

**Principes de
biologie
moléculaire et
applications en
génétique médical**



« Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light » (Harry potter et le prisonnier d'Azkaban) → souvenez vous de cette phrase pour les mois qui vous attendent ;)

Généthilde

Sommaire :

I) Extraction des acides nucléiques

II) Amplification en chaine par polymérase

III) Gel analytique

IV) Digestion enzymatique

V) Application à la génétique médicale

I) Extraction des acides nucléiques

1) Extraction de l'ADN

- Prélèvement de sang
- Lyse et élimination des globules rouges
- Récupération des leucocytes par centrifugation
- Extraction au phénol-chloroforme
- Précipitation à l'éthanol à froid
- Remise en suspension
- Conservation

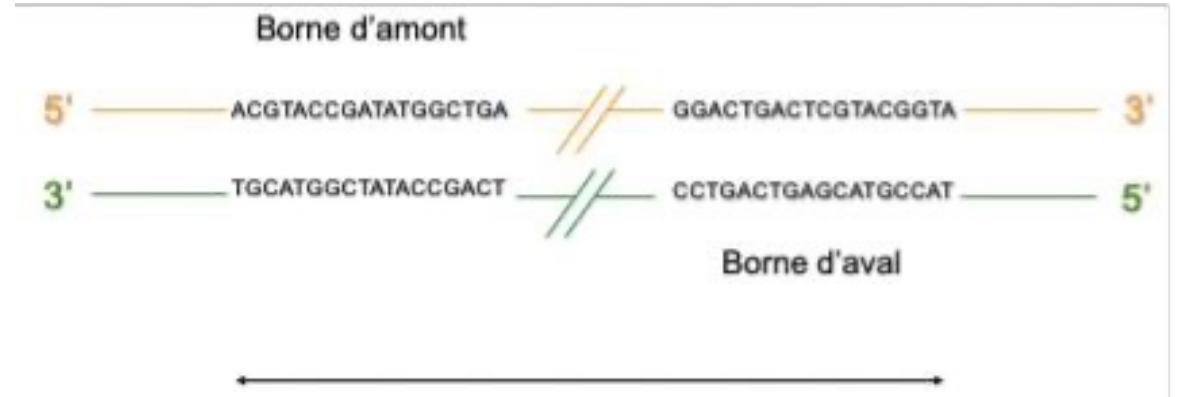
2) Extraction de l'ARN

- Homogénéisation des cellules ou des tissus dans un tampon
- Extraction des ARN totaux dans une solution pour permettre une extraction différentielle entre ARN et ADN
 - Extraction possible des ARNm (1% des totaux) :
 - passage des ARNm sur une colonne d'oligo-dT cellulose
 - lavage
 - précipitation

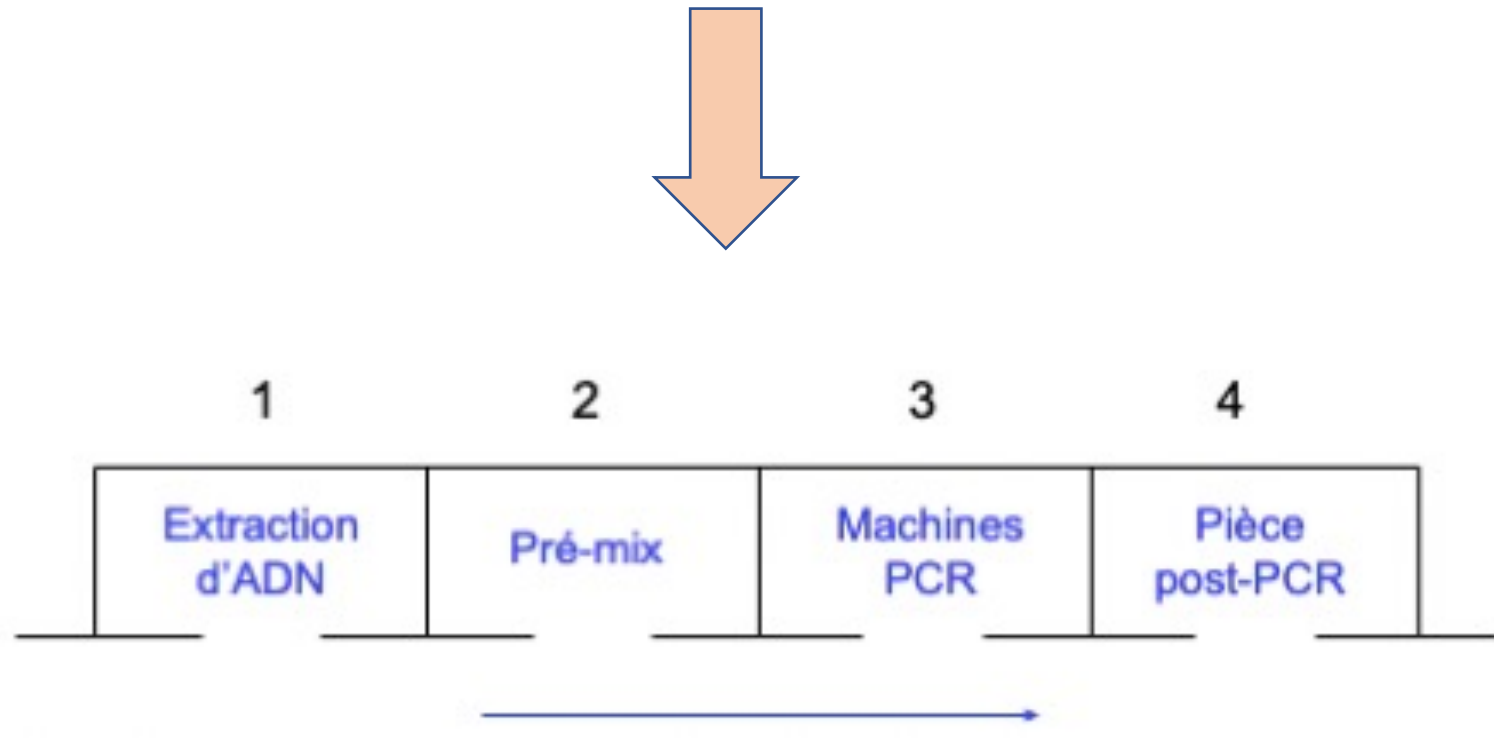
II) Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Le but de la PCR est d'amplifier une région précise d'ADN en grande quantité. C'est une technique extrêmement puissante et très sensible !!! Une fois notre produit de PCR amplifié la contamination est très importante !!

. Pour cette méthode, il faut utiliser des bornes d'amont et d'aval (séquence d'environ 18-20 nucléotides connues).



Le haut niveau de contamination nécessite la mise en place d'un système monodirectionnel pour ne pas contaminer les différents échantillons



La PCR s'effectue par cycle de 3 étapes qui se répètent :

- Dénaturation de l'ADN double brin à 95°
- Hybridation des amorces à 55°
- Elongation à 72°

1. Dénaturation



2. Hybridation d'amorces



3. Elongation

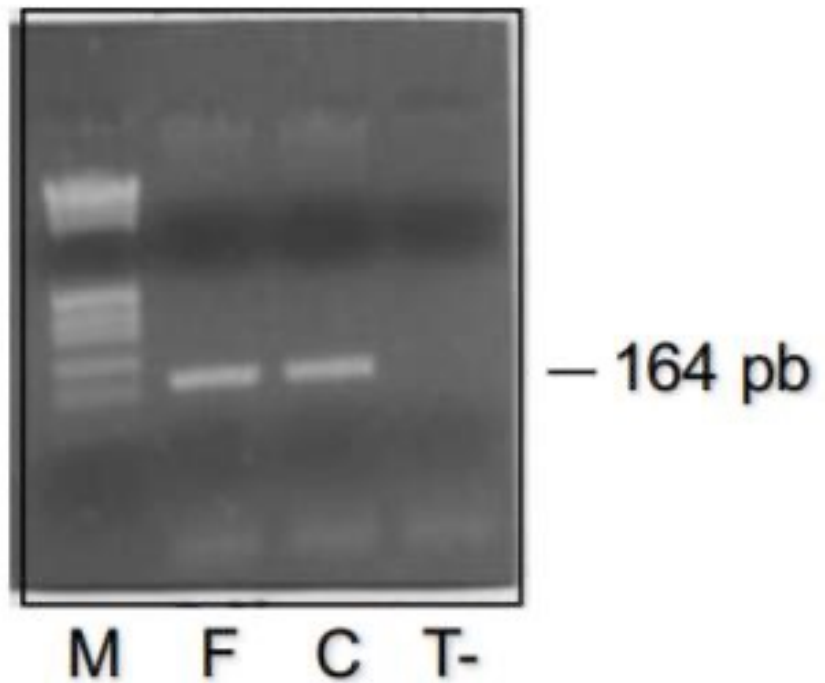


III) Gel analytique

Une fois que nos produits de PCR sont prêts il est temps de les analyser. On réalise alors une électrophorèse sur gel analytique



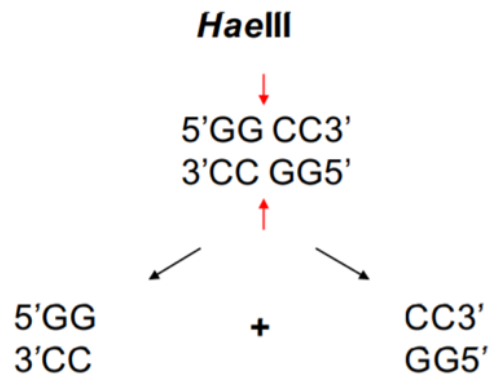
Exemple d'une électrophorèse :



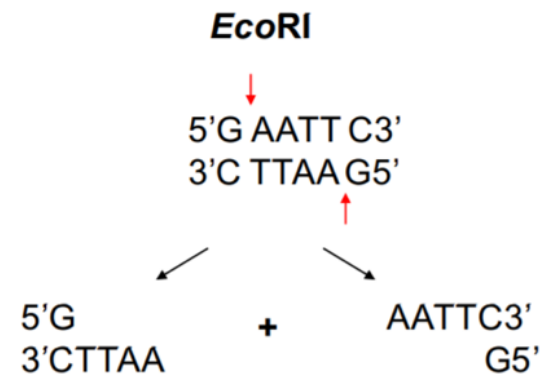
- M → marqueur de poids moléculaire
- F → ADN foetal
- C → individu de contrôle
- T- → témoin négatif

IV) Digestion enzymatique

Coupures à bouts francs (blunt ends)



Coupures à bouts cohésifs (sticky ends)



Les enzymes de restriction servent à couper l'ADN double brin au niveau d'une séquence précise qui est reconnue !! La coupure est **reproductible** et **spécifique** !

V) Application à la génétique médicale

1. Tableau clinique de la maladie

- Petite taille = nanisme
- Membres courts
- Hyperlordose
- Mains courtes
- Macrocéphalie
- Dysmorphie faciale
- Intelligence normale
- Complication neurologiques



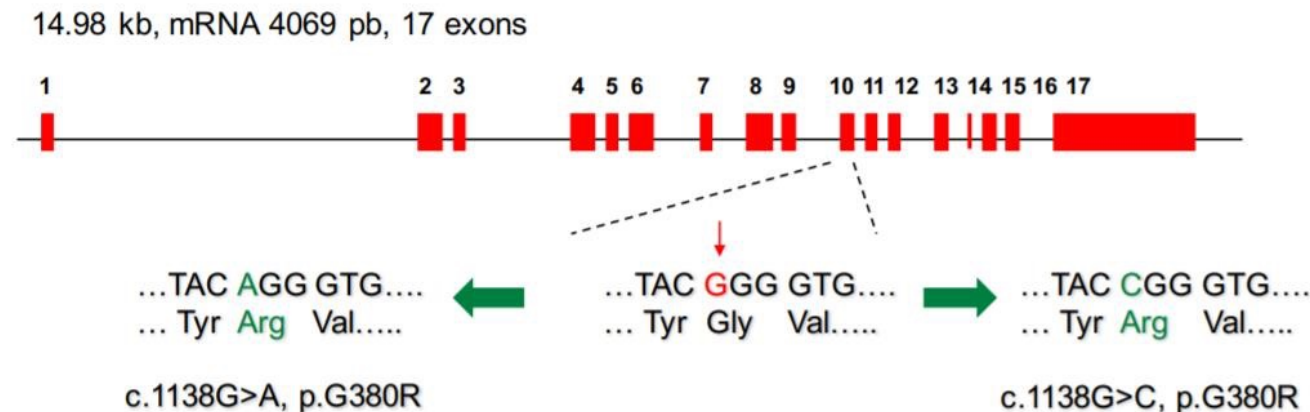
2) Gène responsable

Un seul gène est responsable de l'achondroplasie mais deux mutations sont possibles au niveau du génome. Les deux auront le même effet sur la protéine codée :

→ soit une guanine est remplacée par une adénine

→ soit une guanine est remplacée par une cytosine

Les deux mutations ont lieu dans le même codon, le 380 en position 1138 .

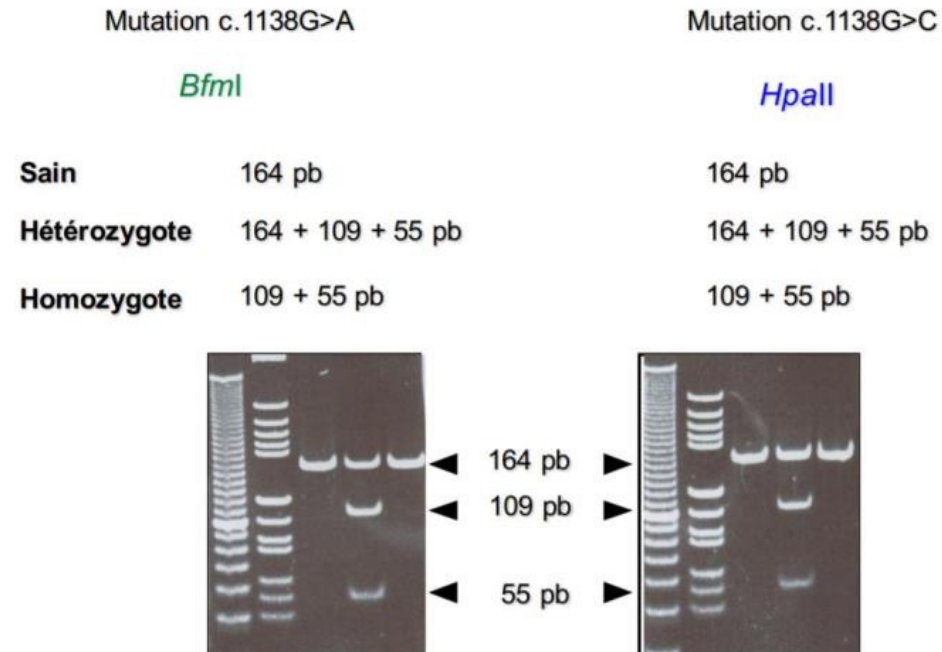


3) Vérification par PCR-RFLP

Après appel échographique, il y a vérification par plusieurs méthodes, pour poser le diagnostic définitif :

- Extraction d'ADN génomique
- Amplification par PCR
- Vérification des amplicons sur le gel d'électrophorèse
- Digestion enzymatique des amplicons de PCR
 - . Bfml \rightarrow G>C
 - . Hpall \rightarrow G>A

- Analyse des produits de digestion des amplicons



- Vérification par séquençage

QCM Time !!!!!!!



QCM 1- Concernant l'achondroplasie, indiquez la(les) réponse(s) exacte(s).

- A- La transmission est autosomique dominante et un enfant atteint a toujours un parent atteint
- B- Le diagnostic est le plus souvent évoqué sur des fémurs courts lors de l'échographie du premier trimestre réalisée chez une femme enceinte
- C- La mutation responsable impliquant toujours le même codon, le diagnostic est réalisé par PCR-RFLP sans vérification par séquençage Sanger
- D- La digestion d'un amplicon du gène FGFR3 encadrant la position 1138 par les enzymes de restriction Bfml et Hpall dans le même tube permet d'identifier la mutation responsable
- E- Les propositions A, B, C et D sont fausses

Réponse :

QCM 1- Concernant l'achondroplasie, indiquez la(les) réponse(s) exacte(s).

A- La transmission est autosomique dominante et un enfant atteint a toujours un parent atteint

→ Et non !! Dans 90% des cas ce sont des néomutations !

B- Le diagnostic est le plus souvent évoqué sur des fémurs courts lors de l'échographie du premier trimestre réalisée chez une femme enceinte

→ Toujours pas ! C'est sur appel échographique lors de l'écho du 2em trimestre !

C- La mutation responsable impliquant toujours le même codon, le diagnostic est réalisé par PCR-RFLP sans vérification par séquençage Sanger

→ Attention on fait un séquençage Sanger justement pour vérifier, on utilise toujours une deuxième méthode !

D- La digestion d'un amplicon du gène FGFR3 encadrant la position 1138 par les enzymes de restriction Bfml et HpaII dans le même tube permet d'identifier la mutation responsable

→ Faux ! Si on met les deux enzymes dans le même tube et qu'il y a digestion, on ne pourra pas savoir qu'elle enzyme a coupé !!! Donc on sépare !!

E- Les propositions A, B, C et D sont fausses

→ Vrai ! (je sais que vous aviez juste, trop fort les bg ;)

QCM 2 – Concernant la technique de PCR (amplification en chaine par polymérase), indiquez la ou les réponse(s) exacte(s)

- A- Elle fonctionne à partir d'ADN génomique
- B- Elle permet d'amplifier en grande quantité une région spécifique d'ADN génomique
- C- Elle nécessite des cycles successifs de variations de pH
- D- Elle représente des risques importants de contaminations entre les échantillons
- E- Les propositions A, B, C et D sont fausses

Réponse :

QCM 2 – Concernant la technique de PCR (amplification en chaine par polymérase), indiquez la ou les réponse(s) exacte(s)

A- Elle fonctionne à partir d'ADN génomique

→ Vrai !

B- Elle permet d'amplifier en grande quantité une région spécifique d'ADN génomique

→ Vrai !

C- Elle nécessite des cycles successifs de variations de pH

→ Et non ! Ce sont des variations de température !

D- Elle représente des risques importants de contaminations entre les échantillons

→ Vrai !

E- Les propositions A, B, C et D sont fausses

→ Faux !

QCM 2:

Vous recevez en consultations une famille dans laquelle se transmet une maladie autosomique récessives. Vous suspectez la présence de la mutation c.377 G>A dans le gène XYZ. Pour rechercher cette mutation vous réalisez une PCR (amplification en chaîne par la polymérase) suivie d'une digestion enzymatique. La séquence d'un sujet contrôle sain encadrant la position 377 est (la position 377 est surlignée):

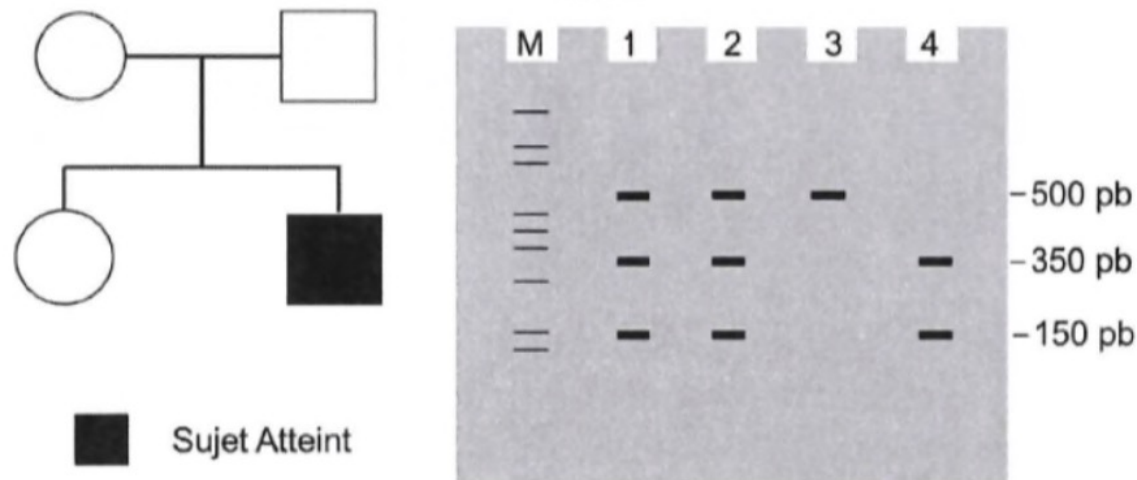
TTACTGGGTCCGTG

Pour déterminer le génotype des différents membres de la famille, vous utilisez l'enzyme de restriction BamHI dont le site de restriction est : GGATCC. Le fragment amplifié a une taille de 500 paires de bases (pb) chez un sujet contrôle sain. La digestion par BamHI entraine deux fragments à 350pb et 150pb.

Le gel ci-dessous est obtenu après digestion par BamHI des produits d'amplification réalisés à partir des prélèvements sanguins des différents membres de cette famille. Les produits de digestion sont séparés sur le gel d'agarose après migration électrophorétique.

M : marqueur de poids moléculaire

Piste 1 : mère ; piste 2: père ; piste 3 : fille et piste 4 : fils



D'après les résultats présentés ci-dessus, indiquer la ou les réponse(s) exacte(s).

A- Les parents sont hétérozygotes pour la mutation c.377G>A

B- Les 2 enfants sont homozygotes pour la mutation c.377G>A

C- Le fils n'est pas porteur de la mutation c.377G>A

D- La fille n'est pas porteuse de la mutation c.377G>A

E- Les propositions A, B, C et D sont fausses

A- Les parents sont hétérozygotes pour la mutation c.377G>A

- Vrai ! On voit bien que les parents ont les barres à 500, 350 et 150

B- Les 2 enfants sont homozygotes pour la mutation c.377G>A

- Non ! La fille ne possède pas la mutation !

C- Le fils n'est pas porteur de la mutation c.377G>A

- Faux ! Justement il l'est !!!!

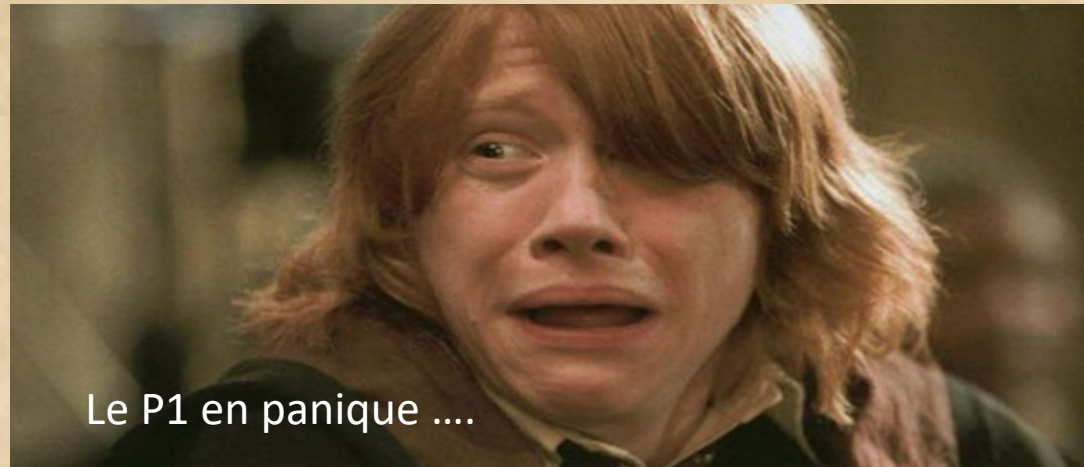
D- La fille n'est pas porteuse de la mutation c.377G>A

- Vrai !

E- Les propositions A, B, C et D sont fausses

- Faux

Fin !!!!!



Le P1 en panique



Tes tutrices à la rescousse !!