




Analyse du polymorphisme

La diversité génétique




La diversité génétique est la variation héritable dans et entre les populations d'organismes
Elle réside dans la séquence des quatre paires de bases qui composent la molécule d'ADN « le code génétique »

La diversité génétique




- D'autres types de diversité génétique peuvent être également identifiés à tous les niveaux d'organisation dans le noyau, y compris la quantité d'ADN par cellule le nombre de chromosomes et la structure de l'ADN
- Des nouvelles variations génétiques se créent continuellement dans les individus par des mutations chromosomiques ou géniques qui se propagent par recombinaison chez les organismes à reproduction sexuée


La diversité génétique

- 
- La diversité génétique se réfère aux variations dans:
 - La séquence d'ADN
 - La quantité d'ADN par cellule, ou
 - Le nombre et la structure des chromosomes
 - La diversité génétique est la résultante de la sélection, la mutation, la migration, la dérive génétique et/ou la recombinaison. Tous ces phénomènes provoquent des changements dans les fréquences de gènes et d'allèles, conduisant à l'évolution des populations


Les ressources génétiques végétales

- 
- Les ressources génétiques végétales contiennent la variation génétique potentiellement utile pour l'avenir de l'humanité
 - Les ressources génétiques végétales comprennent:
 - Des espèces sauvages apparentées aux espèces cultivées
 - Des espèces sauvages non apparentées
 - Des variétés traditionnelles et/ou des variétés de pays
 - Des variétés commerciales, hybrides ou lignées sélectionnées
 - nous devons conserver les ressources génétiques végétales pour pouvoir éventuellement les utiliser.


Mesurer la variation génétique

- 
- La conservation et l'utilisation efficaces des ressources génétiques végétales requièrent une évaluation précise de la variation génétique qu'elles comportent.
 - La variation génétique peut être mesurée à deux niveaux:
 - Le phénotype : la combinaison de caractères individuels résultant d'un génotype et son interaction avec l'environnement
 - Le génotype : la composition génétique particulière d'un organisme


Notion de population

- 
- Une population se définit comme étant l'ensemble des individus d'une même espèce vivant dans une zone géographique donnée
 - Une espèce est donc constituée d'un ensemble de populations


Notion de polymorphisme

- 
- La variabilité en génétique des populations est qualifiée de polymorphisme
 - Ce terme de polymorphisme a été introduit par Ford en 1940 pour désigner « la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou locus donné, dans une population animale, végétale, fongique, bactérienne »
 - Il explique qu'une espèce présente des individus aux caractères phénotypiques différents au sein d'une même population.

Marqueur génétique

- 
- On appelle marqueur génétique, un marqueur biochimique, chromosomique ou moléculaire qui permet de révéler un polymorphisme

Les marqueurs génétiques: description

- 
- Les marqueurs génétiques montrent des caractéristiques du phénotype et/ou du génotype d'un individu
 - Leur transmission héréditaire peut être suivie au cours des générations



Les marqueurs génétiques: Types de marqueurs

- Marqueurs morphologiques
- Marqueurs protéiques (biochimiques)
- Marqueurs ADN (moléculaires)



Marqueurs morphologiques


Avantages:

- Disponibles immédiatement
- Nécessitent seulement un équipement simple
- Constituent la mesure la plus directe du phénotype

Inconvénients:

- Nécessitent une expertise sur la plante cultivée ou l'espèce
- Soumis à l'influence de l'environnement
- En nombre limité

Marqueurs protéiques (biochimiques)


- 
- Un marqueur biochimique et moléculaire est une protéine ou une séquence de ADN facilement détectable et transmissible génétiquement. Il résulte d'un polymorphisme pouvant être utilisé dans l'étude de la diversité génétique



Marqueurs protéiques (biochimiques)

- Basés sur les propriétés de migration des protéines, qui permet leur séparation par électrophorèse
- Détectés par des dosages histochimiques spécifiques
- **Avantages:**
 - Nécessitent un équipement relativement simple
 - Complément robuste de l'évaluation morphologique de la variation
- **Inconvénients:**
 - Soumis à l'influence de l'environnement
 - En nombre limité

Les marqueurs ADN (moléculaires)

- 
- Les marqueurs moléculaires sont un type de marqueur génétique composé de fragments d'ADN qui servent de repères pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre.



Les marqueurs ADN (moléculaires)

- Polymorphismes détectés dans la séquence de l'ADN du noyau ou des organites


Avantages:

- non soumis à l'influence de l'environnement
- Potentiellement en nombre illimité
- Mesure objective de la variation

Inconvénient majeur:

- nécessitent un équipement technique plus complexe

Marqueurs génétiques: propriétés recherchées

- 
- Très polymorphes
 - Reproductibles
 - Codominants
 - Distribués régulièrement le long du génome
 - Discriminants
 - Non soumis à l'influence de l'environnement
 - Neutres
 - Peu coûteux
 - Faciles à mesurer

Marqueurs génétiques: propriétés recherchées



➤ **Très polymorphes**

C'est à dire variable entre individus. Le degré de polymorphisme détecté dépend de la technologie utilisée pour le mesurer.

Marqueurs génétiques: propriétés recherchées

➤ **Reproductibles**

Reproductible dans toute expérience de laboratoire, aussi bien entre expériences dans le même laboratoire qu'entre différents laboratoires réalisant des expériences identiques.



Marqueurs génétiques: propriétés recherchées



➤ Codominants

Selon le type d'application, la technique choisie doit être en mesure de détecter les différentes formes du marqueur, en distinguant homozygotes et hétérozygotes (hérédité codominante). Un individu hétérozygote montre simultanément le génotype combiné des deux parents homozygotes

Marqueurs génétiques: propriétés recherchées

- **Distribué régulièrement le long du génome.**

Plus la couverture du génome est dense et bien répartie, meilleure sera l'évaluation du polymorphisme.



Marqueurs génétiques: propriétés recherchées



➤ **Discriminant :**

C'est à dire capable de détecter des différences entre individus proches apparentés.

Marqueurs génétiques: propriétés recherchées

- 
- **Non sujet aux influences environnementales.**

La révélation du génotype d'un marqueur doit être indépendante de l'environnement dans lequel l'individu vit ou son stade de développement.

Marqueurs génétiques: propriétés recherchées

➤ Neutre

L'allèle présent au locus marqueur est indépendant et n'a pas d'effet sur la pression de sélection exercée sur l'individu. Ceci est généralement une supposition, car généralement aucune donnée n'est disponible pour confirmer ou infirmer cette propriété.


Marqueurs génétiques: propriétés recherchées



➤ Economique

Facile, rapide et peu coûteuse pour sa détection sur un grand nombre d'individus. Si possible, l'équipement doit être à usage multiple dans l'expérience.


En résumé:

- 
- Il faut pouvoir évaluer la variation trouvée dans les ressources génétiques, pour définir des stratégies pour leurs bonnes conservation et utilisation.
 - La diversité génétique des plantes peut être mesurée par l'intermédiaire des marqueurs génétiques - morphologiques, biochimiques et moléculaires
 - Aucun marqueur ne satisfait l'ensemble des propriétés souhaitables
 - Le choix de la technique dépend de la nature de la question biologique posée..



Analyse du polymorphisme protéiques

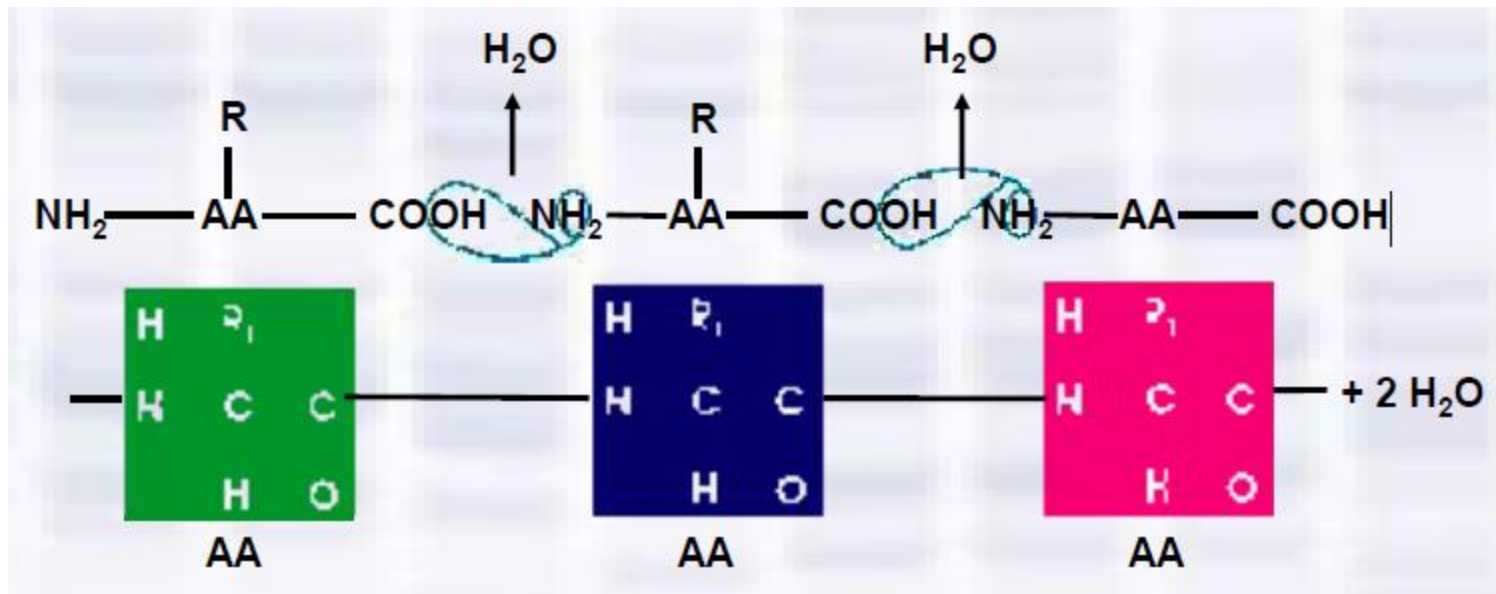
Notions de base sur les protéines

- 
- La séquence des bases azotées de l'ADN renseigne la cellule sur la synthèse des différentes protéines qu'elle doit réaliser pour fonctionner comme partie de l'organisme dans lequel elle existe
 - Les protéines ont de nombreuses fonctions différentes, à la fois structurales et fonctionnelles
 - Les protéines sont des molécules complexes faites de l'assemblage de blocs de construction (les acides aminés) formant ensemble une chaîne (chaîne polypeptidique)

Les structures protéiques: structure primaire

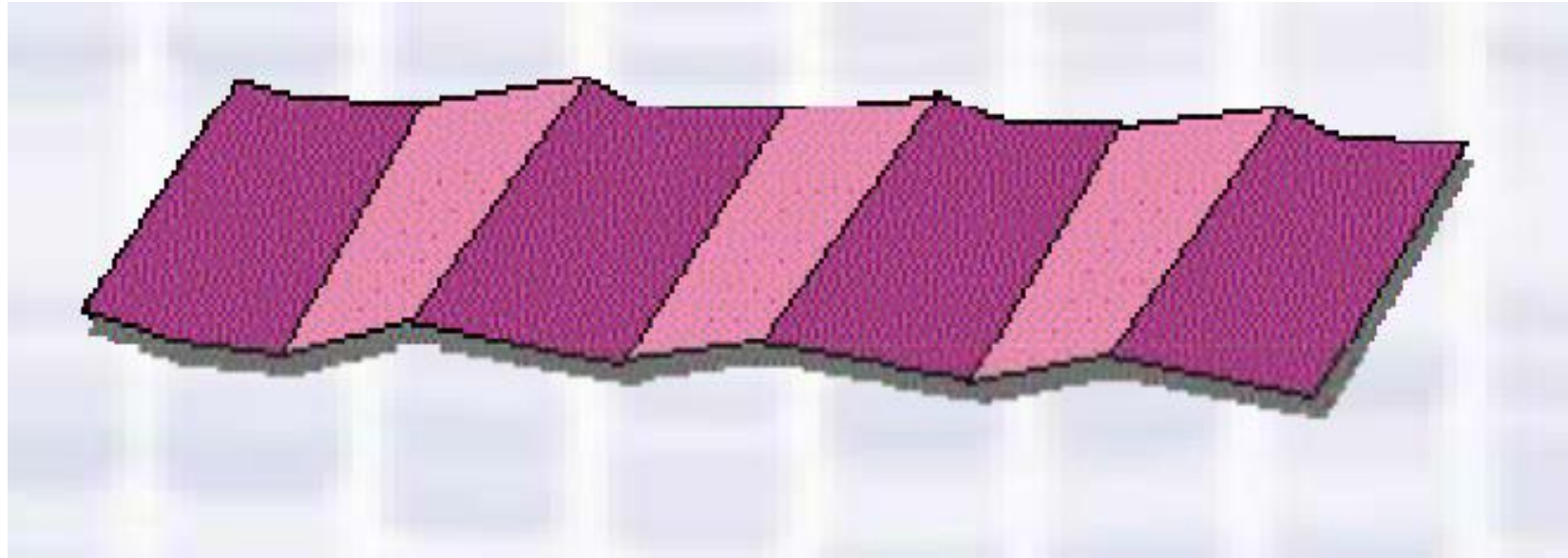
- La structure primaire d'une protéine est l'ordre des acides aminés dans la chaîne polypeptidique

AA = Acide aminé



Les structures protéiques: structure secondaire

- La structure secondaire est le résultat de liaisons hydrogène locales, créées le long du squelette polypeptidique



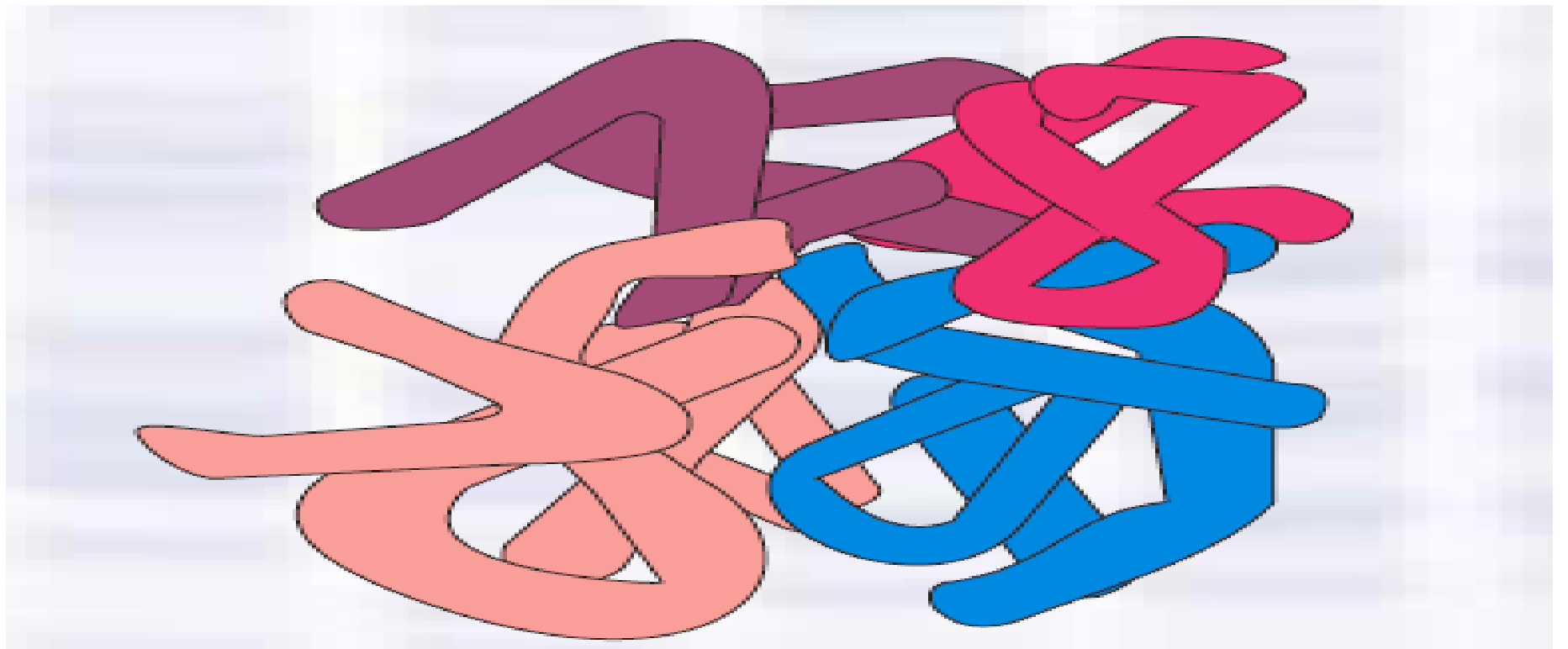
Les structures protéiques: structure tertiaire

- La structure tertiaire résulte dans un polypeptide d'interactions entre des groupes
R: des liaisons covalentes et non covalentes



Les structures protéiques: structure quaternaire

- La structure quaternaire résulte d'interactions entre deux ou plusieurs chaînes polypeptidiques pour former des dimères, trimères, tétramères etc



Fonctions des protéines




- La structure tridimensionnelle des protéines est la résultante directe d'interactions avec leur environnement interne
- La diversité des fonctions des protéines résulte de la complexité de la structure protéique.

Fonctions des protéines

La diversité des fonctions protéiques, facilitée par la complexité de la structure protéique, inclut (avec exemples):

- **Structure** (collagène, fibres musculaires)
- **Stockage** (gliadines du blé, hordéines de l'orge)
- **Enzymes** (hydrolases, transférases, isomérases, polymérases, ligases)
- **Transport** (transfer d'oxygène avec l'hémoglobine)
- **Messagers** (insuline et certaines autres hormones)
- **Anticorps** (protéines se liant à des particules étrangères spécifiques)
- **Régulation** (protéines impliquées dans la régulation de la synthèse d'ADN)

Enzymes: Description

- 
- Les enzymes sont des protéines d'un type particulier qui agissent comme catalyseurs
 - Chaque enzyme est hautement spécifique pour ce qui concerne le type de réaction chimique qu'elle catalyse et les substances (appelées substrats) sur lesquels elle agit.



Enzymes: Allozymes et isozymes

Les multiples formes que peuvent prendre les enzymes se classent en deux groupes selon la façon dont elles sont codées

➤ **Allozymes** - enzymes codées par différents allèles à un locus génique

On appelle des enzymes codées par différents allèles d'un même gène.

Les allozymes n'ayant pas la même structure (taille, charges), on peut les utiliser en biologie et assez facilement les séparer l'une de l'autre, par électrophorèse capillaire par exemple




Enzymes: Allozymes et isozymes


- **Isozymes** - enzymes codées par des allèles à plus d'un locus génique

Les isoenzymes (ou isozymes) sont des enzymes présentant une séquence d'acides aminés différente d'une autre enzyme mais catalysant la même réaction chimique.

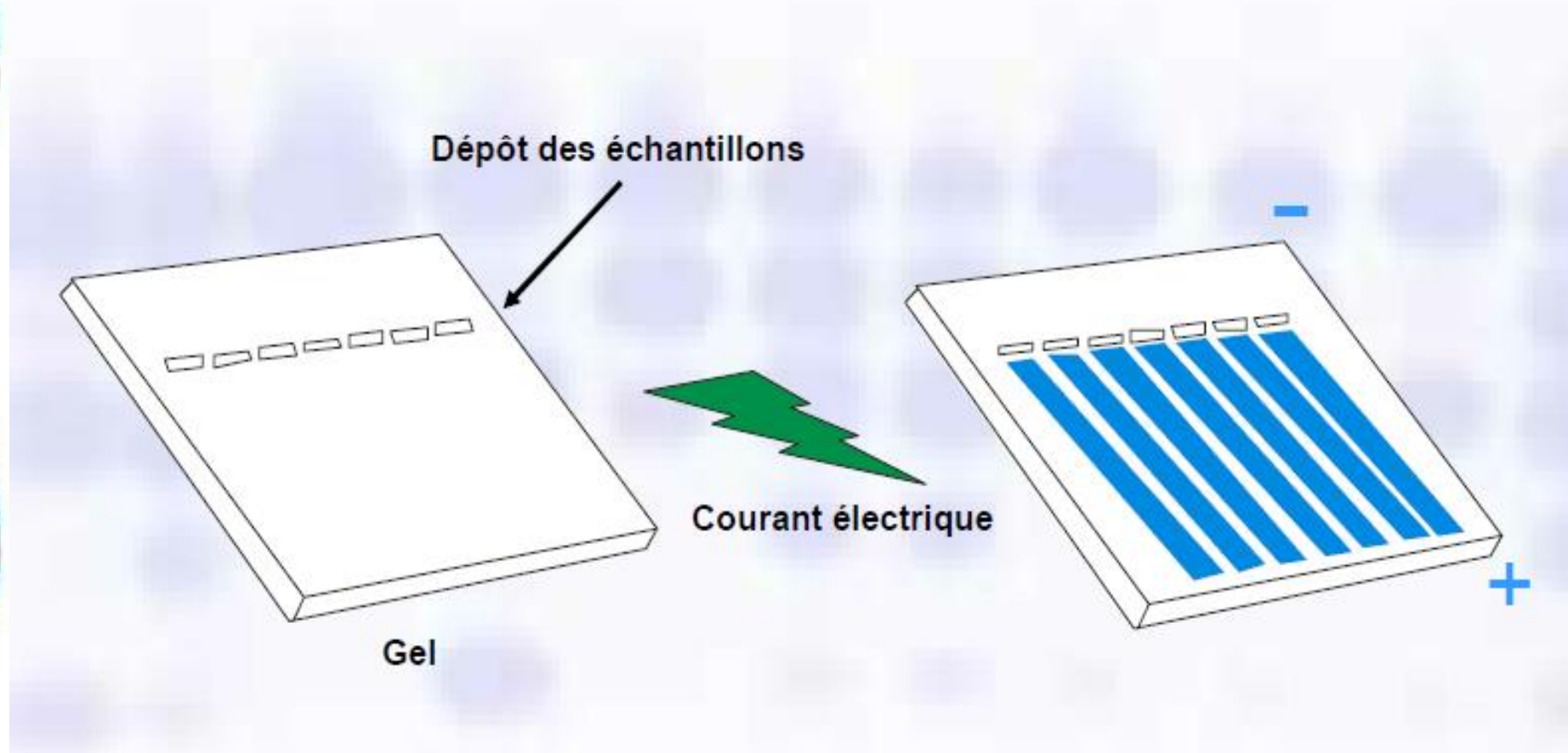
Détection des isozymes: Méthodologie

- 
- Pré-traitement du matériel végétal
 - Electrophorèse sur amidon ou acrylamide
 - Coloration histochimique
 - Analyse des profils de bandes

Détection des isozymes: électrophorèse (1)

- 
- Ce processus combine, par l'application d'un champ électrique, la séparation des molécules suivant leur charge et leur taille
 - Le courant électrique déplace les molécules entre les pores d'une couche de gel
 - Le constituant du gel est choisi pour que ses pores aient une taille adaptée à la séparation d'une gamme de tailles et formes de molécules spécifiques

Détection des isozymes: électrophorèse (2)





Equipement

➤ Ressources:

- Eau distillée et/ou désionisée
- Réactifs

➤ Equipement:

- Réfrigérateur et congélateur
- Générateurs
- Plaque chauffante ou micro-onde
- Gants de coton épais
- pH mètre
- Balances
- Unités d'électrophorèse sur gel
- Verrerie graduée et pompes à vide

Les isozymes en images

Les images suivantes illustrent les étapes des techniques de laboratoire impliquées dans la détection des isozymes



Les isozymes

Le technicien de laboratoire pipette du tampon d'extraction sur une section de feuille. Chaque échantillon est placé dans une coupelle plastique typiquement utilisée pour peser des produits chimiques. D'autres ustensiles peuvent être utilisés alternativement, mais ils doivent être très propres et ne pas absorber les tissus macérés.



Les isozymes

Une fois le tampon d'extraction placé sur l'échantillon de feuille, la feuille est écrasée avec un pilon en plastique pour s'assurer que le tissu est bien broyé et homogénéisé avec le tampon. Cela doit être fait le plus rapidement possible pour éviter une augmentation de température. Quand les échantillons ont été écrasés, les coupelles plastiques peuvent séjourner un moment dans la glace.



Les isozymes

Un petit rectangle de papier, coupé dans un papier poreux, est placé dans l'homogénat, jusqu'à ce que le papier absorbe l'échantillon.



Les isozymes

La solution d'amidon chauffée est coulée dans le moule du gel. Quand le gel se refroidit il prend la consistance d'une gelée. Il sera alors prêt pour le dépôt des échantillons. Jusqu'à son utilisation, le gel peut être stocké dans un réfrigérateur.



Les isozymes

Un gel d'amidon, préparé à l'avance, a été coupé avec un scalpel à un tiers à peu près du bord du moule. Les rectangles de papier sont maintenant placés verticalement contre l'une des bordures de la fente à l'aide de pincettes.



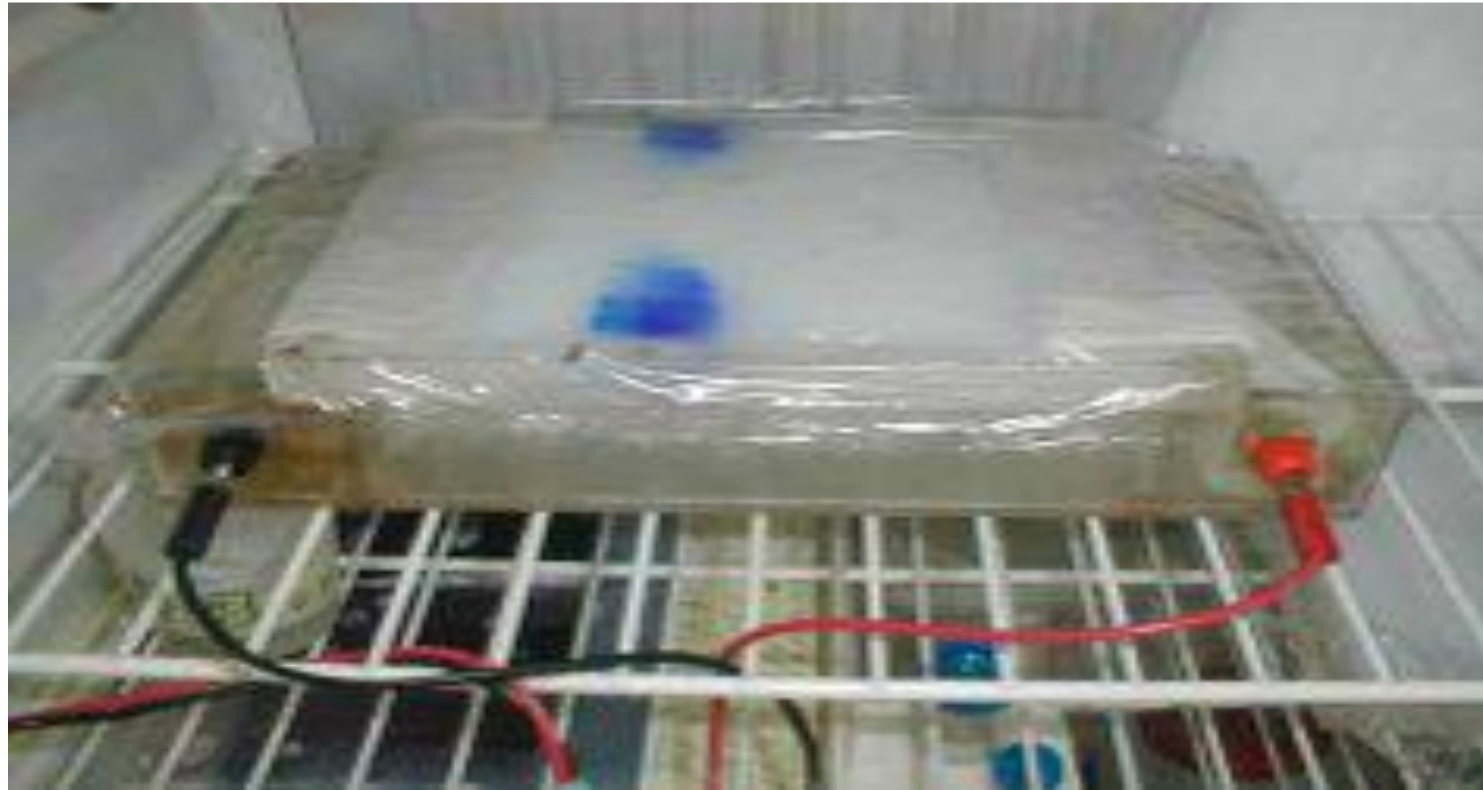
Les isozymes

Un générateur de courant doit être utilisé pour contrôler le voltage et l'intensité du courant pendant l'électrophorèse. Plusieurs modèles sont disponibles dans le commerce, et ont des propriétés et capacités comparables. Dans notre exemple, deux unités d'électrophorèse peuvent être branchées simultanément. Un minuteur peut être inclus pour stopper l'électrophorèse à un temps donné.



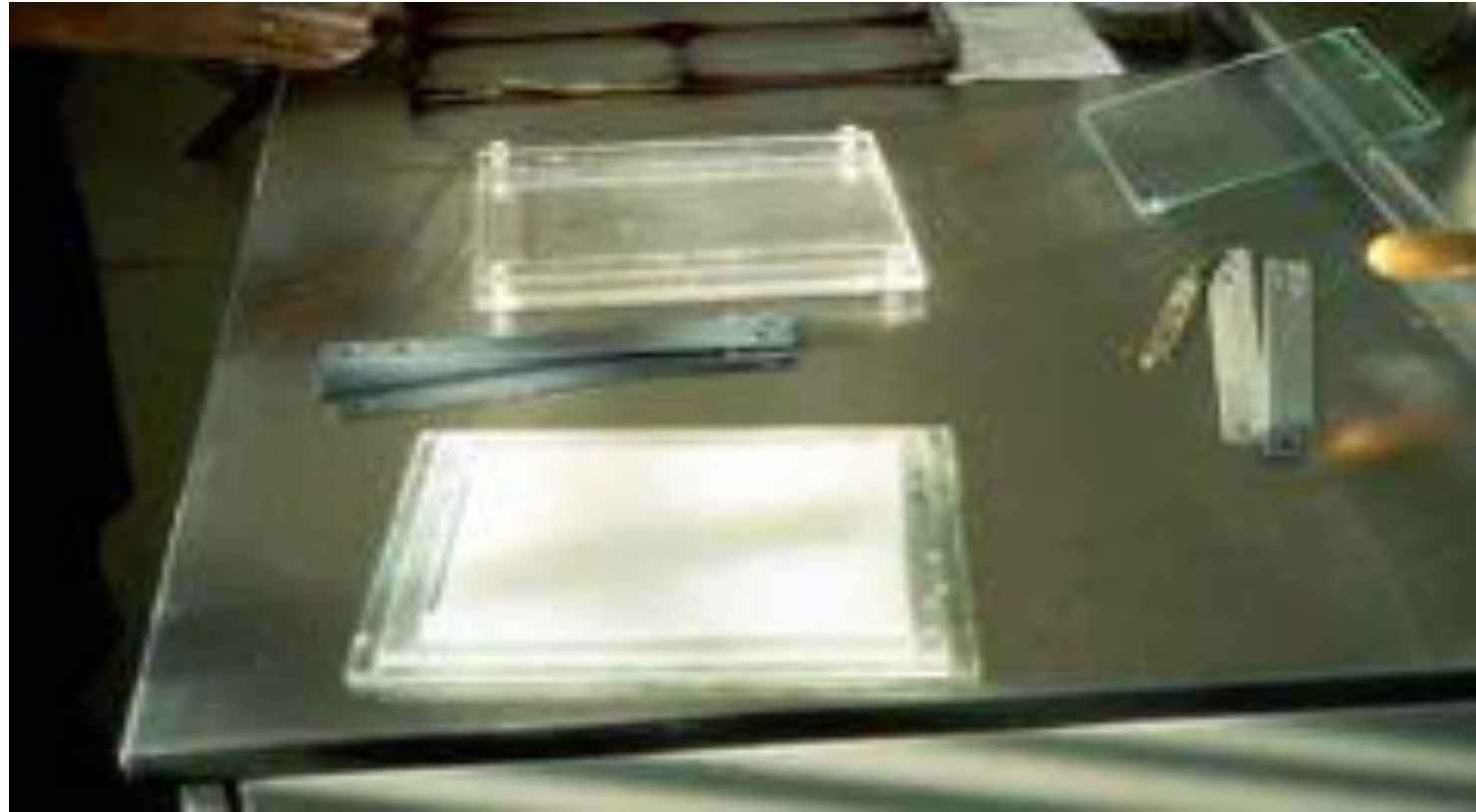
Les isozymes

Le gel est placé dans une unité d'électrophorèse à l'intérieur d'une chambre froide ou d'un réfrigérateur. L'unité contient une cuve remplie de tampon de chaque côté (cathode et anode) et le contact entre le tampon et le gel se fait par une éponge ou une mèche de tissu. Un film plastique est placé par dessus pour éviter le dessèchement du système pendant le processus et assurer un bon transfert du tampon. Les échantillons sont déposés et leur trace suivie par un colorant bleu qui marque la migration dans le gel.



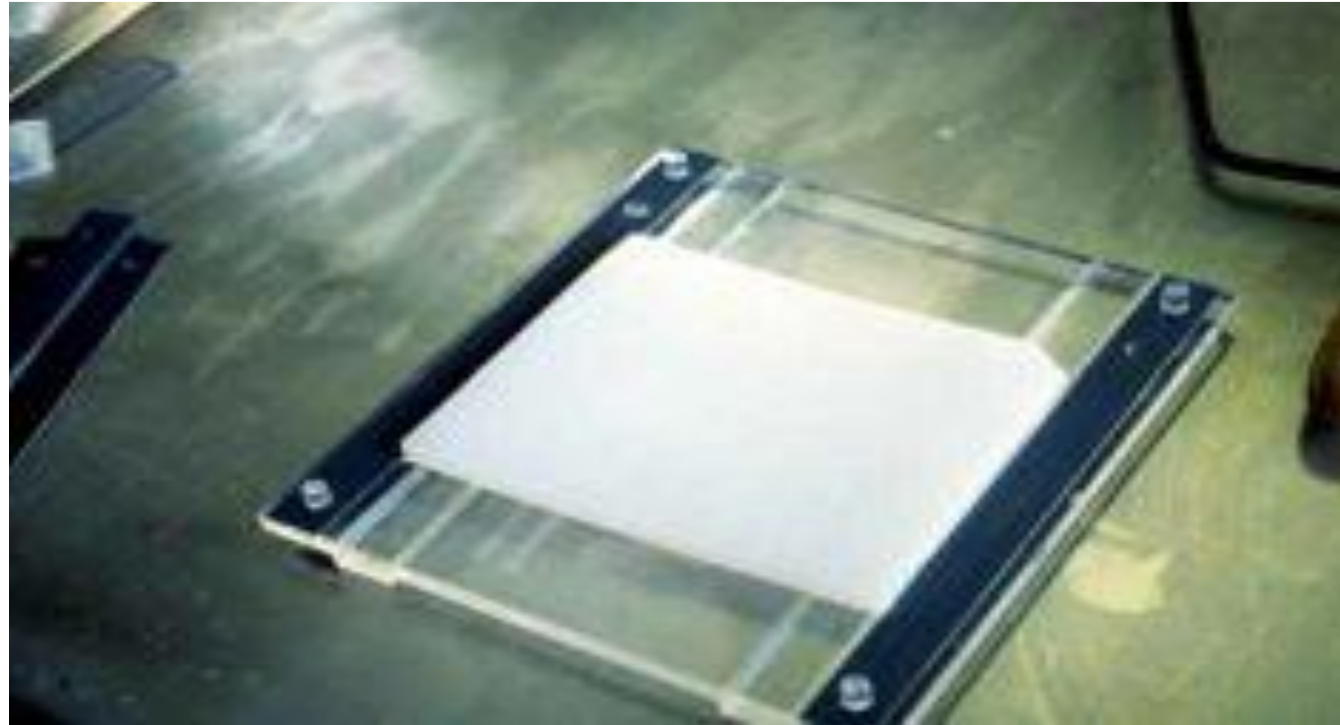
Les isozymes

Quand la migration est complète (généralement une ombre jaunâtre peut être observée du côté opposé à la face de dépôt du gel), le gel peut être coupé en tranches. Le premier plan montre le gel prêt à être coupé, avec une plaque de plexiglass en attente pour le transfert du gel (centre). On peut voir en haut de la photographie un récipient où les coupes vont être placées.



Les isozymes

Le gel est maintenant sur le portoir et des espaceurs fins, noirs, sont placés de chaque côté pour contrôler l'épaisseur des coupes. Une entaille est faite sur un coin (en haut à droite) comme repère pour localiser correctement les échantillons après coloration du gel.



Les isozymes

Une plaque de verre est placée sur le gel pour exercer une pression pendant la coupure, assurant ainsi des tranches égales. Un coupe-fromage, garni d'une corde de guitare, est utilisé pour couper le gel en tranches.



Les isozymes

Différentes solutions de colorations permettent de visualiser différentes enzymes. Ici, une solution de coloration jaunâtre est versée dans le récipient en plexiglass avant que la tranche de gel n'y soit transférée.



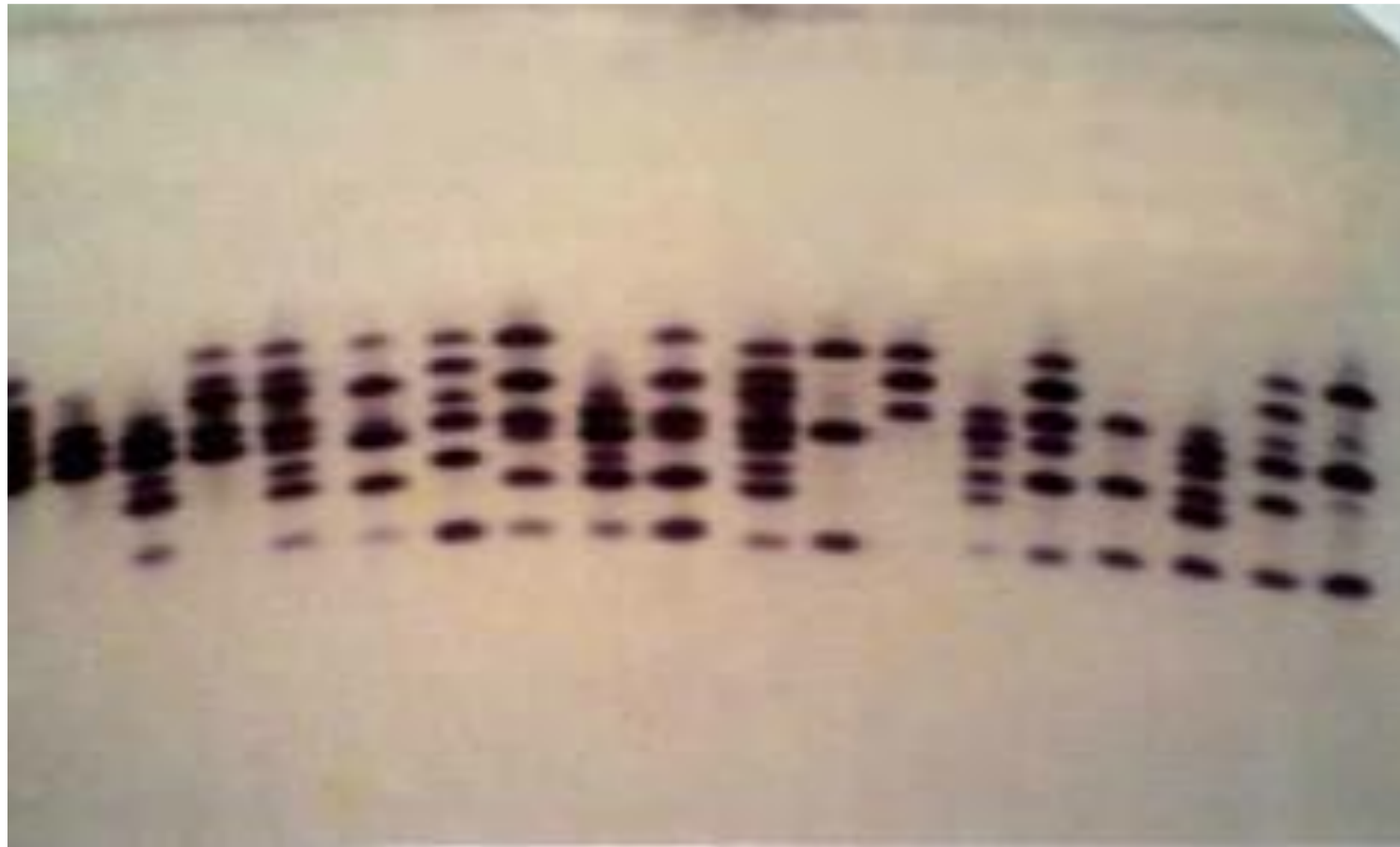
Les isozymes

Une tranche de gel est transférée dans le bac contenant la solution de coloration désirée. Il faut faire attention lors du transfert du gel à cause de sa fragilité. Si la tranche se casse, les morceaux peuvent souvent être réarrangés pour visualiser malgré tout les enzymes sur le gel.



Les isozymes

Après une certaine période d'incubation, la tranche de gel colorée apparaît comme sur la photographie, qui montre l'alcool deshydrogénase foliaire de sainfoin (*Onobrychis viciaefolia*), une espèce fourragère.




Interprétation des profils de bandes

Les sorties de l'analyse sont:


- La structure quaternaire des enzymes (monomérique, dimérique, etc.)
- Savoir si la plante est homozygote ou hétérozygote à chaque locus génique
- Le nombre de locus géniques (isozymes)
- Le nombre d'allèles par locus
- La transmission héréditaire des gènes

Interprétation des profils de bandes



Les allozymes sont contrôlés par des allèles codominants, ce qui signifie que les homozygotes (tous les allèles d'un locus sont similaires) peuvent être distingués des hétérozygotes (les parents de l'individu ont apporté différents allèles à ce locus).

Interprétation des profils de bandes




Pour les enzymes monomériques (c.a.d. constituées d'un seul polypeptide), les plantes homozygotes pour un locus donné vont produire une bande, alors que les individus hétérozygotes vont en produire deux. Pour les enzymes dimériques (c.a.d. constituées de deux polypeptides), les plantes homozygotes pour ce locus vont produire une bande, alors que les individus hétérozygotes en produiront trois à cause de l'association aléatoire des polypeptides.

Interprétation des profils de bandes

Il existe aussi des enzymes multimériques, où les polypeptides sont spécifiés par différents locus. La formation d'hétéromères peut ainsi compliquer considérablement le profil de bande.



Interprétation des profils de bandes

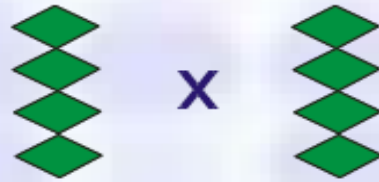


Ces complexités et l'importance d'une bonne interprétation du profil de bandes rendent l'analyse génétique souhaitable, voire nécessaire, en utilisant une analyse de descendance (F1, F2 et rétrocroisements) d'un croisement artificiel entre des individus avec un profil de bande connu.

Exemple 1: Formation d'homomères

- ▶ Allozyme monomérique :

Homozygote

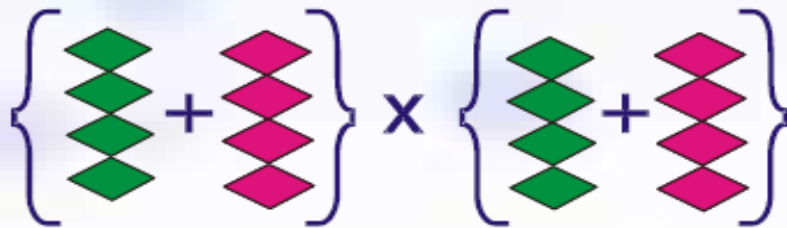


F₁

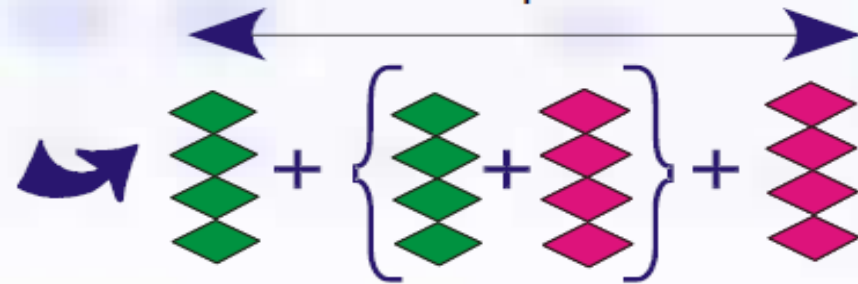


- ▶ Allozyme monomérique :

Hétérozygote



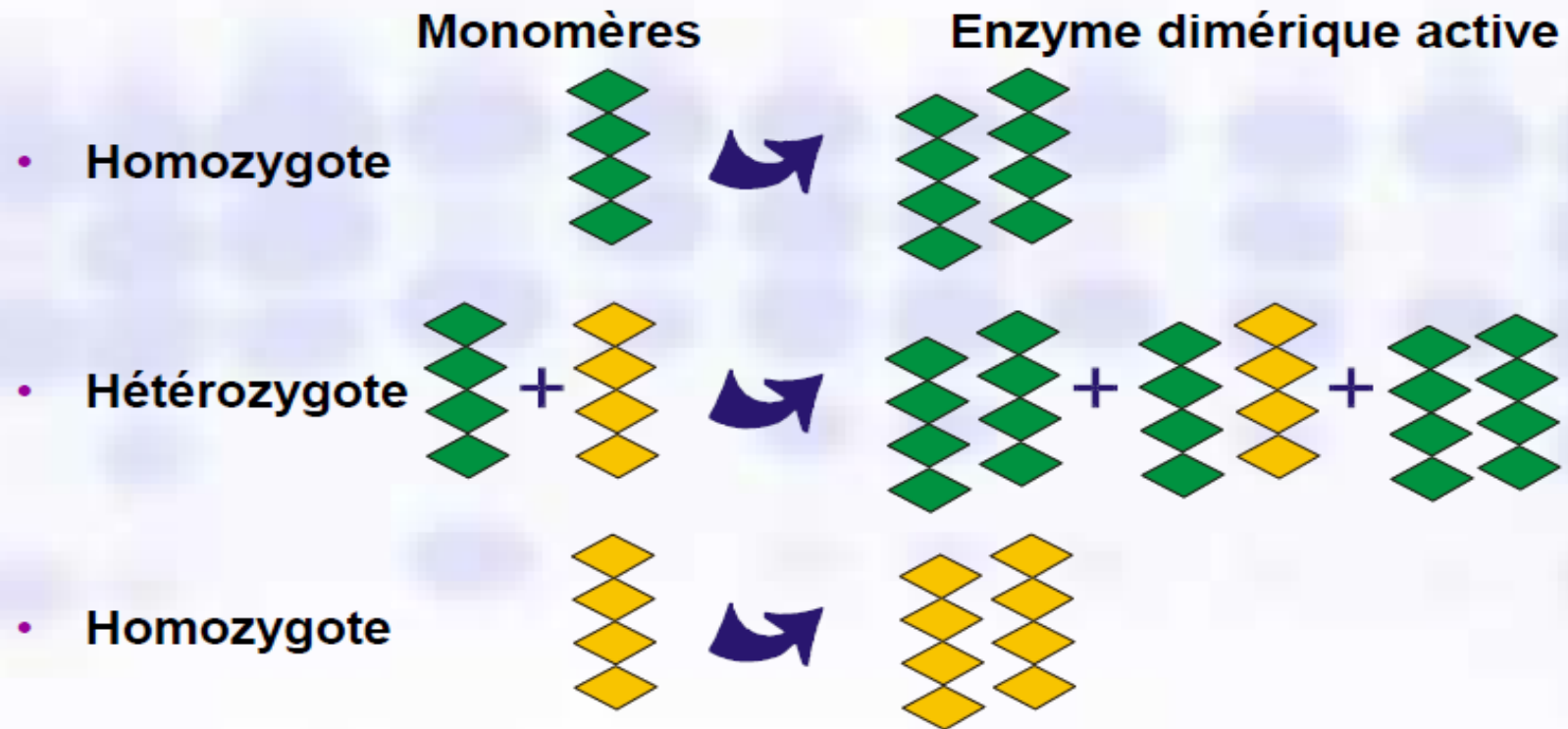
F₁



Cet exemple montre le comportement d'enzymes monomériques dans des croisements. Les parents sont homozygotes pour le même allèle au même locus ou hétérozygotes. Dans le premier cas, toute la descendance F1 sera homozygote et de ce fait on observera une seule bande. Si les parents sont hétérozygotes, on obtiendra trois phénotypes F1 possibles.

Exemple 2: Formation d' hétéromères

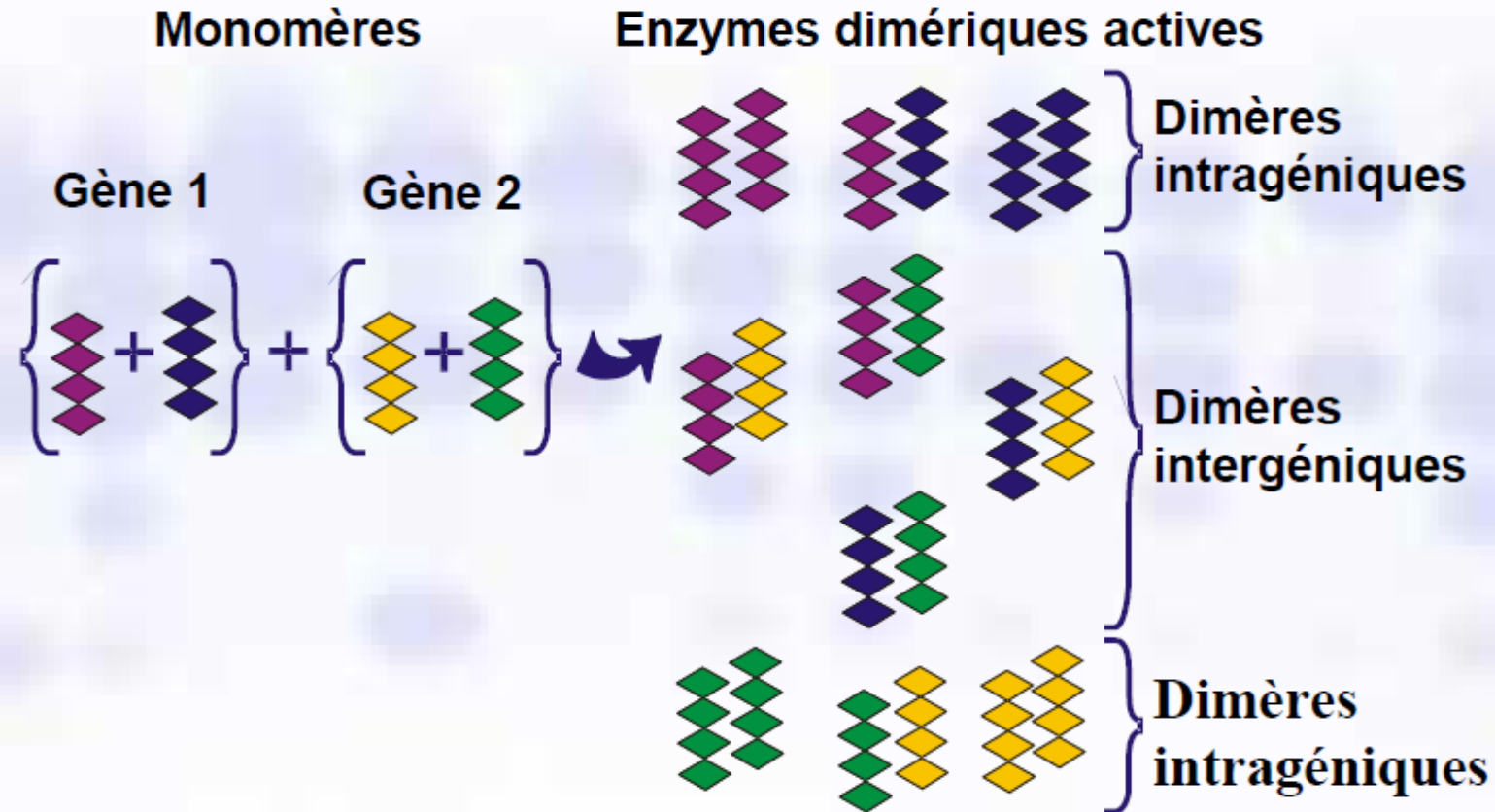
Allozyme dimérique : un gène avec deux allèles



Dans les croisements, les enzymes dimériques peuvent se comporter de trois façons différentes. Si les deux parents sont homozygotes pour différents allèles au même locus, toute la descendance sera hétérozygote, mais à cause de l'association aléatoire des polypeptides, trois combinaisons sont possibles et pour cela trois bandes seront révélées par coloration du gel d'électrophorèse.

Exemple 3: Formation d' hétéromères (suite)

Allozymes dimériques : deux gènes avec deux allèles

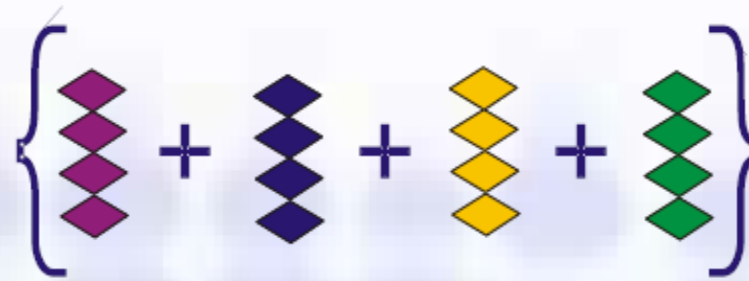


Dans le second exemple sur les allozymes dimériques, les deux polypeptides sont encodés par des locus séparés. Les parents ne partagent aucun allèle commun. L'association au hasard des polypeptides peut conduire à un total de 10 dimères, car aussi bien des dimères intragéniques (allèles au même locus) que des dimères intergéniques (allèles de différents locus) peuvent se former.

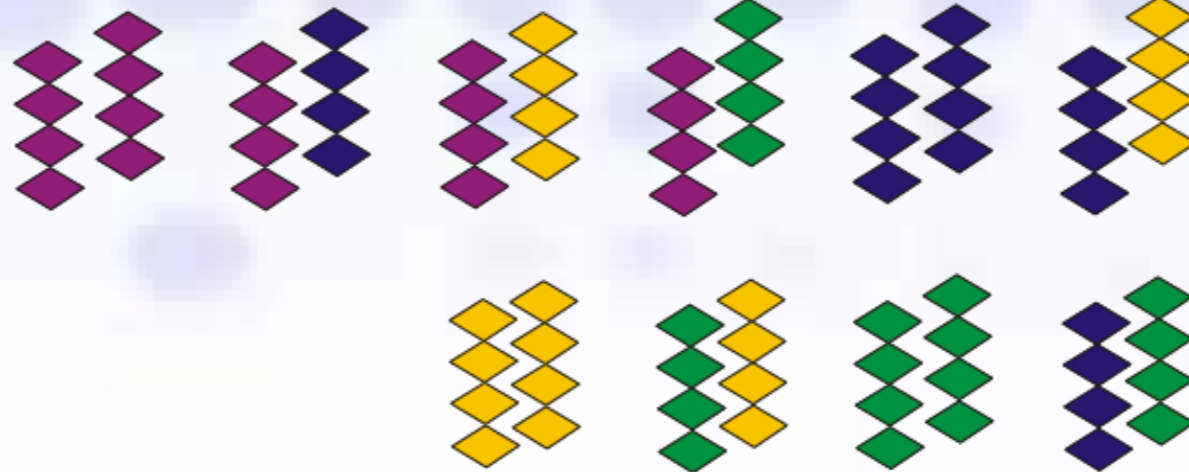
Exemple 4: Formation d'hétéromères (suite)

Tétraploïdes hétérozygotes (un locus, quatre allèles)

- Monomères



- Enzymes dimériques actives



Dans cet exemple, un tétraploïde hétérozygote, avec quatre allèles sur un locus, forment 10 enzymes dimériques actives à cause de l'association aléatoire parmi les quatre monomères.



Avantages et inconvénients


Avantages

- Robuste et très reproductible
- Codominants, c.a.d. utilisables pour estimer une panoplie de paramètres en génétique des populations et pour la cartographie génétique

Inconvénients

- Relativement peu d'essais biochimiques disponibles pour détecter des enzymes
- Analyse basée sur le phénotype

Applications

- 
- Flux de gènes et/ou introgression
 - Génétique des populations
 - Stratégies pour la conservation ex situ
 - Evolution des espèces cultivées
 - Evaluation et caractérisation des ressources génétiques
 - Erosion génétique
 - Stabilité génétique du matériel conservé



Analyse du polymorphisme moléculaire

La technologie de l'ADN

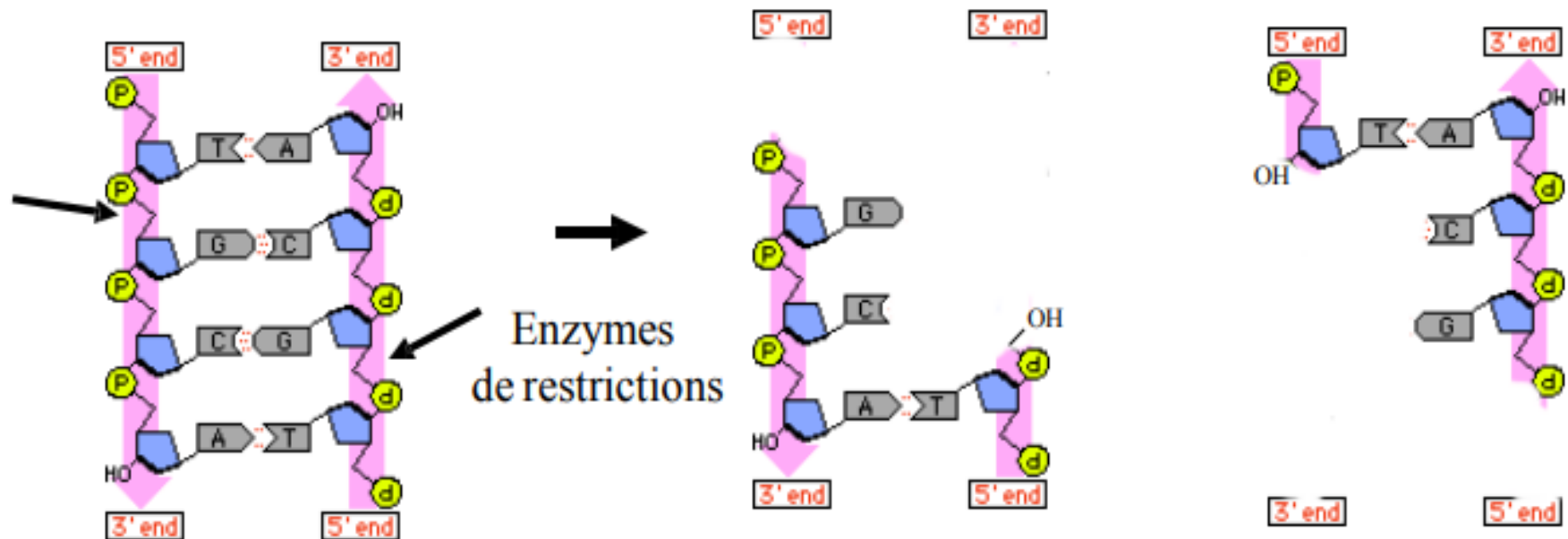
La technologie de l'ADN intègre des concepts sur:

- Enzymes de restriction
- Electrophorèse des acides nucléiques
- Polymorphisme de l'ADN




Enzymes de restriction


- Les enzymes de restriction sont des endonucléase qui peuvent couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence spécifique (4 à 6 paires de bases) appelée site de restriction.



Enzymes de restriction

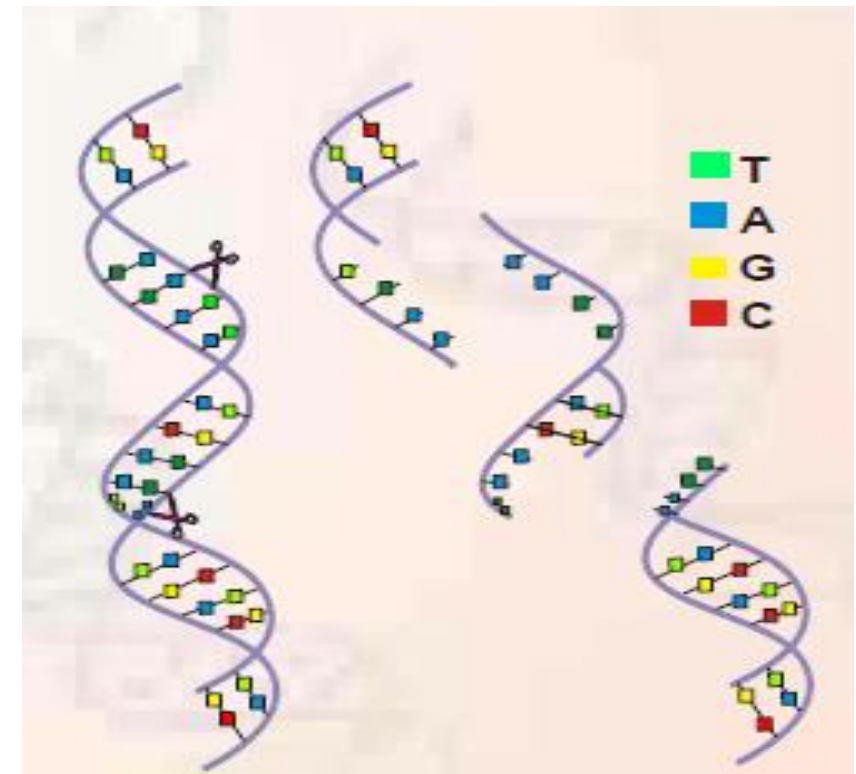
- 
- Plusieurs centaines d'enzymes de restriction sont actuellement connues, on en retrouve naturellement dans un grand nombre d'espèces de bactéries.
 - Elles sont produites par les bactéries pour se protéger de l'ADN étranger provenant d'autres organismes.
 - Elle constitue un mécanisme de défense contre les infections par les bactériophages, des virus spécifiques des bactéries.

Enzymes de restriction

- 
- Les enzymes de restrictions appartiennent à la classe des endonucléases, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur de la chaîne d'un acide nucléique.
 - Les endonucléases diffèrent des exonucléases, puisqu'elles peuvent cliver les brins d'acide nucléique de manière interne, alors que les exonucléases n'attaquent la molécule d'acide nucléique qu'au niveau de ses extrémités.

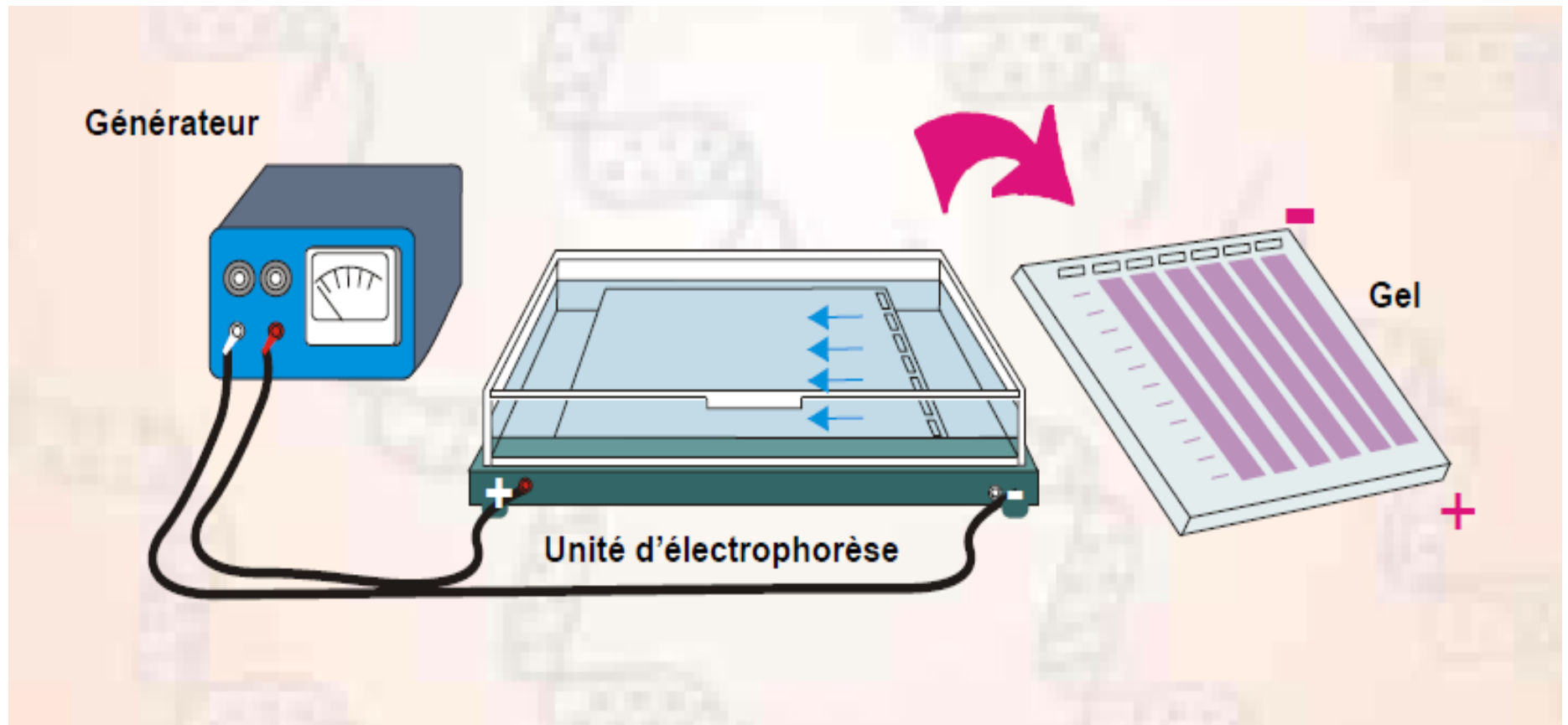
Enzymes de restriction

- Chaque enzyme de restriction coupe l'ADN en fragments de taille définie en agissant au niveau de séquences spécifiques
- Elles forment des extrémités collantes ou des bouts francs
- Types d'enzymes de restriction:
 - Types I et III: coupent l'ADN double brin en dehors de la séquence cible
 - Type II: identifient des séquences de 4, 5 ou 6 pb et coupent à l'intérieur de ces séquences



Electrophorèse des acides nucléiques

- Une méthode pour séparer des fragments d'ADN et permettre leur visualisation et/ou leur identification





Polymorphisme de l'ADN

- Divers événements ont pu produire des variants, plus ou moins complexes, dans la séquence de l'ADN. Ces variants sont généralement décrits comme des polymorphismes
- Le polymorphisme se traduit par des différences dans le génotype - mises en évidence par des profils de bandes différents quand on les détecte selon une procédure adaptée et parfois dans le phénotype
- Plusieurs événements peuvent produire des polymorphismes:
 - Des mutations ponctuelles
 - Des insertions ou délétions
 - Des réarrangements

Les mutations ponctuelles

- Des mutations ponctuelles ont lieu quand une base azotée de la séquence d'ADN est remplacée par une autre. La longueur de la séquence d'ADN ne change pas

AGTTAGCTGACTGATTCAAGCACTCTACTTAACCGAACCGGTACGTTCCGGCAGCC

Remplacement →



AGTTAGCTGACTAGCGTCAAGCACTCTACTTAACCGAACCGGTACGTTCCGGCAGCC

Insertions ou délétions

- Les insertions et délétions sont l'addition ou la disparition de plusieurs bases dans la séquence d'ADN. La taille de la molécule change.

AGTTAGCTGACTGATTCAAGCACTCTACTTAACCGAACCGGTACGTTCCGGCAGCC

Délétion → ▼

AGTTAGCTGACTTCAAGCACTCTACTTAACCGAACCGGTACGTTCCGGCAGCC

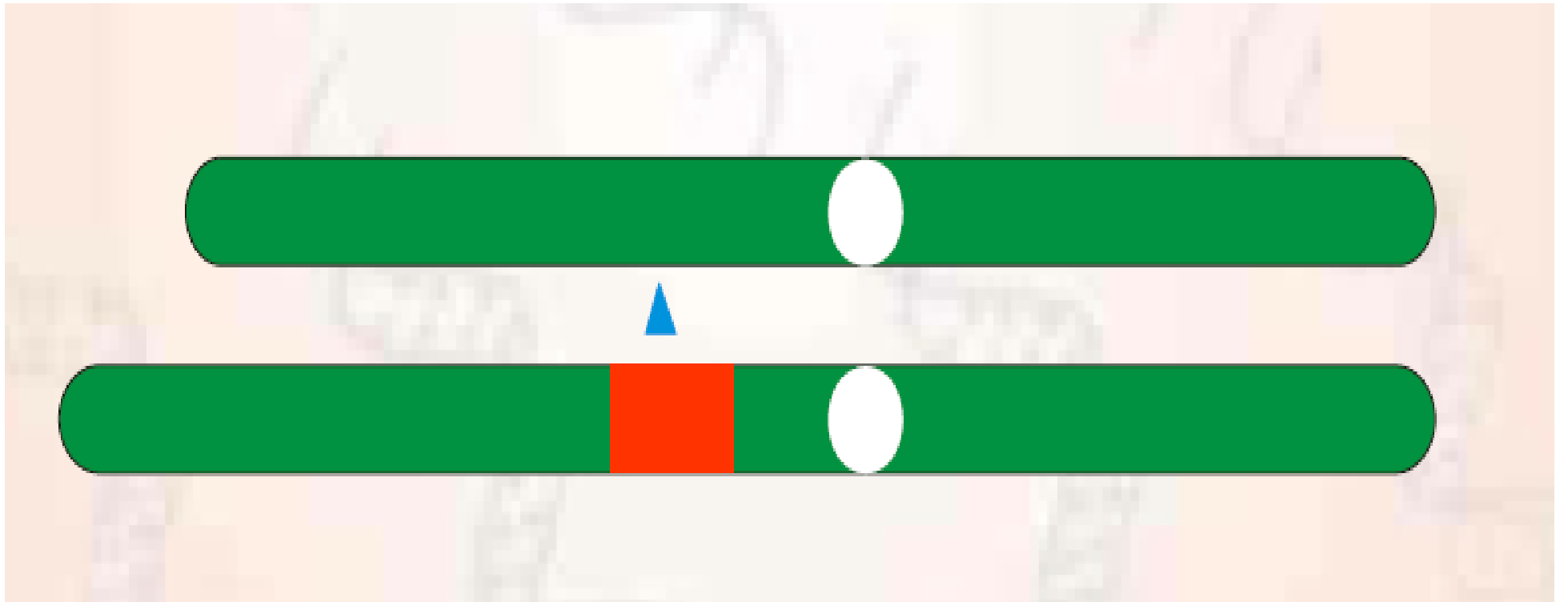
AGTTAGCTGACTGATTCAAGCACTCTACTTAACCGAACCGGTACGTTCCGGCAGCC

Insertion → ▲ AGCAT

AGTTAGCTGACT GATTCAAGCACTCTACTTAACCGAACCGGTACGTTCCGGCAGCC

Réarrangements

- Des réarrangements chromosomiques ont lieu grâce à la recombinaison génétique ou l'insertion d'éléments transposables. La taille de la molécule peut changer ou ne pas changer



Extraction de l'ADN

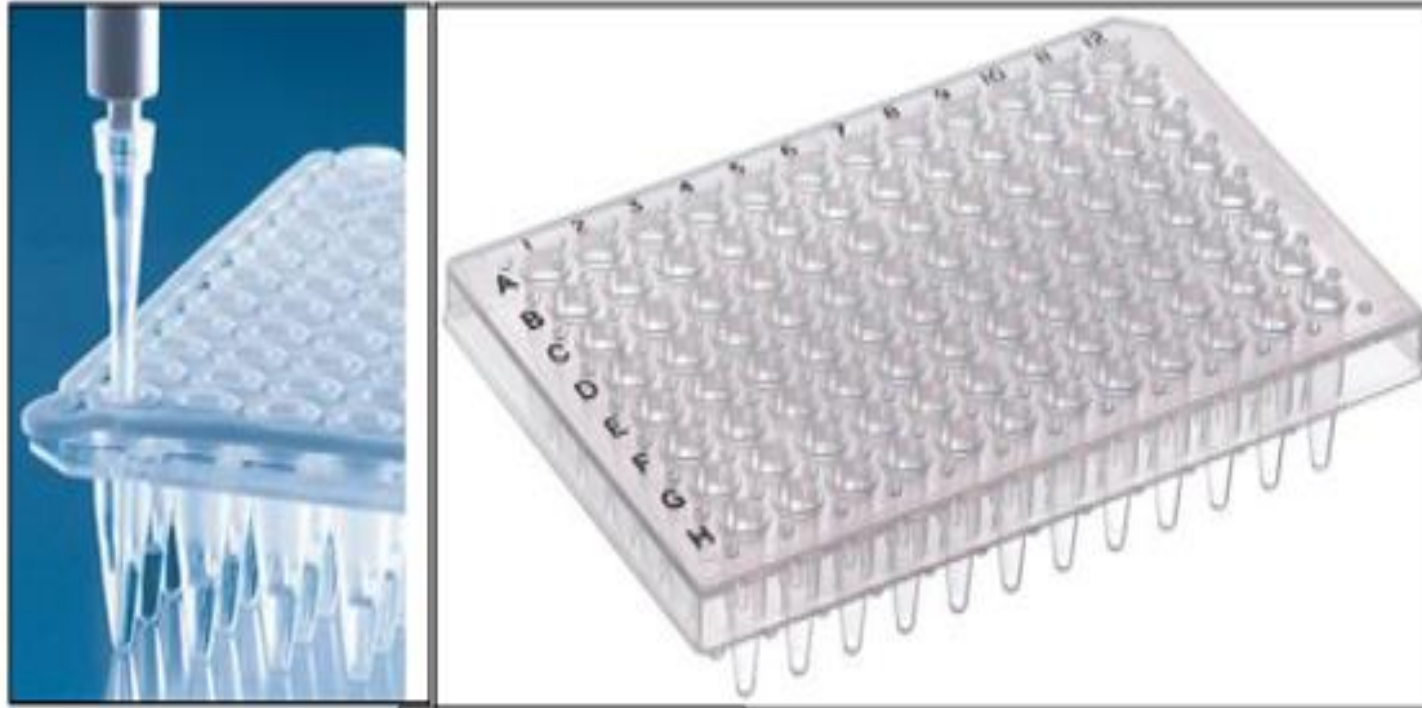
➤ Consommables



Tubes eppendorfs

Extraction de l'ADN

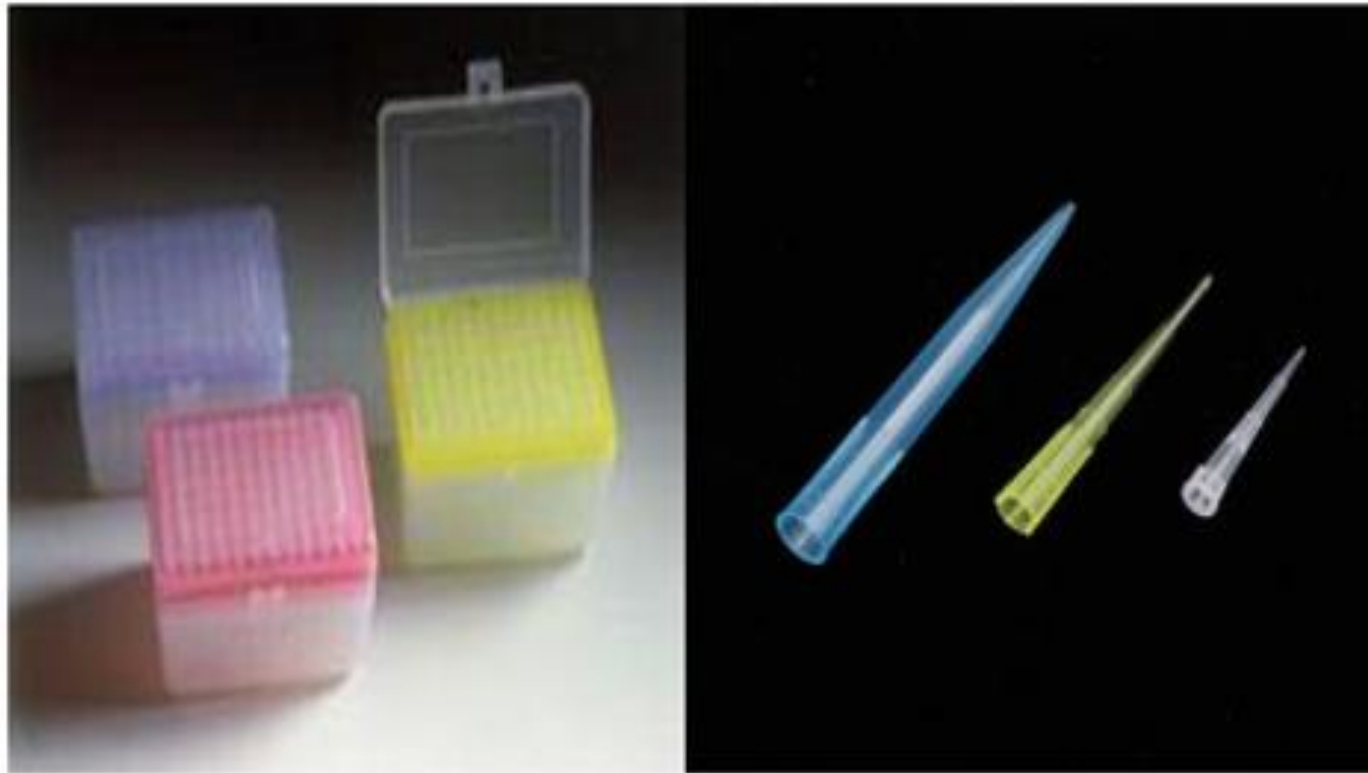
➤ Consommables



Plaques PCR

Extraction de l'ADN

➤ Consommables



embouts pour micropipettes

Extraction de l'ADN

➤ Appareillages



Vortex

Extraction de l'ADN

➤ Appareillages



Thermocycleur

Extraction de l'ADN

➤ Appareillages



Machine à glace

Extraction de l'ADN

➤ Appareillages



Bain marie

Extraction de l'ADN

➤ Appareillages



Spectrophotomètre

Extraction de l'ADN

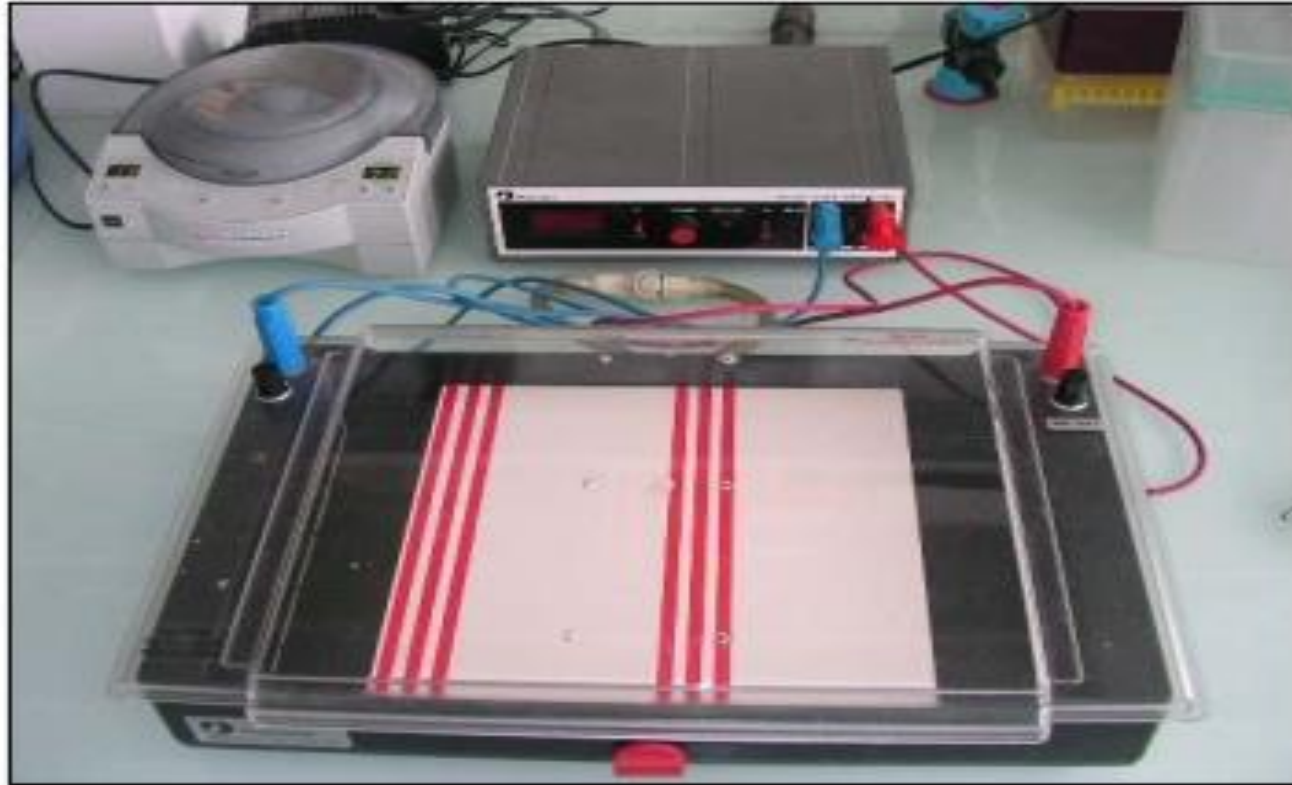
➤ Appareillages



Hotte chimique

Extraction de l'ADN

➤ Appareillages



Electrophorèse

Extraction de l'ADN

➤ Appareillages



Centrifugeuse

Extraction de l'ADN

➤ Appareillages



Micro-pipettes

Extraction de l'ADN

➤ Appareillages



Autoclave



Extraction de l'ADN

Au sein du laboratoire de biologie moléculaire :

Hygiène et sécurité : toute activité dans un laboratoire peut nécessiter l'utilisation de produits chimiques potentiellement dangereux, pour soi et pour l'environnement. Il est donc important de suivre les consignes d'hygiène et de sécurité des bien et des personnes, et de bien respecter l'évacuation des déchets.

Il faut impérativement travailler avec blouse et avec des gants.

Certains solvants nécessitent d'être préparés et manipulés sous des hottes chimiques.



Extraction de l'ADN

Dans un laboratoire de biologie moléculaire, le produit le plus dangereux est le **BET (bromure d'éthidium)**, classé parmi les **CMR**.

Les appareils utilisés peuvent aussi être une source de danger: la centrifugeuse qui tourne à haute vitesse, les autoclaves, les électrophorèse, les lampes UV...

Travailler sans gaspillage des produits et manipuler soigneusement les appareils.



Extraction de l'ADN

Les étapes de base de l'extraction de l'ADN sont les suivantes :

1. La collecte et le stockage de tissus végétaux
2. La lyse des cellules végétales
3. La solubilisation des lipides et des protéines avec des détergents
4. La séparation de l'ADN des autres molécules
5. La purification de l'ADN séparé
6. La suspension dans un tampon approprié

Extraction de l'ADN

Méthodes d'extraction d'ADN végétal

```
graph TD; A[Méthodes d'extraction d'ADN végétal] --> B[Kits commerciaux]; A --> C[Solutions préparées « recette maison »];
```

Kits commerciaux

- Qiagen
- MP Biomedical
- Fisher Scientific

Solutions préparées

« recette maison »



Extraction de l'ADN

L'une des méthodes les plus utilisées chez les végétaux est dite la méthode CTAB (par rapport au composant principal du tampon de lyse qui est le bromure de cétyl-triméthyl-ammonium (Cetyl-Trimethyl-Ammonium Bromide)).

Le CTAB solubilise les membranes et les complexes avec l'ADN. Cette méthode a été décrite en 1980, et elle reste populaire du fait que tous les composants peuvent être préparés au laboratoire et donc le coût par échantillon reste faible.

Il existe aussi la méthode SDS dont le tampon de lyse est dodécyl sulfate de sodium (Sodium Dodecyl Sulfate).



Extraction de l'ADN

Au cours des dernières décennies, des kits commerciaux pour l'extraction rapide à partir de matériel végétal sont devenus d'une utilisation routinière.

Les kits commerciaux se sont révélés être très fiables dans la production de rendements élevés de l'ADN hautement purifié, et ainsi sont devenus la norme lors de la réalisation des dosages moléculaires sensibles.

Ces kits restent trop chères par rapport aux méthodes anciennes.



Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

Protocole d'extraction à partir des feuilles sèches: ce protocole est valable pour beaucoup d'espèces végétales,

1- Récolter **de jeunes feuilles (3 à 4)**: on choisit les jeunes feuilles parce que à ce stade, le taux des protéines et d'autres substances organiques est faible.

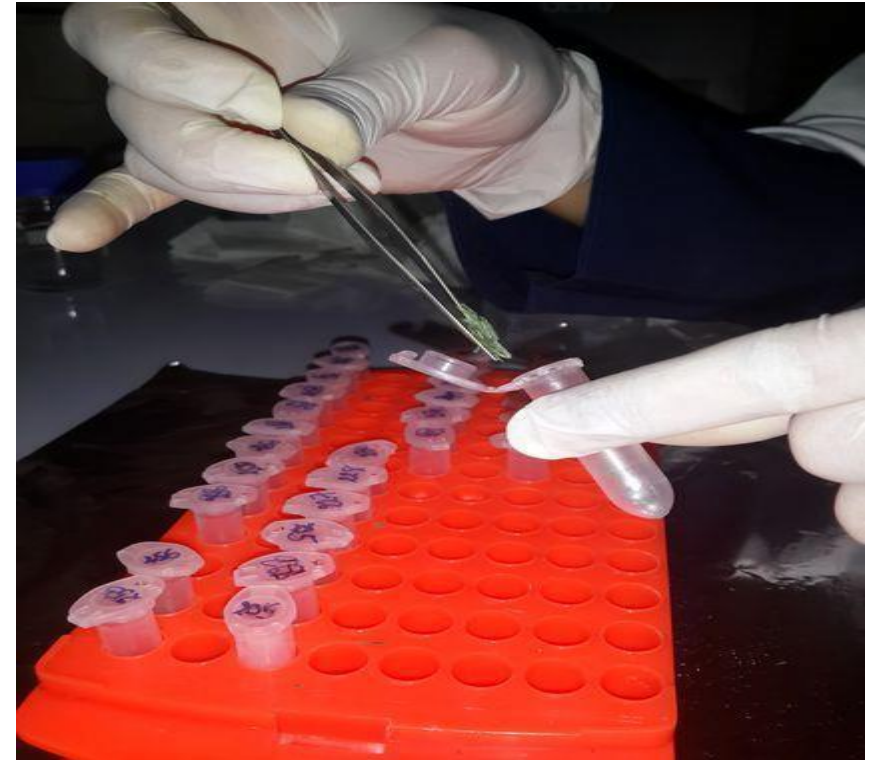
Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

2- Si l'extraction se fait juste après la récolte des feuilles, on les met dans des tubes eppendorfs de 2ml avec 8 billes en métal et on met les tubes (couvercle ouvert) à l'étuve pour le séchage à 65°C pendant une nuit.

Remarque:

les tubes doivent être numérotés avec un marqueur indélébile pour savoir la provenance de l'ADN extrait



Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

3- Si l'extraction ne se fait pas tout de suite, on peut conserver les feuilles dans des sachets en papier (étiquetés) et on les mets dans le gel de silice (gel desséchant). Le jour de l'extraction enlever les feuilles des sachets et les mettre dans les tubes eppendorf avec 8 billes et les passer pendant quelques minutes à l'étuve à 65°C (toujours le couvercle ouvert)





Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

- 4- Une fois les tubes sont enlevés de l'étuve, il faut les refermer immédiatement pour éviter qu'ils s'humidifient de nouveau.
- 5- Réduire les feuilles en poudre

Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

6- Mettre les tubes dans un portoir.

7- Ajouter 1ml de **tampon d'extraction autoclavé** en utilisant une micropipette de 1 ml.





Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

Tampon d'extraction (pour 100 ml):

- 2g de CTAB
- 10 ml de Tris-HCl 1M pH8
- 28 ml de NaCl 5M
- 4 ml d'EDTA 0.5 M pH8
- 0.5 ml bétamercapto-éthanol (à ajouter après autoclavage).

Le tampon peut être conservé pendant 3 mois



Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

L'EDTA (éthylènediaminetétraacétique), ou acide éthylènediaminetétraacétique, est un acide diaminotétracarboxylique de formule $C_{10}H_{16}N_2O_8$. L'EDTA s'utilise dans de nombreuses applications, En biochimie, l'EDTA est utilisé comme inhibiteur des métalloenzymes. Son utilisation est très fréquente dans la purification des acides nucléiques (ADN ou ARN) et des protéines. En séquestrant en particulier les ions magnésium Mg^{2+} , il bloque l'activité de nombreuses nucléases qui sont dépendantes de cet ion.

Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

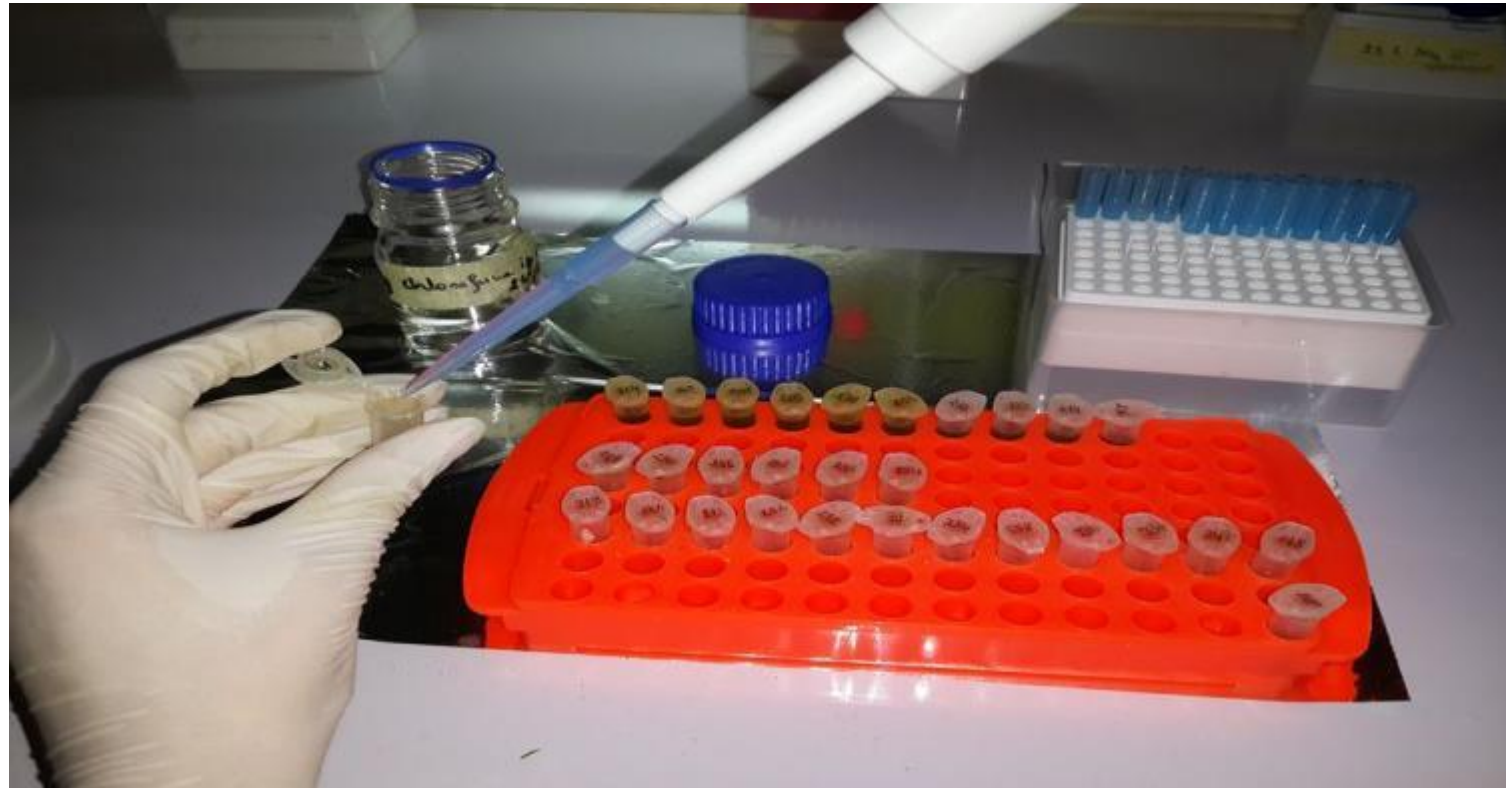
8- Incuber 20 minutes au bain marie à 65°C.



Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

9. Ajouter 600 μ l de chloroforme et agiter vigoureusement à la main pendant 15 minutes à température ambiante



Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

10. Centrifuger 10 minutes à vitesse maximale (13 000 tr/min)



Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

11. Transférer la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube à la pipette sans entrainer l'interface.

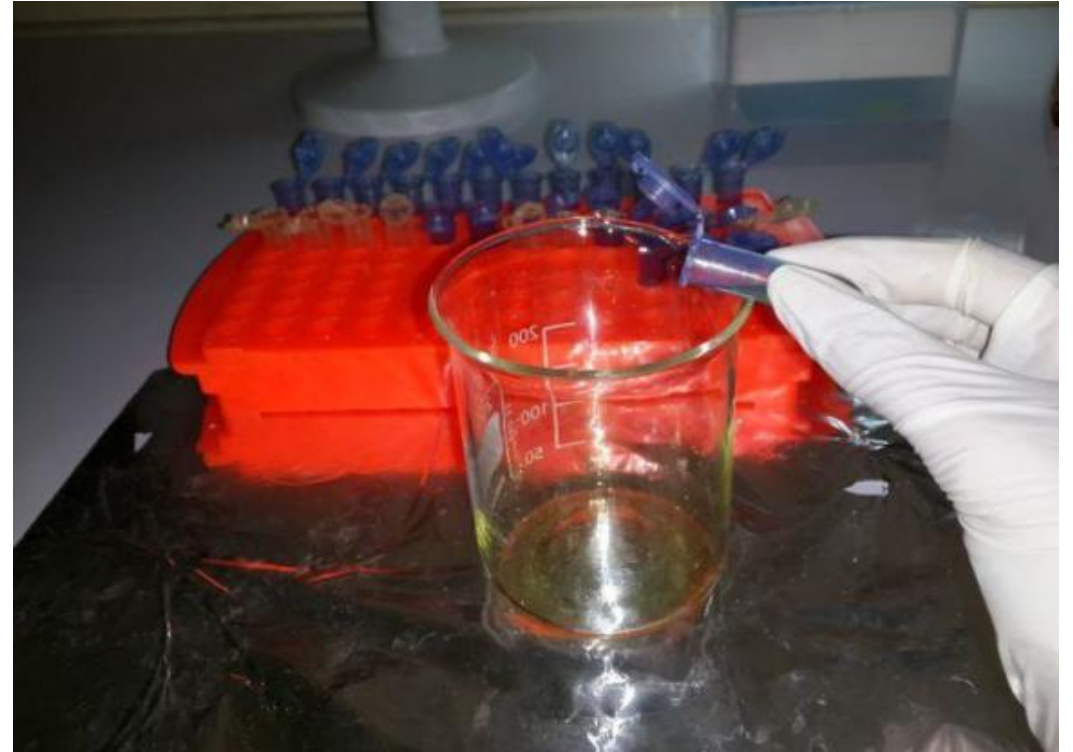


Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

12. Ajouter 600 μ l d'isopropanol et centrifuger immédiatement 20 secondes à vitesse maximale (cette étape est pour enlever le chloroforme et l'ADN va se rassembler en petite pelote).

13. Jeter le surnageant





Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction classique : méthode CTAB

- 14- Ajouter 500 μ l d'éthanol 70 %.
- 15- Centrifuger 10 minutes vitesse maximale et jeter le surnageant.
- 16- Faire sécher sous la hotte ou sur la paillasse
- 17- Re-suspendre le culot dans 50 μ l d'eau distillée stérile
- 18- Rajouter 5 μ l d'ARNase (2.5 mg/ml) et laisser une nuit à 4° c.

Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction par kit commercial :





Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction par kit commercial :

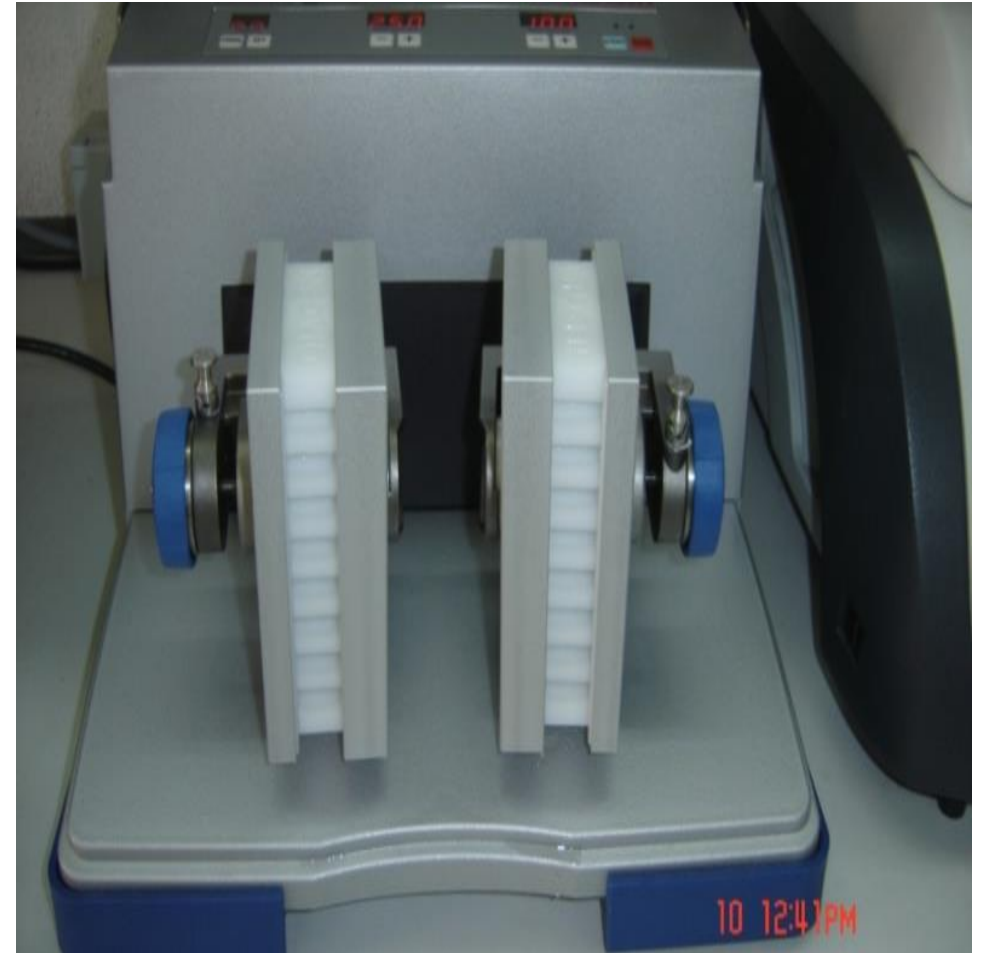
➤ **1. Matériel végétal**

Les feuilles, jeunes et fraîches, sont recueillies et mises avec du silica-gel dans des sacs zip-lock, puis stockées au congélateur à -80°C après leur passage dans l'azote liquide pour un usage ultérieur.

Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction par kit commercial :

- 5 mg des feuilles ont été écrasés dans des tubes Eppendof de 1.5ml en présence d'une petite bille métallique, en utilisant homogénéiseur tissuelyseur qiagen II (Qiagen) pendant 05 mn à 30 tours/seconde vu la rigidité des tissus.



Extraction de l'ADN

Exemple d'une méthode d'extraction par kit commercial :

- Extraction de l'ADN a été effectuée en utilisant les chemagic DNA Plant Kit (Chemagen).
- C'est une trousse qui renferme 06 buffers qui sont utilisés à chaque étape afin de faire l'extraction de l'ADN





Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

Le dosage peut se faire par 4 méthodes :

- Électrophorèse sur gel d'agarose,
- le spectrophotomètre et Nanodrop ,
- le Qubit,
- La qPCR



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ **Électrophorèse sur gel d'agarose,**

L'électrophorèse est un outil important dans l'analyse qualitative et quantitative des acides nucléiques (ADN, ARN).

Son principe repose sur la séparation des molécules.

Les critères de séparation utilisés sont la taille (poids moléculaire) et la charge électrique



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

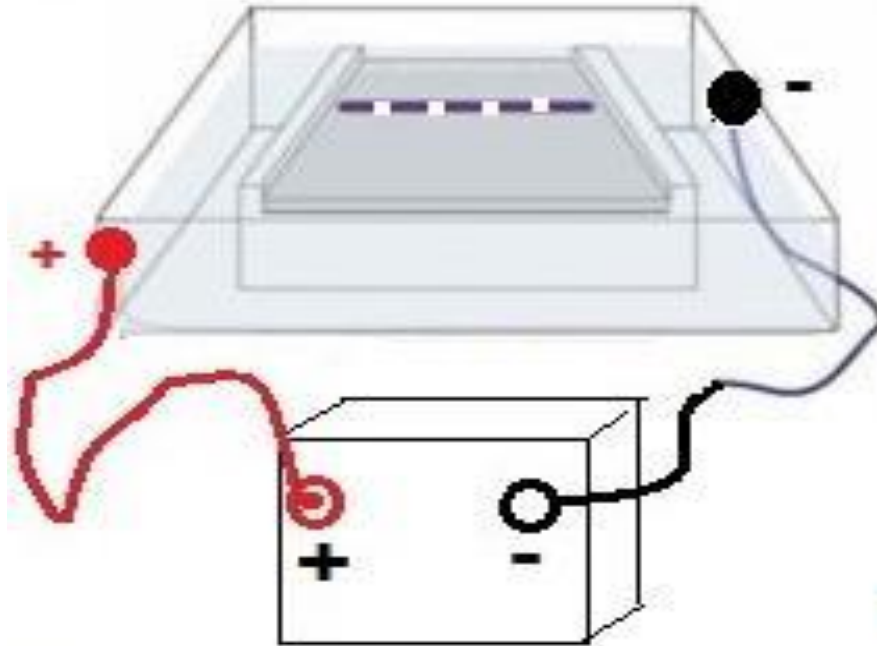
➤ **Électrophorèse sur gel d'agarose,**

Comme les acides nucléiques sont chargés négativement (grâce au phosphate), le critère de la charge électrique n'est pas comptabilisé dans la séparation (toutes les molécules migrent vers l'anode +) donc les fragments de l'ADN sont séparés uniquement en fonction du poids moléculaire.

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

- Électrophorèse sur gel d'agarose,





Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ **Électrophorèse sur gel d'agarose,**

Le gel utilisé est le gel d'agarose (généralement à 1%): par utilisation de marqueur de taille « Low DNA ».

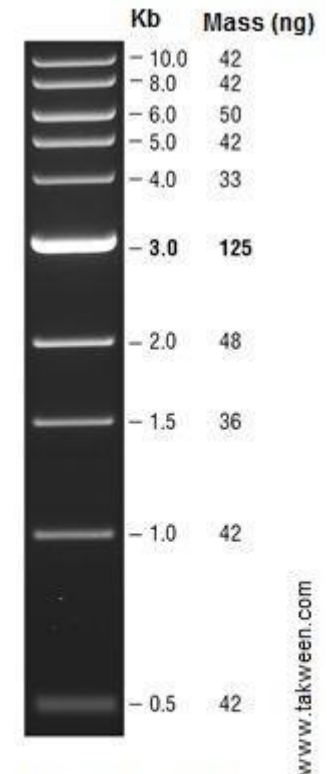
Le marqueur de taille nous permet, selon la migration de connaître la taille de notre ADN.

Exemple: 1 Kb DNA ladder (10 fragments)

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ Électrophorèse sur gel d'agarose,



1 kb DNA Ladder
visualized by ethidium
bromide staining on a
0.8% TAE agarose gel.
Mass values are for
0.5 µg/lane.

(www.neb.com)



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ Électrophorèse sur gel d'agarose,

Comment préparer un gel d'agarose ?

Pour 200 ml:

- 2g d'agarose
- 200 ml de Tris Borate EDTA (TBE 0.5 X)
- Une goutte de BET



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ **Électrophorèse sur gel d'agarose,**

Tampon TBE (Tris borate EDTA) pH 8,3

Pour 1000 mL d'eau distillée :

Tris.HCl 90 mmol.L⁻¹ : 10,89 g

Acide borique 90 mmol.L⁻¹ : 5,56 g

EDTA 2 mmol.L⁻¹ : 0,74 g



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ Électrophorèse sur gel d'agarose,

Tampon !!!!????

En chimie, un tampon est une solution aqueuse qui maintient approximativement le même pH malgré la dilution et l'addition de petites quantités d'un acide ou d'une base.

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

- **Électrophorèse sur gel d'agarose,**
 - Mettre dans une fiole Erlenmeyer les 2 g d'agarose et les 200 ml de tampon « TBE ».
 - Dissoudre complètement l'agarose dans le tampon en plaçant l'Erlenmeyer au four à micro-ondes et en agitant de temps à autre pour homogénéiser le mélange.



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

- **Électrophorèse sur gel d'agarose,**
 - Refroidir le mélange.
 - Rajouter 2 μ l de BET.



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

- **Électrophorèse sur gel d'agarose,**
 - Couler lentement le gel dans le moule avec le peigne et laisser refroidir.





Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

- **Électrophorèse sur gel d'agarose,**
 - Retirer le peigne et placer le gel dans la cuve en s'assurant qu'il est recouvert de tampon « TBE ».
 - Les puits doivent être du côté de la cathode (-, fil noir), car l'ADN est chargé négativement et migrera vers l'anode (+, fil rouge)

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ **Électrophorèse sur gel d'agarose,**
Lancer la migration après avoir chargé les échantillons et les standards (Low DNA Mass Ladder) dans les puits selon le dosage suivant :

- **5 μ l** : 2 μ l d'ADN + 3 μ l de Bleu de bromophénol (tampon de charge)
- **3 μ l** : 1 μ l d'ADN + 2 μ l de BBT
- **1 μ l** de tampon (BBT) + 4 μ l de Low DNA Mass Ladder





Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

- **Électrophorèse sur gel d'agarose,**

Révélation de l'ADN

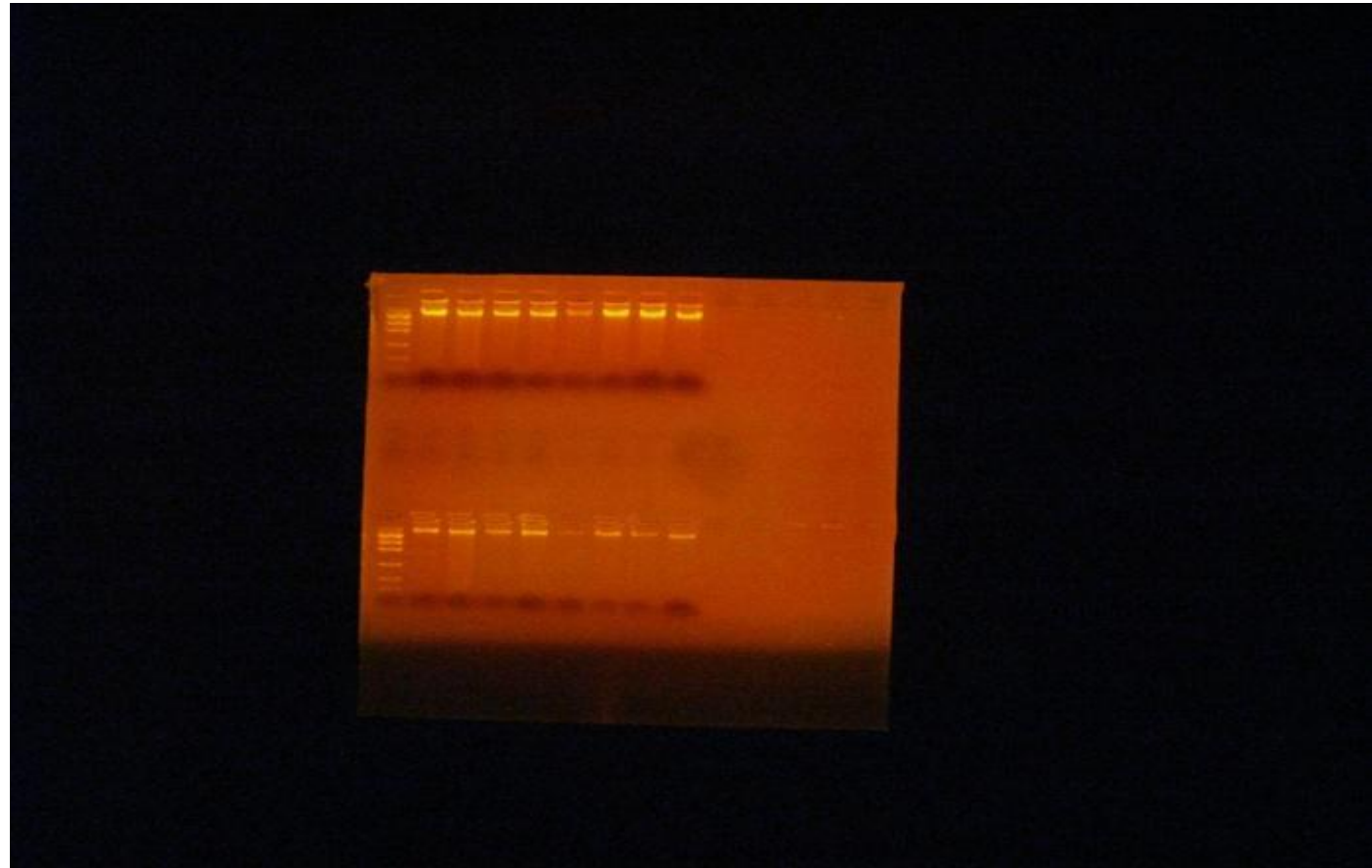
Après la migration d'électrophorèse, le gel est soumis à une lumière sous ultraviolet afin d'observer les bandes d'ADN fluorescentes.

Le marqueur d'acide nucléique contenu dans le gel devient fluorescent avec une couleur rouge orangée.

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

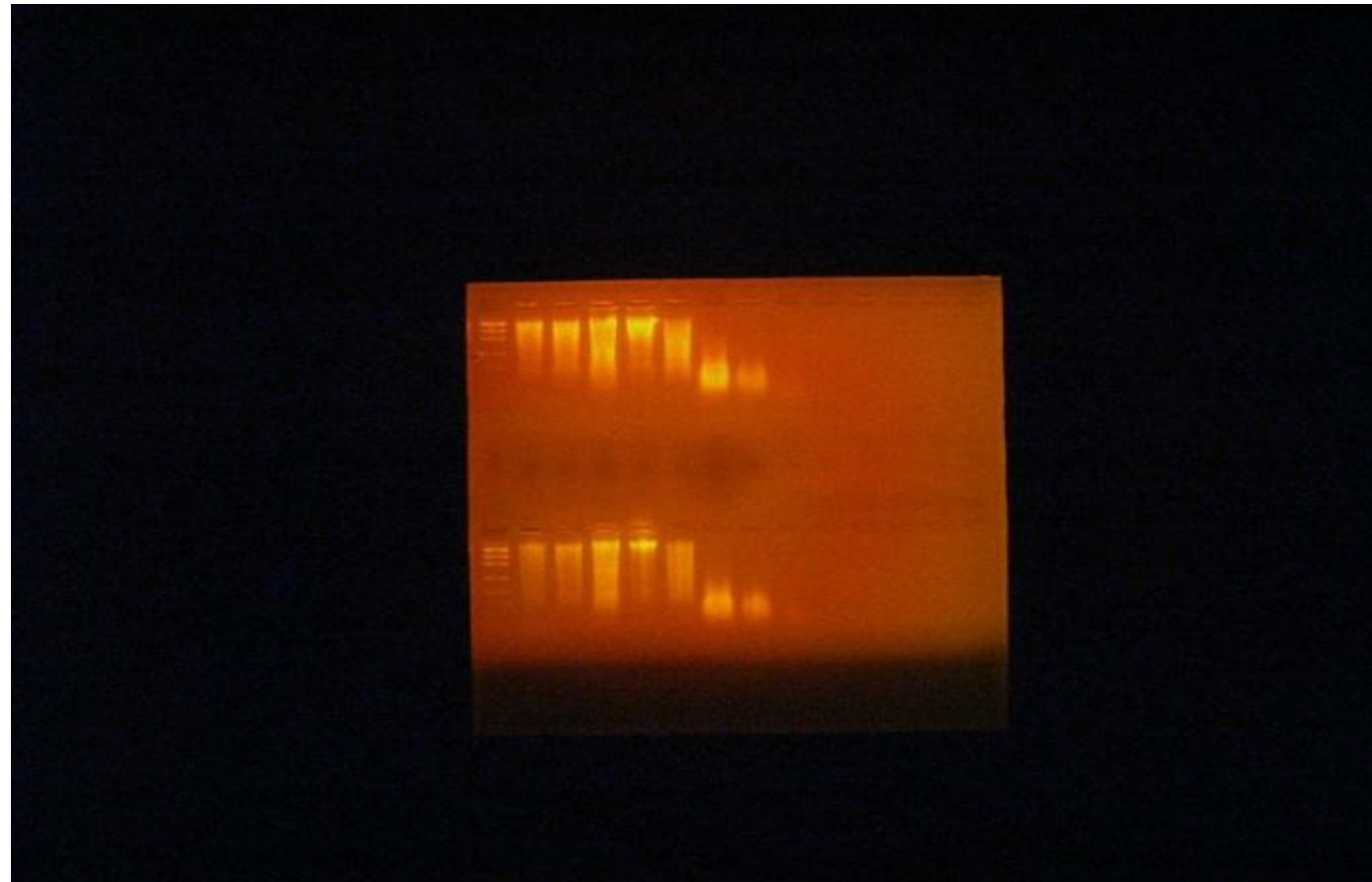
- **Électrophorèse sur gel d'agarose,
Révélation de l'ADN**



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

- **Électrophorèse sur gel d'agarose,
Révélation de l'ADN**





Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

- Électrophorèse sur gel d'agarose,

Révélation de l'ADN

L'estimation de la taille des fragments est faite à l'aide du marqueur de taille moléculaire (Low DNA Mass Ladder) utilisé simultanément dans un autre puits lors de la migration.

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ Électrophorèse sur gel d'agarose,
Révélation de l'ADN





Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

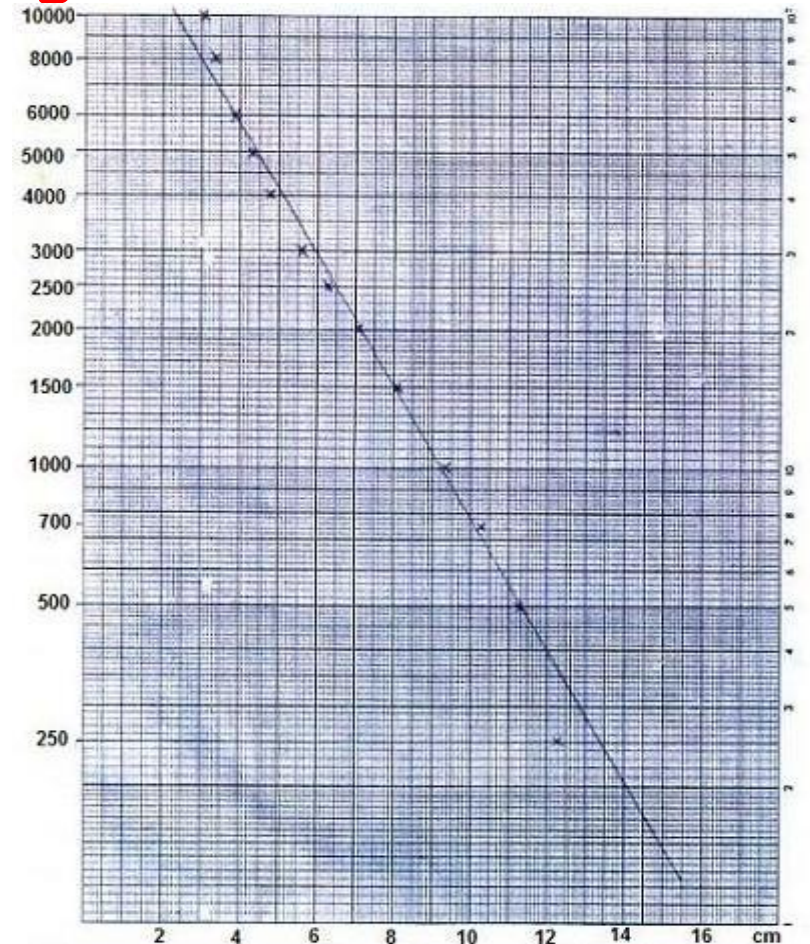
- **Électrophorèse sur gel d'agarose,**
- Pour déterminer le poids moléculaires inconnu des fragment d'ADN, on doit tracer la courbe des poids moléculaires de fragments d'ADN de poids connus (marqueurs de PM, DNAladder) en fonction de la distance parcourue) par les différents fragments.

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ Électrophorèse sur gel d'agarose,

La droite : la taille ou le poids = f (distance de migration) permet de déterminer la taille en paires de base d'un fragment d'ADN inconnu.



Courbe des poids moléculaires en fonction de la distance de migration par électrophorèse sur gel d'agarose

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

- Spectrophotomètre (nano-drop),



Spectrophotomètre

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ Nano-drop,





Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ **Spectrophotomètre (nano-drop),**

Les acides nucléiques absorbent dans l'UV à $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$. En mesurant l'absorbance d'une solution d'acide nucléique pure à 260 nm, on obtient sa concentration à l'aide de l'équation de la loi Beer-Lambert. En pratique, c'est une équation modifiée qui est employée :



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ Spectrophotomètre (nano-drop),

$$C_m = (A \cdot e) / l$$

C_m = concentration massique d'acide nucléique en $\text{ng}/\mu\text{l}$

A = absorbance à 260 nm

e = coefficient d'extinction massique ou la constante en $\text{ng.cm}/\mu\text{l}$

l = trajet optique en cm (généralement 1 cm).

1 unité de DO = 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ Spectrophotomètre (nano-drop),

En pratique, pour chaque séquence d'ADN/ARN, il n'est pas nécessaire de calculer le coefficient d'extinction (ϵ) spécifique. Des coefficients d'extinction estimatifs, acceptés par la communauté scientifique, sont généralement utilisés pour calculer les concentrations des acides nucléiques et qui sont suffisamment précises pour les expériences de biologie moléculaire.



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ **Spectrophotomètre (nano-drop),**

Ces coefficients d'extinction sont listés ci après:

ADN double brin = $\sim 50 \text{ ng.cm}/\mu\text{l}$;

ADN simple brin = $\sim 33 \text{ ng.cm}/\mu\text{l}$;

ARN = $\sim 40 \text{ ng.cm}/\mu\text{l}$



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ Spectrophotomètre (nano-drop),

Le ratio $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$:

Ce ratio explique la pureté des acides nucléiques (évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques).

D'une manière générale, la pureté d'une solution d'acide nucléique est considérée comme acceptable lorsque le ratio $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ est compris entre 1,8 - 2,0 pour l'ADN et entre 2,0 - 2,2 pour l'ARN.



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

➤ Spectrophotomètre (nano-drop),

Le ratio $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$:

Ce ratio est un deuxième indicateur de pureté, il est généralement plus élevé que le ratio A_{260}/A_{280} .

Un ratio A_{260}/A_{230} compris entre 2,0 - 2,2 indique une bonne pureté des acides nucléiques.

Lorsque ce ratio est significativement plus faible que 2,0 - 2,2, cela révèle la présence de contaminants absorbant à 230 nm dans la solution (le phénol, les carbohydrates, les peptides, l'acide humique, l'urée, les polysaccharides ...). Leur présence est détectable grâce à ce ratio.



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

3. Le Qubit :

Les fluoromètres Qubit détectent les colorants fluorescents spécifiquement liés à la molécule cible . Grâce aux tests Qubit optimisés, ils peuvent distinguer l'ADNdb de l'ADNsb ou l'ARN intact de l'ARN dégradé, même en quantités extrêmement faibles ou en présence de contaminants.



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

3. Le Qubit :

Son principe est la fluorométrie basée sur la mesure de la fluorescence des fluorophores spécifiques des acides nucléiques.

Mais des réactifs et standards dédiés sont nécessaires pour réaliser ces mesures sur le Qubit

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

3. Le Qubit :





Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

3. Le Qubit :

contrairement à la spectrophotométrie, la fluorimétrie ne permet pas d'analyser la pureté et ni d'identifier des contaminants dans une solution d'acides nucléiques



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

4. La qPCR: la PCR quantitative ou PCR en temps réel:

Son principe est de suivre la quantité d'ADN cycle après cycle grâce à un marqueur fluorescent dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité de produits.

On doit mettre le mélange réactionnel de la PCR une molécule émettrice de fluorescence (SyberGreen ou des sondes fluorescentes).



Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

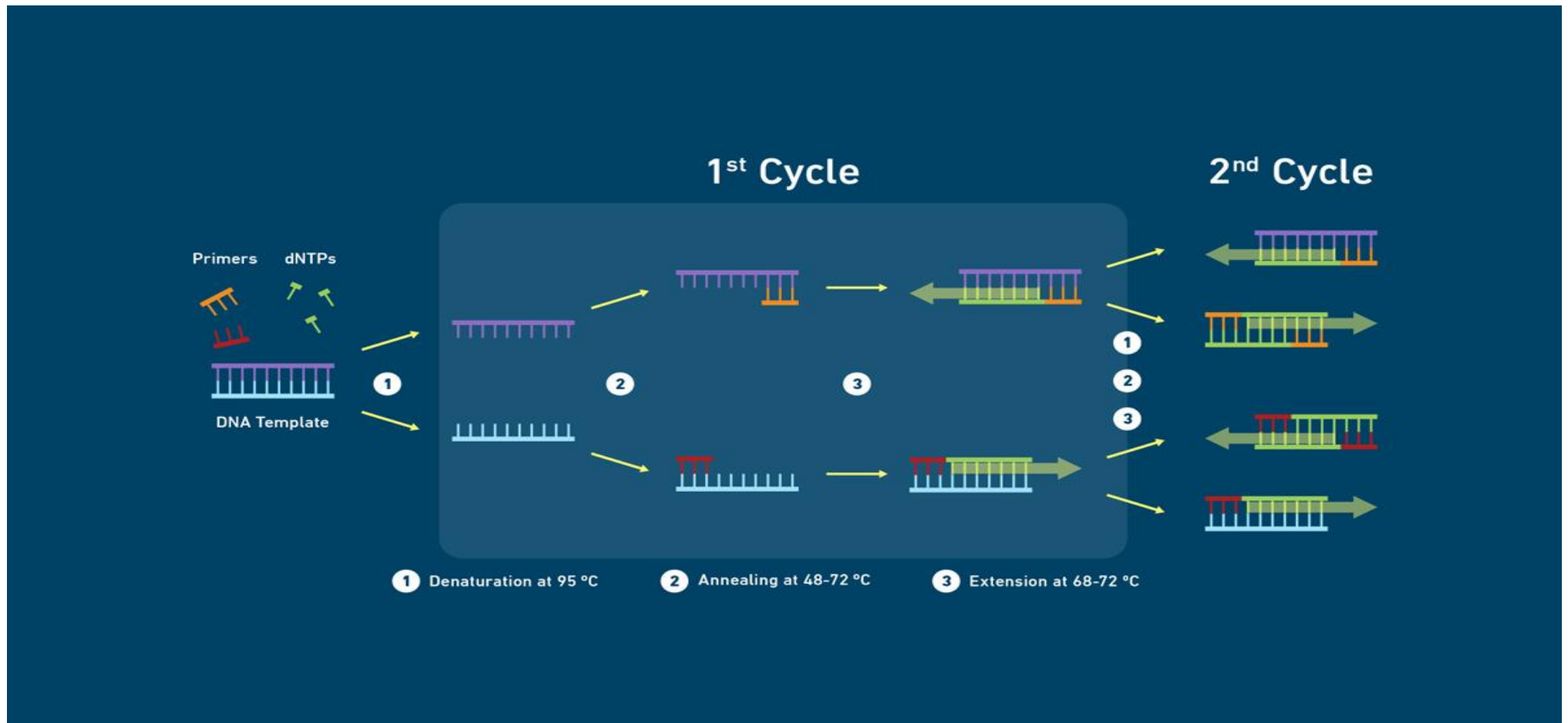
4. La qPCR: la PCR quantitative ou PCR en temps réel:

Le thermocycleur est branché à un ordinateur qui, avec un programme dédié va mesurer l'intensité de fluorescence cycle après cycle et il va tracer une courbe.

Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

4. La qPCR: la PCR quantitative ou PCR en temps réel:





Extraction de l'ADN

Dosage et analyse de la pureté

4. La qPCR: la PCR quantitative ou PCR en temps réel:

NB: Les auteurs recommandent d'utiliser en parallèle le NanoDrop et le Qubit (moins coûteux) ou le NanoDrop et la qPCR (plus coûteux), car ni le Qubit ni la qPCR ne permet la détection de contaminants présents dans les ADN purifiés.

Les ratios A_{260}/A_{230} et A_{260}/A_{280} obtenus par le NanoDrop sont de bons indicateurs de pureté.



Extraction de l'ADN


- La Taq polymérase (aussi appelée « Taq pol » ou simplement « Taq ») est une enzyme, plus particulièrement une ADN polymérase qui agit dans une certaine gamme de température.
- Elle a été isolée à partir de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* en 1969. une bactérie des sources chaudes du parc de Yellowstone (Californie). Sa demi-vie enzymatique à 95°C est de 40 minutes.
- Elle possède des enzymes thermorésistantes, dont une DNA polymérase (Taq polymérase) résistante à l'ébullition et active à 75-80 °C.




Extraction de l'ADN

- Elle est utilisée en biochimie afin de faire des réactions de PCR.
- Cette enzyme faisant une erreur chaque million de paires de base, l'amplicon (le produit de la réaction) sera utilisé pour analyse.


PCR

- 
- L'amplification en chaîne par la polymérase, ou en anglais "polymerase chain reaction" (PCR; Erlich, 1989) est une technique puissante qui est rapidement devenue l'une des plus largement utilisées en biologie moléculaire, parce qu'elle est rapide, économique et simple.
 - La technique amplifie des fragments spécifiques d'ADN à partir de quantités infimes de matériel ADN source, même si cet ADN source est de qualité relativement mauvaise.

Les procédures de la PCR : Conditions du mélange réactionnel

- 
- L'extraction d'ADN et le mélange de la réaction PCR doivent être réalisés dans des pièces séparées.
 - L'utilisation de récipients à usage unique et de pipettes à déplacement positif pour la préparation des échantillons ADN et du mélange réactionnel sont fortement recommandés.

Les procédures de la PCR : Conditions du mélange réactionnel

- 
- Toutes les solutions, à l'exception des dNTPs, des amorces et de la Taq polymérase doivent être autoclavées. Quand cela est possible, les solutions doivent être aliquotées en petites quantités et stockées dans des zones dédiées à la PCR.
 - Une bonne pratique consiste à ajouter un témoin de réaction sans ADN matrice pour vérifier l'absence de contamination.

Les procédures de la PCR : Composantes

Composantes:


- Eau stérile désionisée
- Tampon PCR 10x
- Mélange de dNTPs
- Amorces
- ADN polymérase Taq
- MgCl₂
- ADN matrice



Les procédures de la PCR : Equipement

- 
- **Micropipettes**
 - **Thermocycleur**
 - **Unités d'électrophorèse**
 - **Générateurs**
 - **Equipement photographique**

Les procédures de la PCR : Conditions de cycles

- 
- Dénaturation complète de l'ADN matrice
 - Température optimale d'amorçage
 - Température optimale d'extension
 - Nombre de cycles PCR
 - Étape finale d'extension

Les procédures de la PCR

Le mélange PCR est préparé. Des vêtements de laboratoire ne sont pas requis, mais conseillés, à moins que de bonnes techniques de stérilité ne soient effectuées.



Les procédures de la PCR

Les réactions PCR sont chargées dans le thermocycleur.



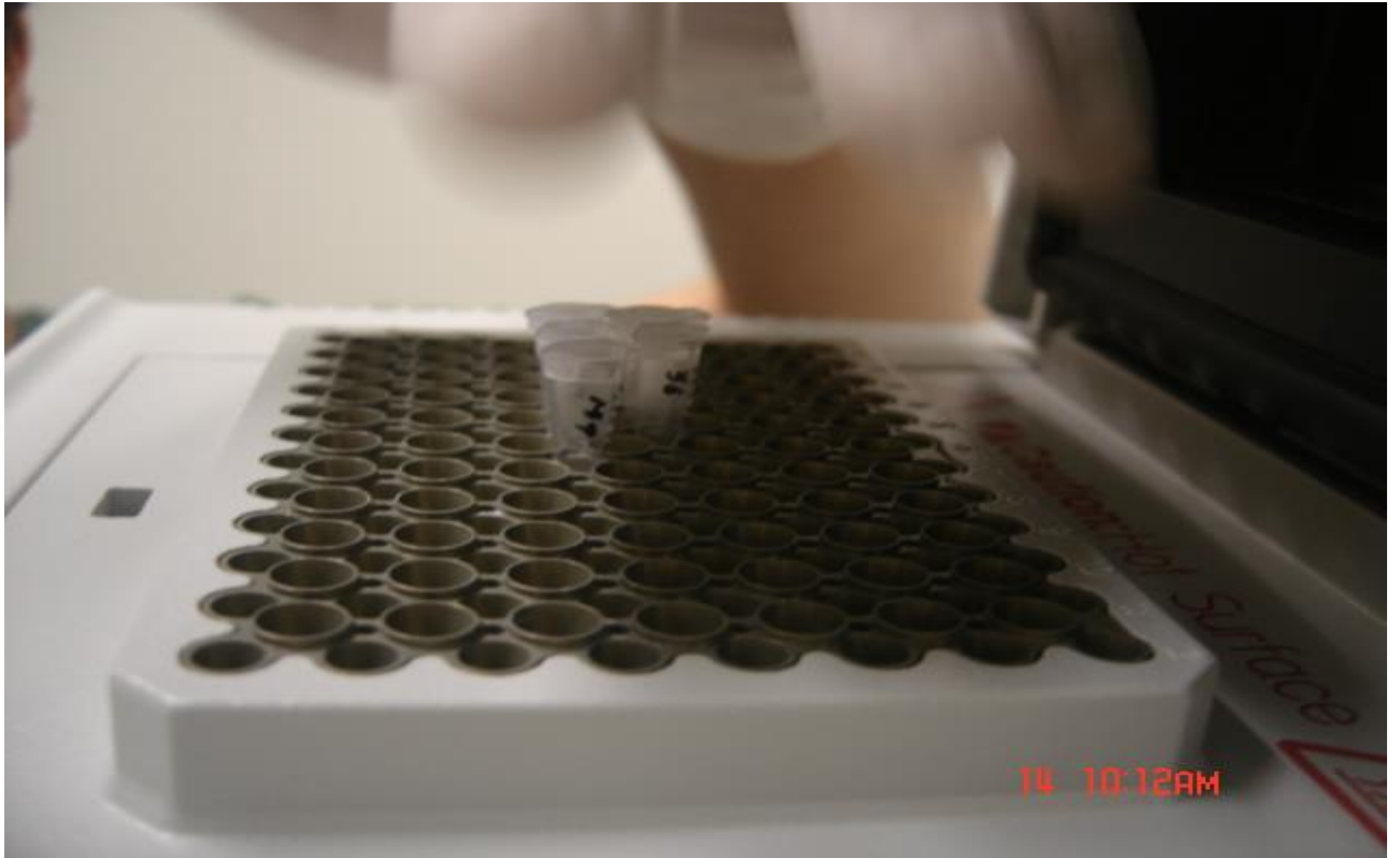
Les procédures de la PCR

Les réactions PCR sont chargées dans le thermocycleur.



Les procédures de la PCR

Les réactions PCR sont chargées dans le thermocycleur.



Les procédures de la PCR

Les réactions PCR sont chargées dans le thermocycleur.



Les procédures de la PCR

Les réactions PCR sont chargées dans le thermocycleur.



Les procédures de la PCR

Le thermocycleur est refermé soigneusement et programmé.



Les procédures de la PCR

Le thermocycleur est refermé soigneusement et programmé.



PCR

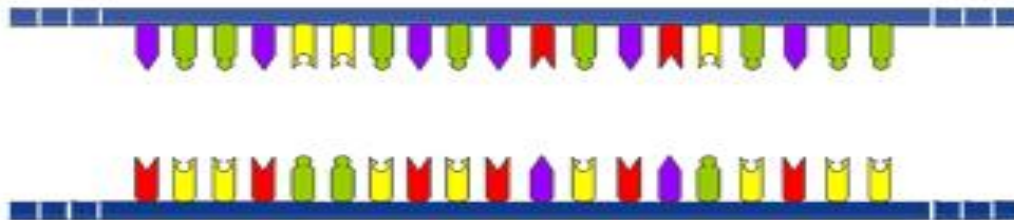
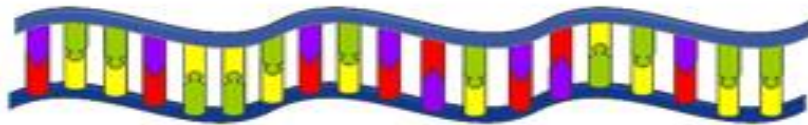
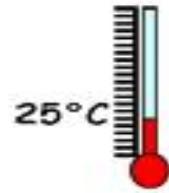
Les étapes de la PCR sont toutes menées l'une après l'autre, en cycles successifs. Le cycle 1 est comme suit:

- Pendant la **dénaturation** (environ 1 min à 95°C), les brins d'ADN se séparent pour former des simples brins.



PCR

dénaturation






PCR

Dans l'étape initiale de dénaturation, il est essentiel que la dénaturation de l'ADN amorce soit complète. Une dénaturation incomplète de l'ADN va rendre inefficace l'utilisation de la matrice dans le premier cycle d'amplification, et en conséquence un faible rendement en produit PCR.

PCR

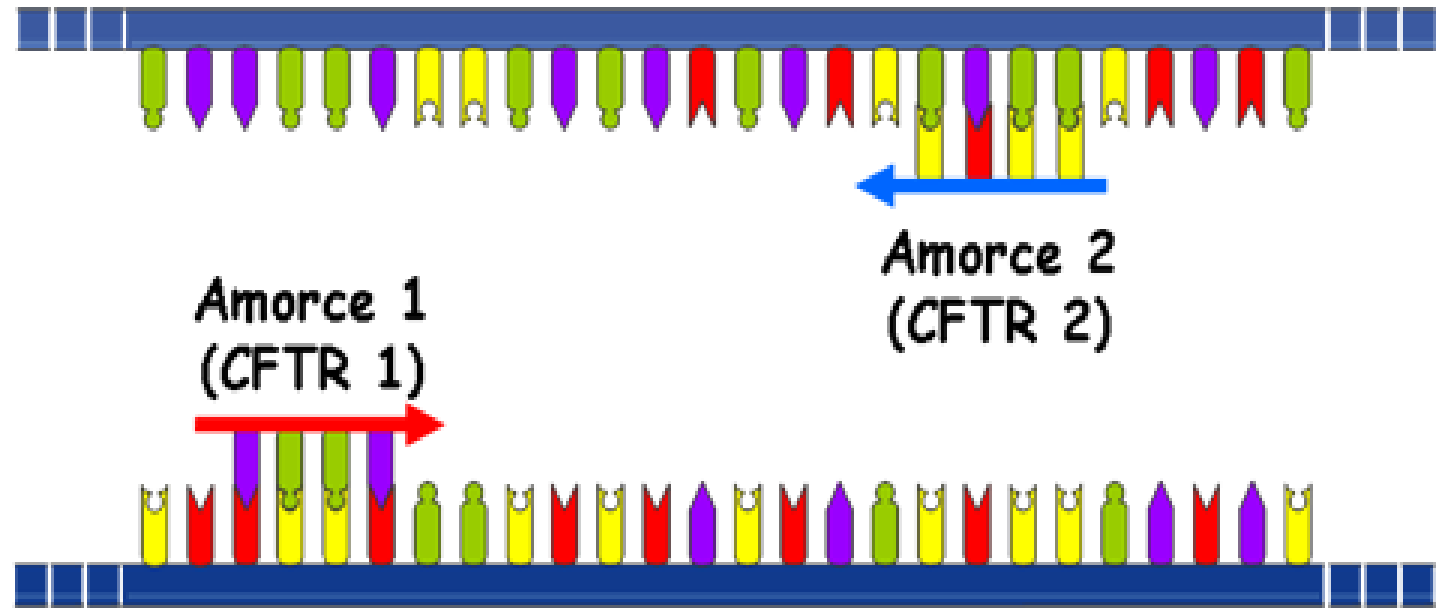
- 
- Pendant **l'amorçage** (environ 1 min à des températures comprises entre 45°C et 60°C), une amorce se lie à l'un des brins d'ADN et l'autre sur le brin complémentaire. Les sites de reconnaissance des amorces sont choisis pour initier la synthèse d'ADN dans la région d'intérêt pendant l'extension.

PCR


➤ l'amorçage.

2

Entre
50°C
et
60°C




Les procédures de la PCR : Conditions de cycles



La température d'amorçage peut être estimée à 5°C de moins que la température de fusion du duplexe amorce-ADN matrice.

Si des produits PCR non spécifiques sont obtenus en plus du produit attendu, la température d'amorçage peut être optimisée en l'augmentant progressivement de $1-2^{\circ}\text{C}$.

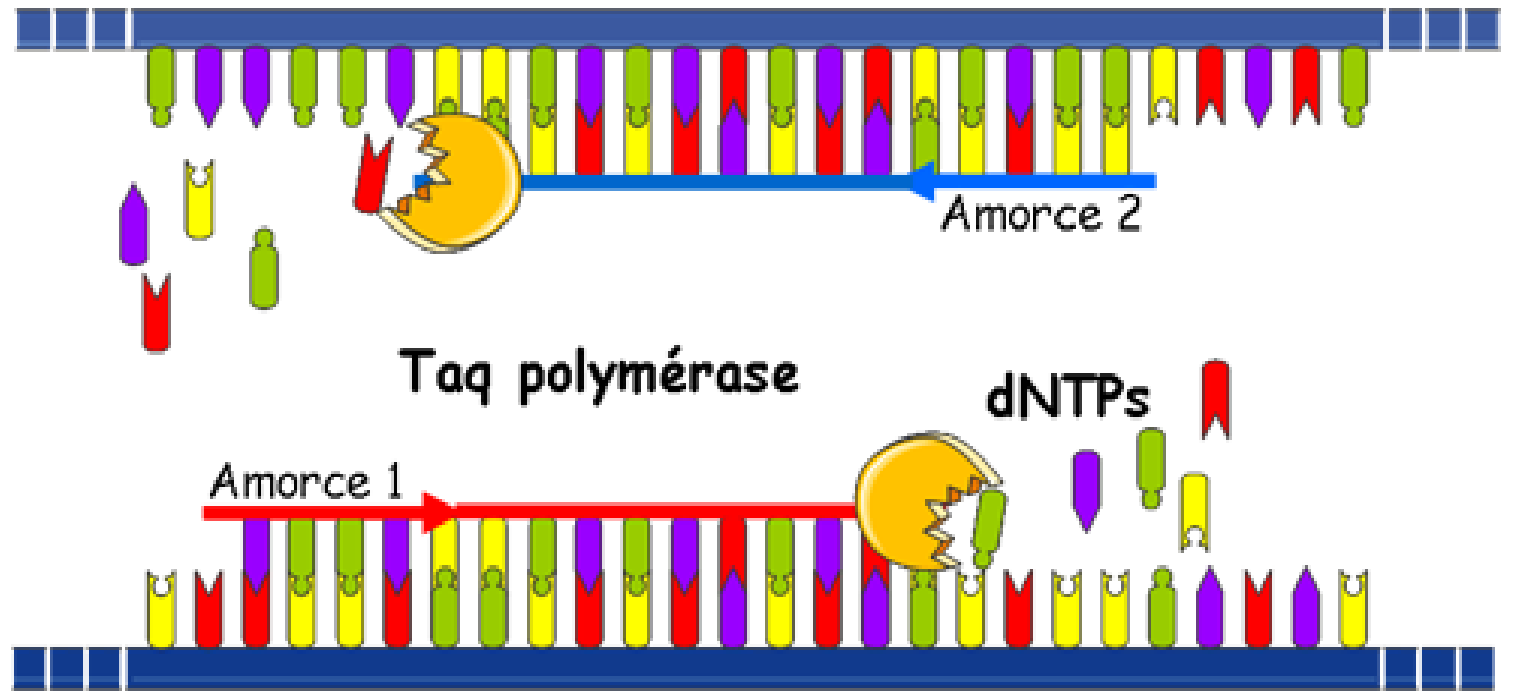
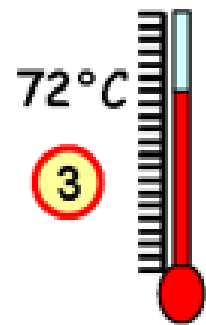
PCR




➤ Pendant **l'extension** (environ 1 min à 72°C), la synthèse d'ADN se produit dans la région cible et sur des distances variables dans la région flanquante, générant ainsi de "longs" fragments de longueurs variables.

PCR

l'extension



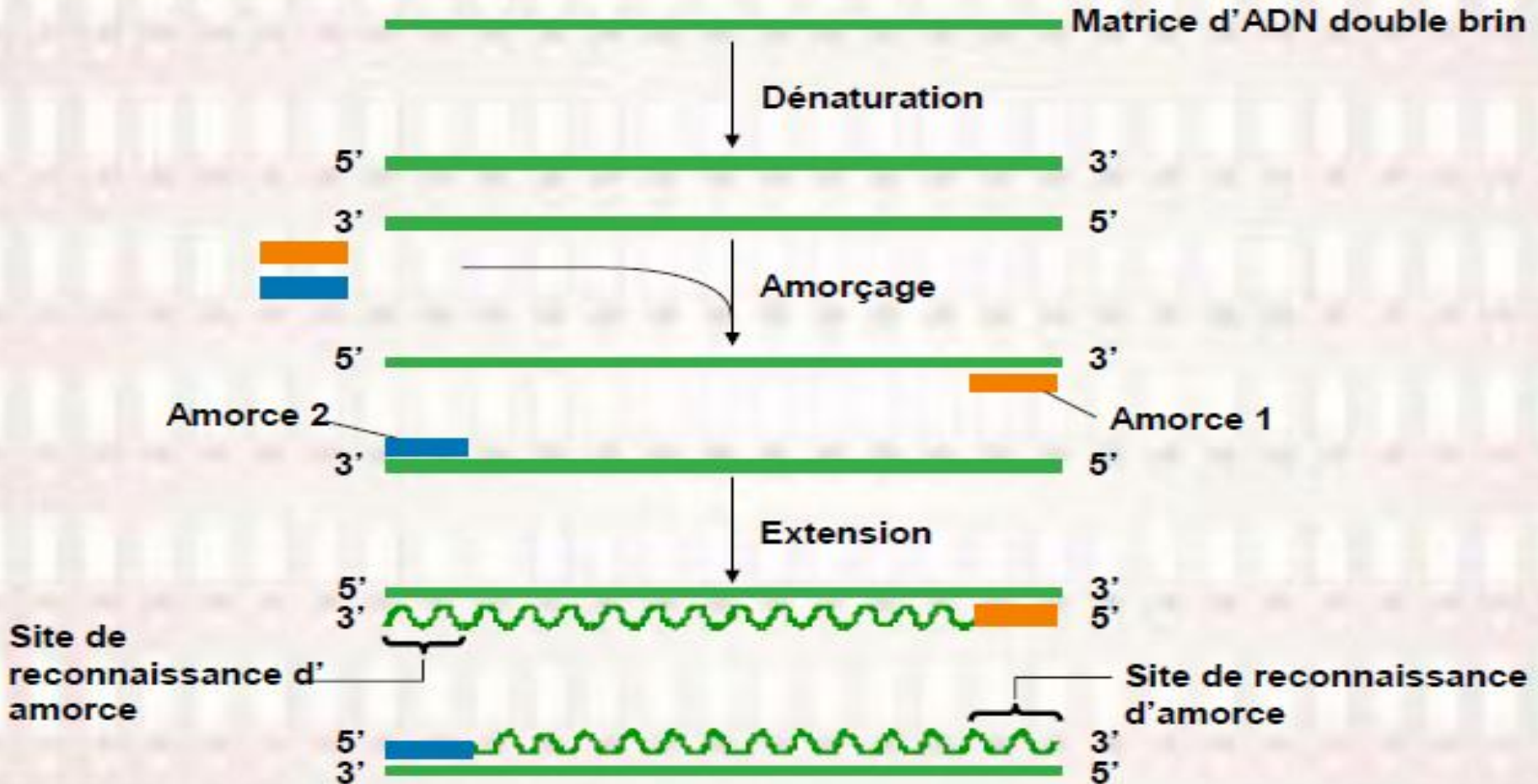
Les procédures de la PCR : Conditions de cycles



Généralement l'étape d'extension est réalisée à 72°C et 1 min d'extension est suffisante pour synthétiser des fragments PCR jusqu'à 2 kb (kb = kilobase = 1000 pb). Quand des fragments d'ADN plus longs sont amplifiés, le temps est généralement augmenté d'1 min pour 1000 pb.

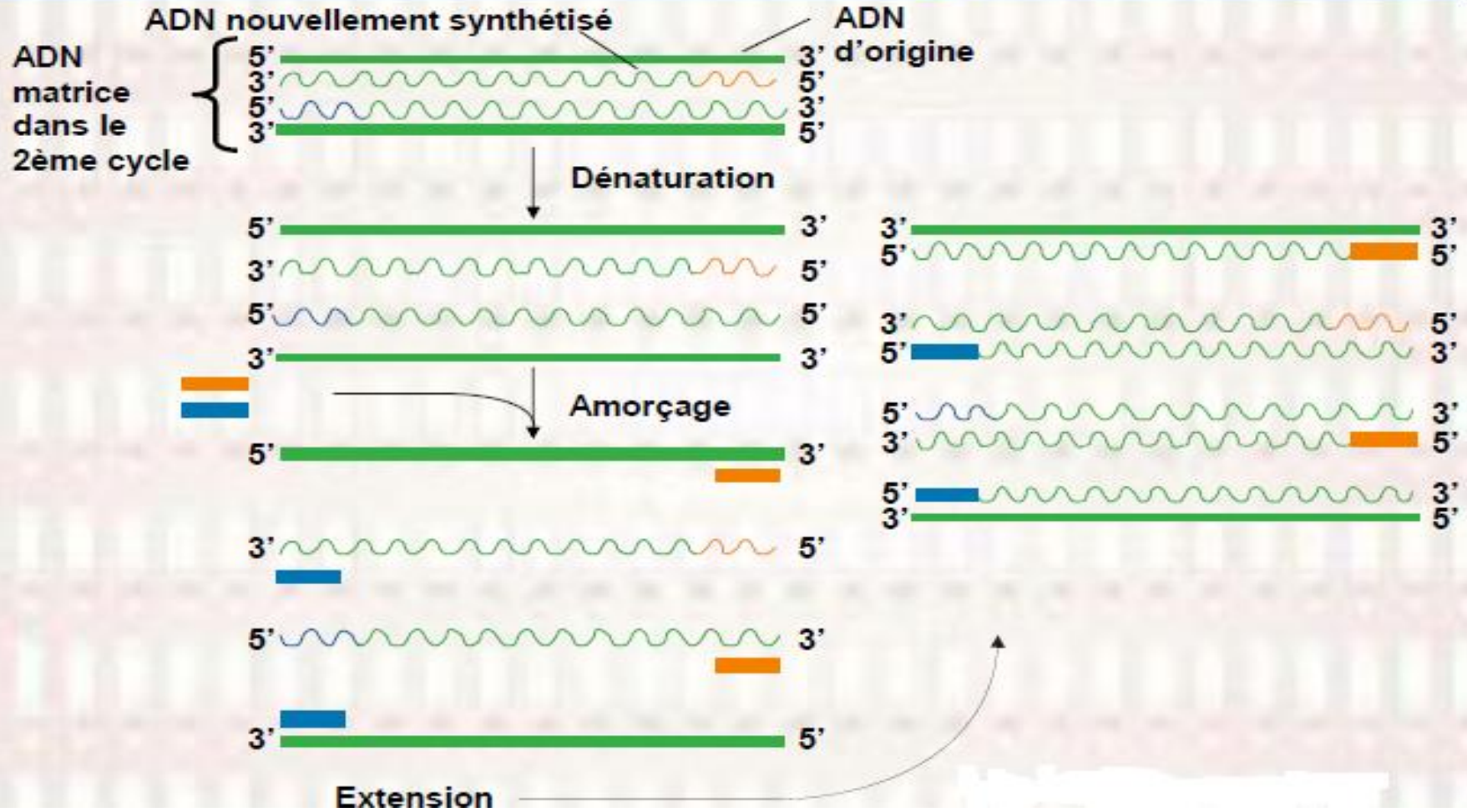
PCR

Les procédures de la PCR: Cycle 1




PCR

Les procédures de la PCR : Cycle 2



PCR

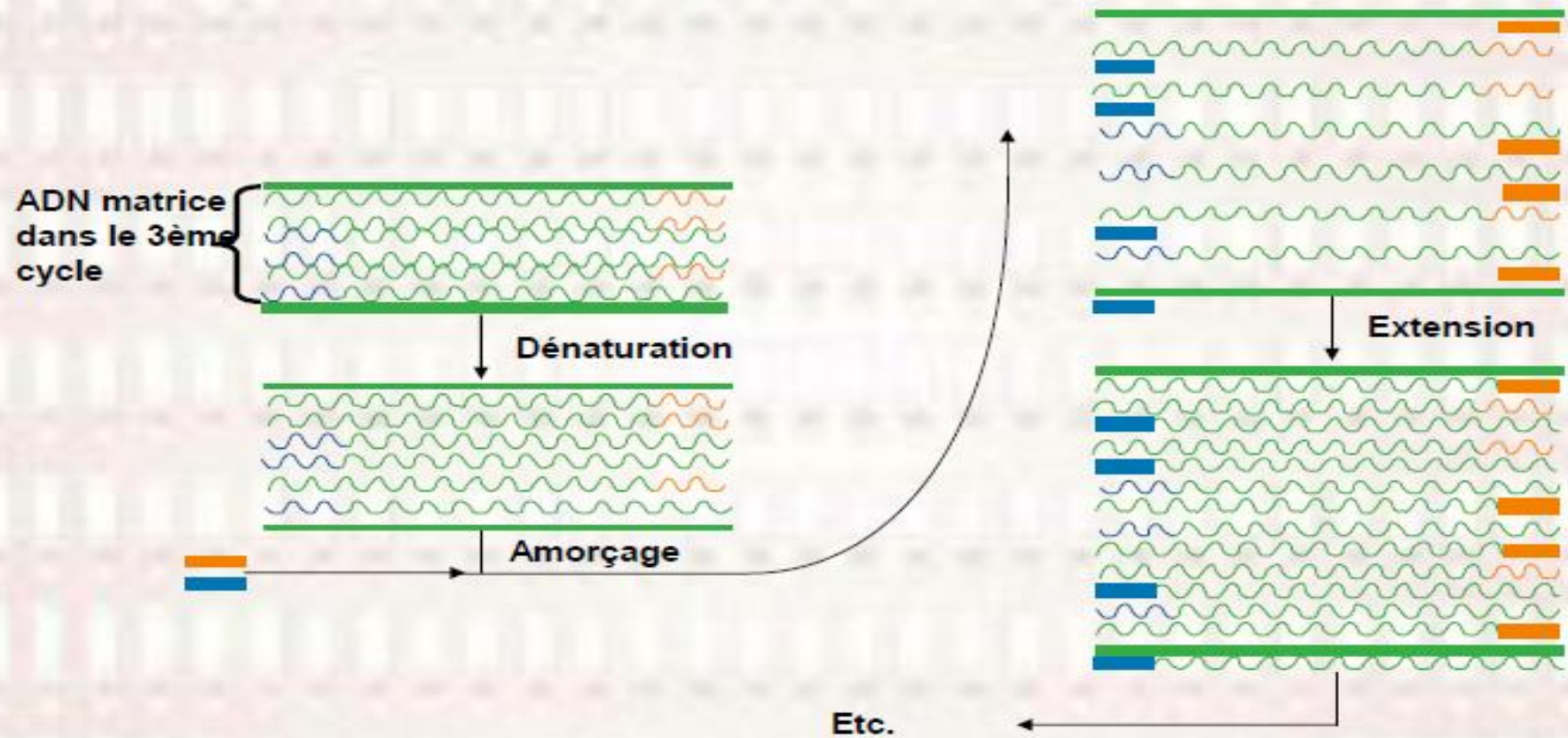


Quand le deuxième cycle commence, il y a effectivement deux types de matrices: (1) les brins d'ADN d'origine; et (2) les brins d'ADN nouvellement synthétisés, qui consistent en la région cible et des longueurs variables des régions flanquantes aux extrémités 3'.


Quand cette dernière matrice est utilisée dans ce cycle, seule la région cible est répliquée.

PCR

Les procédures de la PCR : Cycle 3

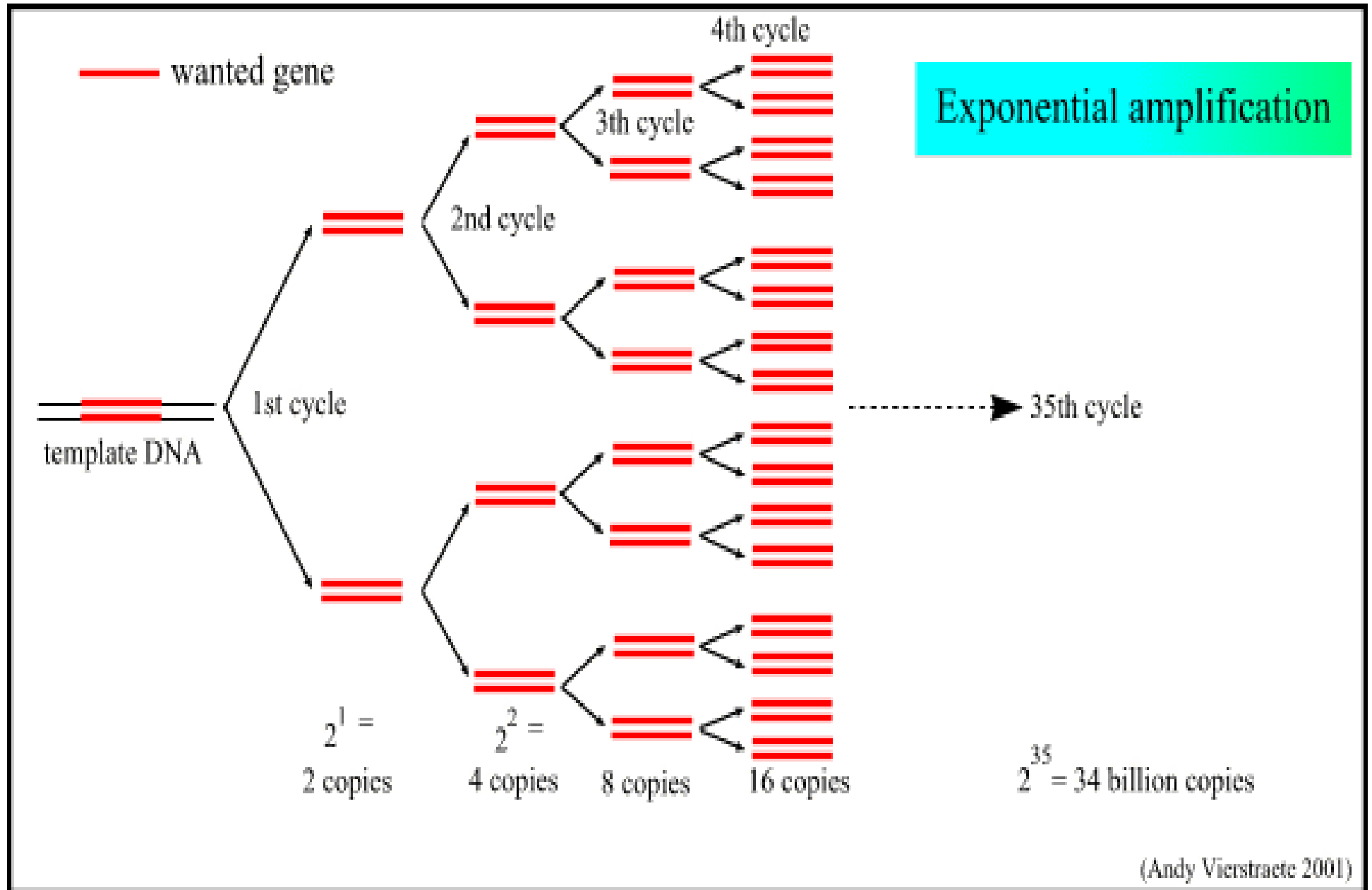


PCR



Dans le troisième cycle, la région cible d'ADN nouvellement synthétisée (c.a.d. sans régions flanquantes) se comporte comme une matrice. La molécule originale d'ADN est toujours présente, et le restera jusqu'à la fin de la réaction. Cependant, après quelques cycles, le fragment d'ADN nouvellement synthétisé se comporte rapidement comme la matrice dominante.

Les cycles sont usuellement répétés de 25 à 45 fois. La standardisation des conditions de fonctionnement du thermocycleur est essentielle pour la reproductibilité des résultats.




(Andy Vierstraete 2001)



PCR

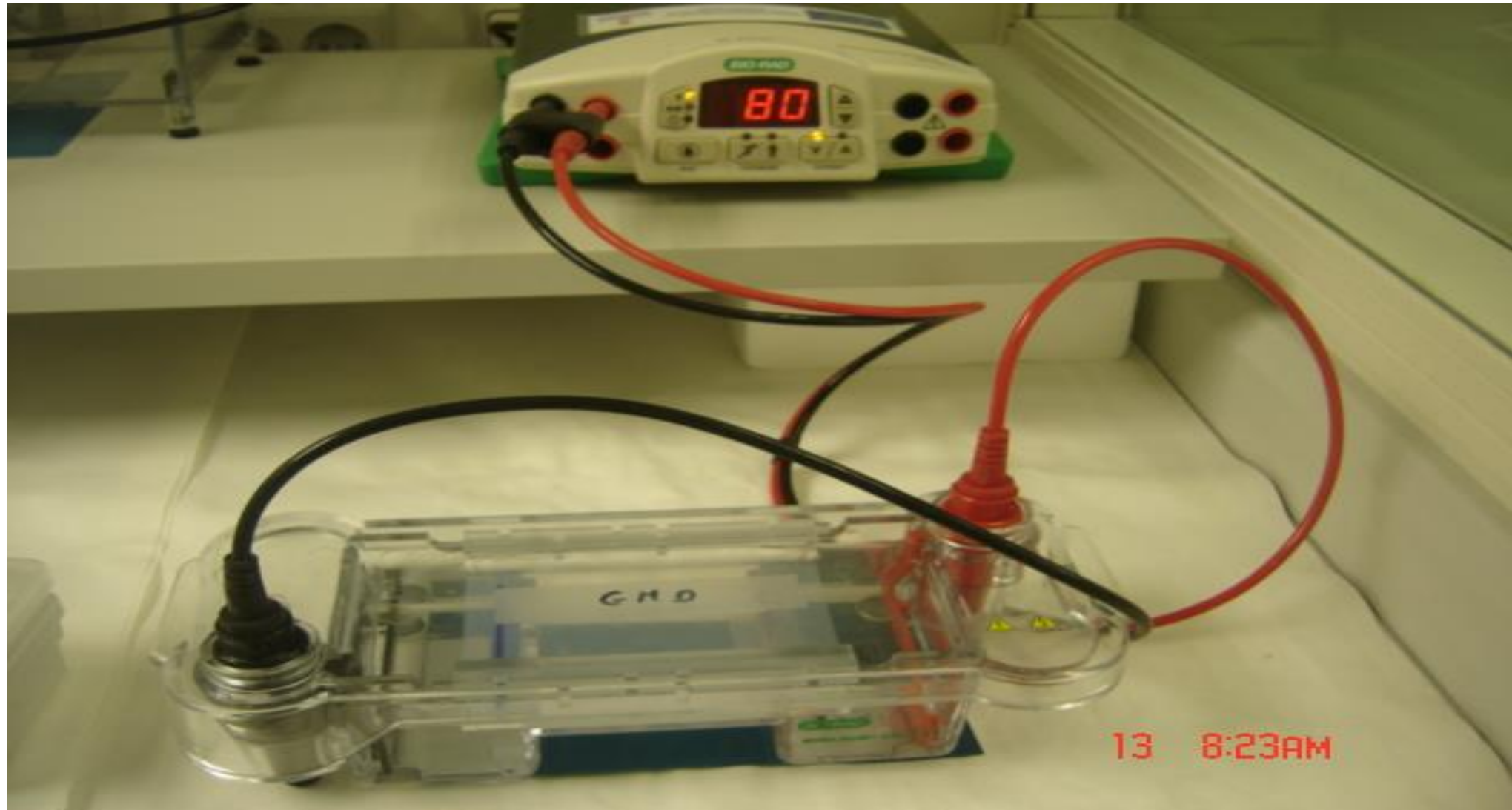
Le nombre de cycles de PCR est fonction à la base du rendement souhaité du produit PCR.

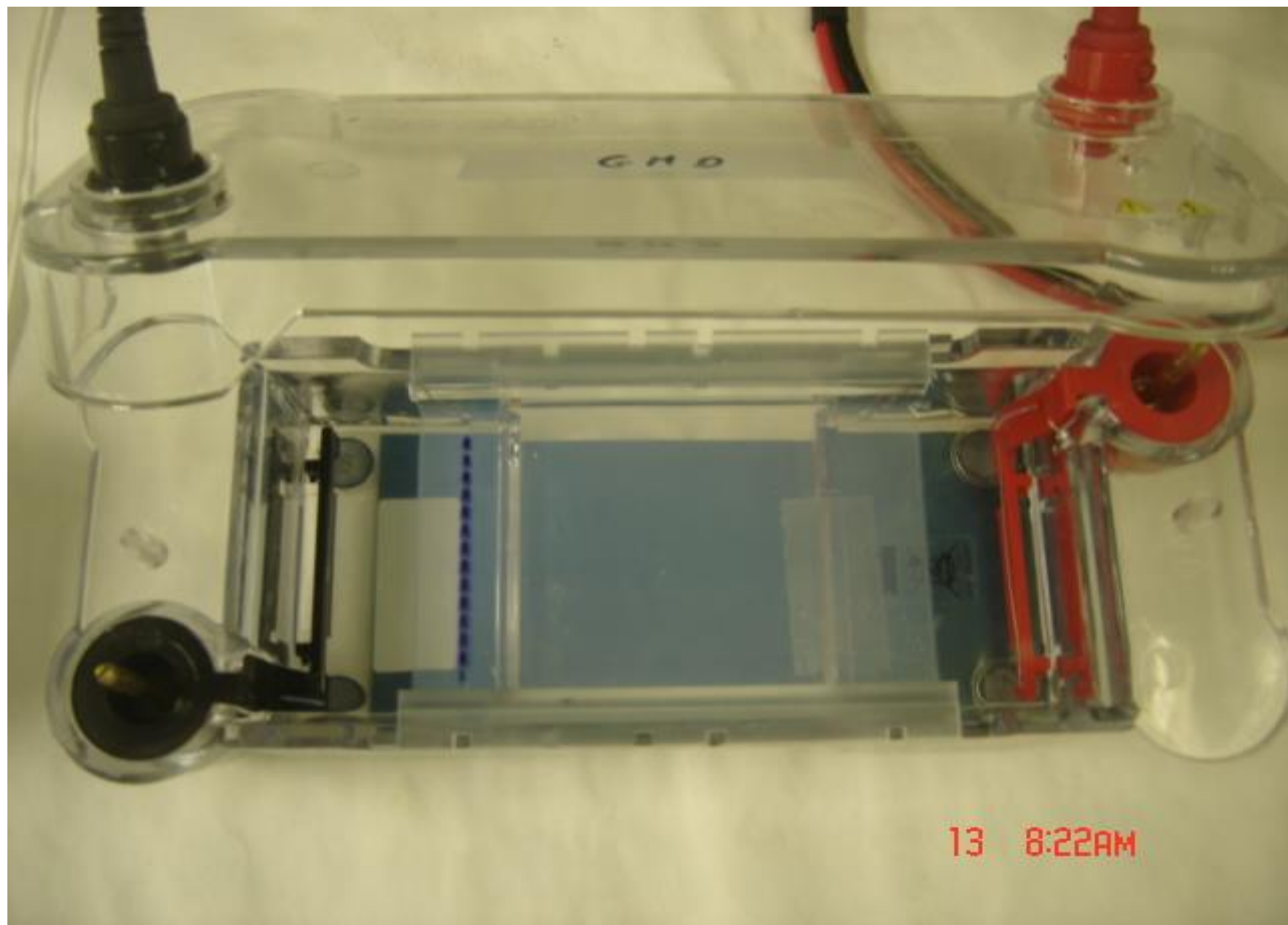
Les procédures de la PCR : Conditions de cycles



Après le dernier cycle, les échantillons sont généralement incubés à 72°C pendant 5 min pour remplir les extrémités saillantes des produits PCR synthétisés.

En fonction de la taille des fragments PCR produits et de la résolution nécessaire, la visualisation des bandes peut se faire sur un gel d'agarose classique, horizontal, ou un gel de séquence en acrylamide. Ici, les produits sont mis à migrer dans un gel d'agarose.





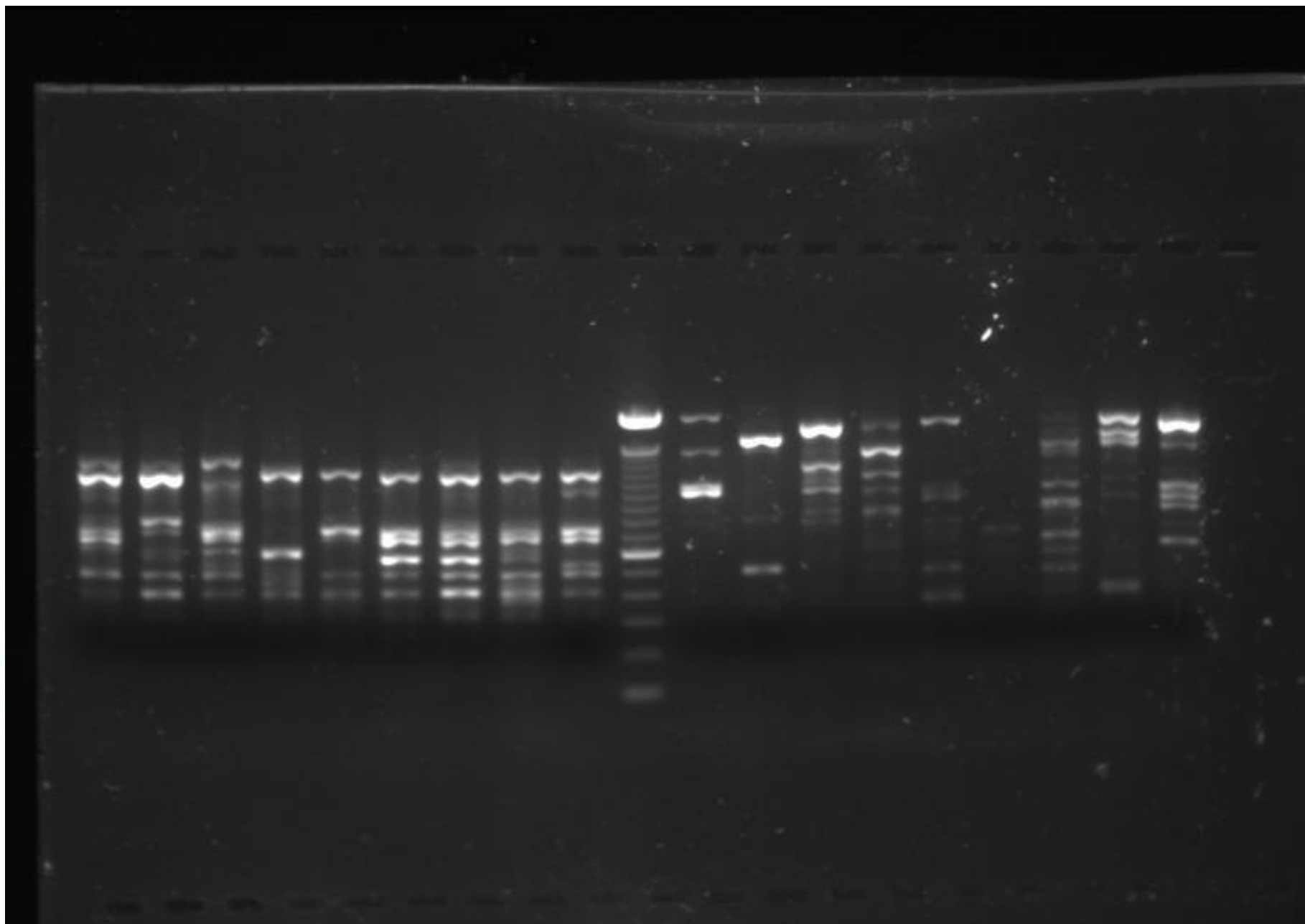


 **CAUTION**

100% ON

9 6:09PM







ADN polymorphe amplifié au hasard ou **RAPD**
(**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA)



RAPD

- La technique RAPD (random amplified polymorphic DNA, ADN polymorphe amplifié au hasard) est une méthode basée sur la PCR qui utilise une petite amorce (généralement 10 bases) pour amplifier des fragments anonymes d'ADN. Avec cette technique, il n'y a pas d'ADN cible spécifique, alors chaque amorce particulière va adhérer à l'ADN matrice au hasard. De ce fait, on ne connaît pas la nature des produits obtenus. Les fragments d'ADN générés sont alors séparés et détectés par électrophorèse sur gel.




RAPD

- On peut utiliser de l'ADN total, chloroplastique ou mitochondrial
 - De faibles quantités d'ADN sont suffisantes
 - L'ADN doit être propre et de haut poids moléculaire
- Si l'on n'obtient pas une qualité minimale d'ADN, la reproductibilité des résultats risque d'être difficile à assurer.

RAPD

Réaction PCR

- 
- Composantes d'une PCR
 - Les amorces (longues de 10 bases) sont proposées par différents distributeurs
 - On ajoute généralement du $MgCl_2$
 - Les cycles d'amorçage sont réalisés à faible température (environ $35^{\circ}C$)



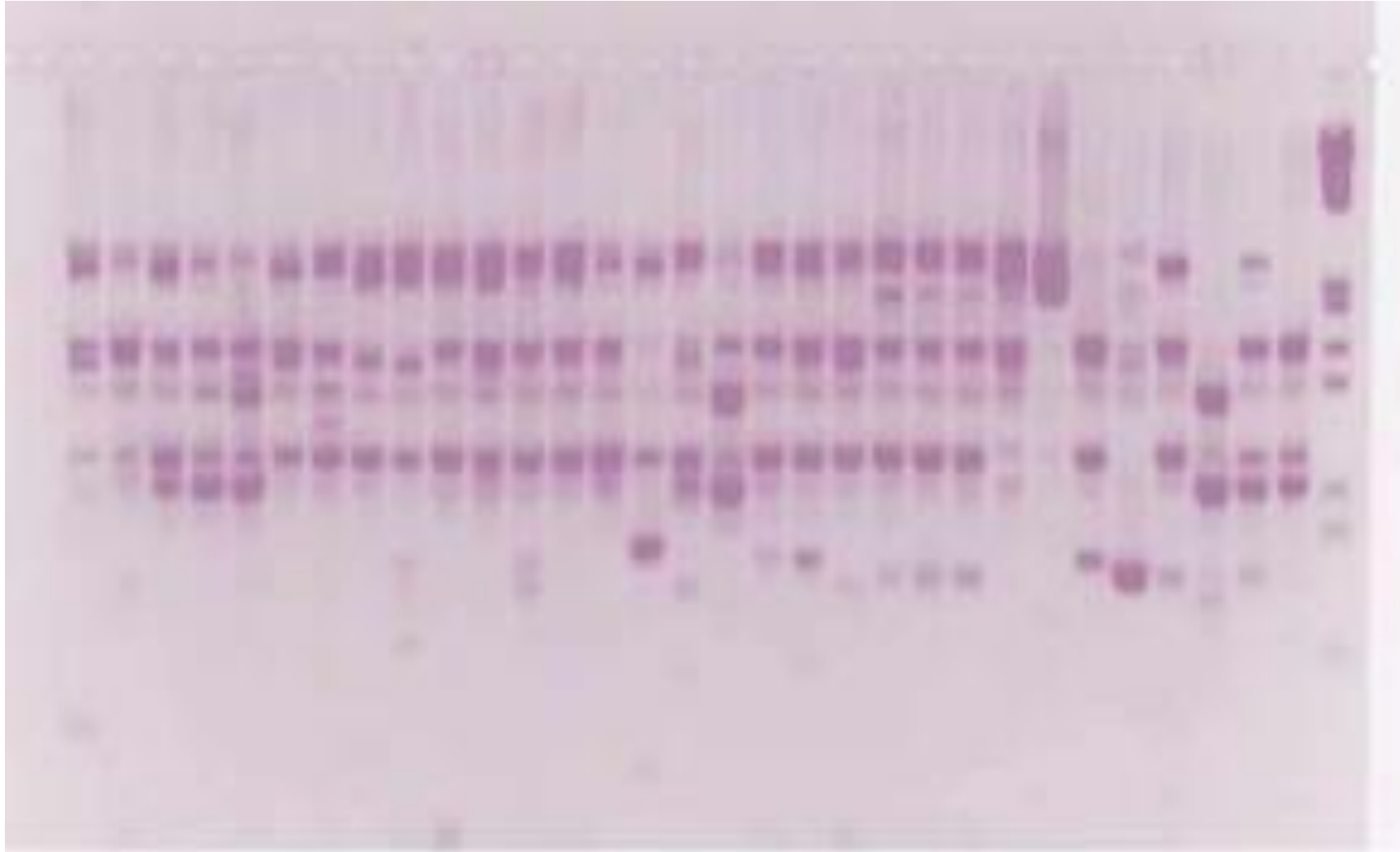
RAPD

Détection des produits RAPD

- Les RAPD peuvent être détectés en faisant migrer les produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide. Dans les deux cas, le gel est coloré au bromure d'éthidium.
- La différence obtenue en faisant migrer les produits RAPD dans un gel d'acrylamide par rapport à un gel d'agarose réside dans le degré de résolution des bandes. Dans la plupart des cas, une électrophorèse sur gel d'agarose donne une résolution suffisante.

RAPD

Détection des produits RAPD





RAPD

Interprétation des profils RAPD (1)

- Le polymorphisme ADN parmi les individus peut être dû à:
- Des mésappariements au niveau du site d'amorçage
- L'apparition d'un nouveau site d'amorçage
- La longueur de la région amplifiée entre les sites d'amorçage



RAPD

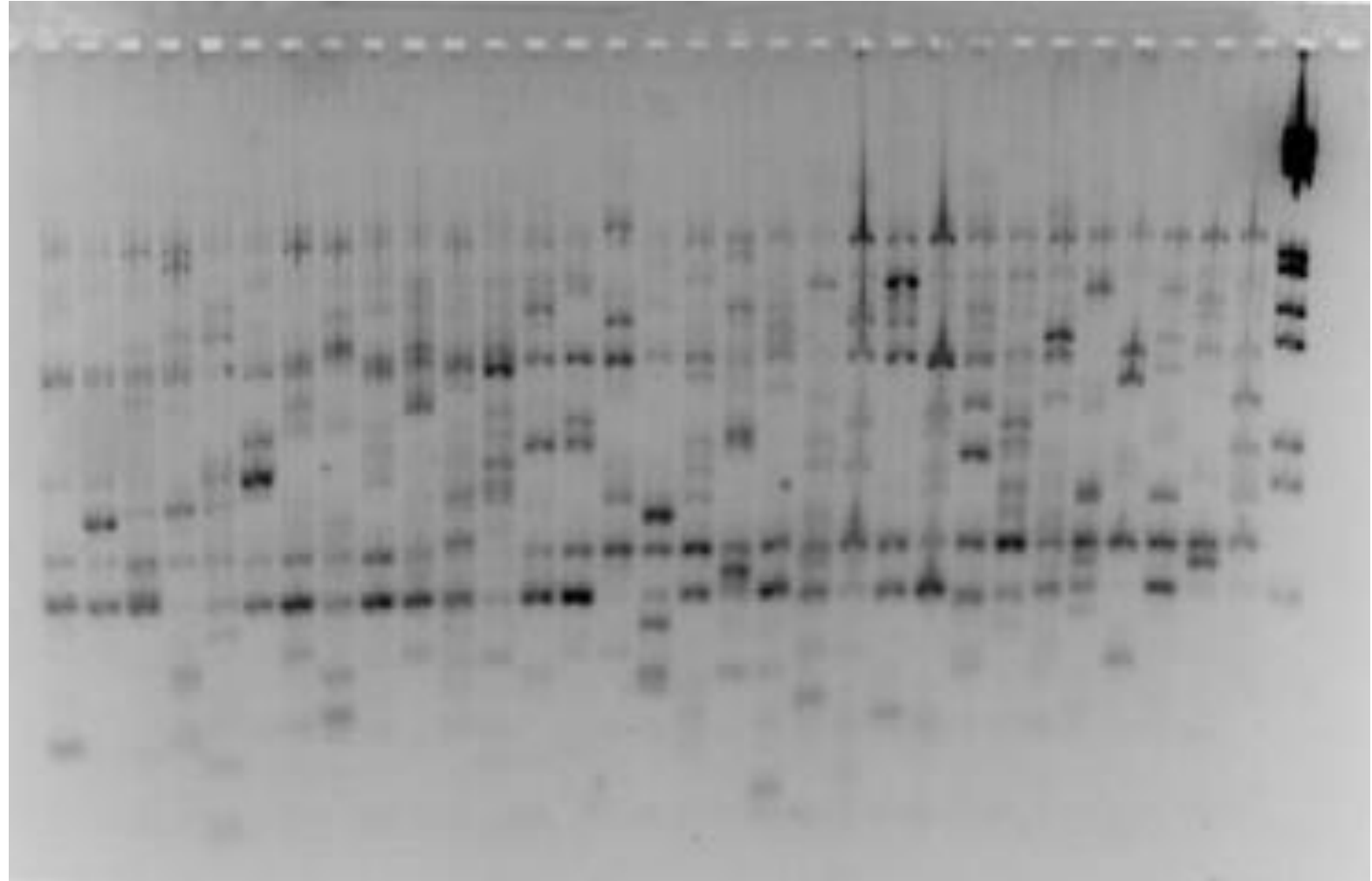
Interprétation des profils RAPD (2)

Du fait de la nature des marqueurs RAPD, on peut seulement caractériser la présence ou l'absence d'une bande particulière. Les critères de sélection des bandes interprétables sont les suivants:

- Reproductibilité—doit être répétable entre expériences
- Largeur des bandes
- Taille
- Ségrégation attendue dans une population de cartographie.

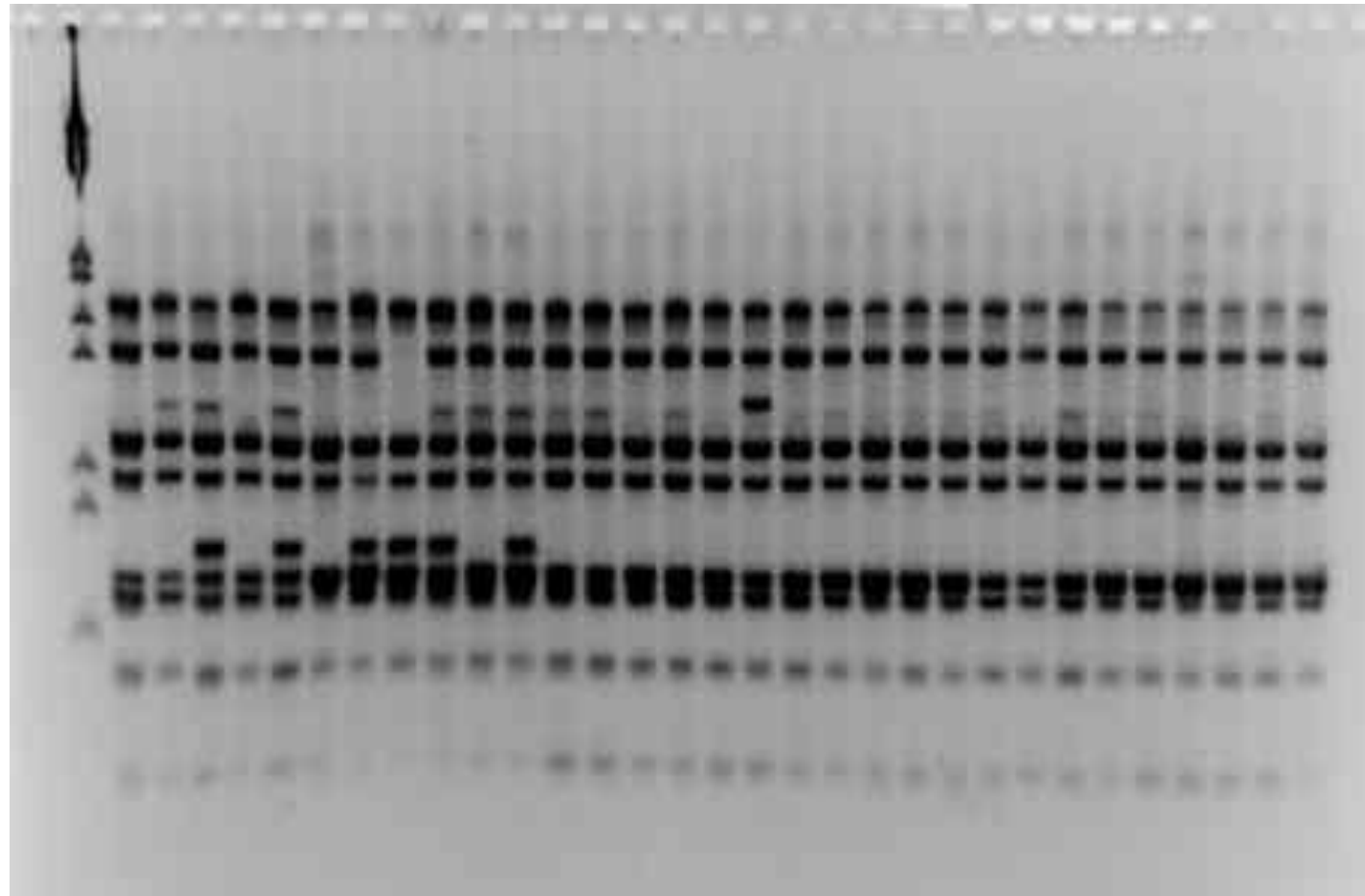
RAPD

Interprétation des profils RAPD : Exemple d'un mauvais gel RAPD



RAPD

Interprétation des profils RAPD : Exemple d'un bon gel RAPD





RAPD

Avantages des RAPD

- Grand nombre de fragments
- Simple
- Les amorces aléatoires peuvent être achetées facilement, sans nécessiter plus d'information génétique ou génomique
- Seules de faibles quantités d'ADN sont nécessaires
- Le coût unitaire par analyse est très faible



RAPD

Inconvénients des RAPD

➤ Dominants

Les marqueurs RAPD sont dominants. L'amplification soit se produit à un certain locus, soit ne se produit pas, conduisant à un marquage des bandes de type présence ou absence. Cela signifie que les homozygotes et les hétérozygotes ne peuvent être distingués. De plus, l'absence d'une bande par manque de séquence cible ne peut pas être distinguée de l'absence se produisant par manque d'amplification lié à d'autres raisons (p.e. La mauvaise qualité de l'ADN), ce qui contribue à des ambiguïtés dans l'interprétation des résultats.



RAPD

Inconvénients des RAPD

- **Manque d'information a priori sur l'identité des produits d'amplification**

On ne sait rien sur l'identité des produits d'amplification à moins que les études soient adossées à une analyse génétique.



RAPD

Inconvénients des RAPD

➤ Problèmes de reproductibilité

Les problèmes de reproductibilité viennent de ce que la RAPD souffre de sa sensibilité aux changements de qualité de l'ADN, composantes et conditions de la PCR, résultant en des changements des fragments amplifiés. Des résultats reproductibles peuvent être obtenus si l'on prend soin de standardiser les conditions utilisées



RAPD

Inconvénients des RAPD

➤ Problèmes de co-migration

Les problèmes de co-migration posent des questions telles que: "Des bandes de même tailles correspondent elles au même fragment d'ADN?"

- La présence d'une bande de même poids moléculaire chez des individus différents n'est pas une preuve en soi que les individus partagent le même fragment d'ADN (homologue).
- Une bande détectée sur un gel comme unique peut comprendre différents produits d'amplification: le type de gel d'électrophorèse utilisé, s'il est capable de séparer l'ADN quantitativement (c.a.d. par sa taille), ne peut séparer des fragments de même taille qualitativement (c.a.d. selon leur séquence nucléotidique).



**Le polymorphisme de longueur des fragments
de restriction ou **RFLP****
(**R**estriiction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)

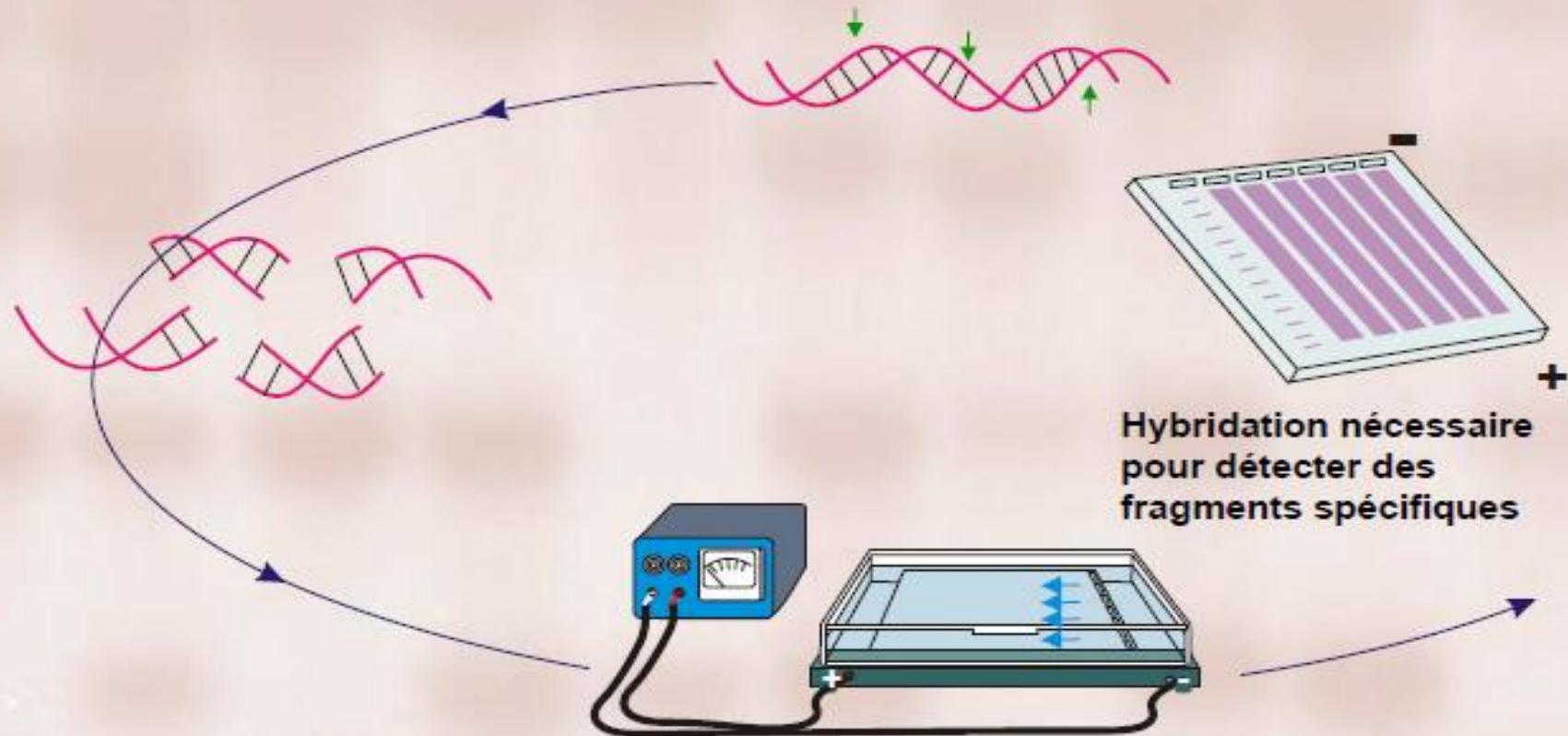


RFLP


- L'analyse de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP pour Restriction fragment length polymorphism) a été l'une des premières techniques à être largement utilisée pour détecter de la variation au niveau de la séquence d'ADN. Le principe sous-jacent de cette technologie réside dans la possibilité de comparer des profils de bandes, générées après digestion de molécules d'ADN d'individus différents par des enzymes de restriction. Diverses mutations peuvent avoir affecté de façon variable les molécules d'ADN, produisant des fragments de longueurs variables. Ces différences dans les longueurs de fragments peuvent être vues après électrophorèse sur gel, hybridation et visualisation.

RFLP


Digestion par enzyme de restriction et électrophorèse sur gel



RFLP

- 
- L'ADN extrait est digéré avec des enzymes de restriction spécifiques, soigneusement choisies. Chaque enzyme de restriction, dans des conditions appropriées, va reconnaître et couper l'ADN de façon prédictible, produisant ainsi un ensemble de fragments d'ADN (les fragments de restriction) de différentes longueurs.

RFLP



Les millions de fragments de restriction produits sont généralement séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Comme les fragments seraient vus comme une traînée continue par coloration au bromure d'éthidium, la coloration seule ne permet pas de détecter des polymorphismes. L'hybridation doit pour cela être utilisée pour détecter des fragments spécifiques.



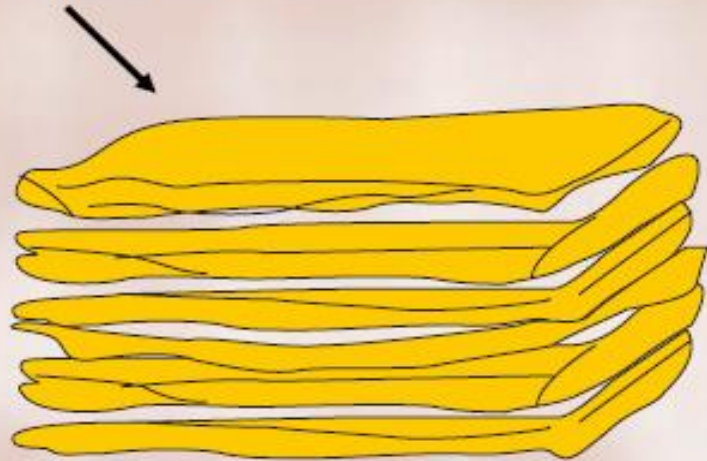
RFLP

Le transfert d'ADN est appelé 'Southern blotting', en référence à E.M. Southern (1975), qui inventa la technique. Dans cette méthode, le gel est tout d'abord dénaturé dans une solution basique et placé dans un bac. Une membrane poreuse de nylon ou de nitrocellulose est étalée sur le gel, et un poids posé sur l'ensemble. Tous les fragments de restriction présents dans le gel se transfèrent sur la membrane sous forme simple brin par capillarité.

RFLP

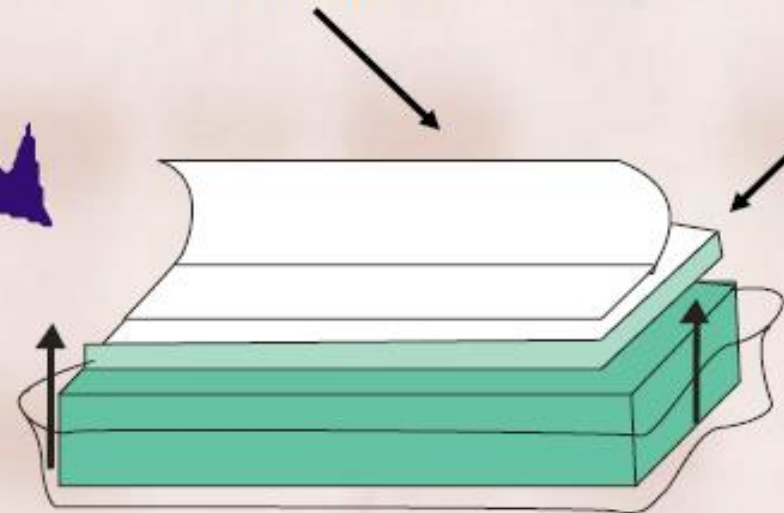
Transfert d' ADN par "Southern blotting"

Poids




Membrane

Gel



RFLP



La membrane avec l'ADN cible est incubée avec la sonde ADN. Les conditions d'hybridation sont telles que si des brins sur la membrane sont complémentaires de ceux de la sonde, l'hybridation se produira et des duplex marqués se formeront. Quand les conditions sont très stringentes, l'hybridation avec des ADN très distants ou non homologues ne se produit pas. Ainsi donc, la sonde ADN accroche des séquences qui sont complémentaires et "idéalement" homologues à elle même, parmi les milliers ou millions de fragments non détectés qui migrent dans le gel.

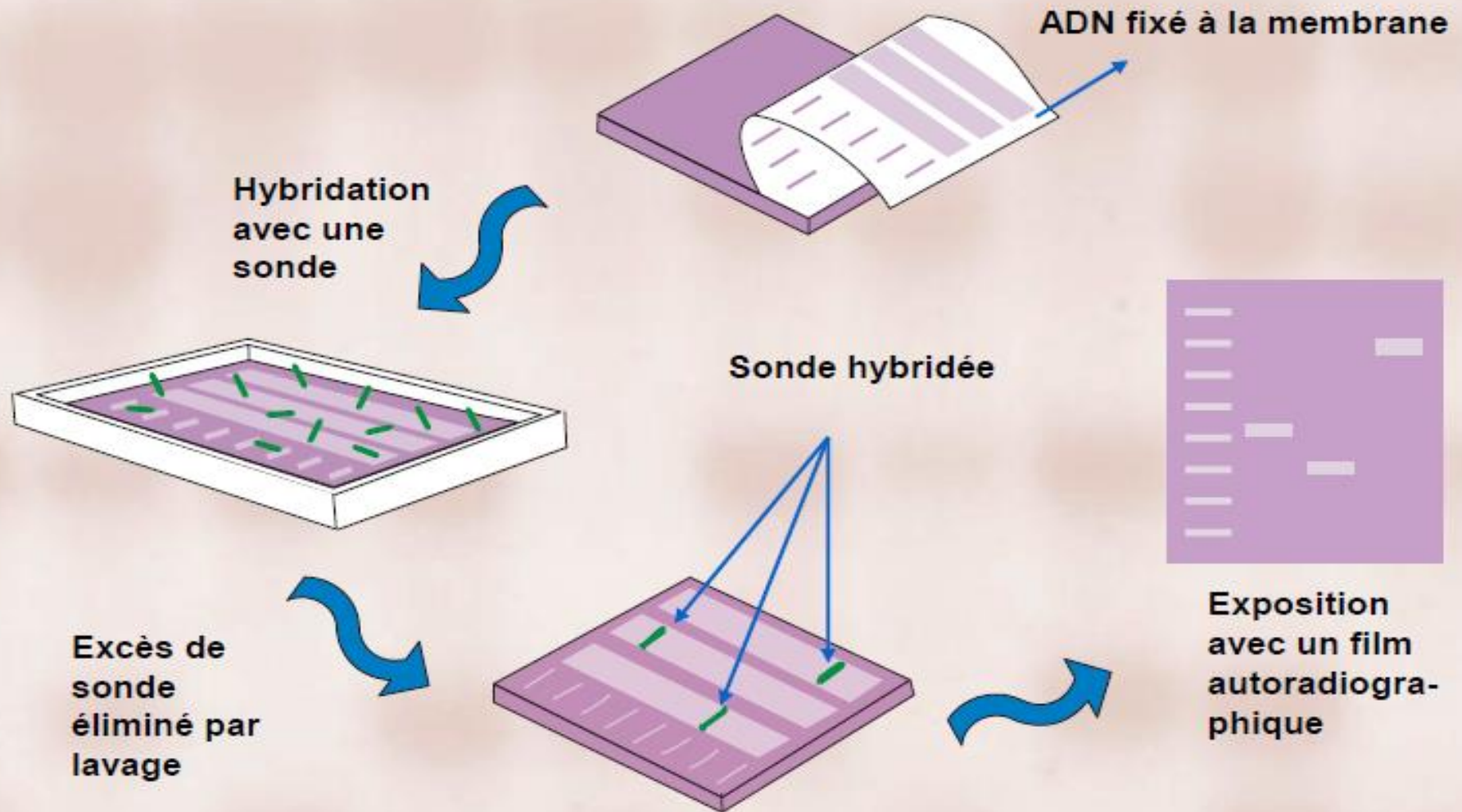


RFLP

Les fragments désirés peuvent être détectés après exposition simultanée de la membrane hybridée et d'un film autoradiographique.

RFLP

Hybridation d'ADN : La procédure





RFLP

Hybridation d'ADN: les sources de sondes

Les sources de sondes ADN comprennent:

- Des banques génomiques – l'ADN total de la plante est digéré par des enzymes de restriction et les fragments individuels clonés dans un vecteur bactérien ou viral. Les sondes convenables sont sélectionnées à partir de cette banque "anonyme" pour l'analyse RFLP.



RFLP

Hybridation d'ADN: les sources de sondes

Les sources de sondes ADN comprennent:

- Des banques d'ADNc (ADN complémentaires) — L'ARNm est isolé et "transcrit" en ADN, en utilisant l'enzyme transcriptase réverse. L'ADNc ainsi obtenu est cloné dans des vecteurs et utilisé comme une banque de sondes dans l'analyse RFLP.



RFLP

Hybridation d'ADN: les sources de sondes

Les sources de sondes ADN comprennent:

- De l'ADN cytoplasmique — des banques d'ADN mitochondrial et chloroplastique



RFLP

Hybridation d'ADN: les sources de sondes

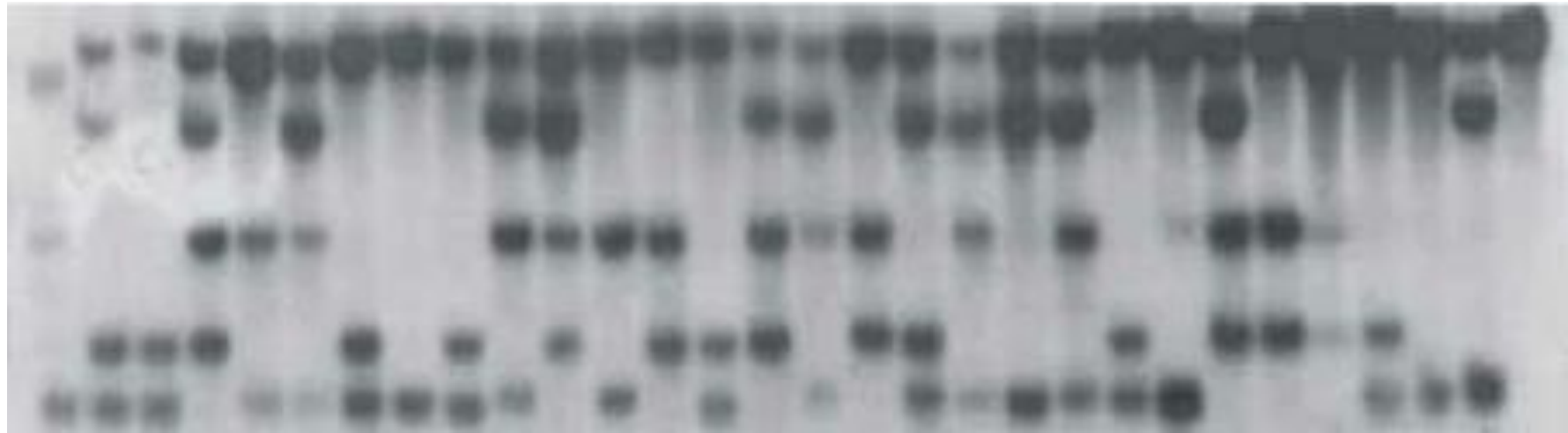
Séquences répétitives ou de type minisatellite:

- «Motif » de base de 10 à 60 pb en tandem
- Très variables entre êtres humains
- Des polymorphismes dans le nombre d'unités de répétition (VNTR pour « variable number of tandem repeat »)

Chez les plantes, des sondes issues d'une répétition interne du gène de la protéine III du bactériophage M13 ont été utilisées pour révéler des séquences de type minisatellite

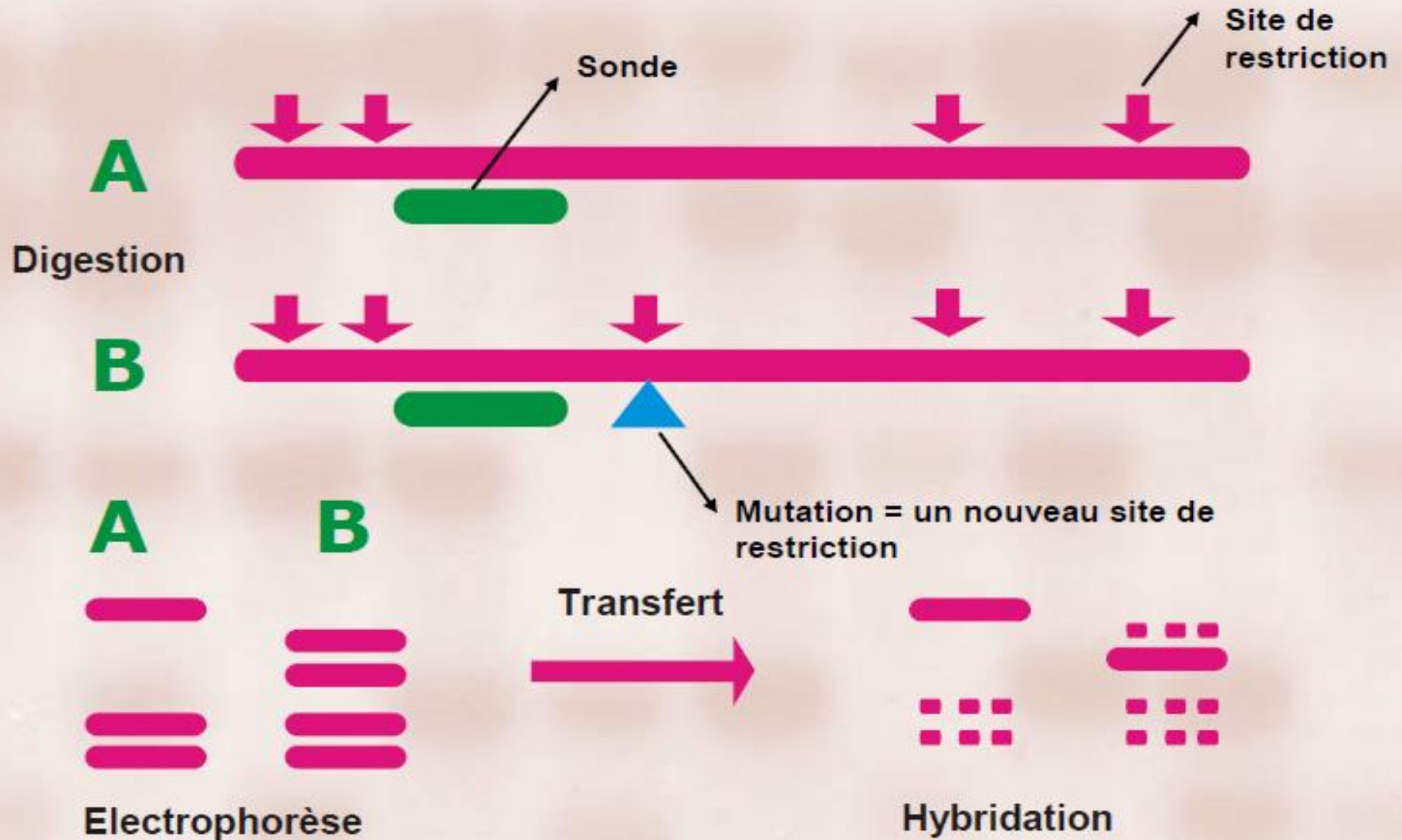
RFLP

Ceci est un autoradiogramme de RFLP



RFLP

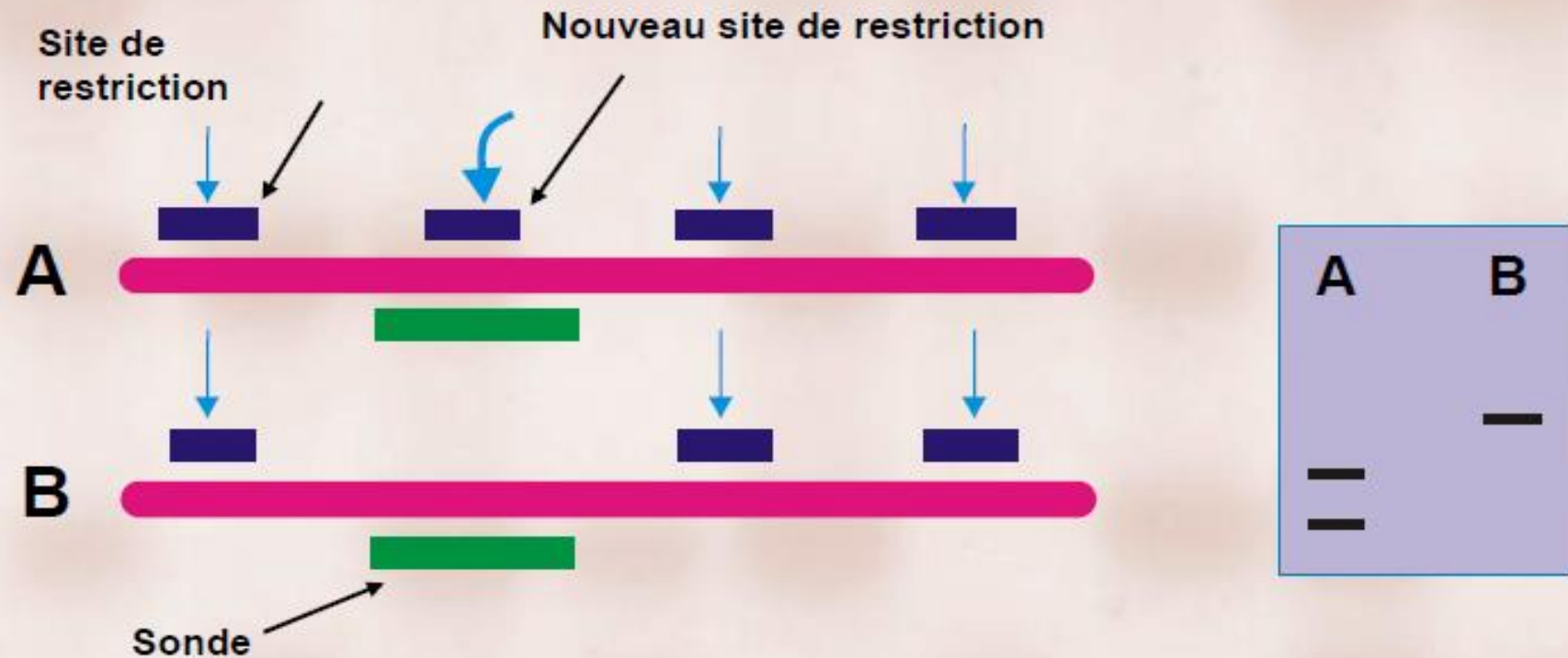
Le RFLP en images: Résumé



RFLP

Interprétation des profils RFLP (1)

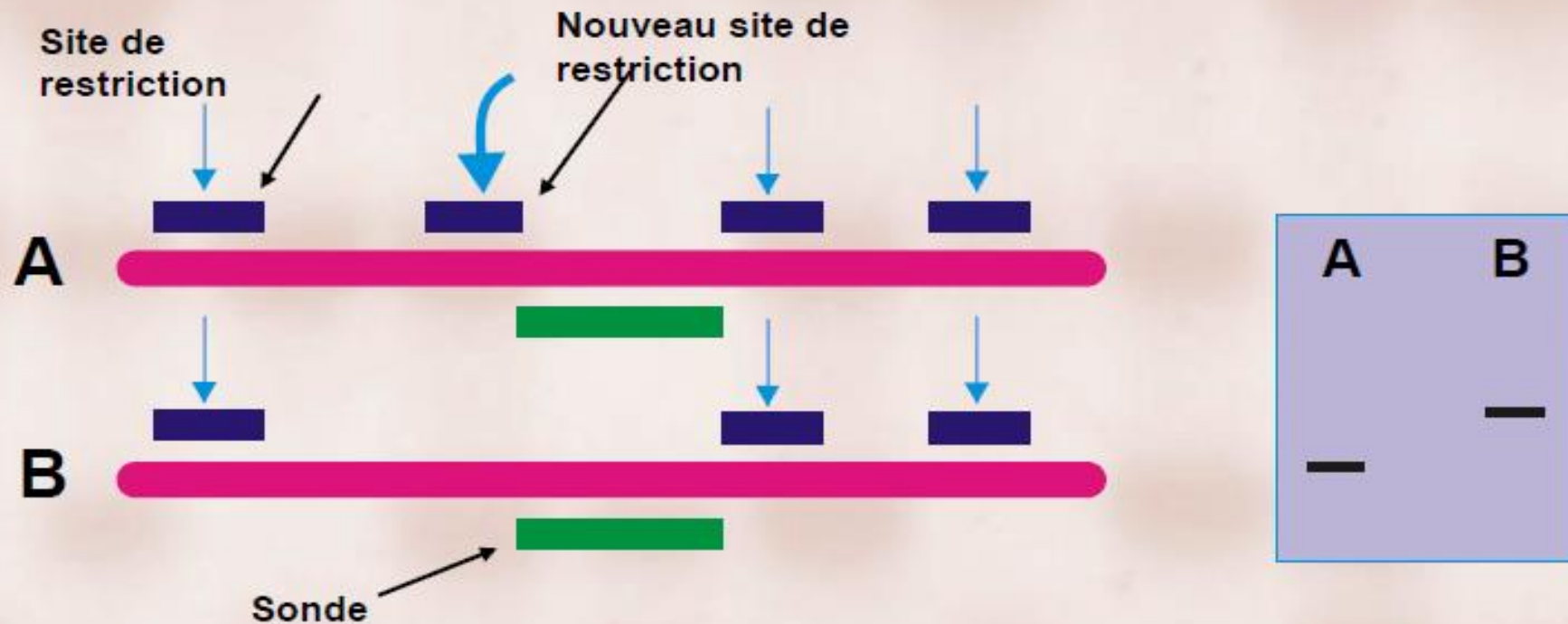
Une mutation crée un nouveau site de restriction dans la région cible. Deux bandes plus courtes sont alors détectées sur le film autoradiographique



RFLP

Interprétation des profils RFLP (2)

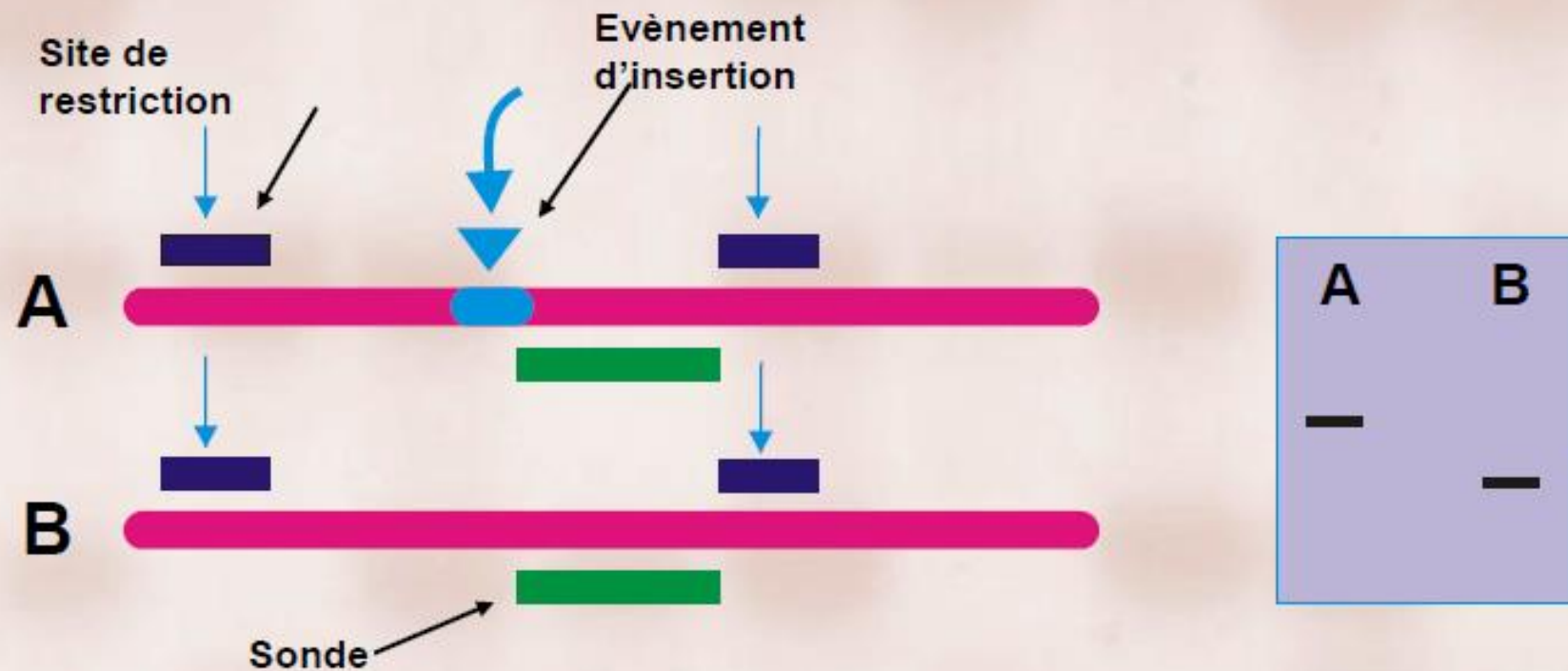
Une mutation crée un nouveau site de restriction entre deux sites de restrictions flanquants, produisant ainsi un fragment de restriction plus court.



RFLP

Interprétation des profils RFLP (3)

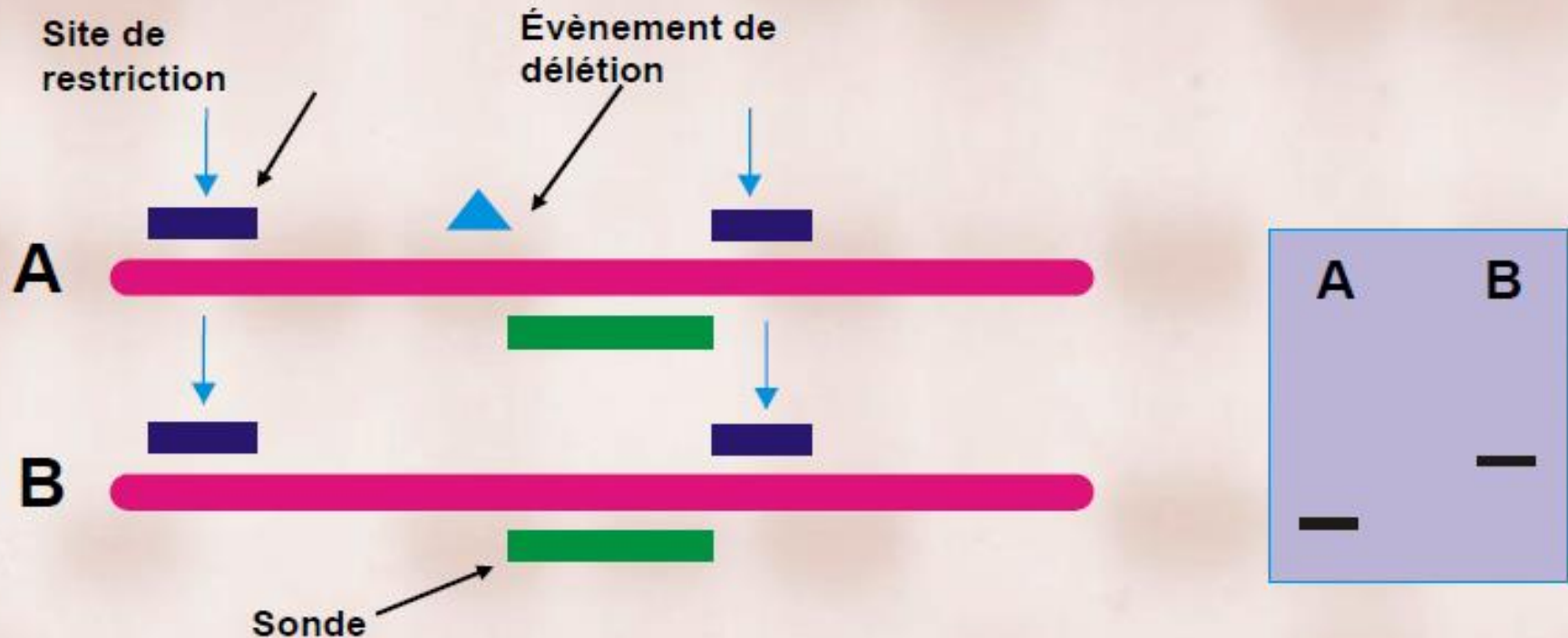
Une insertion d'une séquence d'ADN entre deux sites de restrictions flanquants produit un fragment de restriction plus grand



RFLP

Interprétation des profils RFLP (4)

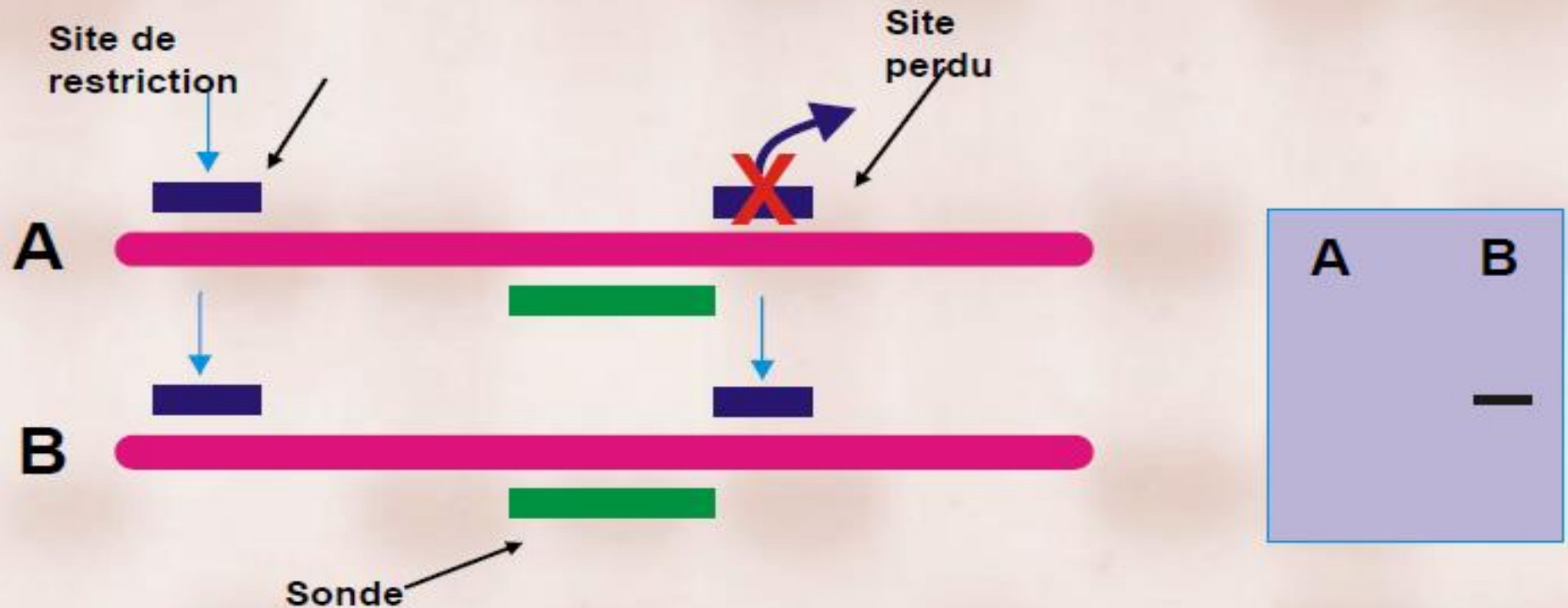
Une délétion d'une séquence d'ADN entre deux sites de restrictions flanquants produit un fragment de restriction plus court



RFLP

Interprétation des profils RFLP (5)

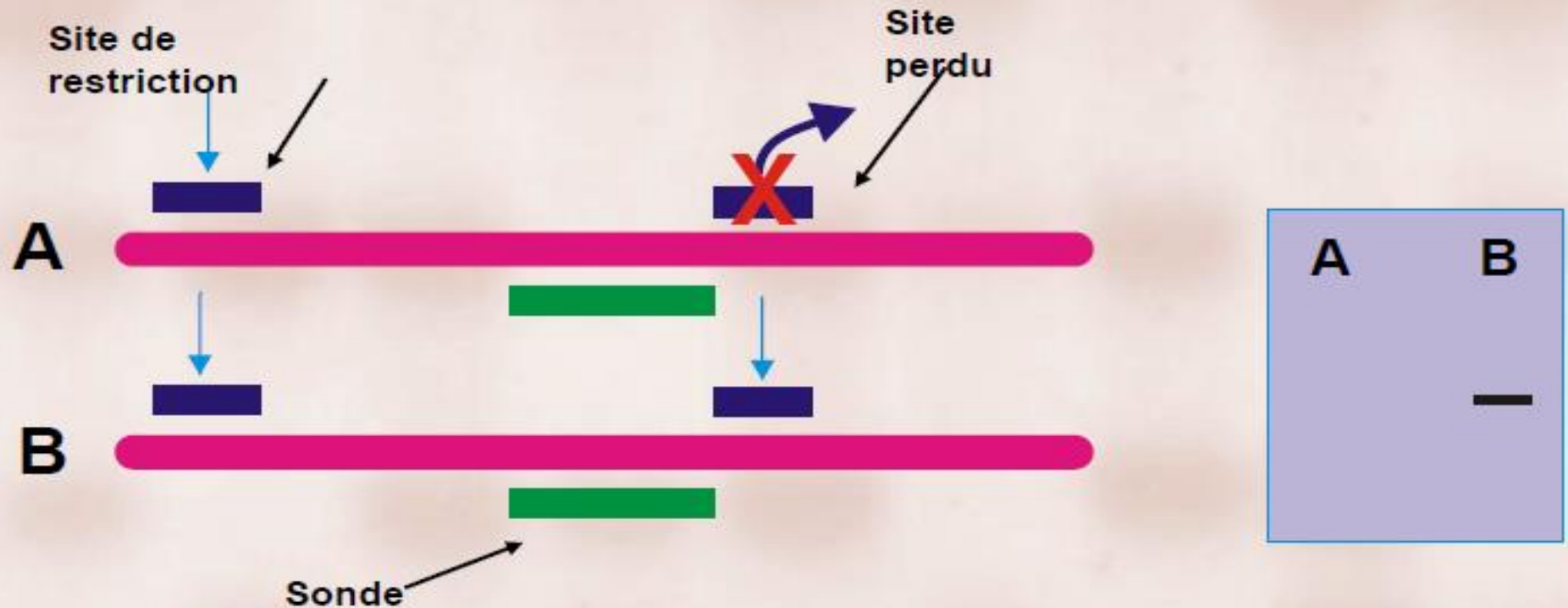
Un des sites de restriction flanquants est changé ou perdu par mutation ou délétion. En conséquence, le fragment de restriction est modifié



RFLP

Interprétation des profils RFLP (5)

Un des sites de restriction flanquants est changé ou perdu par mutation ou délétion. En conséquence, le fragment de restriction est modifié





RFLP

Avantages des RFLP

- Méthodologie très robuste, bien transférable entre laboratoires
- Hérité de façon codominante et, de ce fait, permet d'estimer l'hétérozygotie
- Pas d'information de séquence requise
- Puisque basée sur une homologie de séquence, fortement recommandée pour des analyses phylogénétiques entre espèces apparentées
- Bien adaptée pour la construction de cartes de liaison génétique



RFLP

Avantages des RFLP

- Marqueurs spécifiques de locus, ce qui permet des études de syntenie
- Pouvoir discriminant - au niveau de l'espèce ou de la population (sondes simple copie), ou au niveau individuel (sondes multicopies)
- Simplicité - à condition d'avoir des sondes adaptées
- disponibles, la technique peut facilement être appliquée à n'importe quelle plante



RFLP

Inconvénients des RFLP

- **Grandes quantités d'ADN nécessaires**
- **Automatisation impossible**
- **Faible niveau de polymorphisme chez certaines espèces**
- **Peu de locus sont détectés par expérimentation**
- **Nécessite une banque de sondes appropriée**
- **Consommateur en temps, spécialement avec des sondes**
- **simple-copie**



RFLP

Inconvénients des RFLP

- Coûteux
- Nécessite la distribution de sondes entre des laboratoires en collaboration
- Technicité demandée modérée
- Peut nécessiter différentes combinaisons sonde / enzyme



AFLP

Amplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism

Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés



AFLP

Principales caractéristiques:

- Une combinaison des technologies RFLP et PCR
- Basée sur l'amplification sélective par PCR de fragments de restriction d'un ADN digéré
- Méthode extrêmement sensible pour réaliser une empreinte génétique sur un ADN de n'importe quelle origine et complexité.
- Peut être réalisée avec de l'ADN génomique total ou des ADNc ('transcript profiling')



AFLP

Quatre étapes:

- L'ADN est digéré par deux enzymes de restriction différentes
- Des adaptateurs oligonucléotidiques sont liés aux extrémités des fragments d'ADN
- Des sous-ensembles spécifiques des produits de digestion de l'ADN sont amplifiés, en utilisant des combinaisons d'amorces sélectives
- La détection du polymorphisme se fait avec des radioisotopes, des sondes fluorescentes ou une coloration à l'argent.

AFLP

Digestion de l'ADN et ligation:

- L'une des enzymes de restriction coupe fréquemment l'ADN (site de reconnaissance de 4 bases, p.e. MseI)
- La seconde enzyme de restriction coupe peu fréquemment l'ADN (site de reconnaissance de 6 bases, p.e. EcoRI)
- Des adaptateurs double-brin synthétiques, spécifiques de chaque site de restriction, sont attachés aux fragments d'ADN générés

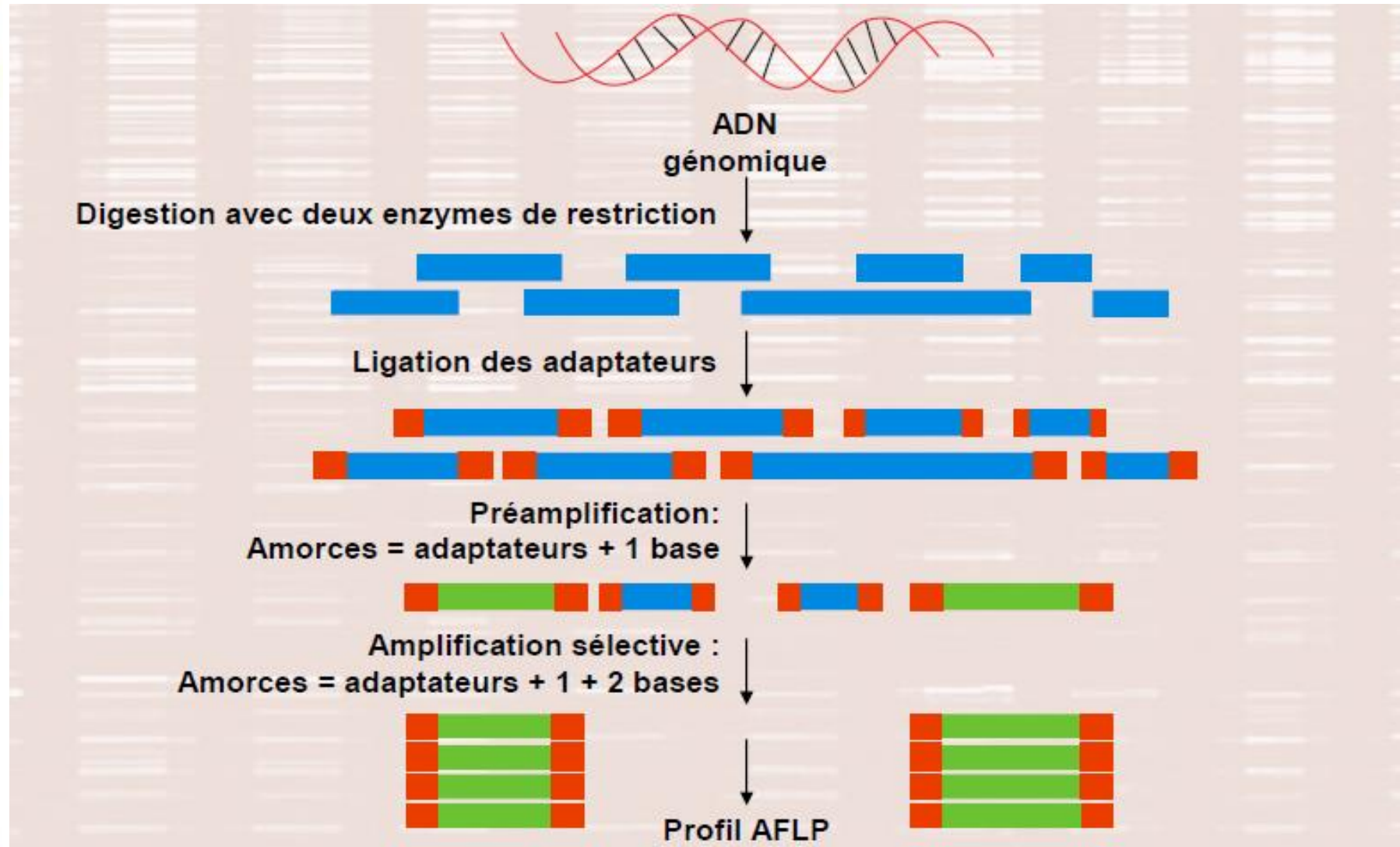
AFLP

PCR et détection:

- Une première PCR (pré-sélective) est réalisée, en utilisant des amorces oligonucléotidiques complémentaires des adaptateurs et sites de restriction. Un nucléotide est ajouté aux amorces pour sélectionner seulement un sous-ensemble de fragments.
- Les produits d'amplification pré-sélective sont soumis à une autre PCR, et ainsi un sous ensemble de ces fragments est sélectionné. Généralement, pour la seconde amplification sélective, deux nucléotides supplémentaires sont ajoutés aux amorces.
- Les fragments sont séparés par électrophorèse sur polyacrylamide ("gels de séquence") ou électrophorèse capillaire,

AFLP

Résumé de la technologie:





AFLP

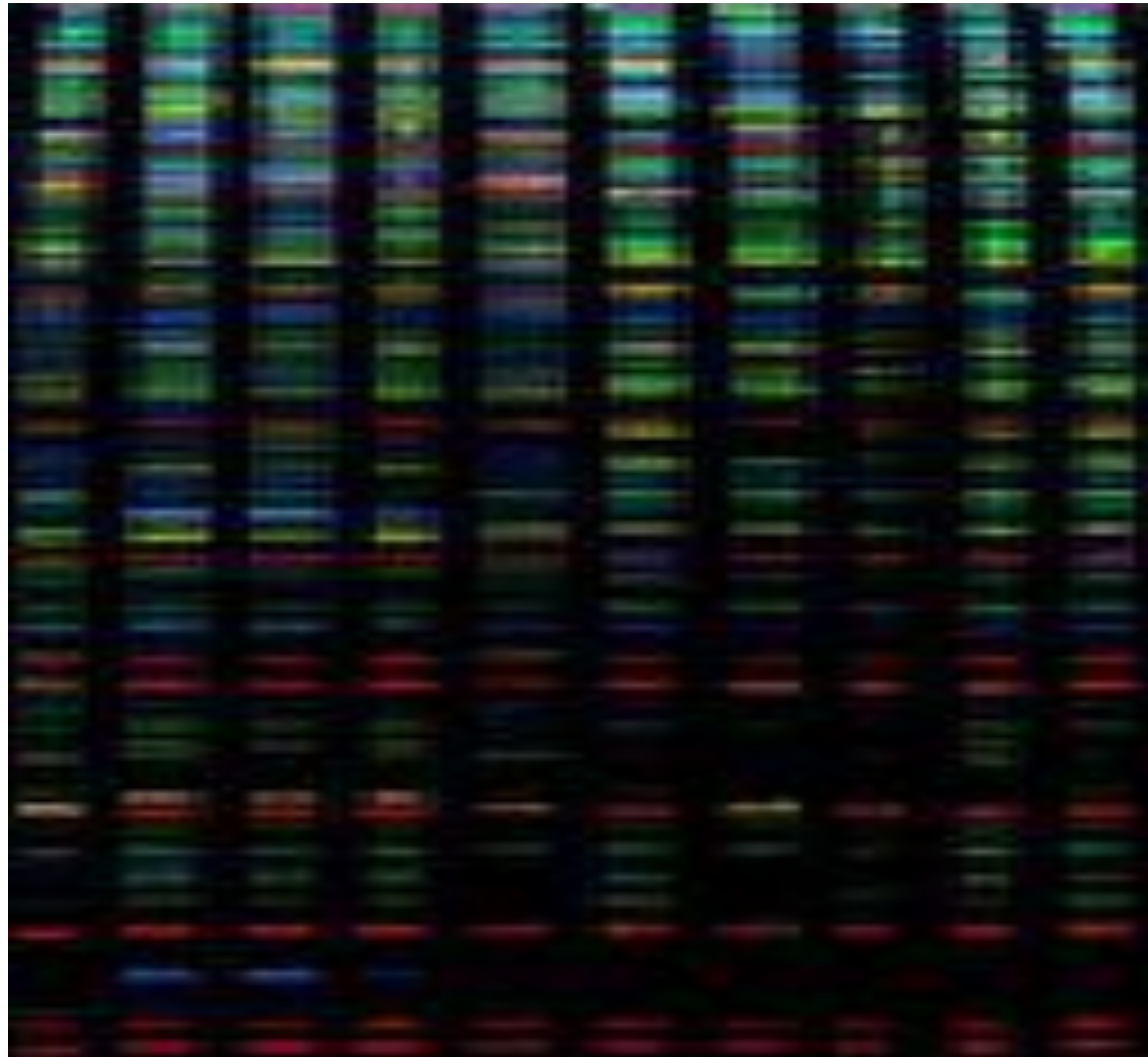
Interprétation des bandes AFLP:

La technique AFLP détecte des polymorphismes qui résultent de changements (présence ou taille) dans les sites de restriction ou adjacents à ces sites

- Différentes enzymes de restriction peuvent être utilisées, et différentes combinaisons de nucléotides pré-sélectifs et sélectifs vont augmenter la probabilité de trouver des polymorphismes utiles
- Plus on ajoute de bases sélectives, moins on détectera de polymorphisme
- Les bandes sont généralement codées comme présentes ou absentes
- Des bandes hétérozygotes peuvent être détectées comparativement à des homozygotes, sur la base de l'épaisseur du signal, mais c'est un peu compliqué

AFLP

Un profil AFLP avec marqueurs fluorescents:



AFLP

Avantages des AFLP:

- Les AFLP permettent le balayage rapide du génome complet pour identifier des polymorphismes
- A cause du grand nombre de bandes générées, chaque marqueur donne une empreinte génétique très informative
- Ils sont aussi extrêmement reproductibles
- Aucune information préalable de séquence ou génération de sonde ne sont nécessaires
- Extrêmement utile pour créer rapidement des cartes génétiques
- Il est possible d'obtenir des profils de transcrits ("Transcript profiling")



AFLP

Inconvénients des AFLP:

- Les AFLP génèrent des quantités énormes d'informations qui peuvent nécessiter des analyses automatisées, et pour cela des technologies informatiques.
- Les marqueurs AFLP sont des marqueurs dominants
- En cartographie génétique, les marqueurs AFLP se regroupent souvent au niveau des centromères et télomères
- Ils demandent une technicité élevée dans le laboratoire, et tout particulièrement dans l'analyse des résultats



Microsatellites (SSR)

Simple Sequence Repeat (SSR).



Microsatellites (SSR)

Les microsatellites sont aussi appelés *sequence repeats* (SSRs) et, occasionnellement, *sequence tagged microsatellite sites* (STMS) ou *simple sequence repeat polymorphisms* (SSRPs).



Microsatellites (SSR)

Les SSR sont de courtes répétitions en tandem, de longueur entre 1 et 10 pb, typiquement 2 ou 3 pb.

Les SSR sont très variables et distribués régulièrement le long du génome. Ce type d'ADN répété est commun chez les eucaryotes, le nombre d'unités répétées variant largement parmi les organismes, allant jusqu'à 50 copies de l'unité répétée.

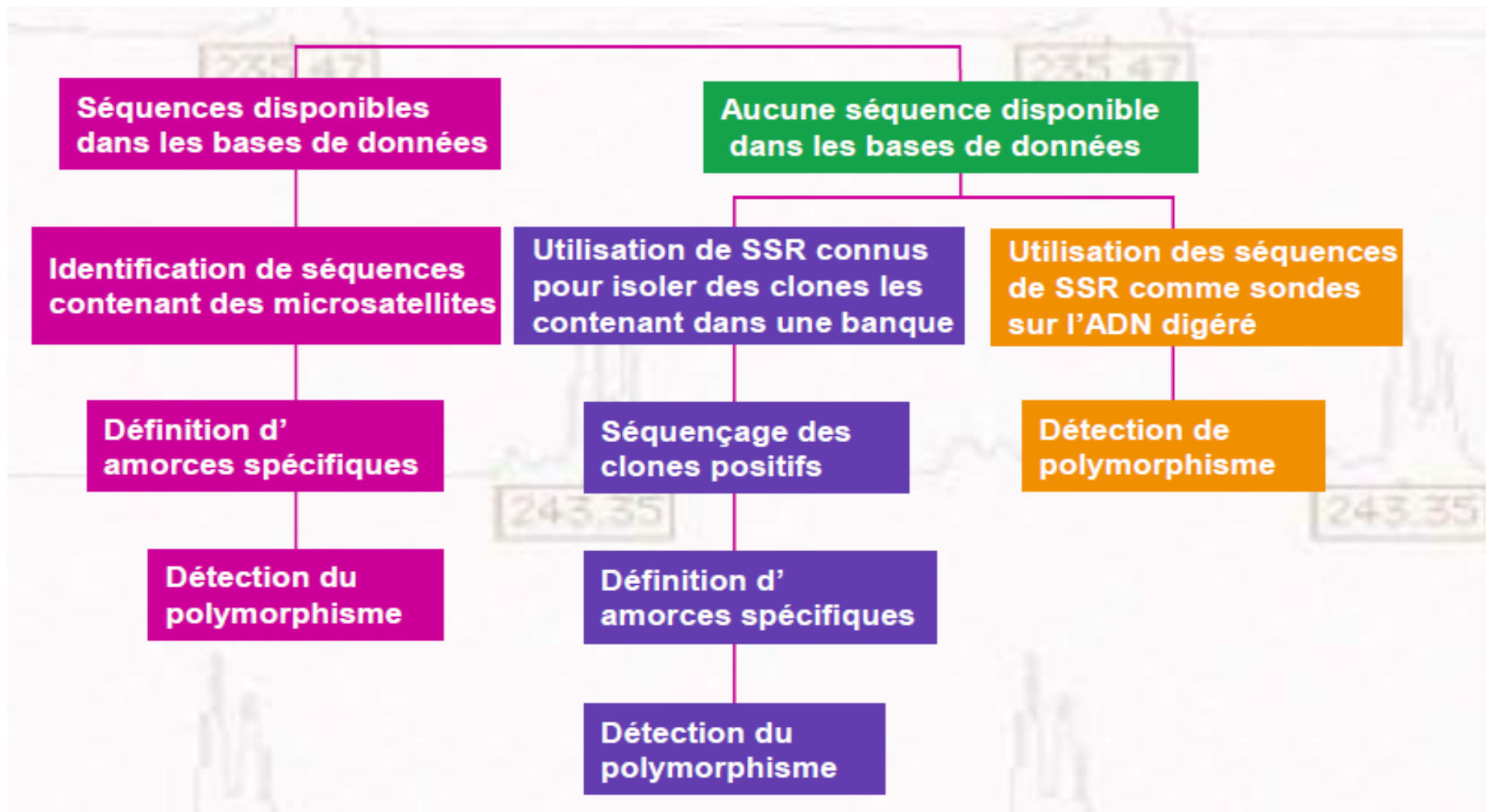


Microsatellites (SSR)

Ces polymorphismes sont identifiés en construisant des amorces PCR dans la région adjacente de la région microsatellite. Ces régions flanquantes tendent à être conservées à l'intérieur de l'espèce, bien que parfois ils puissent être conservés entre groupes taxonomiques plus distants.

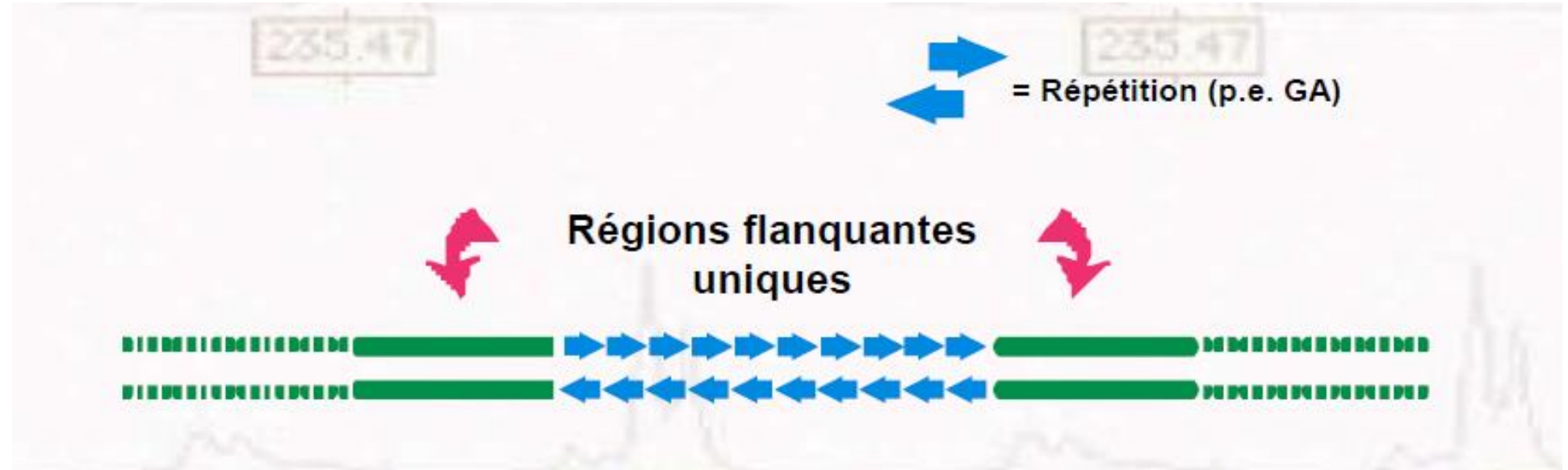
Microsatellites (SSR)

Identification des régions microsatellites

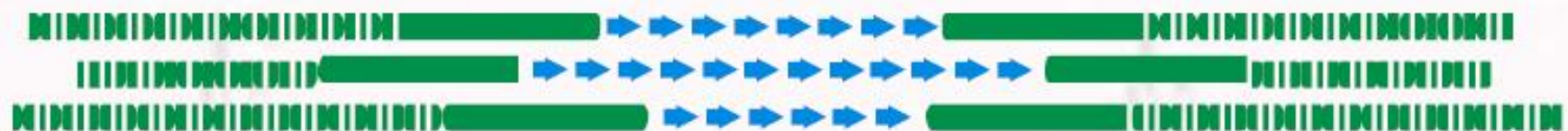


Microsatellites (SSR)

Structure




- ▶ Le nombre de répétitions est très variable entre individus



Microsatellites (SSR)

Sélection des amorces

- ▶ On définit des amorces ( ) complémentaires des régions flanquantes





Microsatellites (SSR)

Methodologie et visualisation

➤ Méthodologie:

- Extraction d'ADN
- PCR avec des amorces spécifiques des régions flanquantes
- Séparation des fragments

➤ Visualisation:

- Par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium et lumière UV, ou
- Gels d'acrylamide et coloration à l'argent ou utilisation de radioisotopes, ou
- Par l'intermédiaire de séquenceurs automatiques, en utilisant des amorces marquées préalablement avec des fluorophores

➤ Analyse des données



Microsatellites (SSR)

Avantages et inconvénients

➤ Avantages:

- Requièrent très peu d'ADN et pas forcément de bonne qualité
- Extrêmement polymorphes
- Répartis régulièrement dans le génome
- Interprétation des résultats simple
- Facilement automatisé, permettant le multiplexage
- Bonne résolution analytique et forte reproductibilité

➤ Inconvénients:

- Procédure de découverte complexe
- Coûteux



ISSR

Amplification intermicrosatellite (Intersimple sequence repeats: ISSR)

- Ce sont les régions présentes entre les répétitions microsatellites
- La technique est basée sur l'amplification par PCR des séquences intermicrosatellite
- Du fait de l'abondance connue des séquences répétées réparties sur tout le génome, elle cible de multiples locus



ISSR

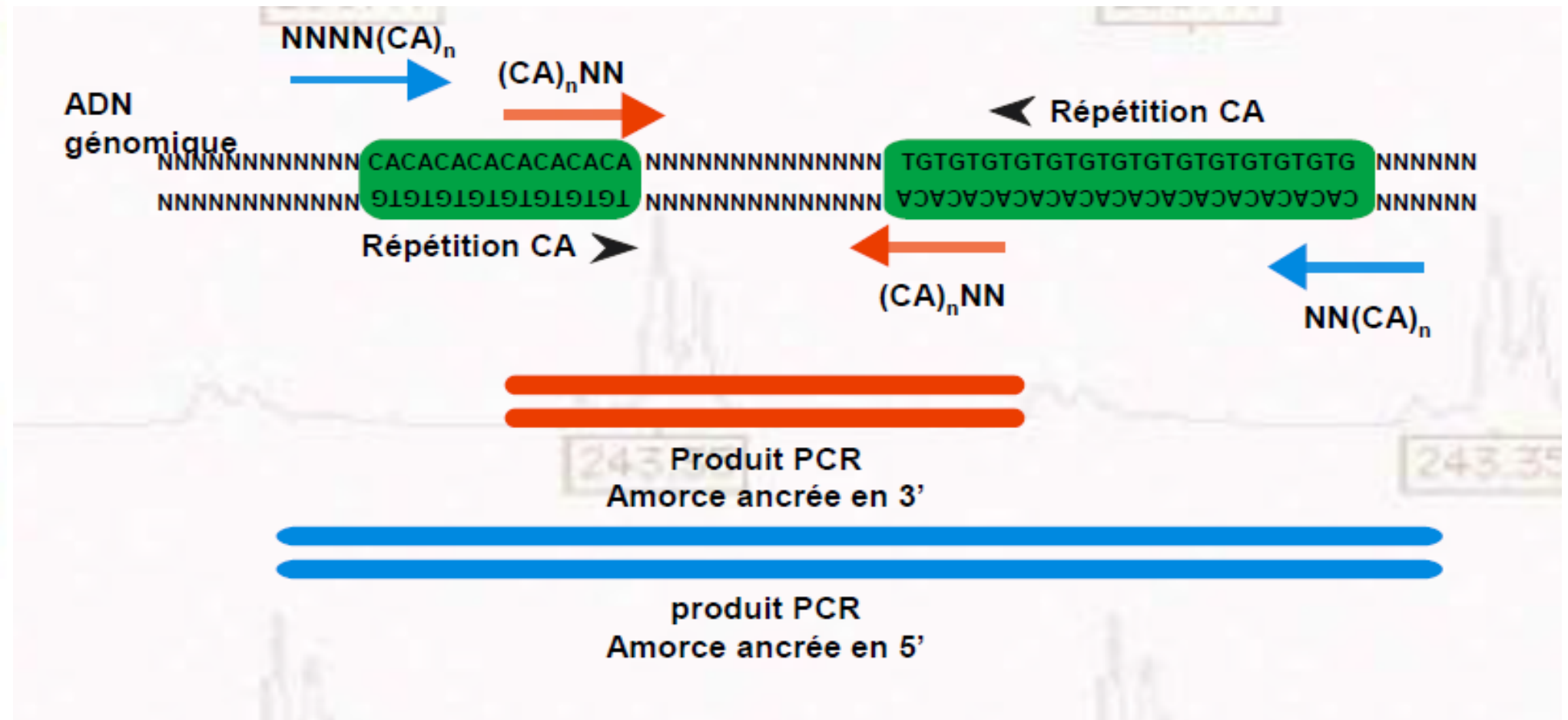
Identification des polymorphismes ISSR

On réalise une PCR type, dans laquelle les amorces ont été définies à partir des séquences répétées des microsatellites, augmentées d'une ou plusieurs bases dans la séquence flanquante comme point d'ancrage. Différentes alternatives sont possibles:

- Une seule amorce est utilisée
- Deux amorces avec des caractéristiques similaires sont utilisées
- Des combinaisons de séquences microsatellite ancrées avec une amorce aléatoire (p.e. Celles utilisées pour les RAPD)

ISSR

Définition des amorces pour identifier du polymorphisme ISSR





ISSR

Avantages et inconvénients

➤ Avantages:

- Ne requiert pas d'information de séquence préalable
- On peut trouver simultanément de la variation à plusieurs locus, dans des régions uniques du génome
- Tend à identifier des niveaux de variation significatifs
- Spécifique des séquences microsatellites
- Très utile pour caractériser des profils d'ADN, surtout pour des espèces très proches

➤ Inconvénients:

- Marqueurs dominants
- Peut nécessiter une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et une détection avec coloration à l'argent ou des radioisotopes.