

UE11 - Analyse du génome



Résumé de la Ronéo 2

I. Principe du séquençage

→ détermination de la **succession de nucléotides** qui compose l'ADN.

Méthode de référence = méthode enzymatique des didésoxyribonucléotides (ddNTPs)
= méthode de **Sanger**

Elle permet de générer des fragments d'ADN de **tailles différentes** !

Le séquençage nécessite :

- ✓ 1 amorce
- ✓ 1 primer
- ✓ ADN polymérase
- ✓ dNTPs
- ✓ ddNTPs

Un ddNTP diffère du dNTP au niveau du **ribose** (perte d'un second oxygène sur le carbone 3'), qui **stoppe la synthèse** du brin d'ADN lors de son introduction.

Les étapes du **séquençage** sont les mêmes que celles de la **PCR** :
Dénaturation/Hybridation/Elongation

❖ Méthode de SANGER

→ **4 réactions indépendantes** contenant chacune 1 seul type de ddNTP.

Les tubes sont mis séparément sur gel d'acrylamide → migration électrophorétique (se lie de bas en haut et par complémentarité).

❖ Méthode AUTOMATISEE

→ **1 réaction**, chaque type de ddNTP est associé à 1 fluorochrome différent.

On fait un **électrophorégramme** via caméra laser (lecture de la fluorescence).

II. Syndrome de Wolfram

→ maladie **autosomique récessive** due à **deS mutationS** dans le gène **WFS1**
(8 exons avec ATG sur le 2^{ème} exon).

Recherche de mutation = amplification par PCR + séquençage des exons de WFS1 (+/- la jonction intron/exon).

On ne peut **séquencer que les exons** (et éventuellement les jonctions intron/exons) !

Résultat 1 : **père** porteur d'**une** mutation (*mais non malade*)
+ **mère** porteuse d'**une** autre mutation (*mais non malade*)
= **enfants malades** (*hétérozygotes composites*).

Résultat 2 : **père** porteur d'**une** mutation (*mais non malade*)
+ **mère** porteuse mais **on n'a rien trouvé au séquençage**
= **enfants malades** et porteurs du seul variant trouvé chez le **père**.

⇒ **variant d'épissage** : on suppose que le variant est présent dans une région **intronique et rallonge l'ARNm**. Il y a eu création d'un site cryptique d'épissage d'où la création d'une nouvelle région codante qui modifie la jonction exon6/7 de l'ARNm d'où une protéine différente et anormale.

On va travailler sur **l'ARNm du patient** :

- 1) Extraction au phénol (*acide*) chloroforme des ARN ;
- 2) On veut amplifier par PCR de ces ARN *MAIS* la Taq est une **ADN** polymérase (d'origine **bactérienne**) donc :

⇒ Il faut d'abord les copier sous forme d'ADN grâce à la **transcriptase inverse** (vient d'un **rétrovirus**), qui synthétise un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un ARN matrice.

⇒ Puis grâce à la **RNase H** on se débarrasse de l'ARNm pour ne garder que le brin d'ADNc.

- 3) Amplification par PCR des ADNc.

Recherche du variant : lors de l'analyse du produit PCR on trouve un fragment plus important pour l'ADNc de la mère, mais ensuite **le séquençage est illisible**, à cause du décalage des séquences des gènes des deux parents qu'on ne peut pas séparer et qu'on est obligés de séquencer en même temps.

III. Clonage moléculaire

Pour identifier la mutation, on doit faire **un clonage moléculaire**.

➔ permet d'obtenir un grand nombre de copies **identiques** et **pures** d'une séquence donnée d'ADN.

➔ utilisation de **vecteurs** : ADN circulaire double brin capable de réplication autonome dans lequel on intègre un **insert** (fragment d'ADN).

Il existe des **vecteurs de clonage** pour le clonage moléculaire (isolent physiquement un ADN et l'amplifient uniquement dans des **bactéries**) ; et des **vecteurs d'expression** pour le clonage d'expression (transfèrent un gène dans une cellule hôte uniquement **eucaryote**).

1) Préparation de l'ADN recombinant :

- Utilisation d'un **vecteur de clonage** = plasmide (un type de vecteur) qui a : polylinker + origine de réplication + gène de sélection (résistance à un antibiotique)

- Le vecteur et l'insert sont digérés par les mêmes enzymes de restrictions

- Ajout d'une ligase pour former les **ADN recombinants**.

2) Introduction du vecteur dans une cellule hôte : transformation bactérienne.

3) Sélection des clones bactériens : sélection blanc/bleu

- le polylinker étant placé dans le gène qui code pour la Bêta-galactosidase, s'il y a un insert au niveau de celui-ci, le gène ne sera pas fonctionnel donc on repique les colonies **blanches**.

4) Amplification clonale des bactéries :

Les bactéries sont repiquées, elles se multiplient, puis il y a une centrifugation, une lyse alcaline et une neutralisation. L'ADN plasmidique est capable de se renaturer, et il reste en suspension dans le tube.

On réalise une **carte de restriction** pour vérifier que l'insert récupéré est bien le bon !

5) **Séquençage séparément des fragments d'ADN pur** : on séquence le variant d'épissage du gène de la mère et on trouve sa mutation intronique pour le diagnostic !

IV. Clonage d'expression

➔ permet d'étudier artificiellement dans les cellules **l'expression** d'une protéine mutante en la surexprimant.

Les **vecteurs d'expression** sont exprimés dans les cellules **eucaryotes**.

La multiplication se fait dans une **bactérie** avant expression dans une cellule **eucaryote** d'où la nécessité d'avoir en plus : promoteur eucaryote + origine de réplication eucaryote + gène de sélection eucaryote

La **transfection eucaryote** se fait avec des réactifs **chimiques** (phosphate de calcium), des méthodes **physiques** et par **infection** (particules virales).

La protéine est synthétisée directement avec à son extrémité **N-term** ou **C-term** un tag (**petit peptide ou protéine fluorescente**) : protéine de fusion. Visualisation en MO à fluorescence (immunofluorescence ou tag fluorescent).

V. PCR en temps réel

➔ **même principe** que pour la **PCR classique** mais en plus on peut mesurer la quantité de produit généré **en temps réel** tout au long de la réaction grâce à un agent fluorescent. Il s'agit d'une technique **quantitative**.

La **mesure** de la fluorescence se fait à la fin de chaque cycle **après l'étape d'élongation** grâce à un agent fluorescent dont l'émission de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'amplicons produit.

Une courbe représente l'intensité lumineuse de fluorescence en **3 phases** :

- **Plateau** : quantité de fluorescence insuffisante pour être détectée ;
- **Exponentielle** : de 20 à 40 cycles environ
- **Plateau** : saturation du système (épuisement du milieu réactionnel).

➔ Le **SYBR Green** est une petite molécule qui s'intercale dans l'ADN double brin et qui émet une fluorescence uniquement quand elle est intercalée !

➔ La **sonde TaqMan** (= fluorochrome + quencher) plus spécifique : **complémentaire** de la région à amplifier où elle **s'hybride**.

Le **quencher** éteint la **fluorescence du fluorochrome** quand ils sont **physiquement proches** sur la sonde.

La polymérase **grignote la sonde lors de l'élongation**, libère le fluorochrome du quencher, et en **séparant ainsi les deux**, il pourra **fluorescer** !