

Fiche Tut' Rentrée

UE11

I/ Analyse moléculaire

- Analyse grâce aux acides nucléiques : **ADN (95% des cas)** ou **ARN (instable)**
- Echantillons de quelques microgrammes extraits à partir de **cellules nucléées** → **Pas à partir de GR**
- Techniques **très sensibles**

A) Extraction d'ADN et d'ARN

ADN : ♥ +++

Prélèvement de sang sous EDTA → Lyse des GR avec une solution hypotonique → Etape de la protéinase K → Extraction au phénol-chloroforme → Précipitation de l'ADN à l'éthanol froid



ARN :

Plus difficile à étudier, très sensible aux RNases A, peu utilisé en diagnostic de « routine », analyse l'expression d'un gène

Extraction des ARN poly-A : Homogénéisation des cellules dans un tampon (inhibition des RNases endogènes) → Précipitation différentielle entre ADN & ARN → Passage des ARN dans une colonne d'oligo-dT → Elution → Précipitation à l'alcool éthylique absolu froid

⚠ Connaître la différence des étapes ADN et ARN

B/ Amplification par PCR

Obtention en grande quantité d'une région d'ADN = **amplification sélective**
 2^n molécules au bout de n cycles, sensibilité ++, contamination ++

- **Borne d'amont et d'aval** (18-20 nucléotides)
- Ingrédients = ADN + amorces + dNTP + tampon $MgCl_2$ + **Taq polymérase** ♥ (ADN polymérase d'origine bactérienne et résistante à la chaleur)
- Etapes isolées
- **Circuit monodirectionnel** (éviter la contamination ++)

DENATURATION → HYBRIDATION → ELONGATION ♥

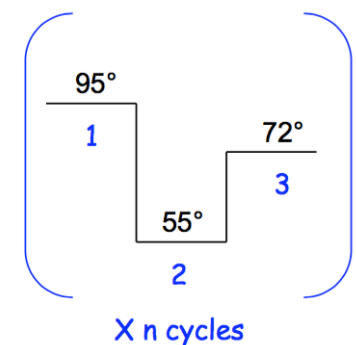
1. Dénaturation



2. Hybridation d'amorces



3. Elongation



C/ Electrophorèse

Vérification de la PCR sur **gel d'agarose** ou **d'acrylamide**

Courant électrique allant **du - au +**

Vitesse de migration en fonction de la **masse** et de la **concentration du gel**
 Après migration, coloration au **bromure d'éthidium** puis fluorescence sous UV

ACHONDROPLASIE

Maladie **monogénique** (non chromosomique) : Gène **FGFR3** responsable, **codant pour le rc d'un FACTEUR DE CROISSANCE FIBROBLASTIQUE ++ / Rare** (1/15000) / La plus fréquentes des chondrodysplasies / **Autosomique dominante** / Anomalie du développement du cartilage

Mutation de novo dans 90% des cas, forme + grave chez les homozygotes, un des 2 parents porteur et malade = 50% de risques d'avoir un enfant atteint
Mutation exon 10, codon 380, position 1138 (*pas à retenir mais savoir que la mutation est toujours au même endroit*) : **G>A** ou **G>C**

Diagnostic évoqué par signe d'appel échographique tardif = **fémurs courts**
Caractéristiques : nanisme + dysmorphie faciale (macrocéphalie, front haut, ensellure nasale marquée) + complications neurologiques + **intelligence strictement normale**

D/ Digestion enzymatique +++

Enzyme de restriction de type II = **ENDONucléase bactérienne**

- **Coupure reproductible et spécifique** de l'**ADN double brin**
- Reconnaissance d'une séquence palindromique (*se lit pareil dans les 2 sens de lecture, comme les mots LOL ou KAYAK*)
- **Coups à bouts francs** ou à **bouts cohésifs**

(Tombe très souvent en QCM et points gratuits avec les diagnostics)

II/ Séquençage de l'ADN

Détermination de la succession de nucléotides composant l'ADN pour vérifier ou faire un diagnostic → **Méthode de Sanger** = **ddNTP**

- Etapes : **Cycles successifs (dénaturation, hybridation, élongation)**
Pas de Taq polymérase, élongation d'un seul brin (une seule amorce)

- Principe :
- **Incorporation AU HASARD** de dNTP ou ddNTP (**arrêt de la synthèse** et couplage spécifique avec des **fluorochromes**)
- **Migration électrophorétique en fonction de leur taille**, lecture des ddNTP par ordre de taille croissante des brins

- Outils : Séquenceurs automatiques, identification des fluorochromes grâce à la caméra laser

SYNDROME DE WOLFRAM

Maladie **autosomique récessive**, **Forme homozygote ou hétérozygote**

Symptômes : surdité + diabète + atrophie optique + troubles neurologiques

Gène responsable : **WFS1** codant pour la wolframine (flux calcique)

2^e mutation au niveau d'un **intron** : **site cryptique d'épissage**

Amplification par PCR : Utilisation d'une **reverse transcriptase**, synthèse d'un simple brin d'ADN (ADNc) à partir d'ARN, hybridation d'une **amorce d'ADN** (succession de T) sur la queue polyadénylée

Recherche de variants d'épissage par **électrophorèse puis identification par séquençage** (*séquençage illisible* → clonage nécessaire)

III/ Clonage moléculaire

Obtenir beaucoup de **copies identiques et pures** d'ADN → Permet de **séparer 2 populations d'ADN**

• Etapes :

- Préparation de l'ADN recombinant (vecteur + insert)
- Insertion d'un fragment d'ADN (insert) dans un vecteur
- Introduction du vecteur dans une cellule hôte (bactérie)
- Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens
- Obtenir un fragment d'ADN pur en grande quantité

• Vecteurs

ADN circulaire double brin, réplication autonome

ADN de taille réduite permettant l'insertion d'un fragment d'ADN étranger et possédant des gènes de sélection pour sélectionner les cellules hôtes ayant intégré le vecteur

Vecteur de clonage	Vecteur d'expression
Isoler physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et amplifier le nombre de copies de cet ADN	Transférer un gène dans une cellule hôte eucaryote

• Plasmides

- **Polylinker** (séquence parfaitement connue)
- **Origine de réplication** : multiplication indépendante dans la bactérie
- **Gène de sélection** : résistance à un antibiotique

Vecteur et insert digérés par les enzymes de restriction → **Hybridation** → **Ligation** des deux par la **T4 DNA ligase** (liaison phosphodiester)

Etape de **déphosphorylation** par une phosphatase (catalyse le retrait du phosphate en 5') nécessaire avant la ligation de fragments d'ADN clivés par des enzymes de restriction générant des extrémités franches

• Transformation bactérienne

- Perméabilisation de la membrane par **choc thermique, électrique ou chimique**
Au final : bactéries avec un type d'ADN recombinant + bactéries non transformées

• Sélection bactérienne

- Etalement sur une boîte de pétri avec une **gélose** (nutrition) + un **antibiotique** (sélection)
- Isolement et amplification des clones bactériens
- Récupération d'une colonie et transfert dans un milieu liquide pour l'amplifier
Au final : **2 populations d'ADN recombinant DIFFERENTES & ISOLEES**

• Sélection blanc / bleu

Jamais 100% d'insertion d'insert → Vecteurs se refermant sans insert
Solution : sélection blanc / bleu avec un polylinker codant pour la **β-galactosidase**

Avec insert	Sans insert
Gène β-galactosidase inactivé (négatif)	Gène β-galactosidase fonctionnel
X-gal incolore non hydrolysé	X-gal hydrolysé colorant le milieu en bleu
COLONIES BLANCHES ♥	COLONIES BLEUES ♥

• Amplification clonale

Milieu liquide adapté à la croissance, récupération et séquençage de l'ADN
Extraction de l'ADN par lyse alcaline, dénaturation, neutralisation, précipitation des protéines et de l'ADN bactérien puis précipitation de l'ADN plasmique

• Cartes de restriction

Séquences de vecteurs que l'on connaît ++

MCS = site de multiclonaage (polylinker)

→ Permet de vérifier que le plasmide contient l'insert

• Vérification par séquençage

- Avant clonage : **séquençage illisible** à cause superposition de l'allèle sauvage et du variant d'épissage (partie d'intron ajoutée)

- Après le clonage : **séparation des 2 produits PCR** → **identification très claire du variant d'épissage impactant sur l'ARNm**

→ Une mutation dans une région intronique peut avoir un impact sur la protéine.

→ Clonage et étude d'expression pour analyser la pathogénicité d'une mutation

• Protéine de fusion

Une fois la protéine surexprimée, il faut pouvoir la suivre :

- Soit avec des **anticorps**

- Soit en utilisant des **étiquettes** ou **Tag** (séquences répétées greffées en C-term ou N-term de la protéine) → **Fluorescents ou reconnus par un anticorps**

Lorsqu'on greffe une étiquette, il faut :

- En N-term : couper le codon ATG et avoir une étiquette commençant par ATG

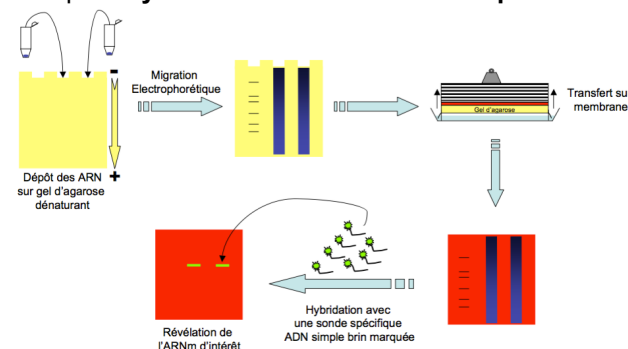
- En C-term : coupler le codon Stop et avoir une étiquette avec un codon Stop

• Transfection des cellules eucaryotes et études d'expression

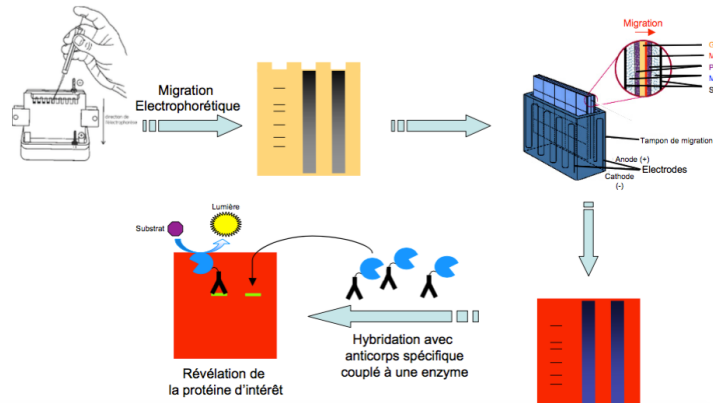
Faire rentrer l'ADN recombinant dans une cellule eucaryote par méthode chimique, physique ou par l'utilisation de particules virales

Analyse de l'expression du gène par :

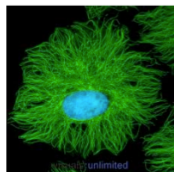
- **Northern-Blot (ARN)** = Lyse des cellules / tissus et purification des ARN → Séparation des ARN en fonction de leur taille, sur un **gel d'agarose dénaturant** par migration électrophorétique → Transfert des ARN sur une membrane → Révélation des ARN d'intérêt après **hybridation d'une sonde complémentaire marquée**



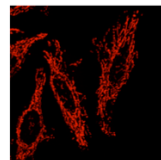
- **Western-Blot (protéine)** = Lyse des cellules / tissus et dénaturation des protéines purifiées → Séparation des protéines en fonction de leur masse, sur un **gel d'acrylamide dénaturant** → Transfert des protéines sur une membrane → **Révélation grâce à un anticorps spécifique**



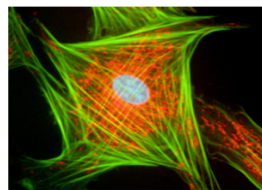
- **Immunofluorescence** (technique permettant de visualiser les protéines **directement au niveau de la cellule**) = Transfection des cellules sur une lamelle avec le plasmide d'intérêt → Visualisation des protéines dans la cellule directement en **microscopie à fluorescence** ou après fixation d'un **anticorps couplé à un marqueur fluorescent**



Marquage :
Réseau des filaments de tubuline (Vert)
Noyau (Bleu)



Marquage :
Réseau des mitochondries (Rouge)



IV/ PCR en temps réel

A/ Principe

PCR **quantitatif** = Méthode particulière de réaction d'amplification en chaîne par la polymérase, permettant de **mesurer la quantité initiale d'ADN** → VS PCR classique = PCR qualitative

Application :

- Quantifier la charge virale
- Déterminer le nombre de copies d'un gène

PCR classique	PCR en temps réel
Mesure de la quantité d'ADN après 35-40 cycles Migration sur gel d'agarose ou acrylamide	Mesure directe de la fluorescence après chaque cycle grâce à un thermocycleur Utilisation de l'agent intercalant SYBR Green

L'intensité de la fluorescence est représentative de la quantité de produit PCR généré et la quantité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin généré.

Dénaturation : ADN simple brin sans intercalation du SYBR Green → Pas de fluorescence

Elongation : Intercalation du SYBR Green à l'ADN double brin → Fluorescence

→ **Phase de plateau** (pas assez d'ADN double brin produit pour lire la fluorescence) puis **point d'inflexion** qui varie en fonction de la quantité d'ADN au départ

Plus on a d'ADN au départ, moins il faudra de cycles pour commencer à observer la fluorescence → Point d'inflexion plus rapide, cycle seuil Ct

Grâce à une gamme d'étalon, on peut quantifier le nb de copie d'ADN à partir de Ct

B/ Sonde TaqMan

2^{nde} technique de PCR en temps réel → Rajout d'une 3^e sonde dans la réaction (sonde **Taqman = quencher + fluorophore** en 5' et 3')

Proximité du quencher et fluorophore proches → Aucune fluorescence

Taq polymérase = **activité exonucléasique 5'-3'** + **activité polymérase 5'-3'**

A l'élongation, la Taq polymérase va dégrader la sonde TaqMan hybridée → Eloignement du quencher et du fluorophore → Apparition de la fluorescence

Spécificité accrue de la réaction avec la 3^e sonde