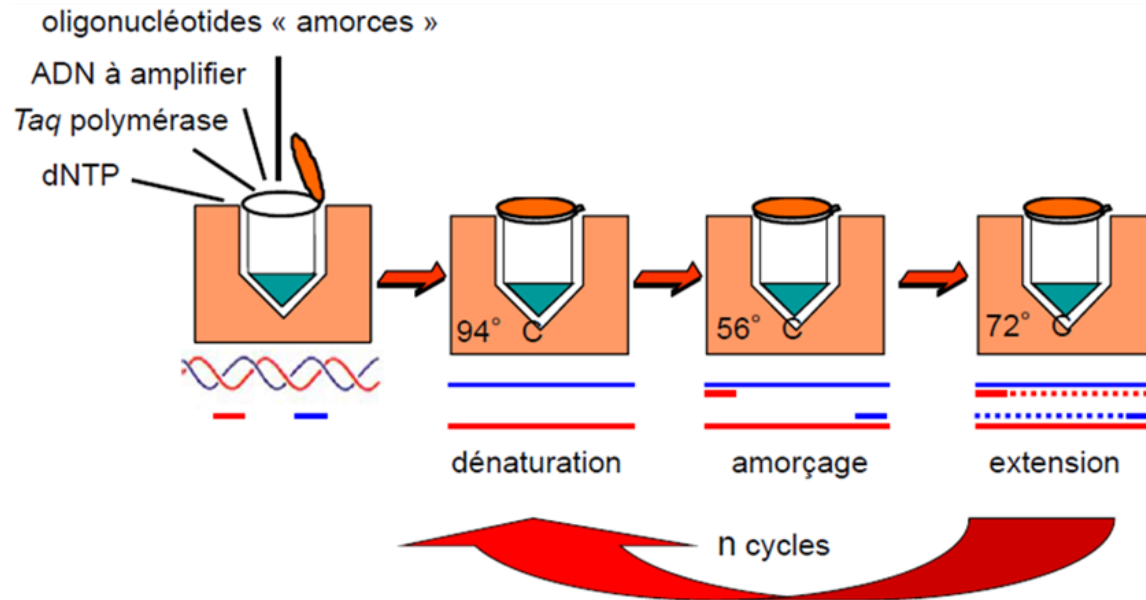


PCR (Poly Chain Reaction):
Réaction de polymérisation en chaîne

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

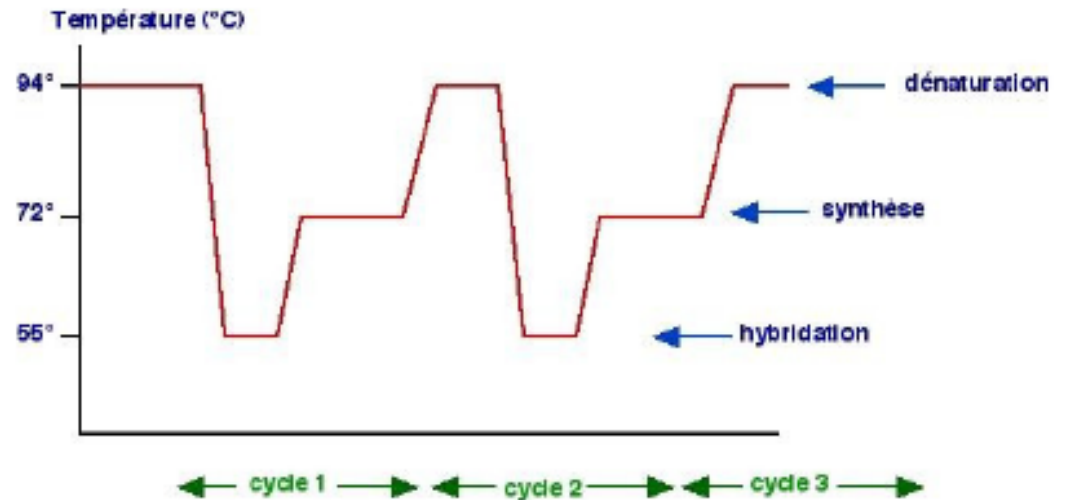
L'ADN matriciel peut être:

- 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



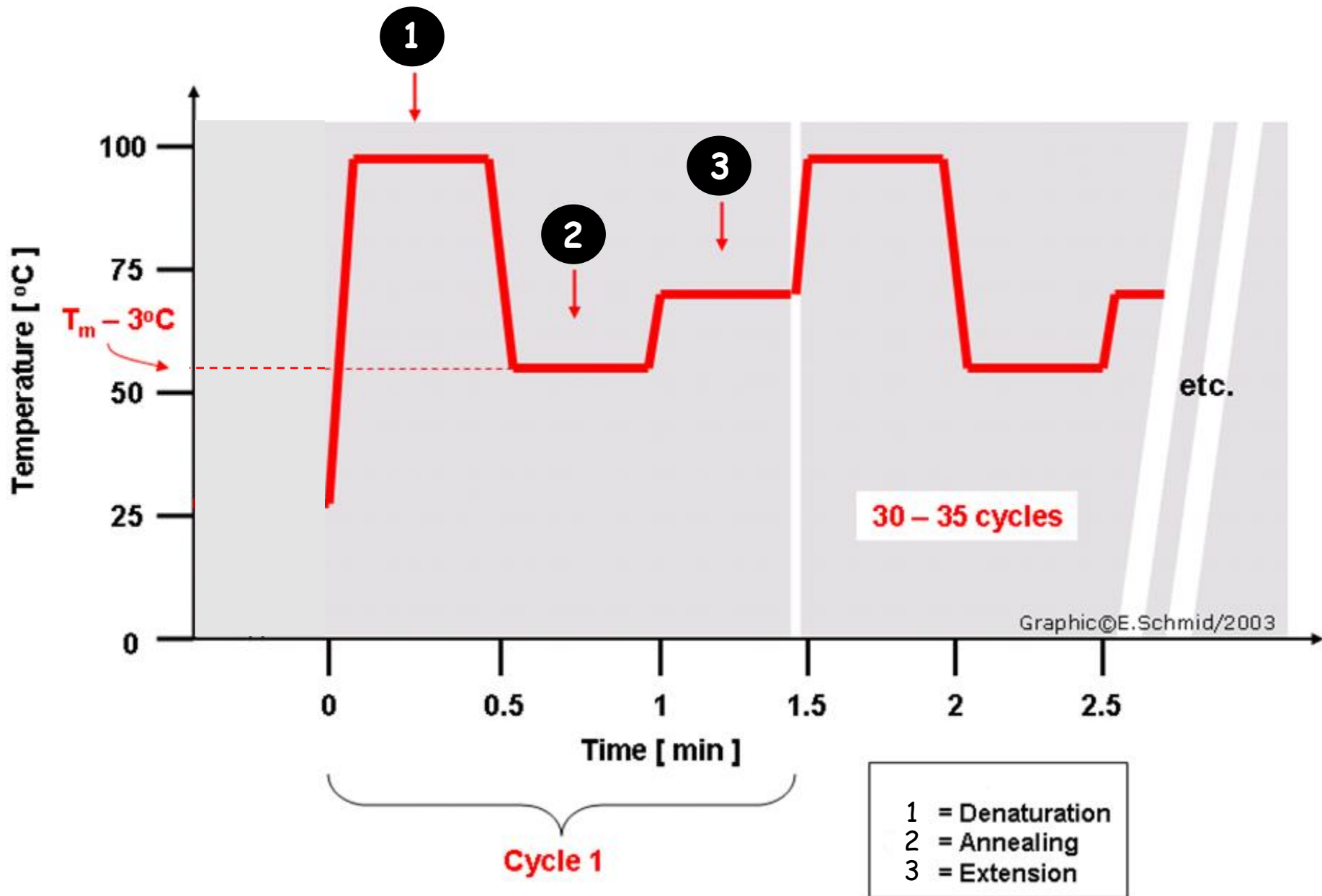
La réaction est réalisée sur un thermocycler

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

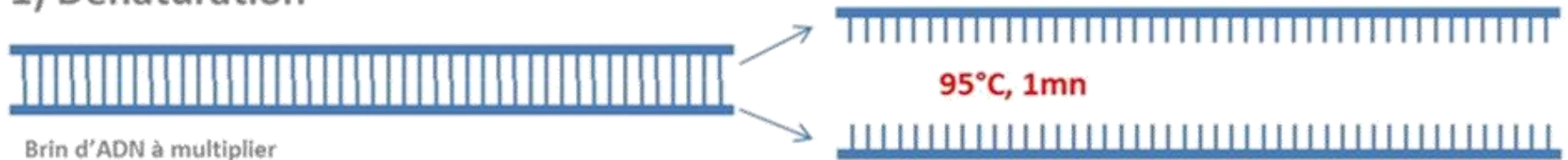
Typical temperature profile of a polymerase chain reaction cycle



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).

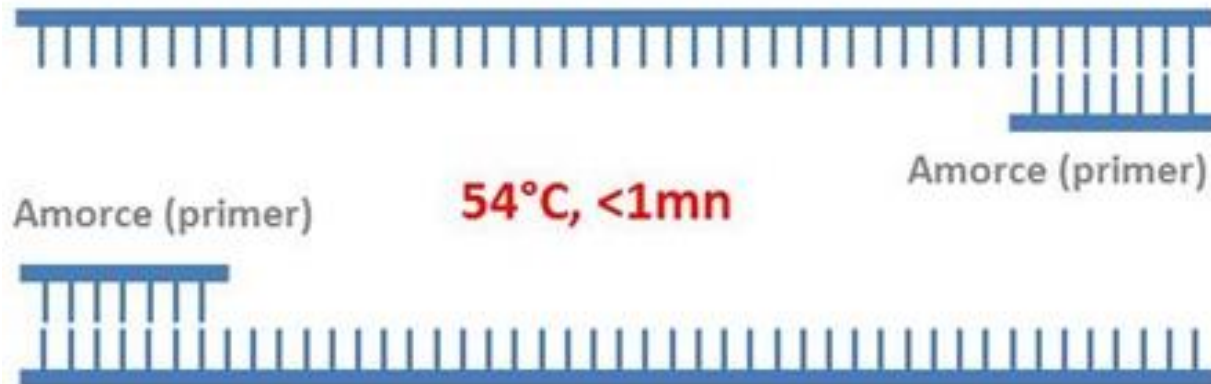
1) Dénaturation



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.

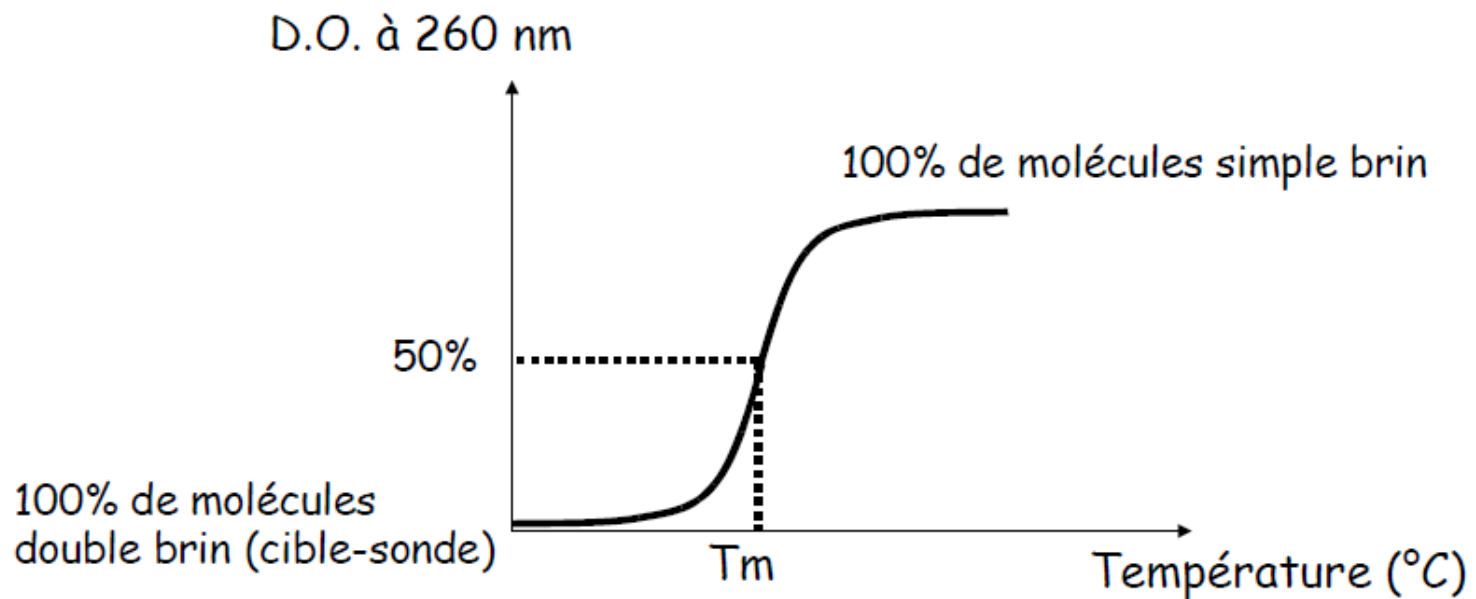
2) Hybridation



!!!!!! T° annealing généralement 2-3°C en dessous de la Tm

Fusion de l'ADN, notion de T_m (T_m = melting temperature)

= température de fusion (T_m = melting temperature) de l'hybride qui représente la température pour laquelle 50% des hybrides sont dissociés en molécules monocaténares.



Facteurs influençant la T_m :

✓ Molécules à hybrider:

- Nature des acides nucléiques à hybrider: ADN ou ARN
- composition en bases (taux de G+C)
- taux de mésappariements de l'hybride (bases non appariées)
- longueur de l'hybride

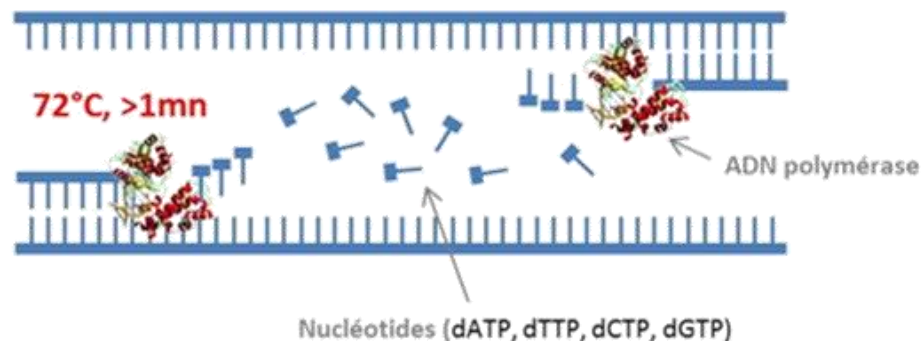
✓ Conditions physico-chimiques:

- Force ionique: milieu stringent(=faible force ionique) $\rightarrow T_m \downarrow$
- pH de la solution
- Présence d'agents déstabilisants des liaisons H: formamide, urée

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.

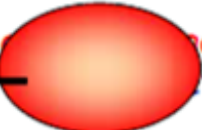
3) Polymérisation

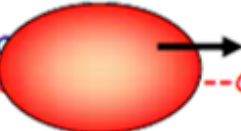


Il est recommandé de rajouter un cycle final d'élongation à 72°C, notamment lorsque la séquence d'intérêt est de grande taille (supérieure à 1 kilobase), à raison de 2 minutes par kilobase. La PCR permet d'amplifier des séquences dont la taille est inférieure à 6 kilobases.

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



5' --agttactttaatgctgatcgtacgtcgatc  atcgtcgatcgatcgtagctgct--
← tagcagctagctagcatcgacga-- 5'

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



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

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

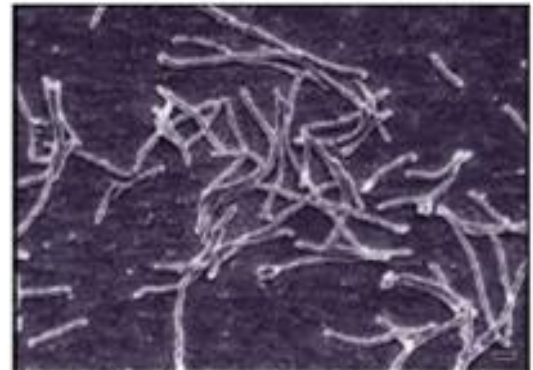
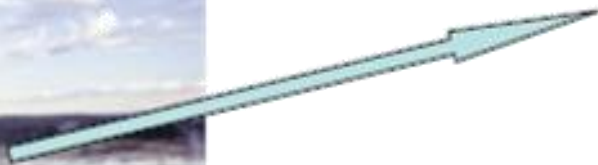
Nombre de copie obtenues après 1 cycle PCR: 2^n
« n » étant le nombre de copie d'AND de départ

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



Analyse du produit d'amplification (amplicon)

- ❑ On utilise en général un gel de 1 à 2 % M/V (1 à 2 g d'agarose pour 100 ml de volume final).
- ❑ Permet de **séparer les acides nucléiques** en fonction de leur **taille**
- ❑ L'augmentation de la concentration en agarose dans le gel réduit la vitesse de migration et permet la **séparation de fragments d'ADN de plus petite taille**.
- ❑ L'Estimation de la **taille du produit de PCR** (amplicon) se fait grâce à l'utilisation d'un **marqueur de taille** (*DNA ladder* ou Echelle ADN)

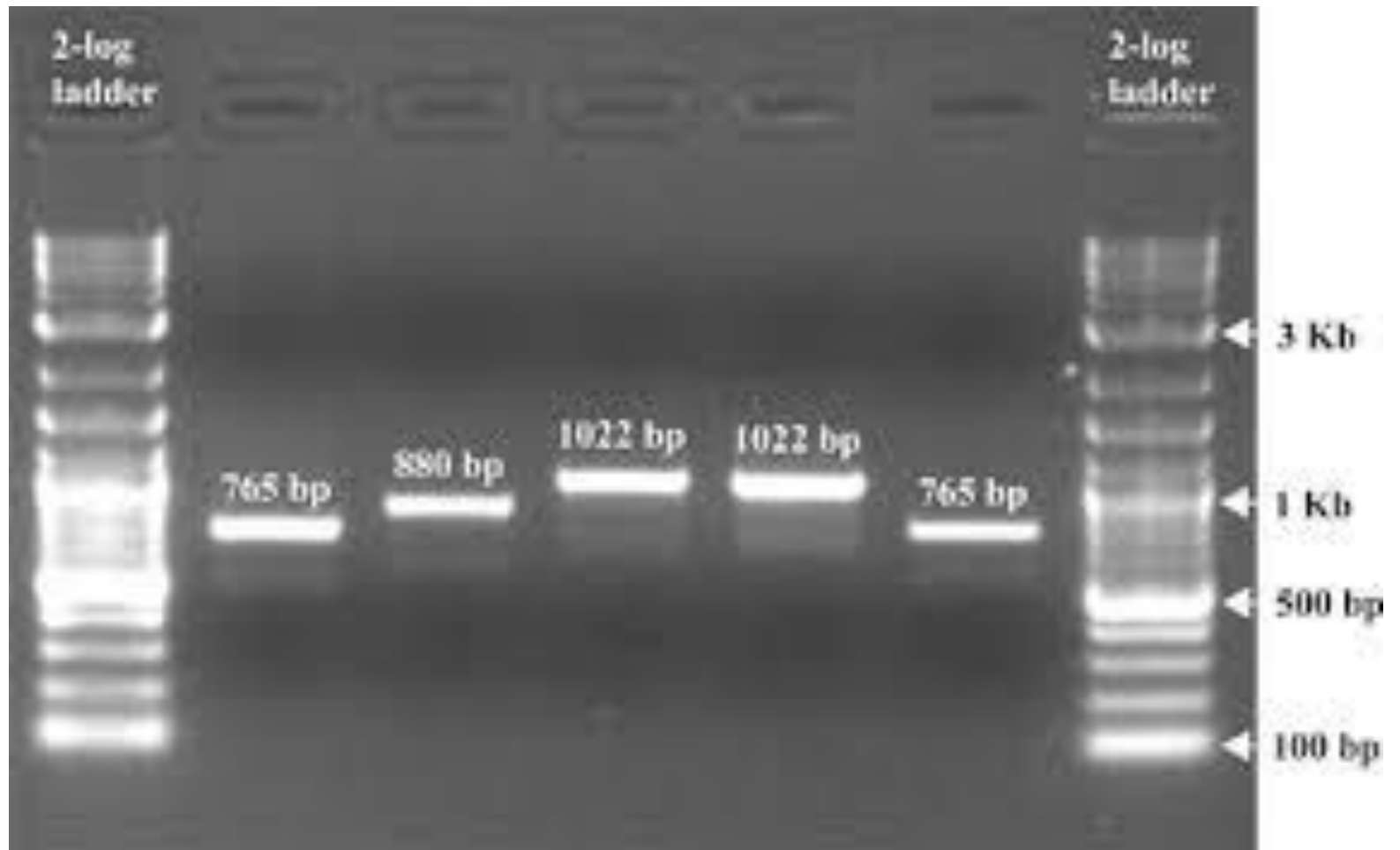
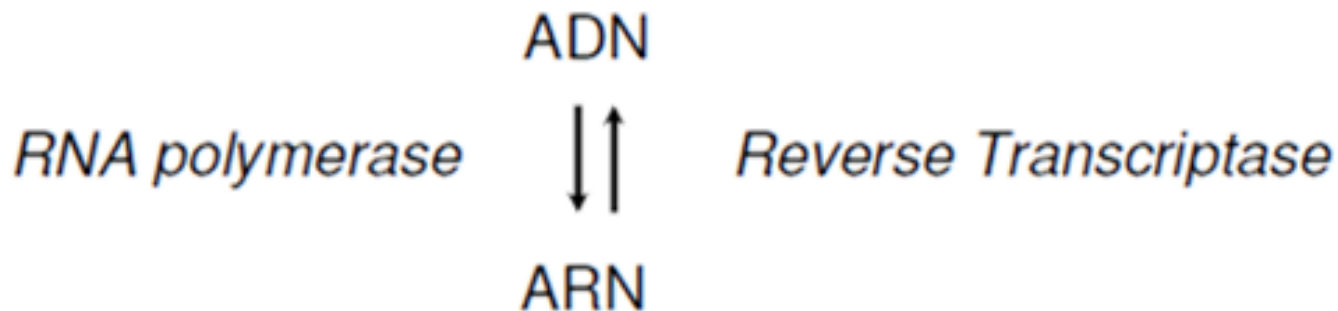


Image gel électrophorèse: Migration de produits de PCR sur gel d'agarose

Reverse Transcriptase et synthèse d'ADN complémentaire

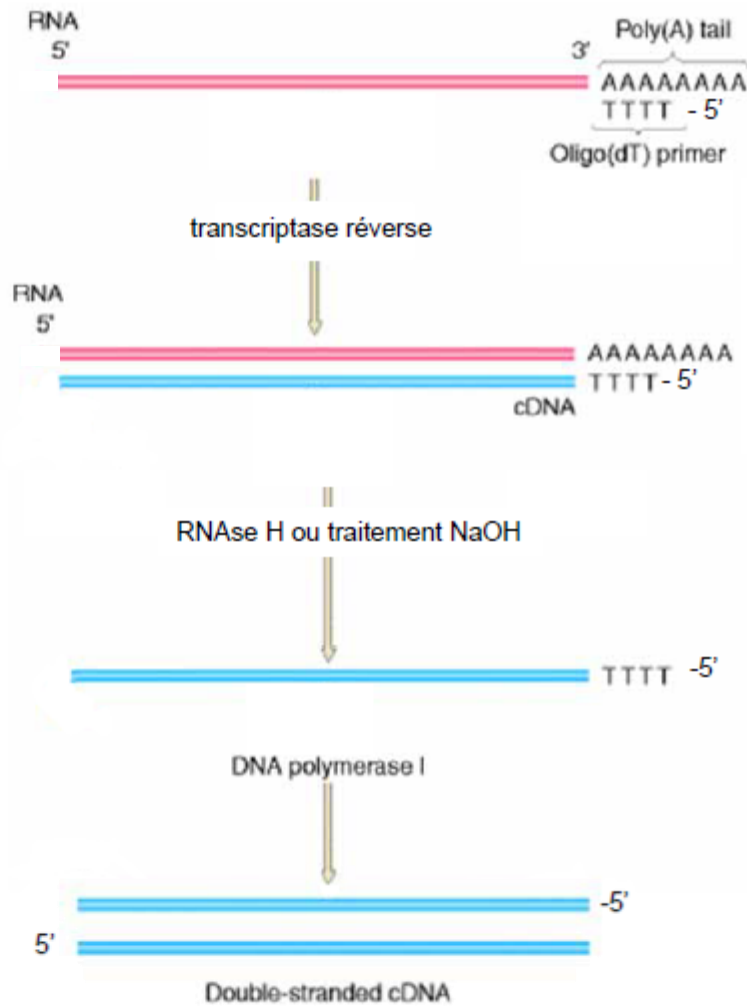
Reverse transcriptase, une enzyme rétrovirale permettant la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à un ARN, c'est à dire l'opération inverse de la transcription.



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

Réaction de Reverse Transcription (RT)

- Obtention d'un ADNc



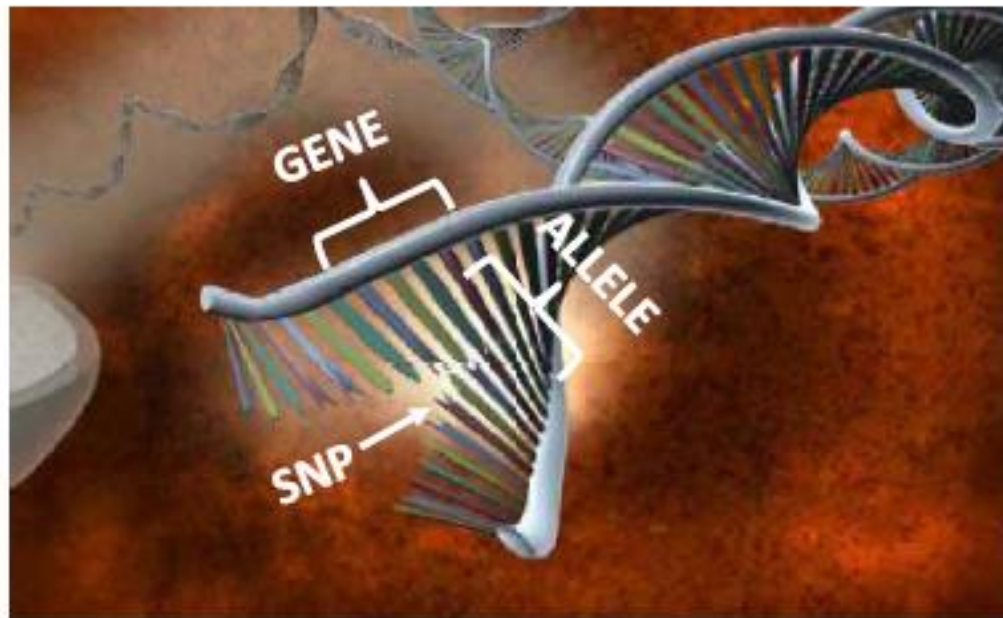






Séquençage de l'ADN

- ✓ 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



Définition

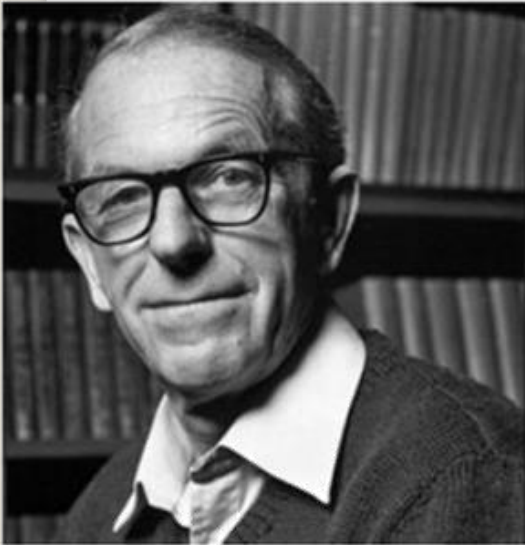
Le séquençage de l'ADN, est la détermination de la succession des nucléotides le composant.

C'est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie.

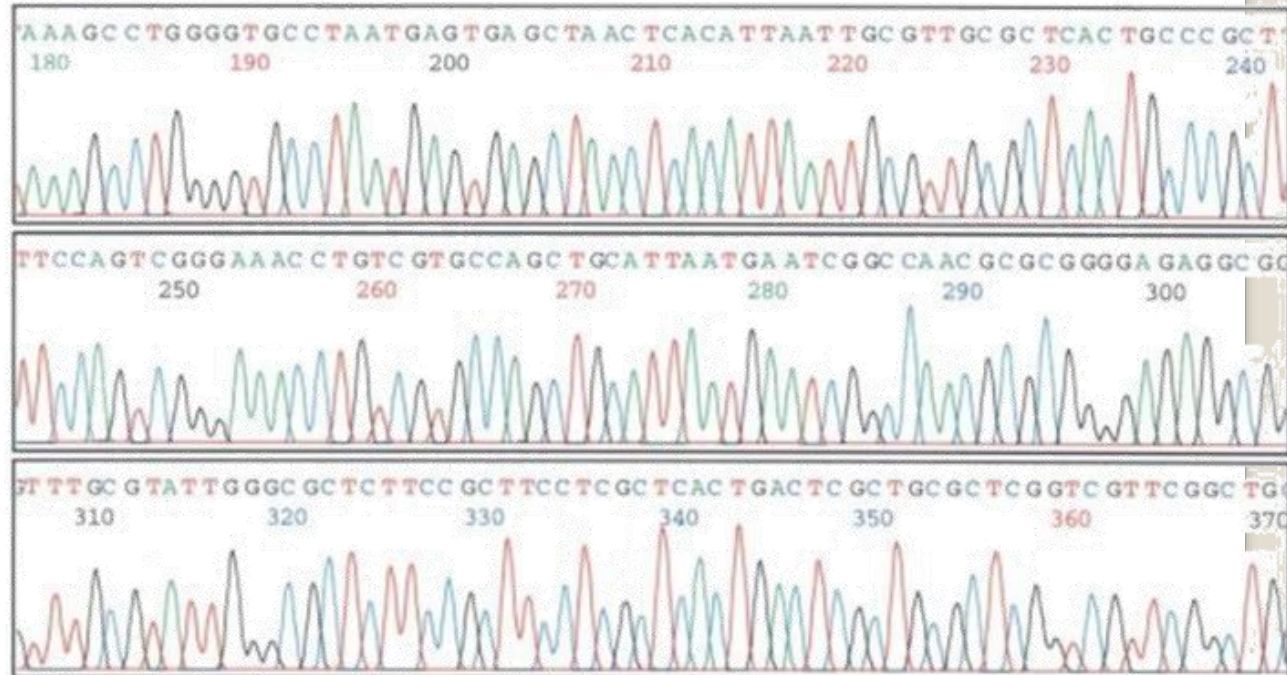
Cette technique utilise les connaissances qui ont été acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN.

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 :

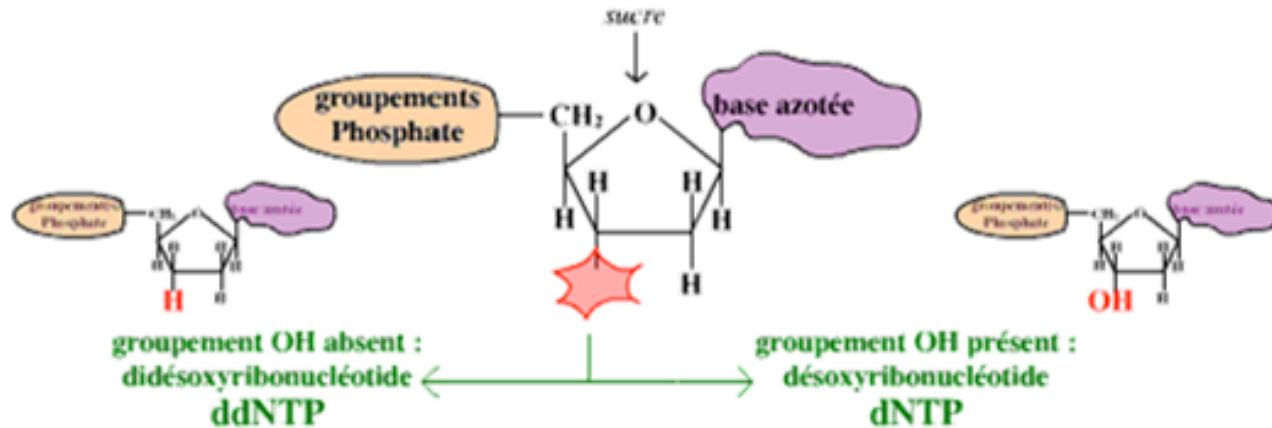
- ADN simple brin à séquencer
- ADN polymérase
- oligonucléotide amorce complémentaire
- 4 nucléotides dNTP
- dans 4 expériences différentes : chaque ddNTP

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).

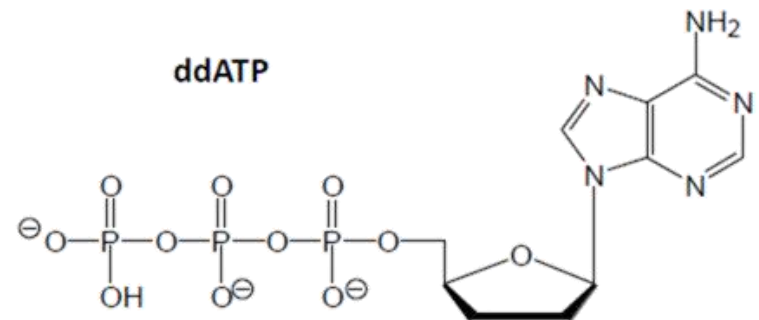
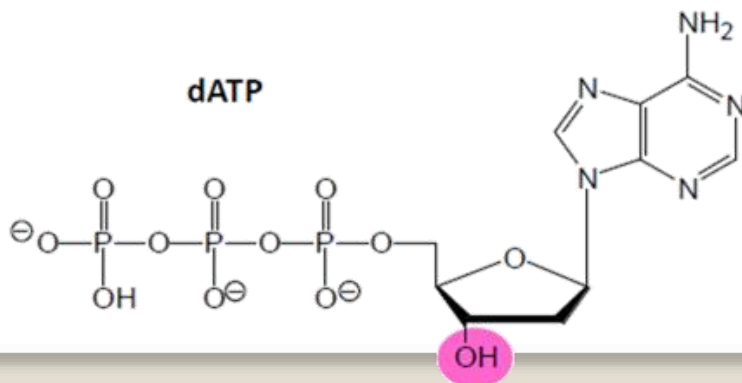
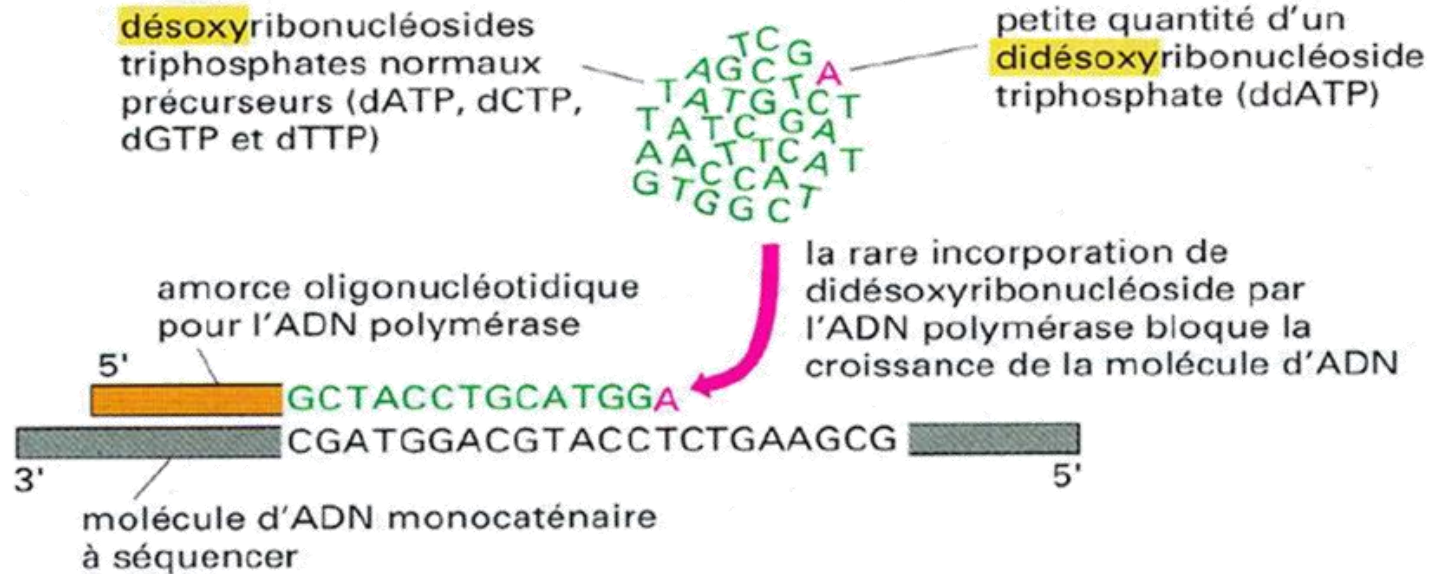
Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.



Deux types de nucléotides triphosphates

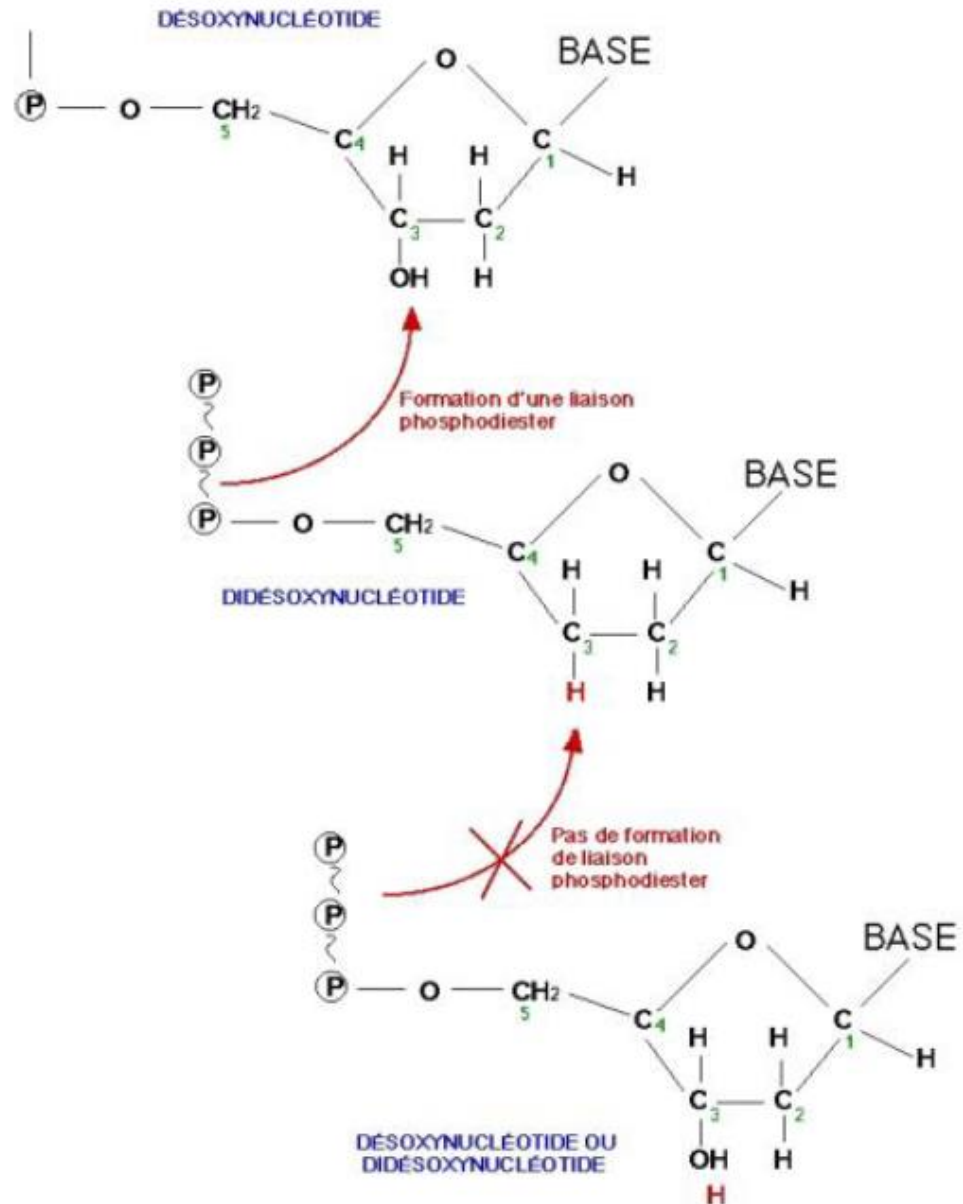
Séquençage de l'ADN

Technique de Sanger



Séquençage de l'ADN

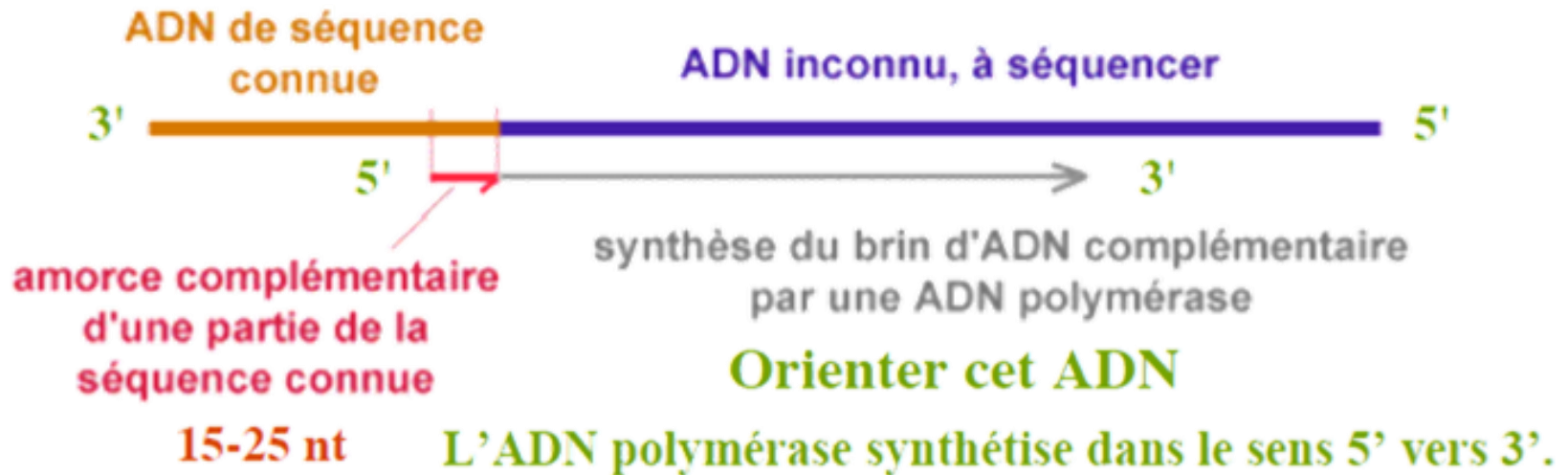
Technique de Sanger



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 = **amorce**
- les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- l'ADN polymérase



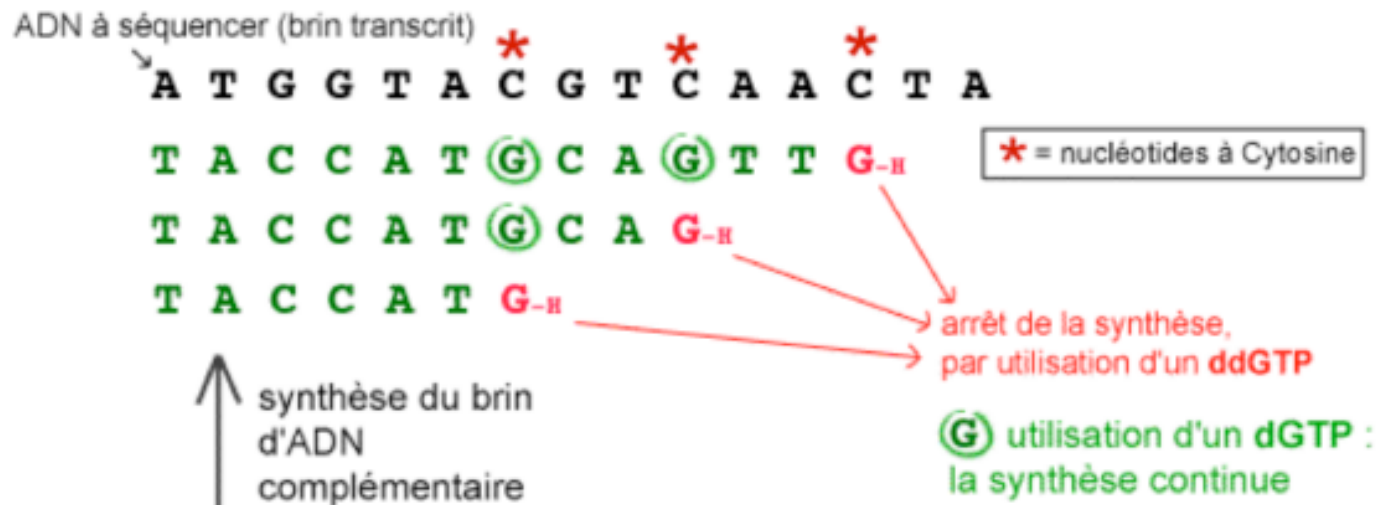
Le protocole

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

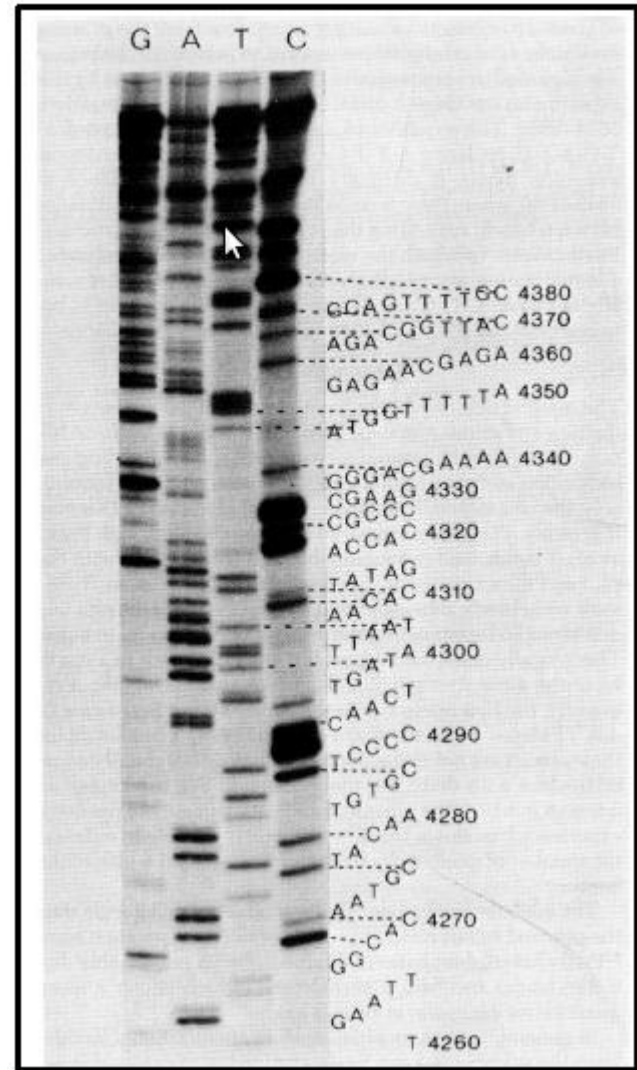


Conclusion :

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



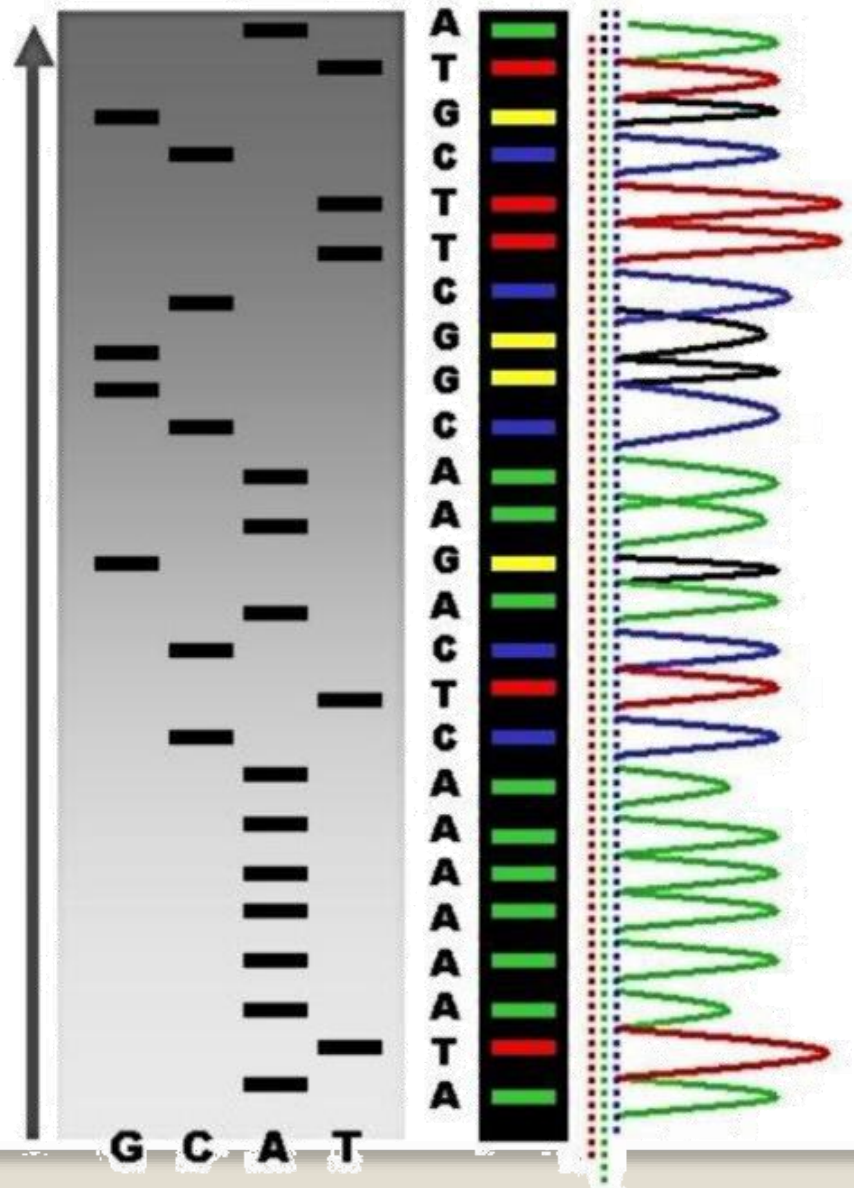
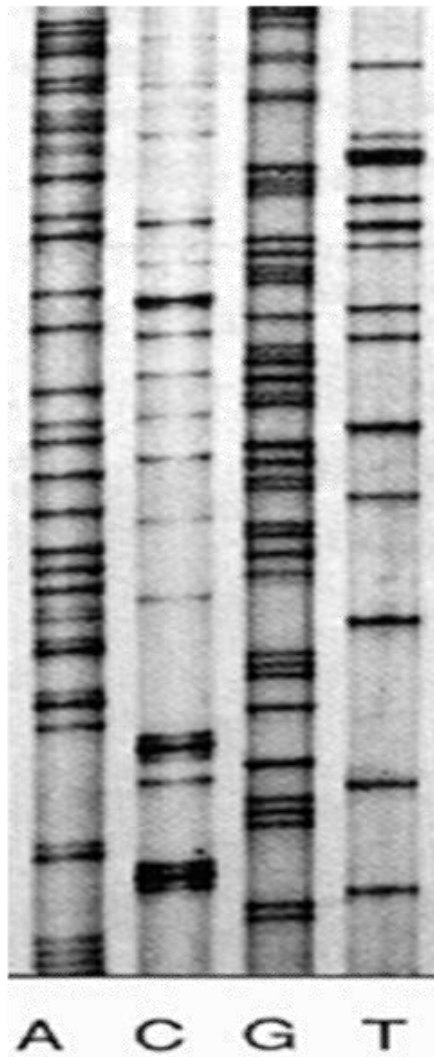
↑ Ajout des 4 ddNTP marqués par un fluorophore différent à la même réaction

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



Méthode de Maxam et Gilbert (Prix Nobel de Chimie 1980)

- ❖ Contrairement à la méthode de Sanger, celle-ci n'utilise quant à elle aucune base modifiée mais une réaction chimique permettant de couper le brin suite à un type de base.
- ❖ Moins facile à robotiser que la méthode de Sanger, utilise des produits chimiques toxiques → cette technique est aujourd'hui très peu utilisée dans les milieux industriels.

Maxam-Gilbert sequencing

