

**Biochimie - Biologie moléculaire**

# Pathologies et génétique moléculaire

Julien Fauré

- **Les outils de la génétique moléculaire**
- **Les maladies et la génétique**

- **Les outils de la génétique moléculaire**
- Les maladies et la génétique

## **Extraction et purification du matériel génétique**

- matériel présent dans les virus, les bactéries et les cellules: ADN et ARN
- ADN des cellules eucaryotes animales = ADN nucléaire + ADN mitochondrial
  - source : sang, tissus (biopsies)
  - chez l'homme  $\approx 6-7 \cdot 10^{-12}$  gramme /cellule
    - ↳ 1 ml de sang  $\approx 5-6 \cdot 10^6$  leucocytes soit  $\approx 30 \cdot 10^{-6}$  g d'ADN
- ARN = ARNm, ARNt, ARNr
  - sensibilité aux RNAses
  - spécificité tissulaire des ARNm
- quantification par mesure de l'absorption à 260 nm

## Extraction et purification du matériel génétique



prélèvement biologique



lyse des cellules nucléées

- lyse par détergents
- traitement mécanique



dégradation des protéines

- traitement par la protéinase K



extraction des acides nucléiques

- solvants organiques
- fixation par interaction de charges

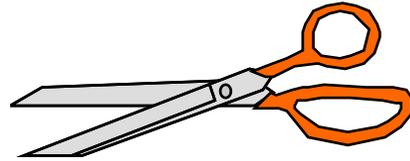
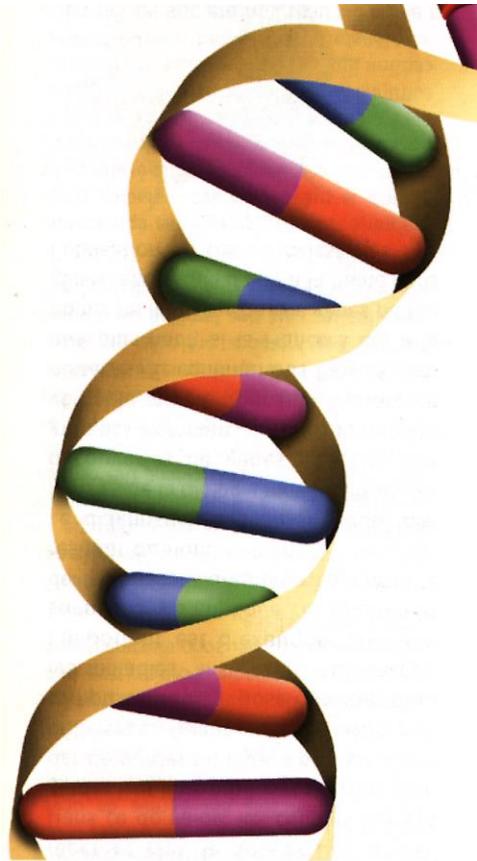


précipitation de l'ADN

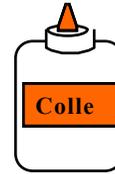
- alcools

Principales étapes de la purification des acides nucléiques

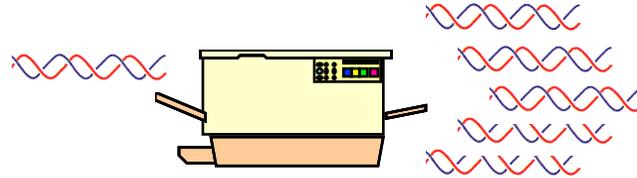
**Des outils enzymatiques pour étudier l'ADN**



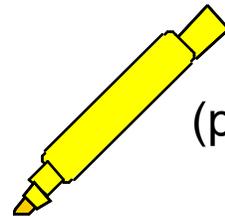
(endonucléases, DNAses...)



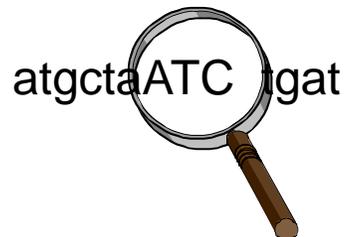
(ligases)



(polymérase...)



(polymérase, kinases...)

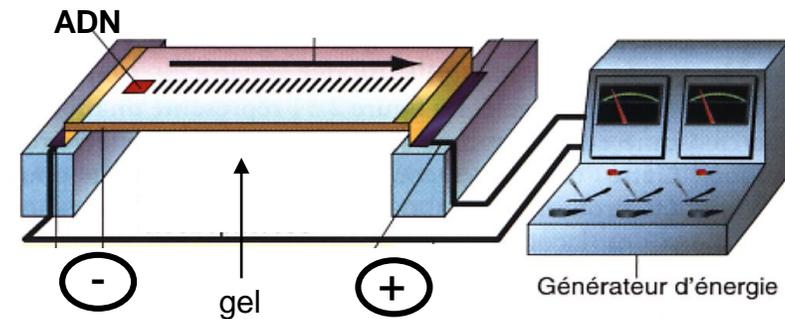


(polymérase...)

## 1- Visualiser l'ADN

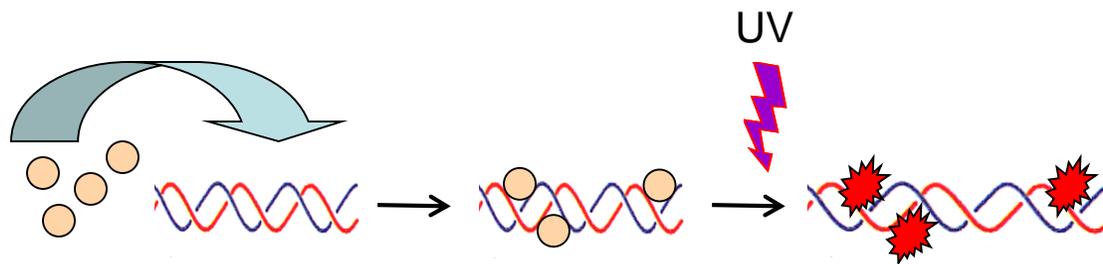
### ● Séparation de fragments d'ADN: l'électrophorèse

- ADN (chargé négativement)
- champ électrique: un générateur
- support poreux: gel d'agarose

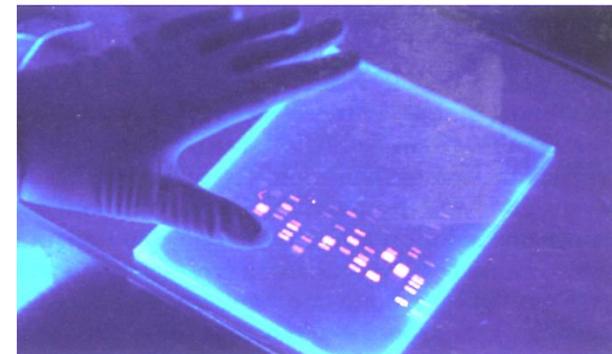


### ● marquer l'ADN

- utilisation de molécules fluorescentes



bromure d'éthidium  
(molécule intercalante fluorescente)



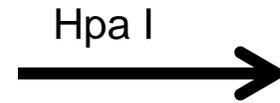
## 2- Couper de l'ADN

### Enzymes de restriction

- séquences spécifiques de reconnaissance (≈ 4 à 8 bases, palindromes)
- origine bactérienne : Eco RI = **E**scherichia **co**li type **R** souche **I**

- coupures franches

5 '---GTTAAC---  
---CAATTG---5 '



5 '---GTT AAC---  
---CAA TTG---5 '

- coupures cohésives

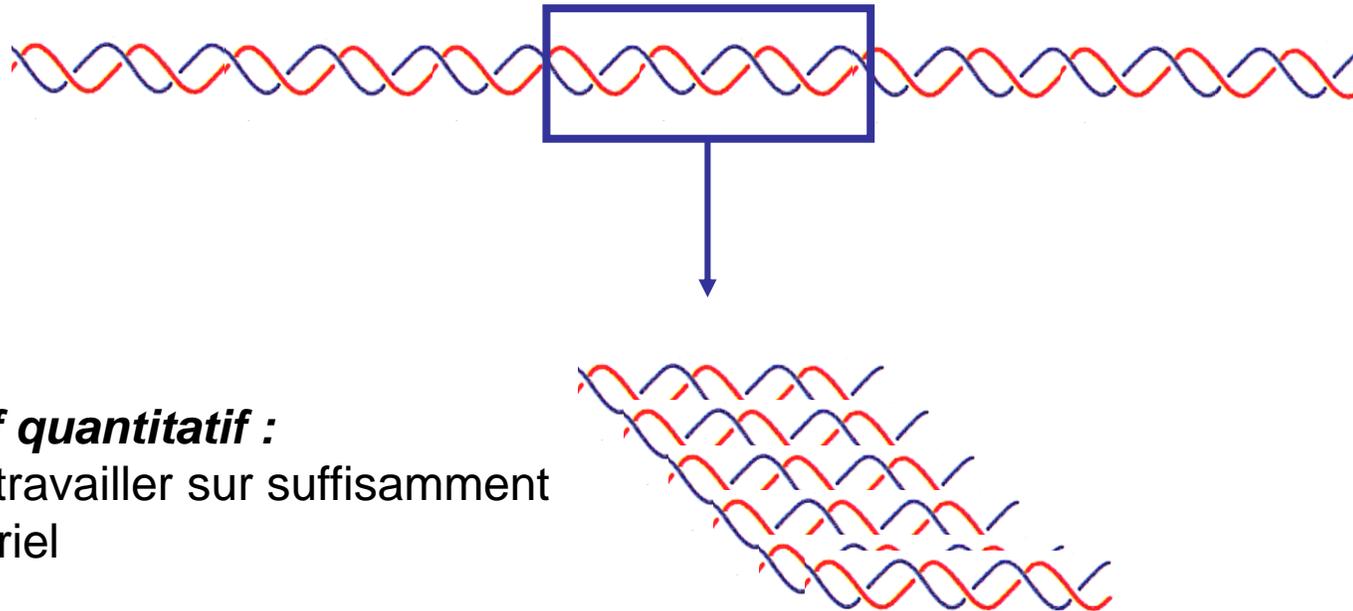
5 '---GAATTC---  
---CTTAAG---5 '



5 '---G AATTC---  
---CTTAA G---5 '

### 3- Amplifier de l'ADN : la PCR (Polymerase Chain Reaction)

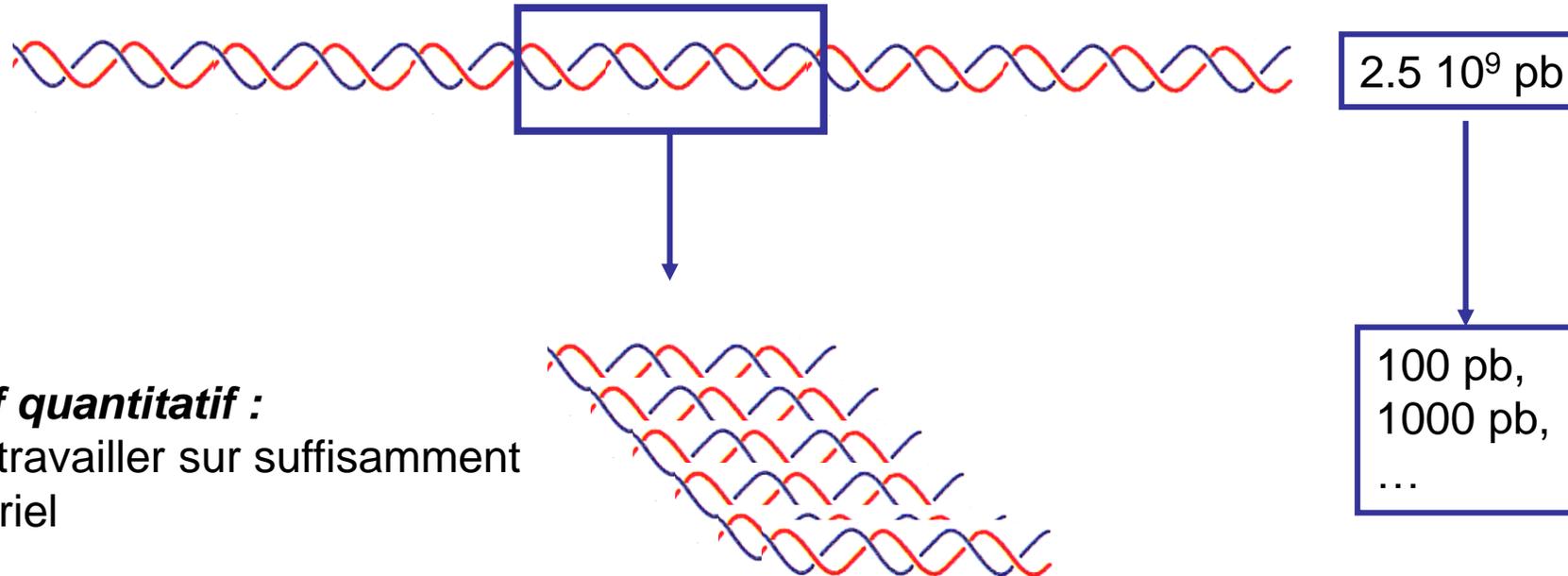
**Objectif:** amplifier une séquence donnée d'ADN



***Objectif quantitatif :***  
pouvoir travailler sur suffisamment  
de matériel

### 3- Amplifier de l'ADN : la PCR (Polymerase Chain Reaction)

**Objectif:** amplifier une séquence donnée d'ADN



**Objectif quantitatif :**

pouvoir travailler sur suffisamment de matériel

**Objectif qualitatif :**

pouvoir travailler sur une portion de génome

### 3- Amplifier de l'ADN : la PCR (Polymerase Chain Reaction)



ADN à amplifier, la matrice

Polymérase thermostable, *Taq*  
dNTP

A horizontal DNA double helix structure consisting of two intertwined strands, one colored red and the other blue, extending across the width of the slide.

Amorces: oligonucléotides d'environ 20 pb

Two short, horizontal bars, one red and one blue, positioned to the right of the text.

### 3- Amplifier de l'ADN : la PCR (Polymerase Chain Reaction)



ADN à amplifier, la matrice

Polymérase thermostable, *Taq*

dNTP

Amorces: oligonucléotides d'environ 20 pb



### 3- Amplifier de l'ADN : la PCR (Polymerase Chain Reaction)



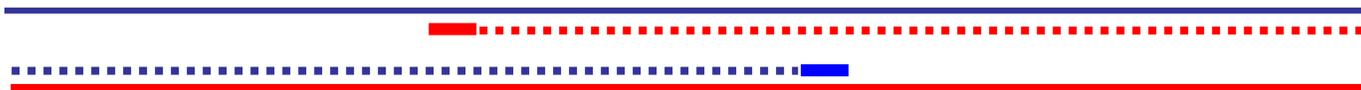
1ere étape : dénaturation à 94°C



2eme étape : hybridation à 55°C



3ere étape : polymérisation à 72°C

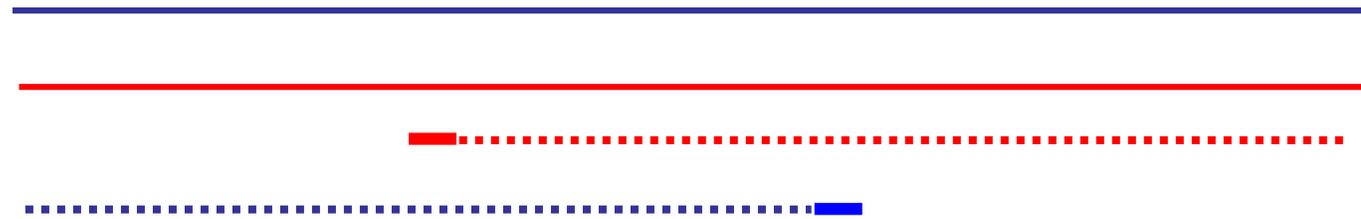


cycle 1

### 3- Amplifier de l'ADN : la PCR (Polymerase Chain Reaction)



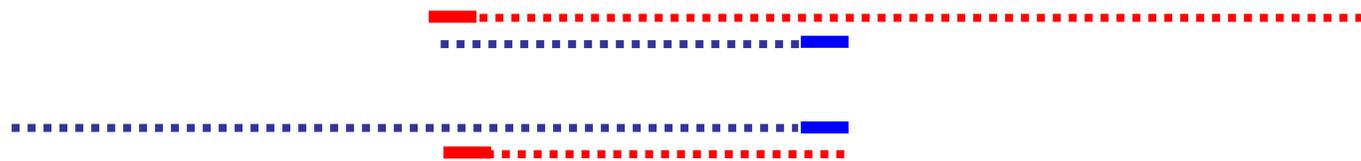
1ere étape : dénaturation à 94°C



2eme étape : hybridation a 55°C



3ere étape : polymérisation à 72°C

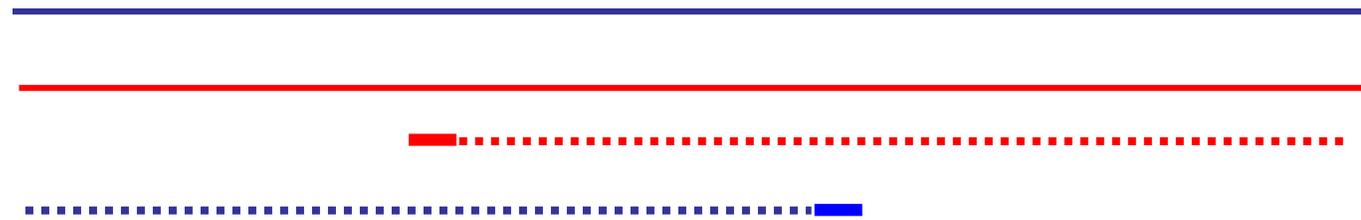


cycle2

### 3- Amplifier de l'ADN : la PCR (Polymerase Chain Reaction)



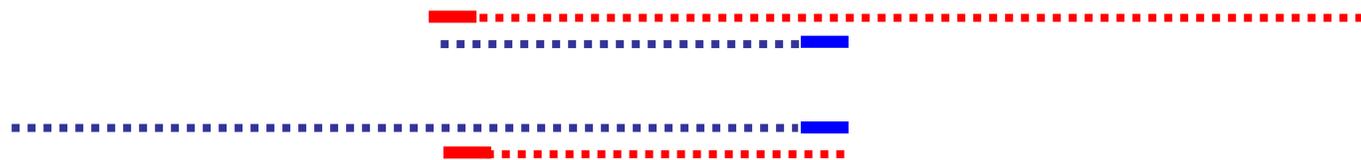
1ere étape : dénaturation à 94°C



2eme étape : hybridation a 55°C

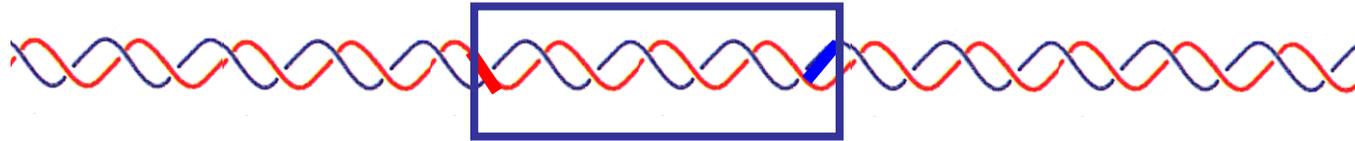


3ere étape : polymérisation à 72°C



cycle2

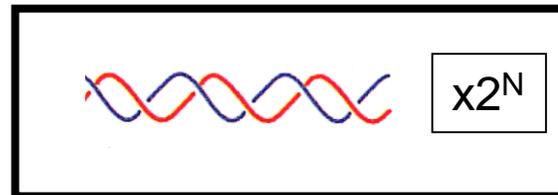
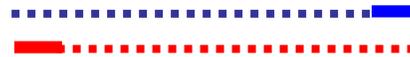
### 3- Amplifier de l'ADN : la PCR (Polymerase Chain Reaction)



1ere étape : dénaturation à 94°C

2eme étape : hybridation à 55°C

3ere étape : polymérisation à 72°C

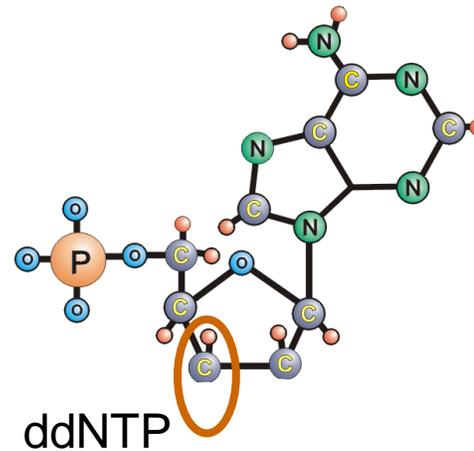
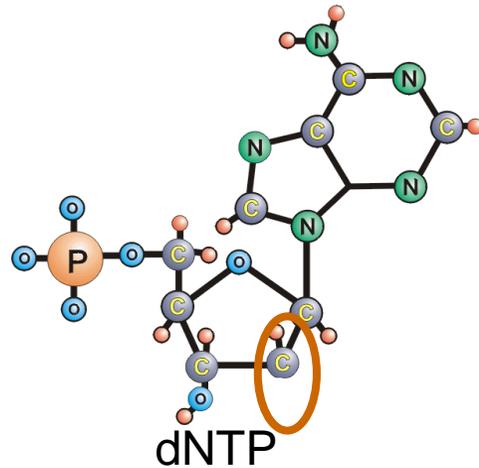


N cycles

## 4- Lire de l'ADN : le séquençage

### Méthode enzymatique (aux di-déoxynucléotides) de Sanger

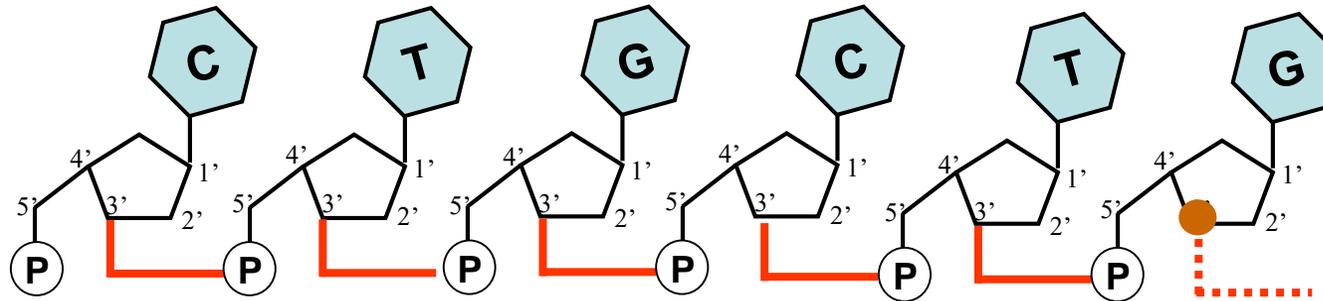
- matrice ADN
- ADN polymérase, amorce
- dNTP & ddNTP (didéoxy-NTP)



### 3- Lire de l'ADN : le séquençage

#### Méthode enzymatique (aux di-déoxynucléotides) de Sanger

- matrice ADN
- ADN polymérase
- dNTP & ddNTP (didéoxy-NTP)



Un ADN qui incorpore un ddNTP ne peut plus être allongé



➤ Les outils de la génétique moléculaire

➤ **Les maladies et la génétique**

**Méthodes d'études génétiques:  
Détermination de la cause des pathologies**



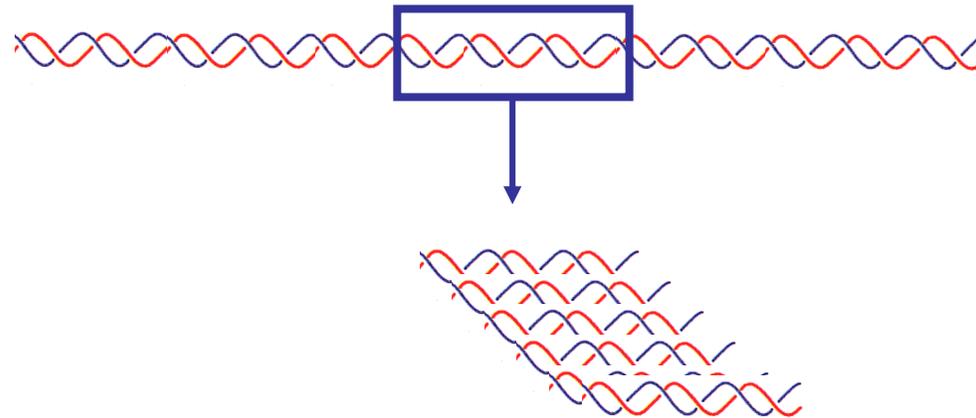
Détection des génomes exogènes



### Détection des génomes exogènes

- ➔ bactériologie, virologie, parasitologie
- ➔ caractère pathogène, virulence, résistance...  
charge virale et suivi thérapeutique

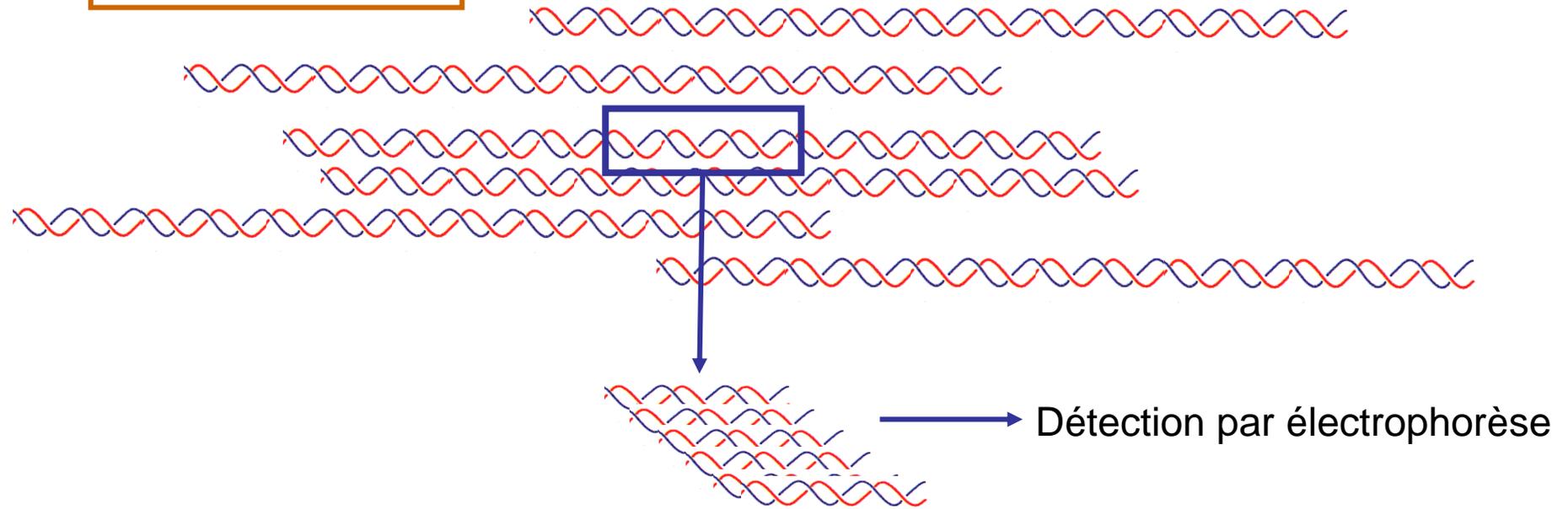
Détection par PCR



Détection des génomes exogènes

- ➔ bactériologie, virologie, parasitologie
- ➔ caractère pathogène, virulence, résistance...  
charge virale et suivi thérapeutique

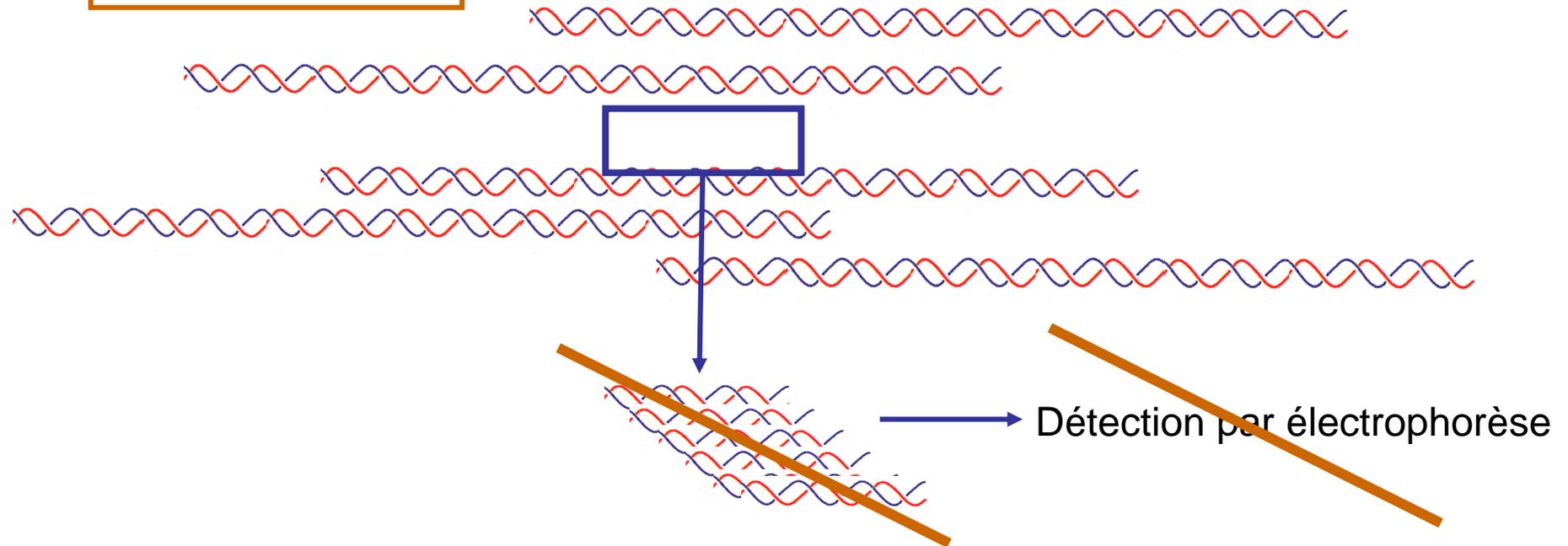
Détection par PCR



Détection des génomes exogènes

- ➔ bactériologie, virologie, parasitologie
- ➔ caractère pathogène, virulence, résistance...  
charge virale et suivi thérapeutique

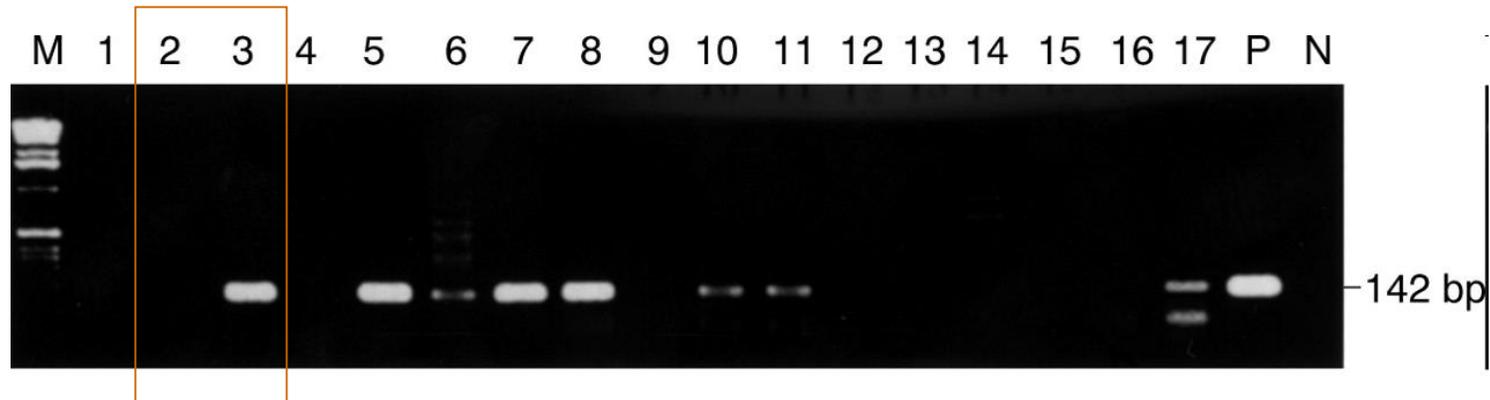
Détection par PCR



Détection des génomes exogènes

- ➔ bactériologie, virologie, parasitologie
- ➔ caractère pathogène, virulence, résistance...  
charge virale et suivi thérapeutique

Détection par PCR



Détection de virus Herpes (HSV) par PCR dans des larmes de patients

**Méthodes d'études génétiques:  
Détermination de la cause des pathologies**

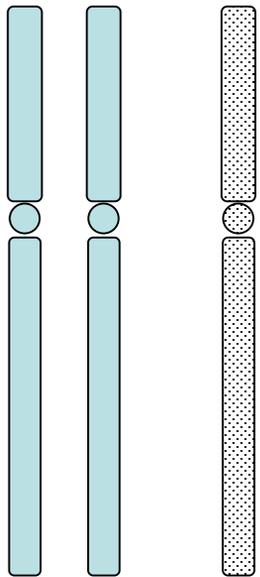


- Anomalies chromosomiques
- Maladies liés à des mutations dans un gène

**Maladie génétique:** maladie causée par une ou plusieurs modifications du génome.

### Anomalies chromosomiques :

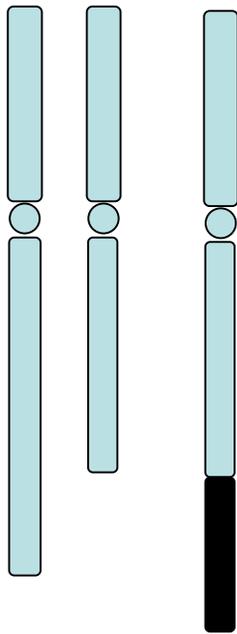
- A la naissance 0,6 à 0,9% des enfants vivants sont porteurs d'une anomalie chromosomique
- 22 paires autosomes + 1 paire gonosomes



Anomalies du nombre : ex. trisomie 21

### Anomalies chromosomiques :

- A la naissance 0,6 à 0,9% des enfants vivants sont porteurs d'une anomalie chromosomique
- 22 paires autosomes + 1 paire gonosomes

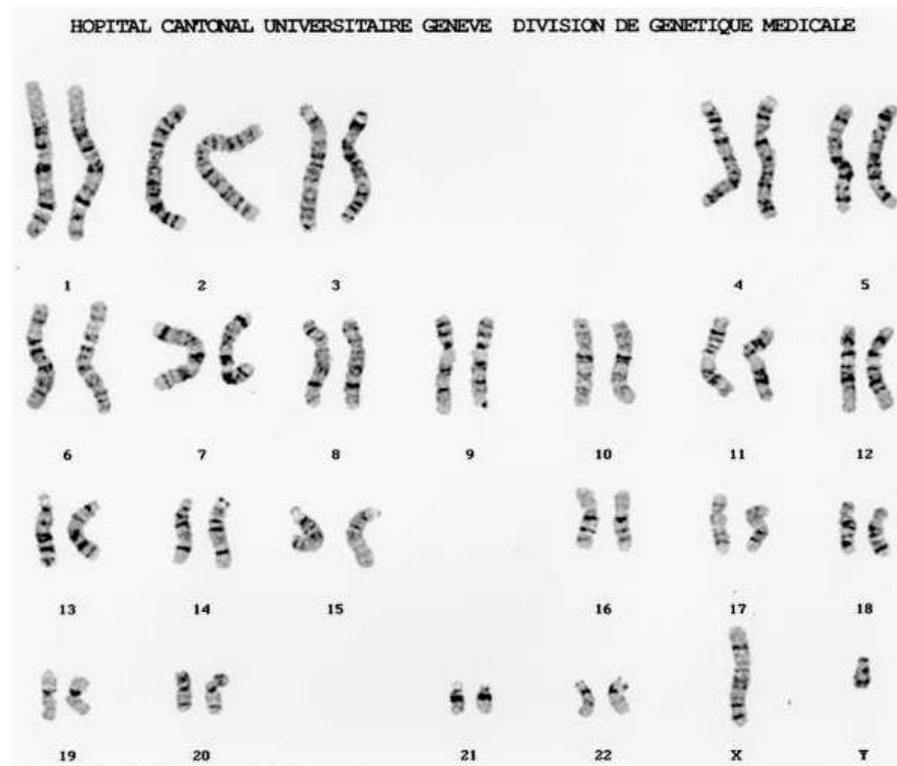
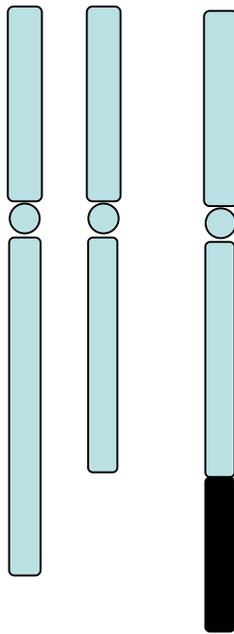


➔ Anomalies du nombre : ex. trisomie 21

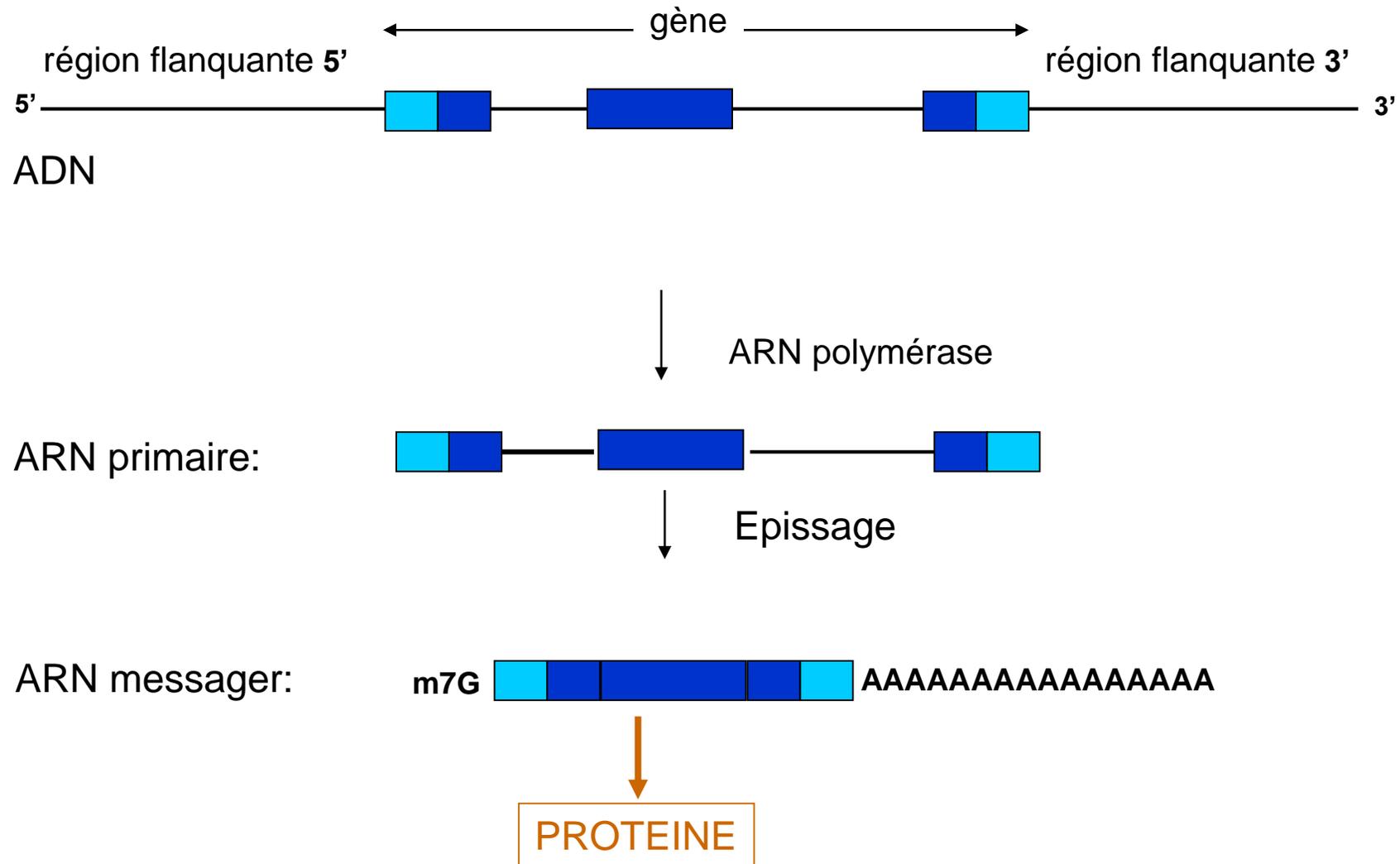
➔ Anomalies de structure : cassures chromosomiques  
réarrangements (ex LMC, t9;22))

### Anomalies chromosomiques :

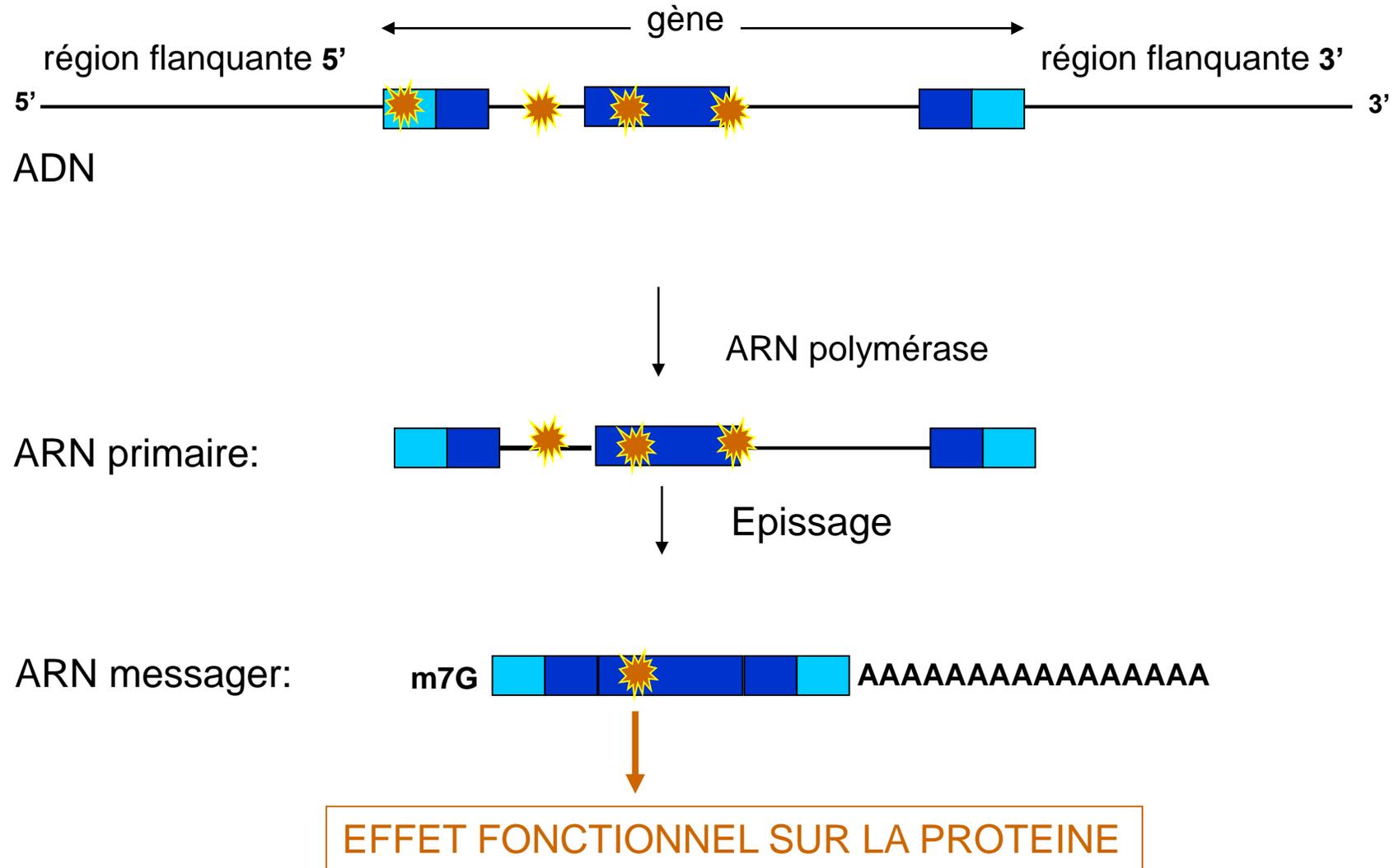
- A la naissance 0,6 à 0,9% des enfants vivants sont porteurs d'une anomalie chromosomique
- 22 paires autosomes + 1 paire gonosomes



### Mutations dans un gène

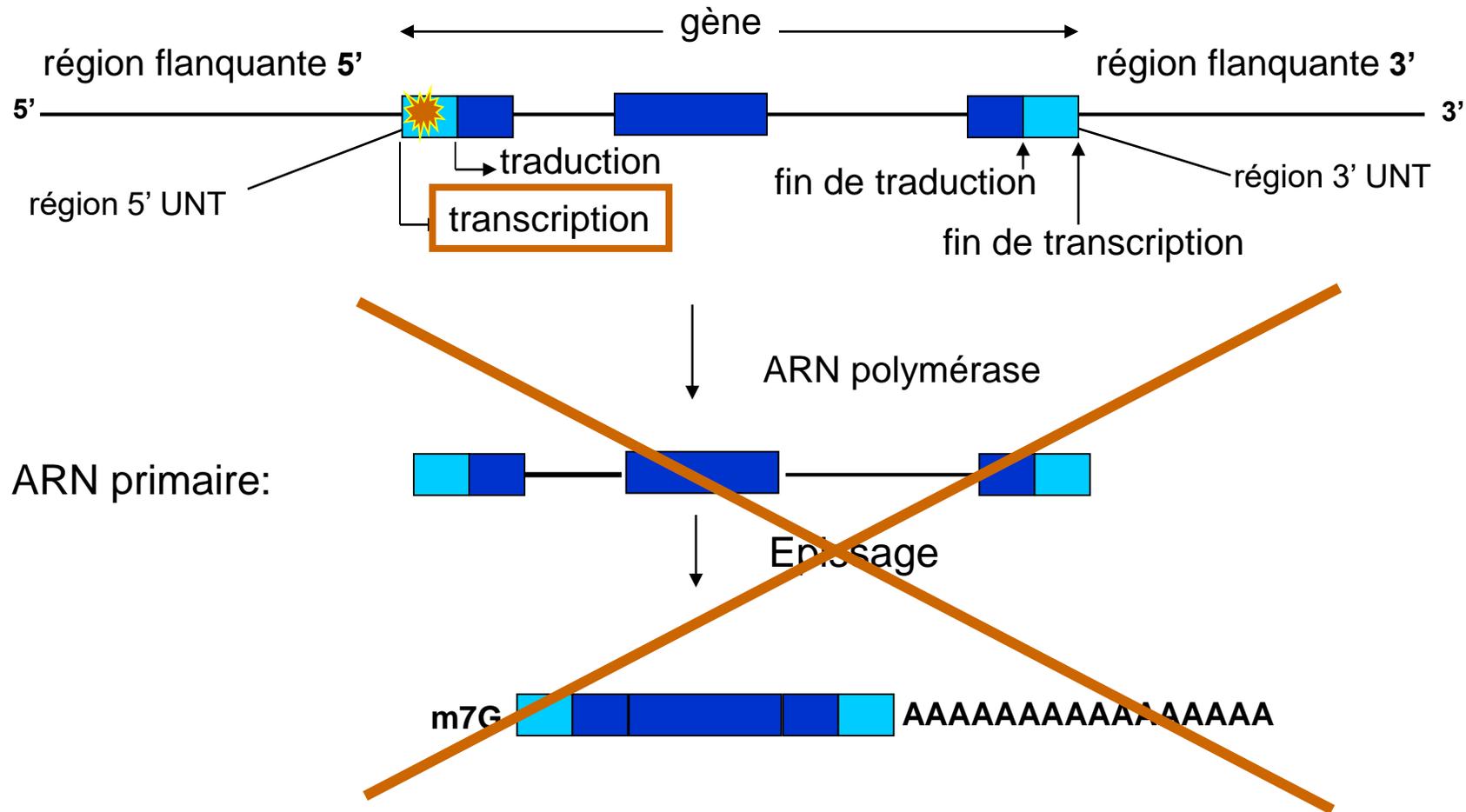


**Mutations dans un gène**



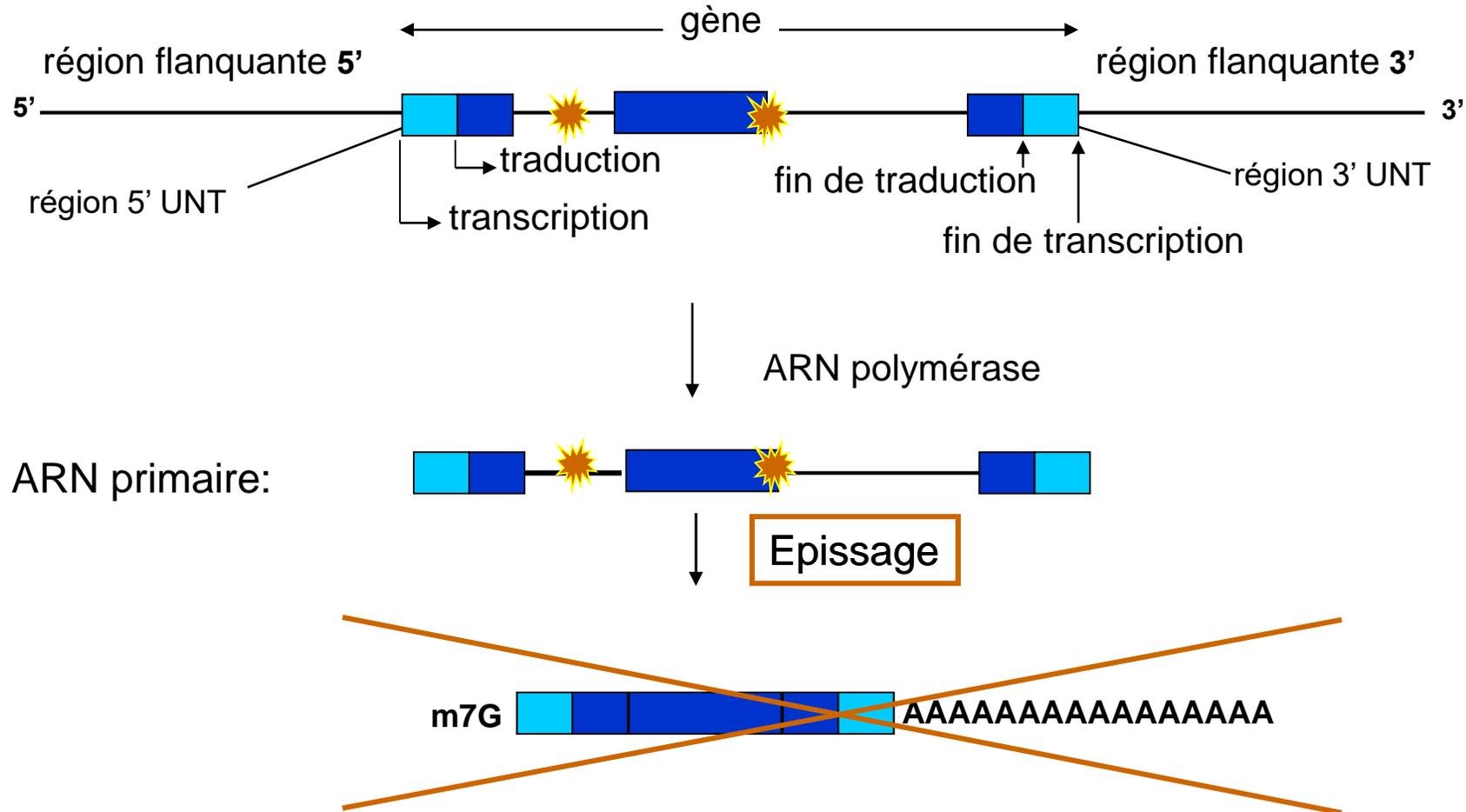


## Mutations dans un gène



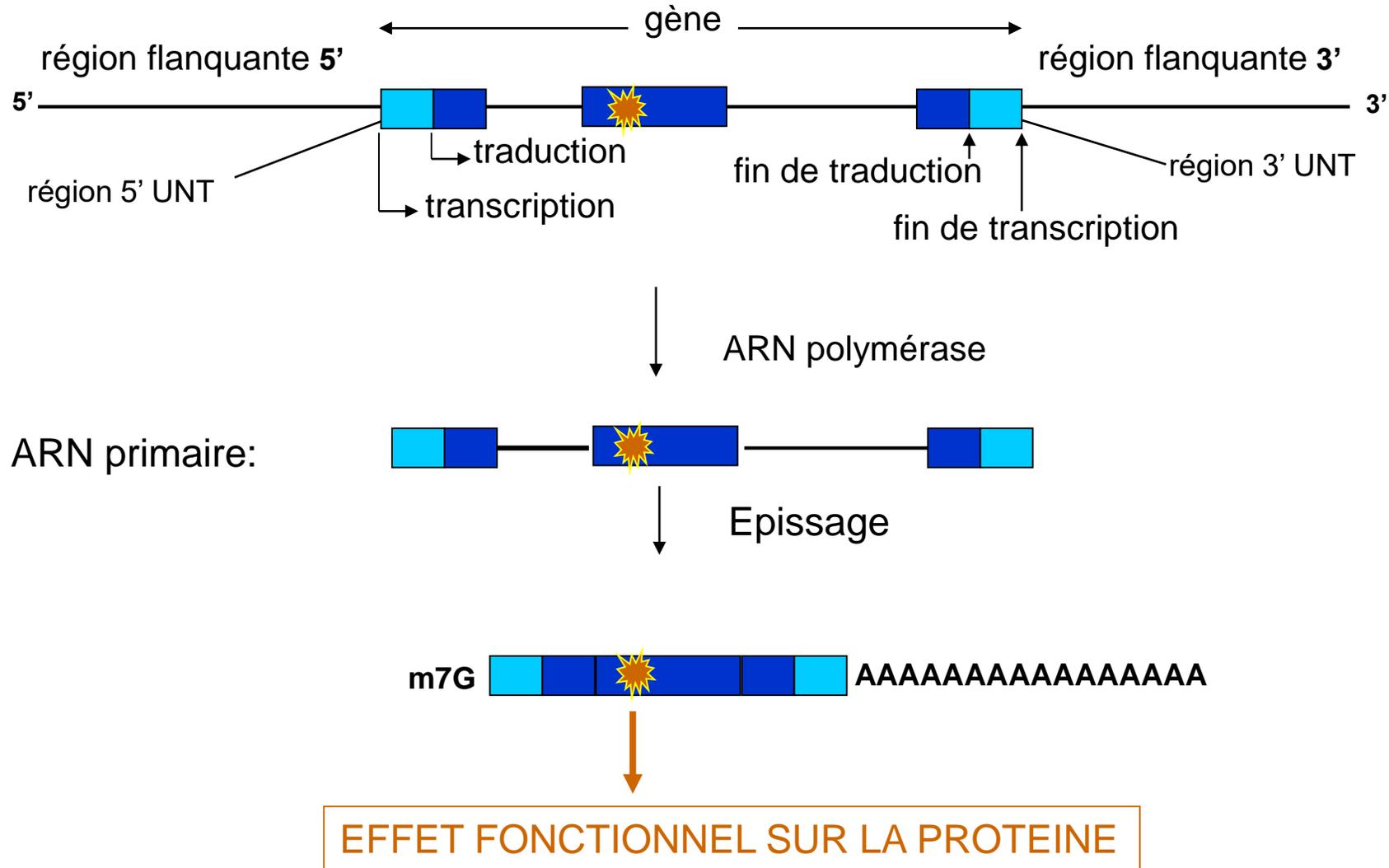


## Mutations dans un gène



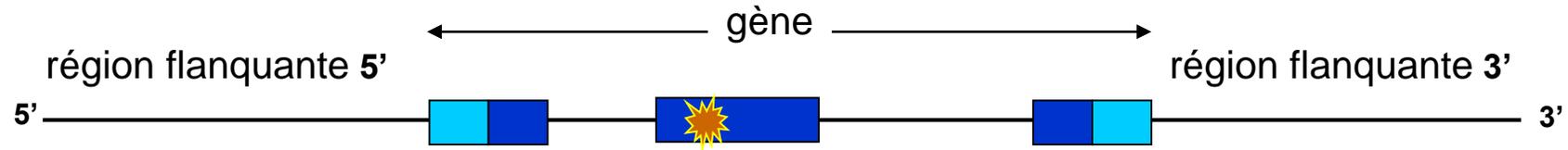


## Mutations dans un gène



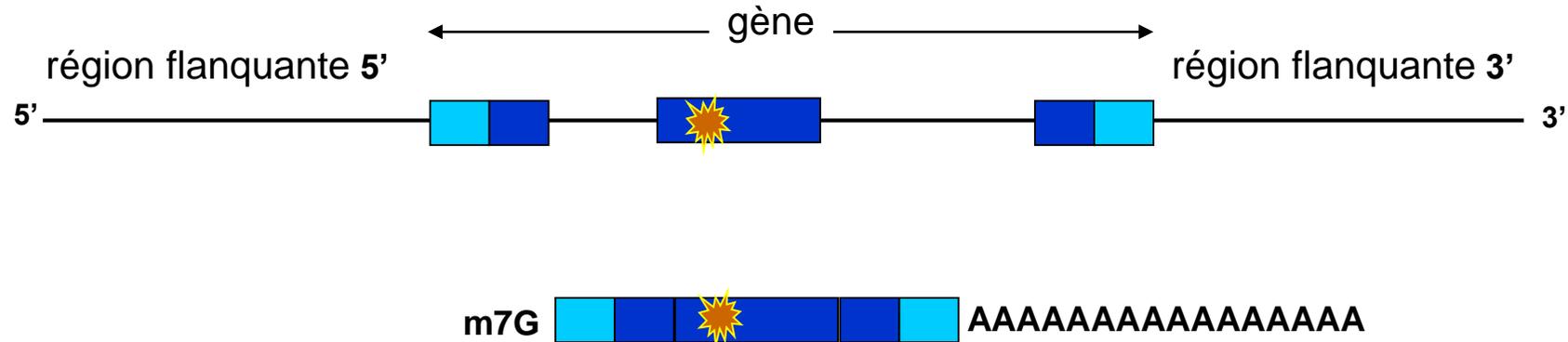


## Mutations dans un gène





### Mutations dans un gène



➤ mutations ponctuelles de substitution

--- UGG UGC UCC --- = -- trp-cys-ser--

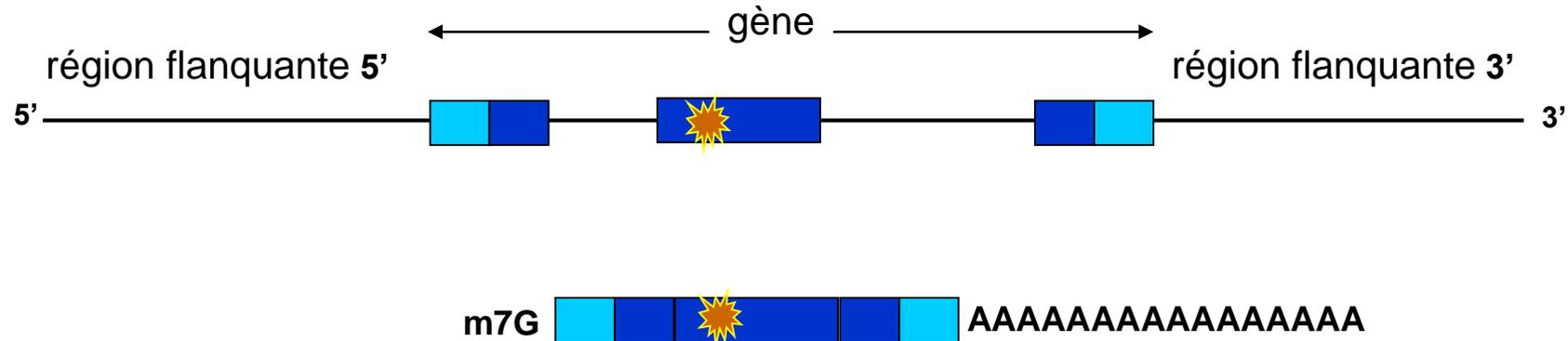
C > U = --trp-cys-ser--

C > G = --trp-trp-ser--

C > A = --trp-stop



### Mutations dans un gène



➤ mutations par délétion ou insertion

--- UGG UGC UCC UUA GUU AGA  
trp cys ser phe val arg

- --- UG-U GC U CC U UA G UU ---  
cys ala pro **stop**

+ --- UGG UGC AUC C UU A GU U AG -  
trp cys ile ile ser **stop**

} décalage du cadre de lecture

## L'identification d'anomalies génétiques

 quand ?

- diagnostic prénatal, pré-implantatoire
- caractéristiques génétiques

} activités diagnostiques  
soumises à agréments

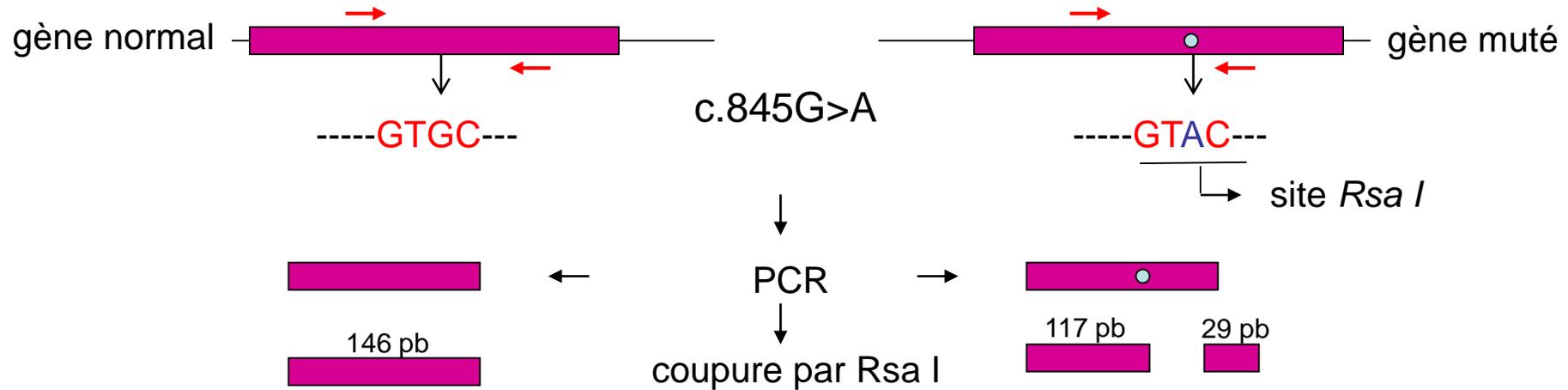
 pourquoi

- aide au diagnostic, conseil génétique
- diagnostic présymptomatique

 sur quel matériel biologique ?

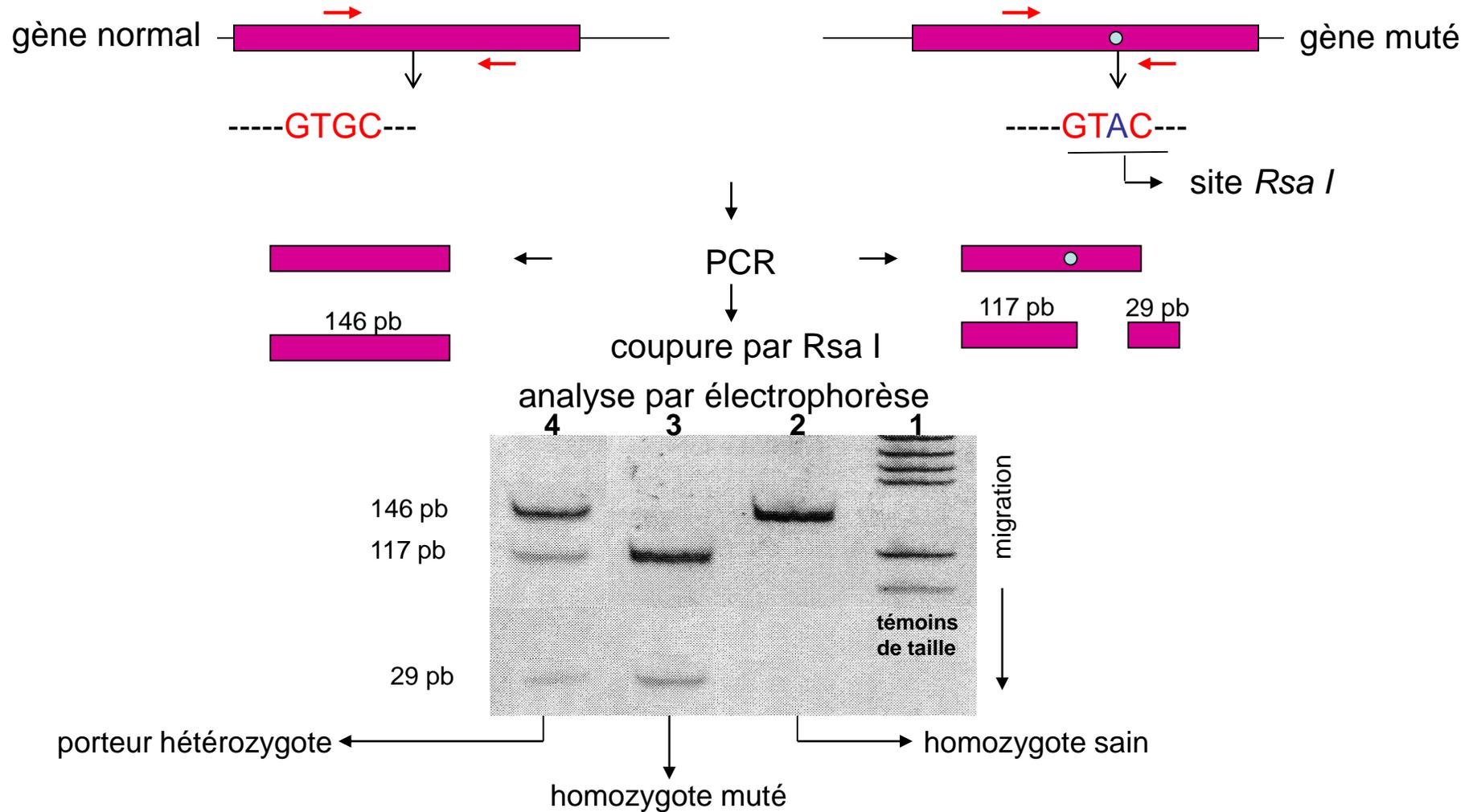
- ADN → SANG
- ARNm → TISSUS

## L'identification d'anomalies génétiques



Hémochromatose, maladie causée par la mutation c.845 G>A du gène HFE

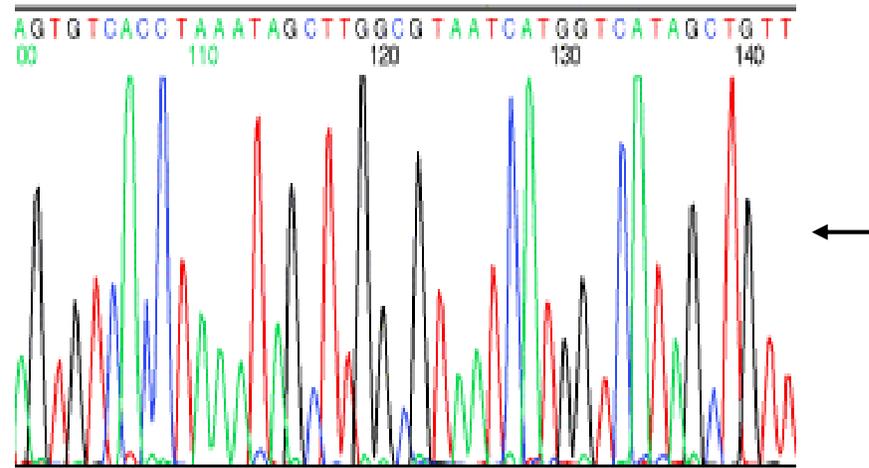
## L'identification d'anomalies génétiques



## L'identification d'anomalies génétiques

Central Core disease (CCD) : Myopathie congénitale gène associé RyR1

- analyse de la séquence des exons sur ADN
- analyse de la séquence de l'ARNm



Électrophorégramme de séquence

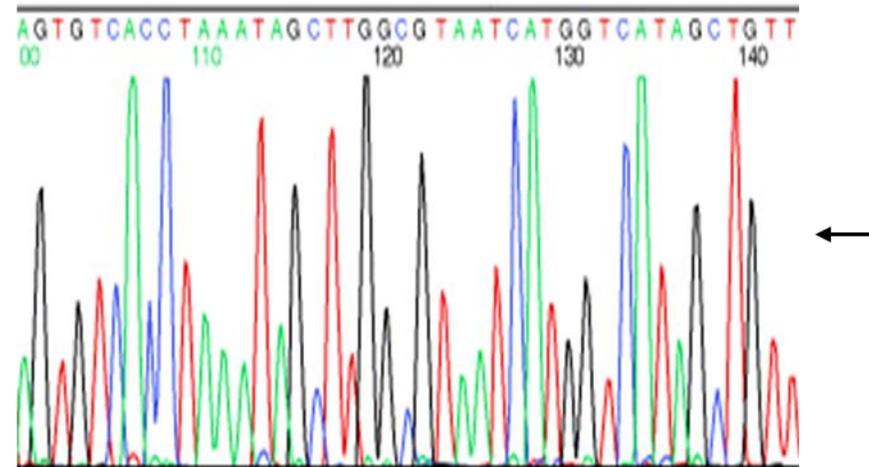
## Ce qu'il faut retenir ?

➔ Des outils performants : enzymes de restriction, PCR, séquençage

➔ Génétique moléculaire et ses applications médicales

- Activité encadrée

- Complexité dans certaines situations



Électrophorégramme de séquence

Merci,  
et bon courage pour la suite ...

## Mentions légales

L'ensemble de ce document relève des législations française et internationale sur le droit d'auteur et la propriété intellectuelle. Tous les droits de reproduction de tout ou partie sont réservés pour les textes ainsi que pour l'ensemble des documents iconographiques, photographiques, vidéos et sonores.

Ce document est interdit à la vente ou à la location. Sa diffusion, duplication, mise à disposition du public (sous quelque forme ou support que ce soit), mise en réseau, partielles ou totales, sont strictement réservées aux Instituts de Formation en Soins Infirmiers de la région Rhône-Alpes.

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits dans les Instituts de Formation en Soins Infirmiers de la région Rhône-Alpes, et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.