



TUT' RENTREE GENETIQUE





Cours 1:

Principe de biologie moléculaire et applications en génétique médicale



Sommaire

1. | Echauffement: Extraction ADN et ARN
2. | Cardio: Amplification en chaine par polymérase (PCR)
3. | Endurance: Gel analytique
4. | Gainage: Digestion enzymatique
5. | Musculation: Application à la génétique médicale
6. | Renforcement cérébral: QCM



1. Echauffement : Extraction ADN et ARN



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.



1. Echauffement : Extraction ADN et ARN

2. Extraction de l'ARN

- 1) **Homogénéisation** des cellules ou des tissus dans un tampon permettant **d'inhiber** les RNAses , de **dénaturer** les acides nucléiques, et de **dégrader** les protéines,
- 2) **Extraction** différentielle entre ARN et ADN a pH acide ou extraction des **ARN polyA+** (= 1% des totaux) :
- 3) **Purification** par affinité avec passage des ARNm sur une colonne d'oligo-dT cellulose fixe les ARNpoly A+,
- 4) Lavage,
- 5) Abaissement par force ionique des ARN poly A+,
- 6) Précipitation.



2. Cardio: Amplification par chaine polymérase



- 🧑‍🚀 Le but de la PCR est **d'amplifier** une région d'ADN.
- 🧑‍🚀 A partir de quelques **mg** d'ADN on obtient une **grande** quantité d'une région précise.
- 🧑‍🚀 C'est une technique extrêmement **puissante** mais très **sensible**.
- 🧑‍🚀 Risque de **contamination** très élevé,

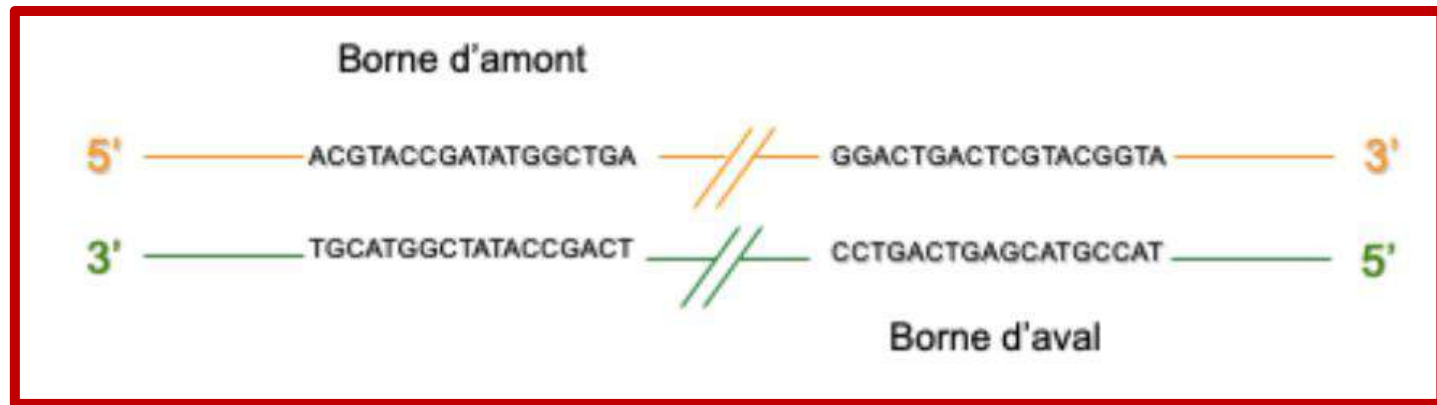
2. Cardio: Amplification par chaine polymérase



2 choses à connaître pour amplifier:

- La borne **d'amont** et la borne **d'aval**,

= 18-20 nucléotides avant et après la séquence à amplifier.




2. Cardio: Amplification par chaine polymérase




3 étapes successives:




 **Dénaturation** de l'ADN double brin en ADN **simple brin**,



 **Hybridation** des primers en amont et en aval sur les 2 brins dénatures et définissent les 2 bornes des brins à amplifier



 **Elongation** des amorces grâce à la **Taq polymérase** à partir des primers dans le sens 5'-3' 72°



(Petite définition qui fait plaisir: Amplicon= Fragment d'ADN amplifié.)

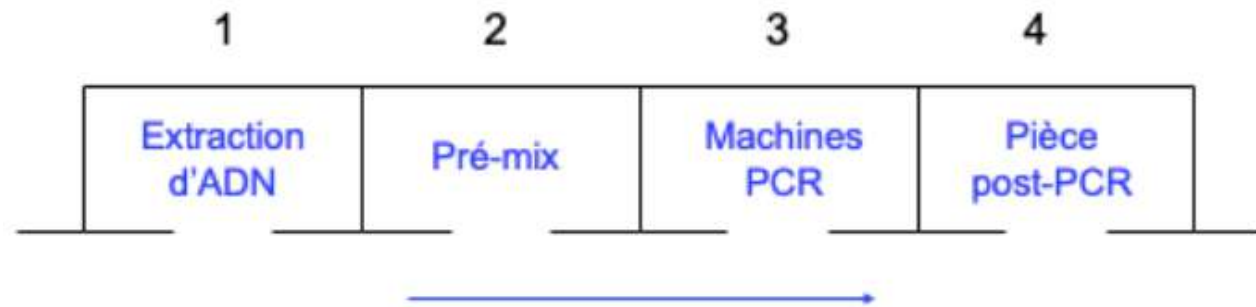


2. Cardio: Amplification par chaine polymérase



Risque de **contamination** car technique très sensible,

Nécessite un circuit **monodirectionnel**



1. Extraction d'ADN,
2. Tous les ingrédients sont mis dans les tubes sauf l'ADN
3. Machine PCR
4. Manipulation produits de la PCR

3. Endurance: Gel Analytique



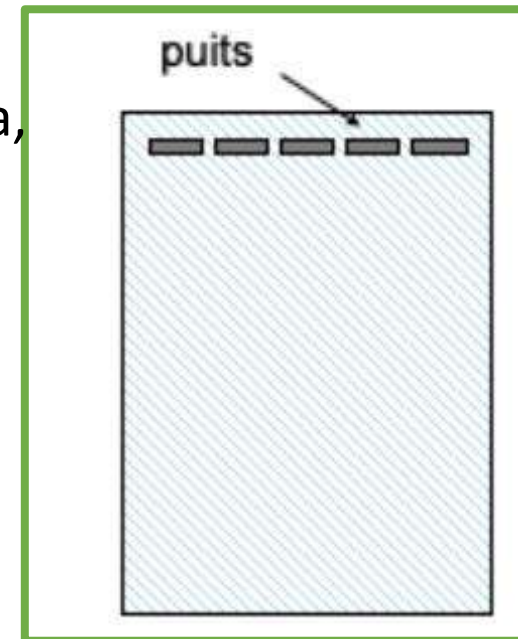
Une fois que notre PCR terminée, il faut **vérifier** et analyser le produit.

 Les amplicons sont mis dans les **puits**,

 On soumet ces puits à un **champ électrique** (- vers +),

 L'ADN étant chargé **négativement** migrera,

 Enfin on visualise les différents puits



3. Endurance: Gel Analytique



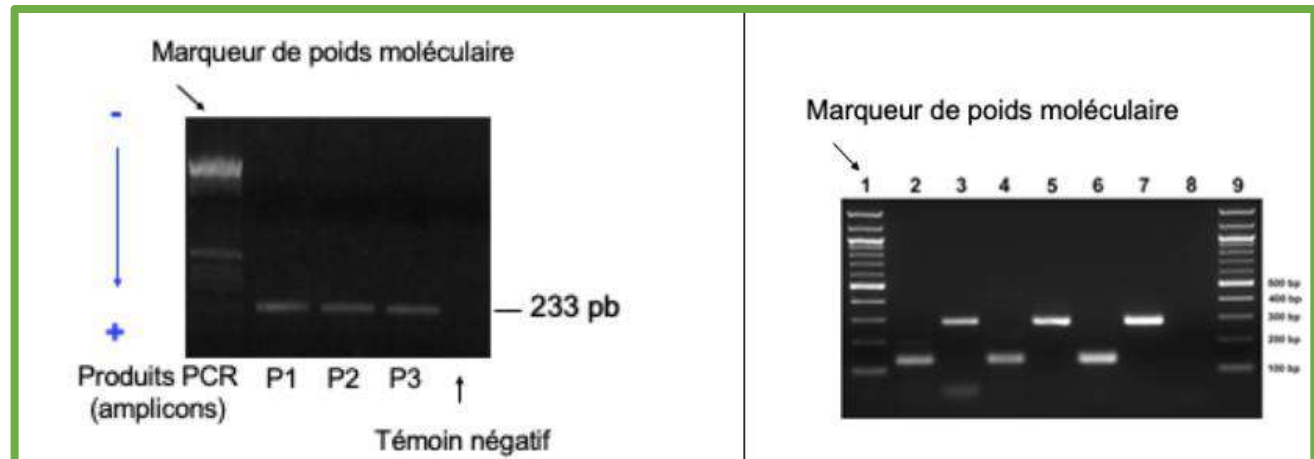
Une fois que notre PCR terminée, il faut vérifier et analyser le produit.

 Les amplicons sont mis dans les puits,

 On soumet ces puits à un **champ électrique** (- vers +),

 L' ADN étant chargé **négativement** migrera,


 Enfin on visualise les différents puits



4. Gainage: Digestion enzymatique



Une fois que la PCR a marché la technique de la **digestion enzymatique** est utilisée.

 Des **enzymes de restrictions** coupent l'ADN double brin au niveau d'une séquence de nucléotides **précise** qui est reconnue,

 La coupure est **reproductible** et **spécifique**

Coupages à bouts francs
(blunt ends)

HaellI

5'GG CC3'
3'CC GG5'

5'GG
3'CC

+

CC3'
GG5'

Coupages à bouts cohésifs
(sticky ends)

EcoRI

5'G AATT C3'
3'C TTAAG 5'

5'G
3'CTTAA

+

AATTC3'
G5'



5. Muscu: Application à la génétique médicale



1) Tableau Clinique de l'achondroplasie

🏀 Maladie rare 1/15 000

- 🏀 Petite taille = nanisme
- 🏀 Membres courts / mains courtes
- 🏀 Hyperlordose
- 🏀 Macrocéphalie
- 🏀 **Intelligence normale +++**
- 🏀 Dymorphie faciale
- 🏀 Complication neurologiques



5. Muscu: Application à la génétique médicale



2) Plan génétique

Maladie monogénique de **transmission autosomique dominante**,

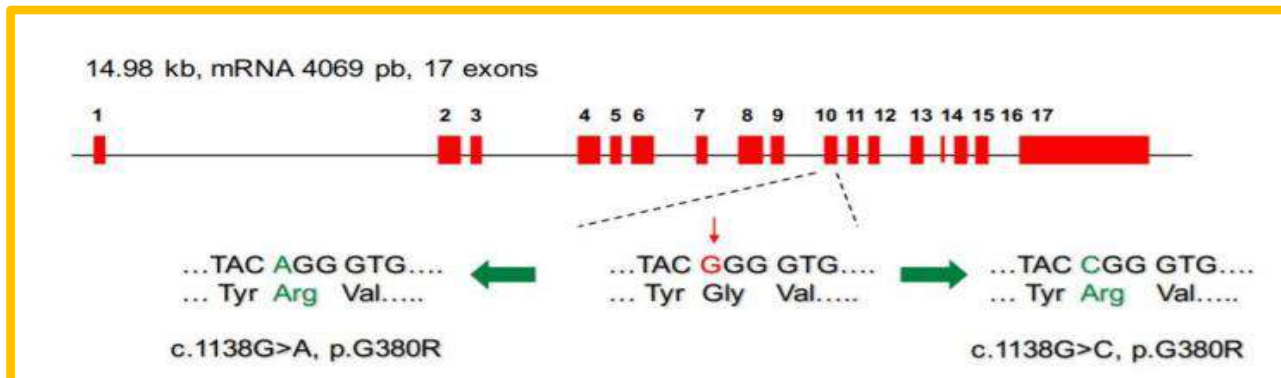
90 % des enfants atteints naissent de parents non atteints: **Néomutations**,

Un seul gène est responsable de l'achondroplasie: **FGFR3**,

Deux mutations sont possible et auront la même traduction protéique qui donnera la même maladie,

Si on a **G -> A**, la **glycine** (GGG) est remplacée par une **arginine** (AGG),

Si on a **G -> C**, la **glycine** est remplacée par une **arginine** également (CGG).



5. Muscu: Application à la génétique médicale



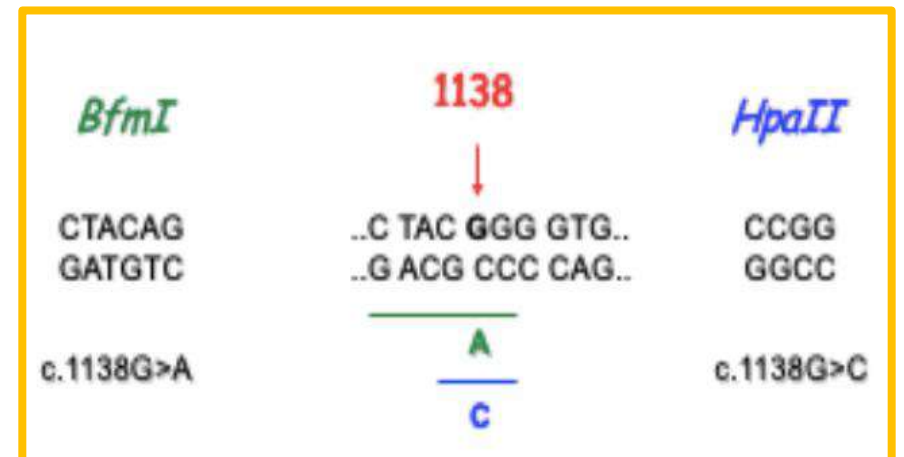
3) Vérification par PCR-RFLP

Devant un **signe d'appel** échographique, il y a vérification par plusieurs méthodes, pour poser le diagnostic définitif :

- **Ponction amniotique** pour extraire l'ADN,
- Amplification par **PCR**,
- Vérification des amplicons sur le **gel**,
- **Digestion enzymatique** des amplicons par les enzymes:

BfmI : reconnais la séquence « CTACAG » et coupe en cas de mutation **G>A** .

HpaII : reconnais la séquence « CCGG » et coupe en cas de mutation **G>C**.



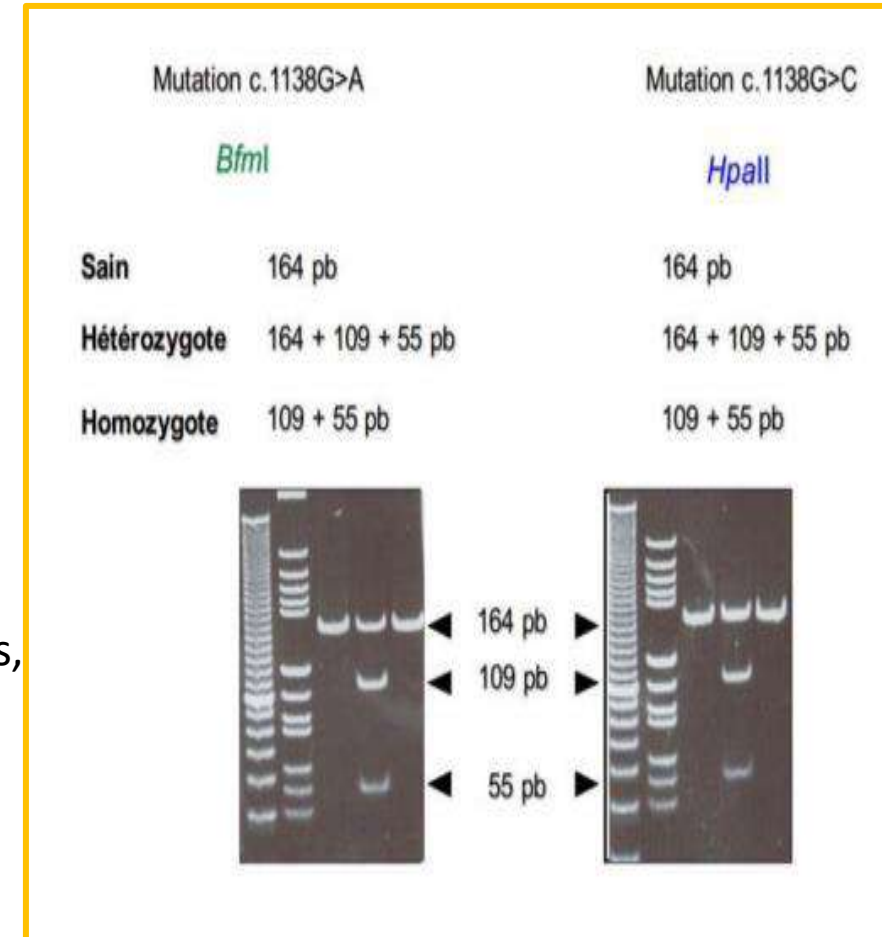
5. Muscu: Application à la génétique médicale



3) Vérification par PCR-RFLP

Devant un signe d'appel échographique, il y a vérification par plusieurs méthodes, pour poser le diagnostic définitif :

- **Ponction amniotique** pour extraire l'ADN,
- Amplification par **PCR**,
- Vérification des amplicons sur le **gel**,
- **Digestion enzymatique** des amplicons par les enzymes,
- **Analyse** des produits de digestion des amplicons,
- Vérification par **séquençage**.



6. Renforcement cérébral: QCM

QCM 1 : A propos des principes de biologie moléculaire, indiquez la (les) proposition(s) exacte(s):

A) La PCR réduit le nombre de nucléotides afin d'étudier un fragment d'ADN précis

B) Le circuit de la PCR est bidirectionnel dans les salles 2, 3

C) Les étapes sont dans l'ordre: dénaturation, fusion et élongation

D) Les enzymes de répression coupent l'ADN de manière spécifique et reproductible

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



6. Renforcement cérébral: QCM



QCM 1 : A propos des principes de biologie moléculaire, indiquez la (les) proposition(s) exacte(s):

A) La PCR ~~réduit~~ le nombre de nucléotides afin d'étudier un fragment d'ADN précis

La PCR **AMPLIFIE** un petit fragment d'ADN (*comme une photocopieuse qui imprime une page en beaucoup d'exemplaires*).

B) Le circuit de la PCR est ~~bidirectionnel~~ dans les salles 2, 3

Le circuit est toujours **MONODIRECTIONNEL** car le risque de **contamination** est très élevé !

C) Les étapes sont dans l'ordre: dénaturation, ~~fusion~~ et élongation

Dénaturation -> **HYDRIDATION** -> Elongation

D) Les enzymes de ~~répression~~ coupent l'ADN de manière spécifique et reproductible

Les enzymes de **RESTRICTION**

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



6. Renforcement cérébral: QCM



QCM 2 : Suite à un signe d'appel à l'échographie vous devez rechercher une mutation sur le codon 380 dans le gène FGFR3, par PCR-RFLP.

La séquence qui encadre la position 1138 est :

Séquence sauvage: TACGGGGTG (*le nucléotide en position 1138 est souligné*).

Séquence mutée: TACCGGGTG

Vous avez à votre disposition des enzymes de restrictions.

A propos des résultats ci-dessous , indiquez la (les) proposition(s) exacte(s):

- A) Vous pouvez utiliser l'enzyme de restriction Bfml
- B) Vous pouvez utiliser l'enzyme de restriction Hpa II
- C) La maladie suspectée est une achondroplasie
- D) Dans 90 % des cas, les parents sont atteints par cette maladie autosomique dominant
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses



6. Renforcement cérébral: QCM



QCM 2 : Suite à un signe d'appel à l'échographie vous devez rechercher une mutation sur le codon 380 dans le gène FGFR3, par PCR-RFLP.

La séquence qui encadre la position 1138 est :

Séquence sauvage: TACGGGGTG (*le nucléotide en position 1138 est souligné*).

Séquence mutée: TACCGGGTG

Vous avez à votre disposition des enzymes de restrictions.

A propos des résultats ci-dessous , indiquez la (les) proposition(s) exacte(s):

A) Vous pouvez utiliser l'enzyme de restriction ~~BfmI~~

B) Vous pouvez utiliser l'enzyme de restriction Hpa II

C) La maladie suspectée est une achondroplasie

D) Dans 90 % des cas, les parents ~~sont atteints~~ par cette maladie autosomique dominant
Dans 90% des cas les parents sont NON atteints car il s'agit de NEOMUTATION



6. Renforcement cérébral: QCM



QCM 2 : Suite à un signe d'appel à l'échographie vous devez rechercher une mutation sur le codon 380 dans le gène FGFR3, par PCR-RFLP.

La séquence qui encadre la position 1138 est :

Séquence sauvage: TACGGGGTG (le nucléotide en position 1138 est souligné).

Séquence mutée: TACCGGGTG

Vous avez à votre disposition des enzymes de restrictions.

A propos des résultats ci-dessous , indiquez la (les) proposition(s) exacte(s):

A) Vous pouvez utiliser l'enzyme de restriction ~~BfmI~~

B) Vous pouvez utiliser l'enzyme de restriction Hpa II

Petite explication: Ici la mutation est G>C, or on sait que (pas de panique vous le saurez un jour !!) :

-BfmI reconnait la séquence G>A et que

-Hpa II reconnait la séquence G>C ,

Donc dans ce cas BfmI ne coupera pas la séquence mais Hpa II oui (elle reconnaitra la séquence) !

Donc on utilise Hpa II.





Toi avant les Jeux Oly'Tut



Toi après avoir assisté à tous les cours de Biomol-génétique!

COURAGE

LES PLOUX

Coeur sur vous c'est
terminé!

