

Chapitre / 11

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La PCR est une technique permettant d'amplifier in vitro des séquences d'ADN par répétition de réactions d'élongation en présence d'amorces nucléotidiques spécifiques et d'une ADN polymérase. La découverte d'une eubactérie thermophile vivant dans les sources chaudes (70 à 75 °C) du Yellowstone National Park, *Thermus aquaticus*, et l'utilisation par la suite de sa polymérase, stable jusqu'à des températures proches de 100 °C, est à l'origine du développement de cette technique.

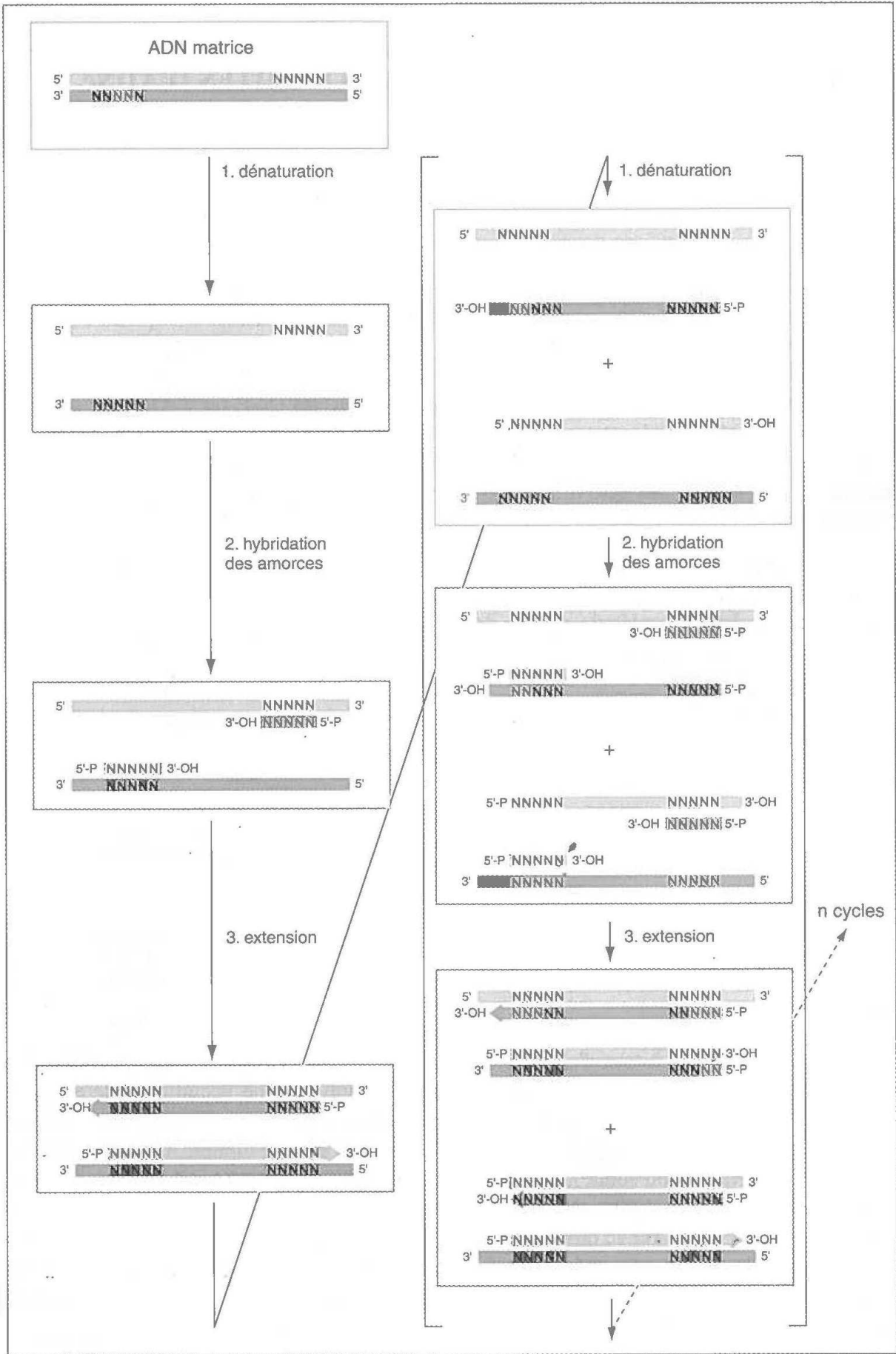
Principe

Le principe de l'amplification in vitro repose sur la répétition de trois processus :

- La dénaturation des deux brins d'ADN à température élevée (environ 95 °C) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténaïres ;
- L'hybridation (*annealing*) d'amorces oligonucléotidiques (ou *primers*) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (la température est alors ramenée à une valeur comprise entre 40 °C et 65 °C afin de permettre une bonne fixation des amorces) ;
- La réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase) à partir des amorces, réalisée à la température optimale de 72 °C.

Les produits de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur. Les amorces sont à nouveau hybridées avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à la polymérase. A chaque cycle, le nombre de copies du fragment d'ADN est doublé : 2^n molécules sont ainsi obtenues après n cycles, soit par exemple 1048576 molécules après vingt cycles.

Cette technique de PCR a littéralement révolutionné les recherches en biologie moléculaire et trouve de nombreuses applications aussi bien dans le clonage et l'étude de l'expression des gènes que dans la recherche d'un polymorphisme génétique.



SÉQUENÇAGE D'ADN

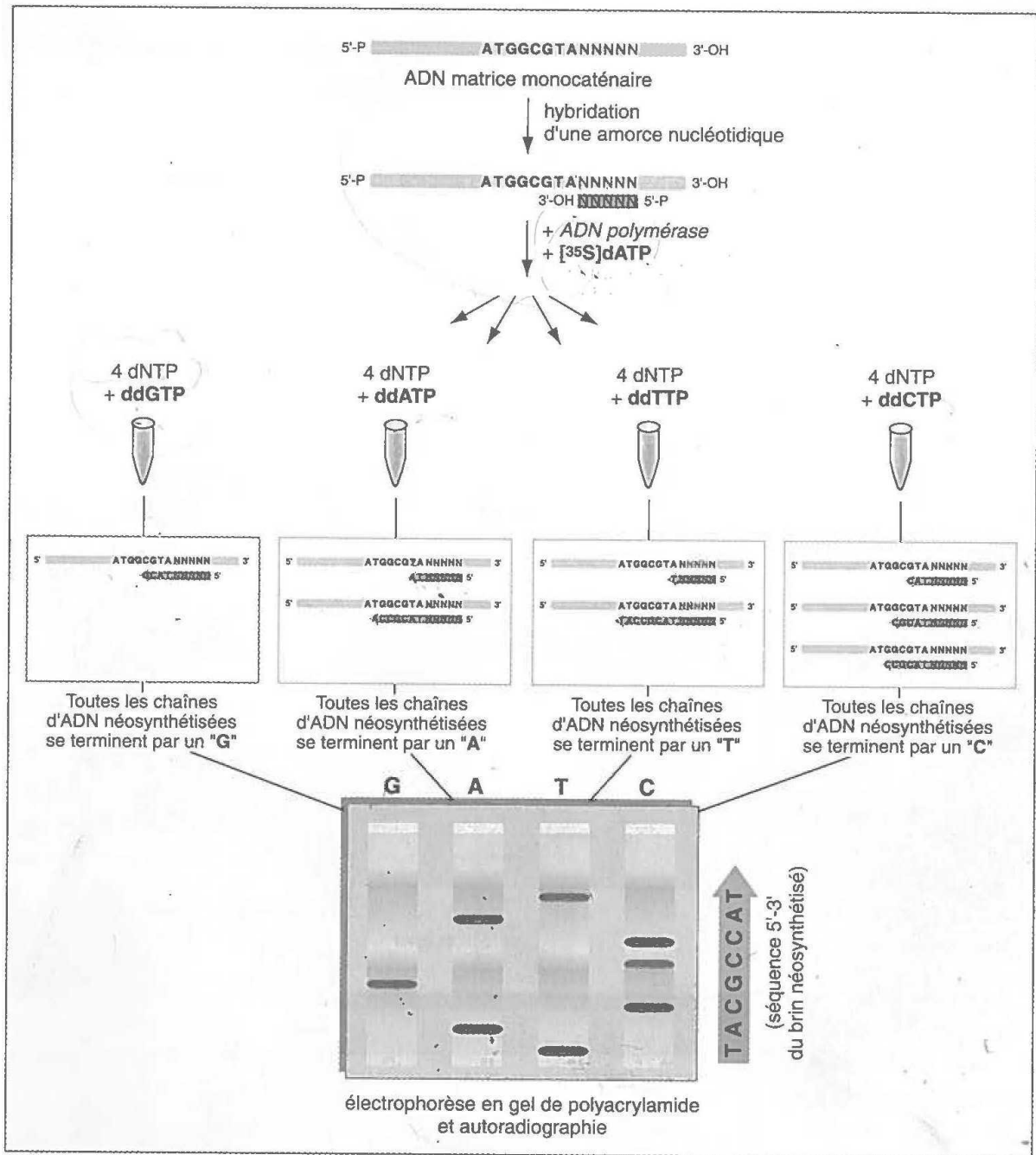
La caractérisation fine d'un gène passe par son séquençage, c'est-à-dire par la connaissance du nombre, de la nature et de l'ordre des nucléotides qui le composent. Cet agencement permet de connaître par exemple l'emplacement des différents sites de restriction du gène afin de mieux le manipuler. Enfin, la traduction *in silico* (par l'ordinateur) de la séquence nucléotidique en séquence d'acides aminés permet éventuellement de confirmer ou de proposer une fonction de la protéine codée par le gène.

Plusieurs techniques de séquençage d'ADN existent, mais nous ne décrivons ici que le principe d'un séquençage enzymatique par incorporation de didésoxynucléotides. Les didésoxynucleotides (ddNTPs) sont des désoxynucléotides modifiés, capables de s'intégrer dans une chaîne d'ADN en synthèse, mais empêchant l'incorporation du nucléotide suivant.

Principe

Une amorce nucléotidique est hybridée au fragment d'ADN monocaténaire dont on veut déterminer la séquence. A partir de l'extrémité 3'-OH de l'amorce appariée, une ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN matrice en présence de désoxynucléotides. L'un des désoxynucléotides doit être marqué (radioactif ou fluorescent). Le mélange est ensuite réparti dans 4 tubes marqués A, C, G et T. Chacun de ces tubes contient, en plus des dNTP, le ddNTP correspondant. Dans chaque tube, le ddNTP ajouté est incorporé dans les fragments en cours d'élongation.

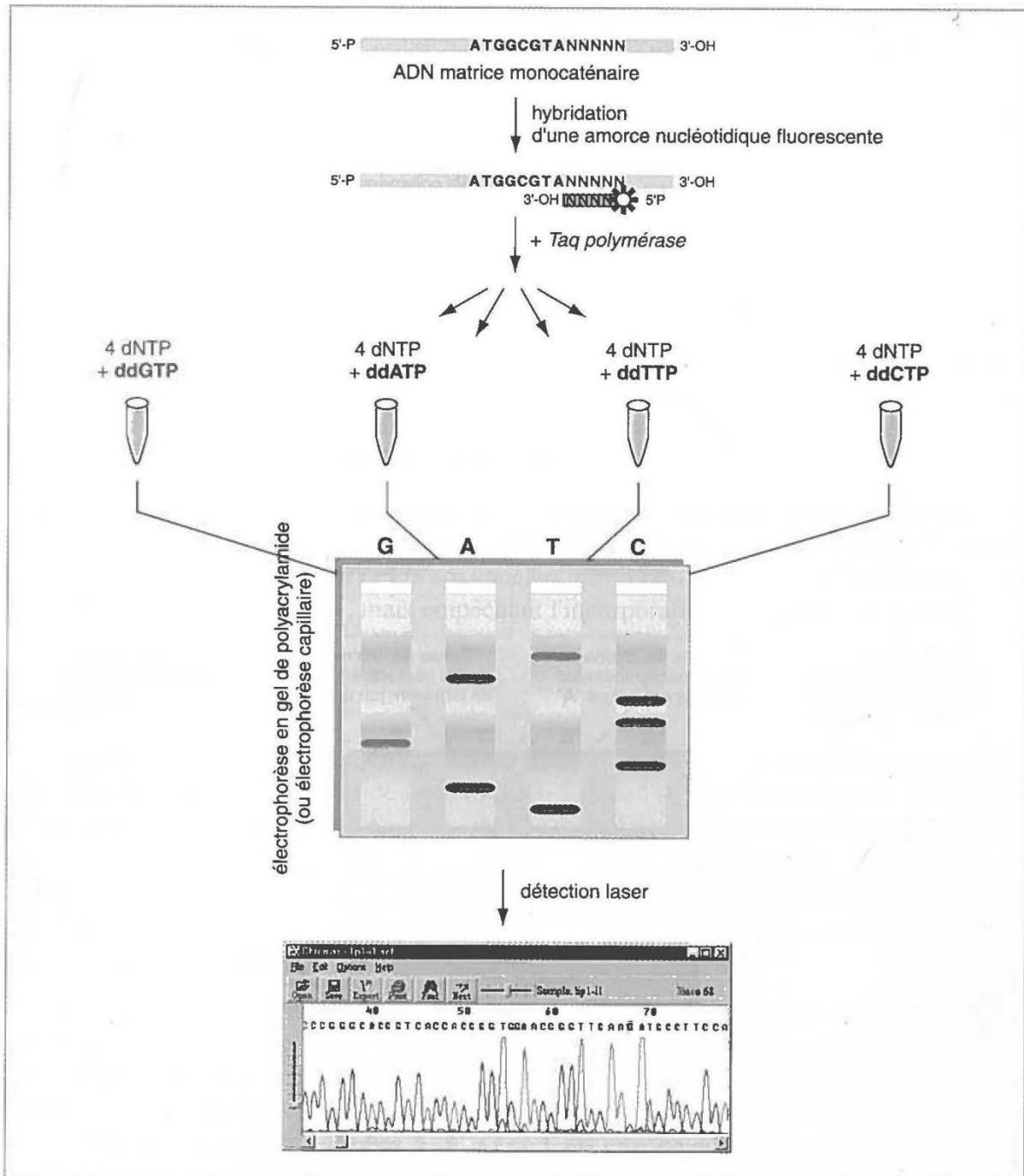
Chaque fois qu'un ddNTP est incorporé à une position, l'élongation de la chaîne est stoppée, ce qui génère un ensemble de molécules de tailles différentes, mais se terminant toutes par le même ddNTP. Si le dNTP et le ddNTP correspondant sont ajoutés en quantités adéquates, tous les fragments d'ADN synthétisés de novo et se terminant par ce ddNTP seront représentés. Le contenu des 4 tubes A, C, G et T est ensuite analysé par électrophorèse en gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (ou en électrophorèse capillaire). Les différents fragments marqués néosynthétisés migrent en fonction de leur taille et sont séparés à la base près. Une autoradiographie (cas des nucléotides radioactifs) ou une lecture en fluorescence (cas des nucléotides fluorescents) est réalisée après migration des molécules dans le gel. La séquence 5'-P→ 3'-OH du brin néosynthétisé peut être lue du bas vers le haut, en comparant les positions relatives des bandes dans les 4 pistes.



Séquençage automatique

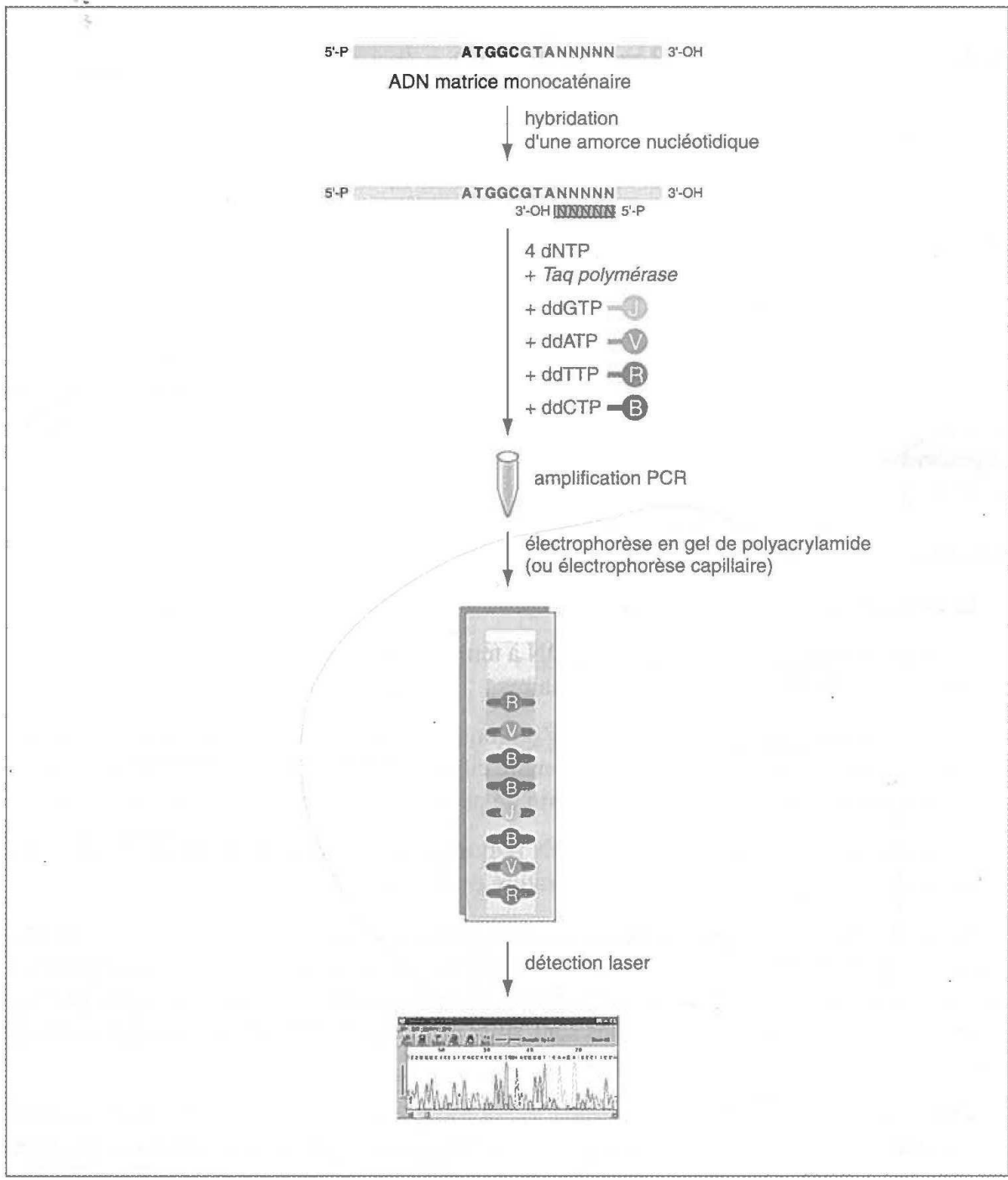
Lors de ces analyses, la lecture du gel et l'acquisition des données sont automatiques. Dans ce cas, le marquage des molécules se fait à l'aide de marqueurs fluorescents. Lors de la migration sur gel, les échantillons sont détectés à leur sortie par un laser qui identifie la molécule marquée. De nouveaux systèmes fondés sur l'électrophorèse capillaire permettent une meilleure automatisation du système : les échantillons sont préparés manuellement puis déposés sur un chargeur automatique. L'appareil prélève automatiquement l'échantillon et le place sur le capillaire. Il n'est plus nécessaire de préparer des gels d'acrylamide. Les

séquenceurs automatiques peuvent analyser en quelques heures jusqu'à 96 échantillons. L'automatisation peut également concerner la réaction de séquençage qui se fait de plus en plus par des robots couplés à des machines PCR.



Dans la méthode dite du *Dye primer*, l'amorce utilisée dans la réaction de séquence est marquée par un fluorophore (*dye*, colorant). La réaction est réalisée dans 4 tubes séparés, chacun contenant l'amorce couplée à un fluorophore en présence d'un ddNTP particulier correspondant. L'ADN polymérase utilisée pour la réaction est thermostable la

polymérisation se fait dans une machine de type PCR avec des cycles comprenant 3 étapes : dénaturation, hybridation et extension (voir Fiche 24). En fin de réaction, les fragments d'ADN dénaturés sont séparés sur un gel de polyacrylamide ou une matrice d'électrophorèse capillaire. Les fragments d'ADN sont analysés automatiquement à la sortie du gel par un système laser permettant d'identifier le fluorophore. Les résultats sont transférés sur ordinateur et un programme informatique permet d'avoir accès au chromatogramme correspondant à la séquence.



Dans la méthode dite du *Dye terminator*, ce sont les ddNTP qui sont marqués chacun avec un fluorophore spécifique. Tout se déroule selon le même principe que pour la méthode dite du *Dye primer* à la différence près que la réaction se fait dans un seul tube. L'avantage de la méthode dite du *Dye terminator* est que l'on peut utiliser n'importe quelle amorce pour la réaction de séquence. Il est donc possible de séquencer un long fragment d'ADN cloné en choisissant l'amorce suivante à partir de la fin de la réaction de séquence précédente. C'est la méthode actuellement la plus utilisée.