

TUT' RENTREE 2012 / 2013
UE11

Méthodes d'étude et d'analyse du génome

OBJECTIFS :

- Connaître les principales techniques de Biologie Moléculaire
- Comprendre ses applications en génétique médicale

Les principales techniques de Biologie Moléculaire

Analyse à partir du support de l'IG : ADN ou ARN

De n'importe quel type de cellule nucléée

(⚠ GR !!)

Quelques microgrammes suffisent car techniques
sensibles ++ :

→ diagnostic possible à partir d'une cellule

→ risque de contamination élevé donc précaution à
prendre



1 - Extraction d'ADN

A partir de sang, d'une cellule, d'un tissu, d'un cheveu ...

Cas à partir de sang :

A – Prélèvement de sang sous anti – coagulant (EDTA)

B – Lyse des GR avec solution hypotonique

C – Récupération des GB après centrifugation qu'on resuspend dans un mélange détergent (lyse membrane plasmique) + protéinases K (lyse protéines)

D – **Extraction au phénol – chloroforme** : séparation ADN / protéines restantes en 2 phases non – miscibles (solubilité différentielle des molécules)

→ ajout du phénol – chloroforme

→ agitation puis centrifugation

→récupération de la phase aqueuse avec l'ADN

E – **Précipitation à l'éthanol froid** (- 20°C) avec sel

→ ajout de sel et d'éthanol 95° froid

→ apparition d'une méduse d'ADN

→ méduse lavée à l'éthanol 70°

→ conservation dans DNAtèque à 4°C



2 –Extraction d'ARN

Plus délicat car ARN très sensible aux ribonucléases (RNases A)

Moins utilisée

Permet d'analyser l'expression du gène

A – **Homogénéisation** des cellules / du tissu dans un tampon qui :

- inhibe les RNases endogènes
- dénature les acides nucléiques
- dégradent les protéines

B – Extraction par **précipitation différentielle** entre ARN et ADN

Extraction des ARN polyA

C – Passage des ARN dans une colonne d'oligo – dT, permettant la fixation des ARN polyA (purification par affinité)

D – Elution (abaissement force ionique)

E – Précipitation à l'alcool éthylique absolu froid

3 – Amplification par PCR

Objectif : Obtention en grande quantité / Amplification d'une région d'ADN à étudier

→ fragment d'ADN double brin de 150 pb à 3 kb



Il n'est pas nécessaire de connaître la séquence de la région à amplifier : les bornes d'amont et d'aval doivent par contre être connues (18 -20 nuc)

ADN polymérase spécifique thermorésistante (**Taq**)

[Très sensible

[Risque de contamination élevé

3 étapes se succèdent (n cycles)

A. Dénaturation

B. Hybridation des amorces

C. Elongation

A. Dénaturation

→ Séparation des 2 brins



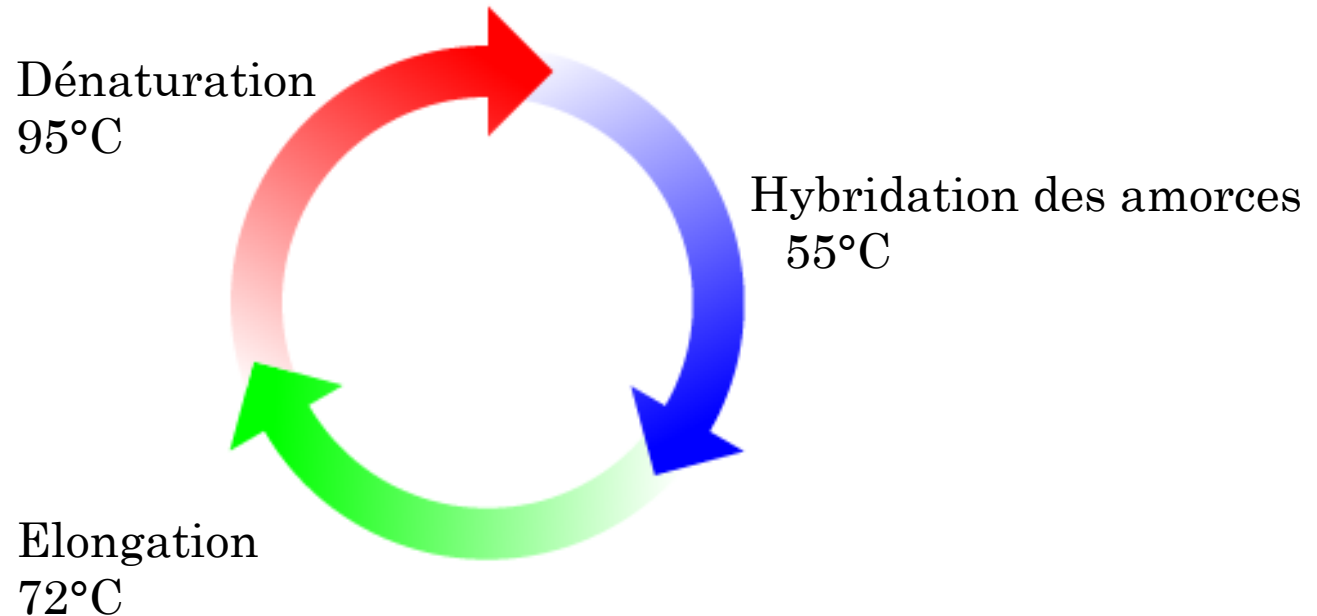
B. Hybridation des amorces/primers

Amorces : oligonucléotides simple brin de
18 – 20 nucléotides

C. Elongation

→ Synthèse du nouveau brin
complémentaire au brin matrice

On obtient 2^n molécules au bout de n cycles



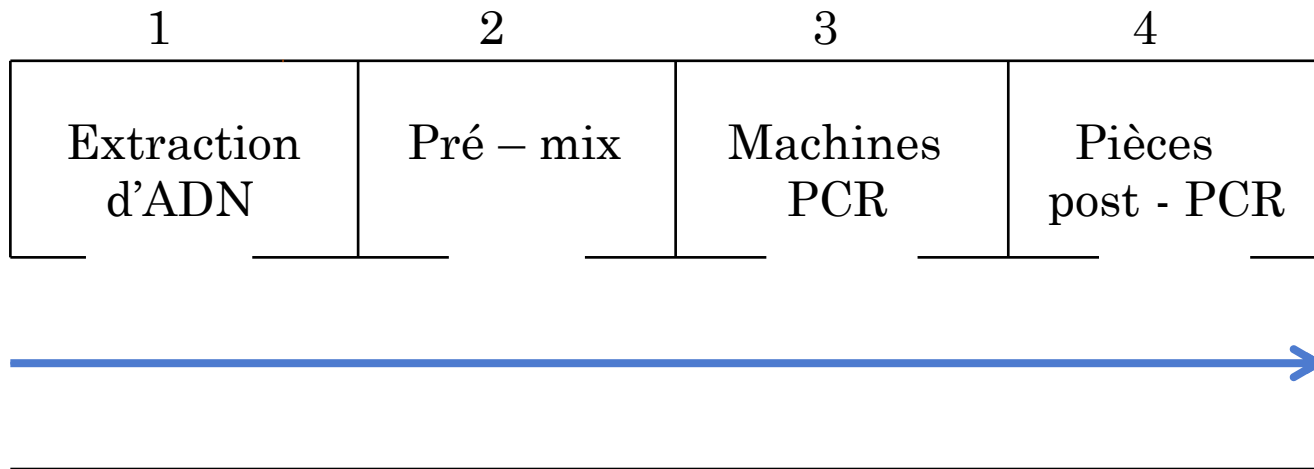
Dans l'automate :

ADN du patient , amorces , désoxynucléotides , Taq polymérase ,
tampon ($MgCl_2$)



Les risques de contamination sont très élevés :

→ **circuit mono - directionnel** constitué de 4 chambres



Le matériel ne doit pas revenir dans les chambres précédentes !

4 – Electrophorèse

Objectif: Vérification de la PCR

Gel d'agarose

Champ électrique

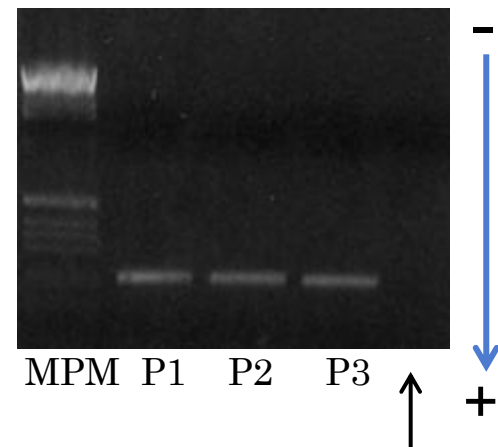
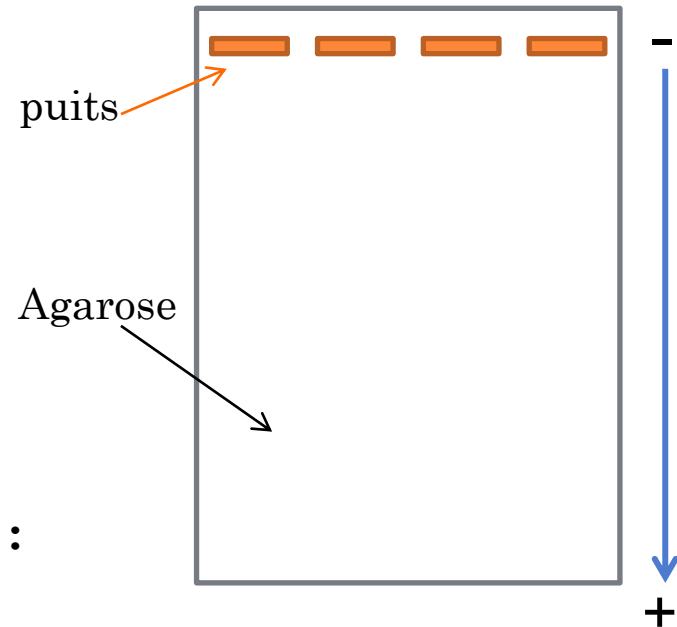
Puits avec amplicons

Vitesse de migration fonction de :

- Masse moléculaire (nb pb)
- Concentration en agarose du gel

Après migration :

- coloration au bromure d'éthidium
- visualisation sous UV



↑
Témoin négatif

5 – Digestion enzymatique par une enzyme de restriction

Endonucléase bactérienne qui coupe l'ADN double brin

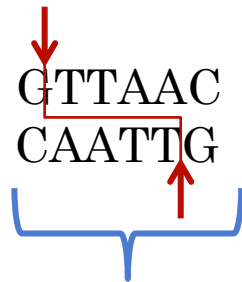
Coupure spécifique et reproductible d'une séquence nucléotidique

3 types d'enzymes de restriction (coupure à distance ou non)

→ Enzyme de restriction de type II :

- reconnaissance de 4 à 8 pb
- coupure au niveau de la séquence reconnue (II)
- séquence palindromique

Exemple :
Eco RI



Séquence Palindromique

GCCATT
CGGTAA

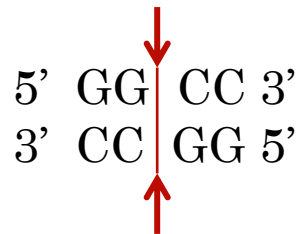


Séquence non - palindromique

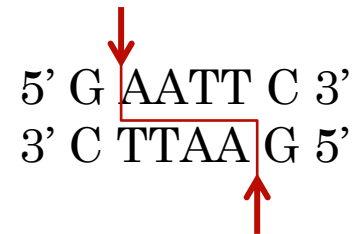
Enzyme de restriction de type II

2 types de coupure :

A bouts francs :



A bouts cohésifs :



Remarques :

- Séquences palindromiques
- Pas d'association spontanée possible (T4 Ligase)

Application en Génétique Médicale

Diagnostic de maladies monogéniques

Un grand nombre de techniques

Evolution technologique rapide

...

Blablabla

Exemple de l'Achondroplasie

Maladie Génétique : mutation du gène FGFR3 (K4)

La plus **fréquente** des chondrodysplasies

Diagnostic évoqué sur signe d'appel échographique
(fémurs courts)



**Petite taille , membres courts , hyperlordose , mains courtes ,
macrocéphalie , front haut , ensellure nasale marquée**



Intelligence normale !!!

Complication neurologique (myélopathie)

Diagnostic radiologique



Exemple de l'Achondroplasie

Transmission autosomique **dominante**

90% des enfants malades naissent de parents non – atteints

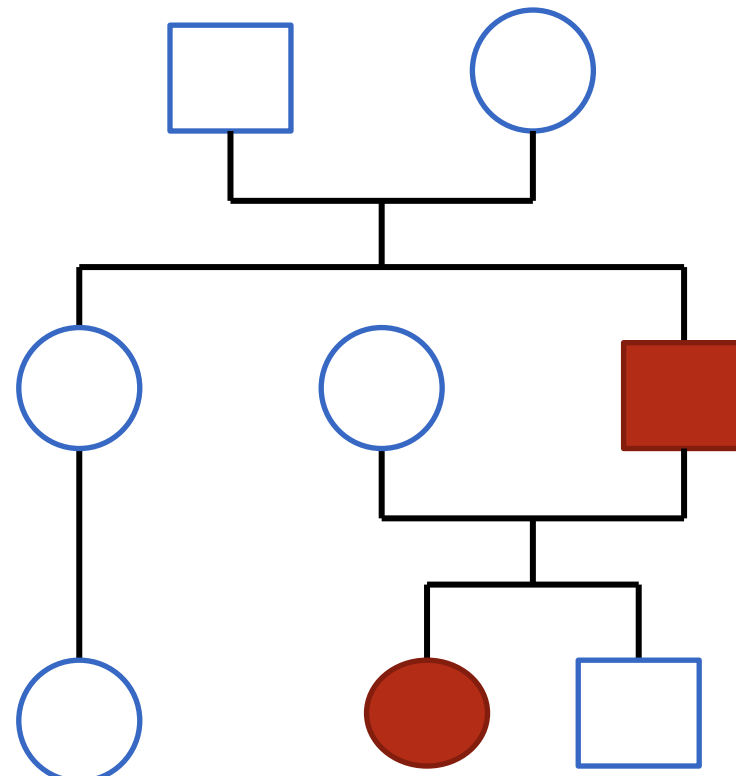
→ **néomutations** +++

Forme plus graves chez les homozygotes

Parents sains

Un enfant malade hétérozygote
→ néomutation

Un petit – enfant malade
Un petit – enfant sain
→ parent hétérozygote



Exemple de l'Achondroplasie

Gène responsable (FGFR3) code pour le RC d'un facteur de croissance fibroblastique , qui régule la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse

Deux mutations (**substitutions**) différentes au niveau du même
nucléotide (position 1138 / codon 380) :

Séquence sans mutation : TAC ³⁷⁹ GGG ³⁸⁰ ³⁸¹ GTG
Gly

Séquences mutées : TAC AGG GTG OU TAC CGG GTG

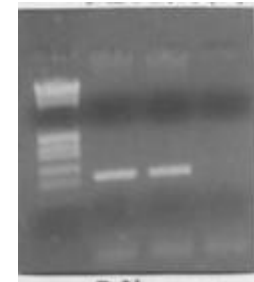
Arg Arg

G → A G → C

Devant un signe d'appel échographique :

- 1 – Extraction d'ADN à partir de cellules amniotiques
- 2 – Amplification (PCR) d'un fragment de 164pb encadrant la position 1138

- 3 – Vérification des amplicons sur électrophorèse



← 164pb

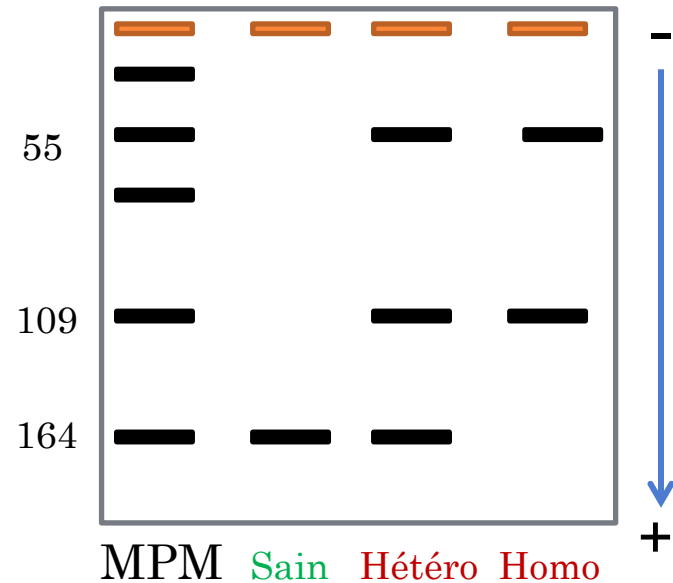
- 4 – Digestion des amplicons par deux enzymes :
 - si G > A : Bmfl
 - si G > C : HpaII

Si l'une ou l'autre des enzymes coupe le fragment de 164pb, c'est qu'il y a reconnaissance de la séquence mutée provoquant l'achondroplasie.
→ individu malade

Mutation G > A

→ BfmI

- Si sain : 164pb
- Si malade hétérozygote : 164 + 55 + 109
- Si malade homozygote : 55 + 109



Mutation G > C

→ HpaII

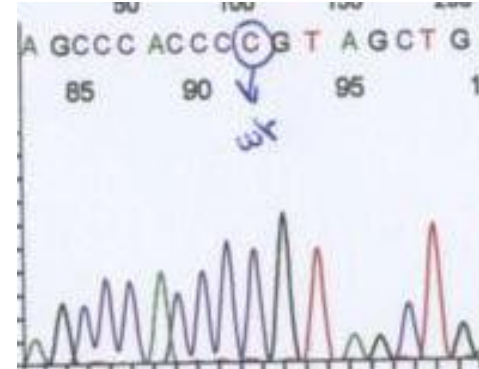
- Si sain : 164pb
- Si malade hétérozygote : 164 + 55 + 109
- Si malade homozygote : 55 + 109

Remarque : à partir du nombre de fragments, on sait s'il y a mutation ou non mais on ne sait pas laquelle !

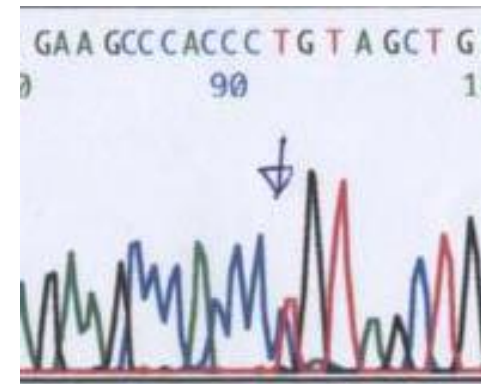
5 – Vérification par séquençage

Séquencer : connaître la succession des nucléotides sur la séquence étudiée

- Wild – type : 5' ... TAC **GGG** GTG ... 3'
3' ... ATG **CCC** CAC ... 5'



- Mutation **G** > **A** : 5' ... TAC **AGG** GTG ... 3'
3' ... ATG **TCC** CAC ... 5'



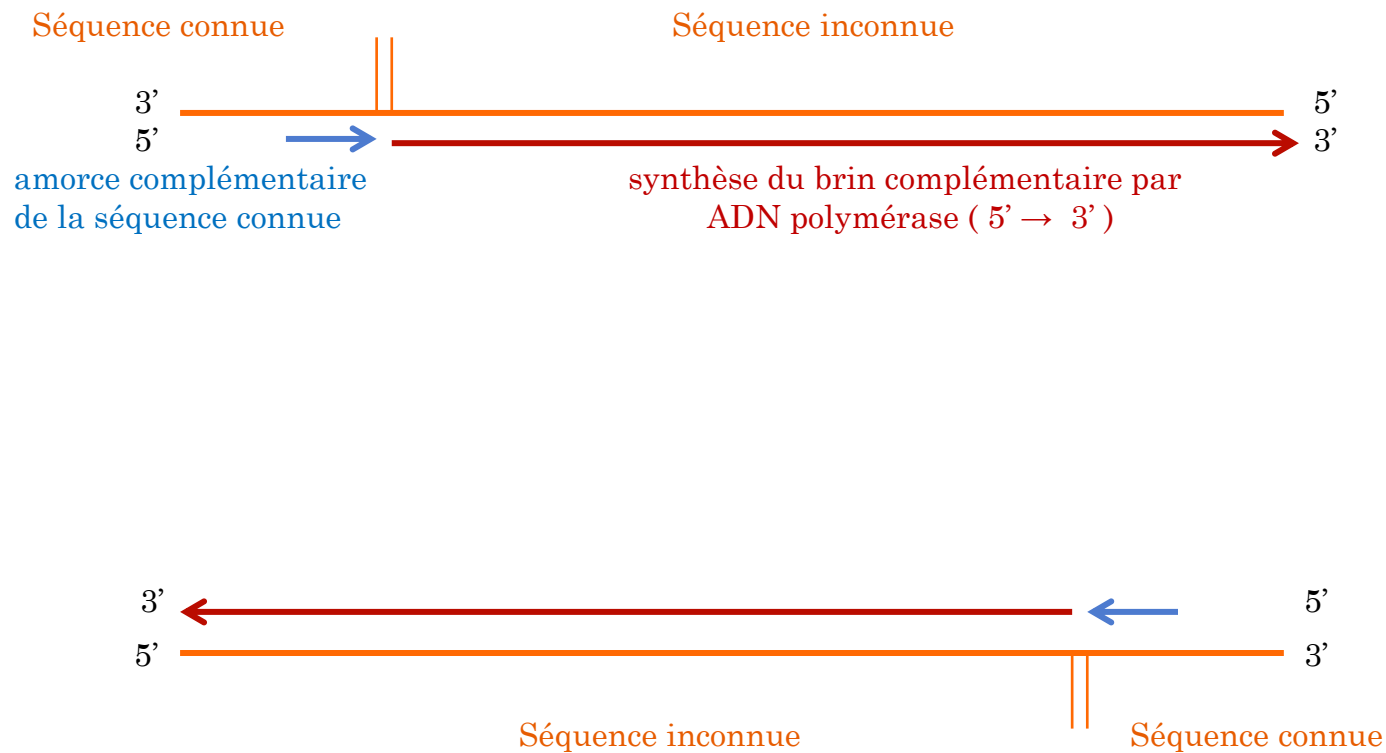
Remarque : deux pics (T et C) car hétérozygote



On séquence le brin complémentaire !

Le séquençage de l'ADN

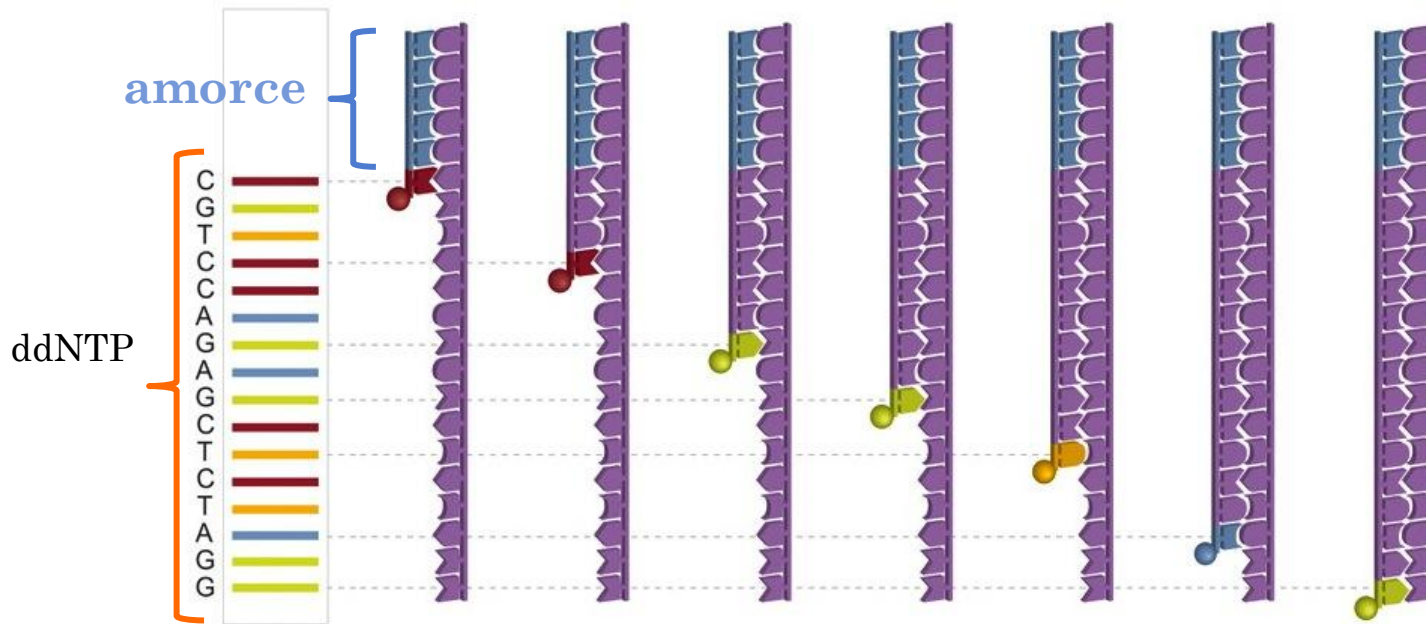
Principe général :



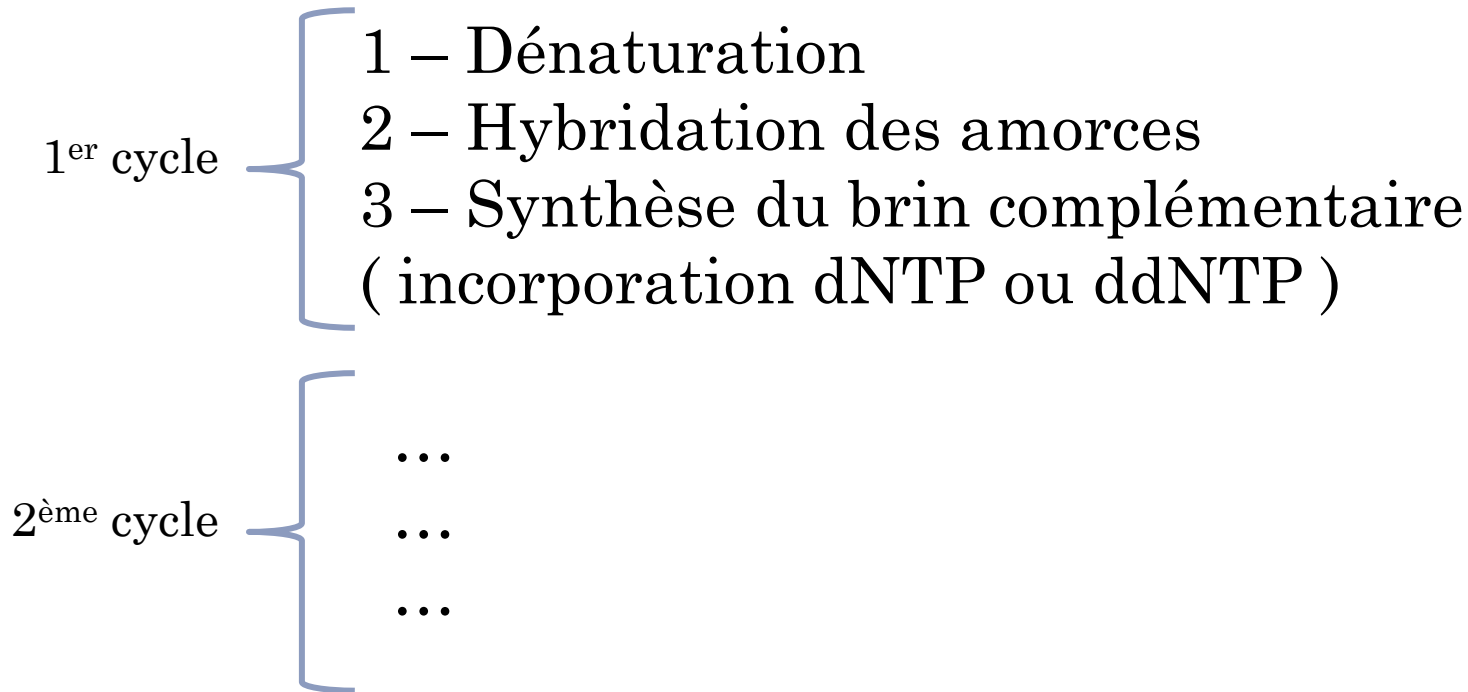
Méthode enzymatique des di-désoxynucléotides (Méthode de Sanger)

L'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire (à partir d'une **amorce**) en incorporant au hasard des dNTP ou des ddNTP.

Les ddNTP sont couplés à un fluorochrome (chacun de couleur différente) et leur incorporation stoppe l'élongation du nouveau brin.



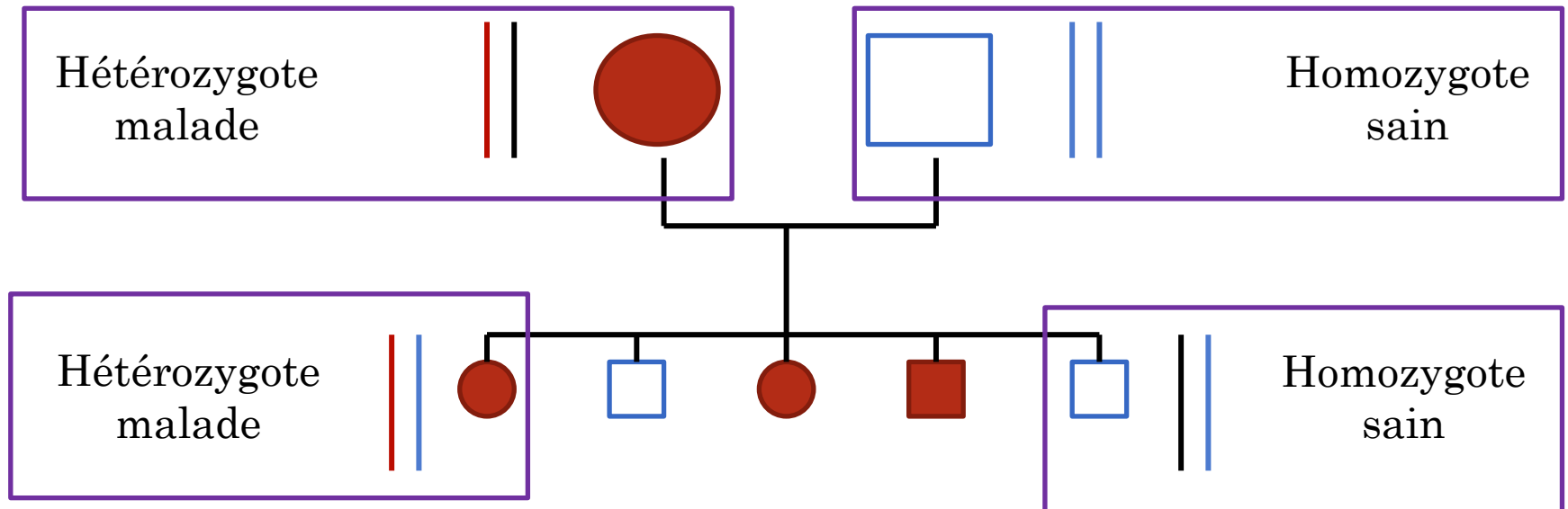
Cycles successifs :



- Obtention de tous les brins (toutes les tailles)
- Lecture des derniers ddNTP par ordre croissant de taille des brins obtenus
(aujourd'hui , séquenceur automatique qui détecte les fluorochromes)
- Séquençage

Recherche de mutation

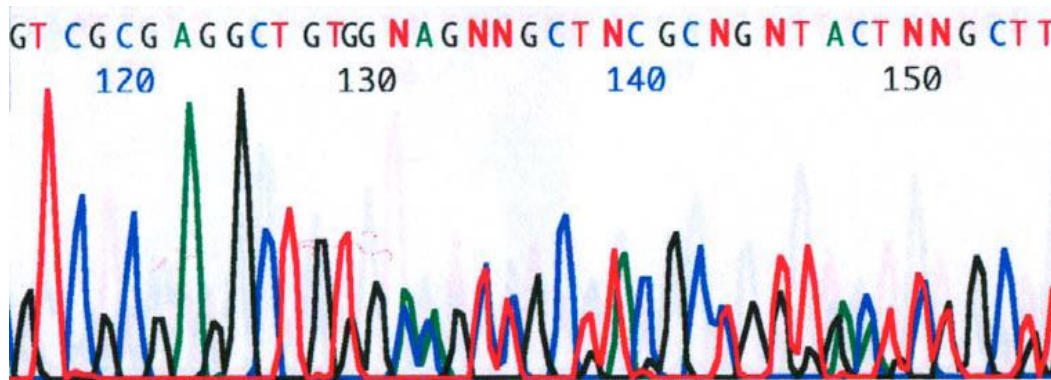
Cas de maladie autosomique dominante
→ un seul allèle muté entraîne la maladie



Problème :

Individu hétérozygote : lors du séquençage , superposition des pics de couleurs différentes (un allèle sain / un allèle malade)

→ mauvaise lecture du séquençage



n cycles successifs → brins de chaque taille et aussi ceux de même taille en « plusieurs exemplaires » : **pour une taille de brin donnée**, le séquenceur automatique va lire différents ddNTP selon si brin complémentaire de l'allèle sain ou complémentaire de l'allèle malade
→ superposition des pics → séquence illisible (**N**)

En gros :

Chez un malade hétérozygote, on a la superposition du séquençage de l'allèle sain et du séquençage de l'allèle muté.

Pour le cas de l'**achondroplasie** : un seul nucléotide qui diffère entre allèle sain et allèle muté → ça passe

Pour le cas d'une maladie où il y a ++ de différences entre l'allèle sain et l'allèle muté → ça passe pas : on n'arrive pas à savoir ce qui ne va pas au niveau de la séquence de l'allèle malade

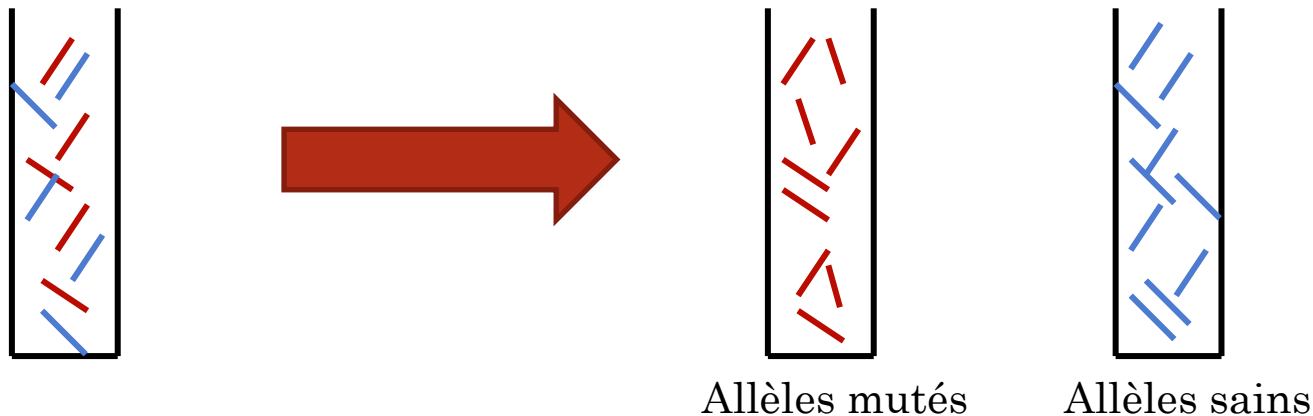
Du coup :

On va séparer les allèles mutés des allèles sains, faire deux séquençages à part et les comparer : on va voir les différences entre les deux séquences ! (combien de nucléotides modifiés ? / insertion , délétion , substitution ? ...)

Le clonage moléculaire

Objectif: Permet d'obtenir une grande quantité de **copies identiques** absolument **pures** d'une séquence donnée d'ADN

→ Ce qui va permettre de séparer les allèles mutés des allèles sains



4 grandes étapes :

- 1 – Préparer l'ADN recombinant (Vecteur + Insert)
- 2 – Introduire l'ADN recombinant dans une cellule hôte (bactéries ++)
- 3 – Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens
- 4 – Obtenir un ADN recombinant pur en grande quantité

1 – Préparer l'ADN recombinant

Vecteur :

- ADN circulaire double brin, capable de se répliquer de façon autonome
- De petite taille, permettant l'insertion d'un ADN étranger (**insert**)
- Possède des gènes de sélection permettant de sélectionner uniquement les cellules hôtes ayant intégrées l'ADN recombinant

Il existe différents types de vecteurs en fonction de leur taille (utilisés selon la taille des inserts) le plus petit étant le plasmide (et celui dont on parlera ++).



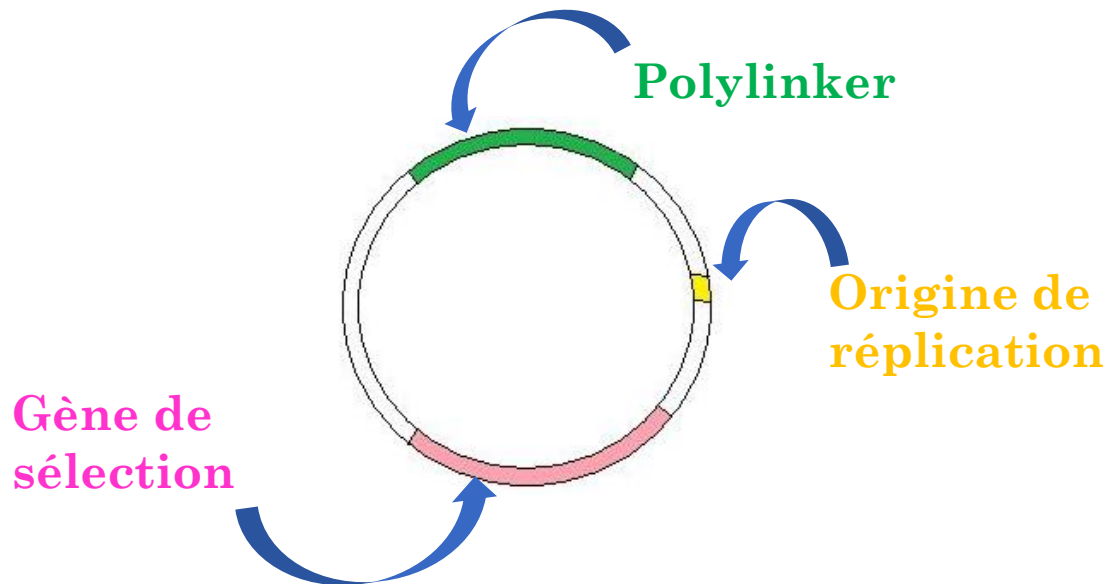
ADN plasmidique (extra-chromosomique)



ADN chromosomique bactérien

3 zones :

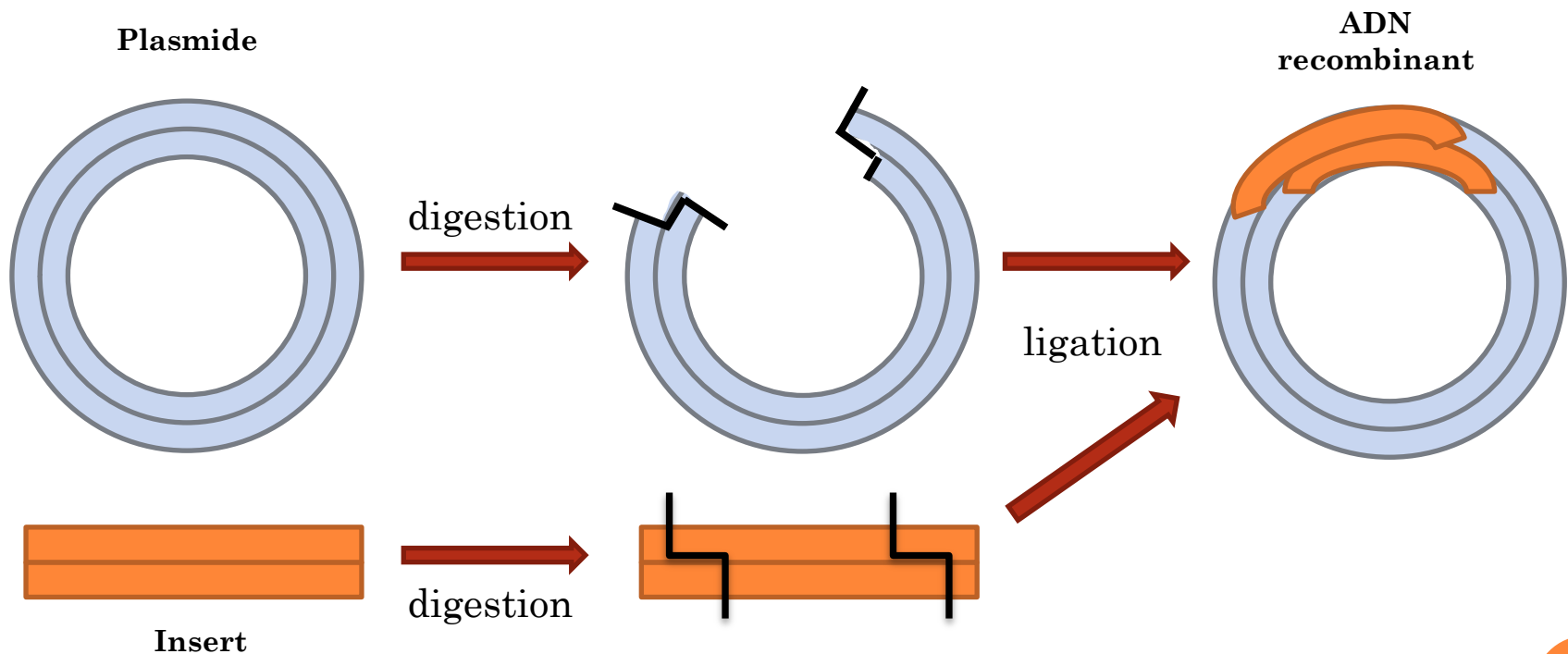
- Origine de réplication
- Gène de sélection (le plus souvent de **résistance à un antibiotique** car cellules hôtes = bactéries !)
- Polylinker (là où les enzymes de restriction vont couper)



Insert :

- Soit produit PCR
- Soit fragment d'ADN d'intérêt

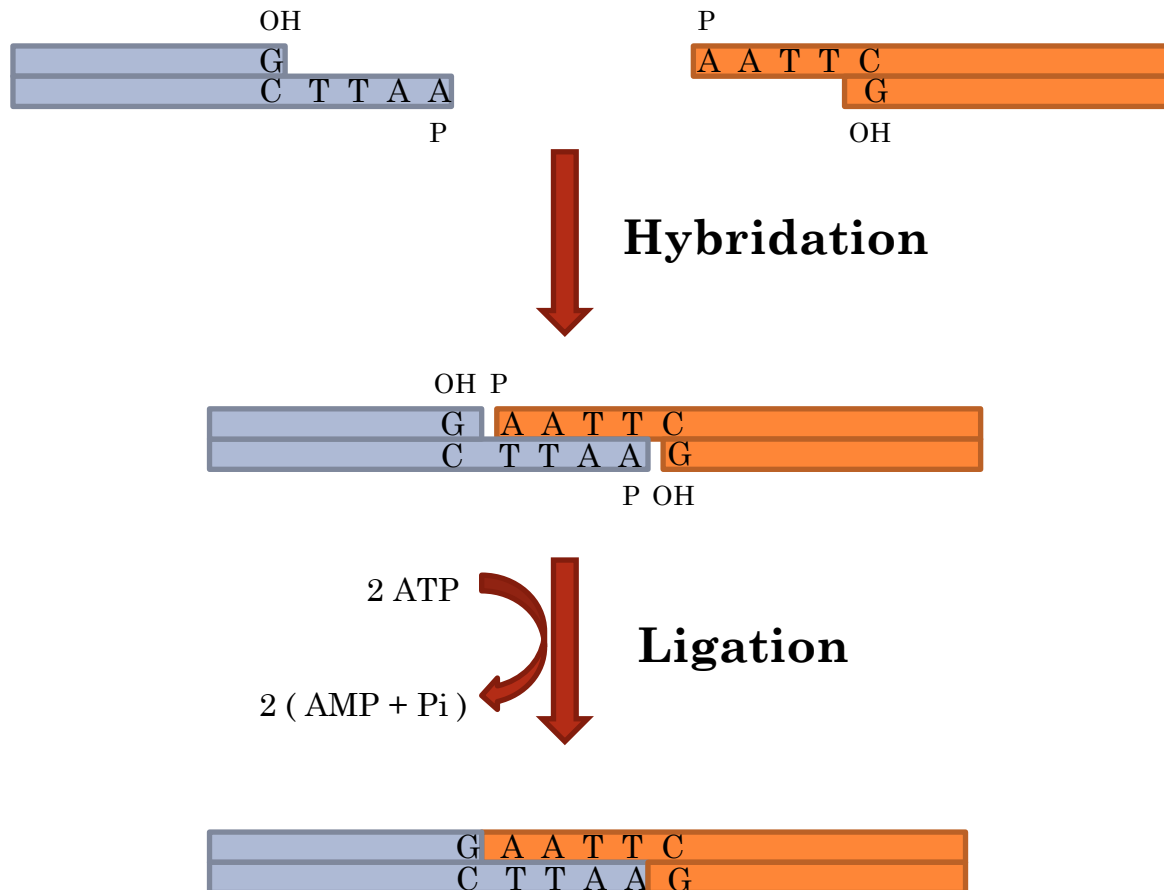
Vecteur et **insert** vont être digérés par la même enzyme de restriction



La ligation

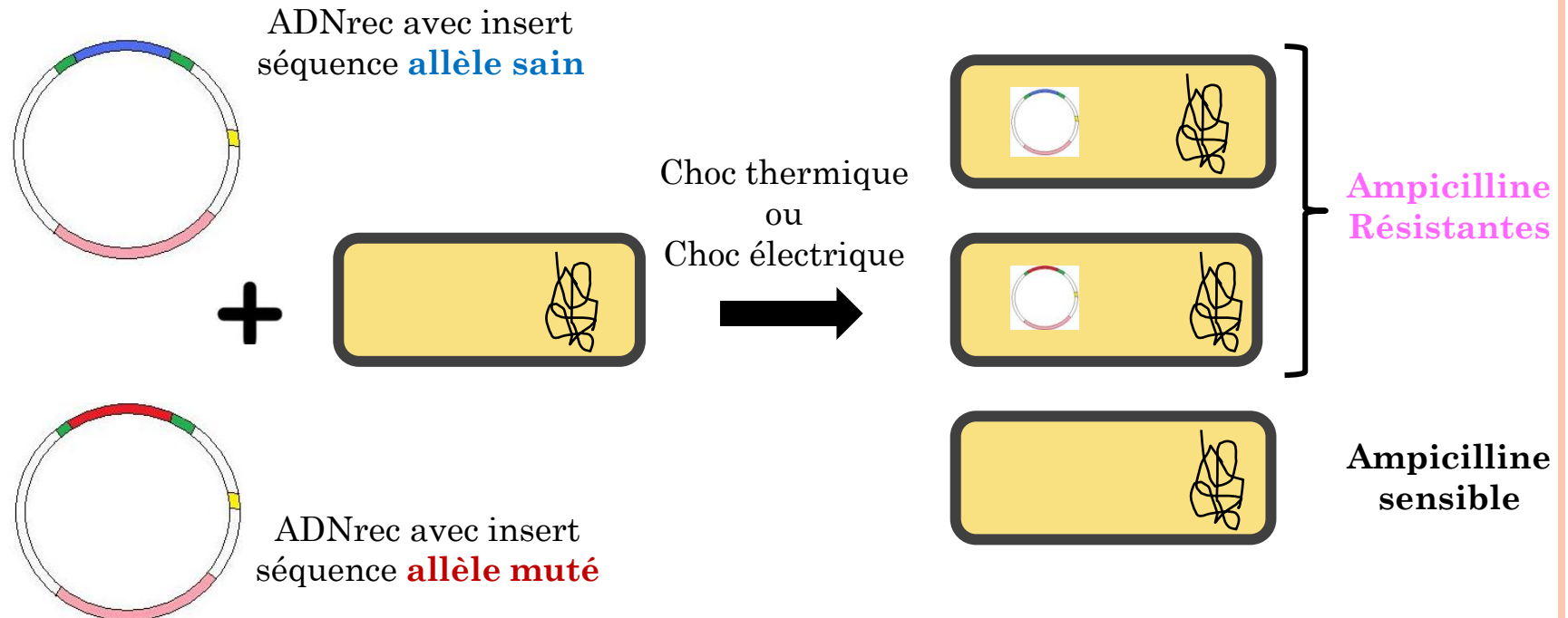
Par la T4 DNA ligase

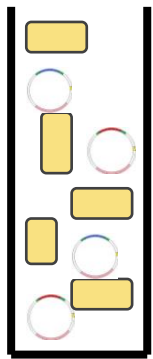
→ enzyme qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester (liaison covalente) entre un OH (3') et un Phosphate (5'), en présence d'**ATP** et d'ions divalents.



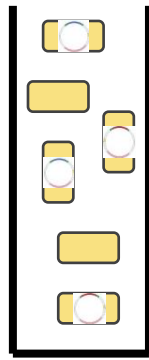
2 – Introduire l'ADN recombinant dans une cellule hôte

Transformation bactérienne :

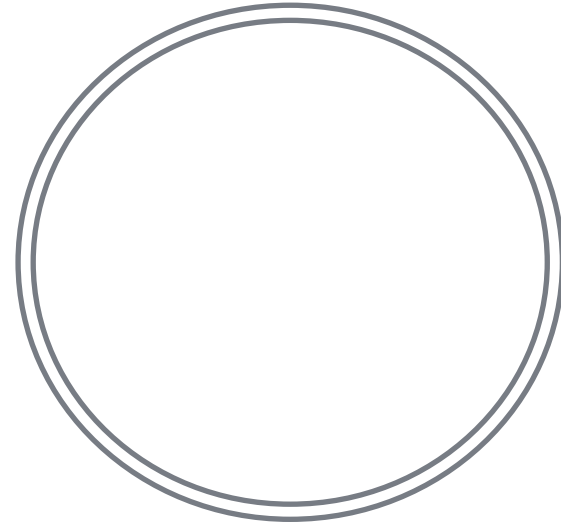




Choc thermique
ou
Choc électrique

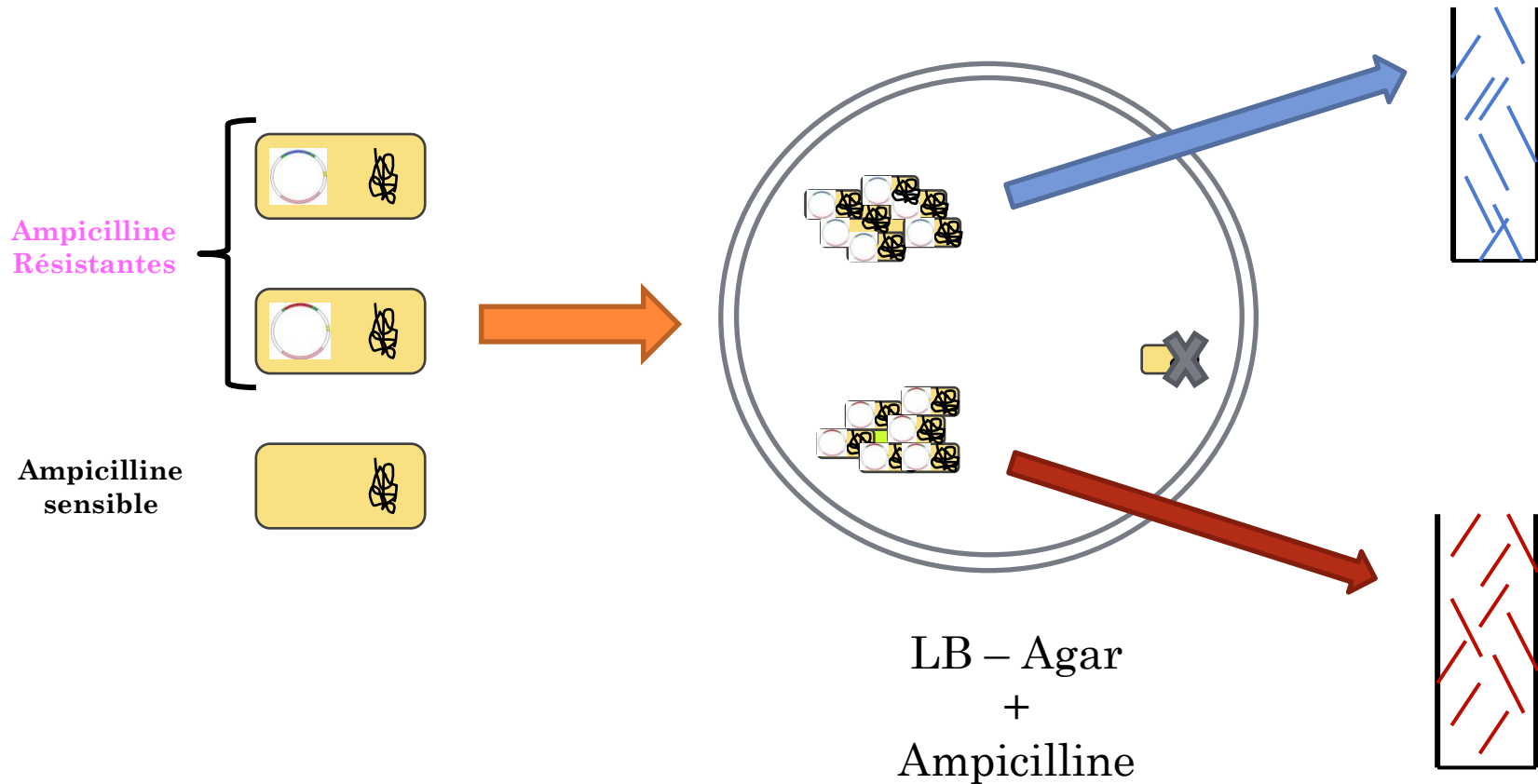


Etallement sur
Boite de Pétri



LB - Agar
+
Ampicilline

3 – Isoler , sélectionner et amplifier les clones bactériens



Seules les bactéries ayant intégrées l'ADN recombinant, et donc le gène de résistance à l'antibiotique, forment des colonies.

4 – Obtenir un ADN recombinant pur en grande quantité

Chaque colonie est placée dans un **mélange LB – liquide et Ampicilline** .

Incubation à 37°C

Centrifugation

Mise en suspension

Lyse alcaline

...

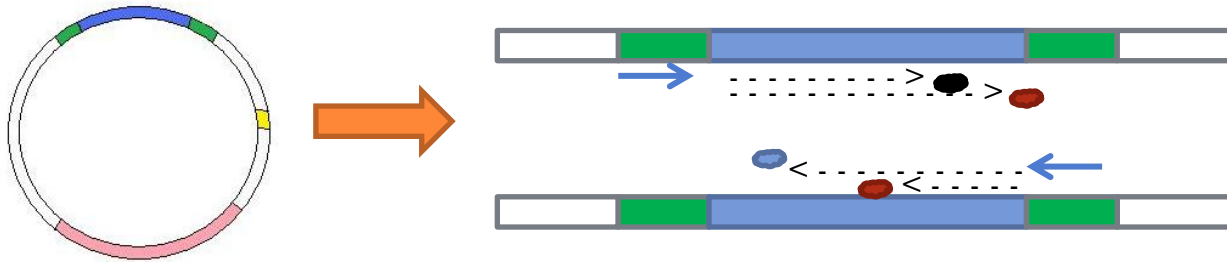
...

Séparation plasmide / [protéines + ADN bactérien]

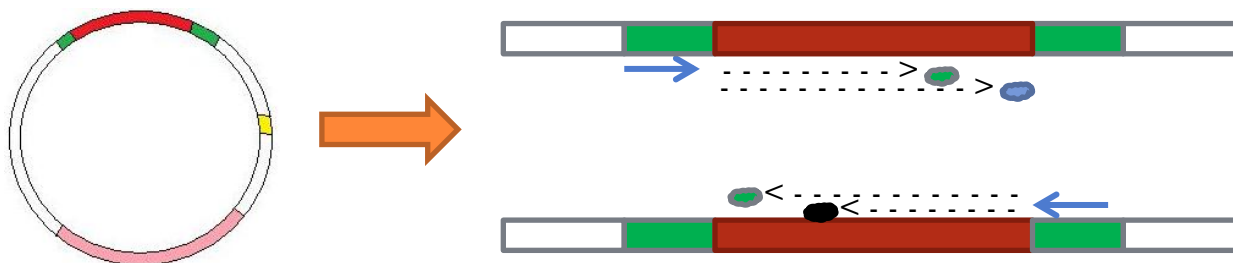
Récupération des plasmides qu'on précipite à l'éthanol froid (avec sel)

Vérification de l'insert par séquençage

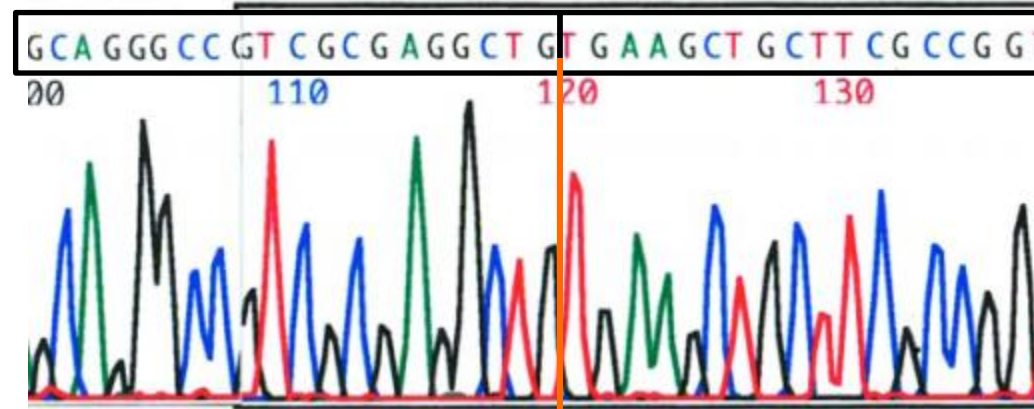
Séquençage de l'allèle sain :



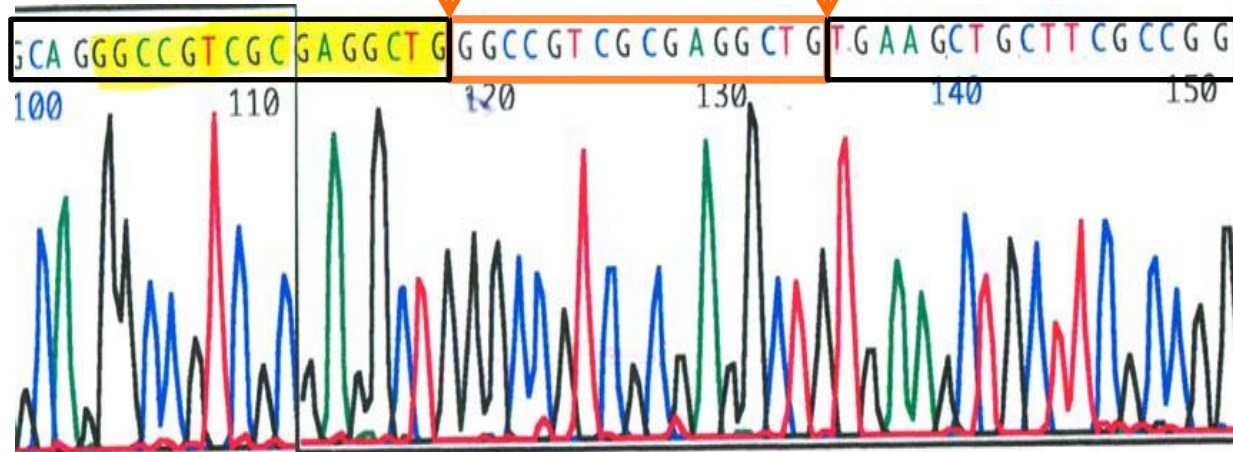
Séquençage de l'allèle muté :



Résultat
séquençage
de l'allèle sain



Résultat
séquençage
de l'allèle muté



Insertion de 16 nucléotides !

Cartes de restriction

Une carte de restriction donne l'ordre des sites de restriction le long de la molécule d'ADN.

Elle peut être utilisée pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert.

Informations apportées:

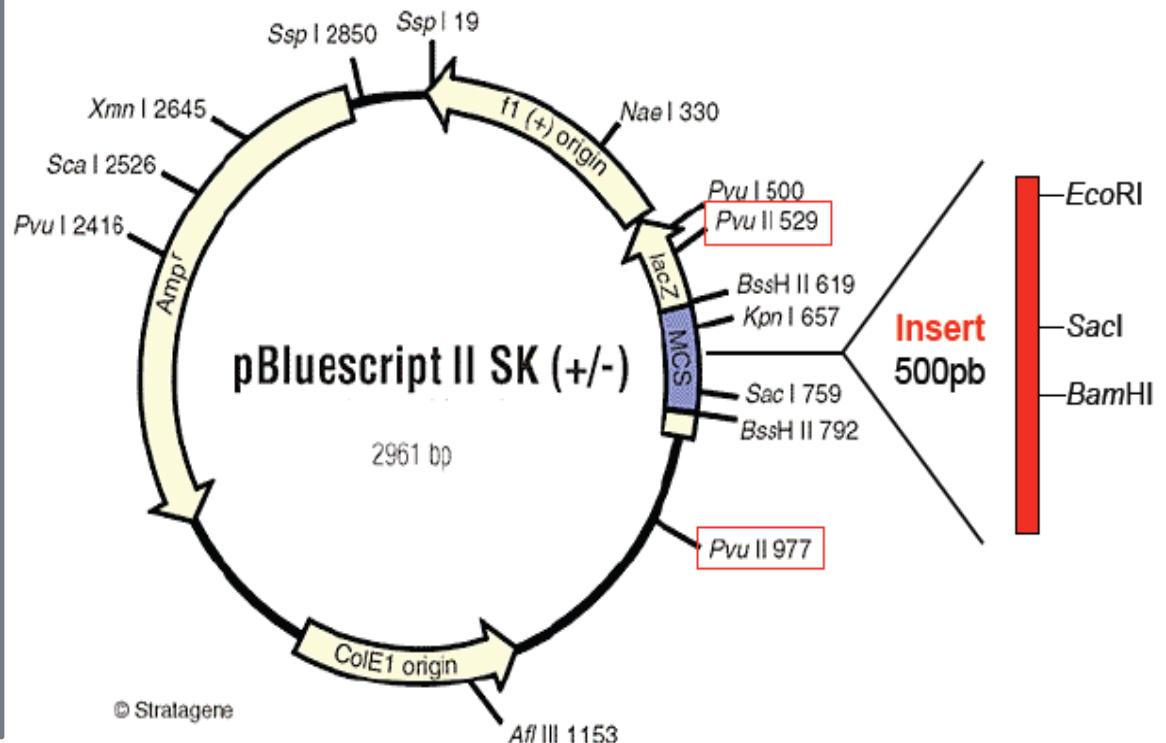
Nom du plasmide

Taille plasmide: 2961 pb

Taille insert: 500 pb

Sites de coupure de différentes enzymes de restriction

→ sites positionnés



Exercice: donner la taille (en nombre de paires de bases) des fragments obtenus après digestion par une ou plusieurs enzymes de restriction, selon si le plasmide a intégré un insert ou non.

Question type CC:

Après digestion enzymatique avec les enzymes **X** et **Y**, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose?

Indiquer la ou les réponse(s) exacte(s).

- A – Plasmides sans insert : ... pb + ... pb
- B – Plasmides avec insert : ... pb + ... pb
- C – Plasmides avec insert : ... pb + ... pb
- D – Plasmides sans insert : ... pb + ... pb
- E – Les propositions A, B, C et D sont fausses

Exemple : Digestion par **PvuII**

1/ Donner la taille des fragments obtenus après digestion par **PvuII** dans le plasmide sans insert

Après digestion enzymatique avec l'enzyme **PvuII**, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose?

Indiquer la ou les réponse(s) exacte(s).

A – Plasmides sans insert : 948pb + 529pb

B – Plasmides sans insert : 2513pb + 448pb

C – Plasmides sans insert : 2961pb + 500pb

D– Plasmides sans insert : 1984pb + 529pb + 977pb

E – Les propositions A, B, C et D sont fausses

Rappel :

Taille plasmide : 2961pb

PvuII coupe au niveau du 529° nucléotide et du 977° nucléotide.

1/ On va donc obtenir le fragment situé entre les 2 sites de coupure de l'enzyme:

$$977 - 529 = 448 \text{ pb}$$

2/ On enlève donc 448 pb au plasmide entier :

$$2961 - 448 = 2513 \text{ pb}$$

➔ Réponse B

Exemple : Digestion par **PvuII**

2/ Donner la taille des fragments obtenus après digestion par **PvuII** dans le plasmide avec insert

Après digestion enzymatique avec l'enzyme **PvuII**, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose?

Indiquer la ou les réponse(s) exacte(s).

A – Plasmides avec insert : 977pb + 529pb + 500pb

B – Plasmides avec insert : 2513pb + 500pb

C – Plasmides avec insert : 2513pb + 948pb

D– Plasmides avec insert : 3461pb

E – Les propositions A, B, C et D sont fausses

Rappel:

Taille plasmide : 2961 pb

Taille insert : 500 pb

PvuII coupe au niveau du 529° nucléotide et du 977° nucléotide
MAIS l'insert va être inséré entre ces deux sites de coupure.

1/ On va donc obtenir le fragment situé entre les 2 sites de coupure de l'enzyme, additionné de 500pb (l'insert):

$$(977 - 529) + 500 = 448 + 500 = 948 \text{ pb}$$

2/ On enlève donc encore 448 pb au plasmide sans insert

$$2961 - 448 = 2513 \text{ pb}$$

OU

On enlève 948 pb au plasmide avec insert

$$(2961 + 500) - (448 + 500) = 3461 - 948 = 2513 \text{ pb}$$

➔ Réponse C

Bon courage !!!

