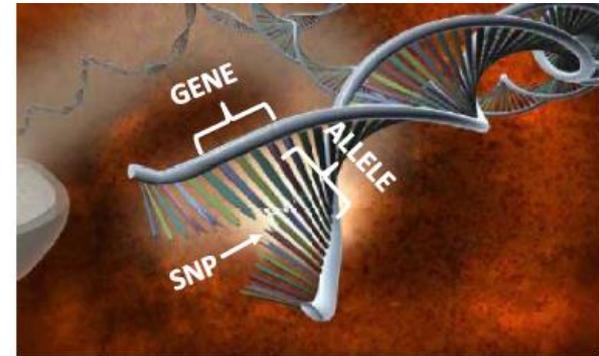


# **Techniques d'Analyse Moléculaire**

# Séquençage de l'ADN



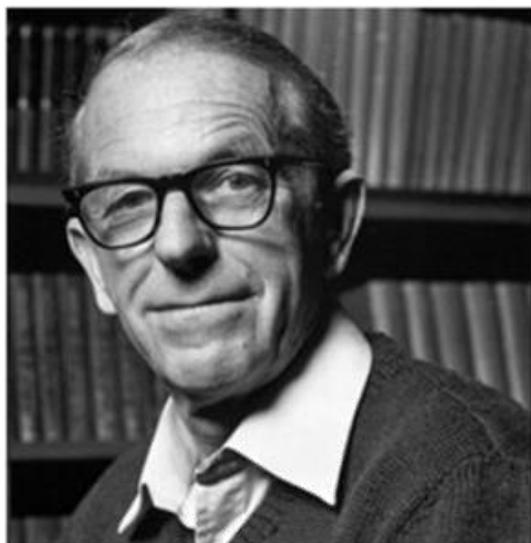
## Définition

Le séquençage de l'ADN, est la détermination de la succession des nucléotides le composant.

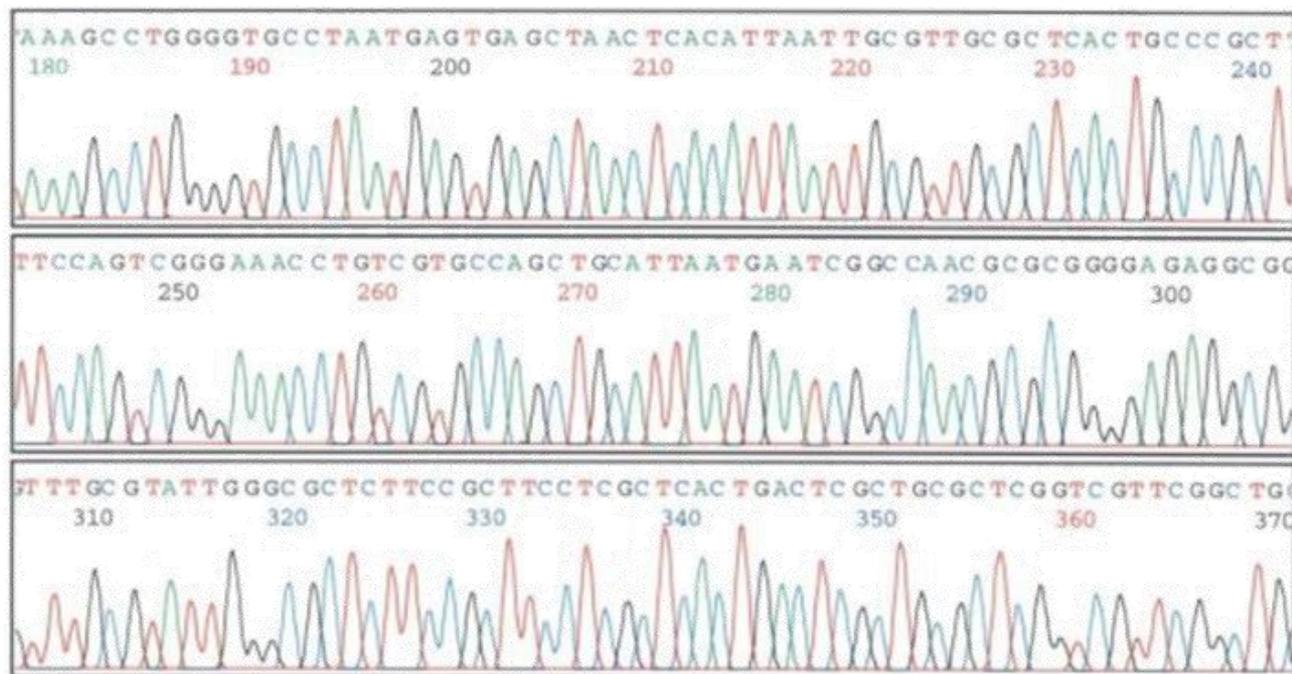
- ✓ Dresser un inventaire de l'ensemble des gènes d'un organisme (génomique)
- ✓ Etudier la fonction de ces gènes et leurs interactions
- ✓ Identifier et gérer les variations génétiques

# Techniques de séquençage de l'ADN

## Séquençage de Sanger



**Frederick Sanger.**  
Prix Nobel de Chimie 1980



# Séquençage de l'ADN

## Technique de Sanger

**Principe** : méthode par synthèse enzymatique du brin complémentaire de l'ADN dont on cherche à déterminer la séquence à l'aide d'une ADN polymérase et de nucléotides « terminateurs de chaîne » **ddNTP** (didésoxyribonucléotides) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose.

Nécessite :

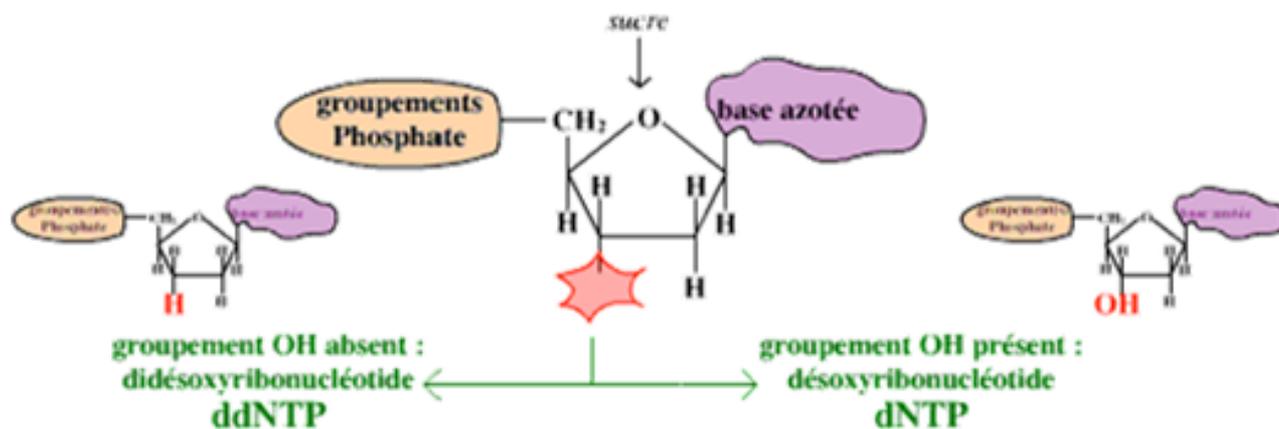
- ADN simple brin à séquencer
- ADN polymérase
- oligonucléotide amorce complémentaire
- 4 nucléotides dNTP
- dans 4 expériences différentes : chaque ddNTP

# Le séquençage selon la technique de Sanger

Les ADN polymérase sont capables de synthétiser un brin complémentaire d'ADN, à partir d'un brin matrice.

Pour le séquençage des nucléotides légèrement différents sont utilisés: les didésoxyribonucléotides (**ddNTP**) au lieu des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP).

Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.



*Deux types de nucléotides triphosphates*

# Séquençage de l'ADN

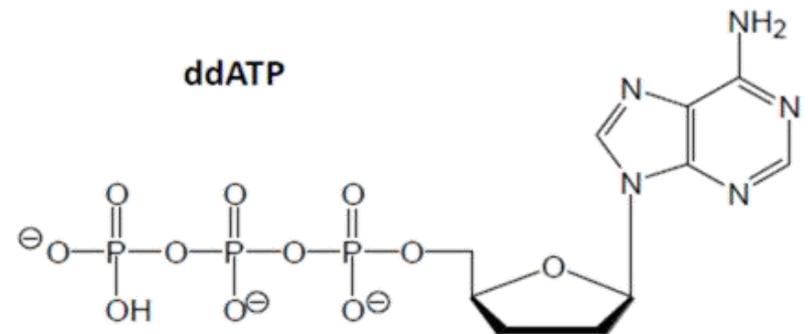
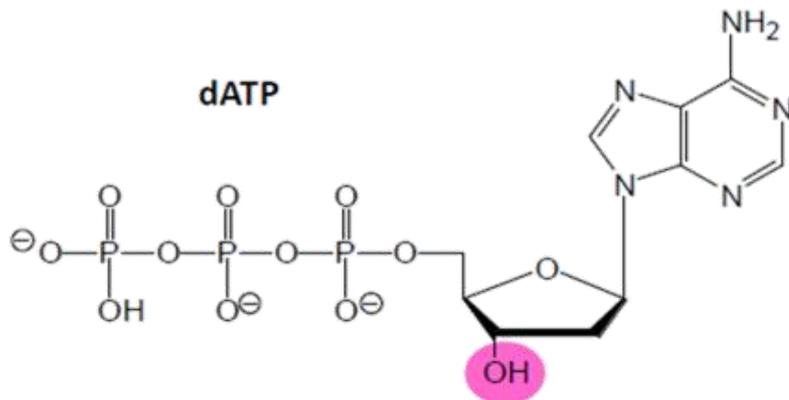
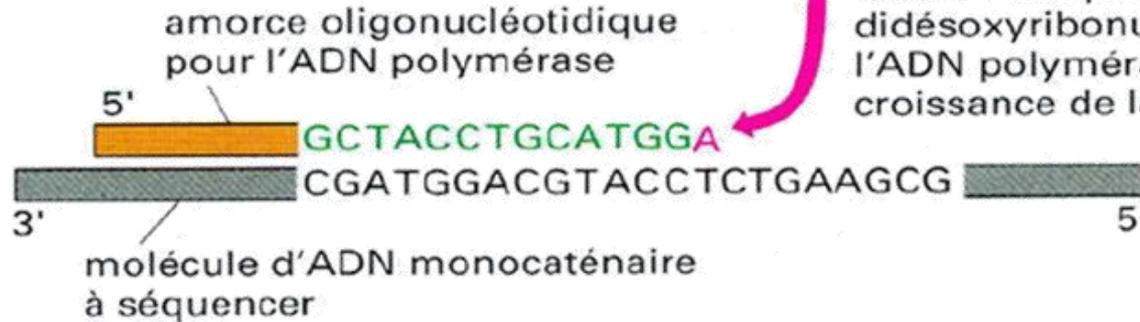
## Technique de Sanger

désoxyribonucléosides triphosphates normaux précurseurs (dATP, dCTP, dGTP et dTTP)

petite quantité d'un didésoxyribonucléoside triphosphate (ddATP)

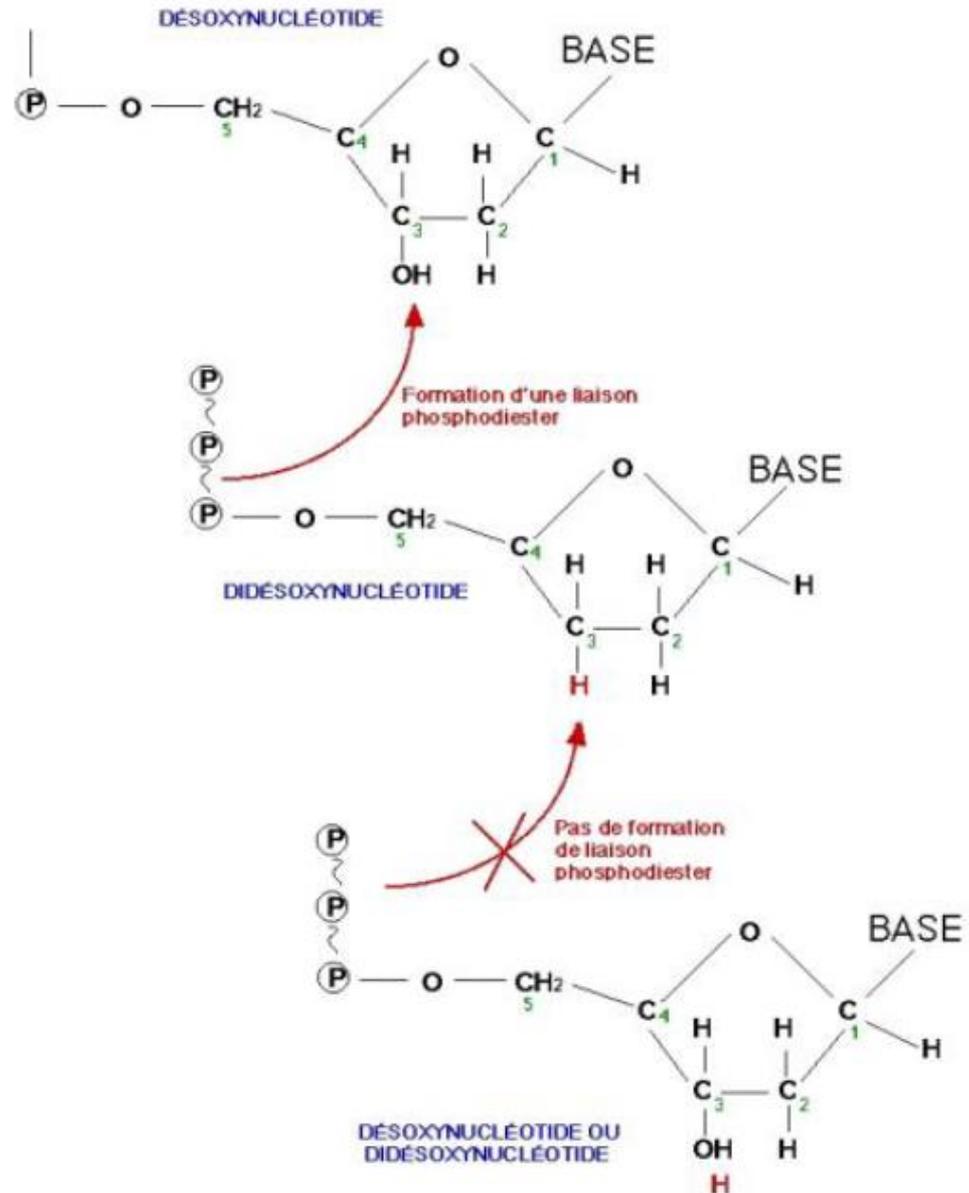
TCG  
TAGCCTA  
TATGTCCT  
TATCGGAT  
AATTTCAT  
GTCCCAT  
GTGGCT

la rare incorporation de didésoxyribonucléoside par l'ADN polymérase bloque la croissance de la molécule d'ADN



# Séquençage de l'ADN

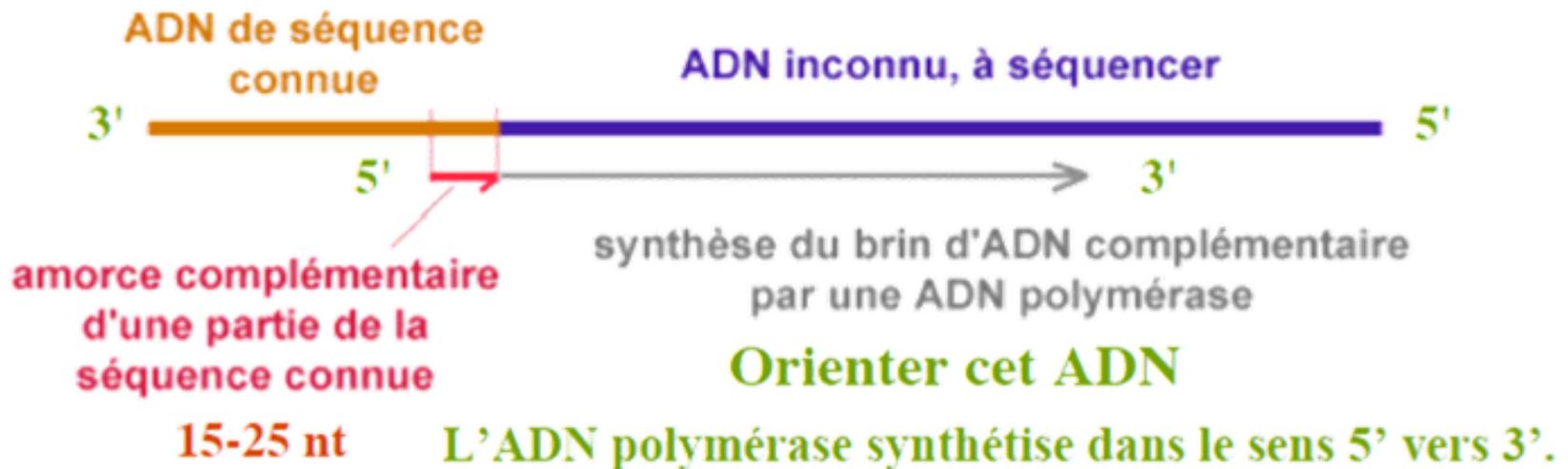
## Technique de Sanger



# Le protocole

Il faut préparer 4 mélanges:

- le fragment qui doit être séquencé
- un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer = **amorçe**
- les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- l'ADN polymérase



## Le protocole

Il faut préparer 4 mélanges:

- le fragment qui doit être séquencé
- un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer
- les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- l'ADN polymérase

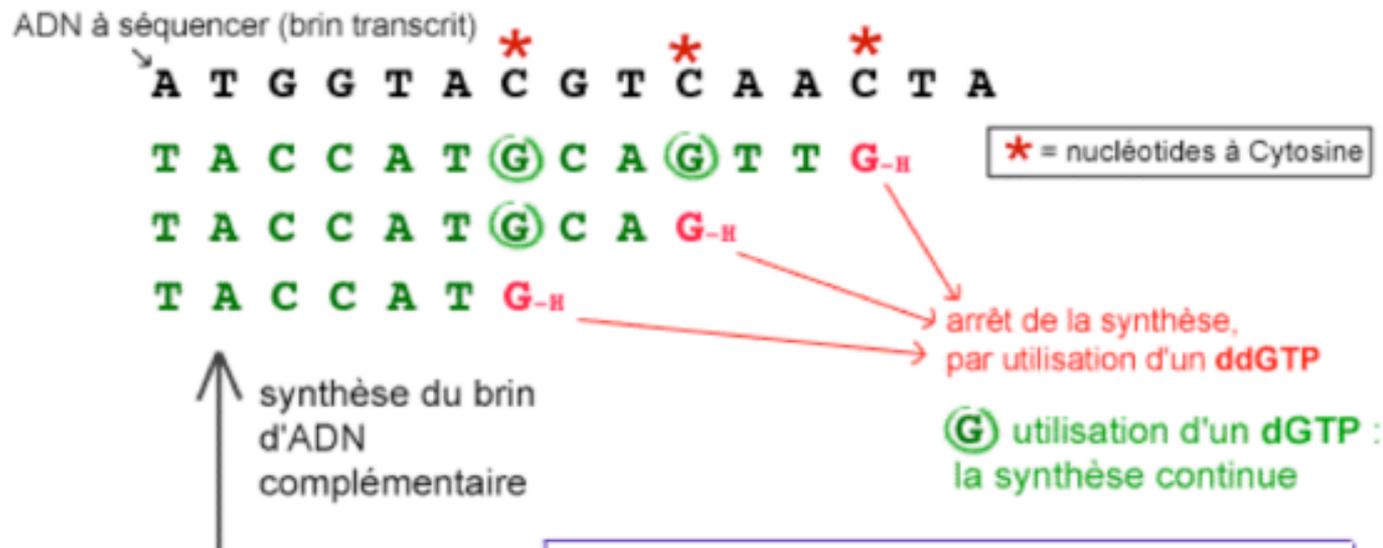
- dans chaque tube, de petites quantités d'un ddNTP fluorescent ou radioactif

--> son incorporation aléatoire stoppant la synthèse

On obtient à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddNTP se sera inséré et que la réaction aura ainsi été stoppée

L'utilisation d'un ddNTP permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacements d'un nucléotide donné

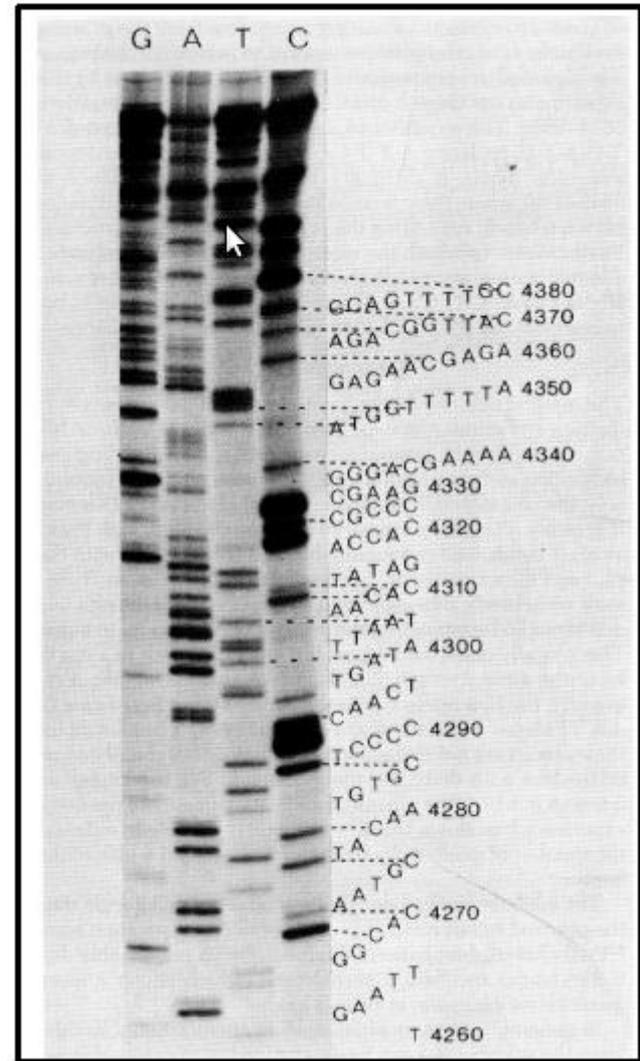
**NB** synthèse du brin complémentaire, donc si arrêt par un ddGTP, c'est qu'il y a une Cytosine sur la séquence



**Conclusion :**  
de manière aléatoire, obtention d'un ensemble de fragments (de différentes tailles), arrêtés au niveau des Cytosines (complémentaires de G) du brin transcrit de l'ADN (donc des **Guanines** du brin codant).

## Lecture de la séquence -séquençage "à la main"-

- Électrophorèse sur gel d'acrylamide.
- Détection des fragments d'ADN, soit en regardant la fluorescence, soit en exposant un film photographique au gel selon le marquage du ddNTP
- Suivant la taille des gels la séquence lue est limitée de 200 à 750 nucléotides environ



# L'automatisation du séquençage



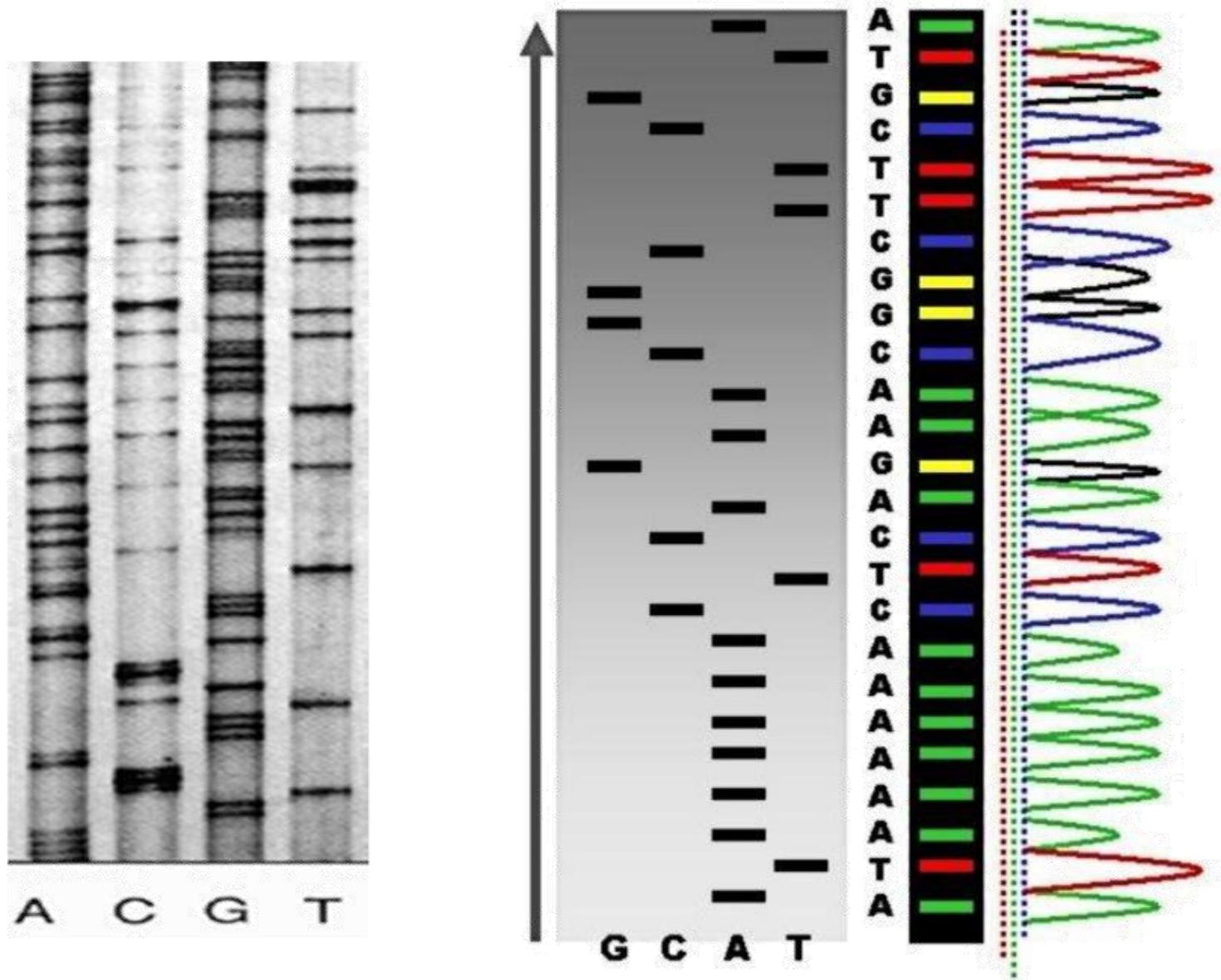
↑ Ajout des 4 ddNTP marqués par un fluorophore différent à la même réaction

**Séquenceurs automatiques** capables de réaliser les réactions de séquence, puis de les lire.

Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise.

# Séquençage de l'ADN

Technique de Sanger

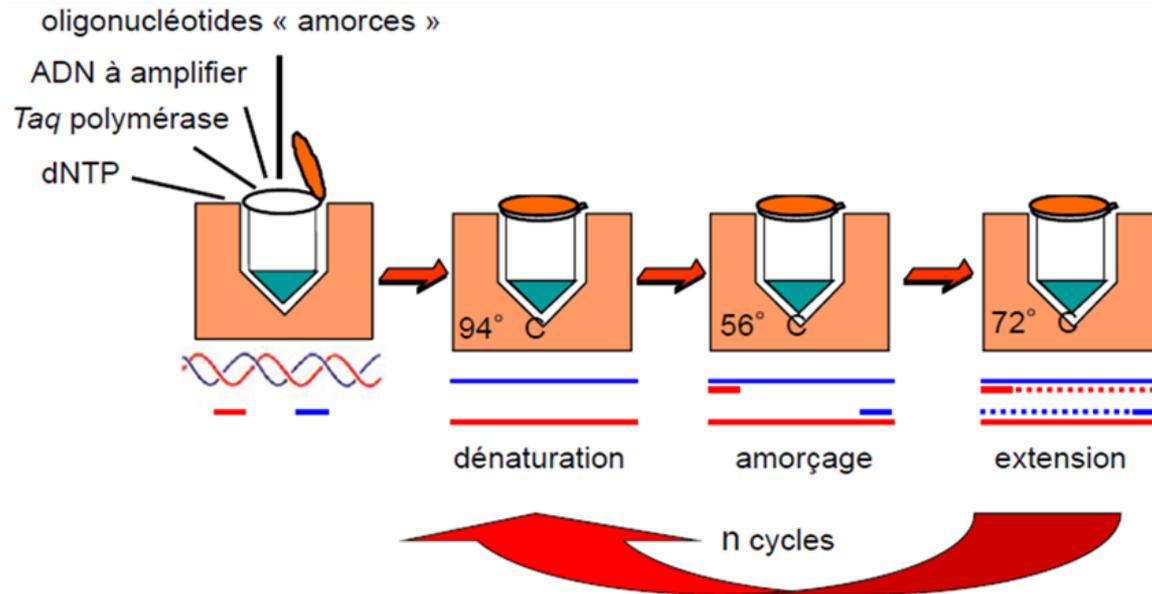


PCR (Poly Chain Reaction):  
Réaction de polymérisation en chaîne

La **PCR** permet d'obtenir par réplification in vitro de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait (ADN matriciel).

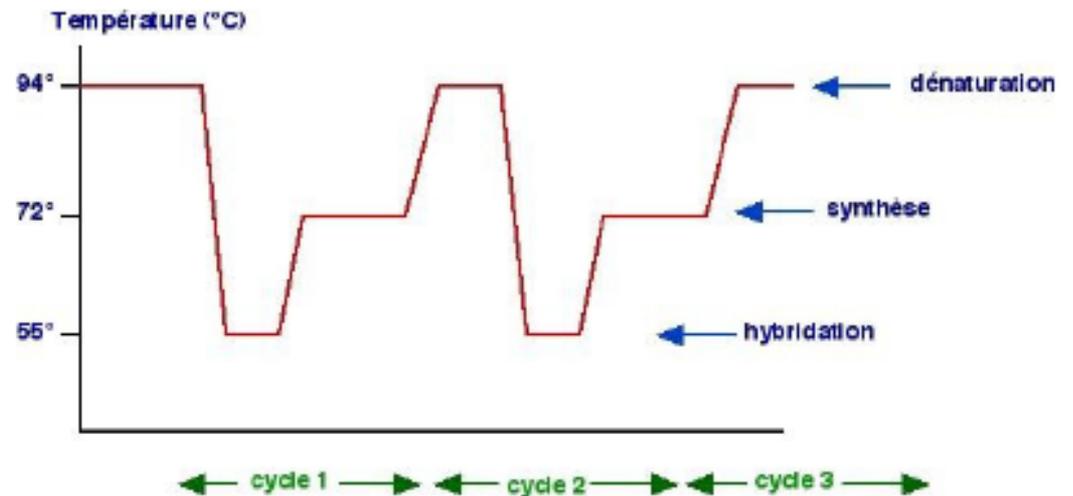
L'ADN matriciel peut être:

- de l'ADN génomique
- l'ADN complémentaire obtenu par RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN messagers (ARN poly-A)
- ou encore de l'ADN plasmidique.



facteur d'amplification :  $2^n$

# Les Cycles PCR



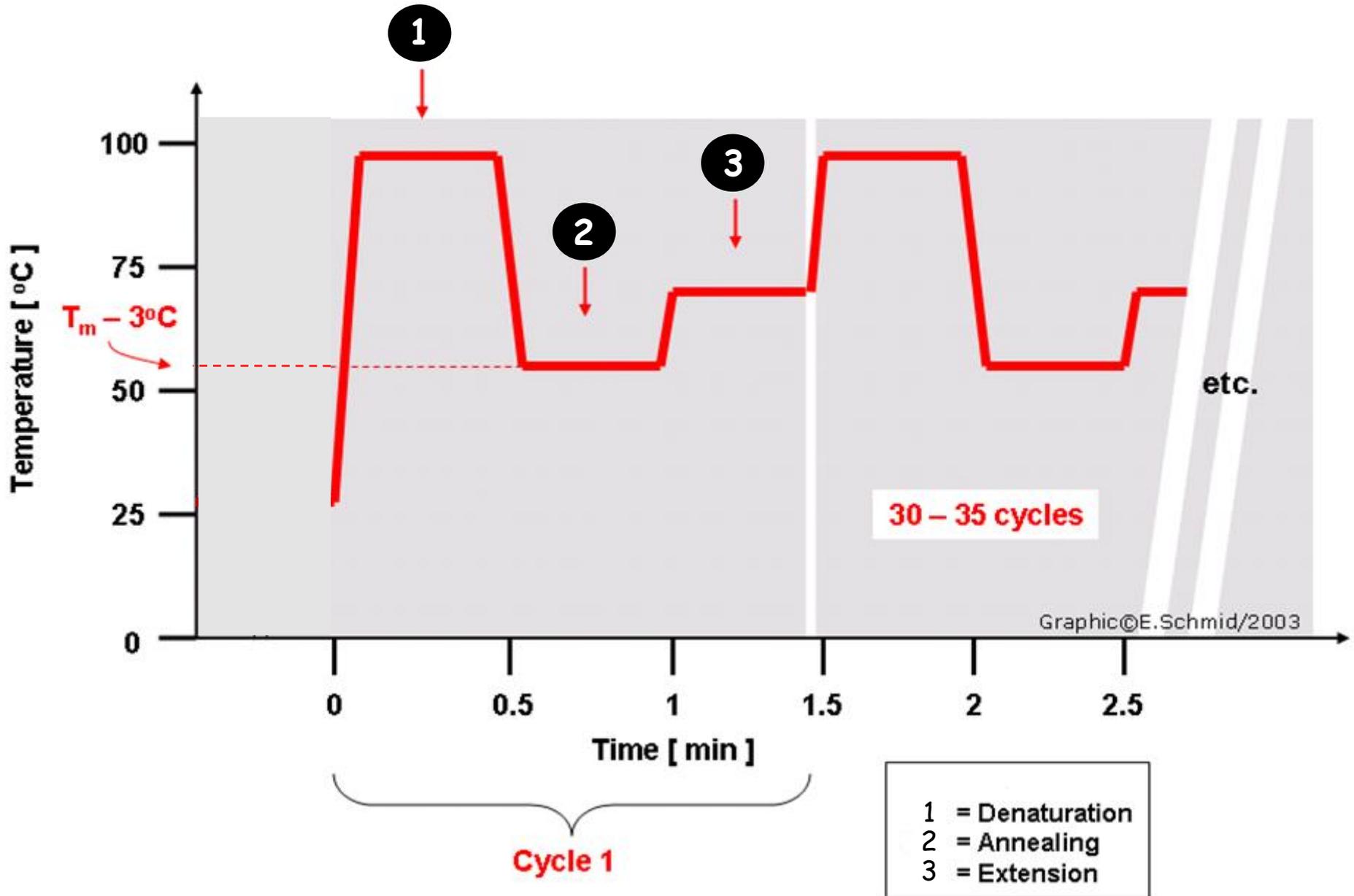
La réaction est réalisée sur un thermocycler

Une alternance de cycles comprenant chacun 3 étapes

1. dénaturation de la matrice: séparation des brins (95 ° C)
2. hybridation amorces (env. 55-60 ° C)
3. extension par ADN polymérase (70 ° C)

Typiquement, une amplification PCR comprend entre 20 et 30 cycles

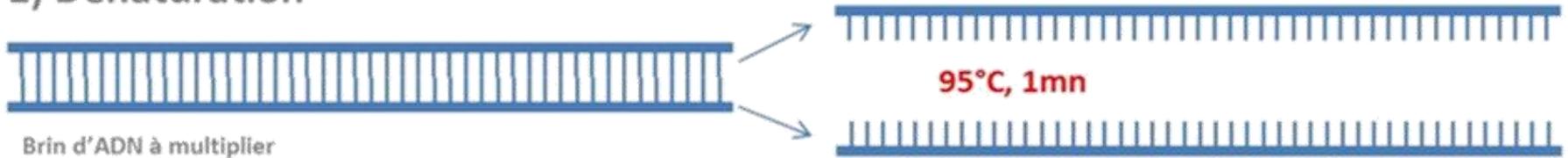
Typical temperature profile of a polymerase chain reaction cycle



## La dénaturation : 94°C

La première période s'effectue à une température de 94°C, dite température de dénaturation. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la réplication, est dénaturé: les liaisons hydrogène ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C et les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténares).

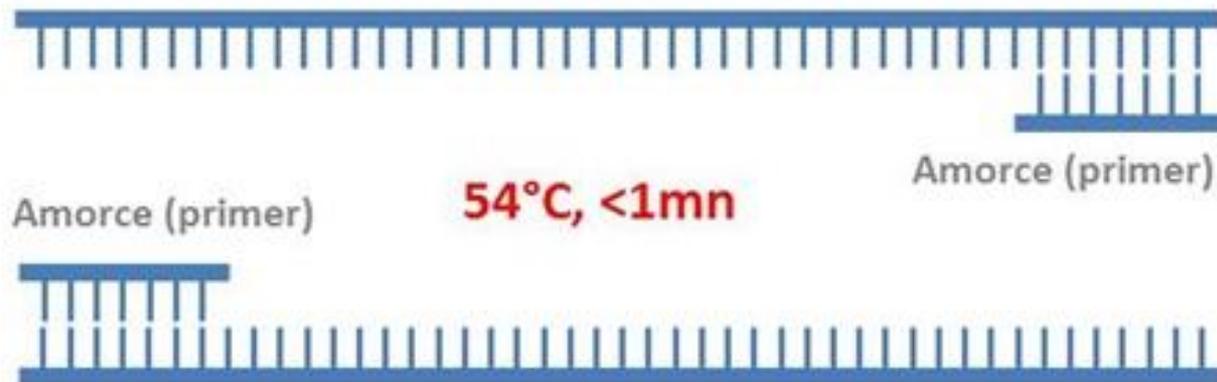
### 1) Dénaturation



## L'hybridation (Annealing) : 40 - 70°C

La deuxième période s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 70°C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences monocaténaire complémentaires de régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique.

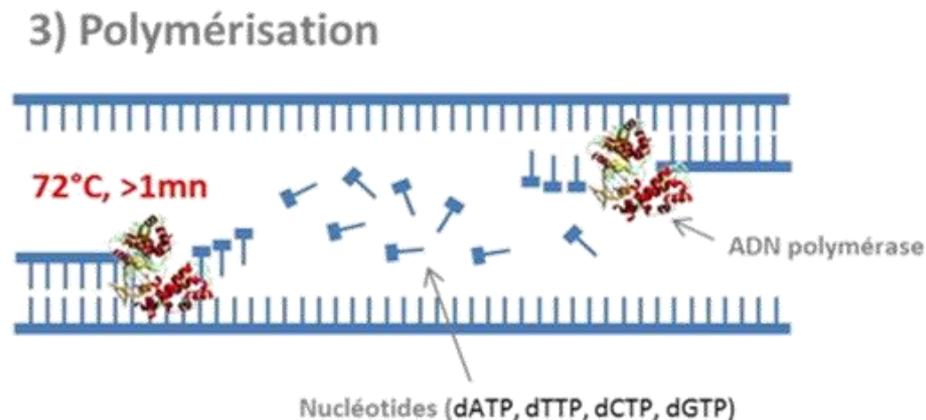
### 2) Hybridation



!!!!!! T° annealing généralement 2-3°C en dessous de la T<sub>m</sub>

## L'élongation : 72°C

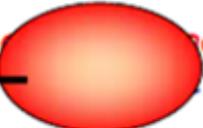
La troisième période s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. À 72°C, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténaire amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) présents dans le mélange réactionnel. Au cycle suivant, les fragments synthétisés au cycle précédent servent à leur tour de matrice. Il faut compter 20 à 40 cycles pour synthétiser une quantité analysable d'ADN (environ 0,1 microgramme). Chaque cycle voit théoriquement doubler la quantité d'ADN présente au cours du cycle précédent.

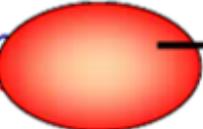


Il est recommandé de rajouter un cycle final d'élongation à 72°C, notamment lorsque la séquence d'intérêt est de grande taille (supérieure à 1 kilobase), à raison de 2 minutes par kilobase. La PCR permet d'amplifier des séquences dont la taille est inférieure à 6 kilobases.

5' --agttactttaatgctgatcgtacgtcgatcg-----gatcgatcgtcgatcgatcgtagctgct--  
--tcaatgaattacgactagcatgcagctagc-----ctagctagcagctagctagcatcgacga-- 5'



5' --agttactttaatgctgatcgtacgtcgatcg-----atcgtcgatcgatcgtagctgct--  
← tagcagctagctagcatcgacga-- 5'

5' --agttactttaatgctgatcgtagc----------ctagctagcagctagctagcatcgacga-- 5'



5' --agttactttaatgctgatcgtacgtcgatcg-----gatcgatcgtcgatcgatcgtagctgct--  
--tcaatgaattacgactagcatgcagctagc-----ctagctagcagctagctagcatcgacga-- 5'

5' --agttactttaatgctgatcgtacgtcgatcg-----gatcgatcgtcgatcgatcgtagctgct--  
--tcaatgaattacgactagcatgcagctagc-----ctagctagcagctagctagcatcgacga-- 5'

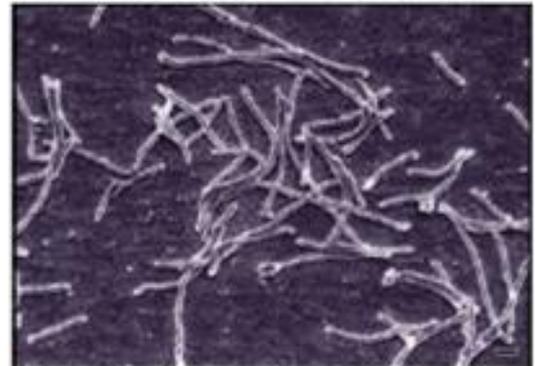
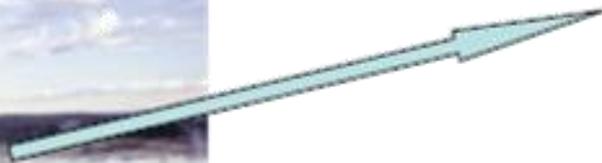
Nombre de copie obtenues après 1 cycle PCR:  $2^n$   
« n » étant le nombre de copie d'AND de départ

# Taq Polymerase et PCR

Initialement, ADN polymerase était rajoutée à chaque cycle de PCR (dénaturation 95° C détruisant la polymérase à chaque cycle)

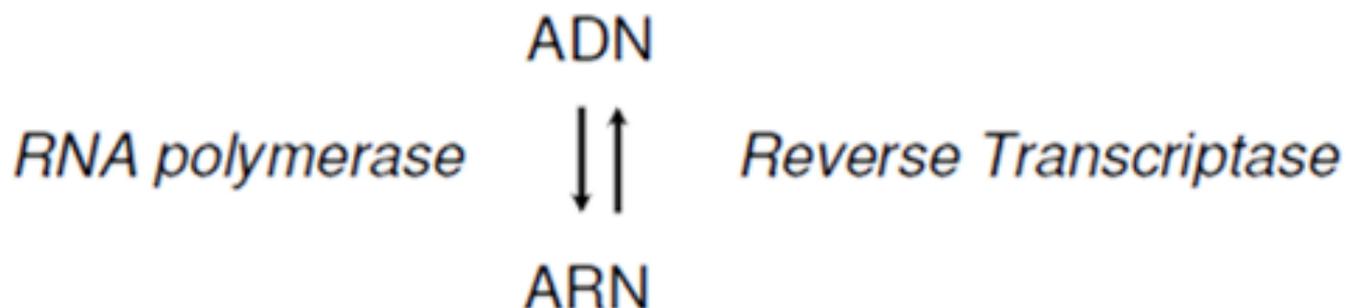
Découverte d'ADN polymerases thermorésistantes, comme la Taq polymerase, qui sont maintenant universellement utilisées

Taq polymerase est à l'origine une polymérase produite par un extrémophile: *Thermophilus aquaticus*, vivant dans sources d'eau chaude



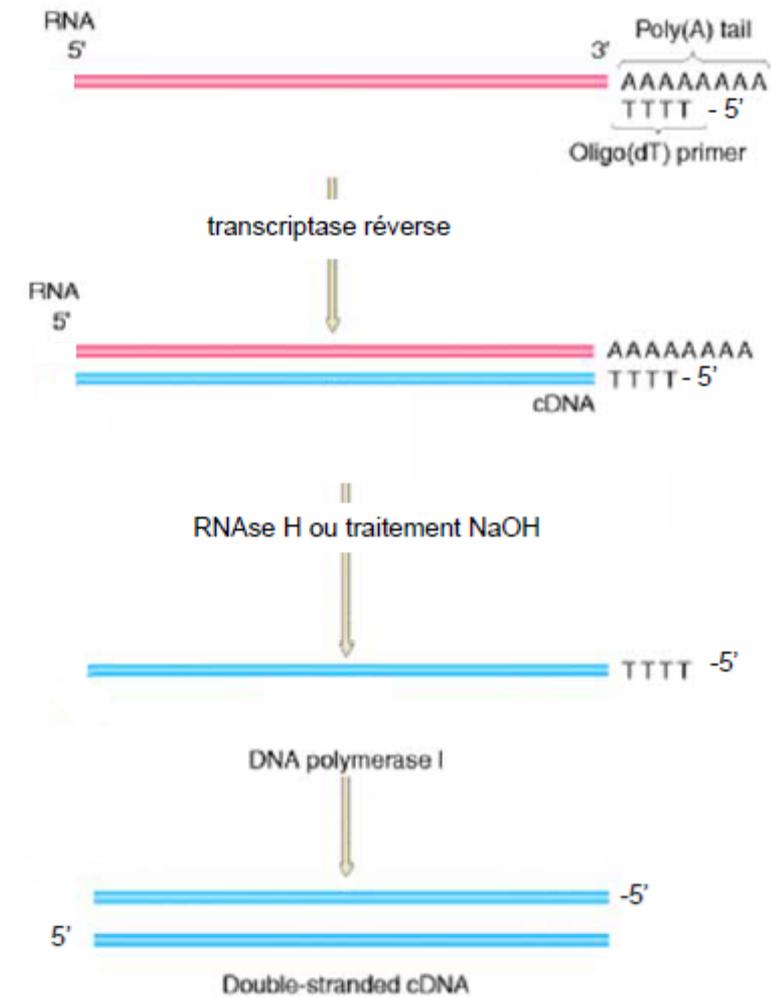
## Reverse Transcriptase et synthèse d'ADN complémentaire

Reverse transcriptase, une enzyme rétrovirale permettant la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à un ARN, c'est à dire l'opération inverse de la transcription.



Meilleure stabilité de l'ADNs, utilisation possible pour applications requérant ADN, le cDNA correspond aux séquences de l'ARN mature (pas d'introns)

## - Obtention d'un ADNc





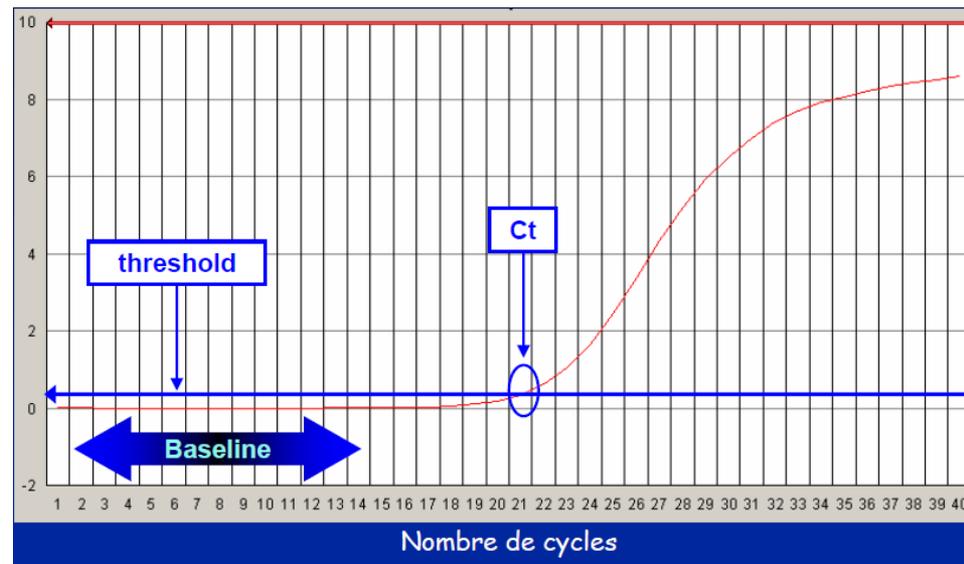
# La PCR quantitative en temps réel Q-RT-PCR



# La PCR en temps réel pour la mesure de l'expression des gènes

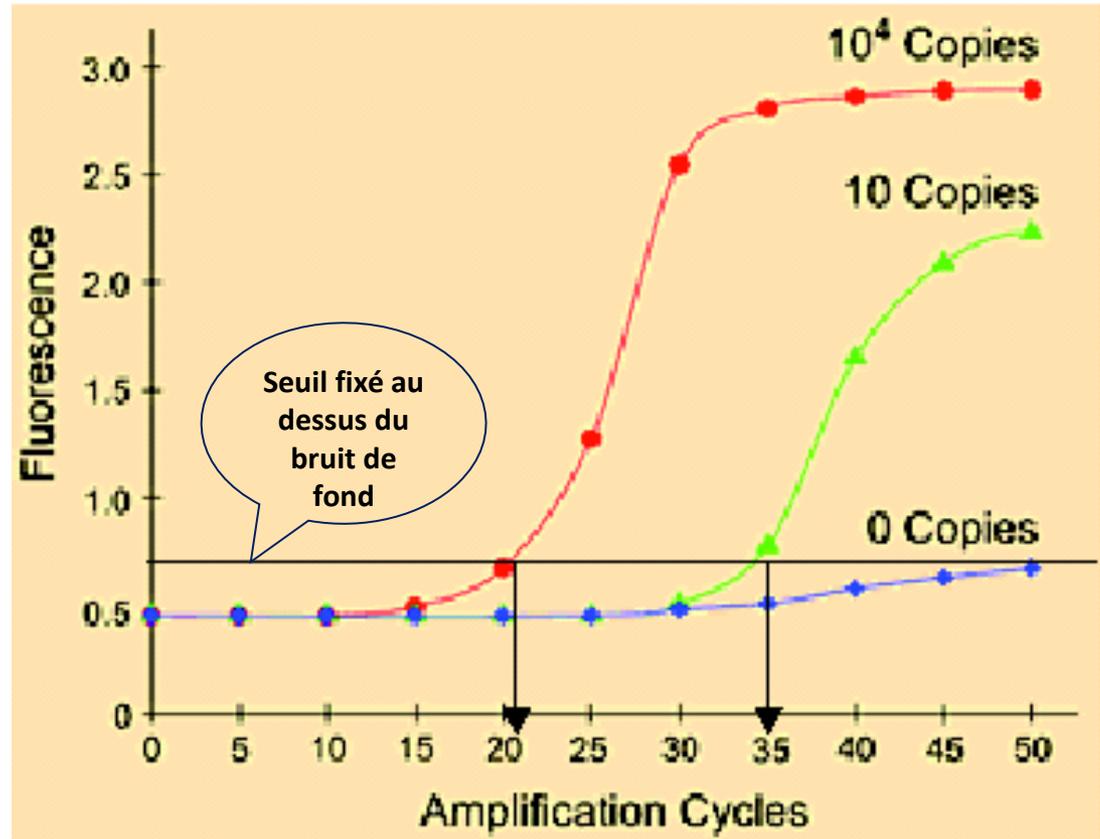
Mesurer l'«expression d'un gène» = mesurer l'abondance des transcrits produits par ce gène à un instant donné

• La PCR quantitative en temps réel (Q-RT-PCR) couple une RT-PCR classique à une méthode de quantification fluorescente. La cinétique de quantification est basée sur la détection « en temps réel » d'un **signal fluorescent** dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de produit PCR généré au cours de l'amplification. La quantification du signal repose sur le concept de « **threshold cycle** » (Ct).



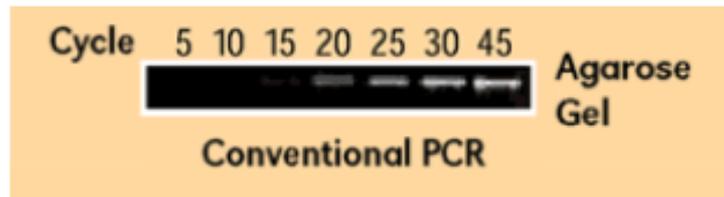
# PCR en temps réel - Quantification

Ct ( Cycle threshold) =  
nombre de cycle  
d'amplification  
nécessaire pour obtenir  
un signal fluorescent  
statistiquement  
significatif par rapport au  
bruit de fond (valeur  
seuil).

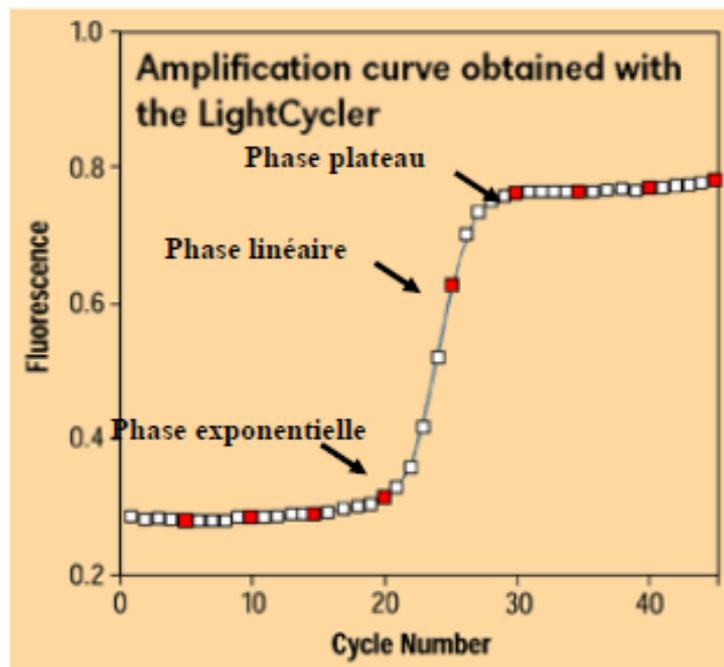


➡ Plus le Ct est petit, plus l'échantillon est concentré

# PCR conventionnelle versus PCR quantitative



Analyse en point final



Analyse dynamique de la PCR quantitative

-haute précision pendant la phase exponentielle

-variabilité importante à la phase plateau

# Les chimies en PCR en temps réel

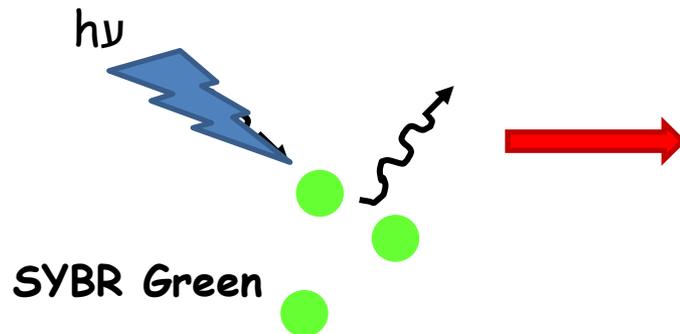


- Basées sur la fluorescence
  - Après l'absorbance de certaines longueurs d'ondes de la lumière (excitation), le fluorophore émet de la lumière à une longueur d'onde plus grande (émission)
  - La fluorescence est proportionnelle au produit amplifié
- 2 chimies couramment utilisées:
  - SYBR<sup>®</sup> Green I
  - Sondes TaqMan<sup>®</sup>

# Principe du SYBR Green I

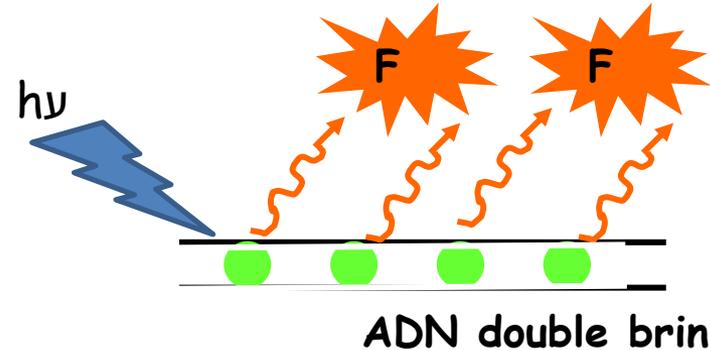
= Agent intercalant dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin

Avant amplification



Le SYBR Green en solution émet peu de fluorescence

Après amplification



Durant l'élongation, il se fixe sur l'ADN double brin naissant, entraînant une augmentation de la fluorescence

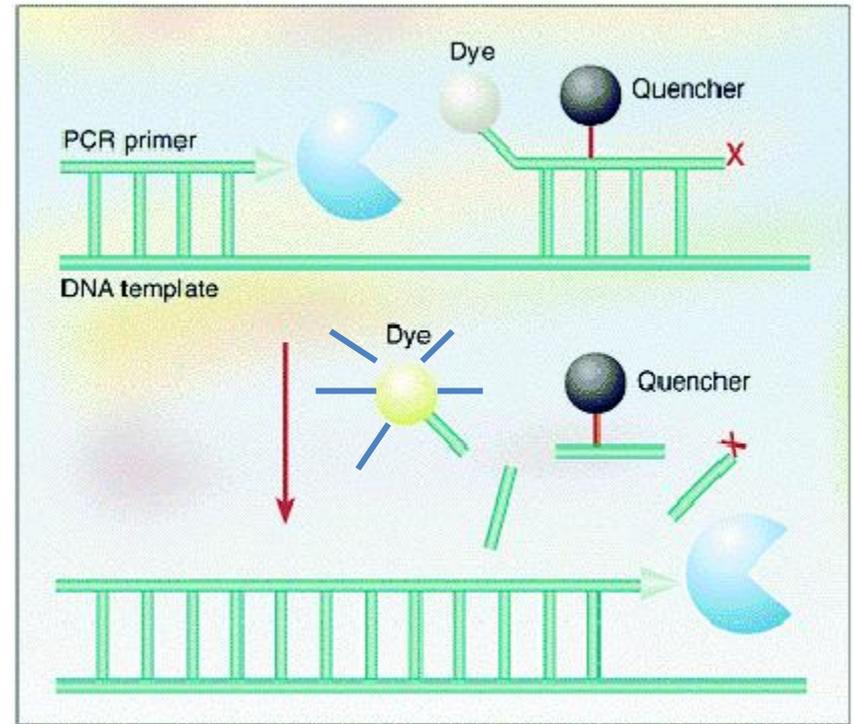
L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation

# Sondes Taqman - Principe

## Hybridation d'une sonde spécifique

### Composition de la sonde

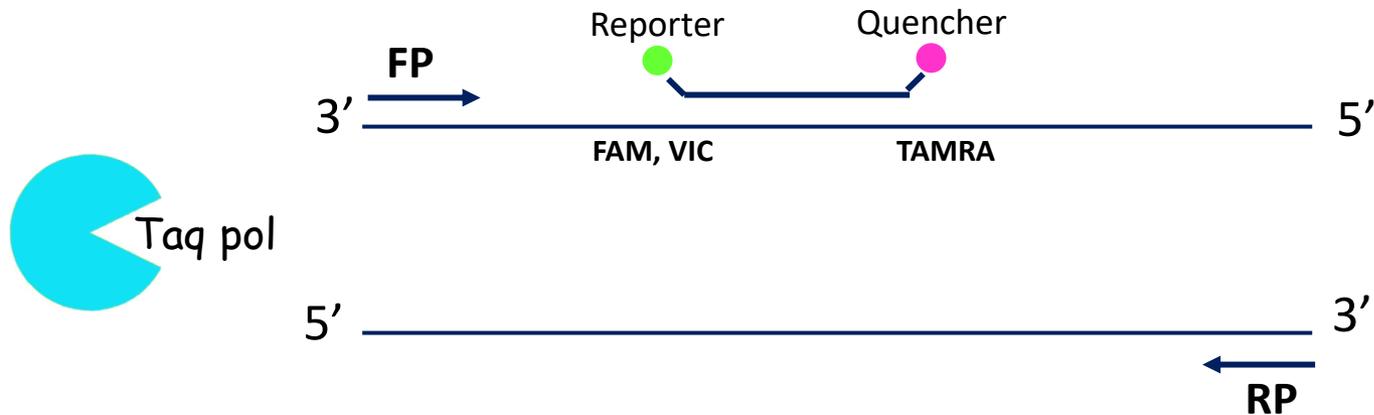
- Fluorochrome émetteur (reporter) en 5'  
Ex : FAM 6-carboxy-fluorescein
- Fluorochrome suppresseur (quencher) en 3'  
ex : TAMRA 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine  
→ pas d'émission de fluorescence



# Sondes Taqman - Principe

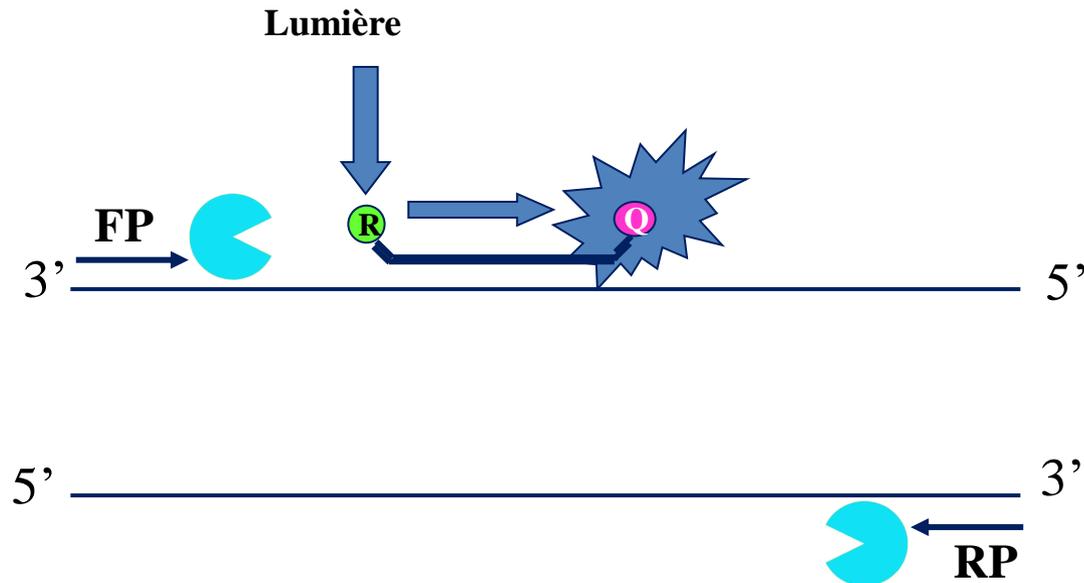
Cette méthode repose sur deux principes :

- la technologie FRET (fluorescence resonance energy transfer)
- l'activité 5'-exonucléase de la Taq Pol



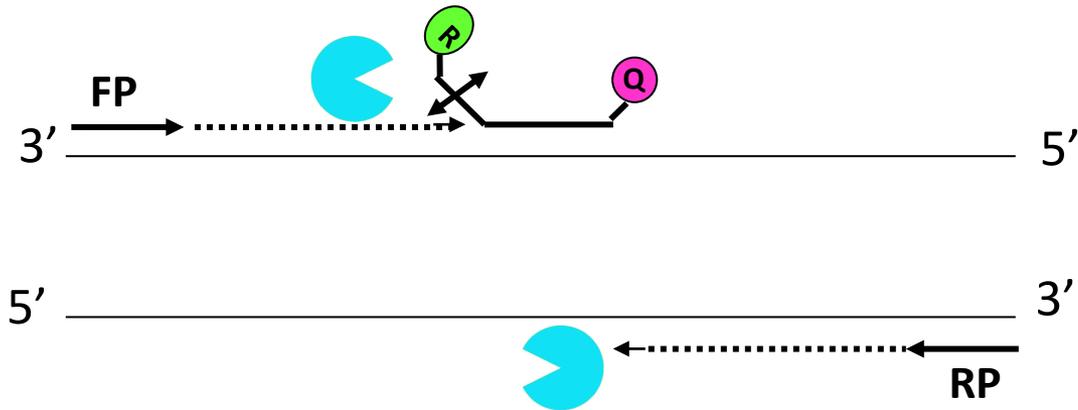
La fluorescence émise par le reporter est absorbée par le quencher

# Sondes Taqman - Principe

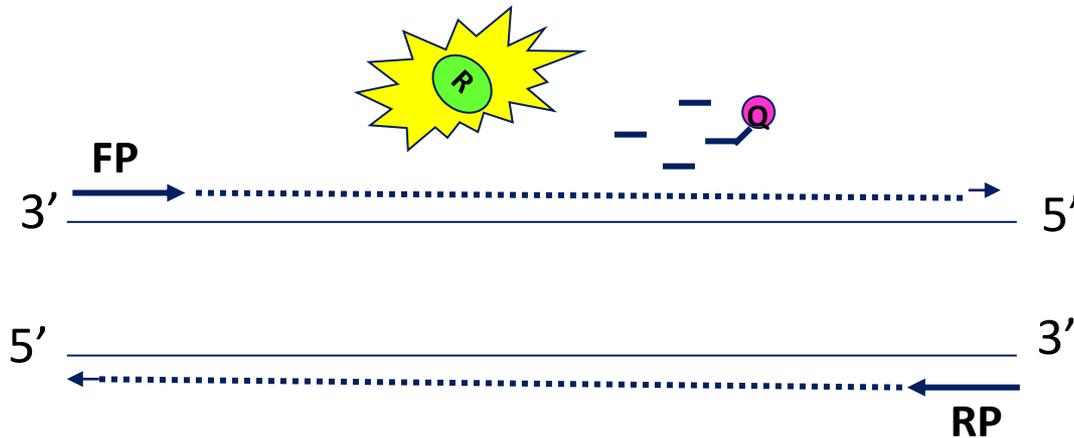


- FRET (fluorescence resonance energy transfer) depuis le *reporter* (haute énergie) vers le *quencher* (faible énergie),

➔ pas de signal fluorescent émis par le reporteur quand la sonde est intacte



- au cours de l'élongation catalysée par la Taq Pol l'activité 5' nucléase coupe la sonde → libération du reporter



- lorsque la polymérisation est complétée, pour chaque molécule d'ADN synthétisée un reporteur émet de la fluorescence.