



# 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**

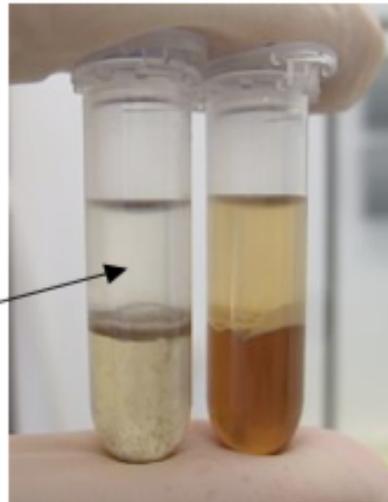
# INTRODUCTION

- 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

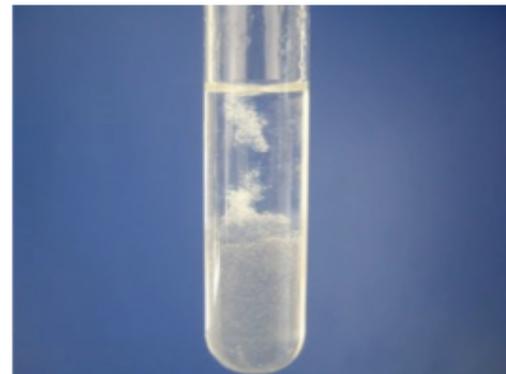
# EXTRACTION D'ADN

- 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**

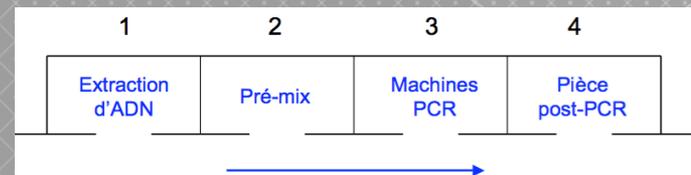
# AMPLIFICATION PAR PCR

- Obtention en **grande quantité** d'une région d'ADN à étudier → **Amplification sélective**
- **2<sup>n</sup> 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 MgCl<sub>2</sub>** + **Taq polymérase** (ADN polymérase d'origine bactérienne résistante à la chaleur)
- Etapes **isolées**
- Circuit **monodirectionnel**



# AMPLIFICATION PAR PCR

Fonctionnement :

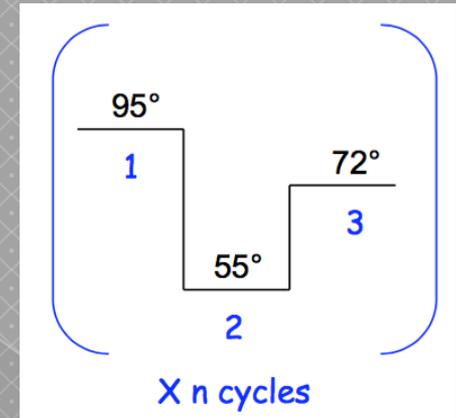
## 1. Dénaturation



## 2. Hybridation d'amorces

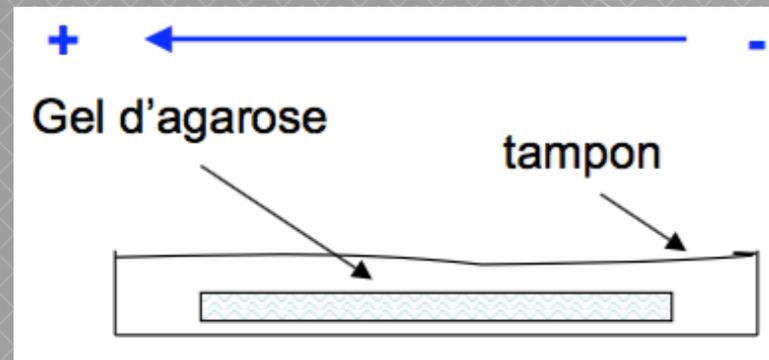
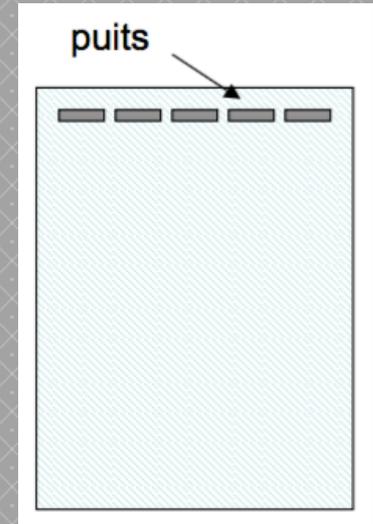


## 3. Elongation



# ELECTROPHORESE

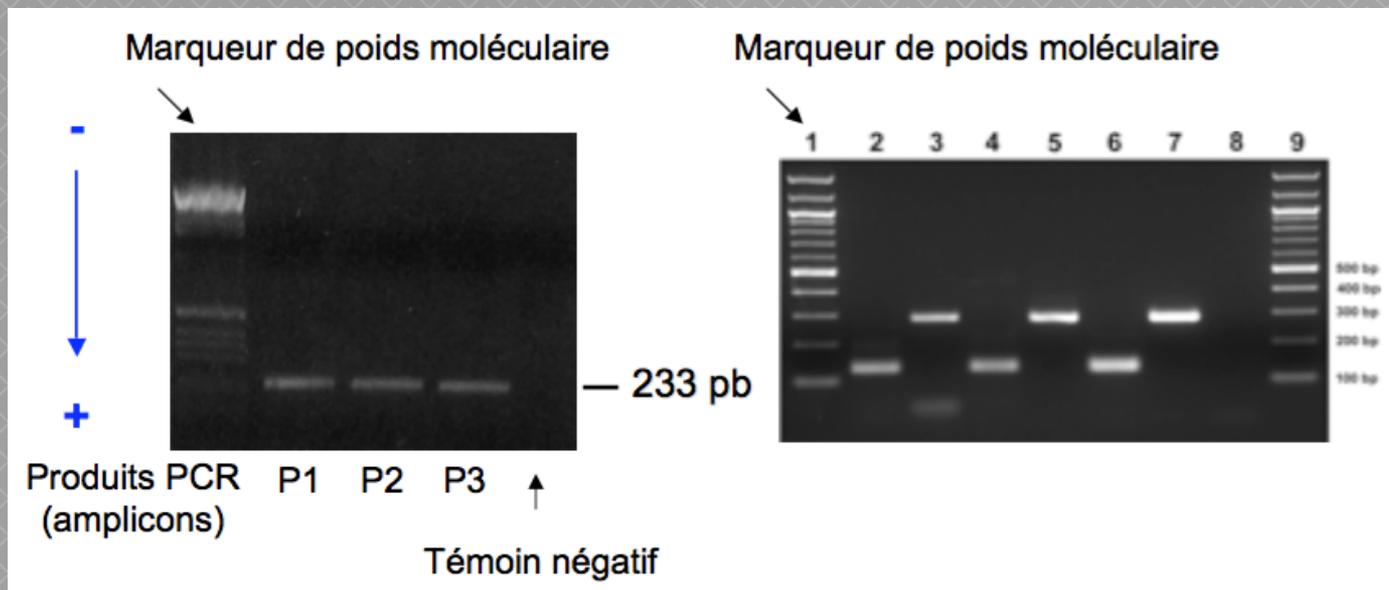
- Analyse des produits d'amplification  
→ **Vérification de la PCR**
- Gel d'**agarose** ou gel d'**acrylamide**
- **Courant électrique** : du - au +
- Vitesse de migration en fonction de la **masse moléculaire**, de la **concentration du gel**



# 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

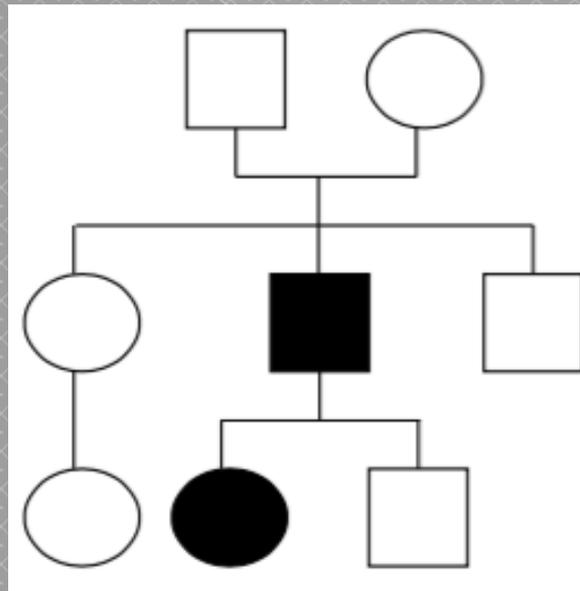
Gène responsable :

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



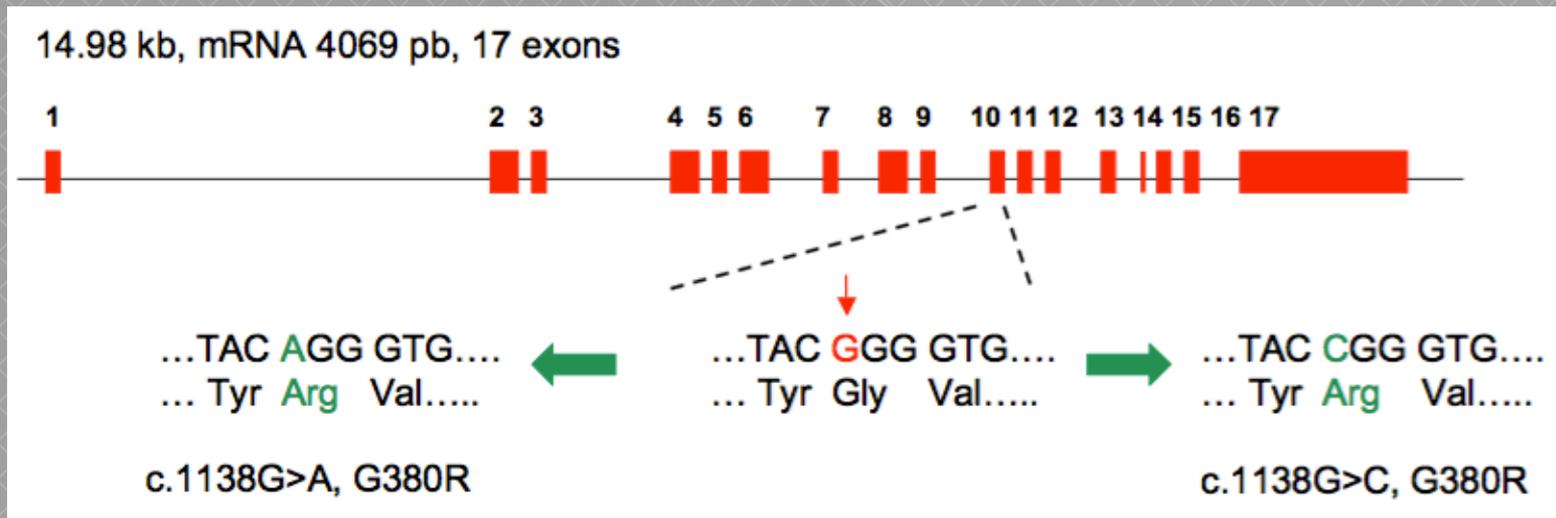
# ACHONDROPLASIE

- 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**

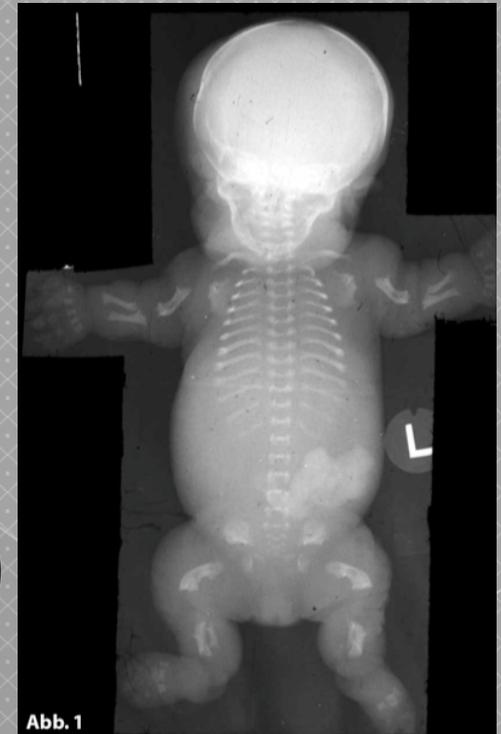


# ACHONDROPLASIE

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

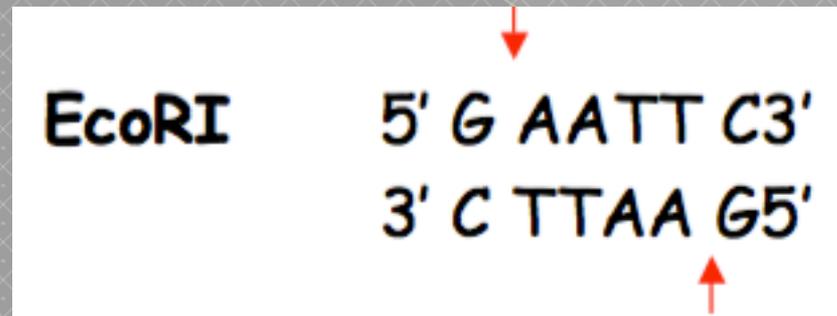
## Caractéristiques :

- **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
  - **Coupe 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

+

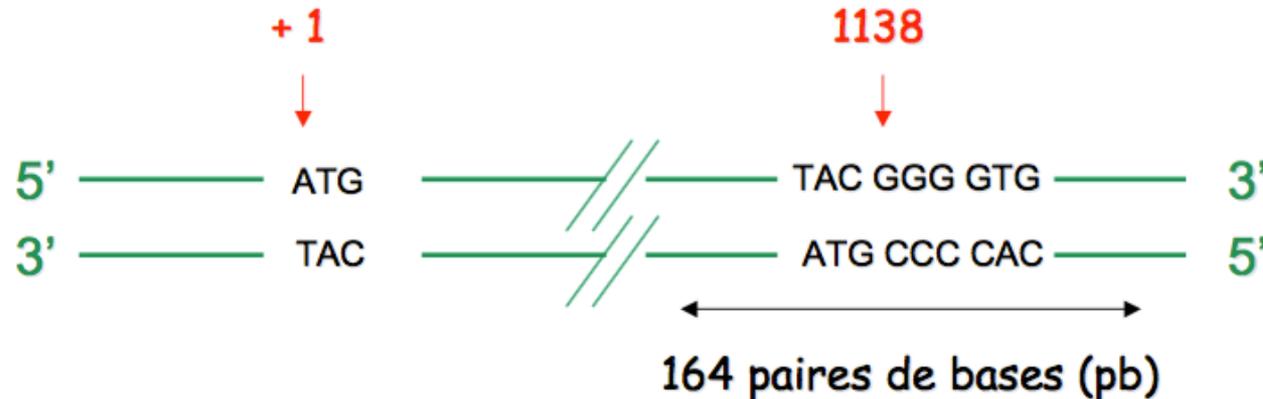
AATTC3'  
G5'

# EXEMPLE DE DIAGNOSTIC

Devant un signe d'appel échographique :

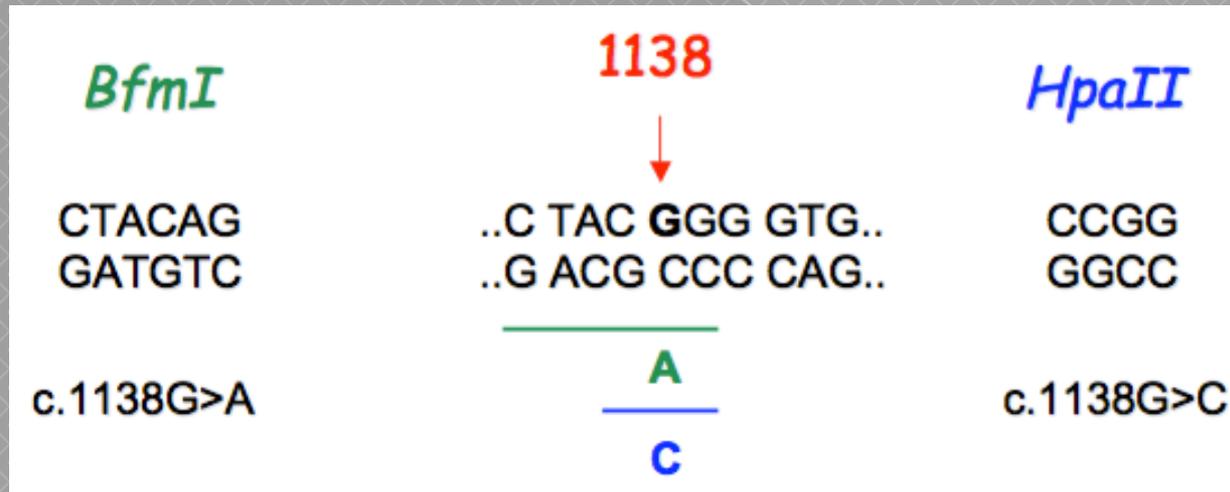
- **Extraction d'ADN** à partir de cellules amniotiques
- Amplification spécifique par PCR de la **région de l'exon 10**
- Fragment amplifié de **164 pb**

## 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**

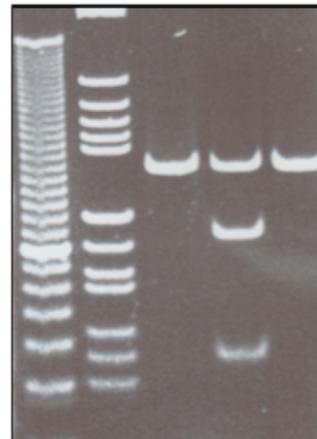


# EXEMPLE DE DIAGNOSTIC

Mutation c.1138G>A

*BfmI*

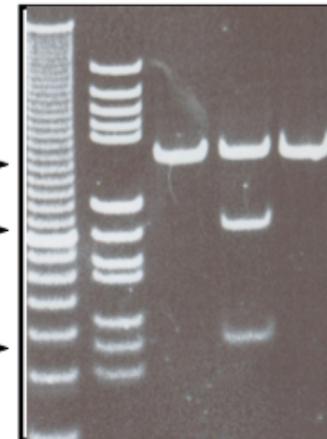
Sain	164 pb
Hétérozygote	164 + 109 + 55 pb
Homozygote	109 + 55 pb



Mutation c.1138G>C

*HpaII*

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



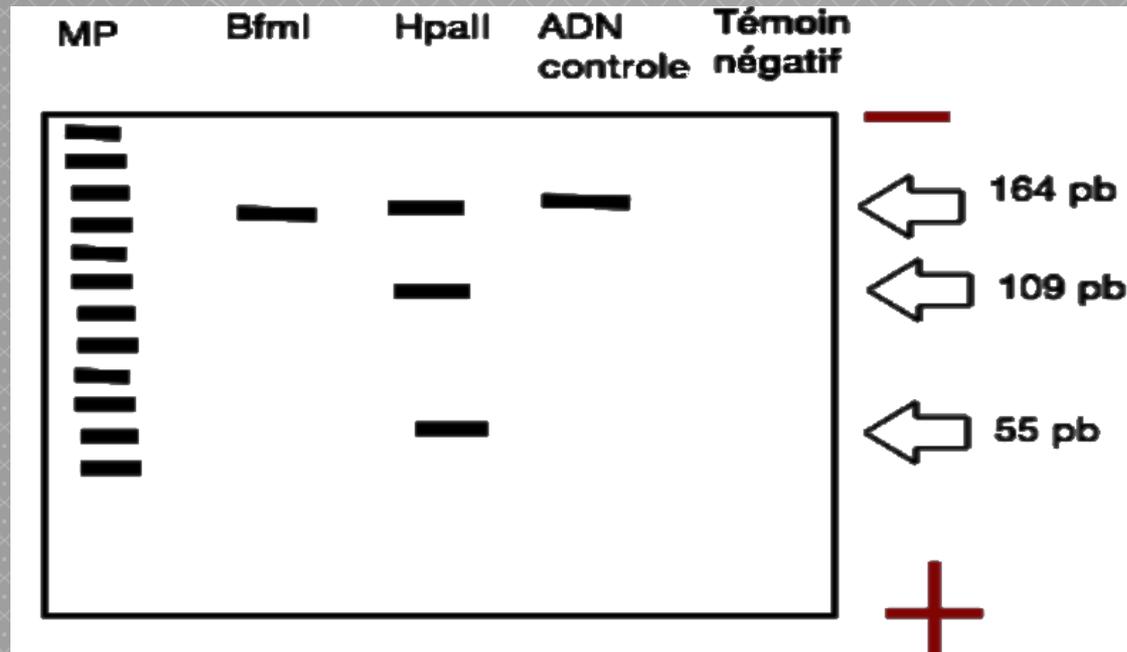
164 pb

109 pb

55 pb

# EXEMPLE DE DIAGNOSTIC

Pour notre exemple :



Conclusion : Le foetus 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**

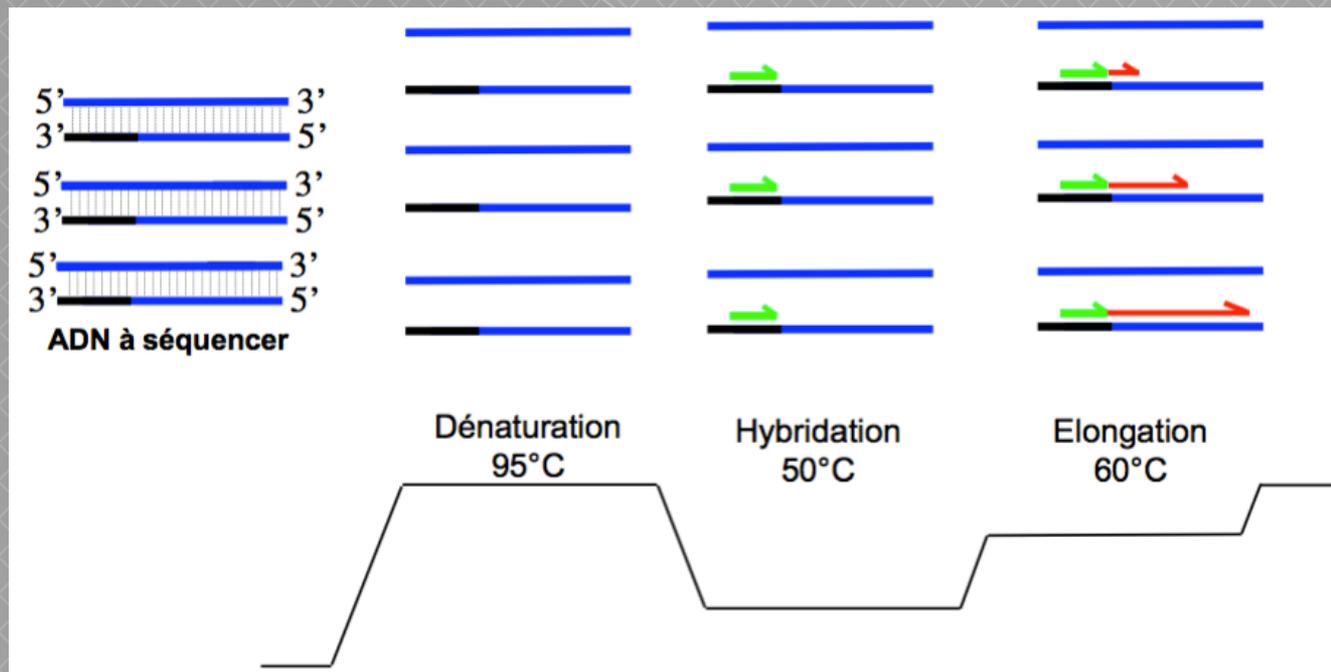
- Méthode enzymatique des **didésoxynucléotides** (ddNTP)

Principe :



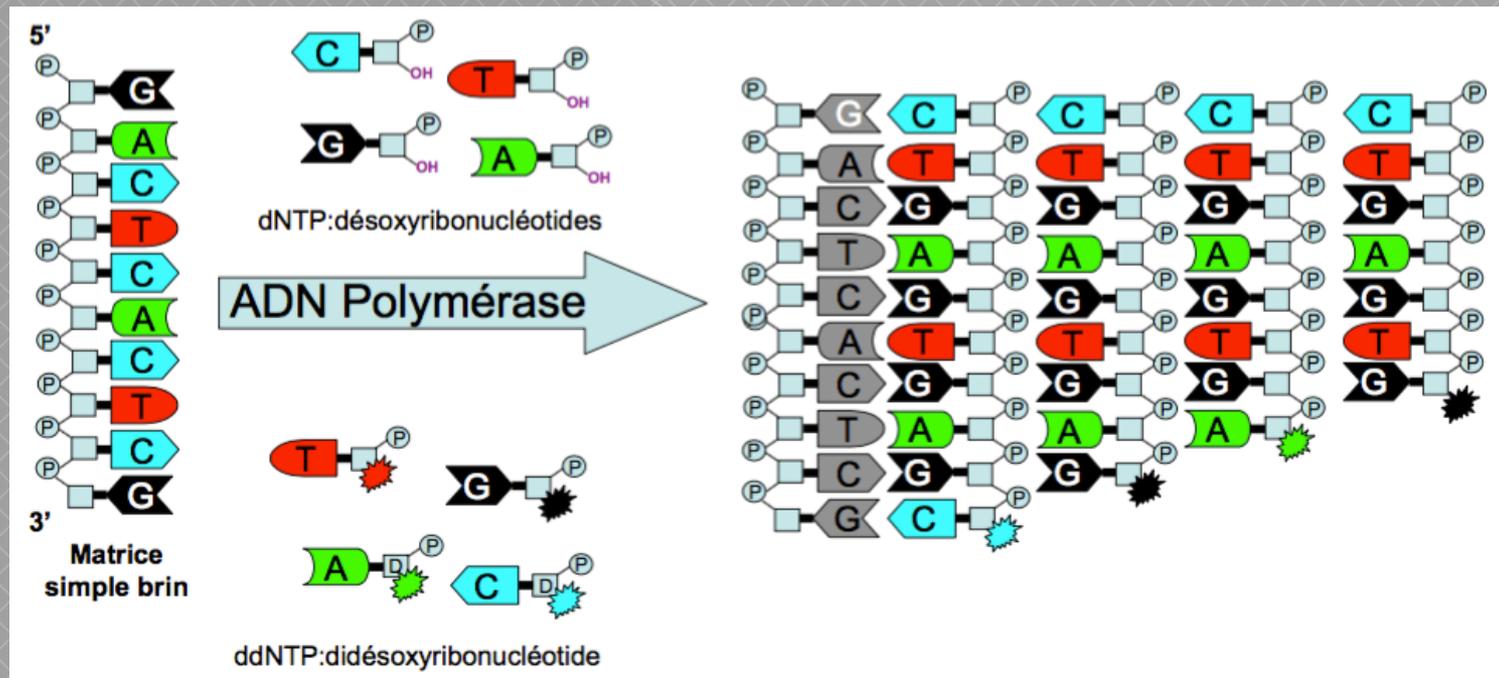
# ETAPES DU SEQUENCAGE

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



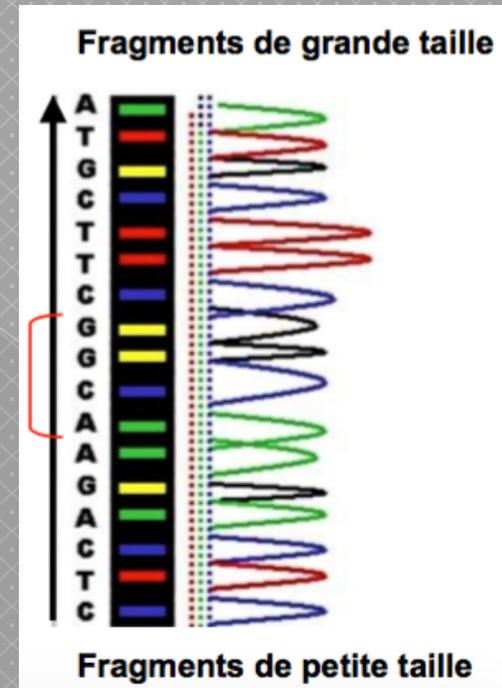
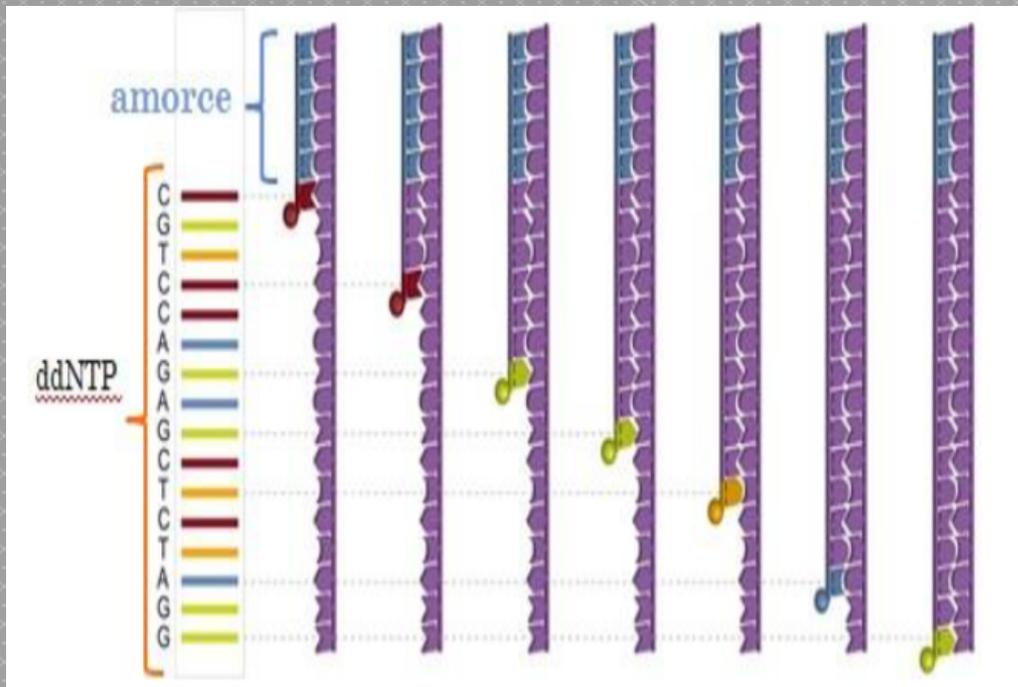
# PRINCIPE DU SEQUENCAGE

- Incorporation **au hasard** de **dNTP** ou de **ddNTP**
- Incorporation d'un ddNTP = **Arrêt de la synthèse** (liaison phosphodiester impossible)
- Couplage spécifique des ddNTP avec des **fluorochromes**



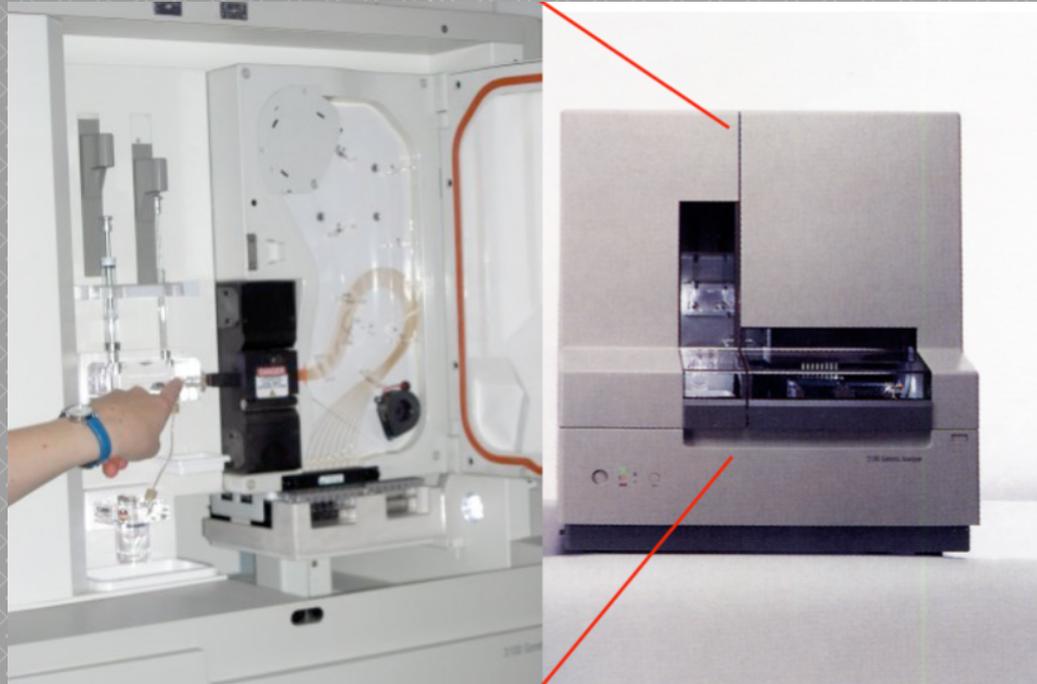
# PRINCIPE DU SEQUENCAGE

- 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 :

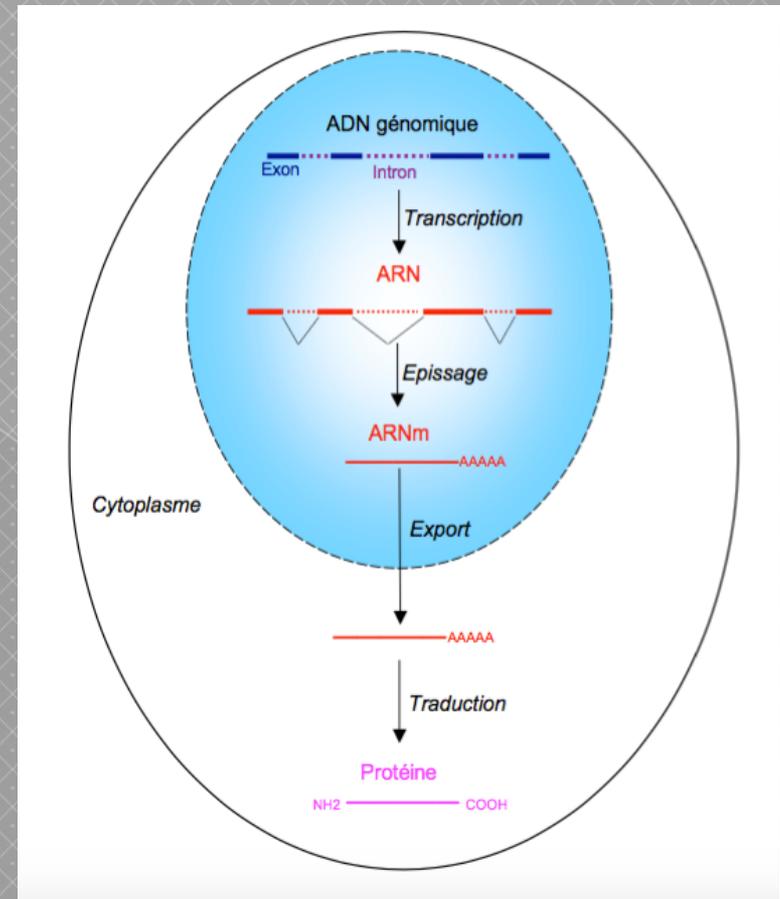
- **WFS1** codant pour la **wolframine** (*fonction peu connue, rôle au niveau du flux calcique*)

# SYNDROME DE WOLFRAM

Rappel :

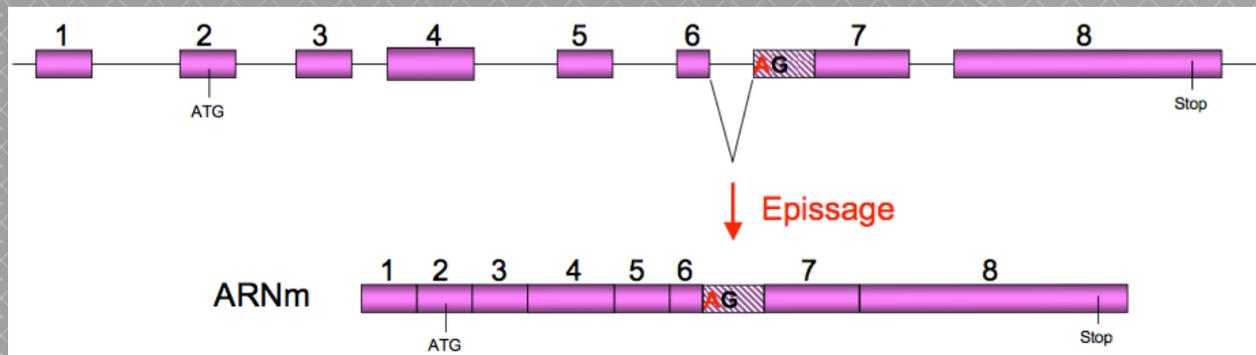
- **Transcription** : ADN → ARN
- **Maturation** : Elimination des introns (épissage) + Ajout de la queue poly-A
- **Traduction** : ARNm → Protéine

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



# SYNDROME DE WOLFRAM

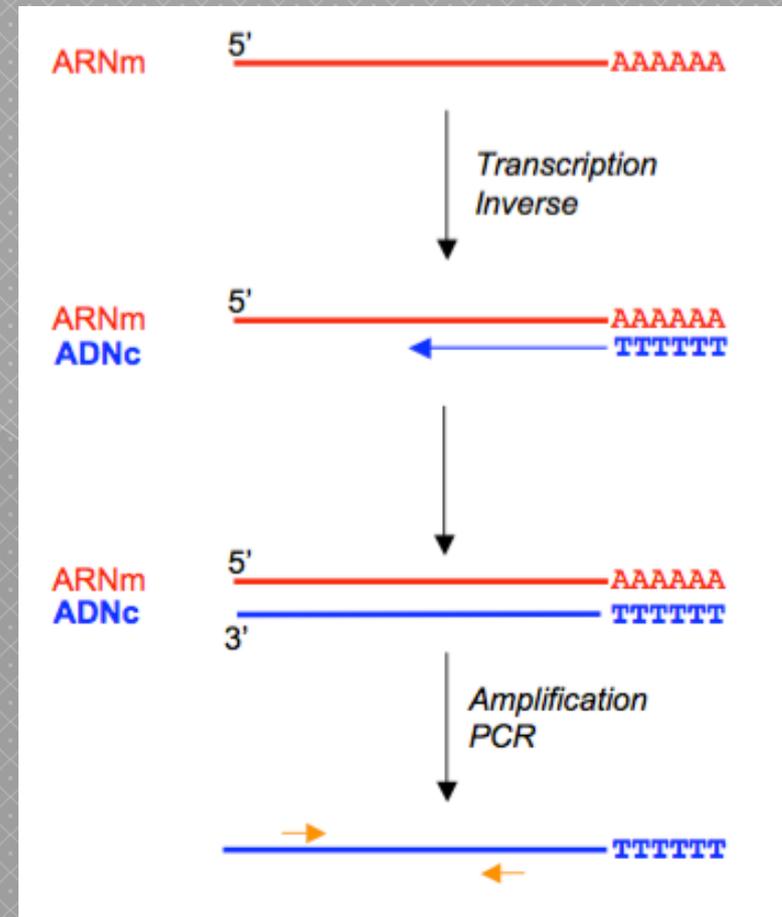
- Maladie **autosomique récessive**
  - Forme **homozygote** pour le même gène muté
  - Forme **hétérozygote** pour 2 mutations différentes  
→ *Détection d'une seule mutation par PCR*  
(amplification des exons uniquement)
- Deuxième mutation au niveau d'un **intron**
  - **Site cryptique d'épissage**



# SYNDROME DE WOLFRAM

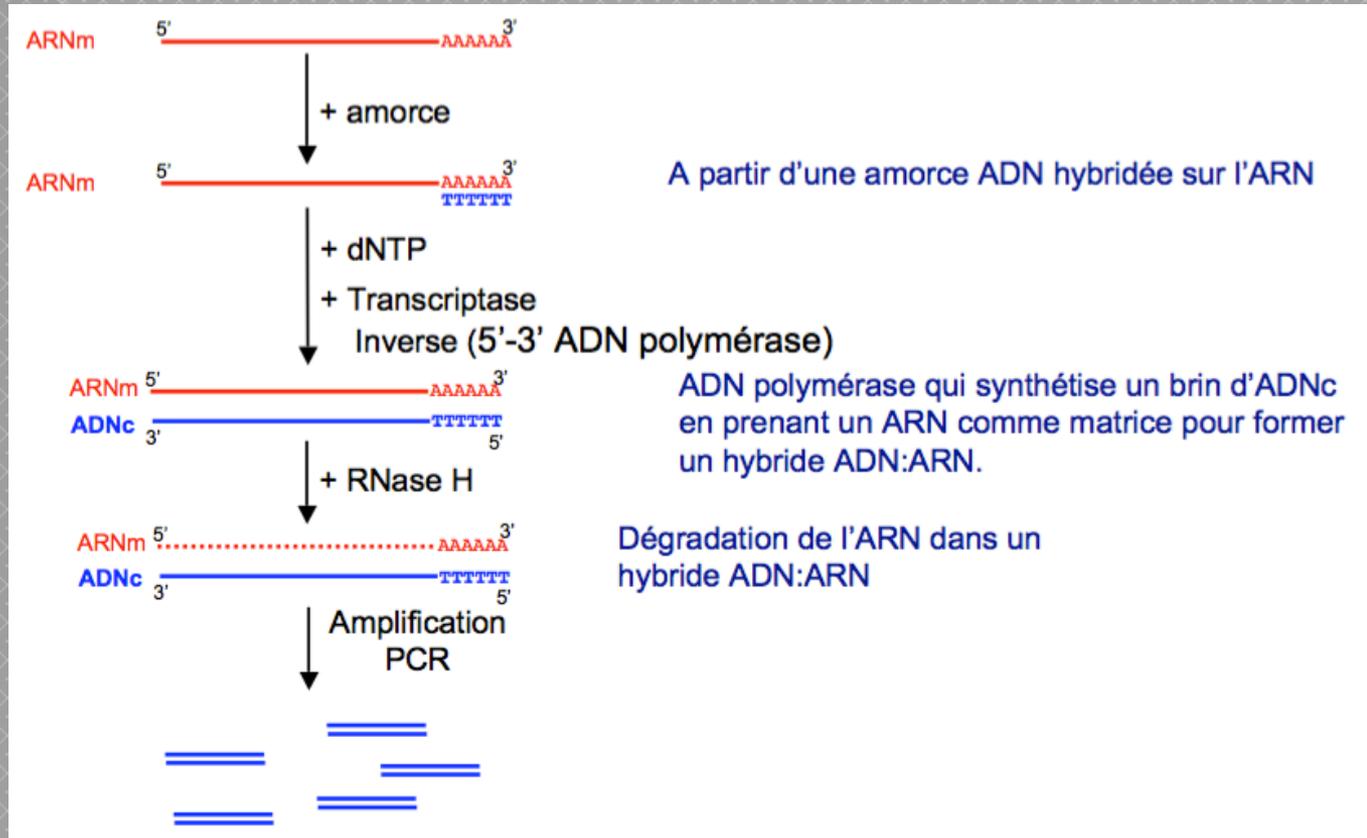
Amplification par PCR :

- 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

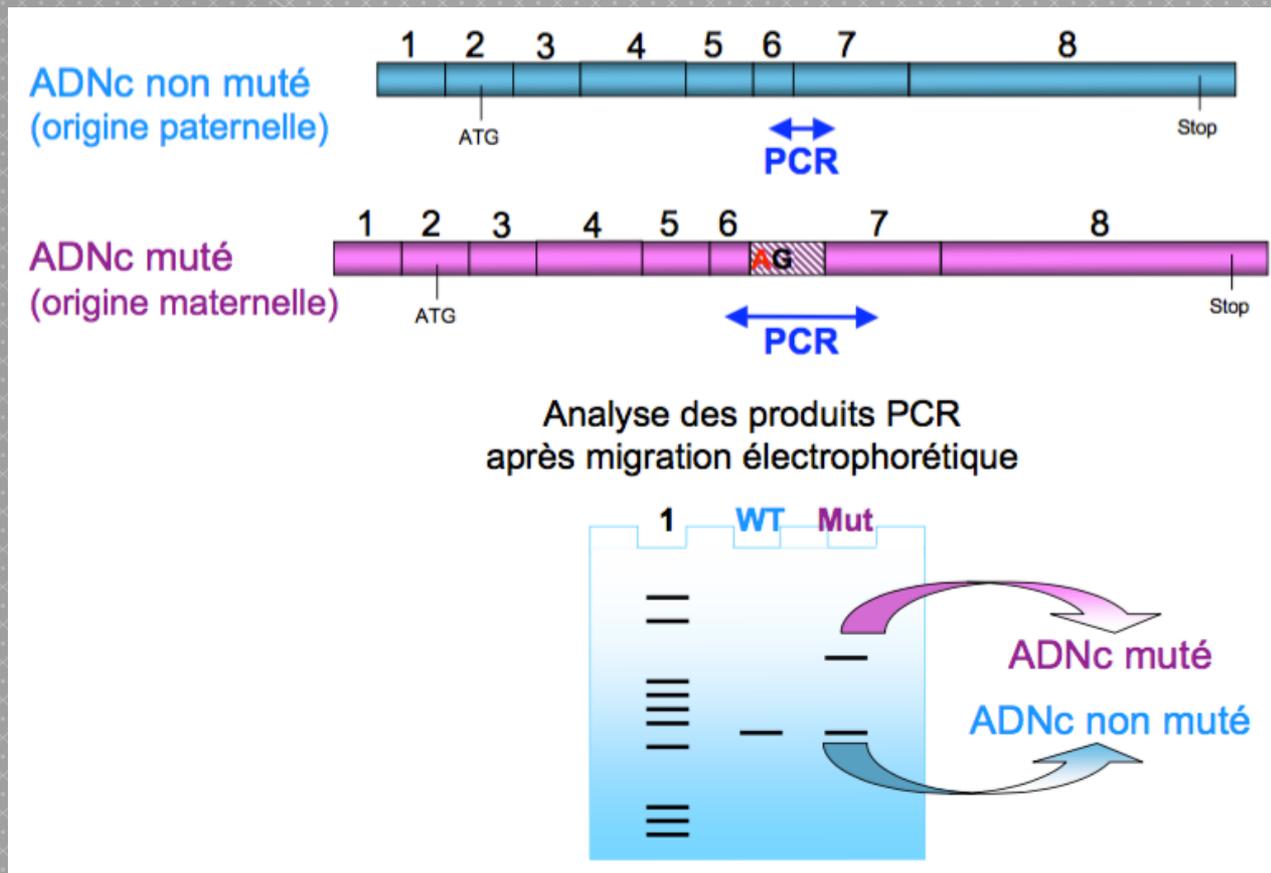
Étapes :



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

# SYNDROME DE WOLFRAM

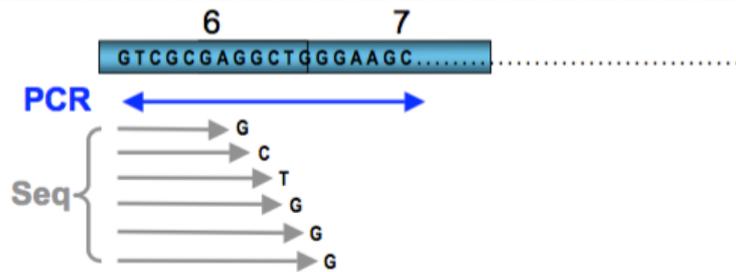
Recherche de variants d'épissage par **électrophorèse** :



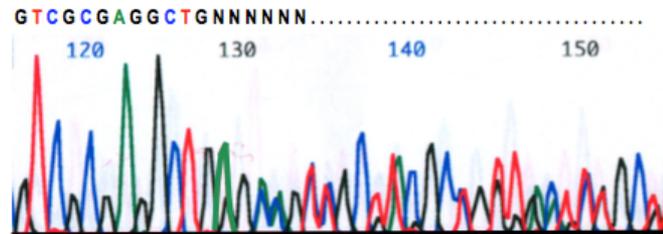
# SYNDROME DE WOLFRAM

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

ADNc non muté  
(origine paternelle)



ADNc muté  
(origine maternelle)

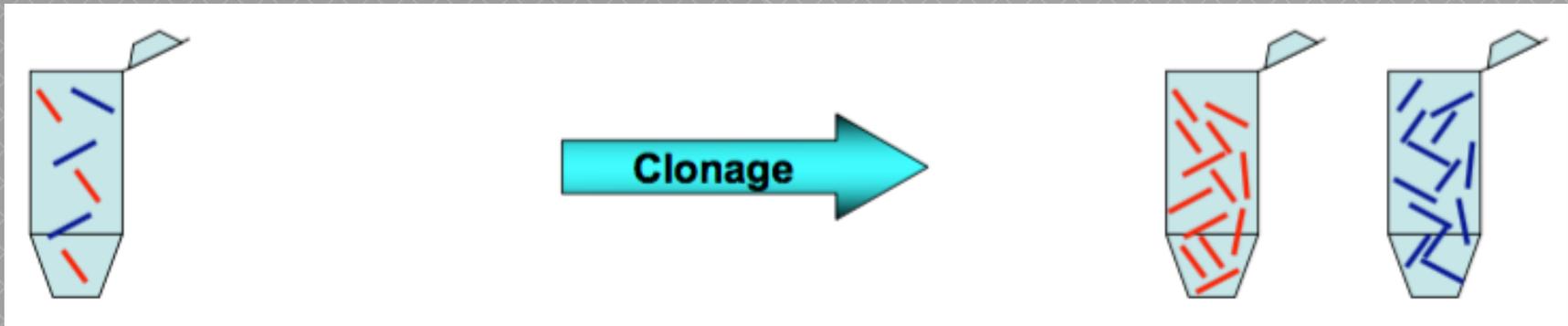


→ Séquençage illisible  
→ Clonage moléculaire nécessaire

# CLONAGE MOLECULAIRE

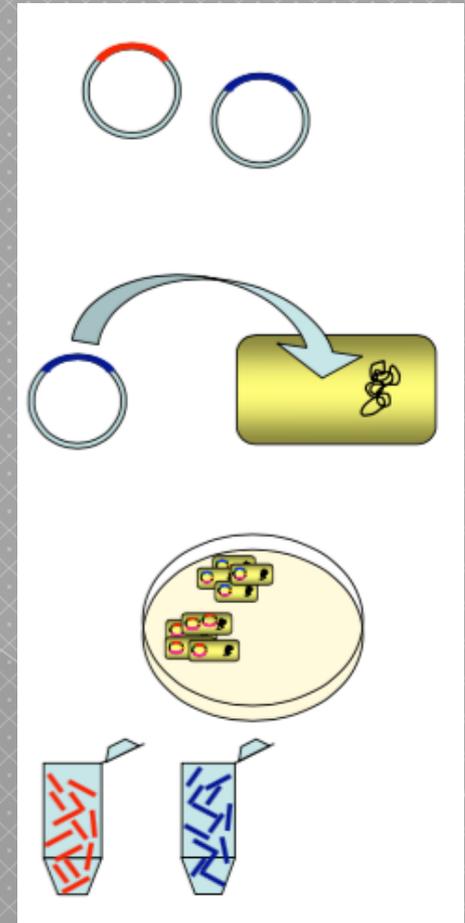
## Objectifs :

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



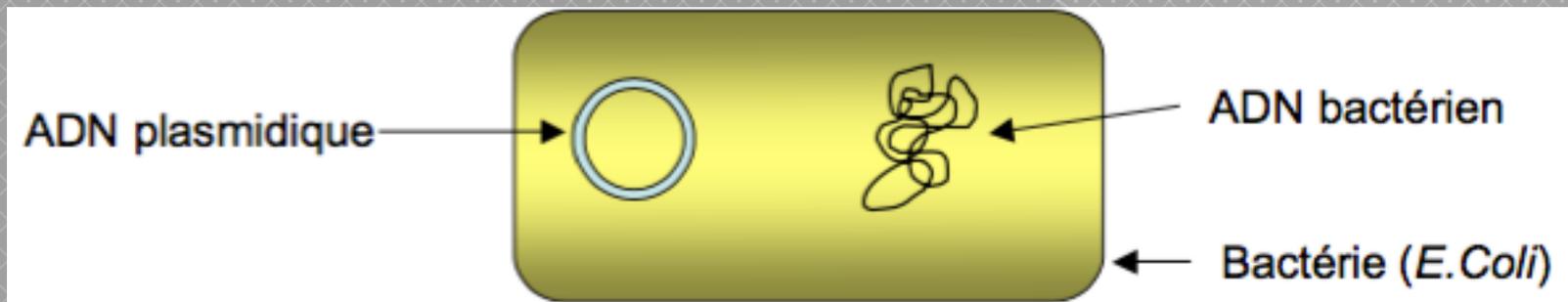
# ETAPES DU CLONAGE

- 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 :

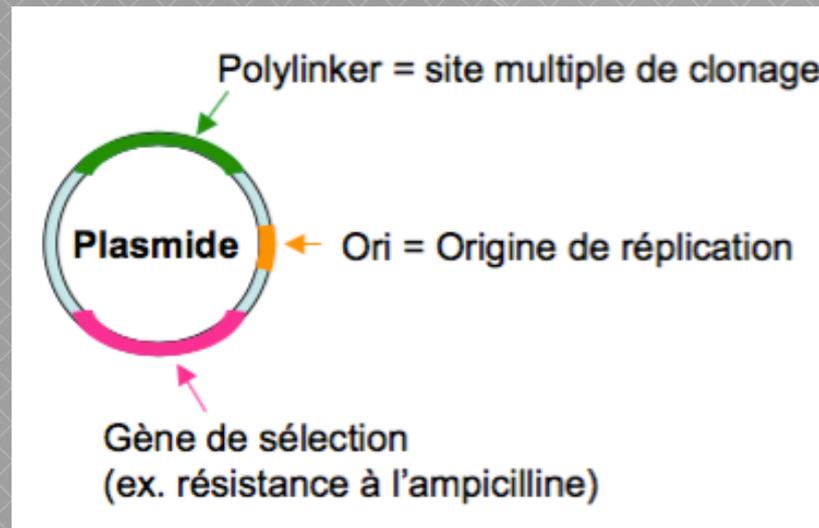
*En fonction de la taille des inserts à étudier*

Type de vecteur	Taille de l'ADN cloné
Plasmide	20 kb
Phage Lambda (virus <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

# PLASMIDES

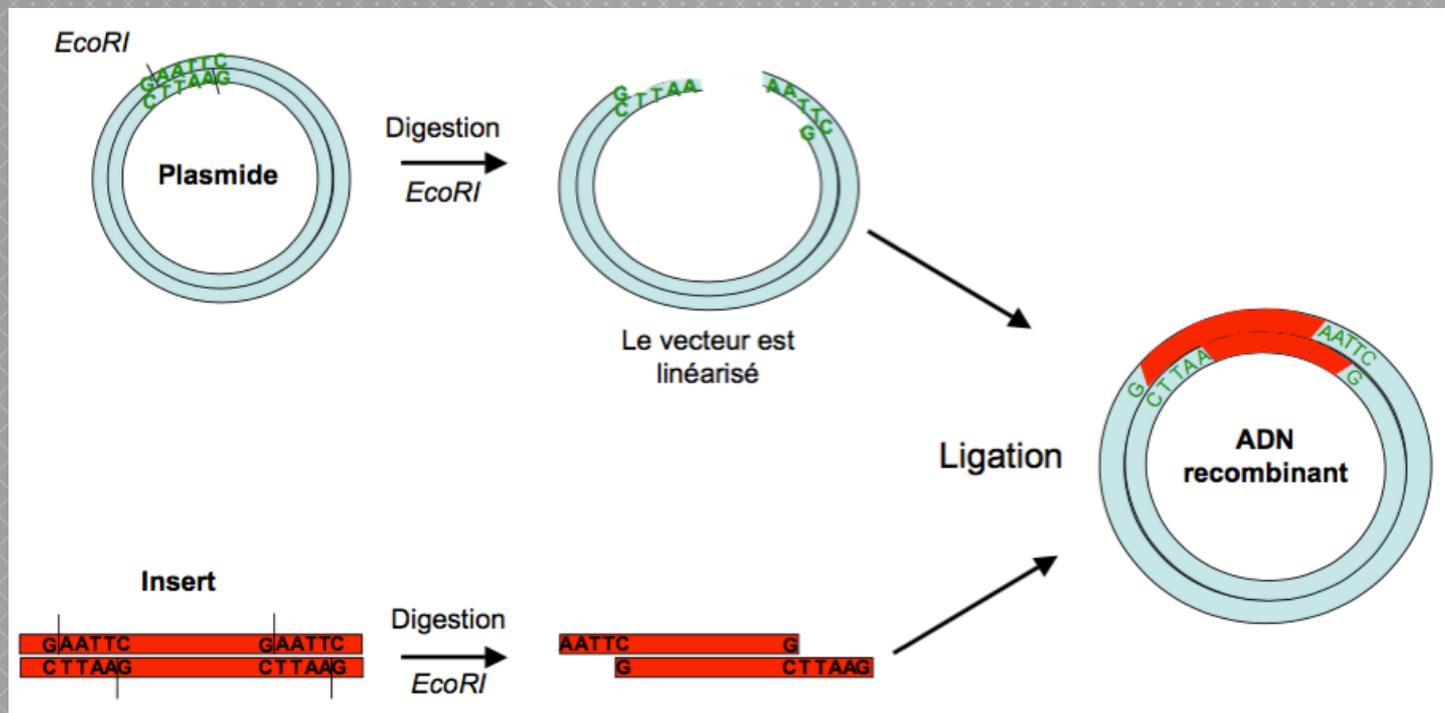
3 caractéristiques :

- **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



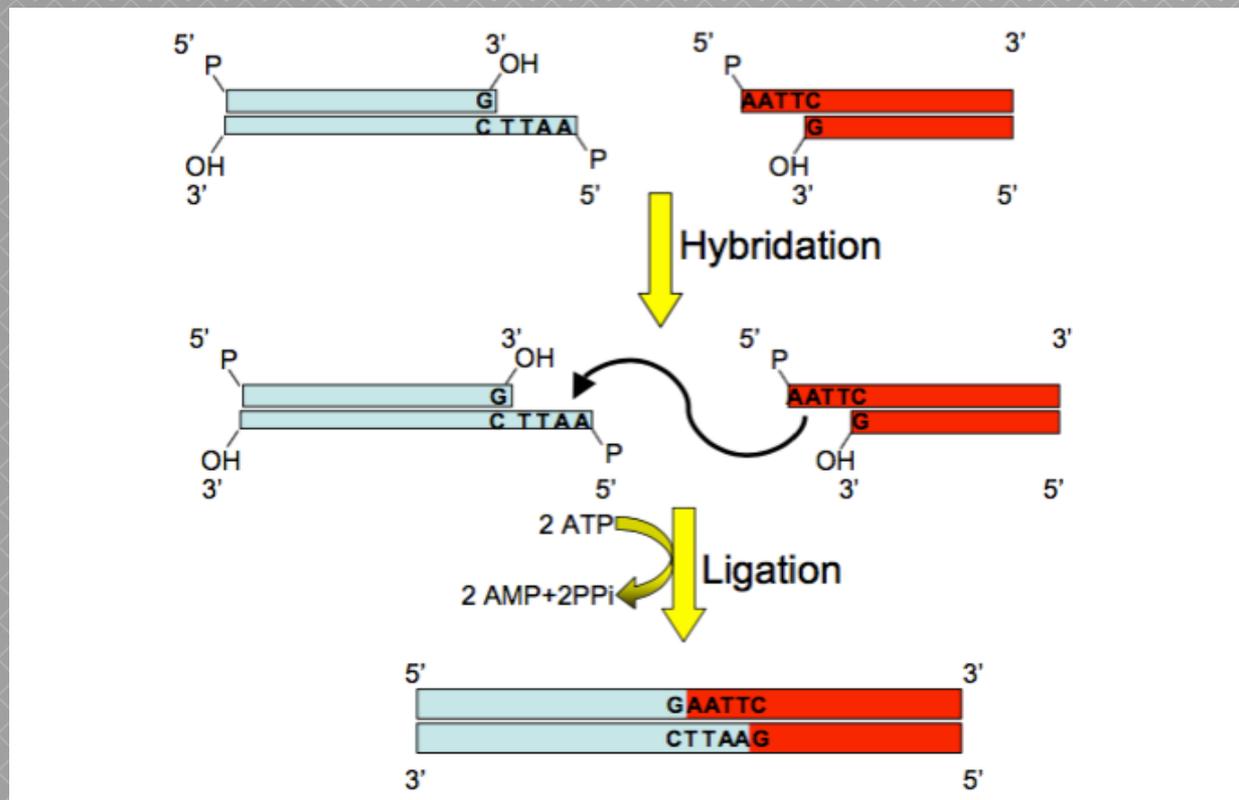
# PREPARATION DU VECTEUR ET DE L'INSERT

Vecteur et insert digérés par les enzymes de restriction :



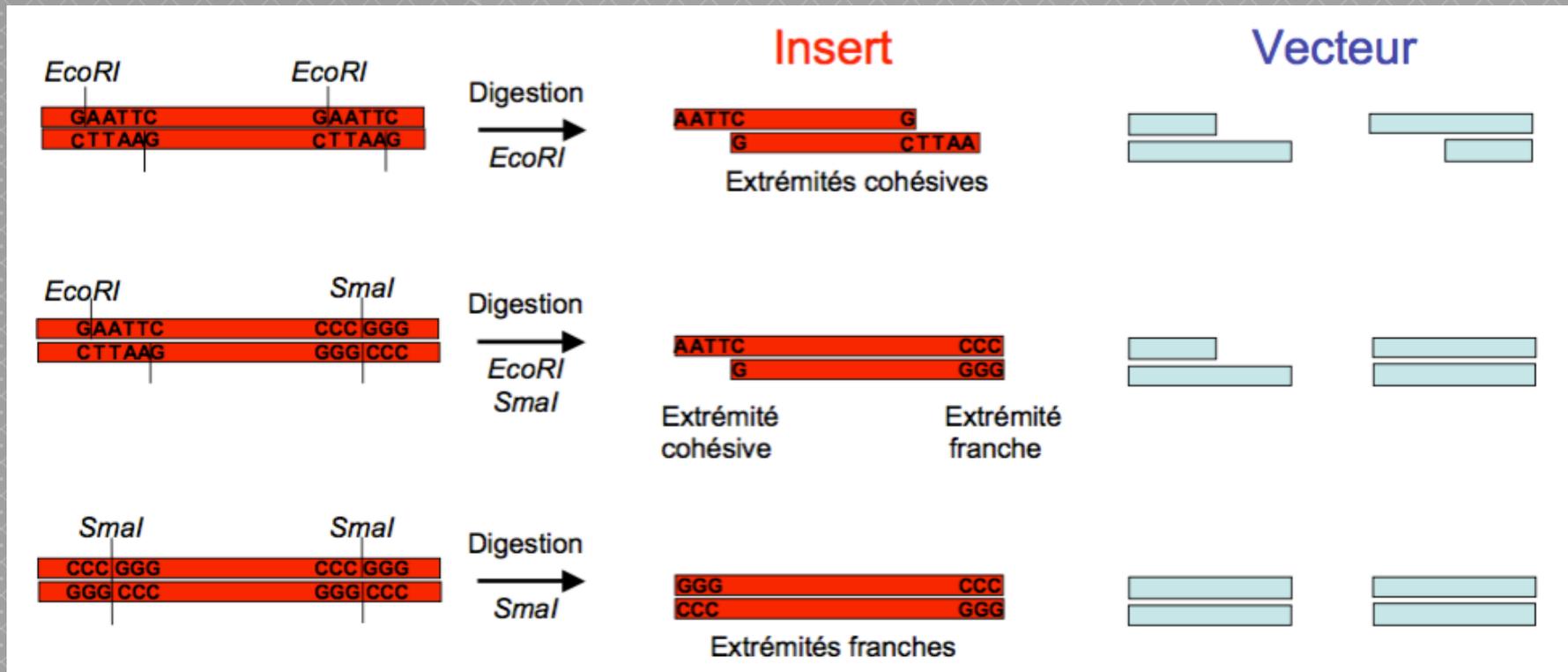
# LIGATION

- 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 :



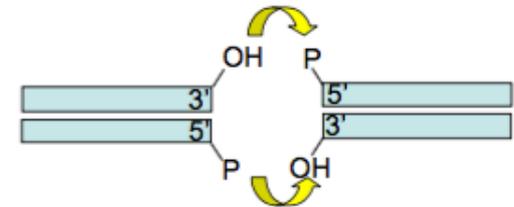
# DEPHOSPHORYLATION

- 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

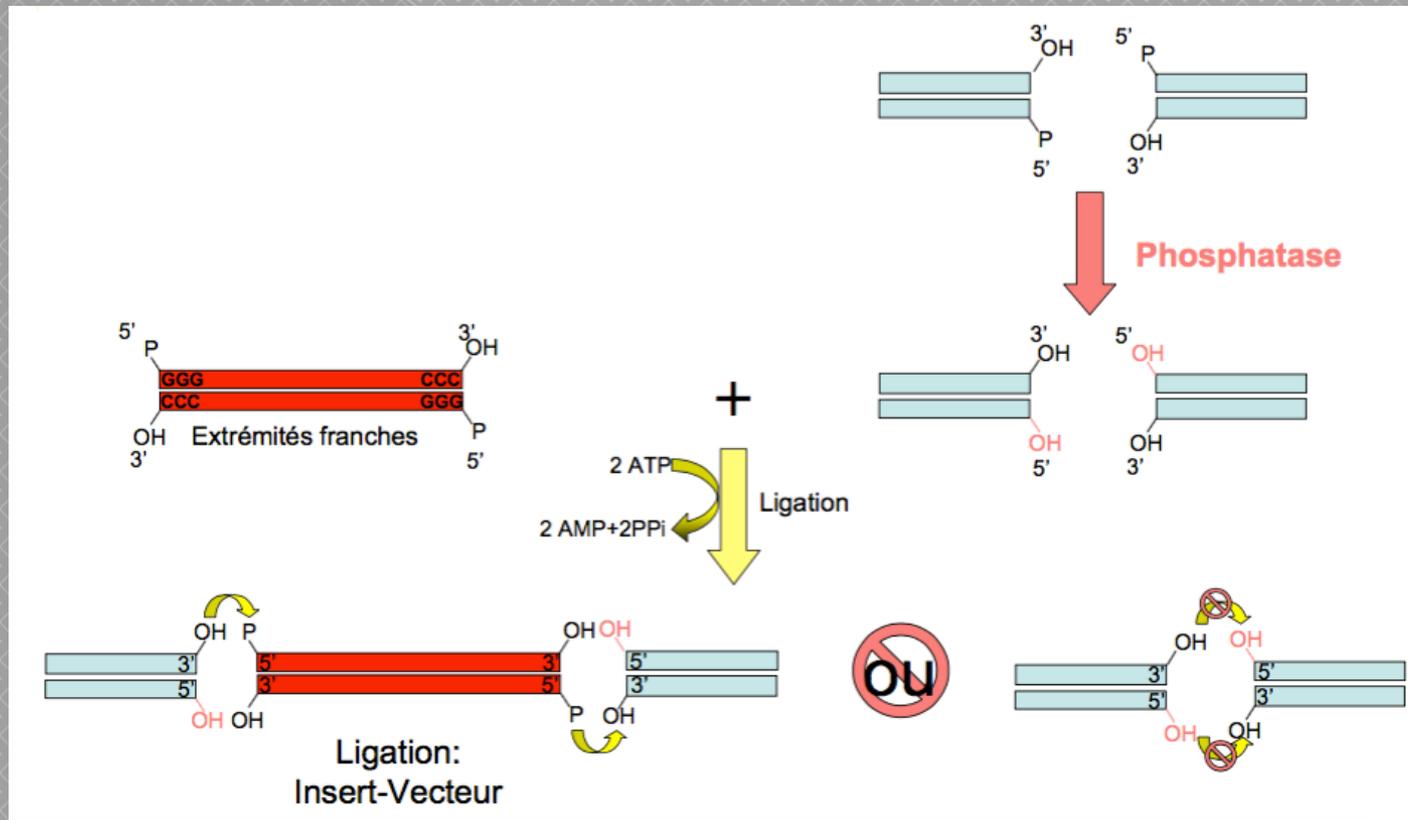
OU



Ligation:  
Vecteur sans insert

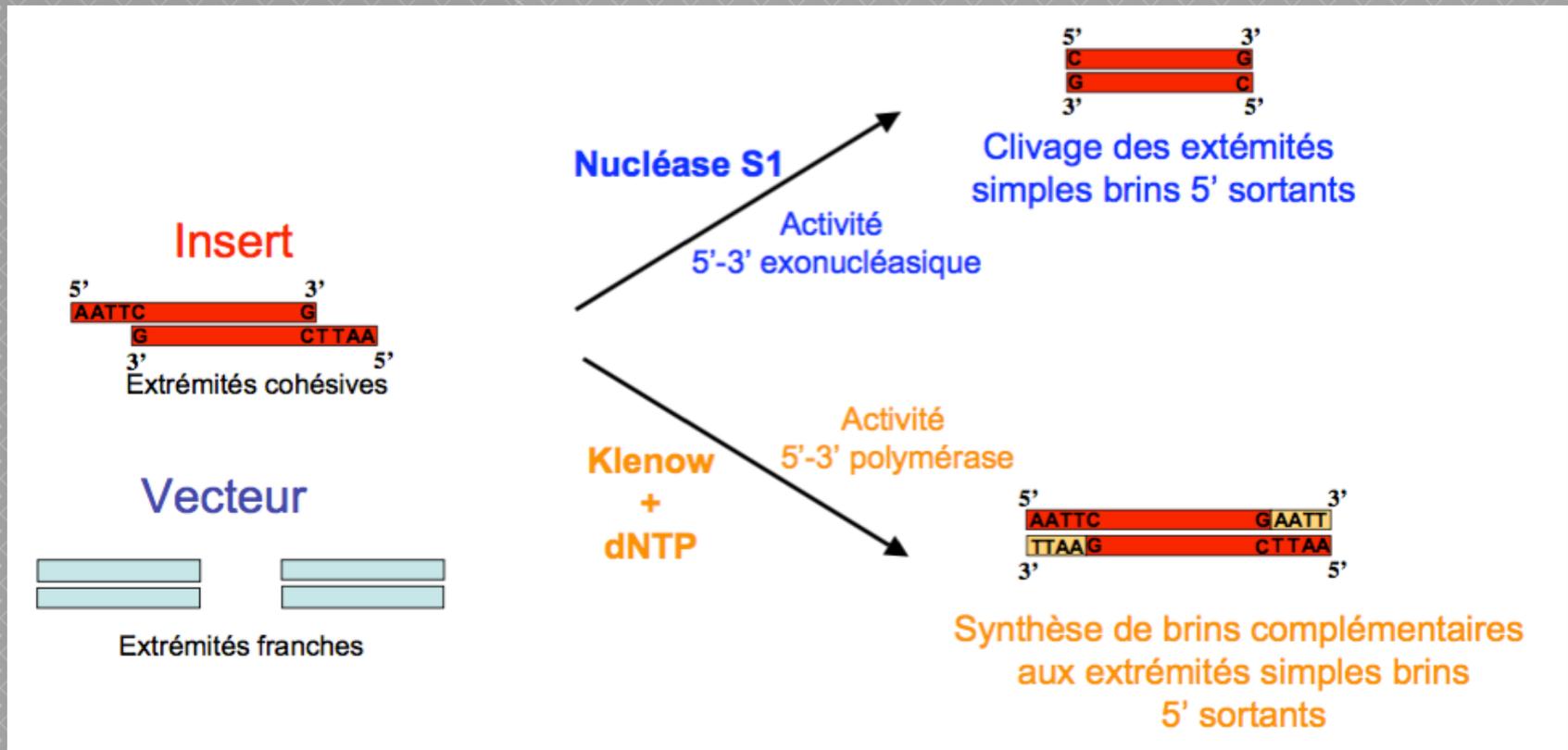
# DEPHOSPHORYLATION

- **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 :



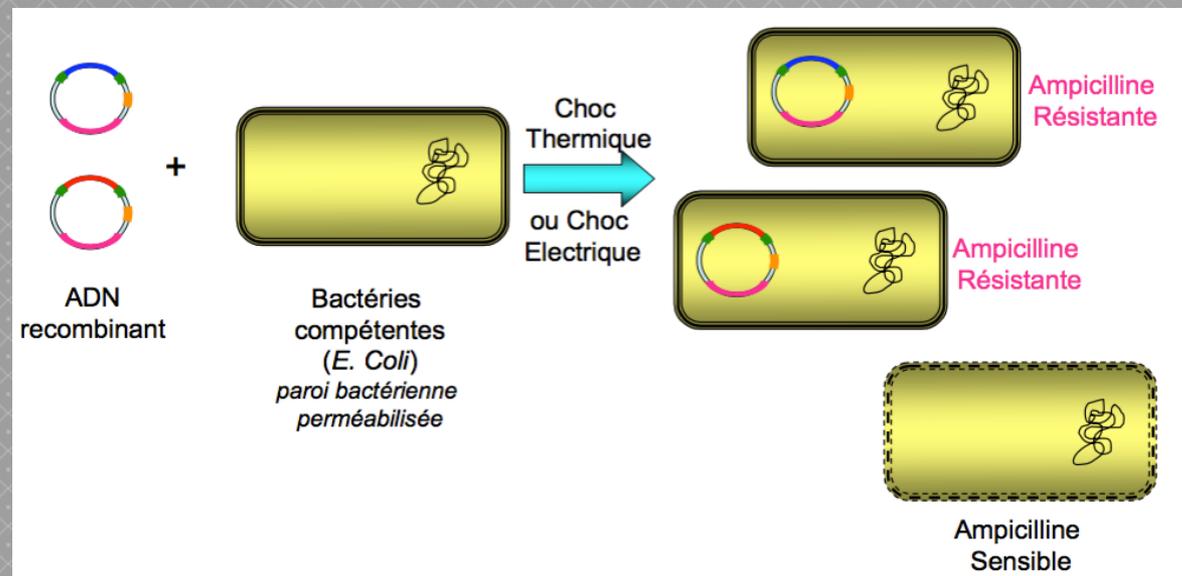
# TRANSFORMATION BACTERIENNE

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

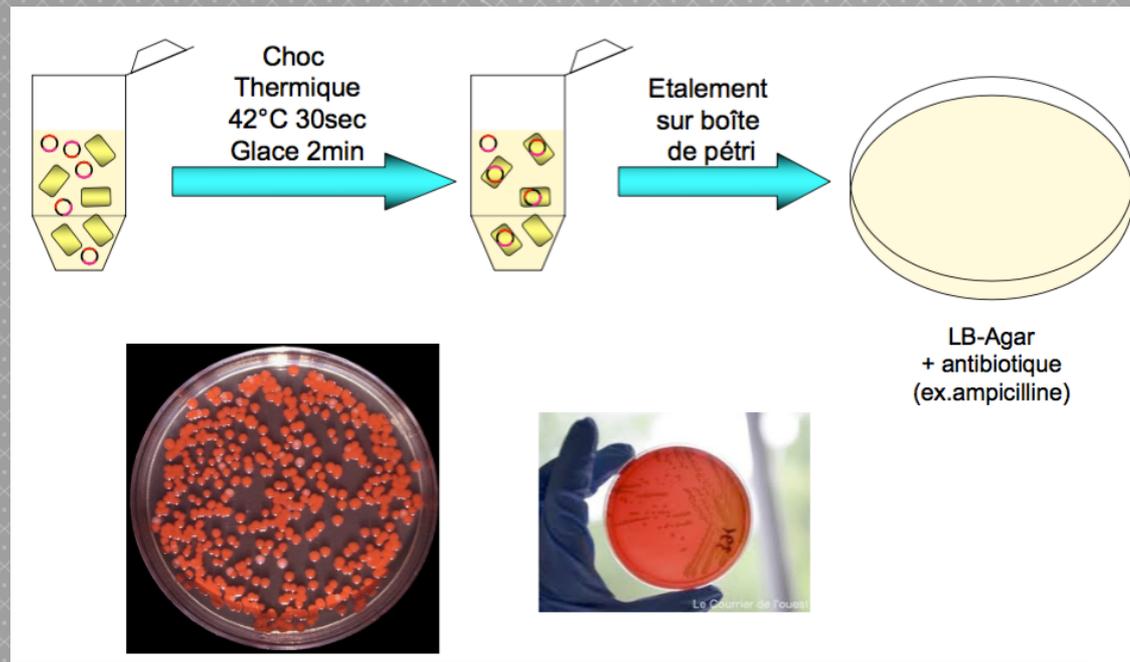
Au final :

- 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

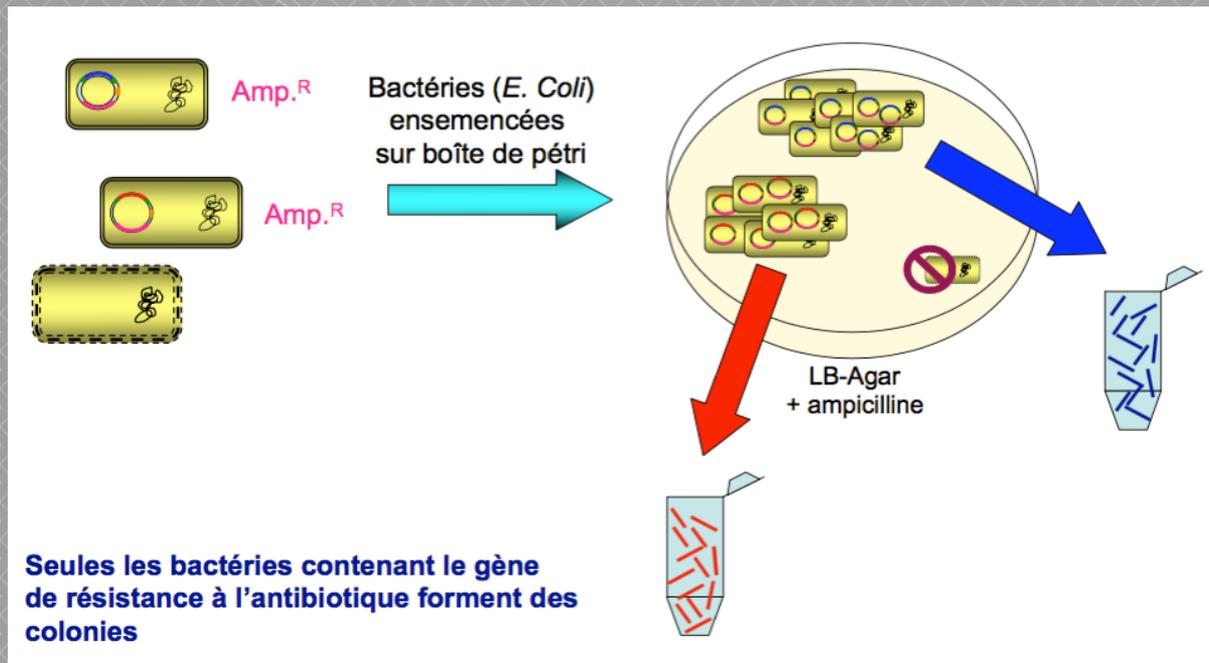


# SELECTION BACTERIENNE

- 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

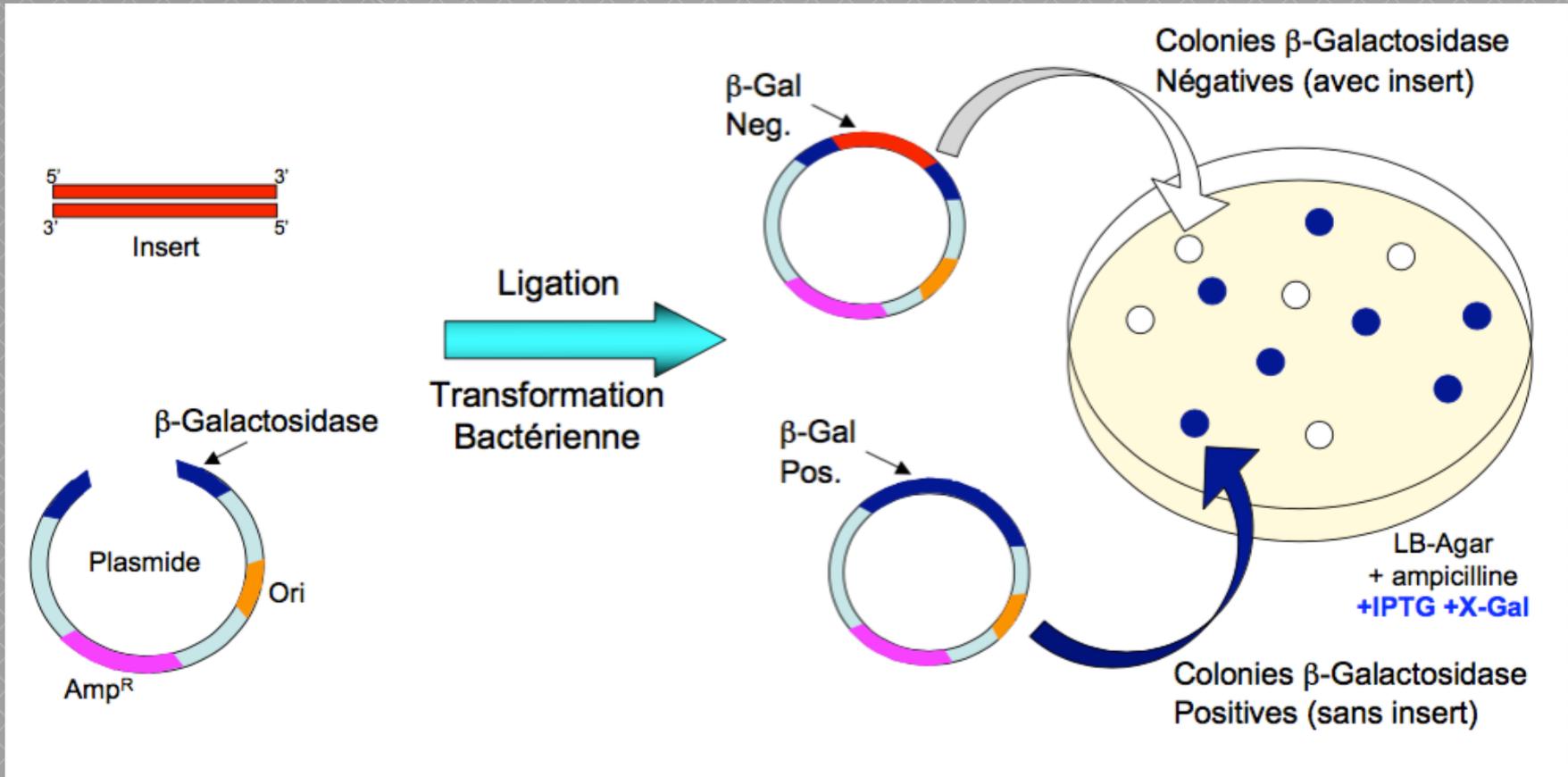
Problème :

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

Solution : **Sélection blanc / bleu**

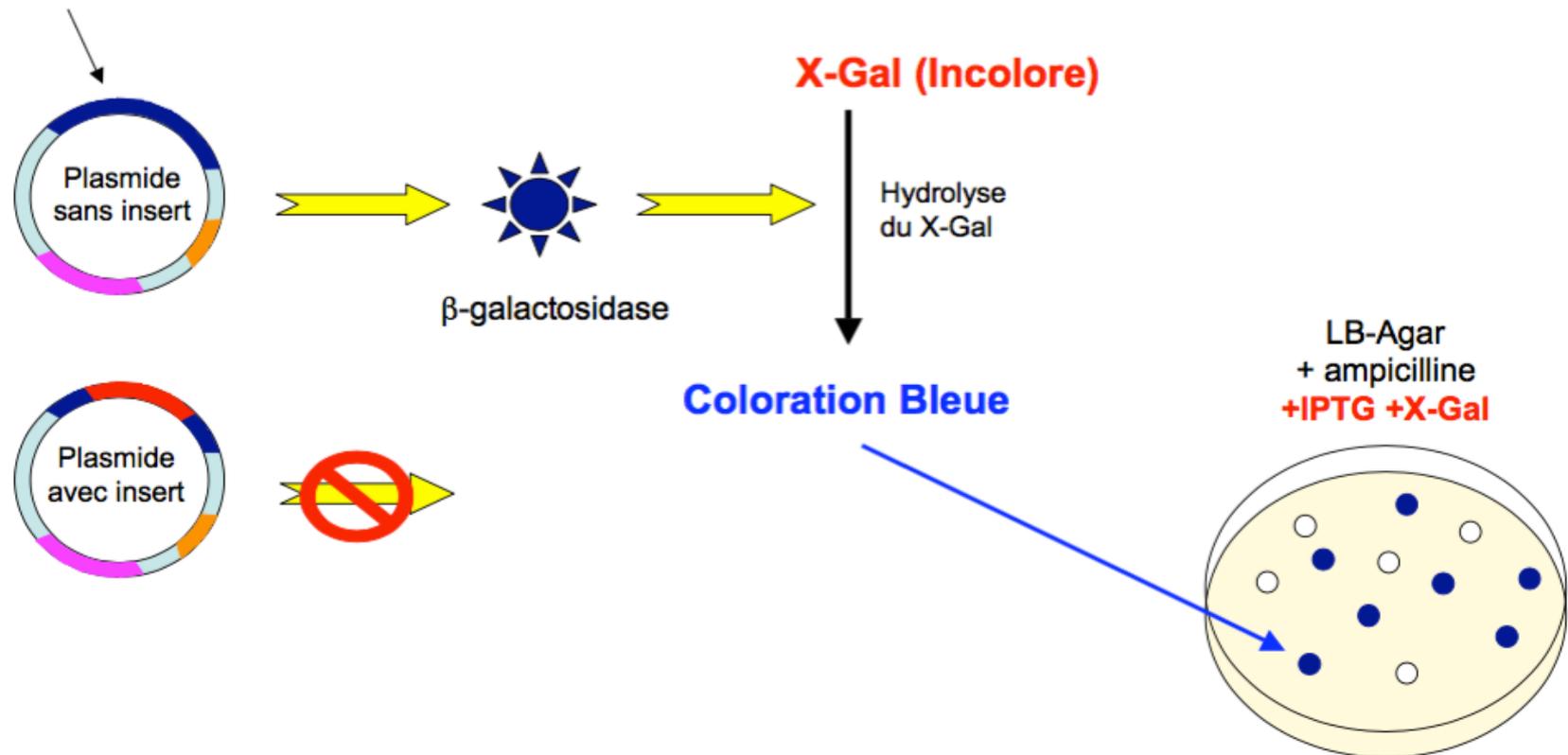
- **Polylinker au milieu d'un gène codant pour la  $\beta$ -Galactosidase**
- Si insertion de l'insert = **Coupure du gène en deux**  
→ ***Pas d'expression de la  $\beta$ -Galactosidase***
- Si vecteur refermé sur lui-même = **Gène de l'enzyme fonctionnel**  
→ ***Expression de la  $\beta$ -Galactosidase***

# SELECTION BLANC / BLEU



# SELECTION BLANC / BLEU

**IPTG** : Induit l'expression de la  $\beta$ -galactosidase

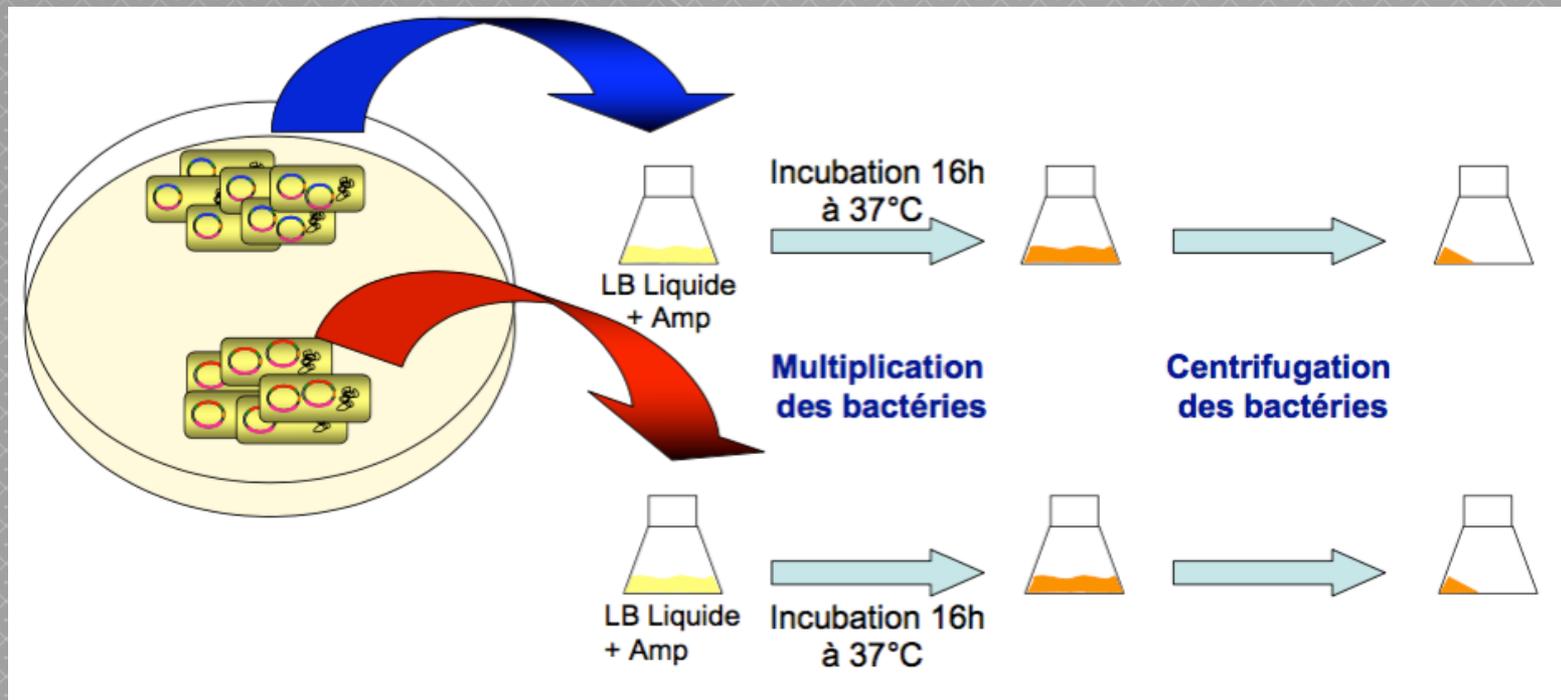


# SELECTION BLANC / BLEU

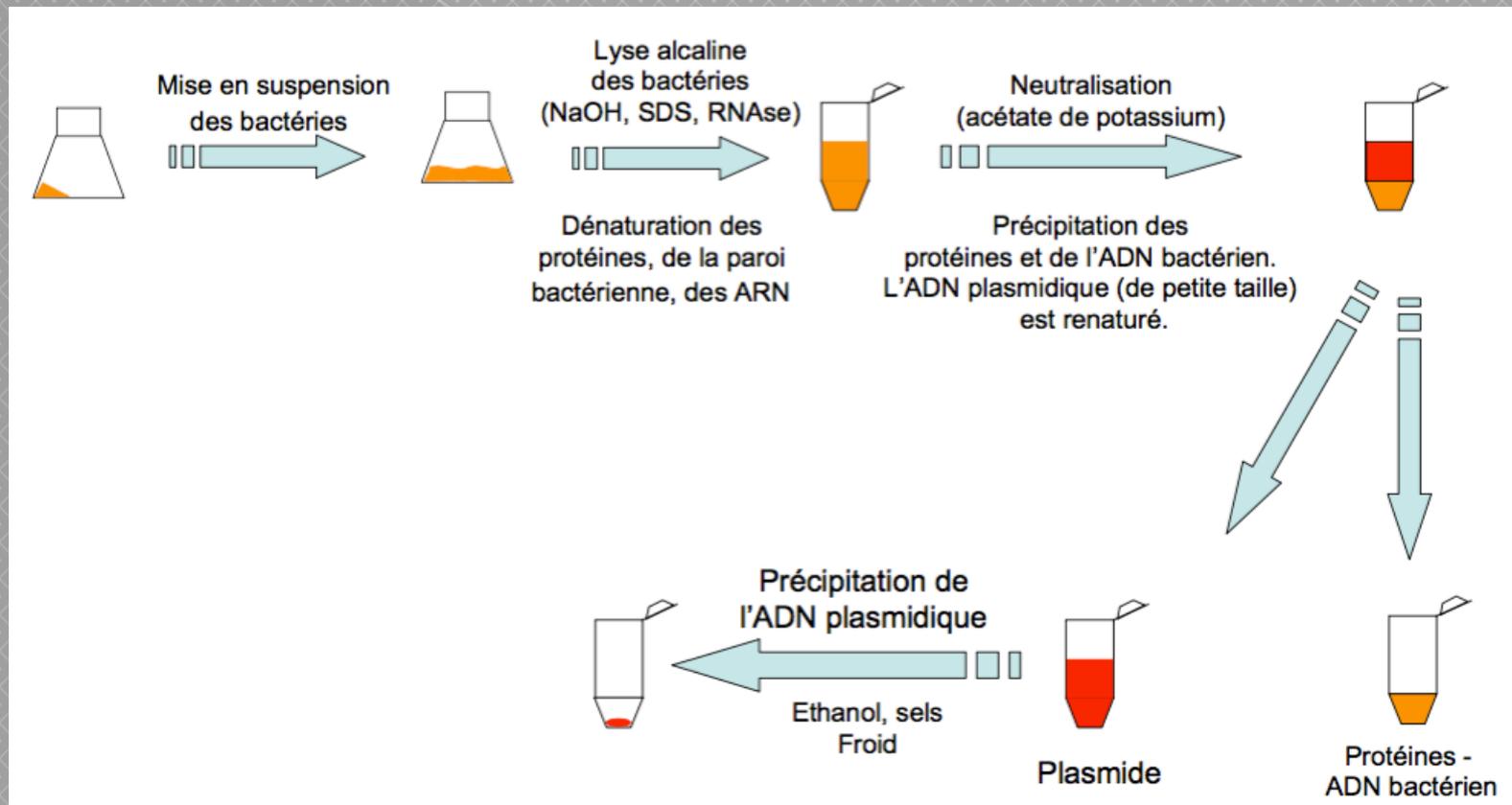
AVEC INSERT	SANS INSERT
Gène $\beta$ -Galactosidase <b>inactivé</b>	Gène $\beta$ -Galactosidase <b>fonctionnel</b>
X-Gal incolore <b>non hydrolysé</b>	X-Gal <b>hydrolysé colorant le milieu en bleu</b>
<b>COLONIES BLANCHES</b>	<b>COLONIES BLEUES</b>

# 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



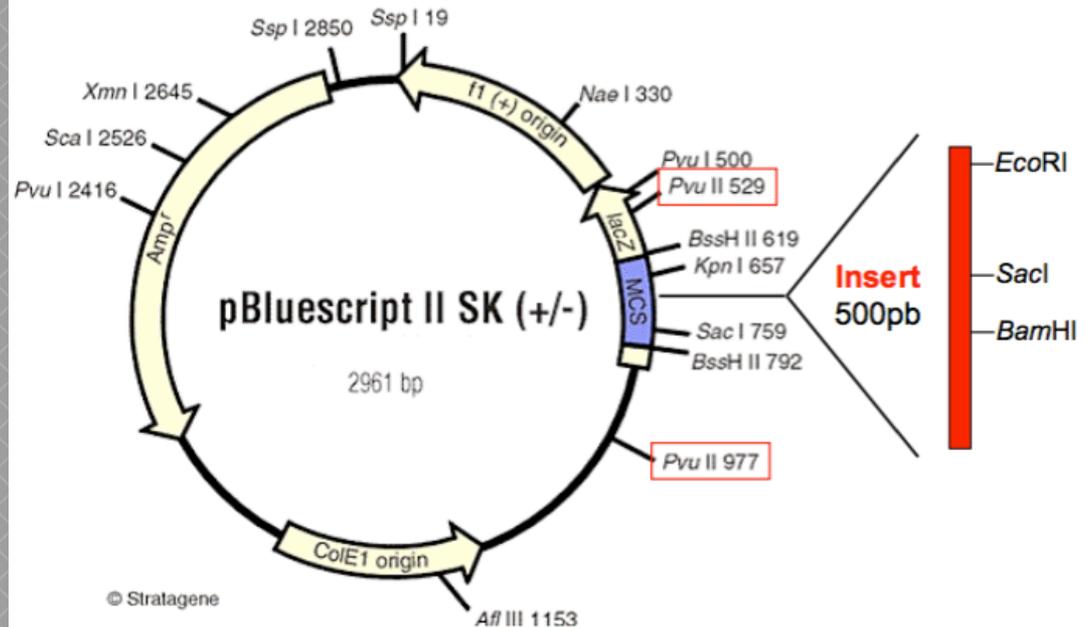
# CARTES DE RESTRICTION

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

## Objectif :

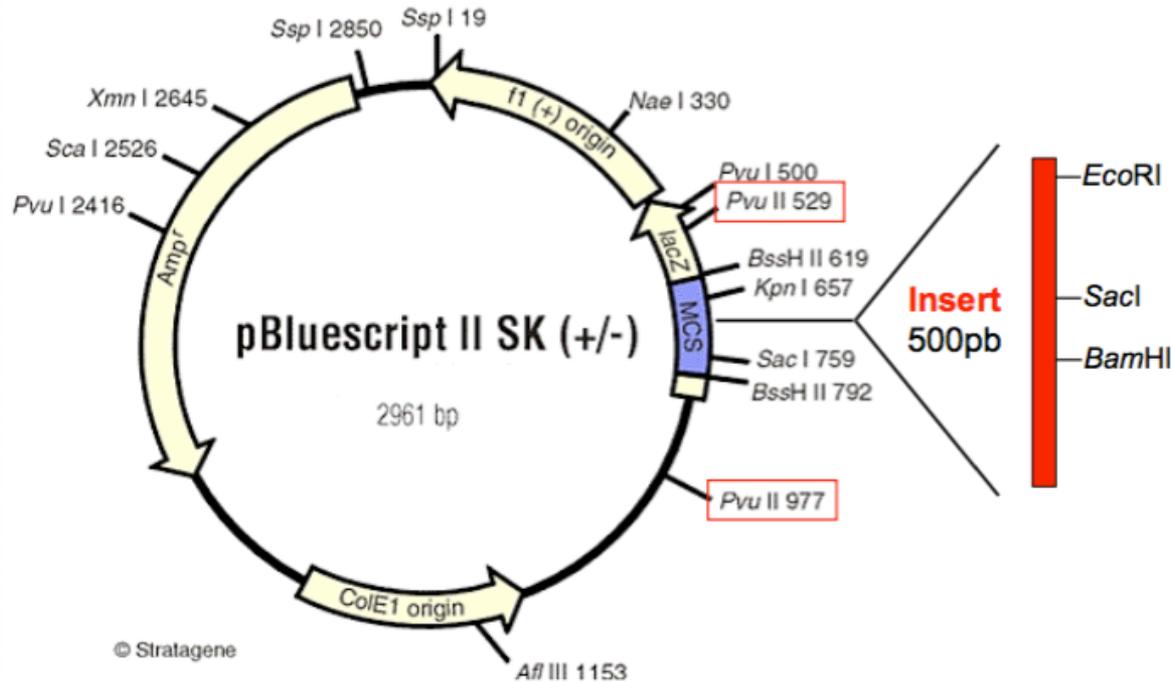
- Vérifier que le plasmide contient l'insert

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



# CARTES DE RESTRICTION

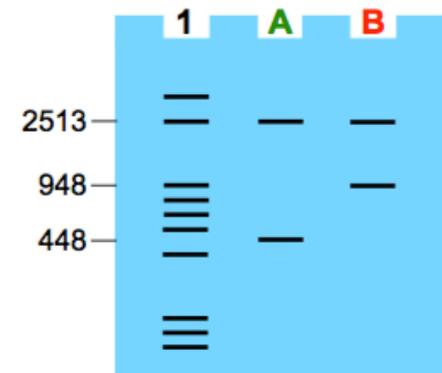
Les ADN recombinants purifiés sont analysés par digestion enzymatique: réalisation de sa carte de restriction.



## Digestion *PvuII*:

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

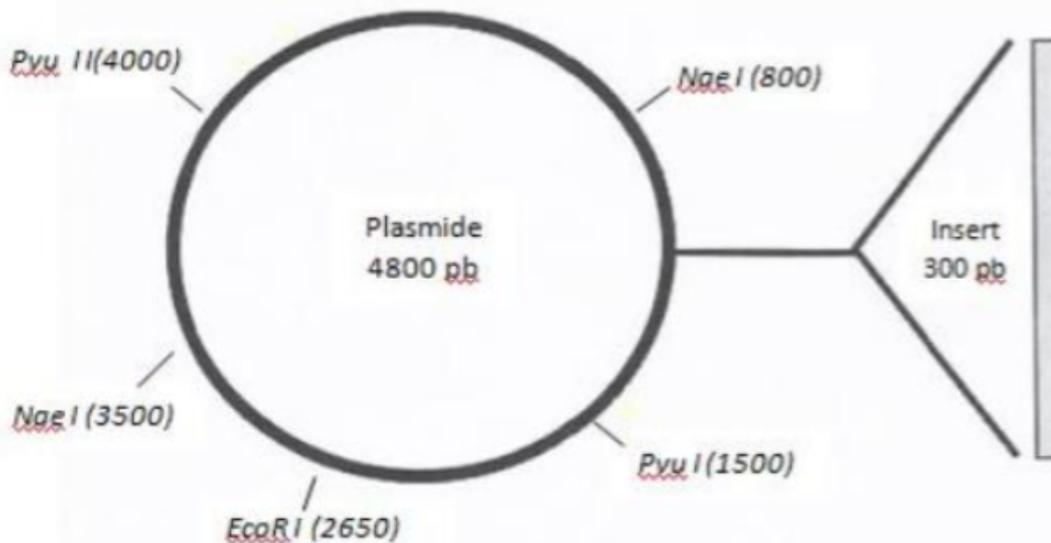
**B-** Plasmide avec insert:  
977-529 = 448 bp  
+ 500bp = 948bp



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

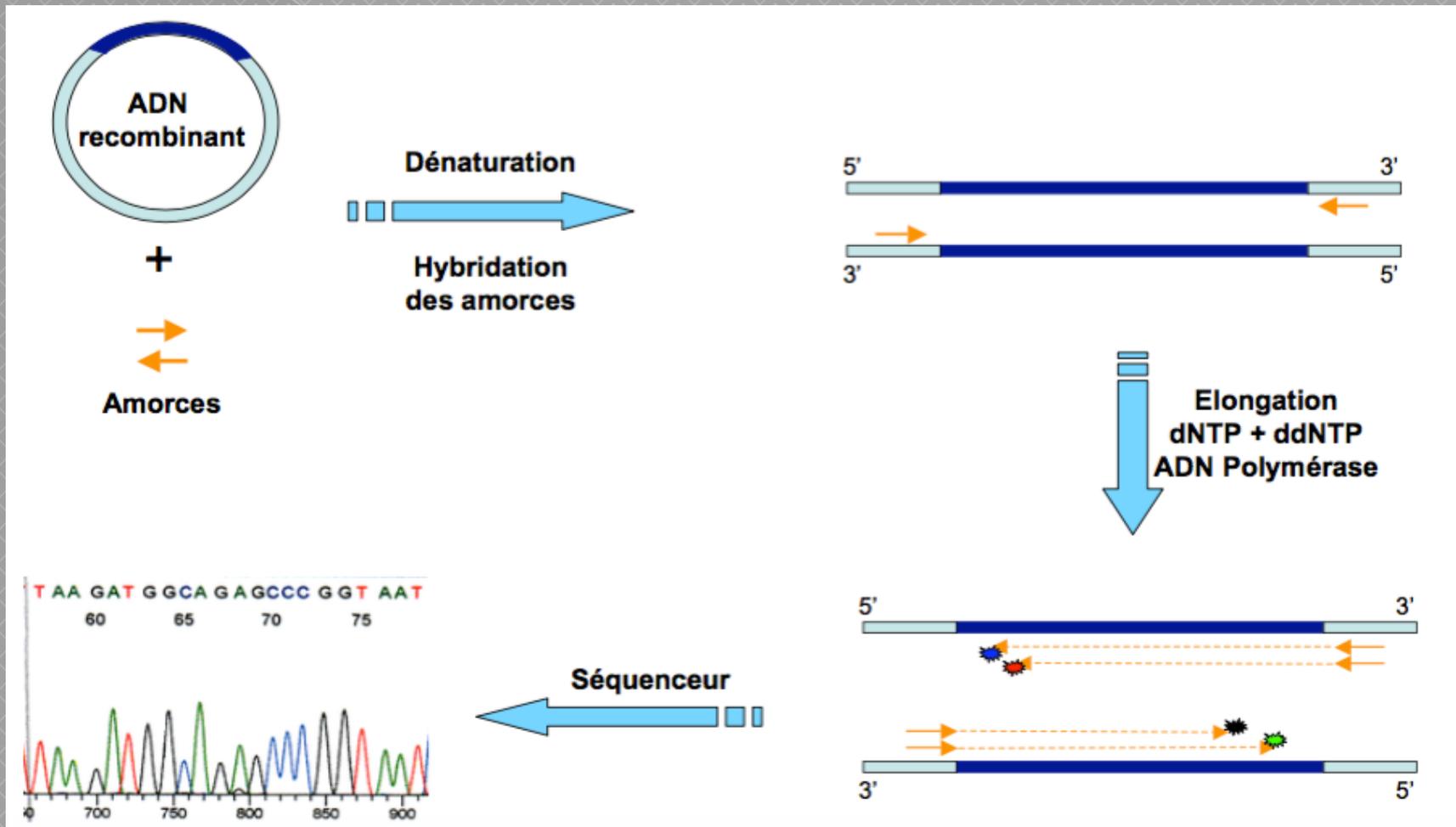
**E**

**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

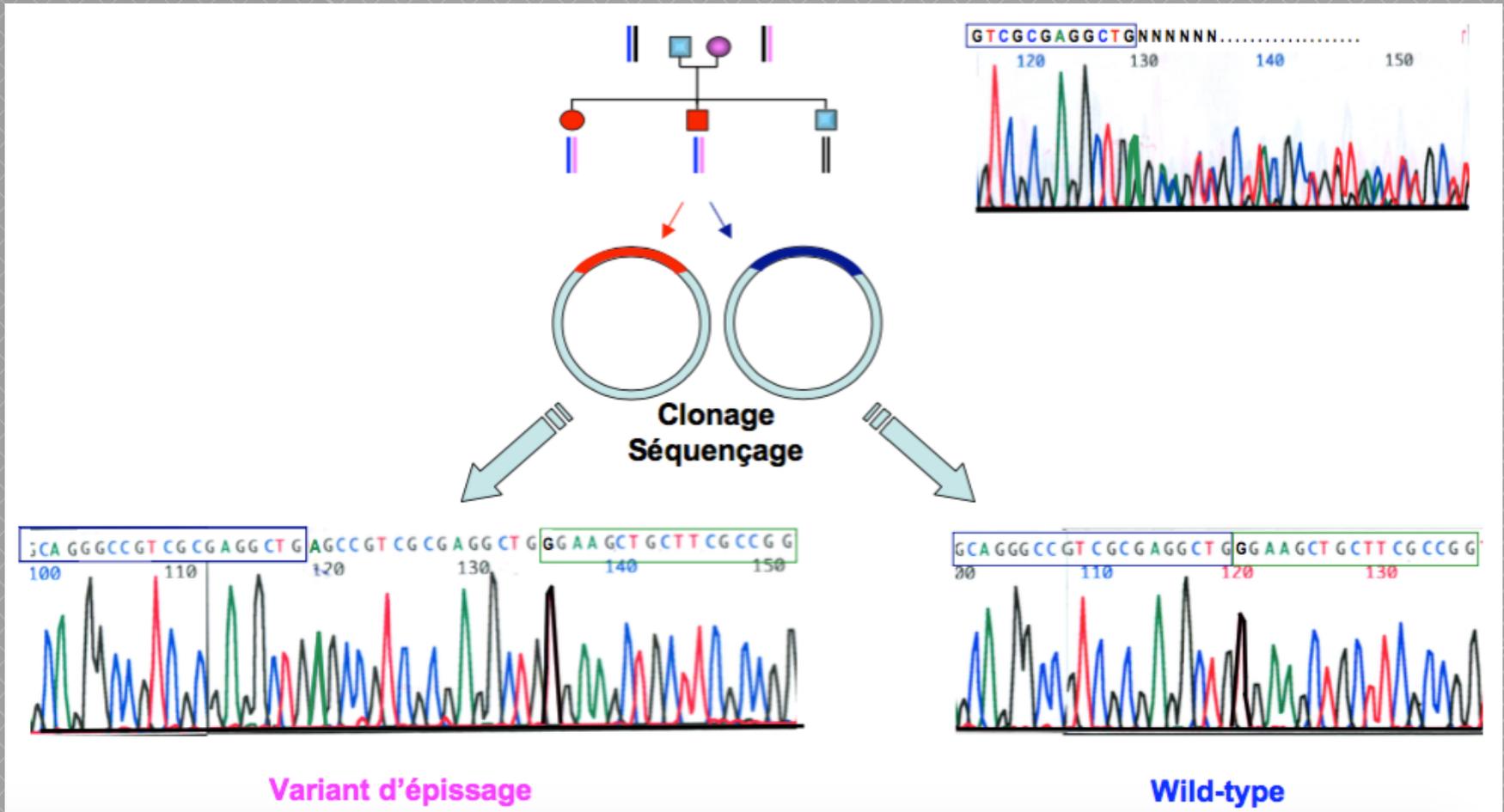
Après le clonage :

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

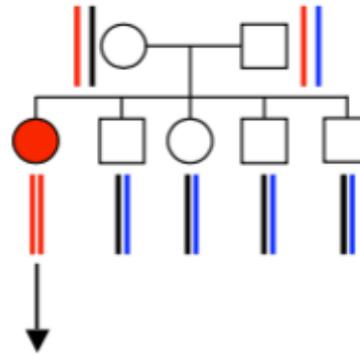
Conclusion :

- **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**

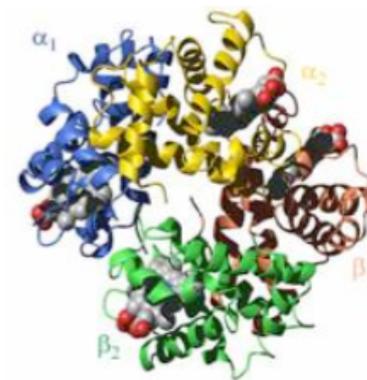
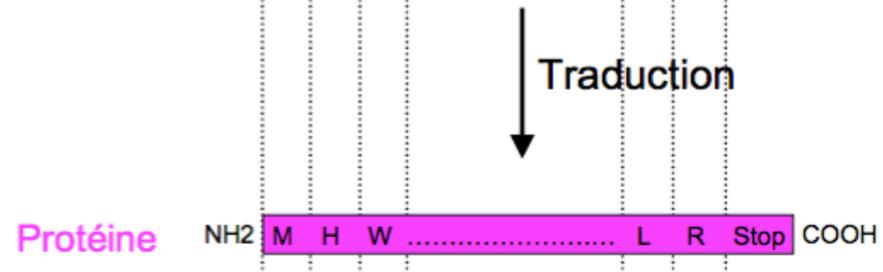
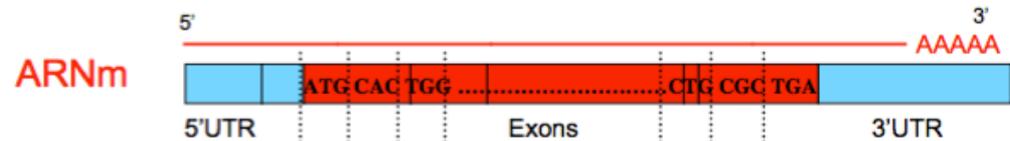
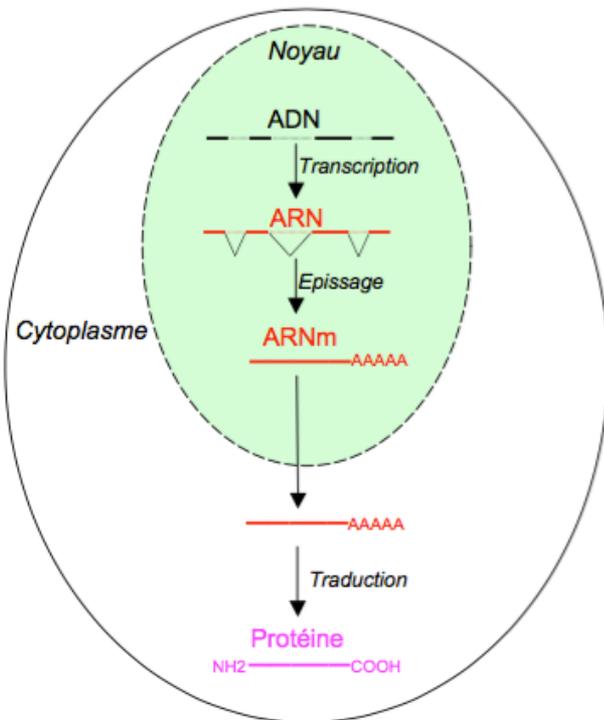
**Quel est le caractère pathogène  
de ce nouveau variant ???**

**Etude de la protéine mutante:**

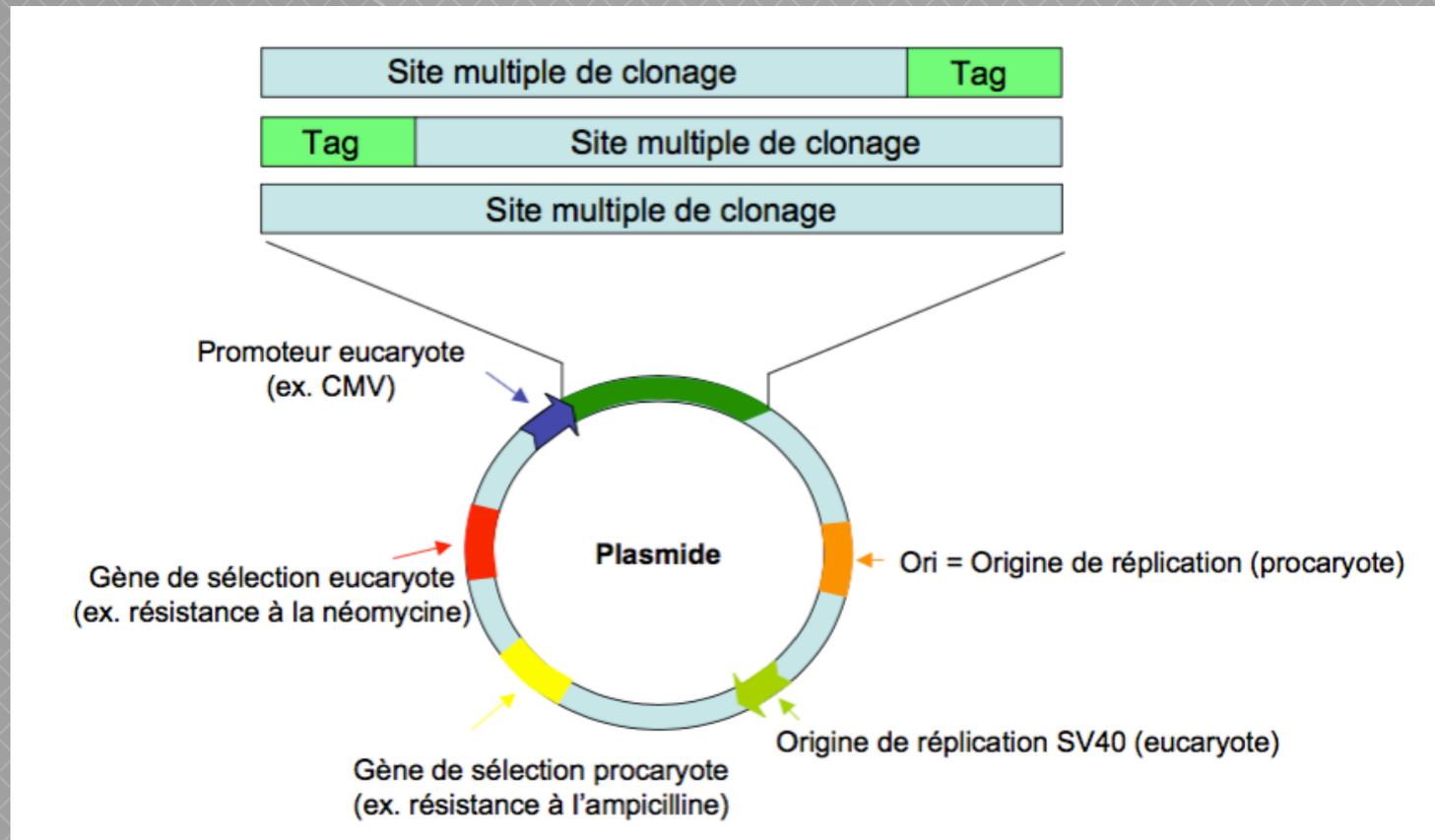
- Clonage d'expression
- Etude d'expression (ARNm, protéine)
- Tests fonctionnels

# CLONAGE D'EXPRESSION

## Quelques rappels :



# VECTEURS D'EXPRESSION EUCARYOTES



# PROTEINES DE FUSION

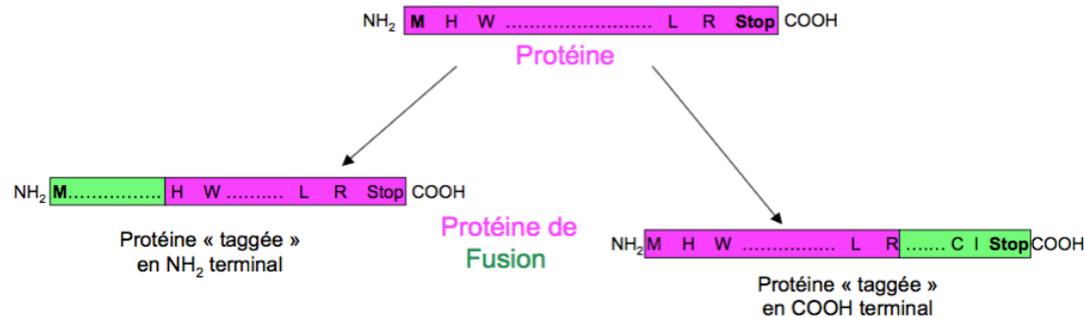
- Une fois la protéine surexprimée, il faut pouvoir la suivre :
  - Soit il existe déjà des **anticorps**
  - Soit il faut utiliser des « **étiquettes** » ou « **Tag** »
- Etiquettes = Répétitions de petites séquences bien définies que l'on greffe **en C-term ou N-term de la protéine**
- Ces « Tag »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

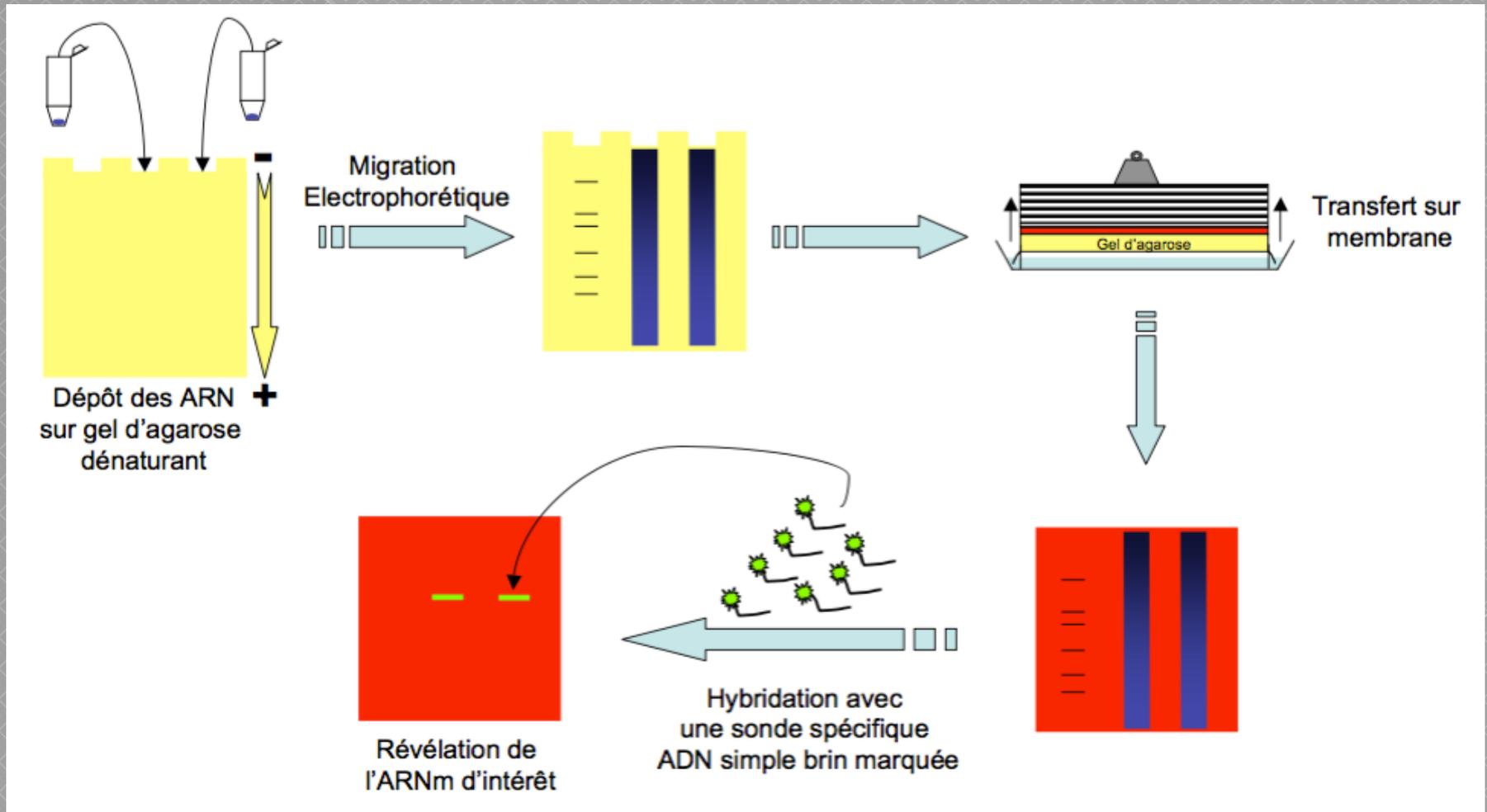
# ETUDES D'EXPRESSION DES ARN

- **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

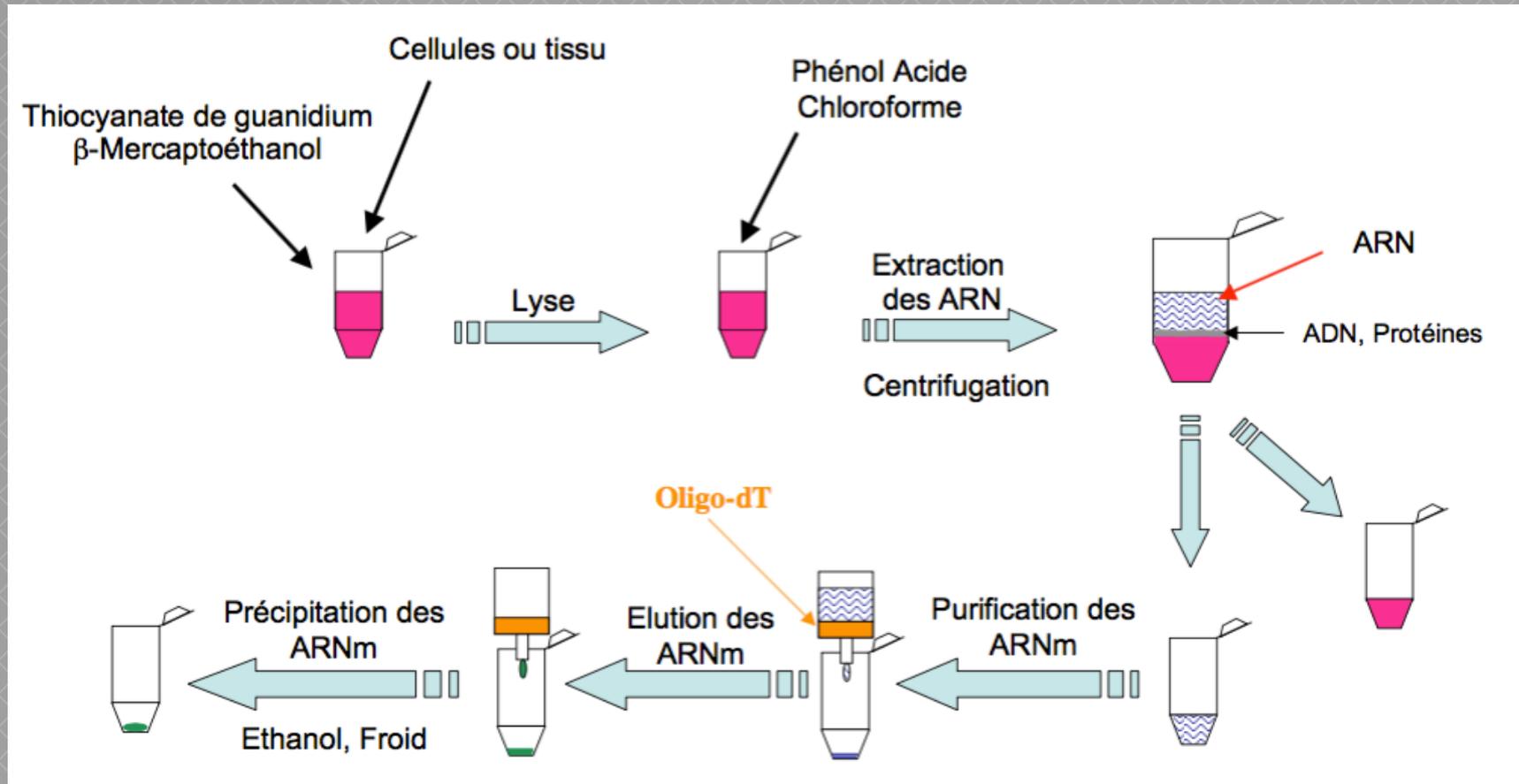
## Technique :

- Lyse des cellules en présence de Thiocyanate de guanidium + inhibiteur de ribonucléase ( $\beta$ -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



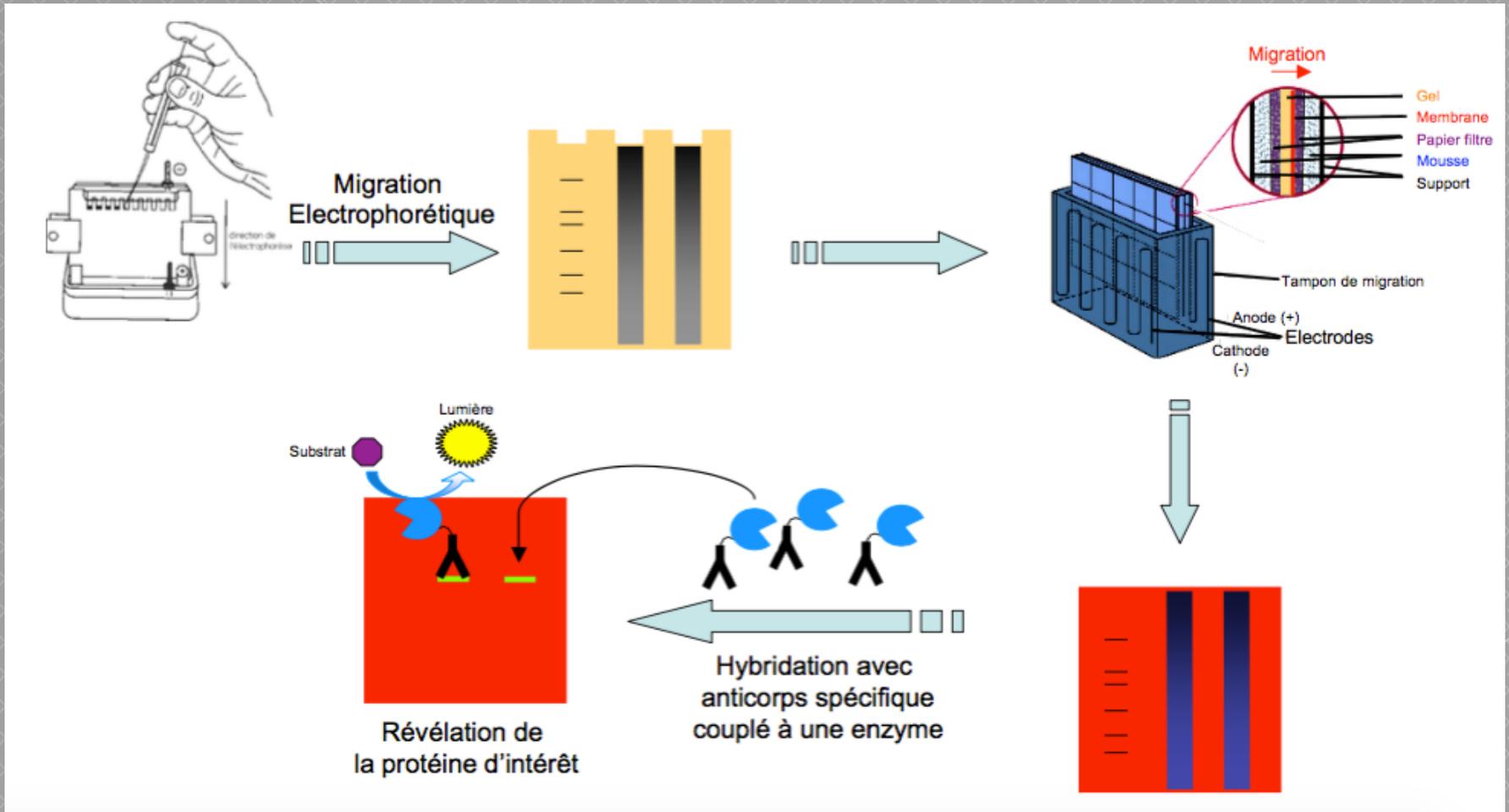
# ETUDES D'EXPRESSION DES PROTEINES

- ◉ **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



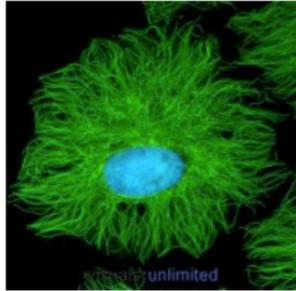
# ETUDES DE LA LOCALISATION DES PROTEINES

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

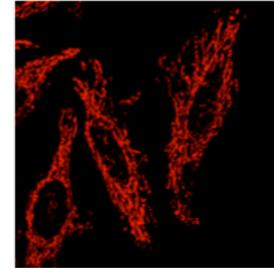
## Technique :

- 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**

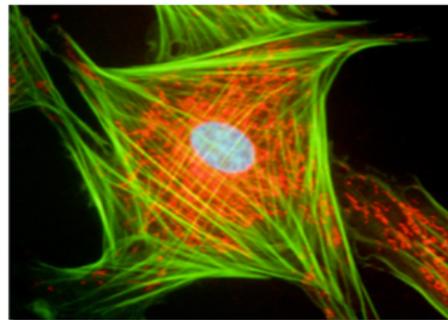
# ETUDES DE LA LOCALISATION DES PROTEINES



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 qualitative**)

Différences avec la PCR classique :

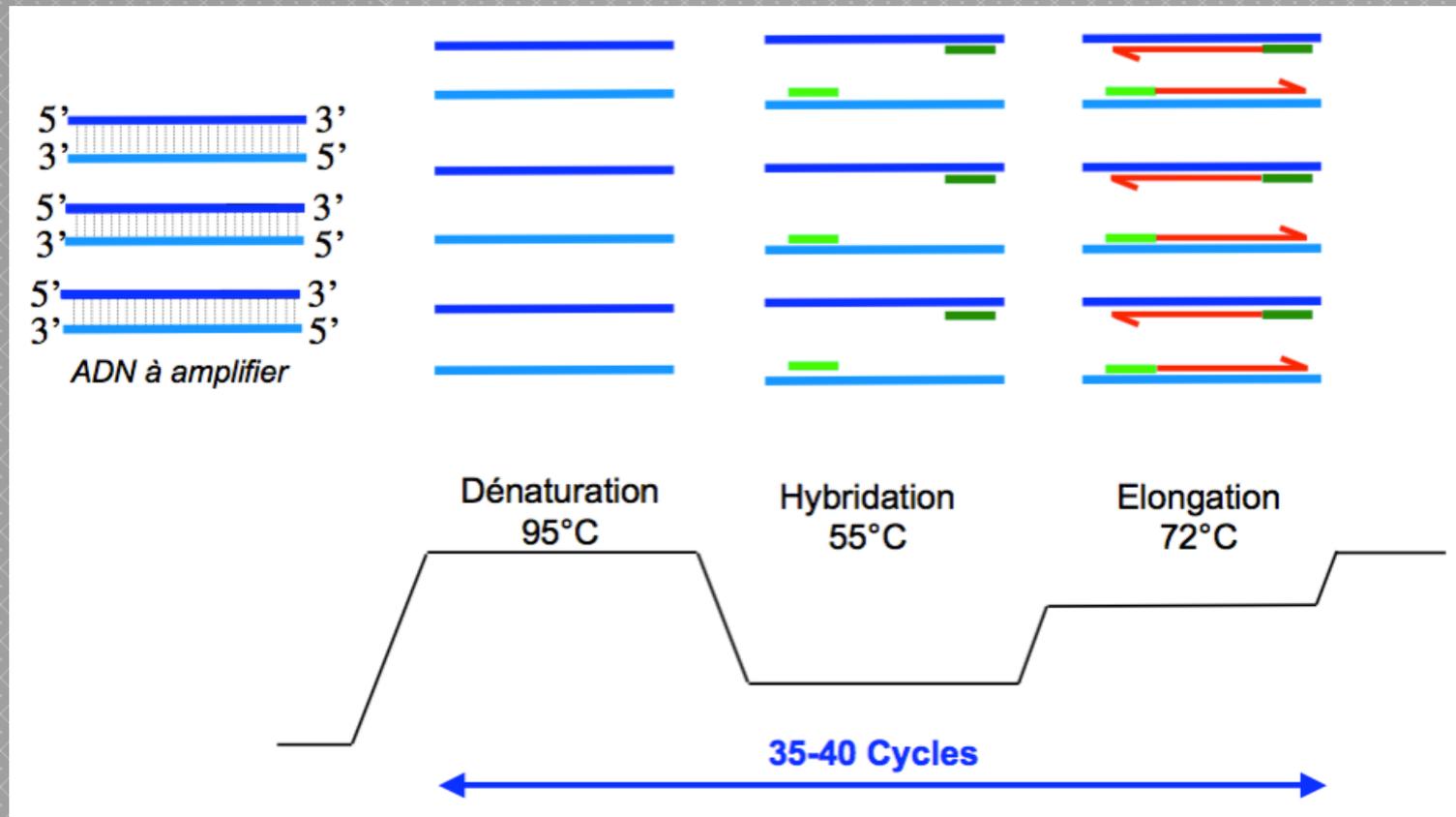
- Mesure de la fluorescence **directement après chaque cycle**
- Agent intercalant utilisé : BET vs **SYBR Green**

PCR classique :

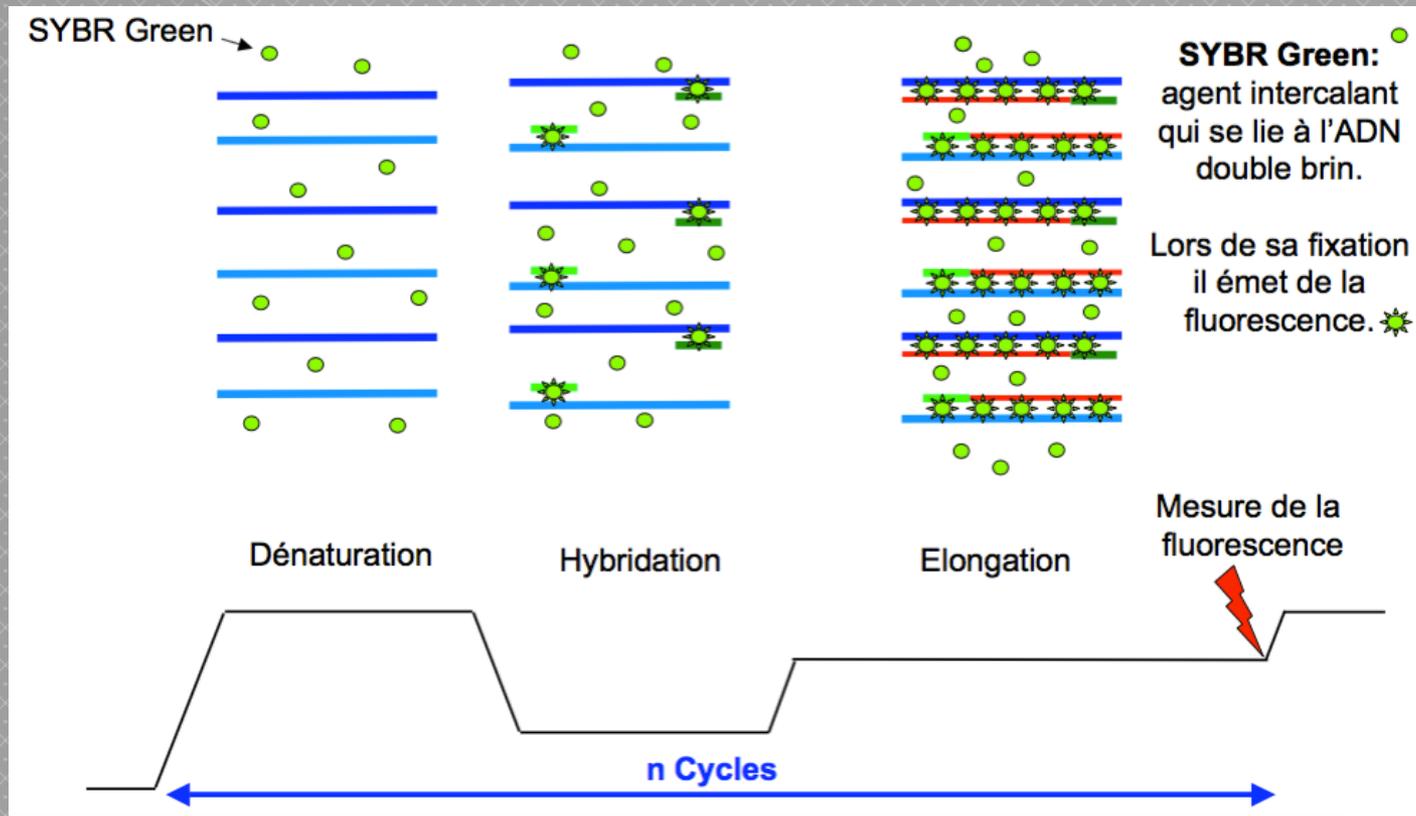
- Mesure de la quantité d'ADN qu'**après 35-40 cycles**
- Migration sur gel d'agarose ou d'acrylamide (sous lumière UV après une coloration BET)

# PCR EN TEMPS REEL

Etapes de la PCR (rappel) :



# PCR EN TEMPS REEL



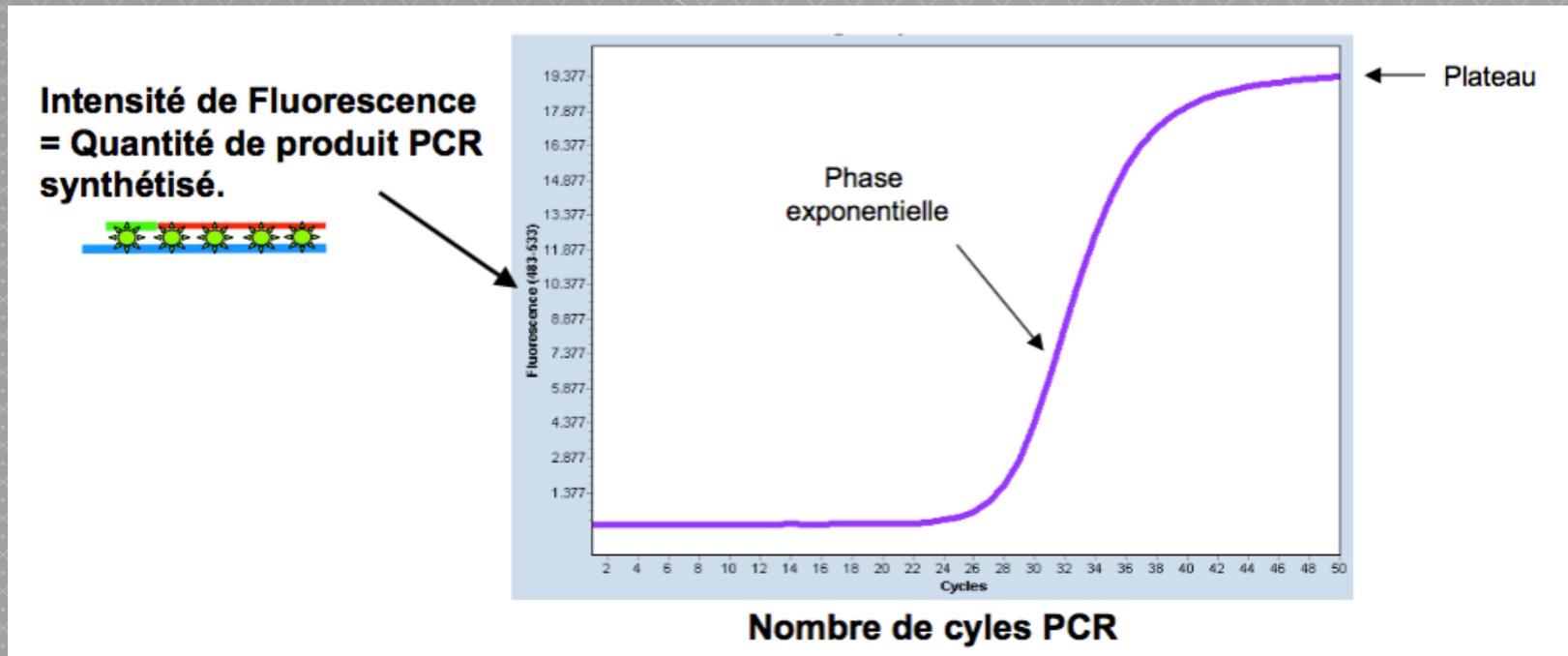
*L'intensité de la fluorescence est représentative de la quantité de produit PCR généré.*

# 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

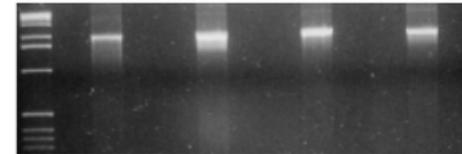
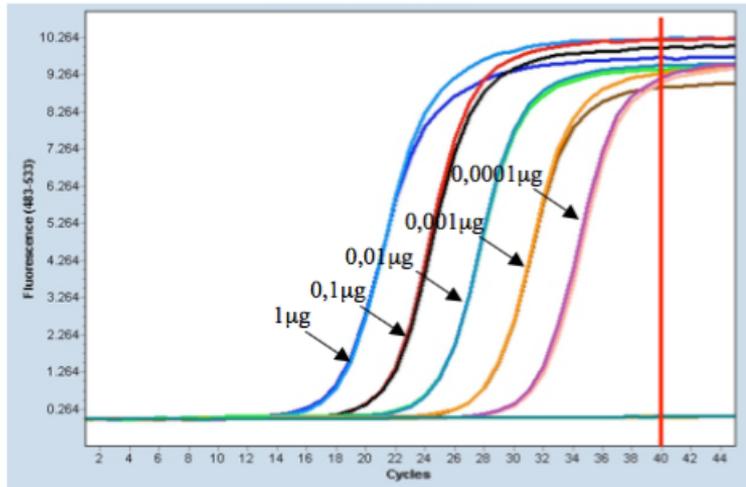
# PCR EN TEMPS REEL

- 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

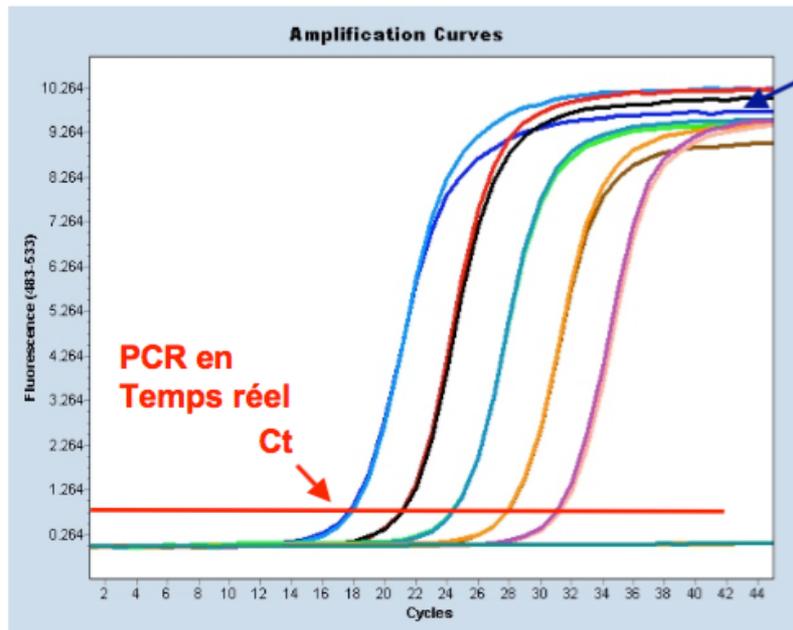


**Produits PCR  
40 cycles**

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

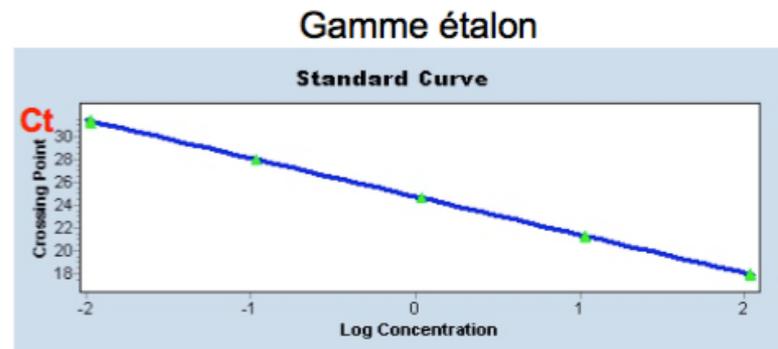
# PCR EN TEMPS REEL

- 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

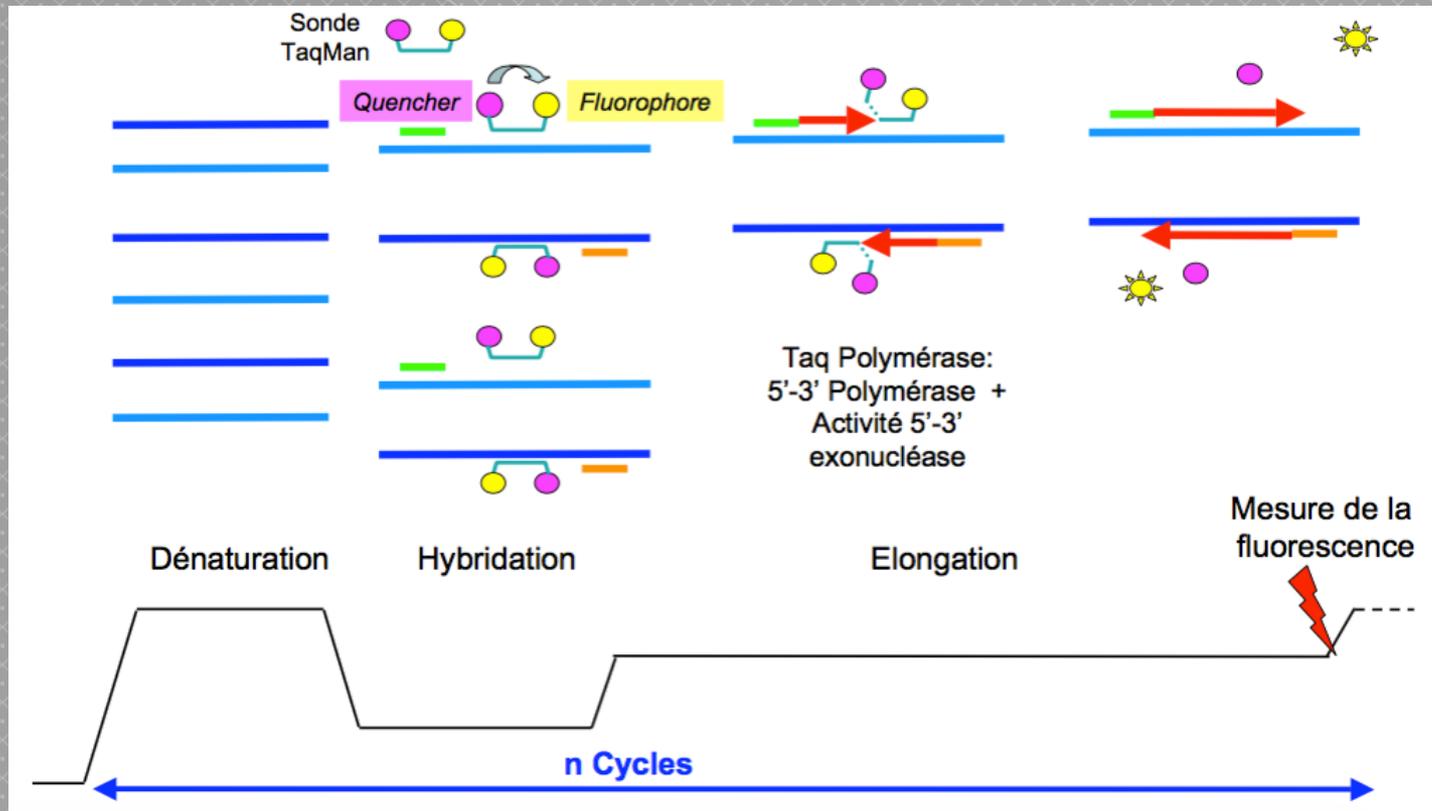
## Principe :

- 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 !