

TD1 : Pathologie de l'ADN

I. Techniques de génomique structurales : ce sont les techniques qui permettent d'étudier le matériel héréditaire des êtres vivants, ça permet d'analyser la structure des gènes et des parties du génome.

1. Polymerase Chain Reaction (PCR): est une technique d'amplification enzymatique permettant de générer un grand nombre d'exemplaires des fragments d'ADN identiques d'une séquence d'ADN ou d'ARN à partir d'une faible quantité d'acides nucléiques.

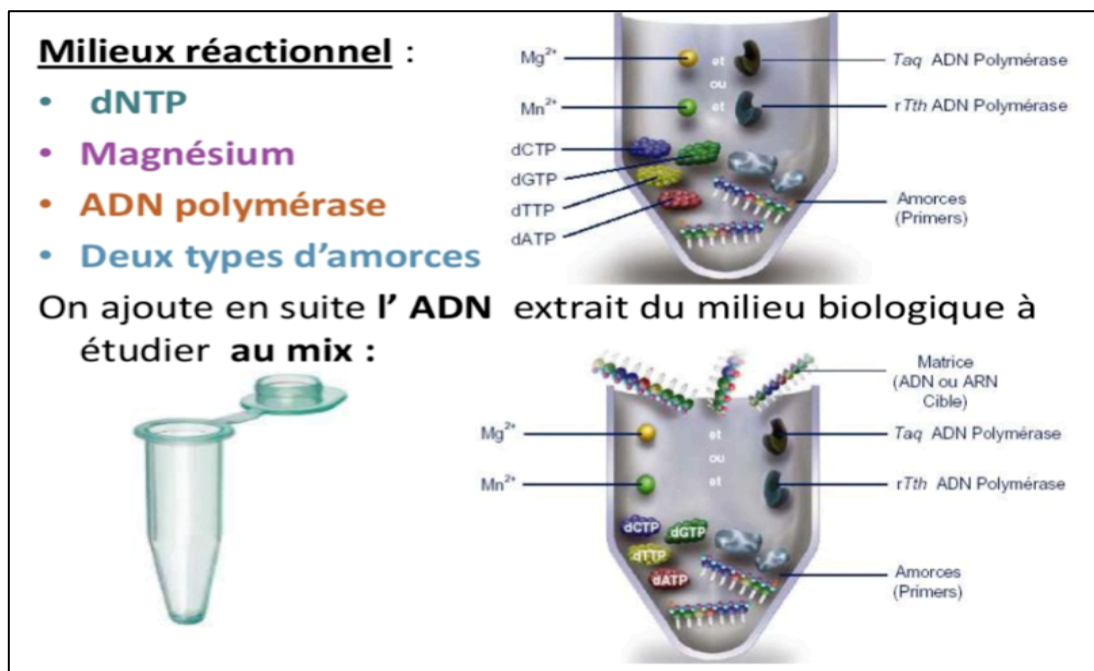


Figure 1 : Préparation de de la PCR

Principe de la PCR : il s'agit de réaliser un ensemble de réactions successive de réplifications d'une matrice double brin d'ADN, elle comporte entre 20 et 40 cycles, chaque cycle est composé de 3 étapes :

1-Dénaturation de l'ADN : dans cette étape la température doit être à 95° , à cette température les liaisons faibles qui sont responsables de la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.

2- Hybridation : cette étape consiste à la reconnaissance et la fixation des amorces sur leurs séquences complémentaires. La température dans cette étape est comprise entre $50^{\circ}C$ et $60^{\circ}C$ et elle est fonction de la

composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) des amorces.

3-Polymérisation : La Taq polymérase, complète la synthèse du brin d'ADN à partir de l'amorce grâce aux oligonucléotides présents dans le milieu de réaction, 72° de température est indispensable pour l'activité de la Taq polymérase. Un thermocycleur, permet d'automatiser la réaction PCR en programmant des cycles de température.

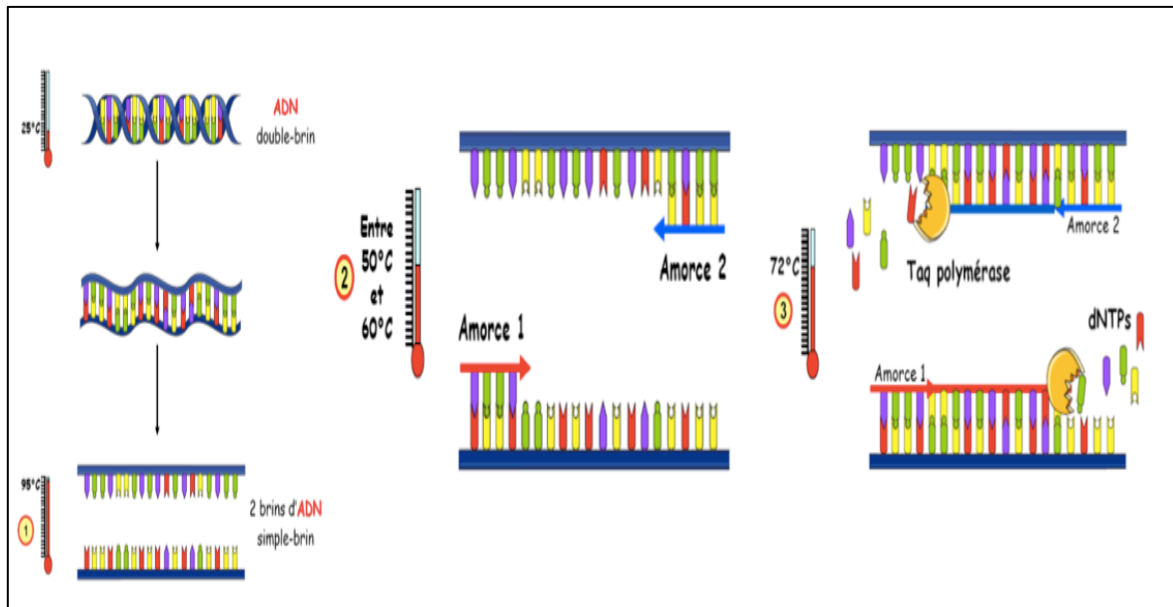


Figure 2 : Etapes de la PCR

2. RFLP : c'est le polymorphisme de taille des fragments de restriction. C'est une technique qui se base sur la digestion d'ADN par une enzyme de restriction, ce qui permet de comparer entre les tailles des fragments d'ADN obtenus

Principe : Les endonucléases sont des enzymes qui coupent l'ADN en courtes séquences. Chaque enzyme de restriction vise différentes séquences de nucléotides dans un brin d'ADN et coupe pour cette raison à différents sites.

La distance entre les sites de clivage d'une certaine nucléase de restriction diffère entre les personnes. Par conséquent, la longueur des fragments d'ADN produits par l'enzyme de restriction différera en travers des deux différents organismes et substances.

Etapes de la RFLP :

-**Extraction d'ADN** : L'ADN est extrait à partir de sang, de la salive ou d'autres échantillons.

-**Fragmentation d'ADN** : Hydrolyse de l'ADN par une enzyme de restriction, les sites de reconnaissances de ces enzymes sont généralement 4 à 6 paires de bases de longueur.

-**Electrophorèse en gel** : les produits de restrictions issus de la fragmentation d'ADN sont hybridés avec une sonde, provenant souvent de banques de DNA génomique ou complémentaire, ces produits s'analysent en utilisant l'électrophorèse en gel, la séparation de molécules se fait selon leur taille et charge.

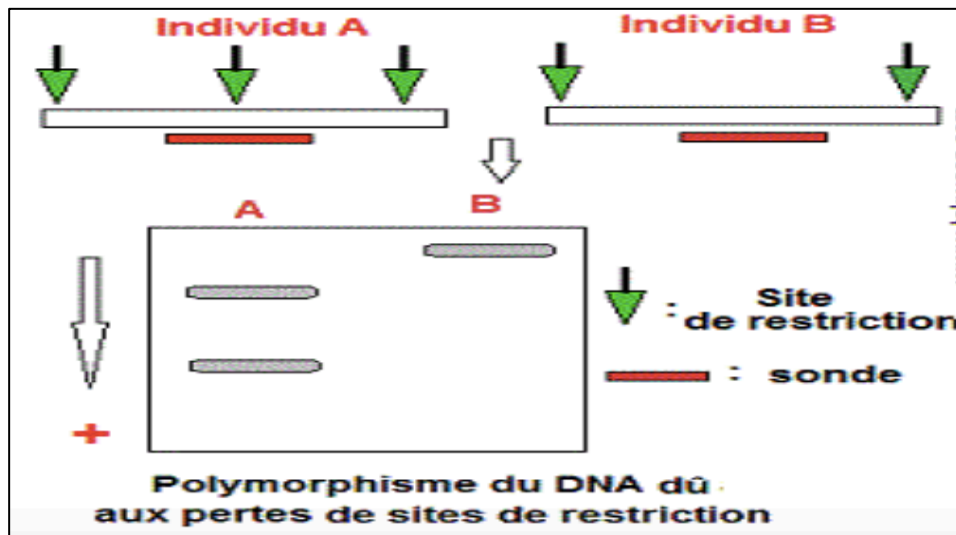


Figure 3 : Exemple résultats RFLP

3. Le séquençage : Le séquençage d'un ADN, c'est la détermination de la succession des nucléotides qui le compose.

Principe de séquençage : est une méthode par synthèse enzymatique qui 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 une ADN polymérase en présence d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et une faible concentration de quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) chacun associé à un marqueur fluorescent différent, ces didésoxynucléotides empêchent

la poursuite de l'élongation. Il en résulte des fragments d'ADN de tailles différentes. Au final, de nombreux brins sont obtenus, de taille variable mais tous terminés par un didésoxynucléotide fluorescent. Par automatisatisation du tri des brins obtenus en fonction de leur taille, la séquence peut être lue par le séquenceur selon la fluorescence observée. Une dernière étape de traitement bioinformatique permet alors la reconstruction d'un génome entier à partir de tous les fragments séquencés.

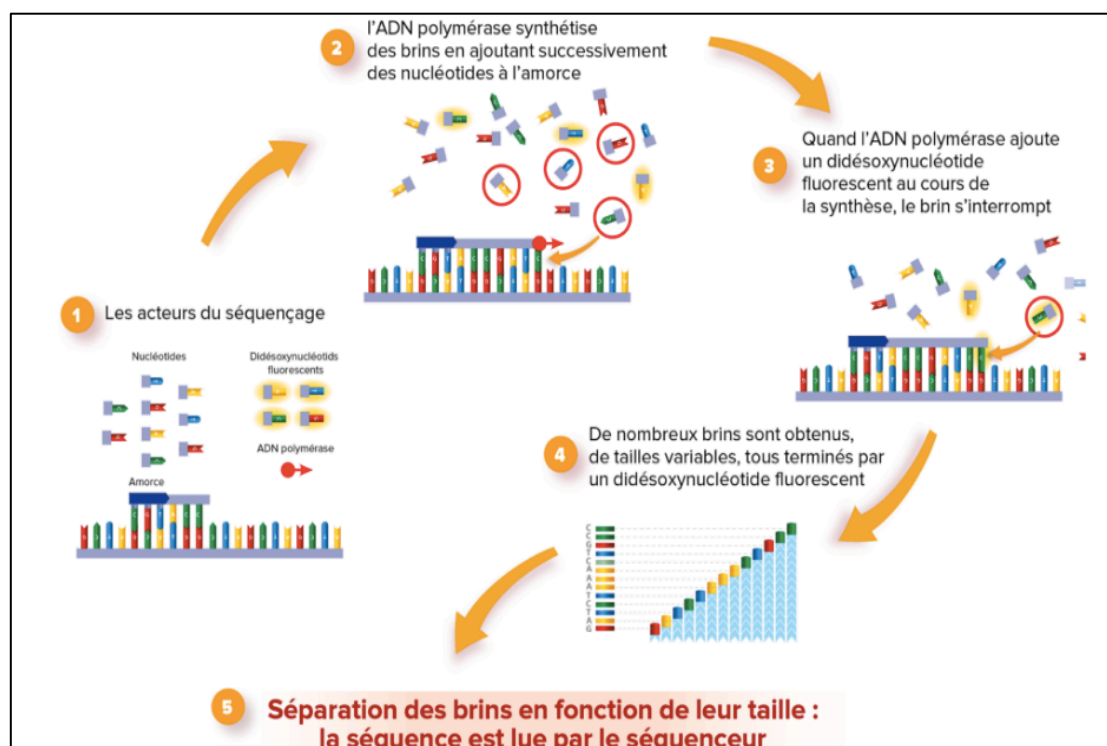


Figure 4 : Principe de séquençage

4. Next Generation Sequencing : NGS (séquençage haut débit) : est une méthodologie de séquençage rapide de milliers à des millions de molécules d'ADN ou d'ARN simultanément, en déterminant l'ordre unique et spécifique des bases des acides nucléiques.

Principe de NGS : cette méthode est basée sur la fluorescence, les dideoxynucleotides incorporés sont marqués par des molécules fluorescentes d'une façon spécifique. La Taq polymérase effectue l'élongation jusqu'à l'incorporation d'un didésoxynucléotide fluorescent. Les fragments générés sont ensuite séparés par électrophorèse.

Un automate prélève la réaction de séquence et l'injecte dans un capillaire contenant un polymère de polyacrylamide. Lors de la migration, un système optique laser détecte la fluorescence passant devant la fenêtre du laser et qui est émise par le ddNTP terminateur du fragment sous l'excitation (lumière verte pour ddATP, bleue pour ddCTP, jaune pour ddGTP et rouge pour ddTTP).

En séparant ces molécules par électrophorèse en fonction de leur taille, on peut lire les lettres successives qui apparaissent sous forme de courbes sur un fluorogramme dont la fluorescence correspond à la base de ce ddNTP terminateur. Un logiciel d'analyse permet de faire la correspondance entre les courbes de fluorescence et le nucléotide incorporé.

TD1 : Pathologie de l'ADN

II. Techniques de génomique Fonctionnelle: ce sont les techniques qui permettent l'analyse de la fonction des gènes et autres parties du génome. Elle inclue l'analyse du transcriptome (ARN messagers).

1. Real-Time PCR : c'est une technique qui permet de détecter et quantifier, les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule en temps réel, elle est aussi appelée PCR quantitative *qPCR*.

Principe de la RT-PCR : L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit grâce à une transcriptase inverse cette dernière permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR quantitative. La transcriptase inverse ou rétrotranscriptase est une enzyme utilisée par les rétrovirus qui transcrivent l'information génétique des virus de l'ARN en ADN, afin de s'intégrer dans le génome de l'hôte. Cette technique est basée sur la détection d'un rapporteur fluorescent qui est un agent générateur de fluorescence en se liant à l'ADN double brin. Elle permet de suivre en continu (en temps réel) le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo formés.

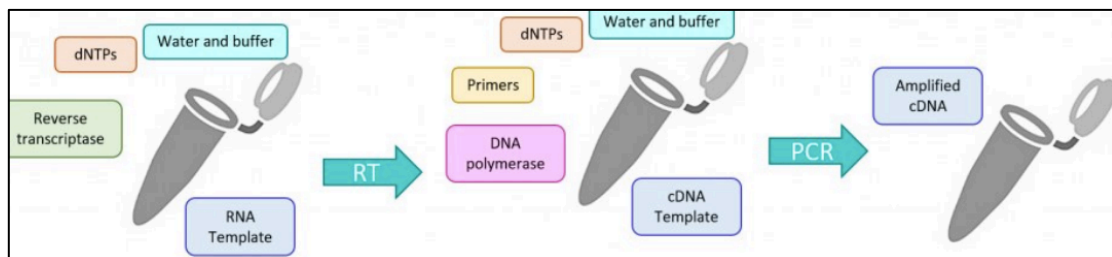


Figure 5 : Étapes de la RT-PCR

2. Microarray : Puces a ADN : sont des lames de verre activées ou en plastique sur lesquelles sont déposées de nombreuses copies d'une séquence d'ADN spécifique d'un gène donné, ces puces a ADN permettent d'analyser le niveau d'expression des gènes dans un organe, tissu ou dans une cellule.

Principe : ARN totaux sont extraits et amplifiés à partir cellules étudiées. Ces ARNm sont ensuite transformés en ADN complémentaires (ADNc) par la technique de rétrotranscription (utiliser

un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire) et marqués par une molécule fluorescente (fluorochrome). Les ADNc sont mis en contact avec la puce, cette étape est nommée hybridation. Chaque brin d'ADNc va alors s'hybrider aux sondes qui lui sont complémentaires pour former un duplex sonde/cible double brin. La puce est ensuite lavée pour éliminer les brins d'ADNc ne s'étant pas hybridés car non complémentaires des sondes fixées sur la lame. La puce va ensuite être analysée par un scanner à très haute résolution, et ce à la longueur d'onde d'excitation des fluorochromes. L'image scannée est alors analysée informatiquement afin d'associer une valeur d'intensité à chaque sonde fixée sur la puce et ainsi de déterminer s'il y a eu une hybridation pour chaque sonde.

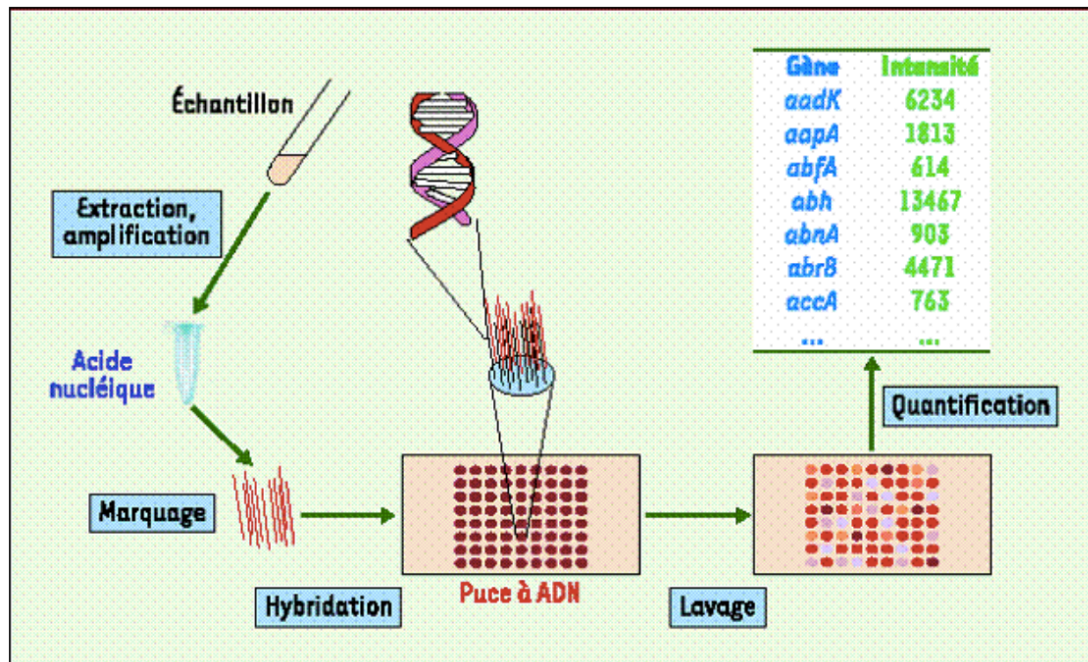


Figure 6 : Analyse d'acide nucléique par puce à ADN

3. Western Blot : ou immunoblot, est une méthode de biologie moléculaire qui permet la détection et la quantification des protéines. Cette technique permet la séparation et l'identification d'une protéine d'intérêt spécifique.

Principe : Cette technique, née des progrès de la protéomique, de la biologie moléculaire et de l'immunofluorescence, elle est basée sur l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer des protéines,

préalablement dénaturées, selon leur taille, elle se fait selon les étapes suivantes :

-Dépôt des échantillons protéiques sur un gel d'électrophorèse et sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. Pour cela, un courant électrique est appliqué dans le gel.

-Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose.

-Blocage de la membrane : cette étape est indispensable pour limiter les interactions non spécifiques ultérieures entre les anticorps et la membrane. Le blocage est réalisé dans une solution de protéines concentrées

-Détection : le principe consiste à appliquer sur la membrane des anticorps marqués qui sont spécifiques des protéines que l'on veut observer. On pourra ainsi observer leur position sur le gel.

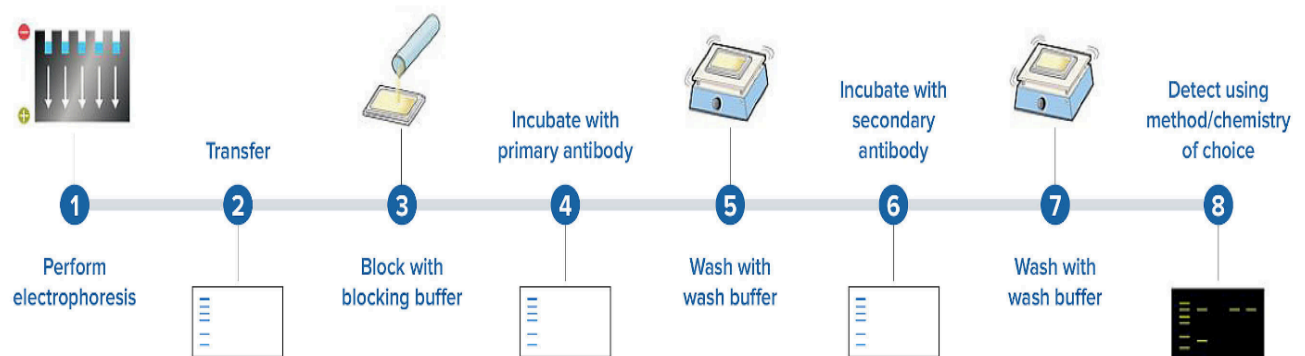


Figure 7 : Étapes de Wester Blot

4. RAPD : Random Amplified Polymorphie DNA c'est une méthode basée sur la réaction d'amplification en chaîne (PCR) de séquences prises au hasard d'ADN génomique.

Principe : Comme la PCR, la RAPD est basée sur la réplication d'ADN double brin. Alors que la PCR classique nécessite deux amorces oligonucléotidiques dont les séquences sont complémentaires des segments encadrant le fragment, la RAPD-PCR nécessite seulement la présence d'une amorce unique choisie au hasard (at random). L'amorce

arbitrairement sélectionnée, elle s'apparie à des séquences complémentaires accessibles sur l'ADN dénaturé. Les fragments amplifiés sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. La présence ou l'absence de fragments amplifiés dépend de l'existence, dans le génome étudié, de séquences complémentaires à l'amorce. Le profil d'amplification dépend ainsi de l'amorce utilisée, mais aussi des conditions de réaction.

La technique permet de comparer les ADN de systèmes biologiques pour lesquels on dispose de peu d'informations. ADN d'espèces peu étudiées ou ADN pour lesquels on dispose de peu de séquences.

5. Foot printing : c'est une technique de biologie moléculaire qui permet l'identification des protéines et facteurs de transcription se fixant sur une séquence de l'ADN.

Principe : cette technique permet de connaître la séquence précise d'ADN impliquée dans la liaison protéique. L'oligonucléotide d'intérêt est marqué à l'une de ses extrémités et mis en contact avec la protéine, le complexe est ensuite traité par un réactif enzymatique ou chimique qui clive partiellement l'ADN. Les fragments obtenus sont étudiés par électrophorèse et autoradiographie. Elle se déroule en plusieurs étapes :

-Formation d'un complexe ADN/protéine sur un double brin radiomarqué suivie par l'action du réactif de footprinting (en moyenne une coupure par molécule d'ADN).

-Séparation des fragments obtenus sur un gel de séquençage. La région protégée correspond à l'absence de bandes parmi les produits de digestion.

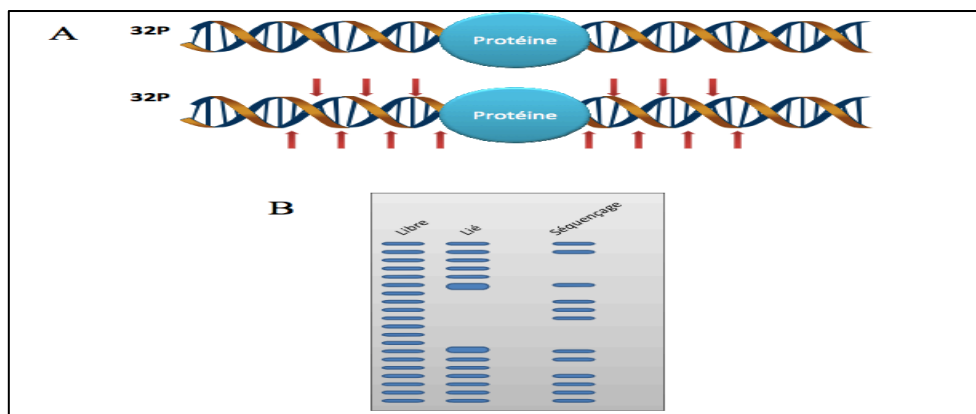


Figure 8 : Étapes de Foot Printing

III. Méthodes de détections de mutations :

1. Les mutations : une mutation est toute modification qui touche le matériel génétique ou génome d'une cellule, contenant le message héréditaire. Nous avons des mutations apparues spontanément dans la nature, transmises ou non aux générations suivantes ou en peut envisager la possibilité d'induire nous-mêmes ces mutations. Les altérations du patrimoine génétique peuvent être diverses et nombreuses, créant ainsi un immense éventail de mutations possibles, classifiées à l'heure actuelle selon de nombreux critères.

-Il y a une grande différence entre les mutations dites essentielles (affectant l'intégralité/fonctionnalité de la protéine) et celles non essentielles (intervenant souvent dans des régions non codantes et non régulatrices de l'ADN).

-On distingue les mutations ponctuelles, affectant une seule base azotée (délétions, insertions) des mutations larges, affectant jusqu'à des régions chromosomiques entières (délétions, insertions, inversions, répétitions, translocations).

-Une nette distinction doit être faite entre mutations somatiques et germinales. Si une mutation a lieu dans une cellule de la lignée germinale (faisant partie de l'ensemble des cellules qui donnent les gamètes), elle sera transmise à la descendance de ces cellules. La mutation est alors héréditaire. La majorité de ces mutations empêchent le développement de la cellule œuf. Si l'œuf est en mesure de se développer, l'individu ainsi généré souffre de malformations diverses. Si une mutation a lieu dans une cellule somatique (ne faisant pas partie de la lignée germinale), elle ne peut être transmise à un descendant, elle n'est pas héréditaire.

2. Les méthodologies de la biologie moléculaire dans la détection des mutations : La détection de mutations dans l'ADN représente une étape essentielle de la biologie moléculaire, pour la recherche fondamentale comme pour les applications médicales.

-Détection des mutations connues par PCR multiplex : quand la nature et l'emplacement d'une certaine mutation est connu la région concernées est ciblée, la PCR-multiplex est la meilleur technique pour étudier cette mutation. La PCR-multiplex présente l'avantage de l'utilisation de plusieurs amorces (primers) au sein de la même réaction (jusqu'à 4 amorces), en conséquent la possibilité de multiples amplifications à sélectivité dirigée.

-Détection des mutations inconnues :

Le screening moléculaire : La plupart des mutations affectant les gènes ne sont pas répertoriées dans les bases de données, leur identification étant bien souvent une première, caractéristique d'un individu ou d'une lignée familiale. La détection de telles mutations est une démarche complexe et aucune des méthodes disponibles n'est applicable seule à toutes les situations, leur choix dépendant de nombreux critères (nature des mutations, taille et structures du gène, accès à l'ARNm, degrés d'efficacité et de sensibilité recherchés). Parmi les techniques courantes de balayage d'un fragment d'ADN ou d'ARN on peut mentionner le Test de troncation protéique (PTT), l'électrophorèse en gel de gradient dénaturant (DGGE), polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP),

1. Test de troncation protéique (PTT) : très intéressant pour la détection spécifique des mutations non-sens ou qui décalent le cadre de lecture de l'ARNm et provoquent une terminaison de traduction prématurée. À la différence des autres techniques de criblage, les mutations ne sont pas détectées au niveau de l'ADN, mais au niveau des produits polypeptidiques obtenus après transcription et traduction *in vitro* des fragments d'ADN génomique ou d'ADNc amplifiés à partir des régions d'intérêt du gène étudié.

Le principe de base de la technique est la différence de taille (et par conséquent de migration électrophorétique) entre une protéine normale et une variante mutante, tronquée. Les produits PCR sont transcrits et traduits *in vitro*. Après séparation électrophorétique des produits de traduction et autoradiographie, la visualisation d'un peptide tronqué de poids moléculaire inférieur au produit normal indique la présence d'une mutation terminatrice dans le fragment d'ADN ou d'ARN constituant le matériel de départ. En général, l'estimation de la taille de la bande anormale permet de localiser approximativement le site muté dans le fragment analysé, de sorte que le séquençage destiné à identifier la mutation

2. L'électrophorèse en gel de gradient dénaturant (DGGE) : C'est une technique d'électrophorèse permettant la séparation de molécules d'acides nucléiques (ADN ou ARN) de même taille. Son principe consiste à déposer un échantillon d'acide nucléique sur un gel d'électrophorèse contenant un agent dénaturant (par exemple l'urée). Dans un gel DGGE,

les fragments d'acide nucléique sont soumis à différentes concentrations croissantes en dénaturant. Les 2 brins d'ADN se séparent plus ou moins rapidement en fonction de leur composition en bases AT et GC (2 liaisons hydrogène pour AT contre 3 pour GC). Deux molécules différentes peuvent avoir des brins qui ne se sépareront pas au même moment et migreront alors différemment. La molécule la plus stable migrera plus vite que celle qui se dénaturera en premier dans le gradient (L'ADN simple brin est plus ralenti que le double brin via interactions avec la matrice).