

**TP SV
F1**
ADN : ELECTROPHORESE ET SEQUENCES

COURS : SV-F-1.1, SV-F-3, SV-D-2.3 TP : SV-F3, SV-D1, SV-D2



Les TP D1 et D2 nous ont permis d'aborder des techniques d'étude des protéines. Ceci permet une analyse du phénotype d'une cellule ou d'un organisme.

Toutefois, ce phénotype est réalisé sous le contrôle d'un génotype, donc de l'information génétique : Il est donc utile de pouvoir analyser l'information génétique, et donc de pouvoir étudier la molécule d'ADN, support permanent de l'information génétique.

L'étude des génomes met en œuvre une grande diversité de techniques de biologie moléculaire, regroupées sous le terme très général de génétique moléculaire. Ces techniques peuvent être destinées à étudier le génome et son organisation (génomique), tout comme son expression (transcriptomique, protéomique) :

			TP
Etude du génomique ↑ ↓ Etude de l' expression Du génome	↑	- Electrophorèse d'ADN	F1
		- Blot d'ADN (Southern)	F1
		- Séquençage	F1
		- Comparaison de séquence	F1
		- Banques de séquences	F1
		- Détection / amplification : PCR / RT-PCR	F1 F3
		- Electrophorèse d'ARN	F3
		- Blot d'ARN (northern)	F3
		- Etude de transcriptomes : puces à ADN, hybridation <i>in situ</i>	F3
	↓	- Modification du génome : transgénèse, mutagenèses	F3

☒ **Génome** = Ensemble de l'information génétique d'une cellule ou d'un organisme ; ADN (cellules) et ARN (certains virus)

☒ **Transcriptome** = Ensemble des transcrits d'une cellule ou d'un organisme ; ARN

☒ **Protéome** = ensemble des protéines d'une cellule ou d'un organisme ; Protéines

Le but de ce TP est d'envisager un certain nombre de méthodes d'étude de l'ADN et des génomes. Il sera complété par le TP SV-F3.

Programme officiel :

Réaliser et analyser les résultats d'une électrophorèse d'ADN.

Interpréter l'organisation des génomes à partir des résultats de séquençage. (séquençage : technique de Sanger)

Exploiter les données de séquençage pour réaliser des alignements de séquence et comparer les séquences.

Analyser et interpréter des résultats expérimentaux utilisant les techniques de Southern blot, northern blot, western blot, PCR et RT-PCR.

Identifier et justifier les témoins de charge des blots.

Compétences :

Exploiter des méthodes d'étude de l'organisation des génomes :

- Réalisation et exploitation d'une électrophorèse d'ADN

- Réalisation et exploitation d'une comparaison de séquences à l'aide de logiciels

- Exploitation de données utilisant la méthode de Southern blot

Exploiter données utilisant des méthodes d'étude de l'expression des génomes :

- northern blot, western blot, PCR et RT-PCR

Plan du TP :
1. Electrophorèse d'ADN et carte de restriction

1.1. Les enzymes de restriction

1.2. Réalisation d'une électrophorèse

1.3. Cartes de restriction

1.4. Electrophorèses et Blots

1.5. Exercices

2. Séquençage et exploitation des données obtenues

2.1. La technique de Sanger

2.2. Pour information, une technique « haut débit » : le pyroséquençage

2.3. Etude de la structure d'un génome

2.4. Alignements de séquences

3. L'amplification d'un ADN (PCR) ou d'un ARN (RT-PCR)

3.1.Principe de la PCR

3.2.Principe de la RT-PCR

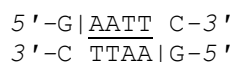
3.3.Exercices

Travail préparatoire :

- 📖 Lecture des informations « techniques » : enzymes de restriction, technique de Sanger, PCR et RT-PCR.
- 📖 Lecture du protocole de l'électrophorèse qui sera réalisée ; rechercher le site de restriction mutée dans l'ADN de phage λ muté
- 📖 Revoir la structure de l'ADN !

1. Electrophorèse d'ADN et carte de restriction**1.1.Les enzymes de restriction****Exemple : EcoRI**

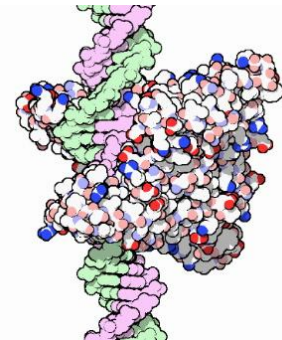
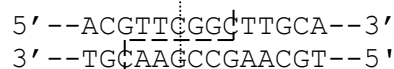
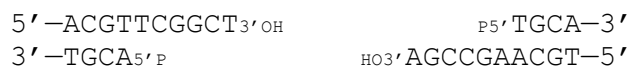
L'enzyme de restriction *EcoRI* a été isolée à partir de l'eubactérie *Escherichia coli* (***EcoRI***) et fait partie des toutes premières enzymes de restriction isolées, en 1971. Elle clive le site palindromique suivant :



EcoRI fixée à son site de restriction sur l'ADN →

Les enzymes de restriction sont des endonucléases (ADNases), capables de couper l'ADN au niveau d'une **séquence spécifique** de chaque enzyme de restriction. Ces enzymes ont été isolées à partir de bactéries (qui s'en servent pour se défendre contre les infections virales).

On peut distinguer deux possibilités lors de la coupure : soit la coupure est inégale entre les deux brins d'ADN, et on obtient des « **bouts collants** », soit la coupure est égale, et on obtient alors des « **bouts francs** ».

**Exemple théorique :****ADN avant digestion****Bouts collants****Bouts francs**

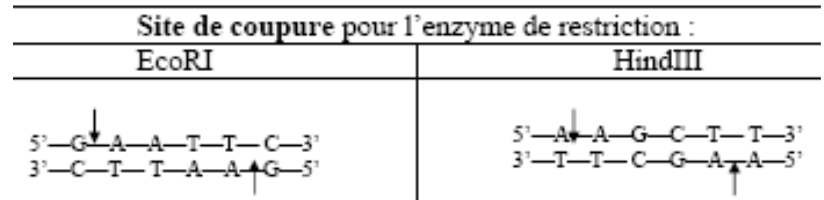
Ces enzymes permettent donc de réaliser une hydrolyse contrôlée d'ADN. Elles peuvent être utilisées :

- Pour vérifier la nature d'un ADN, en connaissant au préalable la séquence attendue pour cette ADN et donc la localisation des sites de restrictions.
- Pour construire un premier niveau de carte génétique : la carte de restriction, qui présente la localisation relative des sites de restriction de ces enzymes.
- Dans une démarche de génie génétique (« ADN recombinant ») : ce sont des « ciseaux moléculaires » permettant la découpe de fragments, la linéarisation d'ADN circulaires, etc.

1.2.Réalisation d'une électrophorèse⇒ Principe :

On se propose d'étudier l'ADN du phage λ . Le phage λ est un virus infectant *E. coli*, qui possède un ADN linéaire de 48 502 paires de bases (sa séquence a été déterminée par ailleurs). L'ADN à disposition a été digéré par deux enzymes de restriction : *EcoRI* et *HindIII*.

On se propose ici de séparer les différents fragments de restriction obtenus après digestion de l'ADN du phage λ par les deux enzymes, afin de construire une carte de restriction de cet ADN (c'est-à-dire de positionner l'emplacement des sites de restriction). **L'objectif est de déterminer si l'ADN étudié présente une mutation ou pas.**



⇒ Matériel et Protocole :

Matériel :

- Quatre microtubes contenant de l'ADN (30 μ L chacun) :
 - o ADN phage λ digéré par EcoRI
 - o ADN phage λ digéré par HindIII
 - o ADN phage λ digéré par EcoRI et HindIII
 - o ADN de saumon non digéré (témoin)*(ces microtubes contiennent du SafeGreen, colorant fluorescent de l'ADN)*
- Un gel d'agarose-TBE coulé (TBE : tampon de migration utilisé ici ; 2% d'agarose)
- Micropipettes
- Cones



Dépôt des échantillons

- Si ce n'est pas déjà fait, **retirer** délicatement le peigne du gel (tirer bien dans l'axe, pour que les huit puits calibrés soient bien formés).
 - Placer le gel dans la cuve, bien **immergé** dans le tampon ; si besoin, rajouter du tampon TBE 1X. Vérifier que les puits sont bien du côté de la cathode (pôle négatif, de couleur noire).
 - **Déposer** 8 μ L de solution dans un puits (1 dépôt au moins par étudiant).
- Le tampon TBE est un tampon « classique » d'électrophorèse, tamponné en général à pH=8,0 et composé de TRIS, d'acide Borique (le TRIS et le Borate permettent de tamponner le milieu) et d'EDTA (chélateur des cations divalents : on « retire » le Mg^{2+} de l'ADN, action nécessaire à son déplacement électrophorétique)*

Migration (en même temps pour tous les groupes d'une même cuve)

- Brancher au **générateur** et faire migrer à 48 V.
- Suivre la migration en allumant le transilluminateur ; arrêter la migration quand les bandes sont suffisamment séparées.

Dans le cas d'une électrophorèse avec une cuve classique (sans transilluminateur) :

- Avant le dépôt, mélanger les solutions d'ADN avec du bleu de charge (contient deux colorants bleu électrophorétiques, qui permettent de suivre la migration)
- La migration est en général arrêtée quand le premier bleu est à 1cm du bout du gel
- Le gel doit ensuite être coloré afin de révéler la présence d'ADN.

Par exemple : 5 minutes dans une solution de bleu Azure A, puis repos à sec 5-10 minutes, rinçage à l'eau courante, et décoloration dans de l'éthanol 70% jusqu'à apparition des bandes.

⇒ Interprétation :

On dispose de la carte de restriction de l'ADN non muté, ainsi que des résultats obtenus.

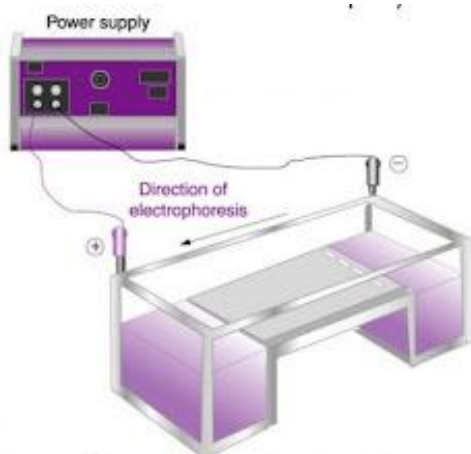
➤ Observer et comparer les ADN mis en évidence (résultats ci-dessous).

➤ Déterminer la localisation de la mutation de l'ADN du phage λ muté.

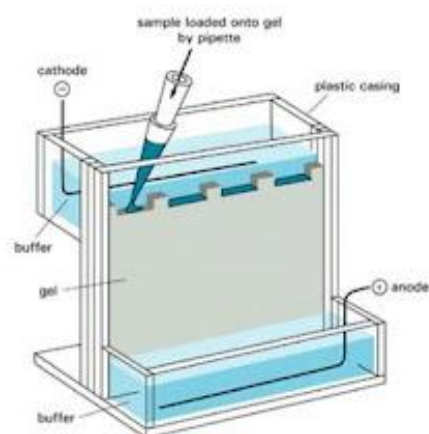


48 502	21 226	23130	21226
7 421	9416		
5 804	6682		
5 643			5148
4 878			4973
	4361		
3 530			4268
			3530
		2322	2027
		2027	1904
			1584
			(1375)
			(947)
			(831)
			(564)
		(564)	(125)
ADN de phage λ	Digéré par EcoRI	Digéré par HindIII	Double digéré par EcoRI et HindIII

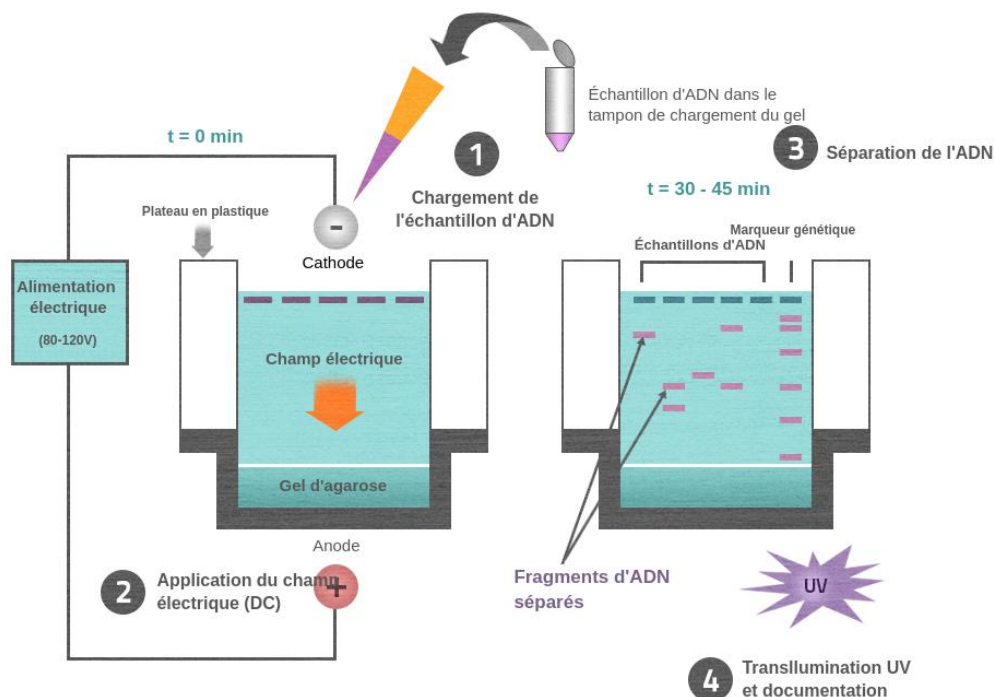
48 502	21 226	23130	21226
7 421	6682		
5 804	6019		
5 643			5148
4 878			4973
	4361		
3 530			4268
	3397		3530
		2322	2027
		2027	1904
			1751
			1584
			(1375)
			(947)
			(831)
			(564)
		(564)	(125)
ADN de phage λ muté	Digéré par EcoRI	Digéré par HindIII	Double digéré par EcoRI et HindIII



Électrophorèse horizontale
(gel d'agarose)



Électrophorèse verticale
(gel de polyacrylamide)



1.3. Cartes de restriction

Voir poly 2 - séance

1.4. Electrophorèses et Blots

Voir poly 2 - séance

1.5. Exercices

Voir poly 2 – séance

2. Séquençage et exploitation des données obtenues

Le séquençage d'un ADN est la détermination de l'enchaînement de bases azotées d'un brin de cet ADN. Il est actuellement presque exclusivement réalisé grâce à des séquenceurs, qui permettent l'automatisation du protocole. Les techniques modernes permettent de réaliser du séquençage à haut débit, très rapide et extrêmement peu coûteux.

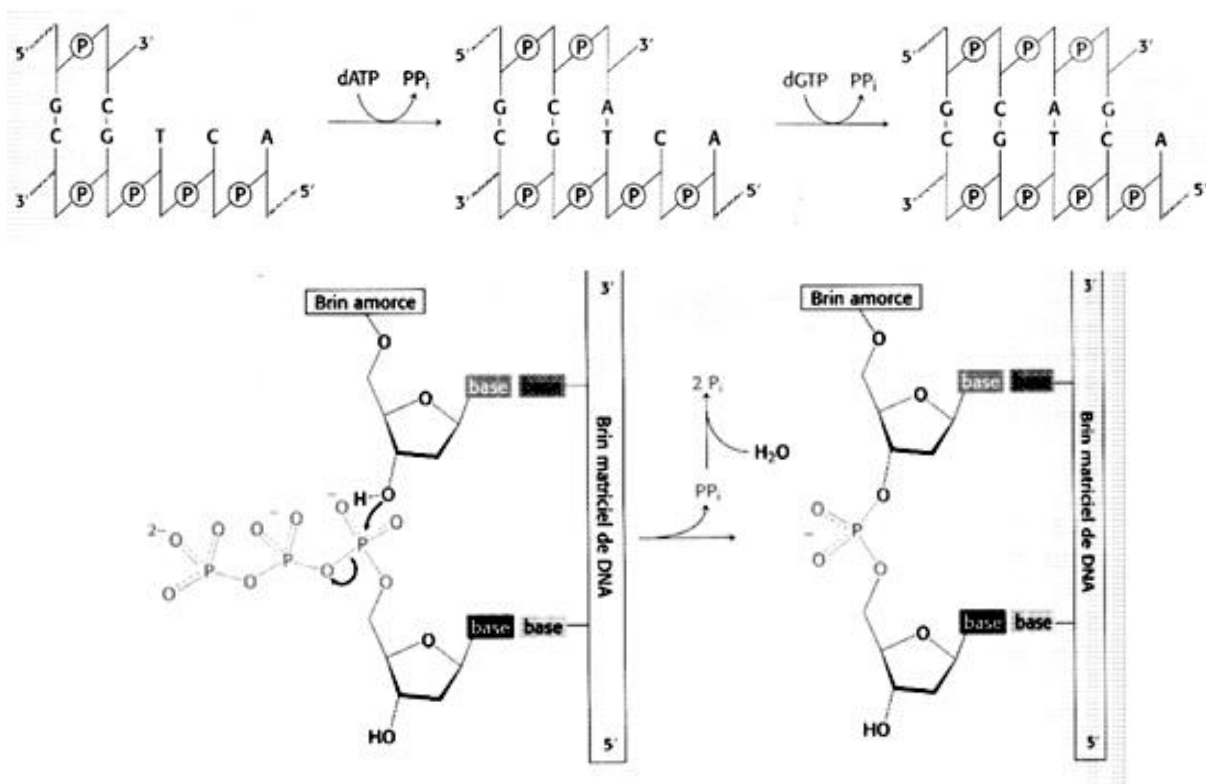
2.1. La technique de Sanger

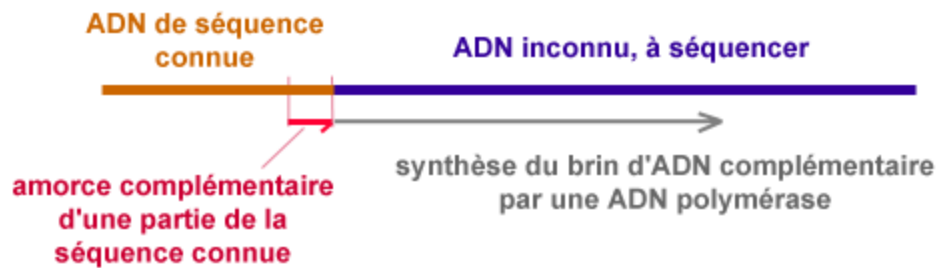
On s'intéresse ici à la technique mise au point en 1977 par Frederick Sanger (1918-2013) (double Nobel de chimie : en 1980 pour le séquençage de l'ADN, et en 1958 pour la structure de l'insuline).

Les séquençages à haut débit utilisent d'autres techniques, dont certaines dérivent de la technique de Sanger.

Cette technique utilise la capacité de l'ADN polymérase de réaliser une synthèse d'ADN :

- En utilisant un brin d'ADN comme **matrice**
- En incorporant des désoxynucléotides triphosphates (**dNTP**)(qui subissent une double déphosphorylation lors de leur incorporation dans le brin néoformé)
- En partant d'une **amorce** = court fragment d'ADN de 15 à 25 nucléotides (ou d'ARN), que l'ADN polymérase allonge (l'ADN polymérase ne peut pas initier un nouveau brin, elle ne peut que l'allonger)

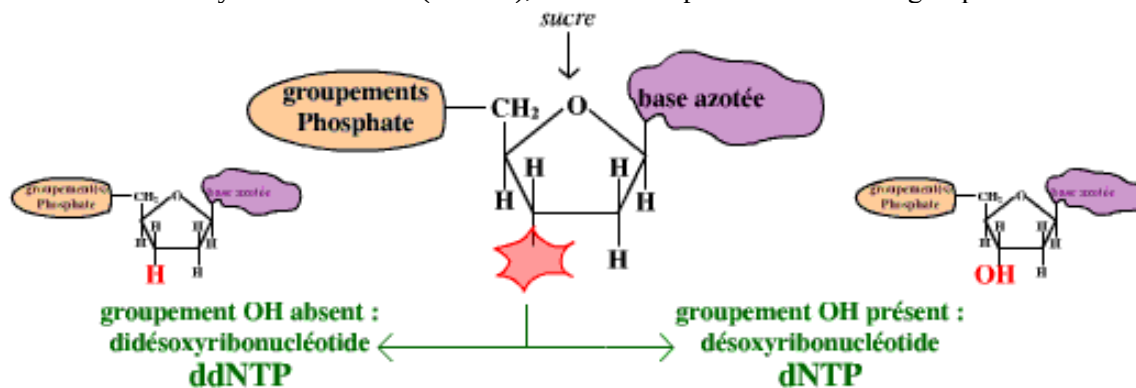




Pour le séquençage, on réunit ainsi :

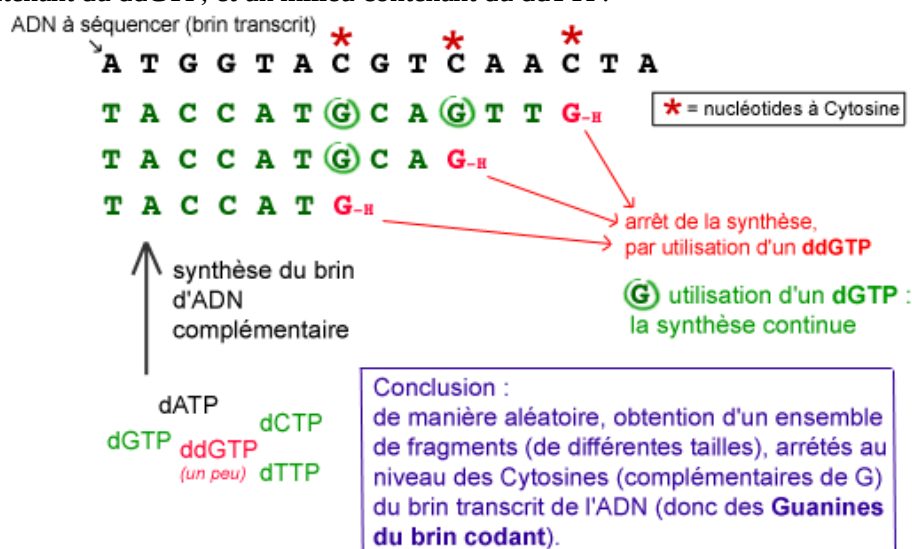
- L'ADN à séquencer = brin matrice
- Une amorce (court ADN monobrin), complémentaire d'une séquence connue de l'ADN à séquencer
- De l'ADN polymérase
- Des dNTP, du magnésium
- Un ddNTP en faible proportion (ddATP ou ddGTP ou ddCTP ou ddTTP)(didesoxynucléotide)

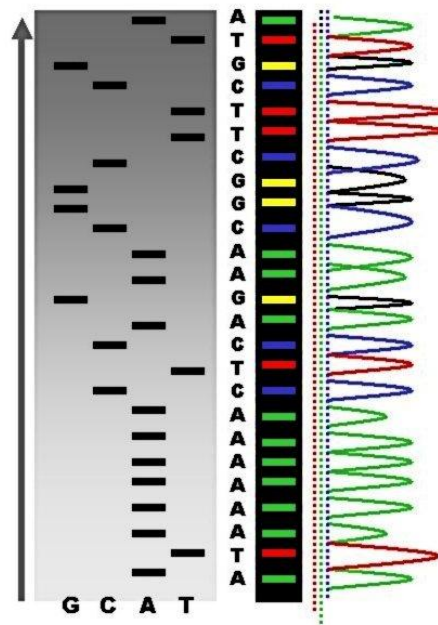
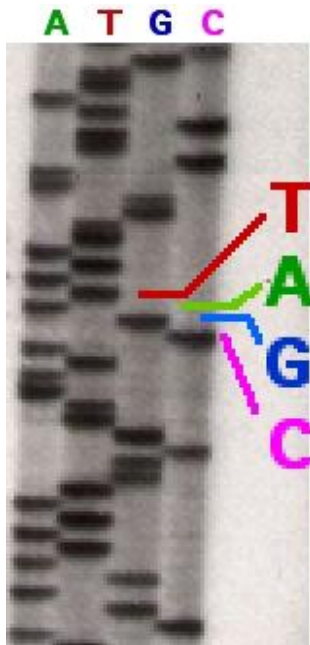
On utilise donc ici des didésoxyribonucléotides (ddNTP), caractérisés par l'absence d'un groupement OH en 3' :



L'ADN polymérase synthétise ainsi le brin complémentaire de l'ADN à séquencer. Dans le milieu de réaction se trouvent des dNTP en grand nombre, et une faible proportion d'un ddNTP (à Adénine, ou Guanine, ou Thymine, ou Cytosine) : A un moment totalement aléatoire, un ddNTP sera ajouté à la chaîne en cours de synthèse, par l'ADN polymérase. Cette synthèse s'arrêtera donc à cet endroit, car l'ajout d'un nouveau nucléotide nécessite la présence d'un groupement 3'OH.

Par exemple, si le milieu réactionnel contient une faible proportion de didésoxyribonucléotide à Guanine (ddGTP), on obtiendra, à la fin des réactions, un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddGTP se sera inséré et que la réaction d'élongation aura ainsi été stoppée (ce qui correspond, du fait de la complémentarité des bases, à la présence d'une Cytosine dans le brin d'ADN séquencé). On répète la même opération avec un milieu contenant du ddATP, un milieu contenant du ddCTP, et un milieu contenant du ddTTP.





Pour le séquençage automatique, on utilise des ddNTP couplés à un fluorochrome ; une chromatographie permet de séparer les différents fragments d'ADN synthétisés.



La lecture se fait du « bas » (= fragments de petite taille) vers le « haut » (= fragments de grande taille)

➡ Lire la séquence obtenue sur le gel de gauche.

2.2. Pour information, une technique « haut débit » : le pyroséquençage

Voir poly 2 – séance

2.3. Etude de la structure d'un génome

Voir poly 2 – séance

2.4. Alignements de séquences

Voir poly 2 – séance

3. L'amplification d'un ADN (PCR) ou d'un ARN (RT-PCR)

La PCR, ou réaction en chaîne de la polymérase, est une puissante technique, mise au point en 1985, en particulier par Kary Mullis (Nobel 1993). Elle a révolutionné la biologie moléculaire, en permettant **l'amplification sélective d'un fragment d'ADN**, à partir de la connaissance de deux courtes séquences bordant le fragment en question.

3.1. Principe de la PCR

Cette technique utilise la Taq polymérase, une ADN polymérase extraite d'une bactérie thermophile et fonctionnant donc à haute température. La PCR consiste en l'amplification d'un fragment d'ADN de séquence connue, de manière sélective, en utilisant un ensemble de réactions cycliques.

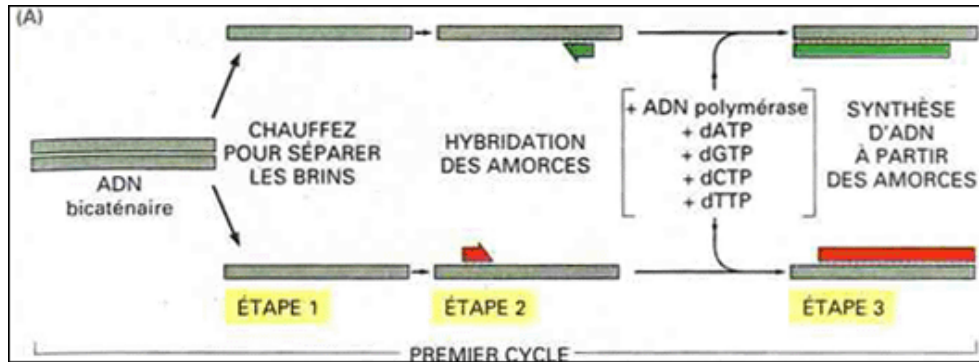
On dispose pour cela d'amorces ADN, complémentaires de courtes séquences flanquant le fragment à amplifier, qui vont permettre l'action de la Taq polymérase.

Un cycle de température permet :

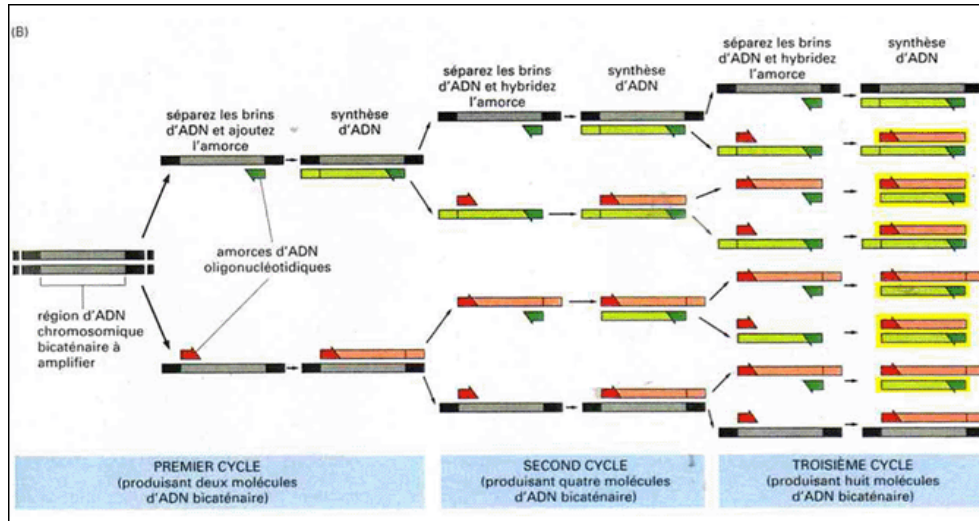
- La séparation des brins d'ADN à 94°C (sans dénaturation de l'enzyme)
- L'hybridation des amorces sur l'ADN à 50-60°C (température précise dépendant de la séquence des sondes ; enzyme inactive à cette température « basse »)
- La synthèse d'ADN à partir des amorces à 72°C (température optimale de la Taq polymérase)

Une PCR comprend de manière classique de 20 à 40 cycles, ce qui permet donc l'obtention de 2^{20} à 2^{40} molécules d'ADN à partir d'une molécule initiale unique.

Principe général d'un cycle de PCR



La PCR permet une amplification du fragment d'ADN ciblé



⇒ Utilisation pour le clonage d'un ADN

Le clonage d'un ADN correspond à l'intégration d'un ADN spécifique dans un vecteur ADN, qui permettra son intégration à une cellule : l'ADN cloné est alors présent dans une culture de cellules (en général des bactéries). Techniquement, cela nécessite de disposer de l'ADN précis que l'on souhaite cloner, en quantités importantes. On peut ainsi amplifier sélectivement cet ADN par PCR, puis l'isoler en réalisant une électrophorèse : la bande de gel contenant l'ADN amplifié peut être récupérée et l'ADN purifié.

⇒ Utilisation en test

Une PCR peut aussi être un test visant à vérifier la présence d'un ADN particulier. Dans ce cas de figure, on réalise une PCR sur l'ADN extrait d'une culture de cellules ou d'un organisme ; on sépare ensuite les ADN obtenus par électrophorèse, et on regarde si une bande est présente au niveau du fragment que la PCR est censée avoir amplifié :

- La présence d'une bande montre alors que l'ADN recherché était présent dans l'extrait.
- L'absence de bande montre que l'ADN recherché n'était pas présent.

3.2.Principe de la RT-PCR

⇒ Principe général : ARN → ADNc → PCR

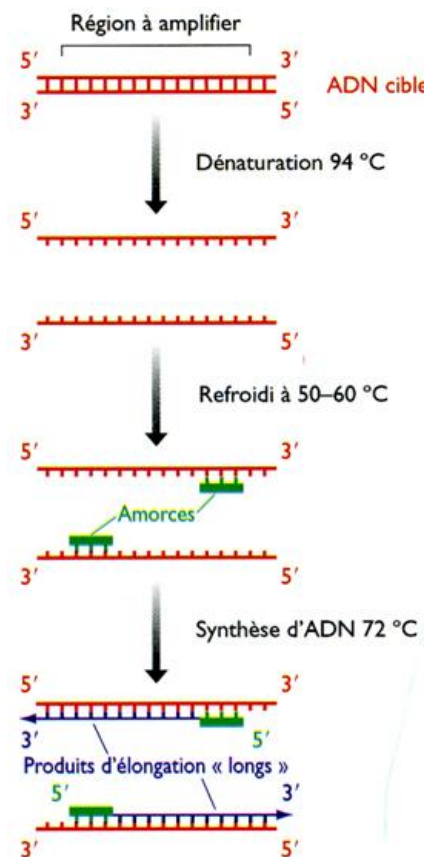
Une RT-PCR est une technique visant à étudier la présence d'un ARN précis.

Pour cela, on réalise de manière successive :

- Une reverse transcription (RT), grâce à une reverse-transcriptase, qui permet la synthèse d'ADNc à partir de l'extrait d'ARN initial
- Une PCR, réalisée sur les ADNc obtenus

Après électrophorèse, la présence d'une bande de la taille attendue correspond donc à la présence de l'ARN dans l'extrait.

Déroulement d'un cycle de PCR



⇒ La qRT-PCR

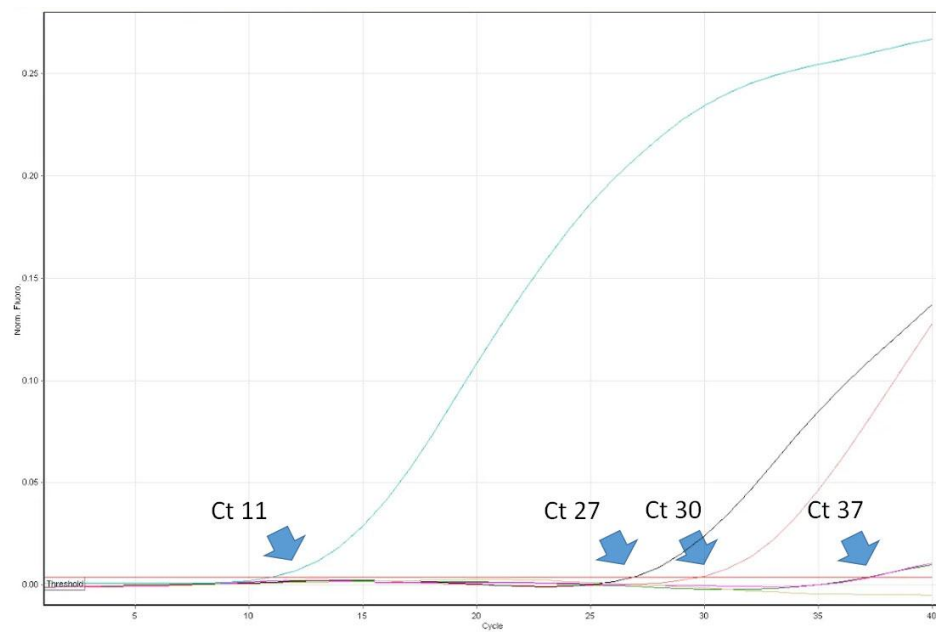
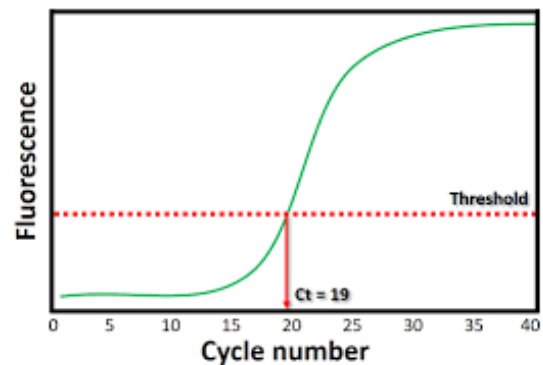
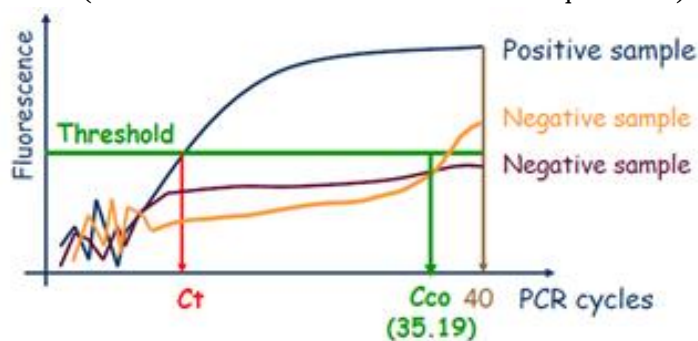
Il est aussi possible de réaliser une qRT-PCR, ou RT-PCR quantitative, dont l'objectif est de quantifier l'ARN présent dans l'extrait. Une qRT-PCR est souvent suivie en temps réel :

- L'ADN produit est fluorescent, par exemple grâce à l'utilisation d'amorces couplées à un fluorochrome
- Le thermocycleur (appareil réalisant les cycles de température de la PCR) suit la fluorescence en temps réel

L'évolution de la fluorescence pendant la phase exponentielle de la PCR permet d'évaluer la quantité initiale d'ADNc (et donc d'ARN) présent.

⇒ Les test COVID-19 par PCR

Dans les cas « COVID-19 » par PCR, on réalise ainsi une qRT-PCR : la quantité d'ADN produit est suivie au cours de la PCR, et on détermine le nombre de cycles (Ct) nécessaires pour atteindre la phase de croissance exponentielle de l'ADN amplifié. Si ce nombre de cycles est sous une valeur seuil, alors le test est considéré comme positif (= la quantité d'ARN présent initialement était « importante »). Dans le cas de ces tests COVID-19, la valeur seuil utilisée est en général entre 30 et 40 (selon les conditions de réalisation de la qRT-PCR).



3.3.Exercices

Voir poly 2 – séance