

Cour 02 : L'électrophorèse et la PCR

Dr. Somia MEDJANI

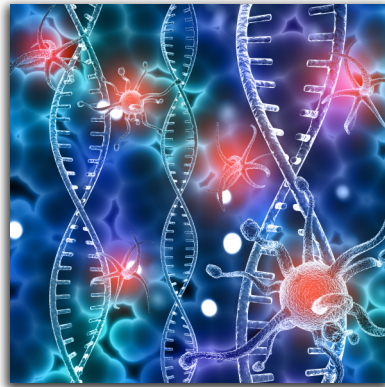
Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf Mila

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologies

Email : medjani.s@centre-univ-mila.dz

1.0 Février 2024



Centre universitaire Mila

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Objectifs | 3 |
| Introduction | 4 |
| I - Électrophorèse | 5 |
| 1. Définition et principe..... | 5 |
| 2. Exercice | 5 |
| 3. Les types d'électrophorèse | 6 |
| 4. Exercice | 6 |
| 5. La préparation d'un gel d'agarose | 6 |
| 6. Exercice | 7 |
| 7. Révélation de l'ADN | 7 |
| 8. Exercice | 7 |
| II - La PCR | 8 |
| 1. Définition et principe..... | 8 |
| 2. Exercice | 8 |
| 3. Les éléments de la PCR..... | 9 |
| 4. Exercice | 9 |
| 5. Les étapes de la PCR..... | 10 |
| 5.1. La dénaturation..... | 10 |
| 5.2. L'hybridation | 10 |
| 5.3. L'élongation | 10 |
| 6. Exercice | 11 |
| 7. Applications de la PCR..... | 11 |
| 8. Conclusion | 11 |
| 9. Exercice : Tester vos acquis..... | 12 |
| Solutions des exercices | 13 |
| Glossaire | 15 |
| Abréviations | 16 |
| Références | 17 |
| Bibliographie | 18 |
| Webographie | 19 |

Objectifs



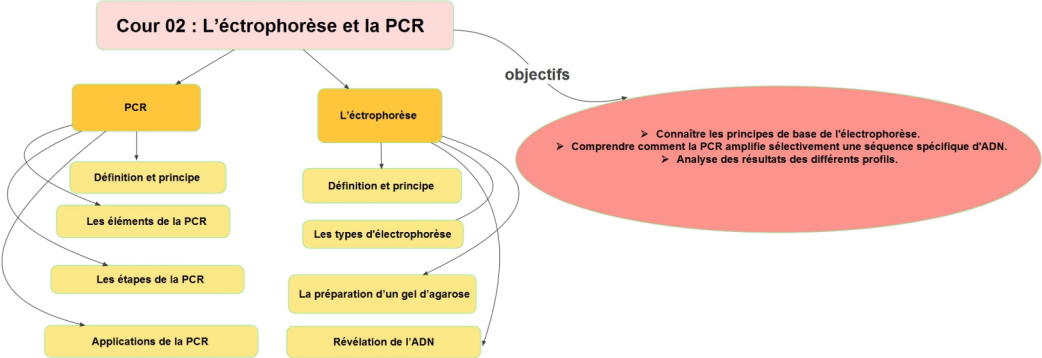
Ce cours vise à :

- Connaître les principes de base de l'électrophorèse et le rôle des champs électriques dans le déplacement des molécules chargées dans un gel.
- Comprendre comment la PCR amplifie sélectivement une séquence spécifique d'ADN.
- Analyser des résultats des différents profils.
- Évaluer les connaissances par des exercices.



Introduction

Les multiples applications scientifiques et technologiques impliquant l'étude de l'ADN font appel à différentes techniques. Parmi elles, l'**électrophorèse** et la **PCR**. Ces méthodes révolutionnaires ont transformé la manière dont les scientifiques étudient, analysent et manipulent l'ADN, ouvrant la voie à d'innombrables avancées dans divers domaines de la recherche biologique.



La carte mentale du cour

Électrophorèse



1. Définition et principe

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**.*

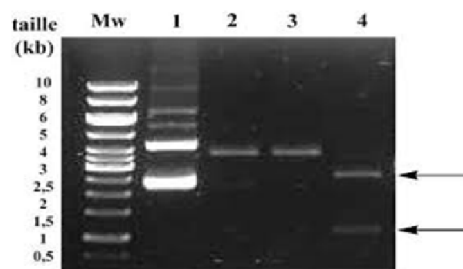
Comme les acides nucléiques sont chargés négativement (grâce au phosphate), le critère de la charge électrique n'est pas comptabilisé dans la séparation (toutes les molécules migrent vers l'anode +) donc les fragments de l'ADN sont séparés **uniquement** en fonction du poids moléculaire.

*En milieu basique, les fragments d'ADN sont chargés **négativement**.** Placé dans un champ électrique, ils vont donc se 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 2%) : avec l'utilisation de marqueur de taille « **Low DNA** ». Le marqueur de taille nous permet, selon la migration de connaître la taille de notre ADN.



Un profil d'électrophorèse avec un marqueur de taille de 1 Kb

2. Exercice

[solution n°1 p. 13]

Quel est le principe de base de l'électrophorèse ?

- Séparation des molécules en fonction de leur masse moléculaire.
- Séparation des molécules en fonction de leur charge électrique.
- Séparation des molécules en fonction de leur couleur.

3. Les types d'électrophorèse

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 :

1. **Le bleu de bromophénol (violet)** migre avec les fragments de petites tailles (donc plus vite).
2. **Le xylène cyanol** (bleu turquoise) migre avec les fragments de grande taille.

4. Exercice

[solution n°2 p. 13]

Quel est le rôle du gel d'agarose dans l'électrophorèse ?

- Amplifier des fragments d'ADN.
- Séparer les protéines.
- Servir de matrice pour la séparation des acides nucléiques.

5. La préparation d'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 (-), car l'ADN est chargé négativement et migrera vers l'anode (+). 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).
 - 1 µl de tampon (BBT) + 4 µl de Low DNA Mass Ladder.

[cf. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE | Séparation et analyse des acides nucléiques]]

6. Exercice

Quelle est la fonction du tampon de migration dans la préparation d'un gel d'agarose ?

- Colorer les échantillons.
- Fournir une source de charge électrique.
- Amplifier les fragments d'ADN.

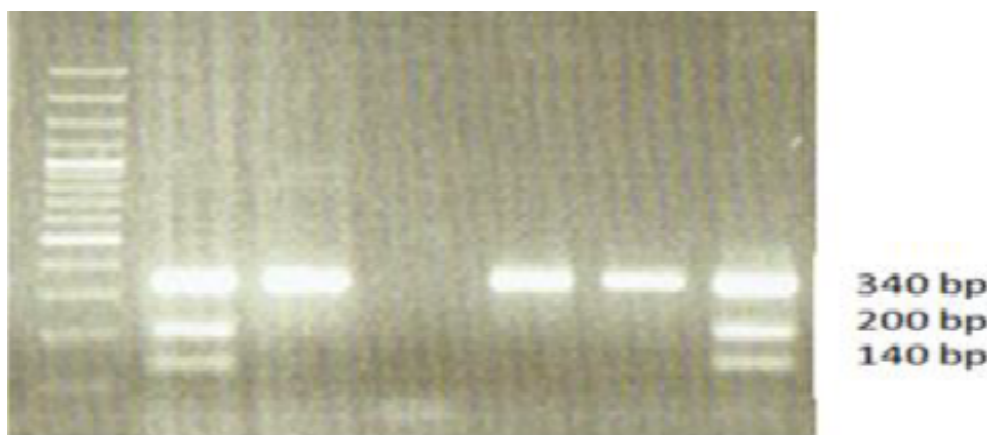
7. Révélation de l'ADN

Les bandes d'ADN sur un gel de polyacrylamide ou d'agarose **ne sont pas visibles** si l'ADN ne sont pas **marquées** ou **colorées**.* 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.



Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose

8. Exercice

Quelle technique permet de documenter et d'analyser les images des gels d'électrophorèse ?

- La spectrophotométrie.
- La PCR en temps réel.
- L'imagerie UV.

La PCR



1. Définition et principe

*L'amplification en chaîne par polymérase ou réaction en chaîne par polymérase (PCR). 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} à la puissance 30 copies de cibles initialement présentes).*

Les cycles de la PCR

| Étape | Objectif | Réactifs/Composants | Conditions | Enzyme impliquée |
|---------------------|---|---|--------------------------------|------------------|
| Dénaturation | Séparation des brins d'ADN double hélice. | ADN cible, amorces, tampon de PCR, ADN polymérase | Température élevée (90-98 °C) | ADN polymérase |
| Hybridation | Liaison des amorces complémentaires aux séquences cibles. | Amorces | Température basse (40-60 °C) | ADN polymérase |
| Élongation | Synthèse des brins complémentaires d'ADN. | Nucléotides, ADN polymérase | Température moyenne (70-75 °C) | ADN polymérase |

2. Exercice

[solution n°5 p. 14]

Quelle est la fonction principale de la PCR ?

- Séparer des molécules en fonction de leur taille.
- Amplifier sélectivement des fragments d'ADN.
- Purifier des protéines.

3. 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. Les amorces oligonucléotides s'hybrident aux extrémités de la séquence qui va être amplifiée, il faut donc connaître les extrémités des séquences nucléotidiques 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.
- Eviter les palindromes.
- Equilibre 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 quatre 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.

[cf. Techniques de PCR]

4. Exercice

[solution n°6 p. 14]

Quelle est la fonction de l'ADN polymérase dans la PCR ?

- Dénaturer l'ADN.
- Amplifier sélectivement des fragments d'ADN.
- Hybridiser les brins d'ADN.

5. Les étapes de la PCR

5.1. 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).

5.2. 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) :

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

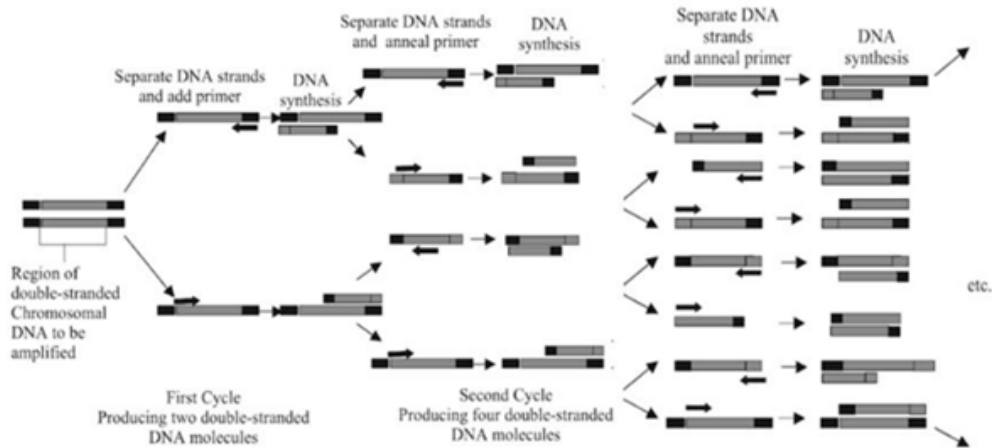
5.3. L'élongation

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.



Le thermocycler



La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

6. Exercice

[solution n°7 p. 14]

Quelle est l'étape pendant laquelle les températures élevées sont utilisées pour séparer les brins d'ADN dans la PCR ?

- Élongation.
- Hybridation.
- Dénaturation.

7. 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

8. Conclusion

En conclusion, l'électrophorèse et la PCR demeurent des outils indispensables pour les chercheurs en biologie moléculaire. Leur histoire illustre comment des idées novatrices peuvent transformer la recherche scientifique et ouvrir de nouvelles perspectives.

En combinant l'électrophorèse et la PCR, les scientifiques ont développé des protocoles sophistiqués pour étudier la diversité génétique, diagnostiquer des maladies, et même résoudre des crimes. Ces techniques ont été au cœur des progrès en génomique, en médecine personnalisée, et ont permis des découvertes importantes dans de nombreux domaines scientifiques.

Cependant, le domaine continue d'évoluer. Les technologies de *séquençage de nouvelle génération** (NGS*) ont repoussé les limites de l'analyse génétique, mais elles dépendent souvent d'une préparation d'échantillons initiale basée sur l'électrophorèse.

9. Exercice : Tester vos acquis

Exercice

La technique de PCR est une amplification en chaîne par la phosphorylase ?

- vrai
- faux

Exercice

Quel est le sens de l'élongation ?

Exercice

Les types de gel les plus couramment utilisés en électrophorèse des acides nucléiques sont gel _____, gel _____

Exercice

Les amorces utilisées dans la PCR sont des oligonucléotides _____

Solutions des exercices



Solution n°1

[exercice p. 5]

Quel est le principe de base de l'électrophorèse ?

- Séparation des molécules en fonction de leur masse moléculaire.
- Séparation des molécules en fonction de leur charge électrique.
- Séparation des molécules en fonction de leur couleur.

Solution n°2

[exercice p. 6]

Quel est le rôle du gel d'agarose dans l'électrophorèse ?

- Amplifier des fragments d'ADN.
- Séparer les protéines.
- Servir de matrice pour la séparation des acides nucléiques.

Solution n°3

[exercice p. 7]

Quelle est la fonction du tampon de migration dans la préparation d'un gel d'agarose ?

- Colorer les échantillons.
- Fournir une source de charge électrique.
- Amplifier les fragments d'ADN.

Solution n°4

[exercice p. 7]

Quelle technique permet de documenter et d'analyser les images des gels d'électrophorèse ?

- La spectrophotométrie.
- La PCR en temps réel.
- L'imagerie UV.

Solution n°5

[exercice p. 8]

Quelle est la fonction principale de la PCR ?

- Séparer des molécules en fonction de leur taille.
- Amplifier sélectivement des fragments d'ADN.
- Purifier des protéines.

Solution n°6

[exercice p. 9]

Quelle est la fonction de l'ADN polymérase dans la PCR ?

- Dénaturer l'ADN.
- Amplifier sélectivement des fragments d'ADN.
- Hybridiser les brins d'ADN.

Solution n°7

[exercice p. 11]

Quelle est l'étape pendant laquelle les températures élevées sont utilisées pour séparer les brins d'ADN dans la PCR ?

- Élongation.
- Hybridation.
- Dénaturation.

Solution n°8

[exercice p. 12]

Exercice

La technique de PCR est une amplification en chaîne par la phosphorylase ?

- vrai
- faux

Exercice

Quel est le sens de l'élongation ?

5' → 3'

Exercice

Les types de gel les plus couramment utilisés en électrophorèse des acides nucléiques sont gel d'acrylamide, gel d'agarose

Exercice

Les amorces utilisées dans la PCR sont des oligonucléotides monobrin.

Glossaire



Amplicon

est un morceau d'ADN ou d'ARN qui est la source et/ou le produit d'événements d'amplification ou de réplication.

Séquençage de nouvelle génération

est une méthodologie moléculaire qui permet le séquençage rapide de milliers à des millions de molécules d'ADN ou d'ARN simultanément, en déterminant l'ordre unique et spécifique des bases des acides nucléiques.

Thermus aquaticus

est une espèce de bactérie pouvant tolérer de fortes températures. À Gram négatif et aérobie, elle fait partie des bactéries thermophiles appartenant au phylum des Deinococcus-Thermus.

Abréviations



ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
NGS : Next-Generation Sequencing
PCR : polymerase chain reaction

Références



- Electrophoresis: Theory, Methods, and Applications* par Barry L. Karger, Pierre E. Gleason, et Michael Righetti.
Ce livre est une ressource complète couvrant la théorie, les méthodes et les applications de l'électrophorèse.
- Manuel de biologie moléculaire : Techniques fondamentales de génomique et de génétique moléculaire* par Andreas Hoffmann
Ce manuel couvre diverses techniques moléculaires, y compris l'électrophorèse, avec des protocoles détaillés.
- PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* par Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., et White, T. J.
Ce livre est un guide complet sur les protocoles de PCR avec des détails sur les différentes variantes de la technique.
- Polymerase Chain Reaction (PCR): The Technique and Its Applications* par Kary B. Mullis et F. A. Falouty, F. A. (1987).
C'est le document original qui décrit la technique de PCR et son application.

Bibliographie



Ahouansou D-J., 2010. Etude comparative de deux techniques d'électrophorèse des protéines sériques : sur gel d'agarose Hydrasys® et en capillaire Capillarys® Université Mohammed v rabat.

Asensio Gil L. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. Trends in Food Science & Technology 18 (11) : 558-566.

Webographie



<https://www.humeau.com/equipement/electrophorese.html>

<https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/l-electrophorese>