

**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 génom ↑ ↓ 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 utilisation 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

1. Electrophorèse d'ADN et carte de restriction

1.1. Les enzymes de restriction

Voir poly 1 - préparation

1.2. Réalisation d'une électrophorèse

Voir poly 1 - préparation

1.3. Cartes de restriction

Une carte de restriction est une représentation graphique d'un ADN :

- Sous forme d'un cercle (ADN circulaire) ou d'un trait horizontal (ADN linéaire)
- Indiquant l'emplacement des sites de restriction (traits coupant l'ADN)
- Indiquant l'emplacement des gènes présents (rectangles, en général)

1.4.Électrophorèses et Blots

Le principe du Western Blot a été présenté dans le TP SV-D1.

Un Blot est une technique comportant trois étapes :

- 1- Une **électrophorèse** sur gel (d'agarose ou de polyacrylamide) séparant les molécules, en général en fonction de leur masse molaire (dont électrophorèse en conditions dénaturantes pour les protéines)
- 2- Le **transfert** du résultat d'électrophorèse du gel à une feuille (d'acétate de cellulose ou autre)
- 3- **Révélation spécifique** de la présence d'une molécule recherchée

On distingue trois types de Blot :

- **Western Blot** : sur des **protéines**. La révélation se fait en général par utilisation **d'anticorps** spécifiques marqués.
- **Southern Blot** : sur de **l'ADN**. La révélation se fait en général en utilisant des **sondes** marquées.
- **Northern Blot** : sur de **l'ARN**. La révélation se fait en général en utilisant des **sondes** marquées. *Ce dernier type de Blot est techniquement plus difficile à réaliser, car nécessitant un travail très soigneux : les ARN sont des molécules fragiles, facilement dégradées.*

1.5.Exercices

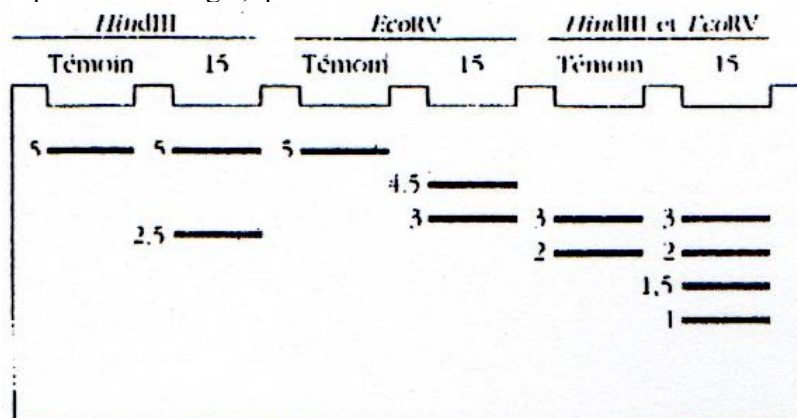
EXERCICE 1 : CARTE DE RESTRICTION #1

Un plasmide bactérien circulaire (pBP1) possède un site unique de restriction pour l'enzyme HindIII, au milieu d'un gène de résistance à la tétracycline (tet^R). L'ADN génomique de la drosophile est digéré par HindIII et une banque est construite dans pBP1 : les fragments d'ADN génomique de drosophile obtenus par digestion par HindIII sont insérés (grâce à une ligase) dans des plasmides pBP1 préalablement digérés par HindIII.

Le criblage révèle que le clone 15 contient u gène intéressant, spécifique de la drosophile. Le clone 15 est soumis à une analyse par l'enzyme de restriction HindIII et une autre enzyme de restriction, EcoRV. Le gel d'électrophorèse coloré au bromure d'éthidium présente les bandes figurant dans le schéma page suivante.

Le bromure d'éthidium est un agent intercalant de l'ADN, qui émet une fluorescence sous les UV. Le témoin est un plasmide pBP1 sans insert. Remarque : dans ce type de gel, les molécules circulaires ne donnent pas de bande de forte intensité. On peut donc supposer que toutes les bandes représentent des molécules linéaires.

- 1) Dessinez les cartes de restriction du plasmide pBP1 avec et sans l'insert, en montrant les sites des séquences cibles et la position approximative du gène tet^R .
- 2) Si le même gène tet^R , cloné dans un vecteur sans aucune homologie est marqué radioactivement et utilisé comme sonde lors d'un transfert Southern de ce gel, à votre avis, quelles seront les bandes radioactives sur un autoradiogramme ?
- 3) Si le gène équivalent chez une mouche étroitement apparentée à la drosophile a été cloné dans un vecteur et est utilisé comme sonde pour ce même gel, quelles bandes vous attendez vous à voir sur l'autoradiographie ?



EXERCICE 2 : CARTE DE RESTRICTION #2

Un plasmide bactérien circulaire contenant un gène de résistance à la tétracycline a été coupé par l'enzyme de restriction BglII. L'électrophorèse montre une bande de 14 kb.

- 1) Que peut-on déduire de ce résultat ?

Le plasmide a été coupé par EcoRV et l'électrophorèse a produit deux bandes de 2,5 kb et 11,5 kb.

2) Que peut-on déduire de ce résultat ?

La digestion conjointe par les deux enzymes a donné trois bandes, de : 2,5 kb, 5,5 kb et 6 kb.

3) Que peut-on déduire de ce résultat ?

L'ADN du plasmide coupé par BglII a été mélangé et ligaturé avec des fragments d'ADN également coupés par BglII pour former des molécules d'ADN recombinant. Tous les clones recombinants se montrent sensibles à la tétracycline.

4) Que peut-on déduire de ce résultat ?

Un clone recombinant a été coupé par BglII et des fragments de 4 kb et 14 kb ont été observés.

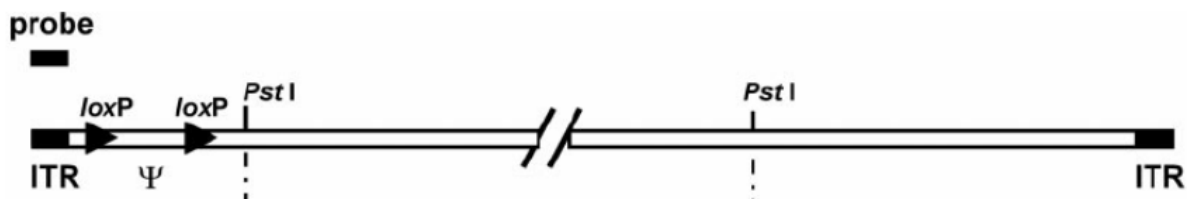
5) Expliquez ce résultat.

Le même clone a été traité par EcoRV et des fragments de 2,5 kb, 7 kb et 8,5 kb sont observés.

6) Expliquez ce résultat en dessinant une carte de restriction de l'ADN recombinant.

EXERCICE 3 : UNE ANALYSE PAR SOUTHERN BLOT

Dans le cadre d'une étude, on utilise des cellules humaines, pour lesquelles deux *locus loxP* ont été insérés au niveau de la zone étudiée :



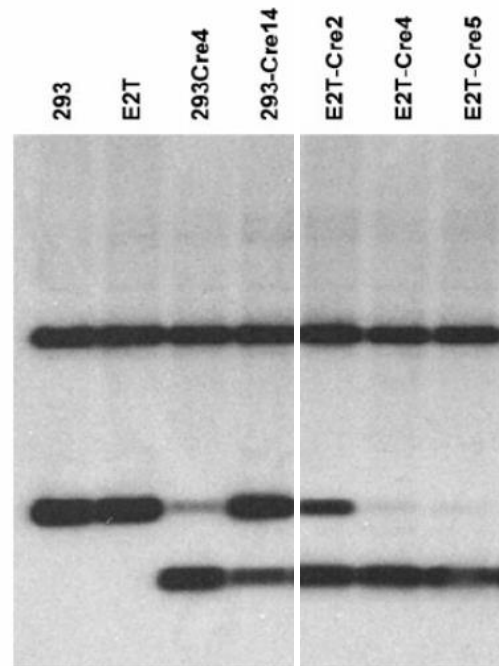
Dans un deuxième temps, on réalise une nouvelle transgénèse, afin de rajouter le gène *Cre*, qui code une protéine permettant de réaliser une recombinaison entre les deux *locus loxP*, et ainsi de réaliser une délétion de la région Ψ comprise entre les deux *loxP*.

Afin de tester la bonne réalisation de l'expérience, l'ADN de cultures cellulaires est extrait, puis incubé avec l'enzyme de restriction *Pst I*. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse, puis le gel est hybridé avec une sonde ADN radioactive (« probe »), complémentaire des séquences ITR présentes dans l'ADN étudié.

Le résultat est présenté ci-contre :

- 293 et E2T : lignées non transgéniques
- 293Cre4 et 293Cre14 : lignées 293 transgéniques
- E2TCre2, E2TCre4 et E2TCre5 : lignées E2T transgéniques

- 1) Expliquer les résultats pour les lignées 293 et E2T. Quels fragments issus de la digestion par *Pst I* sont marqués lors du Southern blot ?
- 2) Quels résultats correspondent à ce qui était attendu, pour les lignées transgéniques ?
- 3) Proposer une hypothèse expliquant les résultats non attendus.



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

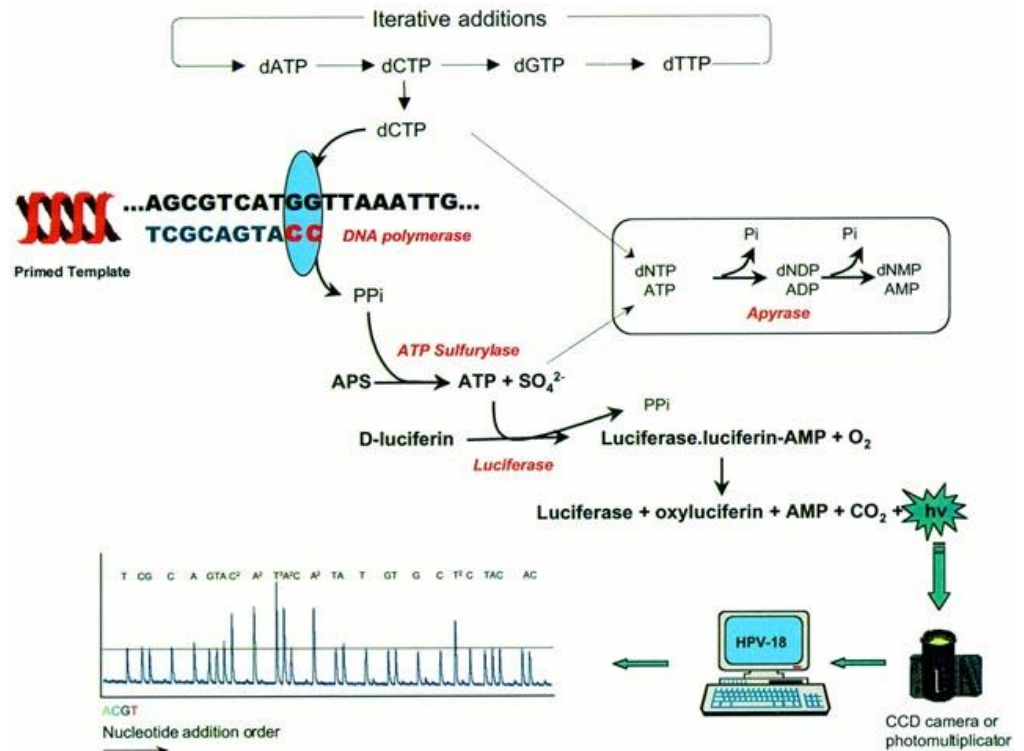
Voir poly 1 - préparation

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

Dans cette technique (automatisée), on ajoute de manière séquentielle chaque dNTP.

Si ce dNTP est intégré au brin en élongation, le PPi libéré permet une production de fluorescence, qui est détectée par le séquenceur :

L'appareil suit ainsi la synthèse du brin néoformé, au fur et à mesure de sa synthèse.



2.3. Etude de la structure d'un génome

Le génome de nombreuses espèces a été séquencé, et annoté : position des gènes connus, d'éléments régulateurs, répétés, etc. Ces données sont librement accessibles.

➤ Ouvrir « USCS genome browser » :

<https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

Par défaut le dernier assemblage du génome humain est sélectionné.

➤ Dans la boîte, indiquer : hexokinase

L'objectif est ici de rechercher le gène de l'hexokinase

➤ Combien de gène d'hexokinase sont-ils présents dans le génome humain ?

➤ Choisir le gène de l'hexokinase 2 (HK2)

Le page fourni alors de nombreux éléments informatifs (accessibles en cliquant dessus), dont en particulier :

- GENCODE :
 - o Position chromomique de HK2
 - o Structure de HK2 en termes d'exons et d'introns
- OMIM : mutations connues dans l'espèce humaine
- Niveau d'expression dans différents tissus
- ENCODE : possibles éléments régulateurs (promoteurs, enhancer...)
- Eléments répétés

En cliquant sur une référence de séquence (GENCODE), on accède à une page permettant d'obtenir en particulier :

- La séquence de la région d'ADN correspondante
- La séquence de l'ARNm (si disponible)
- La séquence protéique (si disponible)
- La structure 3D de la protéine

➤ Déterminer la localisation chromosomique de HK2

⇒ Déterminer la structure du gène HK2

⇒ Remarquer l'abondance de séquences régulatrices putatives, ainsi que de séquences répétées

- Faire un « zoom out » d'un facteur 10, afin d'observer l'environnement chromosomique de HK2
- Accéder aux données d'un gène proche : M1AP, en cliquant sur la ligne des gènes afin de l'étendre, puis en cliquant sur la première référence M1AP

⇒ Lire le résumé sur le gène M1AP et observer son patron d'expression : Ces deux points sont-ils cohérents ?

- Etendre les données OMIM et cliquer sur un des variants de M1AP
- Sur la page obtenue, cliquer sur le lien vers la page OMIM

⇒ Les phénotypes observés dans le cas de mutations sont-ils cohérents avec les informations obtenues précédemment sur le gène M1AP ?

- Faire un « zoom out » d'un facteur 100, afin de pouvoir observer une grande portion du chromosome 2

⇒ La répartition des gènes est-elle homogène ?

2.4. Alignements de séquences

Au concours Agro-Véto : Aucun logiciel n'est au programme, ce qui signifie que des fiches techniques seront fournies et qu'aucune compétence technique spécifique n'est exigible. Anagène 2 est proposé au concours. Geniegen 2 n'est pour l'instant pas proposé, mais le sera peut-être par la suite.

En TP, nous utiliserons Géniegen 2 afin de profiter d'une banque de séquence plus étendue.

Geniegen 2 en ligne : <https://cosphilog.fr/geniegen2/>

<https://www.pedagogie.ac-nice.fr/svt/productions/geniegen2/>

<https://play.google.com/store/apps/details?id=fr.cosphilog.geniegen2>

<https://cosphilog.fr/geniegen2/builds.htm>

application Android
téléchargement pour PC

⇒ (1) Comparaison d'allèles : gène CFTR et Mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique due à un défaut de fonctionnement de la protéine CFTR.

La protéine CFTR est un canal ionique transmembranaire permettant en particulier la sécrétion d'ions Cl⁻ par des cellules épithéliales, en particulier au niveau de l'épithélium pulmonaire. Au niveau des poumons, cette sécrétion est nécessaire à la formation du mucus et pour certains mécanismes de défense immunitaire.

- Ouvrir le pack « comparaison des allèles CFTR »
- Aligner les séquences nucléotidiques

⇒ En quoi les allèles sont-ils différents ?

- Traduire les séquences
- Aligner les séquences protéiques

⇒ Quelles conséquences sur les protéines ? Comment expliquer le phénotype des malades ?

⇒ (2) Comparaison de transcrits et épissage alternatif : gène CGRP

On compare ici la séquence du gène CALCA, sous la forme de son ARN pré-messager = transcrit primaire, obtenu suite à la transcription du gène, et deux ARNm matures :

- ARNm isolé à partir de cellules de la thyroïde, codant la calcitonine. La calcitonine est une hormone peptidique hypocalcémisante et hypophosphorémisante
- ARNm isolé à partir d'extraits de tissu nerveux, codant la CGRP. La CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) est un neurotransmetteur impliqué dans la transmission de la nociception (perception de la douleur)

- Ouvrir le pack « épissage alternatif, cas du gène CALCA »
- Aligner les séquences

- Repérer les introns
- Comparer les deux ARNm

- Traduire les deux ARN

- Comparer les deux protéines

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

Voir poly 1 - préparation

3.2. Principe de la RT-PCR

Voir poly 1 - préparation

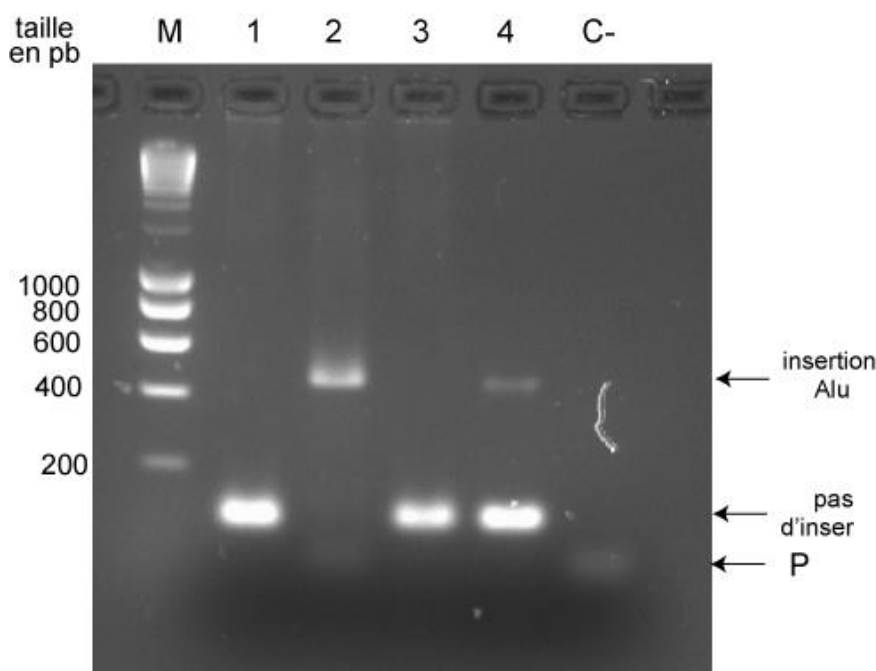
3.3. Exercices

EXERCICE 4 : ETUDE D'UNE PCR

Un transposon est un fragment d'ADN capable de se « déplacer » dans l'ADN. Dans certains cas, ce « déplacement » se réalise en réalisant une copie du transposon, qui est ensuite insérée à un autre endroit du génome.

C'est le cas du transposon *Alu* : Il s'agit d'une séquence d'environ 300 pb, très abondantes dans le génome humain (plus d'un million d'exemplaires, soit environ 10% du génome humain).

Afin de rechercher la présence éventuelle d'un transposon *Alu* dans un gène précis chez l'Homme, on extrait l'ADN de plusieurs individus, puis on réalise une PCR en utilisant des amorces complémentaires à deux séquences situées dans le gène en question. Le produit de ces PCR est ensuite analysé par électrophorèse.



M : marqueur de taille
C- : témoin négatif (sans ADN humain)
1, 2, 3, 4 : individus testés

P : migration des amorces utilisées pour la PCR

- 1) Quelle bande correspond à l'ADN contenant le transposon *Alu*, et quelle bande correspond à l'ADN ne contenant pas le transposon ?
Quels individus présentent *Alu* dans le locus ciblé ?
Ecrire le génotype des 4 individus testés
Alu = transposon présent
- = transposon absent

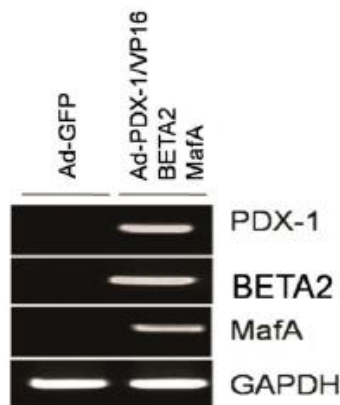
EXERCICE 5 : ANALYSE D'UNE RT-PCR

Le diabète de type I est dû à un défaut de sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Une possibilité de traitement envisagé est la greffe de cellules β afin de restaurer une production d'insuline permettant une régulation de la glycémie.

Une stratégie étudiée ici est de transformer des cellules hépatiques afin de permettre leur différenciation en cellules β .

Afin de réaliser cette transformation, on réalise une transgénèse d'hépatocytes par trois gènes : PDX-1, BETA2 et MafA. Ces trois gènes sont des gènes codant des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules β des îlots de Langerhans, et en particulier dans la stimulation de l'expression du gène de l'insuline.

Une fois le protocole de transgénèse réalisé, l'ADN nucléaire des hépatocytes transformés est extrait et on réalise plusieurs RT-PCR afin de vérifier le succès de la triple transgénèse.



☆ Ad-GFP : hépatocytes transformés avec le gène de la GFP

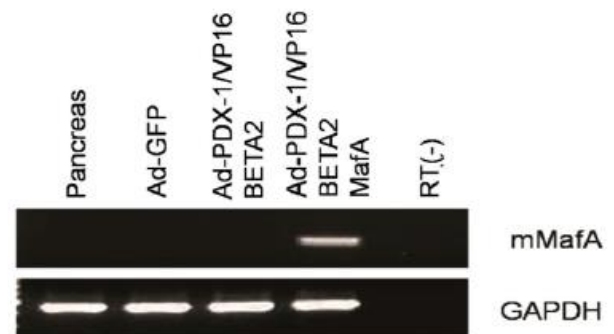
☆ Ad-PDX-1/VP16 BETA2 MafA : hépatocytes transformés avec les gènes PDX-1, BETA2 et MafA

☆ GAPDH : gène codant une enzyme de la glycolyse

- 1) Quel est le rôle des cellules Ad-GFP ?
- 2) Pourquoi faire une RT-PCR pour GAPDH ?
- 3) La transgénèse a-t-elle réussi ?

Une deuxième série de RT-PCR est réalisée sur :

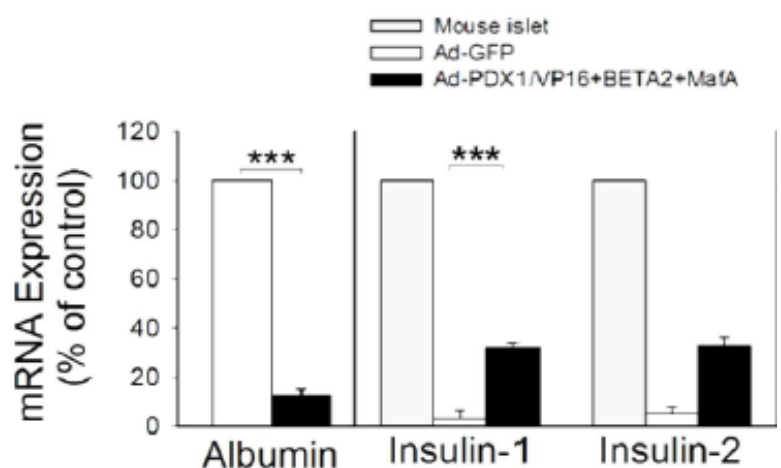
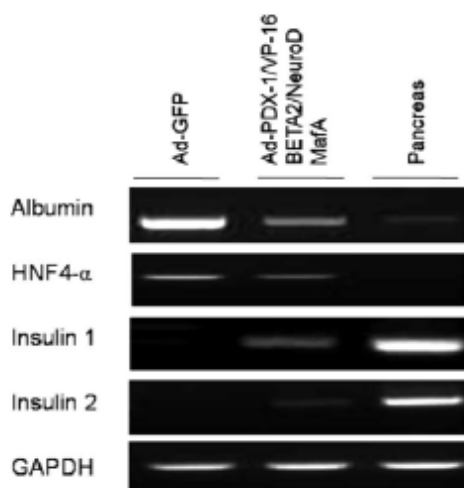
- Des cellules pancréatiques
- Des cellules Ad-GFP
- Des cellules transformées avec PDX-1 et BETA2
- Des cellules transformées avec les trois gènes
- RT(-) : protocole suivi sur les cellules triplement transformées, sans l'état de reverse transcription



- 4) Que permet de vérifier cette expérience ?

On étudie ensuite la différenciation des cellules transgéniques :

- En réalisant une RT-PCR dont les résultats sont analysés par électrophorèse (à gauche ci-dessous)
- En réalisant une qRT-PCR (à droite ci-dessous ; « mouse islet = îlots de Langerhans de Souris)



- 5) Les cellules transgéniques se différencient-elles comme attendu ?