



Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf :117 226

Kit Hémochromatose

Français – p 1

Version : 2301

1 Introduction

❖ Hémochromatose

L'hémochromatose est une des maladies génétiques les plus fréquentes chez l'humain. Elle entraîne une surcharge chronique progressive en fer dans l'organisme. Les symptômes sont peu spécifiques et variables en fonction des malades. Si le fer n'est pas éliminé, il va altérer les organes où il s'accumule (foie, pancréas, cœur, os) et peut entraîner cirrhose, diabète ou insuffisance cardiaque.

En Occident, c'est la maladie génétique avec le plus grand nombre de sujets prédisposés. En France, dans 80% des cas, l'hémochromatose est liée à la mutation p.Cys282Tyr (C282Y) du gène HFE (1 français sur 9 est hétérozygote H/h pour ce gène).



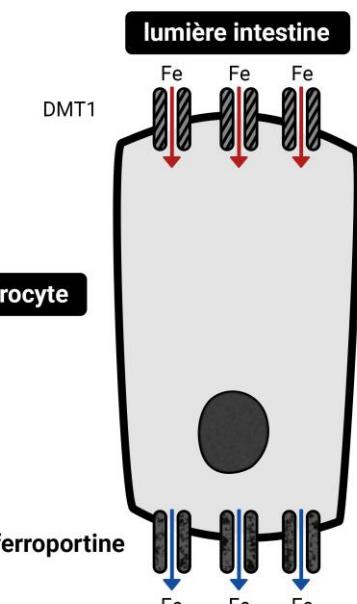
❖ Des symptômes nombreux et divers

- La fatigue générale, ou asthénie, peut être physique ou psychique. À un stade avancé, la fatigue devient permanente, obligeant à l'arrêt de l'activité professionnelle, l'invalidité totale ou encore conduire à un état dépressif.
 - Les lésions ostéo-articulaires sont graves chez 2 patients sur 3, et deviennent très douloureuses.
 - L'atteinte hépatique est fréquente chez 95% des malades.
 - Des troubles sexuels sont généralement observés.
 - L'atteinte cardiaque est observée chez 15% des malades.
 - La mélanodermie est présente chez 90% des malades : l'hyperpigmentation gris verdâtre est due à la stimulation de la synthèse de mélanine dans la couche basale de l'épiderme.
- Il existe également des déformations des ongles, une diminution de la pilosité, une fragilité de la peau et des signes cutanés d'insuffisance hépatique.

Certains malades ont peu de complications (fatigue, douleurs articulaires), tandis que d'autres développent des symptômes graves. Les raisons de cette extrême variabilité sont liées à des facteurs environnementaux favorisant l'absorption du fer (tels que la vitamine C, l'alcool, les virus hépatotropes...).

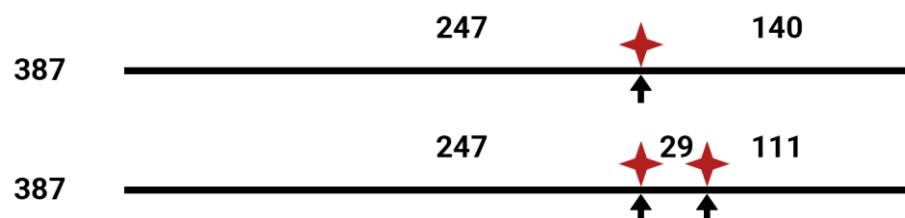
❖ La protéine « signal » HFE défaillante

L'organisme humain contient environ 4 g de fer, en majorité contenus dans l'hémoglobine de nos hématies (pour 75 %) ou stockés dans d'autres tissus, en particulier le foie (0,5 à 1 g). Ce fer provient de notre alimentation et son absorption quotidienne au niveau des entérocytes (cellules de l'intestin) est équivalente aux pertes (environ 2 mg par jour). La régulation de l'absorption du fer alimentaire par les cellules intestinales est sous la dépendance d'une hormone fabriquée par le foie : l'hepcidine. Sa sécrétion dépend notamment d'une protéine nommée HFE. Le mécanisme de l'absorption est décrit par le schéma ci-dessous : La protéine **HFE** produite par les cellules de notre organisme sert de « signal » de la quantité de fer présente dans l'organisme. Cette protéine **HFE** se fixe sur les entérocytes et leur indique ainsi que la charge en fer de l'organisme est suffisante.



Chez les individus atteints d'hémochromatose, cette protéine **HFE** est modifiée et ne peut plus se fixer sur les entérocytes. Les cellules intestinales « interprètent » cette non fixation comme une carence en fer, ce qui induit la synthèse de transporteurs **DMT1**, et donc entraîne une absorption de fer plus importante.

La protéine **HFE** comporte 348 acides aminés. Dans 60 à 100 % des cas, selon les populations étudiées, l'hémochromatose est liée à la mutation **C282Y** du gène **HFE**.



❖ Une origine génétique

La mutation **C282Y** définit l'hémochromatose **HFE1** :

Pour qu'une hémochromatose apparaisse, il faut que les deux chromosomes soient porteurs de l'allèle muté (*h*) ayant la mutation **C282Y** (mutation dite « homozygote »), l'un venant du père, l'autre de la mère. Le gène **HFE** est localisé sur le chromosome 6. L'allèle *h*, porteur de la mutation est récessif par rapport à l'allèle *H*, non muté. Près d'une personne sur 300 en France est porteuse des deux allèles mutés **C282Y** et présente un risque de développer une surcharge en fer.

En plus du facteur génétique, s'ajoute d'autres facteurs qui influencent le métabolisme du fer (habitudes alimentaires, particularités individuelles, environnement) qui génère une sévérité variable de la maladie selon les individus. Certains homozygotes **C282Y** n'auront jamais de bilan du fer anormal. Des études montrent que seuls 50% des Hommes porteurs présentent des anomalies des bilans sanguins (saturation de la transferrine, hausse du taux de ferritine...).

❖ **Principe du dépistage génétique de type PCR- RFLP**

- PCR : Polymerase Chain Reaction (Amplification en chaîne par polymérase)
- RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorphisme de taille des fragments de restriction)

L'apparition de symptômes, complétés d'un bilan sanguin indiquant une augmentation de saturation de la transferrine ($> 45\%$), entraîne le plus souvent une recherche de la mutation C282Y par la technique de PCR-RFLP qui s'effectue en 3 étapes :

Etape 1 (PCR) : Amplification par PCR d'une zone spécifique de gène HFE.

Etape 2 (RFLP) : Digestion enzymatique par Rsa I qui reconnaît dans une séquence de nucléotides le site de restriction GTAC, coupe entre T et A permettant de distinguer l'allèle H de l'allèle h (muté).

Etape 3 (électrophorèse → L'objet de ce TP) : Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments ADN digérés.

❖ **Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel**

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de tailles différentes migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de tamisage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (pb) ou en kb (1 kb = 1000 pb).

Le kit se présente sous la forme de solutions d'ADN prêt à déposer dans le gel : **les solutions d'ADN sont calibrées et ne nécessitent aucune préparation**. Ces solutions contiennent le tampon de charge et les colorants témoins de migration.

Format 40 élèves (20 binômes) :

20 tests soit 80 dépôts à analyser

1 test correspond à :

- 1 dépôt Parent 1 (8 µL)
- 1 dépôt Parent 2 (8 µL)
- 1 dépôt Enfant 1 (8 µL)
- 1 dépôt Enfant 2 (8 µL)

+ 10 dépôts Echelle de poids moléculaire (jusqu'à 10 gels)

1 dépôt (8 µL) de l'échelle de poids moléculaire par gel électrophorèse

Durée globale de la séance 30 à 40 minutes

Dont migration électrophorèse : 15 - 20 minutes

2 Matériels et produits nécessaires

Composition du kit :

- Tube parent 1 H/h 175 µL
- Tube parent 2 H/h 175 µL
- Tube enfant 1 H/H 175 µL
- Tube enfant 2 h/h 175 µL



- Marqueur de taille 90 µL

[Volume supplémentaire « Droit à l'erreur » : 20 dépôts de 8 µl par tube = 160 µl soit un 15 µl pour compenser les erreurs de pipetage]

Consommables nécessaires (non fournis)

Agarose
Tampon TAE
Colorant

Réf. 107646 : cette référence regroupe tous les consommables indispensables pour réaliser 10 mini-gels d'agarose pour système compact avec fluorescence (Type PhorEasy)
(Agarose 4 g / TAE 10x 200 mL / colorant GelGreen 30 µl)

Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

3 Principe de l'expérience

Contextualisation : ici, les 4 tubes d'ADN correspondent à 4 individus d'une même famille (fictive). L'ADN à analyser est présenté comme le résultat d'une amplification du gène HFE par PCR. Cette amplification a été suivie de l'action de l'enzyme de restriction RSA I.

Principe du dépistage par PCR-restriction

Ce dépistage repose sur 3 étapes, une PCR suivie d'une digestion enzymatique puis une électrophorèse. Cette électrophorèse que vont réaliser les élèves va permettre de déterminer si des membres de cette famille sont porteurs de l'allèle h.

Etape 1 : amplification par PCR d'une portion du gène HFE de 387 pb
Le gène HFE correspond à un segment d'ADN d'environ 10 000 paires de bases.

Les séquences ci-dessous correspondent à une portion du brin non transcrit des allèles du gène HFE (le numéro indiqué correspond à la position du premier nucléotide de la séquence). Le reste de la séquence est identique pour les deux allèles.

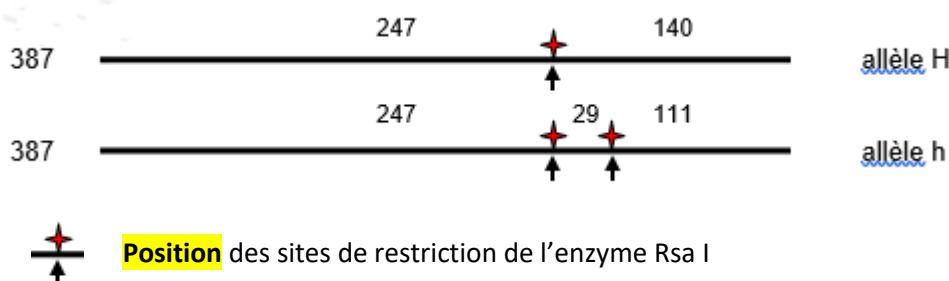
Allèle **H** : ...1031 GGCT**GTAC**CC CCTGGGGAAG AGCAGAGATA TAC**GTGC**CAG GTGGAGCACC...

Allèle **h** : ...1031 GGCT**GTAC**CC CCTGGGGAAG AGCAGAGATA TAC**GTAC**CAG GTGGAGCACC...

Etape 2 : digestion enzymatique par Rsa I

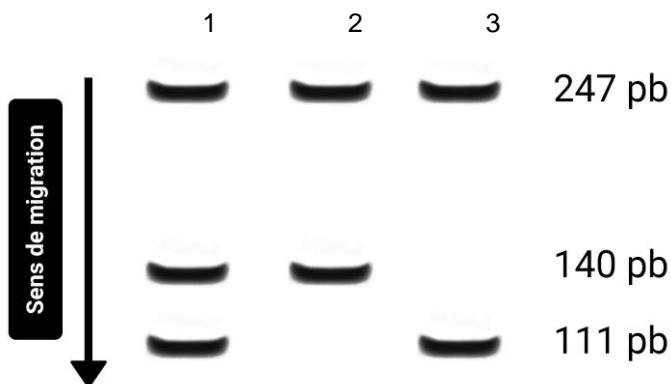
Sous l'action de l'enzyme RSA I, l'allèle H subit une coupure, et l'allèle h subit 2 coupures.

Si dessous la carte de restriction de la zone amplifiée par PCR des allèles **H** et **h** du gène HFE pour l'enzyme Rsa I (*les nombres indiqués correspondent à la longueur des fragments de restriction exprimés en paires de bases*).



- **Résultats attendus du test génétique : 3 profils potentiels**

- 1- Profil hétérozygote H/h [$H = 247 + 140 / h = 247+111$]
- 2- Profil homozygote non muté H/H [$H = 247 +140$]
- 3- Profil homozygote muté h/h [$h = 247 + 111$]



Remarque : La lecture s'appuie uniquement sur les brins 247 /140 /111 pb. Le fragment de restriction de 29 pb migre beaucoup plus rapidement que les autres et n'apparaît plus sur le gel de l'électrophorèse (il a migré hors du gel avant la fin de la migration permettant de séparer clairement les autres brins).

4 Mode opératoire

4.1 Préparation des solutions

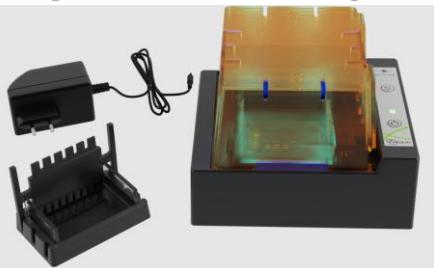
- ❖ **Préparation du tampon TAE 1X :**

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL (gel + tampon migration).
- Verser le contenu du flacon de tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) dans 900 ml d'eau distillée, bien mélanger.
** En fonction du nombre de gel et du nombre de système électrophorèse utilisés au cours du TP, le volume de TAE 1 X à préparer doit être adapté.*

- ❖ **Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 2,5 %* :**

- Verser 15 ml de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,37 g d'agarose dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.
- Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (*ou sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète*).
- S'assurer que la solution est parfaitement translucide
- Ajouter 2 µl de colorant GelGreen à l'aide de la micropipette, bien agiter l'erlenmeyer

phorEasy



Dispositif électrophorèse tout en un

- Laisser l'érlemeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.

* *La concentration en agarose à 2,5 % permet d'avoir une résolution optimale de la séparation des fragments d'ADN. On peut également utiliser un gel à 2 % et obtenir des résultats exploitables (15 ml TAE / 0,30 g).*

❖ **Préparation de l'ADN**

- Les solutions sont directement prêtées à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.
- Avant la séance, décongeler les tubes Eppendorf.

Idéalement décongeler les contenants environ 5 minutes sous l'eau chaude, puis les plonger dans l'eau glacée pendant deux minutes. Cela permet, par chocs thermiques, de séparer les fragments qui auraient pu s'associer à nouveau et d'autre part d'éviter la nouvelle formation de bouts collés.

Le produit supporte aisément une succession de plusieurs alternances de congélation-décongélation sans perdre ses propriétés. Mais il faut réduire au minimum la durée de décongélation pendant laquelle une dégradation occasionnelle par des micro-organismes est possible.

4.2 Dépôt de l'ADN

A l'aide d'une micropipette, déposer :

- 8 µl d'ADN Tubes patients à déposer
- 8 µl pour l'échelle de poids moléculaire

Durée de migration environ 20 minutes pour les systèmes compacts.

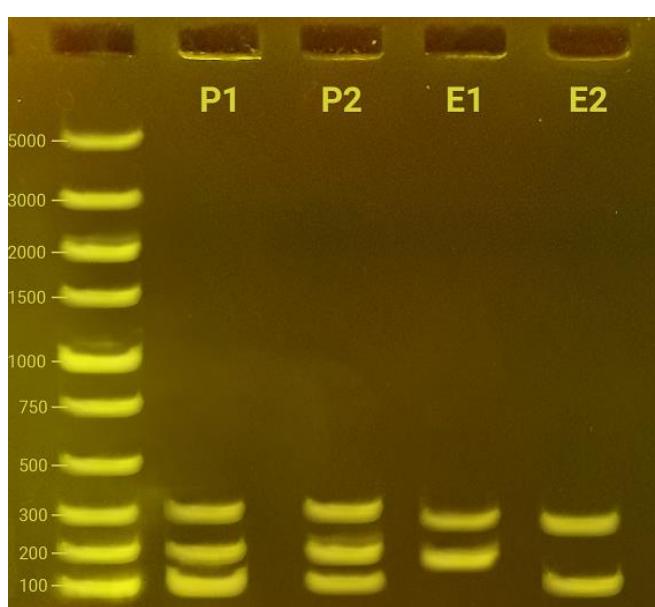
5 Résultats et exploitations

Résultats attendus

Parent 1 et 2 = Profil hétérozygote H/h (porteur sain)

Enfant 1 = Profil homozygote non muté H/H (sain)

Enfant 2 = Profil homozygote muté h/h (malade)



6 Bibliographie

Recommandations pour la (bonne) pratique du diagnostic moléculaire de l'hémochromatose liée au gène HFE, Jouanolle AM, Gérolami V, Ged C, Grandchamp B, Le Gac G, Pissard S, Rochette J, Aguilar-Martinez P, Annales de Biologie Cliniques 2012 : 70, P305-313

Introduction of Molecular Diagnosis of Hemochromatosis Type 1 in Cuba. Cervera GIA, García HM, Teresa Collazo Mesa, Finley 2013, Vol.3 number 2

7 Remerciements

Merci à Pierre Breton, professeur de SVT au Lycée Henri Wallon de Valenciennes, pour son aide à l'élaboration de ce TP.

8 Assistance Technique

Pour tous réglages, contacter le **Support Technique** au **09 69 32 02 10** (**prix d'un appel local, non surtaxé**).

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

09 69 32 02 10*

** prix d'un appel local, non surtaxé*