



Génétique

COURS 2 : Techniques et approches diagnostiques des maladies génétiques

AVANT PROPOS :

Coucou, c'est Roxygène, votre dévouée tutrice de Génétique, mes annotations seront dans cette police/couleur ! Vous vous apprêtez à lire le 2e cours de Génétique, vous allez voir c'est un cours avec beaucoup de pages mais pas de stress, il y a beaucoup d'explications et de détails qu'on ne vous demande pas de connaître sur le bout des doigts pour l'examen (attention je vous préciserai ça, on n'impasse pas grrrrr)

Ici, on va vous présenter différents outils de biologie moléculaire et vous allez comprendre en quoi ces outils sont utiles pour le diagnostic de maladies génétiques constitutionnelles

Gardez en tête pendant votre lecture que, une fois que vous aurez lu cette fiche, vous aurez lu les 2/3 du programme de génétique ! C'est pas beau ça ??

Je vous laisse et vous laissez découvrir ça tranquilou <3

SOMMAIRE

I - Introduction à la génétique moléculaire

II - Les outils en biologie moléculaire

1. Les enzymes
2. Propriétés de l'ADN
3. Analyse de données

III - Extraction ADN/ARN

IV - PCR et Principes de biologie moléculaire

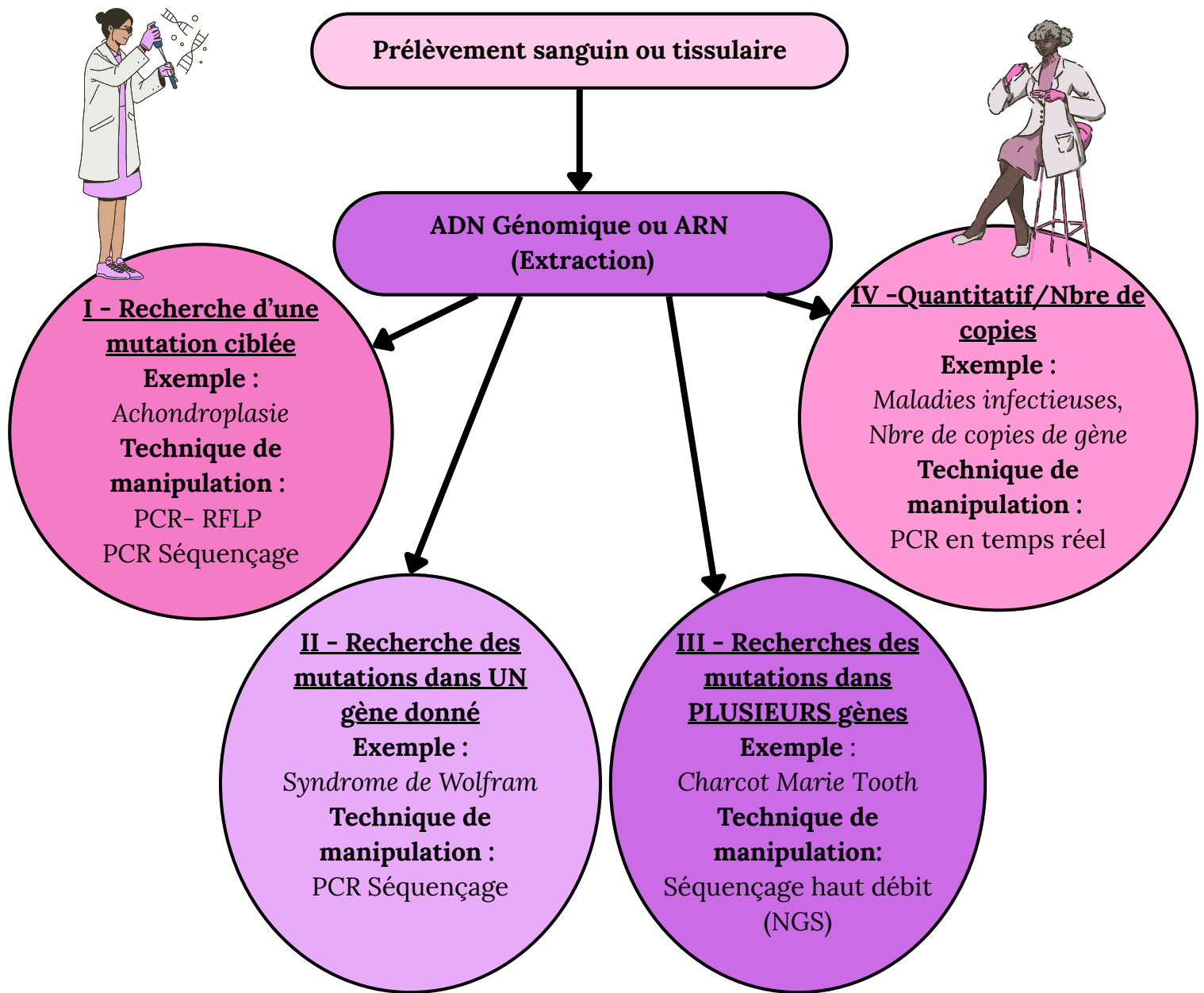
V - La PCR en temps réel

1. Principe
2. PCR en temps réel = PCR quantitative
3. Applications

VI - La digestion enzymatique

VII - L'achondroplasie

1. Généralités
2. Signes cliniques
3. Transmission
4. Génétique
5. Diagnostic et cas clinique



Ce schéma illustre différentes techniques de génétique à notre disposition. En fonction de ce que l'on recherche, du tableau clinique du patient, de ce qu'on s'attend à obtenir, etc, on va préférer une technique à une autre.

I - Introduction à la biologie moléculaire

En **génétique moléculaire**, on analyse les acides nucléiques, soit l'ADN et ARN que l'on va extraire de **n'importe quelle cellule nucléée**.

→ Il faut donc qu'il y ait un **noyau** dans la cellule pour y récupérer son ADN/ARN.

Seuls **quelques microgrammes** (voire nanogrammes) seront nécessaires, donc une toute petite quantité de matériel.

Il existe un très grand nombre de techniques mais encore très peu d'automates.

→ Certains gestes répétitifs sont heureusement **automatisés** mais certaines étapes restent très **manuelles**.

Pour ces techniques on a une **+++ évolution technologique très rapide +++** comme vu dans l'introduction : on a une évolution très rapide de la génétique moléculaire ces 30 dernières années grâce à des technologies ayant permis l'exploration du génome et de l'ADN et de mieux comprendre leur fonctionnement, expression, régulation etc.

⚠ Il existe des risques importants de contamination inter échantillons, comme on le verra avec **la PCR**.

→ La PCR est une **amplification** en très grand nombre d'une très petite région d'ADN, si petite qu'elle peut être volatile, se balader dans l'air et contaminer l'échantillon suivant à analyser par PCR. Il suffit vraiment d'une quantité infime d'ADN pour contaminer un autre tube).

→ Elle est à la **base de tout ce qui est police scientifique** : identification d'individus à partir de traces infimes grâce à l'amplification et le séquençage de l'ADN trouvé.

Les techniques de génétique sont donc **soumises à des agréments**, autant les locaux (risques de contamination importants) que les biologistes et généticiens exerçant cette activité.

→ **Def** : Un **agrément** est une permission, approbation émanant d'une autorité.

→ Ces agréments sont différents pour le diagnostic pré et post natal et sont délivrés par l'agence de biomédecine.

Les techniques de biologie moléculaire étant très **sensibles**, nous pouvons faire des analyses moléculaires ciblées à partir d'une seule cellule.

En génétique, on différencie cytogénétique et génétique moléculaire.

Dans les deux cas, on va étudier l'ADN mais à différentes échelles : la **cytogénétique** s'intéresse aux chromosomes, on va regarder leur nombre ou encore les grandes régions chromosomiques et la **biologie moléculaire** s'intéresse aux nucléotides.

De plus, il existe une **différence de stabilité entre ARN et ADN** (l'ADN est beaucoup plus stable que l'ARN : il se conserve beaucoup mieux et beaucoup plus longtemps) mais **tous deux sont vulnérables à la digestion par les nucléases** (respectivement des DNAses et RNAses) **une fois que la cellule a été +++lysée +++**.

→ La lyse d'une cellule est la dégradation ou destruction d'une cellule dont la membrane externe a été endommagée par des produits chimiques, , des agents physiques (comme les ondes sonores) ou par un virus.

II - Les outils en biologie moléculaire

1 Les enzymes (C'est important de connaître ce vocabulaire car il suffit de connaître le nom ou la classe d'enzyme pour connaître son action !!)

Couper = nucléase (enzyme de restriction)	Copier = polymérase	Coller = ligase
<ul style="list-style-type: none">• Endonucléase : coupe l'ADN au milieu ou à l'intérieur• Exonucléase : coupe l'ADN au niveau des extrémités	<ul style="list-style-type: none">• ADN Polymérase : fait une copie d'un des brins d'ADN• Reverse transcriptase : fait une copie d'ADN à partir d'un brin d'ARN	<ul style="list-style-type: none">• ADN ligase : coller 2 fragments d'ADN ensemble (ligase = liquer = coller 2 fragments)

Les enzymes n'ont **pas été inventées** mais **identifiées** et **purifiées**,

- celles de restriction à partir de bactéries entre autres
- et les reverse transcriptases ont été identifiées à partir de virus ARN, les virus ARN doivent transcrire leur ARN en ADN pour pouvoir entre autres s'intégrer au génome de la cellule infectée.

2 Propriétés de l'ADN

En plus de ces enzymes, on va combiner des **propriétés spécifiques de l'ADN** : (maintenant qu'on connaît les propriétés de l'ADN on peut s'en servir)

- **Variations de température** : on peut casser ou reformer les liaisons hydrogènes qui lient les 2 brins d'ADN

Exemple :

1. Séparation des 2 brins d'ADN en fragment simple brin **en chauffant à 95°C**
2. Diminution progressive de la température **jusqu'à 25°C** : reformation de ces liaisons hydrogènes entre les 2 brins
3. Diminution soudaine de la température **à 4°C** : le choc thermique est tel que les liaisons hydrogène n'ont pas le temps de se reformer, l'ADN reste simple brin

- **Complémentarité des bases** (cf cours de biomol avec la complémentarité des nucléotides)
- **Migration dans un champ électrique** : un fragment d'ADN, dans un champ électrique, est capable de migrer.

Cette propriété est notamment utilisée pour séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille dans certaines machines.

Ici c'est très théorique mais dans la suite du cours vous verrez comment ces propriétés sont utiles, on va revoir tout ça.

3 Analyses de données

Les **analyses informatiques** et **notamment la bio-informatique**, nouvelle discipline qui se développe de plus en plus, ont permis les avancées les plus importantes dans le traitement des données génétiques, en lien direct avec les nouvelles technologies et le séquençage haut débit (NGS, ce sera revu dans la troisième fiche).

On est **très dépendants de ces techniques en génétique**.

C'est **grâce à l'évolution** des algorithmes qu'on peut séquencer aujourd'hui un génome, ce n'est **pas du tout grâce à l'invention** de nouvelles techniques ou la découverte de nouvelles enzymes.

III- Extraction ADN/ARN

En génétique moléculaire, on analyse les acides nucléiques = ADN et ARN que l'on va extraire de n'importe **quelle cellule nucléée**.

La **première étape va être d'extraire l'acide nucléique** à partir duquel on va travailler.

→ Dans la situation la plus fréquente, **on travaille sur l'ADN**. Il va donc falloir l'extraire de tissus, de cellules amniotiques (en cas de diagnostic prénatal), de follicules pileux, de coupes en paraffine... (à partir du moment où vous avez du matériel biologique, on peut extraire de l'ADN).

→ Le plus courant dans les pratiques médicales, c'est d'extraire cet ADN **à partir de sang total**.

EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

1 - Prélèvement du sang total

Quelques mL (de 1 à 10mL) de sang total suffisent.

→ Ils sont prélevés sur **anticoagulant** (EDTA ou acide éthylène diamine tétracétique ++).

→ On ne peut pas faire d'analyse sur du sang prélevé sur héparine, car elle inhibe certaines étapes de biologie moléculaire.

⚠ On utilise de l'EDTA et pas de l'héparine ⚠

→ La professeur en présentiel insiste énormément sur le fait qu'on ne vous demandera pas à connaître certains détails par cœur (je vous les signalerai) MAIS concernant le prélèvement de sang total, ce sera obligatoirement sur EDTA !

→ Pourquoi ? Par ce que l'héparine va inhiber tout ce qu'on va faire derrière (par exemple la PCR).

→ Donc je répète interdiction de tomber dans ce piège, je vais vous traumatiser avec ça désolée mais c'est important 😞

2 - Lyse des globules rouges

On lyse les GR **car ce sont des cellules anucléées** (= sans noyaux).

→ Ils ne possèdent pas de noyau et donc pas d'ADN.

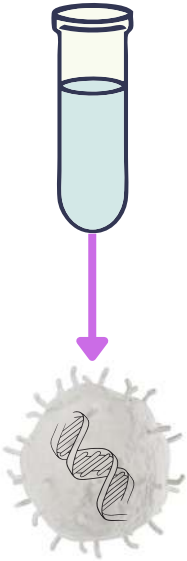
→ Cette lyse se fait grâce à une solution hypotonique. La solution hypotonique fait gonfler les GR jusqu'à les faire éclater. On peut alors s'en débarrasser. (vous verrez ce type de solution en physio)

⚠ Seuls les globules blancs (= GB) nous intéressent dans ces prises de sang car les globules rouges n'ont PAS de noyau ⚠

Si vous avez regardé Il était une fois la vie, vous imaginez que tous les GR (les goats du dessin animé) meurent car on les veut PAS miskine



3 - Récupération des leucocytes :



Pour récupérer les leucocytes, on va :

→ Grâce à une **centrifugation**, récupérer le culot au fond du tube à essai qui contient **uniquement les leucocytes (Globules Blancs)** qu'on va laver afin de finir d'enlever ce qu'il reste autre que les GB (plasma, hémoglobine, restes des GR précédemment lysés...).

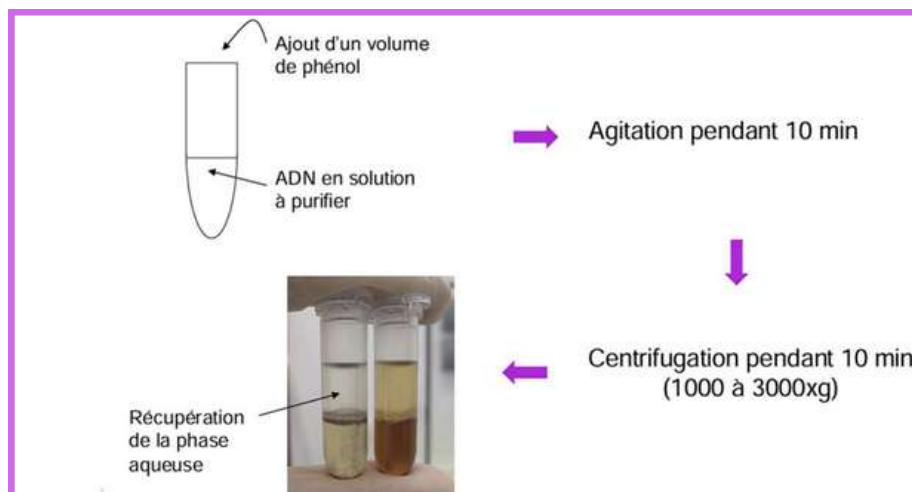
→ **Re suspendre ces GB** dans un mélange de détergent et de Protéinases K.

Pourquoi ? C'est une étape très importante : afin **d'accéder à l'ADN, il faut accéder au noyau** de la cellule et donc **se débarrasser des membranes plasmique et nucléaire** grâce au détergent.

De plus, sur l'ADN **nous avons de nombreuses protéines fixées notamment sur la chromatine, qu'il faut éliminer** (via protéinases). Mais **il faut également éliminer les DNase** de notre ADN une fois la cellule lysée car elles peuvent dégrader notre ADN (car DNase = enzyme pouvant cliver ADN/ARN).

4 - Extraction au phénol-chloroforme :

Cette étape consiste à extraire l'ADN grâce à une solution de **phénol-chloroforme**.



Cette solution permet **l'élimination définitive des protéines** en utilisant la solubilité différentielle des molécules (ADN vs Protéines) entre 2 phases non miscibles.

→ L'ADN à purifier est en solution dans un micro-tube.

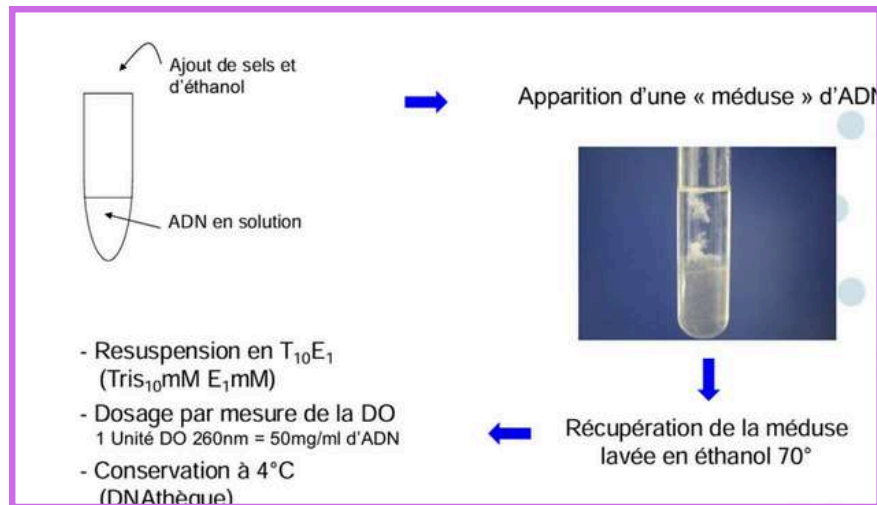
→ On y rajoute un volume de phénol, puis on agite pendant 10 minutes.

→ Ensuite, on centrifuge pour séparer les deux phases.

On obtient in fine dans le tube 2 phases différentes séparées par une galette de protéines dégradées :

- La phase **supérieure : aqueuse**, qui contient l'ADN
- La phase **inférieure : phénolique**

5 - Précipitation éthanol (+ re-suspension, quantification et conservation) :



Précipitation :

Il faut ensuite **précipiter l'ADN grâce à de l'éthanol**,

→ on rajoute à cette phase aqueuse (obtenue à l'étape d'avant) 2,5 volume d'éthanol à 95° froid (-20°) **en présence de sels**.

→ il faut que la **température soit basse** pour que l'ADN précipite (*peu importe le nombre de volumes selon la prof, ce qui est important c'est que si vous rajoutez de l'éthanol, que vous mettez le tube à froid en présence de sel l'ADN va précipiter*)

Lors de cet ajout apparaît une « Méduse d'ADN », sorte de flocculat blanc qui correspond à notre ADN purifié.

On centrifuge ou on utilise une pipette pour récupérer cet ADN :

→ **on va laver à l'éthanol 70°** pour le nettoyer, enlever les sels et tout ce qui pourrait changer ou inhiber les réactions suivantes, qui n'aurait pas déjà été éliminé lors des étapes précédentes.

Re suspension (dissolution de l'ADN qui était sous forme de précipité visible blanc solide) :

Une fois récupéré, **l'ADN est resuspendu soit dans de l'eau soit dans une solution de T10E1** (Tris₁₀ mM E₁ mM → tampon un peu particulier avec du Tris et de l'EDTA), pour protéger l'ADN des éventuelles nucléases qui auraient persisté.

Quantification :

On va ensuite **quantifier** l'ADN grâce à un **spectrophotomètre**, en sachant que : 1 unité de Densité Optique de 260 nm (1DO) = 50 ug/mL d'ADN.

Le petit mot de la prof en présentiel : « Là peu importe le 50 ug/mL, retenez qu'on utilise un spectrophotomètre et des unités de DO pour quantifier l'ADN »

Grâce au dosage d'un petit échantillon de la suspension obtenue, on connaît la concentration de notre ADN génomique.

Conservation :

Cet ADN peut être conservé à **4° dans une DNathèque** pendant extrêmement longtemps car très stable à cette température.

En génétique, il nous arrive souvent d'utiliser des ADN préparés plusieurs années auparavant pour des études de maladies génétiques dans le cadre d'études familiales.

Conserver l'ADN de certains patients en impasse diagnostique à un certain moment permet de ressortir cet ADN des années après.

En reprenant et combinant cet ADN avec le dossier clinique et les nouvelles connaissances et découvertes publiées, on peut réussir à finalement diagnostiquer la maladie génétique dont ils sont atteints. C'est quelque chose que vous devez avoir à en tête, il y encore pleins de gènes dont on ne connaît pas la fonction ou alors on la connaît mais on ne connaît pas de mutations de ce gène reliées à une maladie génétique.

Il faut toujours suivre ce qui se passe dans la littérature car on peut poser un diagnostic 10 ou 20 ans après.

→ Donc conserver l'ADN, c'est **très important** et en plus c'est **très simple** !!

EXTRACTION D'ARN

On peut aussi être amené à étudier et donc extraire de l'ARN bien que **cela reste moins fréquent**.

→ Il est en effet plus difficile à étudier et à manipuler que l'ADN car beaucoup plus instable et très sensible aux ribonucléases (RNase A) qui le dégradent très facilement et très rapidement.

→ Il nécessite une manipulation très stricte, dans des conditions bien particulières. Il est peu utilisé en diagnostic de routine, mais reste très utile et informatif lorsque l'on veut tester la pathogénicité de mutations sur l'épissage ou analyser l'expression des gènes.

L'extraction **se fait globalement de la même façon** à la seule différence qu'**on utilise un phénol à pH acide contre un phénol à pH neutre pour l'ADN** pour une question de solubilité différentielle (pour que l'ARN se trouve dans la phase supérieure comme tout à l'heure pour l'ADN).

Ici, je vous mets certaines étapes (très similaires à celles de l'extraction de l'ADN) en précisant les différences

ETAPE : HOMOGENEISATION

Donc, on fait une **homogénéisation des cellules ou des tissus** dans un tampon qui va permettre la lyse des cellules :

- Inhiber les RNAses endogènes
- Dénaturer les acides nucléiques
- Dégrader les protéines

ETAPE : EXTRACTION

L'extraction est réalisée avec un **phénol à pH acide** permettant l'extraction différentielle ARN/ADN (permettant de récupérer uniquement l'ARN).

Lors de l'extraction, **on peut cibler les ARN messagers matures** (→ ont une répétition de A à leur extrémité 3') = **ARN polyA+** qui représentent 1% des ARN totaux.

→ On réalise donc une purification par affinité en passant les ARN totaux extraits sur une colonne d'oligo dT cellulose qui fixe les ARN poly A+.

→ Après lavage, les ARN poly A+ sont élués par abaissement de la force ionique.

ETAPE : PRECIPITATION

La précipitation est ensuite réalisée avec de **l'alcool éthylique absolu froid** de manière classique.

BUT :

L'étude des ARN permet d'**appréhender les mécanismes d'épissage et d'analyser l'expression d'un gène** (la quantifier, comparer d'un tissu à l'autre, ...).

L'ARN a l'avantage de nous permettre d'**étudier des choses plus fonctionnelles** que l'ADN.

IV - PCR et principes de biologie moléculaire

Cette technique de PCR a été mise en place en 1985 par **Kary Mullis** (prix Nobel de chimie en 1993), c'est sa première publication.

→ Elle a **révolutionné** le génie génétique et la biologie moléculaire.

→ Presque toutes les méthodes de biologie moléculaire commencent par une PCR. C'est une **technique de base** dans un laboratoire de biologie moléculaire.

Cette technique permet d'**obtenir une grande quantité d'une région d'ADN grâce à l'amplification spécifique** de la région d'ADN que l'on veut étudier.

C'est une technique extrêmement puissante car cette amplification du génome **ne se fait qu'à partir des quelques microgrammes d'ADN** génomiques extraits donc d'une très petite quantité. +++

Cette technique a été rendue possible grâce à la découverte et l'isolement/la purification d'une ADN polymérase particulière car thermostable → **la Taq** (Thermophilus Aquaticus) DNA polymérase ou Taq Polymérase +++

Cette polymérase a été identifiée dans la bactérie **Thermophilus Aquaticus**, c'est une bactérie (**! bactérie et pas virus !**), vivant dans les sources d'eau chaude. Contrairement à la majorité des protéines, cette enzyme est capable de travailler à 95°C sans être dégradée ou dénaturée. Elle est donc **thermostable** : elle continue de fonctionner même à de très hautes températures.

Comme c'est une technique +++ **très sensible** +++, les **risques de contamination sont très grands** +++, notamment d'un échantillon à un autre.

⚠ On ne parle pas d'une contamination par un agent pathogène type bactérie ou virus mais bien d'une contamination d'un échantillon à un autre ⚠

→ Ici, on est dans une démarche de diagnostic donc **il ne faut surtout pas « mélanger » des échantillons**. Il faut être absolument certain de diagnostiquer la maladie à la bonne personne et pour cela il ne faut aucune contamination dans notre échantillon.

→ Ce qui est extrêmement contaminant c'est la contamination par l'air car notre ADN va être très volatil.

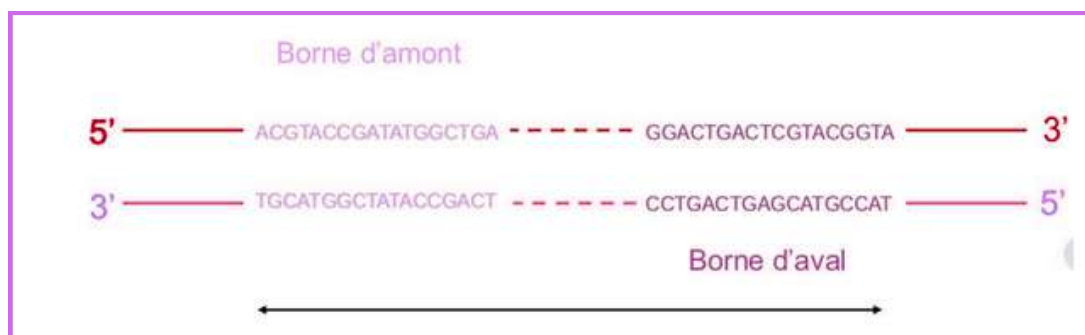
→ Il est donc très important que le **flux** (les étapes de la PCR) soit **unidirectionnel/monodirectionnel**, les locaux agrémentés, etc. Ainsi, lorsqu'on fait ce type de manipulations, il faut vraiment suivre un ordre et +++ ne jamais revenir en arrière +++
Ce sont des **conditions extrêmement strictes**, avec de nombreux contrôles à réaliser, pour être sûr de la fiabilité de ces techniques en termes de diagnostic.

LES ETAPES DE LA PCR

Pour réaliser cette PCR, on part d'un ADN double brin dont on veut amplifier spécifiquement une région. La taille de ce fragment d'ADN à amplifier, appelé amplicon, va varier de 150 paires de bases (pdb) à 3kB. On amplifie généralement un fragment d'ADN de l'ordre de quelques centaines de pdb.

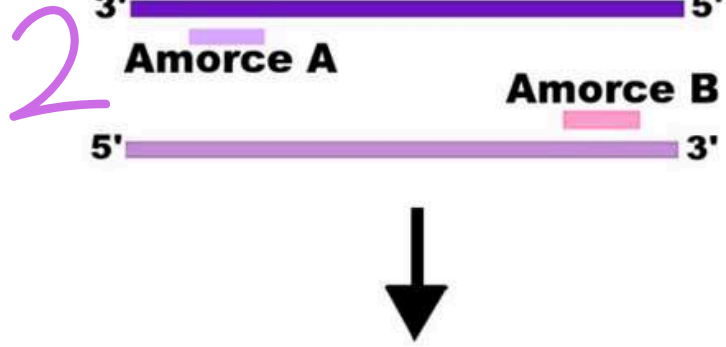
2 choses sont à connaître avant de pouvoir commencer la PCR :

- La **séquence en amont** = borne d'amont : les 18 à 20 nucléotides en amont de la région à amplifier
- La **séquence en aval** = borne d'aval : les 18 à 20 nucléotides en aval de la région à amplifier



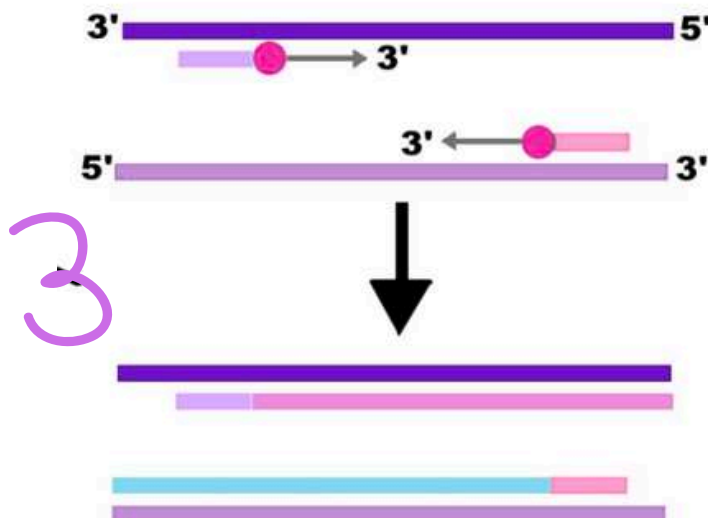


Dénaturation 95° : L'ADN double brin est dénaturé en ADN simple brin par rupture des liaisons hydrogènes.



Hybridation des amorces 55° : On va placer nos simples brins dans certaines conditions, pour que des **primers** (= **amorces** = oligonucléotides simple brin de 18 à 20 nucléotides) s'hybrident par complémentarité sur les bornes d'amont et d'aval des brins dénaturés (d'où la nécessité de les connaître).

→ Ils définissent ainsi les bornes du fragment d'ADN que l'on va amplifier



Élongation d'amorce 72° (Température de fonctionnement de la Taq polymérase) : La **Taq Polymérase** va copier le brin d'ADN, à partir des primers (comme toutes les ADN polymérases), dans le sens 5- - 3' (sens du brin fils).

La **température** de l'automate (95°, 55° puis 72°) est très **importante** pour son bon fonctionnement.

→ Par exemple, il est nécessaire que la 2e étape se fasse à 55° car à cette température c'est encore trop chaud pour que les 2 brins d'ADN se referment mais les amorces sont capables de s'hybrider sur leur région complémentaire.

Mais Roxane, je dois apprendre les températures au degré près ???

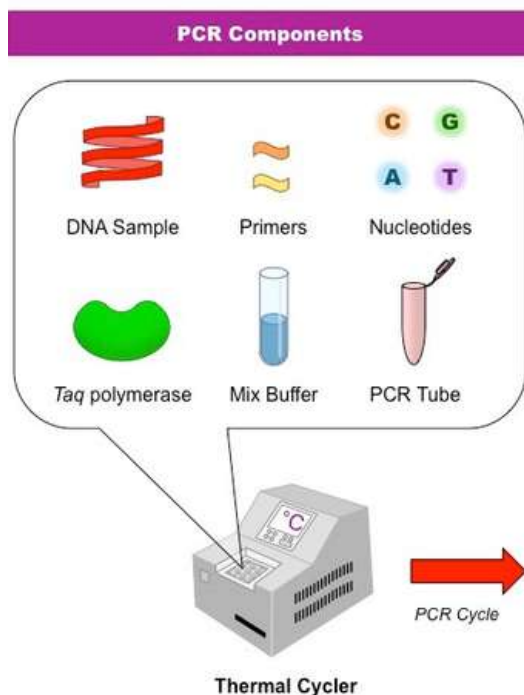
→ Alors, je vais citer les mots de la professeure en présentiel pour vous rassurer <3 : "Là encore on ne va pas vous demander de connaître par cœur les températures (car elles ne sont pas strictes elles peuvent varier). Ce que vous devez savoir c'est que la PCR c'est des variations de températures : on chauffe = on dénature, on baisse la température = pour que nos amorces s'hybrident et la troisième température = température de fonctionnement de la polymérase que l'on va utiliser."

→ Donc je résume la prof ne vous piègera sur le degré près, du style "Non non la Taq Polymérase c'est 72 degré et pas 73 degré 🤓👍" alors on respire et tout va bien !

Ces 3 étapes vont être **répétées n fois**, il y a généralement entre **30 et 45 cycles PCR**. Il y aura **2n molécules au bout de n cycles**.

→ Là il est à compter juste « 30 et 35 » ou « 35 et 45 » ... tout ce qui est entre 30 et 45 c'est juste.

→ Le but de faire plusieurs cycles, c'est donc d'avoir une très grande quantité d'ADN.



Pour réaliser une PCR il faut mettre dans un micro-tube :

- L'ADN du patient (100ng)
- 2 Amorces (Primers) : nécessaires pour le démarrage (amorces sens et reverse) et présentes un grand nombre de fois (elles sont en excès afin de pouvoir faire tous les cycles : il en faut en effet 1 par brin d'ADN à chaque cycle).
- **Désoxynucléotides (dNTP)** (nos A C G T afin que la Taq polymérase puisse faire les brins d'ADN.)
- **Tampon** (contenant du MgCl₂), qui garde le pH neutre
- La **Taq polymérase** (enzyme)

Ensuite, le micro-tube est disposé dans l'automate qui travaille pour faire les n cycles programmés.

Cette automate est un **thermocycleur** (soit un appareil faisant juste des variations de température de manière très rapide, en quelques secondes), c'est lorsqu'on ouvre ce tube que notre ADN alors très volatile peut s'échapper et contaminer les échantillons suivants.

Aujourd'hui, la PCR qui est une technique est **très sensible et très performante**, nous permet de travailler à partir d'une quantité très faible d'ADN : nous pouvons travailler à partir d'une seule cellule lors d'un diagnostic préimplantatoire.

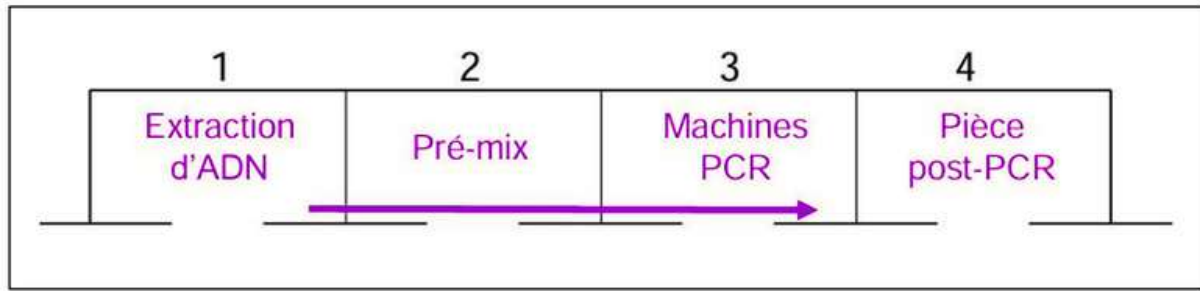
C'est une technique/un examen de base dans un labo de biologie moléculaire.

Elle reste à **hauts risques de contamination** et nécessite **un circuit monodirectionnel**, avec des **conditions d'exercice très règlementées** via des agréments : c'est à dire qu'un biologiste moléculaire ne peut pas être agréé pour faire ce travail sans formation complémentaire.

Cet agrément est indispensable pour le biologiste, l'équipe, le matériel et les locaux.

Qu'est ce qu'un circuit monodirectionnel ?

☞ Un **circuit monodirectionnel en PCR**, c'est l'organisation du laboratoire en zones où l'on circule toujours dans un seul sens pour éviter que l'ADN amplifié ne contamine les échantillons à analyser.



Il existe un circuit monodirectionnel au sein du laboratoire avec :

1. **Une pièce d'extraction**
2. **Une pièce de pré-mix**, donc c'est-à-dire une pièce dans laquelle on prépare nos tubes avec tous nos éléments **sauf l'ADN**
3. **Une pièce avec la machine PCR**, dans laquelle on va rajouter l'ADN du patient dans les tubes
4. **Une pièce post-PCR**, lieu de manipulation des produits d'amplification. C'est dans cette 4e pièce que l'on retrouve des produits hautement contaminants comme des amplicons en quantité très importante.

→ Il n'y a **pas de retour en arrière** pour ne pas contaminer l'ADN de la 1ère pièce.

AUTRES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE LE GEL ANALYTIQUE OU L'ELECTROPHORESE

Une fois la PCR terminée, il **faut vérifier qu'elle a bien fonctionné** en séparant les fragments d'ADN grâce à un champ électrique.

Alors comment vérifier cela ?

- On prépare un gel d'agarose ou d'acrylamide → réseau de mailles (trous) dont la taille dépend de la concentration.
- Les fragments d'ADN migrent dans le gel sous l'effet d'un champ électrique.
- Les petits fragments passent facilement à travers les mailles → migrent loin vers le bas.
- Les gros fragments sont ralentis par le réseau → restent près du puits, en haut du gel.
- Résultat : séparation des fragments selon leur taille, visualisable par coloration, avec un profil en bandes du haut (gros) vers le bas (petits).

☞ En résumé : c'est comme un filtre de cuisine où les pâtes passent plus ou moins bien selon leur taille – sauf qu'ici ce sont des morceaux d'ADN qui migrent dans un gel.

Concrètement, comment on fait une électrophorèse ?

→ Préparation du gel :

On coule un gel d'agarose/acrylamide et on creuse des puits.
Le gel est immergé dans une solution tampon conductrice.

→ Chargement des échantillons :

On dépose dans les puits les différents amplicons issus de la PCR.

→ Migration (électrophorèse) :

On applique un champ électrique: l'ADN, chargé **négativement** grâce aux groupements phosphate (PO_4^-), **migre du - (cathode) vers le + (anode)**.

Les petits fragments avancent plus vite et descendent plus loin, les gros fragments restent en haut.

→ Coloration / visualisation :

Afin de bien visualiser notre migration, on ajoute un **agent intercalant (ex. bromure d'éthidium)**, qui se fixe dans l'ADN.

Sous lumière UV, **il devient fluorescent rose**, révélant les bandes d'ADN.

⚠ Comme **ces agents intercalants sont mutagènes**, ils nécessitent des précautions de manipulation (gants, protections adaptées).

👉 **Résultat final** : un profil en bandes fluorescentes : gros fragments en haut, petits en bas.

Donc, la **vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique dépend de** :

- De sa masse moléculaire (nombre de paires de bases = pdb) → plus le fragment sera petit, plus il migrera loin et plus vite.
- De la concentration en agarose ou en acrylamide du gel préparé

⚠ A noter que nous travaillons beaucoup avec des agents qui modifient l'ADN en s'y intercalant et qui sont donc, par définition, des agents mutagènes.

👉 Dans un laboratoire de BM, nous protégeons les amplicons des contaminations, MAIS AUSSI les manipulateurs car les produits peuvent être extrêmement dangereux pour eux (même si en travaillant bien, il n'existe pas de risque particulier).

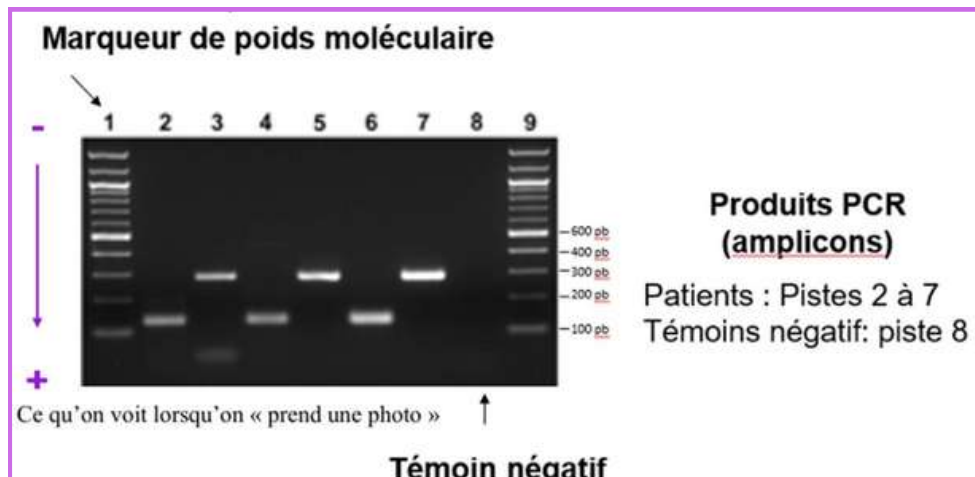
Je vous mets l'exemple sur la page suivante, en attendant, je vais compléter ce magnifique blanc en vous donnant des idées de petites choses à faire pour décompresser et bien vivre son année :

- *faire des soirées "film" le week-end avec votre famille, votre coloc (ça peut être votre carotte du jour pour bien travailler le samedi après la Séance Tut')*
- ***sortir** après les examens blancs avec son entourage : balade, resto, plage → c'est LE moment de prendre une pause*
- *se réserver des créneaux "appels" hebdomadaires avec ses proches pour raconter sa vie et se sentir un peu moins seule dans sa bulle*

Bref, je me tais et je vous laisse continuer le cours, prenez bien soin de vous, vous le méritez tellement <3

EXEMPLE :

Lors de la coloration du gel par le Bromure d'Éthidium, nous obtenons ceci :



Le gel contient 8 pistes (dans cet exemple, le nombre de pistes peut varier) :

- **La première** : nous avons fait migrer un **marqueur** de taille/de poids moléculaire, c'est à dire des fragments d'ADN dont la taille est connue.
→ Cette **piste correspond donc à un repère**, pour les tailles de nos amplicons (ainsi, on pourra connaître la taille de nos morceaux d'ADN amplifiés en fonction de l'endroit où ils s'arrêtent par migration en comparant avec notre repère).
- **Les pistes 2 à 7** : ce sont les **migrations de nos produits** PCR (= nos amplicons) provenant de différents patients.
→ L'intensité de la bande (bande très peu ou très visible) donne une idée sur la quantité d'amplifications PCR de cette taille puisqu'au plus la bande est visible, au plus la quantité est importante.
- **La 8e piste** : c'est notre **témoin négatif**.
→ Cette piste existe toujours, elle est **indispensable** à toutes expérience PCR car elle témoigne de la non contamination de nos amplicons.
→ Elle est le **résultat de la migration** de tous nos produits mis dans le tube de départ **sauf l'ADN** (= tout ce qu'on met dans le tube dans la 2e pièce lors de la PCR).
→ La piste doit donc **rester noire** :
 - Si une **fluorescence apparaît** sur cette piste, **les résultats ne sont pas interprétables** car ils auront été contaminés par un autre ADN. En effet, on n'a pas mis d'ADN dans ce tube donc l'ADN présent provient d'une contamination. Ainsi, nos autres tubes aussi sont probablement contaminés, donc on ne regarde même pas les autres pistes, **on doit tout recommencer !**
 - Si cette **piste reste noire**, cela veut dire que les pistes 2 à 7 sont bien des amplifications des ADN de nos patients, et non d'un ADN contaminant (les résultats sont donc interprétables) → **notre PCR a donc marché.**

DONC, petit récap, sur notre gel on vérifie deux choses :

- Que nos marqueurs sont bien présents et « étalés » et que nos amplicons font la taille qu'on voulait
- Si on a fait la PCR de fragments de 300 pdb, on s'attend à voir des traits à 300pdb
- **MAIS SURTOUT ET EN PREMIER**, on vérifie le témoin négatif pour être sûr que nos tubes ne sont pas contaminés !

IV - La PCR en temps réel :

1.Principe

Dans une **PCR classique**, on réalise environ **35 à 40 cycles de dénaturation, hybridation et élongation**.

→ L'ADN est amplifié de façon exponentielle, mais on **n'analyse le résultat qu'à la fin de tous les cycles**, généralement en faisant une électrophorèse sur gel. On observe donc uniquement la présence ou l'absence d'un fragment d'ADN amplifié, sans suivre la réaction au fur et à mesure.

En PCR en temps réel (ou PCR quantitative, qPCR), on retrouve exactement les mêmes étapes (dénaturation, hybridation, élongation) et les mêmes réactifs que pour la PCR classique (ADN matrice, amorces, polymérase, nucléotides).

→ La différence est qu'on ajoute un agent fluorescent spécifique de l'ADN double brin, le **SYBR Green**.

→ **Étapes :**

- Lors de **l'hybridation** : le SYBR Green commence à s'intercaler entre l'amorce et l'ADN, et devient fluorescent.
- Lors de **l'élongation** : l'ADN double brin est synthétisé et le SYBR Green s'intercale dans la nouvelle molécule → la fluorescence augmente.
- **À la fin de chaque cycle**, un automate mesure l'intensité de fluorescence dans chaque puits.

Comme le **SYBR Green n'est fluorescent que lorsqu'il est intercalé dans de l'ADN double brin**, la fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la quantité d'ADN produit.

Ainsi, la **PCR en temps réel permet de suivre l'amplification cycle après cycle**, contrairement à la PCR classique qui ne donne qu'un résultat final.

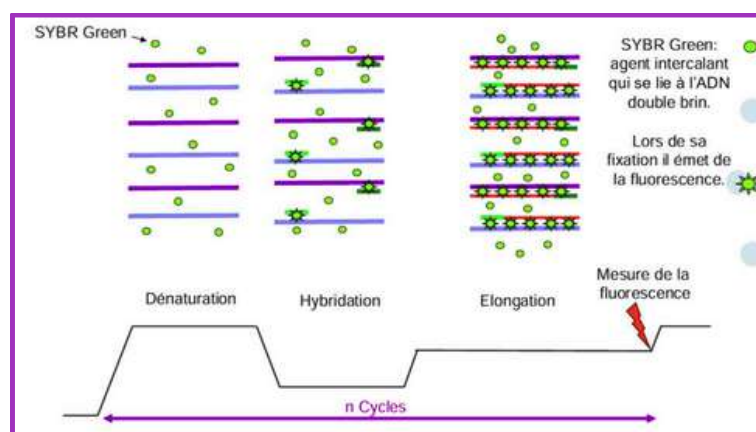
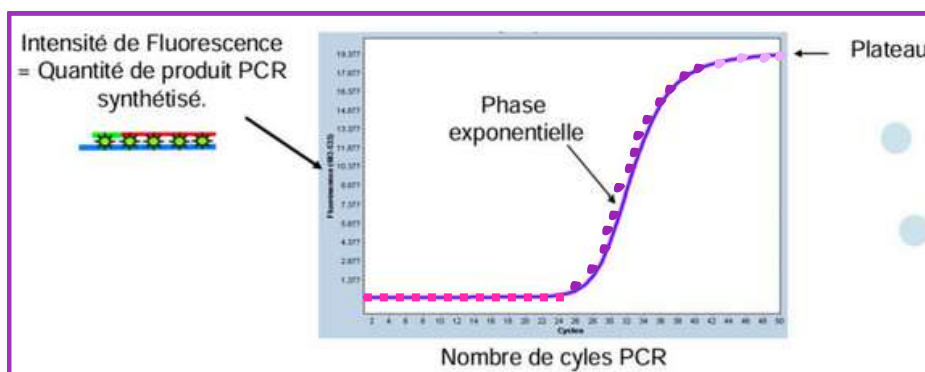


Tableau récap des différences entre PCR classique et PCR en temps réel :

Aspect	PCR classique	PCR en temps réel (qPCR)
Principe	Amplification de l'ADN, analyse seulement à la fin	Amplification de l'ADN suivie en direct à chaque cycle
Réactifs	ADN matrice, amorces, Taq polymérase, nucléotides	Même réactifs + SYBR Green (fluorescent quand lié à l'ADN double brin)
Agent intercalant	Bromure d'éthidium → donne une coloration rose (visualisation post-PCR)	SYBR Green → donne une coloration verte (visualisation en temps réel)
Détection	Gel d'agarose + UV (après 35-40 cycles)	Fluorescence mesurée après chaque cycle par un automate
Information obtenue	Présence/absence et taille des fragments	Quantité d'ADN produite à chaque cycle (quantification)
Résultat	Bande(s) d'ADN visible(s) sur gel	Courbe de fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN



La mesure de cette fluorescence permet de dessiner la courbe cicontre qui correspond à l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

On observe :

- Une **première phase** de plateau où la fluorescence est très basse : il n'y a pas suffisamment de produit PCR produit pour qu'elle soit détectable
- Une **phase exponentielle** où la fluorescence augmente.
- Une **phase de plateau** : à environ 40 cycles le système est saturé. Même en augmentant le nombre de cycles, on n'aura pas plus de produits PCR car il n'y a plus les éléments nécessaires à son fonctionnement = on a épuisé notre système (il n'y a plus de dNTP, la Taq Polymérase ne fonctionne plus car même si elle résiste à de fortes températures au bout d'un moment elle ne va plus très bien fonctionner).

2. PCR en temps réel = PCR quantitative

La PCR en temps réel est une PCR quantitative, elle permet de quantifier la quantité d'ADN mise au départ.

- On voit ci-dessous que les courbes sont décalées en fonction de la quantité initiale d'ADN.
- Si on fait des dilutions de 10 en 10 de la quantité d'ADN (de $1\mu\text{g}$ à $0,0001\mu\text{g}$) on voit un décalage de la courbe et surtout de la phase exponentielle. Si on met beaucoup d'ADN génomique au départ, il faudra moins de cycles pour obtenir une quantité suffisante d'ADN pour que la fluorescence soit détectable.

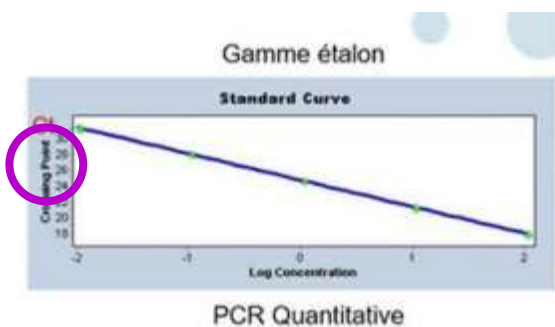


- Si **on mesure au bout de 35-40 cycles (phase de plateau)**, comme en PCR classique : l'intensité des bandes varie très peu. La quantité finale de produit PCR générée est identique quelle que soit la quantité initiale d'ADN génomique utilisée. Ce n'est pas quantitatif.

On voit bien qu'au niveau de la phase de plateau, toutes les courbes sont au même niveau donc on ne peut pas savoir combien d'ADN on a mis au départ.

- Alors que **si on mesure le nombre de cycles au début de la phase exponentielle**, on obtient une mesure quantitative : on quantifie l'ADN de départ.

On voit que la phase exponentielle est atteinte à différents moments pour chaque courbe car on a vu que plus on a d'ADN au départ, plus on atteint vite cette phase.



La relation entre logarithme de la quantité initiale d'ADN et Ct (le nombre de cycle nécessaire pour détecter la fluorescence) est **linéaire**.

On définit un **Ct (cycle threshold)** : le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence franchisse un seuil de détection.

Quand on fait une courbe d'étalonnage, on trace **la droite de la concentration en ADN en fonction du nombre de cycles on voit qu'il y a une proportion linéaire** entre la quantité d'ADN génomique de départ et le nombre de cycle qu'on met à atteindre la phase exponentielle : il y a 3,3 cycles d'écart pour un facteur 10 entre les concentrations d'ADN de départ.

+++ : Pour 10 fois plus d'ADN de départ, on met 3,3 cycles de moins à l'atteindre +++

Pourquoi faire une « gamme étalon » ?

→ On connaît la concentration d'ADN et en regardant le nombre de cycles à partir duquel on a commencé à mesurer de la fluorescence, on peut déterminer la quantité d'ADN de départ qui nous est inconnue, par comparaison.

Ici, j'ai repris les explications de ma vieille (Namasté <3) qui sont juste géniales concernant la gamme étalon dans la PCR quantitative.

→ Plus on a d'ADN au départ dans notre échantillon, plus on détecte vite la fluorescence et c'est logique car plus d'ADN = plus de SYBR green qui s'intercale = plus de fluorescence

→ Une fois qu'on détecte la fluorescence, on est au début de la phase exponentielle. C'est donc à ce stade qu'on voit une différence entre les tubes en fonction de la quantité d'ADN.

Par exemple, je fais un cycle = pas de fluo ; 2 cycles = pas de fluo ; ... ; jusqu'à avoir un cycle où j'ai de la fluorescence dans un tube mais dans les autres tubes non = j'en conclus que dans ce tube il y a plus d'ADN de départ que dans les autres ; ensuite je continue et j'arrive à la fin à avoir une idée de combien contenait d'ADN chaque tube (tube 1 plus que tube 4 plus que tube 3 ...) = PCR QUANTITATIVE !!

+++ Tout ceci est proportionnel : on a pu démontrer que pour 10 fois plus d'ADN de départ, on met 3,3 cycles de moins à l'atteindre +++

→ Maintenant pour réellement connaître/chiffrer la concentration d'ADN de départ de chaque tube, on a fait « une gamme étalon », c'est-à-dire qu'on a fait une PCR quantitative à des tubes dont la concentration d'ADN était connue.

*→ Par exemple : **tube 1 = 1µg** et **tube 2 = 0,1µg**. On remarque de la fluorescence **dans le tube 1 à 14 cycles** et **dans le tube 2 à 16 cycles**.*

*→ Donc, à présent, si on part d'un tube dont on ne connaît pas la concentration de départ et qu'on voit de la fluo à 14 cycles = on en conclue qu'il y avait **1 µg d'ADN de départ**.*

J'espère que c'est compris, si jamais ce n'est pas le cas, on n'hésite pas → go forum <33

3. Applications

La PCR en temps réel est utilisée à partir du moment où on veut quantifier de l'ADN ou de l'ARN pour connaître :

1. Nombre de copies d'un gène
2. Expression d'un ARNm
3. Charge virale

Quand on travaille sur l'ARN on retrouve les étapes vues précédemment mais on ajoute au départ une étape de reverse transcription (car l'ADN polymérase ne travaille que sur l'ADN) pour avoir un ADN simple brin qui pourra être directement utilisé pour la PCR quantitative. **On transforme alors notre ARN en ADN.**

VI- La digestion enzymatique :

Combiné à la PCR, nous allons utiliser une autre technique très utile en biologie moléculaire : la **digestion enzymatique**.

Elle est possible grâce à des **enzymes de restriction**, qui sont des **endonucléases bactériennes**, et qui coupent l'ADN double brin de manière très spécifique.

→ Elles vont **reconnaître et couper** une séquence d'ADN lorsqu'elles la reconnaissent.

→ C'est une **coupure reproductible** et spécifique d'une séquence nucléotidique.

→ On connaît aujourd'hui plus de 500 enzymes de restriction différentes qui reconnaissent donc des sites différents. Leur nom est dérivé des bactéries à partir desquelles on les a purifiées.

Elles ont une nomenclature particulière :

EcoRI	
Escherichia coli R y13	
E : initiale de l'espèce bactérienne	R : souche
co : genre de la bactérie	I : n° d'ordre de découverte de l'enzyme dans une même bactérie
<u>Exemples :</u>	
<i>PvuII (Proteus vulgaris)</i>	
<i>BamHI (Bacillus amyloliquefaciens H)</i>	
<i>HaeIII (Haemophilus aegyptius)</i>	

C'est **grâce à cette découverte** accompagnée de celle de la PCR que la biologie moléculaire a pu connaître un tel essor et prendre une plus grande place au sein de la médecine ces dernières années.

Il existe **3 types d'enzymes de restriction** que l'on différencie en fonction de leur manière de couper. Elles peuvent **couper à distance ou non** de la séquence nucléotidique reconnue et avec un mode de coupure différent.

On se sert principalement des enzymes de restriction **de type II (dont EcoRI)** :

- Reconnaissance de 4 à 8 paires de bases
- L'enzyme coupe l'ADN au niveau de la séquence reconnue
- Les séquences reconnues sont dites palindromiques car elles sont lues dans les 2 sens : GG-AA ou AA-GG

La prof précise : « Ici peu importe de retenir le terme palindromique ou si c'est GGAA ou CCAA mais ce que vous devez retenir c'est qu'en fonction de l'enzyme que vous allez utiliser, vous allez reconnaître une séquence différente et que votre enzyme sera capable de couper l'ADN double brin » → vous devez **COMPRENDRE** au lieu d'apprendre des trucs un peu nuls par cœur (plutôt chouette non ?)

On parle **d'isoschizomères** lorsque deux enzymes reconnaissent la même séquence mais qu'elles sont extraites de bactéries différentes.

Les enzymes de restrictions de type II permettent 2 types de coupures :

Bout francs (Blunt ends)

Ex : Hae III

La coupure se fait au même endroit sur les deux brins, **exactement en face** l'une de l'autre.

→ Ces types de coupures sont plus compliquées à recoller par les ligases que les coupures à bouts cohésifs.

Bout cohésifs (Sticky ends)

Ex : EcoRI

Les coupures sont **au même endroit en termes de nucléotides (ici, entre le G et le A) mais pas en face** lorsque l'on regarde nos deux brins finaux (elles sont en décalées).

→ Nous avons donc des extrémités, avec l'une plus grande que l'autre, ce qui la rend simple brin. Ces extrémités simple brin vont avoir tendance à chercher un autre brin d'ADN puisque l'ADN est trop instable dans cet état.

→ Le fait que ces extrémités simple brin "dépassent" peut être utilisé pour commencer l'hybridation d'un morceau d'ADN ou le coller à un autre bout d'ADN par exemple.

Coupures à bouts francs (blunt ends)

HaeIII



Coupures à bouts cohésifs (sticky ends)

EcoRI



On **recolle** des brins d'ADN grâce à des enzymes T4 **ligase**.

On **relie plus facilement des bouts cohésifs** que des bouts francs. (Car avec cette coupure l'ADN devient simple brin et est donc plus facile à recoller à un autre)

VII- Achondroplasie :

1. Généralités

C'est une **maladie rare**, mais qui **reste la plus fréquente des chondrodysplasies (1/15 000)**.

Les chondrodysplasies sont des maladies qui touchent les **cartilages** (extrêmement importants pour la croissance osseuse).

Le diagnostic est **quasiment toujours évoqué sur signes d'appel échographiques** (« fémurs courts »), notamment lors de l'échographie du 2e trimestre qui vise à chercher des signes malformatifs et des anomalies morphologiques chez le fœtus.

(Il y a 3 échographies dans une grossesse, une par trimestre)

2. Signes cliniques

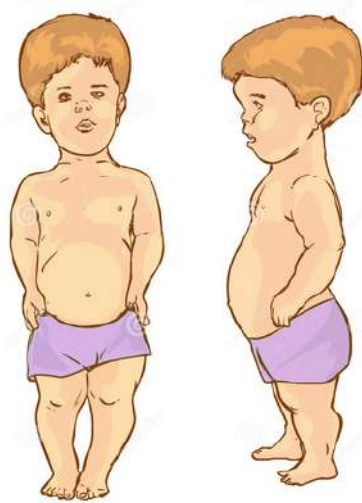


Lors de la surveillance d'un fœtus, on réalise des mesures, ce sont des biométries fœtales, dans lesquelles on mesure la taille des os longs et notamment des fémurs.

→ Chez un fœtus achondroplase, les fémurs seront beaucoup trop petits par rapport à la taille des fémurs habituels. D'autres symptômes vont s'ajouter à celui-ci.

→ La seule manière de faire le diagnostic d'achondroplasie est par **biologie moléculaire**.

Les fémurs trop courts c'est un signe d'appel échographique = on se dit qu'il faut rechercher la maladie chez le fœtus. Mais pour la diagnostiquer = être certain qu'il est atteint, ça passe par la biologie moléculaire.



L'achondroplasie résume plusieurs choses :

- **Petite taille** / nanisme : 130 cm
- **Hyperlordose** = courbe excessive de la colonne vertébrale
- Mains courtes
- **Macrocéphalie** (signe d'appel échographique) = Augmentation anormale du volume de la tête
- **Dysmorphie faciale** : front haut, ensellure nasale marquée
- **+++ Intelligence normale +++**
- **Complications neurologiques** : myélopathie = atteinte dont compression de la moelle

3. Transmission

On en a déjà parlé dans l'introduction pour illustrer la néomutation.

C'est une maladie monogénique, qui se transmet selon un mode autosomique dominant (il suffit que l'un des deux allèles soit muté pour que l'enfant développe la maladie).

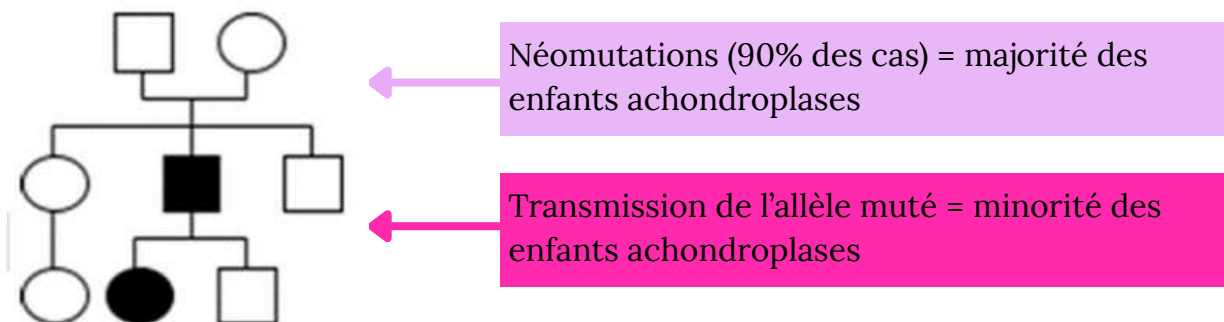
Ceci s'explique par le fait que **dans la majorité des cas**, cette maladie est due à une **néomutation**, qui apparaît lors du stade embryonnaire.

Cet individu sera ensuite capable **de la transmettre dans la minorité des cas**.

→ Je m'explique : En gros, dans la majorité des cas, les enfants achondroplases naissent à cause des néomutations. Sachant que cet allèle muté est dominant, l'individu achondroplase transmet tout le temps la maladie à ses enfants. Cependant, les enfants achondroplases qui naissent car on leur a transmis l'allèle muté représentent la minorité des cas.

→ Qu'est ce que ça représente sur un arbre ?

- Un individu atteint a 1 risque sur 2 (= 50%) de transmettre la maladie, et donc 1 chance sur 2 de ne pas la transmettre à sa descendance (1 allèle sain et un muté).
- Néanmoins, 90% des enfants atteints d'achondroplase naissent de parents non atteints.



Les formes **homozygotes sont plus graves que les hétérozygotes**, mais ces formes ne se voient pratiquement plus aujourd'hui. (Car pour une néomutation il y a très peu de chance que la même mutation apparaisse sur les deux allèles)

4. Génétique

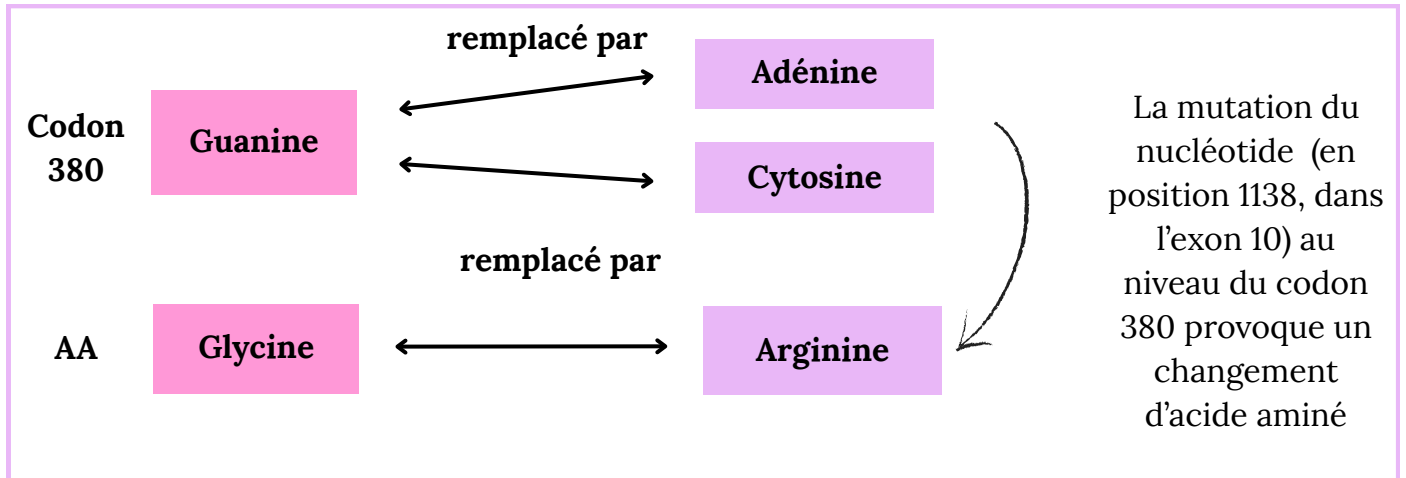
On peut faire aujourd'hui le **diagnostic d'achondroplase** génétiquement puisqu'on connaît le gène responsable : il s'agit de **FGFR3** (Fibroblast Growth Receptor 3) qui code pour le récepteur d'un facteur de croissance fibroblastique.

Ce **facteur de croissance** est exprimé dans les **chondrocytes** (cellules du cartilage), et il régule la différenciation des ostéoblastes et **joue un rôle majeur dans la formation osseuse**. Ce gène est donc très important pour la croissance normale des individus.

Dans le cas de l'achondroplasie, c'est toujours la même anomalie qui est responsable.

C'est ce qui en fait un cas très simple en termes de diagnostic parce que dans la très grande majorité des maladies génétiques, nous retrouvons des mutations différentes ou mêmes des gènes complètement différents.

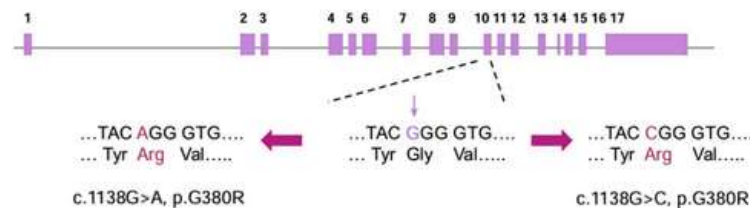
Dans l'achondroplasie, c'est toujours **le codon 380** du gène FGFR3 (15 kB, avec 17 exons) qui est muté :



La mutation s'effectue sur le 1er G du codon 380 (GGG) qui code pour une glycine.

- Si on a la guanine remplacée par une adénine, la glycine est remplacée par une arginine (AGG)
- Si on a la guanine remplacée par une cytosine, la glycine est remplacée par une arginine (CGG)

Ces deux mutations ont **la même traduction protéique**, donc dans les deux cas on a une glycine remplacée par une arginine qui donnera la même maladie : l'achondroplasie.



+++ En résumé, on a : 2 mutations, toujours au même endroit, qui donnent toujours la même traduction mutée +++

Nomenclature : c. = ADN codant (c pour codant), on parle d'un codon codant donc situé dans un exon → on numérote les nucléotides en démarrant du A de l'ATG, on ne tient compte que des exons dans cette numérotation et lorsqu'on passe d'un exon à un autre, on continue la numérotation (ex : le dernier codon de l'exon 1 est le n°50, le 1er codon de l'exon 2 sera le n°51).

Donc, **la numérotation est continue uniquement sur la séquence codante.**

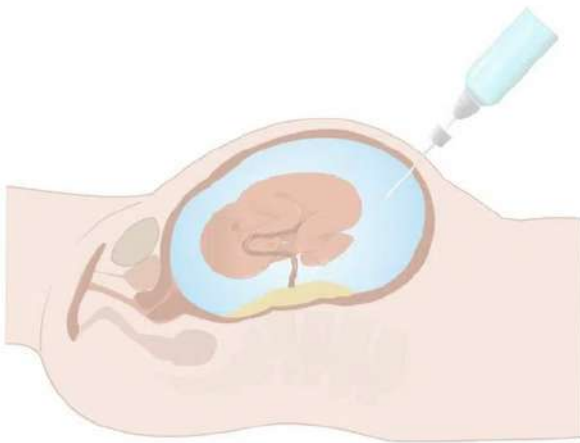
5. Diagnostic et cas clinique

Dans cette partie, on cherche à appliquer les techniques vues précédemment pour diagnostiquer une maladie génétique, ici l'achondroplasie (= cas clinique).

Le diagnostic est souvent fait en prénatal parce qu'on reconnaît des signes d'appel échographiques comme des os courts et notamment les fémurs courts qui font suspecter l'achondroplasie.

Devant un signe d'appel échographique :

A. Prélèvement amniotique et extraction de l'ADN des cellules fœtales



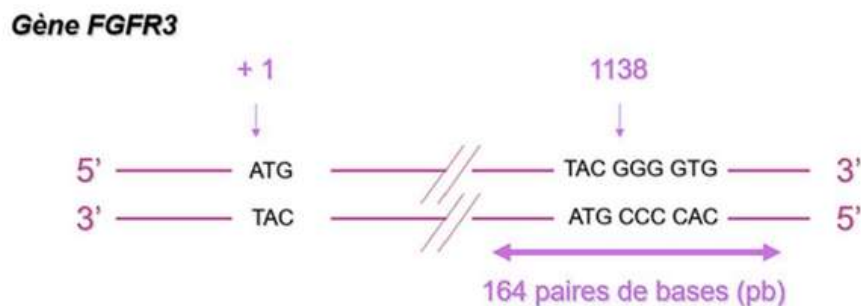
Grâce à une **ponction amniotique** (quelques mL, vers le 6^e/7^e mois), on récupère du liquide amniotique dans lequel baignent des cellules amniotiques provenant de la desquamation de la peau du fœtus ou de l'épithélium urinaire.

On extrait de l'ADN fœtal de ces cellules. (La technique d'extraction est celle vue au début du cours.)

B. Amplification de l'ADN fœtal extrait par PCR

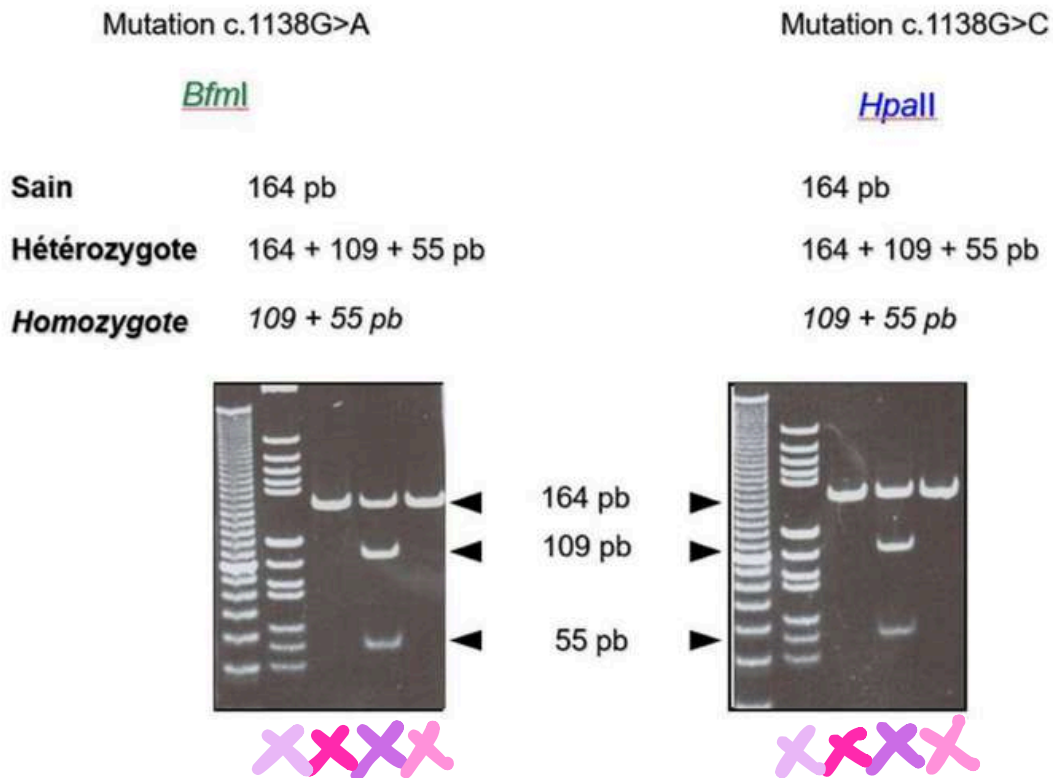
C'est donc l'amplification par PCR d'un fragment d'ADN (amplicon) de **164 paires de bases en encadrant la position 1138 au niveau du codon 380**, position où siège l'une au l'autre des mutations.

⚠ Il faut bien choisir nos primers pour qu'ils encadrent le fragment d'ADN ciblé. ⚠



E. Vérification de la digestion enzymatique sur gel

Une fois la digestion faite, il faut analyser les produits obtenus sur gel analytique avec une électrophorèse.



On retrouve à chaque fois : (dans l'ordre de gauche à droite)

- ✗ La **colonne de marqueurs de poids moléculaire**
 - ✗ Une **piste avec un fragment de 164 pb** → amplicon foetal non digéré
 - ✗ Une piste avec **l'ADN foetal** après digestion avec :
 - **Allèle sain/sauvage/wild type** du foetus = 1 fragment de 164 pdb (**non reconnu** par l'enzyme)
 - **Allèle muté** : on a 2 fragments de poids moléculaire différents → un plus lourd (109 pdb) et un plus léger (55 pdb), la somme de ces deux fragments est de 164 pdb, taille initiale de notre allèle muté (reconnu par l'enzyme)
 -
- On peut donc en conclure que l'enzyme a coupé notre allèle car il y a eu un site de reconnaissance : l'allèle est muté → le foetus porte la mutation définie selon l'enzyme utilisée. La mutation est donc **hétérozygote** chez ce foetus. (Si elle avait été homozygote, tout aurait été coupé et on n'aurait plus du tout de trait à 164 pdb.)
- ✗ La **dernière piste** est un **ADN contrôle digéré chez un foetus non achondroplase** donc ses amplicons feront 164 pdb. (Sinon c'est qu'il y a un problème, c'est encore ici une vérification)

Si on obtient cette électrophorèse suite à la digestion par BfmII alors la mutation est G → A.

Si, au contraire, on l'a avec HpaII, alors on a la mutation G → C.

À l'inverse, un fœtus G → A ne sera pas reconnu et donc pas digéré/coupé par HpaII, et un fœtus G → C ne sera pas reconnu et donc pas digéré/coupé par BfmI.

Le raisonnement est le même pour les deux enzymes, mais selon si on l'applique pour BfmI ou HpaII, on pourra savoir à quelle mutation on a à faire.

+++ En regardant quelle enzyme de restriction va couper, on peut savoir si le fœtus est atteint d'achondroplasie et quel est le changement nucléotidique. +++

F. Vérification par séquençage

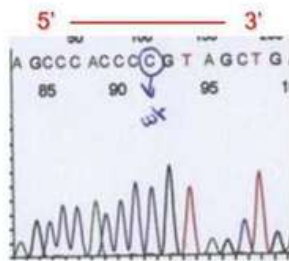
En biologie moléculaire, et surtout quand il s'agit de diagnostic prénatal, on essaie toujours d'avoir une **technique de confirmation** du résultat. = diagnostiquer la maladie avec une deuxième technique pour être absolument certain du résultat

→ L'une de ces techniques de confirmation qui a beaucoup évolué ces dernières années, c'est le séquençage. On peut, par **technique de séquençage de type Sanger**, lire directement la séquence des gènes.

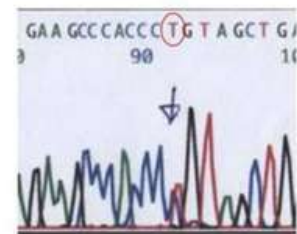
Bien faire attention : Les nucléotides sont inversés (G en C et A en T et inversement) car c'est le brin complémentaire qui est lu.

Ici, nous sommes dans une région de l'exon 10 du gène FGFR3.

Wild-type



Mutation c.1138G>A
hétérozygote



Si l'individu est **sain**, sans achondroplasie, on aura **un seul pic**, l'automate ne va lire qu'un nucléotide, le C (donc G par complémentarité).
Ses deux exons 10 seront sauvages.

Si un patient est **achondroplase**, le profil est différent : on va bien lire GATG, mais lorsqu'on arrive à une position normale d'un C (par complémentarité un G), il y a **un deuxième pic qui se superpose**, pic correspondant à un T et par complémentarité à un A : la mutation est donc un G → A.

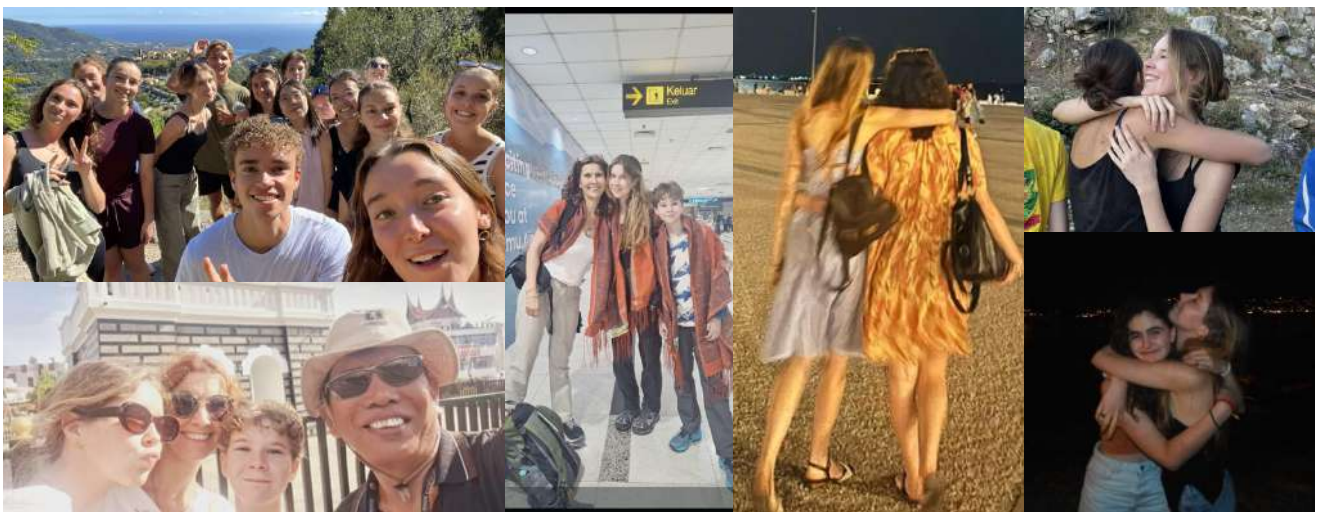
Le séquençage est **quelque chose d'extrêmement important**, qui a beaucoup évolué ces dernières années. Nous avons des possibilités énormes avec ce que l'on appelle le séquençage haut débit ou NGS. *(Le séquençage est détaillé dans le troisième cours !!)*

Maintenant place au meilleur moment de la fiche (comme d'habbb), c'est-à-dire les dédis :

- Dédi à toi !! Bravo d'avoir lu ce cours (ou pas si tu lis les dédis avant mais je faisais pareil je comprends), je sais qu'il est long avec beaucoup d'infos mais tu vas voir qu'avec des QCM, il passe tout seul ! Félicite toi → goûter, petite vidéo YouTube, appel avec un proche, petite marche, bref ce que tu veux

Je sais que le rythme va commencer à s'intensifier, surtout pense à prendre des moments pour te poser car c'est essentiel pour tenir le semestre. Travaille bien, sois consistant et tu vas réussir, tout le Tutorat croit en toi (si ça va pas, parles en à qui tu veux : famille, amis, parrains, même tuteurs...) <3

- Dédi à toute ma petite famille et à mon trio de toujours (LES BILLETS SONT PRIS)
- Dédi aux Dodier du Nord, car vous me manquez trop les couz et j'espère revoir bientôt le sol picard rempli d'éoliennes 😊 (Karima Shaptidai)
- Dédi à ce monsieur passionné par les cailloux et les criquet hérissons, merci pour le canyoning, la via ferrata, pour les billets de train pour Gênes et pour ma Maman
- Dédi à Nana, mon chat l'amour de ma vie, même si tu vas bientôt croûler sous ta propre graisse, je t'aime quand même et tu es la plus belle du monde #bodypositive
- Dédi à Janter, parce que danser la danse des Bataks avec toi en haut d'une colline sur le Lac Toba est le plus beau souvenir de mon été
- Dédi à Abdi, j'espère que tu t'éclates dans ton voyage et que tu seras bientôt Abdi in Paris
- Dédi à toutes mes fillôtes (Claire, Julie, Sixtine, Aisha et Nina → vous allez gérer les filles, je crois fort fort en vous), à ceux de Iris, et à Sara (je sais que tu vas réussir !)
- Dédi à tous les P1 que j'ai rencontrés à la journée Peps, notamment Angela et Mike, vous allez gérer c'est sûr <3
- Dédi à toutes les rencontres folles du Tutorat, mais quelle équipe de malade, je vous aime tous trop trop
- Dédi à tous les gens du théâtre Antibéa (Andréa, Léa, JP mon mentor..), ma safe place pour toujours
- Dédi à la BU de Valrose, deuxième safe place absolue
- Dédi au thé, au chocolat, au chaï latté, aux crêpes de mon père, aux tartes à la tomate de Maman et aux carottes cumin (Iris saura)



Accrochez vous, ce sera ça l'été après votre P1, alors ça vaut le coup, courage <3