

# Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf :117 227

## Kit test de dépistage de la Mucoviscidose

Français – p 1

Version : 2301

# 1 Introduction

La mucoviscidose est une pathologie génétique sévère, qui se traduit par une augmentation de la viscosité des sécrétions corporelles, elle atteint particulièrement les voies respiratoires et digestives. En cause, des mutations, plus de 2000 répertoriées qui altèrent le fonctionnement du gène CFTR affectant la synthèse de la protéine transmembranaire CFTR. Aujourd'hui, la mucoviscidose est systématiquement dépistée à la naissance. Les personnes malades ou porteuses du gène responsable bénéficient de conseils génétiques. Un diagnostic prénatal ou un diagnostic pré-implantatoire est parfois envisagé.

L'activité expérimentale proposée se présente sous la forme d'un test de détection sur un couple qui souhaite connaître le niveau de risque transmission de cette maladie génétique à leur enfant.

Cette expérience est inspirée du test Elucigène CF4, un des premiers tests de détection par PCR élaboré par Zeneca diagnostic. Ce TP est construit par analogie à ce test et étudie des fragments d'ADN de synthèse.

La technique de PCR a permis de faire progresser le dépistage en ciblant directement les mutations. Ce test CF4 ciblait les 4 mutations les plus fréquentes en Europe, il a ensuite été remplacé par des tests plus performants recherchant 12 mutations puis 30, actuellement le test CF-EU2 identifie 50 mutations.

Le principe du test repose sur une double analyse pour un même gène donné. Dans un premier tube, on recherche à amplifier la version de l'allèle non muté du gène et dans un second tube on cherche à amplifier la version de l'allèle muté du même gène. On dispose donc de 2 tubes PCR par individu et il est possible de déterminer son génotype par la présence ou non d'une ou plusieurs mutations.

<https://www.yourgene-health.com/reproductive-health/cystic-fibrosis/cystic-fibrosis-analysis>



## One PCR

- Two tube analysis
- Tube A: mutation detection and polyT status
- Tube B: wildtype detection
- Simple PCR set-up
- Reduced hands on time

## One Analysis

- No post-PCR manipulation
- Compatible with ABI 3\*\*\* and SeqStudio Genetic Analysers
- Highly multiplexed 5 dye chemistry
- Rapid Analysis

## One Report

- GeneMarker® and GeneMapper™ software applications
- Easy data review and analysis
- Informative single page reporting
- No data transfer required

Les techniques actuelles de révélation sont plus sophistiquées qu'une simple électrophorèse. L'analyse par électrophorèse capillaire intègre des outils d'analyse de bioinformatique à l'aide de marqueurs génétiques et de cartographie génomique. Cependant, l'électrophorèse sur gel d'agarose est un outil essentiel pour expérimenter en génétique.

### ❖ 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 Tube A (8 µl)
- 1 dépôt Parent 1 Tube B (8 µl)
- 1 dépôt Parent 2 Tube A (8 µl)
- 1 dépôt Parent 2 Tube B (8 µl)

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

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

Durée globale de la séance 30 à 40 minutes  
Dont migration électrophorèse : 20 minutes

## 2 Matériels et produits nécessaires

#### Composition du kit :

- Parent 1 tube A 175 µL
- Parent 1 tube B 175 µL
- Parent 2 tube A 175 µL
- Parent 2 tube B 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 Le gène CFTR

Le gène CFTR comporte 27 exons, 180 000 paires de bases (clonage et séquençage du gène en 1989).

À ce jour, quelque 2000 variations de séquences du gène CFTR ont été répertoriées.

Fréquences des 10 mutations les plus communes (Schwarz, 1988)

Nom de la mutation	Fréquence	Exon	Typologie
△ F508	75,32 %	10	Délétion de 3 paires (TTT) de bases position 1522
G551D	3,08 %	11	Changement d'un nucléotide 1784
G542X	1,68,4%	11	Mutation sur une base : intron 10- CGA translater en TGA codon stop,
621+1G	0,7%	i4	Changement d'une nucléotide intron 10- CGA translater en TGA codon stop,
1717- I (G > A)	0,57 %	i10	Changement d'un nucléotide
R117H	0,46%	4	Substitution G à A en position 350
R553X	0,46%	11	Substitution C à T en position 1657
1898+ I(G > A)	0,46%	i12	Changement d'un nucléotide
N1303K	0,46%	21	Substitution C à G en position 3909
R560T	0,42%	11	Substitution G à C en position 1679
Cumulé	83,84%		

Données génétiques :

Mode de transmission : autosomique récessif

Maladies : mucoviscidose : MIM #219700

Localisation : chromosome 7 (7q31.2)

ARN messager : 6,5 kb

Protéine CFTR : exprimée à la surface apicale des cellules épithéliales sécrétoires ; constituée de 1480 acides aminés ; masse de 170 kDa.

La protéine CFTR est présent dans la membrane cellulaire, c'est un canal régulant le transport de chlore et de sodium dans les cellules épithéliales exocrines. Il existe différentes structures protéiques liées aux mutations du gène qui se caractérisent par une gravité plus ou moins importante des symptômes de la maladie.

### 4 Principe de l'expérience

#### 4.1 Contextualisation

L'activité se présente sous la forme d'un test de détection sur un couple qui souhaite savoir s'ils risquent de transmettre à leur enfant cette maladie génétique. Ni l'un ni l'autre ne présente de symptôme, mais des membres de leur famille sont atteints de mucoviscidose. Ce test indiquera si un diagnostic pré-implantatoire sera nécessaire sur l'embryon, obtenu par fécondation *in vitro*, avant qu'il ne soit porté par la femme.

Le kit présente des tubes contenant de l'ADN amplifié par PCR

- 2 tubes pour le parent 1
- 2 tubes pour le parent 2

Cette expérience reprend le principe du diagnostic PCR de type Elucigène CF4 Zeneca diagnostic. [Un dépistage en 2 étapes](#)

## 4.2 1<sup>ère</sup> étape du diagnostic : amplification PCR

Cette étape n'est pas l'objet du TP mais est indispensable pour la compréhension et l'interprétation des résultats. La première étape du diagnostic est une amplification PCR de type ARMS\*, qui cible 4 mutations les plus fréquentes du gène CFTR :

- DeltaF508 ;
- G542X ;
- G551D ;
- 621+1.

→ Les tubes fournis des deux parents correspondent aux résultats de la PCR ARMS.

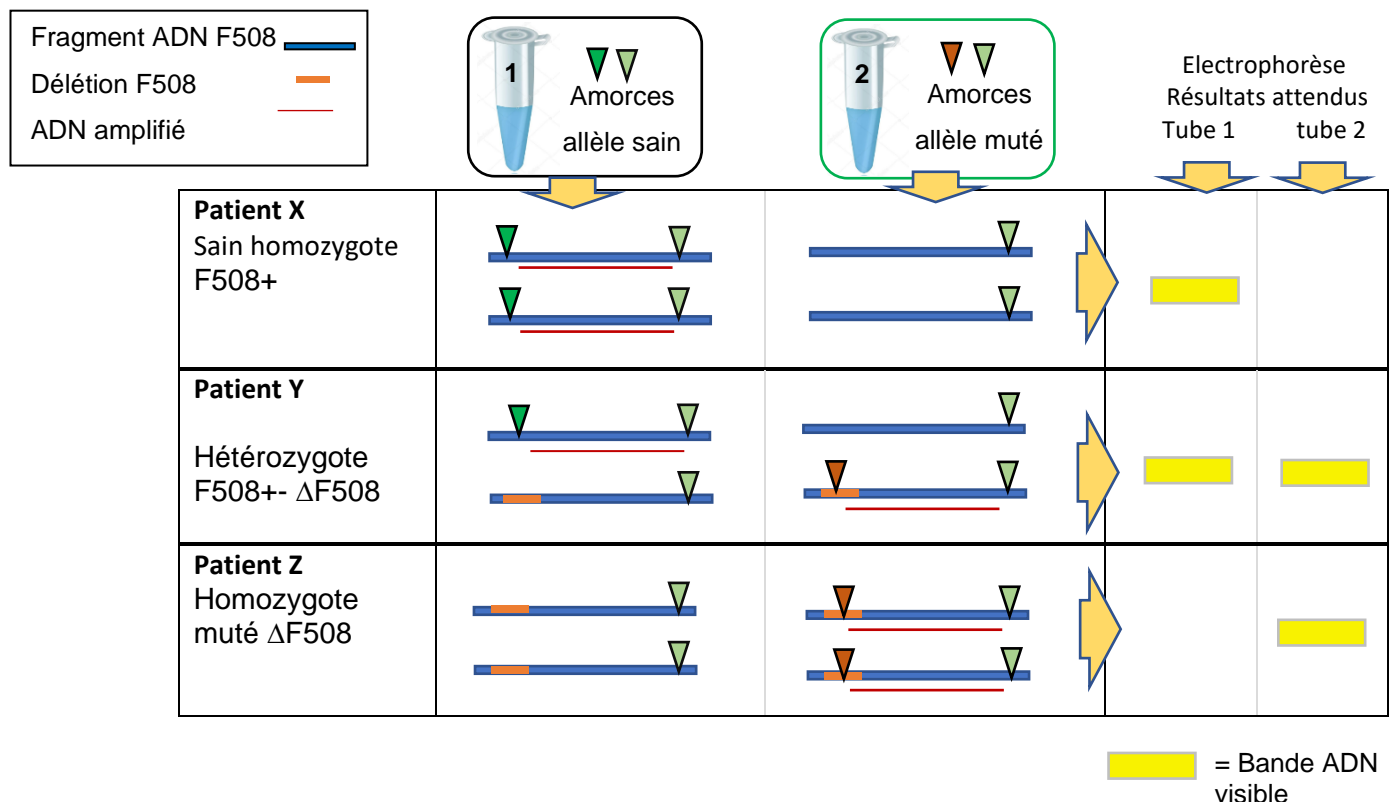
\*Détection par PCR ARMS (Amplification Refractory Mutation System ou « système de mutation réfractaire à l'amplification ») : cette technique PCR est une méthode simple pour détecter toute mutation impliquant des changements de base unique ou de petites délétions ou insertions. Elle combine la puissance de la PCR avec la spécificité des oligonucléotides spécifiques d'allèles.

Le principe repose sur l'amplification de 4 fragments d'ADN (zones où se situent les 4 mutations) du gène CFTR en utilisant deux panels d'amorces :  
 - 1 panel d'amorces cible les versions non mutées des fragments d'ADN  
 - 1 panel d'amorces cible les versions mutées des fragments d'ADN

En parallèle dans 2 tubes distincts, 2 jeux d'amorces différents ciblent les mêmes zones ADN. Dans un tube les amorces ciblent l'**allèle sain** dans l'autre tube les amorces recherchent l'**allèle muté**.

Tube 1 → on recherche que l'allèle sain

Tube 2 → on recherche que l'allèle muté



Le patient X n'est pas porteur de la mutation. Il est homozygote sain.  
 Le patient Y est porteur de la mutation DeltaF508. Il est hétérozygote sain.  
 Le patient Z est porteur de la mutation DeltaF508. Il est homozygote pour DeltaF508 et atteint d'une forme de mucoviscidose.

Le test CF4 cible 4 mutations du gène CFTR.

Position	Taille en pb	Mutations recherchées
1	517	621-1
2	323	G551 D
3	255	G542X
4	160	ΔF508

Les études montrent que la paire de mutation la plus fréquente statistiquement est DeltaF508 - DeltaF508 à 50 %. DeltaF508 – autre mutation, hétérozygote, est à 40 %. Autre mutation - Autre mutation représente 10 % des paires de mutation responsable de la maladie. La mutation DeltaF508 est donc impliqué dans 90 % des cas de mucoviscidose.

### 4.3 2<sup>de</sup> étape du diagnostic : l'électrophorèse

Cette étape est l'objet du TP. Les élèves vont réaliser la séparation des fragments d'ADN par électrophorèse et l'interprétation des résultats.

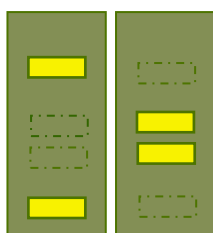
Pour un locus donné, les tailles des amplicons entre l'allèle sain et l'allèle muté, sont relativement identiques (ne diffèrent que seulement de quelques bases (SNPs)). Ils occupent donc la même position en électrophorèse, c'est la raison pour laquelle la recherche s'effectue dans 2 tubes séparés.

#### Comment lire les résultats ?

Pour lire et interpréter les résultats du diagnostic, il faut lire en parallèle les 2 tubes !

Particularité du CF4, le résultat, associe la recherche de 2 allèles sains et de 2 allèles mutés simultanément dans chaque tube. Cela n'est pas intuitif pour la lecture, mais cette disposition sert aussi de contrôle positif\*.

**Profil  
 électrophorétique  
 d'un patient sain**  
 Tube 1    tube 2



Allèles recherchés par tube :

position	Tube 1	Tube 2
1	Allèle sain 621+1 (+)	Allèle muté 621+1 (-)
2	Allèle muté G551D (-)	Allèle sain G551D (+)
3	Allèle muté G542X (-)	Allèle sain G542X (+)
4	Allèle sain DeltaF508 (+)	Allèle muté DeltaF508 (-)

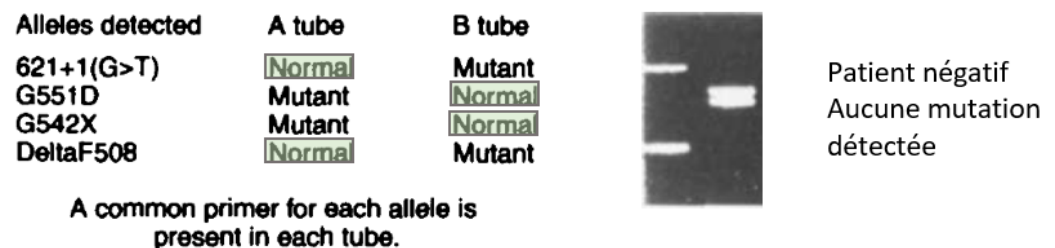


**\*Contrôle positif → Quel est l'intérêt de répartir la recherche de gènes sains et de gènes mutés dans les 2 tubes ?**

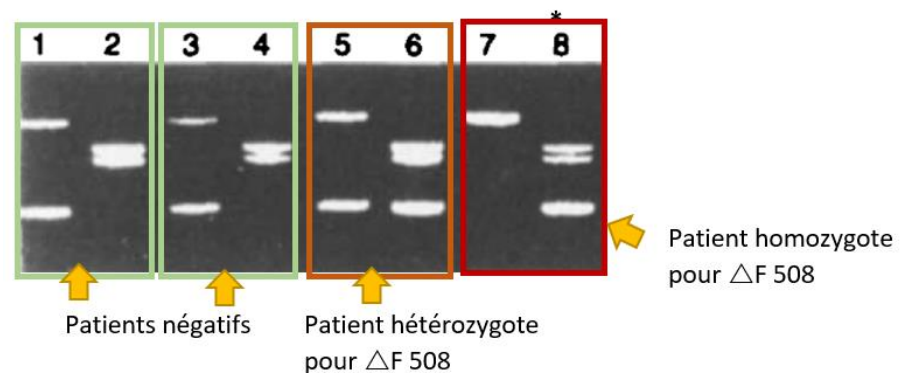
Si l'on présentait tous les allèles sains dans le tube 1 et tous les allèles mutés dans le tube 2, l'absence d'amplification dans le tube 2 peut correspondre à un patient sain, exempt de mutation, mais aussi à une PCR qui aurait pu dysfonctionner (contamination du tube). Ce mode de présentation va être porteur de doute

Statistiquement au niveau d'un individu la probabilité d'avoir au moins un allèle sain dans chaque tube est très élevée. Il y aura toujours une bande visible indiquant que les réactions de PCR se sont bien déroulées.

*Extrait DNA diagnosis of cystic fibrosis", Martin J Schwarz, 1998*



Exemple de résultats



## 5 Mode opératoire

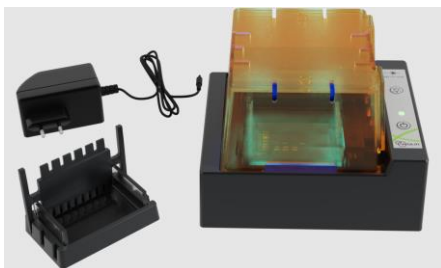
### 5.1 Préparation des solutions

#### ❖ 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.*

phorEasy



Dispositif électrophorèse  
Tout-en-un

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

- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,30 g d'agarose de type II 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.
- Laisser l'erlenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.

❖ **Préparation de l'ADN**

- Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance si nécessaire.
- 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.

## 5.2 Dépôt de l'ADN

À 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

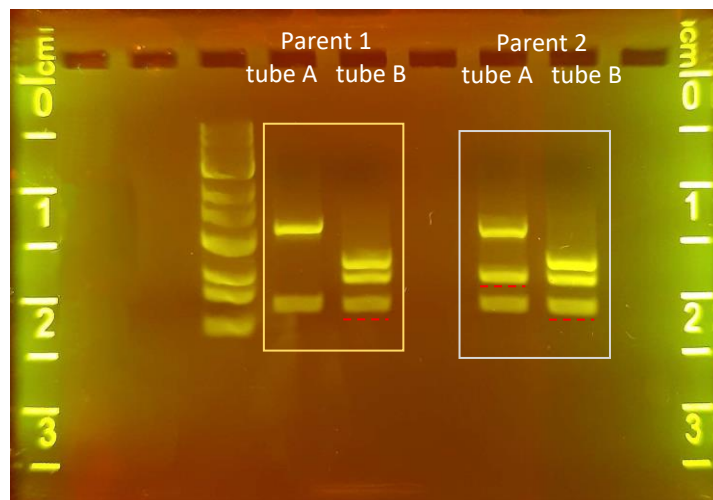
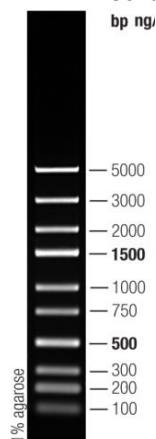
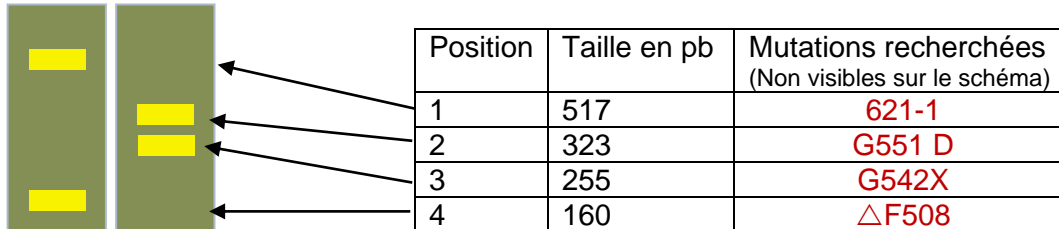


## 6 Résultats et exploitations

Résultat attendu pour un patient sain

Tube A    Tube B

Les fragments sont visibles sous-forme de bandes dont l'épaisseur et la distance de migration sont en fonction de leur masse en paires de bases.



On remarque que les 2 parents sont porteurs de mutations.-----

Parent 1 = On observe une amplification de l'allèle sain 621+1, G551D, G542X et DeltaF508 et une amplification de l'allèle muté DeltaF508. Le parent 1 est donc hétérozygote pour DeltaF508.

Parent 2 = On observe une amplification de l'allèle sain 621+1, G551D, G542X et DeltaF508 et une amplification de l'allèle muté DeltaF508 et G542X. Le parent 2 est donc hétérozygote pour DeltaF508 et G542X

**Le risque de transmission de la maladie à leur enfant est donc très élevé, le recours au diagnostic prénatal ou pré-implantatoire sera fortement recommandé.**

## 7 Bibliographie

DNA diagnosis of cystic fibrosis", Martin J Schwarz, 1998, Ann Clin Biochem, 35: 584-610

BONNES PRATIQUES DES ETUDES DU GENE CFTR Page : 1/33

Référence : ANPGM\_ 074\_3 Numéro de version : 4.0

[ANPGM : Association Nationale Des Praticiens De Génétique Moléculaire]

The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis

K. De Boeck, A. Zolin, H. Cuppens, H.V. Olesen, L. Viviani

Journal of Cystic Fibrosis, volume 13, issue 4, P403-409, July 01, 2014

Unexpected findings in the broadly used Elucigene CF-EU2 CFTR genotyping assay

A.Holubová, M. Libík, L. Dvořáková, J. Paděrová, N. Ptáková, M. Macek Jr.  
Journal of Cystic Fibrosis, volume 14, S31, June 01, 2015

## 8 Assistance Technique

Pour tous renseignements, 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*