

Fiche récap techniques de biologie moléculaire

1- Extraction ADN

- A partir de sang, tissus, cellules amniotiques, follicules pileux, coupes en paraffine
- A partir de sang total :

1- Quelques mL de sang sur anticoagulant (EDTA ou acide éthylène diamine tétracétique) PAS sur héparine car elle inhibe certaines étapes +++

2- Lyse GR -> solution HYPOTonique

3- Récupération du culot de leucocytes lavé et resuspendu dans un mélange de **détergent** et de **protéinases K** -> élimine les protéines chromatidiennes fixées à l'ADN et les DNAses susceptibles de dégrader l'ADN une fois les cellules lysées

4- Extraction phénol-chloroforme -> solubilité différentielle des molécules (ADN / protéines) de deux phases non miscibles

Phase supérieure = aqueuse = ADN en solution

Phase inférieure = phénolique

Entre les 2 = galette de protéines

5- Précipitation à l'éthanol en présence de sel

2- Extraction de l'ARN

Plus difficile à étudier que l'ADN car facilement dégradé par des RNAses.

Homogénéisation des cellules ou des tissus dans un **tampon** permettant d'inhiber les RNAses endogènes, de dénaturer les acides nucléiques & de dégrader les protéines

Cette extraction va être réalisée dans une **solution** permettant l'**extraction différentielle ARN/ADN**.

Extraction des ARN polyA+ (=1% des ARN totaux) = purification par affinité en passant les ARN totaux sur une colonne d'oligo-dT qui va fixer les ARN poly A+.

Puis précipitation avec de l'alcool éthylique absolu froid.

3- PCR

- ✓ Technique de base, très puissante car elle part de quelques microgrammes d'acides nucléiques, et arrive à l'**amplifier en grande quantité**.
- ✓ Elle est extrêmement sensible -> risque contamination ++
- ✓ Elle permet d'obtenir en grande quantité une région spécifique d'ADN.
- ✓ Elle utilise la **Taq (Thermophilus Aquaticus) DNA polymérase**.
- ✓ On doit connaître les **18-20 nucléotides avant et après notre amplicon = bornes d'amont et d'aval**. +++++
- ✓ On a donc pas besoin de connaître la séquence de l'amplicon ! ++
- ✓ **3 étapes** : 1- Dénaturation (95°) 2- Hybridation (55°) 3- Elongation (72°)
- ✓ Ces 3 étapes vont être répétées n fois (entre 30 et 35 cycles). On obtient 2^n molécules au bout de n cycles.

- ✓ Dans un automate: - l'ADN du patient - Les amorces = primers - Des désoxynucléotides - Tampon (MgCl₂) - Taq polymérase
- ✓ Cette technique nécessite un circuit monodirectionnel

4- Gel analytique

- ✓ **Analyse des produits d'amplification obtenus par PCR**
- ✓ Gel d'agarose ou d'acrylamide -> mailles de taille différente selon la taille des produits à analyser
- ✓ Champ électrique (- => +)
- ✓ La vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique dépend : - de sa masse moléculaire (nbre de pb) - de la concentration en agarose ou en acrylamide du gel
- ✓ Visualisation de nos produits grâce à un agent intercalant = bromure d'éthidium = fluorescent sous UV
- ✓ Sur un gel : - un témoin négatif qui doit être vide, sinon il y a contamination = PAS INTERPRETABLE ++ - un marqueur de poids moléculaire

5- Digestion enzymatique

- ✓ **Enzymes de restriction = endonucléases bactériennes** -> coupent ADN double brin
- ✓ Coupure reproductible et spécifique d'une séquence nucléotidique
- ✓ 3 types d'enzymes de restriction
- ✓ Enzymes de restriction de type II principalement utilisées -> reconnaissance de 4 à 8 paires de bases
- ✓ Deux enzymes reconnaissant la même séquence = **isoschizomères**
- ✓ Deux types de coupure : **à bout franc ou cohésif**

Séquençage

- ❖ **Détermination de la succession des nucléotides**
- ❖ Les mêmes étapes que la PCR
- ❖ **ATTENTION : Le séquençage utilise UNE SEULE amorce alors que le PCR en utilise DEUX**
- ❖ On ajoute des **ddNTP = Didésoxyribonucléotides**
- ❖ L'ADN Polymérase incorpore au hasard des dNTP ou des ddNP, lorsqu'on ajoute un ddNTP, la synthèse s'arrête
- ❖ On se retrouve avec une multitude de fragments de taille différente

1- La méthode Sanger

- **4 réactions indépendantes dans 4 tubes différents** contenant chacun **1 type de ddNTP (A, T, C OU G) ET les 4 types de dNTPs (A, T, C ET G).**
- Les produits synthétisés sont ensuite séparés, en fonction de leur taille, par migration électrophorétique.
- L'**identité** = **piste** sur laquelle on fait migrer les produits (=tube), et l'**enchaînement** = **la taille des fragments**.

2- La méthode automatisée

- Utilisation de ddNTPs fluorescents.
- Chaque ddNTP = couplé à un fluorochrome de couleur différente.
- Les **4 ddNTPs = dans le même tube réactionnel ! ++**
- Les nucléotides sont mélangés puis différenciés par ce code couleur
- Les produits synthétisés sont séparés selon leur taille, par migration électrophorétique
- L'**identité = par leur couleur**, et l'**enchaînement = par leur taille**. ++
- Les nucléotides passent ensuite devant une caméra = identification de la couleur du fluorochrome et donc le nucléotide, grâce à un laser
- Un traitement informatique nous donnera la séquence nucléotidique = **électrophorégramme**

RECAP PATHOS :

1- Achondroplasie

- ◆ Maladie rare = la plus fréquente des chondrodysplasies
- ◆ **Le signe d'appel de l'achondroplasie est donc la présence de fémurs courts à l'échographie.**
+++
- ◆ Maladie monogénique **AUTOSOMIQUE DOMINANTE MAIS 90%** des enfants atteints ont leurs **parents NON ATTEINTS** car c'est une **NEOMUTATION ++**
- ◆ Gène responsable = **FGFR3** -> code pour le RECEPTEUR d'un facteur de croissance fibroblastique
- ◆ 2 mutations possibles 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 ++**
- ◆ **DIAGNOSTIC :**

Devant un signe d'appel échographique :

1- Extraction d'ADN à partir de cellules amniotiques après une ponction amniotique

2- Amplification par PCR d'un fragment d'ADN (amplicon) de 164 paires de bases encadrant la position 1138

3- Vérification des amplicons sur gel

4- Digestion des amplicons par endonucléases : - BFMI si G->A , HpaII si G -> C

5- Vérification par séquençage

On ne pose pas de diagnostic avec une seule méthode de biologie moléculaire ! +++

On va alors séquencer le gène FGFR3 afin d'être sûr de la présence d'une mutation ++

2- Syndrome de Wolfram

- ◆ Transmission autosomique **récessive**
- ◆ Gène responsable = WFS1 = 8 exons.

Diagnostic :

- ◆ 7 PCR = amplification de tous les exons sauf l'exon 1 car non codant
- ◆ Si mutation **d'exon** = visible directement sur **séquençage**
- ◆ Si mutation **d'intron** = **site cryptique d'épissage** = utilisation de la **reverse transcriptase** pour obtenir l'ADNc. Dans ce cas, le **fragment sera plus grand sur la PCR** car l'exon rallongé ++

GROS RECAP GENERAL :

- Mutation **ciblée** (achondroplasie) : Digestion enzymatique puis séquençage
- Mutation dans un **gène donné** (Wolfram) : PCR puis séquençage, reverse transcriptase si mutation intronique
- Mutations dans **plusieurs gènes** (Charcot) : NGS
- **Maladies infectieuses / Nombre de copies de gènes** : PCR en temps réel
- **Remaniement chromosomique** : caryotype