

# IV – Les Acides Nucléiques

## 1- Bases azotées

- A- 2 sortes de bases : purines et pyrimidines
- B- Absorbance dans l'U.V.
- C- Densité de charge

## 2- Nucléosides et nucléotides

- A- Liaison avec 2 types de sucres
- B- Modification avec l'acide phosphorique
- C- Nomenclature

## 3- Structures spatiales

- A- Association des nucléotides dans un acide nucléique
- B- Complémentarité des bases
- C- Double hélice/Propriétés
- D- Modifications chimiques des acides nucléiques

## 4- Des nucléotides remarquables : ATP, AMPc et GMP

## 5- Séquençage de l'ADN et PCR



## INTRODUCTION

Selon une célèbre marque de cosmétique française :

« Principe  
cellule  
pouvo  
Extrait sous sa forme native  
grâce à un procédé 100% naturel,  
l'ADN Végétal natif est capable  
de transférer son exceptionnel  
pouvoir de renaissance et de  
revitalisation aux cellules de la  
peau (test *in vitro*). »

**Mais l'ADN.... C'est quoi ?  
À quoi cela ressemble-t-il ?**



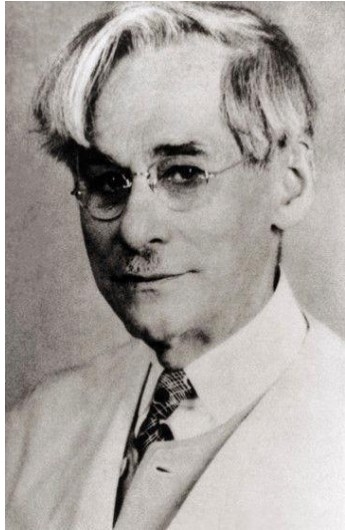
## INTRODUCTION

Les acides nucléiques (ADN, ARN) sont constitués par des molécules de structure "simple" appelés **nucléotides**.

Les nucléotides sont les **briques** élémentaires de la transmission de l'information génétique.

Les acides nucléiques jouent également un rôle **fondamental** :

- dans le métabolisme cellulaire sous forme **di-** et **tri-phosphorylée**
- dans la transmission de l'information dans la cellule (AMP et GMP **cyclique**).



Fishel Levin  
(1869-1940)

Nucléotide :

- base azotée

- sucre

- acide phosphorique

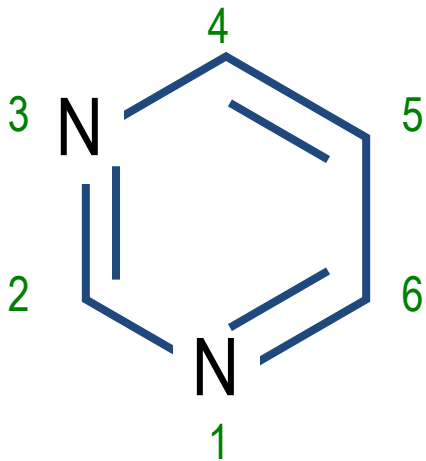
## 1- Bases azotées

A- 2 sortes de bases : purines et pyrimidines

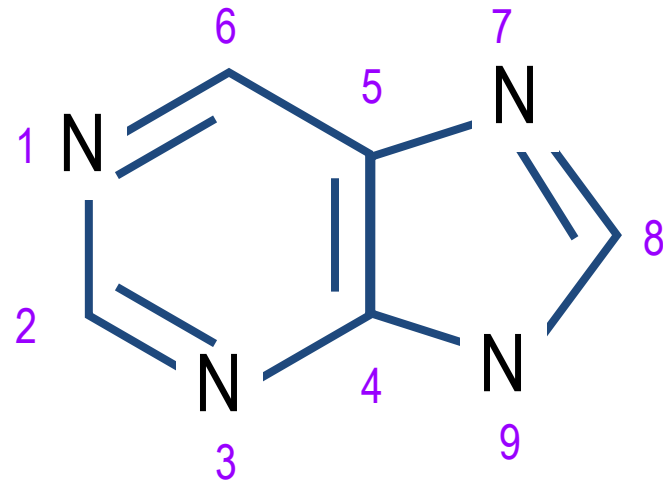
a- Celles retrouvées dans l'ADN et l'ARN

Il existe 2 sortes de bases azotées hétérocycliques :

bases pyrimidiques  
(noyau pyrimidine)



bases puriques  
(noyau purine)

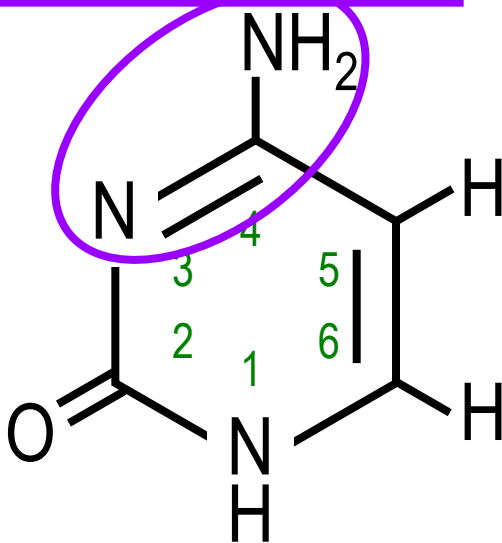


## 1- Bases azotées

A- 2 sortes de bases : purines et pyrimidines

a- Celles retrouvées dans l'ADN et l'ARN

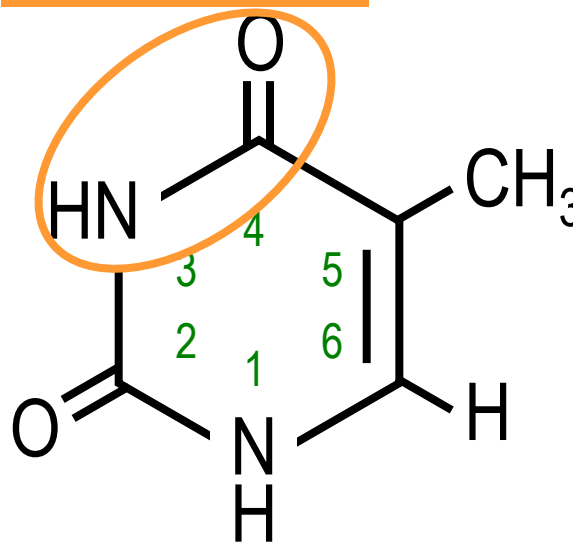
fonction imino-amine



cytosine (C)

ADN/ARN

fonction amide

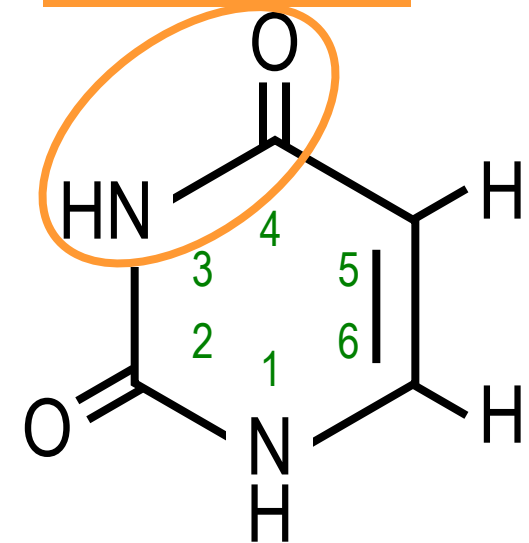


thymine (T)

5-méthyl-uracile

ADN

fonction amide



uracile (U)

ARN



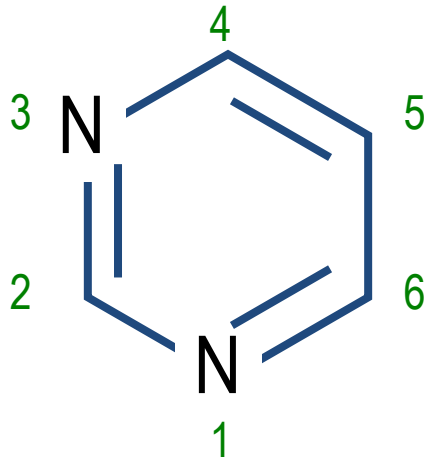
## 1- Bases azotées

A- 2 sortes de bases : purines et pyrimidines

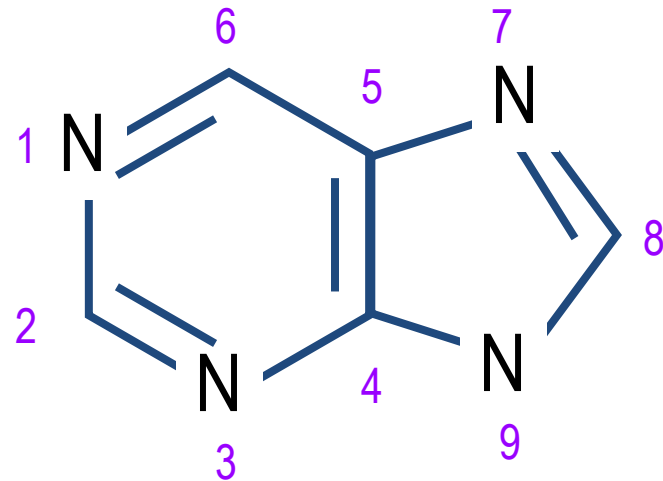
a- Celles retrouvées dans l'ADN et l'ARN

Il existe 2 sortes de bases azotées hétérocycliques :

bases pyrimidiques  
(noyau pyrimidine)



bases puriques  
(noyau purine)

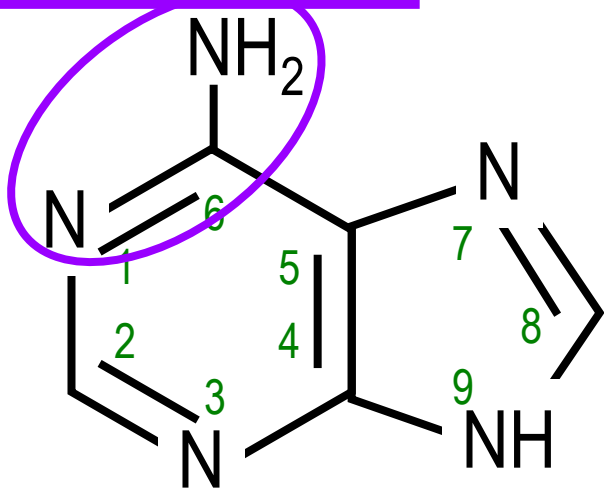


## 1- Bases azotées

A- 2 sortes de bases : purines et pyrimidines

a- Celles retrouvées dans l'ADN et l'ARN

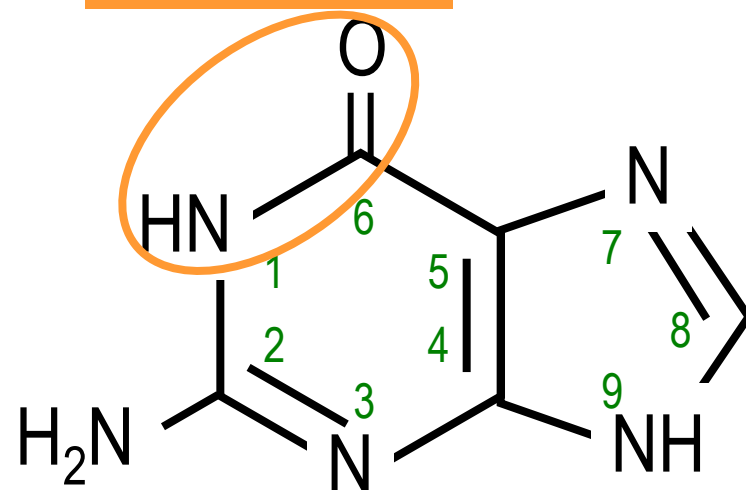
fonction imino-amine



adénine (A)

ADN/ARN

fonction amide



guanine (G)

ADN/ARN

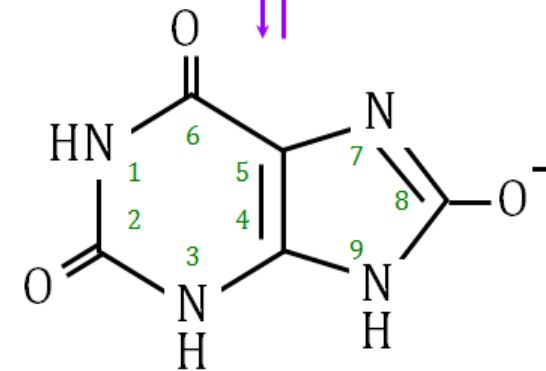
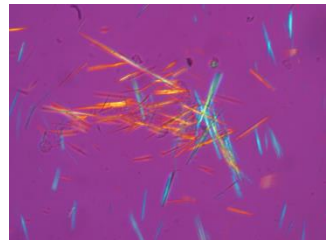
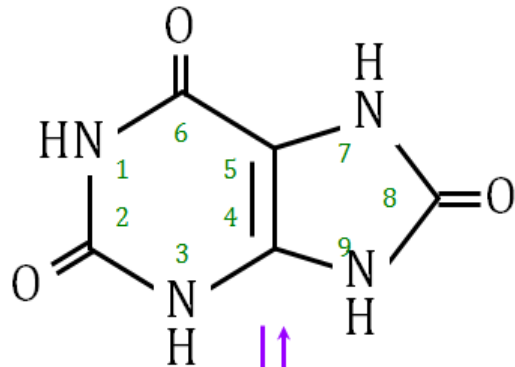




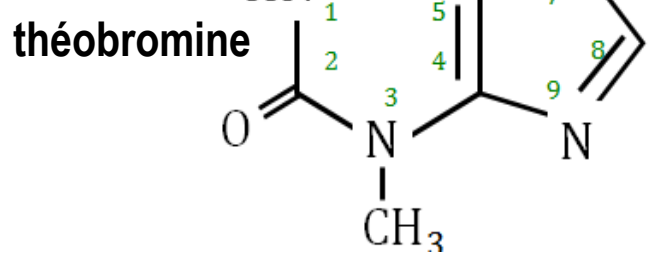
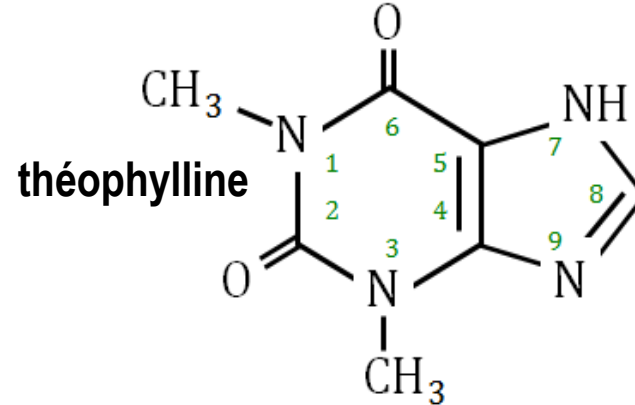
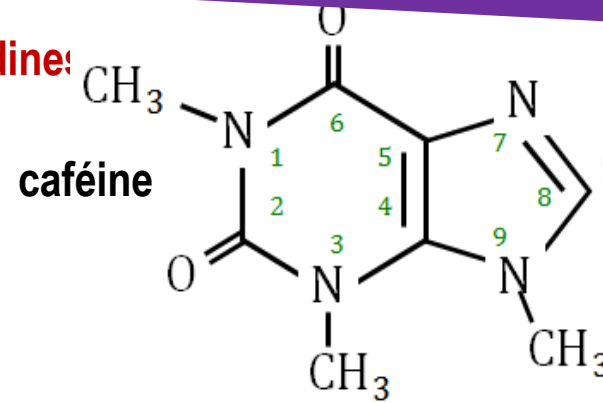
# 1- Bases azotées

A- 2 sortes de bases : purines et pyrimidine:

b- D'autres bases aux rôles variés

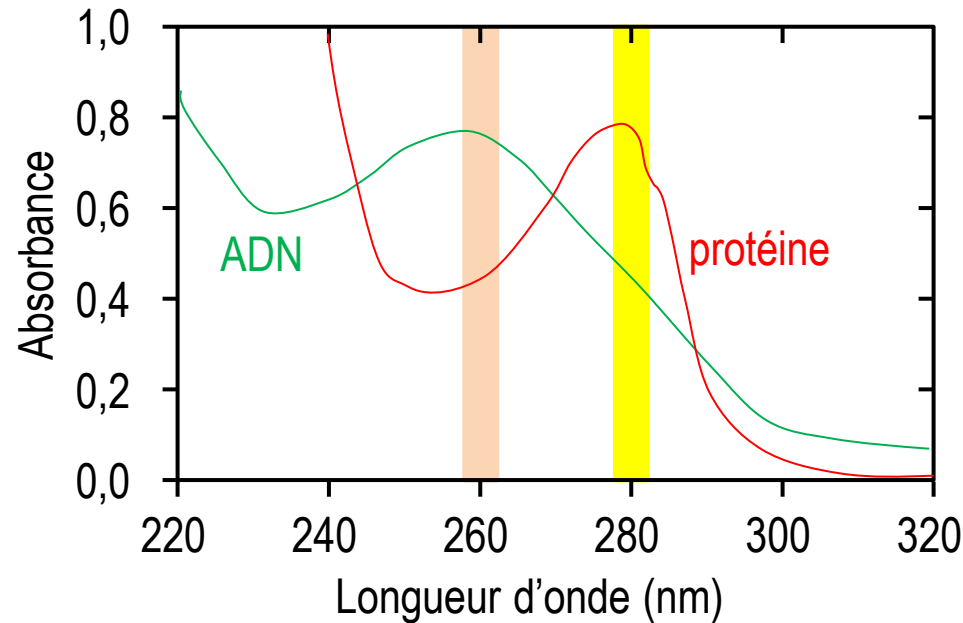


acide urique



# 1- Bases azotées

## B- Absorbance dans l'U.V.



## Pureté

ADN/ARN pur le ratio

$$A_{260}/A_{280} = 1,8$$

Si  $A_{260}/A_{280} < 1,8$

Contamination protéique

## Quantité

Une solution avec  $A_{260} = 1$   
correspond à une concentration :  
de 50  $\mu\text{g/mL}$  d'ADN db  
de 40  $\mu\text{g/mL}$  d'ARN ou ADN sb



## 1- Bases azotées

### B- Absorbance dans l'U.V.

## QUIZZ

Quelle est la concentration en ADN de la solution de départ ?

$$A_{260} = 0,6$$

Volume final dans la cuve = 1 mL

20  $\mu$ L d'ADN q.s.p. 1 mL avec tampon

$$A_{260}/A_{280} = 1,8$$

$$A_{260} = 1 \rightarrow 50 \mu\text{g/mL d'ADN}$$

A- 3  $\mu$ g/mL

B- 1500 mg/L

C- 15 mg/L

D- 3 mg/L

E- 1500  $\mu$ g/mL

## REPONSE

Concentration dans la cuve

$$0,6 \times 50 \mu\text{g/mL}$$

Calcul dilution

$$1000 \mu\text{l} / 20 \mu\text{L} = 50$$

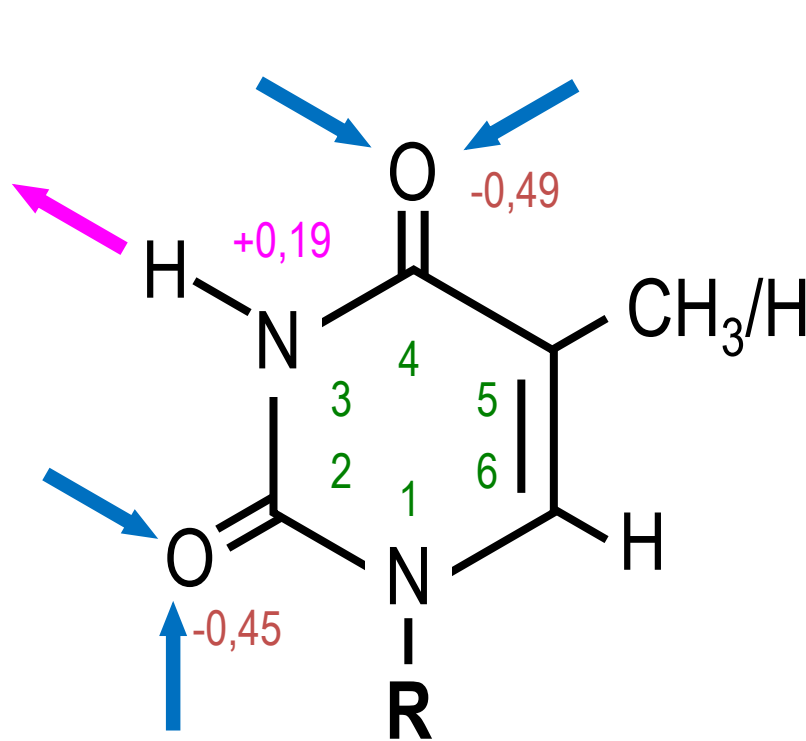
Concentration solution d'ADN de départ

$$30 \mu\text{g/mL} \times 50$$

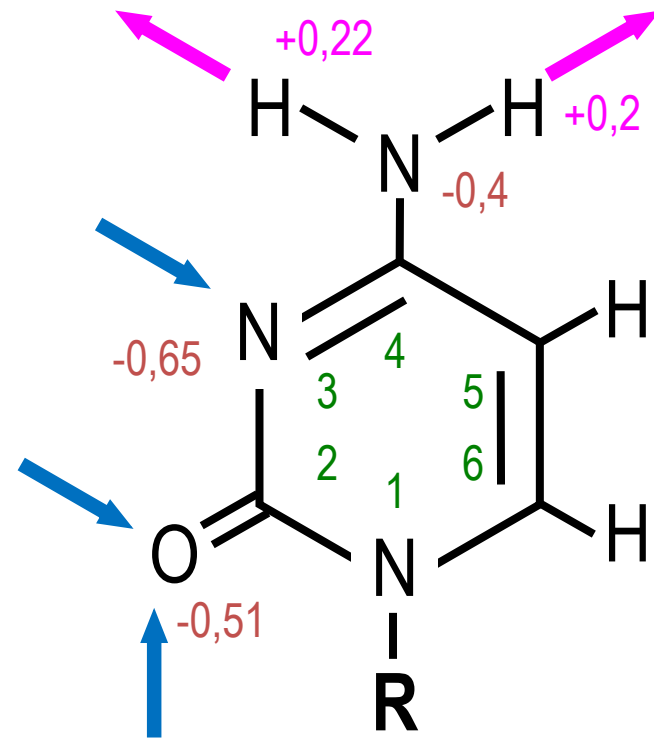
# 1- Bases azotées

## C- Densité de charge

La répartition des électrons à la surface des bases azotées n'est pas uniforme  
→ molécules polarisées.



T/U



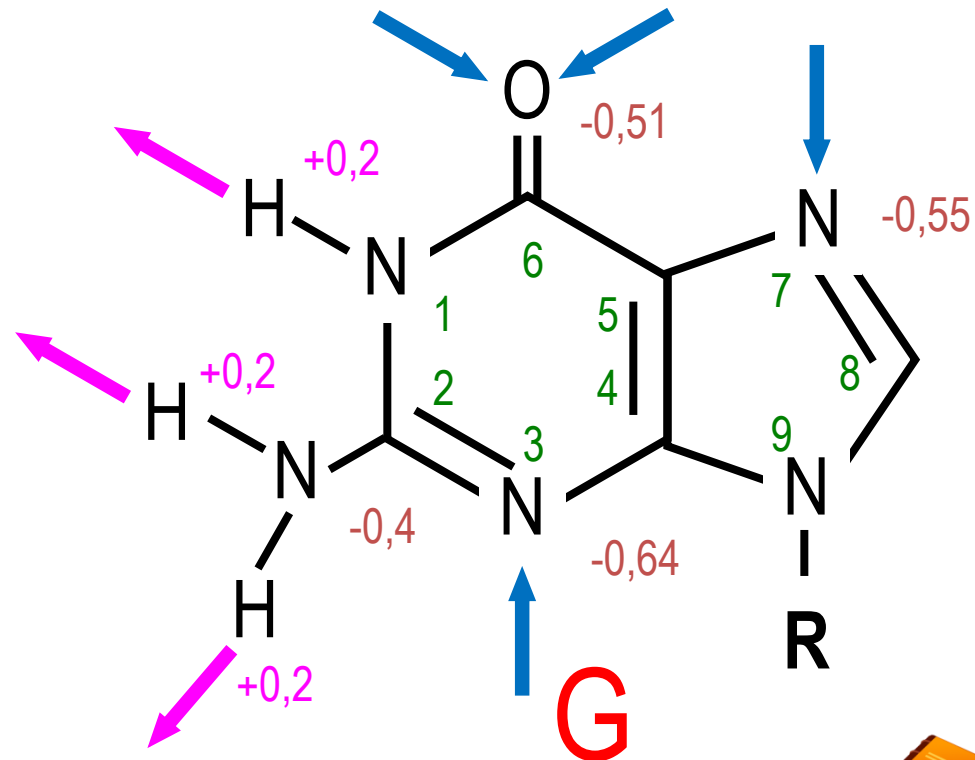
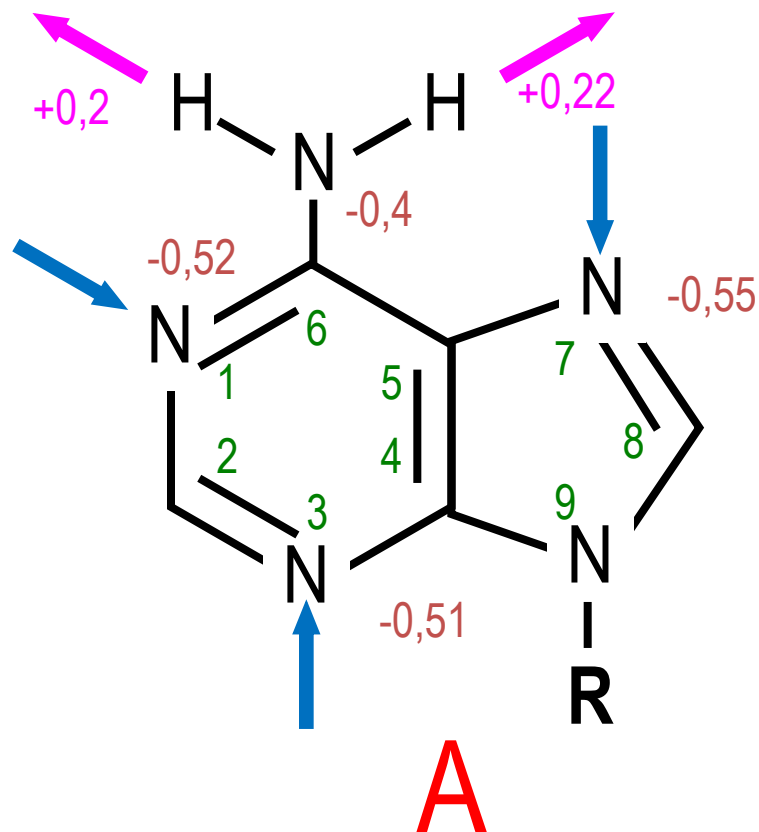
C



# 1- Bases azotées

## C- Densité de charge

La répartition des électrons à la surface des bases azotées n'est pas uniforme  
→ molécules polarisées.



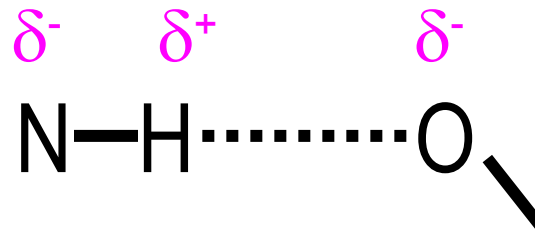
# 1- Bases azotées

## C- Densité de charge

Les densités de charges déterminent les positions et les orientations des liaisons hydrogène.

La liaison hydrogène est **directionnelle** i.e. l'interaction est optimale quand les **3 atomes sont dans l'axe**.

Possibilité avec un angle → interaction plus faible.



Les flèches expliquent la complémentarité **A=T** et **G≡C**. Cependant plusieurs possibilités de liaisons hydrogène existent : **dans la nature, seules certaines interactions sont retrouvées**.

A côté de l'appariement classique A/T et C/G existent des couples G=A ou G=T.

## 2- Nucléosides et nucléotides

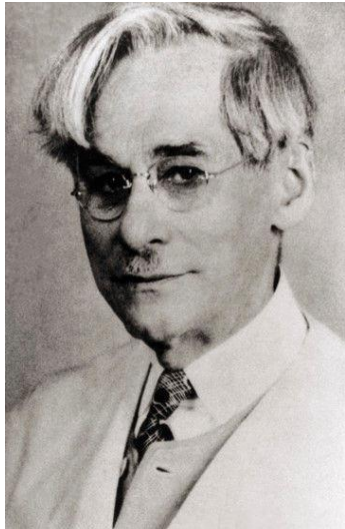
### A- Liaison avec 2 types de sucres

#### Nucléotide :

- base azotée

- sucre

- acide phosphorique

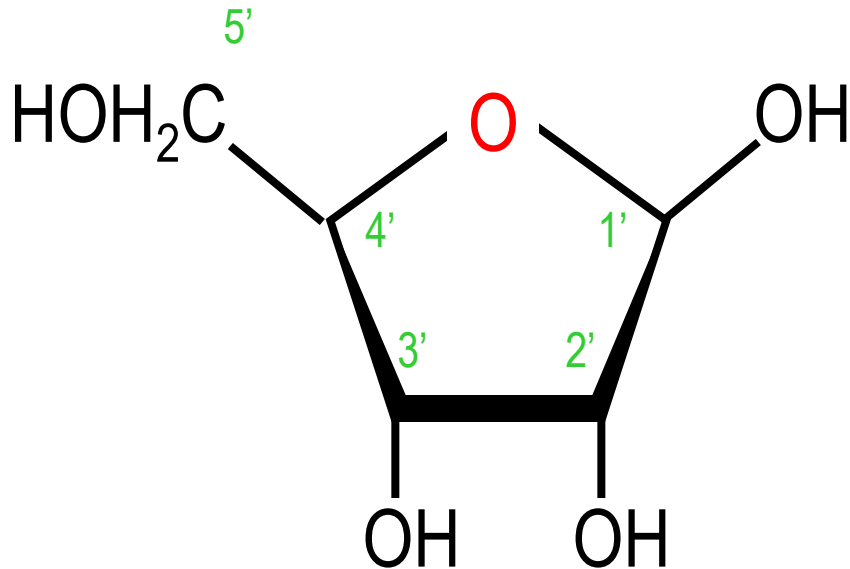


Fishel Levin  
(1869-1940)

## 2- Nucléosides et nucléotides

### A- Liaison avec 2 types de sucres

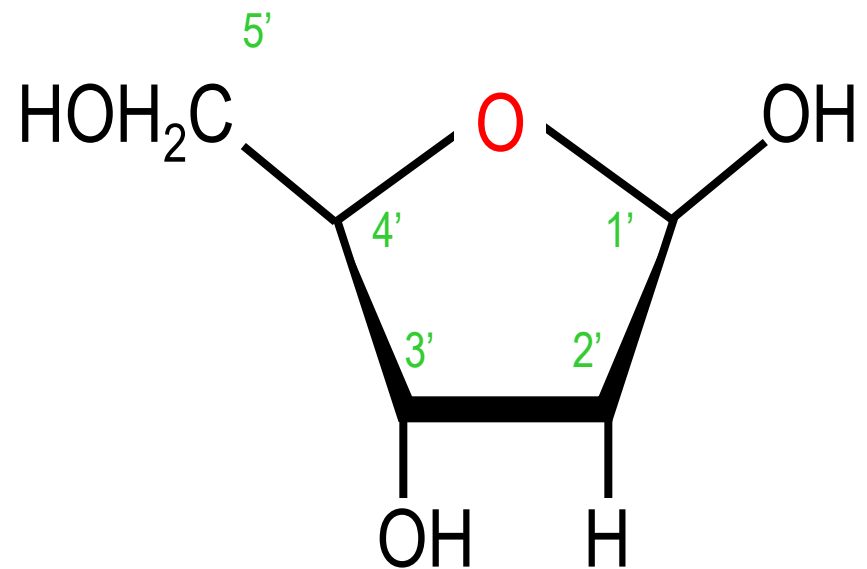
D-ribose



ARN

D-désoxyribose

(2'-désoxyribose)



ADN

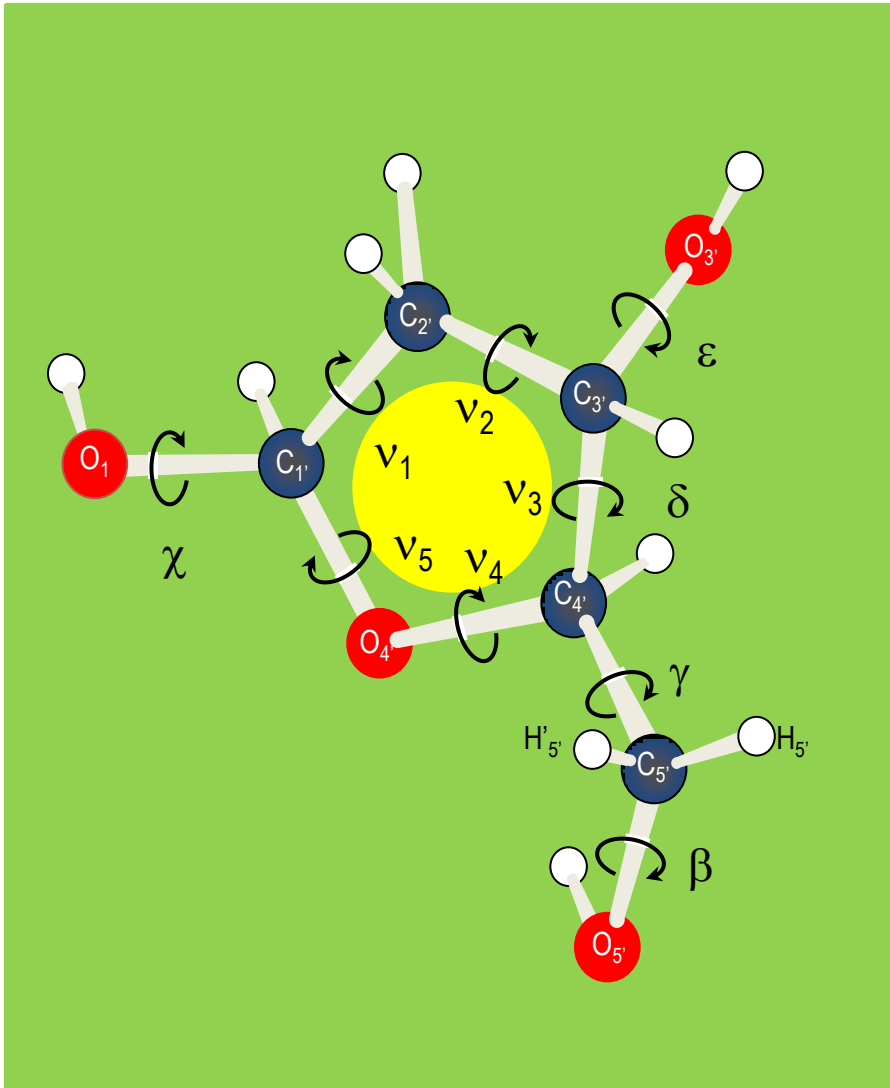
pentoses sous forme **furanique** (5 atomes dans le cycle)





## 2- Nucléosides et nucléotides

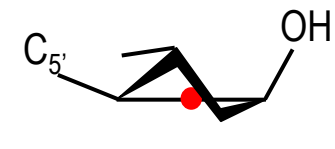
### A- Liaison avec 2 types de sucres



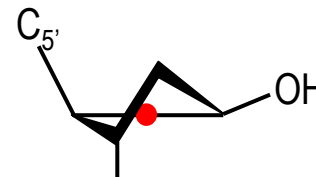
Formes du désoxyribose retrouvées dans l'ADN



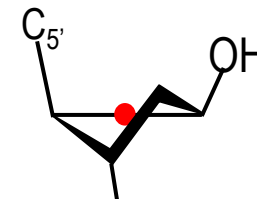
$C_{2'} \text{exo}$



$C_{3'} \text{endo}$



$C_{2'} \text{endo}$



$C_{3'} \text{exo}$

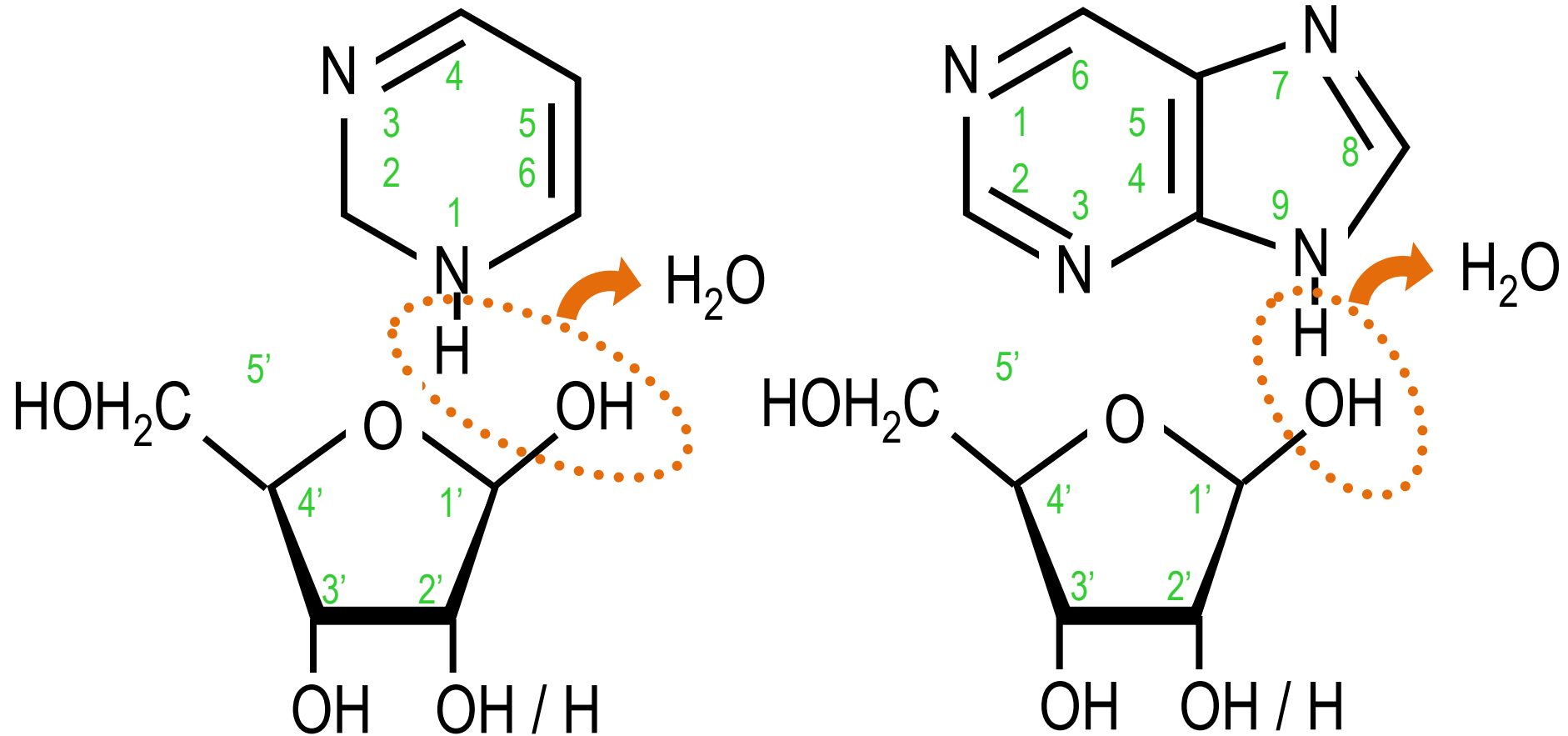
$C_{2'}$  (pyrimidine)  
 $C_{4'}$  (purine)



## 2- Nucléosides et nucléotides

### A- Liaison avec 2 types de sucres

Liaison base-sucre → nucléoside



on obtient une liaison carbone-azote : **liaison N-glycosidique**





## 2- Nucléosides et nucléotides

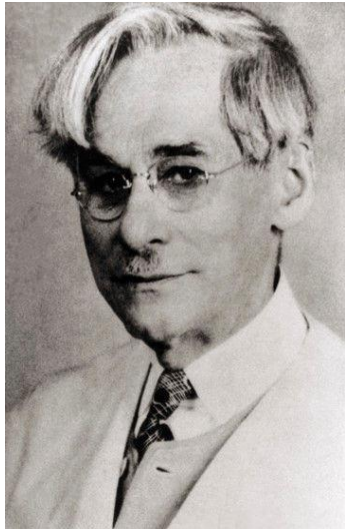
### B- Modification avec l'acide phosphorique

Nucléotide :

- base azotée

- sucre

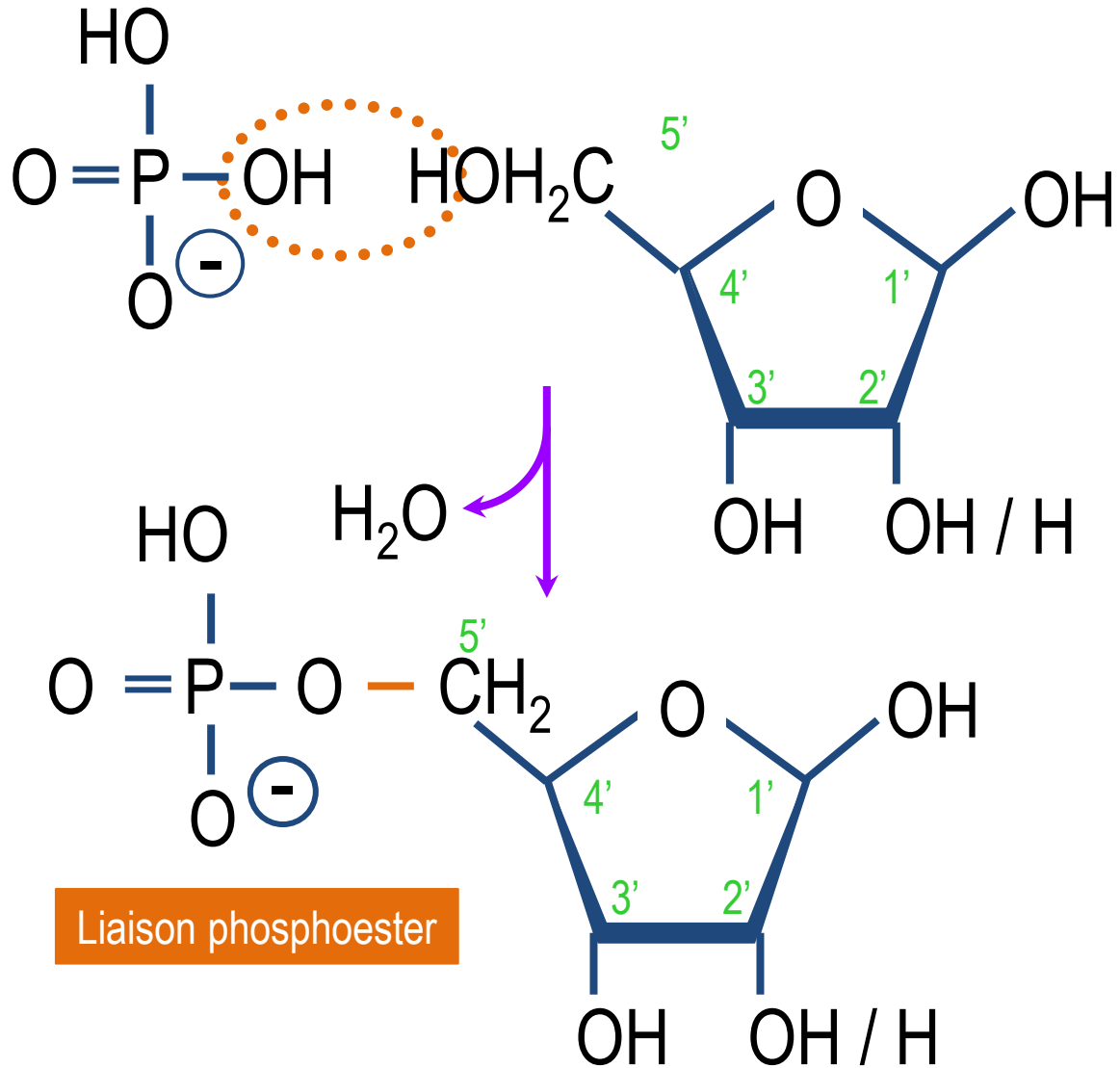
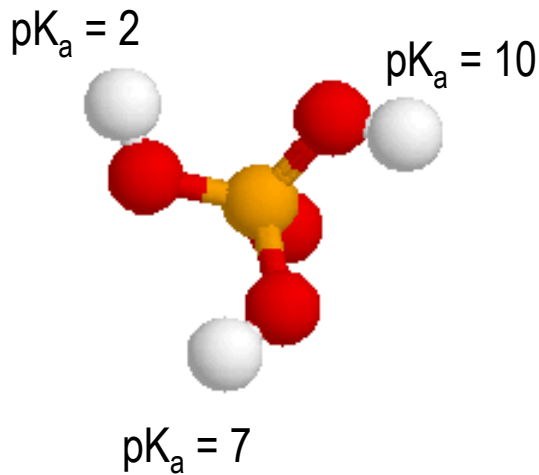
- acide phosphorique



Fishel Levin  
(1869-1940)

## 2- Nucléosides et nucléotides

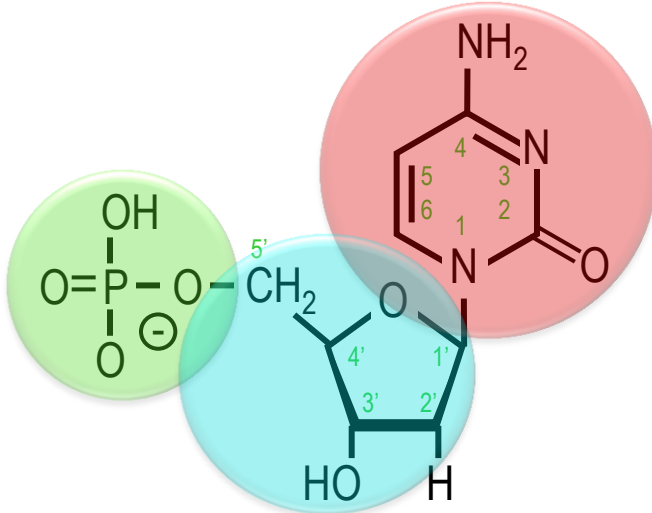
### B- Modification avec l'acide phosphorique



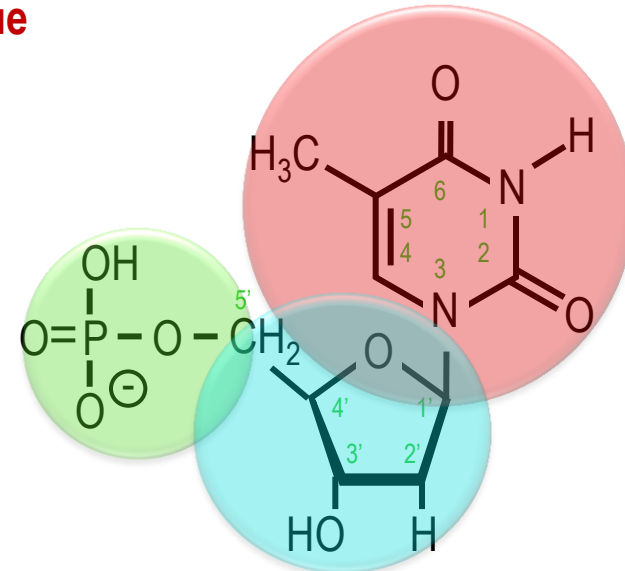
Liaison phosphoester

## 2- Nucléosides et nucléotides

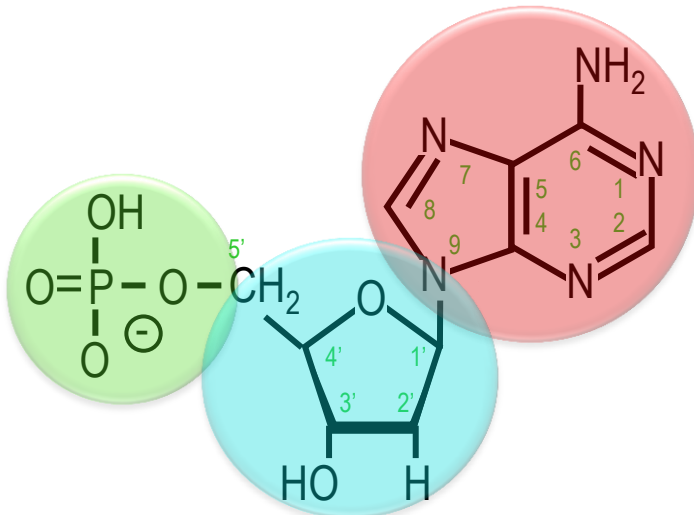
### B- Modification avec l'acide phosphorique



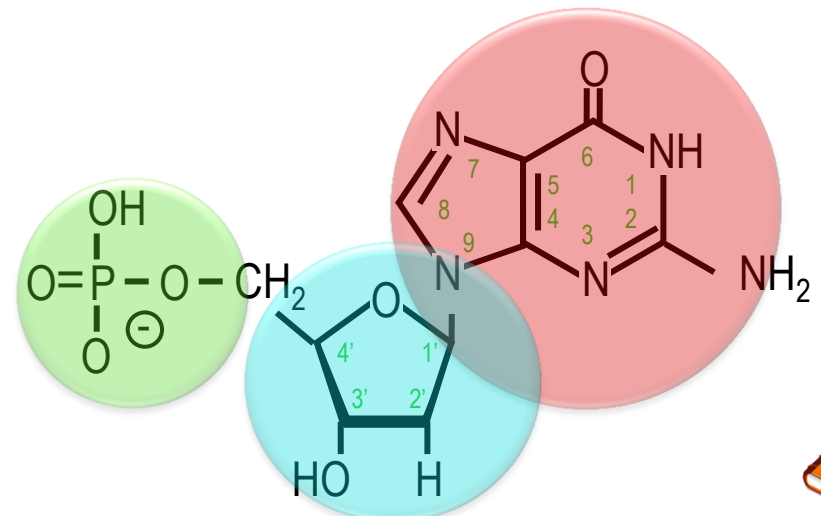
désoxycytidine-5'-monophosphate (dCMP)



désoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP)



désoxyadénosine-5'-monophosphate (dAMP)



désoxyguanosine-5'-monophosphate (dGMP)



## 2- Nucléosides et nucléotides

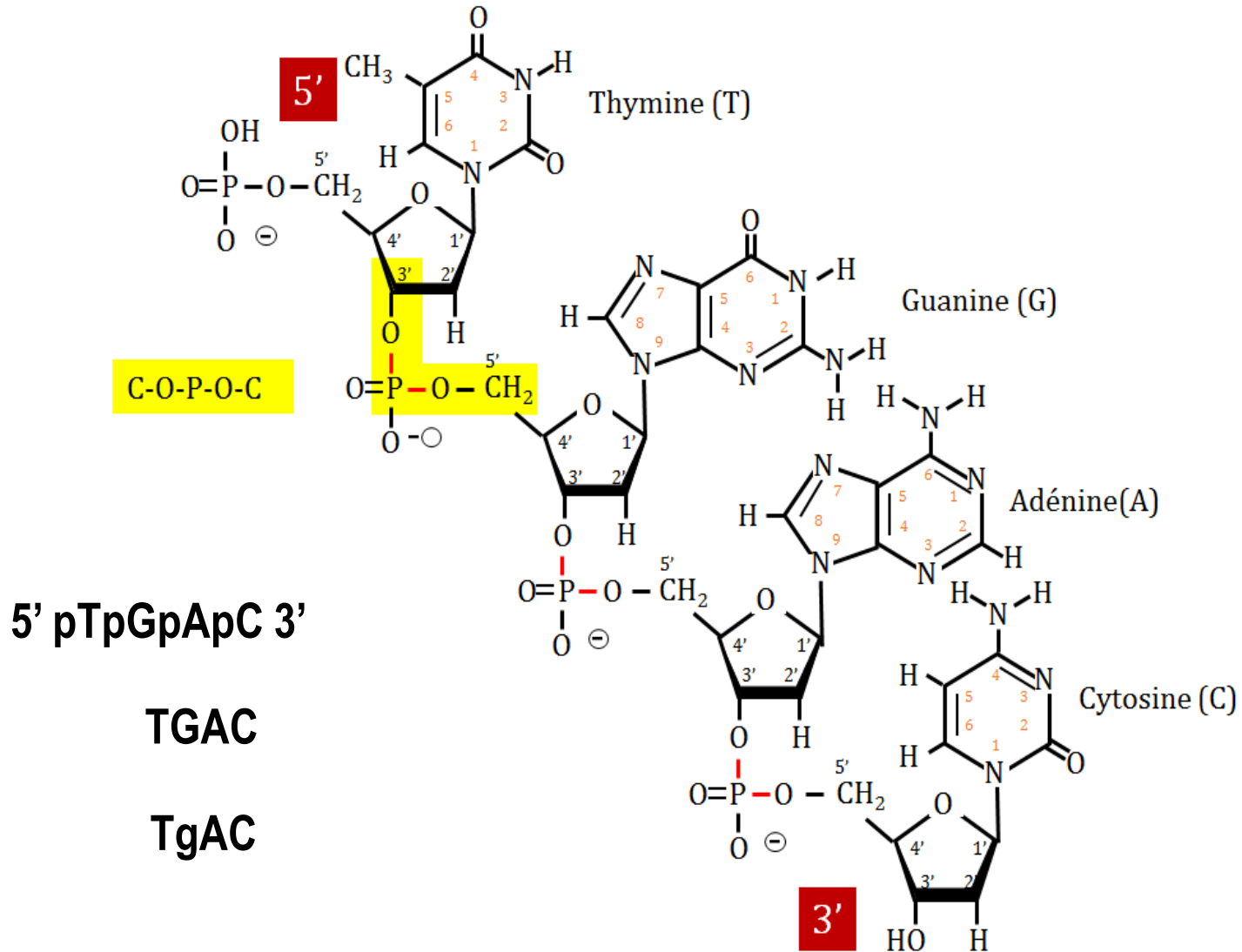
### C- Nomenclature

type de base	base azotée	nucléoside	nucléotide
purine	adénine (ADN/ARN)	adénosine	adénylate
purine	guanine (ADN/ARN)	guanosine	guanylate
pyrimidine	thymine (ADN)	thymidine	thymidylate
pyrimidine	uracile (ARN)	uridine	uridylate
pyrimidine	cytosine (ADN/ARN)	cytidine	cytidylate

Le préfixe *désoxy-* ou *désoxyribo-* est ajouté aux nucléosides ou nucléotides qui comportent du désoxyribose. Le préfixe *ribo-* est ajouté aux nucléosides ou nucléotides qui comportent du ribose.

### 3- Structure spatiale

#### A- Association des nucléotides dans un acide nucléique





# 3- Structure spatiale

## B- Complémentarité des bases

No. 4356 April 25, 1953

NATURE

737

### MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

#### A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

**W**E wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey<sup>1</sup>. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons:

(1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining β-D-deoxyribofuranose residues with 3':5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow righthanded helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions.

Each chain loosely resembles Furberg's<sup>2</sup> model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so

that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain, does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain, is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally<sup>3,4</sup> that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data<sup>5,6</sup> on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in time following, communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereo-chemical arguments.

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

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at King's College, London. One of us (J.D.W.) has been aided by a fellowship from the National Foundation for Infantile Paralysis.

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

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

<sup>1</sup>Pauling, L., and Corey, R. B. *Nature*, 171, 346 (1953); *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, 39, 84 (1953).

<sup>2</sup>Furberg, S., *Acta Chem. Scand.*, 6, 634 (1952).

<sup>3</sup>Chargaff, E., for references see Zaucenohof, S., Bowerman, G., and Chargaff, E., *Biochim. et Biophys. Acta*, 9, 402 (1952).

<sup>4</sup>Wyant, G.R., *J. Gen. Physiol.*, 36, 201 (1952).

<sup>5</sup>Ashbury, W.T., *Symp. Soc. Exp. Biol. I, Nucleic Acids*, 66 (Camb. Univ. Press, 1947).

<sup>6</sup>Wilkins, M. H. F. and Randall, J. T. *Biochim. et Biophys. Acta*, 10, 102 (1953).



Francis Crick  
(1916 - 2004)

James Watson  
(1928- )



Rosalind Franklin  
(1920-1958)

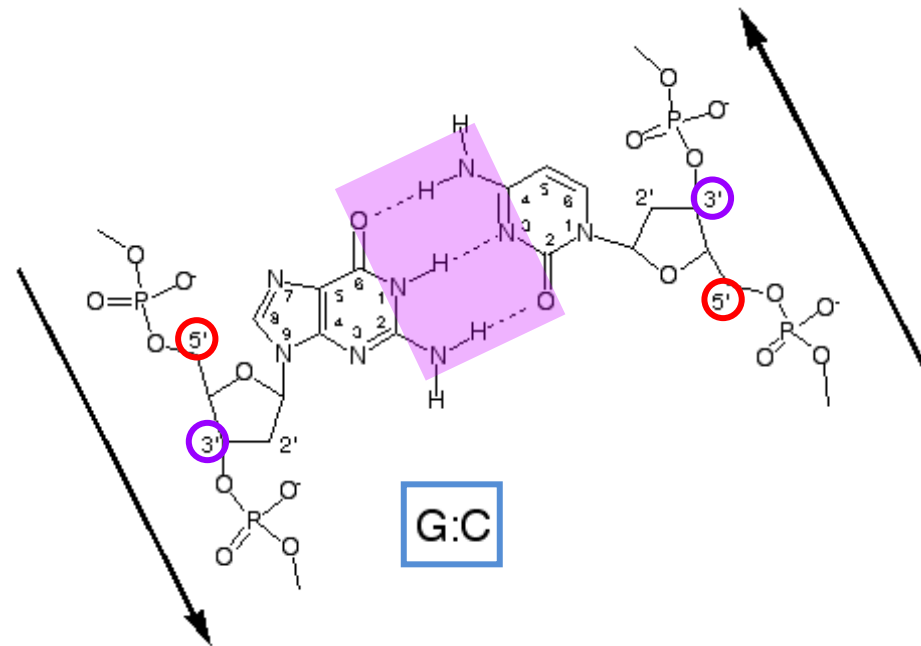
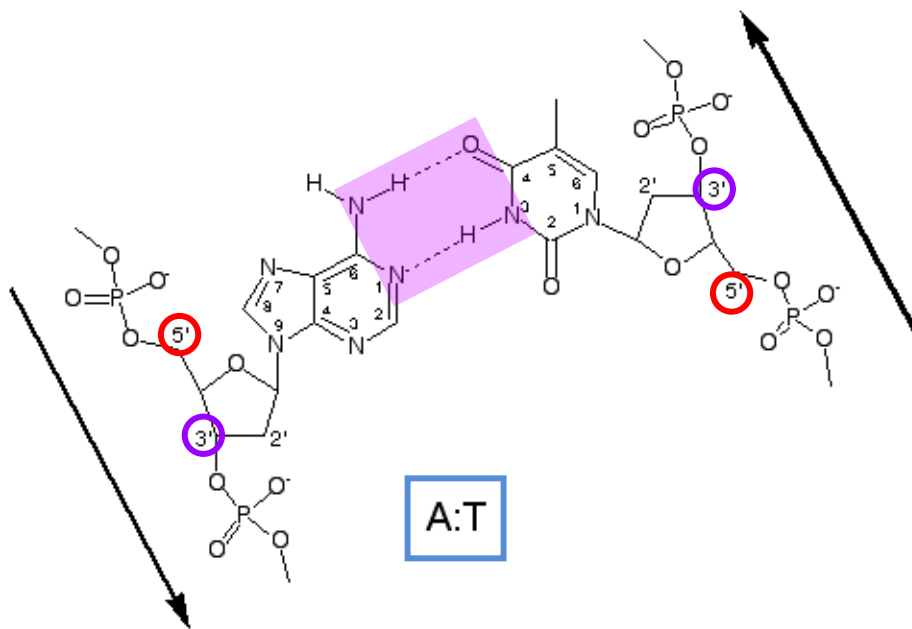
This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis.

### 3- Structure spatiale

#### B- Complémentarité des bases

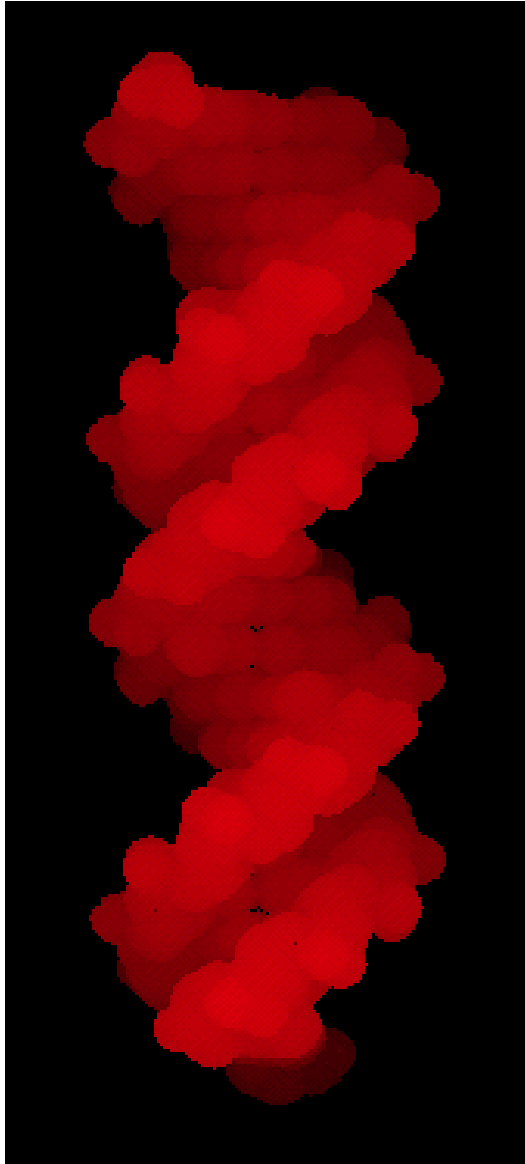
Appariement de Watson et Crick

A C  
T G

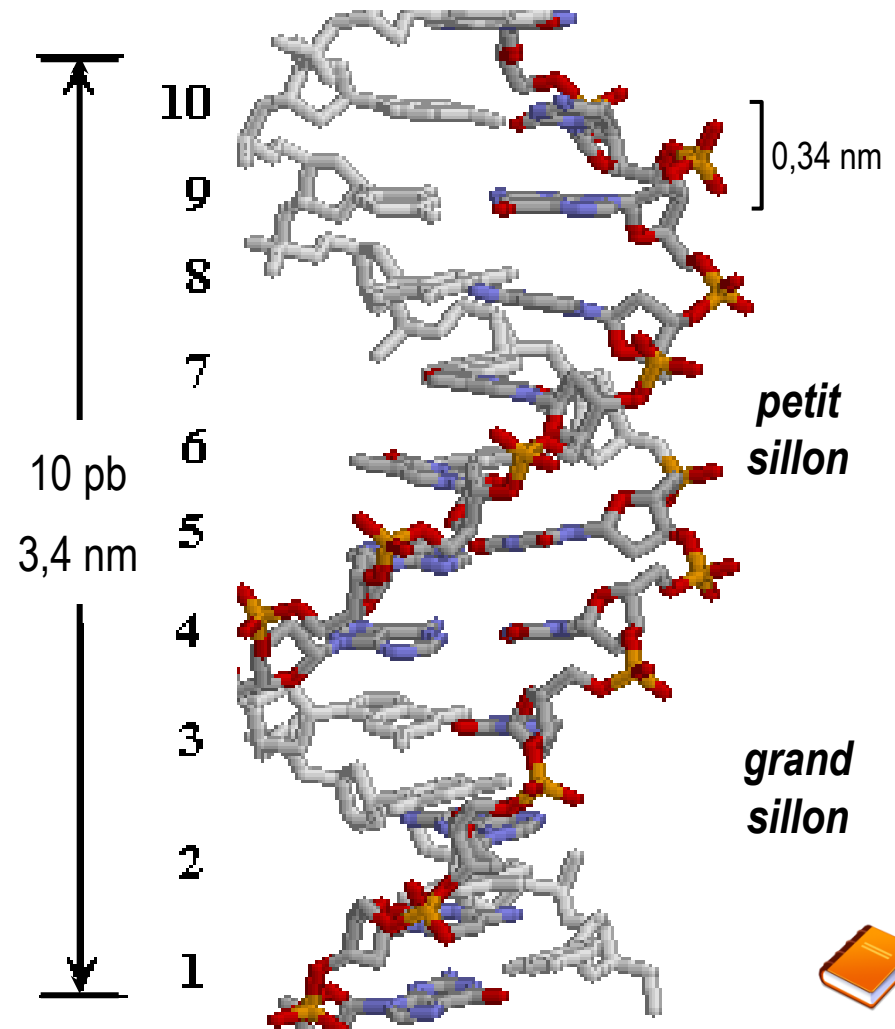


### 3- Structure spatiale

#### C- Double hélice/Propriétés

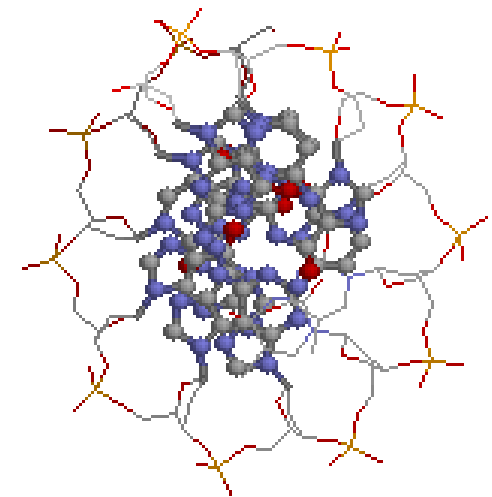
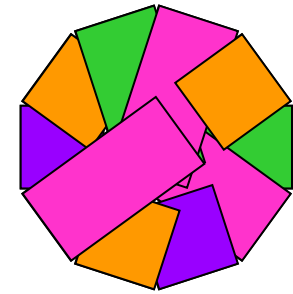
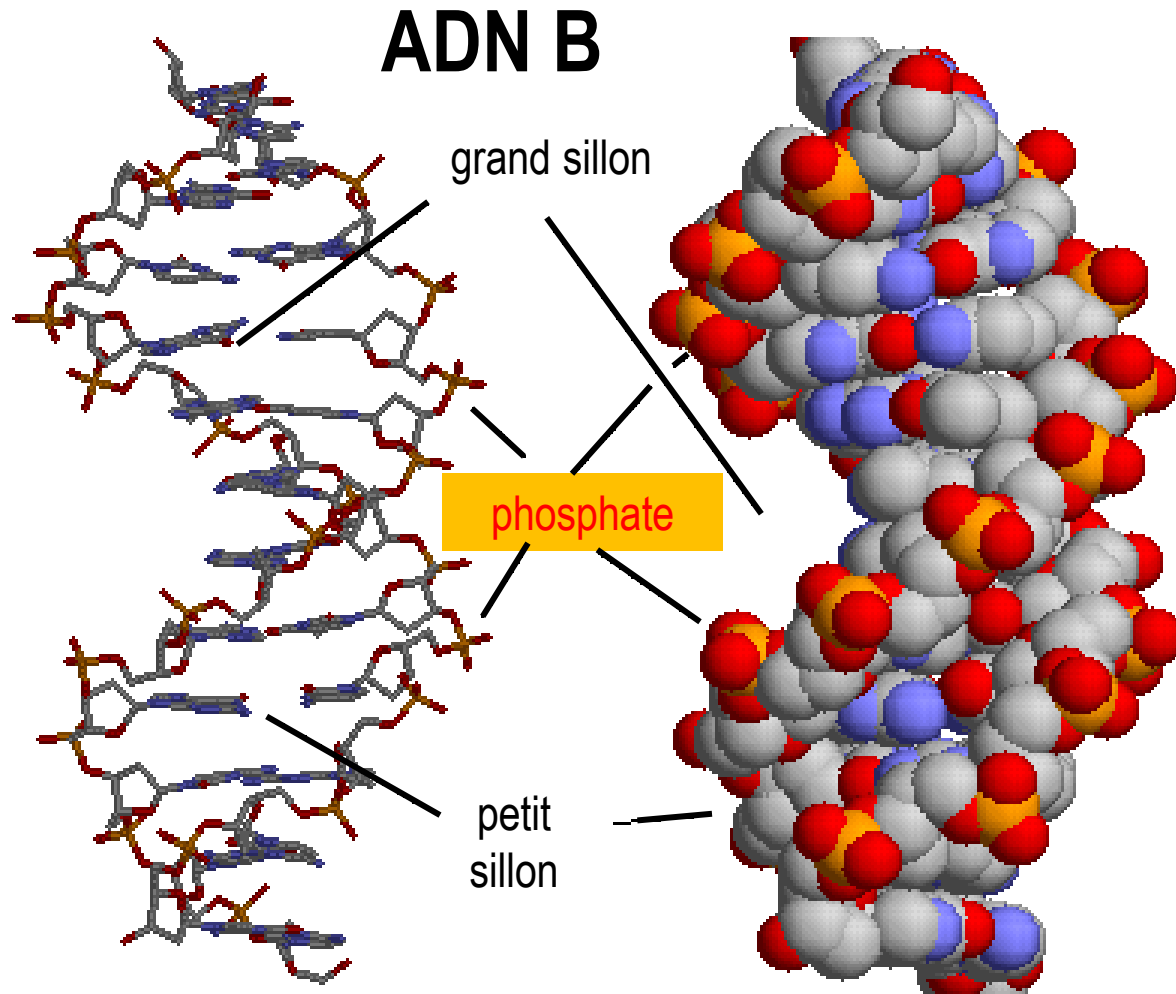


### ADN B



### 3- Structure spatiale

#### C- Double hélice/Propriétés



Vue de dessous



## 3- Structure spatiale

### C- Double hélice/Propriétés

## QUIZZ

Quelle est la longueur d'une molécules d'ADN humaine?

Nombre de paires de base dans un génome humain : 3 milliards.

L'Homme est un être diploïde.

Distance entre 2 paires de bases successives : 0,34 nm.

A- 2 km

B- 200 m

C- 2 m

D- 20 cm

E- 20 mm

## REPONSE

Longueur d'une molécule d'ADN

$3 \times 10^9 \text{ pb} \times 0,34 \times 10^{-9} \text{ m/pb}$

Longueur totale

2 copies  $\times 1 \text{ m}$

### 3- Structure spatiale

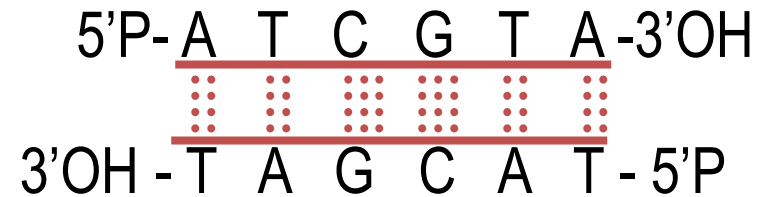
#### C- Double hélice/Propriétés

#### DENATURATION

Chauffer un ADN double brin rompt les liaisons hydrogène et modifie la capacité d'absorption de la lumière des bases azotées.

Une augmentation de l'absorption de lumière U.V. (effet hyperchrome) permet le suivi du phénomène par spectrophotométrie.

La séparation est réversible, la molécule d'ADN peut se reformer à l'identique en faisant diminuer lentement la température du milieu.



dénaturation



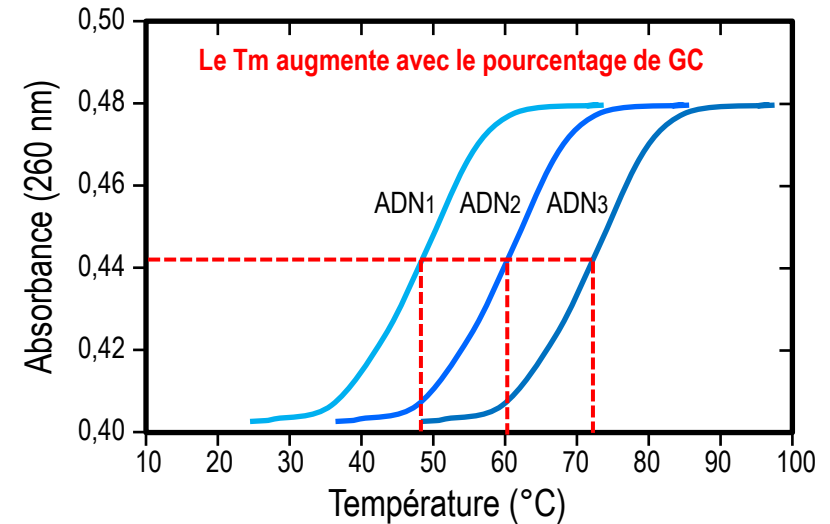
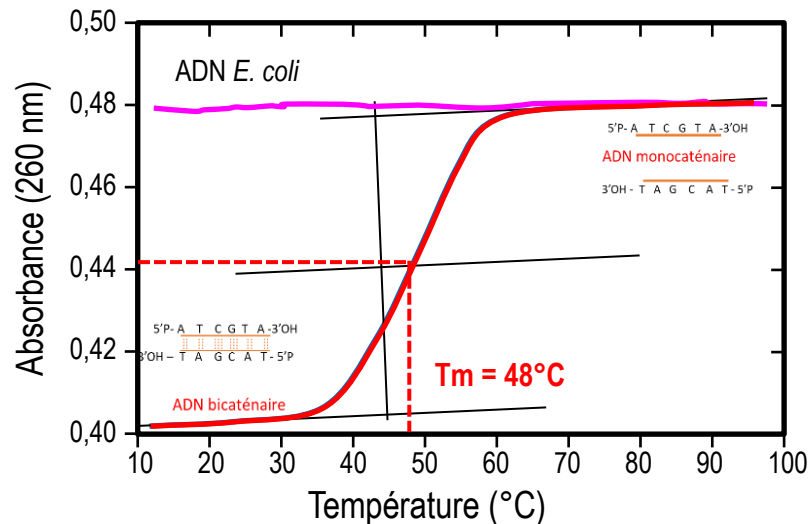
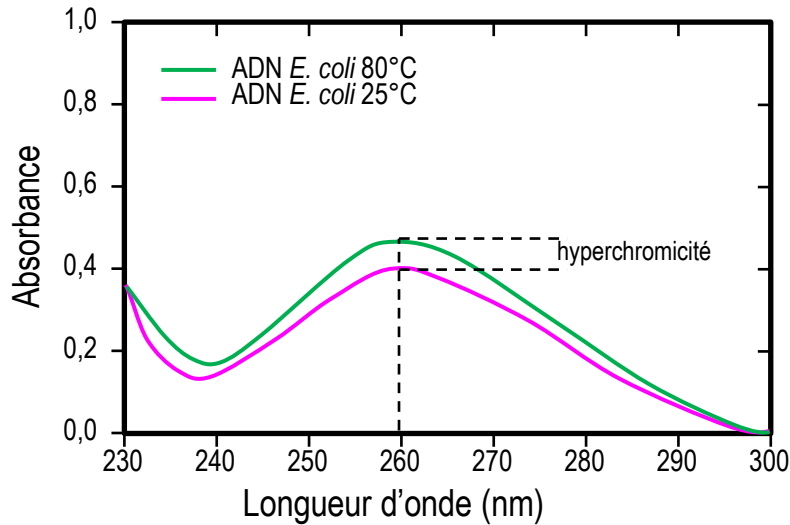
renaturation



## 3- Structure spatiale

### C- Double hélice/Propriétés

#### DENATURATION



L'ADN double brin chauffé à 100°C est dénaturé sous forme de 2 ADN simples brins.

1- On laisse la température du tube redescendre lentement, puis à température ambiante, on remesure l'absorbance à 260 nm : on retrouve la valeur d'absorbance initiale avant chauffage.

L'ADN s'est ré-apparié, il s'est renaturé.

2- On dépose le tube sur de la glace, l'absorbance à 260 nm n'a pas changé : on retrouve la valeur d'absorbance après chauffage.

L'ADN est resté dénaturé.



## 3- Structure spatiale

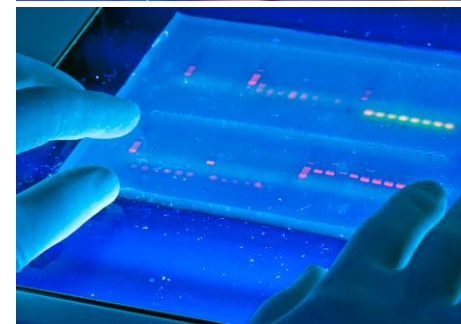
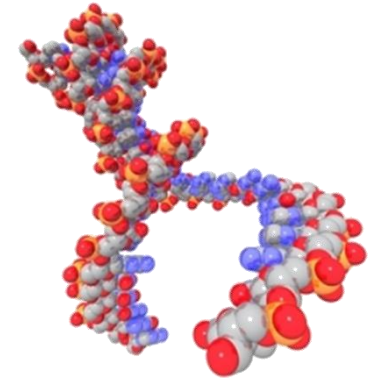
### C- Double hélice/Propriétés

#### RESPIRATION DE L'ADN

A des températures inférieures au  $T_m$ , l'ADN double brin est globalement stable. Cependant, il se produit des dissociations sur un nombre limité de paires de bases.

Ces dissociations sont dues à des rotations de liaisons au sein du cycle furane des désoxyribooses ou des liaisons N-glycosidiques.

Ces phénomènes sont rapides ( $1 \mu s$  environ) et permettent les interactions entre molécules, insertions de molécules intercalantes, transitions locales ADN B et autres types d'hélice.





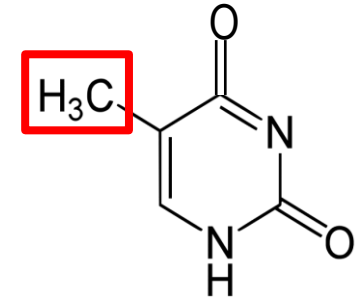
### 3- Structure spatiale

#### D- Modifications chimiques des acides nucléiques

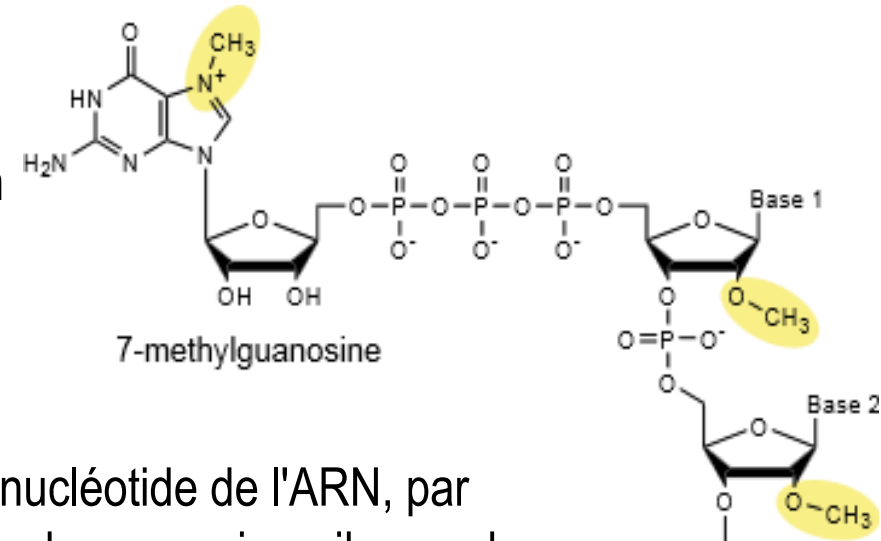
La cytosine peut être **méthylée** sur son carbone 5.

La désamination de la cytosine méthylée donne une **thymine**, base normale de l'ADN.

Ceci peut entraîner l'apparition d'une mutation.



Chez les eucaryotes, les ARN messagers, subissent une modification de leur extrémité 5' afin de les protéger contre la dégradation par des exonucléases.

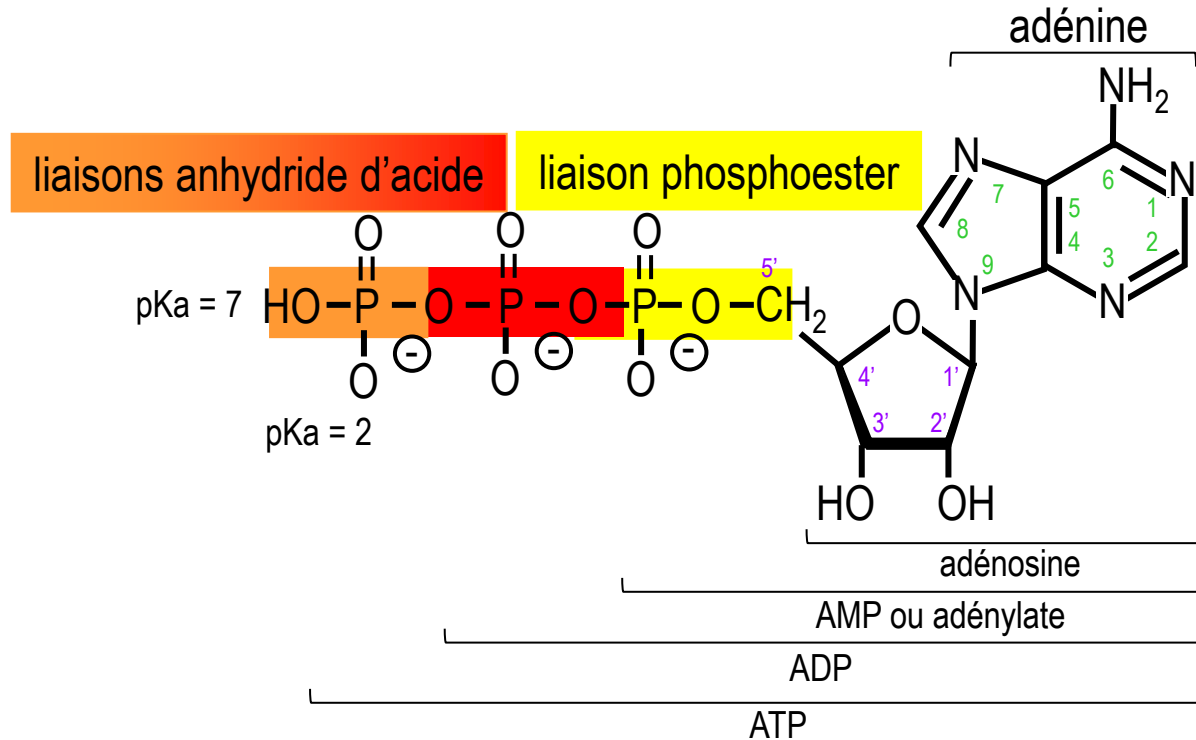


L'addition d'une 7-méthylguanosine sur le premier nucléotide de l'ARN, par une liaison 5'-5' triphosphate s'appelle la coiffe. Les deux premiers riboses de l'ARN transcrit subissent aussi une méthylation de leur fonction alcool en 2'.



## 4- Des nucléotides remarquables : ATP, AMPc et GMPc

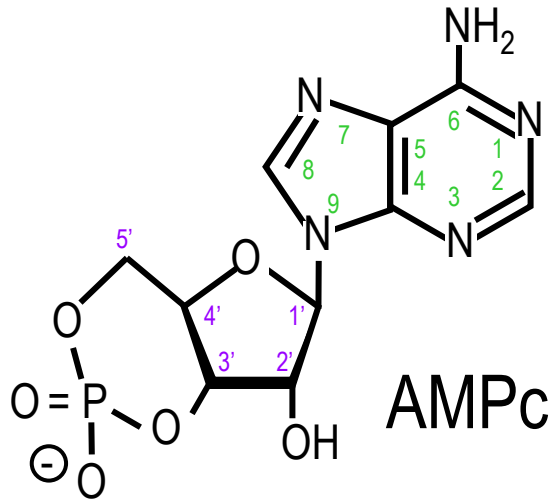
Dans les cellules, les nucléosides sont retrouvés sous formes **mono, di- et triphosphates**.



La valeur du  $pK_a$  de la seconde fonction acide du dernier acide phosphorique est de 7, donc à pH 7, on a 50% de forme protonée, 50% de forme déprotonée.



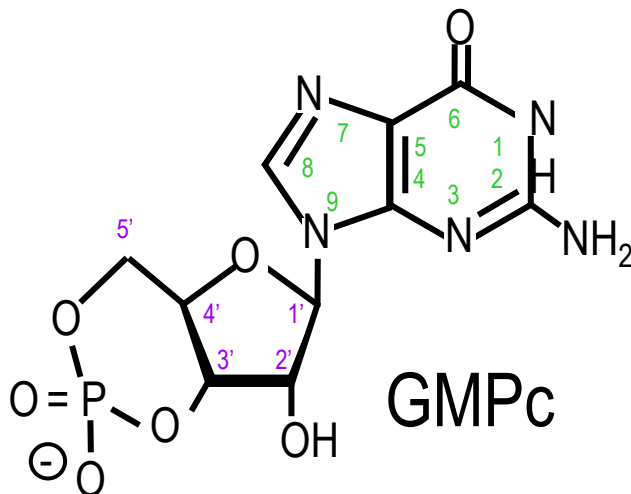
## 4- Des nucléotides remarquables : ATP, AMPc et GMPc



L'AMP cyclique (AMPc) et le GMP cyclique (GMPc), font partie des messagers secondaires.

L'AMPc est produit à partir d'ATP par l'adénylate cyclase, le GMPc dérive du GTP grâce à la guanylate cyclase.

AMPc et GMPc activent des enzymes comme les Protéines Kinases A ou G qui sont des activateur du métabolisme cellulaire.

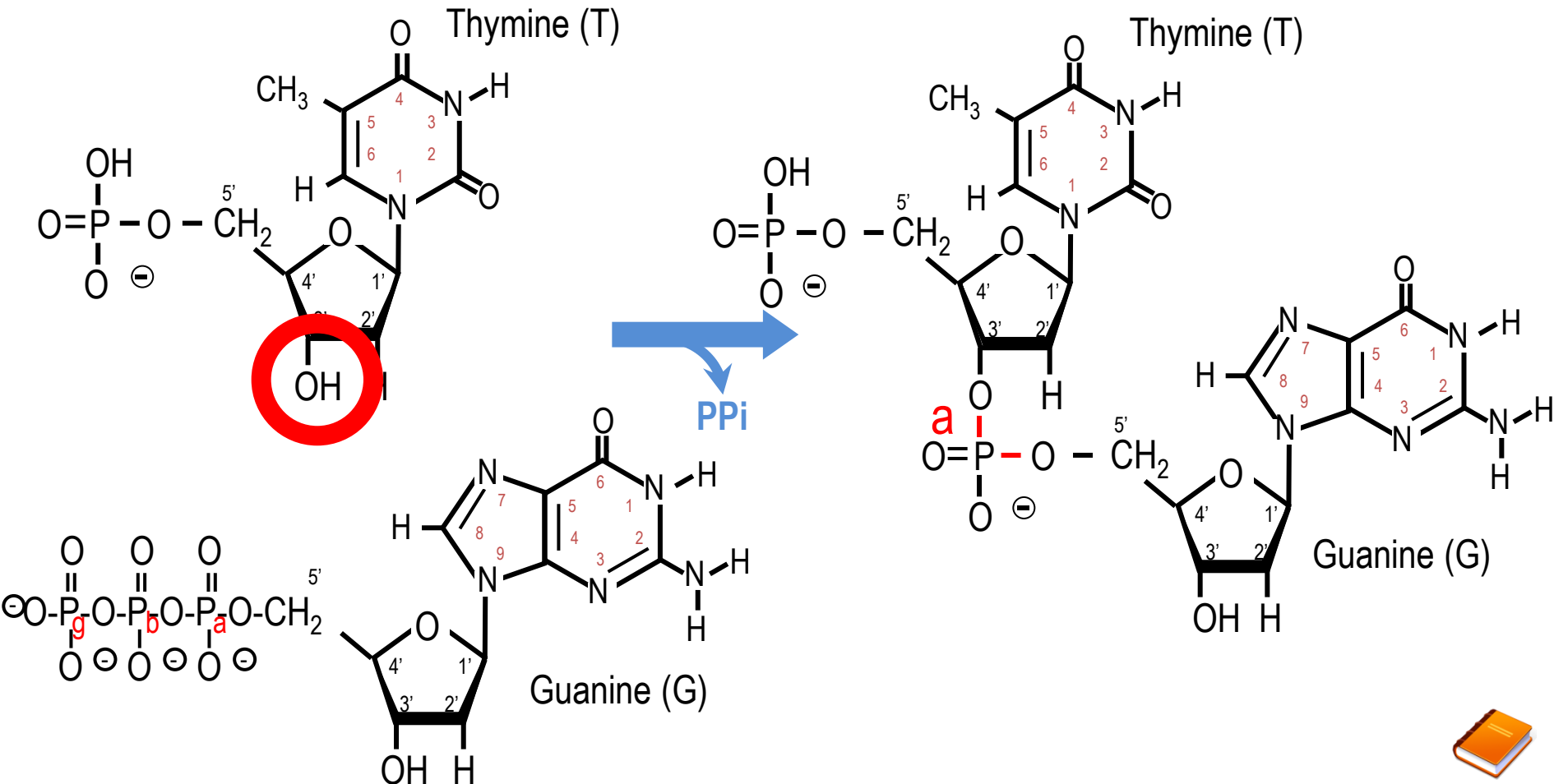


AMPc et GMPc sont dégradés par certaines phosphodiésterases qui sont inhibées par la caféine et la théine.



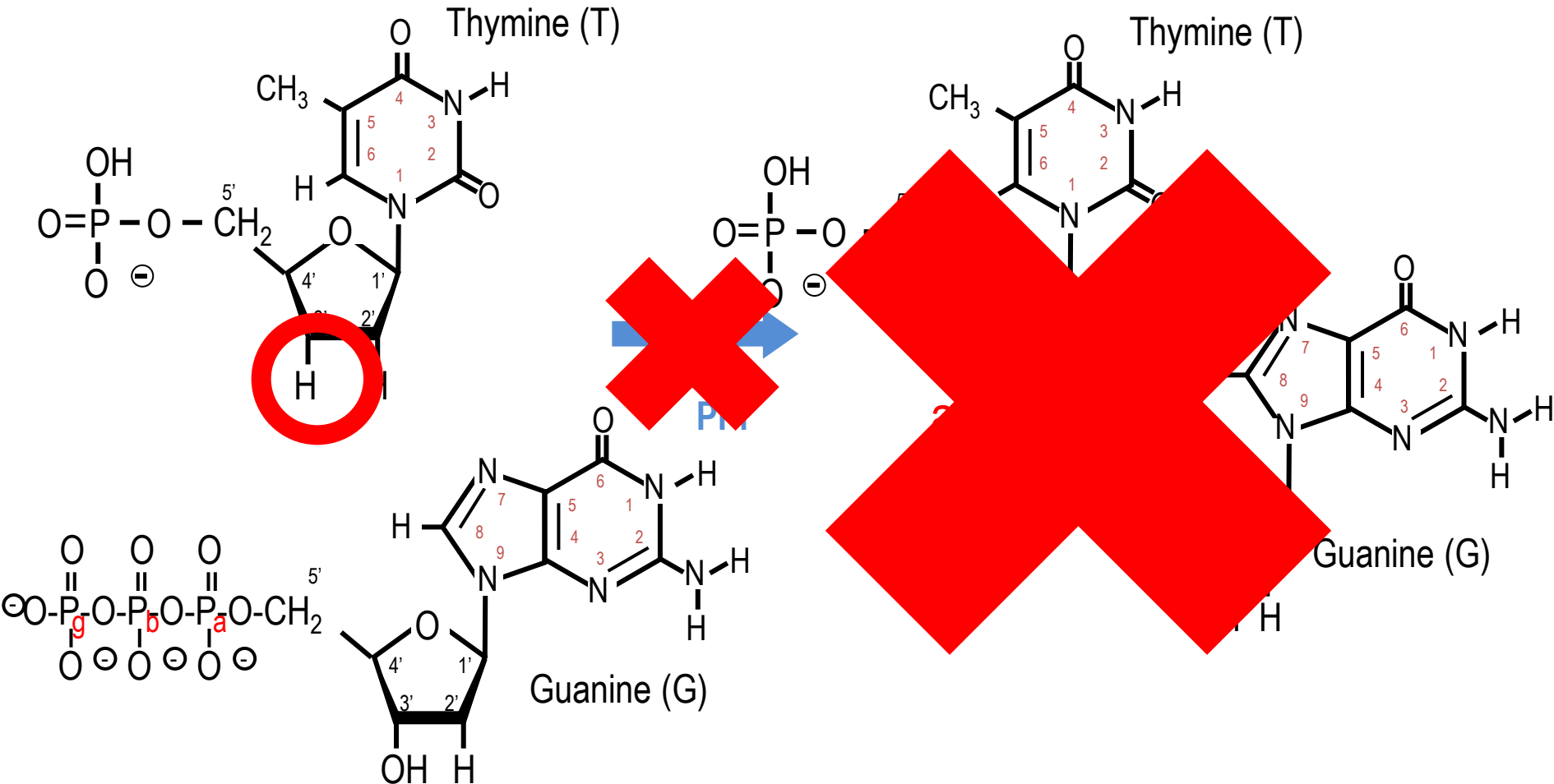
## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

On a vu l'addition d'un nucléotide en 3'-OH...



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

Que se passe-t-il si il n'y a pas de 3'-OH ?

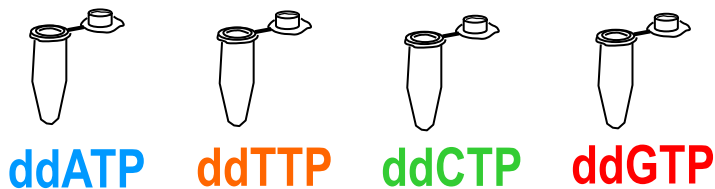
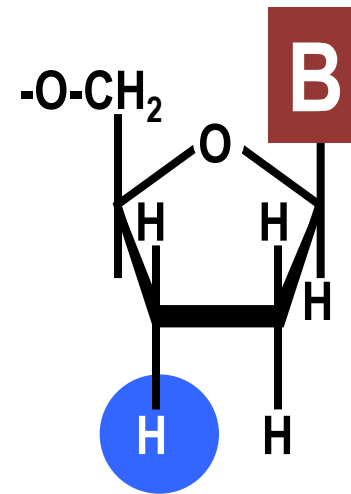
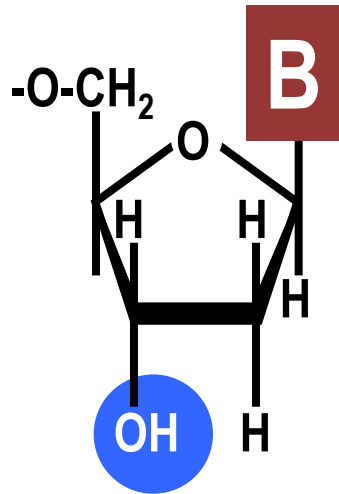


La réaction ne peut avoir lieu....

## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

L'idée...



ADN à séquencer  
ADN polymérase I  
amorce complémentaire (**excès**)  
mélange des 4 dNTPs (**dont 1 radioactif**)  
1 ddNTP **différent** selon le tube



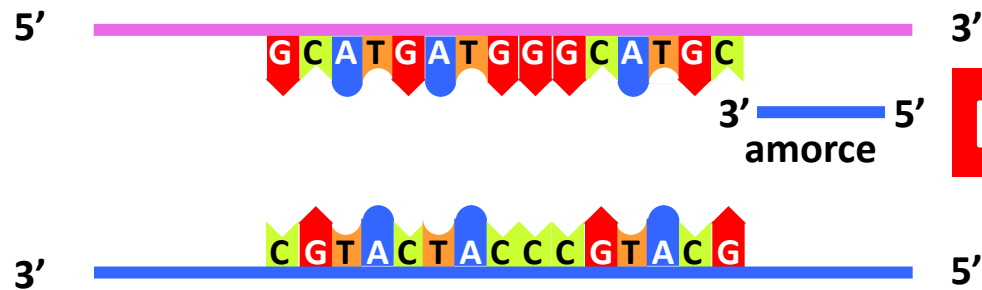
## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger



Chauffage

Diminution de température

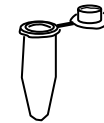


## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

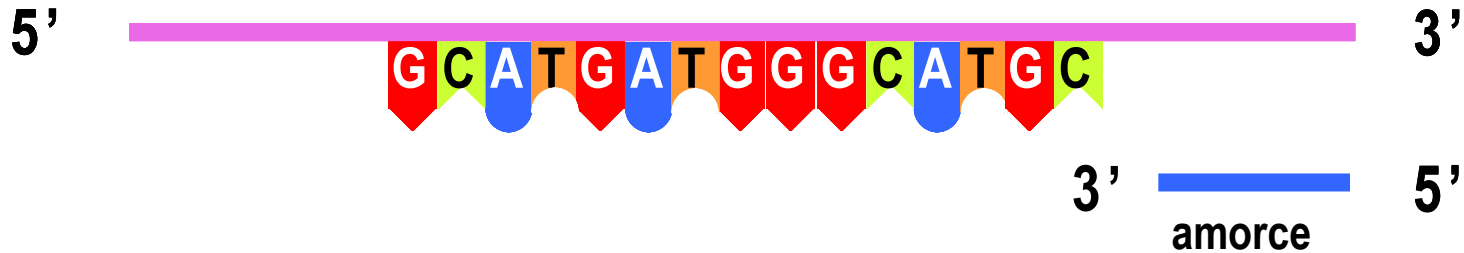
### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.

Regardons le tube contenant du ddCTP (ddCTP/dCTP = 0,01).



ddCTP

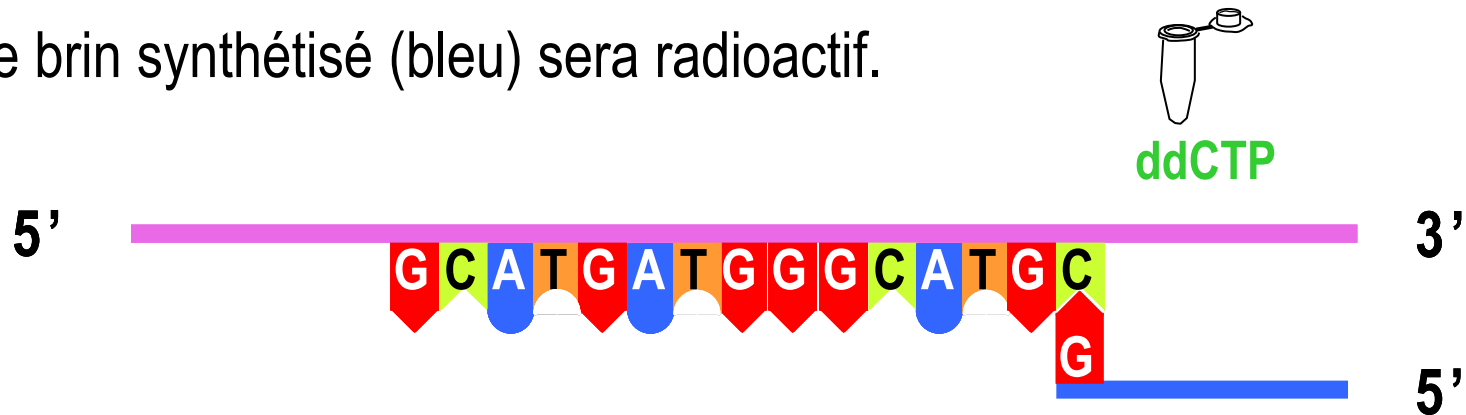




## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

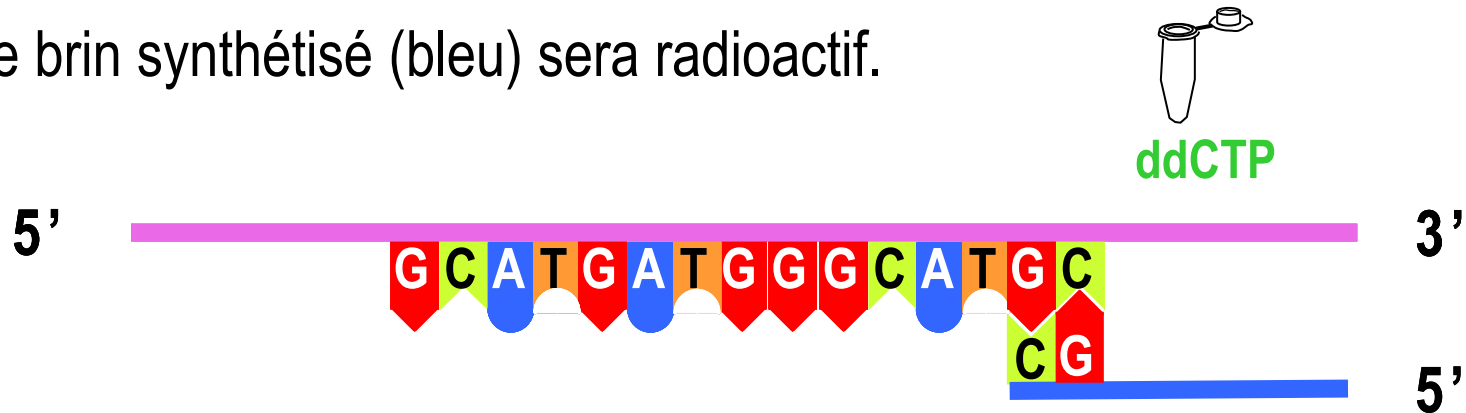
Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



Si le tube contient 1% de ddCTP et 99 % de dCTP :

- Dans 1 % des molécules, un ddCTP sera incorporé, puis le brin ne s'allongera plus
- Dans 99 % des molécules, un dCTP sera incorporé : la réaction peut continuer



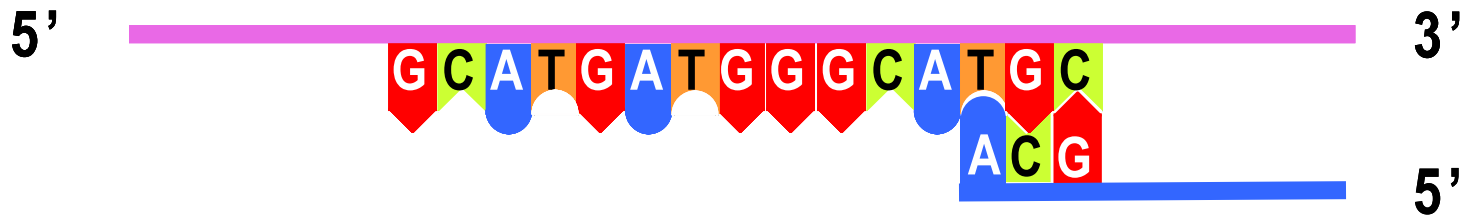
## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



ddCTP



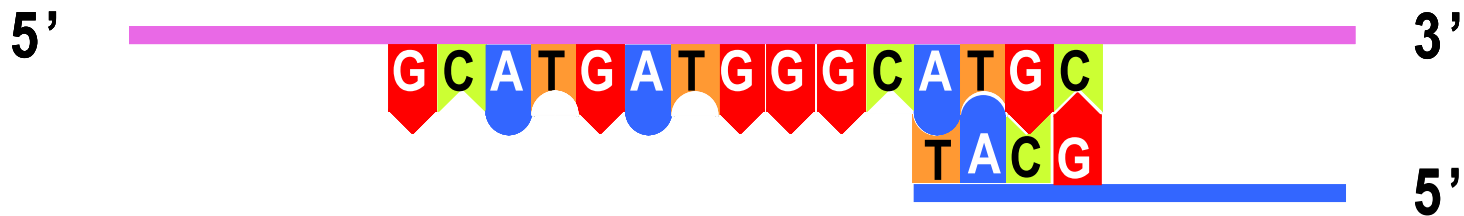
## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



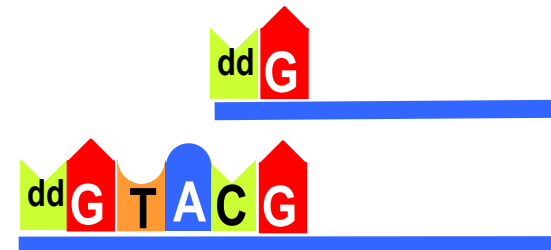
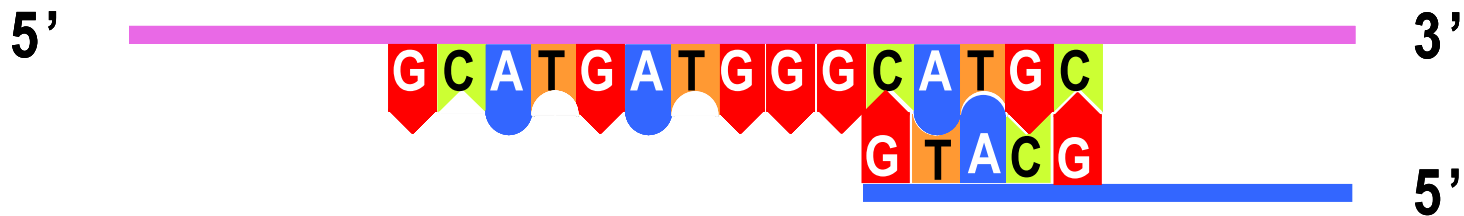
ddCTP



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

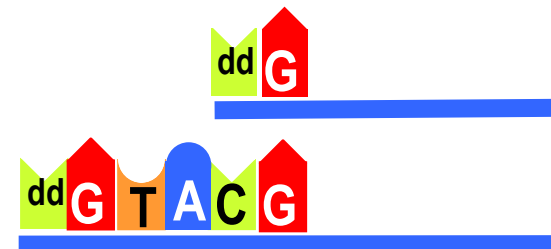
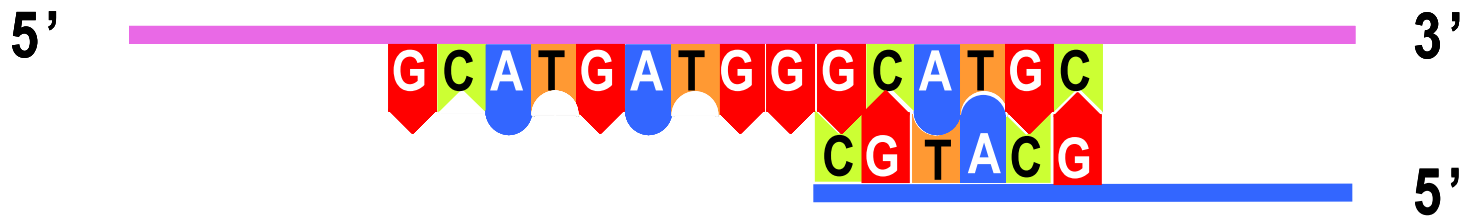
Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



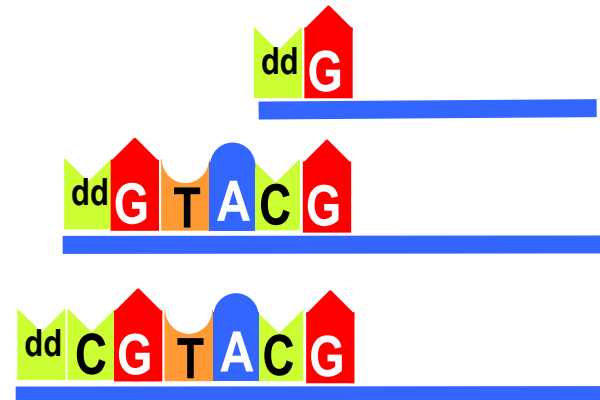
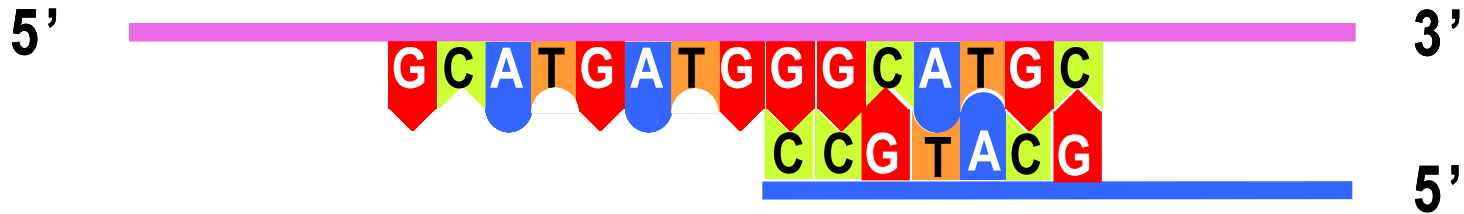
## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



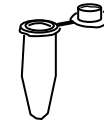
ddCTP



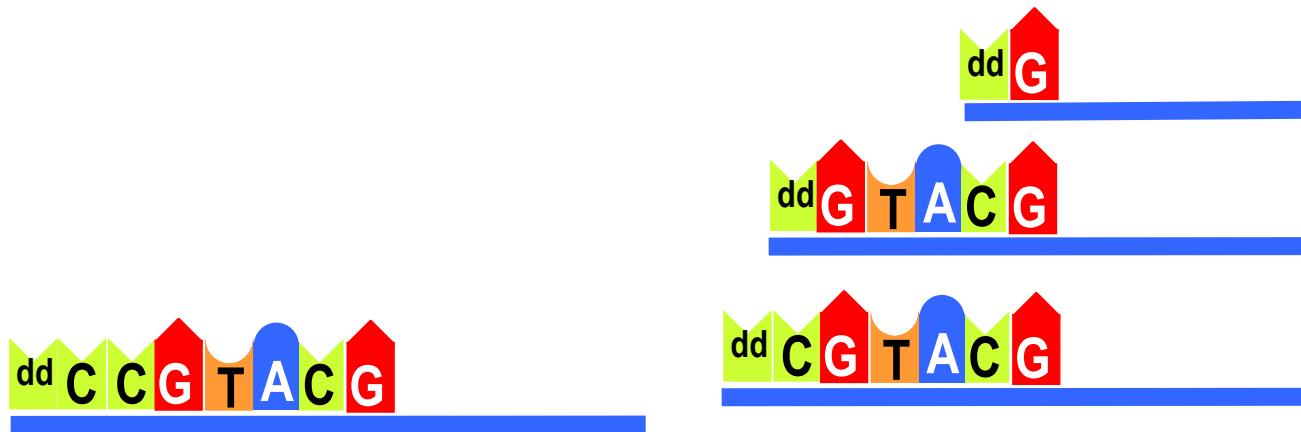
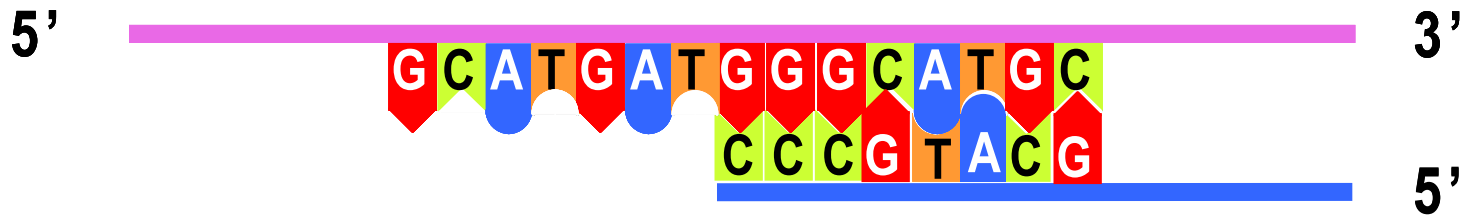
## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



ddCTP





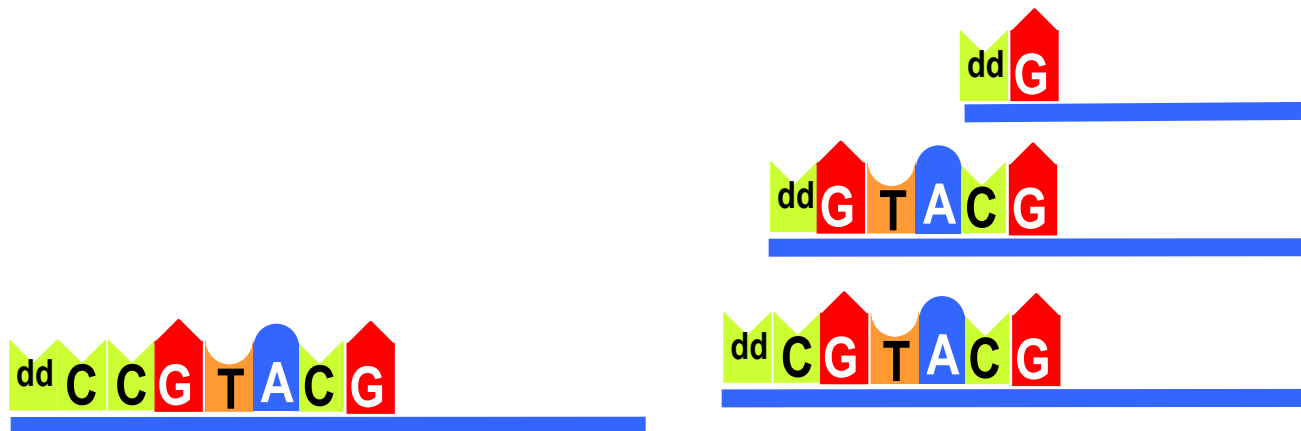
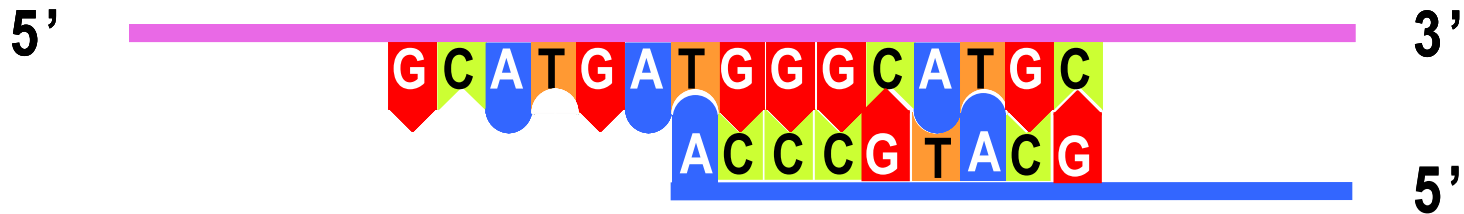
## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



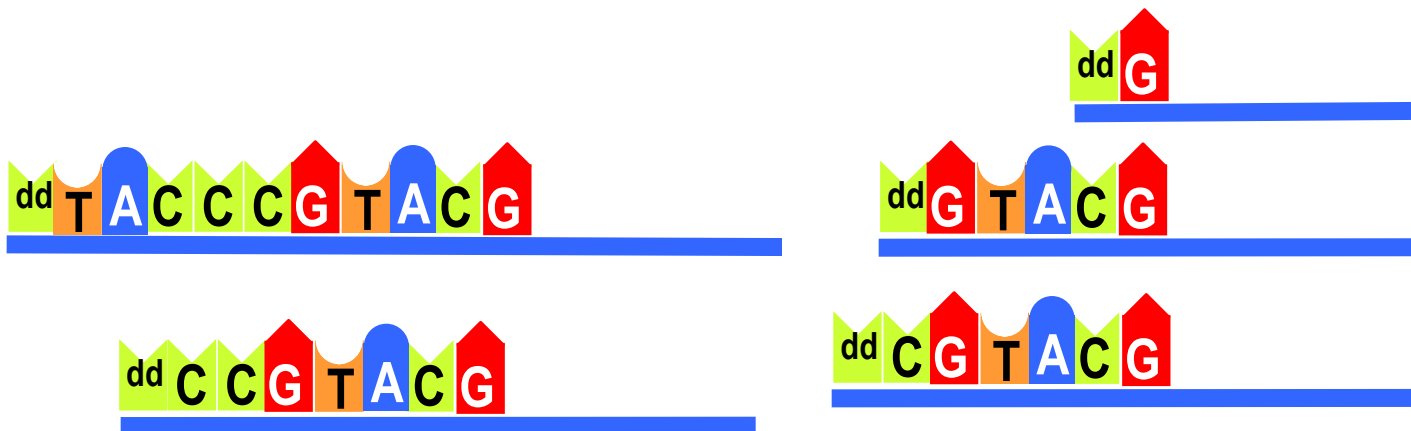
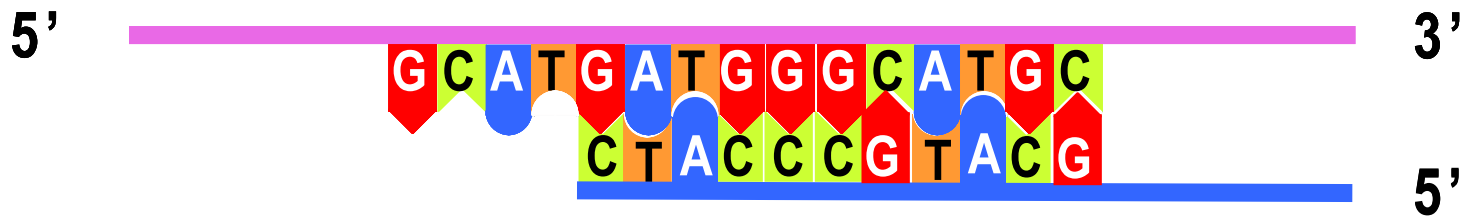
ddCTP



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

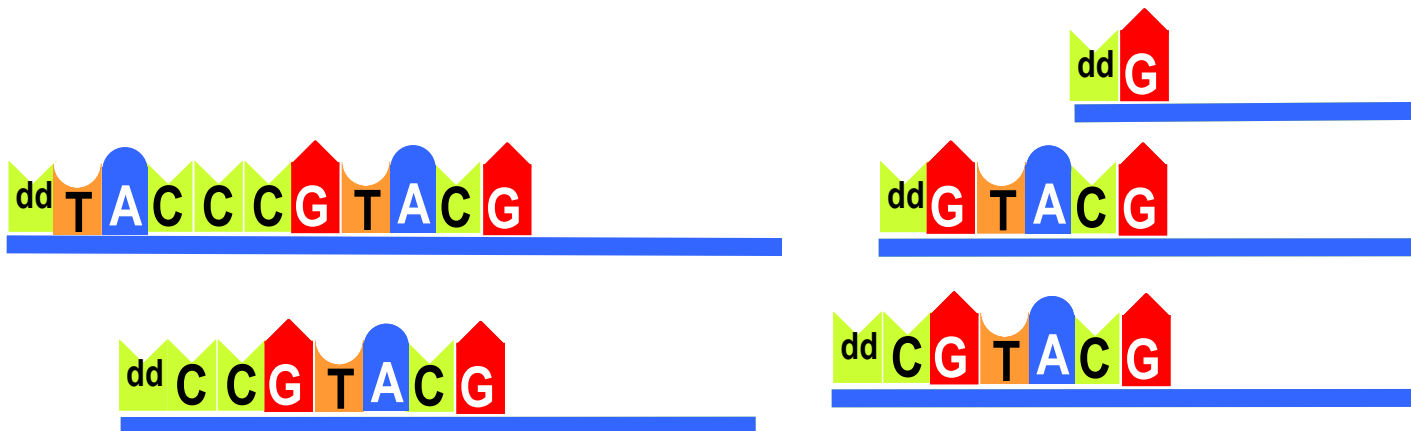
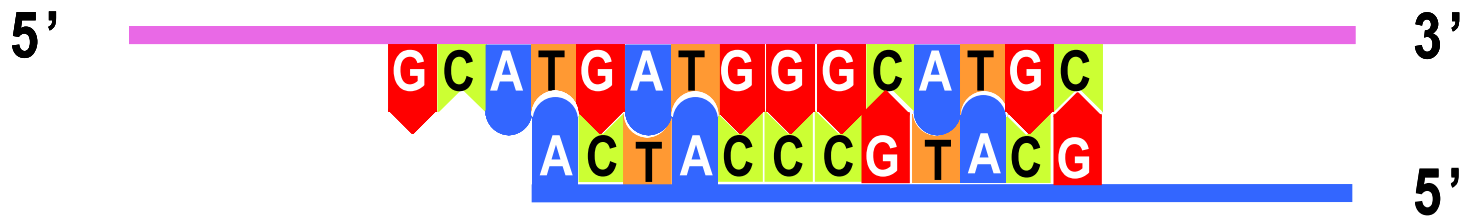
Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

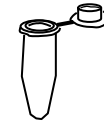
Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



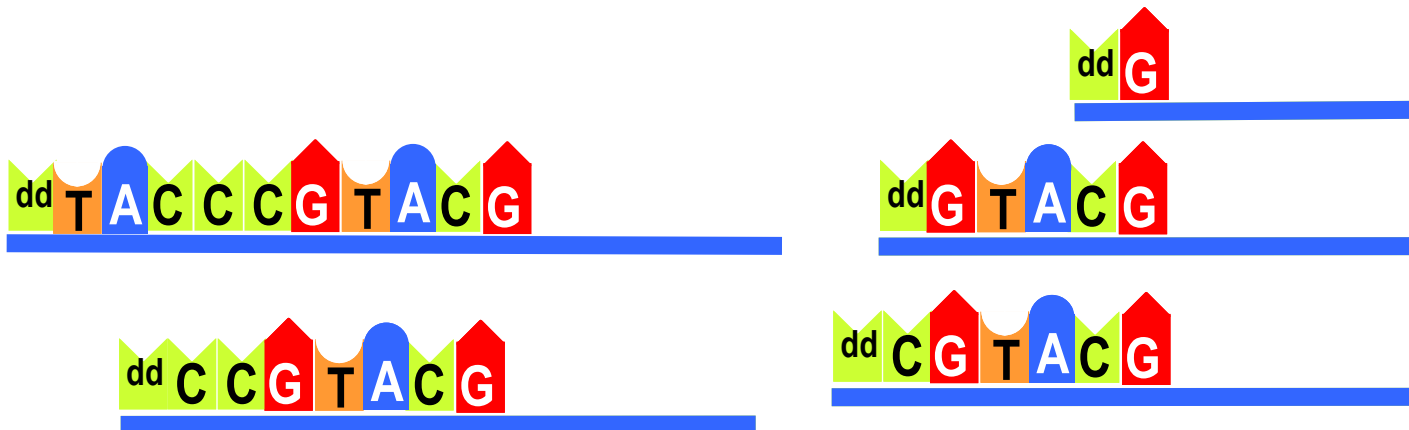
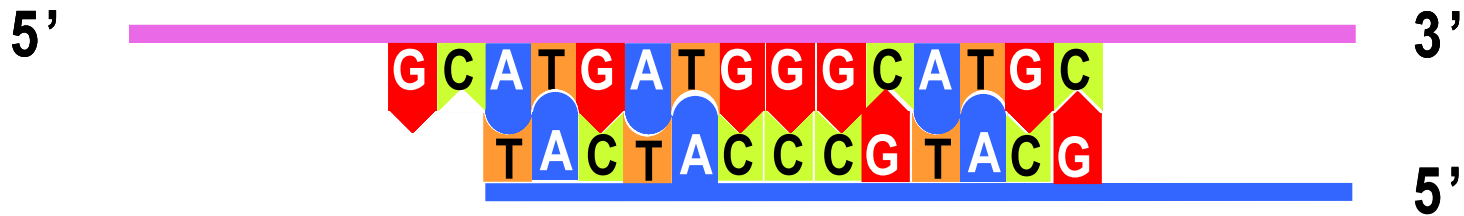
## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



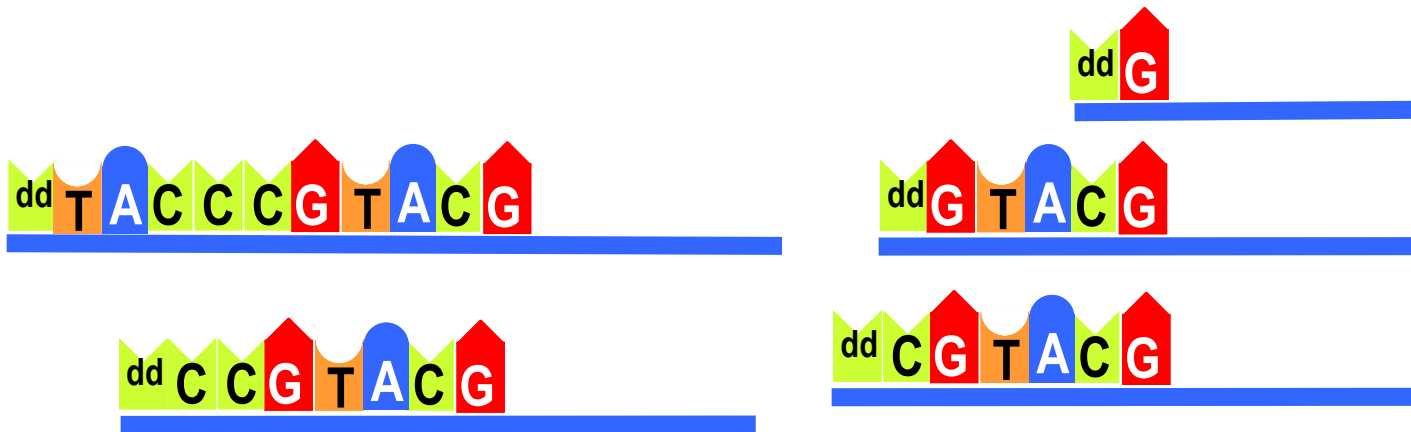
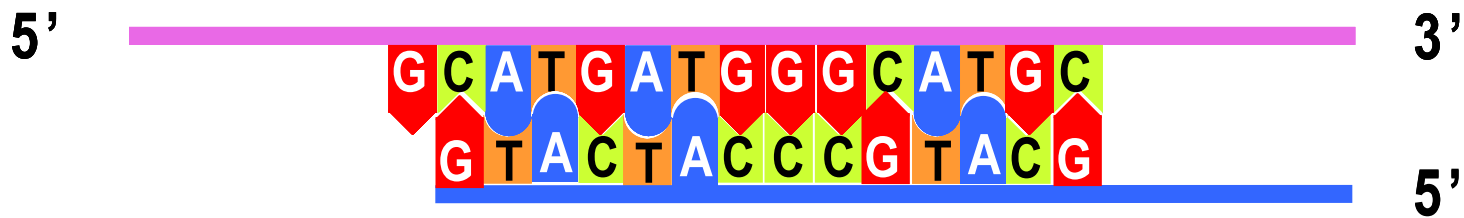
ddCTP



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

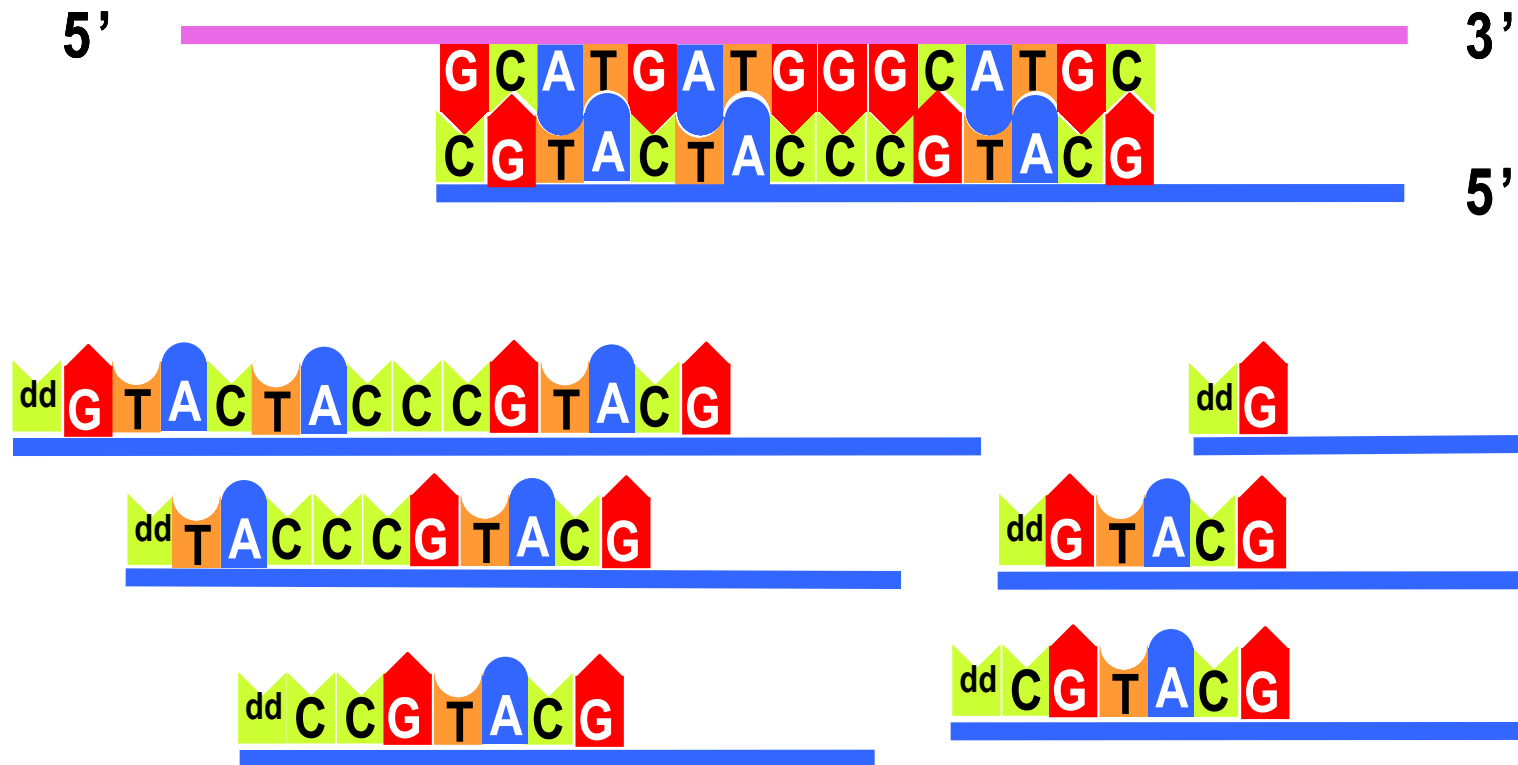
Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

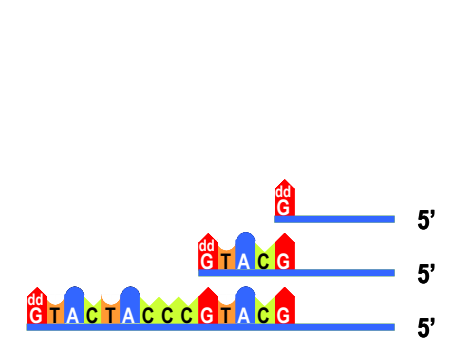
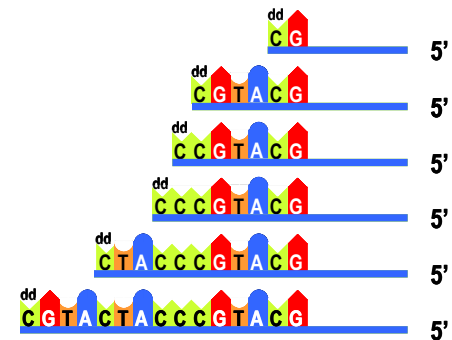
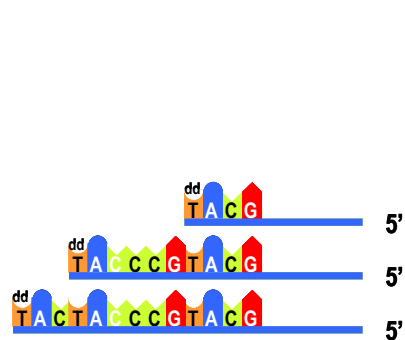
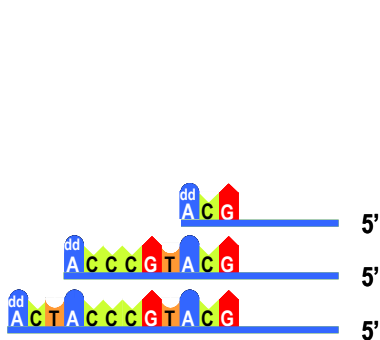
Seul le brin synthétisé (bleu) sera radioactif.



# V- Séquençage de l'ADN et PCR

## Méthode enzymatique de Frederick Sanger

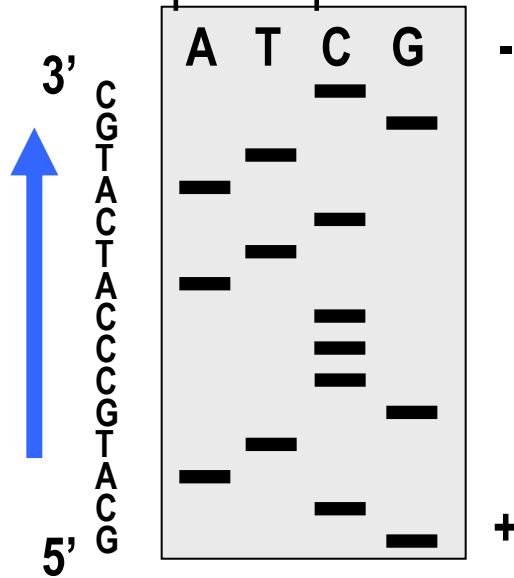
Séquences obtenues dans chaque tube.



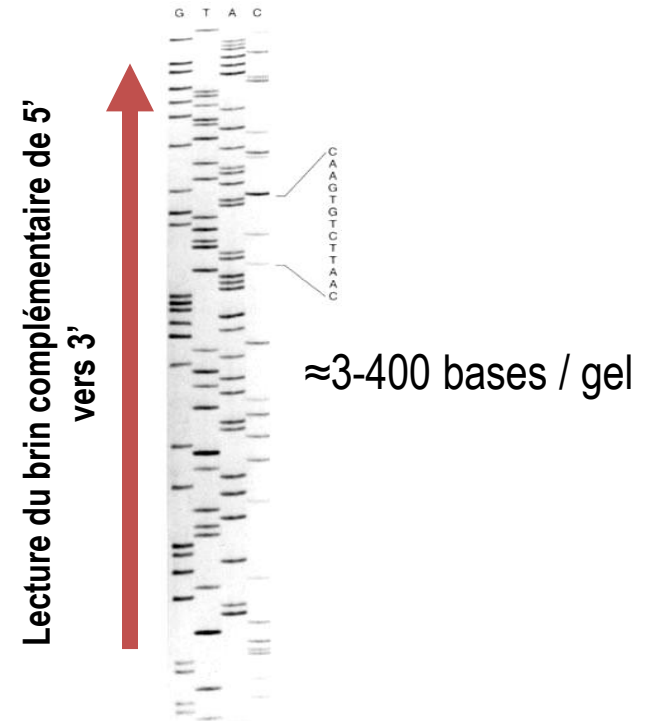
## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### Méthode enzymatique de Frederick Sanger

Séparation des molécules marquées par PAGE.



Séquence du brin complémentaire



Autoradiogramme d'un gel de séquence d'ADN (polyacrylamide)

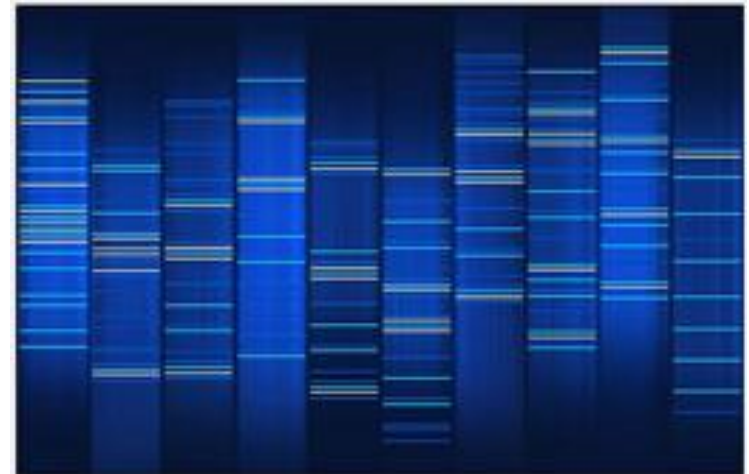




## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### LA PCR : LA PHOTOCOPIEUSE A ADN

Sur une scène de crime parfois les quantités de matériel biologiques sont faibles.



Comment arriver à avoir suffisamment de matériel pour en tirer des empreintes génétiques?

## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### LA PCR : LA PHOTOCOPIEUSE A ADN



### Kary Bank Mullis

Il a reçu le prix Nobel de chimie de 1993 pour la découverte de la réaction de polymérisation en chaîne .

## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

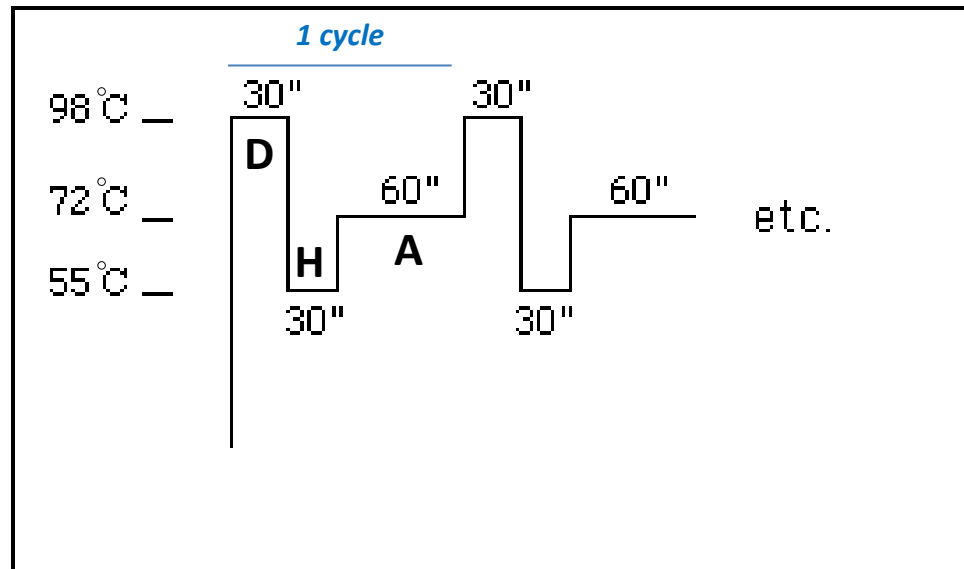
### LA PCR : LA PHOTOCOPIEUSE A ADN

La PCR comment ça marche?



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### LA PCR : LA PHOTOCOPIEUSE A ADN



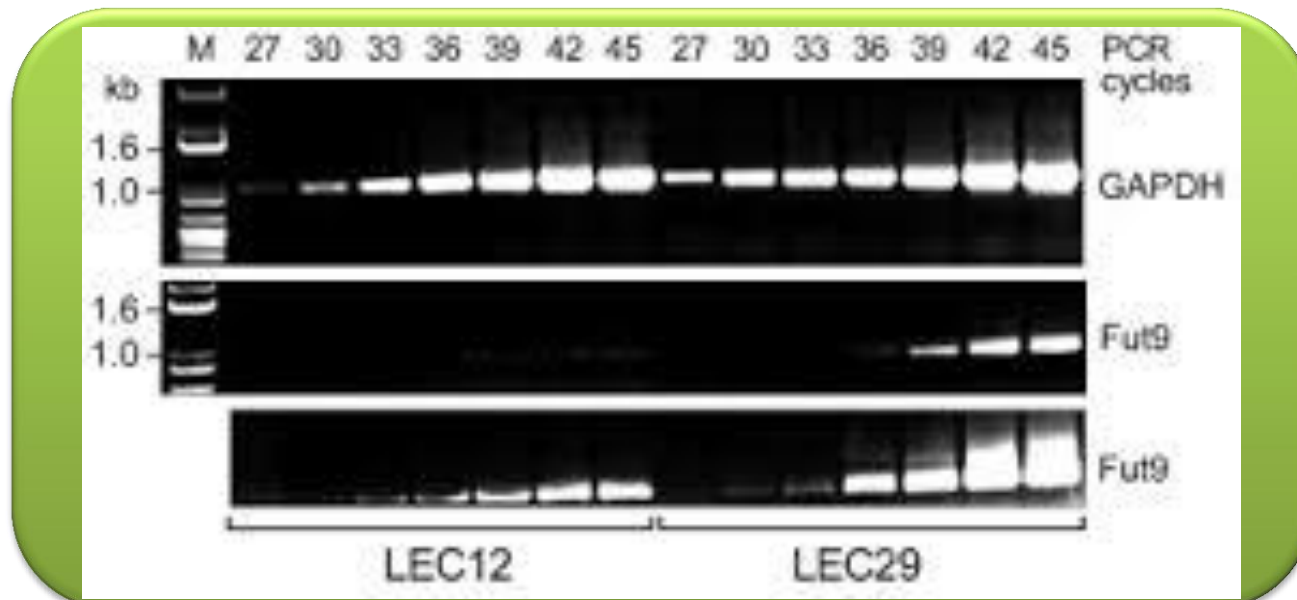
## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### LA PCR : LA PHOTOCOPIEUSE A ADN

A chaque cycle, la quantité d'ADN présente dans le tube est doublée.

**N cycles : quantité initiale x  $2^N$**

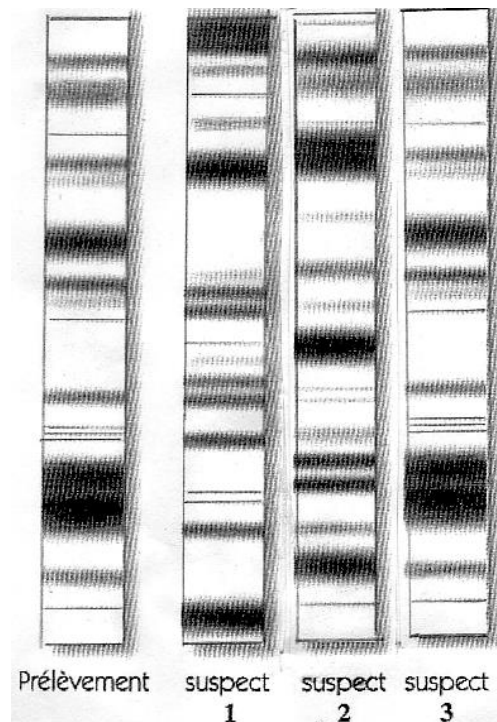
En fin de PCR l'enzyme (Taq polymérase) a de moins en moins de substrat pour fonctionner et le rendement de réaction diminue ( $<2$ ).



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### EMPRUNTES GENETIQUES

L'empreinte génétique repose sur le fait suivant : bien que deux humains aient une large majorité de leur patrimoine génétique identique, un certain ensemble de séquences dans leur ADN reste spécifique à chaque individu (en raison du polymorphisme).



## 5- Séquençage de l'ADN et PCR

### LA PCR QUANTITATIVE

PCR en temps réel utilisant du SYBR Green comme sonde.

### Méthode des $\Delta\Delta Ct$

