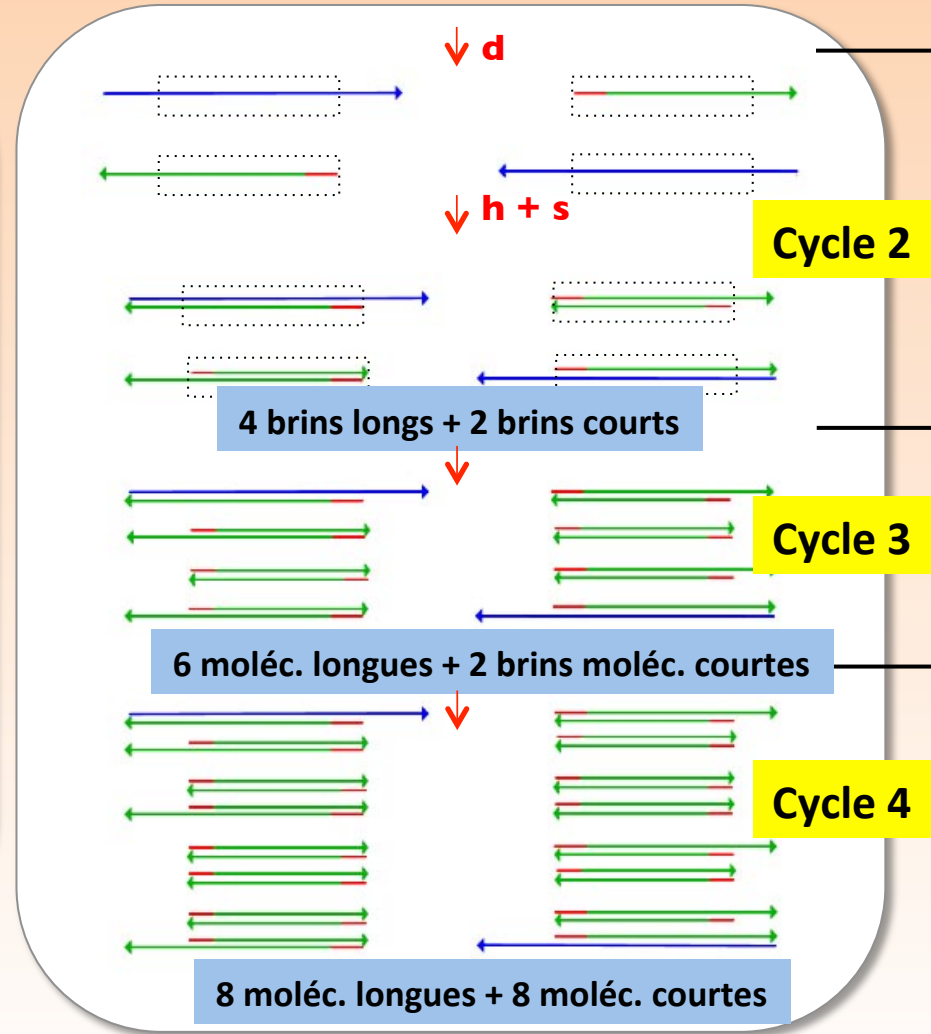
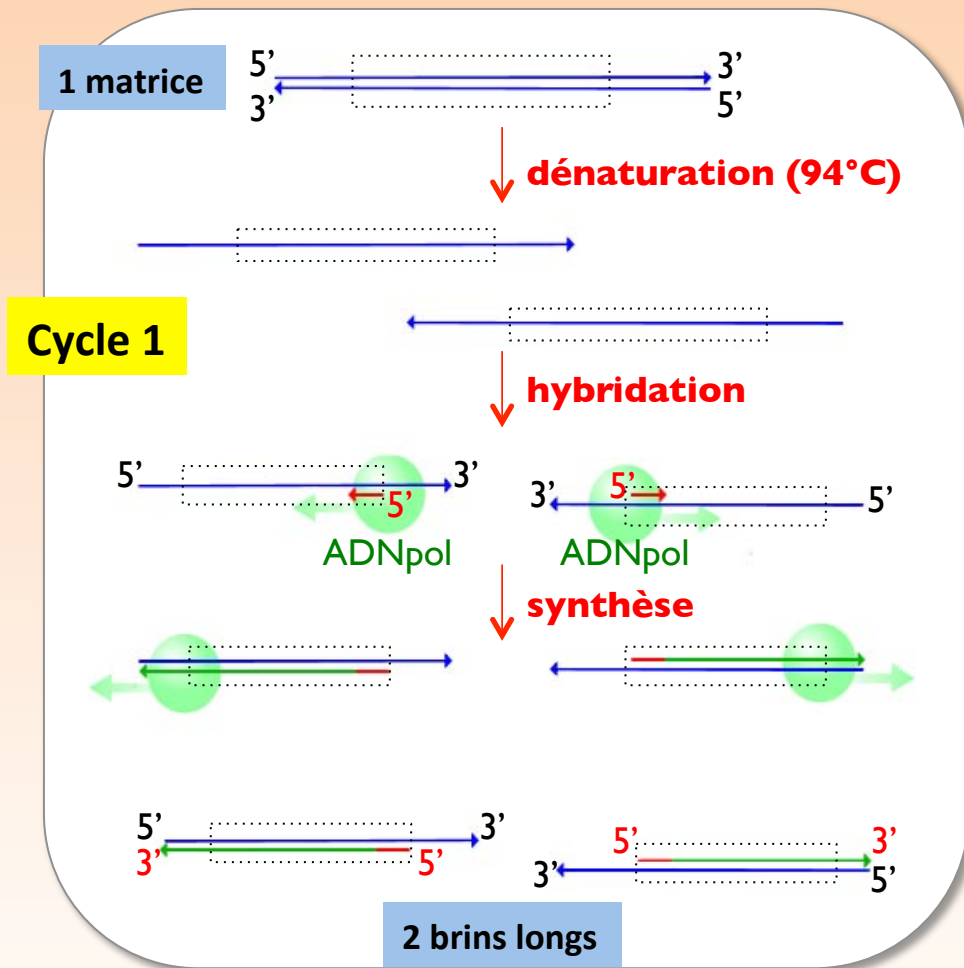


La PCR : Production Exponentielle d'ADN Cible



Sources d'ADN Polymérase Thermostables

ADN polymérase « basique » :

- Taq polymérase** (*Thermus aquaticus*) - 72°C (½-vie 40min 95°C)
- activité terminal transférase
 - absence d'activité exonucléase

Taq polymérases « améliorées » :

- recombinantes*
hot start

ADN polymérase alternatives :

- Pfu polymérase** (*Pyrococcus furiosus*) - 74°C
- Pwo polymérase** (*Pyrococcus woesei*) - 72°C
- Vent , Tli polymérase** (*Thermococcus litoralis*) -72°C (90% activité après 1h à 95°C)

- activité exonucléase
- fiabilité (taux d'erreur # 10^{-6})

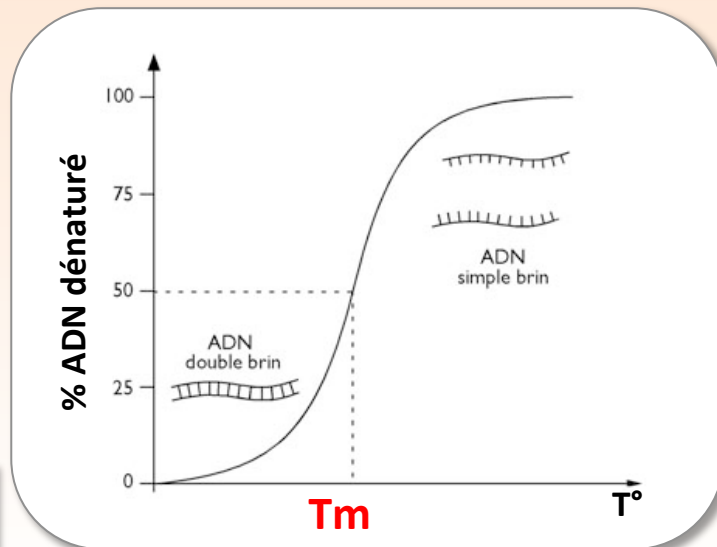
Les (Bonnes) Amorces

5' TGATACGTA ACTGGAGGAC 3'



3' ACGTCCTGATCTAACTATGCATTGACCTCCTGACCTAATACTAATTGG 5'

- **Spécificité** : 3 bases ($4^3 = 64\text{nt}$) ; 20 bases ($4^{20} = 10^{12}\text{nt}$)
- « CG clamping »
- **Température de fusion (T_m)**



Proportionnelle au nombre de liaisons H mises en jeu

- Longueur de l'amorce
- Composition GC de l'amorce
- Concentration saline du milieu réactionnel

Température d'Hybridation Amorces - Matrice

Formules simplifiées pour le calcul du Tm :

Amorces <13 bases

$$T_m = (nbA + nbT) * 2 + (nbG + nbC) * 4$$

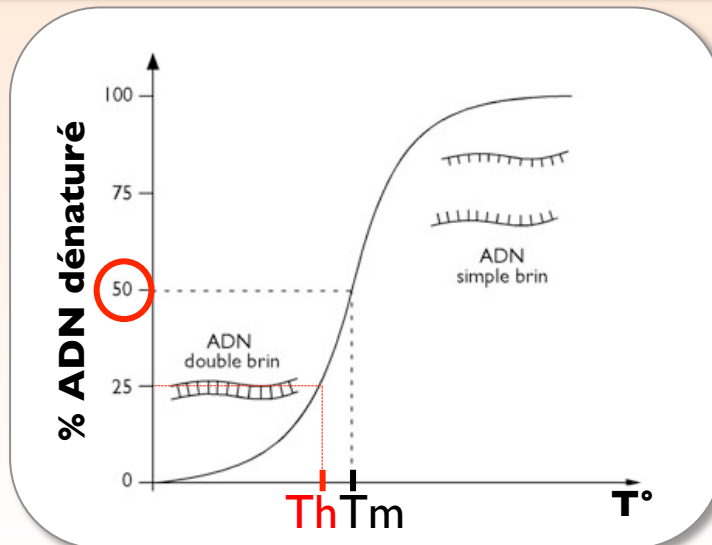
Amorces >14 bases

$$T_m = 64.9 + 41 * (nbG + nbC - 16.4) / (nbATGC)$$

Formule corrigée en fonction de la concentration saline :

$$T_m = 100.5 + (41 * (yG + zC) / (wATGC)) - (820 / (wATGC)) + 16.6 * \log_{10}([Na^+])$$

[Na⁺] en mM

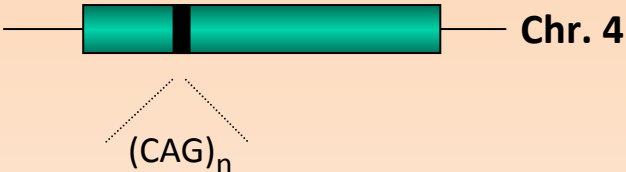


$$T^{\circ} \text{ hyb} = T_m - 3 \text{ à } 5^{\circ} \text{C}$$

Utilisation des VNTR pour le Diagnostic

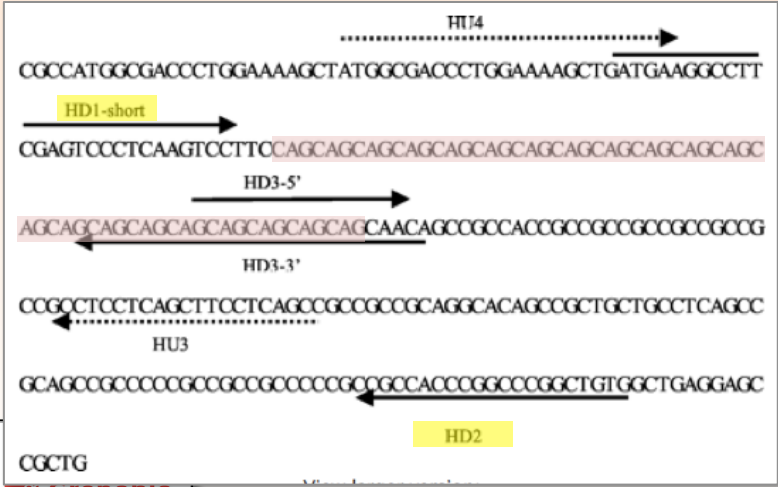
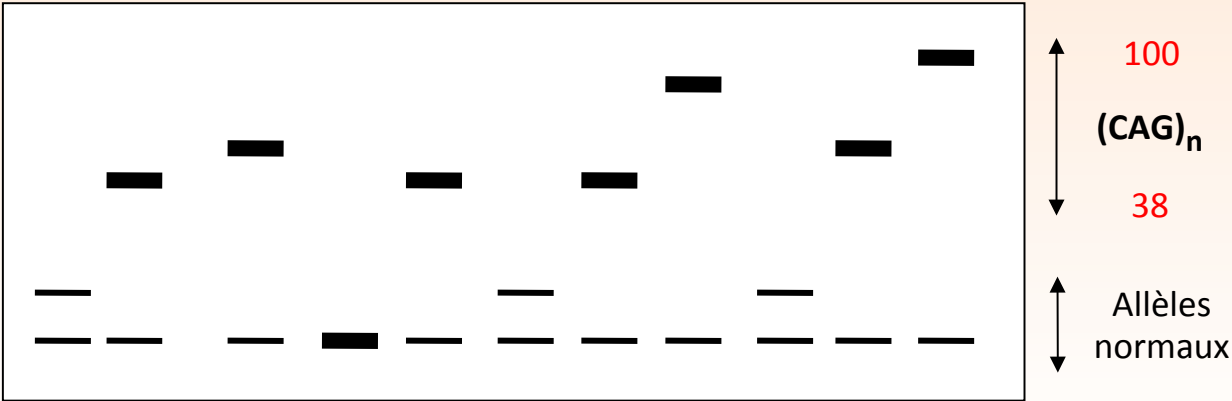
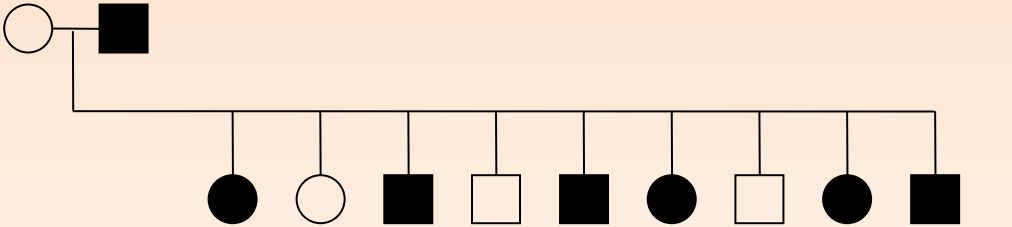
La chorée de Huntington (maladie de Huntington) :

- Dégénérescence des neurones
- Fréquence: 1:10.000
- Maladie dominante



Le nombre de répétitions (CAG) est **naturellement polymorphe** dans la population humaine.

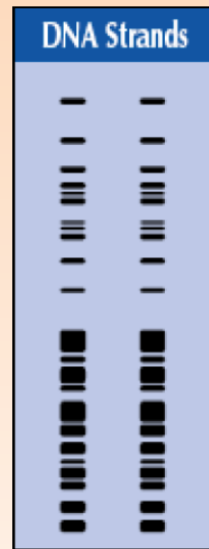
- Si $8 < n < 36$ protéine normale
- Si $n > 37$ protéine mutante



Identification Humaine par Génomique Moléculaire



1er fichier
d'empreintes digitales :
Scotland Yard **1901**
(UK)



1er fichier
d'empreintes génétiques :
Forensic Science Service **1985**
(UK)

Médecine légale

Identification de victimes :

- tsunami en Thaïlande
- charniers au Kosovo
- attentats du 11 sept 2001
- accident du tunnel du Mont Blanc, etc.

Filiations :

- tests de paternité
- filiation après décès (Yves Montand)
- Identification des restes des Romanov

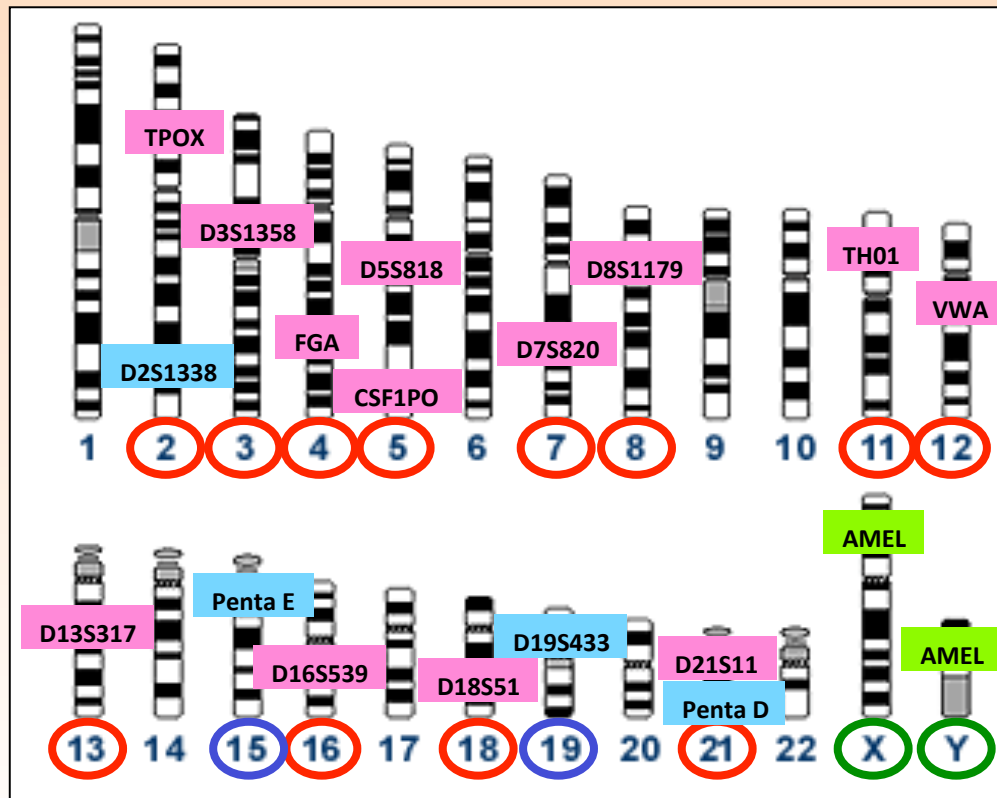
Police scientifique :

Identification de suspects :

- viols
- meurtres
- *mais aussi qques fois lors de vol de scooter...*

Les Marqueurs STR (=VNTR) des Polices Scientifiques

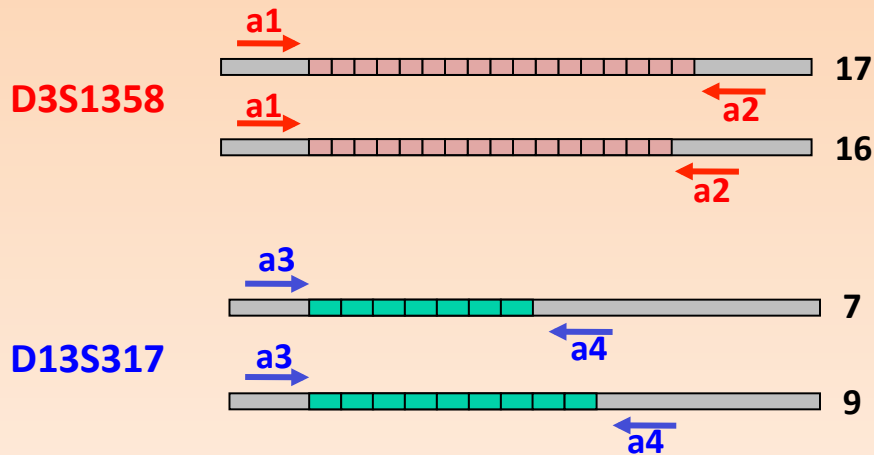
CODIS: Combined DNA Index System - 13 marqueurs autosomaux **principaux** et 1 marqueur **sexuel**
 - plusieurs marqueurs autosomaux **secondaires**



Génotypage STR :

- nécessite très peu d'ADN (PCR)
- partiellement dégradé (STR=séq. courtes)
- détection rapide & fiable

Détection des Allèles STR par PCR



PCR n°1

PCR n°2

Allele Frequencies	
Locus <u>D3S1358</u>	
Race <u>Caucasian</u>	
(N = 203)	
Allele	Frequency
12	0.012
13	0.012
14	0.140
15	0.246
16	0.222
17	0.222
18	0.163
19	0.012

Proba = $2pq$

$P = 2 \times 0,222 \times 0,222 = 0,098$

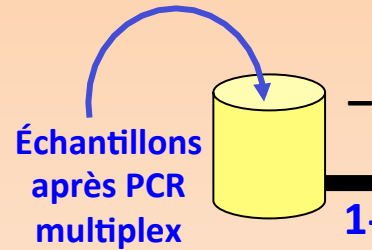
Soit # 10%

COUPLAGE D'UN FLUOROCHROME PARTICULIER PAR COUPLE D'AMORCES :

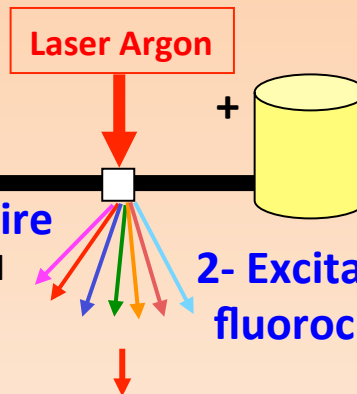


Identification des Allèles STR après PCR

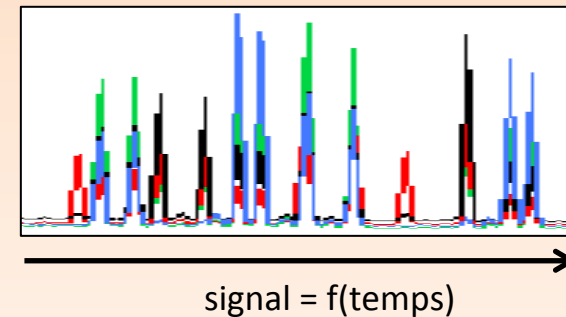
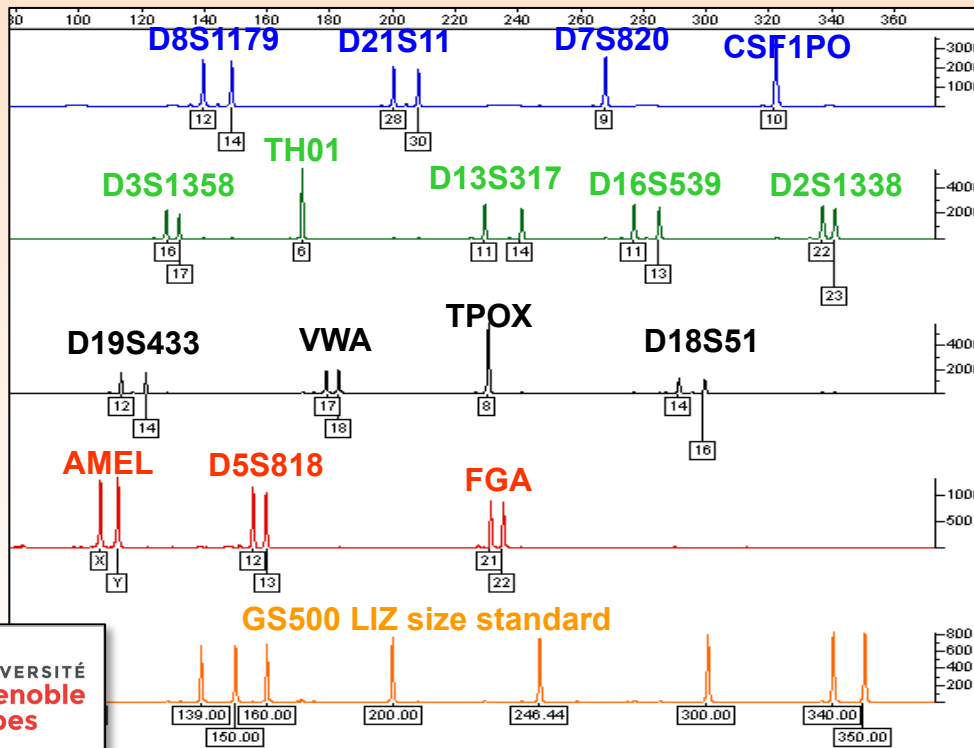
Séquenceurs
et analyseurs génétiques



1- Electrophorèse capillaire
séparation des fragments sur gel
d'acrylamide



**2- Excitation des
fluorochromes**



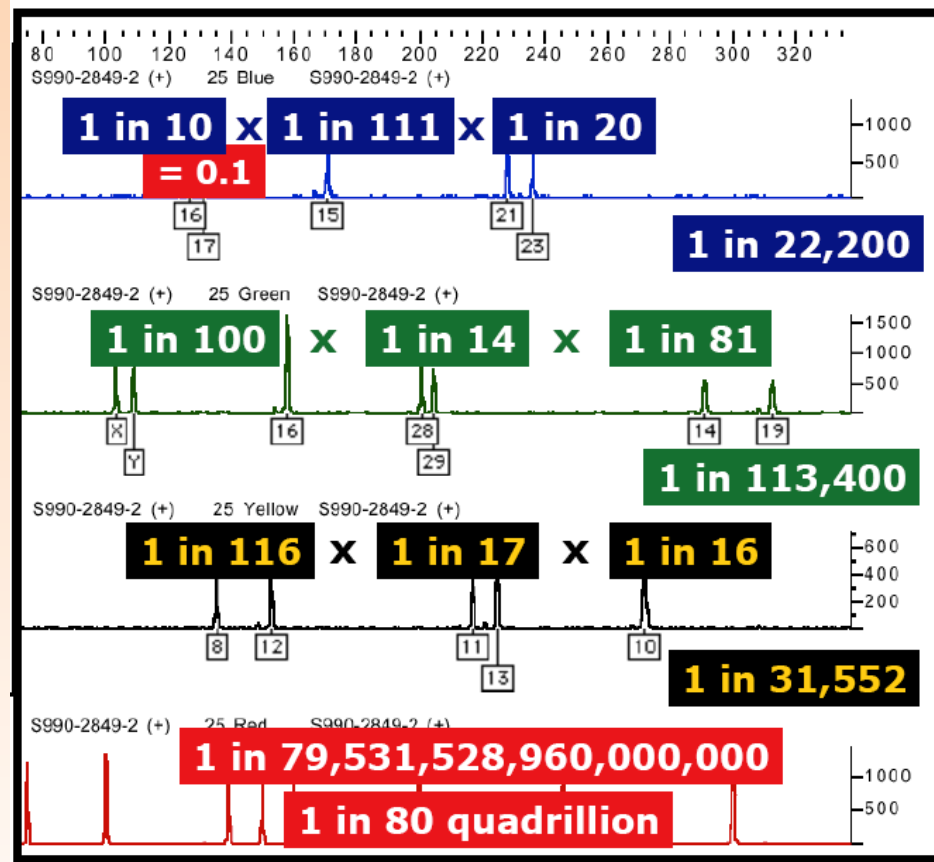
3- Relevé brut

4- Traitement des données

Analyse et comparaison avec des marqueurs de taille

5- Génotype de l'individu

Génétique et Probabilités

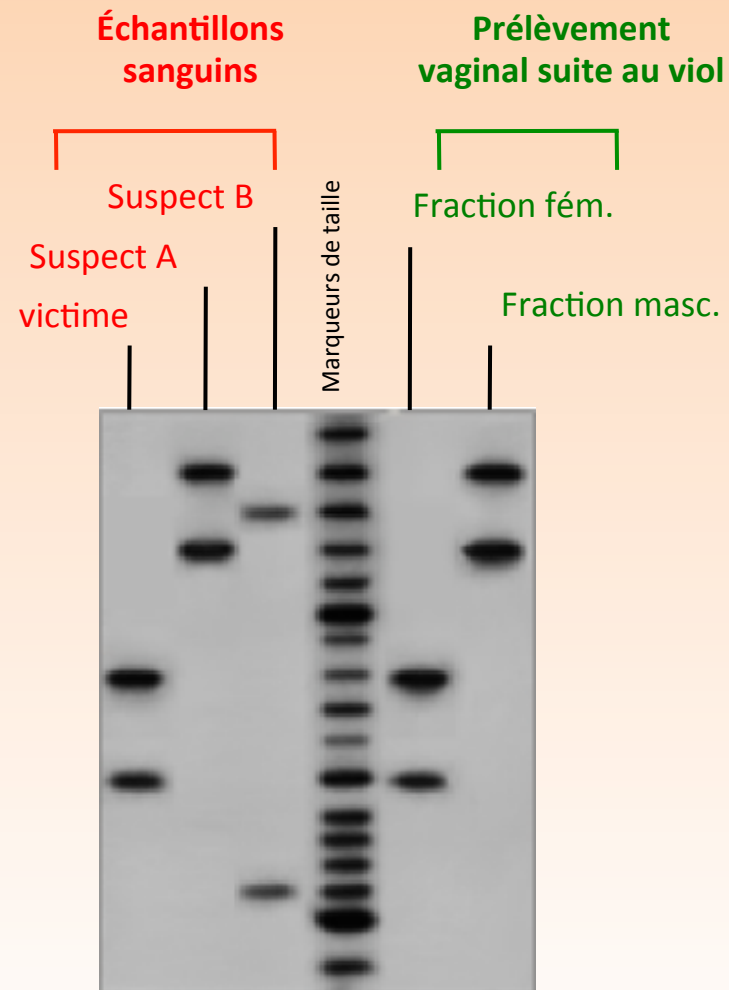


1 chance sur 80×10^6 milliards

Si Vous Etiez Juge d'Instruction...

Si un suspect a un profil génétique **différent** de celui du sperme :
C'est un cas d'exclusion : Il n'est pas le violeur

Si un suspect a un profil génétique **identique** à celui du sperme :
C'est un cas de concordance : il faut tester d'autres marqueurs



Cold Case : L'Affaire ROMANOV

Août 1917 : révolution russe

La famille royale, le docteur et 3 domestiques sont capturés, déportés et assassinés. Les restes sont recouverts de chaux vives et enterrés au bord d'une route.

Juillet 1991 : 9 squelettes sont découverts dans une fosse commune près d'Ekatarinbourg.

S'agit-il des restes de la famille du tsar Nicolas II ?



1- Amplification du marqueur AMEL (partie pseudo autosomale)

X -> fragment de 106pb

Y -> fragment de 112pb -> **présence de 4 hommes et de 5 femmes**

2- Amplification de 5 marqueurs STR (autosomaux)

Skeleton	HUMVWA/31	HUMTH01	HUMF13A1	HUMFES/FPS	HUMACTBP2
1 (servant)	14,20	9,10	6,16	10,11	ND
2 (doctor)	17,17	6,10	5,7	10,11	11,30
3 (child)	15,16	8,10	5,7	12,13	11,32
4 (Tsar)	15,16	7,10	7,7	12,12	11,32
5 (child)	15,16	7,8	5,7	12,13	11,36
6 (child)	15,16	8,10	3,7	12,13	32,36
7 (Tsarina)	15,16	8,8	3,5	12,13	32,36
8 (servant)	15,17	6,9	5,7	8,10	ND
9 (servant)	16,17	6,6	6,7	11,12	ND

^aAllele designation for all loci except HUMACTBP2 is based on the number of repeat units by sequencing of specific alleles — data not shown). The allele designation for HUMACTBP2 is based on an arbitrary scale identical to that of Kimpton et al.².



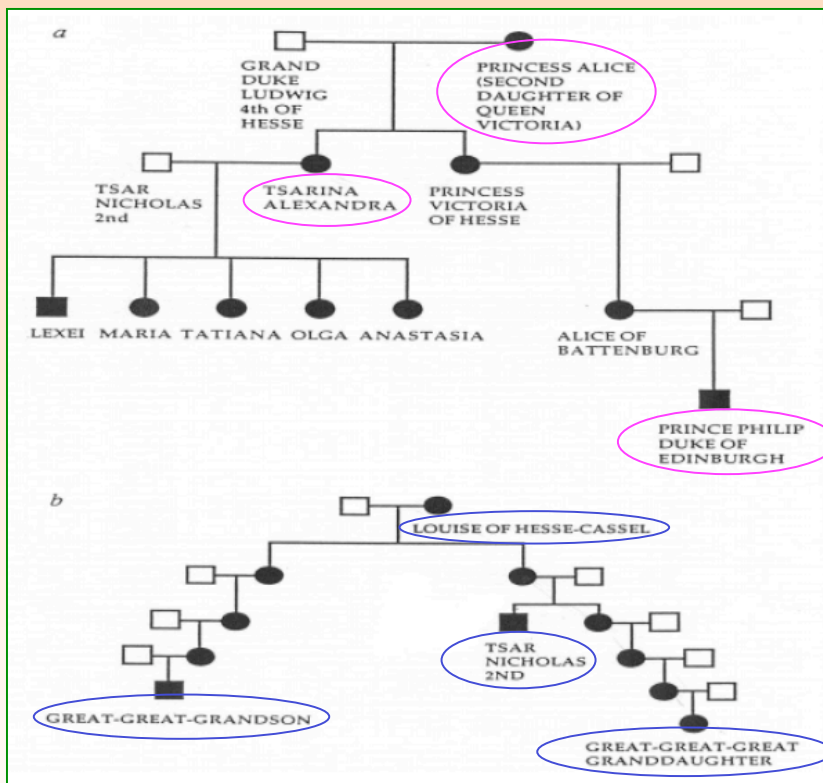
Les squelettes 4 et 7 sont les parents des squelettes 3, 5 et 6

Les squelettes 1, 2, 8 et 9 ne montrent aucun lien de parenté

Cold Case : L'Affaire ROMANOV

Mais comment attribuer avec « certitude » ces restes aux Romanov ?

---> Les loci hypervariables mitochondriaux à héritage maternel



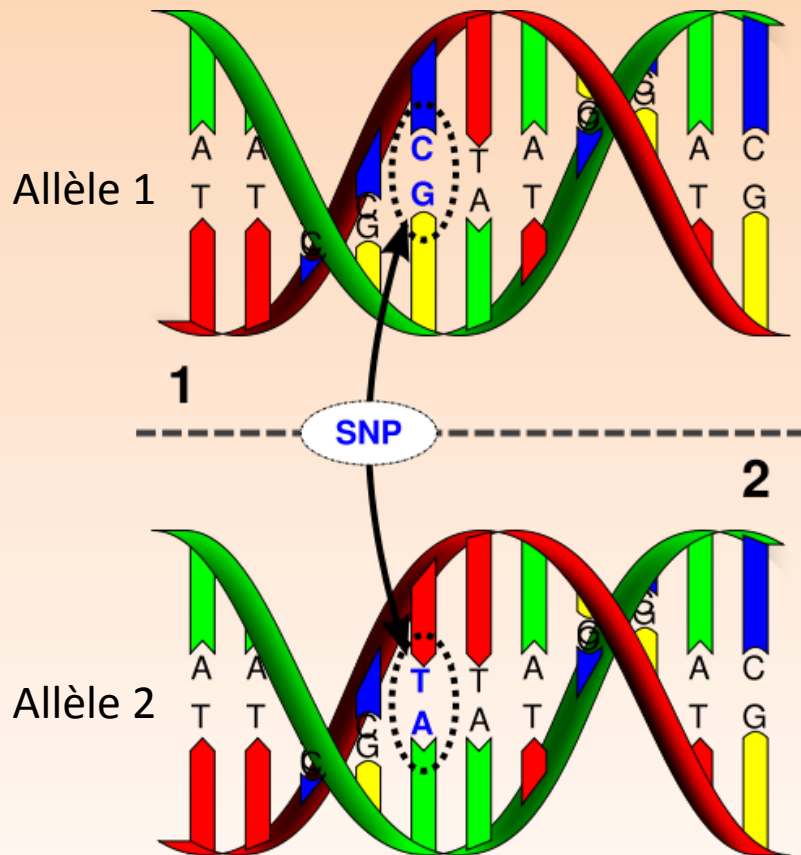
MtDNA Analysis

Summary of mtDNA differences compared to the Anderson²¹ reference sequence

Origin of sample	DNA source	Length sequenced (bp)	Positions within hypervariable regions (HVR) of mitochondrial DNA																		
			HVR 1							HVR 2											
			16111	16126	16169	16261	16264	16278	16293	16294	16296	16304	16311	16357	73	146	195	263	309.1	309.2	315.1
			Séquence de référence :																		
			C	C	C	C	A	C	C	T	T	T	T	T	A	T	T	A	*	*	*
Servant 1 (?)	Femur skeleton 1	760	C	.	.	-	.	.	G	C	C	C
Servant 2 (?)	Femur skeleton 8	742	C	.	.	-	.	.	G	.	.	C
Servant 3 (?)	Femur skeleton 9	650	.	.	.	T	.	T	G	.	.	C	.	.	-	.	.	C	G	.	C
Royal Physician	Femur skeleton 2	736	.	.	.	T	C	.	G	C	C	C
Dr Botkin (?)		
Daughter 1 of Tsar/Tsarina (?)	Femur skeleton 3	755	T	C	G	.	.	C
Daughter 2 of Tsar/Tsarina (?)	Femur skeleton 5	634	T	C	G	.	.	C
Daughter 3 of Tsar/Tsarina (?)	Femur skeleton 6	760	T	C	G	.	.	C
Tsarina Alexandra (?)	Femur skeleton 7	744	T	C	G	.	.	C
Duke of Edinburgh (Grandson of Tsarina)	Blood sample	760	T	C	G	.	.	C
Tsar Nicholas II (?)	Femur skeleton 4	782	.	C	Y	.	.	.	T	T	G	.	.	G	.	.	C
Gt. Gt. grandson of Louise of Hesse-Cassel	Blood sample	781	.	C	T	.	.	.	T	T	G	.	.	G	.	.	C
Gt. Gt. granddaughter of Louise of Hesse-Cassel	Blood sample	782	.	C	T	.	.	.	T	T	G	.	.	G	.	.	C

., Sequence unchanged from reference sequence; -, No nucleotide assignment; *, Nucleotide absent from reference sequence; Y, C/T heteroplasmy.

Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)



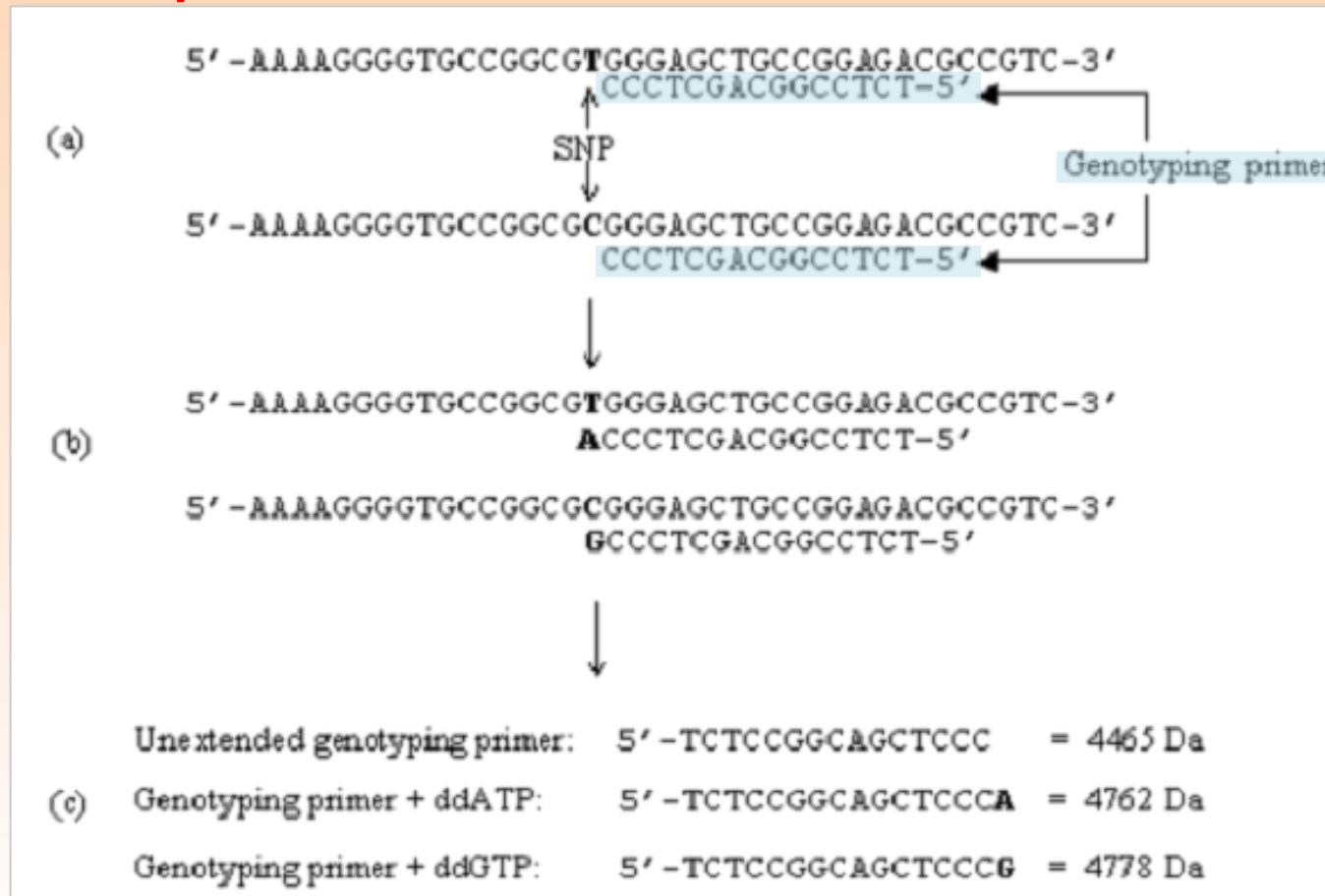
99,9% génome identique entre humains

0,1% restant: **90% variations sont des SNP**

Fréquence: **1 : 100-1000pb** (env. $5 \cdot 10^6$ par génome)
Dispersée de manière homogène sur génome

Principe de Détection des SNP

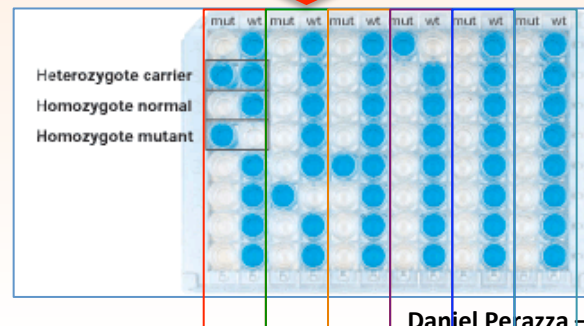
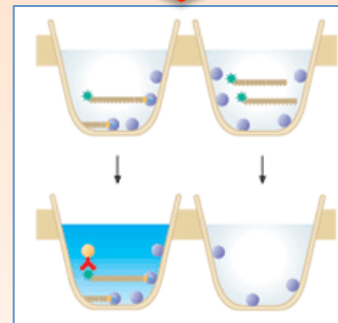
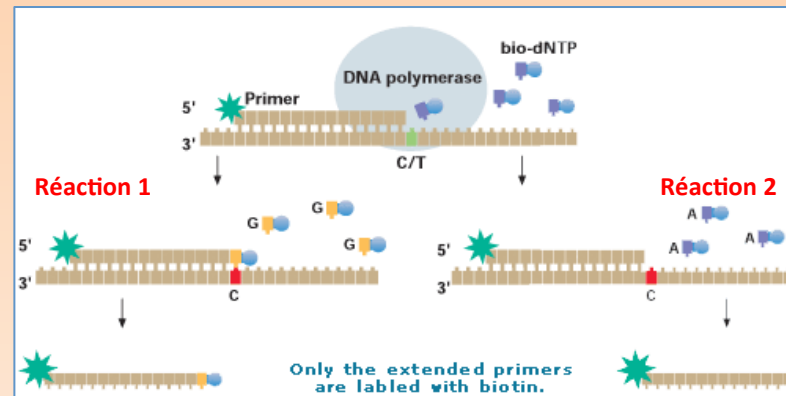
Single nucleotide primer extension










SNP : Application au Diagnostic

Oligo-FITC

Nucléotide-biotine



SNP : Application au Diagnostic

NAME	ASSOCIATED DISEASES	GENE / MUTATION	MUTATION / SAMPLE	TESTS / KIT	CATALOGUE NUMBER	PRICE
 PRONTO® 2 GeneScreen	1. Mucopolipidosis IV 2. Niemann Pick Type A, Type B	MCOLN (Del[ex 1-7], IVS3-2A>G), SMPD1 (L302P, fsP330, R496L, R608del)	6	24	F9954	get a quote
 PRONTO® 5FU	5FU Susceptibility	DPD (DPD*2A G/A variant)	1	48	F9984	get a quote
 PRONTO® 4 GeneScreen	1. Canavan 2. Bloom Syndrome 3. Fanconi Anemia C 4. Familial Dysautonomia	ASPA (693C>A, 854A>C) BLM (2281del6ins7) FANCC (IVS4+4A>T) IKBKAP (2507+6T>C, R696P)	6	24	F9953	get a quote
 PRONTO® AAT	Alpha-1 Antitrypsin Deficiency	SERPINA1 [AAT] (PIZ)	1	144	F9971	get a quote
 PRONTO® APC	Predisposition to Colorectal Cancer	APC (3920T>A)	1	96	F9907	get a quote
 PRONTO® ApoE	Predisposition to Hypercholesterolemia, Cardiovascular Disease	APOE (ε2, ε3, ε4)	2	48	F9903	get a quote
 PRONTO® Ataxia / Fanconi A	1. Ataxia Telangiectasia 2. Fanconi Anemia A	ATM (103C>T) FANCA (2127-2173insG, 4275delT)	3	48	F9982	get a quote