

BIOLOGIE

METHODES D'ETUDE DU GENOME

I) Domaines d'application médicale

A) Génétique

Lésion sur l'ADN :

- Rayons X, espèces radioactives de l'oxygène, agents alkylants, réactions spontanées, agents antitumoraux - Rayons UV, hydrocarbures aromatiques polycycliques - Erreurs de réplication	- Cassure simple brin, uracile, 8-oxoguanine (oxydation anormale : cétone en 8), site AP, double brin, pontage des 2 brins - Dimères pyrimidine (liaison covalente), pontages volumineux - Mésappariement, insertion, délétion
--	--

➔ Réplication quasi sans erreur grâce à capacité exonucléasique de l'ADN polymérase.

Variation/Mutation : changement permanent de la structure de l'acide désoxyribonucléique qui sera copié dans toutes les cellules des générations futures. Donne des ≠ entre les individus, des susceptibilités à des pathologies, et des pathologies.

Polymorphisme : variation fréquente >1%

Mutation : variation rare à caractère délétère <1%

Si mutation trop délétère : mort de la cellule. Si ne meurt pas, se divise et peut donner pathologies.

Substitution : remplacement d'un nucléotide par un autre dans la structure primaire d'un acide nucléaire.

- Transition : échange purine ↔ purine (A ↔ G) ou pyrimidine ↔ pyrimidine (T ↔ C)
- Transversion : échange purine ↔ pyrimidine (A/G ↔ T/C)

Donne des synonymes, des faux sens ou non sens.

Délétion : suppression d'un ou plusieurs nucléotides dans la séquence d'un acide nucléique. (Dans séquence codante ? Taille de la délétion ? Changement du cadre de lect ?)

Si la protéine est tronquée (= codon STOP apparu prématurément par décalage du cadre de lecture), elle est détruite prématurément.

Insertion : addition d'un ou de plusieurs nucléotides dans la séquence d'un acide nucléique.

Nomenclature :

Substitution : REF > VARIANT	
c.1000 T > A	Séquence ADNc : T remplacé par A
p.Ser 300 Phe ou p.Ser 300 X	Séquence de la protéine : Sérine remplacée par autre AA ou par STOP (X)
Délétion / Insertion	
5000 del T	Délétion T
1000 – 1001 ins T	Insertion T

-> Pour ADN on se réfère au codon ini :

x	A	U	G	x
-1	+1	+2	+3	+4

B) Infections virales

VIH = rétrovirus : ARN copié en ADN avant d'être recopié en ARN. L'ARN contient toute l'information génétique pour sa structure (polymérase, enveloppe etc.).

-> inhiber la réplication globale avec antiviraux car le virus ne peut survivre qu'au dépend des cellules et détourne leur machinerie.

II) Préparation des acides nucléiques

A) Extraction de l'ADN et de l'ARN

Sang + milieu de purification

→ centrifugation → recupère des lymphocytes qu'on mélange avec du phénol

→ centrifugation → Surnageant : ADN, ARN ; Protéines ; Phénol

→ Solution à -20°C avec NaCl → Méduse

→ Centrifugation → Culot d'ADN

→ Sécher et redissoudre ADN purifier.

B) Synthèse de l'ADNc

Purification d'un ARNm → hybridation d'un oligo(dT)

→ copie de l'ARNm en ADNc par ajout d'une transcriptase reverse

→ ajout NaOH : dégradation ARNm et formation boucle du ADNc

→ Ajout ADNpol : synthèse brin complémentaire

→ Ajout nucléase S1 : suppression de la boucle

III) Les outils

A) Les enzymes

- ADN polymérases / Taq polymérases
- ARN polymérases
- Réverse transcriptase
- Ligase
- Les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction : sont des endonucléases (qui coupent n'importe où à la différence des exonucléases qui ne coupent qu'aux extrémités). Reconnaittent une séquence spécifique de 4 à 6 paires de base sur ADN bicaténaire = site de restriction. Coupent les 2 brins de l'ADN et donnent des extrémités franches ou cohésives.

Restriction se réfère à la fonction de ces enzymes qui est de détruire ou de restreindre l'ADN étranger. Les produits de digestion par des enzymes de restriction → fragments de restriction → cartes de restriction.

Extrémités franches : ----- -----	Extrémités cohésives : ----- -----
---	--

Cartes de restrictions permettent d'ordonner la position relative des sites de restriction sur une molécule d'ADN. On dresse la carte de restriction d'une région particulière. Les cartes permettent de localiser un gène et facilitent son isolement.

Polymorphisme de restriction : variation individuelles d'une séquence de d'ADN révélée par des modifications de la longueur des fragments de restriction. A l'électrophorèse il y a polymorphisme des longueurs des fragments de restriction.

Marqueur génétique : modification structurale de l'ADN statistiquement liée à un caractère héréditaire sans en être la cause → associé à une maladie.

B) Les séparations des acides nucléiques

- Electrophorèse sur gel
- Visualisation de l'ADN

C) Identification des séquences spécifiques d'acides nucléiques

Hybridation de sondes : une sonde nucléotidique est un segment d'acide nucléique repérable (radioactivité ou fluorochrome), complémentaire du segment à reconnaître.

- 1) dénaturation de l'ADN purifié : 90°C : ADN devient simple brin
- 2) Amorces de réplication
- 3) Addition de l'ADN polymérase et des nucléotides marqués
- 4) L'ADN polymérase incorpore des nucléotides marqués donnant une population de molécules d'ADN qui contiennent des échantillons marqués de toutes les séquences sur les deux brins.

Température d'hybridation :

Oligonucléotide < 20nt	Oligonucléotide > 20nt
$T_m = (A+T) \cdot 2 + (C+G) \cdot 4$	$T_m = 69,3 + 0,41(\%C+G)$

Southern Blot : migration ADN :

- 1) dépôts échantillon ADN sur gel
- 2) transfert grâce à tampon du gel sur membrane
- 3) mise de la membrane dans un sac plein d'une solution de sonde radioactive
- 4) membrane hybridée dans une boîte fermée avec film de radiographie
- 5) révélation du film

D) Amplification génétique par la technique de PCR (Réaction en chaîne par polymérase)

Permet d'avoir une grosse quantité d'ADN qu'on veut étudier. On peut amplifier quelques centaines de paires de bases. Il faut faire plusieurs cycles pour avoir une quantité suffisante d'ADN avec des extrémités franches.

Etape 1	Repérage de la région du double brin à amplifier	
Etape 2	90°C pendant 1 min	Dénaturation ADN : séparation des 2 brins d'ADN
Etape 3	55°C-60°C pendant 1 ou 2 min	Hybridation nucléotidique aux 2 extrémités : fixation amorces d'ADN (oligonucléotides)
Etape 4	72°C = T° optimale pour ADN polymérase TAC	Ajout : - dNTP - ADN pol TAC → Synthèse ADN

IV) Séquençage de l'ADN

Méthode la + utilisée pour synthèse d'ADN (+ que l'amplification)

Synthèse in vitro

- dénaturation
- synthèse grâce à amorce (ADN polymérase, d-NTP)
- artifice : ajout de didéoxy-NTP (désoxy en 2 et 3) sert à arrêter la synthèse

Séquençage par hybridation :

- Ajout de dd-NTP couplé à fluorochrome. (1 fluorochrome pour 1 nucléotide)
- Comme le dd-NTP arrête la synthèse, après synthèse d'ADN j'ai toutes les possibilités de la réaction avec des morceaux de toutes les tailles dont le dernier nucléotide est couplé à un fluorochrome.
- On fait migrer sur gel : les plus courts vont le plus loin : on les trie selon la taille.
- Entre un morceau et le suivant 1 nucléotide a été ajouté, et il est couplé à un fluorochrome qui code pour un nucléotide
- Grâce à un détecteur un ordinateur dresse la séquence en prenant les morceaux par ordre croissant et en traduisant le dernier nucléotide grâce au code couleur-nucléotide.

V) ADN recombinant

Le clonage de l'ADN est une technique destinée à produire des grandes quantités d'un segment d'ADN spécifique

- ADN vecteur
- véhicule pour transport de l'ADN
- dans une cellule hôte E. Coli

Le nombre de molécules d'ADN recombinant augmente dans la même proportion que les cellules bactériennes produites.

Caractéristiques d'un vecteur de clonage :

- 1) se réplique dans une cellule hôte
- 2) petite taille
- 3) contient des gènes de sélection
- 4) des sites uniques de restriction

Vecteurs et hôtes	Caractéristiques	Taille de l'insert
Plasmide	Petites molécules circulaires d'ADN	<5/10 kb
Bactériophage lambda ou phage lambda (bactérie)	ADN viral linéaire	< 20kb
Cosmide (bactérie)	Hybrides de plasmides et phage lambda	< 50kb
Chromosome artificiel de levures ou YAC	ADN contenant centromère, télomère et origines de réplication de levures	De 200 à 1000 kb

Ajout du plasmide recombinant dans le milieu de culture des bactéries. Les bactéries sont capables de prélever de leur ADN de leur environnement = transformation. Sélection des bactéries renfermant le plasmide

recombinant : le plasmide se réplique de façon indépendante dans la bactérie réceptrice, il est transmis à sa descendance.

Transgénèse : intégration d'un fragment d'ADN exogène dans le génome qui sera transmis à la descendance comme un nouveau caractère héréditaire. Rendue possible par le développement durant les dernières décennies des techniques permettant :

- l'isolement, le séquençage et la manipulation des gènes
- le transfert des gènes dans des cellules ou dans un organisme.