

Techniques d'Analyses de Biologie Moléculaire

Dr. ZIADA-BOUCHAAR H.
MI Génétique moléculaire

Université des frères Mentouri
Constantine

2019-2020

Test RER ou MSI

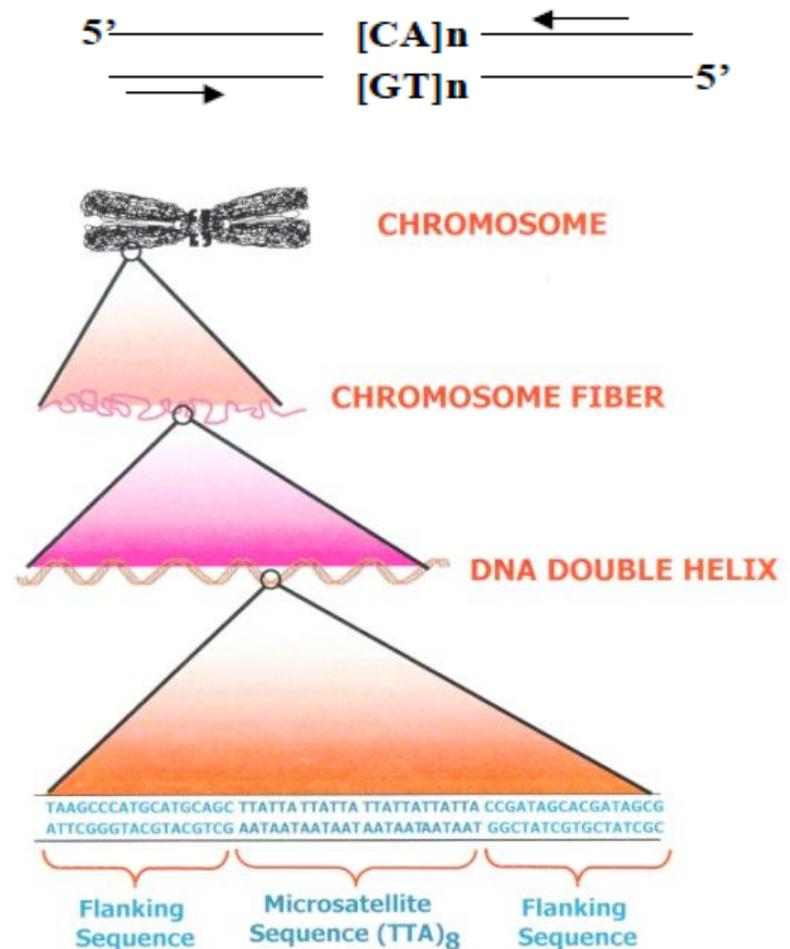
Les microsatellites

- sont des petites séquences d'ADN, non codantes, réparties aléatoirement dans le génome. Elles sont souvent caractérisées par des répétitions de binucléotide. : (CA)/(GT)
- sont les témoins privilégiés d'un dysfonctionnement cellulaire au cours de la réplication.

Microsatellites

Polymorphisme de taille

- Fréquent 100 000 (CA)_n
- Multiallélique



Les microsatellites

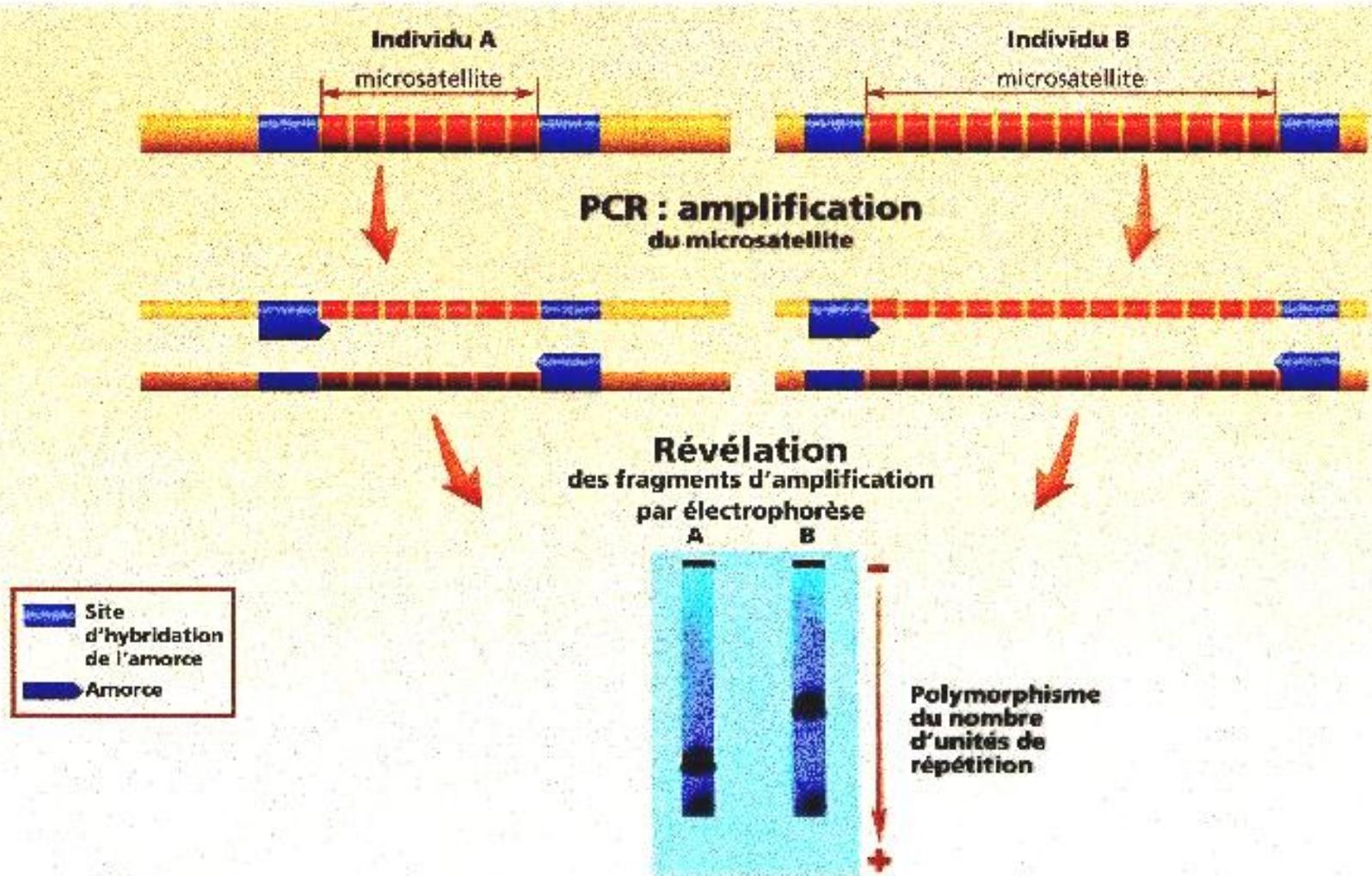
- Les microsatellites introniques sont le siège du polymorphisme génétique :

il existe un allèle maternel et un allèle paternel, qui peuvent être de taille différente.

Ce polymorphisme des allèles microsatellitaires est d'ailleurs à la base de "l'empreinte génétique" qui caractérise chaque individu et qui est utilisée en médecine légale.

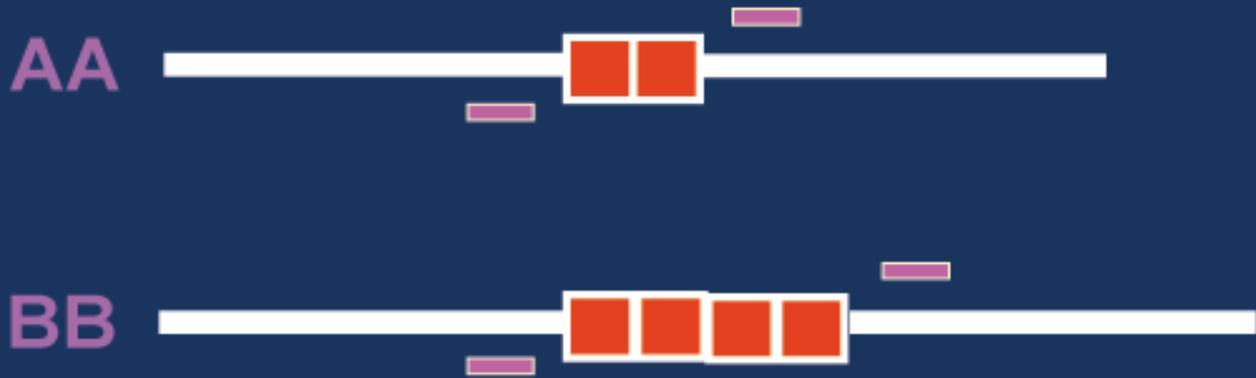
C'est également ce polymorphisme qui impose de bien comparer l'ADN tumoral à l'ADN du tissu sain .

Les marqueurs microsatellites

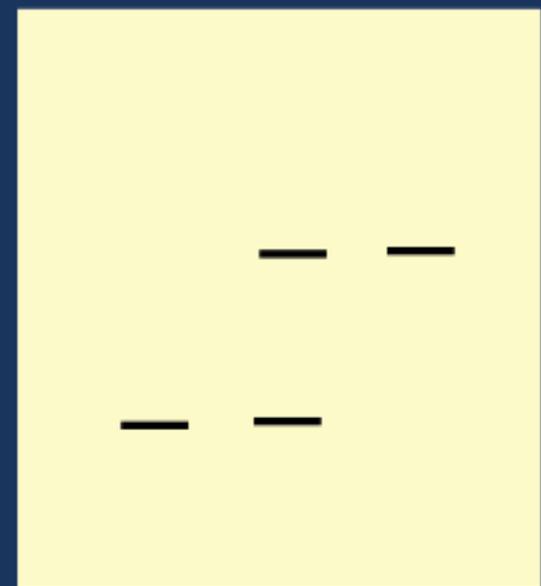


Marqueur = paire d'amorces spécifiques bordant le microsatellite

VNTR/SSR(STR)



AA AB BB



Systeme MMR et réparation de l'ADN

- En effet, au cours de la réplication de l'ADN, se glissent fréquemment des erreurs d'appariement des bases induisant des erreurs de séquence au sein de l'ADN répliqué.
- Lors du processus normal, ces erreurs sont corrigées, en cours de réplication, par un ensemble coordonné de protéines : les protéines du système MMR (pour Mismatch Repair). Cette correction assure ainsi la préservation de la séquence de l'ADN qui sera transmis aux cellules filles

Systeme de réparation de mésappariement d'ADN:

Définition:

- La réparation MMR (Mismatch Repair) est le système de réparation des mésappariements.
- Le système reconnaît les mésappariements de simples bases, jusqu'à 4 nucléotides ou plus.
- Il est essentiel pour maintenir l'intégrité de l'information génétique contenue dans le génome au cours des multiples divisions cellulaires.

○ Rôle:

- Il permet la réparation d'erreurs de la réplication, de façon orientée.
- En effet, l'ADN du brin parental est méthylé sur les Cytosines. Cette méthylation se produit après la réplication sur le brin néosynthétisé. Si la réparation intervient avant cette méthylation, le système reconnaît le brin non encore méthylé.

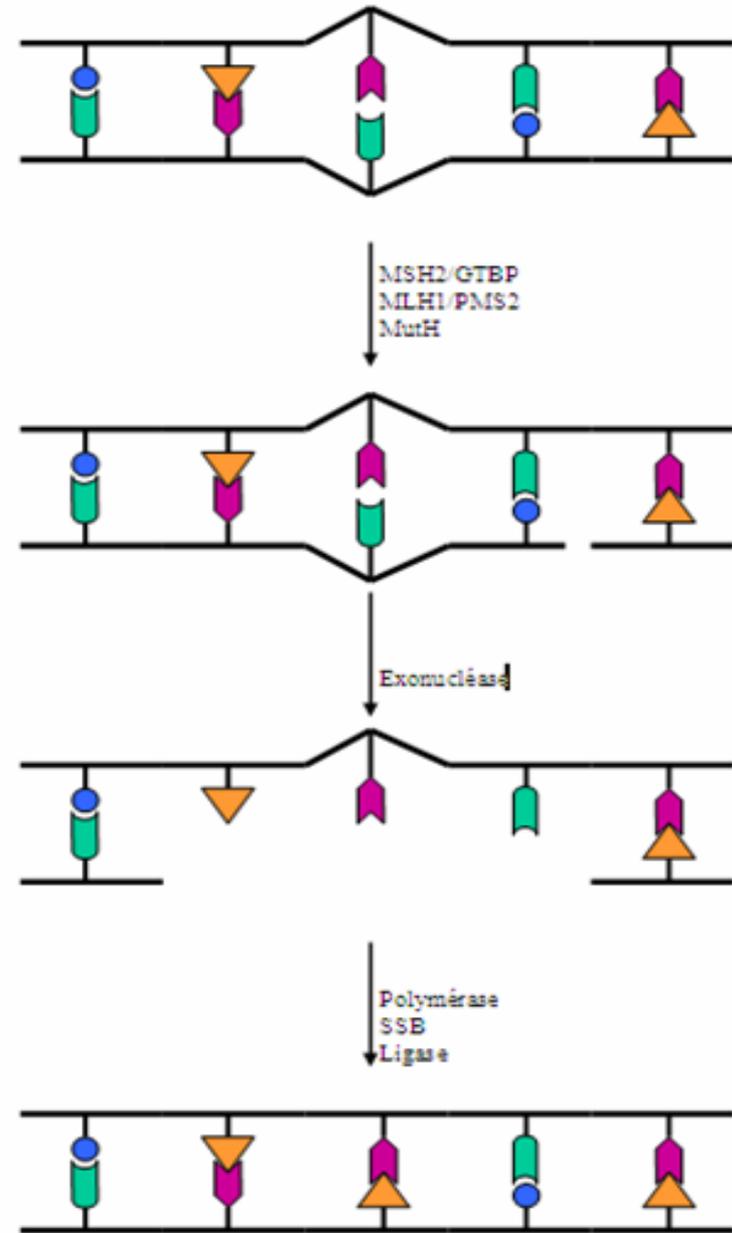
Principe:

Le dimère MSH2/GTBP reconnaît le mésappariement. Ceci est confirmé par association avec le dimère MLH1/PMS2.

MutH reconnaît le brin méthylé et entraîne une coupure en face du site de méthylation, sur le brin non encore méthylé.

Une exonucléase (l'exonucléase I ou l'hélicase II) prolonge la destruction du brin d'ADN, emportant la zone de mésappariement.

La resynthèse s'effectue par l'ADN polymérase III avec son cofacteur SSB, puis une ligase.



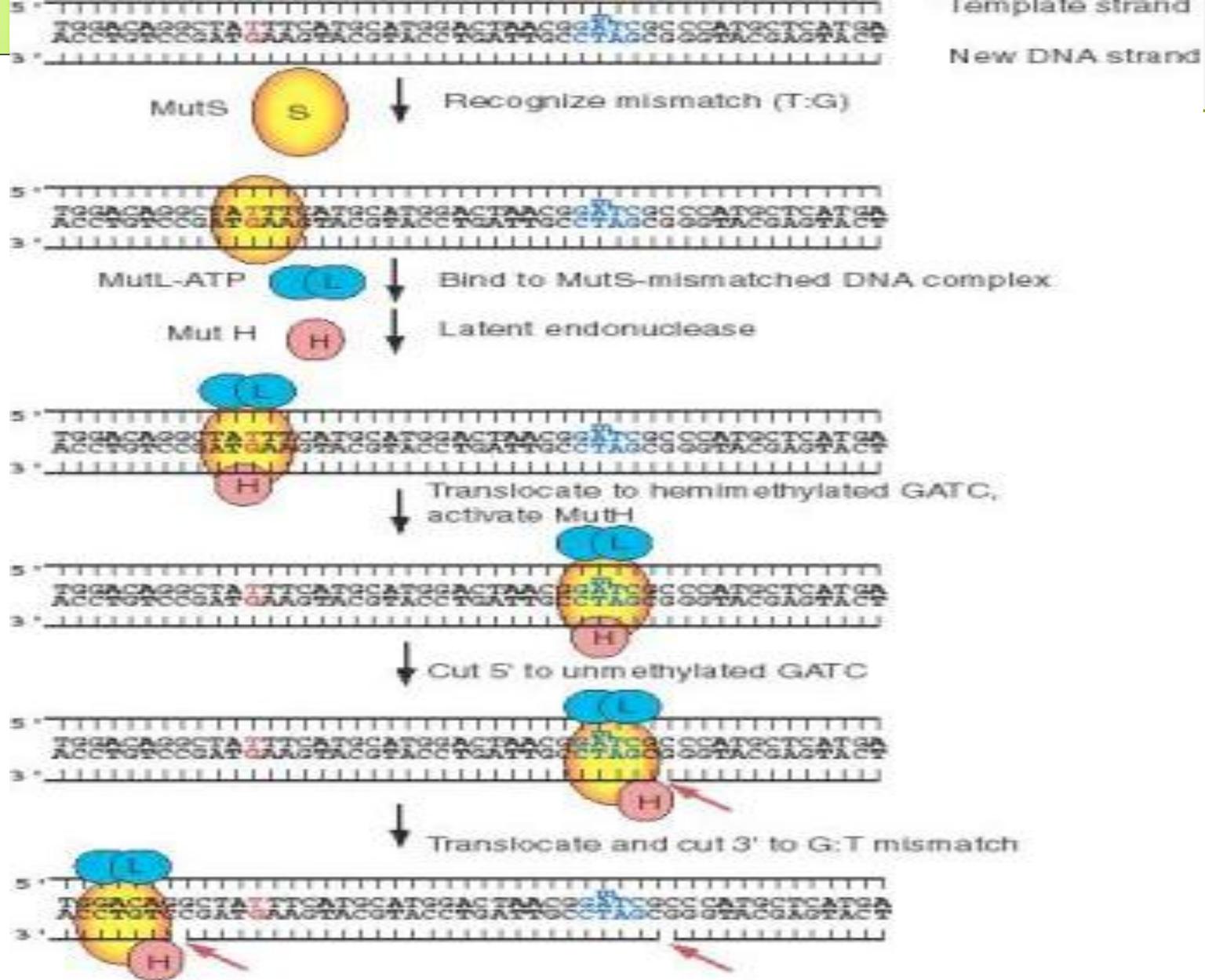
○ **Etapas:**

1-Chez les procaryotes : le système MutHLS:

Le processus de réparation des mésappariement de l'ADN chez *Escherichia coli* fait intervenir douze protéines, dont trois spécifiques.

Le système reconnaît efficacement les mésappariements depuis une simple base et jusqu'à 4 nucléotides:

- Reconnaissance du mésappariement par MutS
- Confirmation par recrutement de MutL
- Reconnaissance du brin méthylé par MthH, une endonucléase qui interagit avec MutL
- Coupure du brin non méthylé par MthH.
- Digestion du brin non-méthylé depuis la coupure jusqu'à la lésion par une exonucléase, après déroulement progressif du duplexe par une hélicase.
- Resynthèse par l'ADN polymérase III
- Suture du brin par l'ADN ligase .

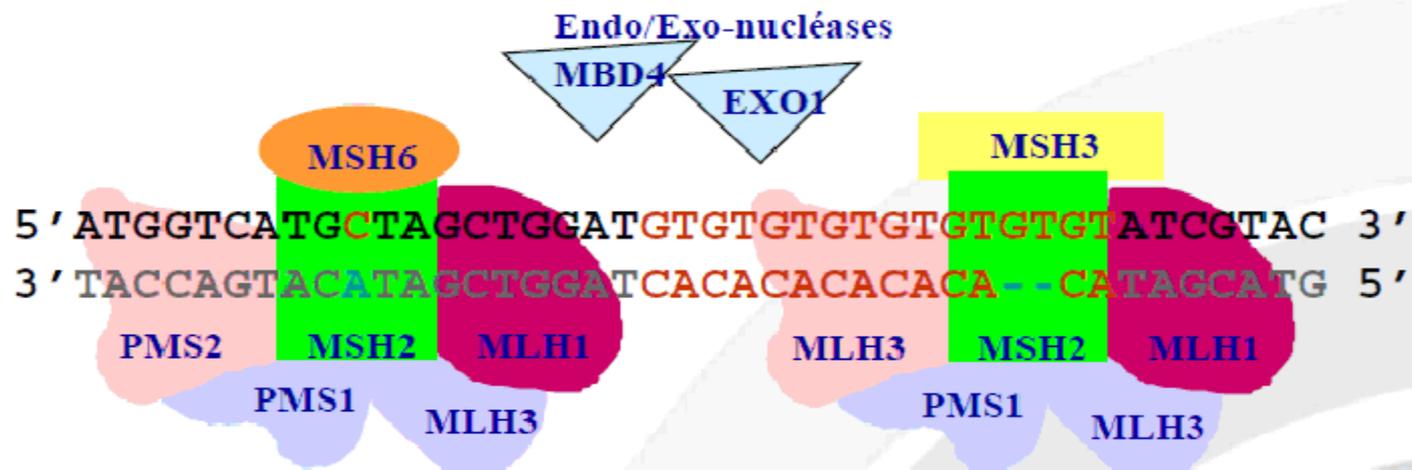
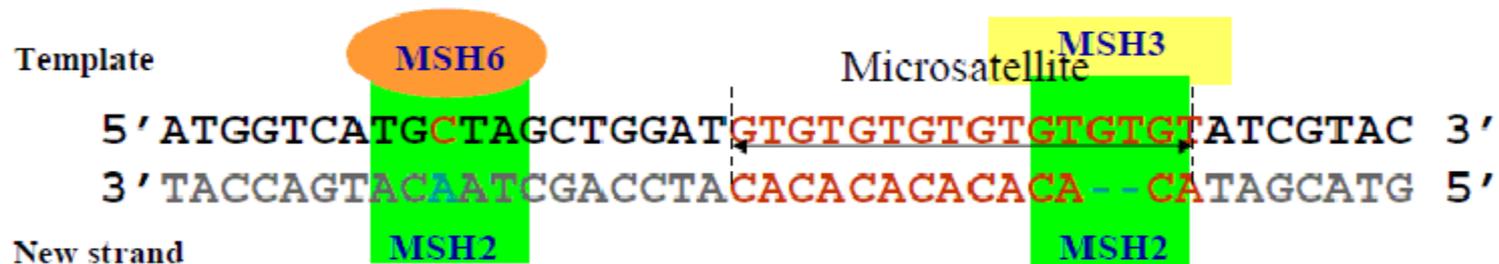


Le processus de réparation des mésappariement de l'ADN chez les procaryotes.

2-Chez l'eucaryote : cas de l'Homme

- Homologue humain de Mut S : MSH2 - MSH6
- Homologue humain de Mut L : MLH1 couplé à PMS1, PMS2 ou MLH3
- Aucun homologue de Mut H n'est connu à ce jour

Le système DNA mismatch repair (MMR)



L'erreur est ici un mésappariement de type G/T à corriger en G/C. Le processus démarre par la liaison du complexe hMSH2/hMSH6 qui recrute le dimère hMLH1/hPMS2. Ce complexe possède alors la capacité de se déplacer dans les deux directions sur la molécule d'ADN (flèche verte). Lorsqu'il rencontre une discontinuité sur un brin, par exemple un gap entre deux fragments d'okazaki, il se lie à l'anneau PCNA (cercle bleu) et recrute une exonucléase (EXO1, en rouge) initiant ainsi la dégradation du brin néo-synthétisé. Ce processus est ré- initié par des fixations secondaires de complexes hMSH2/hMSH6/hMLH1/hPMS2 au niveau du mésappariement. Des protéines de type RPA (losanges bleus) viennent stabiliser le simple brin. Une polymérase puis une ligase assurent la re-synthèse du brin et sa ligation. Adapté de Stojic et al, 2004 (Stojic, Brun, and Jiricny 2004).

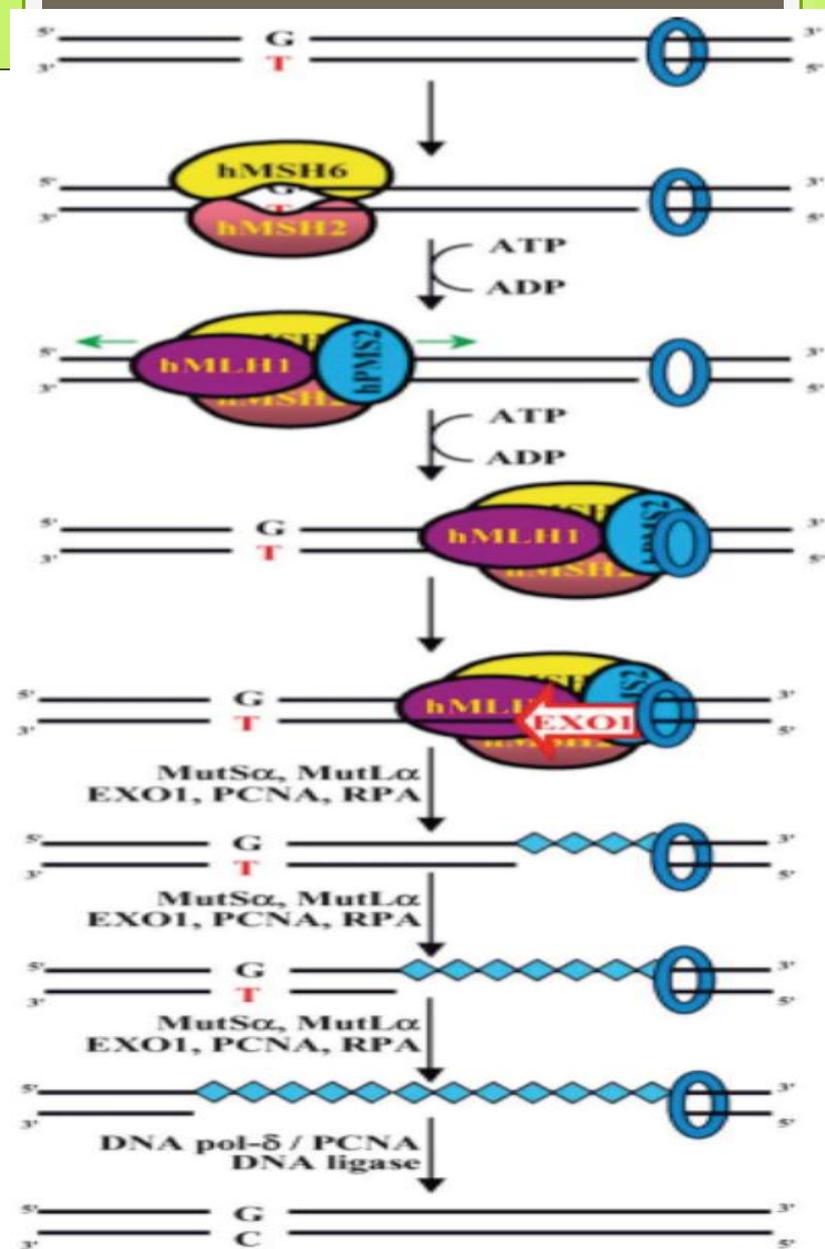


Figure 1.6 : Représentation schématique du système de correction des mésappariements post-répliatifs dans des cellules humaines.

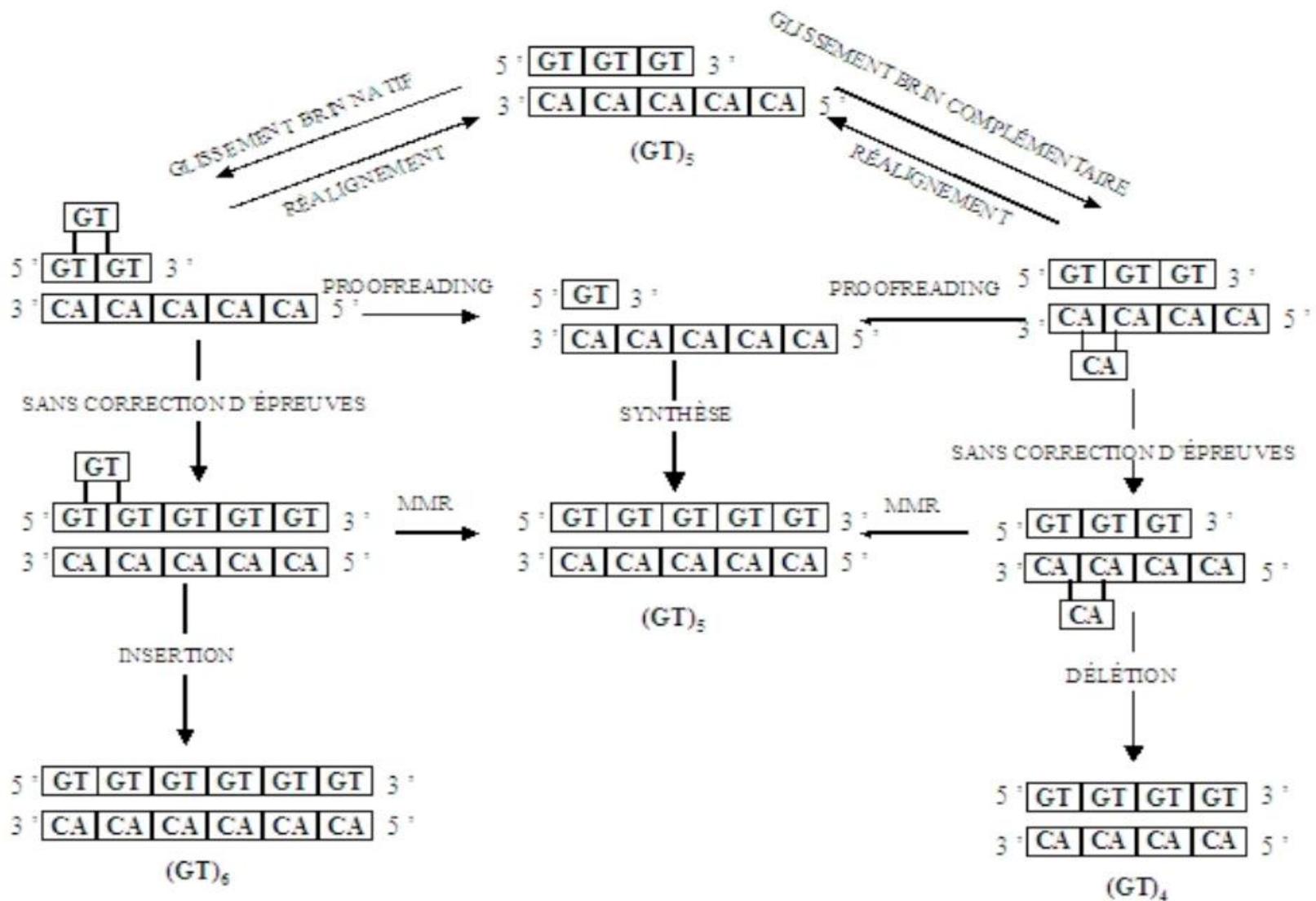


Figure 1.2: Schéma illustrant l'instabilité d'un microsatellite (GT)₅.

instabilité microsatellitaire

- présence un défaut du système de réparation de bases qui entraîne des non-réparations des erreurs de l'ADN polymérase se traduisant par un phénotype microsatellite instable (MSI).
- Ce phénotype MSI est observé dans le syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer) mais dans Environ 15 % des cancers colorectaux (CCR) sporadiques.
- Cela est dû à une altération du système *Mismatch Repair* (MMR). Les tumeurs ayant ce phénotype MSI sont déficientes pour le système MMR (dMMR) ;
- les autres tumeurs sont proficientes pour le système MMR (pMMR) et ont un phénotype microsatellite stable (MSS).

- Le syndrome HNPCC est une prédisposition héréditaire au cancer, liée dans environ 70% des cas à une altération constitutionnelle des gènes du système MMR (MLH1, MSH2, MSH6).
- Les patients atteints d'un syndrome HNPCC ont un risque élevé de développer des cancers colorectaux, de l'endometre, de l'intestin grêle et de l'urothélium (spectre tumoral étroit) et un risque faible de cancers de l'ovaire, de l'estomac et des voies biliaires (spectre tumoral large).
- Ces formes héréditaires représentent environ 5% des cancers colo-rectaux.

Réalisation du test RER

- Le test *REplication Error* (RER) permet de mettre en évidence ces phénotypes (MSI ou MSS) en comparant les microsatellites de l'ADN tumoral (présents dans les cellules cancéreuses) aux microsatellites présents dans l'ADN des cellules normales.

- Le principe du test repose sur la comparaison des microsatellites de l'ADN de la tumeur avec ceux du tissu sain.
- Ces microsatellites correspondent à des séquences répétées d'acides nucléiques (sous forme de mono- ou de dinucléotides), peuvent être codants (exoniques) ou non codants (introniques) et sont localisés préférentiellement dans les régions microsatellitaires des chromosomes (d'où leur nom). Ces séquences répétées représentent des zones difficiles à répliquer par l'ADN polymérase : cela explique que les microsatellites soient le siège préférentiel des erreurs de réplification de l'ADN.

Réalisation du test MSI

- En pratique, ce test est réalisé par analyse comparative du tissu tumoral et du tissu sain d'un patient :
- les zones correspondantes, préalablement sélectionnées par un pathologiste, sont grattées sur des lames blanches coupées à partir des blocs de tissus fixés et inclus en paraffine. Bien évidemment, ces 2 tissus sont recueillis dans 2 tubes différents . (car l'intérêt du test est de comparer les profils microsatellitaires du tissu sain par rapport au tissu tumoral).
- En l'absence de tissu sain présent dans l'échantillon à tester ,il est possible d'utiliser un ADN normal de référence..

- L'ADN des 2 tissus est ensuite extrait en utilisant un kit ou un automate. L'étape suivante consiste à amplifier les régions génomiques d'intérêt par PCR.
- Pour cela, on utilise un panel de référence comportant 7 marqueurs microsatellitaires monomorphes est utilisé (BAT25, BAT26, BAT40, NR21, NR22, NR24 et NR27), associé à un panel de 4 marqueurs microsatellitaires polymorphes

- associé à un panel de 4 marqueurs microsatellitaires polymorphes D2S123/AFM093xh3, D5S346/LNS, D17S250/MFd et TGF β RII).
- Après migration des produits d'amplification au moyen d'un séquenceur automatique, le profil (poids moléculaire) de chacun de ces microsatellites provenant du tissu sain est superposé à celui provenant du tissu tumoral.
- Dans le cas d'une instabilité microsatellitaire, il y a apparition de microsatellites de tailles différentes au niveau de la tumeur : le système de réparation des mésappariements de bases ne fonctionnant plus, une ou plusieurs bases sont "ajoutées" (insertions) ou "sous-traitées" (délétions) à la séquence d'ADN microsatellitaire.

- On parle alors d'instabilité d'un microsatellite si le tissu tumoral ne s'aligne pas sur le tissu sain pour ce marqueur microsatellitaire. Il est établi qu'il faut au moins 2 marqueurs microsatellitaires instables pour que la tumeur soit considérée comme de phénotype MSI (*figure 1*) ; la tumeur est alors dMMR. Dans le cas contraire (superposition parfaite des 2 profils), la tumeur a un phénotype MSS (*figure 2*) et est pMMR.

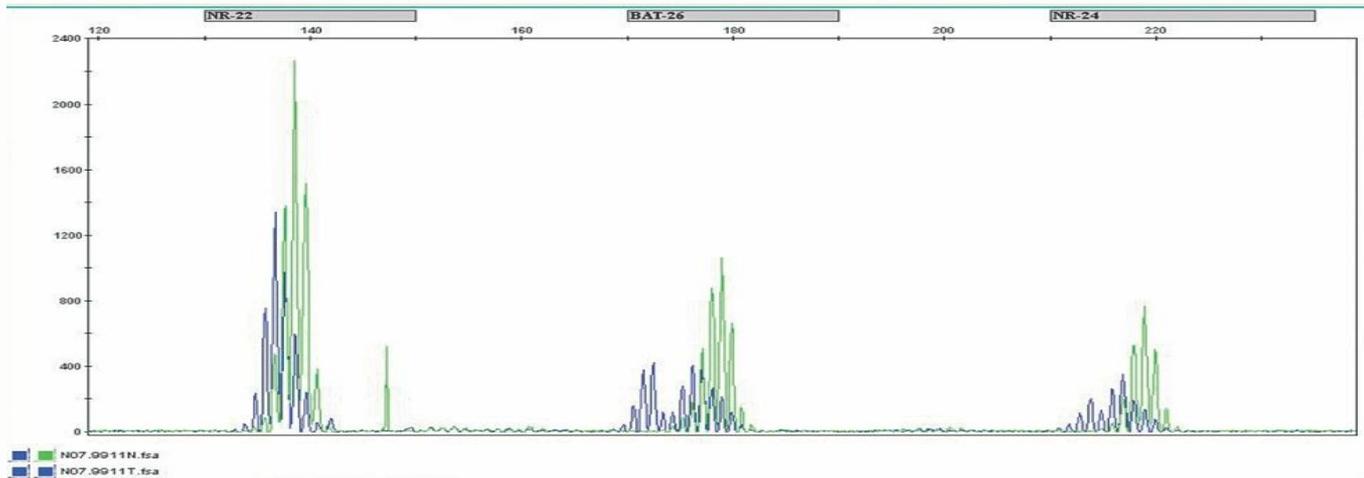


FIG 1: MSI

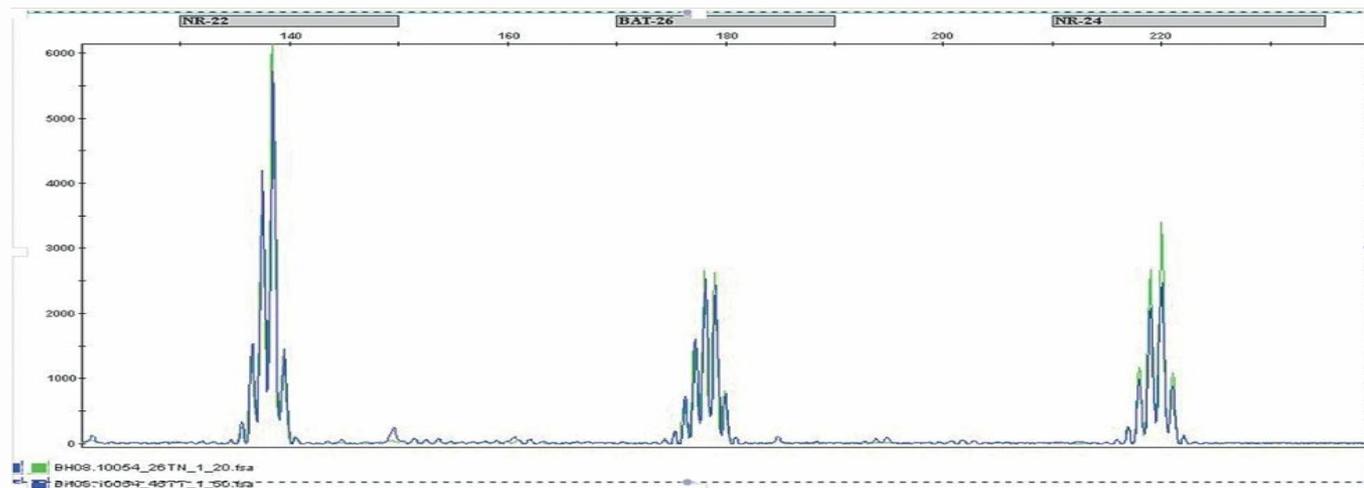


FIG 2: MSS