

Syndrome de Wolfram et Clonage moléculaire.

Fiche TTR

1-Le syndrome de Wolfram :

Associe : (4)

- Diabète
- Atrophie optique
- surdité
- troubles neurologiques variables

Ce syndrome est **autosomique récessif**.

Le gène responsable est **WFS1** : composé de 8 exons **dont le 1^{er} est non codant**.

→ Le codon start (**ATG**) est situé sur le **2nd exon**.

WFS1 code pour une protéine appelée Wolframine de fonction inconnue (potentiellement rôle dans la régulation du **flux calcique** permettant la communication entre mitochondrie et réticulum endoplasmique).

2-Séquençage:

Pour rechercher les mutations de WFS1 responsable du syndrome de Wolfram, on réalise tout d'abord un **séquençage des exons codants seulement + jonction avec l'intron (+/-5 nucléotides introniques de chaque coté)** -> **7 PCR** séquencées.

La pathologie étant récessive, les 2 allèles doivent être mutés : soit dans l'ADN codant, soit dans l'ADN non codant.

- > les variants peuvent être différents : **hétérozygotie composite**.

Si après séquençage des exons, une allèle revient normale (=wild type) alors il peut y avoir une mutation d'un **site cryptique d'épissage** : On séquence alors l'ARNm (+ rapide pour voir si il y a délétion d'un exon ou ajout d'une portion intronique dans l'ARNm)

Pour l'ARNm :

- Lyse dans du **phénol à pH acide** (≠phénol chloroforme pour l'ADN)
- recueil des ARNm via leur **queue poly-A (sur support oligo-dT)** qui est **spécifique** du type d'ARNm.

-**transcriptase inverse** (=enzyme **virale**, activité **5'-3'** ADN polymérase) sur **amorce**(= **queue d'oligo-dT**)

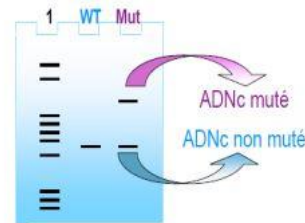
-obtention d'un **hétéroduplex** =hybride ARN/ADNc

-lyse de l'ARN hybridé à l'ADN par la **RNAse H** (seulement si hybridé).

-PCR (sans dénaturation au départ car ADN simple brin)

-Vérification par électrophorèse sur gel analytique.

++savoir lire un gel d'électrophorèse++



-séquençage du variant pour identifier la mutation sur le site d'épissage.

(Il faut identifier les deux mutations pour poser le diagnostic).

Or les 2 allèles sont mélangés dans les cellules de l'enfant : on doit donc séparer les 2 allèles et faire 2 PCR pour pouvoir les séquencer individuellement et rendre cela lisible .

→ On réalise un **clonage moléculaire**.

3-Clonage moléculaire:

Le but est d'obtenir un grand nombre de copies identiques et pures d'une séquence d'ADN.

Pour cela :

- On crée un **ADN recombinant** (=vecteur+insert)
- on réalise une **transformation** bactérienne (insertion de l'ADNc dans une bactérie)
- on réalise une culture/amplification sur boîte de Pétri.
- on réalise une sélection par antibiotique
- on isole les bactéries des deux populations.
- on peut récupérer de l'ADN pur en grande quantité.

Syndrome de Wolfram et Clonage moléculaire.

a) Les vecteurs :

Un vecteur est un ADN circulaire double brin de petite taille, dans lequel on insère un fragment d'ADN de PCR appelé insert.

La réplication du vecteur est dite **épisomiale** = indépendante du génome de la cellule hôte.

Le vecteur possède dans sa séquence **un gène de résistance** à un antibiotique (ampicilline pour une cellule procaryote, néomycine pour une cellule eucaryote).

-> ici on utilise surtout l'Ampicilline car le clonage moléculaire ne se réalise qu'avec des cellules procaryotes= bactéries ou levure pour les gros fragments.

Ici, on utilise des vecteurs de clonage : pour séparer et amplifier un fragment d'ADN (≠ vecteur d'expression : pour observer les effets de l'expression du gène dans une cellule).

On se concentre surtout sur les **plasmides** = molécules d'ADN circulaires bactériens en suspension dans le cytoplasme en plus du K circulaire.

Un plasmide contient :

- une origine de réplication procaryote (pour la réplication épisomiale =indépendante)
- un gène de résistance (antibio)
- un **polylinker/ site multiple de clonage**, là où l'ADN s'insère après ouverture du plasmide par une enzyme.

b) Formation de l'ADN recombinant.

On digère le plasmide et les extrémités de l'insert avec des enzymes de restrictions qui donnent des extrémités franches, cohésives ou combinés (association extrémités franches d'un côté et cohésives de l'autre).

Les extrémités **cohésives (EcoRI)** sont facile à assembler par simple formation de liaisons hydrogènes-> la meilleure solution.

Les extrémités **franches (SmaI)** ont tendance à laisser le plasmide se refermer sur lui-même sans intégrer un insert.

Pour que les extrémités cohésives du plasmide et de l'insert coïncident on ajoute une séquence complémentaire du plasmide(site de restriction d'EcoRI) au début de l'amorce de l'insert, avant de l'amplifier par PCR.

La ligation du plasmide et de l'insert (liaisons phosphodiester=covalentes) est réalisé par la **T4 DNA ligase, avec ATP et ions divalents).**

Pour les extrémités franches on peut réaliser une étape **supplémentaire facultative** de **déphosphorylation**.

Par une phosphatase, on enlève le P des extrémités **du vecteur SEULEMENT** qui devient un OH pour empêcher la fermeture spontanée du vecteur.

Pour des extrémités combinés : 2 stratégies :

- Couper les extrémités sortantes par la Nucléase **S1 : activité 5'-3' exonucléasique**
- Allonger l'extrémité courte par la Klenow **(+dntps) : activité 5'-3' polymérase**

c) Introduction Vecteur dans bactérie.

Pour que l'ADN recombinant puisse rentrer dans la cellule, la membrane de la cellule doit être **COMPÉTENTE**(= perméabilisé par un choc thermique ou électrique)

[Introduction d'ADN dans une cellule procaryote/bactérienne = transformation
Introduction d'ADN dans une cellule eucaryote=transfection]

++La sélection par survie à l'antibiotique permet de savoir si la cellule à inséré un ADN recombinant.++

++La sélection Blanc/bleu permet de savoir si la cellule a intégré un insert.++

Syndrome de Wolfram et Clonage moléculaire.

- > Le **polylinker** (zone d'insertion de l'insert) se trouve au milieu du gène de la B galactosidase. Ce gène est donc gèné lorsqu'un insert se trouve dans le plasmide : il n'est **pas** fonctionnel.

La B galactosidase est une enzyme qui fonctionne en présence de **X-Gal (substrat)** et **d'IPTG (induit l'expression de la protéine)**.

La B galactosidase fonctionnelle **hydrolyse** le X-Gal qui devient bleu.

- **Les colonies blanches ont un insert et doivent être repiquées.**

On récupère les bactéries blanches et on les place sur une boîte de Pétri pour former une colonie (chaque colonie provient d'une bactérie et donc possède un seul type d'ADN : maternel ou paternel)

d) Séquençage :

On récupère l'ADN des bactéries pour le séquencer.

-on récupère les bactéries par centrifugation.

-Mise en **suspension** des bactéries dans tampon :

NaOH :Lyse des **protéines**

SDS :**détergent pour la paroi** bactérienne

RNAses :pour l'ARN bactérien

-Neutralisation de la lyse alcaline par **l'acétate de potassium**

-Précipitation des protéine +ADN bactérien qui est séparé des plasmides par centrifugation

-Précipitation de l'ADN plasmidique +**éthanol et**

NaCl-> on récupère le culot d'ADN plasmidique.

-on vérifie que la séquence est intacte en réalisant une carte de restriction + migration électrophorétique (cf fiche méthodo)

Fin !