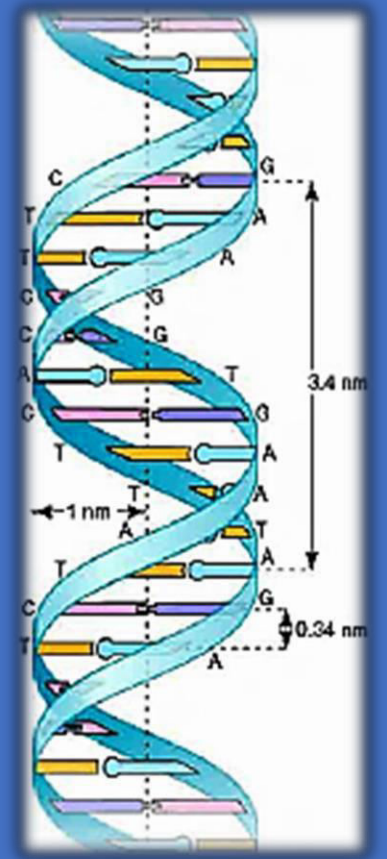


Biologie moléculaire Appliquée





Chapitre 1

PCR et séquençage

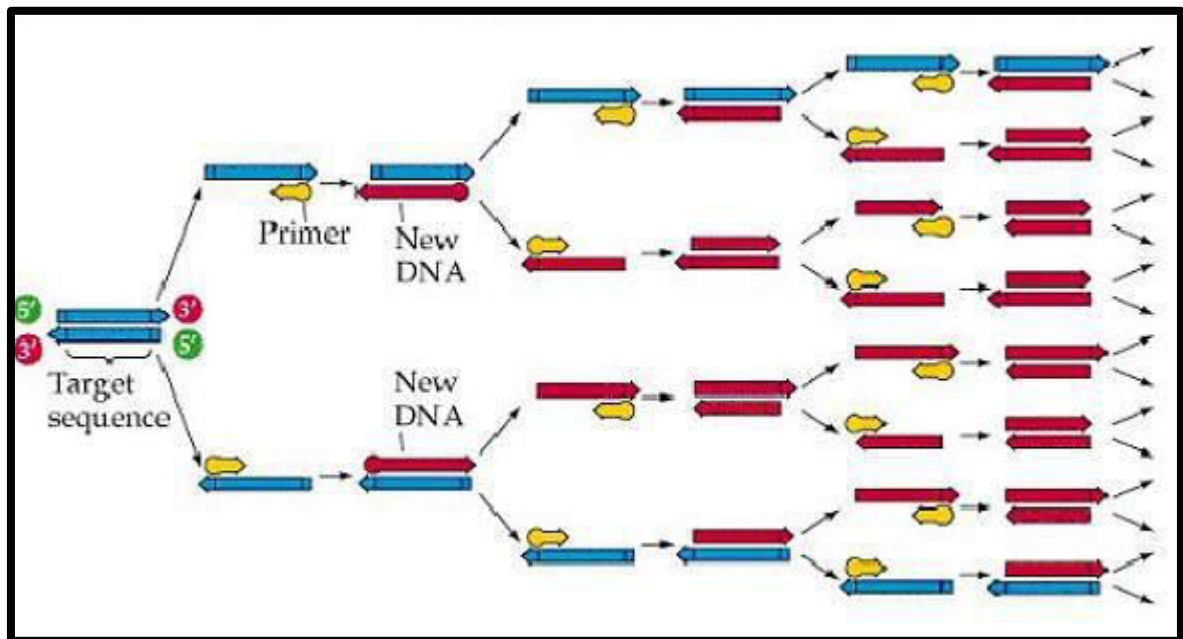


Amplification des acides nucléiques *in vitro*

Réaction PCR (Polymerase Chain Reaction ou la réaction en chaîne par polymérase)

Historique et principe

- ✓ La PCR est une technique fondamentale en biologie moléculaire développée par Kary Bank Mullis en 1985 (prix Nobel de chimie en 1993).
- ✓ Il s'agit d'une méthode enzymatique rapide, hautement efficace, extrêmement sensible et spécifique qui permet **de sélectionner et amplifier** une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'obtenir une quantité suffisante.
- ✓ Son principe est dérivé des connaissances du mécanisme moléculaire de la réplication d'ADN, et des propriétés de dénaturation-renaturation de l'ADN.
- ✓ Une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle



les éléments nécessaires à cette réplication sont :

1- La matrice (ADN)

- La matrice est une molécule d'**ADN double-brin** ou **ADNc** extraite et purifiée à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules...).
- Cette matrice doit-être **propre** c'est-à dire qu'elle ne doit pas contenir contaminants provenant de l'échantillon ou des réactifs utilisés dans les protocoles d'extraction d'ADN (phénol, acétate, éthanol, EDTA).
- La matrice doit y être en **quantité suffisante**, c'est-à dire entre 10 et 100 brins d'ADN.

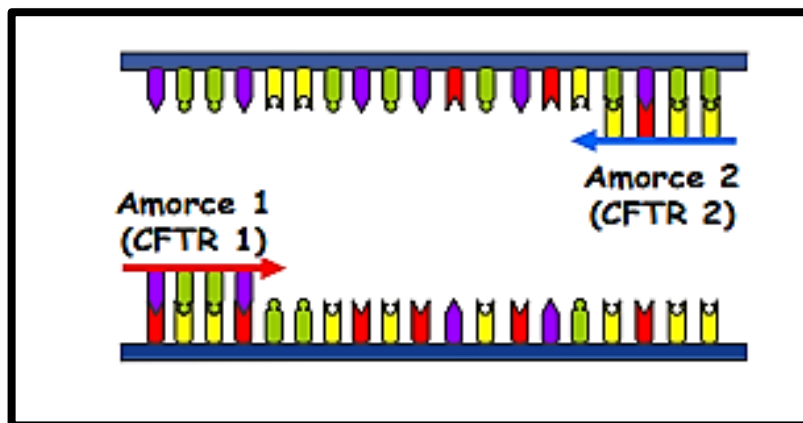
Remarque

La mauvaise qualité et/ou une quantité trop importante d'ADN matrice peut conduire à une amplification aspécifique, voire à une inhibition enzymatique.

2- Les amorces

Ce sont des fragments courts d'ADN (oligonucléotides), capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier

- Elles doivent contenir entre 18 et 30 nucléotides avec 30 à 40% de G-C.
- Avec des extrémités 3'OH libres afin de permettre l'action de la polymérase.
- Leur T_m est de 5°C de moins que la température d'hybridation (Généralement, ce sont les valeurs comprises entre 55 et 70°C qui donnent de bons résultats avec de concentrations de 0,1 à 0,2 μM).



3- Une polymérase

C'est une enzyme capable de synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après sa fixation à une amorce. On utilise souvent la Taq-poylmérase qui est une polymérase thermostable, extraite d'une bactérie (*Thermus aquaticus*) des sources chaudes (80-90°C). Mais autres enzymes thermorésistantes provenant d'autres microorganismes sont

actuellement utilisées : la **PFU** extraite de *Pyrococcus furiosus* et **Vent** extraite de *Thermococcus litoralis*.

Actuellement, les enzymes utilisées sont dites recombinantes, ce qui simplifie considérablement leur obtention, et leurs propriétés ont été largement modifiées pour les rendre plus efficaces.

4- Des nucléotides triphosphates

Les désoxyribonucléotides Triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) utilisés par la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire. Elles sont souvent ajoutées à des concentrations allant de 20 à 200 µM (les fortes concentrations cause des amplifications parasites dues aux erreurs de réplication).

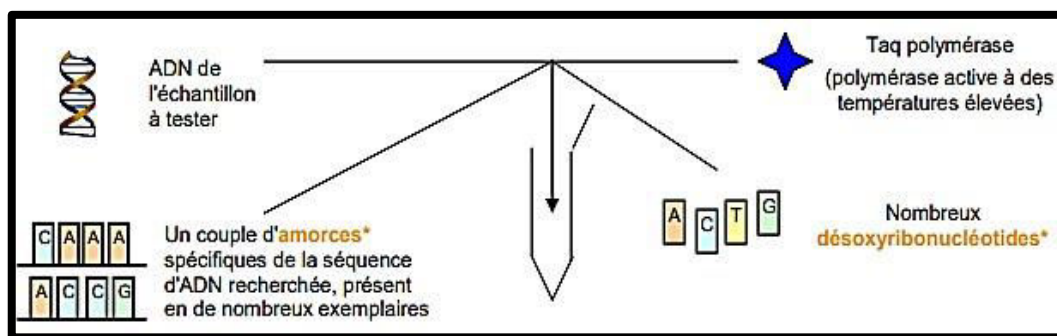
5- Le tampon

Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir le pH du milieu réactionnel stable au niveau optimal pour la Taq polymérase (Tris-HCl à pH basique 8,5 - 9).

Ce tampon doit contenir des cations bivalents Mg^{2+} et monovalents (K^+ ou NH_4^+). La présence de ces derniers dans le milieu réactionnel induit la neutralisation des charges négatives des groupements phosphates et la stabilisation des hybrides ADN/ADN.

Les ions magnésium ajoutés des concentrations de 0,5 à 2,5 mM servent à des cofacteurs indispensables à l'activité de la Taq polymérase.

Remarque
La concentration en sels doit rester compatible avec l'activité de l'ADN polymérase (précipitation de



Températures de la réaction

Les étapes constituant le cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures très rapidement et précisément (de 0°C à 100°C). Les tubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur.

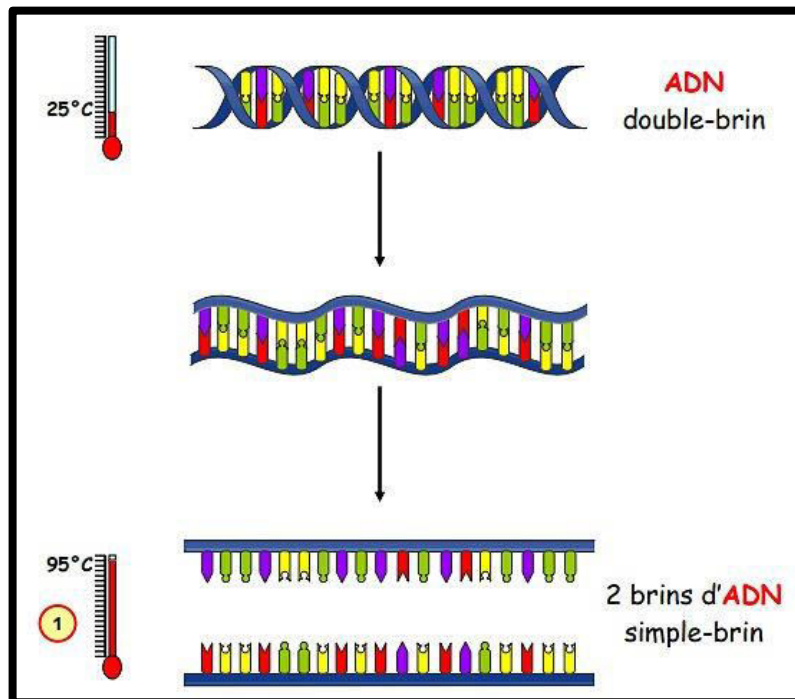


Etapes

Chaque cycle de PCR est composé d'une succession de trois étapes :

Etape 1 : La dénaturation

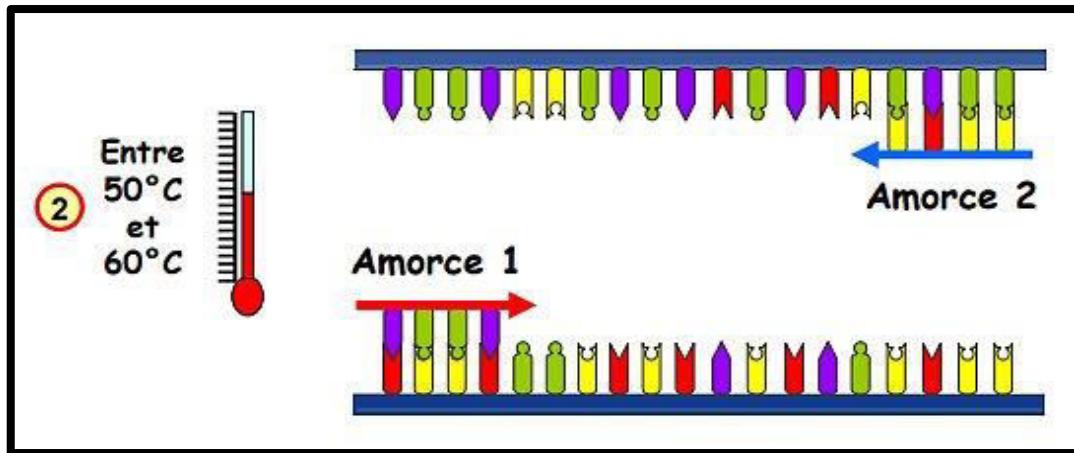
L'ADN à amplifier est chauffé à une température de 95°C. Les liaisons hydrogène reliant les bases de chaque brin d'ADN étant instables à cette température ce qui induit la séparation des deux brins.



Etape 2 : L'hybridation

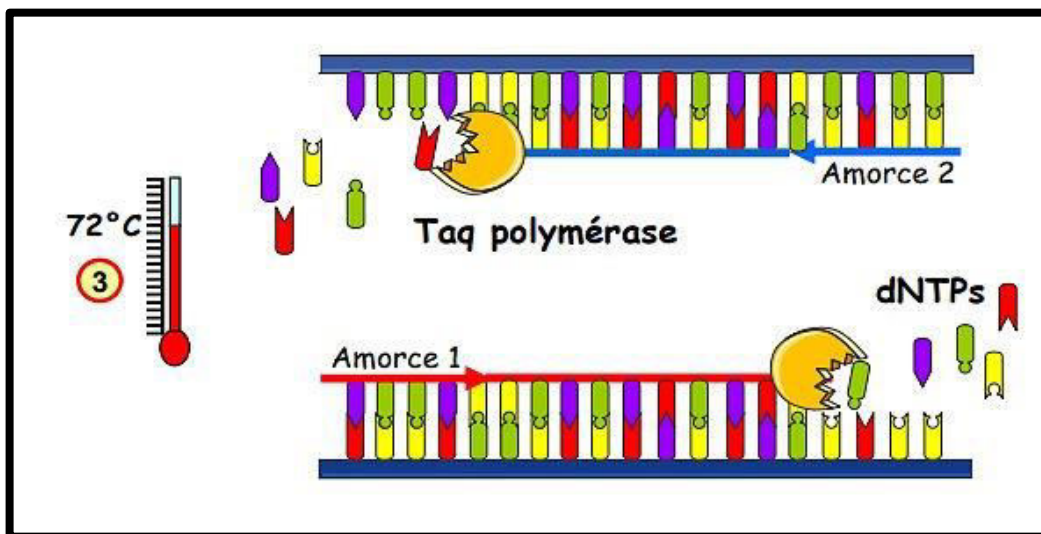
La température est descendue à une température dite d'hybridation généralement comprise entre 50°C et 60°C (choisi en fonction de la composition en désoxyribonucléotides

constituant les amorces). A cette température les amorces s'hybrident au brin d'ADN (reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène).



Etape 3 : L'élongation

A cette étape la température est réglée à 72°C. c'est la température idéale pour l'activité de la Taq polymérase qui synthétise des brins complémentaires à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.



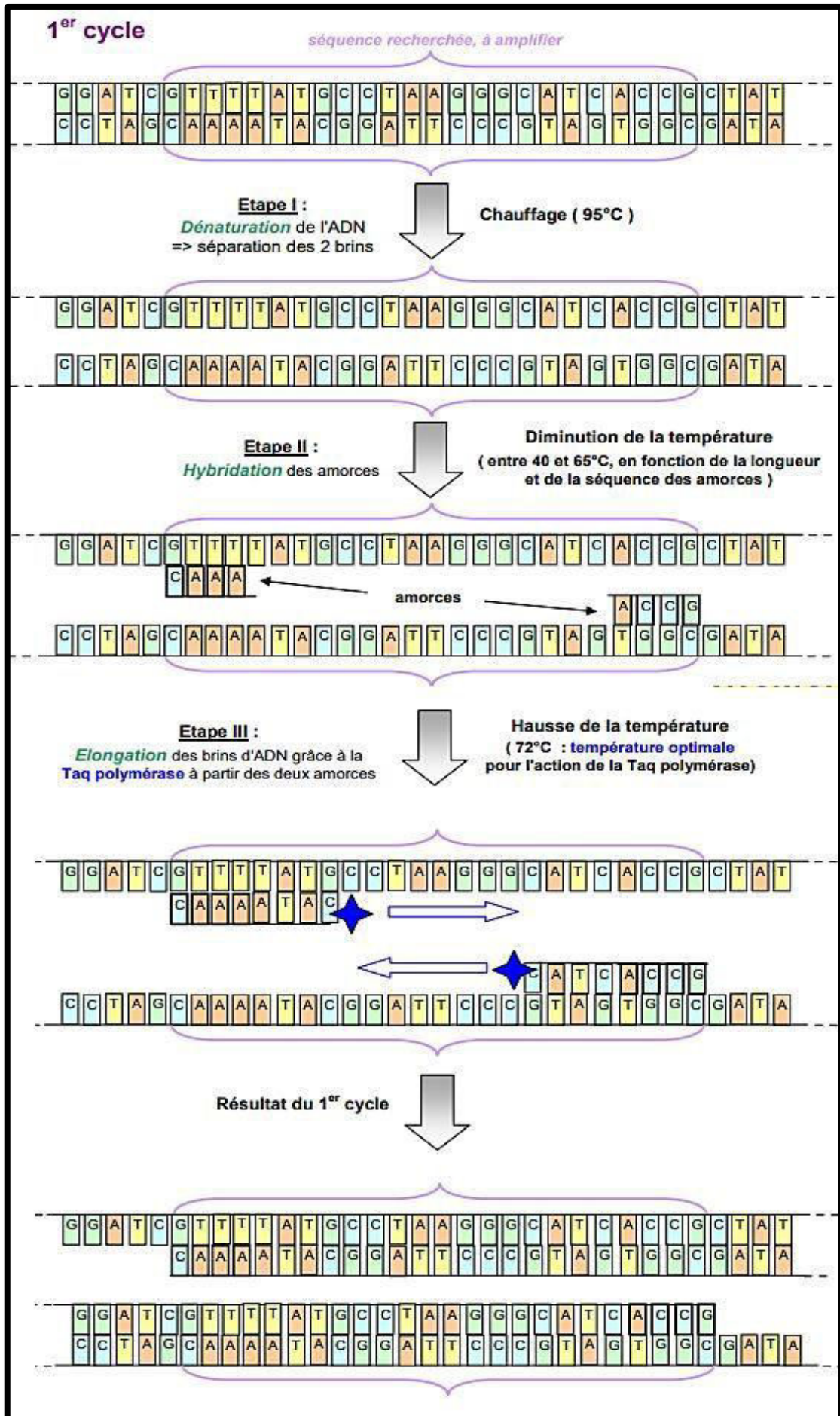
Remarque

Les températures prédéterminées et les durées bien définies du processus de PCR dépendent de la taille de la séquence à amplifier et de la taille et la composition en désoxyribonucléotides des amorces.

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes, seule la température d'hybridation devra être calculée pour chaque nouvelle PCR. Cette température d'hybridation dépend de la composition en bases des oligonucléotides amorces. Elle est légèrement inférieure (environ de 5°C) au T_m qui est la température de demi-dénaturation. Pour calculer le T_m d'un oligonucléotide inférieur à 30 nucléotides, on utilise la relation suivante :

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

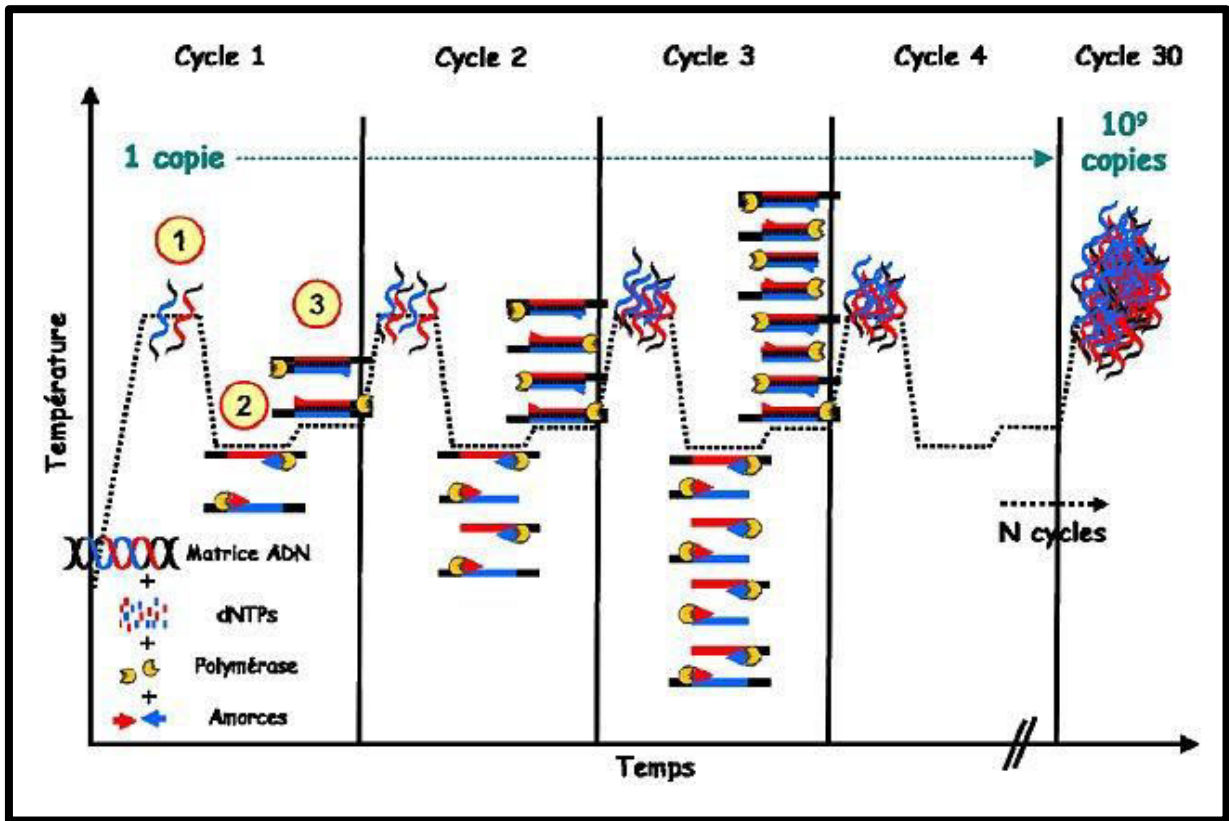
(Ou A, T, G et C sont respectivement le nombre de chacune de ces bases dans l'oligonucléotide).



Aspects quantitatifs de la réaction PCR

La PCR est une suite de cycles, qui se répètent en boucle, comportant chacun les trois paliers de température. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles.

Au cycle suivant, les nouveaux fragments synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux fragments d'ADN. Donc théoriquement à la fin de chaque cycle la quantité d'ADN cible se double.



En théorie, le nombre de copies de la séquence à amplifier dépend du nombre de cycles à réaliser. Puisque à chaque cycle, le nombre de copies est multiplié par deux, on aura alors un nombre égal à 2^n après n cycles.

En pratique, le rendement est beaucoup plus faible (85%) et le nombre de copies (si le rendement reste constant tout au long de l'amplification) est de $(1+R)^n$; R étant le rendement et n, le nombre de cycles.

Nombre de copies de la cible	Nombre de cycles
10^5	25 à 30
10^4	30 à 35
10^2 à 10^3	35 à 40
1 à 10^2	40 à 45

RT-PCR :

La RT-PCR se déroule en deux phases. Une première phase correspond à la copie d'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur l'ADNc synthétisé.

Dans la première phase, l'ARN messager à étudier est repéré en utilisant une sonde Oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul ARNm auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou retrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme de ADNc simple brin), une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension.

L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique.

La technique RT-PCR a permis de montrer que la transcription de tous les gènes s'effectuait dans tous les tissus et ceci même pour les gènes qui présentent une très grande spécificité tissulaire. On parle dans ces conditions de transcription illégitime. Il est évident qu'avant les techniques d'amplification génique, la sensibilité des méthodes classiques n'avait pas permis de mettre en évidence un tel phénomène.

Applications de la PCR

Les produits d'amplification obtenus par PCR peuvent être utilisés pour :

- ✓ Le clonage et le séquençage des gènes.
- ✓ Pour des études comparatives ou phylogénétiques.
- ✓ Pour la mise en évidence des mutations ponctuelles.
- ✓ Le diagnostic microbiologique et moléculaire des maladies génétiques et infectieuses (surtout les cancers et les microorganismes difficilement cultivés Ex. *Bartonella*, virus ...etc.).

Le séquençage de l'ADN

Historique

- En **1977**, deux méthodes de séquençage ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de Walter Gilbert aux Etats-Unis (dégradation chimique sélective), et l'autre par Frederick Sanger au Royaume-Uni (synthèse enzymatique sélective).
- En **1980**, Gilbert et Sanger ont eu le prix Nobel en chimie.
- Le virus bactériophage ϕ X174 de la famille des *Microviridae* était le premier organisme séquencé par la méthode de Sanger en 1977.
- L'automatisation de ces techniques a permis la finalisation du génotypage humain en **2003**.
- Actuellement, le séquençage du génome d'un individu se fait en quelques jours.

Technique de Maxam et Gilbert

Principe

Le marquage radioactif des fragments d'ADN puis leur coupure sélective suite à une dégradation chimique.

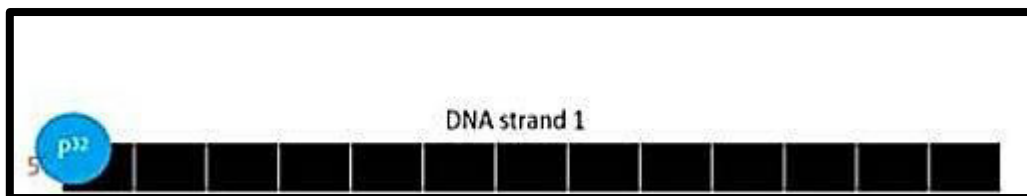
Procédure et étapes

1. La dénaturation :

La dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin par augmentation de la température.

2. Marquage radioactif :

Marquage radioactif de l'extrémité 5' par le phosphore radioactif (P^{32}).

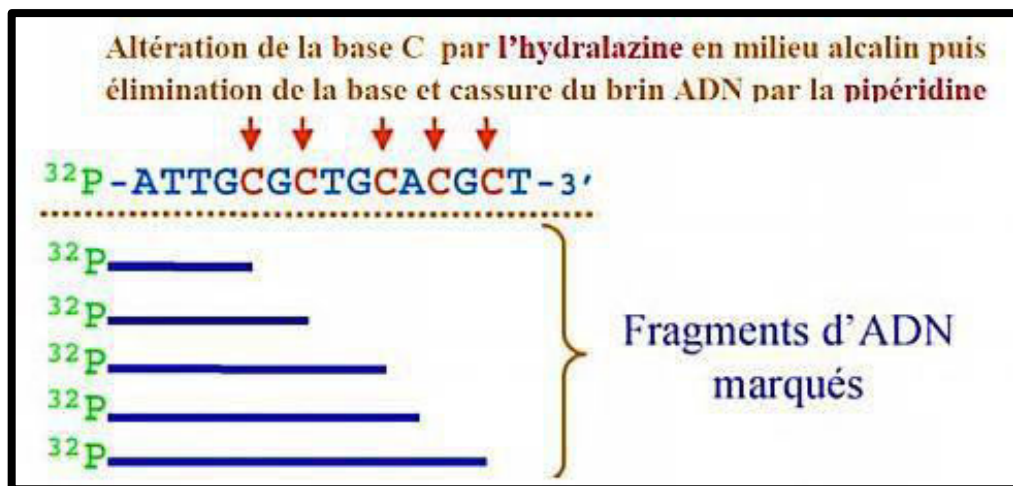
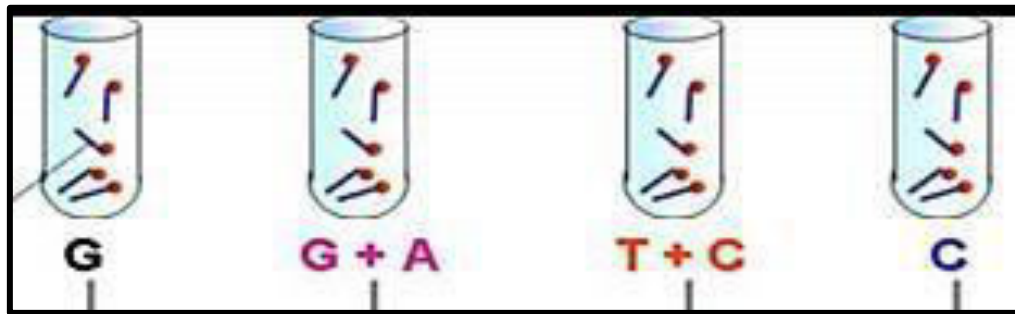


3. Clivage du brin d'ADN à des positions spécifiques en utilisant des réactions chimiques :

Chaque brin est soumis à quatre réactions d'hydrolyse partielle qui vont permettre de cliver la molécule d'ADN à des positions variables (avant : A+G, G, C, C+T). Mais toujours du côté 3' de l'extrémité marquée.

Réactifs	Diméthyle sulfate (DMS)	L'acide formique	L'hydrazine	L'hydrazine (en milieu alcalin)
Sites	Avant « G »	Avant « A+G ».	Avant « C+T »	Avant « C » uniquement

Après l'usage des réactifs on ajoute de la pipéridine, cette dernière coupe les brins d'ADN au niveau des bases modifiées. Cela produit plusieurs molécules d'ADN a tailles différentes dans quatre tubes de réaction.



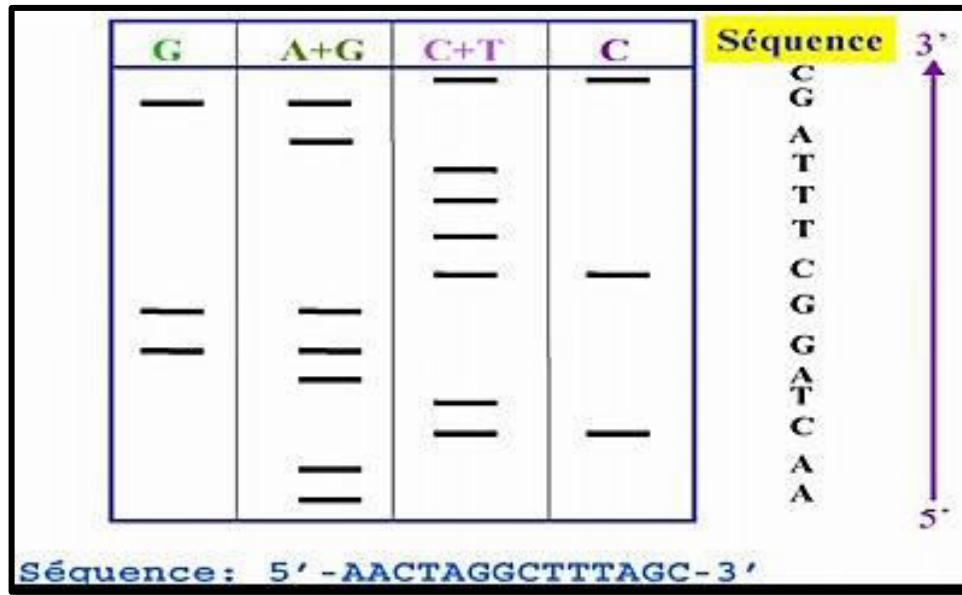
4. Électrophorèse

Les fragments ainsi obtenus sont soumis à une électrophorèse sur des gels d'acrylamide à haute résolution (Les fragments sont classés en fonction de leurs tailles ; deux fragments de longueur différant par 1 nucléotide sur 500 ou plus seront séparés)

5. Autoradiographie

Ces gels sont placés sous un film radiographique pour visualiser les molécules ayant une extrémité 5' marquée (des bandes foncées).

La séquence est lue directement dans le sens 5'→3' (du bas en haut) sur l'autoradiographie comparant le résultat des 4 réactions



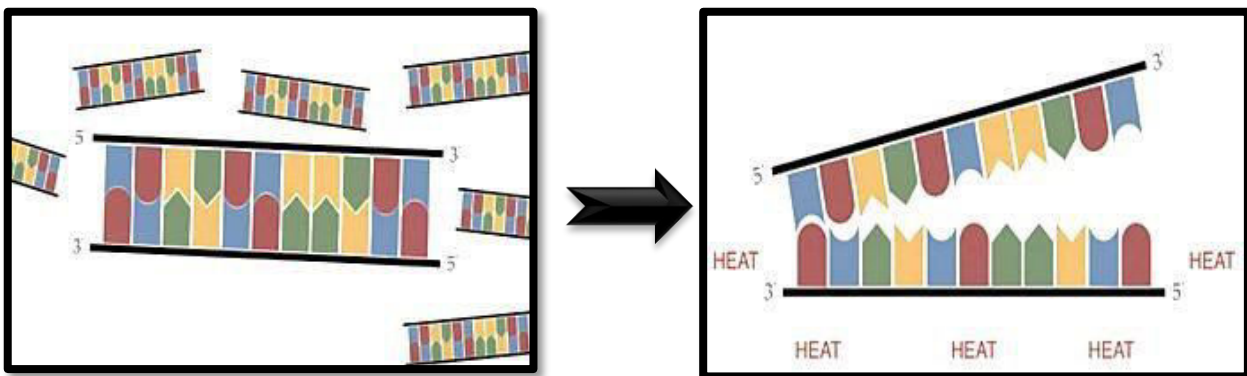
Méthode de Sanger

Principe

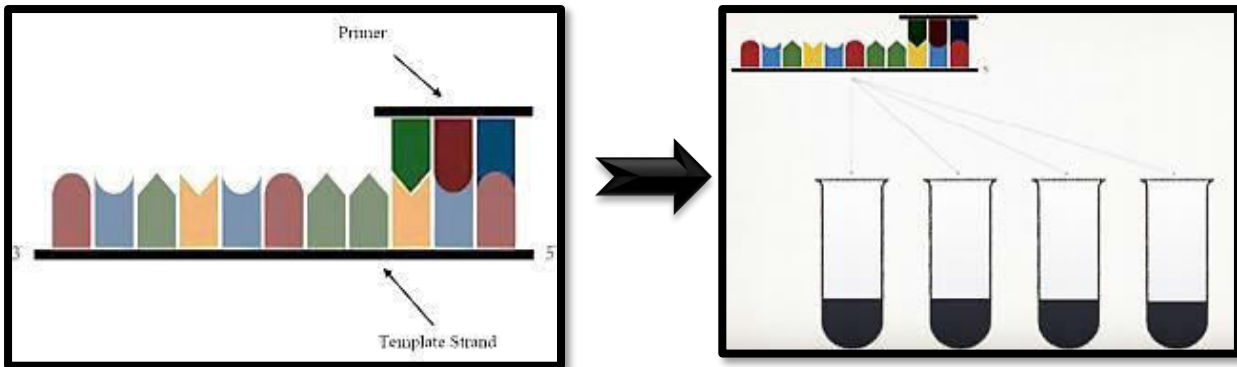
Le principe de cette méthode consiste à synthétiser toutes les copies partielles intermédiaires possibles d'une molécule d'ADN par une polymérase. Cette synthèse est réalisée à l'aide d'un composé chimique fluorescent qui provoque l'interruption aléatoire et systématique derrière un seul type de nucléotide (par exemple, toutes les copies intermédiaires d'une série seront terminées par un A).

Procédure et étapes

- 1- **L'amplification de l'ADN** à séquencer pour l'obtention d'un très grand nombre de copies de la séquence d'ADN choisie. Les molécules d'ADN ainsi obtenues sont dénaturées (dénaturation par la chaleur).

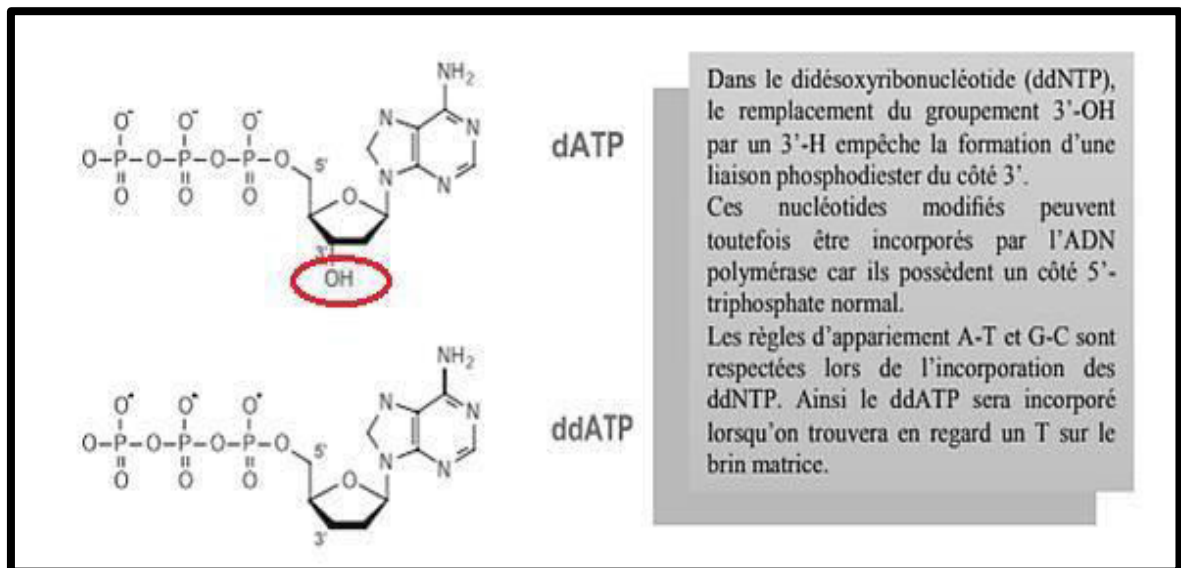


- 2- L'ADN monocaténaire obtenu est amorcé par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce), complémentaire au brin matrice. Et l'ADN amorcé est **dispersé** dans quatre tubes.



- 3- L'ajout de l'ADN polymérase à tous les tubes suivis par les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Ainsi que l'ajout d'un seul type de didésoxyribonucléotides (ddNTP) à chaque tube.

- ❖ Les ddNTP diffèrent des dNTP par leurs extrémités 3'OH (remplacées par une extrémité 3'H). Une fois les ddNTP sont incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation, car ils n'ont pas de groupe hydroxyle au niveau du carbone 3'. Donc la synthèse d'ADN est interrompue.



Notez bien

- ❖ Dans le milieu réactionnel il y a une compétition entre les dNTP et les ddNTP. Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de la polymérase pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles.
- ❖ Les ddNTPs sont ajoutés à faible quantité pour inhiber la synthèse d'une façon aléatoire.

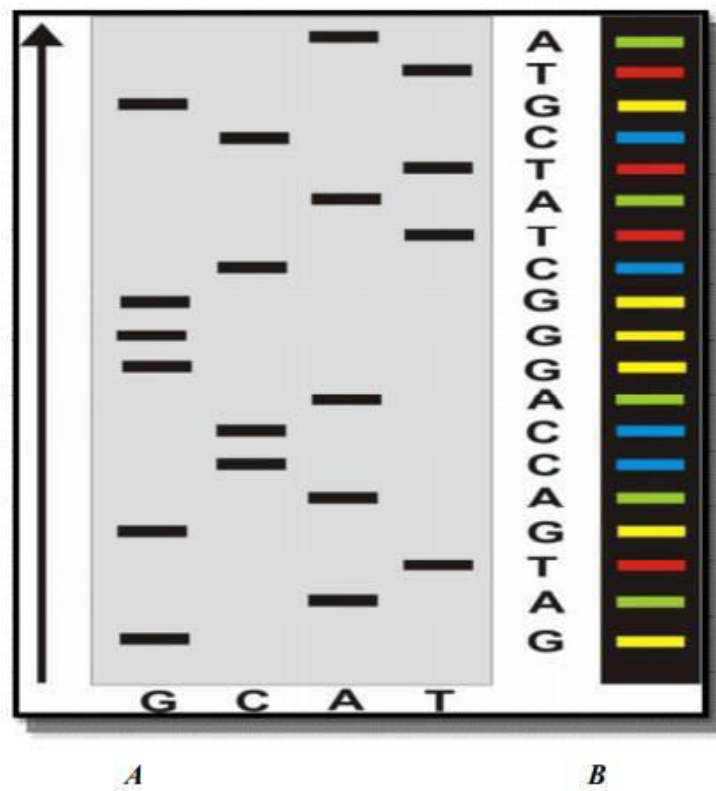
4- On obtient donc un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes qui se terminent tous au niveau d'une des bases.

- ❖ Afin de pouvoir identifier les fragments d'ADN synthétisés par la polymérase et en particulier pour pouvoir les distinguer de l'ADN matrice, on les marque avec un traceur fluorescent. Celui-ci est accroché en 3' sur le didésoxyribonucléotide terminateur ; la couleur émise indique la base ajoutée (vert pour didésoxyA, bleu pour didésoxyC, jaune pour didésoxyG et rouge pour didésoxyT)

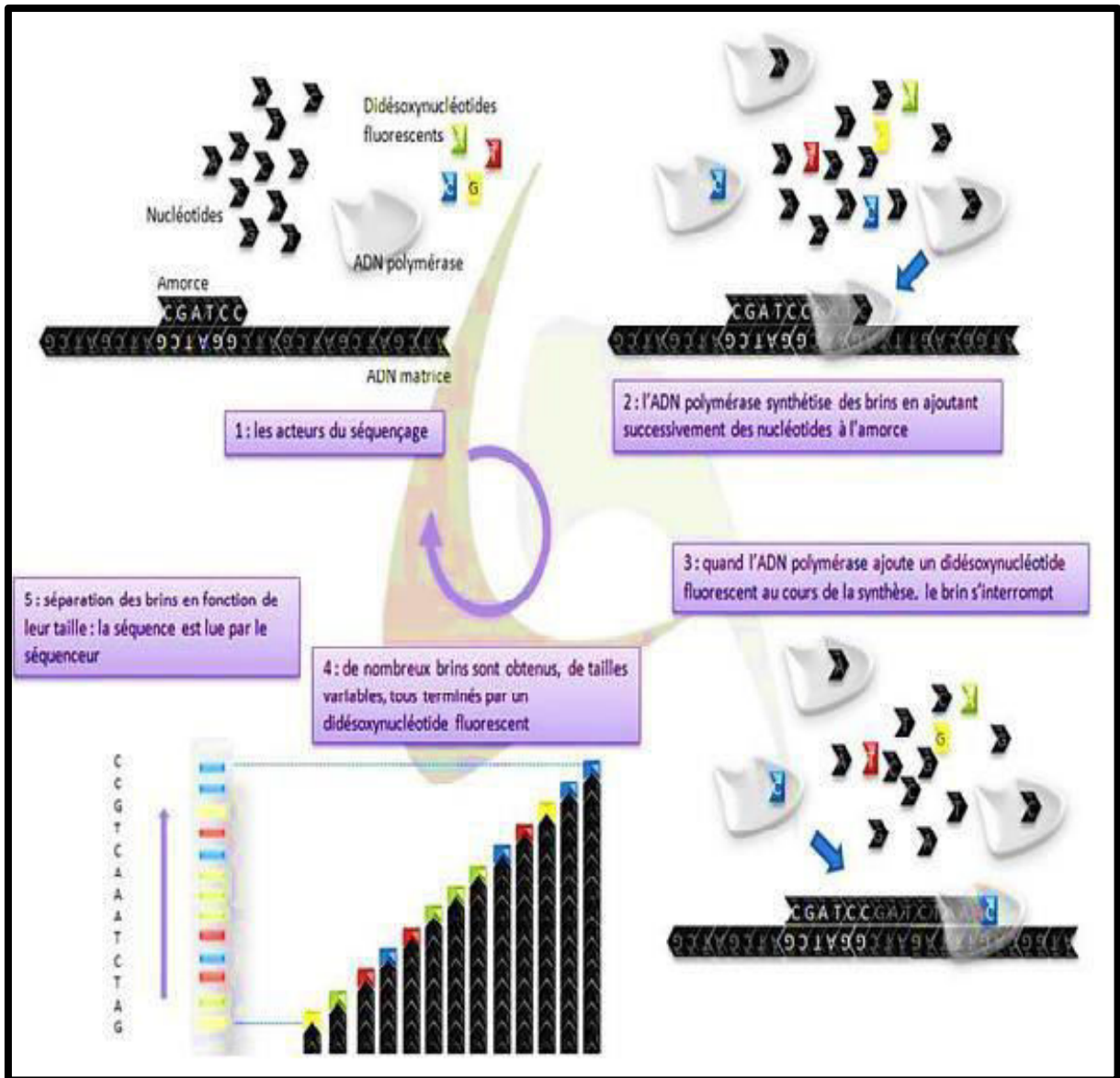
5- Une migration électrophorétique des produits des réactions sur un gel de polyacrylamide permet de séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire (taille).

Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les grands et la grande résolution de ce gel vas permettre la distinction des fragments différents entre eux d'une paire de base.

L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial.



A - Electrophorèse en gel standard. B - Séquençage à l'aide de fluorophores.



Avantages et inconvénients

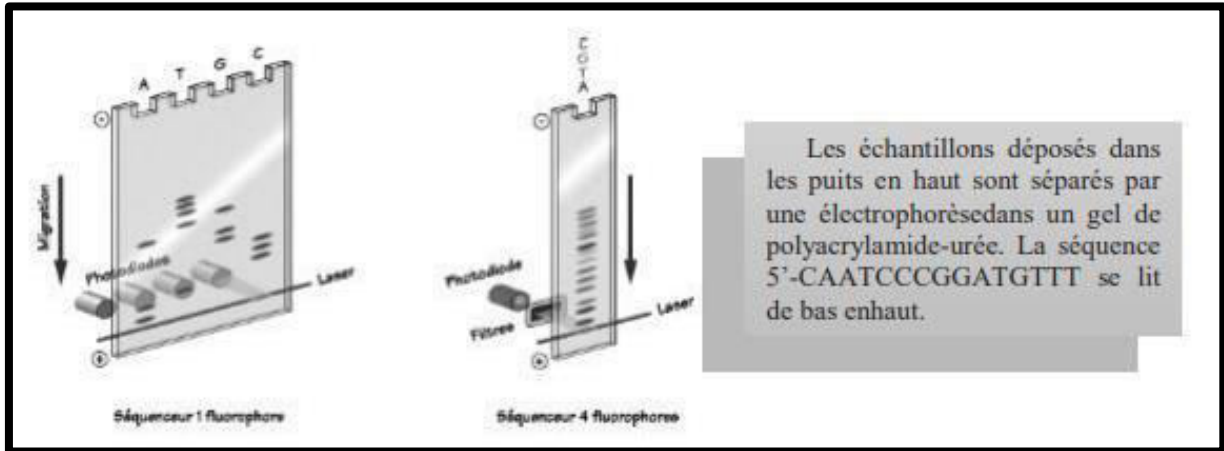
Tableau I: Avantages et inconvénients du séquençage de première génération.

	Avantages	Inconvénients
Méthode de Maxam et Gilbert	<ul style="list-style-type: none"> > N'est pas dépendante des problèmes de synthèse d'ADN par une polymérase > Moins facile à robotiser que la méthode de Sanger. 	<ul style="list-style-type: none"> > Analyse de fragments d'ADN de moins de 250 Pb. > L'utilisation des réactifs chimiques toxiques.
Méthode de Sanger	<ul style="list-style-type: none"> > Technique bien Rodée à faible taux d'erreur > Lecture de longs Fragments (500-800 Pb voire 1000 Pb). > Miniaturisation possible 	<ul style="list-style-type: none"> > Faible rendement de lecture (longue durée d'analyse d'un génome). > Temps et coût.

Séquenceurs automatiques

L'amélioration de la technique de production des amorces, l'amplification des brins et la généralisation des traceurs fluorescents ont permis d'améliorer considérablement les techniques de séquençage. L'apparition des séquenceurs automatiques.

Les séquenceurs automatiques modernes utilisent un système de détection in situ pendant l'électrophorèse. Le faisceau d'un laser émettant dans la bande d'absorption du fluorophore traverse le gel.



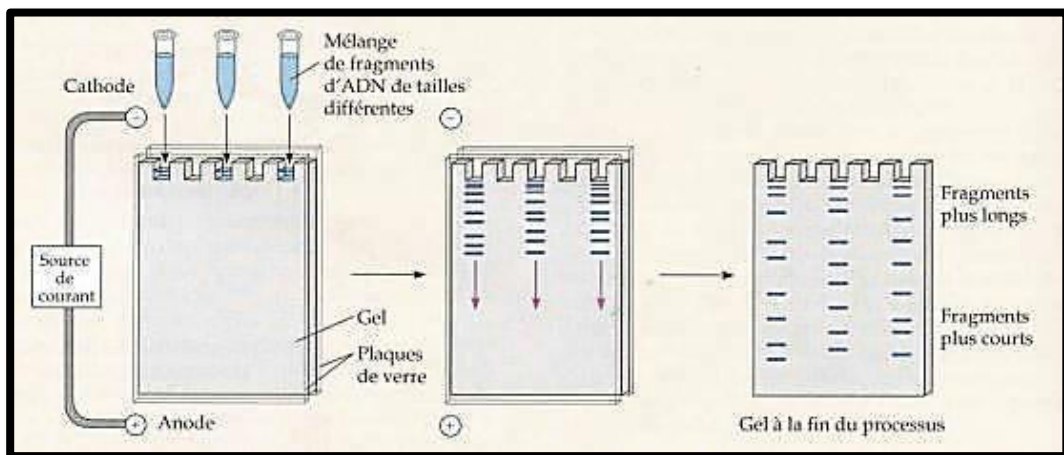
Pendant la migration, lorsqu'une bande d'ADN passe devant le faisceau, un signal de fluorescence est émis. Celui-ci est capté par une photodiode située en regard du gel. Le signal est amplifié puis transmis à l'ordinateur de contrôle et analysé par un logiciel spécialisé. Dans des conditions favorables, cette technique permet de lire jusqu'à 1000 nucléotides par fragment séquencé. En routine, la moyenne est de l'ordre 500 à 800 nucléotides par expérience.

II- Electrophorèse des acides nucléiques

L'action d'une enzyme de restriction sur une molécule d'ADN génère des fragments de restriction. Ces fragments d'ADN peuvent être séparés suivant leur taille sur un gel d'agarose ou d'acrylamide.

1- Principe

L'électrophorèse sur gel est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer les acides nucléiques ou les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Elle est basée sur la séparation des molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers une matrice (un gel d'agarose ou de polyacrylamide). Le gel agit à la manière d'un tamis moléculaire au travers duquel les molécules en mouvement doivent passer ; Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures (due aux difficultés de passage à travers les mailles (pores)).



2- Applications de l'électrophorèse

- ❖ Séparation de fragments ADN digérés
- ❖ Estimation du poids moléculaire de fragment d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction
- ❖ Analyse d'ADN après une amplification par PCR

3- Electrophorèse des acides nucléiques

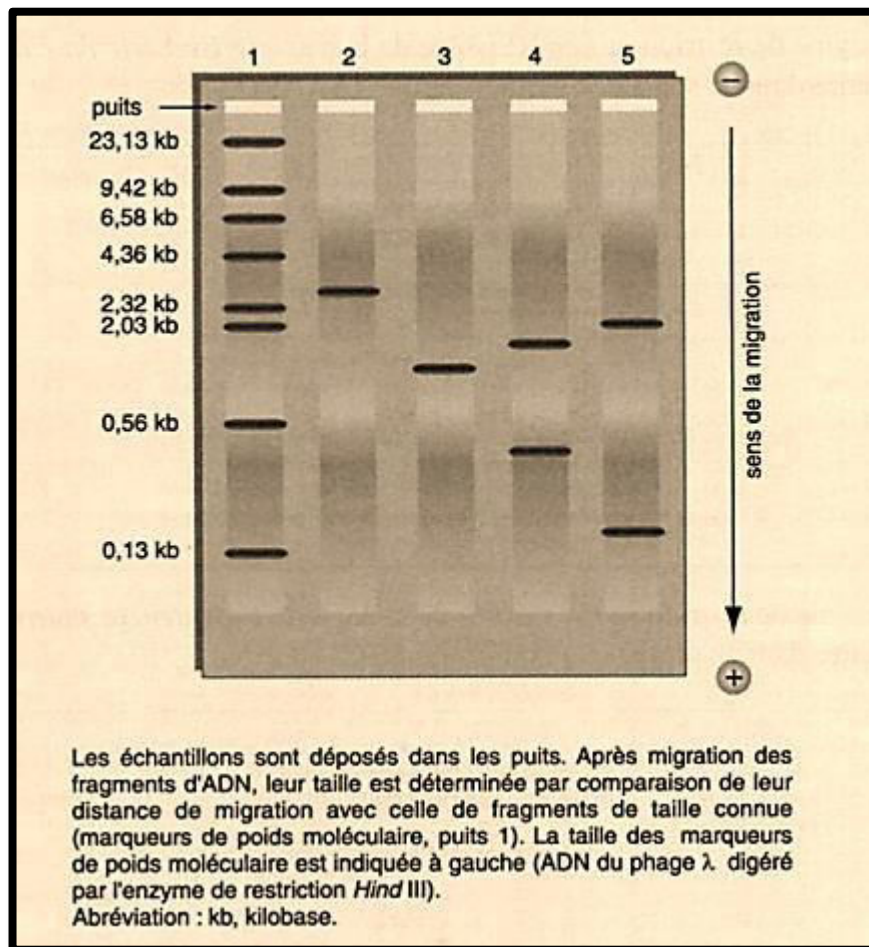
Le mélange contenant l'ADN coupé par l'enzyme de restriction est déposé à une extrémité du gel qui est ensuite soumis à un champ électrique.

Les molécules d'ADN (chargées négativement à pH 7~8) migrent dans le champ électrique vers l'anode (+). En passant au travers des mailles de l'agarose ou de l'acrylamide. Elles se séparent selon leur taille : les molécules les plus grandes sont retenues que les petites molécules et migrent moins vite et donc moins loin.

L'électrophorèse sur gel d'agarose présente plusieurs avantages :

- ❖ Préparation du gel d'agarose est aisée, rapide, et peu coûteuse.
- ❖ L'agarose est plus ferme et moins toxique que le gel de polyacrylamide
- ❖ Les échantillons peuvent être récupérés en vue d'analyses supplémentaires (Pas de dénaturation des échantillons)

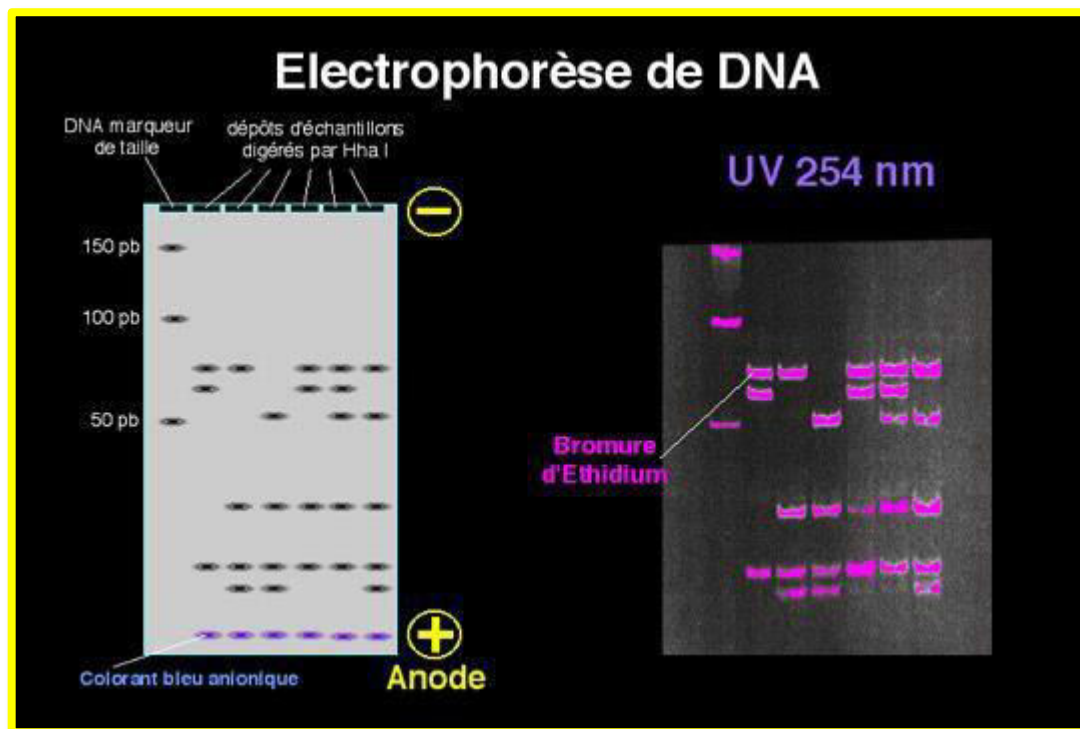
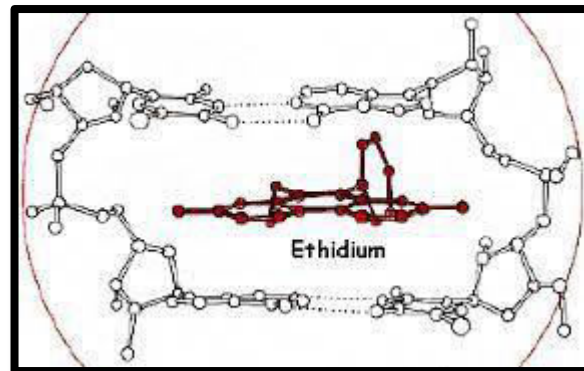
Cependant, l'acrylamide a un pouvoir séparateur plus important que l'agarose. Mais ce produit est toxique et la préparation des gels d'acrylamide est difficile.



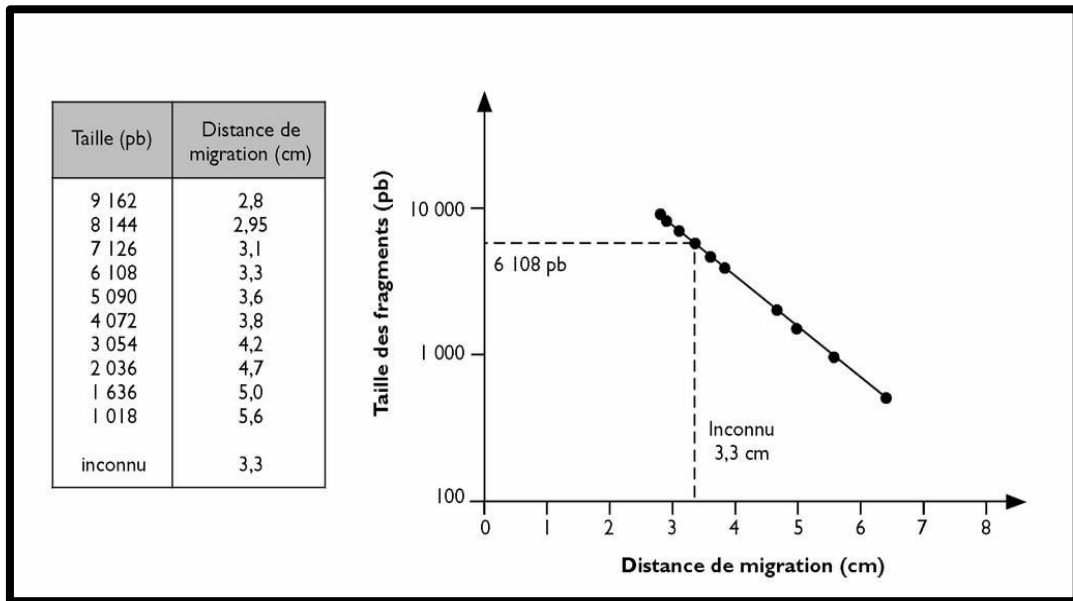
Afin de visualiser les fragments d'ADN après électrophorèse, le gel est trempé dans une solution contenant du bromure d'éthidium. Cette molécule s'intercale entre les bases des acides nucléiques et a la propriété d'émettre une fluorescence rouge orange lorsqu'elle est

excitée par la lumière ultraviolette. Le gel est alors observé sous une lampe à U.V (à 254 nm) et les molécules d'ADN complexées au bromure d'éthidium deviennent visibles.

NB : Le bromure d'éthidium est un produit dangereux mutagène et cancérigène qui doit être manipulé dans des conditions particulières (gants, blouse, déchets recyclés...).



Comme la distance de migration est proportionnelle au logarithme du nombre de bases, il est possible de déterminer la taille des fragments de restriction obtenus en comparant leur mobilité électrophorétique à celle de fragments d'ADN de taille déterminée (marqueurs de taille). Il existe également des marqueurs permettant d'estimer pour chaque fragment la quantité d'ADN bicaténaire.



Dans certains cas, les molécules à séparer sont préalablement marquées par l'incorporation d'un isotope radioactif, ce qui permet une détection facile par autoradiographie (les particules énergétiques émises par le radio-isotope impressionnent un film photographique placé sur le gel. Il suffit ensuite de développer le film comme un film photographique ordinaire pour voir apparaître des signaux (bandes) noirs correspondant aux molécules radioactives).

NB : Les films autoradiographiques sont de plus en plus souvent remplacés par des écrans autoradiographiques dont les signaux sont révélés par numérisation.

Facteurs affectant la migration :

Les facteurs les plus importants sont :

- ❖ **La longueur de la molécule d'ADN :** la séparation se fait en fonction du poids moléculaire et donc de la taille de l'ADN.
- ❖ **La concentration du gel :** L'augmentation de la concentration d'agarose dans un gel réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragment d'ADN de plus petite taille.
- ❖ **Le voltage :** plus le voltage est important, plus la vitesse de migration augmente. Toutefois le voltage est limité en intensité (5V/cm) : un fort voltage induit une augmentation de température ce qui peut faire fondre le gel.
- ❖ **La conformation de l'ADN :** l'ADN plasmidique, non digéré par une enzyme de restriction, migre à différentes vitesses (du plus lent au plus rapide) : ADN circulaire, ADN linéaire et ADN superenroulé.

