



Génétique moléculaire et cellulaire P8

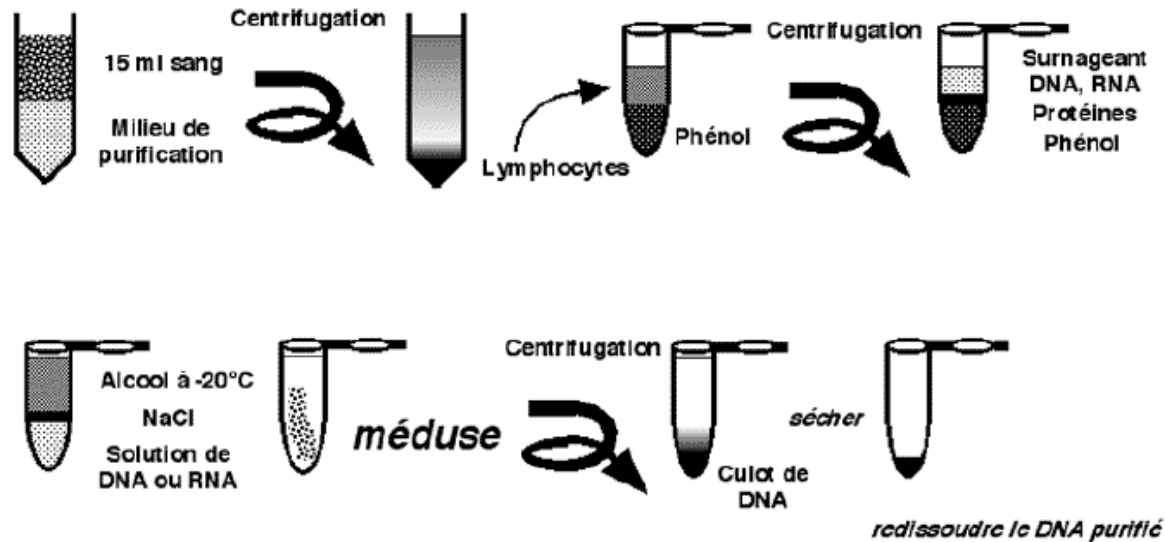
Module : Génétique

2eme année Pharmacie

Dr. Khedidja BENSEDDIK

La biologie moléculaire

Le DNA au laboratoire : Extraction et purification du DNA



- ✓ L'ADN est extrait à partir des lymphocytes d'une prise de sang sur EDTA (anticoagulant chélateur du Calcium).
- ✓ On sépare les lymphocytes des autres cellules sanguines par un gradient de densité, puis on les lave avant de les centrifuger en un culot de lymphocytes.
- ✓ On dissout ce culot dans un tampon et on pratique une extraction par le phénol, qui dissout les lipides et précipite les protéines en laissant les acides nucléiques en solution.
- ✓ On précipite enfin le DNA par l'alcool en présence de sel.
- ✓ Le DNA précipite en un nuage cotonneux blanchâtre (la « méduse ») qu'on centrifuge et qu'on lave avant de dissoudre le DNA purifié dans de l'eau distillée.

Le DNA au laboratoire : propriétés physico-chimiques

1. Taille et masse : ADN

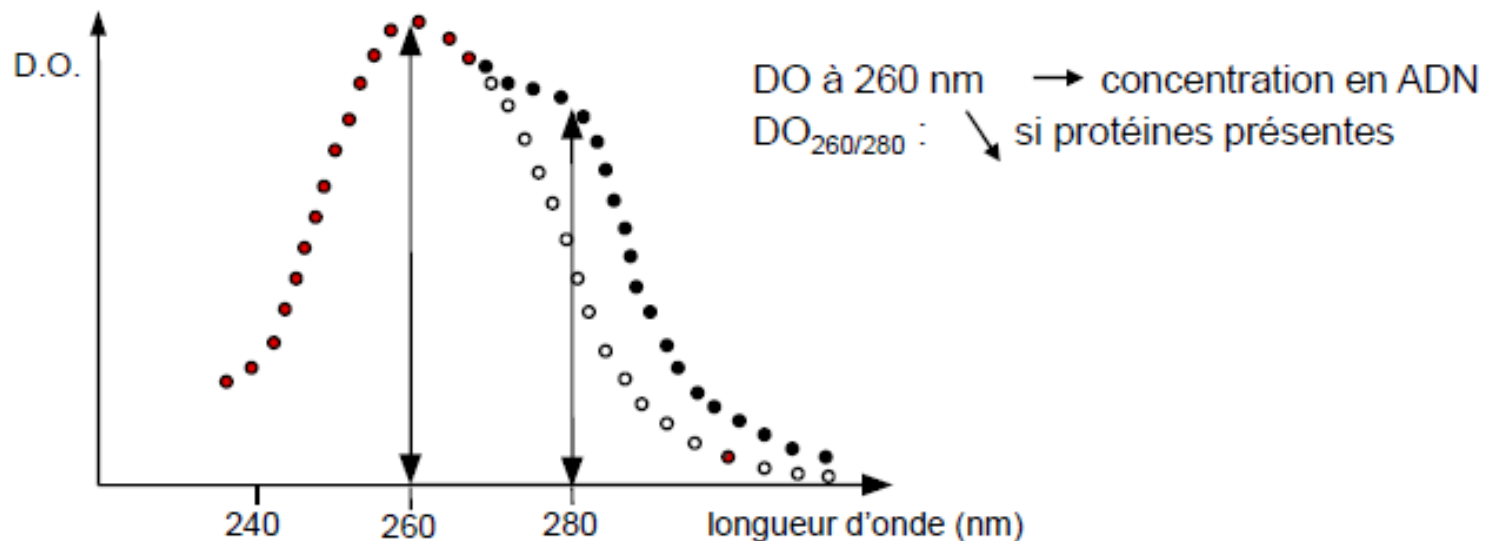
	ADN d'une cellule		
	taille	masse	longueur
adénovirus	$\approx 35 \cdot 10^3$ pb	$\approx 10^7$ Da	$\approx 1,1 \cdot 10^{-6}$ m
E. coli	$\approx 3,5 \cdot 10^6$ pb	$\approx 10^9$ Da	$\approx 1,3 \cdot 10^{-3}$ m
homme	$\approx 2 \times 3 \cdot 10^9$ pb	$\approx 10^{12}$ Da	≈ 2 m

1 kpb = 1000 pb, 1 Mpb = 1 000 000 pb...

ARN : de 15-20 nucléotides à quelques milliers de nucléotides

2. Absorption :

L'ADN a une absorption maximale à 260 nm à cause des bases.



Le DNA au laboratoire : propriétés physico-chimiques

3. Densité :

Lorsqu'on chauffe l'ADN, la viscosité diminue et la densité optique à 260 nm augmente. C'est l'**hyperchromicité** ou **effet hyperchrome**. Ceci est dû à la séparation des 2 brins d'ADN (appelée fusion).

4. Charge électrique :

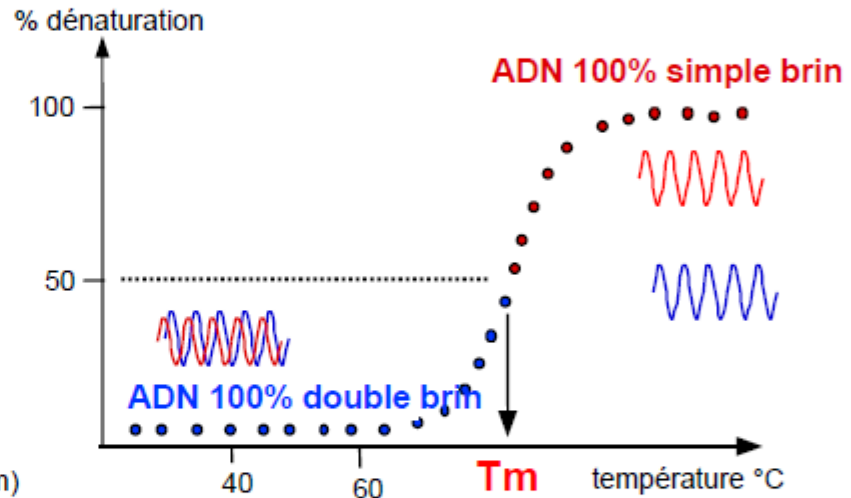
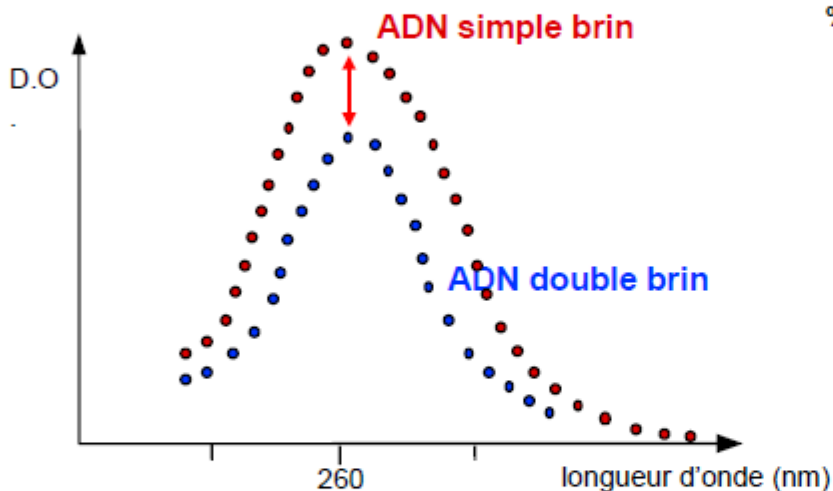
La charge est négative en raison des groupes phosphates. D'où la migration vers le pôle (+) dans un champ électrique.

5. Dénaturation/ Renaturation :

Est induite par l'augmentation de la température ou du pH.

Modulée par la taille du fragment, le % GC et la force ionique du milieu.

Caractérisée par l'hyperchromicité et la T_m .

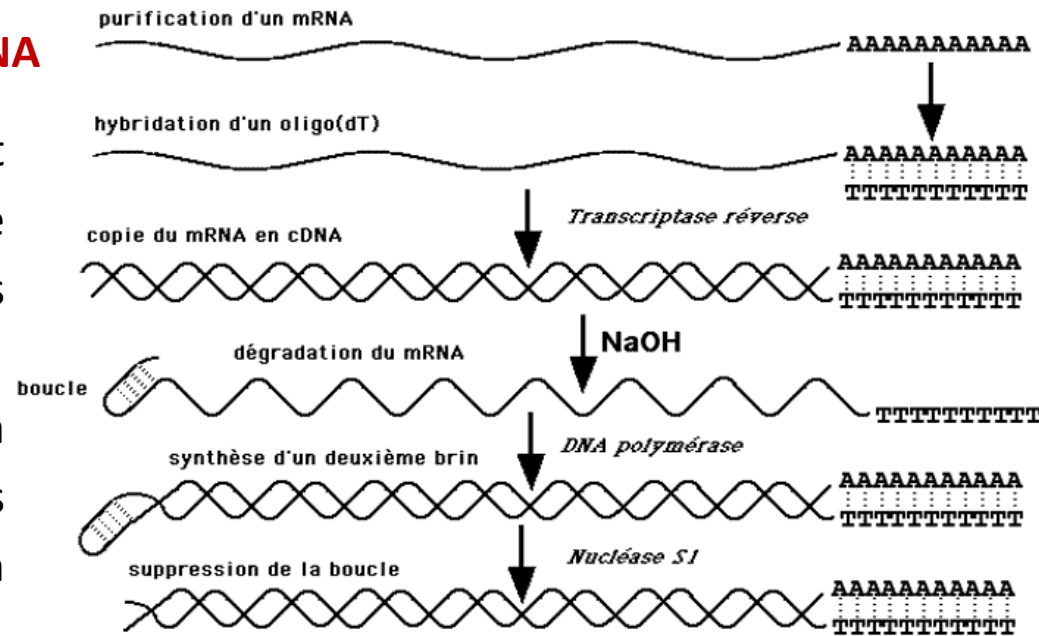


Le DNA au laboratoire : Synthèse d'un cDNA

✓ La manipulation et l'étude des RNA est difficile à cause de leur grande sensibilité aux ribonucléases qui les détruisent.

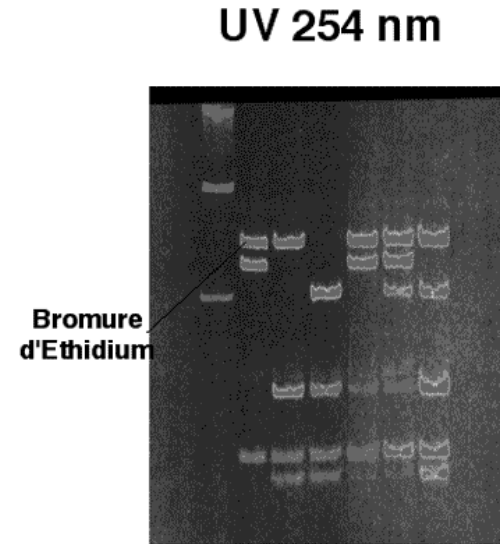
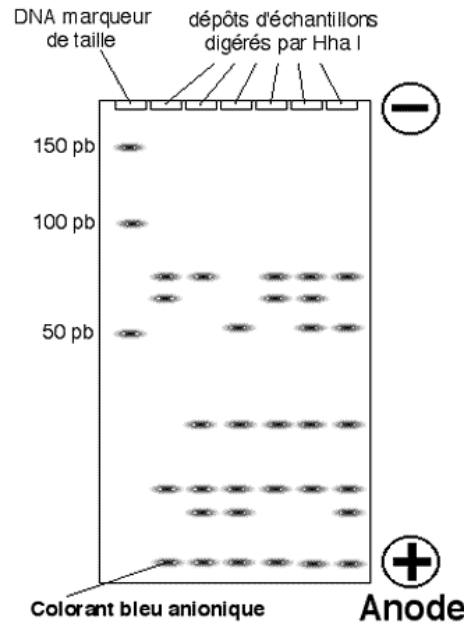
✓ Il est nécessaire de recopier la séquence en DNA pour qu'elle soit plus stable et qu'on puisse l'amplifier en fonction des besoins :

1. Le mRNA purifié avec des oligonucléotides poly(T) qui s'attachent à la queue poly(A).
 2. A partir de l'extrémité 3' de cette amorce poly(T) la transcriptase réverse, qui est une DNA polymérase, synthétise un brin de DNA complémentaire du messenger de départ.
 3. Ensuite, on dégrade le RNA par une base forte ou par une ribonucléase spécifique.
 4. Le brin de DNA fabriqué forme spontanément à son extrémité 3' une boucle en épingle à cheveux en s'hybridant sur lui-même.
 5. L'extrémité 3' de cette boucle va servir de site de démarrage pour la DNA polymérase.
 6. Une nucléase spécifique du DNA simple brin supprimera la boucle de l'extrémité.
- ✓ On peut ainsi constituer autant de cDNA qu'il existe de messagers dans une cellule : l'ensemble de ces cDNA forme une « banque de cDNA ».



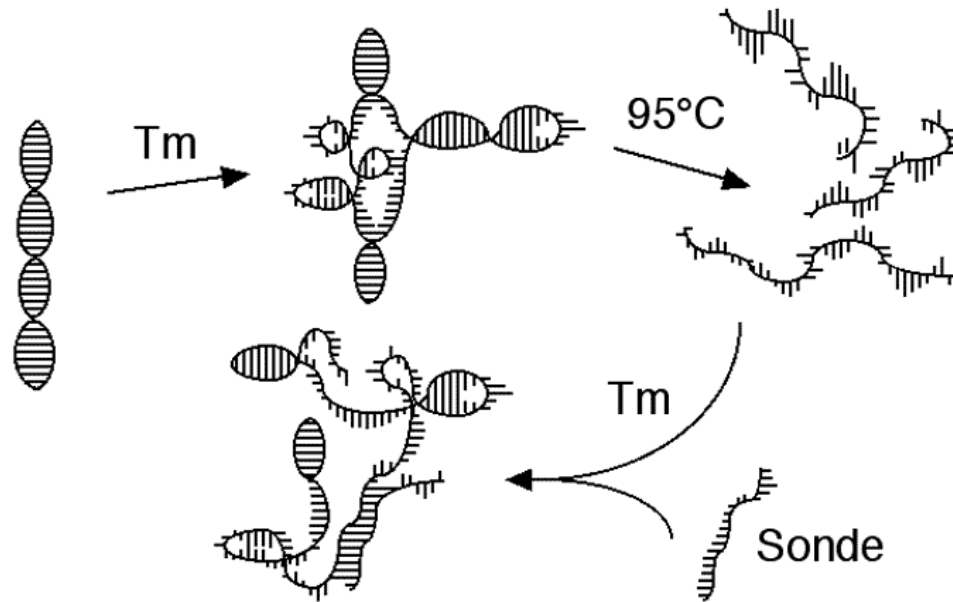
Le DNA au laboratoire : Electrophorèse de DNA

✓ Les fragments d'un DNA digéré par une enzyme de restriction comme Hha I, sont des anions et si on les soumet dans un gel à un champ électrique, ils migrent vers le pôle positif (anode) à une vitesse d'autant plus grande qu'ils sont de taille plus petite :



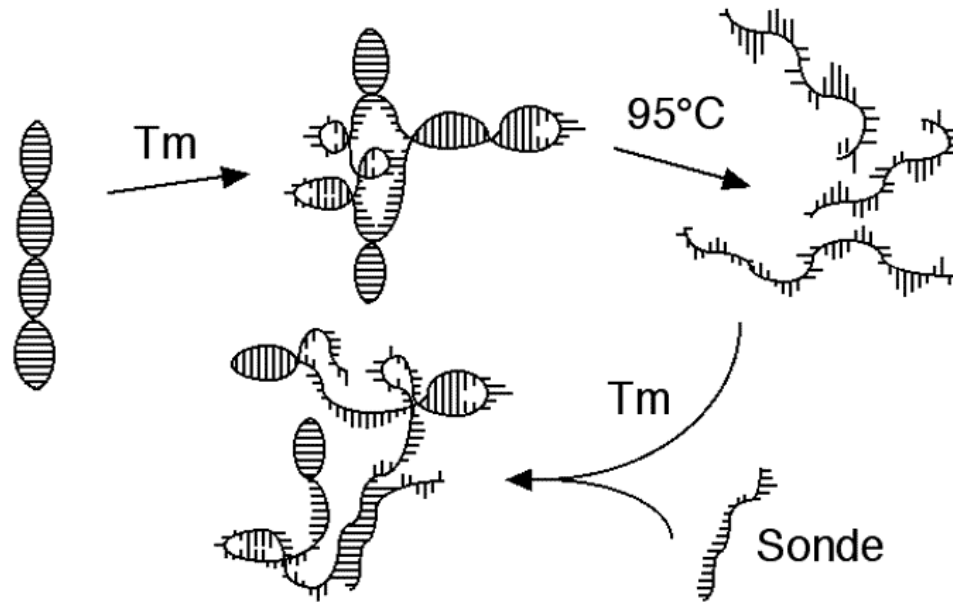
1. On place dans un des puits de dépôt des fragments de DNA de tailles connues pour servir de marqueurs de taille.
2. On ajoute dans les dépôts deux colorants : un bien visible sur le gel qui va migrer très rapidement avant les fragments de DNA pour limiter la distance parcourue au bord de l'anode ;
3. Un autre, le bromure d'éthidium qui se fixe spécifiquement au DNA quelle que soit la séquence et qui émet une fluorescence mauve lorsqu'on l'éclaire avec des rayons ultra-violet.
4. On examine le gel sous lumière ultra-violette à 254 nm et on photographie les fragments de DNA digéré.

Le DNA au laboratoire : Hybridation d'une sonde



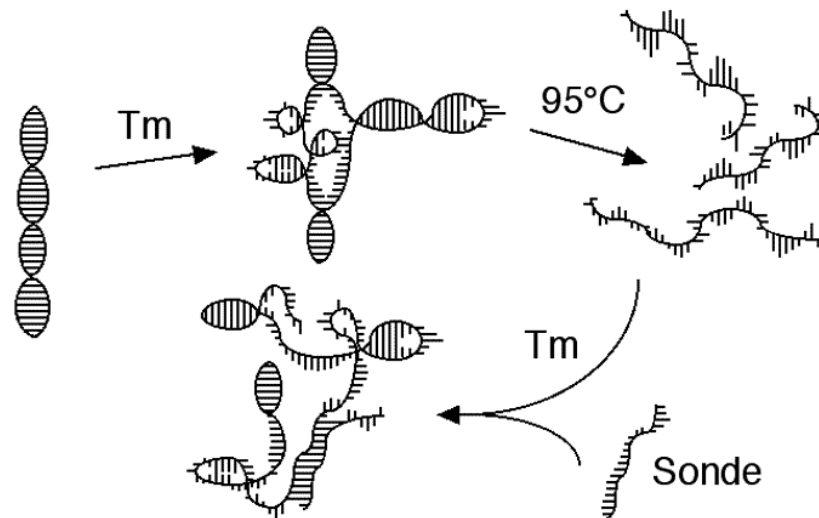
1. Un fragment de DNA double brin affecte normalement une structure secondaire en double hélice.
2. En élevant la température jusqu'à la T_m , on disjoint 50 % environ des liaisons hydrogène qui unissent les brins de DNA, ce qui dénature partiellement la double hélice.

Le DNA au laboratoire : Hybridation d'une sonde



3. Lorsque la température atteint 95°C. toutes les liaisons hydrogène sont rompues et la dénaturation du DNA est complète : le DNA simple brin est qualifié de « dénaturé ». Au cours de la dénaturation, le coefficient d'extinction du DNA à 260 nm augmente (hyperchromicité).

Le DNA au laboratoire : Hybridation d'une sonde



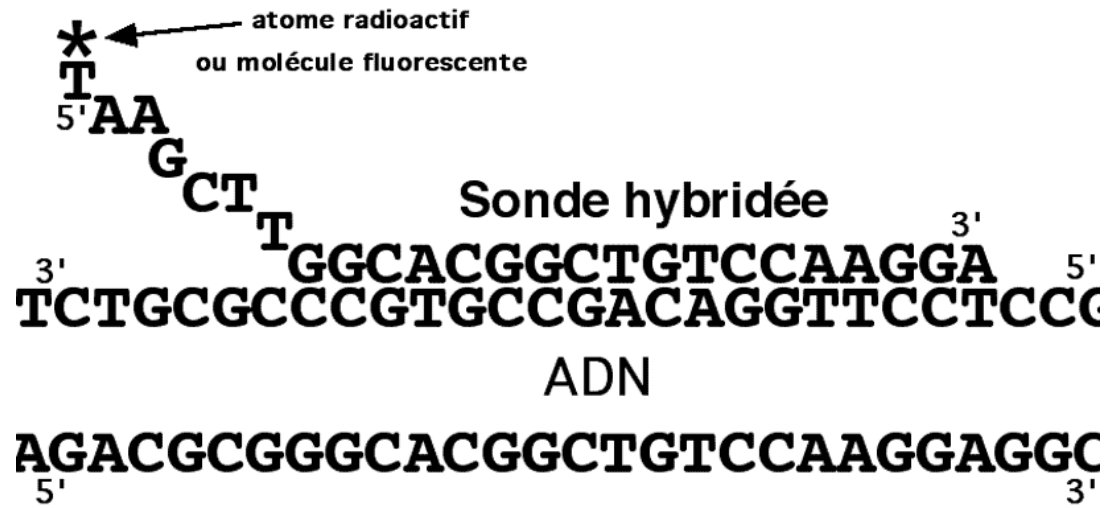
3. En refroidissant brutalement (placer les tubes dans la glace) les structures secondaires ne se reforment pas et le DNA reste dénaturé.
4. Mais si on refroidit doucement, la double hélice se reforme progressivement : Un oligonucléotide (sonde) ajouté peut s'hybrider avec un fragment complémentaire du DNA, dès que la température descend en-dessous de la T_m .
5. L'hybridation d'une sonde marquée (atomes radioactifs, radicaux fluorescents ou ligands spécifiques) sur un DNA dénaturé permet de marquer spécifiquement tous les fragments de ce DNA dont la séquence est complémentaire de la sonde.

Le DNA au laboratoire : Calcul de la Tm

- **Oligonucléotide inférieur à 20 nt**
 - $(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4 = T_m$ en °C.
- **Oligonucléotide supérieur à 20 nt**
 - $[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] \times (1 + [(N-20)/20]) = T_m$ en °C.

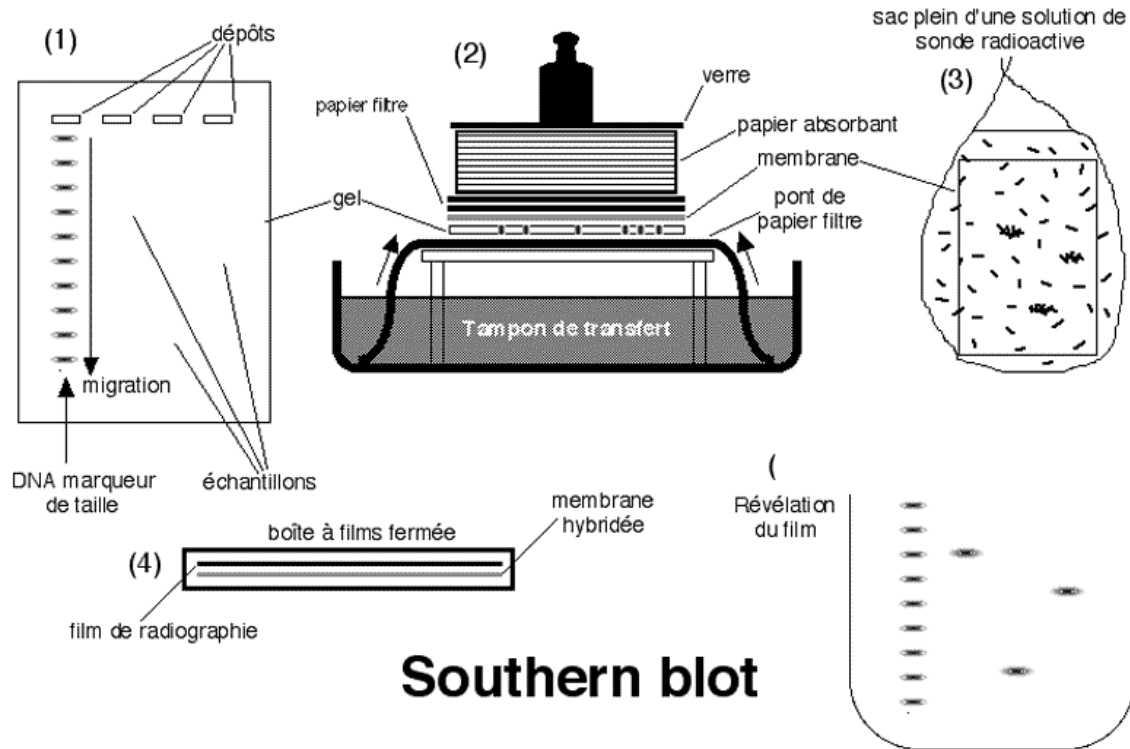
- ✓ Si l'ADN a une longueur égale ou inférieure à 20 nt on compte 2°C par couple A:T et 4°C par couple G:C. A partir de $N = 20$, on corrige d'un multiplicateur proportionnel à la longueur au delà de ce chiffre : $1 + [(N-20)/20]$.
- ✓ Lorsqu'il existe des mésappariements il faut soustraire de la Tm calculée autant de degrés C que le pourcentage de séquence non-appariée de l'oligonucléotide.

Le DNA au laboratoire : Sonde hybridée



- ✓ Parce qu'elle est complémentaire au brin du DNA, la sonde est capable de se fixer spécifiquement sur celui-ci, mais uniquement au niveau de la séquence complémentaire.
- ✓ En marquant cette sonde par un atome radioactif ou par une molécule fluorescente liés de façon covalente à un des nucléotides de la sonde, on peut détecter la sonde et le morceau de DNA complémentaire qui lui est hybridé.

Le DNA au laboratoire : *Southern blot*



Southern blot

Le *Southern blot* est une technique mise au point par Edward M. Southern en 1975 pour rechercher des fragments de DNA sur une électrophorèse en les hybridant avec une sonde complémentaire.

Le DNA au laboratoire : *Southern blot*

Les étapes :

1. On soumet les fragments d'ADN à une électrophorèse pour les faire migrer dans un gel de haut en bas en fonction inverse de leur taille.

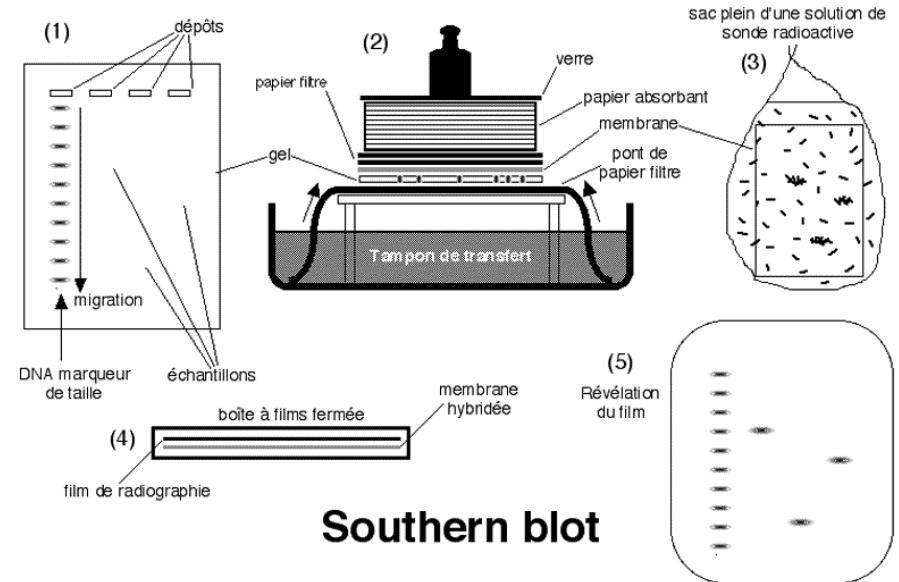
2. On transfère le DNA grâce à une montée de tampon par capillarité depuis le gel à une membrane de nylon, où le DNA va se fixer par des liaisons stables.

3. La membrane est mise à incuber dans un sac contenant une solution d'une sonde radioactive spécifique du fragment de DNA qu'on recherche.

4. On lave la membrane des molécules de la sonde en excès, puis on la met en présence d'un film radiographique.

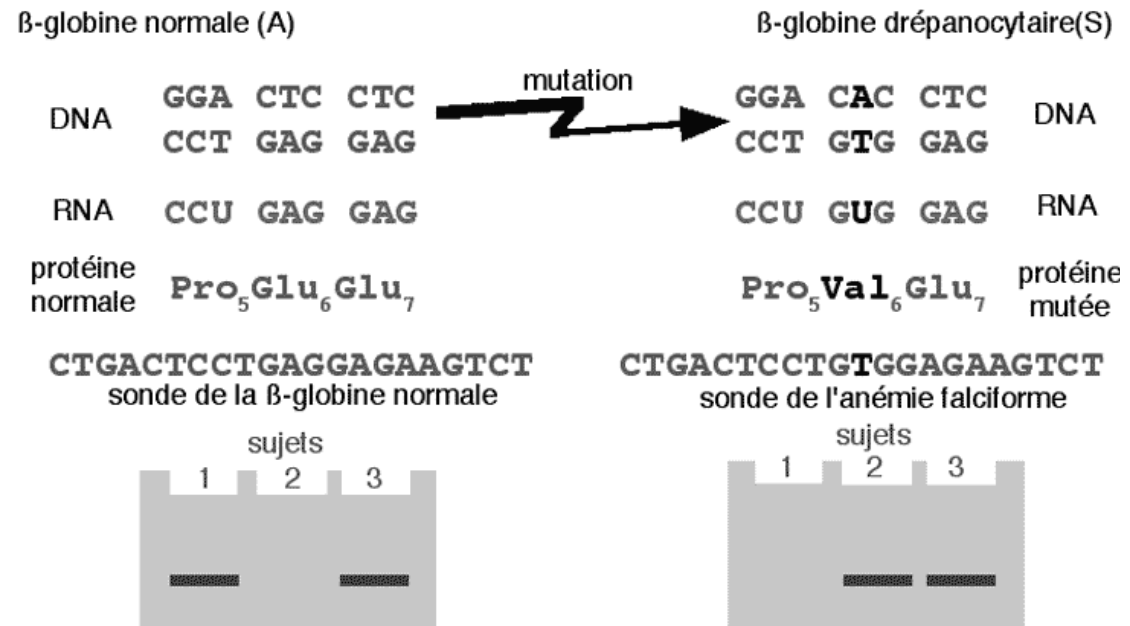
On révèle le film où des taches noires correspondent aux emplacements où ont migré les fragments de DNA complémentaires de la sonde.

5. On compare les distances de migration avec des fragments de DNA radioactifs de tailles connues qui servent de marquer de taille.



Southern blot

Le DNA au laboratoire : Sonde spécifique d'allèle (ASO)

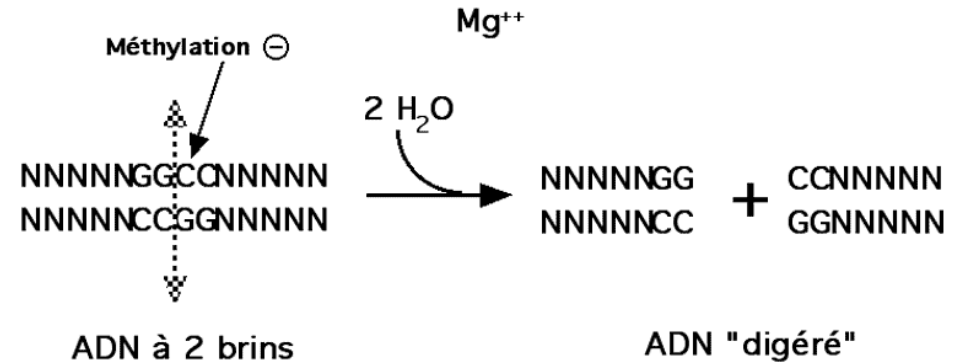


- ✓ La drépanocytose ou anémie falciforme est une maladie des globules rouges qui sont déformés par une cristallisation anormale de l'hémoglobine. Cette cristallisation résulte d'une substitution A→T dans le sixième codon dans le gène HBB.
- ✓ Cette substitution s'exprime par une mutation Glu→Val de la chaîne β de la globine.
 1. L'électrophorèse de l'ADN du gène HBB est révélée par deux sondes : l'une spécifique de la séquence normale, l'autre de celle de la protéine mutée (ASO = *Allele Specific Oligonucleotide*).
 2. Le DNA d'un sujet est révélé par la seule sonde normale s'il possède deux gènes HBB normaux (homozygote normal), par la seule sonde de la protéine mutée s'il possède deux gènes HBB responsables de la mutation (homozygote muté) et par les deux sondes s'il possède un gène normal et un gène de la protéine mutée (hétérozygote).

Le DNA au laboratoire : Enzymes de restriction

- ✓ Hae III est une enzyme de restriction produite par *Haemophilus aegypticus*.
- ✓ Le site de liaison à l'ADN est formé de quatre paires de nucléotides : 5'GGCC3'

Hae III (enzyme de restriction)

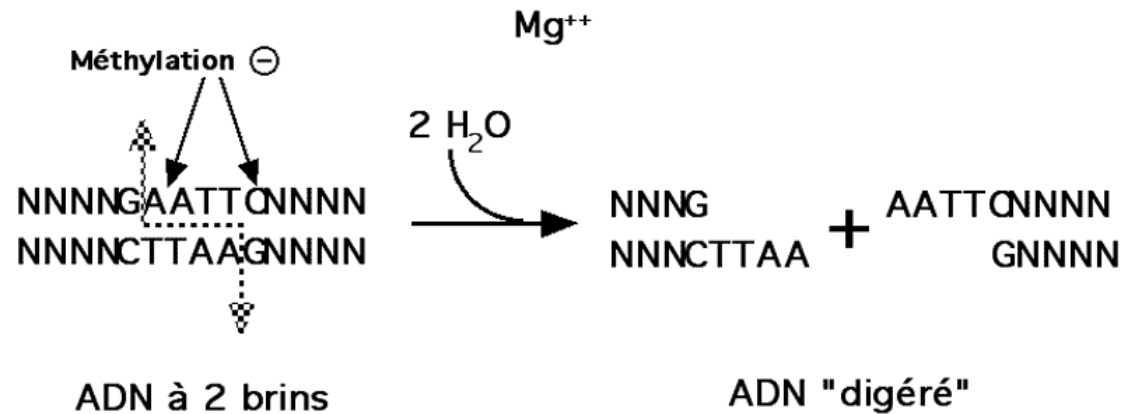


- ✓ Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin).
- ✓ Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait au centre de symétrie du palindrome toutes les paires de nucléotides restent appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts francs ».
- ✓ La méthylation de la cytosine immédiatement en aval du site d'hydrolyse inhibe la reconnaissance du site par Hae III. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

Le DNA au laboratoire : Enzymes de restriction

EcoR I (enzyme de restriction)

- ✓ EcoR I est une enzyme de restriction produite par *Escherichia coli*, souche R.



- ✓ Le site de liaison à l'ADN est formé de six paires de nucléotides : 5'GAATCC3'
- ✓ Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait loin du centre de symétrie du palindrome certaines paires de nucléotides restent non appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts cohésifs ».
- ✓ La méthylation des adénines ou de la cytosine du site d'hydrolyse inhibent la reconnaissance du site par EcoR I. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

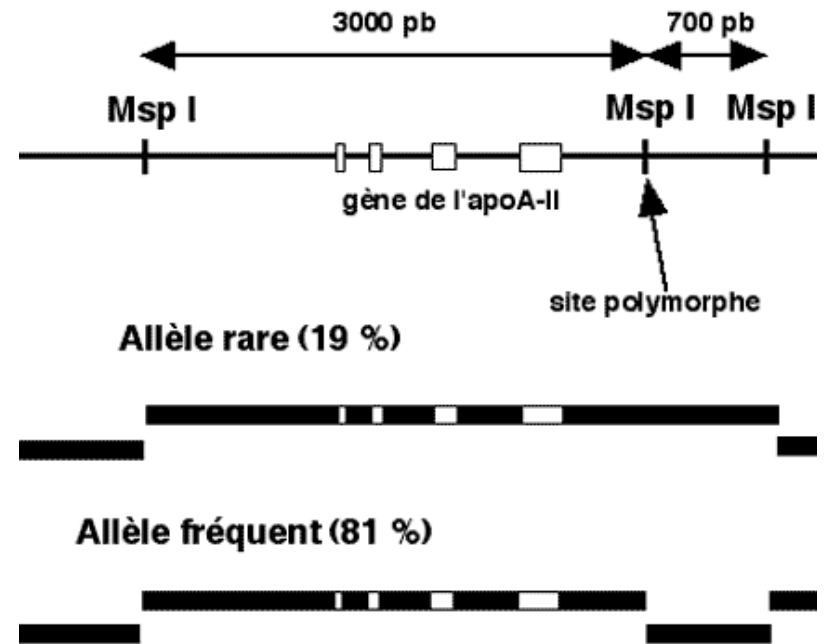
Le DNA au laboratoire : Polymorphisme de restriction

Les variations individuelles d'une séquence de DNA révélée par des modifications de la longueur des fragment de restriction.

À l'électrophorèse il y a polymorphisme de longueur des fragments de restriction= RFLP.

- ✓ Le profil électrophorétique obtenu avec une enzyme de restriction donnée montre des différences individuelles dans la taille des fragments de restriction (RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*).
- ✓ Chaque système allélique de restriction définit un locus polymorphe.

Le DNA au laboratoire : Polymorphisme Msp I de l'apoA-II

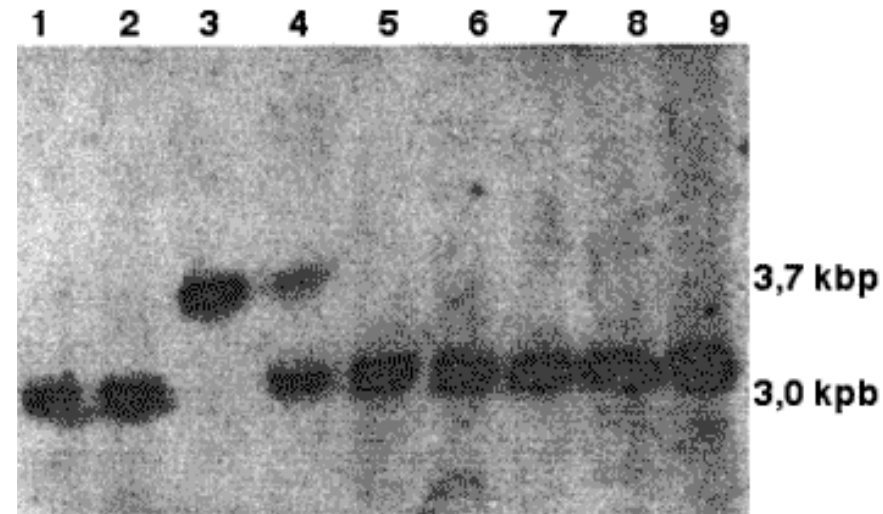


- ✓ Il existe un polymorphisme dans le gène de l'apolipoprotéine A-II. Ce polymorphisme altère la séquence du site reconnu par l'enzyme de restriction Msp I situé en aval du gène, de telle sorte que 19 % des sujets (anglais) ne présentent pas de site de restriction à cet endroit.
- ✓ Lorsqu'on digère le DNA génomique de plusieurs individus choisis au hasard on obtient des fragments de taille différentes entre chaque point de coupure par l'enzyme.
- ✓ Le *Southern blot* permet la détection des polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP ou *restriction fragments length polymorphism*).

Le DNA au laboratoire : Polymorphisme Msp I de l'apoA-II

Autoradiographie du Southern blot

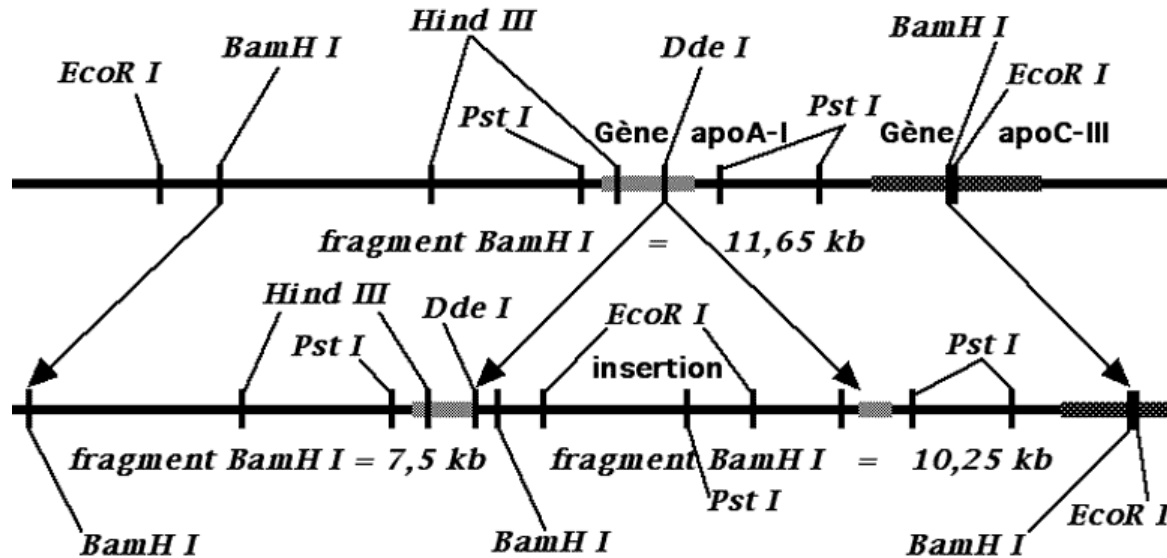
1. Après électrophorèse pour séparer ces fragments en fonction de leur taille et transfert sur une membrane,
2. On hybride les fragments sur la membrane avec une sonde complémentaire des exons de l'apoAII puis on fait l'autoradiographie de la membrane pour révéler ces fragments.



Résultats :

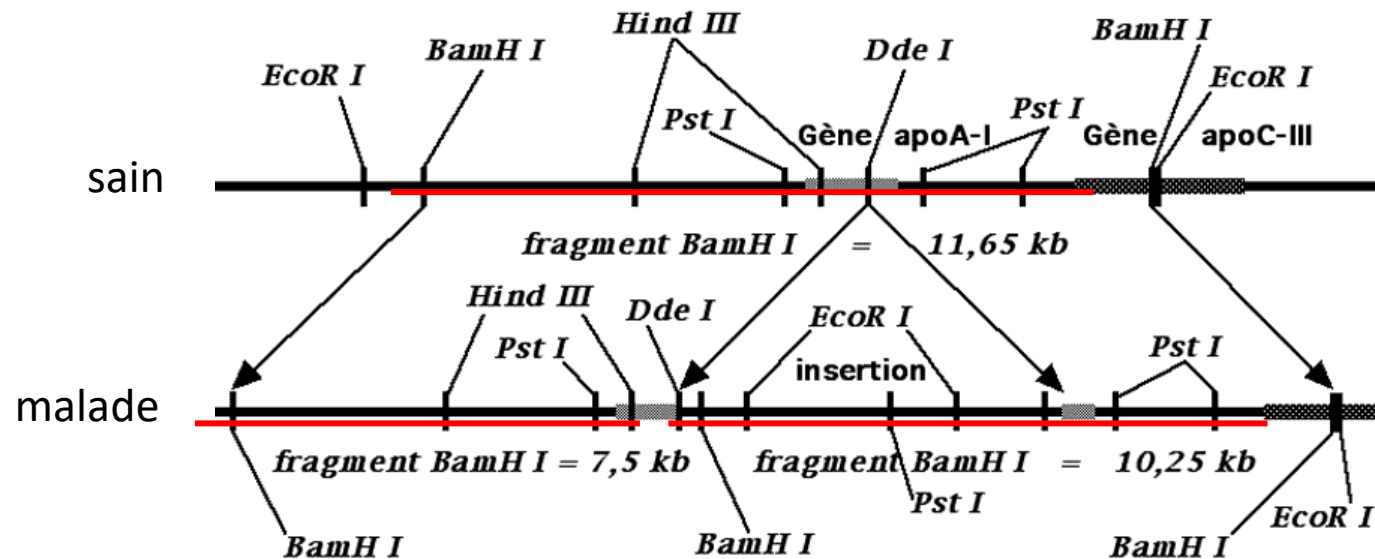
- ✓ Les sujets (81 %) qui possèdent trois sites de coupure autour du gène donnent un fragment de 3000 paires de nucléotides (3,0 kb).
- ✓ Les autres sujets, plus rares (19 %) qui ne possèdent pas le site de restriction ont un fragment plus grand = 3700 paires de nucléotides (3,7 kb). Le sujet dont le DNA a été déposé dans l'électrophorèse au n°3 est dans ce cas.
- ✓ Il arrive qu'un sujet porte un allèle du type fréquent sur un chromosome et l'autre allèle sur l'autre chromosome. Il est alors hétérozygote pour le polymorphisme et à l'électrophorèse (n°4) on voit les deux fragments révélés par la sonde.

Le DNA au laboratoire : Cartes de restriction



- ✓ Les marqueurs génétiques peuvent aussi caractériser les DNA responsables des maladies héréditaires grâce aux cartes de restriction.
- ✓ Le DNA du malade est digéré par de nombreuses enzymes de restriction isolément ou associées entre elles. Les fragments de restriction sont reconnus par une sonde spécifique du gène responsable de la maladie.
- ✓ Il en résulte un grand nombre de fragments possibles dont les longueurs (en kilobases) sont mesurées par électrophorèse à côté d'un marqueur de masse moléculaire.

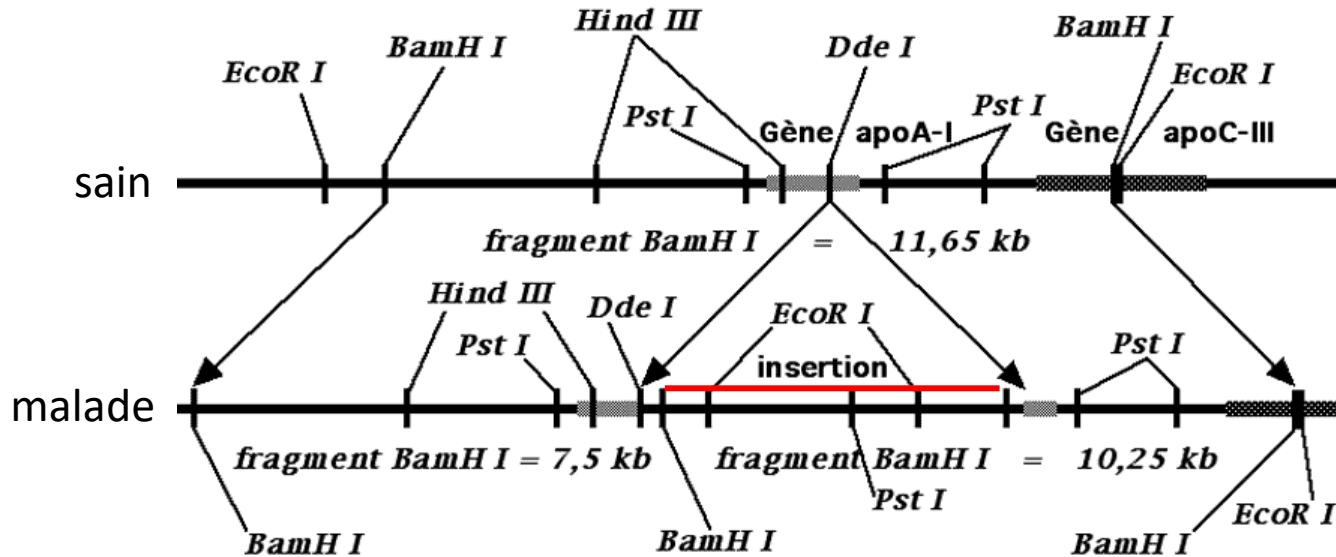
Le DNA au laboratoire : Cartes de restriction



Ainsi, le DNA d'un malade atteint d'une dyslipoprotéinémie et celui d'un témoin sain ont été digérés par BamH I :

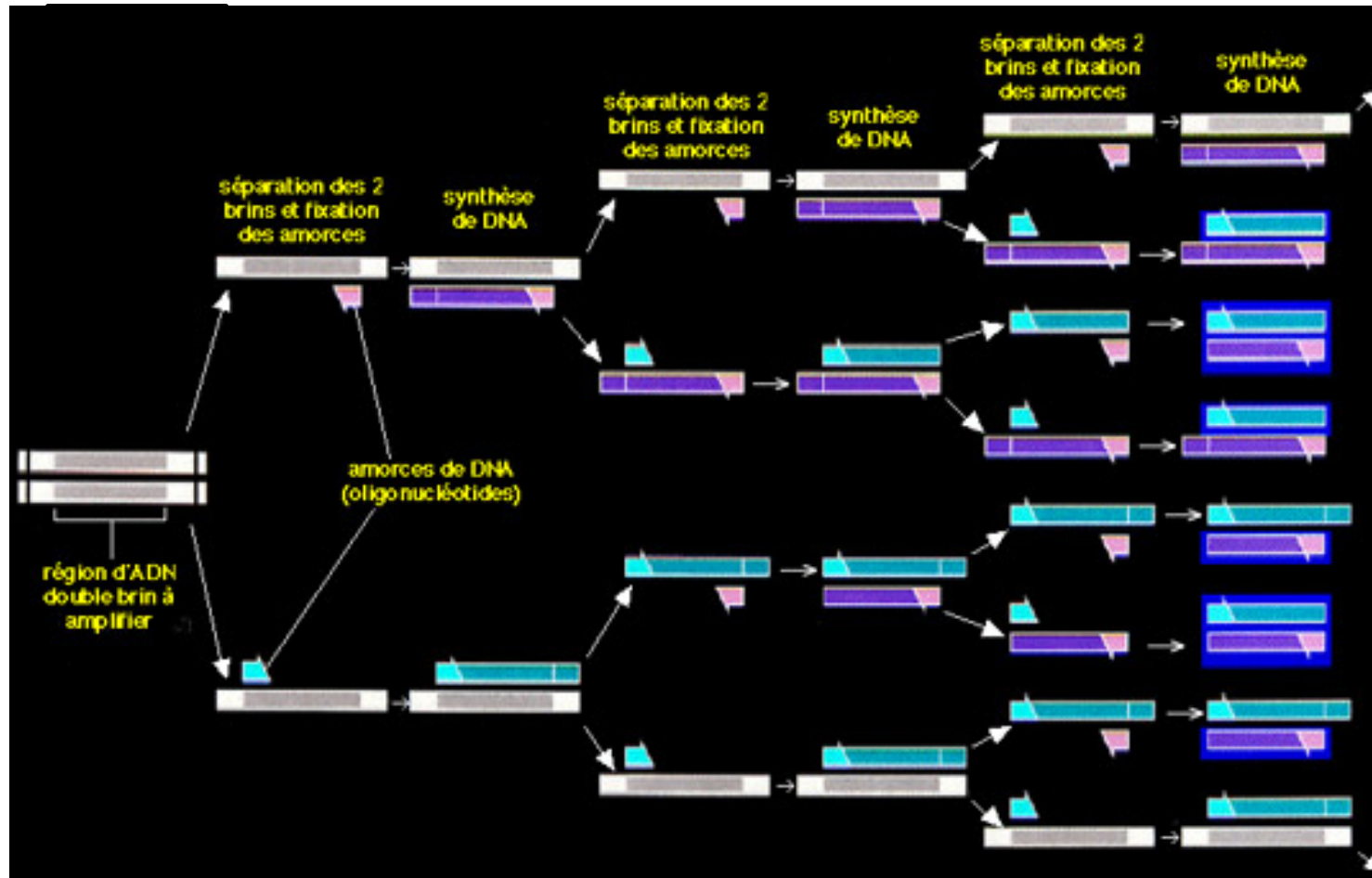
- le sujet sain montre un seul fragment long de 11,65 kb reconnaissable par la sonde du gène de l'apoA-I,
- le DNA du malade en montre deux de 7,5 et 10,25 kb.
- Le fragment BamH I du sujet témoin peut encore être digéré par d'autres enzymes donnant à chaque fois deux fragments (Dde I) ou trois (Hind III) ou quatre (Pst I).

Le DNA au laboratoire : Cartes de restriction



- ✓ Les fragments peuvent être comparés comme les morceaux d'un puzzle pour obtenir une carte des emplacements des sites de restriction sur le DNA :
 - La même carte, chez le sujet malade, montre les mêmes sites de restriction aux deux extrémités du fragment BamH I,
 - mais il apparaît une insertion de 6 kb au milieu du gène de l'apoA-I avec des sites nouveaux : BamH I, EcoR I, Pst I non retrouvés chez le témoin.
- ✓ Cette insertion est responsable d'une absence d'expression de l'apoA-I ce qui se traduit par une dyslipoprotéinémie.

Le DNA au laboratoire : PCR

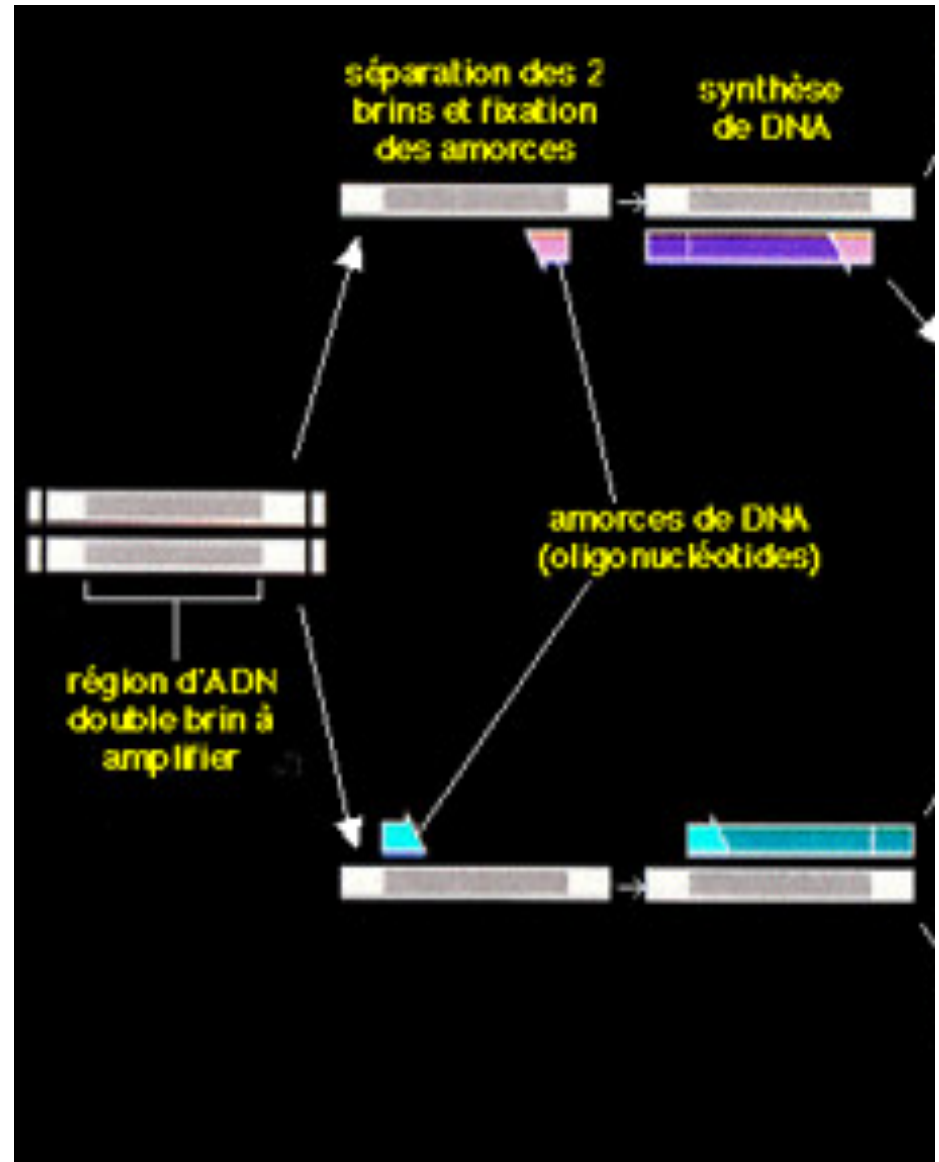


La PCR (*polymerase chain reaction*) permet d'amplifier spécifiquement une région de DNA double brin de quelques centaines de paires de bases. Ce DNA doit d'abord être séparé en simples brins (dénaturation à 95°C).

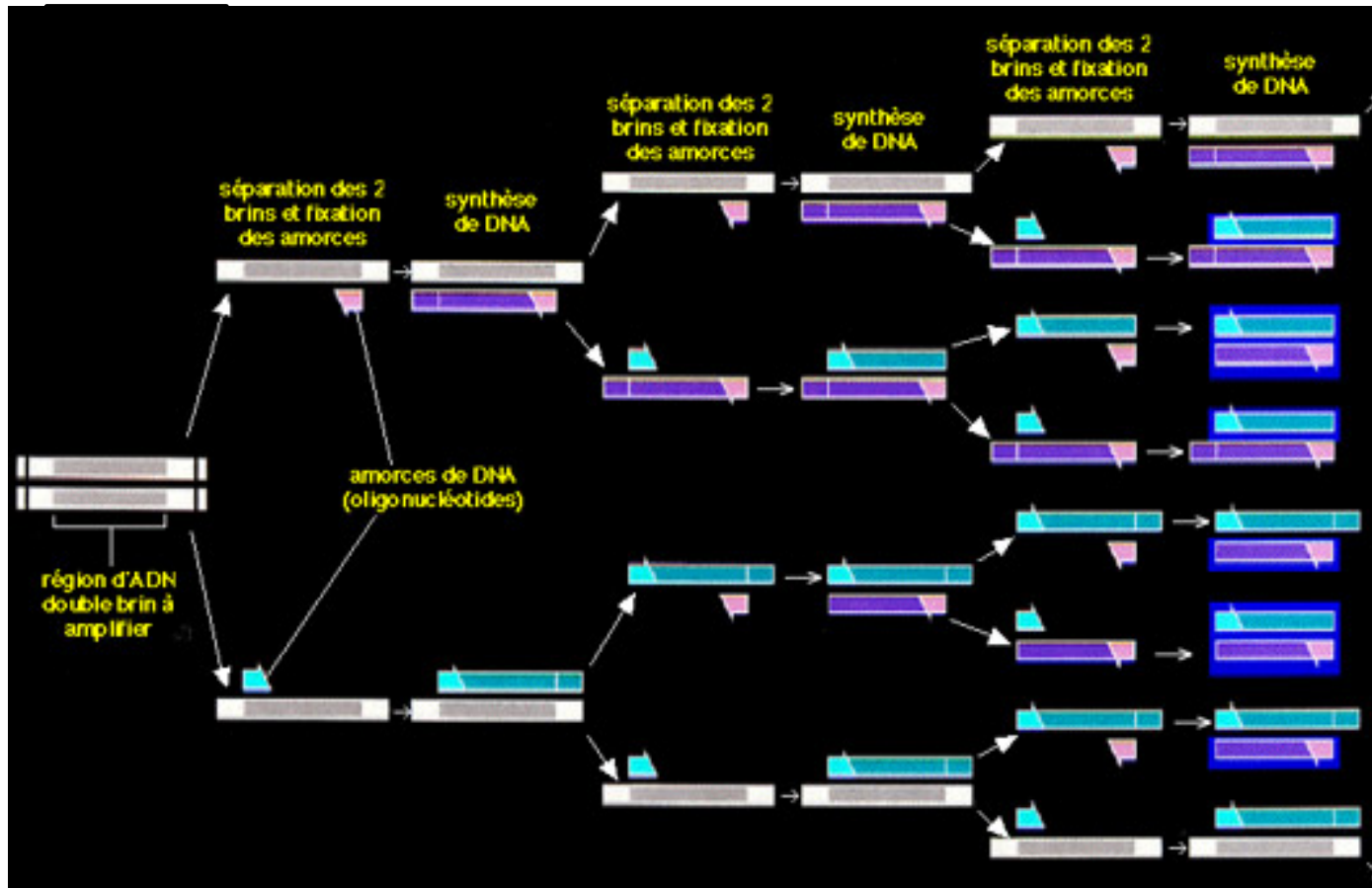
Le DNA au laboratoire : PCR

Les étapes :

1. Ce DNA doit d'abord être séparé en simples brins (dénaturation à 95°C).
2. On ajoute au DNA de départ une large quantité d'amorces qui vont s'hybrider à ~60°C avec la séquence complémentaire sur chacun des brins de DNA, et les quatre dNTP qui serviront de substrats.
3. On soumet le tout à l'activité d'une DNA polymérase (*Taq polymerase*) qui synthétise à 72°C un brin complémentaire à partir du 3'OH de l'amorce hybridée.
 - On obtient deux brins de DNA double brin.



Le DNA au laboratoire : PCR



4. On recommence à dénaturer ces 2 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 4 brins de DNA double brin.

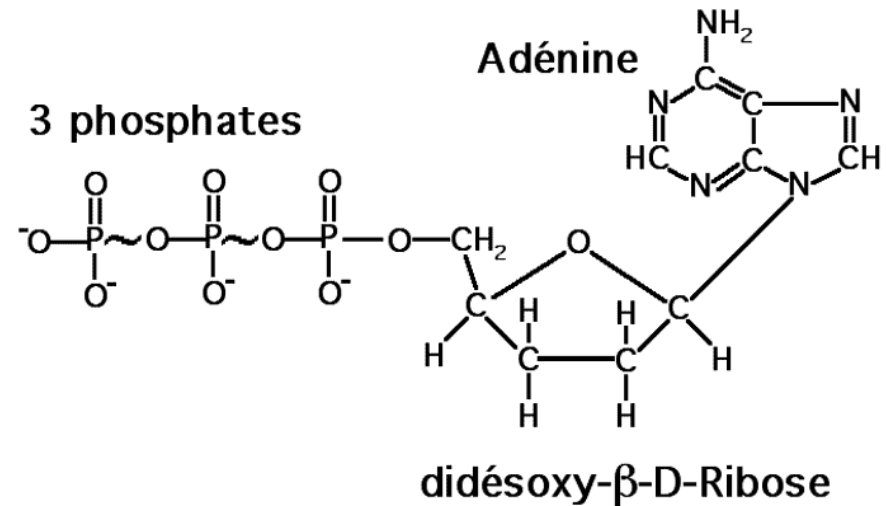
5. On recommence à dénaturer ces 4 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 8 brins de DNA.

- Et ainsi de suite 36 fois, ce qui aboutit à 34359738368 brins de DNA (34 milliards !), ce qui représente une quantité suffisante pour étudier le fragment de DNA amplifié.

Le DNA au laboratoire : Exemples d'applications de la PCR

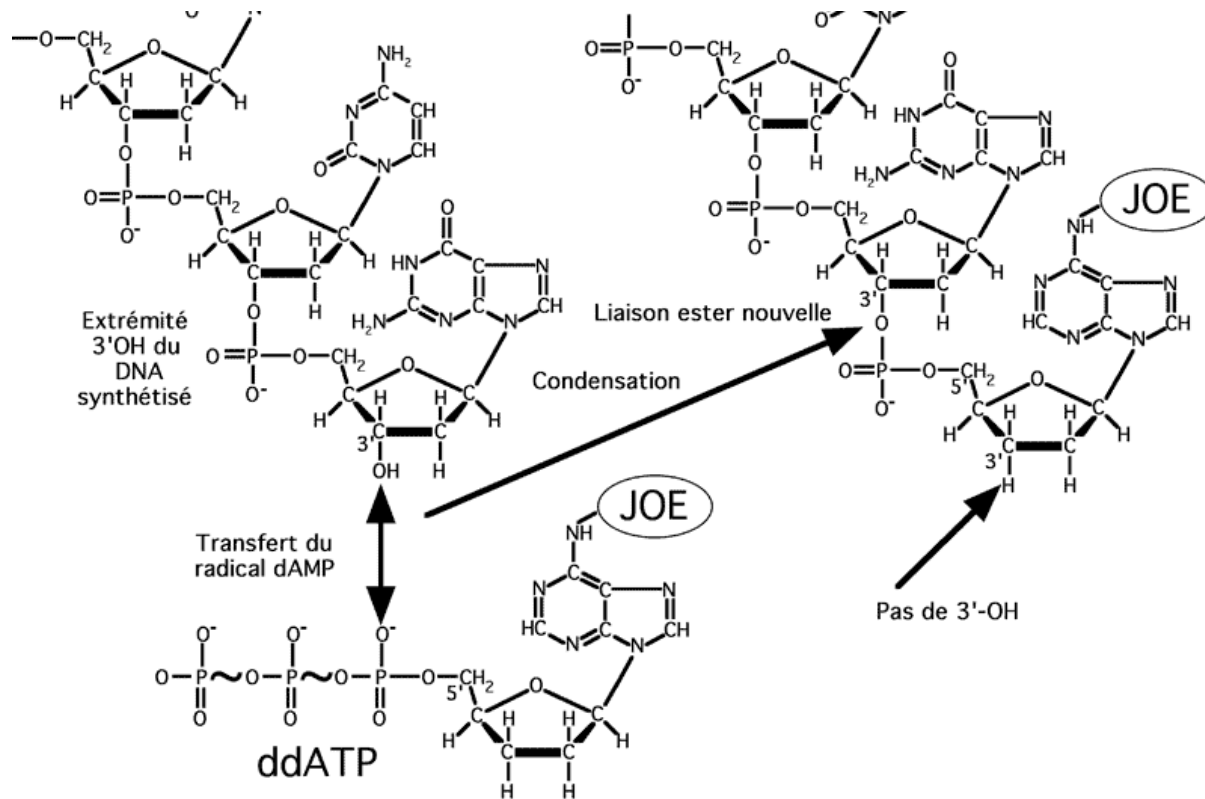
- clonage direct d'un gène
- Mutagénèse dirigé
- Détection et quantification d'OGM (par un gène de résistance à un ATB)
- Détection de microorganisme pathogène
- Test de paternité, médecine légale
- Estimation de la quantité de transcrit par qRT-PCR

Le DNA au laboratoire : Séquençage : Didésoxyadénosine triphosphate



- ✓ Le didésoxyadénosine triphosphate (ddATP) est un nucléoside triphosphate de synthèse. Sa structure est dépourvue de fonction alcool en 3'.
- ✓ Analogue structural de nucléotide, le ddA est utilisé comme inhibiteur de la réplication (DNA polymérase).
- ✓ L'absence de fonction alcool en 3' empêche toute condensation avec le nucléotide suivant.
- ✓ Cette inhibition est principalement utilisée pour le séquençage des DNA.

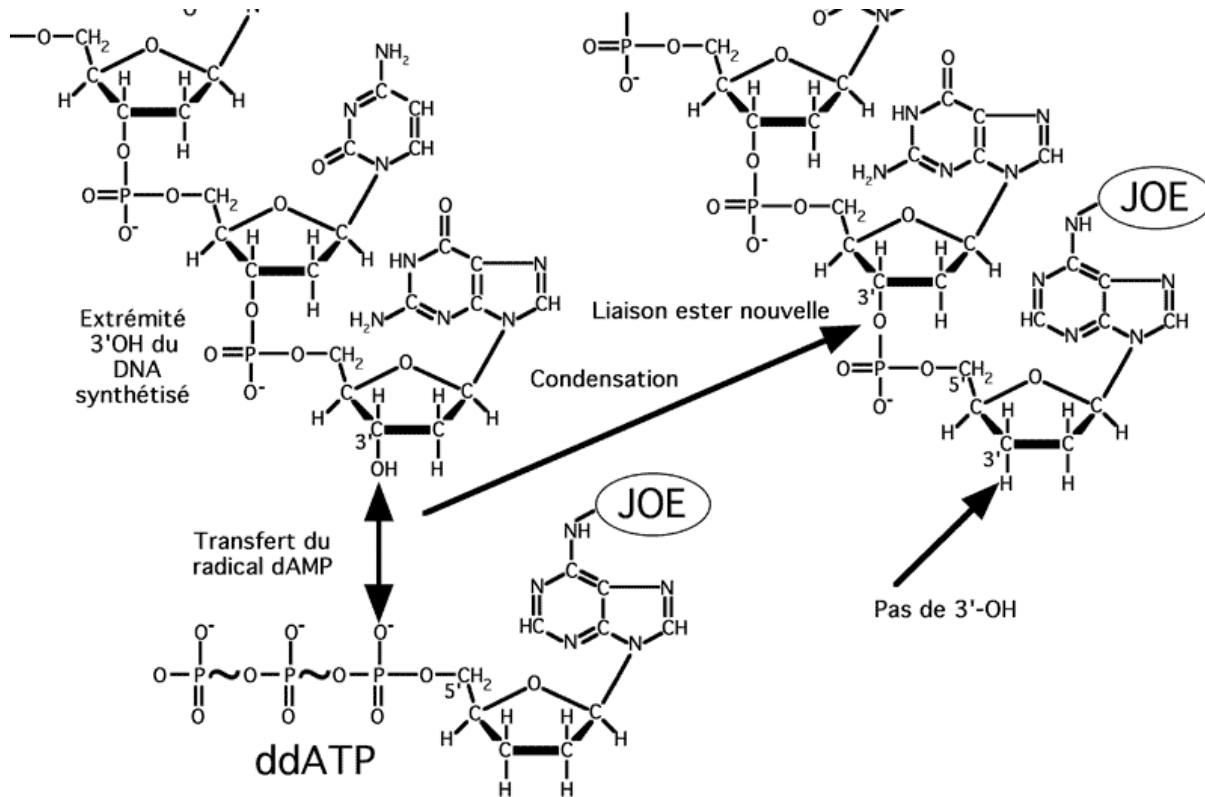
Le DNA au laboratoire : Séquençage : Réaction de séquence



Pour lire la séquence d'un DNA simple brin :

1. Pour cette synthèse on apporte comme substrats les quatre désoxyribonucléosides triphosphates. En plus une très petite quantité de didésoxyribonucléosides triphosphates fluorescents (ddATP-JOE, ddCTP-5-FAM, ddGTP-TAMRA et ddTTP-ROX).
2. La polymérase choisira le plus souvent un désoxyribonucléoside normal et la synthèse se poursuivra jusqu'à ce qu'elle incorpore un didésoxyribonucléoside (ddNTP) fluorescent.
3. A ce stade le brin en cours de synthèse n'a plus d'extrémité 3'-OH et la réaction de polycondensation ne peut plus se poursuivre.

Le DNA au laboratoire : Séquençage : Réaction de séquence

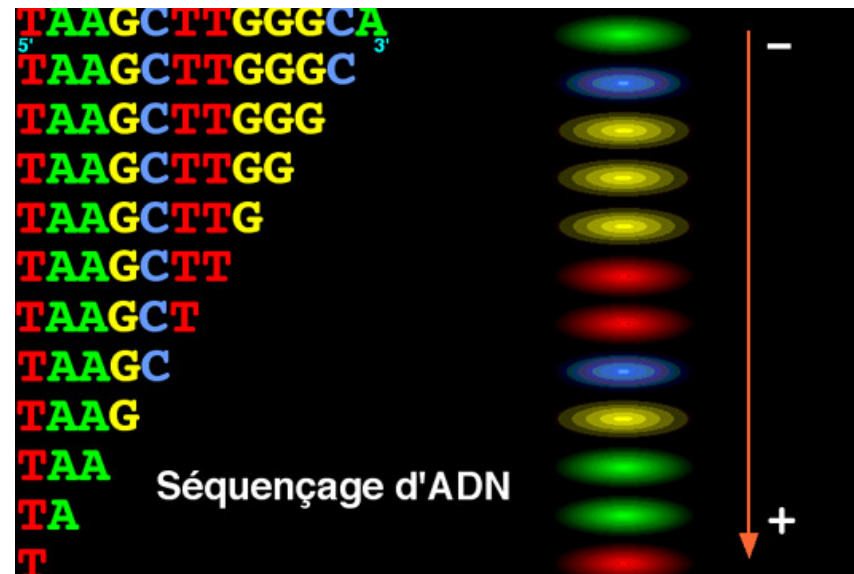


4. Le didésoxyribonucléotide incorporé en dernier est fluorescent et émet sous l'excitation une lumière verte pour JOE (ddAMP), bleue pour 5-FAM (ddCMP), jaune pour TAMRA (dd-GMP) et rouge pour ROX (ddTMP).
5. A chaque lettre de la polycondensation un petit nombre de molécules sont ainsi arrêtées et marquées de la fluorescence correspondant au dernier nucléotide incorporé.
6. En séparant ces molécules par électrophorèse en fonction de leur taille on peut lire les lettres successives qui apparaissent comme des zones sur l'électrophorégramme dont la fluorescence correspond à la base de ce dernier nucléotide.

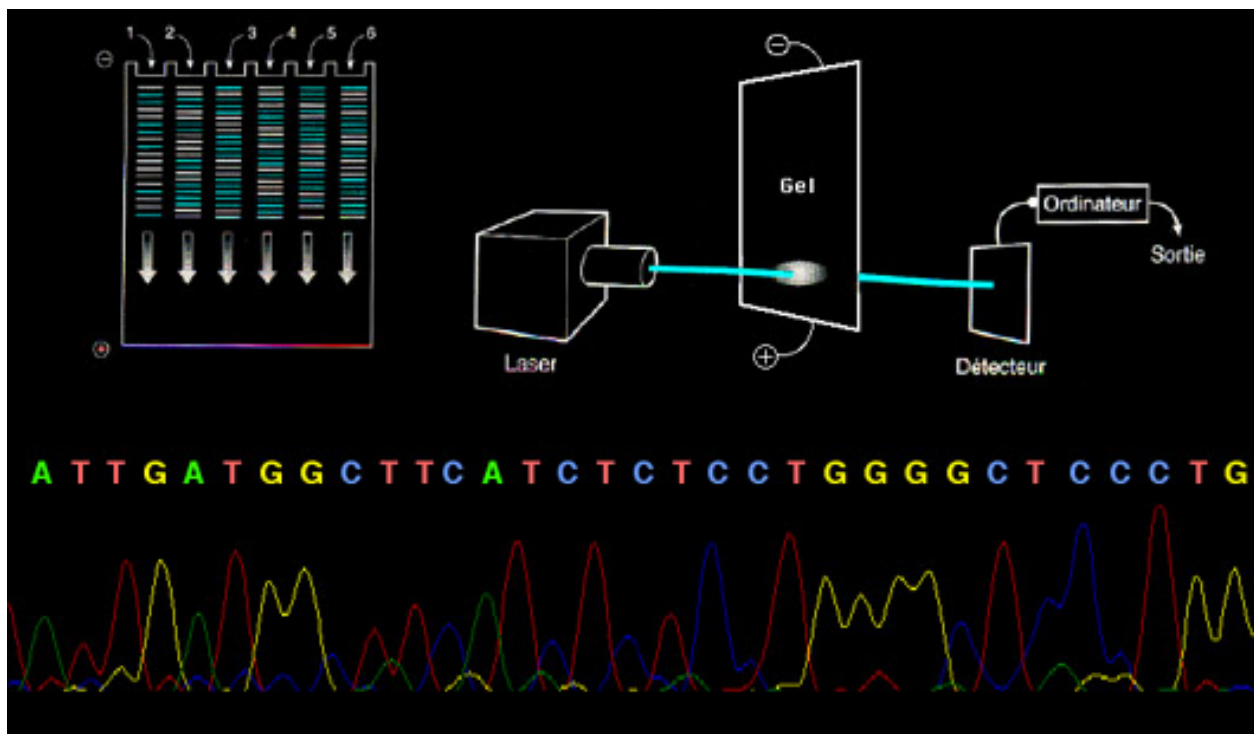
Le DNA au laboratoire : Séquençage d'ADN

Pour connaître la séquence des DNA, on fait synthétiser un brin du DNA par une enzyme spécifique la Taq polymérase.

1. L'enzyme commence son travail à partir de l'extrémité 3' d'une sonde hybridée qui sert d'amorce. Elle ajoute des nucléotides complémentaires de ceux du brin de DNA qu'elle copie.
2. On lui donne pour substrats des désoxynucléosides triphosphates normaux mélangés avec des didésoxynucléotides dont la fonction alcool secondaire en 3' est réduite ce qui empêche la synthèse de se poursuivre au delà.
3. Les didésoxynucléotides incorporés en dernier sont marqués spécifiquement par des molécules fluorescentes (vert pour didésoxyA, bleu pour didésoxyC, jaune pour didésoxyG et rouge pour didésoxyT).
4. On sépare ensuite les fragments synthétisés dans électrophorèse en fonction de leur longueur.
5. On lit ensuite les taches successives, identifiées par leur couleur, ce qui révèle la séquence des fragments synthétisés.



Le DNA au laboratoire : Gel de séquence



- ✓ Ces fragments détecte au passage par un faisceau laser qui excite la fluorescence et une cellule photoélectrique qui lit la lumière émise à chacune des longueurs d'onde des fluorescences caractéristiques des quatre bases.
- ✓ L'ordinateur reçoit donc une série de mesure d'intensité lumineuses en forme de pics correspondant au passage de chacun des fragments : en interprétant la couleur de la fluorescence de chaque pic l'ordinateur écrit la séquence du DNA.

Le DNA en génie génétique : Production de protéines hétérologues (recombinantes)

Protéine qui n'est pas synthétisée naturellement par l'organisme qui la produit. L'organisme lui-même est dit recombinant, il a été obtenu par génie génétique.

Extrêmement répandu, cette technique permet de produire et de purifier une protéine donnée en grande quantité afin de :

- l'étudier (propriété biologique, structure...)
- la commercialiser à des fins thérapeutique ou industrielle (insuline, anticorps, ATB)
- produire des Ac contre la protéine donnée
- produire des protéines modifiées présentant de nouvelles propriétés.

Le DNA en génie génétique : Production de protéines hétérologues (recombinantes)

Les principaux systèmes d'expression

Expression chez les procaryotes : C'est le système de référence lorsque l'on travaille avec une protéine sans modification post traductionnelle.

Avantages

Croissance rapide et peu onéreuse

Non pathogène pour l'homme

Système génétique bien connu, nombreuses souches améliorées.

Expression des gènes contrôlable

Nombreux vecteurs d'expression disponibles, facilité de transfection dans les cellules hôtes

Bons rendements de production des protéines (plusieurs dizaines de gramme par litre de culture)

Corps d'inclusion cytoplasmique : facilité de purification

Inconvénients

Influence du vecteur sur le taux de croissance cellulaire, la consommation d'énergie

Pas de modification post-traductionnelle, activité biologique différente de la protéine native.

Corps d'inclusion : protéines insolubles ou mal repliée

Sécrétion dans l'espace périplasmique : rendement moins important.

Présence d'endotoxine bactérienne

Le DNA en génie génétique : Production de protéines hétérologues (recombinantes)

Les principaux systèmes d'expression

Expression chez la levure :

Avantages	Inconvénients
Petit génome eucaryote facilement manipulable et bien caractérisé	Hypoglycolysation
Absence d'endotoxine	N-glycosylation : immunogène pour l'Homme
Fermentation peu couteuse	Mauvais repliement de la protéine produite
Bons rendements (quelques grammes par litre de culture)	
Modifications post traductionnelles simples	
Possibilité de sécrétion de la protéine d'intérêt	

Le DNA en génie génétique : Production de protéines hétérologues (recombinantes) Les principaux systèmes d'expression

Expression dans les cellules de mammifères : Ce système devient de plus en plus poussé et efficace, mais en contrepartie, de plus en plus dure de mettre en place.

Avantages	Inconvénients
Nombreux vecteurs d'expression disponibles	Culture des cellules difficile et coûteuse
Maturation proche de la protéine native, profil de glycosylation complet si utilisation de cellules humaines	Croissance lente
	Cellules recombinées peu stable (perte de vecteurs)
	Faible rendement (de l'ordre de 10 mg/l de culture)
	Peu de recul sur la sécurité virale (lignée cellulaire transformées)

Le DNA en génie génétique : Exemple d'application :

Fabrication de molécules à visée thérapeutique

- ✓ Aujourd'hui, dans le monde, une centaine de produits pharmaceutiques, obtenus par production de protéines hétérologues sont commercialisés :
 - vaccins
 - anticorps thérapeutique
 - interférons
 - facteurs sanguins
 - facteur de croissance hématopoïétique
 - hormones de croissance
 - interleukine

- ✓ Cette fabrication a plusieurs intérêts :
 - La synthèse biologique est plus simple et moins coûteuse que la synthèse chimique (sauf dans le cas de petits peptides).
 - La purification de protéines taguées est beaucoup plus simple que la purification de protéines naturelles extraites de liquide biologique.
 - Le risque de contamination par un agent pathogène est très limité.

Fin du module !