

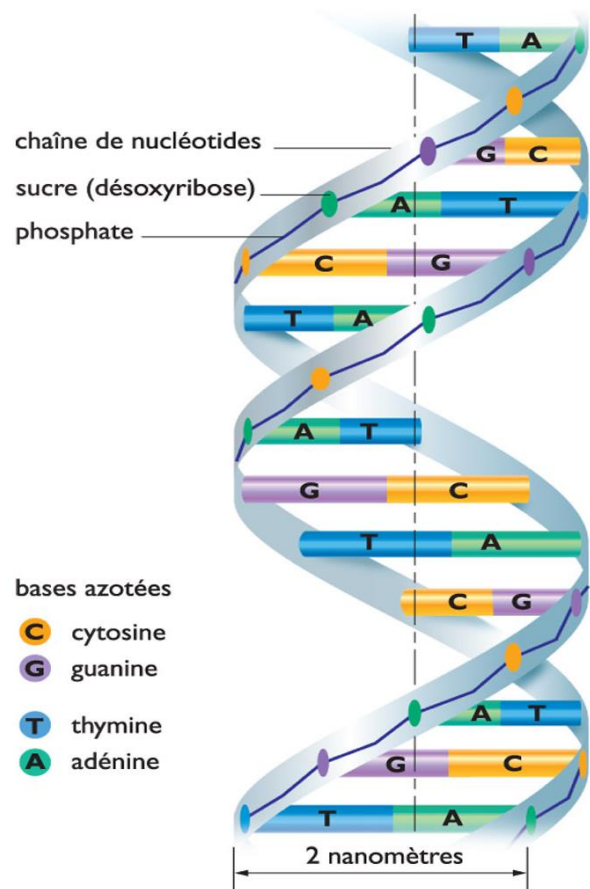
Séance 5 : Génotypage et PCR

Cours de Biologie UE Codage

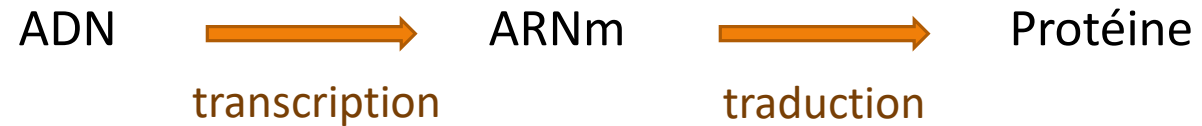
SARAH BEN SADOUN

sarah.ben-sadoun@agroparistech.fr

Structure de l'ADN



- ADN : support de l'information génétique



- Découverte de la structure de la molécule d'ADN par Watson et Crick en 1953
- Double hélice, deux brins, deux chaînes complémentaires de nucléotides
- 3 liaisons hydrogènes pour le couple G-C et 2 pour le couple A-T

Diversité génétique



Génotypage

Génotypage : technologie permettant d'identifier des variations génétiques à une ou à plusieurs positions donnée(s) chez une individu ou un groupe d'individus d'une même espèce

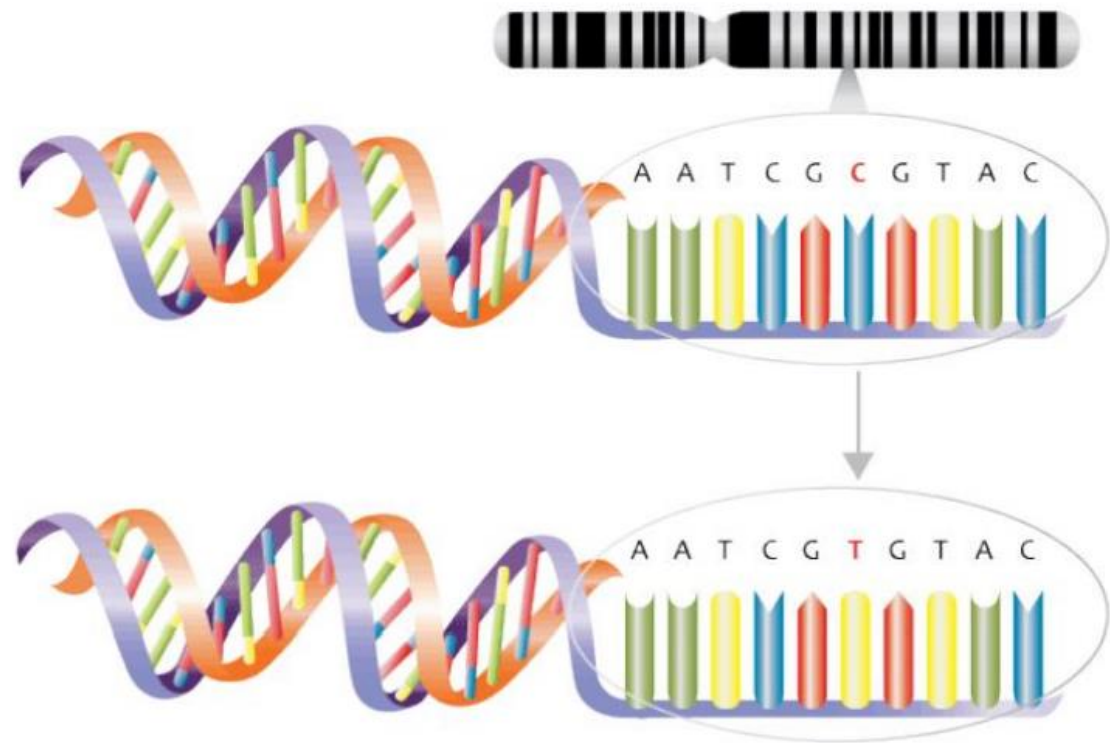
Pour réaliser le génotypage, il faut avoir identifier des **régions** du génome **polymorphiques**

A	A	C	A	C	G	G	C	C	A	...	T	T	C	G	G	G	T	C	...	A	G	T	C	G	A	C	C	G	
A	A	C	A	C	G	G	C	C	A	...	T	T	C	G	A	G	G	T	C	...	A	G	T	C	A	A	C	C	G
A	A	C	A	C	G	G	C	C	A	...	T	T	C	G	G	G	T	C	...	A	G	T	C	A	A	C	C	G	
A	A	C	A	C	G	G	C	C	A	...	T	T	C	G	G	G	T	C	...	A	G	T	C	G	A	C	C	G	

Marqueurs SNP

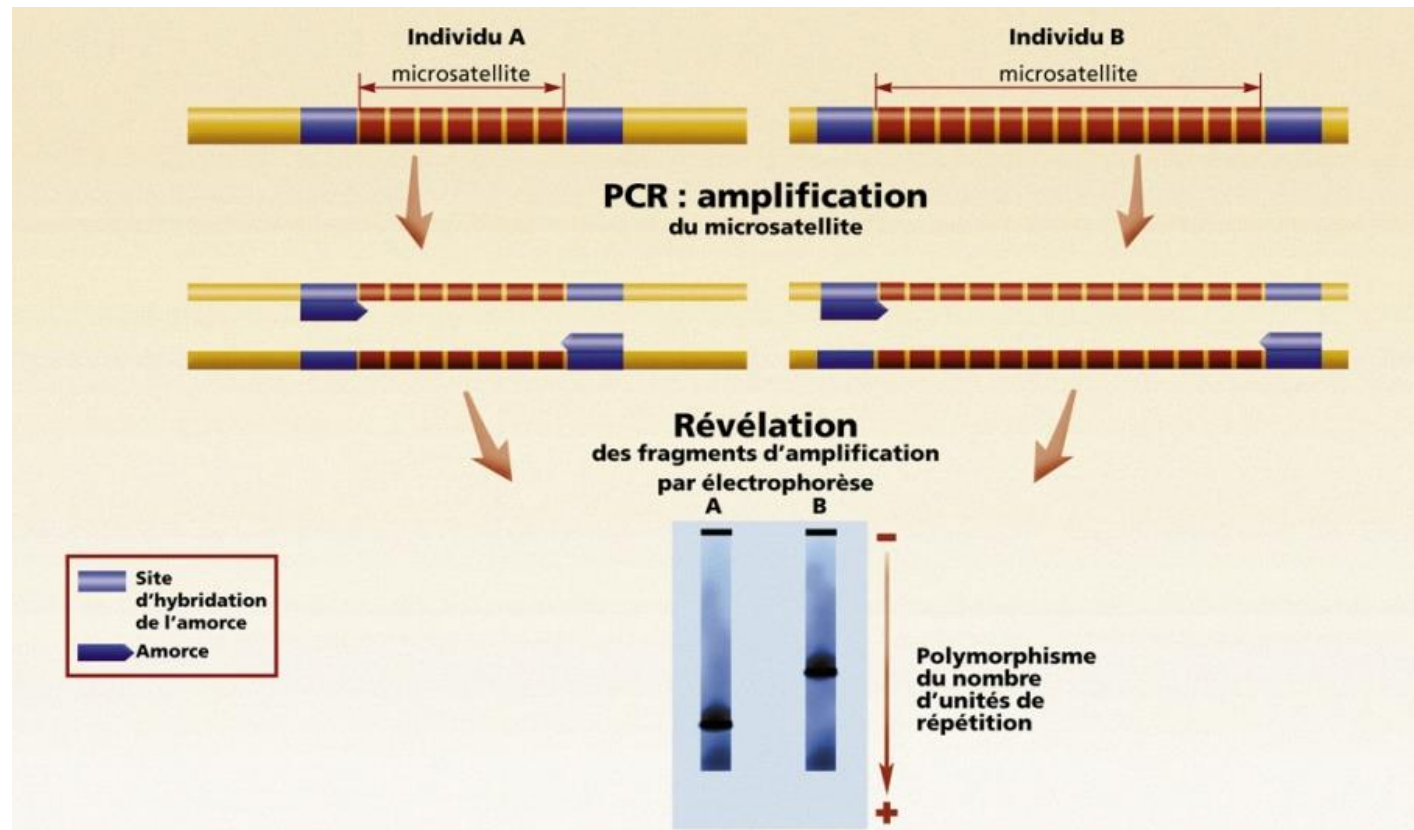
SNP (*Single-Nucleotide Polymorphism*) :

- Type de marqueur moléculaire largement utilisé
- Substitution d'un nucléotide à une position donnée du génome



Marqueurs microsatellites

Microsatellites (SSR) : polymorphisme du nombre d'unités de répétition





**A quoi ça sert de génotyper
un individu ?**

Utilisation du génotypage

Identification des individus

— Base de données de profils d'ADN

Créée en 2002, la base de données de profils d'ADN d'INTERPOL contient actuellement plus de 280 000 profils communiqués par 87 pays membres.

Notre base de données de profils d'ADN est capable d'établir en quelques minutes une concordance entre différents profils, d'établir un lien et de résoudre des infractions comme les viols, les meurtres et les vols à main armée.

Utilisation du génotypage

Test de parenté

Dans quel cadre peut-on effectuer un test de paternité ?

Vérifié le 11 août 2023 - Direction de l'information légale et administrative (Premier ministre), Ministère chargé de la justice

Un test génétique est autorisé **uniquement dans le cadre d'une procédure judiciaire** visant l'un des objectifs suivants :

- Établir ou contester un lien de *filiation*
- Recevoir ou supprimer une contribution financière (aussi appelée subsides)
- Établir l'identité d'une personne décédée, dans le cadre d'une enquête de police

Le test de paternité peut être accompli selon l'une des méthodes suivantes :

- Examen comparé des sangs
- Identification par les empreintes génétiques (test ADN)

Le test de paternité peut être effectué uniquement par des techniciens spécialement agréés à cet effet.

À savoir

Aucun test de paternité ne peut être pratiqué avant la naissance.

[Tout déplier](#)

Utilisation du génotypage

Dépistage de maladies

Tests génétiques A quoi servent-ils ?

● MODIFIÉ LE : 15/05/2015 ● PUBLIÉ LE : 11/07/2017 ● TEMPS DE LECTURE : 10 MIN

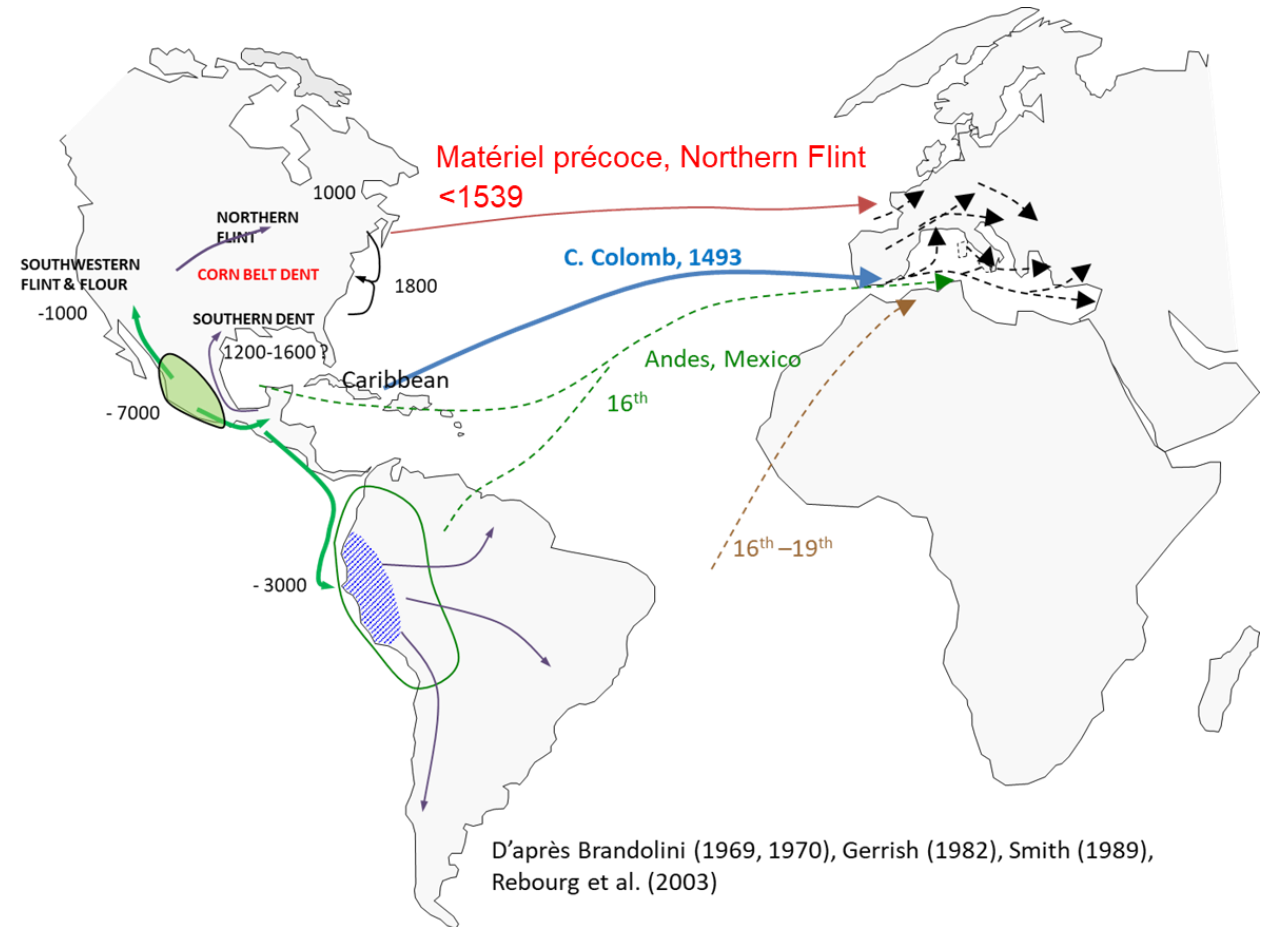
De nombreux tests génétiques apportent des informations relatives à la santé des individus ou à celle de leur famille. Ces tests consistent à rechercher des anomalies sur la molécule d'ADN elle-même, ou à dépister des anomalies concernant le nombre ou la forme des chromosomes. Il faut distinguer les tests qui apportent des informations sur le patrimoine génétique transmissible, présent dans toutes les cellules de l'organisme (génétique constitutionnelle), et les tests qui informent sur l'état du génome de cellules tumorales (génétique somatique). En outre, d'autres tests permettent d'obtenir des informations sur la réponse à un traitement ou sur les risques d'effets secondaires (pharmacogénomique).

Dossier réalisé en collaboration avec le Pr François Eisinger, onco-généticien et membre du comité d'éthique Inserm

Utilisation du génotypage

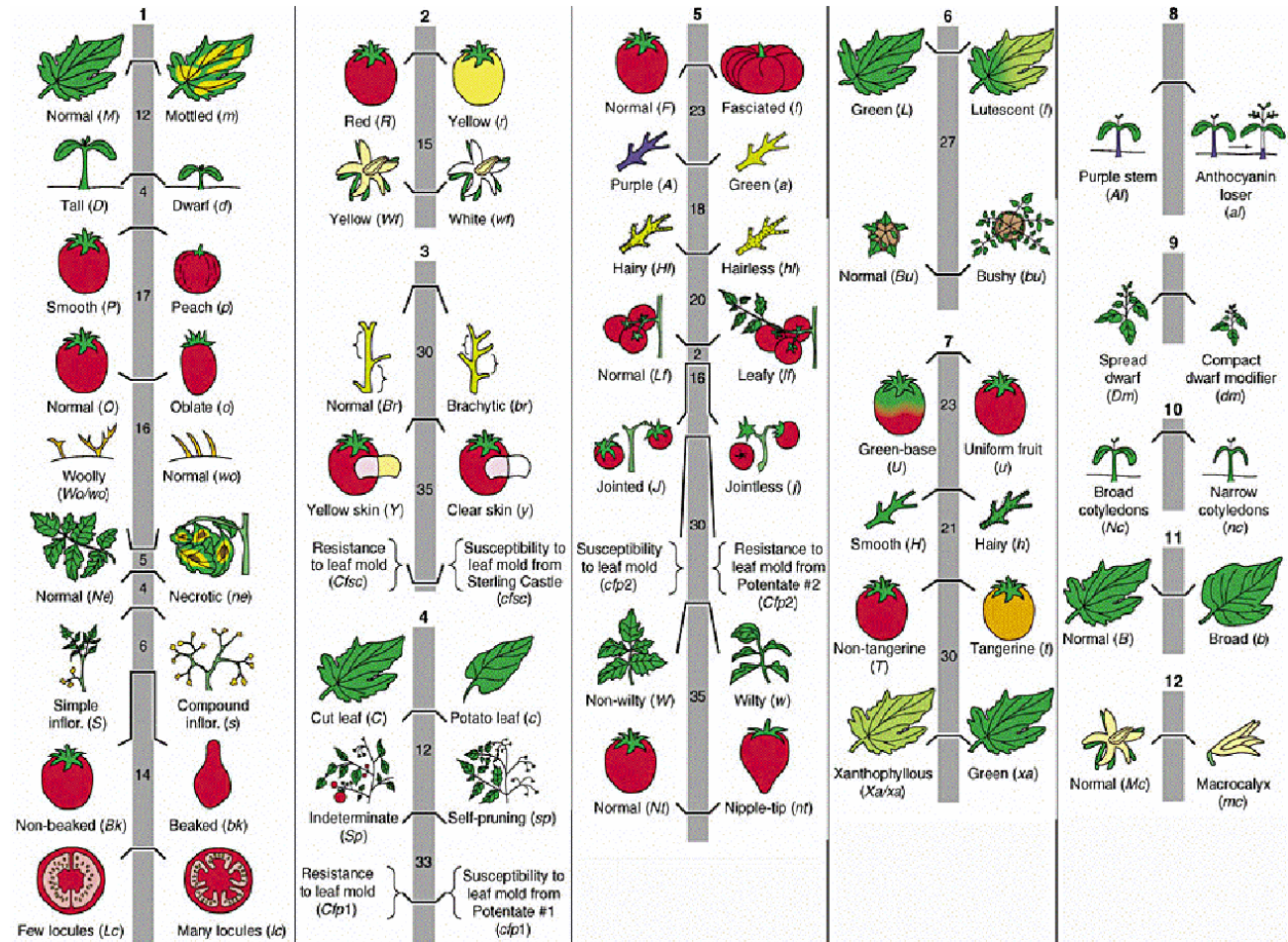
Etude de l'histoire évolutive d'une espèce

Ce que nous dit l'histoire et ce que l'on confirme par l'analyse de la structure des populations américaines et européennes



Utilisation du génotypage

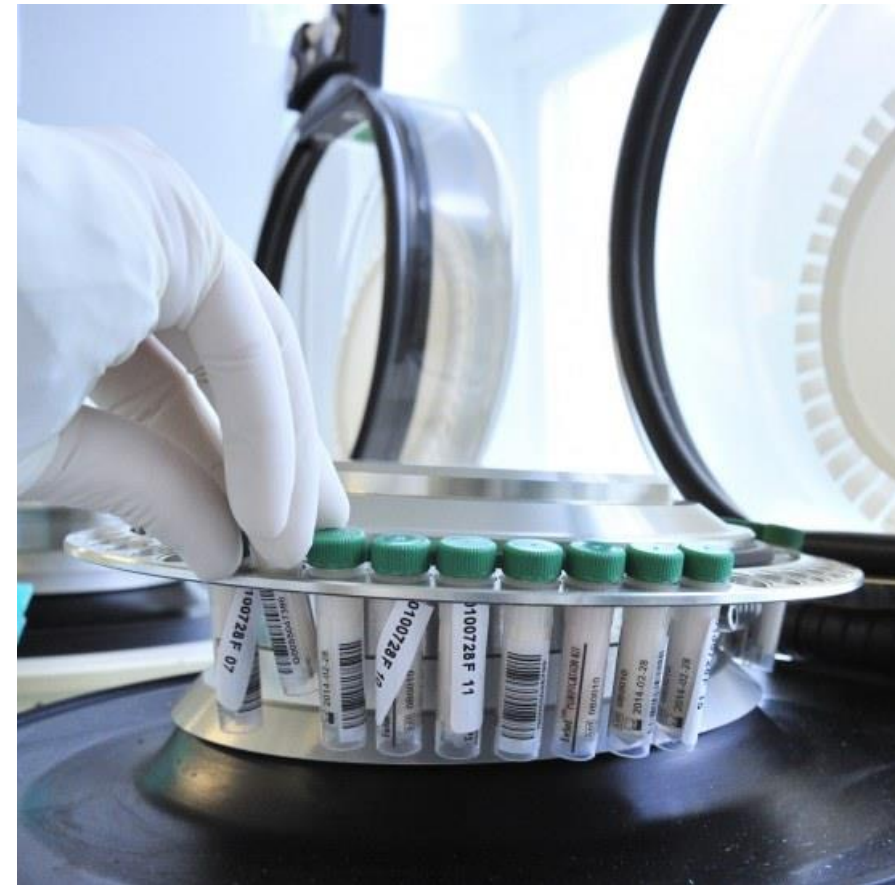
Identification de gènes en étudiant les liens entre phénotype et génotype



Utilisation du génotypage

Traçabilité des produits agroalimentaires

- Vérifier l'identité génétique des matières premières
- Evaluer la salubrité des aliments (identification de microorganismes pathogènes présents)

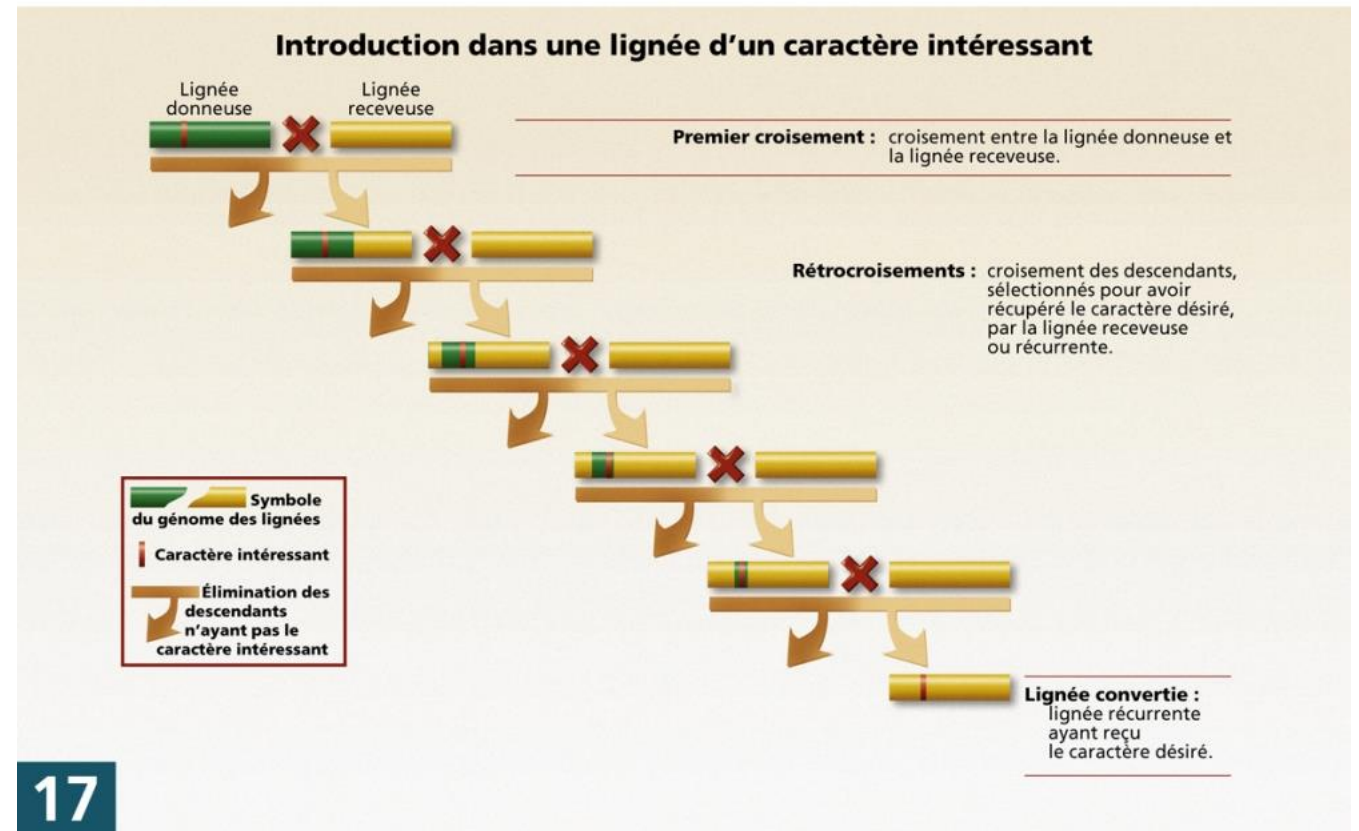


Utilisation du génotypage

Sélection assistée par marqueurs

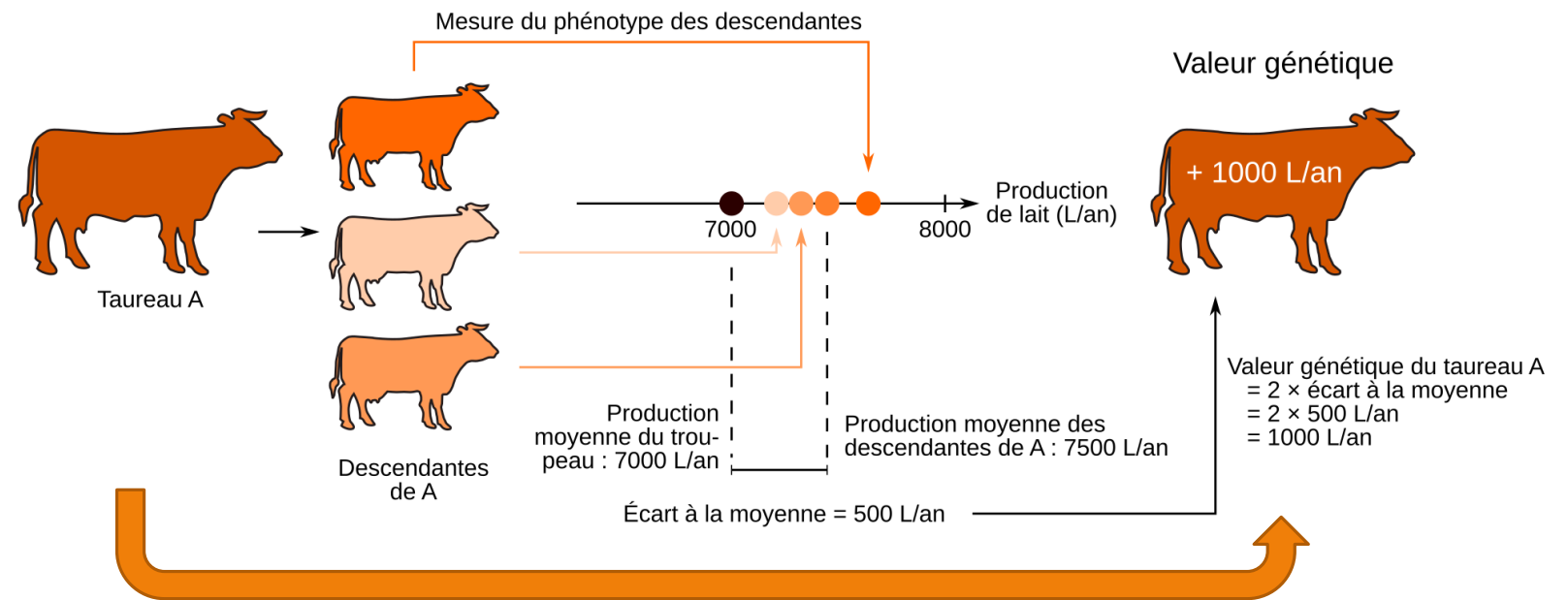


Le rétrocroisement



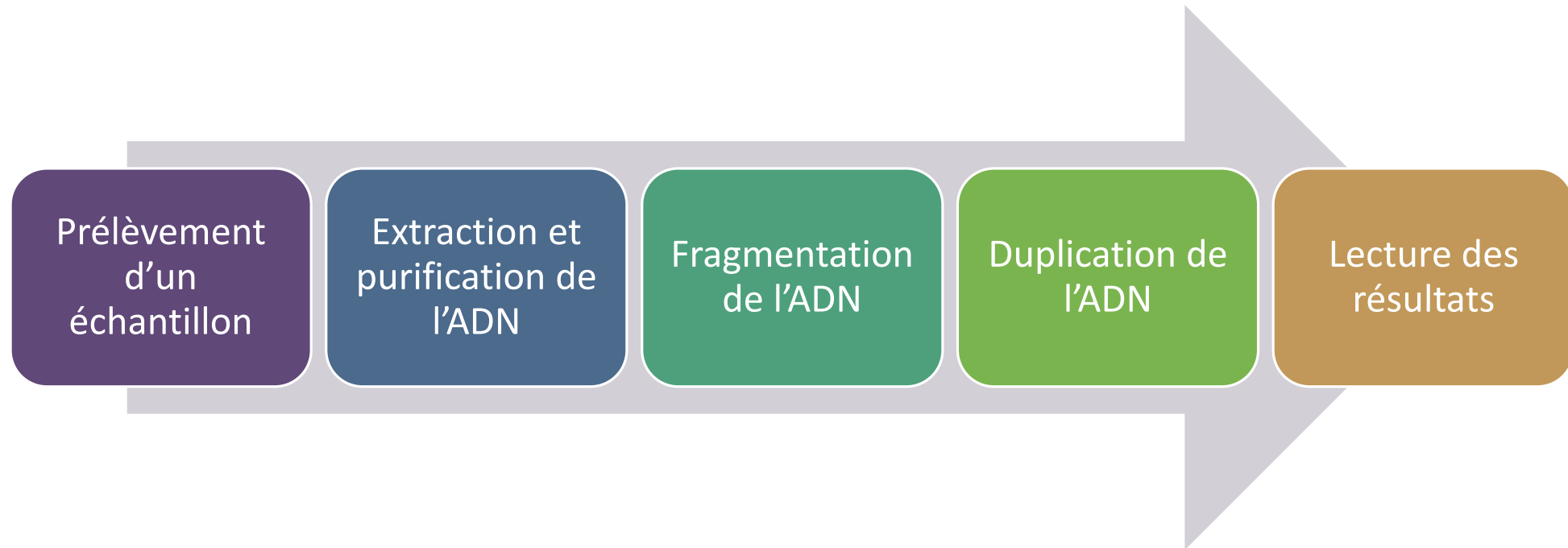
Utilisation du génotypage

Prédictions génomiques



Eviter le phénotypage en prédisant la valeur de l'individu grâce à son génotype

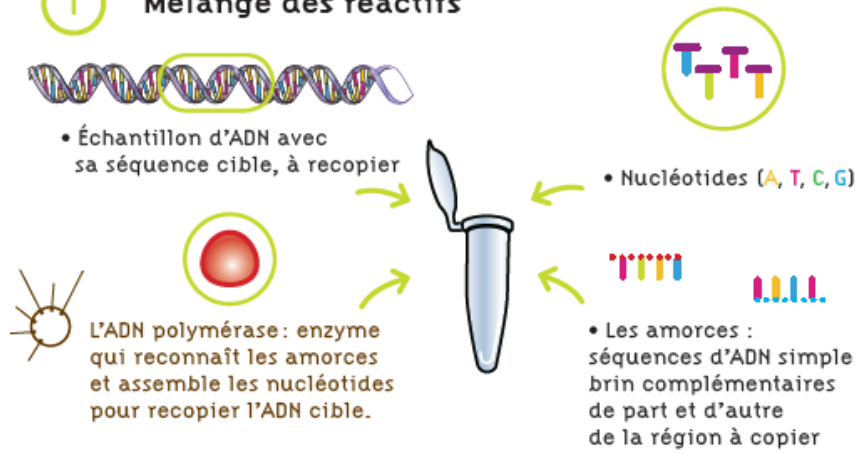
Principales étapes du génotypage



«Polymerase Chain Reaction» ou PCR

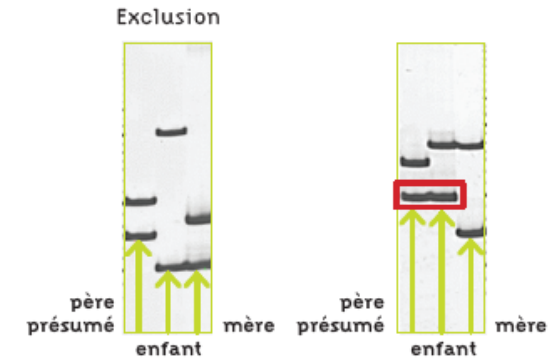
- K. Mullis en 1985
- Technique de réplication ciblée *in vitro*
- La PCR permet d'obtenir d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie
- Succession de réactions de réplication, chaque réaction utilise deux amorces (*primers* en anglais) oligonucléotidiques dont les extrémités l'une vers l'autre et qui bornent la séquence à amplifier
- Les produits de chaque étape sont utilisés comme matrices pour les étapes suivantes
➔ l'amplification est exponentielle

1 Mélange des réactifs



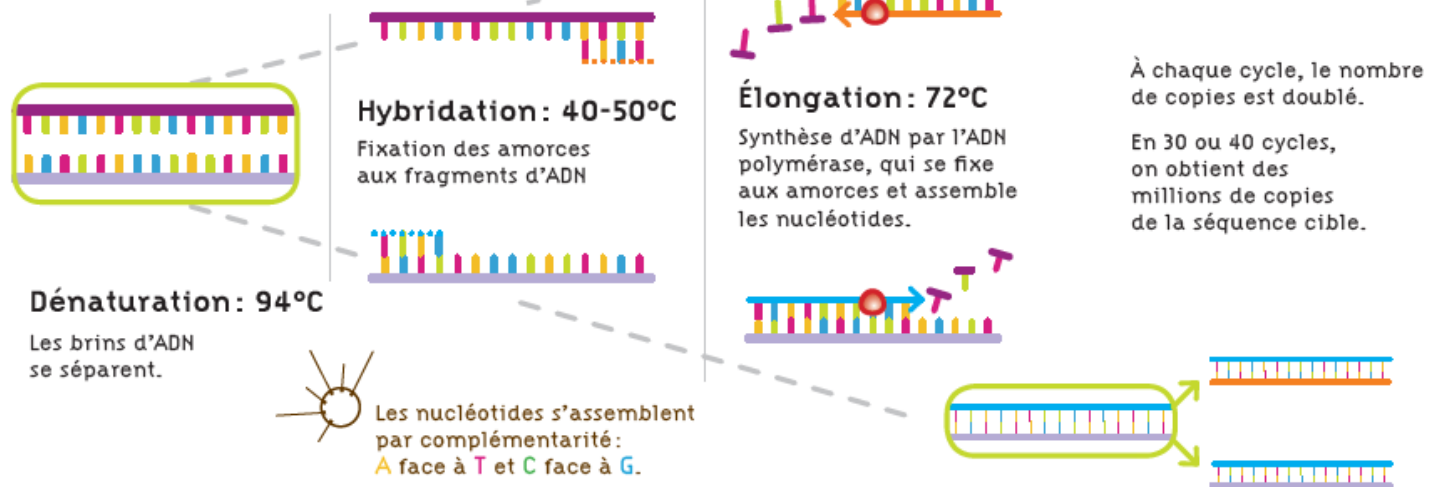
3 Analyse des fragments obtenus par électrophorèse

Exemple du résultat d'un test de paternité

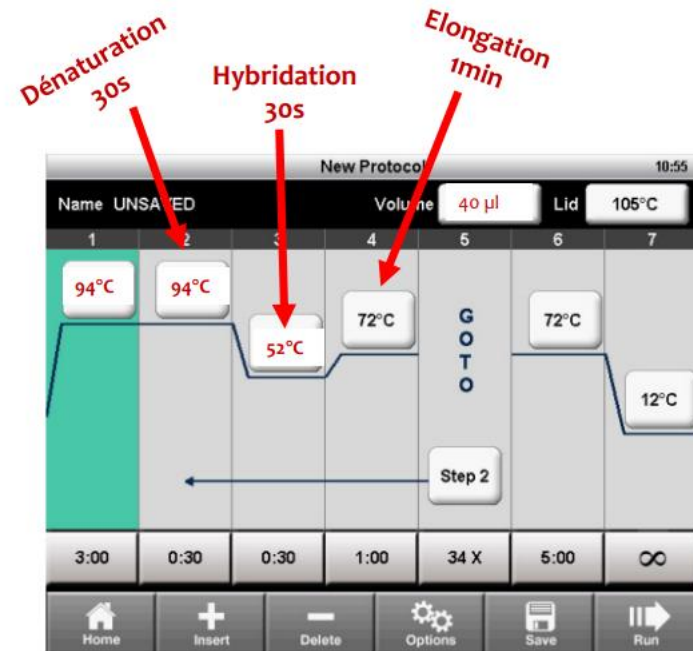
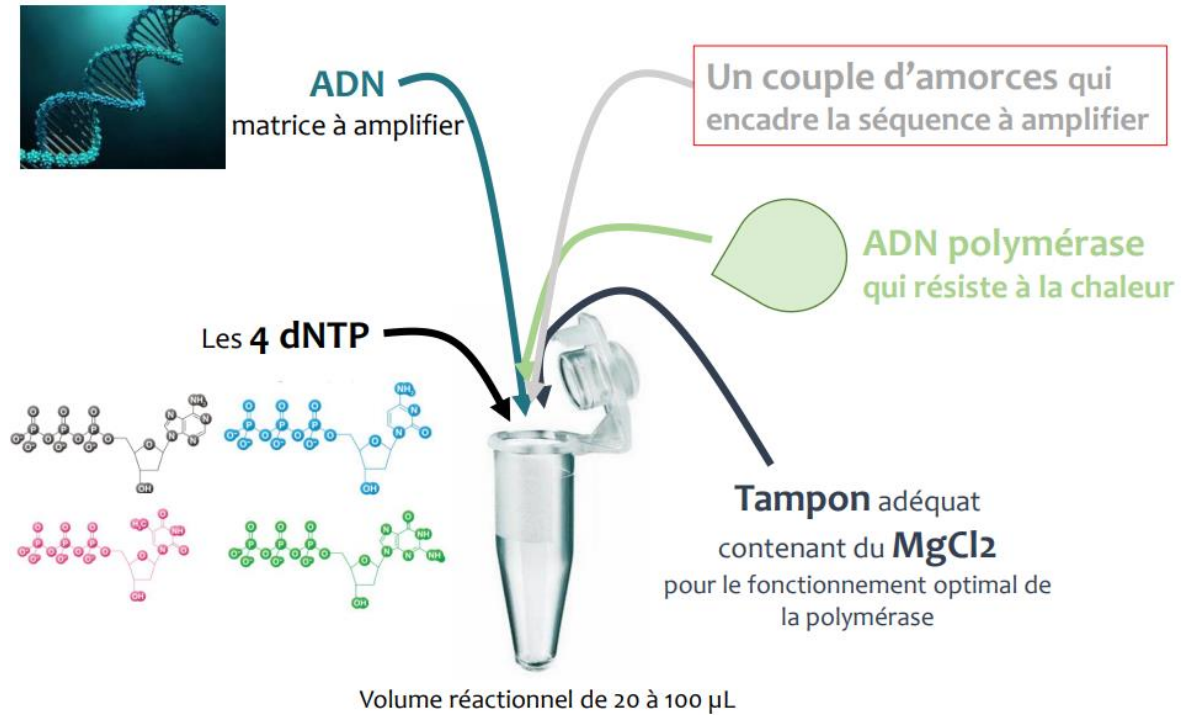


2 Le mélange est soumis à des variations de températures rapides grâce au thermocycleur.

Il est programmé pour faire 20 à 40 cycles. Chaque cycle comprend 3 étapes.

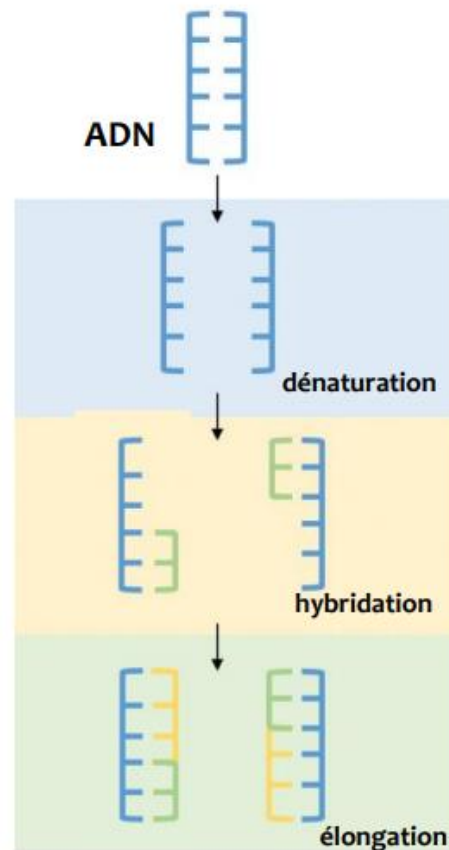


Éléments nécessaires pour une PCR



Maryline Moulin

Les 3 étapes de la PCR

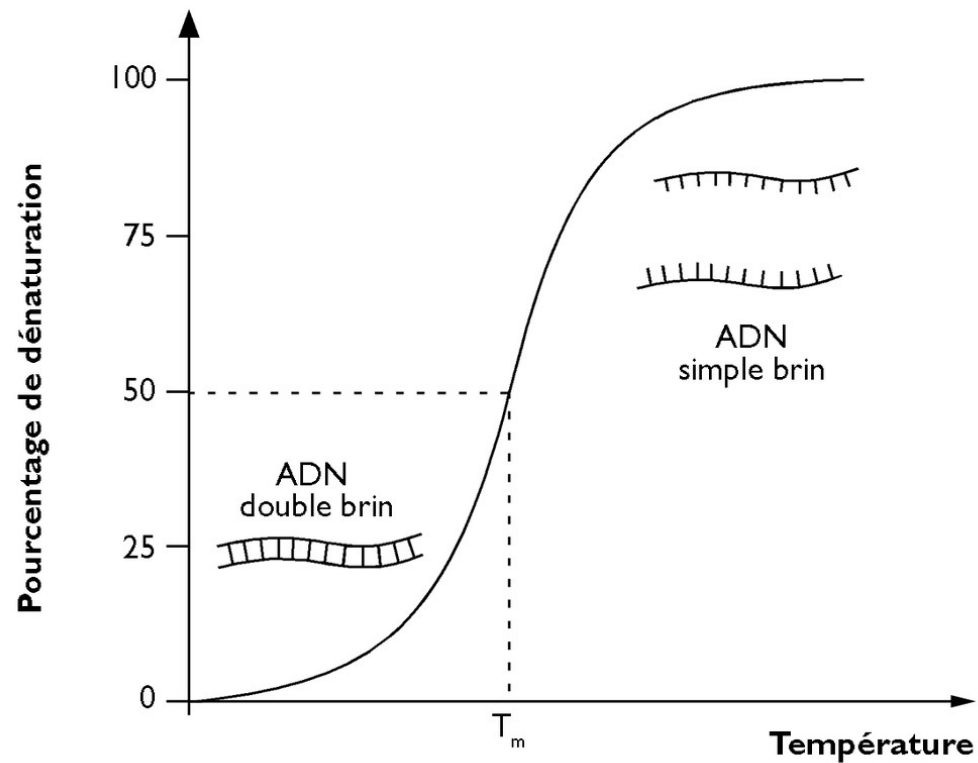


Dénaturation autour de 95°C
pour pouvoir séparer les deux brins d'ADN

Hybridation à la T_m la plus petite des deux amorces
pour s'assurer qu'on a au moins 50% des amorces
hybridées

Élongation à 72°C , la température optimale
pour l'activité polymérase de la Taq polymérase

Dénaturation de l'ADN



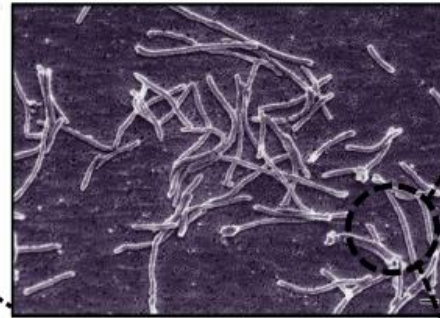
- La séparation des deux brins d'ADN sous l'effet de la température : dénaturation de l'ADN
- Après dénaturation, les bases azotées ne sont plus engagées par des liaisons hydrogènes
- Phénomène est réversible : si on refroidit on a la reconstitution d'une double hélice

Taq polymérase

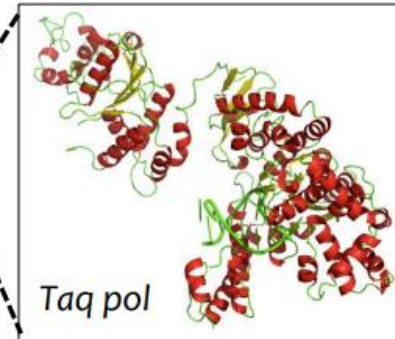
La technique PCR a été développée suite à la découverte d'une bactérie thermophile vivant dans les sources chaudes du Yellowstone National Park, *Thermus aquaticus*, et l'utilisation par la suite de son ADN polymérase (connus sous le nom de **Taq Pol** ou **Taq**)



Geyser de Yellowstone National Park (70°C-75°C)



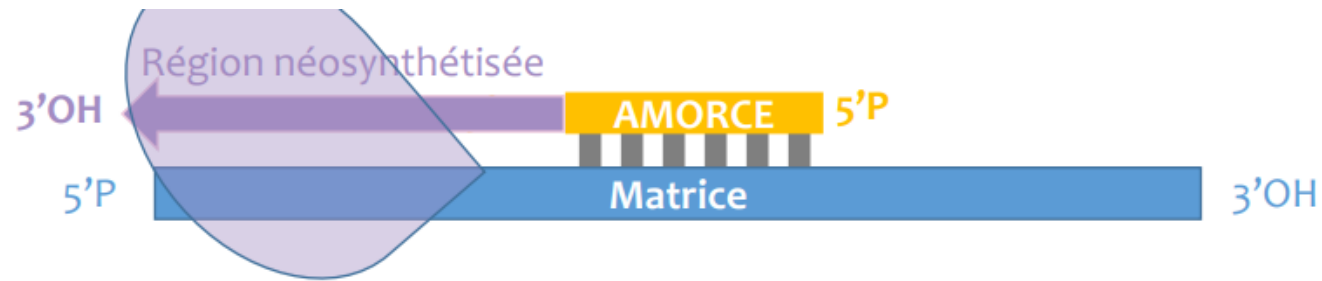
Thermus aquaticus



Taq pol

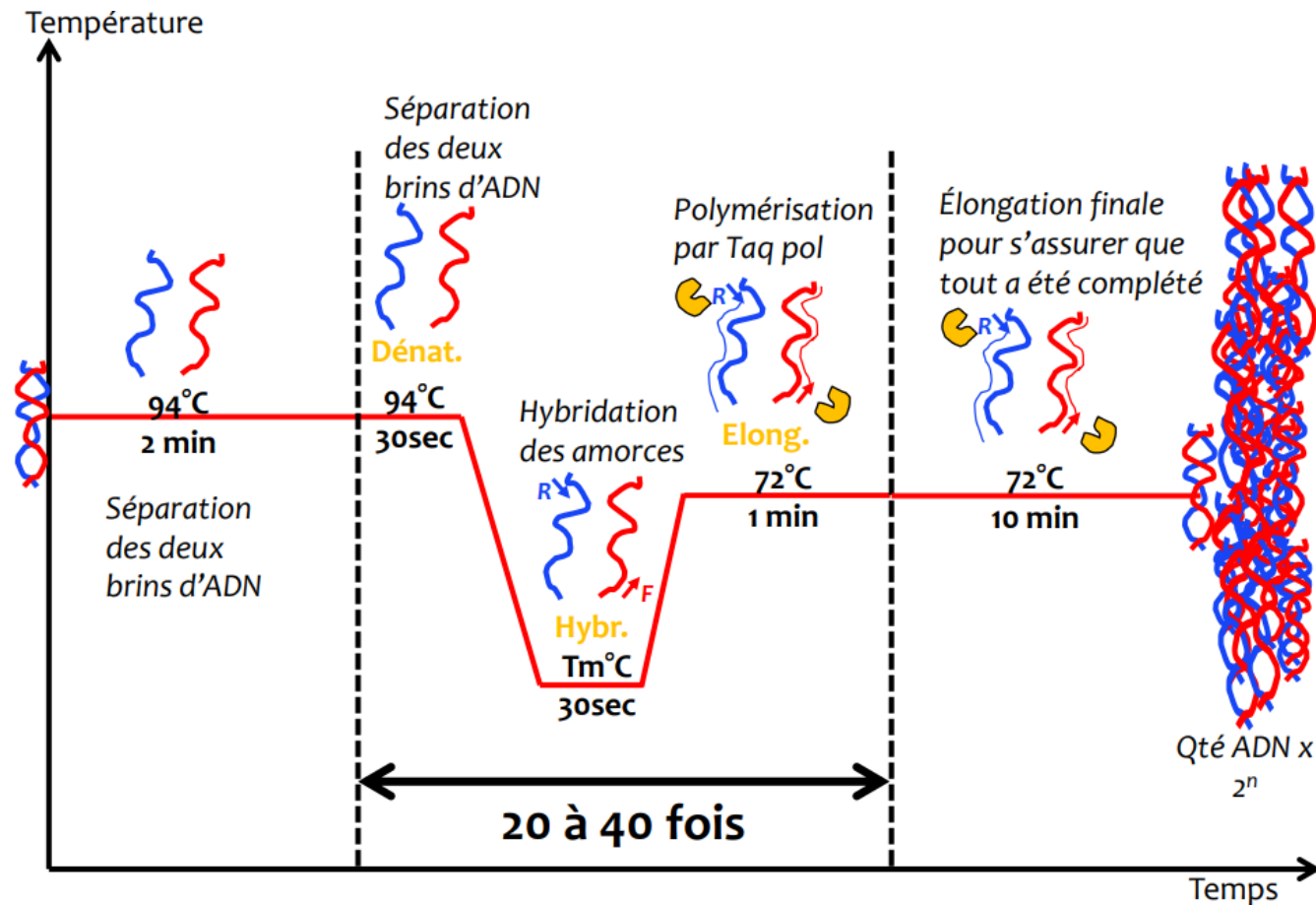
- La Taq pol a une demi-vie enzymatique à 95 °C de 40 minutes !!
- La Taq pol a une activité optimale à 72°C
- La Taq pol sauvage fait une erreur pour chaque million de paires de base, il a eu donc d'autres mutants et d'autres polymérases plus efficaces sur le marché

Elongation



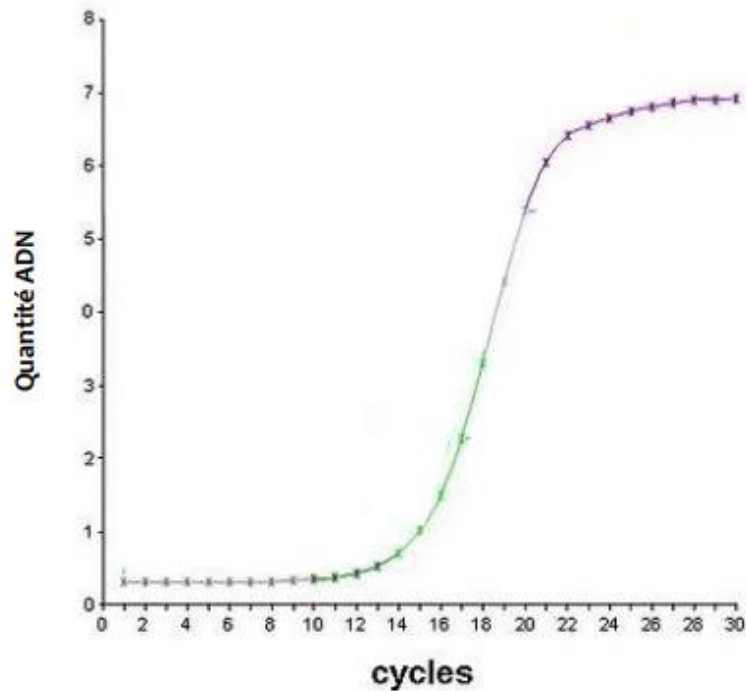
- La matrice est lue dans le sens 3'OH vers 5'P
- Ajout séquentiel de nucléotides à l'extrémité 3'OH de l'amorce
- L'élongation du brin néosynthétisé dans le sens 5'P vers 3'OH

Bilan du programme PCR



Maryline Moulin

Bilan du programme PCR

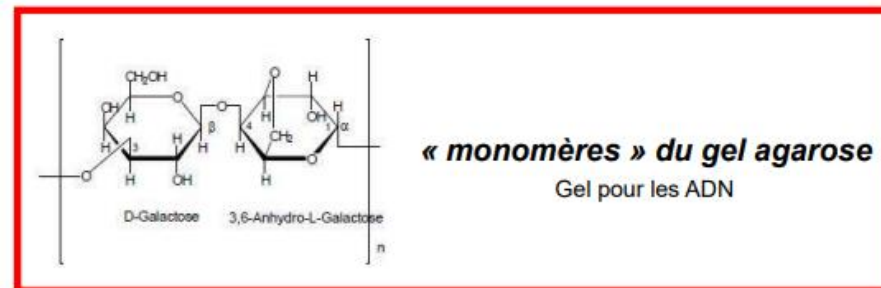
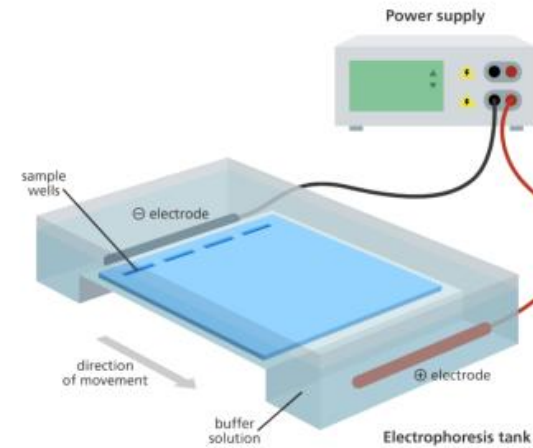


- En théorie, après n cycles, le nombre d'ADN intérêt est multiplié par 2^n
- En pratique, le nombre de brins est limité à cause de la baisse de certains réactifs, l'augmentation de la viscosité du milieu et la baisse de l'activité de l'ADN polymérase thermostable
- A l'issue de la PCR, on obtient des fragments de même taille correspondant à la distance en base qui sépare les amorces

Analyse des fragments obtenus par électrophorèse

= technique utilisée pour séparer des fragments d'acides nucléiques de différentes tailles en les faisant migrer dans un gel en les soumettant à un courant électrique

= le gel est constitué d'une matrice de polymère d'agarose baignant dans un tampon conducteur.

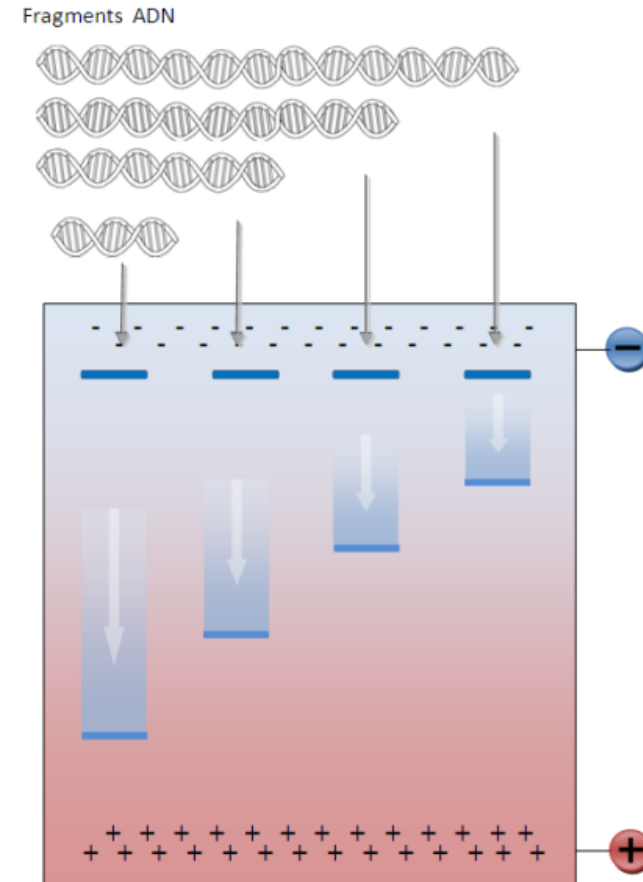


Analyse des fragments obtenus par électrophorèse

L'ADN est chargé (-) à pH 7 = migration vers le pôle positif

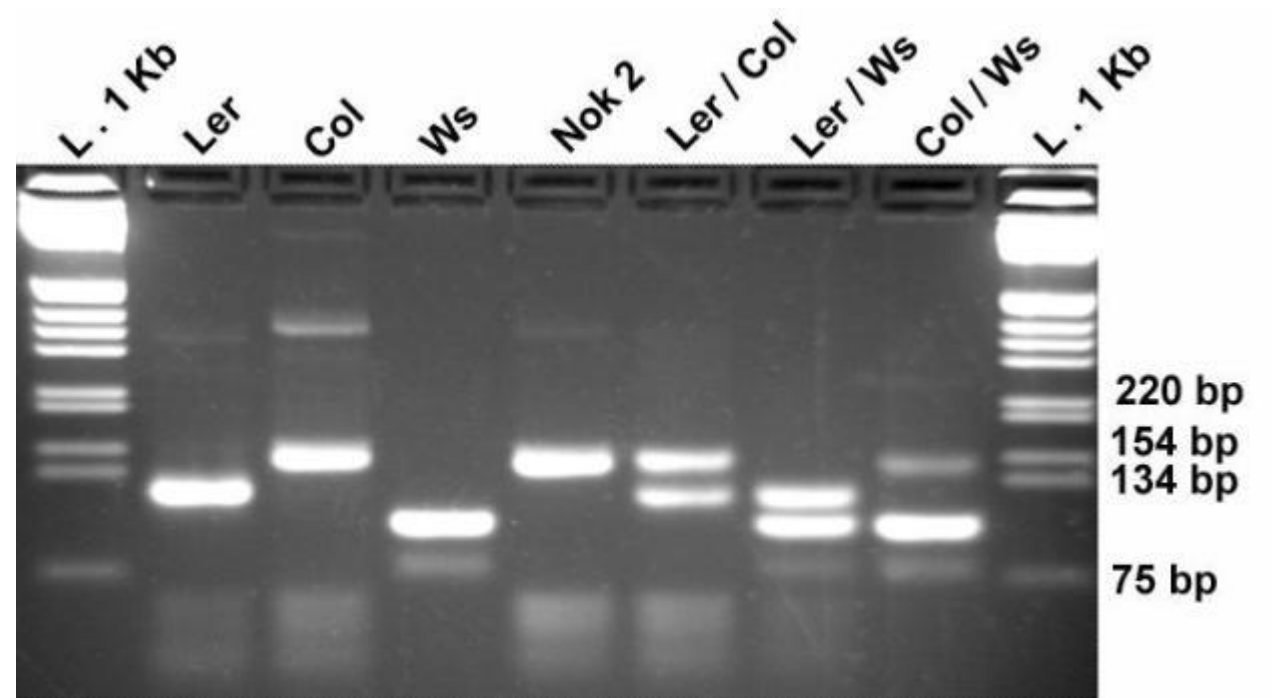
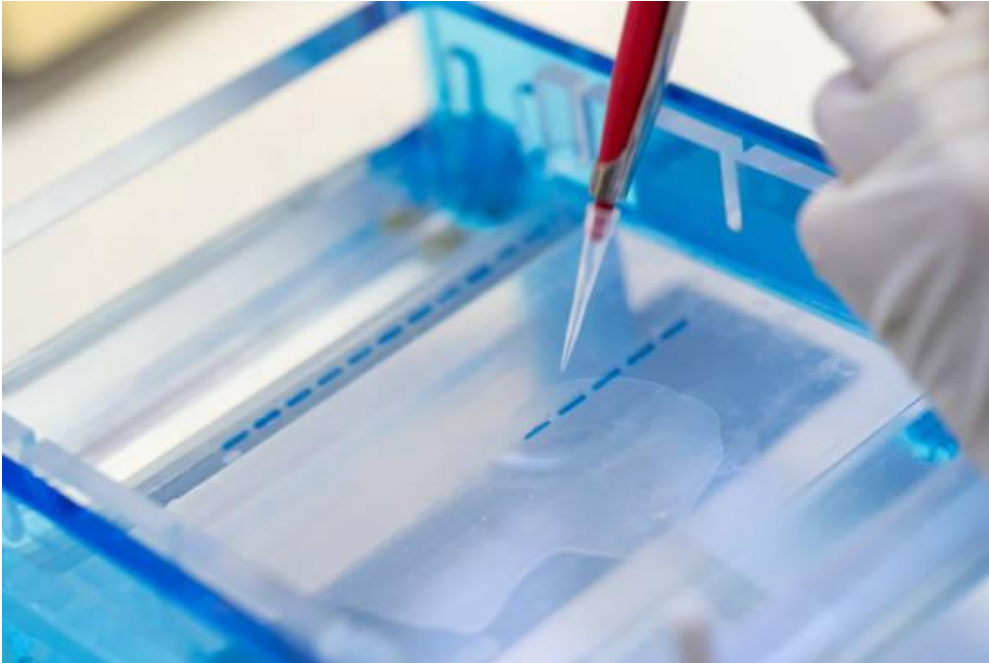
Facteurs affectant la migration :

- Longueur de l'ADN
Plus l'ADN est long, plus sa vitesse de migration est faible
- La conformation ADN circulaire migre moins rapidement que l'ADN linéaire
impossible de déterminer la taille d'un ADN circulaire
- La concentration du gel
- Le voltage : la vitesse de migration augmente lorsque le voltage augmente



Maryline Moulin

Analyse des fragments obtenus par électrophorèse

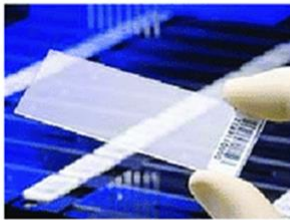


Diversité des types de PCR

- **PCR classique**
- **RT-PCR** qui permet de se servir d'ARN comme point de départ en utilisant une transcriptase inverse
- **PCR quantitative** en temps réel ou qPCR qui permet de mesure la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (en temps réel) grâce à un marqueur fluorescent

Les puces ADN

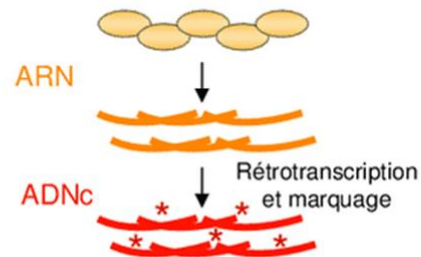
1. Greffage de brins synthétiques sur support solide



SONDE

2. Préparation des cibles

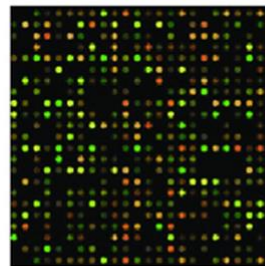
Cellules



CIBLE

HYBRIDATION

3. Lecture de l'hybridation



Acquisition de l'image et analyse des données



Etude de plusieurs dizaines de milliers de marqueurs