



UE11

Méthodes d'études et d'analyse du génome

TUT' RENTREE 2016

PRESENTATION DE LA MATIERE

- **UE spécifique** commune aux 5 filières
- Enseignée par le **Pr. Bannwarth** et le **Pr. Paquis**
- **3 cours** de 2 heures → **RONEO**

Au Concours :

- **8 QCMs** pour **10 min** d'épreuve
- **20 points** au total

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**

PLAN DU COURS

- **ANALYSE MOLECULAIRE DU MATERIEL GENETIQUE**
 - Extraction d'ADN
 - Amplification par PCR
 - Electrophorèse
 - Digestion enzymatique
- **SEQUENCAGE DE L'ADN**
 - Méthode de Sanger
- **CLONAGE MOLECULAIRE**
 - Vecteur de clonage
 - Vecteur d'expression
- **PCR EN TEMPS REEL**

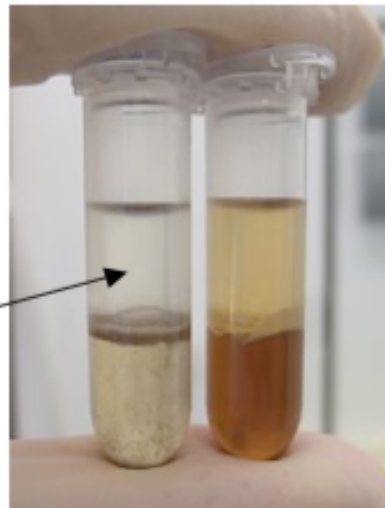
INTRODUCTION

- Analyse à partir d'acides nucléiques (**ADN** ou **ARN**)
- **95%** des diagnostics à partir d'ADN
- Echantillons de l'ordre de **quelques microgrammes**
- Extraction à partir de **cellules nucléées**
 - **Pas d'ADN dans les globules rouges**
- Techniques **très sensibles**
- **ARN très instable** contrairement à l'ADN

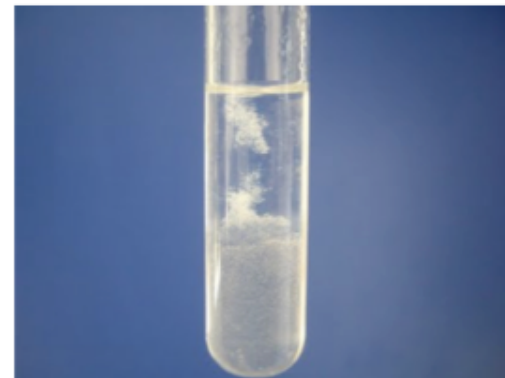
EXTRACTION D'ADN

- **Prélèvement de sang** sous EDTA
- **Lyse des globules rouges** avec une solution hypotonique
- Etape de la **protéinase K**
- **Extraction au phénol-chloroforme**
- **Précipitation à l'éthanol** de l'ADN

Récupération
de la phase
aqueuse



Apparition d'une « méduse » d'ADN



EXTRACTION D'ARN

- ◉ Plus **difficile à étudier** que l'ADN
- ◉ **Très sensible** aux ribonucléases (RNase A)
- ◉ **Peu utilisé** en diagnostic de « routine »
- ◉ Permet d'**analyser l'expression d'un gène**

Pour l'extraction des ARN poly-A :

- ◉ **Homogénéisation** des cellules / tissus dans un tampon
→ **Inhibition des Rnases endogènes** (*entre autres*)
- ◉ Extraction par **précipitation différentielle** entre ADN et ARN
- ◉ Passage des ARN dans une **colonne d'oligo-dT**
- ◉ **Elution**
- ◉ **Précipitation à l'alcool éthylique absolu froid**

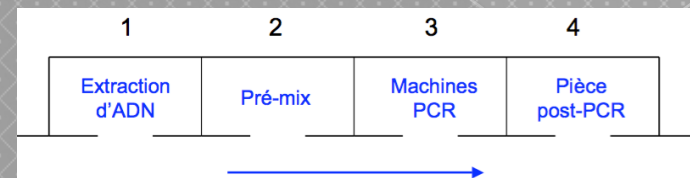
AMPLIFICATION PAR PCR

- Obtention en **grande quantité** d'une région d'ADN à étudier → **Amplification sélective**
- **2ⁿ molécules** au bout de **n cycles**
- **Sensibilité +++**
- **Risque de contamination +++**



Conditions :

- **Borne d'amont** et **borne d'aval** (18-20 nucléotides)
- Dans un automate : **ADN** du patient + **amorces** + **dNTP** + **Tampon MgCl₂** + **Taq polymérase** (ADN polymérase d'origine bactérienne résistante à la chaleur)
- Etapes **isolées**
- Circuit **monodirectionnel**



AMPLIFICATION PAR PCR

Fonctionnement :

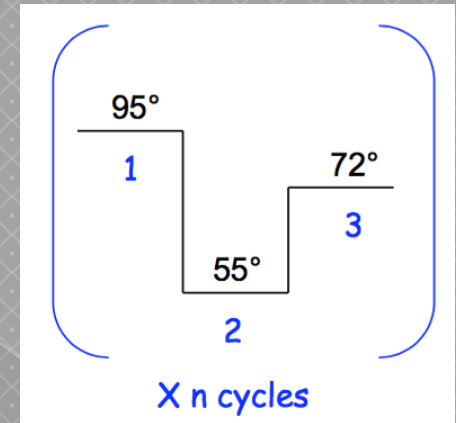
1. Dénaturation



2. Hybridation d'amorces

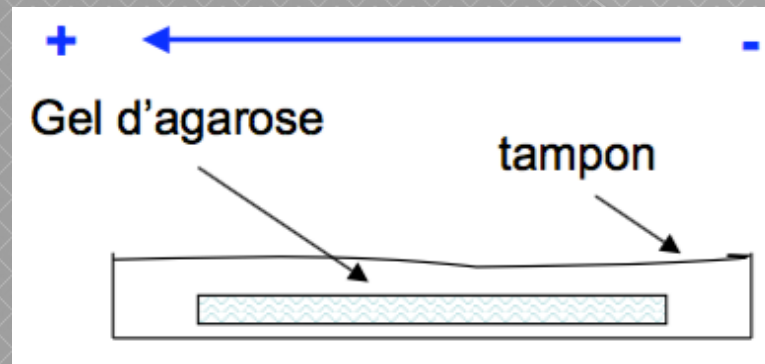
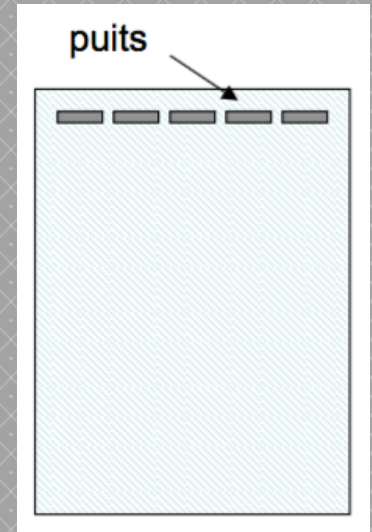


3. Elongation



ELECTROPHORESE

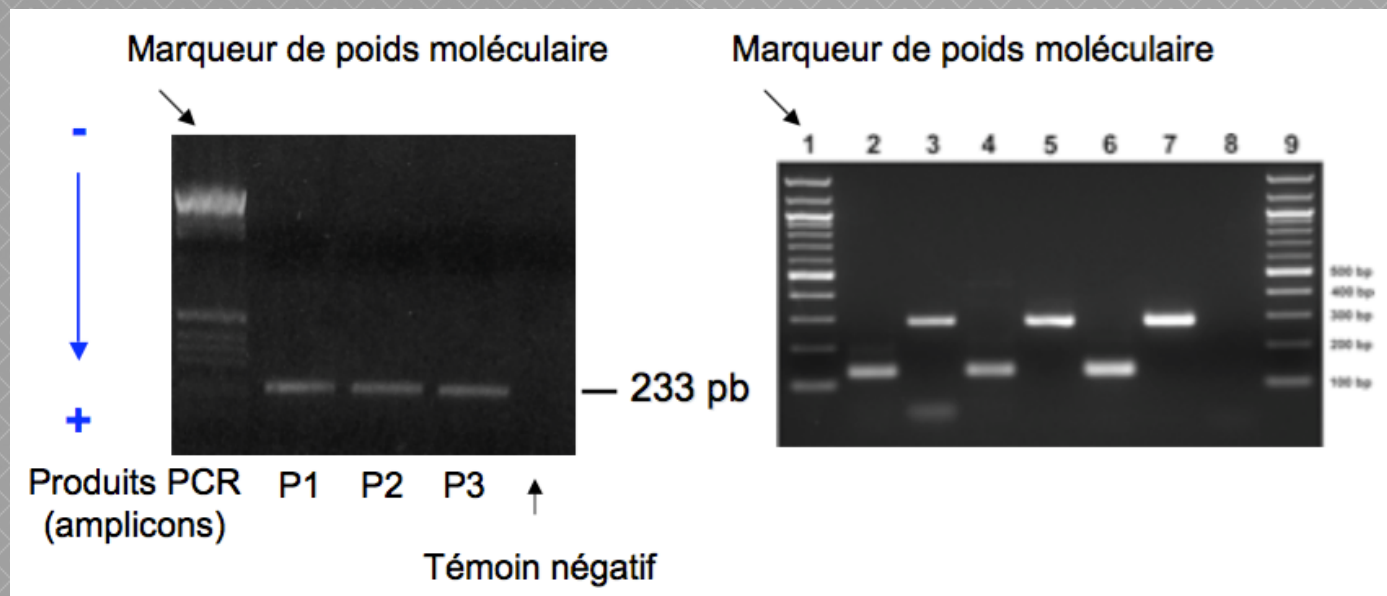
- Analyse des produits d'amplification
→ **Vérification de la PCR**
- Gel d'**agarose** ou gel d'**acrylamide**
- **Courant électrique** : du - au +
- Vitesse de migration en fonction de la **masse moléculaire**, de la **concentration du gel**



ELECTROPHORESE

Après migration :

- **Coloration au bromure d'éthidium** (*agent mutagène s'intercalant entre les bases de l'ADN et émettant une fluorescence rose sous lumière UV*)
- Visualisation sous **lumière UV**



ACHONDROPLASIE

- Maladie **monogénique** (\neq maladie **chromosomique**)
- Maladie **rare** (1/15000 naissances)
- **La plus fréquence** des chondrodysplasies
- Maladie **autosomique dominante**
- Liée à une anomalie du développement du cartilage

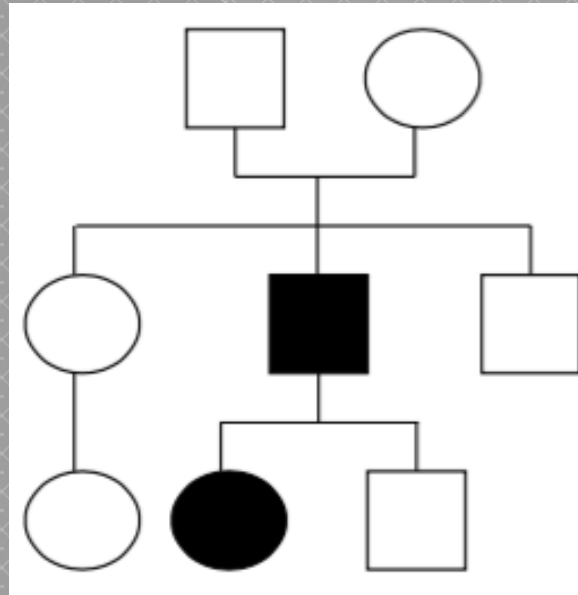
Gène responsable :

- **FGFR3** (Fibroblast Growth Receptor 3)
codant pour le récepteur d'un **facteur de croissance fibroblastique**



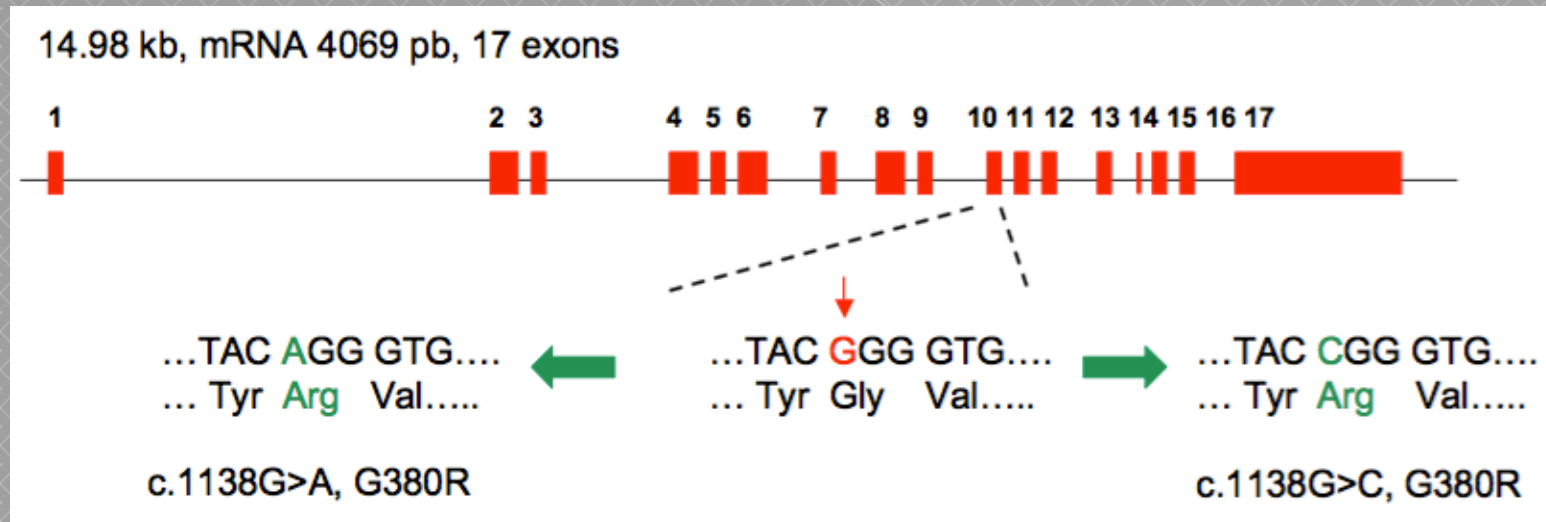
ACHONDROPLASIE

- **Mutation de novo dans 90% des cas**
- **Forme plus grave chez les homozygotes**
- Un des deux parents **porteur et malade** = **50%** de risques d'avoir un enfant atteint



ACHONDROPLASIE

- Mutation toujours localisée au même endroit :
 - Exon 10
 - Codon 380
 - Position 1138
- **G>A** OU **G>C**
- **Glycine → Arginine**

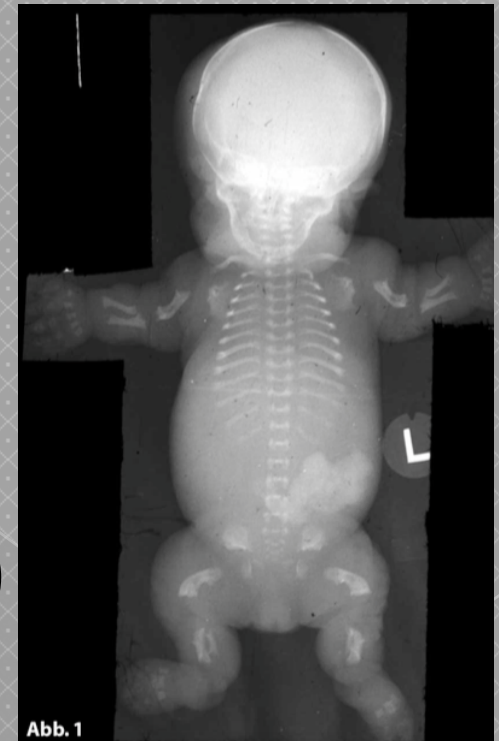


ACHONDROPLASIE

- Diagnostic évoqué sur signe d'appel échographique **tardif** : « **fémurs courts** »

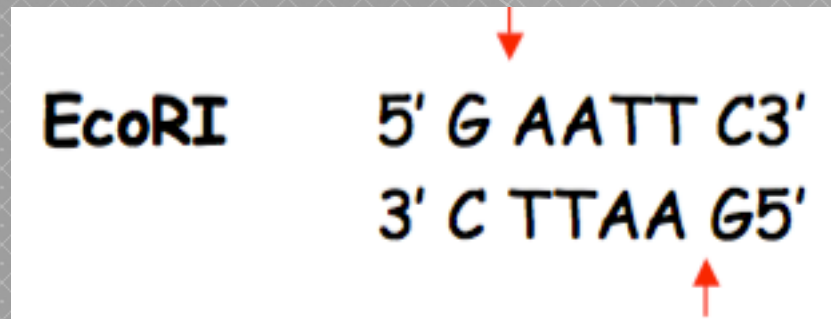
Caractéristiques :

- Nanisme** (1m30, membres courts, hyperlordose)
- Dysmorphie faciale** (macrocéphalie, front haut, ensellure nasale marquée)
- Intelligence strictement normale**
- Complications neurologiques** (myélopathie)



DIGESTION ENZYMATIQUE

- ◉ **Enzymes de restriction de type II** = Endonucléases d'origine bactérienne
 - ◉ **Coupure reproductible et spécifique** de l'ADN double brin
 - ◉ Reconnaissance d'une **séquence palindromique**



DIGESTION ENZYMATIQUE

Types de coupure :

Coupures à bouts francs
(blunt ends)

HaeIII



5'GG CC3'
3'CC GG5'



5'GG
3'CC

+

CC3'
GG5'

Coupures à bouts cohésifs
(sticky ends)

EcoRI



5'G AATT C3'
3'C TTAA G5'



5'G
3'CTTAA

+

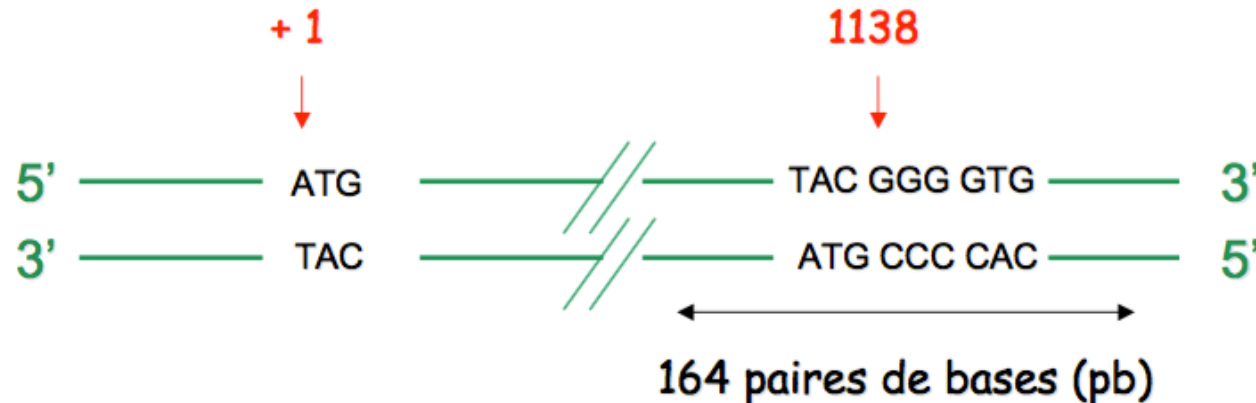
AATTC3'
G5'

EXEMPLE DE DIAGNOSTIC

Devant un signe d'appel échographique :

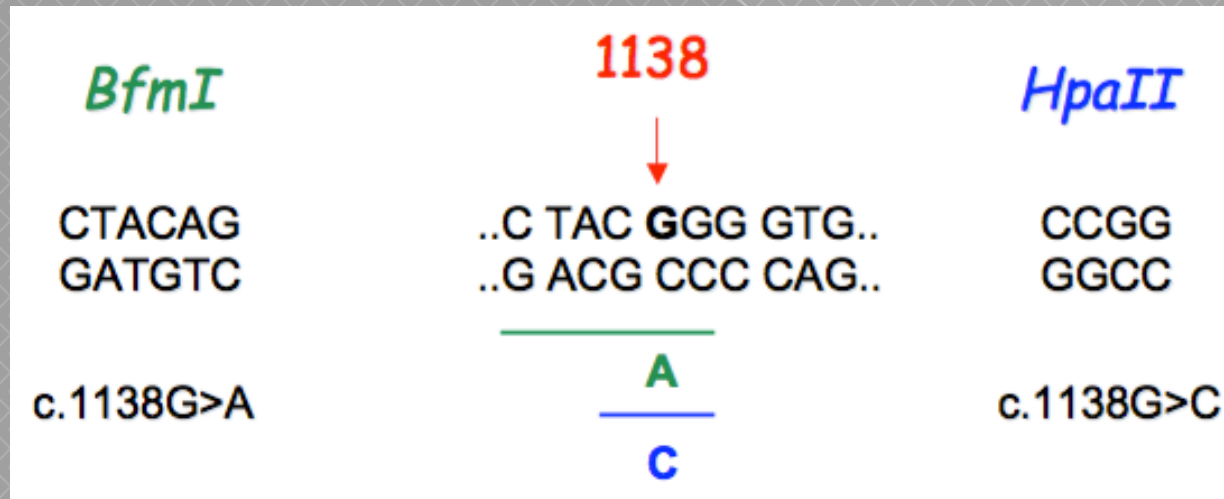
- **Extraction d'ADN** à partir de cellules amniotiques
- Amplification spécifique par PCR de la **région de l'exon 10**
- Fragment amplifié de **164 pb**

Gène *FGFR3*



EXEMPLE DE DIAGNOSTIC

- Réalisation d'une **électrophorèse** avec **2 enzymes de restriction** :
 - Pour la mutation **G>A** : **BfmI** qui reconnaît spécifiquement la séquence **CTACAG**
 - Pour la mutation **G>C** : **HpaII** qui reconnaît spécifiquement la séquence **CCGG**

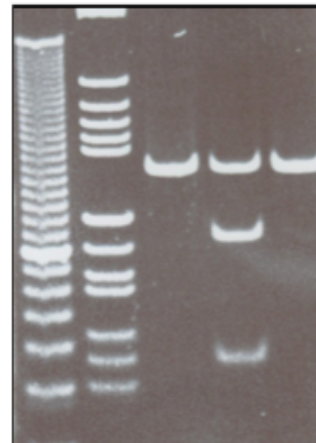


EXEMPLE DE DIAGNOSTIC

Mutation c.1138G>A

BfmI

Sain	164 pb
Hétérozygote	164 + 109 + 55 pb
Homozygote	109 + 55 pb



164 pb

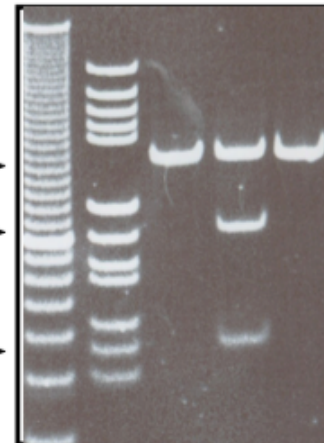
109 pb

55 pb

Mutation c.1138G>C

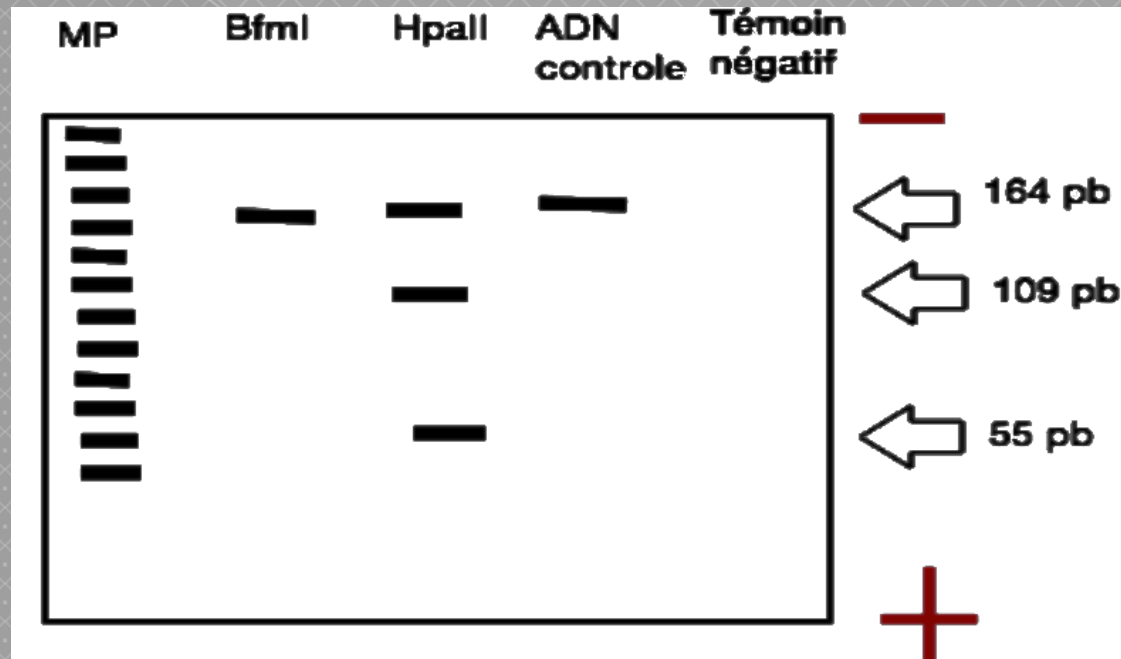
HpaII

164 pb
164 + 109 + 55 pb
109 + 55 pb



EXEMPLE DE DIAGNOSTIC

Pour notre exemple :



Conclusion : Le fœtus est **atteint d'achondroplasie à l'état hétérozygote**, à cause d'une **mutation G>C** en position 1138 codon 380 de l'exon 10.

SEQUENCAGE DE L'ADN

- Détermination de la succession de nucléotides composant l'ADN

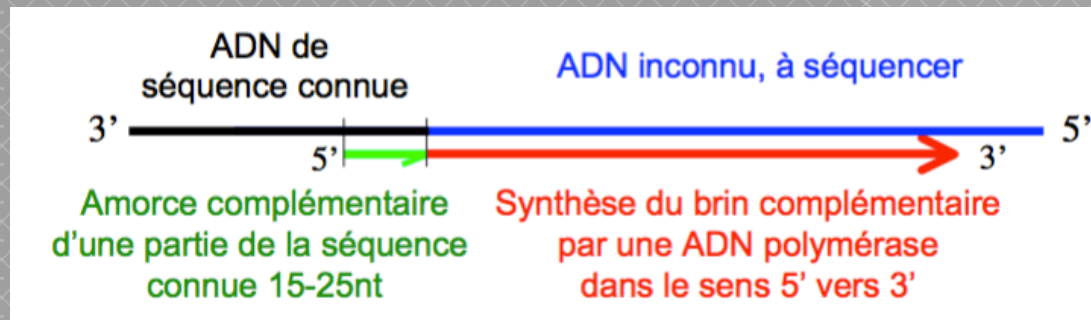
Objectifs :

- Vérification d'un diagnostic
- Faire un diagnostic

Méthode de référence : **Méthode de Sanger**

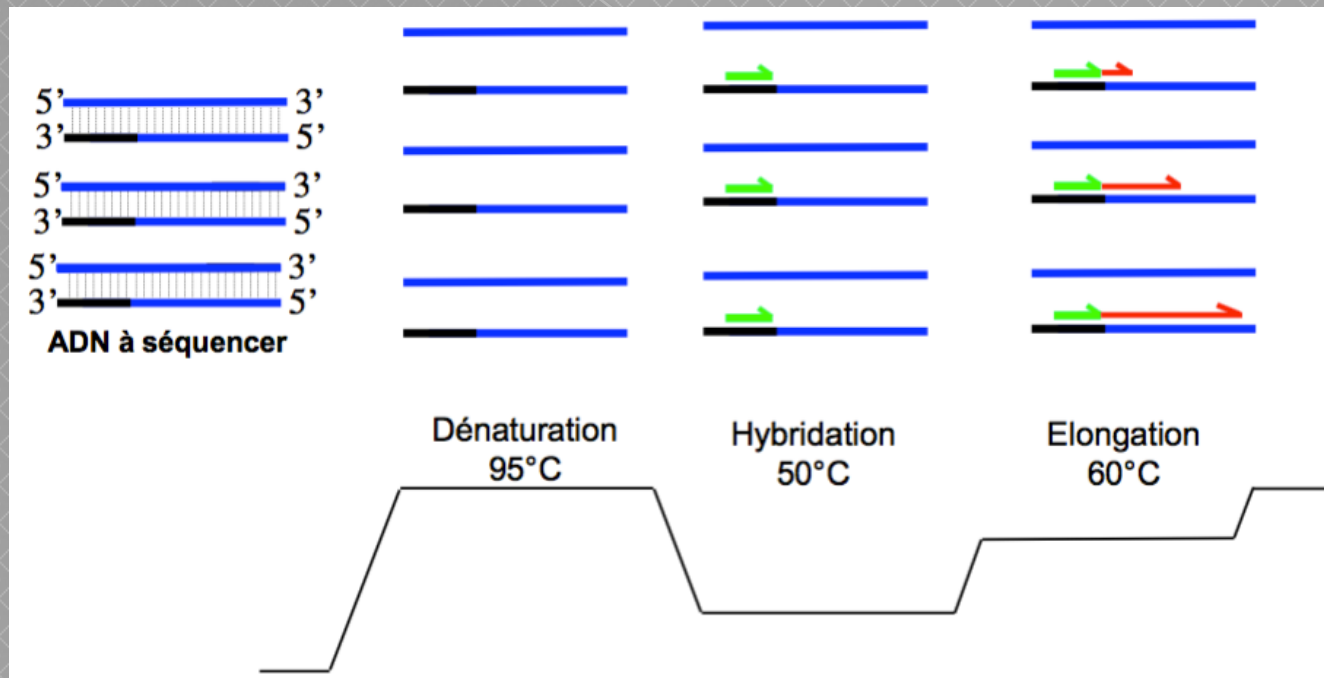
- Méthode enzymatique des **didésoxynucléotides** (ddNTP)

Principe :



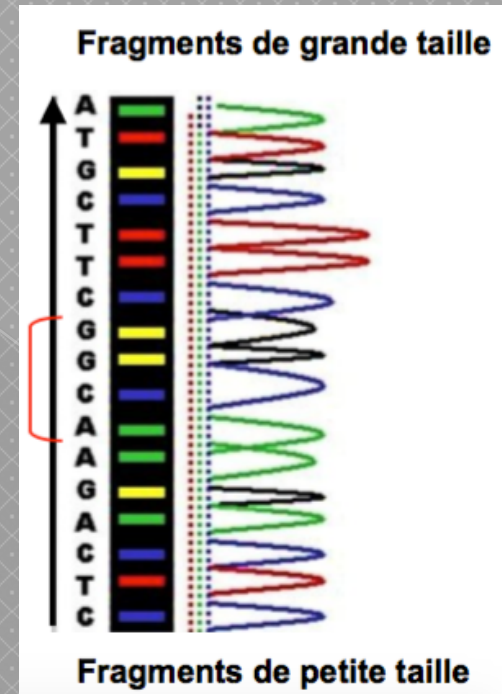
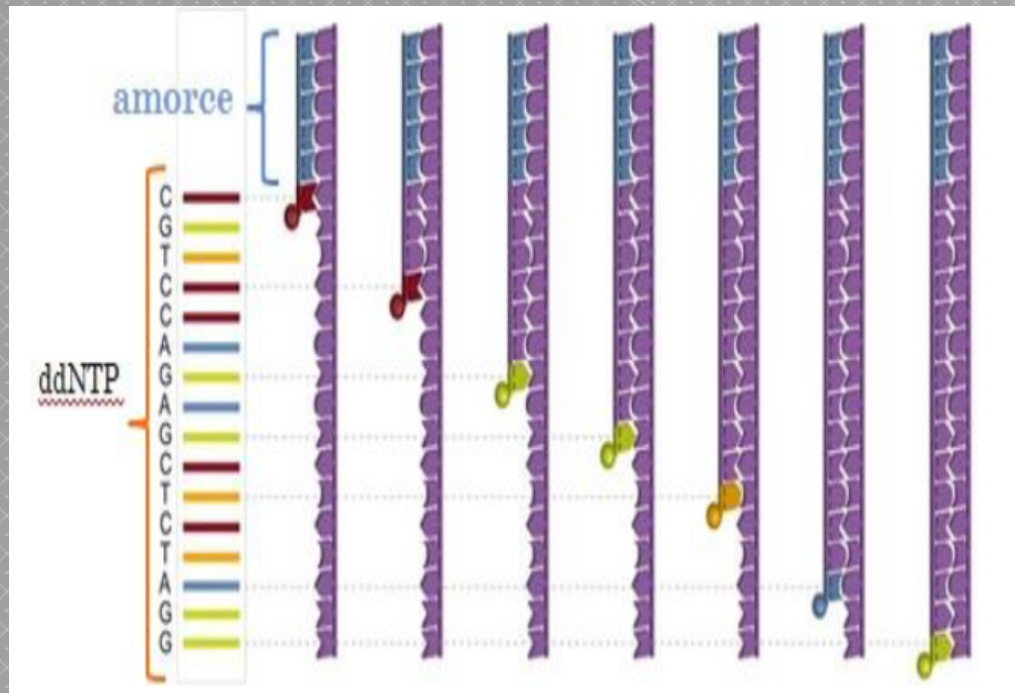
ETAPES DU SEQUENCAGE

- Cycles **successifs** (30 à 35 cycles) : **dénaturation, hybridation, élongation**
- Pas de Taq polymérase
- Elongation d'un seul brin → Une seule amorce



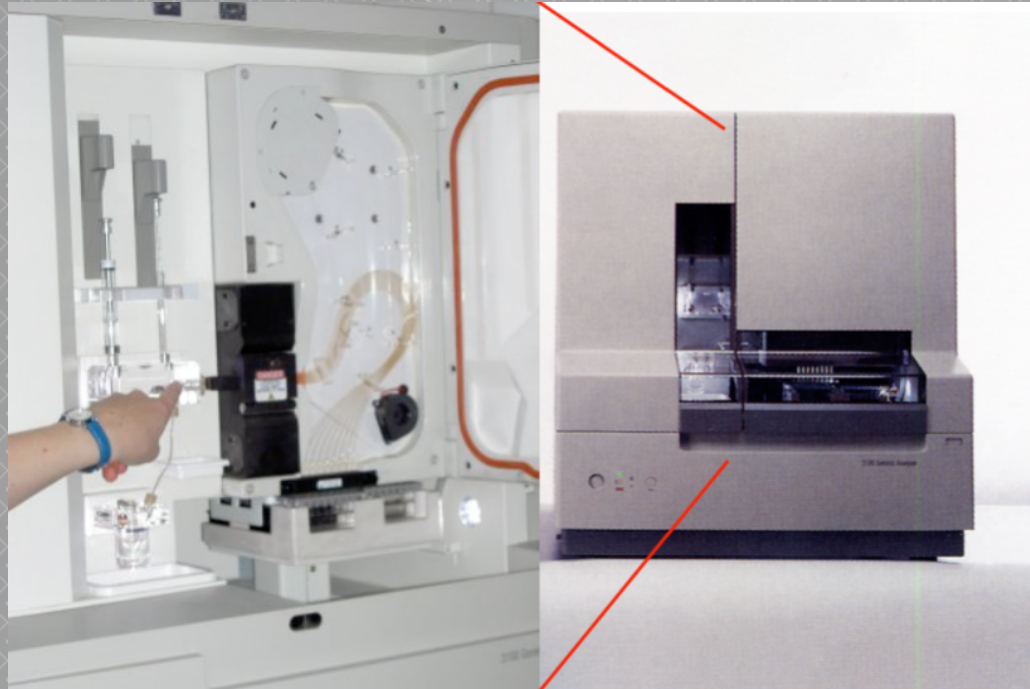
PRINCIPE DU SEQUENCAGE

- Produits synthétisés séparés en fonction de leur taille par **migration électrophorétique**
- Lecture des ddNTP **par ordre de taille croissante** des brins



PRINCIPE DU SEQUENCAGE

- **Séquenceurs automatiques** utilisés en routine en laboratoire de génétique
- Présence d'une **caméra laser** → *Identification des fluorochromes*



SYNDROME DE WOLFRAM

- Pathologie **autosomique récessive**

Symptômes :

- Surdité
- Diabète
- Atrophie optique
- Troubles neurologiques

Gène responsable :

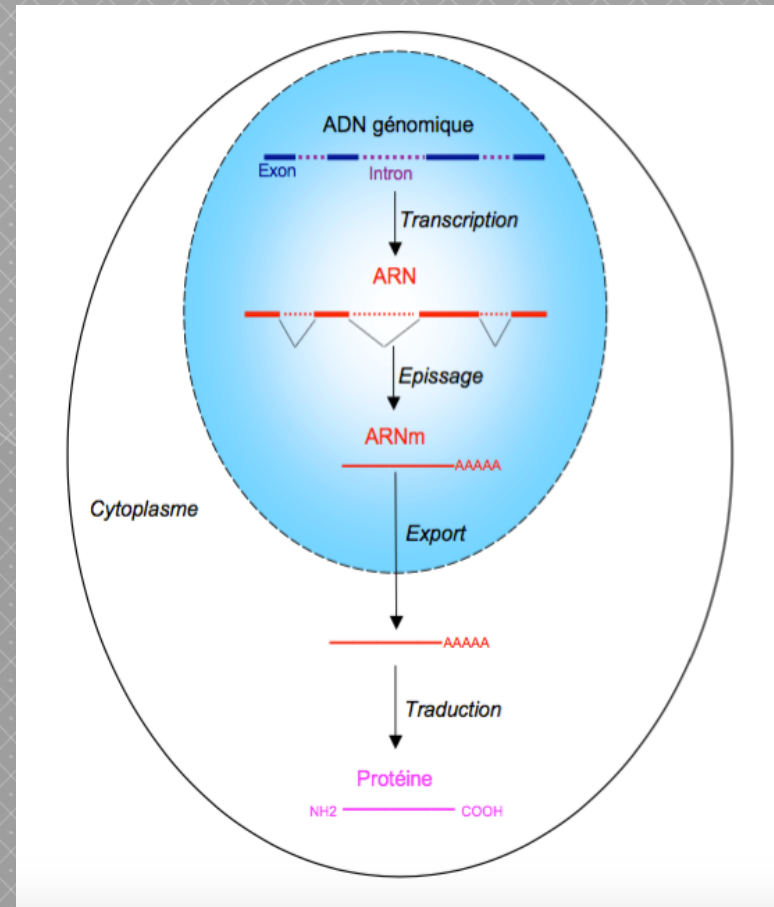
- WFS1** codant pour la **wolframine** (*fonction peu connue, rôle au niveau du flux calcique*)

SYNDROME DE WOLFRAM

Rappel :

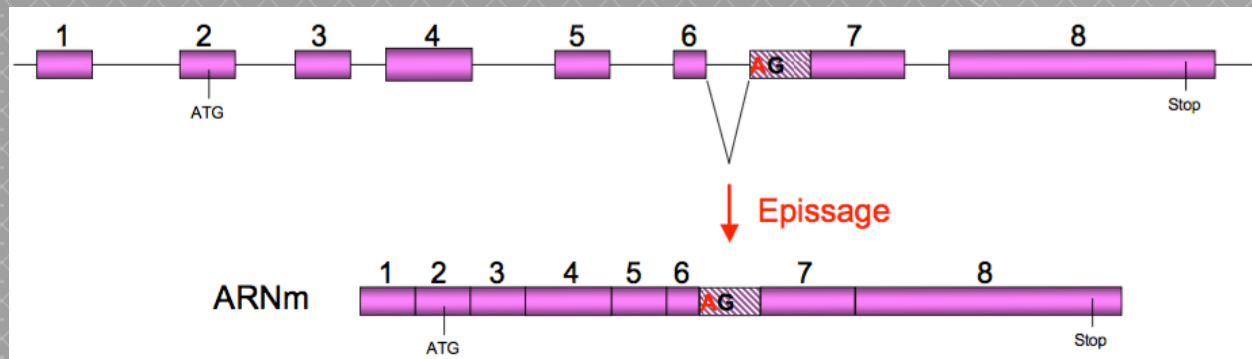
- **Transcription** : ADN \rightarrow ARN
- **Maturation** : Elimination des introns (**épissage**) + Ajout de la queue poly-A
- **Traduction** : ARNm \rightarrow Protéine

\rightarrow Une mutation survenant à n'importe quelle étape du processus peut générer une **protéine anormale** et par conséquent une **pathologie**.



SYNDROME DE WOLFRAM

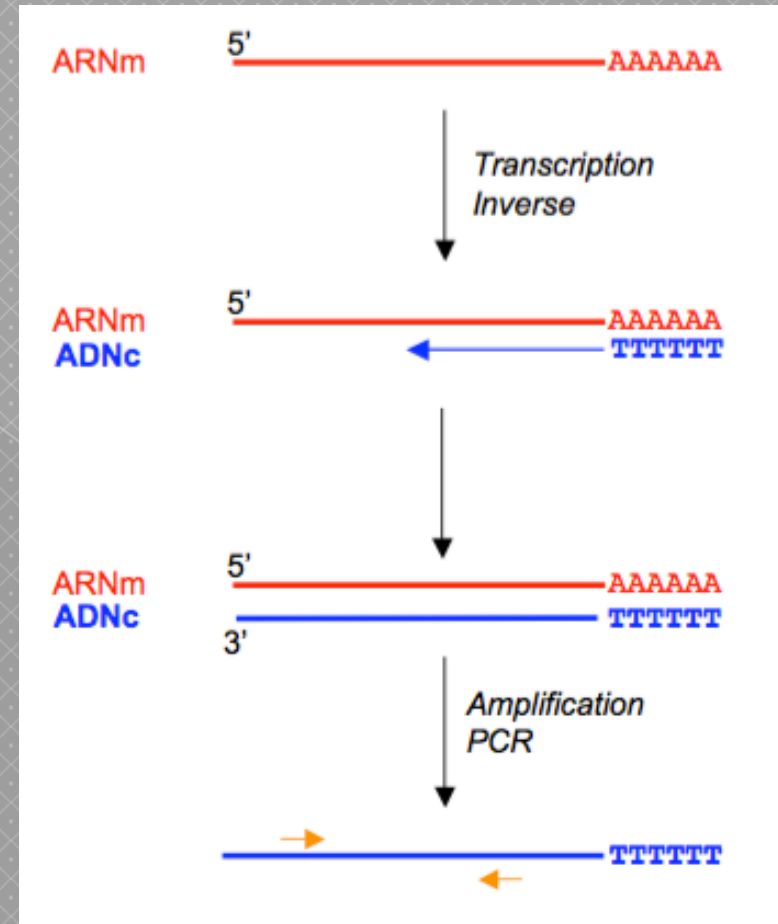
- Maladie **autosomique récessive**
 - Forme **homozygote** pour le même gène muté
 - Forme **hétérozygote** pour 2 mutations différentes
→ *Détection d'une seule mutation par PCR*
(amplification des exons uniquement)
- Deuxième mutation au niveau d'un **intron**
 - Site cryptique d'épissage**



SYNDROME DE WOLFRAM

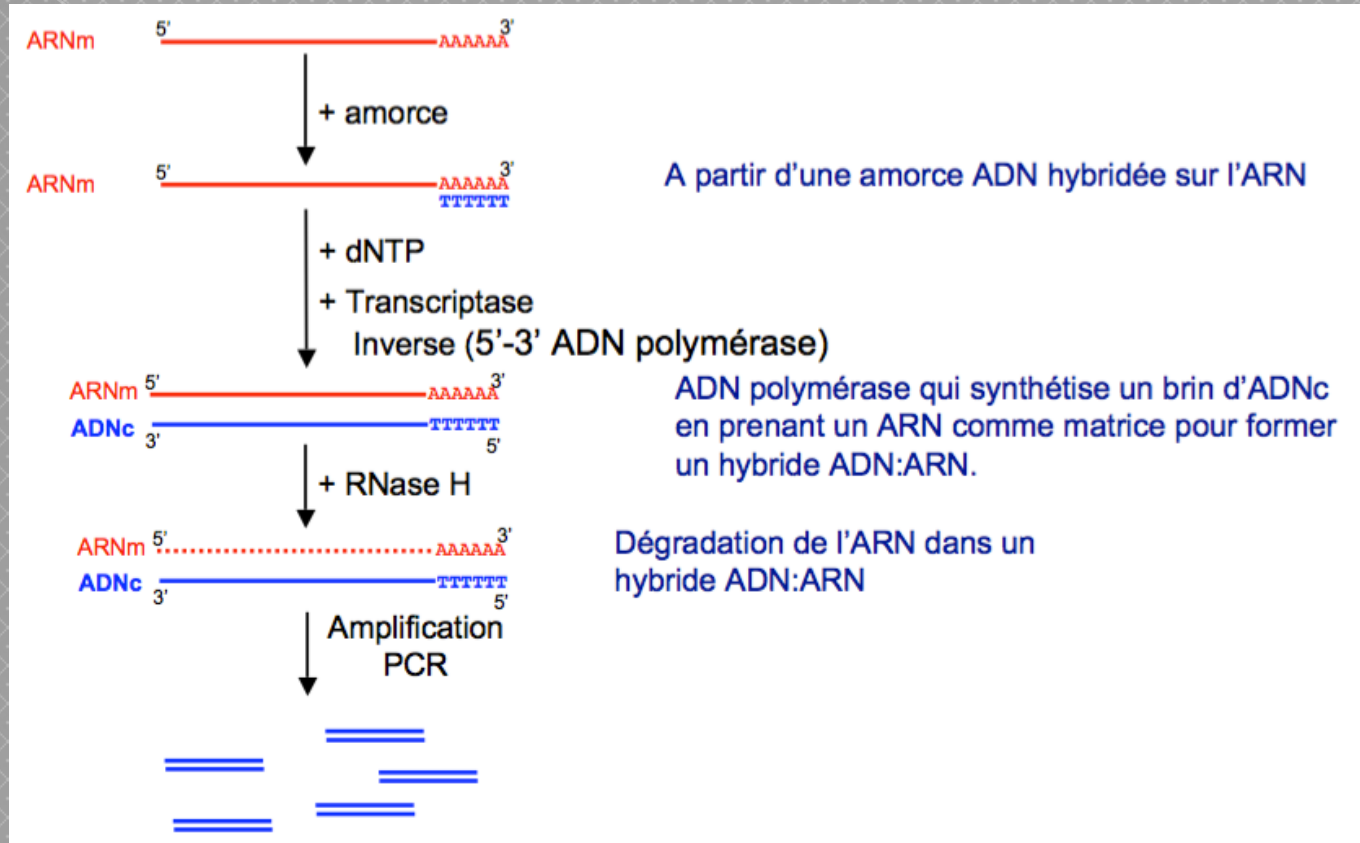
Amplification par PCR :

- Utilisation d'une **reverse transcriptase** (récupérée à partir de **rétrovirus**)
- Synthèse dans le sens 5'-3' d'un **simple brin d'ADN** (**ADNc**) à partir d'un brin d'ARN
- Hybridation d'une **amorce d'ADN** (succession de T) sur la queue polyadénylée de l'ARNm



SYNDROME DE WOLFRAM

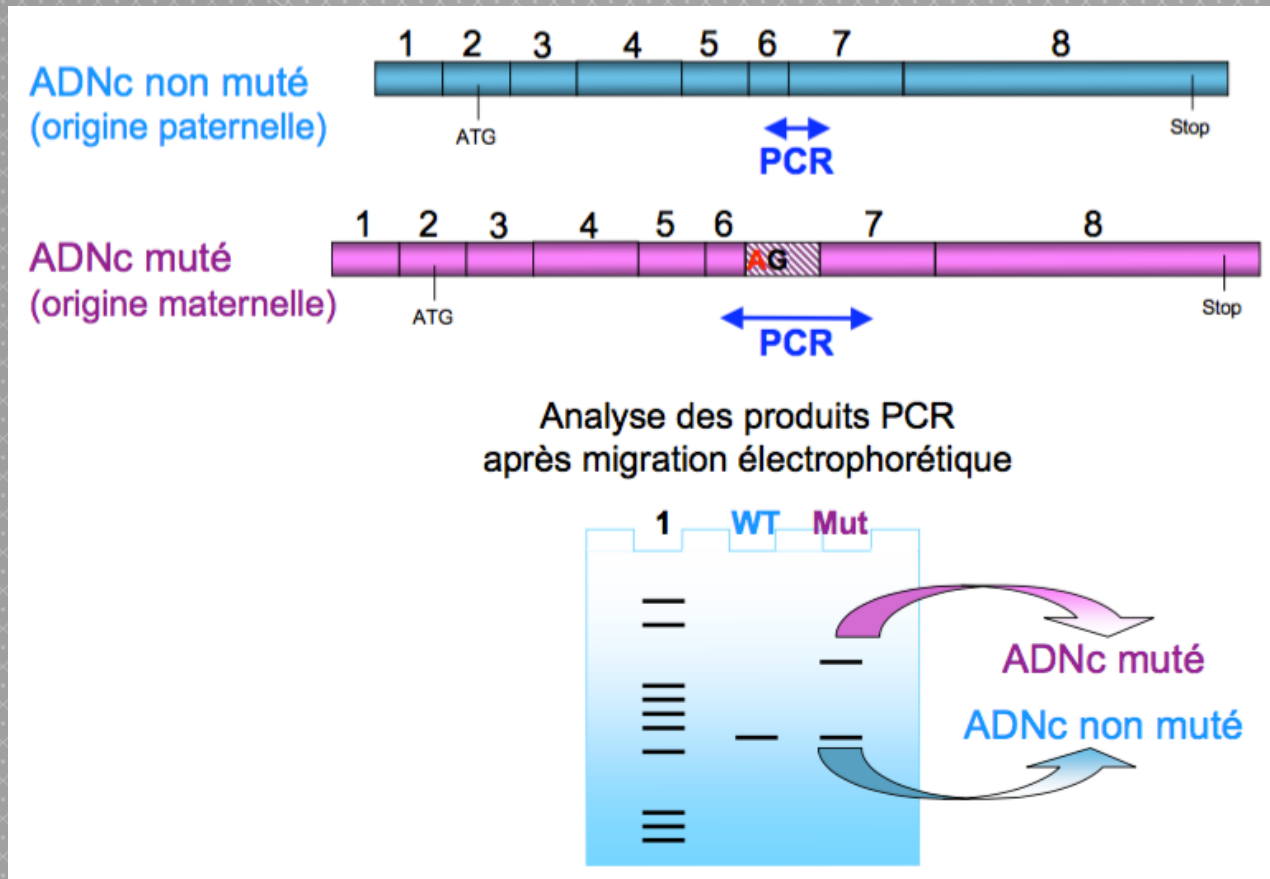
Etapes :



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

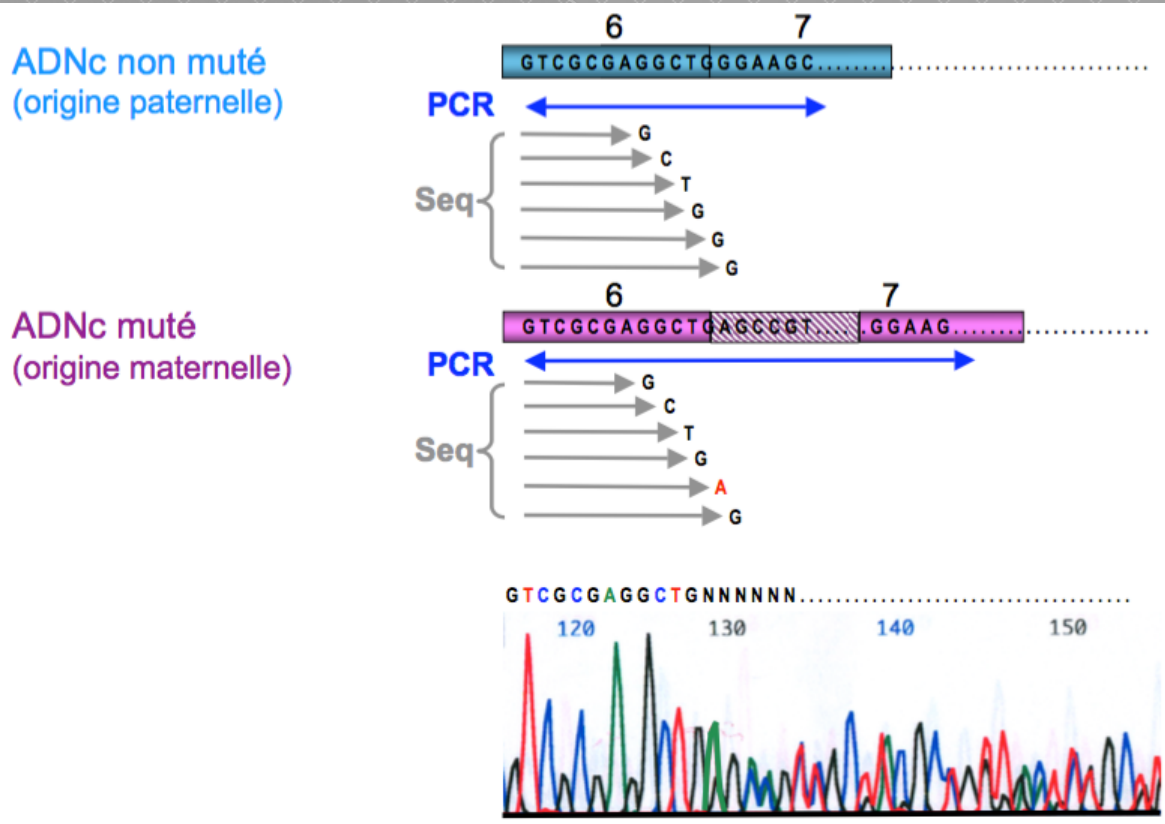
SYNDROME DE WOLFRAM

Recherche de variants d'épissage par **électrophorèse** :



SYNDROME DE WOLFRAM

Identification du variant à la base de la mutation d'épissage par **séquençage** :

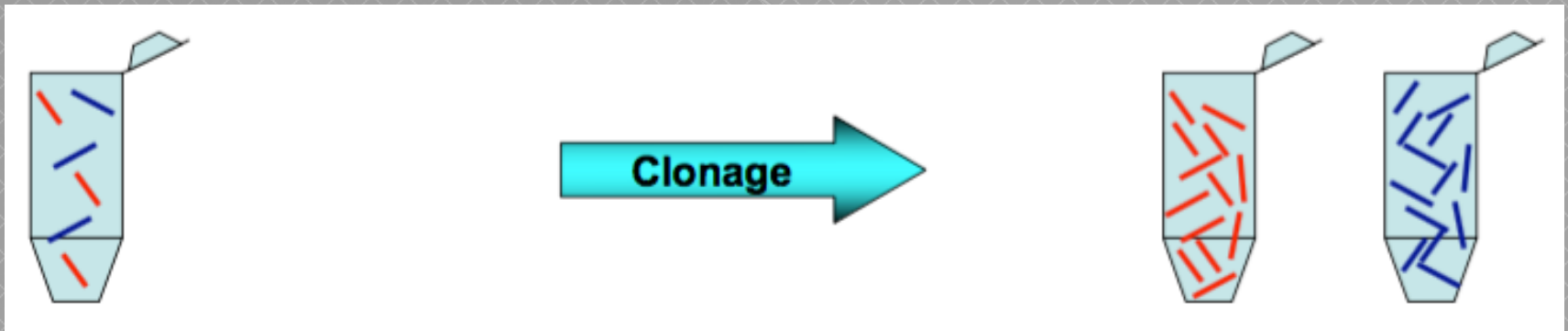


→ **Séquençage illisible**
→ **Clonage moléculaire**
nécessaire

CLONAGE MOLECULAIRE

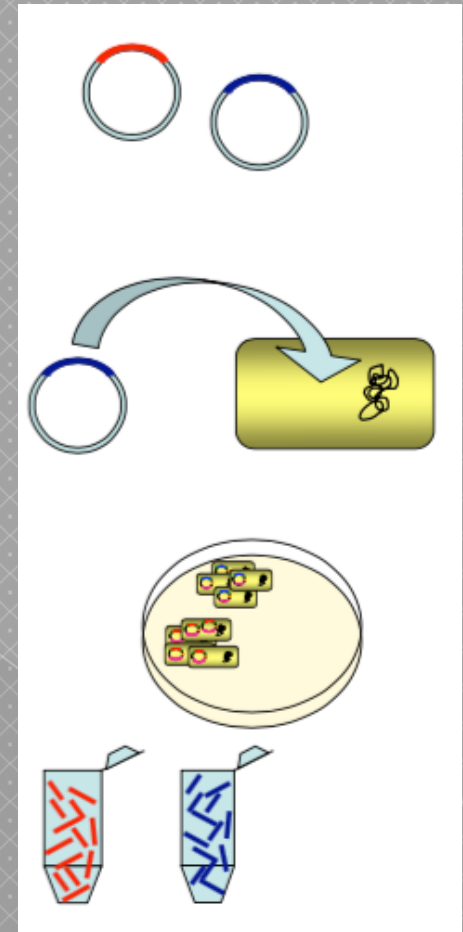
Objectifs :

- Obtenir un grand nombre de copies **identiques** et absolument **pures** d'une séquence donnée d'ADN
→ Permet de **séparer 2 populations d'ADN**



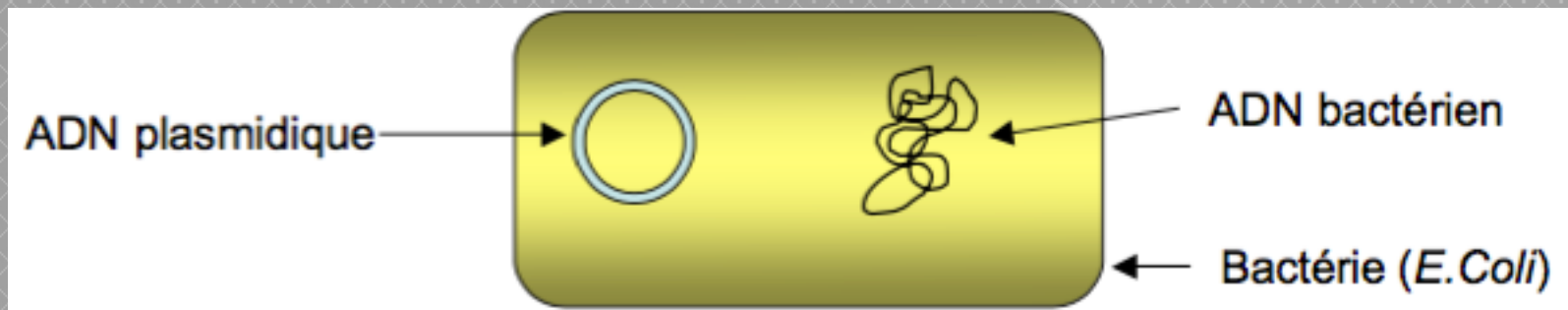
ETAPES DU CLONAGE

- Préparation de l'**ADN recombinant**
(= vecteur + insert)
- Intégrer un fragment d'ADN (= **insert**) dans un **vecteur**
- Introduire le vecteur dans une **cellule hôte** (*bactéries*)
- **Sélectionner, isoler** et **amplifier** les clones bactériens
- Obtenir un **fragment d'ADN pur** en **grande quantité**



VECTEURS

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



VECTEURS

2 grandes catégories :

- ◉ **Vecteurs de clonage** = Destinés à **isoler** physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et à **amplifier** le nombre de copies de cet ADN
- ◉ **Vecteurs d'expression** = Destinés à **transférer un gène** dans une cellule hôte eucaryote

Différents vecteurs :

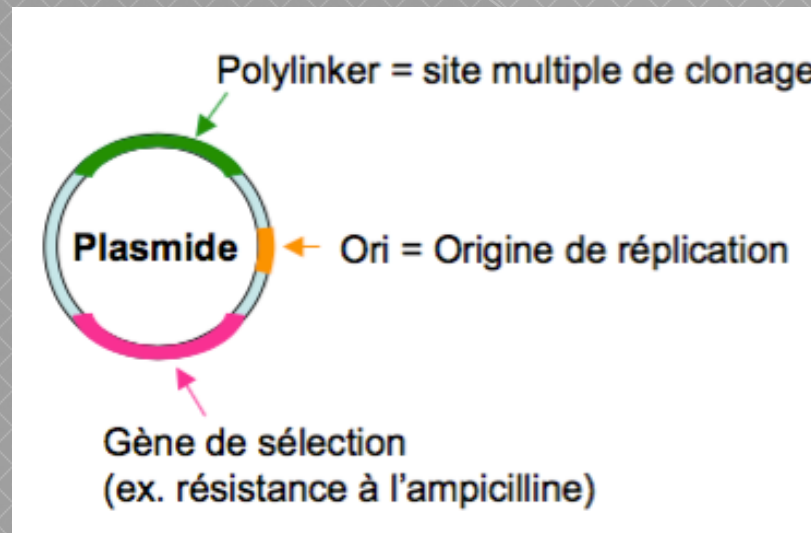
*En fonction de la taille
des inserts à étudier*

Type de vecteur	Taille de l'ADN cloné
Plasmide	20 kb
Phage Lambda (virus E. Coli)	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

PLASMIDES

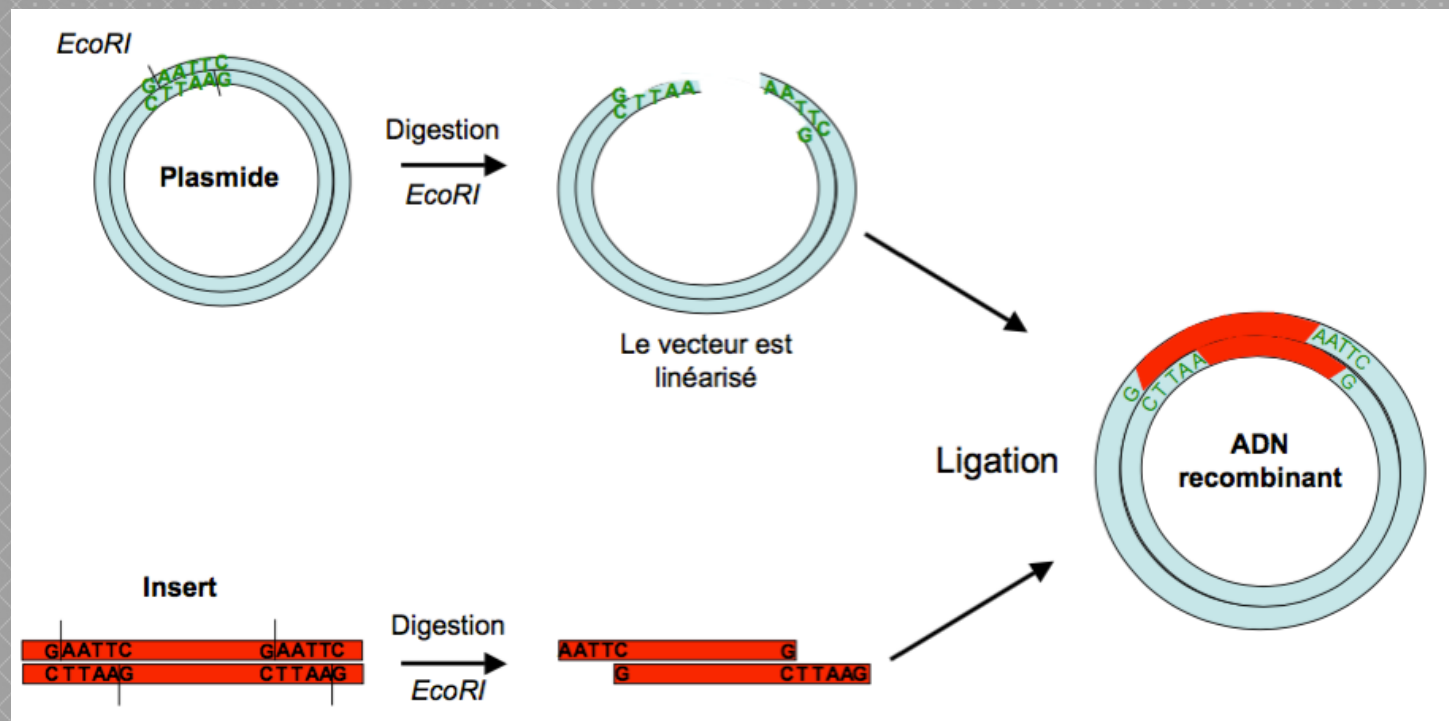
3 caractéristiques :

- ◉ **Polylinker** = **Séquence parfaitement connue** → “On sait où coupe précisément chaque enzyme de restriction”
- ◉ **Origine de réplication** = Permet de se multiplier dans la bactérie et indépendamment de celle-ci
- ◉ **Gène de sélection** = Gène de résistance à un antibiotique



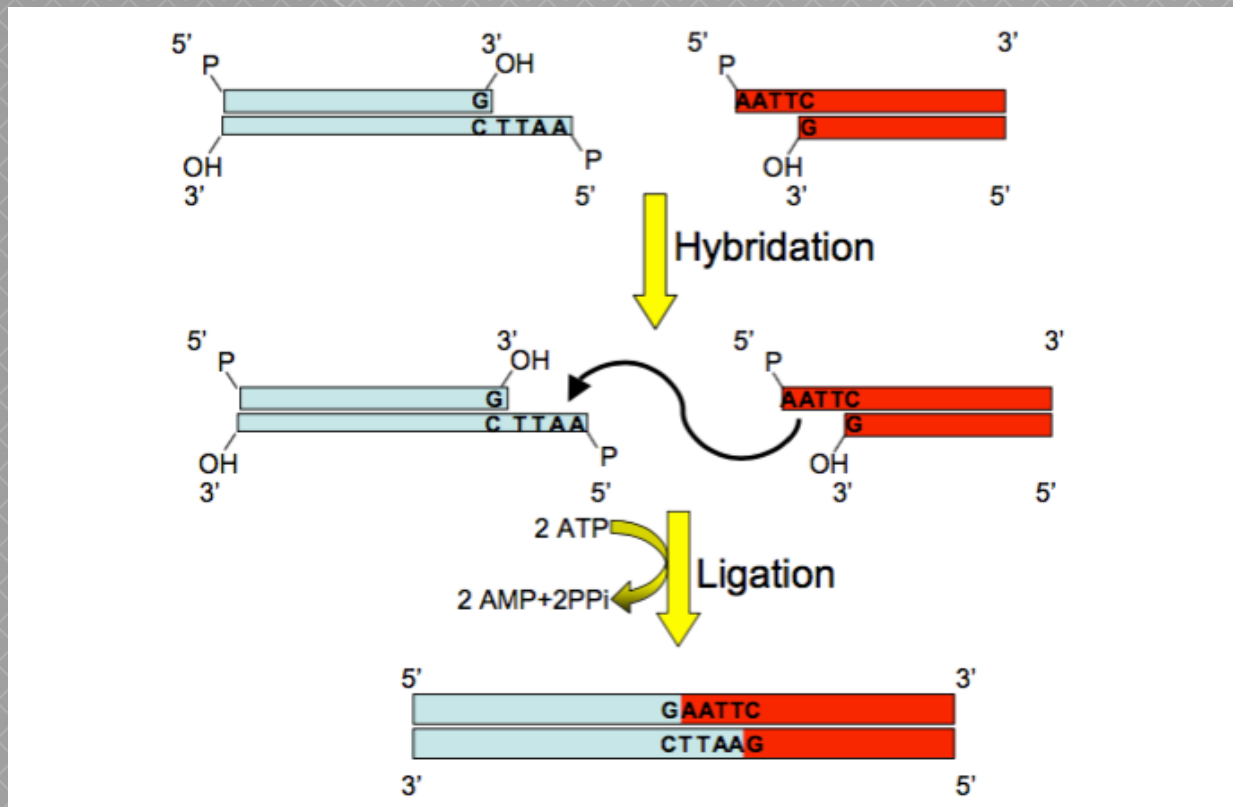
PREPARATION DU VECTEUR ET DE L'INSERT

Vecteur et insert digérés par les enzymes de restriction :



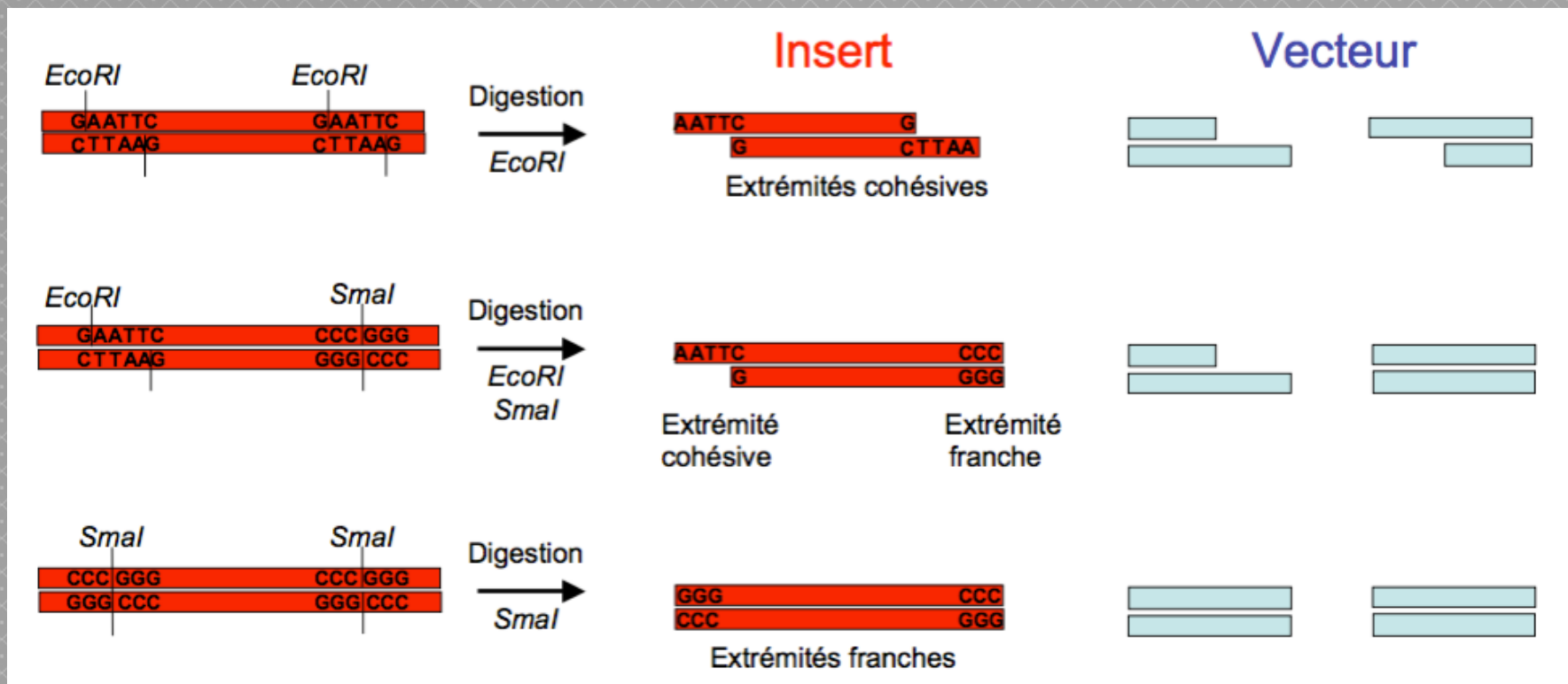
LIGATION

- Ligation du vecteur et de l'insert par la **T4 DNA ligase** (formation d'une **liaison phosphodiester**)



STRATEGIES DE CLONAGE

En fonction des enzymes de restriction :



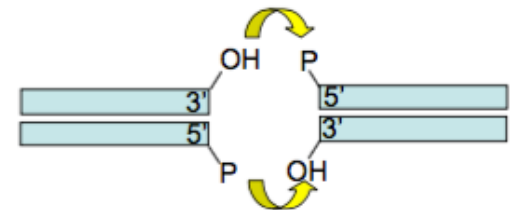
DEPHOSPHORYLATION

- Ligase : Renferme **indifféremment** le vecteur avec ou sans insert
→ Etape de **déphosphorylation** nécessaire avant la ligation de fragments d'ADN clivés par des enzymes de restriction générant des **extrémités franches**



Ligation:
Insert-Vecteur

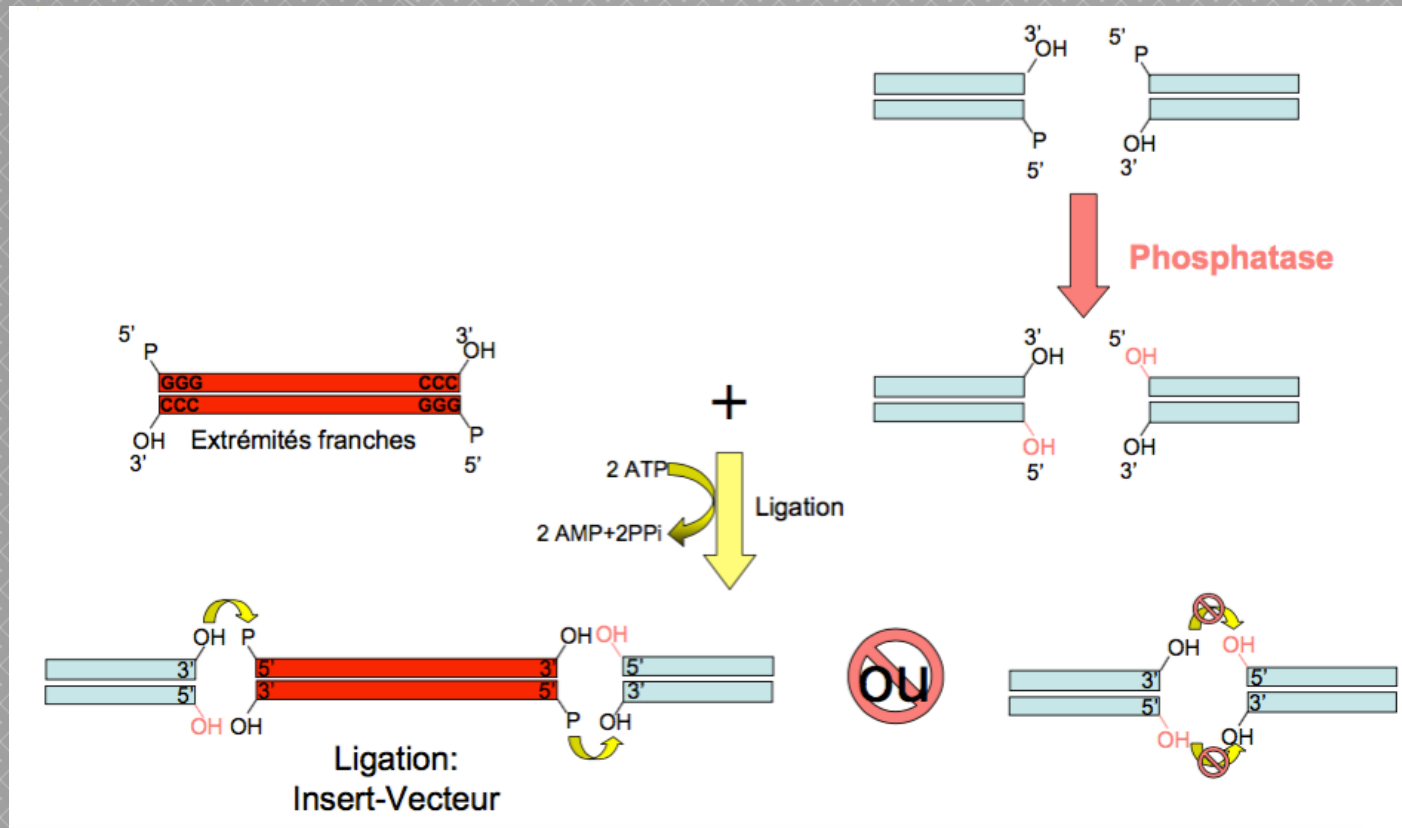
ou



Ligation:
Vecteur sans insert

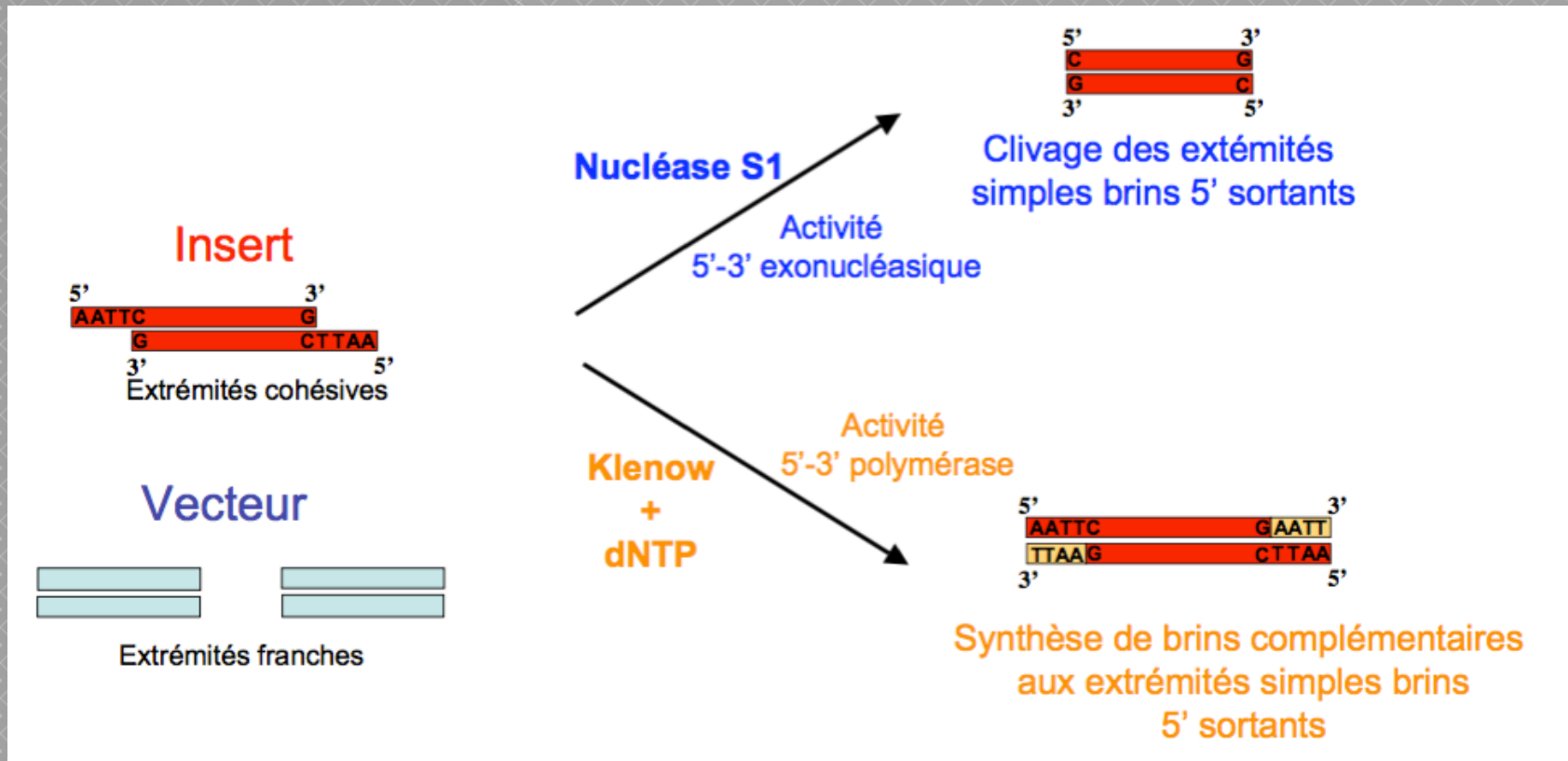
DEPHOSPHORYLATION

- **Phosphatase** = Enzyme catalysant le retrait du phosphate en 5'



STRATEGIES DE CLONAGE

Cas d'un insert à extrémités cohésives et d'un vecteur à extrémités franches :



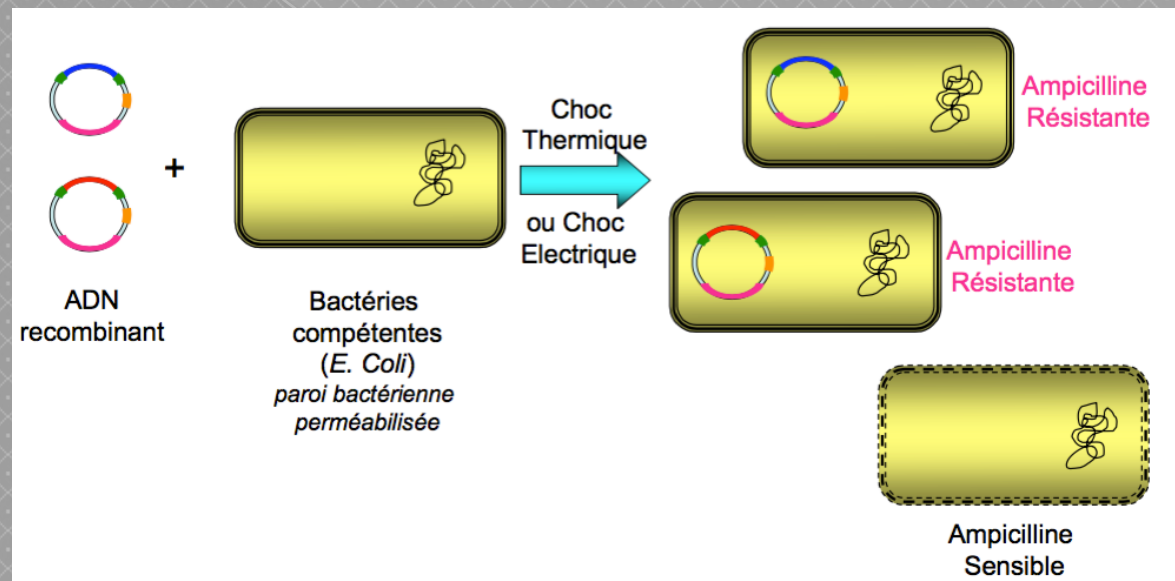
TRANSFORMATION BACTERIENNE

On considère qu'un seul produit PCR a été incorporé dans le vecteur : soit d'origine maternelle, soit d'origine paternelle.

- **Perméabilisation** de la membrane par choc thermique, électrique ou chimique

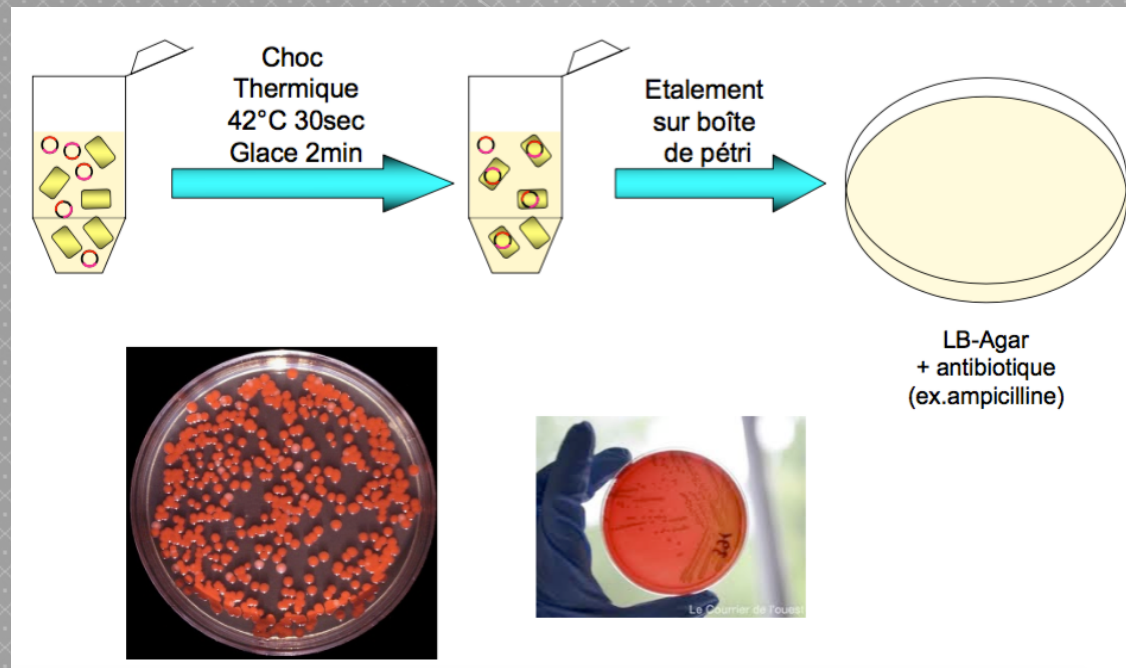
Au final :

- Bactéries avec un seul type d'**ADN recombinant**
- Bactéries **non transformées**



SELECTION BACTERIENNE

- Etalement sur une boîte de pétri contenant une **gélose** (= substance nutritive) et un **antibiotique**
→ Permet de discriminer les bactéries ayant intégré l'ADN recombinant des autres

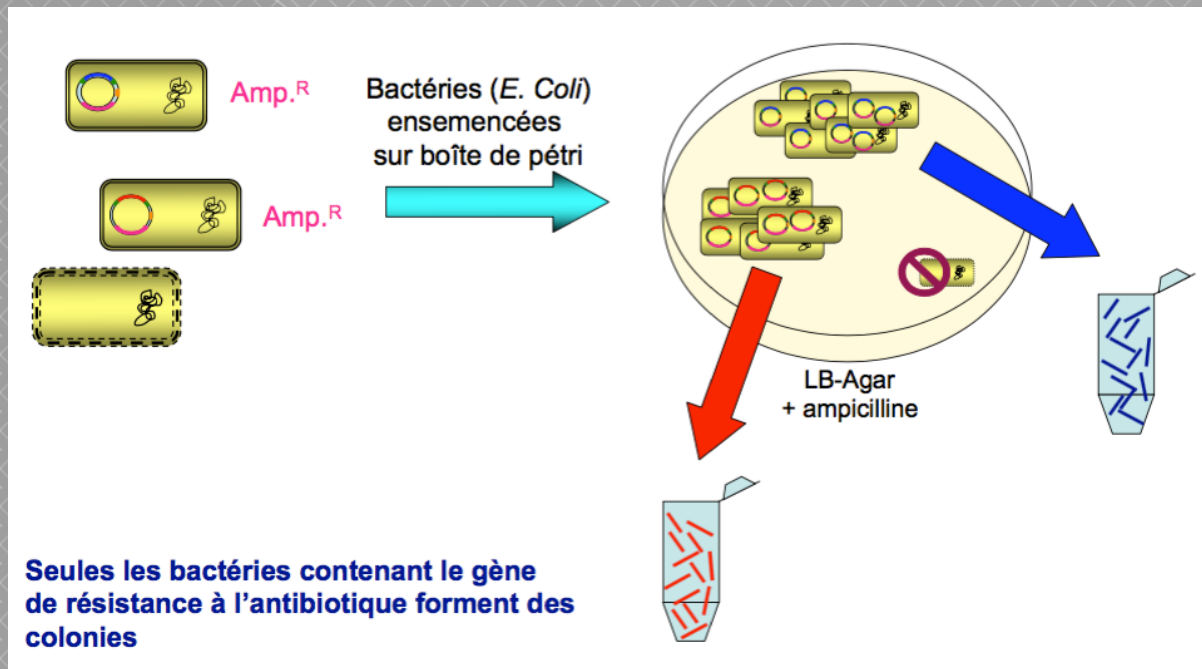


SELECTION BACTERIENNE

- Isolement et amplification des clones bactériens
→ Une colonie provient à l'origine d'une seule bactérie
- Récupération d'une colonie et transfert dans un **milieu liquide** pour l'amplifier → *Idem avec l'autre colonie*

Au final :

- 2 populations d'ADN recombinant différentes isolées



SELECTION BLANC / BLEU

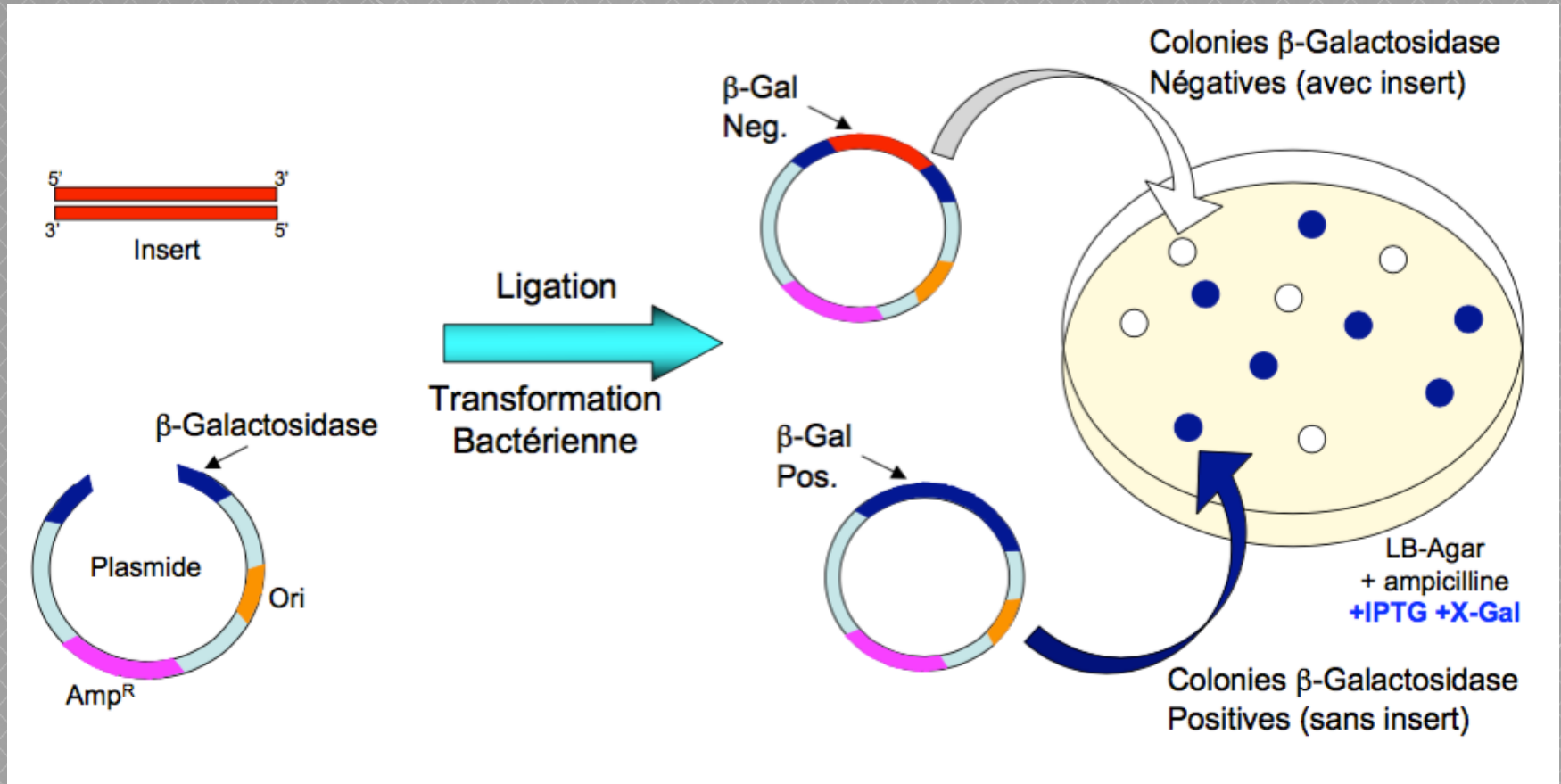
Problème :

- On a **jamais 100% d'insertion de l'insert**
- Certains vecteurs peuvent **se refermer sans l'insert** malgré les phosphatases

Solution : **Sélection blanc / bleu**

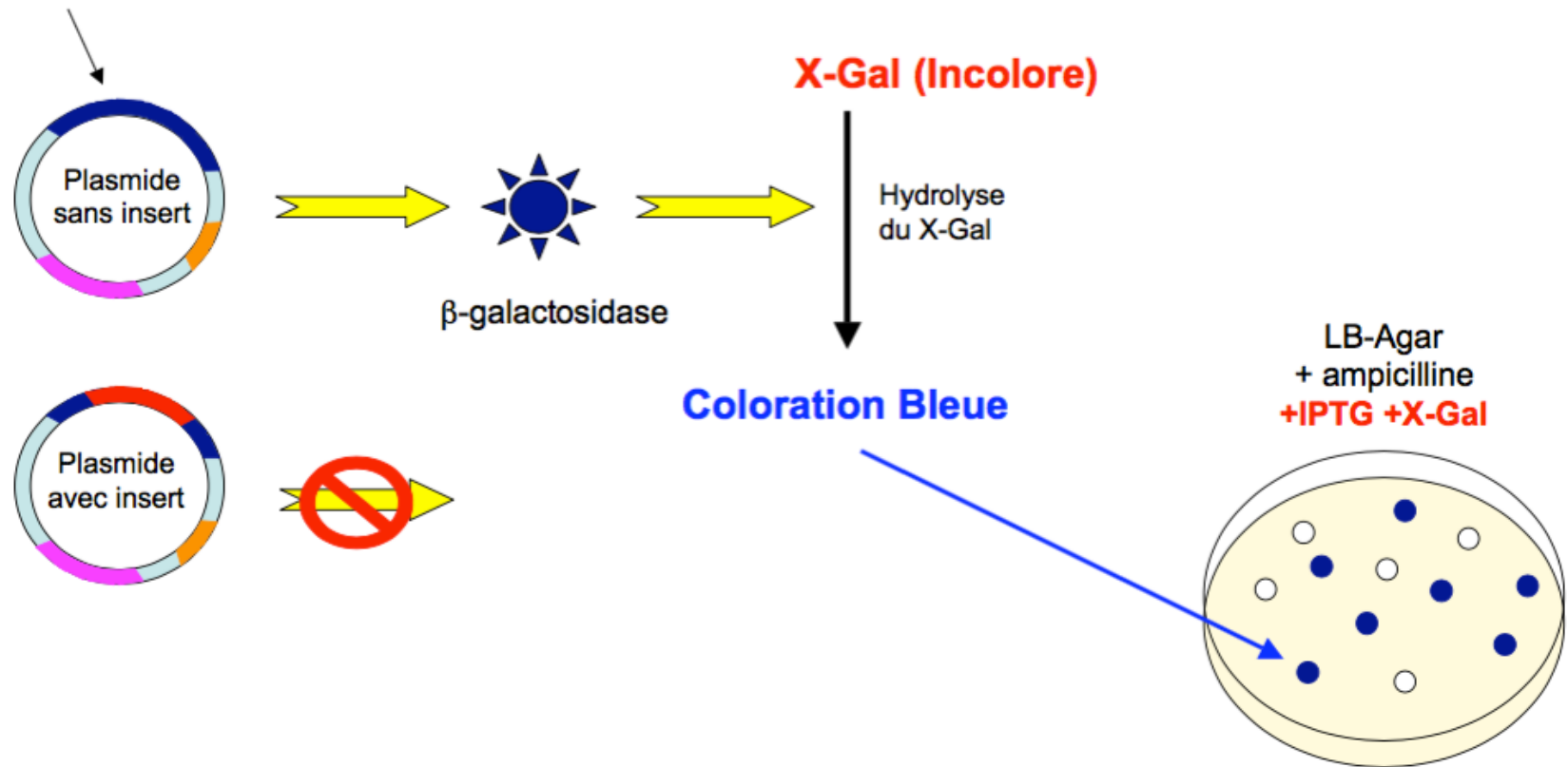
- **Polylinker au milieu d'un gène codant pour la β -Galactosidase**
- Si insertion de l'insert = **Coupure du gène en deux**
→ ***Pas d'expression de la β -Galactosidase***
- Si vecteur refermé sur lui-même = **Gène de l'enzyme fonctionnel**
→ ***Expression de la β -Galactosidase***

SELECTION BLANC / BLEU



SELECTION BLANC / BLEU

IPTG : Induit l'expression de la β -galactosidase

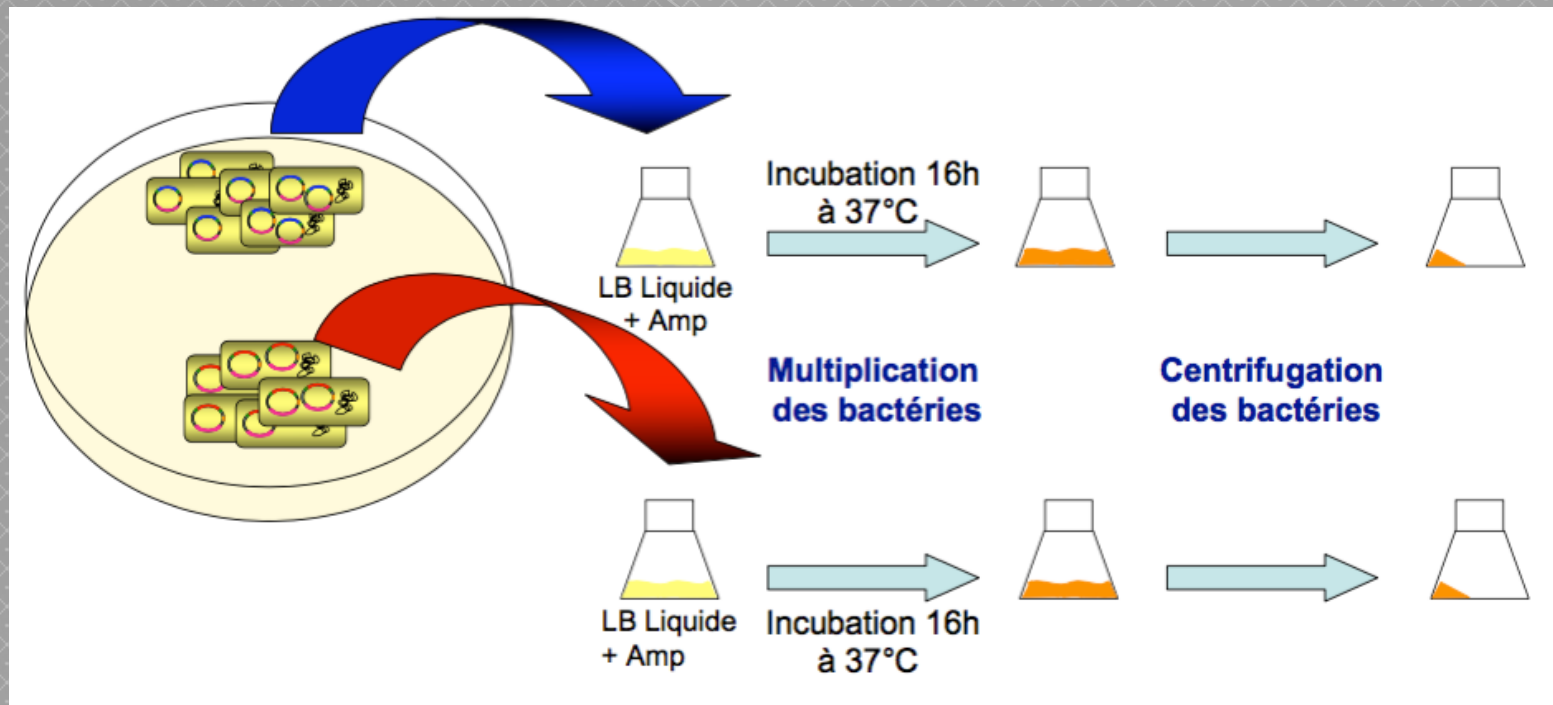


SELECTION BLANC / BLEU

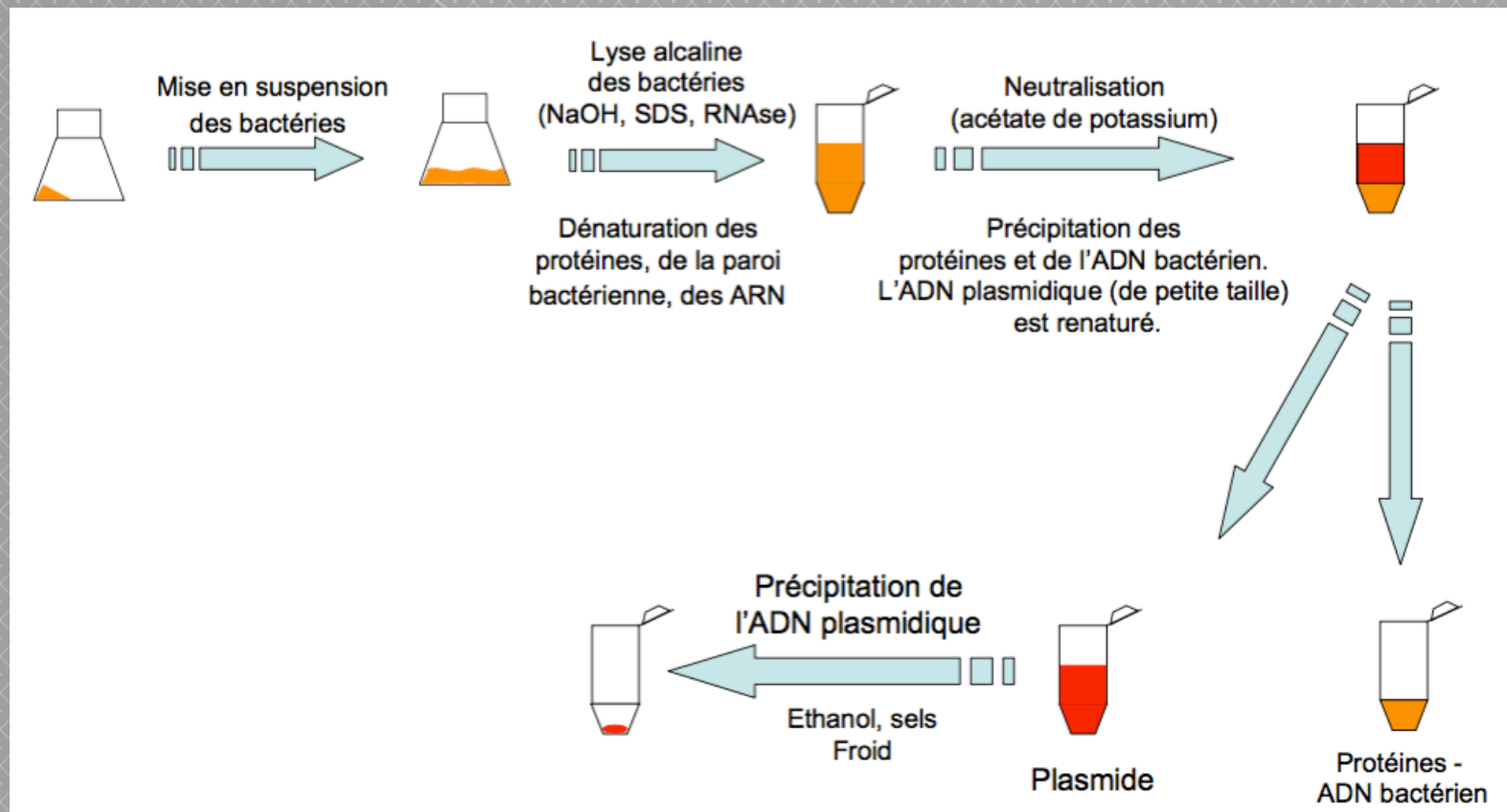
AVEC INSERT	SANS INSERT
Gène β -Galactosidase inactivé	Gène β -Galactosidase fonctionnel
X-Gal incolore non hydrolysé	X-Gal hydrolysé colorant le milieu en bleu
COLONIES BLANCHES	COLONIES BLEUES

AMPLIFICATION CLONALE

- Colonie mise en culture dans un **milieu liquide** de culture adapté à la croissance bactérienne
- Amplification des différentes populations pour **récupérer l'ADN et le séquencer**



EXTRACTION DE L'ADN RECOMBINANT



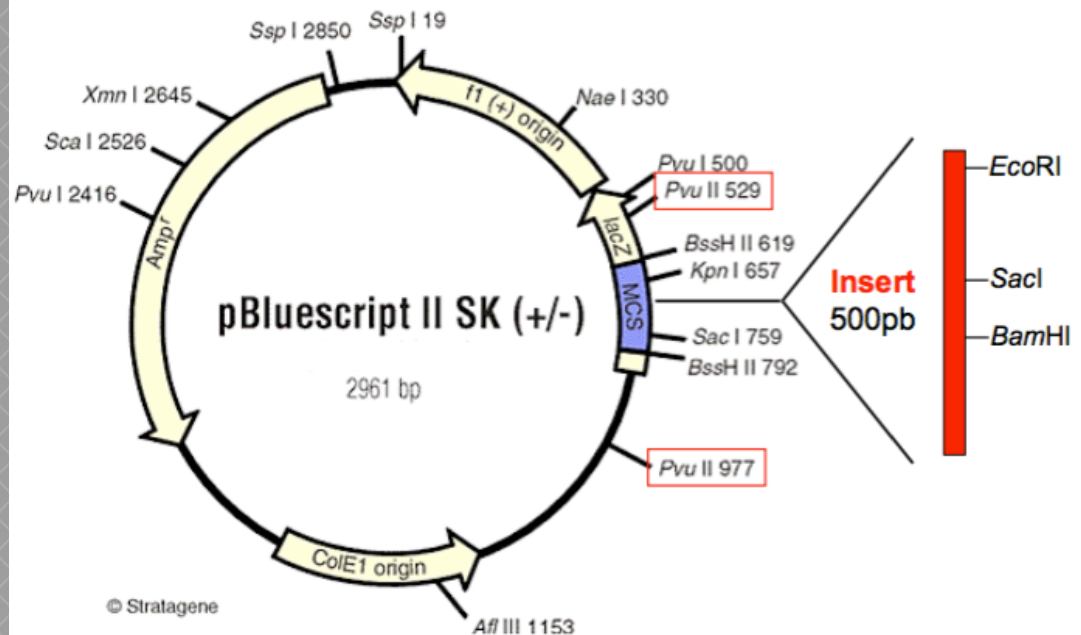
CARTES DE RESTRICTION

- Séquences de vecteurs que l'on connaît parfaitement
- **MCS** = Site de multiclونage = Polylinker

Objectif :

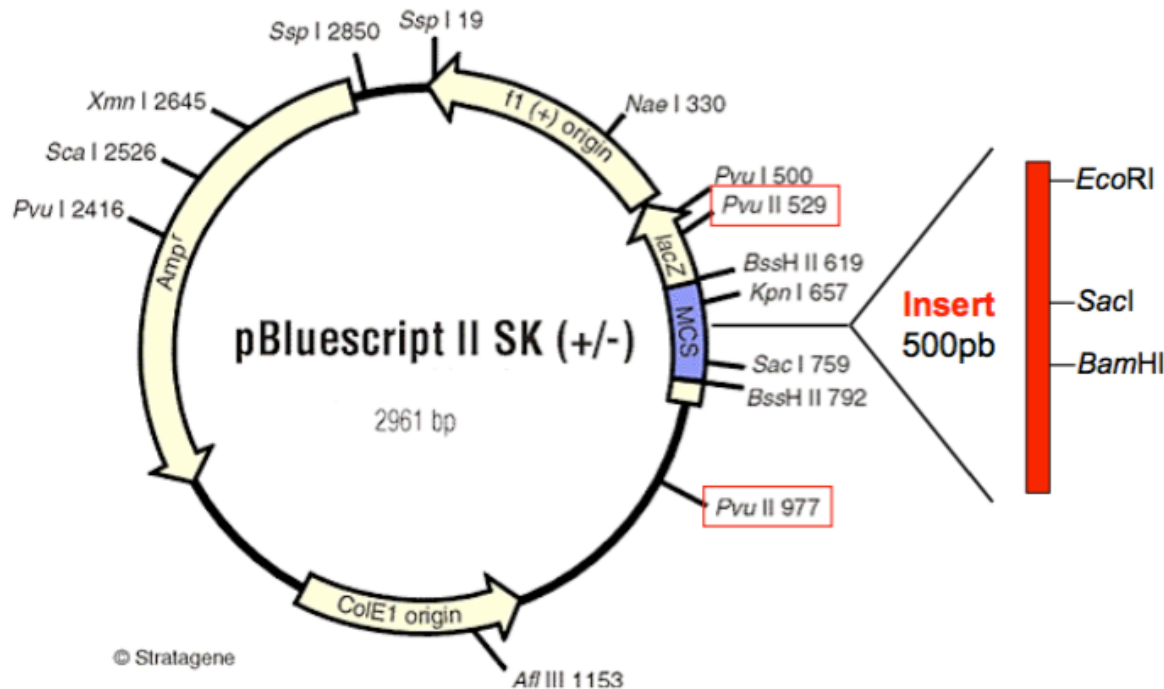
- Vérifier que le plasmide contient l'insert

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



CARTES DE RESTRICTION

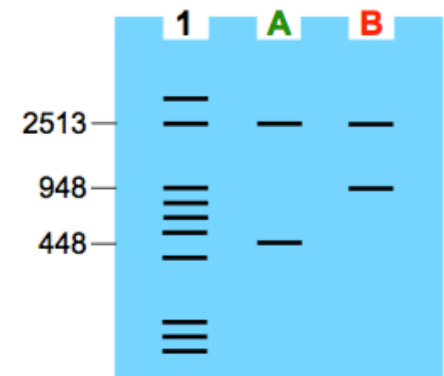
Les ADN recombinants purifiés sont analysés par digestion enzymatique: réalisation de sa carte de restriction.



Digestion *PvuII*:

A- Plasmide sans insert:
 $977-529 = 448 \text{ bp}$

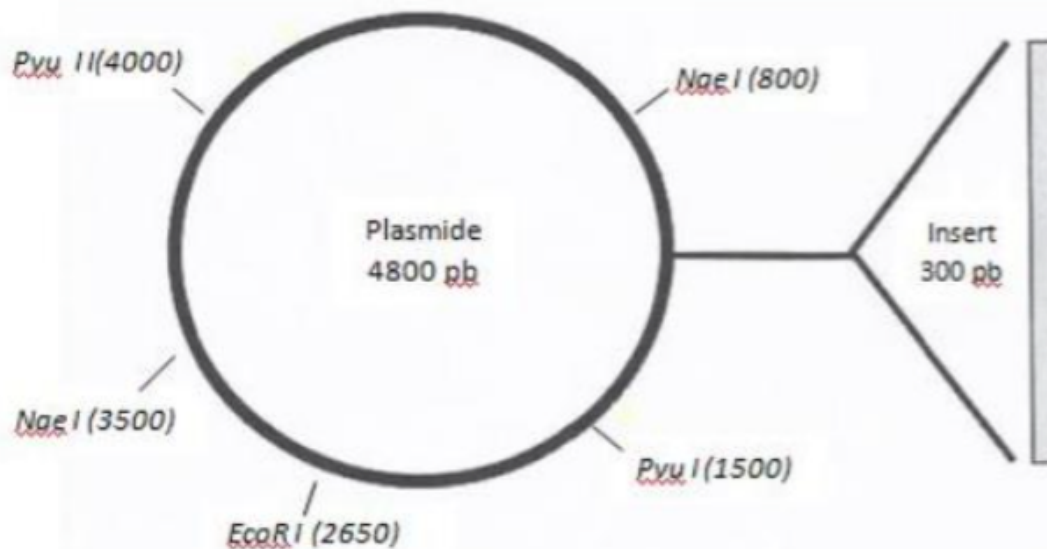
B- Plasmide avec insert:
 $977-529 = 448 \text{ bp}$
 $+ 500 \text{ bp} = 948 \text{ bp}$



1- Marqueur de taille

CARTES DE RESTRICTION

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

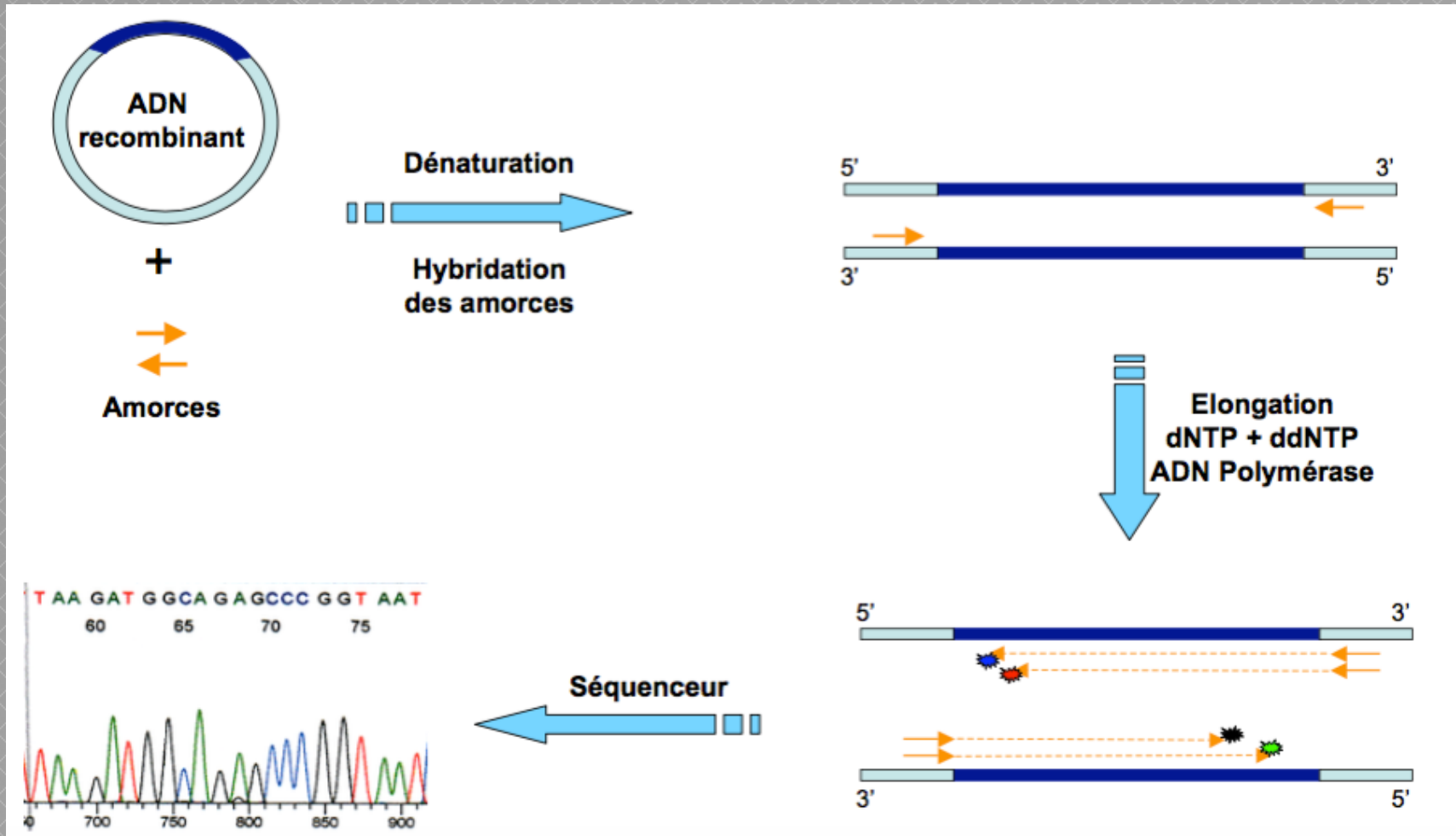
E

Correction :

Plasmide avec insert : 3000pb + 2100pb

Plasmide sans insert : 2700pb + 2100pb

VERIFICATION PAR SEQUENCAGE



VERIFICATION PAR SEQUENCAGE

Avant le clonage :

- Séquençage illisible à cause de la superposition de l'allèle sauvage et du variant d'épissage

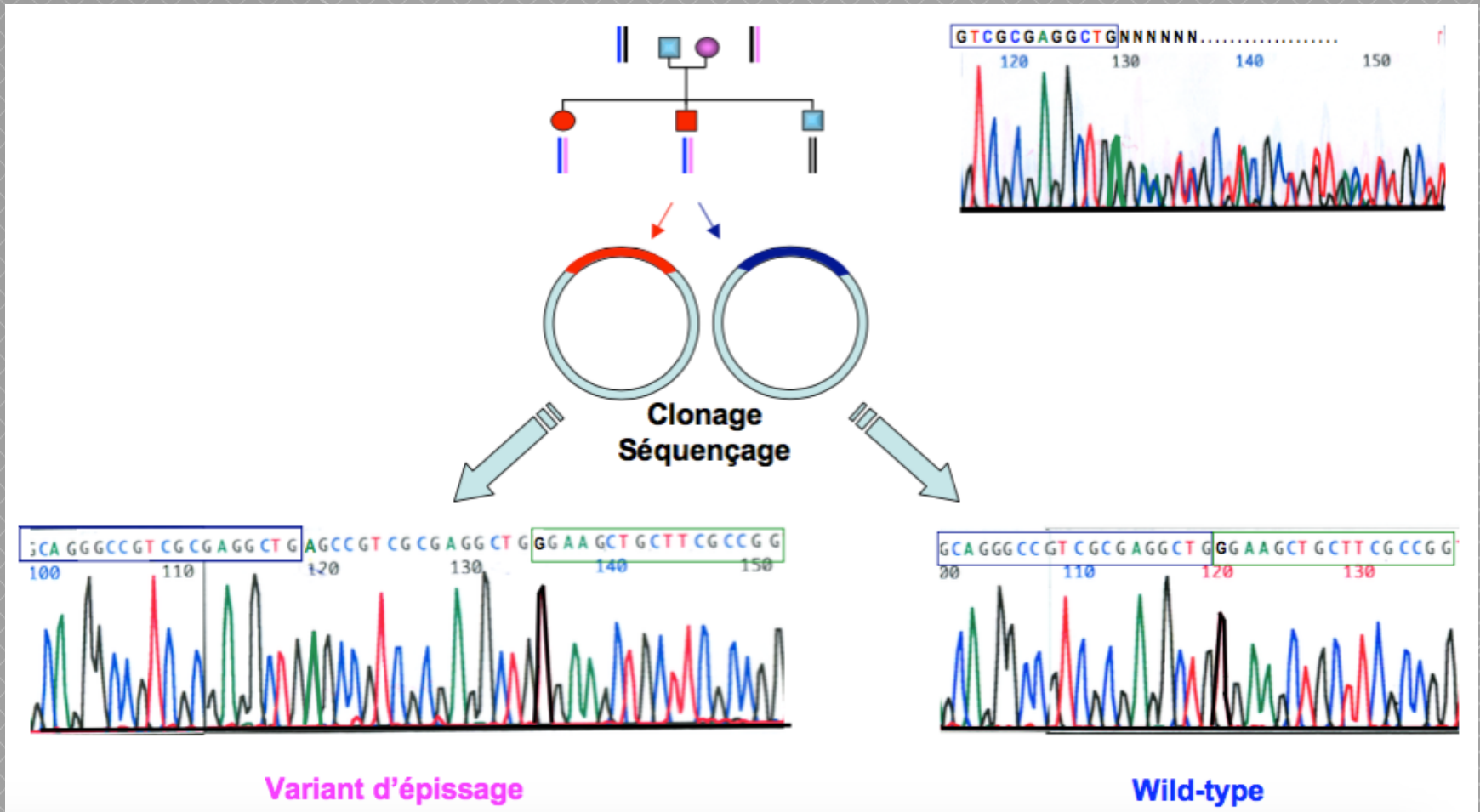
Après le clonage :

- Séparation des 2 produits PCR
- Identification très claire de la partie de l'intron ajouté (= variant d'épissage) impactant sur l'ARNm

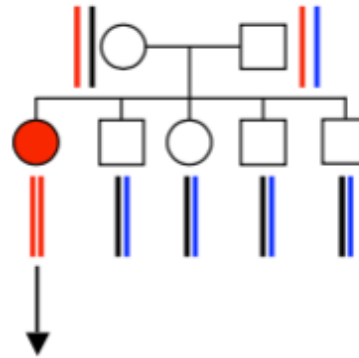
Conclusion :

- **Une mutation dans une région intronique peut avoir un impact sur la protéine.**

VERIFICATION PAR SEQUENCAGE



PATHOGENICITE D'UNE MUTATION



**Identification d'un variant
exonique inconnu dans un gène**

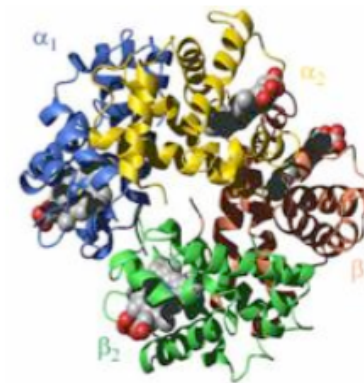
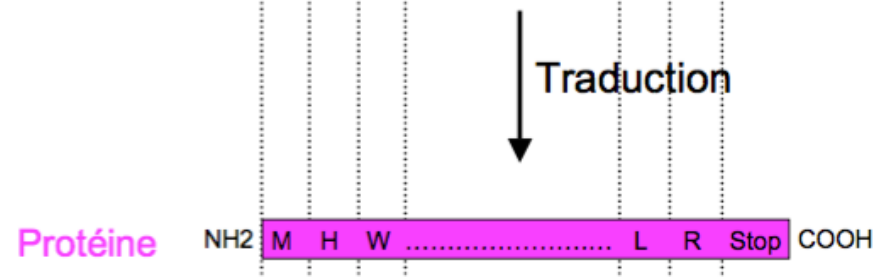
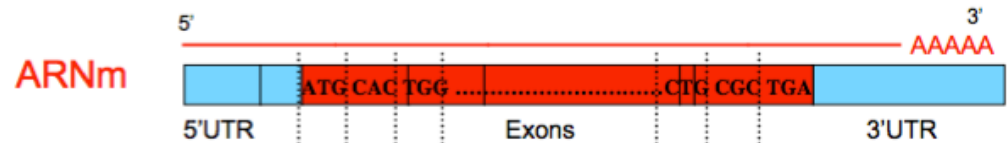
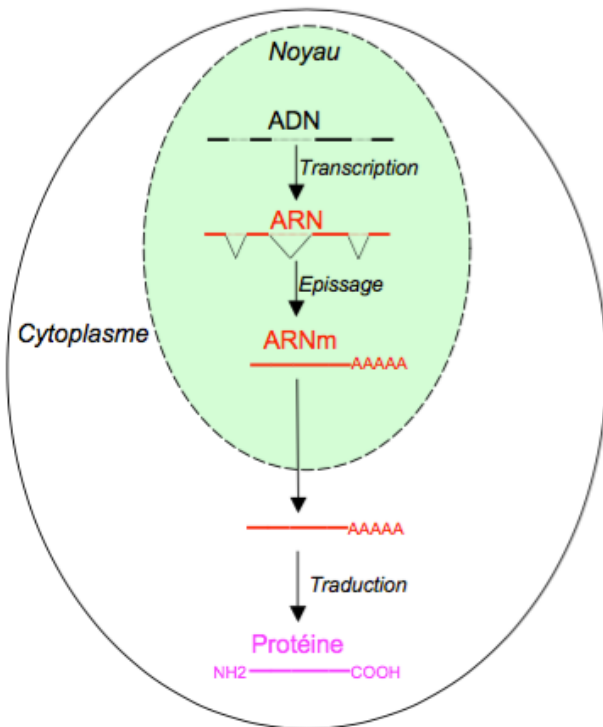
**Quel est le caractère pathogène
de ce nouveau variant ???**

Etude de la protéine mutante:

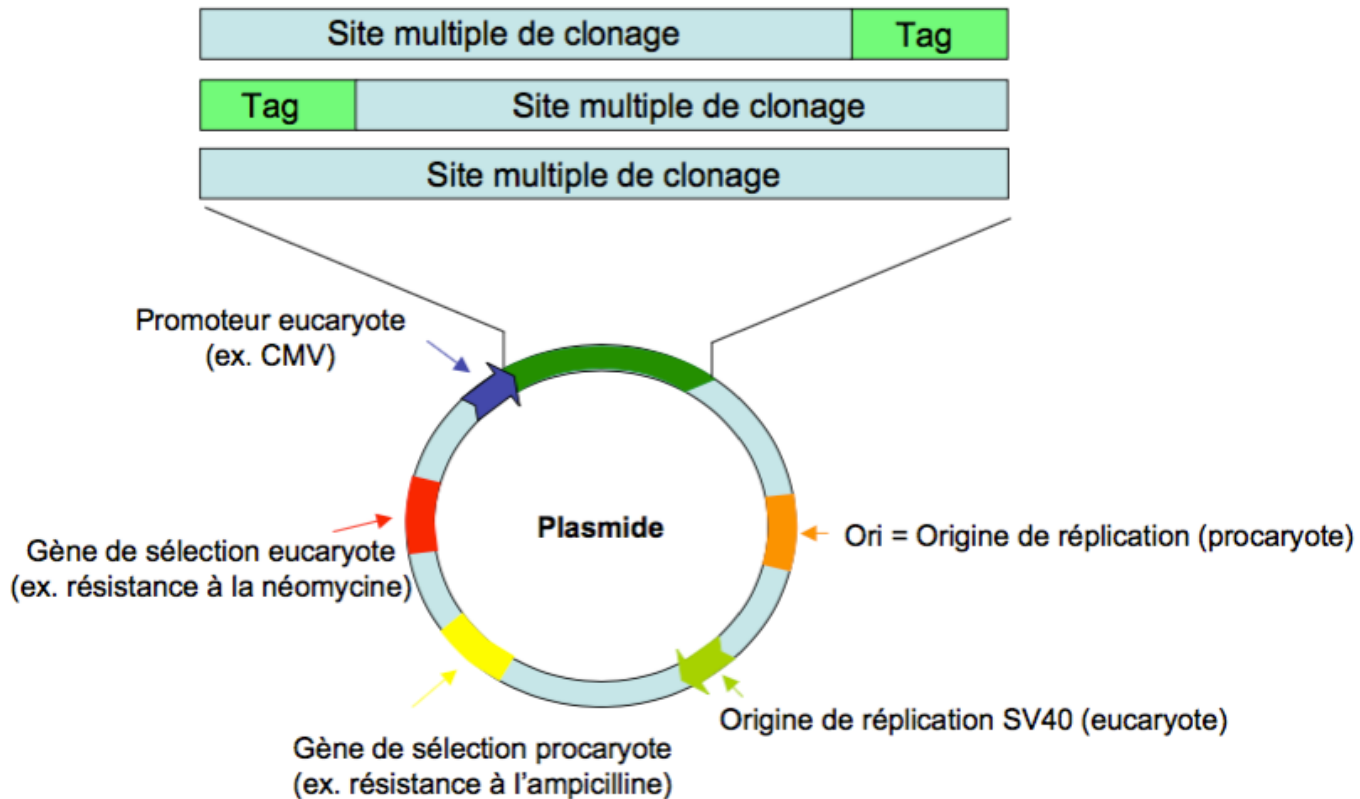
- Clonage d'expression
- Etude d'expression (ARNm, protéine)
- Tests fonctionnels

CLONAGE D'EXPRESSION

Quelques rappels :



VECTEURS D'EXPRESSION EUCARYOTES



PROTEINES DE FUSION

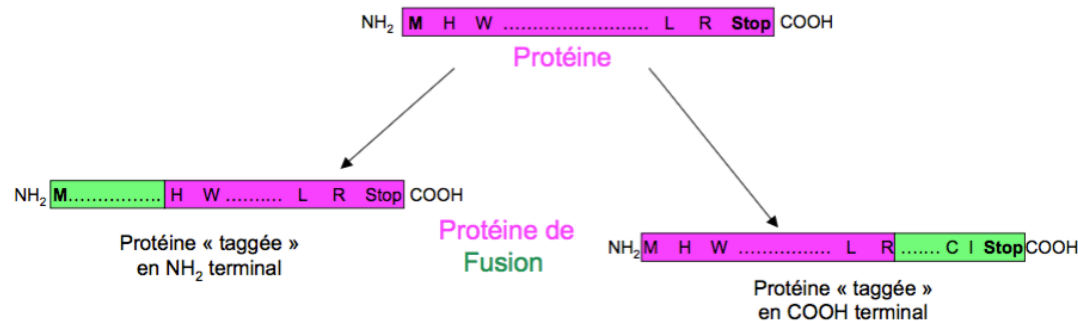
- Une fois la protéine surexprimée, il faut pouvoir la suivre :
 - Soit il existe déjà des **anticorps**
 - Soit il faut utiliser des « **étiquettes** » ou « **Tag** »
- Etiquettes = Répétitions de petites séquences bien définies que l'on greffe **en C-term ou N-term de la protéine**
- Ces « Tag » peuvent :
 - Soit être **reconnu par un anticorps**
 - Soit être **fluorescent**

PROTEINES DE FUSION

Comment greffer une étiquette ?

- En **N-terminal** :
 - Couper le codon ATG
 - Avoir une étiquette commençant par ATG
- En **C-terminal** :
 - Enlever le codon Stop
 - Avoir une étiquette avec un codon Stop

Protéine de Fusion = cDNA d'intérêt + étiquette (« Tag »).



TRANSFECTION DES CELLULES EUCARYOTES

- ◉ Faire rentrer l'ADN recombinant dans une cellule eucaryote
- ◉ Plusieurs méthodes :
 - ◉ Méthodes **chimiques** (*les plus utilisées*) : *Phosphate de sodium, liposome*
 - ◉ Méthodes **physiques** : *Electroporation*
 - ◉ Utilisation de **particules virales**

ETUDES D'EXPRESSION

- Après transfection dans des cellules eucaryotes, **analyse de l'expression du gène d'intérêt** portant la mutation à étudier :
 - Etude au niveau de l'ARN :
Expression → Northern-Blot
 - Etude au niveau de la protéine :
Expression → Western-Blot
Localisation intracellulaire → Immunofluorescence

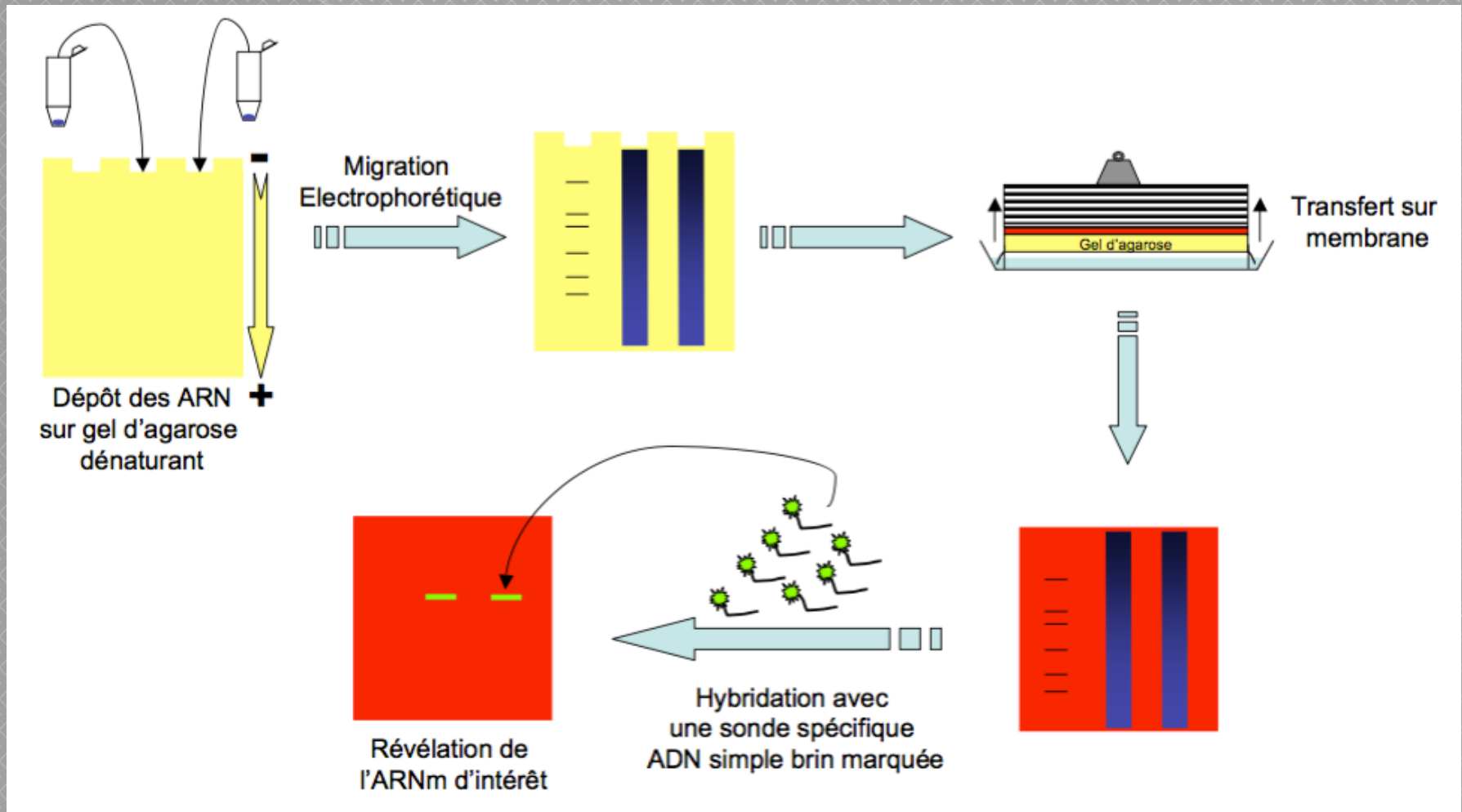
ETUDES D'EXPRESSION DES ARN

- ◉ **Northern-Blot** = Technique équivalente à celle du Southern-Blot mais pour les **ARN**

Technique :

- ◉ Lyse des cellules / tissus et purification des ARN
- ◉ Séparation des ARN en fonction de leur taille, sur un **gel d'agarose dénaturant** par migration électrophorétique
- ◉ Transfert des ARN sur une membrane
- ◉ Révélation des ARN d'intérêt après **hybridation d'une sonde complémentaire marquée**

NORTHERN-BLOT



EXTRACTION DES ARN

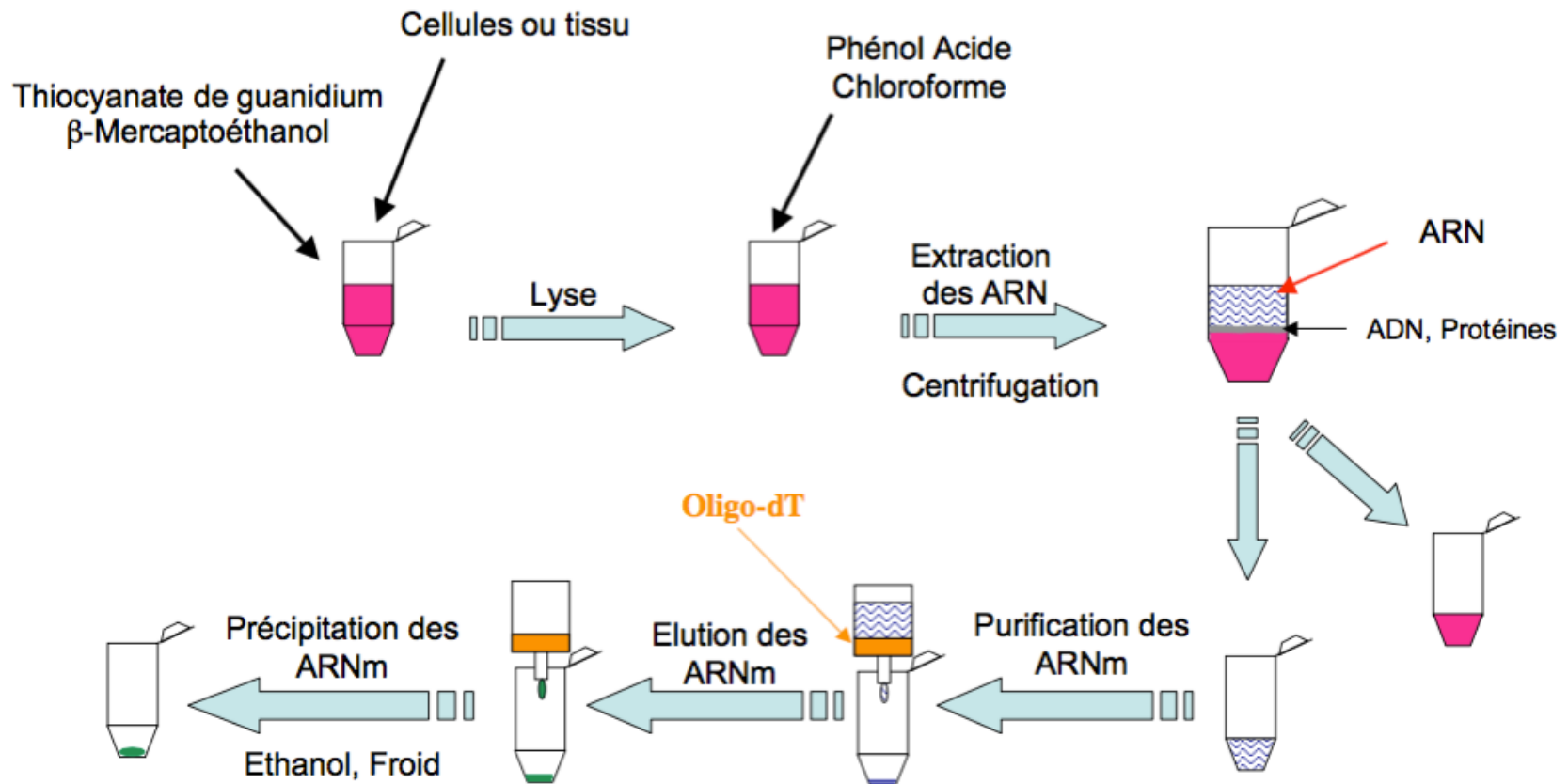
Technique :

- ◉ Lyse des cellules en présence de Thiocyanate de guanidium + inhibiteur de ribonucléase (β -mercaptoéthanol)
- ◉ Extraction des ARN par ajout de phénol acide, de chloroforme et centrifugation à froid à haute vitesse

La séparation des ARN et des ADN repose sur une précipitation différentielle en fonction du pH : en condition acide, les ARN restent en solution aqueuse, l'ADN et les protéines se trouvent à l'interphase.

- ◉ Précipitation des ARN par ajout d'éthanol absolu à froid

EXTRACTION DES ARN



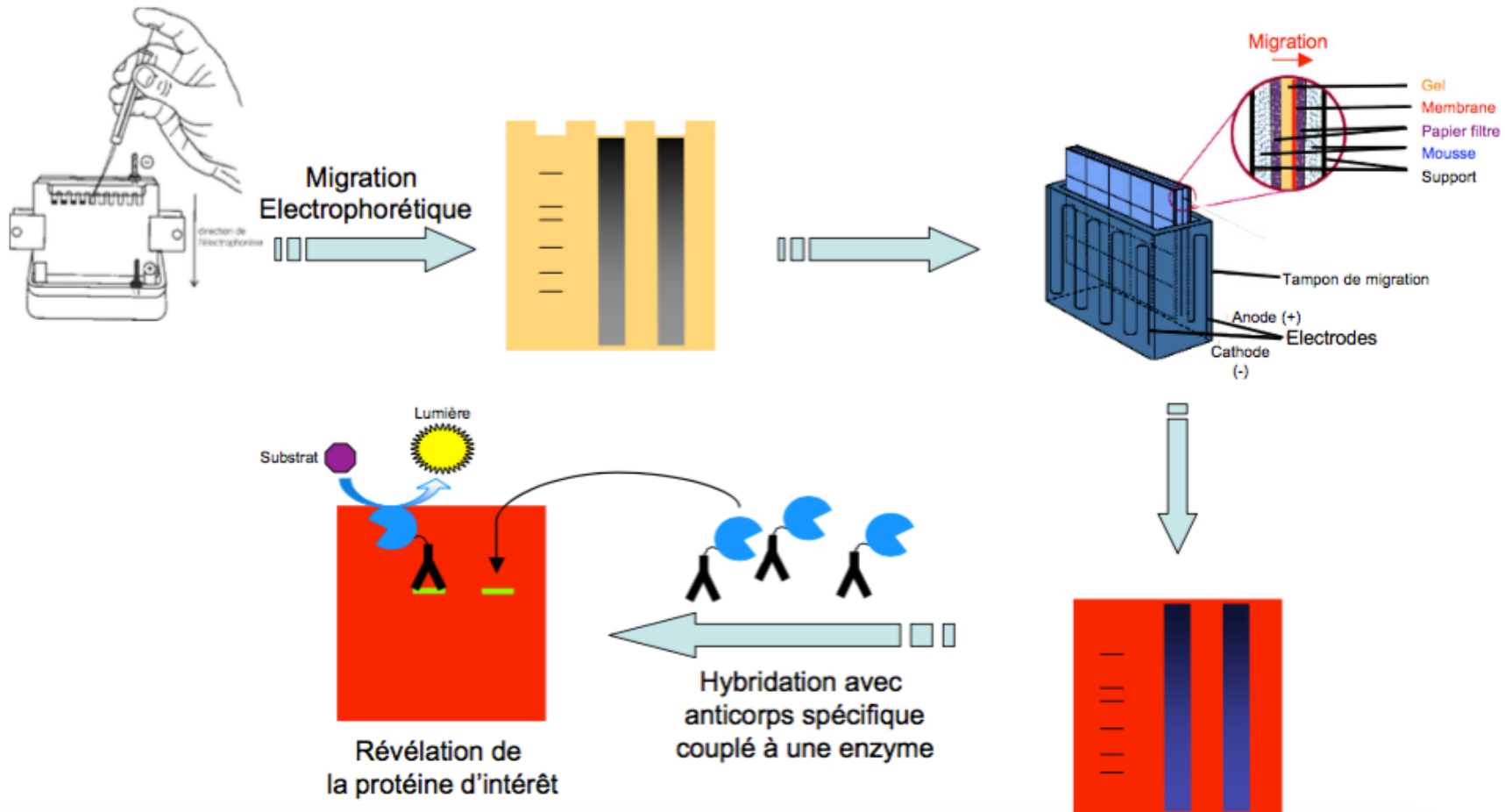
ETUDES D'EXPRESSION DES PROTEINES

- ◉ **Western-Blot** = Technique équivalente à celle du Southern-Blot ou du Northern-Blot mais pour les **PROTEINES**

Technique :

- ◉ Lyse des cellules / tissus et dénaturation des protéines purifiées
- ◉ Séparation des protéines en fonction de leur masse, sur un **gel d'acrylamide dénaturant**
- ◉ Transfert des protéines sur une membrane
- ◉ Révélation de la protéine d'intérêt grâce à un **anticorps spécifique**

WESTERN-BLOT



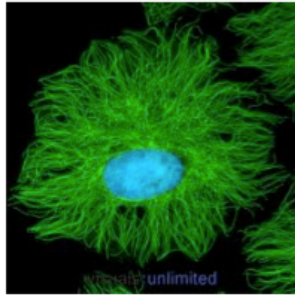
ETUDES DE LA LOCALISATION DES PROTEINES

- **Immunofluorescence** = Technique permettant de visualiser les protéines directement au niveau de la cellule

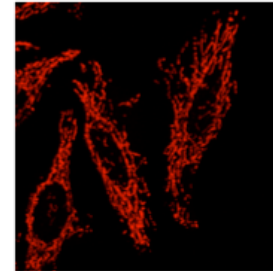
Technique :

- Transfection des cellules,ensemencées sur une lamelle en verre, avec le plasmide d'intérêt
- Fixation et perméabilisation des cellules
- Les protéines sont :
 - Soit visualisées directement en **microscopie à fluorescence** (protéines avec un « Tag » GFP)
 - Soit révélées et visualisées après **fixation d'un anticorps couplé à un marqueur fluorescent**

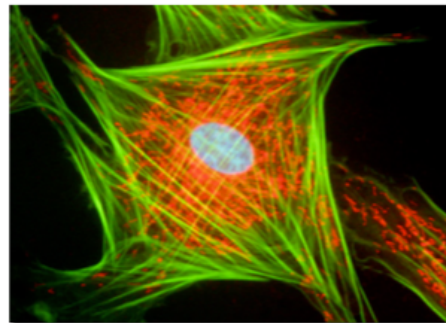
ETUDES DE LA LOCALISATION DES PROTEINES



Marquage :
Réseau des filaments de tubuline (Vert)
Noyau (Bleu)



Marquage :
Réseau des mitochondries (Rouge)



PCR EN TEMPS REEL

- PCR en temps réel = **PCR quantitative**
- Méthode particulière de réaction d'amplification en chaîne par la polymérase permettant de **mesurer la quantité initiale d'ADN**

Application :

- **Quantifier la charge virale** → *Diagnostic des maladies infectieuses*
- **Déterminer le nombre de copies d'un gène** → *Pathologies où c'est la variation de ce nombre qui est responsable*

PCR EN TEMPS REEL

Repose sur le même principe que la PCR classique (= **PCR qualitatif**)

Différences avec la PCR classique :

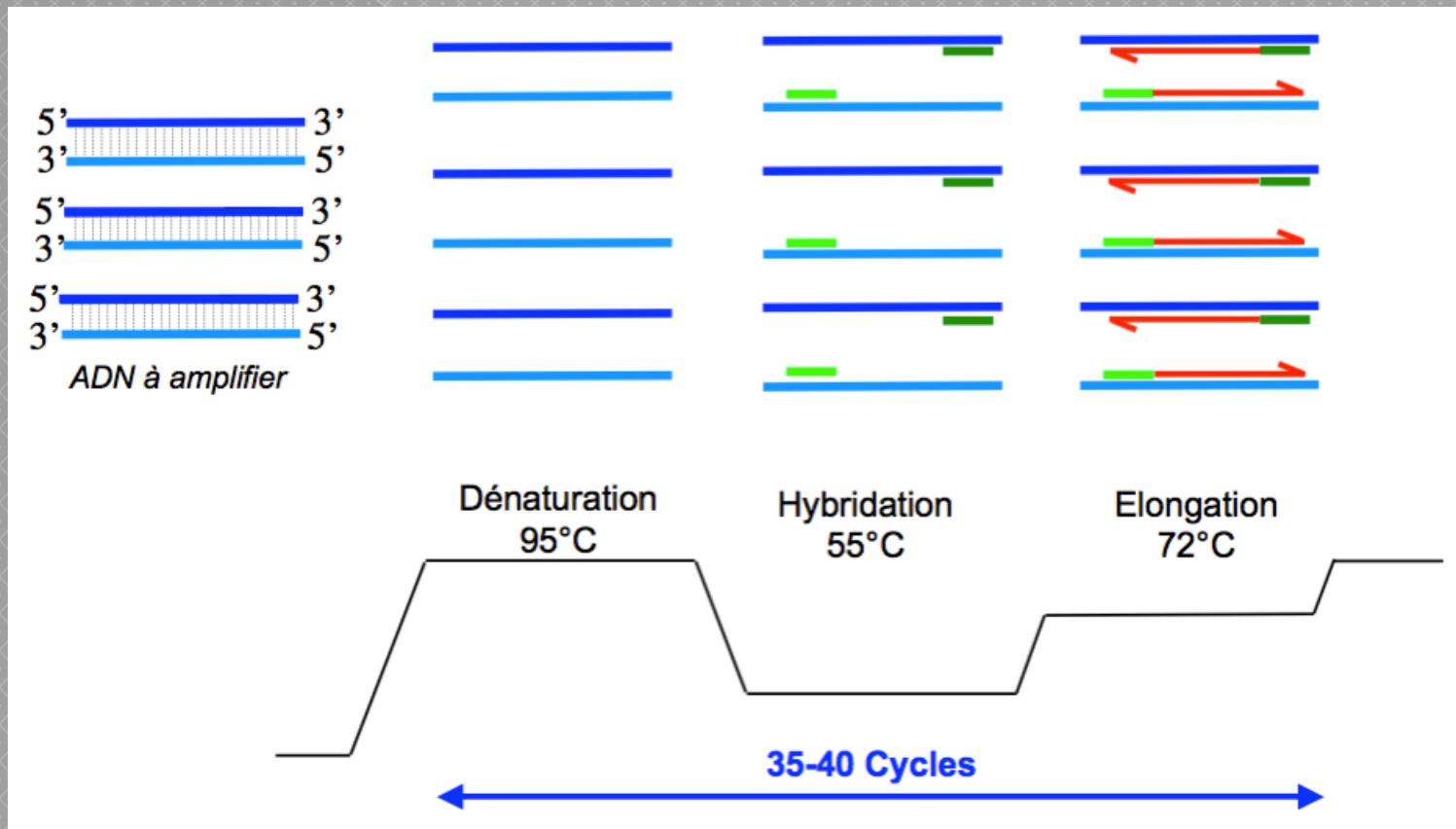
- Mesure de la fluorescence **directement après chaque cycle**
- Agent intercalant utilisé : BET vs **SYBR Green**

PCR classique :

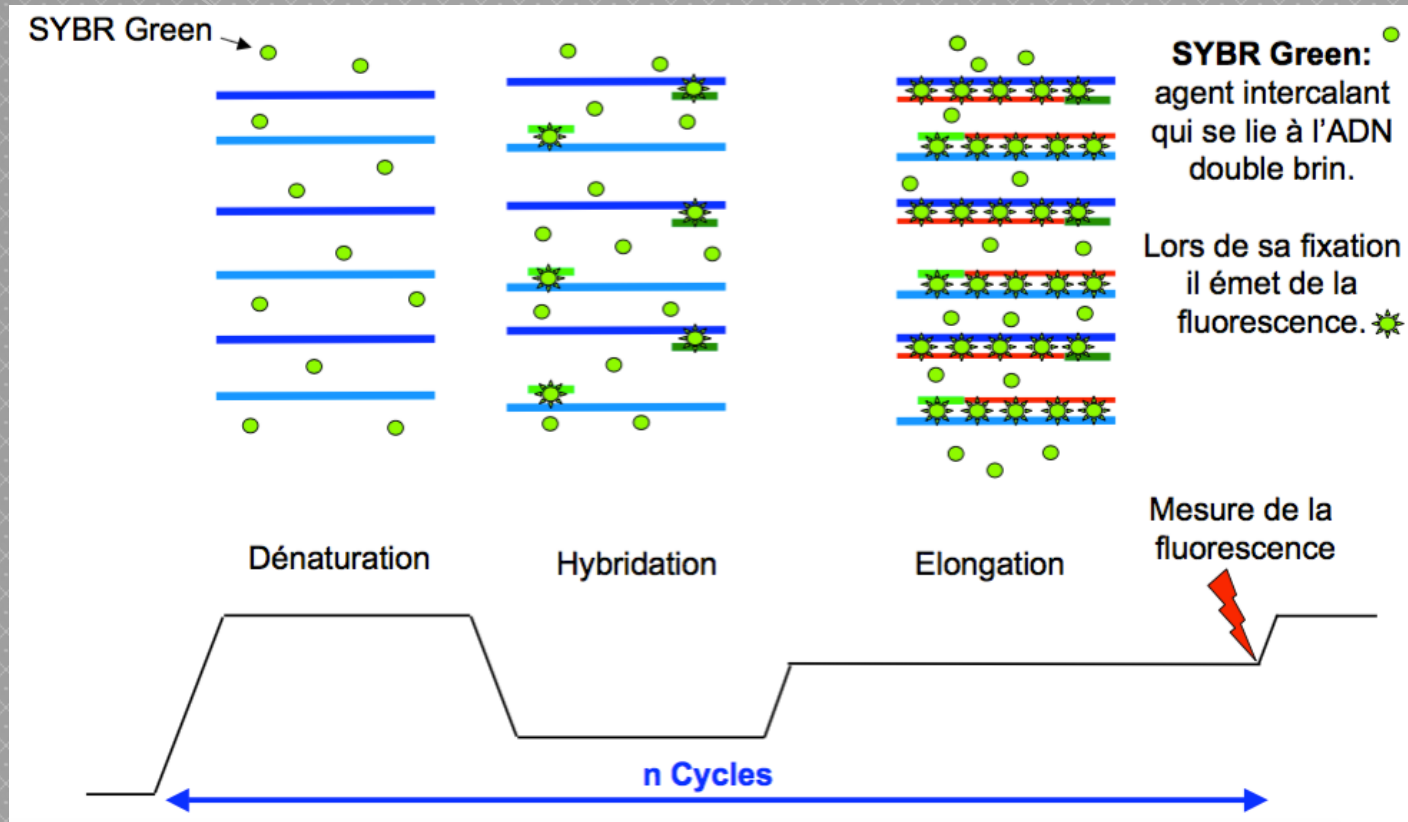
- Mesure de la quantité d'ADN qu'**après 35-40 cycles**
- Migration sur gel d'agarose ou d'acrylamide (sous lumière UV après une coloration BET)

PCR EN TEMPS REEL

Etapes de la PCR (rappel) :



PCR EN TEMPS REEL



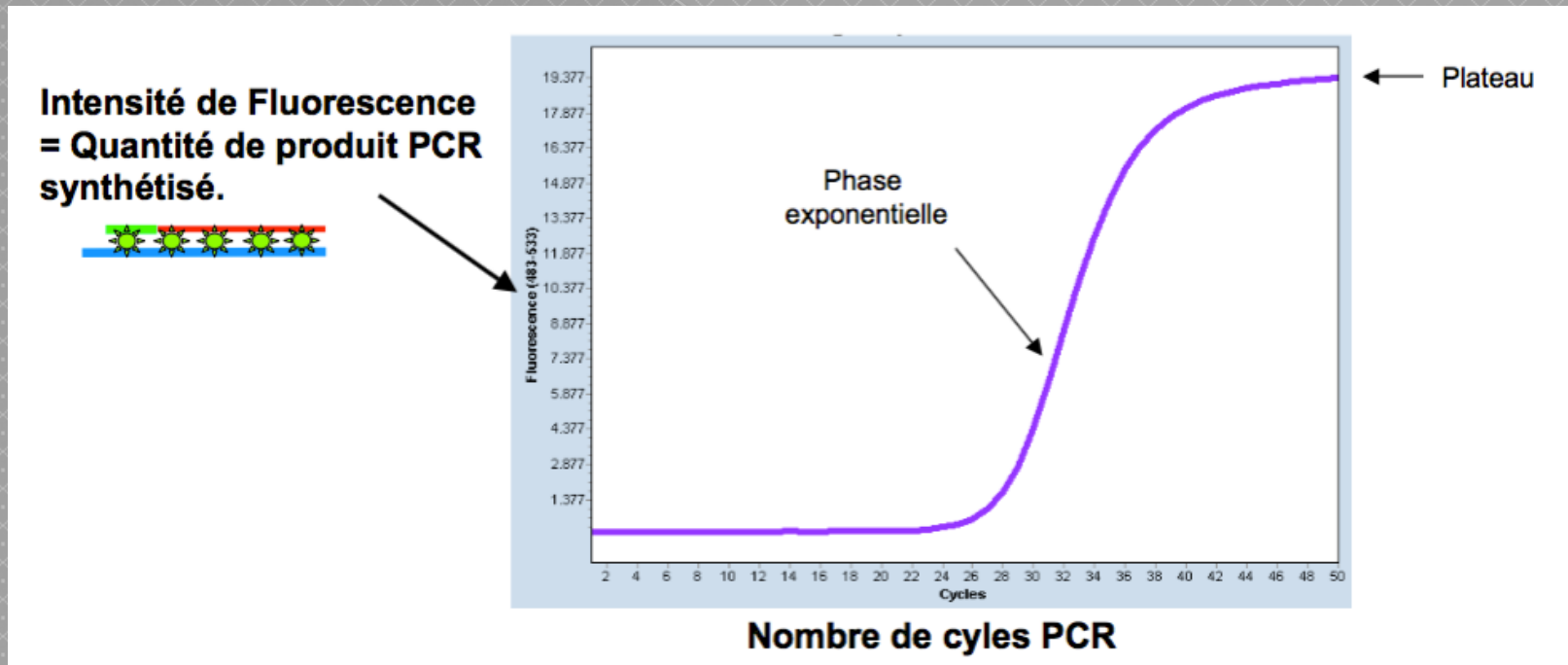
L'intensité de la fluorescence est représentative de la quantité de produit PCR généré.

PCR EN TEMPS REEL

- A l'étape de dénaturation :
ADN sous forme simple brin → Pas d'intercalation du SYBR Green → Pas de fluorescence
- Au moment de l'élongation :
Intercalation du SYBR Green → Fluorescence
- Thermocycleur : Lit en temps réel la production de fluorescence après chaque cycle, c'est-à-dire à la fin de chaque étape d'élongation
→ Quantité de fluorescence **proportionnelle** à la quantité d'ADN double brin généré

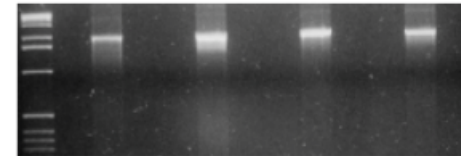
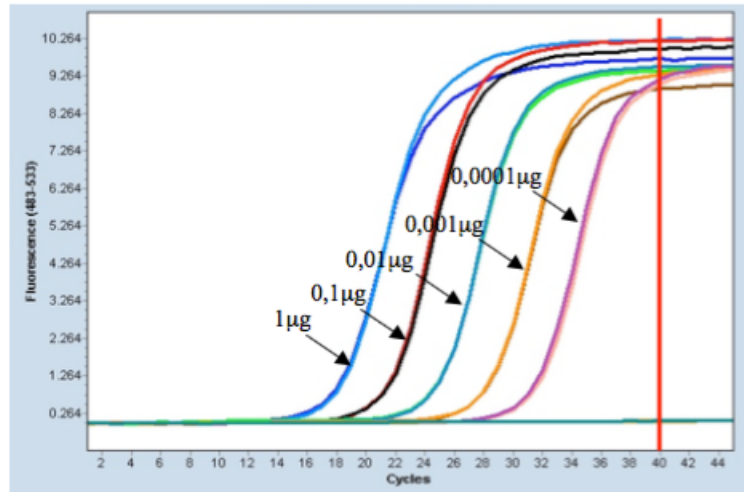
PCR EN TEMPS REEL

- Phase de plateau au départ : Pas assez d'ADN double brin produit pour que le système puisse lire la fluorescence
- Point d'inflexion : Varie en fonction de la quantité d'ADN génomique au départ



PCR EN TEMPS REEL

- Plus on a d'ADN au départ, moins il faudra de cycles pour commencer à observer une fluorescence → **Point d'inflexion plus tôt**
- L'appareil va mesurer le point d'inflexion et déterminer le **cycle seuil Ct** = Nombre de cycles qu'il faut pour commencer à voir une fluorescence

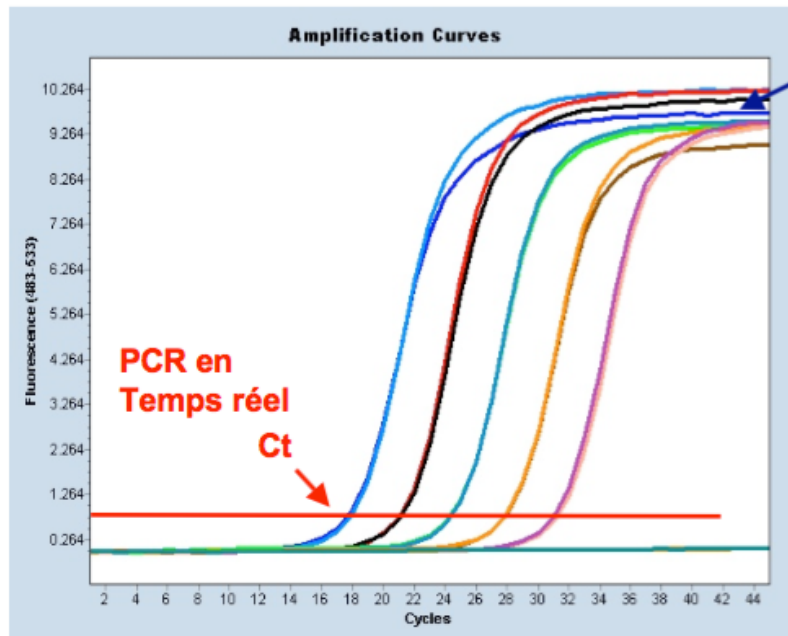


**Produits PCR
40 cycles**

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

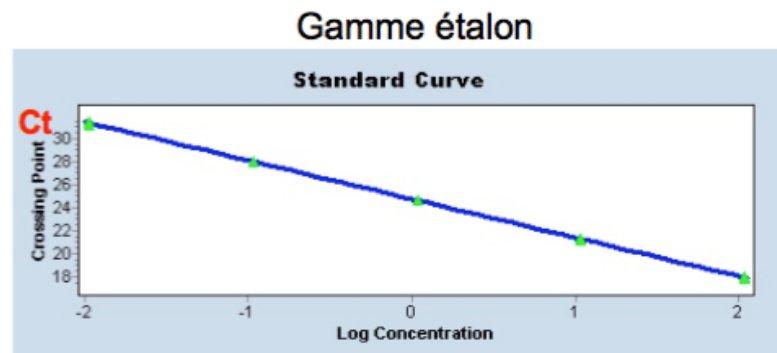
PCR EN TEMPS REEL

- Grace 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

SONDES TAQMAN

- **Sonde TaqMan** : Utilisée dans la seconde grande technique de PCR en temps réel

Principe :

- Rajout dans le milieu de réaction d'une troisième sonde = **sonde Taqman** (avec un **quencher** et un **fluorophore** en 5' et en 3')
- Positionnement de la sonde sur le brin d'ADN
- La proximité du quencher et du fluorophore éteint la fluorescence → **Aucune fluorescence au départ**



SONDES TAQMAN

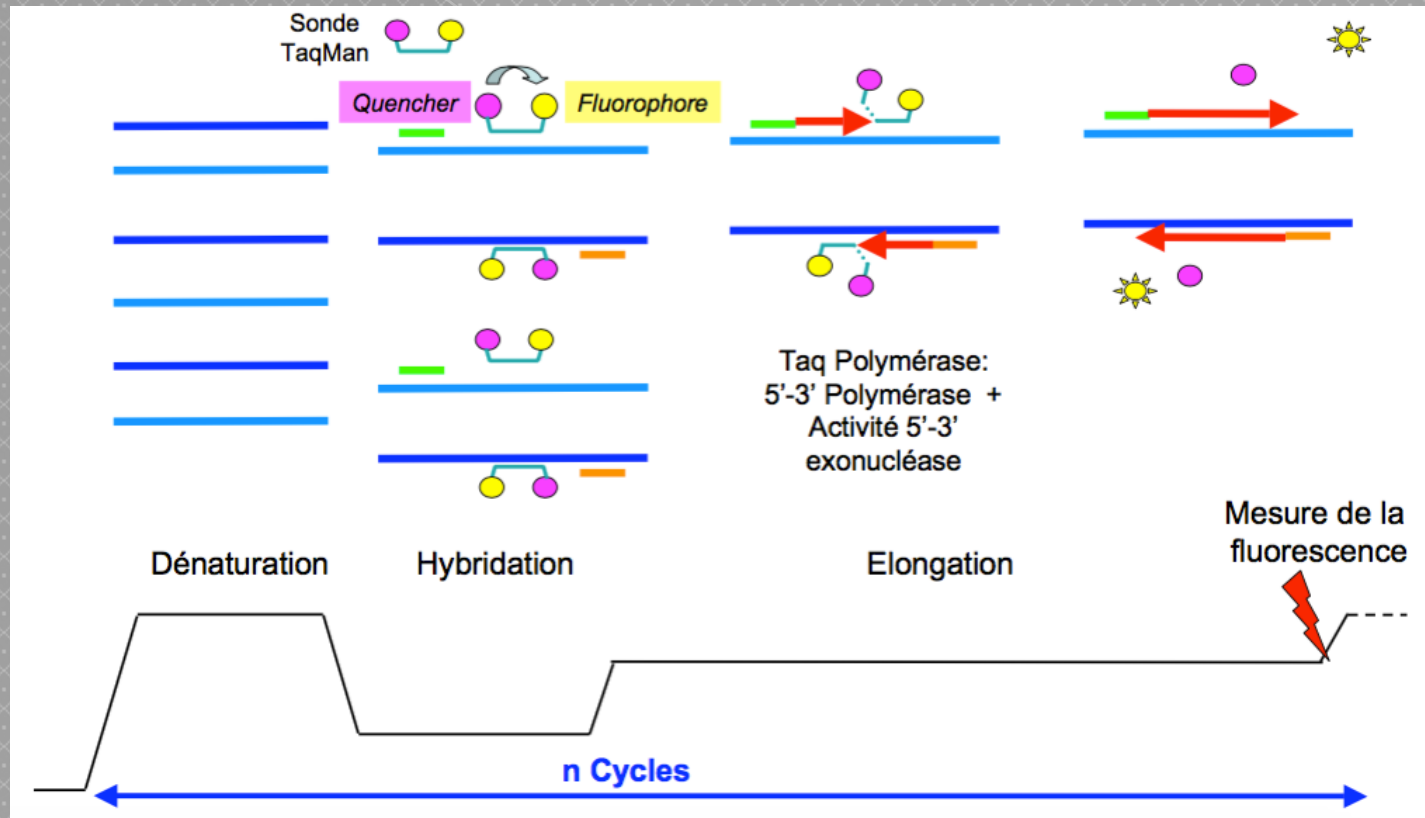
Principe :

- La Taq polymérase possède une **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 de la fluorescence**
- La suite est la même : Le thermocycleur va lire en temps réel la production de fluorescence après chaque cycle, c'est-à-dire à la fin de chaque étape d'élongation

SONDES TAQMAN

Avantage :

- **Spécificité** de la réaction accrue avec la troisième sonde



CONCLUSION

Ce qu'il faut retenir :

- *Techniques de base en biologie moléculaire*
 - **Extraction ADN génomique / ARN**
 - **Amplification par PCR**
 - **Séquençage**
 - **Clonage**
- *Outils de biologie moléculaire (enzymes)*
 - **Endonucléases / Exonucléases**
 - **Polymérases**
 - **Ligases**
- *Principes de biologie moléculaire*
 - **Migration électrophorétique**
 - **Northern-Blot / Southern-Blot / Western-Blot**

THE END



Merci pour votre
attention !