

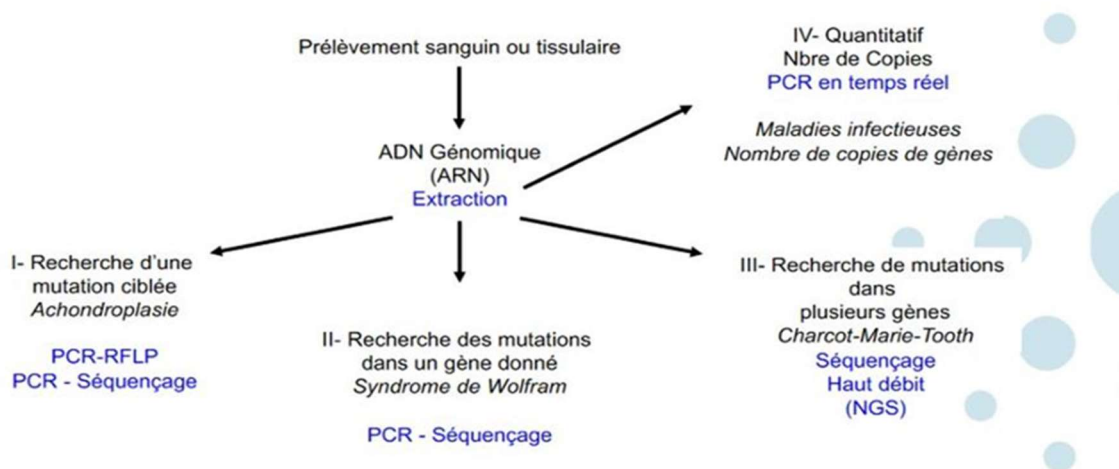
## Techniques et approches diagnostiques des maladies génétiques

*SALUUUT LA TEAM !! Tous ce qui est écrit comme ça c'est moi, Namasté, qui parle. Le cours peut paraître long mais il y a beaucoup d'explications alors prenez ça tranquilou et ça va le faire !!*

*La génétique moléculaire et la génétique dans son ensemble est très liée aux technologies, au génie génétique et à différents outils dont nous allons voir les plus importants dans ce cours.*

*Ce cours est une introduction à la biologie moléculaire et à ses applications en génétique médicale. Au cours de vos études, vous verrez que la biologie moléculaire est un outil, qui s'applique aujourd'hui à l'ensemble des spécialités médicales. Ce cours permet de comprendre en quoi ces outils de biologie moléculaire (BM) sont utiles pour le diagnostic de maladies génétiques constitutionnelles.*

*Ce cours est divisé en 2 parties : une première qui vise à vous montrer quelques-unes des techniques disponibles pour les généticiens et la seconde sera là pour vous donner un exemple d'utilisation de ces techniques pour faire le diagnostic de maladie génétique.*



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.

Sur ce schéma vous avez :

- D'abord l'indication
- En dessous en italique, un exemple de maladie indiquée pour cette technique
- Encore en dessous la technique ou manipulation qu'on va choisir de faire

## I - Introduction Génétique moléculaire

En génétique moléculaire, on analyse les acides nucléiques = 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 (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).

*Petit aparté sur la PCR : 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 (des risques de contamination importants) que les biologistes et généticiens exerçant cette activité.

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.

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 +++**.

## II - Les outils en biologie moléculaire

En biologie moléculaire, ce sont toujours les mêmes outils utilisés que l'on combine de façon différente (associés à de l'informatique).

### 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 !! *nucléase = enzyme qui coupe par ex*

| Couper = <u>nucléase (enzyme de restriction)</u>  | Copier = <u>polymérase</u>   | Coller = <u>ligase</u>  |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Endonucléase</u> : coupe l'ADN au milieu/à l'intérieur</li> <li>- <u>Exonucléase</u> : coupe l'ADN au niveau de ses extrémités</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>ADN polymérase</u> : faire une copie d'une des brins d'ADN</li> <li>- <u>Reverse transcriptase</u> : refaire une copie d'ADN à partir d'un brin d'ARN</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>ADN ligase</u> : coller 2 fragments d'ADN ensemble (liguer = coller)</li> </ul> |

Les enzymes n'ont pas été inventées mais **identifiées et purifiées**, celles de restriction à partir de bactéries entre autres et les reverses transcriptases ont été identifiées à partir de 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** : peuvent casser ou reformer les liaisons hydrogènes qui lient les 2 brins d'ADN

Exemple : • Séparation des 2 brins d'ADN en fragment simple brin en chauffant à 95°C

• Diminution progressive de la température jusqu'à 25°C : reformation de ces liaisons hydrogènes entre les 2 brins

• 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...

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

#### *Extraction d'ADN génomique :*

##### 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 +++++ /!\**

##### 2. Lyse des globules rouges (GR) :

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.

**!\ Seuls les globules blancs (= GB) nous intéressent dans ces prises de sang car les globules rouges n'ont PAS de noyau ++++ /\**

### 3. Récupération des leucocytes :

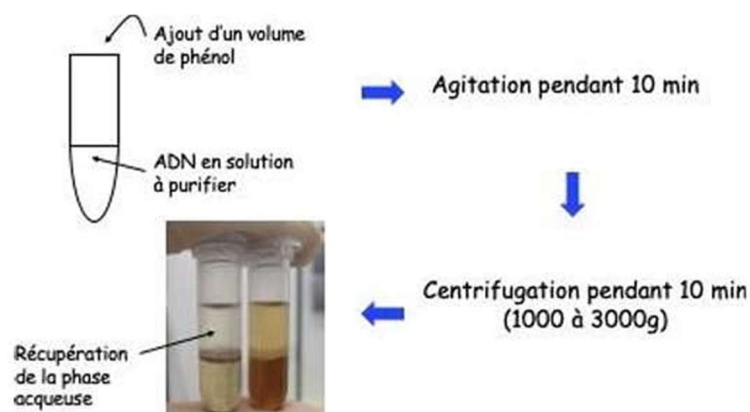
Grâce à une **centrifugation**, on récupère le culot au fond du tube à essai qui contient uniquement les leucocytes (Globules Blancs) qu'on va **laver** afin de finir d'enlever ce qu'il reste autre que les GB (plasma, hémoglobine, restes des GR précédemment lysés...).

Puis on va **re-suspendre** ces GB dans un mélange de détergent et de Protéinases K.

C'est une étape très importante : pour 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 :



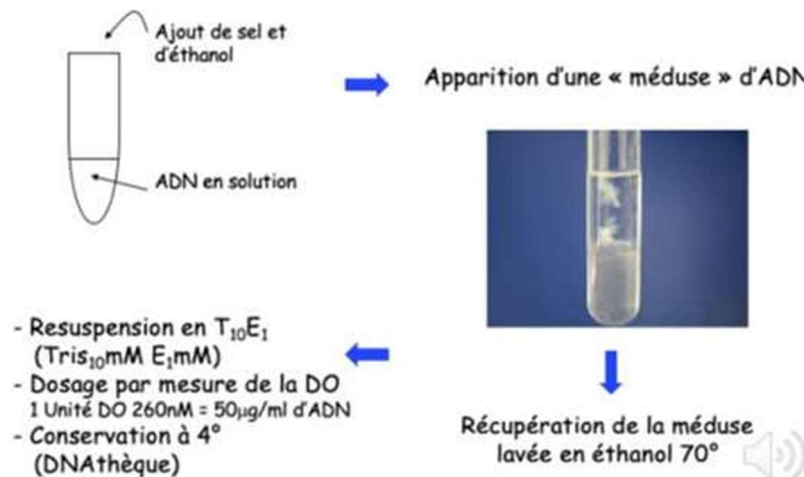
Cette étape consiste à extraire l'ADN grâce à une **solution de Phénol- Chloroforme**. Cette solution permet **l'élimination définitive des protéines** en utilisant la solubilité différentielle des molécules (ADN vs Protéines) entre 2 phases non miscibles.

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) :



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.

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

On centrifuge et récupère cet ADN qu'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.

Une fois récupéré, l'ADN est re-suspendu 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.

**Re-suspension** = dissolution de l'ADN qui était sous forme de précipité visible blanc solide.

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

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



Cet ADN peut être conservé à 4° dans une DNAtèque 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.

### 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.

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

Puis 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.

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

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, ...).

#### IV- PCR et principes de biologie moléculaire

##### Amplification en chaîne par la polymérase ou PCR (= polymerase chain reaction)

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, 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 ce qui ne faut surtout pas faire c'est « 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.

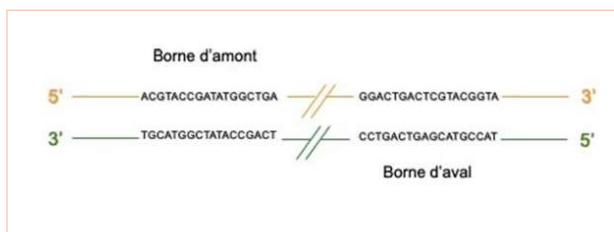


Il est donc très important que le flux (les étapes de la PCR) soit **unidirectionnel/monodirectionnel**, les **locaux agrémentés**, etc. Lorsqu'on fait ce type de manipulations, il faut vraiment **suivre un ordre** et **+++ ne jamais revenir en arrière +++**

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 étapes 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 effectuer 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

### La PCR contient 3 étapes successives :

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



2. **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.

3. **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**.

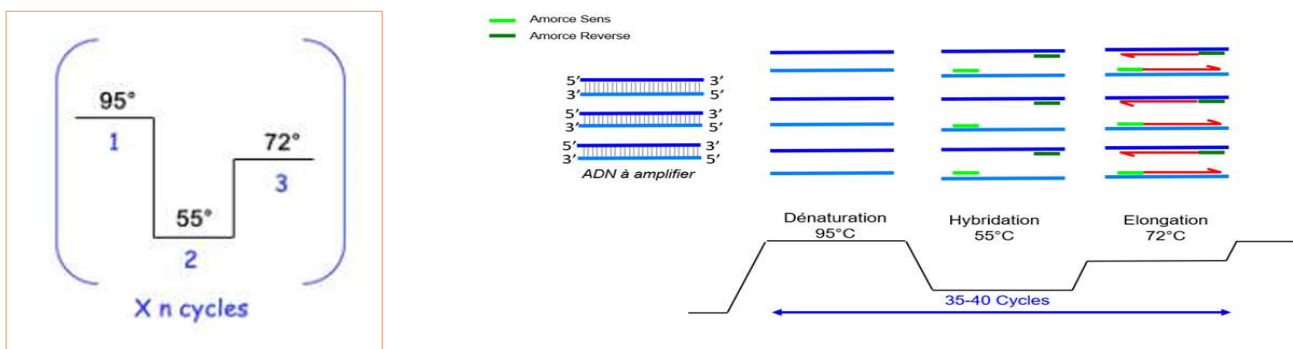
Par exemple : il est nécessaire que la 2e étape se fasse à 55° car à cette température c'est encore trop chaud pour que les 2 brins d'ADN se referment mais les amorces sont capables de s'hybrider sur leur région complémentaire.

*Voici la réponse de la prof concernant les températures :*

*« Les chiffres des températures NE SONT PAS à connaître par cœur en valeur absolue (car ce n'est pas si strict que cela .... Même si dans le cours on vous le présente comme tel pour faciliter la compréhension). Il faut savoir qu'il y a les 3 étapes : Dénaturation à haute température (95°C en général) / Hybridation à une température plus basse qui dépend de la séquence des primers (entre 55-65°C environ) / Elongation à la température optimale de la taq polymérase (entre 68-72°C environ). »*

*Donc globalement reprenez bien quelles sont les étapes et pourquoi on est à des hautes températures, qui diffèrent d'une étape à l'autre (=pour le bon fonctionnement de ces différentes étapes).*

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).*



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  $MgCl_2$ ), 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.



= **Thermocycleur** (appareil faisant juste des variations de température) : c'est lorsqu'on ouvre ce tube que notre ADN alors très volatile peut s'échapper et contaminer les échantillons suivants.

### *Circuit monodirectionnel :*

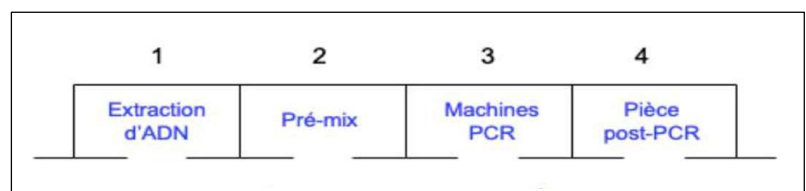
Aujourd'hui, cette technique qui est **très sensible et très performante**, nous permet de travailler à partir d'une quantité très faible d'ADN : nous pouvons travailler à partir d'une seule cellule lors d'un diagnostic préimplantatoire.

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

Elle reste à **hauts risques de contamination** et nécessite donc **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.

Il existe un circuit monodirectionnel avec :

- 1) Une pièce d'extraction



- 2) Une pièce de pré-mix : 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.

### *Gel analytique (électrophorèse) :*

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

L'analyse des produits d'amplification peut se faire grâce à **un gel analytique et à une électrophorèse**.

Pour ça, on va couler du gel d'agarose ou d'acrylamide (grosse galette) dans lequel se trouvent des mailles qui varient en fonction de la taille des fragments d'ADN que l'on veut isoler et visualiser.

*La vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique sera fonction :*

- **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**

Dans ce gel, on creuse des puits, puis on l'immerge dans un tampon.

On met dans chacun des puits les différents amplicons que l'on veut analyser.

Enfin, on soumet ce gel à une électrophorèse/un champ électrique.

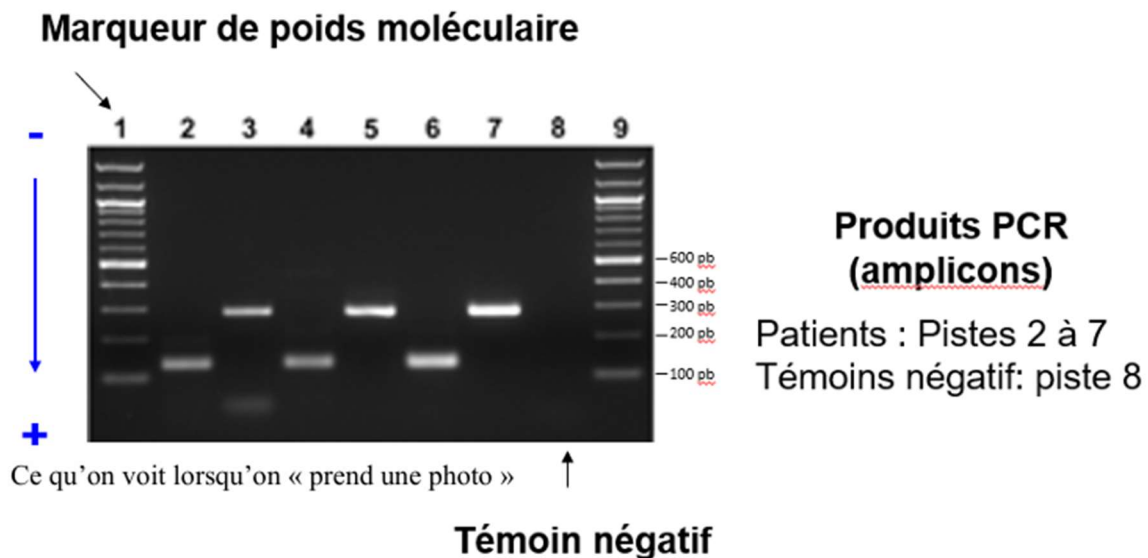
Dans cette étape, on utilise la charge électrique de l'ADN qui est négative de par le groupement PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (= propriété électro-physique de l'ADN) : **+++ l'ADN migre du - vers le + = de la cathode vers l'anode. +++**

Une fois la migration terminée, il faut **visualiser nos ADN / amplicons**. Pour ça, on va utiliser un **agent intercalant** (**+++mutagène+++**) = le **Bromure d'Éthidium** qui s'intercale dans l'ADN double brin et a la particularité de prendre une **coloration fluorescente rose lorsqu'il est visualisé sous lumière UV**.

*À 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).

**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 rester noire** : si une fluorescence apparaît sur cette piste, les résultats ne sont pas interprétables car ils auront été contaminés par un autre ADN ++. 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.

## V- La PCR en temps réel

### 1. Principe

Contrairement à la PCR classique où on analyse ce qu'on a obtenu à la fin de nos 35-40 cycles, lors de la PCR en temps réel, on suit à chaque cycle l'amplification de notre amplicon, sa quantité.

On va retrouver **les mêmes cycles de dénaturation-hybridation-élongation** en fonction de la température.

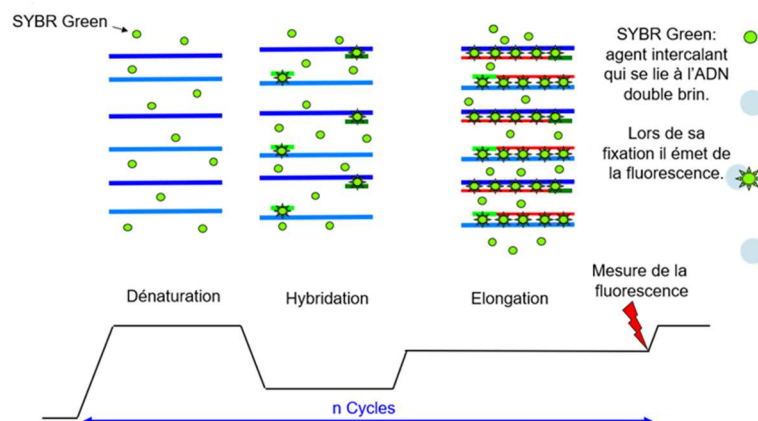
Dans le milieu réactionnel, on met exactement **les mêmes réactifs** que la PCR classique (fragments d'ADN, primers, polymérase...) auxquels on ajoute le SYBR Green.

L'agent intercalant permettant la visualisation de l'ADN est le SYBR Green pour la PCR en temps réel et ~~non le bromure d'éthidium~~ comme dans la PCR classique.

Comme pour la PCR classique on a la dénaturation puis le refroidissement et l'hybridation des amorces par complémentarité des bases. À ce moment-là, lors de l'hybridation, le SYBR green commence à s'intercaler dans l'ADN (entre le brin d'ADN à synthétiser et l'amorce) et à **fluorescer**.

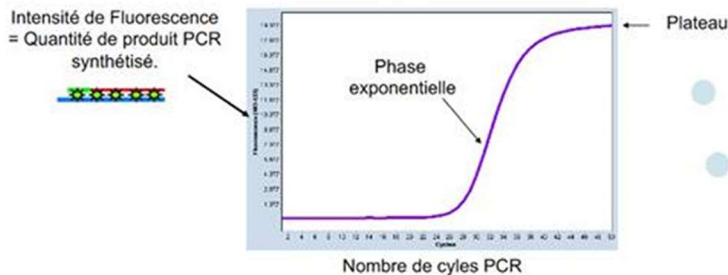
Puis se passe l'élongation où la Taq Polymérase synthétise le brin complémentaire et SYBR Green s'intercale dans l'ADN double brin en formation et devient alors fluorescent.

Enfin, **la mesure de la fluorescence se fait après chaque cycle PCR** = à la fin de l'élongation puisque SYBR Green a en effet la propriété d'être fluorescent **uniquement** lorsqu'il s'intercale dans un ADN double brin (donc après l'élongation *ou l'hybridation dans le cas des amorces*).





Après élongation, un automate mesure dans chaque puit la **fluorescence**, qui reflète la **quantité d'ADN produit** : la fluorescence est produite par le **SYBR green** uniquement lorsqu'il s'intercale dans l'ADN double brin, donc la quantité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN produite.



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

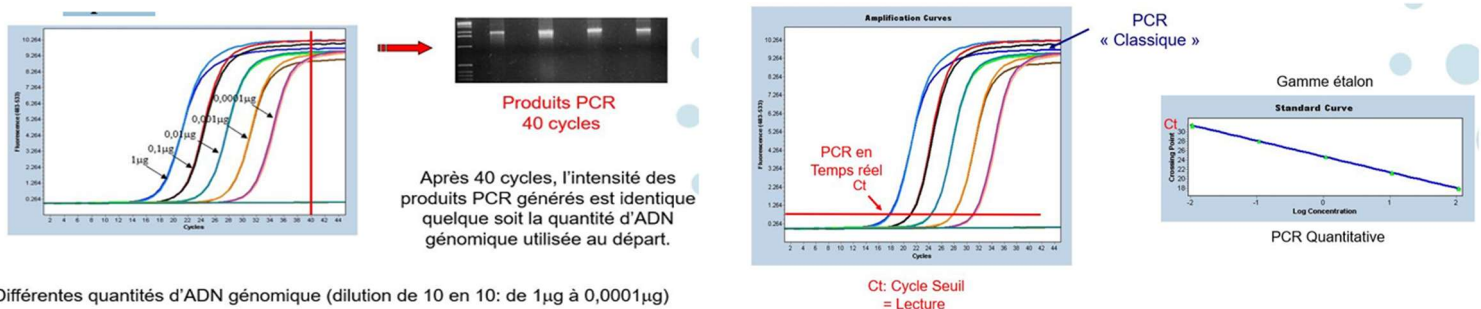
*On observe :*

- 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 (il n'y a plus de dNTP, la Taq Polymérase ne fonctionne plus...).

## 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 1µg à 0,0001µg) 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. Car on ne peut pas voir combien il y avait d'adn 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. Car on a vu que plus on a d'adn au départ plus on atteint vite cette phase

Si on trace la droite de la concentration 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 +++

Ainsi, en utilisant une « gamme étalon » dont on connaît la concentration 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.

Alors là ça peut vous paraître compliqué mais ça ne l'est pas tant que ça !! Ce qu'il faut bien comprendre c'est que :

- 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. Et 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. Et on a vu de la fluorescence dans le tube 1 à 14 cycles, dans le tube 2 à 16 cycles. Donc maintenant 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 cette partie est comprise, j'ai essayé de reformuler afin d'aider à la compréhension car je sais qu'on peut avoir du mal au début après si ça ne vous aide pas ou que tout était déjà très clair avant mon explication = NE LISEZ PAS !

### 3. Applications

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

- 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 notre arn en adh = reverse transcription pour pouvoir faire une pcr*

### 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  
**co** : genre de la bactérie

**R** : souche  
**I** : n° d'ordre de découverte de l'enzyme dans une même bactérie

Exemples : PvuII (*Proteus vulgaris*)  
BamHI (*Bacillus amyloliquefaciens* H)  
HaeII (*Haemophilus aegyptius*)

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  
AA-GG
- 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**

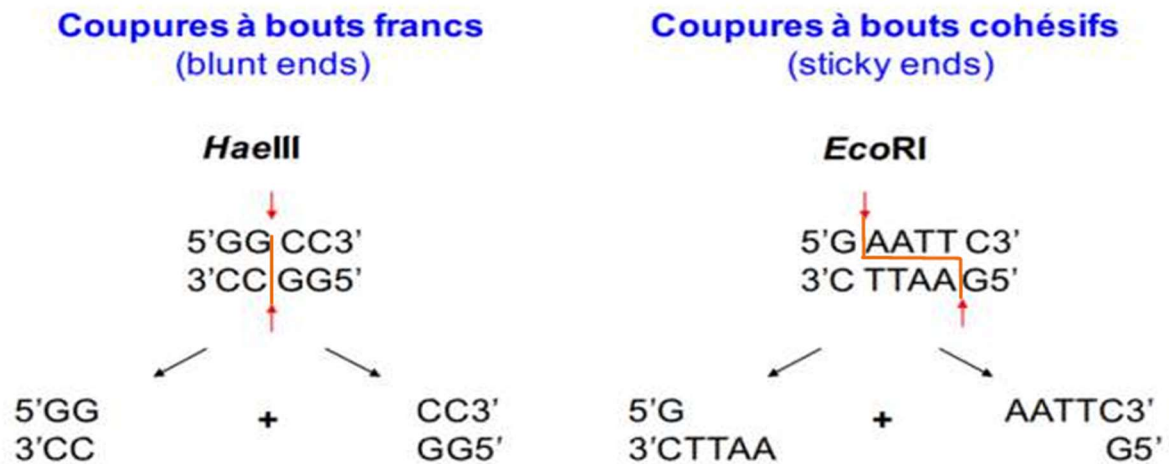
La coupure se fait au **même endroit sur les deux brins**, exactement en face l'une de l'autre. Ces types de coupures sont plus compliquées à recoller par les ligases que les coupures à bouts cohésifs.

**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.



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 2<sup>e</sup> 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 :

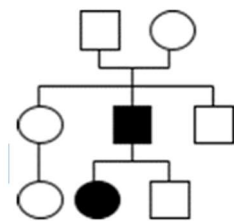
- Petite taille / nanisme : 130 cm
- Hyperlordose = *courbe excessive de la colonne vertébrale*
- Mains courtes
- Macrocéphalie (signe d'appel échographique) = *Augmentation anormale du volume de la tête*
- Dysmorphie faciale : front haut, ensellure nasale marquée
- **+++ Intelligence normale +++**
-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



Arbre généalogique : 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'achondroplasie naissent de parents non atteints.**

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, *ici ça peut porter à confusion mais l'individu est TOUT LE TEMPS capable de transmettre la maladie car autosomique dominant. Mais c'est « dans la minorité des cas » que c'est de cette manière qu'un enfant achondroplase naît*).

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'achondroplasie 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**.

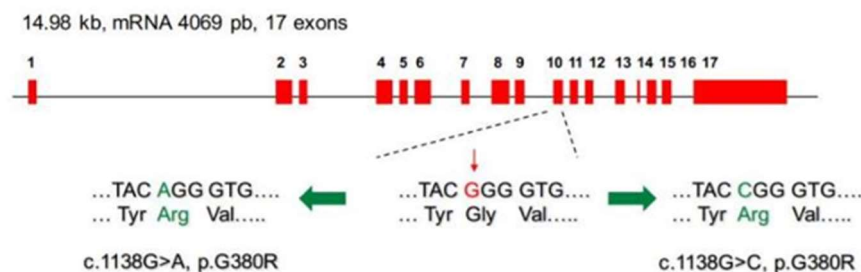
*C'est ce qui en fait un cas très simple en termes de diagnostic parce que dans la très grande majorité des maladies génétiques, nous retrouvons des mutations différentes ou mêmes des gènes complètement différents.*

Dans l'achondroplasie, c'est **toujours le codon 380 du gène FGFR3** (15 kB, avec 17 exons) qui est muté : la **glycine** est remplacée par une **arginine** à cause d'une mutation nucléotidique en amont (en position 1138, dans l'exon 10) qui remplace une **guanine** par une **adénine** ou par une **cytosine**.

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** = *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 +++**

Petit aparté par rapport à la 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°52).

## 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.

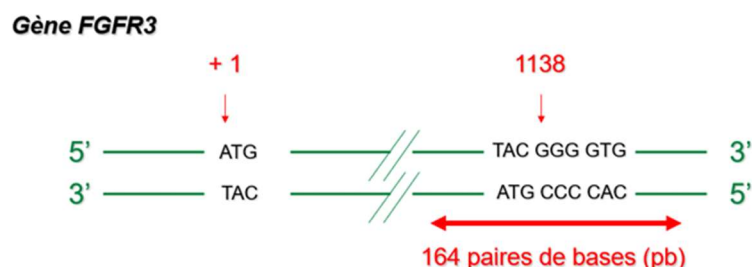
Devant un signe d'appel échographique :

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

Grâce à une ponction amniotique (quelques mL, vers le 6e/7e 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 par PCR

Amplification par PCR d'un fragment d'ADN (amplicon) de 164 paires de bases en encadrant la position 1138, position où siège l'une ou l'autre des mutations. Il faut bien choisir nos primers pour qu'ils encadrent le fragment d'ADN ciblé.

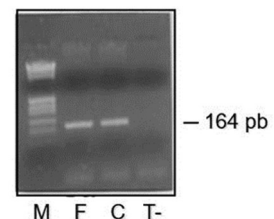


### C. Vérification des amplicons sur gel d'agarose

Après la PCR, on vérifie qu'elle a fonctionné via un gel et une électrophorèse : on vérifie la taille des amplicons en faisant migrer nos amplicons. On visualise notre électrophorèse sous UV.

On remarque 4 pistes :

- M : marqueurs de poids moléculaire
- F : amplicons d'ADN fœtal
- C : amplicon d'un ADN contrôle qui n'a pas l'achondroplasie
- T- : témoin négatif noir → pas de contamination → résultats interprétables.



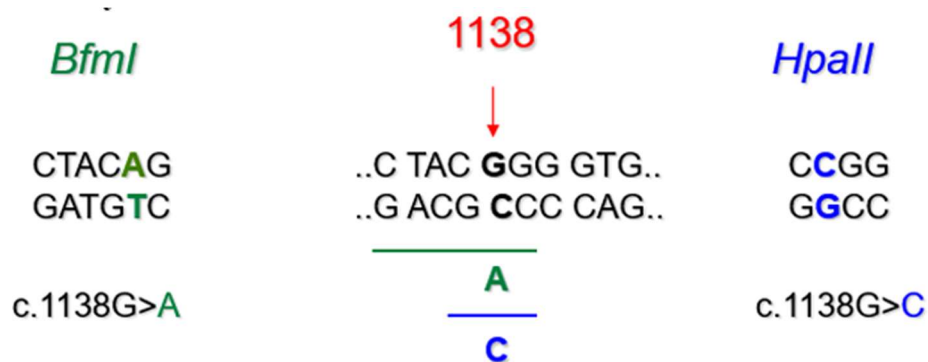
Les fragments originaux font **164 pdb**. On le sait et on vérifie que l'électrophorèse obtenue correspond bien à des amplicons de 164 pdb.

#### D. Digestion enzymatique des amplicons

Les résultats de l'électrophorèse étant bons, on réalise ensuite **une digestion enzymatique** grâce des enzymes de restriction spécifiques pour savoir si le fœtus a une mutation, et si oui, laquelle.

On utilise l'enzyme **BfmI**, qui reconnaît la séquence palindromiques **CTACAG** s'il y a mutation de la **guanine en adénine** : elle coupe alors l'amplicon.

On utilise en parallèle l'enzyme **HpaII**, qui reconnaît et coupe la séquence palindromiques **CCGG** s'il y a mutation de la **guanine en cytosine**.



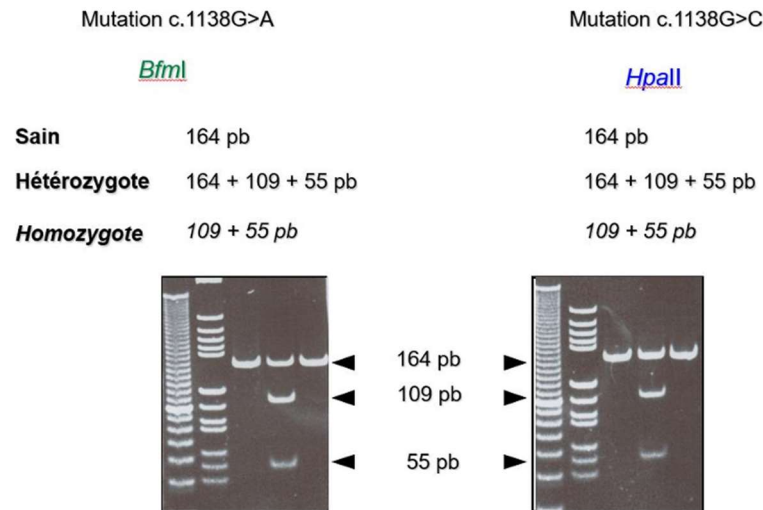
Donc on fait 2 digestions :

- **BfmI** si : **Coupe** → mutation **G → A**  
               Ne coupe pas → pas de mutation **G → A**
- **HpaII** si : **Coupe** → mutation **G → C**  
               Ne coupe pas → pas de mutation **G → A**
- Aucune enzyme ne coupe → aucune mutation

Ces digestions enzymatiques se font **dans 2 réactions séparées** (pour savoir quelle enzyme coupe et donc quelle est la mutation, si mutation il y a).

#### 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 fœtal non digéré
- Une piste avec l'ADN fœtal après digestion avec :
  - 1 fragment de 164 pb = allèle sain/sauvage/wild type du fœtus, non reconnu par l'enzyme
  - Allèle muté : on a 2 fragments de poids moléculaire différents → un plus lourd (109 pb) et un plus léger (55 pb), la somme de ces deux fragments est de 164 pb, taille initiale de notre allèle muté.

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 fœtus porte la mutation définie selon l'enzyme utilisée. **La mutation est donc hétérozygote** chez ce fœtus

- La dernière piste est un ADN contrôle digéré chez un fœtus non achondroplase donc ses amplicons feront 164 pb. *(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  $G \rightarrow A$ .

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

À l'inverse, un fœtus  $G \rightarrow A$  ne sera pas reconnu et donc pas digéré/coupé par HpaII, et un fœtus  $G \rightarrow C$  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. +++

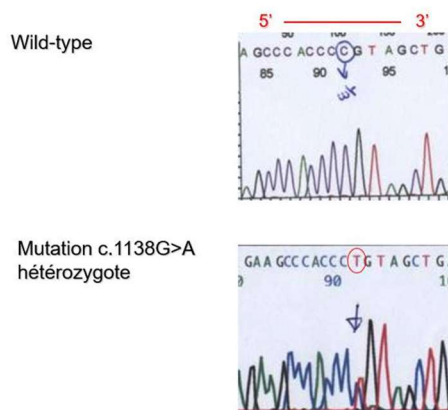
*Ici la digestion enzymatique c'est important à COMPRENDRE avant tout !! Vous verrez en qcm y'a rien de compliqué suffit d'avoir compris et de s'être entraîné car c'est toujours la même chose vous avez un exemple de digestion enzymatique avec une photo comme ici. Au début ça peut ne pas être évident mais c'est en essayant, en se trompant, en posant des questions qu'on apprend !*

## 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 qui correspond à la séquence sauvage. Lorsque **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  $G \rightarrow A$ .

Le deuxième graphique appartient donc à un patient atteint d'achondroplasie. Il y a un allèle FGFR3 sauvage, et un muté  $G \rightarrow A$  en 1138.

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 !!*

BRAVOO !! C'est la FIN de ce cours !!

J'espère que la fiche vous plait et que mes explications en plus vous aident !! N'hésitez pas à me faire des retours sur mes fiches (Naomi berger sur messenger) et à me poser des questions si vous ne comprenez pas certaines parties !! (Forum ou discord j'essaye de vous répondre le plus vite possible)

DEDI A VOUS !! Vous êtes vraiment courageux !

Dédi à Alessandra et Sarah deux tutrices plus que quali que vous rencontrerez au S2 ! Et encore pardon de ne pas vous avoir cité sur la première fiche (je ne vous connaissais pas encore en même temps mais je sais c'est pas une excuse mdr)

Dédi à tous les tuteurs d'ailleurs !!!

Dédi à mes parents, mon frère et toute ma famille

Dédi à ma coloc : « - tu veux une dédi ? - Hein ? Quoi ? » j'ai appris à parler seule ...

Deuxième dédi à elle car elle vient de me faire un thé et qu'accessoirement elle me supporte depuis le collège

Dédi à la vidéo de yoga que je viens de faire, la relaxation c'est cool hashtagNAMASTE

Dédi à Maëvacuole, Sarah, Anissa, Charlotte, Célia, Jade, Lisa, Mathéo #Famille (oui c'est bon j'ai trouvé le symbole au final)

Dédi à SPARTAAAAA et à ta réussite prochaine ! courage mv

Dédi à tes audios nounours

Dédi n&n's

Dédi à nous 4 <3

Dédi au 26 (mon chiffre préf)