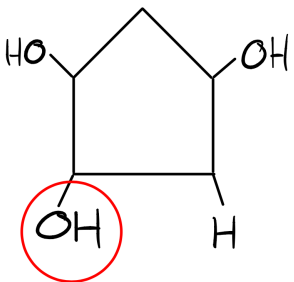
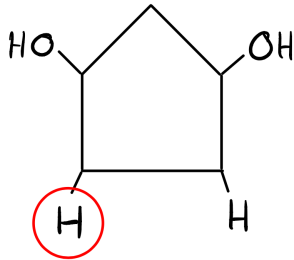


Séquençage – PCR – Clonage Moléculaire

I – Séquençage

1) Principe

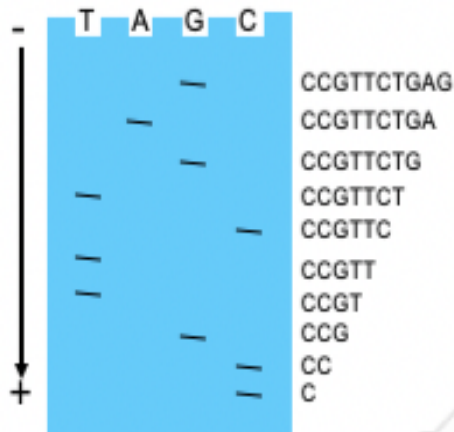
- C'est quoi : Le séquençage permet de déterminer la **succession de nucléotides** qui composent un fragment d'ADN (du genre AATGCG...).
- Comment on réalise un séquençage : Les étapes sont les mêmes que celles que l'on retrouve lorsqu'on réalise une PCR à savoir : Dénaturation, Hybridation et Élongation.
- GROSSE DIFFÉRENCE : dans une PCR on met dans notre tube des désoxyribonucléotides (DNTPs), ici on va rajouter en plus des **DI**désoxyribonucléotides (**DDNTPs**).

 <p>Désoxyribonucléotide</p>	 <p>DIdésoxyribonucléotide</p>
<p>Le groupe OH du haut à gauche permet de faire une liaison avec le phosphate. Celui de droite fait une liaison avec la base azotée. ET le groupe du bas fait une liaison 3'-5' phosphodiester avec un phosphate d'un autre nucléotide.</p>	<p>En enlevant l'oxygène, le nucléotide n'est plus capable de former une nouvelle liaison avec un autre nucléotide.</p>

- A quoi ça sert : Lors de l'élongation, les nucléotides arrivent aléatoirement. Si c'est un DNTPs qui arrive, l'élongation continue normalement. Mais dans le cas où c'est un DDNTPs qui arrive, l'élongation ne peut pas continuer car on ne peut pas créer de nouvelles liaisons, et la synthèse est obligée de se stopper.
- Le séquençage s'effectue uniquement après avoir réalisé une PCR, on a donc un nombre très important de brins. Ce processus s'effectue sur tous les brins, et comme c'est aléatoire, on ne contrôle pas si c'est un DNTPs ou un DDNTPs qui arrive, on se retrouve à la fin avec plein de brins de tailles différentes.

2) Ancienne Méthode : Méthode Sanger

- Dans la méthode Sanger on effectue **4 réactions distinctes dans 4 tubes différents** et il n'y a **qu'un seul type de DDNTPs par tube** (soit A, T, C ou G) +++
- On réalise ensuite une électrophorèse afin de séparer les fragments obtenus. Les brins étant de tailles différentes, ils migrent à des niveaux différents



On a besoin de 2 informations pour reconstituer la séquence :

- La migration des brins nous permet de connaître leur taille et la position du DNTPs. Plus le brin est court, plus il est léger plus il migrera loin. **Le sens de lecture se fait de bas en haut.**
- La colonne indique le DDNTPs du tube. Cela nous permet de connaître quel est le nucléotide présent à telle position.
⚠ MAIS ATTENTION ⚠ on vient de réaliser une élongation. C'est à dire que le brin qui vient d'être séquencé correspond à la **séquence COMPLEMENTAIRE** du brin que l'on veut séquencer.

++ A RETENIR : Dans un QCM où on vous demande de déterminer la séquence d'origine, vous devez lire de bas en haut et donner la séquence complémentaire ++

Ici la séquence d'origine est : **GGCAAGACTC**.

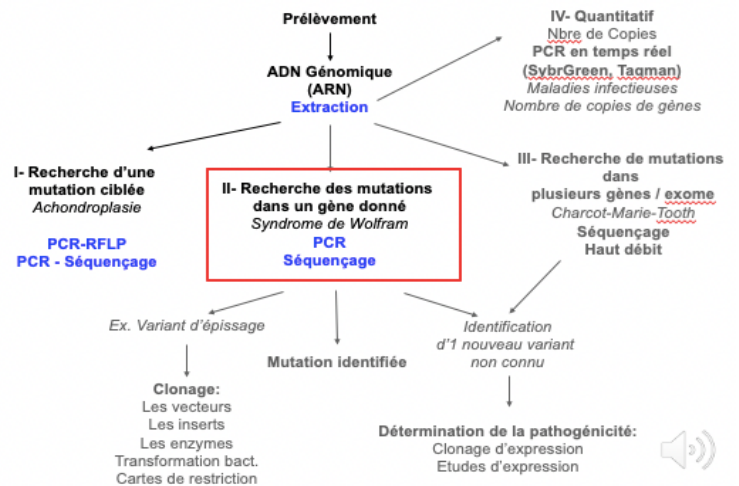
3) Méthode automatisée

- Par la suite la méthode s'est simplifiée. Il n'y plus qu'une seule réaction, dans un seul tube avec des DDNTPs fluorescents.
- Chaque DDNTPs est associé à une couleur :
T → Rouge / A → Vert / G → Noir / C → Bleu
- La lecture de la séquence est donc effectuée dans un automate :
 - ⇒ Un champ électrophorétique permet de connaître la migration et donc la taille du brin ce qui donne la **POSITION ++** (comme tout à l'heure koa)
 - ⇒ Une caméra enregistre la couleur émise et donne le **NOM ++**

II – Analyse d'un gène par PCR + séquençage

Jusqu'à présent on a vu comment repérer une mutation quand on connaît le gène ET l'endroit dans le gène (dans l'achondroplasie par ex)

Maintenant on veut chercher une mutation quand on **connaît le gène mais pas l'endroit exact**. On ne pourra pas effectuer une PCR + digestion enzymatique, on va réaliser une PCR + séquençage.



1) Syndrome de Wolfram dans un « cas classique »

- On prend l'exemple du Syndrome de Wolfram. C'est une **maladie autosomique récessive**. Le gène muté est WFS1 qui comporte 8 exons.

Petit aparté biomol 😊

La traduction commence au codon **START** (ATG) et se termine au codon **STOP**.

Elle ne commence pas au début de l'ARNm et ne s'arrête pas à la fin +++ Il existe des séquences dans l'ARNm mature appelées 5'-UTR et 3'-UTR Untranslated qui ne sont pas traduites.

- Ce qui nous intéresse dans une mutation c'est l'impact qu'il va y avoir sur la **protéine**. On va donc séquencer uniquement les exons (*en l'occurrence on réalise 7 PCR et pas 8 parce que le codon ATG se trouve sur le 2^e intron et on n'a pas besoin de séquencer le 1^{er} mais franchement osef*)
- Ici on est dans un cas classique :
 - ⇒ On a des enfants atteints du syndrome alors on recherche la mutation chez les parents.
 - ⇒ On fait 7 PCR puis 7 séquençages et on voit que les parents possèdent une mutation à l'état hétérozygote (= porteur sain)
 - ⇒ Les enfants ont hérité des 2 gènes mutés chez les parents.

2) Cas un poil plus relou (désolée)

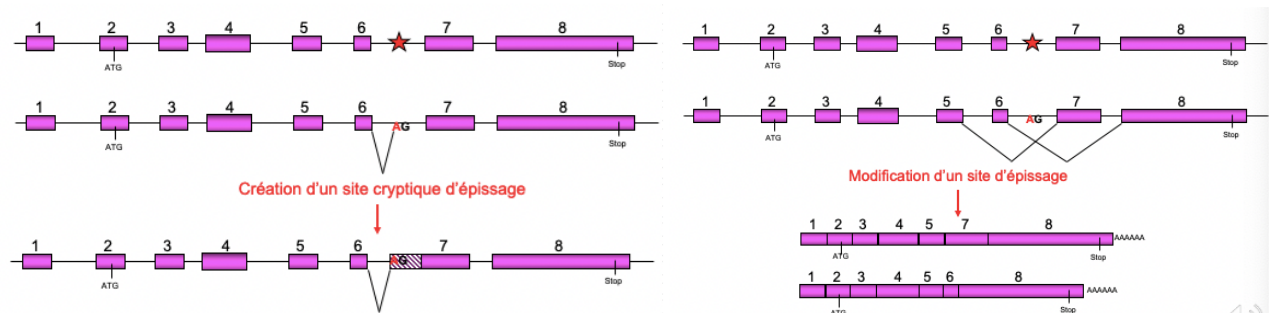
Tu l'aura compris c'est pas toujours tout rose, des fois on galère un peu plus à poser un diagnostic.

- Dans ce 2^e cas, les enfants sont toujours atteints de la maladie MAIS la mutation n'est pas détectée chez 1 des 2 parents. Sauf que c'est impossible car c'est une maladie autosomique **récessive**.
- Comment c'est possible ?? En fait on a réalisé une PCR uniquement sur les exons, car logiquement s'il y a une mutation sur un intron, la séquence n'est pas traduite car elle n'est pas présente sur l'ARNm mature et donc ça n'a pas d'impact sur la protéine. MAIS il existe là aussi des exceptions.

LES VARIANTS D'ÉPISSAGES

En gros, on peut avoir dans certains cas une mutation sur un intron qui peut donner :

- ⇒ **Un site cryptique d'épissage** : la mutation aura pour conséquence qu'il reste une partie d'un intron même après la maturation
- ⇒ **Une modification des sites donneurs ou accepteurs** : par ex on peut avoir la perte totale d'un exon dans l'ARNm



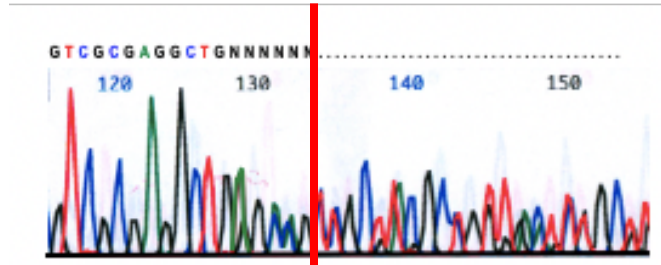
A RETENIR : Une mutation sur un intron peut modifier la maturation de l'ARNm et donc modifier la protéine +++

Ok cool et maintenant on fait comment ??

- Le meilleur moyen de connaître le problème que rencontre la protéine c'est d'étudier directement l'ARNm. Sauf que problème (*oui encore un snif*) c'est qu'on ne peut pas réaliser de PCR sur de l'ARN (la TAQ polymérase ne travaille que sur l'ADN).
- Il faut créer une séquence d'ADN à partir d'ARN. On l'appelle **ADN Complémentaire** ou **ADNc** qui sera la copie conforme de notre ARN.
- On va utiliser une enzyme : la **Transcriptase Inverse**. Elle est présente chez les rétrovirus car ils sont capables de copier leur génome qui est de l'ARN afin de l'insérer dans le génome de nos cellules (*pas très cool*).
- On peut enfin réaliser notre PCR puis une électrophorèse : et bingo on observe 2 tailles différentes :
 - ⇒ 1 brin court = gène sans la mutation
 - ⇒ 1 brin plus long = il permet de déduire qu'il y a création d'un site cryptique d'épissage et on a la confirmation qu'il y a une **MUTATION !!**

III – Clonage Moléculaire

- Maintenant que l'on sait qu'il y a une mutation, on a besoin de l'identifier. On réalise un séquençage.
- Sauf que souci (*parce qu'on n'en a pas eu assez comme ça...*) on a 2 séquences différentes. A partir du site cryptique d'épissage, tous les nucléotides sont décalés et on se retrouve avec 2 séquences superposées l'une sur l'autre. Le résultat est illisible.



- Pour lire les séquences il faut séparer nos 2 produits PCR → C'est là qu'intervient notre fameux CLONAGE MOLÉCULAIRE

1) ADN Recombinant

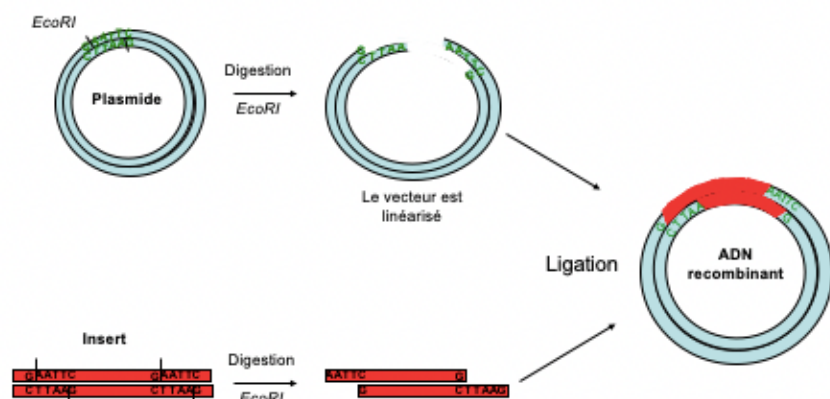
- C'est quoi le principe → il va falloir insérer notre séquence d'ADN dans une **bactérie**
- Pour cela il faut intégrer notre ADN dans un autre ADN circulaire double brin

++ Petit point terminologie ++

Notre séquence d'ADN = **Insert**
 ADN circulaire double brin = **Vecteur**
 Insert + Vecteur = **ADN recombinant**

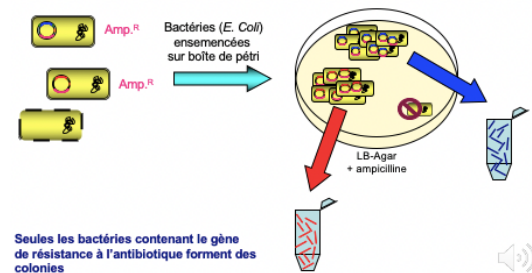
Le vecteur doit posséder **3 caractéristiques / séquences importantes +++** :

- Une **origine de réplication** : il faut que le vecteur ait une réplication autonome et indépendante de l'ADN de la bactérie hôte
- Un **gène de sélection** : ici c'est une résistance à l'antibiotique (mais on y revient plus tard)
- Un **Polylinker** : un site qui permet à l'insert de s'insérer



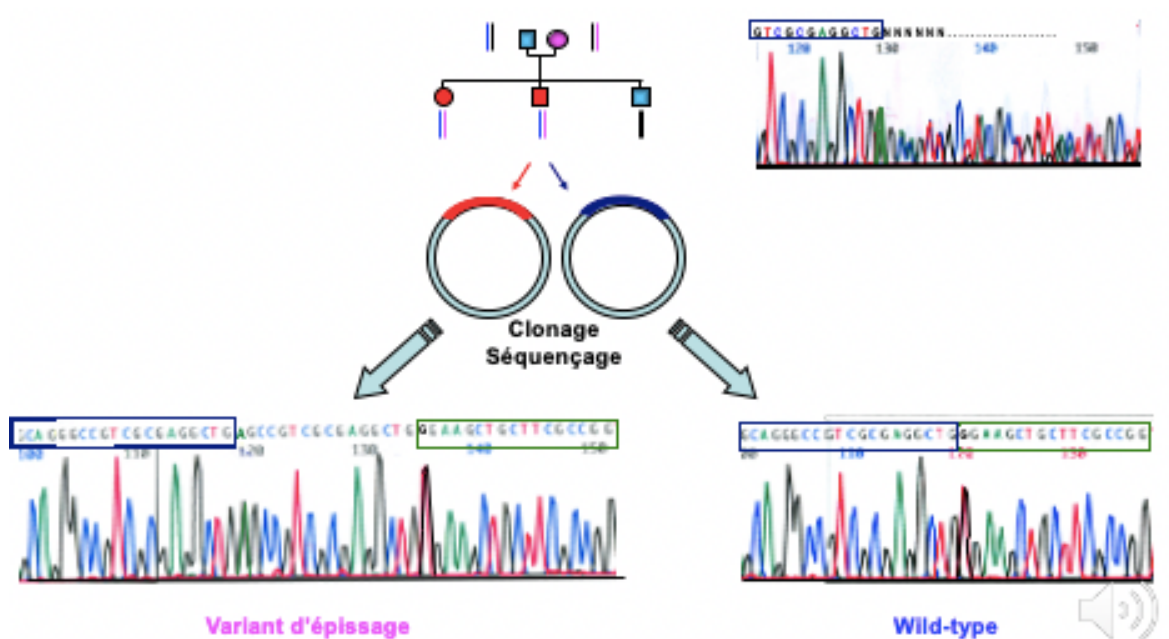
2) Introduction de l'ADN recombinant et sélection des clones

- Une fois que notre ADN recombinant est prêt, on va utiliser un choc thermique ou électrique pour le faire entrer dans la bactérie.
- Ensuite, on met les bactéries dans un milieu nutritionnel ET **en présence d'un antibiotique**. Les bactéries ayant ingéré le vecteur posséderont un gène de sélection et pourront résister à l'antibiotique. Cependant, les bactéries n'ayant pas ingéré de vecteur n'auront pas de gène de résistance à l'antibiotique et vont mourir. Ça nous permet de faire le tri et de garder uniquement les bactéries avec l'ADN recombinant.
- **+++ Là c'est le moment important** : on va avoir une formation de **COLONIE** :
 - ⇒ 1 colonie = 1 bactérie à l'origine ; en fait les bactéries ne se mélangent pas entre elles pour ne pas mélanger leur descendance
 - ⇒ Donc **1 colonie = 1 clone UNIQUE** +++
 - ⇒ C'est ce qu'on appelle la **sélection bactérienne**



3) Résultats

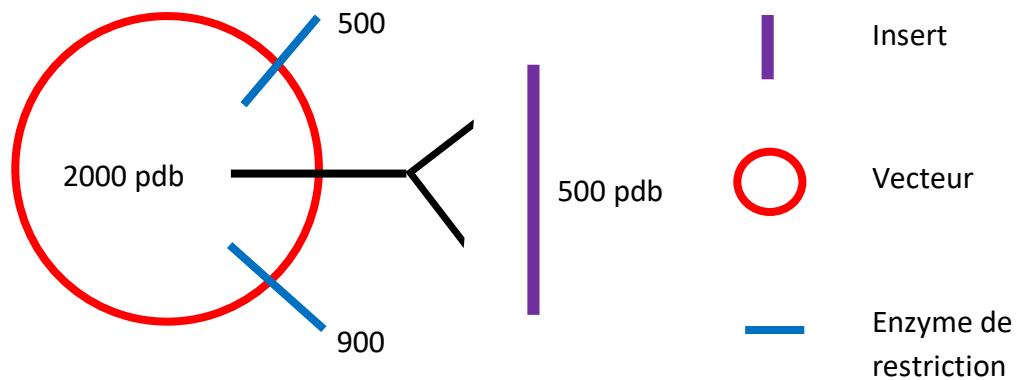
- On récupère notre ADN recombinant des bactéries
- On va pouvoir effectuer **2 séquençages** et donc avoir **2 lectures indépendantes** des **2** différentes séquences



- Dans cette situation, le clonage était donc **INDISPENSABLE** pour déterminer le variant +++

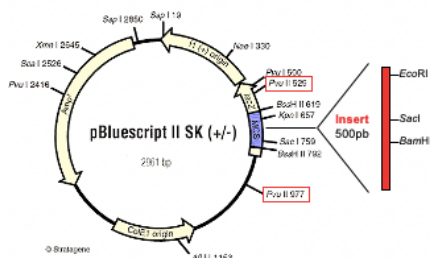
4) Cartes de restrictions ++

Pour terminer on va voir comment fonctionne une carte de restriction (*c'est pas si complexe en vrai*)



- Ça sert à vérifier si le vecteur a bien intégré l'insert.
- Les enzymes de restriction vont découper le vecteur en plusieurs morceaux, et on pourra vérifier leur taille avec une électrophorèse.
- Voilà un QCM type : Donner la taille de chaque morceau après digestion enzymatique avec ET sans insert ?
- Sans insert :
 - ⇒ On calcule d'abord le morceau entre la position 500 et 900 : $900 - 500 = 400$
 - ⇒ Puis on calcule le morceau restant : $2000 - 400 = 1600$
- Avec Insert :
 - ⇒ On fait pareil mais on ajoute l'insert : $900 - 500 + 500 = 900$
 - ⇒ Et encore pareil qu'avant : $2500 - 900 = 1600$
- Ici il n'y a que 2 enzymes et les chiffres sont simples mais en QCM les chiffres peuvent être plus durs et il peut y avoir plus que 2 morceaux.
- Enfin, voilà à quoi ressemble une carte de restriction en QCM (plutôt la 2^e)

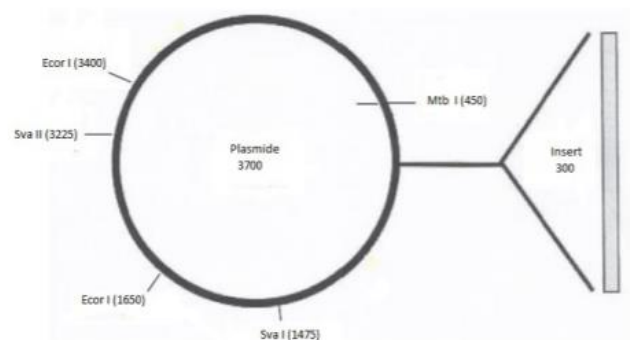
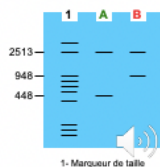
Les ADN recombinants purifiés sont analysés par digestion enzymatique: réalisation de sa carte de restriction.



Digestion PvuII:

A- Plasmide sans insert:
977-529 = 448 bp

B- Plasmide avec insert:
977-529 = 448 bp
+ 500bp = 948bp



Et voilà c'est la fin de ma 1^{ère} fiche, et c'est mon 1^{er} mot de la fin (j'ai attendu siiii longtemps ce moment) ! J'ai pas trop de place pour les dédicaces (je me rattraperai dans les ronéos hihi). Déjà bravo à toi d'en être arrivé là, tu peux vraiment être fier !! Si vous avez des remarques (constructives hein) à me faire sur la fiche n'hésitez pas, c'est votre support de travail donc il faut que ça vous plaise à vous. Pour terminer, je sais que la pré-rentree ça peut faire peur, l'année dernière j'étais paniquée quand j'ai vu tout ce qu'il y avait à faire, et puis au final c'est passé. Donc allez-y tranquilles, avec du travail et de la motivation vous avez toutes les cartes en mains pour y arriver, pas besoin d'être un génie ! Allez, je compte sur vous et bon courage !!