



UE 11

Méthode d'étude et d'analyse du génom

Tut rentrée 2015

PRESENTATION DE LA MATIERE

- Une Spécialité pour tout le monde
- 8 qcms au concours de l'année dernière

Déroulement de la tut rentrée

1) Analyse moléculaire du matériel génétique :

- ▶ Technique d'extraction d'ADN
- ▶ Technique d'amplification d'ADN (PCR)

2) Exemples de maladies

3) Clonage moléculaire

4) Applications en QCMs

INTRODUCTION

Objectifs

Connaître les principales techniques de biologie moléculaire

Comprendre ses applications en génétique médicale

Applications générales de génétique médicale :

Diagnostic positif

Diagnostic prénatal

Diagnostic pré-symptomatique

INTRODUCTION

ANALYSE MOLECULAIRE DU MATERIEL BIOLOGIQUE

95% des diagnostics se font à partir **d'ADN**, mais aussi à partir d'ARN.

On travaille sur des échantillons de l'ordre du microgramme - nanogramme (=microtechniques)

EXTRACTION D'ADN

- L'ARN traduit l'expression d'un gène
- L'ARN est très **instable** contrairement à l'ADN car les *Rnases sont beaucoup plus virulentes* que les Dnases
- L'extraction d'ADN se fait à partir de cellule nucléée (qui contiennent donc de l'ADN)=>
 - ⊖ les **GR/Hématies ne possèdent PAS d'ADN**

EXTRACTION D'ADN

• Etapes **non** spécifiques

• Prélèvement sanguin

• Lyse des GR

• Etapes **spécifiques** de l'extraction de l'ADN

• 1. Etape de la protéinase K

• 2. Etape de l'extraction au phénol-chloroforme

• 3. Précipitation de l'ADN



Polymerase Chain Reaction

- Amplification sélective de la région du génome que l'on veut étudier

Conditions :

- 20 nucléotides en amont & et en aval
- dans le tube à essai : ADN du patient + 2 amorces (→) + nucléotides (dNTP) + tampon MgCl₂ + Taq polymérase
- étapes **isolées**, circuit **monodirectionnel**, **contamination** ++

PCR

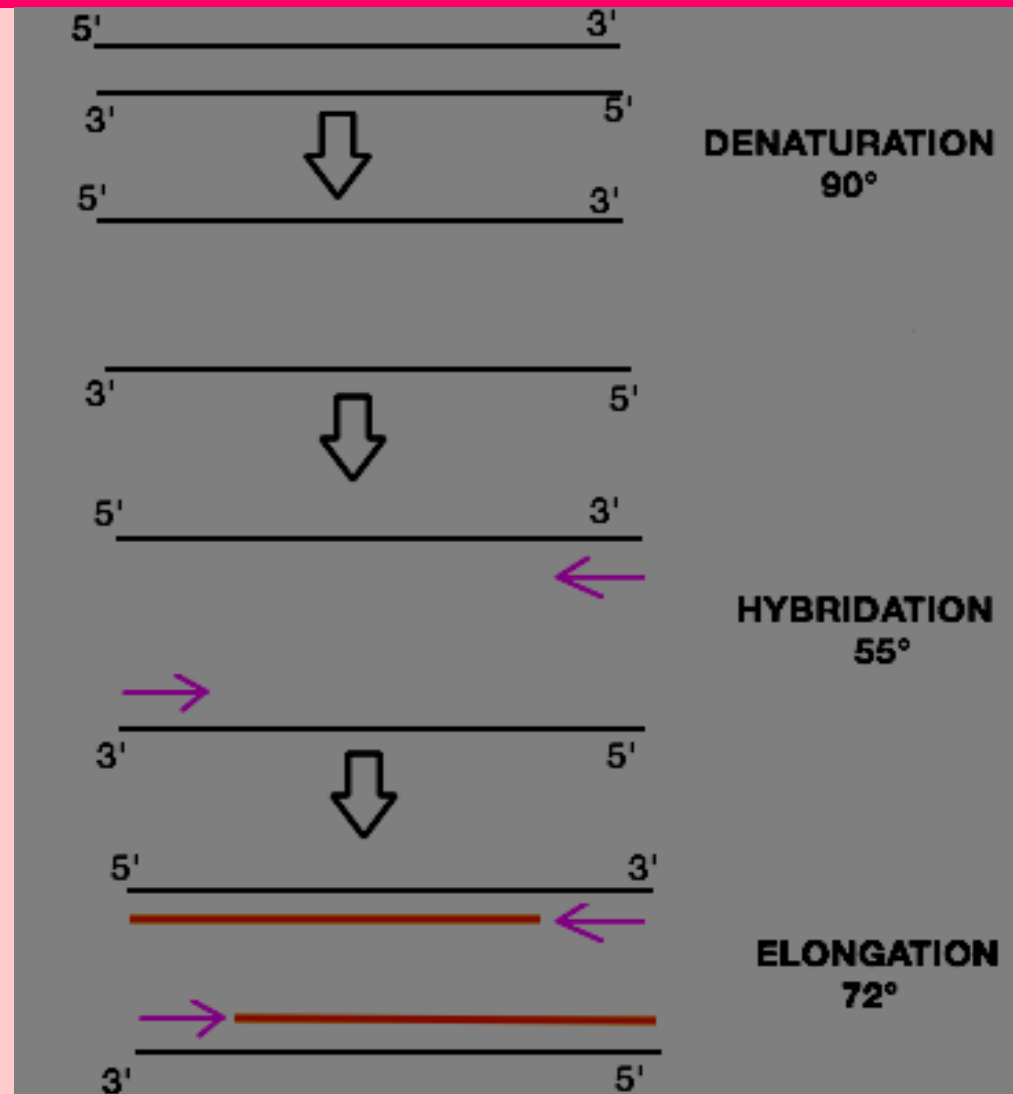
FONCTIONNEMENT :

• DENATURATION : **90°** = rupture des liaisons hydrogènes par chaleur

• HYBRIDATION : **55°** = insertion des 2 oligomères ou primers (amorces)

• ELONGATION : **72°** = grâce à la **TAQ polymérase** + les dNTPs

PCR



PCR

• Note sur la **TAQ POLYMERASE** :

ADN polymérase d'origine bactérienne qui résiste à la chaleur.

Elle permet d'obtenir 2^n molécules de la région du gène après n cycles (économie)

ELECTROPHORESE

► séparation des molécules d'ADN en fonction de leur taille et de la concentration du **gel d'agarose** ou **d'acrylamide** parcouru par un courant électrique **du - vers le +** de haut en bas (l'ADN est placé en haut du gel analytique car il est chargé négativement)

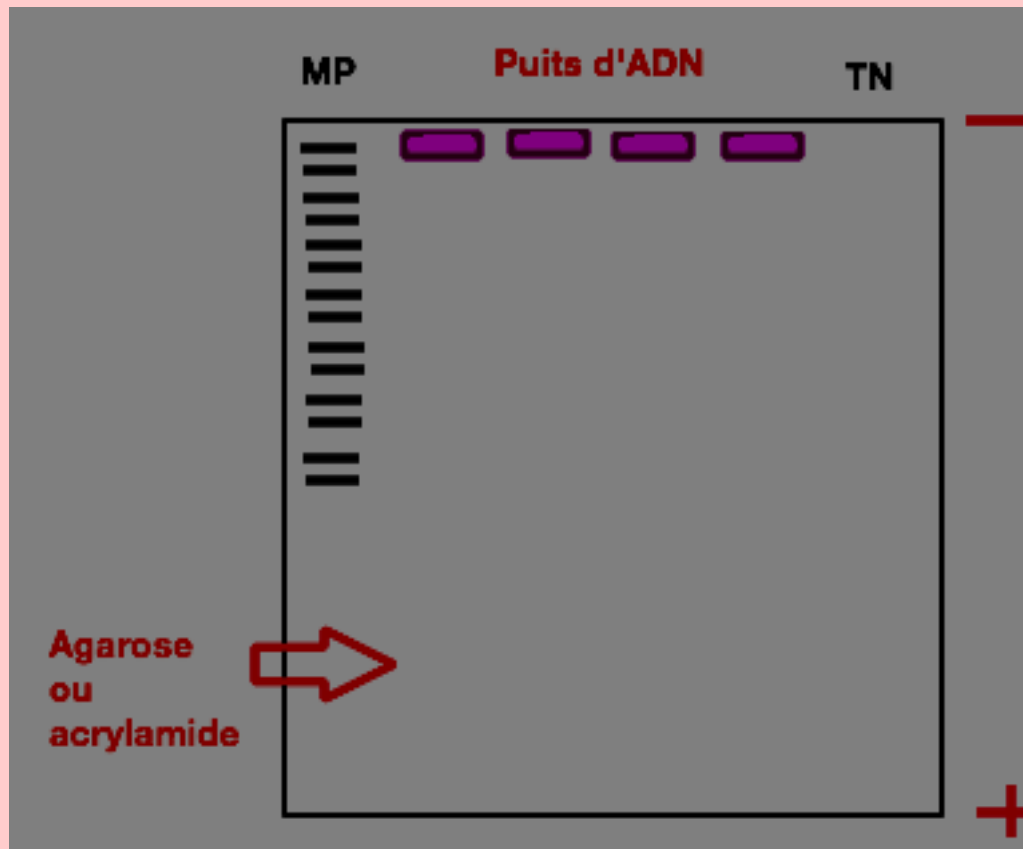
.Conditions :

1 bande de marqueur de poids moléculaire: mélange d'ADN de taille différente qu'on connaît parfaitement

1 bande de témoin négatif: contient tout sauf de l'ADN. C'est un contrôle négatif pour être sûr qu'il n'y a pas eu contamination

ELECTROPHORESE

Exemple :



VISUALISATION DE L'ADN

→ grâce à une drogue intercalante le **BROMURE D'ETHIDIUM** (agent mutagène) qui s'intercale entre les bases de l'ADN et émet une **fluorescence rose** sous lumière UV

APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

⊖ maladie ***monogénique*** (sur lesquelles on travaille en biologie moléculaire) \neq maladie ***chromosomique*** (ex : trisomie 21)

⊖ la majorité des maladies humaines ne sont **PAS** monogénique

Les maladies ***monogéniques*** sont rares

(«orpheline»: 1/2500)

APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

LA MUCOVSCIDOSE :

maladie autosomique RECESSIVE = il faut que ***les deux*** versions du **gène CFTR** soient mutées pour que la maladie s'exprime.

Les parents sont donc porteurs sains et ont **25%** de risques d'avoir un enfant atteint à chaque grossesse

⊖ ON NE DEMANDE **PAS** DE CARYOTYPE (≠ maladie chromosomique)

APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

L'ACHONDROPLASIE

•La + fréquente des chondrodysplasie

•Monogénique

•autosomique DOMINANTE

•Rare (1/15000 naissances)

•liée à une anomalie du développement du cartilage.

Il suffit **qu'1 seule** version du **gène FGFR3** qui correspond à un ***récepteur de croissance des chondrocytes*** soit muté.

APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

L'ACHONDROPLASIE

Un parent au moins est porteur & malade et ils ont 50% de risques d'avoir un enfant atteint à chaque grossesse.

⊖ c'est une mutation de novo dans 90% des cas

Elle se localise toujours au même endroit :
dans le sens 5'-3', exon 10, au codon 380, position
1138

.G → A ou G → C

.On obtiendra une ARGININE au lieu d'une GLYCINE

APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

L'ACHONDROPLASIE

Diagnostic dans 99,9% des cas: appel échographique TARDIF
(3ème trimestre de grossesse) «**fémur court**»

Caractéristiques des malades (adultes et enfants):

- nanisme (1m30, membres courts, **hyperlordose...**)
- **intelligence strictement normale**
- **dysmorphie faciale** (macrocéphalie, front haut, ensellure nasale marquée)
- troubles neurologiques (myélopathie)

APPLICATIONS EN PATHOLOGIES



Le tutorat est gratuit. Toute vente ou
reproduction est interdite.

ENZYMES DE RESTRICTION

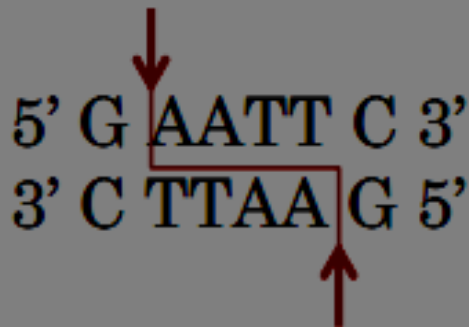
- **ENDO**nucléases
- d'origine **bactérienne**
- coupent de manière spécifique l'ADN double brin : reconnaissent la même séquence palindromique (= *que l'on peut lire dans un sens et dans l'autre de la même façon*)
- **a bout franc** (= coupure des deux brins au même endroit) **ou** **a bout cohésif** (= coupure des deux brins à des niveaux différents)

ENZYMES DE RESTRICTION

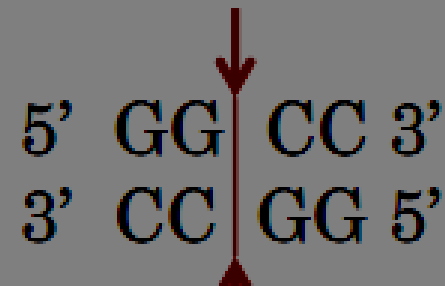
•Séquence palindromique



A bouts cohésifs :



A bouts francs :



Exemple de diagnostic utilisé en application de QCM

.on prélève 20mL de liquide amniotique par voie transabdominale sous échographie.

.Amplification spécifique par PCR de la ***région de l'exon 10*** qui encadre l'endroit où la mutation achondroplasique est présente.

Ce fragment amplifié a une taille de **164pb.**

.Grâce a une **ELECTROPHORESE** on va pouvoir **savoir de quelle mutation il s'agit.**

Exemple de diagnostic utilisé en application de QCM

On se sert de deux 2 enzymes de restrictions: **BfmI** et **HpaII**

BfmI reconnaît spécifiquement la séquence CTACAG. S'il y'a reconnaissance, elle coupe.

HpaII reconnaît spécifiquement la séquence CCGG. S'il y'a reconnaissance elle coupe.

La séquence normale au niveau de l'exon 10 est la suivante:

C TAC **G**GG GTG
G ACG CCC CAC

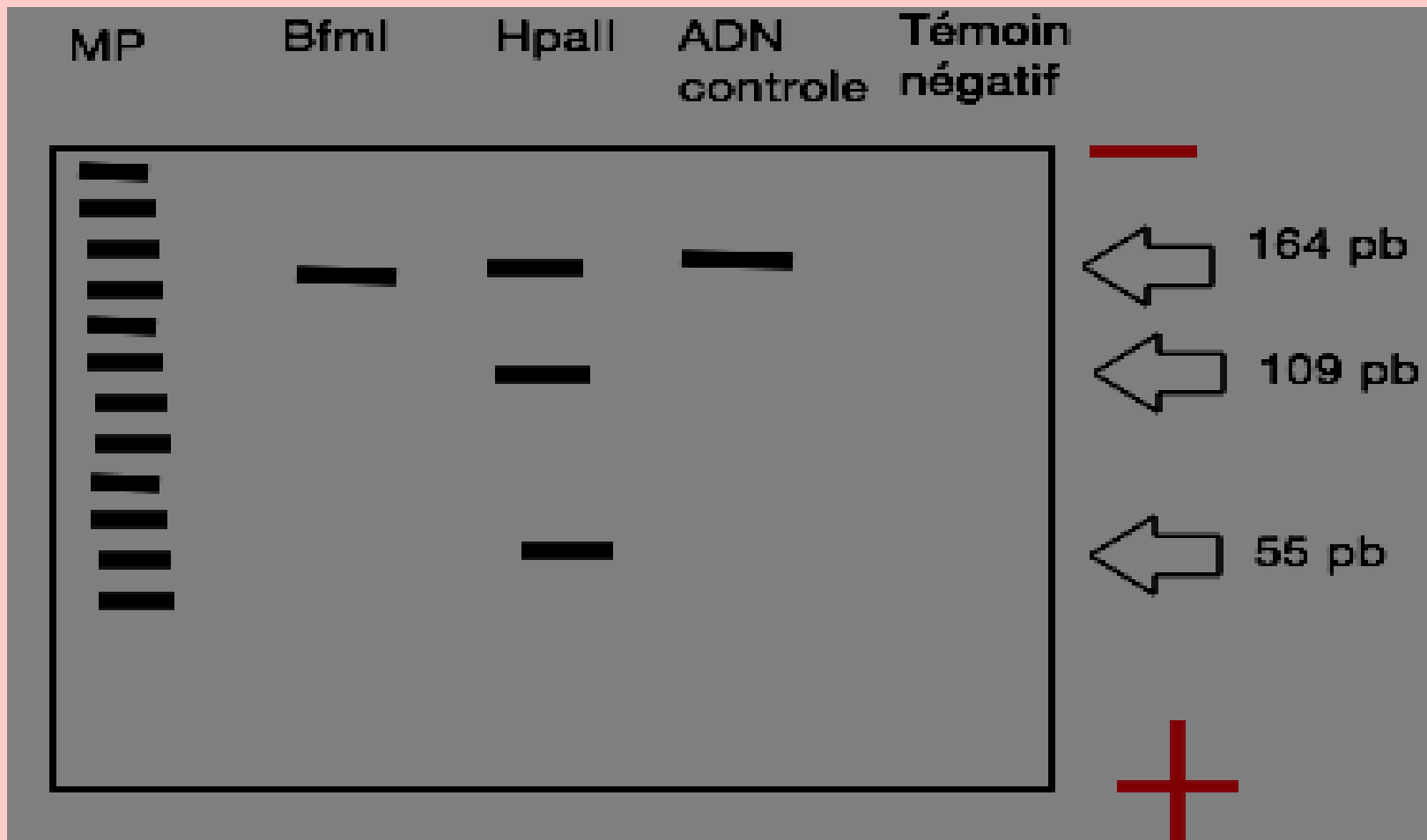
G est la guanine située en position 1138.

Si **G** → **A**, la séquence devient: C TAC **A**GG GTC, alors BfmI peut couper

Si **G** → **C**, la séquence devient: C TAC **C**GG, alors HpaII peut couper.

Exemple de diagnostic utilisé en application de QCM

Électrophorèse



Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

Exemple de diagnostic utilisé en application de QCM

Note:

- Si on trouve 3 fragments dont **1** de la taille de l'ADN sain (allèle sain) ET **2** dont la somme fait la taille de l'ADN sain (allèle muté), l'individu est alors **HETEROZYGOTE** pour la maladie.

Le patient sera **MALADE** *si et seulement si* la maladie est DOMINANTE
(ex: achondroplasie ≠ mucoviscidose)

- Si on trouve 2 fragments dont la somme fait la taille de l'ADN sain (2 allèles mutées), l'individu est alors **HOMOZYGOTE pour la maladie**

Exemple de diagnostic utilisé en application de QCM

Conclusion:

Le foetus est atteint d'achondroplasie à l'**état hétérozygote** à cause d'une mutation **G** → **C** en position 1138 du codon 380 dans l'exon 10

LE SEQUENCAGE ADN

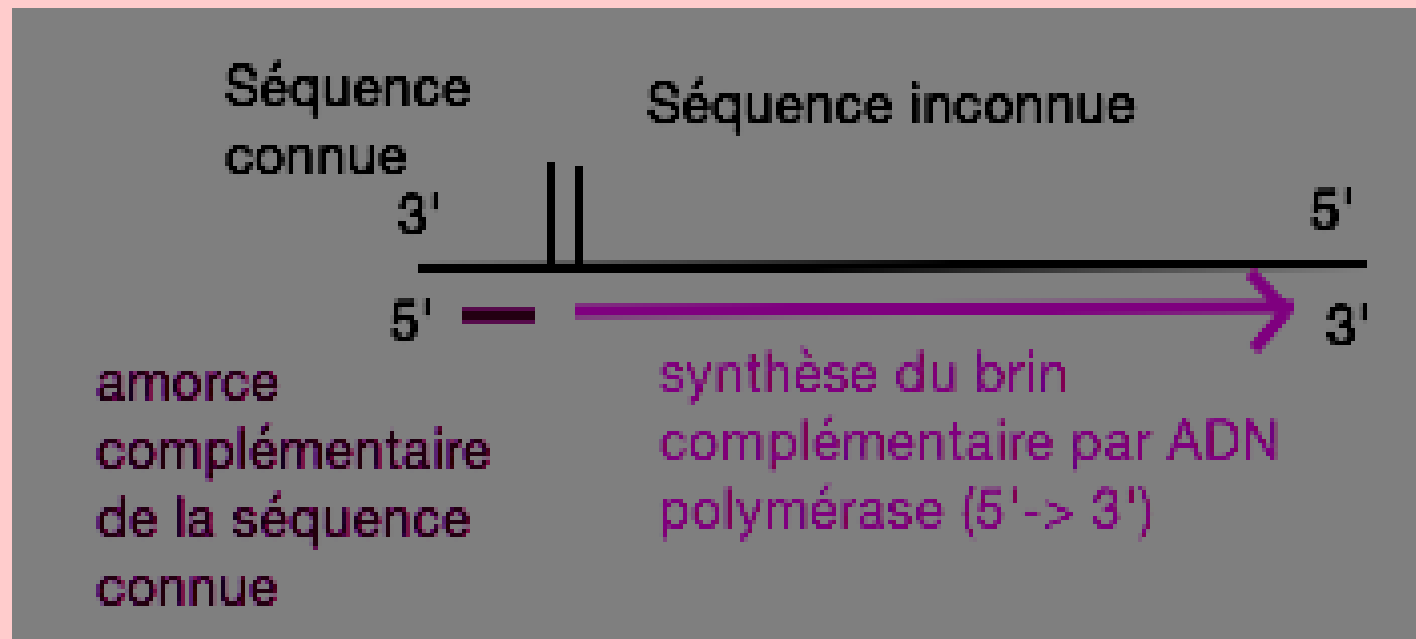
- Vérification du diagnostic + faire un diagnostic
Déterminer la succession de nucléotides au niveau de la région étudiée.

La méthode de référence est la METHODE DE SANGER = méthode enzymatique des di-désoxynucléotides (ddnTp)

Conditions :

- étapes de la PCR (dénaturation, hybridation).
 - ⊖ **Elongation**: ici l'ADN polymérase utilisée n'est **PAS** la TAQ polymérase.
Celle ci fonctionne à 60°
L'élongation ne concerne **qu'un seul brin**, et on a besoin que d'un seul **primer**
- dNTP + ddNTP (≠ PCR) = **qui ont le rôle de stopper la polymérisation.**
(processus au hasard)
- Couplage spécifique des ddNTP avec des fluorochromes: Rouge-T, Bleu-C, Noir-G, Vert-A

LE SEQUENCAGE ADN

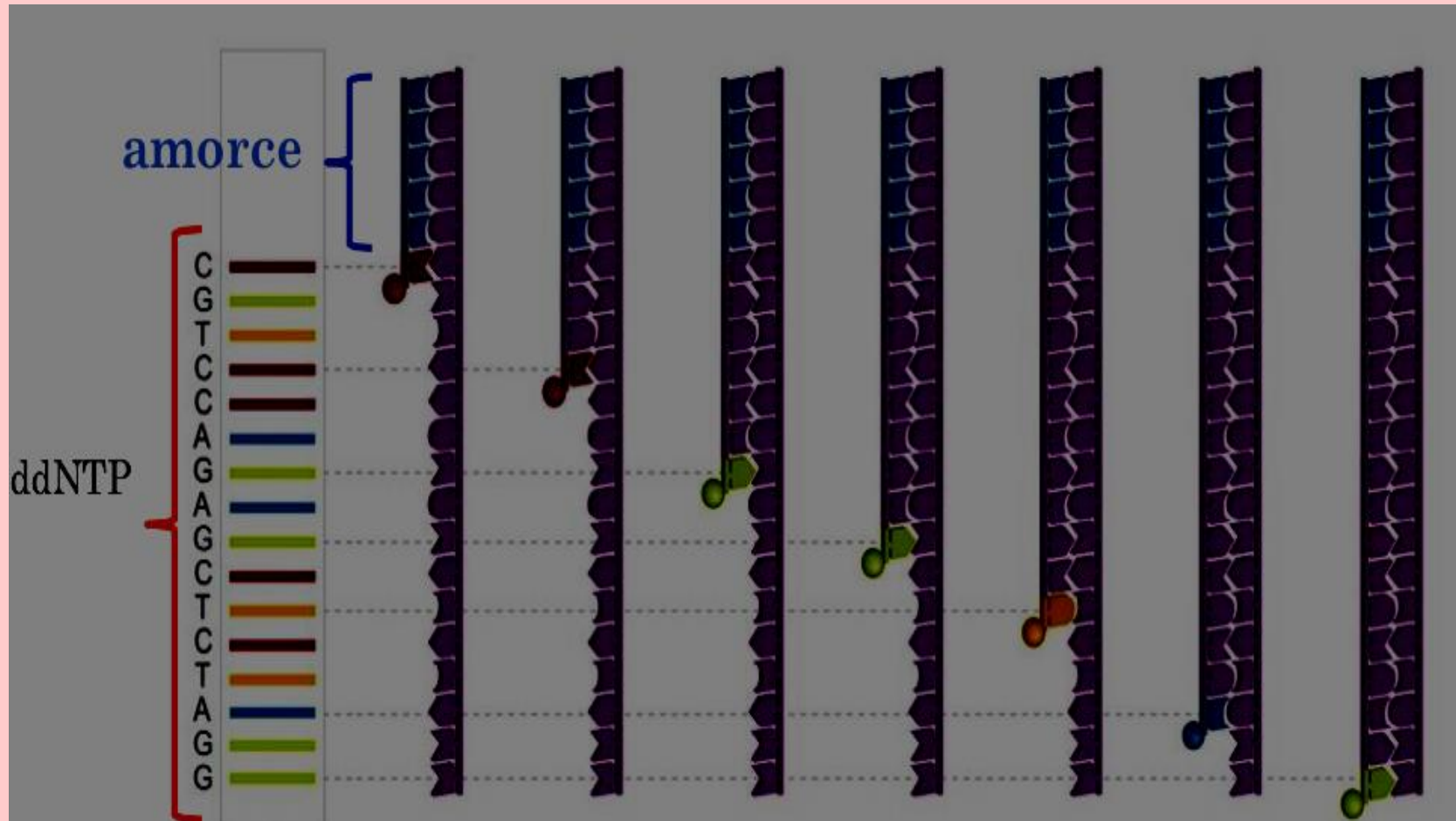


LE SEQUENCAGE ADN

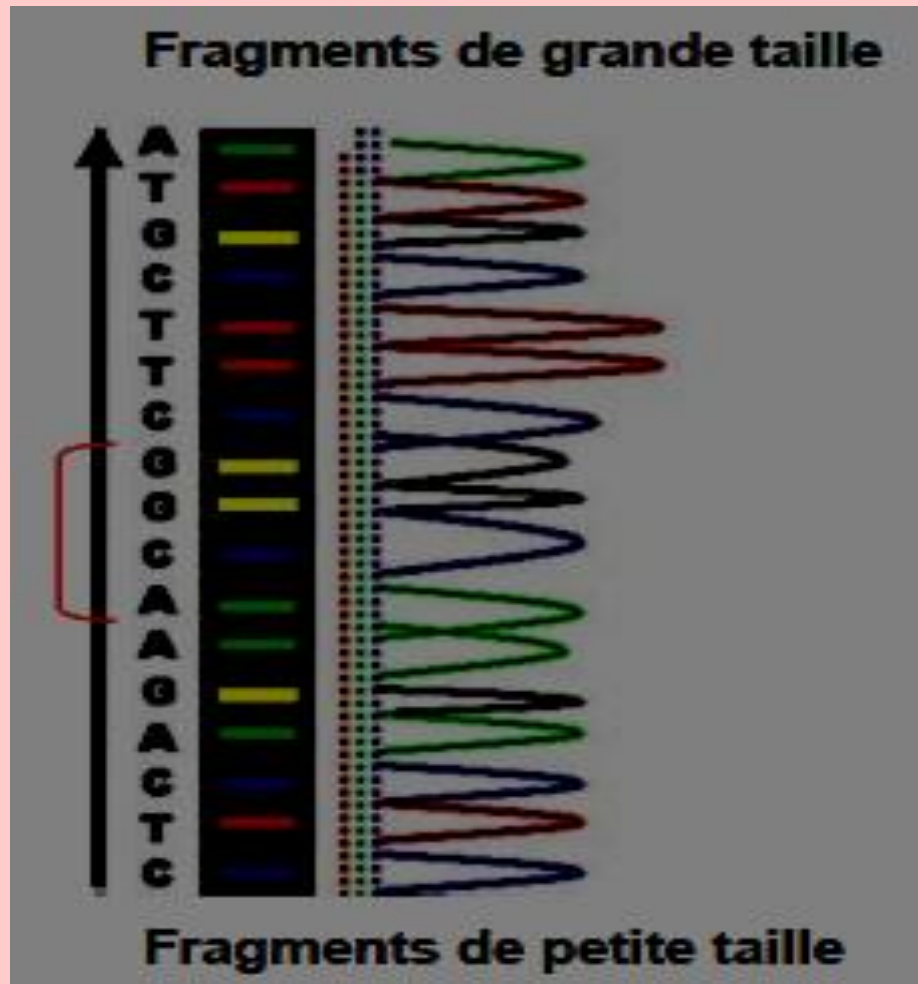
Principe:

- Au hasard dNTP + ***ddNTP*** (*qui eux génèreront des fragments fluorescents*).
 - Les ***ddNTP*** possèdent un H associé à un fluorochrome à la place du OH = la liaison phosphodiester ne pourra pas se faire, l'ADN polymérase stoppe l'élongation.
 - On réalise une électrophorèse dans de petits capillaires, et en fonction de la couleur des fragments, on sait de quel nucléotide il s'agit.
 - Les **séquenceurs capillaires** sont utilisés en routine en laboratoire de génétique.
- Il y'a présence d'une caméra laser qui va identifier les fluorochrome, qui va détecter en premier les molécules les plus petites.

LE SEQUENCAGE ADN



LE SEQUENCAGE ADN



APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

LE SYNDROME DE WOLFRAM

- pathologie autosomique **RECESSIVE**
- symptômes: surdité, diabète, atrophie optique, troubles neurologiques
- les 2 parents sont porteurs sains de la mutation au niveau du **gène WFS1** codant pour la wolframine = qui joue un rôle au niveau du flux calcique.

APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

•Rappel: Les gènes sont sous forme de double hélice avec des exons séparés par des régions non codantes, les introns.

Transcription = ADN \rightarrow ARN

Maturation de l'ARN = **élimination des introns** (épissage) + ajout d'une queue polyadénylée.

Traduction = ARNm \rightarrow Protéine

► Une mutation qui survient à n'importe quelle étape du processus peut donc générer une protéine anormale et par conséquent une pathologie.

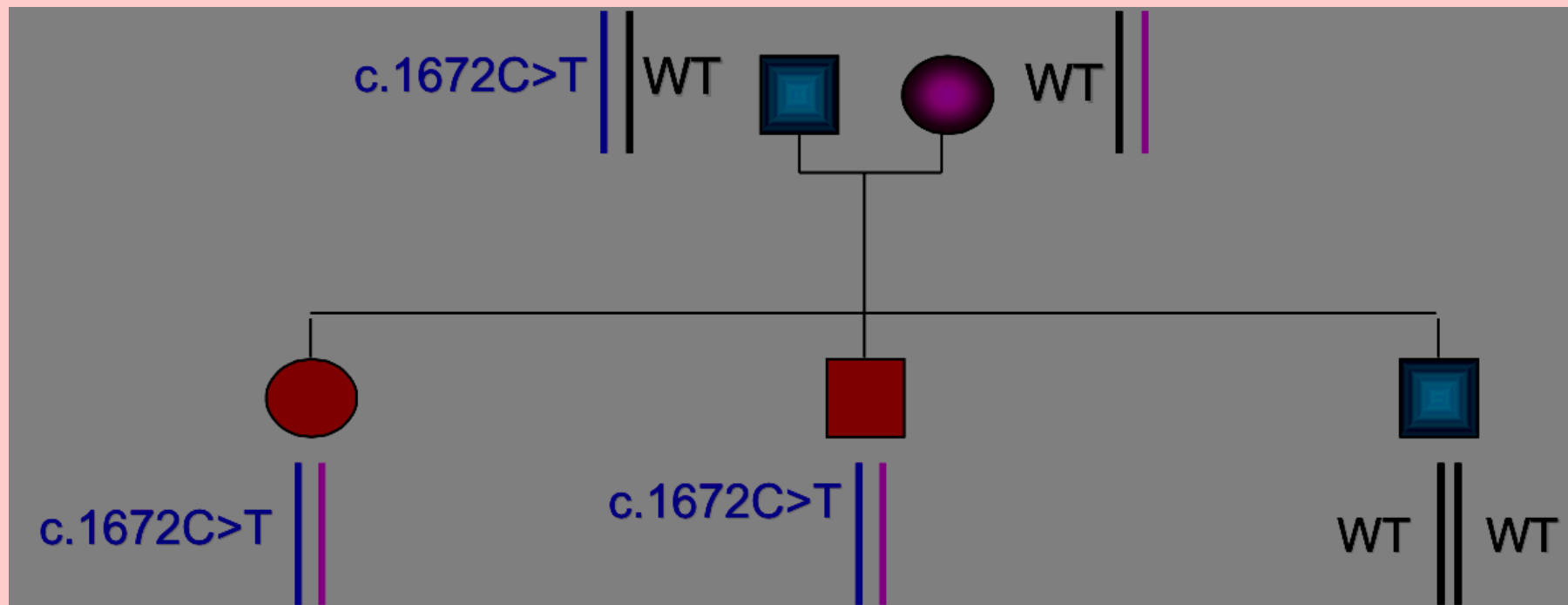
APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

- ⊖ Maladie autosomique RECESSIVE peut correspondre
 - une forme homozygote pour le même gène muté
 - ou une forme hétérozygote pour 2 mutations différentes.

Dans ce dernier cas, on **ne peut détecter qu'une seule mutation par PCR**, car la PCR permet d'amplifier uniquement les exons.

La 2ème mutation doit se trouver au niveau d'un intron au niveau d'un **site cryptique d'épissage** = *une partie de l'intron va devenir un exon au cours de la maturation de l'ARN et donc être traduite en protéine et donner une molécule anormale.*

APPLICATIONS EN PATHOLOGIES



- Une seule mutation identifiée après PCR et séquençage des régions codantes du gène *WFS1* = manque la 2ème mutation

APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

On ne peut pas amplifier directement l'ARN = **REVERSE
TRANSCRIPTASES**

- récupérées à partir des **RETROVIRUS**

- elles synthétisent de 5' en 3' par complémentarité, à partir d'un brin d'ARN, un ***simple*** brin d'ADN

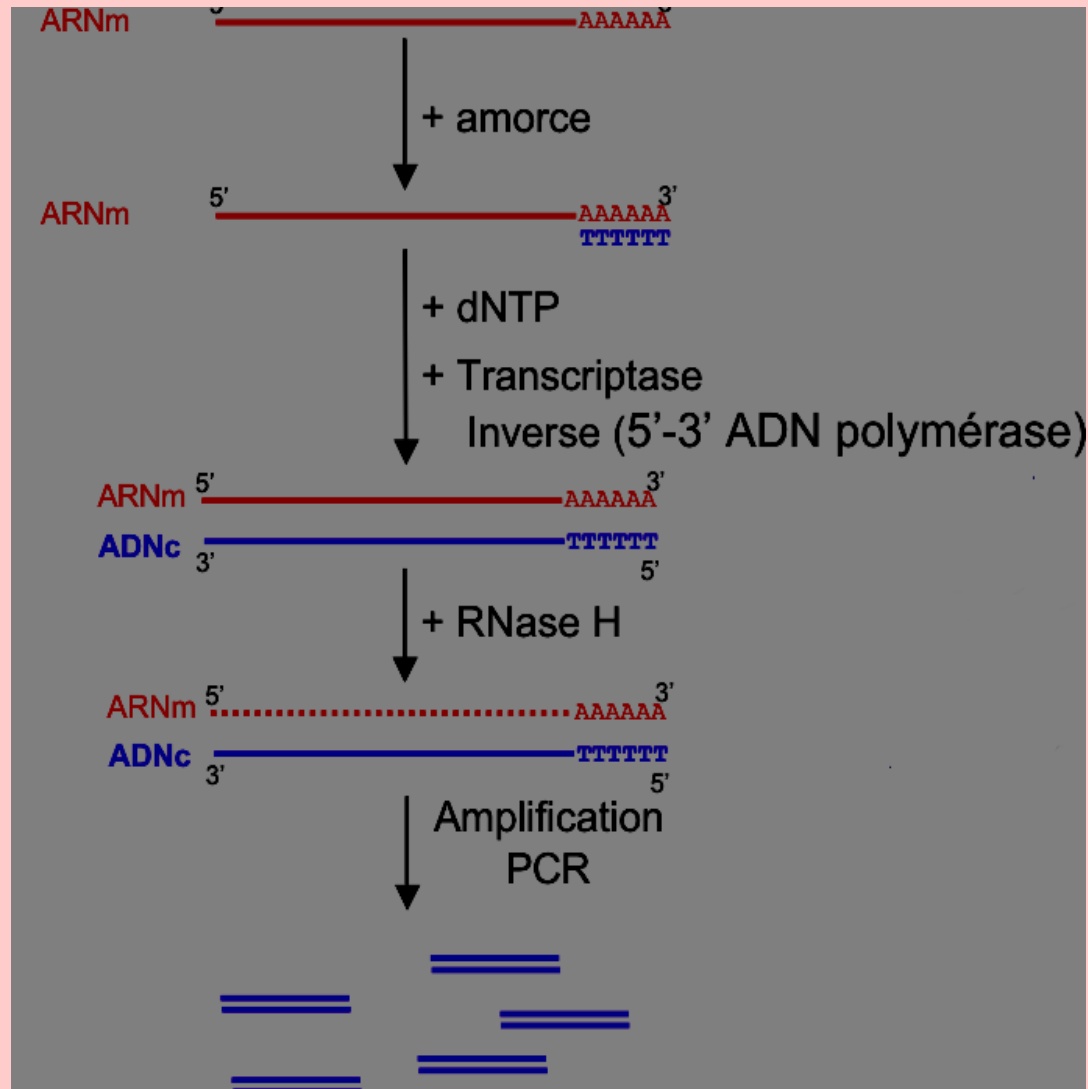
- utilisent **1 amorce** d'ADN (succession de T) qui va aller s'hybrider sur la queue polyadénylée de l'ARNm

Dans le tube à essai:

Amorce d'oligoT + dNTPs + polymérase d'activité Reverse Transcriptase + RNase H qui **dégrade l'ARN** uniquement lorsqu'il est hybridé avec l'ADN

La copie d'ADN simple brin peut directement aller en PCR sans passer par l'étape de dénaturation.

APPLICATIONS EN PATHOLOGIES



APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

Électrophorèse à partir de l'ADNc synthétisé à partir d'ARN

exemple :

- **le père** est porteur de la mutation au niveau exonique (« forme classique »)
- **la mère** est porteuse de la ***mutation d'épissage***

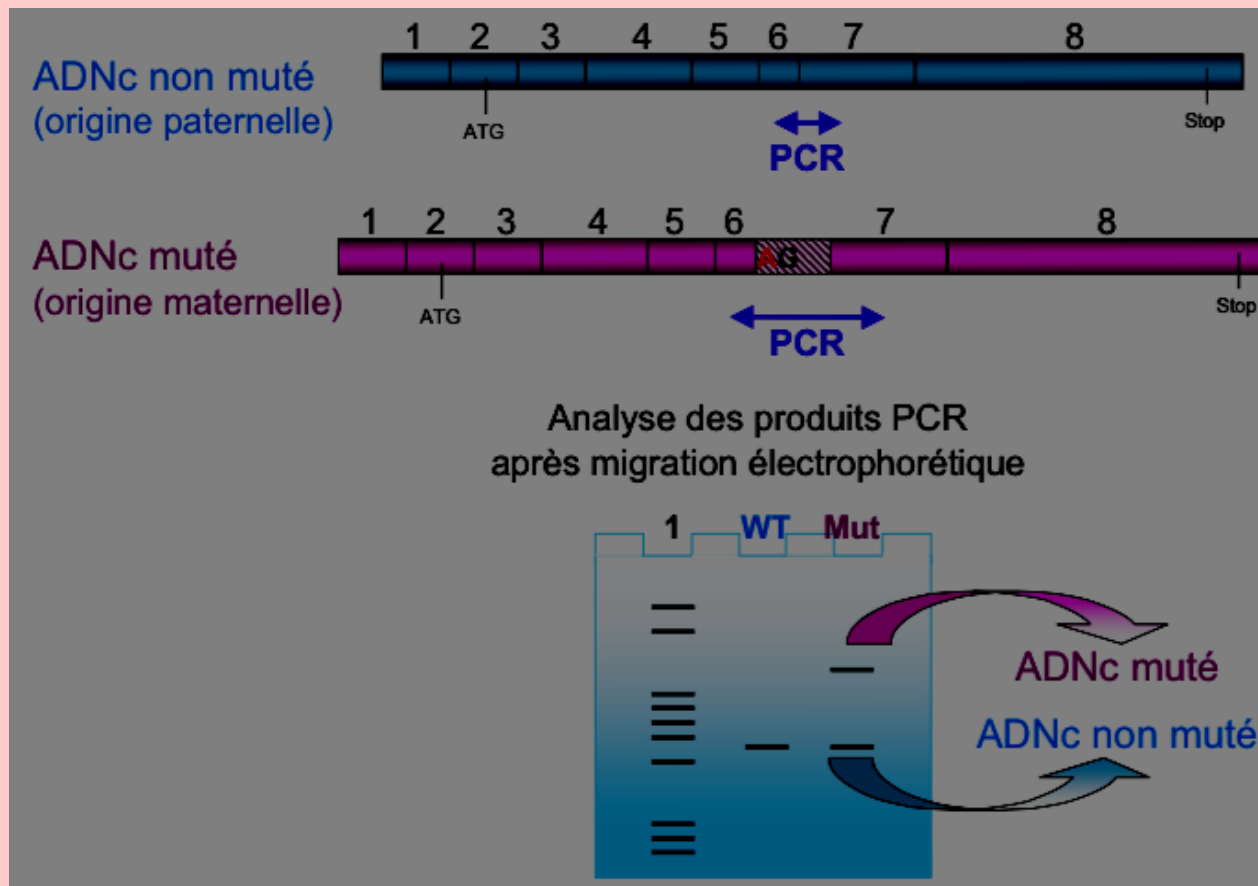
Père : 1 seule bande (mutation d'un nucléotide)

Mère : 2 bandes = l'ADNc comme celui du père + ADNc avec épissage particulier.

Le séquençage va alors nous permettre d'identifier le variant à la base de la mutation de l'épissage.

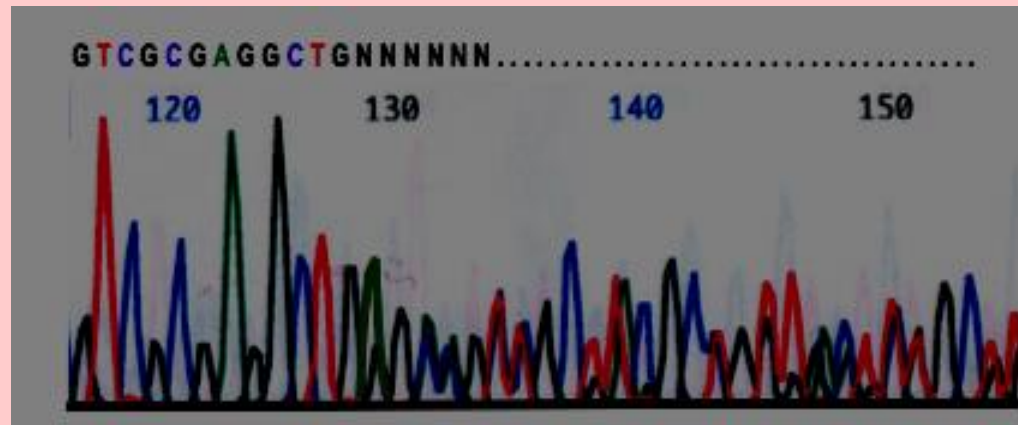
APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

ELECTROPHORESE SPECIALE ADN_c



APPLICATIONS EN PATHOLOGIES

- Séquençage illisible
- → besoin du clonage moléculaire



CLONAGE MOLÉCULAIRE

But : Obtenir un grand nombre de copies identiques absolument **pures** d'une séquence donnée d'ADN.

Permet donc de **séparer 2 populations d'ADN** (*ADN_c WT et ADN_c muté*)

Principe :

- 1- Intégrer un fragment d'ADN (=Insert) dans un vecteur
- 2- Introduire le vecteur dans une cellule hôte (bactéries)
- 3- Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens
- 4- Obtenir un fragment d'ADN **pur** en grande quantité

CLONAGE MOLÉCULAIRE

1) Préparation de l'ADN recombinant (= Vecteur + Insert) :

→ Vecteur =

- ADN circulaire double brin capable de réplication **autonome** indépendante de l'ADN de la cellule hôte (=réplication épisomale)
- ADN de taille réduite qui permet **l'insertion d'un fragment d'ADN étranger**
- ADN qui possède des **gènes de sélection** permettant de sélectionner les cellules hôtes qui ont intégré le vecteur

CLONAGE MOLÉCULAIRE

2 grandes catégories :

les vecteurs de clonage : destinés à isoler physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et à amplifier le nombre de copies de cet ADN

les vecteurs d'expression : destinés à transférer un gène dans une cellule hôte eucaryote

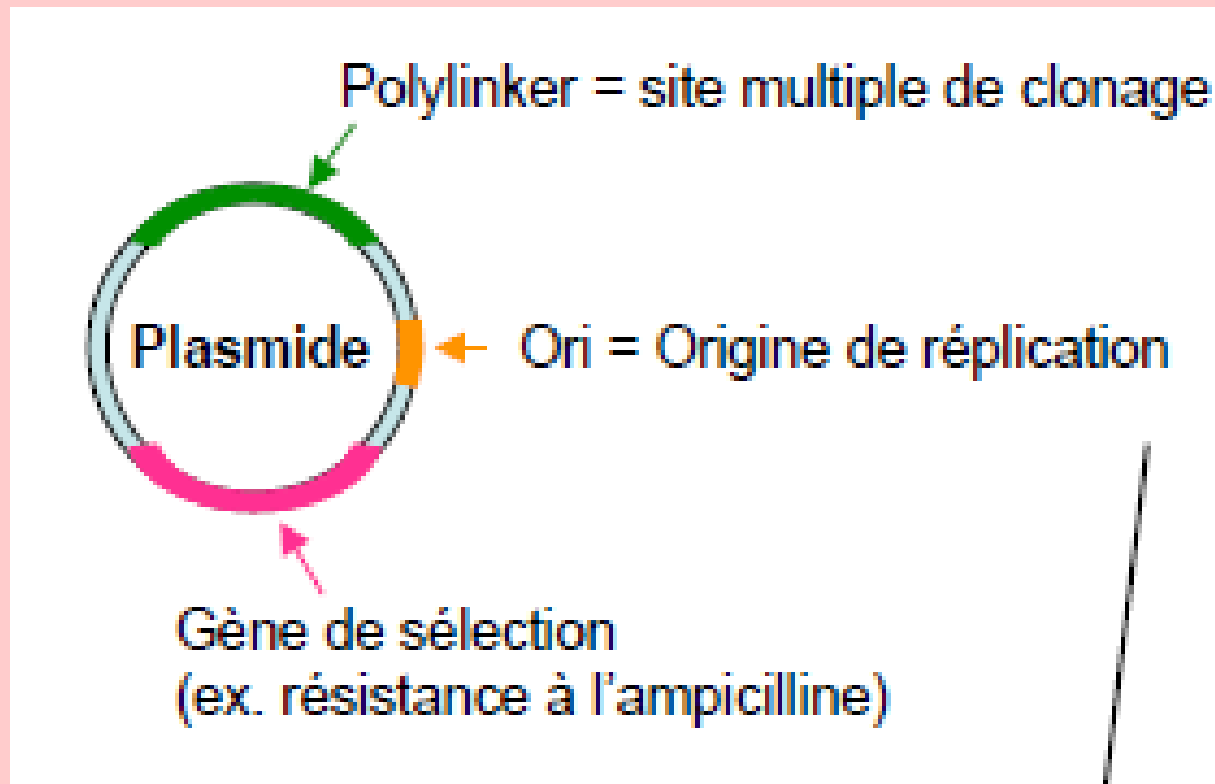
CLONAGE MOLÉCULAIRE

💣 Différents vecteurs en fonction de la taille de l'insert :

Type de vecteur	Taille de l'ADN cloné
Plasmide	20 kb
Phage Lambda (virus <i>E. Coli</i>)	25 kb
Cosmide (vecteur artificiel dérivé du phage et du plasmide)	45 kb
Phage P1	100 kb
BAC (Bacterial Artificial Chromosome)	300 kb
YAC (Yeast Artificial Chromosome)	1000 kb

CLONAGE MOLÉCULAIRE

3 caractéristiques du vecteurs :



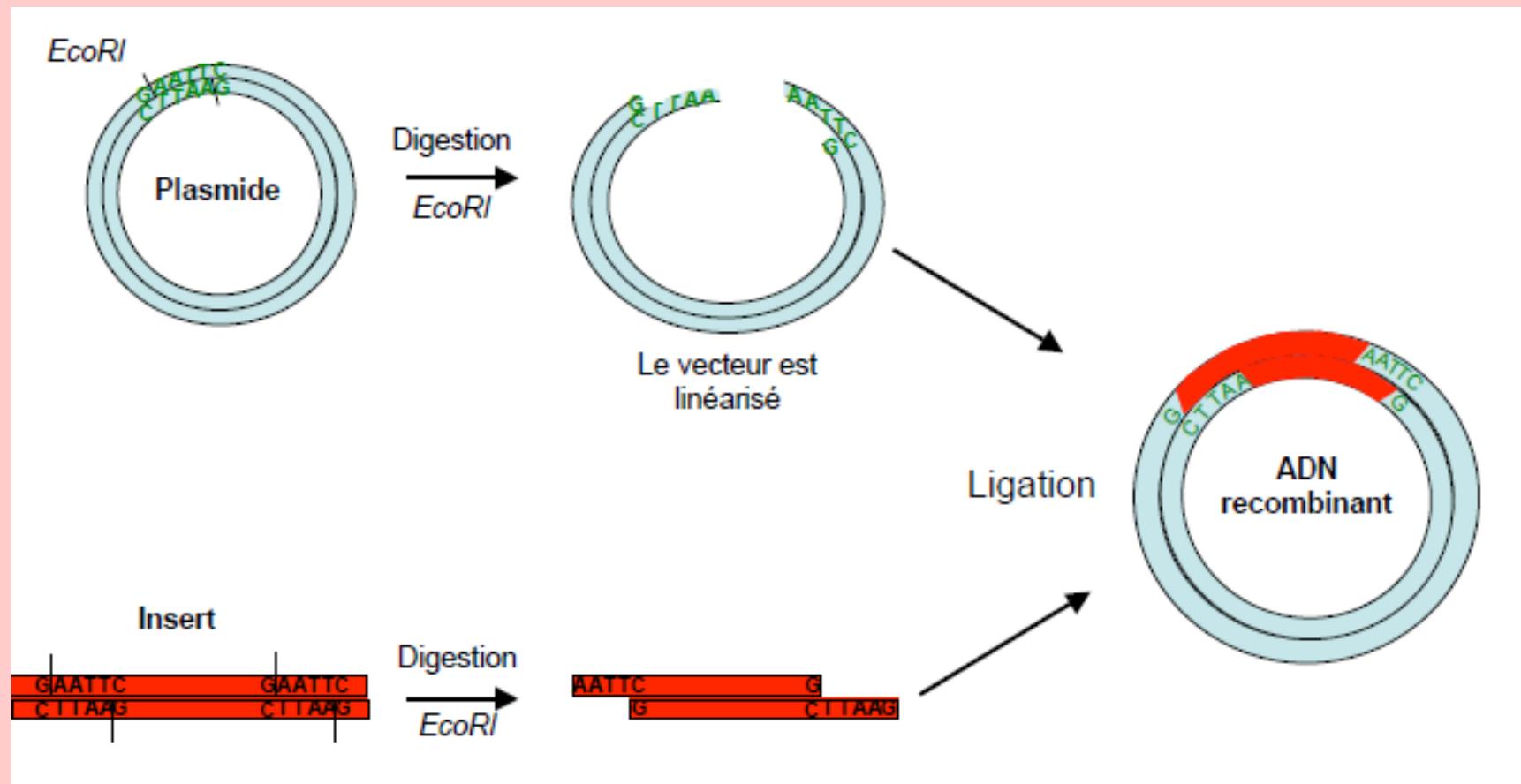
Site de multiclonaage = polylinker dont on connaît parfaitement la séquence, « on sait où coupe précisément chaque enzyme de restriction »

Origine de réplication qui lui permet de se multiplier dans la bactérie et indépendamment d'elle

Gène de sélection = de résistance à un antibiotique

CLONAGE MOLÉCULAIRE

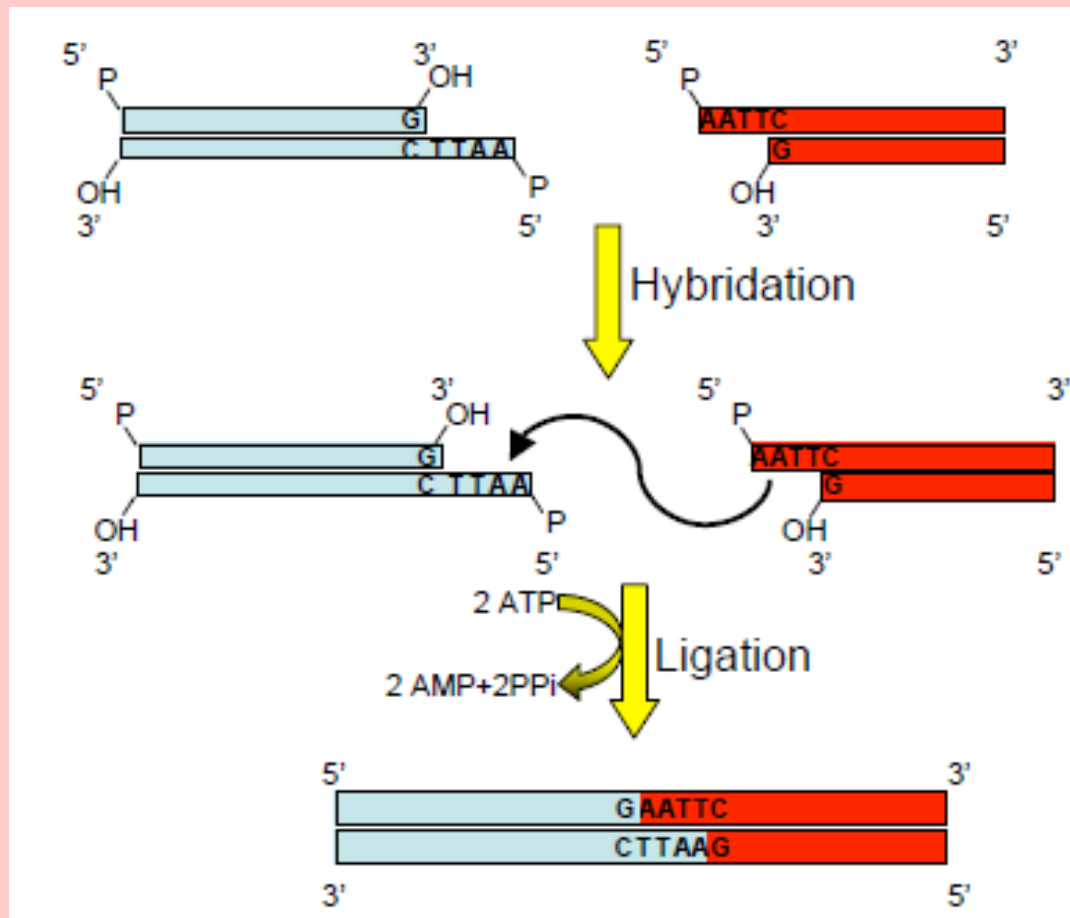
→ préparation du vecteur + de l'insert digérés par des enzymes de restrictions



Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

CLONAGE MOLÉCULAIRE

→ Ligation vecteur + insert par la T4 DNA ligase



- l'ADN n'est pas fait pour être simple brin > hybridation par complémentarité avant l'action de la ligase
- de préférence, on utilise le même types d'enzymes de restrictions sur le vecteur et sur l'insert pour avoir les mêmes extrémités franches ou cohésives

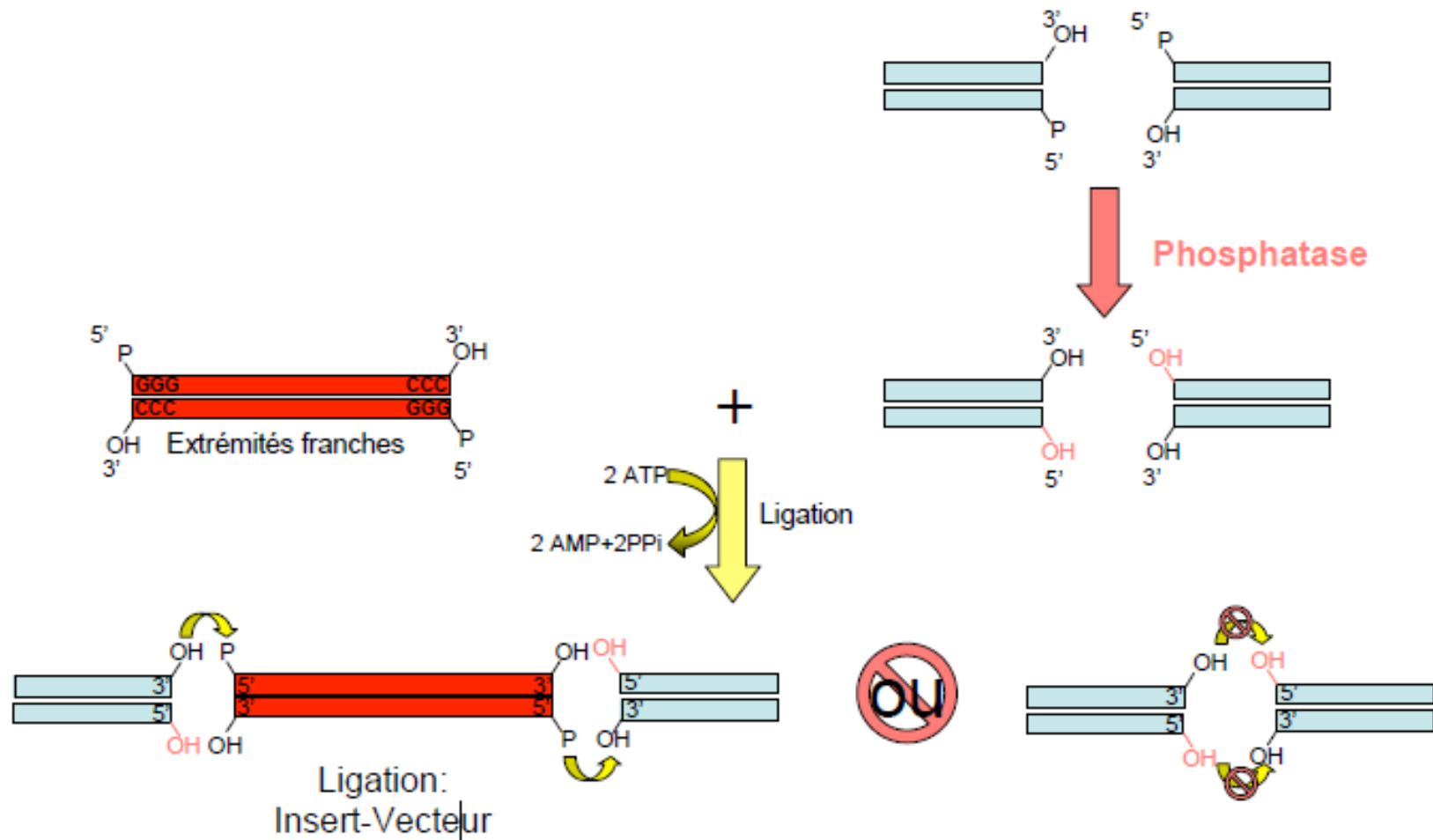
CLONAGE MOLÉCULAIRE

→ La ligase referme indifféremment le vecteur avec ou sans insert

→ **Étape de déphosphorylation** : nécessaire avant la ligation de fragments d'ADN clivés par des d'enzymes de restriction qui génèrent des extrémités franches

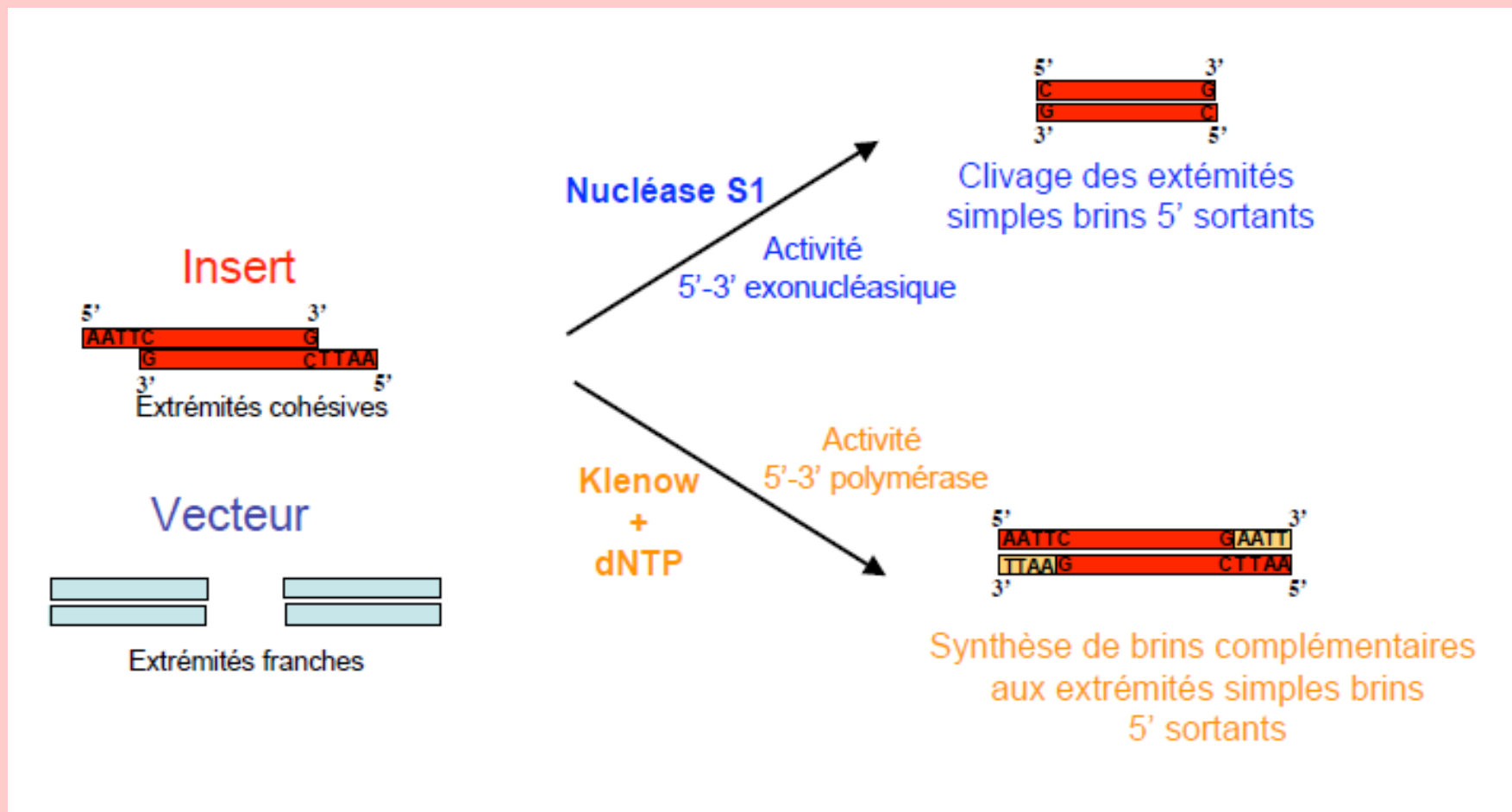
But : que la ligase n'est plus le choix entre refermer le vecteur sur lui-même ou avec l'insert,

CLONAGE MOLÉCULAIRE



CLONAGE MOLÉCULAIRE

→ Stratégie de clonage :



CLONAGE MOLÉCULAIRE

On considère qu'un seul produit PCR a été incorporé dans le vecteur :

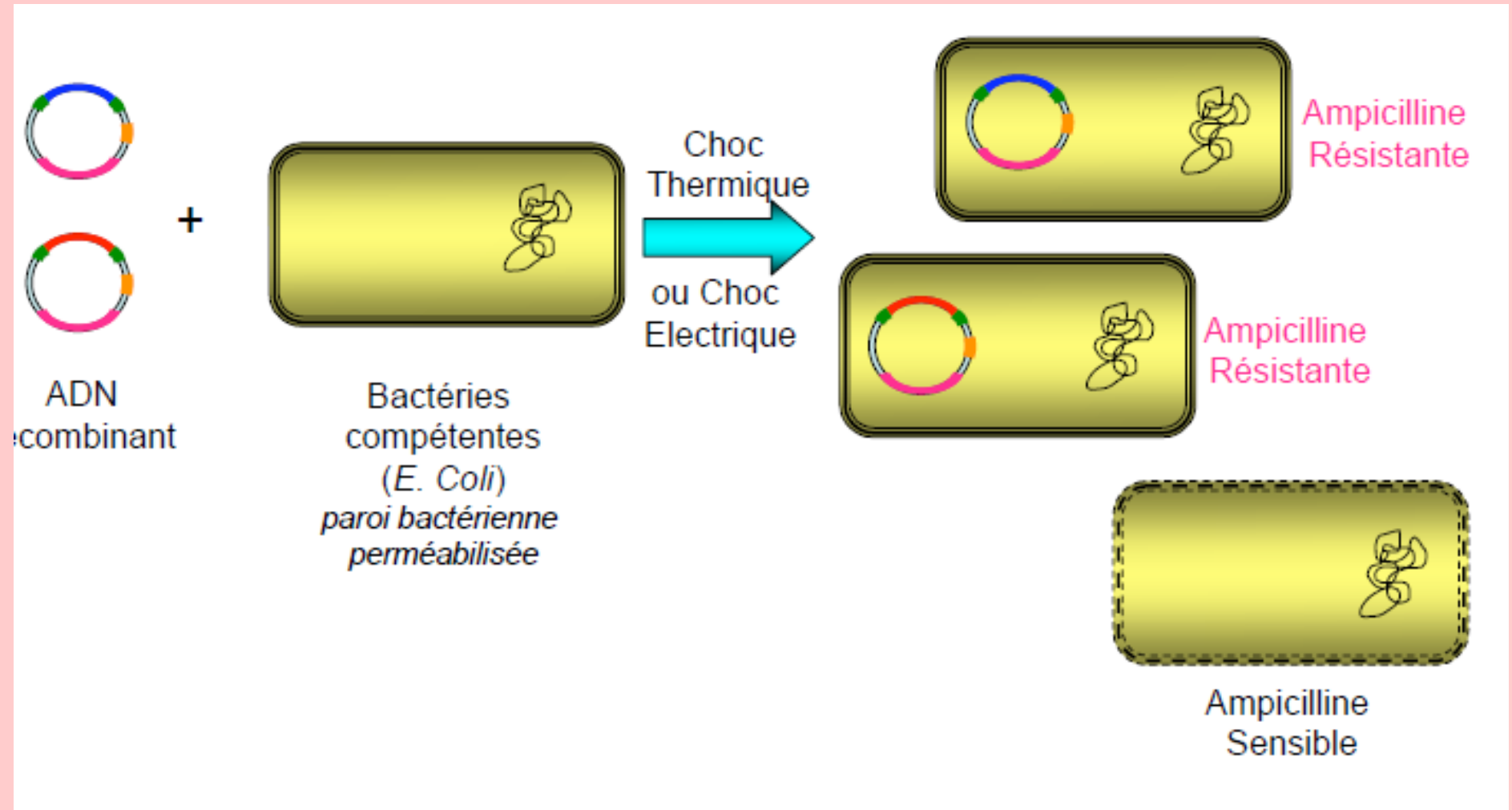
- > soit d'origine maternel
- > soit d'origine paternel

2) Introduire le vecteur dans une cellule hôte (bactéries = TRANSFORMATION)

> perméabilisation de la membrane par choc thermique, électrique, ou chimique

Au final : bactéries avec un seul type d'ADN recombinant = un seul produit PCR + bactéries non transformées

CLONAGE MOLÉCULAIRE



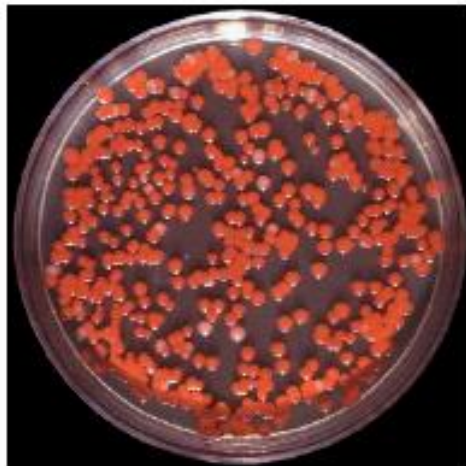
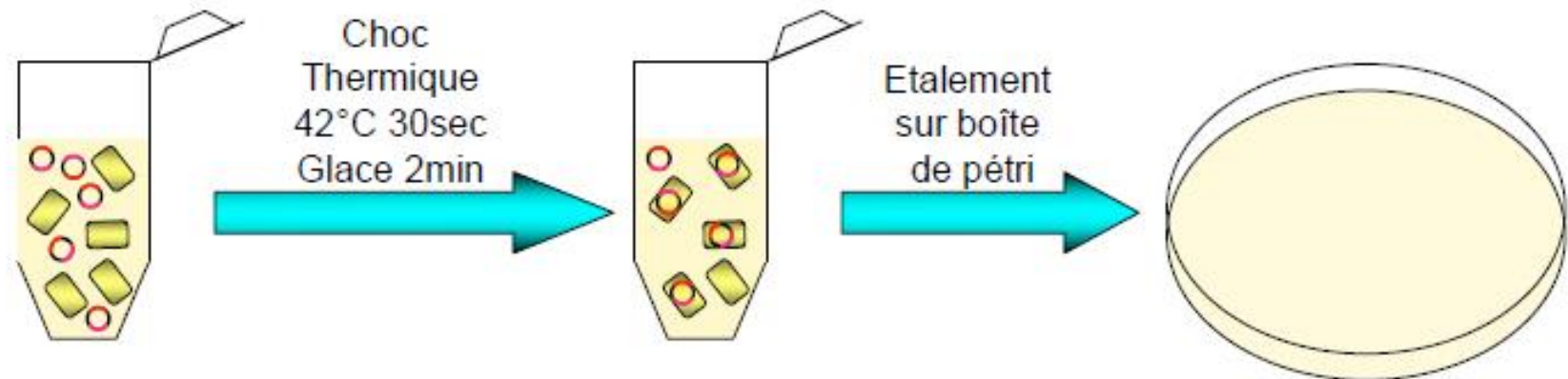
CLONAGE MOLÉCULAIRE

3) Sélection des clones bactériens :

- ✓ Étalement sur boîte de pétri contenant une gélose (=substance nutritive) et un antibiotique
- ✓ L'antibiotique permet de discriminer les bactéries ayant intégrées notre ADN recombinant (vecteur + insert) des autres
- ✓ En effet, le vecteur possède un gène de résistance à l'antibiotique

Au final : seul les bactéries ayant intégrées notre vecteur avec ou sans insert pourra proliférer et faire des colonies

CLONAGE MOLÉCULAIRE



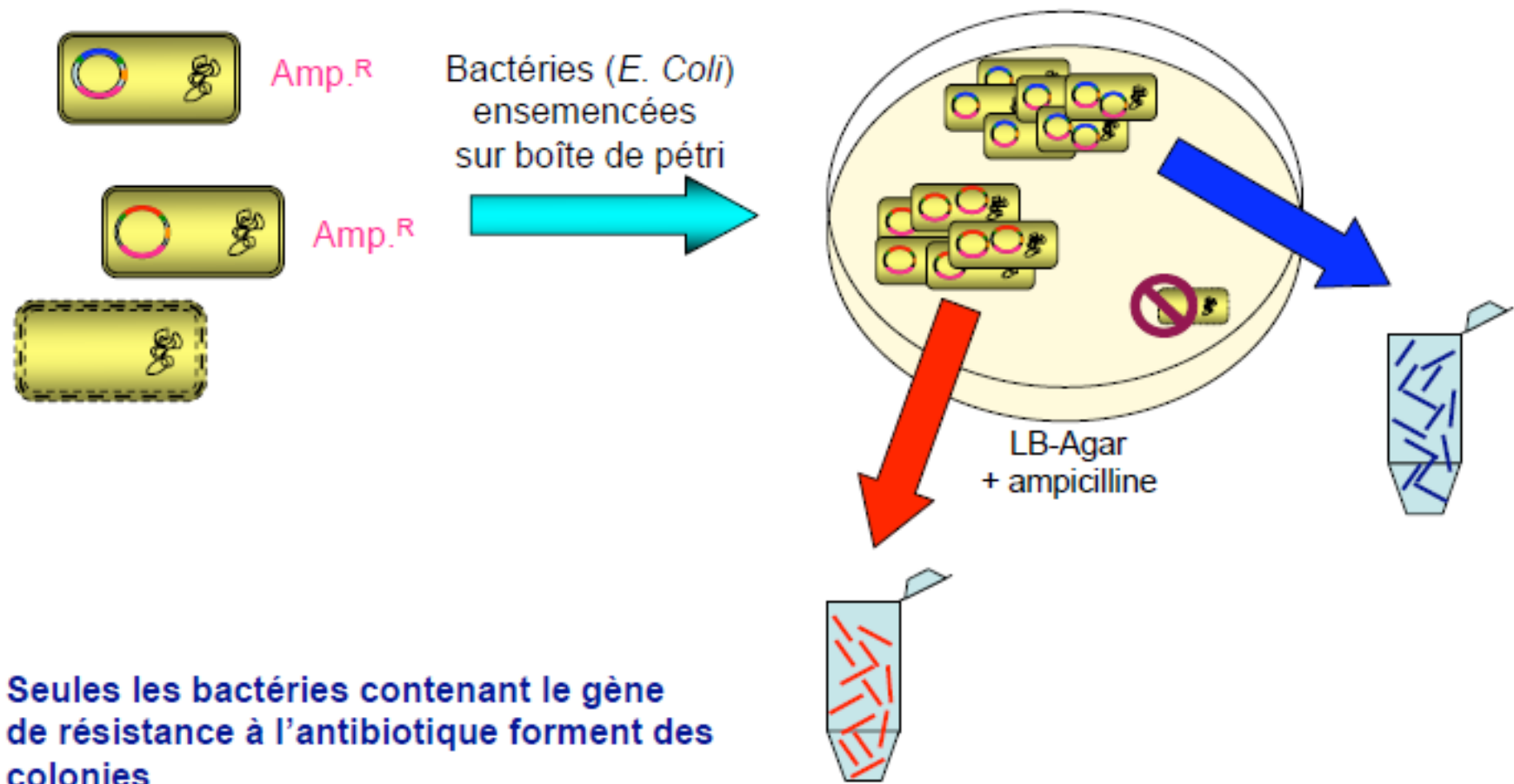
CLONAGE MOLÉCULAIRE

3) Isoler et amplifier des clones bactériens :

- ✓ Une colonies provient à l'origine d'une seul bactérie (si bactériesensemencées pas en excès)
- ✓ On récupère une colonie, qu'on transfère dans un milieu liquide pour l'amplifier
- ✓ Pareil avec une autre colonie

Au final : 2 populations d'ADN recombinant différentes isolées ! On a bien réussi à séparer nos 2 populations (ADNc père / ADNc mère)

CLONAGE MOLÉCULAIRE



CLONAGE MOLÉCULAIRE

3) Sélection des clones bactériens :

- ✓ Étalement sur boîte de pétri contenant une gélose (=substance nutritive) et un antibiotique
- ✓ L'antibiotique permet de discriminer les bactéries ayant intégrées notre ADN recombinant (vecteur + insert) des autres
- ✓ En effet, le vecteur possède un gène de résistance à l'antibiotique

Au final : seul les bactéries ayant intégrées notre vecteur avec ou sans insert pourront proliférer et faire des colonies

CLONAGE MOLÉCULAIRE

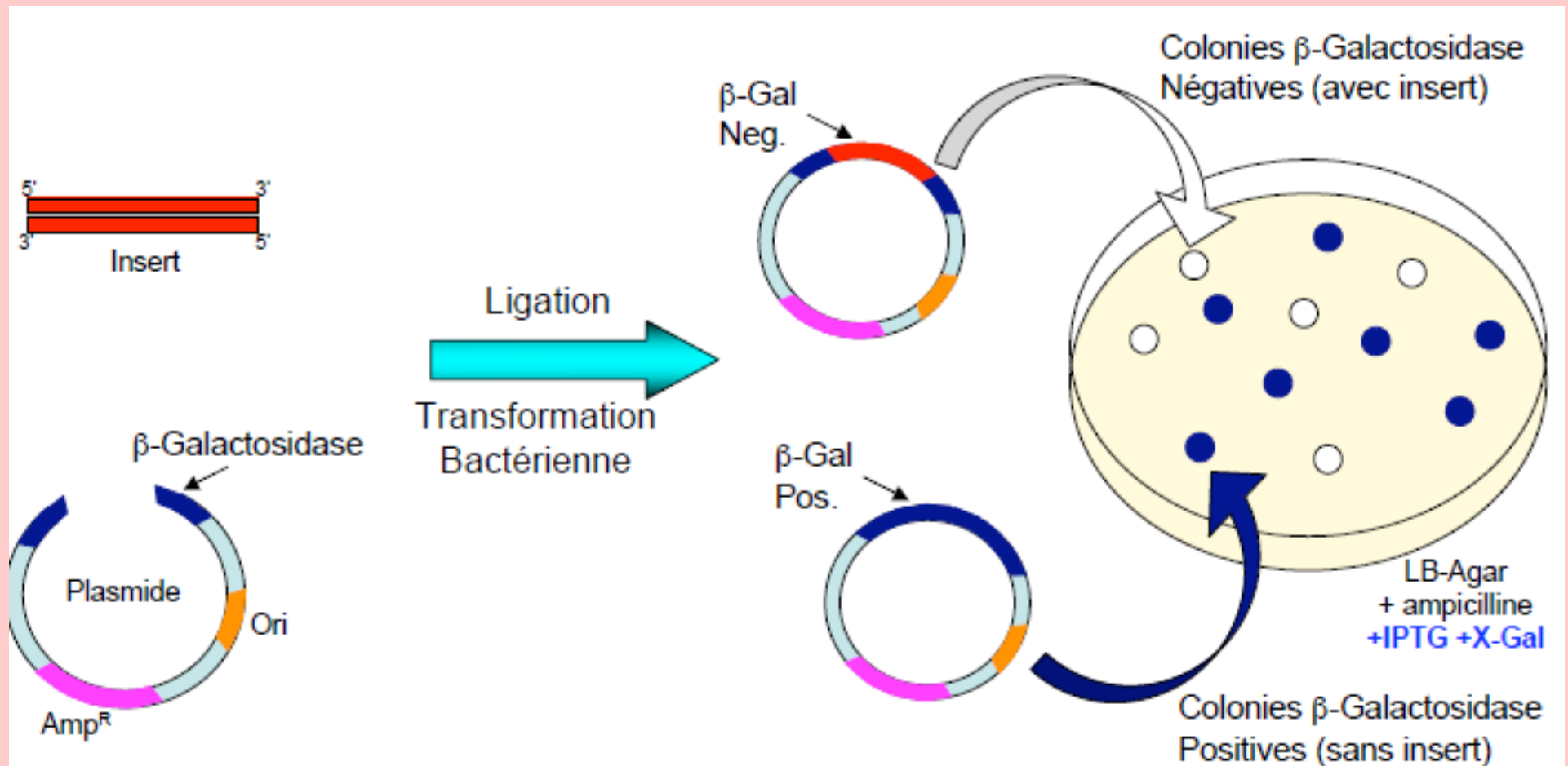
Problème : on a jamais 100 % d'insertion de l'insert, certains vecteurs se sont refermés sans l'insert malgré les phosphatases.

Solution : sélection blanc-bleue

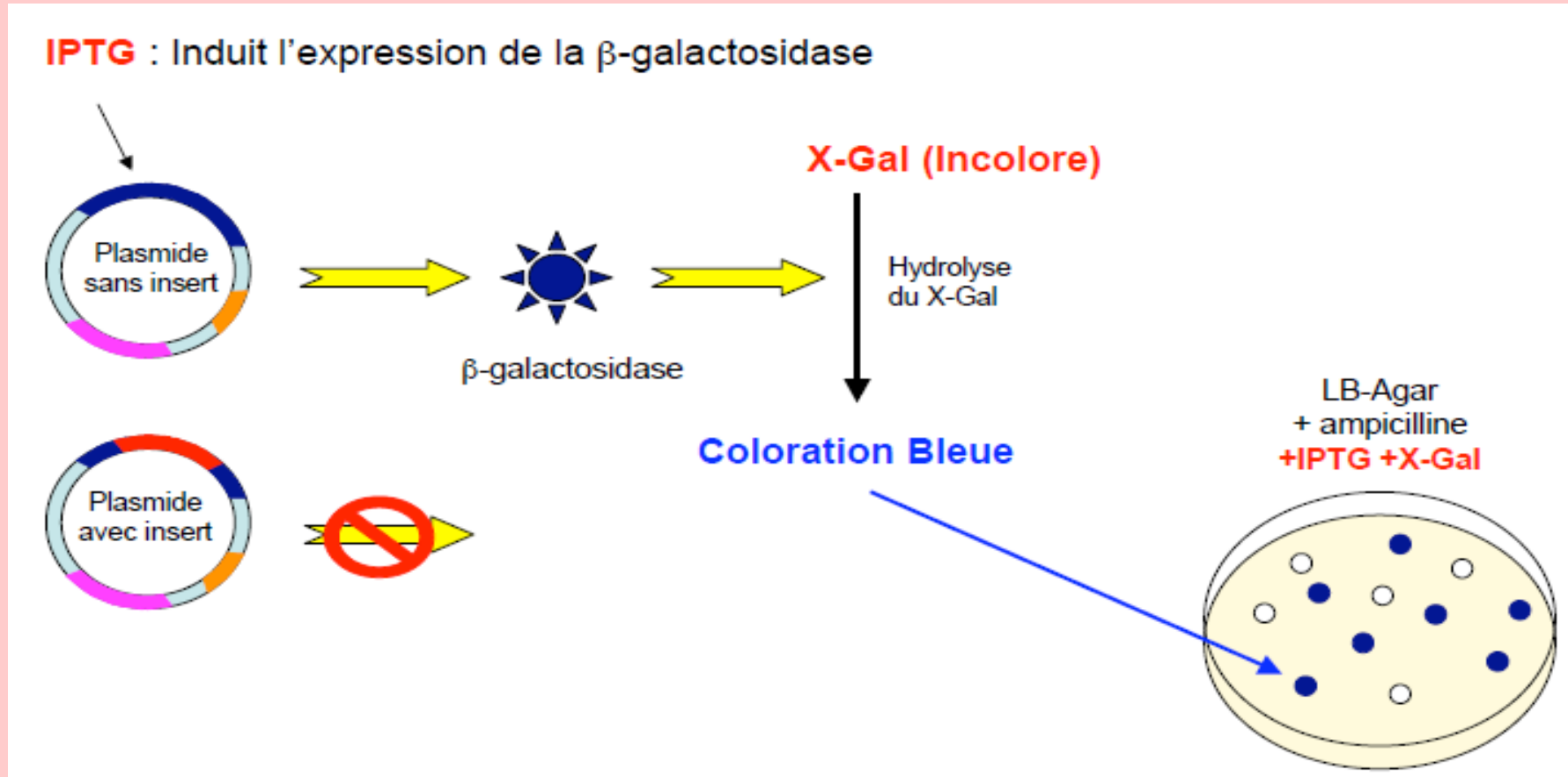
- ✓ Polylinker au milieu d'un gène qui code pour la B-Galactosidase
- ✓ Si insertion de l'insert = coupure du gène en 2 = pas d'expression de la B-Galactosidase
- ✓ Si le vecteur se referme sur lui-même = gène de l'enzyme continue = expression de la B-Galactosidase

CLONAGE MOLÉCULAIRE

→ Sélection blanc-bleue :



CLONAGE MOLÉCULAIRE



IPTG = induit expression de la B-galactosidase

Ampicilline = antibiotique

X-Gal = substrat

Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

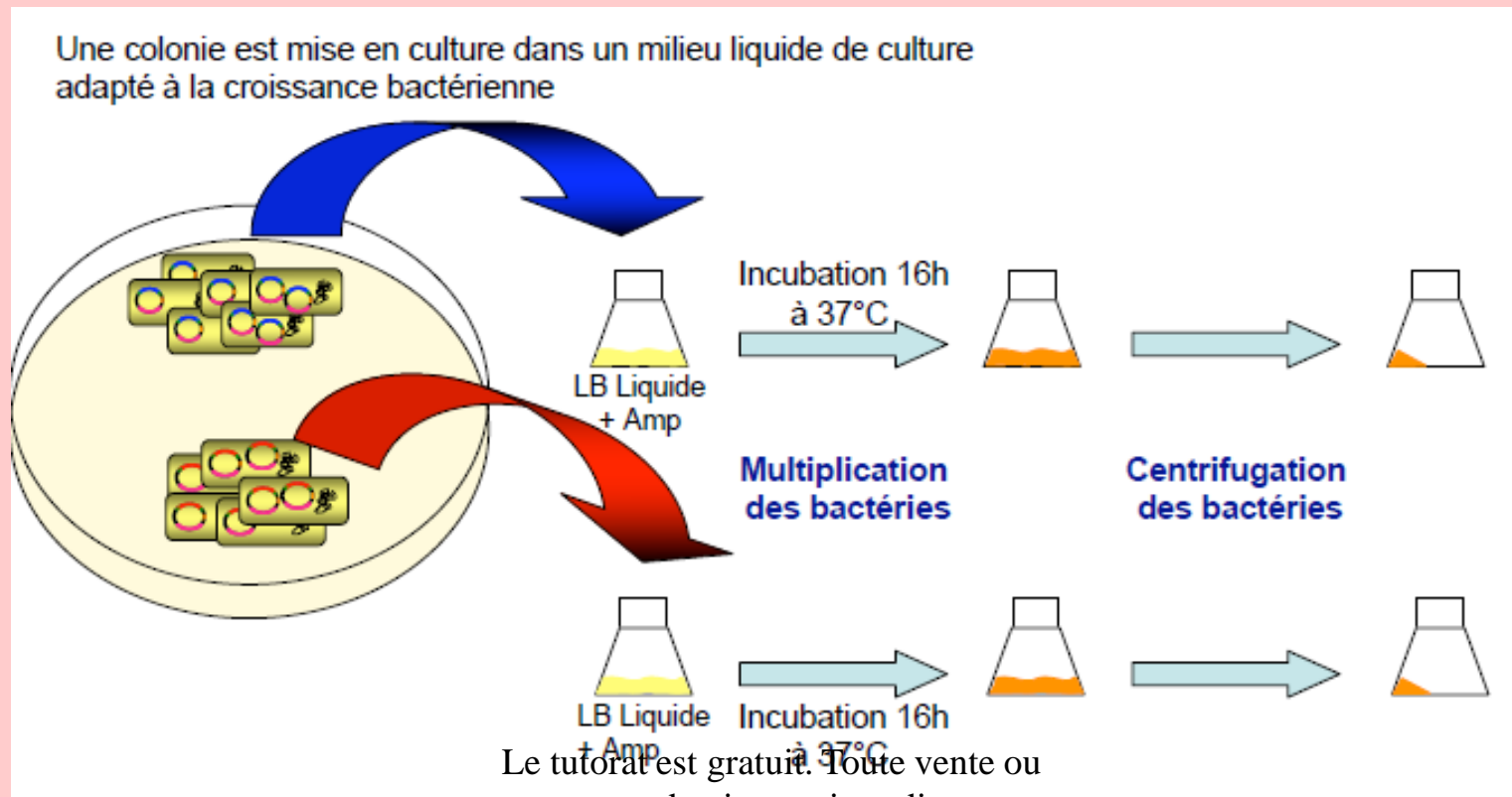
CLONAGE MOLÉCULAIRE

AVEC INSERT	SANS INSERT
gène B-Galactosidase inactivé	gène B-Galactosidase fonctionnel
X-Gal incolore non hydrolysé	X-Gal incolore hydrolysé colorant le milieu en bleu
= COLONIES BLANCHES	COLONIES BLEUES

CLONAGE MOLÉCULAIRE

3) Amplification clonale des clones bactériens

- ✓ On amplifie ces différentes populations pour récupérer l'ADN et le séquencer



Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

CLONAGE MOLÉCULAIRE

4) Séquençage

On obtient un fragment d'ADN **pur** en grande quantité qu'on va pouvoir séquencer individuellement

Pour cela, on procède d'abord à :

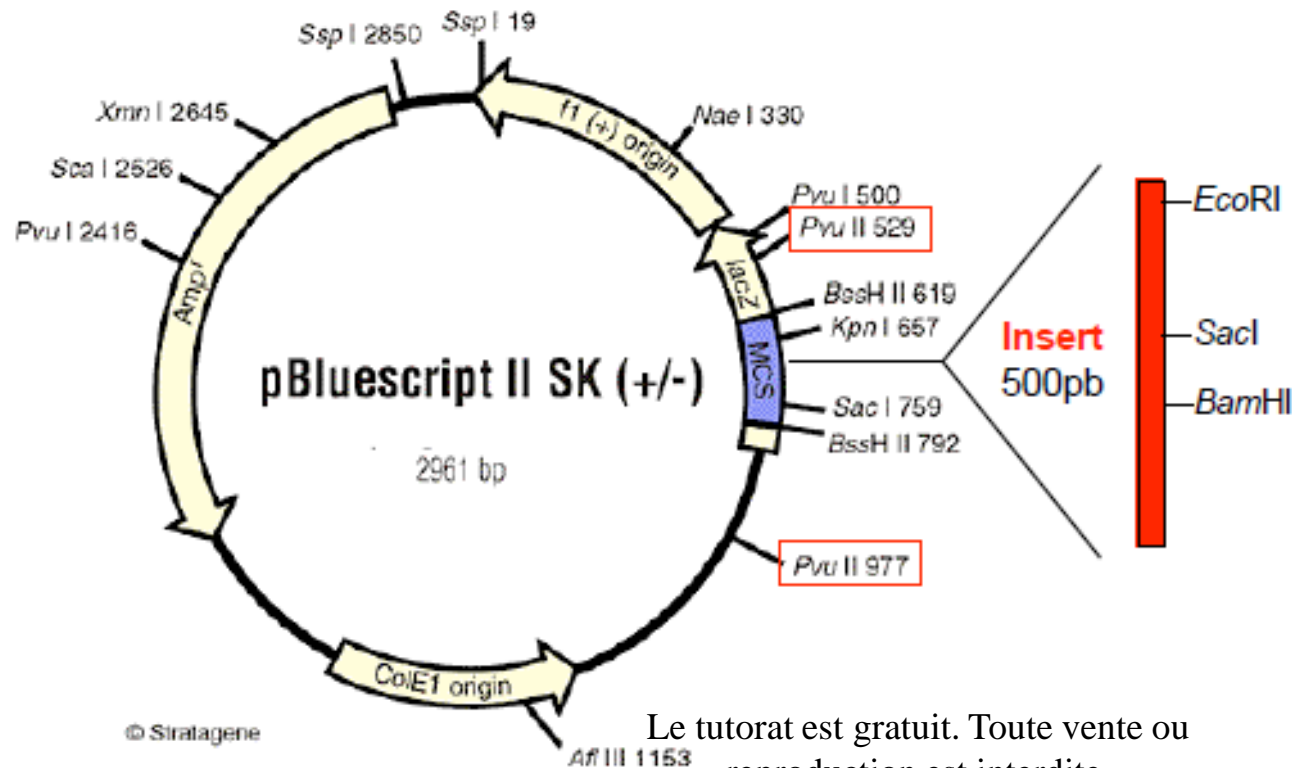
- ✓ à l' extraction de l'ADN recombinant
- ✓ les ADN recombinants purifiés sont analysés par digestion enzymatique : réalisation de sa carte de restriction = VERIFIER QUE LE PLASMIDE CONTIENT L'INSERT

CLONAGE MOLÉCULAIRE

→ **Carte de restriction** = séquences des vecteurs que l'on connaît parfaitement

→ **MCS** = site de multiclونage = polylinker = lieu d'insertion de l'insert

Les ADN recombinants purifiés sont analysés par digestion enzymatique: réalisation de sa carte de restriction.

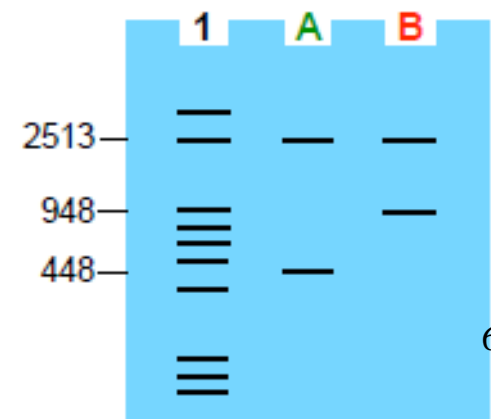


Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

Digestion *PvuII*:

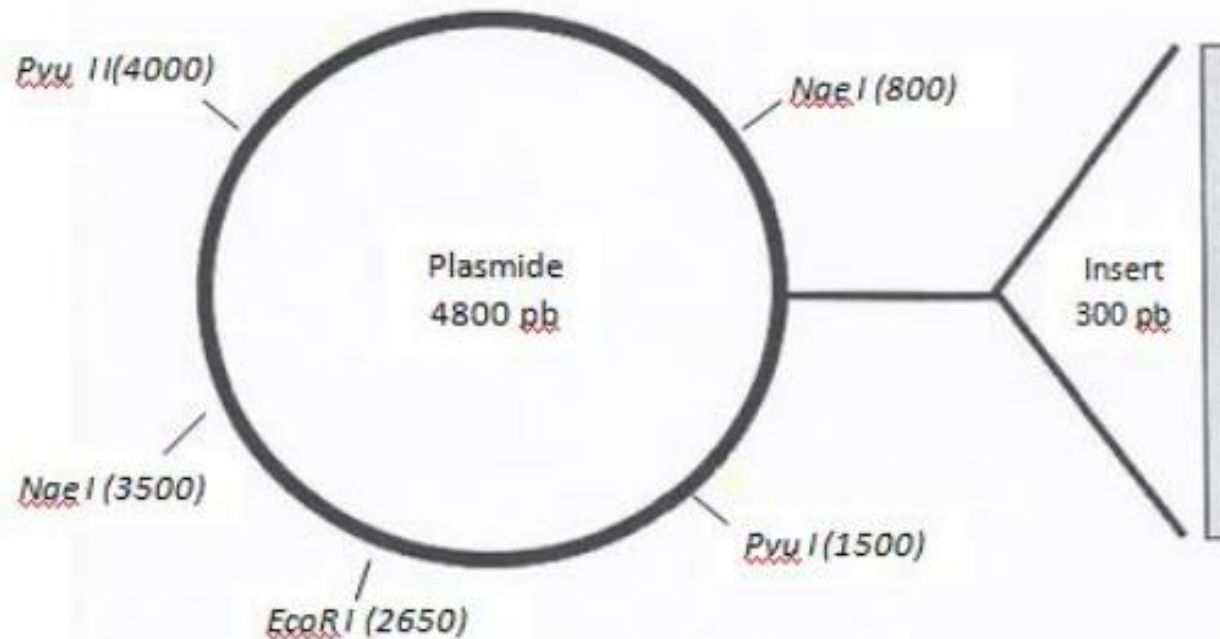
A- Plasmide sans insert:
977-529 = 448 bp

B- Plasmide avec insert:
977-529 = 448 bp
+ 500bp = 948bp



CLONAGE MOLÉCULAIRE

QCM 1 : Vous réalisez une carte de restriction pour différencier les plasmides contenant un insert de ceux ne contenant pas d'insert. La carte de restriction est schématisée ci-dessous.



Méthode de résolution :

Taille du fragment entre Nae I et Nae I sans l'insert :

$$3500 - 800 = 2700 \text{ pb}$$

Taille du reste du plasmide :

$$4800 - 2700 = 2100 \text{ pb}$$

Taille du premier fragment avec l'insert :

$$2700 + 300 = 3000 \text{ pb}$$

Après digestion enzymatique avec l'enzyme Nae I, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose ? Donner la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide avec insert : 2700pb + 2100pb
- B) Plasmide avec insert : 2700pb + 2400pb
- C) Plasmide sans insert : 3000pb + 2100pb
- D) Plasmide sans insert : 2700pb + 2400pb
- E) Aucune de ces réponses n'est correcte

E

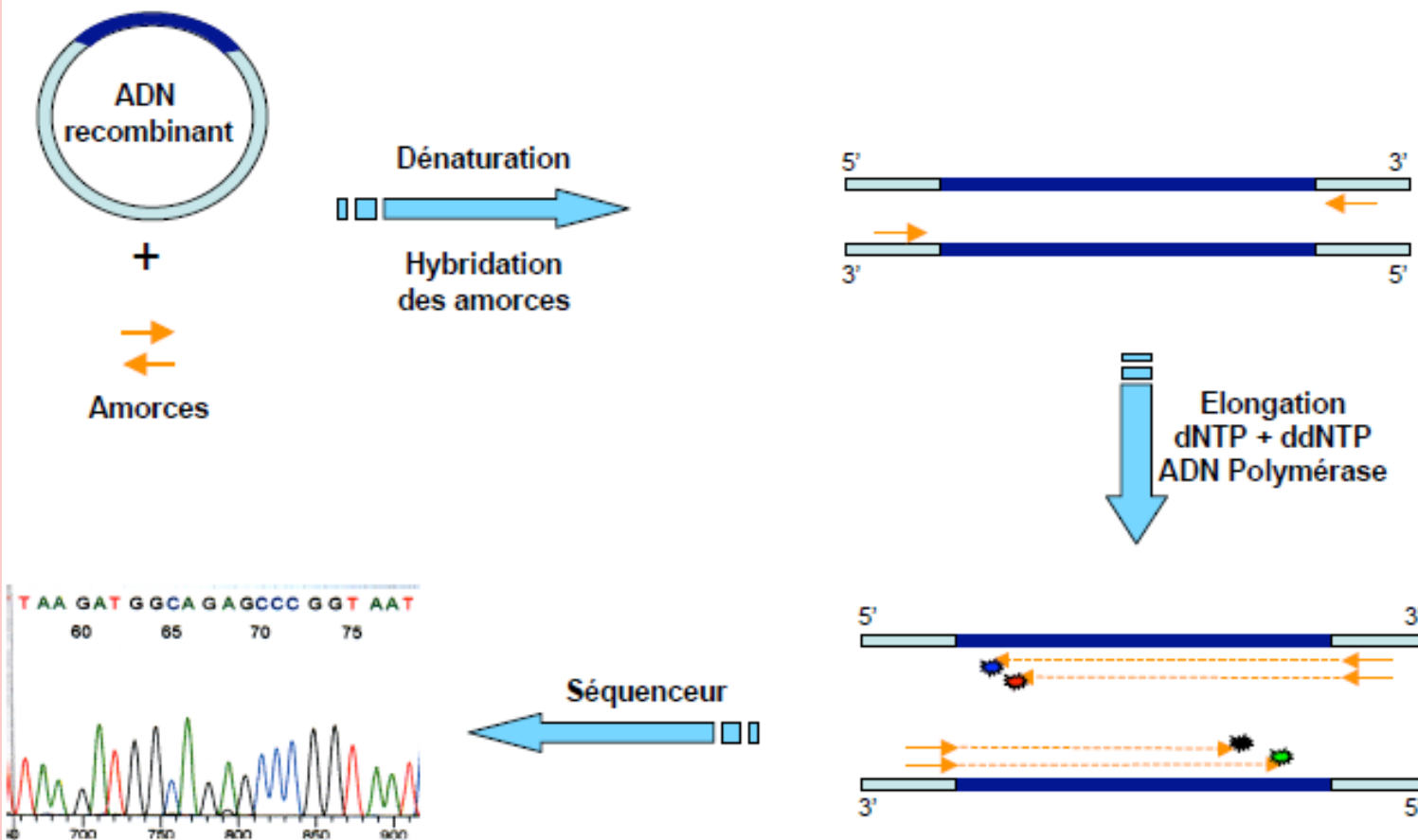
Correction :

Plasmide avec insert : 3000pb + 2100pb

Plasmide sans insert : 2700pb + 2100pb

CLONAGE MOLÉCULAIRE

Vérification de l'insert par séquençage



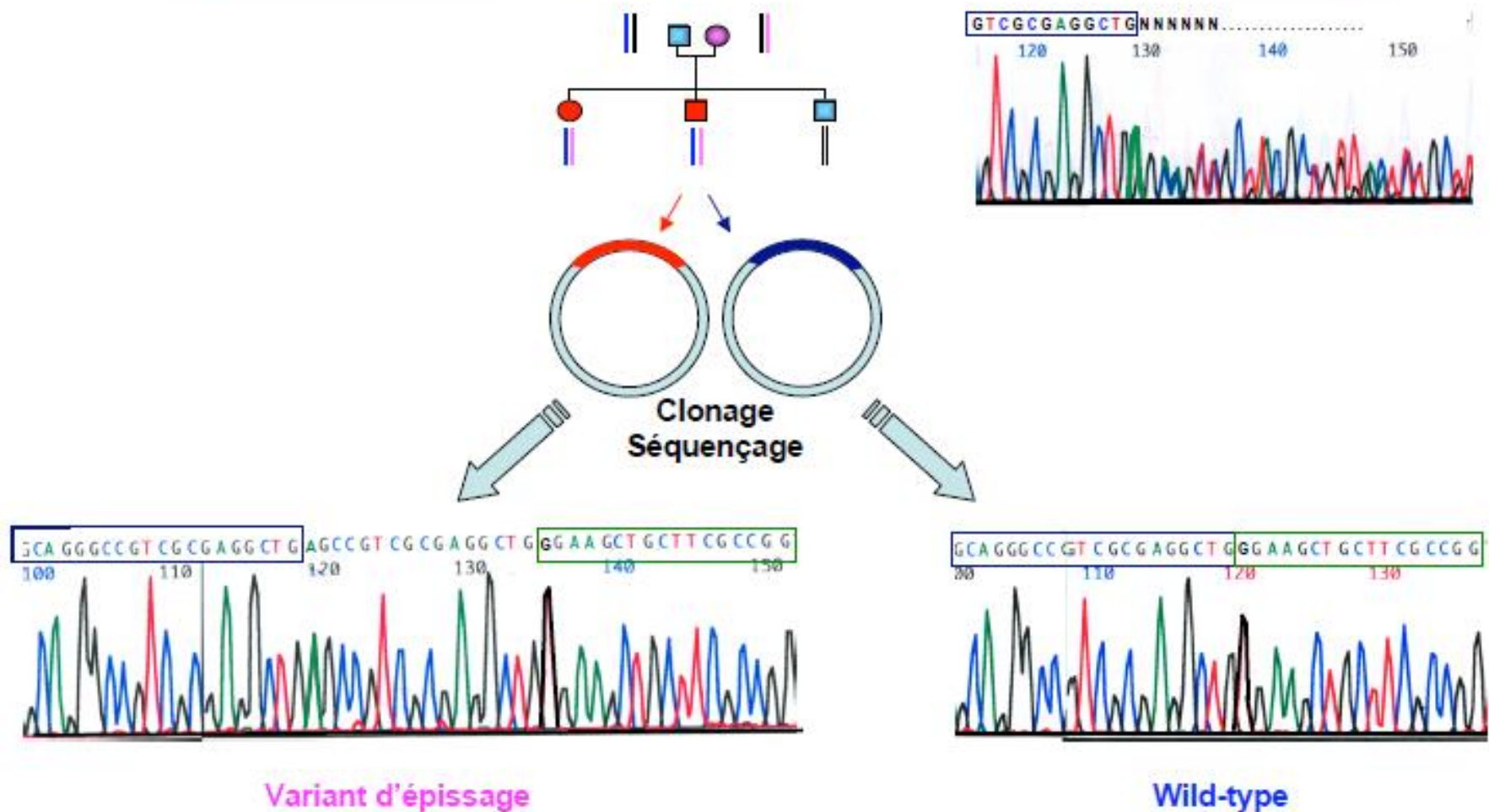
CLONAGE MOLÉCULAIRE

4) Séquençage

- ✓ Au départ = séquençage illisible car superposition allèle sauvage et variant d'épissage
- ✓ Après clonage = séparation des 2 produits PCR qui venaient des 2 allèles de la mère (WT et variant d'épissage)
- ✓ On identifie très clairement la partie de l'intron ajouté = variant d'épissage = impact sur l'ARNm
 - 💣 Donc une mutation dans une région introniques peut avoir un impact sur la protéine
- ✓ Tandis que dans le séquençage wild type on retrouve la jonction exon6-exon7

CLONAGE MOLÉCULAIRE

Vérification de l'insert par séquençage



SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT (NGS)

Définition :

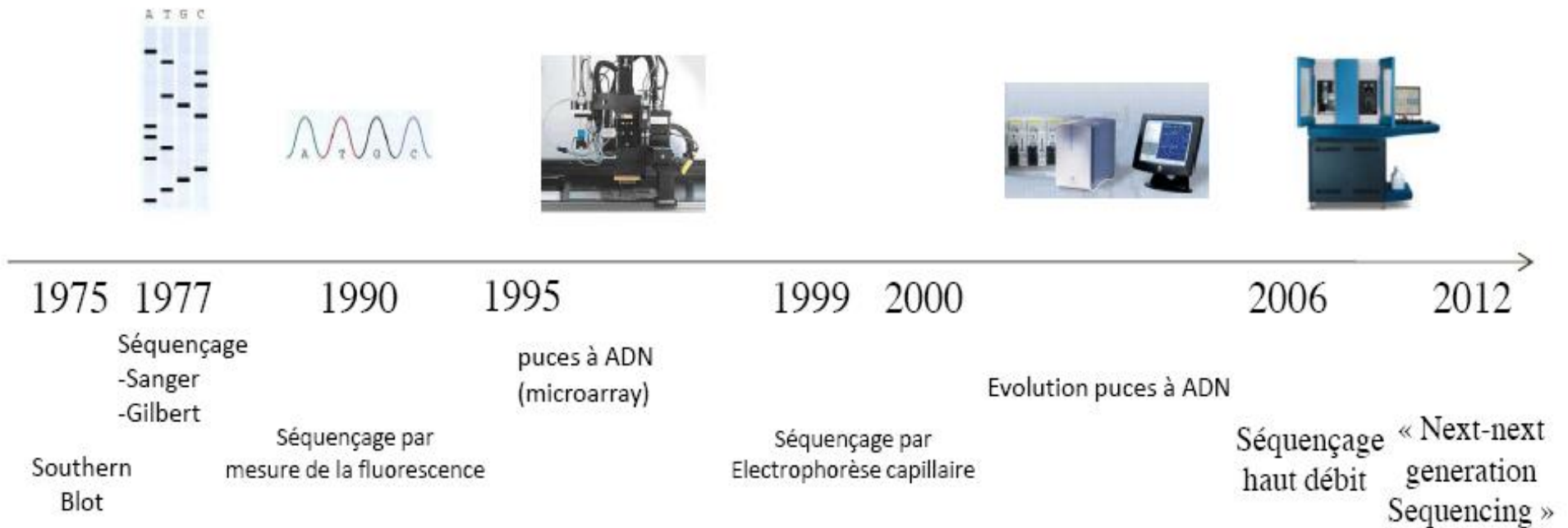
« Séquençage massif **en parallèle** de molécules d'ADN individuellement séparées et amplifiées sous forme de clones ou de molécules unique. »

Différence avec la méthode de séquençage classique :

1 réaction de séquence par Sanger : 400pb-800pb

1 réaction de séquence NGS : 10Mb à 100Gb, voire même l'exome complet en 1 réaction (= totalité des séquences codantes d'un individu)

SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT (NGS)



SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT (NGS)

3 types de séquenceurs NGS :

→ Illumina

→ Roche

→ Life Technologies

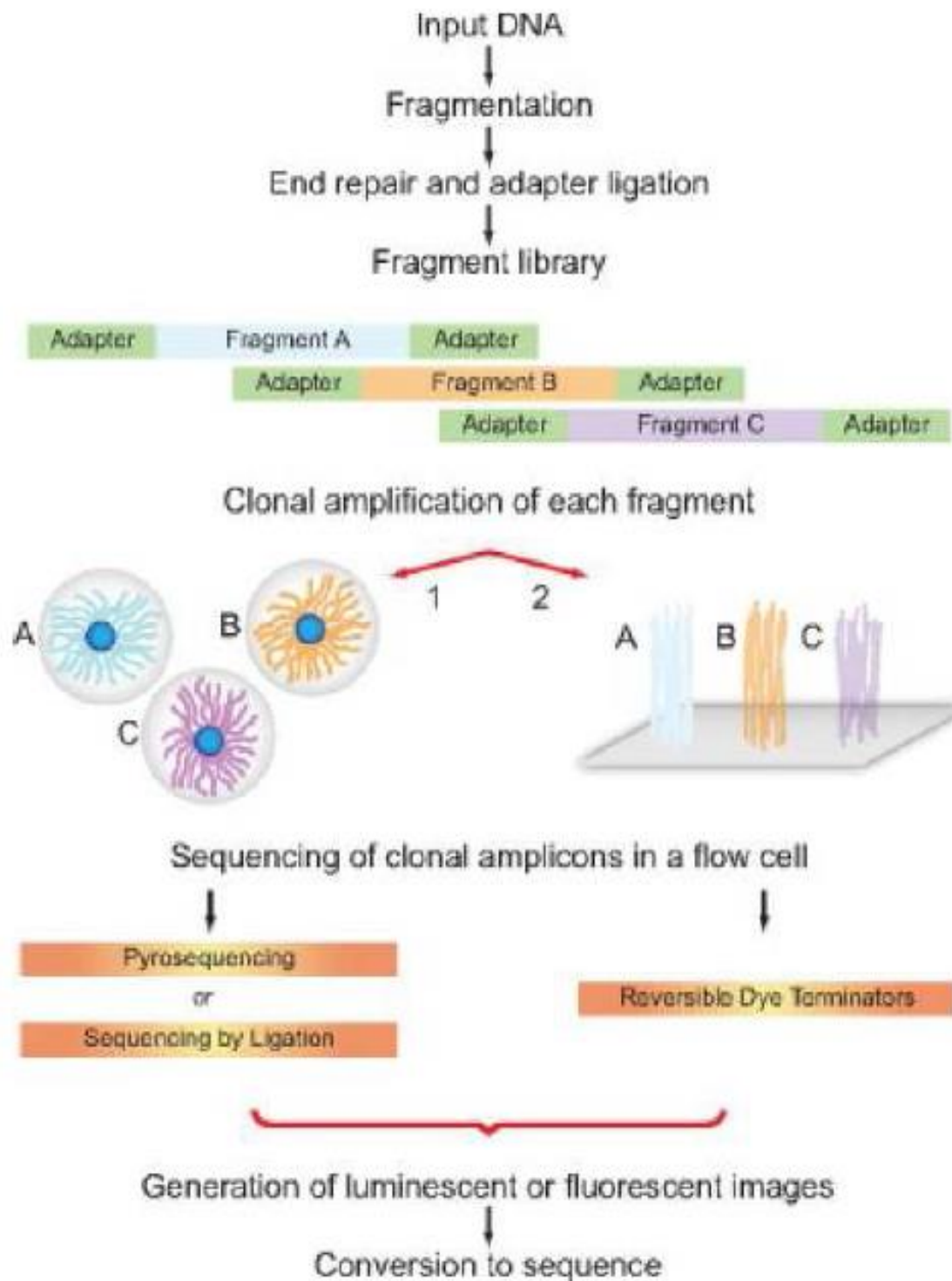
Le principe de base est le même pour les 3 types :

1) FRAGMENTATION de l'ADN

2) Ajout ADAPTATEURS + CODES BARRES

3) Amplification PCR

4) Séquençage



SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT (NGS)

1) **FRAGMENTATION de l'ADN**

- casser l'ADN double brin par :
 - ↳ **des endonucléases**
 - ↳ **ou par des sonicateurs (ultrasons)**
- obtention de fragment d'ADN de 200 à 400pb

SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT (NGS)

2) Ajout ADAPTATEURS + CODES BARRES

- à l'aide d'ADN ligases
- permet d'identifier les différents échantillons (96 PCR d'ADN simultanés pour LT)
- on obtient des petits fragments d'ADN avec à leurs extrémités 5' et 3' exactement les mêmes séquences

avantage = quelque soit le fragment d'ADN on va pouvoir utiliser les mêmes primers

SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT (NGS)

3) **Amplification PCR**

La technique d'amplification va différencier les 3 types de séquenceurs !

BUT : amplifier et séquencer **individuellement** et **simultanément** en séparant ces petits fragments les uns des autres

→ Illumina : **amplification clonale sur support solide**

→ Roche + Life Technologies : **amplification clonale sur billes d'agaroses**

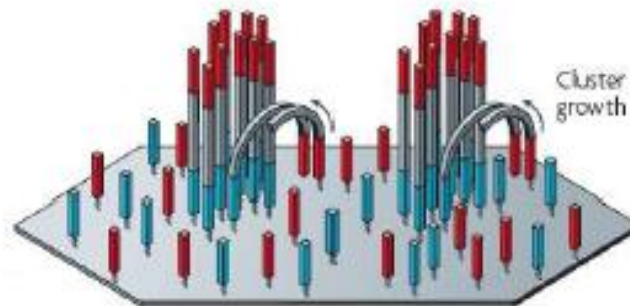
- Emulsion huile/eau puis ePCR (emulsion PCR) [SoliD](#) , [Roche](#), [Ion torrent](#)



Emulsion et création de microréacteurs

Emulsion PCR

- Immobilisation sur phase solide puis bridge amplification [Illumina](#)



SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT (NGS)

4) Séquençage

- Séquençage générant des signaux (fluorescent ou chimique)
- Détection des signaux émis et conversion en séquence

	ILLUMINA	Roche	Life technologies
Amplification clonale sur	SUPPORT SOLIDE	BILLES AGAROSSES	BILLES AGAROSSES
Discrimination des nucléotides intégrés	Δ FLUO	Δ FLUO	Δ PH

SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT (NGS)

Amplification PCR

Illumina:

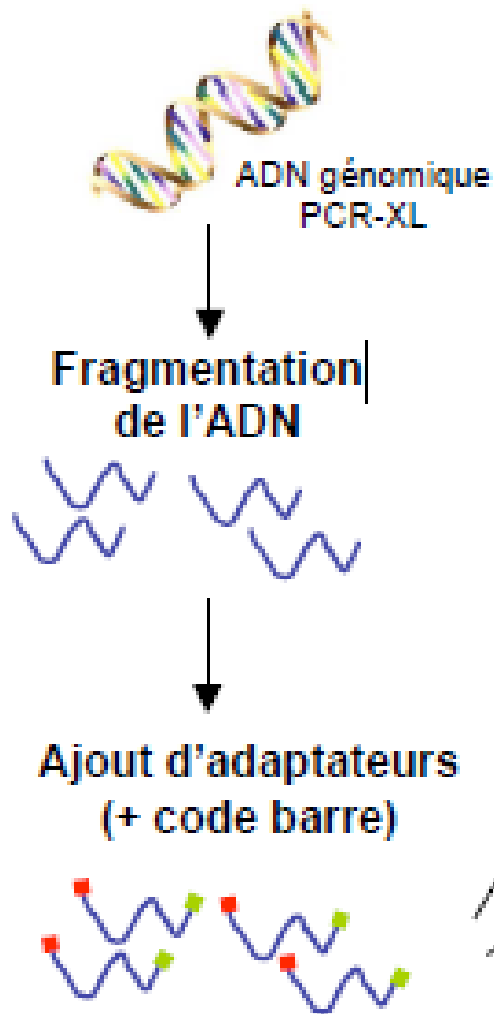
**Capture des fragments d'ADN
et amplification sur support solide**

Roche:

**Fixation sur billes d'agarose
Séparation des billes (Eau/huile)
PCR en émulsion**

Life Technologies:

**Fixation sur des sphères
Séparation des billes (Eau/huile)**





PacBio RS
Pacific Bioscience



Helicos Biosciences
Heliscope

Vidéos à titre illustratives :

[Illumina sequencing technology](#)
[Illumina](#)

[Roche technology](#)

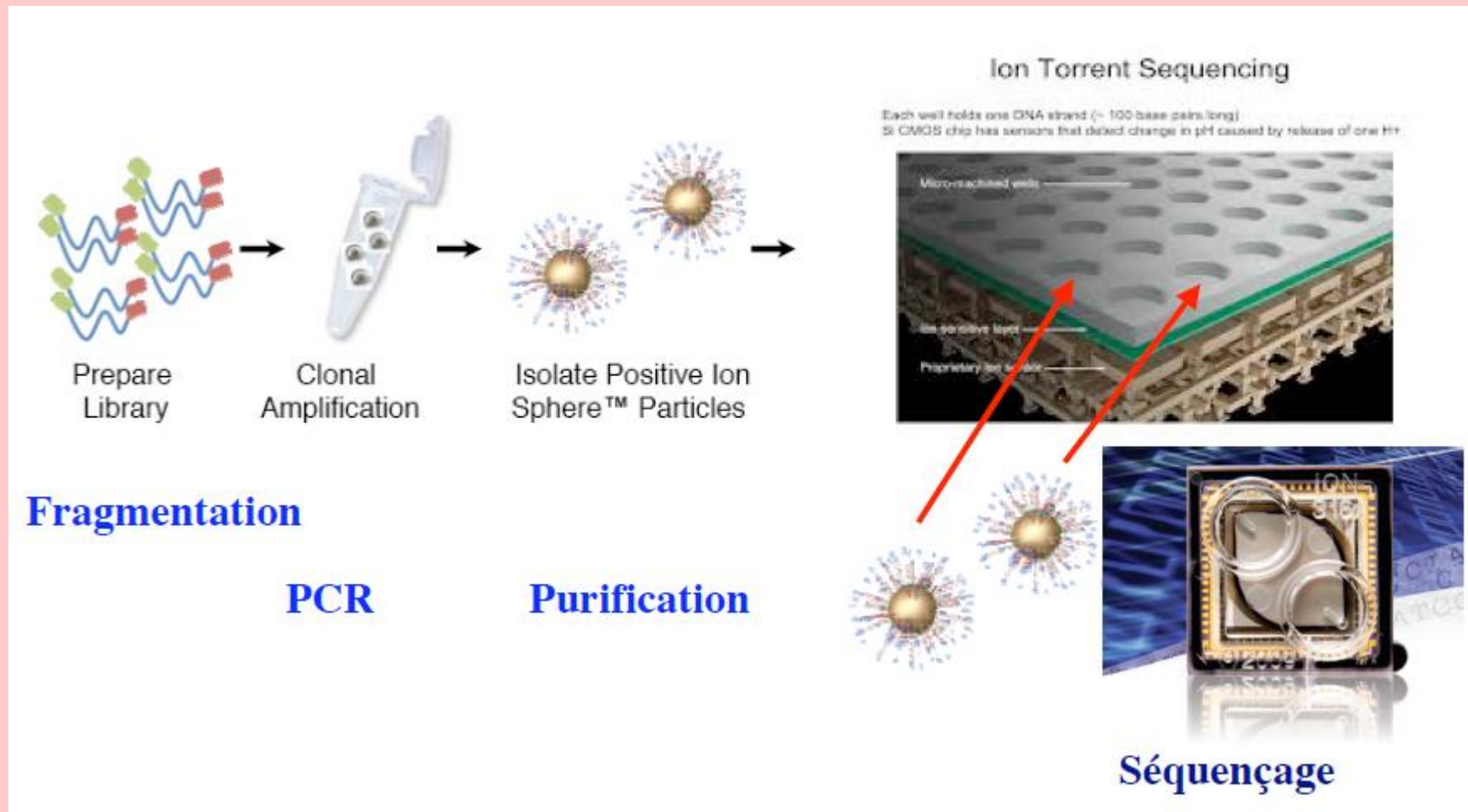
[Life technologie Torrent](#)

Système Life Technologies Torrent

Principe :

- La création d'une liaison phosphodiester libère un proton
- variations de [protons] = variation de pH
- Le système LT **mesure la variation de pH pour savoir si un nucléotide donné a été intégré**
- On peut ainsi séquencer le fragment d'ADN donné

Système Life Technologies Torrent



Systeme Life Technologies Torrent

Fonctionnement :

- 1) **Fragmentation** de l'ADN
- 2) Fixation **adaptateurs** en 5' et 3'
- 3) Chaque fragment d'ADN sera piégé sur une **sphère**
- 4) **Émulsion huile-réactifs** de façon à créer des **micro-réacteurs** = chaque goutte contenant une sphère et tout les réactifs nécessaires à l'amplification PCR (Taq polymérase, les primers ...)
- 5) Amplification de chaque fragment d'ADN (PCR en émulsion)

Systeme Life Technologies Torrent

Fonctionnement (suite) :

- 6) On place ces sphères dans des **puits recouvrant une puce** de 2-3cm de diamètre (1 puce = 1 à 11 millions de puits = 1 à 11 millions de réactions simultanées)
- 7) Séquentiellement l'appareil va envoyer les différents nucléotides A,T,G,C
- 8) **Si le nucléotide envoyé a été incorporé par la polymérase, le séquenceur mesurera une variation de pH dû à la libération d'un proton lors de la formation de la liaison phosphodiester**

Systeme Life Technologies Torrent

Avantages :

- ✓ Gain de temps
- ✓ Gain de capacité (10Mb à 100Gb en 1 seule réaction)

Inconvénients :

- ✓ Traitement bio-informatique lourd
- ✓ Pas assez de recul sur la viabilité de ces méthodes (2005)

La méthode Sanger reste quand même la méthode de référence, il faudra toujours confirmer par une PCR-séquençage classique

Bonus : PCR EN TEMPS RÉEL

Définition :

La **PCR en temps réel** ou **PCR quantitative** est une méthode particulière de réaction d'amplification en chaîne par polymérase **permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN**.

Application :

- ✓ **Quantifier la charge virale** (diagnostics maladies infectieuses)
- ✓ **Déterminer le nombre de copie d'un gène** (pathologies où c'est la variation de ce nombre qui est responsable)

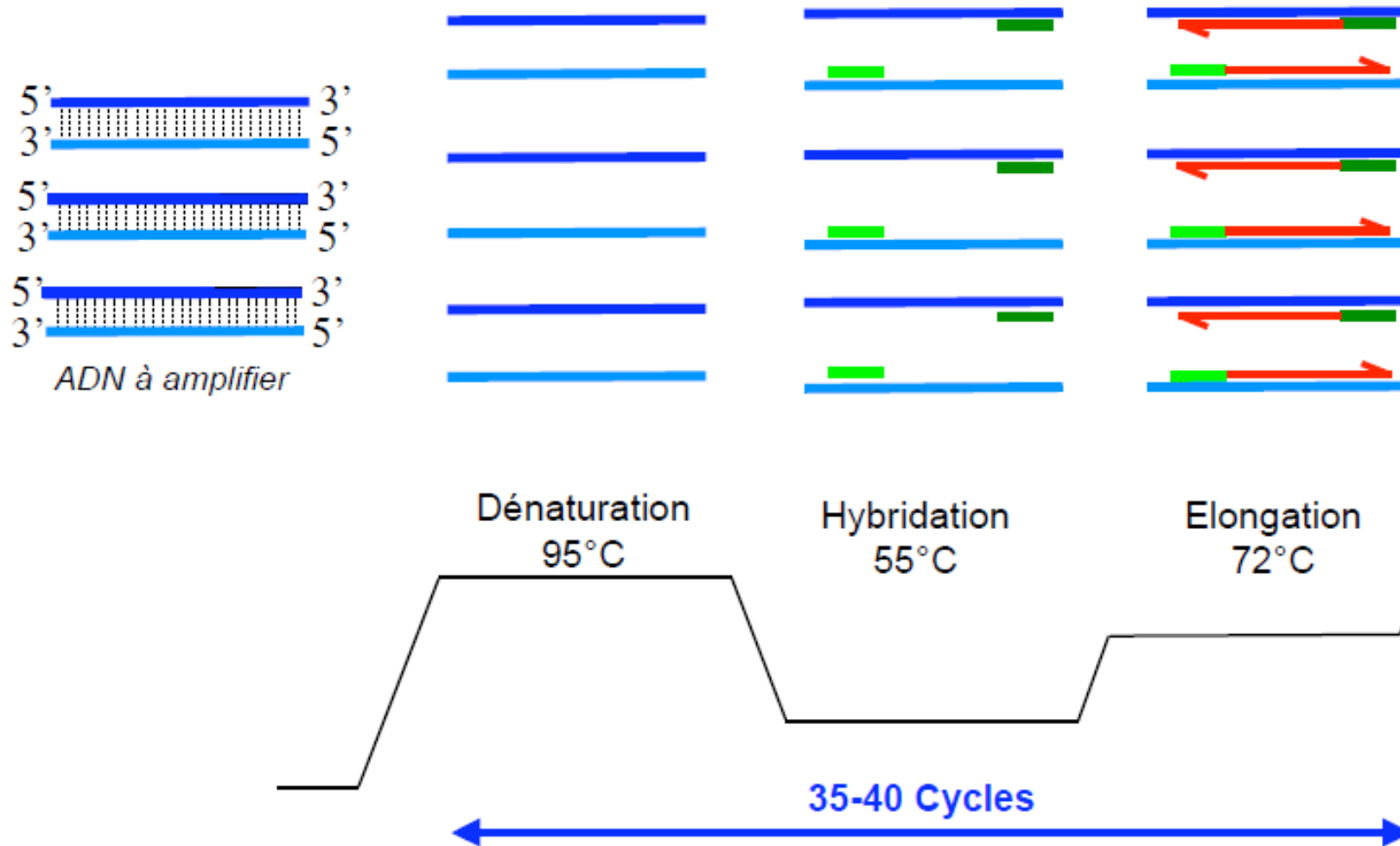
PCR EN TEMPS RÉEL 1

La première grande technique repose sur le même principe que la **PCR QUALITATIVE** :

💣 **À l'exception de la mesure de la fluorescence qui se fait directement après chaque cycle et de l'agent intercalant utilisé (BET vs SYBR green)**

→ Avec la PCR classique la mesure de la quantité d'ADN ne se fait qu'après 35-40 cycles et migration sur gel d'agarose ou d'acrylamide (sous lumière UV après coloration BET)

Rappel : les étapes de la PCR



PCR EN TEMPS RÉEL 1

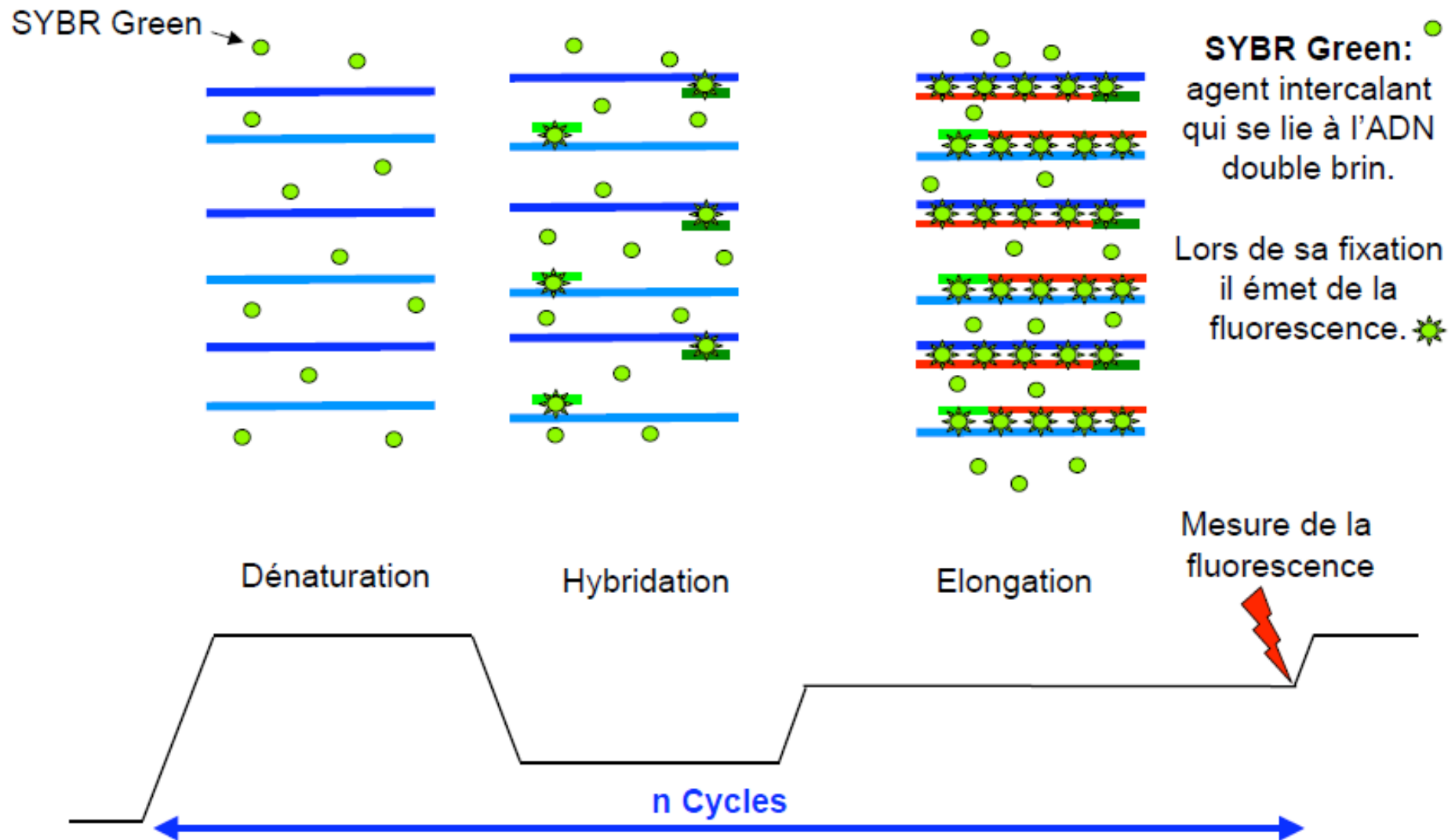
Pour permettre la lecture de la quantité de produit PCR produit à chaque cycle, on ajoute au milieu réactionnel le SYBR green (= intercalent comme le BET).

Propriété SYBR green :

Émettre une fluorescence quand il est incorporé dans un ADN double brin

➔ L'intensité de la fluorescence est donc représentatif de la quantité de produit PCR généré

PCR EN TEMPS RÉEL 1



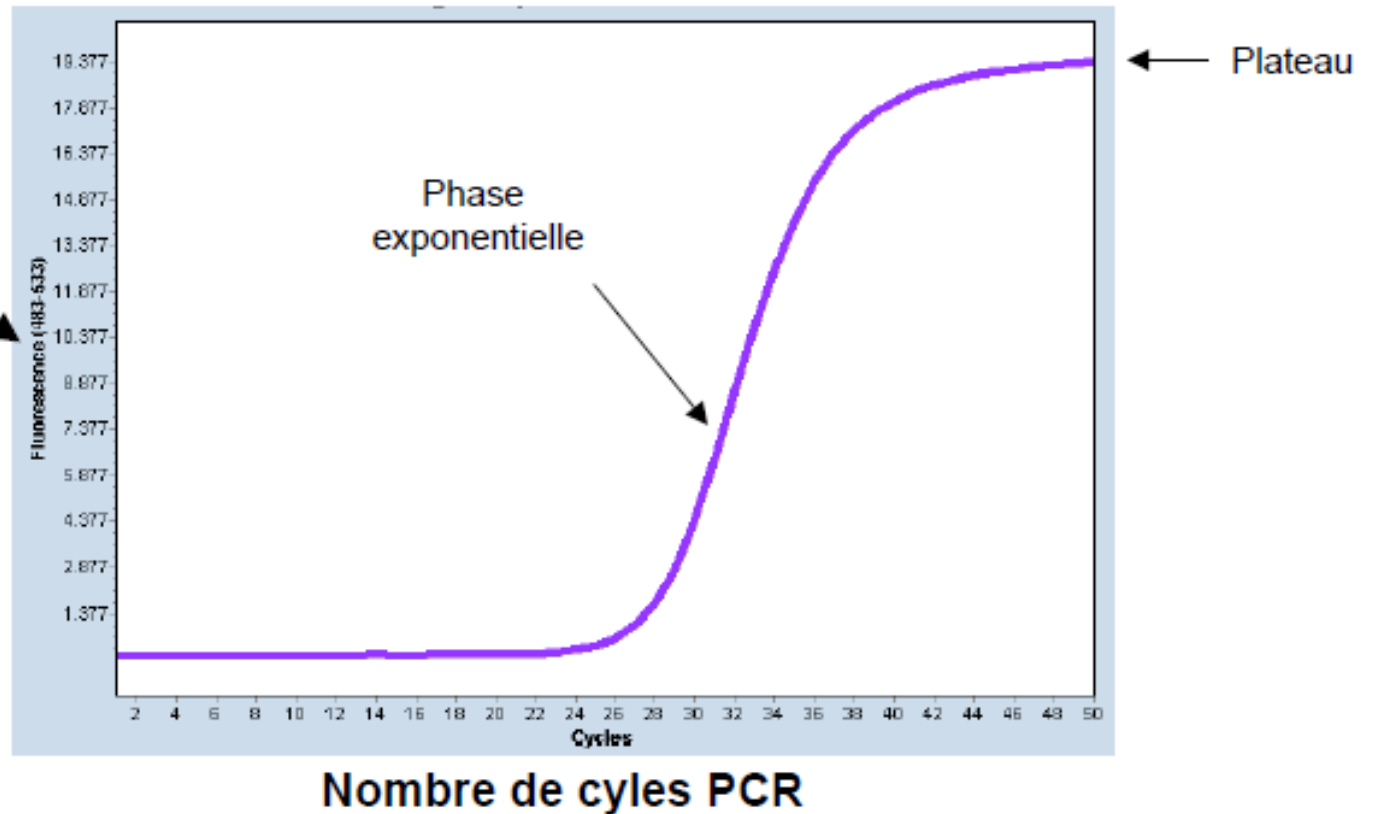
PCR EN TEMPS RÉEL 1

- **A l'étape de dénaturation = pas de fluorescence** car l'ADN est sous forme simple brin, donc le SYBR green ne peut pas s'intercaler
- Ce n'est qu'au moment de l'élongation qu'il s'intercale et fluoresce
- Le thermocycleur va lire en temps réel la production de fluorescence après chaque cycle, c-à-d à la fin de chaque étape d'élongation
- **La quantité de fluorescence est donc proportionnelle à la quantité d'ADN double brin généré**

PCR EN TEMPS RÉEL 1

Résultat :

Intensité de Fluorescence
= Quantité de produit PCR
synthétisé.



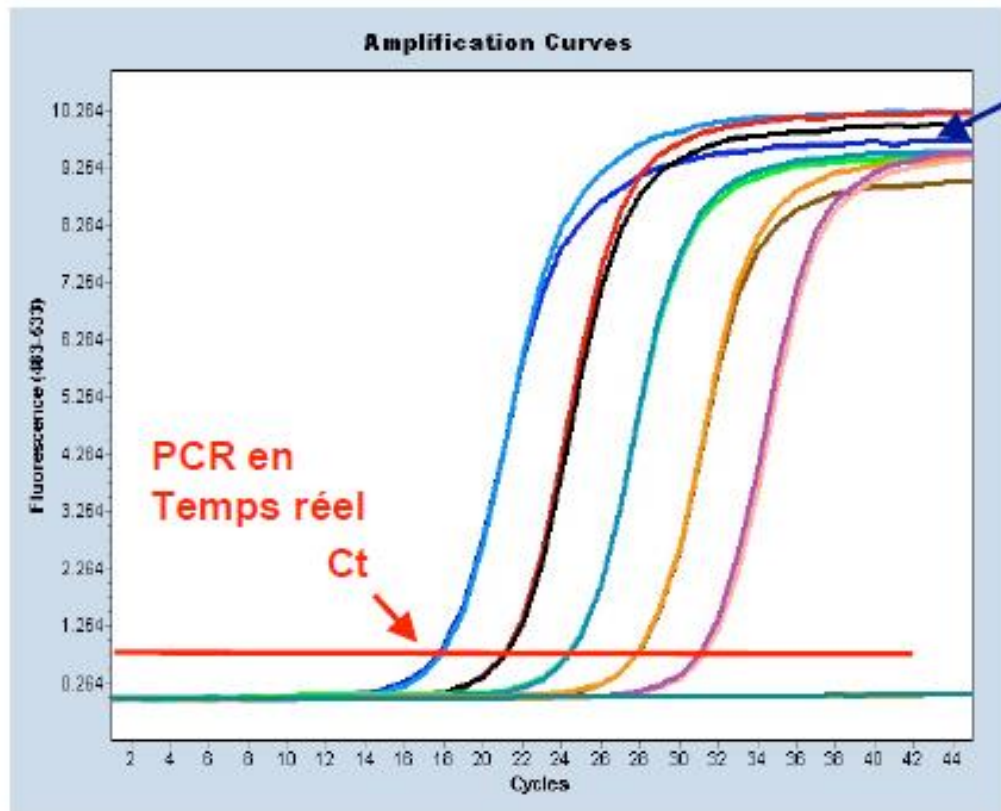
PCR EN TEMPS RÉEL 1

- une phase de plateau au départ : pas assez d'ADN double brin produit pour que le système puisse lire la fluorescence
- un point d'inflexion : varie en fonction de la quantité d'ADN génomique au départ
- 💣 **plus on a d'ADN au départ, moins il faudra de cycle pour commencer à observer une fluorescence = point d'inflexion plus tôt**

L'appareil va mesurer le point d'inflexion et déterminer le cycle seuil C_t = nombre de cycle qu'il faut pour commencer à voir une fluorescence

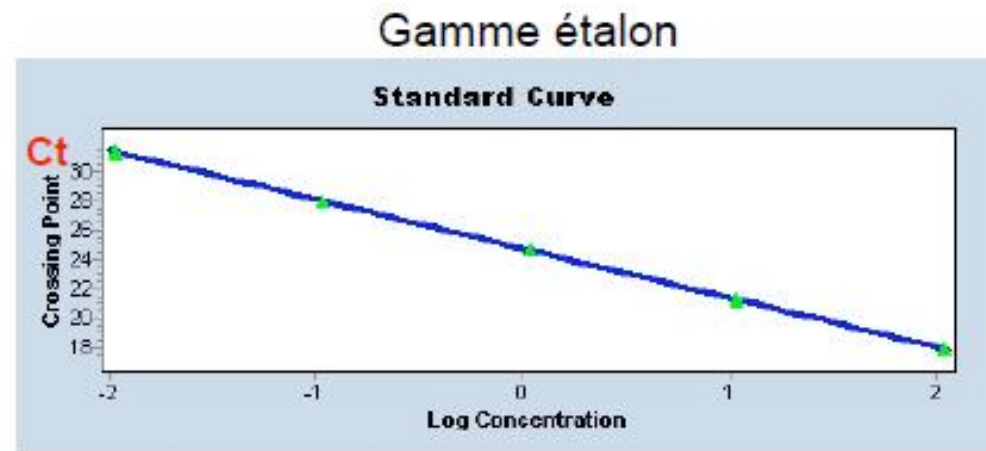
PCR EN TEMPS RÉEL 1

Grâce à une gamme d'étalon, on peut quantifier le nombre de copie d'ADN au départ à partir de Ct !



**Ct: Cycle Seuil
= Lecture**

PCR « Classique »



PCR Quantitative

PCR EN TEMPS RÉEL 1

→ une phase exponentiel

→ une phase de plateau final :

🔴*Après 40 cycles, l'intensité des produits PCR générés est identique quelque soit la quantité d'ADN génomique utilisée au départ.

En effet, le système arrive à saturation = toutes les amorces, les dntps ont été utilisés + les 35-40 cycles usent la taq polymérase

PCR EN TEMPS RÉEL 2

La seconde grande technique de PCR en temps réel utilise la sonde TaqMan.

Principe :

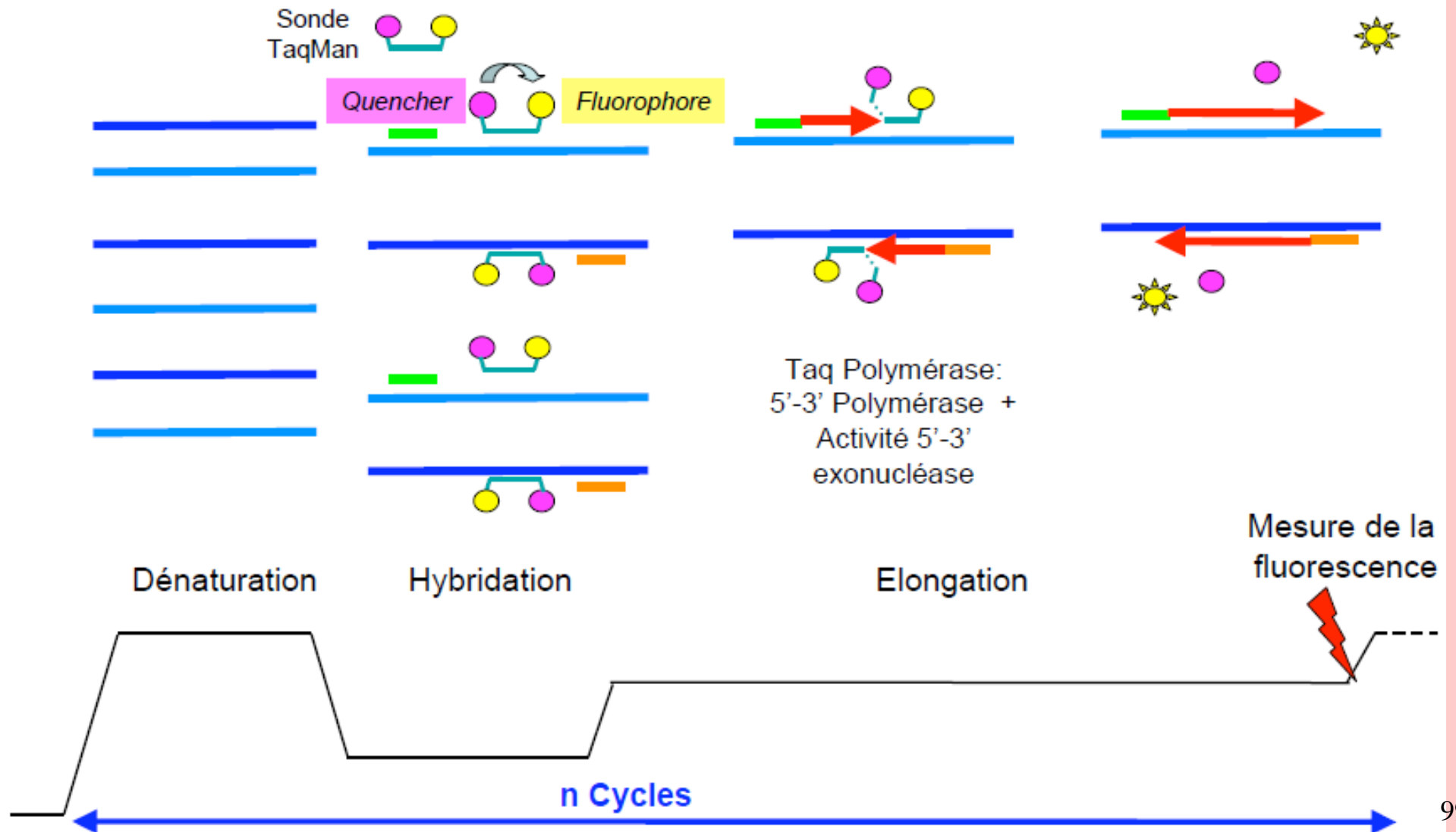
- ✓ dans notre milieu de réaction on rajoute une 3^{ème} sonde = la **sonde Taqman** à la différence près des amorces qu'on lui rajoute un quencher et un fluorochrome en 5' et en 3'
- ✓ la sonde se positionne sur le brin d'ADN
- ✓ le quencher très proche du fluorochrome éteint sa fluorescence = **aucune fluorescence au départ**

PCR EN TEMPS RÉEL 2

- ✓ La Taq polymérase possède une seconde **activité exonucléasique 5'-3'** en même temps qu'elle progresse et qu'elle synthétise le brin fils par son activité polymérase 5'-3'
- ✓ Au moment de l'élongation, elle va dégrader la sonde TaqMan hybridée provoquant **l'éloignement du quencher et du fluorophore = apparition fluorescence**
- ✓ La suite est la même : le thermocycleur va lire en temps réel la production de fluorescence après chaque cycle, c-à-d à la fin de chaque l'étape d'élongation...

Avantage : spécificité de la réaction accru avec la 3^{ème} sonde

La PCR en temps réel: les sondes TaqMan



UE 11

MERCI POUR VOTRE ATTENTION

