

Outils de la biologie moléculaire

Pr M. Aberkane
2^e année de Médecine

Rappel du programme de génétique de 2^{ème} année de médecine

Au terme de ces cours, l'étudiant doit être capable de :

1. Décrire le principe de l'hybridation moléculaire.
2. Définir la dénaturation ou fusion de l'ADN.
3. Calculer le T_m ou température de fusion d'une séquence d'ADN.
4. Définir une sonde d'acide nucléique.
5. Caractériser les différents types de sondes.
6. Enumérer les applications de l'hybridation moléculaire.
7. Décrire l'action des enzymes de restriction.
8. Préciser la nomenclature appliquée aux enzymes de restriction.
9. Ecrire les différentes séquences reconnues par les enzymes de restriction.
10. Lister les différentes applications des enzymes de restriction.



- 11.** Décrire l'activité de quelques enzymes qui permettent l'étude des acides nucléiques (polymérases, ligases et nucléases).
- 12.** Définir un vecteur.
- 13.** Caractériser le principe de construction et d'utilisation d'un vecteur.
- 14.** Citer les différents types de vecteurs.
- 15.** Définir l'extraction d'ADN.
- 16.** Citer les conditions de prélèvement pour une extraction d'ADN.
- 17.** Préciser les différentes étapes de l'extraction.
- 18.** Identifier les critères d'évaluation d'une technique d'extraction d'ADN.
- 19.** Décrire le principe de la PCR.
- 20.** Citer les outils de la PCR.
- 21.** Citer les différentes étapes de La PCR.
- 22.** Lister les limites de la PCR.
- 23.** Enumérer les applications de la PCR.
- 24.** Définir le séquençage de l'ADN.
- 25.** Décrire brièvement les principales étapes du processus de séquençage de l'ADN selon les différentes techniques utilisées (Sanger, NGS).

Que peut on faire avec de l'ADN

Purifier l'ADN en le séparant du reste des constituants de la cellule: protéines, membranes, ARN etc...

Visualiser l'ADN en utilisant le bromure d'ethidium...

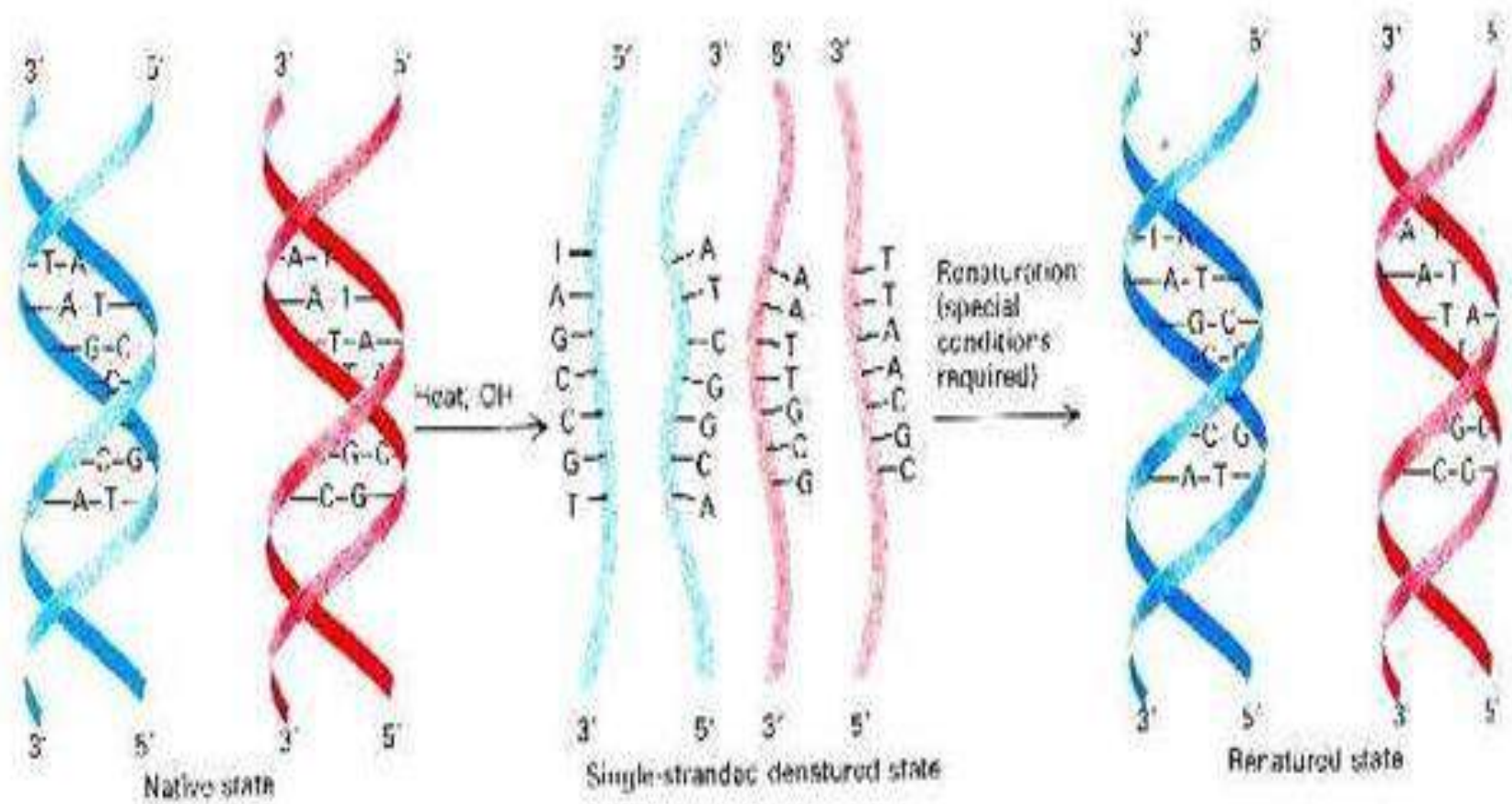
Couper l'ADN en fragments pour isoler un gène particulier...

Amplifier par PCR un gène spécifique (réaction de polymérase en chaîne)...

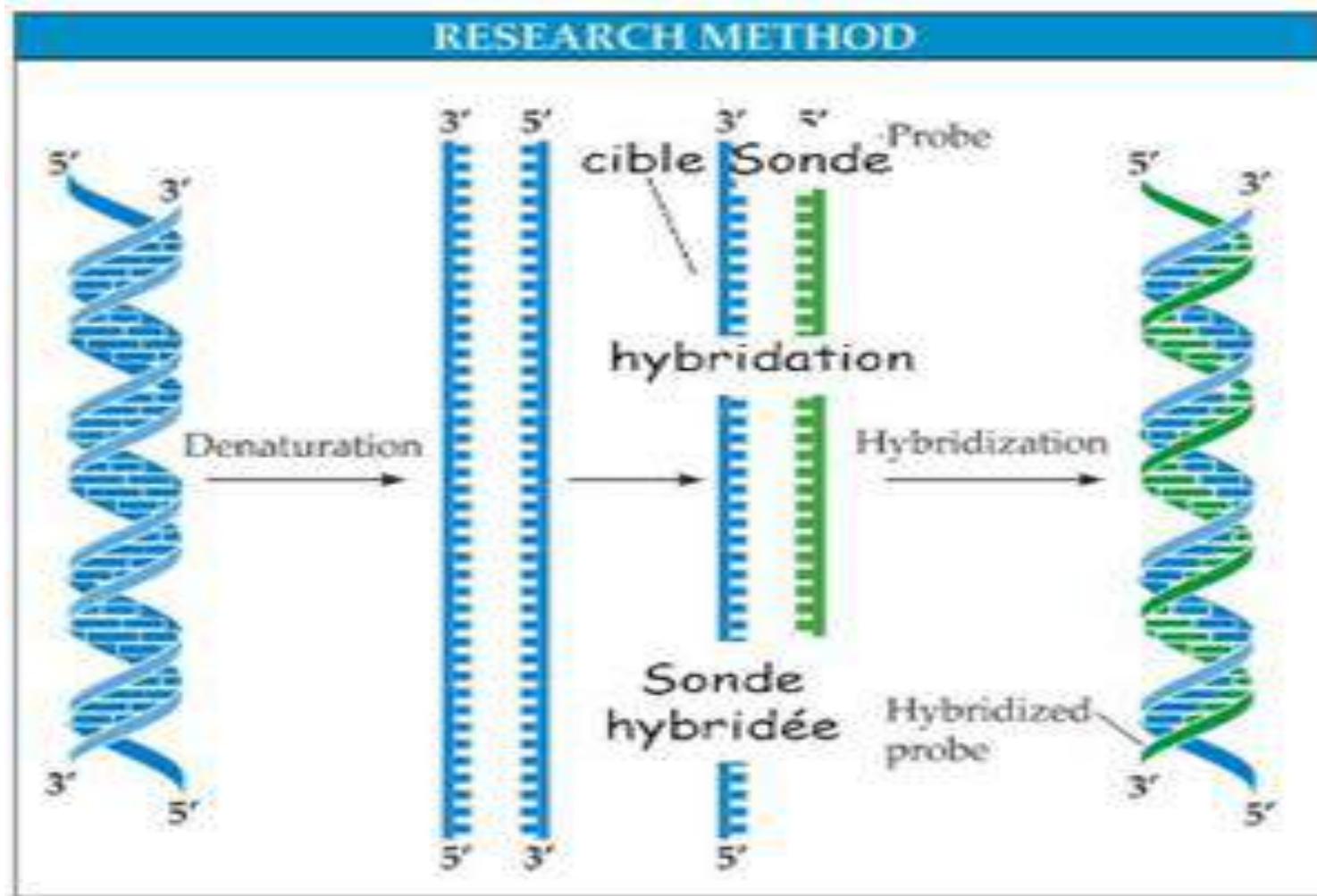
Déterminer la séquence en bases azotées d'un fragment d'ADN

On peut aussi faire du clonage de gènes!

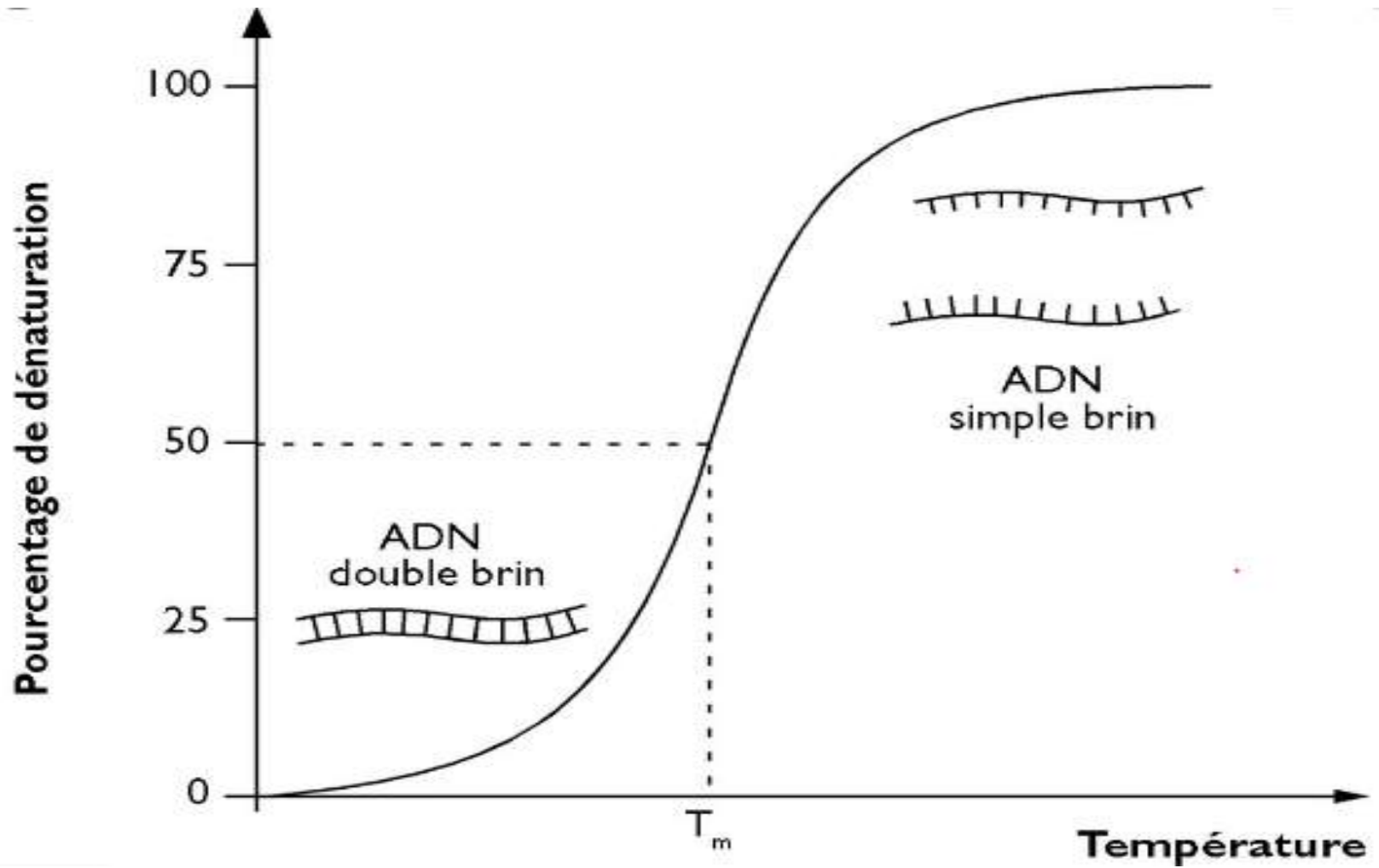
Dénaturation de l'ADN



Hybridation moléculaire



TEMPÉRATURE DE FUSION MOLÉCULAIRE (ou T_m)



Calcul de la Tm

- Oligonucléotide inférieur à 20 nt

- $(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4 = T_m \text{ en } ^\circ\text{C}$

- Oligonucléotide supérieur à 20 nt

- $[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] \times (1 + [(N-20)/20]) = T_m \text{ en } ^\circ\text{C}$

La composition du milieu réactionnel

- a) La teneur en sel et en particulier en cations monovalents type Na^+
Facilitent la réassociation
- b) La teneur en produits chimiques : formamide
Favorise la dénaturation

Le rôle de différents constituants sur la T_f se traduit par la formule empirique de T_f , pour une molécule d'ADN de taille n supérieure à 100 pb et présentant un pourcentage en guanine et cytosine (noté $\%(G+C)$) compris entre 30 et 70, propriétés intrinsèques de la molécule :

$$T_f (\text{°C}) = 81,5 + 16,6 \log[\text{Na}^+] + 0,41 \% (G+C) - 600/n - 0,61 \% \text{ formamide}$$

Notion de stringence

Ensemble de conditions expérimentales de température, de pH et de force ionique permettant l'hybridation moléculaire. La stringence est d'autant plus forte que la température est proche de la température de fusion et que la concentration en cations monovalents (Na^+ par exemple) est faible.

En résumé

Lorsque la concentration en sodium du tampon d'hybridation n'excède pas 1M, on utilise la formule :

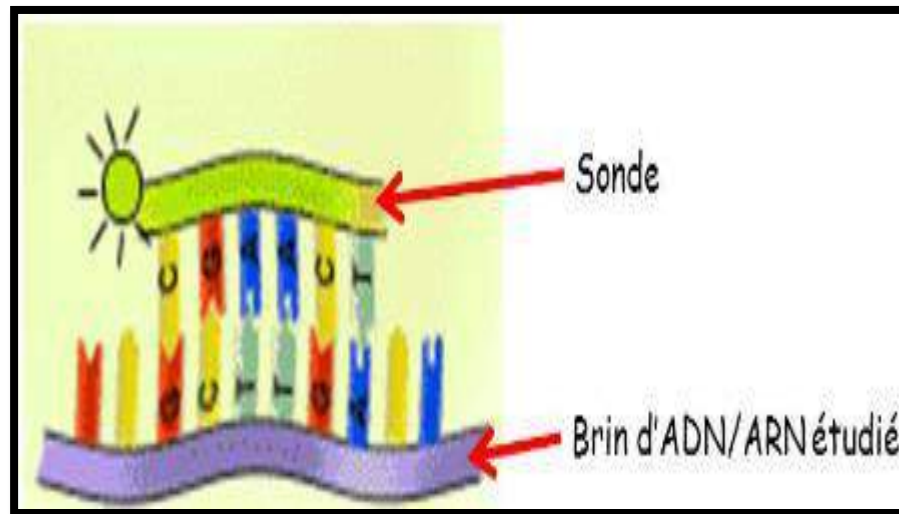
$$T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41[(G+C)/N] - (600/N)$$

Lorsqu'on travaille en présence de formamide, il faut encore diminuer la T_m en fonction de la concentration de l'amide :

$$T'_m = T_m - 0,6 (\% \text{ formamide})$$

Définition des sondes d'acide nucléique

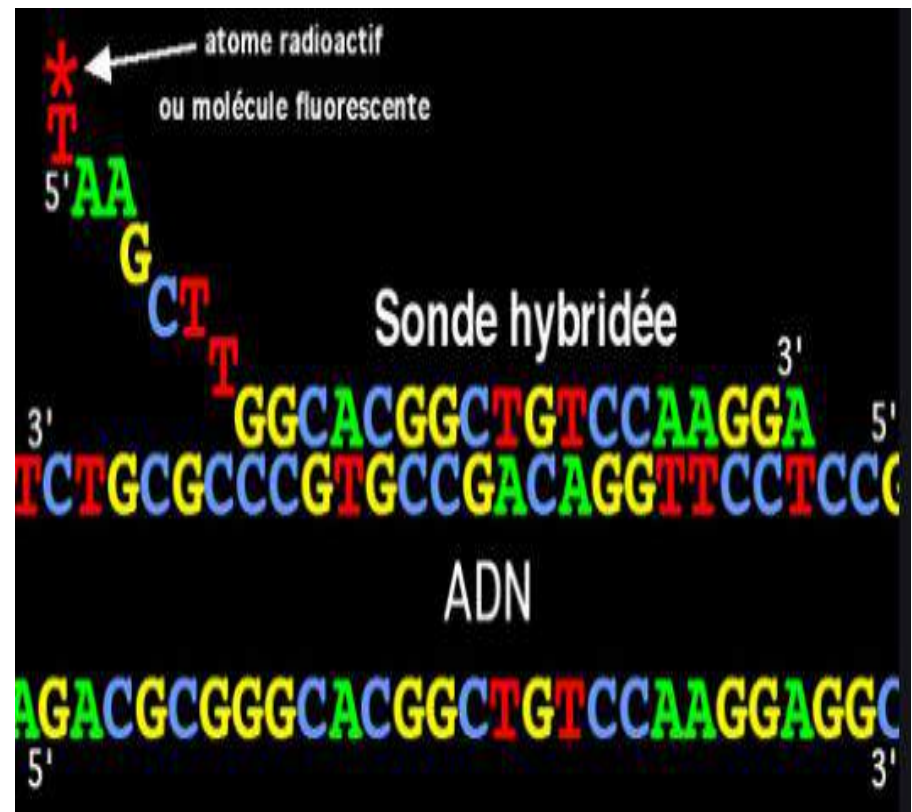
Les sondes sont utilisées pour détecter des séquences spécifiques. C'est une séquence d'acide nucléique (ADN ou ARN) mono brin de 20-30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides généralement marquée, complémentaire et antiparallèle à la séquence qu'on cherche à détecter in vitro



* **Sondes directes:** exploration d'une séquence génétique dont on a quelques informations

* **Sondes indirectes ou anonymes:** exploration de gènes peu ou pas connus

la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage avec un radioisotope (marquage chaud/ radioactif), mais il existe également des sondes avec marquage froid (fluorescence, colorimétrie chimioluminescence).



Différents types de sondes

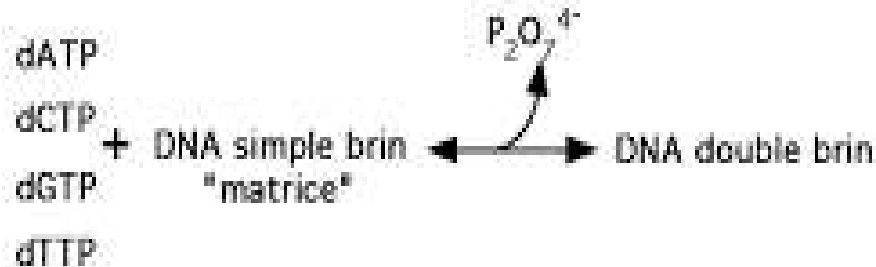
- Sonde oligonucléotidique ou oligosonde (60 maximum):
fabriquée par synthèse chimique
- Sonde génomique: conçue en remontant grâce au code génétique à la séquence d'ADN.
- Sonde ADNc (exempte d'introns) obtenue par rétrotranscription d'un ARNm (grâce à la rétrotranscriptase)
- Sonde à ARN ou ribosondes : une sonde est souvent un ARNm

Fonctions des enzymes les plus importantes

Polymérase

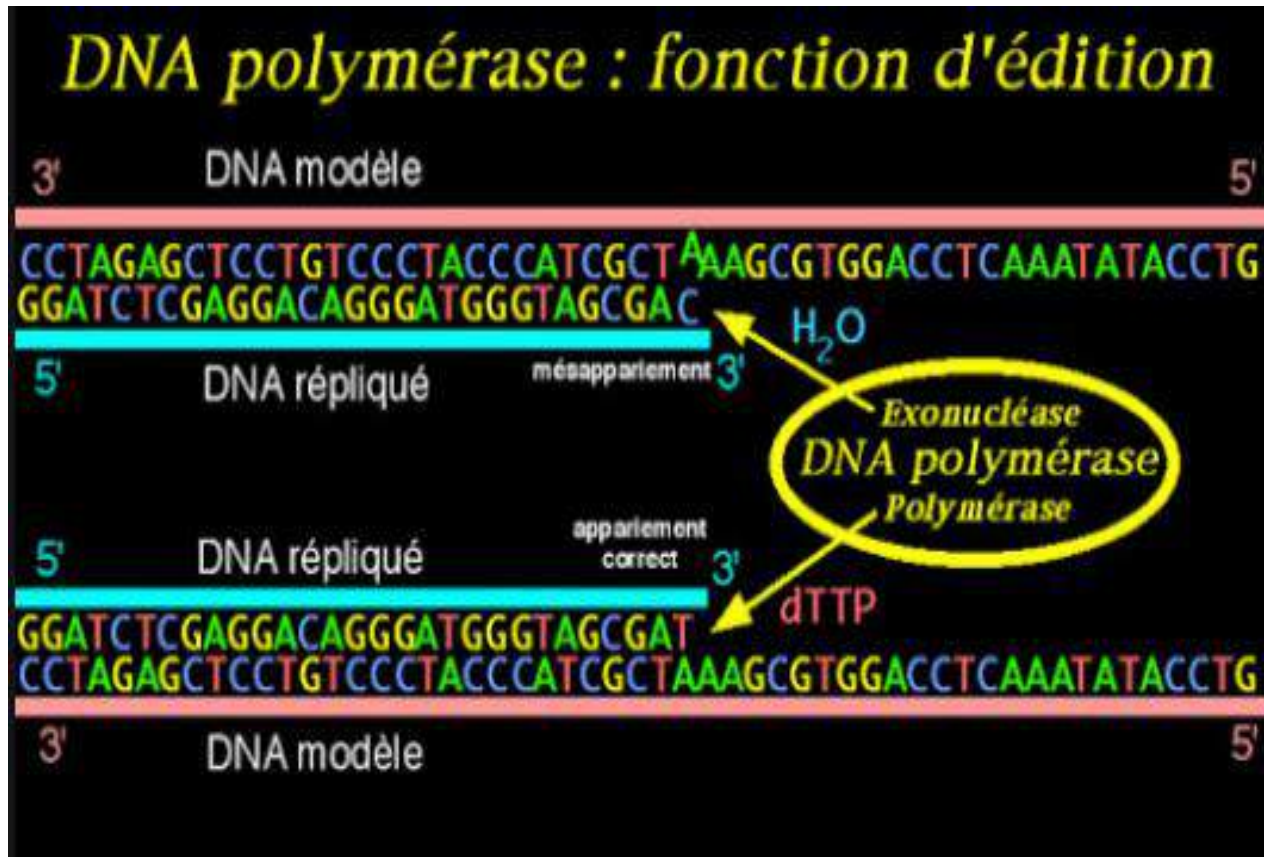
DNA polymérase

Primase, DNA-ligase, Hélicase, ... Mg^{++}



Rôle: agissent en phase S du cycle pour doubler systématiquement l'ensemble du génome diploïde.

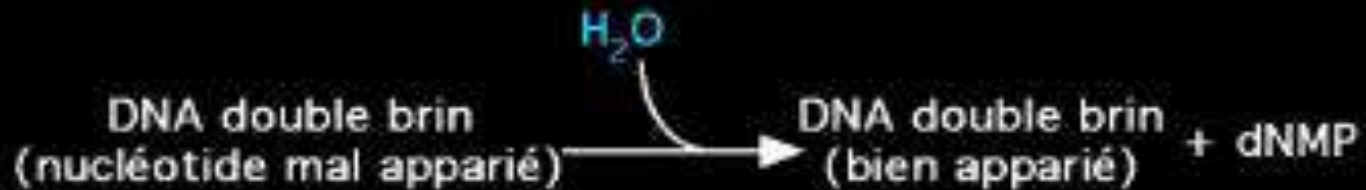
DNA polymérase (fonction d'édition) 5' - 3'



DNA polymérase (exonucléase 3'→5')

DNA polymérase (*exonucléase 3'→5'*)

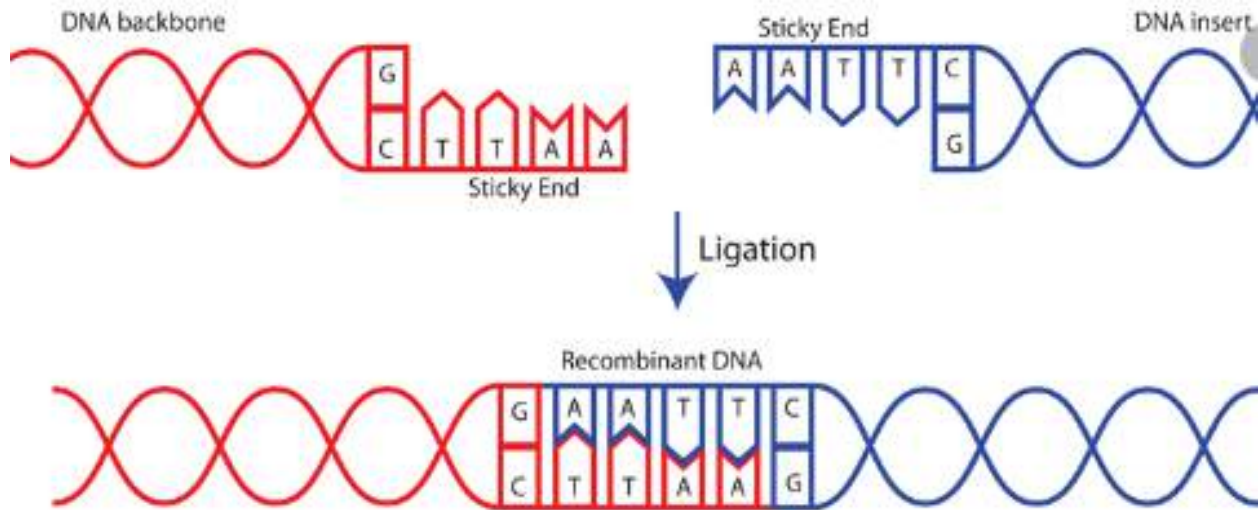
Primase, DNA-ligase, Hélicase,... Mg^{++}



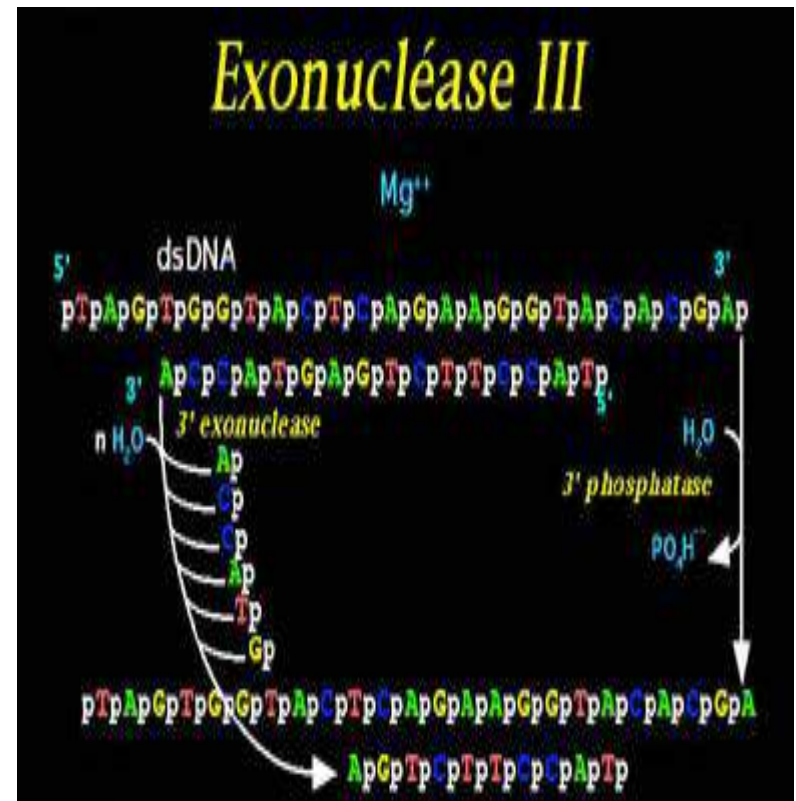
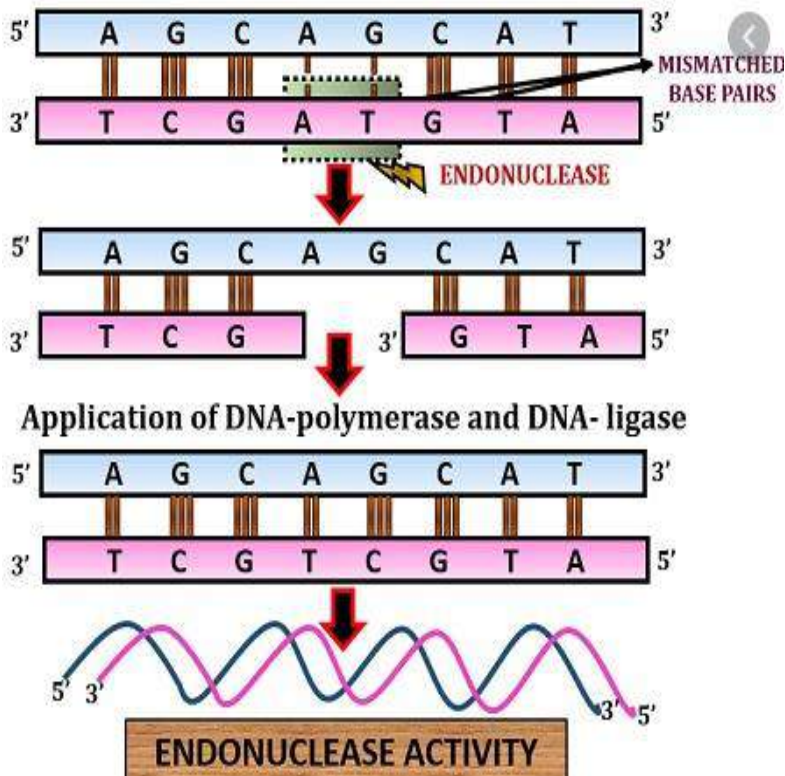
DNA-polymérase

	MM	Autres activités		pH opt
		5'→3'	3'→5'	
<i>E. coli DNA pol I</i>	109000	+	+	7,4
<i>E.coli Klenow fragment</i>	76000	-	+	8,4 (Tris)
<i>T4 DNA pol</i>	114000	-	+	8,5
<i>T7 DNA pol (Sequenase)</i>	92000	-	-	7,7
<i>Th. aquat. DNA pol (Taq)</i>	94000	-	-	8,3 (Tris)
<i>Reverse transcriptase</i>	84000	-	-	7,6

Ligases



Nucléases: exonucléases/ endonucléases

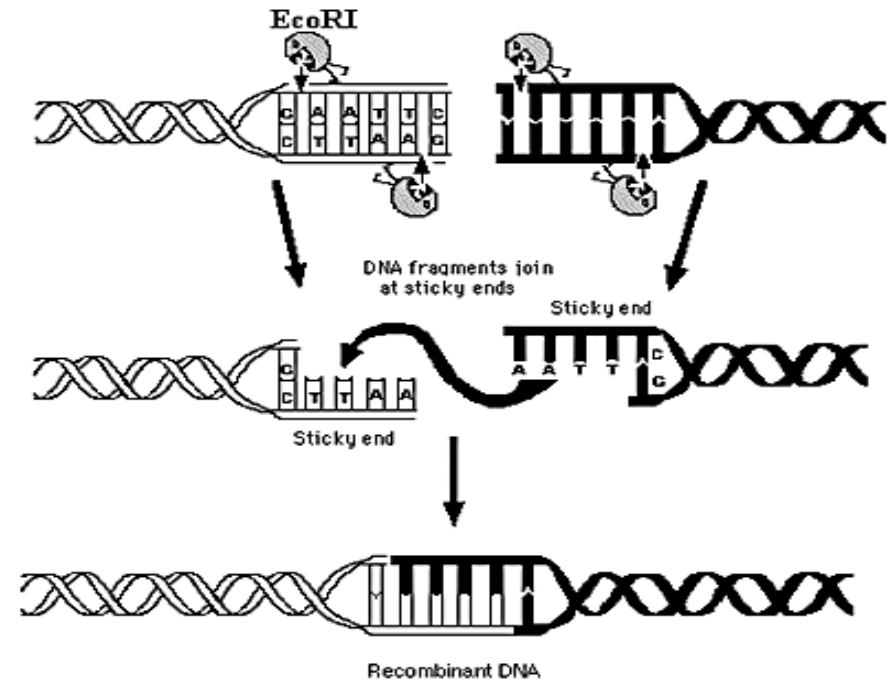
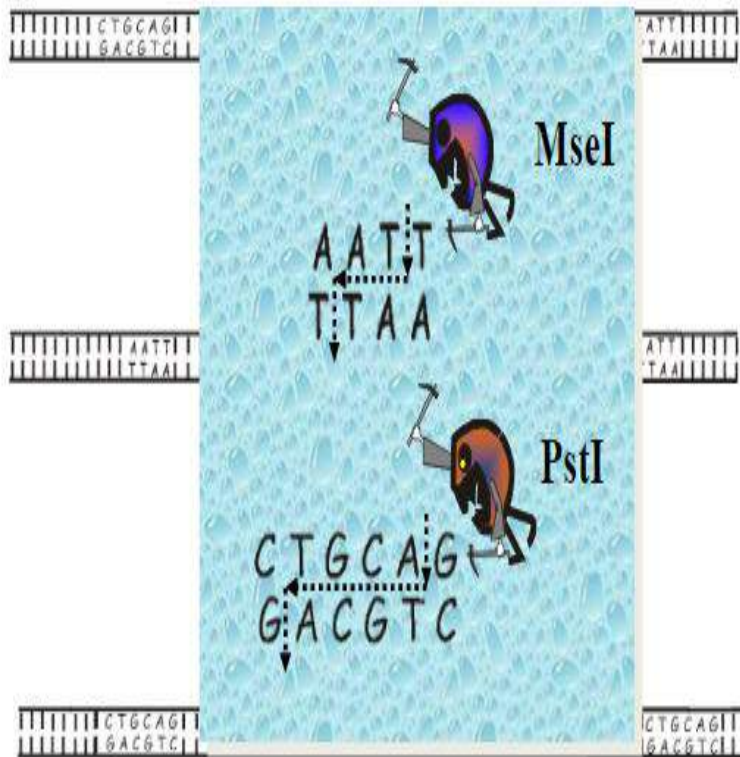


Endonucléases de restriction ou enzymes de restriction

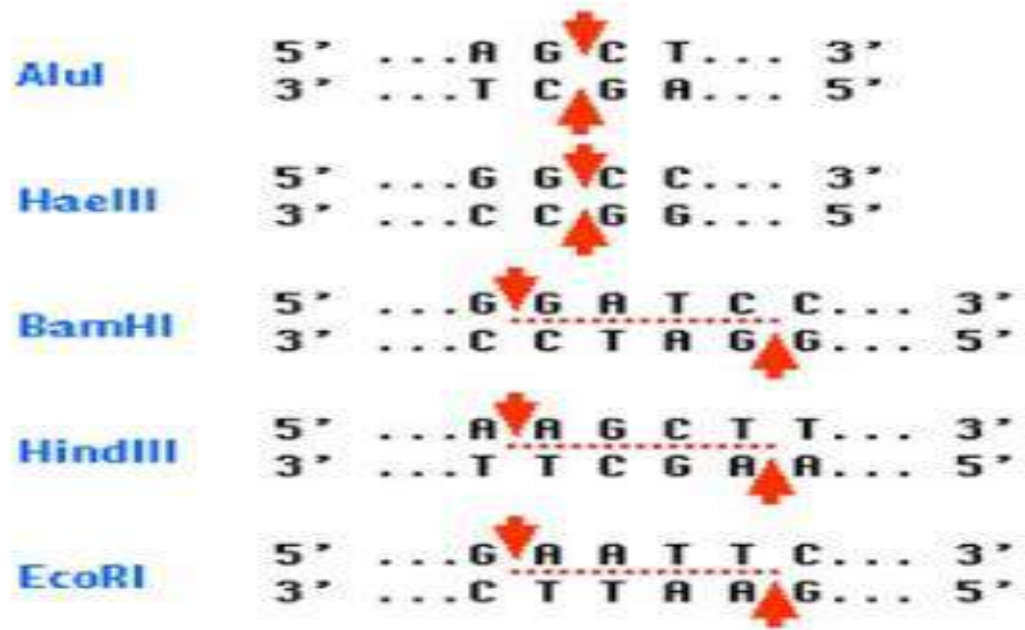
- Découvertes à partir de 1973. Extraites de micro-organismes, le plus souvent des bactéries.
- classe des endonucléases, (clivent les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides)
- Les endonucléases de restriction sont des enzymes bactériennes participant à un mécanisme de défense des bactéries vis-à-vis des virus : système de restriction-méthylation

.

➤ Reconnaissance et clivage d'une courte séquence palindromique, de 4 à 10pb (séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5' à 3' (gauche-droite) pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens droite-gauche pour le second brin (sens 5' à 3')).



Restriction Enzyme Action of EcoRI



➤Création d'extrémités franches ou d'extrémités cohésives.

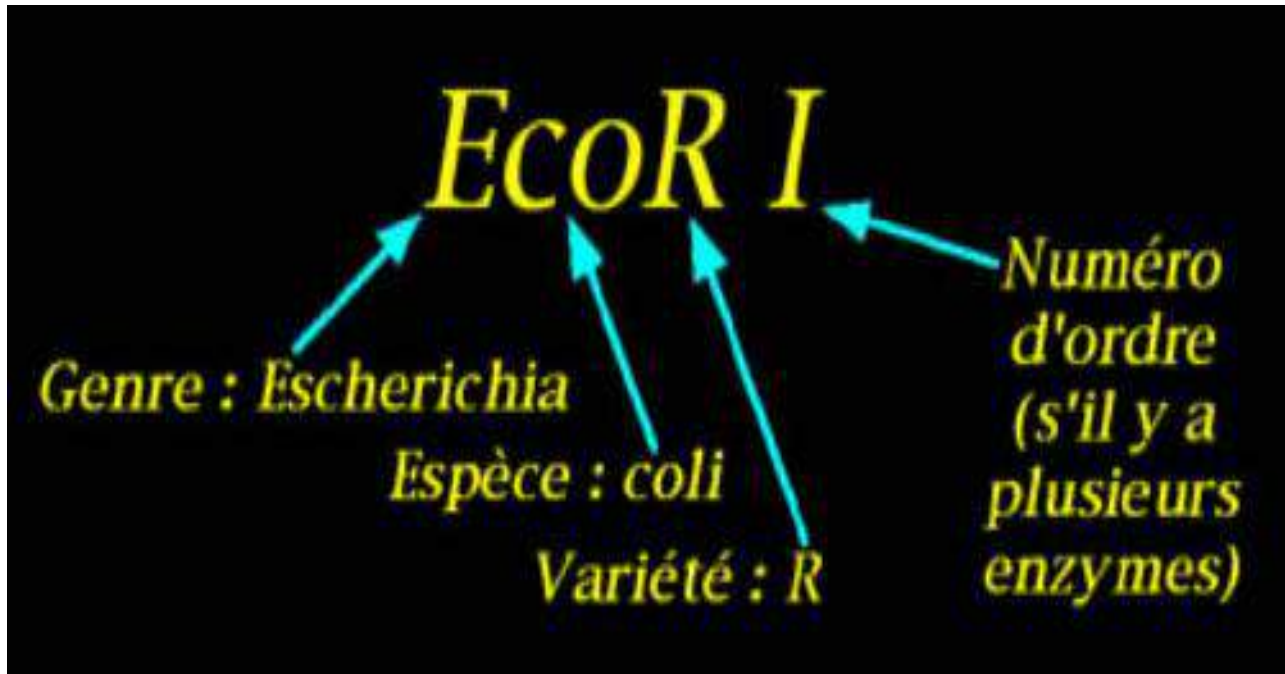
Tableau 14.2 Quelques endonucléases de restriction de type II et leur séquence de reconnaissance

Enzyme	Source microbienne	Séquence reconnue ^a	Extrémité formée ^b
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	$ \begin{array}{c} 5' - A - G \downarrow C - T - 3' \\ 3' - T - C \uparrow G - A - 5' \end{array} $	$ \begin{array}{c} C - T - 3' \\ G - A - 5' \end{array} $
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	$ \begin{array}{c} 5' - G \downarrow G - A - T - C - C - 3' \\ 3' - C - C - T - A - G \uparrow G - 5' \end{array} $	$ \begin{array}{c} G - A - T - C - C - 3' \\ G - 5' \end{array} $
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	$ \begin{array}{c} 5' - G \downarrow A - A - T - T - C - 3' \\ 3' - C - T - T - A - A \uparrow G - 5' \end{array} $	$ \begin{array}{c} A - A - T - T - C - 3' \\ G - 5' \end{array} $
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	$ \begin{array}{c} 5' - G - G \downarrow C - C - 3' \\ 3' - C - C \uparrow G - G - 5' \end{array} $	$ \begin{array}{c} C - C - 3' \\ G - G - 5' \end{array} $
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae b</i>	$ \begin{array}{c} 5' - A \downarrow A - G - C - T - T - 3' \\ 3' - T - T - C - G - A \uparrow A - 5' \end{array} $	$ \begin{array}{c} A - G - C - T - T - 3' \\ A - 5' \end{array} $
<i>NorI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarium</i>	$ \begin{array}{c} 5' - G - C \downarrow G - G - C - C - G - C - 3' \\ 3' - C - G - C - C - G - G \uparrow C - G - 5' \end{array} $	$ \begin{array}{c} G - G - C - C - G - C - 3' \\ C - G - 5' \end{array} $
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	$ \begin{array}{c} 5' - C - T - G - C - A \downarrow G - 3' \\ 3' - G \uparrow A - C - G - T - C - 5' \end{array} $	$ \begin{array}{c} G - 3' \\ A - C - G - T - C - 5' \end{array} $
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	$ \begin{array}{c} 5' - G \downarrow T - C - G - A - C - 3' \\ 3' - C - A - G - C - T \uparrow G - 5' \end{array} $	$ \begin{array}{c} T - C - G - A - C - 3' \\ G - 5' \end{array} $

^a Les flèches indiquent les sites de coupure sur chaque brin.

La méthylation de la cytosine (sur le carbone 5) ou de l'adénine (sur l'azote 6) appartenant à des sites de restriction aboutit à une inactivation de l'enzyme de restriction correspondante

Nomenclature des enzymes de restriction



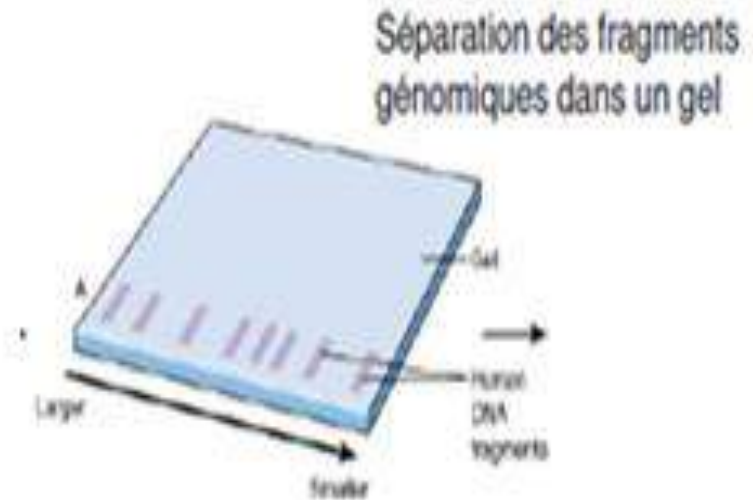
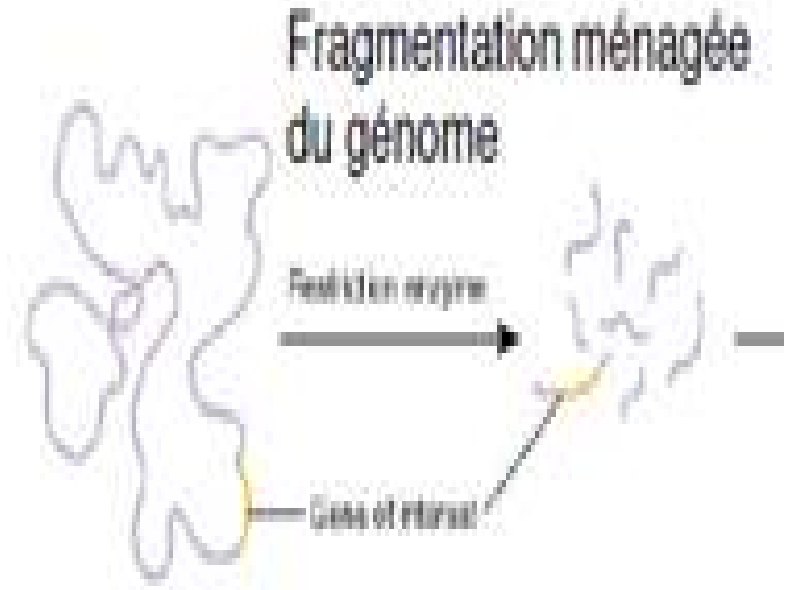
Applications de l'hybridation moléculaire et utilisation des enzymes de restriction

* Southern blot et Northern blot

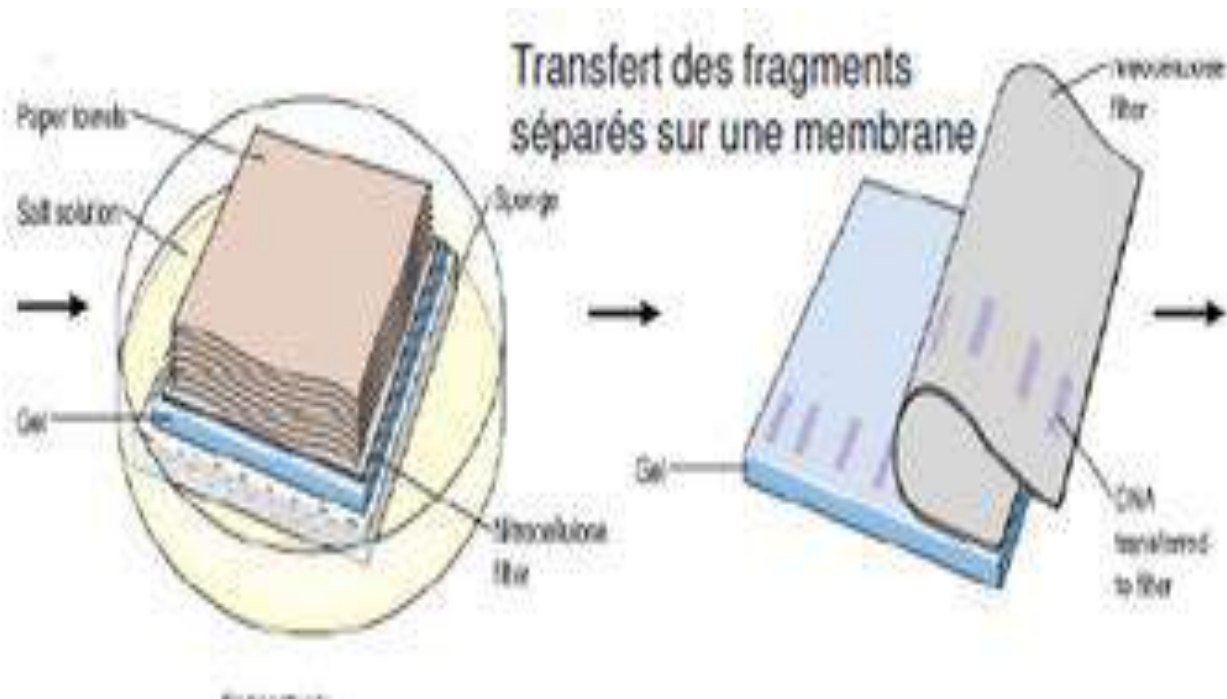
Dans ces deux types d'expériences, on cherche à repérer soit dans le génome soit dans les ARNm d'une cellule un fragment particulier, par exemple un gène donné. Pour cela, on utilise une sonde marquée d'ADN dont la séquence est complémentaire du fragment recherché. Le « repérage » se fait par hybridation entre la sonde marquée et le fragment d'ADN ou d'ARNm correspondant. Le marquage de la sonde avec un radioélément ou un fluorochrome permet de visualiser et de quantifier l'hybridation

Southern blot

- Extraction de génome total
- L'ADN est digéré par les enzymes de restriction
- Séparation des fragments digérés par électrophorèse
- Le gel d'électrophorèse est trempé dans une solution alcaline (contenant habituellement du NaOH) afin de permettre la dénaturation de l'ADN bicaténaire



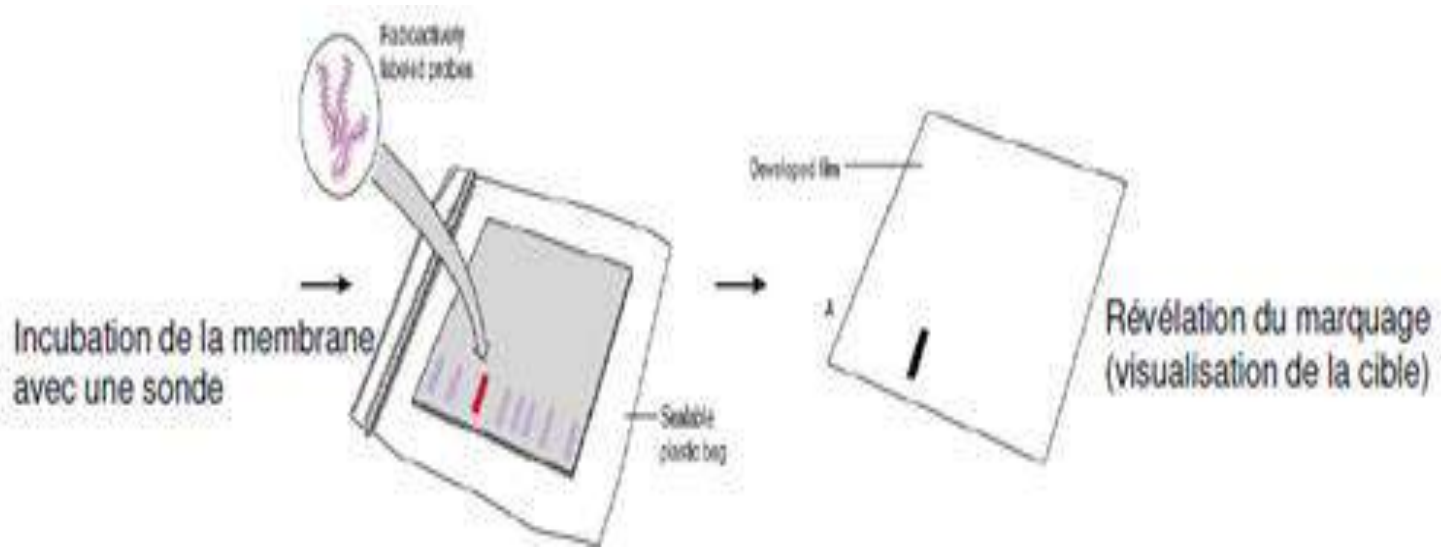
-Une feuille de membrane en nitrocellulose (ou encore en nylon) est placée sur le gel. Une pression est appliquée au gel en plaçant une pile de serviettes de papier et par un poids sur la membrane et le gel, par exemple. Ceci va permettre le déplacement de l'ADN contenu dans le gel sur la membrane par capillarité grâce à une solution saline. L'ADN va se fixer sur la membrane.



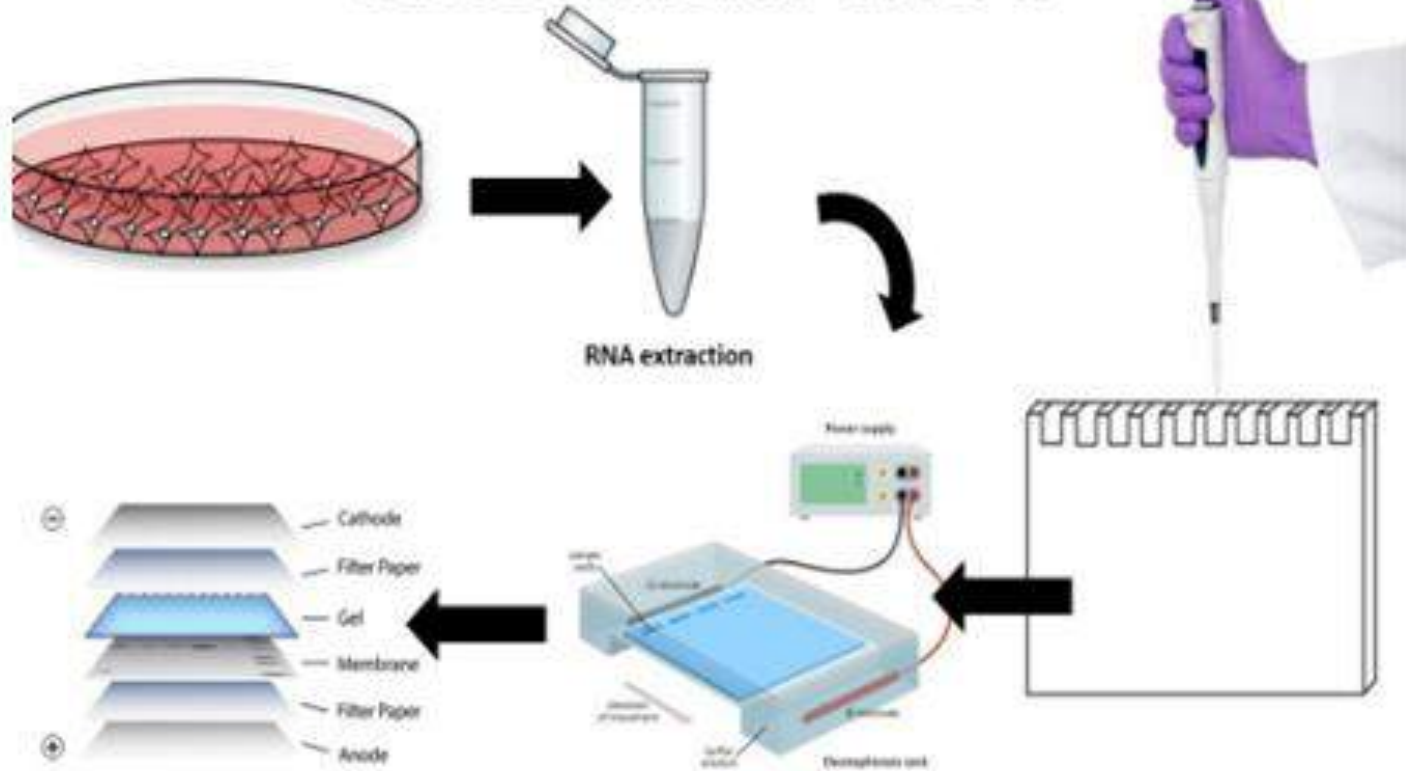
-La membrane est ensuite mise en contact avec une sonde spécifique de la séquence d'ADN recherchée. La sonde est marquée de sorte qu'elle puisse être détectée

-Après hybridation, la sonde en excès est éliminée de la membrane par différents lavages, et l'hybridation est visualisée sur un film autoradiographique, dans le cas d'une sonde radioactive

-Cette technique permet de repérer un fragment d'ADN particulier dans un génome.



Northern blot



Cette technique permet le repérage d'un type de molécule d'**ARN** dans un mélange d'acides nucléiques.

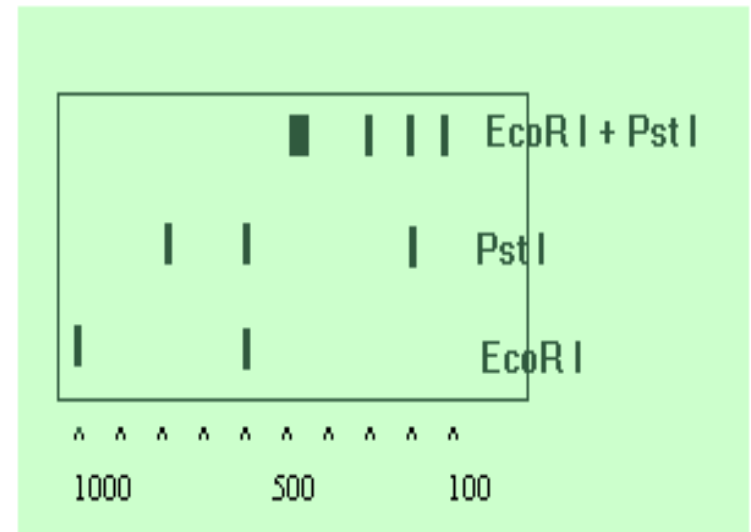
Différentes utilisations des enzymes de restriction

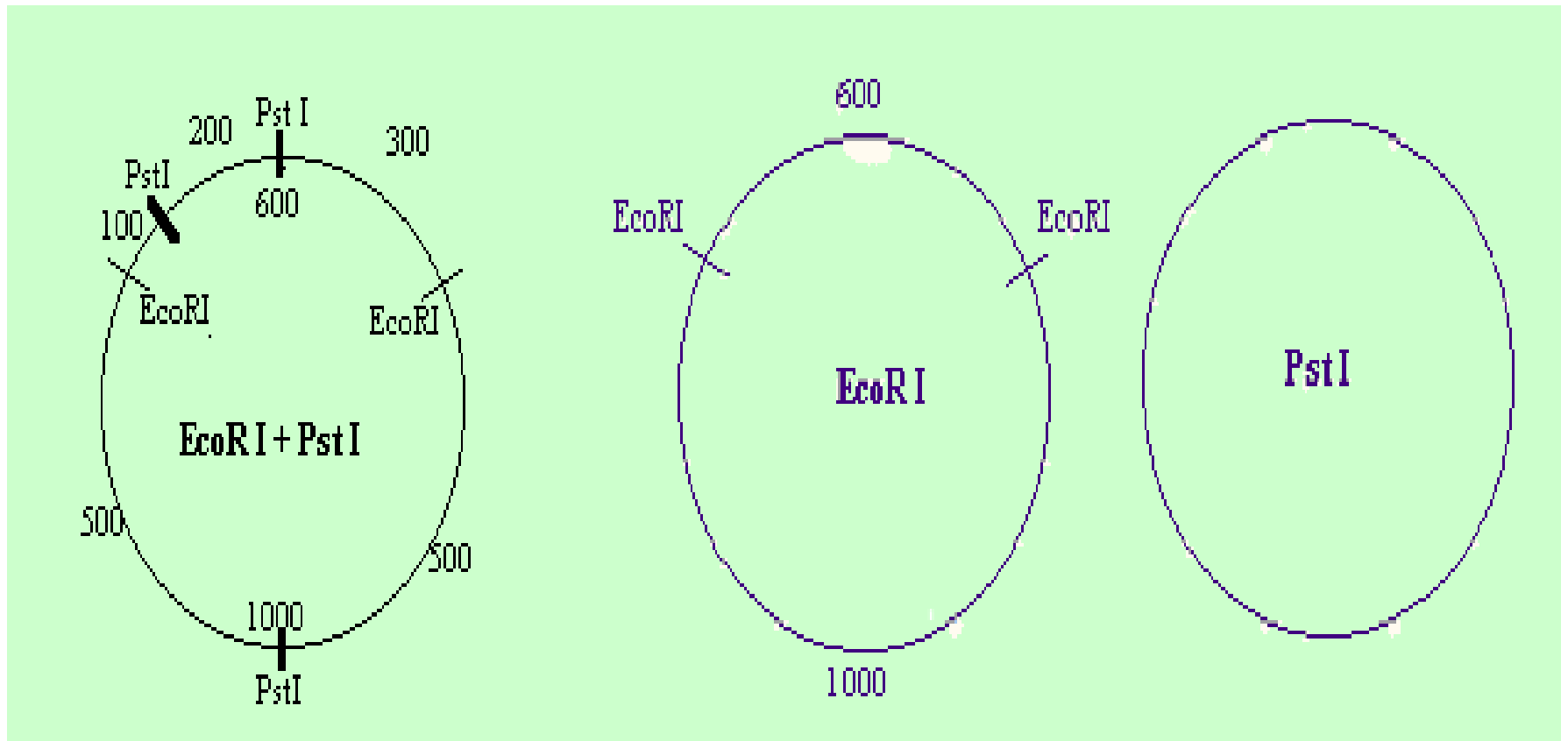
1/ Carte de restriction de l'ADN.

Les enzymes de restriction coupent l'ADN au niveau de séquences parfaitement définies. Il est donc possible d'établir une véritable carte d'un gène donné par la technique de Southern. Cette carte porte le nom de carte de restriction.

En pratique, l'ADN à étudier est réparti en différentes fractions. Chaque fraction est traitée par une enzyme de restriction ou un couple d'enzymes de restriction.

Ex: lorsqu'on opère une digestion de restriction d'un ADN plasmidique circulaire de 1.6 kb par 2 enzymes EcoR I et Pst I. Le profil électrophorétique obtenu est le suivant :

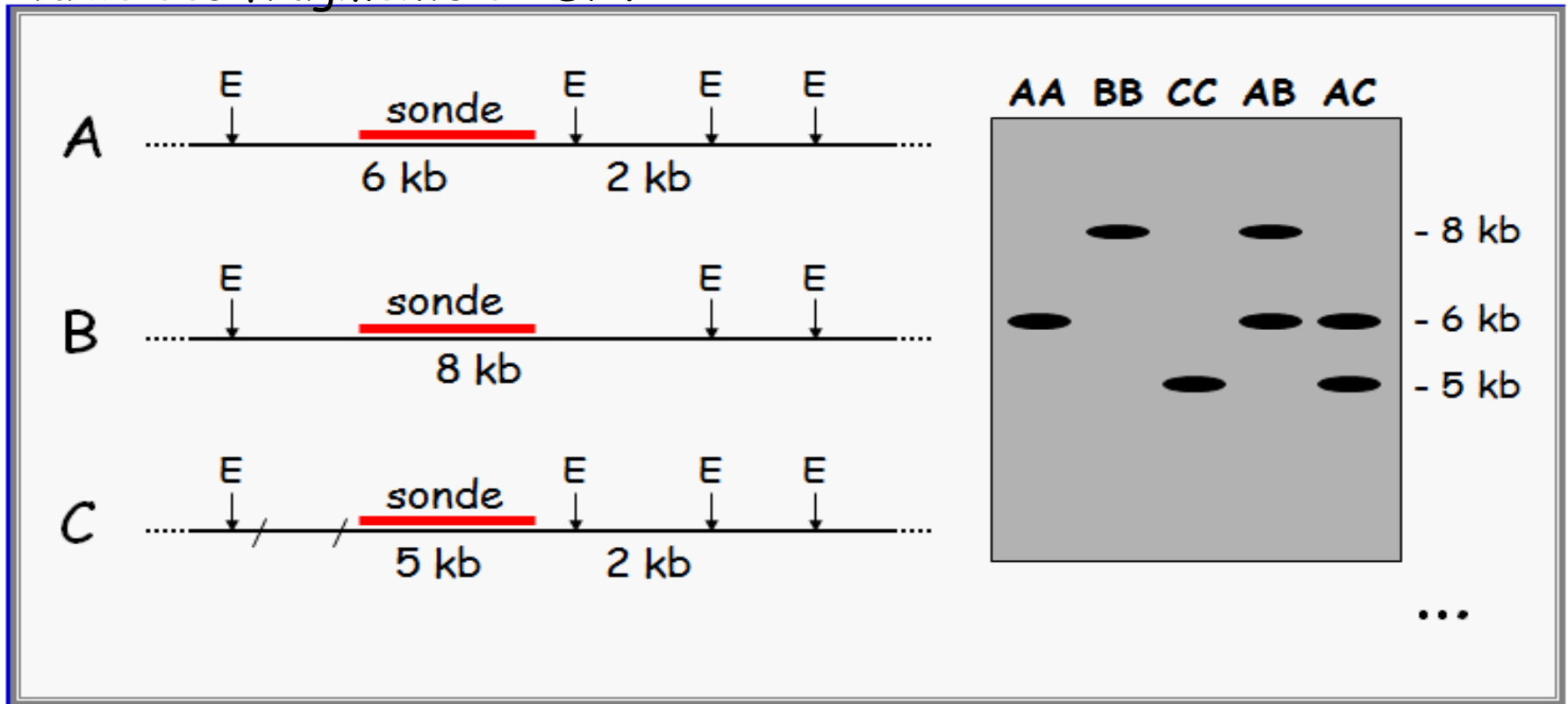




Carte de restriction de l'ADN d'EcoR1 coli

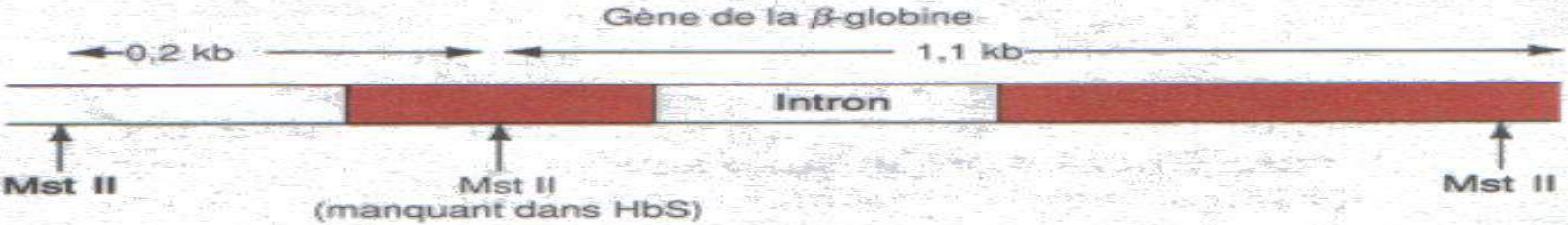
Mise en évidence de mutations, délétions et insertions par southern blot

Si on dispose de sondes spécifiques du gène à explorer. Mise en évidence des délétions dans un gène ou une zone juxta-génique. L'étendue de la délétion peut être estimée par la détermination de la taille des fragments d'ADN.



Ex: Mise en évidence de la *drépanocytose* : hémoglobine S, ou anémie à cellules falciformes (sickle-cell anemia en anglais) ... par southern blot

Type de Hb	Séquence en acides aminés Séquence nucléotidique
A	-Pro-Glu-Glu- -CCT-GAG-GAG- <i>Mst II</i>
S	-Pro-Val-Glu -CCT-GTG-GAG-



ADN de cellules normales

ADN de cellules falciformes

Mst II

Electrophorèse sur gel

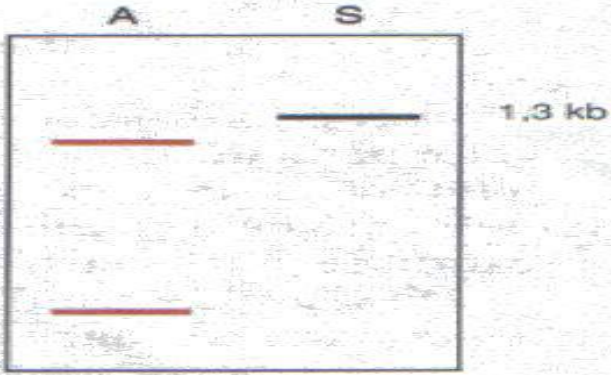


1,1 kb

Buvardage à la Southern

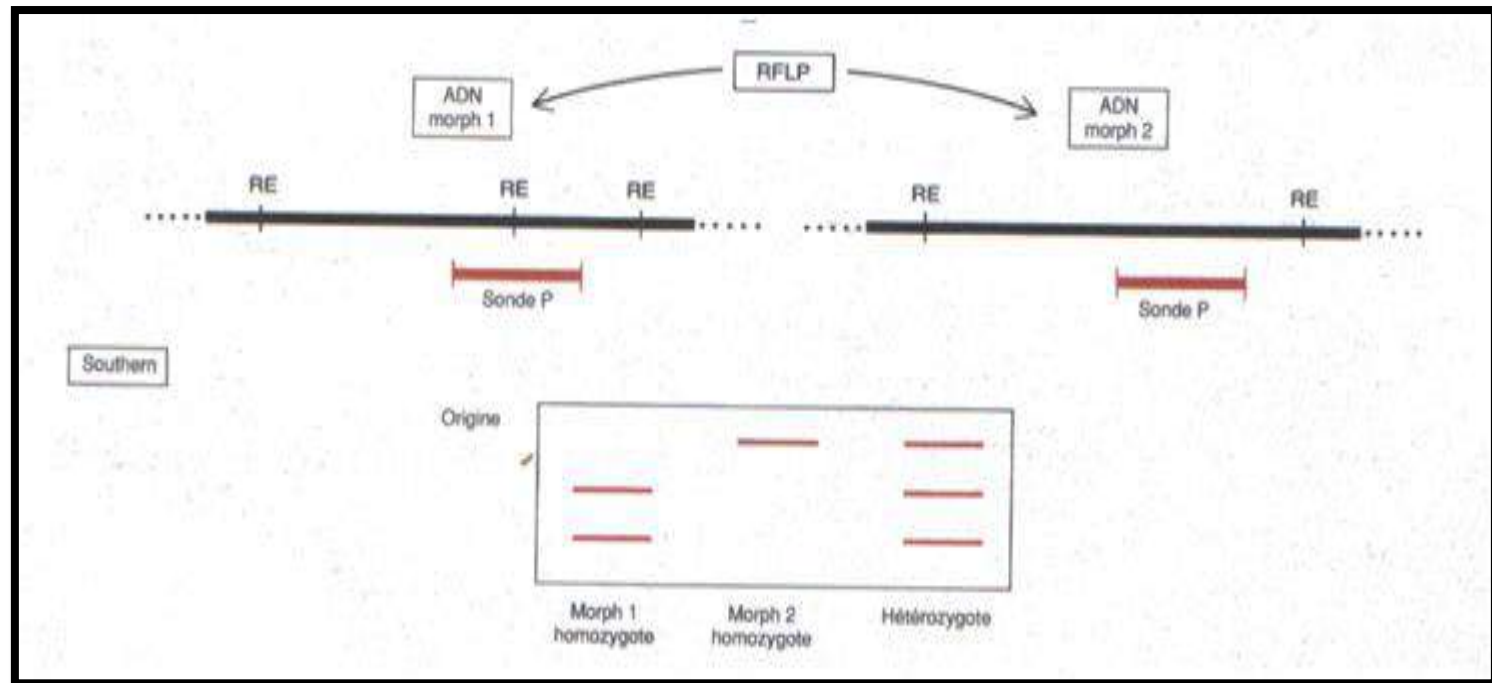
0,2 kb

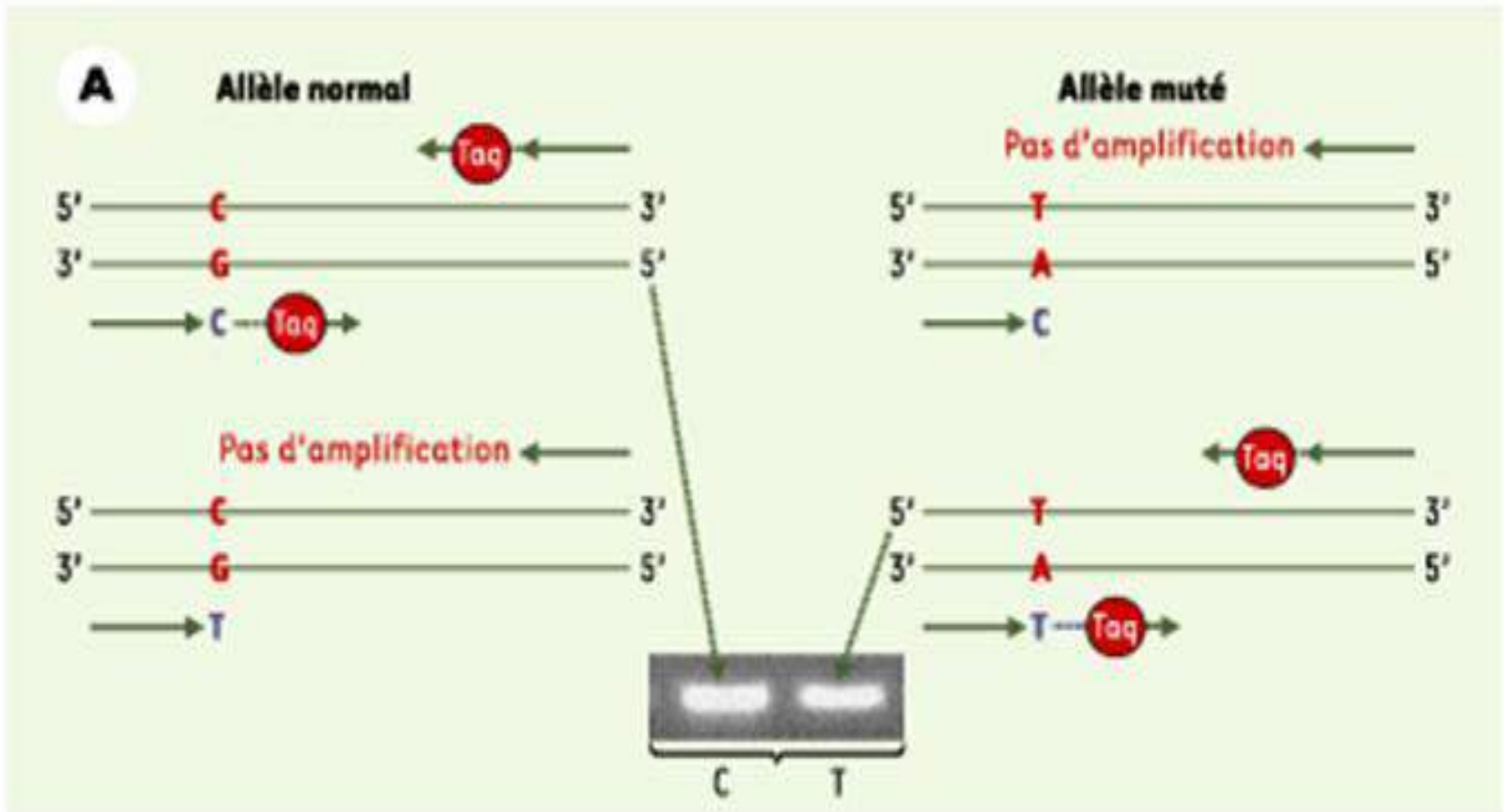
ADNc de β -globine marqué au ^{32}P



Comparaison de l'ADN de différents individus avec mise en évidence des polymorphismes de restriction.

En présence de mutation(s) ponctuelle(s) dans des sites de restriction, des variations dans la taille de certains fragments seront observées et ceci par exemple à l'intérieur d'une même population. Ces petites différences entre des individus dans une même population sont appelées polymorphisme de taille des fragments de restriction (ou **RFLP** pour « restriction fragment length polymorphism »).

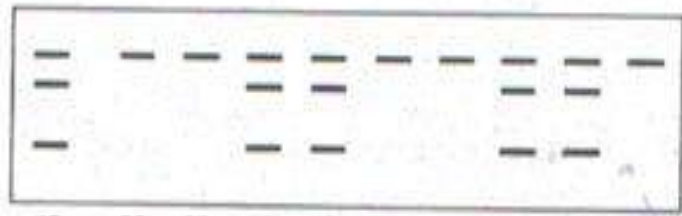
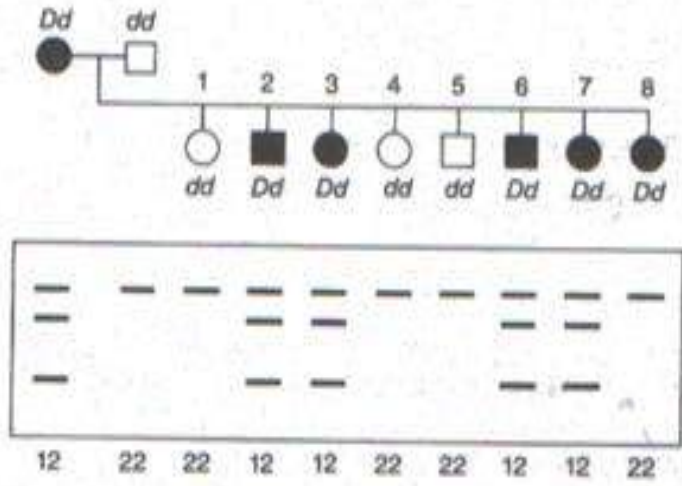




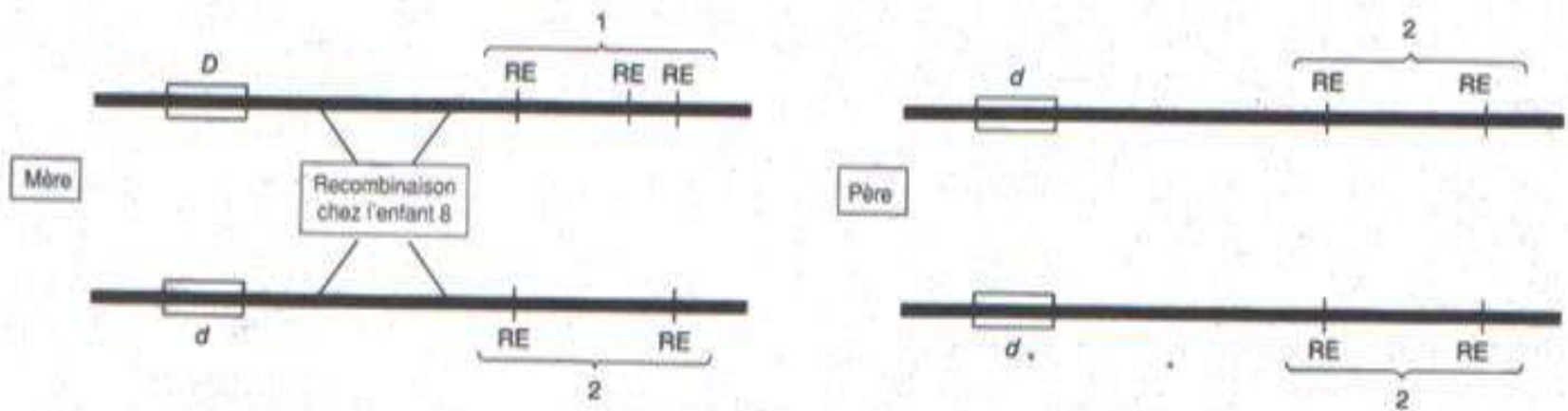
Principe de la PCR-ASO. Cette technique est fondée sur la spécificité de séquence des amorces utilisées pour la réaction de PCR. Pour chaque analyse, la réaction est réalisée en double de manière simultanée, sur l'ADN du patient, en utilisant une amorce « anti-sens » commune et une amorce « sens » dont la séquence terminale est spécifique de la mutation ou de l'allèle normal. En cas de non appariement, la réaction d'élongation par la Taq polymérase ne peut se faire. Ainsi, l'analyse des produits de la réaction après électrophorèse en gel d'agarose permet de visualiser la présence ou l'absence d'un produit d'amplification suivant le couple d'amorces utilisé, permettant ainsi de déterminer la présence ou l'absence, dans l'échantillon d'ADN, de l'allèle muté.

Mise en évidence des recombinaisons entre des gènes.

Liaison au locus D

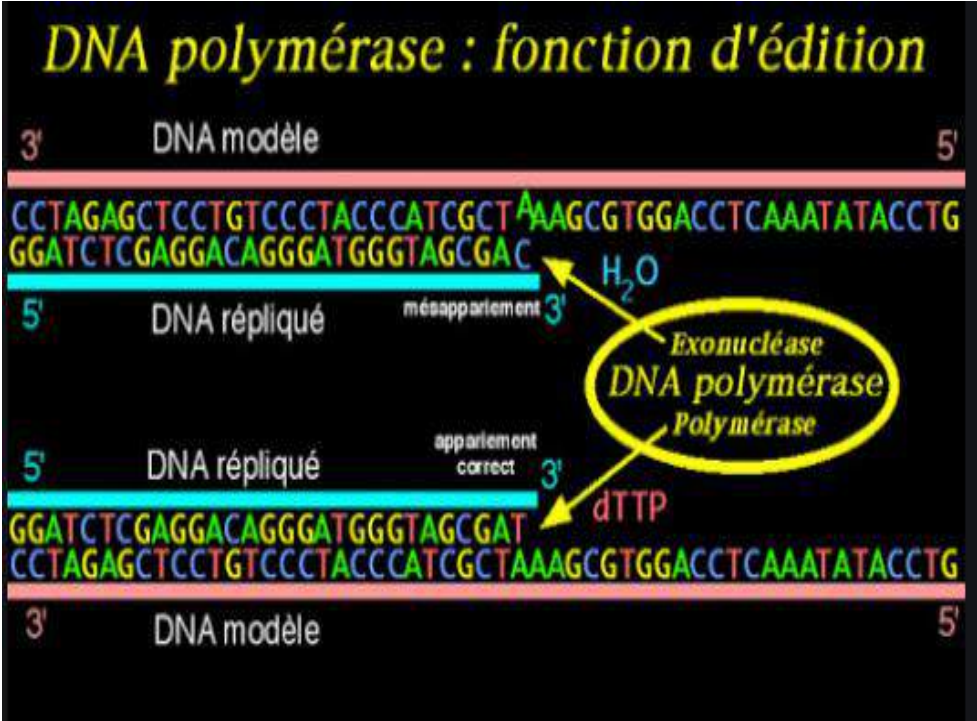


Conclusions



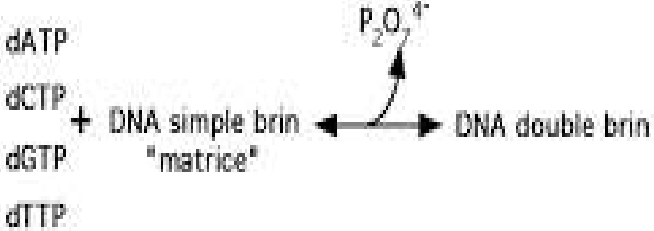
Fonctions des enzymes les plus importantes

Polymérases

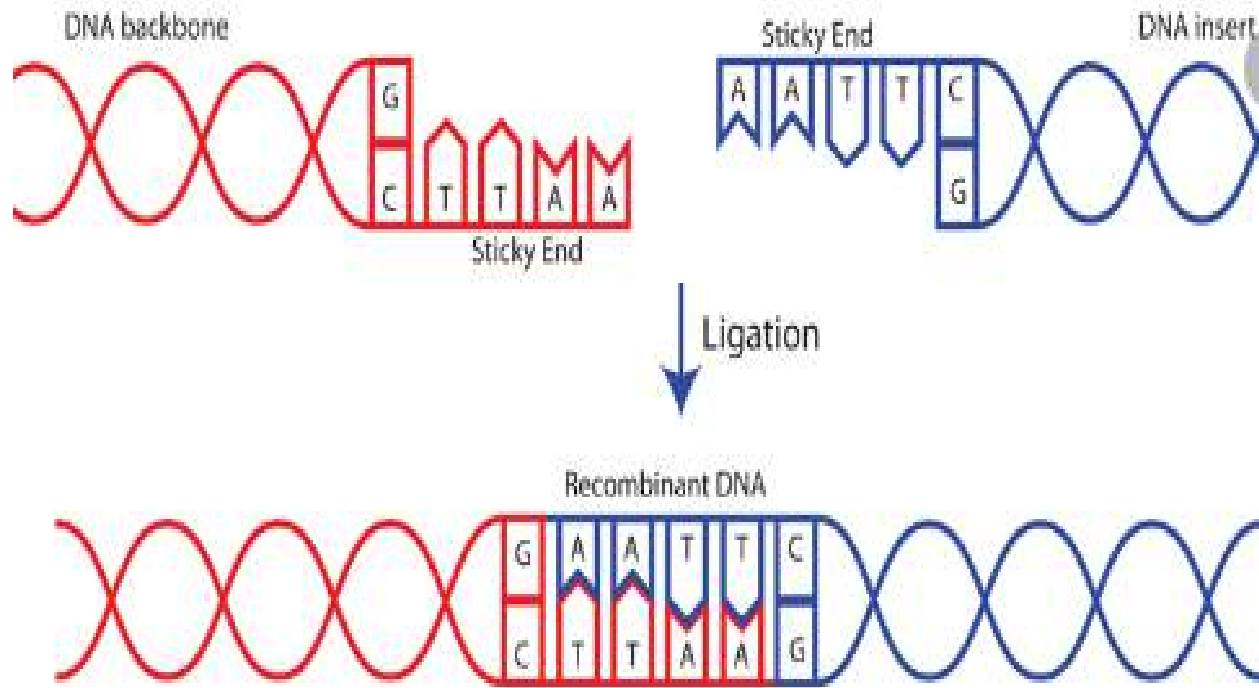


DNA polymérase

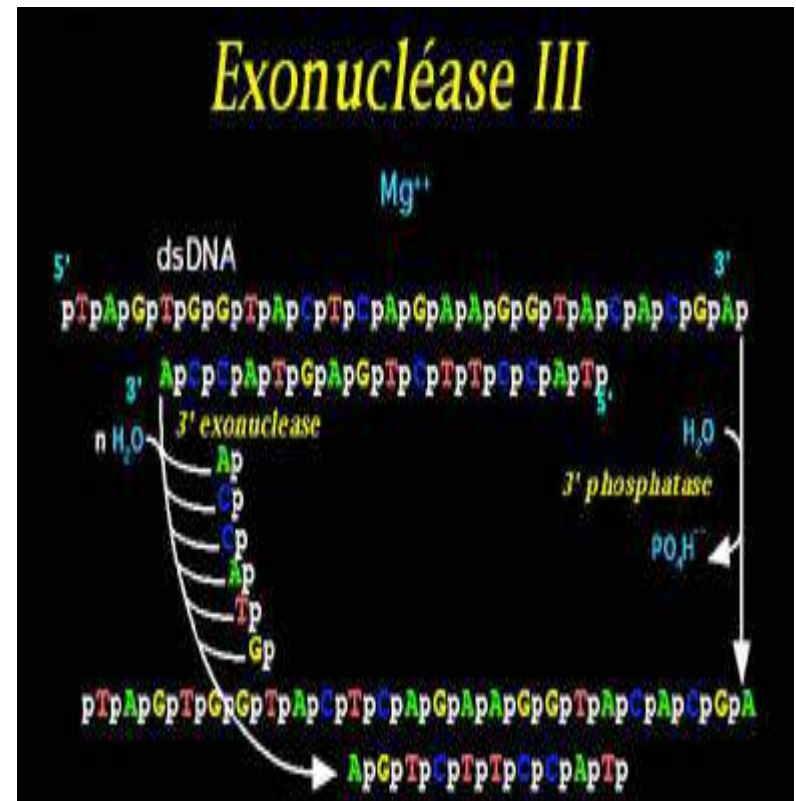
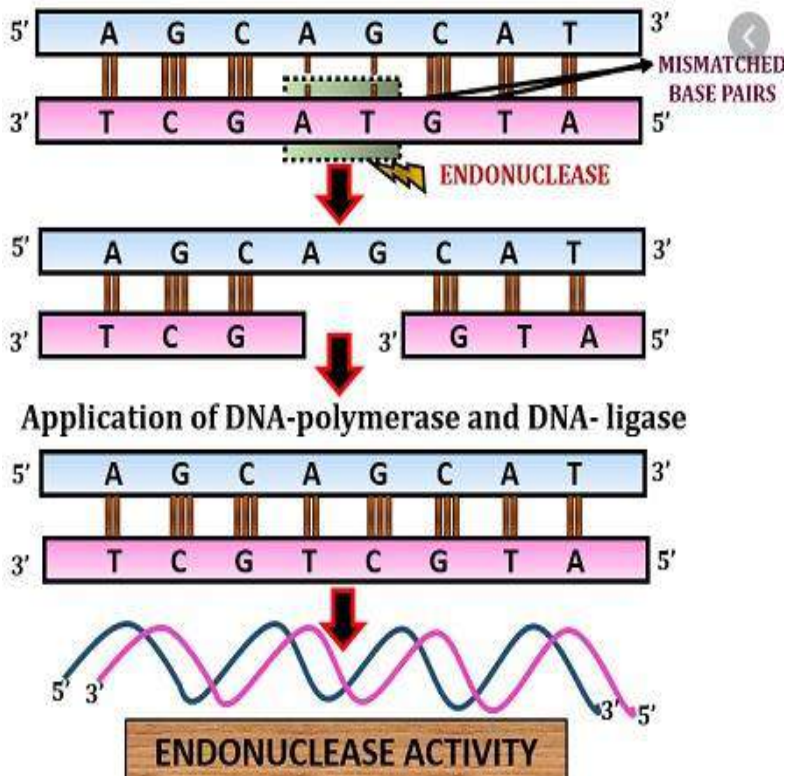
Primase, DNA-ligase, Hélicase, ... Mg⁺⁺



Ligases



Nucléases: exonucléases/ endonucléases



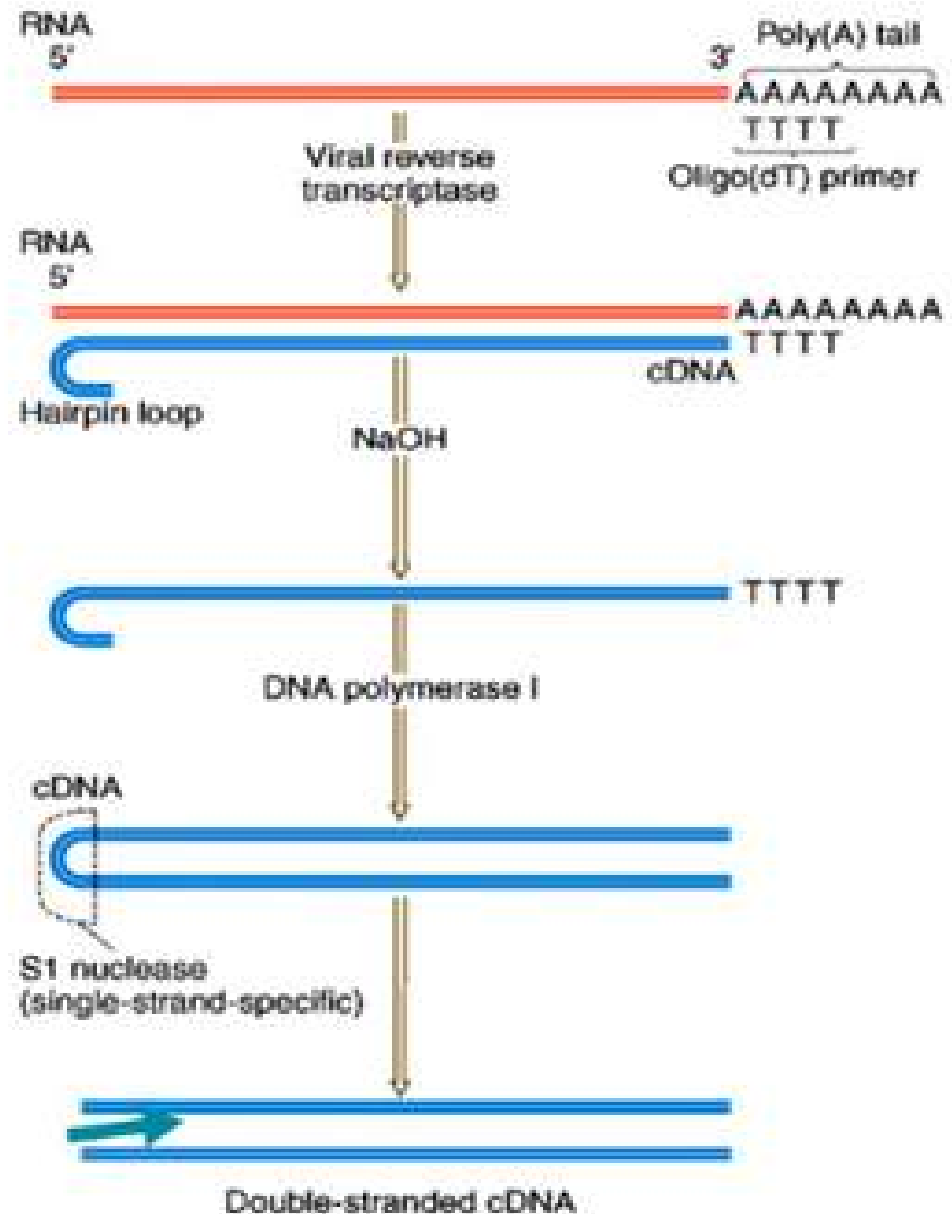
Définition d'un vecteur en biologie moléculaire

En biologie moléculaire, un vecteur est un véhicule de transport qui permet le transfert d'une séquence d'ADN spécifique dans une cellule hôte, cette insertion doit assurer la réplication ou l'expression de cet acide nucléique dans la cellule qui le reçoit.

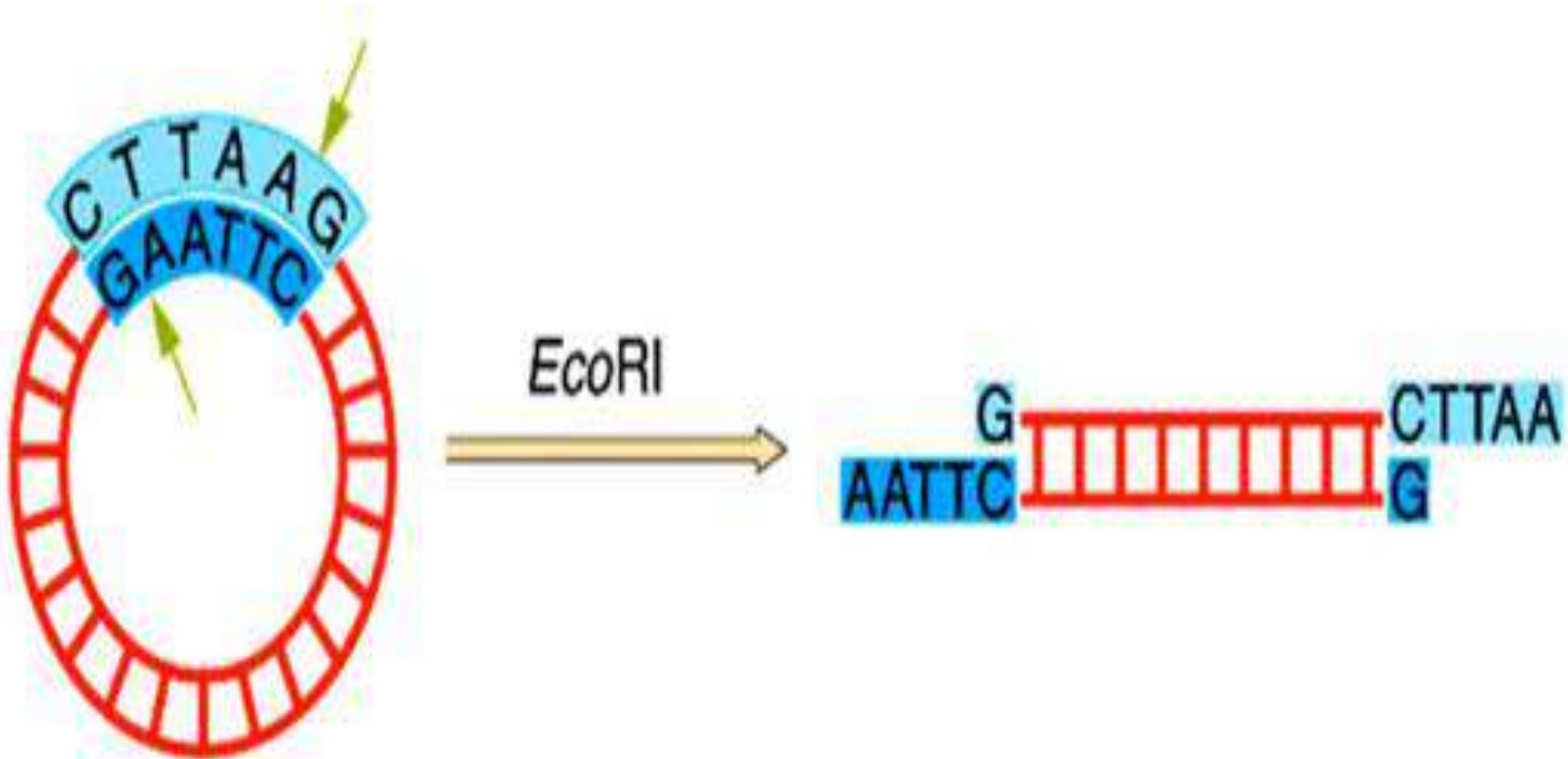
Les plasmides bactériens, les bactériophages et de nombreux virus sont des vecteurs naturels permettant la transfection de différents types de cellules-hôtes. D'autres vecteurs encore plus performants ont été obtenus artificiellement à partir de ceux-là grâce à des manipulations génétiques

Isolement d'ADN complémentaire chez les eucaryotes

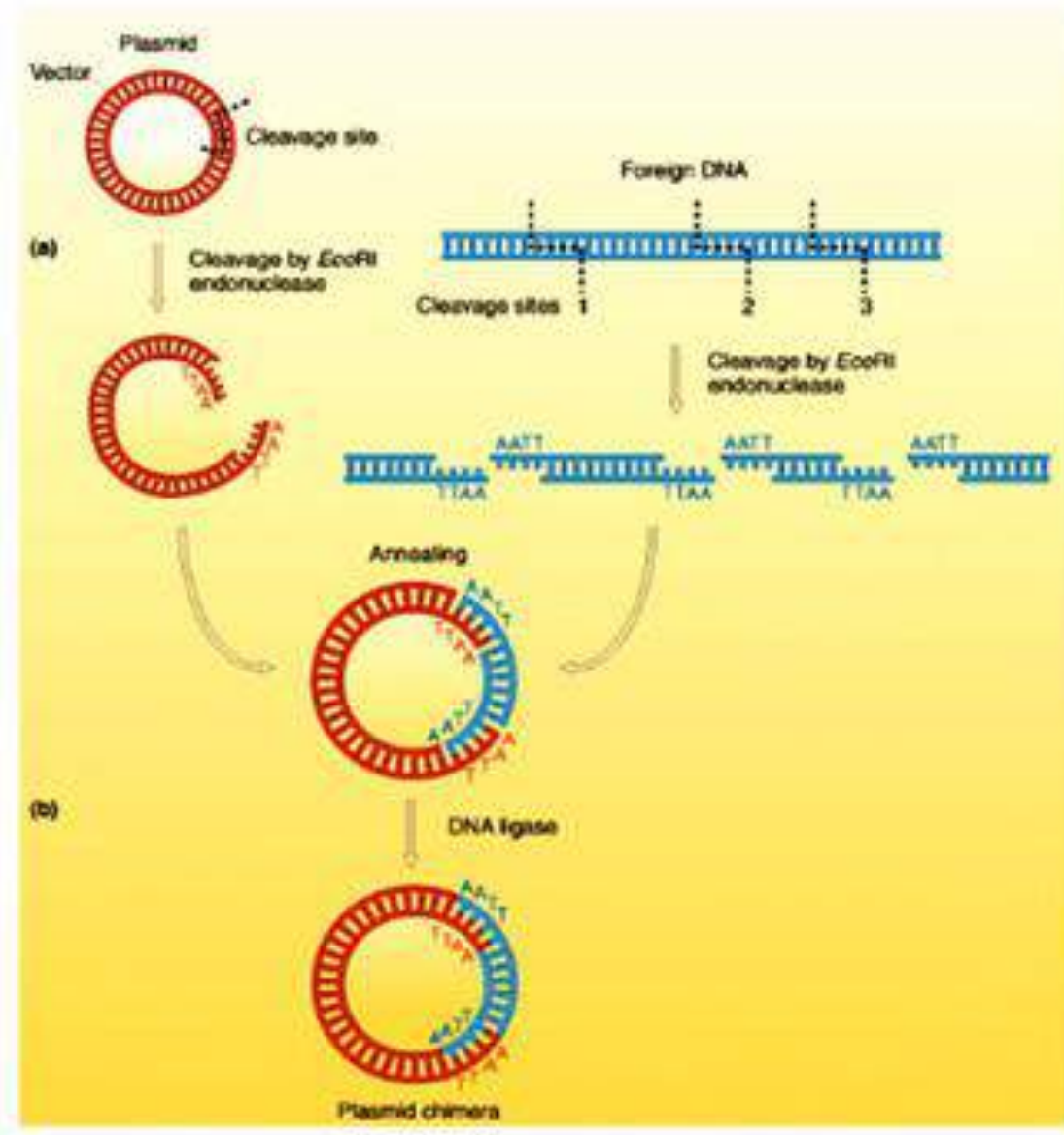
La transcription reverse permet d'obtenir un fragment d'ADN d'un gène à partir des molécules d'ARN messenger (on obtient ADN complémentaire qui est sans introns). Cet ADN peut être cloné directement dans un vecteur d'expression.



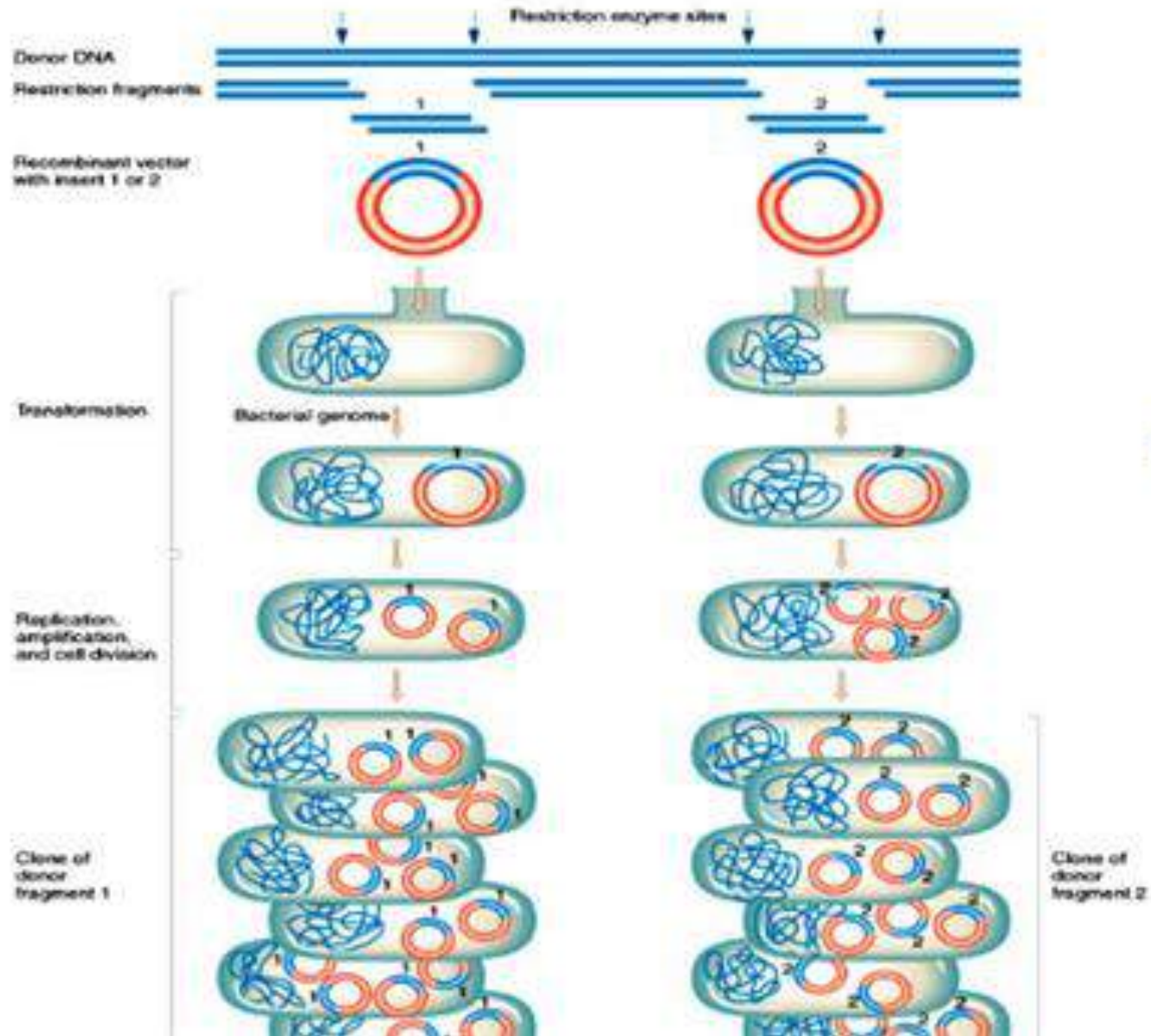
Coupure des vecteurs de clonage



Construction de plasmides chimériques avec une enzyme de restriction



Clonage de l'ADN génomique



Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN des cellules ou des tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

Lyse des cellules

Élimination des protéines

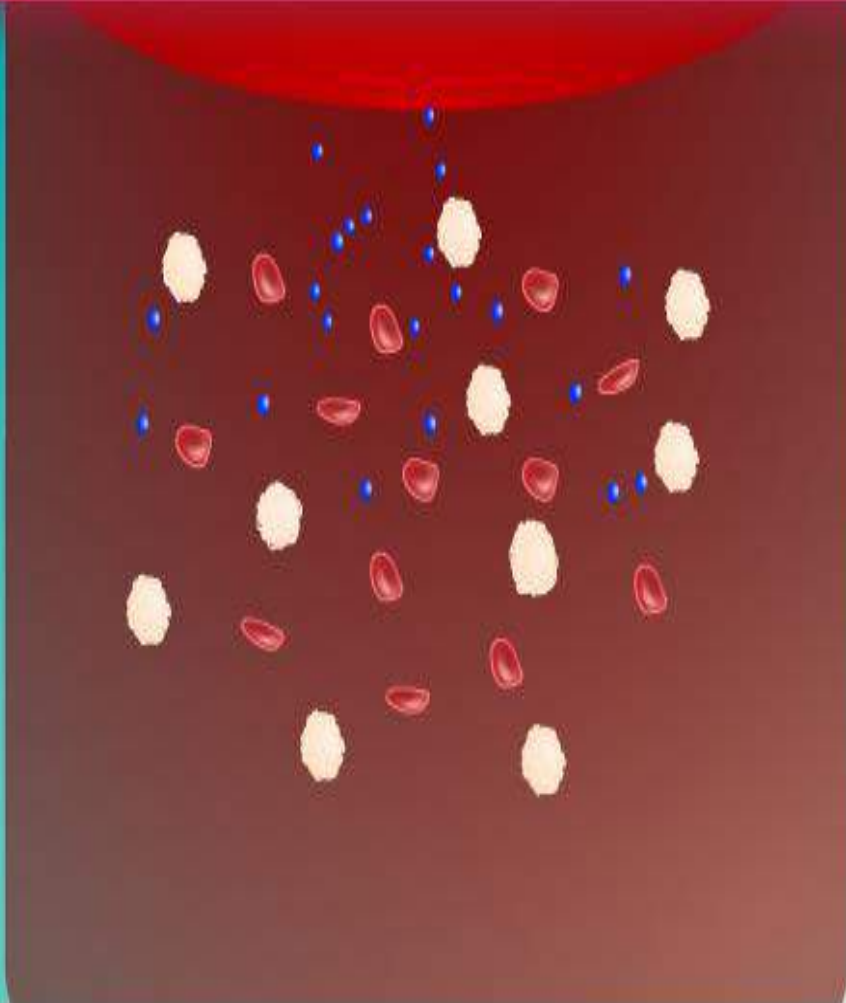
Élimination des autres acides nucléiques (ARN), etc.)

Concentration de l'ADN par précipitation à l'éthanol

Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement ces extractions à l'aide de réactifs prêts à l'emploi

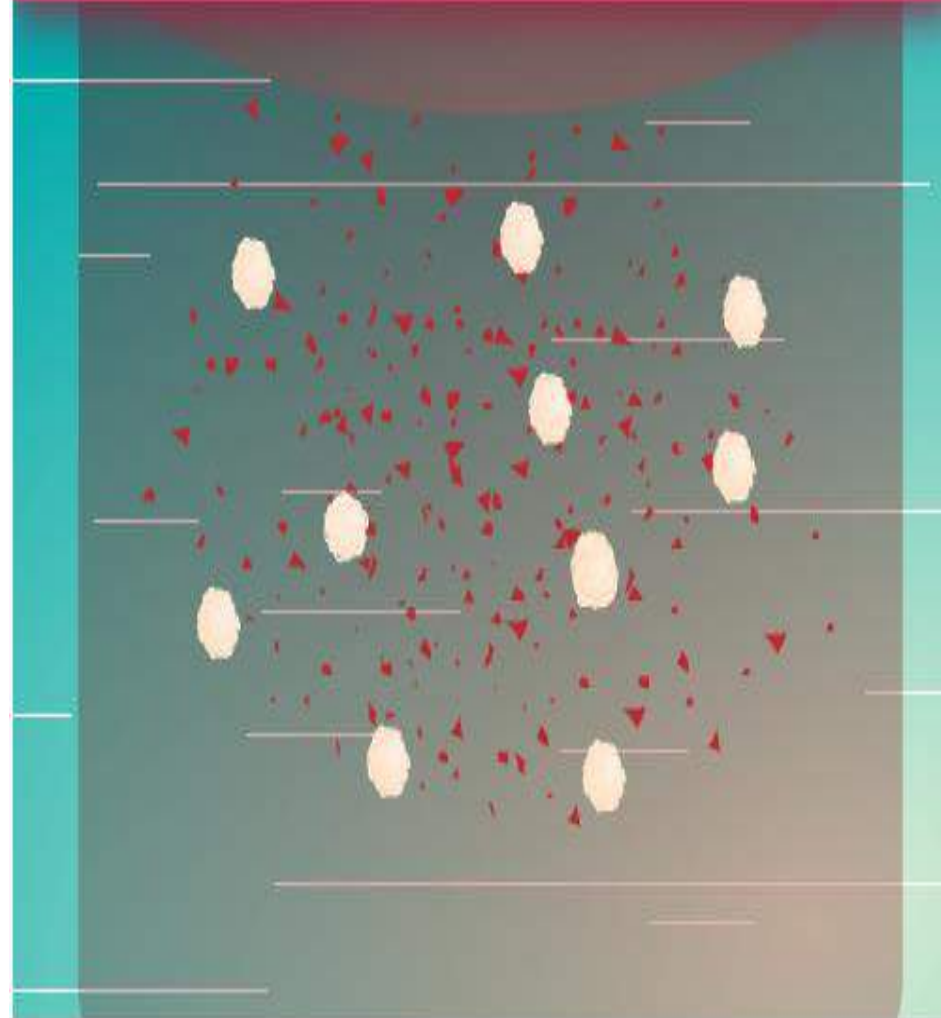
Lavages

Cette première étape consiste à éliminer les globules rouges ainsi que toutes les impuretés du milieu extracellulaire. Ce lavage se fait par ajout d'une solution hypotonique qui aura pour effet de faire éclater les globules rouges mais pas les globules blancs qui eux sont beaucoup plus résistants. Les globules rouges ne contiennent pas d'ADN, l'ADN sera extrait des globules blancs.



Centrifugation

La centrifugation va séparer les globules blancs des débris de globules rouges. A la fin de la centrifugation on peut voir au fond du tube un « culot » blanc (globules blancs) et un surnageant rouge (débris de globules rouges) qui est retiré du tube. La centrifugation se fait à la vitesse de 4000 rpm (rotation par minute) pendant 5 minutes.



Ces 2 premières étapes sont réalisées jusqu'à obtenir une solution au dessus du « culot » limpide



Destruction des globules blancs : lyse des blancs

On utilise pour cette étape une solution agressive de détergeant qui va déstabiliser la membrane des globules blanc et le noyau de la cellule .On ajoute une enzyme appelée « protéinase K » qui va dégrader les protéines de la cellule. Pour avoir une activité optimale de la protéinase K le tube est chauffé entre 55 et 65 °C de 1 heure à toute une nuit.



Après cette étape le tube d'extraction contient un mélange d'ADN et les restes de la cellule, fragments de protéines, résidus de la membrane de la cellule et toutes les molécules du cytoplasme



Précipitation de l'ADN

La précipitation a pour but de séparer l'ADN du reste de la solution de lysat. L'étape va consister à ajouter délicatement de l'isopropanol pur (dit isopropanol 100%) et mélanger le tube délicatement. Au bout de 4 à 5 agitations, il se forme une masse opaque appelée « pelote » qui n'est autre que l'ADN



Élimination de la solution de lyse et lavage à l'éthanol à 70%

La centrifugation va mettre la pelote d'ADN au fond du tube. Il sera alors possible d'éliminer le surnageant contenant les restes de la cellule sans toucher à l'ADN.



Pour être sûr d'éliminer le maximum de la solution de lyse, on ajoute dans le tube de l'éthanol 70%. L'éthanol 70 % éliminera mieux les restes de la solution de lyse que l'isopropanol car il contient 30% d'eau. L'eau solubiliserait les impuretés autour de la pelote d'ADN. L'échantillon est agité pour laver au mieux la pelote. Le tout est centrifugé à 4000 rpm pour mettre la pelote au fond du tube et éliminer le surnageant.



Séchage et hydratation de l'ADN

L'éthanol peut altérer les analyses qui seront réalisées sur cet ADN. Le tube va être laissé ouvert pour que l'éthanol s'évapore.



L'ADN en pelote sèche ne peut pas être utilisé pour les analyses de biologie moléculaire. Il faut que l'ADN soit réhydraté dans une solution. L'ADN sera totalement réhydraté lorsque la pelote aura disparu. La solution est le plus souvent du TE pour Tris-EDTA. Ces composés donnent un pH et une force ionique à l'eau optimisant l'hydratation et la conservation de l'ADN. Pour une meilleure hydratation de l'ADN le tube est chauffé à 65°C pendant 1 à 2 heures après l'ajout du TE.



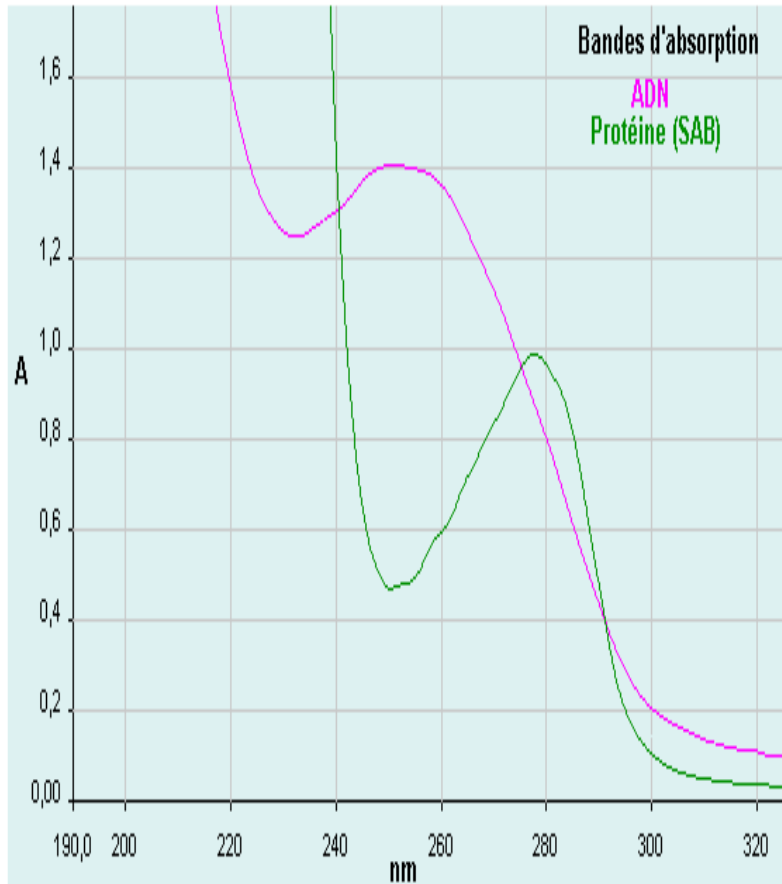
Dosage de l'ADN par spectrophotométrie

La **spectrophotométrie** est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus la substance est concentrée plus elle absorbe la lumière

Le dosage s'effectue dans l'ultra-violet à 260 nm. Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260 nm. Une unité de densité optique correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ ou à l'absorption d'une solution d'ADN simple brin (ou d'ARN) à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$.



Signification du rapport A260 / A280

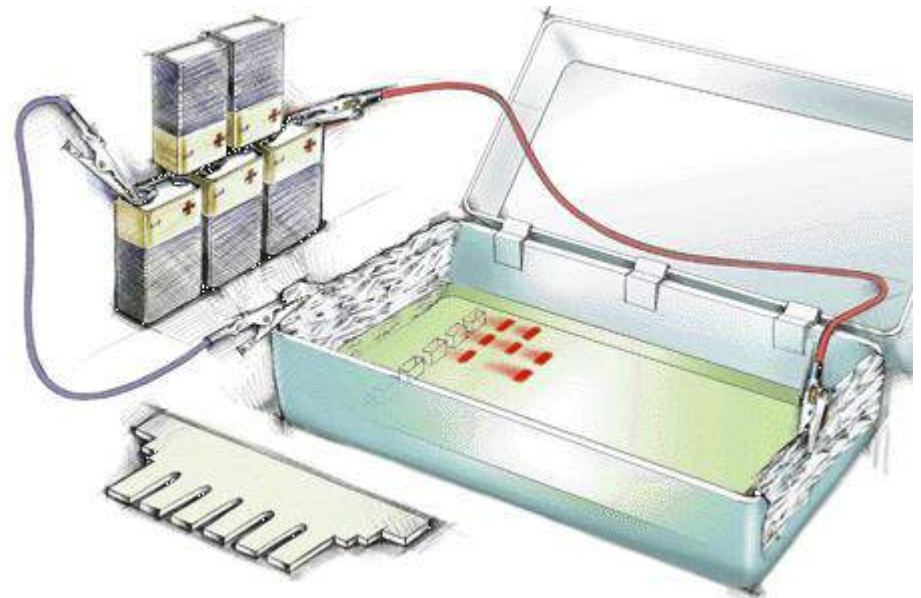


-Quand on réalise un extrait cellulaire d'ADN, il est accompagné par des protéines dont la présence peut être indésirable. La valeur du rapport A260/A280 fournit une bonne indication sur la pureté de l'échantillon. En effet, la présence de protéines fait augmenter A280.

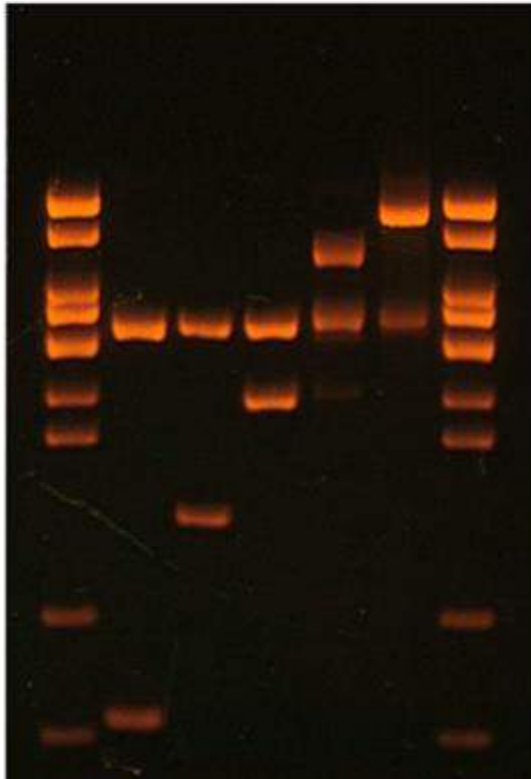
-On a établi qu'un rapport, mesuré par spectroscopie, d'une valeur comprise entre 2 et 1,8 indique que l'ADN extrait est pur alors que si il est inférieur, on peut envisager une contamination par des protéines. Une valeur supérieure à 2 indique, en général, une présence importante d'ARN

Séparation des acides nucléiques par Electrophorèse

Technique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique. On peut ainsi analyser et purifier dans un milieu gélifié (gel d'agarose, gel de polyacrylamide...) l'ADN, l'ARN, les protéines



Visualisation de l'ADN



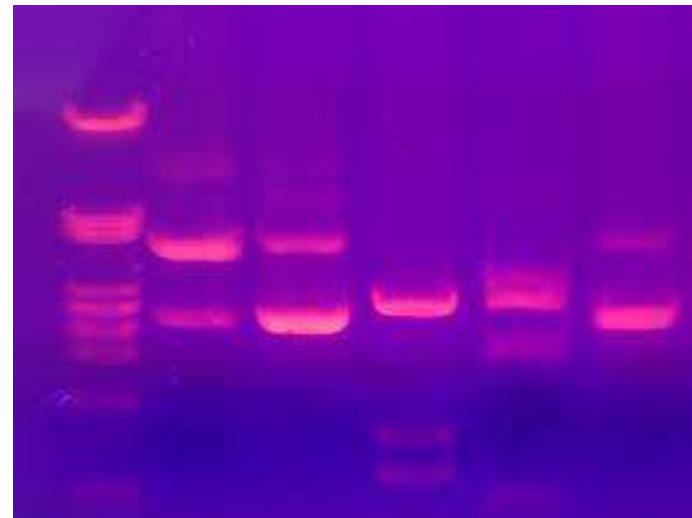
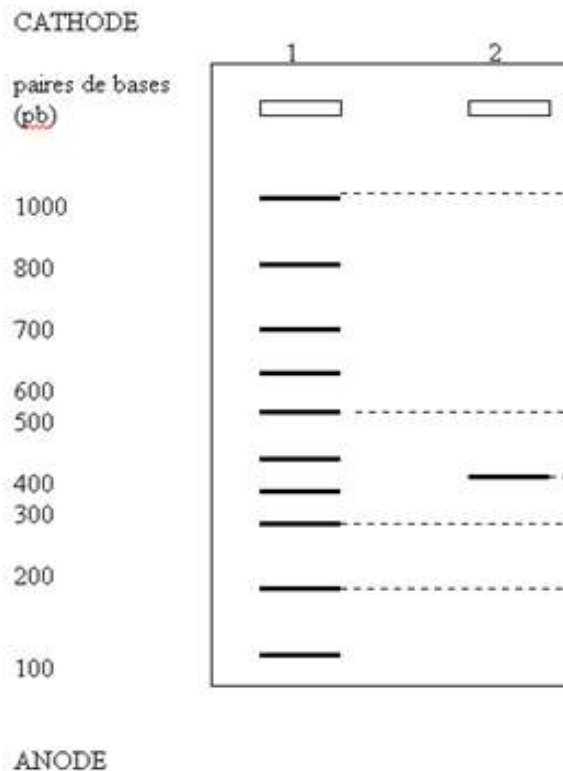
Le bromure d'éthidium s'intercale entre les bases de l'ADN. Le bromure d'éthidium absorbe la lumière ultraviolette et émet de la lumière visible: L'ADN devient ainsi visible sous les UV.

La détection de l'ADN sur ce type de gel est réalisée par exposition aux rayons UV après réaction avec un réactif spécifique (bromure d'éthidium par exemple, agent s'intercalant entre les brins d'ADN).

L'électrophorèse des fragments d'ADN en gel d'agarose permet des séparations jusqu'à 20-25 kb (20000-25000 pb).

Le tampon utilisé pour la migration électrophorétique a un pH basique (par exemple: 8,3 dans le cas du tampon appelé TBE = Tris-Borate-EDTA).

Les fragments d'ADN de taille restreinte (inférieure à 1000 paires de bases) peuvent être séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.



* PCR (polymerase chain reaction)

Cette technique (1985 K. MULLIS Prix Nobel dès 1993) permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement.

Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides en général). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces

Cette méthode permet d'amplifier l'ADN compris entre les deux amorces d'un facteur de 10^5 à 10^6

Le principe de la PCR

Deux amorces (oligonucléotides d'environ 20 bases) spécifiques du fragment à rechercher et situées à chaque extrémité de la cible sont utilisées comme "têtes chercheuses".

Bien choisies, ces amorces sont incapables de s'hybrider de façon efficace ailleurs que sur le fragment ciblé, ce qui explique la spécificité de la PCR.

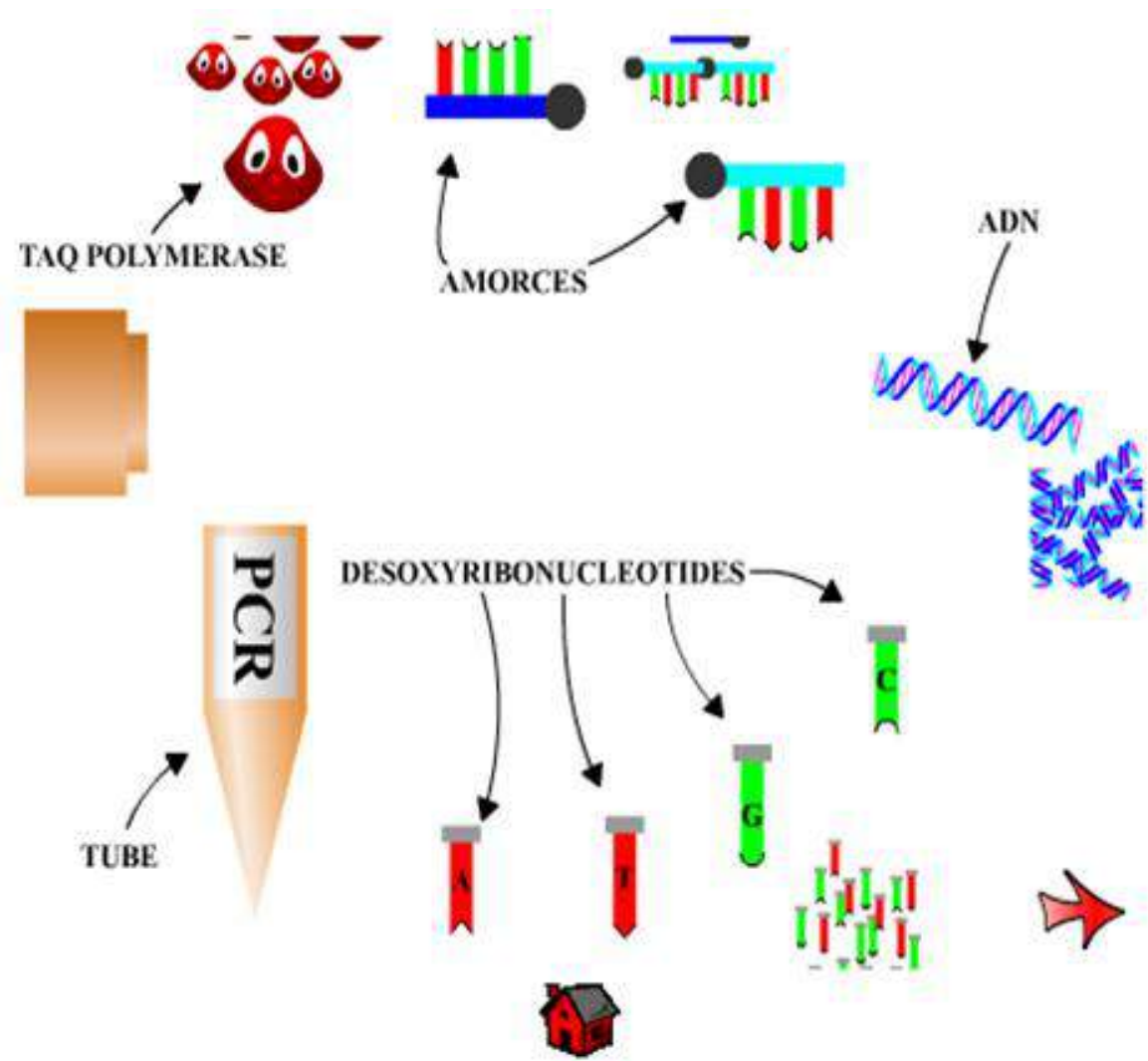
Une fois la cible trouvée, une enzyme thermostable (la Taq Polymérase) synthétise de façon très fidèle de nouveaux fragments d'ADN similaires à ceux de la séquence originale présente dans le prélèvement.

Ces cycles d'hybridation des amorces et de polymérisation d'ADN sont répétés au moins 30 à 50 fois aboutissant à une multiplication exponentielle de la séquence cible originale.

Cette amplification explique la sensibilité des techniques PCR (ou plutôt leurs seuils de détection très bas : la présence de quelques copies de génome viral donne naissance en deux heures à plusieurs milliards de fragments identiques)

- **Réplication ciblée in vitro**
- **Obtention d'ADN spécifique de longueur définie**
- **Séquence cible = segment amplifié sélectivement grâce aux amorces**

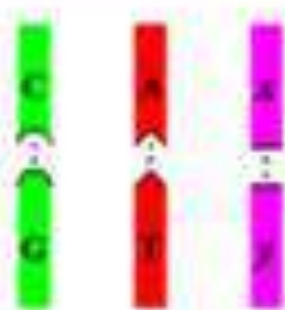
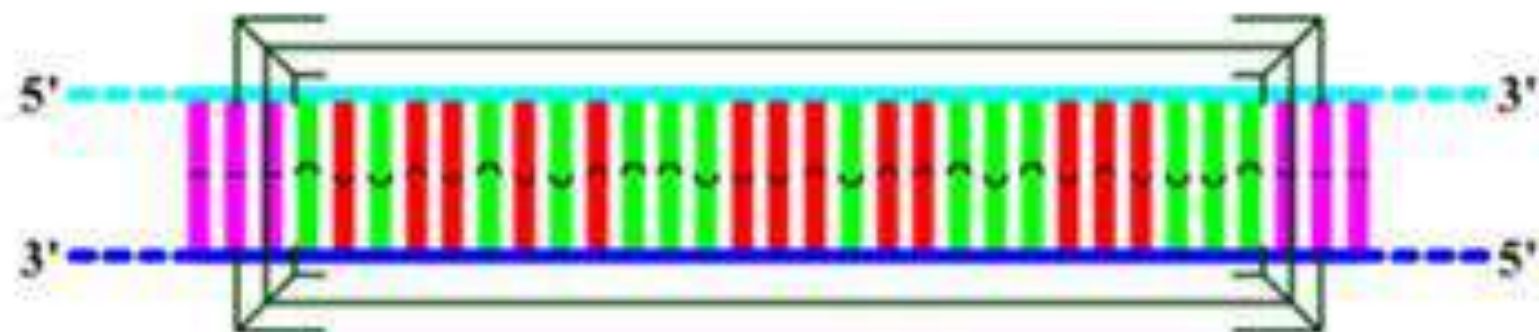
Réalisation d'une PCR



*Thermocycleur
(appareil qui
comporte une
enceinte où l'on
dépose les tubes
échantillons et
dans laquelle la
température peut
varier, très
rapidement et
précisément, de 0
à 100°C)*



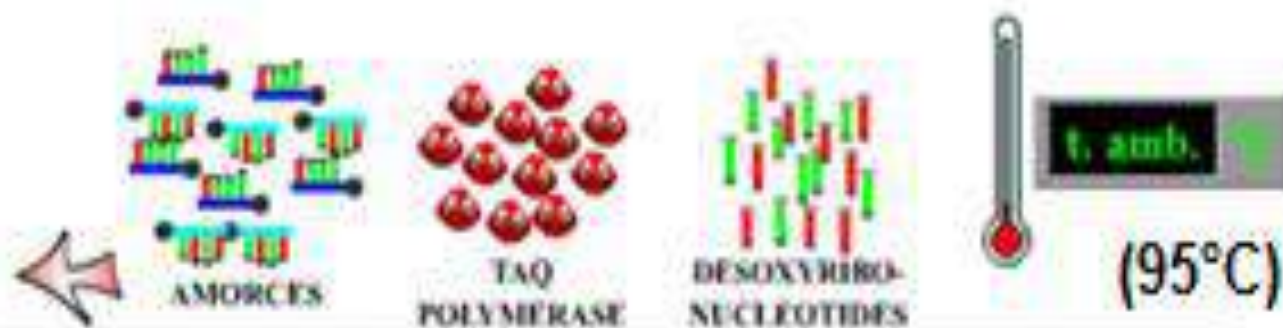
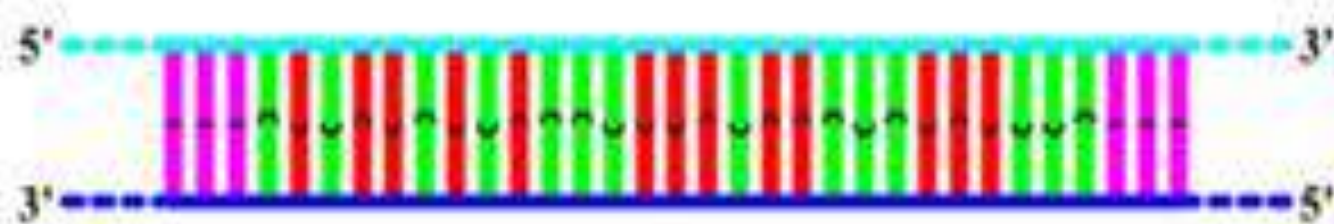
SEQUENCE CIBLE



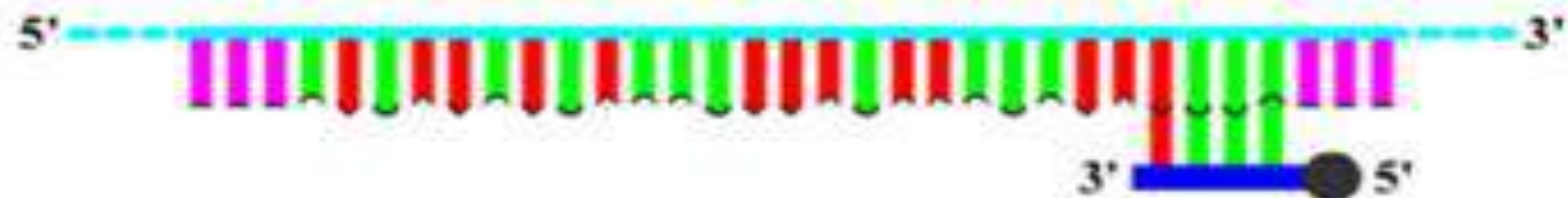
CYCLE PCR

Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes : la dénaturation, l'hybridation (ou annelage) et l'élongation (ou extension des amorces)

DENATURATION



HYBRIDATION



PRIMER DIMERS



TAQ
POLYMERASE

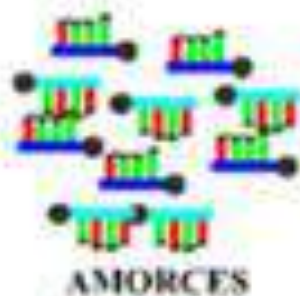
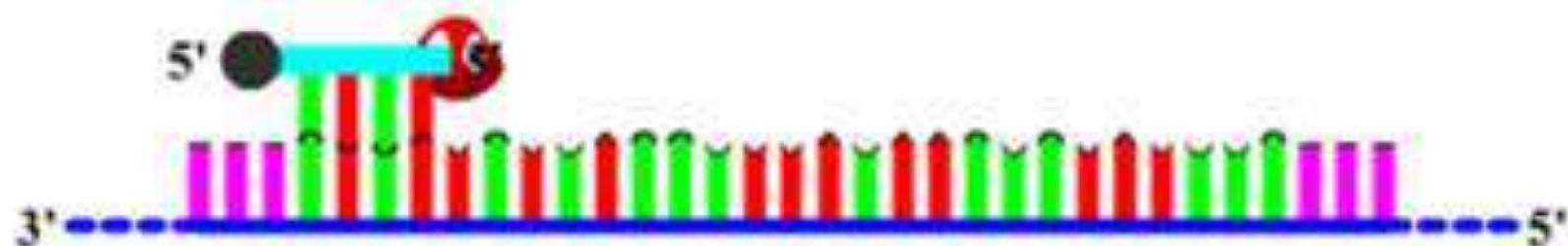


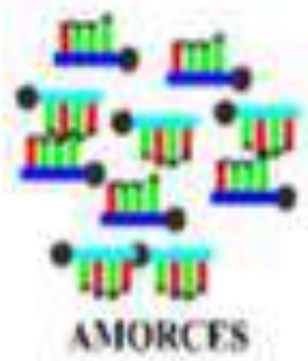
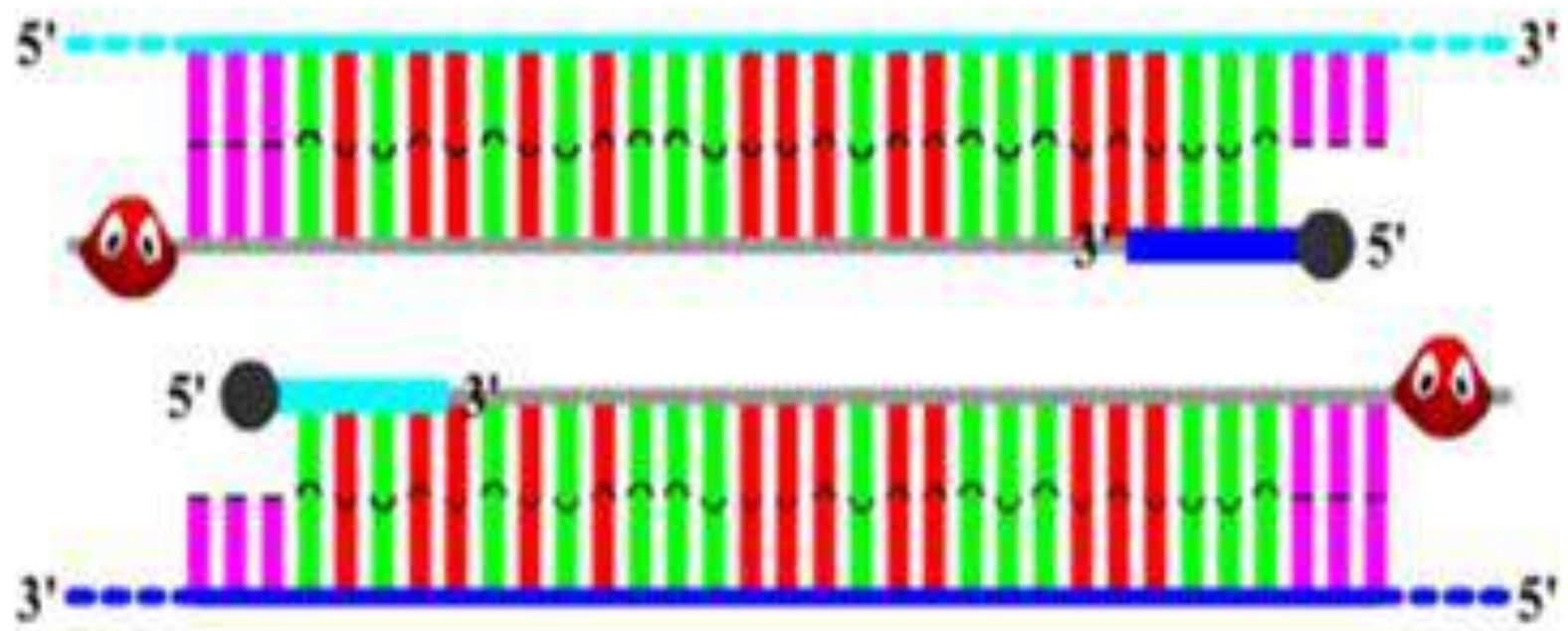
DESOXYRIBO-
NUCLEOTIDES



40-65 °C

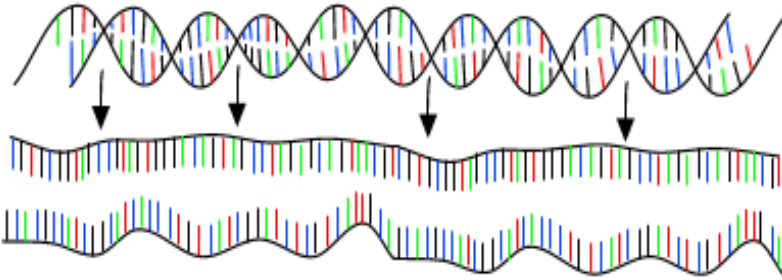
ELONGATION





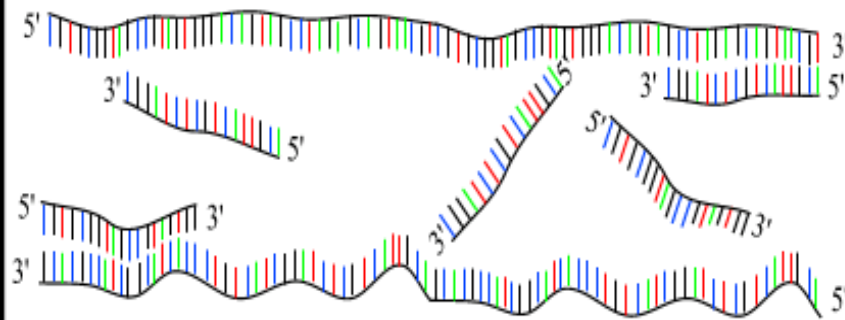
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

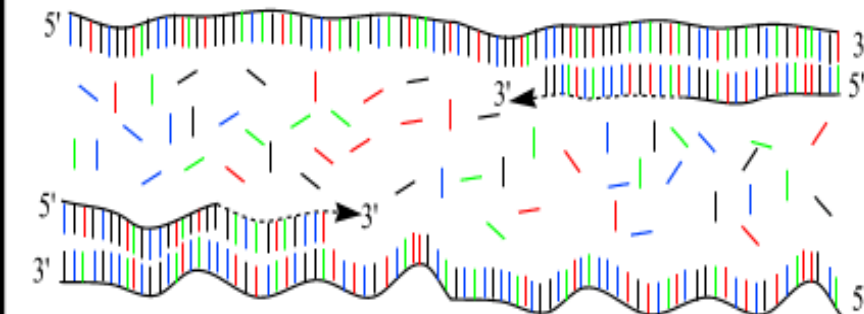
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)

Dans un microtube :

-ADN à amplifier ou matrice : 50ng à 500ng

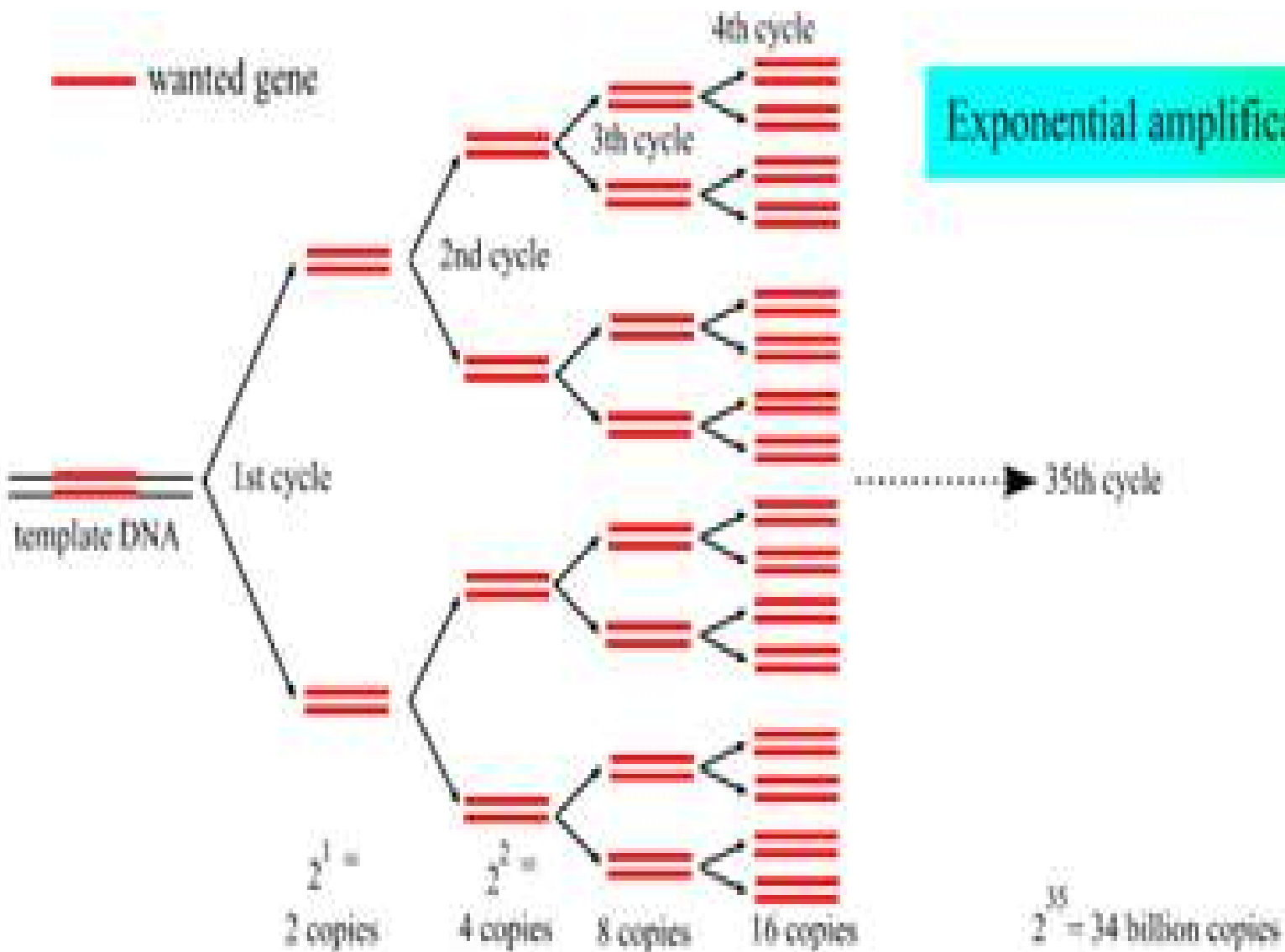
-les 2 amorces

-dNTP
(désoxynucléotides tri phosphates)

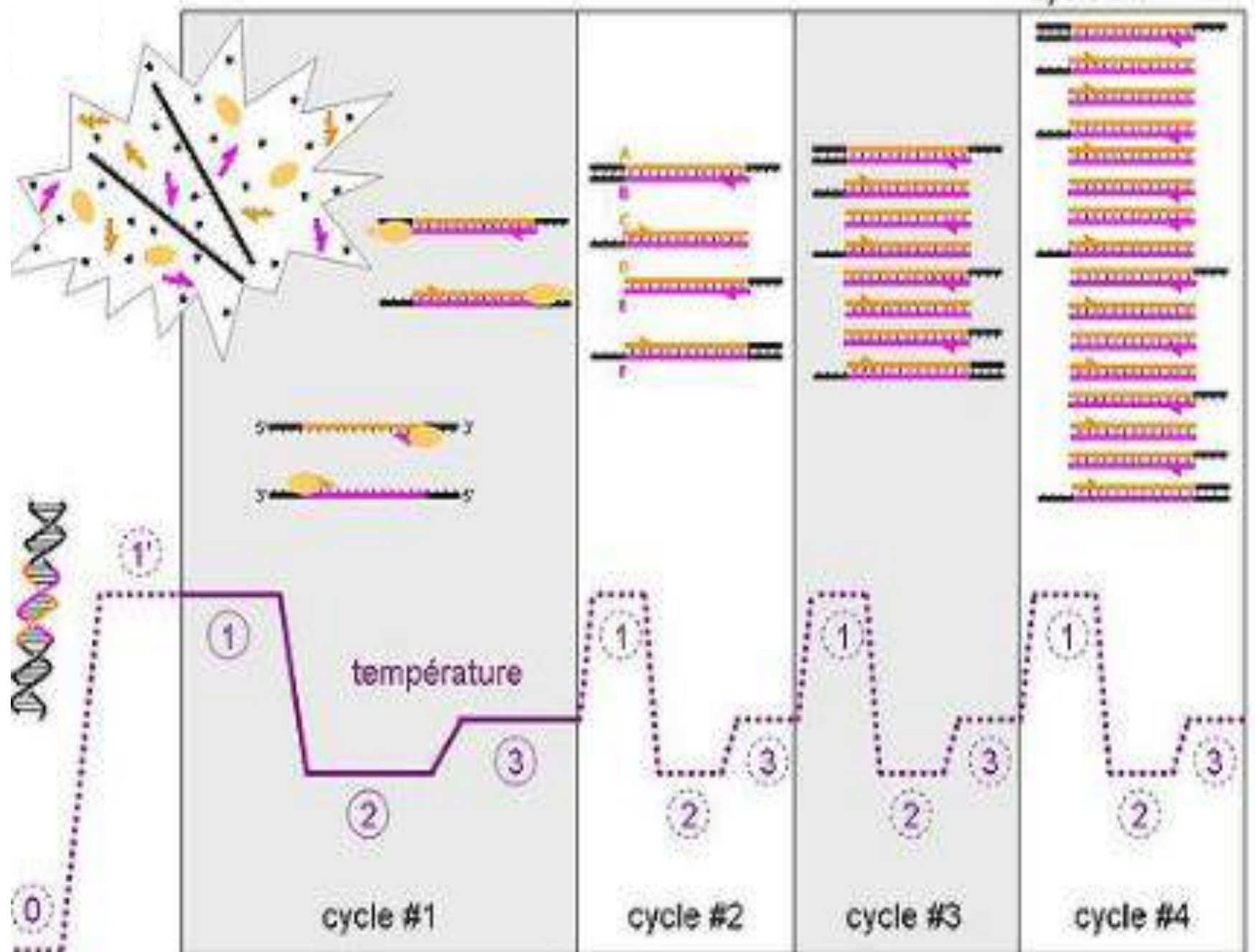
-Taq Polymérase (ADN polymérase résistante à la chaleur. extraite d'une bactérie thermophile (Thermus aquaticus).

-tampon (stabilise le PH) avec Mg⁺⁺ cation divalent nécessaire à l'activité de la Taq.

Appareil : Thermocycler



cycle #n →



0

1

1

2

3

cycle #1

1

2

3

cycle #2

1

2

3

cycle #3

1

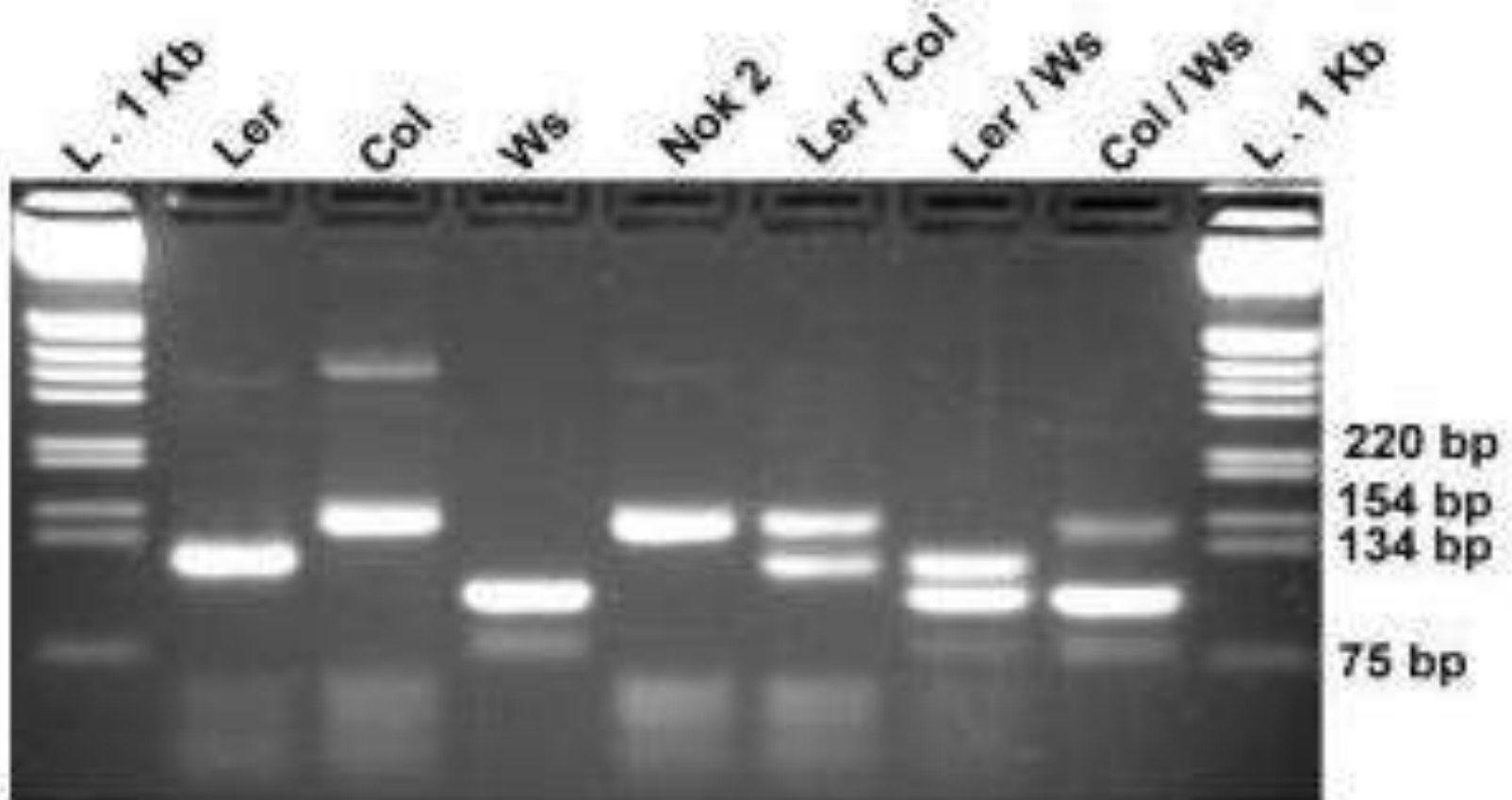
2

3

cycle #4

température

Comment visualiser le résultat de l'amplification d'ADN ?



Mise en évidence d'un marqueur moléculaire révélé par PCR

Les applications de la PCR

A. La recherche d'une pathologie:

- En parasitologie
- En bactériologie (ex : tuberculose)
- En virologie
- En oncologie (gènes impliqué dans la cancérogenèse) .

On met en évidence l'absence, ou la présence, dans le prélèvement d'un fragment d'ADN spécifique de l'agent causal.

B. Le diagnostic des maladies héréditaires (diagnostic anténatal)

- Identification sur un gène d'une mutation connue et identifiée (ex : mucoviscidose « maladie des mucus visqueux ») ou d'une délétion, responsables et caractéristiques de la maladie recherchée.

D'autres applications de la PCR

- Recherche d'OGM
- Détection de polymorphismes
- Séquençage
- Recherche de paternité

Séquençage de l'ADN

Synonymes :

- séquençage haut débit (Next Generation Sequencing)
- séquençage de nouvelle génération
- séquençage massif en parallèle



ADN :

molécule double brin
composé de 4 lettres
A, T, G, C



Séquençage :

lire les lettres,
c'est à dire notre
code génétique



Méthode enzymatique de séquençage (méthode de Sanger aux didésoxynulcéotides)

Méthode de synthèse partielle basée sur l'arrêt de la synthèse par l'incorporation de didésoxynucléotides

Nécessite:

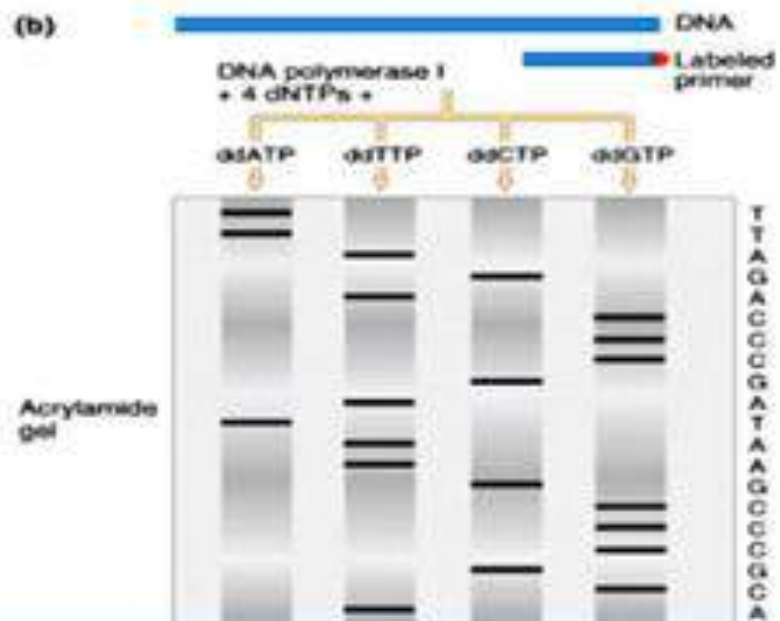
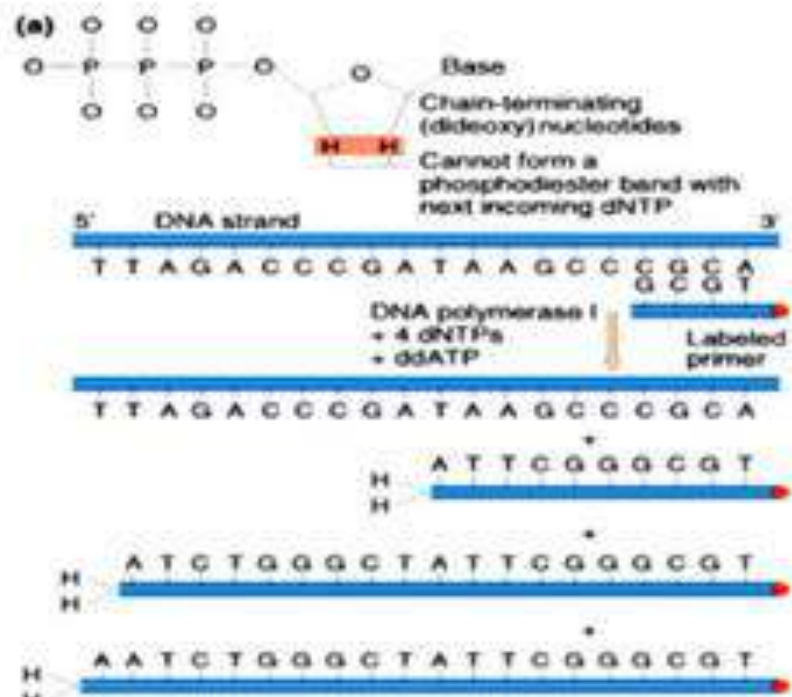
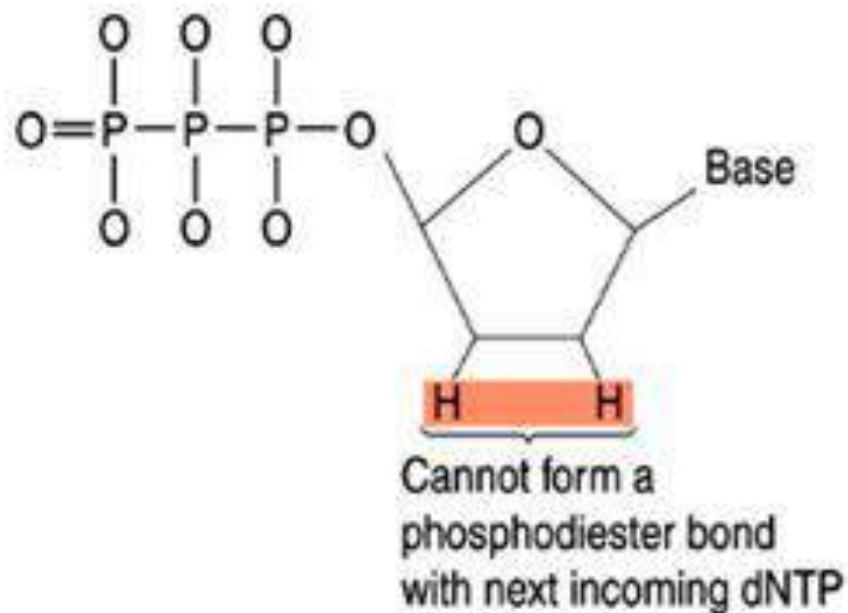
Brin simple matrice

Amorce

ADN polymérase (Klenow)

Déoxynucléotides

Didéoxynucléotides

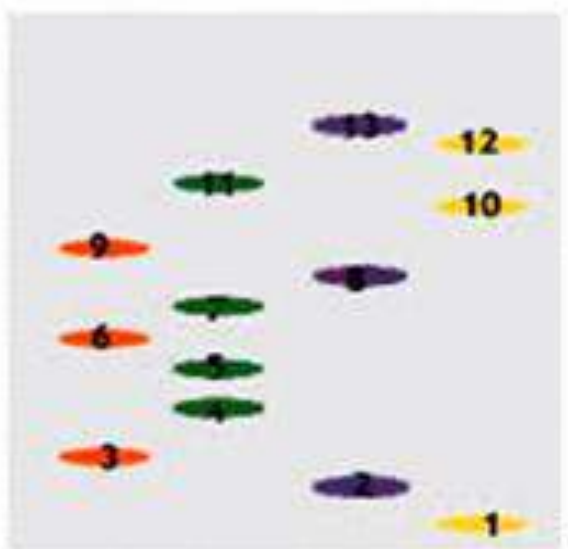


ddGTP ddATP ddCTP ddTTP



G A C T

Add ddGTP, ddATP, ddCTP, ddTTP, one to each of four tubes containing target DNA. Load each onto a separate lane on a gel.

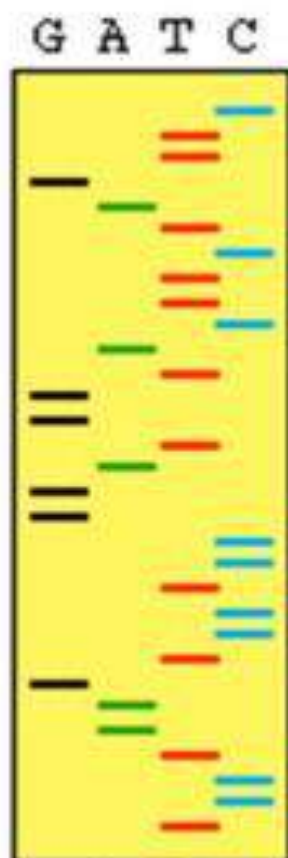


Largest

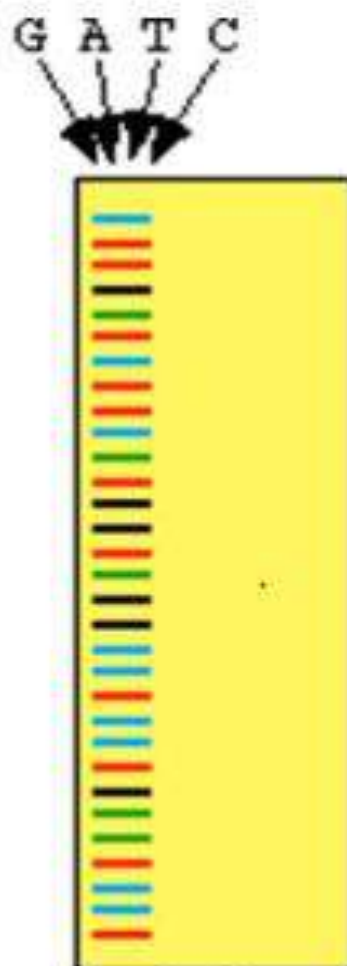
To sequence, read the order of bases from the smallest to the largest.

TCGAAGACGTATC

Smallest



Here's what the products would look like in separate gel lanes.



Here's what the products would look like in a single gel lanes.

- Possibilité de lire des séquences de **500 bases** en moyenne (jusqu'à 1 000 rarement plus)
- Lecture morceau de séquence par morceau de séquence : **1 après l'autre**. Rendu d'un résultat parfois en 2 ans...

A = Adénine, **T** = Thymine, **G** = Guanine, **C** = Cytosine

AT CCT TCT TTACCGTGAATGGGACTTAAC ATATGTGACGGTGTCTCTCTGTCTGGCCGTGAATGGGACTTAACA
TAGTGTGAAATGATTGTGTCTCTGTTACCTTTATGGGACTTAACGTAACCTATTGGTAACCATGTCTGTCTGTTACCGTG
AATGGGACTAGACCAACGTGTTCTTAATGTCTGTCCGTGAATGGGACTTAACGGGGTACGC GCATTTAATGTCTGTCT
GTTACCGTGAATGGGCCTACTCCATTGGCCTGACAATGTCTGTCTGTGAATGGGACTTGATGGACAATGTCTGTCTG
ATACTTGAATGGGACTTAACGATGGAGTCATAGAGATCATGATCTACCTGTCTGTTACCGTGAATGGGACCGATATGA
TAGTTACCTACTGTATGATGAGGTCTCATGCACATGGTA

LIMITES DE LA TECHNIQUE « SANGER »



Une page
compte en moyenne
75 lettres
sur 30 lignes
soit
2 250 lettres



Un roman
compte en moyenne
entre **250 000**
et **300 000 lettres**



Un génome
en compte
3 000 000 000
(x2 car deux brins)
soit **10 000 romans**
(lus dans un sens et dans l'autre) :
27 ans au rythme
d'un roman par jour !

- Arrivée de nouvelles générations de séquenceurs dits « **haut débit** »

- Roman de 300 pages : chaque page est lue en même temps en parallèle : **temps de lecture divisé par 300 !**

- Séquençage de millions de lettres grâce au séquençage en parallèle : **plusieurs milliers de brins d'ADN sont séquencés en un même temps** (on parle de reads)



LES TYPES DE SÉQUENÇEURS



SANGER

120 000 séquenceurs
96 capillaires :
environ 100 Kb en 3 heures
= **12 millions de lectures**
de **1 000 bases**

Un génome :
15 ans...

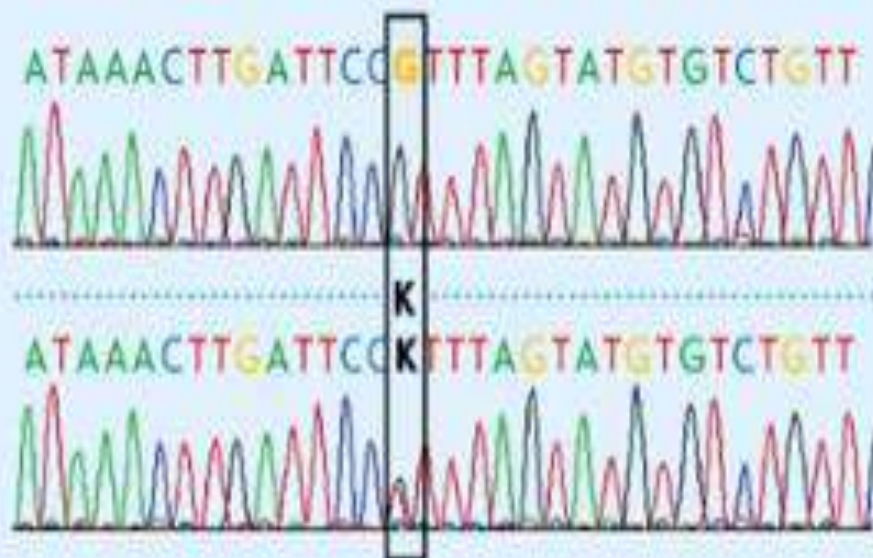


PGM/PROTON

1 puce PI : 12 Gb en 3 heures
= **80 millions de lectures**
de **150 bases**

1 génome 3Gb
Profondeur 4x :
1 semaine

SANGER



Superposition de deux pics
Mutation hétérozygote



25 « reads » wild type
25 « reads » muté
Mutation hétérozygote

UTILITÉ DU SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT

AUGMENTER

les chances de trouver
une anomalie génétique
et cela
plus rapidement

SÉQUENCER

plusieurs gènes
en même temps
pour plusieurs
patients

DIMINUER

l'errance diagnostique
pour les maladies
génétiques



APPORT DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES



SANGER

Exon par exon

Grand gène : plusieurs mois

.....

NGS / MPS

(Séquençage massif en parallèle)

Toutes les régions codantes (exons)

Tout le gène (*introns compris*)

Tout le génome ! **Une seule manipulation !**

VERS LE SÉQUENÇAGE EN ROUTINE DE GÉNOMES ENTIERS

