

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 quelle ϕ nucléée (quelques mg suffisent)
- Techniques très sensibles \rightarrow risque de contamination élevé

1- Extraction d'ADN à partir de sang

A - Prélèvement de sang sous EDTA

B - Lyse des GR (solution hypotonique)

C - Centrifugation, récupération et suspension des GB dans un mélange détergent + protéinases K

D - **Extraction** au phénol-chloroforme : séparation ADN (phase aqueuse) - protéines restantes par solubilité différentielle

E - **Précipitation** à l'éthanol 95° froid (+sel): apparition d'une méduse d'ADN, lavée à l'éthanol 70° et conservée (DNAtèque)

2 - Extraction d'ARN

ARN très sensibles aux Rnases A : plus délicate, moins utilisée

A - **Homogénéisation** des ϕ / du tissu dans un tampon qui inhibe les RNases endogènes, dénature les acides nucléiques et dégradent les protéines

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

Extraction des ARNpolyA :

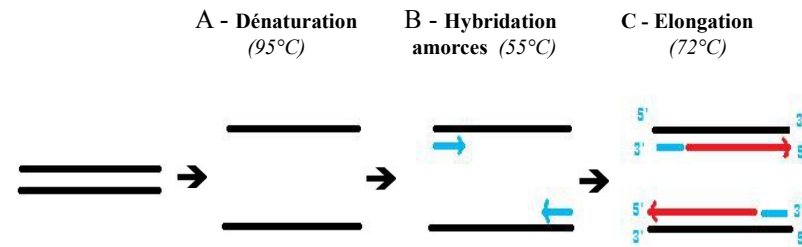
C - Passage des ARN dans une colonne d'oligo-dT

D - Éluion

E - Précipitation à l'alcool éthylique absolu froid

3 – Amplification par PCR

OBJECTIFS: Obtention en grande quantité d'une région d'ADN à étudier (fragment double brin) : 2^n molécules au bout de n cycles

Remarques:

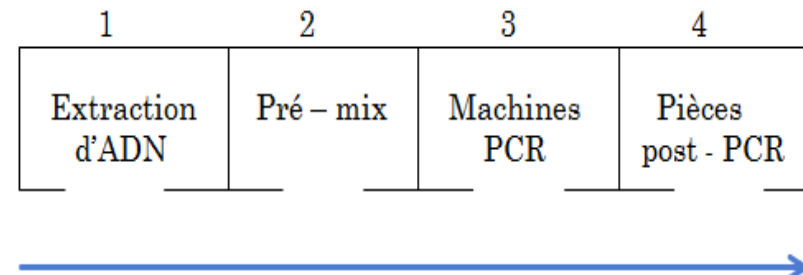
- il n'est pas nécessaire de connaître la séquence de la région à étudier : la connaissance de celles des bornes d'amont et d'aval suffisent
- une amorce est un oligonucléotide simple brin, de 10 - 20 nucléotides
- l'élongation se fait grâce à une ADN polymérase thermostable (Taq)

Dans l'automate : ADN du patient, amorces, désoxyribonucléotides, Taq Polymérase, tampon ($MgCl_2$)

Technique très sensible :

\rightarrow risque de contamination élevé

\rightarrow circuit mono-directionnel



4 – Électrophorèse

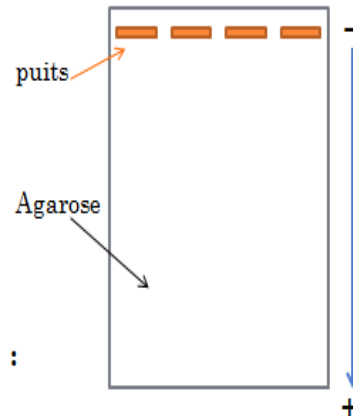
OBJECTIFS: Vérification de la PCR

Vitesse de migration fonction de :

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

Après migration :

- coloration au bromure d'éthidium
- visualisation sous UV

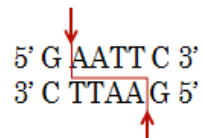
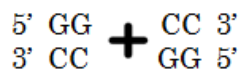
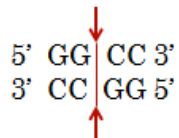


5 – Digestion par une enzyme de restriction

Enzyme de restriction : endonucléase bactérienne qui coupe l'ADN double brin de manière spécifique et reproductible

Enzyme de restriction de type II :

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



Application en Génétique Médicale

→ Exemple de l'achondroplasie :

- Maladie génétique à transmission autosomique dominante **MAIS** due le plus souvent à des néo-mutations (90% des enfants naissent de parents non-atteints)
- Le gène muté code pour le RC d'un facteur de croissance fibroblastique
- La plus fréquente des chondrodysplasies
- Forme plus grave chez les homozygotes
- Diagnostic évoqué sur signe d'appel échographique (« fémurs courts »)

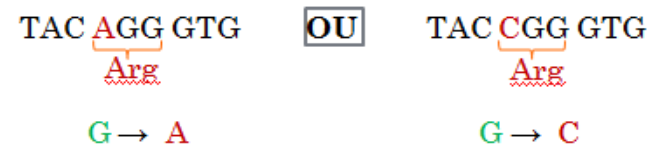
Caractéristiques : petite taille, membres courts, hyperlordose, mains courtes, macrocéphalie, front haut, ensellure nasale marquée et complication neurologique



INTELLIGENCE NORMALE

Deux mutations possibles (substitutions) au niveau du même nucléotide (position 1138)

Normalement, le codon 380 est GGG qui correspond à la Glycine.



Que faire devant un signe d'appel échographique ?

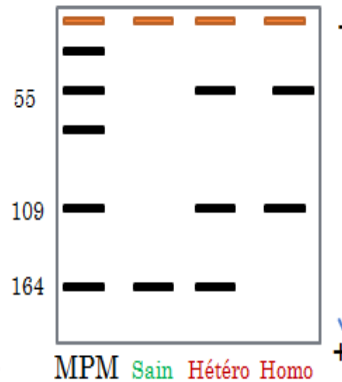
- 1 - Extraction d'ADN à partir de cellules amniotiques
- 2 - Amplification (PCR) d'un fragment de 164pb encadrant la position 1138
- 3 - Vérification des amplicons sur électrophorèse
- 4 - Digestion des amplicons par deux enzymes :
 - si G > A : Bmfl
 - si G > C : HpaII

Quelque soit la mutation (G>A ou G>C)

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

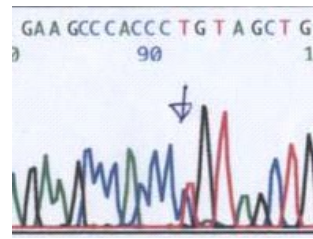
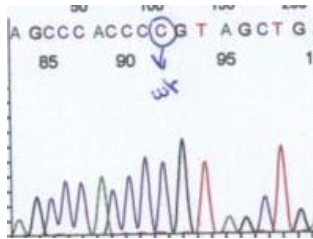
Remarques :

- Si l'une ou l'autre des enzymes coupe le fragment de 164pb, c'est que l'individu est malade.
- A 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



Type sauvage :

5' ... TAC GGG GTG ... 3'
3' ... ATG CCC CAC ... 5'

Mutation G>A : *

5' ... TAC AGG GTG ... 3'
3' ... ATG TCC CAC ... 5'

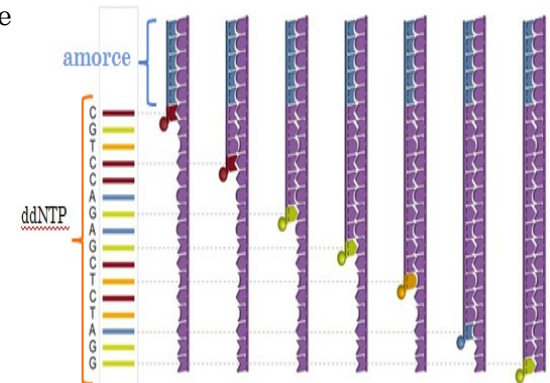
! On séquence le brin complémentaire !

* Au niveau de la position 1138, on obtient 2 pics superposés car le sujet est hétérozygote

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.

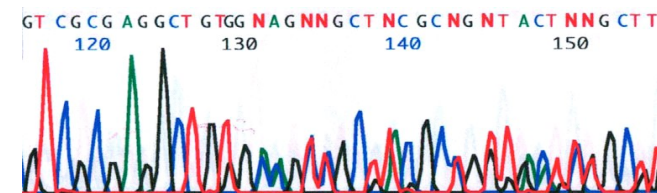


n cycles successifs pour obtenir toutes les tailles de brins :

- 1 – Dénaturation
- 2 – Hybridation des amorces
- 3 – Synthèse du brin complémentaire (incorporation dNTP ou ddNTP)

On peut alors lire les ddNTP (terminateurs de chaîne) par ordre de taille croissante des brins obtenus (aujourd'hui, séquenceur automatique qui détecte les fluorochromes).

Problème au niveau du séquençage d'un individu hétérozygote :

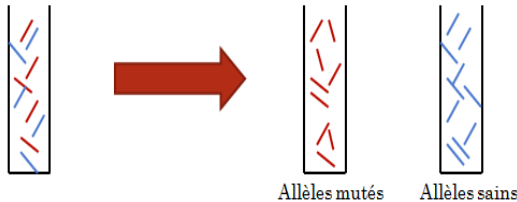


Selon si on séquence le brin complémentaire de l'allèle sain ou le brin complémentaire de l'allèle malade, pour une taille de brin donnée, on va avoir 2 ddNTP différents au niveau des nucléotides subissant une mutation → superposition de pics de couleurs différentes → séquence illisible

On va alors séparer les allèles mutés des allèles sains, faire deux séquençages à part et les comparer : on va voir les différences entre les deux séquences.

Le clonage moléculaire

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



4 grandes étapes :

1 – Préparer l'ADN recombinant (vecteur + insert)

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.



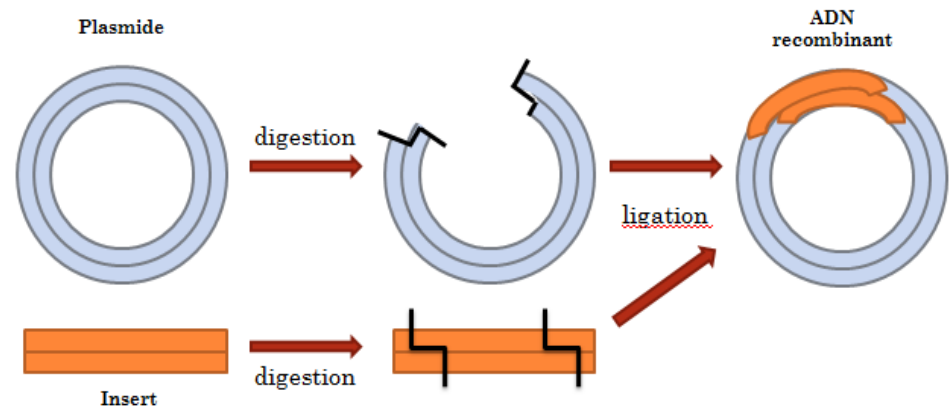
ADN plasmidique (extra-K)
≠
ADN chromosomique bactérien

3 zones :

- ✓ Une origine de réplication
- ✓ Un site polylinker (coupure par les enzymes de restriction)
- ✓ Un gène de résistance (le + souvent à un antibiotique)

INSERT : produit PCR ou fragment d'ADN d'intérêt

VECTEUR et **INSERT** sont dirigés par la même enzyme de restriction

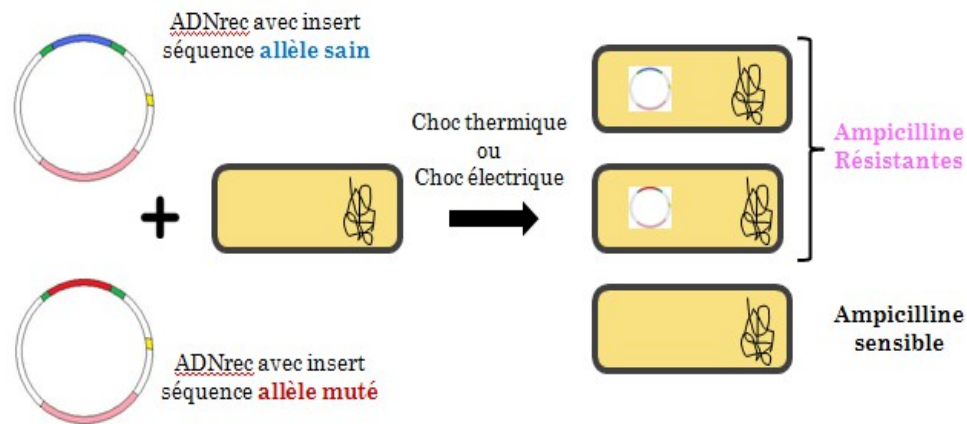


Avant la ligation, il y a une simple hybridation entre les bouts cohésifs de l'insert et ceux du vecteur, c'est à dire la formation de liaisons hydrogènes entre leurs bases complémentaires.

La ligation est la formation d'une liaison phosphodiester (liaison covalente) entre les extrémités 3' OH et 5' Phosphate de l'insert et du vecteur, en présence d'ATP et d'ions divalents: l'enzyme qui catalyse cette liaison est la **T4 DNA ligase**.

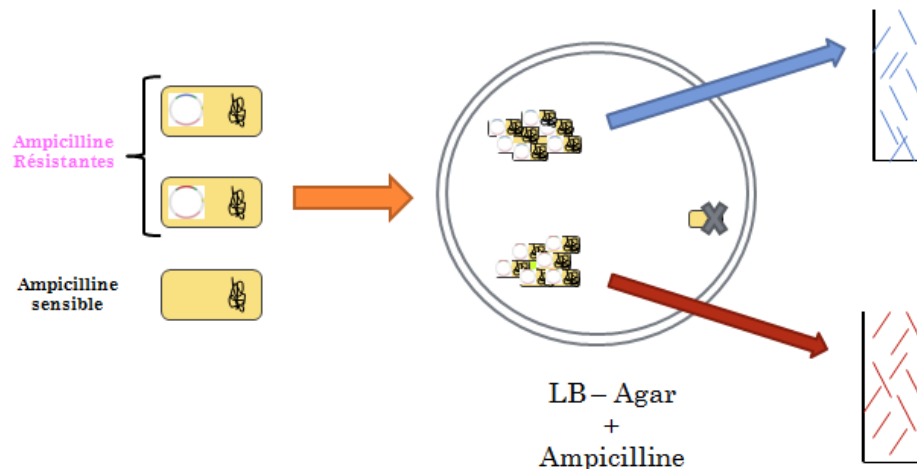
2 – Introduire l'ADN recombinant dans une cellule hôte

En général, on introduit l'ADN recombinant dans une bactérie : on parle de transformation bactérienne.



3 – Sélectionner, isoler 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.



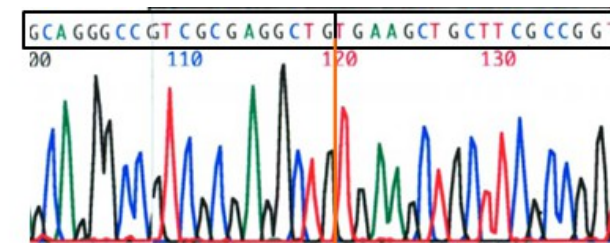
4 – Obtenir un ADN recombinant pur en grande quantité

Après de multiples manipulations, on peut séparer les plasmides des protéines et de l'ADN bactérien.

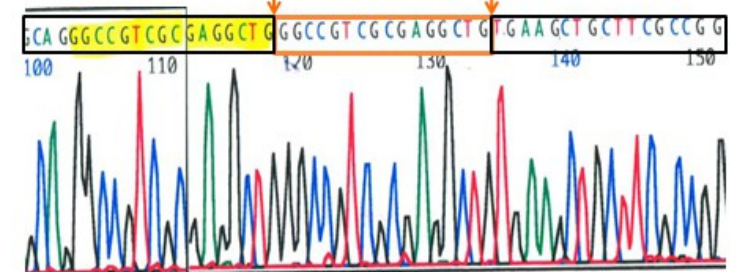
Les plasmides sont alors précipités à l'éthanol froid (+sel).

Vérification de l'insert par séquençage

Résultat
séquençage de
l'allèle sain

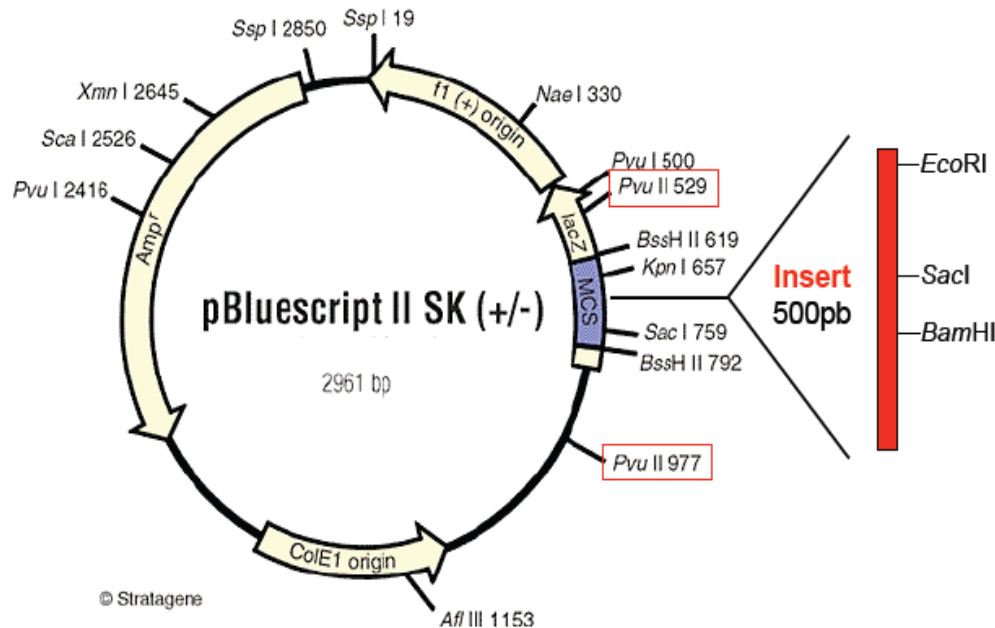


Résultat
séquençage de
l'allèle muté



→ INSERTION DE 16 NUCLEOTIDES

CARTES DE RESTRICTION

Informations apportées:

- Nom du plasmide
- Taille plasmide: 2961 pb
- Taille insert: 500 pb
- Sites de coupure de différentes enzymes de restriction
→ sites positionnés

EXERCICE

1/ 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

2/ 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

Réponses:

1/ **PvuII** coupe au niveau du 529° nucléotide et du 977° nucléotide.

→ On obtient le fragment situé entre les 2 sites de coupure de l'enzyme (977-529 = 448) et on enlève 448pb au plasmide entier (2961 - 448 = 2513)

→ **Réponse B**

2/ **PvuII** coupe au niveau du 529° nucléotide et du 977° nucléotide **MAIS** l'insert (500pb) va être inséré entre ces deux sites de coupure.

→ On obtient le fragment situé entre les 2 sites de coupure de l'enzyme additionné de 500pb (448+500 = 948) et on enlève les 448pb au plasmide sans insert (2961 - 448 = 2513)

→ **Réponse C**