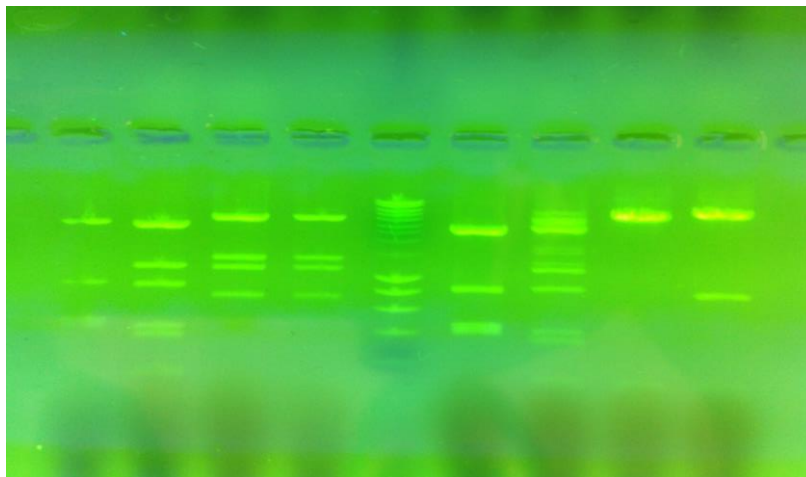


Valise Pédagogique: À la découverte de l'ADN
Une collaboration entre l'Université de Fribourg
et le Musée d'histoire naturelle de Fribourg

L'ADN dans le diagnostic médical

Protocole pour les élèves

Léonard Cardinaux, Adrien Pairraud, Marie-Pierre Chevron



Relecture : Luc Le Grand Catherine Pfister Aspert, Lisa Schild
Remerciements : D^r Peter Wandeler, Jean-Christophe Lallement

CONTENUS

Cet atelier expérimental et ses fiches pédagogiques proposent d'illustrer les notions d'empreinte génétique, d'ADN, d'enzyme de restriction, et de présenter la technique de biologie moléculaire classique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

Les fiches pédagogiques accompagnant l'expérience permettent de guider le travail et d'approfondir les concepts : ADN, enzymes de restriction, applications du polymorphisme de restriction.



MANIPULATIONS

Fiche 1 : RFLP, principe général

Fiche 2 : Matériel et sécurité

Fiche 3 : Protocole expérimental



RESULTATS ET REFLEXION

Fiche 4 : Compte-rendu



BASES THÉORIQUES

Fiche 5 : Enzymes de restriction et RFLP

Fiche 6 : Electrophorèse en gel d'Agarose

Fiche 7 : Myopathie de Duchenne

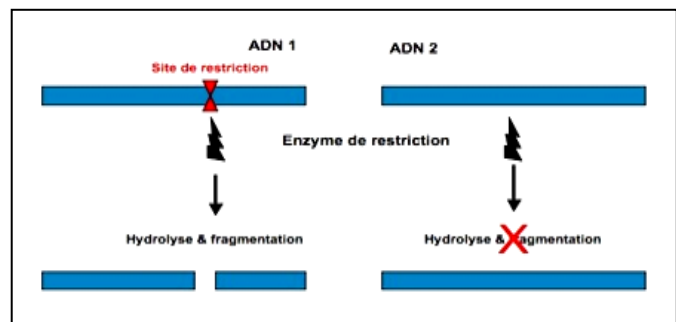


Comparaison de deux ADN polymorphes

Des échantillons d'ADN peuvent être comparés afin de savoir s'ils diffèrent dans leurs séquences nucléotidiques. Les échantillons d'ADN peuvent provenir de n'importe quel organisme vivant. Il peut s'agir d'échantillons de patients pour la détection d'une maladie génétique, d'échantillons prélevés sur une scène de crime, d'échantillons de différentes espèces animales ou végétales à comparer, ...

Digestion enzymatique

La digestion enzymatique est une technique utilisant des enzymes de restriction pour découper l'ADN. Une enzyme de restriction hydrolyse n'importe quel fragment d'ADN si celui-ci présente une courte séquence spécifique (site de restriction). Chaque enzyme possède un site de reconnaissance propre. Si une séquence d'ADN possède cette séquence spécifique, elle est fragmentée par l'enzyme, sinon elle reste intacte.



RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

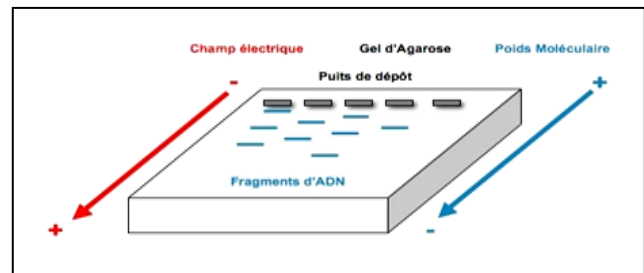
Cf. Fiche 5

Migration par électrophorèse

Les fragments obtenus par digestion sont déposés dans un gel d'Agarose puis soumis à un champ électrique. Ils vont ainsi migrer dans le gel suivant leur poids moléculaire (les petits rapidement, les grands plus lentement).

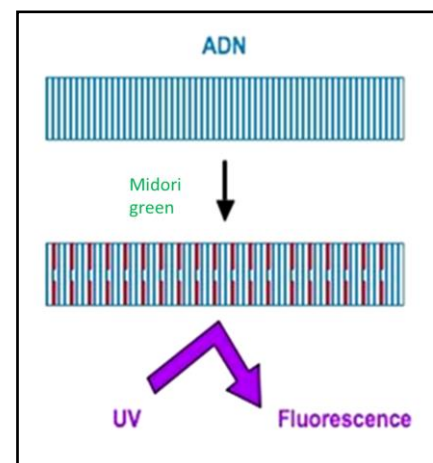
L'ajout d'un colorant permet d'augmenter la densité de la solution contenant les fragments d'ADN et de suivre leur migration dans le gel.

Cf. fiche 6



Révélation du gel

Après migration, les fragments d'ADN n'étant pas visibles à l'œil nu, il faut procéder à une étape de révélation. Pour cela on a précédemment ajouté au gel un composé chimique, le Midori Green, qui se fixe sur l'ADN et fluoresce sous lumière UV. Il est également possible d'utiliser d'autres produits de révélation.

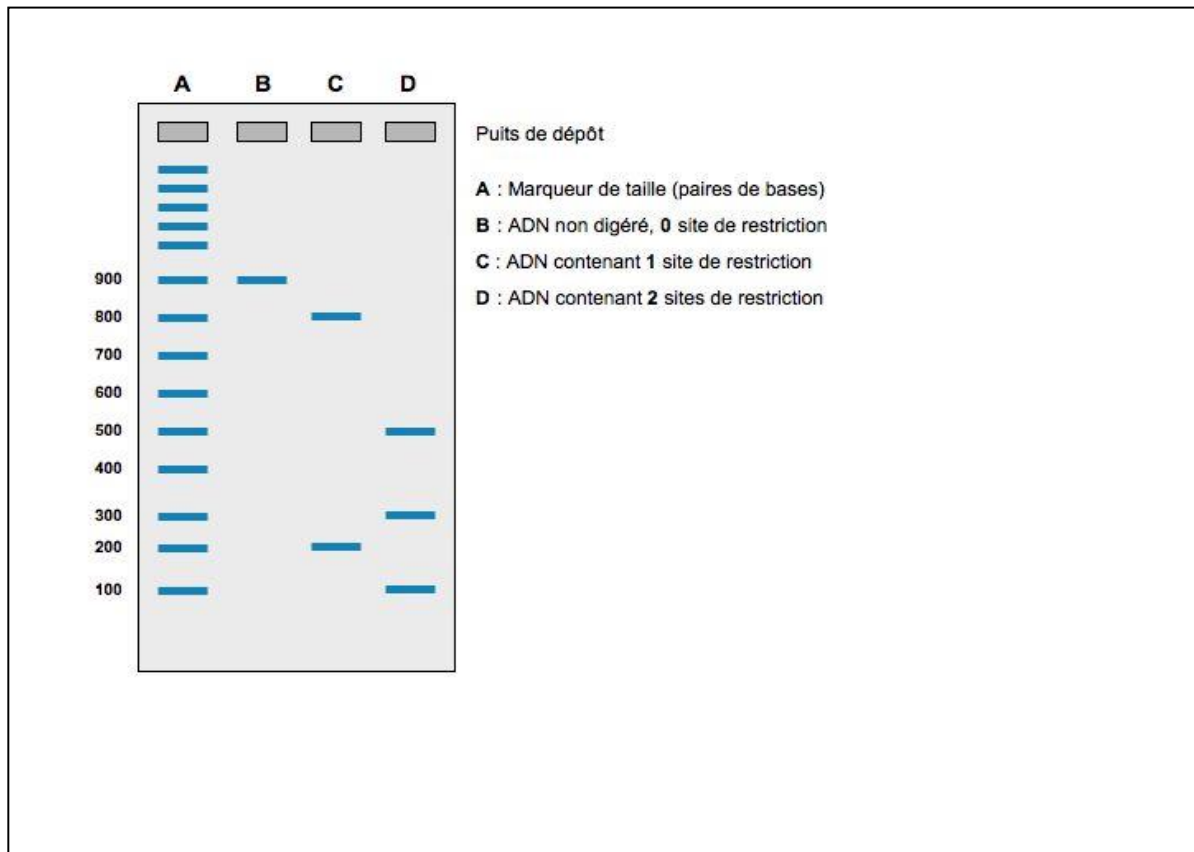


Analyse des profils obtenus

Les résultats obtenus se présentent sous la forme d'une photographie montrant les bandes d'ADN fluorescentes sous UV.

Un échantillon non digéré apparaît sous la forme d'une bande unique. Un échantillon soumis à hydrolyse présente deux ou plusieurs bandes de tailles différentes en fonction du nombre de sites de restriction qu'il contient.

La taille des morceaux d'ADN obtenus est déterminée par comparaison avec un marqueur de référence constitué de fragments d'ADN dont la taille est connue et standardisée.





1. Sécurité et bonnes pratiques de laboratoire

Ce travail pratique requiert rigueur, habileté et respect des règles d'hygiène et de sécurité. Il faut donc prêter attention aux consignes suivantes :

- ✓ Le matériel de laboratoire est fragile et onéreux
Manipulez-le avec le plus grand soin, en particulier les centrifugeuses, micropipettes et générateurs d'électrophorèse.
- ✓ Le matériel biologique est sensible à la température et aux contaminations
Veillez à la propreté des plans de travail, des mains et du matériel de pailleasse. Respectez les indications de température notamment pour le stockage des enzymes.
Annotez clairement tous les tubes en précisant leur contenu et l'opérateur.
- ✓ Certains appareils et produits sont potentiellement dangereux
En particulier, la manipulation des gels contenant le Midori Green (cancérigène) doit se faire avec des gants en latex. Les UV peuvent provoquer de graves brûlures. En cas d'exposition directe, il convient donc de porter des gants et de se protéger avec un masque adapté.

Une zone de travail dédiée à l'utilisation du Midori Green doit être aménagée. En particulier, on place un papier absorbant sous les cuves d'électrophorèse. Avant rangement dans la valise, tout le matériel est nettoyé méticuleusement afin d'éliminer toute trace de Midori Green (cuve, support, chambre de révélation ...).

➔ **En cas de doute, ne pas hésiter à demander de l'aide.**

2. Matériel à disposition

Laboratoire :

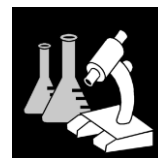
Micropipettes
Centrifugeuse
Portoirs pour microtubes
Incubateur
Balance de précision
Micro-onde
Support de gel et peignes
Cuve et générateur à électrophorèse
Erlenmeyer et éprouvette
Chambre UV ou LED

Réactifs et Consommables :

Pointes de pipette
Microtubes
Eau distillée stérile
Tampon TAE (Tris-Acétate, EDTA)
Agarose
Midori Green
Tampon de charge
Marqueur de taille
Tampon de digestion
Gants en latex

Matériel biologique :

Échantillons ADN pour test et Enzymes de restriction XhoI et PstI



1. Digestion enzymatique

Par poste :

1. 1x « ADN 1 - Référence » 16 µl ; 1x « ADN2 - Embryon » 16 µl
2. 1 x PstI 2 µl ; 1 x XhoI 2 µl
3. Tampon 8 µl
4. H₂O stérile 36 µl

- ✓ Dans des microtubes, réaliser à l'aide de la micropipette les préparations indiquées dans le tableau ci-dessous. Changer d'embout après chaque pipetage. Faire très attention aux volumes prélevés !

Echantillon	ADN	H2O	Tampon	Enz. PstI	Enz. XhoI	Vol. final
Pst_1	8 µl ADN1	9 µl	2 µl	1 µl	-	20 µl
Pst_2	8 µl ADN2	9 µl	2 µl	1 µl	-	20 µl
Xho_1	8 µl ADN1	9 µl	2 µl	-	1 µl	20 µl
Xho_2	8 µl ADN2	9 µl	2 µl	-	1 µl	20 µl

- ✓ Centrifuger rapidement puis incuber les échantillons à 37°C pendant 20-45 min

2. Préparation des gels d'Agarose– PORT DES GANTS OBLIGATOIRE

- ✓ Sur la balance de précision peser l'Agarose
- ✓ Avec l'éprouvette graduée mesurer le TAE 1X
- ✓ Dans l'Erlenmeyer mélanger Agarose et TAE, puis porter à ébullition à la micro-onde. (ATTENTION AUX ECLABOUSSURES)
- ✓ Laisser refroidir le mélange 2 minutes puis ajouter le Midori Green (N'oubliez pas les gants!)
- ✓ Couler le mélange dans le support plastique sans faire de bulles, déposer les peignes puis laisser polymériser sans déplacer le gel avant polymérisation complète. Le gel pourra être conservé à 4°C sous plastique (pour éviter qu'il sèche). (Ne pas mettre dans un frigo servant à l'alimentation)

Quantités (dépend de la taille du support de gel):

Support de gel	Agarose	TAE 1X	Midori Green
100 ml	0.65 g	100 ml	10 µl
80 ml	0.55 g	80 ml	8 µl
60 ml	0.4 g	60 ml	6 µl
50 ml	0.35 g	50 ml	5 µl
20 ml	0.15 g	20 ml	2µl

3. Dépôts des échantillons et électrophorèse – PORT DES GANTS OBLIGATOIRE

- ✓ Sur le gel solidifié, retirer délicatement le peigne afin de créer les puits de dépôt
- ✓ Déposer le gel et son support dans la cuve à électrophorèse
- ✓ Ajouter du TAE 1X à recouvrement du gel (~500 ml)
- ✓ Sortir les échantillons digérés et ajouter à chacun 4µl de tampon de charge
- ✓ Déposer 5µl de marqueur de taille dans un premier puits
- ✓ Déposer ensuite délicatement 20µl de chaque échantillon dans des puits de dépôt successifs. Changer de pointe entre chaque dépôt !
- ✓ Fermer la cuve d'électrophorèse et la brancher au générateur, pôle négatif (noir) du côté des puits de dépôt
- ✓ Faire migrer le gel 30 min à 100 V (*l'ampérage se règle automatiquement*)

4. Révélation des gels – PORT DES GANTS OBLIGATOIRE

- ✓ Arrêter le générateur et retirer le couvercle de la cuve
- ✓ Chambre UV: Sortir le gel et son support de la cuve, égoutter, placer le gel dans la chambre UV et prendre la photographie
- ✓ Lampe LED: Laisser le gel dans la cuvette et recouvrir avec le couvercle avec lampe LED intégrée, allumer la lampe et prendre la photographie

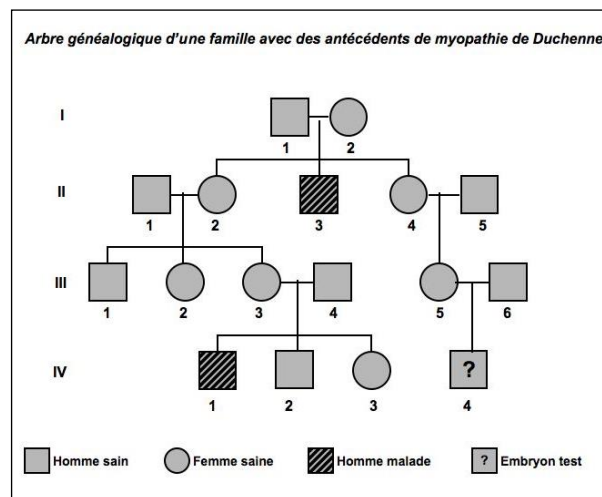


Cas clinique : Test génétique de détection de la myopathie de Duchenne

Un couple (III 5 & III 6) consulte lors de sa première grossesse afin de savoir si leur futur enfant est atteint de la myopathie de Duchenne. En effet, des antécédents familiaux de cette pathologie sont signalés sur plusieurs générations dans la famille maternelle. Cette maladie incurable provoque une atrophie musculaire extrêmement handicapante (Fiche 7).

Dans un premier temps, l'arbre généalogique ci-dessous est établi, puis une amniocentèse est pratiquée afin de déterminer le sexe de l'embryon et pour prélever son ADN en vue de réaliser un test génétique.

L'ADN prélevé sur l'embryon correspond à l'échantillon « ADN 2 » utilisé durant cette expérimentation. L'échantillon « ADN 1 » est un échantillon de référence prélevé chez un homme sain.



Q1 : A l'aide de cet arbre généalogique, de recherches effectuées sur internet et de la fiche 7 « Myopathie de Duchenne » :

- précisez les principaux symptômes de cette maladie.
- indiquer son déterminisme génétique (dominant/récessif; autosome/sexuel),
- quel rôle joue le gène *DMD* dans le fonctionnement des muscles ?

Les informations sélectionnées devront être confirmées par au moins deux sources différentes que vous préciserez.

Q2 : Avant de pouvoir procéder à la digestion enzymatique plusieurs étapes expérimentales ont été nécessaires. Lesquelles ?

Q3 : A l'aide de la fiche 6 « Electrophorèse en gel d'Agarose », préciser :

- Quelle est la charge électrique de l'ADN dans la cuve d'électrophorèse ?
- Quel facteur détermine la vitesse de migration des fragments d'ADN dans le gel d'Agarose ?

Q4 : Le tableau suivant présente les sites de restriction théoriques attendus pour des allèles normal et muté du gène *DMD*. Indiquer le profil de restriction (nombre de bandes) attendu dans chacun des cas.

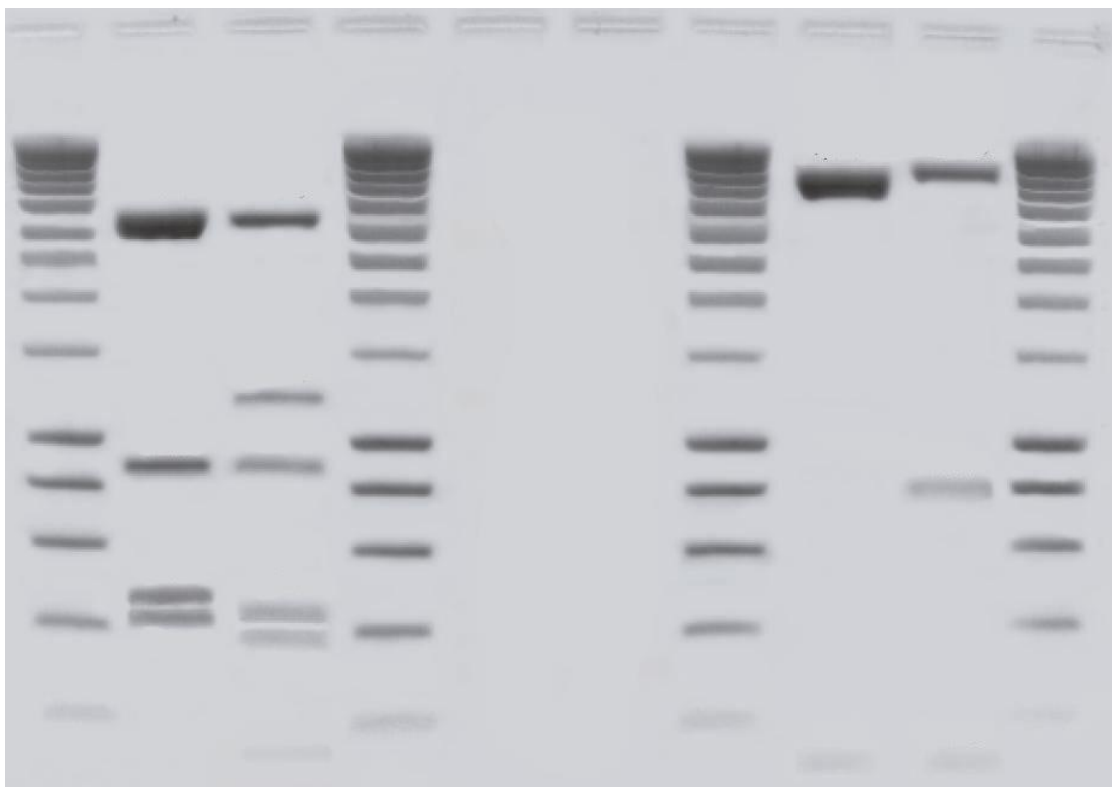
	Allèle normal	Allèle pathologique
PstI	2	3
XhoI	0	1

Q5 : La photographie ci-dessous présente les résultats que vous avez obtenus après révélation de votre gel d'électrophorèse.

Légendez soigneusement la figure en indiquant le nom des échantillons, l'enzyme utilisée et la taille des fragments de digestion obtenus.

Pouvez-vous repérer les différences observables entre les profils de restriction des deux allèles ?

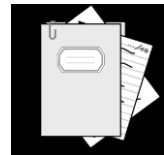
Que concluez vous concernant le risque de voir le futur nouveau-né atteint de la myopathie de Duchenne ?



- Fiche 5 -

Enzymes de restriction

Enzymes de restriction & RFLP



Les enzymes de restriction sont des endonucléases bactériennes, qui coupent toute molécule d'ADN au niveau de sites spécifiques, les sites de restriction, qui correspondent à de courtes séquences particulières de 4 à 8 nucléotides.

Exemples de sites de restriction

PstI

5' ...CTGCA▼G... 3'
3' ...G▲ACGTC... 5'

XhoI

5' ...C▼TCGAG... 3'
3' ...GAGCT▲C... 5'

Les premières enzymes de restriction ont été découvertes en 1962 par le suisse Werner Arber. Il montre que ces enzymes servent aux bactéries, dépourvues de système immunitaire, pour se défendre contre les virus (phages) qui les infectent. Elles sont capables de couper l'ADN du phage au niveau de sites de restriction différents en fonction des enzymes.

En 1970, l'Américain Hamilton O. Smith purifie la première enzyme de restriction (HaeI) à partir de la bactérie *Haemophilus influenzae*. L'année suivante, son compatriote Daniel Nathans l'utilise pour découper l'ADN du virus SV40. Ces trois chercheurs recevront, en 1978, le prix Nobel de médecine.

On a depuis isolé une centaine de ces enzymes de restriction, véritables ciseaux moléculaires, qui permettent de couper l'ADN à volonté et ont permis de développer un nombre considérable de techniques en génie génétique. Parmi celles-ci les méthodes RFLP occupent une place choix.

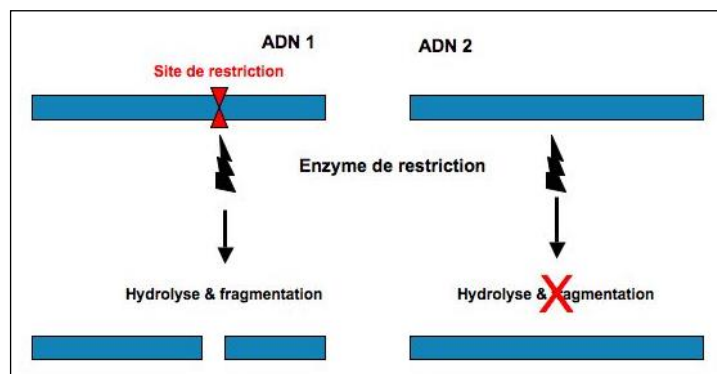
Polymorphismes de restriction, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

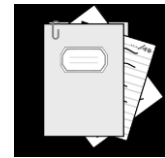
Les polymorphismes de restriction s'appuient sur les propriétés particulières des enzymes de restriction. Celles-ci coupent indifféremment les ADN codant et non-codant en reconnaissant des sites de restriction spécifiques qui peuvent être présents en plus ou moins grand nombre. La petite taille des sites de restriction, et leur grand nombre dans un génome, les rendent particulièrement sensibles à tout changement de séquence nucléotidique : mutations par délétion, insertion, translocation chromosomique ...

Les enzymes de restriction sont donc utilisées pour révéler le polymorphisme existant entre des ADN provenant d'un génome, d'un gène isolé, d'un plasmide, etc.

Seule ou associée à d'autres techniques, PCR et hybridation moléculaire principalement, la méthode RFLP est utilisée afin d'identifier des espèces, des variétés, des individus.

Elle permet d'établir des phylogénies moléculaires, de diagnostiquer certaines maladies génétiques, d'établir une filiation, ou encore de rechercher un coupable dans une enquête criminelle.



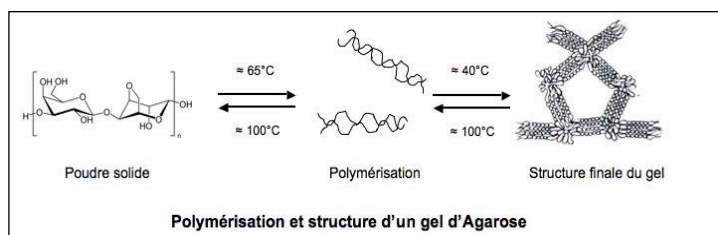


Cette méthode permet de séparer des fragments linéaires d'ADN linéaires selon leur poids moléculaire en les soumettant à un champ électrique linéaire dans un gel poreux.

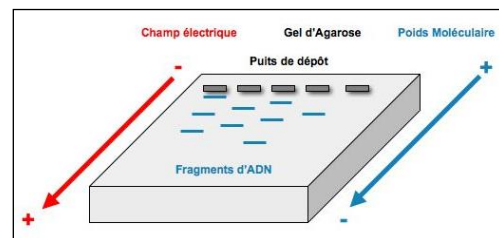
Une molécule d'ADN est un polynucléotide, chaque nucléotide est composé de 3 types de résidus : le désoxyribose, la base azotée, le groupement phosphate H_2PO_4 qui peut s'ioniser en PO_4^{2-} .

En milieu basique, le tampon TAE utilisé a un pH proche de 8, l'ADN va se charger négativement ($H_2PO_4 \rightarrow 2 H^+ + PO_4^{2-}$), et devient une chaîne polyanionique. La charge électrique est uniforme et, les molécules vont donc migrer en direction de la borne positive, c'est pourquoi on effectue les dépôts du côté de la borne négative.

L'agarose est un polymère gélifiant à base d'agar-agar purifié composé essentiellement de galactose non ramifié. Il est extrait de la paroi cellulaire de certaines algues rouges. On le retrouve sous des formes moins pures pour la fabrication des milieux de cultures *in vitro* et comme additif alimentaire (E 406).

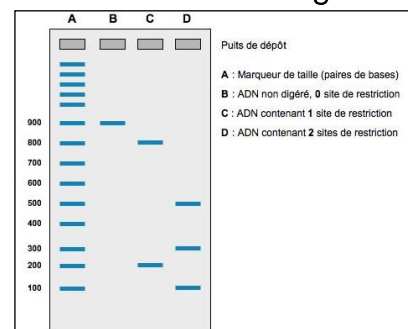


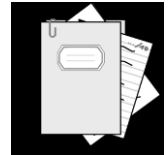
La migration de l'ADN sous l'effet du champ électrique va se réaliser dans l'épaisseur du gel poreux d'Agarose dans lequel l'ADN a été déposé. Les pores de ce gel vont se comporter comme un tamis qui freine le déplacement des fragments d'ADN. La résistance du gel à la migration des fragments est proportionnelle à leur taille, les plus petits fragments migrent le plus vite donc le plus loin.



La concentration du gel en agarose va influencer sur la résolution de celui-ci. Plus un gel est concentré en Agarose, plus il permet de séparer des fragments de petite taille ou des fragments ne différant que de quelques nucléotides. Si la résolution est insuffisante, trop peu d'Agarose ou trop d'ADN semblable, on obtient généralement une traînée (« smear »). La limite usuelle de résolution se situe aux environs de 300pb. Pour des séparations plus fines, il faut généralement recourir à des gels de polyacrylamide.

On remarquera que l'épaisseur et la fluorescence des bandes visualisées sur le profil électrophorétique décroît avec la distance au dépôt. Ceci est dû à certaines propriétés du Midori Green. Celui-ci est fluorescent aux rayons UV, et se fixe entre les bases de l'ADN. La quantité de Midori Green de chaque bande est proportionnelle au nombre de nucléotides d'ADN sur lequel il s'est fixé. L'épaisseur et la fluorescence des bandes d'électrophorèse, vues sur la table UV/ lampe LED, est donc proportionnelle à la taille des ADN: ce sont bien les ADN les plus gros qui migrent le moins loin.





Symptômes

Décrite en 1858 par Guillaume Duchenne, cette myopathie se manifeste par une atrophie progressive de tous les tissus musculaires, y compris le muscle cardiaque (myocardiopathie) et le diaphragme. Les causes principales de mortalité sont essentiellement un arrêt cardiaque ou un arrêt respiratoire. Les symptômes apparaissent avant l'âge de 5 ans et se caractérisent par des faiblesses musculaires symétriques, une hypertrophie des mollets puis la perte de la marche avant l'âge de 13 ans.

Ces symptômes ont pour origine un déficit des tissus musculaires en dystrophine. Cette protéine est localisée sous la surface de la membrane des cellules musculaires. Elle permettrait aux muscles de résister à l'effort d'élongation en maintenant, l'architecture des fibres musculaires. En effet, la dystrophine stabilise des complexes protéiques des cellules musculaires en servant de point d'ancrage à des protéines extracellulaires, et aux protéines d'actine du cytosquelette interne.

Génétique

Il s'agit d'une mutation sur le chromosome X, la maladie touche donc principalement les garçons. Les femmes sont généralement porteuses saines, mais peuvent manifester dans de rares cas la maladie (lors de translocations chromosomiques).

Malgré la diagnostic génétique possible de cette pathologie, on rencontre encore de nombreux cas de Myopathie de Duchenne car le gène impliqué dans cette pathologie est de très grande taille, et est donc susceptible de muter fréquemment. Il s'agit donc d'une maladie relativement fréquente puisque l'incidence de cette pathologie est de 1 sur 3000 naissances de garçons.

La maladie est due à des mutations du gène *DMD*. Ce gène est situé sur le bras court du chromosome X au niveau du locus 21.2 et mesure 2,4 Mb. Il est transcrit en plusieurs ARN messagers codants pour différentes formes de la protéine. Il contient 7 promoteurs alternatifs et 79 exons. Un épissage alternatif du gène produit 7 isoformes différentes de la dystrophine. Chacun de ces promoteurs est exprimé différenciellement selon le type cellulaire. L'ARNm observé dans les muscles du squelette est un ARNm de 14 kb. Il sera traduit en une protéine de haut poids moléculaire (427 kDa).

Les remaniements génétiques responsables des anomalies du fonctionnement du gène sont des délétions (65%), des duplications (6%) et plus marginalement, des substitutions impliquant un unique nucléotide, des insertions et des erreurs lors de l'épissage.

Lorsque ces mutations entraînent un déficit complet de la production de dystrophine, on parle alors de Myopathie de Duchenne (DMD), forme extrêmement

sévère de la pathologie. Il s'agit de mutations qui génèrent un codon STOP très tôt dans la séquence de l'ARNm interdisant ainsi toute production de protéine.

Certaines mutations du gène permettent un maintien du cadre de lecture au niveau de l'ARNm produit et peuvent être ainsi traduites en des formes plus ou moins tronquées et fonctionnelles de la protéine. Dans ce cas, on parle de Myopathie de Becker (BMD), forme moins sévère de la pathologie. Un exemple de patient BMD portant une délétion de plus de 70% du gène DMD a été décrit : cette délétion gigantesque maintenait un cadre de lecture ouvert, c'est à dire ne conduisant pas à la création d'un codon stop trop tôt dans la séquence d'ARNm, et autorisant ainsi la production d'une protéine très courte mais fonctionnelle puisqu'elle contenait les régions les plus importantes pour la fonction de la protéine. Cette protéine a été appelée « mini-dystrophine », et la séquence codante lui correspondant a été utilisée dans des test de thérapie génique.

Traitement et dépistage

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif de cette maladie, la prise en charge est avant tout palliative pour ralentir la progression de la maladie : rééducation musculaire, ventilation de la cage thoracique et éventuellement chirurgie. L'espérance de vie d'un enfant myopathe est aujourd'hui de 20 à 30 ans.

Le diagnostic est souvent réalisé après l'âge de 2 ou 3 ans, après l'apparition des premiers signes cliniques. On pratique généralement une biopsie musculaire, un bilan sanguin et un électrocardiogramme.

En cas de grossesse à risque (antécédents familiaux ou premier enfant malade), il est conseillé de réaliser une amniocentèse et un test génétique de dépistage afin de déterminer le sexe de l'enfant et de savoir s'il est porteur ou non de l'anomalie génétique à l'origine de la maladie. Dans ce cas, il est possible de recourir à une interruption de grossesse thérapeutique. On parle dans ce cas de diagnostic génétique préimplantatoire (DPI). Il n'est pas autorisé actuellement en Suisse (2015), mais après le « oui » lors des votations du 14 juin 2015, les lois par rapport aux DPI vont changer bientôt.