

# Techniques d'Analyses de Biologie Moléculaire

Dr. ZIADA-BOUCHAAR H.  
MI Génétique moléculaire

Université Frères Mentouri  
Constantine  
2019-2020

# Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA):

La MLPA permet la détection de remaniements génomiques de grande taille. Cette technique est utilisée pour la recherche de perte et/ou de duplication exonique (non visible lors du séquençage).

# Historique de la découverte

- En 2000, était décrit par White, la MAPH (*multiplex amplifiable probe hybridization*), technique de détection de la variation et de quantification du nombre de copies de plusieurs exons simultanément. (qté import. d'ADN 1 µg lourd. tech. )
- En 2002, Schouten décrit pour la première fois une nouvelle méthode simple et rapide de quantification génique en multiplex, la MLP A. Elle se révèle rapidement très supérieure à la MAPH par sa plus grande facilité d'utilisation
- Elle fut ensuite appliquée avec succès à l'analyse de multiples gènes pour lesquels les délétions ou les duplications sont fréquentes.

# Introduction MRC-Holland

- Créée en 1985
- Debut comme fournisseur de
  - enzymes de restriction
  - enzymes modifiant l'ADN.
  - marqueurs de poids moléculaires de l'ADN.
- Development innovatif de nouvelles techniques pour Recherches des acides nucléiques (TE-AFLP + MLPA)
  - la technologie de la MLPA depuis 2002
    - technique sensible pour quantification relative à plus de
- 50 different sequences acides nucleiques, reaction facile à utiliser et interpreter.
- La société MRC-Holland™
- commercialise depuis plusieurs kits dans de très nombreuses pathologies, et contribue à sa très large diffusion et son utilisation en routine par les laboratoires de diagnostic

# Principe de la MLPA

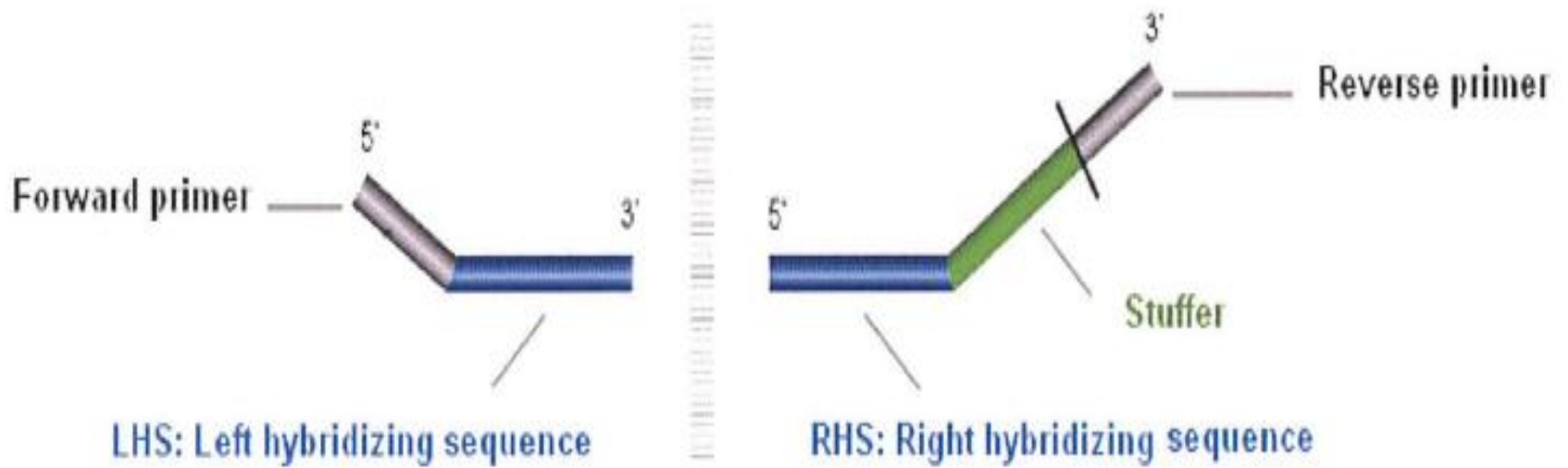
- est basé sur une réaction de ligation de **2 oligonucléotides adjacents**, formant **une sonde** après leur hybridation à des séquences cibles spécifiques, ce qui permet d'obtenir pour chaque locus un fragment amplifié de taille différente et de les quantifier par électrophorèse sur un séquenceur.
- Chaque fragment peut alors être visualisé sous forme d'un pic qui selon son amplitude par rapport au témoin, permet la détection du nombre de copies au niveau de ce locus.

# Composition de la sonde

- Chaque sonde est ainsi composée de deux oligonucléotides: un oligonucléotide synthétique court ou LPO (left probe oligo), composé d'une séquence spécifique de la cible à son extrémité 3' ou LHS (left hybridizing sequence) et une séquence commune à l'une des deux amorces (primers) universelles de PCR en position 5'.
- un oligonucléotide long ou RPO (right probe oligo) obtenu après clonage dans un vecteur (le phage M13 par exemple), composé de trois séquences distinctes : une séquence spécifique de la cible à son extrémité 5' ou RHS (right hybridizing sequence), une séquence commune à l'une des amorces de PCR à son extrémité 3' et entre les deux précédentes une séquence non spécifique de taille variable appelée « stuffer », qui sert à différencier les amplifiats en fonction de leur taille.

LPO : Left probe oligonucleotide

RPO : Right probe oligonucleotide



**Schéma et nomenclature conventionnelle  
d'une sonde MLPA selon Schouten 2002.**

# Composition du kit SALSA MLPA

- Kit de réaction :SALSA MLPA (100 reactions)
  - SALSA MLPA buffer (Yellow cap)
  - Ligase-65 (Green cap)
  - Ligase-65 Buffer A (Transparent cap)
  - Ligase-65 Buffer B (White cap)
  - SALSA PCR Primer mix (Brown cap); mix of two PCR primers + dNTPs
  - SALSA Polymerase (Orange cap)

SALSA MLPA probemix

- SALSA MLPA Probemix (Black cap) is available in 25, 50 and 100 reactions



# La MLPA comporte 4 étapes

- **Hybridation**

Après **dénaturation**, une dilution d'ADN (généralement à 50 ng/ $\mu$ l), est mis en contact avec un Mix de sondes (amorces de ligation) pour **une hybridation passive** pendant 16 heures (une nuit) à 60°C.

- **Ligation**

ligation ne se réalisera que si les 2 « amorces de ligation » se sont hybridées de façon spécifique et conjointe. La ligase raccordera donc la partie 3' à la partie 5' phosphorylée .

- **PCR**

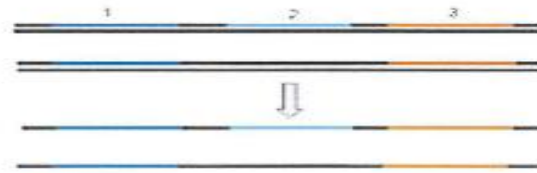
Après inactivation de la ligase par chauffage, on réalise une amplification des produits de ligation. L'amorce anti sens est marquée en 5' par un fluorophore, permettant par la suite la détection des amplifiats après séparation électrophorétique sur un automate de séquençage.

Durant le premier cycle de PCR, seul l'amorce Reverse s'hybride. Au moment du second cycle la deuxième amorce s'hybride également.

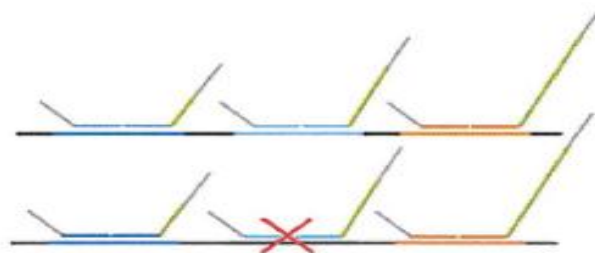
- **Etude de fragments**

Migration des produits d'amplification sur le séquenceur. Une étude de la perte et/ou délétion exonique est réalisée en comparant la hauteur des pics obtenue pour un patient avec celle des témoins normaux, grâce à l'utilisation d'un programme de calcul informatique.

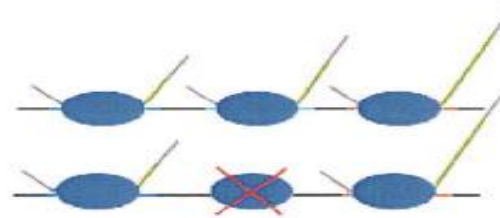
## 1. Dénaturation



## 2. Hybridation



## 3. Ligation



## 4. Amplification

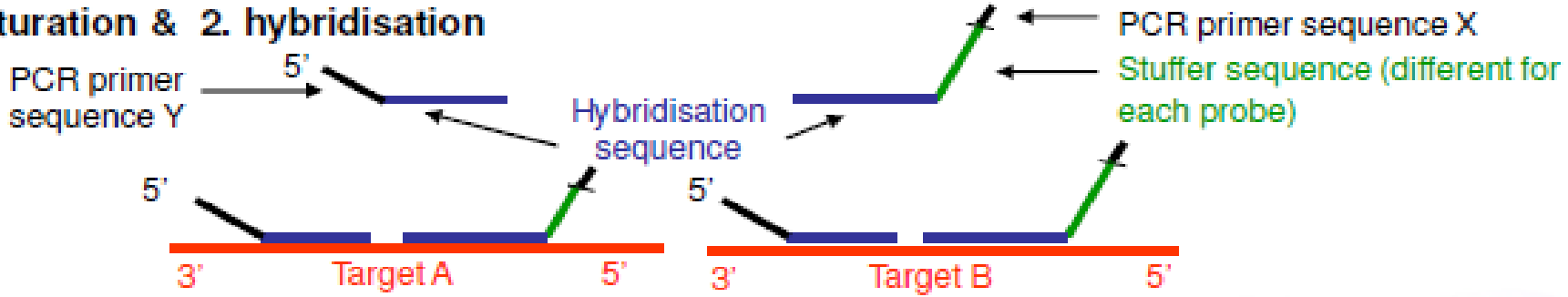


## 5. Séparation électrophorétique

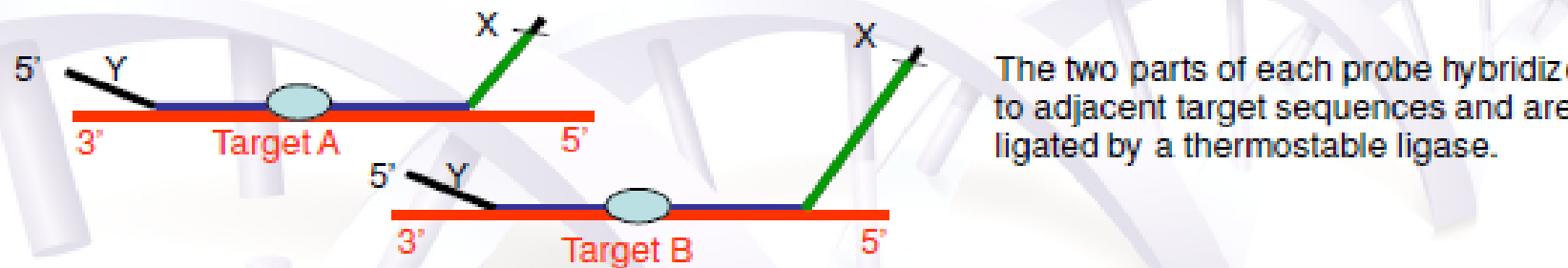


Principe général de la réaction de MLPA.

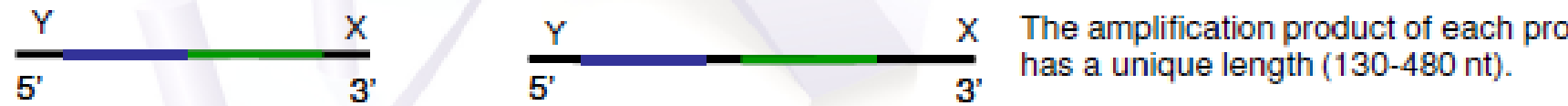
1. Denaturation & 2. hybridisation



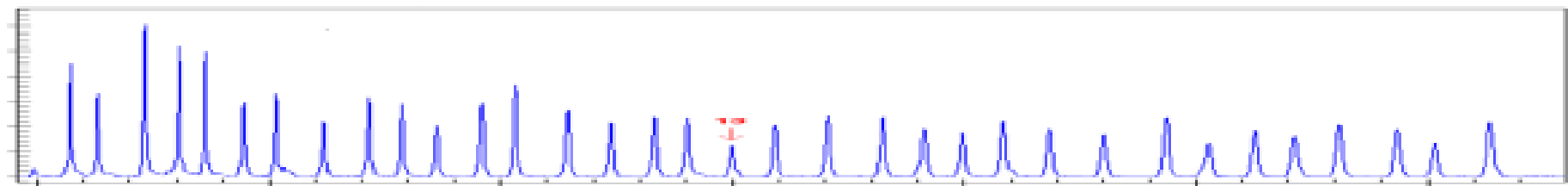
3. Ligation



4. PCR: All probe ligation products are amplified by PCR using only one primer pair.




5. Separation of amplification products by electrophoresis: Amplification products are separated by electrophoresis. Relative amounts of probe amplification products, as compared to a control DNA sample, reflect the relative copy number of target sequences.




# : étapes de la MLPA

séquence de l'amorce de PCR Y




séquence de l'amorce de PCR X



séquence d'hybridation



séquence Stuffer (différente taille pour chaque sonde)

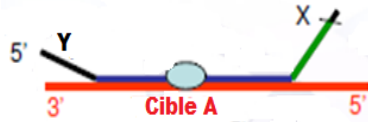


Hybridation après dénaturation



Les deux parties de chaque sonde s'hybrident à des séquences cibles adjacentes

Ligation



Les deux parties de sondes hybridées sont ligaturées par une ligase thermostable

PCR

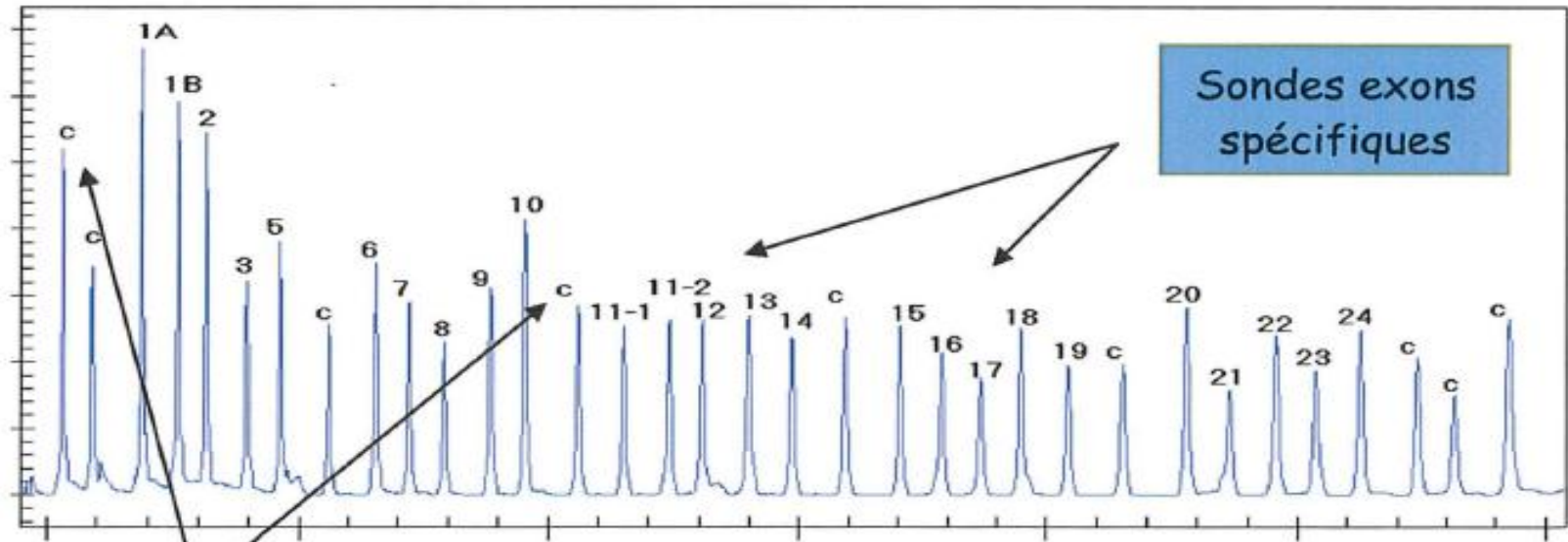
Tous les produits de ligation de sondes sont amplifiés par PCR en utilisant une seule paire d'amorces



Le produit d'amplification de chaque sonde a une longueur unique (130-480)

de fragments produits d'amplification sont séparés par électrophorèse. Des quantités relatives de produits d'amplification de sonde reflètent le nombre de copies de séquences cibles

# Les spectres obtenus ou électrophérogrammes sont représentés



Sondes  
contrôles

Exemple d'électrophérogramme de MLPA (gène *BRCA1*). Chaque pic représente une sonde exon spécifique. Les pics surmontés d'un (c) (contrôle) représentent les sondes contrôles utiles pour la normalisation.

Chaque pic correspond au signal émis par une sonde spécifique d'une région d'intérêt, par exemple un exon. Dans le spectre, on distingue les sondes dites contrôles (c) ou de références, spécifiques de régions réputées constantes dans le génome humain et qui permettront de normaliser les signaux obtenus en fin d'analyse.

# Réalisation pratique de la MLPA

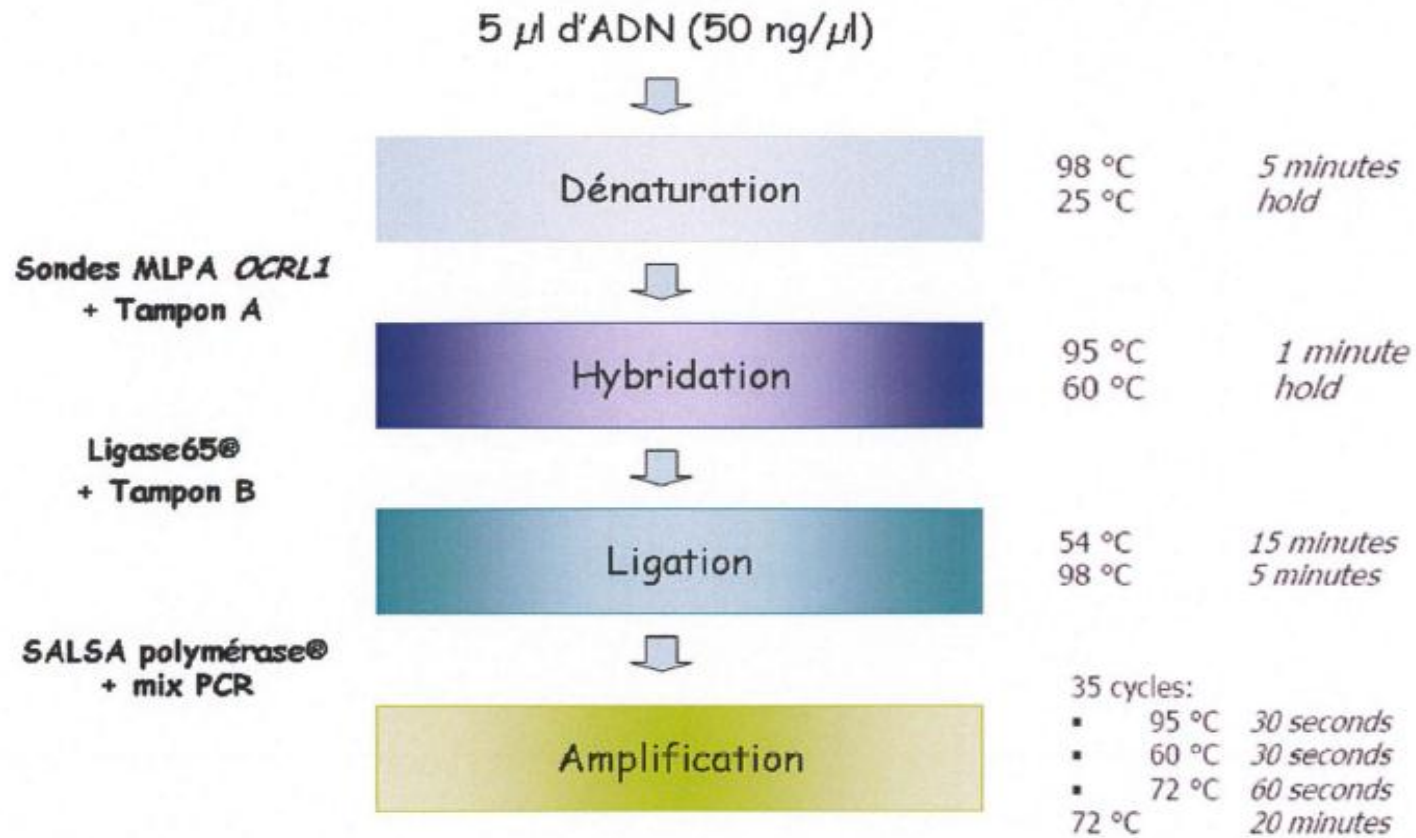


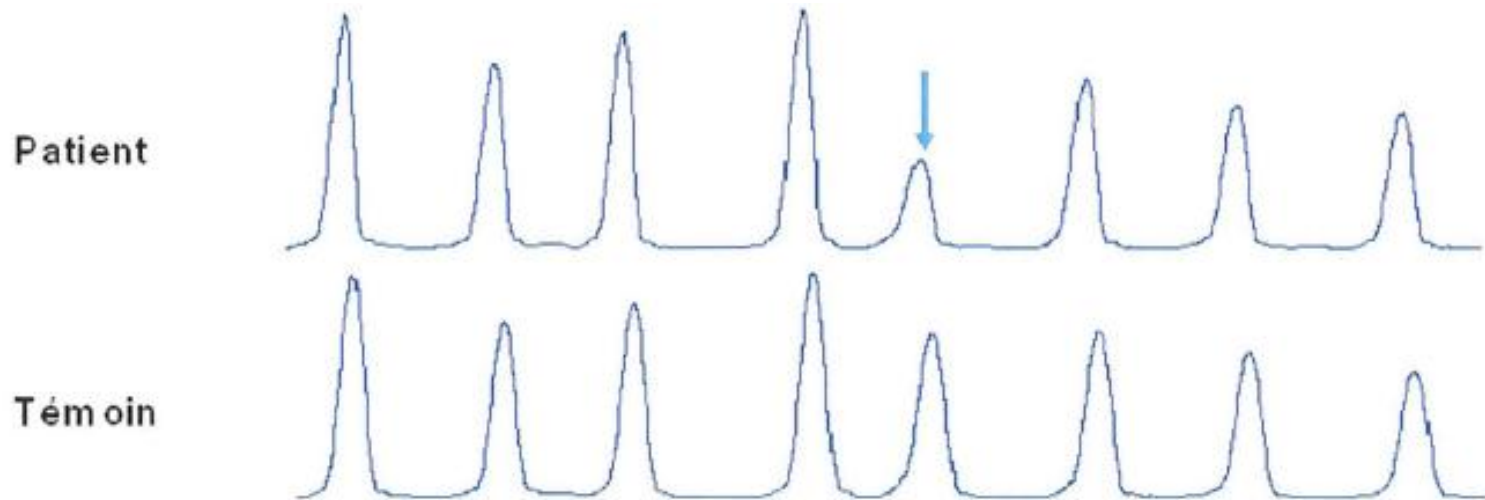
Schéma simplifié de la réaction de MLPA.

# Analyse des résultats

- Les résultats sont analysés par un logiciel dédié (exemple Genemapper<sup>®</sup>, Applied Biosystems, Foster City, CA). Ces outils bioinformatiques permettent de visualiser facilement les profils obtenus, d'identifier les pics et de calculer les aires ou les hauteurs des différents pics représentés.
- Ces données seront par la suite indispensables pour permettre une quantification «numérique» relative des différents signaux entre eux.
- il est possible de détecter les variations quantitatives. En effet, une différence relative de la hauteur ou surface d'un pic indique une variation du nombre de copie de la séquence cible

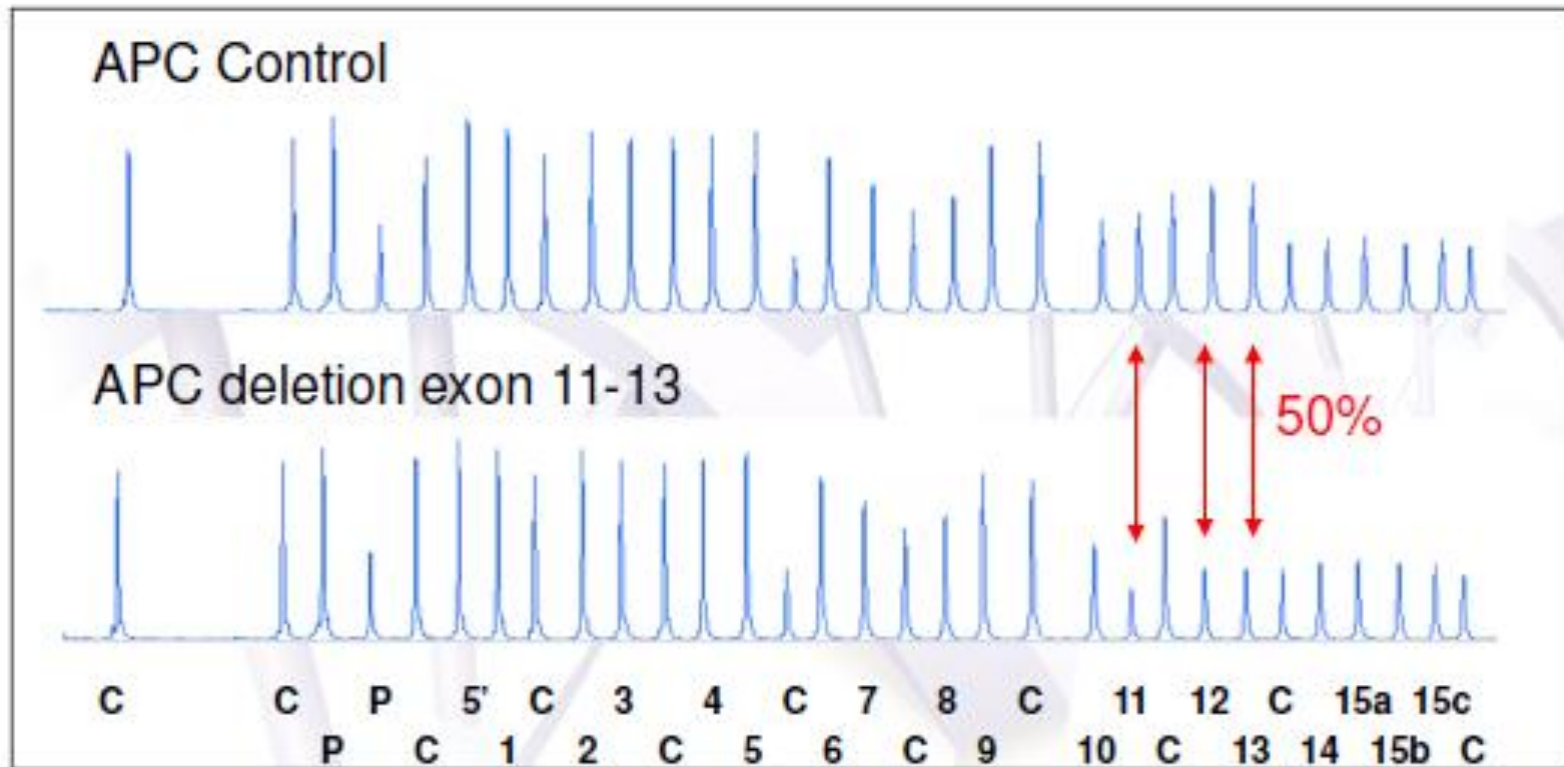


# Exemple 1



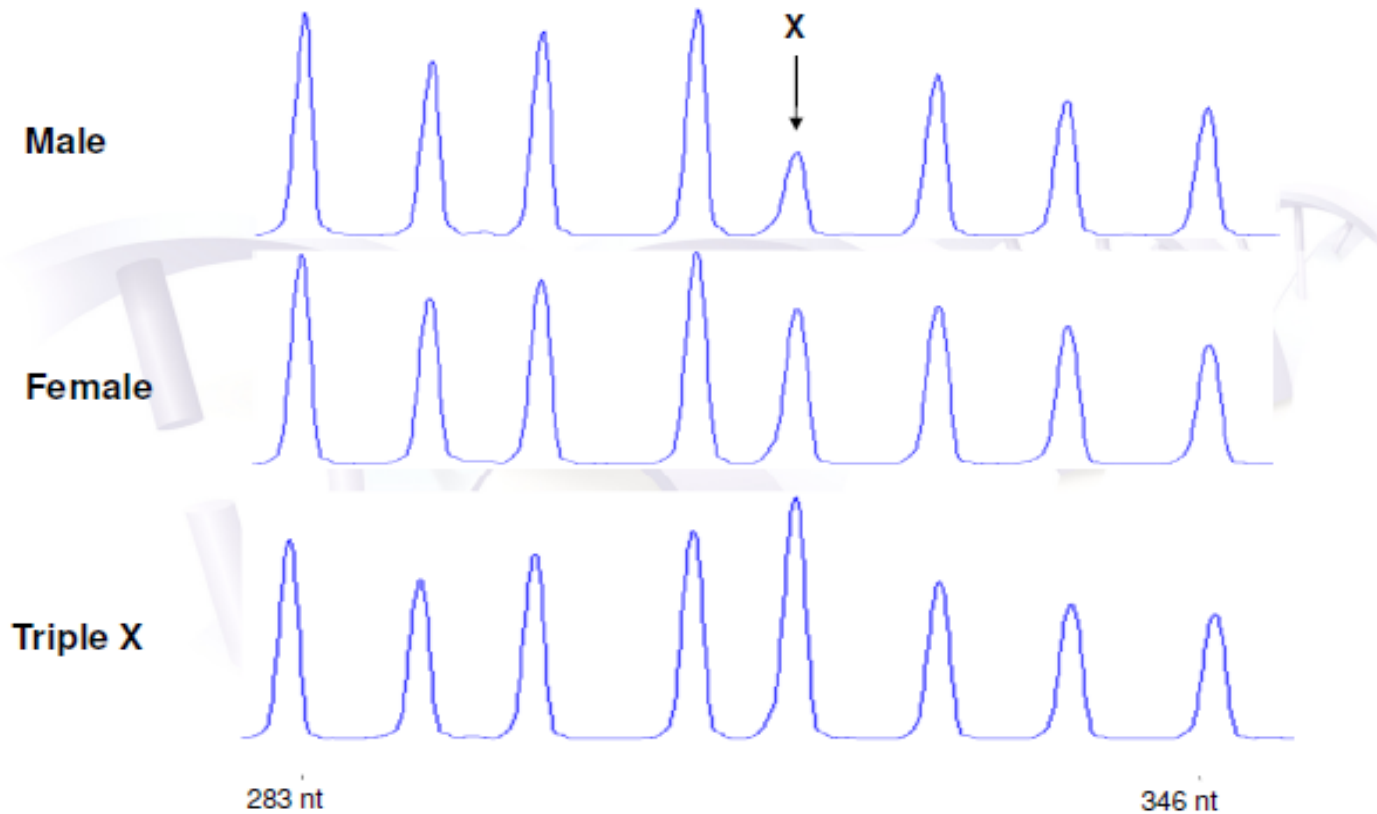
Profil MLPA obtenu chez un patient sain témoin et chez un patient avec une délétion (pic surmonté d'une flèche).

# Example 2



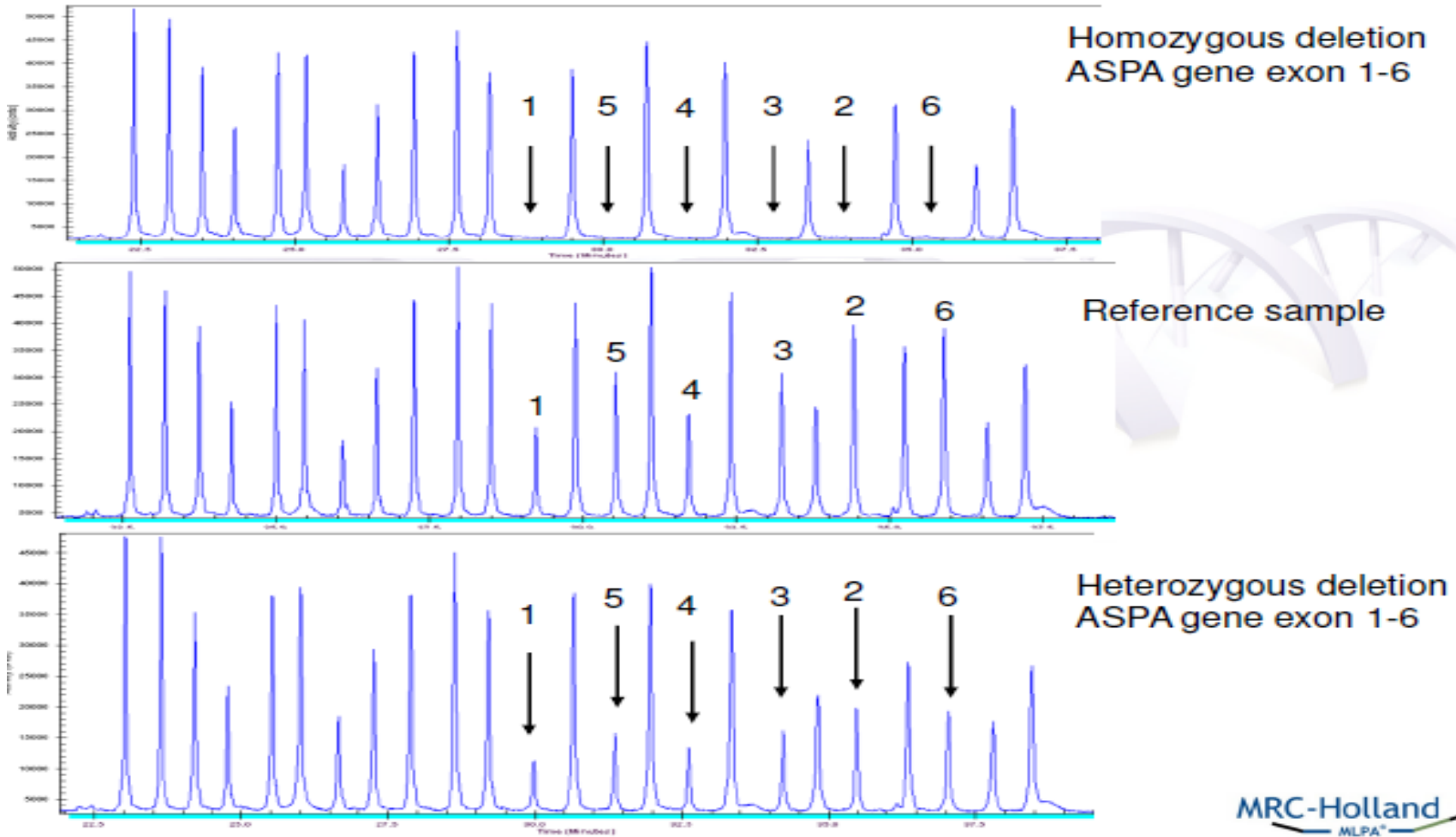
Differences reflecting the changes in the number of copies of sequences detected by the MLPA probes.

## Example 3



**Detection de nombre de copies du chromosome X : 1, 2 or 3 copies par cell**

# Example 4



deletion Homozygote & heterozygote du gene ASPA

# Instruments



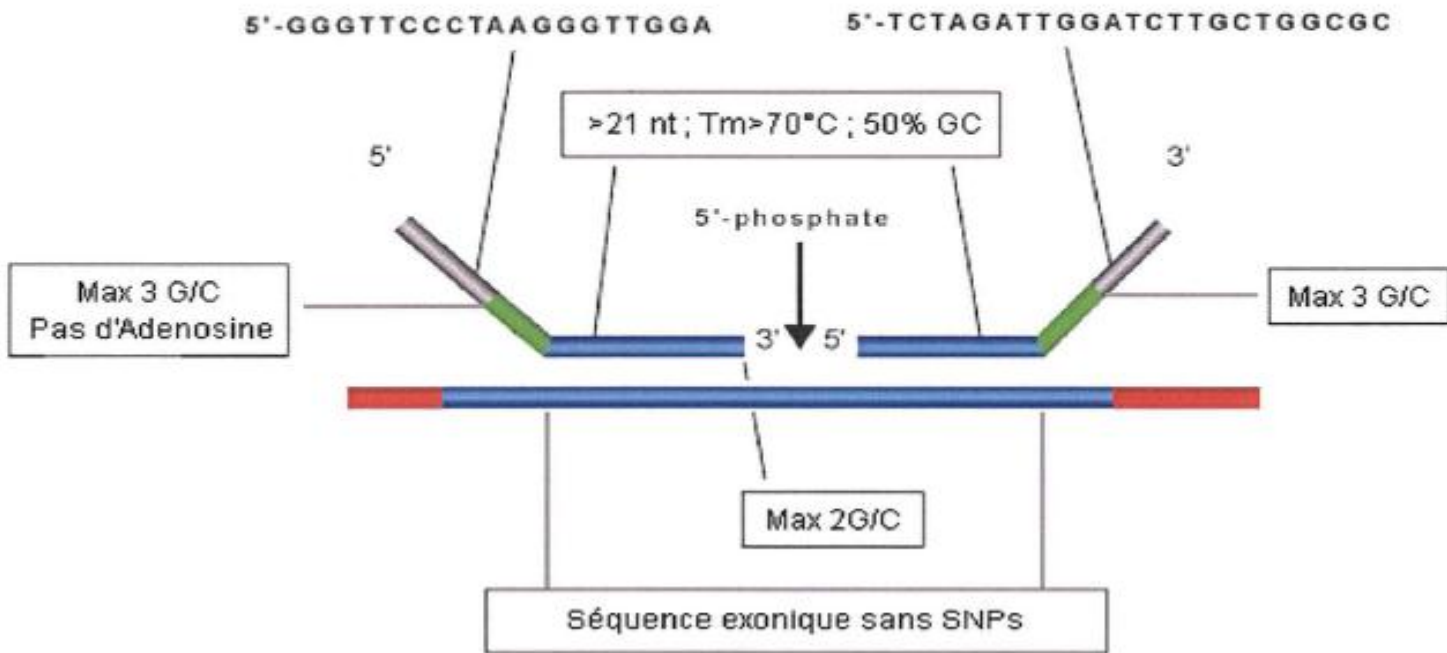
**Un thermocycler et un système électrophorèse de type séquenceur sont nécessaires pour une application MLPA.**

- **Les résultats sont obtenus dans 24 heures.**
- **Jusqu'à 96 échantillons peuvent être analysés en cours d'une seule réaction.**

# Variantes de la MLPA

- MLPA et sondes « entièrement synthétiques »

Longueur totale d'une sonde MLPA: 90-150 nt  
Longueur de chaque oligonucléotide: 45 - 75 nt  
Enthalpie libre de chaque oligonucléotide:  $\Delta G > 0$  kcal/mmol



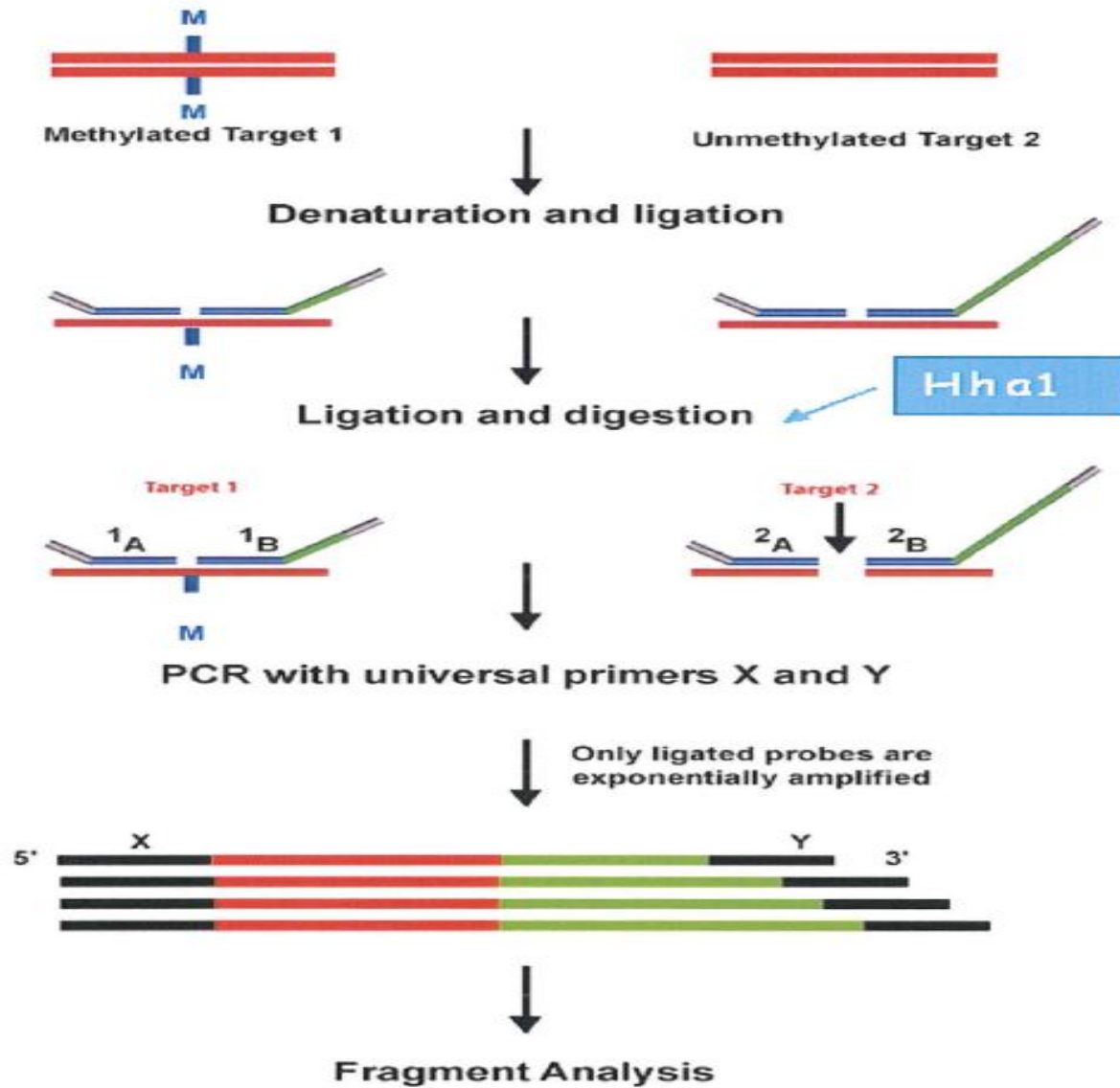
Représentation et caractéristiques principales des sondes MLPA « toutes synthétiques » selon Kozłowski et al. 2008.

# Variantes de la MLPA

- **Méthylation-specific MLPA (MS-MLPA):** La MLPA spécifique de méthylation.
- Principe: combine une réaction de ligation avec une sonde composée de deux oligonucléotides dont un possède un site de restriction pour une endonucléase spécifique, HhaI sensible à la méthylation. La ligation est suivie d'une étape de digestion des produits de ligation par HhaI. Seules les sondes hybridées sur des régions non méthylées seront digérées par l'action de l'endonucléase. Ainsi, seules les sondes hybridées sur des régions méthylées pourront être amplifiées et donneront un signal en fin de réaction.
- Il sera ensuite aisé de déterminer le statut de méthylation des régions étudiées.

- Cette technique est donc parfaitement appropriée pour détecter des méthylations aberrantes d'ilots CpG. Elle permet d'étudier ainsi les modifications épigénétiques impliquées dans certains cancers mais aussi l'empreinte génomique, processus de régulation de l'expression des gènes selon leur origine parentale, impliquée entre autres dans les syndromes de Prader-Willi / Angelman





# Variantes de la MLPA

- **Reverse transcription-MLPA (RT-MLPA)**
- permet de quantifier jusqu'à 45 transcrits différents
- Cette technique présente un avantage certain par rapport à des techniques comme la RT-PCR ou le Northern blot mais reste toutefois très inférieure en terme de débit par rapport aux puces de transcriptomique utilisées aujourd'hui en routine dans de multiples laboratoires.
- Ses principaux atouts sont sa rapidité (1-2 jours), la faible quantité d'ARNm total nécessaire (150 ng) et son coût.
- L'application de la MLPA à la quantification de l'ARNm implique quelques modifications

# Avantages de la MLPA

- La MLPA est aujourd'hui la technique de choix pour la quantification des petits réarrangements génomiques. En effet, elle offre de nombreux avantages :
- Une grande sensibilité et une grande capacité de multiplexage jusqu'à 45 loci).
- Une spécificité élevée car elle emploie deux oligonucléotides adjacents comme sonde.
- Une résolution supérieure à la FISH [Janssen et al. 2005].
- Une utilisation de faibles quantités d'ADN (20 ng suffisent) provenant de tissus différents (sang, liquides amniotiques, trophoblastes, tissus paraffinés).
- Une rapidité de résultats (24-48h), compatible avec une utilisation en routine.
- Un coût moindre que la FISH ou la CGH-array.

# Limites de la MLPA

- MLPA ne peut être appliquée sur une seule cellule. Au moins 3000 cellules sont nécessaires.
- MLPA ne peut être encore utilisée sur des échantillons amplifiés par les méthodes WGA (Whole Genome Amplification).
- MLPA est incapable de détecter les translocations équilibrées. La MLPA avec des probémixes spécifiques aux télomères peut être utilisée pour détecter les plus fréquentes translocations déséquilibrées.