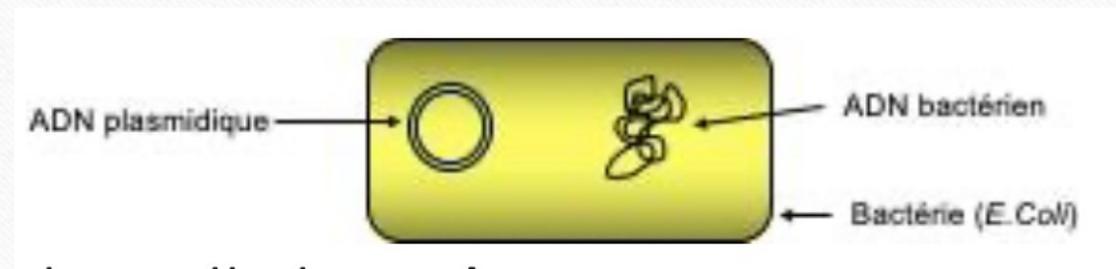
Il permet d'obtenir un grand nombre de copies identiques absolument pures d'une séquence donnée d'ADN



Préparation de notre ADN recombinant (insert + vecteur)

## Clonage dans un plasmide

- Un Polylinker
- Une origine de réplication (Ori)
- Un gène de sélection

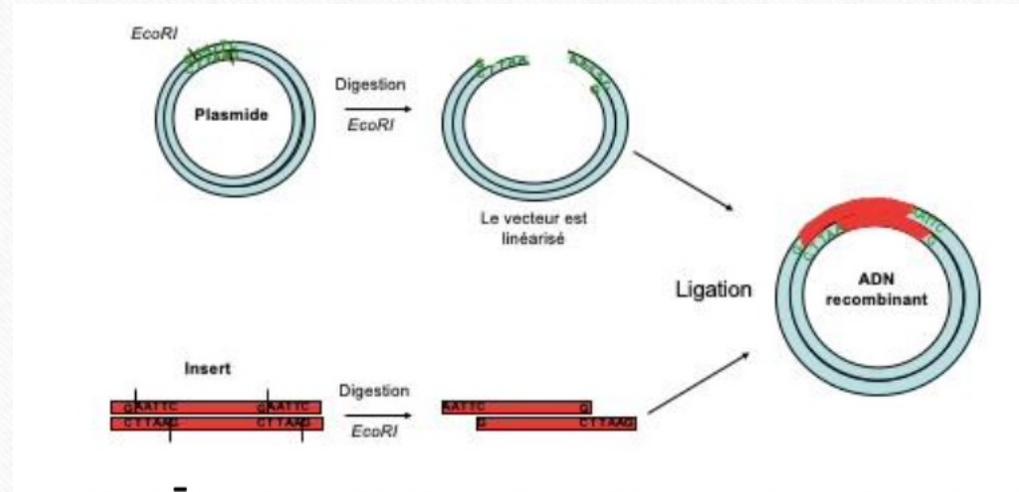


## Préparation du vecteur et de l'insert

- enzymes de restriction : endonucléases
- linéariser le vecteur

---

- libérer les extrémités 5' et 3' de l'ADN compatibles avec les extrémités libérées dans le vecteur.

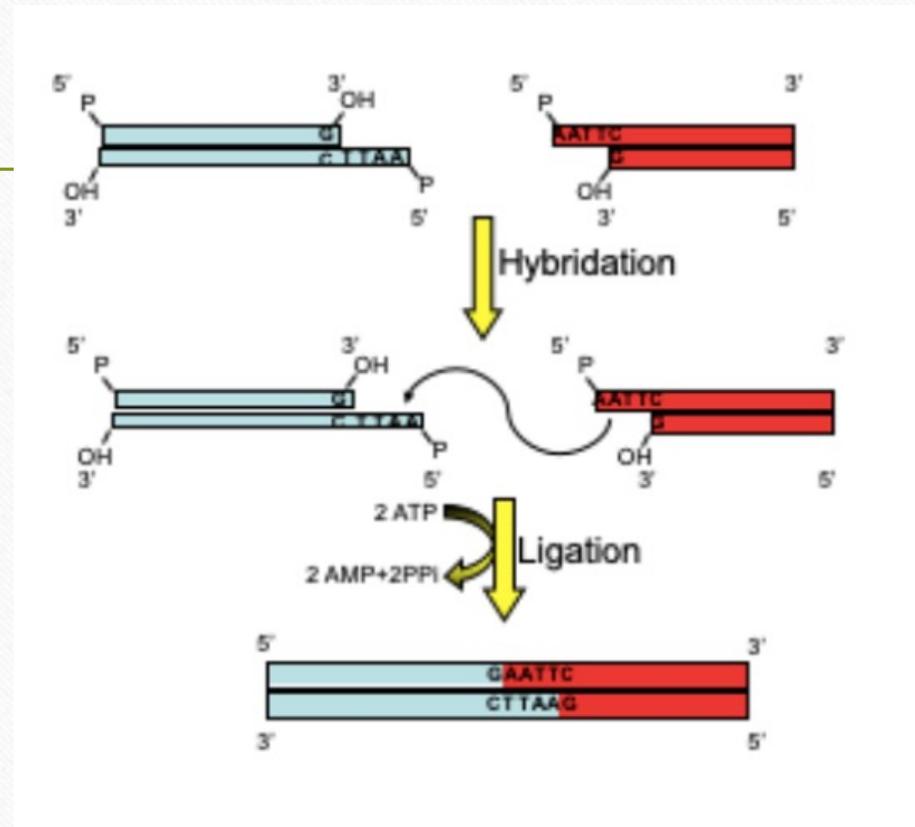


# La ligation

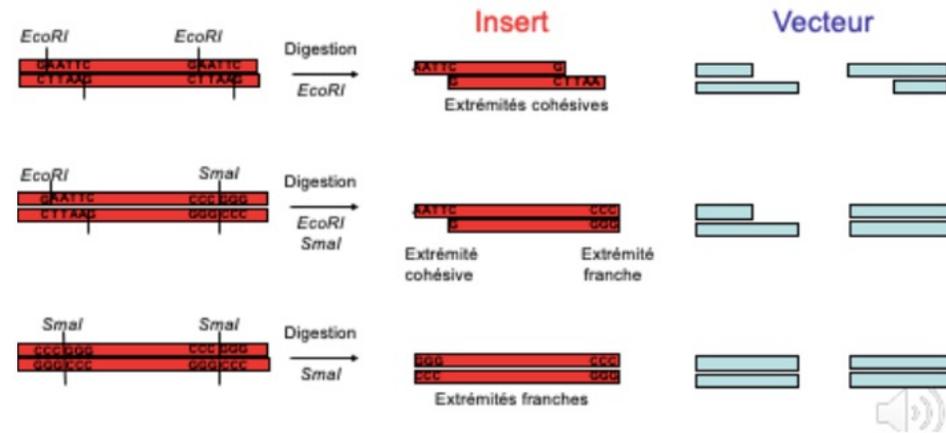
## T4 DNA Ligase

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

Après hybridation des extrémités cohésives par complémentarité des bases



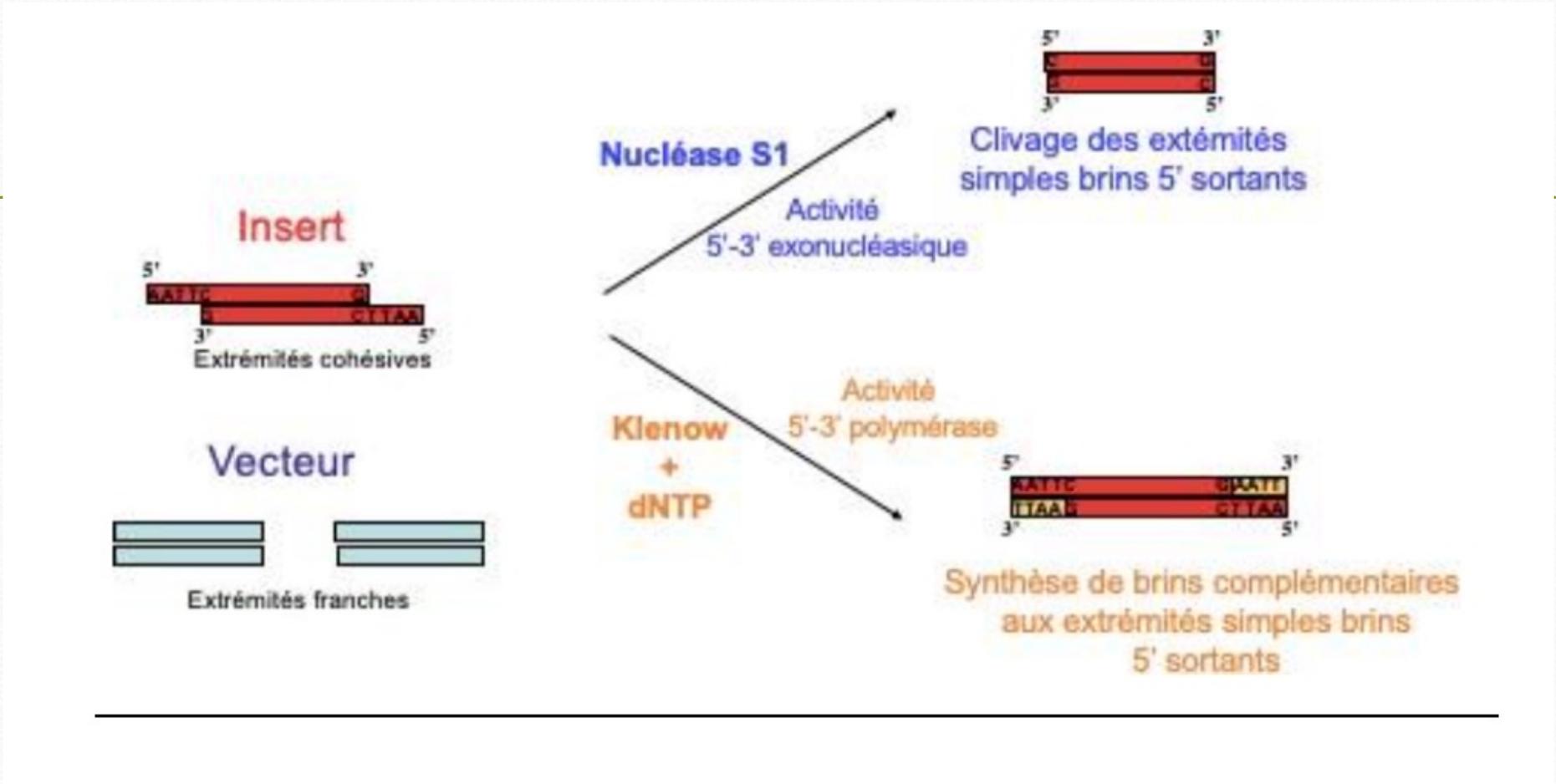
## Les strategies de clonage



Extrémities cohésives

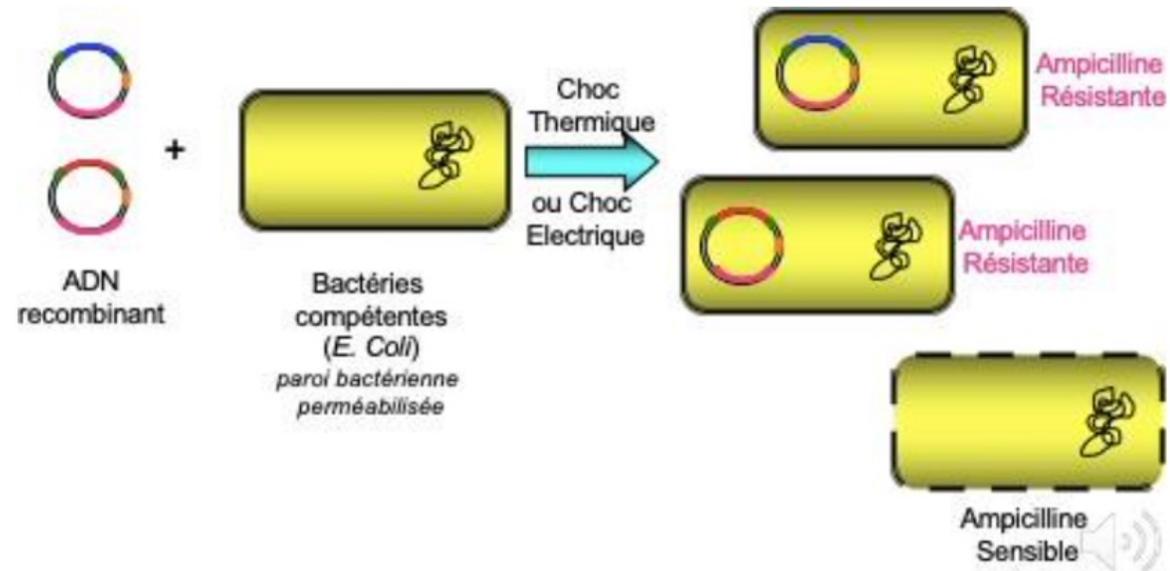
Extrémities différentes

Extrémities franches



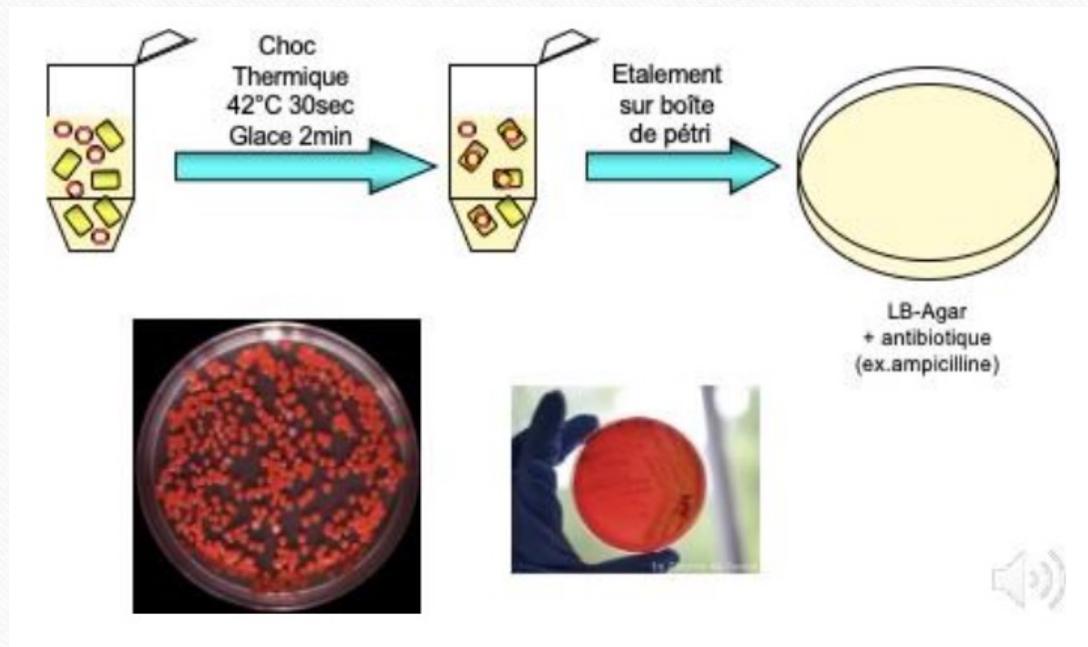
## Introduction du vecteur dans la cellule hôte (bactérie)

### Transformation bactérienne

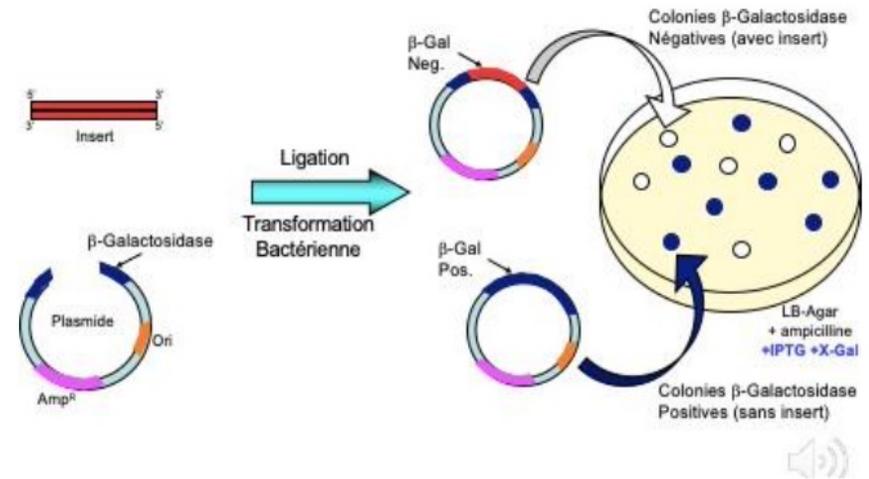


## Etapes de la transformation bactérienne

## Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens

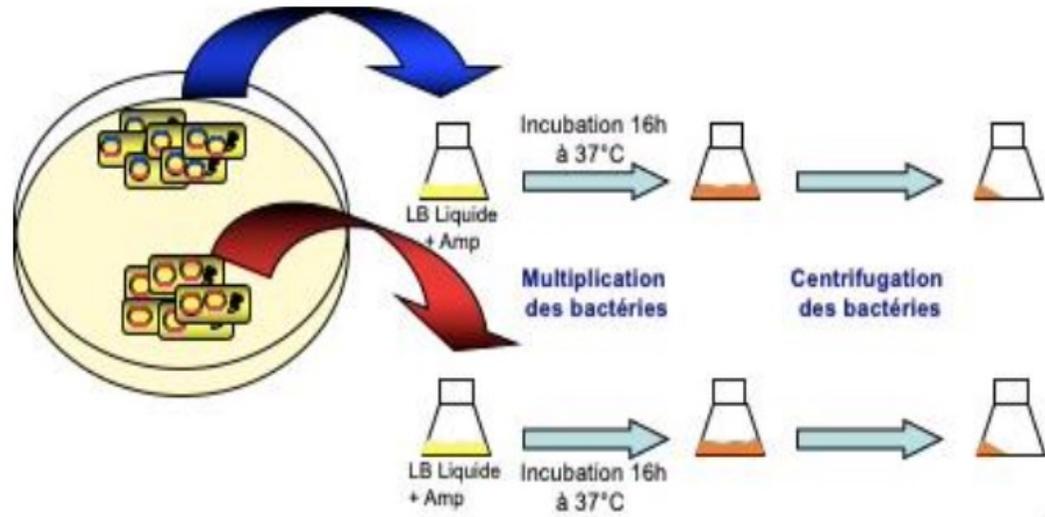


1 colonie (clone pur) correspond  
à 1 bactérie



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

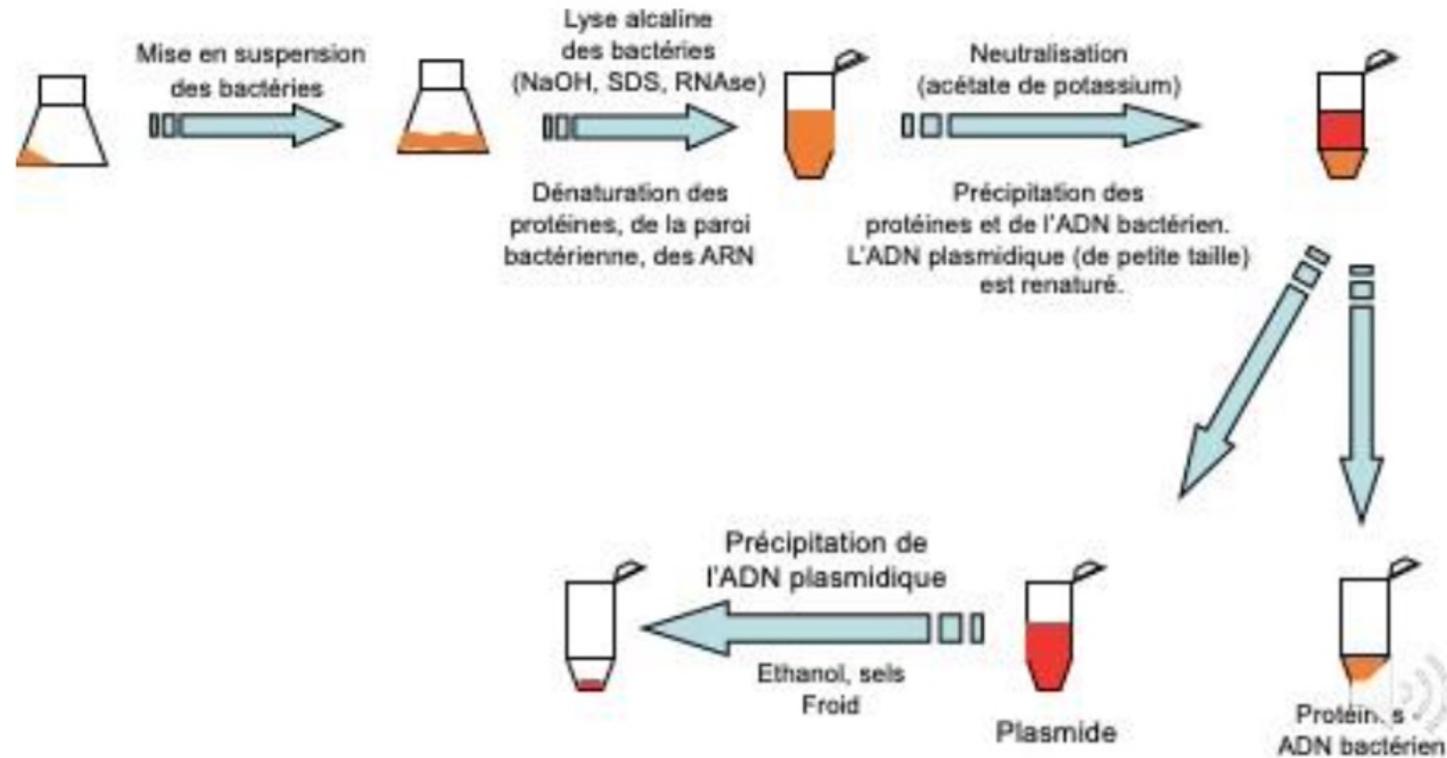
**Sélection des bactéries ayant intégré l'insert : grâce à la sélection blanc / bleu de la B-Galactosidase**



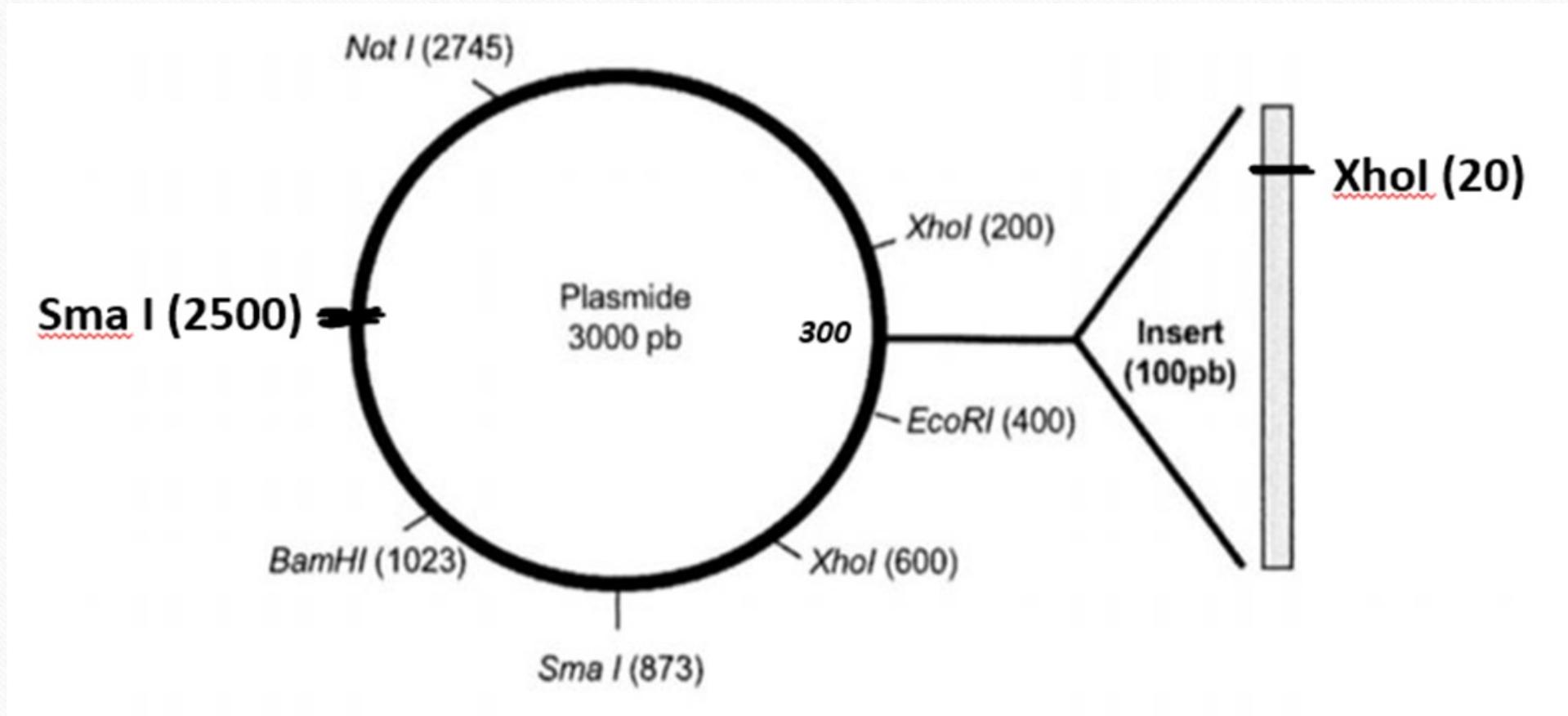
Et enfin on veut obtenir un ADN pur en grande quantité...

## Extraction de l'ADN recombinant

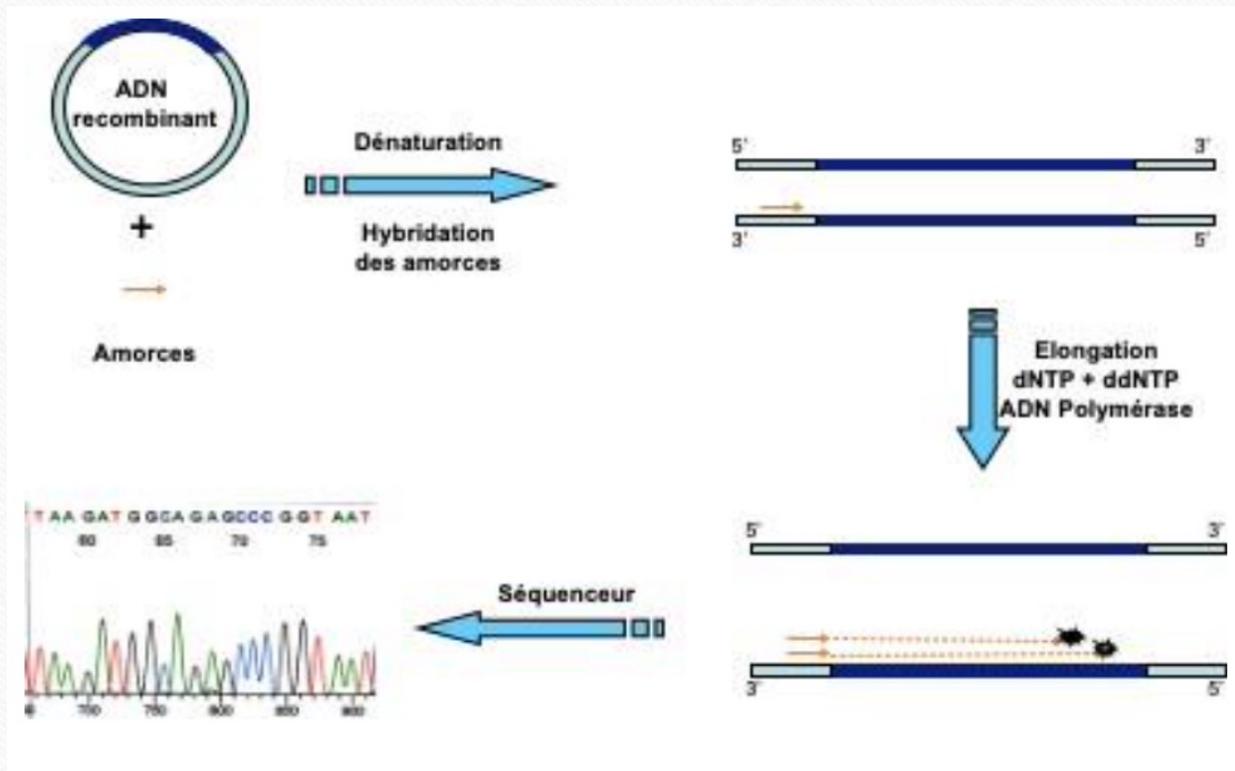
Après une étape de centrifugation, on va pouvoir récupérer le culot bactérien, c'est-à-dire les bactéries qui contiennent notre ADN d'intérêt.



# Les cartes de restriction

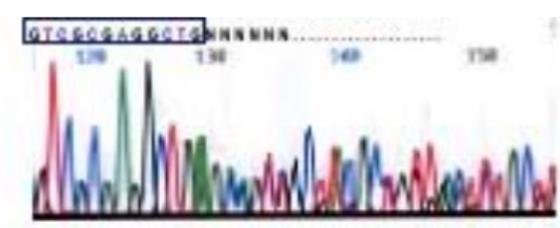
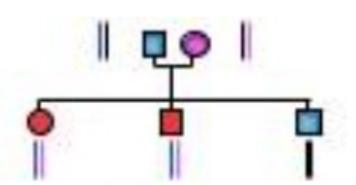


# Vérification ADN recombinant par séquençage

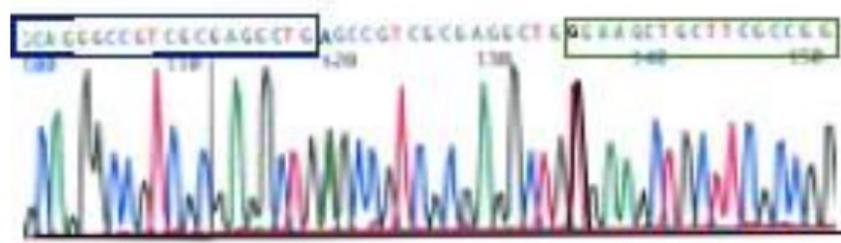


## Séquencage Sanger :

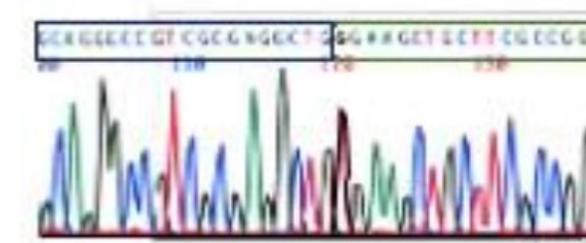
dénaturation, hybridation des amorces, élongation



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

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