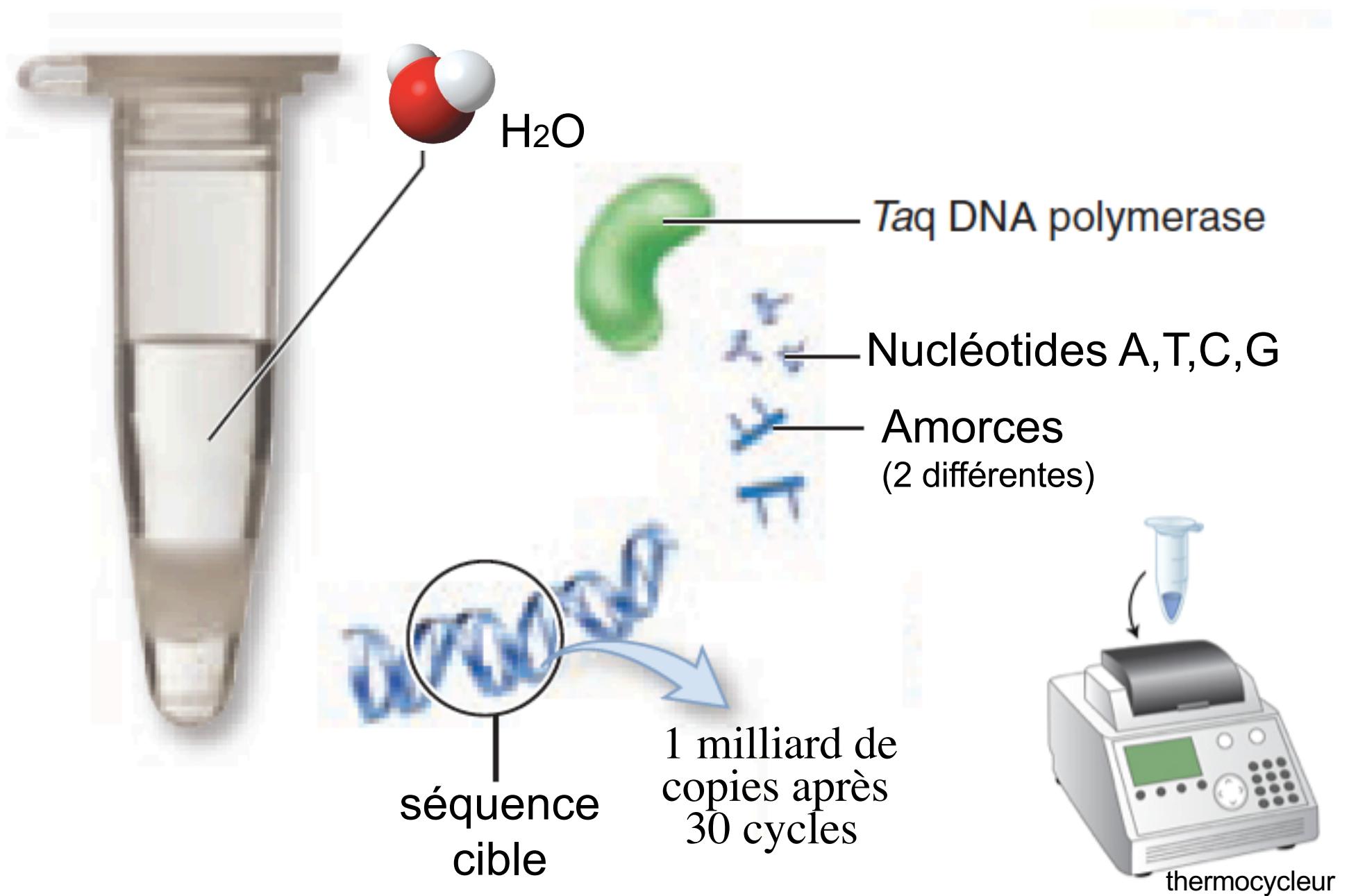


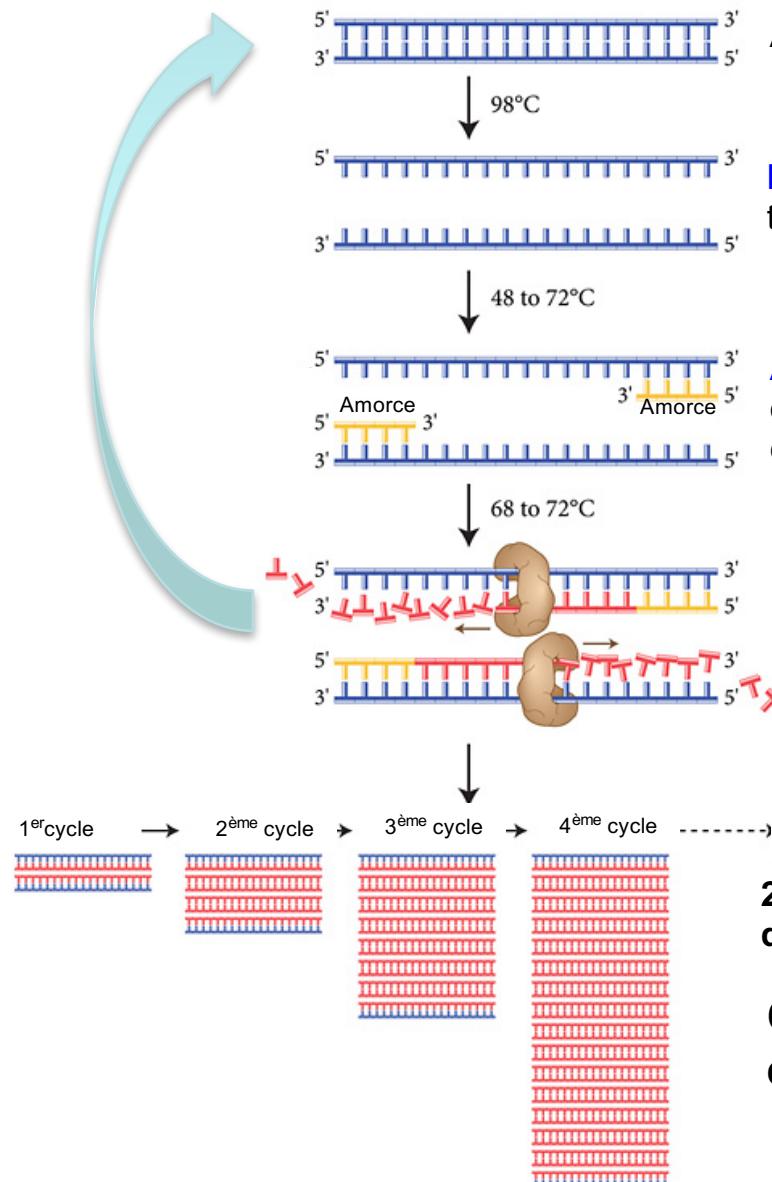
# Les ingrédients d'une PCR :



# La PCR (polymerase chain reaction)



thermocycleur



ADN double brin à amplifier

**Dénaturation:** en augmentant la température, on casse les ponts hydrogène

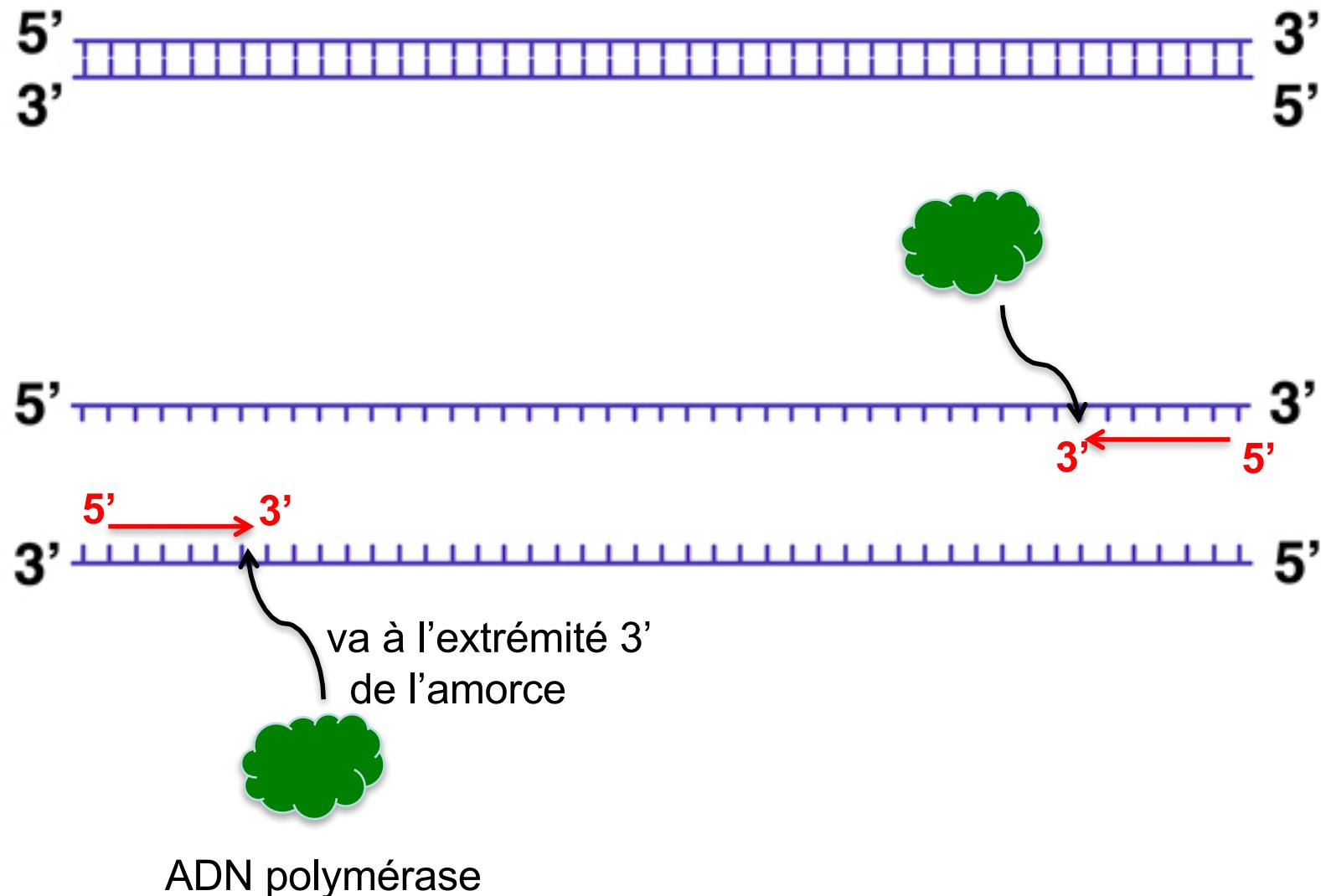
**Annealing:** on diminue la température afin que les amores se lient aux séquences complémentaires

**Extension:** l'ADN polymérase allonge les chaines d'ADN à partir des amores

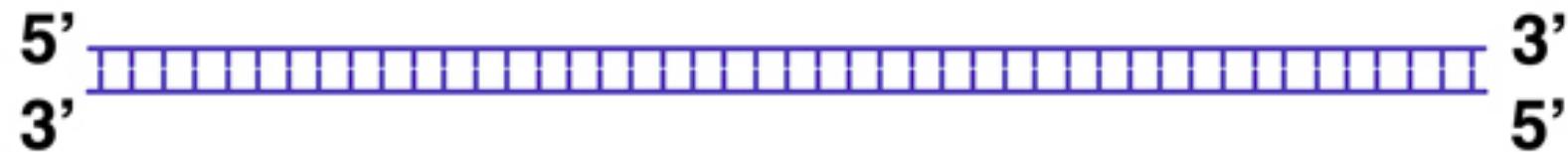
$2^{30} = 1$  milliards de copies d'ADN double brin

**C'est une amplification exponentielle !**

# Amorces correctes pour un P C R :

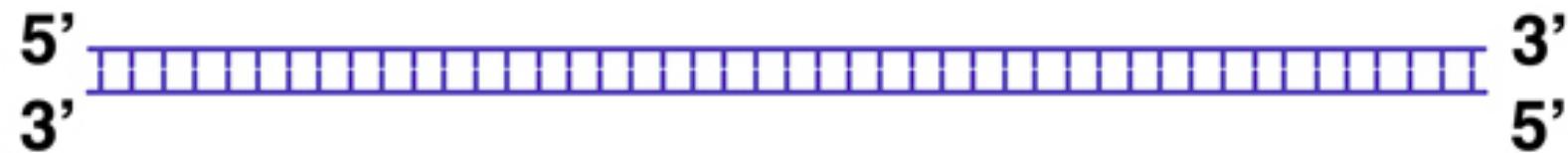


## Amorces **incorrectes** pour un P C R :



Amorces divergentes : 30 copies en 30 cycles

## Amorces **incorrectes** pour un P C R :



Amorces sur le même brin : 30 copies en 30 cycles

# RéPLICATION de l'ADN :

la copie est-elle identique à l'original ?

Les DNA polymérases ont des problèmes quand elles copient des séquences répétitives en tandem (**microsatellites**).

Applications pratiques : science forensique

## Erreurs durant la réplication de l'ADN :

Un bout de séquence d'un chromosome 7 humain :

10 20 30 40 50  
TGTCATAGTTAGAACGAACTAACGATAGATAGATAGATAGATAGATAGA  
60 70 80 90 100  
TAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGATTGATAGTTTTTTTTATCTCA  
110 120 130 140 150  
CTAAATAGTCTATAGTAAACATTAAATTACCAATATTGGTGCAATTCTG  
160 170 180 190 200  
TCAATGAGGATAAAATGTGGAATCGTTATAATTCTTAAGAATATATATTCC  
210 220  
CTCTGAGTTTGATACCTCAG

$\hookrightarrow c 10^{-9}$

Remarquez l'unité :  
mutation par génération

Transmission parent → enfant :

- Changement d'une base :  $10^{-9}$
- addition d'un GATA ou soustraction d'un GATA :  $10^{-3}$

# Microsatellites / STR

## Un bout de séquence d'un chromosome 7 humain :

10 20 30 40 50  
 TGTCATAGTTAGAACGAACTAACGATAGATAGATAGATAGATAGATAGA  
 60 70 80 90 100  
 TAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGATTGATAGTTTTTTTATCTCA  
 110 120 130 140 150  
 CTAAATAGTCTATAGTAAACATTAAATTACCAATATTGGTGCAATTCTG  
 160 170 180 190 200  
 TCAATGAGGATAAAATGTGGAATCGTTATAATTCTTAAGAATATATATTCC  
 210 220  
 CTCTGAGTTTTGATAACCTCAG

12 éléments sur cette séquence : (GATA)<sub>12</sub>

Les DNA polymérasées peinent à copier correctement les microsatellites.

## Variations génétiques entre individus d'une même espèce

## Genome Variation

SSR

## Short Sequence Repeats

# STR = microsatellites

## **Allele 1** (CA)**13**

## Allele 2 (CA)<sub>16</sub>

## Allele 3 (CA)7

Unité répétée : 1 base

p. ex. CCCCCCCC

2 bases  
etc

# Variations génétiques entre individus d'une même espèce

## Genome Variation

### SNP

### Single Nucleotide Polymorphism

ACCGCTGGAGACCTGACCTGACACGTGCTAGCTAGCTCTCGAGACCTAGGGCTCTGATATAGCTCGGACACACAGATATAGCGCTCCCTGAAACAGCTCGACACAGCTCGACACCGCTCGAGACCTGACCTGACACGTGCTAGCTAGCTCTCGAGACGTAGGGCTCTCGATATAGCTCGGACACACAGATATAGCGCTCCCTGAAACAGCTCCGACACAGCTCGACACCGCTCGAGACCTGACCTGACACGTGCTAGCTAGCTCTCGA

GACGTAGGGCTCTGATATAGCTCGGACACACAGATATAGCGCTCCCTGAAACAGCTCGACACAGCTCGACACCGCTCGAGACCTGACCTGACACGTGCTAGCTAGCTCTCTCGAGACCGTCAAGGGCTCTCGATATAGCTCGGACACACAGATATAGCGCTCCCTGAAACAGCTCCGACACAGCTCGACACCGCTCGAGACCTGACCTGACACGTGCTAGCTAGCTCTCGA

### Allele 1

ACCGCTGGAGACCTGACCTGACACGTGCTAGCTAGCTCTCTCGAGACGTAGGGCTCTGATATAGCTCGGACACACAGATATAGCGCTCCCTGAAACAGCTCGACACAGCTCGACACCGCTCGAGACCTGACCTGACACGTGCTAGCTAGCTCTCTCGAGACGTAGGGCTCTCGATATAGCTCGGACACACAGATATAGCGCTCCCTGAAACAGCTCCGACACAGCTCGACACCGCTCGAGACCTGACCTGACACGTGCTAGCTAGCTCTCTCGA

ATAGCGCTCCCTGAAACAGCTCGACACAGCTCGACACCCGCTCGAGACCTGACCTGACACGTGCTAGCTAGCTCTCTCGAGACCGTCAAGGGCTCTCGATATAGCTCGGACACACAGATATAGCGCTCCCTGAAACAGCTCCGACACAGCTCGACACCCGCTCGAGACCTGACCTGACACGTGCTAGCTAGCTCTCTCGA

### Allele 2

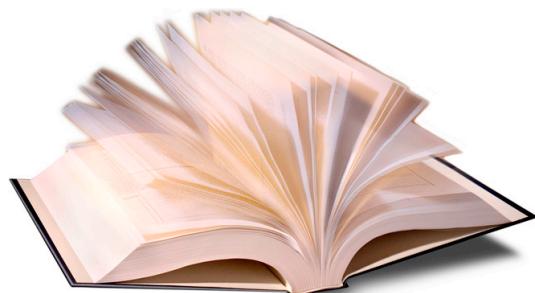
Différences entre 2 humains :  
en moyenne 1 différence de base toutes les 1'000 bases

Différences entre un humain et un chimpanzé :  
En moyenne 1 différence de base toutes les 100 bases

## La PCR c'est comme

si on faisait 1 milliard de photocopies  
de la page 345 d'un livre

Génome  
paternel



**12 GATA**

Génome  
maternel



**14 GATA**

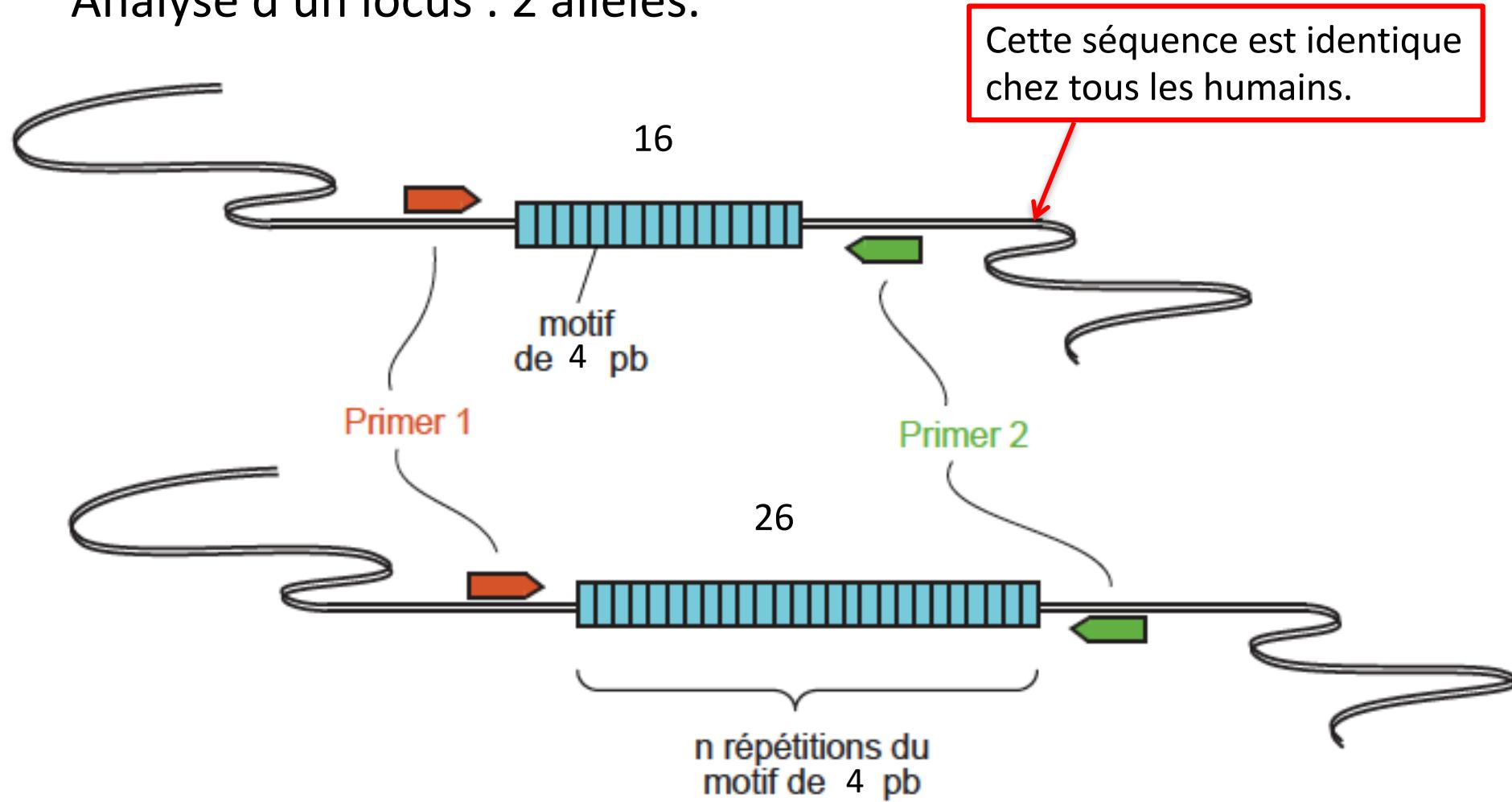


Le nombre de copies produites par PCR double à chaque cycle :

30 cycles  $\rightarrow 2^{30} \approx 10^9$  copies ( $2^{10} \approx 10^3$ )

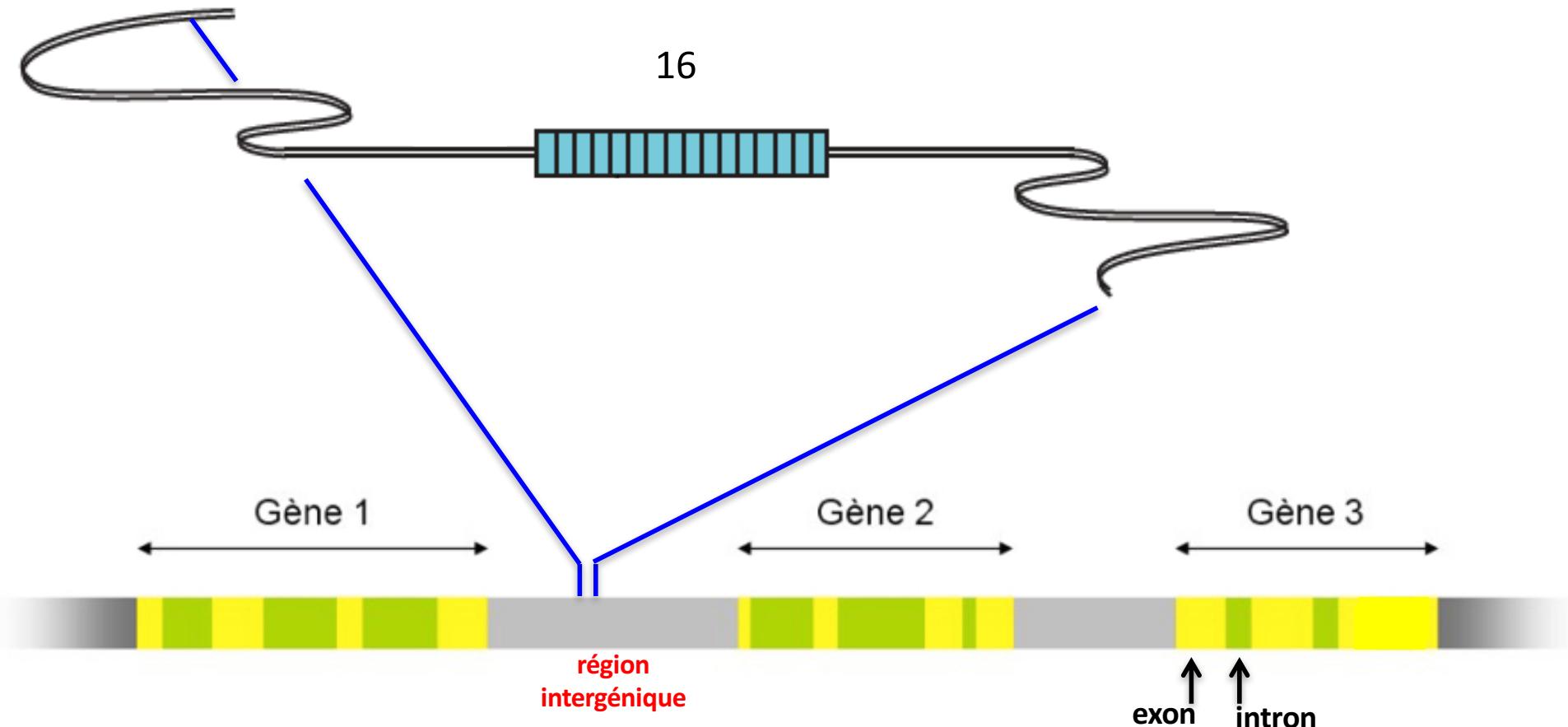
# Analyse de microsatellites par PCR

Analyse d'un locus : 2 allèles.



Cette personne est hétérozygote 16 / 26

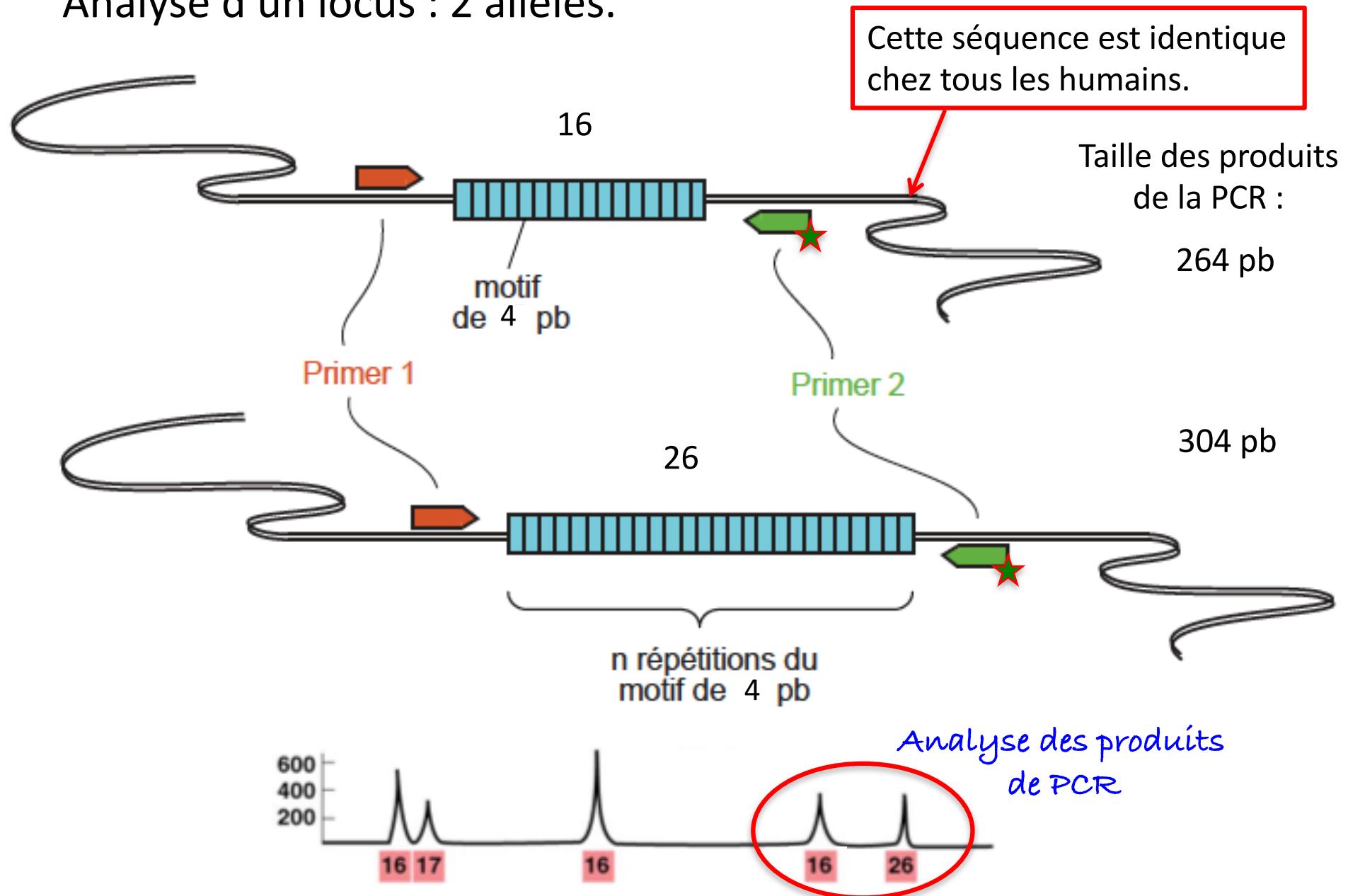
# Analyse de microsatellites par PCR



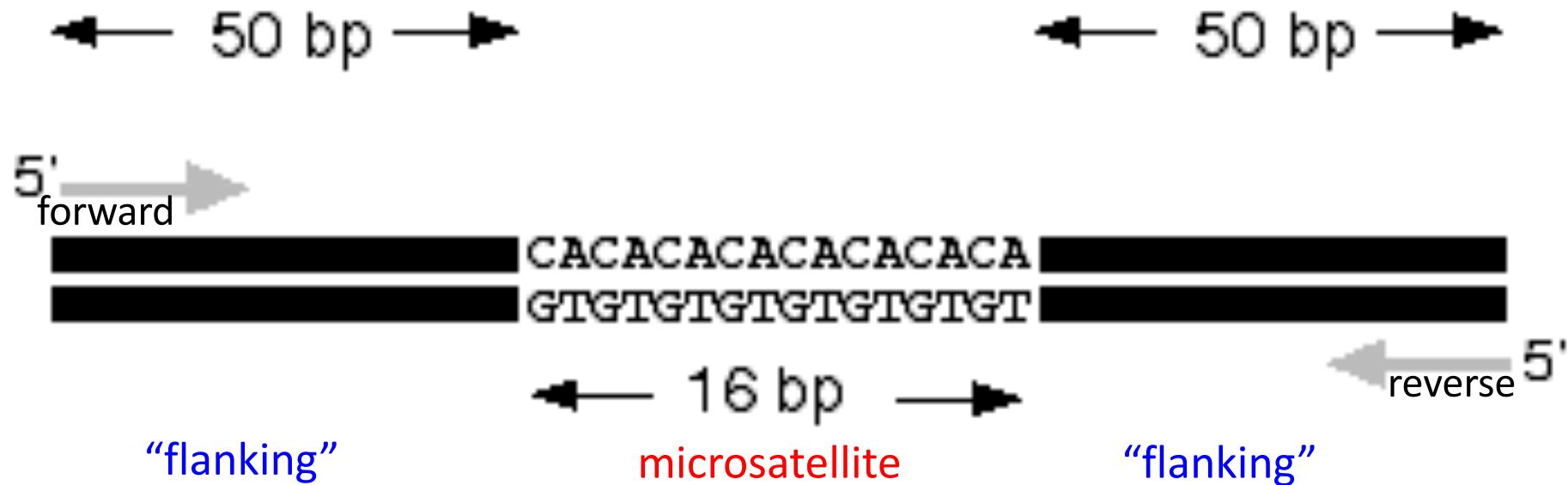
Pour le profil ADN on analyse des microsatellites sans importance fonctionnelle, situés entre les gènes, dans l'ADN « junk ».

# Analyse de microsatellites par PCR

Analyse d'un locus : 2 allèles.



# La *taille* [pb] du produit d'amplification est convertie en *nombre* de répétitions

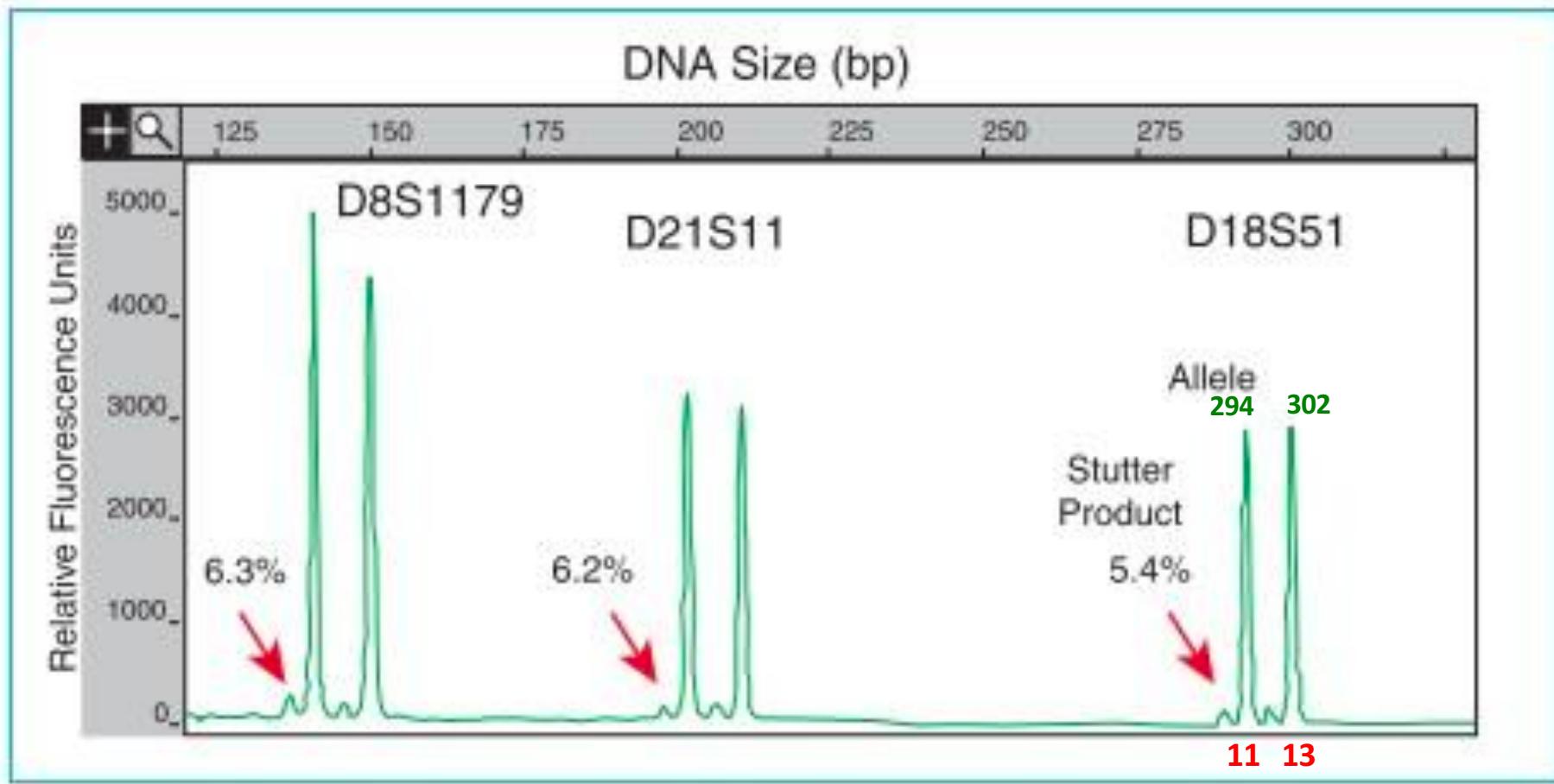


Les régions adjacentes au microsatellite sont invariantes : 100 pb chez tous. L'expérimentateur choisit la longueur des 2 séquences constantes incluses dans la PCR.

Un produit de 116 pb contient donc un microsatellite de 16 pb soit 8 répétitions de CA.

# Analyse de 3 loci :

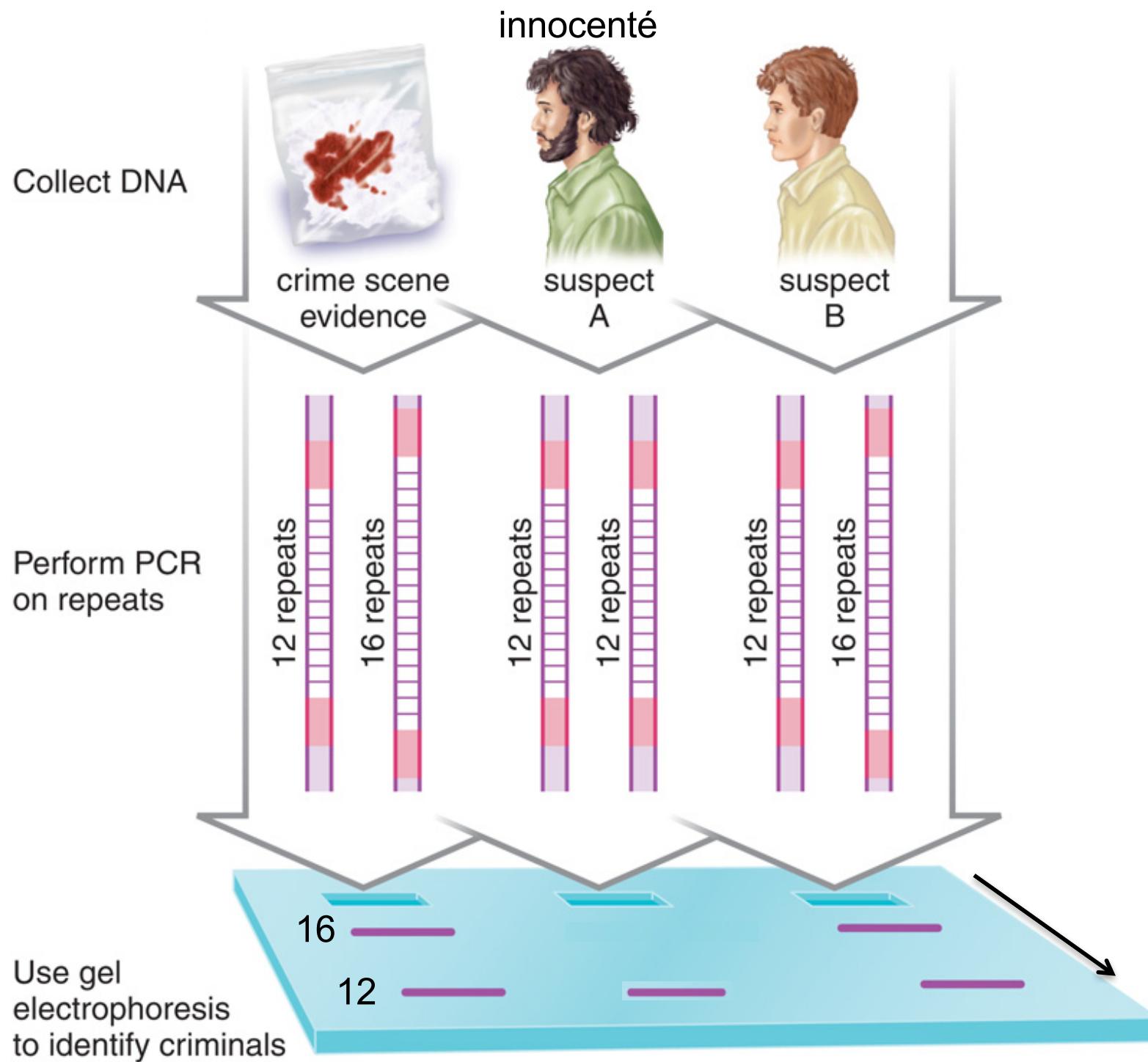
Mesure de la **taille** des produits de la PCR



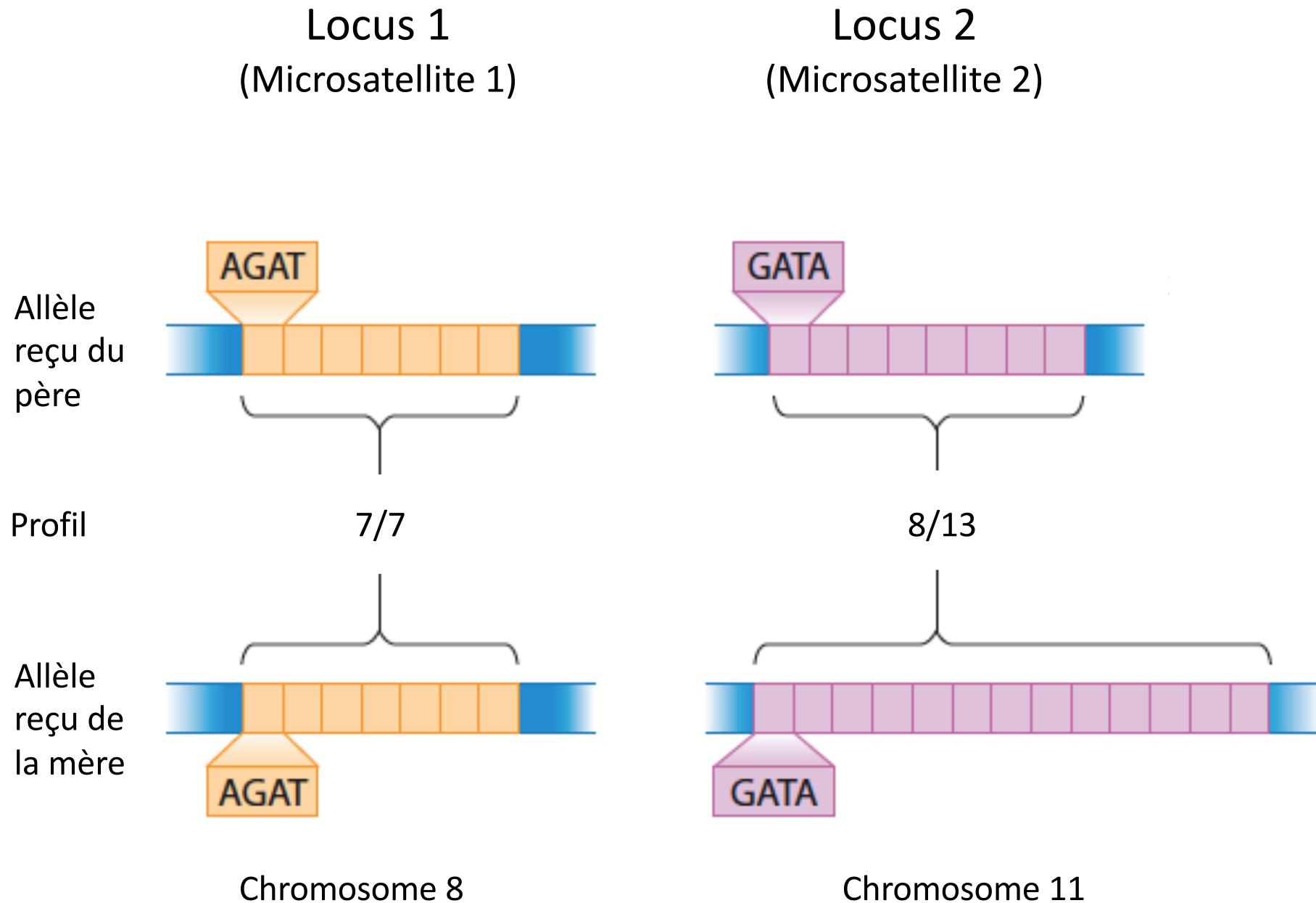
Stutter = bégaiement

$$250 + 44 (4 \times 11) = 294$$

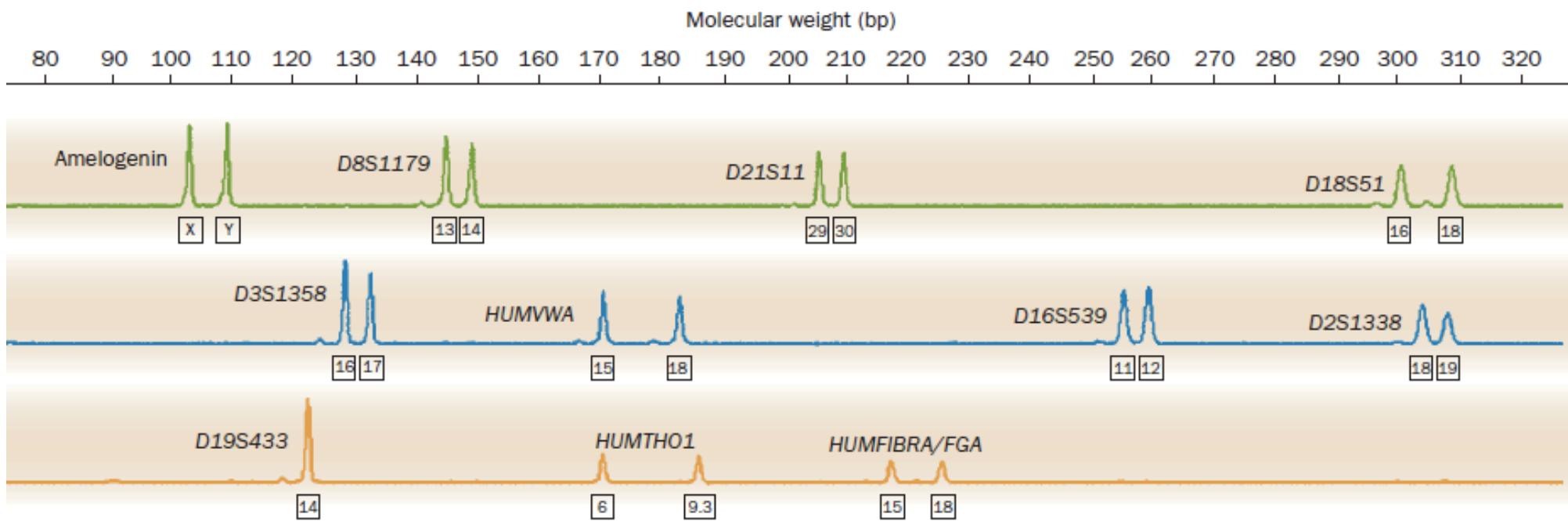
$$250 + 56 (4 \times 13) = 302$$



## Un profil ADN : analyse de 10 loci.



# Un profil ADN conforme à la loi Suisse.



Le profil est stocké dans une banque de donnée informatique sous forme d'une suite de chiffre :

Locus : 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

13/14 29/30 16/18 16/17 15/18 11/12 18/19 14/14 06/9.3 15/18

**Ordonnance du DFJP  
sur les exigences de prestations et de qualité requises  
pour les laboratoires forensiques d'analyse d'ADN  
(Ordonnance du DFJP sur les laboratoires d'analyse d'ADN)**

<sup>5</sup> Les marqueurs génétiques (loci) suivants doivent être analysés selon les découvertes scientifiques les plus récentes:

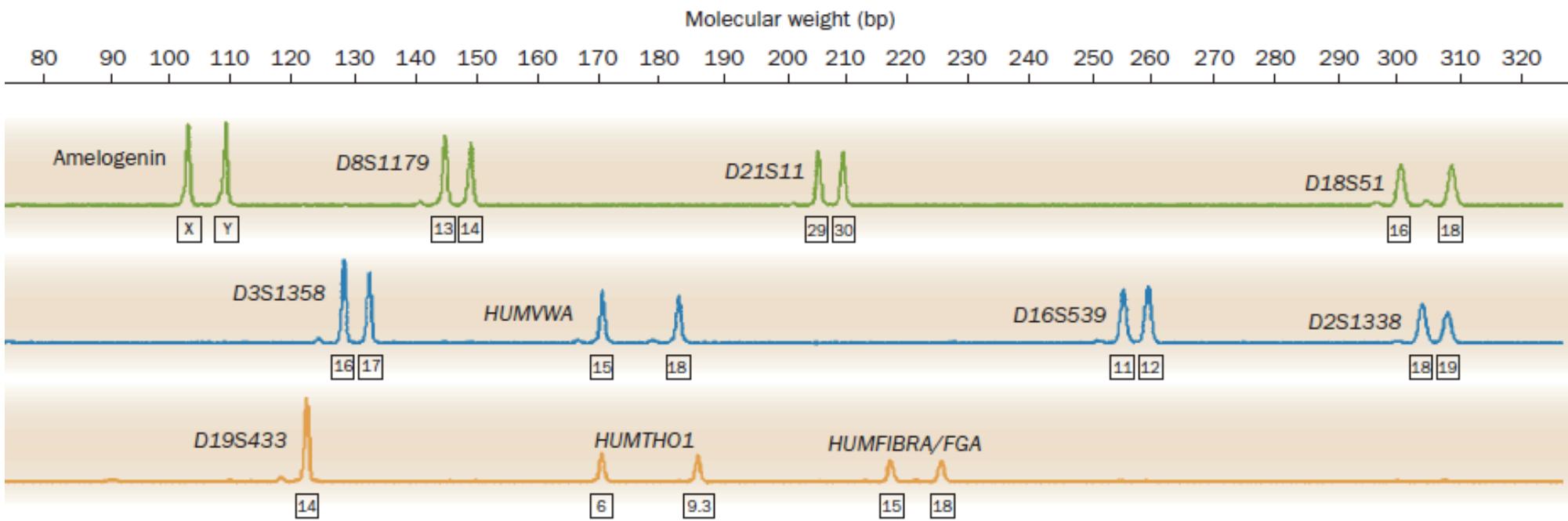
- a. D3S1358;
- b. vWA;
- c. D16S539;
- d. D2S1338;
- e. D8S1179;
- f. D21S11;
- g. D18S51;
- h. D19S433;
- i. TH01;
- j. FGA;
- k. Amélogénine.

**10 microsatellites**

(Il existe des dizaines de milliers de microsatellites dans le génome humain. La loi en désigne 10 pour l'analyse du profil ADN.)

→ Détermination du sexe : XX / XY

## Un profil ADN conforme à la loi Suisse.



2 pics : hétérozygote

1 pic : homozygote

L'homme analysé est hétérozygote à 9 loci et homozygote à un locus.

Cette empreinte est unique à une seule personne.

Exception : jumeaux monozygotes

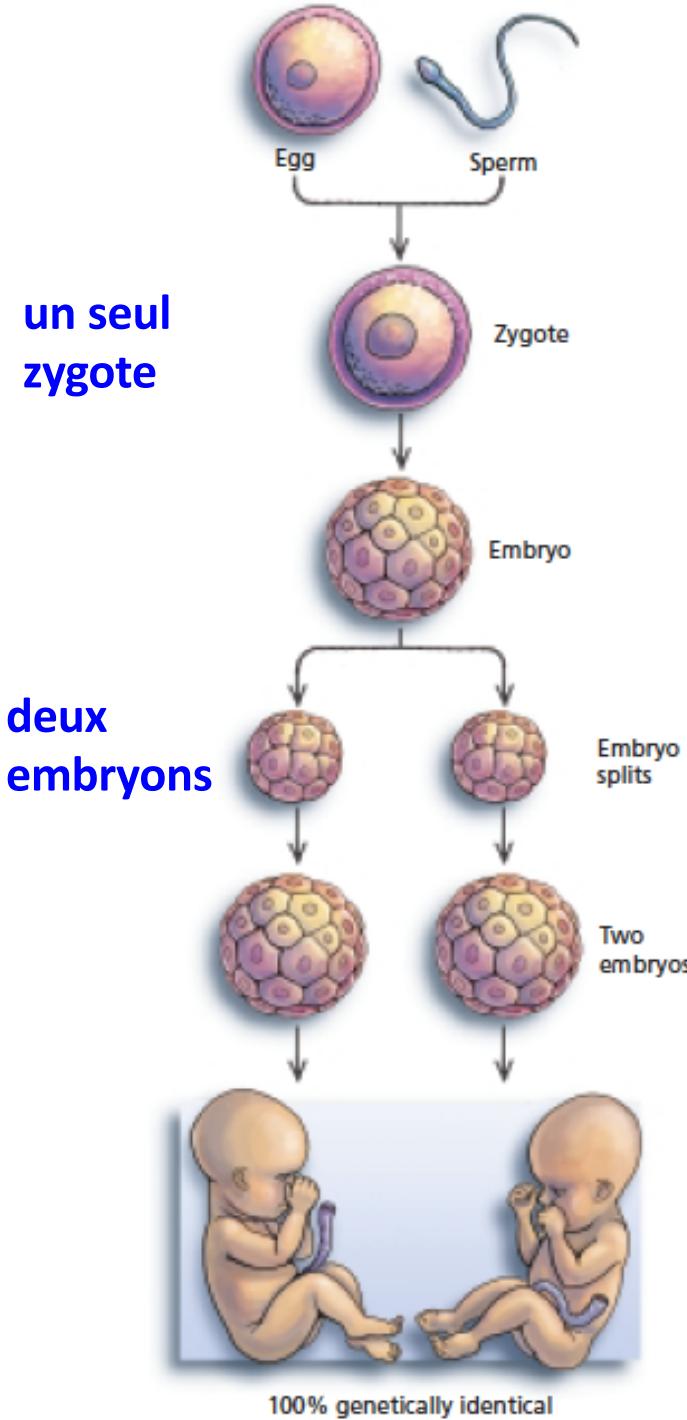
Les “vrais” jumeaux ont le même profil ADN.



Fig\_06-11a *Genetics, Second Edition* © 2005 W.H. Freeman and Company

NB / les empreintes digitales ne sont pas identiques

(a) Monozygotic (identical) twins



# Jumeaux monozygotes

## Jumeaux identiques

## Jumeaux vrais



## Statistique pour la Suisse :

Fin 2007, trois ans après l'entrée en vigueur de la loi sur les profils d'ADN, la banque de données CODIS contenait 92'912 profils de personnes 17'346 traces relevées sur les lieux de délits.

90'000 personnes analysées en 3 ans !!

# L'empreinte ADN ne révèle rien sur la santé d'une personne.

Office fédéral de la police

## La partie non codante de l'ADN

Retour à «[Profils d'ADN](#)»

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est présent dans chaque noyau cellulaire du corps humain. Il est donc possible d'établir des profils d'ADN à partir de la plupart des matériaux biologiques, comme le sang, les tissus, la salive, les os ou le sperme. Toutes les séquences de l'ADN analysées dans le cadre d'une évaluation forensique proviennent de la partie non codante du génome. Cela signifie que les informations enregistrées dans la banque de données ADN ne permettent en aucun cas de connaître les caractéristiques physiques ou psychiques des personnes concernées, ni même d'éventuelles maladies (une exception est possible en cas de trisomie 21).

Les jumeaux univitellins présentent le même profil d'ADN et les analyses d'ADN ne permettent pas de les distinguer l'un de l'autre, ce qui est en revanche possible par leurs empreintes digitales.

univitellins = monozygotes

## L'analyse des microstallites est (semi-)quantitative



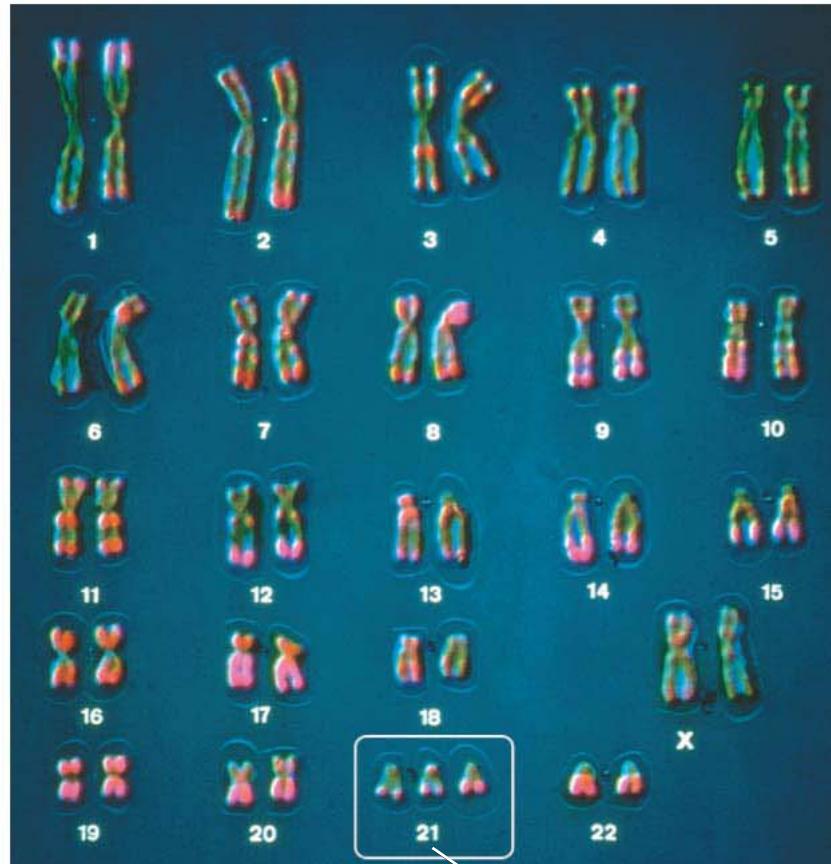
## L'étude des microsatellites permet

1. de déterminer l'origine parentale d'un chromosome surnuméraire
2. de tester la paternité
3. d'identifier une personne (p. ex. un violeur)

**2 et 3 nécessitent de maîtriser le calcul de probabilité**

# La trisomie 21 (syndrome de Down)

LM



Trisomie 21

caryotype



# La trisomie 21 (syndrome de Down)

Profil ADN :

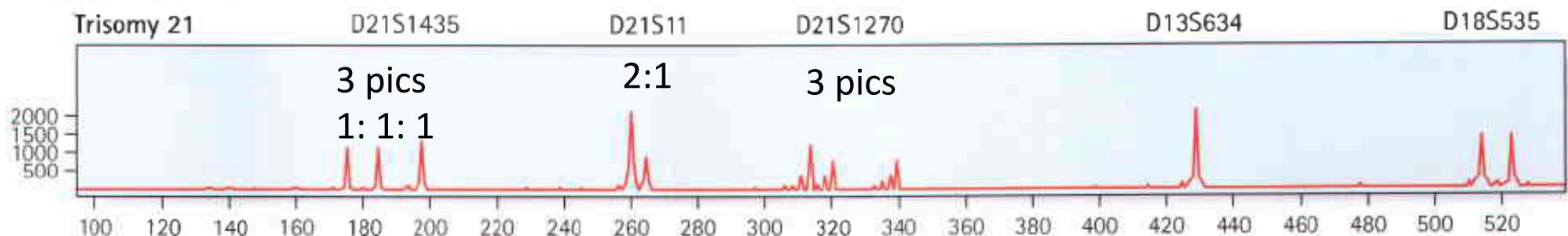
**Microsatellites sur le 21 :**

3 pics 1 : 1 : 1

ou

2 pics 2 : 1

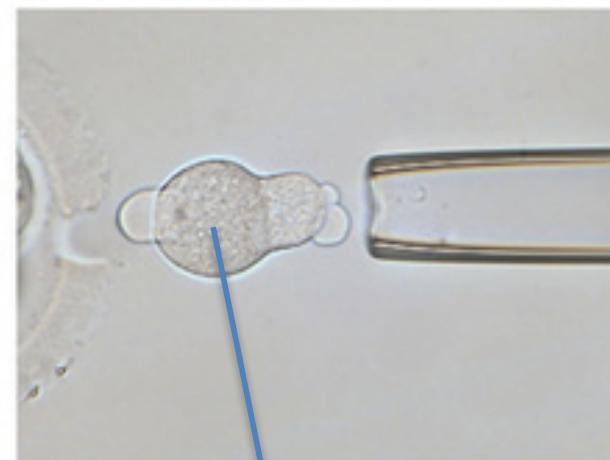
Microsatellites sur les autres chromosomes : sans particularité



DPI :

## Prélèvement d'un blastomère

Cet embryon  
est-il atteint  
par la maladie  
présente dans  
la famille ou  
d'une trisomie?



L'embryon  
poursuit un  
développement  
normal.

analyse de l'ADN par **PCR**

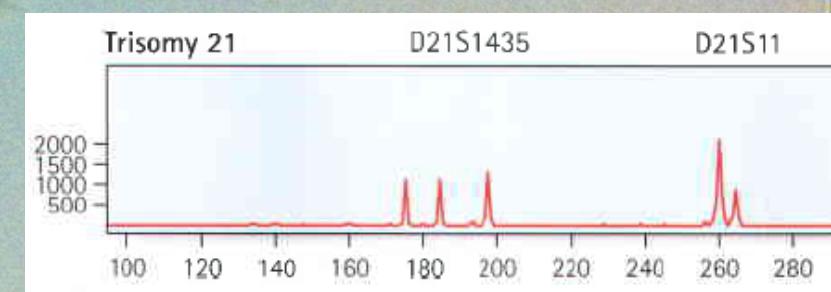
# Diagnostic pré-implantatoire (DPI) :

Morula de  
8 cellules

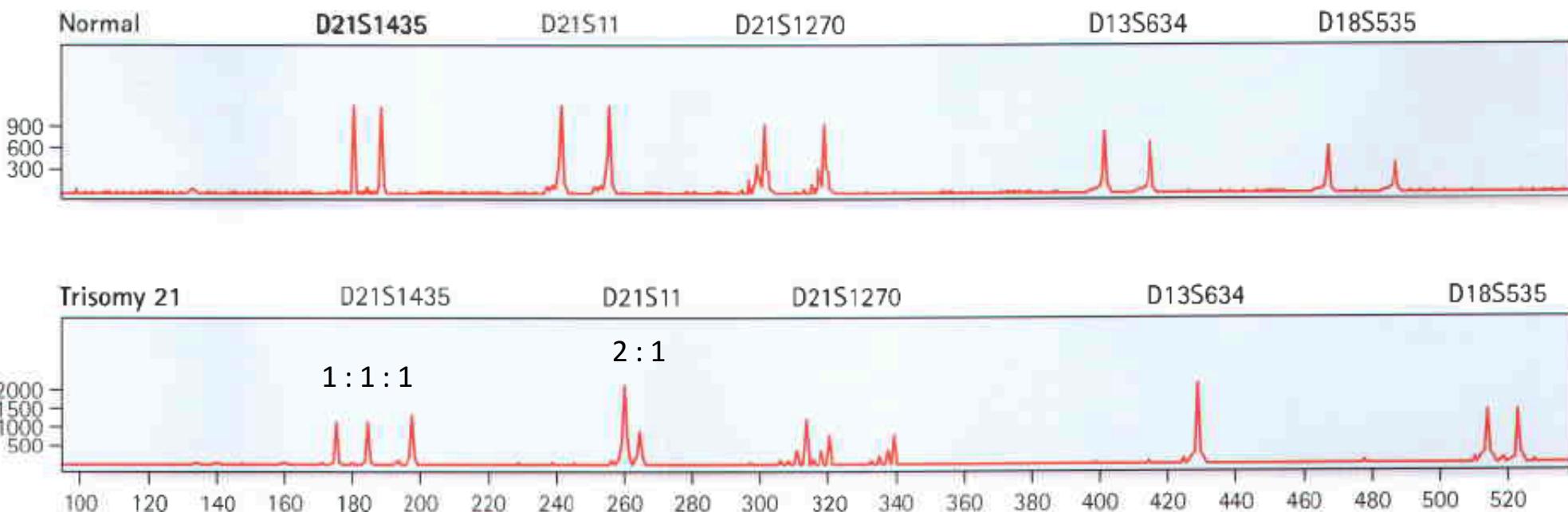
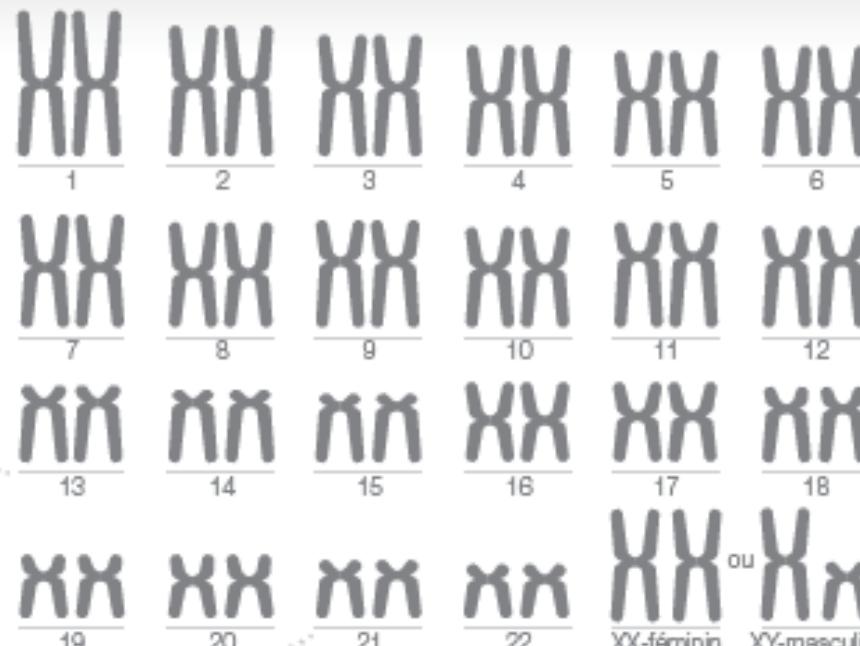
3 jours après  
la fécondation



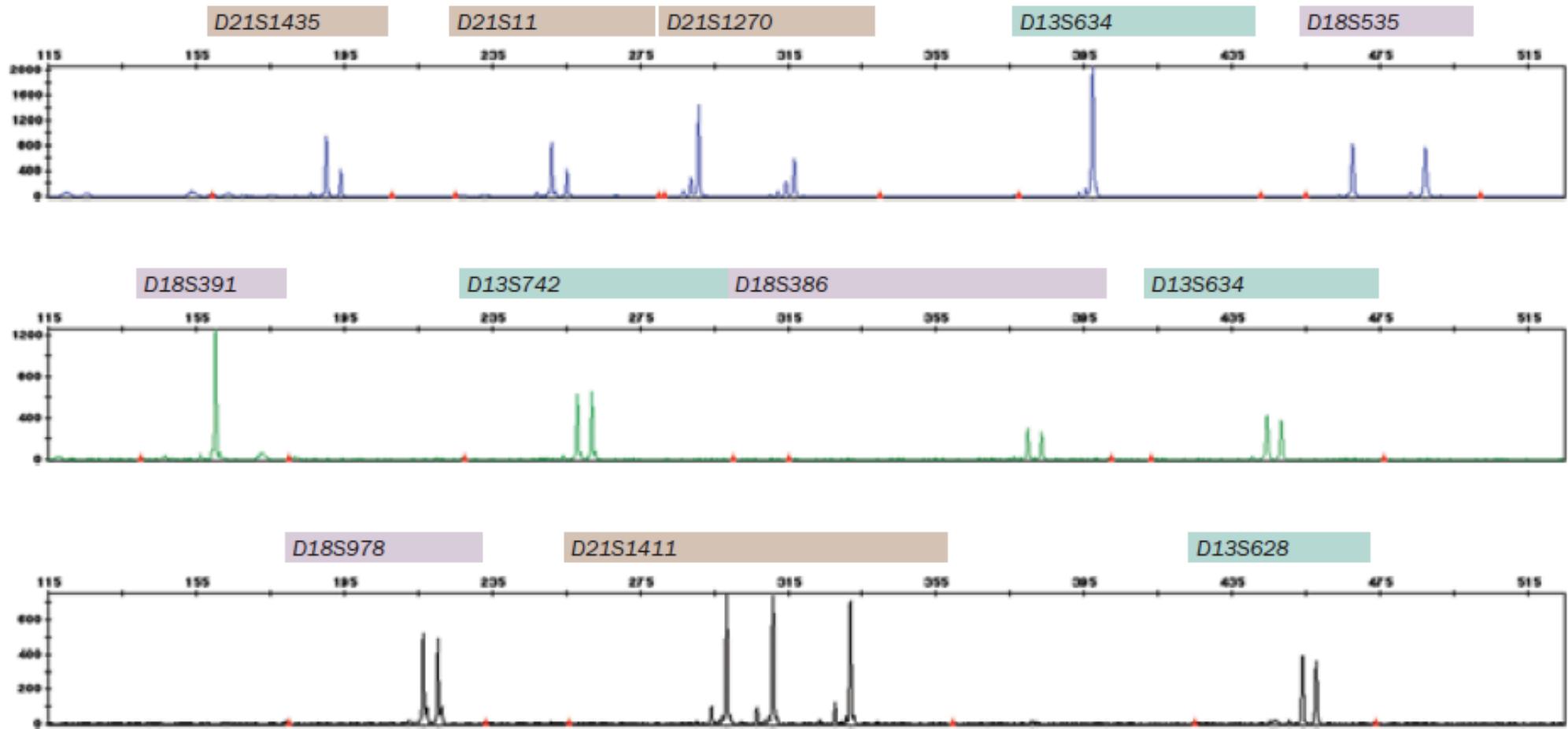
ADN



# Détection des 3 trisomies viables par P C R.



## QF-PCR : Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction



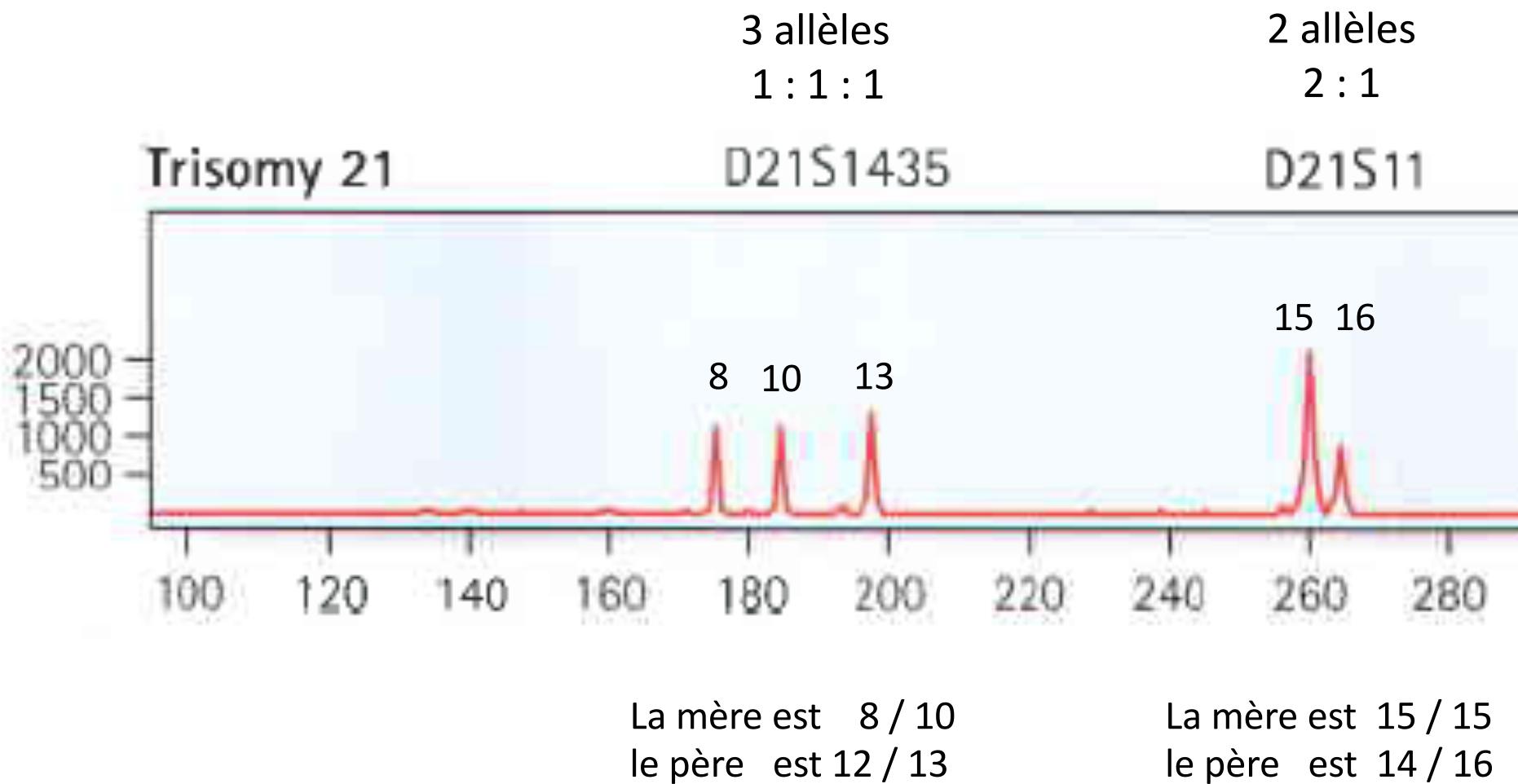
4 loci sur le chromosome 21

4 loci sur le chromosome 18

4 loci sur le chromosome 13

Diagnostic : trisomie 21

## Détection d'une trisomie par analyse de microsatellites :

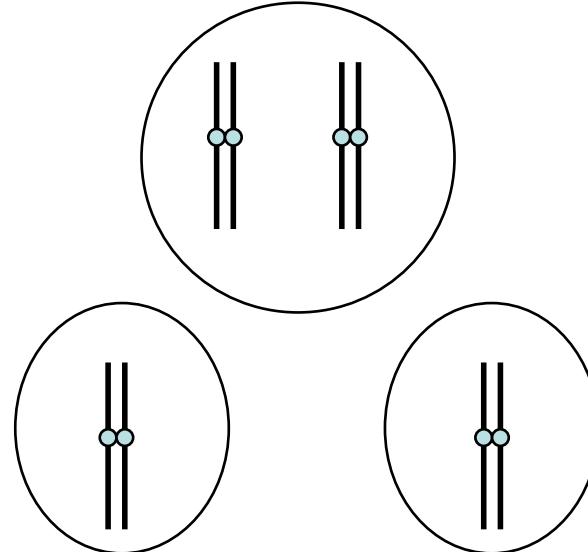


Questions : 1. origine parentale de la trisomie 21 ?  
2. non-disjonction à quelle division méiotique ?

$2n = 46$ , if human

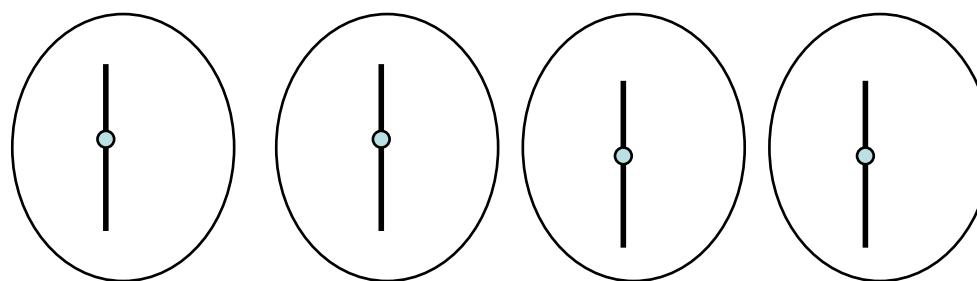
We are following one pair of homologs.

Méiose I

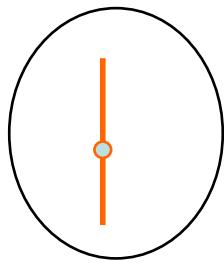


Disjonction normale

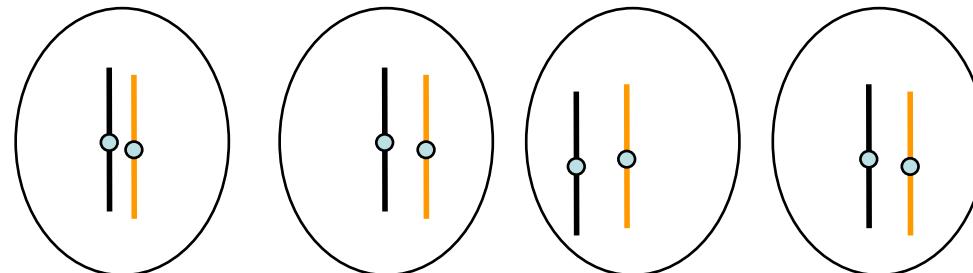
Méiose II



(gamètes)



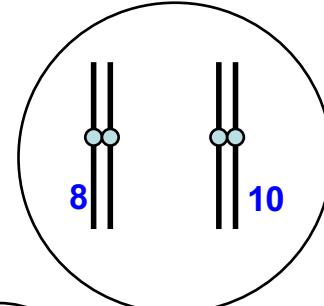
Gamète haploïde



Disomique

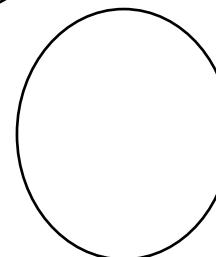
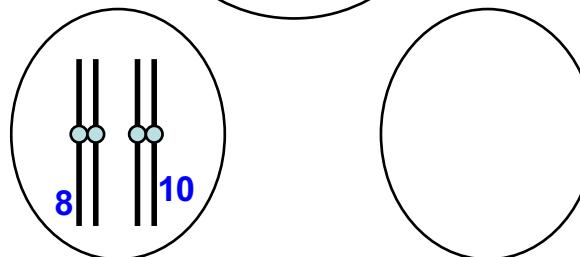
$2n = 46$ , if human

We are following one pair of homologs.

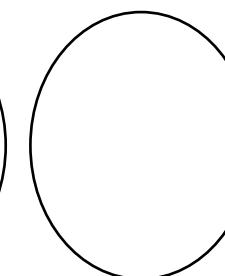
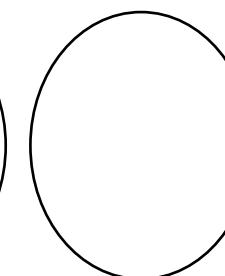
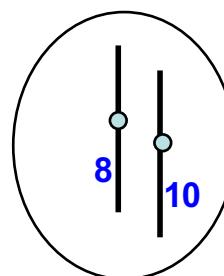
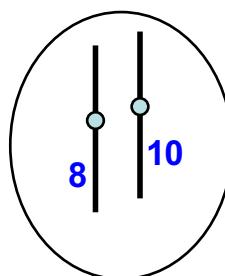


Nondisjunction  
en méiose I

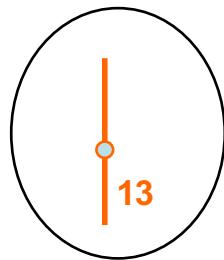
Méiose I



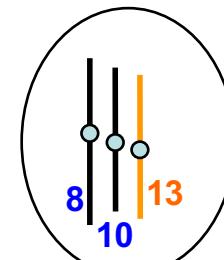
Méiose II



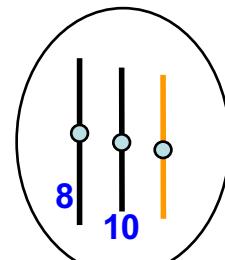
(gamètes)



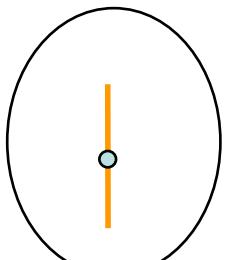
Gamète haploïde



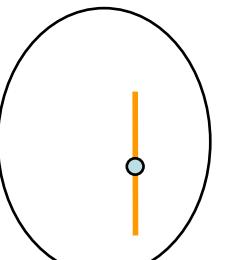
Trisomique



Trisomique



Monosomique

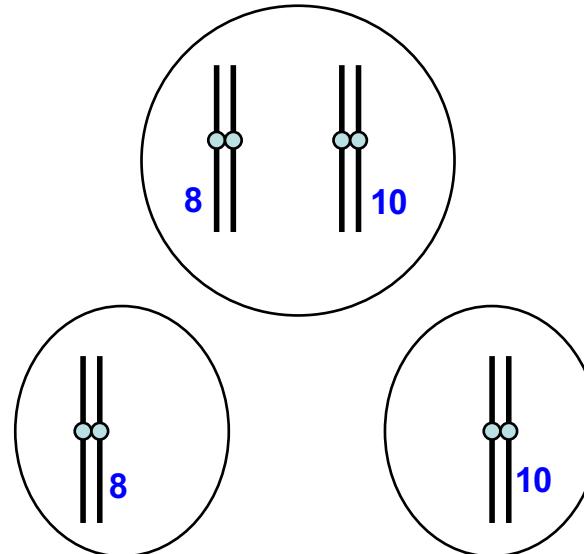


Monosomique

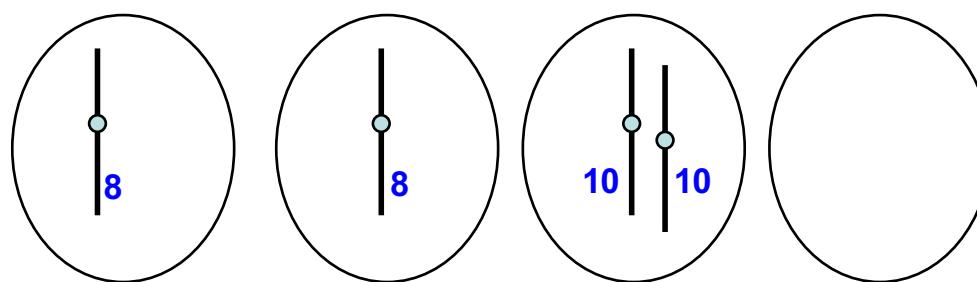
$2n = 46$ , if human

We are following one pair of homologs.

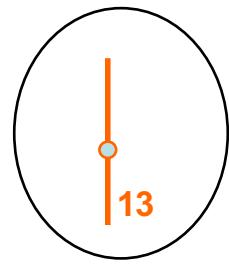
Méiose I



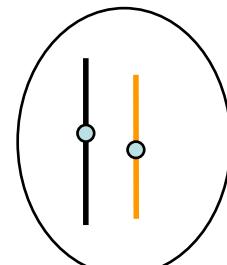
Méiose II



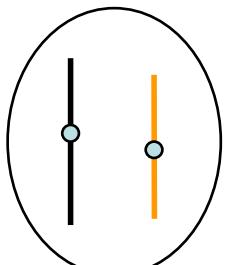
(gamètes)



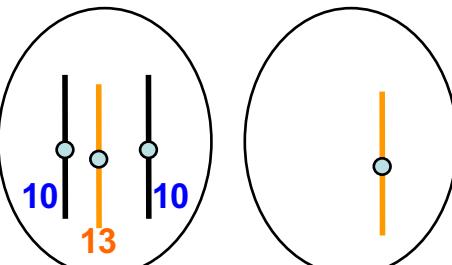
Gamète haploïde



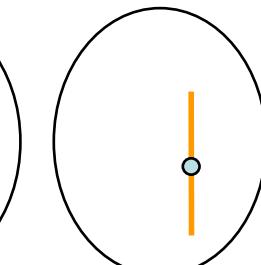
Disomique



Disomique



Trisomique

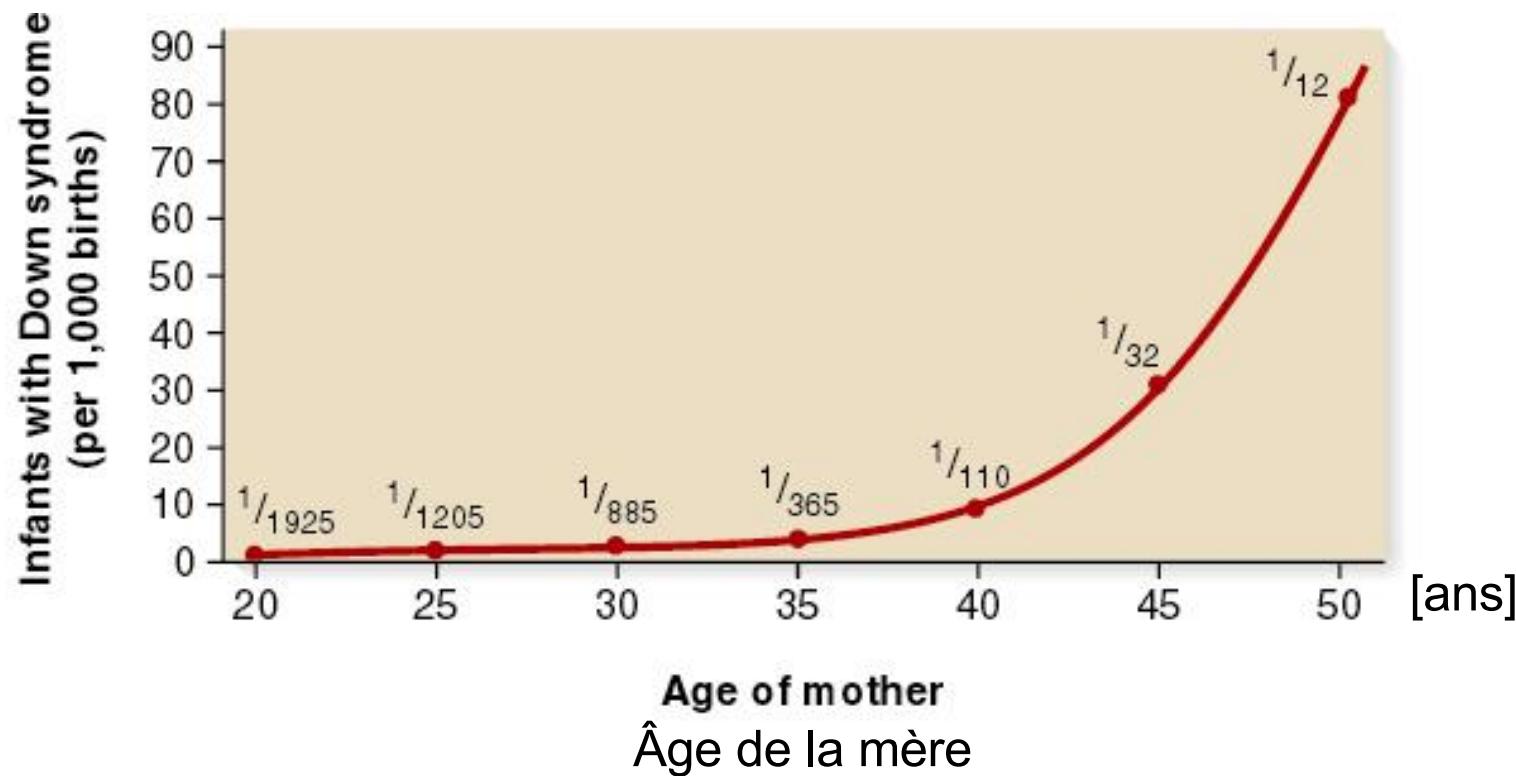


Monosomique

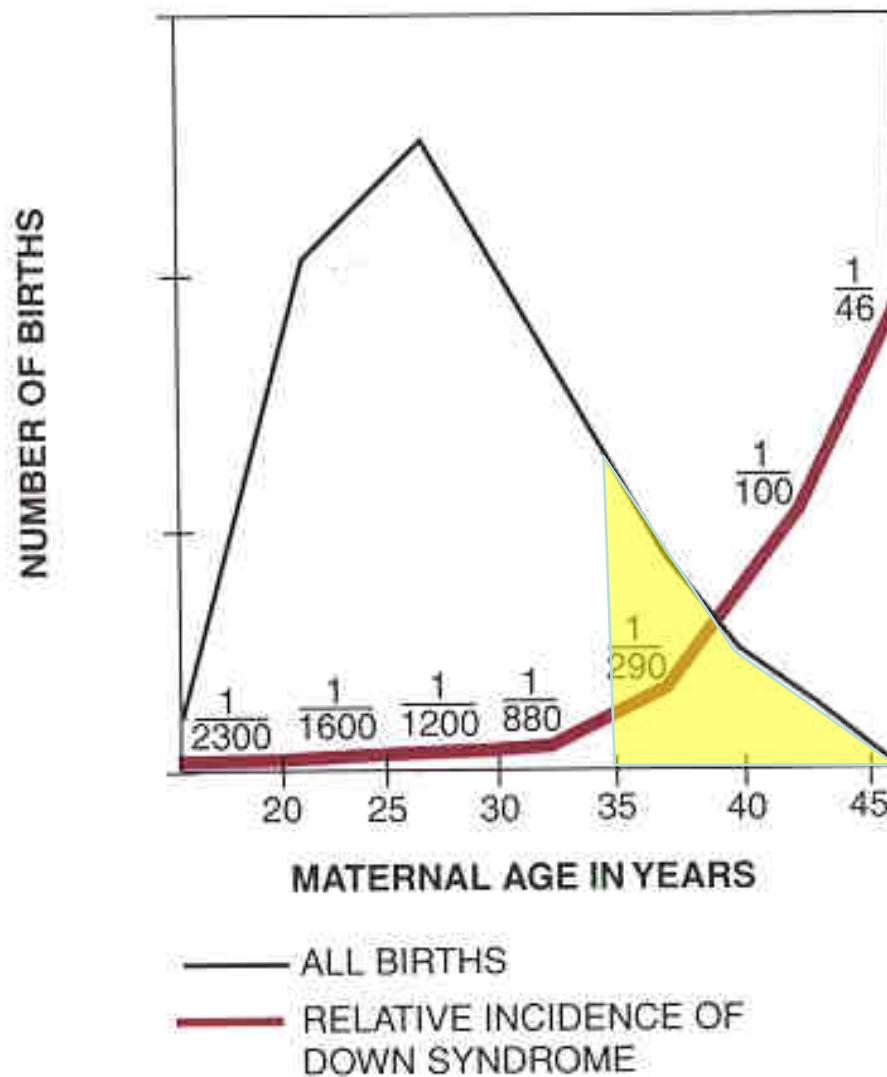
Nondisjonction  
en méiose II

9 trisomies 21 sur 10 sont d'origine maternelle.

L'âge maternel au moment de la conception augmente le risque de trisomie 21.

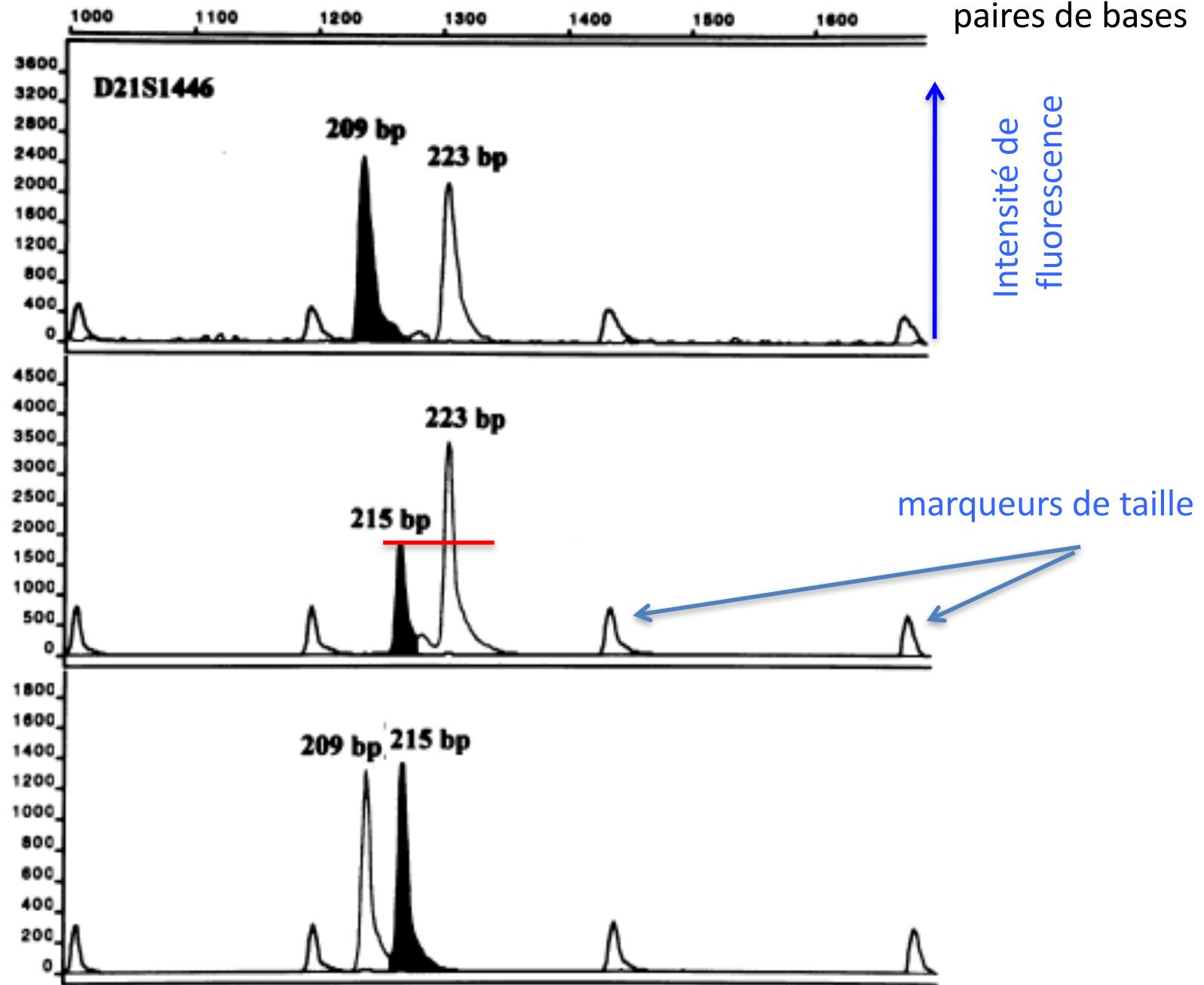


L'âge du père = l'âge de la mère  $\pm$  2 ans



Exemple :  
(réel)

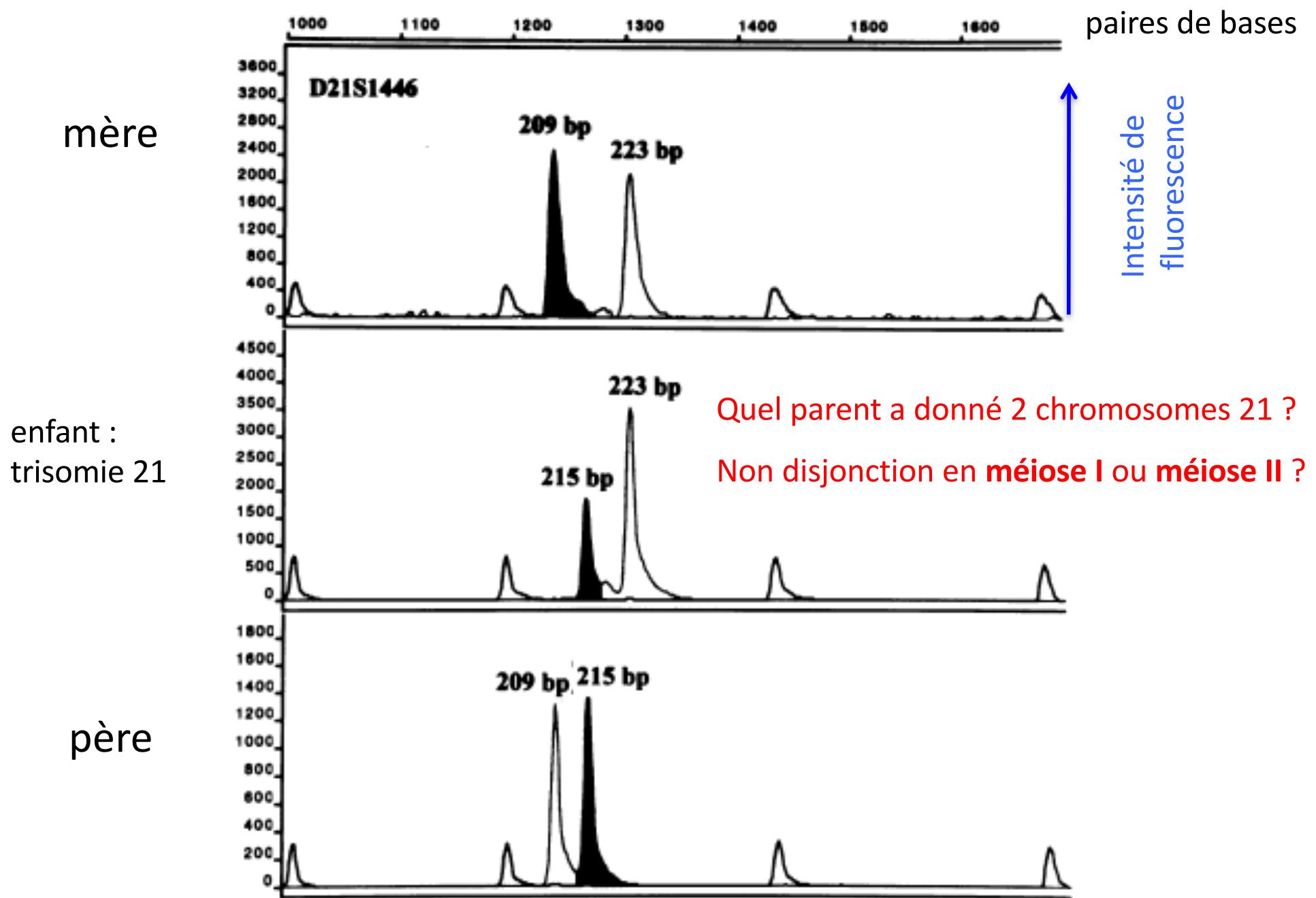
mère



enfant :  
trisomie 21

père

Ne comparez pas  
les échelles entre  
les analyses



## L'étude des microsatellites permet

1. de déterminer l'origine parentale d'un chromosome surnuméraire
2. de tester la paternité
3. d'identifier une personne (p. ex. un violeur)

**2 et 3 nécessitent de maîtriser le calcul de probabilité**