

Cour 02 : L'électrophorèse et la PCR

I. L'électrophorèse définition et principe de la technique

L'électrophorèse est un outil important dans l'analyse qualitative et quantitative des acides nucléiques (ADN, ARN). Son principe repose sur la séparation des molécules. Les critères de séparation utilisés sont la taille (poids moléculaire) et la charge électrique.

Comme les acides nucléiques sont chargés négativement (grâce au phosphate), le critère de la charge électrique n'est pas comptabilisé dans la séparation (toutes les molécules migrent vers l'anode +) donc les fragments de l'ADN sont séparés uniquement en fonction du poids moléculaire.

En milieu basique, les fragments d'ADN sont chargés négativement. Placé dans un champ électrique, ils vont donc déplacer vers l'anode, mais leurs charges respectives étant à peu près équivalentes, c'est leur masse moléculaire qui va régler leur vitesse de déplacement à travers les mailles du gel dans lequel ils ont été placés. Plus les fragments sont petits, plus ils vont migrer rapidement et donc, plus loin de la zone de dépôt.

Le gel est constitué d'une matrice polymère baignant dans un tampon conducteur.

Deux principaux polymères sont utilisés : l'agarose et le polyacrylamide.

Le réseau de mailles constituant le gel forme un tamis moléculaire à l'intérieur duquel les molécules d'ADN migrent.

La taille des mailles varie selon la concentration d'agarose

Le gel utilisé est le gel d'agarose (généralement à 1%) : par utilisation de marqueur de taille « Low DNA ». Le marqueur de taille nous permet, selon la migration de connaître la taille de notre ADN.

Exemple : 1 Kb DNA ladder (10 fragments)

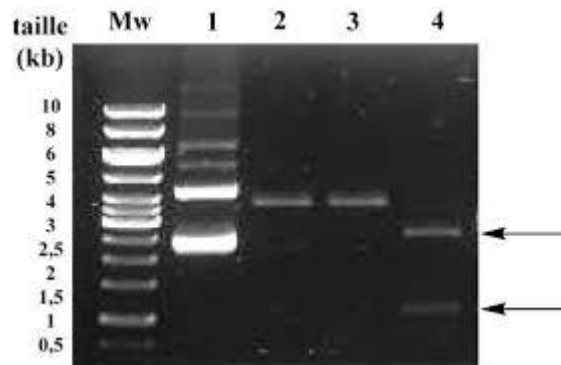


Figure : un profil d'électrophorèse avec un marqueur de taille de 1 Kb

Les différents types d'électrophorèse permettent de séparer les acides nucléiques en fonction de leur taille :

- L'électrophorèse horizontale** sur gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN de 50 à 10 000 paires de bases en fonction de la concentration du gel en agarose.
- L'électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide (PAGE, poly-acrylamide gel electrophoresis)** permet de séparer les fragments d'ADN dont les longueurs vont de 1 à 1 000 nucléotides.

□ **L'électrophorèse sur gel d'agarose en champ pulsé (PFGE)** permet de séparer des fragments d'ADN double brin dont la taille peut varier de 220 000 à 2 500 000 paires de bases. (PFGE pour Pulsed Field Gel Electrophoresis).

Les échantillons d'ADN, avant d'être déposés dans les puits, sont mélangés avec une solution de charge qui contient :

- **Un alourdisseur** (glycérol ou saccharose) pour entraîner l'ADN au fond du Puits.
- **Des marqueurs de mobilité** (colorants visibles : bleu de bromophénol et xylène cyanol).
- **Des marqueurs de taille** pour l'identification (dans le puits de référence).

Les deux marqueurs (colorants) migrent à des vitesses différentes.

- ❖ Le bleu de bromophénol (violet) migre avec les fragments de petites tailles (donc plus vite)
- ❖ alors que le xylène cyanol (bleu turquoise) migre avec les fragments de grande taille.

- **Comment préparer un gel d'agarose ?**

Pour 200 ml :

2g d'agarose, 200 ml de Tris Borate EDTA (TBE 0.5 X) et une goutte de BET.

- Mettre dans une fiole Erlenmeyer les 2 g d'agarose et les 200 ml de tampon « TBE ».
- Dissoudre complètement l'agarose dans le tampon en plaçant l'Erlenmeyer au four à micro-ondes et en agitant de temps à autre pour homogénéiser le mélange. Rajouter 2 µl de BET.
- Couler lentement le gel dans le moule avec le peigne et laisser refroidir.
- Retirer le peigne et placer le gel dans la cuve en s'assurant qu'il est recouvert de tampon « TBE ».
- Les puits doivent être du côté de la cathode (-, fil noir), car l'ADN est chargé négativement et migrera vers l'anode (+, fil rouge). Lancer la migration après avoir chargé les échantillons et les standards (Low DNA Mass Ladder) dans les puits selon le dosage suivant :

-5µl : 2 µl d'ADN + 3 µl de Bleu de bromophénol (tampon de charge) ou 3 µl : 1 µl d'ADN + 2 µl de BBT

-1 µl de tampon (BBT) + 4 µl de Low DNA Mass Ladder.

- **Révélation de l'ADN**

Les bandes d'ADN sur un gel de polyacrylamide ou d'agarose ne sont pas visibles si l'ADN n'est pas marqué ou coloré. C'est une méthode sensible de coloration de l'ADN consiste à plonger le gel après électrophorèse dans du bromure d'éthidium (BET ou EtBr) un intercalent de l'ADN qui devient cent fois plus fluorescent sous illumination ultra-violette lorsqu'il est lié à l'ADN.

Après la migration d'électrophorèse, le gel est soumis à une lumière sous ultraviolet afin d'observer les bandes d'ADN fluorescentes.

Le marqueur d'acide nucléique contenu dans le gel devient fluorescent avec une couleur rouge orangée.

L'estimation de la taille des fragments est faite à l'aide du marqueur de taille moléculaire (Low DNA Mass Ladder) utilisé simultanément dans un autre puits lors de la migration.

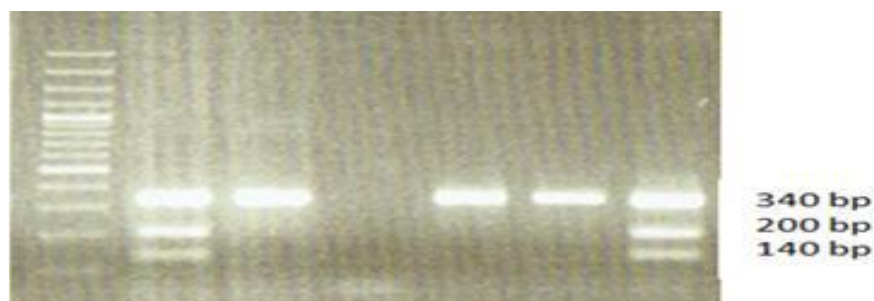


Figure : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose

II. La PCR définition, principe et étapes

L'amplification en chaîne par polymérase ou réaction en chaîne par polymérase (PCR est l'abréviation anglaise de polymerase chain reaction). Cette technique a été mise au point par le scientifique américain Karry Mullis en 1983 et développée par le H.A. Herlich avec la collaboration du laboratoire Cetus Corp à Emery ville, Californie en 1985.

La PCR est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique (séquence spécifique d'ADN (l'Amplicon)) et d'amorces spécifiques. La quantité obtenue finalement est suffisante pour pouvoir manipuler le gène amplifié ou en faire des analyses détaillées.

Cette amplification repose sur la réplication d'une matrice d'ADN double brin. Elle se décompose en trois phases : une phase de dénaturation, une phase d'hybridation avec des amorces et une phase d'élongation. Les produits de chaque étape de synthèse servent de matrice pour les étapes suivantes, ainsi on réalise une amplification exponentielle (selon la formule 2^n et n représente le nombre de cycles, par exemple une PCR de 30 cycles génère théoriquement 2^{30} copies de cibles initialement présentes).

- **Les éléments de la PCR**

1. **L'ADN matriciel**

En théorie une copie ADN de la séquence recherchée est suffisante pour avoir une amplification.

2. **Les amorces**

Dans la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces ou primers est crucial. Elles vont avoir un rôle : en s'hybridant à l'ADN matriciel, elles délimitent la région d'ADN à amplifier (étape 2 du cycle) et avec leur extrémité 3' OH libre servent d'amorce pour l'ADN polymérase (étape 3 du cycle).

Les oligonucléotides amorces s'hybrident aux extrémités de la séquence qui va être amplifiée, il faut donc connaître les séquences nucléotidiques des extrémités de la région ADN amplifiée. C'est en effet au niveau de ces extrémités que les oligonucléotides amorces vont s'hybrider.

Pour le choix des amorces il faut un couple d'amorces : Forward et Reverse (sens et anti-sens), chaque amorce doit contenir :

- 17 à 28 nucléotides (environ 20)
- % GC : plus de 50 % et moins de 68 %
- Extrémité 3' : de préférence se termine par GC/CG/CC/GG
- Des séquences qui ne soient pas complémentaires entre elles
- Éviter les palindromes
- Équilibre des bases :

20-30 % G; 20-30 % C; 20-25 % A; 20-25 % T;

3. L'ADN polymérase

Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées), comme *Thermus aquaticus* (Taq polymérase). Le rôle de l'ADN polymérase en PCR est copier les molécules de l'ADN. L'enzyme en présence d'amorces se fixe à l'ADN simple brin et synthétise un nouveau brin complémentaire du brin d'origine.

4. Des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP)

Ces molécules représentent les quarts bases de l'ADN (guanine, adénine, cytosine, thymine) nécessaire dans toute PCR et qui sont utilisés par l'ADN polymérase pour la synthèse du nouvel ADN

5. Le tampon

Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase (TrisHCl à pH basique 8,5 à 9). Il contient des cations bivalents Mg^{2+} , cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents Mg^{2+} et de cations monovalents (K^+ ou NH_4^+) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides.

• Les étapes de la PCR

1. La dénaturation

La première étape s'effectue à une température de 94°C, dite température de dénaturation (généralement 10 à 15 minutes). À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la réplication, est dénaturé : les liaisons hydrogène ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C et les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténares).

2. L'hybridation

La deuxième étape s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 60°C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogènes de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences monocaténares complémentaires de régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique.

La température d'hybridation est déterminée par la séquence et le nombre de bases dans les amorces.

La température d'hybridation (T_h) d'une amorce est en déduite à partir de la formule de Wallace pour la T_m (température de fusion) :

$$T_m = 4(C+G) + 2(A+T) ; T_h = T_m - 5 \text{ en } (^\circ\text{C})$$

3. L'élongation

La troisième étape s'effectue à une température de 72°C , dite température d'élongation. Elle permet aux polymérase de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

Un totale de 20 à 40 cycles est mené à bien, en fonction de l'abondance initiale de la séquence cible. Afin de programmer les changements de températures nécessaires, la PCR se déroule dans un bloc de chauffage contrôlé électriquement appelé cycleur thermique ou thermocycleur.

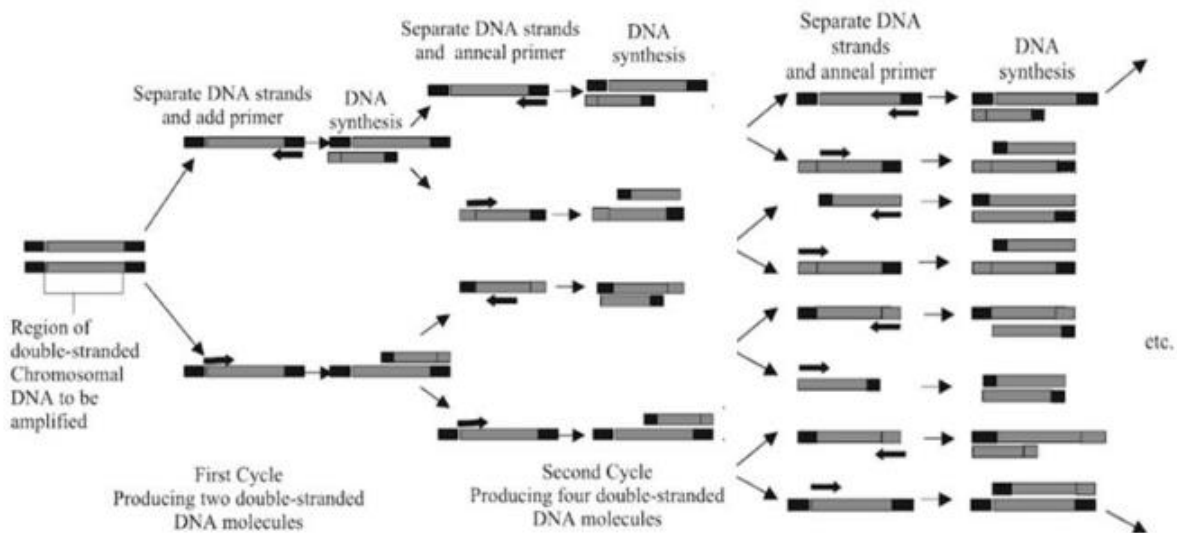


Figure : La réaction de polymérisation en chaine (PCR)



Figure : Le thermocycler

❖ Applications de la PCR :

La PCR est utilisée en routine comme outil de recherche et elle a permis d'améliorer la capacité d'étude des gènes. En fait, de nombreuses études en génétique moléculaire impliquent l'utilisation de la PCR à une étape au moins, normalement comme élément de la stratégie globale et en association avec d'autres techniques.

La PCR est utilisée dans la plupart des domaines de la biologie et de la médecine :

- les maladies héréditaires
- la recherche contre le cancer
- les sciences médico-légales
- les biotechnologies

III. La RT-PCR définition, principe et étapes

La RT-PCR est une variante extrêmement utile de la PCR standard qui permet l'amplification de transcrits d'ARNm spécifiques à partir de très petits échantillons biologiques. C'est la méthode la plus sensible pour détecter les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule.

Le principe consiste à extraire les ARN totaux des tissus étudiés et de les copier in vitro en ADNc simple-brin, grâce à l'action de la transcriptase inverse. Les molécules d'ADN obtenues servent de matrice à une réaction de PCR. Les fragments PCR obtenus après les cycles de PCR sont visualisés par électrophorèse sur gel.

De manière pratique, les dNTP, le tampon, la Taq polymérase, les amorces oligonucléotidiques, la transcriptase inverse (RT) et la matrice d'ARN sont ajoutés ensemble dans le tube réactionnel. La réaction est incubée à 37 ° C, ce qui permet à la RT de fonctionner et permet la synthèse d'une copie d'ADNc.

Une PCR standard est effectuée pour amplifier le produit d'ADNc, conduisant à la synthèse du second brin, puis à un double brin. Le choix de l'amorce pour la synthèse du premier brin dépend de l'expérience. Si une amplification de tous les ARNm dans l'extrait cellulaire est nécessaire, alors une amorce oligodT qui hybriderait toutes les queues poly A peut être utilisée. Si un ADNc spécifique est recherché, une amorce spécifique à la région codante peut être utilisée avec succès.

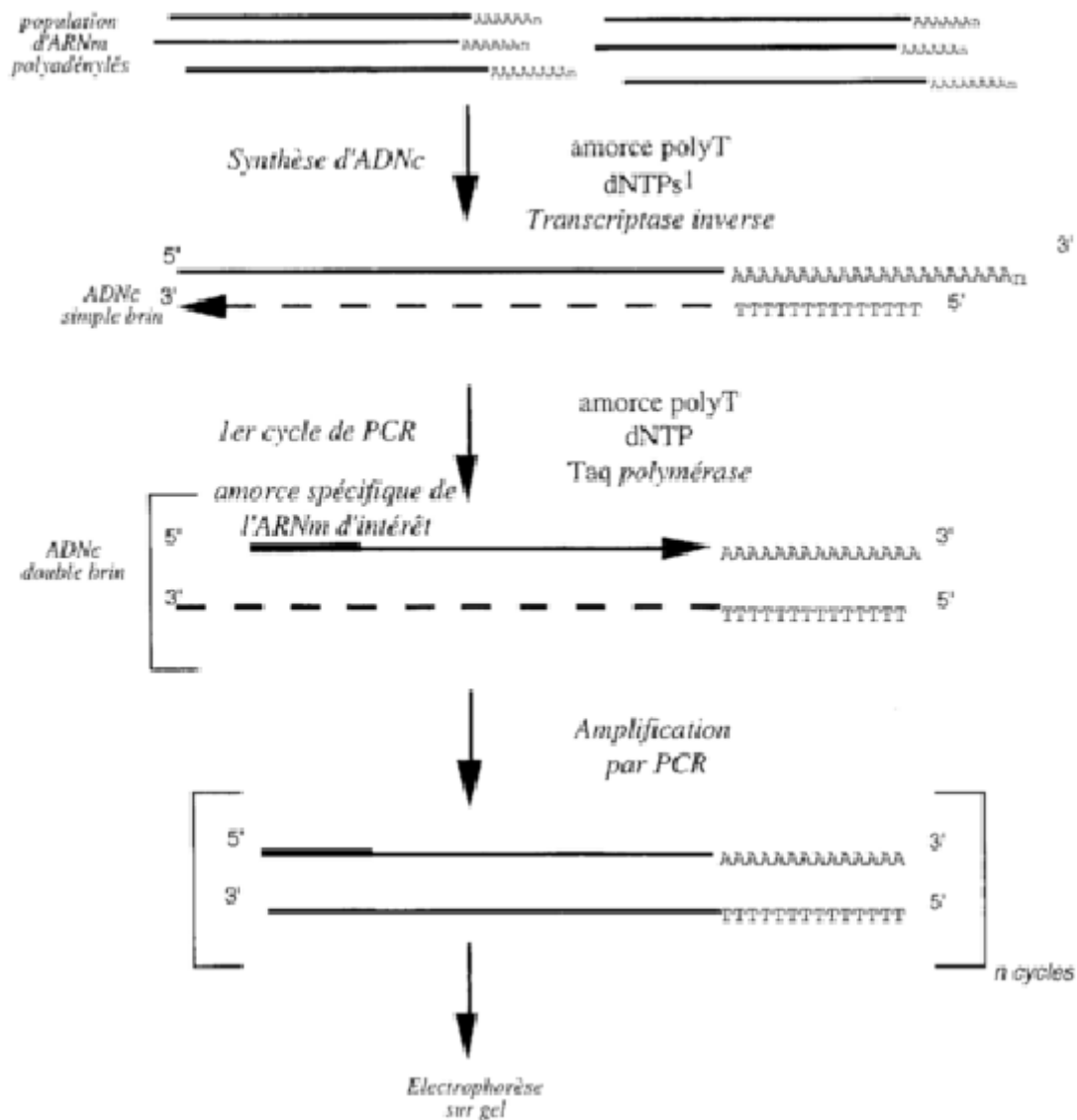


Figure : Principe de la RT-PCR

❖ Application de la RT- PCR :

La Reverse Transcription-PCR constitue une technique très sensible dans laquelle un nombre faible de copies de molécules d'ARN peut être détecté. Elle est largement utilisée dans le diagnostic des maladies génétiques et, semi-quantitativement, dans la détermination de l'abondance de différentes molécules d'ARN spécifiques dans une cellule ou un tissu afin de mesurer l'expression génique. Elle trouve aussi son application dans les domaines suivants :

- Insertion de gènes : La RT-PCR peut également être utilisée pour insérer des gènes eucaryotes dans des êtres procaryotes. Elle est couramment utilisée dans l'étude des génomes de virus à ARN
- Diagnostic des maladies génétiques
- Détection et étude du cancer : utiliser la RT-PCR dans la détection du cancer pour améliorer le pronostic et surveiller la réponse au traitement