

UE1 : Biochimie – Biologie moléculaire

Chapitre 8 : Méthodes d'études

Professeur Joël LUNARDI

Année universitaire 2011/2012

Université Joseph Fourier de Grenoble - Tous droits réservés.

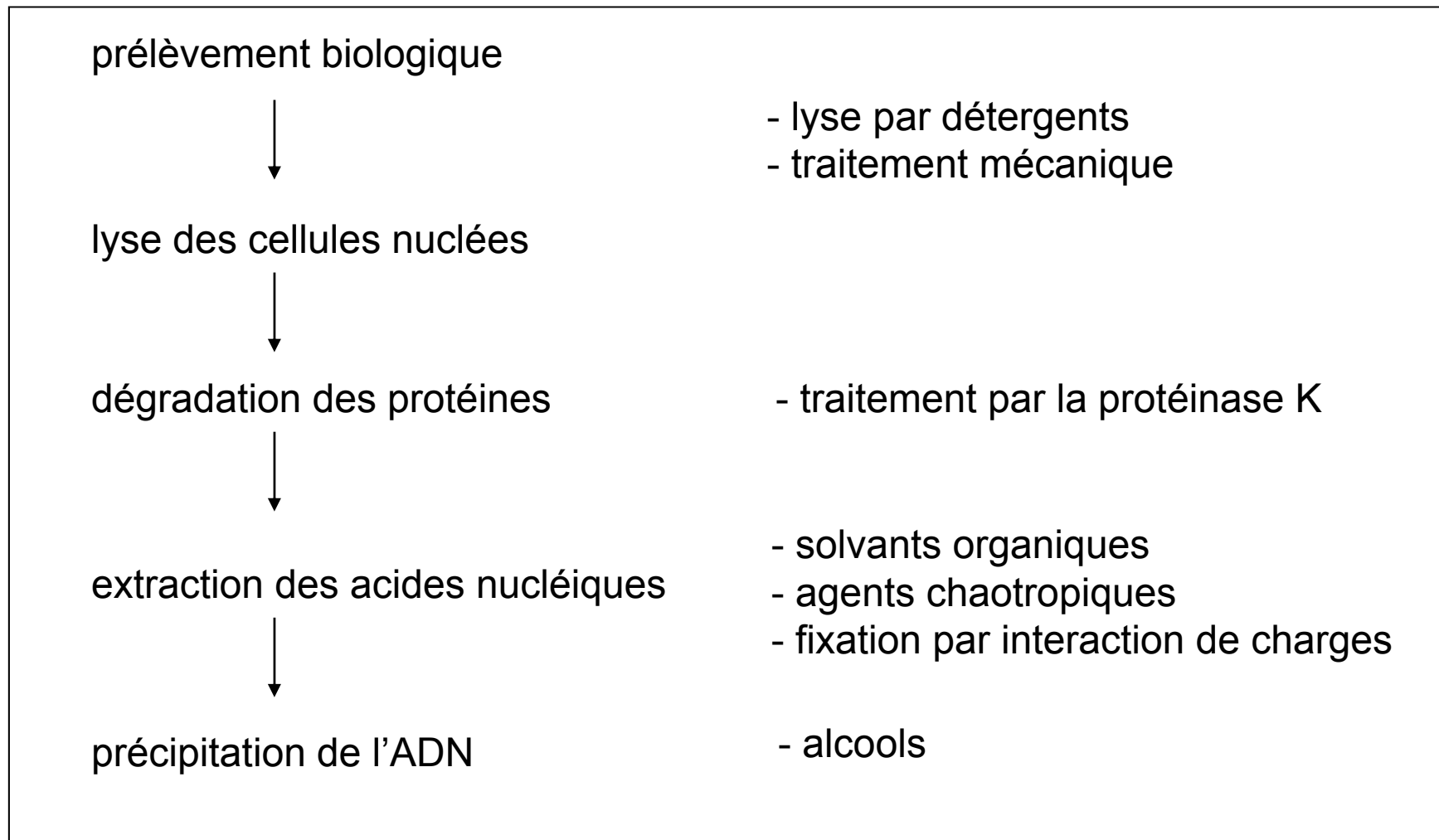
Chapitre 8. Méthodes d'études

- I. Matériel biologique et outils enzymatique de biologie moléculaire
- II. L'hybridation moléculaire
- III. Le clonage moléculaire
 - I. Les techniques d'amplification de l'ADN
 - II. Le séquençage de l'ADN
 - III. Modifier le matériel génétique des cellules eucaryotes
- IV. Méthodes d'étude de l'expression des gènes
- V. Bio-informatique

I. Méthodes et outils généraux

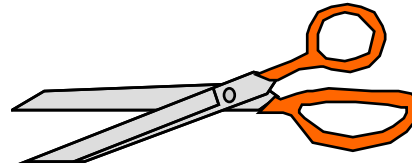
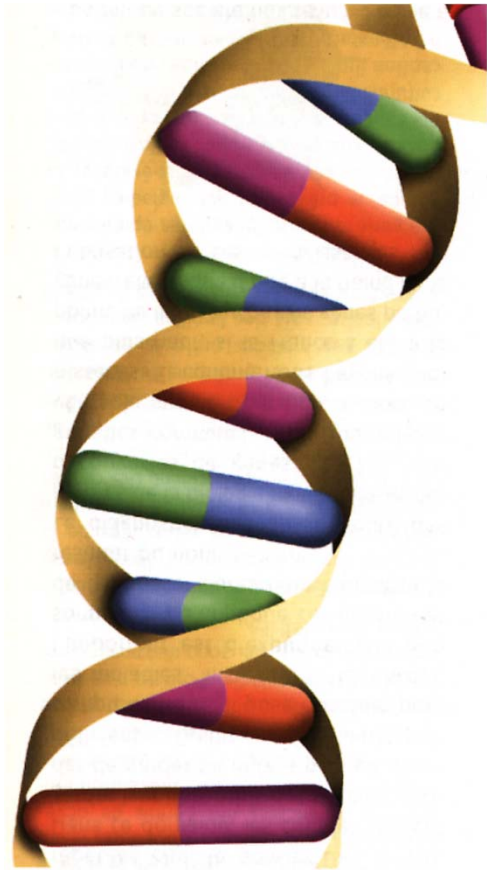
1. Extraction et purification du matériel génétique

- matériel présent dans les virus, les bactéries et les cellules
- ADN des cellules eucaryotes animales = ADN nucléaire + ADNmit
 - source : sang, tissus (biopsies), cultures cellulaires...
 - chez l'homme $\approx (2 \times 3 \times 10^9) \times 660 / 6,02 \times 10^{23} \approx 6-7 \times 10^{-12}$ gramme /cellule
 - ↳ 1 ml de sang $\approx 5-6 \times 10^6$ leucocytes soit $\approx 30 \times 10^{-6}$ g d'ADN
 - et $\approx 10^{14}$ cellules dans le corps humain soit ≈ 600 g d'ADN !
- ARN = ARNm, ARNt, ARNr
 - sensibilité aux RNAses
 - spécificité tissulaire des ARNm (ADNc)
- quantification par mesure de l'absorption à 260 nm

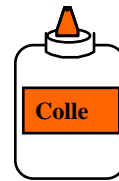


Principales étapes de la purification des acides nucléiques

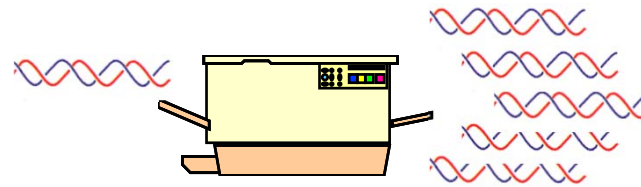
2. Des outils enzymatiques pour étudier l'ADN



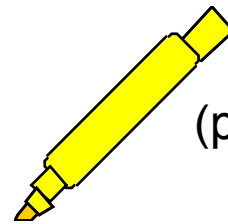
(endonucléases, DNAses...)



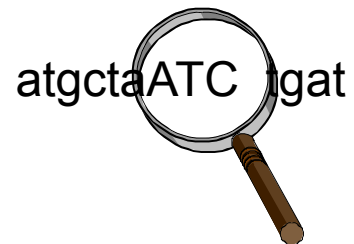
(ligases)



(polymérase...)



(polymérase, kinases...)



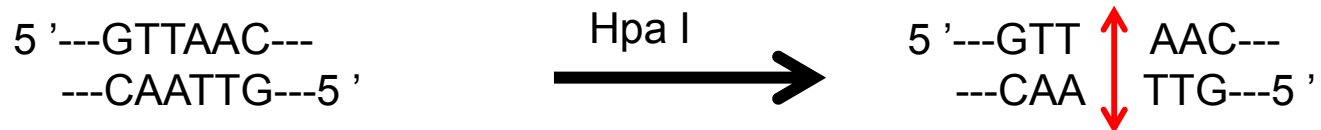
(polymérase...)

2.1. Couper

2.1.1 Enzymes de restriction

- séquences spécifiques de reconnaissance (\approx 4 à 8 bases, palindromes)
- origine bactérienne : Eco RI = **E**scherichia **co**li type **R** souche **I**

- coupures franches



- coupures cohésives



2.1.2. Endonucléases

- DNase I : - ADN double ou simple brin
- nucléase S1: - ADN simple brin
- RNase A (ARN), H (hybrides ARN/ADN)

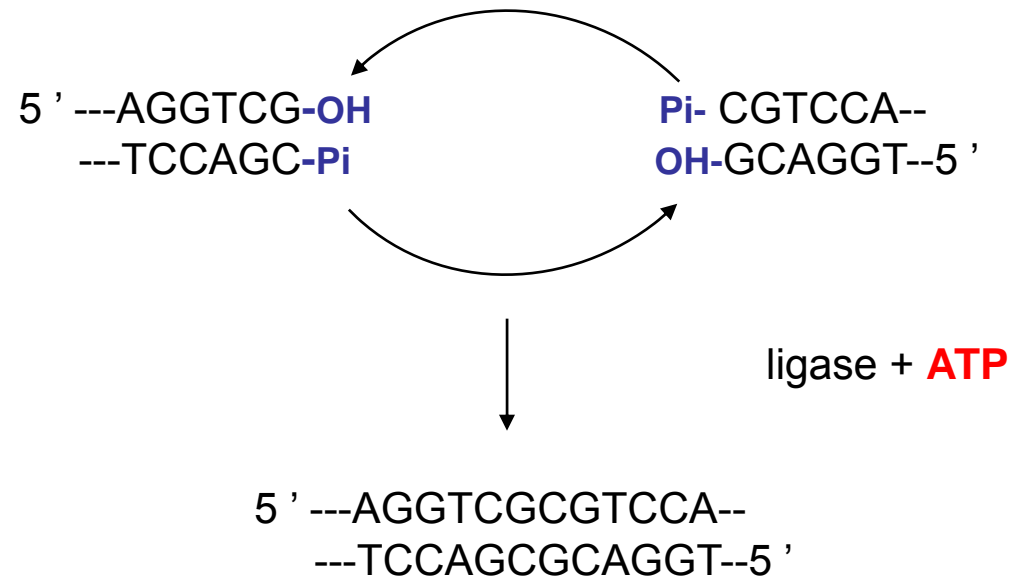
2.1.3. Exonucléases : 5'→3' ou 3'→5'

2.2. Synthèse et copie

- activité des polymérases : 5' → 3'
- ADN polymérases :
 - produit : ADN
 - matrice : ADN simple brin + amorce ARN ou ADN
 - activités exonucléases 3' - 5' et/ou 5' - 3' exonucléases : + / -
 - polymérases modifiées, thermostables (PCR)
- ARN polymérases :
 - produit : ARN
 - matrice : ADN simple brin
- ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase réverse, inverse) :
 - produit : ADN
 - matrice : ARN + amorce

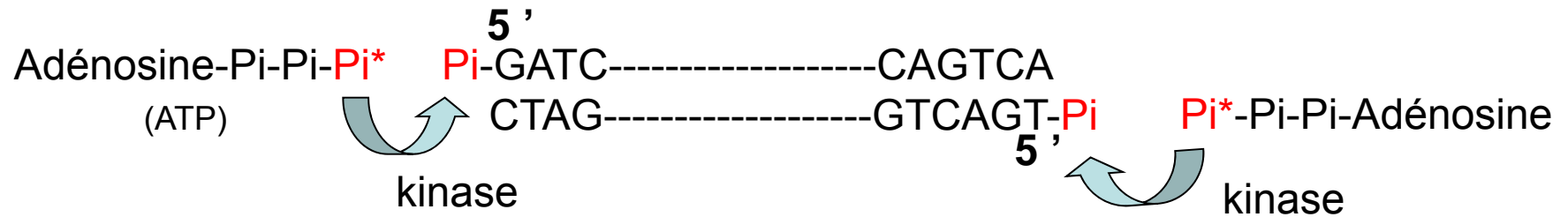
2.3. Coller

- Les ligases catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre un 5' phosphate et un 3'-OH de 2 brins adjacents

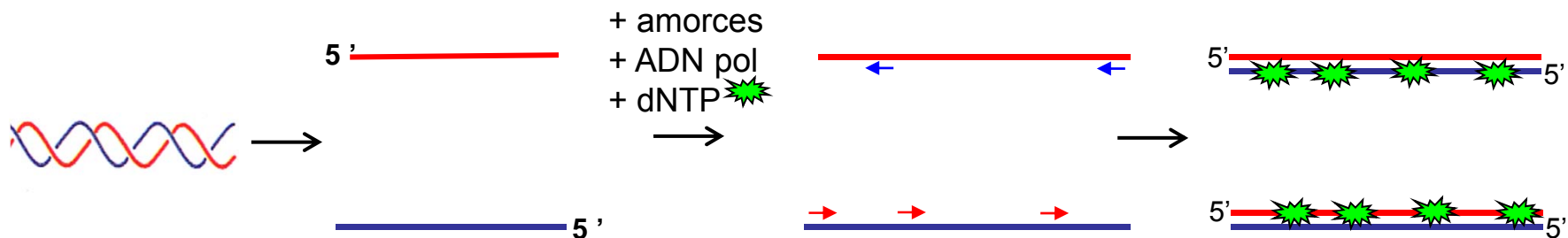


2.4. Marquer

- groupes marqueurs : isotopes (^{32}P , ^{33}P , ^{35}S), fluorophores, biotinylation ...
- marquage aux extrémités
 - extrémité 3'-OH : terminal transférase
 - extrémité 5'-Pi : ATP- γ ^{32}P & T4-kinase

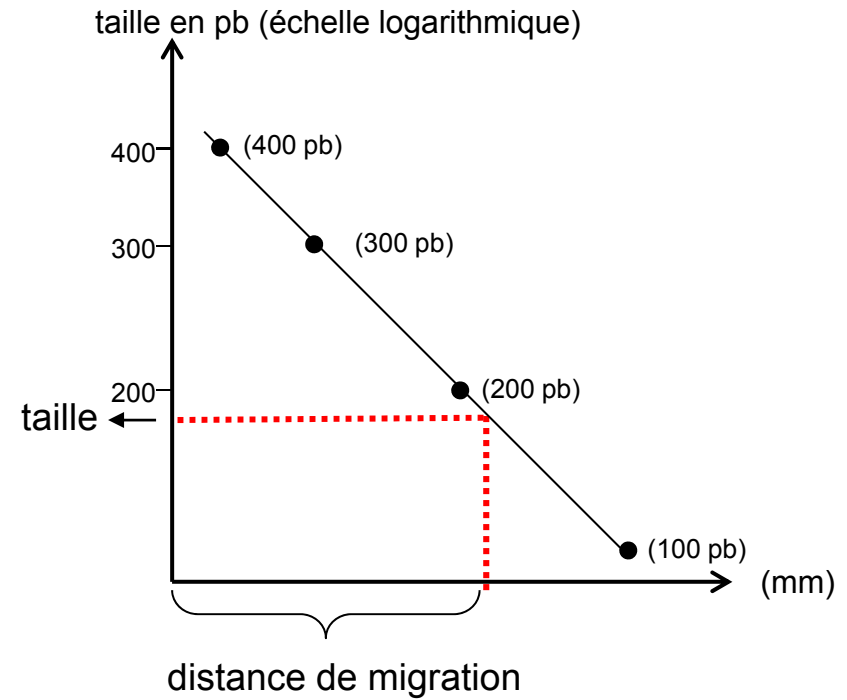
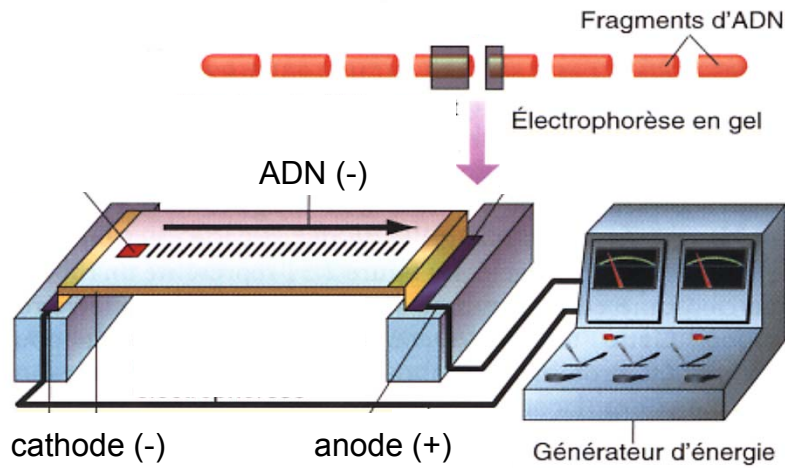


- marquage interne par amorçage aléatoire (random priming)



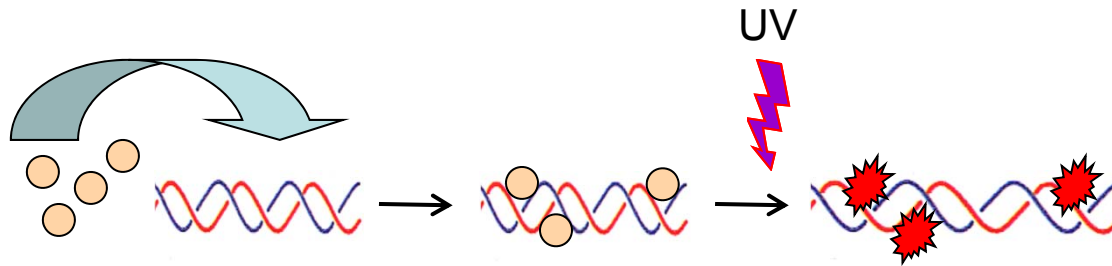
3. Séparation de fragments d'ADN

3.1. Électrophorèse sur gel (agarose, acrylamide...)

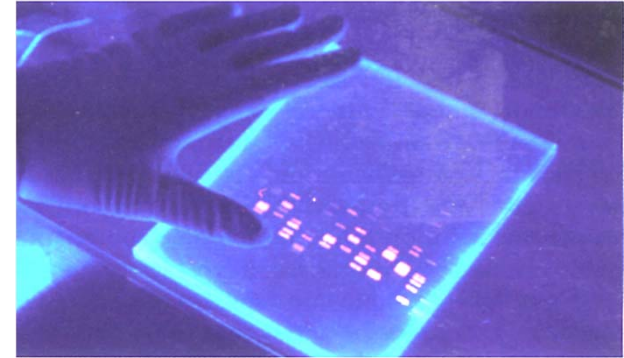


- Électrophorèse en champ pulsé

- visualisation de l'ADN
 - utilisation de molécules fluorescentes



bromure d'éthidium
(molécule intercalante fluorescente)



- coloration chimiques
- Isotopes radio-actifs et autoradiographie

3.2. Electrophorèse capillaire

3.3. Chromatographie liquide haute pression (HPLC)

- Chromatographie liquide-solide en phase réverse utilisant une forte pression (cf cours protéines)
- DHPLC : HPLC en conditions dénaturantes

4. Synthèse chimique d'ADN

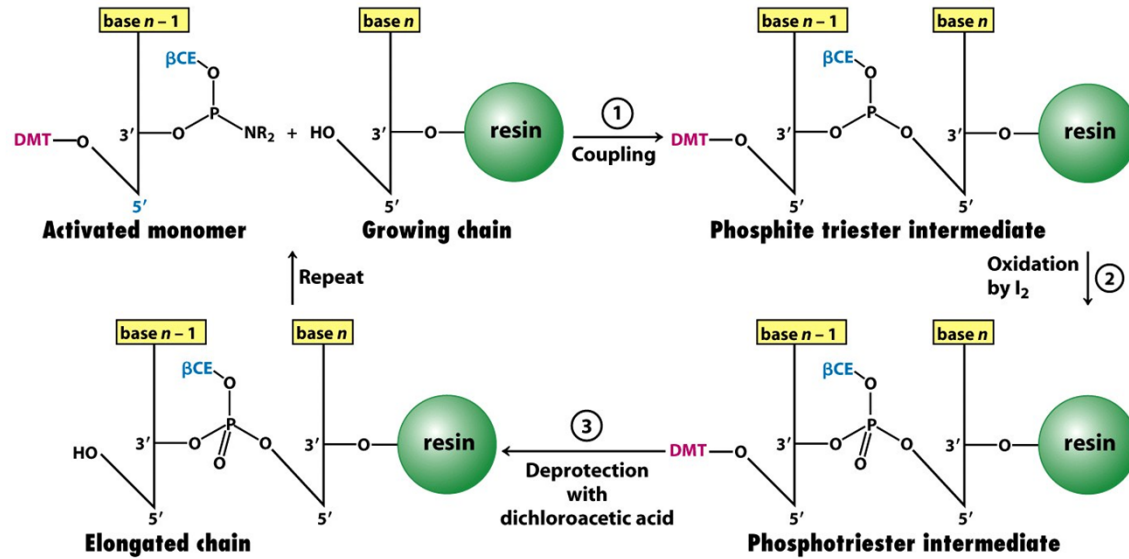


Figure 5-6
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

II. Hybridation moléculaire

1. Sondes moléculaires et hybridation

- hybridation : association de 2 séquences d'acides nucléiques sous forme simple brin sur la base de leur complémentarité

5' caggtag~~tc~~atctgattactgacatgg

5' caggtagggatactgaactgacatgg

5' ~~tc~~atctgatt
gtccatc~~agtagacca~~atgactgtacc 5'



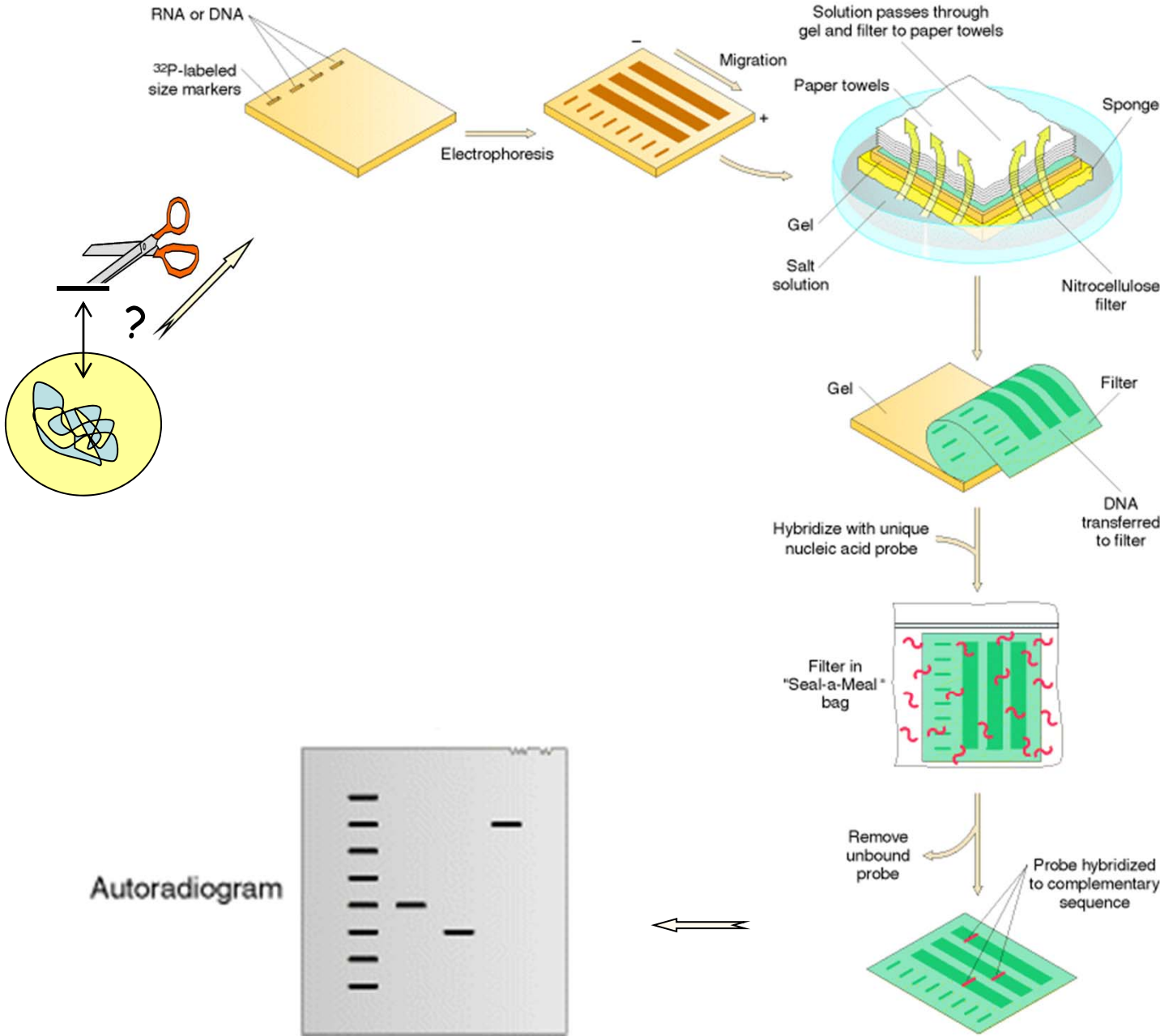
gtccatccctatgacttgactgtacc 5'

II. Hybridation moléculaire

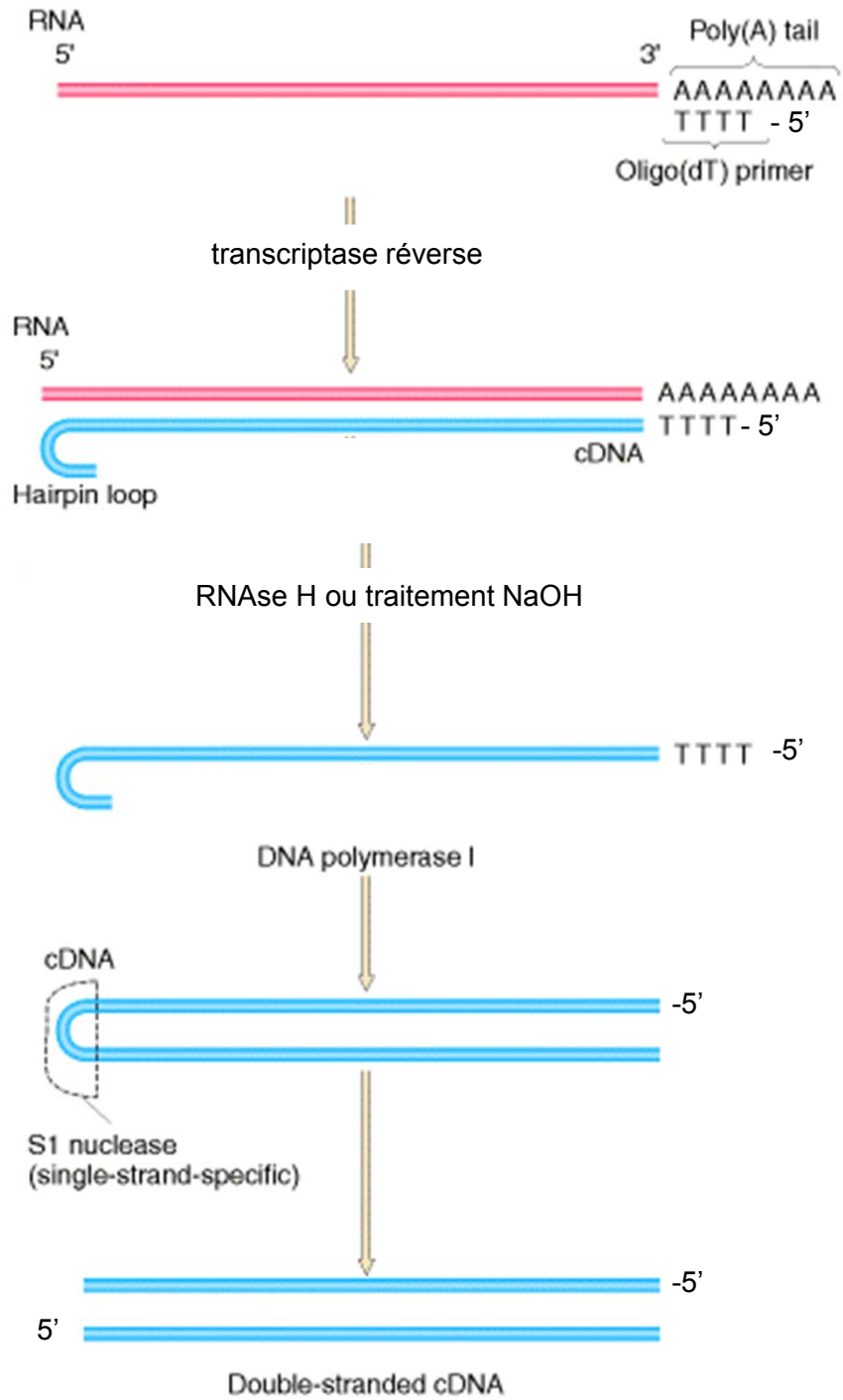
1. Sondes moléculaires et hybridation

- hybridation : association de 2 séquences d 'acides nucléiques sous forme simple brin sur la base de leur complémentarité
- sonde : séquence d 'ADN complémentaire de la séquence cible
- facteurs ayant une influence sur l'hybridation
 - la température: la température optimale d'hybridation est en général inférieure au T_m de la sonde
 - la taille des fragments ou des sondes
 - la force ionique: l'hybridation est accélérée en forte concentration saline
 - la nature des hybrides : la stabilité des hybrides (des plus stables aux moins stables est la suivante: ARN/ARN > ARN/ADN > ADN>ADN
- types de sondes
 - sonde génomique : fragment obtenu par coupure de l'ADN génomique
 - sonde ADNc : sonde ADN obtenue par transcription réverse d 'un ARNm messager (= séquence codante)
 - sonde oligonucléotides : ADN (ou ARN) simple brin de 18 à 50 nucléotides synthétisé chimiquement

2. Hybridation sur support : Southern blot (ADN), northern blot (ARN)



- Obtention d'un ADNc



III. Le clonage moléculaire

- obtenir une population de bactéries, de cellules ou d'organismes qui contiendront le même matériel génétique
 - population homogène de cellules identiques (population clonale)
 - organisme vivant identique à un organisme d'origine
- clonage - pour amplifier et conserver une séquence d'ADN
 - pour exprimer une séquence d'intérêt
 - pour introduire un gène dans des cellules ou des organismes
 - pour produire une protéine d'intérêt
 - ...
- principales étapes du clonage
 1. **préparation** de l'**insert** à cloner (fragment d'ADN d'intérêt) et du **vecteur**
 2. **intégration**-ligation de l'insert dans le vecteur
 3. **transformation** de l'hôte par le vecteur recombiné
 4. **sélection** des hôtes recombinants

1. Vecteurs

➤ propriétés générales

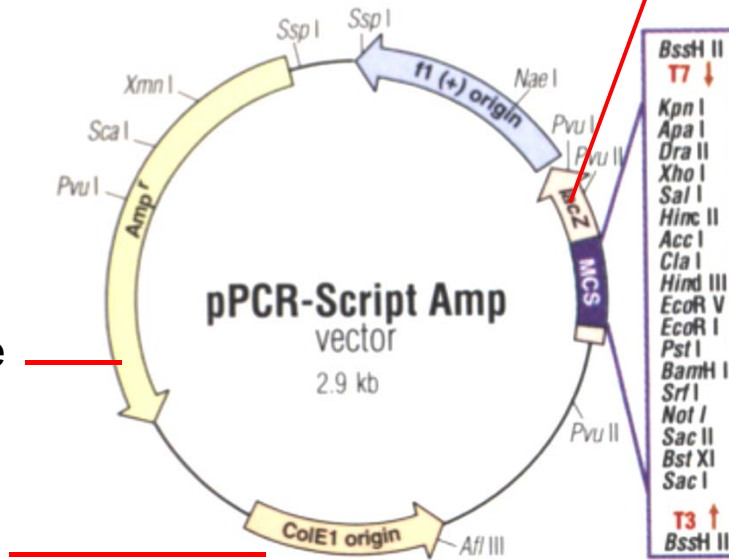
➤ les plasmides

gène de résistance
à un antibiotique

origine de réplication

gène de
sélection (lac Z)

site de clonage
multiple



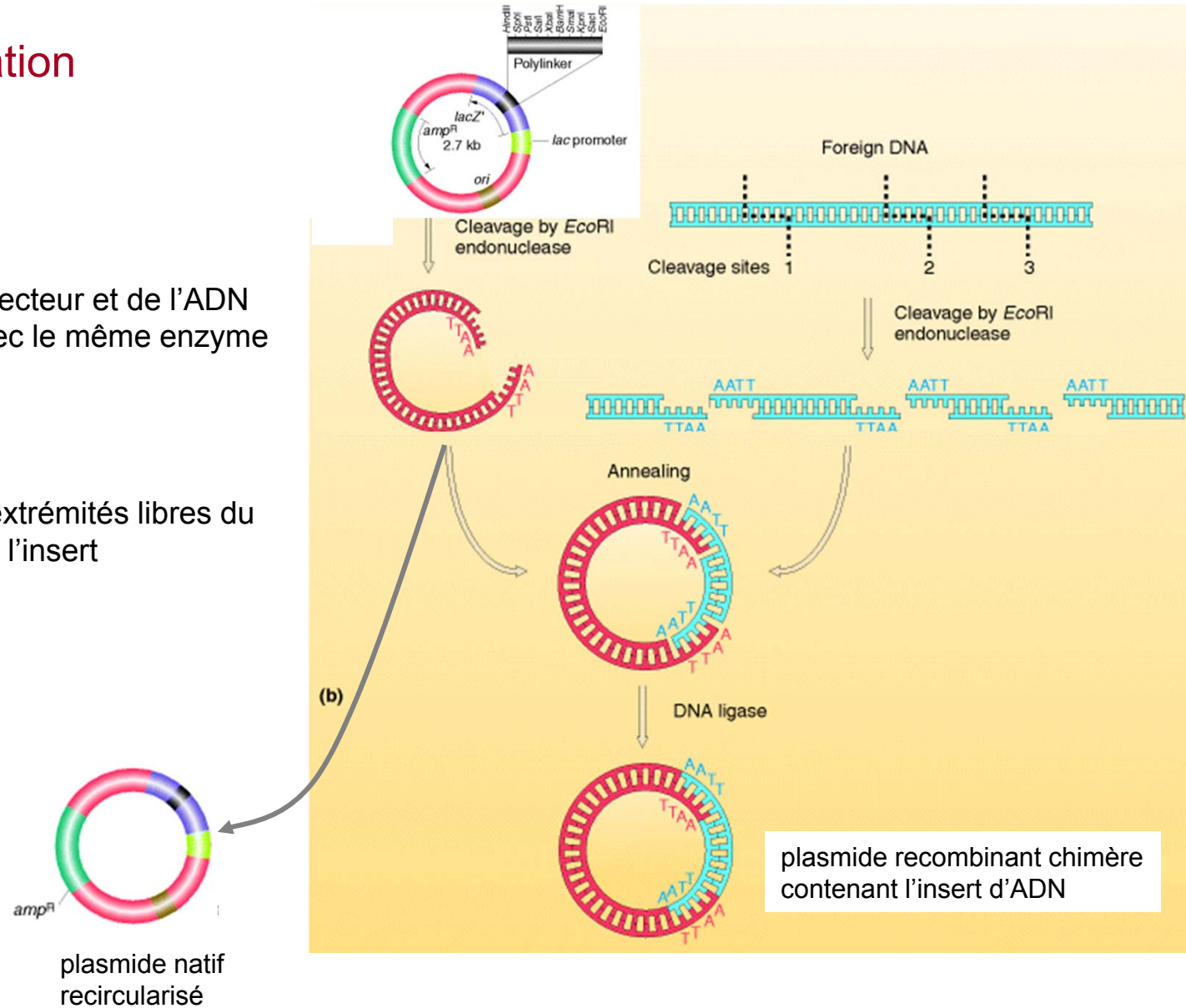
➤ phages, cosmides, yac et bac, vecteurs viraux, vecteurs navettes...

2. Intégration, transformation et sélection d'un vecteur recombinant

2.1. Intégration

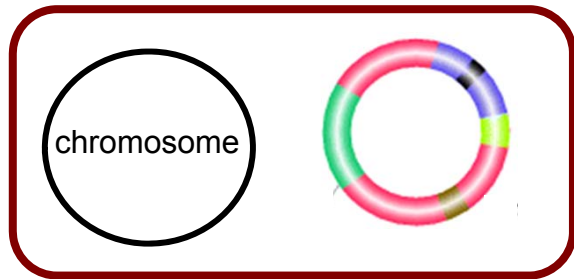
coupeure du vecteur et de l'ADN à intégrer avec le même enzyme de restriction

ligation des extrémités libres du vecteur et de l'insert

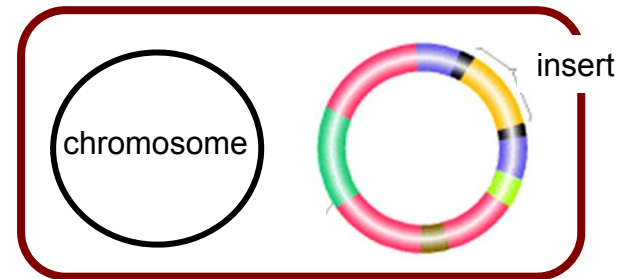


2.2. Transformation et sélection des bactéries hôtes

- les plasmides sont introduits dans les bactéries : la transformation

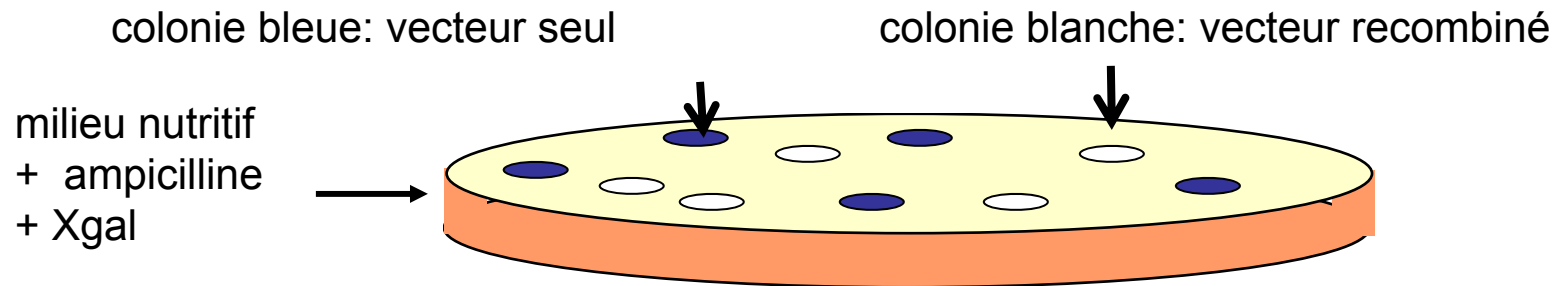


bactérie avec plasmide natif recircularisé



bactérie avec plasmide recombinant

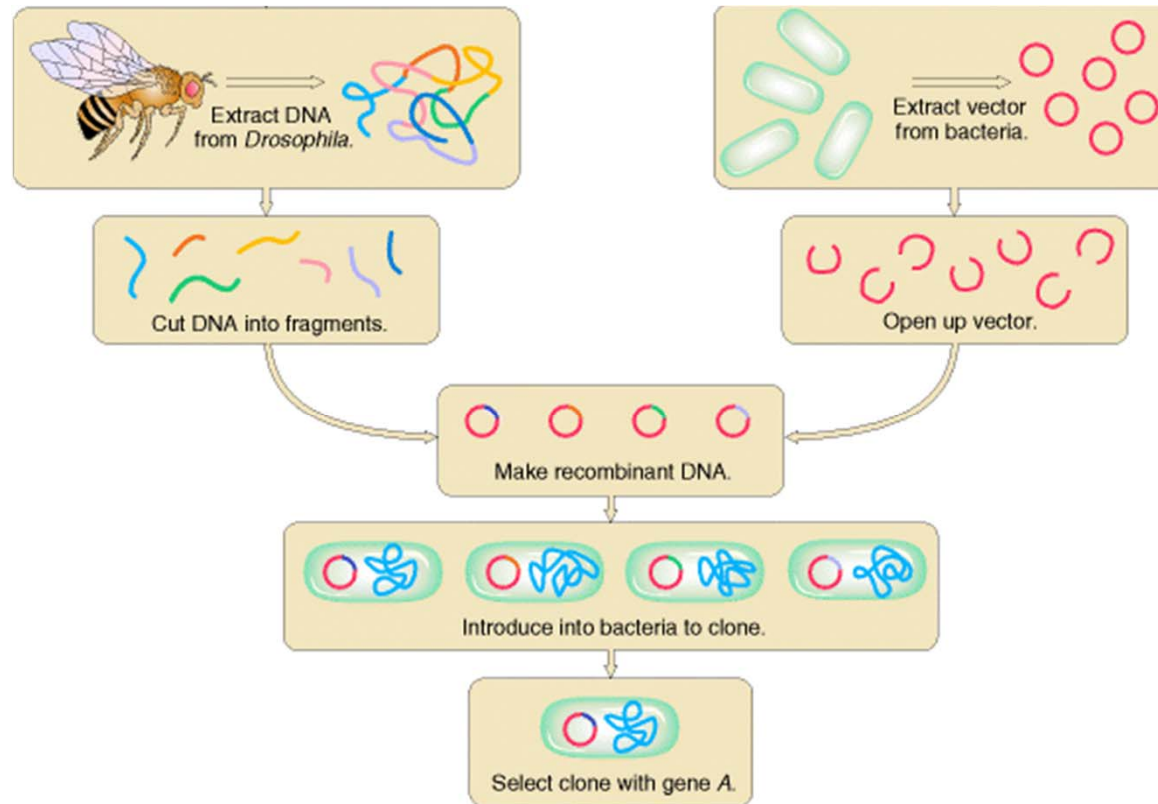
- les bactéries ayant intégré un plasmide sont sélectionnées grâce aux 2 gènes de sélection présents dans le vecteur (ex choisi : gène de résistance à l'ampicilline et gène permettant l'expression de la β -galactosidase)



3. Les « banques » d 'ADN

➤ banque génomique

- obtenue en intégrant des fragments d 'ADN génomique dans des vecteurs.
- représente tout le matériel génétique

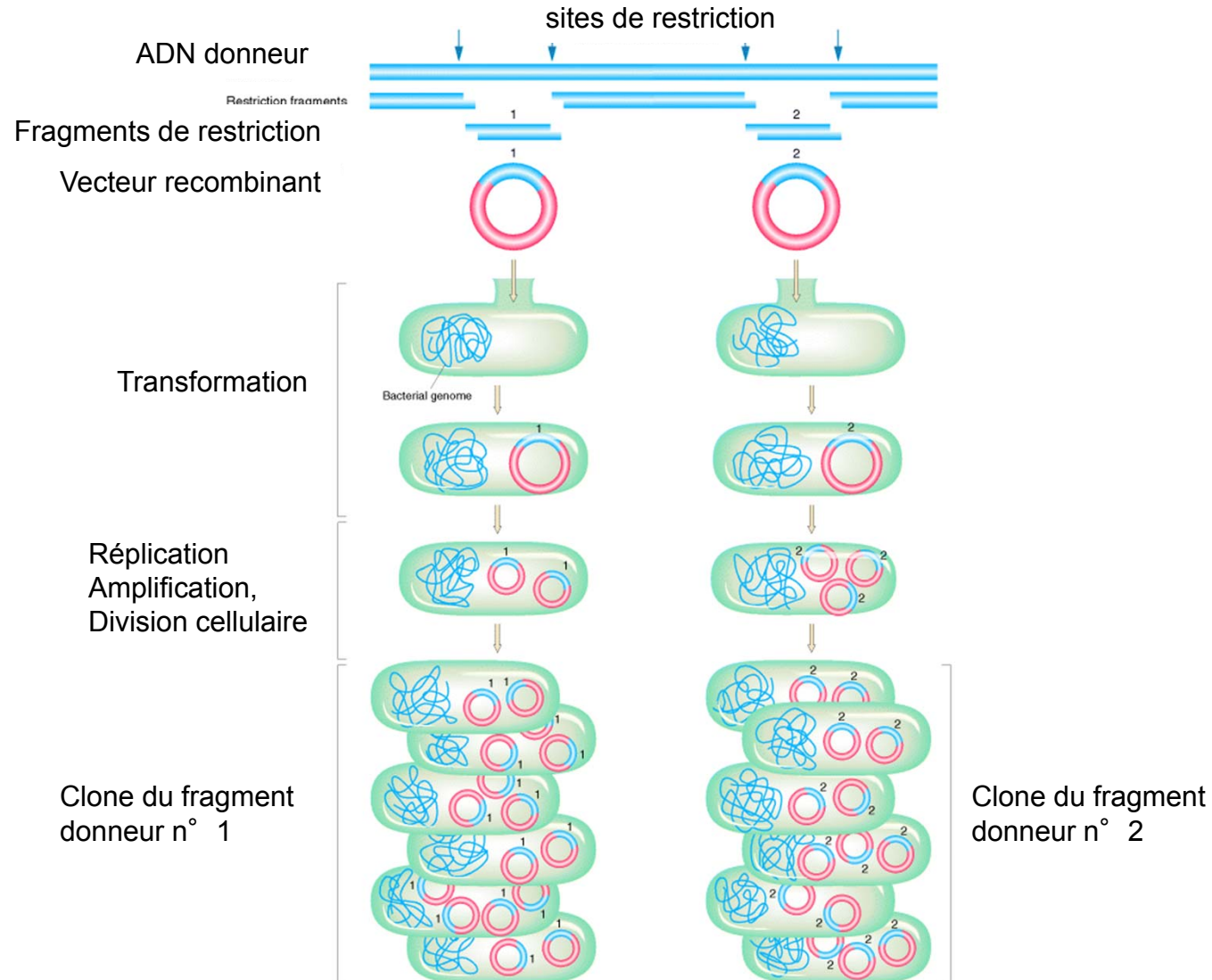


➤ banque ADNc :

- obtenue en intégrant des fragments d 'ADNc dans des vecteurs
- ne représente que l 'ADN exprimé dans les cellules à partir desquelles l 'ARNm a été extrait

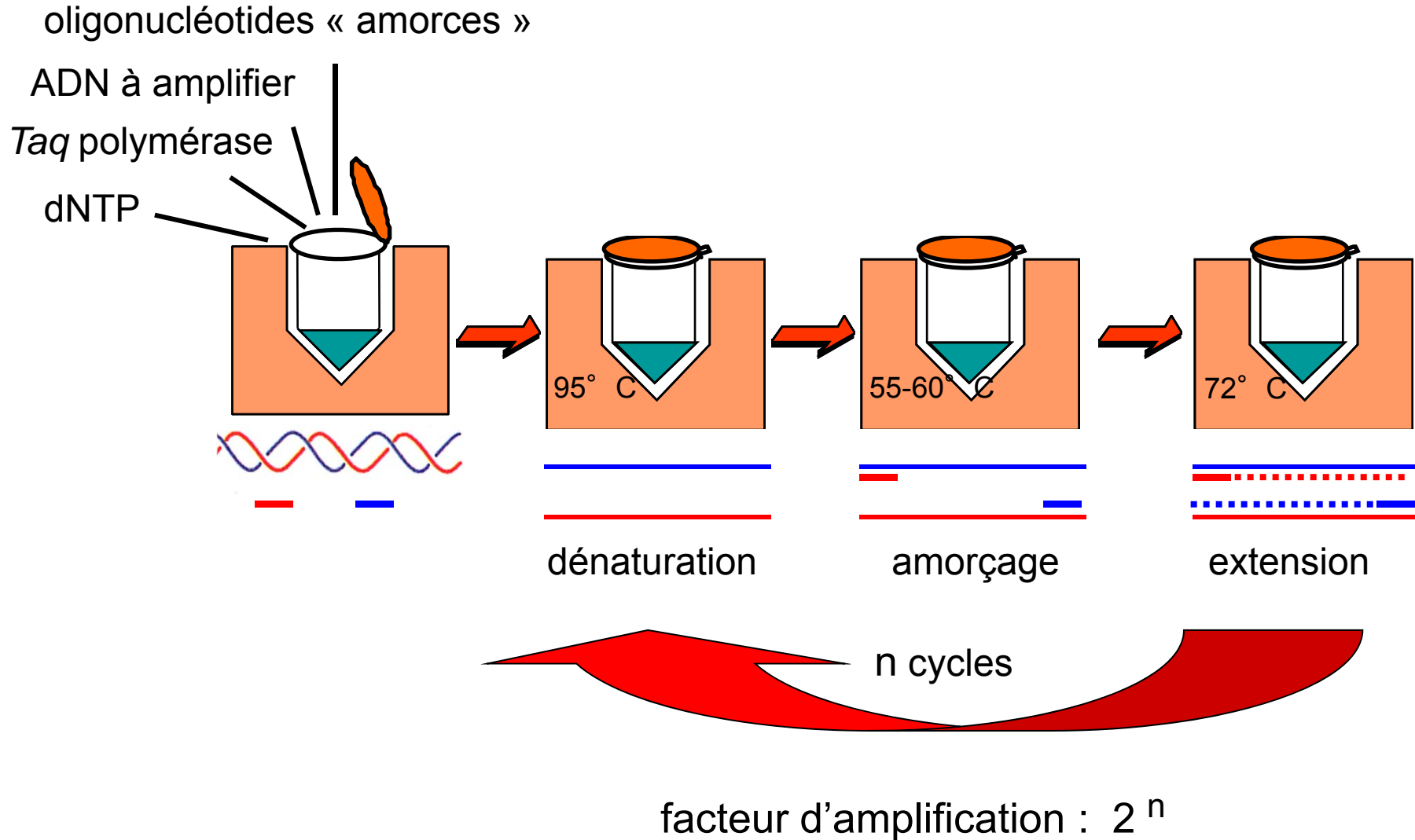
IV. Amplifier l'ADN

1. Amplification par clonage



2. Amplification PCR : polymerase chain reaction

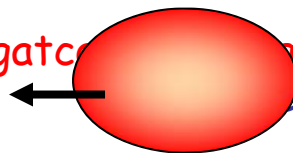
(amplification enzymatique en chaîne par ADN polymérase thermostable)



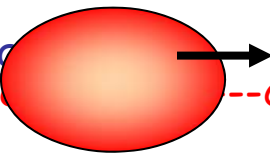
5' --agttacttaatgctgatcgtacgtcgatcg-----gatcgatcgtcgatcgatcgtagctgct--
--tcaatgaattacgactagcatgcagctagc-----ctagctagcagctagctagcatcgacga-- 5'



5' --agttacttaatgctgatcgtacgtcgatcgtacgtcgatcgtagctgct--
--tcaatgaattacgactagcatgcagctagcagctagctagcatcgacga-- 5'



5' --agttacttaatgctgatcgtacgtagctgct--
--tcaatgaattacgactagcatgcagctagctagcatcgacga-- 5'



5' --agttacttaatgctgatcgtacgtcgatcg-----gatcgatcgtcgatcgatcgtagctgct--
--tcaatgaattacgactagcatgcagctagc-----ctagctagcagctagctagcatcgacga-- 5'

5' --agttacttaatgctgatcgtacgtcgatcg-----gatcgatcgtcgatcgatcgtagctgct--
--tcaatgaattacgactagcatgcagctagc-----ctagctagcagctagctagcatcgacga-- 5'

- Variantes de la PCR « classique » : PCR « hot start », PCR « long range », PCR multiplex ...

- Quantification : détermination du nombre de copies cibles initiales

$$\text{=====} \times n \text{ cycles} \longrightarrow A = A_0 \times (1+E)^n \text{ avec } 0 < E < 1$$

détermination de E (efficacité) ←

- par PCR « temps réel » où l'amplification est mesurée à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent qui s'incorpore dans le double brin formé
- par utilisation d'un standard interne

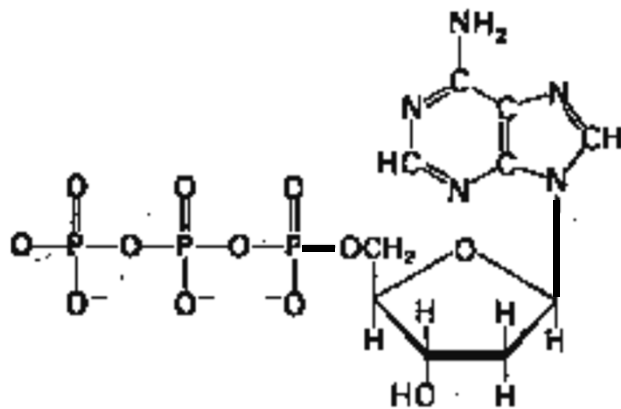
- amplification à partir d'ARN : RT-PCR



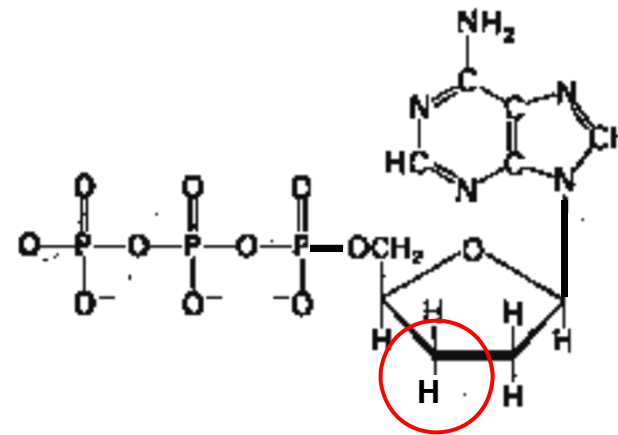
V. Séquencer l'ADN

1. Méthode enzymatique (aux di-déoxynucléotides) de Sanger

- matrice ADN
- amorce de séquençage
- ADN polymérase
- dNTP & ddNTP (didéoxy-NTP)



dATP



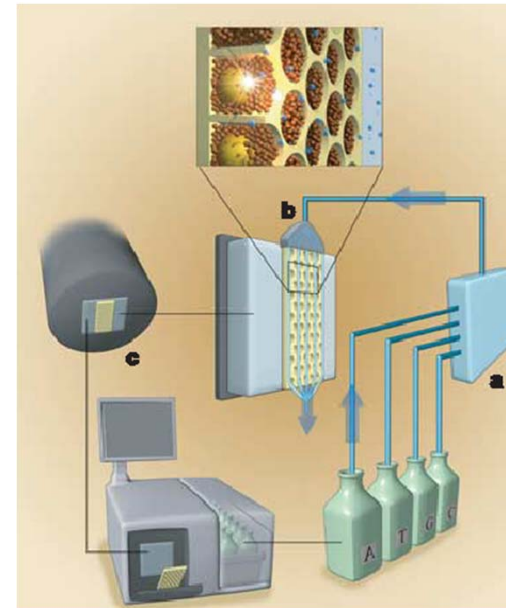
ddATP

2. Méthode chimique de Maxam et Gilbert

3. Pyro-séquençage

4. Séquençage haut-débit

- Séquençage parallèle
- Puces de re-séquençage



- Puces de re-séquençage

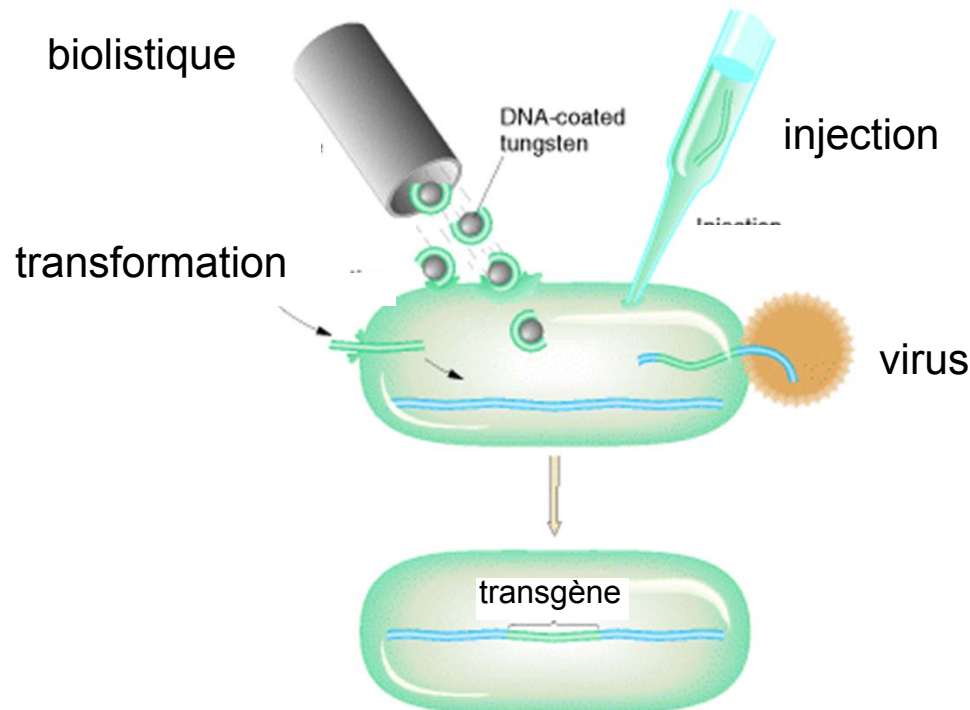


VI. Modifier le matériel génétique des cellules eucaryotes

1. Mutagénèse

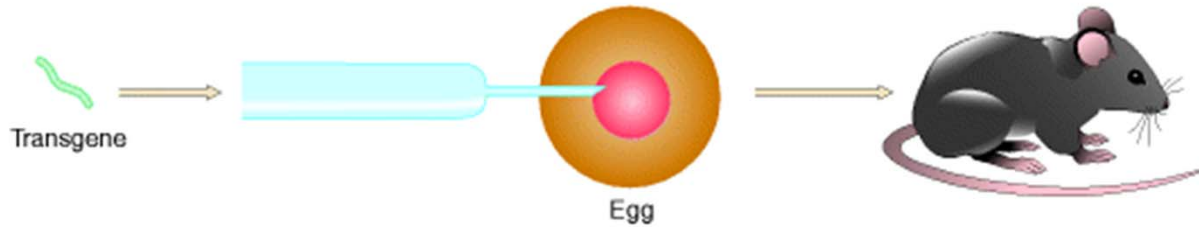
2. Transfert *ex vivo* et *in vivo* de matériel génétique

- transfection, vecteurs de transfection, marqueurs de sélection (gènes de résistance aux antibiotiques, thymidine kinase, dihydrofolate réductase...)



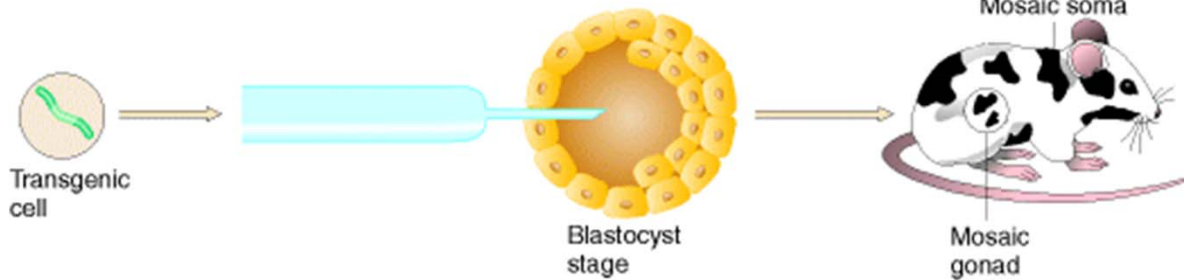
➤ Modification des cellules germinales ou des cellules somatiques

(a) Injection of fertilized egg



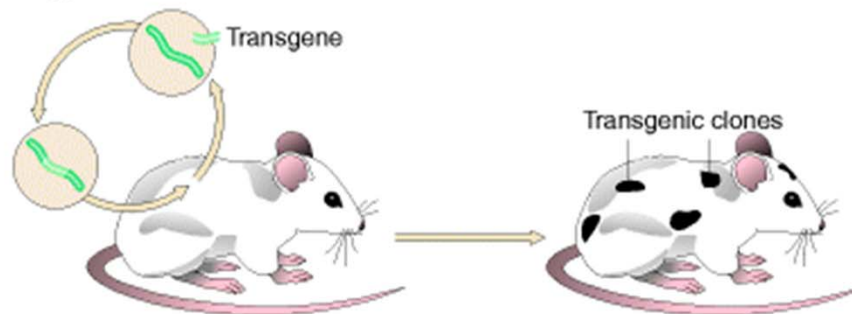
modification de toutes les cellules de l'organisme

(b) Germinal therapy



modification d'une partie des cellules de l'organisme y compris au niveau des gonades (animal chimère)

(c) Somatic therapy



modification d'une cellule ou d'un clone cellulaire

VII. Méthodes d'étude de l'expression des gènes

1. Analyse qualitative et quantitative des transcrits

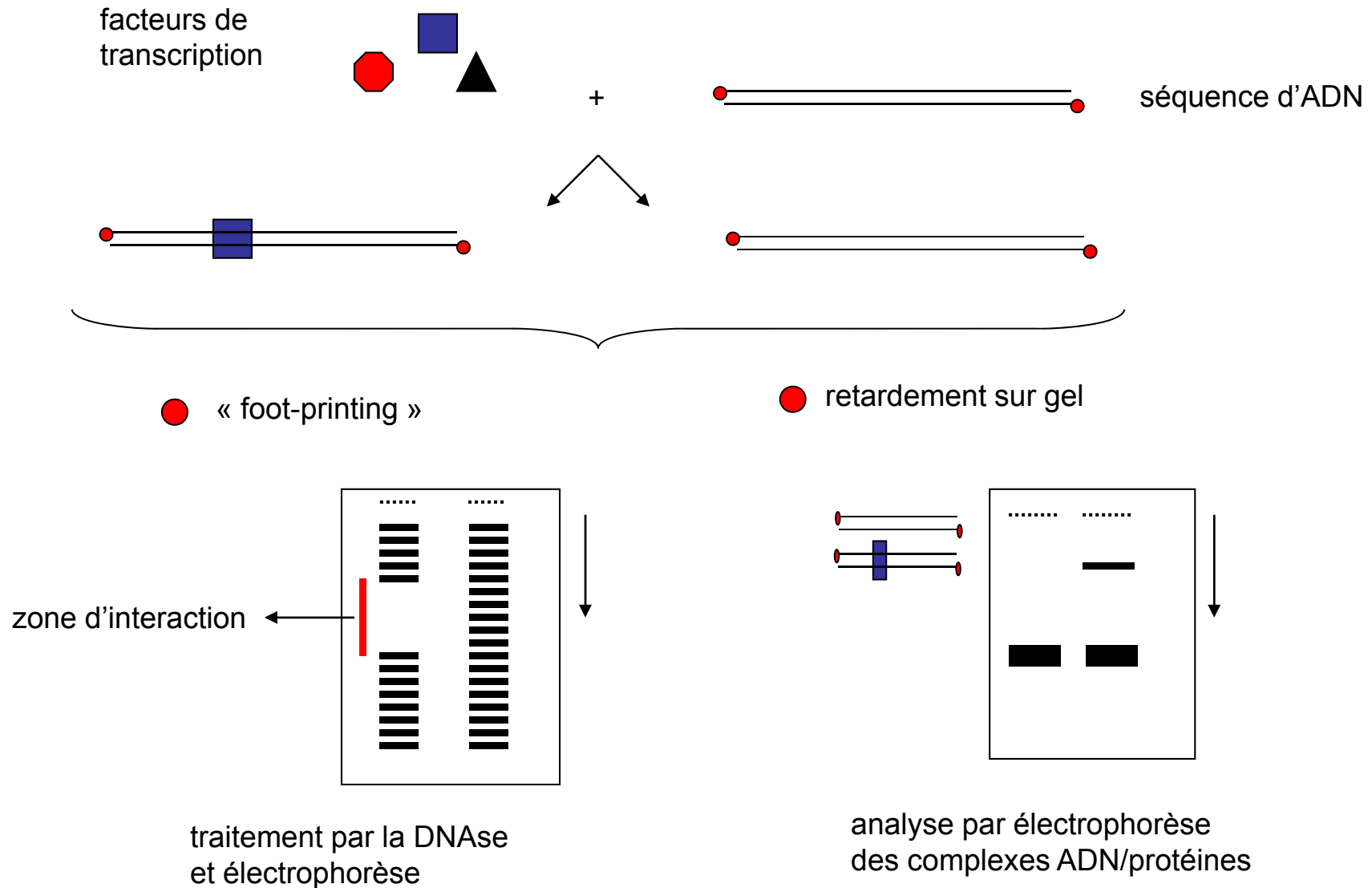
- northern blot :
 - taille du transcrit
 - intermédiaires de maturation
 - estimation semi-quantitative
- RT-PCR : quantification

2. Analyse dynamique de la transcription

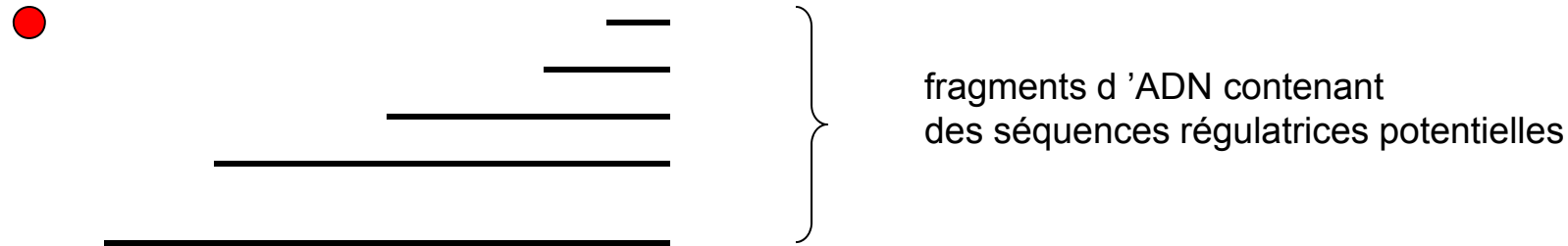
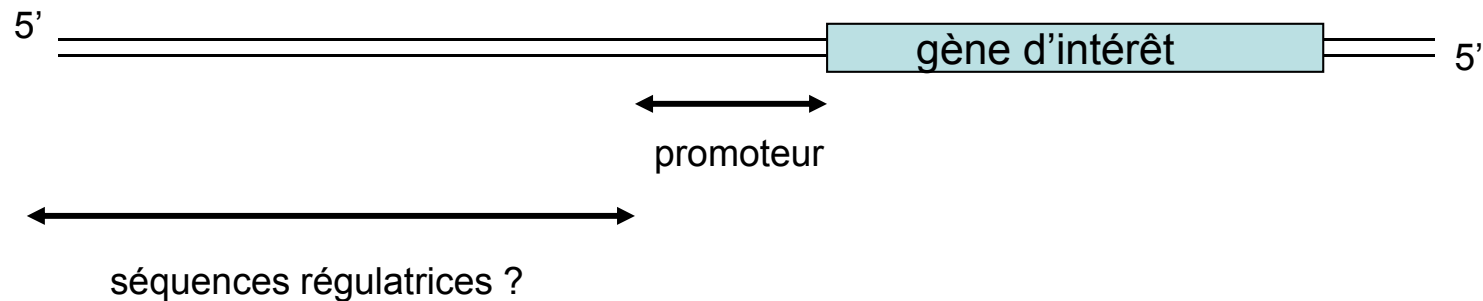
- élongation *in vitro* (après isolement des noyaux) et en présence d'UTP ³²P de la transcription initiée *in vivo*
 - la quantité d'UTP incorporée =
 - (f) vitesse de transcription
 - (f) ARN pol fonctionnelles

3. Analyse des éléments de régulation de la transcription

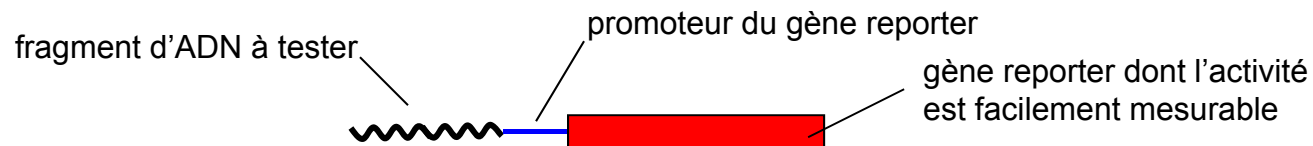
3.1. analyse de l'interaction entre facteurs protéiques trans et séquences ADN cis



3.2. Caractérisation de séquences régulatrices



- insertion de ces séquences devant le promoteur d'un gène « reporter »



- intégration de la construction dans un vecteur, transfection cellulaire et mesure de l'expression du gène « reporter » dans la cellule modifiée

expression du gène = (f) protéine = (f) ARNm) = (f) rôle de la séquence testée

4. Méthodes d 'analyse globale post génomique

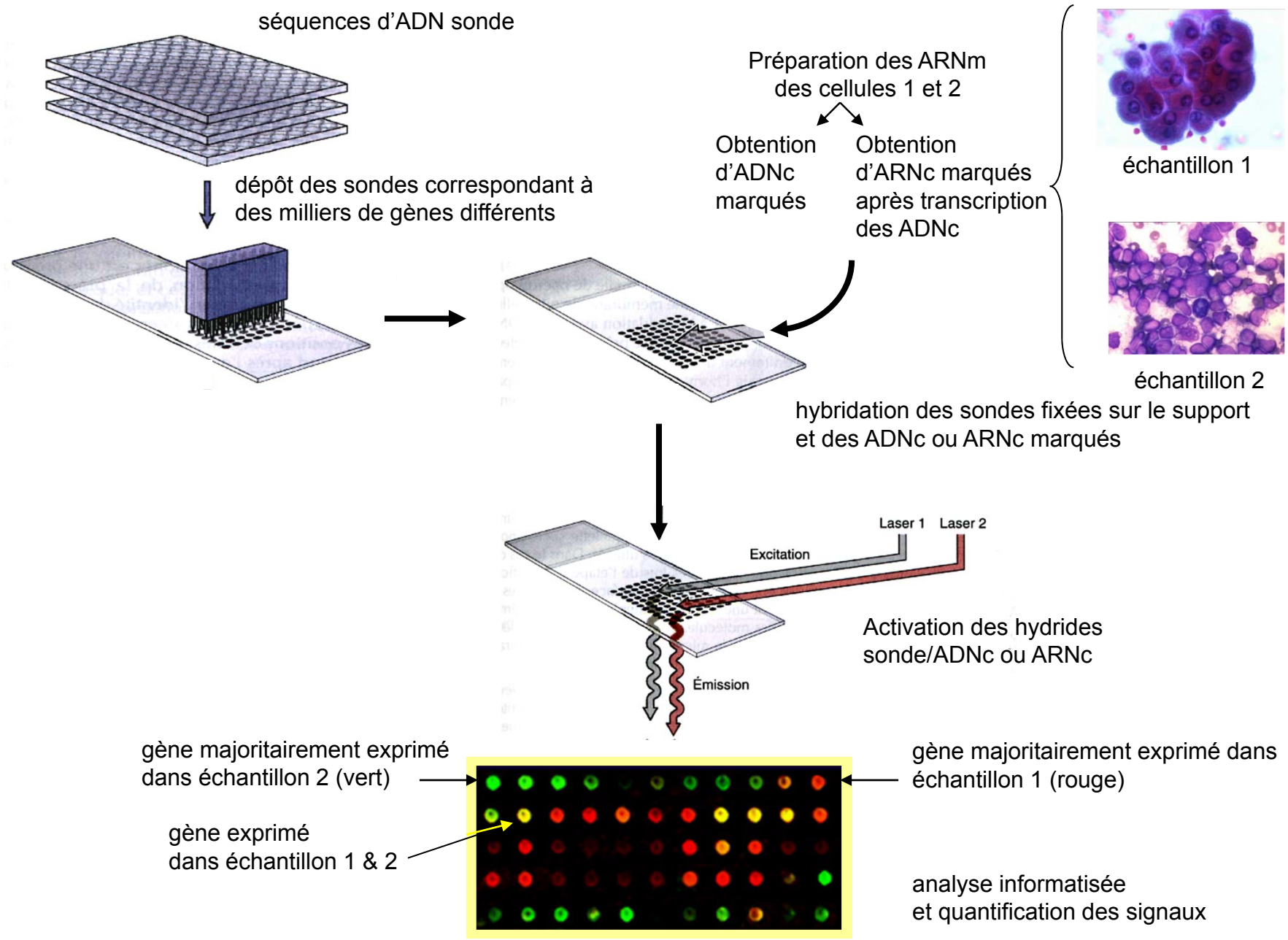
➤ analyse du transcriptome

➤ analyse du protéome

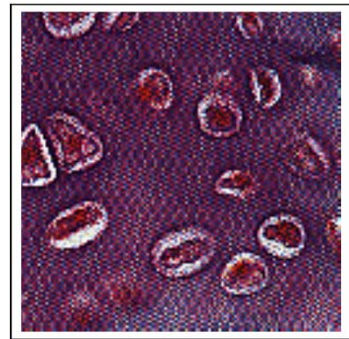
➤ analyse du métabolome

} analyses simultanées du produit
(ARN, protéine, activité) de
l'expression d'une grande
population de gènes

4.1. Analyse du transcriptome



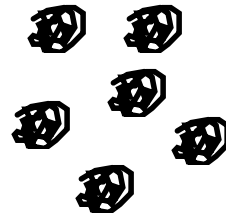
4.2. Analyse du protéome



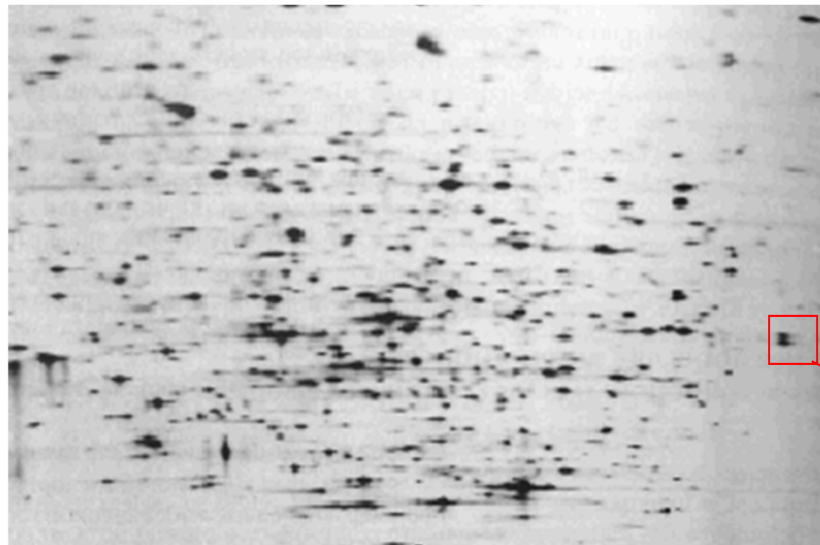
lyse et extraction



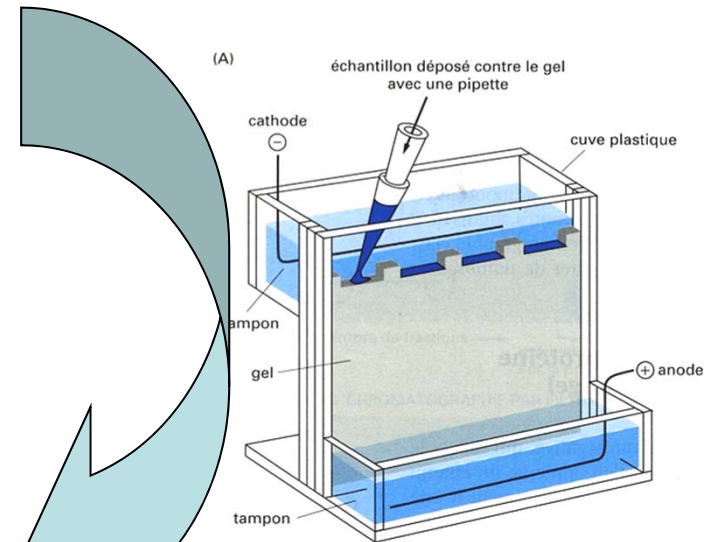
protéines



charge



taille



électrophorèse 2D


- Analyse de la protéine
- spectrométrie de masse
 - immuno-détection
 - séquençage

5. Analyse du rôle d'un gène

4.1. expression

4.2. extinction

- utilisation de anti-sens et d'ARN interférents

- hybride ARNm normal / ARN anti-sens :  expression

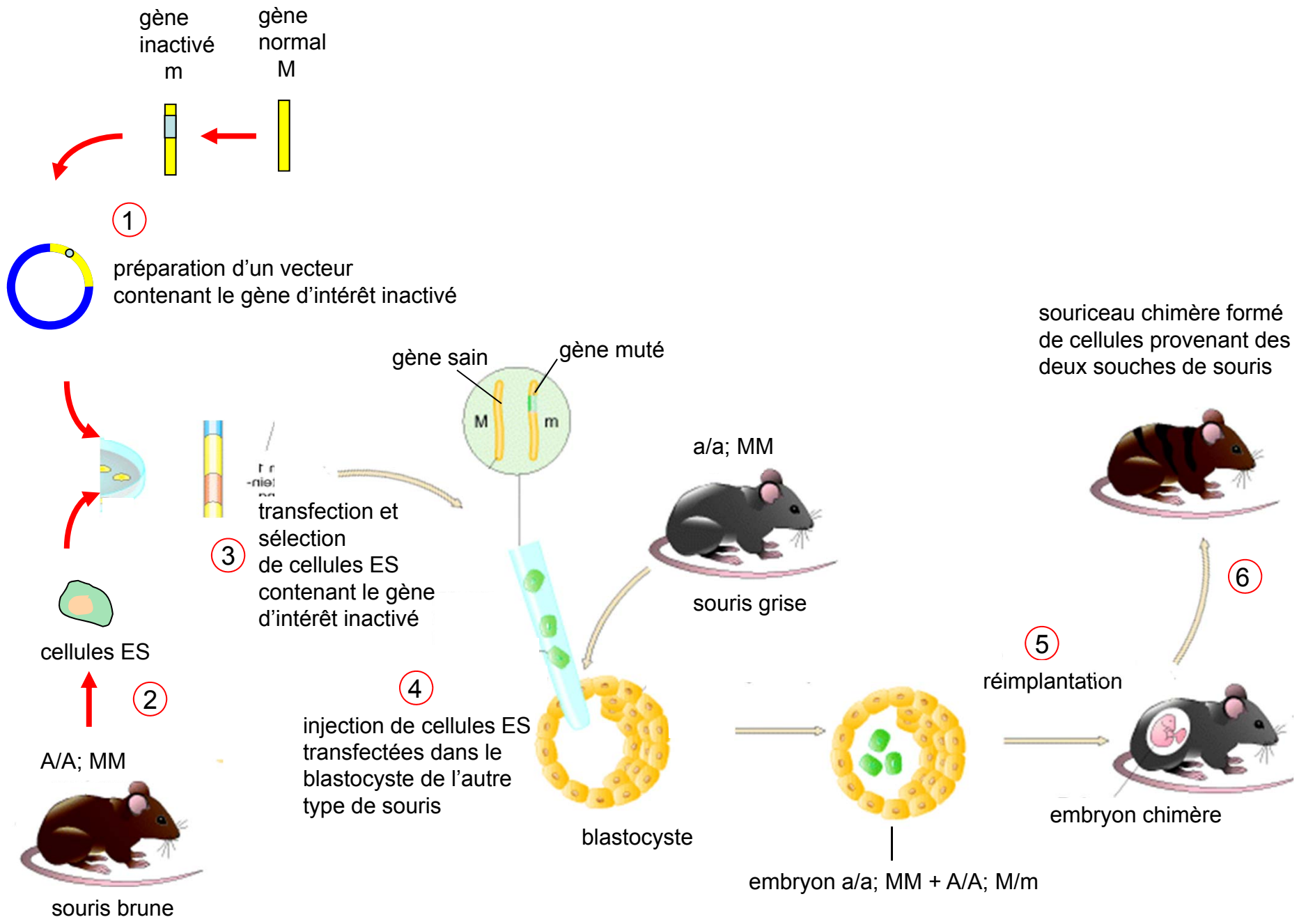
- hybride ARNm normal / ARNsi : dégradation des ARNm =  expression

- invalidation génique

- remplacement du gène ciblé par recombinaison homologue dans une cellule souche embryonnaire par :

- un gène inactivé (KO constitutif, KO conditionnel)
- un gène modifié (K-In)

- animaux chimériques et sélection des homozygotes par croisement



VIII. Bioinformatique

- clonage « in silico »
- analyse et traitement des séquences
- annotation des génomes
- analyse génétique (lod scores, haplotypage...)
- banques de données
 - séquences d'ADN, ARN, protéines
 - <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>
 - http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/
 - <http://us.expasy.org/sprot>
- génétiques :
 - OMIM maladies génétiques: <http://www.ncbi.nih.gov/Omim/>
 - HMDB mutations, <http://www.uwcm.ac.uk>
 - info-biogène : <http://www.infobiogen.fr>
 - ...
- bibliographiques : <http://www.ncbi.nih.gov/PubMed/>

Que faut il retenir ^a :

- savoir pourquoi la nature des prélèvements nécessaires à l'étude peut varier selon que l'on analyse l'ADN ou l'ARNm
- connaître le principe général de l'extraction de l'ADN
- savoir définir les termes d'enzyme de restriction, de palindrome, d'endonucléase, d'exonucléase
- savoir définir les 3 grands types de polymérase
- savoir quelles données peuvent être obtenues par une électrophorèse de fragments d'ADN
- connaître le principe de l'hybridation et les différents types de sondes utilisables
- connaître le principe du clonage à l'aide d'un vecteur plasmidique , savoir définir ce qu'est un banque génomique, un banque d'ADNc
- connaître le principe de la PCR et savoir dessiner les 2 amorces nécessaires à une réaction de PCR, savoir définir ce qu'est l'efficacité d'une réaction PCR
- connaître le principe de la réaction de séquençage aux didéoxynucléotides
- connaître les principales méthodes d'analyse de l'ARN et des interactions entre ADN et facteurs de régulation
- connaître les méthodes d'analyse du rôle d'un gène

^a : *les exemples numériques et de pathologies sont destinés à illustrer le cours et à permettre une meilleure intégration des connaissances, de même les détails des séquences ou des protéines ainsi que les noms des médicaments cités à titre d'exemples ne sont pas à apprendre systématiquement*

Mentions légales

L'ensemble de cette œuvre relève des législations française et internationale sur le droit d'auteur et la propriété intellectuelle, littéraire et artistique ou toute autre loi applicable.

Tous les droits de reproduction, adaptation, transformation, transcription ou traduction de tout ou partie sont réservés pour les textes ainsi que pour l'ensemble des documents iconographiques, photographiques, vidéos et sonores.

Cette œuvre est interdite à la vente ou à la location. Sa diffusion, duplication, mise à disposition du public (sous quelque forme ou support que ce soit), mise en réseau, partielles ou totales, sont strictement réservées à l'université Joseph Fourier (UJF) Grenoble 1 et ses affiliés.

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits à l'Université Joseph Fourier (UJF) Grenoble 1, et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.