

# **Cours 1 UE 11**

## **Méthodes et principales techniques de biologie moléculaire**

# I- Analyse du matériel génétique :

- A partir d'acides nucléiques
- Quelques microgrammes
- N'importe quelle **cellule NUCLEE**
- Techniques de biologie moléculaire **très sensibles** permettant de une **analyse moléculaire ciblée à partir d'une seule cellule**

**Différence de stabilité entre ARN et ADN mais tous deux sont vulnérables à la digestion par les nucléases (DNAses et RNAses) une fois la cellule lysée++**

**ATTENTION les GR n'ont PAS DE NOYAU, on ne peut pas s'en servir pour prélever de l'ADN !! +++**

# **Plan :**

## **I- Analyse du matériel génétique**

- 1- Extraction de l'ADN
- 2- Extraction de l' ARN
- 3- PCR
- 4- Digestion enzymatique

## **II- Biologie moléculaire et génétique médicale**

L'achondroplasie

## **III- Séquencage de l'ADN**

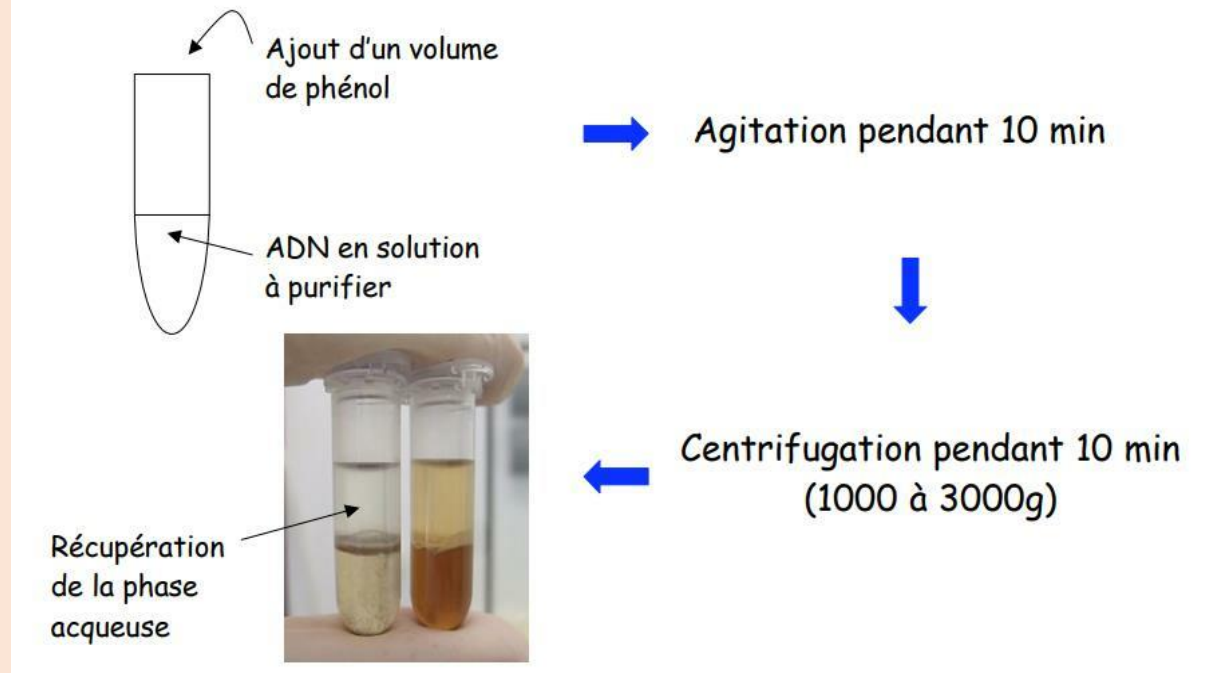
## On peut extraire de l'ADN à partir de :

- **Sang** ( les globules BLANCS, pas les GR qui n'ont pas de noyaux !! ++)
- **Tissus**
- **Cellules amniotiques** -> diagnosctic prénatal
- **Follicules pileux**
- **Coupes en parafine**

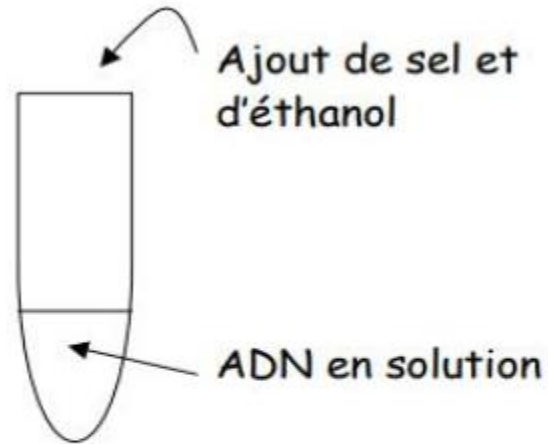
# 1- Extraction de l'ADN : 5 étapes à connaître

- A partir de sang total :

1. quelques ml de sang total sur **anticoagulant** (**EDTA** ou acide éthylène diamine tétracétique)
2. **lyse des globules rouges** avec une solution **hypotonique**
3. récupération du culot de leucocytes lavé et **resuspendu** dans un mélange de **détergent** et de **protéinase K**
4. **extraction phénol-chloroforme** : pour éliminer les protéines en utilisant la solubilité différentielle des molécules (ADN/Protéines) entre 2 phases non miscibles



## 5. Précipitation éthanol : 2,5 volumes d'éthanol à 95° froid (-20°) en présence de sel



Apparition d'une « méduse » d'ADN



Récupération de la méduse  
lavée en éthanol 70°

- Resuspension en  $T_{10}E_1$   
(Tris<sub>10</sub>mM E<sub>1</sub>mM)
- Dosage par mesure de la DO  
1 Unité DO 260nm = 50µg/ml d'ADN
- Conservation à 4°  
(DNAthèque)



## L'ARN:

Il est plus représentatif de ce qui est exprimé dans les cellules, donc des protéines produites

L'ARN a des avantages : reflet plus exact des protéines

MAIS à cause de son instabilité, on utilisera plutôt l'ADN génomique en routine +++

## 2- Extraction de l'ARN

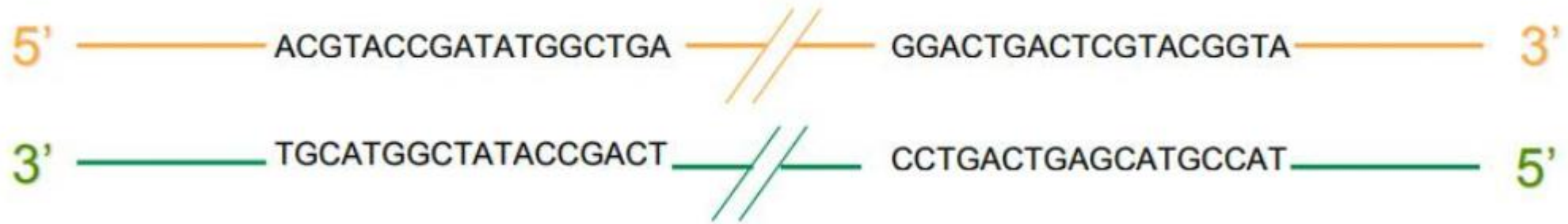
- Plus difficile à étudier que l'ADN car très sensible aux ribonucléases (RNase A)
- Peu utilisé en diagnostic de routine
- **Homogénéisation des cellules ou des tissus dans un tampon** permettant: ~~d'inhiber les RNases endogènes, de dénaturer les acides nucléiques, de dégrader les protéines~~
- Extraction réalisée avec une solution permettant l'**extraction différentielle ARN/ADN**
- **Extraction des ARN polyA<sup>+</sup> : 1% des ARN totaux**, purification par affinité en passant les ARN totaux sur une ~~colonne d'oligo-dT cellulose~~ qui va **fixer les ARN poly A<sup>+</sup>**. Après lavage, les ARN poly A<sup>+</sup> sont élués par **abaissement de la force ionique**.  
La ~~précipitation~~ est ensuite réalisée avec de l'**alcool éthylique absolu froid**.
- L'étude des ARN permet d'analyser ~~l'expression d'un gène~~.



### 3 - Amplification en chaîne par la polymérase (PCR)

- Technique de base dans un laboratoire de biologie moléculaire
- Amplifie une **REGION SPECIFIQUE d'ADN** +++
- Permet d'obtenir en **grande quantité une région d'ADN** à étudier
- On part d'une **molécule d'adn double brin** pour obtenir à la fin une **grande qtté d'adn amplifié**++
- Il suffit de connaître les séquences de 18-20 nucléotides avant et après le séquence qu'on veut amplifier = **bornes d'AMONT et d'AVAL**
- Utilise la **Taq polymérase**, qui est **thermostable** (résiste à la chaleur)
- Technique **très sensible** -> **Risque de contamination** +++++

Borne d'amont



Borne d'aval



*Amplification d'un fragment d'ADN double brin de 150pb à 3kb*

Borne d'amont = 18-20 nucléotides en amont de la région à amplifier

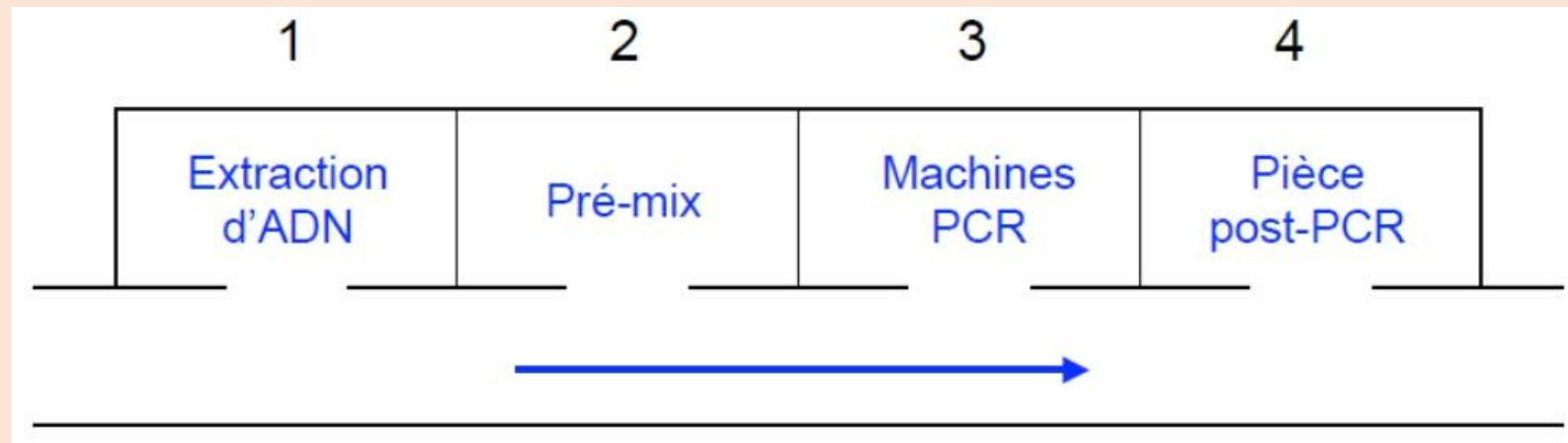
Borne d'aval = 18-20 nucléotides en aval de la région à amplifier

# A. Matériel de la PCR

Pour réaliser une PCR, il faut mettre dans un **automate** :

- L'**ADN** du patient en **petite quantité**
- **2 amorces = primers**
- Des **désoxyribonucléotides** (= dNTPs)
- Un **tampon MgCl<sub>2</sub>** (pour stabiliser les polymérases)
- La **Taq Polymérase**: c'est une **ADN polymérase**

**Risque de contamination qui nécessite un circuit monodirectionnel, indispensable pour l'agrément +++**



# B. Étapes de la PCR

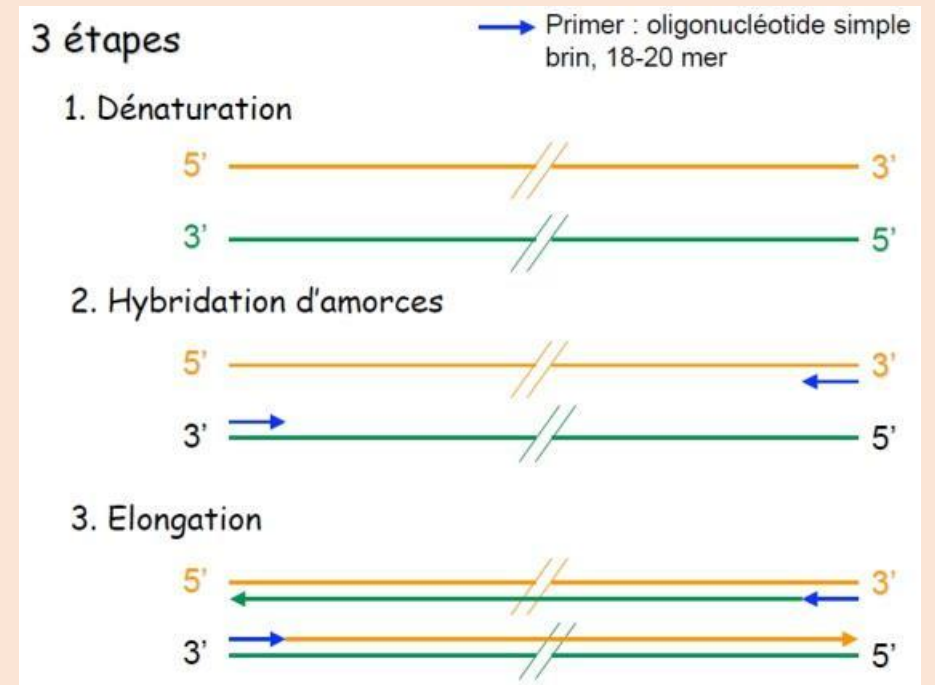
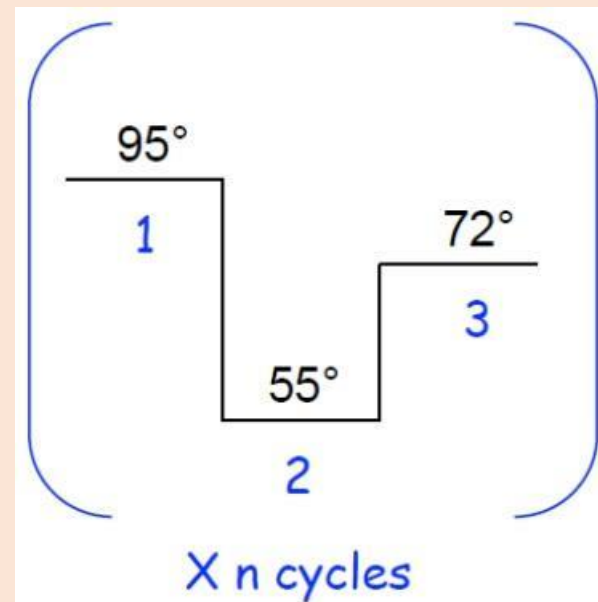
La PCR est un cycle de **trois étapes répétées n fois** qui permet l'amplification **exponentielle** du matériel génétique, de telle sorte qu'au bout de **n cycles** on obtiendra  **$2^n$**  molécules d'ADN !

La PCR est une amplification exponentielle générant  **$2^n$**  molécules d'ADN au bout de **n cycles** ++++

1- Dénaturation (95°C)

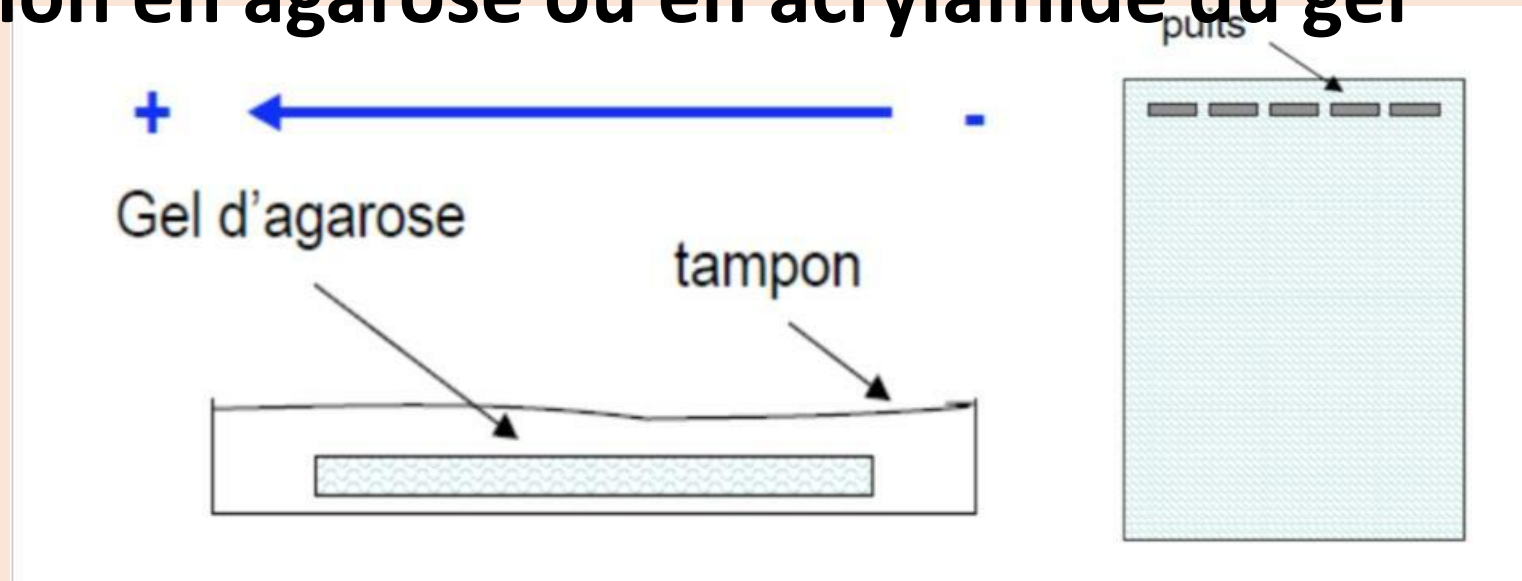
2- Hybridation (55°C)

3- Elongation (72°C)

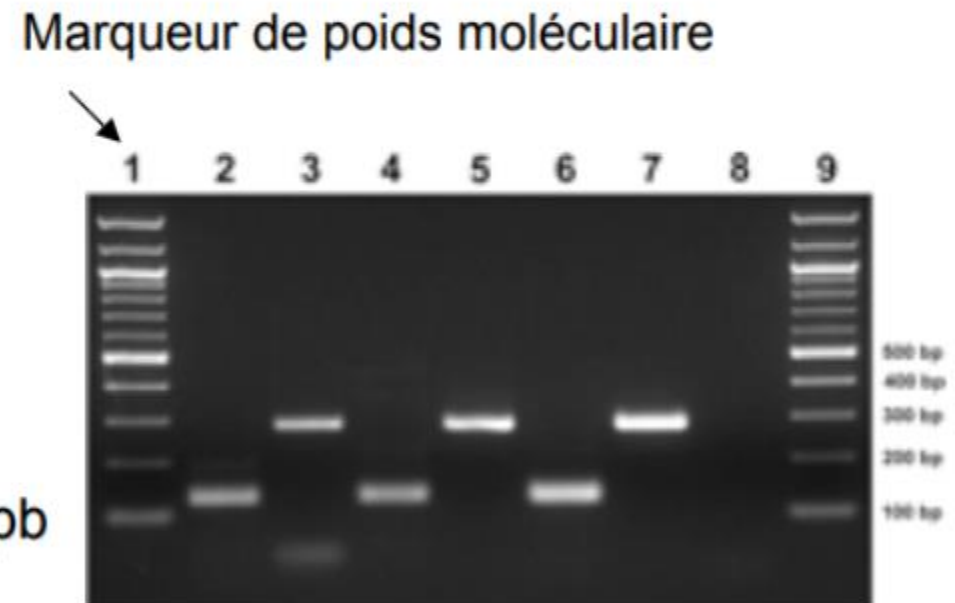
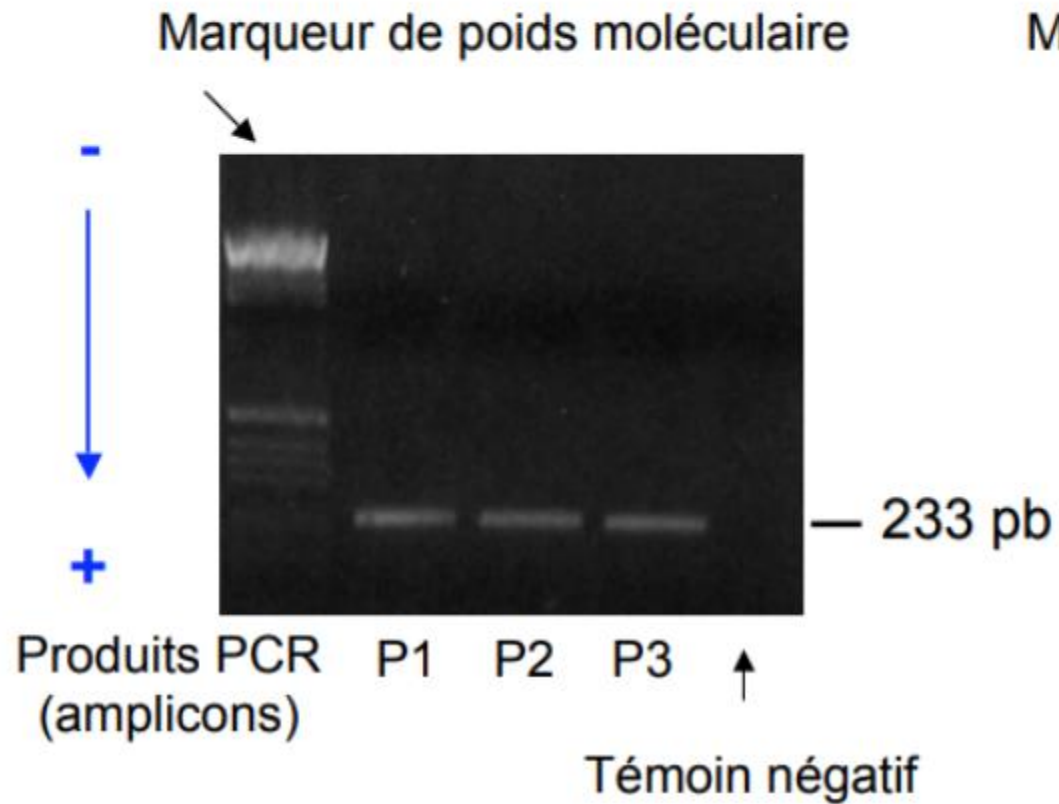


## C. Vérification sur gel analytique (électrophorèse)

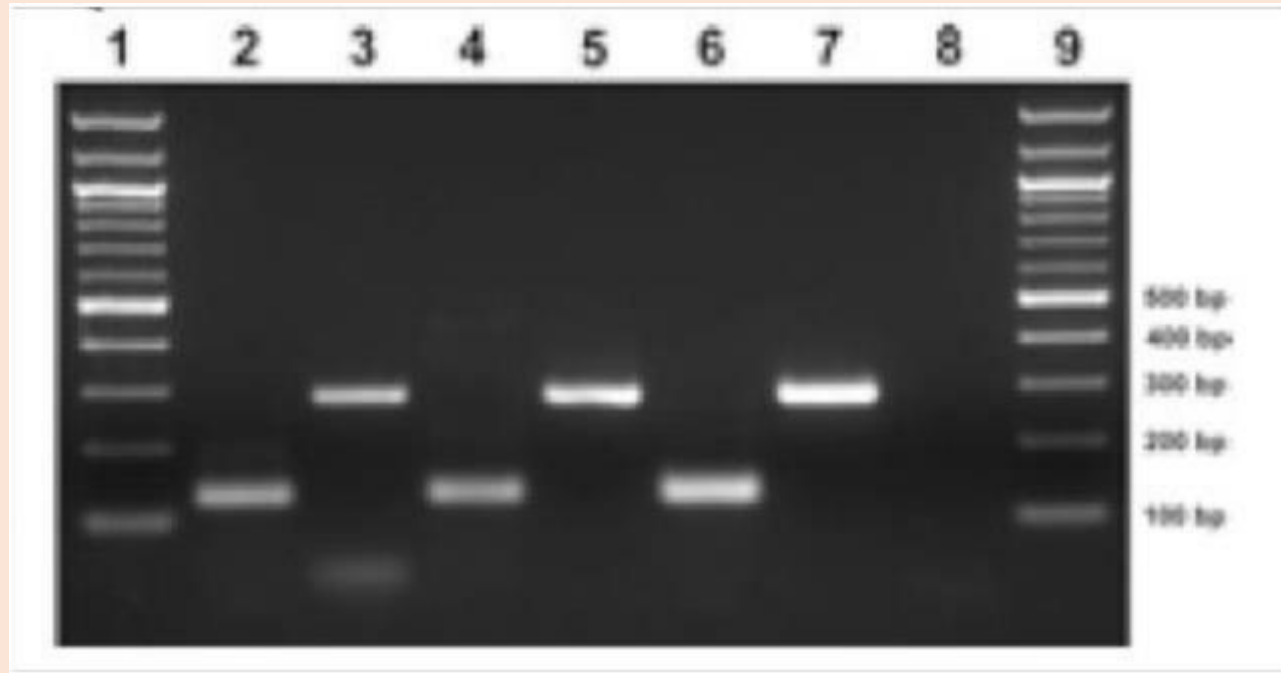
- Analyse des produits d'amplification
- Gel d'agarose ou d'acrylamide
- Champ électrique (- => +)
- La **vitesse de migration** d'une molécule d'acide nucléique sera fonction : de sa **masse moléculaire** (nbre de pb) et de la **concentration en agarose ou en acrylamide du gel**



- Après migration, coloration au bromure d'éthidium
- Visualisation sous lumière UV



# Interprétation de l'électrophorèse



Les **colonnes 1 et 9** sur l'électrophorèse sont des **marqueurs de poids moléculaire**

**On regarde en premier le témoin négatif (ici colonne 8) : on y a mis tous les éléments sauf l'ADN, La colonne du témoin négatif doit toujours rester vide sinon il y a contamination et l'électrophorèse est ininterprétable ! +++**

## 4 - Digestion enzymatique

### Enzyme de restriction :

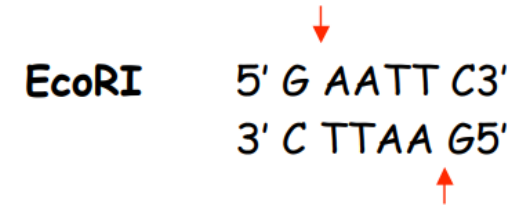
- **ENDOnucléases bactériennes** qui coupent l'ADN double brin
- **Coupure reproductible et spécifique** d'une séquence nucléotidique
- Elle détruit les **liaisons PHOSPHODIESTERS** (entre 2 nucléotides)
- Plus de 500 enzymes différentes



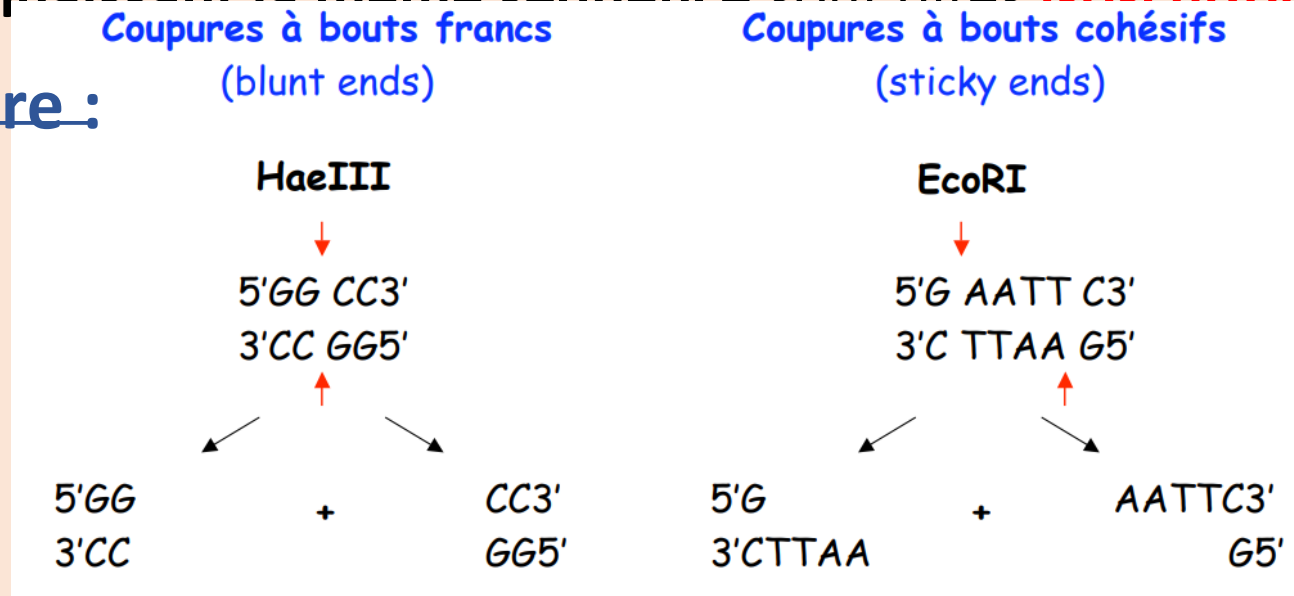
## 3 types d'enzymes de restriction en fonction du fait qu'elles coupent à distance ou non de la séquence nucléotidique reconnue:

### 1) Enzymes de restriction de type II :

- reconnaissance de 4 à 8 paires de bases
- l'enzyme coupe l'ADN au niveau de la séquence reconnue
- séquence dite **palindromique**
- 2 enzymes reconnaissant la même séquence sont dites **isoschizomères**



### 2 types de coupure :



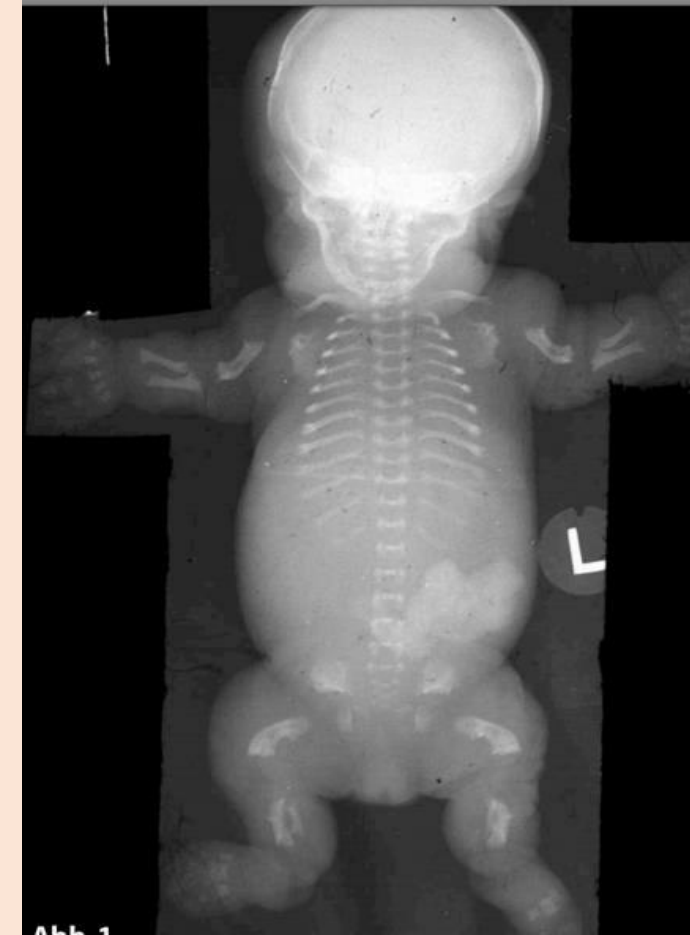
### 2) Enzymes de restriction de type I et III : coupent aléatoirement l'ADN

# I- BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENETIQUE MEDICALE :

## 1- L'achondroplasie :

### Définition :

- Petite taille
- Membres courts
- Faciès caractéristique :  
front haut + dysmorphie
- Intelligence normale** ++
- Complications neurologiques -> moelle épinière



**Signe d'appel échographique = FEMURS COURTS**

## Maladie monogénique AUTOSOMIQUE DOMINANTE

MAIS 90% des enfants atteints ont leurs parents NON ATTEINTS car c'est une **NEOMUTATION** ++

Le gène responsable = **FGFR3**, qui code pour le **RECEPTEUR** d'un facteur de croissance fibroblastique

Ce gène s'exprime normalement dans les **CHONDROCYTES**

2 mutations du gène FGFR3 :

● **Guanine** remplacée par une **Adénosine** ( G -> A)

● **Guanine** remplacée par une **Cytosine** ( G -> C)

● Dans les 2 cas, on a une **substitution d'AA** : une **GLYCINE** est remplacée par une **ARGININE** ++

Pour le diagnostic on veut savoir si le fœtus a la mutation G -> A ou G->C

# Analyse génomique :

Après un **signe d'appel échographique**

1- Extraction d'ADN des cellules amniotiques après une ponction amniotique

2- Amplification par PCR

3- Vérification des produits PCR

4- Digestion par endonucléases :

- B~~E~~M~~L~~ reconnaît son site de restriction si **G->A**

- H~~p~~a~~l~~ reconnaît son site de restriction si **G -> C**

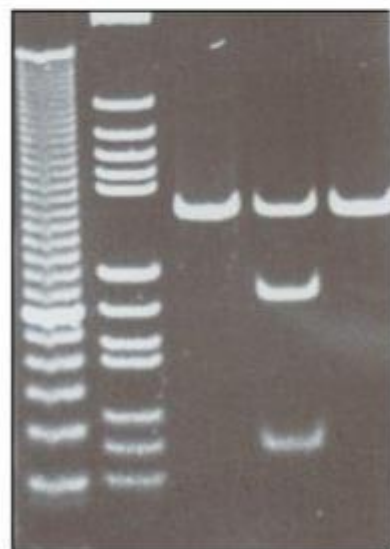
Si en présence des 2 enzymes de restriction , on a un ~~séquençage sauvage = PAS de coupures~~, il n'y a pas de mutation ++

5- Séquençage pour vérifier la présence de la mutation

Mutation c.1138G>A

*BfmI*

<b>Sain</b>	164 pb
<b>Hétérozygote</b>	164 + 109 + 55 pb
<b>Homozygote</b>	109 + 55 pb



164 pb

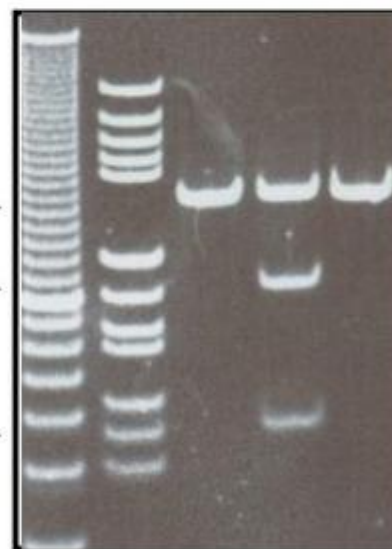
109 pb

55 pb

Mutation c.1138G>C

*HpaII*

164 pb
164 + 109 + 55 pb
109 + 55 pb



# Le séquençage de l'ADN

## 1- Principe :

**On ne pose pas de diagnostic avec UNE seule technique de biologie moléculaire +**

**Le séquençage détermine la succession de nucléotides d'une séquence d'intérêt**

**Cette méthode ajoute des ~~ddNTP~~ = DIdésocytiribonucléotides**

**Les étapes du séquençage sont les mêmes que la PCR +++ :**

**Le ~~séquençage~~ utilise UNE SEULE amorce** alors que le **~~PCR~~ en utilise DEUX+++**

**Dans la ~~PCR~~ on ajoutait des dNTPs (nucléotides avec un OH),** alors que pour le **séquençage on ajoute des ~~ddNTPs~~ (nucléotides SANS OH++)**

**La Taq incorpore de manière ALEATOIRE un ~~dNTP~~ ou un ~~ddNTP~~ pour synthétiser le brin complémentaire**

**~~La synthèse s'arrête quand elle incorpore un ddNTP car in n'y a plus de OH disponible pour faire une liaison avec le nucléotide suivant +++++~~**

## 2- La méthode SANGER = initiale = de référence

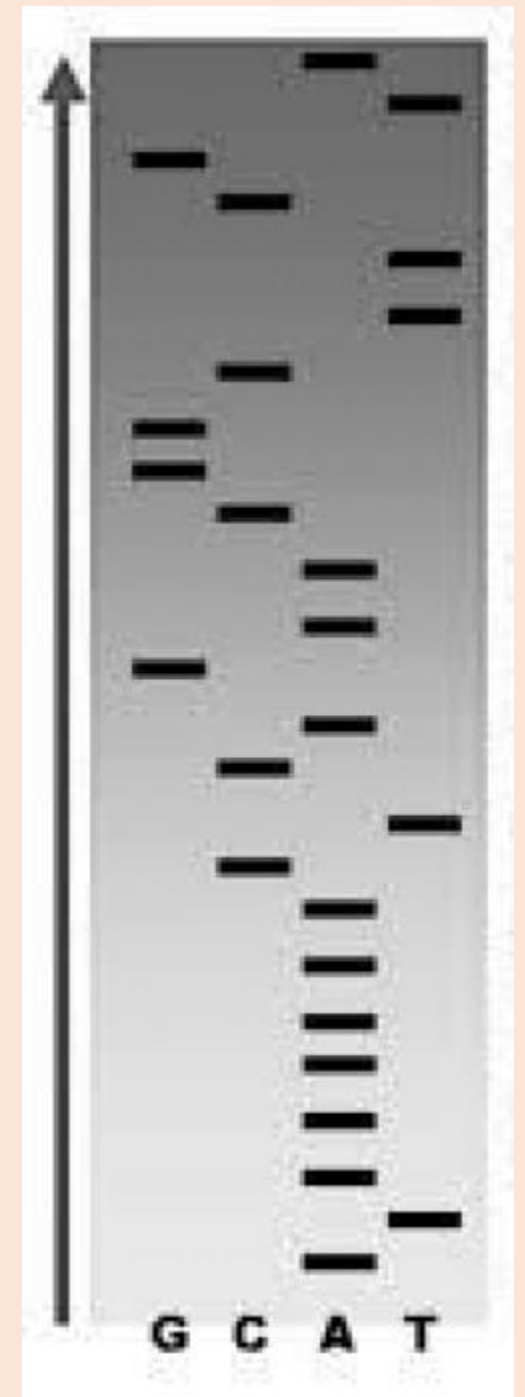
On a **4 tubes** contenant le mélange réactionnel, **chaque tube contient un ddNTP différent +++**

**Donc chaque tube contient un type de ddNTP ( A, T, C, G )  
ET les 4 types de dNTPs (A, T, C ET G)**

On obtient **plusieurs fragments de taille différente en fonction de l'endroit où le ddNTP a été incorporé**

Ensuite on fait migrer les fragments en fonction de leur taille

**On lit le gel du BAS vers le HAUT car les plus petits migrent plus loin**





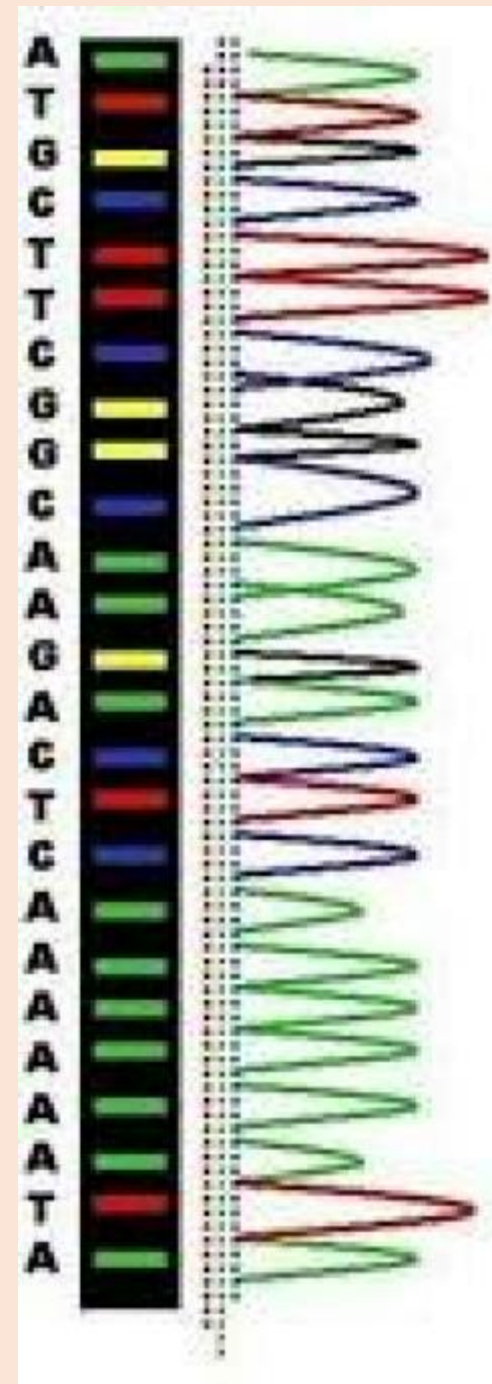
# Méthode automatisée :

C'est le même principe, mais on n'est **plus obligés d'avoir 4 tubes séparés**  
Aujourd'hui on a des **ddNTPs fluorescents**, chaque type de ddNTP a un **couleur spécifique** émise par un fluorochrome particulier  
Ce **code couleur** permet de **tout mélanger** et on retrouve l'identité de nos nucléotides par leur couleur

La migration se fait plus sur gel mais sur un séquenceur automatique. On a toujours l'électrophorèse  
Mais les fragments passent devant une **caméra** qui reconnait la couleur du ddNTP et donc l'identité du nucléotide

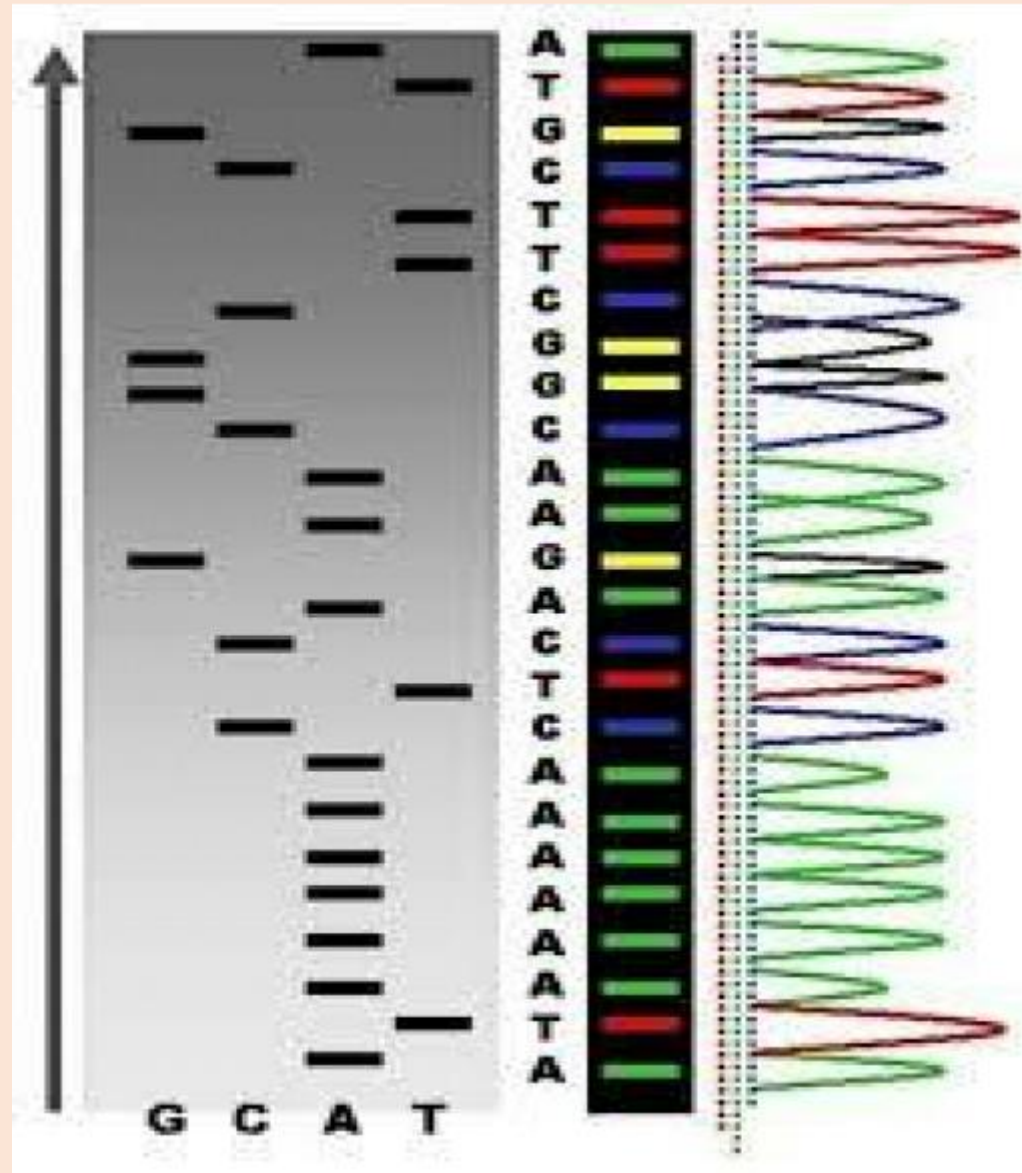
On a donc une séparation en fonction de : +++++

- la **COULEUR** qui nous donne l'**IDENTITE des nucléotides**
- la **TAILLE** qui nous donne l'**ENCHAINEMENT des nucléotides**





# Différence Séquencage Sanger / Automatique





FINIIII

