



## Fiche 2 : PCR et principes de biologie moléculaire

### I) Amplification en chaîne par la polymérase (PCR)

Cette technique a été créée en 1985 par Kary Mullis (prix Nobel de médecine en 1993) et a révolutionné le génie génétique et la biologie moléculaire.

Suite à l'extraction d'ADN, une seconde technique de base est utilisée :

« **L'amplification en chaîne par la polymérase** » ou « PCR ».

La PCR permet **d'amplifier** une région d'ADN de quelques **mg** en une grande **quantité**. Cette technique est **extrêmement puissante**.

Elle est possible grâce à la purification d'une DNA polymérase particulière que l'on appelle la **Taq DNA polymérase (Thermophilus Aquaticus DNA Polymérase) ++**.

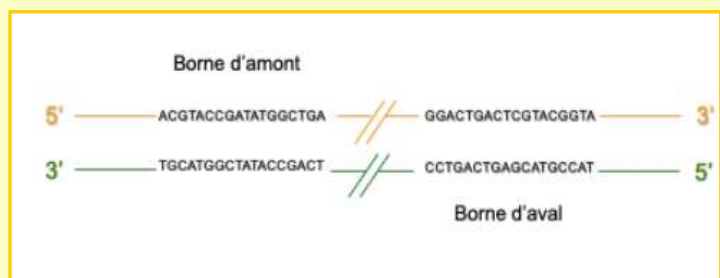
Cependant, cette technique est très **sensible** et les risques de **contamination** sont très grands. Il faut donc, lorsqu'on travaille dans un laboratoire de BM, exercer une série de contrôle, pour être sûr que notre ADN final correspond à celui de notre patient, et qu'il n'y a eu aucune contamination lors de la PCR.

Cette technique PCR est possible grâce à la **Taq Polymérase**, protéine qui vient de la purification des **bactéries** (pas virus) qui vivent dans les geysers d'eaux chaudes. La majorité des protéines sont dégradées à la chaleur mais pas la Taq Polymérase qui résiste à de hautes températures sans être dégradée.

C'est donc l'isolement / la purification de cette Taq PM qui a permis de mettre en place cette technique PCR.

Lors d'une PCR, une région spécifique d'ADN va être amplifiée. Ce fragment d'ADN double brin de 150 pb à 3kb est appelé **amplicon**.

2 choses sont à connaître afin d'amplifier de l'ADN : la borne **d'amont** et la borne **d'aval** (càd 18 à 20 nucléotides en amont/aval de la région à amplifier).



**Les 3 étapes successives de la PCR :**



**1. Dénaturation :**

L'ADN double brin est dénaturé en ADN simple brin par rupture des liaisons hydrogènes.



**2. Hybridation des amorces :** des **Primers** (oligonucléotides simples brins de 18 à 20 nucléotides) s'hybrident en amont et en aval sur les 2 brins dénaturés. Ils vont ainsi définir les bornes du fragment d'ADN que l'on va amplifier.

et en aval sur les 2 brins dénaturés. Ils vont ainsi définir les bornes du fragment d'ADN que l'on va amplifier.



**3. Elongation :** Elongation des amorces grâce à la **Taq Polymérase** à partir des primer dans le **sens 5'-3'**.

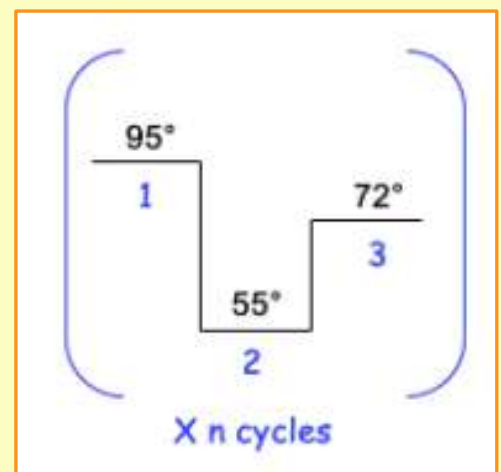


**Températures :**

La température de l'automate est très importante.

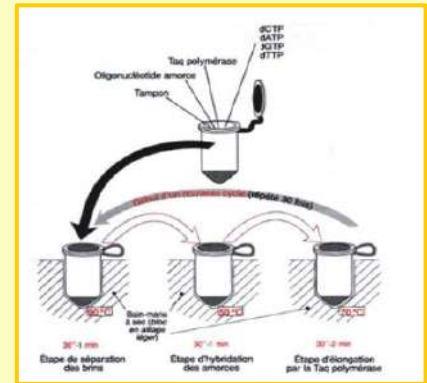
**Dénaturation : 95°C**  
**Hybridation : 55°C, phase en plateau**  
**Elongation : 72°C**

Ces 3 étapes vont être répétées n fois (généralement entre 30 et 35 cycles PCR). Il y aura 2<sup>n</sup> molécules au bout de n cycles.



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

- L'ADN du patient (100ng),
- 2 Amorces (Primers),
- Désoxynucléotides (dNTP),
- Tampon (MgCl<sub>2</sub>), garde le pH neutre
- La Taq polymérase (enzyme).



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

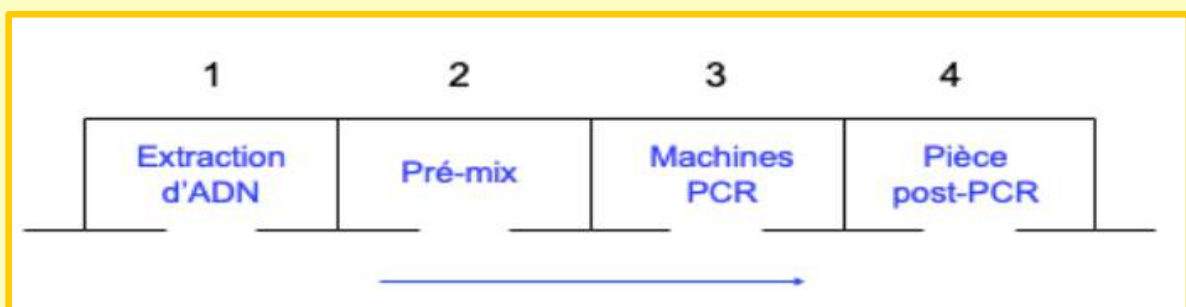
Cette technique permet de travailler à partir d'une quantité **très faible** d'ADN. Cela est très utile lors de diagnostic pré implantatoire où l'on utilise qu'une cellule. C'est une technique de base dans un labo de BM très performante mais très sensible. Elle est à hauts **risques de contamination**. Elle nécessite donc un **circuit monodirectionnel** indispensable pour l'agrément.

Les conditions d'exercices sont très réglementées (via des agréments) : c'est à dire qu'un biologiste moléculaire ne peut pas être agréé pour faire ce travail sans formations complémentaires. Cet agrément est indispensable pour le biologiste, l'équipe, le matériel et les locaux.

Il existe un **circuit monodirectionnel** avec :

- 1<sup>ère</sup> pièce : **Extraction de l'ADN**,
- 2<sup>ème</sup> pièce : **Pré-mix** = pièce dans laquelle on prépare nos tubes avec tous nos éléments sauf l'ADN,
- 3<sup>ème</sup> pièce : **Machine PCR**, dans laquelle on va ajouter l'ADN du patient dans les tubes,
- 4<sup>ème</sup> pièce : **Post-PCR**, lieu de manipulation des produits d'amplification, il y a 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 1<sup>ère</sup> pièce.

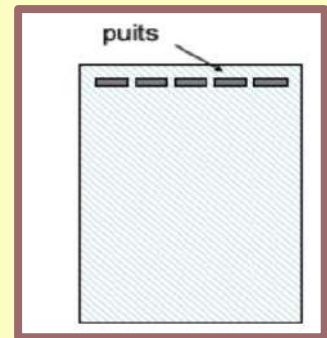
Il y a bcp de contrôles pour être sûr de la **fiabilité** de ces techniques en termes de diagnostic.



## II) Gel analytique

Une fois la PCR terminée, il faut vérifier qu'elle a bien fonctionné. L'analyse des produits d'amplification peut se faire grâce à un **gel analytique** et à une **électrophorèse**.

Pour ça, on coule 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.



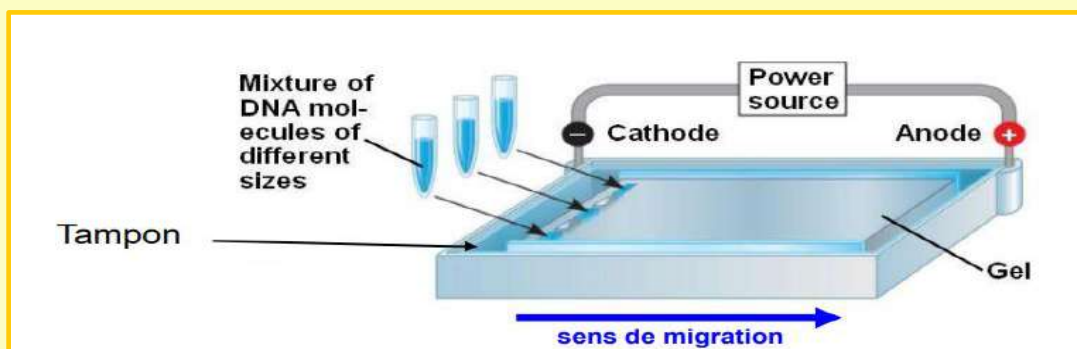
La **vitesse de migration** d'une molécule d'acide nucléique sera fonction :

- De sa **masse moléculaire** (nombre de pb),
- 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 à analyser. Enfin, on soumet ce gel à une électrophorèse / un champ électrique (- vers +).

Dans cette étape, on utilise la **charge électrique** de l'ADN qui est **négative** de par le groupement PO<sub>4</sub> - :

**l'ADN migre du - vers le +.** +++



Une fois la migration terminée, il faut visualiser les amplicons.

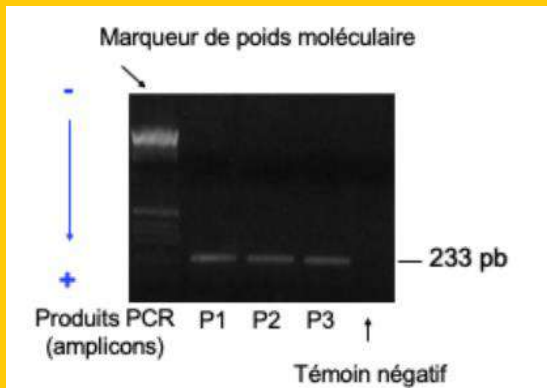
Pour ça, on va utiliser un **agent intercalant (mutagène +++)** que l'on appelle le **Bromure d'Éthidium** qui a la particularité de prendre une coloration fluorescente rose lorsqu'il est visualisé sous lumière **UV**.

En biologie moléculaire beaucoup d'agents mutagènes sont utilisés. Ces derniers modifient l'ADN en s'y intercalant.

Il est important dans un labo de BM de protéger des contaminations les amplicons 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).

Lors de la coloration du gel par le Bromure d'Éthidium, nous obtenons ceci (ce sont des exemples ++):

Exemple 1 :



Ce gel contient 5 pistes :

- La première : nous avons fait migrer un **marqueur de poids moléculaire**. Ce mélange de fragment d'ADN a une taille connue et sert de repère par rapport à la taille des amplicons).

- Les pistes 2 à 4 : on a les **amplicons** des produits PCR de 3 patients différents.

*Ici, on visualise des bandes au niveau de 233pb. Dans cet exemple on voulait des morceaux d'ADN amplifiés de 233 pb, donc on a la bonne taille.*

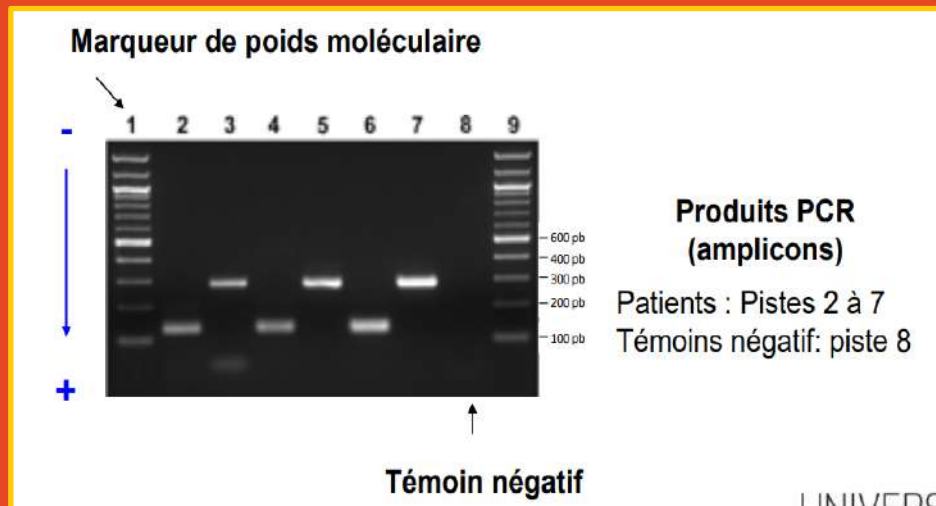
- La cinquième piste : c'est notre **témoin négatif**. Cette piste est indispensable à toutes expérience PCR. On y a mis tous les réactifs de la PCR sauf l'ADN. Il n'y a rien dans cette piste donc **pas de contamination** car sans ADN on n'amplifie pas. Les bandes des pistes P1 à P3 viennent donc bien de nos patients et non pas d'un ADN qui aurait contaminé nos préparations.

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.

*Ici, la PCR a marché car on a un témoin négatif et les produits PCR des patients qui correspondent à la taille recherchée (233 pb).*

Exemple 2 :

Ici, nos amplicons ont des tailles et donc des poids moléculaires différents. Notre échantillon n'a pas été contaminé le témoin est négatif.



### III) Digestion Enzymatique

Une fois que la PCR à bien marché, une autre technique nous est utile : la **digestion enzymatique**.

Cette technique a été rendu possible grâce à l'identification **des enzymes de restrictions** qui sont des **endonucléases bactériennes** (*endonucléase car elles coupent à l'intérieur*).

Ces dernières reconnaissent une séquence précise de nucléotides et la coupe. La coupure de l'ADN double brin est donc **spécifique** et **reproductible**.

Aujourd'hui, on connaît plus de **500** enzymes différentes (qui reconnaissent donc des sites différents).

Petit instant Nomenclature (<3) :

**EcoRI**

**Escherichia coli R y13**

<p><b>E</b> : initiale de l'espèce bactérienne</p> <p><b>co</b> : genre de la bactérie</p> <p><i>PvuII</i> (<i>Proteus vulgaris</i>)</p> <p><i>BamHI</i> (<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>)</p> <p><i>Haell</i> (<i>Haemophilus aegyptius</i>)</p>	<p><b>R</b> : souche</p> <p><b>I</b> : n° d'ordre de découverte de l'enzyme dans une même bactérie</p>
---	--




La PCR et la découverte de ces enzymes ont fait grandement avancer la médecine ces dernières années.

Il y a beaucoup d'enzymes qui reconnaissent des séquences nucléotidiques différentes et qui servent énormément pour des choses très spécifiques.

#### 3 types d'enzymes de restriction :

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.

#### **Enzymes de restriction de type II (dont EcoRI) :**

-  Ce sont les plus utilisées,
-  Reconnaissance de **4 à 8 paires de bases**,
-  L'enzyme coupe l'ADN au niveau de la séquence reconnue,

✂ Les séquences reconnues sont **palindromiques** (lues pareil 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.

✂ **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.

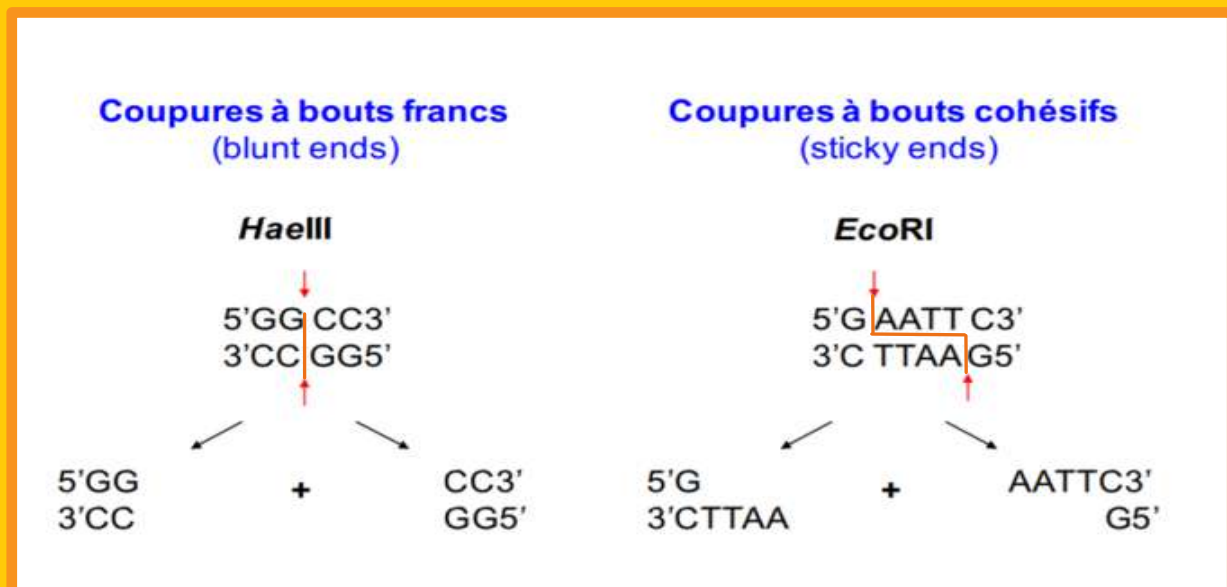
### Bout cohésifs (Sticky ends)

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**.

THE END !!!

Courage, force à vous, je vous envoie tout mon amour, mon soutien et mon ADN, <3 KISSSSSSSEESSSSSSSSSSSS