

LA TECHNIQUE D'AMPLIFICATION *IN VITRO* PCR

La PCR ou Polymerase Chain Reaction (la réaction en chaîne par polymérase) est une technique qui permet d'amplifier l'ADN ou l'ARN *in vitro*. Elle a été développée par **Kary Bank Mullis** (prix Nobel de chimie en 1993).

La PCR se base sur le principe suivant :

- Connaître d'abord les fragments (20 nucléotides) qui encadrent la séquence d'ADN à amplifier.
- Synthèse de séquences complémentaires à ces fragments : ce sont les amorces oligonucléotidiques.
- L'ADN polymérase commence la synthèse des brins complémentaires grâce aux amorces et le nombre de copies de la séquence d'ADN est doublé pour chaque réplication.

6-1/ Réalisation de la PCR : L'ADN à amplifier est chauffé à une température supérieure à sa T_m (en pratique, environ 95°C) pour séparer les deux brins. Les éléments nécessaires à cette réplication sont présents dans le tube, à savoir :

1. **l'enzyme Taq polymérase** : c'est une polymérase thermostable, extraite d'une bactérie (*Thermus aquaticus*) des sources chaudes (80-90°C). D'autres enzymes thermorésistantes sont actuellement utilisées et proviennent d'autres microorganismes : la **pfu** extraite de *Pyrococcus furiosus* et **Vent** extraite de *Thermococcus litoralis*.
2. **les nucléotides triphosphates** : Au départ on utilisait des concentrations qui allaient jusqu'à 1,5 mM. Mais cette concentration cause des amplifications parasites dues aux erreurs de réplication. Les concentrations de 20 à 200 μM sont de plus en plus utilisées.
3. **les amorces** : ces oligonucléotides initient le travail de la Taq polymérase. Leur T_m est de 5°C de moins que la température d'hybridation. Généralement, ce sont les valeurs comprises entre 55 et 70°C qui donnent de bons résultats avec des concentrations de 0,1 à 0,2 μM .
4. **les ions magnésium** : A des concentrations de 0,5 à 2,5 mM, ils servent de stabilisateurs pour les nucléotides et activent l'enzyme.

Etape 1 : Une fois tous les éléments rassemblés, l'ADN à amplifier est chauffé jusqu'à 90°C pendant 30 secondes à une minute pour séparer ses deux brins.

Etape 2 : Le tube est refroidi à environ 50°C (température calculée en fonction de la séquence des amorces). Cette température va permettre l'hybridation des deux brins d'ADN avec les deux amorces.

Etape 3 : synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase.

Remarque : les trois étapes forment un cycle. La PCR se fait entre 30 et 40 cycles.

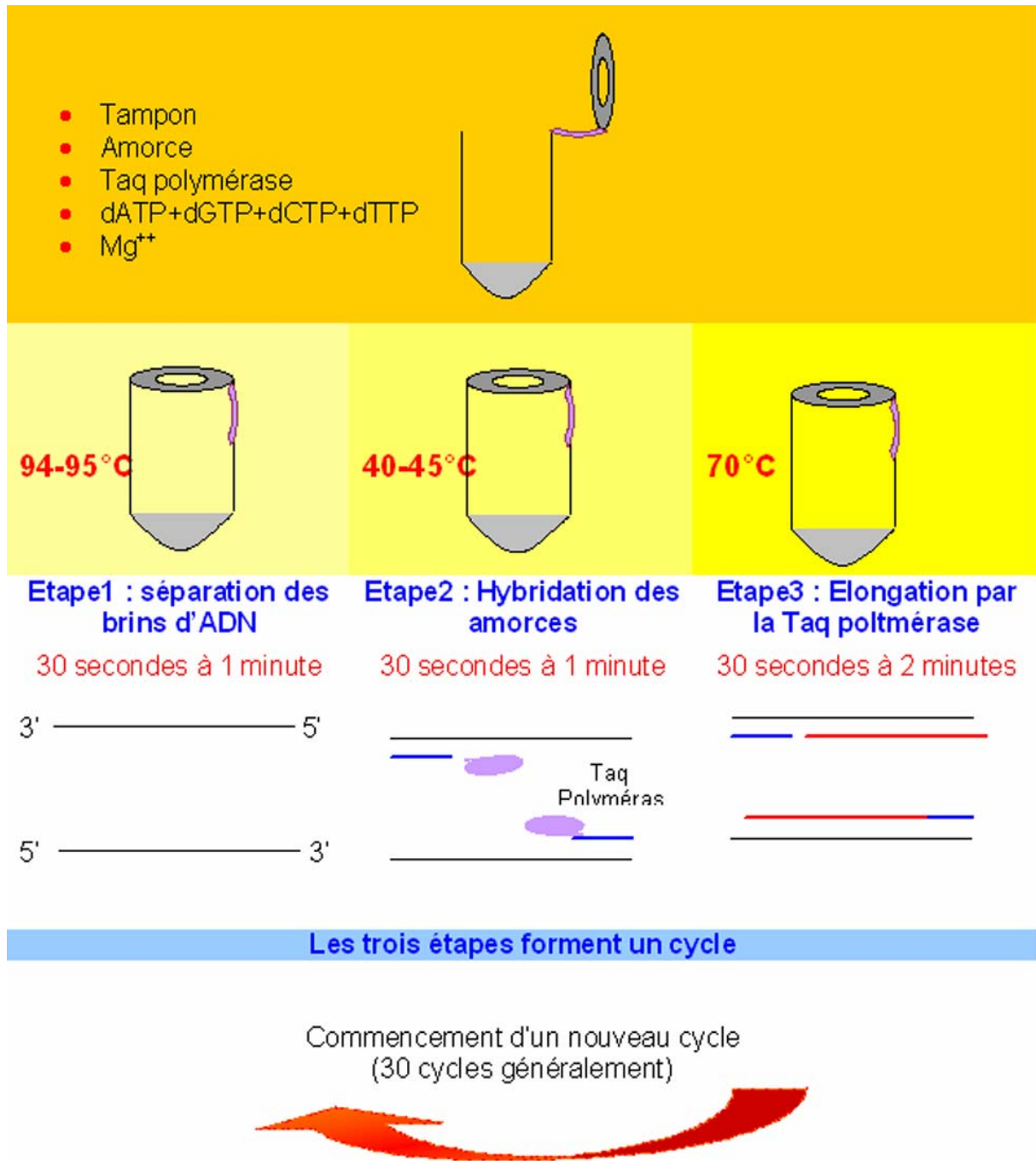


Figure N°20 : La technique d'amplification PCR

Le nombre de copies de la séquence à amplifier dépend du nombre de cycles à réaliser. Puisque à chaque cycle, le nombre de copies est multiplié par deux, on aura alors un nombre égal à 2^n après n cycles.

Remarque : Concernant la troisième étape de chaque cycle, des durées de plusieurs minutes peuvent être nécessaires pour les fragments plus longs (2 à 3 Kb, ou les fragments de 3 à 40 Kb dans la longue PCR « ou long PCR ») : surtout les fragments riches en G et C.

Tableau N° : Exemples de cycles PCR en fonction des fragments

Nombre de copies de la cible	Nombre de cycles
10^5	25 à 30
10^4	30 à 35
10^2 à 10^3	35 à 40
1 à 10^2	40 à 45

En théorie, le nombre de copies obtenues devrait être de 2^n , n étant le nombre de cycles. Dans la pratique, le rendement est beaucoup plus faible (85%) et le nombre de copies (si le rendement reste constant tout au long de l'amplification) est de $(1+R)^n$; R étant le rendement et n, le nombre de cycles.

6-2/ Analyse du génome : Le Southern blotting

Cette technique permet d'analyser le génome et ses modifications (mutations). Il suffit de posséder des séquences connues pour les hybrider avec l'ADN à analyser.

Elle est donc capable de détecter un fragment de restriction dans un mélange complexe (mixture) formé de plusieurs fragments produits par clivage enzymatique entier de la totalité du génome. On peut utiliser une ou plusieurs enzymes de restriction pour réaliser ce clivage qui, généralement peut donner jusqu'à 10^6 fragments en cas d'ADN génomique humain.

Les fragments de restriction présents dans le gel sont dénaturés grâce à une solution alcaline puis transférés sur une feuille de nitrocellulose ou sur une membrane en nylon. Ce transfert se fait par blotting.

Bien que tous les fragments ne soient pas séparés complètement par l'électrophorèse sur gel, un fragment individuel à l'intérieur d'une des bandes de migration peut être identifié par hybridation.

Réalisation de la technique :

1. L'ADN à analyser est soumis à l'action des enzymes de restriction, puis coloration au bleu de bromophénol.
2. Prélèvement des échantillons pour une électrophorèse en gel d'agarose (90 mV/1h) : les fragments les plus courts migrent vers l'anode plus vite que les fragments longs.
3. Coloration de l'ADN par le bromure d'éthidium : une couleur rougeâtre est révélée sous UV (254 nm).
4. L'ADN bicaténaire est soumis à un traitement alcalin pour séparer les deux brins.
5. On pose une membrane de nitrocellulose ou de nylon sur le gel d'agarose, puis sur cette membrane est placé du papier absorbant. Ceci permet aux brins monocaténaires de passer du gel vers la membrane par simple capillarité : c'est le **blotting** ou buvardage.
6. La membrane, devenue une copie de migration électrophorétique du gel d'agarose, est soumise soit aux UV afin de lier l'ADN simple brin à la membrane (liaisons covalentes) dans le cas de membrane de nylon, soit à la chaleur dans le cas d'une membrane de nitrocellulose.
7. On place la membrane dans un bain d'une solution d'hybridation qui contient des sondes radioactives d'ADN monocaténaires. Celles-ci vont s'hybrider (en cas de compatibilité) spécifiquement avec les fragments monobrans de l'ADN contenu dans la membrane de nitrocellulose. Après hybridation, la sonde en excès est éliminée de la membrane par différents lavages.
8. Un film photographique est placé sur cette membrane. Les radiations émises par les sondes marquées permettent l'impression sur le film photographique : c'est l'autoradiographie. Grâce à ce film on pourra visualiser la localisation de l'hybridation sous forme d'empreintes génétiques.

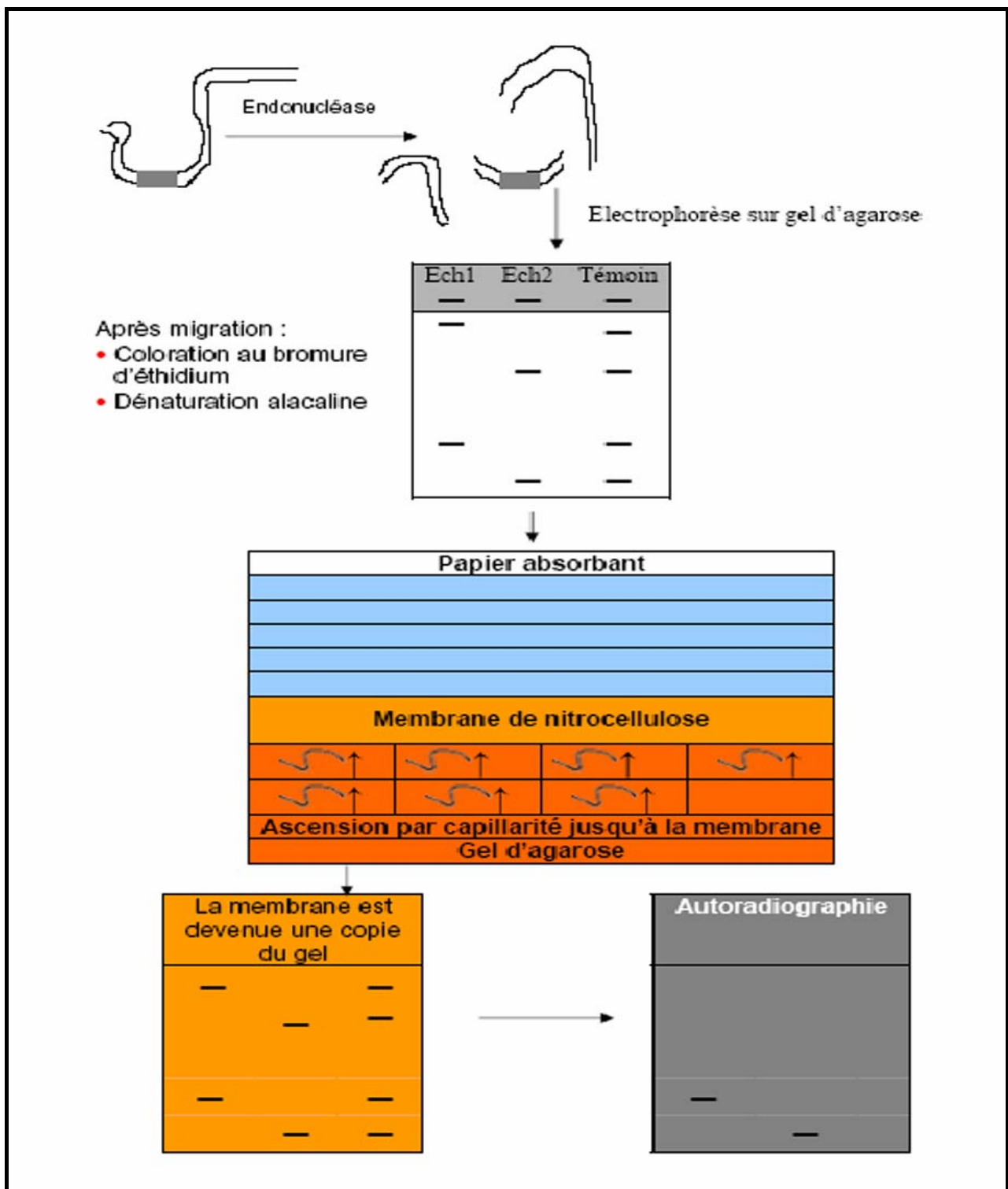


Figure N°21 : Technique de Southern-Blot