

Cours de Biologie Moléculaire



F. GESBERT

franck.gesbert@universite-paris-saclay.fr



Que savons nous?

- Le support de l'hérédité est l'ADN.
- Le principe transformant décrit par Griffith est l'ADN, comme montré par Avery, McLeod et MacCarthy.
- Les Acides nucléiques sont des polymères de nucléotides.
- Les nucléotides sont soit néosynthétisés au prix d'une importante dépense énergétique soit recyclés à partir de bases et/ou de nucléosides issus du catabolisme.
- Le PRPP est le ribose "activé" utilisé dans la néosynthèse ou l'épargne.
- Le système cellulaire régule l'équilibre des nucléotides.



Donc, au milieu des années 40, les questions sont:

- Qu'elle est la structure de l'Acide Désoxyribonucléique?
- Comment l'information génétique y est-elle "stockée" et comment est elle transmise ?

Objectif: déterminer une structure qui rende compte de sa polymérisation, de sa capacité à porter une information, de sa capacité à rendre compte d'une réplication.



Règle de Chargaff

A+

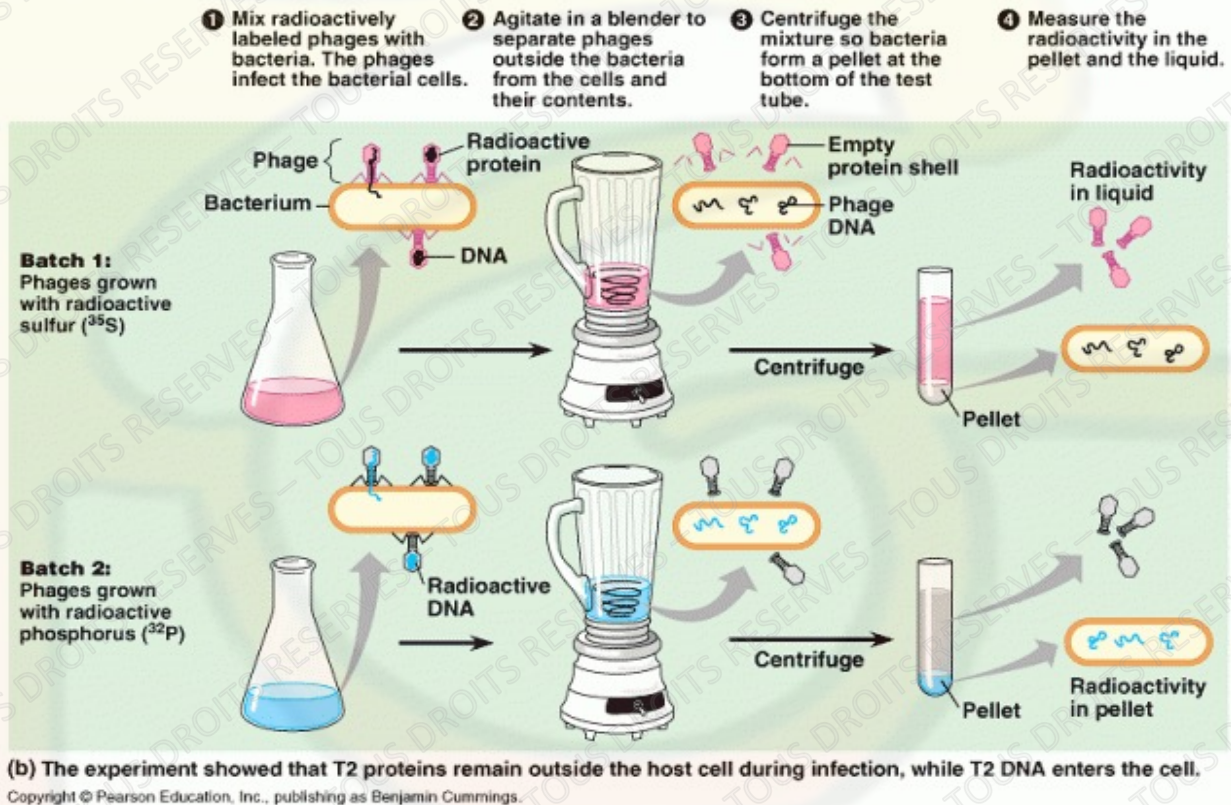
Erwin Chargaff (1905-2002)

The Separation and Quantitative Estimation of Purines and Pyrimidines in Minute Amounts. Vischer, E. and Chargaff, E. (1948) *J. Biol. Chem.* 176, 703-714.

	%A	%T	%G	%C
Human	30.9	29.4	19.9	19.8
Chicken	28.8	29.2	20.5	21.5
Locust	29.3	29.3	20.5	20.7
Wheat	27.3	27.1	22.7	22.8
Yeast	31.3	32.9	18.7	17.1
E. coli	24.7	23.6	26.0	25.7

$\%A = \%T$ $\%G = \%C$ Dans l'ADN

Donc ... % purines = % pyrimidines sur un ADN double brin



INDEPENDENT FUNCTIONS OF VIRAL PROTEIN AND NUCLEIC ACID IN GROWTH OF BACTERIOPHAGE*

By A. D. HERSHEY AND MARTHA CHASE

(From the Department of Genetics, Carnegie Institution of Washington, Cold Spring Harbor, Long Island)

(Received for publication, April 9, 1952)

We infer that sulfur-containing protein has no function in phage multiplication, and that DNA has some function.

We infer that sulfur-containing protein has no function in phage multiplication, and that DNA has some function

It must be recalled that the following questions remain unanswered. (1) Does any sulfur-free phage material other than DNA enter the cell? (2) If so, is it transferred to the phage progeny? (3) Is the transfer of phosphorus (or hypothetical other substance) to progeny direct—that is, does it remain at all times in a form specifically identifiable as phage substance—or indirect?

Our experiments show clearly that a physical separation of the phage T2 into genetic and non-genetic parts is possible. A corresponding functional separation is seen in the partial independence of phenotype and genotype in the same phage (Novick and Szilard, 1951; Hershey *et al.*, 1951). The chemical identification of the genetic part must wait, however, until some of the questions asked above have been answered.

Démonstration que l'ADN a une fonction dans la répllication et la multiplication du virus.

The chemical identification of the genetic part must wait, however, until some of the questions asked above have been answered.



La double hélice

A+

- 1953: **Rosalind Franklin** (Par cristallographie aux rayons X, dans le laboratoire de Maurice Wilkins) montre que :
 - 1- l'ADN peut se présenter sous deux formes.
 - 2- le squelette "sucre-phosphate" se trouve exposé à l'extérieur de la molécule d'ADN
- 1953: **Jim Watson** et **Francis C. Crick** savent que:
 - Les gènes dirigent l'expression de protéines
 - Les gènes sont des entités situées sur les chromosomes
 - Les gènes sont constitués d'Acides Nucléiques
 - Le support de l'information génétique est, au moins en partie, l'Acide Désoxyribonucléique
 - Il y a une "relation" entre A et T et entre G et C (règle de Chargaff)



La double hélice

A+

En assemblant les formes tautomériques correctes des bases (ce que ne sait pas Linus Pauling), Watson et Crick aboutissent à cette conclusion:

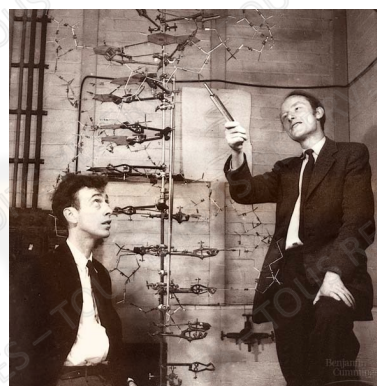
L'ADN est une **double hélice**, composée d'un **squelette** externe "**sucre-phosphate**" et les **bases s'apparient** dans l'hélice par des **liaisons hydrogène**. Ces appariements sont dirigés par la complémentarité de structure des bases A-T et G-C.

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid
No. 4356 April 25, 1953 NATURE

J. D. WATSON
F. H. C. CRICK

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems,
Cavendish Laboratory, Cambridge.
April 2.

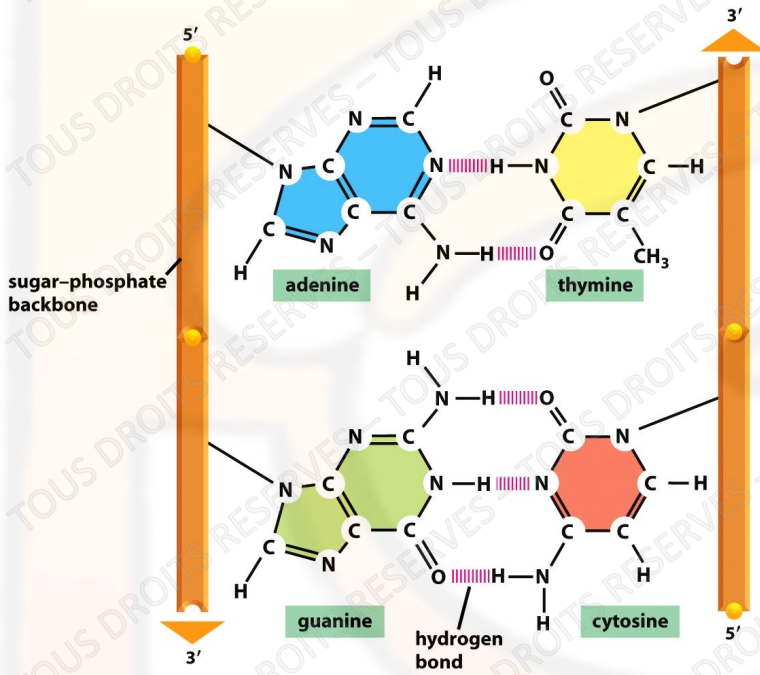


Physiology, medicine 1962, Crick, Wilkins, Watson



La double hélice

A+



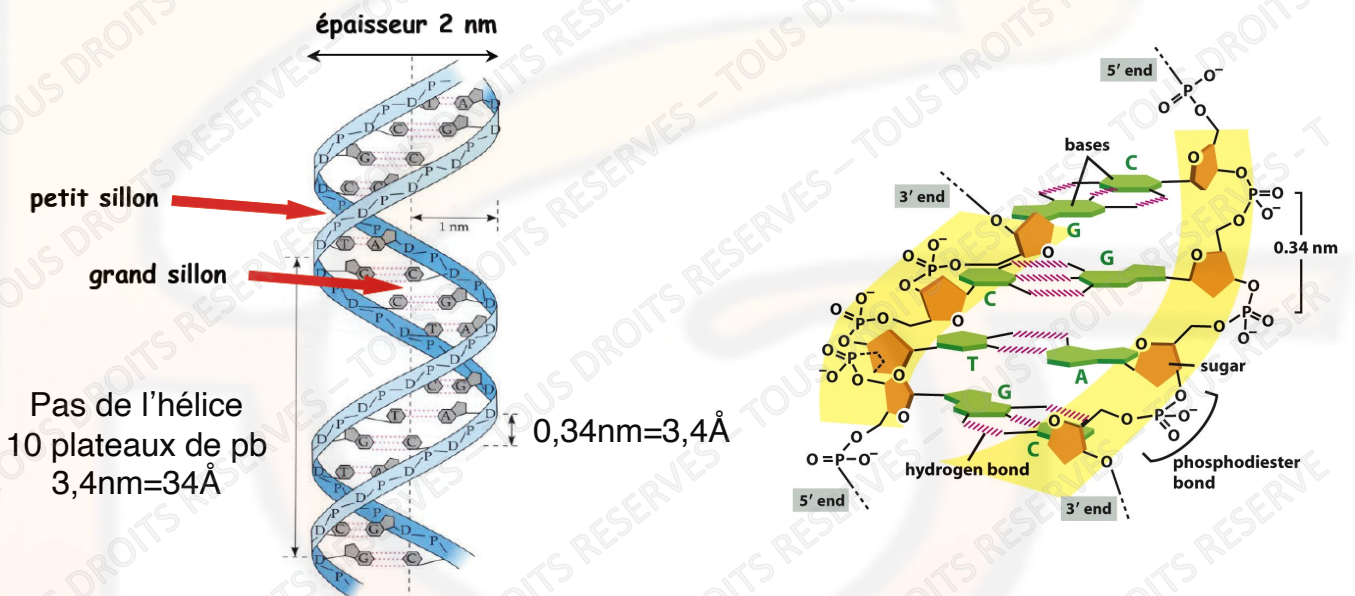
Ce modèle rend donc parfaitement compte d'une structure en **double hélice** et explique les résultats de Chargaff (%A=%T et %G=%C).

La double hélice est composée de **deux brins** (orientés 5'-3') **complémentaires et antiparallèles**.



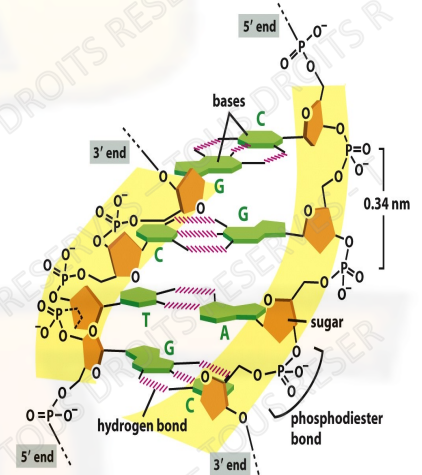
La double hélice

A+



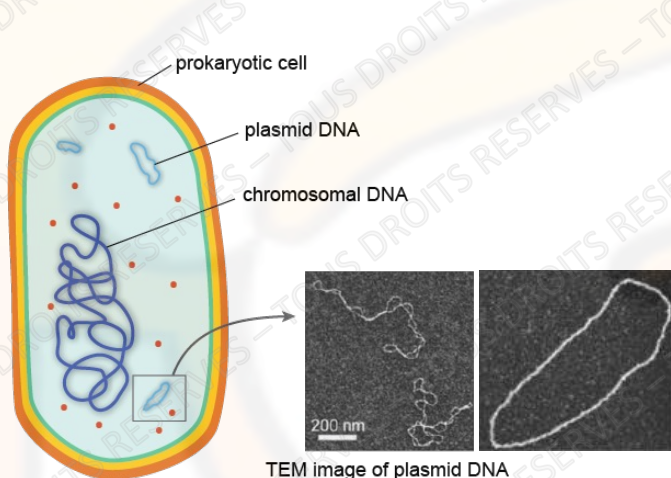
Forme B, hélice droite, hydratée

- **L'ADN est une double hélice formée de 2 brins complémentaires orientés de manière antiparallèle.**
 - Chaque brin est composé de désoxyribonucléotides reliés de façon covalente par une liaison phosphodiester. La liaison ester est établie entre le phosphate en 5' porté par le nucléotide n et le groupement OH en 3' porté par le nucléotide (n+1).
 - Les 2 brins sont appariés par des liaisons hydrogènes établies entre une purine et une pyrimidine. Cet appariement suit une règle de complémentarité stricte entre A/T et G/C.
 - Plus une séquence sera riche en GC plus l'appariement sera stable.
- **L'ARN est un simple brin composé de ribo-nucléotides.**
 - La Thymine en est absente et est remplacée par l'**Uracile**.
 - Il peut y avoir formation de double hélice ADN/ARN ou ARN/ARN (intra ou intermoléculaire). Avec une règle de complémentarité A/U et G/C.

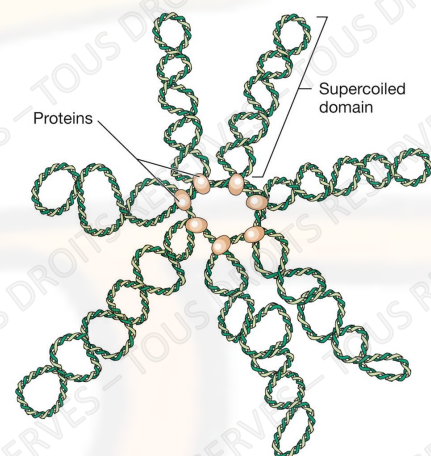


L'ADN - structure et organisation

L'ADN bactérien (*E. coli*) est une macromolécule unique, circulaire et super-enroulée de 4600 kb (1,5mm).



TEM image of plasmid DNA

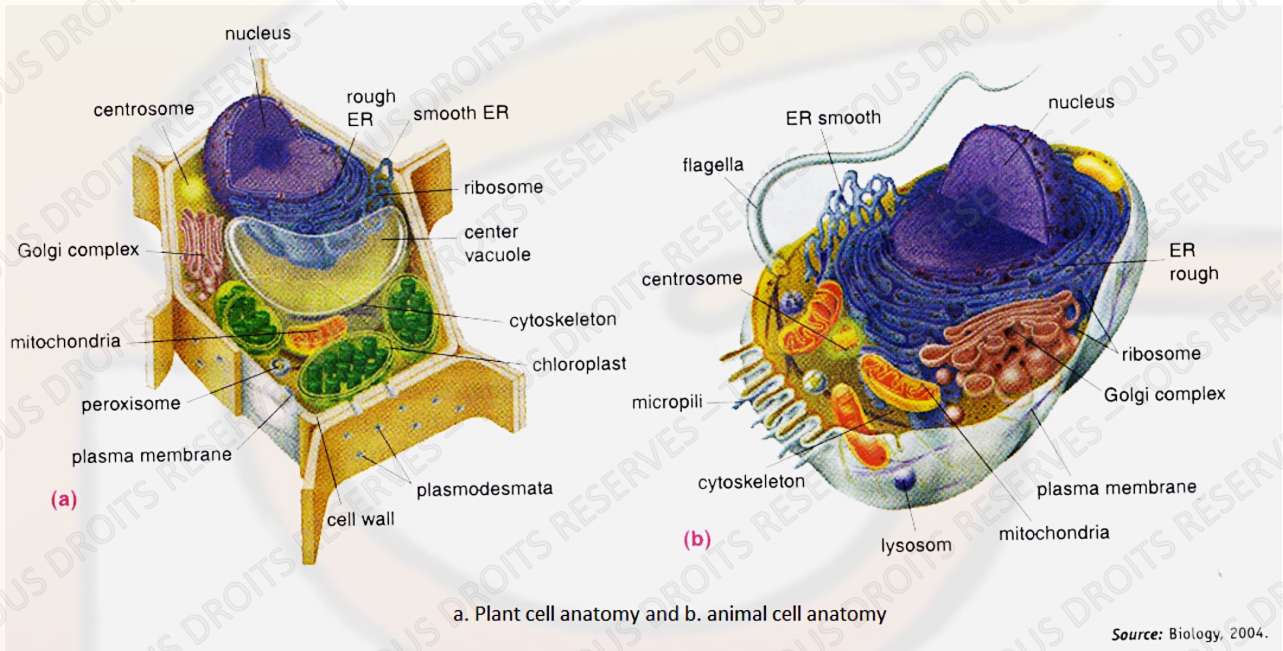


(d) Chromosomal DNA with supercoiled domains

Le chromosome bactérien circulaire est super-enroulé suite à l'action de la gyrase (topoisomérase de type II)

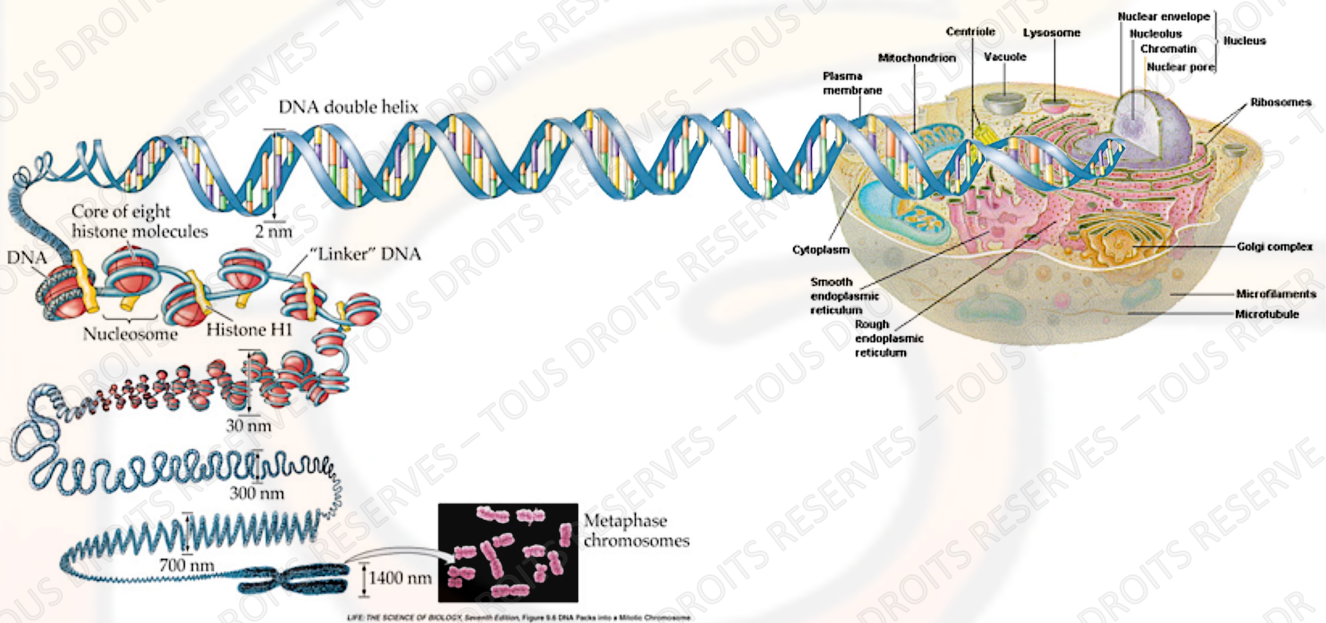


3 localisations possibles pour l'ADN dans les cellules eucaryotes: Noyau, mitochondries et chloroplastes



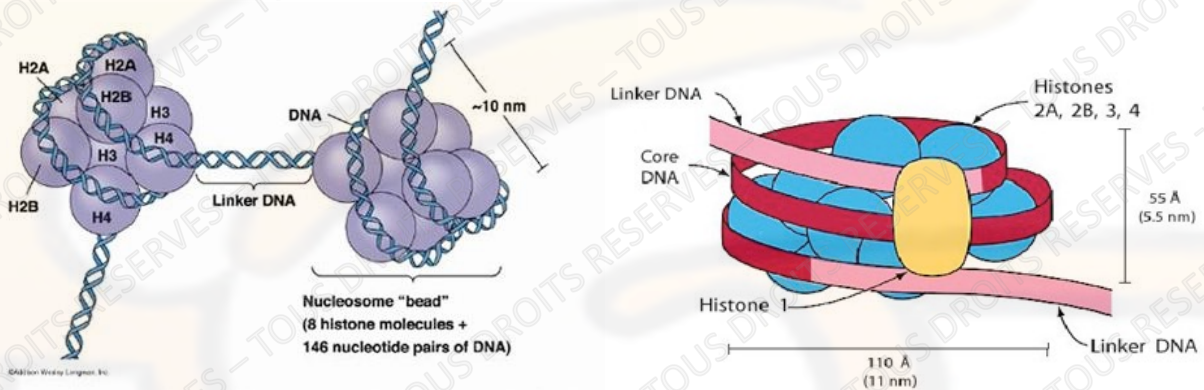
L'ADN - structure et organisation

Le chromosome eucaryote nucléaire est constitué d'une double hélice d'ADN linéaire et de protéines histones et non histones





Le nucléosome



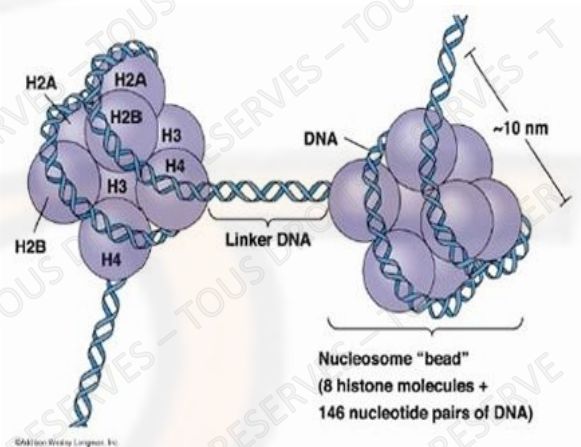
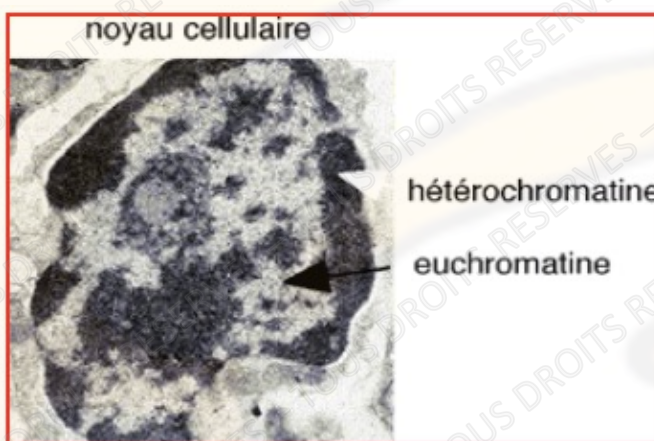
Structure des nucléosomes: Chaque nucléosome est composé de 8 histones, soit 2 de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4, associées à 146 pb d'ADN; un bout d'ADN de liaison relie chaque nucléosome.

$$1 \text{ nucléosome} = 2 \times (H2A + H2B + H3 + H4) + 146 \text{ pb ADN} + 60 \text{ pb ADN (linker)} + H1$$



L'ADN - structure et organisation

La chromatine



- Complexe nucléo-protéique de l'ADN nucléaire
- Chromatine = ADN + protéines histones + protéines non histones
- Plusieurs niveaux de condensation
- Unité de répétition: le nucléosome



Il n'avait pas échappé à Watson et Crick que la structure en double hélice pouvait également permettre à la molécule d'ADN de se dupliquer.



It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

J. D. WATSON
F. H. C. CRICK

NATURE

April 25, 1953 VOL. 171

Comment se réplique l'ADN au cours d'une division cellulaire?

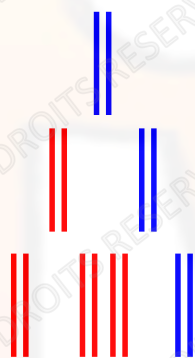


La double hélice est composée de deux brins complémentaires et antiparallèles.

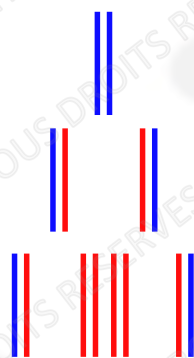
Question au milieu des années 50:

Comment ces deux brins sont-ils utilisés pour générer deux nouveaux brins lors de la réplication ?

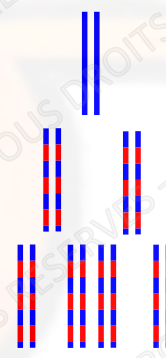
3 hypothèses possibles:



Modèle conservatif



Modèle semi-conservatif

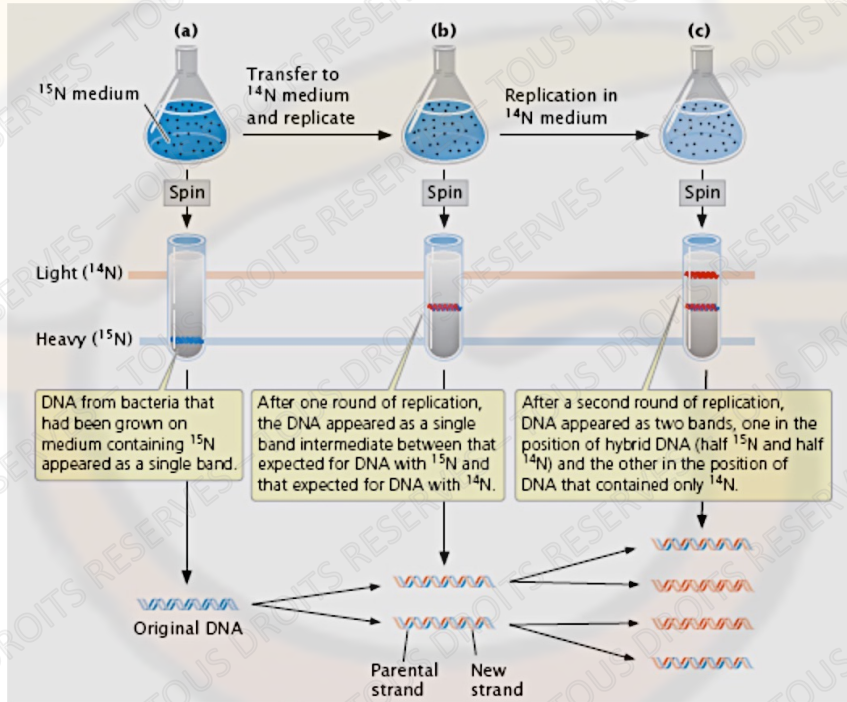


Modèle dispersif

La réplication est semi conservative

A+

1958: Meselson et Stahl mettent en évidence le principe **semi-conservatif** de la réplication. Mise au point du protocole de séparation de molécules d'ADN sur gradient de CsCl.



La réplication

A+

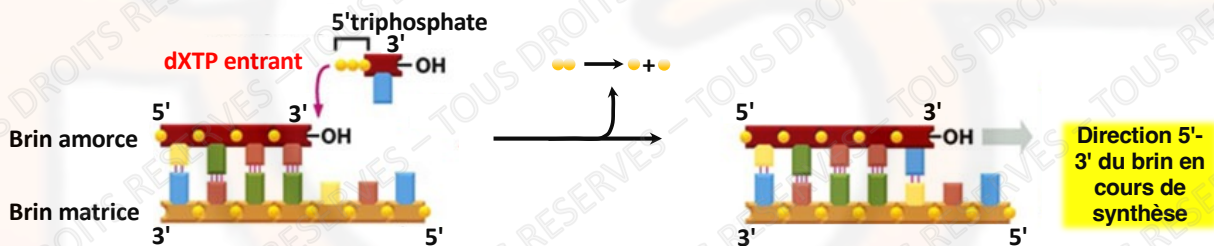
L'ADN est synthétisé par les **ADN polymérases**

Matrice: ADN simple brin

Amorce: court oligonucléotide (ADN ou ARN), apparié à la matrice

Précurseurs: dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP)

Synthèse de 5' vers 3'





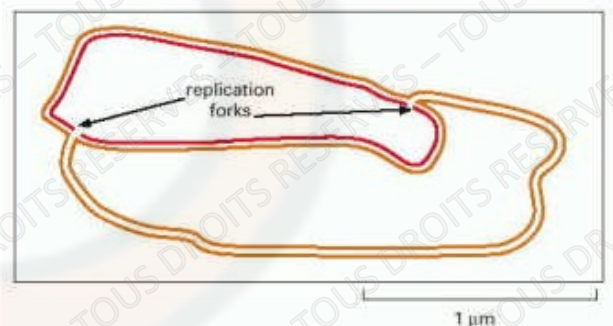
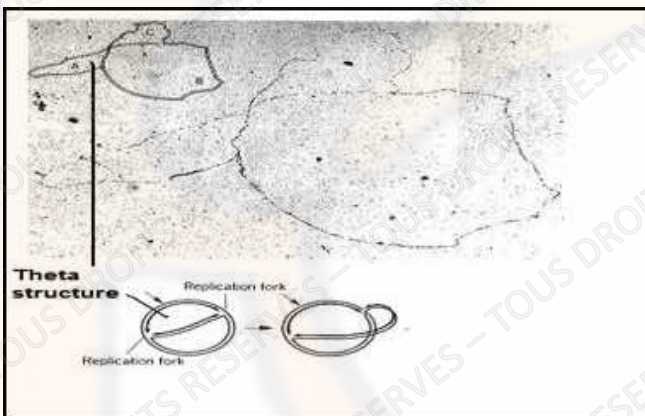
La réplication est divisée en trois étapes successives

- 1- **Initiation**: ouverture de la double hélice, maintien sous forme simple brin et démarrage de la copie.
- 2- **Elongation**: Recopie des deux brins de manière coordonnée et finalisation des brins retardés.
- 3- **Terminaison**: Finalisation de la copie. Maintien de la fidélité en fin de copie. Problèmes liés à la structure circulaire ou linéaire.



Cairns, Broda et Masters (1963-1971):

- marquage de l'ADN bactérien en présence de ^3H au cours de deux cycles cellulaires
- extraction du chromosome et dépôt sur une plaque recouverte d'émulsion photo
- impression pendant deux semaines au froid.



La réplication bactérienne est **bi-directionnelle** à partir d'un **site unique**



La réplication - topoisomérases

A

- Gyrase** : - topoisomérase de type II
- avance en amont de chaque fourche de réplication

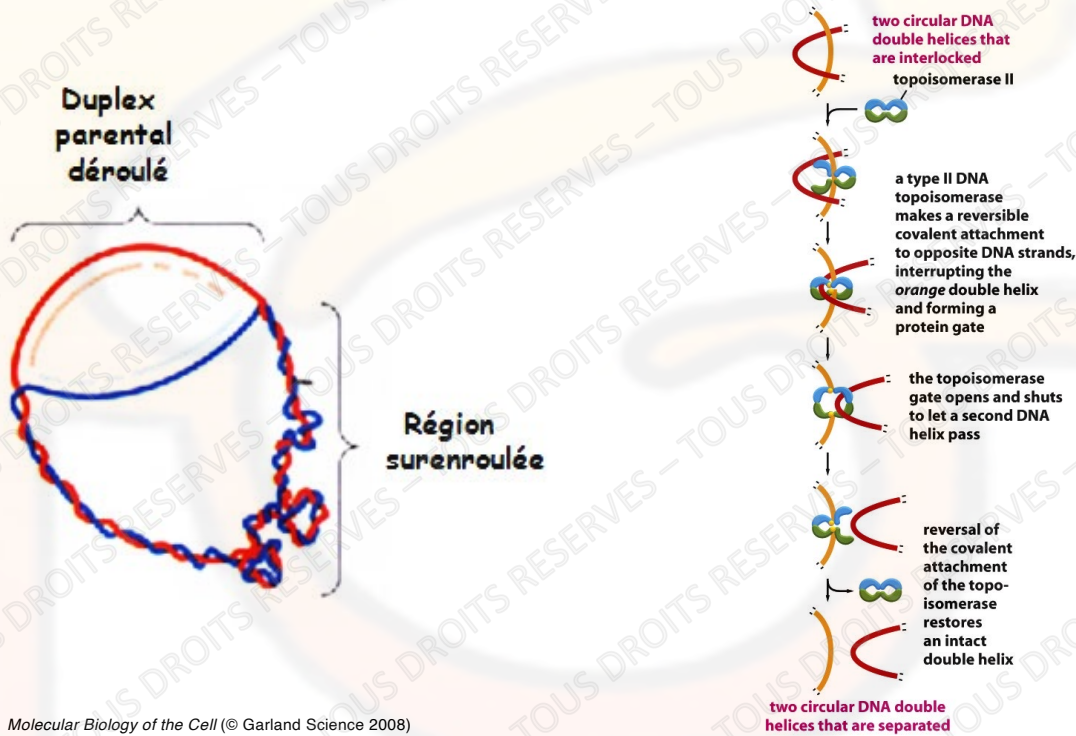


Figure 5-24 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



La réplication - topoisomérases





Les topoisomérases:

- enzymes responsables du contrôle de la topologie des molécules d'ADN.
- Font et défont des supertours.
- Parmi les protéines les plus conservées dans le monde ADN

- 2 catégories:
 - Type I: responsables de cassures simple brin. Topo IA, IB, IC, III, V
 - Type II: responsables de cassures double brin. Topo IIA, IIB, IV

- Fonctions variées:
 - compaction
 - réplication, ségrégation des chromosomes
 - Transcription
 - Recombinaison et réparation

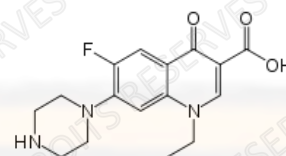


Topoisomérases et cibles thérapeutiques

- antibiotique
 - inhibiteurs de Gyrase (topo II):

fluoroquinolones

(Norfloxacin, Ciprofloxacin, levofloxacin...)



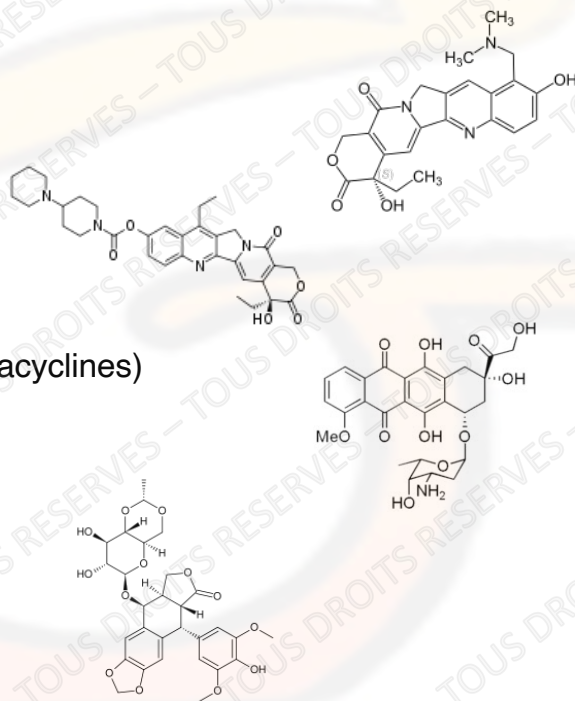
Attention : suite à réévaluation par EMA, les fluoroquinolones sont désormais à réserver aux infections pour lesquelles une antibiothérapie est indispensable et où d'autres antibiotiques ne peuvent pas être utilisés.



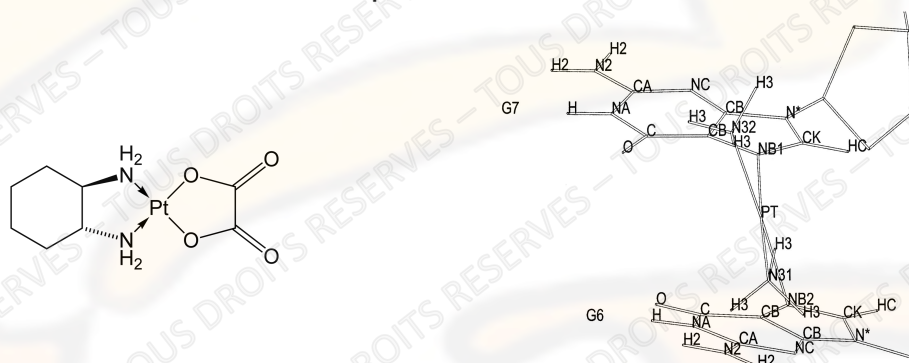
Topoisomérases et cibles thérapeutiques

Anticancéreux

- inhibiteurs des Topo I:
 - Topotécane
 - Irinotécane
- inhibiteurs des Topo II:
 - doxorubicine (anthracyclines)
 - étoposide



Cisplatine, oxaliplatine : Formation de dimères de guanine intra chaîne (agents alkylants), inhibiteurs de la réplication.



quelques exemples:

- 1^{ere} ligne de défense contre le cancer colorectal :
 - Irinotécane – 5FU- acide folinique, ou seul.
- Cancer du poumon à petites cellules: Cisplatine - étoposide

Propriétés physico-chimiques des acides nucléiques



Propriétés physico-chimiques des acides nucléiques

A+

Quelques conventions à respecter:

- Une séquence d'acide nucléique sera écrite de gauche à droite avec le 5' à gauche.
- Les unités de longueurs sont les nucléotides.
- Les tailles sont exprimées en longueur (pour les protéines c'est en masse)
- Masse d'un nucléotide ≈ 300 Da.

Pour l'ADN (double brin)

- Unité de longueur = 1 paire de base (1pb)
- 1000 pb = 1kb
- 1000 kb = 1Mb

Pour l'ARN (simple brin)

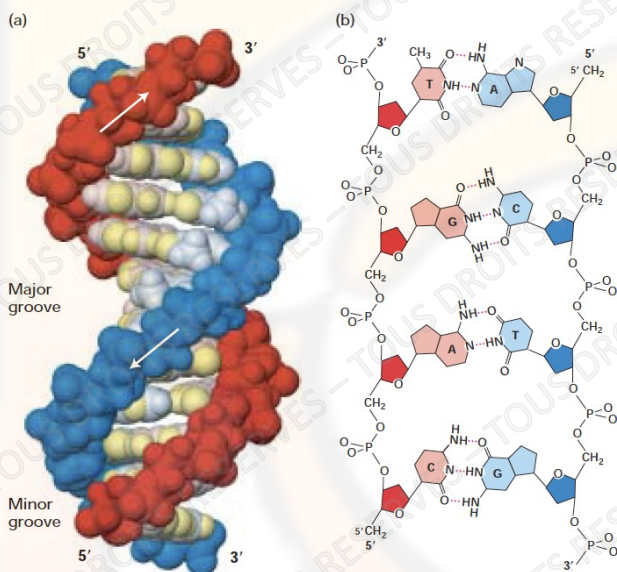
- Unité de longueur = 1 nucléotide = 1 mer



- connaître les propriétés physico-chimiques des acides nucléiques :
 - Nature, taille, densité
 - Charge
 - Propriétés spectrales
- Méthodes d'études :
 - Extraction et purification
 - Dénaturation et renaturation
 - Hydrolyse chimique et enzymatique
 - Action d'enzymes de modifications
- Savoir les utiliser à des fins expérimentales



I- CHARGE



1- Les Acides Nucléiques sont chargés négativement à $\text{pH} \approx 7$

2- Possibilité de séparation selon la taille :

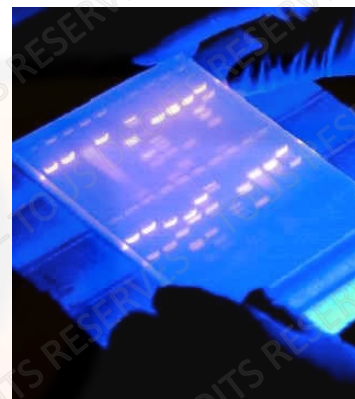
- Sur gel d'agarose (TAE ou TBE) avec une résolution au mieux de 20 à 30nt

- Sur gel d'acrylamide avec une résolution de 1nt.



Séparation des acides nucléiques selon leur taille par électrophorèse

- A pH7, ADN et ARN sont chargés négativement.
- il est possible de les faire migrer dans un champ électrique.
- Les molécules pourront être séparées selon leur taille dans un maillage d'agarose ou d'acrylamide.

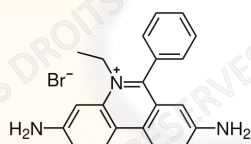


Les intercalants

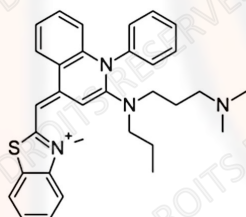
A

Molécules polycycliques planes s'intercalant entre deux plateaux de paires de bases au sein d'une double hélice d'acides nucléiques.

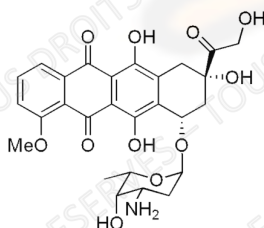
- cancérigènes, mutagènes et affectent la reproduction (BET, benzopyrène, aflatoxine).
- changement de conformation de l'ADN (le plus souvent), qui peut conduire à une modification fonctionnelle.



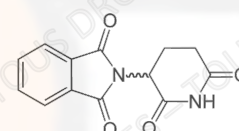
Bromure d'ethidium



Sybr Green



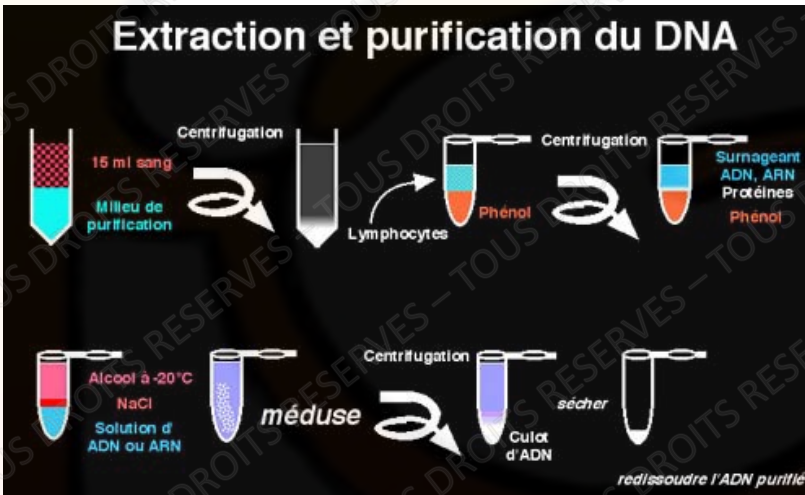
Doxorubicine



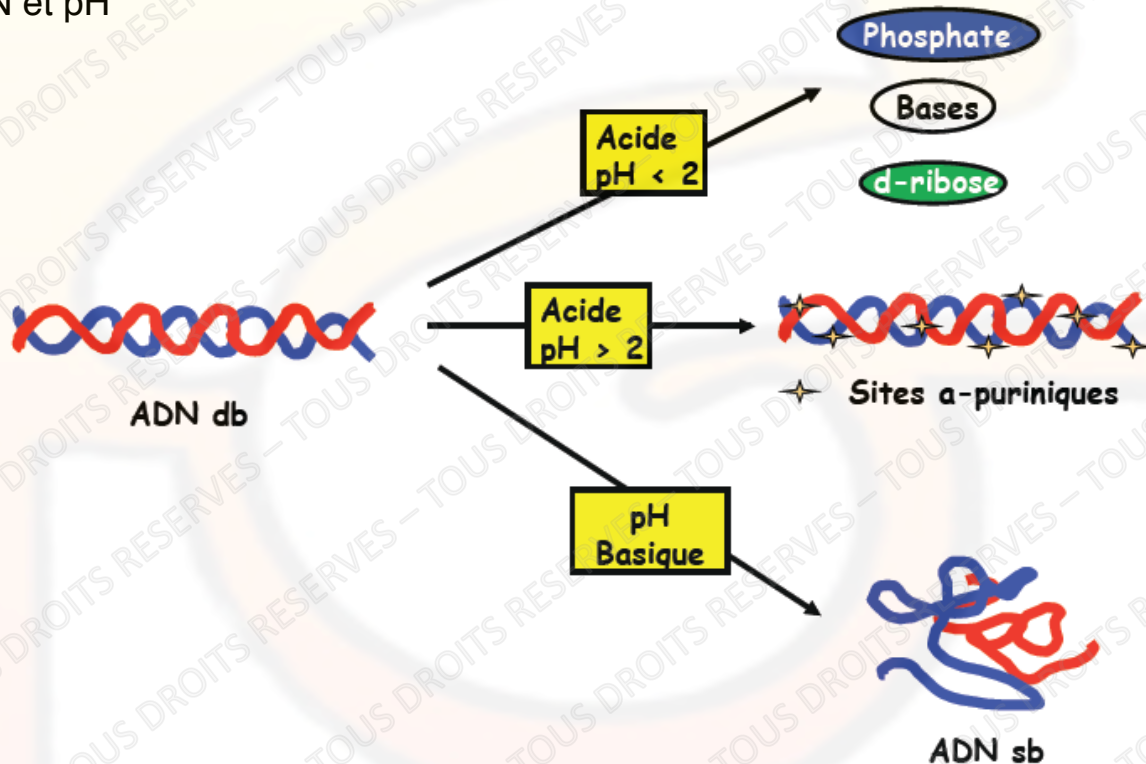
Thalidomide

II- Solubilité

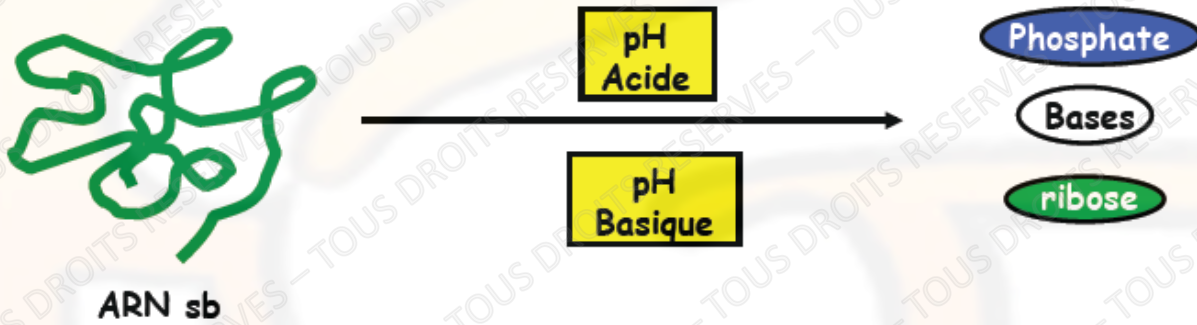
- 1- Solubles dans l'eau
- 2- Précipitent en alcool
- 3- Insolubles dans les solvants organiques



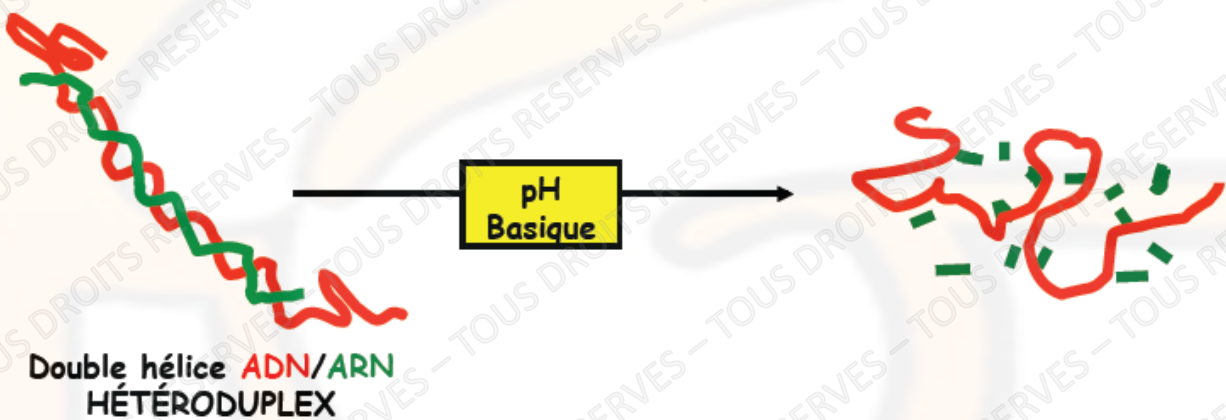
ADN et pH



ARN et pH

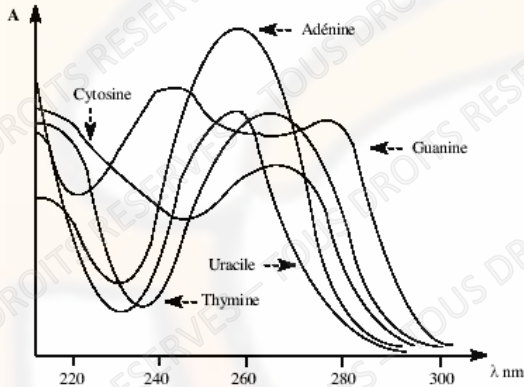


A noter: nous disposons d'un moyen simple pour éliminer l'ARN et conserver l'ADN

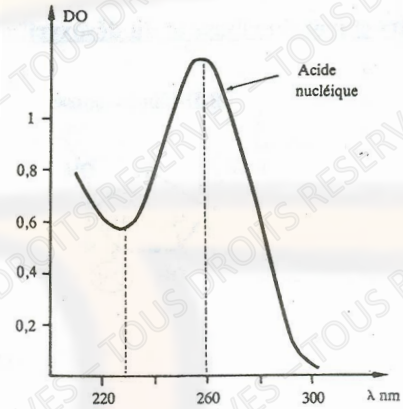


Propriétés spectrales

Absorption des UV par la structure cyclique des bases azotées



Spectre d'absorption des bases puriques et pyrimidiques à pH7



Spectre d'absorption d'un acide nucléique à pH7

Les acides nucléiques présentent un pic d'absorption à 260 nm

Quantification des acides nucléiques à 260 nm

Pour une Abs = 1

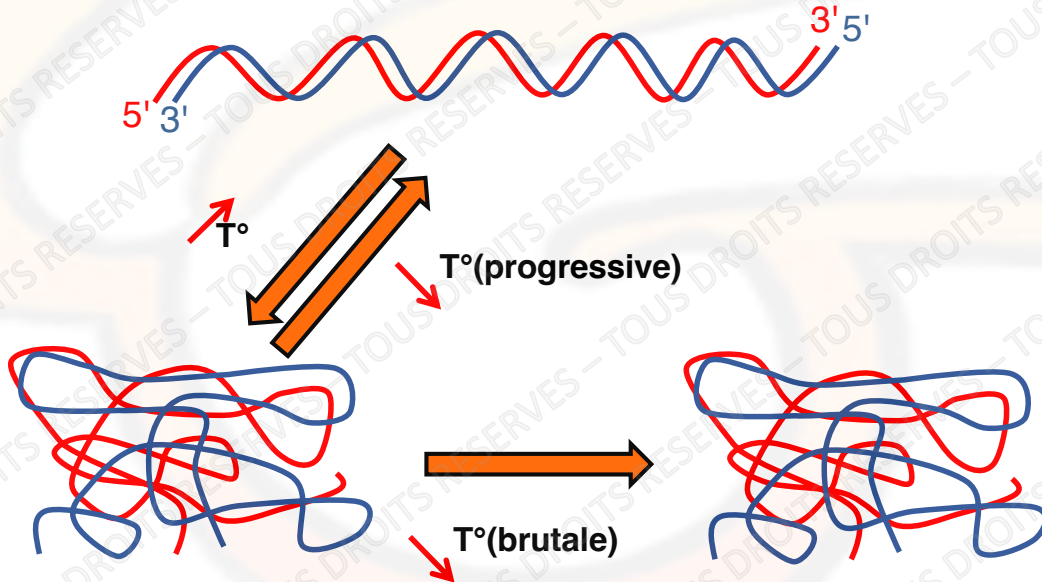
$$[\text{ADN}_{\text{db}}] = 50 \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{ARN}] = 40 \mu\text{g/ml}$$

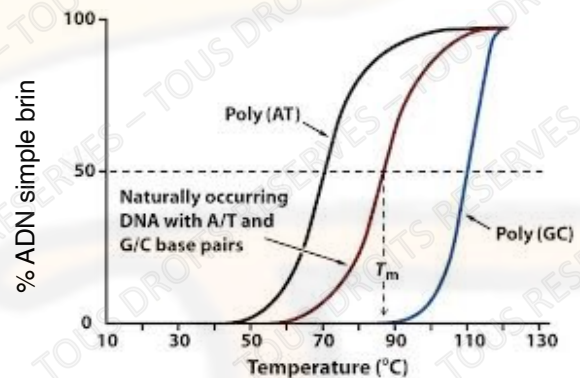
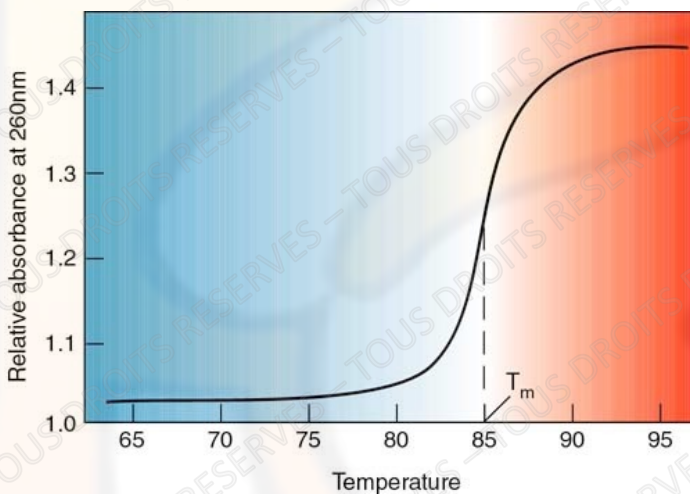
$$[\text{ADN}_{\text{sb}}] = 33 \mu\text{g/ml}$$

Capacité de dénaturation réversible

Dénaturation thermique



Dénaturation thermique et hyperchromicité de l'ADN simple brin



1- T_m = température de fusion = température à partir de laquelle 50% d'une solution d'ADN est présente sous forme simple brin

2- plus le contenu en GC est important plus il faut fournir d'énergie pour dénaturer.



- 1950 : découverte du phénomène de "restriction" par Luria et Bertani
- 1965 : découverte des enzymes de restriction par Arber et Meselson
- 1972 : création du premier ADN recombinant par P. Berg

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 69, No. 10, pp. 2904-2909, October 1972

Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*

(molecular hybrids/DNA joining/viral transformation/genetic transfer)

DAVID A. JACKSON*, ROBERT H. SYMONS†, AND PAUL BERG

Department of Biochemistry, Stanford University Medical Center, Stanford, California 94305



Paul Berg



Chimie, 1980



Hydrolyses enzymatiques des acides nucléiques: les enzymes de restriction

Endonucléases d'origine bactérienne constituant un mécanisme de défense contre les infections par les bactériophages.

Les sites reconnus par ces enzymes sont souvent des séquences palindromiques

En littérature un palindrome est un mot ou une phrase pouvant se lire de la même façon de gauche à droite ou de droite à gauche

Exemple: "la malade pedala mal" ou "esope reste ici et se repose"

En biologie moléculaire il s'agit d'une séquence se lisant de la même façon de 5' vers 3' sur un brin et sur son complémentaire

Exemple: 5'-TTAAGCTTAA-3'

Les Acides Nucléiques - modifications enzymatiques

Hydrolyses enzymatiques des acides nucléiques: les enzymes de restriction

Endonucléases d'origine bactérienne constituant un mécanisme de défense contre les infections par les bactériophages.

Les sites reconnus par ces enzymes sont souvent des séquences palindromiques

En littérature un palindrome est un mot ou une phrase pouvant se lire de la même façon de gauche à droite ou de droite à gauche

Exemple: "la malade pedala mal" ou "esope reste ici et se repose"

En biologie moléculaire il s'agit d'une séquence se lisant de la même façon de 5' vers 3' sur un brin et sur son complémentaire

Exemple: 5'-TTAAGCTTAA-3'
3'-AATTCGAATT-5'

Les Acides Nucléiques - modifications enzymatiques



Table 7.2 Occurrence of Restriction Sites for Restriction Enzymes in DNA with Randomly Distributed Nucleotide Pairs

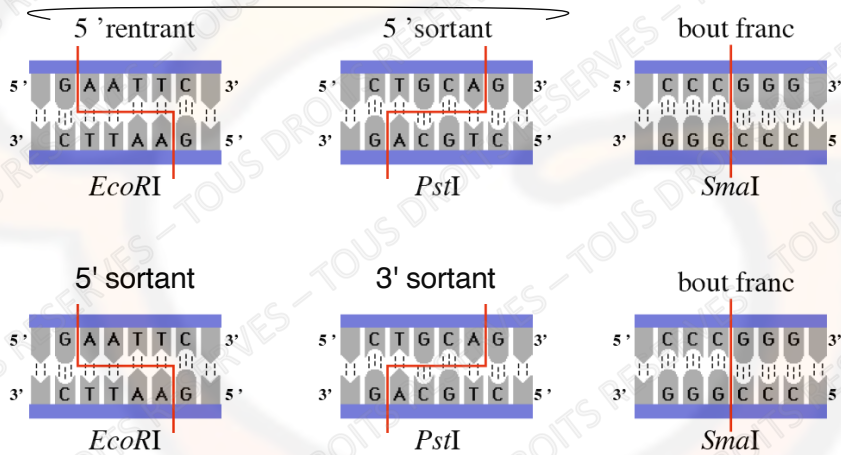
Nucleotide Pairs in Restriction Site	Probability of Occurrence
4	$(1/4)^4 = 1$ in 256 bp
5	$(1/4)^5 = 1$ in 1,024 bp
6	$(1/4)^6 = 1$ in 4,096 bp
8	$(1/4)^8 = 1$ in 65,536 bp
n	$(1/4)^n$

Enzyme	Source Microorganism	Recognition Site*	Ends Produced
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	↓ -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- ↑	Sticky
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	↓ -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- ↑	Sticky
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	↓ -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- ↓	Sticky
KpnI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	↓ -G-G-T-A-C-C- -C-C-A-T-G-G- ↑	Sticky
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	↓ -C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C- ↑	Sticky
SacI	<i>Streptomyces achromogenes</i>	↓ -G-A-G-C-T-C- -C-T-C-G-A-G- ↑	Sticky
SalI	<i>Streptomyces albus</i>	↓ -G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G- ↑	Sticky
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	↓ -C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C- ↑	Blunt
SphI	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	↓ -G-C-A-T-G-C- -C-G-T-A-C-G- ↑	Sticky
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i>	↓ -T-C-T-A-G-A- -A-G-A-T-C-T- ↑	Sticky

Les enzymes de restriction génèrent deux types d'extrémités:

- cohésives
- franches

Extrémités cohésives (sticky ends)



L'utilisation des enzymes de restriction permet de:

- Réaliser des digestions ciblées indispensables lors de clonage de séquences d'ADN
- Etablir des cartes de restriction
- Mettre en évidence des profils de restriction

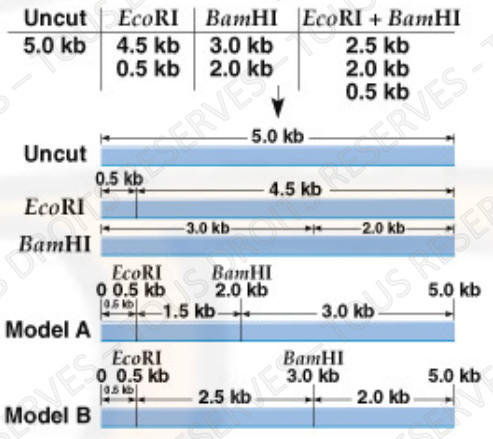
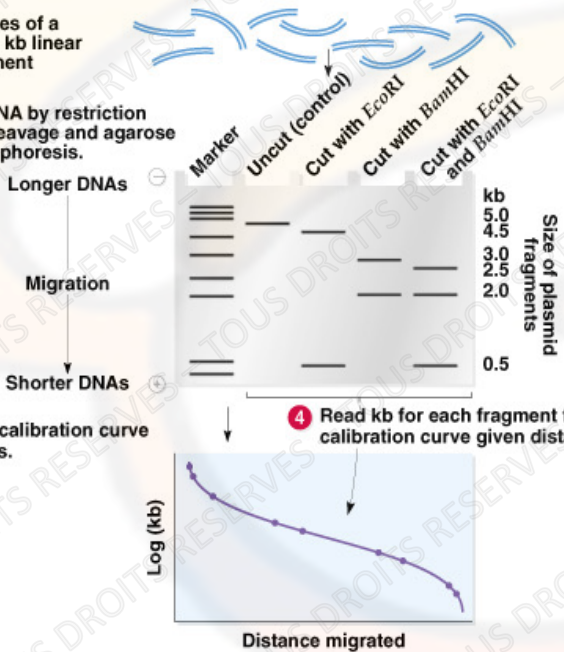
Etablissement de cartes de restriction

1 Many copies of a cloned 5.0 kb linear DNA fragment

2 Analyze DNA by restriction enzyme cleavage and agarose gel electrophoresis.

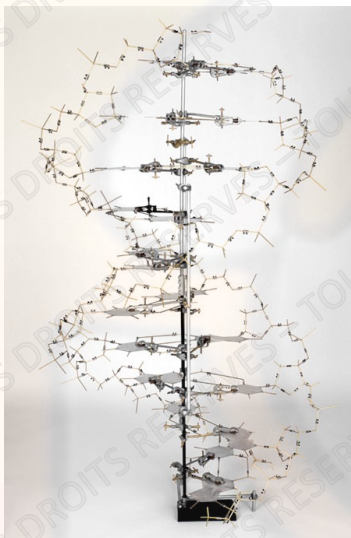
3 Construct calibration curve for markers.

4 Read kb for each fragment from calibration curve given distance migrated



La réplication

Il n'avait pas échappé à Watson et Crick que la structure en double hélice pouvait également permettre à la molécule d'ADN de se dupliquer.



It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

J. D. WATSON
F. H. C. CRICK

NATURE

April 25, 1953 VOL. 171

Comment se réplique l'ADN au cours d'une division cellulaire?

Applications techniques



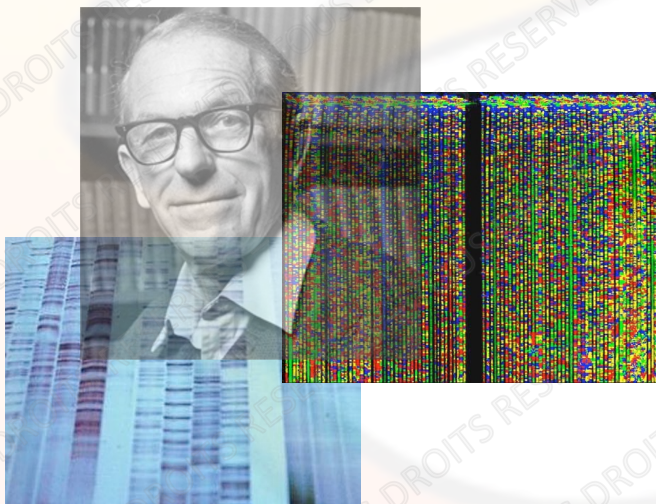
La réplication - applications

B

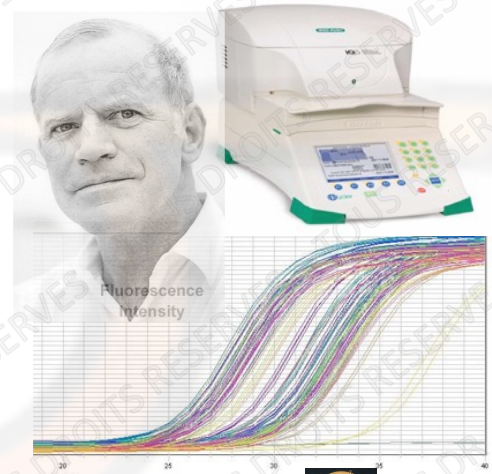
Applications méthodologiques issues des connaissances acquises sur les mécanismes de réplication

2 exemples:

- 1- séquençage
- 2- PCR



Chimie, 1980 (et...accessoirement chimie, 1958)



Chimie, 1993

Séquençages



Applications - séquençage

A+

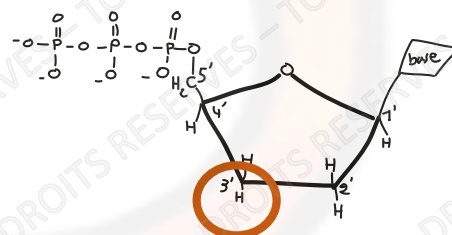
Frederick Sanger, séquençage par terminaison d'élongation, 1977

mélange réactionnel de base:

- ADN (matrice)
- amorce (complémentaire de la matrice)
- dNTP
- ^{32}P αdCTP
- ADN polymérase

Ce mélange est divisé en 4 tubes, chaque tube contenant soit:

- didéoxy CTP
- didéoxy ATP
- didéoxy GTP
- didéoxy TTP

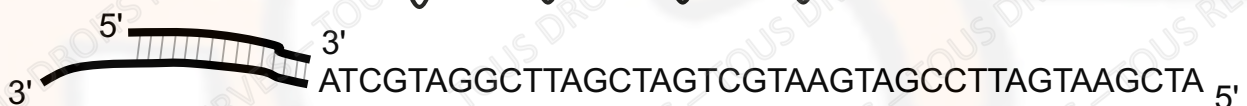
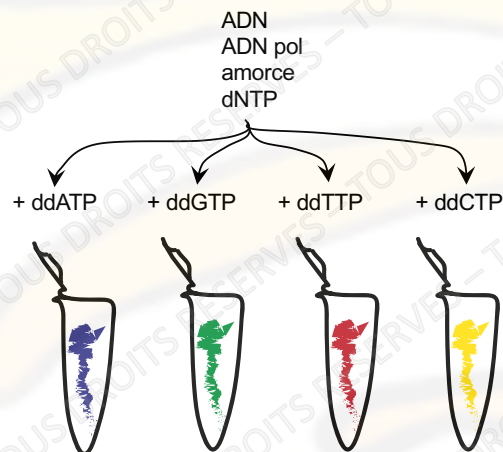
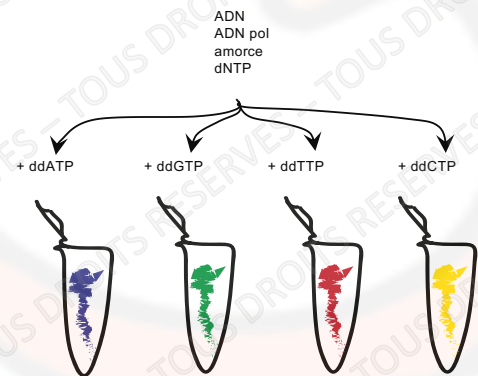




séquençage par terminaison d'élongation

Principe:

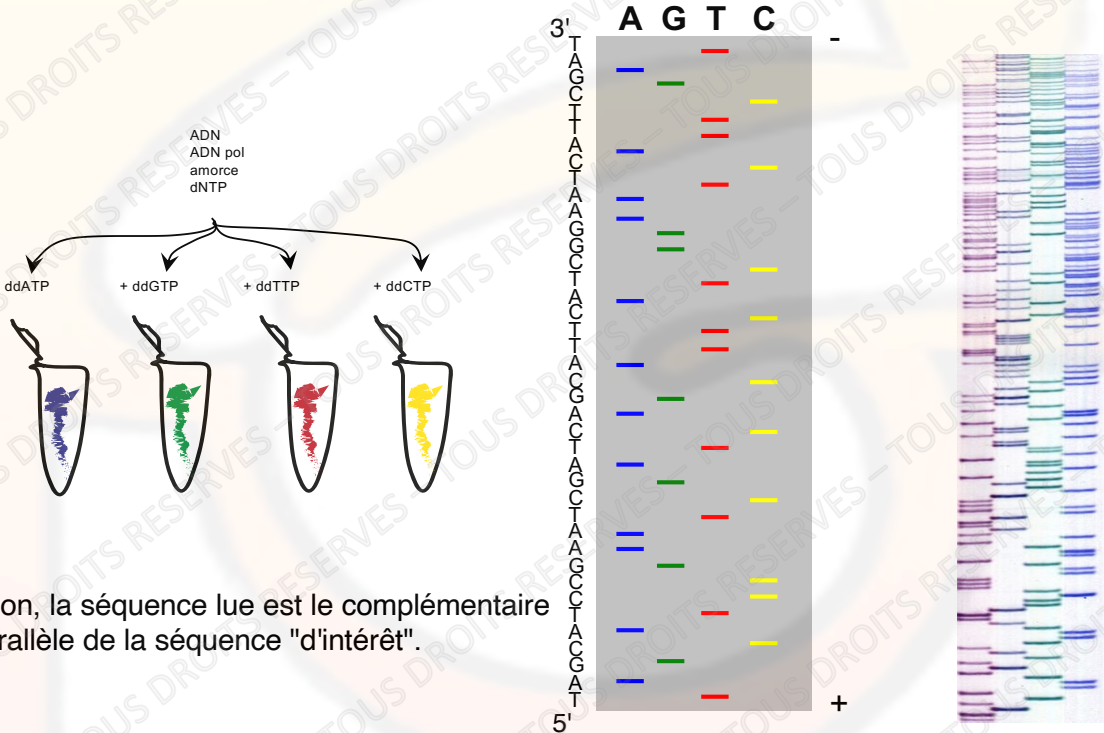
L'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire à la matrice que nous souhaitons séquencer en utilisant des dNTP. Synthèse initiée au site d'hybridation de l'amorce fournie. En veillant à ce que les dNTP soient en excès par rapport au ddNTP ajouté dans chacun des mélanges réactionnel. Aléatoirement, la polymérase ajoutera un ddNTP interrompant ainsi l'élongation. Si des ddNTP différents ont été ajoutés dans chacun des mélanges, et ce de manière exclusive, alors nous pourrons déterminer la séquence.



Dans le tube 1 nous aurons une représentation statistiques des séquences se terminant par A

- TA
- TAGCA
- TAGCATCCGA
- TAGCATCCGAA
- etc...

migration des produits de synthèse sur gel 20 % acrylamide (permet une résolution à 1 base près)
 5'-ATCGTAGGCTTAGCTAGTCGTAAGTAGCCTTAGTAAGCTA-3'



Attention, la séquence lue est le complémentaire antiparallèle de la séquence "d'intérêt".

Cette technique est toujours utilisée pour les petits projets et est à la base des projets de séquençage haut débit automatisés.

Dans les séquenceurs automatiques à haut débit le dCTP32 n'est plus utilisé. Chaque didéoxy-NTP porte un fluochrome de couleur différente. La réaction de synthèse est migrée en capillaire et "lue" par un scanner.



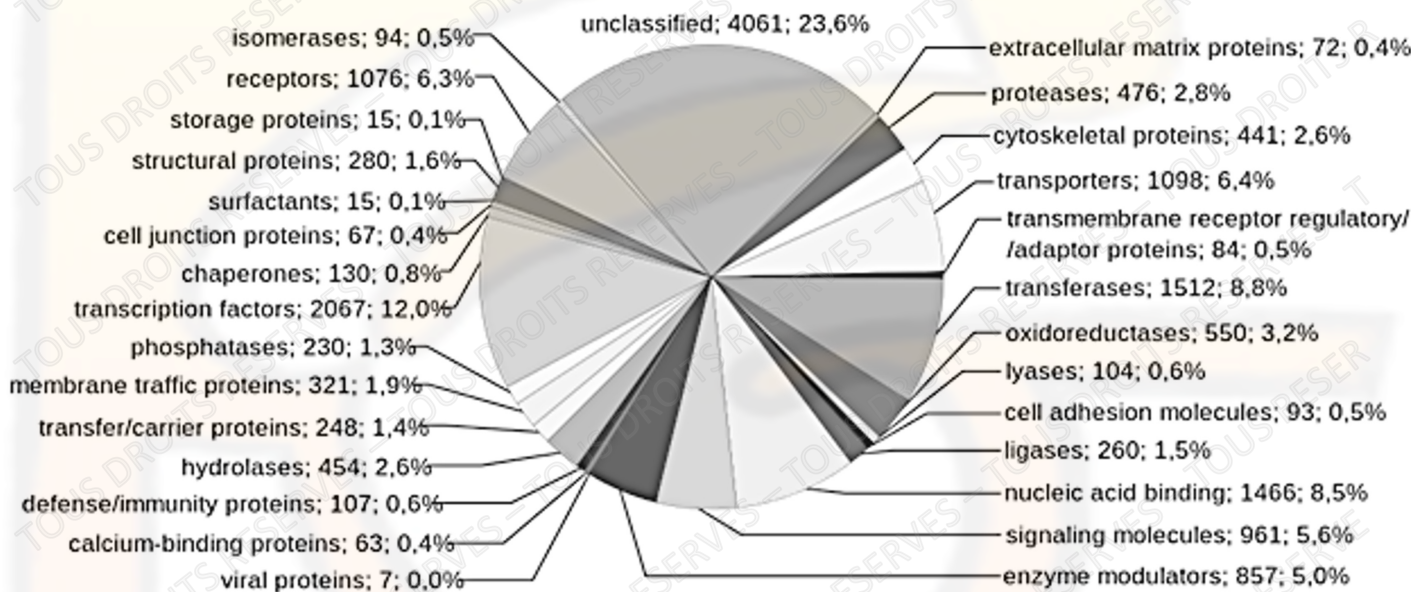
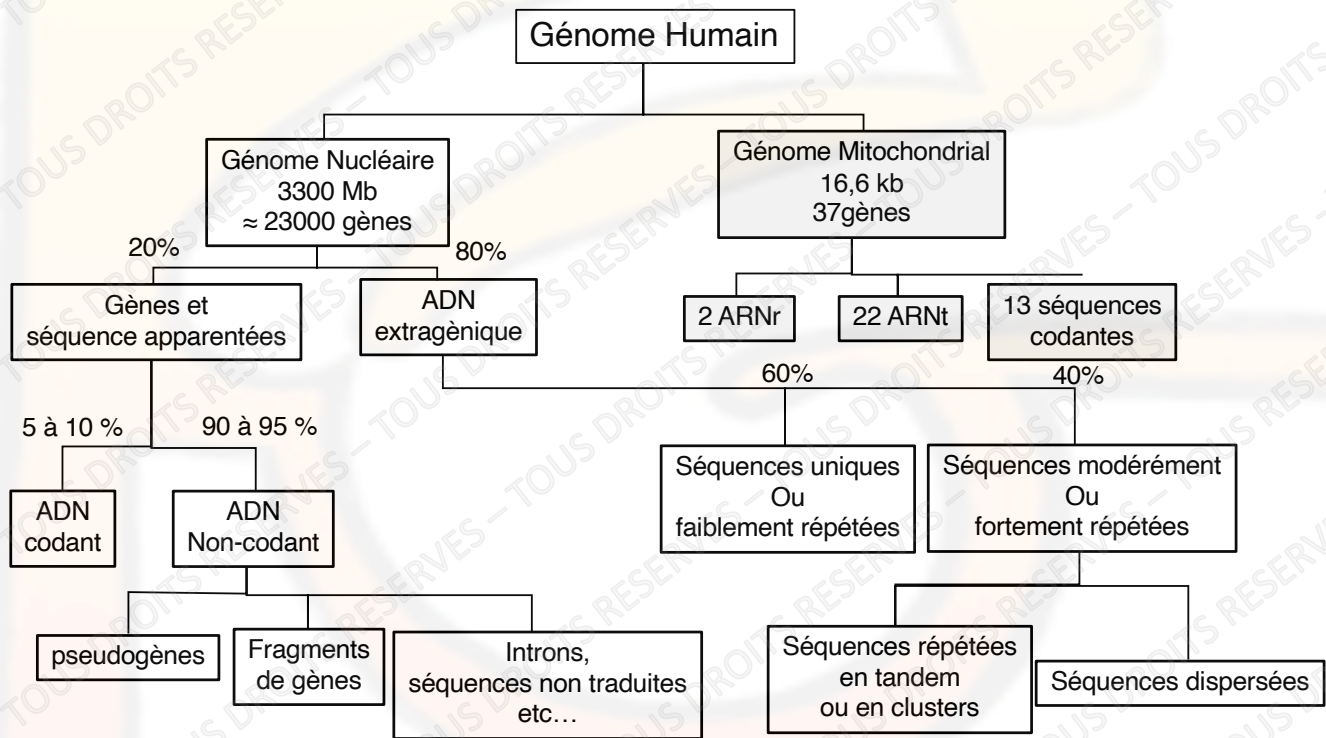


Chaque canal est lu comme un chromatogramme qu'il faut savoir lire et interpréter



HGP– Human Genome Project





La méthode de Sanger reste **LA** méthode standard de séquençage

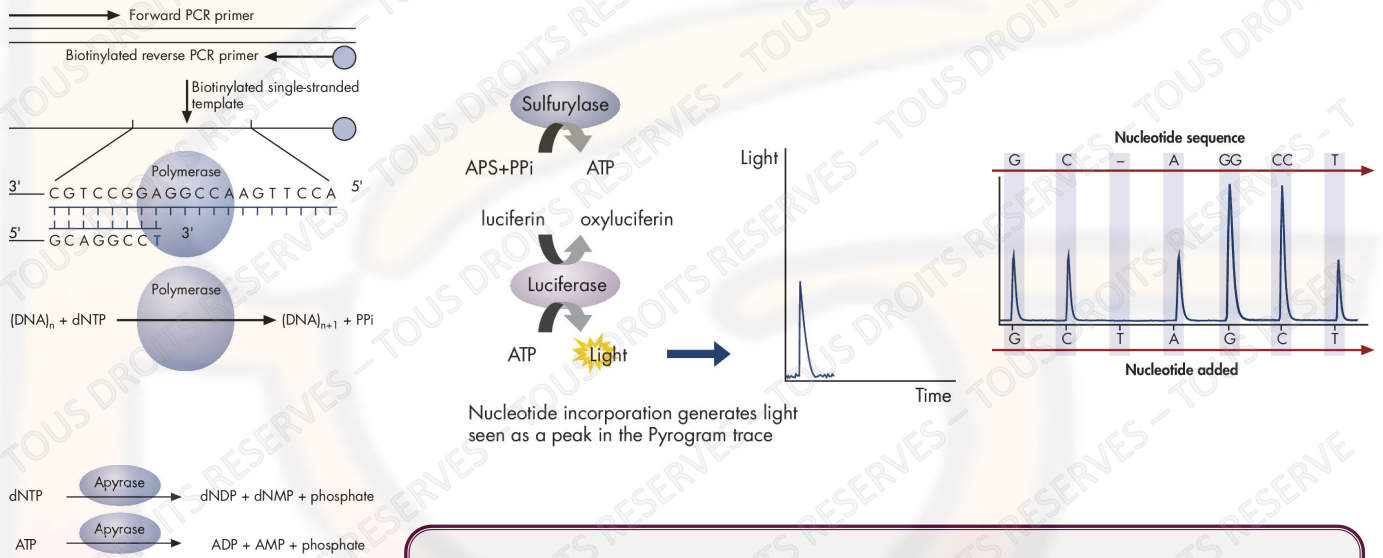
Il faut cependant aujourd'hui lui adosser des techniques récentes dites « à haut débit »

Platform	Library preparation	Chemistry	Read length	Bases per run	Run time
Roche 454 GS FLX Titanium	Emulsion PCR	Pyrosequencing	400	500 Mb	10 h
Illumina/solexa	Bridge PCR	Reversible terminators	100	18–35 Gb	4–9 d
SOLiD	Emulsion PCR	Sequencing by ligation	50	30–50 Gb	7–14 d
Sanger	PCR and cloning	Dye terminators	800	800 bp	3 hours

Platform	Library/ template preparation	NGS chemistry	Read length (bases)	Run time (days)	Gb per run	Machine cost (US\$)	Pros	Cons	Biological applications	Refs
Roche/454's GSFLX Titanium	Frag, MP/ emPCR	PS	330*	0.35	0.45	500,000	Longer reads improve mapping in repetitive regions; fast run times	High reagent cost; high error rates in homo- polymer repeats	Bacterial and insect genome <i>de novo</i> assemblies; medium scale (<3 Mb) exome capture; 16S in metagenomics	D. Muzny, pers. comm.
Illumina/ Solexa's GA _x	Frag, MP/ solid-phase	RTs	75 or 100	4 [†] , 9 [‡]	18 [‡] , 35 [§]	540,000	Currently the most widely used platform in the field	Low multiplexing capability of samples	Variant discovery by whole-genome resequencing or whole-exome capture; gene discovery in metagenomics	D. Muzny, pers. comm.
Pacific Biosciences (target release: 2010)	Frag only/ single molecule	Real-time	964*	N/A	N/A	N/A	Has the greatest potential for reads exceeding 1 kb	Highest error rates compared with other NGS chemistries	Full-length transcriptome sequencing; complements other resequencing efforts in discovering large structural variants and haplotype blocks	S. Turner, pers. comm.

*Average read-lengths. †Fragment run. ‡Mate-pair run. Frag, fragment; GA, Genome Analyzer; GS, Genome Sequencer; MP, mate-pair; N/A, not available; NGS, next-generation sequencing; PS, pyrosequencing; RT, reversible terminator; SBL, sequencing by ligation; SOLiD, support oligonucleotide ligation detection.

Le Pyroséquençage ou séquençage par synthèse



Avantages : Rapide et peu couteux

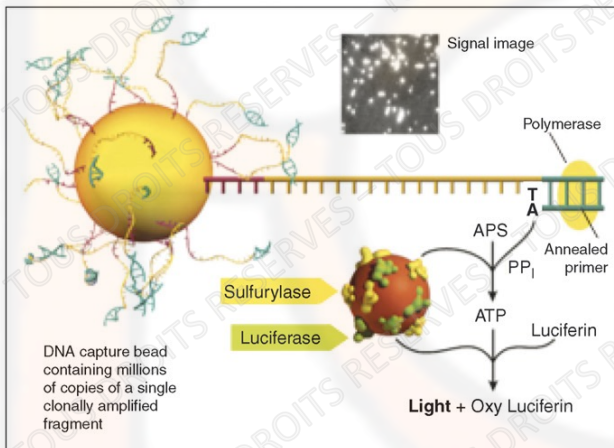
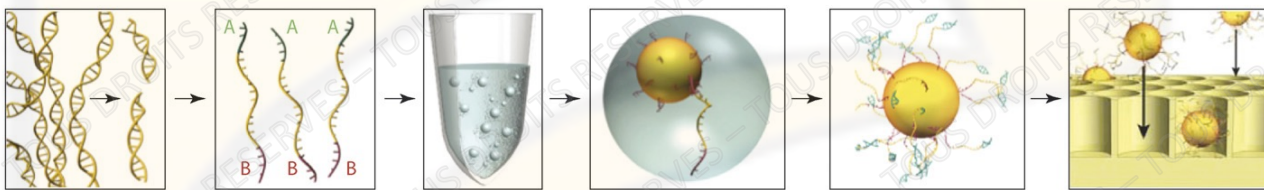
Limites : faible longueur des séquences lues, précision

Roche (454) GSFLX Workflow:

Library construction

Emulsion PCR

PTP loading



Pyrosequencing reaction

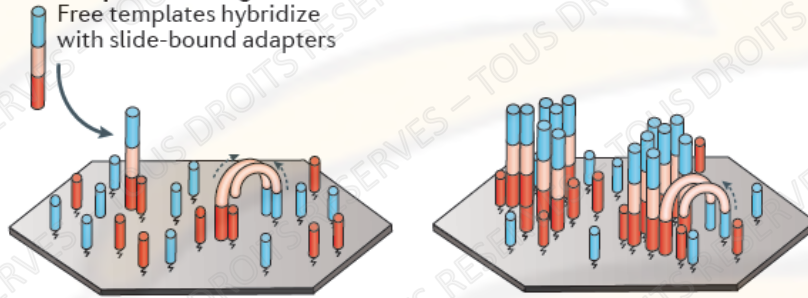
Principe du 454 sequencing développé par roche.

- Digestion de l'ADN par enzyme de restriction.
- Addition d'adapteurs aux extrémités.
- PCR clonale en émulsion.
- Pyroséquençage en plaque PTP (pico titer plate)
- Un seul fragment amplifié par puits.
- Environ 250pb lues par puits
- Plus de 100Mb lues en totalité
- temps d'un run : 7h



b Solid-phase bridge amplification (Illumina)

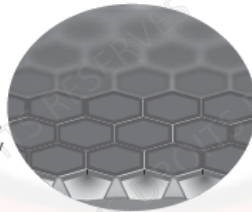
Template binding
Free templates hybridize with slide-bound adapters



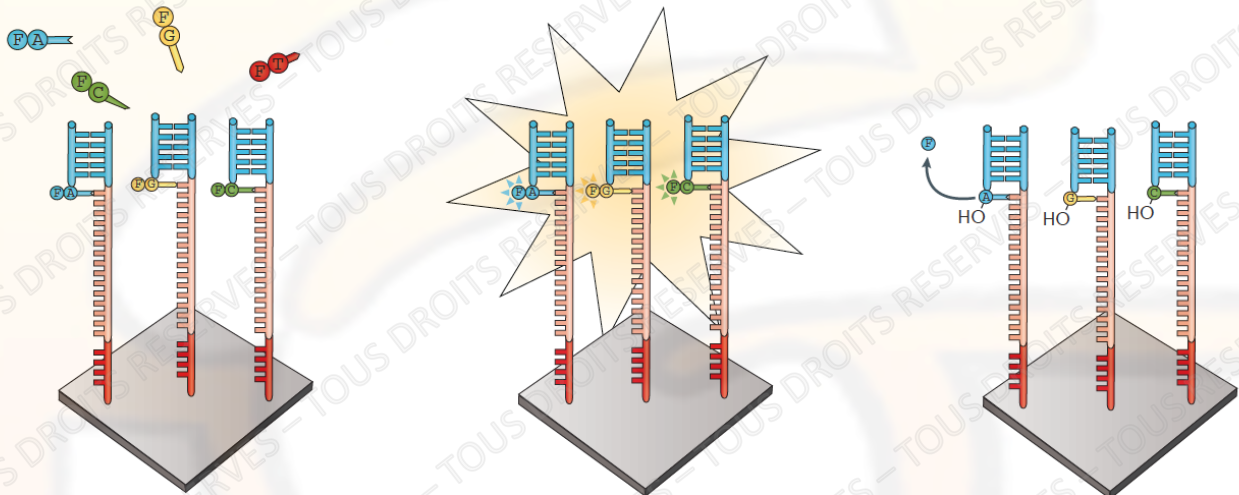
Bridge amplification
Distal ends of hybridized templates interact with nearby primers where amplification can take place

Cluster generation
After several rounds of amplification, 100–200 million clonal clusters are formed

Patterned flow cell
Microwells on flow cell direct cluster generation, increasing cluster density



a Illumina



Nucleotide addition
Fluorophore-labelled, terminally blocked nucleotides hybridize to complementary base. Each cluster on a slide can incorporate a different base.

Imaging
Slides are imaged with either two or four laser channels. Each cluster emits a colour corresponding to the base incorporated during this cycle.

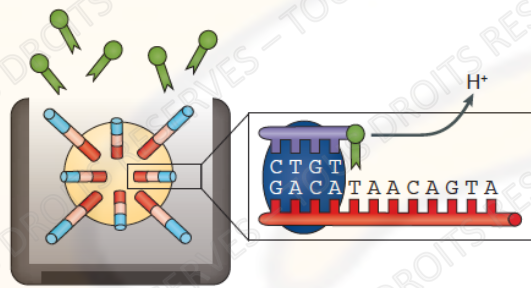
Cleavage
Fluorophores are cleaved and washed from flow cells and the 3'-OH group is regenerated. A new cycle begins with the addition of new nucleotides.



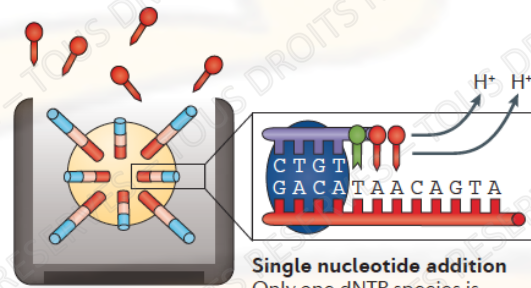
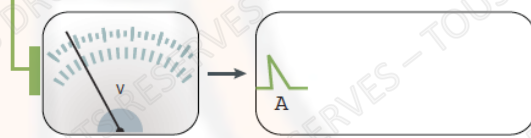
Séquençage – Ion Torrent

B

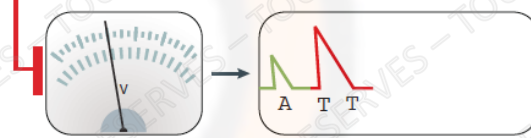
b Ion Torrent (Thermo Fisher)



Semiconductor sequencing
As a base is incorporated, a single H⁺ ion is released, which is detected by a CMOS-IFET sensor



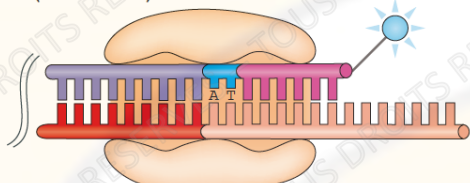
Single nucleotide addition
Only one dNTP species is present during each cycle; several identical dNTPs can be incorporated during a cycle, increasing the emitted ions



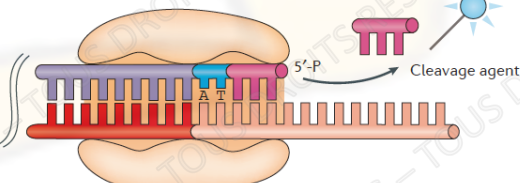
Séquençage – SOLiD

B

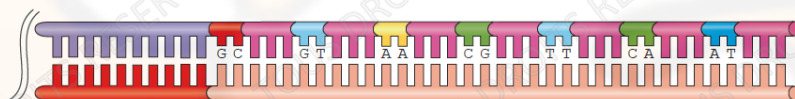
a SOLiD (Thermo Fisher)



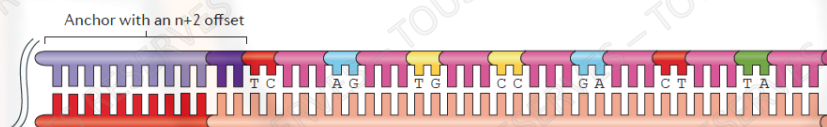
Two-base-encoded probes
Probes with two known bases followed by degenerate or universal bases hybridize to a template; ligase immobilizes the complex and the slide is imaged



Cleavage
The fluorophore is cleaved from the probe along with several bases, revealing a 5' phosphate



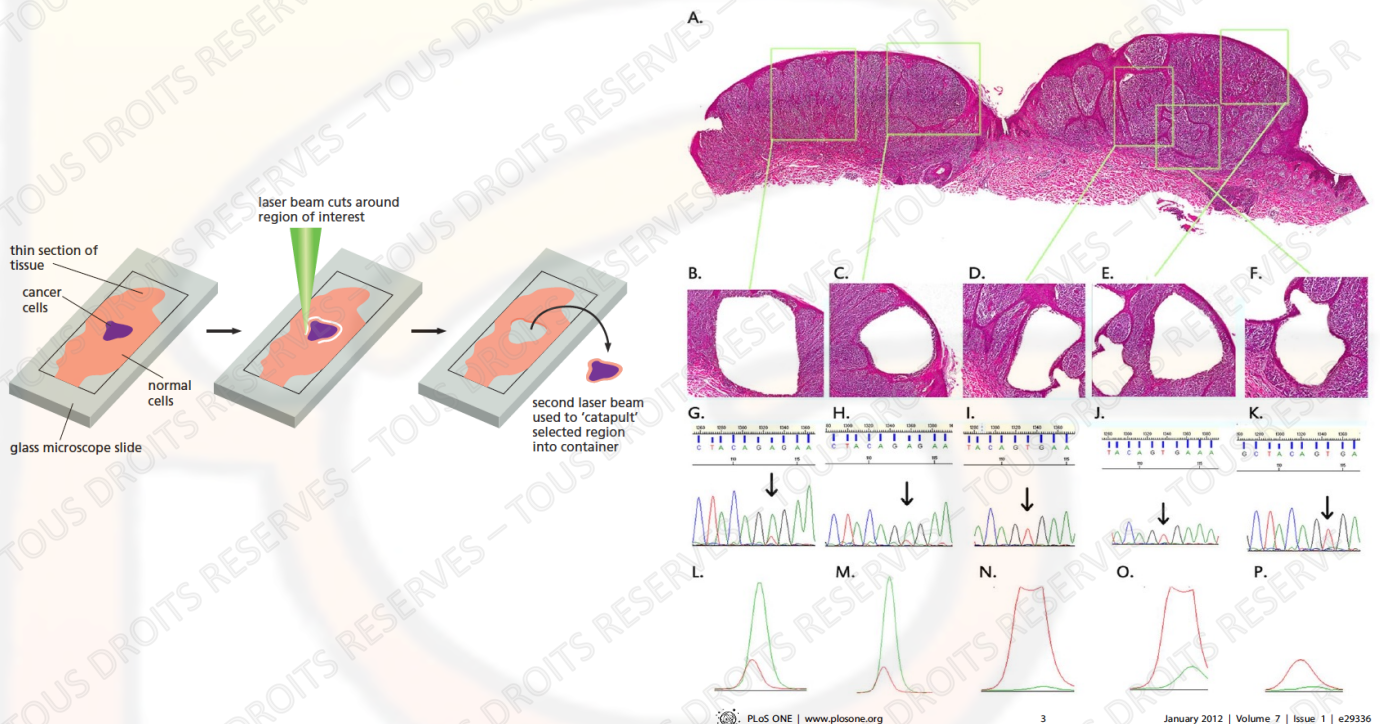
Probe extension
10 rounds of hybridization, ligation, imaging and cleavage identify 2 out of every 5 bases

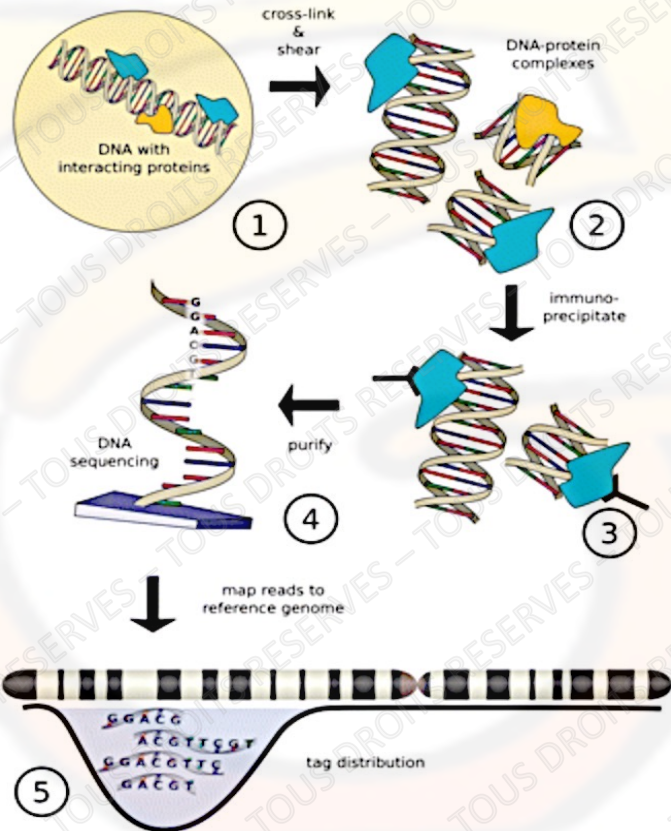


Reset
After a round of probe extension, all probes and anchors are removed and the cycle begins again with an offset anchor

Method	Single-molecule real time sequencing	Ion semiconductor	Pyrosequencing (454)	Sequencing by synthesis (Illumina)	Sequencing by ligation (SOLID sequencing)	Chain termination (Sanger sequencing)
Read length	2900 bp average ¹	200 bp	700 bp	50 to 250 bp	50+35 or 50+50 bp	400 to 900 bp
Accuracy	87% (read length mode), 99% (accuracy mode)	98%	99.9%	98%	99.9%	99.9%
Reads per run	35–75 thousand	up to 5 million	1 million	up to 3 billion	1.2 to 1.4 billion	N/A
Time per run	30 minutes to 2 hours	2 hours	24 hours	1 to 10 days, depending upon sequencer and specified read length	1 to 2 weeks	20 minutes to 3 hours
Cost per 1 million bases	\$2	\$1	\$10	\$0.05 to \$0.15	\$0.13	\$2400
Advantages	Longest read length. Fast. Detects 4mC, 5mC, 6mA.	Less expensive equipment. Fast.	Long read size. Fast.	Potential for high sequence yield, depending upon sequencer model	Low cost per base.	Long individual reads. Useful for many applications.
Disadvantages	Low yield at high accuracy. Equipment can be very expensive.	Homopolymer errors.	Runs are expensive. Homopolymer errors.	Equipment can be very expensive.	Slower than other methods.	More expensive and impractical for larger sequencing projects.

Microdissection Laser et séquençage





Les PCR





La PCR (Polymerase Chain Reaction), Kary Mullis et coll, Cetus, 1983

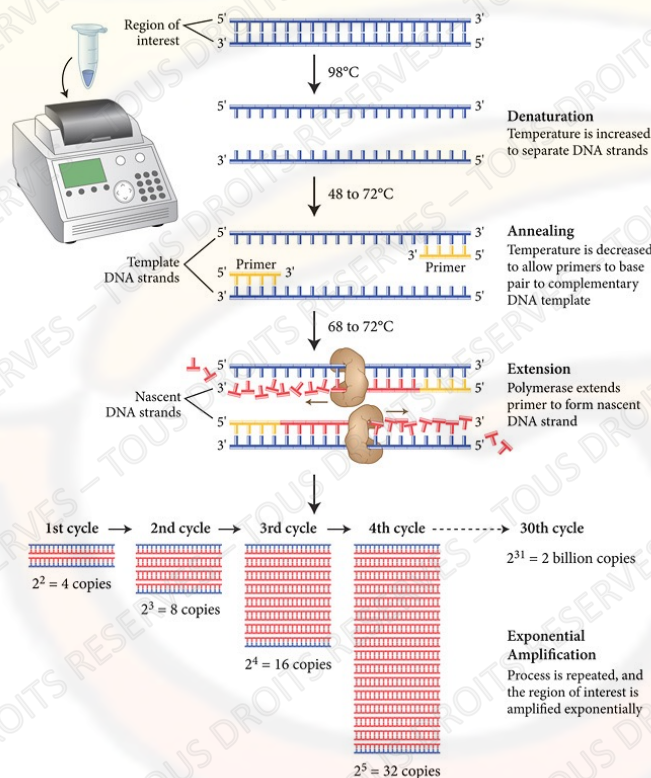
Principe:

amplification logarithmique d'une séquence précise d'une matrice d'acide nucléique double brin à l'aide d'une paire d'amorces, d'une ADN polymérase et de dNTP.

Mise en pratique de plusieurs éléments de connaissance:

- principe hybridation/déshybridation
- polymérisation 5'-3'

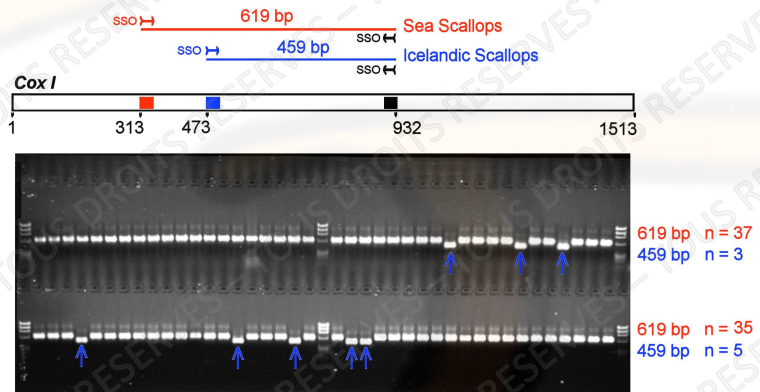
Amélioration grâce à la découverte des Archae et des organismes extrémophiles (Termophilus aquaticus, Taq)





Applications de la PCR:

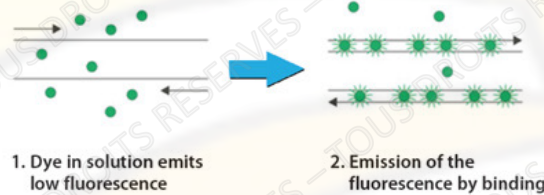
- Médecine:
 - prédictive
 - diagnostique
 - personnalisée
 - légale
- Recherche fondamentale
- Agroalimentaire
- Histoire



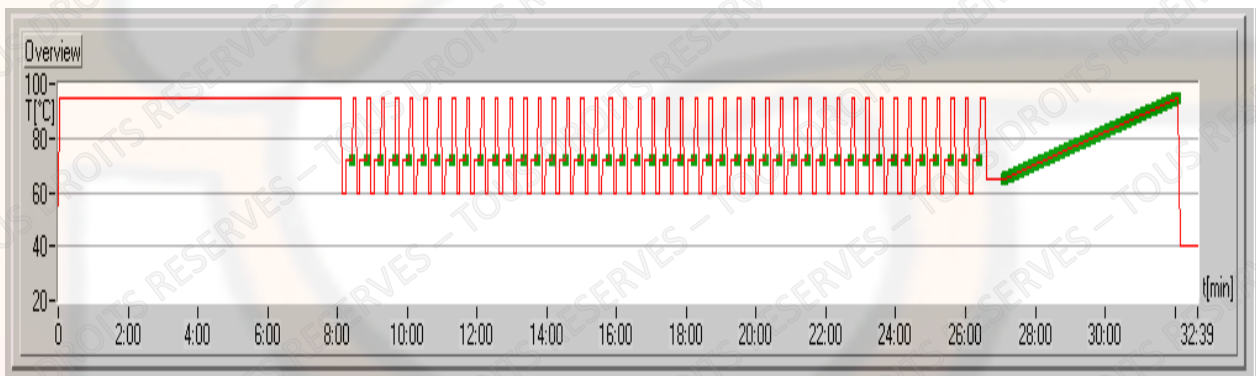
"la fraude aux coquilles saint jacques"



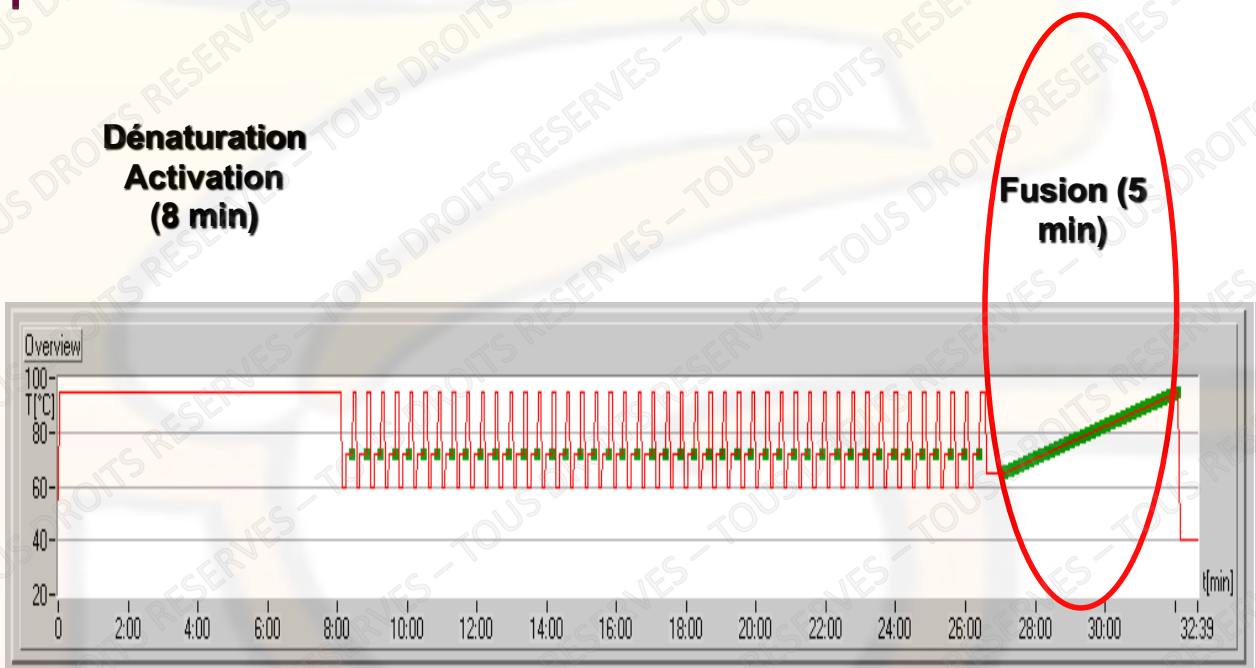
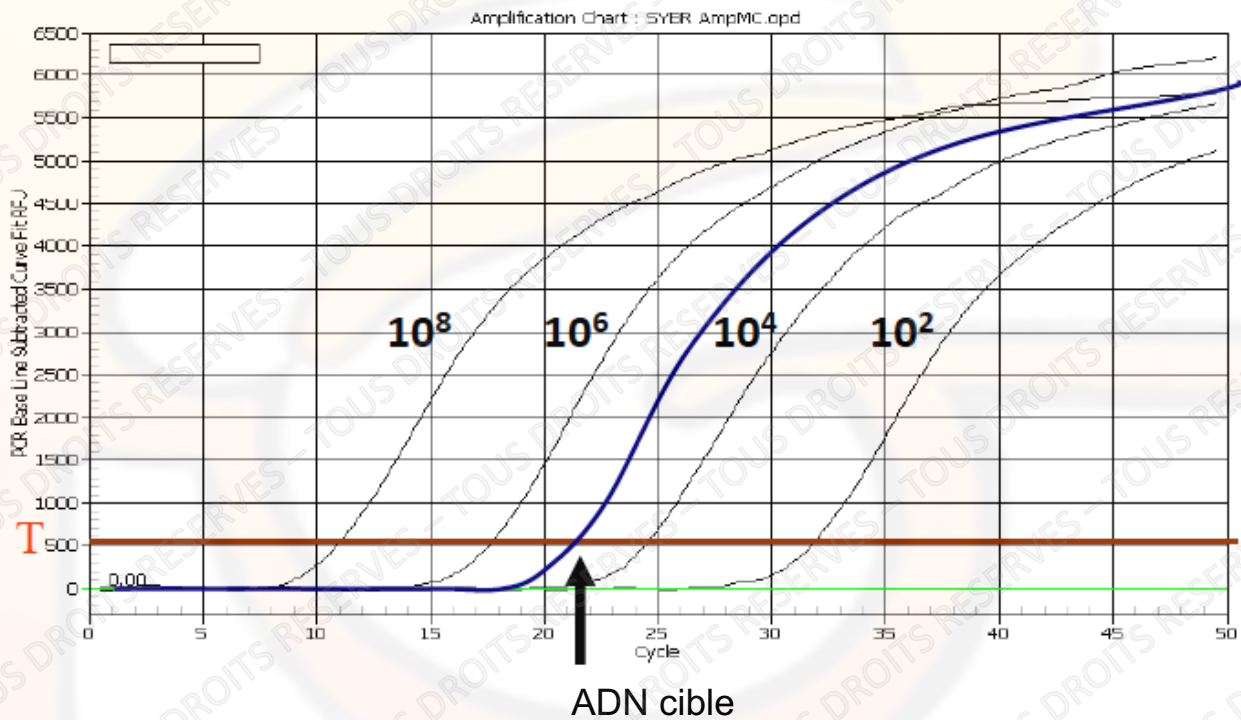
Dénaturation Activation (8 min)



Fusion (5 min)



➔ **Durée totale ~ 30-40 min**



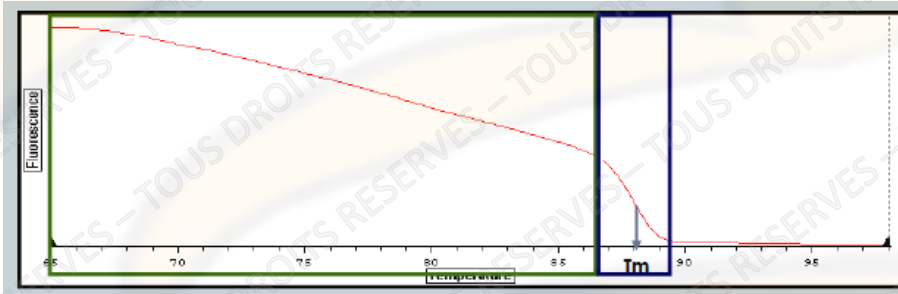
Durée totale ~ 30-40 min



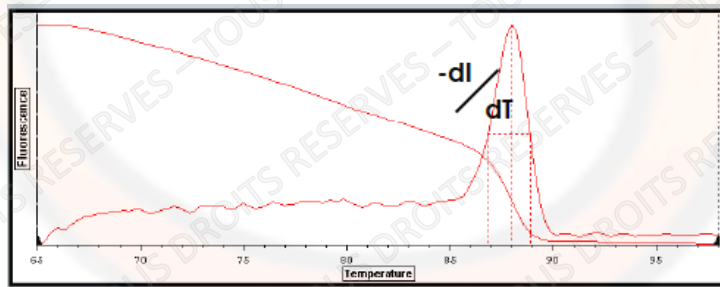
qPCR – Sybr green et courbe de fusion

A+

T_m est le point d'inflexion de la courbe.
Correspond à 50% d'ADN_{db} et 50% d'ADN_{sb}



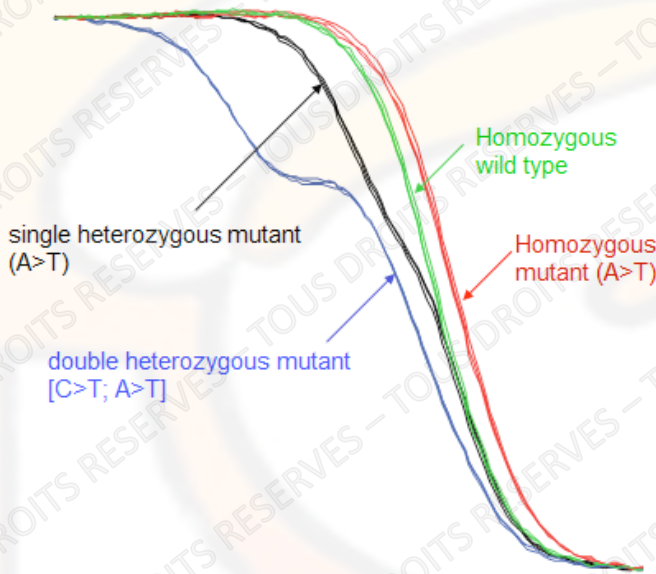
On peut représenter $-dI/dT$



qPCR – Sybr green et courbe de fusion

A

Information loss due to Temperature Shifting normalization



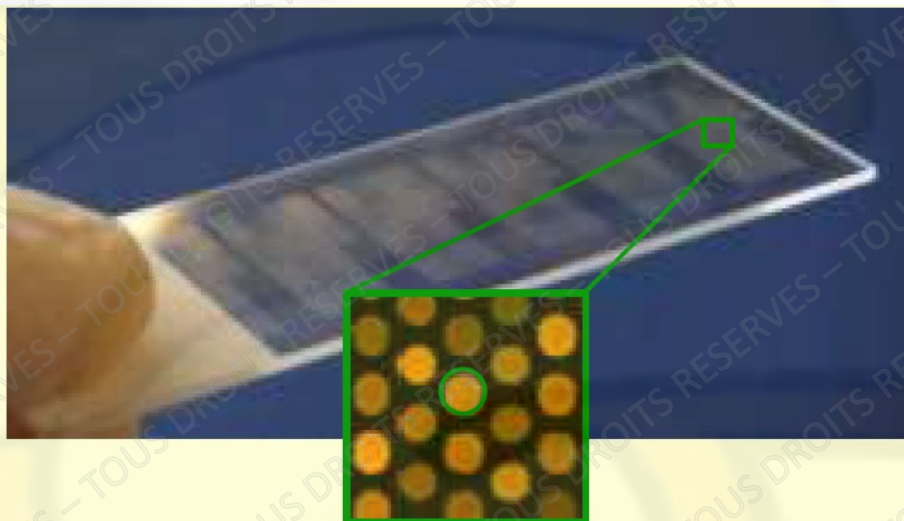
A: Unshifted HRM curves

Méthodes d'hybridation



Comparative Genomic Hybridization - CGH

A



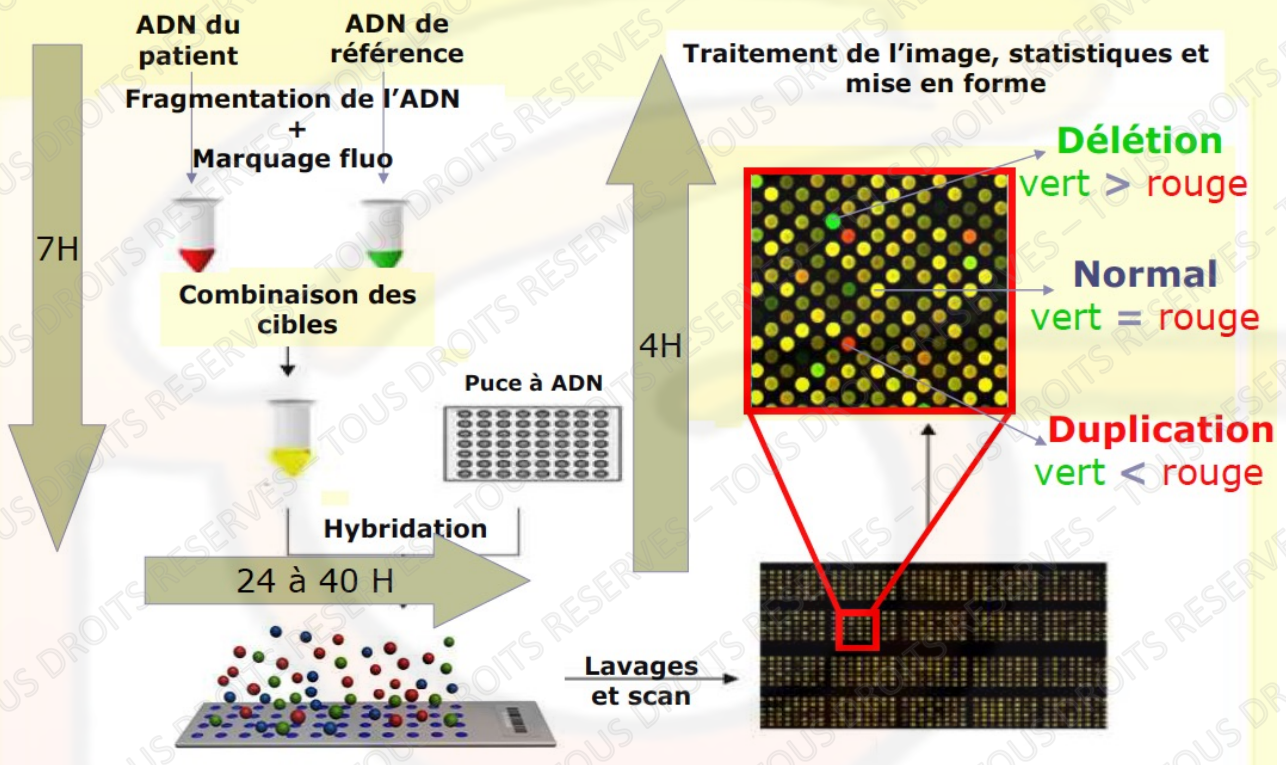
1 spot = 1 séquence d'ADN présente en multiples copies.

1 bonne sonde = **séquence d'ADN unique présente dans le génome humain.**

Plus il y a de sondes différentes sur la puce à ADN, meilleure sera la résolution de la puce (+ d'informations).

Comparative Genomic Hybridization - CGH

A



from CHU Nantes-Laboratoire de cytogénétique

Comparative Genomic Hybridization - CGH

A



from CHU Nantes-Laboratoire de cytogénétique

