

UE11 - Méthodes d'étude et d'analyse du génome



Principales techniques de Biologie Moléculaire

I. Introduction

Objectifs :

- Connaître les principales techniques de biologie moléculaire
- Comprendre ses applications en génétique médicale

Applications en génétique médicale :

- Diagnostic **pré-symptomatique** (avant que la maladie ne se déclare)
- Diagnostic **prénatal** (possibilité de déclencher une IVG si patho grave)
- Diagnostic **positif** (possibilité de confirmer avec certitude une pathologie en identifiant/séquençant la mutation causale)
- Comprendre la **pathogénicité des maladies** (comment et pourquoi une mutation agit sur l'organisme, quelle est sa capacité à déclencher la maladie, et avec quelle gravité)
- **Thérapeutique** (traiter les patients avec des thérapies géniques)

La génétique médicale a de très larges applications qui reposent essentiellement sur les techniques de biologie moléculaire

L'intérêt de ce premier cours est de voir successivement :

I. Comment **recueillir** et **extraire** le **matériel génétique**, point de départ essentiel de toutes les techniques que nous allons voir.

II. Quelles sont les **principales techniques** qui vont être majoritairement utilisées pour faire différents diagnostics en clinique.

III. Un premier exemple de diagnostic où ces techniques sont utiles avec la configuration la plus simple qui existe en génétique médicale, la **mutation ciblée** : le cas clinique de l'**achondroplasie**.

II. Extraction du matériel génétique

Quand on fait une **analyse génétique**, il faut pratiquement toujours travailler à partir d'**acides nucléiques** : **ADN** (dans **95** voire **99%** des diagnostics) ou **ARN** (dans des conditions très particulières).

On travaille avec des **quantités infimes** de matériel, quelques **microgrammes** voire quelques **nanogrammes** !

Remarque : on peut extraire de l'**ADN** à partir d'un **cheveu**, à condition qu'il y ait son **bulbe** !

Ces acides nucléiques sont extraits de n'importe quelle **cellule nucléée**, ce qui n'inclut donc pas les **érythrocytes** qui sont **anucléés** (ils n'ont pas de noyau pour pouvoir contenir davantage d'hémoglobine, ce qui leur permet de transporter plus de dioxygène).

On n'extrait jamais d'ADN à partir des globules rouges car ils ne contiennent pas de noyau !

Remarque : L'**ADN** mitochondrial est un cas particulier car il est extrait à partir des **mitochondries** qui ne sont pas des cellules nucléées mais des **organites** !

Les techniques de biologie moléculaire sont très **sensibles** et permettent une analyse moléculaire ciblée à partir d'**une seule cellule** !

Il y a cependant une différence de **stabilité** entre ADN et ARN. L'**ARN** est plus **sensible** aux **nucléases** (RNAses) que l'**ADN**, ce qui fait qu'on préfère travailler avec de l'**ADN** ! L'**ADN** est **très stable** et peut être conservé dans des **DNathèques** pendant des années...

Mais ADN et ARN restent vulnérables à la digestion par les **nucléases** (DNAses pour l'**ADN** et RNAses pour l'**ARN**) une fois la cellule **lysée** !

A. Extraction d'ADN

Il existe de nombreuses et diverses façons d'extraire de l'**ADN** d'un patient :

- Du **sang** (**ATTENTION** on travaille sur les **leucocytes/globules blancs** jamais sur les érythrocytes/globules rouges qui sont anucléés et sans ADN, il faudra donc avant toute chose se débarrasser des GR et ne garder que les GB !)
- Des **tissus** (biopsies cutanées, musculaires, cardiaques, hépatiques, cérébrales pendant une autopsie, à partir de frottis buccaux...)
- Des **cellules amniotiques** (très utile pour un **diagnostic prénatal**, on prélève des cellules dans le liquide amniotique par ponction = **amniocentèse** pour analyser l'ADN fœtal et diagnostiquer d'éventuelles mutations)
- Des **follicules pileux** (le matériel génétique est contenu dans le **bulbe**)
- Des **coupes en paraffine** (surtout utilisé en **oncologie** car le laboratoire d'analyse reçoit des **tumeurs déjà fixées et incluses en paraffine** desquelles on peut extraire de l'ADN)

On travaille le plus souvent à partir de **prélèvements sanguins (sang total)** pour deux raisons : on obtient **suffisamment de matériel** pour faire toute une **série d'analyses** (plusieurs tests), et c'est l'une des techniques les **moins invasives** et donc les **moins contraignantes** pour le patient.



Étapes d'extraction d'ADN : on prend le cas où on utilise un prélèvement sanguin

1- Prélèvement de **quelques ml** de **sang total** sur anticoagulant : **EDTA** = Acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique (*retenez juste EDTA le nom complet est pour votre culture G la prof ne vous demandera jamais ce que ça veut dire*)

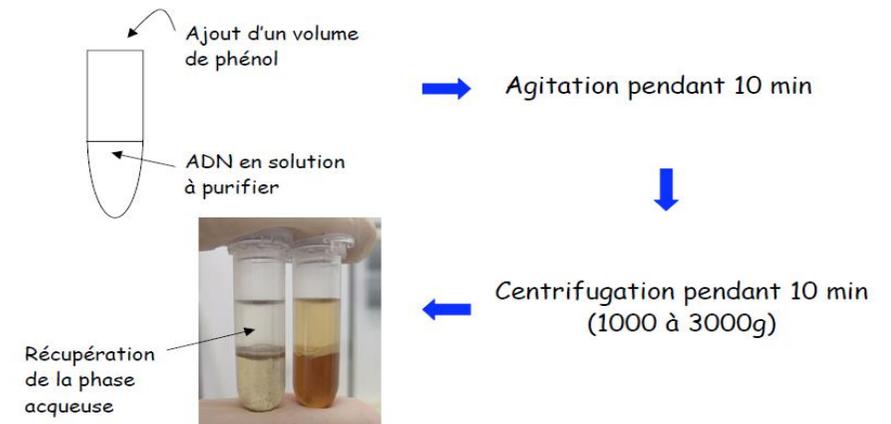
On n'utilise jamais d'héparine comme anticoagulant car elle inhibe les enzymes utilisées lors de la PCR (comme la Taq Polymérase)

2- Lyse des globules rouges (inutiles car anucléés et donc sans ADN) avec une solution **hypotonique** (on les fait éclater en faisant rentrer de l'eau à l'intérieur, Cf. U3b pour plus de détails)

3- Récupération du culot de leucocytes (globules blancs) **lavé et resuspendu** dans un mélange de **détergent** et de **protéinase K**, qui vont permettre respectivement la dégradation de la **membrane lipidique** des leucocytes et la dégradation des **protéines** entourant l'ADN et des **nucléases** (DNAses car on cherche à extraire de l'ADN)

Rappel biomoléculaire : l'ADN est sous forme de **chromatine**, c'est-à-dire enroulé autour d'**histones** qui sont des **protéines** pour former des nucléosomes ! La **protéinase K** a donc pour but d'éliminer ces **protéines de compaction** de l'ADN ainsi que les **DNAses** (nucléases digérant l'ADN). Il s'agit donc d'une étape capitale +++

4- Extraction au phénol-chloroforme pour **éliminer les protéines dégradées** en utilisant les propriétés de **solubilité différentielle** des molécules (ADN/Protéines) entre deux phases **non miscibles** !



On ajoute à l'ADN à purifier un volume de phénol-chloroforme, on agite la solution pendant 10 min avant de centrifuger pendant encore 10 min.

On obtient au final :

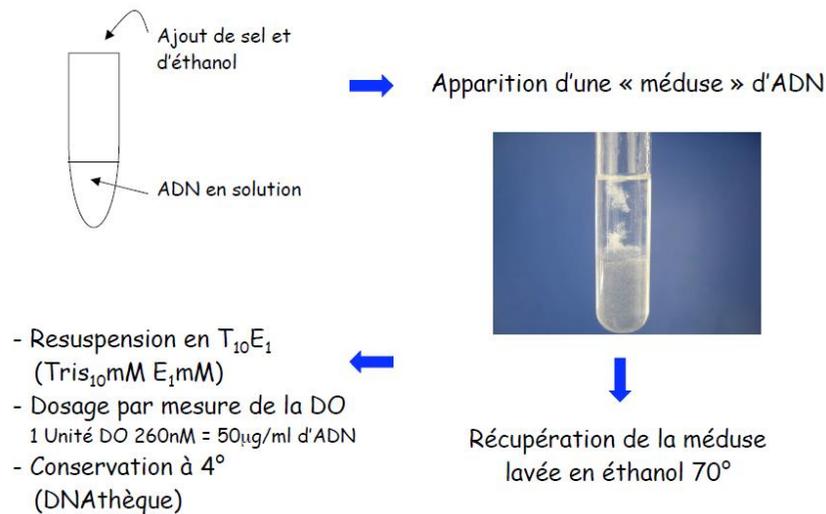
- L'ADN purifié dans la **phase aqueuse** (*en haut*) →
- Une **galette de protéines digérées** (*au centre*) →
- La **phase phénolique** = organique (*en bas*) →



Remarque: Le plus souvent pour ne pas se tromper de phase et pour bien récupérer la phase aqueuse qui nous intéresse (car c'est elle qui contient l'ADN purifié du patient), on colore au préalable le **phénol-chloroforme** (d'où l'aspect jaunâtre de la phase phénolique sur la photo).

5- Précipitation éthanol de l'ADN purifié par ajout de **2,5 volumes d'éthanol à 95° froid (- 20°C)** en présence de **sel** : apparition d'une **méduse d'ADN** !

La méduse d'ADN correspond à la matérialisation de la double hélice d'ADN



- **Récupération** de la méduse d'ADN lavée à l'éthanol à 70°
- **Resuspension** en T₁₀E₁ (**solution tampon**) (*ne surtout pas retenir, je vais vous expliquer rapidement ce que c'est, je vois déjà les questions sur le forum arriver :p*) : la classification de type T_xE_x correspond à ce qu'on appelle « TE buffer », littéralement « TE tampon ». Le T correspond au Tris, un composé à base d'acide chloridrique permettant de régler le pH de la solution à 8, le « 10 » en indice signifie que la solution en contient 10 mM. Le E correspond à l'EDTA et le « 1 » en indice signifie que la solution en contient 1 mM !
- **Dosage** de la quantité d'ADN contenue dans la solution par mesure de la **densité optique** (on sait que 1 unité DO 260 nM = 50 µg/ml d'ADN)
- **Conservation** de l'ADN (**extrêmement stable**) à 4°C dans une **DNAtèque**

B. Extraction d'ARN

Il faut savoir que quand on étudie l'ADN on s'intéresse au **patrimoine génétique de l'individu** qui est **strictement identique** dans **toutes les cellules** de son organisme, alors que l'ARN est au contraire **spécifique** d'un **type cellulaire** particulier ! C'est le concept de la différenciation cellulaire : une cellule différenciée n'exprime plus qu'une partie de son patrimoine génétique par rapport à une cellule souche, et ne produira donc que certains types d'ARNs !

Ex : un hépatocyte produit de l'albumine, alors qu'un érythrocyte produit de l'hémoglobine...

L'étude des ARNs permet d'analyser l'expression d'un gène

Récap sur les classes de gènes :

- Les **gènes de classe I** produisent des **ARNr**.
- Les **gènes de classe II** produisent des **protéines**. Les protéines sont formées par traduction des ARNm qui sont plus instables que les autres ARN.
- Les **gènes de classe III** produisent des **ARNt**, les **ARNr 5S** et les **petits ARN nucléaires ou nucléolaires**.

L'ARN est cependant plus **difficile à étudier** que l'ADN car il est **très sensible** aux **ribonucléases** (RNase A), et est donc **peu utilisé en diagnostic de « routine »**.

On retrouve à peu près les mêmes étapes pour l'extraction d'ARN que pour l'extraction d'ADN

On **homogénéise** des cellules ou des tissus dans un **tampon** qui va :

- Inhiber les RNases endogènes
- Dénaturer les acides nucléiques
- Dégrader les protéines

Puis une **solution** permet de réaliser l'**extraction différentielle ARN/ADN** !

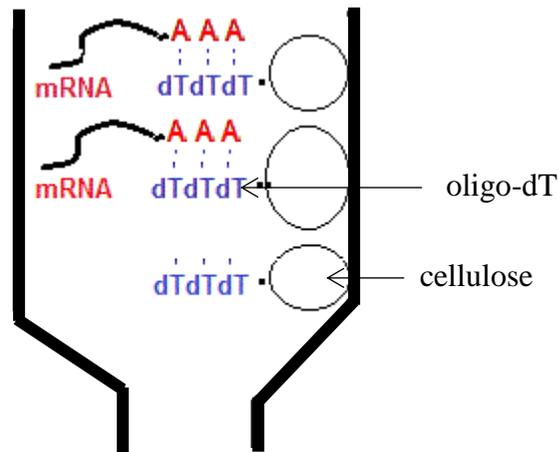
Extraction des ARN polyA+ :

Ces ARN représentent **1% des ARN totaux**.

Il y a une **purification par affinité** en passant tous les ARN sur une **colonne d'oligo-dT cellulose** qui va fixer uniquement les ARN poly A+ (avec une **queue Poly-A**).

Après lavage, ces ARN poly A+ sont **élués** par **abaissement de la force ionique** pour rompre les liaisons qu'ils ont formées avec les oligo-dT (on rappelle que selon le **principe de complémentarité des bases** l'Adénine s'apparie uniquement avec la Thymines).

La **précipitation** est ensuite réalisée avec de l'**alcool éthylique absolu froid**.



Je sais que le récap sur les classes de gènes n'est pas dans le cours de la prof mais un item sur les gènes de catégorie II est déjà tombé au concours alors que la prof n'en avait jamais parlé et que ce n'était pas non plus dans son diapo... Je vous conseille donc de lire ce que je vous ai rajouté, c'est largement suffisant pour répondre au qcm qu'elle a déjà fait tomber et vous ne vous ferez pas avoir si jamais il lui prenait l'envie de recommencer !

Maintenant que nous avons réussi à **extraire le matériel génétique** de notre patient, on va pouvoir commencer à **travailler dessus** ! On dispose ainsi de plusieurs techniques de biologie moléculaire afin de nous permettre de poser un diagnostic. Nous allons détailler dans cette partie celles qui vont nous permettre de diagnostiquer une **mutation ciblée**, avant de voir comment elles sont utilisées sur un cas clinique concret : l'**achondroplasie**.

III. Principales techniques de laboratoire

Nous avons réussi à **extraire le matériel génétique** de notre patient. Mais il y a un petit problème : on en a extrait une **quantité infime** (quelques microgrammes voire nanogrammes, **le contenu d'une seule cellule**). On ne pourra donc **pas faire autant de tests que l'on veut** et si l'on se trompe, on devra extraire de nouveau de l'ADN du patient ce qui est une réelle perte de temps et d'efficacité, avec un potentiel retard diagnostique...

L'objectif serait donc d'**obtenir plus de matériel** génétique avant de commencer à travailler dessus ! On pourrait certes multiplier les prises de sang du patient, mais cela reste assez contraignant et potentiellement contre-indiqué ou impossible selon le patient dont il est question.

La solution idéale est donc de **multiplier, d'amplifier** le matériel génétique que l'on vient d'extraire avant de commencer à le manipuler : c'est le but de la **PCR** (Polymerase Chain Reaction).

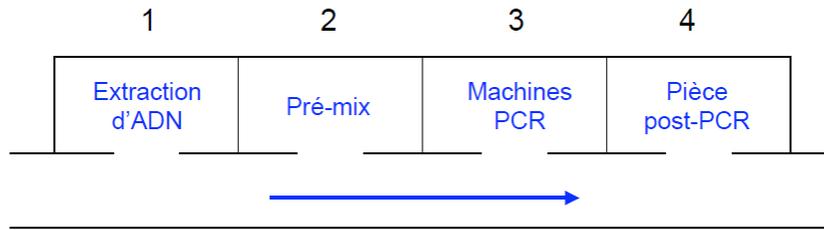
A. Amplification en chaîne par la polymérase (PCR)

La PCR est la **technique de base** dans un laboratoire de biologie moléculaire. Elle permet d'obtenir en **grande quantité**, parmi les 35000 gènes de notre génome, une **région d'ADN** que l'on veut étudier : c'est une **amplification spécifique** !

On amplifie uniquement quelques centaines de paires de base (pb) sur plusieurs millions...

La PCR utilise la **Taq Polymérase**, une **ADN polymérase** provenant de *Thermophilus Aquaticus*, une **bactérie** thermophile vivant dans les geysers d'eau chaude. La Taq Polymérase est dotée d'une particularité indispensable au bon déroulement de la PCR : elle **résiste à la chaleur** !

La PCR est une technique **très sensible** caractérisée par un **fort risque de contamination**, ce qui requiert des **étapes isolées** dans un **circuit monodirectionnel**, indispensable pour l'**agrément** (certification attestant de la qualité de la réalisation de la technique).



On part d'une **molécule d'ADN double brin** (antiparallèles) pour obtenir à la fin une **grande quantité d'ADN amplifié**.

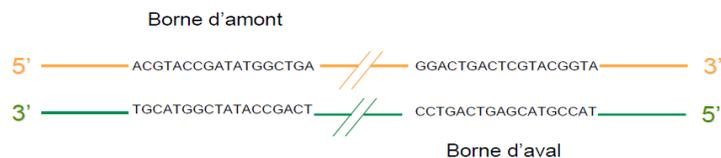
1. Matériel de la PCR :

Pour réaliser une PCR, il faut mettre dans un **automate** :

- L'**ADN** du patient en **petite quantité** (environ 100 ng)
- Des **amorces** (qui viendront se placer en amont et en aval de la séquence d'intérêt, on parle de bornes d'amont et d'aval)
- Des **désoxynucléotides** (= désoxy**ribo**nucléotides = dNTPs)
- Un **tampon MgCl₂** (pour stabiliser les polymérase)
- La **Taq Polymérase** (résistante à la chaleur +++)

Pour faire une PCR, il suffit juste de connaître les séquences de **18-20 nucléotides** (amorces) en **amont** et en **aval** de la région que l'on veut amplifier (on parle de **bornes d'amont et d'aval**). Le fragment d'ADN à étudier fait en général de **150 pb à 3 kb**.

Il n'est pas nécessaire de connaître la séquence entière du fragment à amplifier pour faire une PCR !



Amplification d'un fragment d'ADN double brin de 150pb à 3kb

Borne d'amont = 18-20 nucléotides en amont de la région à amplifier
Borne d'aval = 18-20 nucléotides en aval de la région à amplifier

2. Etapes de la PCR :

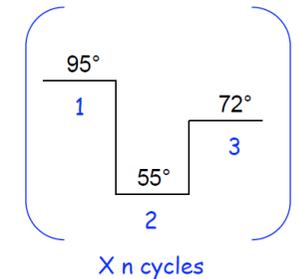
La PCR est un cycle de **trois étapes répétées n fois** qui permet l'amplification **exponentielle** du matériel génétique, de telle sorte qu'au bout de **n cycles** on obtiendra **2ⁿ molécules d'ADN** !

La PCR est une amplification exponentielle générant 2ⁿ molécules d'ADN au bout de n cycles

Ces trois étapes sont répétées autant de fois que nécessaire (la séquence est doublée à chaque cycle) :

1- Dénaturation (95°C) : la **chaleur** casse les **liaisons hydrogènes** unissant les deux brins complémentaires

2- Hybridation (55°C) : les **amorces** sont de courtes séquences de 18 à 20 nucléotides qui **s'hybrident** en **amont** et en **aval** de la séquence d'intérêt à amplifier



3- Elongation (72°C) : la **Taq Polymérase** synthétise le brin complémentaire dans le **sens 5'-3'**

3 étapes

→ Primer : oligonucléotide simple brin, 18-20 mer

1. Dénaturation



2. Hybridation d'amorces



3. Elongation



B. Vérification sur gel analytique (électrophorèse)

Nous venons donc d'**amplifier par PCR** le matériel génétique que l'on a **extrait de notre patient**. Nous avons plus précisément amplifié seulement une **région d'intérêt** de ce matériel génétique, celle qui est susceptible de **contenir la mutation** recherchée dans le cadre de notre **diagnostic** !

Nous voulons ainsi avant toute chose être sûrs que nous avons **amplifié la bonne séquence**, la seule région que l'on voulait, mais on veut également vérifier qu'il n'y a **pas eu de contamination des échantillons** au cours du processus (c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'artéfacts, de déchets réactionnels quand on a manipulé l'ADN qui soient venus perturber le bon déroulement de la PCR, et modifier la séquence amplifiée par exemple).

La PCR étant une technique **très sensible**, ce risque de contamination est important et **non négligeable**, d'où la nécessité de **vérifier** grâce à l'**électrophorèse** que tout s'est déroulé sans souci et que le **matériel génétique amplifié** à partir duquel nous allons travailler est **fiable** !

On analyse les produits d'amplification après n cycles de PCR

1. Matériel de l'électrophorèse :

- Les **produits d'amplification** du patient obtenus après n cycles de PCR.
 - Un **gel d'agarose** (si on veut faire migrer des acides nucléiques) ou un **gel d'acrylamide** (si on veut faire migrer des protéines).
- Ce gel est un **mince filet** composé de **mailles** plus ou moins larges/grandes déterminées par la **concentration** en **agarose** ou en **acrylamide** du gel !
- Un champ électrique (- → +). L'ADN étant **chargé négativement**, il est placé au **pôle négatif** du gel et il **migre vers le pôle positif** !

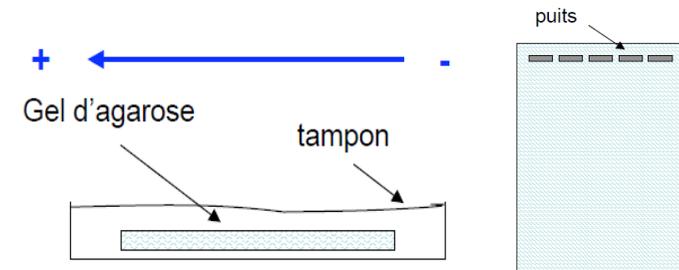
Remarque : la vitesse de migration de la molécule d'acide nucléique dépend :

- de sa **masse moléculaire/taille** (nombre de pb) de telle sorte que les **petites molécules** se faufilent plus facilement entre les mailles du gel et **migreront plus loin** !
- de la **concentration en agarose ou en acrylamide du gel**, déterminant la **taille des mailles** du « filet » !

2. Principe de l'électrophorèse :

On creuse des **puits** dans le gel dans lesquels on verse les **produits d'amplification PCR**, au niveau de la **borne négative du champ électrique imposé**.

On laisse **migrer** les fragments afin de les **séparer** en fonction de leur **taille** (et non pas en fonction de leur séquence nucléotidique) !

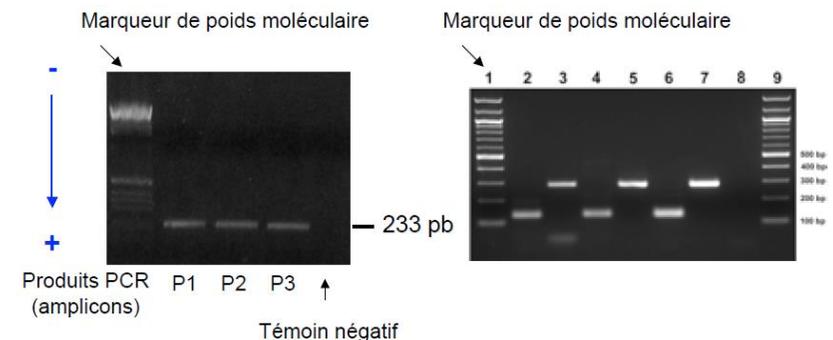


Une fois la **migration terminée**, on ne peut pas immédiatement voir les produits d'amplification : ils sont invisibles à l'œil nu.

On va donc les **colorer au bromure d'éthidium**, qui est un **agent intercalant très toxique**. Au contact de l'ADN double brin, il s'intercale entre les paires de bases et émet une **fluorescence rose** caractéristique rendue **visible sous rayonnement U.V** (avec des lunettes de protection).

Remarque : le bromure d'éthidium est un agent intercalent mutagène nécessitant de se protéger lors de son utilisation, ce qui fait qu'il est de moins en moins utilisé en laboratoire.

3. Interprétation de l'électrophorèse :



Nous avons deux exemples de migration électrophorétique :

- La **première colonne** sur l'électrophorèse de gauche ainsi que les **colonnes 1 et 9** sur l'électrophorèse de droite sont des **marqueurs de poids moléculaire**.

On a pris un mélange de fragments d'ADN **dont la taille est connue**, et on les fait migrer sur le gel, ce qui nous permet d'avoir une **référence** en termes de taille pour nos produits d'amplification.

Donc, pour savoir quelle taille fait notre produit d'amplification, **on se réfère à cette « graduation » !**

- La **toute première chose** que l'on doit **TOUJOURS** vérifier systématiquement lorsqu'on regarde pour la première fois une électrophorèse est la colonne du **témoin négatif** (il s'agit de la dernière colonne sur l'électrophorèse de gauche, et de la colonne 8 à droite).

On a mis dans ces puits **témoins négatifs** tous les éléments **SAUF l'ADN**, c'est-à-dire nos produits d'amplification PCR : on appelle cette manipulation « **faire un blanc** ». Cette manipulation a pour but de vérifier qu'il n'y a eu aucune contamination lors de la réalisation de l'électrophorèse, c'est obligatoire de le faire !

En effet, le puits témoin négatif n'étant **pas supposé contenir d'ADN**, si on observe sur la piste de migration de ce puits un **trait témoignant de la présence d'un fragment**, peu importe à quelle hauteur il est situé, cela signifie qu'il y a **contamination** et le gel analytique est alors **ininterprétable**, il ne nous est d'aucune utilité !

La colonne du témoin négatif doit toujours rester vide sinon il y a contamination et l'électrophorèse est ininterprétable !

- Tous les autres puits contiennent les **produits d'amplification pour chaque patient** (1 produit d'amplification par patient et par puits)

On a donc un **marqueur de poids moléculaire** qui permet de positionner des fragments dont **la taille est connue** pour pouvoir se repérer avec des fragments d'ADN de **tailles inconnues** (qui résultent de notre amplification PCR) !

Ex : On a amplifié une séquence d'ADN de **233 pb**, on veut vérifier qu'on ne s'est pas trompé. Imaginons qu'on a déposé produit PCR dans **le puits P2** (à gauche), il est à la hauteur de **233 pb** d'après le **marqueur de poids**, c'est bon !

C. Digestion enzymatique

Les **enzymes de restriction** sont des **endonucléases bactériennes** qui **coupent l'ADN double brin**. Elles coupent **au milieu de l'ADN** (et non pas à ses extrémités).

Cette coupure est **reproductible** et **spécifique** d'une séquence nucléotidique donnée ! C'est pourquoi ces enzymes sont dites « **séquence-spécifiques** ». Il en existe plus de 500 différentes.

1. Nomenclature :

EcoRI

Escherichia coli R y13

E : initiale de l'espèce bactérienne
co : genre de la bactérie

R : souche
I : n° d'ordre de découverte de l'enzyme dans une même bactérie

Il existe d'après cette nomenclature différentes enzymes de restriction :

- PvuII (*Proteus vulgaris*)
- BamHI (*Bacillus amyloliquefaciens* H)
- HaeII (*Haemophilus aegyptius*)

On différencie **trois types** d'enzymes de restriction en fonction du fait qu'elles **coupent à distance ou non** de la séquence reconnue !

Nous allons nous intéresser aux **enzymes de restriction de type 2** : elles reconnaissent une séquence qui permet de **couper 4 à 8 pb**.

Elles coupent au niveau de la séquence reconnue, qui est dite **palindromique**. Autrement dit, cette séquence est **identique** pour les **deux brins complémentaires** à condition qu'on les lise chacun dans leur **sens 5'-3' respectif** ! Comme les brins sont **antiparallèles**, ils sont **lus en sens inverse**, et leur séquence sera certes **identique**, mais **disposée à l'envers l'une par rapport à l'autre** !

C'est ce qu'on appelle un palindrome, le mot « **K₁ A₂ Y₃ A₄ K₅** » sera lu ainsi de **gauche** à **droite**, mais aussi de **droite** à **gauche** (à l'envers donc) on lit toujours « **K₅ A₄ Y₃ A₂ K₁** », à l'endroit comme à l'envers !

Remarque : l'analyse génétique ne concernant que les pathologies **monogéniques**, elle **n'inclut donc pas le NGS** qui est uniquement indiqué dans le diagnostic des pathologies **polygéniques** !

Cette technique vue dans le dernier cours est vraiment à part et n'est pas incluse dans les techniques classiques de biologie moléculaire, notamment car elle est beaucoup plus récente, elle a des indications très précises et particulières et ne permet pas de diagnostic à elle seule car elle doit toujours être confirmée par un séquençage Sanger classique (qui est la seule technique de référence, le NGS n'offrant pas assez de recul en termes de fiabilité pour le moment).

On va donc travailler en biologie moléculaire, avec les techniques que nous venons de présenter, uniquement sur les maladies **monogéniques** comme la mucoviscidose, l'achondroplasie...

Remarque : il ne faut pas absolument pas confondre **maladie génétique** et **maladie chromosomique** !

Une maladie chromosomique touche le **nombre de chromosomes** de l'individu qui aura alors un **caryotype anormal** : ce n'est **pas une anomalie de séquence** (il n'y a pas de mutation) mais une anomalie du nombre de chromosomes !

L'individu a soit **un chromosome en moins** (syndrome de Turner 45X0), mais il peut aussi avoir **un chromosome surnuméraire** (trisomies 13, 18, 21, syndrome de Klinefelter 47XXY).

Dans tous les cas il s'agit d'une **anomalie quantitative** et non pas qualitative car il n'y a **pas de mutation nucléotidique** mais du **matériel génétique en trop ou en moins** !

Une maladie génétique touche la **séquence nucléotidique** qui est **mutée**, l'individu aura un **caryotype normal** car il contiendra le **bon nombre de chromosomes** (46XX ou 46XY) mais une mutation va **perturber le message génétique** ! La maladie peut être **autosomique** ou **gonosomique** selon le chromosome touché, et **récessive** ou **dominante**.

Il s'agit d'une **anomalie qualitative** et non pas quantitative car il y a la **bonne quantité de matériel génétique** (soit 46 chromosomes) mais il y a quelque part une **mutation nucléotidique** !

La **mucoviscidose** est une maladie **autosomique récessive**, et l'**achondroplasie** que l'on va voir est une maladie **autosomique dominante**.

B. Achondroplasie

Nous allons reprendre tout ce dont nous avons parlé depuis le début du cours (concernant l'**extraction du matériel génétique** et les **principales techniques de biologie moléculaire**) et nous allons dans cette dernière partie l'appliquer à un **cas clinique concret** :

Comment diagnostiquer l'achondroplasie chez un fœtus, pathologie monogénique liée à une mutation ciblée ?

L'**achondroplasie** est la **plus fréquente** des **chondrodysplasies** (avec une fréquence de 1/15000).

Remarque : la fréquence d'apparition de l'achondroplasie est **inférieure à 1/2000**, c'est donc bien une **maladie rare** bien qu'elle soit la plus fréquente des chondrodysplasies !

Le diagnostic d'achondroplasie est évoqué sur **signe d'appel échographique** : on parle de « **fémurs courts** » (chez 99,9% des patients, ce n'est donc pas toujours le cas dans l'absolu).

On considère que **le diagnostic est radiologique +++**

1. Caractéristiques :

- Petite taille (130 cm)
- Membres courts
- Hyperlordose
- Mains courtes
- Macrocéphalie
- Front haut
- Ensellure nasale marquée
- Myélopathie



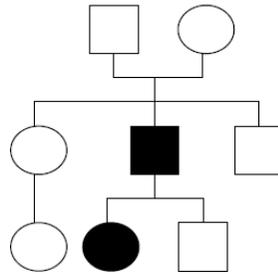
Mais l'intelligence du patient est NORMALE !

C'est une maladie **autosomique** (et non pas chromosomique) de **transmission dominante**.

Il suffit donc qu'un seul des deux allèles soit muté pour développer la maladie !

Un individu atteint aura donc à chaque grossesse une chance sur deux de transmettre la mutation !

Mais dans 90% des cas les enfants naissent de parents non atteints à cause de néomutations !



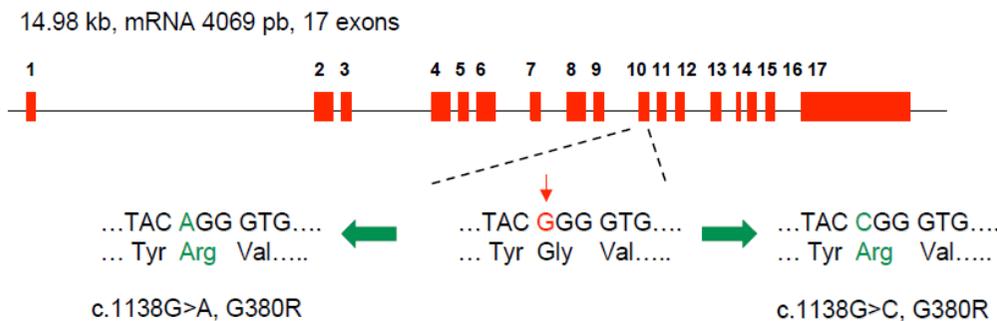
On remarque une forme plus grave de la maladie chez les homozygotes.

Le gène responsable est le gène **FGFR3** (Fibroblast Growth Factor Receptor) qui code pour le récepteur d'un facteur de croissance fibroblastique !

FGFR3 code pour le récepteur et pas pour le facteur de croissance !

Ce récepteur s'exprime normalement dans les chondrocytes et régule la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse.

- Mutation au codon 380 : c.1138G>A, G380R
c.1138G>C, G380R



La mutation ponctuelle est toujours située au même endroit et ce quel que soit le patient : **exon 10, codon 380 (ce qui correspond au 380^{ème} acide aminé), nucléotide 1138**. C'est pour ça qu'il est important d'apprendre la position exacte du nucléotide muté, car c'est toujours le même qui est concerné et c'est le point de départ de toute notre démarche diagnostique lorsqu'on cherche à diagnostiquer une **mutation ciblée** !

Il existe deux variants de mutation possibles pour le nucléotide 1138 :

- La **Guanine (G)** est remplacée par une **Adénosine (A)**
- La **Guanine (G)** est remplacée par une **Cytosine (C)**

Dans les deux cas la **Glycine** codée originellement est remplacée par une **Arginine** car le code est dégénéré (la mutation est donc faux-sens).

2. Etapes du diagnostic :

Chez le fœtus malade, on observe une cassure de la courbe de croissance des os longs (notamment les fémurs). On le remarque tardivement dans la grossesse (deuxième trimestre en général). Si le diagnostic d'achondroplasie que l'on suspecte se confirme, la maladie étant incurable on peut proposer une interruption médicale de grossesse, et ce sans limite de temps.

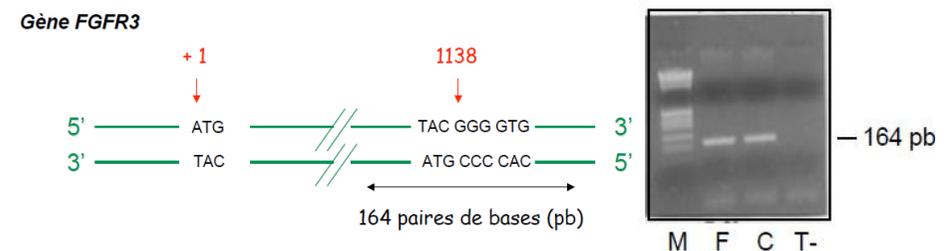
Pour pouvoir confirmer ce diagnostic pouvant être lourd de conséquences, on va faire une analyse du génome pour identifier la mutation ciblée responsable !

Devant un signe d'appel échographique, on va faire :

1. **Extraction d'ADN fœtal** à partir de cellules amniotiques récupérées lors d'une **amniocentèse** (ponction de liquide amniotique)

2. **Amplification par PCR** d'un fragment d'ADN (amplicon) de 164 pb encadrant la position 1138.

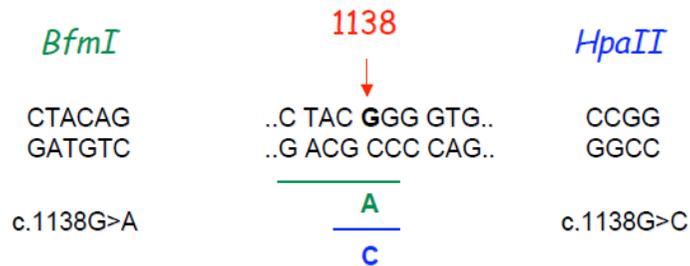
3. **Vérification des amplicons sur gel analytique**, on vérifie que notre fragment amplifié fasse bien 164 pb !



4. Digestion des amplicons par des enzymes de restrictions (endonucléases). Il s'agit d'une **méthode indirecte** car on ne va **pas séquencer directement** la mutation, on va vérifier sa présence en se servant des propriétés des enzymes !

Nous avons donc **deux possibilités** (car il existe **deux variants de mutation** possibles) :

- L'enzyme **BfmI** coupe si on a la mutation **c.1138G>A** (G remplacé par A)
- L'enzyme **HpaII** coupe si on a la mutation **c.1138G>C** (G remplacé par C)



Si l'enzyme BfmI coupe il y a la mutation c.1138G>A

Si l'enzyme HpaII coupe il y a la mutation c.1138G>C

Si aucune des deux enzymes ne coupe la séquence est sauvage

Donc si **BfmI** coupe, **HpaII** ne coupera pas puisqu'on ne peut avoir **qu'une seule des deux mutations** : si l'individu est homozygote, il possèdera obligatoirement la **même mutation** sur ses deux allèles. S'il n'y a **aucune mutation** et que la séquence est **saine**, alors **aucune enzyme ne coupera** !

Une fois que les enzymes ont coupé, on met tout sur un gel analytique et on regarde la **taille des fragments après coupure** (si la séquence était mutée).

Exemple de raisonnement avec BfmI : (même raisonnement avec *HpaII*)

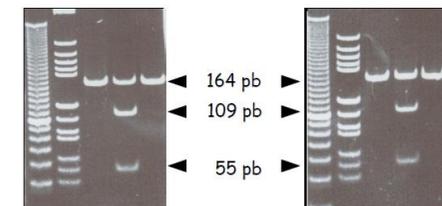
Si le patient est homozygote pour la mutation **c.1138G>A** on aura uniquement deux fragments d'ADN à 109 et 55 pb. L'enzyme de restriction a coupé les deux allèles mutés du gène (**BfmI a coupé deux fois** et on a donc deux fragments à 109 pb et deux fragments à 55 pb qui **se superposent**).

Si le patient est hétérozygote pour la mutation **c.1138G>A** on aura trois fragments d'ADN sur la piste du gel. En effet **un seul des deux allèles a été digéré** car **l'autre est sain** : l'enzyme n'a donc pas reconnu sa séquence et n'a pas pu couper !

Si le patient possède la mutation **c.1138G>C** reconnue par *HpaII*, **BfmI** ne coupera pas car elle ne reconnaît que la mutation **c.1138G>A** ! On aura donc le même cas de figure que si le patient était sain ce qui n'est pas le cas, on a juste **pas utilisé la bonne enzyme** ! Si une enzyme ne digère pas l'allèle du patient il faudra toujours essayer avec l'autre enzyme avant de conclure à une absence de mutation !

Le patient est sain uniquement si aucune des deux enzymes ne peut couper !

	Mutation c.1138G>A <i>BfmI</i>	Mutation c.1138G>C <i>HpaII</i>
Sain	164 pb	164 pb
Hétérozygote	164 + 109 + 55 pb	164 + 109 + 55 pb
Homozygote	109 + 55 pb	109 + 55 pb



5. Vérification par séquençage, méthode **directe** (contrairement aux enzymes de restriction) car on lit directement la séquence

