

Méthodes de détection des mutations connues et inconnues

I/ Stratégie Générale

Deux situations peuvent se présenter et donner lieu à des choix sur les techniques à utiliser pour détecter les mutations qu'elles soient connues ou inconnues :

Lorsque la clinique est :

1/ Evocatrice d'une pathologie ou syndrome (**génotype +, phénotype +**)

2/ Non évocatrice d'une pathologie ou syndrome (**génotype +, phénotype -**)

Parmi les méthodes de détection des mutations, on distingue :

- **celles fondées sur la recherche spécifique d'une ou plusieurs mutations connues (techniques de « **criblage** »),**
- **de celles dites de « **balayage** » (scanning ou screening en anglais), qui détectent n'importe quelle variation de séquence dans une séquence d'ADN ou d'ARN de quelques centaines de paires de bases, sans préjuger de leur localisation ni de leur nature.**

I.1. Clinique évocatrice d'une pathologie ou syndrome

I.1.1/ Gène identifié

Lorsque le gène est déjà identifié, deux cas se présentent :

I.1.1.a/ Mutation ciblée

On cherche une mutation bien précise, la mutation incriminée est directement ciblée, dans les maladies héréditaires et conservée, donc familiales : A titre d'exemple, la **Mucoviscidose.**

En cas de suspicion de Mucoviscidose, on cherche, en premier lieu, la mutation $\Delta F508$ qui représente 70% des mutations.

La mutation $\Delta F508$ est due à une délétion de 3 paires de bases de l'exon 10 du gène CFTR, responsable de la Mucoviscidose.

La Mucoviscidose

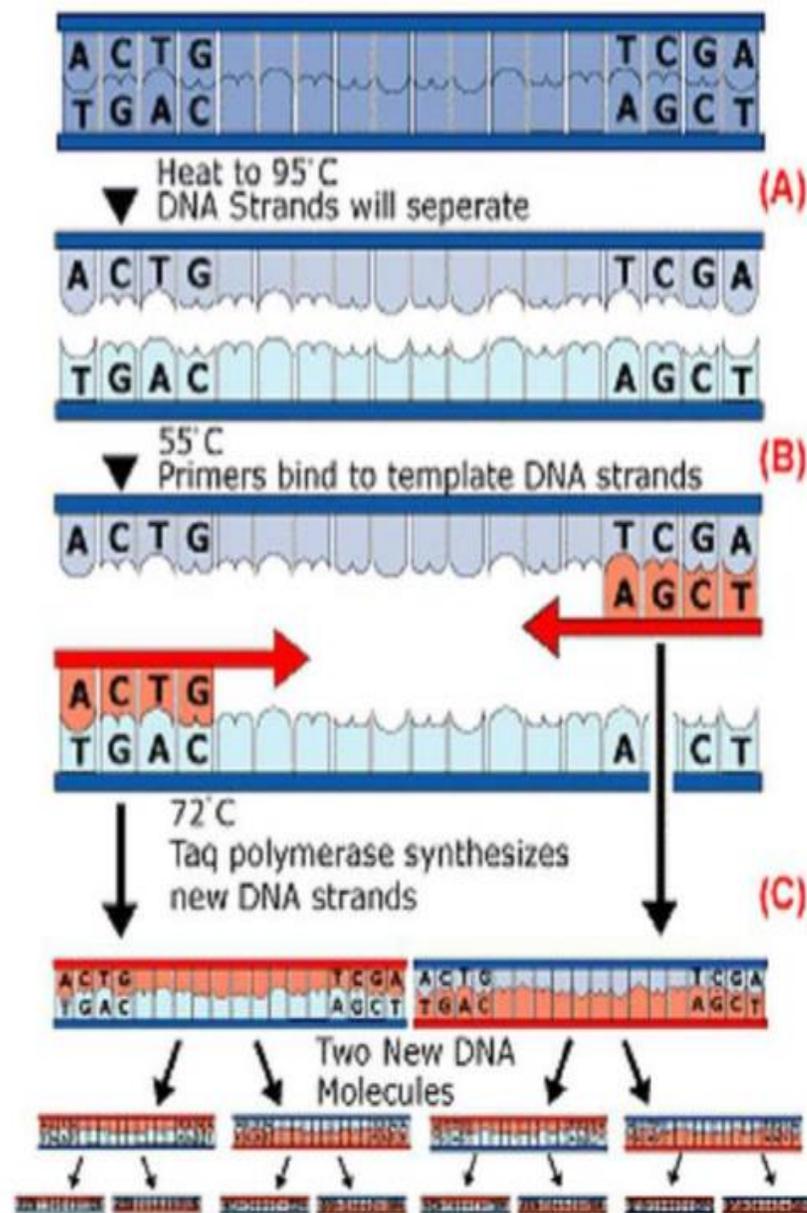
- ✓ **C'est une pathologie généralisée des glandes exocrines séreuses et à sécrétion muqueuse suite à une accumulation d'épaisses sécrétions dans les voies respiratoires et digestives.**
- ✓ **Le gène incriminé est : 7q31.2 avec 27 exons à 230 Kb.**
- ✓ **Il est transcrit pour synthétiser une protéine: CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).**
- ✓ **Cette protéine régule les flux d'eau et de sel au travers des membranes cellulaires (canal chlore).**
- ✓ **Il est donc possible de tester directement la sueur, par dosage du Cl⁻, qui s'avère en augmentation, en cas de Mucoviscidose.**

On procède toujours en premier lieu à une amplification du matériel génétique par PCR :

A/ PCR

- **La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*.**
- **Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.**
- **Chaque cycle de PCR est constitué de **trois étapes** :**
 - ✓ **une **dénaturation** de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent,**
 - ✓ **une **hybridation** des amorces aux extrémités de la séquence recherchée,**
 - ✓ **puis une **élongation** grâce à l'action d'une ADN polymérase.**
- **Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible.**

Polymerase Chain Reaction (PCR)



Dénaturation



Hybridation



Elongation



Cycle répété n fois

Nb de copies final = 2^n

A typical thermal cycle might be as follows:

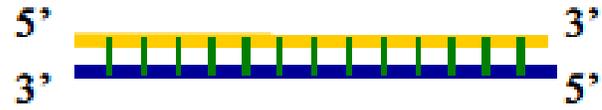
f Heat denaturation at 94°C for 20 seconds

f Primer annealing at 55°C for 20 seconds

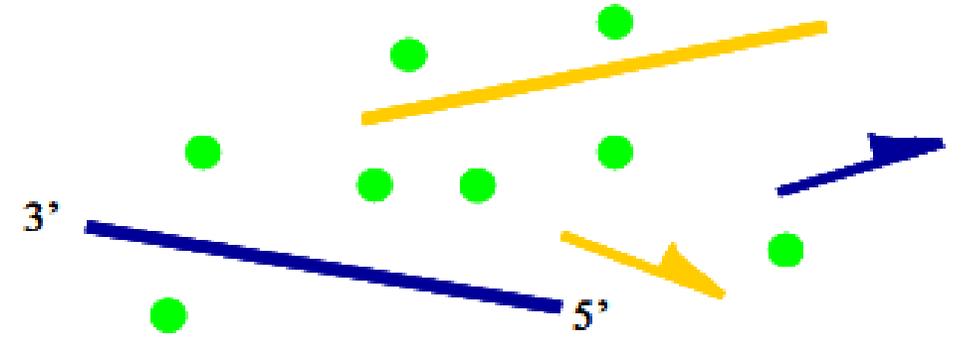
f Primer extension at 72°C for 30 seconds

B/ RT-PCR

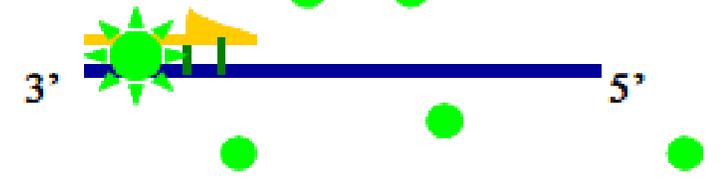
- ✓ **Le principe de la PCR en Temps Réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR en point final).**
- ✓ **Des sondes fluorescentes se fixent :**
 - **soit sur l'ADN double brin**
 - **soit sur une séquence d'ADN précise**
- ✓ **Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN.**
- ✓ **La mesure de la fluorescence permet de déterminer "en temps réel" si le fragment recherché (amplicon) est effectivement présent — et donc amplifié — sans avoir besoin de faire une électrophorèse, par exemple.**
- ✓ **De plus, la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR.**



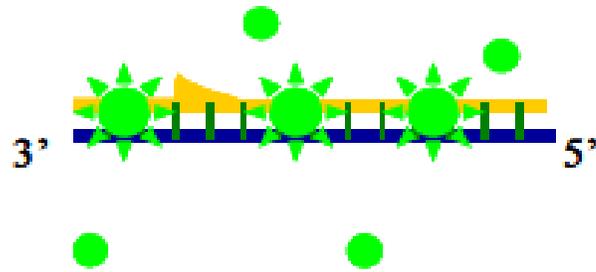
a →



↓ **b**



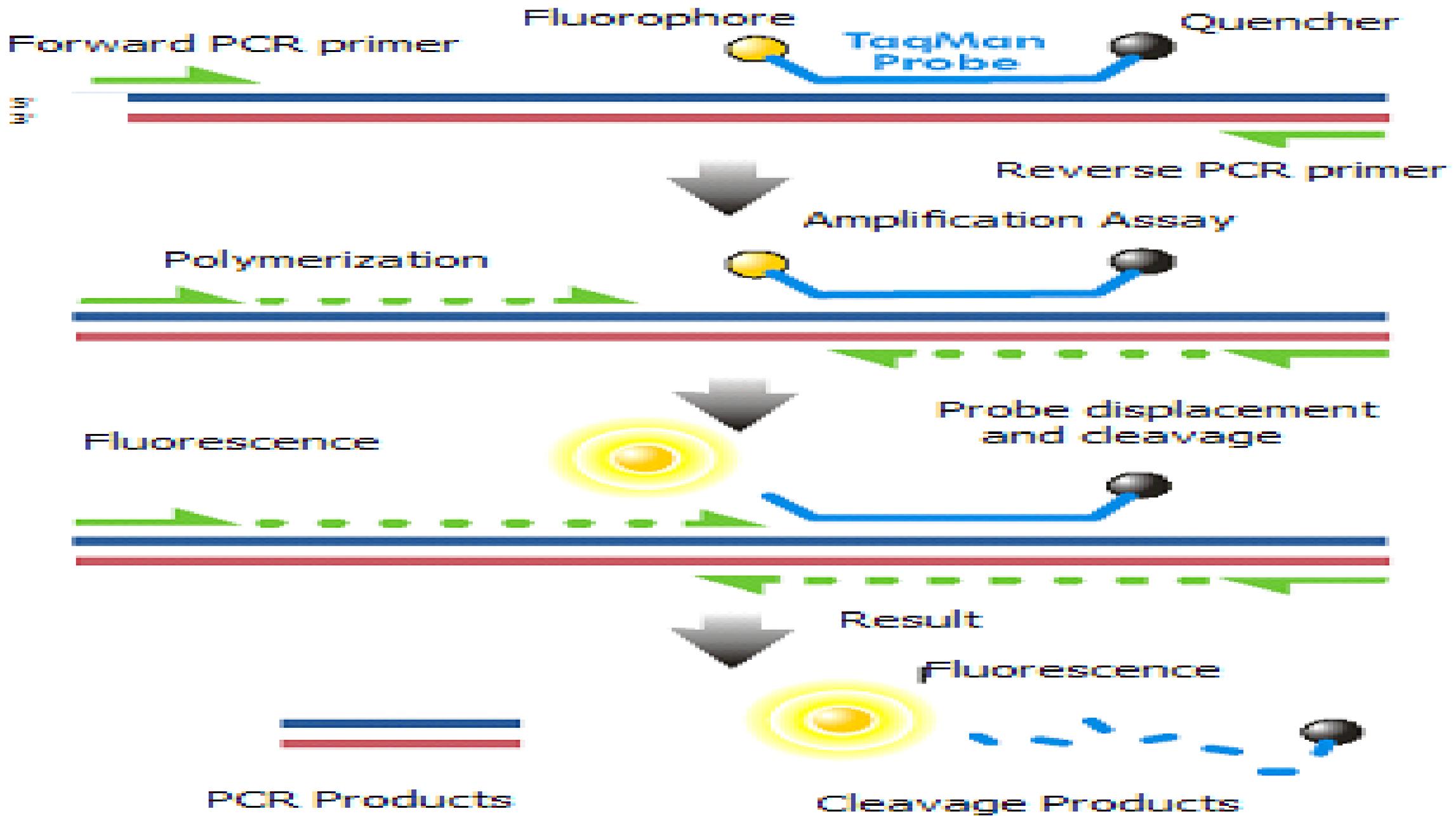
← **c**



 : fluorochrome stimulé
 : fluorochrome non stimulé libre

 : amplicon  : amorce
 : ADN double brin cible

- ✓ La sonde TaqMan consiste en un fluorophore attaché de manière covalente à l'extrémité d'un oligonucléotide et en un désactivateur (*quencher*) à l'autre extrémité.
- ✓ Différents fluorophores (ex : 6-carboxyfluorescéine, acronyme : *FAM*, tétrachlorofluorescéine, acronyme : *TET*) et désactivateurs (ex : tétraméthylrhodamine, acronyme: *TAMRA*) sont utilisables.
- ✓ Le désactivateur inhibe la fluorescence émise par le fluorophore lorsqu'il est excité par la source de lumière du thermocycleur. Ainsi, tant que le fluorophore et le désactivateur sont à proximité l'un de l'autre, le signal fluorescent est inhibé par le désactivateur.
- ✓ Chaque sonde TaqMan est conçue de sorte à s'hybrider avec une région d'ADN spécifique amplifiée par une paire d'amorces spécifiques (contrairement à la figure, la sonde s'hybride à de l'ADN simple-brin).
- ✓ Alors que la *Taq* polymérase élonge l'amorce et synthétise le brin néoformé du brin complémentaire, l'activité exonucléase 5'–3' de cette même *Taq* polymérase dégrade la sonde déjà hybridée au brin matrice.
- ✓ La dégradation de la sonde relargue le fluorophore cassant ainsi la proximité existant avec le *quencher* et permettant l'expression de la fluorescence. Ainsi, la fluorescence détectée est directement proportionnelle au relargage de fluorophore et donc à la quantité d'ADN d'intérêt.



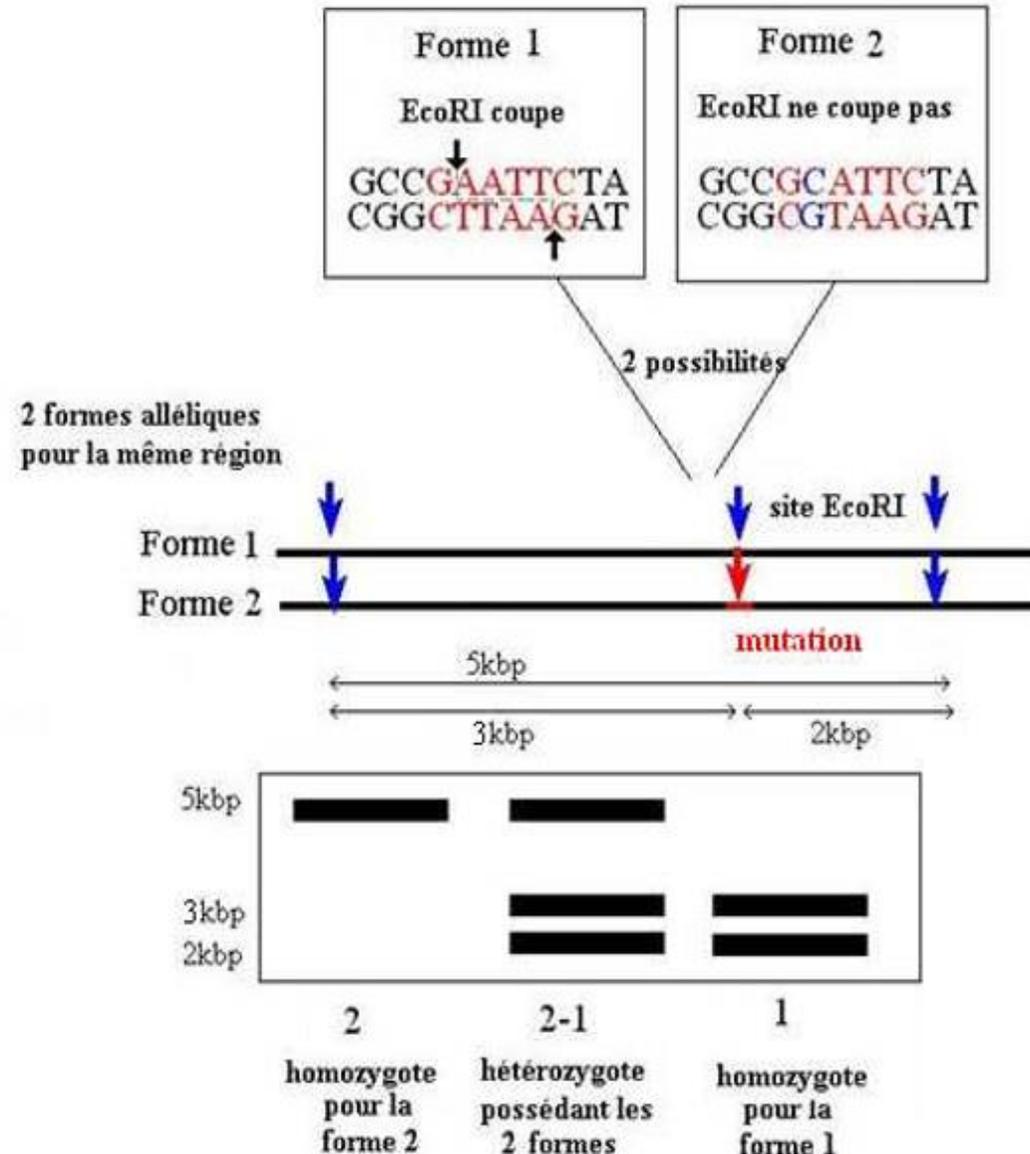
C/ PCR-RFLP

- ✓ **La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: polymorphisme de longueur des fragments de restriction) repose sur la digestion d'un ADN cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par l'ADN.**
- ✓ **Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec une sonde ADN, provenant souvent de banques d'ADN génomique ou complémentaire.**
- ✓ **Cette sonde peut provenir d'une espèce proche de l'espèce à étudier (sonde hétérologue).**

PCR-RFLP (Restriction fragment Length Polymorphism)

EcoRI (Eco « R » un)

est une enzyme de restriction produite par la souche bactérienne *Escherichia coli*, bactérie du système digestif humain.



D/ PCR-ARMS

Amplification Refractory Mutation System (ARMS) est une application de PCR dans laquelle l'ADN est amplifié par des amorces spécifiques d'allèles.

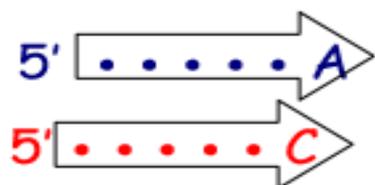
C'est une méthode extrêmement utile pour l'identification des mutations ponctuelles ou des polymorphismes.

PCR ARMS

PCR spécifiques d'allèles

.....A..... Allèle 1 (n)
.....C..... Allèle 2 (m)

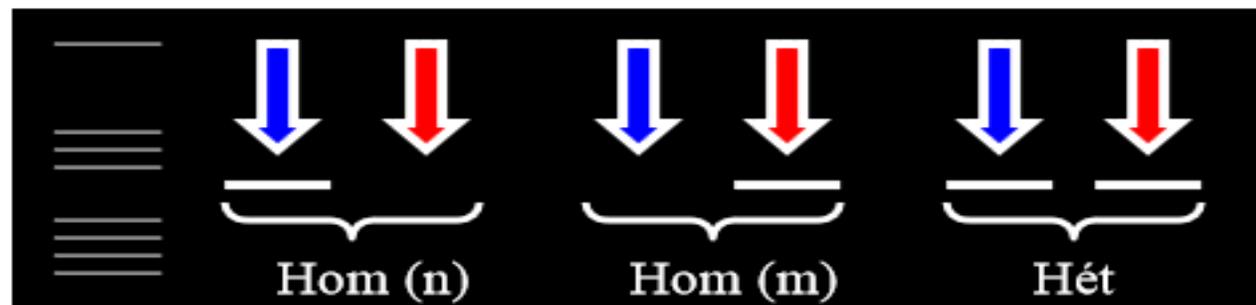
Construction
d'amorces



Amorce spécifique de l'allèle 1 (ASPn)
Amorce spécifique de l'allèle 2 (ASPm)



PCR avec ASPn ou ASPm
+ COM

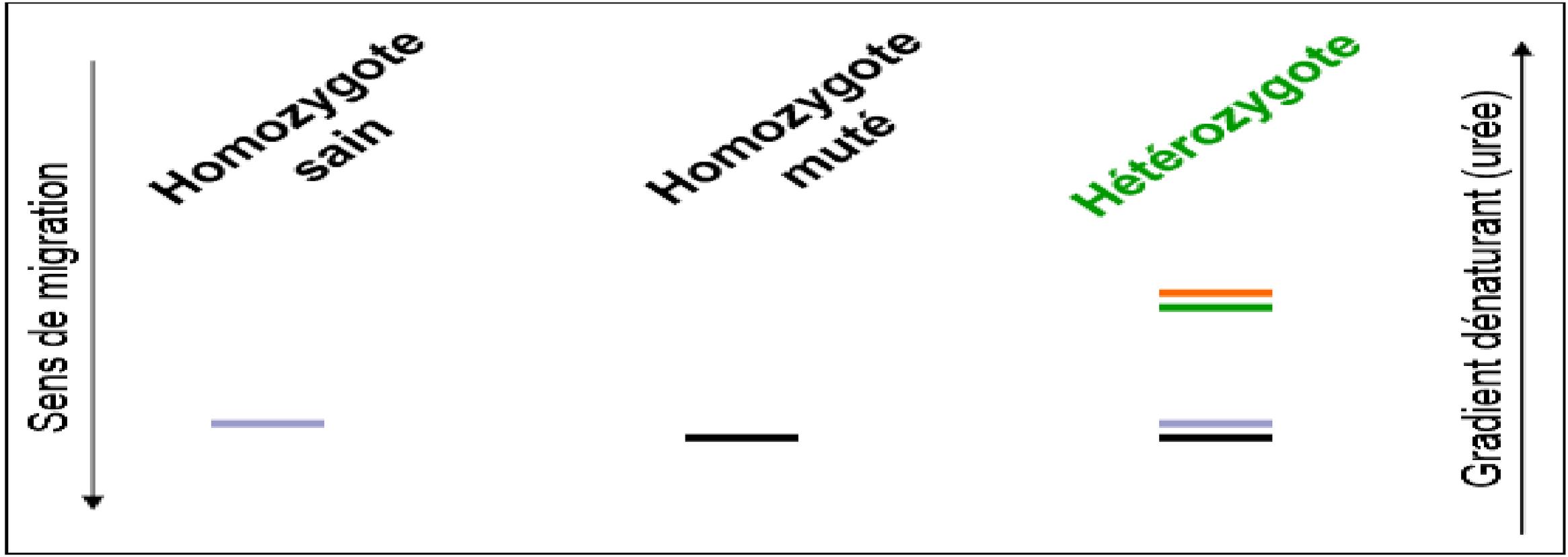
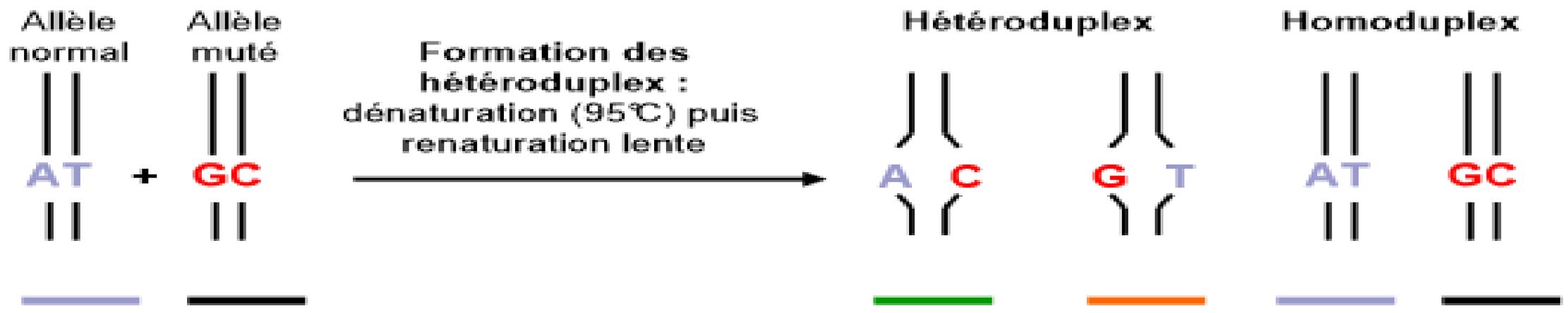


I.1.1.b/ Criblage du gène

On procède à la recherche d'une mutation au niveau d'un gène cible.

A/ DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis ou Technique d'électrophorèse de l'ADN en gradient de gel dénaturant)

- ✓ Les fragments d'ADN migrent d'abord comme des molécules double brin. Plus tard, le gel changeant de composition (sous des conditions de dénaturation croissante : concentrations en formamide/urée), les molécules se dénaturent et deviennent simple brin, pour former une structure avec des branchements.**
- ✓ Ce changement de structure conduit à des molécules qui ont une capacité de migration dans le gel diminuée et qui cessent de migrer.**
- ✓ La localisation finale de la molécule dans le gel dépend de ce fait de la séquence nucléotidique des fragments.**



B/ HRM (High Resolution Melting)

L'analyse HRM est réalisée à partir d'échantillons d'ADN double brin. La région de l'ADN potentiellement porteuse de la mutation est d'abord amplifiée par PCR.

L'amplicon est alors chauffé très progressivement et précisément d'environ 50°C à 95°C. À un certain point, les deux brins d'ADN se séparent : c'est ce processus que l'on appelle fusion de l'ADN.

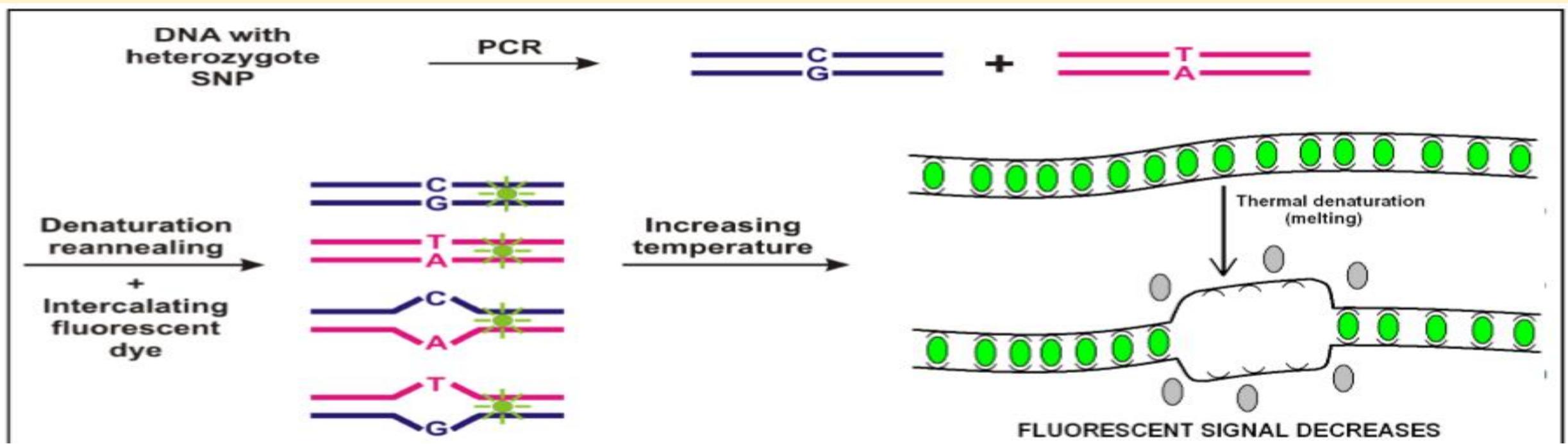
Le principe de la HRM est d'observer cette fusion en temps réel.

Cela est possible grâce à des composés particuliers, appelés colorants intercalants, qui ont la propriété de devenir plus fluorescents lorsqu'ils sont fixés à de l'ADN double brin.

En l'absence de double brin, ils ne peuvent pas se fixer et leur niveau de fluorescence est très faible.

Au début de la méthode de l'analyse HRM, à la plus basse température, l'intensité de fluorescence est très importante, car l'ensemble de l'amplicon est présent sous forme double brin. Mais, au fur et à mesure que la température augmente et que les brins se séparent, la fluorescence diminue. L'enregistrement de l'intensité de fluorescence en fonction de la température est appelée courbe de fusion.

Un changement, même mineur, dans la séquence de l'ADN conduit à une variation de la cinétique de fusion, qui peut être détectée grâce à la haute résolution utilisée.

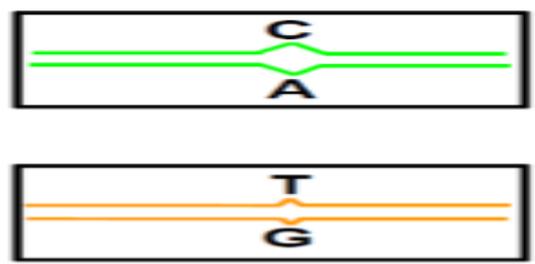


Melting Curves

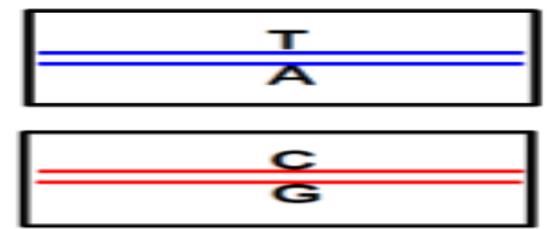
Heterozygote Amplification

Observed Combination of 4 Duplexes

Two Heteroduplexes



Two Homoduplexes



Normalized Fluorescence

Temperature

C/ Inno LIPA (Génotypage par sondes immobilisées sur bandelettes)

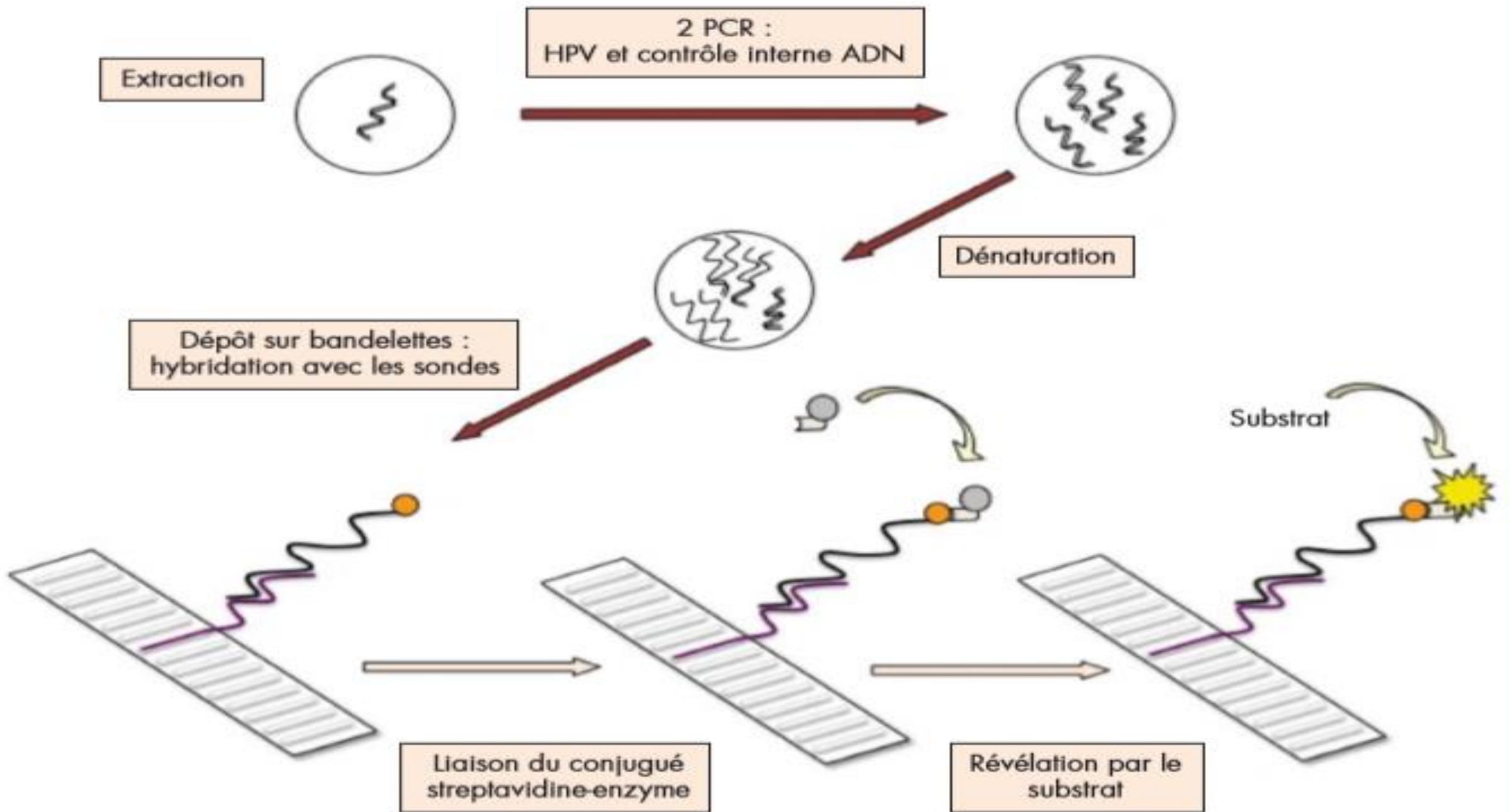
Cette technologie utilise le principe de l'hybridation inverse, avec des sondes oligonucléotidiques fixées sur des bandelettes.

Le test repose sur l'amplification par PCR d'un fragment en utilisant les amorces biotinylées. Les amplicons biotinylés sont ensuite hybridés avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques qui sont immobilisées en lignes parallèles sur des bandelettes de nitrocellulose.

Après hybridation et lavage stringent, le conjugué streptavidine phosphatase alcaline est ajouté et se lie à tout hybride biotinylé formé.

L'incubation avec le chromogène BCIP/ NBT forme un précipité violet au niveau des lignes réactionnelles permettant une interprétation visuelle des résultats.

(BCIP : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, NBT: Nitro-blue tetrazolium)

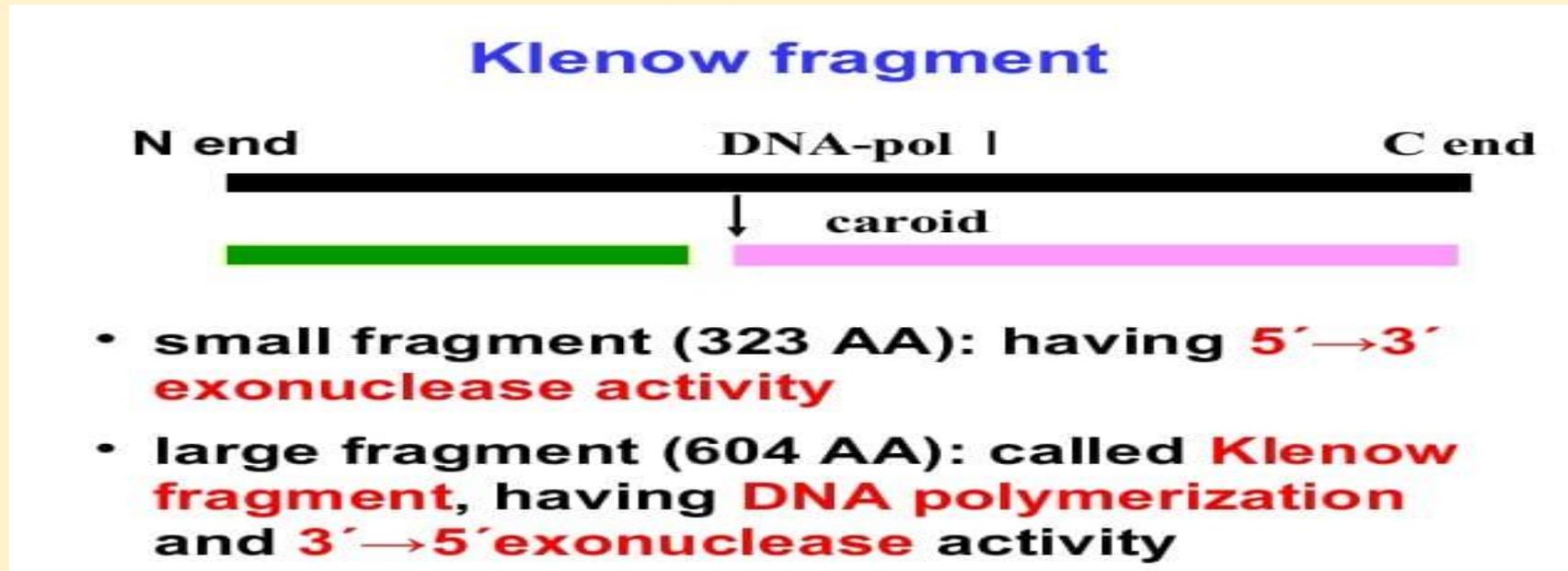


D/ Séquençage classique

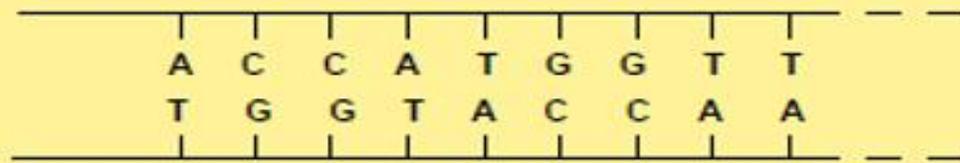
- ✓ Le principe de cette méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer.
- ✓ L'élongation de l'amorce est réalisée par le fragment de Klenow et maintenue par des ADN polymérases thermostables, celles qui sont utilisées pour la PCR.

Fragment de Klenow

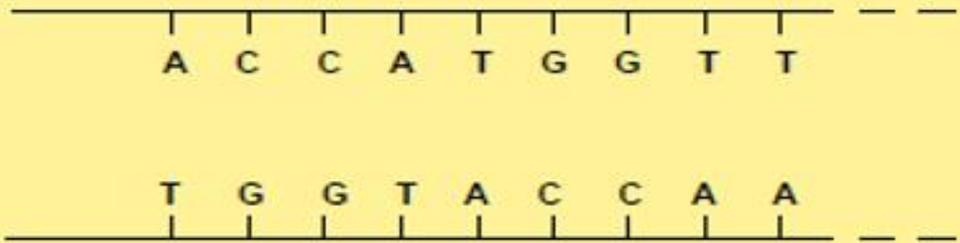
Le plus grand des deux fragments protéiques de l'ADN polymérase I d'*Escherichia coli*, qui sont formés après le clivage enzymatique avec la subtilisine, est appelé le fragment de Klenow, également connu sous le nom d'enzyme de Klenow. Il a toujours l'activité polymérase 5' → 3' et l'activité exonucléase 3' → 5', mais plus l'activité exonucléase 5' → 3' de l'ADN polymérase I.



- ✓ Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'une faible concentration de l'un des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP).
- ✓ Ces didésoxyribonucléotides agissent comme des « poisons » terminateurs de chaîne : une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation.
- ✓ Cette terminaison se fait spécifiquement au niveau des nucléotides correspondant au didésoxyribonucléotide incorporé dans la réaction.
- ✓ Pour le séquençage complet d'un même fragment d'ADN, on répète cette réaction quatre fois en parallèle, avec les quatre (04) didésoxyribonucléotides différents.
- ✓ Le mélange réactionnel contenant, à la fois du dGTP et un peu de ddGTP, la terminaison se fait de manière statistique suivant que l'ADN polymérase utilise l'un ou l'autre de ces nucléotides.
- ✓ Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent tous au niveau d'un des G dans la séquence.
- ✓ Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, ce qui permet ainsi de repérer la position des G dans la séquence.
- ✓ La détection des fragments ainsi synthétisés se fait en incorporant un traceur dans l'ADN synthétisé.
- ✓ Initialement ce traceur était radioactif ; aujourd'hui, on utilise des traceurs fluorescents, attachés soit à l'oligonucléotide, soit au didésoxyribonucléotide.



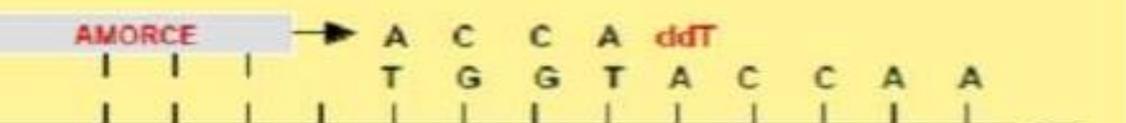
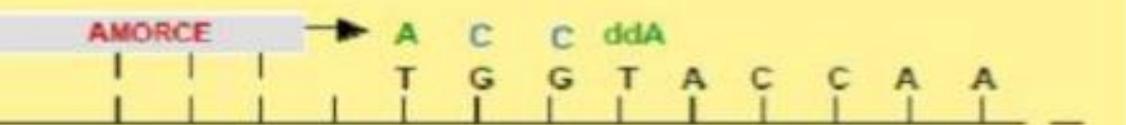
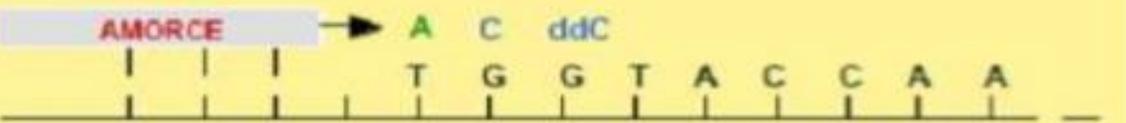
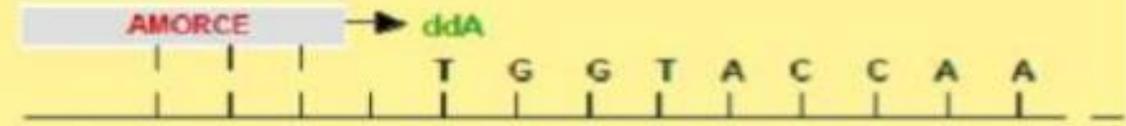
dénaturation



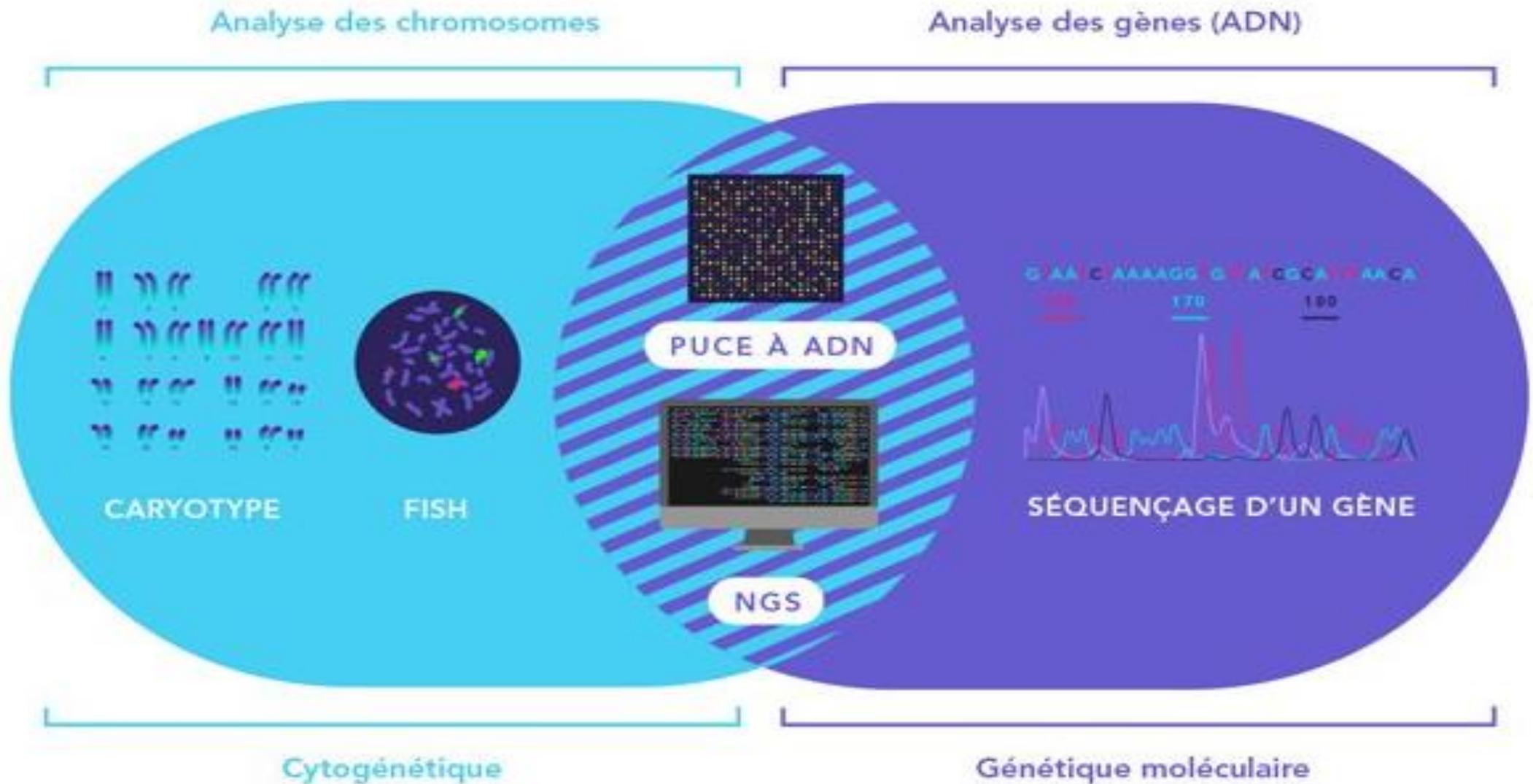
hybridation



synthèse

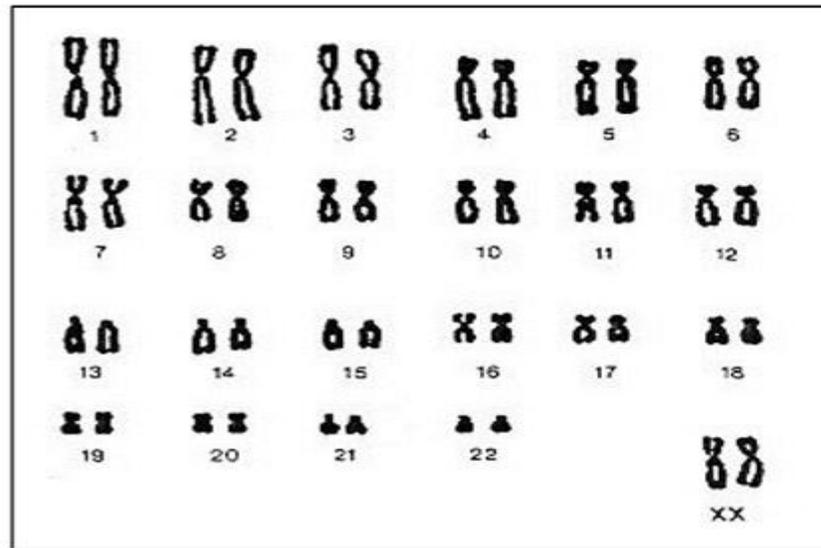
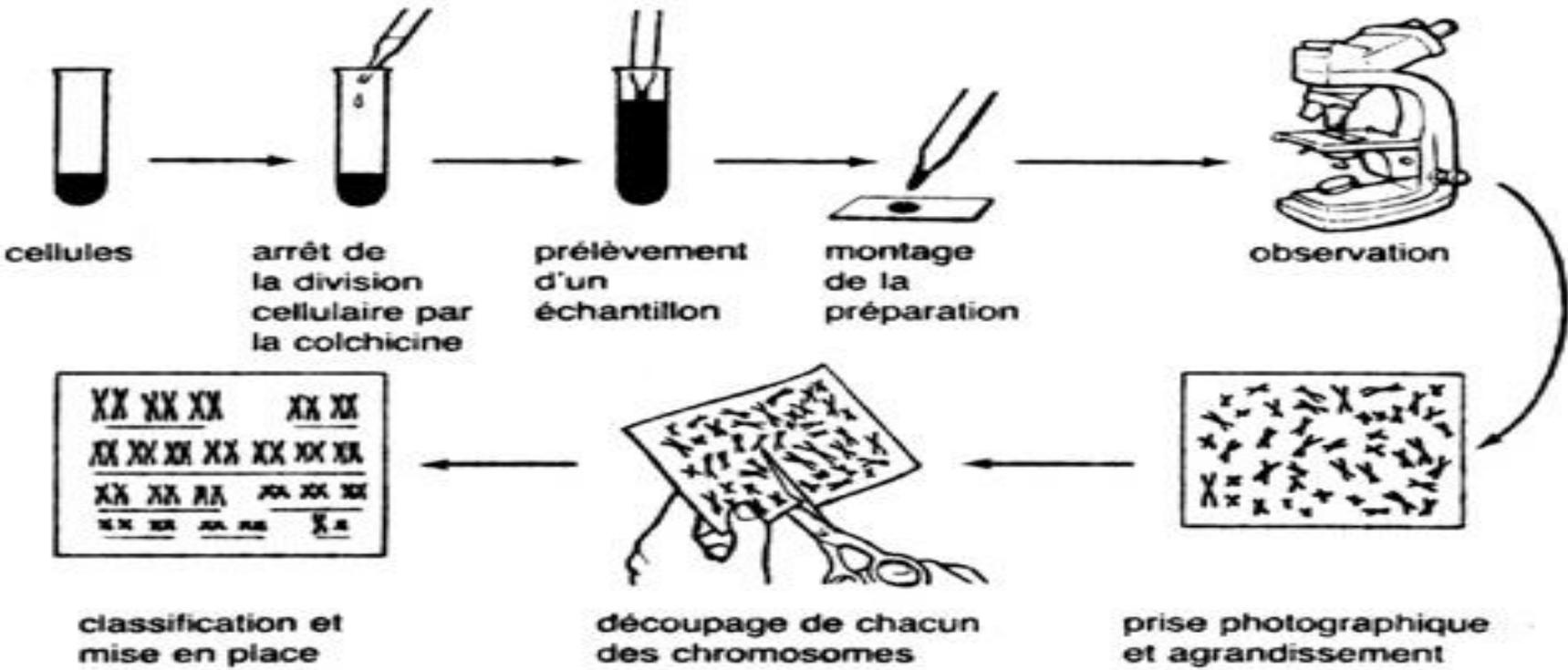


I.1.2/ Chromosomique

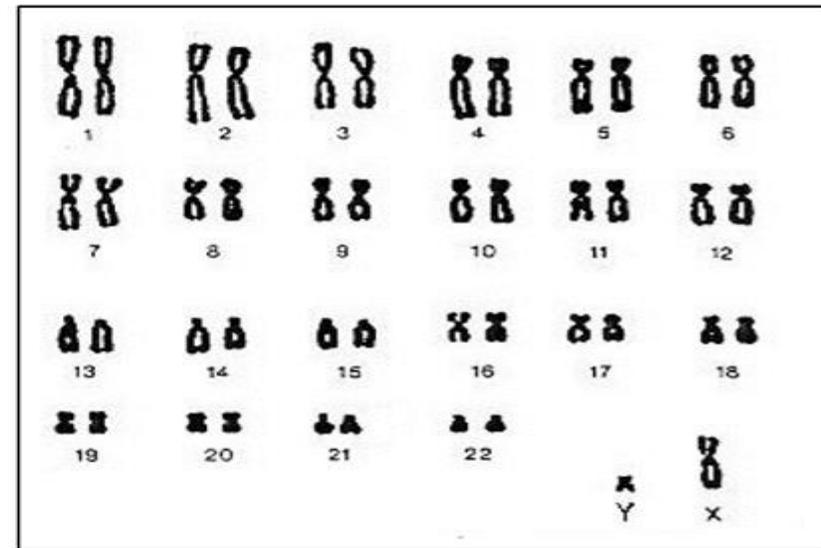


A/ Caryotype

- ✓ **Le caryotype consiste à observer l'ensemble des chromosomes constituant le patrimoine génétique d'un individu.**
- ✓ **Une étape de culture des cellules est nécessaire (2 à 3 semaines) de manière à ce que les chromosomes puissent être observés au microscope au moment où ils se divisent.**
- ✓ **C'est le seul moment où ils sont visibles.**
- ✓ **On pourra ainsi les classer par paire, et en vérifier le nombre, la forme et la structure.**



Caryotype d'une femme

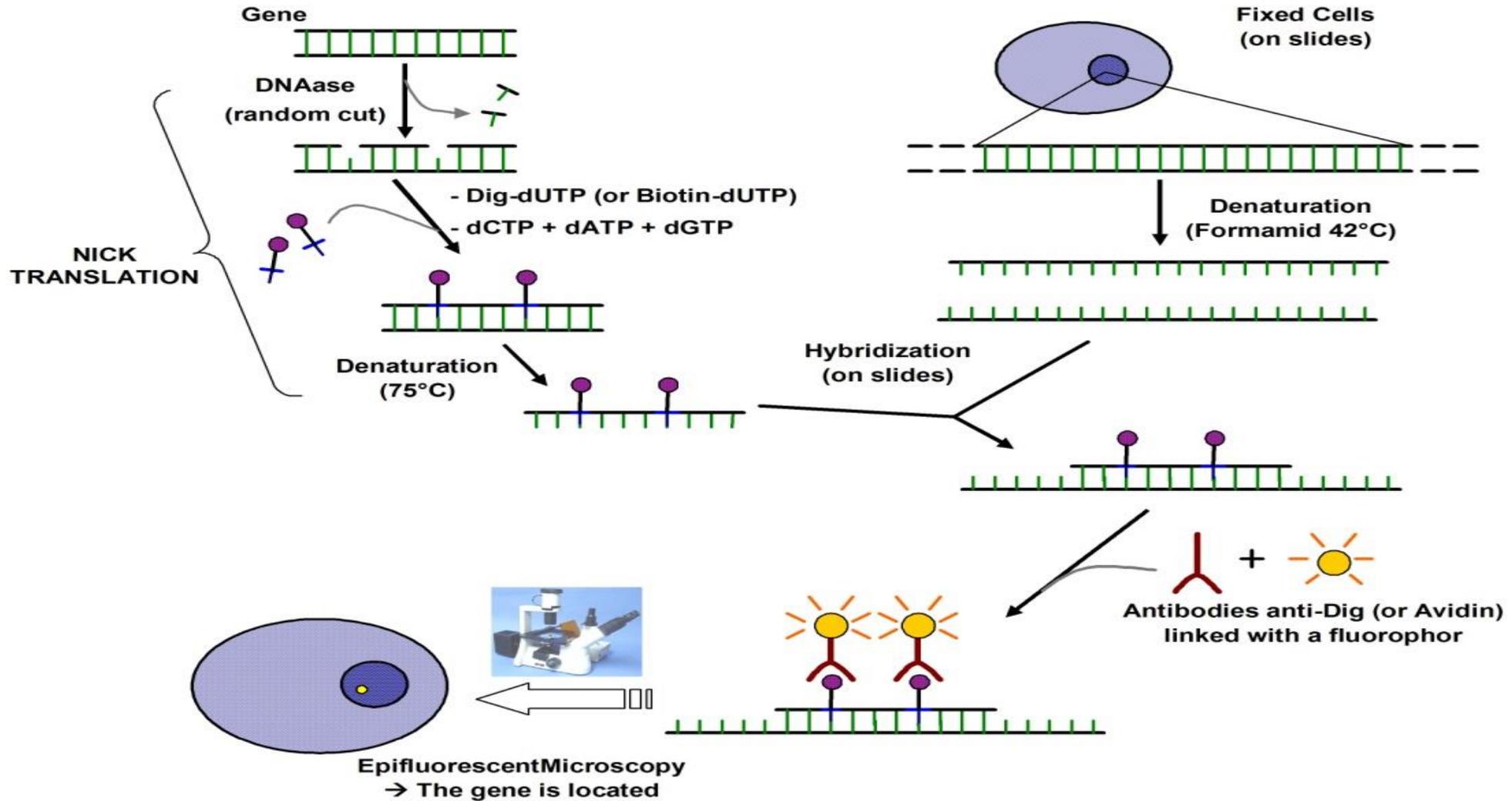


Caryotype d'un homme

B/ Analyse par FISH (Fluorescent In Situ Hybridation)

- ✓ **L'analyse par FISH est une technique qui permet de voir une zone spécifique d'un chromosome, contrairement au caryotype qui permet de tous les analyser.**
- ✓ **Elle est donc proposée lorsque les signes cliniques orientent l'examen génétique vers un chromosome précis.**
- ✓ **Cet examen est généralement plus rapide.**
- ✓ **Il permet aussi de visualiser des anomalies de trop petite taille pour être identifiées sur le caryotype.**
- ✓ **Le principe de l'analyse par FISH est de rendre fluorescente la zone du (ou des) chromosome(s) que l'on veut visionner au microscope.**

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



C/ MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

La MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification = amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation) est une variante de la PCR multiplex qui utilise une sonde divisée en deux, nécessitant la ligation des deux parties pour que l'amplification ait lieu.

Cette méthode est utilisée pour dénombrer les copies d'une même séquence dans un ADN.

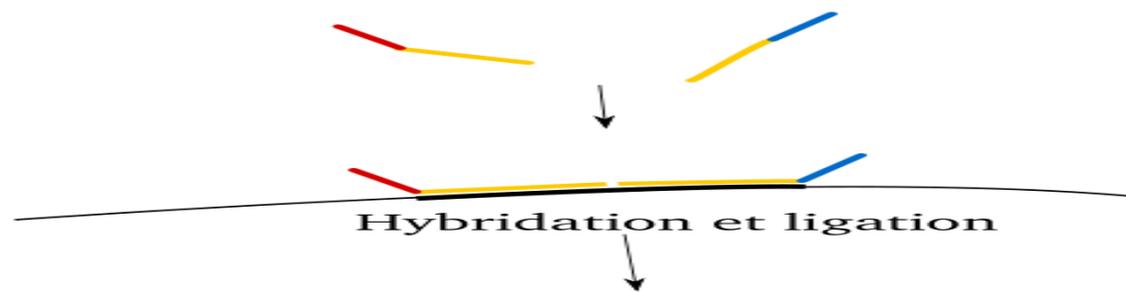
Deux oligonucléotides sont utilisés :

- Le 1er contient à la suite une région correspondant à une première amorce de PCR et la première moitié de la sonde complémentaire de la région à détecter,**
- Le 2nd contient la deuxième moitié de la sonde suivie d'une région correspondant à la deuxième amorce de PCR. Au cours de l'analyse, ces deux oligonucléotides se fixent sur l'ADN à analyser, au niveau de la région correspondant à la sonde.**

Comme les deux moitiés de la sonde se trouvent l'une à côté de l'autre, il est possible de les assembler par ligation.

- ✓ On obtient alors une sonde complète liée à l'ADN étudié, avec de chaque côté une région non-liée sur laquelle il est possible de fixer une amorce.
- ✓ Cette sonde est détachée de l'ADN et l'on procède à une amplification par PCR avec les amorces choisies au début.
- ✓ Seuls les oligonucléotides ayant subi une ligation, c'est-à-dire ceux qui se sont liés au brin d'ADN, sont susceptibles d'être amplifiés.
- ✓ On évite ainsi d'amplifier les oligonucléotides qui ne se sont pas liés à l'ADN cible.
- ✓ L'amplicon est détecté grâce à un marqueur fluorescent attaché aux amorces avant amplification.
- ✓ Il est possible de réaliser cette analyse simultanément sur plusieurs sites, il suffit pour cela que les sondes soient de longueurs différentes de sorte que l'on puisse les séparer par électrophorèse.

Amorce + demi-sonde 1 Amorce + demi-sonde 2



Sonde complète pouvant être amplifiée

I.2. Clinique non évocatrice d'une pathologie ou syndrome

Dans ce cas là, on procède à un screening large, en utilisant, à titre d'exemple, les techniques suivantes :

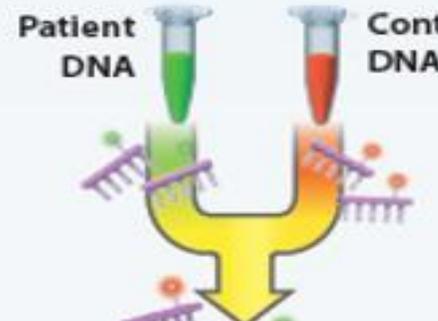
A/ CGH-Array

- ✓ **La CGH-array analyse l'ensemble du génome, comme un caryotype, mais avec un zoom 10 à 100 fois plus important.**
- ✓ **Elle augmente ainsi la détection des altérations chromosomiques.**
- ✓ **Cette technique permet de repérer des anomalies chromosomiques ou l'existence de grands morceaux d'ADN (ou de gènes) en plus ou en moins.**
- ✓ **Le principe de la puce est la comparaison de l'ADN du patient à de l'ADN standard.**
- ✓ **Cela permet de voir s'il y a une augmentation ou une diminution anormale du matériel génétique qui pourrait expliquer la maladie recherchée.**

Array CGH: The Complete Process

- Steps 1-3** Patient and control DNA are labeled with fluorescent dyes and applied to the microarray.
- Step 4** Patient and control DNA compete to attach, or hybridize, to the microarray.
- Step 5** The microarray scanner measures the fluorescent signals.
- Step 6** Computer software analyzes the data and generates a plot.

Step 1 Patient DNA Step 2 Control DNA

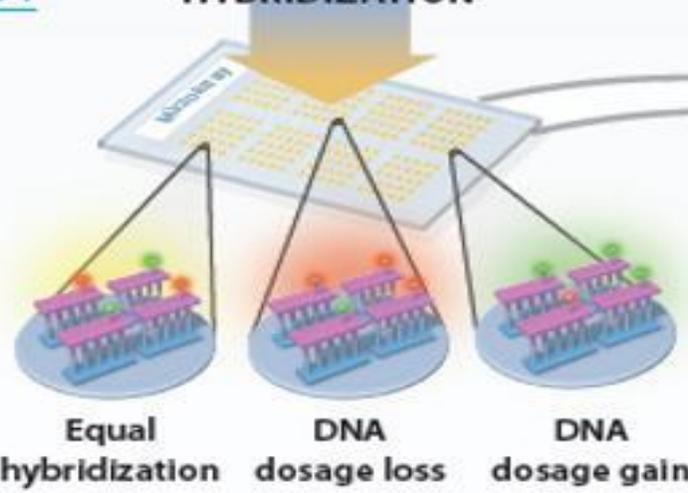


Step 3



Step 4

HYBRIDIZATION



Step 5

Step 6



COMPUTER SOFTWARE



**DATA PLOT
(Chromosome 7)**

B/ Séquençage haut débit

Le séquençage nouvelle génération (NGS: Next-Generation Sequencing), également connu sous le nom de séquençage à haut débit, est un terme commun utilisé pour décrire différentes technologies de séquençage moderne comme :

Illumina® (Solexa)



Roche 454



Ion torrent: Proton / PGM



SOLiD



Ces technologies récentes permettent de séquencer l'ADN et l'ARN beaucoup plus rapidement que les méthodes précédentes, et comme telles, elles ont révolutionné l'étude de la génomique et de la biologie moléculaire.