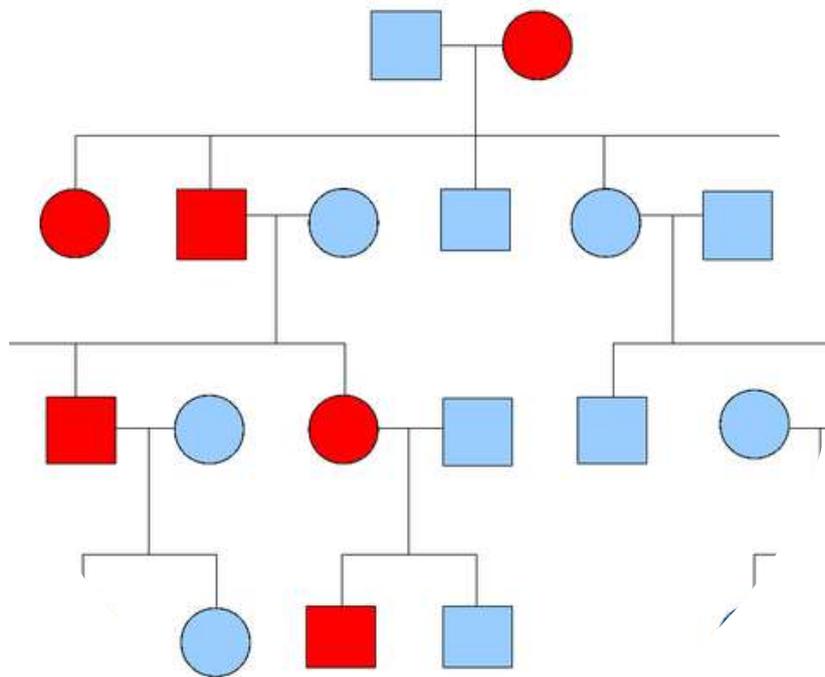


Génétique



SCIENCES DE LA VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE



UNIVERSITE ABDE LMAEK ESSAADI
FACULTE DES SCIENCES DE TETOUAN
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



GENETIQUE HUMAINE ET MOLECULAIRE

TD 2

Les techniques de diagnostic des maladies génétiques

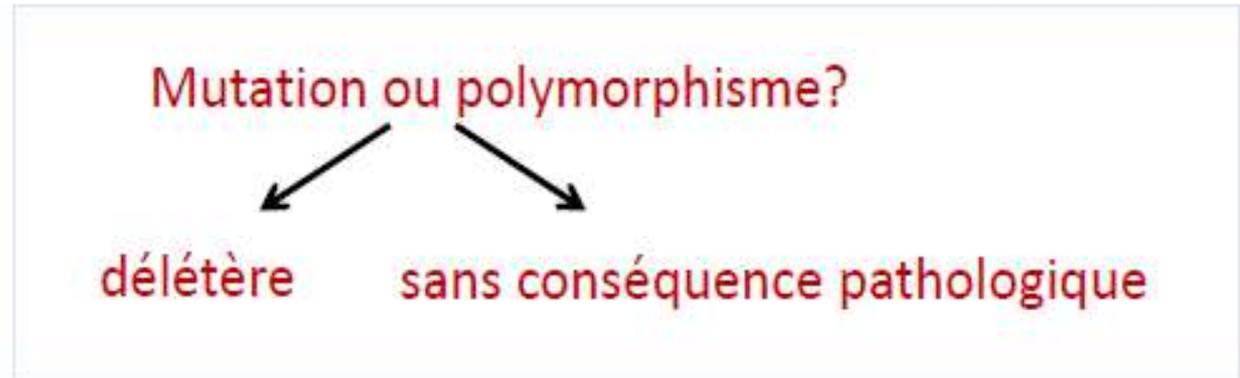
S5

Pr: Mme BENIOURI R.

2016-2017

Exemple d'une mutation

Interprétation:



Substitution trouvée
chez d'autres patients?

Substitution absente dans
une population contrôle?

Changement biochimique important au niveau
de l'acide aminé

Ségrégation avec la maladie ?
Néomutation chez un enfant dont les
parents ne sont pas malades

Séquence conservée
au cours de l'évolution

Altération de la fonction
protéique? Modélisation?

Etude fonctionnelle de la
protéine in vitro/in vivo

LE CONSEIL GENETIQUE

Le conseil génétique est une consultation spécialisée
de **médecine préventive**.

C'est un acte médical particulier qui consiste à évaluer la probabilité pour qu'un enfant à naître soit atteint d'une affection qui est déjà survenue dans la famille ou qui a un risque plus élevé d'y survenir du fait d'une situation particulière.

LE CONSEIL GENETIQUE REPOSE SUR:

§- Le diagnostic précis de l'affection

L'identification formelle de la maladie est l'un des impératifs du conseil génétique, surtout en cas de recours à des investigations anténatales chez le fœtus.

§- L'enquête génétique

C'est une des plus importantes étapes du conseil génétique. L'enquête familiale doit être minutieuse et aboutir à un arbre généalogique le plus complet possible.

§- Des connaissances actualisées sur la maladie

De la connaissance du gène au test utilisable en clinique

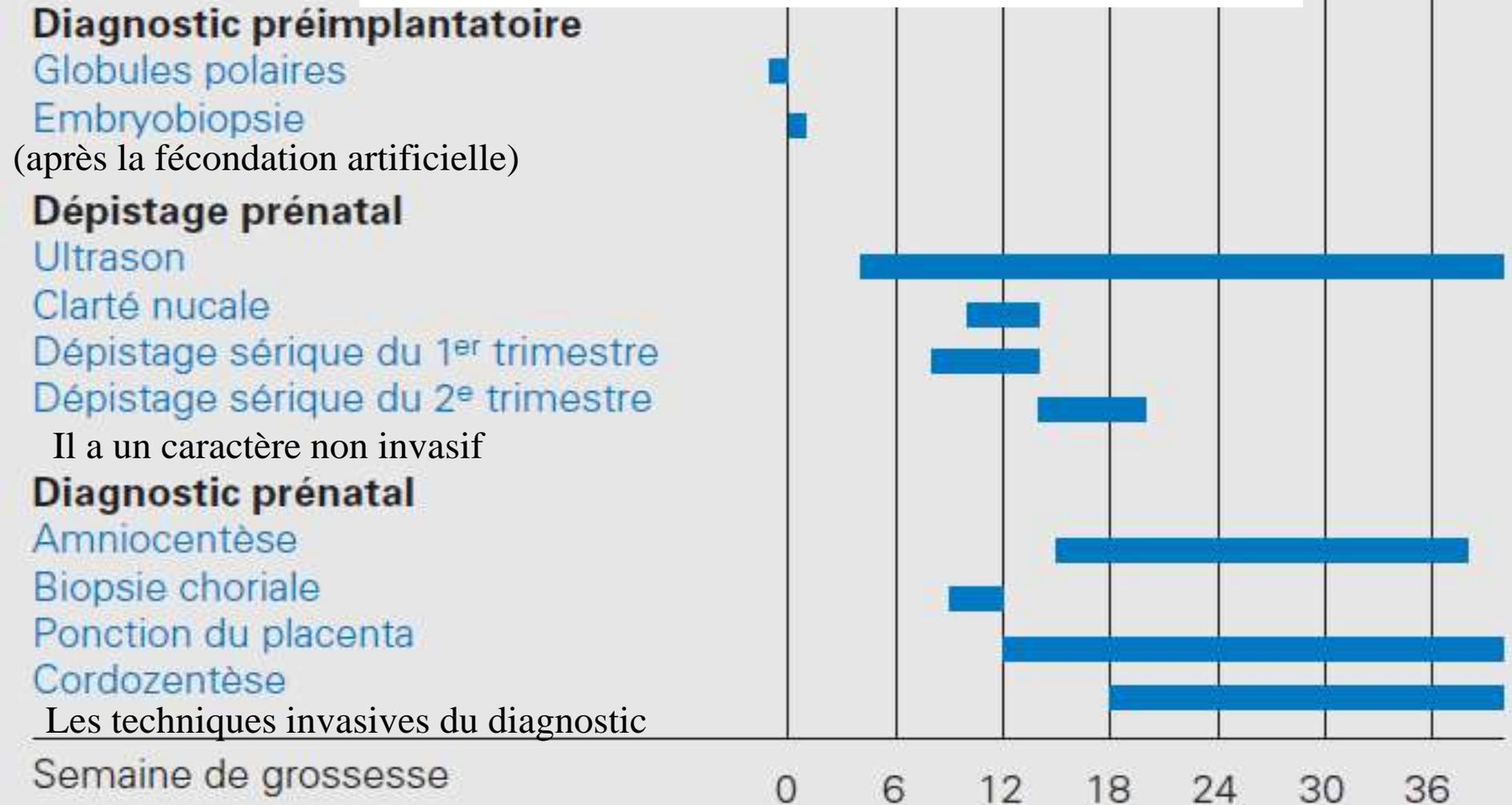
Le domaine de la génétique moléculaire,
l'étude des gènes responsables de maladies,
est en constante évolution.

La génétique moléculaire,

initialement tournée vers les maladies monogéniques graves de l'enfant
(telles **la myopathie de Duchenne**, **la mucoviscidose**),
avec un but essentiellement de diagnostic prénatal,
se tourne depuis quelques années vers les maladies monogéniques de
déclaration tardive, chez l'adulte (telle la chorée de **Huntington**),
ainsi que vers l'oncogénétique (les cancers du colon, du sein) et,
plus récemment, vers les maladies multigéniques ou multifactorielles,
comme **l'hypertension artérielle** ou le **diabète**.

Cela s'effectue dans un but de **diagnostic**,
de meilleure prise en charge de la maladie,
mais aussi dans un but de diagnostic présymptomatique :
c'est l'« ère » de la prédiction génétique.

Les analyses génétiques prénatales.



l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel

Il est désormais possible d'analyser des fragments d'ADN fœtal présents dans le sang de la mère et récoltés à partir d'une simple prise de sang chez cette dernière.

Cette pratique constitue un progrès important car elle évite des prélèvements invasifs et leurs risques.

Diagnostic génétique

■ Diagnostic prénatal :

définition

- recherche de la mutation identifiée chez le parent à risque sur un prélèvement de tissu foétale
(choriocentèse, amniocentèse, cordocentèse)
 - *pour les maladies graves à début précoce*
- mucoviscidose, amyotrophie spinale, dystrophie de Duchenne

■ Diagnostic présymptomatique :

définition

- déterminer si une personne à risque, encore asymptomatique, est porteuse de l'anomalie génétique responsable de la maladie
 - *pour les maladies à révélations tardives*
- formes familiales de cancer, de cardiopathie, maladie de Huntington

Techniques d'étude d'anomalies du Génome entre Microlésions et Macrolésions

MACROLESIONS

Echelle du Chromosome

MICROLESIONS

Echelle du Gène

CYTOGENETIQUE

2 à 5Mb

CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE

Centaines de kb à 1kb

GENETIQUE MOLECULAIRE

Quelques kb à 1pb

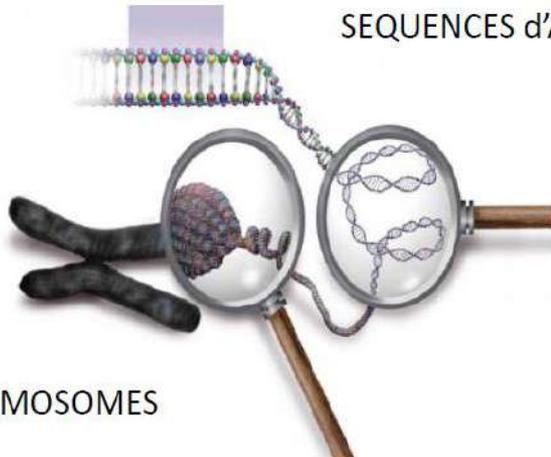
Résolution

Quelques dizaines ou 1000ers de pb

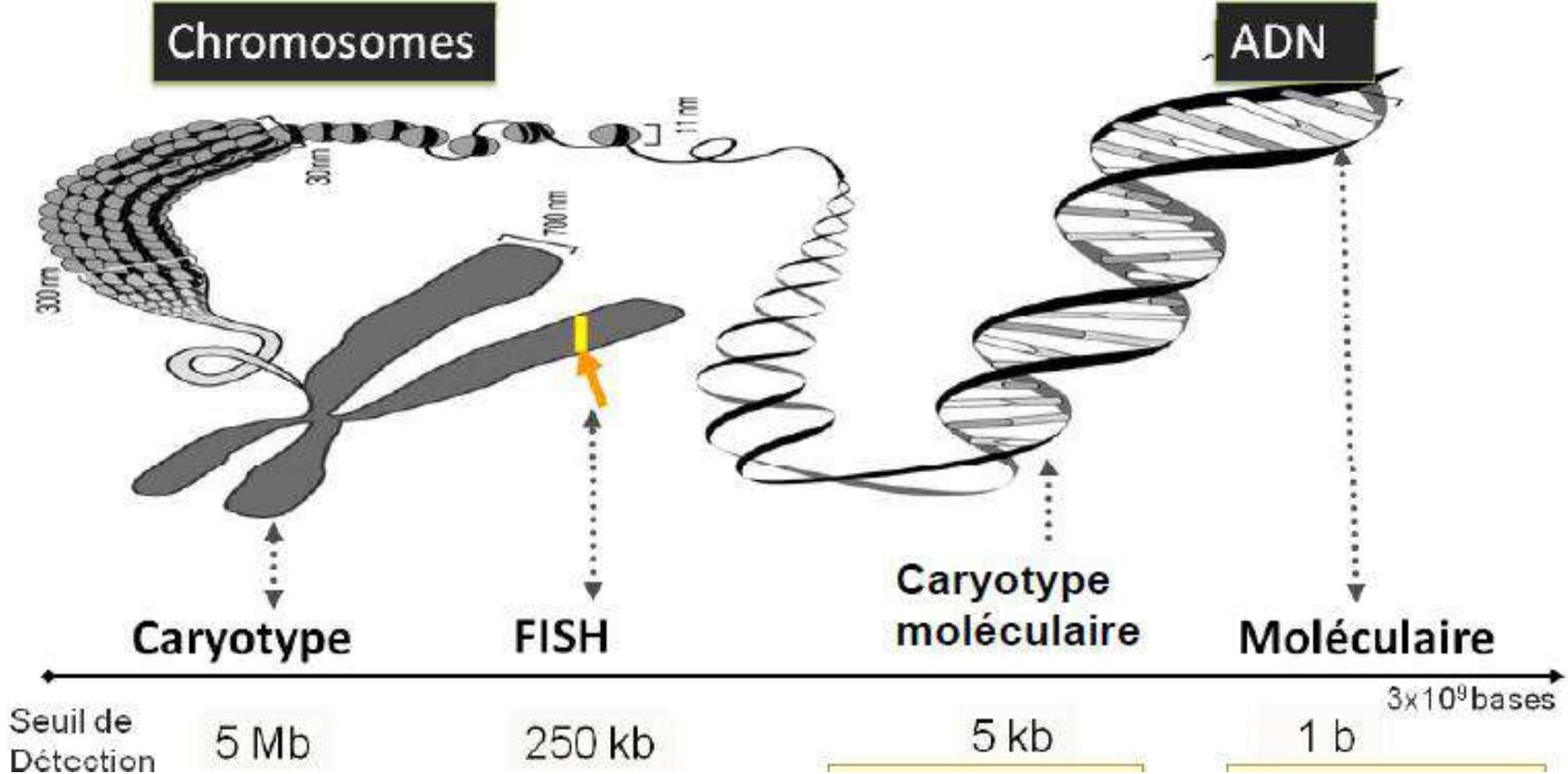
■ CGH array

■ Autres: Southern Blot, ...

SEQUENCES d'ADN



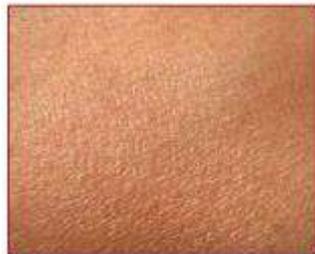
CHROMOSOMES



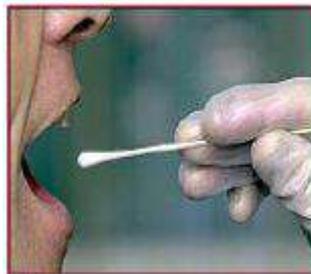
PRELEVEMENTS



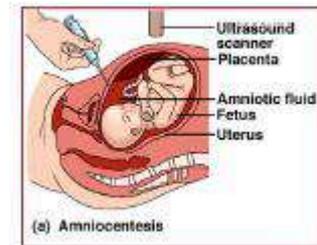
Sang,



peau,



frottis buccal etc..



Liquide amniotique

METHODES BIOLOGIQUES DE DIAGNOSTIC

-1: Analyse phénotypiques

(biochimiques et métaboliques rarement histologiques):

dosages enzymatiques dans certaines maladies métaboliques.

-2 : Le caryotype métaphasique

Il faudra au minimum une mutation de 5 Mb (mégabase) pour qu'elle soit détectée (anomalie de nombres et anomalie de structure).

-3 : Hybridation in situ en fluorescence.

La **FISH** peut s'appliquer aux cellules fœtales au stade d'interphase.

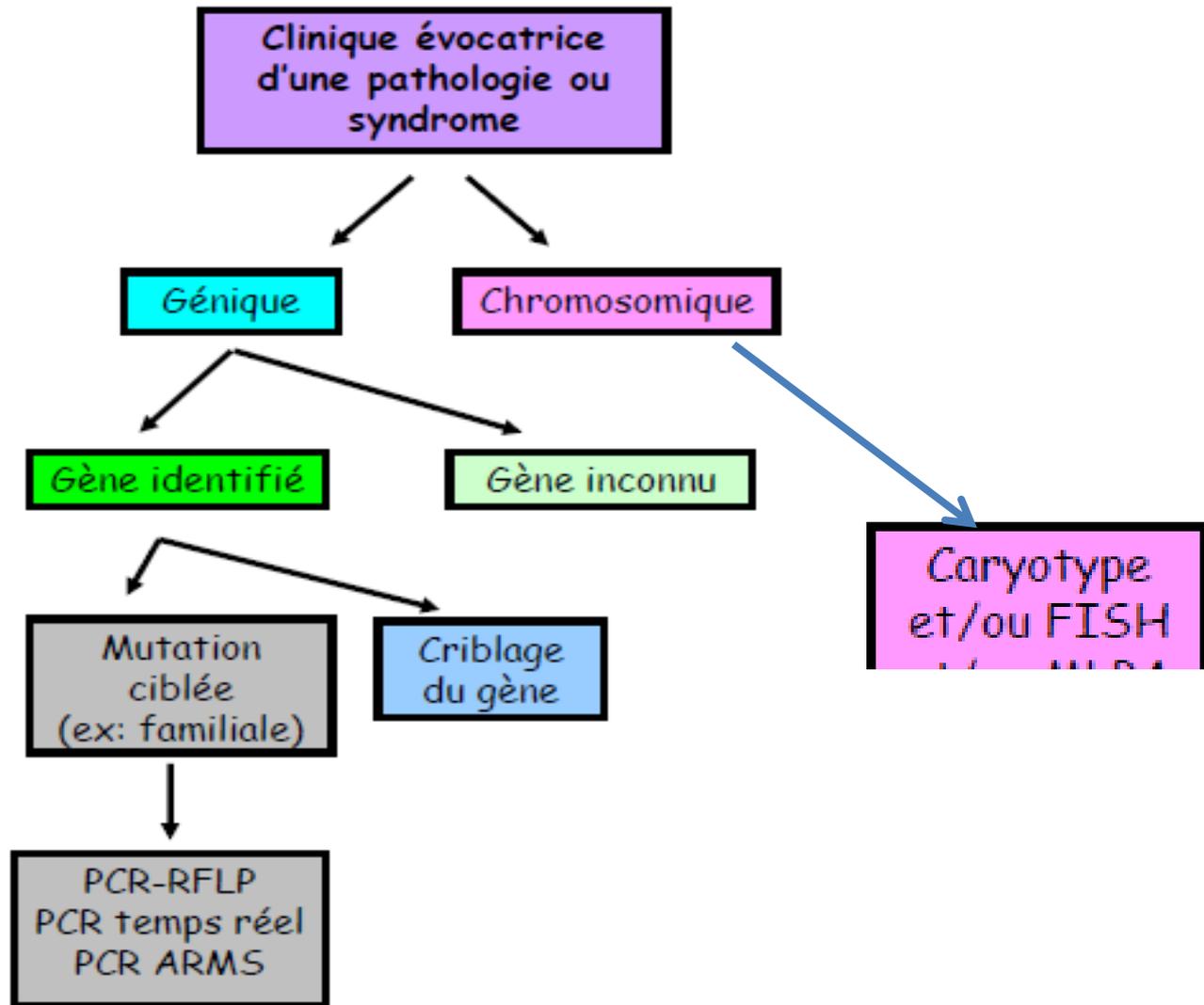
Elle pourra confirmer, dès le prélèvement du liquide amniotique, la présence d'un complément euploïde ou aneuploïde.

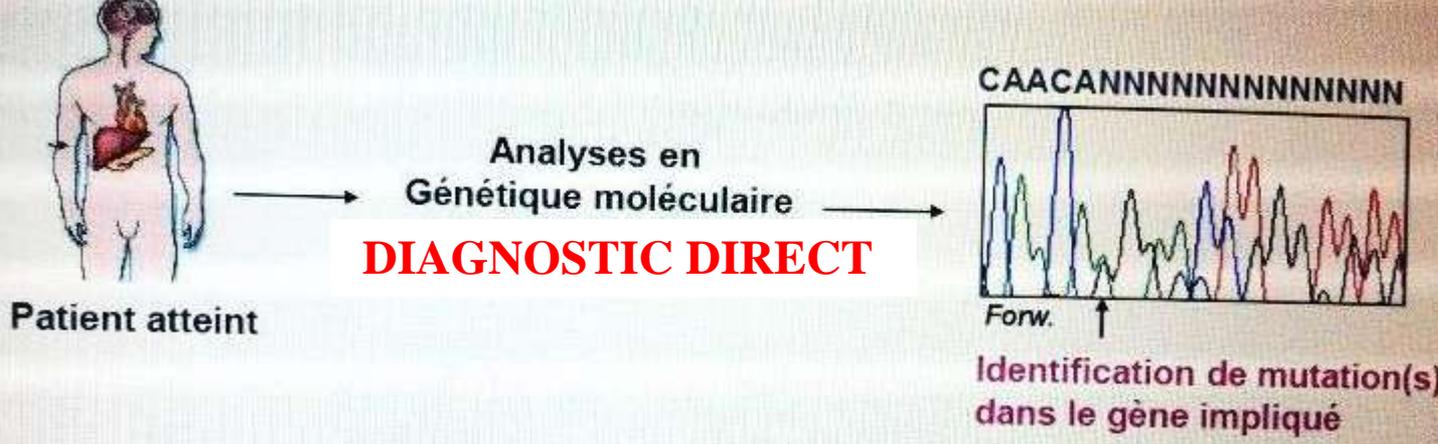
-4 : Analyses moléculaires:

***- Recherche directe d'une mutation:** lorsque cette dernière est spécifique de la pathologie recherchée, ou lorsque la mutation à l'origine de la maladie dans la famille étudiée a été déjà identifiée.

***- Diagnostic indirect par utilisation de marqueurs génétiques après étude familiale.**

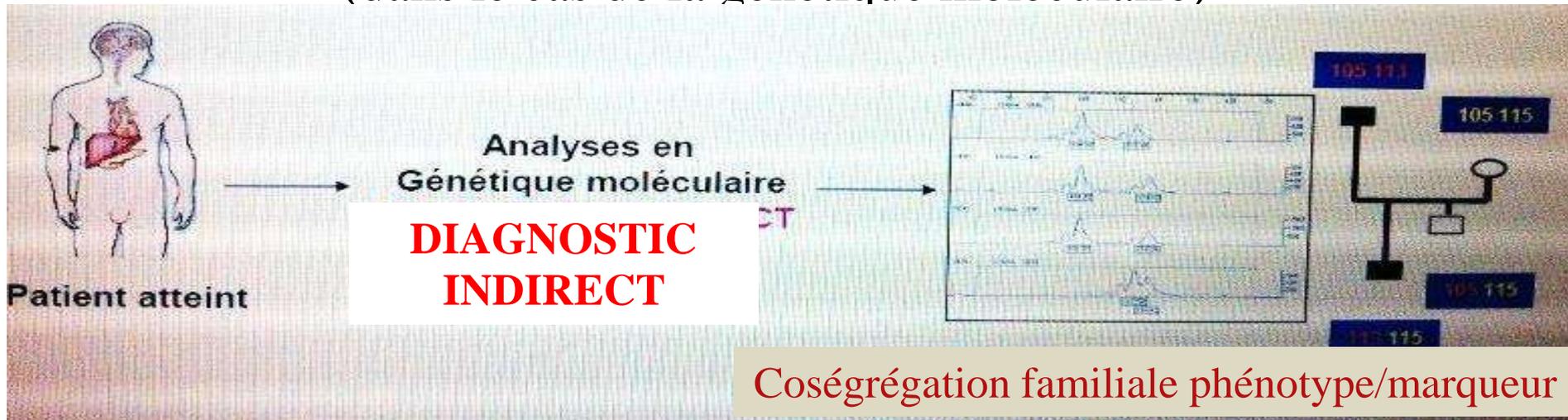
Lorsque le gène clairement impliqué dans la maladie est localisé mais non encore cloné ou lorsque les mutations du gène responsable sont très hétérogènes.





Le diagnostic direct :
 identification de l'anomalie causale :

identification de la mutation dans le gène impliqué
 (dans le cas de la génétique moléculaire)



Le diagnostic indirect : Approche secondaire si les analyses directs ne permettent pas d'identifier l'anomalie génétique causale. Consiste à suivre indirectement la transmission de la mutation au sein de la famille grâce à des marqueurs génétiques.

Diagnostic indirect

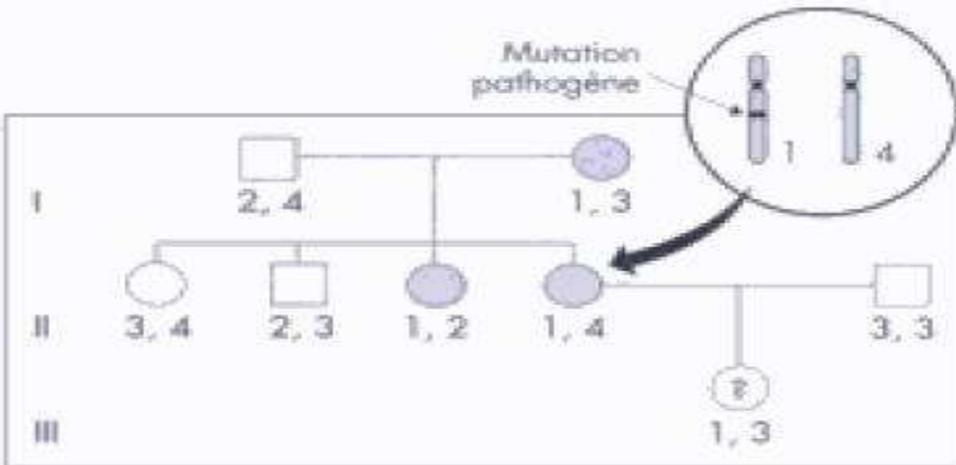
C'est l'étude de la transmission des différents allèles d'un locus dans une famille.

Technique utilisée quand la mutation n'est pas encore identifiée

Liaison ou linkage

Deux loci localisés sur le même chromosome parental peuvent demeurer ensemble ou être séparés au cours de leur transmission.

La recombinaison lors du crossing-over est responsable de la ségrégation indépendante de deux loci situés sur le même chromosome.



Principe :

Repérage de la transmission de la mutation par l'analyse familiale de marqueurs génétiques (polymorphismes)



Plus 2 loci sont proches, moins grandes sont les chances de recombinaisons.

La coségrégation de deux ou plusieurs loci est nommée liaison

et ne concernent que les loci pas les allèles.

TESTS GÉNÉTIQUES

De nombreux tests génétiques apportent des informations relatives à la santé des individus ou à celle de leur famille.

Ces tests consistent à rechercher des anomalies sur la molécule d'ADN, ou à dépister des anomalies concernant le nombre ou la forme des chromosomes.

Ils peuvent être réalisés avant la naissance (**test prénatal**) ou après, à n'importe quel âge (**test postnatal**).

Techniques de détection de remaniements géniques

La détection de tels remaniements

(délétions, inversions, duplications de fragments de gènes)

fait historiquement appel à la technique de « **Southern blot** »,

qui impose de travailler avec 10 à 20 fois plus d'ADN

que la **technique de PCR**,

ce qui constitue une difficulté pour le diagnostic prénatal par exemple,

et impose un délai de rendu de résultats de 7 à 10 jours.

elle est supplantée par la technique de PCR qui permet,

en quelques heures de faire le diagnostic

de délétion, de duplication ou ...

L'ADN est présent dans toutes les cellules nucléées et sa séquence est identique dans toutes les cellules d'un même organisme.

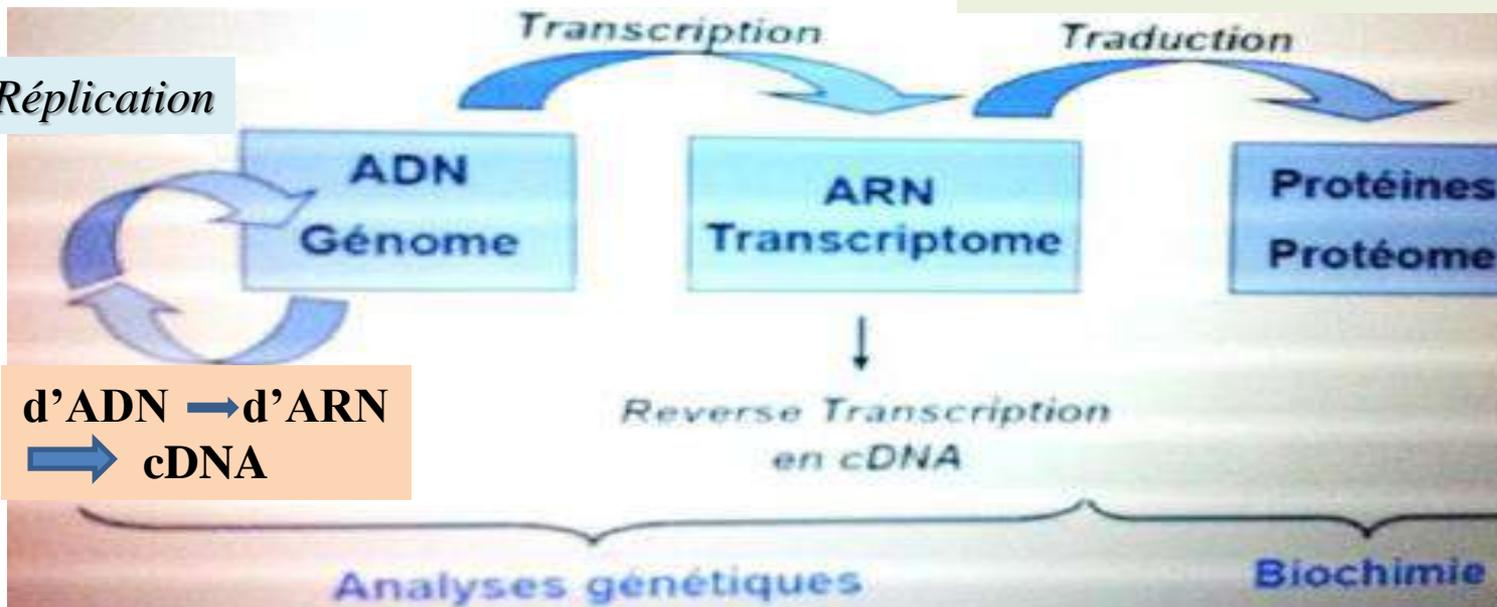
Il y a 12 picogrammes d'ADN par cellule.

1 ml de sang contient environ 5 millions de leucocytes soit 60 mg d'ADN. Cette quantité est largement suffisante pour le diagnostic moléculaire et parfois pour des études de recherche.

L'analyse de l'ADN est un moyen de diagnostic utilisé depuis plusieurs années et cette technologie évolue très vite .

Le matériel génétique constitutionnel est identique dans toutes les cellules du corps

Ubiquitaire ou spécifiques d'un tissu d'un type cellulaire d'un état



Nous allons traiter deux techniques largement utilisées en diagnostic médical: la PCR et le séquençage de l'ADN.

LES ANALYSES MOLÉCULAIRES

Effectuée sur de l'ADN extrait de cellules nucléées :

sanguines, fibroblastes, des cheveux, buccale, tumoral, amniotique, chorioniques, ...

Le choix de la technique dépend du gène à analyser ainsi que du type de prélèvement.

§- *Techniques de Southern blot*

Électrophorèse de l'ADN fragmenté par une enzyme de restriction, transfert sur une membrane et hybridation avec une sonde

§- *Réaction en chaîne par l'ADN polymérase : PCR*

Amplification de l'ADN ou de l'ARN en quelques heures, en plusieurs millions de copies.

Permet donc des analyses sur base d'un matériel très petit.

§- *Analyse au moyen des sondes oligonucléotidiques allèle spécifiques*

Une sonde oligonucléotidique est une séquence connue de nucléotides d'un gène particulier avec un marqueur radioactif ou tout autre marqueur.

Hybridation de l'ADN avec sonde qui ne s'hybride qu'avec de l'ADN ayant une séquence normale → ne donne des infos que dans la recherche de mutations connues.

§- *Séquençage d'un gène*

Détermination de la séquence complète de nucléotides d'un gène.

§- *Autres techniques*

I- ANALYSES DIAGNOSTIQUES CLASSIQUES

CARYOTYPE: LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

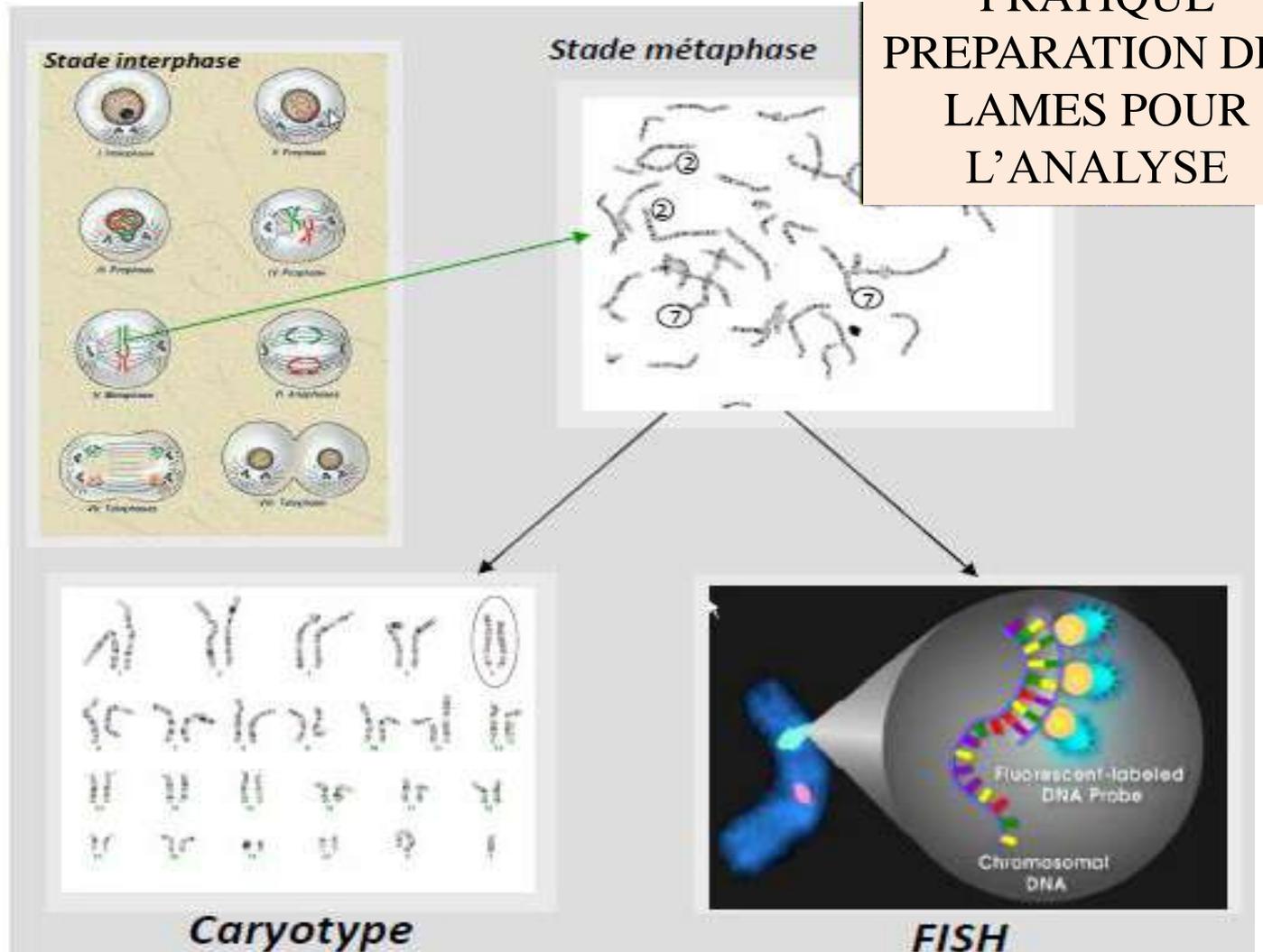
mutations de grandes tailles

Culture cellulaire

Division cellulaire

Analyse des Chromosomes

Interprétation

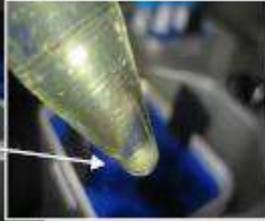


Résultat anormal: 46,XY,del(5)(p13p15.1)

délétion hétérozygote sur un des chromosomes 5 impliquant la région du bras court.....



Liquide amniotique



Mise en culture



Changement de milieu

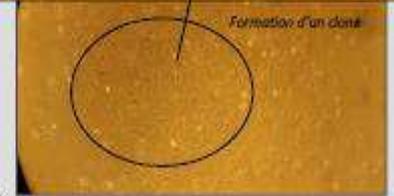
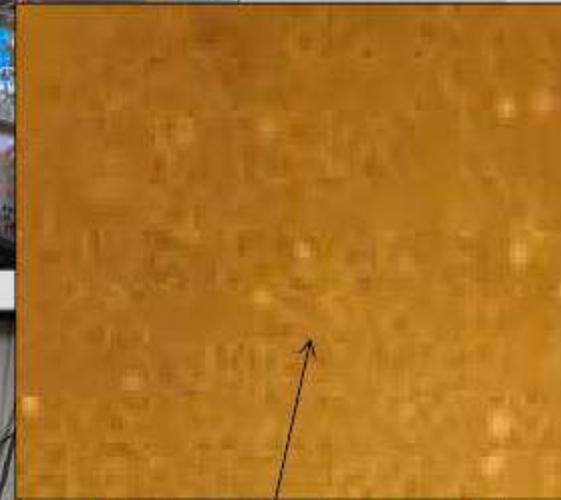
Culture cellulaire



*Division cellulaire
(Etuve à CO₂)*



observation



Formation d'un clone

*Clones cellulaires
Liquide amniotique*

Division cellulaire

Analyse des Chromosomes



Microscope



Analyse sur photo



Système d'analyse ordinateur



Dossiers en attente d'interprétation

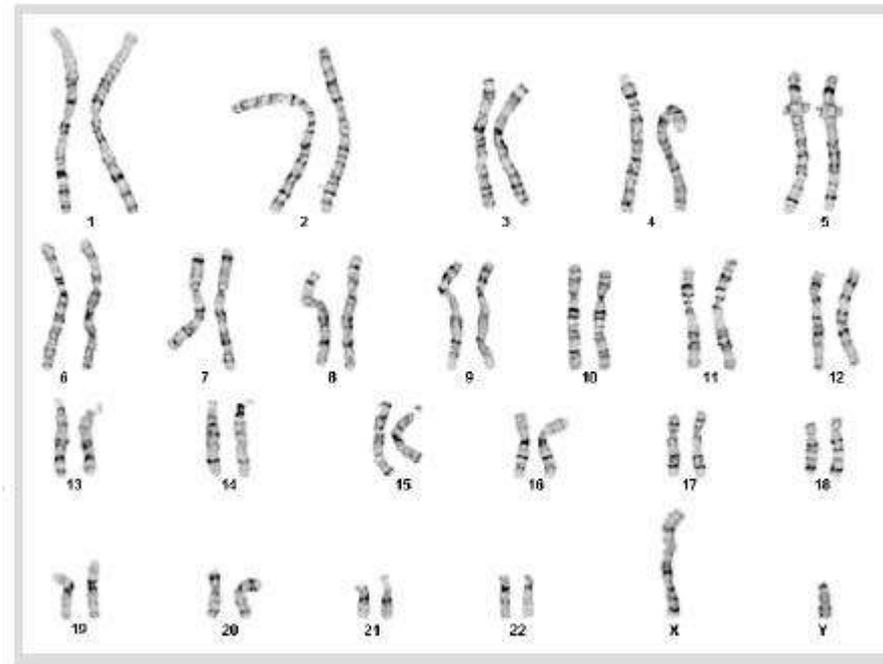
Résultat anormal : présence d'une translocation entre les chromosomes....

Interprétation



métaphase

CARYOTYPE



Résultat: 46,XY masculin normal

II- MUTATION GENIQUE- RECHERCHE DE MUTATIONS DE PETITE TAILLE

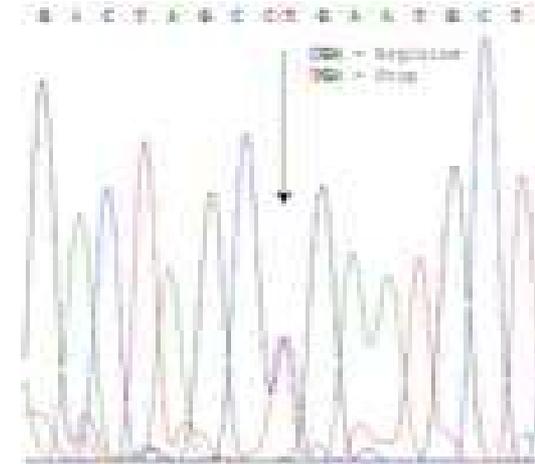
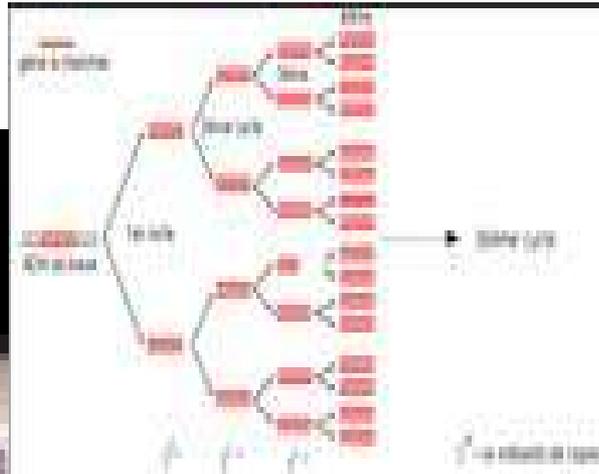
Choix de la stratégie diagnostique

- Maladie (homogénéité /hétérogénéité génétique)
- Mutation récurrente ou hétérogénéité allélique
 - Différents types de mutations

Extraction d'ADN

PCR

Séquençage



Situations

- 1) Mutations prédéfinies: screening (criblage)
- 2)) Mutations inconnues: scanning (balayage)

1- Mutations prédéfinies: screening (criblage)

Exemple de **la mucoviscidose**: Maladie autosomique récessive

Gène impliqué: **CFTR**

Analyse: **détection de certaines mutations par hybridation.**

§- Extraction d'ADN: **Extraction de l'ADN génomique**

= **technique permettant d'isoler l'ADN**

de cellules ou de tissus.

§- PCR (*exon spécifique*)

§- Hybridation du produit d'amplification

§- Révélation

ou

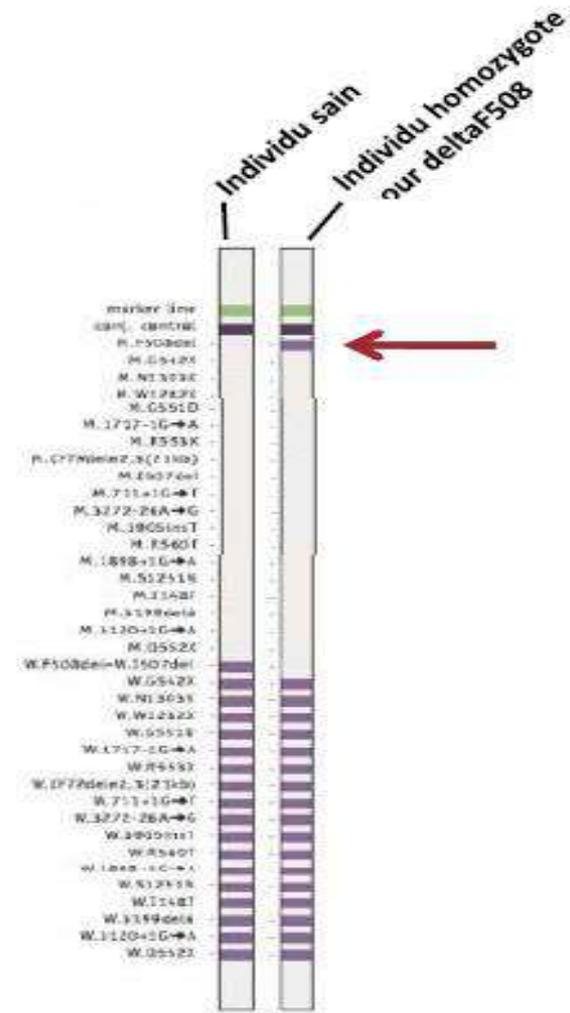
§- Digestion, hybridation (Southern blot),

REMARQUE

L'extraction/purification de l'ADN = 2 Etapes:

*- **Extraction**: digestion des tissus et lyse des cellules

*- **Purification**: séparation de l'ADN des autres constituants cellulaires



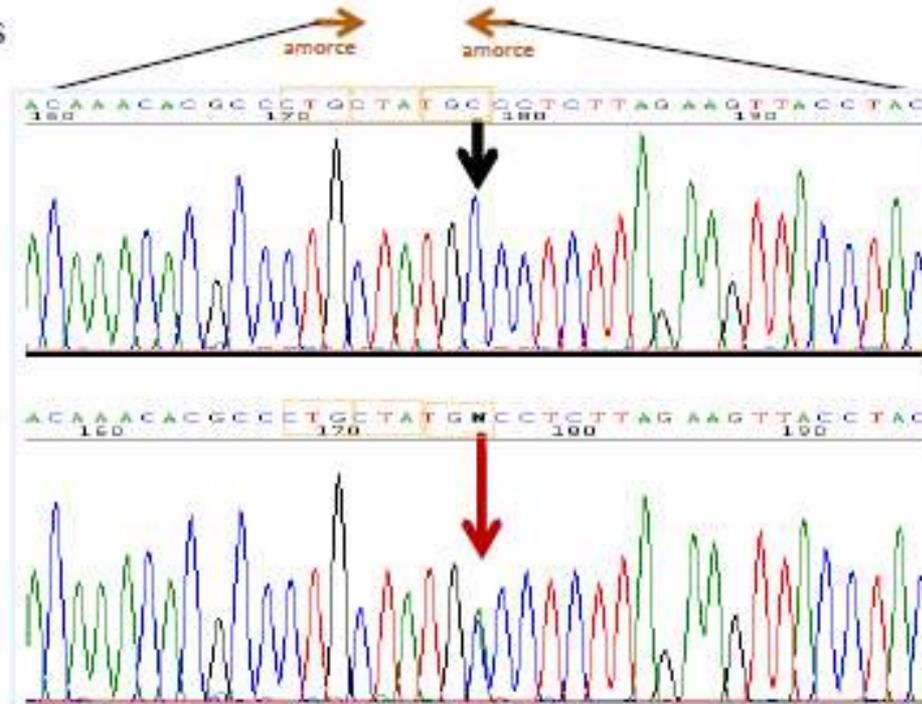
2) Mutations inconnue: scanning (balayage)



Amplification régions codantes

Séquençage

Séquence de référence
(bases de données)



Séquence du patient

Comparaison des
Séquence

Substitution d'un nucléotide hétérozygote

.. CCC CTG CTA TGC CCT ...

CYS



.. CCC CTG CTA TGA CCT ...

STOP

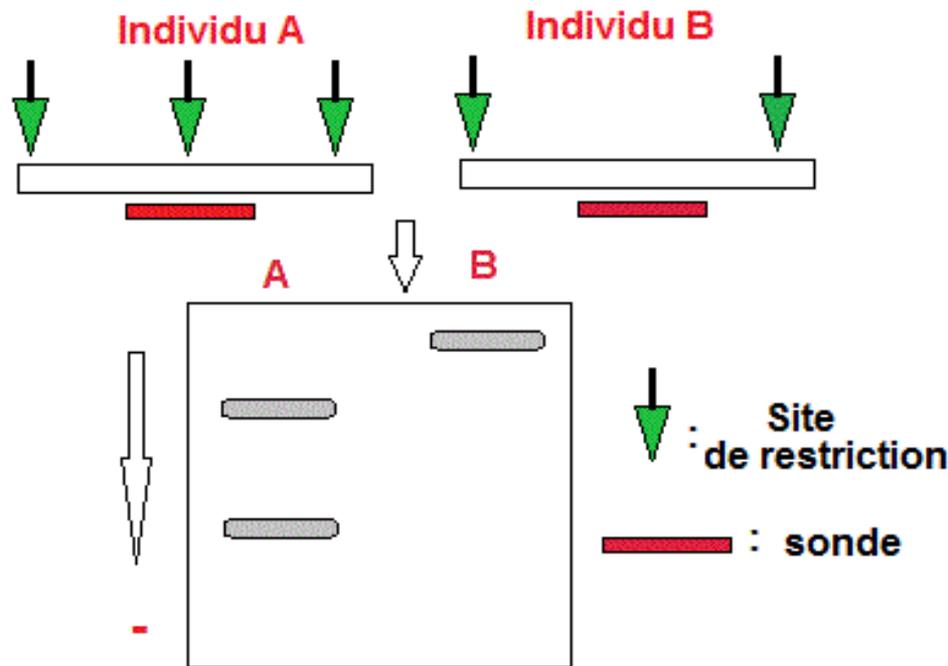
- RFLP : polymorphisme de longueur de fragment de restriction

Origines du polymorphisme de restriction (RFLP) :

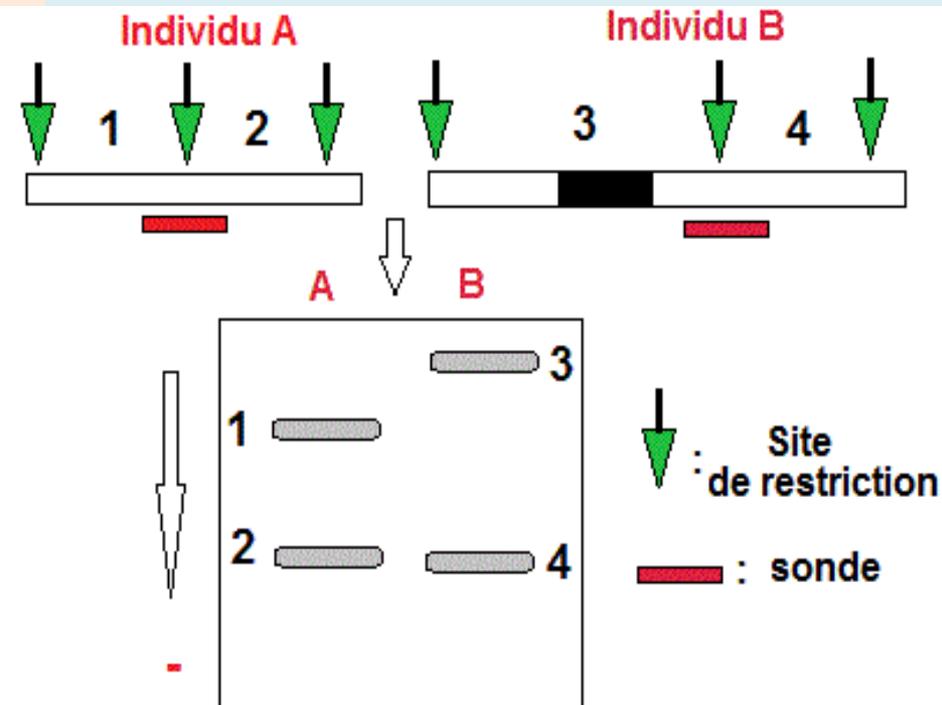
- Perte ou gain d'un site de restriction
- Mutation de type insertion-délétion

Dans les deux cas les loci sont généralement bialléliques et l'expression des allèles est codominante.

Polymorphisme du à la disparition d'un site de restriction (mutations ponctuelles).



Polymorphisme du aux mutations de type « insertion – délétion ».



RAPPELS

A- Enzymes de restriction : molécules extraites à partir de microorganismes (généralement des bactéries) et qui coupent les liaisons phosphodiester au niveau des acides nucléiques.

1 Les exonucléases : Elles digèrent l'ADN à partir de l'extrémité 5' ou 3'.

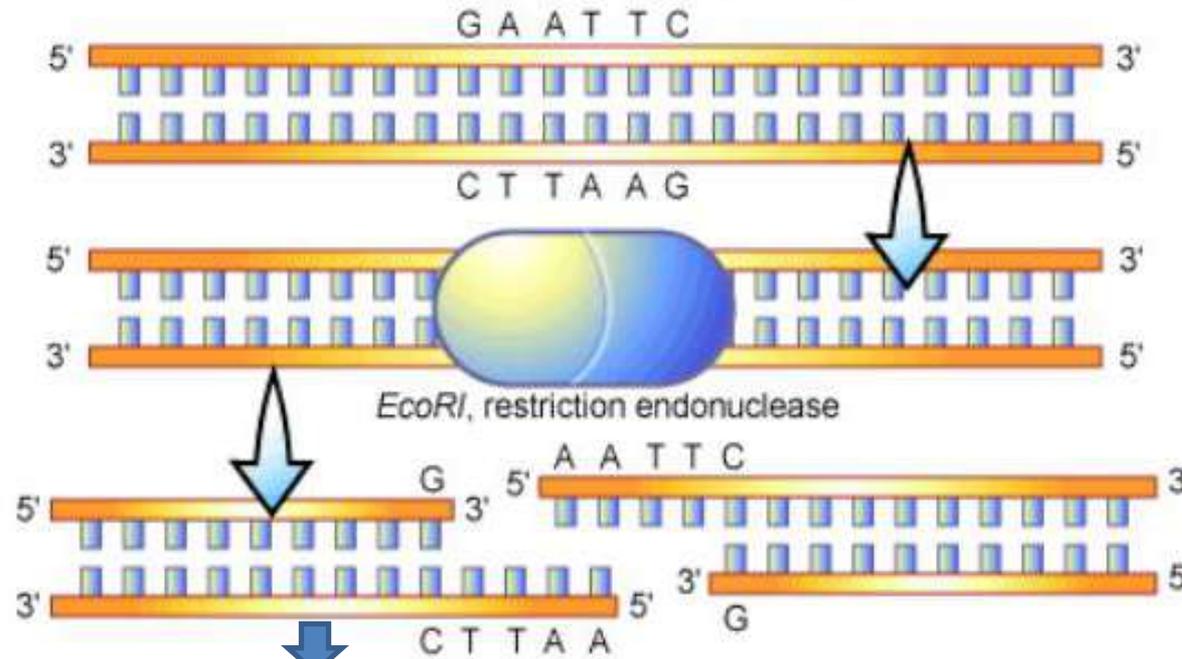
2 Les endonucléases : elles coupent l'ADN à l'intérieur en cassant les liaisons phosphodiester.

Les **endonucléases** coupent au niveau de sites spécifiques appelés « **sites de restrictions** » ces sites sont de nature **palindromique**, c'est-à-dire que la lecture des deux brins complémentaires dans des sens opposés donne la même séquence

«**palindrome**»



Les enzymes de restriction sont des ciseaux moléculaires clivant des liaisons phosphodiester entre deux nucléotides.



En fonction de la position de ces sites, la restriction va produire des fragments de taille différente.

Ces fragments seront ensuite séparés lors d'une électrophorèse.

extrémités cohésives

Il y a **deux catégories d'endonucléases** :

- (a)*- celles qui donnent des **extrémités franches** et
- (b)*- celles qui donnent des **extrémités cohésives**.

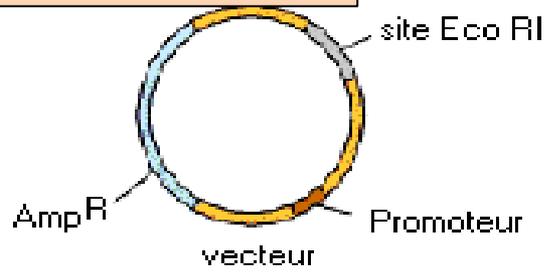
Séquence palindromique

(a)*BamH1 :	5' G/GATCC 3' 3' CCTAG/G 5'	5' ...G 3' ...CCTAG	+	GATCC 3' G 5'
(b)*SmaI	5' CCC/GGG3' 3' GGG/CCC5'	5' ...CCC 3' ...GGG	+	GGG 3' CCC 5'

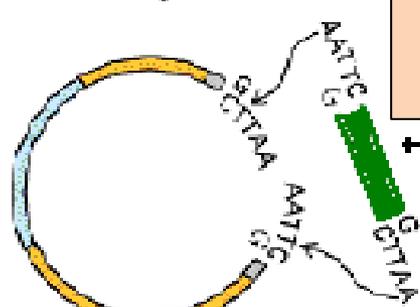
B- Le clonage moléculaire

OBJECTIFS: Permet d'obtenir une grande quantité de **copies identiques** absolument **pures** d'une séquence donnée d'ADN

(2) VECTEUR



EcoRI (ouverture du vecteur avec EcoRI)



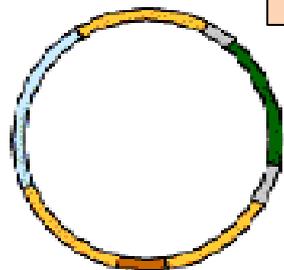
(3) VECTEUR et INSERT sont dirigés par la même enzyme de restriction

(1) INSERT : produit PCR ou fragment d'ADN d'intérêt

(6) Obtenir un ADN recombinant pur en grande quantité

(4) LIGATION

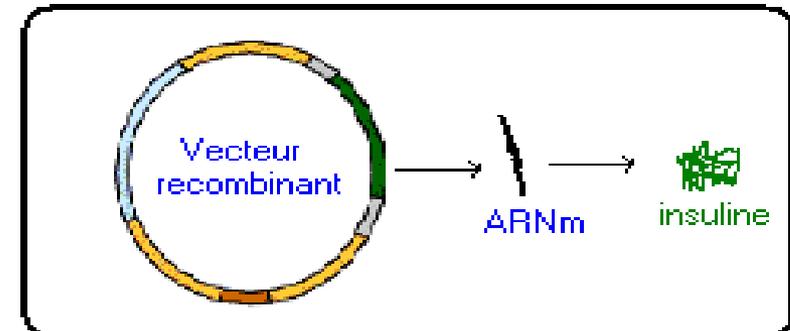
ligase+ATP (fermeture du vecteur)



VECTEUR RECOMBINANT

(5) Introduire l'ADN recombinant dans une cellule hôte

Transformation d'une cellule receptrice



synthèse de l'insuline par la cellule receptrice

extraction et purification de l'insuline

Stratégie de la synthèse de l'insuline par génie génétique

Pour mettre en évidence les RFLP, on réalise **un southern blot**.

Les étapes : **Le Southern blot** :

1- Préparation de l'ADN à étudier

-- **Digestion** par une **enzyme de restriction** adéquate.

-- **Séparation** des fragments par électrophorèse.

· **Dénaturation de l'ADN** par incubation du gel d'électrophorèse dans une solution de soude.

· **Transfert de l'ADN** sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon par un flux de liquide entraînant l'ADN :

- Une feuille de membrane en nitrocellulose (ou encore en nylon) est placée sur le gel.

- Une pression est appliquée au gel en plaçant une pile de serviettes de papier et un poids sur la membrane et le gel.

- Ceci va permettre une montée par capillarité du tampon imprégnant le gel.

Ce déplacement de liquide entraîne l'ADN qui va ainsi se fixer **à la membrane de nitrocellulose** (ou de nylon).

-- **Fixation covalente de l'ADN** sur la membrane par cuisson (nitrocellulose) ou exposition aux U.V courts (nylon).

2- Hybridation

On ajoute la sonde dénaturée à la solution d'hybridation.

La sonde est marquée de sorte qu'elle puisse être détectée, habituellement par incorporation de la radioactivité ou en "étiquetage« de la molécule avec un fluorophore.

Dans certains cas, la sonde peut être faite à partir d'ARN, plutôt que d'ADN.

3- Lavages

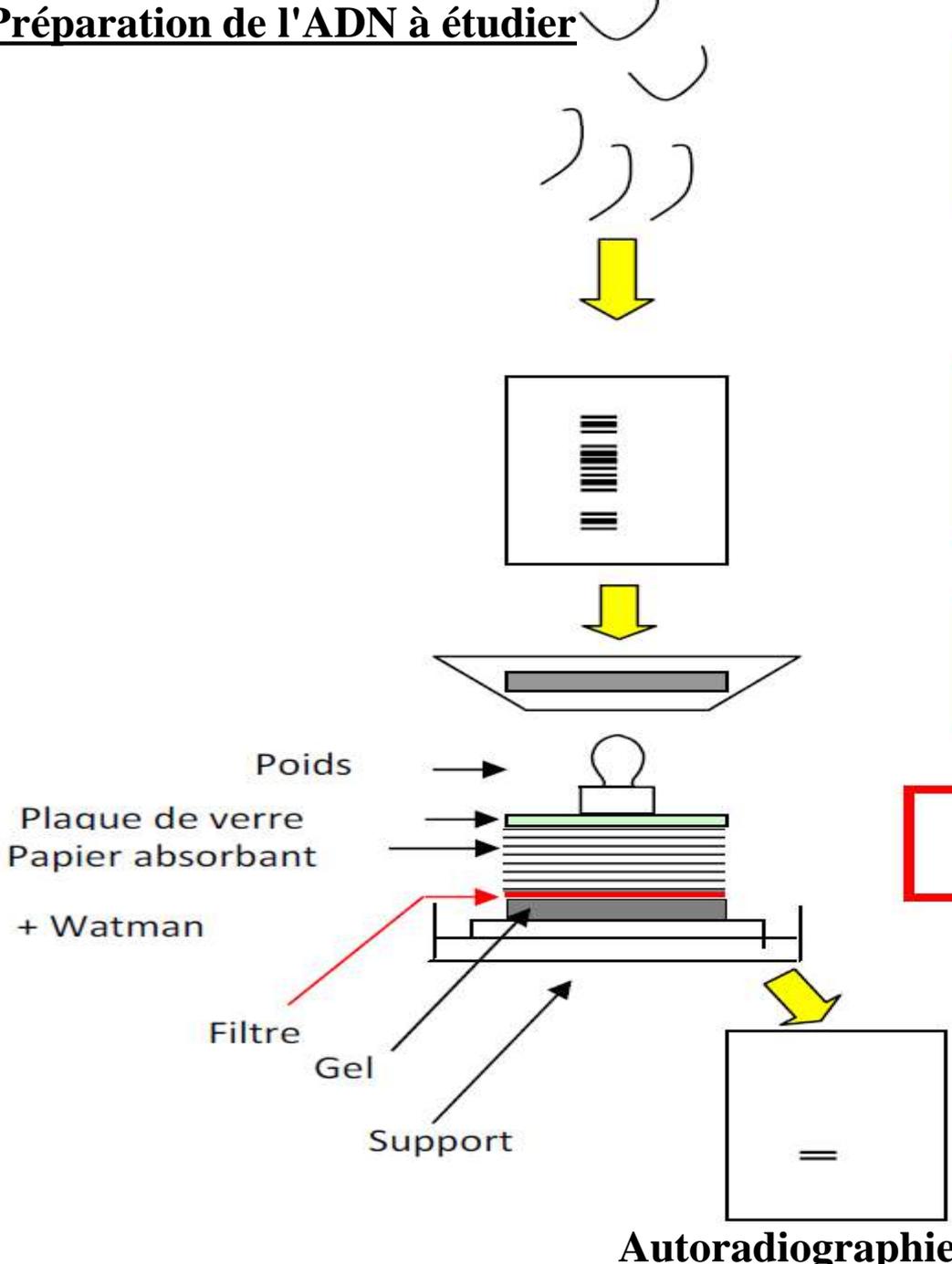
Le lavage élimine la sonde en excès.

4- Autoradiographie

Dans le cas d'une sonde radioactive, on met la membrane en présence d'un film radiographique vierge dans une enceinte opaque pour que la sonde radioactive fixée sur les fragments de l'ADN complémentaires impressionne le film.

On révèle le film : les taches noires (sur le négatif) correspondent aux emplacements où ont migré les fragments d'ADN complémentaires de la sonde.

Préparation de l'ADN à étudier



ADN génomique total digéré par une enzyme de restriction

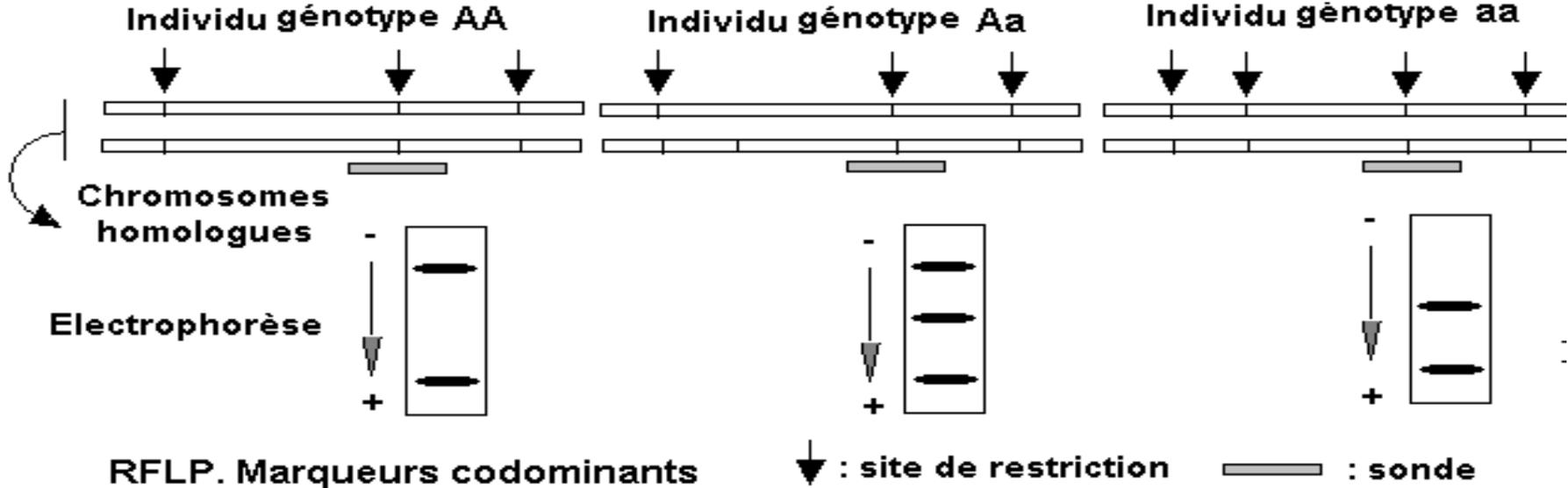
Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Traitement du gel et dénaturation de l'ADN

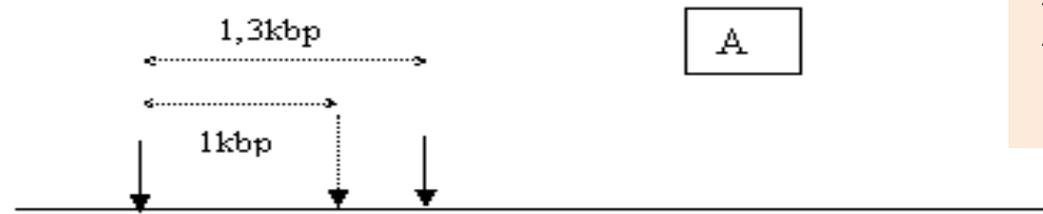
Transfert des fragments d'ADN

Hybridation du filtre avec une sonde spécifique du gène analysé puis révélation par autoradiographie

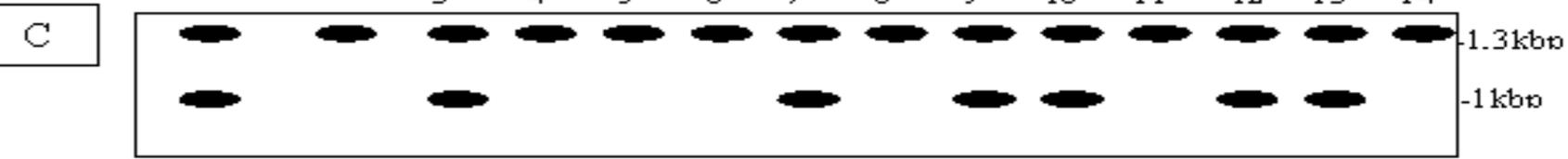
Autoradiographie



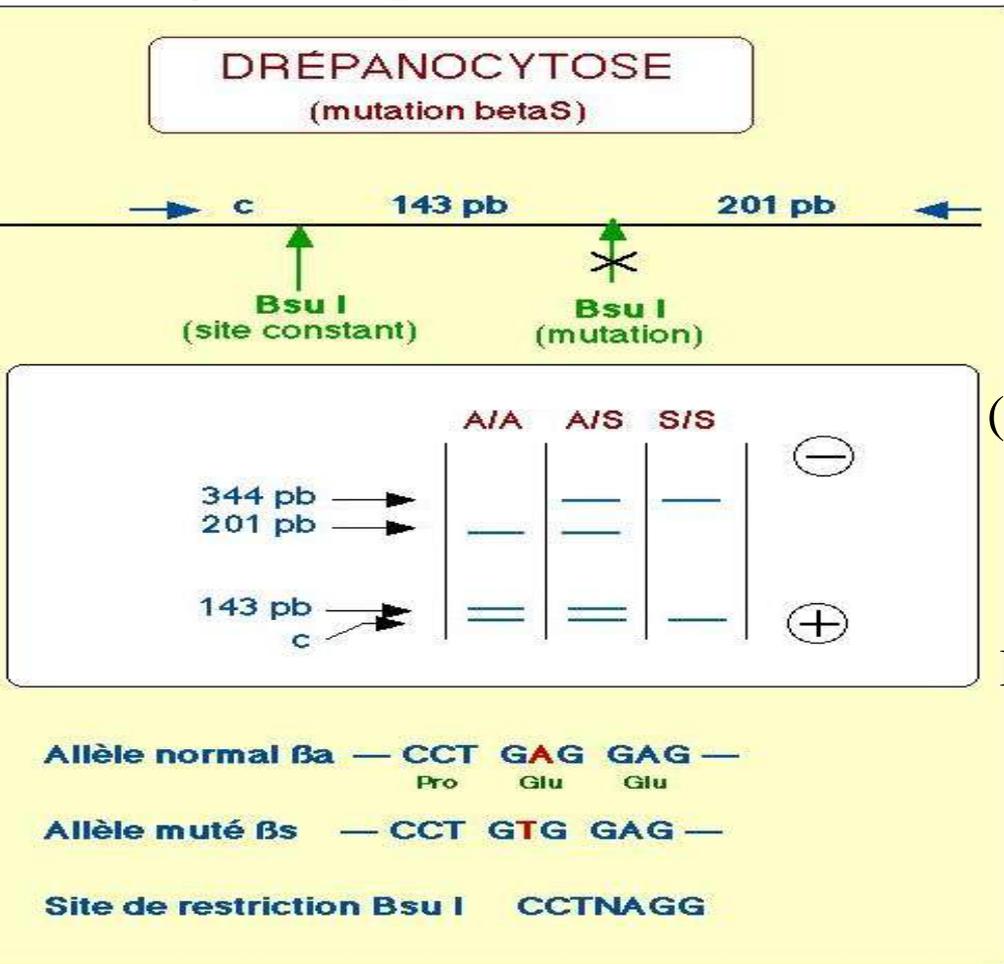
Diagnostic de l'achondroplasie par RFLP



■ sonde utilisée pour révéler le RFLP



Diagnostic prénatal d'anémie falciforme par RFLP intragénique



La drépanocytose est due à une mutation ponctuelle au niveau du sixième codon du gène codant pour la chaîne β de l'hémoglobine ; il s'agit d'une substitution A->T changeant un acide aminé **Glutamate** (GAG) en **Valine** (GTG) = **Hémoglobine S**

Cette mutation conduit à la **suppression d'un site de l'enzyme de restriction Bsu I.**

Il est donc possible de détecter la présence ou l'absence de la mutation par l'utilisation de cette enzyme.

En pratique, la région contenant ce site de restriction est amplifiée par

PCR à partir de l'ADN génomique du patient à tester.

Le produit de PCR est ensuite mis en présence de l'enzyme *Bsu I*.

Les produits de digestion sont séparés sur un gel d'électrophorèse afin de détecter les fragments d'ADN selon leurs tailles.

Dans le cas où la mutation est présente (allèle β_S), **le site de restriction est supprimé et le fragment d'ADN est donc plus long (344 pb).**

Cas clinique I :

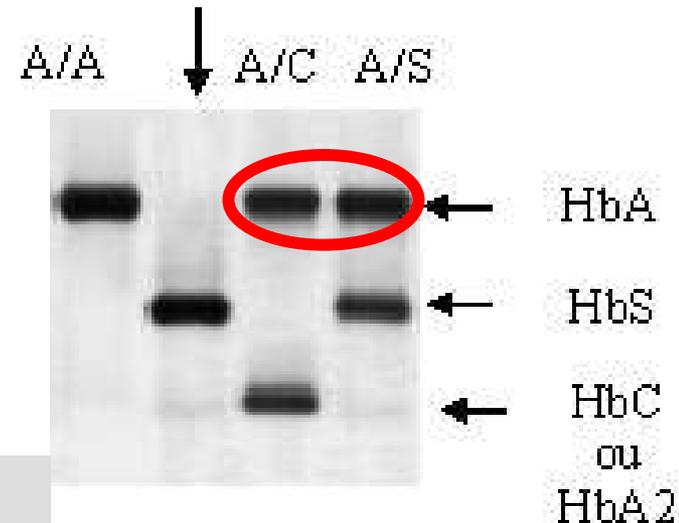
I. Une enfant de 18 mois est hospitalisée en urgence pour une fièvre à 38° C associée à des douleurs abdominales et articulaires. Cette enfant est Béninoise et il n'existe pas d'antécédents familiaux ou personnels.

A l'examen clinique et radiologique, on retrouve une splénomégalie (augmentation de taille de la rate) mais pas de signes évocateurs d'une urgence chirurgicale. La numération formule sanguine révèle une anémie due à une lyse des globules rouges. Un test de solubilité de l'hémoglobine en milieu réducteur est réalisé au laboratoire et confirme le diagnostic.

Cas index

L'électrophorèse de l'hémoglobine à pH 8,6

Remarque: HbC ($\beta 6$ Glu Lys)



**1. Interpréter les résultats,
quel gène est en cause dans cette maladie ?**

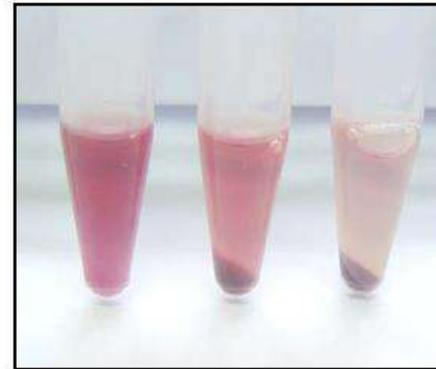
Interprétation des résultats :

-Test de solubilité de l'hémoglobine en milieu réducteur

Hémoglobine S hémoglobinopathie

➤ Drépanocytose

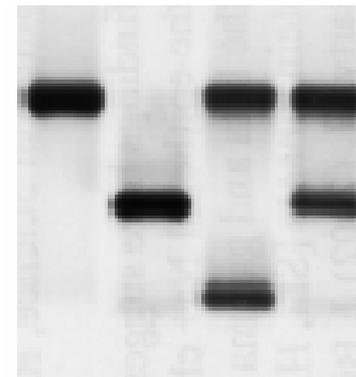
prévalence élevée de la maladie dans certaines régions (2 à 3 % des naissances au Bénin).



AA AS SS

Cas index

A/A ↓ A/C A/S



← HbA

← HbS /HbD

← HbC /HbE
ou
HbA2

Mode de transmission
autosomique récessif,
Gène de la β globine
sujets atteints homozygotes
(individus SS).

-> physiopathologie :
falciformation,
troubles vaso-occlusifs.

-Electrophorèse de l'hémoglobine à pH 8,6

Physiopathologie

À basse concentration d'oxygène,
HbS deoxygénée polymérise
précipitation de l'Hb S et formation
des fibres insolubles.

Accumulation des fibres dans
les globules rouges (forme en faucille).
De telles hématies ne peuvent pas
transporter d'oxygène et peuvent
boucher les capillaires.

Modifications morphologiques du globule rouge.

POLYMERISATION

Rigidité ↑

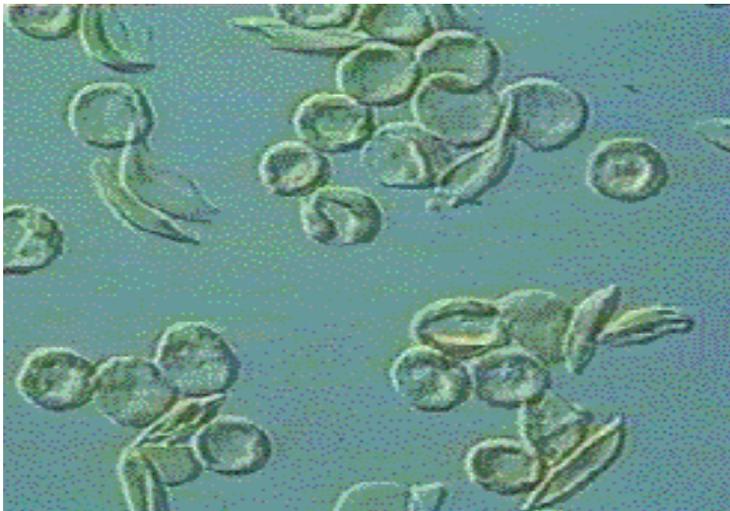
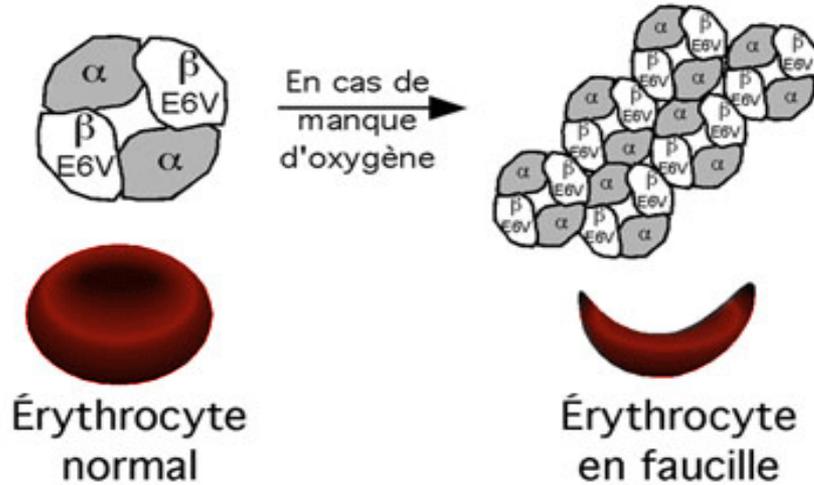
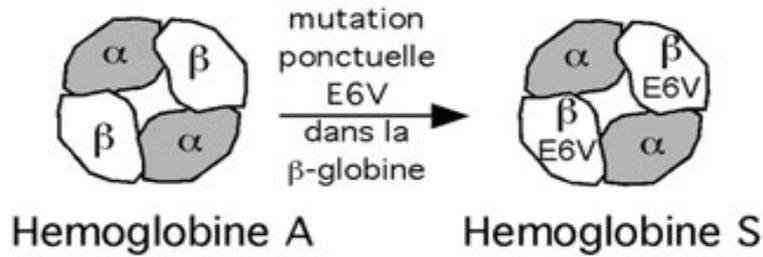
Fragilité ↑

Adhérence ↑

Hémolyse

Occlusions vasculaires

→ **DOULEURS**



PCR (Polymerase Chain Reaction)

Une anomalie génétique que l'on cherche à identifier

Problème : étude au niveau moléculaire → faible quantité de matériel à disposition or il est nécessaire d'avoir une grande quantité de matériel pour réaliser les analyses.

Solution : soit on travaille sur de grandes quantités de prélèvement, soit on utilise l'amplification de la région d'intérêt.

La PCR est une technique permettant d'amplifier en grande quantité une région d'intérêt, basée sur l'utilisation :

- De courts fragments d'ADN synthétiques (les amorces) complémentaires à la séquence d'intérêt (appariement).
- D'une enzyme ADN Polymérase (**Taq** qui est thermostable) qui permet d'amplifier/copier de manière fidèle un ADN cible à partir de régions doubles brin (zones d'appariements ADN cible-amorces).

séquence à amplifier



Techniques d'identification des mutations par la PCR

■ Caractéristiques :

- PCR = *polymerase chain reaction* permet d'amplifier de l'ADN

■ Mécanisme :

1) **dénaturation** en simple brin de l'ADN à 95°C.

2) **hybridation d'amorces** aux 2 extrémités de la région à amplifier à 60°C

-> amorce sens (en 5' du brin sens) s'hybridant avec le brin anti-sens

-> amorce anti-sens (en 3' du brin sens) s'hybridant avec le brin sens.

3) **synthèse d'un brin complémentaire** à partir de l'extrémité 3'OH de l'amorce par la Taq polymérase à 70°C.

4) **formation de 4 brins d'ADN.**

5) **après 35 cycles -> formation de 34 milliards brins d'ADN**

1er cycle

Séquence d'intérêt

ADN matriciel

94°C - Denaturation

40 à 70°C - Hybridation des amorces

amorce F

CCGAGCCTCGGATCCGTCGAG
GGTCTGGAGCCCTGCGCAATTC

CCGGCGATTAGCGGGAGGCGTC
GGGGGCTATGAGCCCTCCGAG

amorce R

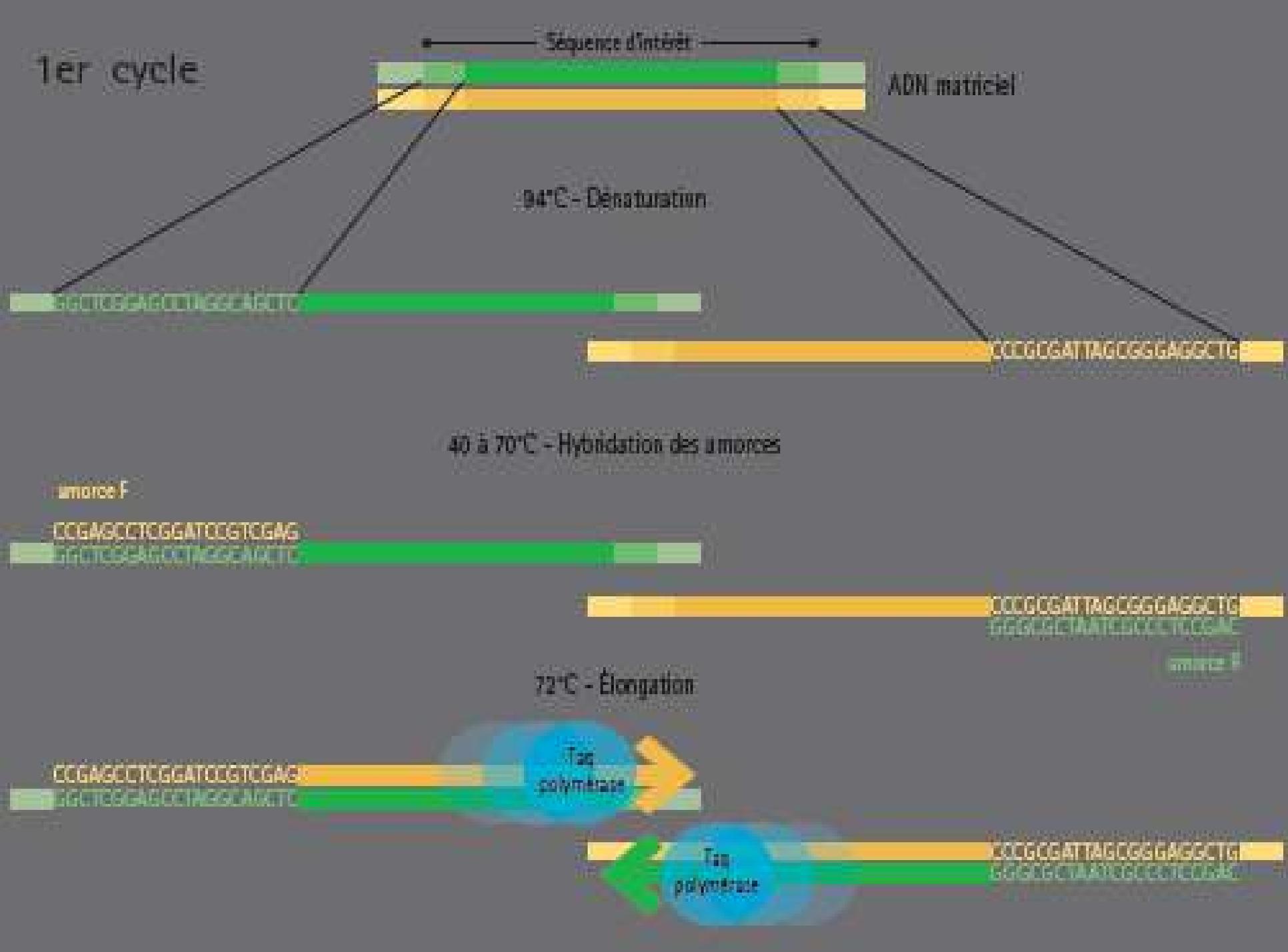
72°C - Élongation

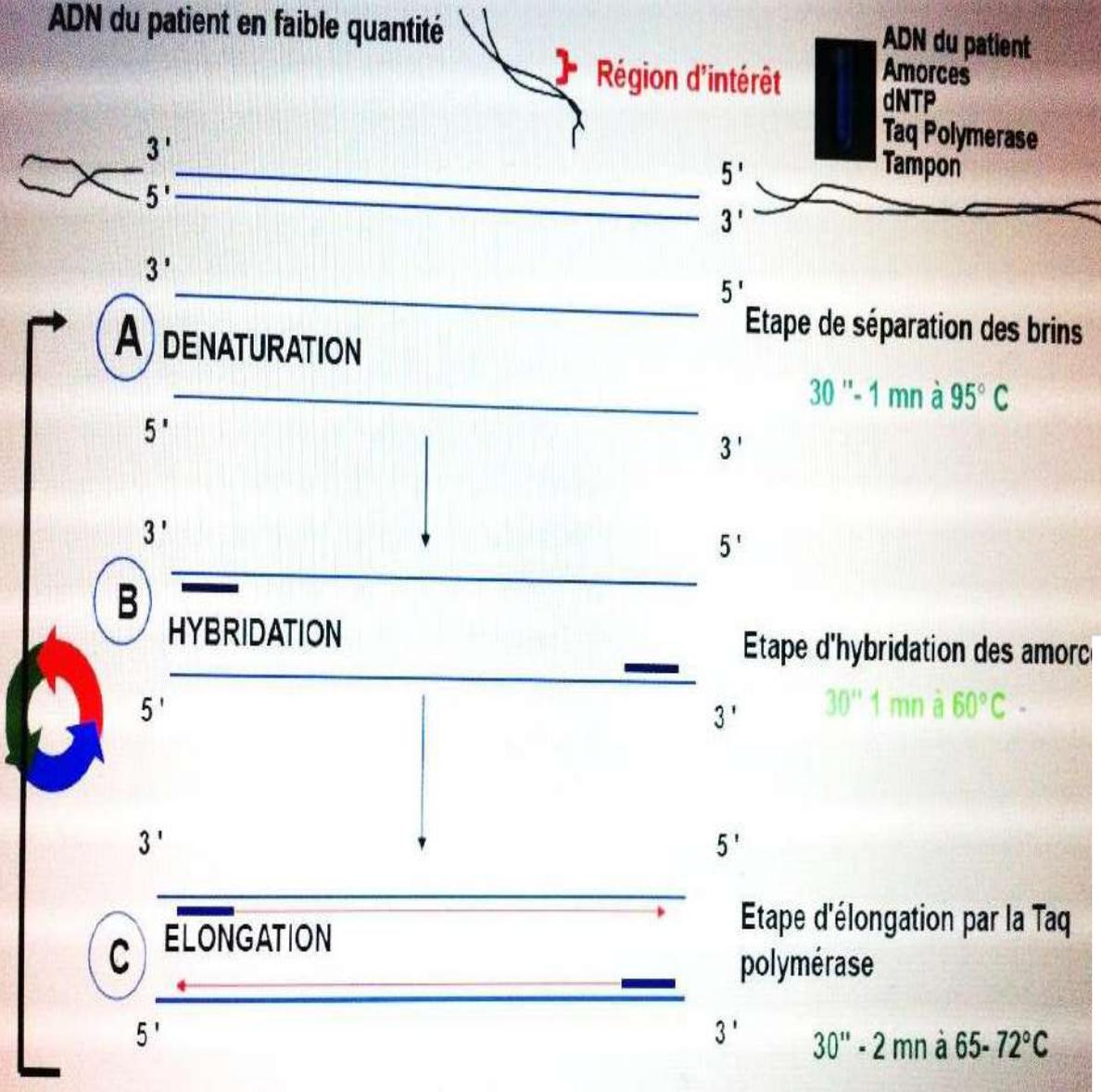
CCGAGCCTCGGATCCGTCGAG
GGTCTGGAGCCCTGCGCAATTC

Taq polymérase

Taq polymérase

CCGGCGATTAGCGGGAGGCGTC
GGGGGCTATGAGCCCTCCGAG

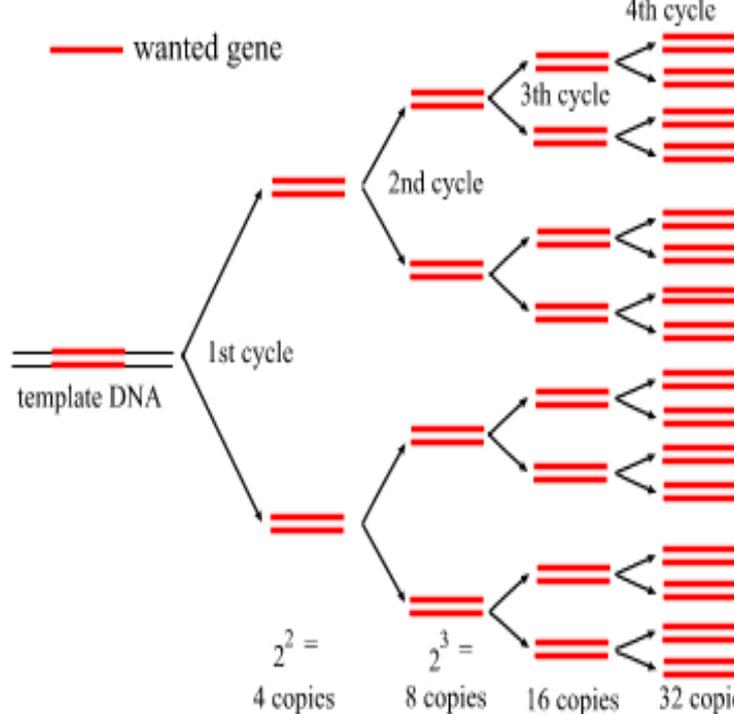




La séquence est doublée à chaque cycle.
Si l'on effectue n cycles on obtient 2^n copies.
La technique de la PCR est répétée environ 30 cycles

➡

amplification exponentielle de la région d'intérêt.



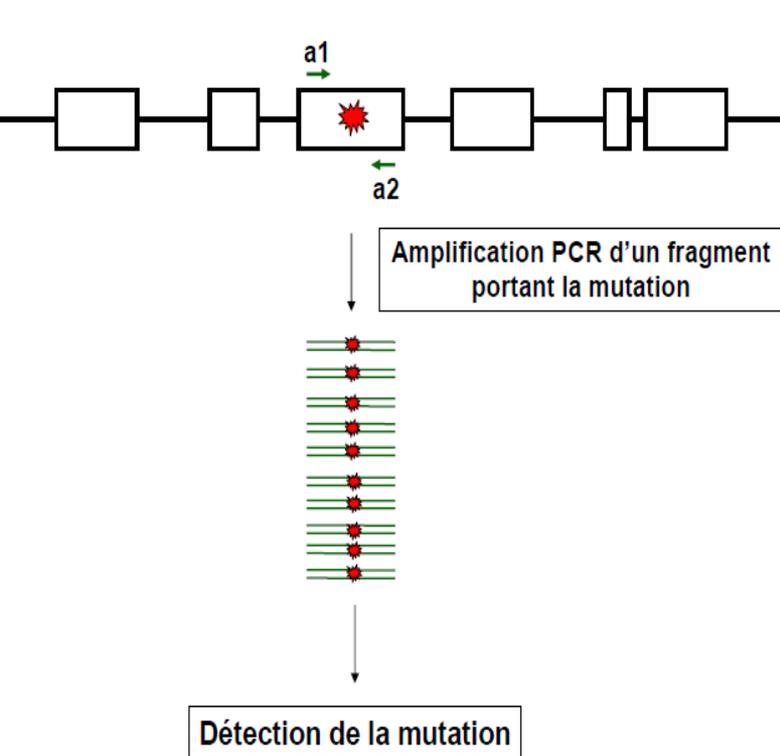
L'objectif n'est pas que d'amplifier mais aussi d'analyser la séquence de la région d'intérêt

Recherche d'une mutation connue

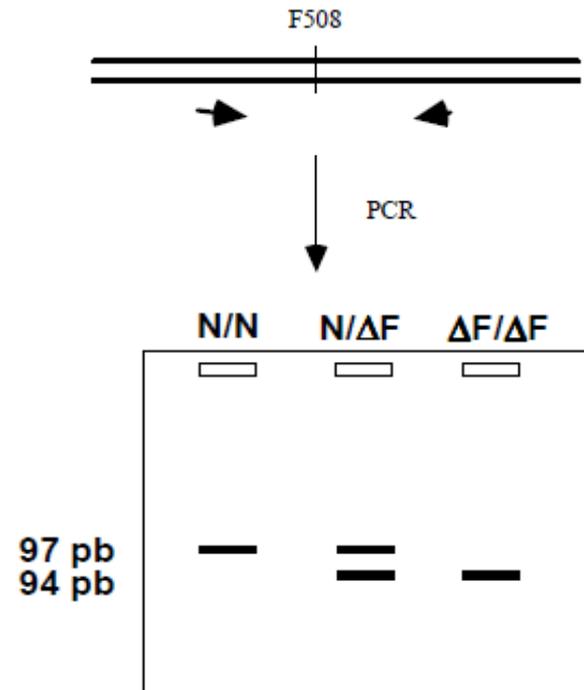
DIAGNOSTIC DIRECT DE LA MUTATION

EXEMPLE 1: MUCOVISCIDOSE : MUTATION DF508

Gène CFTR : cystic fibrosis conductance transmembrane regulator



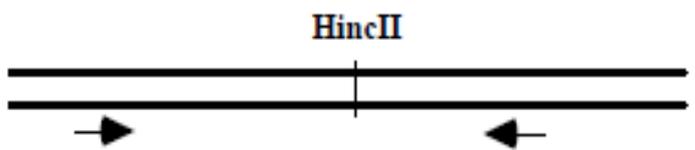
Ile Phe
allèle normal : C ATC TTT GG
allèle DF508 : C AT- - -T GG
Ile



Electrophorèse :
allèle normal : 97 pb
allèle DF508 : 94 pb

MUCOVISCIDOSE : MUTATION G551D Gène CFTR

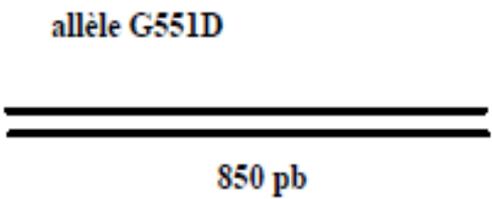
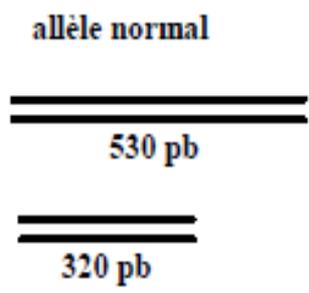
allèle normal : GGT CAA CGA
 allèle G551D : GAT CAA CGA
 (site HincII : GTCAAC)



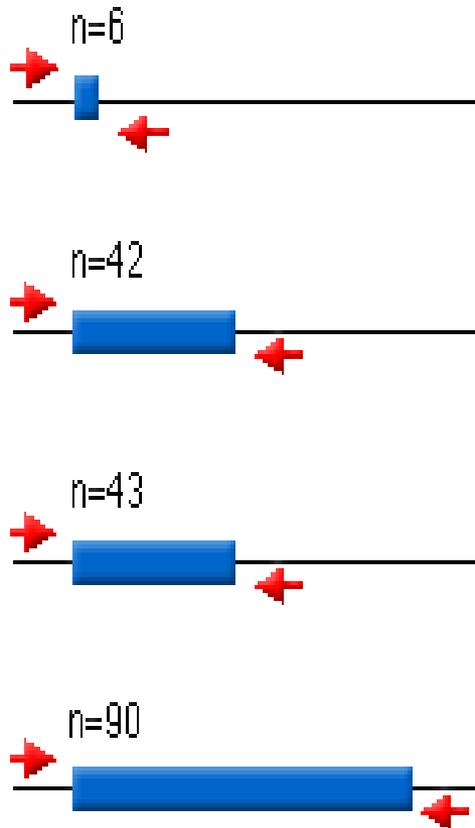
↓ PCR



↙ digestion HincII ↘

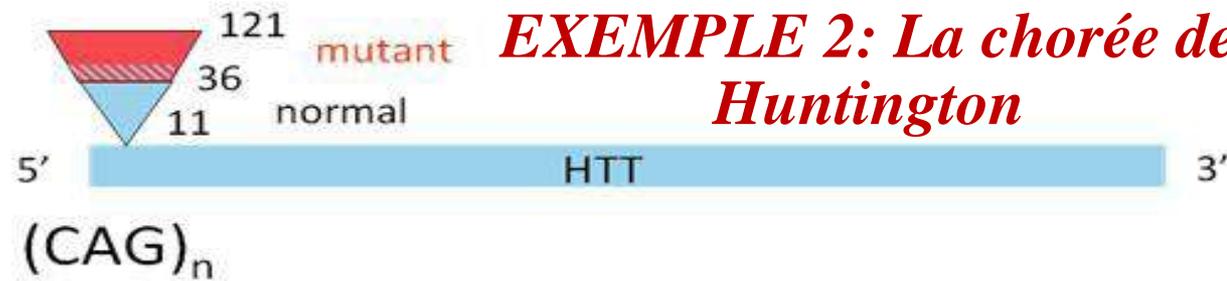


	N/N	N/M	M/M
850 pb			
530 pb			
320 pb			



Légende :

- Répétitions trinuécléotidiques
- n Nombre de répétitions
- ➔ Amorce N°1
- ➔ Amorce N°2

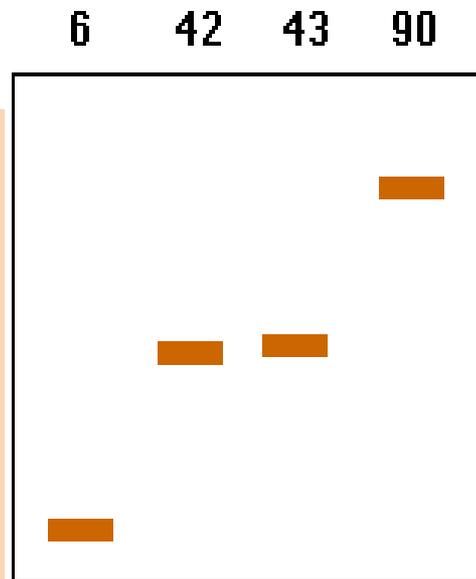


EXEMPLE 2: La chorée de Huntington

L'extrémité 5' de HTT a une séquence (CAG)_n répétitions.

La taille des fragments amplifiés est déterminée par la distance séparant l'amorce N°1 de l'amorce N°2, donc par le nombre de répétitions.

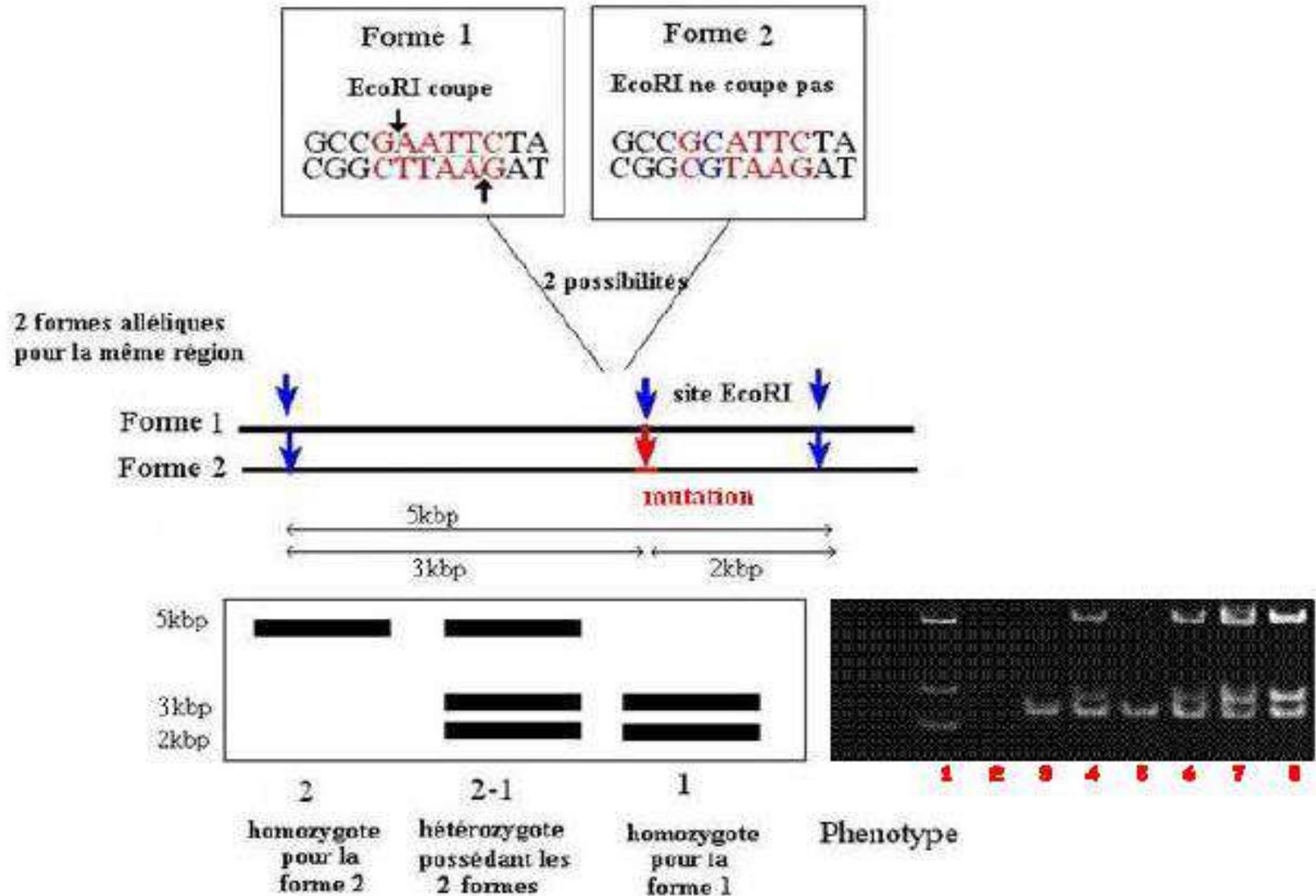
En ce sens, la PCR permet de mesurer la taille des régions variables avec une grande précision si nécessaire.



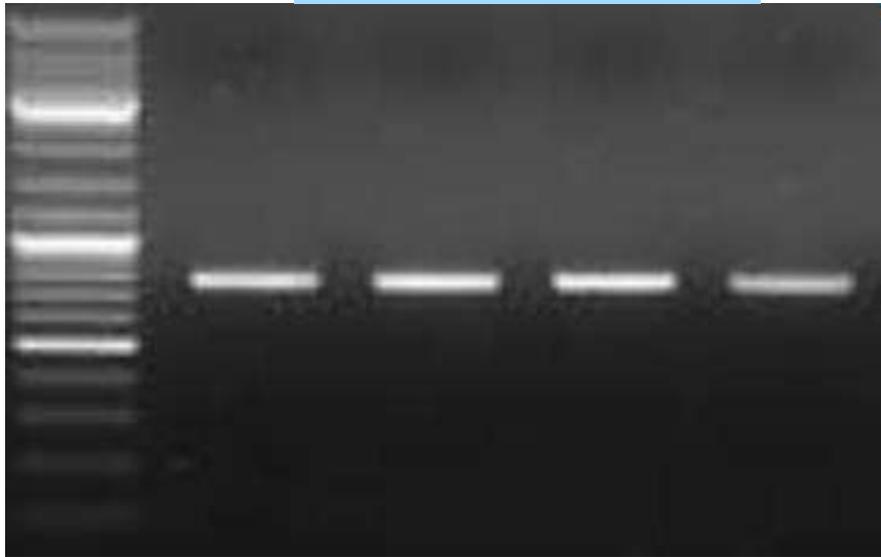
Légende :

- ➔ Résultats après électrophorèse en gel d'acrylamide et coloration.
- Bandes colorées correspondant aux différents produits d'amplification.

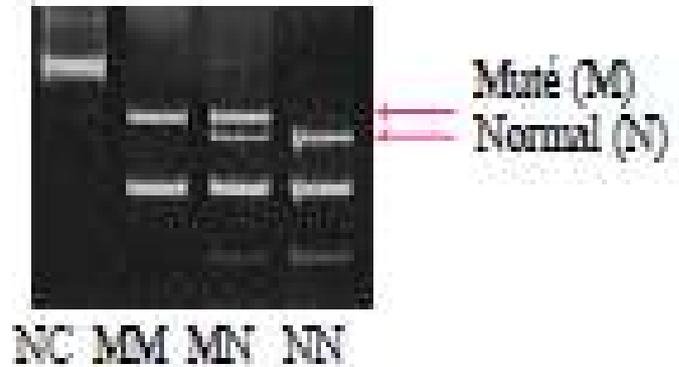
PCR-RFLP (Restriction fragment Length Polymorphism)



Standard-PCR

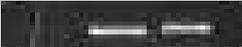


PCR, puis digestion par enzyme de restriction



Analyse au moyen des sondes oligonucléotidiques allèle spécifiques
Une sonde *oligonucléotidique* est une séquence connue de nucléotides d'un gène particulier avec un marqueur radioactif ou tout autre marqueur. Hybridation de l'ADN avec sonde qui ne s'hybride qu'avec de l'ADN ayant une séquence normale → ne donne des infos que dans la recherche de mutations connues.

PCR avec une amorce N ou M
Deux réactions en parallèle

 PCR avec amorce M

 PCR avec amorce N

NN MM MN

Électrophorèse: la technique la plus utilisée pour la séparation des acides nucléiques

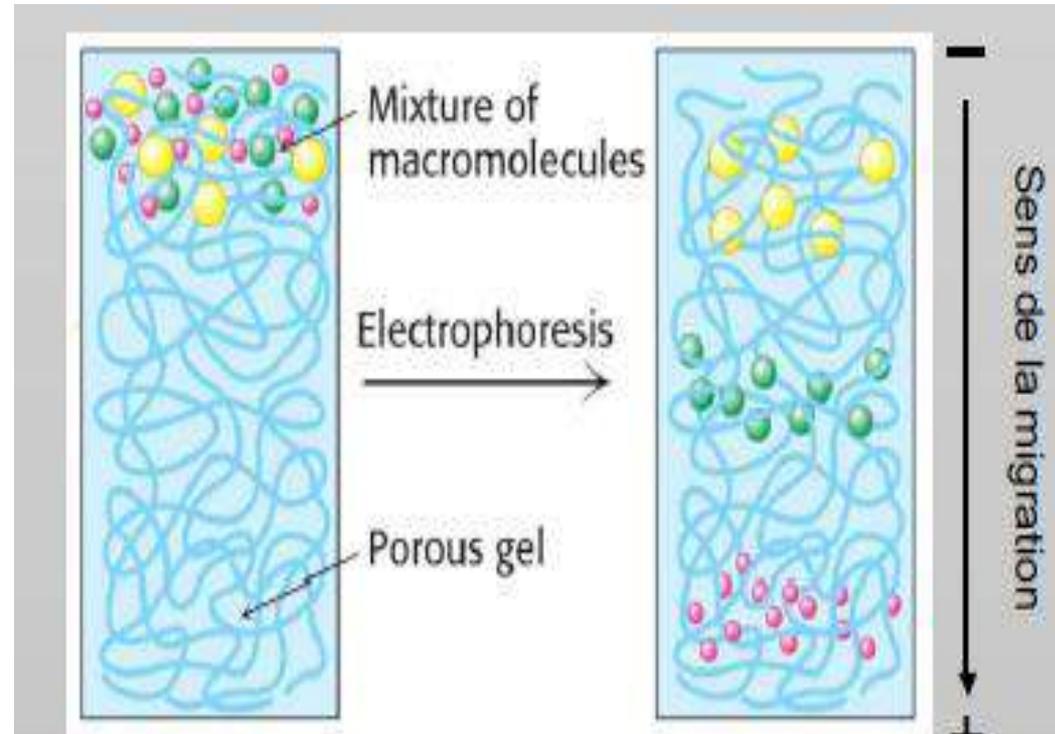
C'est en fait une migration différentielle dans un gel d'agarose.

Le gel agit comme un tamis moléculaire laissant passer plus facilement les petits fragments.

La force motrice est un champ électrique agissant sur la charge négative des phosphates de l'ADN.

Le bromure d'éthidium est une molécule qui est fluorescente lorsqu'il est irradié par des rayons UV.

Sa structure lui permet de s'intercaler entre deux plans formés par les bases de l'ADN. Après la migration, les fragments peuvent ainsi être révélés et on peut réaliser une photo du gel de migration.



Principe général:

Dans un milieu donné, la séparation des particules se fait en fonction de leur **charge électrique** et pour des charges identiques, en fonction de leur **taille**.

= technique de biologie moléculaire permet à séparer des fragments d'ADN de différentes tailles en les faisant migrer dans un **gel** en les soumettant à un **courant électrique**.

" Deux principaux polymères sont utilisés : l'**agarose** et le **polyacrylamide**.

→ la séparation des acides nucléiques chargés négativement à pH 7~8, vers l'anode (+) sous l'effet d'un champ électrique.

Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel en fonction de la taille des molécules.



Le Dot Blot

« *Dot* » signifie tache en anglais.

C'est une technique d'une grande simplicité, le dot blot est utilisé pour l'étude de petits fragments d'ADN ou des ARN.

Un échantillon est déposé sur un filtre en nylon.

Contrairement au Southern blot,

il n'y a pas d'étape préalable de digestion par des enzymes de restriction ni d'électrophorèse.

Comme pour la technique de Southern, dénaturation, hybridation, lavage et autoradiogramme sont ensuite effectués.

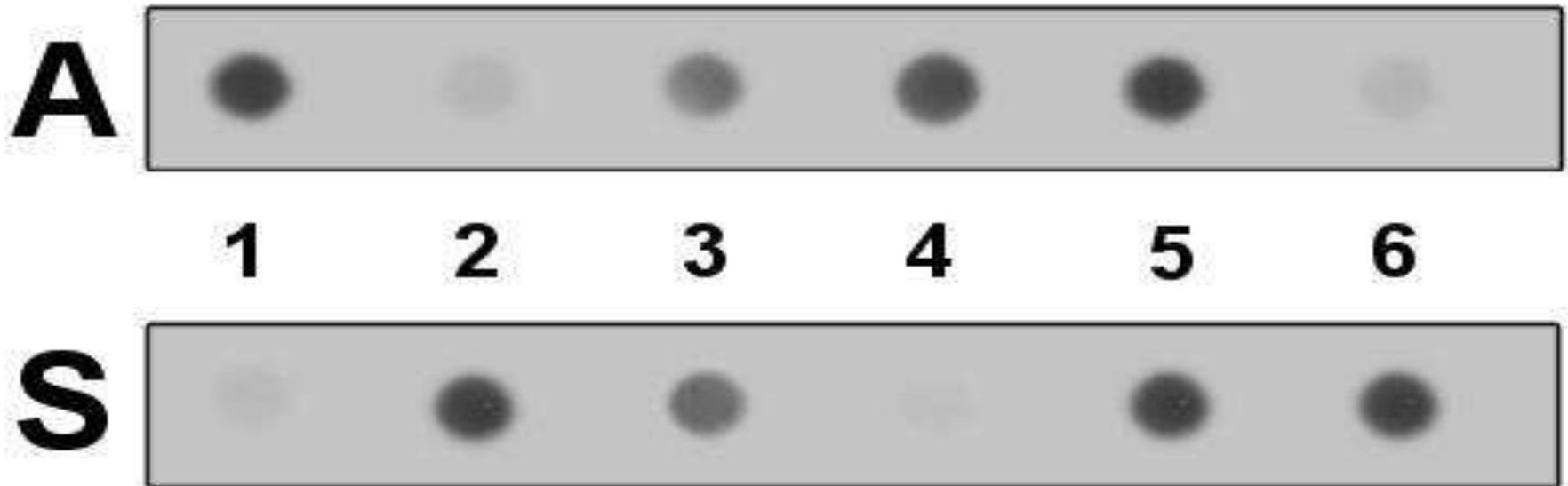
Dans le dot blot on utilise une sonde (oligonucléotide de séquence connue marqué par exemple avec des radioisotopes).

Ainsi, cette technique permet de savoir si, dans le mélange des acides nucléiques testés, il existe une ou plusieurs séquences complémentaires de celle de la sonde.

Dans un *dot blot*, on transfère les acides nucléiques (ADN ou ARN) depuis un milieu liquide directement sur une membrane, sans séparation préalable, donc sans électrophorèse préalable.

Le transfert peut être réalisé par diffusion simple, par diffusion dans champs électrique (électrodiffusion) ou par aspiration sous vide.

La détection est similaire à celles utilisées dans les transferts avec séparation : par exemple des séquences de nucléotides pour l'ADN ou l'ARN ou des **anticorps** pour les **protéines**.



Sonde spécifique d'allèle (ASO)

β-globine normale (A)

β-globine drépanocytaire(S)

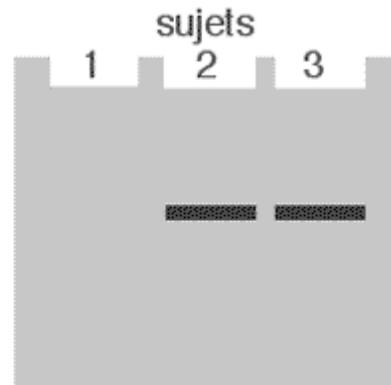
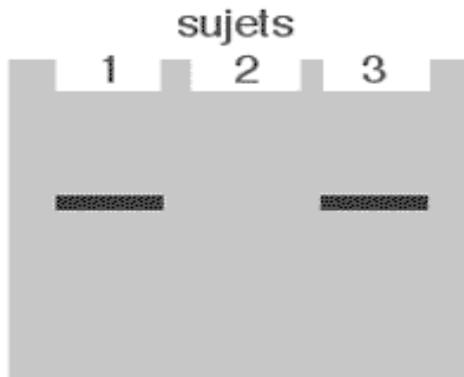


Extraction de l'ADN

L'ADN génomique
a été extrait
des cellules nucléées:

CTGACTCCTGAGGAGAAGTCT
sonde de la β-globine normale

CTGACTCCTGTGGAGAAGTCT
sonde de l'anémie falciforme



*soit à partir de sang veineux,
*soit à partir
de villosités choriales,
du liquide amniotique ou
de leurs cellules de culture

Amplification de l'ADN

L'ADN génomique a été amplifié par la technique PCR

Recherche de mutations connues

Technique d'hybridation par des sondes

oligonucléotidiques spécifiques d'allèles (ASO) :

Cette technique consiste à effectuer une électrophorèse d'un produit PCR

L'électrophorèse de l'ADN du gène Hémoglobine (HBB), qui code pour la chaîne β des globines est révélée par deux sondes :
l'une spécifique de la séquence normale,
l'autre de celle de la protéine mutée
(ASO = *Allele Specific Oligonucleotide*).

- L'ADN d'un sujet est révélé par la seule sonde normale s'il possède deux gènes HBB normaux (homozygote normal),
par la seule sonde de la protéine mutée s'il possède deux gènes HBB responsables de la mutation (homozygote muté) et
par les deux sondes s'il possède un gène normal et un gène de la protéine mutée (hétérozygote).

Diagnostic prénatal dans la famille avec β -thalassémie par test ASO

1. Mutation ponctuelle:

Une famille qui a déjà un enfant atteint de β -thalassémie sévère à cause de la substitution $A \rightarrow G$ à la boîte « **TATA** » du gène de β -globine.

Ils attendent un deuxième enfant.

Le diagnostic prénatal est indiqué.

2. Hybridation par ASO :

WT 5'-GCTGGGGCATAAAAGTCAG-3'

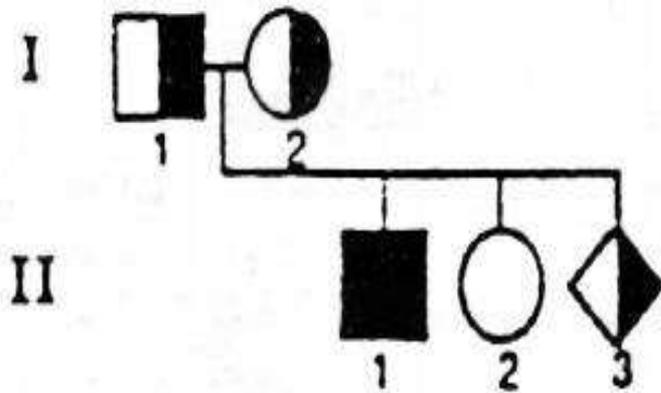
MT 5'-GCTGGGGCATAGAAGTCAG-3'



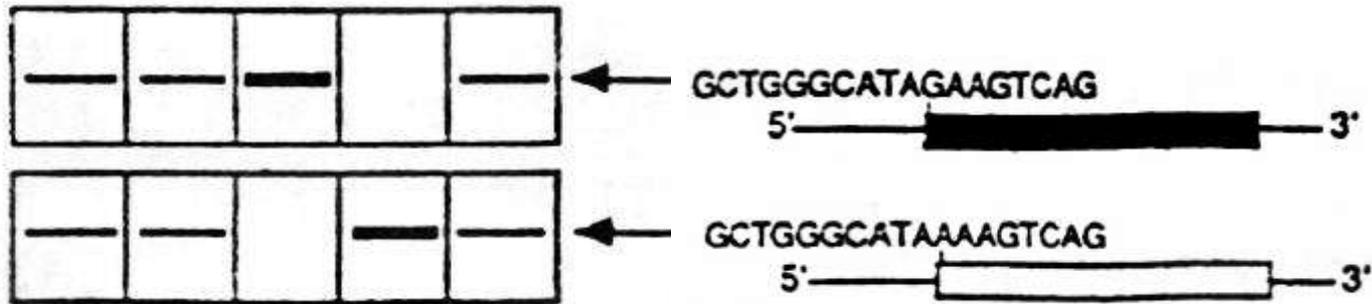
3. Résultats:

L'analyse a montré que l'ADN des cellules de liquide amniotique avait un gène de β -globine muté et un normal, et le fœtus est identifié comme porteur de β -thalassémie.

Le conseil génétique est offert aux parents.



allele-specific oligonucleotide (ASO)

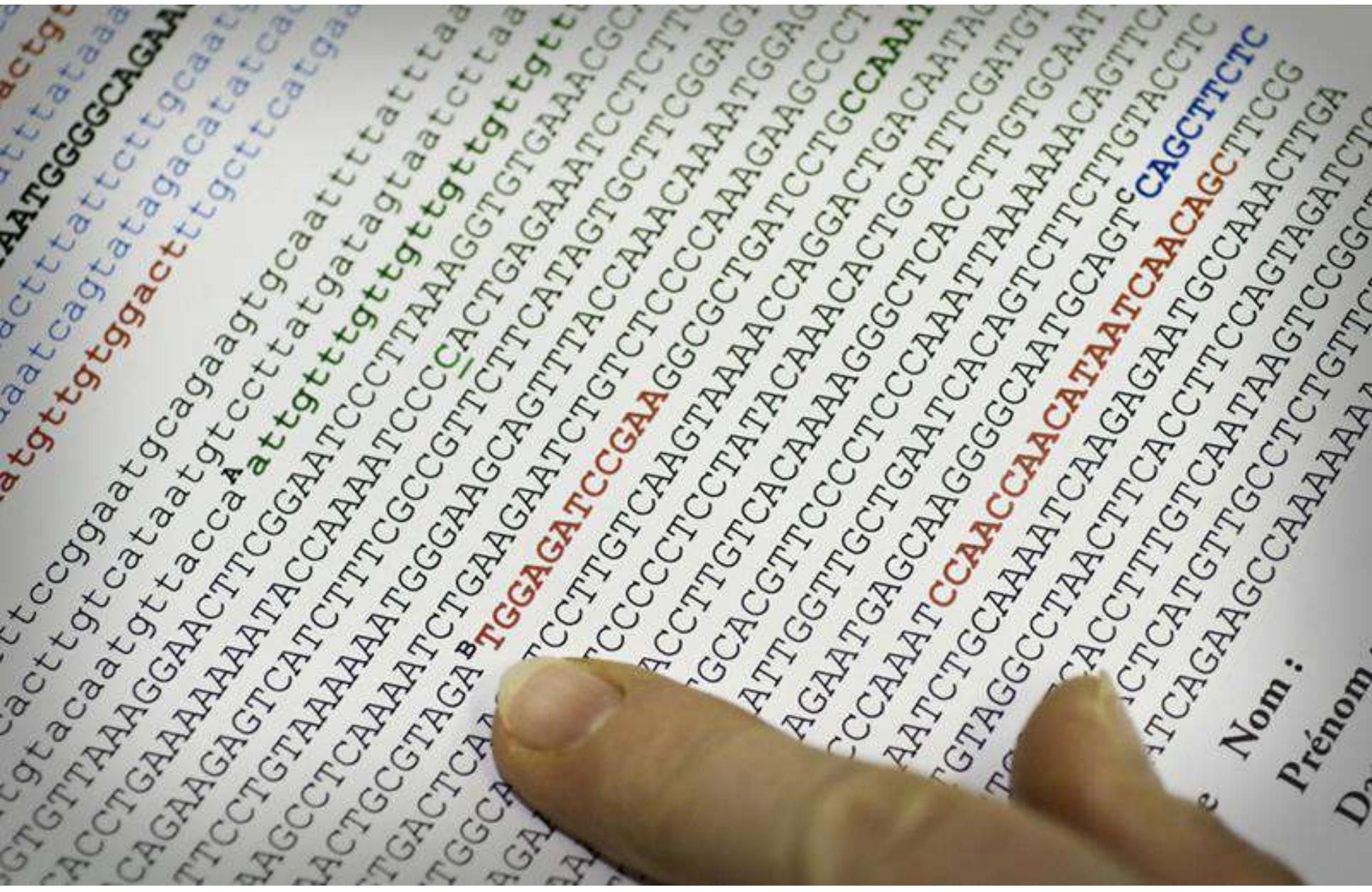


En théorie,

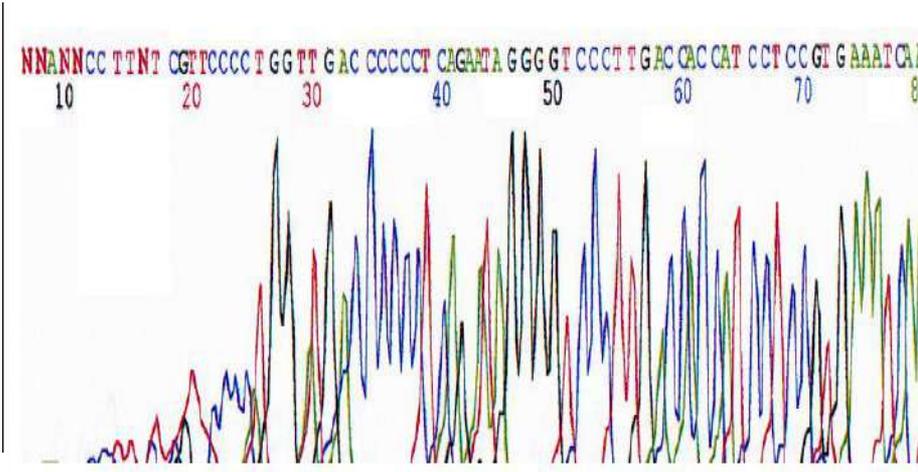
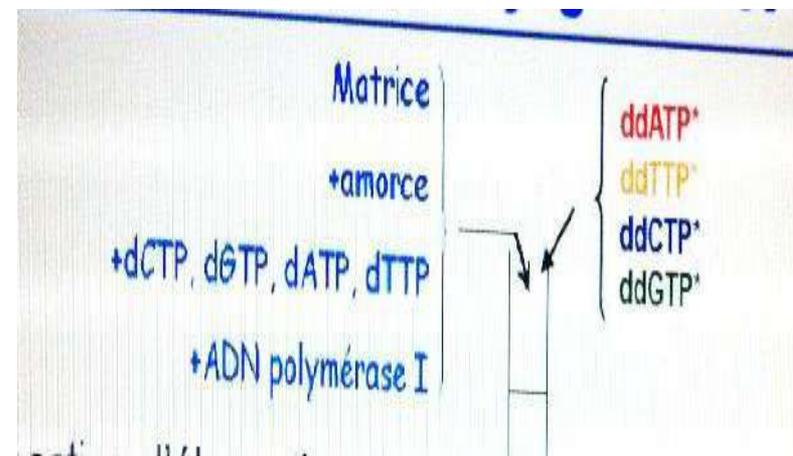
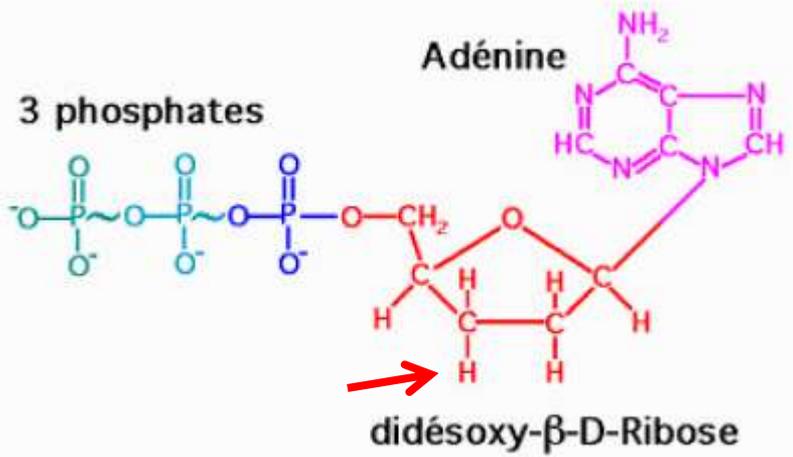
l'analyse ASO peut identifier toutes les mutations connues dans un gène particulier.

Mais, l'application est limitée à cause de l'hétérogénéité génétique dans beaucoup des maladies autosomiques récessives.

Le séquençage de l'ADN : détermination de la séquence d'un acide nucléique



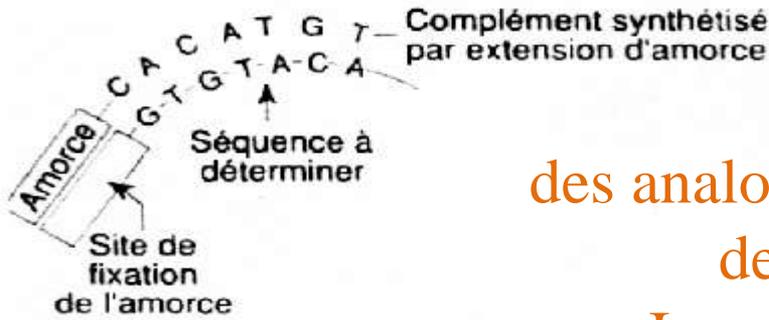
didésoxyadénosine triphosphate



Exemple de mise en évidence d'une mutation ponctuelle par séquençage

Séquençage : la méthode de Sanger.

Utilisation de **ddNTP** qui sont des analogues structuraux des dNTP mais incapables de réaliser une liaison phosphodiester. Incorporation au hasard de ddNTP marqués qui stoppent à chaque fois l'élongation



Réaction T

- — Amorce — C A C A ddT
- — Amorce — C A C A T G ddT

Réaction A

- — Amorce — C ddA
- — Amorce — C A C ddA

Réaction G

- — Amorce — C A C A T ddG

Réaction C

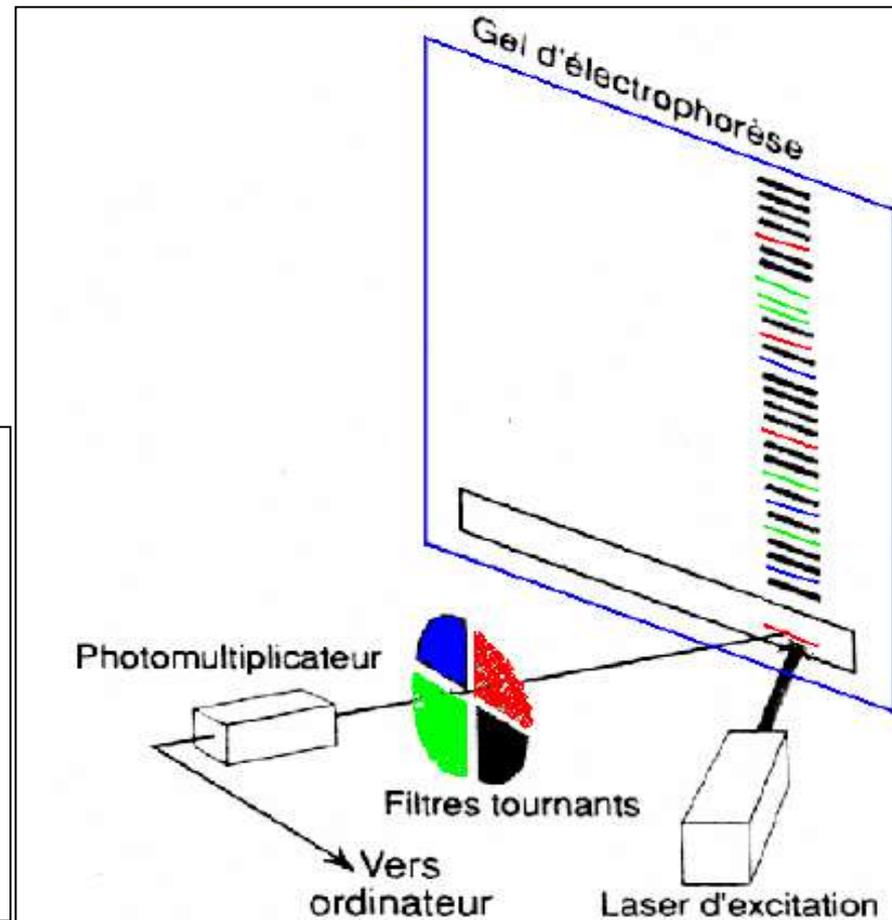
- — Amorce — ddC
- — Amorce — C A ddC

Produits

Séquence

	Am — C A C A T G ddT	A
	Am — C A C A T ddG	C
	Am — C A C A ddT	A
	Am — C A C ddA	T
	Am — C A ddC	G
	Am — C ddA	T
	Am — ddC	G

3' ↑
5' ↓





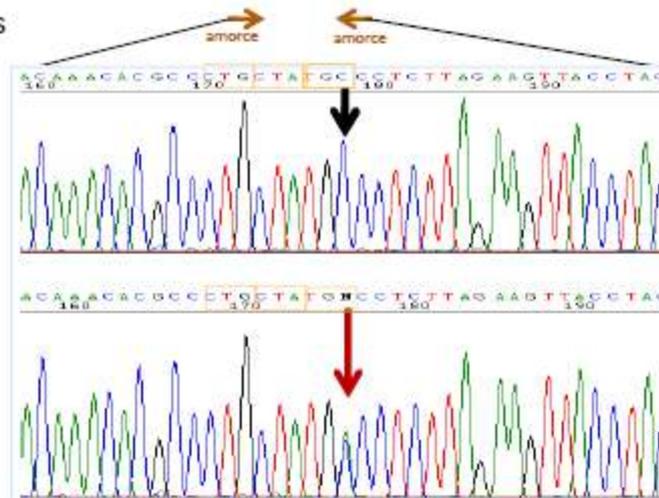
Amplification régions codantes

Séquençage

Séquence de référence
(bases de données)

Séquence du patient

Comparaison des
Séquence



Substitution d'un nucléotide hétérozygote

```

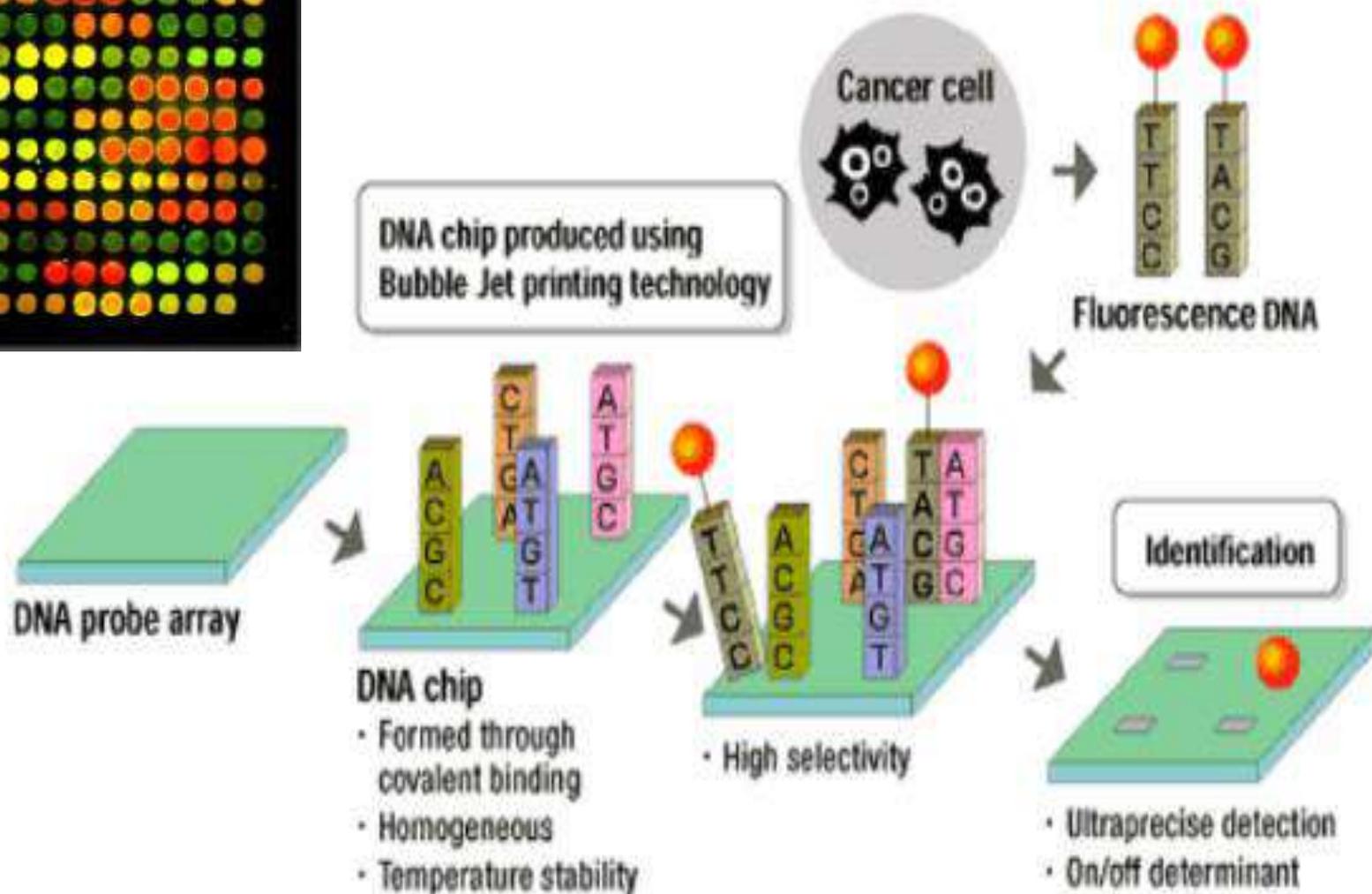
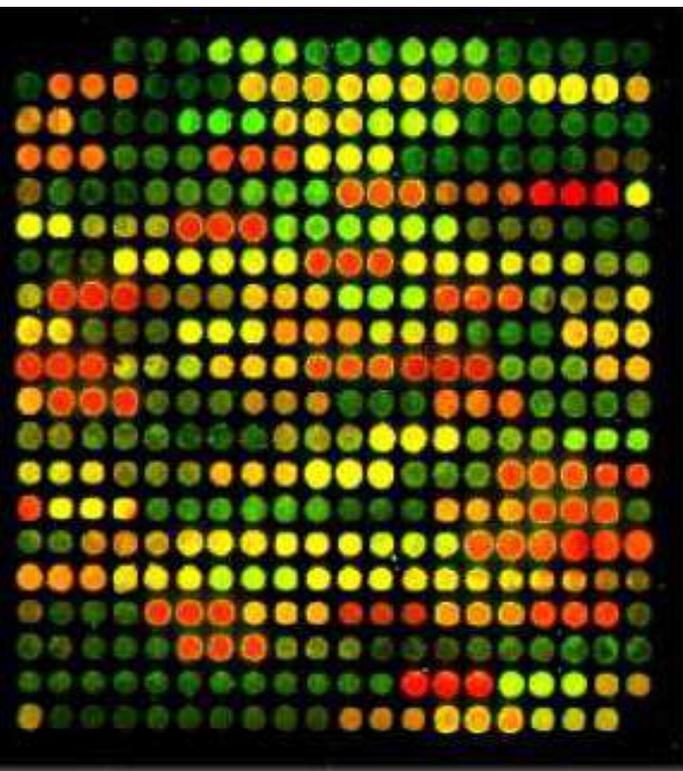
.. CCC CTG CTA TGC CCT ...
                   CYS
                   ↓
.. CCC CTG CTA TGA CCT ...
                   STOP
  
```

Nouvelles technologies

Les puces à ADN, dont le principe repose sur l'hybridation à un très grand nombre d'oligonucléotides immobilisés sur un support miniaturisé, permettent en particulier, dans le cadre du diagnostic moléculaire, de faire du séquençage d'ADN, ou de détecter simultanément un très grand nombre de mutations ponctuelles.

Cette technologie très puissante, susceptible de révolutionner la pratique des laboratoires de génétique moléculaire, est encore dans une phase de recherche et de développement, et reste pour l'instant hors de portée des moyens financiers des laboratoires publics de diagnostic.

Principe et exemple de puce à ADN



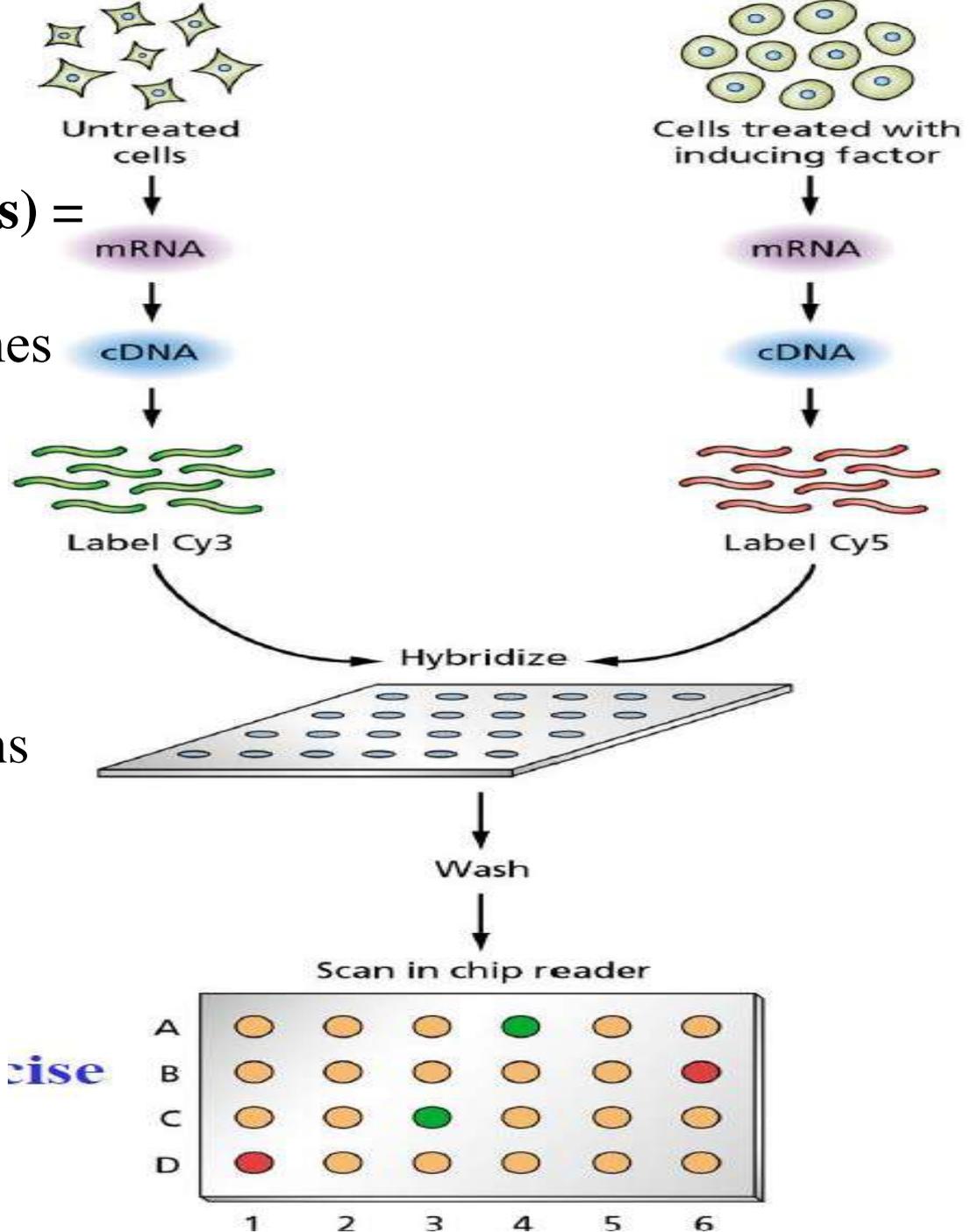
« **Micropuces** » (Microarrays) =
PUCE à ADN

Etude de l'expression des gènes
à grande échelle
(totalité des gènes)

Comparaison de **2** échantillons

Par exemple:

- 2 tissus différents
- 1 tissus à 2 stades
- 1 tissus +/-traitement
- mutation



Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

