

Fiche Cours 1 TTR - UE11

Méthodes et principales techniques de biologie moléculaire

I- Analyse du matériel génétique :

L'analyse du matériel génétique se fait à partir d'**acides nucléiques** (quelques microgrammes). On peut le faire avec **n'importe quelle cellule NUCLEE++**.

Les techniques de biologie moléculaire sont **très sensibles** permettant une analyse moléculaire ciblée à partir d'**une seule cellule**

On observe une **différence de stabilité entre ARN et ADN**, mais tous deux sont vulnérables à la digestion par les nucléases (DNases et RNases) une fois la cellule lysée++

ATTENTION les GR n'ont PAS DE NOYAU, on ne peut pas s'en servir pour prélever de l'ADN !! +++

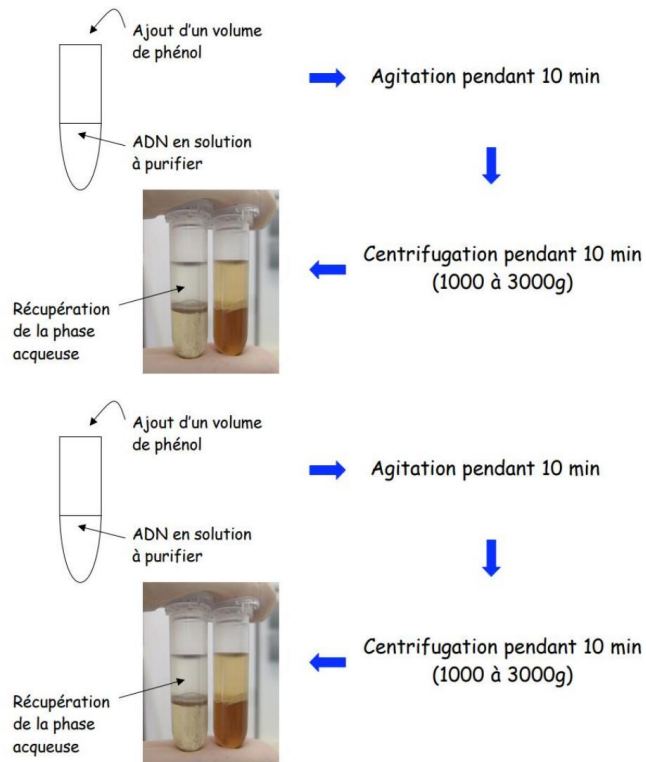
On peut extraire de l'ADN à partir de :

- Sang (**les globules BLANCS, pas les GR qui n'ont pas de noyaux !! ++**)
- Tissus
- Cellules amniotiques -> diagnostic prénatal
- Follicules pileux
- Coupes en paraffine

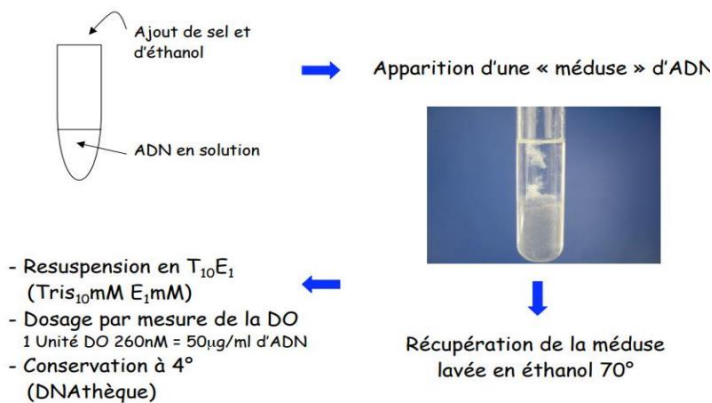
Extraction de l'ADN : 5 étapes à connaître ++

- A partir de sang total :

1. Quelques ml de **sang total sur anticoagulant** (EDTA ou acide éthylène diamine tétracétique)
2. Lyse des globules rouges avec une solution **hypotonique**
3. Récupération du culot de leucocytes lavé et resuspendu dans un mélange de détergent et de protéinase K
4. **Extraction phénol-chloroforme** : pour éliminer les protéines en utilisant la solubilité différentielle des molécules (ADN/Protéines) entre **2 phases non miscibles**



5. Précipitation à l'éthanol : 2,5 volumes d'éthanol à 95° froid (-20°) en présence de sel



L'ARN :

Il est **plus représentatif** de ce qui est exprimé dans les cellules, donc des **protéines produites**

L'ARN a des **avantages** : **reflet plus exact des protéines** MAIS à cause de son instabilité, on utilisera plutôt l'ADN génomique en routine +++

Extraction de l'ARN :

Son extraction est **plus difficile à étudier que l'ADN car il est très sensible aux ribonucléases (RNase A)**.
L'ARN est peu utilisé en diagnostic de routine.

On observera différentes étapes :

1- Homogénéisation des cellules ou des tissus dans un tampon permettant: d'inhiber les RNases endogènes, de dénaturer les acides nucléiques, de dégrader les protéines

2- Extraction réalisée avec une solution permettant l'extraction différentielle ARN/ADN

3- Extraction des ARN polyA+ : 1% des ARN totaux, purification par affinité en passant les ARN totaux sur une colonne d'oligo-dT cellulose qui va fixer les ARN poly A+. Après lavage, les ARN poly A+ sont élués par abaissement de la force ionique.

4 - La précipitation est ensuite réalisée avec de l'alcool éthylique absolu froid.

L'étude des ARN permet d'analyser l'expression d'un gène.

3- Amplification en chaîne par la polymérase (PCR)

C'est une technique de base dans un laboratoire de biologie moléculaire

Elle va servir à amplifier une REGION SPECIFIQUE d'ADN +++ .

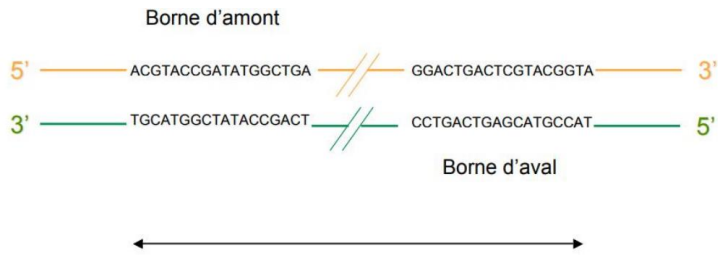
Elle permet d'obtenir en **grande quantité une région d'ADN à étudier**

On part d'une molécule d'ADN double brin pour obtenir à la fin une grande quantité d'ADN amplifié++

Il suffit de connaître les **séquences de 18-20 nucléotides avant et après le séquence qu'on veut amplifier**
= bornes d'AMONT et d'AVANT

Dans cette technique on utilise la **Taq polymérase**, qui est **thermostable** (résiste à la chaleur)

C'est une **technique très sensible**, qui comporte donc un **risque de contamination** ++++



Amplification d'un fragment d'ADN double brin de 150pb à 3kb

Borne d'amont = 18-20 nucléotides en amont de la région à amplifier

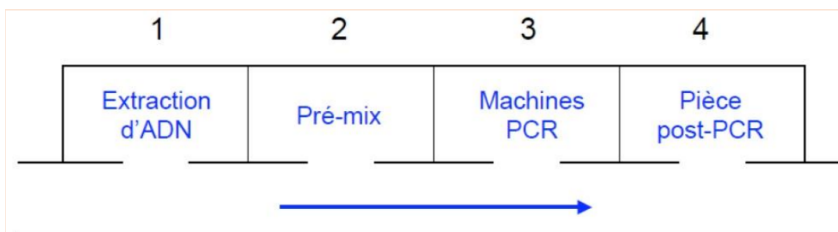
Borne d'aval = 18-20 nucléotides en aval de la région à amplifier

A - Matériel de la PCR

Pour réaliser une PCR, il faut mettre dans un automate :

- L'**ADN du patient** en petite quantité
- **2 amorces = primers**
- Des **désoxyribonucléotides** (= dNTPs)
- Un **tampon MgCl₂** (pour stabiliser les polymérases)
- La **Taq Polymérase**: c'est une ADN polymérase

Il y a un **risque de contamination** qui nécessite un **circuit monodirectionnel**, indispensable pour l'agrément +++



B - Étapes de la PCR

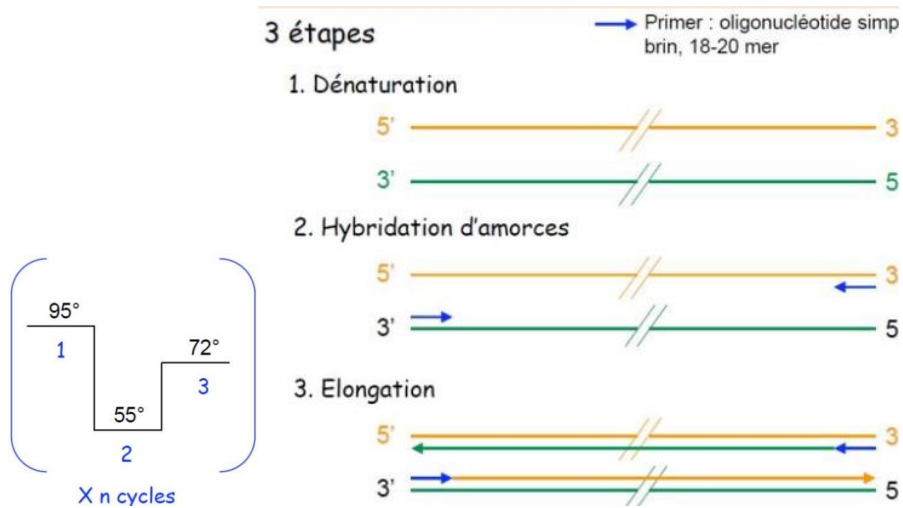
La **PCR** est un **cycle de trois étapes répétées n fois** qui permet l'**amplification exponentielle du matériel génétique**, de telle sorte qu'au bout de n cycles on obtiendra 2^n molécules d'ADN !

La PCR est une amplification exponentielle générant **2^n molécules d'ADN au bout de n cycles** ++++

1- Dénaturation des deux brins à 95°C

2- Hybridation des amorces à 55°C

3- Elongation à 72°C



C- Vérification sur gel analytique (électrophorèse)

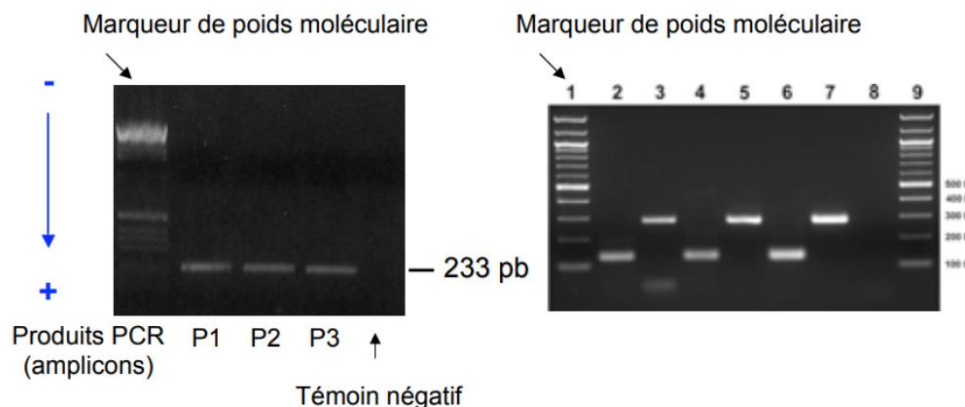
C'est une analyse des produits d'amplification, sur gel d'agarose ou d'acrylamide

On va produire un champ électrique (- => +) afin de faire migrer les protéine selon leur éléctonégativité

La **vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique** sera fonction : de sa **masse moléculaire** (nbre de pb) et de la **concentration en agarose ou en acrylamide du gel**.

Après migration, on colorera les protéines au **bromure d'éthidium**.

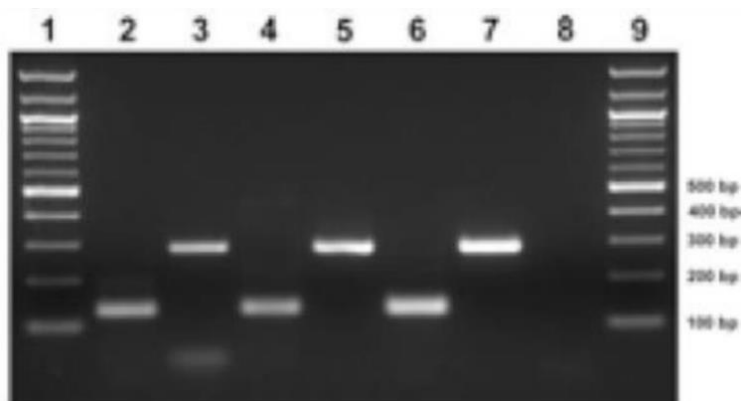
On pourra alors les visualiser sous **lumière UV** :



La colonne la plus à gauche est le **marqueur de poids moléculaire**, c'est un mélange de protéines dont la masse est connue, afin de pouvoir créer une "échelle" de poids moléculaire pour connaître celui des protéines qu'on fait migrer.

La colonne la plus à droite est le **témoin négatif**. Si on voit la présence de protéine, c'est que l'échantillon a été contaminé et est donc ininterprétable.

Interprétation de l'électrophorèse :



Les colonnes 1 et 9 sur l'électrophorèse sont des marqueurs de poids moléculaire.

On regarde en premier le témoin négatif (ici colonne 8) : on y a mis tous les éléments sauf l'ADN, La colonne du témoin négatif doit toujours rester vide sinon il y a contamination et l'électrophorèse est ininterprétable ! +++

4 - Digestion enzymatique

Les enzymes de restriction sont ENDOnucléases bactériennes qui coupent l'ADN double brin

Elles permettent des coupures reproductibles et spécifiques d'une séquence nucléotidique

Elle **détruit les liaisons PHOSPHODIESTERS** (entre 2 nucléotides)

Il existe plus de 500 enzymes différentes

Il existe **3 types d'enzymes de restriction** en fonction du fait qu'elles coupent à distance ou non de la séquence nucléotidique reconnue:

1) Enzymes de restriction de type II :

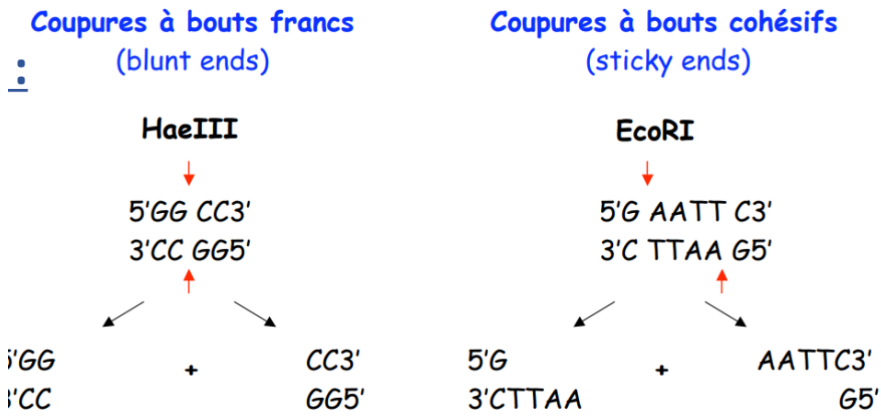
Elles reconnaissent 4 à 8 paires de bases. L'enzyme coupe l'ADN au niveau de la séquence reconnue.

La **séquence reconnue** est dite **palindromique**.

2 enzymes reconnaissant la même séquence sont dites **isoschizomères**.

2) Enzymes de restriction de type I et III : coupent aléatoirement l'ADN

Il existe **2 types de coupure** :



II- Biologie moléculaire et génétique médicale

1- L'achondroplasie :

Définition :

- Petite taille
- Membres courts
- Faciès caractéristique : front haut + dysmorphie
- Intelligence normale ++
- Complications neurologiques -> moelle épinière

Le signe d'appel échographique sont les fémurs courts +++



C'est une maladie monogénique AUTOSOMIQUE DOMINANTE MAIS 90% des enfants atteints ont leurs parents NON ATTEINTS car c'est une NEOMUTATION ++

Le **gène responsable** est **FGFR3**, qui code pour le **RECEPTEUR d'un facteur de croissance fibroblastique**.

Ce gène s'exprime normalement dans les **CHONDROCYTES**

2 mutations du gène FGFR3 :

- **Guanine** remplacée par une **Adénosine** (G -> A)
- **OU** **Guanine** remplacée par une **Cytosine** (G -> C)
- Dans les 2 cas, on a une **substitution d'AA** : une **GLYCINE** est remplacée par une **ARGININE** ++

Pour le diagnostic on veut savoir si le fœtus a la mutation G -> A ou G->C

Analyse génomique :

Après un signe d'appel échographique

1- Extraction d'ADN des cellules amniotiques après une ponction amniotique

2- Amplification par PCR

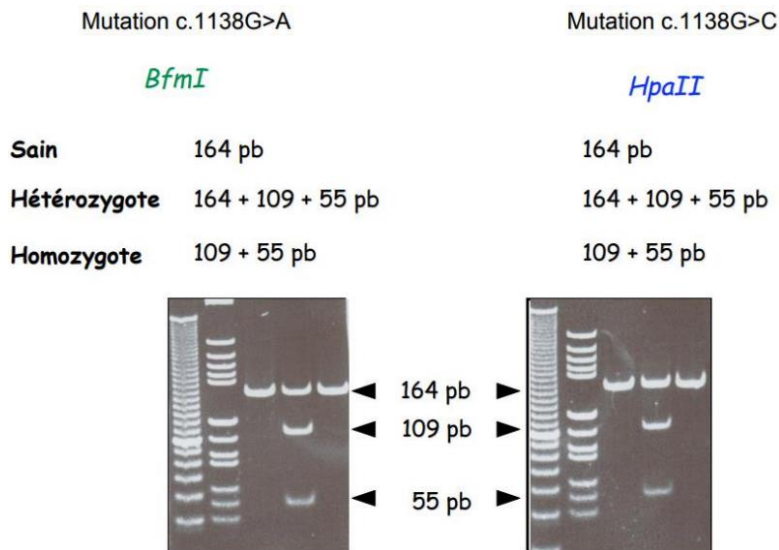
3- Verification des produits PCR

4- Digestion par endonucléases :

- **BFML** reconnaît son site de restriction si **G->A**
- **HpaII** reconnaît son site de restriction si **G -> C**

-Si en présence des **2 enzymes de restriction** , on a un **séquencage sauvage = PAS de coupures**, il n'y a **pas de mutation ++**

5- Séquencage pour vérifier la présence de la mutation



III - Le séquençage de l'ADN

1- Principe :

On ne pose pas de diagnostic avec UNE seule technique de biologie moléculaire +

Le séquencage détermine la succession de nucléotides d'une séquence d'intérêt

Cette méthode ajoute des ddNTP = Didésocytiribonucléotides

Les étapes du séquençage sont les mêmes que la PCR +++ :

Le séquencage utilise UNE SEULE amorce alors que le PCR en utilise DEUX +++

Dans la PCR on ajoutait des dNTPs (nucléotides avec un OH), alors que pour le séquencage on ajoute des ddNTPs (nucléotides SANS OH++)

La **Taq** incorpore de manière **ALEATOIRE** un **dNTP** ou un **ddNTP** pour synthétiser le brin complémentaire

La synthèse s'arrête quand elle incorpore un ddNTP car il n'y a plus de OH disponible pour faire une liaison avec le nucléotide suivant ++++

2- La méthode SANGER = initiale = de référence

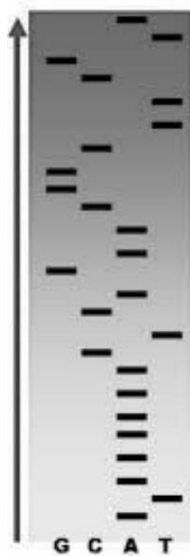
On a **4 tubes** contenant le mélange réactionnel, chaque tube contient un ddNTP différent +++

Donc chaque tube contient un type de ddNTP (A, T, C OU G) ET les 4 types de dNTPs (A, T, C ET G)

On obtient plusieurs fragments de taille différente en fonction de l'endroit où le ddNTP a été incorporé.

Ensuite on fait migrer les fragments en fonction de leur taille.

On lit le gel du BAS vers le HAUT car les plus petits migrent plus loin.



3 - Méthode automatisée :

C'est le même principe, mais on n'est **plus obligés d'avoir 4 tubes séparés.**

Aujourd'hui on a des **ddNTPs fluorescents**, chaque type de ddNTP a un couleur spécifique émise par un fluorochrome particulier. Ce **code couleur permet de tout mélanger** et on retrouve l'identité de nos nucléotides par leur couleur. La migration se fait plus sur gel mais sur un séquenceur automatique.

On a toujours l'**électrophorèse**, mais les **fragments passent devant une caméra qui reconnaît la couleur du ddNTP et donc l'identité du nucléotide**

On a donc une séparation en fonction de : +++++

- la **COULEUR** qui nous donne **l'IDENTITE** des nucléotides
- la **TAILLE** qui nous donne **l'ENCHAINEMENT** des nucléotides

