

Génétique

Principales techniques de biologie moléculaire

I. Introduction

Objectifs :

- Connaître les principales techniques de biologie moléculaire
- Comprendre ses applications en génétique médicale

Applications en génétique médicale :

- Diagnostic de maladies génétique (pouvant se transmettre à la descendance) *ex : diabète, achondroplasie*
- Diagnostic de maladies pré-symptomatique (avant que la maladie ne se déclare) *ex : maladie de Huntington*
- Diagnostic prénatal (possibilité de faire une IVG dans le cas de pathologies graves) *ex : malformations congénitales : phocomélie*
- Diagnostic positif (possibilité de confirmer avec certitude une pathologie en identifiant la mutation causale) *ex : Covid-19*
- Comprendre la pathogénicité des maladies (comment et pourquoi une mutation agit-elle sur l'organisme ? quelle est sa capacité à déclencher la maladie et avec quelle gravité ?)

- ♥ La génétique médicale a donc de très larges applications qui reposent sur des techniques de biologie moléculaire

II. Analyse du matériel génétique

- ♥ L'analyse du matériel génétique se fait à partir de quelques microgrammes d'acides nucléiques. On peut ainsi le faire avec n'importe quelle cellule nucléée. +++

En effet, les techniques de biologie moléculaire sont vraiment **très sensibles** et permettent une analyse **ciblée** à partir d'une **unique cellule**.

On observe également une **grande différence de stabilité** entre l'ADN et l'ARN (*ADN double brin étant beaucoup plus stable que l'ARN simple brin*)

- ✓ Donc, dans 95 à 99% des cas, on travaille donc avec de l'ADN

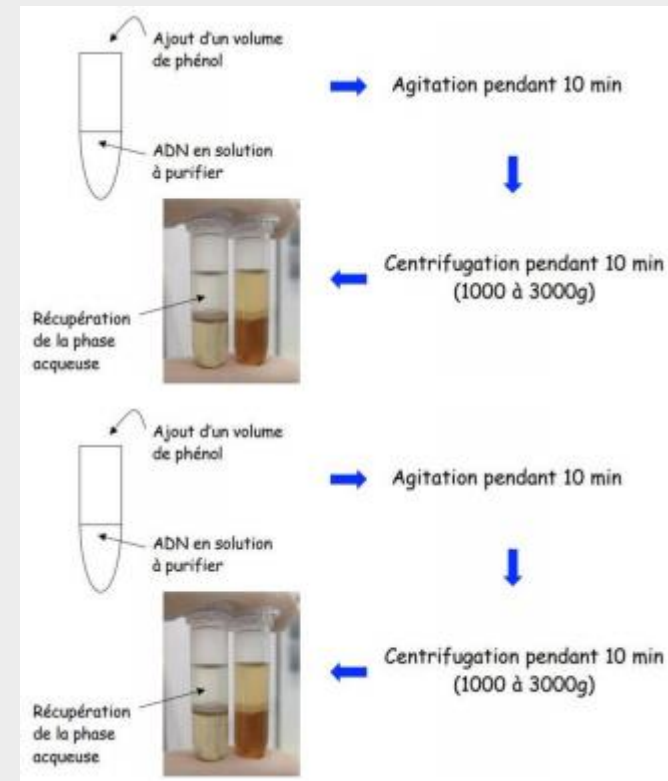


ATTENTION : Les globules rouges n'ont pas de noyaux +++ il est donc totalement impossible de s'en servir pour en extraire de l'ADN.

- ♥ Cependant, on peut extraire de l'ADN à partir de :
 - Sang (Globules blanc = cellules nucléées +++)
 - Tissus
 - Cellules amniotiques (amniocentèse)
 - Follicules pileux
 - Coupes en paraffine

♥ Par ailleurs, il est possible d'extraire de l'ADN en **5 étapes** à partir de quelques millilitres de sang total :

1. Prélèvement de quelques millilitres de sang total sur un tube contenant **un anticoagulant : l'EDTA**.
→ Par prudence, on n'utilisera JAMAIS d'héparine comme anticoagulant car elle **inhibe** les mécanismes d'amplification de la PCR faisant intervenir des polymérases (revu après 😊)
2. Lyse des globules rouges (inutiles du coup car ils sont anucclés Ø ADN) grâce à **une solution hypotonique** (explosion des GR par entrée massive d'eau)
3. Récupération du culot de globules blancs (leucocytes) lavés et resuspendus dans **un mélange** de **détergent** et de **protéinases K**
→ **Ce mélange** permettra de dégrader **diverses protéines autour de l'ADN** : la **membrane lipidique**, la **membrane nucléaire** mais également les **histones** qui protègent l'ADN
4. Extraction au **phénol-chloroforme**, **afin de pouvoir éliminer les protéines dégradées pendant l'étape 3** en utilisant les propriétés de **solubilité différentielle** des molécules (**ADN que l'on veut récupérer/Protéines qu'on veut dégrader**) entre deux phases **NON MISCIBLES**

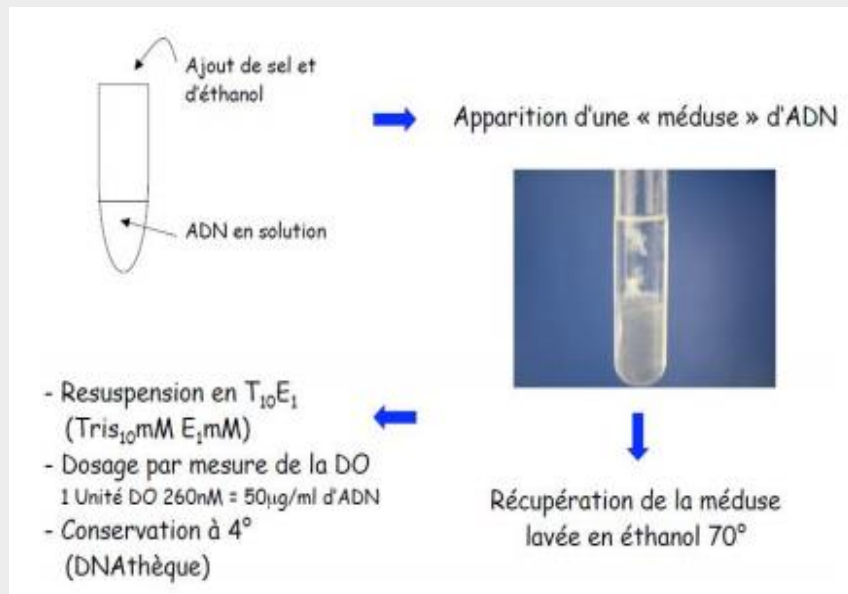


♥ On obtient finalement trois phases non miscibles :

- ✓ Une phase aqueuse contenant **l'ADN purifié en haut**
- ✓ Une phase intermédiaire contenant **les protéines digérées**
- ✓ Une phase phénolique (organique) **en bas**

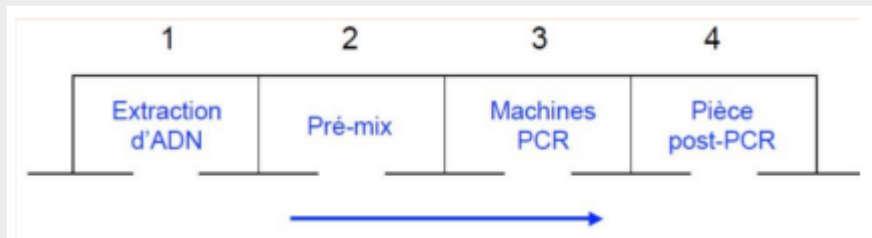
5. Précipitation à l'éthanol de l'ADN purifié par ajout d'éthanol à 95° froid (-20°C) en présence de sel :

- On obtient une « méduse d'ADN » qui correspond à de **l'ADN double brin**
- On récupère cette « méduse » qu'on lave avec de l'éthanol à 70°
- On conserve cet ADN dans une **DNAtèque** (≈ aux bibliothèques pour les livres) à 4°C

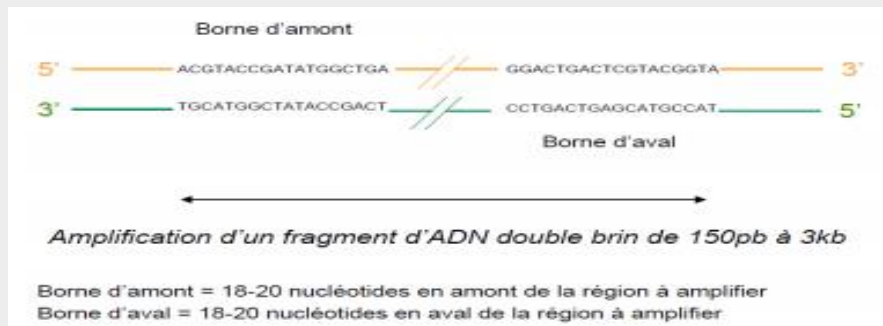


III. Amplification en chaîne par la Polymérase (PCR)

- ♥ La PCR est une technique de base dans un laboratoire de biologie moléculaire. Elle permet d'obtenir en grande quantité, parmi les 35000 gènes de notre génome, **une région d'ADN** que l'on veut étudier : c'est une **amplification spécifique** ! *Askip vous avez déjà vu cette notion en Première S, si c'est le cas c'est trop fun hahaha*
 - ♥ La PCR pour fonctionner utilise une **TAQ Polymérase** : c'est une **ADN Polymérase** qui elle-même provient d'une archéobactérie très particulière : **la Thermophilus Aquaticus** qui est une bactérie thermophile (en grec thermophile = aime la température) c'est-à-dire qu'elle résiste à des chaleurs extrêmes. Cette propriété particulière permet le bon déroulement de la PCR qui se fait à des températures vraiment hautes.
 - ♥ La PCR étant une technique **très sensible** elle suscite alors un risque très élevé de **contamination** +++ cela requiert alors que les étapes isolées de la PCR se fasse dans un circuit monodirectionnel (un seul sens) pour éviter de contaminer tous le circuit
 - **Matériel de la PCR** : un peu similaire au matériel utilisé pdt la répli
- ADN du patient en petite quantité
 - 2 amorces = primers
 - Des désoxyribonucléotides (= dNTPs)
 - Un tampon MgCl₂ qui **stabilise** les polymérases pendant la PCR
 - **La TAQ Polymérase** (haute résistance à la température)



→ Pour réaliser une PCR, il suffit de connaître les séquences de **18 à 20 nucléotides** avant et après la séquence qu'on veut amplifier. On parlera ainsi de bornes d'AMONT et d'AVAL !



Rappel : pb = paire de bases 😊

♥ Il n'est pas nécessaire de connaître la séquence entière du fragment à amplifier pour faire une PCR !

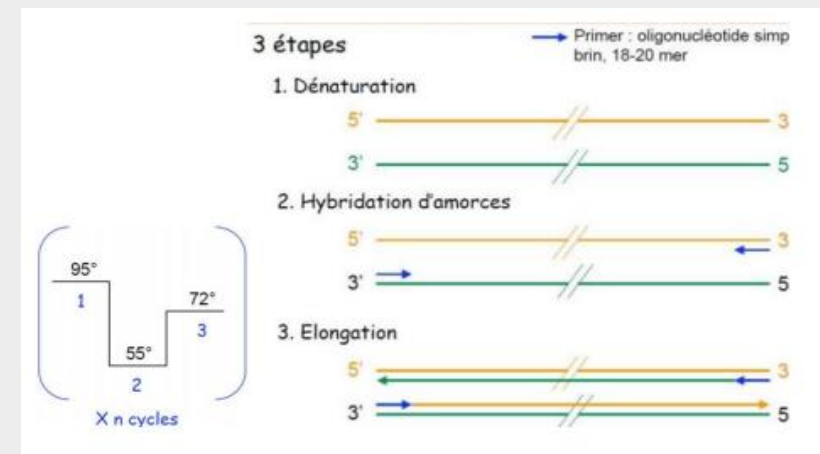
▪ **Etapes de la PCR :**

→ 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 **2ⁿ molécules d'ADN**

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



1. Dénaturation des deux brins à 95°C
2. Hybridation des amorces à 55°C
3. Elongation à 72°C



Donc du coup voilà pour cette fiche ! Uniquement ce qu'il y a dessus tombera au CCB de Septembre +++

J'ai volontairement fait exprès de ne pas parler de la partie électrophorèse + extraction de l'ARN puisque des changements sont à prévoir sur les cours que l'on vous fait pdt la Tut'Rentrée !! Sinon, si vous êtes un peu curieux vous pouvez essayer de voir ces mécanismes dans la fiche de l'année dernière en attendant de voir si la prof en parle cette année ou non !

Dédicasse à Oumi, Jaeji et Maria et Léa <3333

Dédicasse à Coco de Wejdene, si la chanteuse passe par là sache que je t'aime

Dédicasse à ma chanson préférée : Même pas Bonne de Shay

Dédi au co-learning qui est encore fermé... RIP

Dédi à mes co-tuts les sangs Tristoune et Audrey <3

Dédi à mes fillottes <3

Dédi à Manon, Lucille, Papa, Maman, Tonton, Braïllane, Pierrot, Kim, Himda, Kyliou, Hanna, EP <3, Clara, Thomas, Yamitose, Thithi, Robi, Matilda, Raphou, Cloé, Colin, Nico, Elena, Manon, Julia, Alexis, Sacha, Anna, Caroline, Marine, Cléo, Laura, Hugo, Anne, Baptiste, Lilou, (y'a trop de gens mdr), Ambre, Amelie Valdenaire, Marie Cordelier, Marie Gerva, Mathilde, Tous les tuteurs de cette année <3 mais aussi aux chefs-tuts ! Bisouuuuuuuuuuuuuus et grosse dédi du siècle à la fibre optique ainsi qu'à la guillotine

