

Techniques de Biologie Moléculaire

I . Analyses Cytogénétiques

1) Introduction :

La biologie moléculaire est une discipline scientifique au croisement de la génétique, de la biochimie et de la physique, dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire.

Les méthodes et les techniques de biologie moléculaire développées durant ces dernières décennies, pour séquencer, transférer et analyser les produits de l'expression du matériel génétique des diverses espèces vivantes ont donné lieu à une application sous le nom de « **génie génétique** ».

Depuis la fin des années 1950 et le début des années 1960, les biologistes moléculaires ont appris à caractériser, isoler et manipuler les composants moléculaires des cellules et des organismes. Ces composants incluent l'ADN,ARN, protéines, molécules structurales et enzymatiques les plus importantes des cellules.

2) Comment visualiser la *chromatine* ?

Il existe des colorants qui permettent de visualiser la chromatine grâce à leur affinité pour l'ADN et/ou les protéines qui lui sont associées. Le plus couramment utilisé est le Giemsa qui est une association de trois colorants de base et qui donne une coloration rose violacée de la chromatine en lumière visible.

Il existe également des colorants fluorescents qui permettent de visualiser spécifiquement l'ADN. Ces colorants fluorescents sont essentiellement employés dans le cadre de la *cytogénétique* moléculaire (*hybridation in situ* de sondes d'ADN sur une préparation chromosomique) alors que le Giemsa est le colorant de base de toutes les techniques de marquage en bandes des chromosomes.

3) Obtention de préparations chromosomiques. les chromosomes ne sont visibles que pendant une courte période du cycle cellulaire, lors de la division cellulaire (*mitose* ou *méiose*). Toutes les techniques cytogénétiques visent donc à obtenir un maximum de cellules bloquées à ce stade.

3.1) Culture cellulaire

Pour cela, il est nécessaire d'avoir des cellules en phase de multiplication active, soit spontanément (cas des *villosités choriales* ou de certaines cellules tumorales) soit par une culture préalable le plus souvent. La durée de cette culture est variable en fonction du type cellulaire considéré et de la quantité de matériel biologique disponible au départ.

Blocage des cellules en mitose

I

L'étape suivante consiste à bloquer les cellules en *métaphase* afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour cela, on utilise un poison du fuseau de division (classiquement c'est la Colchicine qui est utilisée ou son équivalent synthétique la Colcémide) qui empêche la progression de la mitose vers l' *anaphase* .

3.2) Choc hypotonique

Les cellules sont alors plongées dans une solution hypotonique ce qui entraîne leur gonflement. Cette étape est indispensable à l'obtention d'un étalement correct des chromosomes.

3.3) Fixation - Etalement

Enfin, la dernière étape consiste en une fixation par un mélange d'alcool et d'acide acétique. La préparation est alors étalée en laissant tomber une goutte de la suspension cellulaire sur une lame.

3.4) Coloration des préparations

Lorsque l'on colore des préparations chromosomiques avec du Giemsa, les chromosomes prennent un aspect rose violacé à peu près homogène sur toute leur longueur. On ne peut donc les distinguer les uns des autres que par leur taille et leur forme. Cependant, ces critères sont insuffisants pour assurer la reconnaissance et l'interprétation correcte des anomalies chromosomiques.

Pour reconnaître spécifiquement chaque paire chromosomique, on utilise donc des techniques de marquage particulières qui permettent d'obtenir une coloration inhomogène des chromosomes par le Giemsa et l'apparition de bandes. C'est la succession de bandes sombres et claires le long d'un chromosome, identique chez tous les individus pour un chromosome donné, qui en permet l'identification précise, selon le même principe qu'un code à barres.

Il existe deux techniques principales de marquage en bandes des chromosomes (*banding*), utilisées en routine :

Bandes G obtenues après traitement des chromosomes par la trypsine

Bandes R obtenues par un traitement à la chaleur.

Dans les deux cas, les bandes ne deviennent visibles qu'après une coloration avec le Giemsa. Ces deux techniques donnent un marquage réciproque, c'est-à-dire que là où l'on obtient une bande sombre avec l'une des deux techniques, on observe une bande claire avec l'autre.

I

D'autres techniques de marquage complémentaires existent qui permettent d'analyser certaines régions particulières du *génom*e :

Bandes C : cette coloration par le Sulfate de Baryum permet de mettre en évidence l' *hétérochromatine* constitutive, qui correspond à des régions non codantes du génome comme les régions centromériques.

4) Classement des chromosomes métaphasiques : le caryotype

Plusieurs critères vont permettre de reconnaître et de classer les chromosomes :

***la taille** Par convention, les chromosomes sont classés du plus grand au plus petit.

***l'index centromérique**, c'est-à-dire le rapport entre la taille du bras court et la taille totale du chromosome

Cet index permet de reconnaître trois familles de chromosomes :

les chromosomes métacentriques dont les deux bras ont une taille à peu près équivalente,

les chromosomes submétacentriques qui ont un bras franchement plus petit que le bras long

les chromosomes *acrocentriques* dont le bras court est quasi inexistant (on ne trouve sur ces bras courts que les gènes codant pour les ribosomes ; ces gènes étant présents à plusieurs centaines d'exemplaires double génome, la perte du bras court d'un chromosome acrocentrique n'a pas de conséquence clinique)

***les bandes chromosomiques**, qui sont caractéristiques de chacune des paires.

Le nombre de bandes visibles est variable d'une mitose à l'autre et dépend du niveau de condensation du chromosome. Plus les chromosomes sont condensés, moins on peut observer de bandes et moins l'analyse permet de dépister des anomalies de petite taille. Le nombre de bandes par lot *haploïde* (c'est-à-dire pour 23 chromosomes) permet de définir la résolution de l'analyse cytogénétique ; un caryotype standard a une résolution de 300 à 550 bandes ; certaines techniques dites de haute résolution permettent d'augmenter le nombre de bandes visualisées en bloquant les chromosomes au tout début de leur condensation.

I

5) La cytogénétique moléculaire :

(Applications de l'hybridation *in situ* FISH : Fluorescence In Situ Hybridisation)

Le principe repose sur l'utilisation d'une sonde moléculaire, c'est-à-dire une petite séquence d'ADN (ou d'ARN) dont l'emplacement normal est connu dans le génome et qui est marquée chimiquement de façon à pouvoir être repérée par la suite. Cette sonde est mise en contact avec les chromosomes d'une mitose (ou de noyaux interphasiques) et va s'hybrider spécifiquement au niveau de sa séquence complémentaire. On peut alors visualiser la sonde au microscope dont l'emplacement identifie précisément la région chromosomique dont elle est complémentaire.

Les sondes sont marquées soit avec une molécule fluorescente, soit avec un haptène (molécule qui peut être reconnue par un anticorps). Dans le premier cas, la sonde est directement visible au microscope à fluorescence, tandis que dans le second, une étape supplémentaire de révélation avec un anticorps fluorescent est nécessaire.

.Les sondes sont obtenues par :

- PCR : longueur de 10 Kb au maximum.
- à partir de clones : 0,1 à quelques centaines Kb.
- synthèse : oligonucléotide de 60 bases au maximum.
- transcription (cas des sondes ARN) à partir d'ADN cloné dans un vecteur.

5.1) Principales applications de FISH:

Dénombrement de chromosomes : mise en évidence d'anomalie de nombre des chromosomes, homogènes ou en mosaïque.

Identification de l'origine d'un fragment chromosomique : chromosomes marqueurs, matériel supplémentaire d'origine inconnue sur un chromosome

Mise en évidence de microdélétions, non vues sur le *caryotype* standard

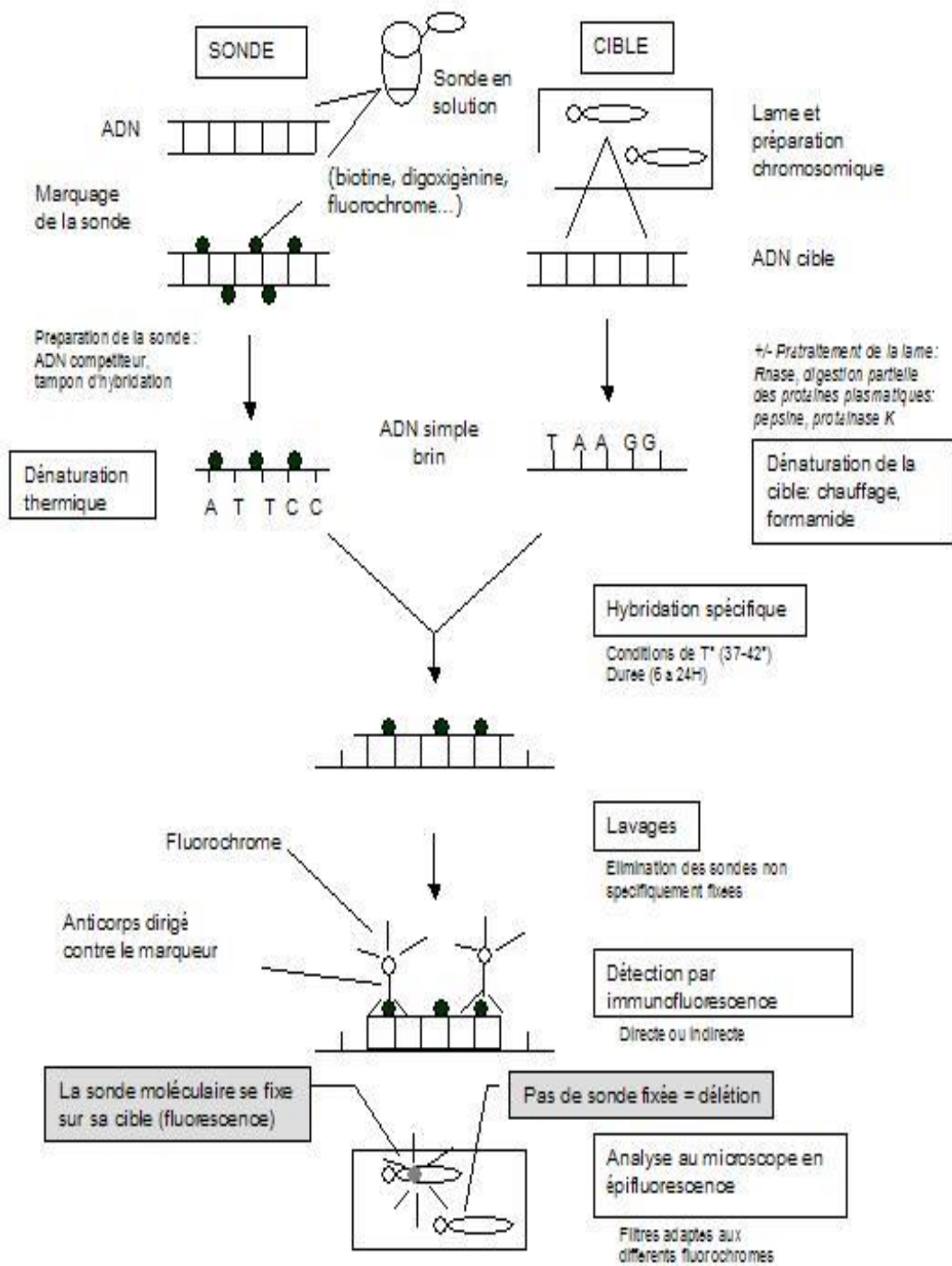
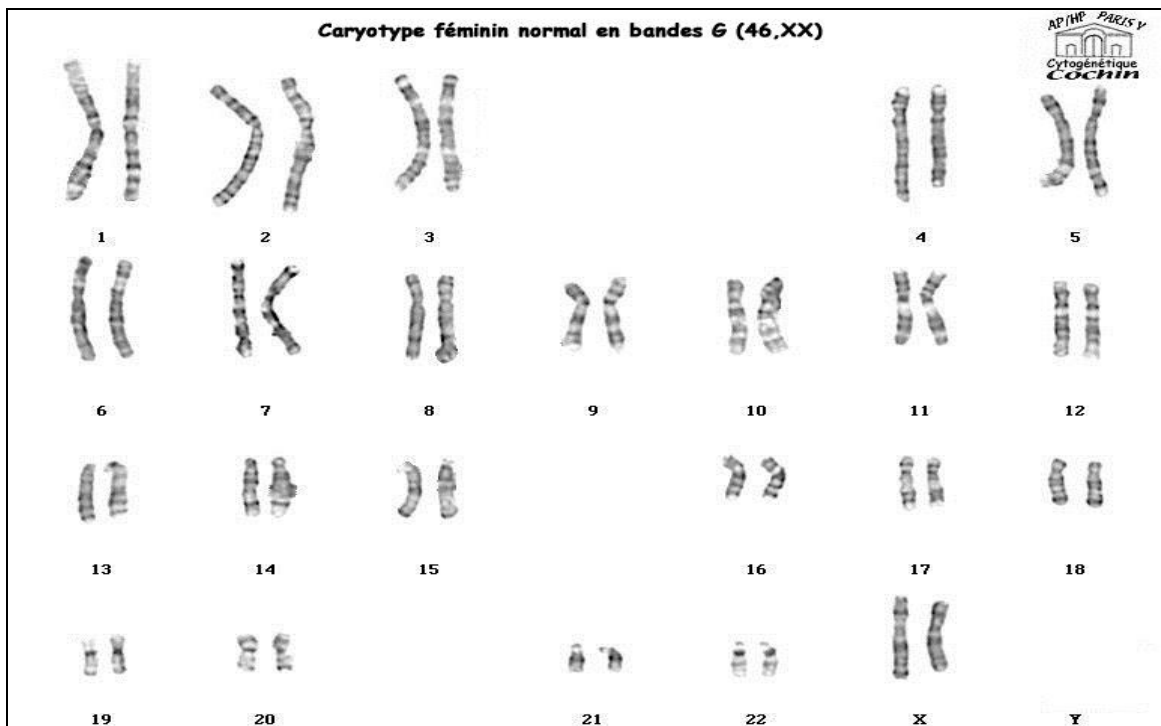
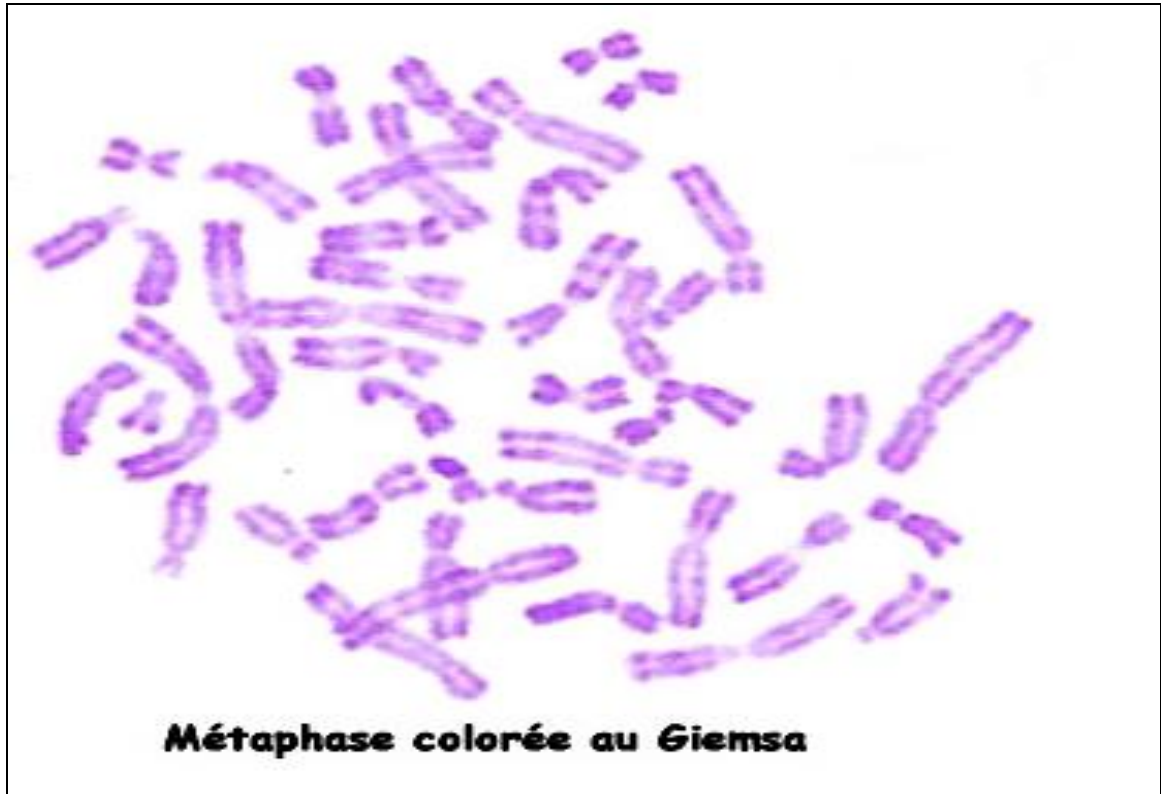
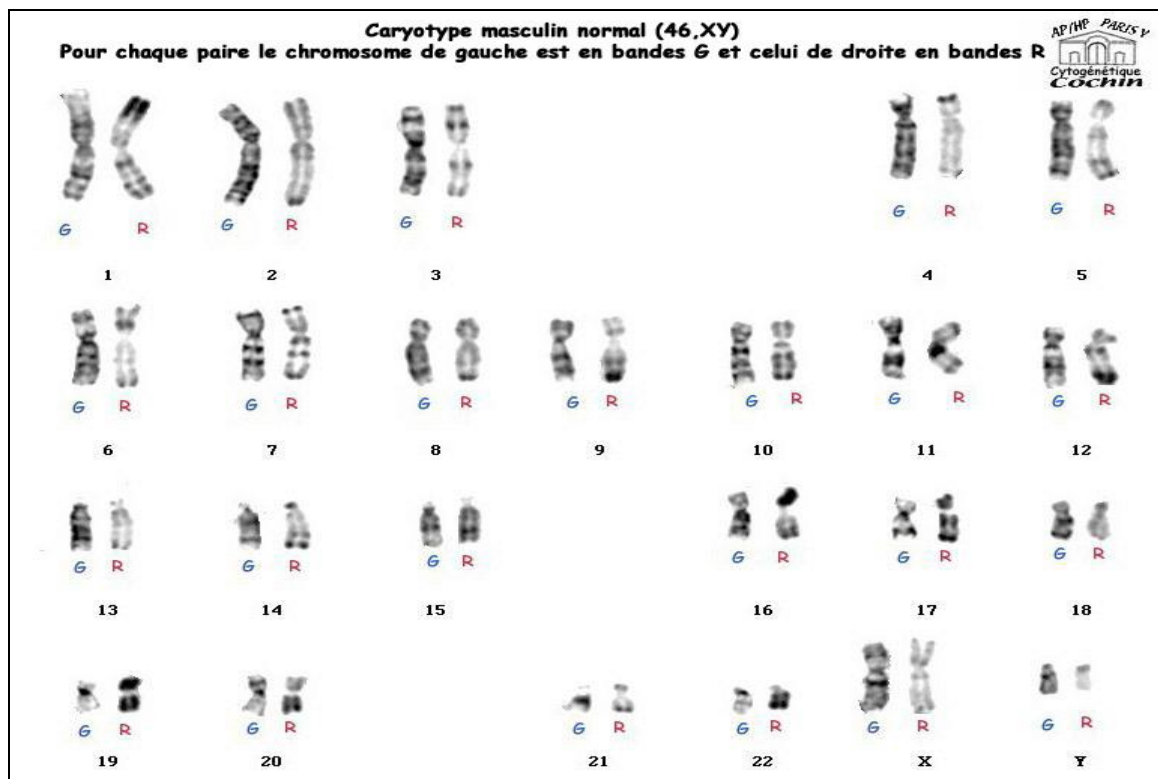
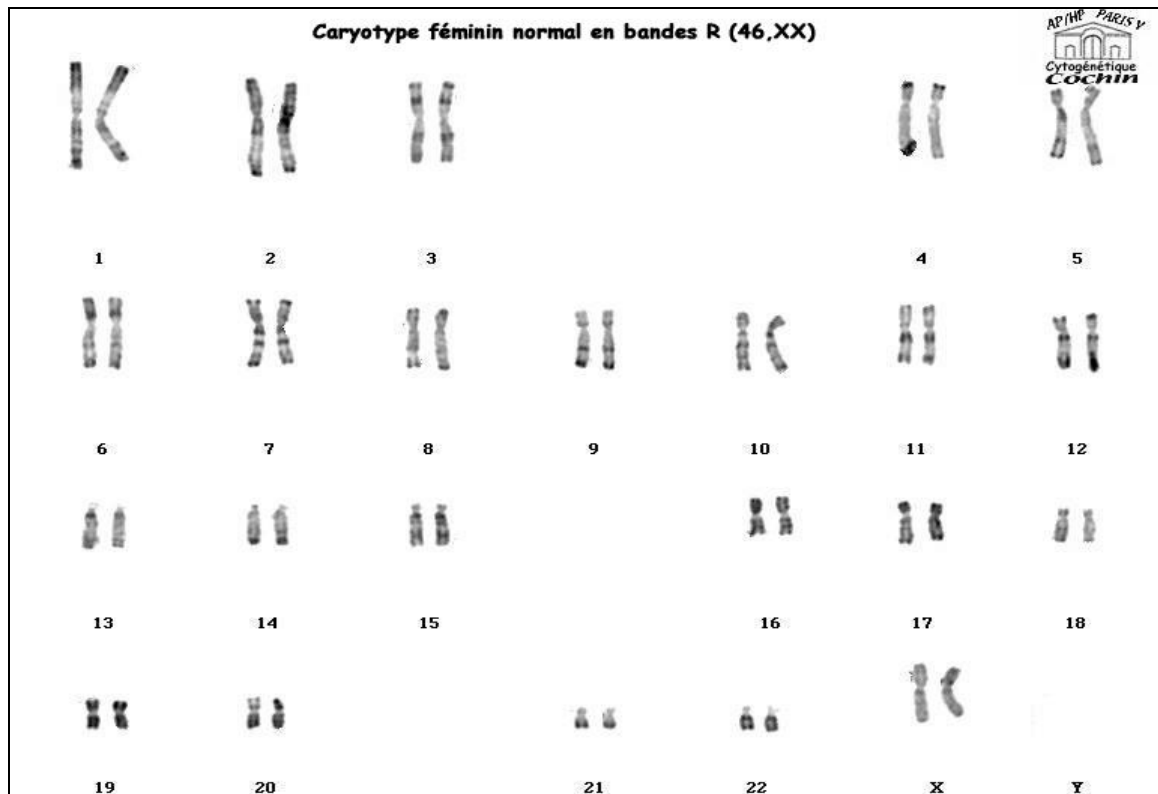


Figure 2 : Principe de la FISH : les différentes étapes sur préparation chromosomique sont indiquées schématiquement. Exemple d'une sonde spécifique de la région proximale d'un chromosome acrocentrique. Le résultat indique la perte du locus testé sur l'un des chromosomes homologues.

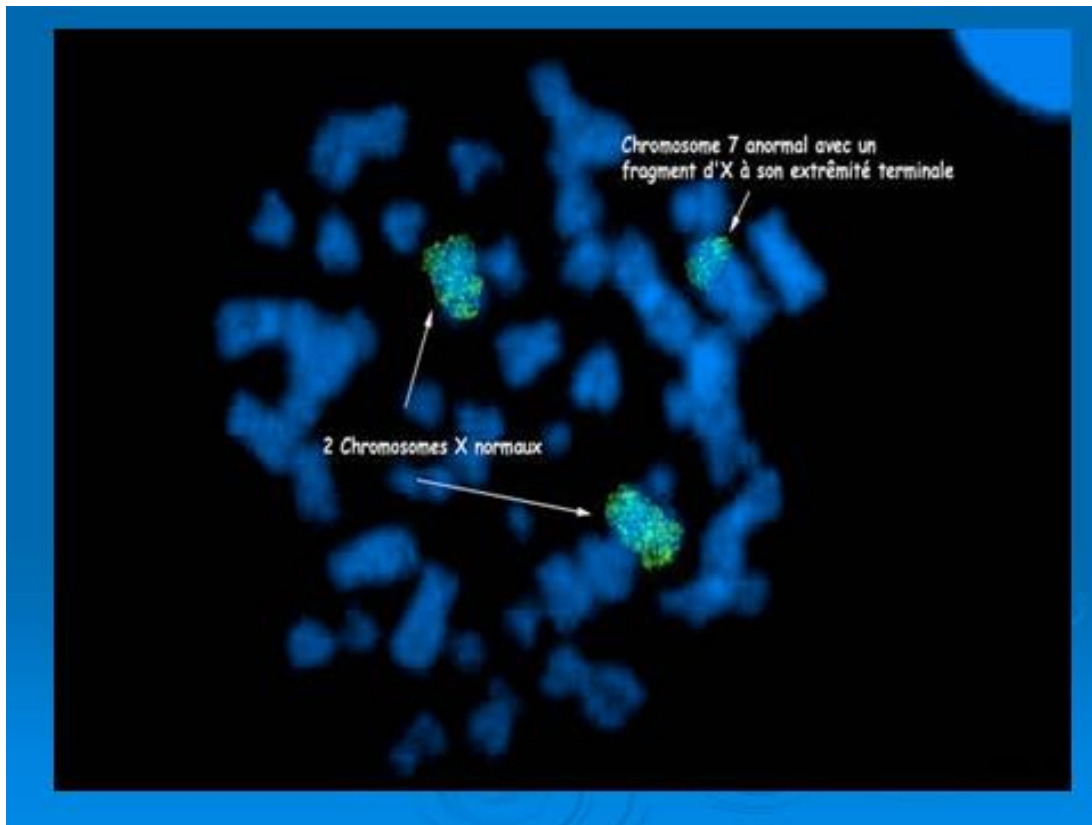
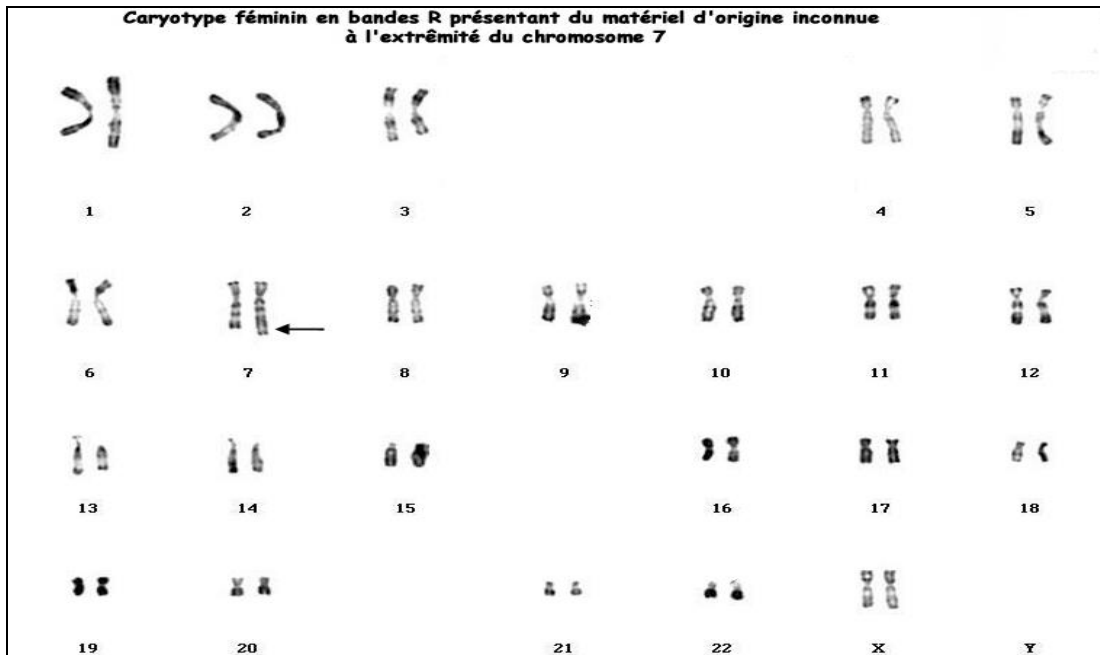


I

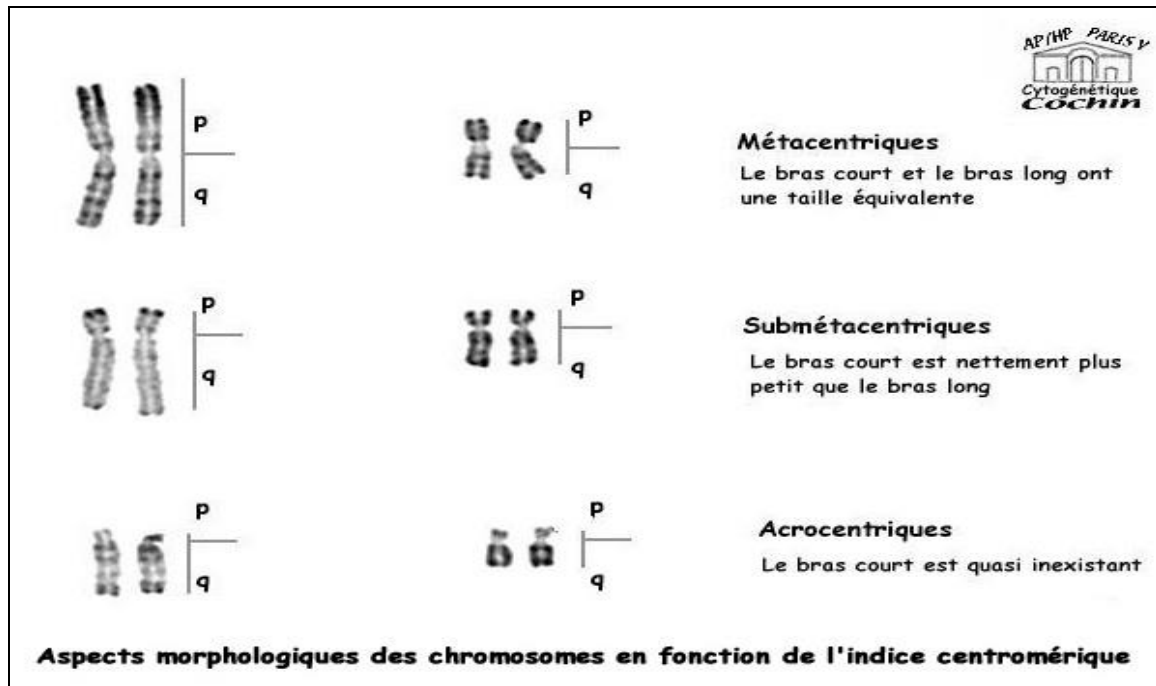


I

Application de FISH



Classement des chromosomes



**** L'HYBRIDATION**

Toutes les méthodes de biologie moléculaire reposent au départ sur le principe de l'hybridation moléculaire. Il s'agit de la propriété que présente une molécule d'ADN monobrin de s'associer spontanément et de façon spécifique et réversible à une autre molécule monobrin si celle-ci lui est complémentaire. L'hybridation moléculaire est permise par les liaisons hydrogènes que peuvent établir les bases puriques et pyrimidiques constituant l'ADN.

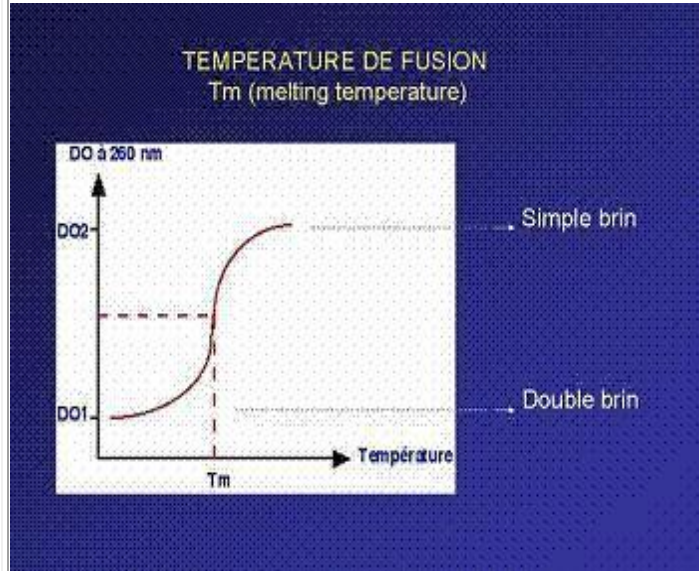
L'hybridation moléculaire est :

- **spécifique** : Sous certaines conditions expérimentales (*stringence*), une séquence d'ADN monobrin ne peut s'apparier qu'à la séquence qui lui est complémentaire dans le génome.
- **réversible** : l'expérimentateur peut, en jouant sur les conditions expérimentales (essentiellement la température du milieu réactionnel) réaliser ou au contraire supprimer (dissociation) l'hybridation de deux molécules d'ADN.

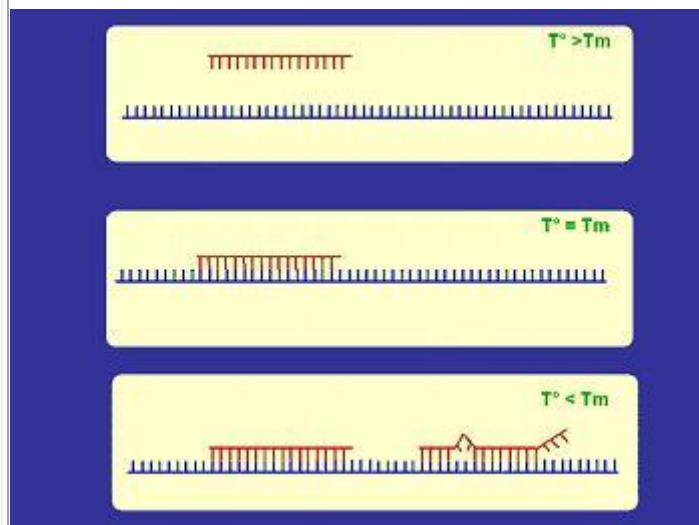
I

-Le paramètre déterminant dans la spécificité et la réversibilité de l'hybridation moléculaire est le T_m ou température de fusion (melting temperature). C'est la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme monobrin et l'autre moitié sous forme double brin.

-Un passage d'une forme à l'autre se visualise très bien si on mesure la DO à 260 nm (UV) car l'ADN simple brin absorbe plus les UV que l'ADN double brin.



Le T_m dépend de nombreux facteurs tels que la longueur du fragment d'ADN considéré, sa richesse en cytosines et guanines et la concentration en ion Na du milieu réactionnel. En pratique, l'expérimentateur peut créer ou supprimer l'hybridation moléculaire en choisissant une température du milieu réactionnel inférieure, égale ou supérieure au T_m .



Prenons l'exemple d'un oligonucléotide d'une taille de 20 nucléotides et d'une séquence plasmidique monobrin de 3 kb contenant quelque part la séquence complémentaire de cet oligonucléotide.

I

- Si la température du milieu réactionnel est supérieure au T_m , l'ADN plasmidique et l'oligonucléotide ne s'hybrideront pas. Ils resteront sous forme monobrin.
- Si la température est égale (en pratique légèrement inférieure) au T_m , il y aura hybridation spécifique, c'est à dire à l'endroit de la séquence cible qui est complémentaire de l'oligonucléotide.
- Si la température est très inférieure au T_m , il y aura hybridation sur la séquence complémentaire mais aussi hybridation non spécifique, c'est à dire à des endroits de la séquence cible qui ne sont pas parfaitement complémentaires de l'oligonucléotide. Cette situation est parfois intéressante, par exemple dans le cas d'expériences de mutagenèse dirigée.