

I. 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 +++

1) Extraction d'ADN

ÉTAPES D'EXTRACTION DE L'ADN	
1 – Prélèvement du sang total	<ul style="list-style-type: none">- Quelques mL → de 1 à 10 mL suffisent.- Prélèvement sur anticoagulant : EDTA+++- NE PAS utiliser D'HÉPARINE +++
2 – Lyse des GR	<ul style="list-style-type: none">- Les GR n'ont pas de noyau donc n'ont d'ADN +++- Lyse grâce à une solution hypotonique.
3 – Récupération des leucocytes	<ul style="list-style-type: none">- Lavé et resuspendu dans un mélange de :<ul style="list-style-type: none">➤ Détergent➤ Protéinase K : dégradent les protéines fixées sur l'ADN et les DNases qui peuvent endommager l'ADN après la lyse.
4 – Extraction au phénol – chloroforme	<ul style="list-style-type: none">- Élimination des protéines en utilisant la solubilité différentielle des molécules (ADN vs Protéines) entre 2 phases non miscibles.- Après centrifugation, on obtient dans le tube 2 phases différentes :<ul style="list-style-type: none">• La phase supérieure : aqueuse, qui contient l'ADN• La phase inférieure : phénolique• Les deux sont séparées par une galette de protéines dégradées
5 – Précipitation de l'ADN à l'éthanol	<ul style="list-style-type: none">- Rajout à la phase aqueuse 2,5 volume d'éthanol à 95° froid (-20°) en présence de sel.- Apparition d'une « Méduse d'ADN » = ADN purifié.
6 – Re-suspension et quantification	<ul style="list-style-type: none">- Re-suspendre dans une solution de T10E1 : protège l'ADN des nucléases pouvant persister dans le milieu si mal dégradées.- Quantification par mesure de densité optique :<ul style="list-style-type: none">➤ 1 unité de DO À 260 nm 50 ug/mL d'ADN.
7 – Conservation	<ul style="list-style-type: none">- ADN très stable → conservé dans une DNathèque à 4°C pendant longtemps.- En génétique, utilisation des ADN préparés plusieurs années auparavant pour étudier des maladies génétiques dans le cadre d'études familiales.

2) Extraction d'ARN

- **Plus difficile à étudier** que l'ADN → **très sensible** aux ribonucléases qui les **dégrade 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**.

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

3) Amplification en chaine par la polymérase (PCR)

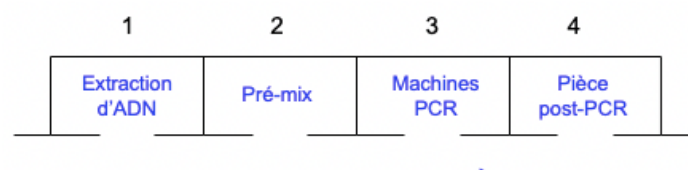
Après l'extraction de l'acide nucléique, on utilise une seconde **technique de base ++** dans un laboratoire de biologie moléculaire, que l'on appelle **PCR**.

Cette technique permet d'obtenir une **grande quantité d'une région d'ADN** grâce à une **amplification spécifique d'une région d'ADN**.

- Technique **extrêmement puissante** → l'amplification ne se fait qu'à partir **des quelques microgrammes d'ADN génomiques** extrait.

C'est une technique **très sensible** → **risques de contamination sont très grands**.

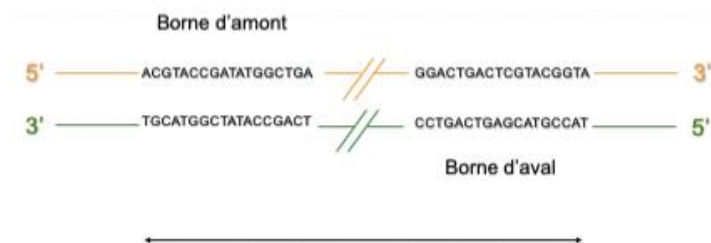
- Nécessite un **circuit monodirectionnel** (un seul sens) pour éviter de contaminer tout le circuit.



La PCR utilise une **Taq DNA polymérase** qui provient d'une archéobactérie particulière : la *Thermophilus Aquaticus* DNA Polymérase qui est une **BACTÉRIE THERMOPHILE +++**

- Elle résiste à la chaleur alors que la majorité des protéines n'y survivent pas.

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



Pour réaliser une PCR, il suffit de connaître les séquences de **18 à 20 nucléotides** avant et après la séquence qu'on veut amplifier. On parlera ainsi de bornes d'AMONT et d'AVAL !

Un cycle de PCR contient **3 étapes successives** :

Dénaturation de l'ADN double brin 95 °C	On obtient un ADN simple brin par rupture des liaisons hydrogènes	1. Dénaturation
Hybridation des amorces 55°C	Les primers se fixent sur les bornes d'amont et d'aval.	2. Hybridation d'amorces
Élongation d'amorce 72°C	La Taq DNA Polymérase va copier le brin d'ADN dans le sens 5' 3' (sens du brin fils)	3. Elongation

⚠ IMPORTANCE de la **température** de l'automate : **95°, 55°, et enfin 72°**.

- Ces 3 étapes vont être **répétées n fois** → Généralement $n = 30$ à 35 .
- **La PCR est une amplification exponentielle générant $2n$ molécules d'ADN au bout de n cycles**

Matériel de la PCR :

- **ADN** du patient (100ng)
- **Amorces** (Primers) nécessaire pour le démarrage
- **Désoxynucléotides**
- **Tampon** ($MgCl_2$) dans lequel fonctionne la Taq
- **Taq polymérase**

4) Gel analytique (électrophorèse)

Ça sert à quoi ? Permet d'analyser les produits d'amplification par PCR.

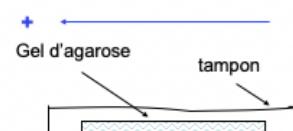
Comment ça marche ?

- 1- On va couler du **gel d'agarose ou d'acrylamide** dans lequel on creuse des puits, puis on l'immerge dans un tampon.
- 2- Dans chacun des puits, on ajoute les différents amplicons que l'on veut analyser.
- 3- Enfin, on soumet ce gel à une électrophorèse / un champ électrique.
Dans cette étape, on utilise la **charge électrique de l'ADN qui est négative** de par les groupements 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

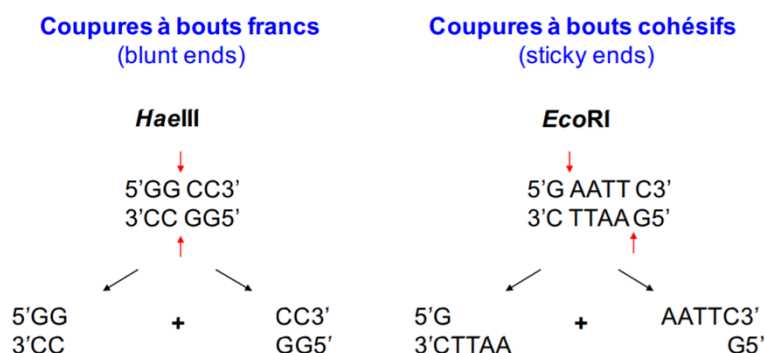


5) Digestion enzymatique

Après vérification du bon déroulement de la PCR, nous allons utiliser une technique très utile en BM.

- La digestion enzymatique utilise des enzymes de restriction qui sont des **ENDOnucléases bactériennes**, qui coupent notre ADN double brin de manière **reproductible et spécifique** sur une séquence **spécifique**.
- Il existe 500 enzymes différents répertoriées **en 3 différents types**.
→ On se sert surtout des enzymes de restrictions de types II (dont EcoRI).
- 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.** ++

Les enzymes de types deux permettent
2 types de coupures différentes :



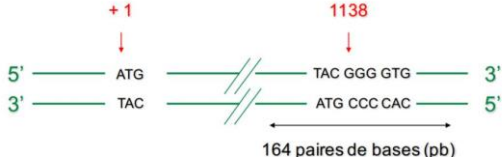
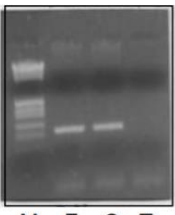
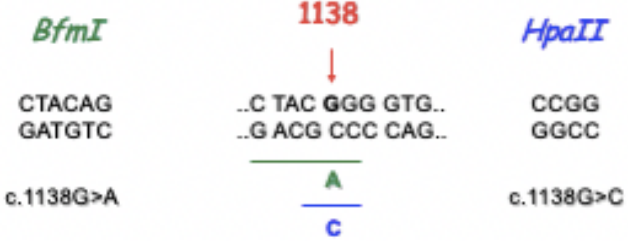
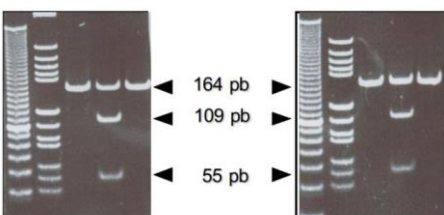
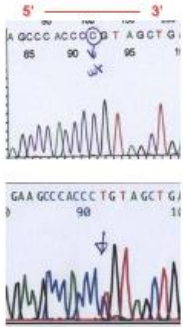
II. Achondroplasie

- C'est une maladie rare mais elle reste la plus fréquente des chondrodysplasie (1/15.000).
Une chondrodysplasie est une maladie touchant 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.
- Le gène responsable est FGFR3, qui code pour **le RECEPTEUR** d'un facteur de croissance fibroblastique. Ce gène s'exprime normalement dans les chondrocytes et régule la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse.
- On a 2 mutations possibles du gène FGFR3 :
 - Guanine remplacée par une Adénosine (G > A)
 - Guanine remplacée par une Cytosine (G > C)

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

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

– Devant une suspicion à l'échographie :

Extraction d'ADN à partir de cellules amniotiques par une ponction amniotique	
Amplification par PCR d'un fragment d'ADN de 164 pb comprenant la position 1138	<p>Gène FGFR3</p> 
Vérification des amplicons sur gel	 <p>— 164 pb</p> <p>M= marqueur de poids moléculaire F= foetus C= individu de contrôle T- = témoin négatif</p>
Digestion des amplicons par des endonucléases → BfmlI coupe si G > A → HpaII coupe si G > C → Si en présence des deux il n'y a pas de coupures : séquence sauvage soit PAS DE MUTATIONS. ++	 <p>c.1138G>A</p> <p>c.1138G>C</p>
Vérification du séquençage	<p>Mutation c.1138G>A</p> <p><i>Bfml</i></p> <p>Sain 164 pb Hétérozygote 164 + 109 + 55 pb Homozygote 109 + 55 pb</p> <p>Mutation c.1138G>C</p> <p><i>HpaII</i></p> <p>Sain 164 pb Hétérozygote 164 + 109 + 55 pb Homozygote 109 + 55 pb</p> 
Vérification par séquençage	<p>Wild-type</p> <p>5'..C TAC GGG GTG..3' 3'..G ATG CCC CAC..5'</p> <p>Mutation c.1138G>A hétérozygote</p> <p>5'..C TAC AGG GTG..3' 3'..G ATG TCC CAC..5'</p> 

On ne pose pas de diagnostic avec une seule méthode de biomol. +++++

On fait alors un séquençage du gène FGFR3 pour être sur de la mutation.

