

Chapitre 05: Les techniques les plus utilisées en Génie génétique



1. Séparation des acides nucléiques

La technique la plus utilisée pour la séparation
des acides nucléiques: **L'électrophorèse**



Principe général:

Dans un milieu donné, la séparation des particules se fait en fonction de leur **charge électrique** et pour des charges identiques, en fonction de leur **taille**.

ELECTROPHORESE DE L'ADN

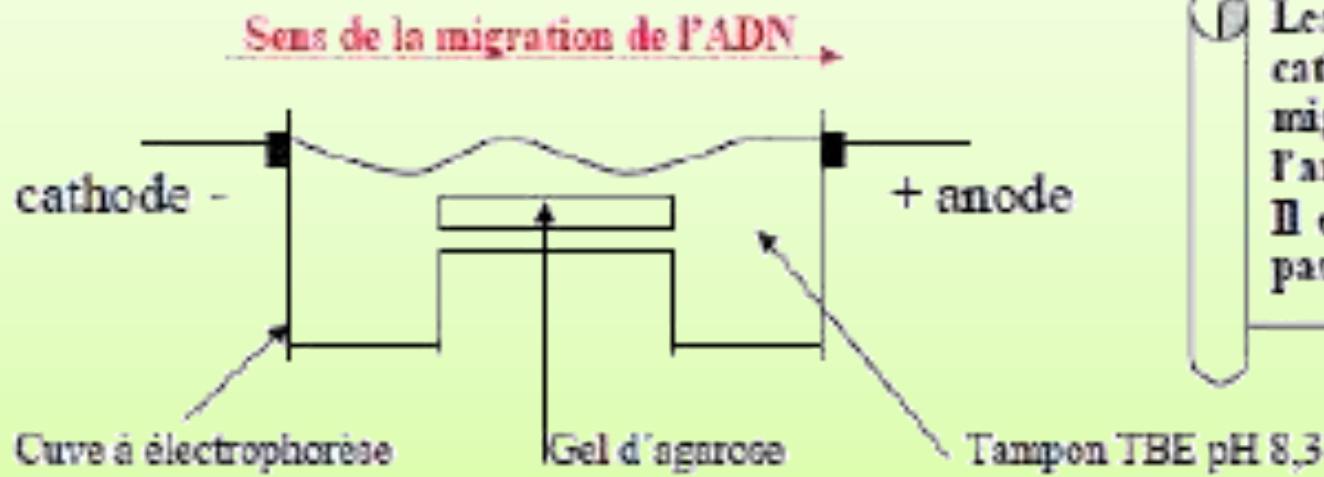
= technique de biologie moléculaire → séparer des fragments d'ADN de différentes tailles en les faisant migrer dans un **gel** en les soumettant à un **courant électrique**.

- Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur.
- Deux principaux polymères sont utilisés : l'**agarose** et le **polyacrylamide**.

Cette technique est assez simple à mettre en œuvre si on dispose des bons outils et de quelques astuces.

Principe:

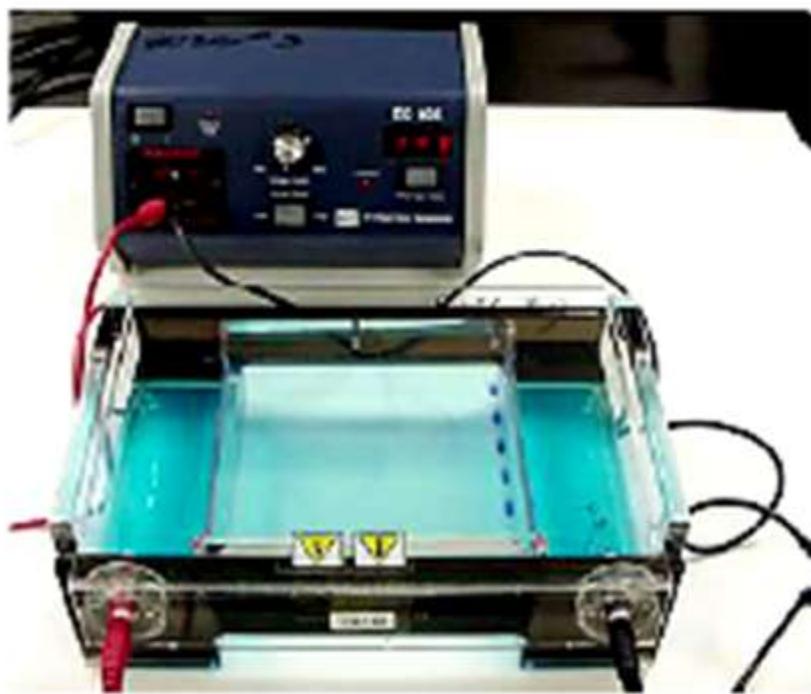
basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement à pH 7~8, vers l'anode (+) sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel en fonction de la taille des molécules.



Les dépôts se font côté cathode car la migration se fait vers l'anode.
Il est important de ne pas se tromper !

TBE : tampon de migration (Tris, d'acide borique et d'EDTA)

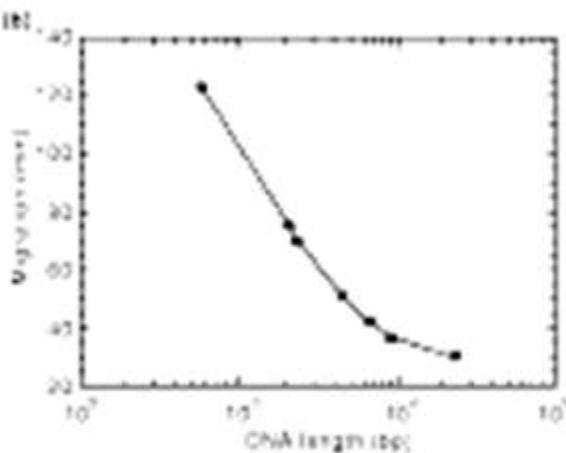
Electrophorèse d'ADN



L'ADN chargé (-) migre toujours vers le pôle + (anode)

L'ADN migre généralement en fonction de sa taille

Les pores du gel sont d'autant plus petit que le % en agarose ou en acrylamide est grand



Les applications de l'électrophorèse de l'ADN

- Estimation du poids moléculaire de fragments d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction
- Analyse d'ADN ou d'ARN après une amplification par PCR
- Séparation de fragments d'ADN digérés avant Southern blot ou d'ARN dans le cas de Northern Blot.

Il existe de nombreux types d'électrophorèses, dont :

- électrophorèse sur gel de polyacrylamide (ou PAGE pour Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) ;
- électrophorèse en gel d'agarose ;
- focalisation isoélectrique (électrophorèse dans un gradient de pH) ;
- électrophorèse bi-dimensionnelle ;
- électrophorèse en champ pulsé ;
- Immunoélectrophorèse (pour détecter une interaction antigène/anticorps) ;

1.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

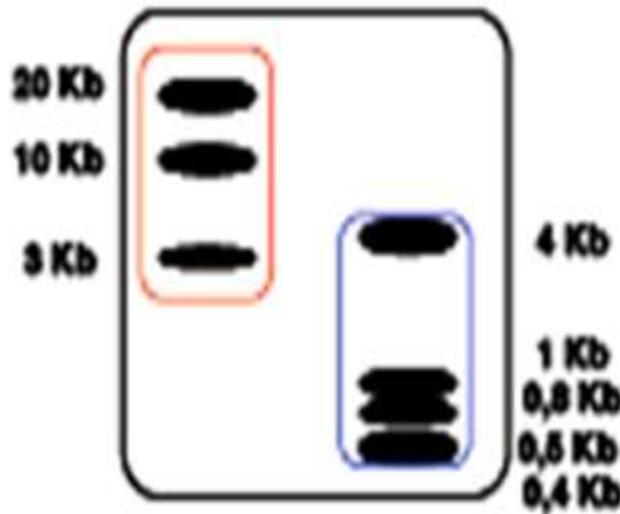
- © L'agarose = polymère à base d'agar purifié. Différentes puretés d'agarose sont disponibles. En général, de l'agarose de grande pureté à solidification lente est utilisé lorsque l'ADN doit être extrait du gel après migration.
- © L'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5% à 2% (poids/volume) et permet de séparer des molécules de très grande taille, principalement de l'ADN ou de l'ARN ;

Pouvoir de séparation d'ADN linéaire, double brin, selon la concentration d'agarose du gel

Concentration d'agarose (% en M/V)	Gamme de tailles idéales (en kb)
0.3	5 – 60
0.6	1 – 20
0.7	0.8 – 10
0.9	0.5 – 7
1.2	0.4 – 6
1.5	0.2 – 3
2.0	0.1 – 2

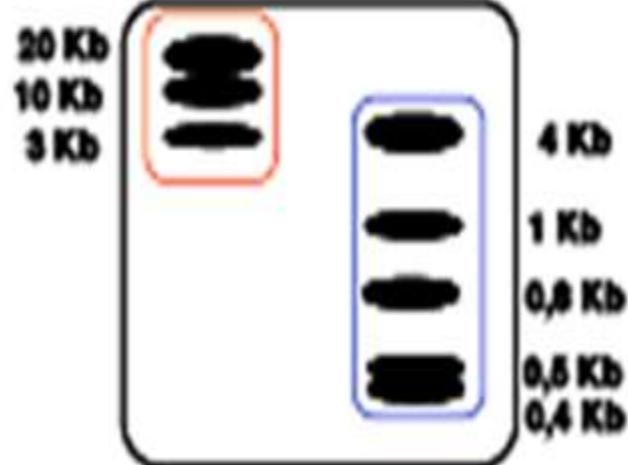
GEL D'AGAROSE

GEL D'AGAROSE 0,6%

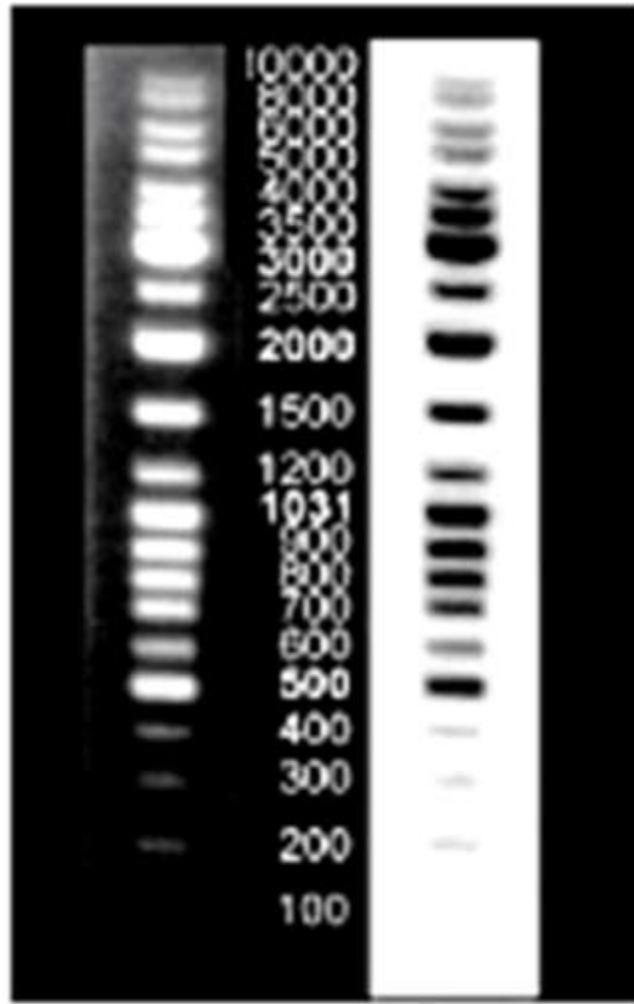


GEL D'AGAROSE

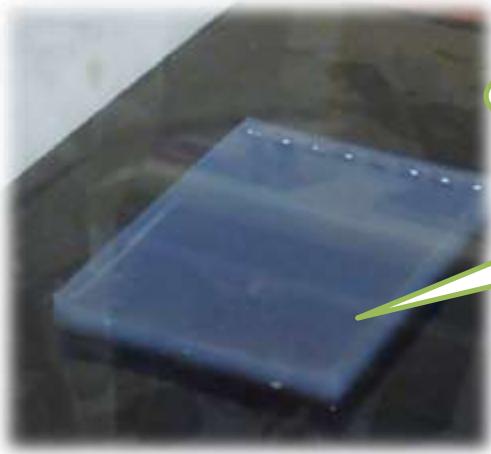
GEL D'AGAROSE 1,2 %



Le pouvoir de résolution d'un gel d'agarose dépend du % d'agarose. Il peut varier de 0,5 à 2%



Le gel d'agarose n'est pas résolutif pour de petits fragments d'ADN (Inférieurs à 100 pb)



Un gel d'agarose avant éclairage sous ultraviolets

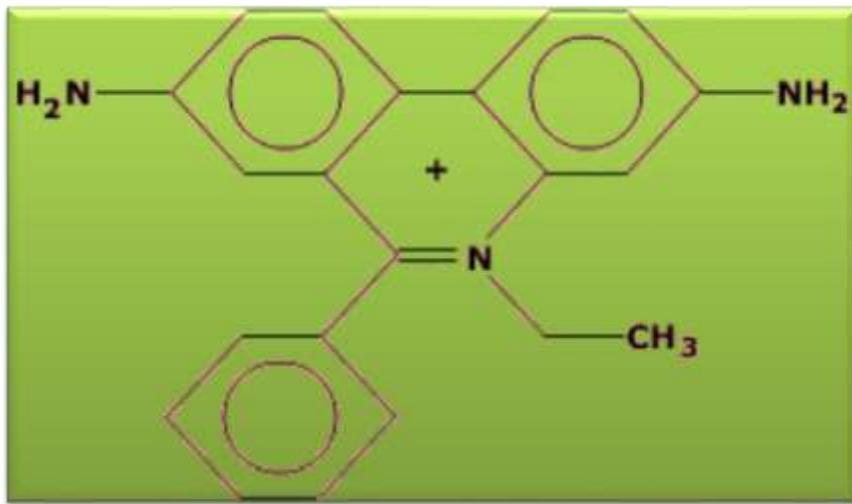
Le gel est exposé à des rayonnements ultraviolets, le BET colore l'ADN en une couleur rouge-orangée



Photographie du gel

Puits :

1. Echelle de marqueur de poids moléculaire (1kbplus)
2. vide,
3. Un produit de PCR d'une taille légèrement supérieure à 500 paires de bases
4. Fragment d'environ 4.5kb d'un Plasmide digéré par une enzyme de restriction



Formule du bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium (EtBr) = à la fois un agent intercalant et un fluorochrome.

Structure aromatique plane → s'intercaler entre les paires de bases → détorsion de la double hélice et émission de lumière (fluorescence) dans le rouge-orange lorsque le complexe ADN-EtBr est excité en lumière ultraviolette.

C'est l'une des principales méthodes de détection de l'ADN dans les gels d'électrophorèse.

Les avantages de l'électrophorèse en gel d'agarose sont:

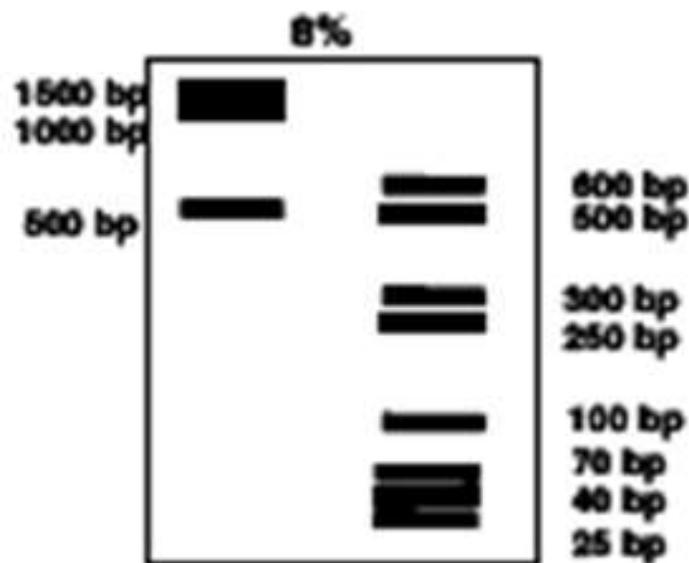
- ▶ préparation aisée, rapide, et peu coûteuse des gels d'agarose
- ▶ pas de dénaturation des échantillons
- ▶ l'agarose plus ferme et moins毒ique que le gel de polyacrylamide
- ▶ les échantillons peuvent être récupérés en vue d'analyses supplémentaires

1.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

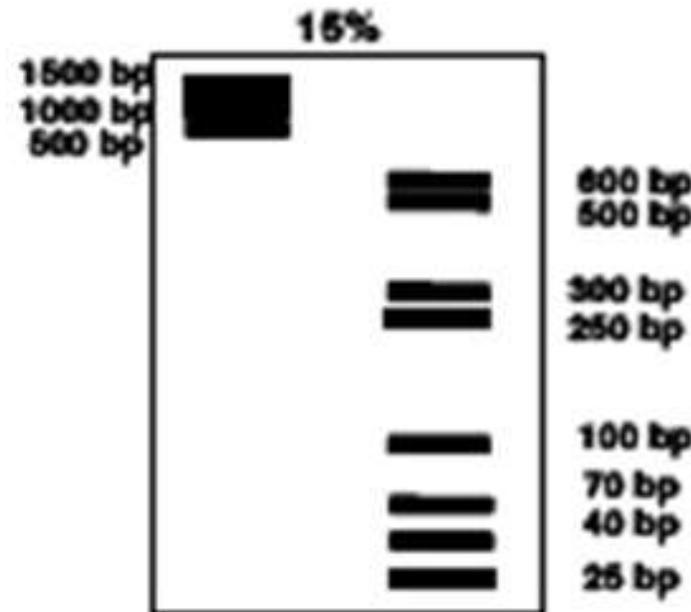
- ② L'acrylamide est le nom usuel du 2-propénamide (amide acrylique) de formule brute C_3H_5NO .
- ② En biologie moléculaire, on utilise l'acrylamide polymérisé (**polyacrylamide**) pour réaliser des électrophorèses.
- ② Le polyacrylamide est utilisé à des concentrations de 4% à 20% (poids/volume) et permet de séparer des molécules plus petites d'acides nucléiques.
- ② On peut aussi faire varier sa réticulation (taux de ramification) lors de la polymérisation pour moduler les paramètres de séparation ;

GEL D'ACRYLAMIDE NATIF (L'ADN est double brin)

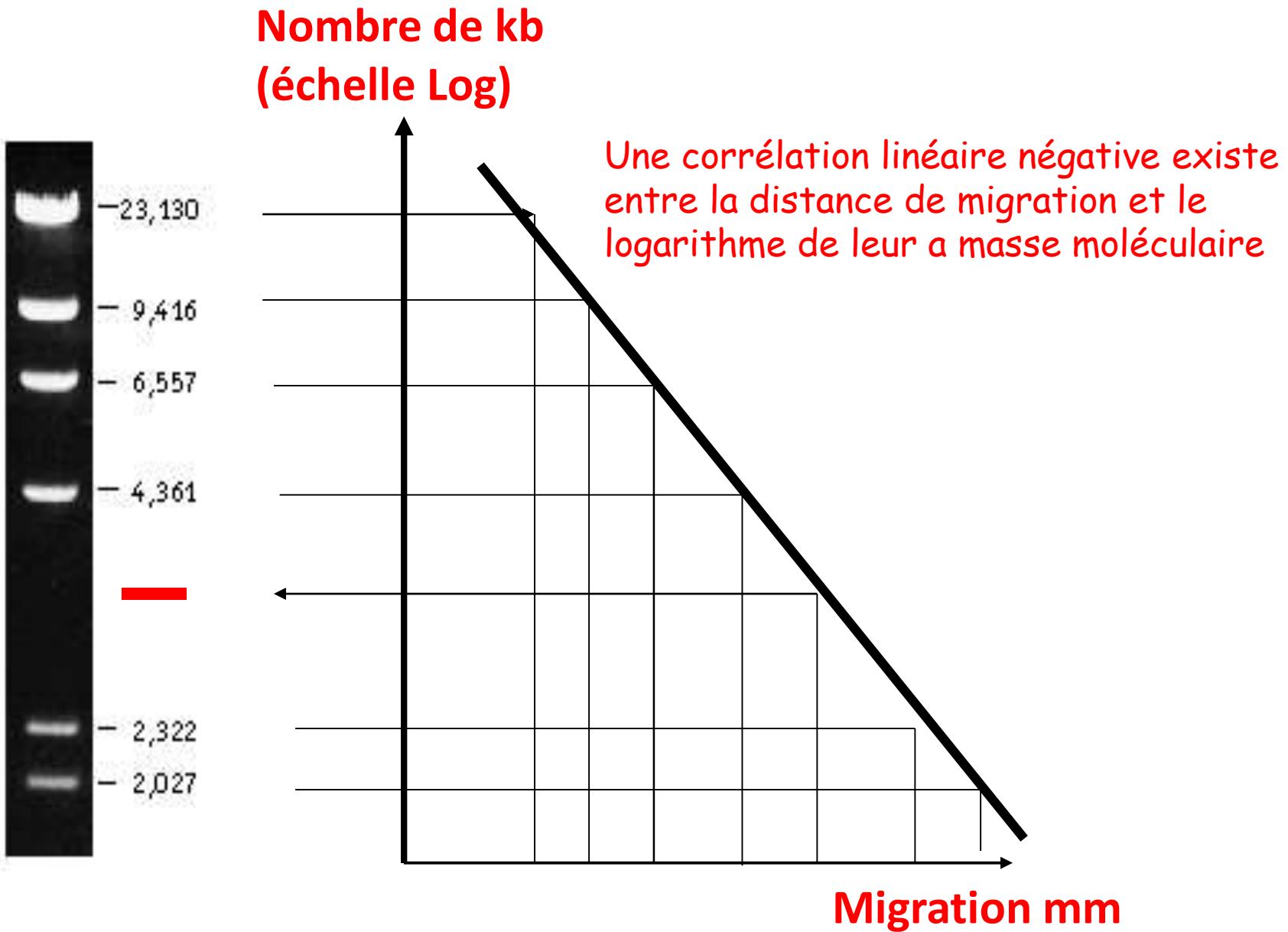
GEL D'ACRYLAMIDE



GEL D'ACRYLAMIDE



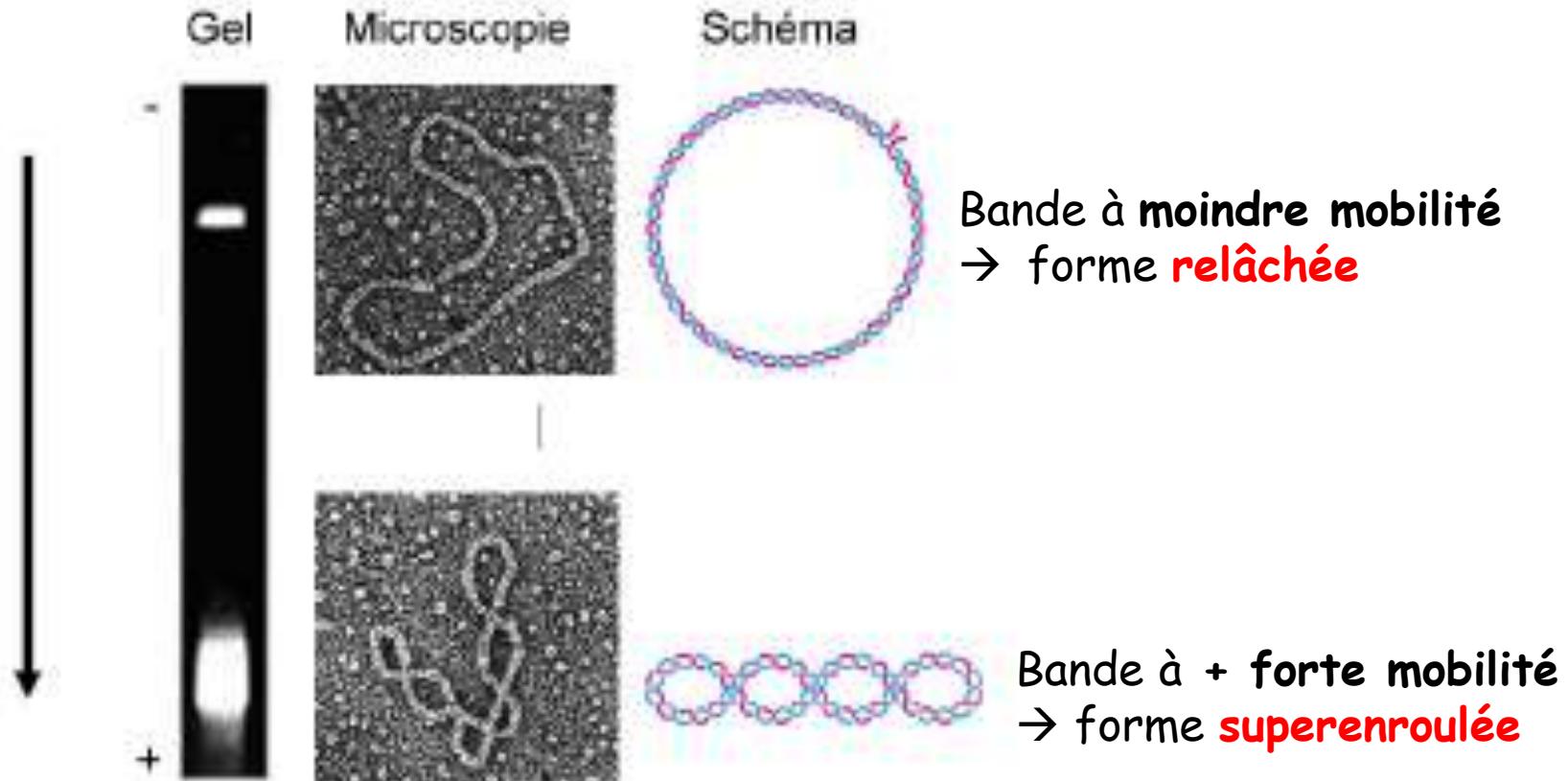
Efficace pour les petits fragments d'ADN entre 20 & 2000 paires de bases. (cartographie)



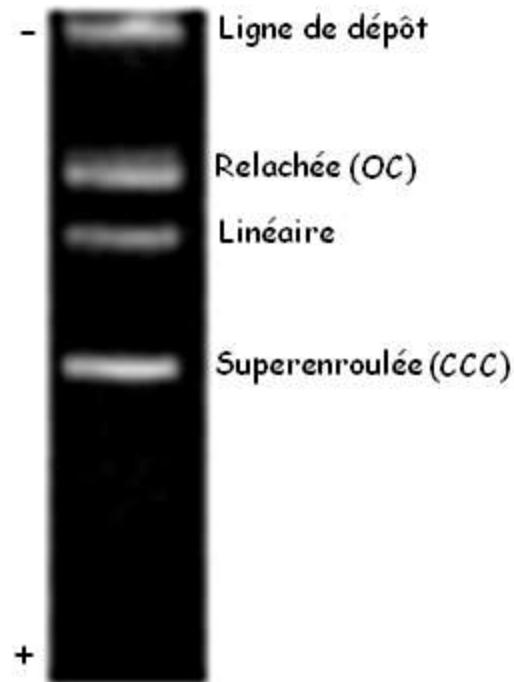
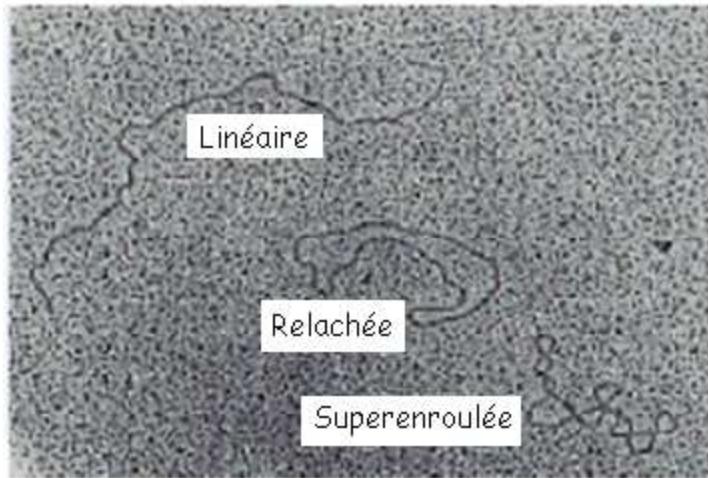
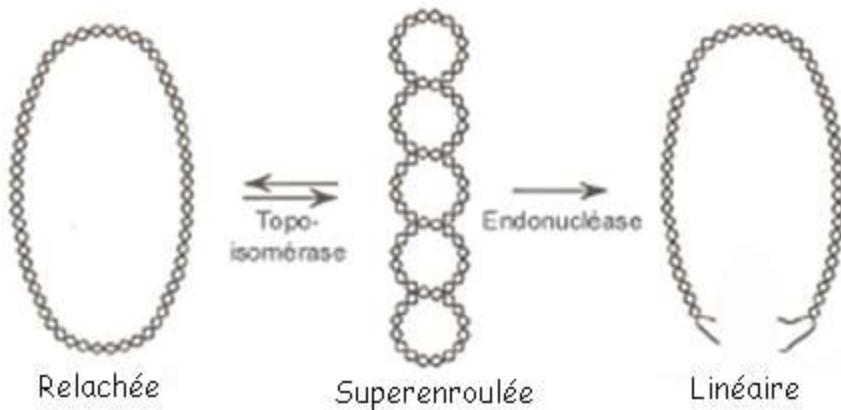
Facteurs affectant la migration

- ⌚ 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 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.
- ⌚ La concentration du gel: l'augmentation de la concentration 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 → augmentation de température (fondre le gel).

Electrophorèse de l'ADN plasmidique



Formes linéaire, relâchée, super-enroulée

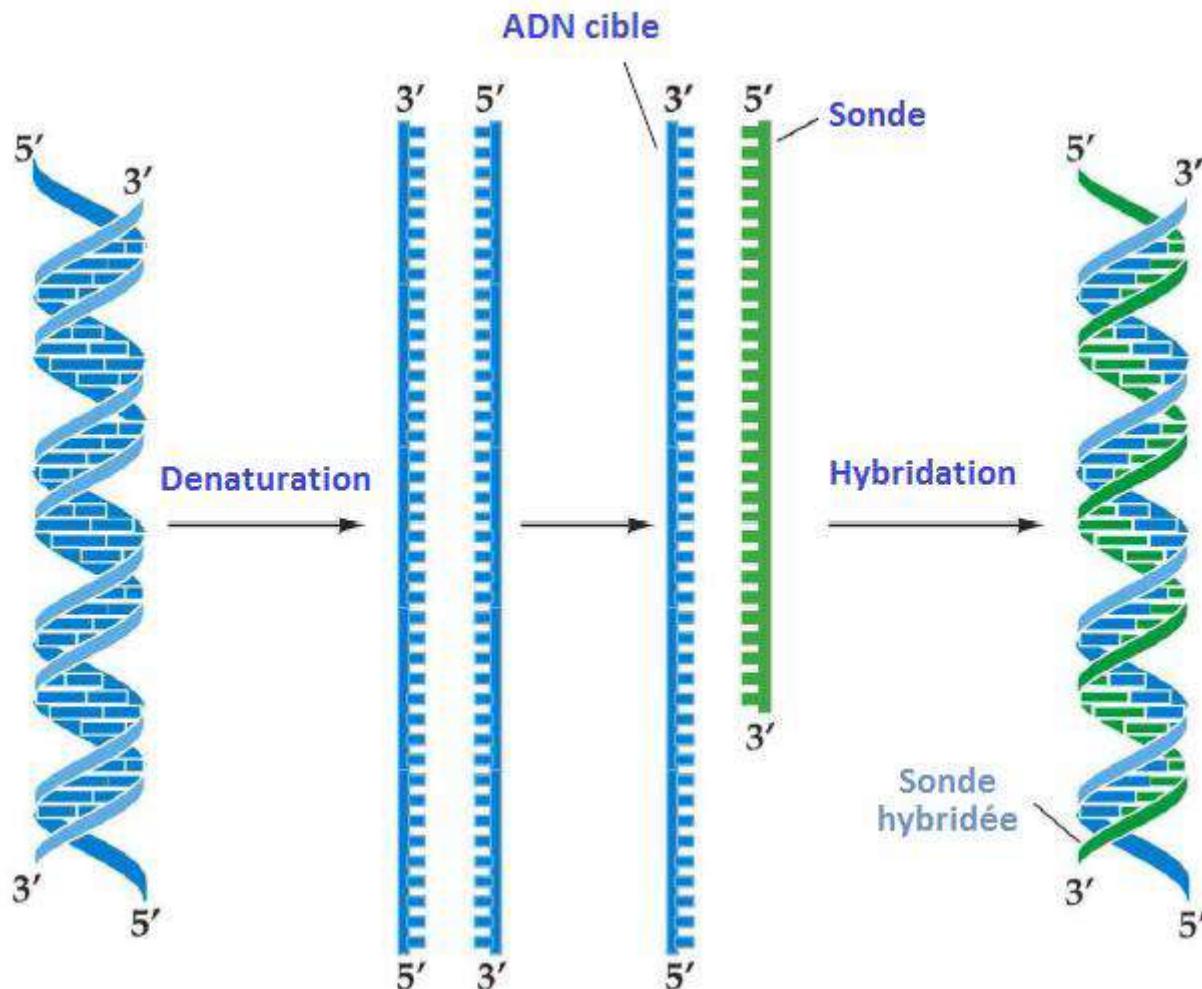


2. Hybridation des acides nucléiques

L'hybridation est une propriété fondamentale des acides nucléiques qui repose sur les règles de complémentarité. Il est possible d'apparier des brins d'ADN ou ARN avec des oligonucléotides qui reconnaissent spécifiquement des séquences sur les brins d'ADN de manière antiparallèle et complémentaire. Ces oligonucléotides sont appelés sondes nucléiques.

Pour le cas de deux brins complémentaires de la même molécule d'ADN (brins homologues) on parle de renaturation (hybridation à 100%). Chaque 1% de non homologie diminue la température d'hybridation (T_h) de 1°C.

L'hybridation moléculaire est utilisée surtout dans la détection de l'homologie entre les molécules d'ADN de sources différentes. La complémentarité dépendra de la spécificité et de la sensibilité.



Hybridation des acides nucléiques

La Th est estimée en utilisant plusieurs formules, cela dépend de la:

- Longueur du fragment (nombres de nucléotides).
- Composition du milieu
- Mis-appariement
- Le contenu en C+G

➤ **Formules utilisées pour calculer la Th:**

Formule de Wallace: $Tm = 4(C+G) + 2(A+T)$; $Th = Tm - 5$

La formule de Wallace permet de déduire la Th des petits oligonucléotides (Ex. Les amorces). Pour les oligonucléotides avec $N < 100$ nucléotides on utilise la formule suivante en tenant compte la concentration du sel, les mésappariements et la concentration de formamide:

$$Tm = 16.6\log[Na^+] + 0.41\%(C+G) + 81.5 - (675/N) - \%mismatch - 0.65\% \text{ de formamide}$$

Dans les conditions réactionnelles standards la Tm pour les longs séquences (>100):

$$Tm = 69.3 + 0.41\%(C+G)$$

La formule globale:

$$Tm = 81.5 + 16.6\log[sel] + 0.41\%(C+G) - \% \text{ mis-appariement} - (500/N) - 0.65\%(\text{formamide}).$$

Facteurs influençant l'hybridation

✓ Concentration en ADN

Plus la **concentration en ADN** augmente plus on retrouve des copies complémentaires disponibles dans le mélange, augmentant ainsi l'efficacité de l'hybridation.

✓ Temps de réaction

Plus on laisse de temps à la réaction pour opérer, plus les copies complémentaires auront de temps pour se rencontrer. Il y aura par conséquent plus d'hybrides.

✓ Température

La ré-association est optimale lors que la réaction opère à 25 % de moins que la température de fusion.

✓ Longueur des fragments

La vitesse d'hybridation est proportionnelle à la racine carrée de la **longueur des fragments**.

✓ Concentration en sels

Lorsque la **concentration en sel** augmente, la vitesse d'hybridation fait de même (*jusqu'à $[Na^+] = 1,2 \text{ mol/L}$*).

✓ Complexité des séquences

Dans un mélange, plus les séquences sont différentes moins il y a de chances pour un brin d'ADN d'aller s'hybrider. L'hybridation est ainsi ralentie.

✓ La nature des acides nucléiques

Lorsque l'**ARN est en large excès**, la vitesse d'hybridation est identique à une situation ADN/ADN.

Quand c'est l'**ADN qui est en excès**, la vitesse d'hybridation est 5 fois plus faible que dans une situation normale

Les différents types d'hybridation et leurs applications :

■ **En milieu liquide** : les séquences complémentaires dont on désire obtenir l'hybridation sont en solution dans un tampon. Elles s'associeront si du fait de l'agitation thermique des molécules elles se rencontrent et si la température de la solution est inférieure d'au moins quelques degrés à la Tm.

Trois types de techniques sont utilisables pour l'analyse quantitative des hybrides :

- les méthodes spectrophotométriques (l'abaissement de la DO à 260 nm correspond à l'augmentation des hybrides),
- chromatographiques (sur hydroxylapatite, seuls les double-brin se fixent. Après élution la quantité d'ADN est déterminée par spectrophotométrie),
- enzymatiques (la nucléase S1 ne digère pas les hybrides qui seront récupérés et quantifiés).

Applications :

- comparaison des tailles de génomes sans séquences répétitives (virus, bactéries, mitochondries..).
- analyse globale des pourcentages d'homologie de séquence entre deux espèces proches : A réaction complète, le % d'hybrides peut être assimilé grossièrement au % de séquences homologues.
- analyse des séquences répétitives : qui auront tendance à provoquer une déformation du début de la courbe représentant la cinétique d'hybridation du fait que les séquences répétitives possèdent une cinétique de réassociation plus rapide.

■En milieu solide :

l'immobilisation de l'une des séquences complémentaires (le plus souvent la cible) facilite d'une part les manipulations, d'autre part la séparation des fractions hybridées et non hybridées ; enfin, elle empêche la réassociation des brins d'ADN, cibles des sondes. La nitrocellulose fut le 1^{er} support utilisé pour l'immobilisation des acides nucléiques. Aussi, il existe des membranes synthétiques à base de nylon (Zetabind[®], Hybond[®], etc...).

NB : A propos des trois types de blot : le Southern blot, le Northern blot et le Dot blot (slot blot).

Southern blot

Introduction:

- Les blots sont des techniques de transfert d'ADN, d'ARN et de protéines sur un support de sorte qu'ils peuvent être séparés
- C'est une technique indirecte d'hybridation de l'ADN mise au point en 1975 par le biochimiste Edward Southern.
- La technique est connue comme le transfert d'ADN ou «Southern blot»
- Le Southern blot est une technique longue qui est la base de l'essor de la biologie moléculaire mais qui est souvent remplacée par la PCR.

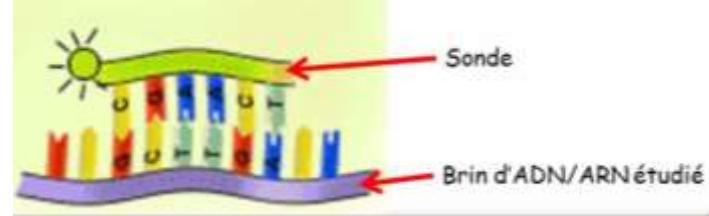
Le but de southern blot:

- Elle permet de détecter une séquence d'ADN génomique dite unique
- Cette technique permet de localiser une séquence d'ADN parmi les fragments ayant migrés, grâce à une sonde marquée

Les sondes

Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides monobrin (ADN ou ARN) identifié, utilisé pour rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Sa taille est très variable : oligonucléotide de 20-30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides.

Les étapes de la technique :

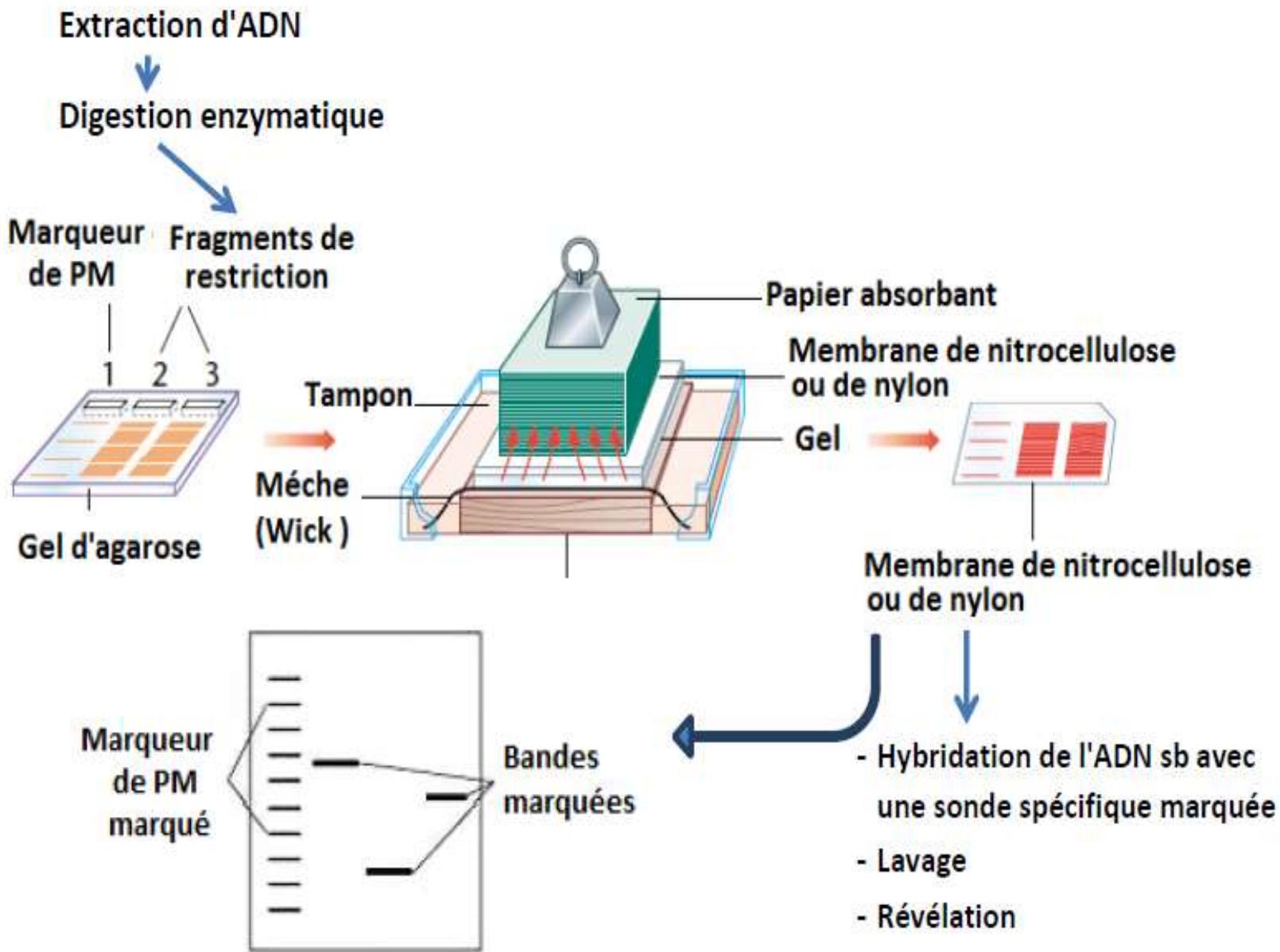


La procédure de ce type d'hybridation est résumée en sept étapes

- 1- Extraction de l'ADN
- 2- Digestion enzymatique (par les enzymes de restriction)
- 3- Electrophorèse du produit de la digestion
- 4- Transfert sur membrane
- 5- Hybridation avec une sonde spécifique marquée.
- 6- Lavages
- 7- Révélation

Les étapes de la technique :

1. Extraction de l'ADN génomique
2. Digestion par des enzymes de restriction différentes du même ADN génomique : on obtient un très grand nombre de fragments, mais seuls quelques fragments correspondent à une partie ou à la totalité du gène étudié.
3. Séparation électrophorétique des fragments d'ADN par électrophorèse dans un gel d'agarose.
4. Dénaturation des fragments d'ADN : par un traitement alcalin du gel d'électrophorèse. Ce traitement transforme les fragments d'ADN double brin en fragments d'ADN monobrin.
5. Transfert des fragments monocaténaires du gel d'agarose à un support souple : Une membrane en nitrocellulose (ou nylon)
6. Fixation des fragments monocaténaires d'ADN sur la membrane et hybridation avec la sonde marquée à un radioisotope.
7. Lavage et révélation (dans ce cas par autoradiographie)



Champs d'application

- Pour identifier l'ADN spécifique dans un échantillon d'ADN
- Identifier les mutations, délétion et des réarrangements de gènes
- Utilisé dans le pronostic du cancer, EX: MYCN
- Le diagnostic de VIH-1 et les maladies infectieuses
- Dans RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): Dans les empreintes génétiques
- Le diagnostic prénatal et des maladies génétiques

Northern blot

Northern est une technique employée pour étudier l'expression de gènes. Elle dérive du Southern blot, sauf qu'au lieu d'étudier de l'ADN, on étudie de l'ARN.

L'ARN va être analysé par électrophorèse et détecté par une sonde. Une différence du procédé par rapport à la technique de Southern est l'utilisation de formaldéhyde dans le gel d'électrophorèse comme dénaturant, parce que le traitement d'hydroxyde de sodium utilisé en Southern dégraderait l'ARN.

La procédure :

- Extraction d'ARN
- électrophorèse
- transfert
- hybridation, lavage, révélation

■ Hybridation *in situ* :

On appelle hybridation *in situ* (HIS) l'utilisation de sondes d'acides nucléiques pour mettre en évidence et localiser, dans des cellules ou des tissus, des séquences d'acides nucléiques, complémentaires de la sonde par leurs bases. L'HIS est un outil incomparable pour étudier l'expression des gènes. Elle est très proche, dans son principe, des Southern et des Northern blots et repose, comme eux, sur l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique (ADN ou ARN) marquée avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques que l'on cherche à identifier et à localiser. Mais les Southern et Northern blot se font sur des broyats de tissus, alors que l'HIS s'effectue sur une coupe histologique de tissu, apportant ainsi des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés.

Les sondes utilisées sont le plus souvent de l'ADN (double brin ou plus rarement monobrin) ou un ARN-messager (riboprobes) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides). Le marquage des sondes peut être réalisé par des isotopes radioactifs («sondes chaudes» : tritium H3, phosphore P32 ou P33, soufre S35) ou par des produits non radioactifs (sondes dites «froides») soit fluorescents (FISH) soit non-fluorescents comme la biotine («sondes biotinylées»), la digoxigénine ou des enzymes (phosphatase alcaline par exemple).

Le mode de révélation varie en fonction de la nature du marquage, autoradiographies en cas de sondes radioactives, microscopie à fluorescence en cas de FISH, avidine ou streptavidine pour la biotine, anticorps marqués par un enzyme et/ou par l'or colloïdal pour la digoxigénine, anticorps ou chromogènes pour les enzymes. Le comptage des grains d'argent sur les autoradiographies permet une étude quantitative (ou plutôt semi-quantitative).

Les **deux principales applications** de l'HIS sont la localisation des gènes sur des chromosomes en métaphase et la recherche des bactéries qui ont intégré le plasmide ou le phage recombinant recherché (criblage de banques).

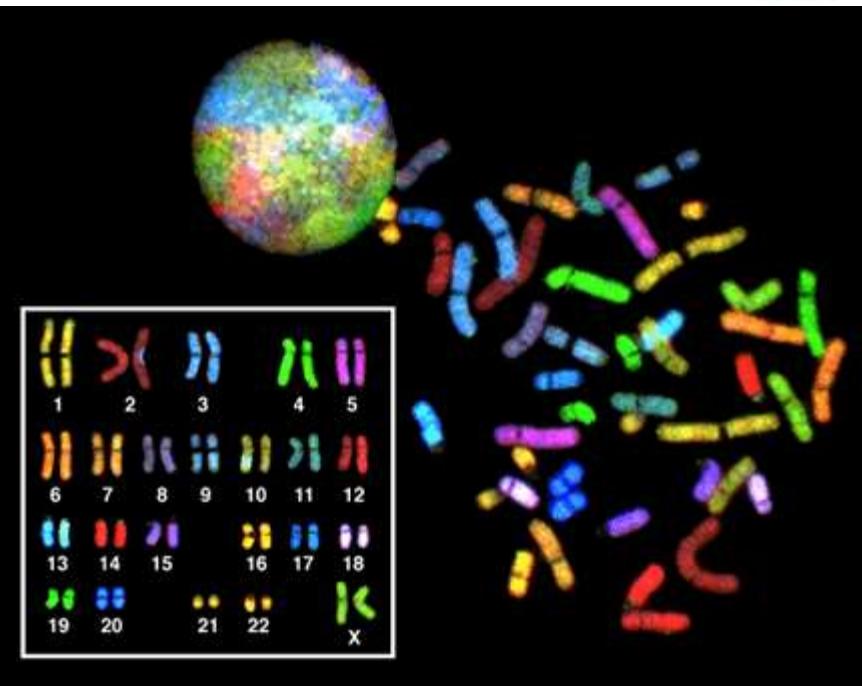
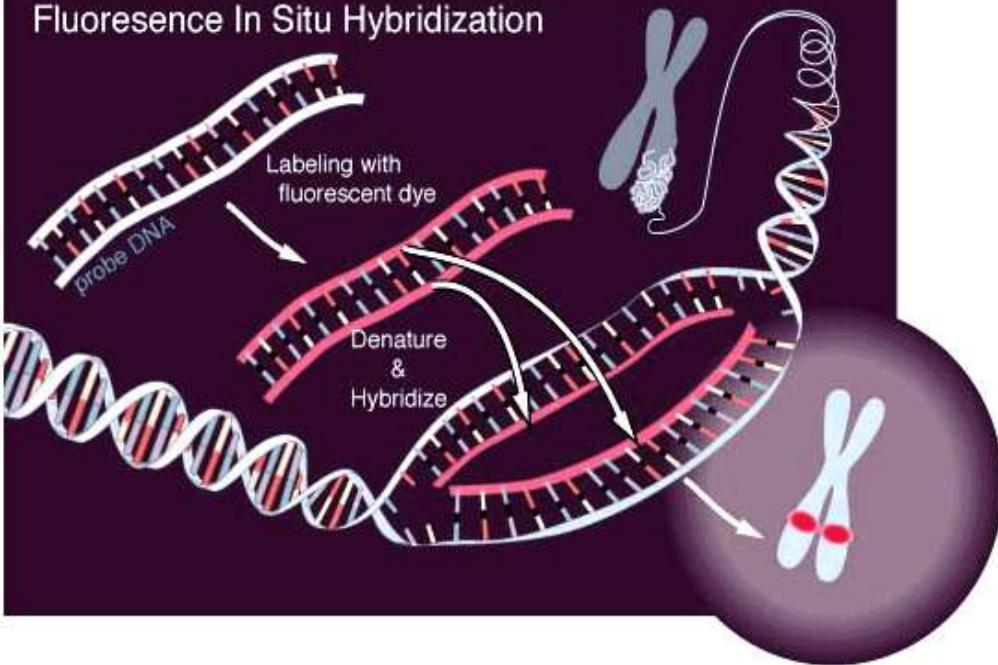
Hybridation sur chromosomes (FISH)

La FISH (Fluorescence in Situ Hybridization) repose sur la capacité d'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires. La région à étudier (située sur un chromosome préalablement légèrement dénaturé par traitement chimique pour le débarrasser des protéines associées) est repérée grâce à une sonde oligonucléotidique complémentaire (fig1).

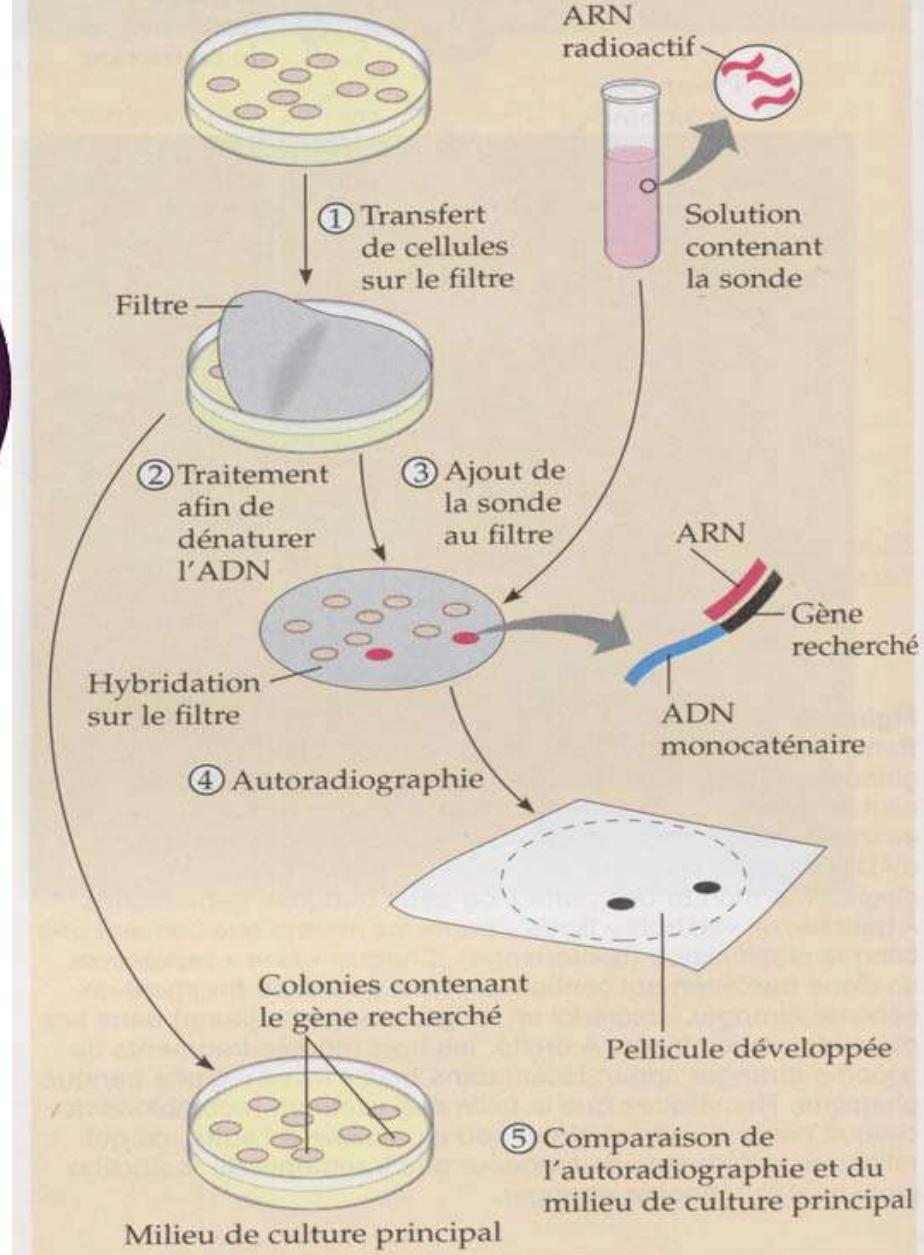
Certains de ces nucléotides de cette sonde sont couplés à une molécule antigénique reconnue par un anticorps fluorescent. En utilisant diverses sondes, greffées à des antigènes différents, on peut ainsi visualiser simultanément plusieurs séquences sur un ou plusieurs chromosomes (fig2).

Technique permettant de déterminer la position d'un fragment d'ADN dans le génome : le repérage se fait par rapport au bras du chromosome (p:bras court et q:bras long) et par rapport aux bandes (mises en évidence par la coloration Giemsa) du chromosome.

Fluorescence In Situ Hybridization



Colonies bactériennes contenant des gènes étrangers sous forme de segments clonés



Hybridation sur colonies : il s'agit d'un transfert de colonies de cellules d'une boîte de Pétri sur un filtre ou une membrane avant de procéder à une hybridation moléculaire de leur matériel génétique avec une sonde marquée.

Boîtes avec colonies
-bactéries ou phages-
(milliers à millions)



Prise
d'empreinte
(nylon ou
nitrocellulose)

Coussin de NaOH
(éclatement cellules +
dénaturation ADN)

Fixation
(cuisson ou UV)

Hybridation
+ Sonde

Lavages

Autoradiographie
Localisation des
clones d'intérêt

3. Le Séquençage d'ADN

- Le séquençage de l'ADN est la détermination de la succession des nucléotides le composant.
- C'est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie.
- Cette technique utilise les connaissances qui ont été acquises sur les mécanismes de la réPLICATION de l'ADN.

Technique de Sanger

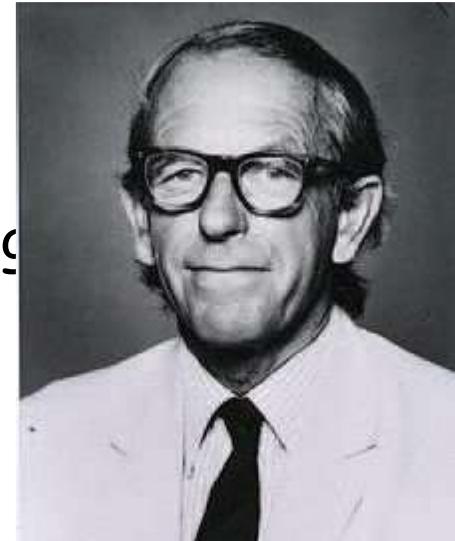
➤ Frederick SANGER (1918-2013) biochimiste anglais

a reçu 2 prix Nobel de chimie:

- 1958 : structure des protéines (insuline)
- 1980 : pour le séquençage

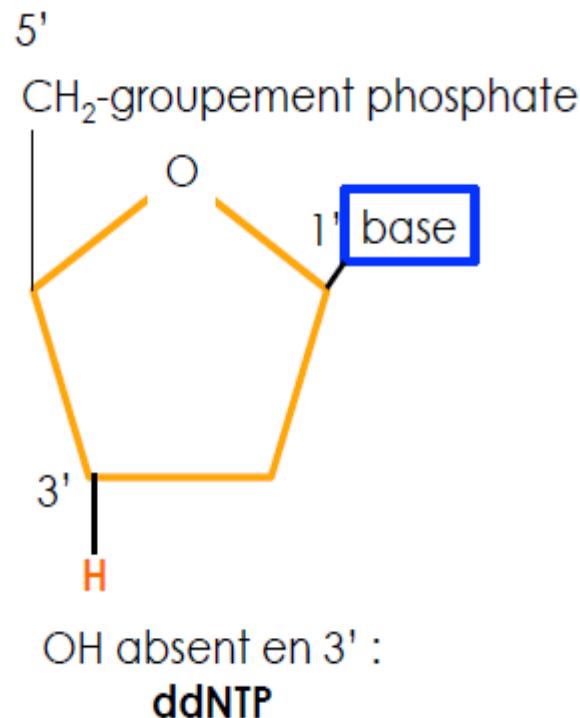
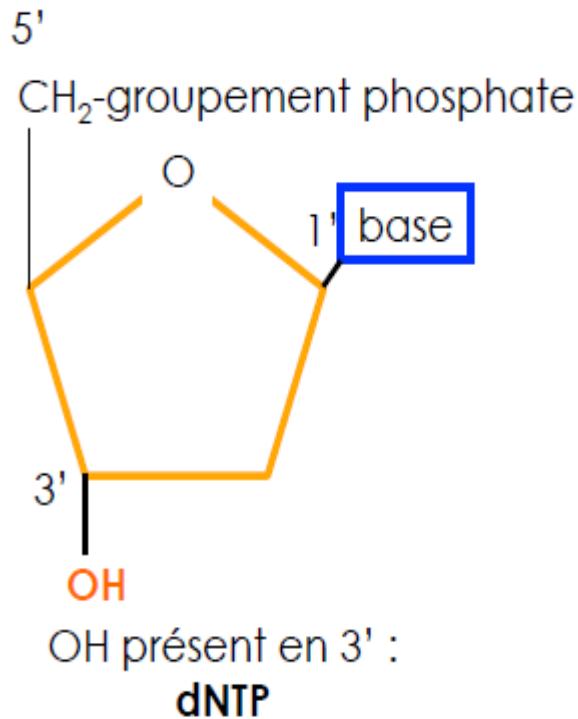
➤ Les ADN polymérases sont capables de synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'un brin matrice.

➤ Pour le séquençage, des nucléotides légèrement différents sont utilisés : les **didésoxyribonucléotides (ddNTP)** au lieu des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP).



dNTP vs ddNTP

- Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'.
- Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : **la synthèse du brin d'ADN s'arrête**



Protocole (Sanger)

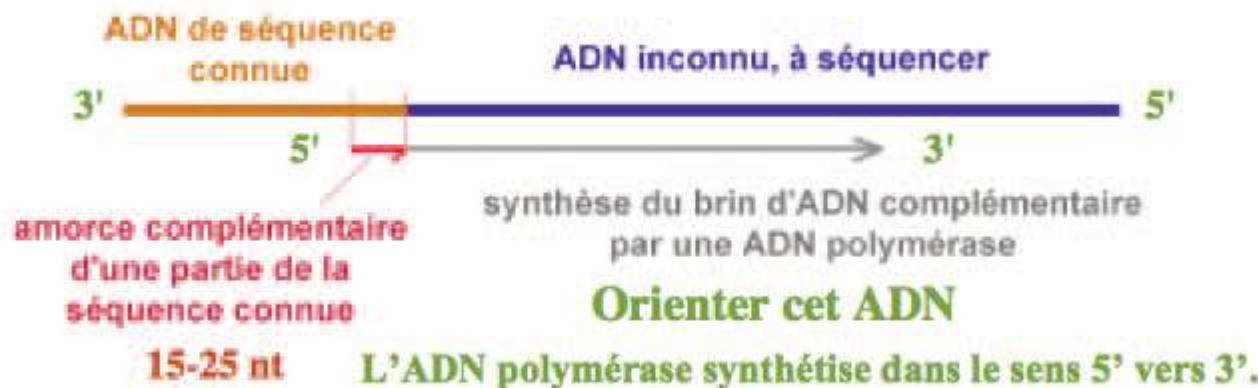
➤ Il faut préparer 4 solutions contenant chacune:

le fragment qui doit être séquencé

un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité

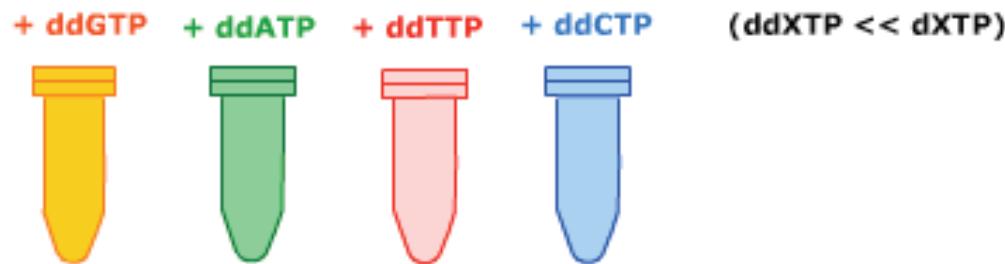
3' du fragment à séquencer = **amorce**

- les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- l'ADN polymérase



Protocole

- Dans chaque tube, on met de petites quantités d'un ddNTP **fluorescent** ou **radioactif** (^{32}P)

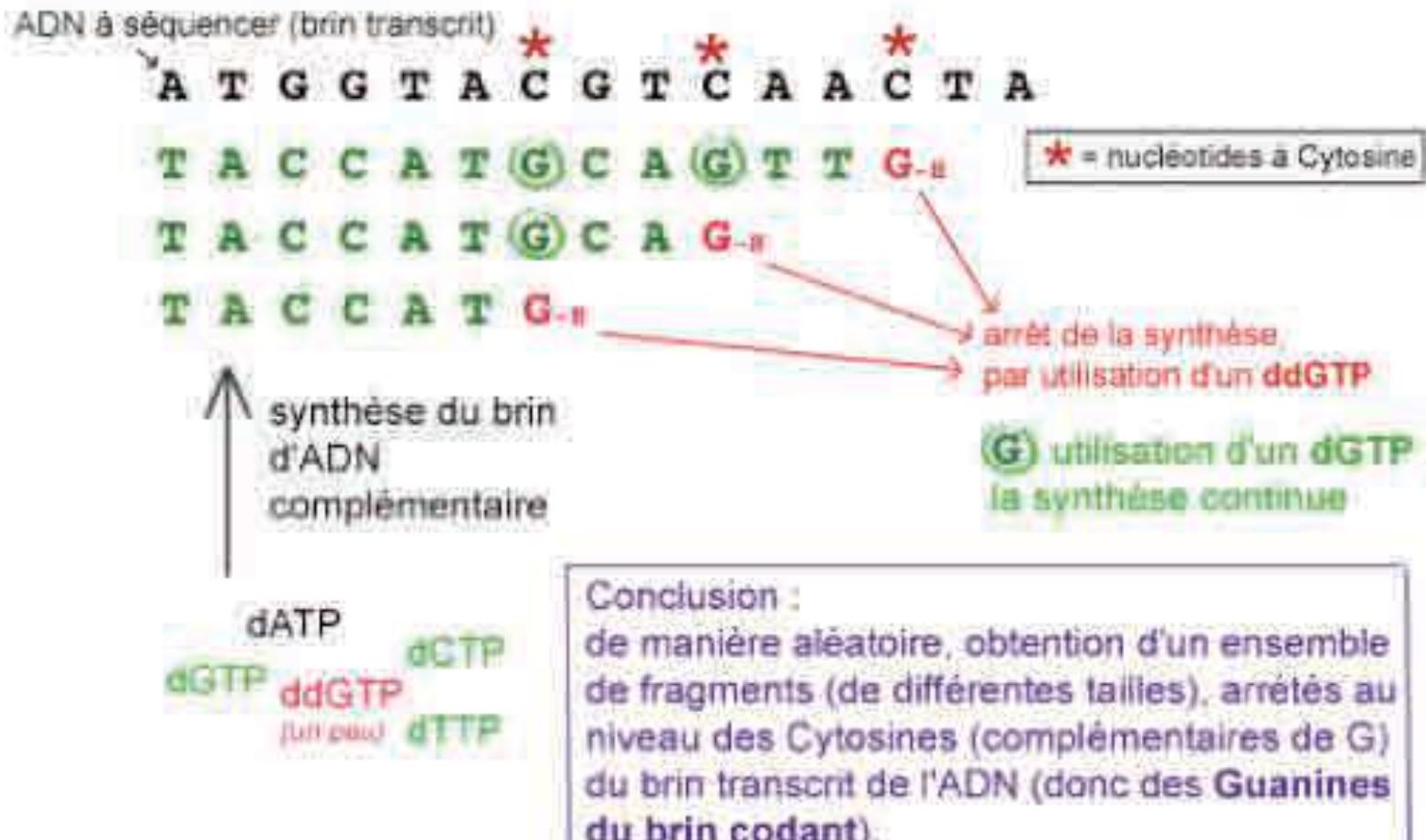


L'incorporation aléatoire d'un ddNTP stoppe la synthèse

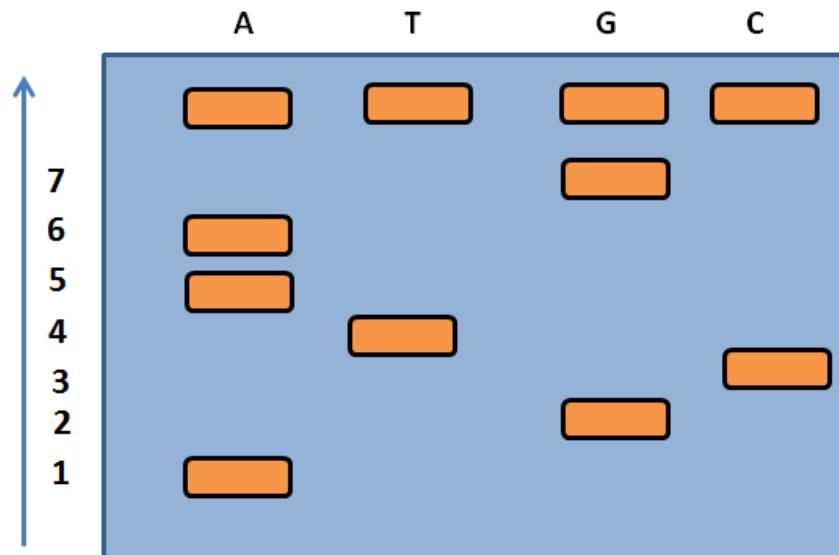
- On obtient donc à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de **tailles variées**, selon l'endroit où un ddNTP se sera inséré.

Protocole (suite)

- Synthèse du brin complémentaire → si arrêt par un ddGTP, c'est qu'il y a une Cytosine dans la séquence

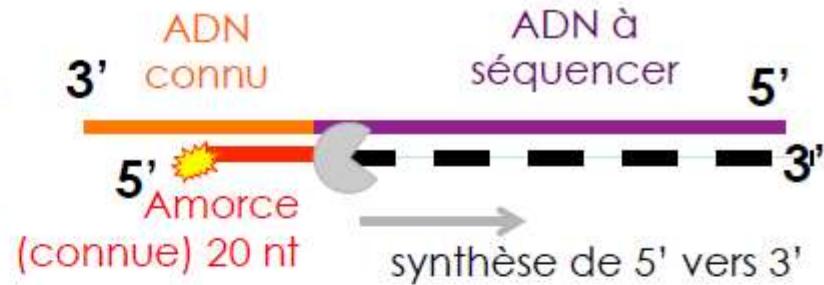
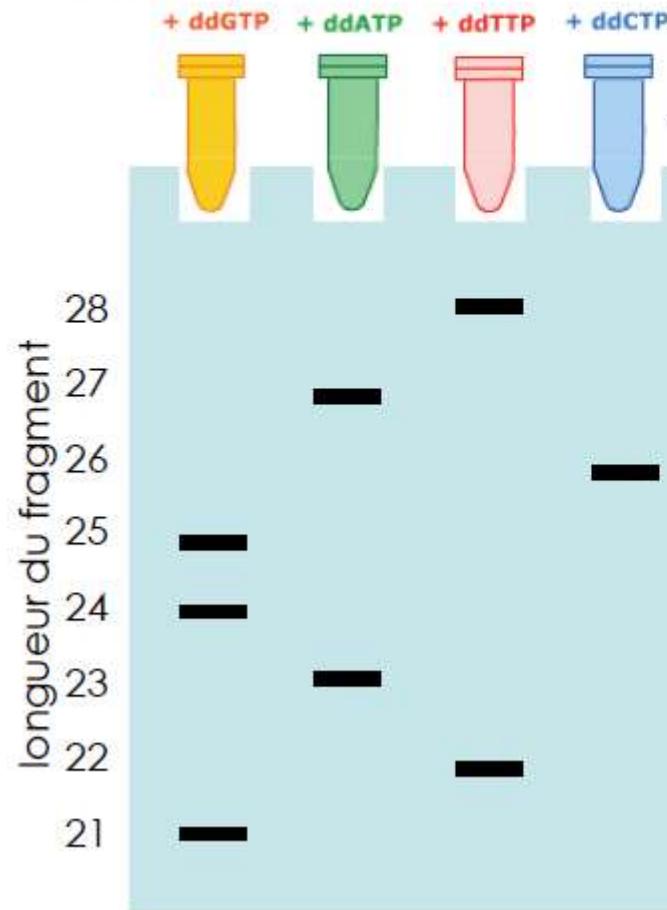


- Il suffit ensuite de faire migrer ces différents fragments d'ADN de quatre tubes dans un gel de polyacrylamide, puis les analyser pour connaître la séquence du fragment d'ADN étudié.
- On peut lire la séquence du bas vers le haut dans le sens 5' → 3' pour le brin complémentaire.
- Il suffit d'en déduire la séquence du brin matriciel par complémentarité dans le sens 3' → 5', puis de l'écrire dans le sens conventionnel 5' → 3'.



Lecture des brins

Paristech
Migration électrophorétique
(4 colonnes)



GTAGGGCAT → ADN à séquencer
5'-ATGCCTAC-3'

GTAGGGCA

GTAGGGC

GTAGGG

GTAGG

GTAG

GTA Exemple d'auto-

GT radiographie

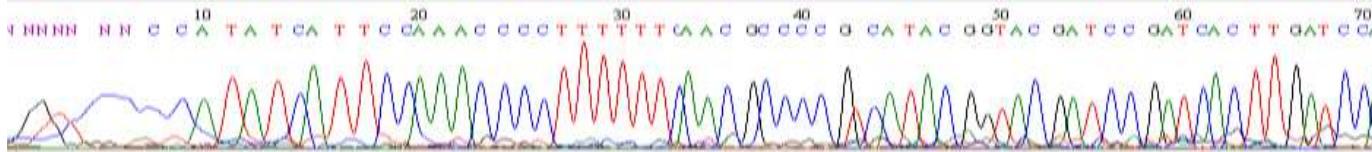
G (marquage ^{32}P)

d'un gel
d'électrophorèse



L'automatisation du séquençage

- Dans le séquençage automatique, des marqueurs fluorescents sont utilisés, un marqueur différent pour chaque ddNTP (bleu, rouge, vert, orange...etc.). La polymérisation se fait dans un seul tube contenant le mélange réactionnel et les quatre ddNTPs.
- Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie (ou après migration sur un gel de polyacrylamide), repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Un faisceau de laser excite les marqueurs attachés et un système de détection identifie la base terminale en fonction de la longueur d'onde de la fluorescence émise.
- Le résultat est présenté par le séquenceur sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui en faite en terme de nucléotides.



4. Réaction de Polymérisation en Chaîne "PCR"

La synthèse et le séquençage d'ADN ont permis l'émergence d'une méthode d'amplification de l'ADN appelée PCR (Polymerase Chain Reaction), à partir d'un gène (ou fragment) spécifique, de grand quantité d'ADN sont obtenues in vitro. L'ADN polymérase copiant jusqu'à un milliard de fois cette région cible « quantité suffisante pour être révélée ».

Historique

Cette méthode de Biologie Moléculaire a été mise au point en 1985 par Kary Mullis, qui obtint pour ces travaux le prix Nobel de Chimie en 1993.

Aujourd'hui, ce procédé révolutionnaire couplé à l'utilisation d'une ADN polymérase thermorésistante permet d'obtenir, sans clonage, une amplification considérable d'un fragment donné d'ADN.

- **Etapes de PCR :**

La dénaturation de la double hélice nécessite une haute température (autour de 95°C), donc l'enzyme utilisée doit être résistante aux hautes températures ou bien elle devait être ajoutée lors de chaque cycle. Ce problème a été résolu en utilisant une ADN polymérase thermiquement stable d'une bactérie thermophile : *Thermus aquaticus*, isolée d'une source chaude. Cette enzyme nommée ADN Taq polymérase est stable à 95°C (tab. 2) et n'est pas affectée par l'étape de dénaturation. Avec l'utilisation du Taq polymérase, l'ADN étant copié à 72°C et non plus 37°C, son utilisation augmente la spécificité de la PCR. Car aux hauts températures l'hybridation non spécifique d'amorces à l'ADN non cible est rare. Les produits de l'ADN Taq polymérase sont donc plus homogènes que ceux obtenus avec l'ADN polymérase III d'*E. coli*. En résumé il y'a quatre étapes :

1- Dénaturation (autour de 95°C) : Sert à dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin.

2- Hybridation (autour de Th): Lors du refroidissement du mélange, les amorces étant en excès, la plupart des brins d'ADN cibles se fixent à celles et non entre eux.

3- Extension (72°C) : L'ADN polymérase « prolonge les amorces : côté 3'-OH libre » en utilisant les brins cibles comme matrice. 4- Après une période appropriée d'incubation, le mélange est chauffé de nouveau pour séparer les brins. Il est alors refroidi pour que les amorces s'hybrident aux régions complémentaires de l'ADN nouvellement synthétisé. Le processus complet est alors répété « cycle ».

- **Thermocycleur**
- Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur (fig. 7). Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur (effectuer automatiquement les cycles de chauffage) (fig. 8).

- Le secret de la PCR est que le produit d'un cycle d'extension sert de matrice pour le suivant (fig. 8), ainsi la technique PCR est remarquable par le fait que l'ADN cible se double à chaque cycle.
- En pratique 20 à 40 cycles sont habituellement réalisés, ils génèrent 10^6 à 10^9 fois la séquence cible. « Elle repose sur la succession de plusieurs cycles » (fig.9).

Tab. 3: Progression géométrique de raison 2 des cycles de PCR et nombre de copies.

Cycle	1	2	3	4	5	6	-----n	n : nombre de cycle
Copies totale (N)	2	4	8	16	32	64	-----	$N=2^n$
Copies parasites	2	4	6	8	10	12	-----	$2n$
Copies cibles	0	0	2	8	22	52	-----	$2^n - 2n$

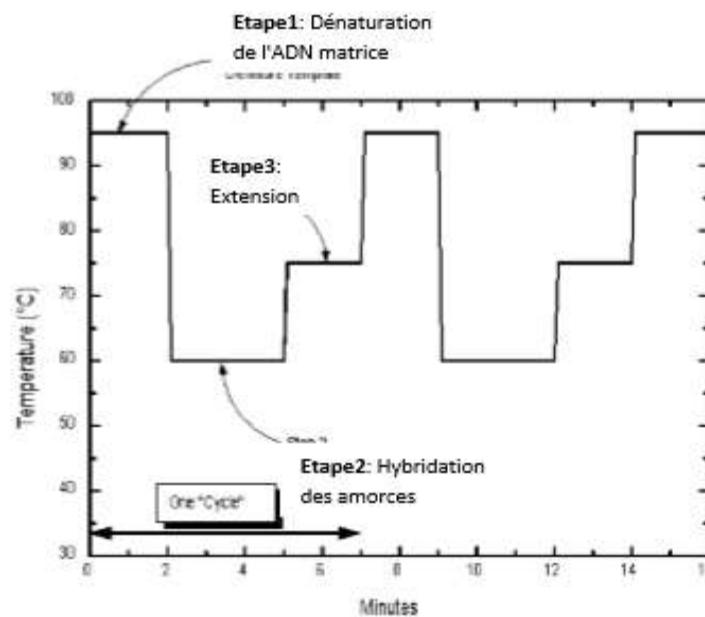
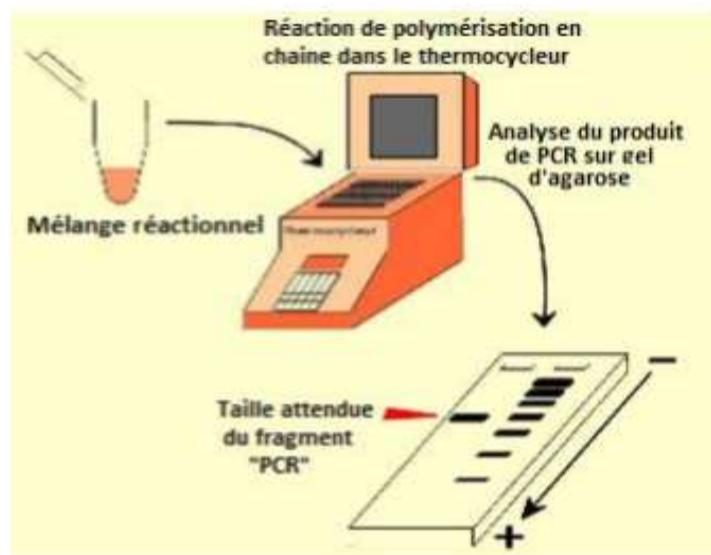


Fig.7: Réaction d'amplification d'ADN dans le thermocycleur et visualisation du produit de PCR par électrophorèse.

Fig.8: Profile de cycles de la température de la PCR

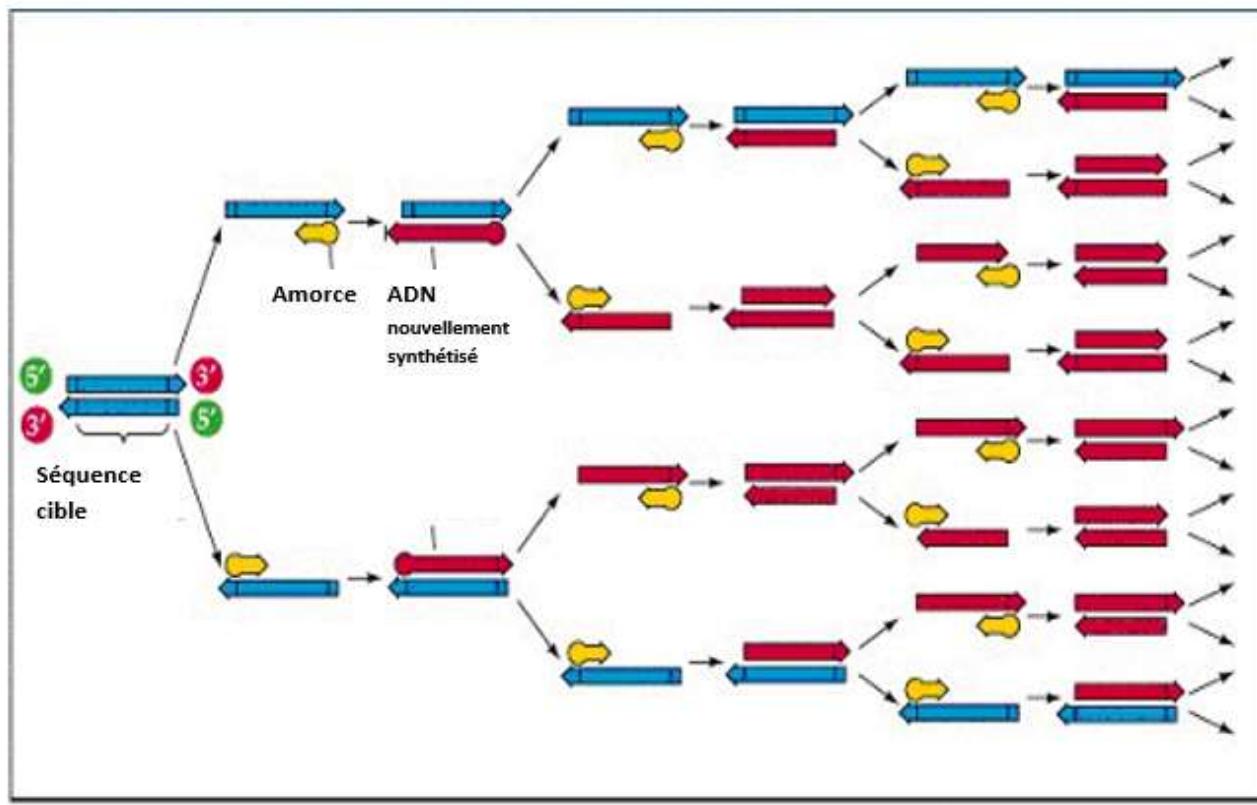


Fig.9:Amplification d'ADN par PCR. Le produit d'un cycle sert de matrice pour le cycle qui suit.

- **Le désigne des amorces (primers) repose sur les critères suivants:**
- - Taille entre 17 à 31 nucléotides –
- Contenu GC : $\approx 50\%$ -
- Th proches entre les deux amorces (F et R).
- - Absence de répétition d'un même nucléotide
- - Absence de complémentarité entre les deux amorces (pas de risque de formation de dimères)
- - Faible risque de formation des structures secondaires (Ex. Epingle à cheveux).
- Pour calculer le Th d'une amorce on utilise la formule suivante:

$$Th = 4(C+G) + 2(A+T) - 5$$

- Variantes de la PCR « classique » : PCR « hot start », PCR « long range », PCR multiplex ...
- Quantification : détermination du nombre de copies cibles initiales

-par PCR «temps réel» où l'amplification est mesurée à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent qui s'incorpore dans le double brin formé -par utilisation d'un standard interne

- amplification à partir d'ARN : RT-PCR

