

Harry Pot'Tut

Génétique (aka la meilleure matière !!!!)

Principes de biologie moléculaire et applications à la génétique médicale

Les p'tites bases :

La biologie moléculaire est une discipline utilisée dans le diagnostic de certaines maladies génétiques. Les différentes méthodes peuvent être utilisées à la fois pour un diagnostic prénatal et post-natal et se basent sur l'utilisation d'acides nucléiques (l'ADN ou l'ARN) en très petite quantité (quelques milligrammes suffisent voir quelques nanogrammes). L'extraction de ces acides nucléiques se fait à partir de cellules nucléées (qui ont un noyau quoi !) comme des cellules amniotiques, des leucocytes et bien d'autres mais attention pas de globules rouges car ils n'ont pas de noyaux !!

Les différentes méthodes de BM utilisent plus couramment de l'ADN plutôt que l'ARN car beaucoup plus stable, il se conserve mieux et plus longtemps. Toutefois les deux sont sensibles aux nucléases, des enzymes qui coupent les acides nucléiques (on parle de DNAses pour l'ADN et RNAses pour l'ARN)

Toutes ces techniques vont permettre (le plus souvent) le diagnostic de maladies monogéniques comme l'achondroplasie, la mucoviscidose ...

I/ Extraction des acides nucléiques

1) Extraction de l'ADN

Dans les situations les plus courantes, on travaille sur l'ADN qu'il faut d'abord extraire des tissus, cellules, coupes en paraffine ... Le plus souvent on utilise du sang.

Étapes	Détails
1. Prélèvement du sang	. Quelques mL de sang total prélevé sous anti-coagulant (EDTA et surtout pas héparine qui inhibe certaines étapes de BM)
2. Lyse et élimination des globules rouges	. Avec une solution hypotonique
3. Récupération des leucocytes par centrifugation	. On récupère et on remet en suspension avec un mélange de détergent et protéinases K (permet de dégrader les protéines qui protègent l'ADN)
4. Extraction au phénol-chloroforme	. Élimination définitive des protéines en utilisant la solubilité différentielle de l'ADN et des protéines (on obtient deux phases non miscibles et séparées par une galette de protéines dégradées : - Phase aqueuse = phase supérieure avec acides nucléiques - Phase phénolique = phase inférieure
5. Précipitation à l'éthanol	. On ajoute 2,5 volumes d'éthanol à froid (-20°C) en présence de sel → obtention de la méduse d'ADN que l'on rince dans de l'éthanol à 70°C
6. Remise en suspension	. On re-suspend la méduse dans un mélange de T10E1
7. Conservation	. L'ADN obtenu est très stable et peut être conservé dans une DNAtèque à 4°C pendant plusieurs années

Et maintenant que tu gères l'extraction de l'ADN on passe à l'ARN (mais tkt petit P1 c'est plus facile ;)

2) Extraction de l'ARN

On se souvient que travailler sur l'ARN est moins fréquent mais ça peut aussi arriver par exemple dans l'expression des gènes avec des possibilités de mutations susceptibles de jouer un rôle sur l'épissage !

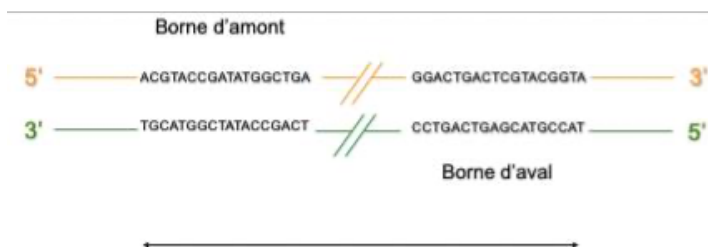
Protocole d'extraction de l'ARN :

- Homogénéisation des cellules ou des tissus dans un tampon qui permet :
 - D'inhiber les RNAses endogènes
 - De dénaturer les acides nucléiques
 - De dégrader les protéines
- Extraction des ARN totaux avec une solution qui permet une extraction différentielle de l'ARN et de l'ADN.
 - on peut aussi faire une extraction des ARN poly A+ (ARNm) qui représentent 1% des ARN totaux. Pour cela :
 - Passage des ARN poly A+ sur une colonne d'oligo-dT cellulose (ce qui permet de fixer l'ARN)
 - Lavage puis élution pour abaisser la force ionique
 - Précipitation avec de l'alcool éthylique absolu froid

II/ Amplification en chaine par polymérase (PCR)

Une fois qu'on a fait notre extraction d'acide nucléique ADN ou ARN (ici on se positionne avec une extraction d'ADN) on va utiliser une autre méthode pour permettre d'en avoir une grande quantité, c'est l'amplification en chaine par polymérase ou PCR. Cette technique permet d'obtenir une quantité importante d'une région spécifique d'ADN. C'est une technique extrêmement puissante car on part de quelques microgrammes d'ADN génomique. Elle est possible grâce à la découverte de la Taq DNA polymérase (purifiée à partir de bactéries vivants dans des gerseys d'eau chaude et capable de travailler à haute température sans être dénaturée comme la plupart des enzymes).




ATTENTION !!!! C'est une technique très sensible et donc les risques de contaminations sont très importants. Il y a alors la mise en place d'un circuit monodirectionnel dans les laboratoires pour obtenir les différents types d'agréments et éviter la contamination des échantillons.



Pour l'amplification de l'ADN, l'enchainement des nucléotides n'est pas à connaître mais les bornes d'amont et d'aval sont à connaître et permettent l'hybridation des amorces simples brins. Ce sont des régions de 18-20 nucléotides avant et après la région à amplifier.

La PCR s'effectue par répétition d'un cycle de 3 étapes à partir d'un mélange dans un micro-tube qui contient :

- L'ADN du patient, environ 100ng
- Les amorces pour le démarrage de l'élongation
- Les Désoxynucléotides
- Le tampon de MgCl₂ (pour le fonctionnement de la Taq)
- La Taq polymérase

Étapes	Détails	Schémas
1. Dénaturation de l'ADN double brin à 95°C	<ul style="list-style-type: none"> . Rupture des liaisons hydrogènes qui relient les deux brins d'ADN . Obtention de deux molécules simples brins 	1. Dénaturation 
2. Hybridation des amorces à 55°C	<ul style="list-style-type: none"> . Fixation des amorces ou primers (oligonucléotides simples brins) sur les bornes d'amont et d'aval par complémentarité des bases 	2. Hybridation d'amorces 
3. Élongation à 72°C	<ul style="list-style-type: none"> . Copie par la Taq polymérase de chacun des brins dans le sens 5' → 3' (Sens du brin fils) en partant du petit fragment double brin formé grâce aux primers 	3. Elongation 

Attention !!! Les températures sont aussi à retenir, piège facile faudrait pas tomber dedans !!!

Ces trois étapes vont être répétées un nombre n de fois, souvent entre 30 et 35 fois. Après répétition des cycles on obtient 2ⁿ molécules d'ADN ce qui correspond à l'amplicon (et c'est ça qui est super contaminant !!).

III/ Gel analytique (électrophorèse)

Une fois que les fragments d'ADN sont amplifiés, on va les vérifier sur le gel analytique ou électrophorèse. L'objectif est de séparer les fragments en fonction de leur taille grâce à leur migration sur le gel.

Pour cela on a besoin de :

- Gel d'agarose ou d'acrylamide avec des puits pour y déposer les amplicons
- Tampon pour immerger le gel
- Un champ électrique qu'on applique au gel pour faire migrer l'ADN

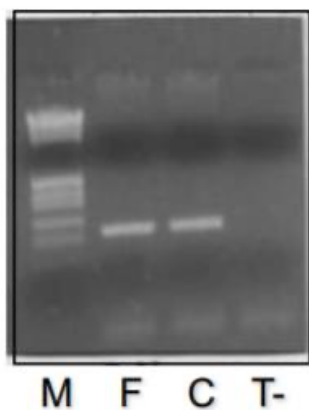


Une fois que le gel est soumis à un champ électrique, l'ADN va migrer de la cathode vers l'anode c'est-à-dire du pôle négatif vers le pôle positif donc du – vers le plus + (retenez le comme vous voulez mais c'est super important !!!!!)

La vitesse de migration de l'ADN sur le gel dépend de la concentration en agarose ou en acrylamide du gel considéré et de la masse moléculaire donc du nombre de pb. Donc les fragments d'ADN les plus courts vont migrer plus vite et seront plus bas que ceux qui sont plus longs et donc plus lourds.

Une fois que la migration de notre ADN sur le gel est terminée, il faut le visualiser *(et oui sinon ça sert à rien !)* et pour cela on utilise un agent intercalant, le Bromure d'Éthidium (BET ou EtBr) qui va prendre une coloration fluorescente sous lumière UV.

Exemple d'électrophorèse des produits PCR :



- M → marqueur de poids moléculaire
- F et C → pistes migration des produits PCR
- T- → témoin négatif

La première piste est celle du marqueur de poids moléculaire. Elle se fait grâce à la migration d'un mélange de fragments d'ADN ayant un poids connu et correspond à notre repère.

Les pistes F et C sont des bandes dans lesquelles ont eu lieu la migration des amplicons. Ici les produits de PCR ont une taille de 164 pb.

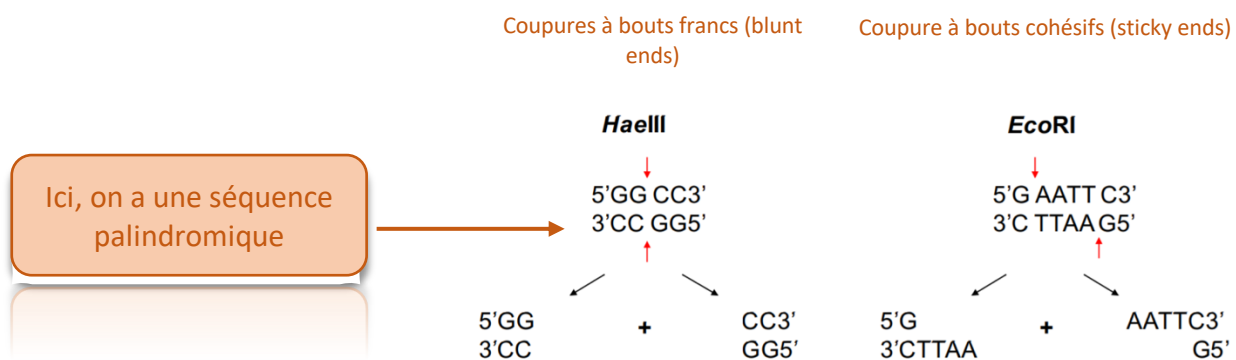
La piste T- est hyper importante et correspond au témoin négatif qui est fait avec un mélange comme pour la PCR mais sans mettre d'ADN dedans. Il ne faut pas qu'il y est de bande !!! Si c'est le cas, il y a eu contamination par un autre ADN et donc le résultat n'est pas interprétable. Ici, il n'y a rien dans la piste T- et donc pas de contamination, on peut alors interpréter correctement le résultat, c'est-à-dire des fragments d'ADN de 164 pb.

(Il faut vraiment comprendre le principe de cet exemple par ce que ça tombe beaucoup !!! A l'examen il peut y avoir une image et il faut le bon raisonnement pour répondre mais no stress ça se fait tranquille !!!!)

Une fois qu'on a vérifié que nos amplicons sont corrects, on applique une autre méthode de BM qui est la digestion enzymatique. Pour celle-ci on utilise des enzymes de restrictions qui sont des endonucléases bactériennes. Elles sont capables de couper l'ADN double brin de manière reproductible et spécifique et ont la capacité de reconnaître une séquence spécifique d'ADN pour le couper à cet endroit en particulier (*c'est fou hein*). Il existe un très grand nombre de ces enzymes (+ de 500) qui reconnaissent différentes séquences.

Il en existe plusieurs types mais les plus utilisées sont celles de type II qui reconnaissent des séquences de 4 à 8 paires de bases généralement palindromique (lu de la même manière dans le sens de lecture 5'→3' sur les deux brins).

Il existe 2 types de coupures, celles à bouts francs (coupure au même endroit sur les deux brins) et celles à bouts cohésifs (coupure des 2 brins à des endroits différents).



P'tite info comme ça : les coupures à bouts francs sont plus difficiles à recoller que celles à bouts cohésifs

V/ Application à la génétique médicale

Et maintenant que vous êtes au taquet sur les techniques de BM on passe à un exemple concret qui est très important à connaître (tombe souvent !!) : l'achondroplasie.

L'achondroplasie est une maladie rare qui touche environ 1/15000 personnes. Son diagnostic se fait sur appel échographique comme avec la présence d'un fémur court (trop court pour l'âge fœtal) à l'échographie du 2^e trimestre. Attention le diagnostic ne s'arrête pas là ! On va utiliser deux techniques différentes pour le confirmer, le PCR-séquençage et le PCR-RFLP.

1) Tableau clinique de la maladie

Comme dit précédemment, il peut y avoir une suspicion à l'échographie lorsque les os longs (notamment le fémur) ont une taille beaucoup trop petite par rapport à la normale. Mais ce n'est pas le seul symptôme, on retrouve :



- . Petite taille = nanisme (environ 130 cm)
- . Membres courts
- . Hyperlordose
- . Mains courtes
- . Macrocéphalie
- . Dysmorphie faciale (front haut, ensellure nasale marquée)
- . Intelligence normale
- . Complications neurologiques (myélopathie par exemple qui atteint la moelle épinière)

Je ne reviens pas sur la transmission qui a été vu dans le cours d'introduction à la génétique de Molka

1) Gène responsable

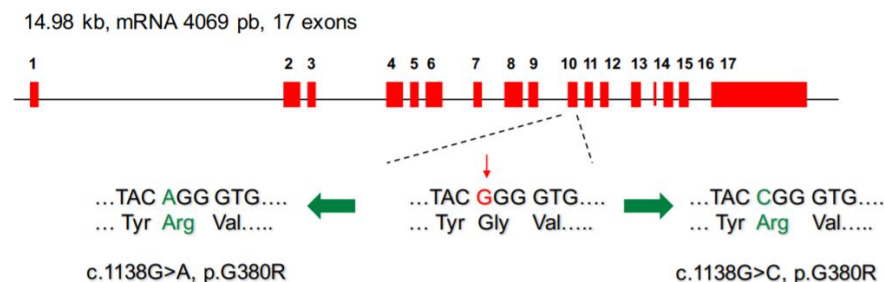
C'est le gène *FGFR3*, codant pour une protéine impliquée dans les récepteurs d'un facteur de croissance fibroblastique qui est responsable de l'achondroplasie. Ce gène s'exprime dans les chondrocytes (cellules du cartilage) et permet la régulation de la différenciation des ostéoblastes et de la formation osseuse.

Dans le cas de l'achondroplasie, c'est toujours la même anomalie qui est responsable !!!! C'est le codon 380 du gène codant normalement pour une glycine, qui va être remplacé par une arginine à cause d'une mutation à la position 1138 dans l'exon 10 remplaçant une guanine par une cytosine ou une adénine.

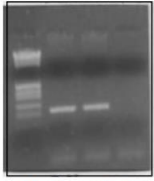
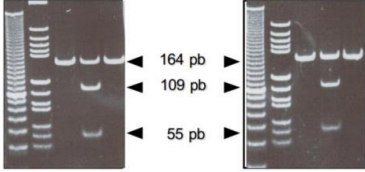
Récap :

Il y a deux possibilités dans la mutation nucléotidique mais toujours dans le même exon, à la même place et qui donne la même traduction protéique.

- Soit G > A (G devient A) et le codon code pour une arginine
- Soit G > C et le codon code aussi pour une arginine



2) Vérification avec la PCR-RFLP

Étapes	Détails												
1. Extraction d'ADN génomique	<p>. A partir de cellules amniotiques = cellules du fœtus (obtenus vers 6 mois de grossesses par ponction de liquide amniotique)</p> <p>. Extraction de l'ADN de ces cellules avec la méthode vu précédemment</p>												
2. Amplification par PCR	<p>. Amplification d'un fragment de 164 paires de bases qui encadre la position 1138 dans l'exon 10 (position de mutation de l'achondroplasie)</p>												
3. Vérification des amplicons sur gel d'électrophorèse	<div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p>— 164 pb</p> <p>M F C T-</p> <p>M : marqueur F : amplicon fœtal C : amplicon d'un ADN contrôle T- : Témoin négatif</p> </div> </div> <p>. Ici les fragments d'ADN sont bien de 164 paires de bases</p>												
4. Digestion enzymatique des amplicons de PCR	<p>. Dans le cas de l'achondroplasie on doit utiliser deux enzymes de restrictions :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bfml qui reconnaît la séquence CTACAG et coupe pour la mutation G>A mais ne coupe pas pour la mutation G>C - HpaII qui reconnaît la séquence CCGG et coupe pour la mutation G>C mais pas pour la G>A <p>. Attention ! Aucune des enzymes ne coupe s'il n'y a pas de mutation !!</p>												
5. Analyse des produits de digestion des amplicons	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>Mutation c.1138G>A</p> <p>Bfml</p> <table border="1"> <tr><td>Sain</td><td>164 pb</td></tr> <tr><td>Hétérozygote</td><td>164 + 109 + 55 pb</td></tr> <tr><td>Homozygote</td><td>109 + 55 pb</td></tr> </table> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Mutation c.1138G>C</p> <p>HpaII</p> <table border="1"> <tr><td>Sain</td><td>164 pb</td></tr> <tr><td>Hétérozygote</td><td>164 + 109 + 55 pb</td></tr> <tr><td>Homozygote</td><td>109 + 55 pb</td></tr> </table> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">  <p>164 pb 109 pb 55 pb</p> </div> <p>. Ici pour les deux électrophorèses le principe est le même, les deux premières pistes sont les colonnes de marqueurs de poids moléculaire.</p> <p>. Sur la troisième piste il y a une bande à 164 pb (piste pour un amplicon non digéré donc un ADN sain)</p> <p>. La dernière colonne est un ADN contrôle (d'un fœtus non achondroplase) digéré.</p> <p>. La quatrième piste à un profil différent, c'est de l'ADN fœtal après digestion. Ici il y a trois éléments, une bande à 164 pb qui représente l'allèle sauvage (non reconnu par l'enzyme et donc non digéré) et deux autres bandes à 109 et 55 pb qui représentent l'allèle muté. Le morceau a été coupé en deux par une enzyme. Il y a donc un allèle sain et un muté. Nous pouvons alors conclure à une mutation hétérozygote donc le fœtus est atteint (<i>et oui car autosomique dominant !!</i>)</p>	Sain	164 pb	Hétérozygote	164 + 109 + 55 pb	Homozygote	109 + 55 pb	Sain	164 pb	Hétérozygote	164 + 109 + 55 pb	Homozygote	109 + 55 pb
Sain	164 pb												
Hétérozygote	164 + 109 + 55 pb												
Homozygote	109 + 55 pb												
Sain	164 pb												
Hétérozygote	164 + 109 + 55 pb												
Homozygote	109 + 55 pb												
6. Vérification par séquençage	<p>. En biologie moléculaire on utilise une deuxième méthode pour vérifier le résultat. Pour cela on fait un séquençage (ce qui permet d'obtenir la séquence précise de l'ADN et bien vérifier s'il y a la mutation).</p> <p>(Le séquençage sera expliqué dans les cours de l'année)</p>												

Et ça y'est c'est la fin de ce cours de génétique qui est important !!!! Et qui dit fin de cours dit dédicace (j'en ai rêvais pendant un an et ça y'est c'est mon tour !!! Et bientôt le vautre ;)
Déjà grosse dédiiss à mes cotuts qui sont juste incroyables et qui donnent tout pour faire au mieux cette année rien que pour vous !!!
Dédis au tutorat (aka la clé de la réussite pour votre année de P1) et à tous les tuteurs qui se donnent à fonds !!! On est derrière jusque au bout !!!
Dédis à la biomol family cette dynastie de tuteurs de la meilleure matière !!!
Une énorme dédi à Nathanaël, votre incroyable tuteur de pharmacologie (je sais c'est moins bien que la génétique mais le pauvre ...) qui a été avec moi tout au long de ma P1, c'est avec lui que je me suis lancée dans cette aventure de folie et ça y est, on a réussi !! C'est maintenant avec lui que je vie l'incroyable expérience du tutorat et de la P2 !!!! Je vous souhaite à tous d'avoir un ami comme lui, je vous promets qu'on en a tous besoin !!!
Et surtout grosse dédis à vous les P1 pour votre courage d'être là (et ouais vous êtes déjà là en amphi au mois d'aout alors que vos potes sont encore à la plage gros seum mais c'est pour la bonne cause ...). Défoncez-vous cette année vous en êtes capable !!! Dites-vous qu'on été exactement à votre place l'année dernière et que si on l'a fait vous le pouvez aussi !!!!
Je vous envoie tout le courage du monde et tout plein de loveeee (vous allez en avoir vraiment besoin !!)