



PCR et principes de biologie moléculaire

Comme pour la fiche sur l'extraction adn/arn ce n'est pas une fiche complète. Ce sont des notions que vous retrouverez dans la fiche complète de techniques et approches diagnostiques des maladies génétiques.

Amplification en chaîne par la polymérase ou PCR (= polymerase chain reaction)

Cette technique de PCR a été mise en place en **1985** par **Kary Mullis** (prix Nobel de chimie en 1993) c'est sa première publication. Elle a révolutionné le génie génétique et la biologie moléculaire.

Presque toutes les méthodes de biologie moléculaire commencent par une PCR. C'est une **technique de base** dans un laboratoire de biologie moléculaire.

Cette technique permet d'obtenir une grande quantité d'une région d'ADN grâce à l'amplification spécifique de la région d'ADN que l'on veut étudier. C'est une technique extrêmement puissante car cette amplification du génome ne se fait qu'à partir des **quelques microgrammes d'ADN** génomiques extraits donc **d'une très petite quantité**.

+++ Cette technique a été rendue possible grâce à la découverte et l'isolement/la purification d'une ADN polymérase particulière car **thermostable** → la **Taq (Thermophilus Aquaticus) DNA polymérase** ou **Taq Polymérase** +++

Cette polymérase a été identifiée dans la bactérie Thermophilus Aquaticus, bactérie (/\ **bactérie et pas virus** +++), vivant dans les sources d'eau chaude. Contrairement à la majorité des protéines, cette enzyme est **capable de travailler à 95°C sans être dégradée ou dénaturée**.

Elle est donc **thermostable** : elle continue de fonctionner même à de très hautes températures.

Comme c'est une technique +++ **très sensible** ++, les risques de contamination sont très grands ++, notamment d'un échantillon à un autre.

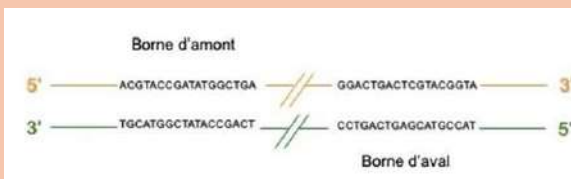
(/\ on ne parle pas d'une contamination par un agent pathogène type bactérie ou virus mais bien d'une contamination d'un échantillon à un autre /\). *Ici, on est dans une démarche de diagnostic donc ce qui ne faut surtout pas faire c'est « mélanger » des échantillons. Il faut être absolument certain de diagnostiquer la maladie à la bonne personne et pour cela il ne faut aucune contamination dans notre échantillon.*

Il est donc très important que le flux (*les étapes de la PCR*) soit **unidirectionnel/monodirectionnel**, les **locaux agrémentés**, etc. Lorsqu'on fait ce type de manipulations, il faut vraiment **suivre un ordre** et +++ **ne jamais revenir en arrière** +++

Ce sont des conditions extrêmement strictes, avec de **nombreux contrôles à réaliser**, pour être sûr de la fiabilité de ces techniques en termes de diagnostic.

Les étapes de la PCR :

Pour réaliser cette PCR, on part d'un ADN double brin dont on veut amplifier **spécifiquement une région**. La taille de ce fragment d'ADN à amplifier, appelé **amplicon**, va varier de 150 paires de bases (pdb) à 3kB. On amplifie généralement un fragment d'ADN de l'ordre de quelques centaines de pdb.



2 choses sont à connaître avant de pouvoir effectuer la PCR :

- La séquence en amont = **borne d'amont** : les 18 à 20 nucléotides en amont de la région à amplifier
- La séquence en aval = **borne d'aval** : les 18 à 20 nucléotides en aval de la région à amplifier

La PCR contient 3 étapes successives :

1. **Dénaturation 95°** : L'ADN double brin est dénaturé en **ADN simple brin** par rupture des liaisons hydrogènes.



2. **Hybridation des amorces 55°** :

On va placer nos simples brins dans certaines conditions, pour que des **Primers** (= amorces = oligonucléotides simple brin de 18 à 20 nucléotides) s'hybrident par complémentarité sur les bornes d'amont et d'aval des brins dénaturés (d'où la nécessité de les connaître).



Ils définissent ainsi les bornes du fragment d'ADN que l'on va amplifier.

3. **Élongation d'amorce 72°** (Température de fonctionnement de la Taq polymérase)

La Taq Polymérase va **copier le brin d'ADN**, à partir des primers (comme toutes les ADN polymérases), dans le sens 5' 3' (sens du brin fils).



La température de l'automate (95°, 55° puis 72°) est **très importante pour son bon fonctionnement**.

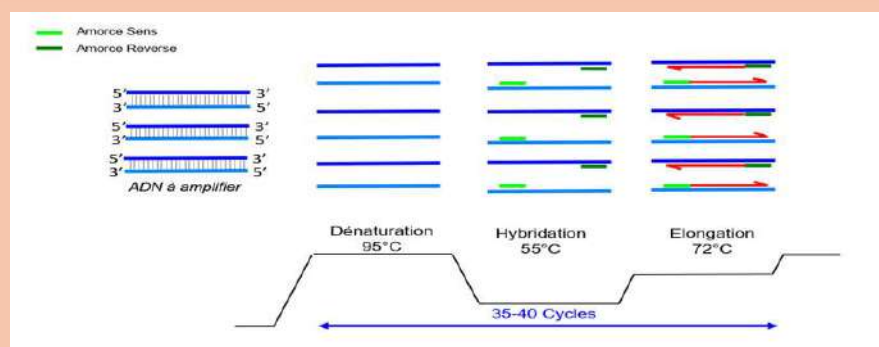
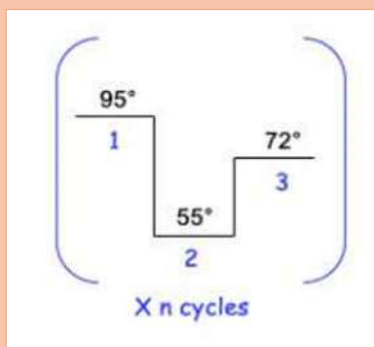
Par exemple : il est nécessaire que la 2^e étape se fasse à 55° car à cette température c'est encore trop chaud pour que les 2 brins d'ADN se referment mais les amorces sont capables de s'hybrider sur leur région complémentaire.

Voici la réponse de la prof concernant les températures :

« Les chiffres des températures NE SONT PAS à connaître par cœur en valeur absolue (car ce n'est pas si strict que cela Même si dans le cours on vous le présente comme tel pour faciliter la compréhension). Il faut savoir qu'il y a les 3 étapes : Dénaturation à haute température (95°C en général) / Hybridation à une température plus basse qui dépend de la séquence des primers (entre 55-65°C environ) / Elongation à la température optimale de la taq polymérase (entre 68-72°C environ). »

Donc globalement reprenez bien quelles sont les étapes et pourquoi on est à des hautes températures, qui diffèrent d'une étape à l'autre (=pour le bon fonctionnement de ces différentes étapes).

Ces 3 étapes vont être répétées n fois, il y a généralement entre 30 et 45 cycles PCR. Il y aura 2n molécules au bout de n cycles. (Là il est à compter juste « 30 et 35 » ou « 35 et 45 » ... tout ce qui est entre 30 et 45 c'est juste).



Pour réaliser une PCR il faut mettre dans un micro-tube :

- L'ADN du patient (100ng)
- 2 Amorces (Primers) : nécessaires pour le démarrage (amorces sens et reverse) et présentes un grand nombre de fois (elles sont en excès afin de pouvoir faire tous les cycles : il en faut en effet 1 par brin d'ADN à chaque cycle).
- Désoxynucléotides (dNTP) *nos A C G T afin que la Taq polymérase puisse faire les brins d'ADN.*

- Tampon (contenant du $MgCl_2$), qui garde le pH neutre
- La Taq polymérase (enzyme)

Ensuite, le micro-tube est disposé dans l'automate qui travaille pour faire les n cycles programmés.



= **Thermocycleur** (appareil faisant juste des variations de température) : c'est lorsqu'on ouvre ce tube que notre ADN alors très volatile peut s'échapper et contaminer les échantillons suivants.

Circuit monodirectionnel :

Aujourd'hui, cette technique qui est **très sensible et très performante**, nous permet de travailler à partir d'une quantité très faible d'ADN : nous pouvons travailler à partir d'une seule cellule lors d'un diagnostic préimplantatoire.

C'est une technique/un examen de base dans un labo de biologie moléculaire.

Elle reste à **hauts risques de contamination** et nécessite donc un **circuit monodirectionnel**, avec des conditions d'exercice très règlementées via des **agréments** : c'est à dire qu'un biologiste moléculaire ne peut pas être agréé pour faire ce travail sans formation complémentaire. Cet agrément est indispensable pour le biologiste, l'équipe, le matériel et les locaux.

Il existe un circuit monodirectionnel avec :

- 1) Une pièce d'extraction



- 2) Une pièce de pré-mix : pièce dans laquelle on prépare nos tubes avec tous nos éléments **sauf l'ADN**

- 3) Une pièce avec la machine PCR, dans laquelle on va rajouter l'ADN du patient dans les tubes

- 4) Une pièce post-PCR, lieu de manipulation des produits d'amplification. C'est dans cette 4e pièce que l'on retrouve des produits hautement contaminants comme des amplicons en quantité très importante. Il n'y a **pas de retour en arrière** pour ne pas contaminer l'ADN de la 1ère pièce.

Gel analytique (électrophorèse) :

Une fois la PCR terminée, il faut vérifier qu'elle a bien fonctionné en séparant les fragments d'ADN grâce à un champ électrique.

L'analyse des produits d'amplification peut se faire grâce à **un gel analytique et à une électrophorèse**.

Pour ça, on va couler du gel d'agarose ou d'acrylamide (grosse galette) dans lequel se trouvent des mailles qui varient fonction de la taille des fragments d'ADN que l'on veut isoler et visualiser.

La vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique sera fonction :

- **De sa masse moléculaire** (nombre de paires de bases = pdb) → plus le fragment sera petit, plus il migrera loin et plus vite.

- **De la concentration en agarose ou en acrylamide du gel préparé**

Dans ce gel, on creuse des puits, puis on l'immerge dans un tampon.

On met dans chacun des puits les différents amplicons que l'on veut analyser.

Enfin, on soumet ce gel à une électrophorèse/un champ électrique.

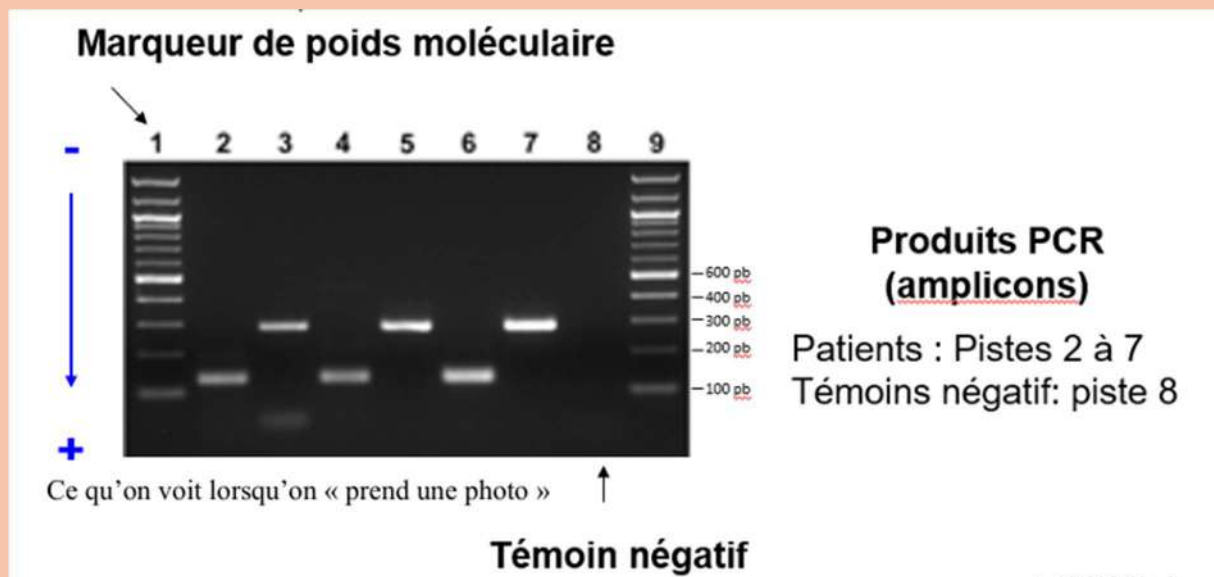
Dans cette étape, on utilise la charge électrique de l'ADN qui est négative de par le groupement PO₄⁻ (= propriété électro-physique de l'ADN) : **+++ l'ADN migre du - vers le + = de la cathode vers l'anode. +++**

Une fois la migration terminée, il faut **visualiser nos ADN / amplicons**. Pour ça, on va utiliser un **agent intercalant** (**+++mutagène+++**) = le **Bromure d'Éthidium** qui s'intercale dans l'ADN double brin et a la particularité de prendre une **coloration fluorescente rose lorsqu'il est visualisé sous lumière UV**.

À noter que nous travaillons beaucoup avec des agents qui modifient l'ADN en s'y intercalant et qui sont donc, par définition, des agents mutagènes.

Dans un laboratoire de BM, nous protégeons les amplicons des contaminations, MAIS AUSSI les manipulateurs car les produits peuvent être extrêmement dangereux pour eux (même si en travaillant bien, il n'existe pas de risque particulier).

EXEMPLE = Lors de la coloration du gel par le Bromure d'Éthidium, nous obtenons ceci :



Le gel contient 8 pistes (dans cet exemple, le nombre de pistes peut varier) :

- **La première** : nous avons fait migrer un **marqueur de taille/de poids moléculaire**, c'est-à-dire des fragments d'ADN dont la taille est connue.

Cette piste correspond donc à un repère, pour les tailles de nos amplicons (ainsi, on pourra connaître la taille de nos morceaux d'ADN amplifiés en fonction de l'endroit où ils s'arrêtent par migration en comparant avec notre repère).

- **Les pistes 2 à 7** : ce sont les migrations de **nos produits PCR** (= nos amplicons) provenant de différents patients.

L'intensité de la bande (bande très peu ou très visible) donne une idée sur la quantité d'amplifications PCR de cette taille puisqu'au plus la bande est visible, au plus la quantité est importante.

- **La 8e piste** : c'est notre témoin négatif. Cette piste **existe toujours**, elle est indispensable à toutes expérience PCR car elle **témoigne de la non-contamination de nos amplicons**.

Elle est le résultat de la migration de tous nos produits mis dans le tube de départ sauf l'ADN (= tout ce qu'on met dans le tube dans la 2e pièce lors de la PCR).

La piste doit rester noire : si une fluorescence apparaît sur cette piste, les résultats ne sont pas interprétables car ils auront été contaminés par un autre ADN ++. Si cette piste reste noire, cela veut dire que les pistes 2 à 7 sont bien des amplifications des ADN de nos patients, et non d'un ADN contaminant (les résultats sont donc interprétables) → notre PCR a donc marché.

La digestion enzymatique :

Combiné à la PCR, nous allons utiliser une autre technique très utile en biologie moléculaire : la digestion enzymatique.

Elle est possible grâce à des **enzymes de Restriction**, qui sont des endonucléases bactériennes, et qui coupent l'ADN double brin de manière très spécifique : elles vont reconnaître et couper une séquence d'ADN lorsqu'elles la reconnaissent.

C'est une **coupure reproductible et spécifique d'une séquence nucléotidique**.

On connaît aujourd'hui **plus de 500 enzymes de restriction différentes** qui reconnaissent donc des sites différents.

Leur nom est dérivé des bactéries à partir desquelles on les a purifiées.

Elles ont une nomenclature particulière :

EcoRI
Escherichia coli R y13

<p>E : initiale de l'espèce bactérienne co : genre de la bactérie</p>	<p>R : souche I : n° d'ordre de découverte de l'enzyme dans une même bactérie</p>
--	--

Exemples : *PvuII* (*Proteus vulgaris*)
BamHI (*Bacillus amyloliquefaciens H*)
HaeII (*Haemophilus aegyptius*)

C'est grâce à cette découverte accompagnée de celle de la PCR que la biologie moléculaire a pu connaître un tel essor et prendre une plus grande place au sein de la médecine ces dernières années.

Il existe **3 types d'enzymes de restriction** que l'on différencie en fonction de leur manière de couper. Elles peuvent couper à distance ou non de la séquence nucléotidique reconnue et avec un mode de coupure différent.

On se sert principalement des **enzymes de restriction de type II** (dont EcoRI) :

- Reconnaissance de 4 à 8 paires de bases
- L'enzyme coupe l'ADN au niveau de la séquence reconnue
- Les séquences reconnues sont dites **palindromiques** car elles sont lues dans les 2 sens :
GG-AA
AA-GG

- On parle d'**isoschizomères** lorsque **deux enzymes reconnaissent la même séquence** mais qu'elles sont **extraites de bactéries différentes**.

Les enzymes de restrictions de type II permettent 2 types de coupures :

Bout francs (Blunt ends)

Ex : Hae III

La coupure se fait au **même endroit sur les deux brins**, exactement en face l'une de l'autre.

Ces types de coupures sont plus compliquées à recoller par les ligases que les coupures à bouts cohésifs.

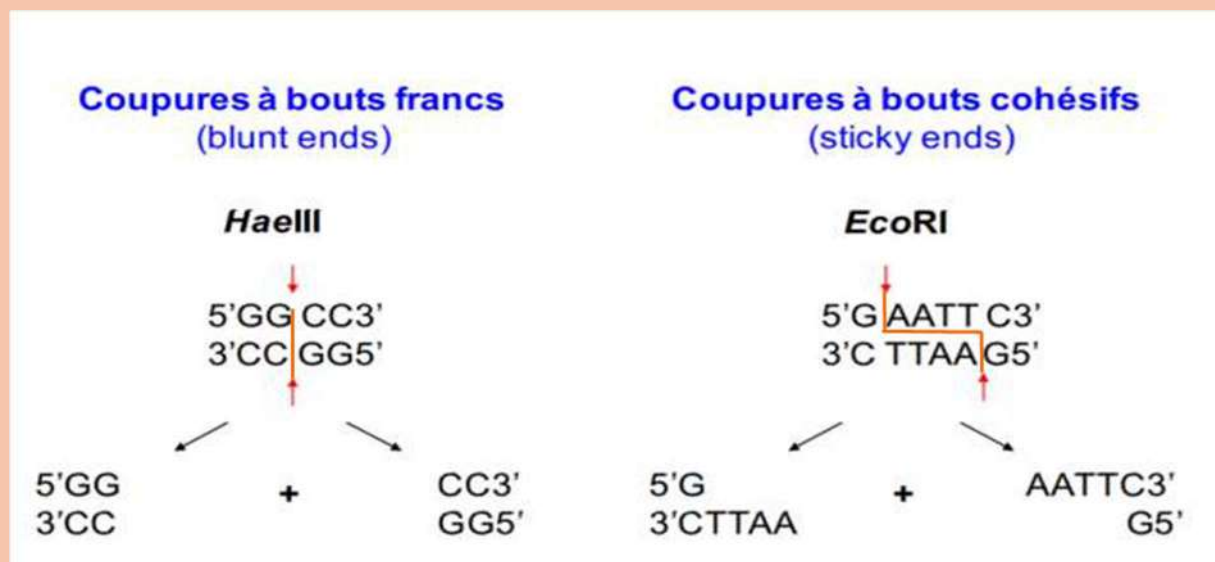
Bout cohésifs (Sticky ends)

Ex : EcoRI

Les coupures sont au même endroit en termes de nucléotides (ici, entre le G et le A) mais pas en face lorsque l'on regarde nos deux brins finaux (elles sont en décalées).

Nous avons donc des extrémités, avec l'une plus grande que l'autre, **ce qui la rend simple brin**.

Ces extrémités simple brin vont avoir tendance à chercher un autre brin d'ADN pour s'apparier et ne pas rester simple brin. Cet état est donc très instable.



On recolle des brins d'ADN grâce à des **enzymes T4 ligase**. On relie plus facilement des bouts cohésifs que des bouts francs. (Car avec cette coupure l'ADN devient simple brin et est donc plus facile à recoller à un autre)