



UE 11 : Analyse moléculaire du matériel génétique

Fiche 1 tut rentrée

INTRODUCTION

→ Objectifs

Connaître les principales techniques de biologie moléculaire
Comprendre ses applications en génétique médicale

→ Applications générales de génétique médicale :

Diagnostic positif
Diagnostic prénatal
Diagnostic pré-symptomatique

ANALYSE MOLECULAIRE DU MATERIEL BIOLOGIQUE

- 95% des diagnostics se font à partir d'ADN, mais aussi à partir d'ARN.
- On travaille sur des échantillons de l'ordre du microgramme – nanogramme (=microtechniques)

A. Extraction d'ADN :

Notes importantes :

L'ARN traduit l'expression d'un gène
L'ARN est très instable contrairement à l'ADN car les Rnases sont beaucoup plus virulentes que les Dnases
L'extraction d'ADN se fait à partir de cellule nucléée (qui contiennent donc de l'ADN) :

- ➔ les **GR/Hématies ne possèdent PAS d'ADN**

Etapes NON spécifiques ADN ou ARN :

1. **Prélèvement sanguin** (10 mL au minimum chez un adulte / 200 microlitres chez un nouveau né) sous anticoagulant EDTA (et **PAS l'HEPARINE** ➔)
2. **Lyse des globules rouges** avec une solution *hypotonique*

3 étapes spécifiques de l'extraction d'ADN

1. **Etape de la protéinase K** : à partir des leucocytes
→ lyse des protéines (histones...)
→ lyse des DNases = enzymes = protéines

2. **Etape de l'extraction au phénol-chloroforme**
utilise la solubilité différentielle de l'ADN et des protéines pour les séparer, de bas en haut dans le tube à essai après centrifugation :
→ **phase phénolique**
→ **galette centrale de protéines dégradées**
→ **phase aqueuse qui correspond à de l'ADN**



3. **Précipitation de l'ADN**
ajout de sel + éthanol froid -20°
→ **apparition d'une méduse d'ADN**



Puis **centrifugation, rinçage** à l'éthanol (70°), **suspension** dans un tampon, **dosage par spectrométrie** et enfin **stockage** à 4° dans la Dnathèque stable ++

B. Extraction d'ARN :

ARN très sensibles aux RNases A : + délicate, - **utilisée**

1. Homogénéisation des cellules / du tissu dans un tampon qui inhibe les RNases endogènes, dénature les acides nucléiques et dégradent les protéines
2. Extraction par précipitation différentielle entre ARN et ADN

C. Polymerase Chain Reaction :

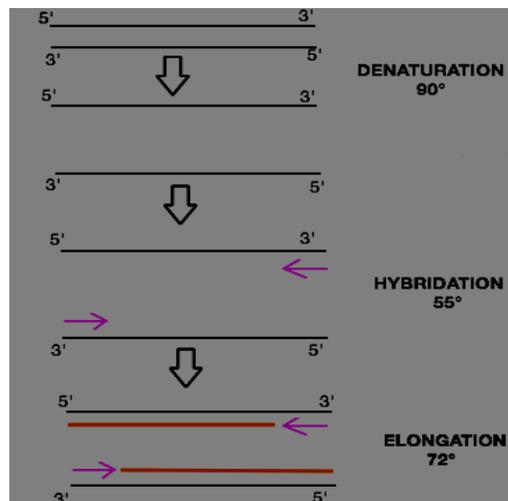
A partir de l'échantillon d'ADN que l'on a obtenu, la PCR va nous permettre d'amplifier sélectivement la région du génome que l'on veut étudier.

Conditions :

- connaître les séquences des **20 nucléotides en amont & en aval** de la région
- dans le tube à essai : **ADN du patient + amorces + nucléotides (dNTP) + tampon MgCl₂ + Taq polymérase**
- étapes isolées dans un circuit monodirectionnel pour éviter la contamination ++

Fonctionnement:

- 1) **Dénaturation: 90°** = rupture des liaisons hydrogènes par la chaleur
- 2) **Hybridation: 55°** = insertion de **20 nucléotides** simple brin strictement identiques aux bornes d'amont & d'aval (**oligomères** ou **primer**)
- 3) **Elongation: 72°** = la TAQ polymérase synthétise de l'ADN avec les dNTPs dans le sens 5'-3'



Note sur la TAQ polymérase : ADN Gollum

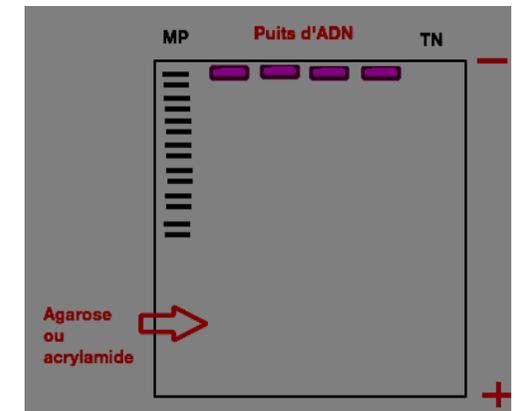
polymérase *d'origine bactérienne* qui résiste à la chaleur que nécessite la dénaturation ect. Elle permet d'obtenir **2n molécules de la région du gène après n cycles** (économie)

D. Électrophorèse :

→ séparation des molécules d'ADN en fonction de leur taille et de la concentration du **gel d'agarose** ou **d'acrylamide** parcouru par un courant électrique **du - vers le +** de haut en bas (l'ADN est placé en haut du gel analytique car il est chargé négativement)

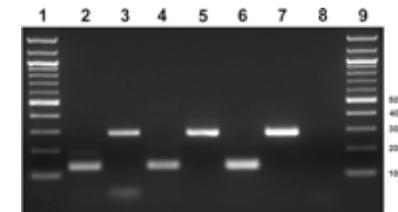
Conditions :

- **1 bande de marqueur de poids moléculaire:** mélange d'ADN de taille différente qu'on connaît parfaitement
- **1 bande de témoin négatif:** contient tout sauf de l'ADN. C'est un contrôle négatif pour être sûr qu'il n'y a pas eu contamination



E. Visualisation de l'ADN :

→ grâce à une drogue intercalante le BROMURE D'ETHIDIUM (agent mutagène) qui s'intercale entre les bases de l'ADN et émet une **fluorescence rose** sous lumière UV



Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

F. Enzymes de restriction

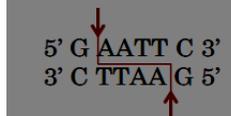
Caractéristiques :

- **ENDOnucléases**
- d'origine bactérienne
- coupent de manière spécifique : reconnaissent la même **séquence palindromique** (= que l'on peut lire dans un sens et dans l'autre de la même façon)

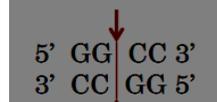


- **à bout franc** (= coupure des deux brins au même endroit) **ou** à **bout cohésif** (= coupure des deux brins à des niveaux différents)
- **isoschizomeres**: 2 enzymes qui reconnaissent la même séquence

A bouts cohésifs :



A bouts francs :



APPLICATION EN PATHOLOGIES

⊖ maladie **monogénique** (sur lesquelles on travaille en biologie moléculaire)
≠ maladie **chromosomique** (ex : trisomie 21)

⊖ la majorité des maladies humaines ne sont **PAS** monogénique
Les maladies **monogéniques sont rares** («orpheline»: 1/2500)

→ **LA MUCOVISCIDOSE** : maladie autosomique **RECESSIVE** = il faut que les deux versions du **gène CFTR** soient mutées pour que la maladie s'exprime.

Les parents sont donc porteurs sains et ont **25%** de risques d'avoir un enfant atteint à chaque grossesse

⊖ ON NE DEMANDE **PAS** DE CARYOTYPE (≠ maladie chromosomique)

→ **L'ACHONDROPLASIE** :

= la plus fréquente des chondrodysplasie, **monogénique, autosomique DOMINANTE, rare (1/15000)**, liée à une **anomalie du développement du cartilage**.

Il suffit qu'une seule version du **gène FGFR3** qui correspond à un **récepteur de croissance des chondrocytes soit muté**.

Un parent au moins est **porteur & malade** et ils ont **50% de risques d'avoir un enfant atteint à chaque grossesse**.

⊖ Cela dit : 90% des enfants atteints naissent de parents de taille normale = c'est une **mutation de novo dans 90% des cas**.

Elle se localise toujours au même endroit :

dans le sens 5'-3', exon 10, au codon 380, position 1138

Une guanine G a été remplacée par une adénine A **ou** par cytosine C => (**rappel de biomol**: le code génétique est dégénéré) => **on obtiendra une ARGININE** au lieu d'une GLYCINE

(des **formes homozygotes** peuvent exister, ce sont des **formes graves**.)

Diagnostic dans 99,9% des cas :

appel échographique TARDIF (3ème trimestre de grossesse) «**fémur court**» (on accepte une **IMG** tardive car maladie incul-rable & grave)

Si **G** → **C**, la séquence devient: C TAC **CGG**, alors HpaII peut couper.

Caractéristiques des malades (adultes et enfants):

- nanisme (1m30, membres courts, **hyperlordose...**)
- **intelligence strictement normale**
- **dysmorphie faciale** (macrocéphalie, front haut, ensellure nasale marquée)
- troubles neurologiques (myélopathie)



Exemple de diagnostic utilisé en application de QCM:

- on prélève 20mL de liquide amniotique par voie transabdominale sous échographie.
- Amplification spécifique par PCR de la **région de l'exon 10** qui encadre l'endroit où la mutation achondroplasique est présente.
- Ce fragment amplifié a une taille de **164pb**.
- Grâce à une électrophorèse on va pouvoir **savoir de quelle mutation il s'agit**.

On se sert deux **2 enzymes de restrictions: BfmI et HpaII**

- **BfmI** reconnaît spécifiquement la séquence **CTACAG**. S'il y'a reconnaissance, elle coupe.
- **HpaII** reconnaît spécifiquement la séquence **CCGG**. S'il y'a reconnaissance elle coupe.

La séquence normale au niveau de l'exon 10 est la suivante:

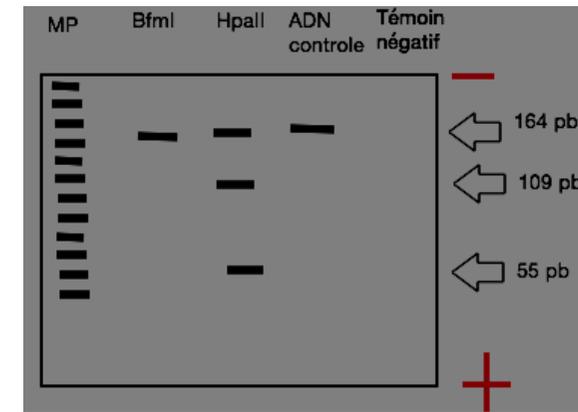
C TAC **G**GG GTG
G ACG CCC CAC

G est la guanine située en position 1138.

Si **G** → **A**, la séquence devient: C TAC **A**GG GTC, alors BfmI peut couper

Gollum

Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.



- **MP**: c'est la colonne de marqueur de poids moléculaire = mélange de fragments d'ADN de tailles différentes que l'on connaît parfaitement.
- **BfmI**: c'est la colonne dans laquelle l'ADN amplifié a été placé avec l'enzyme de restriction BfmI
- **HpaII**: c'est la colonne dans laquelle l'ADN amplifié a été placé avec l'enzyme de restriction HpaII
- **ADN contrôle**: c'est la colonne où l'ADN a été placé, sans enzyme de restriction.
- **Témoin** (sans ADN): c'est la colonne qui prouve qu'il n'y a pas eu de contamination.

Interprétation:

BfmI: on ne voit qu'1 fragment d'ADN de 164 pb = l'enzyme BfmI est inactive sur le fragment d'ADN du patient.

HpaII: on voit 3 fragments d'ADN de 164pb, de 109pb et de 55pb = le fragment d'ADN prélevé est coupé par l'enzyme de restriction HpaII. Ceci veut dire que l'enzyme a reconnu la séquence CCGG.

Il y'a donc une mutation au niveau de l'exon 10 en position 1138 codon 380 chez cet individu, et il s'agit d'une substitution **G** → **C**

Note:

- Si on trouve 3 fragments dont **1** de la taille de l'ADN sain (allèle sain) ET **2** dont la somme fait la taille de l'ADN sain (allèle muté), l'individu est alors **HÉTÉROZYGOTE** pour la maladie.
Le patient sera MALADE si et seulement si la maladie est DOMINANTE (ex: achondroplasie ≠ mucoviscidose)
- Si on trouve 2 fragments dont la somme fait la taille de l'ADN sain (2 allèles mutés), l'individu est alors **HOMOZYGOTE** pour la maladie

Conclusion:

Le fœtus est atteint d'achondroplasie à l'état hétérozygote à cause d'une mutation **G → C** en position 1138 du codon 380 dans l'exon 10

G. LE SEQUENCAGE ADN :

C'est une autre technique pour confirmer le diagnostic de la maladie. Il nous permet de déterminer la succession de nucléotide au niveau de la région étudiée.

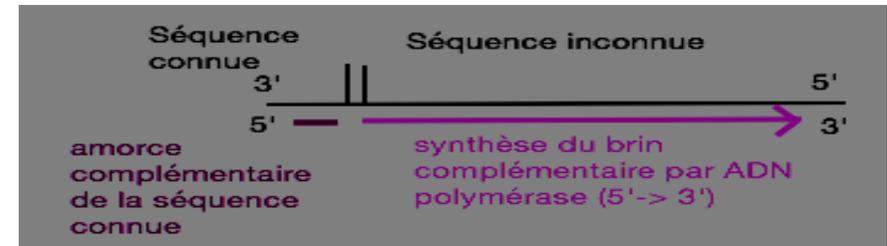
La méthode de référence est la METHODE DE SANGER = méthode enzymatique des di-désoxynucléotides (ddnTp)

Conditions:

- étapes de la PCR (dénaturation, hybridation).
 - ⊖ Elongation: ici l'ADN polymérase utilisée n'est PAS la TAQ polymérase.
Celle ci fonctionne à 60°
L'élongation ne concerne **qu'un seul brin**, et on a besoin que d'**un seul primer**
- dNTP + ddNTP (≠ PCR) = qui ont le rôle de stopper la polymérisation. (processus au hasard)
- Couplage spécifique des ddNTP avec des fluorochromes: Rouge-T, Bleu-C, Noir-G, Vert-A

Gollum

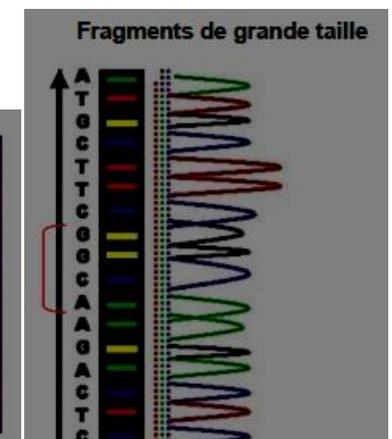
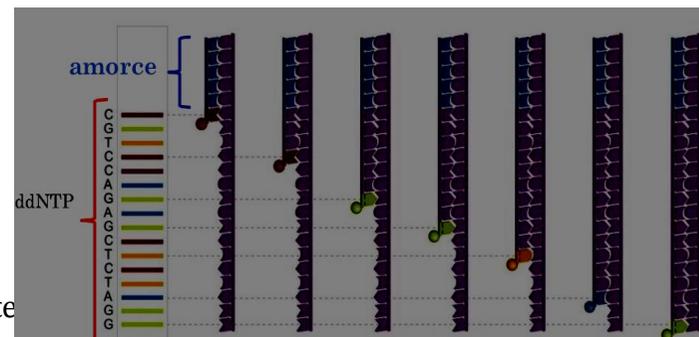
Le tutorat est gratuit. Toute

**Principe:**

- ✓ Au hasard la polymérase incorpore des dNTP et des ddNTP (qui eux génèreront des fragments fluorescents).
- ✓ Les ddNTP possèdent un H associé à un fluorochrome à la place du OH = la liaison phosphodiester ne pourra pas se faire, l'ADN polymérase stoppe l'élongation.
- ✓ La réaction a lieu dans un même tube pour les 4 ddNtps.
- ✓ On réalise une électrophorèse, et en fonction de la couleur des fragments, on sait de quel nucléotide il s'agit.
- ✓ Cette migration électrophorétique se déroule dans de petits capillaires. Il y a présence d'un polymère (un peu comme le gel d'agarose) qui va permettre la migration des molécules d'ADN.

→ Les **séquenceurs capillaires** sont utilisés en routine en laboratoire de génétique.

Il y'a présence d'une caméra laser qui va identifier les fluorochrome, qui va détecter en premier les molécules les plus petites.



→ Le SYNDROME DE WOLFRAM

- pathologie autosomique **RECESSIVE**
- symptômes: surdité, diabète, atrophie optique, troubles neurologiques
- les 2 parents sont porteurs de la mutation au niveau du **gène WFS1** codant pour la wolframine = qui joue un rôle au niveau du flux calcique.

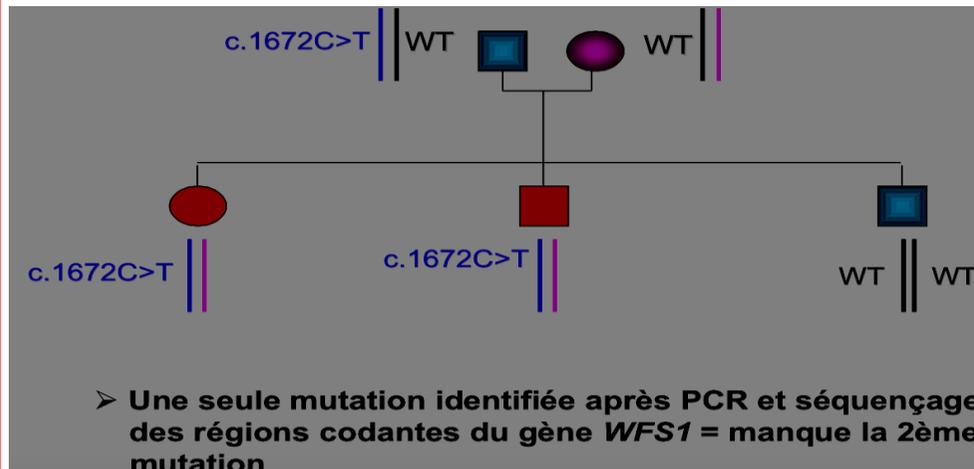
Rappel: Les gènes sont sous forme de double hélice avec des exons séparés par des régions non codantes, les introns.

Transcription = ADN → ARN

Maturation de l'ARN = élimination des introns ( pissage) + ajout d'une queue polyadénylée.

Traduction = ARNm → Protéine

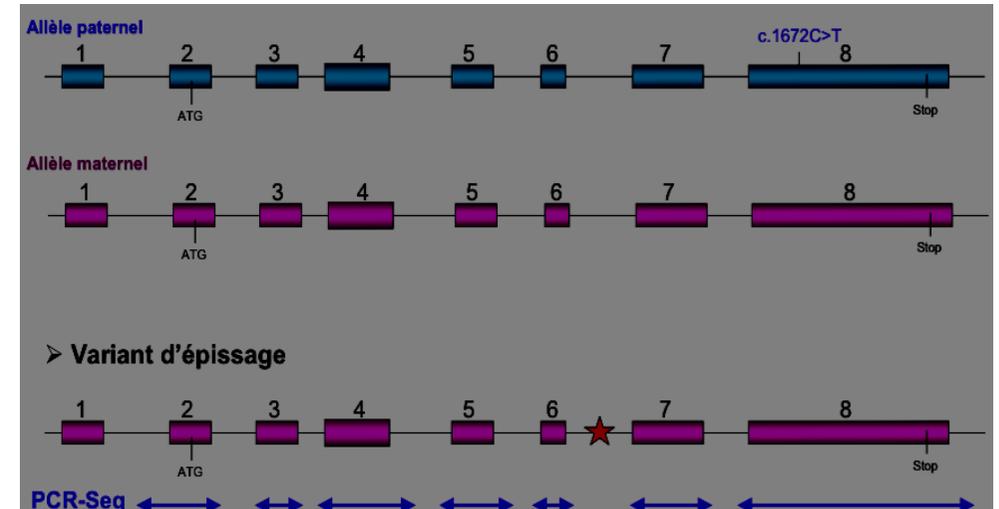
► Une mutation qui survient à n'importe quelle étape du processus peut donc générer une protéine anormale et par conséquent une pathologie.



⊖ Maladie autosomique RECESSIVE peut correspondre à une forme homozygote pour le même g ne muté, ou une forme hétérozygote pour 2 mutations différentes.

Dans ce dernier cas, on ne peut détecter qu'une seule mutation par PCR, car la PCR permet d'amplifier uniquement les exons.

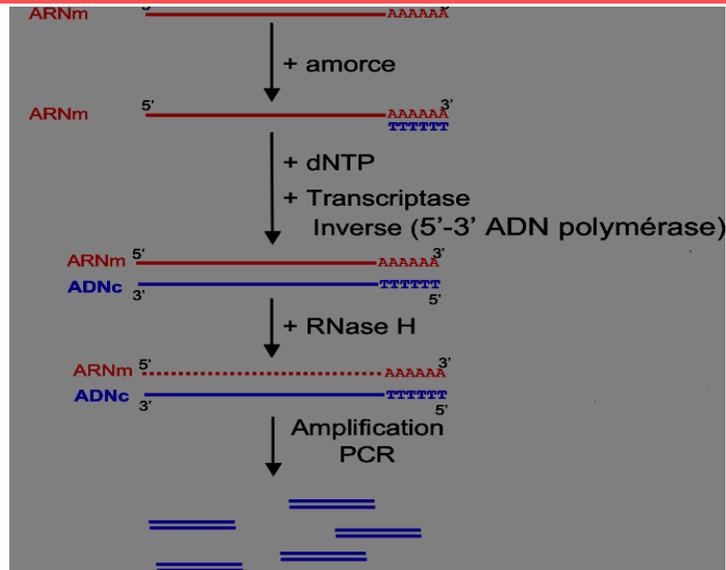
La 2 me mutation doit se trouver au niveau d'un intron au niveau d'un **site cryptique d'épissage** = une partie de l'intron va devenir un exon au cours de la maturation de l'ARN et donc être traduite en protéine et donner une molécule anormale.



Un variant d'épissage ne peut se détecter qu'en travaillant sur l'ARN (≠ PCR)
On ne peut **pas** directement amplifier les ARN.

On va utiliser les **REVERSE TRANSCRIPTASES**:

- récupérées à partir des RETROVIRUS
- elles synthétisent de 5' en 3' par complémentarité, à partir d'un brin d'ARN, un **simple** brin d'ADN
- utilisent une amorce d'ADN (succession de T) qui va aller s'hybrider sur la queue polyadénylée de l'ARNm



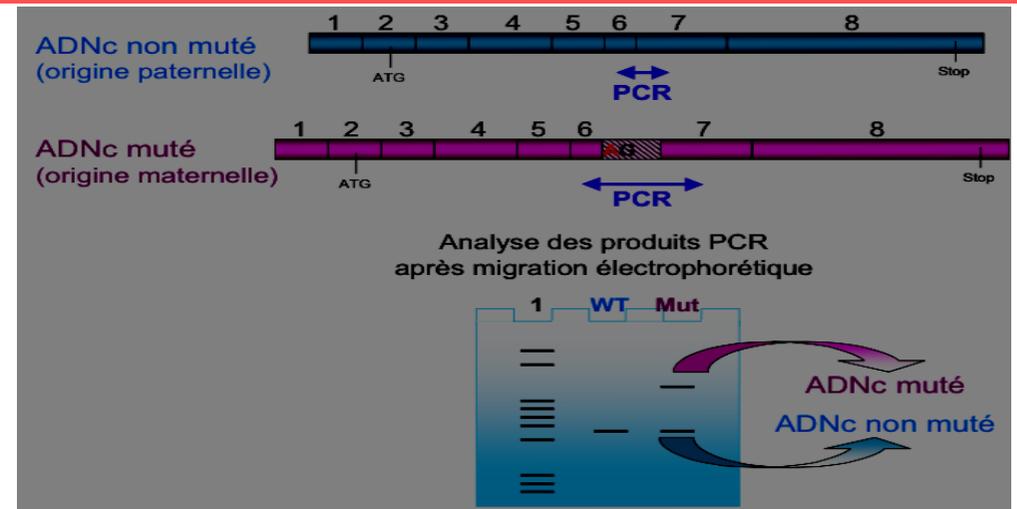
Dans le tube à essai:

- Amorce d'oligoT + dNTPs + polymérase d'activité Reverse Transcriptase + RNase H qui **dégrade l'ARN** uniquement lorsqu'il est hybridé avec l'ADN
- La copie d'ADN simple brin peut directement aller en PCR sans passer par l'étape de dénaturation.

Électrophorèse à partir de l'ADNc synthétisé à partir d'ARN

exemple:

- le père est porteur de la mutation au niveau exonique (« forme classique »)
 - la mère est porteuse de la **mutation d'épissage**
- 1) Chez le père on obtient 1 seule bande car pas de mutation d'épissage mais mutation d'un nucléotide
 - 2) Chez la mère: 2 bandes = l'ADNc comme celui du père + ADNc avec épissage particulier.



Le séquençage est illisible (trop de pics qui se superposent), donc on utilisera le clonage moléculaire pour séparer les 2 allèles de la mère (WT= sauvage + variant d'épissage= muté) afin de les séquencer seules.

En gros :

Chez un malade hétérozygote, on a la superposition du séquençage de l'allèle sain et du séquençage de l'allèle muté.

Pour le cas de **l'achondroplasie** : un seul nucléotide qui diffère entre allèle sain et allèle muté = mutation ciblée → ça passe : on la détecte par simple PCR + séquençage (2 pics au niveau du séquençage = position de la mutation)

Pour le cas d'une maladie où il y a ++ de différences entre l'allèle sain et l'allèle muté → ça passe pas : on n'arrive pas à savoir ce qui ne va pas au niveau de la séquence de l'allèle malade

Du coup :

On va séparer les allèles mutés des allèles sains, faire deux séquençages à part et les comparer : on va voir les différences entre les deux séquences ! (combien de nucléotides modifiés ? / insertion , délétion , substitution ? ...)

Dans le syndrome de Wolfram, le clonage moléculaire suivit d'un séquençage nous permettra de déterminer la séquence de l'intron en trop dans la séquence de l'ARNm qui ne contient normalement que les exons suite à l'épissage = variant pathogène d'épissage => voir fiche 2