

10c : La PCR -Sensibilité au PTC

La technique de polymérisation en chaîne (en anglais « polymerase chain reaction ») ou PCR, permet d'amplifier des millions de fois un unique fragment d'ADN. Cette méthode est devenue un outil précieux non seulement pour la recherche en biologie moléculaire mais également pour le diagnostic médical, la détermination de microorganismes ou encore la criminologie. L'invention de la PCR revient à Kary Mullis dans les années 80. Il obtint pour cette découverte le Prix Nobel de Chimie en 1993. La découverte d'ADN polymérases thermorésistantes (la Taq polymérase par exemple) isolées de bactéries (*Thermus aquaticus*) vivant dans des sources d'eau chaude a facilité l'utilisation de la PCR et a permis son automatisation.

Thèmes : la PCR, la structure du génome humain, le génotypage, la criminologie, l'ADN, l'électrophorèse.

Une réaction de PCR nécessite :

1. de l'ADN à amplifier (dénommé template)
2. des amorces (également appelés primers)
3. des desoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
4. une ADN polymérase thermorésistante (la Taq par exemple)
5. du magnésium (Mg⁺⁺) indispensable au fonctionnement de l'ADN polymérase

Ces 5 ingrédients sont mélangés dans un tube à essai et soumis à différents cycles de températures.

Un cycle de PCR

1^{ère} étape : **La dénaturation** (94°C)

L'ADN template est chauffé à 94°C. Les deux brins de l'ADN se séparent. On parle de dénaturation de l'ADN.

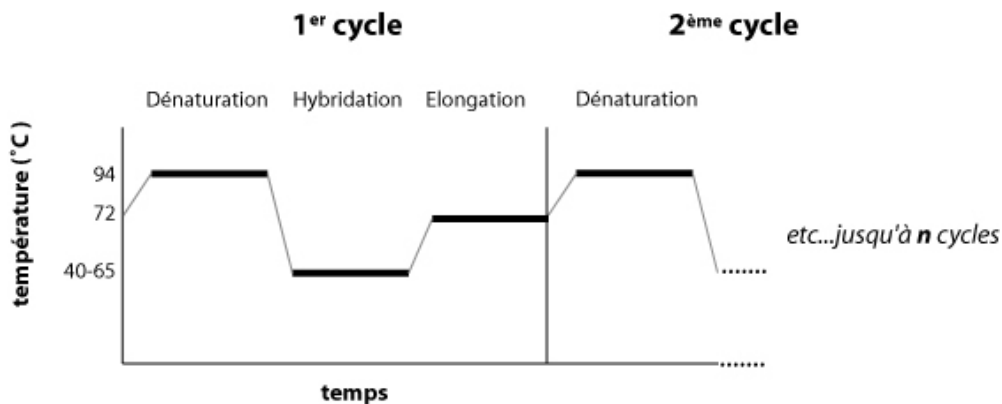
2^{ème} étape : **L'hybridation** (40-65°C)

En descendant la température, les amorces s'apparient (s'hybrident) par complémentarité à leurs séquences cibles sur l'ADN.

3^{ème} étape : **L'élongation** (72°C)

A cette température, la Taq synthétise les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des desoxynucléotides triphosphates à la suite des amorces. Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et de la vitesse de polymérisation de l'enzyme (la Taq ajoute environ 1000 nucléotides par minute).

Ces trois étapes correspondent à 1 cycle de PCR, à la suite duquel on a doublé le nombre de fragment d'ADN cible initial. Environ une trentaine de cycles sont en principe effectués dans une expérience de PCR classique. Ainsi, après 30 cycles on aura amplifié 2ⁿ fois notre ADN cible.



Sensibilité au PTC

L'homme est capable de distinguer 5 saveurs fondamentales, le sucré, le salé, l'acide, l'amer et l'umami (glutamate) grâce à des récepteurs situés au niveau de bourgeons gustatifs.

Dans les années 30, un chimiste du nom d'Arthur Fox est le premier à mettre en évidence la différence de sensibilité au PTC (phénylthiocarbamide), un composé organique amer produit par diverses plantes comme le brocoli. Alors qu'il venait de synthétiser ce composé, l'un de ses collègues s'est plaint de l'amertume du produit alors que lui ne sentait rien.

Quelques années plus tard, une étude menée par Albert Blakeslee a montré que l'incapacité à sentir le PTC est un trait génétique récessif qui varie au sein de la population.

Il existe une trentaine de récepteurs sensibles aux différentes substances amères. Identifié en 2003, le gène TAS2R38, localisé sur le chromosome 7, code pour le récepteur sensible au PTC. Le séquençage du gène a permis la mise en évidence d'une mutation, caractérisée par trois SNPs (en rouge sur la séquence du gène ci-dessous), conférant ainsi aux porteurs de cette mutation, une plus grande sensibilité au PTC.

SNP

Un SNP (Single Nucleotide Polymorphisme) est une variation dans une séquence d'ADN qui arrive lorsqu'un seul nucléotide diffère entre les membres d'une même espèce. Ces variations sont très fréquentes dans le génome humain, environ 1/1000. Elles représentent d'ailleurs 90% de l'ensemble des variations génétiques humaines.

Gène TAS2R38

```
1 cttttctgca ctgggtggca accaggtcct tagattagcc aactagagaa gagaagtaga
61 atagccaatt agagaagtga catcatgttg actctaactc gcatccgcac tgtgtcctat
121 gaagtcagga gtacatttct gttcatttca gtcctggagt ttgcagtggg gtttctgacc
181 aatgccttcg ttttcttggg gaatttttgg gatgtagtga agaggcagc actgagcaac
241 agtgattgtg tgcctgctgtg tctcagcatc agccggcttt tccctgcatgg actgctgttc
301 ctgagtgcta tccagcttac ccacttccag aagttgagtg aaccactgaa ccacagctac
361 caagccatca tcatgctatg gatgattgca aaccaagcca acctctggct tgctgcctgc
421 ctcagcctgc tttactgctc caagctcatc cgtttctctc acaccttctt gatctgcttg
481 gcaagctggg tctccaggaa gatctcccag atgctcctgg gtattattct ttgctcctgc
541 atctgcaactg tcctctgtgt ttgggtgcttt tttagcagac ctacttcac agtcacaact
601 gtgctattca tgaataacaa tacaaggctc aactggcaga ttaaagatct caatttattt
661 tattcctttc tcttctgcta tctgtggtct gtgcctcctt tcctattggt tctggtttct
721 tctgggatgc tgactgtctc cctgggaagg cacatgagga caatgaagg ctataaccaga
781 aactctcgtg accccagcct ggaggccac attaaagccc tcaagtctct tgtctcctt
841 ttctgcttct ttgtgatata atcctgtgct gccttcatct ctgtgcccct actgattctg
901 tggcgcgaca aaataggggt gatggtttgt gttgggataa tggcagcttg tccctctggg
961 catgcagcc tccctgatctc aggcaatgcc aagttgagga gagctgtgat gaccattctg
1021 ctctgggctc agagcagcct gaaggtaaga gccgaccaca aggcagattc ccggacactg
1081 tgctgagaat ggacatgaaa tgagctcttc attaatcgc ctgtgagtct tcataaatat
1141 gcc
```

Primer forward 5' CCT TCG TTT TCT TGG TGA ATT TTT GGG ATG TAG TGA AGA GGC GG 3'

Primer reverse 5' AGG TTG GCT TGG TTT GCA ATC ATC 3'

Le primer forward a été designé de façon à obtenir, à son extrémité, le site de restriction de HaeIII 5' GGCC 3' dans le cas d'un individu porteur du SNP.

PROTOCOLE

Extraction d'ADN

- Mettre 500 µl d'eau dans un tube eppendorf
- A l'aide d'un écouvillon stérile, grattez-vous l'intérieur de la bouche afin de récupérer le maximum de cellules
- Tremper l'écouvillon dans votre tube contenant l'eau, et le frotter contre les parois en tournant.
- Essorer bien l'écouvillon en le sortant du tube.
- Fermer le tube et centrifugé 2 min à vitesse maximale.
- A l'aide de la P1000 enlever le surnageant en prenant garde de bien laisser le culot de cellules au fond du tube.
- Resuspendre votre culot dans 100 µl de NaOH 200mM.
- Fermer le tube et l'incuber 10 minutes à 95°
- Vortexer brièvement et ajouter 100 µl de HCl 200mM
- Ajouter enfin 100 µl de Tris-HCl 200mM (pH8.5)

Votre solution d'ADN est prête à être utilisée directement ou stockée au congélateur

Amplification par PCR

Dans un tube eppendorf, préparer le mix PCR comme indiqué ci-dessous.

	<u>1x</u>	<u>22x</u>
2x Ready mix	12.50 µl	275 µl
PTC primer mix 10 µM	5.00 µl	110 µl
DMSO	1.25 µl	27.5 µl
H2O	1.25 µl	27.5 µl

- Distribuer 20 µl du mix dans chaque tube PCR, préalablement annoté avec les initiales de l'élève.
- Ajouter 5 µl de votre solution d'ADN
- Pour le contrôle négatif (tube marqué -), ajouter 5 µl d'eau
- Pour le contrôle positif (tube marqué +), ajouter 5 µl d'ADN contrôle B2B

Fermer tous les tubes, les disposer dans la machine PCR et lancer le programme PTC.

Programme PCR ptc (durée ~1h30)

94°	5'	30 cycles
94°	30''	
64°	45''	
72°	45''	
72°	4'	

A la fin du programme, les tubes peuvent être gardés au congélateur jusqu'à la leçon suivante.

Digestion du produit PCR

- Transférer 20 µl du produit PCR dans un tube eppendorf.
- Ajouter 5 µl du mix de digestion

	<u>1x</u>	<u>22x</u>
Tp digestion 10x (NEB4)	2.5 µl	55 µl
Enzyme HaeIII	1 µl	22 µl
H₂O	1.5 µl	33 µl

- Fermer le tube, le centrifuger quelques secondes afin de tout faire tomber au fond du tube.
- Placer votre tube eppendorf à 37° et laisser digérer 20-30minutes.

A la fin de la digestion, les tubes peuvent être gardés au congélateur pour la leçon suivante.

Préparation du gel d'agarose.

Le gel d'agarose est une matrice qui permet de séparer les molécules d'ADN selon leur taille dans un champ électrique. Les petits fragments migrent plus vite que les grands, la concentration d'agarose est choisie en fonction de la taille des fragments à séparer. Ici nous allons utiliser un gel à 2% d'agarose.

- Peser 1.4 gr d'agarose et les mettre dans un erlen de 250 ml
- Ajouter 70 ml de TBE 1x.
- Faites bouillir au micro-onde jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissout.
- Laisser refroidir jusqu'à environ 60° et ajouter 7 ul de SYBR safe
- Verser l'agarose dans la cuve préparée avec le peigne afin de former les puits.

- Lorsque le gel est refroidi et solidifié, couper une petite lamelle d'agarose en haut et en bas du gel afin de libérer les électrodes.
- Ajouter ensuite du tampon d'électrophorèse (TBE 1x) et enlever le peigne.

Analyse du génotype sur gel

Récupérer tous vos tubes (digérés) et charger les échantillons de la manière suivante

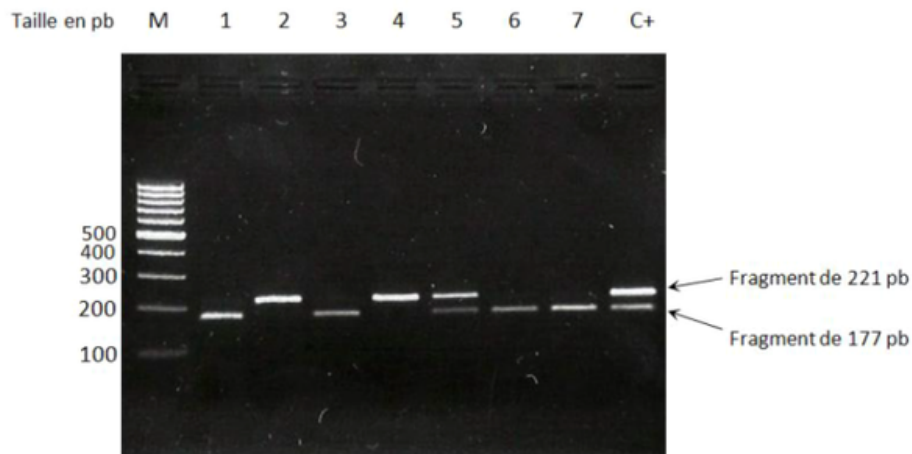
1 ^{er} puit	5 µl de marqueur d'ADN
2 ^{ème} puit et suivants	20 µl de vos échantillons
Avant dernier puit	Contrôle négatif
Dernier puit	Contrôle positif

Allumer le transformateur et laisser migrer à 100 V

Quand le colorant rouge arrive en bas du gel, arrêter la migration.

Laisser refroidir le gel quelques instants et observer sur la lampe bleue.

Exemple de résultat obtenu :



M : marqueur de taille. Colonnes 1 à 7 : génotypes de 7 individus. Les individus 1, 3, 6, 7 sont sensibles au PTC (+/+), les individus 2 et 4 sont non-sensibles au PTC (-/-), l'individu 5 et le contrôle positif sont sensibles (+/-).

Homozygote non sensible (-/-) : 1 fragment de 221 bp

Homozygote sensible (+/+) : 2 fragments de 177 et 44 bp

Hétérozygote sensible (+/-) : 3 fragments de 221, 177 et 44 bp

Remarque : la bande à 44 bp n'est pas forcément visible

Observez votre génotype et ceux des autres personnes.

- Calculez la **fréquence des génotypes** de la classe.
- Calculez la **fréquence des allèles** de la classe.
- Calculez la **valeur de Hardy-Weinberg** pour la classe.

Analyse du phénotype

La sensibilité au PTC est un trait génétique dominant. Ainsi les personnes possédant la mutation sur au moins un des allèles devraient détecter l'amertume du produit. Pour le vérifier, vous aller recevoir deux papiers imprégné ou non de PTC.

Commencer par déposer sur votre langue le papier contrôle, non imprégné et goûté ensuite le papier imprégné de PTC.

Que constatez-vous ?

Vérifiez s'il y a concordance entre le génotype et le phénotype.

Matériel

- P20
- P200
- P1000
- Pointes jaunes stériles
- Pointes bleues stériles
- Ecouvillons stériles
- Solutions NaOH, HCl et Tris-HCl
- Tubes eppendorf 1.5 ml
- Machine PCR + tubes PCR
- Cuves électrophorèse + transformateur
- Bloc chauffant
- Centrifugeuse
- Agarose
- TBE 1x
- SYBR Safe
- Bouteilles d'eau stérile
- RedTaq Ready mix
- PTC primers mix
- DMSO
- ADN contrôle
- Tampon de digestion
- Enzyme HaeIII
- Marqueur d'ADN