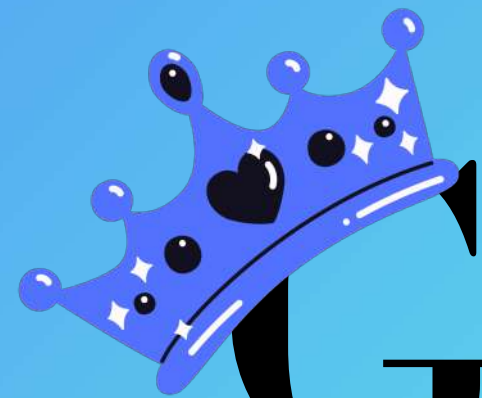
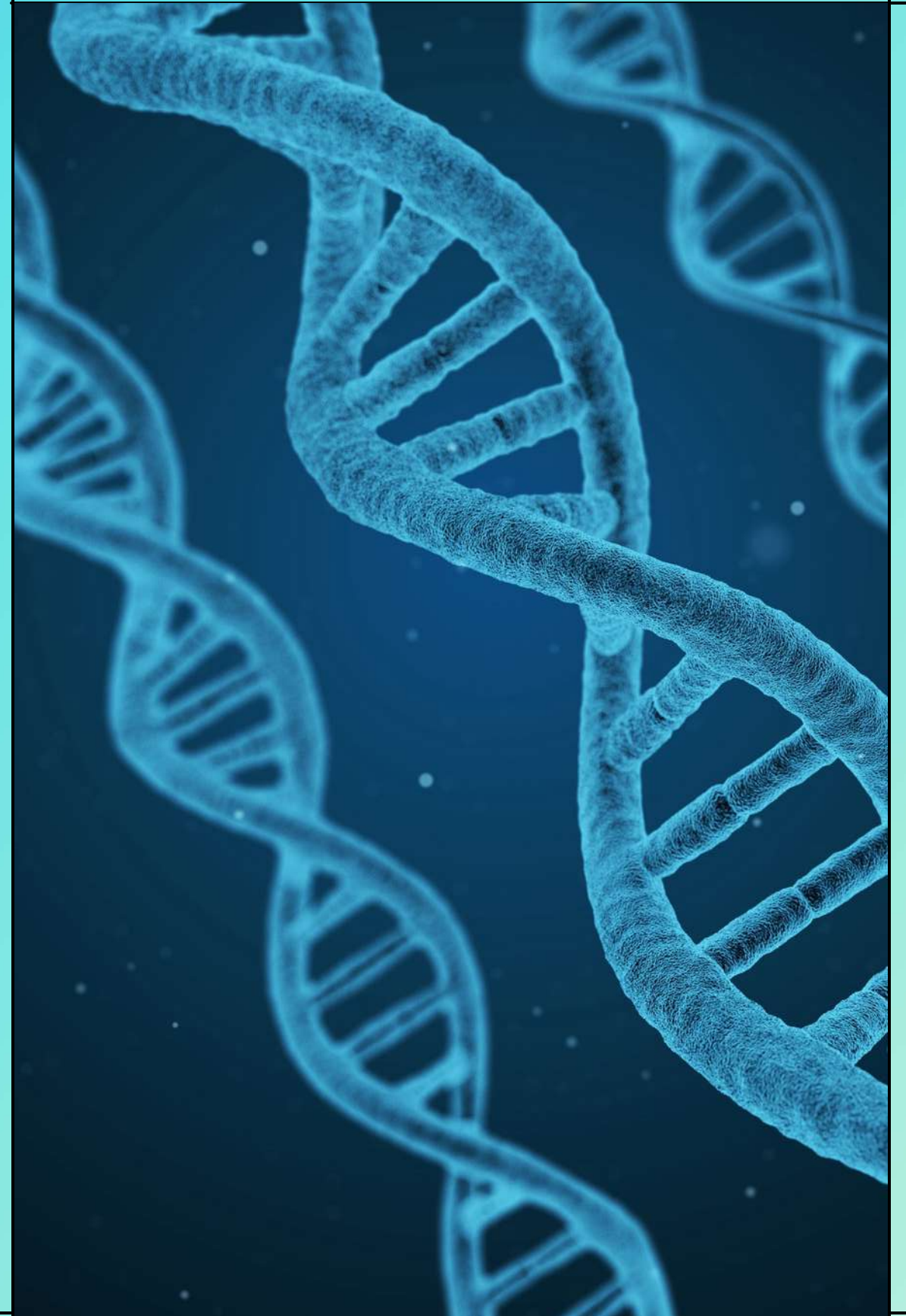


Once upon  
a Time...



Génétique



# Matériel biologique et principales techniques de biologie moléculaire



- Analyses à partir **d'acides nucléiques** : ADN ou ARN.
  - En **petite quantité** : que quelques **microgrammes**.
  - Techniques très sensibles → analyses moléculaires ciblées à partir d'une **seule** cellule.
- Extraction de l'ADN et de l'ARN de **n'importe quelle cellule nucléée humaine**.
- **Différence entre ARN et ADN**
  - ADN = beaucoup **plus stable** que l'ARN. Il se conserve mieux et plus longtemps.
  - ADN et ARN **vulnérables à la digestion par les nucléases** (DNAses et RNAses) une fois que la cellule a été lysée +++



# ✦ Exiraciion de l'ADN ✦

## 1 – prélèvement du sang total (GR + GB) :

On effectue un prélèvement UNIQUEMENT sur **tube EDTA+++**  
Quelques millilitres suffisent.



## 2 – Lyse des GR : GR n'ont pas de noyau donc n'ont pas d'ADN !

## 3 – Récupération et lavage des leucocyte (=GB) :

Les leucocytes sont resuspendu dans un mélange de :

- Détergent.
- Protéinase K : dégradent le protéines qui protègent l'ADN et les DNAses qui peuvent endommager l'ADN après la lyse

# Extraction de l'ADN

## 4 – Extraction au phénol-chloroforme

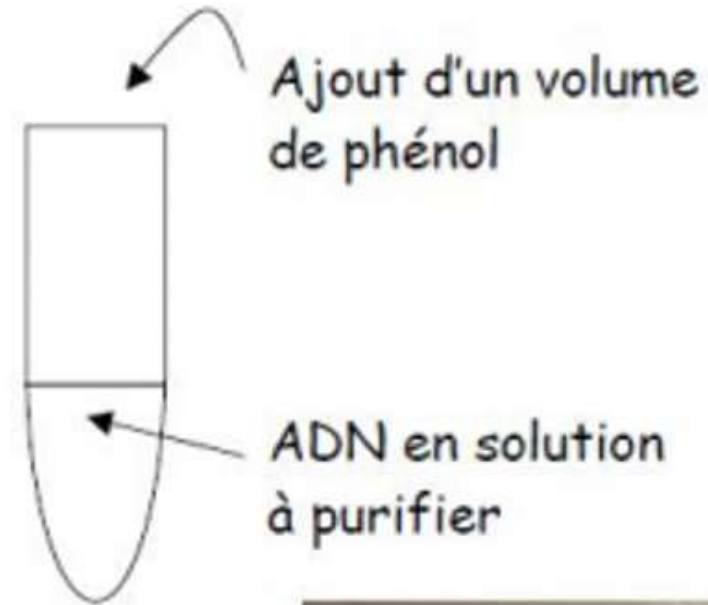
Le phénol-chloroforme permet d'éliminer les protéines dégradées grâce à ses propriétés de solubilité différentielle entre deux phases non miscibles

(ex : eau / huile)





# Extraction de l'ADN

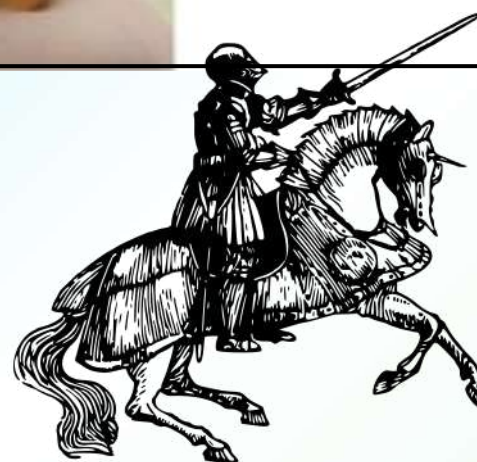
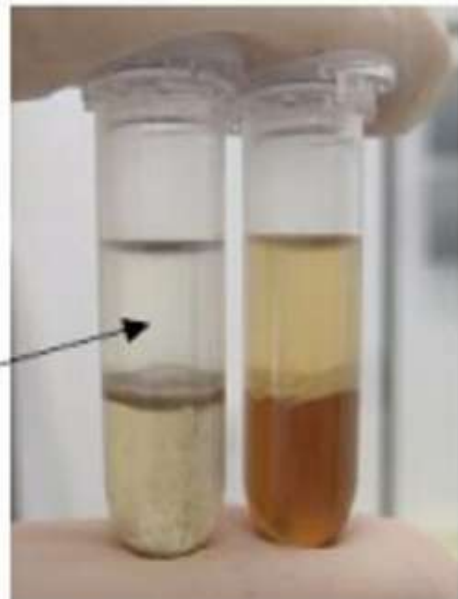


→ Agitation pendant 10 min



← Centrifugation pendant 10 min  
(1000 à 3000g)

Récupération de la phase aqueuse



## 4 - Extraction au phénol-chloroforme

Après centrifugation, on obtient dans le tube :

- La phase **supérieure** : **aqueuse**, qui contient l'ADN
- La phase **inférieure** : **phénolique**
- Les deux sont séparées par une **galette de protéines dégradées**



# Extraction de l'ADN ✦

## 5 – Précipitation de l'ADN à l'éthanol :

- Rajout à la phase aqueuse 2,5 volume d'éthanol à 95° froid (–20°) + sel.
- Obtention d'une « **Méduse d'ADN** » = ADN purifié

## 6 – Re-suspension et quantification

- Re-suspendre dans une solution de T10E1 : protège l'ADN des nucléases
- Quantification par mesure de densité optique





# Extraction de l'ARN ✨

---

- **Plus difficile à étudier** que l'ADN :
  - Très sensible aux ribonucléases qui les dégradent facilement.
- Peu utilisé en diagnostic de routine.
  - Reste très utile pour tester la pathogénicité de mutations susceptibles de jouer un rôle sur l'épissage ou **analyser l'expression des gènes.**

# Extraction de l'ARN

ÉTAPES D'EXTRACTION DE L'ARN	
1 – Homogénéisation des cellules ou des tissus dans un tampon	<ul style="list-style-type: none"><li>- Permet :<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Inhibition des RNAses endogènes.</li><li>➤ Dénaturation des acides nucléiques.</li><li>➤ Dégradation des protéines.</li></ul></li></ul>
2 – Extraction	<ul style="list-style-type: none"><li>- Avec une solution permettant l'extraction différentielle ARN/ADN.</li></ul>
2bis – Extraction des ARN polyA+	<ul style="list-style-type: none"><li>- ARN polyA+ représentent 1% des ARN totaux.</li><li>- On réalise une <b>purification par affinité</b> :<ul style="list-style-type: none"><li>➤ on passe les ARN totaux extraits sur une <b>colonne d'oligo-dT cellulose qui va fixer les ARN poly 1+</b>.</li><li>➤ Après lavage, les ARN poly A+ sont élués par abaissement de la <b>force ionique</b>.</li><li>➤ La précipitation est ensuite réalisée avec de l'<b>alcool éthylique absolu froid</b> de manière classique.</li></ul></li></ul>



# PCR

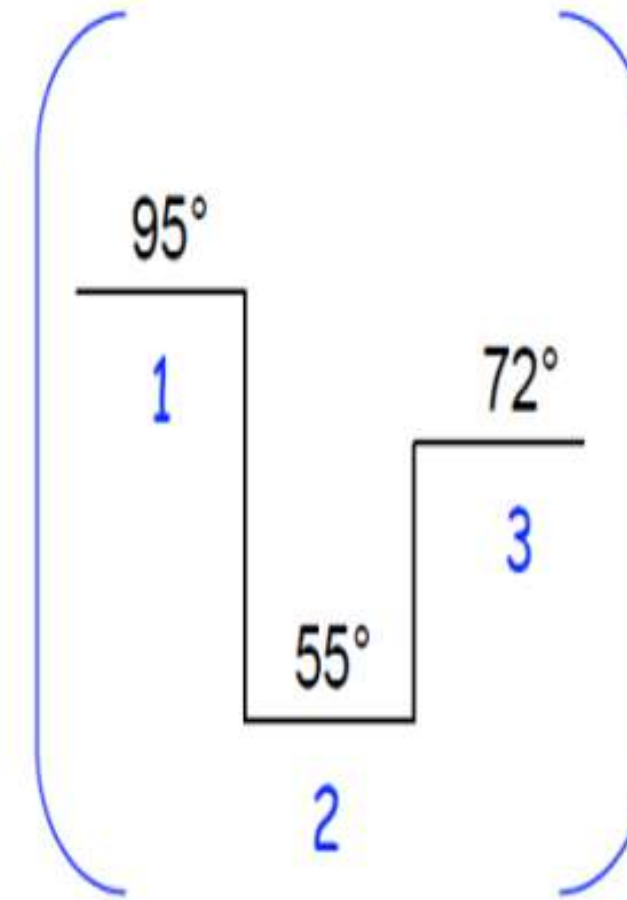
Ces 3 étapes vont  
être répétées n fois

$2^n$  molécules d'ADN  
au bout de n cycles

1- Dénaturation (95°C)

2- Hybridation (55°C)

3- Elongation (72°C)



3 étapes

→ Primer : oligonucléotide simple  
brin, 18-20 mer

1. Dénaturation

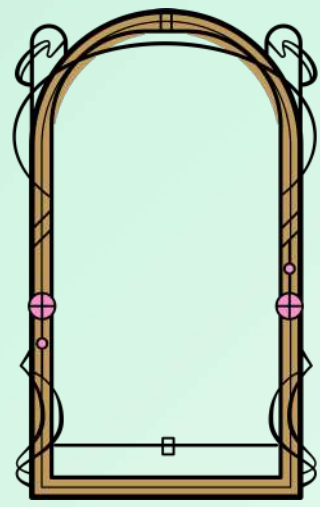


2. Hybridation d'amorces



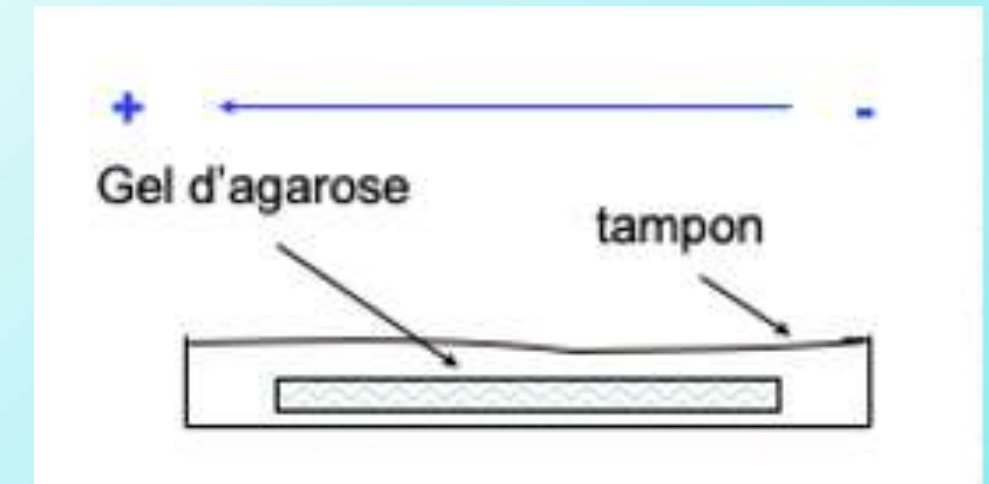
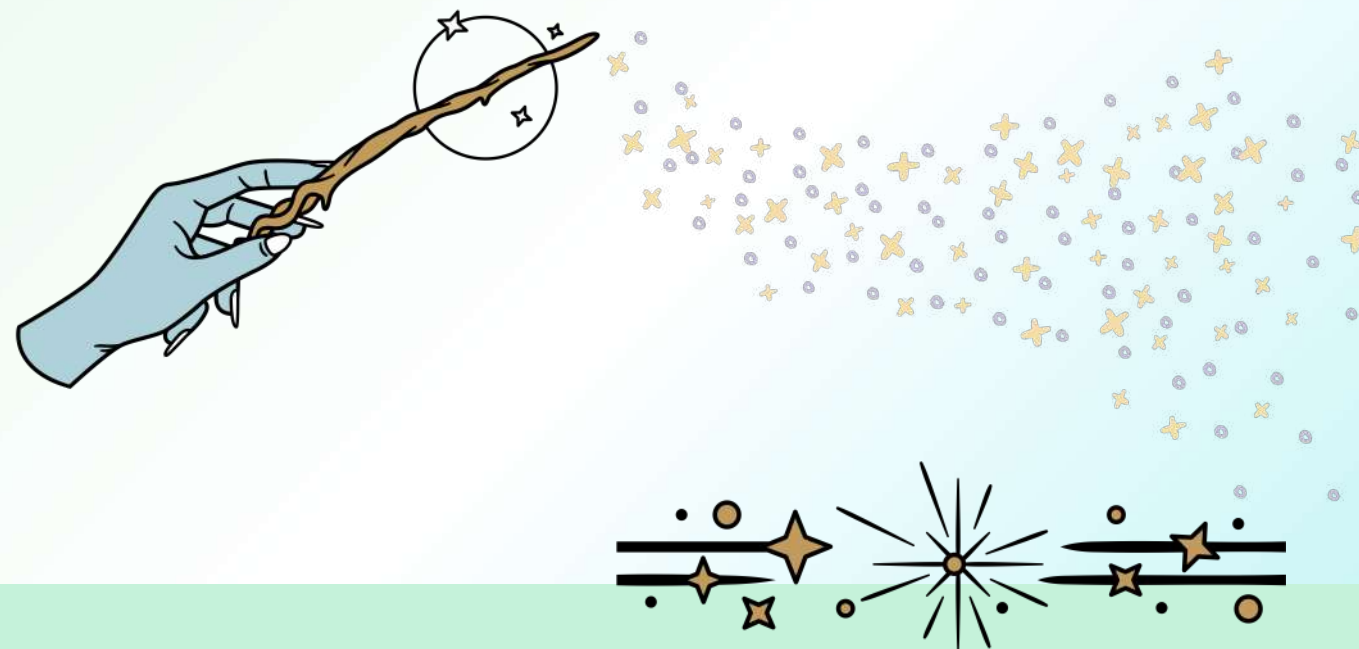
3. Elongation





# Gel analytique : électrophorèse

- Permet d'analyser les produits d'amplification par PCR.
- On utilise la charge électrique de l'ADN qui est négative de par les groupement phosphate : **l'ADN migre du – vers le +. +++**



- La vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique sera fonction :
  - **De sa masse moléculaire** : nombre de paires de bases (pb)
  - **De la concentration en agarose ou en acrylamide** du gel préparé





# Digestion enzymatique



- Utilise des enzymes de restriction = ENDOnucléases bactériennes
  - Elles coupent l'ADN **double brin** de manière **reproductible** et **spécifique** sur une **séquence spécifique**.
- 500 enzymes différents en 3 différents types.
- Les enzymes de restriction de type II :
  - Reconnaissent 4 à 8 paires de bases.
  - Coupe l'ADN au niveau de la séquence reconnue.
  - La séquence est **palindromique**. +++ = identique dans les deux sens.
- **Deux enzymes reconnaissant la même séquence sont dites isoschizomères. ++**





# Digestion enzymatique

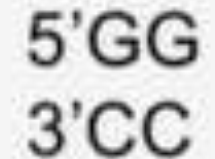
## ➤ Enzymes de restriction de type II :

- types de coupure

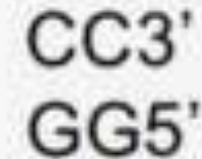


### Coupures à bouts francs (blunt ends)

***HaeIII***



+



### Coupures à bouts cohésifs (sticky ends)

***EcoRI***



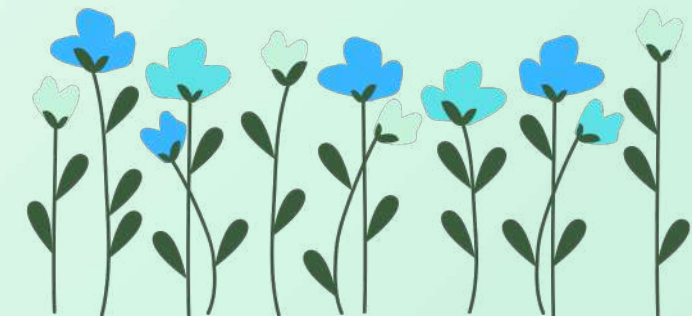
+





# Achondroplasie

- Touche le cartilage => important pour la croissance.
- C'est une **maladie AUTOSOMIQUE DOMINANTE MAIS 90% des enfants atteints ont leurs parents SAINS.**
  - C'est une **NEOMUTATION**. +++++
- Les formes sont plus graves chez les patients homozygotes.

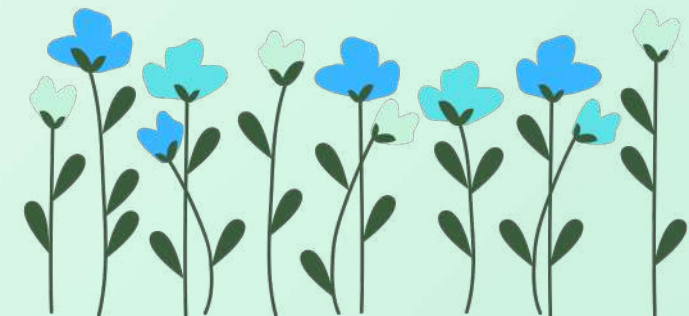




# Achondroplasie

Le gène responsable est **FGFR3**.

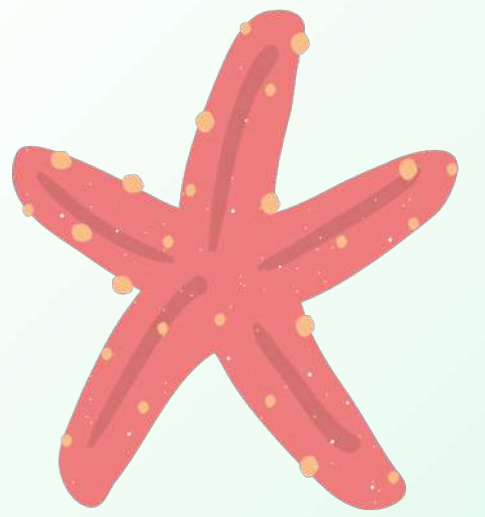
- Code pour le RECEPTEUR d'un facteur de croissance fibroblastique.
- Ce gène s'exprime normalement dans les chondrocytes







# Achondroplasie



- On a 2 mutations possibles du gène FGFR3 :
  - Guanine remplacée par une Adénine (G > A)
  - Guanine remplacée par une Cytosine (G > C)

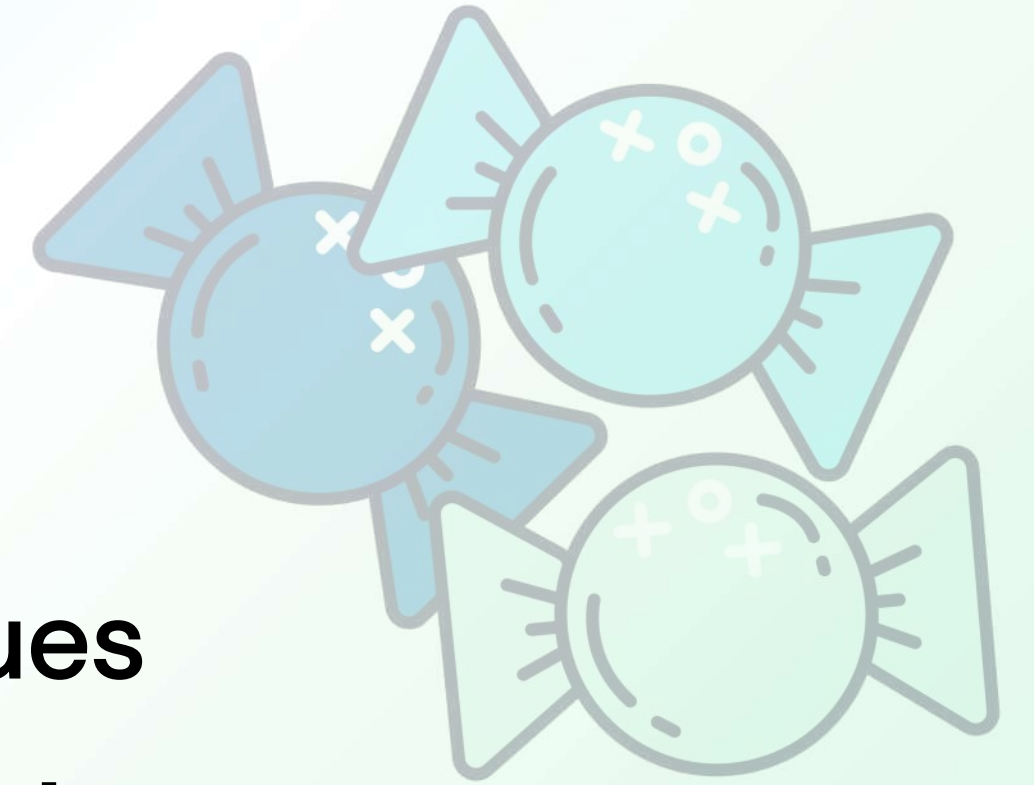
On a une substitution d'Acide Aminée : Glycine remplacée par Arginine peu importe la mutation. +++

**Dans les deux cas c'est le même codon qui est muté : le codon 380 au 1138ème nucléotide.**

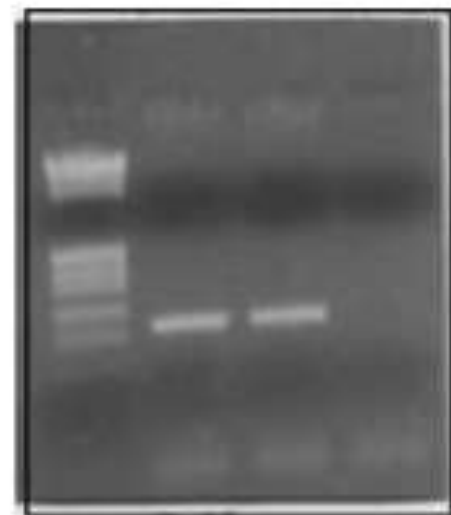




# Achondroplasie



- Devant une suspicion par échographie :
- 1. Extraction d'ADN à partir des cellules amniotiques
- 2. Amplification par PCR d'un fragment de 164 pb encadrant la position 1138
- 3. Vérification sur gel



— 164 pb

M F C T-

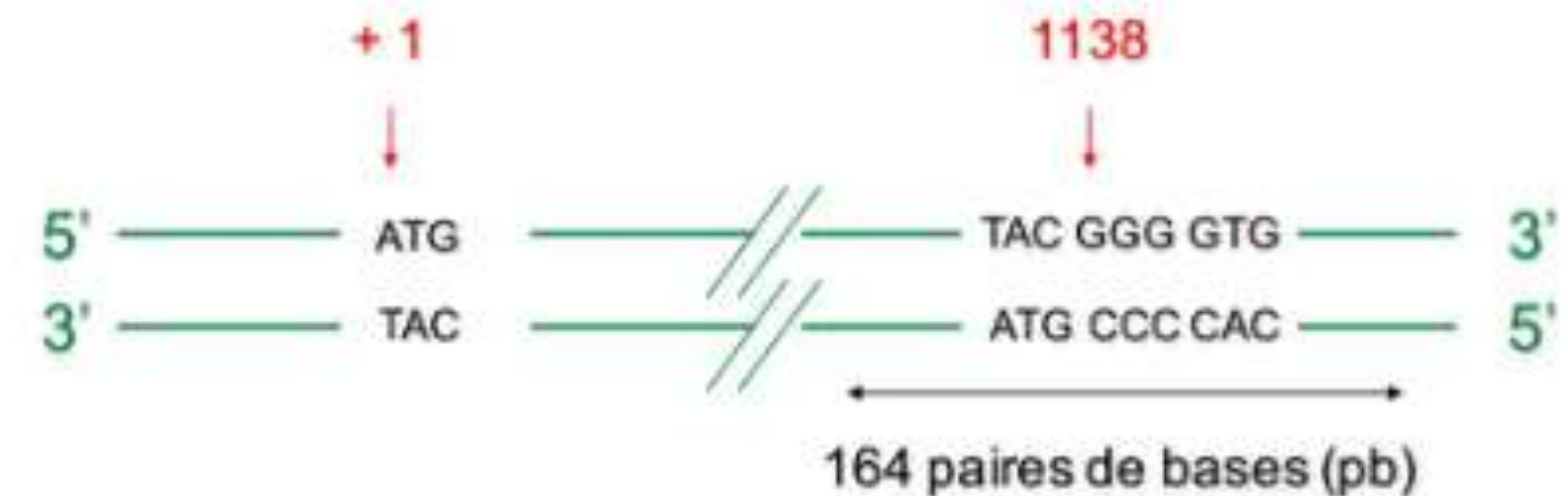
M= marqueur de poids moléculaire

F= foetus

C= individu de contrôle

T- = témoin négatif

Gène *FGFR3*



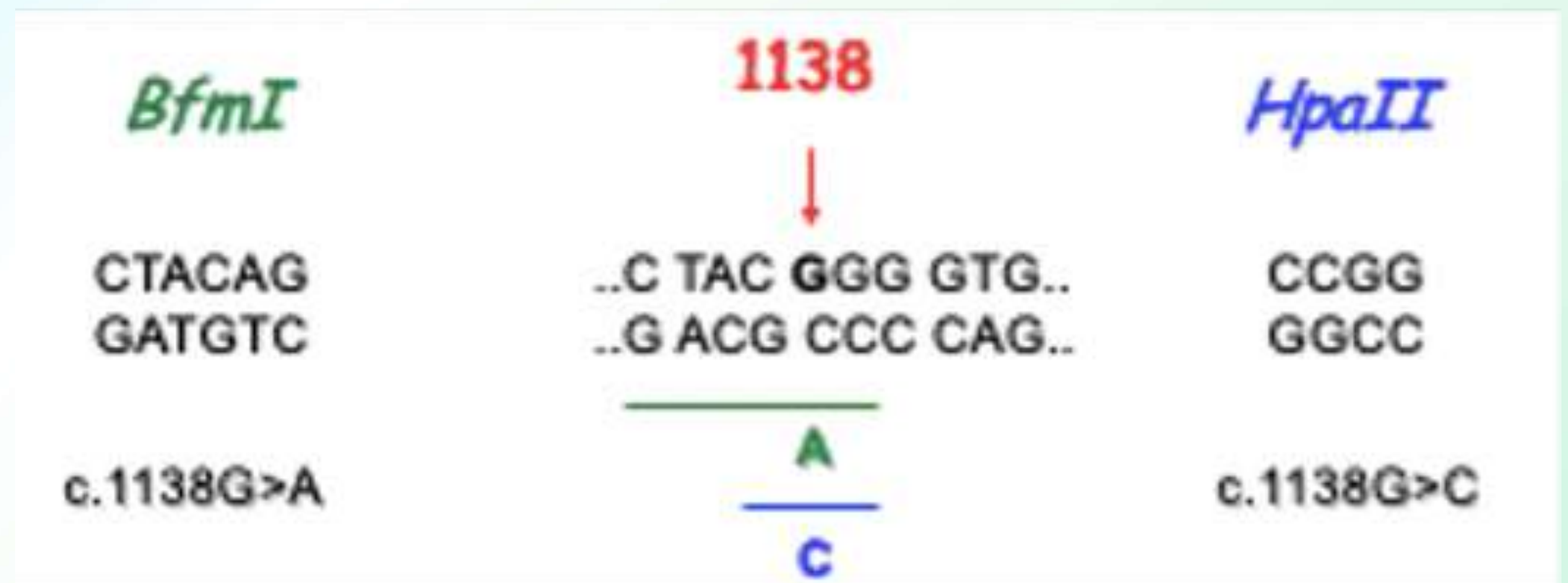


# Achondroplasie

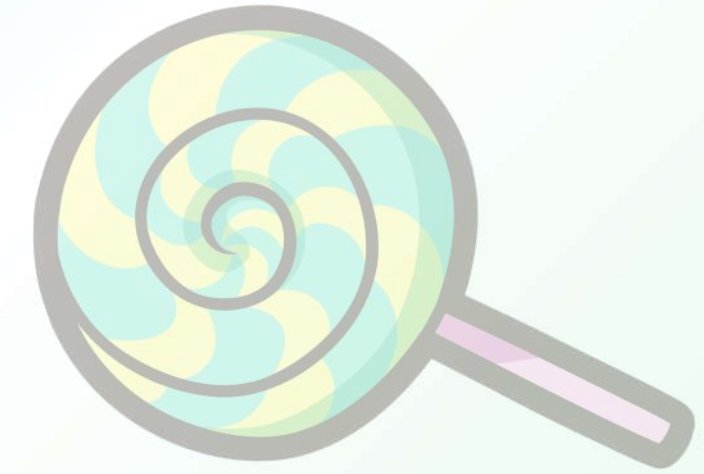
- Devant une suspicion par échographie :

## 4. Digestion des amplifions par des endonucléases

- BfmI pour G > A
- HpaII pour G > C

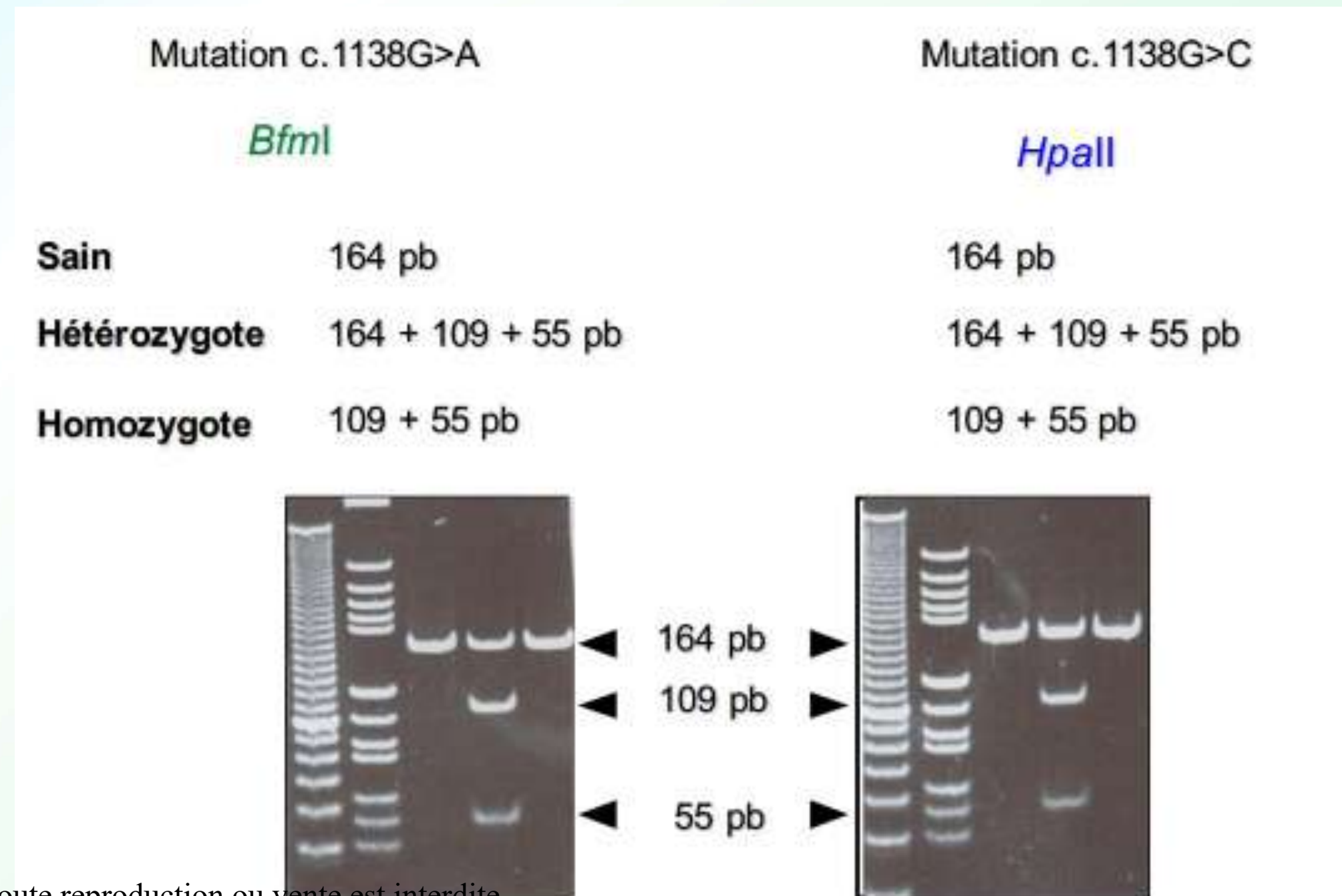


# Achondroplasie



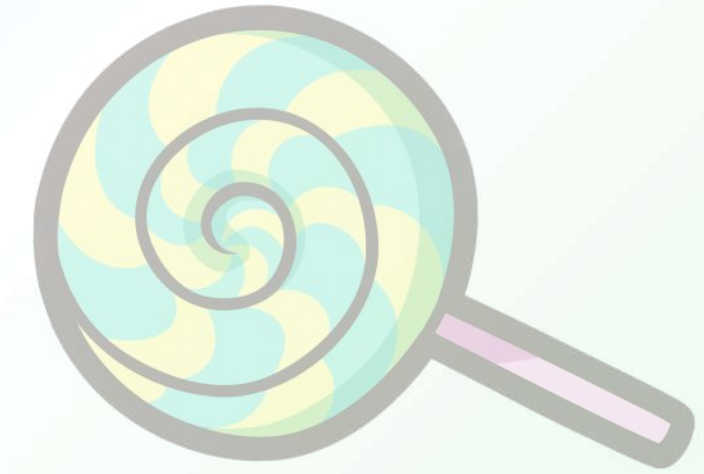
- Devant une suspicion par échographie :

## 5. Vérification sur gel





# Achondroplasie



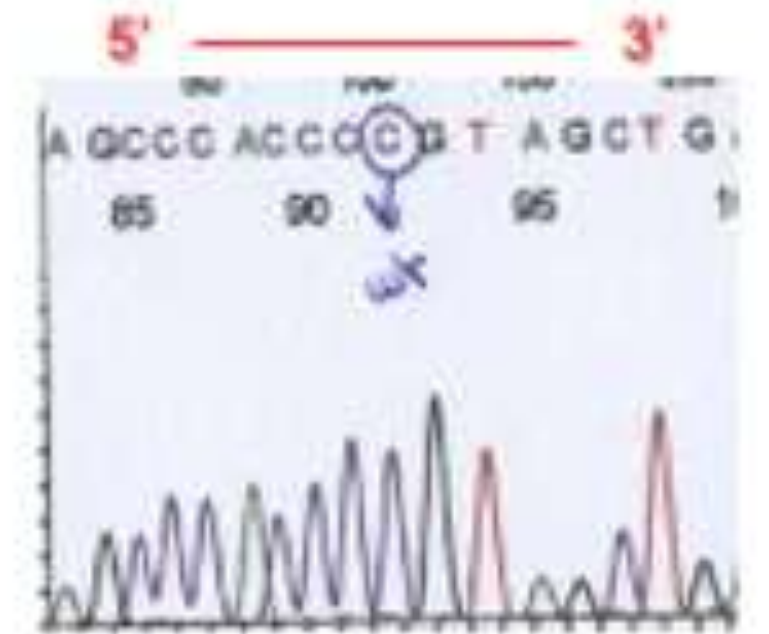
- Devant une suspicion par échographie :

## 6. Vérification par séquençage

**On ne peut pas poser de diagnostic avec une seule technique de biologie moléculaire**

Wild-type

5'..C TAC GGG GTG..3'  
3'..G ATG CCC CAC..5'



Mutation c.1138G>A  
hétérozygote

5'..C TAC AGG GTG..3'  
3'..G ATG TCC CAC..5'

