

Andrew Tolonen (atolonen@gmail.com)
avril 2013

L2 microbiologie TD08: méthodes de la microbiologie moléculaire

Exercice 1: amplification d'un gène d'intérêt par PCR

Vous êtes un médecin travaillant dans un hôpital où une nouvelle souche de *S. aureus* (souche A) vient d'apparaître. Cette souche est résistante à tous vos antibiotiques, même la vancomycine. Vous avez une hypothèse que la résistance de souche A à la vancomycine est dû au gène *mecA*. Pour tester votre hypothèse, vous souhaitez utiliser la PCR pour examiner si le gène *mecA* est présent dans la souche A qui a infecté vos patients.

1.1 Quels quatre réactifs sont nécessaires pour amplifier le gène *mecA* de la souche A de *S. aureus* par PCR?

- 1 ADN génomique de la souche *S. aureus*
- 2 amorces ADN qui s'hybrident aux extrémités de *mecA*
- 3 nucléotides libres (A,C,G,T)
- 4 une polymérase d'ADN

1.2 Pourquoi est-il essentiel d'utiliser une polymérase isolée d'une bactérie thermophile (ie *Thermus aquaticus*) ou archée (ie *Pyrococcus furiosus*)?

Il est nécessaire d'utiliser une polymérase d'un micro-organisme thermophile parce que ces enzymes peuvent résister à la température élevée pour dénaturer les 2 brins d'ADN dans la machine PCR.

1.3 A partir de la molécule d'ADN illustré ci-dessous, décrivez ce qui se passe à chaque étape d'un cycle de PCR: dénaturation, d'hybridation et d'élongation.



Dénaturation: séparation des 2 brins d'ADN

Hybridation: hybridation des amorces à l'extérieur de la séquence d'intérêt

Elongation: formation d'un second brin par le polymérase

1.4 Avant le PCR, il y a 20 copies du gène dans le tube. Combien des copies du gène est-ce qu'il y aura après 30 cycles de PCR?

$$N_t = N_0 \cdot 2^n$$

N_t = copies du gène après PCR

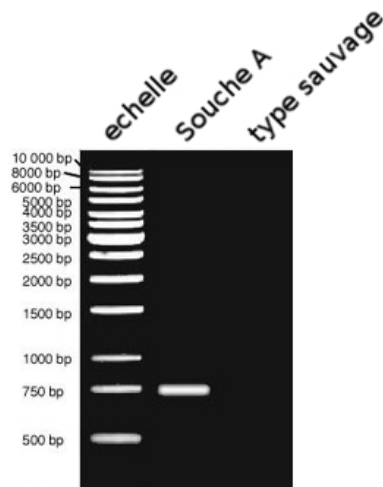
N_0 = copies du gène avant PCR

n = le nombre des cycles de PCR

1.5 L'électrophorèse est une méthode pour séparer les molécules d'ADN dans un champ électrique. Pourquoi est-ce que l'ADN migrent vers l'électrode positive?

ADN se compose d'une base nucléique (adenine, cytosine, guanine, thymine), un sucre (ribose généralement), et un groupe phosphate. Cette dernière composante, le groupe phosphate, porte une charge négative.

1.6 Vous déposez le produit PCR sur un gel d'agarose et vous obtenez le résultat suivant par électrophorèse. Le 'type sauvage' est la souche normale qui est sensible à la vancomycine. Comment expliquez-vous ce résultat?



Ces résultats démontrent que la souche A contient un gène de 750 pb qui est amplifié par la PCR et qui est absent chez le type sauvage. Cette séquence correspond probablement au gène *mecA*.

1.7 PCR sert à amplifier une séquence d'ADN spécifique. Ici, nous avons utilisé la PCR pour détecter la présence d'un gène dans une bactérie, mais quelles sont les autres applications de la PCR dans notre société?

- 1 test de paternité
- 2 détection de contamination dans les aliments
- 3 détection d'ADN à un scène de crime

Exercice 2 clonage des gènes

2.1 Après avoir amplifié le gène *mecA* par PCR, vous voulez l'exprimer chez *E. coli* pour voir si la souche transformée est devenue résistante à la vancomycine. Décrivez les étapes du clonage de *mecA* chez *E. coli*.

- 1 couper le produit PCR et un plasmide avec des enzymes de restriction
- 2 coller les 2 molécules avec ligase.
- 3 transformer le plasmide dans une souche d'*E. coli*

2.2 Vous voulez utiliser les enzymes *ecoRI* et *hindIII* pour cloner le gène *mecA* dans un plasmide parce qu'elles coupent aux extrémités du *mecA*. Quelles considérations devez-vous prendre en compte pour ces enzymes par rapport au plasmide?

Il faut vérifier que les enzymes coupent le plasmide à l'endroit désiré (et pas ailleurs dans le

plasmide).

2.2 Quelles sont les deux façons de préparer les cellules d'*E. coli* pour que l'ADN environnemental puisse facilement entrer dans la cellule?

Transformation chimique: on resuspend les cellules dans une forte concentration de sel et on les choque avec chaleur.

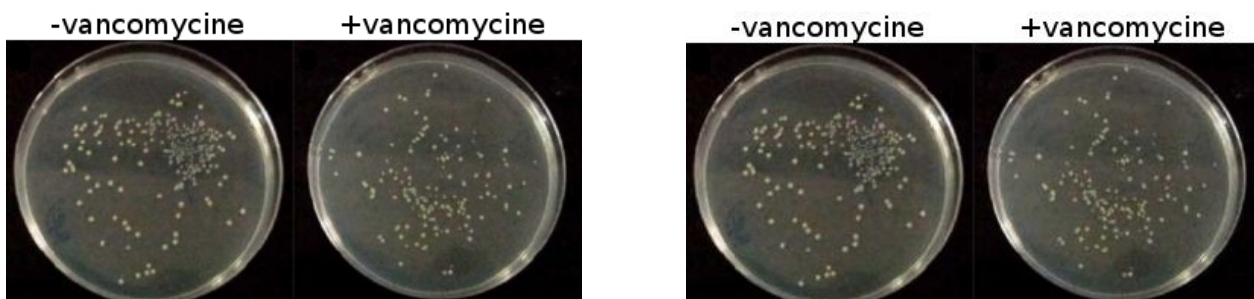
Transformation d'electroporation: on lave les cellules et on les resuspend dans un milieu sans sel. On choque les cellules avec une forte impulsion électrique.

2.3 Une fois que vous avez transformé le plasmide chez *E. coli*, vous étalez les cellules non-transformées (témoin) et celles transformées sur les boîtes de Pétri avec et sans la vancomycine et vous obtenez les résultats suivants. Comment interprétez-vous ces résultats?

Boîtes de Pétri d'*E. Coli*

type sauvage (non-transformé)

souche transformé avec le plasmide *mecA*



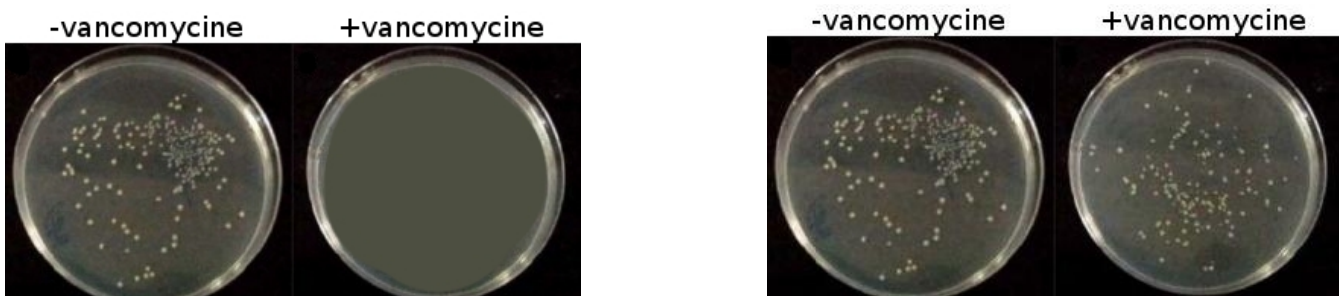
Vancomycine inhibe la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries gram-positives. A cause des différences des mécanismes par lequel les bactéries gram-négatives produisent leurs parois cellulaires et les divers facteurs liés à la prise de la membrane externe d'organismes Gram-négatives, de la vancomycine n'est pas actif contre les bactéries à Gram négatif.

2.4 Vous isolez le plasmide qui contient *mecA* d'*E. coli* et vous le transformez dans une souche de *S. aureus* qui est sensible à la vancomycine. Comment expliquez-vous les résultats suivants?

Boîtes de Pétri de *S. aureus*

type sauvage (non-transformé)

souche transformé avec le plasmide *mecA*



La transformation de *S. aureus* avec le plasmide *mecA* offre une résistance à la vancomycine. On peut donc conclure que le gène *mecA* est responsable pour la résistance à la vancomycine.

#####

Informations Supplémentaires

PCR (polymerase chain reaction): amplification d'une séquence spécifique d'ADN

Reactifs nécessaires

- 1 ADN génomique (template pour la réaction)
- 2 amorces d'ADN qui s'hybrident aux extrémités de la séquence
- 3 polymérase ADN
- 4 nucléotides libres (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

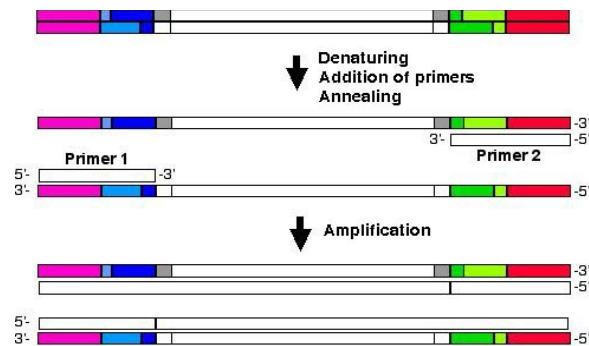
Programmation de la machine de PCR

30 cycles des 3 étapes:

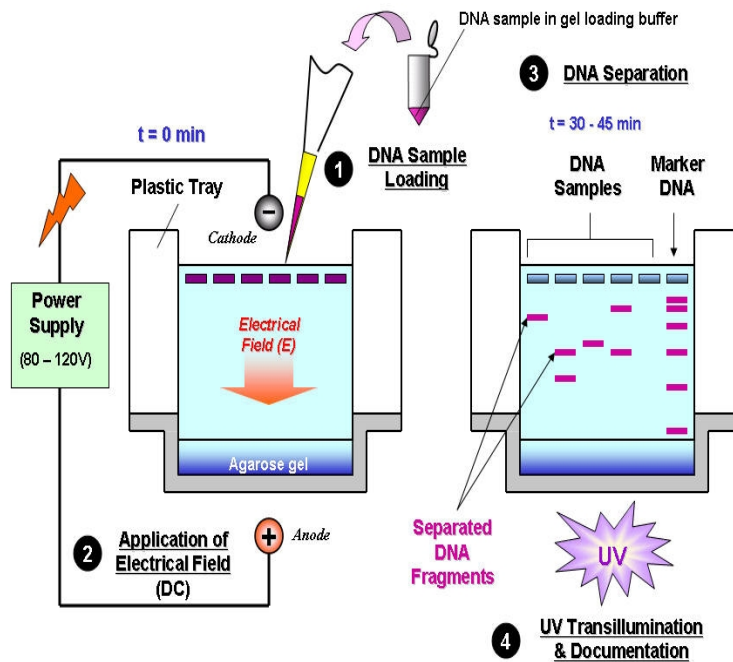
- 95C pour 30 sec (dénaturation d'ADN)
- 55C pour 15 sec (hybridation des amorces)
- 72C pour 1 minute (élongation du second brin par le polymérase)



Le principe de l'amplification par PCR: doublement de la séquence ciblée après chaque cycle



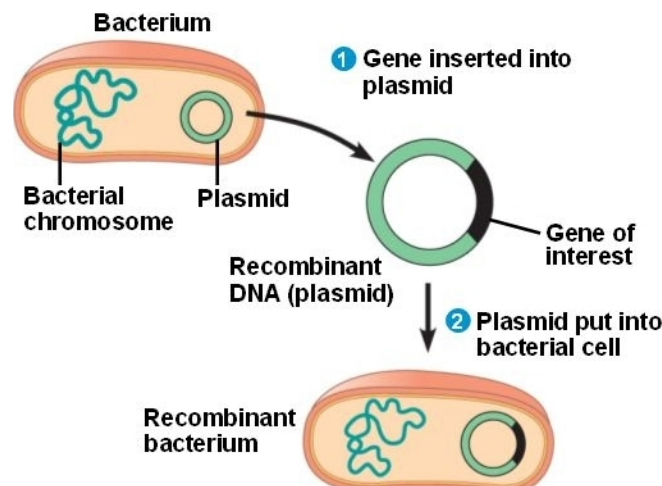
Electrophorèse d'ADN sur gel: séparation des molécules d'ADN par taille. Molécules d'ADN (charge négative) sont séparés dans une matrice d'agarose par l'application d'électricité. Molécules plus courtes migrent plus facilement et plus loin dans le gel.



Graphic©ESchmid/2001

Clonage des gènes:

'Clonage' veut dire la production des nombreuses copies de la même chose. Le clonage des gènes décrit le processus d'insérer un gène dans un plasmide à fin de produire beaucoup de copies dans une cellule vivante. Une fois que le gène est dans la cellule, le gène s'exprime pour produire la protéine qui est codé par le gène.



Etapes de clonage de gènes

- 1 Amplification du gène par PCR
- 2 Insertion du gène dans un plasmide
- 3 Transformation (insertion) du plasmide dans une cellule vivante (plus souvent *E. coli*)

Clonage par enzymes de restriction: Insertion d'une séquence d'ADN dans un plasmide grace aux enzymes de restriction.

Une enzymes de restriction est une enzyme qui coupe l'ADN à une séquence spécifique (souvent 6 bp). Si un produit de PCR (en jaune ci-dessous) et un plasmide sont coupé par les memes enzymes, on peut coller les 2 molécules avec l'enzyme DNA ligase.

