

UE11 : Principales techniques de biologie moléculaire (Partie 1)

I. Introduction

Objectifs :

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

Utilisation de la génétique médicale :

- **Diagnostics pré-symptomatique, prénatal, positif**
- Compréhension de la **pathogénicité des maladies**
- **Thérapeutique** (ex : thérapie génique)

II. Principales techniques de biologie moléculaire

Analyse moléculaire du matériel biologique :

- A partir d'**ADN** ou d'**ARN**, avec **95%** (voire 99%) des diagnostics à partir d'**ADN**
- A partir de **quantités infimes** (qq microgramme, voire nanogramme)
- A partir de **n'importe quelle cellule nucléée** (cas particulier pour l'**ADN mitochondrial**)
- Analyse **très sensible** (possible à partir d'une seule cellule)
- **ADN très stable** contrairement à l'ARN → *Conservation possible de l'ADN dans des **DNathèques** pendant des années*

*Remarque : ARN et ADN sont tous les 2 vulnérables à la digestion par les nucléases (respectivement **RNases** et **DNases**) une fois la cellule lysée.*

A. Extraction d'ADN

→ A partir de sang, de tissus, de cellules amniotiques, de follicules pileux, de coupes en paraffine, etc...

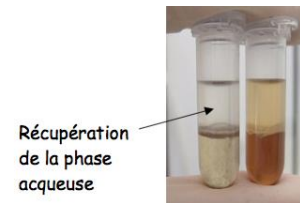
/! Dans le **sang**, on travaille sur les **leucocytes** et non les **globules rouges** (pas de noyau, donc pas d'ADN).

Etapes : (à partir de sang total)

- 1) Quelques mL de sang total sur **anticoagulant (EDTA)**

/! **Jamais d'héparine** comme anticoagulant (*inhibition des enzymes utilisées*)

- 2) **Lyse des globules rouges** (*inutiles*) avec une **solution hypotonique**
- 3) Récupération du **culot de leucocytes** lavé et suspendu dans un mélange de **détergent** et de **protéinase K ++** (*rôle fondamental dans la dégradation des protéines entourant l'ADN, des DNases, des nucléases...*)
- 4) **Extraction au phénol-chloroforme** pour éliminer les protéines dégradées → Utilisation de la **solubilité différentielle des molécules** (ADN/protéines) entre 2 phases non miscibles



Récupération de la phase aqueuse

De haut en bas :

- Phase **aqueuse** = **ADN**
- Galette centrale de **protéines dégradées**
- Phase **phénolique**

- 5) **Précipitation éthanol** par ajout de sel + éthanol à 95% froid (-20°) → Apparition d'une « **méduse** » d'ADN

- Récupération de la méduse lavée en éthanol 70°
- Resuspension
- Dosage par mesure de densité optique
- Conservation à **4°C** dans une **DNathèque** (*stabilité de l'ADN ++*)



B. Extraction d'ARN

→ **Plus difficile à étudier** que l'ADN car **très sensibles aux RNases A**

→ **Peu utilisé** en diagnostic de « routine »

→ Etude permettant d'**analyser l'expression d'un gène**

→ ARN = **spécifique d'un type cellulaire** particulier (≠ADN).

Extraction parallèle à celui de l'ADN : (mise à part qq protéines)

- **Homogénéisation** des cellules ou des tissus dans un **tampon** qui inhibe les RNAses endogènes, dénature les acides nucléiques et dégrade les protéines
- Extraction réalisée avec une solution permettant l'**extraction différentielle ARN/ADN**

C. Amplification en chaîne par la polymérase (PCR)

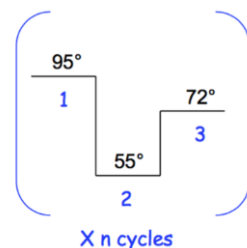
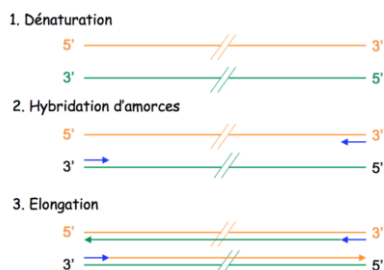
- **Technique de base** dans un laboratoire de biologie moléculaire
- Obtention en **grande quantité** d'une région d'ADN à étudier ⇒ Amplification **spécifique** (qq centaines de pb sur des millions)
- Utilisation de la **Taq** (= **ADN polymérase**) : origine **bactérienne**, résistance à de **fortes températures**
- Technique **très sensible**
- Grand risque de **contamination** ⇒ Etapes **isolées** dans un **circuit monodirectionnel** (indispensable pour l'agrément).

Dans un automate : ADN du patient + amorces + dNTP + *tampon MgCl₂* + **Taq polymérase**

Remarque : Il suffit juste de connaître les séquences de 18-20 nucléotides (amorces) **en amont** et **en aval** (⇒ **bornes d'amont & d'aval**) de la région à amplifier, et non pas la séquence entière du fragment.

Fonctionnement : **Cycle de 3 étapes** se répétant autant que nécessaire

- 1) **Dénaturation** (95°) = Rupture des liaisons hydrogène par la chaleur
- 2) **Hybridation des amorces** (55°)
- 3) **Elongation** (72°) = Synthèse par la Taq dans le sens 5'-3'



Remarque : Au bout de **n cycles**, on obtient **2ⁿ molécules d'ADN**.

D. Gel analytique (électrophorèse)

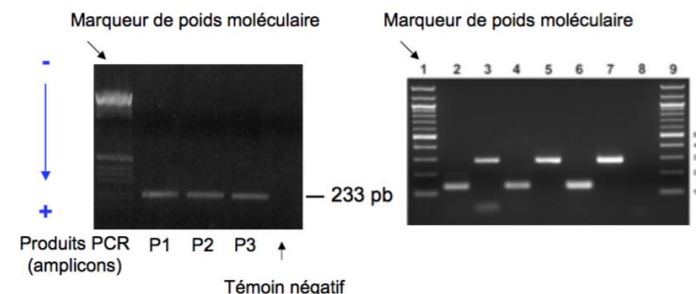
→ **Analyse des produits d'amplification** (permet de s'assurer qu'il n'y a pas eu contamination)

Fonctionnement :

- **Séparation des molécules d'ADN** (chargées négativement) en fonction de leur **taille** sur un **gel d'agarose ou d'acrylamide** parcouru par un courant électrique **du - vers le +** (et de haut en bas)
- Après migration, **coloration au bromure d'éthidium BET** (agent intercalant mutagène ⇒ nécessité d'une protection lors de son utilisation)
- Visualisation sous **lumière UV** (⇒ fluorescence rose)

Conditions :

- 1 puits servant de **marqueur de poids moléculaire** (= mélange de fragments d'ADN de poids connus)
- 1 puits « **témoin négatif** » (contenant tout sauf de l'ADN) → **Contrôle négatif** permettant d'affirmer qu'il n'y a pas eu contamination



Remarque : La vitesse de migration d'une molécule d'ADN est en fonction de sa **masse moléculaire** (nb de pb) et de la **concentration du gel**.

E. Digestion enzymatique

Enzymes de restriction :

- **Endonucléases** d'origine **bactérienne** coupant au milieu de l'ADN **double brin**
- Coupure **reproductible** et **spécifique** d'une séquence nucléotidique

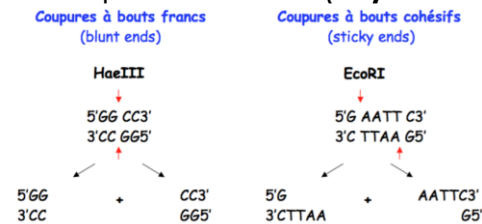
- **3 types** en fonction qu'elle coupe à distance ou non de la séquence

Enzymes de restriction de type II :

- Reconnaissance de 4 à 8 pb
- Coupure de l'ADN au niveau de la séquence reconnue (**séquence palindromique**)

*Remarque : Deux enzymes reconnaissant la même séquence sont dites **isoschizomères**.*

- **2 types de coupure :**
 - o **A bouts francs**
 - o **A bouts cohésifs**



III. Applications en pathologies

Maladie monogénique (rare) ≠ **Maladie chromosomique** (ex : trisomie 21)

*Remarque : En biologie moléculaire, on travaille sur les maladies **monogéniques** (ex : mucoviscidose, achondroplasie, etc...). Généralement se sont des maladies rares qui touchent **moins d'1 personne sur 2000 +++**.*

❖ **ACHONDROPLASIE**

- **La plus fréquente** des chondroplasies (1/15000)
- Diagnostic évoqué sur signe d'appel échographique (« **fémurs courts** »)
- Maladie de **transmission autosomique dominante**
- 90% des enfants atteints naissant de parents non atteints → **Mutations de novo** (= **néomutations**) ++
- Forme plus grave chez les homozygotes

Caractéristiques :

- o Petite taille
- o Membres courts
- o Hyperlordose
- o Mains courtes
- o Macrocéphalie
- o Front haut
- o Ensellure nasale marquée
- o **Intelligence normale** ++



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

- o Complications neurologiques (*myélopathie*)

Gène responsable : **FGFR3** (*Fibroblast Growth Receptor 3*)

- Code pour le **récepteur d'un facteur de croissance fibroblastique**
- Expression dans les **chondrocytes**
- Régulation de la **différenciation des ostéoblastes** et de la **formation osseuse**
- Mutation **toujours au même endroit** (exon 10, codon 380, position 1138)
- **2 variants de mutation** possible pour le nucléotide 1138 :

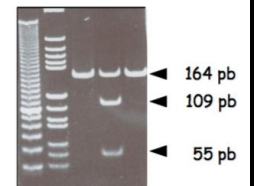
- o Guanine (G) → **Adénine** (A)
- o Guanine (G) → **Cytosine** (C)

→ Dans les 2 cas, on obtient une **Arginine** (= *acide aminé*) au lieu d'une Glycine (⇒ **mutation faux sens**)

Devant un signe d'appel échographique :

- 1) **Extraction d'ADN à partir de cellules amniotiques** obtenues après une ponction amniotique (*risque non négligeable de fausse couche, mais c'est un risque **relatif** étant donné la gravité de l'achondroplasie*)
- 2) **Amplification par PCR** d'un fragment d'ADN (= *amplicon*) de 164 pb encadrant la position 1138
- 3) **Vérification des amplicons sur gel analytique** (*électrophorèse*)
- 4) **Digestion enzymatique des amplicons** (*méthode indirecte*) par :
 - o **Bfm I** s'il y a la mutation **G>A**
 - o **Hpa II** s'il y a la mutation **G>C**

Sain	164 pb
Hétérozygote	164 + 109 + 55 pb
Homozygote	109 + 55 pb



*Remarque : Il n'y a **pas de digestion** par les enzymes de restriction si la séquence est **saine**.*

NB : Un patient atteint ne peut avoir qu'une **seule des 2 mutations**, c'est-à-dire qu'il peut être :

- Soit hétérozygote G>A // Sain
- Soit hétérozygote G>C // Sain
- Soit homozygote G>A // G>A
- Soit homozygote G>C // G>C

→ Il n'y a **pas d'hétérozygotie composite** (G>A // G>C), donc une seule des 2 enzymes fonctionnera, traduisant **soit la présence de la mutation G>A, soit G>C**.

- 5) **Vérification par séquençage** (*méthode directe*)