

UE11 : PRINCIPALES TECHNIQUES D'ANALYSE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

1) INTRODUCTION

De nos jours, on utilise la biologie moléculaire dans presque toutes les spécialités médicales. Pour faire une analyse génétique, on part presque toujours d'**acide nucléiques** (ADN principalement, et parfois ARN) en très petite quantité. Il y'a une différence de stabilité entre l'ADN et l'ARN : ce dernier est plus sensible aux **protéases** ; mais les 2 sont vulnérables aux **nucléases** après lyse de la cellule.

L'acide nucléique est extrait à partir de toute cellule nucléée (pas les globules rouges).

2) EXTRACTION DU MATERIEL GENETIQUE

a) Extraction de l'ADN

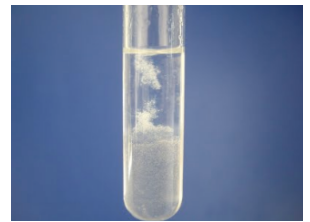
On peut l'extraire à partir : du sang, de tissus, de cellules amniotiques, de follicules pileux ou encore de coupes en paraffine....

Etapes d'extraction :

- Prélèvement de sang sous **anticoagulant** (et non pas héparine) ;
- Lyse des GR dans une solution hypotonique ;
- Récupération du culot de **leucocytes**, lavé et resuspendu dans un mélange de détergent et protéinase K ;
- Extraction de l'ADN au phénol-chloroforme ;
- Précipitation de l'ADN à l'éthanol froid.

⇒ Apparition d'une **méduse d'ADN**.

Cet ADN va pouvoir être conservé de nombreuses années car il est extrêmement stable. (++)



b) Extraction de l'ARN

Il faut savoir que l'ARN est **spécifique** d'un type cellulaire particulier, contrairement à l'ADN qui est le même dans toutes les cellules. C'est pourquoi l'ARN permet d'analyser l'**expression d'un GENE**. Il est plus difficile à étudier car il est très sensible aux ribonucléases, et est donc peu utilisé en diagnostic de routine.

En 1^{er} on homogénéise des cellules ou des tissus dans un tampon qui va :

- Inhiber les RNAses endogènes ;
- Dénaturer les acides nucléiques ;
- Dégrader les protéines.

Puis une solution permet de réaliser l'extraction différentielle ARN/ADN.



3) AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR LA POLYMERASE (PCR)

C'est la *technique de base* (++) dans les laboratoires de biologie moléculaire. Elle permet d'obtenir en **grande quantité** une région **spécifique** d'ADN à étudier. Cette amplification est **spécifique**, très **sensible** et possède un fort risque de **contamination**. C'est pourquoi elle est réalisée dans un circuit monodirectionnel.

Pour réaliser une PCR, sont nécessaires :

- ⇒ **Une petite quantité de l'ADN du patient** ;
- ⇒ **Deux amorces** (= primers) ;
- ⇒ **Des désoxyribonucléotides** ;
- ⇒ **Un tampon (MgCl₂)**
- ⇒ La **Taq polymérase**. (++)

Nb : cette **Taq polymérase** (= *thermophilus aquaticus*) est une ADN polymérase d'origine bactérienne résistante à la chaleur.

Il faut aussi connaître les **bornes d'amont** et les **bornes d'aval** de la séquence à amplifier (18-20 nt).

La PCR est un cycle de 3 étapes qui permet l'amplification exponentielle de l'ADN. Donc au bout de **n** cycles, on aura **2ⁿ** ADN (++).

3 étapes

→ Primer : oligonucléotide simple brin, 18-20 mer

Les étapes du cycle sont :

1. Dénaturation



1-DENATURATION

2. Hybridation d'amorces

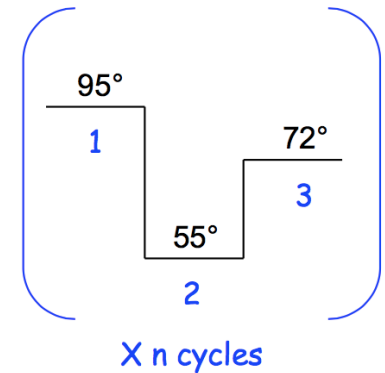


2-HYBRIDATION

3. Elongation



3-ELONGATION



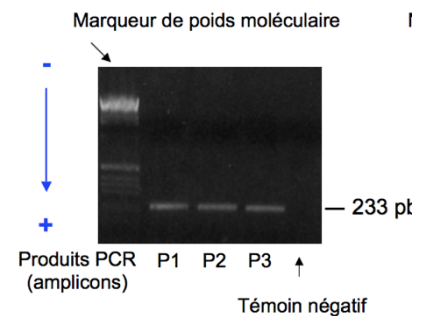
4) ELECTROPHORESE SUR GEL

On va vérifier qu'il n'y a pas eu de contamination lors de notre PCR. Pour cela on va séparer nos molécules d'ADN en fonction de leur taille.

On utilise :

- ✓ Un gel d'agarose ou d'acrylamide (où on creuse des puits pour y déposer nos produits). Ce gel est composé de mailles plus ou moins larges ;
- ✓ Un champ électrique (du - vers le +, l'ADN étant chargé **négativement**).

On va laisser migrer l'ADN, et après migration on colore au *bromure d'éthidium* ce qui nous permet de visualiser notre électrophorèse sous **UV**.



5) DIGESTION ENZYMATIQUE

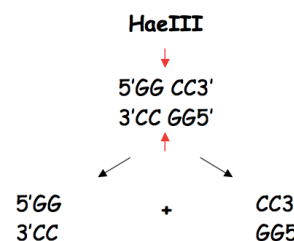
La digestion enzymatique est réalisée par des **enzymes de restriction**. Ce sont des **endonucléases bactériennes** séquences-spécifiques qui coupent au milieu de l'ADN double brin. Il s'agit d'une méthode indirecte.

Il en existe 3 types. On s'intéresse aux enzymes de restriction de **type 2**, qui reconnaissent et coupent au niveau de la séquence palindromique.

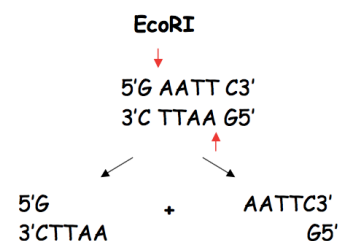
Il y a 2 types de coupures possibles :

- A bout **FRANCS** ;
- A bout **COHESIFS** (plus facile à recoller).

Coupures à bouts francs
(blunt ends)



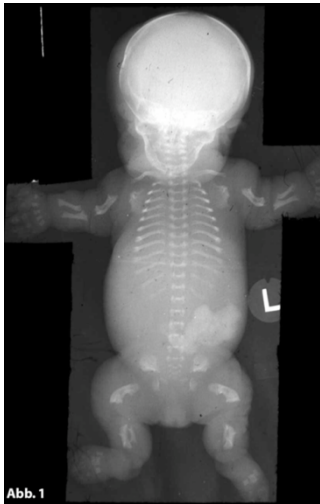
Coupures à bouts cohésifs
(sticky ends)



6) GENETIQUE MEDICALE

Il existe 2 types de maladies :

- ⇒ Les maladies fréquentes (diabète, hypertension...)
- ⇒ Les maladies rares (moins d'1/2000) qui sont généralement **monogénique**.



On va s'intéresser à l'**ACHONDROPLASIE** :

- ❖ C'est la plus fréquente des chondrodysplasies (1/15000) ;
- ❖ Son diagnostic est évoqué sur signal d'appel échographique (= syndrome des fémurs courts) ;
- ❖ C'est une maladie autosomique dominante ;
- ❖ Dans 90% des cas, il s'agit d'une **mutation de novo** ;
- ❖ La forme est plus grave chez les homozygotes.

Caractéristiques :

- Petite taille + membres courts ;
- Hyperlordose ;
- Macrocéphalie avec front haut ;
- Complications neurologiques
- Intelligence NORMALE

Le gène responsable de cette mutation est le gène **FGFR3**. Il code pour le *récepteur d'un facteur de croissance fibroblastique* (qui s'exprime normalement dans les chondrocytes et qui régule la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse).

La mutation se trouve presque toujours au même endroit (exon 10 codon 380 nucléotide 1138). Il s'agit d'une mutation ponctuelle **faux-sens**.

Devant un signal d'appel échographique, on va faire :

- 1- Une **amniocentèse** (extraction d'ADN à partir de cellules amniotiques) ;
- 2- Une amplification par **PCR** du fragment qui nous intéresse ;
- 3- Une vérification de la PCR sur **gel analytique** ;
- 4- Une **digestion enzymatique** ;
- 5- Une vérification par **séquençage**.

7) SEQUENCAGE DE L'ADN

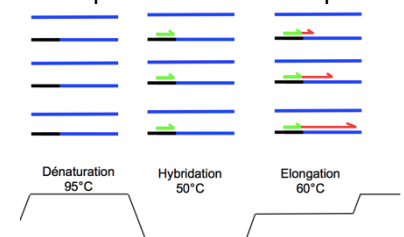
C'est la détermination de la succession des nucléotides qui composent l'ADN. Il s'agit d'une méthode **directe**.

La méthode des di-désoxyribonucléotides ou méthode de Sanger est la méthode de référence du séquençage.

Sur le principe : il s'agit d'une ADN polymérase qui synthétise à partir d'une amorce, un brin complémentaire à la séquence à amplifier.

Pour cela, on a besoin :

- ✓ **ADN polymérase** ;
- ✓ **Désoxyribonucléotides** (dNTP) ;
- ✓ **Di-désoxyribonucléotides** (ddNTP) (diffère de par son *ribose*. Son introduction par la polymérase stop la synthèse).



Ce sont les mêmes étapes que la PCR répétées **30 à 35** fois :

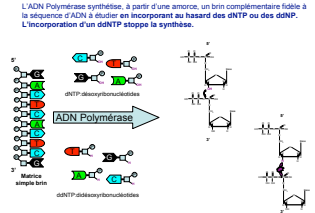
DENATURATION : à **95°** les liaisons hydrogènes sont rompues ;

HYBRIDATION : à **50°** le primer va s'hybrider au brin d'ADN par complémentarité ;

ELONGATION : à **60°** l'ADN polymérase fonctionne et synthétise le nouveau brin d'ADN.

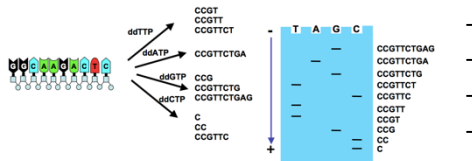
Lors de l'**élongation** la polymérase synthétise le brin complémentaire en incorporant au hasard des dNTP ou des ddNTP. Si c'est un **ddNTP** qui est intégré, alors la synthèse du brin est **stoppée**.

Donc à la fin on obtient un mélange de fragment d'ADN générés de toutes les tailles possibles.



a) Méthode de SANGER

C'est une méthode *manuelle* datant de 1977.



Il s'agit de **4 réactions indépendantes**, contenant chacune :

- 1 ddNTP radiomarqué ;
- Les 4 dNTP ;
- L'ADN polymérase ;
- L'amorce ;
- Le fragment d'ADN à synthétiser.

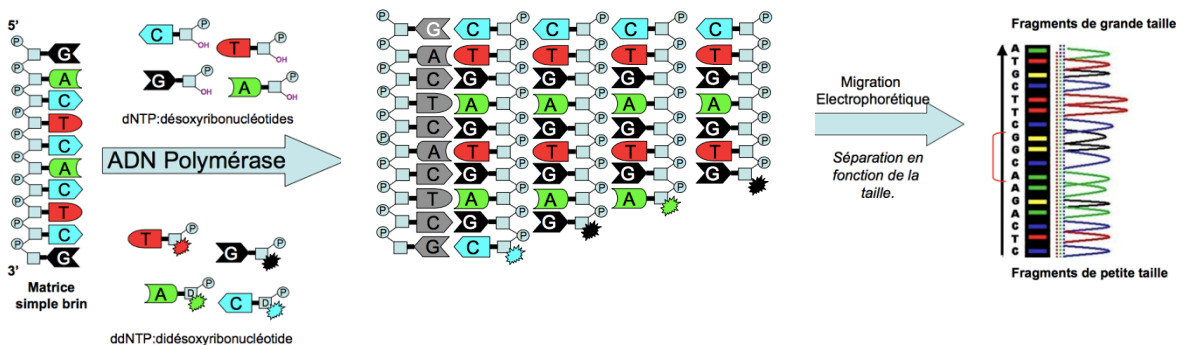
Dans chacun des tubes on répète les 3 étapes : dénaturation- hybridation- élongation Puis à la fin, on met nos tubes à migrer sur un **gel d'acrylamide** afin de les séparer par **migration électrophorétique** en fonction de leur poids.

Donc pour déterminer la séquence du fragment, on lit de **bas en haut** et en **complémentarité** de ce qu'on avait sur la piste.

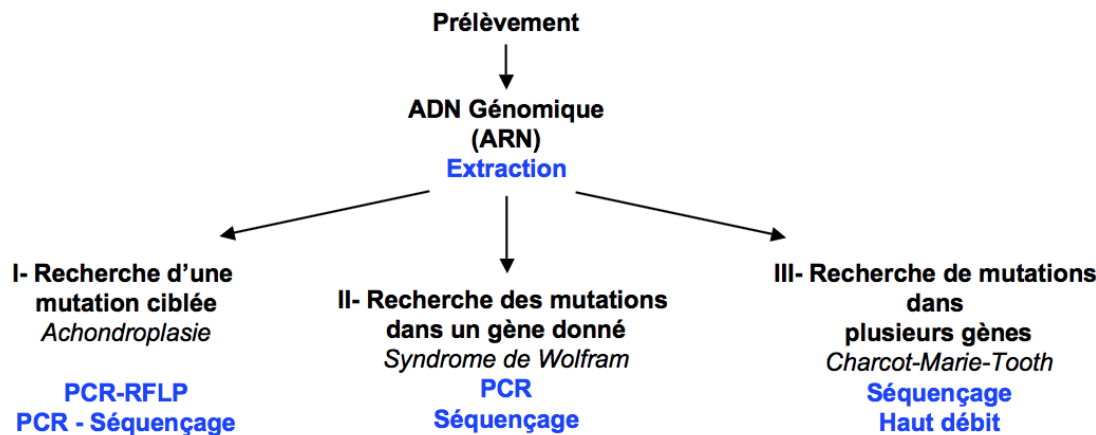
b) Méthode automatisée

Cette fois, il n'y a **qu'une seule** réaction : les 4 ddNTP peuvent être mélangés car ils sont chacun couplés à un **fluorochrome** de couleur différente.

Les produits sont ensuite séparés par **électrophorèse**.



En résumé : (diapo la + importante de l'ue11 donc par ♥)



bb dédicaces : à vous **tous** pour avoir lu nos fiches ; à **toi** parce que quoi qu'il arrive tu peux être fier de toi ; à mon **cotut'** de me supporter ; à votre tut d'ue8 **Carlacouche** ; et à mes **fillots** que jmmmm