

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie
Département de Biologie



UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Biochimie Appliquée

Par
MEK DAD SAFIA
&
RIF FAIZA

Thème :

Amplification du polymorphisme rs10050860 (C<T) du gène ERAP1 par PCR en temps réel en utilisant la technologie *TaqMan*

Soutenu le 12/06/2024 devant le jury composé de :

Présidente :	Mme HENNIA Aicha	M.C.A	Université de Mostaganem
Encadrante :	Mme DAHMANI Chahinez Amira	M.C.B	Université de Mostaganem
Examinatrice :	Mme BEKENNICHE Nahla	M.C.B	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2023/2024



Remerciment



Tout d'abord, nous remercions le bon Dieu qui nous a donné la force et la patience pour terminer nos études.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude à **Mme HENNIA Aïcha** pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider ce jury de soutenance.

Nous tenons à exprimer notre sincère reconnaissance envers **Mme BEKENNICHE Nahla** pour sa gentillesse et sa volonté d'accepter de faire partie de ce jury en tant qu'examineur.

Nous tenons à remercier vivement **Mme Dahmani Chahinez Amira** ; l'encadrante de ce mémoire ; qui a ménagé de grands efforts afin de nous permettre de mener à bien notre modeste travail. Nous lui exprimons toute notre gratitude et nos respects.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers **Pr BOUDJEMA Abdallah** pour nous avoir accueilli au sein du Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire (LGMC-USTO-MB). Nous souhaitons lui adresser ici notre respect et notre sincère gratitude pour cette opportunité.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail et que nous n'avons pas pu citer individuellement.



Dédicace



C'est avec profonde gratitude et sincérité que nous dédions ce modeste travail.

À nos chères mères,

Vous avez supporté pour nous les soins et consenti les efforts pour notre éducation. Aucune dédicace ne saurait exprimer tout le respect et l'amour que nous vous portons. Vous nous avez toujours fait confiance. Veuillez trouver en ce travail la consolation et le témoignage de notre patience.

À nos chers pères,

Malgré les grandes responsabilités que vous assumez dans votre travail et en tant que pères de famille, vous avez toujours été présents pour nous écouter, nous soutenir, nous suivre et nous encourager. Puisse ce travail diminuer vos souffrances et vous apporter bonheur.

Nous dédions également ce travail

À nos frères, à nos sœurs, à nos familles,

À notre encadrante, **Mme DAHMANI CHAHINEZ**, qui nous a beaucoup aidé et encouragé.

À tous nos enseignants qui nous ont enseigné, et à tous ceux qui nous sont chers.

Résumé :

La PCR en temps réel, une technique qui a révolutionné la biologie moléculaire en utilisant des marqueurs fluorescents, offrant ainsi une détection plus rapide, une sensibilité plus grande et une quantification plus précise des acides nucléiques. Dans ce travail, nous avons opté pour l'utilisation de la technologie des sondes TaqMan qui utilise des sondes spécifiques pour détecter différents polymorphismes génétiques.

Nous avons justement quantifié et amplifié deux molécules d'ADN extraits à partir de deux individus sains déjà disponibles dans une banque d'ADN au Laboratoire LGMC, USTO-MB par l'étude d'un polymorphisme nucléotidique simple rs10050860 C<T du gène ERAP1 au niveau de l'exon 12 de ce gène.

Les résultats de la quantification ont montré que les concentrations des deux ADNs étaient élevées du coup l'étape de la dilution semblait être nécessaire. La PCR en temps réel nécessite des concentrations qui ne dépassent pas les 50 ng/μL. Par ailleurs, les résultats de l'amplification nous ont permis d'établir d'une part le génotypage du polymorphisme rs10050860 C<T chez les deux individus sains. D'autre part, la PCR en temps réel nous a permis de calculer les valeurs Ct pour chaque échantillon.

Finalement, l'utilisation de la PCR en temps réel avec la technologie TaqMan s'est avérée être une bonne approche, fiable et rapide surtout pour l'étude d'un polymorphisme génétique, tel que le rs10050860 (C/T) du gène ERAP1 exploré dans ce travail.

En perspectives, il serait intéressant d'étudier le polymorphisme rs10050860 chez les patients, pour mieux comprendre son rôle dans les maladies auto-immunes et inflammatoires.

Mot clé : ADN ,rs10050860, ERAP1, PCR , TaqMan

تلخيص :

توفر تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي، وهي تقنية أحدثت ثورة في البيولوجيا الجزيئية باستخدام علامات الفلورسنت، كدفاً أسرع وحساسية أكبر وقياساً كمياً أكثر دقة للأحماض النووية. في هذا العمل، اخترنا استخدام تقنية مسبار TaqMan ، التي تستخدم مسابر محددة للكشف عن تعدد الأشكال الجينية المختلفة.

وقمنا بقياس وتضخيم جزيئين من الحمض النووي مستخرجين من شخصين أصحاء متوفرين بالفعل في بنك الحمض النووي في مختبر مركز الطب الشرعي في جامعة كاليفورنيا في بنسلفانيا من خلال دراسة تعدد أشكال النوكليوتيدات الأحادية C<T rs10050860 لجين ERAP1 في الإكسون 12 من هذا الجين..

أظهرت نتائج القياس الكمي أن تركيزات الحمضين النوويين كانت عالية، لذا يبدو أن خطوة التخفيف ضرورية. يتطلب تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي تركيزات لا تزيد عن 50 نانوغرام/ميكرو لتر. كما مكننا نتائج التضخيم أيضاً من تحديد النمط الجيني لـ rs10050860 C<T متعدد الأشكال في الشخصين الأصحاء. ثانياً، مكننا استخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي من حساب قيم Ct لكل عينة.

أخيراً، أثبت استخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي باستخدام تقنية TaqMan أنه نهج جيد وموثوق وسريع، خاصة لدراسة تعدد الأشكال الجينية مثل (C/T) rs10050860 لجين ERAP1 الذي تم استكشافه في هذا العمل.

بالنظر إلى المستقبل، سيكون من المثير للاهتمام دراسة تعدد الأشكال rs10050860 لدى المرضى، لفهم دوره في أمراض المناعة الذاتية والالتهابات بشكل أفضل.

الكلمات المفتاحية :

حمض نووي ريبي ، rs 10050860 ، ERAP1 ، TaqMan ، تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل

Abstract :

Real-time PCR, a technique that has revolutionized molecular biology by using fluorescent markers, offers faster detection, greater sensitivity and more accurate quantification of nucleic acids. In this work, we opted to use TaqMan probe technology, which uses specific probes to detect different genetic polymorphisms.

We precisely quantified and amplified two DNA molecules extracted from two healthy individuals already available in a DNA bank at the LGMC Laboratory, USTO-MB by studying a single nucleotide polymorphism rs10050860 C<T of the ERAP1 gene at exon 12 of this gene.

Quantification results showed that the concentrations of both DNAs were high, so dilution appeared to be necessary. Real-time PCR requires concentrations of no more than 50 ng/μL. The amplification results also enabled us to genotype the rs10050860 C<T polymorphism in the two healthy individuals. Secondly, real-time PCR enabled us to calculate Ct values for each sample.

Finally, the use of real-time PCR with TaqMan technology proved to be a good, reliable and rapid approach, especially for the study of a genetic polymorphism such as the rs10050860 (C/T) of the ERAP1 gene explored in this work.

Looking ahead, it would be interesting to study the rs10050860 polymorphism in patients, to better understand its role in autoimmune and inflammatory diseases.

Key words:

DNA, rs10050860, ERAP1, PCR , TaqMan

Table des matières

I. Introduction.....	2
Revue Bibliographique	3
1- La définition de la PCR	4
2- Historique	4
3- Le Principe de la technique.....	5
3.1 Les étapes de réalisation de la PCR	6
3.1.1 Extraction	6
3.1.2 Amplification	6
3.2 La réaction de polymérisation	7
4- Les Phases de la PCR.....	8
4-1 Dénaturation de l'ADN	8
4-2 Annelage/Hybridation des amorces.....	10
4-3 Extension/Élongation des amorces.....	10
5- Les Caractéristiques de la PCR	11
5.1 Spécificité analytique.....	11
5.2Sensibilité analytique.....	12
5.3 Reproductibilité	12
6- Application de PCR	12
7-les type de la PCR... ..	16
7.1 PCR simplexe	14
7.2 PCR multiplexe	15
8- Les Variétés de la PCR	15
8.1 PCR point final	15
8.2 PCR en temps réel	15
8.3PCR quantitative	16
8.4RT-PCR.....	16
9- Etude d'un polymorphisme génétique sur le gène ERAP 1	17
9 .1- Définition deL'endoplasmicreticulum aminopeptidase	17
9.2- Le Gène ERAP1.....	21
9-3-Le Polymorphisme rs10050860 (C<T) du gène ERAP1	19
III. Objectifs	21

Matériel et Méthodes.....	22
IV. Matériel	23
1) Population d'étude	23
2) Matériel nécessaire.....	23
2.1. Appareillage	23
2.2. Matériel utilisé	23
V. Méthodes	24
1) Stérilisation de la pailasse	24
2) Quantification d'ADN	24
3) Amplification des ADNs	25
3.1 Le principe de la technologie TaqMan	25
3.2 Préparation du mélange réactionnel.....	27
Résultat et Discussion.....	30
VI. Résultat.....	31
1- Résultats de la quantification d'ADN	31
2- Résultats d'amplification des ADNs par PCR en Temps Réel	32
VII. Discussion.....	37
Conclusions et perspectives	41
Références bibliographiques	44

Liste des Abréviations

ACP : Amplification en Chaîne par Polymérase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ANGLV:Angiogenin-LikeProtein (Protéine similaire à l'angiogénine)

AngIV : angiotensine IV

BRCA1 :Breast Cancer 1 (Cancer du sein 1)

BRCA2 :Breast Cancer 2 (Cancer du sein 2)

CD8 : Cluster of Differentiation 8 (Cluster de différenciation 8)

CMH1 :Complex Majeur d'Histocompatibilité de Classe 1 (Major HistocompatibilityComplex Class 1)

COVID-19 : Corona Virus Disease 2019 (Maladie à coronavirus 2019)

Cq : Cycle de quantification

CV : Coefficient de variation

dNTP: Désoxyribonucléotide triphosphate

ERAP1 :EndoplasmicReticulumAminopeptidase 1 (Aminopeptidase du réticulum endoplasmique 1)

ERAP2 :EndoplasmicReticulumAminopeptidase 2 (Aminopeptidase du réticulum endoplasmique 2)

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization (Hybridation in situ en fluorescence)

Glu : glutamate

HLA :HumanLeukocyteAntigen (Antigène leucocytaire humain)

HTLV-1 :Human T-Lymphotropic Virus 1 (Virus lymphotrope T humain 1)

IFN-gamma : Interferon-gamma (Interféron-gamma)

IL-1 : Interleukin-1 (Interleukine-1)

Kb : Kilo base (unité de longueur d'ADN)

LNPEP : Leucyl-cystinylaminopeptidase (Aminopeptidaseleucyl-cystinyl)

Mg²⁺ : Ions Magnésium

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

Na⁺ : Ions Sodium

NaCl : Chlorure de Sodium (sel de table)

NK : Natural Killer (Cellules tueuses naturelles)

ODBMB : Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Dictionnaire Oxford de biochimie et biologie moléculaire)

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

pH : Potentiel Hydrogène

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérase en chaîne)

PCR-RFLP : Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (Réaction de polymérisation en chaîne - Polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne de polymérase avec transcription inverse)

SA : la spondylarthrite ankylosante

SD : Écart type

SID : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

SNP : Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme d'un seul nucléotide)

TAP : Transporter Associated with Antigen Processing (Transporteur associé au traitement de l'antigène)

TaqMan : Technique d'amplification en temps réel basée sur une sonde TaqMan (TaqMan probe-based real-time amplification technique)

TNF- α : facteur de nécrose tumorale-alpha

TNRI : Tumor Necrosis Factor Receptor I (Récepteur du facteur de nécrose tumorale I)

T_m : Température de fusion

UPR : Unfolded Protein Response (Réponse aux protéines dépliées)

UV : Ultraviolet

RE : réticulum endoplasmique

Liste des Figures

Figure 01 : Évolution de la température et des différents types de brin d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR.

Figure 02 : thermocycleur avec bloc chauffant.

Figure 03 : la phase de dénaturation d'ADN.

Figure 04 : la phase d'hybridation des amorces.

Figure 05 : la phase d'élongation des amorces.

Figure 06 : Thermo Scientific™ NanoDrop™ One/OneC Spectrophotomètre UV-visible à microvolume.

Figure 07 : Principe de la sonde TaqMan.

Figure 8 : la plaque programmée pour la PCR en temps réel

Figure 09 : Photo du résultat de la 1ère amplification des deux ADNs par PCR en temps réel en utilisant le Master Mix *TaqMan Genotyping* prise au niveau du laboratoire LGMC (Mars 2024).

Figure 10 : Photo du résultat de la 2ème amplification des deux ADNs par PCR en temps réel en utilisant deux Master Mix prise au niveau de laboratoire LGMC (Avril 2024).

Figure 11 : Photo du résultat de la 2ème amplification des deux ADNs par PCR en temps réel Master Mix du kit COVID-19 Virella SARS-CoV-2 SEQCprise au niveau du laboratoire LGMC (Avril 2024).

Figure 12 : Photo du résultat de la 2^{ème} amplification des deux ADNs par PCR en temps réel en utilise le Master Mix *TaqMan Genotyping* prise au niveau du laboratoire LGMC (Avril 2024).

Liste des tableaux

Tableau 01 :Le Protocol de la 1ère amplification.

Tableau 02 : programme d'amplification approprié pour effectuer la PCR en temps réel

Tableau 03 :Présentation des résultats de la concentration des deux ADNs avant la dilution.

Tableau 04 :Présentation des résultats de la concentration des deux ADNs après la dilution.

Tableau 05 :Le géotypage des deux échantillons amplifiés par PCR en temps réel.

Tableau 06 :Les valeurs de Ct de trois échantillons amplifiés.

Introduction

Introduction

I. Introduction :

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique fondamentale en biologie moléculaire permettant l'amplification exponentielle d'une séquence d'ADN cible à partir d'une quantité infime de matériel de départ. Cette méthode repose sur une succession cyclique de trois étapes clés : la dénaturation de l'ADN, l'hybridation d'amorces spécifiques et l'élongation enzymatique par une ADN polymérase thermostable.

La PCR en temps réel (qPCR) est une variante de la PCR classique qui permet de suivre en direct l'amplification de la séquence cible. Elle utilise des sondes fluorescentes qui s'hybrident spécifiquement à l'amplicon et émettent un signal lumineux proportionnel à la quantité d'ADN formé à chaque cycle. Cette approche quantitative offre de nombreux avantages comme une grande sensibilité, une large gamme de quantification et la possibilité de détecter des polymorphismes génétiques.

Dans le cas du polymorphisme rs10050860 (C/T) du gène ERAP1, la qPCR avec la technologie TaqMan permet de cibler efficacement cette variation d'un seul nucléotide (SNP) dans une durée très courte. Ce polymorphisme a été largement étudié par la PCR classique.

Par ailleurs, les sondes TaqMan sont marquées par des fluorochromes différents et vont alors pouvoir s'hybrider spécifiquement aux séquences contenant soit l'allèle C ou l'allèle T de ce polymorphisme. L'amplification en temps réel des ADNs génomique étudiés permettra alors de déterminer avec précision le génotype de chaque individu (CC, CT ou TT) concernant le polymorphisme rs10050860.

Revue
Bibliographique

Revue Bibliographique

II.Revue Bibliographique : 1-

La définition de la PCR :

L'Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (ODBMB) donne une définition plus précise de la PCR comme étant la "méthode utilisée pour amplifier une séquence spécifique de nucléotides d'un brin double d'acide désoxyribonucléique (ADN). La séquence cible est identifiée en utilisant de courts oligonucléotides synthétiques complémentaires aux deux régions terminales de la séquence d'ADN à amplifier. Ces oligonucléotides servent de point de départ à l'ADN polymérase, qui synthétise une nouvelle chaîne complémentaire en utilisant l'ADN matrice comme guide. Les nouvelles chaînes d'ADN englobent la région délimitée par les deux régions terminales choisies. Les brins nouvellement synthétisés sont ensuite dénaturés par la chaleur, et le processus est répété un grand nombre de fois" (Cammack, R et al 2006).

2- Historique :

La PCR, une technologie révolutionnaire en biologie moléculaires'est rapidement répandue dans les laboratoires et a connu d'importantes évolutions : (Mullis, K. B. (1990))

- L'avènement des thermocycleurs a rendu la PCR moins contraignante et plus reproductible. Elle est désormais un pré requis indispensable pour la plupart des nouvelles applications.
- En 1953, Watson et Crick découvrent que l'ADN est constitué de deux brins formant une double hélice. La même année, James Dewey Watson et Francis Harry Compton Crick dévoilent la structure en double hélice de l'ADN(Watson j et al 1953).
- En 1956, Arthur Kornberg découvre l'ADN polymérase dépendante de l'ADN (ADN polymérase) (Kornberg A et al 1992).
- En 1970, Howard Temin et David Baltimore font une découverte indépendante de l'ADN polymérase dépendante de l'ARN (Temin H et al 1972).
- En 1986, KaryMullis publie les premiers résultats de la PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase)(Mullis K B 1985).
- La première PCR a été réalisée en 1988 par Saiki RK en utilisant une ADN polymérase thermostable provenant de *Thermusaquaticus*.

Revue Bibliographique

- Cette avancée a permis de remplacer le fragment de Klenow et l'ADN polymérase d'*Escherichia coli* par une polymérase thermorésistante, initialement la Taq polymérase, éliminant ainsi la nécessité d'ajouter de l'enzyme à chaque cycle.
- En 1992, Ryozi Higuchi invente la PCR en temps réel, facilitant ainsi les méthodes quantitatives et éliminant plusieurs étapes expérimentales contraignantes telles que l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'acquisition de fluorescence et l'étalonnage du signal d'acquisition (Higuchi R et al 1992).
- En 1995, Yang Liu publie les premiers résultats sur la taille-PCR (Liu, Y. (1995)).
- En 1996, Lacholem et Birch DE développent des polymérases temporairement inactives et activables.
- En 1997, Carl Wittwer met en évidence la variation de température dépendante du SYBR Green dans la PCR (Wittwer C et al 1997).
- En 1997, MD Lay réalise les premières discriminations d'allèles grâce à la courbe de fusion (Reed G H et al 1997).

3- Le Principe de la technique :

La détection des acides nucléiques dans un milieu biologique a d'abord été réalisée à l'aide de méthodes simples d'hybridation moléculaire, où une séquence cible spécifique est hybridée avec une sonde complémentaire contenant un marqueur facilement détectable. Cependant, ces techniques ne permettaient pas la détection de faibles quantités de séquences cibles, ce qui est souvent le cas en microbiologie. C'est pourquoi, en 1985, Mullis (Californie, États-Unis, lauréat du prix Nobel en 1993)(Mullis, K. B. (1990)). À décrit une méthode d'amplification in vitro de l'ADN : la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Cette technique repose sur l'utilisation d'une enzyme polymérase permettant de copier de manière exponentielle une séquence cible connue à partir d'une amorce, facilitant ainsi sa détection par des méthodes d'hybridation moléculaire classiques. L'enzyme clé de cette technique est la Taq polymérase, qui est extrêmement stable à des températures élevées (Mullis, K. B. et al 1987). Elle reste fonctionnelle tout au long des cycles répétés de la PCR. Plus tard, cette technique a été adaptée à l'amplification de l'ARN.

3.1 Les étapes de réalisation de la PCR :

3.1.1 Extraction :

L'extraction des acides nucléiques peut être réalisée de manière manuelle ou automatisée. Une étape préliminaire consiste à lyser les cellules, ce qui peut être effectué par des produits chimiques ou des variations thermiques. Les produits chimiques couramment utilisés pour la lyse comprennent le sulfate de guanidine et le chloroforme. Le reste du processus d'extraction vise à capturer les acides nucléiques et à éliminer les éléments non nécessaires par purification (Boom, R. et al 1990).

3.1.2 Amplification :

Dans la PCR, la technique repose sur la répétition de cycles de transition de température. À l'exception de certaines méthodologies utilisant des sondes d'hydrolyse, chaque cycle comprend généralement trois étapes (Kubista, M2006), comme indiqué dans la Figure 01.

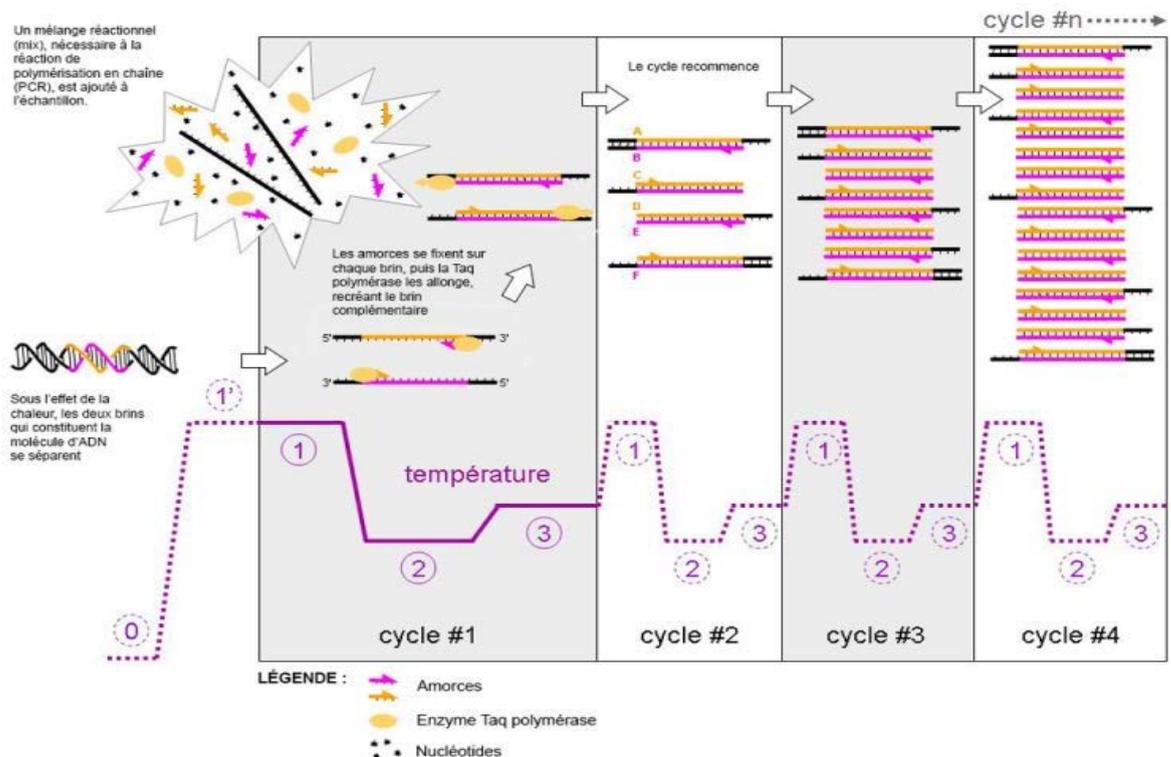


Figure 1: Évolution de la température et des différents types de brin d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR. (1) Dénaturation de l'ADN double brin afin de le rendre utilisable comme matrice simple brin ; (2) Hybridation des amorces avec la séquence cible d'ADN; (3) Synthèse du brin complémentaire par élongation à partir de l'amorce

3.2 La réaction de polymérisation:

La PCR est une méthode automatisée effectuée à l'aide d'un thermocycleur. Cet appareil est équipé d'un bloc chauffant dans lequel on place les tubes contenant notre mélange pour la réaction de PCR. Il permet de faire varier rapidement et avec une grande précision la température de 0°C à 100°C (Dube, Set al 2008).

Le thermocycleur est programmé pour exécuter les différentes étapes de la PCR. Chaque cycle comprend une série de paliers de température prédéterminés, avec une durée spécifique. Ces deux paramètres, la température et le temps, dépendent de la taille de la séquence à amplifier, ainsi que de la taille et de la composition en désoxyribonucléotides des amorces utilisées (Innis, M. A et al 1990).



Figure 2: thermocycleur avec bloc chauffant (source openlab.unistra.fr)

4- Les Phases de la PCR :

Les différentes étapes de la PCR impliquent une série d'environ quarante cycles (généralement estimés à environ 34 à 35 cycles pour détecter une copie). Chaque cycle se compose de trois étapes principales : la dénaturation de l'ADN double brin, l'hybridation ou appariement des amorces sens et anti-sens, et finalement l'extension ou l'élongation des amorces. Tous les composants nécessaires à la réaction (amorces, désoxyribonucléotides (dNTP) et Taq polymérase) sont présents en excès abondant dans le mélange réactionnel, qui est soumis à différentes températures correspondant à chaque étape. L'appareil utilisé pour automatiser ces cycles de température est le thermocycleur (Mullis, K. B. (1990)).

4-1 Dénaturation de l'ADN :

Cette phase est réalisée à 95°C pendant 1 minute. Elle a pour but de synchroniser les réactions (afin de garantir la précision de la PCR) en dénaturant les double-hélices d'ADN pour les convertir en molécules linéaires à simple brin (désappariement de l'ADN). Pendant cette dénaturation, l'ADN devient accessible aux amorces qui interviendront lors de l'étape suivante. De plus, ces étapes permettent également de libérer les ADN polymérase qui pourraient encore être liées à une matrice (Lawyer, F. C et al1993).

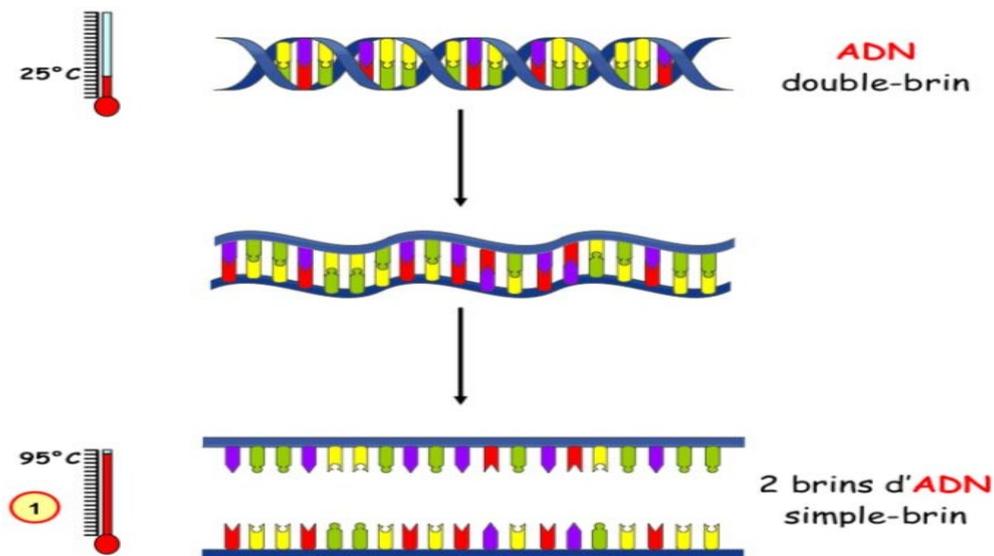


Figure 3 : la phase de dénaturation d'ADN (source openlab.unistra.fr)

4-2 Annelage/Hybridation des amorces :

Le mélange réactionnel est rapidement refroidi à la température d'hybridation (TH), à laquelle les amorces en excès dans le mélange vont pouvoir se lier à l'ensemble des séquences cibles. Au cours de cette étape cruciale de la PCR, la quantification d'une cible spécifique nécessite l'hybridation d'une quantité d'amorces proportionnelle à la quantité de la cible, à chaque cycle, afin de permettre une amplification exponentielle. Il est donc nécessaire d'atteindre une hybridation à 100% si l'on souhaite se prémunir contre d'éventuelles variations aléatoires (observées à l'aide de duplications d'échantillons) (Saiki, R. et al (1988)).

La température d'hybridation, généralement située entre 45 et 60°C, correspond à la température de fusion (T_m) du duplex moins 5 à 10°C (Rychlik, W. et al (1990)). Elle dépend principalement de trois paramètres clés :

- Composition en bases de l'amorce : la présence de paires de bases G-C, avec des liaisons hydrogène supplémentaires, rend les duplex riches en GC beaucoup plus stables que les duplex riches en AT (Breslauer, K. J. et al (1986)).
- Longueur et concentration de l'amorce : le taux d'hybridation est proportionnel à ces deux paramètres. Des concentrations élevées d'amorces favorisent la formation de duplexes (Rychlik, W et al (1990)).
- Composition du mélange réactionnel : l'influence de la composition ionique du milieu (Mg^{2+} , Na^+ , additifs, etc.) (Roux, K. H. (1995)).

L'hybridation des amorces pendant l'étape d'extension suit une cinétique de deuxième ordre, débutant par un mouvement brownien lent suivi d'une hybridation plus rapide. Ce processus, appelé "zipping de l'ADN", commence aux sites spécifiques appelés noyaux de nucléation.

Il existe une compétition entre les amorces et les brins complémentaires. L'hybridation des brins complémentaires est thermodynamiquement plus favorable que celle des amorces sur le brin matriciel. Ainsi, une concentration élevée d'amorces est utilisée pour compenser cette préférence. L'hybridation préférentielle du brin complémentaire peut entraîner une diminution du rendement de la réaction, tandis que l'hybridation de la cible sur elle-même peut provoquer un arrêt de l'amplification, connu sous le nom de phase de "plateau". Des inhibitions enzymatiques, comme l'inhibition par des inhibiteurs de l'ADN polymérase, peuvent

Revue Bibliographique

Toutes ces étapes sont réalisées aussi rapidement que possible, les unes après les autres, au cours de 30 à 40 cycles d'amplification. Pendant ces cycles, la quantité d'amplicons augmente de manière exponentielle (Kary Mullis. (1990)).

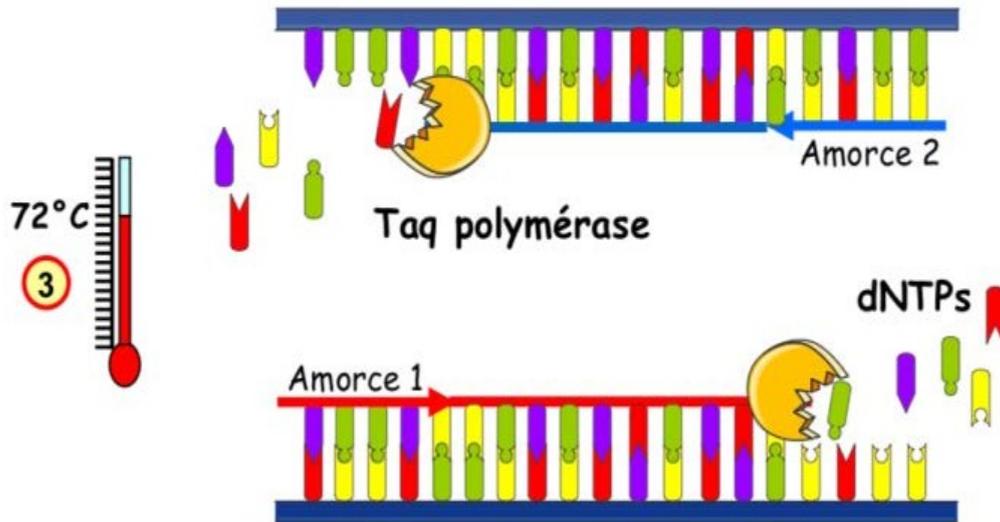


Figure 05 : la phase d'élongation (source openlab.unistra.fr)

5- Les Caractéristiques de la PCR :

Il est possible d'identifier trois caractéristiques principales, à savoir la spécificité et la sensibilité analytique, la reproductibilité, la précision et la répétabilité (Valasek, M. A. et al (2005)).

5.1 Spécificité analytique :

La spécificité est attribuée au fait que la détection d'une séquence connue dans le milieu réactionnel est ciblée, par opposition aux séquences non spécifiques également présentes dans le mélange réactionnel. Elle revêt une importance particulière dans des conditions normales de détection, c'est-à-dire lorsque la séquence cible est présente en quantité suffisante dans l'échantillon. Cette spécificité tend à diminuer lorsque l'on se rapproche des limites de quantification (Bustin, S. A. (2000)).

5.2 Sensibilité analytique :

La sensibilité est conférée par la nature exponentielle de la réaction et se réfère au nombre minimum de copies de séquences cibles présentes dans un échantillon pouvant être mesuré avec précision par PCR en temps réel. La sensibilité est exprimée en tant que limite de détection (LOD), c'est-à-dire la concentration qui peut être détectée à l'aide d'une réaction de PCR optimisée avec une certitude raisonnable (généralement, avec une probabilité de 95%) (Bustin, S. A. (2000)).

5.3 Reproductibilité :

La caractéristique cyclique de la réaction confère cette précision. En effet, à chaque cycle, une réinitialisation des paramètres se produit, théoriquement avec une efficacité initiale maximale et une synchronisation des réactions. Cette précision à long terme, également appelée variance inter-essais, fait référence à la variation des résultats observés entre les différentes exécutions de programmes thermiques de PCR effectuées dans différents laboratoires pour la même analyse. Elle est généralement mesurée par l'écart-type (SD) ou le coefficient de variation (CV) du nombre de copies ou des concentrations. Cependant, il a été démontré que les valeurs caractéristiques de chaque amplification, notées C_q (cycle de quantification), obtenues à partir de différents essais, sont soumises à une variation inhérente entre les essais. Par conséquent, il n'est pas approprié de calculer des ratios de variation de C_q entre les essais (Bustin, S. A. (2004)).

6- Application de PCR :

La PCR est une technique polyvalente largement utilisée dans de nombreux domaines (Mullis, K. B. (1990)).

Voici quelques exemples supplémentaires d'applications courantes de la PCR :

- En médecine : pour diagnostiquer des maladies génétiques (myopathie, mucoviscidose, etc.), des infections virales comme la maladie d'aujourd'hui Corona virus (COVID19), (SIDA, Hépatite C SRAS), bactériennes (tuberculose) ou parasitaires (toxoplasmose), mais aussi des cancers (Nolte, F. S. (2008)).
- La PCR est une technique essentielle utilisée dans les laboratoires de diagnostic moléculaire, y compris en cancérologie. Dans ce domaine, son objectif est la détection

Revue Bibliographique

de mutations spécifiques dans des gènes liés au cancer. Pour cela, il est nécessaire de connaître les gènes altérés et les mutations associées à un type de cancer donné. Par exemple, des recherches approfondies ont été menées sur les gènes BRCA1 et BRCA2 dans le cancer du sein, de la prostate et de la thyroïde (Sanger, F. et al (1977)).

- En agroalimentaire

La technique de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) permet la détection d'agents pathogènes tels que les bactéries, les champignons, les phytoplasmes, les virus et les viroïdes chez les plantes. La PCR nécessite une connaissance préalable du génome de l'agent pathogène pour développer les tests appropriés. Pour les agents pathogènes à ADN double brin, la PCR peut être réalisée directement à partir de l'ADN extrait de la plante suspectée. Pour les agents pathogènes à ARN monocaténaire, une étape de rétro-transcription (RT-PCR) est requise pour transformer l'ARN en ADN avant la PCR (Henson, J. M. et al (1993)).

Un organisme génétiquement modifié (OGM) est un organisme dont le matériel génétique a été altéré en introduisant un ou plusieurs gènes spécifiques, ce qui confère de nouvelles caractéristiques à l'organisme (par exemple, une résistance à un herbicide ou à un parasite). Les gènes ajoutés sont appelés des transgènes. Des laboratoires se sont spécialisés dans la détection des OGM dans de nombreux produits alimentaires courants tels que le maïs, le soja, la farine, la semoule, les corn flakes, les amidons et leurs dérivés, les extraits protéiques, le sirop de glucose, le lait de soja, le tourteau, la lécithine, etc. Pour cela, ils extraient l'ADN des produits et réalisent plusieurs réactions de PCR en utilisant des paires d'amorces spécifiques pour un transgène connu. Si le transgène n'est pas présent dans le produit, les amorces ne se lient pas à l'ADN et la réaction de PCR donne un résultat négatif. En revanche, si le transgène est présent, il sera détectable par l'amplification d'un produit spécifique, ce qui conduit à un résultat positif de la PCR (Anklam, E, et al (2002)).

- **En histoire :**

L'ADN fossile est extrait de restes anciens de plantes et d'animaux et a suscité un grand intérêt médiatique. En 1993, des chercheurs ont réussi à extraire de l'ADN d'un charançon fossilisé vieux de 130 millions d'années trouvé dans de l'ambre. Cependant, l'extraction de l'ADN fossile présente des défis en raison de sa fragilité et de sa dégradation sous l'influence de l'environnement. Malgré cela, il peut être préservé dans différents types de tissus, notamment les tissus mous provenant de restes momifiés, de spécimens naturalisés ou de

collections. La congélation dans des environnements froids ou la dessiccation dans des déserts chauds et secs sont des moyens naturels de conservation. De nos jours, on peut également extraire de l'ADN à partir de tissus durs tels que les os et les dents. Les environnements froids, les déserts chauds et secs, les tourbières et les fosses à goudron sont des milieux qui préservent mieux l'ADN ancien. Malgré les difficultés techniques, l'étude de l'ADN fossile a fourni des informations précieuses sur l'évolution et l'histoire des espèces (Lindahl, T. (1993)).

- Pour des études phylogénétiques sur des squelettes fossiles (ADN fossile), rechercher les liens de parenté entre les individus (cas les plus célèbres: les enfants de Louis XVII, ou ceux du tsar Nicolas II) agroalimentaires, détecter la présence d'OGM dans un aliment par exemple (Hofreiter, M., et al (2001)).
- Pour l'étude des migrations des populations humaines et animales (en Islande, les indiens d'Amérique), pour la détection d'infections virales, bactériennes et parasitaires sur des momies égyptiennes et andines (par exemple H-C Li et son équipe ont montré la présence du virus HTLV-1, à l'origine du SIDA, dans des momies de la Cordillère des Andes datant de plus de 1500 ans)(Rasmussen, M., et al (2015)).

En médecine légale :

Pour identifier une personne par son empreinte génétique dans le cadre d'une enquête judiciaire, et pour un test de paternité (Jobling, M. A. et al (2004)).

7- Les types de la PCR :

7.1 PCR simplexe :

Les PCR simplexe, qui utilisent un seul couple d'amorces, ainsi que leurs tests diagnostiques moléculaires distincts ciblant une seule séquence, sont généralement plus sensibles que la PCR multiplexe. Ces technologies sont souvent choisies lorsque le nombre de marqueurs est limité et le nombre d'échantillons est élevé. Elles ne nécessitent pas d'équipement particulier en dehors d'un thermocycleur et d'un lecteur de fluorescence en temps réel ou en point final indépendant ou multiplexé (Elnifro, E. M et al 2000).

7.2 PCR multiplexe :

La PCR multiplexe (ou multiplex PCR) est un protocole conçu pour amplifier plusieurs amplicons en même temps en utilisant au moins trois amorces par réaction de PCR. Les produits de PCR compétitionnent alors pour la polymérase, les dNTP et éventuellement le marqueur d'ADN. Il est également possible d'amplifier différents types d'ADN reconnus par un même couple d'amorces. Cependant, dans la PCR multiplexe, il peut être difficile de trouver un contrôle endogène adéquat : un contrôle qui est plus abondant que toutes les cibles à quantifier et qui ne modifie pas les niveaux d'expression selon les conditions expérimentales ou les échantillons utilisés (Henegariu, O. et al 1997).

8- Les Variétés de la PCR

8.1 PCR point final :

L'amplification d'une séquence d'ADN de 1 à 2 kb est réalisée en utilisant des amorces spécifiques qui délimitent la région cible. Une ADN polymérase thermorésistante est utilisée, ce qui permet l'automatisation des cycles d'amplification. Cette polymérase n'a pas d'activité exonucléasique 3'-5' (proofreading), ce qui signifie qu'elle commet une erreur toutes les 10 bases environ. Dans le cas d'une PCR point final, une fois l'amplification terminée, on procède à une migration électrophorétique sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Ce colorant devient fluorescent en présence de nucléotides et sous une lumière UV, ce qui permet de visualiser les différents fragments migrés. On obtient ainsi une lecture qualitative : on peut déterminer si le fragment de la longueur attendue est présent ou non. Une lecture semi-quantitative peut également être effectuée en comparant les intensités des signaux visualisés. Dans la PCR point final, les résultats ne sont observés qu'à la fin de l'ensemble des cycles d'amplification (Saiki, R. K et al 1985).

8.2 PCR en temps réel :

La PCR en temps réel (Real-time PCR) est une avancée majeure dans l'utilisation de la PCR. Russell Higuchi a été l'un des pionniers dans l'analyse des cinétiques de la PCR (réaction en chaîne par polymérase) en développant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure de son accumulation. Ce système en "temps réel" utilisait le bromure d'éthidium comme agent intercalant dans chaque réaction d'amplification, ainsi qu'un thermocycleur modifié pour stimuler l'émission d'échantillons par rayonnement UV. L'émission de

fluorescence était détectée à l'aide d'une caméra CCD (dispositif à transfert de charge). Une augmentation de l'émission de fluorescence était observée lorsque le bromure d'éthidium se liait à l'ADN double brin produit pendant l'amplification. En traçant l'augmentation de l'émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles, le système produisait des courbes d'amplification montrant un schéma plus complet du processus de la PCR que la simple détermination des amplicons (produits d'amplification) accumulés à la fin de l'amplification (Higuchi, R. et al 1992).

8.3 PCR quantitative :

Elle permet de mesurer la quantité initiale d'ADN présente. La quantification d'une séquence d'ADN spécifique par PCR consiste à estimer le nombre de copies de cette séquence contenues dans l'échantillon de départ. Ensuite, il suffit d'appliquer une simple règle de trois pour estimer la quantité totale de cette séquence dans le matériau biologique ou génomique étudié en fonction du volume testé par PCR. On peut distinguer deux stratégies de PCR quantitative, selon qu'elle est réalisée à la fin de la PCR sur les produits d'amplification (PCR à point final) ou en temps réel pendant la PCR. Ces deux types de stratégies sont illustrés par la PCR compétitive et la PCR en chimie TaqMan (Higuchi, R et al 1993).

8.4 RT-PCR :

L'acronyme RT-PCR signifie Réaction en chaîne par polymérase avec transcription inverse. Il s'agit essentiellement d'une PCR réalisée à partir d'un ADN complémentaire (ADNc) obtenu par transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN). La RT-PCR a été développée pour permettre l'amplification des ARN et est considérée comme la méthode la plus sensible pour détecter (et éventuellement quantifier) les ARN messagers présents dans un organe, un tissu ou une cellule. Elle est souvent réalisée in situ, c'est-à-dire directement sur du matériel biologique fixé. Elle est également utilisée dans la construction de banques d'ADNc, le tri d'ARNm (Différencial Display RT-PCR) et la production de sondes d'ADN. Cependant, l'une des difficultés de cette méthode réside dans la préparation des ARN, car ils peuvent être facilement dégradés et contaminés par de l'ADN génomique (Bustin, S. A. (2000)).

9- Etude d'un polymorphisme génétique sur le gène ERAP 1 :

9.1- L'endoplasmicreticulum aminopeptidase :

L'endoplasmicreticulum aminopeptidase (ERAP) est une enzyme luminaire du réticulum endoplasmique (RE) jouant un rôle essentiel dans la présentation des antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (Shastri et al. (1995)). Cette métallopeptidase à zinc raccourcit de manière séquentielle les peptides en clivant leurs acides aminés à l'extrémité N-terminale, générant ainsi des fragments de 8 à 10 résidus - la longueur optimale pour la liaison aux molécules du CMH de classe I. Ce processus de "trimming" des peptides par l'ERAP est finement régulé (Saric et al. (2002)), notamment par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation. En contrôlant ainsi la longueur des peptides, l'ERAP optimise leur présentation aux lymphocytes T CD8+ du système immunitaire, jouant un rôle clé dans l'homéostasie et la pathologie immunitaire. De plus, l'ERAP participe à la modulation de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 bêta, soulignant son implication dans les processus inflammatoires. Des polymorphismes de cette enzyme ont d'ailleurs été associés à diverses maladies auto-immunes, confirmant son importance dans la régulation fine de la réponse immunitaire (Tsui et al (2010)). Il existe deux types de ERAP :

ERAP2 est une famille d'aminopeptidases (aminopeptidase 2). Sa deuxième fonction est de cliver les récepteurs des cytokines (IL-1, IL-6 et TNF) à la surface des cellules (Cui et al., 2002). Les variations génétiques peuvent interférer avec la fonction d'ERAP1, entraînant des effets pro-inflammatoires et un déséquilibre de la réponse immunitaire (Yan et al., 2006, Reeves, Elliott, James, & Edwards, 2014).

ERAP1 est une famille d'aminopeptidases (aminopeptidase 1). L'implication d'ERAP1 va au-delà de la présentation des antigènes. (Reeves et al. (2012)) ont démontré qu'ERAP1 participe également au relargage des récepteurs de cytokines à la surface des cellules (par exemple, IL-1R2, TNFR1 et IL-6R α). Ce relargage réduit la capacité des récepteurs à transmettre les signaux, favorisant ainsi les processus inflammatoires. Les cytokines sont connues pour réguler les processus biologiques (Yan et al. (2015)), notamment la cytotoxicité, les réponses inflammatoires et antivirales, et la transcription des gènes. Les mutations dans le gène ERAP1 peuvent altérer le trimming des peptides ou la présentation des antigènes, conduisant à une prédisposition aux maladies auto-immunes et auto-inflammatoires et

Revue Bibliographique

compromettant les réponses immunitaires des cellules NK(Ombrello et al. (2012)) .ERAP1 joue également un rôle dans la régulation de l'immunité innée (Cifaldi et al. (2012)). Il est principalement localisé dans le RE mais peut également se trouver sous forme soluble dans le cytoplasme et sous forme de protéine membranaire de type II intégrale à la membrane cellulaire. Selon les changements environnementaux, les facteurs de stress cellulaire et le type cellulaire, ERAP1 et ERAP2 peuvent modifier leurs localisations subcellulaires(Hattori and Tsujimoto (2013)). Par exemple, les signaux inflammatoires peuvent influencer leur localisation

ERAP1 et ERAP2 sont des aminopeptidases qui présentent des propriétés distinctes mais complémentaires (Saveanu et al. (2005)) et jouent un rôle important dans la formation de l'immunopeptidome du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). Tandis que ERAP1 clive les résidus hydrophobes en position N-terminale (Reeves et al. (2002)), ERAP2 a une affinité pour les acides aminés chargés positivement. Ce processus est médié par l'interféron-gamma (IFN-gamma)(Yan et al. (2015)). Le mécanisme est essentiellement le suivant : les peptides du cytoplasme sont transloqués dans le réticulum endoplasmique (RE) par le transporteur associé au traitement de l'antigène (TAP) (Hulpke and Tampe (2013)), un membre de la famille des transporteurs ABC. Ici, les ERAP raccourcissent leurs extrémités N-terminales à des longueurs optimales (8-10 acides aminés). Les complexes peptide-HLA de classe I résultants sont transportés à la surface cellulaire et présentés aux cellules T CD8 et aux cellules NK, facilitant les réponses immunitaires (Rock et al (2016)).

9-2 Le Gène ERAP 1 :

Le gène ERAP1 (*EndoplasmicReticulumAminopeptidase1*) est situé sur le chromosome 5q15, appartient à la famille des aminopeptidases de type M1, le gène ERAP1 fait 47 379 paires de bases de longueur et se compose de 20 exons . Code pour une protéine composée de 948 acides aminés. C'est un gène polymorphe avec plusieurs variants courants dont cinq SNP (rs27044, rs30187, rs10050860, rs17482078 et rs2287987) (Saric et al., 2002). Il a été considéré comme un gène candidat fonctionnel dans la spondylarthrite ankylosante (maladie inflammatoire chronique) en raison de ses deux principales fonctions. Le premier rôle majeur est de ERAP1 a pour fonction principale d'ajuster les précurseurs peptidiques à la longueur optimale de neuf acides aminés pour la liaison et la présentation par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (Yan et al., 2006). Cette fonction est accomplie en collaboration avec le deuxième membre de la famille des aminopeptidases

ERAP2 (aminopeptidase 2) (Yan et al., 2006, Reeves, Elliott, James et Edwards, 2014). La deuxième fonction d'ERAP1 est de cliver les récepteurs de cytokines (IL-1, IL-6 et TNF) à la surface cellulaire (Cui et al., 2002). Les variations génétiques peuvent perturber la fonction d'ERAP1, entraînant des effets pro-inflammatoires et un déséquilibre de la réponse immunitaire.

9.3 Le Polymorphisme rs10050860 (C<T) du gène ERAP1 :

Le polymorphisme rs10050860 consiste en un changement d'un seul nucléotide SNP, de cytosine (C) en Thymines (T), à la position 730 au niveau de l'exon 12 de la séquence codante de l'ERAP1 (D575N) (Hanada et al., 2013). Cette substitution nucléotidique entraîne un changement d'acide aminé dans la protéine ERAP1 (Haroon and Inman, 2010). Cette modification structurelle de la protéine ERAP1 peut affecter sa fonction enzymatique et son activité (Evnouchidou et al., 2011).

Les études menées ont démontré que ce polymorphisme rs10050860 jouait un rôle important dans la régulation des voies d'immuno-stimulation innée et adaptative (Tsui et al., 2010). En effet, l'ERAP1 joue un rôle clé dans le traitement des antigènes pour la présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (Hammer et al., 2007).

Le polymorphisme rs10050860 peut ainsi affecter la capacité de l'ERAP1 à cliver certains peptides, modulant la génération des épitopes présentés aux lymphocytes T (Reeves et al., 2014). Cela peut favoriser l'inflammation et la pathogenèse de diverses maladies auto-immunes et inflammatoires, comme la spondylarthrite ankylosante, le psoriasis et la maladie de Crohn (Evans et al., 2011; Wittekindt et al., 2011).

Objectifs

Objectif

III. Objectifs :

La PCR en temps réel : spécifiquement la technologie TaqMan ; offre des avantages significatifs par rapport à la PCR classique en termes de sensibilité, spécificité et rapidité pour l'étude des mutations génétiques, y compris les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP).

L'objectif initial de notre mémoire était de comparer l'amplification de l'ADN par l'étude du polymorphisme rs10050860 du gène ERAP1 entre deux différentes techniques de biologie moléculaire couramment utilisées au niveau du laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire (LGMC, USTO-MB), Oran, notamment la PCR classique et la PCR en temps réel. Cependant, à cause des contraintes pratiques, nous nous sommes contentés de réaliser l'amplification de ce polymorphisme uniquement par la PCR en temps réel. De ce fait, nous avons sélectionnés de nouveaux objectifs pour notre travail de Master :

1. Etude bibliographique sur les techniques d'amplification des acides nucléiques, la PCR et ses dérivées.
2. Etude bibliographique concernant le polymorphisme rs10050 du gène ERAP1.
3. La quantification et le dosage de l'ADN par spectrophotométrie en utilisant un Nanodrop.
4. L'amplification de l'ADN par la PCR en temps réel en utilisant la technologie TaqMan.
5. Analyse des résultats obtenus selon les études précédemment publiées.

Matériel et Méthodes

IV. Matériel :

1) Population d'étude :

Notre étude a concerné deux molécules d'ADN extraites à partir du sang total d'individus sains non apparentés. Ces ADN sont disponibles dans une banque d'ADN appartenant à l'équipe 2 du Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed-Boudiaf (LGMC, USTOMB), stockées à -20°C. L'extraction de ces molécules a été faite préalablement par la technique du *Salting Out*.

2) Matériel nécessaire :

2.1. Appareillage :

- **Centrifugeuse** : Un instrument utilisé en laboratoire pour séparer les composants d'un échantillon en les faisant tourner à grande vitesse, créant une force centrifuge. Dans le contexte de l'ADN, la centrifugeuse est utilisée pour des étapes telles que la préparation de la réaction de PCR, l'élimination des impuretés, la concentration de l'ADN et la récupération des produits d'amplification. Elle facilite ainsi les processus d'extraction, de purification et d'amplification de l'ADN.

- **Appareil de PCR en temps réel** (*Analytikajena*) : C'est un appareil utilisé pour mesurer l'accumulation de produits d'amplification d'ADN au fur et à mesure de la réaction, ce qui permet de suivre la progression de la réaction en temps réel.

- **Nanodrop** (*Thermo Scientific*) : C'est un spectrophotomètre utilisé pour mesurer la concentration et la pureté des échantillons d'ADN ou d'ARN. Il utilise de très petites quantités d'échantillon et permet une mesure rapide.

2.2. Matériel utilisé :

- **Portoir** : C'est un support utilisé pour maintenir les tubes Eppendorf ou à PCR de manière organisée lors des manipulations en laboratoire.

- **Les cônes** : Les cônes font référence aux embouts de micropipettes qui sont placés sur les pointes des micropipettes pour prélever et transférer des liquides.

- **Tubes à PCR** : Ceux sont des tubes en plastique d'une capacité de 200µl spécialement conçus pour effectuer des réactions de polymérase en chaîne.

- **Les tubes Eppendorf:** Ceux sont de petits tubes en plastique d'une capacité de 1,5ml utilisés pour stocker de petits échantillons liquides, tels que des échantillons d'ADN.
- **Micropipette :** Ce sont des instruments de mesure utilisés pour prélever et transférer avec précision de petits volumes liquides. Les lettres "P" suivies de chiffres (par exemple, P10 ou P100) indiquent les volumes que chaque micropipette peut prélever.

V. Méthodes :

1) Stérilisation de la paillasse :

Avant de commencer chaque manipulation, il faut s'assurer de stériliser la paillasse pour éviter les contaminations. Utiliser l'eau de javel diluée pour nettoyer la surface.

2) Quantification d'ADN :

C'est une étape essentielle avant de commencer les expériences en biologie moléculaire. Elle permet de déterminer la concentration d'ADN dans un échantillon ainsi que sa qualité, ce qui est crucial pour des applications de biologie moléculaire.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'appareil NanoDrop (*Thermo Scientific*) qui est un spectrophotomètre UV-visible à microvolume , développé pour l'analyse de micro-volumes d'acides nucléiques (ADN, ARN) et des protéines. Son système de rétention d'échantillon breveté permet de mesurer des échantillons hautement concentrés sans devoir les diluer. L'instrument dispose d'un écran tactile de haute résolution intégré Android de 7 pouces et d'un logiciel de commande (Figure 06).



Figure 06 : Spectrophotomètre UV-visible à microvolume : Thermo Scientific™ NanoDrop™

Matériels et méthodes

- Tout d'abord nous nous sommes assurés que la surface de mesure était propre et dépourvue de contaminants.
- Ensuite, nous avons préparé un échantillon blanc en utilisant uniquement de l'eau distillée (ou le tampon approprié) sans ADN. Cet échantillon blanc a servi de référence pour mesurer l'absorbance de fond. Puis, une petite quantité de notre solution d'ADN a été déposée délicatement sur la surface de mesure du spectrophotomètre, en veillant à éviter la formation de bulles d'air.
- Enfin, nous avons sélectionné l'option de mesure appropriée pour l'ADN double brin sur le spectrophotomètre et nous avons lancé la mesure sur l'appareil afin d'obtenir les lectures d'absorbance.
- Par ailleurs, nous avons également vérifié la pureté de nos ADNs en analysant le rapport d'absorbance à différentes longueurs d'onde. Nous avons utilisé le rapport 260nm/280nm pour évaluer la pureté protéique de l'ADN et le rapport 260nm/230nm pour évaluer la pureté des contaminants organiques. Des valeurs spécifiques de rapport ont été considérées comme indicatives d'une bonne pureté de l'ADN.

3) Amplification des ADNs :

Dans cette étude, nous avons eu le privilège d'utiliser la PCR en temps réel, également appelée qPCR, une technique de biologie moléculaire qui permet de détecter et de quantifier l'amplification d'ADN ou d'ARN de manière spécifique. Elle utilise des marqueurs fluorescents pour surveiller l'amplification au fur et à mesure de la réaction, offrant ainsi une détection plus rapide, une plus grande sensibilité et une quantification précise des acides nucléiques. Cette technique a révolutionné la biologie moléculaire en offrant une puissance et une large utilisation dans divers domaines de recherche et d'application. Dans ce travail, nous avons opté pour l'utilisation de la technologie *TaqMan* expliquée ci-dessous.

3.1 Le principe de la technologie TaqMan :

Cette méthode utilise des sondes spécifiques pour détecter et discriminer différents allèles ou variants génétiques. La sonde TaqMan consiste en un fluorophore attaché de manière covalente à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide et en un désactivateur (quencher) à l'extrémité 3'. Quatre différents fluorophores (ex: 6-carboxyfluorescéine, acronyme : FAM tétra chlorofluorescéine, acronyme TET) et désactivateurs (ex : tétraméthylrhodamine, acronyme : TAMRA) sont utilisables. Le désactivateur inhibe la fluorescence émise par le

Matériels et méthodes

fluorophore lorsqu'il est excité par la source de lumière du thermocycleur¹. Ainsi, tant que le fluorophore et le désactivateur sont à proximité l'un de l'autre, le signal fluorescent est inhibé par le désactivateur (Figure 07).

Chaque sonde TaqMan est conçue de sorte à s'hybrider avec une région d'ADN spécifique amplifiée par une paire d'amorces spécifiques. Alors que la Taq polymérase élongue l'amorce et synthétise le brin néoformé de l'extrémité 3' vers 5' du brin complémentaire, l'activité exonucléase 5'-3' de cette même Taq polymérase dégrade la sonde déjà hybridée au brin matrice. La dégradation de la sonde relargue le fluorophore cassant ainsi la proximité existant avec le quencher et permettant l'expression de la fluorescence. Ainsi, la fluorescence détectée est directement proportionnelle au relargage de fluorophore et donc à la quantité d'ADN d'intérêt présent dans le produit de PCR.

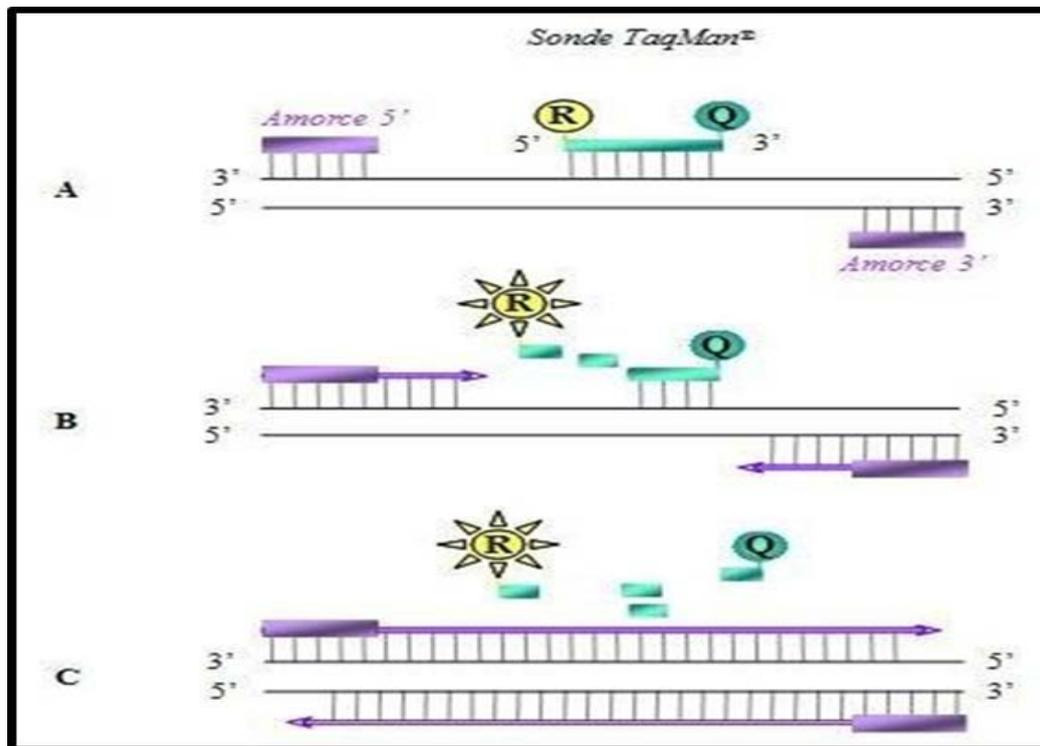


Figure 7 : Principe de la RQ-PCR (Taqman) (Bustin, S. A. (2004))

A : Hybridation de la sonde Taqman™ entre les amorces sens et antisens. Une partie de la fluorescence émise par le reporter est absorbée par le quencher.

B : élongation par la polymérase et clivage (grâce à l'activité exonucléase) de la sonde Taqman™ : émission de fluorescence par le reporter (plus d'inhibition par le quencher).

C : synthèse du nouveau brin complémentaire

Matériels et méthodes

3.2 Préparation du mélange réactionnel :

1ère amplification :

Nous avons testé une PCR en temps réel pour amplifier le polymorphisme rs10050860 du gène ERAP1 chez deux individus sains (ADN1 et ADN2) en utilisant le *TaqMan Genotyping Master Mix* (référence 4371355). Nous avons aussi amplifié un tube comme témoin négatif (sans ADN). Le Protocole de la réaction est comme suite :

Tableau 01 : Le protocole expérimental de la 1^{ère} amplification

PCR en Temps Réel	
Un Seul ADN	
Volume Final (V_f)	20µl
Master Mix (ADN poly + tompon + dNTP)	10X
Assay(rs10050860) (amonces + sondes)	40X
ADN	(20-50ng)
H₂O	QSP

2^{ème} amplification :

Nous avons préparé le mélange réactionnel de la PCR du polymorphisme rs10050860 du gène ERAP1 chez les deux individus sains déjà amplifiés (ADN1 et ADN2) en testant deux masters mix différents cette fois-ci.

Le premier master mix : est celui du kit Virella SARS-CoV-2 SEQC (référence G01128-96), qui est probablement utilisé pour la quantification du virus SARS-CoV-2. Le Virella SARS-CoV-2 SEQC est spécifiquement conçu pour la détection et le séquençage du génome du virus SARS-CoV-2, permettant ainsi d'identifier les variantes et les mutations présentes dans l'échantillon testé.

Matériels et méthodes

Le deuxième master mix : est le *TaqManGenotyping* Master Mix (référence 4371355), qui est utilisé pour les analyses de génotypage par la méthode TaqMan c'est-à-dire l'identification des variations génétiques dans les échantillons testés.

Pour la deuxième amplification, nous avons utilisé le même protocole bien sûr en rajoutant un contrôle négatif pour chaque réaction donc trois échantillons ont été amplifiés à chaque fois, ADN1, ADN2 et le Témoin.

Premièrement, nous avons sélectionné une zone de travail propre et stérile, nous avons étiqueté deux tubes à réaction, les distinguant "Tube A" et "Tube B" sachant que :

- Tube A : Mélange réactionnel avec le master mix 1.
- Tube B : Mélange réactionnel avec le master mix 2.

En second lieu, nous avons programmé une plaque d'amplification selon le dispositif de l'appareil, les tubes ont été disposés comme mentionné sur la figure ci-dessous :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figure 8 : la plaque programmée pour la PCR en temps réel

ADN1 : E4 ; F4, ADN2 : E5 ;F5 Et Témoin négatif : E6 ; F6

Master Mix TaqMan Génotyping pour la ligne E , et Master Mix kit Virella SARS-CoV-2 SEQC pour la ligne F

Matériels et méthodes

Par la suite, nous avons suivi les consignes disponibles au laboratoire LGMC concernant les étapes de programmation de cette plaque. Cependant, nous avons choisi les deux fluorophores FAM/VIC avant de lancer la réaction afin de marquer les deux versions alléliques (C/T) du polymorphisme rs10050860. Le fluorophore VIC a été utilisé pour marquer l'allèle sauvage (C), tandis que le fluorophore FAM a été utilisé pour marquer l'allèle polymorphe (T). Ce marquage a été réalisé selon une fiche technique disponible en ligne sur le site de *Applied Biosystems*. L'utilisation des fluorophores FAM/VIC permet de distinguer lors de l'analyse des résultats d'amplification les deux allèles sauvages et polymorphes du polymorphisme rs10050860 du gène ERAP1.

Nous avons ensuite lancé la PCR en temps réel selon le programme défini au niveau de Laboratoire LGMC/USTO-MB et détaillé sur le Tableau 02. L'appareil a effectué les cycles de réaction (45 cycles) et a collecté les données de fluorescence après chaque cycle. La durée de notre PCR en temps réel était de 1h 21 min.

Tableau 02 : programme d'amplification approprié pour effectuer la PCR en temps réel

Steps	°C	m : s
1	45.0	10 :00
2	95.0	05 :00
3	95.0	00 :10
4	60.0	00 :40

45 ×

Résultats et Discussion

VI. Résultats :

Notre étude a combiné des informations précieuses sur l'utilisation de la PCR en temps réel pour l'analyse de l'ADN. Cette technique avancée offre de nombreux avantages potentiels, notamment la détection quantitative en temps réel, la rapidité des résultats et la quantification précise de l'ADN initial dans l'échantillon. Dans cette partie, nous présenterons en détail les résultats obtenus de notre travail, en mettant l'accent sur les principales constatations et les implications significatives de notre recherche.

1- Résultats de la quantification d'ADN :

Les résultats de la concentration d'ADN obtenus à l'aide du spectrophotomètre Nanodropsont présentés dans le tableau05. En effet, l'ADN 1 a été trouvé concentré à 188 ng/μl avec un rapport A260/A280 de 1,85 et l'ADN 2 a été trouvé concentré à 153ng/μl avec un rapport A260/A280 de 1,66.

Tableau 03 : Présentation des résultats de la concentration des deux ADN avant la dilution.

<i>Echantillon</i>	ng/μl	A260/A280
<i>Blanc</i>	0.0	/
<i>ADN 1</i>	188	1.85
<i>ADN 2</i>	153	1.66

Après vérification de la concentration de la solution des deux ADN sélectionné pour notre étude, nous avons réalisé une étape de dilution cette étape s'est avérée nécessaire pour l'amplification des deux ADN plus tard. En effet, nous avons calculé le volume d'eau distillée stérile nécessaire pour obtenir une concentration finale entre 20 et 50 ng/μL (BustinS.A, 2004). Cette étape est importante pour les applications PCR car elles se situent dans la plage optimale d'efficacité d'amplification et offre une bonne sensibilité de détection et est compatible avec les protocoles standards. C'est une concentration de référence

largement utilisée dans le domaine de l'amplification de l'ADN par PCR en temps réel (Bustin S.A, 2004 ; Nolan, T et al 2006).

Tableau 04 : Présentation des résultats de la concentration des deux ADN après la dilution.

ECHANTILLONS	NG/ μ L	A260/A280
ADN 1	46,9	1.74
ADN 2	34,7	1.90

2- Résultats d'amplification desADNs par PCR en Temps Réel :

Les résultats de la 1^{ère} Amplification qui a été faite en utilisant le Master Mix *TaqManGenotyping* (réf : 4371355) sont représentés sur la figure ci-dessous (Figure 09). La PCR en temps réel nous donne la possibilité de suivre l'intensité de fluorescence mesurée en fonction du nombre de cycles sélectionnés dans le programme (45 cycle). Nous avons observé que l'intensité est restée relativement stable autour de 0 jusqu'à environ 45 cycles, ceci nous indique qu'il ne y a eu aucune amplification. Etant donné que le témoin négatif (sans ADN) utilisé dans cette partie a donné aussi une courbe voisine de 0, nous avons soupçonné le non fonctionnement des réactifs d'amplification plutôt que les ADN. De ce fait, nous avons supposé que le Master Mix *TaqManGenotyping* utilisé dans cette 1^{ère} amplification n'ait pas fonctionné à cause des pannes répétitives d'électricité au laboratoire LGMC. Pour cela, nous avons tenté une deuxième amplification avec un autre Master mix disponible au Laboratoire de COVID-19 à l'Université USTO-MB toujours.

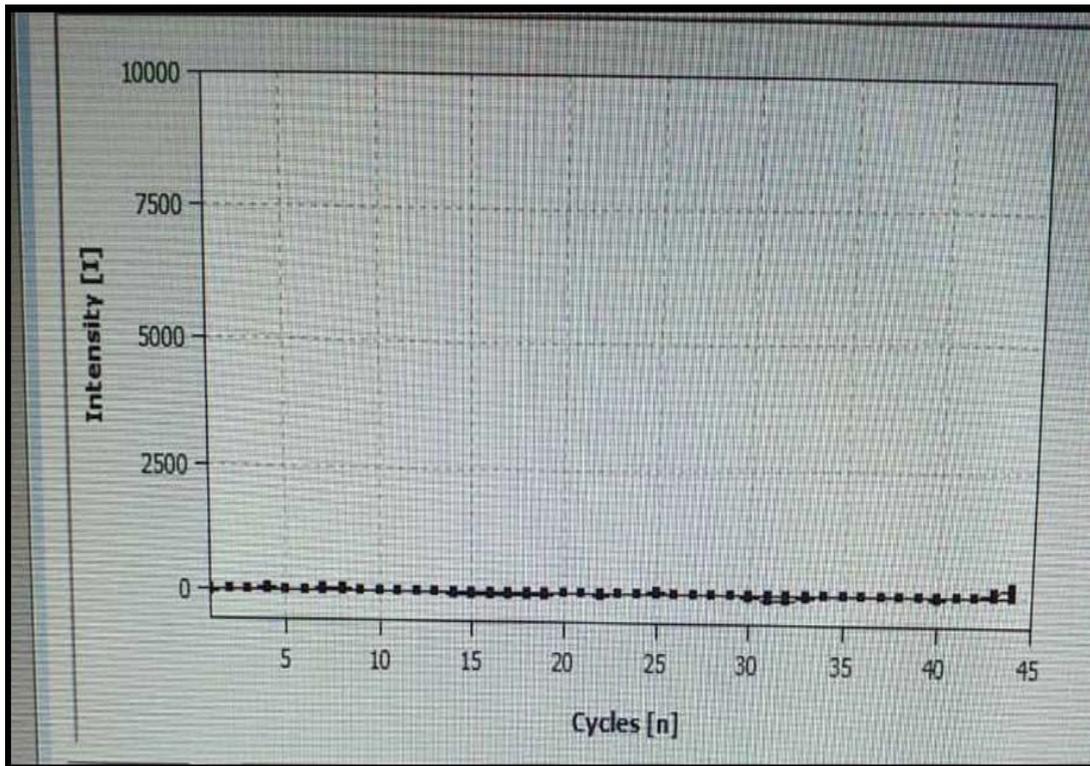


Figure 09 :Photo du résultat de la 1^{ère} amplification des deux ADNs par PCR en temps réel en utilisant Master Mix *TaqManGenotyping* (réf : 4371355) prise au niveau de laboratoire LGMC (Mars 2024).

Par ailleurs, nous avons refait une 2^{ème} amplification et cette fois-ci, nous avons utilisé deux Master Mix différents, le premier qui est le même utilisé dans la 1^{ère} amplification ; *Master Mix TaqManGenotyping* (réf : 4371355) ; et le deuxième Master Mix extrait à partir d'un kit de test COVID-19 ; *Virella SARS-Cov -2 SEQC* (G01128-96). Nous avons réalisé cette deuxième amplification pour confirmer l'efficacité et la sensibilité du Master Mix lors d'une PCR en temps réel.

Le résultat de cette deuxième amplification est illustré sur la Figure 10 où le graphique représente l'intensité de fluorescence mesurée et observée lors des 45 cycles d'amplification.

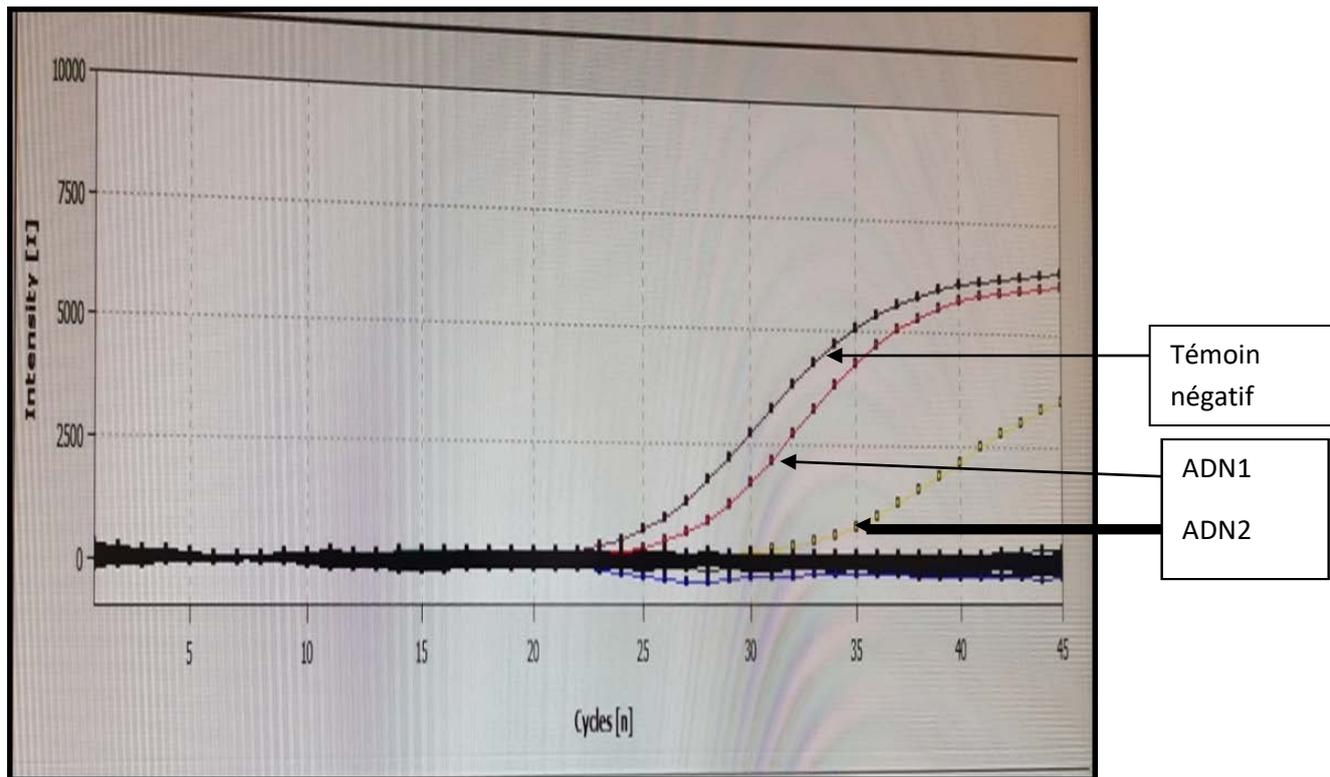


Figure 10 :Photo du résultat de la 2^{ème} amplification des deux ADNs par PCR en temps réel en utilisant les deux Master Mix prise au niveau de laboratoire LGMC (Avril 2024).

Cette figure nous a montré d'une part, la présence d'une amplification à travers quelques courbes observés et d'une autre part l'absence d'amplification à travers des courbes plates. Ce qui indiquerait qu'un Master mix a bien fonctionné et que l'autre non. Pour répondre à cette question, nous avons sélectionné le graphique de la 1^{ère} amplification et celui de la 2^{ème} amplificationséparément. Finalement, nous avons eu un résultat positif pour le Master Mix du kit COVID-19 *Virella SARS-CoV-2 SEQC* (G01128-96) et ceci est démontré sur la Figure 10. En effet, nous avons observé que l'intensité a augmenté à partir du 20^{ème} cycle, le signal a augmenté exponentiellement, indiquant une phase d'amplification exponentielle de l'ADN. Le signal a continué d'augmenter jusqu'à atteindre un plateau entre 35 et 40 cycles, traduisant une saturation de l'amplification. De plus, nous avons observé trois courbes d'amplification qui correspondent aux deux ADNs amplifiés et le Témoin Négatif(Figure11).

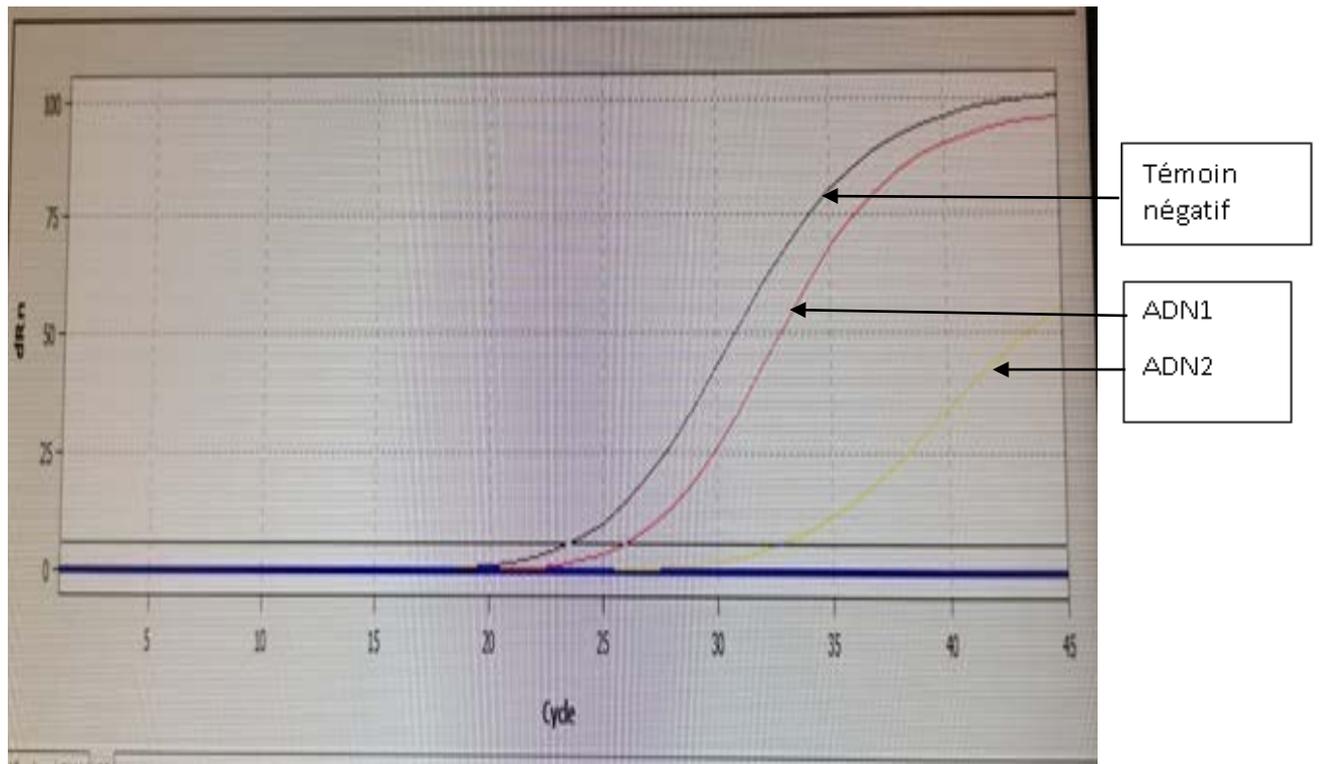


Figure 11 : photo du résultat de la 2^{ème} amplification des deux ADNs par PCR en temps réel en utilisant le Master Mix du kit COVID-19 Virella SARS-CoV-2 SEQC prise au niveau de laboratoire LGMC (Avril 2024).

En revanche, selon le résultat observé sur la (Figure12), nous avons toujours observé un résultat négatif avec la réaction utilisant le Master Mix *TaqManGenotyping* (réf : 4371355).

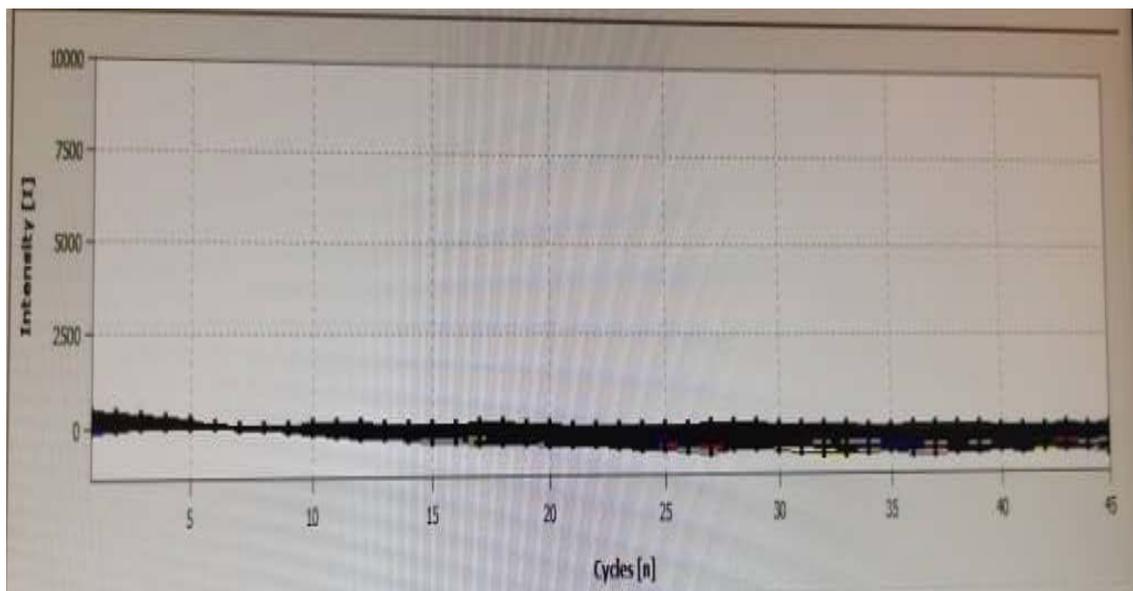


Figure 12 : Photo du résultat de la 2^{ème} amplification des deux ADNs par PCR en temps réel en utilisant le Master Mix *TaqManGenotyping* prise au niveau de laboratoire LGMC (Avril 2024).

- **Résultat du génotypage :**

La deuxième amplification illustrée sur la (Figure10) nous a montré que les trois échantillons ont été marqués par le fluorochrome VIC selon le tableau suivant :

Tableau 05 : Le génotypage des deux échantillons amplifiés par PCR en temps réel.

ECHANTILLONS	DYE	GENE
ADN1	VIC	ERAP1
ADN2	VIC	ERAP1

Comme expliqué dans la partie matériels et méthodes, ce fluorophore VIC représente évidemment un des deux allèles de notre polymorphisme étudié sur le gène ERAP1, notamment le rs10050860 (C<T). Dans la section méthodes, nous avons indiqué que le VIC représente l'allèle sauvage C de ce polymorphisme. Ceci indiquerait que les deux ADNs étudiés 1 et 2 présentent un génotype homozygote pour cet allèle, notamment CC.

- **Calcul des valeurs Ct :**

Sur la Figure10 plus haut, nous avons observé qu'à partir de 20-25 cycles, le signal de fluorescence a augmenté exponentiellement, indiquant une phase d'amplification

exponentielle de l'ADN. C'est à ce moment-là que l'appareil a enregistré les valeurs Ct des échantillons amplifiés.

Les résultats de Ct obtenus à l'aide de l'appareil de PCR en temps réel (Analytikajena) sont présentés dans le tableau 07. L'échantillon « ADN 1 » a une valeur de Ct de 32,66, tandis que l'échantillon « ADN 2 » présente une valeur de Ct de 25,87. Le contrôle négatif affiche une valeur de Ct de 23,52.

Tableau 06 : Les valeurs de Ct des échantillons amplifiés.

ECHANTILLONS	CT
ADN1	32.66
ADN2	25.87
CONTROLE NEGATIF	23.52

VII. Discussion :

Nous avons étudié l'amplification du polymorphisme rs10050860 (C/T) du gène ERAP1 par PCR en temps réel en utilisant la technologie TaqMan. Pour cette étude, nous avons fait la quantification des ADN. Les résultats initiaux ont montré que les concentrations des deux ADN sélectionnés pour ce travail sont élevées, 188 ng/μL pour l'ADN 1 et 153 ng/μL pour l'ADN 2. Ces concentrations sont trop importantes pour une utilisation directe dans des applications de la PCR en temps réel qui nécessitent généralement des concentrations qui ne dépassent pas les 50 ng/μL, une étape de dilution a donc été nécessaire. Les résultats après dilution ont montré que l'ADN 1 a été dilué à 46,9 ng/μL et que l'ADN 2 a été dilué à 34,7 ng/μL. Ces concentrations se situent bien dans la valeur optimale de 20-50 ng/μL. Les études ont montré justement que des concentrations d'ADN dans cette plage sont idéales pour assurer des résultats fiables et reproductibles en PCR en temps réel (Bustin S.A, 2004 ; Nolan, T et al 2006).

Cette étape de quantification nous a également permis d'identifier les rapports A260/A280 des deux ADN. Ce rapport est utilisé généralement pour la vérification du degré de pureté de l'ADN extrait. Un rapport idéal se situe entre 1,8 et 2,0, indiquant que l'échantillon est relativement pur et exempt de contaminations comme des

protéines(Sambrook, J.,et al . (1989). L'ADN 1 présente un rapport de 1,85, ce qui est dans une valeur idéale. Cependant, le rapport de 1,66 pour l'ADN 2 est un peu en dessous de la valeur idéale, suggérant une pureté légèrement moindre. Cela peut indiquer la présence de contaminants comme des protéines ou des solvants résiduels. Cependant, les rapports A260/A280 ont été largement améliorés après la dilution où nous avons noté un rapport de 1,74 pour l'ADN 1 et 1,90 pour l'ADN 2.

Par ailleurs, après avoir réalisé la quantification des deux ADN, nous avons entamé l'amplification de ces ADN par PCR en temps réel en utilisant la technologie TaqMan. En effet, les résultats de la première amplification utilisant le Master Mix *TaqMan Genotyping* (réf : 4371355) n'ont montré aucune amplification. L'intensité de fluorescence est restée relativement stable autour de 0 jusqu'à la fin des 45 cycles. Cela indique que le processus d'amplification n'a pas fonctionné correctement avec ce master mix. Le témoin négatif (sans ADN) a également donné une courbe proche de 0, suggérant un problème avec les réactifs d'amplification et non pas les ADN. Les pannes répétitives d'électricité au laboratoire LGMC ont probablement affecté le fonctionnement de ce master mix. Pour confirmer que ce Master Mix *TaqMan Genotyping* (réf : 4371355) a été difonctionnel ou pas,nous avons refait une deuxième amplification en utilisant deux master mix différents : le même *TaqMan Genotyping* et un nouveau master mix extrait d'un kit de test COVID-19, le Virella SARS-Cov-2 SEQC (G01128-96) procuré au laboratoire de COVID-19 (Université USTO-MB).

Les résultats de cette deuxième amplification d'ADN ont donné des aperçus différents. Avec le master mix Virella SARS-CoV-2 SEQC, on observe une amplification effective. L'intensité de fluorescence augmente à partir du 20ème cycle, indiquant une phase d'amplification exponentielle de l'ADN. Le signal a continué d'augmenter jusqu'à atteindre un plateau entre 35 et 40 cycles. Après 40 cycles, le signal diminue, ce qui traduit la fin de la réaction.Cependant, avec le master mix *TaqMan Genotyping*, nous avons toujours observé l'absence d'amplification, l'intensité de fluorescence est restée proche de 0 durant les 45 cycles. Ces résultats confirment que le master mix Virella SARS-CoV-2 SEQC a bien fonctionné et a permis l'amplification des deux ADN selon les courbes qui ont été générées, contrairement au master mix *TaqMan Genotyping* qui est probablement devenu difonctionnel à causedes pannes répétitives d'électricité au laboratoire.

L'amplification du polymorphisme rs10050860 (C/T) du gène ERAP1 chez les deux ADN 1 et 2 nous a permis de générer le génotypage moléculaire en utilisant la méthode de réaction en chaîne par polymérase en temps réel, par la technologie TaqMan.Dans cette étude,

nous avons utilisé deux fluorophores VIC et FAM qui marquaient respectivement les deux allèles de ce polymorphisme C et T. Nos résultats ont montré que la PCR avait détectée une fluorescence unique de type VIC concernant les deux échantillons amplifiés, à savoir, ADN 1 et ADN 2. Ceci indiquerait que les deux ADNs étudiés 1 et 2 présentent un génotype homozygote, notamment CC concernant le polymorphisme étudié sur le gène ERAP1, le rs10050860 (C<T). Ce résultat est attendu car les deux ADNs étudiés sont extraits à partir de deux individus témoins sains.

Nos résultats sont concordant avec les études effectuées précédemment. En effet, une thèse de doctorat a été publiée en 2023 par Mme AZZOUNE Asmaa, a étudié le polymorphisme rs10050860 du gène ERAP1 dans un échantillon de la population de l'Ouest Algérien où 116 sujets témoins ont été génotypés par PCR en temps réel. En effet, les résultats de cette thèse indiquent que l'allèle T représentait bien l'allèle mineuren Algérie avec une fréquence de 24% contre 76% pour l'allèle C. Ces fréquences sont semblables chez plusieurs populations dont la population belge (Kadi et al., 2013), portugaise (Kadi et al., 2013), d'Asie de l'Est (Gao et al., 2020 ; Lee & Song, 2016) et iranienne (Babaie et al., 2020).

Le Ct (*Threshold Cycle*), également connu sous le nom de Cycle de seuil ou Cycle de détection, est un paramètre couramment utilisé dans les expériences de PCR quantitative (qPCR). Le Ct est déterminé en utilisant des méthodes statistiques ou algorithmiques pour identifier le cycle auquel le signal de fluorescence dépasse le seuil. Il est généralement défini comme le premier cycle où le signal atteint une valeur significative au-dessus du bruit de fond.

Concernant les valeurs CT retrouvées dans notre étude, le premier ADN avait un Ct de 32,66 alors que le deuxième ADN avait un Ct de 25,87. Cependant, le contrôle négatif avait un Ct de 23,52. Les études ont montré que plus le Ct est faible, plus la quantité de cible initiale est élevée. Il est important de noter que le Ct est influencé par divers facteurs tels que l'efficacité de l'amplification de la PCR, la qualité de l'échantillon et les conditions expérimentales. De ce fait, nos valeurs sont plutôt correctes, l'ADN 2 a une valeur proche de celle du témoin négatif et ce qui indique une bonne qualité d'amplification donc une qualité d'ADN juste idéale pour une telle amplification. Cependant, le premier ADN avait une valeur plus ou moins élevée, ceci impliquerait la mauvaise qualité de l'ADN utilisée malgré la concentration et dilution réaliser. Par conséquent, il est recommandé d'utiliser des gènes de référence ou des gènes de contrôle internes pour normaliser les valeurs de Ct et obtenir des résultats plus fiables et comparables entre les échantillons.

La PCR en temps réel est effectivement la méthode la plus précise et sensible pour l'analyse des polymorphismes génétiques, mais la méthode PCR-RFLP peut être une bonne alternative et plus abordable lorsque la quantification précise n'est pas nécessaire. La technique PCR-RFLP combine l'amplification par PCR d'une région génomique spécifique contenant un polymorphisme d'intérêt, suivie de la digestion des amplicons par des enzymes de restriction et de la séparation des fragments obtenus par électrophorèse sur gel (Mullaney et al., 1990 ; Botstein et al., 1980).

La PCR en temps réel est une technique de choix, rapide et efficace qui permet une analyse rapide, sensible et spécifique pour la détection et la quantification précise des polymorphismes génétiques mais laborieuse malheureusement. La PCR en temps réel utilise des sondes fluorescentes et nécessite un équipement de PCR en temps réel, plus coûteux que la méthode RFLP.

Conclusion
et
perspectives

VIII. Conclusion et perspectives :

La PCR en temps réel, une technique qui a révolutionné la biologie moléculaire en utilisant des marqueurs fluorescents, offrant ainsi une détection plus rapide, une sensibilité plus grande et une quantification plus précise des acides nucléiques. Dans ce travail, nous avons opté pour l'utilisation de la technologie des sondes TaqMan. Cette méthode utilise des sondes spécifiques pour détecter et discriminer différents allèles ou variantes génétiques. En effet, durant ce mémoire, nous avons quantifié et amplifié deux ADN extraits à partir de deux individus sains déjà disponibles dans une biothèque d'ADN au Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire d'Oran (LGMC, USTO-MB).

Les résultats de ce mémoire ont montré d'une part, que les concentrations des deux ADN étudiés étaient très élevées où l'étape de la dilution semblait être nécessaire. Ces concentrations sont impératives pour une utilisation directe de la PCR en temps réel qui nécessite des concentrations ne dépassant pas les 50 ng/μL. Les résultats après dilution ont montré que l'ADN 1 a été dilué à 46,9 ng/μL et que l'ADN 2 a été dilué à 34,7 ng/μL avec des rapports de pureté idéaux (1,74 pour l'ADN 1 et 1,90 pour l'ADN 2).

D'une autre part, nous avons utilisé la technologie des sondes TaqMan en étudiant un polymorphisme nucléotidique situé au niveau du gène ERAP1, appelé rs10050860 et qui représente le changement d'une Cytosine par une Thymine au niveau de l'exon 12 de ce gène. Les résultats nous ont permis d'établir le génotypage de ce polymorphisme chez les deux individus sains avec une grande spécificité et sensibilité. La PCR en temps réel nous a permis aussi de calculer les valeurs des points CT pour chaque échantillon. Les résultats étaient satisfaisants pour l'ADN 1 et le contrôle négatif indiquant une bonne qualité d'amplification. L'utilisation de deux Master mix différents nous a aidé aussi à apprendre comment optimiser les conditions d'une réaction de PCR en cas d'échec.

Finalement, l'utilisation de la PCR en temps réel avec la technologie TaqMan s'est avérée être une bonne approche, fiable et rapide surtout pour l'étude d'un polymorphisme génétique, tel que le rs10050860 (C/T) du gène ERAP1 exploré dans ce travail.

En perspectives, étant donné que le polymorphisme rs10050860 (C/T) a été associé à diverses maladies auto-immunes et inflammatoires (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007 ; Evans et al., 2011 ; Ortiz et al., 2016), il serait intéressant de l'explorer chez les patients dans le cadre de futures études épidémiologiques ou cliniques afin de mieux

Conclusion

comprendre son rôle physiologique dans la pathogenèse de ces affections. Des études de type cas-témoins seraient idéales pour l'étude de ce polymorphisme génétique.

Par ailleurs, nous serons ravies aussi de réaliser notre objectif initial qui était la comparaison pratique entre une PCR classique qui nécessite des manipulations post-PCR et la PCR en temps réel qui s'est avéré très simple et rapide.

Références bibliographiques

Références Bibliographique

IX. Référence Bibliographique :

- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*, 28(3), 495-503
- Breslauer, K. J., Frank, R., Blöcker, H., & Marky, L. A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 3746-3750
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169-193
- Bustin, S. A. (2004). *A-Z of quantitative PCR (Vol. 5)*. Iafate, AJ: IUL Biotechnology Series.
- Bustin, S. A. (2004). *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, La Jolla, CA
- Cammack, R., Atwood, T., Campbell, P., Parish, H., Smith, A., Vella, F., & Stirling, J. (Eds.). (2006). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (2nd ed.)*. Oxford University Press.
- Choi et al. (2010) *Nat Genet.* 42(9):758-763.
- Cifaldi et al. (2012) *Journal of Immunology.* 188(12):6183-6192
- Cui, X., Hawari, F., Alsaaty, S., Lawrence, M., Combs, C. A., Geng, W., ... Levine, S. J. (2002). Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(4), 515– 526. <https://doi.org/10.1172/JCI13847>
- Dove, W. F., & Davidson, N. (1962). Cation effects on the denaturation of DNA. *Journal of Molecular Biology*, 5(4), 467-478
- Dube, S., Qin, J., & Ramakrishnan, R. (2008). Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a microfluidic device. *PloS one*, 3(8), e2876
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 559-570
- Evans et al. (2011) *Nat Genet.* 43(7):691-696.
- Evnouchidou et al. (2011) *J Immunol.* 186(8):4871-4880.
- Hammer et al. (2007) *Annu Rev Immunol.* 25:739-779.
- Hanada et al. (2013) *Nat Genet.* 45(3):284-290.
- Haroon and Inman (2010) *Curr Rheumatol Rep.* 12(5):340-347.
- Hattori and Tsujimoto (2013) *The Journal of Biochemistry.* 154(3):221-229
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23(3), 504-511

Références Bibliographique

- Henson, J. M., & French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual review of phytopathology*, 31(1), 81-109
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10(4), 413-417
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11(9), 1026-1030
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M., & Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2(5), 353-359
- <https://ed414-openlab.unistra.fr/uploads/media/PCR.pdf>
- https://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9action_en_cha%C3%A9ne_par_polym%C3%A9rase
- Hulpke and Tampe (2013) *Biological Chemistry*. 394(8):1019-1026
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.). (1990). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press
- Jobling, M. A., & Gill, P. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*, 5(10), 739-751
- Kary Mullis. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65
- Keidel, S., Chen, L., Pointon, J., & Wordsworth, P. (2013). ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Current Opinion in Immunology*, 25(1), 97-119 102. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.11.002>
- Kellogg, D. E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P. D., & Chenchik, A. (1994). TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques*, 16(6), 1134-1137
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95-125
- Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Chang, S. Y., Landre, P. A., Abramson, R. D., & Gelfand, D. H. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Research*, 2(4), 275-287
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709-715
- Liu, Y. (1995). Size-dependent PCR amplification: implications for quantitative analysis and probe selection. *BioTechniques*, 18(4), 586-591
- Marmur, J., & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of molecular biology*, 5(1), 109-118
- Mühlhardt, C. (2000). The Polymerase Chain Reaction (PCR). In *Molecular Biology and Genomics* (pp. 41-62). Springer, Berlin, Heidelberg

Références Bibliographique

- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in enzymology* (Vol. 155, pp. 335-350). Academic Press.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Nolte, F. S. (2008). Molecular diagnostics for detection of bacterial and viral pathogens in community-acquired pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 47(Supplement_3), S123-S126
- Ombrello et al. (2012) *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(8):2509-2514
- Rasmussen, M., et al. (2015). The ancestry and affiliations of Kennewick Man. *Nature*, 523(7561), 455-458
- Reeves et al. (2002) *The Journal of Biological Chemistry*. 277(48):46014-46018
- Reeves et al. (2012) *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(19):7414-7419
- Reeves et al. (2014) *Arthritis Rheumatol*. 66(6):1608-1617.
- Rock et al. (2016) *Annual Review of Immunology*. 34:317-341.
- Roux, K. H. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome research*, 4(5), S185-S194.....
- Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, 18(21), 6409-6412
- Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, 18(21), 6409-6412
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 1). Cold spring harbor laboratory press
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press

Références Bibliographique

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467
- SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4), 1460-1465
- Saric et al. (2002) *Nature Immunology*. 3(12):1169-1176
- Saveanu et al. (2005) *Nature Immunology*. 6(7):689-697
- Schildkraut, C., & Lifson, S. (1965). Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. *Biopolymers*, 3(2), 195-208
- Shastri et al. (1995) *Immunological Reviews*. 148:31-50
- Tsui et al. (2010) *Arthritis and Rheumatism*. 62(5):1305-1311
- Tsui et al. (2010) *Arthritis Rheum*. 62(5):1305-1311.
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 29(3), 151-159
- Vondrušková, J., Procházková, S., Svobodová, L., Košar, M., Morávek, N., Voltr, V., & Hubálek, Z. (2021). Comparison of Spectrophotometric Quantification Methods for Determination of DNA Concentration. *Molecules*, 26(11), 3301.
- Wetmur, J. G. (1991). DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 26(3-4), 227-259
- Winter, G., Fields, S., & Brownlee, G. G. (1978). Nucleotide sequence of the haemagglutinin gene of a human influenza virus H1 subtype. *Nature*, 275(5679), 512-516
- Wittekindt et al. (2011) *Genome Med*. 3(6):39
- Yan et al. (2015) *Nature Communications*. 6:6340
- Yan et al. (2015) *Nature Communications*. 6:6340
- Yan, J., Parekh, V. V., Mendez-Fernandez, Y., Olivares-Villagómez, D., Dragovic, S., Hill, T., ... Van Kaer, L. (2006). In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(3), 647–659. <https://doi.org/10.1084/jem.20052271>

