

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. POPULATION D'ETUDE

Une des premières étapes de cette étude consiste à se procurer et à rassembler les échantillons nécessaires à sa réalisation. L'échantillonnage s'est fait en s'accompagnant d'un certain nombre de paramètres tels que : l'âge de la patiente, l'ethnie, le statut matrimonial, le nombre de gestation, le mode d'allaitement, etc. Des échantillons de tissu parfaitement sain et des échantillons de tissu cancéreux ont été prélevés. Les prélèvements sont effectués à l'Hôpital lors d'intervention chirurgicale chez des sujets malades. Ils ont immédiatement été congelés pour être acheminés au laboratoire où se feront les différentes étapes d'études génétiques après conservation dans de l'alcool 96°. L'analyse portera sur au total 57 échantillons dont 22 tissus sains (témoins) et 35 tissus cancéreux.

II.2. ETUDES GENETIQUES

II.2.1. Extraction de l'ADN des tissus

II.2.1.1. Extraction

L'ADN total des tissus est extrait grâce à la méthode Standard Qiagen (Kit Qiagen Dneasy Tissue) et par la méthode du direct PCR.

- ✓ Avec le Kit Qiagen, les tissus sont broyés dans 180 µl de tampon de digestion (ATL) contenant des détergents qui entraîne une dissociation des tissus et une individualisation des cellules. 20 µl de protéinase K sont ajoutés pour dégrader toutes les protéines, après une incubation à 55°C pendant 3h. Les débris tissulaires sont éliminés après centrifugation rapide et récupération du surnageant. A cette solution, 200 µl de tampon de lyse cellulaire (AL) sont ajoutés puis un passage immédiat au vortex et incubation pendant 10 minutes à 70°C. La phase suivante consiste à ajouter

200µl d'éthanol absolu 96-100%, à vortexer et à transvaser le mélange obtenu sur une colonne que nous avons placée au préalable sur un tube collecteur de 2 ml (fourni dans le Kit), puis à centrifuger à 1361,35688 radian/seconde pendant une minute pour retenir l'ADN au niveau de la membrane de la colonne. En effet, l'ADN chargé négativement se fixe, par interactions ioniques, sur la membrane de silice chargée positivement. Par contre

les protéines, les lipides et les polysaccharides sont éliminés. L'ADN fixé sur la colonne est ensuite purifié pour éliminer toutes traces de contaminant. Ce lavage est réalisé par ajout successif de 500 µl de chacun des 2 tampons (AW1 et AW2) qui passent à travers la membrane par centrifugation à

1361,35688 radian/seconde pendant respectivement 1 et 3 minutes. 200 µl de tampon AE au préalable incubé à 70°C pour augmenter le rendement de 15 à 20% est directement versé sur la membrane que nous avons placée sur un tube de 1,5 ml pour recueillir l'ADN. Juste après cette étape l'ADN est conservé à -20°C.

- ✓ Avec le direct PCR, contrairement au Kit Qiagen les tissus sont broyés dans 200 µl de tampon direct PCR Lysis Reagent ; ensuite 20 µl de protéinase K sont ajoutés pour dégrader les protéines ; après une incubation à 55 °C pendant toute une nuit. Elle est suivie, d'une autre incubation à 85°C pendant 45 minutes. Il s'en suit une centrifugation à 1361,35688 radian/ seconde pendant 1 minute. A ce niveau l'ADN est prêt à l'emploi. Il est important de signaler, qu'avec le direct PCR, un enchainement de l'extraction, suivie d'une PCR permet d'avoir une amplification.

Car, pendant le refroidissement il se produit d'autres réactions.

II.2.1.2. Migration électrophorétique : Préparation et dépôt des échantillons

L'électrophorèse consiste à séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille par migration dans une matrice solide appelée gel d'agarose soumis à un champ électrique. La molécule d'ADN ayant une charge négative va migrer sous l'effet du champ électrostatique vers l'anode. La distance parcourue, mesurée à partir des puits de dépôt, dépendra de la taille de chaque fragment. De ce fait, plus la taille du fragment est importante moins grande sera la distance parcourue et vice-versa. Les échantillons, 7µl d'extraits d'ADN + 3µl de bleu de bromophénol (bleu de charge), seront déposés sur un gel d'agarose de 1,5 % et migrés à 100 volts pendant 30 à 35 minutes. L'ADN migré est révélé dans une chambre noire sous UV après passage dans un bain de Bromure d'Ethidium BET. La taille de l'ADN est évaluée approximativement à l'aide d'un marqueur de taille SmartLadder 200pb. Le gel est préparé avec 1,5 gramme d'agarose que l'on ajoute à 100 ml de solution TAE 0,5X.

II.2.2. Amplification en chaine par polymérase du Cytochrome b

La PCR est une méthode permettant l'amplification d'une courte séquence d'ADN appelée séquence cible, à partir d'une infime quantité d'ADN génomique. Elle consiste à une amplification sélective in vitro d'une séquence particulière d'ADN matrice par extension de deux amorces par

une ADN polymérase, en présence de désoxyribonucléotides (dNTP) et d'ions Mg^{2+} . Nous avons amplifié le *Cyt.b* qui présente beaucoup d'intérêts. Le Cyt.B est une région de plus d'un millier de paires de bases du génome mitochondrial, situé en positions 14201 et 15341 dans la séquence humaine, possède un taux de recombinaison faible (lié à son hérédité exclusivement maternelle) et présente une variabilité relativement élevée malgré qu'il s'agisse d'une séquence codante, ce qui justifie le choix de ce marqueur. L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 50 μ l contenant 28,9 μ l d'eau MilliQ, 5 μ l de Tampon (10X) qui contient des ions Mg^{2+} à une concentration initiale de 15 mM, 2 μ l de dNTP, 5 μ l de chaque amorce qui sont : H15915 (TCT-CCA-TTT-CTG-GTT-TAC-AAGAC) et L14723 (ACC-AAT-GAC-ATG-AAA-AAT-CAT-GGT-T), 0,1 μ l de Taq polymérase et de 4 μ l d'extrait d'ADN. L'amplification est effectuée par une répétition de cycles qui assure une multiplication par deux, de l'ADN cible à chaque cycle (240). La PCR a lieu dans un thermocycleur de type Eppendorf dans les conditions suivantes : dénaturation préliminaire à 94°C (3 minutes), suivie d'une répétition de 40 cycles de dénaturation initiale à 92°C (45 secondes), d'hybridation à 50°C (1 minute) et d'élongation des brins d'ADN complémentaire à 72°C pendant (1 minute 30s) et est bouclée par une élongation finale (10 minutes).

II.2.3. Séquençage du Cytochrome b

Cette technique consiste à déterminer la séquence en nucléotides d'un fragment d'ADN. Elle permet en comparant les séquences d'un même gène chez différents individus de la même espèce ou d'espèces différentes, de mettre en évidence des mutations ponctuelles, mais également des insertions ou des délétions. La méthode utilisée aujourd'hui, proposée par F. Sanger en 1977, repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés didésoxyribonucléotides, qui bloquent la synthèse d'ADN par les ADN polymérases après leur incorporation. En d'autres termes, c'est une réaction de PCR particulière utilisant, en plus des composés habituels (ADN matrice, polymérase, amorces, dNTP, Mg^{2+}), des nucléotides modifiés : les didésoxyribonucléotides (ddNTP). Ces ddNTPs ont la particularité d'être couplés à des fluorochromes : ddATP-vert, ddTTP-rouge, ddCTP-bleu et ddGTP-jaune (en noir sur l'électrophorogramme) (figure 4). Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont ces nucléotides de former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le carbone 3'. Le séquençage a été réalisé dans la ville de Séoul en Corée du Sud par une société Américaine nommée MacroGen à partir de 30 μ l du produit PCR et dans un seul sens.

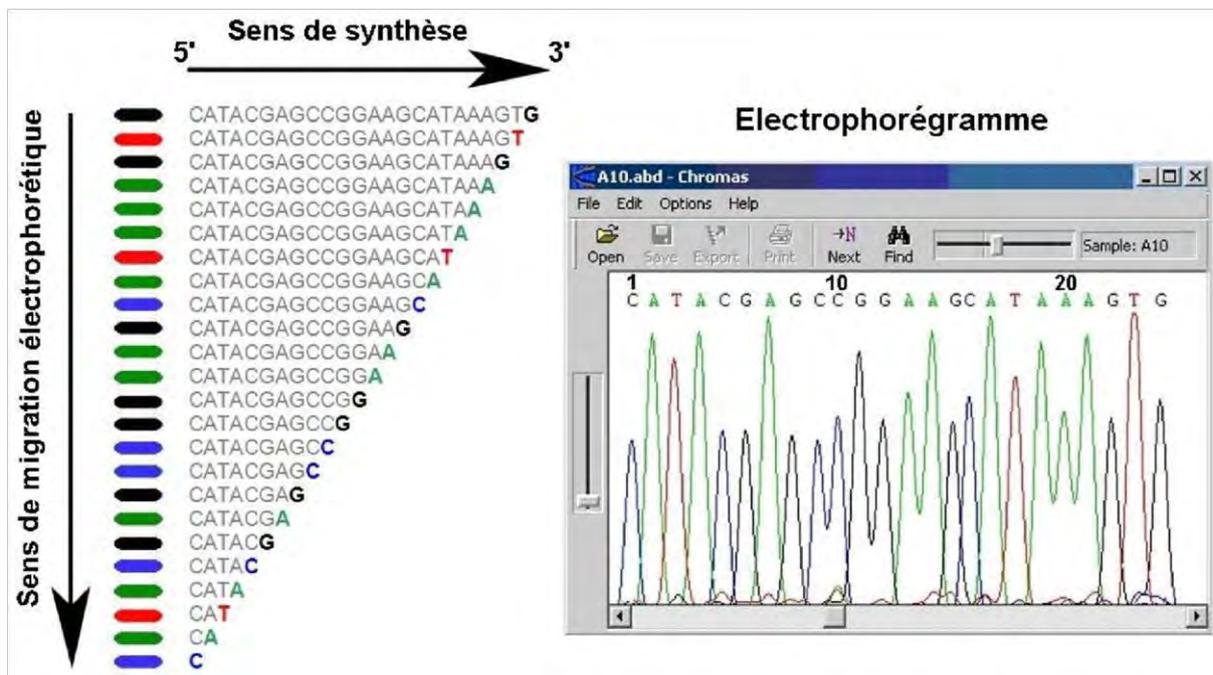


Figure 4 : Résultat d'une réaction de séquençage (Mbaye, 2011)

II.3. ANALYSES MOLECULAIRES

- Les séquences du Cyt.B, des tissus sains et cancéreux sont minutieusement vérifiées, corrigées et alignées avec le logiciel BioEdit version 7.0.5.3. (Hall, 1999).

L'alignement est en effet une étape importante de l'analyse des données. Il sert notamment, à mettre en évidence, les similitudes entre les séquences en retrouvant la position des délétions ou des insertions probables. Les tissus témoins sont alignés en premier, suivi des tissus cancéreux.

- Les paramètres de la variabilité génétique correspondent en quelque sorte à la carte d'identité de notre jeu de données. Ces paramètres dont le nombre de sites polymorphes, le nombre total de mutations, le nombre moyen de différence nucléotidique, la nature des mutations (% de transitions et de transversions), la composition en acides aminés ainsi que les diversités haplotypique et nucléotidique sont déterminés pour chaque type de tissu grâce au logiciel DnaSP version 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2010) et MEGA version 7.0.14 (Kumar *et al.*, 2015).
- La mise en évidence de la structure génétique requiert d'une part une estimation de la différenciation génétique avec deux indices : les distances génétiques de Nei, intra et inter-populations, obtenues avec le logiciel MEGA version 7.0.14 (Kumar *et al.*, 2015) et les Fst (facteur de différenciation génétique) obtenus avec le programme Arlequin version 3.5.2.2. (Excoffier, 2015) ; d'autre part, pour déterminer la structuration génétique des populations

en fonction d'un facteur donné, on utilise l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) implémentée dans le programme Arlequin version 3.5.2.2. (Excoffier, 2015). Dans notre étude, on a pris comme facteur l'âge et le nombre de gestation, en les répartissant en 3 groupes chacun. Pour l'âge on a : inférieur à 35 ans, entre 35 et 50 ans, supérieur à 50 ans. Pour le nombre de gestation on a : celles qui n'ont jamais eu de grossesse, celles qui en ont eu moins de 5, et celles qui en ont eu 5 et plus.

- On a effectué des tests démo-génétiques se basant uniquement sur le polymorphisme :
D de Tajima (Tajima, 1989a) et F_s de Fu (Fu, 1997). Il s'agit de comparer le niveau d'ajustement entre la diversité observée au niveau des loci et celle attendue sous l'hypothèse d'un modèle neutraliste : toutes les mutations sont sélectivement neutres (Kimura, 1983). Ces différents estimateurs peuvent être obtenus avec le programme Arlequin version 3.5.2.2. (Excoffier, 2015).
- Nous avons également déterminé l'analyse de la disparité de distribution (Mismatch distribution), qui est la représentation graphique de la distribution de distances génétiques existant entre les individus d'une population. L'analyse de Mismatch s'accompagne de deux indices qui testent la qualité d'ajustement de la distribution. Ces indices sont la SSD (somme de carrées des déviations) et le Raggedness (indice d'irrégularité Rag). Les graphes ont été construits avec le logiciel DnaSP version 5.10.01 (Rozas et al., 2010) et les indices SSD et Rag ont été obtenus avec le programme Arlequin version 3.5.2.2. (Excoffier, 2015).