

UE 11 <3

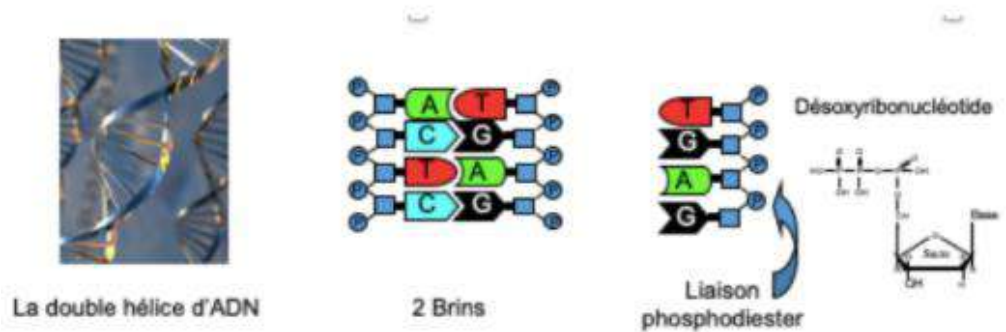


Chapitre 2 : Séquençage Sanger et application

I / Séquençage Sanger

Le séquençage d'un fragment d'ADN est une technique qui permet de déterminer la succession des nucléotides qui le composent. +++

Pour rappel, Pour rappel, l'ADN est cette double hélice composée des 4 nucléotides A/T/C/G reliés par des liaisons phosphodiester (dans un même brin), avec ces deux brins **antiparallèles**, liés entre eux par des liaisons hydrogènes (entre les deux brins).



Le principe du séquençage d'ADN basé sur les **di-désoxynucléotides** (ddNTPs) (aussi appelée méthode de Sanger). C'est une méthode enzymatique, aujourd'hui la méthode de référence pour séquencer l'ADN. **Elle reste la méthode de référence malgré les nouvelles technologies actuelles. ++**

A) Principe

Les différentes étapes du séquençage sont très proches de celles de la PCR.

Le séquençage utilise une ADN polymérase. Cette enzyme permet de synthétiser de l'ADN complémentaire à une séquence à partir d'une amorce. (cf. biomol 😊)



Ce sont les mêmes types d'amorces que celles utilisées pour la PCR !! +++++

L'ADN polymérase va synthétiser un brin complémentaire fidèle à la séquence ADN dans le sens 5'-3' (cf.biomol)

31 Etapes

**« L'ADN polymérase synthétise, à partir d'une amorce, un brin complémentaire, fidèle à la séquence d'ADN à étudier, grâce à des cycles successifs (3à 35 cycles) de 3 étapes :
Dénaturation - Hybridation - Élongation**

Explications :

Dans un tube, on va mettre :

- L'ADN à séquencer, qui peut être le résultat d'un produit PCT
- La Taq Polymérase
- L'amorce (1 seule) qui doit être spécifique du brin que l'on veut séquencer (si on veut en séquencer deux, alors on utilise une autre amorce dans une autre tube : ici, une seule amorce)
- Le matériel nécessaire à la Taq polymérase et à la synthèse du nouveau brin, à savoir les nucléotides (dNTPs)
- Les tampons

Nous allons avoir ensuite des variations successives de températures en 3 étapes :

- ① → **Dénaturation à 95°C** : les liaisons hydrogènes cassent à cette température
- ② → **Hybridation à 55°C** de l'amorce sur l'ADN devenu simple brin
- ③ → **Elongation à 60°C** : synthèse du brin complémentaire à la séquence

L'autre particularité du séquençage est **l'utilisation de didésoxyribonucléotides ou ddNTPs. ++**

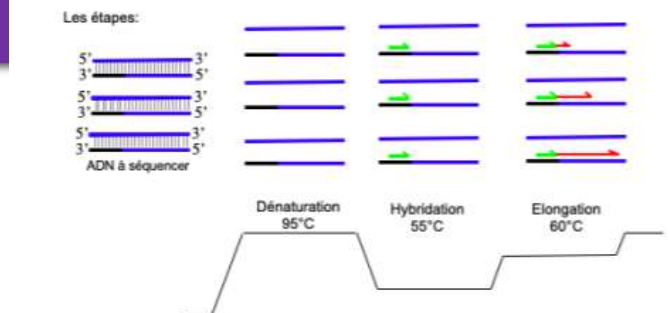
Lors de la synthèse, la Polymérase va incorporer de manière aléatoire soit un dNTP soit un ddNTP.

L'utilisation de dNTPs permet la création de liaisons phosphodiesters entre deux nucléotides consécutifs et donc la continuité de la synthèse du brin.

Mais **l'utilisation de ddNTPs bloque la synthèse du brin. +++** Car l'atome d'oxygène (O) n'est plus présent et il reste seulement un H en 3'. **Donc pas de synthèse possible. ++++**

01 Cycles successifs

On va réaliser plusieurs cycles en parallèle de synthèse d'ADN. Sachant que l'incorporation de dNTPs ou de ddNTPs se fait **au hasard**, on obtient



alors une multitude de fragments de différentes tailles. Tous complémentaires de la séquence recherchée.

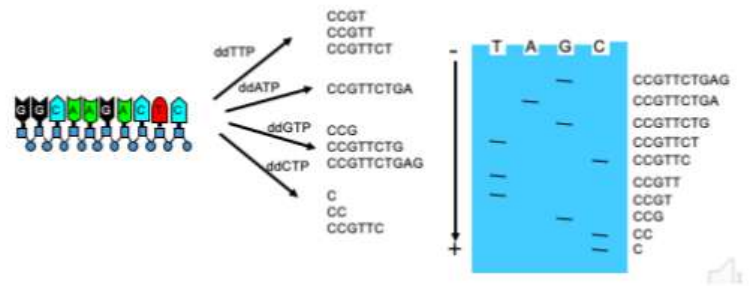
D1 Histoire

Dans la méthode Sanger, historiquement, nous faisons **4 réactions indépendantes** avec dans chaque tube :

- un **seul** type de ddNTPs (A, T, C ou G)
- les **4** types de dNTPs (A, T, C et G)

Chaque tube contenait tout ce dont la polymérase a besoin pour séquencer :

- Le fragment d'ADN
- La polymérase
- L'amorce
- Les dNTPs
- Un seul type de ddNTP



Les réactions de synthèse s'effectuent dans les **4 tubes distincts** montrées sur l'image ci-dessus. Les fragments obtenus sont ensuite séparés sur un gel par électrophorèse. L'ADN étant chargé **négativement**, la migration se fait du pôle - vers le pôle +. La migration dépendra de la taille du fragment. Plus il est long, moins il va migrer.

L'identité des nucléotides est apportée par la piste sur laquelle les fragments migrent. L'enchaînement des nucléotides est indiqué par la taille des fragments. +++

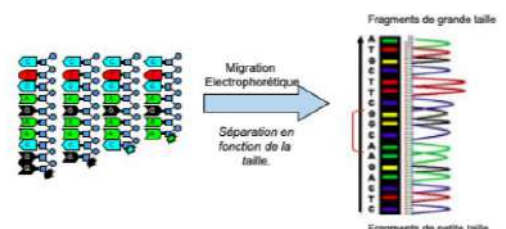
Pour analyser un gel, on lit la séquence dans le sens INVERSE de la migration. Sur cette image au-dessus on lit donc de bas en haut. Du plus petit fragment au plus gros. +++

ATTENTION : LA SEQUENCE LUE SUR LE GEL N'EST PAS LA SEQUENCE RECHERCHEE !!!! C'EST LA SEQUENCE COMPLEMENTAIRE. POUR TROUVER LA SEQUENCE D'ORIGINE IL FAUT RAISONNER PAR COMPLEMENTARITE DES BASES ! ++++++

Ex : sur l'image au-dessus, on lit la séquence CCGTTCTGAG sur le gel, donc la séquence que l'on cherche est GGCAAGACTC.

E1 Méthode automatisée

La méthode Sanger a été par la suite simplifiée et automatisée par l'utilisation de **ddNTPs fluorescents**. Chaque ddNTP est couplé à un **fluorochrome** de couleur différente.



Les 4 ddNTPs sont ajoutés dans le même tube réactionnel.

Il se passe donc la même chose que pour la méthode Sanger. A la différence qu'ici **tout se passe dans un seul et même tube**. Grâce à un code couleur on pourra savoir quel nucléotide a été incorporé. Les produits sont séparés en fonction de leur taille par migration électrophorétique.

F1 Les séquenceurs automatiques

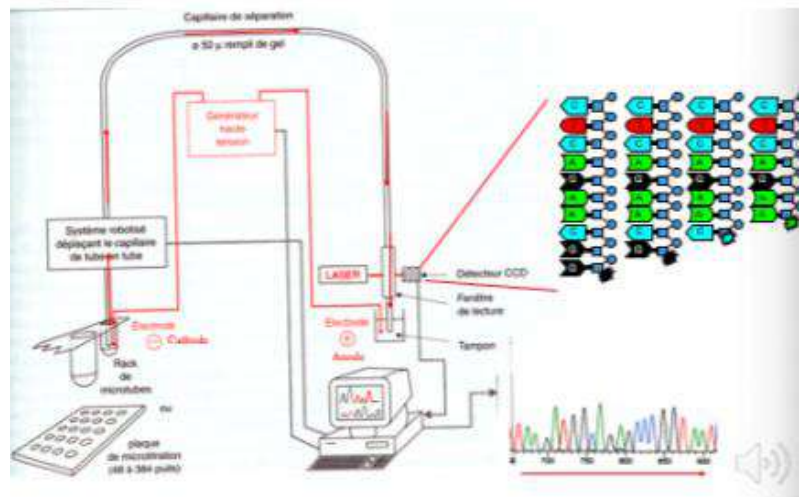
La migration électrophorétique et l'identification des nucléotides fluorescents se fait dans des « **séquenceurs automatiques** » dans lesquels on retrouve des capillaires. Chaque capillaire correspond à un gel d'agarose, donc à une migration électrophorétique.

Les fragments vont ensuite passer devant une **caméra** qui va lire le fluorophore incorporé.



Explication :

La machine trempe chacune de ses extrémités dans un tampon avec deux électrodes : d'un côté une cathode et de l'autre l'anode de façon à ce que **la migration puisse faire de la cathode vers l'anode**. Ce capillaire est également rempli d'un **gel de polymère** particulier (équivalent à de l'agarose vu précédemment). Ceci va permettre de séparer l'ADN en fonction de sa taille suite à la migration dans un champs électrophorétique.



À gauche nous avons les tubes de séquences, injectés dans ces capillaires. Les préparations vont migrer dans un champ électrique.

Les fragments vont ensuite passer devant **une caméra** qui va, grâce à un laser, identifier les fragments et la couleur des fragments qui passent. Donc en fonction du ddNTP, la caméra va voir plutôt un A incorporé si c'est du vert...

Par traitement informatique, la séquence apparaît sous forme **d'électrophorégramme**.

G1 Exemple de résultats

Nous avons ici quelques résultats :

- Sur la gauche, nous avons des résultats de la techniques utilisés en 77, avec des ddNTPs radiomarqués dans 4 réactions différentes. Nous avons 4 tubes par patients, avec le patient de

gauche sain et le patient de **droite muté**. On note une mutation au niveau de la flèche est présente : nous avons un fragment arrêté avec un ddNTP A, et un autre arrêté avec un ddNTP G. Cela signifie que pour cette position-là, nous avons un **hétérozygote C à T** (puisque'on parle en complémentarité : si c'est un A qui a stoppé la synthèse, c'est que nous avons un T).

- Sur la droite, la méthode automatisée. Aujourd'hui, cette même mutation serait lue avec cette façon. C'est à dire que nous avons des électrophorégrammes avec des couleurs pour chaque nucléotide. Chez le patient muté, on a une **superposition de 2 pics** puisqu'il est **hétérozygote** : le fragment a la même taille, mais comme nous avons 2 allèles différents, nous avons deux possibilités d'incorporation de nucléotides. On lit donc un C et un T, soit la superposition des 2 pics.



II /Application

Maintenant que vous avez vu quelques techniques d'analyse du génome. Il est temps de montrer leur utilité dans le diagnostic, avec comme 1^{er} exemple : l'achondroplasie.

A1 Définition de l'achondroplasie

C'est une maladie rare qui reste néanmoins la plus fréquente des chondrodysplasie (1/15000). Le diagnostic est **évoqué** sur des signes d'appel échographique notamment la taille des fémurs lors de l'échographie de 2^e trimestre afin de chercher des signes malformatifs ou des anomalies morphologiques chez le fœtus.

Point tut' : les chondrodysplasie sont des maladies touchant le tissu cartilagineux.

ATTENTION : L'ECHOGRAPHIE NE PERMET PAS DE POSER LE DIAGNOSTIC !!! IL NE FAIT QUE L'EVOQUER !! LA SEULE MANIERE DE FAIRE LE DIAGNOSTIC EST LA BIOMOL <3++++++>

Vous voyez que la biomol ça sert ;)

B1 Signes cliniques



Lors de l'échographie, on mesure la taille des os longs et plus particulièrement des fémurs. Un fœtus achondroplase aura des fémurs plus petits.

D'autres signes sont à décrire et à connaître : +++

- Petite taille/nanisme : 130 cm
- Membres courts
- Hyperlordose
- Mains courtes
- Macrocéphalies
- Dysmorphies faciales
- **Intelligence normale +++**
- Complications neurologiques : maladie très invalidante à cause de compressions possibles de la moelle épinière



CJ Transmission

La transmission de cette maladie monogénique est **autosomique DOMINANTE**. Donc théoriquement **50% de risques de transmission** (cf.biomol). Il suffit d'être hétérozygote pour être atteint. Par ailleurs les formes homozygotes sont plus graves.

Cependant **90% des personnes atteintes ont leurs parents non atteints**. Dans la majorité des cas c'est une néomutation qui apparaît lors du stade embryonnaire.

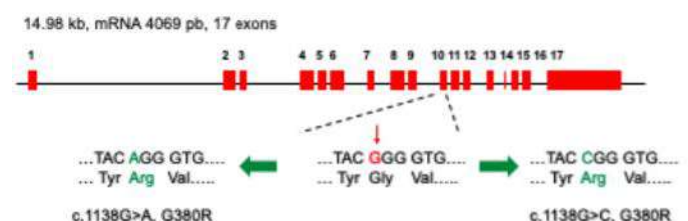
DJ Génétique

Il se passe quoi concrètement ? :(

Le gène impliqué dans cette maladie est le gène *FGFR3* qui code pour un **RECEPTEUR** de **facteur de croissance fibroblastique**.

Ce facteur de croissance est exprimé dans les chondrocytes (cellules du cartilage), et il régule la différenciation des ostéoblastes et joue un rôle majeur dans la formation osseuse. Ce gène est donc très important pour la croissance normale des individus.

Dans le cas de l'achondroplasie, c'est **toujours la même anomalie qui est responsable**. C'est ce qui en fait un cas très simple en termes de diagnostic



Dans l'achondroplasie, c'est toujours le **codon 380** du gène *FGFR3* (15 kB, avec 17 exons) qui est muté. La **glycine** est **remplacée** par une **arginine** à cause d'une mutation nucléotidique en amont (en position 1138, dans l'exon 10) qui remplace une **guanine** par une **adénine** ou une **cytosine**.

En regardant le cadre de lecture, on voit :

- TAC → Tyrosine

- GGG → Glycine (wild type / allèle sauvage)
 - ✕ Achondroplasie : 1^{ère} guanine remplacée par une adénine G→A
 - ✕ Achondroplasie : 1^{ère} guanine remplacée par une cytosine G→C
- GTG → Valine

Glycine→Arginine

Pour résumer, on a 2 mutations possibles au même endroit qui donneront le même acide aminé muté.

61 Diagnostic

La seule manière de diagnostiquer ce fœtus comme malade et de prévoir la suite de la grossesse, c'est le diagnostic génétique par analyse moléculaire du gène **FGFR3**, en mettant en évidence une mutation. +++

J'insiste sur ce point car c'est déjà tombé au concours ;)

Voici les différentes étapes d'acheminement vers le diagnostic :

① Prélèvement amniotique :

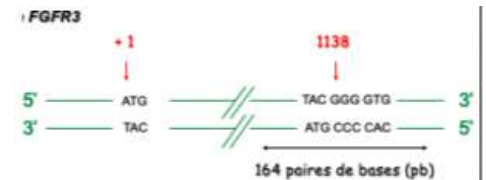
On récupère quelques mL de liquide amniotique dans lequel se trouvent des cellules amniotiques.

② Extraction de l'ADN des cellules fœtales :

On utilise la technique vue dans le 1^{er} cours donné par votre Yanou adoré <3 <3

③ Amplification par PCR :

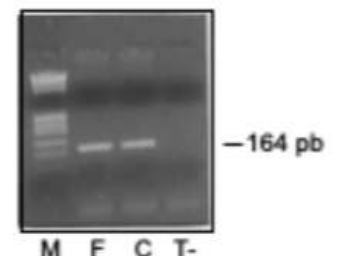
Amplification d'un fragment de 164 pb entourant la position 1138



④ Vérification des amplicons sur gel :

On vérifie que la PCR a bien fonctionné. Sur la photo ci-contre on observe 4 pistes :

- M (marqueur moléculaire)
- F (amplicon d'ADN fœtal)
- C (amplicon d'ADN contrôle non muté sur la région étudiée)
- T (témoin négatif noir=pas de contamination=résultats interprétables)



Les fragments originaux font **164 pb**.

⑤ Digestion enzymatique :

Les résultats étant bons, on réalise une digestion enzymatique pour savoir s'il y a une mutation et laquelle.

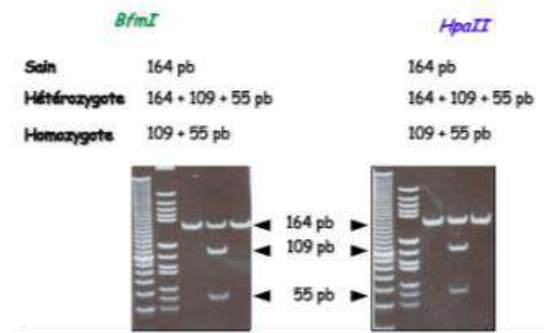
On utilise deux enzymes de restrictions :

- **BfmI** qui coupe s'il y a la mutation G→A
- **HpaII** qui coupe s'il y a la mutation G→C

⑥ Analyse de la digestion :

Une fois la digestion faite, il faut analyser les produits obtenus sur gel analytique puis avec une électrophorèse. Le résultat est indiqué sur l'image ci-contre. On retrouve toujours :

- La colonne marqueur de poids moléculaire
- Une piste avec un fragment de 164pb (ADN foetal non digéré)
- Une autre piste avec un marquage différent. C'est l'ADN foetal après digestion
- La dernière colonne est un ADN sain ayant subi la digestion



Sur la piste 4 on remarque **3 éléments** :

- Un fragment à 164 pb, correspondant à l'allèle sauvage du foetus, non reconnu par l'enzyme : la mutation est hétérozygote
- 2 nouveau fragments de poids moléculaires différents : il s'agit de notre allèle muté, qui a été coupé en 2 morceaux car il présentait un site de reconnaissance pour l'enzyme. Nous avons donc un morceau plus lourd (109 pb) et un plus léger (55 pb). En effet, on remarque que l'addition de nos deux poids donne le poids de départ ($109 + 55 = 164$). On peut donc en conclure que l'enzyme a coupé notre allèle car il y a eu un site de reconnaissance : l'allèle était muté et le foetus porte la mutation définie selon l'enzyme utilisée.

Point tut important :

Un cas n'est pas illustré sur ce schéma. C'est celui de la personne homozygote pour la mutation. Dans ce cas on n'aurait non pas 3 fragments visibles sur le gel mais seulement 2, car les deux allèles mutés aurait subi la digestion. On n'aurait donc que des fragments de 109pb et 55 pb visibles.

La coupure permet donc de faire le diagnostic.+++

⑦ Vérification par séquençage :

En biologie moléculaire, et surtout quand il s'agit de diagnostic prénatal, on essaie toujours d'avoir une **technique de confirmation du résultat**.

Ici, nous sommes dans une région de l'**exon 10** du gène *FGFR3* qui correspond à la séquence sauvage. On lit de la droite vers la gauche, et il faut lire l'allèle qui est en **rouge**.

Vous voyez sur cette image la **mutation** entourée en **rouge** on a une **Thymine** anormalement présente. En raisonnant par complémentarité des bases on en déduit que c'est une mutation G>A.

Sur le graphique on remarque à la même position la superposition de **2 pics** de **couleurs différentes**. Ici on retrouve la couleur de la **Thymine** qui par complémentarité montre une mutation G>A.

