

MATERIEL ET METHODES

I) Matériel utilisé :

Il s'agit d'étude prospective de 15 patients ayant un cancer colorectal issu de la tumeur primitive ou des métastases.(

II) Méthodes :

Il s'agit des prélèvements tissulaires obtenus par résections chirurgicales ou de biopsies qui ont été collectés du Service d'anatomie pathologique du CHU Hassan II de FES.

1) Biopsie :

Elle correspond au prélèvement d'un échantillon de tissus de l'organisme dans le but de réaliser un examen microscopique, et elle peut se faire de trois façons différentes suivant l'échantillon :

- ⌘ Prélèvement superfacique.
- ⌘ Prélèvement à l'aide d'une aiguille.
- ⌘ Prélèvement par aspiration avec une seringue-aiguille.

N.B : (Les foyers de nécrose ou d'hémorragie doivent ne pas être prélevés).

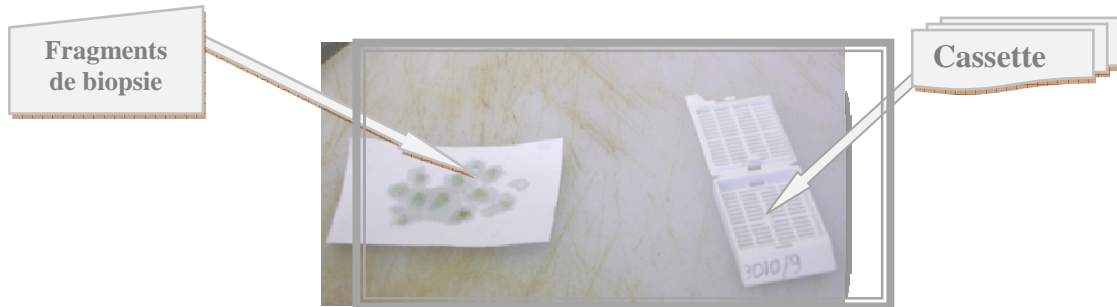


Figure 11 : Biopsie sous forme de plusieurs fragments

Une biopsie au niveau du côlon ou du rectum se fait pendant une coloscopie ou une rectoscopie, grâce à de petites pinces introduites dans l'endoscope.

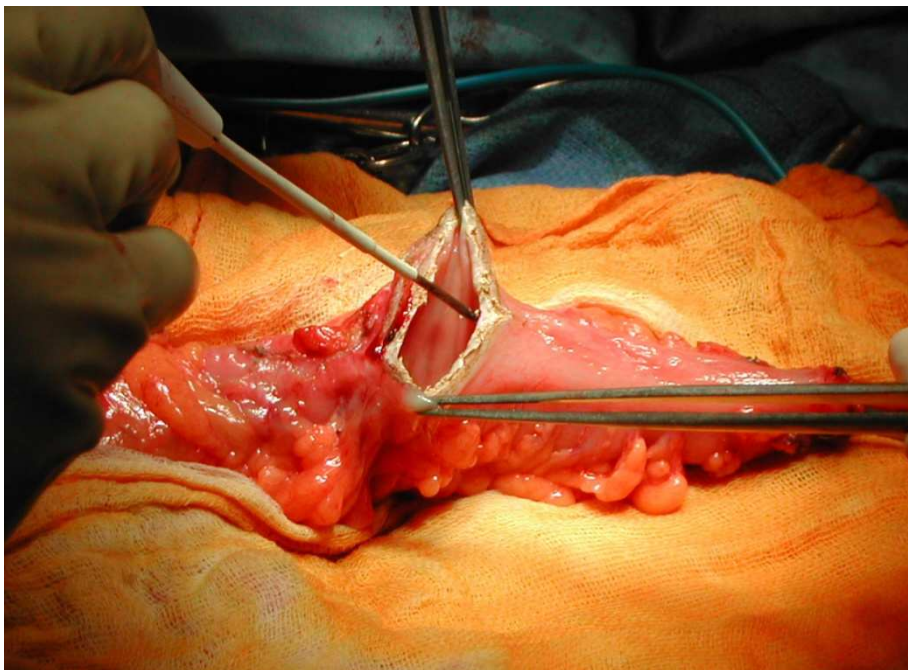


Figure 12 : Coloplastie

Tout ce qui est prélevé lors de la biopsie est ensuite envoyé rapidement dans un laboratoire d'anatomopathologie pour être analysé au microscope.

Les fragments sont placés dans une solution de fixation (formol 10%) dans un délai moins d'une heure, et avec une quantité suffisante d'au moins dix fois le volume de la pièce chirurgicale.

2) Examen histologique sur tissu fixé :

Les prélèvements destinés au laboratoire pour un examen histologique, passent par une série d'étape avant qu'ils soient lus et interprétés par le pathologiste responsable.

La technique est réalisée en cinq étapes, et il s'agit principalement de :

- La fixation.
- L'inclusion.
- La microtomie.
- La coloration.
- Le montage.

a) La fixation :

Elle constitue une technique de référence pour l'étude histologique des prélèvements humains destinés à un examen anatomopathologique ; étape essentielle dans la préparation tissulaire.

Son but est de s'opposer à l'autolyse tissulaire et à la putréfaction, garantir la conservation des structures et le durcissement des pièces, afin de garder le prélèvement dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

Le choix du fixateur dépend de la nature du sujet à couper, le laboratoire d'anatomopathologie utilise le formol 10% dont sa durée d'action et sa quantité sont proportionnelles à la taille du de la pièce.

Les prélèvements arrivent au laboratoire l'après midi, ils restent toute la nuit dans le fixateur, et ils sont analysés le lendemain par un anatomopathologiste qui se chargera de faire tout d'abord un examen macroscopique, au cours duquel il fait un descriptif détaillé de la biopsie ou de la pièce (taille mesurée dans les dans les 3 dimensions, couleur, forme, aspect à la coupe, ...etc.), et il peut même avoir recours à une balance afin d'apprécier d'éventuelles variations de poids des organes.

Selon cet examen macroscopique, le pathologiste incube les fragments dans des cassettes susceptibles de subir une inclusion dans la paraffine.

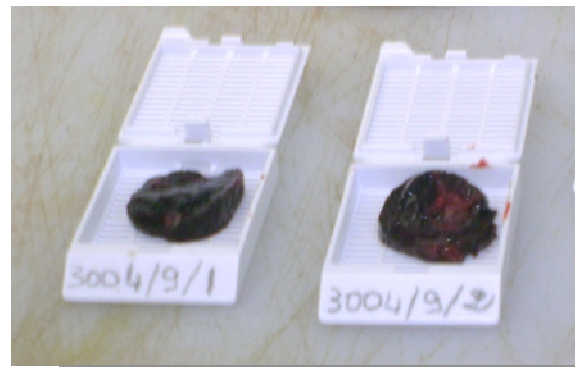


Figure 13 : inclusion des fragments dans les cassettes

b) L'inclusion :

Elle a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltrer. Les tissus acquièrent ainsi une consistance permettant d'obtenir des coupes minces au microtome.

La substance d'inclusion, généralement la paraffine, est une substance liquide à chaud, solide à température ambiante et insoluble dans l'eau et dans l'alcool.

Comme cette substance est hydrophobe (non miscible à l'eau), la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant son inclusion dans la paraffine. Mais vu qu'elle n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation ; on procède donc à une double substitution, c'est à dire qu'on remplace l'eau par de l'alcool (déshydratation) et on remplace l'alcool par le toluène (substitution).

Pour réaliser cette étape, on utilise un automate d'inclusion appelé histokinette qui peut se charger de toutes les phases conduisant à la mise à disposition d'un bloc de paraffine prêt à être microtomisé.



Figure 14 : Histokinette

L'étape qui consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires a reçu le nom de circulation :

2 bains de Formol 10% (30 min x 2) ⇒ 5 bains d'Alcool de degré croissant 75%, 80%, 90%, 95%, et absolu (1h x 3, 1h30 et 2h) ⇒ 3 bains de Toluène (1h, 1h30 et 2h) ⇒ 2 bains de Paraffine (2h et 3h)

- **Déshydratation par l'alcool :**

Consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient, tenant compte que l'agent déshydratant doit être miscible en même temps à l'eau et à la paraffine.

- **Eclaircissement par le toluène :**

C'est l'étape qui réalise le remplacement de l'alcool par un solvant de la paraffine, qui est destiné à chasser l'alcool par trois bains successifs de toluène.

Le toluène en remplaçant l'agent déshydratant, le tissu devient transparent d'où le nom d'éclaircissement.

- **Enrobage dans la paraffine :**

C'est l'étape terminale de la circulation, réalisée par passage du tissu dans la paraffine liquide.

L'inclusion ne se fera de façon satisfaisante que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool).

Ce bloc est plus facile à manipuler que le tissu seul, et il peut s'attacher à la pince porte-objet du microtome sans briser la pièce.

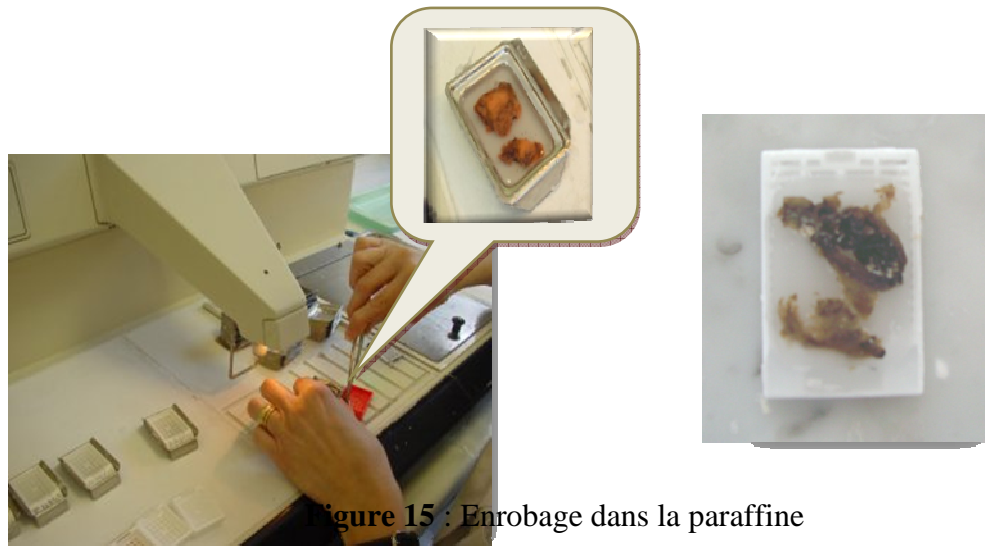


Figure 15 : Enrobage dans la paraffine

c) Réalisation des coupes ou microtomie :

Après montage du bloc dans le porte-bloc du microtome qui est construit de manière à produire de fine tranche de matière en opérant un mouvement vertical, et après réglage du rasoir de manière à dresser une face de coupe nette, ainsi qu'un réglage de l'épaisseur des coupes (3-5 μ) ; on procède à la réalisation des rubans.



Figure 16 : Microtomie

Ces coupes sont immergées dans des bains d'alcool, puis étalées en les dépliant sur la lame par flottation à la surface d'un bain chaud.

d) Coloration :

La coloration histologique est celle qui permet de différencier finement tous les éléments d'un tissu.

Elle consiste à accentuer les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation.

La coloration utilisée est de type H.E.S (hématoxyline-éosine safran). Elle a pour but de permettre la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules ainsi que des fibres de collagène. Dont l'hématoxyline colore le noyau en violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose, et le safran se charge de colorer les fibres de collagène en jaune.

Les lames doivent être préparées, afin de pouvoir recevoir les colorants.

• **Déparaffinage :**

Consiste à enlever la paraffine de la coupe tissulaire pour que les colorants (préparés en phase aqueuse), puissent pénétrer le tissu et le colorer.

Ce déparaffinage se réalise tout d'abord par la mise des lames dans l'étuve sous une température de 70° pendant une heure, puis les faire plonger dans le toluène.

• **Hydratation :**

Elle a pour objet de retirer le toluène du tissu et le remplacer par de l'eau. Le toluène et l'eau n'étant pas miscibles, on procède d'abord au remplacement du toluène par l'alcool, puis les coupes sont passées dans un bain d'eau courante, dont l'eau remplacera l'alcool du fait de leur miscibilité.

e) **Le montage :**

Opération consistant, une fois la coloration est terminée, à fixer à l'aide d'une substance appelée milieu de montage (composé de glycérol, de gélatine et de thymol), une lamelle de verre sur la coupe tissulaire.

Le montage permet une protection mécanique des coupes, ainsi qu'une protection chimique des colorants.

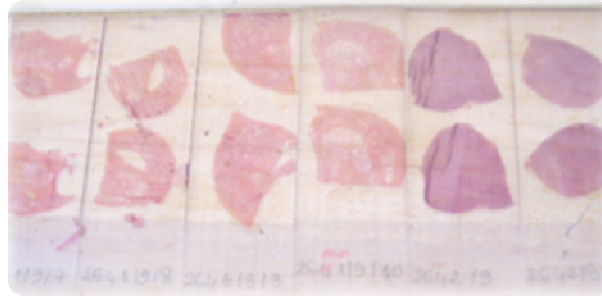


Figure 17 : Lames montées et colorées

La lame colorée est ensuite transmise au médecin anatomopathologiste de la plateforme pour identifier une zone contenant plus de 50% de cellules tumorales.

La zone d'intérêt est cerclée avec un marqueur et ensuite séparée du reste de l'échantillon par macro-dissection, afin de s'assurer d'une proportion de cellules tumorales supérieure à 50 % et de réduire ainsi la contamination par les cellules normales. S'il y a plus de 50% de cellules tumorales, le test est considéré comme fiable, dans le cas contraire, les cellules saines peuvent interférer et il y a un risque de conclure à un résultat faux négatif.

Les lames préparées sont ensuite étudiées par l'immunohistochimie.

3) Immunohistochimie :

Avant d'avoir recours aux outils moléculaires, la méthode d'immunohistochimie (IHC) permet d'étudier sur une coupe histologique l'expression tissulaire des protéines de réparation des mésappariements (MMR) de l'ADN, sur cellules colorectales tumorales ; à l'état normal, ces protéines sont exprimées dans le noyau de plusieurs cellules. Pendant la croissance tumorale, l'allèle sauvage est inactivé par mutation délétion ou méthylation, ce qui aboutit à une perte d'expression de la protéine dans les cellules tumorales. Ceci permet d'orienter le généticien dans le choix du test moléculaire à effectuer [103].

Des marqueurs spécifiques sont ainsi aujourd'hui connus pour divers cancers. Nous pouvons citer à titre d'exemples :

- L'antigène carcino-embryonnaire (CEA) ;
- Le CD15 et CD30 : utilisés pour la maladie de Hodgkin ;
- L'alpha-foetoprotéine : en cas de carcinome hépatocellulaire ;
- Le CD117 : en cas de tumeur stromale gastro-intestinale ;
- Le Ki-67 : un des indices de prolifération tumorale

➤ **Principe :**

Le principe du test d'IHC consiste à rechercher une perte de l'expression d'une ou plusieurs des protéines de réparation des mésappariements de l'ADN à savoir MSH6, MSH2, MLH1, PMS2, PMS1, MLH2 ; par rapport aux tissus normaux présents sur la coupe histologique.

Une immunoréaction est composée de trois éléments principaux :

1. La préparation (tissu, cellule, organite subcellulaire, virus...) contenant l'antigène à étudier
2. Un anticorps primaire dirigé contre l'antigène recherché ;
3. Le système révélateur qui permet de visualiser l'immunoréaction. (Figure 17).

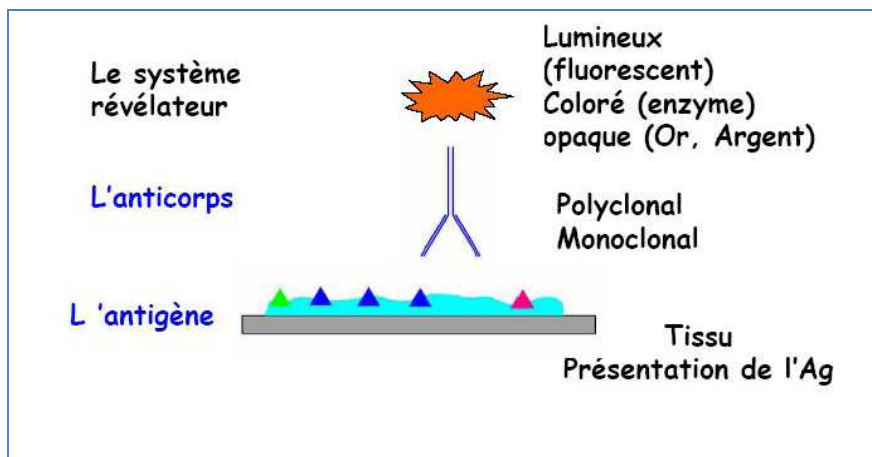


Figure 18 : Les différents composants d'une immunoréaction

Le système révélateur est composé d'un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire.

➤ **Protocole expérimental de l'immunohistochimie manuelle :**

-Préparation à la technique :

• **Déparaffinage**

Le déparaffinage consiste à enlever la paraffine fixée dans le tissu. Il s'effectue par passage à l'étuve (58°C) pendant 1 nuit, puis dans deux bains de toluène et d'alcool absolu pendant 7 min chacun. Ensuite par rinçage à l'eau courante puis à l'eau distillée.

• **Technique**

- Egoutter les lames
- Passage dans H₂O₂ à 0,4% (H₂O 30%) 10 min
- ✓ Plusieurs tissus contiennent des peroxydases endogènes qui peuvent donner des réactions non spécifiques donc on traite les tissus par H₂O₂ puis par rinçage en tampon PBS pendant 5 min
- Rinçage à l'eau courante puis à H₂O distillée 10 min
- Passage dans le tampon citrate bouillant (cocotte) 5 min

- ✓ Le démasquage antigénique permet aux anticorps d'accéder aux antigènes en coupant les liaisons covalentes et intramoléculaires entre les protéines, les glycoprotéines, les polysaccharides et les acides nucléiques.
- Rincer à l'eau distillée
- Rincer avec du PBS (1 bain) 5 min
- Egoutter les lames et entourer les fragments par le Pap-Pen
- Mettre le bloquant sur le fragment (lait écrémé 0,4%) 10 min
- Disposer les lames dans une chambre humide
- Enlever le surplus du bloquant en secouant
- Application de l'anticorps primaire 1h
- ✓ Laisser l'anticorps primaire anti MSH6 sur le fragment couvert pour qu'il ne sèche pas.
- Couvrir les lames pour qu'elles ne sèchent pas
- Egoutter un peu les lames et les mettre dans un panier
- Rinçage dans du PBS (3 bains) 5 min chacun
- Application de l'anticorps secondaire (1 goutte) 15 min
- Couvrir les lames pour qu'elles ne sèchent pas
- Rinçage dans du PBS (3 bains) 5 min chacun
- Application de la peroxydase (1 goutte) 15 min
- Rinçage dans du PBS (3 bains) 5 min chacun
- Egoutter les lames
- Application sur chaque lame du substrat chromogène fraîchement préparé (2 gouttes + 5 ml d'AEC) 4-15 min
- ✓ Pour la révélation du complexe Ag-Ac primaire on utilise une technique basée sur l'utilisation de Streptavidine-Biotine.
- Rinçage à l'eau courante 10 min
- Egoutter les lames
- Application de l'hématoxyline 3 min
- Rinçage à l'eau de robinet
- Rinçage à l'eau distillée
- Montage à l'eau

Etude moléculaire :

4)Extraction d'ADN à partir de tissus tumoraux

➤ **But :**

Extraction d'ADN à partir de tissus FFPE (formaldehyd/paraformaldehyd fixed/parafin-embedded tissues) : ADN et ARN

➤ **Kit utilisé :**

RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit. (Voir ANNEXE 1)

➤ **Principe general de fonctionnement:**

Les échantillons inclus en paraffine sont incubés dans le xylène à température élevée afin d'enlever la paraffine des tissus, ensuite lavés dans des solutions d'alcool pour enlever les traces de xylène. Les échantillons ainsi déparaffinés sont sujets à une étape de digestion des protéines liées à l'ADN et l'ARN par l'action d'une protéase. Enfin les acides nucléiques sont purifiés par capture sur un filtre puis lavage et élution.

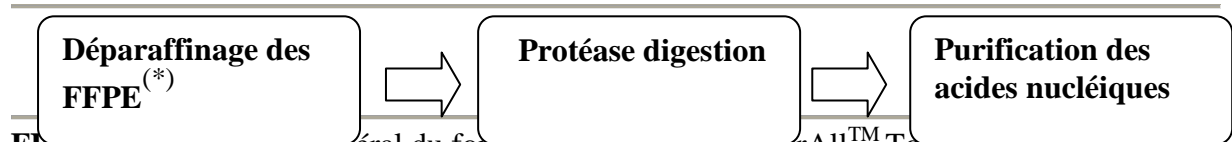


FIGURE 15 : Schéma général du fonctionnement du RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit

(*) Formaldehyde or paraformaldehyde-fixed paraffin-embedded tissues

5) Test qualité de l'ADN :

➤ **Principe :**

En biologie moléculaire, il est utilisé après l'extraction de l'ADN, pour quantifier l'ADN et déterminer sa pureté. On utilise la longueur d'onde 260 nm qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN.

Pour une solution d'ADN purifiée, le rapport R. doit être compris entre 1,8 et 2. Si R est nettement inférieur à 1,8 alors des protéines contaminent probablement la solution. Supérieur à 2, ce rapport indique une probable contamination par des ARN.

$$R = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$$

R est simplifié lorsque (cas fréquent) $A_{320} = 0$.

La concentration d'ADN peut-être calculée à partir de la mesure à 260 nm en utilisant un facteur de corrélation :

- * ADN double-brin : 1 Abs = 50 ng/μl
- * ADN simple-brin : 40 ng/μl (comme l'ARN simple brin)
- * ARN : 1 Abs = 40 ng/μl.

➤ **But :**

Après extraction de l'ADN à partir de tissu tumoral, on procède à un test qualité de l'ADN. On estime la concentration de l'ADN extrait par spectrophotométrie. Car afin de passer à la phase d'amplification d'un gène recherché par PCR, il est nécessaire que les solutions d'ADN extraits aient la même concentration (10 ng/ml), il faut donc estimer la quantité d'ADN pour diluer à la bonne concentration.

6) Amplification de l'ADN extrait par PCR :

➤ **Le protocole expérimental :**

On a fait une amplification par PCR du gène *BRAF*, *KRAS* et la PCR pentaplex pour déterminer MSI.

Les constituants utilisés pour la réaction PCR sont : les amorces, la Taq polymérase, les dNTP, le tampon et l'ADN, atteignant un volume finale de 25 µl.

- **Constituants de la réaction d'amplification des gènes *BRAF* et *KRAS*.**

- Les amorces utilisées pour l'amplification du gène ***BRAF* (l'exon 15 de 147 pb)** :

Tableau 4 : Amorces utilisées pour le séquençage de l'exon 15 de *BRAF* de 147 pb

NOM	SEQUENCE 5' - 3'
BRAF_15F	TGC-TTG-CTC-TGA-TAG-GAA-AAT-G
BRAF_15R	GTA-ACT-CAG-CAG-CAT-CTC-AGG-G

- AMORCES utilisés pour l'amplification du gène ***KRAS* (l'exon 2 de 115pb)**

**KRAS* 2 BIS +/-

***KRAS* 2BIS+/ AGGCCTGCTGAAAATGACTG (20nt)**

***KRAS* 2BIS - / TGGATCATATTCGTCCACAAAA (22nt)**

- On prépare le mix PCR selon les indications des tableaux
- On aliquote le mix préparé à raison de 23 µl par tube et on ajoute dans chaque tube 2 µl d'ADN pour avoir un volume total de 25 µl.
- On met les tubes dans le thermocycleur et on lance le programme de dénaturation/hybridation/élongation
- A la fin de la PCR, on prépare un gel d'agarose de 2% (voir Annexe)
- Pour chaque échantillon, on mélange 5 µl de produit PCR avec 2 µl de tampon de charge.
- On lance la migration à 100V
- On visualise les bandes à l'aide des ultraviolets

Tableau 5 : composition du mix PCR pour l'amplification des gènes *BRAF* et *KRAS*

MIX PCR	Concentration initiale	Volume pour 1 réaction
Eau stérile		13,3 µl
Amorce sens F	10 µM	1 µl
Amorce anti-sens R	10 µM	1 µl
dNTPs	10 µM	1 µl
MgCl ₂	25µM	2,5 µl
Tampon PCR 5x		5 µl
Taq polymérase	5 U/µl	0,2 µl
ADN		1 µl
Volume total		25 µl

Le programme du thermocycleur :

Tableau 6 : Récapitulatif du programme du thermocycleur (Thermocycler- Programme)

Cycles	Températures	Temps
1	95°C	10 min
35/40 cycles	94°C	30 sec
	60°C	1 min
	72°C	30 sec
1	72°C	10 min
1	4°C	∞
VERIFICATION DES PRODUITS DE PCR PAR ELECTROPHORESE		

N.B : 35 cycles pour BRAF et 40 cycles pour KRAS

- **Constituants de la réaction d'amplification des loci microsatellites (phénotype RER)**

Cette étape correspond à l'amplification des loci microsatellites choisis par PCR multiplex. Les 5 couples d'amorces permettant d'obtenir des amplicons de tailles proches mais de marquage différent de façon à pouvoir les distinguer lors de l'analyse de fragments. Les amorces sens sont donc marquées en 5' par différents fluorochromes
 Les amorces utilisées sont

Tableau 7 : Amorces utilisées pour le phénotypage RER

Nom du marqueur	Taille du fragment	SEQUENCE 5' - 3'
NR21 R	103 pb	ATT-CCT-ACT-CCG-CAT-TCA-CA
NR21 F		NED - TAA-ATG-TAT-GTC-TCC-CCT-GG
NR22 R	142 pb	AAT-TCG-GAT-GCC-ATC-CAG-TT
NR22 F		HEX - GAG-GCT-TGT-CAA-GGA-CAT-AA
NR24 R	132 pb	ATT-GTG-CCA-TTG-CAT-TCC-AA
NR24 F		NED - CCA-TTG-CTG-AAT-TTT-ACC-TC
BAT25 R	123 pb	TCT-GCA-TTT-TAA-CTA-TGG-CTC
BAT25 F		6-FAM -TCG-CCT-CCA-AGA-ATG-TAA-GT
BAT26 R	119 pb	AAC-CAT-TCA-ACA-TTT-TTA-ACC-C
BAT26 F		HEX -TGA-CTA-CTT-TTG-ACT-TCA-GCC

-On a utilisé seulement 3 amorces: NR22/NR24/BAT25

Les deux autres amorces ont perdu leur fluorescence.

✓ **Préparation des amorces MSI :**

- 7,5 µl d'amorce NR22 R + 7,5 µl d'amorce NR22 F
- 7,5 µl d'amorce NR24 R + 7,5 µl d'amorce NR24 F
- 7,5 µl d'amorce BAT25 R + 7,5 µl d'amorce BAT25 F

-On ajoute 200 µl du TE 1X

-On prépare le mélange dans un tube eppendorff de 0,5 µl

✓ **Condition de PCR MSI :**

- Tampon 5x : 5 µl
- MgCl₂ : 2,5 µl
- dNTP : 1 µl
- Amorce 10x : 5 µl
- Taq : 0,2 µl
- Eau stérile : 19 µl
- ADN : 1 µl

-On obtient le volume de 33,7 µl par tube

-On met les tubes dans le thermocycleur et on lance le programme suivant :

✓ **Programme du thermocycleur :**

- 15 min : 95°C → 1 cycle
- 30 sec : 94°C
- 90 secs : 61°C → 35 cycles
- 60 sec : 72°C
- 30 min : 60°C → 1 cycle

-A la fin de la PCR, on prépare un gel d'agarose de 4%

-Pour chaque échantillon, on mélange 5 µl de produit PCR avec 2 µl de tampon de charge.

-On lance la migration à 100V

-On visualise les bandes à l'aide des UV

-Les produits PCR des gènes BRAF et KRAS ont été séquencés

-Les produits PCR des loci microsatellites ont été analysé (l'analyse des fragments

7) Séquençage des produits PCR des gènes BRAF et KRAS :

➤ **Principe général de la méthode :**

Dans la méthode de Sanger, la polymérisation de l'ADN est initiée par un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par la « séquenase » (une ADN polymérase I dépourvue d'activités exonucléasiques 5'→3'et 3'→5', et 100 fois plus rapide que le fragment de Klenow). Les quatre désoxynucléosides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'en faible concentration les quatre 2'-3'didésoxynucléosides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par des fluorochromes différents. Ces didésoxynucléosides, une fois incorporés à la nouvelle chaîne synthétisée, empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte de nouveaux fragments d'ADN de taille variable, qui sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide.

Il n'y a qu'une seule réaction de séquençage en présence des 4 didésoxyribonucléotides :

ADN matrice + dNTP + ddCTP fluorescent bleu + ddATP fluorescent vert + ddGTP fluorescent jaune + ddTTP fluorescent rouge

Le séquençage a été fait au CURI (Centre Universitaire Régional et d'Interface)

➤ **But :**

Notre objectif est d'appliquer le séquençage pour détecter les différentes mutations pour les différentes maladies étudiées avant de passer nos produits PCR, il faudra les purifier pour éliminer l'excès d'amorces, dNTP et d'ADN polymérase pour ne pas s'interférer avec séquenceur, pour cela il s'agit de 3 réactions essentielles comme suit :

- **Purification par ExoSAP®**

ExoSAP-IT est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I(Exo) qui dégrade les ADN Simple brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres, et en excès sans interférence avec les applications en aval. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simple brins inférieurs à 100pb sont ainsi dégradés.

-On utilise 2µl de l'enzyme ExoSAP avec 10µl du produit PCR

-On le place au niveau du thermocycleur suivant le cycle suivant :

Tableau 8 : Programme du thermocycleur

Température	Durée
37°C	3 min
80 °C	15 min
10°C	∞

- **Reaction de sequence par BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing :**

Selon la réaction de Sanger qui repose sur l'incorporation aléatoire par cette ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel dont chacun est marqué par un fluorophore spécifique dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'élongation ou "*BigDye Terminators*" ou "*Dye-labeled terminator*".

Nous utilisons la technologie Big Dye Terminator_version2 (Applied Biosystems : ABI), version 2.

Tableau 9 : composition de mélange de réaction de séquence

Tube	F (Forwad)/ +	R (reverse)/-
Amorce	1 µl (KRAS 2bis+ : 12,5 µM /BRAF F : 10 µM)	1 µl (KRAS 2 bis- : 12,5 µM/ BRAF R : 10 µM)
Big dye	1,5 µl	1,5 µl
Produit de purification par EXOSAP	2 µl	2 µl

La technologie Big Dye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488nm et 514,5nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP.

Tableau 10: dichloroRhodamines utilisées et le spectre d'émission maximum de ddNTP

ddNTP	dichloroRhodamines utilisées	Spectre d'émission maximum
A	dR6G	560-565nm
T	dROX	615-620nm
C	dR110	530-535nm
G	dTAMRA	590-595nm

Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et, par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique (fig20).

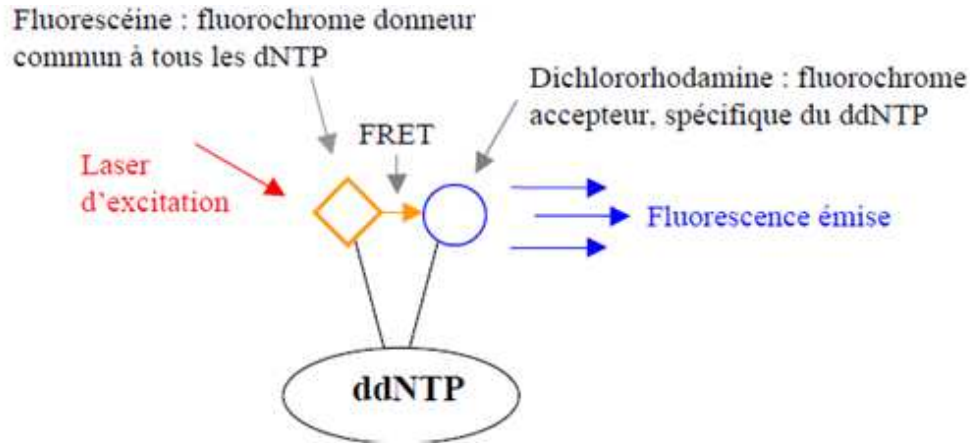


Figure 20 : Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance

On effectue 25 cycles d'amplification sur le thermocycleur dans des conditions spécifiques à la réaction de séquence. Un cycle correspond à :

- **Une étape de dénaturation de l'ADN** à 96°C pendant 10 sec pour obtenir l'ADN sous forme simple brin.
- **Une étape d'hybridation** à 50°C pendant 5 sec (température moyenne d'hybridation pour la majorité des amorces utilisées).
- **Une étape d'élongation de l'ADN** par la Taq polymérase à 60°C pendant 2 min.

Cette température faible ralentit la Taq et va déplacer l'équilibre pour permettre une meilleure incorporation des ddNTP.

Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier la réaction de séquence.

- **Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye-X Terminator :**

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par électrophorèse capillaire.

Le kit contient : - un flacon "SAM Solution" (stockage à T° ambiante)

- un flacon: « X Terminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler)

1. Déposer 10 μ l de produits de réaction de séquence dans la plaque Applied.
2. Centrifuger la plaque.
3. Préparer un mix contenant :
 - 45 μ l de solution SAM par puits
 - 10 μ l de X Terminator Solution par puits à l'aide des cônes spécifiques.**!! Vortexer 10'' le flacon X Terminator Solution et prélever immédiatement la quantité nécessaire.**
4. Vortexer le mélange et ajouter 55 μ l dans chaque puits à l'aide de la pipette distributrice ou de la pipette monocanal.

!! Vortexer le mix très régulièrement (la solution X terminator « se redépose » très rapidement)

5. Sceller la plaque correctement avec un film adhésif
 6. Mettre la plaque sur l'agitateur Eppendorf Mix Mate.
 7. Lancer l'agitateur sur la position 1800 rpm pendant 30 secondes et vérifiez que tout se mélange bien et que la plaque reste bien attachée.
 8. Agiter à 1800 rpm pendant 30 minutes.
 9. Centrifuger la plaque 2 minutes à 1000 g (Centrifugeuse Heraeus Multifuge 3S-R)
 10. Lancer le run sur le séquenceur 3730 avec le Run Protocole Module adapté
- N.B : Les plaques peuvent être conservées 7 jours à 4°C (pas congelées) avant d'être analysées avec le séquenceur.**

- **Détermination de la séquence :**

Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur capillaire ABI Prism™ 3130 Genetic Analyser et séquenceur 8 capillaires ABI PRISM 3130xl)

8) L'analyse des fragments des MSI :

Cette analyse a été faite au CURI.

- On a préparé un mélange de formamide (9,25 μ l) et de standard (0,25 μ l). Ces deux produits sont prêts à l'emploi.
- On a déposé dans chaque puits de l'appareil 9,5 μ l de mélange préparé et ajouté 1,5 μ l de l'échantillon. Les fragments sont ainsi analysés par le logiciel Peak Scanner Software V1.0