

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

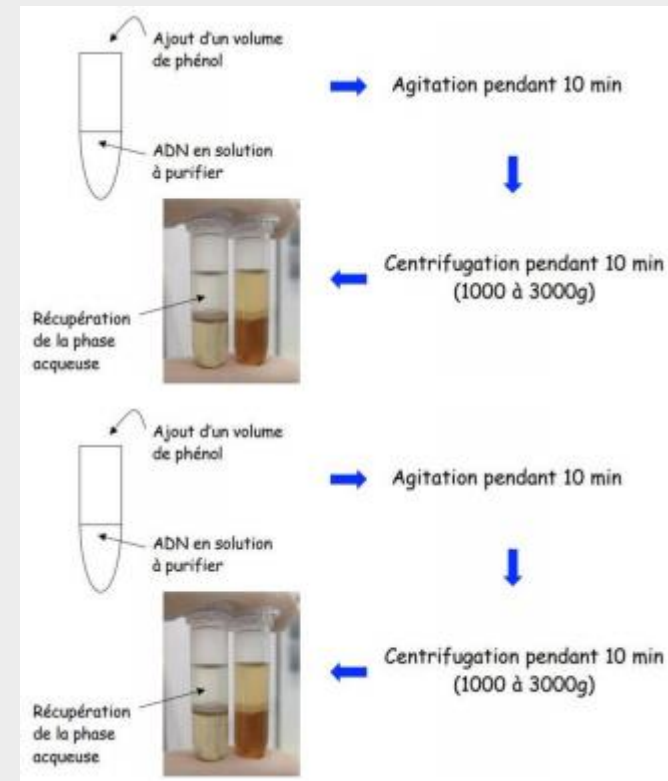


ATTENTION : Les globules rouges n'ont pas de noyaux +++ il est donc totalement impossible de s'en servir pour en extraire de l'ADN.

- ♥ 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**

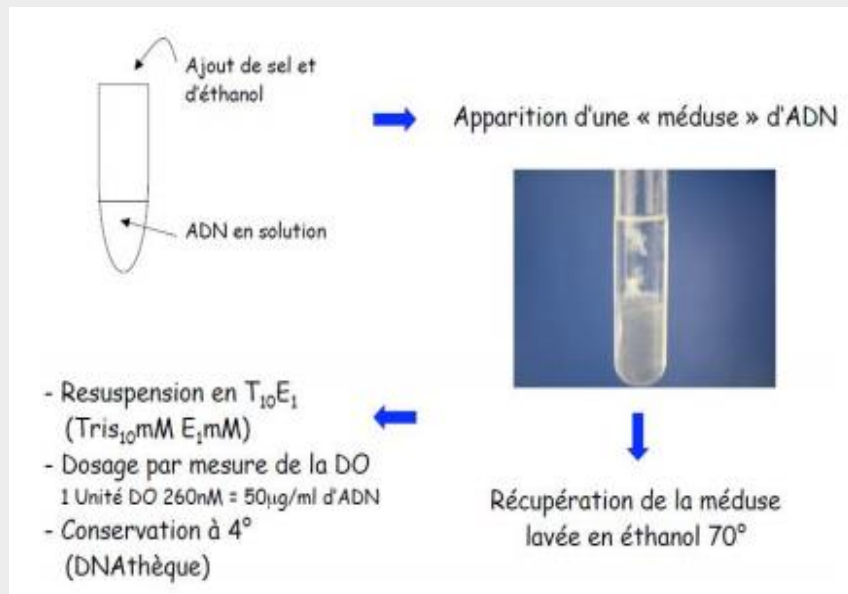


♥ On obtient finalement trois phases non miscibles :

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

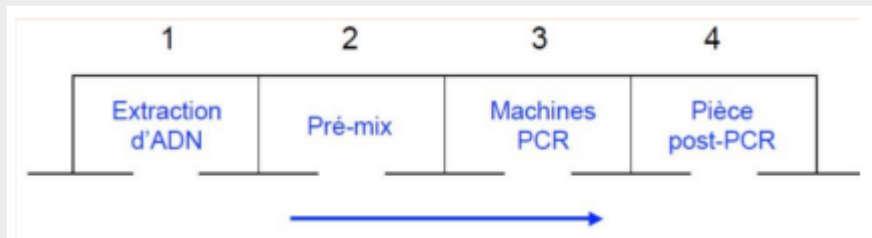
5. Précipitation à l'éthanol de l'ADN purifié par ajout d'éthanol à 95° froid (-20°C) en présence de sel :

- 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

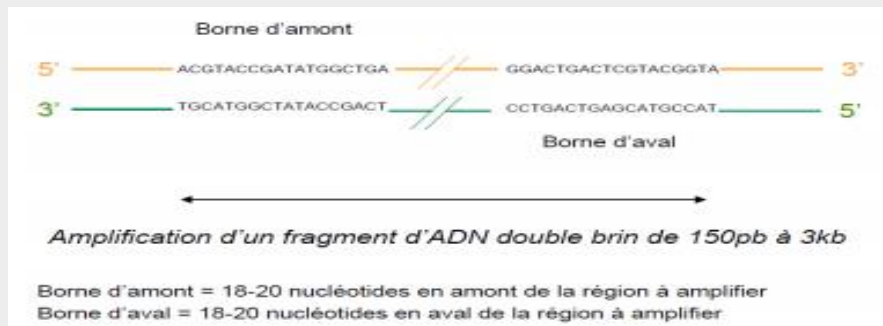


III. Amplification en chaîne par la Polymérase (PCR)

- ♥ 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

