

*Code Bibliothèque FS : .....*

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université M'Hamed BOUGARA Boumerdes**



**Faculté des Sciences**  
**Département de BIOLOGIE**

**Domaine: SNV**  
**Filière: Sciences Biologiques**

**Polycopié de Cours de**  
**(Méthodes de Biologie Moléculaire)**

**Réalisé par :**  
**AIT-IDIRDjouher (MCA)**

**Ce polycopié est destiné aux étudiants inscrits en Licence L3**  
**Spécialité : Biologie Moléculaire**

**2024/2025**

## SOMMAIRE

<b>Chapitre I : ORGANISATION D'UN LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre II : EXTRACTION- PURIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES.....</b>	<b>2</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>2</b>
<b>1) Extraction d'ADN génomique .....</b>	<b>2</b>
1.1) Origine des échantillons biologiques .....	2
1.2) Etapes communes d'une extraction d'ADN.....	3
1.3) Extraction de l'ADN génomique à partir du sang total.....	3
1.3.1) Purification et lyse des leucocytes.....	3
1.3.2) Méthodes d'extraction .....	5
1.3.2.1) Méthodes utilisant des solvants organiques : Méthode au phénol-chloroforme.....	5
1.3.2.2) Méthodes utilisant des solvants non organiques : Méthode de salting out.....	5
1.3.2.3) Méthode d'extraction d'ADN sur phase solide : chelex 100.....	6
<b>2) Extraction de l'ARN.....</b>	<b>7</b>
2.1) Conservation de l'échantillon biologique avant extraction des ARN.....	7
2.2) Préparation de l'ARN.....	7
2.2.1) Méthodes basées sur l'utilisation de guanidine.....	7
2.2.1) Extraction et purification des ARN messagers.....	8
<b>3) Contrôle qualitatif des acides nucléiques extraits.....</b>	<b>8</b>
3.1) ADN génomique.....	8
3.2) ARN total.....	9
Références bibliographiques.....	9
<b>Chapitre III :SEPARATION DES ACIDES NUCLEIQUES.....</b>	<b>10</b>
<b>1) Principe de séparation des acides nucléiques.....</b>	<b>10</b>
<b>2) Gel d'agarose.....</b>	<b>11</b>
2.1) Propriétés d'un gel d'agarose.....	11
2.2) Paramètres de migration.....	12
<b>3) Gel de polyacrylamide.....</b>	<b>13</b>
3.1) Polymérisation du gel de polyacrylamide.....	14
<b>4) Préparation des gels.....</b>	<b>15</b>
<b>5) Tampon de charge (Loading buffer).....</b>	<b>15</b>
<b>6) Visualisation des acides nucléiques.....</b>	<b>16</b>
Références bibliographiques.....	16
<b>Chapitre IV : AMPLIFICATION GENIQUE.....</b>	<b>17</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>17</b>
<b>1) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) classique.....</b>	<b>17</b>
1.1) Principe de la PCR.....	18
1.2) Les composants de la PCR et leur influence sur l'amplification.....	20
1.2.1) Concentration en ions magnésium.....	20
1.2.2) Nucléotides (dNTP).....	20
1.2.3) Amorces.....	20
1.2.4) ADN polymérase.....	21
1.2.5) L'ADN matrice (template).....	22
<b>2) Les différents types de PCR.....</b>	<b>23</b>
2.1) Reverse transcription-PCR (RT-PCR).....	23
2.1.1) Principe de la RT-PCR.....	23
2.1.2) Amorces utilisées au cours de la rétrotranscription.....	23
2.1.3) L'enzyme : la transcriptase inverse.....	24

2.1.4)	Déroulement de la Réaction RT-PCR.....	25
2.1.5)	Applications de la RT-PCR.....	26
2.2)	PCR spécifique d'allèles/PCR-ARMS.....	26
2.2.1)	Principe.....	26
2.2.2)	Méthodologie.....	27
2.3)	Amplification par PCR en temps réel (rt-PCR).....	27
2.3.1)	Principe de rt-PCR.....	27
2.3.2)	Méthodologie.....	27
2.3.3)	Cinétique de la rt-PCR.....	28
2.3.4)	Paramètres de la courbe de fluorescence.....	28
2.3.5)	Les systèmes de détection en temps réel.....	29
2.3.6)	Variante de la PCR en temps réel : RT-PCR en temps réel.....	30
2.3.7)	Applications de la PCR et temps réel.....	31
	Références bibliographiques.....	31
	<b>Chapitre V : METHODES DE DETECTION DES VARIATIONS DE SEQUENCES</b>	<b>32</b>
	<b>NUCLEOTIDIQUES</b> .....	
	Introduction.....	32
<b>1)</b>	<b>Notion de polymorphismes</b> .....	32
1.1)	Types de polymorphismes.....	34
1.1.1)	Polymorphisme bi-allélique.....	34
1.1.2)	Polymorphismes de répétition ou polymorphismes multi-alléliques.....	34
1.2)	Conséquences des polymorphismes.....	35
1.3)	Intérêt des polymorphismes.....	35
<b>2)</b>	<b>Principales techniques de détection des variations nucléotidiques</b> .....	35
2.1)	Détection des mutations connues.....	36
2.1.1)	Méthode de RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ).....	36
2.1.2)	Technique de Southern Blot.....	38
2.2)	Détection des mutations inconnues.....	40
2.2.1)	Technique de D.G.G.E ( <i>Denaturing Gel Gradient Electrophoresis</i> ).....	40
2.2.2)	Technique de SSCP ( <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> ).....	42
	Références bibliographiques.....	43
	<b>Chapitre VI : TECHNIQUES DE SEQUENÇAGE DE L'ADN</b> .....	<b>44</b>
	Introduction.....	44
<b>1)</b>	<b>Intérêt général du séquençage</b> .....	44
<b>2)</b>	<b>Techniques de séquençage</b> .....	45
2.1)	Méthode de Maxam-Gilbert.....	45
2.2)	Méthode de Sanger.....	45
2.2.1)	Principe de la technique du séquençage par la méthode de Sanger.....	45
2.2.2)	Méthode automatisée de Sanger.....	46
<b>3)</b>	<b>Electrophorèse capillaire</b> .....	48
	Références bibliographiques.....	49

## **Chapitre I : ORGANISATION D'UN LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**

### **Plan du cours**

Introduction

#### **1) Présentation du matériel d'un laboratoire en général**

1.1) Présentation du matériel spécifique aux manipulations de l'ADN

#### **2) Organisation du laboratoire de biologie moléculaire**

2.1) Identification des différentes zones de manipulation

2.1.1) Manipulations sans risque

2.1.2) Poste pour l'électrophorèse de l'ADN

2.1.3) Zone de visualisation de l'ADN sur gel d'agarose.

#### **3) Les différents types de risque**

3.1) Risques chimiques et prévention

3.2) Risques physiques et prévention

3.3) Risques biologiques

#### **4) Consignes de sécurité pour les étudiants**

### **Remarque**

Le contenu de ce chapitre est traité sous forme d'un TP (TP1 d'initiation).

## Chapitre II : EXTRACTION- PURIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES

### Objectifs du cours

- a) Comprendre les principes des différentes techniques d'extraction des acides nucléiques.
- b) Comprendre les différences entre l'extraction de l'ADN génomique et l'extraction de l'ARN total, à partir du sang total.
- c) Comprendre le rôle de chaque réactif utilisé dans les différentes méthodes d'extraction des acides nucléiques (notamment l'action des détergents et de la protéinase K).
- d) Différencier entre les termes : dénaturation, déprotéinisation, purification, précipitation.
- e) Insister sur les précautions à prendre afin de neutraliser l'action des enzymes : les DNases et les RNases.
- f) Contrôle qualitatif et quantitatif de l'acide nucléique extrait.

### Plan du cours

Introduction

#### **1) Extraction d'ADN génomique**

- 1.1) Origine des échantillons biologiques
- 1.2) Etapes communes d'une extraction d'ADN
- 1.3) Extraction de l'ADN génomique à partir du sang total
  - 1.3.1) Purification et lyse des leucocytes
  - 1.3.2) Méthodes d'extraction
    - 1.3.3.1) Méthodes utilisant des solvants organiques : Méthode au phénol-chloroforme
    - 1.3.3.2) Méthodes utilisant des solvants non organiques : Méthode de salting out
    - 1.3.3.3) Méthode d'extraction d'ADN sur phase solide : chelex 100

#### **2) Extraction de l'ARN**

- 2.1) Conservation de l'échantillon biologique avant extraction des ARN
- 2.2) Préparation de l'ARN
  - 2.2.1) Méthodes basées sur l'utilisation de guanidine
  - 2.2.2) Extraction et purification des ARN messagers

#### **3) Contrôle qualitatif des acides nucléiques extraits**

- 3.1) ADN génomique
- 3.2) ARN total

### Introduction

L'extraction d'ADN se fait dans le but d'effectuer une analyse génétique. Dans le domaine médical, l'ADN obtenu va servir dans le diagnostic moléculaire des maladies génétiques (héréditaires et cancers) et des maladies infectieuses.

L'ADN va servir également dans divers domaines, notamment les sciences médico-légales (pour les enquêtes criminelles), la détermination de la paternité, le génie génétique pour l'amélioration des plantes par exemple et le clonage.

L'extraction de l'ARN est nécessaire dans l'étude des profils d'expression de certains gènes (cytokines, protéines de l'inflammation...) et le diagnostic de certaines infections virales comme le COVID-19.

#### **1) Extraction d'ADN génomique**

##### **1.1) Origine des échantillons biologiques**

L'ADN génomique peut être extrait à partir de plusieurs types de matériels biologiques.

Dans le sang total, les leucocytes constituent la source majeure de l'ADN. Dans ce cas, le sang total est recueilli sur un anti-coagulant : E.D.T.A (éthylène diamino tétra-acétate), Citrate ou héparine. Un

prélèvement sanguin sur héparine est déconseillé lorsque l'ADN à extraire est destiné à une amplification par PCR (héparine est un inhibiteur de la *Taq* polymérase).

L'ADN peut être extrait également à partir de cellules épithéliales buccales, de cellules en culture (fibroblastes, monocytes, lymphocytes, amniocytes), de tissus ou encore d'échantillons médico-légaux (cheveux, sperme...).

L'ADN peut avoir une origine microbienne (virus, bactéries, parasites) ou végétale.

Les échantillons biologiques doivent être transportés et conservés à température adéquate. Le sang frais est préférable pour l'extraction d'ADN. Le sang peut être conservé au maximum 1 à 2 jours à température ambiante ou 7 jours à +4°C. L'extraction d'ADN peut s'effectuer sur du sang décongelé (une longue durée de conservation du sang diminue le rendement).

Les pièces tissulaires doivent être conservées ou congelées dans de l'azote liquide.

## **1.2) Etapes communes d'une extraction d'ADN**

L'extraction d'ADN consiste à isoler les molécules d'ADN à partir d'un organisme, d'un tissu ou de cellules. Dans tous les cas, la technique d'extraction doit être adaptée à la nature de l'échantillon biologique, source de l'ADN génomique, mais aussi de la quantité de l'échantillon. De nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels.

Une extraction d'ADN suit généralement les étapes suivantes :

- Destruction des tissus et lyse cellulaire,
- Inactivation des endonucléases,
- Déprotéinisation (élimination des protéines),
- Purification de l'ADN.

(Certains protocoles d'extraction d'ADN intègrent un traitement à la RNase afin d'éliminer l'ARN).

## **1.3) Extraction de l'ADN génomique à partir du sang total**

Dans la plupart des études de routine en médecine, les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN.

### **1.3.1) Purification et lyse des leucocytes**

Quelle que soit la méthode d'extraction des acides nucléiques utilisée à partir du sang fraîchement recueilli ou décongelé, le sang doit être initialement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges. Dans une seconde étape, la purification et la dissolution des membranes biologiques des leucocytes va permettre de récupérer les acides nucléiques contenus dans les noyaux.

**1.3.1.1) Lyse des globules rouges :** le sang total ou le culot cellulaire obtenu après centrifugation est mélangé à une solution hypotonique qui conduit à l'éclatement des hématies (hémolyse). Il existe une variété de solutions pour la lyse des globules rouges (voir TP). La lyse est en général réalisée à +4°C pendant 20 à 30 minutes. Après centrifugation du lysat et élimination du surnageant, le culot de leucocytes ou de globules blancs est récupéré.

**1.3.1.2) Lyse des globules blancs :** il existe un grand nombre de solutions de lyse des globules blancs en fonction de la nature du détergent utilisé (voir TP). Souvent la lyse des leucocytes et la libération de l'ADN résultent de l'action combinée d'un détergent et de la protéinase K.

**a) Détergents :** des molécules amphiphiles (amphipathiques); ils possèdent une partie aliphatique ou aromatique non polaire et une partie polaire. L'addition à des membranes biologiques de détergents permet de solubiliser les lipides et les protéines membranaires intégrées et de former des micelles composées de détergents, de protéines et de lipides. Les détergents rompent les membranes en s'insérant dans les bicouches phospholipidiques et en solubilisant les lipides et les protéines (Figure 1).



Dans le cas d'extraction de l'ADN, la protéinase K est utilisée pour la digestion des protéines qui sont associées à l'ADN. En fonction des protocoles, le traitement par la protéinase K est effectué 1 à 2 heures à 65°C ou 18 heures à 37°C. L'activité de l'enzyme est préservée en présence de SDS (0,5 à 1%).

### 1.3.2) Méthodes d'extraction

Les étapes de lyse sont communes aux différentes méthodes d'extraction. A partir de cette étape, les méthodes d'extraction vont varier. Les méthodes d'extraction des acides nucléiques peuvent être classées selon leur principe : les méthodes utilisant des solvants organiques, les méthodes utilisant des solvants non organiques, méthodes d'extraction sur phase solide (résine de chelex 100, micro-colonnes de résines échangeuses d'ions).

#### 1.3.3.1) *Méthodes utilisant des solvants organiques : Méthode au phénol-chloroforme*

C'est l'une des méthodes les plus couramment utilisées en biologie moléculaire. Elle permet de **séparer un mélange de molécules sur la base de leur solubilité différentielle dans deux liquides différents non miscibles**. Cette propriété est exploitée pour séparer l'ARN, l'ADN et les protéines.

Dans cette méthode d'extraction au phénol-chloroforme dite de référence, le principe consiste à traiter le lysat cellulaire ou l'homogénat tissulaire dans un premier temps par un même volume de phénol-chloroforme. La centrifugation du mélange conduit à la formation de 2 phases : une phase organique inférieure et une phase aqueuse supérieure (Le mélange type de phénol- chloroforme est de 1:1).

Le phénol est un puissant agent dénaturant des protéines et permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques qui ont la propriété d'être insolubles dans le phénol.

Le phénol possède une densité de 1,07 g/cm<sup>3</sup> et forme la phase inférieure lorsqu'il est mélangé avec de l'eau (1g/cm<sup>3</sup>). Le chloroforme est ajouté pour assurer une nette séparation des phases des 2 liquides ; En effet le chloroforme est miscible au phénol et sa densité est plus élevée (1,47 g/cm<sup>3</sup>) que celle du phénol.

Les acides nucléiques sont polaires en raison de leur groupements phosphate chargés négativement. Ils sont donc solubles dans la phase aqueuse supérieure au lieu de la phase organique inférieure (l'eau est plus polaire que le phénol). Inversement, les protéines contiennent des proportions variables de domaines chargés (régions hydrophiles) et non chargés (régions hydrophobes). En présence de phénol, les noyaux hydrophobes des protéines interagissent avec le phénol et forment un précipité (blanc) à l'interface, entre les deux phases liquide et organique. Les lipides se retrouvent dans la phase organique inférieure.

Le pH du phénol détermine la répartition des molécules d'ADN et d'ARN entre les phases aqueuse et organique. A un pH neutre ou légèrement alcalin (pH 7- 8), les groupements phosphate des acides nucléiques sont chargés négativement permettant ainsi à l'ADN et à l'ARN de se répartir dans la phase aqueuse. Après centrifugation, la phase aqueuse est traitée par addition d'un mélange de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>)- alcool isoamylique (24:1) qui a notamment pour objectif d'éliminer les traces éventuelles de phénol qui auraient pu être emportées avec la phase aqueuse et qui sont inhibitrices des réactions enzymatiques et en particulier de la *Taq* polymérase. De plus, le phénol est un produit toxique.

#### 1.3.3.2) *Méthodes utilisant des solvants non organiques : Méthode de salting out*

Dans ces méthodes, le principe consiste à traiter le lysat cellulaire par une solution saline de hautes concentrations. Le traitement par les sels permet l'élimination par précipitation des protéines dénaturées

(élimination des protéines par *salting-out*, relargage par les sels). Différentes solutions salines peuvent être utilisées : le NaCl 6M, acétate de potassium, acétate d'ammonium.

Les débris cellulaires et les protéines sont éliminés par centrifugation.

Pour ces deux méthodes d'extraction, la purification de l'ADN est réalisée le plus souvent par précipitation, en additionnant 2,5 volumes d'alcool absolu (100°) froid par volume d'échantillon. La précipitation de l'ADN peut être réalisée également par l'isopropanol  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$  (L'alcool isopropylique ou isopropanol ou 2-propanol). La précipitation se fait volume à volume et elle est surtout recommandée dans le cas des grands volumes.

L'ADN précipite sous forme de filaments (méduse) visibles à l'œil nu. Ce précipité est recueilli puis transféré dans un autre tube. Pour éliminer les sels et le reste de l'isopropanol, le précipité d'ADN est re-suspendu dans de l'éthanol froid à 70%. La méduse est ensuite transférée dans un tube puis séchée (étuve, 37°C) ou à température ambiante. La dissolution de l'ADN ou la réhydratation se fait soit dans de l'eau pure stérile ou dans le tampon Tris-EDTA (TE) stérile (pH=8).

### 1.3.3.3) Méthode d'extraction d'ADN sur phase solide : chelex 100

Contrairement aux deux précédentes adaptées aux grands échantillons, la méthode d'extraction au chelex 100 est adaptée à l'extraction d'ADN génomique à partir d'un faible échantillon (petit nombre de cellules). Cette méthode est rapide, simple et n'implique aucun solvant organique nocif.

Le Chelex100® est une résine échangeuse d'ions, formée de copolymères de styrène-divinylbenzène contenant des groupes iminodiacétates (Figure 3). Les fonctions acides confèrent à la résine une grande affinité pour les cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ).

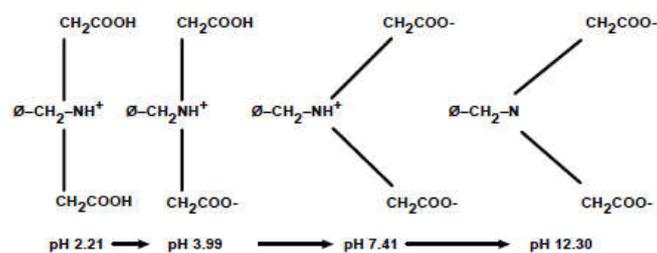


Figure 3 : Structure du Chelex 100

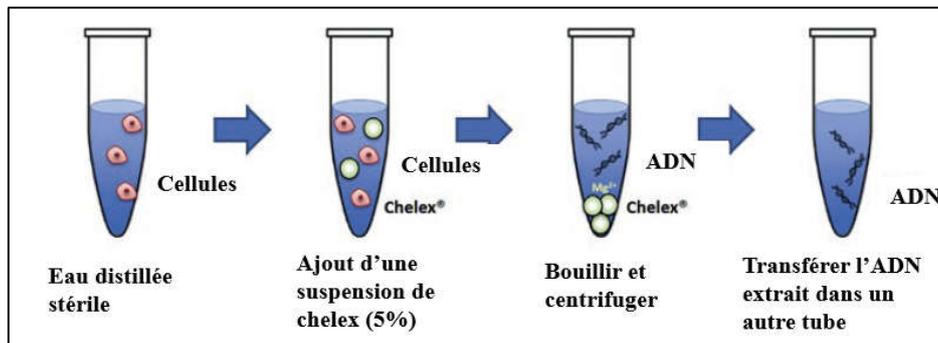
Le protocole d'extraction est basé sur l'utilisation d'une suspension alcaline (pH 10- 11) de chelex 100 chauffée à haute température.

A titre d'exemple, les cellules épithéliales buccales sont mélangées à une suspension de chelex à 5%. Le chauffage à 100°C permet la libération de l'ADN par lyse cellulaire (Figure 4), alors que le chelex protège l'ADN de la dégradation en chélatant les ions métalliques. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation.

Le chauffage provoque également la dénaturation de la double hélice de l'ADN. Les billes de résine se lient aux composants cellulaires, tandis que l'ADN (et l'ARN) reste dissous dans la solution aqueuse. Après centrifugation, il y a formation de 2 phases bien distinctes : le culot qui contient les billes de chelex et les débris cellulaires et le surnageant qui contient l'ADN simple brin.

Il faut prendre soin de ne pas aspirer le culot qui contient les billes de chelex, car celui-ci est un inhibiteur de la Taq-polymérase.

Il est à noter que certains protocoles intègrent une étape d'incubation à 56°C en présence de la protéinase K avant addition de la suspension de chelex et chauffage à 100°C.



**Figure 4 :** Etapes d'extraction de l'ADN par le chelex 100 (McKiernan et Danielson, 2017)

## **2/ Extraction de l'ARN**

L'extraction d'ARN est plus complexe que celle de l'ADN car les molécules d'ARN sont fragiles et très sensibles à l'action des ribonucléases (RNases). Des précautions particulières doivent être prises aussi bien durant la collecte et conservation des échantillons que durant les étapes d'extraction.

### **2.1) Conservation de l'échantillon biologique avant extraction des ARN**

L'ARN est principalement isolé dans le but d'étudier l'expression des gènes. L'instabilité des profils d'ARN dans le temps constitue l'un des problèmes majeurs rencontrés lors de l'étude de l'expression des gènes. Ainsi, le profil de l'ARNm n'est plus conforme au profil qui existait au moment du prélèvement. Les modifications du profil d'expression des gènes peuvent intervenir par dégradation spécifique et non spécifique des ARN et par induction transcriptionnelle des gènes. Ces changements ont lieu souvent en peu de temps (moins d'une heure). Il est ainsi nécessaire de stocker immédiatement l'échantillon biologique dans l'azote liquide ou à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant l'extraction. Toutefois, pour éviter les dégradations irréversibles et des analyses inexacts de l'expression des gènes, des solutions de stabilisation ont été développées par différents industriels. Ces réactifs, en perméabilisant rapidement les cellules, stabilisent immédiatement les ARN par inactivation des RNases.

### **2.2) Préparation de l'ARN**

Dans tous les protocoles d'extraction d'ARN, la 1<sup>ère</sup> étape est une lyse de cellules dans les conditions de **dénaturation des ribonucléases**. L'ARN est alors séparé des autres constituants cellulaires de différentes manières : solvants organiques, centrifugation au chlorure de césium. La méthode de préparation de l'ARN dépend du type de l'échantillon biologique.

Pour éviter les contaminations par les RNases, des précautions particulières doivent être prises en considération. Les solutions et le matériel en verre ou en plastique utilisés doivent être traités avec un agent chimique, le DEPC (diethylpyrocarbonate) à 0,1% qui inactive les ribonucléases.

#### **2.2.1) Méthodes basées sur l'utilisation de guanidine**

En 1979, Chirgwin et Coll. ont utilisé le thiocyanate de Guanidinium pour isoler de l'ARN à partir de tissus riches en ribonucléases. La méthode a été ensuite améliorée pour accélérer la procédure d'extraction en combinant la lyse au thiocyanate de guanidinium (TCG) à la phase d'extraction au phénol-chloroforme dans les conditions acides (*The single step method of RNA isolation*). C'est la méthode de choix pour l'extraction de l'ARN, surtout à partir de tissus riches en ribonucléases (RNases). Elle permet d'obtenir un ARN pur.

Le TCG [NH<sub>2</sub>-C-(NH)-NH<sub>2</sub>·HSCN, PM= 118,26] est un agent puissant de dénaturation des protéines et permet l'inactivation des RNases. L'utilisation du TCG pour la lyse cellulaire a été introduite à l'origine pour l'extraction d'ARN à partir de cellules riches en ribonucléases comme les cellules du pancréas.

Le protocole d'extraction associe également l'action du β-mercaptoéthanol, un agent réducteur pour provoquer la rupture des ponts disulfures et ainsi la dénaturation irréversible des RNases.

Le principe de la méthode d'extraction de l'ARN en une seule étape est basé sur la solubilité de l'ARN dans une solution acide contenant du TCG à pH 4 en présence d'une phase organique de phénol/chloroforme.

Dans les conditions acides, l'ADN et les protéines se répartissent soit à l'interphase soit dans la phase organique inférieure, alors que l'ARN se répartit dans la phase aqueuse.

Le mélange est centrifugé, l'ARN contenu dans la phase aqueuse est purifié par précipitation à l'isopropanol.

Depuis son introduction la méthode d'extraction de l'ARN en une seule étape est largement appliquée pour isoler l'ARN total à partir d'échantillons biologiques très variés.

### 2.2.2) Extraction et purification des ARN messagers

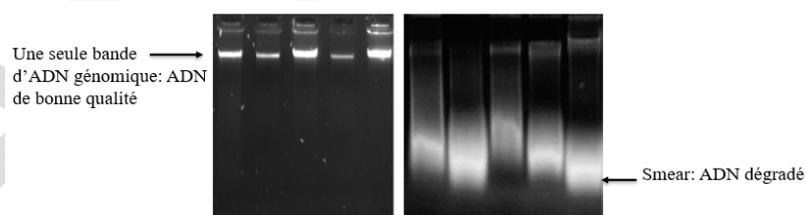
Parfois on désire extraire l'ARNm et non les ARN totaux. En effet, dans une cellule de mammifère, les ARNm représentent moins de 10% des ARN totaux. L'ARNm possède une extrémité 3'-polyadénylée (queue poly(A)) d'environ 200 nucléotides chez les mammifères. Cette caractéristique est exploitée pour sa purification par chromatographie d'affinité. L'ARNm se fixe sélectivement par complémentarité de séquence sur des colonnes d'oligo (dT) cellulose (chromatographie d'affinité). Deux approches peuvent être utilisées : soit les ARNm sont purifiés à partir des ARN totaux préalablement extraits, soit à partir de lysat cellulaire.

## 3) Contrôle qualitatif des acides nucléiques extraits

### 3.1) ADN génomique

#### 3.1.1) Intégrité de l'ADN extrait

Avant toute utilisation, il est indispensable de vérifier que l'ADN n'a pas été dégradé au cours des différentes étapes de l'extraction. La qualité de l'ADN extrait peut être analysée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8% (Figure ci-dessous).



#### 3.1.1) Concentration et pureté de l'ADN extrait

La concentration d'un échantillon d'ADN double brin est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{ADN } \mu\text{g/ml} = \text{DO}_{260\text{nm}} \times \text{Facteur de dilution} \times 50$$

La concentration d'un échantillon d'ADN simple brin est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{ADN } \mu\text{g/ml} = \text{DO}_{260\text{nm}} \times \text{Facteur de dilution} \times 37$$

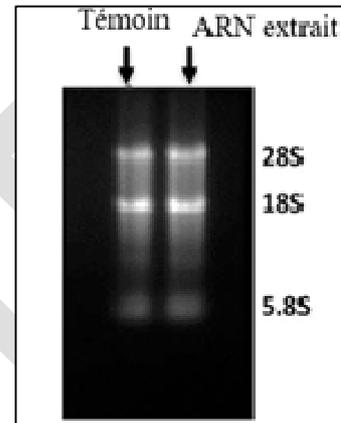
La contamination de l'ADN extrait par des protéines est appréciée en mesurant la densité optique des extraits d'ADN à 260nm et 280 nm et en effectuant le rapport (R) DO 260 nm/DO 280 nm.

- $1,8 \leq (R) \leq 2,0$  : ADN pure, non contaminé par les protéines.
- $R < 1,8$  indique une contamination de l'ADN par les protéines.
- $R > 2$ , indique que l'ADN est contaminé par l'ARN.

### 3.2) ARN total

#### 3.2.1) Intégrité de l'ARN extrait

La qualité de l'ARN extrait est vérifiée par la migration de l'échantillon sur gel d'agarose de 1% à 1,2 % suivie d'une visualisation sous lumière UV. Les deux bandes d'ARN ribosomiaux d'eucaryotes (18S à 1,9 kb et 28S à 5 kb) doivent être présentes (Figure ci-contre). Si les ARN migrent sous la forme d'une traînée (smear) et que les deux bandes ne sont pas visibles, l'échantillon d'ARN a donc été dégradé.



#### 3.2.2) Concentration et pureté de l'ARN extrait

La quantité d'ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260nm.

La concentration d'ARN en  $\mu\text{g/ml}$  est déterminée par la relation :

$$\text{DO}_{260} \times \text{facteur de dilution} \times 40$$

Pour un ARN pur, le rapport de  $\text{DO}_{260/280}$  doit être compris entre 2 et 2,2.

En même temps, il est possible de rechercher des traces de phénol en mesurant la DO à 230nm.

### Références bibliographiques

#### Articles

- Chacon-Cortes D, Griffiths L: **Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives.** *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* 2014, **2**:1-9.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R: **Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material.** *Biotechniques* 1991, **10**:506-513

#### Ouvrages

- Ameziane N, Bogard M, Gougerot-Pocidallo MA, Lamoril J: **Principes de biologie moléculaire en biologie clinique.** Elsevier ; 2005 (<https://books.google.dz/books?id=cwxYehzAoz8C>). Gautam A: **DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts.** Springer International Publishing; 2022 (<https://books.google.dz/books?id=Lt5mEAAQBAJ>).
- Darnell JE, Baltimore D, Lodish HF: **La cellule biologie moléculaire.** Vigot ; 1988 (<https://books.google.dz/books?id=Z3TWPQAACAAJ>).
- Kaplan JC, Delpuch M: **Biologie moléculaire et médecine.** In *Biologie Moléculaire et Médecine.* Edited by Médecine Sciences F: Flammarion Médecine-Sciences; 1993 (<https://books.google.dz/books?id=xhHUMwEACAAJ>).
- McKiernan HE, Danielson PB: **Chapter 21 - Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science.** In *Molecular Diagnostics (Third Edition).* Edited by Patrinos GP: Academic Press; 2017: 371-394 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128029718000213>).

## Chapitre III : SEPARATION DES ACIDES NUCLEIQUES

### Objectifs du cours

- Comprendre le principe d'une électrophorèse.
- Comprendre les paramètres qui régissent la migration électrophorétique des molécules d'acides nucléiques.
- Comprendre les utilisations d'un gel d'agarose et d'un gel de polyacrylamide.
- Comprendre le processus de polymérisation des gels d'agarose et de polyacrylamide.
- Comprendre la différence notamment en matière de résolution entre un gel d'agarose et un gel de polyacrylamide.
- Préparation des échantillons pour une électrophorèse.

### Plan du cours

Introduction

#### **1) Principe de séparation des acides nucléiques**

#### **2) Gel d'agarose**

2.1) Propriétés d'un gel d'agarose

2.2) Paramètres de migration

#### **3) Gel de polyacrylamide**

3.1) Polymérisation du gel de polyacrylamide

#### **4) Préparation des gels**

#### **5) Tampon de charge (Loading buffer)**

#### **6) Visualisation des acides nucléiques**

Références bibliographiques

### Introduction

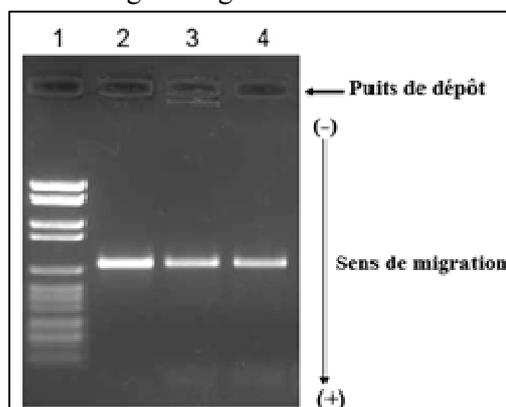
Le terme électrophorèse décrit la migration d'une particule chargée sous l'influence d'un champ électrique. De nombreuses molécules biologiques, telles que les acides aminés, les peptides, les protéines, les nucléotides et les acides nucléiques, possèdent des groupes ionisables et, par conséquent, à un pH donné, existent en solution sous forme d'espèces chargées électriquement, soit sous forme de cations (+) soit d'anions (-). Sous l'influence d'un champ électrique, ces particules chargées migrent soit vers la cathode, soit vers l'anode, selon la nature de leur charge nette.

Des fragments d'acides nucléiques peuvent être séparés suivant leur taille sur un gel d'agarose ou d'acrylamide. La solution contenant les acides nucléiques (ADN ou ARN) est déposée à une extrémité du gel qui est ensuite soumise à un champ électrique (Figure 1).

**Figure 1 :**

Exemple d'une électrophorèse sur gel d'agarose

(Puits 1: marqueurs de poids moléculaire ; Puits 2, 3, 4 : bandes d'ADN)



#### **1) Principe de séparation des acides nucléiques**

Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées. Ainsi, sous l'effet d'un champ électrique, ils peuvent migrer sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide et être séparés. La charge relative étant constante, la séparation sera fonction du poids moléculaire.

Les acides nucléiques chargés négativement se déplacent à travers le gel vers la borne positive (cathode).

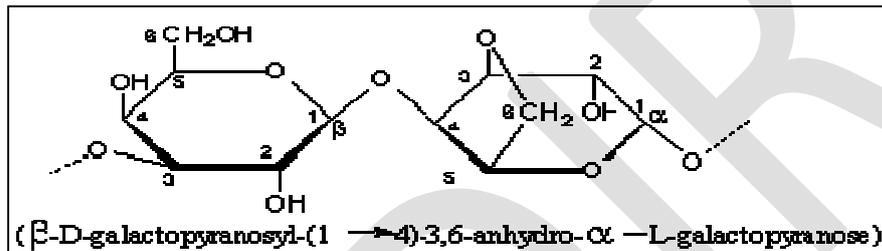
Le gel d'agarose est le plus utilisé. Il permet la séparation des fragments de taille comprise entre 0,5 et 20 kb. Les gels sont coulés à l'horizontale dans des appareils transparents aux UV de manière à pouvoir suivre

périodiquement la migration. Le gel de polyacrylamide est utilisé pour séparer de petits fragments, de moins de 1000 pb. Le gel est coulé entre deux plaques de verre. La migration est verticale.

## 2) Gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est la méthode de choix pour la séparation, la purification et l'identification des fragments d'ADN et d'ARN. L'agarose agit comme un tamis moléculaire, à travers lequel les acides nucléiques sont entraînés par un champ électrique.

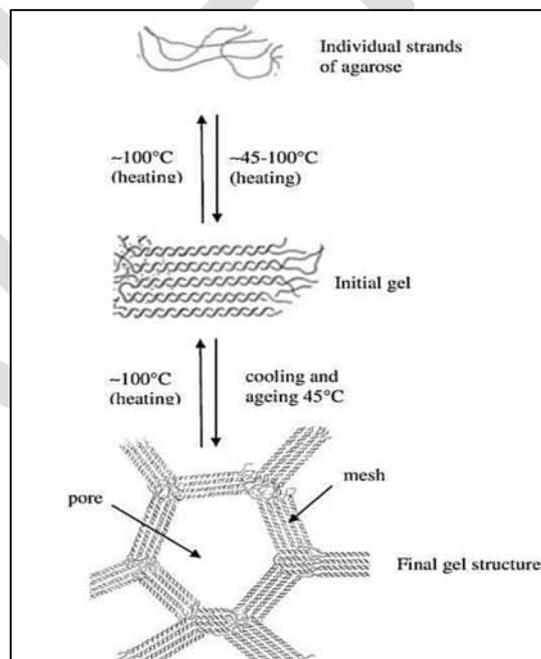
L'agarose est un polysaccharide (poly D-galactose 3,6-anhydro-L galactose) issu des algues rouges marines. Il est formé de sous unités répétitives d'agarabiose qui forment de longues chaînes polysaccharidiques (400 unités d'agarabioses) de 120 KDa.



Structure chimique de l'agarabiose

### 2.1) Propriétés d'un gel d'agarose

2.1.1) Gélification (formation du gel) : l'agarose se présente sous forme d'une poudre blanche. En fin de gélification, l'agarose en solution (tampon approprié) adopte une conformation de manière à former des pores de taille moyenne entre 100 et 300nm et variant avec la concentration de l'agarose (Figure 1).



**Figure 1** : Structure des polymères de polysaccharides après la formation du gel (Goławska et al., 2014)

2.1.2) Les températures de solidification et de fusion : Le gel d'agarose est sensible aux variations de la température. On dit qu'il est thermoréversible. La température de fusion d'un gel d'agarose augmente avec l'augmentation de la concentration.

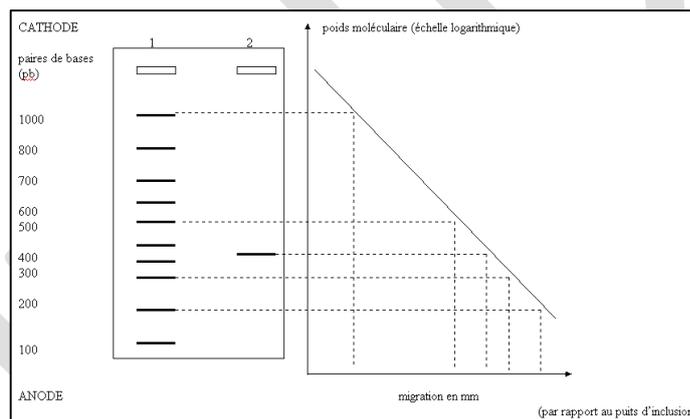
La température de solidification est également influencée par la concentration du gel.

2.1.3) La résistance du gel d'agarose : Le gel d'agarose possède l'avantage de présenter une force de résistance même à faible concentration. La résistance du gel est définie comme la force exprimée en  $\text{g/cm}^2$ , qu'il faut appliquer pour le couper ou le casser. Dans les conditions dénaturantes, lorsque l'urée est ajoutée dans le gel, il y a rupture des liaisons hydrogène et le gel est alors fragilisé.

## 2.2) Paramètres de migration

La séparation des molécules d'ADN dans un gel d'agarose dépend de quatre paramètres :

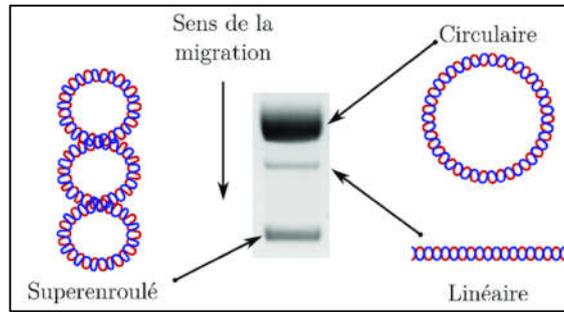
2.2.1) La taille de la molécule d'ADN : l'ADN sous forme linéaire migre avec une vitesse inversement proportionnelle au logarithme de sa taille, pour une concentration donnée du gel d'agarose (Figure 2). Les molécules de petite taille migrent plus rapidement et sur une longue distance que les molécules de grande taille. Autrement, les molécules les plus grandes sont davantage retenues que les molécules plus petites et migrent moins vite et donc moins loin dans le gel.



**Figure 2** : Relation entre la taille d'une molécule d'ADN linéaire et la distance de migration (Kaplan et Delpech, 1993)

(Puits 1: Marqueurs de poids moléculaire (exprimés en paires de bases) ; Puits 2: Echantillon d'ADN).

2.2.2) La conformation de l'ADN : Les ADN circulaires ou plasmidiques peuvent prendre trois formes tridimensionnelles : superenroulée, circulaire et linéaire (la forme linéaire résulte d'une digestion du plasmide par des enzymes de restriction). La forme superenroulée migre plus rapidement que les deux autres formes (Figure 3).



**Figure 3** : Schéma des trois formes de l'ADN plasmidique et leur propriété migratoire sur un gel d'agarose (Douat, 2016)

2.2.3) La concentration de l'agarose : Un fragment d'ADN d'une taille donnée migre à des vitesses différentes selon la concentration en agarose du gel. Il y a un rapport direct entre le logarithme de la mobilité de l'ADN ( $\mu$ ) et la concentration du gel. Un gel de concentration donnée permet donc de séparer une fourchette donnée de fragments d'ADN (Tableau 1).

**Tableau 1**: Séparation d'ADN linéaire, double brin, selon la concentration d'agarose du gel

Concentration d'agarose (%)	Gamme de tailles idéales (en <b>kb</b> )
0,3	5 – 60
0,6	1 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 3
2,0	0,1 – 2

2.2.4. Le courant appliqué : plus le voltage est important, plus la vitesse de migration augmente. Toutefois le voltage est limité en intensité. Un fort voltage induit une augmentation de température ce qui peut faire fondre le gel. Le voltage maximum pour un gel d'agarose se situe autour de 5 V/cm.

Remarque : Les ARN sont le plus souvent des molécules de taille importante (> 0,8kb). Ils forment souvent des structures secondaires qui perturbent la migration électrophorétique et faussent l'estimation du PM. Ainsi, les gels d'agarose utilisés contiennent des agents dénaturants comme le formaldéhyde qui déstabilisent les appariements entre les bases.

### 3) Gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été introduite par Raymond et Weintraub en 1959. Aussi, le gel de polyacrylamide agit comme un tamis moléculaire pour séparer l'ADN sous un champ électrique, dont le principe de migration est le même que celui d'un gel d'agarose. Cependant, l'acrylamide a un pouvoir de résolution (séparation) plus important que l'agarose, mais la réalisation des gels d'acrylamide est moins aisée et ce produit est toxique.

### 3.1) Polymérisation du gel de polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide sont formés à partir de la polymérisation de deux composés :

- Des monomères d'acrylamide :  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$  contenant une double liaison  $\text{C}=\text{C}$  dans leur structure,
- Un agent de réticulation, le N, N1-méthylène-bisacrylamide (MBA) (Figure 4).

La polymérisation est induite par les radicaux libres issus de la décomposition du persulfate d'ammonium (PAS) en présence de TEMED (N, N, N', N'tétraméthylènediamine, accélérateur de la polymérisation. Celui-ci catalyse la décomposition des ions persulfate pour donner un radical libre ( $\text{R}^\cdot$ ) :



Les radicaux libres du PAS attaquent les doubles liaisons des monomères d'acrylamide pour initier la réaction de polymérisation. La polymérisation de l'acrylamide seule conduit à la formation d'une solution visqueuse, impossible à manipuler car elle est formée de longues chaînes linéaires non reliées entre elles. La polymérisation nécessite donc la présence d'une faible quantité d'agents réticulant (pontage) qui permettent la formation de ponts entre les chaînes linéaires d'acrylamide. Le méthylènebisacrylamide (bisacrylamide) assure le pontage entre les chaînes d'acrylamide pour produire un réseau tridimensionnel. En modifiant le taux de pontage, il est possible de modifier la réticulation, donc le diamètre des pores.

La taille des pores du polyacrylamide est déterminée par la concentration du gel et varie généralement de 3% à 30 % d'acrylamide et de bisacrylamide. La séparation des molécules au sein d'un gel est déterminée par les tailles relatives des pores formés au sein du gel

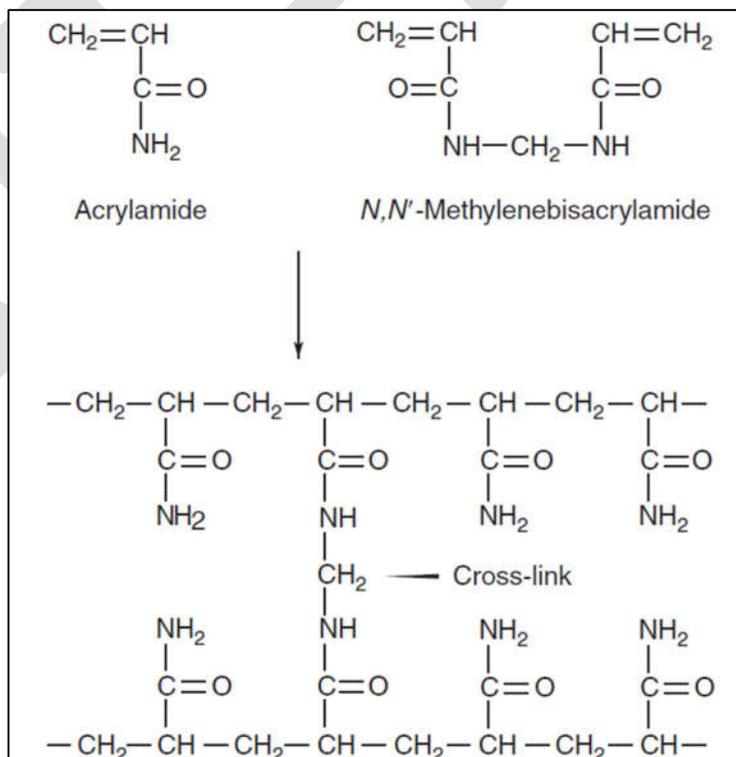


Figure 4 : Structure d'un gel de polyacrylamide (Philippova et Khokhlov, 2012)

#### 4) Préparation des gels

Les gels d'agarose sont généralement préparés à une concentration allant de 0,5 à 6%. Ils sont préparés dans les tampons de migration TBE (Tris, Borate, EDTA), TAE (Tris-Acétate-EDTA) ou TPE (Tris-Phosphate-EDTA) (Tableau 2). Les tampons TBE et TAE sont les plus communément utilisés (voir TP)

**Tableau 2** : composition chimique des différents tampons de migration

Tampon	Composition
TBE 10X	Tris-base : 107,80g ; Borate : 55g ; EDTA <sub>2</sub> Na : 7,44g ; Eau distillée QSP=1L (pH 8,3)
TAE 50X	Tris-base : 242g ; Acide acétique glacial : 57,1ml ; EDTA-Na <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O : 18,61g ; Eau distillée QSP= 1l
TPE 10X	Tris-base : 108g ; Acide phosphorique à 85% : 15,5ml ; EDTA-Na <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O : 7,44g ; Eau distillée QSP= 1l

Le type de tampon peut influencer la séparation des molécules d'ADN ; le tampon TAE permet une meilleure résolution des fragments d'ADN supérieurs à 4kb, et le tampon TBE permet une meilleure résolution des fragments d'ADN de taille 0,1-3kb.

La préparation d'un gel de polyacrylamide est réalisée dans le tampon TBE (1X).

Le tampon de migration doit maintenir un pH constant. La force ionique du tampon dans le gel doit être suffisante pour assurer la solubilité de l'échantillon et permettre une bonne séparation. L'ADN est une molécule acide, dans un tampon pH 8,3 elle sera chargée négativement.

#### 5) Tampon de charge (Loading buffer)

Les échantillons doivent être mélangés avec le tampon de charge (loading buffer, loading dye) avant la migration. Ce tampon renferme un agent qui augmente la densité de l'ADN permettant ainsi à l'échantillon de l'ADN de bien sédimenter dans le puits de dépôt. Le colorant présent dans le tampon facilite la visualisation lors du dépôt de la solution d'ADN et permet de suivre la migration (Tableau 3).

**Tableau 3** : composition chimique des différents tampons de charge

Tampon de charge	Composition (6X)	Température de stockage
A base de Sucrose	Sucrose 40% ; Bleu de bromophénol 0,25% ; Xylène cyanol 0,25%	+4°C
A base de Glycérol	Glycérol 30% ; Bleu de bromophénol 0,25% ; Xylène cyanol 0,25%	+4°C

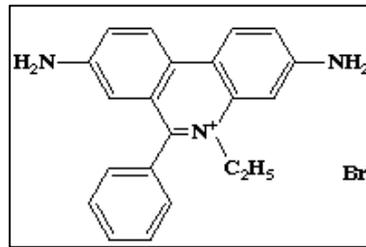
Deux colorants avec des vitesses de migration différentes sont souvent utilisés :

- Bleu de bromophénol (bleu foncé) qui migre avec des fragments d'ADN dont la taille est de 300-500pb
- Xylène cyanol (Bleu turquoise) qui migre avec des fragments d'ADN d'environ 5000pb.

Un autre colorant, Orange G, migre avec des fragments d'ADN de 50pb.

## 6) Visualisation des acides nucléiques

De façon conventionnelle, l'ADN dans un gel d'agarose est visualisé en utilisant une solution de bromure d'éthidium (BET).



Formule chimique du BET

Le BET s'intercale entre les bases des acides nucléiques et possède la propriété d'émettre une fluorescence rouge orange lorsqu'il est excité par la lumière ultraviolette et les molécules d'ADN complexées au bromure d'éthidium deviennent visibles (Figure 1).

Le BET est soit ajouté au gel d'agarose à une concentration de 0,5µg/ml, soit le gel est trempé dans une solution contenant le BET.

La limite de détection est d'environ 5ng d'ADN avec le BET.

Cependant, le BET est un produit cancérigène (mutagène). Ainsi, il est de plus en plus remplacé par des molécules moins dangereuses comme le SyberSafe.

### Références bibliographiques

#### Articles:

- Goławska S, Sprawka I, Goławski A, Matok H: **Are agarose-sucrose gels useful for studying the probing and feeding behavior of aphids?** *Australian Journal of Crop Science* 2014, **8**:263-270.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH: **Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments.** *J Vis Exp* 2012, **20**

#### Ouvrages

- Douat C: **Study of a cold atmospheric pressure plasma micro jet. Etude d'un micro-jet de plasma à pression atmosphérique.** Université Paris Sud - Paris XI, 2014 (<https://theses.hal.science/tel-00960400>). Kaplan JC, Delpéch M: **Biologie moléculaire et médecine.** In *Biologie Moléculaire et Médecine*. Edited by Médecine Sciences F: Flammarion Médecine-Sciences; 1993 (<https://books.google.dz/books?id=xbHUMwEACAAJ>).
- Kaplan JC, Delpéch M: **Biologie moléculaire et médecine.** In *Biologie Moléculaire et Médecine*. Edited by Médecine Sciences F: Flammarion Médecine-Sciences; 1993 (<https://books.google.dz/books?id=xbHUMwEACAAJ>).
- Philippova OE, Khokhlov AR: **1.13 - Polymer Gels.** In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Edited by Matyjaszewski K, Möller M. Amsterdam: Elsevier; 2012: 339-366
- Seow Ven L, Abdul Rani B: **Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA Fragments Analysis.** In *Gel Electrophoresis*. Edited by Sameh M. Rijeka: IntechOpen; 2012: Chapter 4

## Chapitre IV : AMPLIFICATION GENIQUE

### Objectifs du cours

- a) Connaître les différentes étapes d'un cycle d'amplification de l'ADN par une PCR classique.
- b) Comprendre surtout les différents paramètres à optimiser en vue d'obtenir une amplification d'ADN spécifique (notamment le choix des amorces, température d'hybridation, concentration en ions  $Mg^{2+}$ ).
- c) Connaître d'autres types de PCR.
- d) Comprendre les étapes d'une rétrotranscription (RT-PCR) et les différentes enzymes utilisées.
- e) Comprendre le principe et la cinétique d'une amplification par PCR en temps réel et la notion du cycle seuil
- f) Comprendre notamment les différences entre une PCR en temps réel et une PCR en point final (PCR classique).

### Plan du cours

Introduction

#### **1) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) classique**

- 1.1) Principe de la PCR
- 1.2) Les composants de la PCR et leur influence sur l'amplification
  - 1.2.1) Concentration en ions magnésium
  - 1.2.2) Nucléotides (dNTP)
  - 1.2.3) Amorces
  - 1.2.4) ADN polymérase
  - 1.2.5) L'ADN matrice (template)

#### **2) Les différents types de PCR**

##### **2.1) Reverse transcription-PCR (RT-PCR)**

- 2.1.1) Principe de la RT-PCR
- 2.1.2) Amorces utilisées au cours de la rétrotranscription
- 2.1.3) L'enzyme : la transcriptase inverse
- 2.1.4) Déroulement de la Réaction RT-PCR

2.1.5) Applications de la RT-PCR

##### **2.2) PCR spécifique d'allèles/ PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System)**

- 2.2.1) Principe
- 2.2.2) Méthodologie

##### **2.3) Amplification par PCR en temps réel (rt-PCR)**

- 2.3.1) Principe
  - 2.3.2) Méthodologie
  - 2.3.3) Cinétique de la rt-PCR
  - 2.3.4) Paramètres de la courbe de fluorescence
  - 2.3.5) Les systèmes de détection en temps réel
  - 2.3.6) Variante de la PCR en temps réel : RT-PCR en temps réel
  - 2.3.7) Applications de la PCR et temps réel
- Références bibliographiques

### Introduction

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou réaction de polymérisation en chaîne est une technique permettant d'amplifier *in vitro* un fragment d'ADN bien défini (ADN cible) à partir d'un ADN génomique appelé ADN matrice (Figure 1). Pour cela, la PCR nécessite la connaissance de la séquence d'ADN qui flanque le fragment d'ADN à amplifier. À partir de ces informations, deux amorces (primers) peuvent être synthétisées, chacune complémentaire d'un segment d'ADN adjacent au fragment cible.

La séquence cible est amplifiée par répétition d'un cycle de 3 réactions, ce qui conduit à des milliers/des millions de copies d'ADN. La technique de PCR a été mise au point en 1985 par Kary Mullis. C'est une technique qui a permis de grandes avancées dans le domaine de biologie moléculaire. Elle est largement utilisée dans les domaines de la clinique et de la recherche. La découverte d'une eubactérie thermophile et l'isolement de sa polymérase thermostable a permis le développement de cette technique.

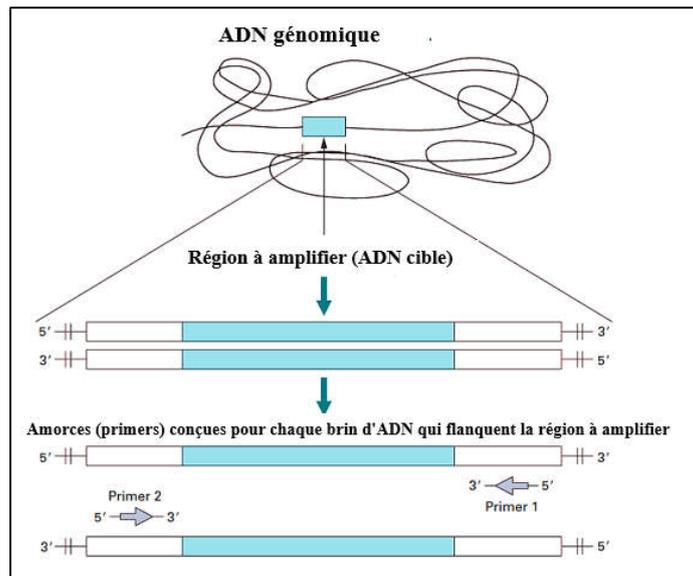


Figure 1 : Vue d'ensemble sur la PCR (Rapley, 2010)

## 1) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) classique

### 1.1) Principe de la PCR

Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition d'un cycle de 3 étapes (Figure 2):

- La **dénaturation des deux brins d'ADN** à température élevée afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares,
- L'**hybridation des amorces** (primers) complémentaires d'une séquence d'ADN monocaténaire cible,
- La réaction d'**élongation** par une ADN polymérase thermostable à partir des amorces.

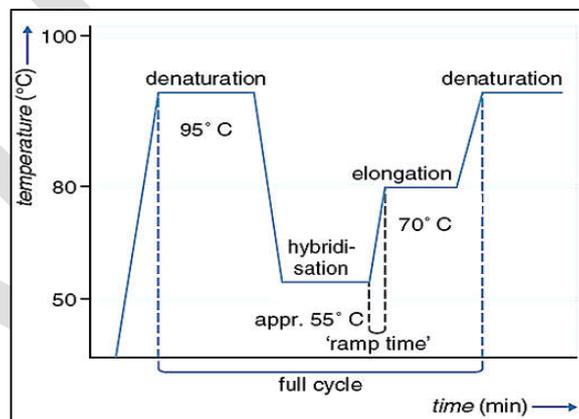


Figure 2 : Etapes d'un cycle de PCR (van Pelt-Verkuil et al., 2008)

La dénaturation ou la séparation des deux brins d'ADN est souvent réalisée à 94°C. Une incubation excessive à cette température pourrait causer des dommages à la molécule d'ADN notamment par rupture des liaisons entre les bases et les sucres.

Au cours de la 1ère étape de la PCR, la dénaturation se fait pendant 2 à 5 minutes car au début de la PCR la molécule d'ADN est complètement sous forme double brin. Cependant, au cours des cycles de la PCR, ce temps est réduit de 30 secondes à 1 minute.

Après le chauffage et une séparation de l'ADN double brin en simples brins, un refroidissement progressif est réalisé afin de permettre une hybridation des amorces entre des séquences complémentaires.

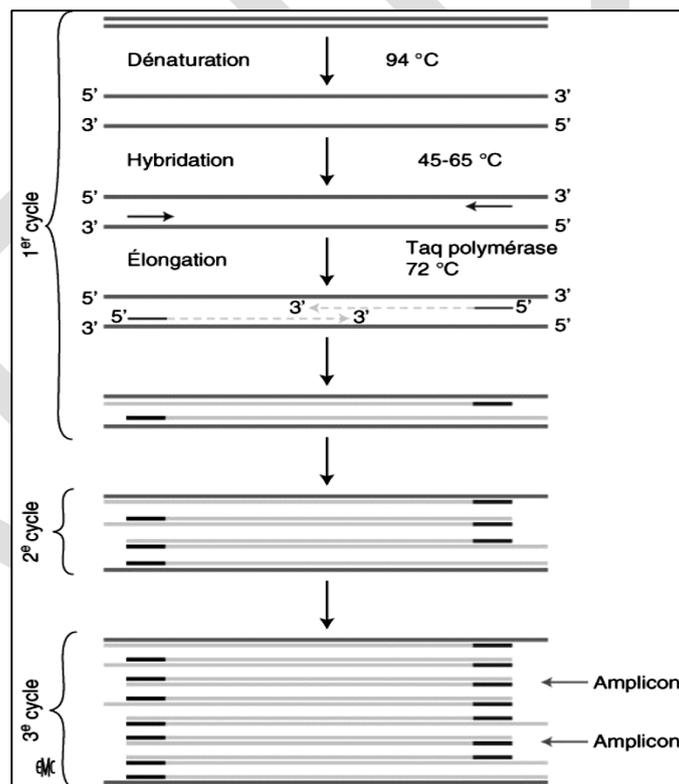
Ce n'est qu'après l'hybridation des amorces qu'a lieu la synthèse d'un nouveau brin d'ADN (élongation) grâce à l'ADN polymérase qui va synthétiser les brins complémentaires d'ADN à partir des extrémités 3'OH libres des amorces hybridées.

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes ; seule la température d'hybridation pourra être modifiée pour chaque nouvelle PCR en fonction de la séquence des amorces.

Les produits du 1<sup>er</sup> cycle de PCR sont ensuite dénaturés par la chaleur. Les amorces sont à nouveau hybridées avec les brins d'ADN provenant du 1<sup>er</sup> cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à la polymérase (Figure 3).

A chaque cycle (dénaturation, hybridation, élongation), le nombre de copies de la séquence comprise entre les sites d'hybridation des amorces est doublé. Par conséquent, le nombre d'exemplaires de la séquence étudiée augmente de façon exponentielle. De manière théorique,  $2^n$  molécules sont ainsi obtenues après  $n$  cycles, soit 1 073 741 824 copies après 30 cycles.

Ces cycles sont renouvelés entre 20 et 50 fois suivant la quantité de cible de départ. Il est inutile de trop augmenter le nombre de cycles, car l'amplification cesse d'être exponentielle après un certain nombre de cycles et atteint rapidement un plateau (l'un des composants de la PCR devient un facteur limitant). Le rendement du produit d'amplification au cours de la PCR suit une courbe sigmoïde.



**Figure 3** : Principe schématisé de la technique de PCR (Vassias, 2012)

## **1.2) Les composants de la PCR et leur influence sur l'amplification**

Le déroulement d'une réaction de PCR nécessite un milieu réactionnel contenant les éléments suivants :

- De l'ADN à amplifier (ADN matrice ou ADN template),
- Des amorces (également appelés oligonucléotides ou primers),
- Des désoxyribonucléosides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
- Une ADN polymérase thermorésistante (*Taq* polymérase),
- Tampon adéquat pour la *Taq* polymérase (Tampon PCR),
- Des ions magnésium ( $Mg^{2+}$ ) indispensable au fonctionnement de l'ADN polymérase.

Les étapes de la PCR doivent être optimisées pour chaque ADN matrice et paires de primers utilisés. L'optimisation est souvent compliquée car il y a implication de plusieurs facteurs. Les conditions optimales ne peuvent pas être prévues à l'avance, elles doivent être déterminées par l'expérimentation. Le problème le plus fréquent est l'amplification parasite de séquences autres que celle désirée.

### **1.2.1) Concentration en ions magnésium**

Le magnésium constitue le cofacteur de la *Taq* polymérase et peut influencer sa performance. L'excès du  $Mg^{2+}$  aboutit à la formation de produits d'amplification non spécifiques (amplification parasite) qui peuvent être mis en évidence par l'existence de plusieurs bandes de migration sur un gel d'agarose. Au contraire, lorsque le taux de  $MgCl_2$  est insuffisant, la *Taq* polymérase est inactive.

Il est très important d'optimiser la concentration du  $MgCl_2$  pour chaque réaction de PCR. La *Taq* polymérase requiert du  $Mg^{2+}$  libre pour son activité ; une partie de  $MgCl_2$  est liée par l'ADN matrice, les amorces, les dNTP ainsi que par les chélateurs présents dans les solutions stock de primers et de DNA.

En général, les concentrations de  $Mg^{2+}$  utilisées se situent entre 0,5 et 5mM. Ainsi, pour l'optimisation, il est nécessaire de réaliser une série de réactions dans lesquelles la concentration en  $MgCl_2$  varie entre 0,5- 5mM.

### **1.2.2) Nucléotides (dNTP)**

La concentration des dNTP peut affecter le rendement et la spécificité de la PCR. Une faible concentration en dNTP minimise une incorporation erronée des nucléotides, ce qui augmente la fiabilité de la *Taq* polymérase. Il n'est pas recommandé d'utiliser de grandes concentrations de dNTP car ceci augmente les erreurs de la *Taq* polymérase.

Des concentrations de 20 à 200 $\mu$ M de chaque dNTP ont été utilisées efficacement dans la PCR. Cependant l'amplification de séquences longues (20kb ou plus) nécessite des taux de dNTP allant jusqu'à 400 à 500 $\mu$ M chacun.

### **1.2.3) Amorces**

Les amorces constituent un facteur critique de la PCR ; son succès ou son échec dépend largement du choix des amorces. Les amorces sont choisies de façon à cadrer la séquence d'ADN à amplifier (amorce sens ou forward, amorce anti-sens ou reverse).

Les amorces sont sélectionnées selon les critères suivants :

- i. *La complémentarité entre les amorces et l'ADN cible* ; une amorce non complémentaire ne va pas s'hybrider à l'ADN cible.
- ii. *La taille de l'amorce* : la longueur optimale se situe entre 15 et 30 bases.
  - Si le primer est trop court, les chances d'hybridation en plusieurs endroits de l'ADN matrice sont grandes, ce qui conduit aux produits d'amplification non spécifiques.

- Si le primer est long, la PCR est difficile sauf s'il est strictement complémentaire à l'ADN cible.
- iii. *Les extrémités 3' des amorces ne doivent pas être complémentaires* afin d'éviter la production de dimères d'amorces au cours de la réaction.
- iv. *La température d'hybridation des amorces à l'ADN cible :*

- La température optimum d'hybridation (annealing) des amorces pour une PCR donnée dépend de la séquence nucléotidique, de la longueur et de la concentration des amorces.
- La température d'hybridation n'est pas la même pour toutes les PCR. Idéalement, cette température devrait être inférieure de la température de fusion (melting temperature,  $T_m$ ) des amorces de 5°C.
- La température de fusion est définie comme étant la température de dissociation de l'amorce de l'ADN. Pour les amorces de moins de 20 nucléotides, le  $T_m$  est calculé par la relation :

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

De manière générale, la température d'hybridation est calculée en fonction du  $T_m$  de l'amorce :

$$T_{\text{hybridation}} = T_m - 5^\circ\text{C}.$$

Si la température d'hybridation des amorces est faible, le risque des hybridations non spécifiques est augmenté. L'idéal est de choisir des amorces avec un  $T_m$  élevé afin de minimiser le risque d'une hybridation non spécifique. Des températures d'hybridation allant de 55-70°C conduisent à de meilleurs résultats. La différence de  $T_m$  entre les deux amorces d'une PCR ne doit pas être trop importante, si possible :

$$(T_mA - T_mB) < 5^\circ\text{C}.$$

- v. *La concentration des amorces* se situe, en général, entre **0,01 à 1µM**. Une forte concentration en primers peut aboutir à une hybridation non spécifique, alors qu'une faible concentration risque de compromettre l'efficacité de la PCR.
- vi. *Composition en GC (40- 60%)* : Idéalement, l'amorce présentera un mélange presque aléatoire de nucléotides, une teneur de 50 % en GC et une longueur d'environ 20 bases. La  $T_m$  se situera alors entre 56 et 62 °C.

Les amplifications parasites dépendent de la séquence des amorces utilisées. Le moyen le plus efficace est d'augmenter la **stringence**, le plus souvent en augmentant la température. Cette augmentation se fait progressivement jusqu'à disparition des bandes non spécifiques (aspécifiques).

Actuellement, il existe des programmes informatiques qui permettent le choix des amorces dont le plus utilisé est le programme OLIGO.

#### **1.2.4) ADN polymérase**

- L'enzyme communément utilisée au cours de la PCR est la *Taq* DNA polymérase pour sa thermostabilité. C'est une ADN polymérase-ADN dépendante de 94KDa qui provient d'une bactérie thermophile appelée *Thermus aquaticus*.
- Elle permet la synthèse d'un nouveau brin d'ADN en utilisant les brins existants comme matrice. La synthèse s'effectue dans le sens 5'-3' à 72°C.
- Contrairement à l'ADN polymérase humaine qui se dénature et perd son activité à des températures élevées, la *Taq* polymérase et une enzyme recombinante, thermostable même à 95°C.
- La *Taq* polymérase ultrapure possède une activité optimum aux températures 75 à 80°C. Sa demi-vie est de 40min à 95°C ce qui la maintient active pendant 30 cycles ou plus.
- A 72°C, l'enzyme permet un taux d'extension de 35 à 100 nucléotides par seconde. La température d'extension des amorces est de 72°C ce qui est légèrement inférieure à la température optimum de la

*Taq* polymérase (75°C). Des températures plus élevées risquent de provoquer le détachement des amorces de l'ADN cible.

- La concentration requise est de 1-2,5 unités/100µl (volume réactionnel). Cependant, la concentration de l'enzyme peut être ajustée en fonction des primers utilisés et de l'ADN matrice. Une concentration supérieure à 2,5unités/réaction pourrait augmenter l'efficacité de la PCR. Mais, une forte concentration pourrait conduire à une amplification non spécifique. Ainsi, l'optimisation de la [C] de la *Taq* polymérase est testée sur un intervalle de 0,5 à 5 unités/100µl de volume réactionnel.

### **1.2.5) L'ADN matrice (template)**

Une amplification avec succès de la région cible dépend à la fois de la qualité et de la quantité de l'ADN matrice. La plupart des agents chimiques utilisés lors de l'extraction d'ADN sont des inhibiteurs de la *Taq* polymérase (phénol, sels, guanidine, chelex). Ainsi, il faut s'assurer de leur élimination. Pour permettre une PCR satisfaisante,  $10^{+4}$  à  $10^{+7}$  molécules d'ADN matrice sont recommandées. Pour l'ADN génomique, en général, 100 à 500ng d'ADN sont utilisés (1µg d'ADN génomique humain=  $3,04.10^{+5}$  molécules).

### **Applications de la PCR**

Les applications sont très nombreuses pour les citer toutes. Cette technique est appliquée par exemple dans :

- Le diagnostic de maladies infectieuses : recherche de parasites (toxoplasmose, leishmanioses...), de bactéries (tuberculose, méningocoques...), de virus (HIV...).
- Le diagnostic moléculaire de cancers (recherche d'oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs...).
- Le diagnostic de plusieurs maladies génétiques.

Il s'agit de recherches effectuées sur les produits d'amplification qui servent de base à l'application d'une seconde technique : le séquençage direct ou des techniques susceptibles de faire apparaître une différence de comportement entre ADN normal et ADN muté (RFLP, DGGE, SSCP : chapitre IV).

- Amplification de certains gènes des micro-organismes (bactéries, champignons) pour la recherche de certains gènes (toxicité).
- Identification de genres bactériens.

### **Avantages et inconvénients de la PCR**

C'est une technique rapide, sensible et spécifique. Elle comporte cependant des inconvénients qui en font une méthodologie délicate à mettre en œuvre :

- i. L'optimisation de la PCR en vue d'une meilleure spécificité et sensibilité est une étape importante (dépend de multiples facteurs, ci-dessus).
- ii. La propreté de l'ADN cible est prépondérante.
- iii. Le problème majeur consiste à éliminer tout risque de contamination. En effet, si du produit amplifié contamine un tube de PCR prêt à être amplifié, celui-ci sera automatiquement positif. Le contrôle de ces contaminations nécessite la présence de contrôles négatifs lors de l'amplification, mais surtout une organisation rigoureuse au niveau des pièces et du matériel. En effet les étapes d'extraction, préparation de l'amplification et détection des amplicons doivent se faire dans des pièces séparées avec des matériels distincts.

## 2) Les différents types de PCR

En PCR conventionnelle, la technique est dite en "**PCR en point final**" car ce n'est qu'une fois la réaction de PCR terminée que la détection du produit amplifié est effectuée. L'électrophorèse en gel (agarose ou acrylamide) est la plus courante.

### 2.1) Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Cette technique vise à détecter et analyser des ARN (ARNm ou totaux) présents même en très faible quantité dans un échantillon biologique et comprend deux étapes :

- La 1<sup>ère</sup> étape est une rétrotranscription pour transformer l'ARN en ADN complémentaire (ADNc).
- La seconde étape est la PCR qui permet d'amplifier cet ADNc.

Cela revient à inverser le sens normal de l'information génétique (de l'ADN vers l'ARN) par rapport au dogme central (Figure 4).

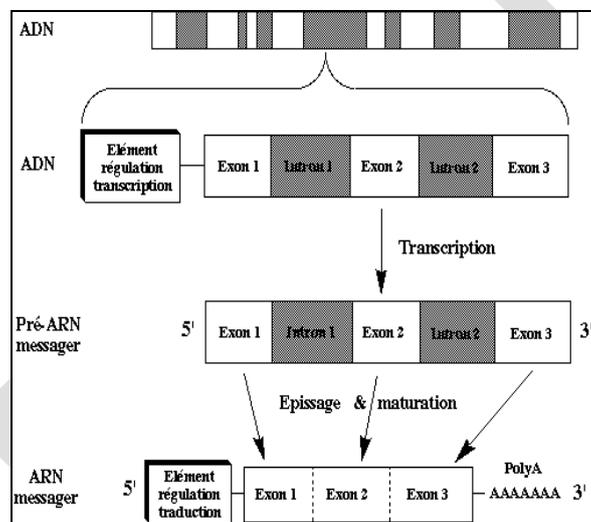


Figure 4: Dogme central de la biologie moléculaire

#### 2.1.1) Principe de la RT-PCR

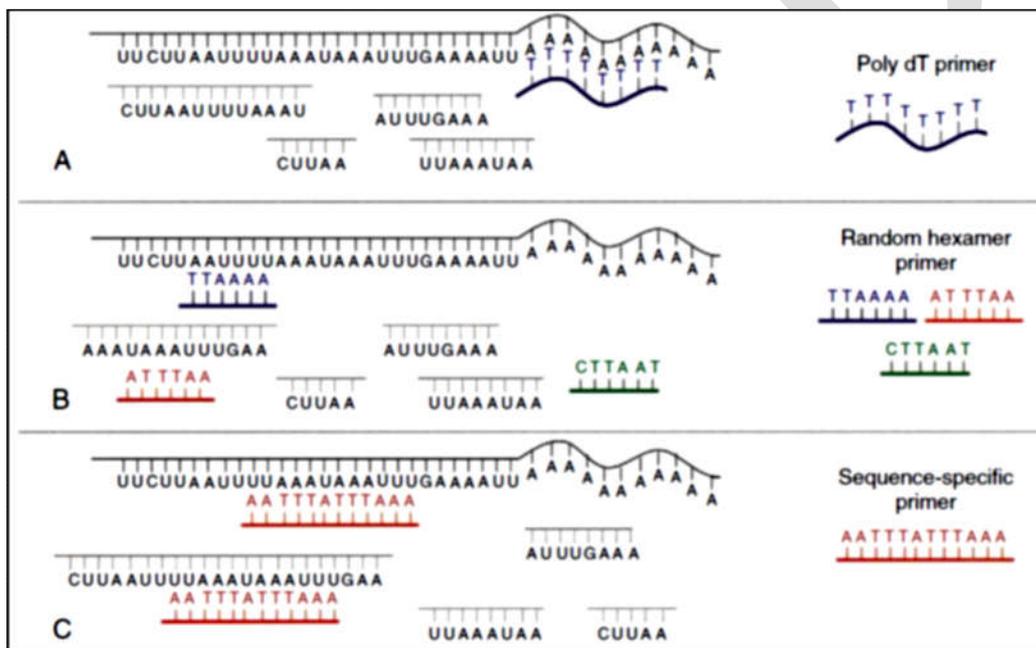
Pour amplifier l'ARN, il faut introduire une étape préalable de **transcription inverse** (Reverse Transcription, RT), réalisée grâce à une enzyme à activité **ADN polymérase-ARN dépendante** appelée **transcriptase inverse**. L'ADNc obtenu est ensuite amplifié par la technique de PCR classique, d'où RT-PCR.

Le principe de la technique consiste à extraire les ARN totaux des tissus étudiés et les copier *in vitro* en ADNc simple brin grâce à l'action de la transcriptase inverse. Les molécules d'ADNc obtenues servent alors de matrice à une réaction PCR en utilisant un couple d'amorces spécifiques de la séquence d'ARN d'intérêt. Les fragments de PCR obtenus sont visualisés par électrophorèse sur gel.

#### 2.1.2) Amorces utilisées au cours de la rétrotranscription

Comme toutes les ADN polymérases, les transcriptases inverses ne peuvent pas initier seules la synthèse d'un brin d'ADN. Elles ont besoin d'une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre. 3 types d'amorces peuvent être utilisés pour la synthèse du premier brin ADNc à partir d'ARNm (Figure 6) :

- **Oligonucléotide poly-dT (amorces oligodT)**: sont des oligonucléotides de synthèse composés de 12 à 18 T (Thymine) en général, capables de s'hybrider à la région polyA en 3' des ARNm d'eucaryotes (Figure 5A).
- **Hexanucléotides d(N)<sub>6</sub>**: amorces hexamériques de séquences aléatoires (randomisées). Il s'agit d'un mélange d'amorces de 6 nucléotides, comprenant toutes les séquences possibles pouvant composer un hexanucléotide (4<sup>6</sup> séquences différentes) (Figure 5B).
- **Amorce 3' spécifique** de la séquence complémentaire de celle de l'ARN à étudier, limitant la rétrotranscription à un transcrite donné (Figure 5C).



**Figure 5** : Types d'amorces utilisées pour initier la RT-PCR (Wilczynski, 2009).

### 2.1.3) L'enzyme : la transcriptase inverse

La phase de passage de l'ARN vers l'ADNc est assurée par une ADN polymérase-RNA dépendante ou la transcriptase inverse. C'est une enzyme présente dans les rétrovirus qui convertissent leur ARN génomique présent dans la particule virale en un ADN double brin. Elle transcrit en 1<sup>er</sup> lieu un ADNc pour former un hybride RNA-DNA. Ensuite la RNase H dégrade le brin d'ARN du duplex ARN-ADN. L'ADN simple brin est alors utilisé comme matrice pour la synthèse d'un ADNc double brin qui sera amplifié par PCR pour produire plusieurs copies.

Les transcriptases inverses issues des rétrovirus comme le virus du Myéloblastome Aviaire (AMV, Avian myeloblastosis virus) et le virus de la Leucémie Murine (Mo-MLV ou Mu-LV, Moloney murine leukemia virus) (Tableau I).

- *Transcriptase inverse AMV*: possède en plus d'une activité ADN polymérase une activité RNase H importante. L'activité RNase H dégrade le brin d'ARN au niveau des hétéroduplex ARN/ADN formés avec les amorces ou le brin d'ADNc en cours de synthèse.

- *Transcriptase inverse MMLV*: L'activité RNase H de cette enzyme est nettement plus faible que celle de l'AMV. La variante MMLV est plus efficace car dépourvue de l'activité RNase H. La matrice ARN n'étant pas détruite, l'enzyme fournit un meilleur rendement.

- *ADN/ARN polymérase Tth*: enzyme thermostable, isolée de la bactérie *Thermus thermophilus*. Elle est douée d'une double activité :

- Activité ADN polymérase identique à celle de la *Taq polymérase*,  $Mg^{2+}$  dépendante.
- Activité ADN polymérase-ARN dépendante qui nécessite les ions manganèse ( $Mn^{2+}$ ).

Les reverse transcriptases extraites sont progressivement abandonnées au profit des RT recombinantes (c'est-à-dire clonées et exprimées dans un autre organisme que celui d'origine).

Les reverse transcriptase actives à haute température (> 42 °C) sont préconisées pour augmenter l'efficacité de rétrotranscription des séquences riches en structures secondaires. Les hautes températures permettent l'élimination des structures secondaires permettant une meilleure hybridation des amorces et une meilleure activité de la reverse transcriptase.

**Tableau I** : propriétés des enzymes reverse transcriptases

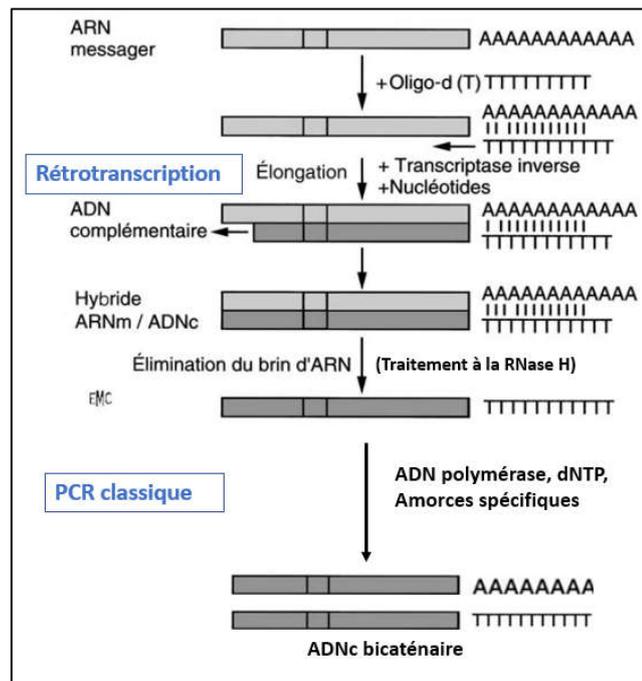
Enzyme	Longueur maximum de la matrice	Température optimum	Ions nécessaires à l'activité enzymatique	Activité RNase H	Activité RT et DNA polymérase combinée
AMV Reverse transcriptase	Jusqu'à 12 kb	42°C (à 60°C)	$Mg^{2+}$	Forte activité	Non
M-MuLV Reverse transcriptase	Jusqu'à 10 kb	37°C	$Mg^{2+}$	Faible activité	Non
Tth DNA polymerase	Jusqu'à 1 kb	60- 70°C	$Mn^{2+}$	Absente	Oui

#### 2.1.4) Déroulement de la Réaction RT-PCR

- i. **La RT-PCR en une seule étape** (*single step RT-PCR*) consiste à mélanger les réactifs de RT et de PCR (ARN, amorces, dNTP, tampon PCR, enzymes RT et *Taq* polymérase ou l'enzyme qui peut assurer les 2 activités) afin que les deux étapes puissent se faire sans avoir à ouvrir le tube. Cela permet de réduire le risque de contamination mais il est plus difficile d'optimiser le milieu réactionnel pour chaque étape.

Certains kits permettent de réaliser la réaction de RT et de PCR en une seule étape. Ces kits utilisent soit un mélange d'AMV et de *Taq* polymérase, soit une enzyme possédant la double activité.

- ii. **La RT-PCR en 2 étapes** (Two-steps RT-PCR): d'abord la transcription reverse ensuite la PCR classique (Figure 6).



**Figure 6** : Illustration (modifiée) d'une RT-PCR en deux étapes (Delabesse, 2003)

Dans la 1<sup>ère</sup> étape, les échantillons sont mis dans un appareil à PCR pour la réalisation de la reverse transcription (48°C pendant 45 minutes par exemple).

Dans la 2<sup>ème</sup> étape, dans chaque tube PCR, est ajouté un mélange contenant les dNTP, MgCl<sub>2</sub>, *Taq* polymérase ainsi que les amorces spécifiques de la région d'intérêt. Les tubes sont mis alors dans l'appareil à PCR pour réaliser les cycles d'une PCR classique.

### 2.1.5) Applications de la RT-PCR

La RT-PCR est devenue l'une des Techniques largement appliquées dans la recherche biomédicale. Elle est la méthode la plus sensible pour **détecter et quantifier les ARN messagers**, produit de l'expression des gènes, au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule.

Pour l'analyse du produit d'expression des gènes, il pourra s'agir de la détection de transcrits anormaux, comme par exemple les transcrits de fusion issus des translocations chromosomiques associées à certains cancers (sarcomes). La détection de ces transcrits de fusion permet alors le diagnostic de la tumeur.

Dans le cadre du diagnostic génétique, l'étude de l'expression de certains gènes peut également servir au diagnostic. La RT-PCR permet également la recherche de mutations dans les exons par séquençage d'ADNc, ce qui facilite le travail dans le cas de gènes comportant de multiples exons

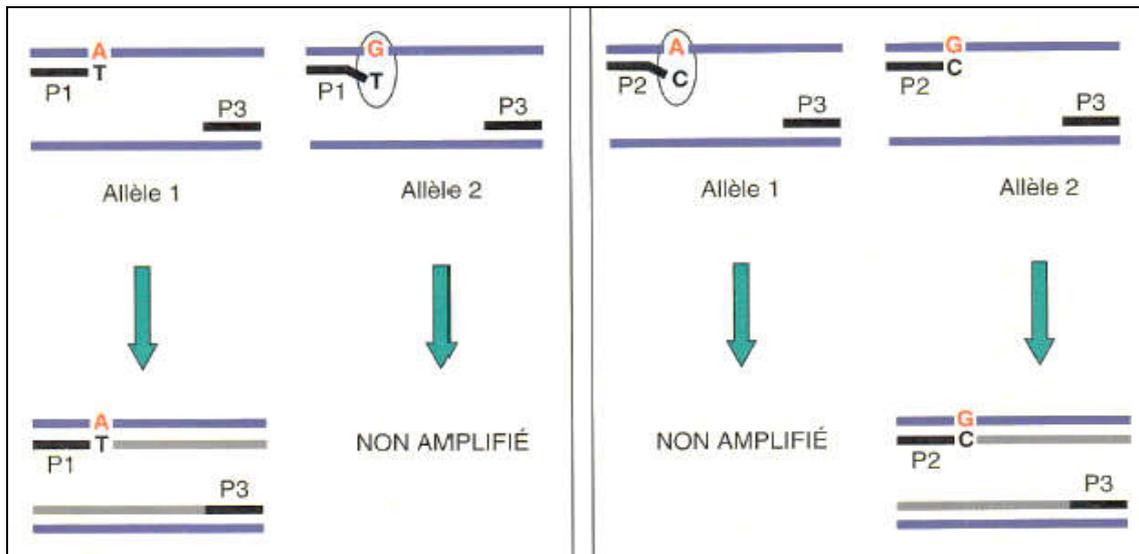
La RT-PCR offre également de nombreuses possibilités de diagnostic permettant la détection sensible de virus ARN tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'hépatite C (VHC).

### 2.2) PCR spécifique d'allèles/ PCR-ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*)

Il s'agit d'une technique appliquée pour distinguer 2 allèles d'un même gène ne différant que par un seul nucléotide. Elle est appliquée donc pour l'étude d'un polymorphisme bi-allélique et la recherche d'une mutation ponctuelle de type substitution.

**2.2.1) Principe** : un mésappariement en 3'du complexe ADN cible-amorce ralentit considérablement l'extension du duplex. Cette propriété est exploitée pour la mise en place de cette technique (Figure 7).

Pour la réalisation de cette technique, une ADN polymérase sans activité 3'-5' exonucléase correctrice d'erreur est utilisée : c'est le cas de la *Taq* polymérase.



**Figure 7:** Principe schématisé de la PCR spécifique d'allèles (Ameziane, 2006)

Soit 2 primers P1 complémentaire de l'allèle normal (1) et P2 complémentaire de l'allèle muté (2) où A est remplacée par G. Une amorce commune est utilisée pour les deux allèles. P1 et P2 diffèrent en 3'.

- ⇒ L'amorce P1 s'hybridera parfaitement avec l'allèle 1 ce qui va permettre son amplification. La même amorce formera un mésappariement avec l'allèle 2 ce qui va empêcher son amplification.
- ⇒ L'amorce P2 s'hybridera parfaitement avec l'allèle 2 permettant ainsi son amplification. La même amorce par contre formera un mésappariement avec l'allèle 1 et ne va pas donc permettre son amplification.

**2.2.2) Méthodologie :** cette technique sera réalisée en TP (le protocole expérimental est détaillé sur le fascicule de TP).

### 2.3) Amplification par PCR en temps réel

La PCR en temps réel (*real-time PCR*, *rt-PCR*) combine amplification et détection simultanée des produits amplifiés (réalisée en une seule étape). A l'inverse des techniques utilisant la PCR classique dont les étapes d'amplification et d'analyse du produit amplifié sont séparés.

#### 2.3.1) Principe

La rt-PCR est une technique qui repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction de PCR. Le signal fluorescent est proportionnel à la quantité de produits de PCR générés (Amplification et détection synchronisée). Elle permet de déterminer le taux d'ADN ou d'ARN spécifiques dans un échantillon biologique. Elle permet par son principe de faire des mesures quantitatives (expliquant l'appellation PCR quantitative, *qPCR*).

#### 2.3.2) Méthodologie

Les étapes de la rt-PCR sont les mêmes que celles d'une PCR classique, excepté la révélation des amplicons qui est analysée en temps réel. Les amorces répondent aux mêmes critères de spécificité que celles de la PCR

classique. Aussi, il faut appliquer la température d'hybridation aux caractéristiques des amorces et à leur concentration.

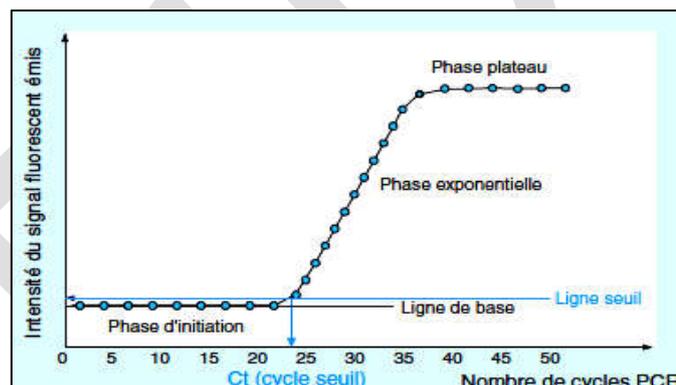
L'exécution de cette technique nécessite :

- La *Taq* polymérase
- Les quatre nucléotides
- Le couple d'amorces
- Une molécule émettrice de fluorescence. Les deux molécules les plus utilisées :
  - Un agent se liant à l'ADN double brin ou le Sybergreen (SYBR Green).
  - Les sondes fluorescentes ou sondes "Taqman" ou sondes d'hydrolyse.
- L'ADN matrice double brin, simple brin ou encore l'ARN.

### 2.3.3) Cinétique de la rt-PCR

La cinétique d'une PCR en temps réel décrit une courbe sigmoïde comportant trois phases (Figure 8) :

- **Une phase d'initiation** : durant laquelle l'amplification n'est pas détectable
- **Une phase exponentielle** : observée lorsqu'un nombre suffisant de produits PCR a été accumulé pendant la phase d'initiation. Pendant cette phase, la quantité des produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice.
- **Une phase de plateau** : atteinte lorsqu'un des constituants nécessaires à la PCR devient limitant ou encore l'inactivation thermique partielle de l'ADN polymérase.

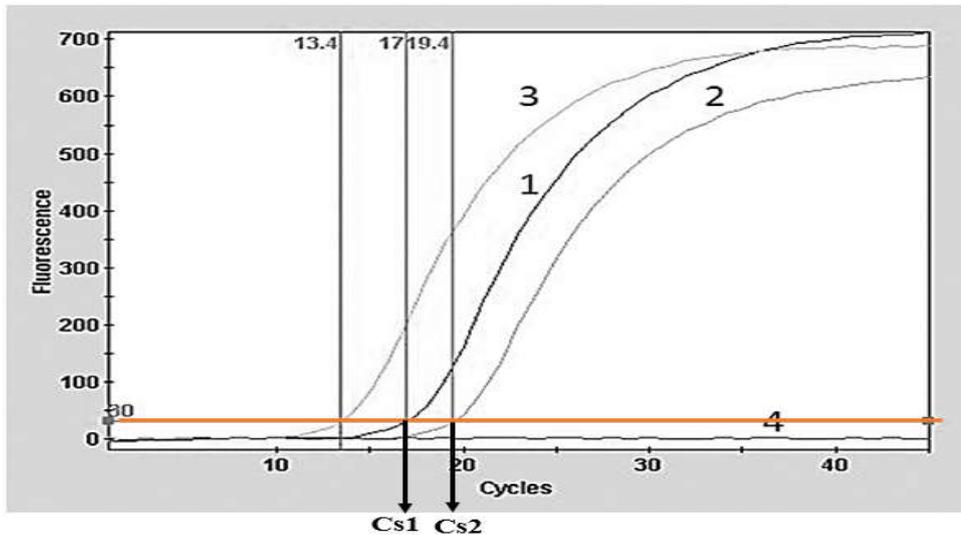


**Figure 8** : Courbe de fluorescence obtenue lors d'une PCR en temps réel (Garnier et al., 2011).

### 2.3.4) Paramètres de la courbe de fluorescence

- i. **La ligne seuil** : correspond au seuil de détection de la fluorescence au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle.
  - ii. **La ligne de base** : reflète le bruit de fond de fluorescence. Au cours des premiers cycles d'amplification, l'intensité de la fluorescence émise est très faible et va permettre de définir la ligne de base de la courbe.
  - iii. **Le cycle seuil Ct** (threshold cycle) : le point d'intersection de la courbe avec la ligne seuil et correspond au cycle de la PCR où le signal de la fluorescence atteint la valeur du seuil.
- Le cycle seuil est le point de départ de la phase exponentielle. Il est directement lié à la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon.
  - Le cycle seuil (Cs) est inversement proportionnel au logarithme du nombre  $N_0$  de molécules d'acide nucléique cible initialement présentes avant amplification par PCR (Figure 9).

Exemple : deux échantillons possédant des quantités d'ADN initiales différentes : il faut moins de cycles pour pouvoir détecter des quantités significatives d'ADN dans l'échantillon E1 (Cs=17), alors qu'il faut plus de cycles pour obtenir le même résultat à partir de l'échantillon E2 (Cs2=19,4).



**Figure 9** : Courbes de PCR en temps réel pour la recherche de *Bordetella pertussis* .

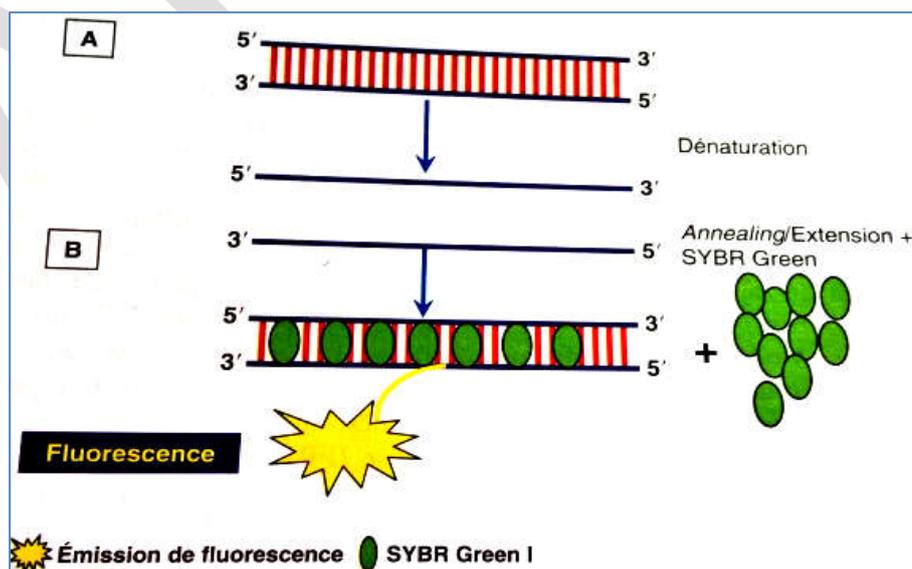
(1 : ADN d'un patient positif ; 2 : ADN d'un patient positif; 3 : témoin positif ; 4 : témoin négatif) (Garnier et al., 2011)

### 2.3.5) Les systèmes de détection en temps réel

Les produits d'amplification peuvent être détectés selon deux grands principes : par marquage non spécifique avec des agents se liant à l'ADN double brin et par marquage spécifique à l'aide de sondes fluorescentes.

#### 2.3.5.1) Les agents intercalants

Dans certains cas, un marquage non spécifique est réalisé à l'aide du fluorochrome SYBR Green. Le SYBR Green est un composé organique aromatique de formule chimique C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>S. C'est un agent intercalant qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. La fluorescence est émise lorsqu'il se lie à l'ADN sous sa forme double brin. Il permet de quantifier l'augmentation des produits PCR en mesurant la fluorescence émise (Figure 10).



**Figure 10** : SYBER Green se liant à l'ADN double brin (Ameziane, 2006)

Durant la dénaturation, le SYBR Green libre exhibe peu de fluorescence. Lors de la température d'hybridation, quelques molécules se lient à l'ADN double brin néosynthétisé ; il en résulte une émission de fluorescence lors de l'excitation. Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel.

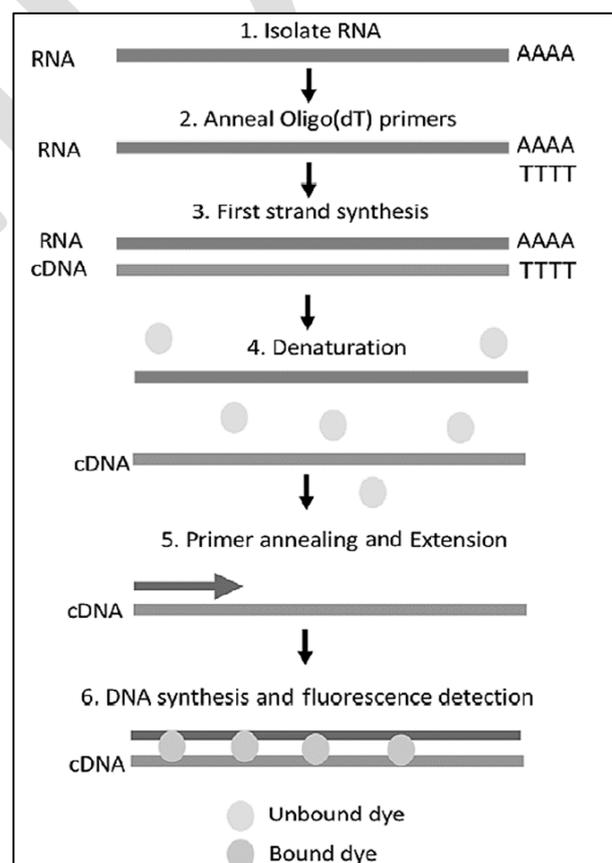
### 2.3.5.2) Les sondes fluorogéniques

Une méthode de détection spécifique du produit de PCR par les sondes TaqMan sont souvent employées. Elles sont les fréquemment utilisées pour la détection de mutations ponctuelles (SNP) ou la quantification de gènes. Ce sont des sondes d'environ 15-30 bases marquées par 2 fluorophores : un à l'extrémité 5' (fluorescéine) et l'autre à l'extrémité 3' (rhodamine) (Cours de Biologie Moléculaire appliquée, Master 1- Biologie moléculaire et cellulaire).

### 2.3.6) Variante de la PCR en temps réel : RT-PCR en temps réel

Il arrive que la PCR quantitative implique une étape de transcription inverse. C'est le cas de la RT-PCR en temps réel (rRT-PCR, Real Time Reverse transcriptase PCR) est une technique qui permet de faire une PCR quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est d'abord rétrotranscrit grâce à la transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR en temps réel (Figure 11).

La RT-qPCR a été mise au point pour utiliser les ARN comme matrice d'amplification de la PCR quantitative. Elle permet d'identifier les virus à ARN ou rétrovirus (Coronavirus, HIV) ainsi que pour la détection et la quantification d'ARNm dans les organes.



**Figure 11** : Déroulement schématisé de la rRT-PCR (Adam, 2020)

Des appareils permettant de réaliser à la fois la réaction de PCR et la détection de la fluorescence ont été développés. Ces appareils sont à la fois des thermocycleurs et des fluoromètres qui détectent spécifiquement en temps réel l'amplicon (produit PCR) ; Exemple : Light Cycler (piloté par un ordinateur)

### 2.3.7) Applications de la PCR et temps réel

En biologie médicale, les applications sont très nombreuses et couvrent des domaines très diversifiés dont les plus importants se situent en microbiologie clinique, virologie et dans l'étude de l'expression des gènes.

- Détection et quantification d'agents pathogènes bactériens (Ex : mycobactéries, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia*) et fongiques (*Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*).
- Détection des virus.
- Estimer le niveau d'expression de gènes d'intérêt
- Analyser l'expression des variants d'épissage génique.

**Remarques :** d'autres types de PCR feront l'objet du cours de Biologie Moléculaire appliquée, Master 1-Biologie moléculaire et cellulaire.

### Références bibliographiques :

#### Articles :

- Adams G: **A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR.** *The Biochemist* 2020, **42**:48-53.
- Delabesse E, Asnafi V, Macintyre E: **Application à l'hématologie maligne des techniques de biologie moléculaire.** *Transfusion Clinique et Biologique* 2003, **10**:335-352.
- Singh J: **a critical review on PCR, its types and applications.** *International Journal of Advanced research in biological sciences* 2014, **1**:65-80
- Vassias I : **Principe de l'amplification en chaîne par polymérase** *EMC Biologie médicale* 7 2012, **7**:1-5.

#### Ouvrages :

- Ameziane N, Bogard M, Gougerot-Pocidal MA, Lamoril J: **Principes de biologie moléculaire en biologie clinique.** Elsevier ; 2005 (<https://books.google.dz/books?id=cwxYehzAoz8C>).
- Garnier F, Burucoa C, Lanotte P: **Biologie moléculaire: application à la détection, à l'identification et au génotypage** In *Bactériologie médicale Techniques usuelles.* Elsevier Masson; 2011.
- Kaplan JC, Delpech M: **Biologie moléculaire et médecine.** In *Biologie Moléculaire et Médecine.* Edited by Médecine Sciences F: Flammarion Médecine-Sciences; 1993 (<https://books.google.dz/books?id=xbHUMwEACAAJ>).
- Pelt-verkuil E, van Belkum A, Hays J: **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification.** *Springer Dordrecht*; 2008.
- Rapley R: **Molecular biology, bioinformatics and basic techniques.** In *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology.* 7 edition. Edited by Wilson K, Walker J. Cambridge: Cambridge University Press; 2010: 138-194 (<https://www.cambridge.org/core/product/B0E4C2435F3F95ABE3501AEBD9B11A01>).
- Wilczynski SP: **Chapter 7 - Molecular Biology.** In *Modern Surgical Pathology (Second Edition).* Edited by Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. Philadelphia: W.B. Saunders; 2009: 85-120 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416039662000060>).

## Chapitre V : METHODES DE DETECTION DES VARIATIONS DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES

### Objectifs du cours

- a) Différencier entre les différents types de polymorphismes.
- b) Différencier entre : techniques de criblage d'un gène ou d'une partie d'un gène et identification spécifique d'une mutation connue.
- c) Comprendre l'action des enzymes de restriction dans l'identification de variations nucléotidiques connues.
- d) Comprendre le principe d'identification d'une mutation connue par Southern Blot.
- e) Connaître les étapes de la technique de Southern.
- f) Comprendre le principe de recherche de mutations ou variations inconnues.
- g) Comprendre le principe de migration des fragments d'ADN amplifiés au cours de l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE).
- h) Comprendre le principe de migration des fragments d'ADN amplifiés au cours de la technique de polymorphisme de conformation des acides nucléiques simple brin (SSCP).
- i) Comprendre les différences entre la DGGE et la SSCP.

### Plan du cours

Introduction

#### **1) Notion de polymorphismes**

- 1.1) Types de polymorphismes
  - 1.1.1) Le polymorphisme bi-allélique
  - 1.1.2) Les polymorphismes de répétition ou polymorphismes multi-alléliques
- 1.2) Conséquences des polymorphismes
- 1.3) Intérêt des polymorphismes

#### **2) Principales techniques de détection des variations nucléotidiques**

- 2.1) Détection des mutations connues
  - 2.1.1) Méthode de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
  - 2.1.2) Technique de Southern Blot
- 2.2) Détection des mutations inconnues
  - 2.2.1) Technique de DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis)
  - 2.2.2) Technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

### Introduction

Le développement des techniques de la biologie moléculaire a permis la mise en évidence d'une très grande variabilité de l'ADN tant au niveau chromosomique (remaniements) qu'au niveau nucléotidique (mutations et polymorphismes).

#### **1) Notion de polymorphismes**

Il existe d'un individu à l'autre, dans les populations humaines, des variations de séquence de l'ADN appelées **polymorphismes** qui peuvent n'avoir aucune conséquence pathologique.

La notion de « polymorphisme » repose à la fois sur le caractère non pathogène de la variation de séquence, et la fréquence dans la population ( $\geq 1$  % par définition).

En effet, le projet de séquençage du génome humain a démontré la présence de nombreuses variations du génome d'un individu à l'autre. Un polymorphisme peut se localiser n'importe où sur le génome avec une fréquence variable dans les populations (différences ethniques et géographiques).

Une **mutation** est une variation allélique pouvant aboutir au développement d'une maladie. Une mutation de manière générale est une altération de l'ADN modifiant le génotype du sujet. La conséquence d'une mutation est l'altération du fonctionnement normal du gène ou de l'expression de celui-ci. De nombreuses maladies héréditaires présentent des anomalies sur le(s) gène(s) impliqué(s) ou dans les régions régulant l'expression de ces gènes.

## 1.1) Types de polymorphismes

1.1.1) Le polymorphisme bi-allélique : Une base (A, C, G ou T) peut être remplacée par une autre base sur un gène : **2 allèles possibles pour un locus**. Le polymorphisme bi-allélique également appelé *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), peut être présent à l'état hétérozygote ou homozygote (Figure 1).

```
Chromosome 1.....ATCGTTCCGTAACGTTGCTAACGTGATCGTGAC....  
Chromosome 2.....ATCGTTCCGTAACGTTGATAAACGTGATCGTGAC...
```

**Figure 1** : Exemples de polymorphismes bi-alléliques (SNP)

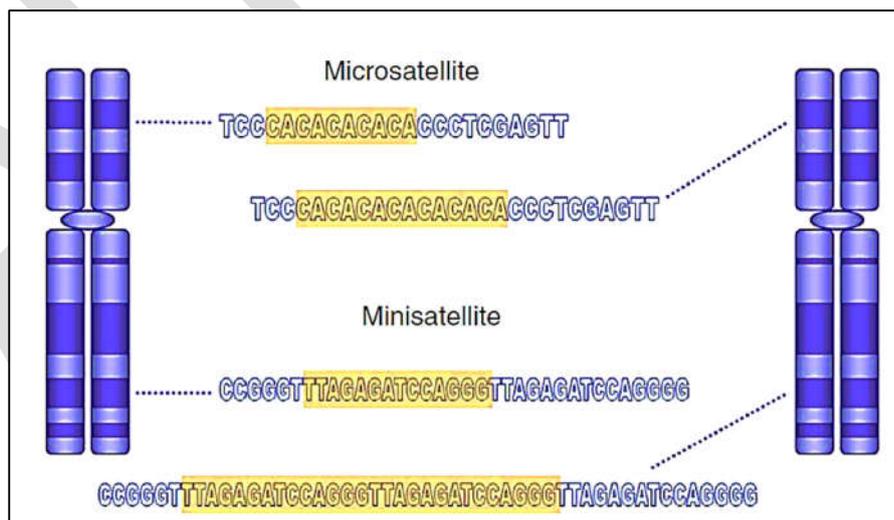
Les SNP sont les plus fréquents dans le génome humain et peuvent être classés selon les conséquences qu'ils peuvent engendrer et leur localisation dans le génome :

- Changements d'une base : transition/transversion (A/C, A/T, G/C, G/T)
- Pas de changement d'acides aminés,
- Changement d'acides aminés,
- Création/abolition d'un site de restriction (polymorphisme de restriction),
- Présents dans les régions 3' et 5' non codantes ou autres régions du génome.

Leur nombre a été estimé à environ dix millions dans le génome de chaque individu. L'association de SNP dans une région du génome située sur un même chromosome s'appelle un **haplotype**.

1.1.2) Les polymorphismes de répétition ou polymorphismes multi-alléliques

- Il s'agit le plus souvent d'une **séquence répétée en tandem** au niveau du même site.
- Le **nombre de répétitions** varie d'un individu à l'autre et constitue un **allèle**.
- De taille variable, constitués de répétitions d'un motif unitaire plus ou moins complexe (Figure 2).



**Figure 2** : Polymorphismes de répétition : microsatellite and minisatellite (Korf, 2017)

Selon la taille du motif et le nombre de répétitions, on distingue :

- i. **Les microsatellites ou short tandem repeats (STR)**
  - Les microsatellites comportent des séries de répétitions d'un **motif de base court** (1 à 4 paires de bases)
  - Nombreux sur l'ensemble du génome : 50000-100000 copies par génome.
  - Le nombre de répétitions de ce motif est variable d'un individu à l'autre dans la population.
  - Pour un locus : très nombreux allèles possibles= **multi-allélique**.
  - Leur détection est obtenue par **PCR** du locus contenant la séquence répétée suivie d'une électrophorèse du produit de PCR qui permet de distinguer les allèles en fonction de leur taille.
- ii. **Les minisatellites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)**
  - Séquences répétées en tandem, ayant en commun un motif central de 11 à 16 pb en moyenne, parfois plus longs : **(TTAGAGATCCAGGG)<sub>n</sub>**
  - Ces séquences sont disséminées sur tous les chromosomes, souvent en régions télomériques (à l'exception des chromosomes X et Y).

Les microsatellites et les minisatellites se situent souvent dans les régions non codantes du génome.

- iii. **La variation du nombre de copies d'un gène** (variation structurale): Certains gènes ou séquences extragéniques sont présents en plusieurs copies. Ce nombre de copies peut varier d'un sujet à l'autre. On parle de variation du nombre de copies (copy number variation, CNV). Par exemple, le nombre de copies du gène AMY1A (OMIM 104700, codant pour l'amylase salivaire) est variable d'une population à l'autre (1 à 10 copies) et aboutit à une concentration salivaire d'amylase variable et proportionnelle au nombre de copies du gène d'un sujet à l'autre et même d'une population à l'autre

### **1.2) Conséquences des polymorphismes**

- Aucune conséquence pathologique directe.
- Peut entraîner des variations phénotypiques (couleur des yeux),
- Prédilection à certaines pathologies (polymorphismes fonctionnels),
- Réponses différentes aux médicaments (pharmacogénétique)...

### **1.3) Intérêt des polymorphismes**

Les polymorphismes sont des outils d'un intérêt fondamental dans l'analyse du génome humain :

- Localisation et identification de gènes nouveaux.
- Le diagnostic des maladies monogéniques.
- Médecine légale.
- Etude de paternité.

**Remarque** : cet aspect sera détaillé dans le cours de Biologie Moléculaire Appliquée (Master 1- Biologie Moléculaire et Cellulaire).

## **2) Principales techniques de détection des variations nucléotidiques**

De nombreuses techniques ont été décrites et utilisées pour la détection des mutations ou des SNP. Parmi celles-ci on peut citer :

- **Les techniques de criblage** : permettent un screening large d'un gène ou d'une partie d'un gène. Elles sont utilisées pour localiser une région du génome dans laquelle pourrait se trouver une mutation ou un

polymorphisme. Ces techniques ne permettent pas de caractériser d'une manière précise une mutation. Une fois la région est déterminée, la mutation ou le polymorphisme est ensuite identifié par séquençage.

- **Les techniques de détection de mutations connues** (ou SNP connus) : PCR spécifique d'allèles, PCR-RFLP, Southern Blot, PCR en temps réel.

## 2.1) Détection des mutations connues

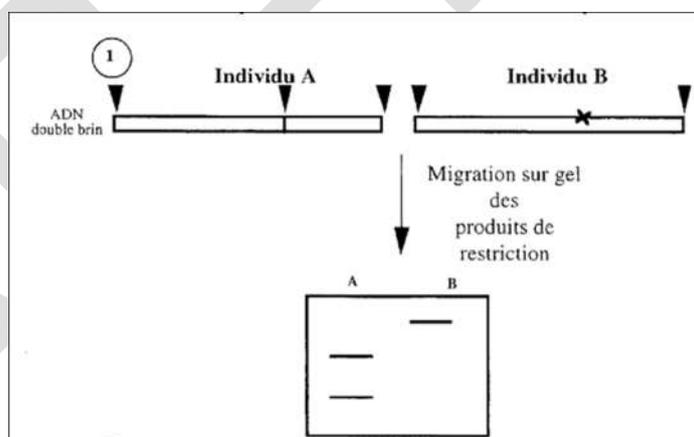
### 2.1.1) Méthode de RFLP (*polymorphisme de la longueur des fragments de restriction* ou *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Il s'agit d'une technique permettant d'analyser la séquence des acides nucléiques, mise en place suite à la découverte d'enzymes de restriction bactériennes ou endonucléases de restriction. Ces enzymes reconnaissent spécifiquement dans l'ADN de courtes séquences (de 4- 6 bases généralement) et coupe l'ADN à cet endroit.

Le génome d'une espèce contient, dans sa séquence nucléotidique, des sites de restriction reconnus par des endonucléases. Certains de ces sites sont **invariants** et toujours présents (sites naturels). D'autres sont **facultatifs** et constituent un marqueur RFLP (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction). Selon que le site est présent ou absent, l'action de l'endonucléase, à cet endroit du génome, donnera deux fragments courts ou bien un seul fragment long.

#### 2.1.1.1) Principe de la RFLP

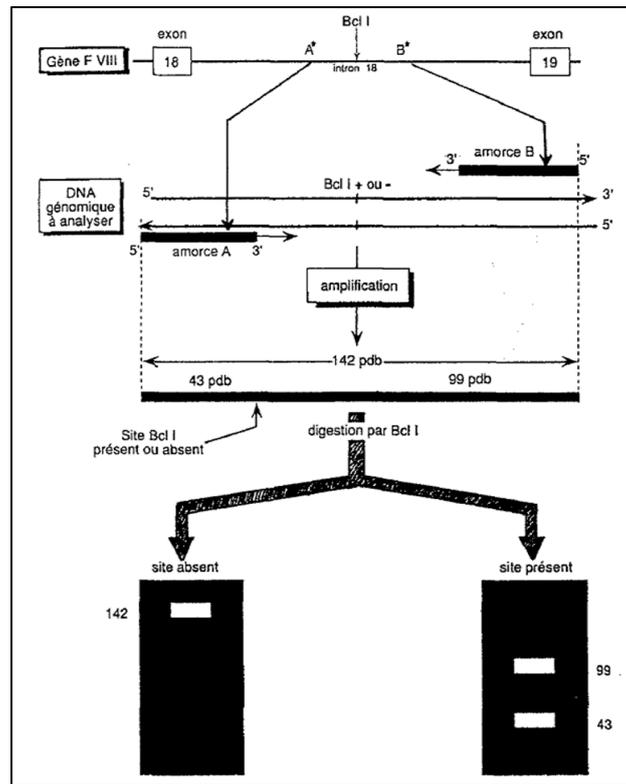
Le principe repose sur la comparaison de profils de coupure par les enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans la séquence d'une molécule d'ADN par rapport à une autre (Exemple : ADN d'un individu A et d'un individu B). Des mutations ponctuelles (ou SNP) apparaissant sur une séquence d'ADN reconnue par une enzyme de restriction vont provoquer des longueurs de fragments de restriction différentes. L'ADN des individus à comparer est donc digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction (Figure 3).



**Figure 3** : Principe de la RFLP (Tagu, 2006)

#### 2.1.1.2) Méthodologie

Sur le plan pratique, le fragment d'ADN contenant le site de restriction est d'abord amplifié par PCR grâce à des amorces spécifiques. Ensuite, l'endonucléase est mise à agir sur les produits de PCR (d'où PCR-RFLP). Les produits de restriction sont visualisés par électrophorèse (gel d'agarose ou polyacrylamide) (Figure 4).



**Figure 4 :** schéma général pour l'exploration d'un RFLP intragénique du facteur VIII par PCR (Cazenave et al., 1995)

L'identification du variant nucléotidique dans un segment génique est mise en évidence par **création** ou **abolition du site de restriction**

- **Identification d'une mutation par abolition d'un site restriction**

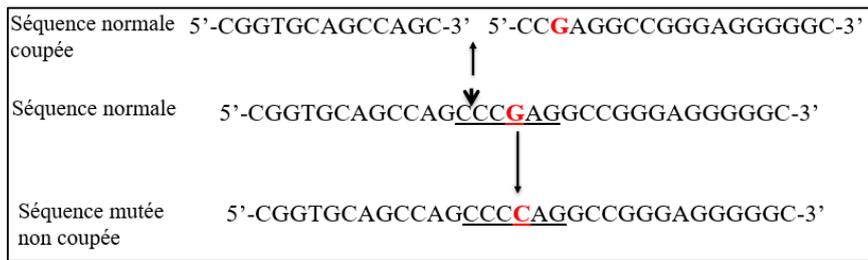
Exemple : Recherche de p. E148Q (p.Glu148Gln) dans l'exon 2 du gène *MEFV* (*Mediterranean Fever*) par PCR-RFLP.

Cette mutation est une substitution d'une G par une C en position 442 de l'ADN codant : c.442G>C.

*AvaI* est l'enzyme de restriction qui met en évidence la présence de p.E148Q. Elle reconnaît et coupe la séquence suivante : 5'- **CYCGRG** -3' (Y peut être C ou T; R peut être A ou G).

Sur le plan pratique :

- La 1<sup>ère</sup> étape consiste à amplifier la région d'intérêt (exon 2) avec un couple d'amorces spécifiques.
- Les produits PCR obtenus sont ensuite digérés par l'endonucléase *AvaI* pendant un certain temps (3 heures par exemple) à 37°C dans le tampon approprié de l'enzyme.
- Révélation des réactions de digestion par électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide.
- Interprétation des profils de restriction obtenus.



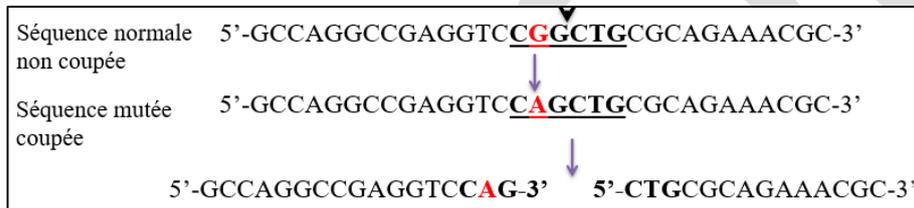
Dans la séquence nucléotidique représentant l'allèle normal, *AvaI* coupe au niveau de la position 13.

La substitution de **G>C** au niveau de la séquence reconnue par l'enzyme de restriction (soulignée) empêche l'action de celle-ci : Il y a alors **abolition du site de restriction**.

▪ **Identification d'une mutation par création d'un site de restriction**

Exemple : Recherche de p. R202Q (p.Arg202Gln) dans l'exon 2 du gène *MEFV* par PCR-RFLP. Cette mutation correspond à une substitution de G par A en position 605 de la séquence codante : **c.605G>A**.

La variation nucléotidique est identifiée par l'endonucléase ***PvuII*** qui reconnaît la séquence suivante : **5'-CAGCTG-3'**.



La séquence normale n'est pas coupée par l'enzyme de restriction *PvuII*. La présence de p.R202Q dans l'exon 2 conduit à la création d'un site de restriction reconnu et coupé par *PvuII* : il y a **création d'un site de restriction**.

2.1.2) Technique de Southern Blot

Les techniques de Blot (**Transfert**) ou de transfert par capillarité sont utilisées pour la visualisation de fragments spécifiques d'ADN ou d'ARN.

- Southern blot: ADN
- Northern blot: ARN (expression des gènes)
- Western blot: Protéines

La technique de Southern blot a été introduite en 1975 par Edward Southern. Elle permet de détecter des altérations importantes dans un gène (délétions, insertions, réarrangements), les mutations ponctuelles ou encore les polymorphismes de restriction (RFLP).

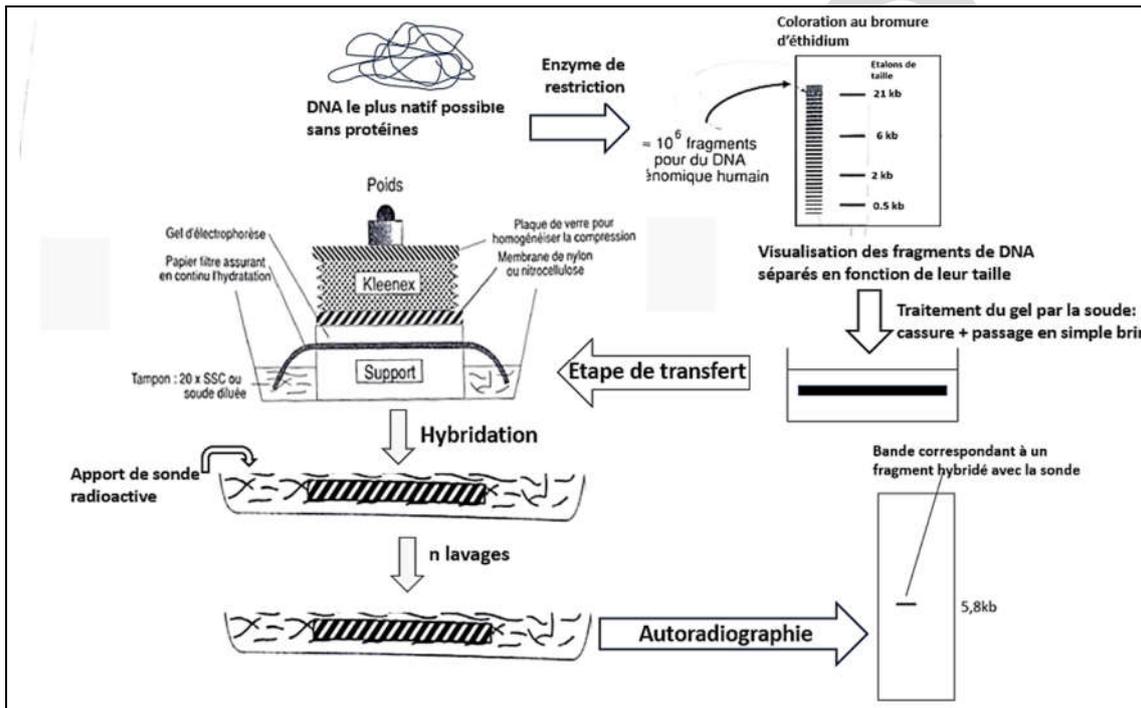
**2.1.2.1) Principe**

La technique a été mise au point après la découverte des enzymes de restriction. La détection spécifique des acides nucléiques repose sur les principes généraux de **l'hybridation moléculaire** ADN-ADN ou ADN-ARN (plus rarement ARN-ARN). L'hybridation moléculaire permet de repérer ou de rechercher une molécule d'ADN ou d'ARN spécifique dans une population hétérogène, en utilisant une sonde marquée, monocaténaire **et complémentaire à la séquence d'ADN d'intérêt**. La phase d'hybridation met en contact les acides nucléiques fixés sur une membrane synthétique avec une sonde nucléique marquée. Lorsque la sonde reconnaît son

homologue dans la population de molécules cibles, il y a hybridation et l'hybride devient marqué par la présence de la sonde et révélé par autoradiographie.

**2.1.2.2) Etapes de la technique du Southern Blot (Figure 5) :**

- i. Digestion enzymatique : L'ADN isolé est soumis à l'action d'une ou de plusieurs endonucléases.
- ii. Séparation des acides nucléiques par électrophorèse : Les fragments de restriction obtenus sont mis à migrer sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide.



**Figure 5** : Étapes de la technique de Southern Blot (Kaplan et Delpech, 1993)

- iii. Transfert des acides nucléiques sur membrane : Les fragments d'ADN sont ensuite transférés par **capillarité** sur une feuille de nitrocellulose ou de nylon (**Southern blot**), produisant ainsi une réplique exacte du profil obtenu sur le gel.

Avant le transfert, les acides nucléiques doivent être dénaturés. Cette opération s'effectue soit durant l'électrophorèse (électrophorèse en condition dénaturante, cas des ARN), soit après l'électrophorèse en plongeant durant plusieurs minutes le gel d'électrophorèse dans une solution dénaturante, le plus souvent à base de NaOH. Cette solution diffuse à l'intérieur du gel pour faire passer l'ADN sous forme simple brin pour permettre l'hybridation des sondes.

Dans l'étape de transfert des fragments d'ADN dénaturés, le gel est recouvert de la membrane de nylon ou de nitrocellulose puis déposé sur un montage qui assure son hydratation continue. Le tout est recouvert d'un épais paquet de papier hydrophile pour absorber le liquide contenu dans le gel, ce qui crée un courant liquidien ascendant entraînant les fragments d'ADN jusqu'à la membrane de nylon.

Le paquet de papier est maintenu sur le gel par application d'un poids.

Afin que la fixation des fragments d'ADN à la membrane devienne irréversible, la membrane doit subir un traitement à la chaleur.

- iv. Etape d'hybridation : la membrane de nylon ou de nitrocellulose avec l'ADN fixé est incubée dans un sac contenant une solution d'une sonde marquée d'ADN monocaténaire complémentaire du fragment d'ADN d'intérêt. Lorsque la molécule sonde reconnaît son homologue dans la population de molécules cibles, il y a hybridation et l'hybride devient marqué par la présence de la sonde.
- v. Etape de révélation : La membrane est soumise à des lavages afin d'éliminer les sondes non fixées sur l'ADN. La membrane est ensuite recouverte d'un film radiosensible dans une enceinte opaque pour que la sonde radioactive fixée sur les fragments de DNA complémentaires impressionne le film : révélation par **autoradiographie**. Ainsi, sur le film, les taches noires correspondent aux emplacements des fragments d'ADN complémentaires de la sonde. On compare les distances de migration avec des fragments de DNA radioactifs de tailles connues qui servent de marqueurs de taille. Les films autoradiographiques sont de plus en plus remplacés par des écrans autoradiographiques dont les signaux sont révélés par numérisation.

## 2.2) Détection des mutations inconnues

Un certain nombre de méthodes combinées à la PCR ont été développées pour la détection des mutations et des polymorphismes. Les méthodes de criblage (screening) les plus fréquemment utilisées pour la recherche de mutations ou de polymorphismes sont l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) et le polymorphisme de conformation monocaténaire (SSCP). Cependant, **ces méthodes ne permettent pas d'identifier de façon formelle une mutation mais seulement de la localiser**. Il est alors nécessaire de réaliser un séquençage pour identifier la mutation.

### 2.2.1) Technique de D.G.G.E (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) ou Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant

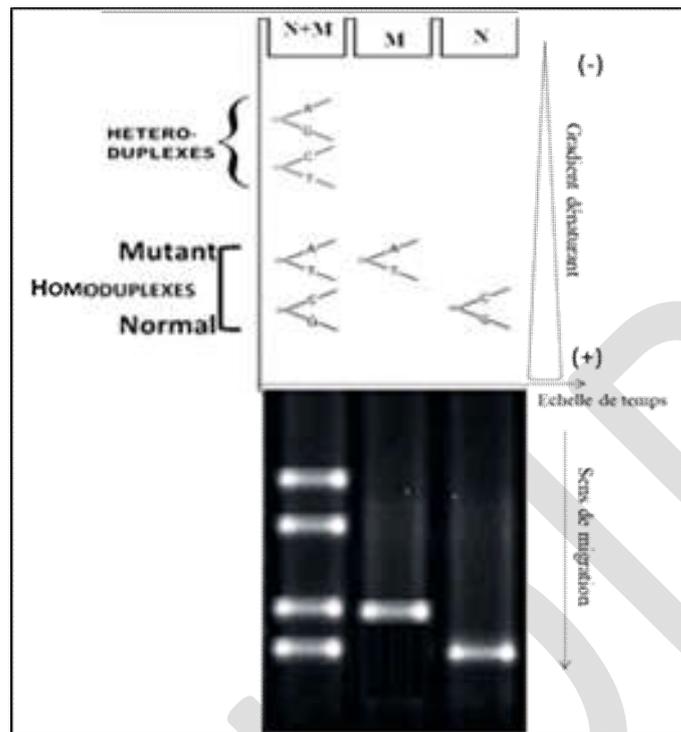
C'est est une technique d'électrophorèse décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1983 par Fischer et Lerman, pour la détection de variants ponctuels (polymorphismes, mutations) dans des fragments de taille inférieure à 500pb.

#### 2.2.1.1) Principe

La DGGE repose sur une migration électrophorétique **dépendante de la séquence** d'un fragment d'ADN obtenu après PCR. Le principe de la technique est basé sur le fait que la **température de fusion (T<sub>m</sub>)** d'une molécule d'ADN double brin dans les conditions dénaturantes est fonction de sa séquence nucléotidique.

En soumettant des fragments d'ADN de séquences différentes à un gradient de dénaturation croissant obtenu avec des agents chimiques dénaturants (formamide- urée), on observera des cinétiques de dénaturation différentes (DGGE implique la séparation de fragments d'ADN double brin de même taille mais de séquence différente).

Au cours de l'électrophorèse, l'ADN migre d'abord à l'état bicaténaire, puis rencontre des conditions qui dénaturent le domaine de fusion le moins stable de la molécule, formant une structure partiellement monocaténaire, dite branchée ou ramifiée (Figure en Y) (Figure 6). La dénaturation partielle du fragment induit un ralentissement de sa mobilité électrophorétique par rapport à celle du même fragment migrant sous sa forme native. Pour un fragment d'ADN donné, le domaine correspondant à la région dont la T<sub>m</sub> est la plus basse est dénaturé en premier.



**Figure 6** : Principe de la détection d'une mutation ponctuelle par DGGE montrant les figures en Y (Kaplan et Delpech, 1993)

Si l'on considère un fragment d'ADN pouvant contenir une séquence soit normale, soit mutée, la présence d'une variation ponctuelle, d'une petite délétion ou d'une insertion va influencer la valeur de  $T_m$  du domaine correspondant. **La dénaturation du domaine muté se fait ou plus tôt ou plus tard et la différence de migration par rapport à celle de l'ADN normal (non muté) est visible sur le gel** (Figure 6).

### 2.2.1.2) Méthodologie

Après amplification PCR des régions susceptibles de contenir une mutation, l'ADN de ces fragments migre dans un gel d'acrylamide où il rencontre des conditions de plus en plus dénaturantes (gradient en acrylamide). Les produits PCR (15 $\mu$ l) sont mélangés au tampon de charge (5 $\mu$ l) puis déposés dans les puits. La migration se fait dans un bain Marie rempli d'un tampon de migration, le TAE (Tris-Acétate-EDTA) et préalablement chauffé à 62°C. La migration se fait pendant 6 heures sous une tension de 180V.

Pour chaque de migration, **un témoin positif** (porteur d'une mutation) est mis à migrer en même temps que les échantillons d'ADN. Après la migration, les plaques supportant les gels sont plongées dans un bain de BET (Bromure d'Ethidium) pendant 10 minutes. Les plaques sont ensuite transférées sur le transilluminator pour l'observation aux UV.

La figure 6 montre :

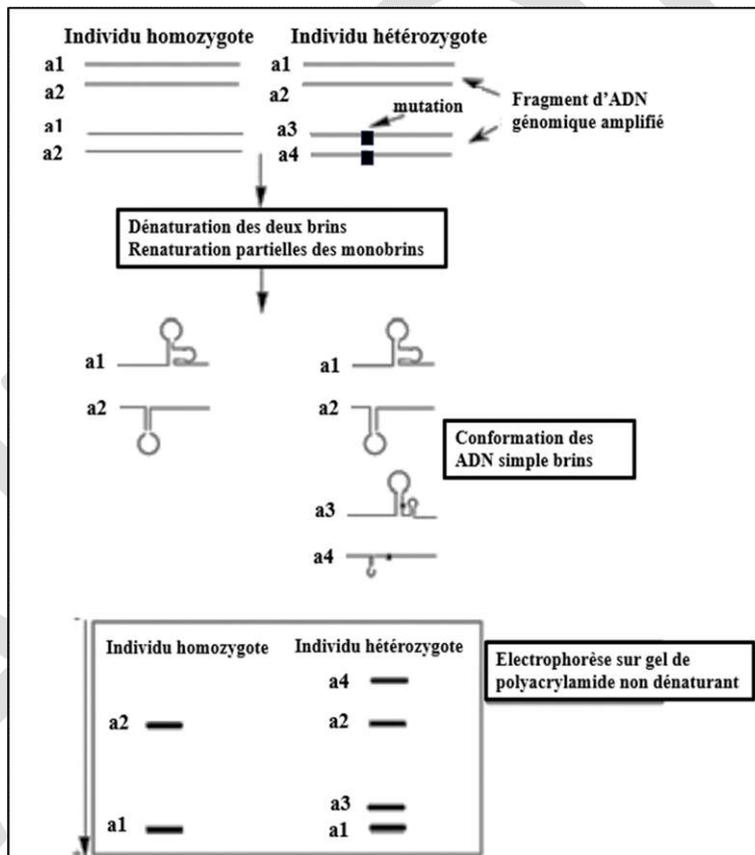
- La bande A/T migre moins loin du fait de la présence de deux liaisons hydrogène (A=T), alors que la bande C/G migre plus loin du fait de la présence de 3 liaisons hydrogène.
- Chez les individus hétérozygotes, 4 bandes sont observées : 2 bandes correspondant aux homoduplex, et 2 bandes correspondant aux hétéroduplex.
  - Homoduplexe : 2 brins d'ADN parfaitement complémentaires
  - Hétéroduplexe : 2 brins d'ADN partiellement complémentaires.

La présence de **mésappariement** dans les hétéroduplexes provoque leur **dénaturation rapide**, ainsi une **mobilité électrophorétique très réduite**.

### 2.2.2) Technique de SSCP

La technique de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism* ou polymorphisme de conformation de l'ADN monocaténaire) est basée sur l'analyse électrophorétique des produits PCR sous forme de **fragments simples brins**. Leur migration dans un **gel de polyacrylamide non dénaturant** dépend de leur **conformation secondotertiaire**. La structure secondaire que prend un DNA monobrin est fonction de sa séquence. La présence d'une variation de séquence (mutation ponctuelle ou polymorphisme) altère la conformation spatiale de la molécule, ce qui se traduit par une variation de migration de l'ADN (Figure 8).

Sur le plan pratique, dans un premier temps, la séquence contenant la mutation est amplifiée par PCR. Les produits amplifiés sont dénaturés, refroidis rapidement et soumis à une électrophorèse. Les différentes conformations migrent à différentes vitesses. La température de migration est constante, le plus souvent à +4°C ou à température ambiante.



**Figure 7 :** Principe général de la méthode de la SSCP (Negura et al., 2006)

L'individu homozygote est normal (témoin). L'autre individu est porteur d'une mutation à l'état hétérozygote. Chez un individu hétérozygote, on observe en général quatre bandes.

## Références bibliographiques

### Articles

- Daniel R, Walsh SJ: **The Continuing Evolution of Forensic DNA Profiling - From STRS to SNPS.** *Australian Journal of Forensic Sciences* 2006, **38**(2):59-74.
- Green MR, Sambrook J: **Analysis of DNA by Southern Blotting.** *Cold Spring Harb Protoc* 2021, **1**.
- Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P, Bogard M : **Notions de génétique moléculaire pour comprendre l'hérédité.** *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2008, **23**:331-352.
- Le Morvan V, Formento JL, Milano G, Bonnet J, Robert J: **Techniques de recherche des polymorphismes génétiques.** *BioTribune Magazine* 2007, **21** :76-85.
- Maréchal V: **Southern blot et northern blot.** *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Encyclopédie Médico-Biologique* 2006, **90**-60-0330.
- Negura L, Carasevici E, Humm A-M, Arteni V : **Méthodologie actuelle de la biologie moléculaire pour la détection des mutations.** *Analele Științifice Ale Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași, Sectiunea II A : Genetica si Biologie Moleculara* 2006, **7**.
- Wallis Y: **Denaturing gradient gel electrophoresis.** *Methods Mol Biol* 2002, **187**:125-135.

### Ouvrages :

- Ameziane N, Bogard M, Gougerot-Pocidal MA, Lamoril J: **Principes de biologie moléculaire en biologie clinique.** Elsevier ; 2005 (<https://books.google.dz/books?id=cwxYehzAoz8C>).
- Kaplan JC, Delpech M: **Biologie moléculaire et médecine.** In *Biologie Moléculaire et Médecine.* Edited by Médecine Sciences F: Flammarion Médecine-Sciences; 1993 (<https://books.google.dz/books?id=xbHUMwEACAAJ>).
- Korf BR: **Chapter 16 - Introduction to Human Genetics\***. In *Clinical and Translational Science (Second Edition)*. Edited by Robertson D, Williams GH: Academic Press; 2017: 281-311
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF: **Tools of Human Molecular Genetics.** In *Thompson & Thompson Genetics in Medicine E-Book.* edition. Edited by Elsevier Health Sciences; 2007: 41-58 (<https://books.google.dz/books?id=tvYcnOwX4W4C>).
- Swynghedauw B, Silvestre JS: **Aide-mémoire de biologie et génétique moléculaire - 3ème édition.** Dunod; 2008 (<https://books.google.dz/books?id=YbG8DahAYgcC>).
- Tagu D, Moussard C: **Principes des techniques de biologie moléculaire: 2e édition, revue et augmentée.** Science Publishers ; 2006 (<https://books.google.dz/books?id=woBtjTLCJBMC>).

## Chapitre VI : TECHNIQUES DE SEQUENÇAGE DE L'ADN

### Objectifs du cours

- a) Comprendre la différence entre le séquençage et les autres techniques d'identification des variations nucléotidiques
- b) Comprendre les principes fondamentaux du séquençage de l'ADN.
- c) Connaitre l'histoire du séquençage de l'ADN.
- d) Méthode de Sanger : principe et étapes du séquençage d'ADN par terminaison de chaîne.
- e) Connaitre la différence entre les dNTP et les ddNTP.
- f) Comprendre le principe et l'avantage d'une électrophorèse capillaire pour la séparation des fragments d'ADN séquencés.

### Plan du cours

Introduction

#### 1) Intérêt général du séquençage

#### 2) Techniques de séquençage

2.1) La méthode de Maxam-Gilbert

2.2) La méthode de Sanger

2.2.1) Principe de la technique du séquençage par la méthode de Sanger

2.2.2) Méthode automatisée de Sanger

#### 3) Electrophorèse capillaire

Références bibliographiques

### Introduction

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T qui constituent la structure de l'ADN (**lire une séquence nucléotidique**). Le séquençage d'ADN est devenu un outil essentiel en biologie moléculaire tant en médecine que dans de nombreuses autres disciplines des sciences de la vie. L'invention du séquençage date du milieu des années 1970. Les deux premières techniques de séquençage de l'ADN, celle de **Maxam-Gilbert** (États-Unis) et celle de **Frédéric Sanger** (Royaume-Uni) ont été décrites en 1977. La technique de Sanger a révolutionné le monde de la biologie moléculaire en permettant de décrypter différents génomes, tel que le génome humain complètement déchiffré en 2006 ou d'autres génomes, le génome bactérien.

La première séquence connue d'un être vivant date de 1977 : il s'agit génome du bactériophage  $\Phi$ X174 séquencé par la méthode de Sanger.

En 1998, le 1<sup>er</sup> génome d'un animal, celui d'un ver de terre (*Caenorhabditis elegans*) fut publié.

En 1990, un projet colossal désigné *Human Genome project* (Hugo) avait pour objectif de déterminer la séquence complète de l'ADN génomique humain (contenu dans le noyau de la cellule). Ce projet a duré 13 ans et a réuni plusieurs équipes internationales.

#### 1) Intérêt général du séquençage

**Tableau 1** : Quelques applications du séquençage

<b>Diagnostic et traitement de nombreuse maladies Humaines</b>	Cancers Maladies infectieuses Maladies Héréditaires
<b>Informations sur le génome</b>	Structure Fonction Etude des variations du génome: Polymorphismes bi-alléliques Insertion, Délétions. Réarrangement de gènes, variations du nombre de copies de gènes
<b>Analyse de méthylation du génome</b>	Etudes épigénétiques et Méthylome (profil de méthylation)
<b>Analyse microbiologique</b>	Identification des espèces, Taxonomie.....
<b>Tests de paternité et médecine légale</b>	
<b>Police scientifique</b>	
<b>Pharmaco génomique</b>	

## 2) Techniques de séquençage

Le séquençage par la méthode de Maxam-Gilbert et par la méthode de Sanger est connu sous le nom de **séquençage de première génération**. Ces deux méthodes sont fondées sur des principes opposés : l'approche de Sanger est une méthode par synthèse enzymatique sélective, tandis que celle de Maxam et Gilbert est une méthode par dégradation chimique sélective.

Depuis 2007, de nouvelles techniques de séquençage ont été développées et regroupées sous le terme de séquençage à haut débit ou **Next generation sequencing**, NGS. Le séquençage à haut débit permet d'analyser beaucoup de gènes à la fois, grâce à des appareils plus puissants, rapides et sensibles (Cours-Biologie Moléculaire Appliquée, Master 1-Biologie Moléculaire et Cellulaire).

Bien que les techniques de séquençage évoluent, la méthode de Sanger continue d'être la méthode la plus employée dans le monde à l'heure actuelle.

### 2.1) La méthode de Maxam-Gilbert

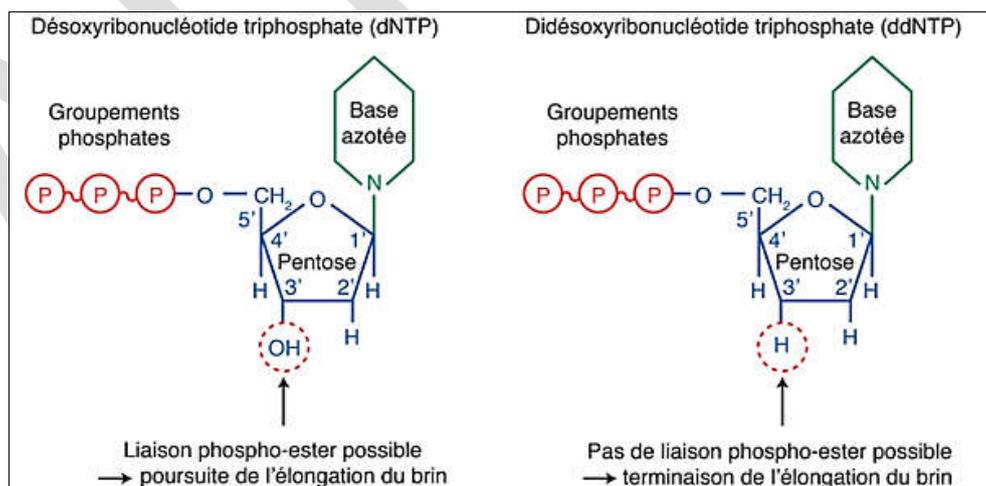
Actuellement, cette technique est abandonnée. Il s'agit d'une méthode chimique de séquençage. Elle est basée sur une dégradation chimique de l'ADN et utilise les réactivités différentes des quatre bases A, T, G et C, pour réaliser des coupures sélectives. En reconstituant l'ordre des coupures, on peut remonter à la séquence des nucléotides de l'ADN correspondant (La technique détaillée, voir le cours de Génie-Génétique).

### 2.2) La méthode de Sanger

Cette méthode a rapidement dépassé la méthode de Maxam-Gilbert pour la remplacer et reste à ce jour la principale méthode de séquençage utilisée dans les laboratoires.

#### 2.2.1) Principe de la technique du séquençage par la méthode de Sanger

Cette méthode est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire (arrêt d'élongation), par utilisation de **didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP)**, qui stoppent la réaction de d'élongation (nucléotides terminateurs de chaîne). Les ddNTP sont des analogues structuraux des dNTP, mais ne possèdent pas de groupe 3'-hydroxyle (3'-OH) indispensable à la réaction de polymérisation par la *Taq* polymérase (Figure 1).



**Figure 1** : Structure des nucléotides utilisés dans le séquençage de Sanger (Segarra et al., 2021)

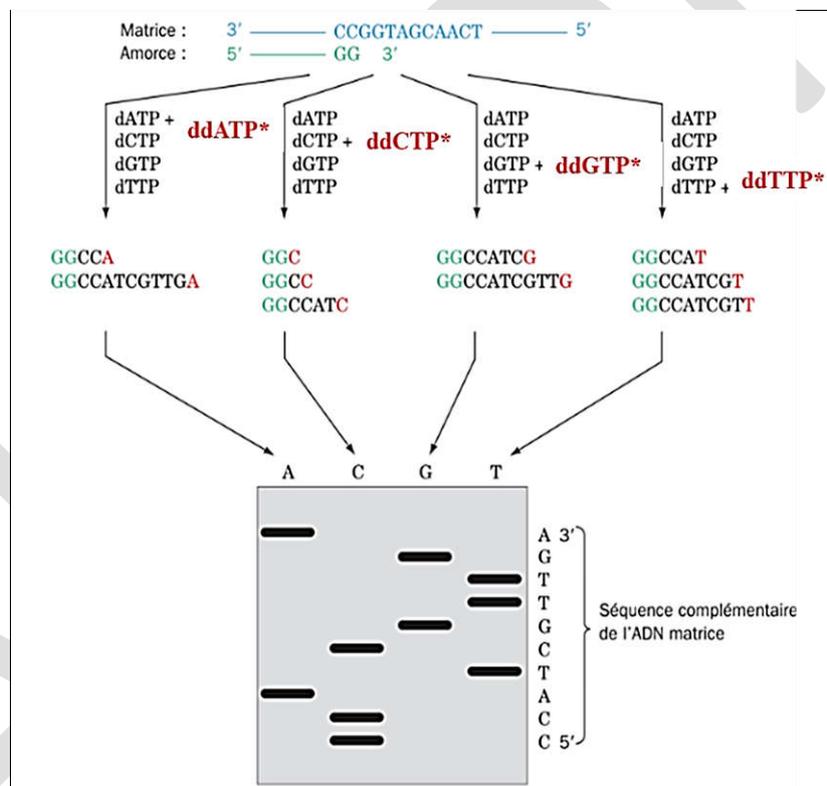
### 2.2.2) Méthode automatisée de Sanger

La technique de Sanger a été automatisée. Pour cela, plusieurs modifications ont été apportées comme l'introduction de **traceurs fluorescents**. Le marquage des ddNTP n'est plus réalisé par la radioactivité mais par des fluorophores qui émettent à 4 longueurs d'ondes différentes. Chacun des ddNTP est marqué par un fluorophore différent et va émettre donc un signal spécifique permettant de le repérer.

A l'origine, la méthode de séquençage par Sanger utilisait des ddNTP terminateurs **radioactifs**, marqués par le  $^{35}\text{S}$  (ou  $^{32}\text{P}$ ). Ainsi, pour la distinction entre les 4 ddNTP\*, il était donc nécessaire de réaliser 4 réactions en parallèle, dans 4 tubes contenant chacun un ddNTP\* (Figure 3).

Les produits des 4 réactions sont séparés par électrophorèse sur gel à haute résolution ; les produits contenus dans chacun des 4 tubes sont mis à migrer séparément (1 tube par puits de dépôt).

La révélation se fait par autoradiographie. Les fragments séparés diffèrent entre eux par une seule base nucléotidique. De ce fait, la lecture de la séquence se fait de bas en haut (du fragment le plus court au fragment le plus long). Pour l'exemple ci-dessous, on lit la séquence : CCATCGTTGA.



**Figure 2** : Méthode de séquençage par Sanger utilisant des ddNTP radioactifs (Voet et al., 2016)

Dans la technique automatisée, chaque ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) comprend un marqueur fluorescent. Lorsqu'un ddNTP est attaché à la séquence en cours d'élongation, la base devient fluorescente en fonction du nucléotide associé. Par convention :

- A est indiqué par une fluorescence verte,
- T par une fluorescence rouge,
- G par une fluorescence noire,
- C par une fluorescence bleue.

D'autres facteurs ont favorisé le développement de la technique de Sanger automatisée :

- Développement de la synthèse chimique automatisée des amorces.
- Développement de la PCR.
- Utilisation de l'électrophorèse capillaire dans des automates pour la séparation des fragments nucléotidiques et lecture des séquences.

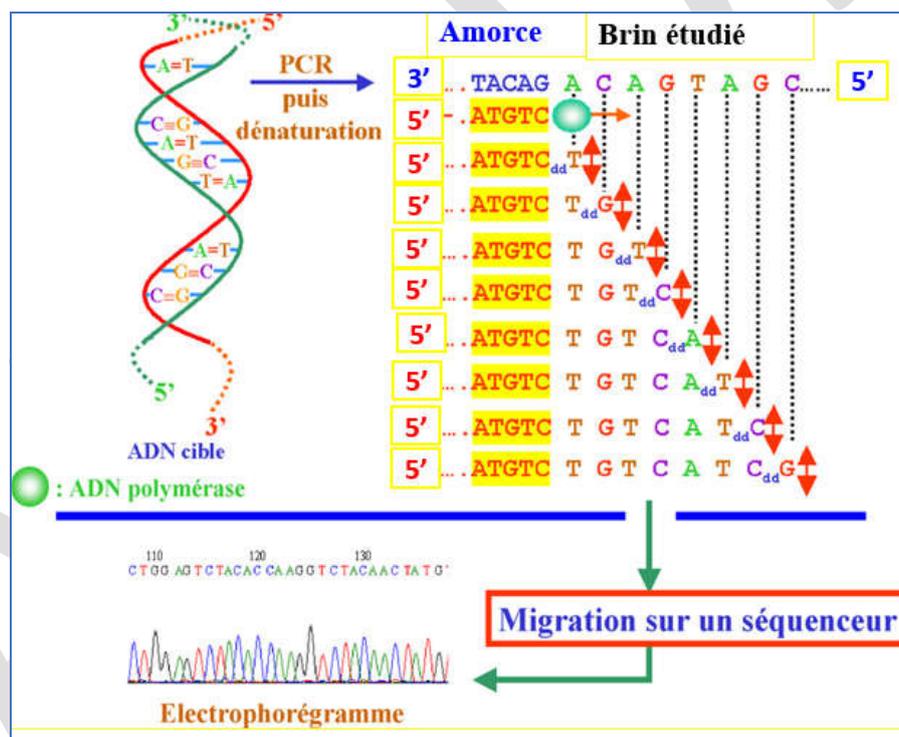
Sur le plan pratique, cette technique permet de séquencer des segments d'ADN d'environ 500pb à 1000pb de long.

Dans ce cas, la réaction de PCR se fait dans **un seul tube** avec les 4 ddNTP en même temps (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) fluorescents.

La 1<sup>ère</sup> étape consiste à amplifier l'ADN cible par PCR. Les fragments amplifiés sont ensuite dénaturés pour obtenir un ADN simple brin. À l'aide d'une amorce spécifique et complémentaire du brin étudié (sens ou antisens), identique ou différente de celle utilisée pour la PCR, une ADN polymérase effectue alors la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de cette amorce (Figure 3).

L'ADN polymérase ajoute les dNTP (5'→3') complémentaires, et les ddNTP de manière aléatoire (exemple un ddCTP sera parfois ajouté à la place d'un dCTP). Au cours de la réaction de polymérisation, la séquence continue à s'allonger avec des dNTP jusqu'à ce qu'un ddNTP se fixe, ce qui va stopper la réaction de polymérisation. Un ensemble de fragments de différentes taille est alors obtenu.

Ces fragments d'ADN sont ensuite soumis à une migration par électrophorèse capillaire pour une analyse de séquence ou lecture de la séquence nucléotidique.



**Figure 3** : Etapes du séquençage selon la méthode automatisée de Sanger (Lamoril et al., 2008)

### 3) Électrophorèse capillaire

A la fin de la réaction de PCR, les fragments obtenus sont analysés par **électrophorèse capillaire**. L'électrophorèse capillaire réalisée sur un **automate de séquençage** est la méthode de choix : elle permet d'augmenter considérablement la vitesse de séparation électrophorétique des fragments et possède un **grand pouvoir de résolution** (sépare les fragments ne différant que par un seul nucléotide). Il s'agit de gels ultrafins et permettent grâce à l'utilisation de champs électriques intenses, de faire des migrations en 2h30' pour des tailles d'environ 500pb, alors que sur un gel classique 4 à 6 heures. Ce sont des gels de polyacrylamide soit des gels utilisant d'autres polymères comme par exemple alkyl cellulose, polyvinyl alcool.

Ces gels sont utilisés sur certains automates de séquences. Par exemple, le séquenceur commercialisé par la société Applied Biosystems (ABI Prism) permet l'analyse de séquences en plaques de 96 ou 384 puits par électrophorèse capillaire.

Les molécules d'ADN sont introduites à une extrémité des capillaires par électro-injection et migrent ensuite tout au long de ceux-ci sous l'effet d'un très haut voltage (12kv) de façon à les séparer en fonction de leur longueur (molécules migrent toutes vers l'anode).

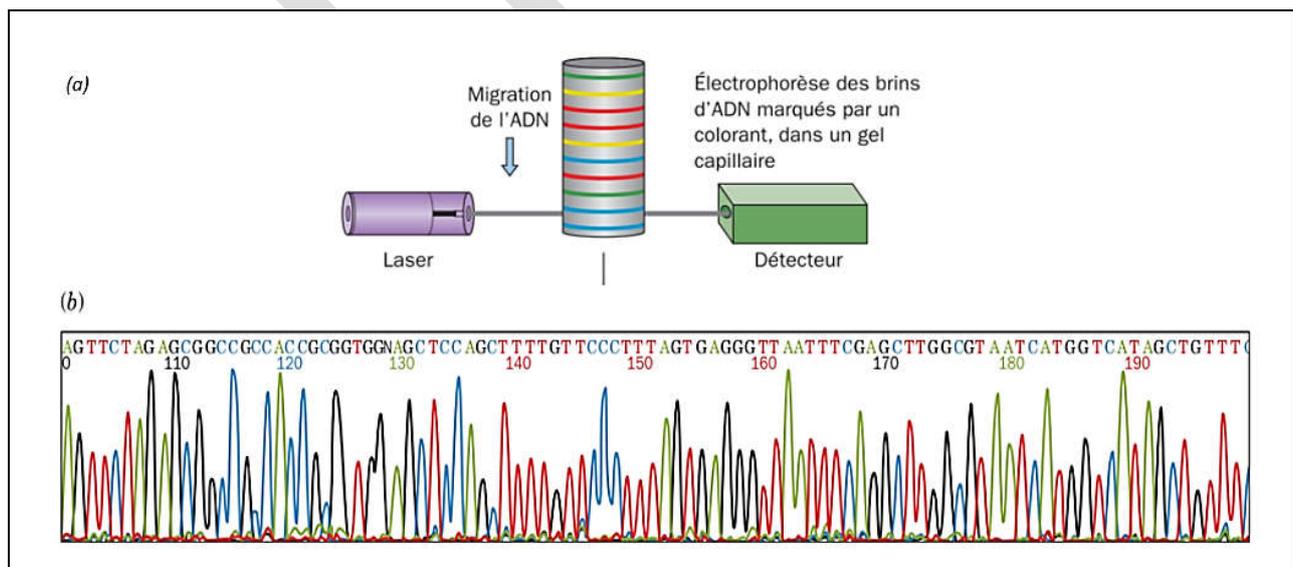
Près de l'anode, un rayon LASER traverse chaque capillaire afin d'exciter les ddNTP fluorescents incorporés à l'ADN au cours de la réaction de séquençage.

Une caméra mesure l'émission de fluorescence au fur et à mesure que les copies d'ADN passent devant le LASER. Les ddNTP fluorescents sont distingués les uns des autres selon la longueur d'onde émise.

L'émission de fluorescence est mesurée à 4 longueurs d'onde correspondant aux 4 fluorophores. Chaque base a donc un signal spécifique qui permet de l'identifier lors de son passage dans le faisceau d'un photomètre (Laser) situé à la sortie du capillaire (Figure 4, a).

L'analyse des signaux reçus est réalisée par un ordinateur (logiciel spécifique) et permet de reconstituer la séquence avec une grande précision.

Le résultat de l'analyse peut être lu, par exemple, sous forme d'un **électrophorégramme**, de lecture facile (Figure 4, b). Pour confirmer un résultat, toute réaction de séquence d'un fragment d'ADN est systématiquement faite sur le brin sens et le brin antisens.



**Figure 4** : Principe de détection et lecture des séquences (Voet et al., 2016)

## Références bibliographiques

### Articles

- Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P, Bogard M: **Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie.** *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2008, **23**:260-279.

### Ouvrages

- Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR: **Chapter 8 - DNA Sequencing.** In *Molecular Biology (Third Edition)*. Edited by Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR: Academic Cell; 2019: 240-269 (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00008-2>).
- Hawkins GA: **Chapter 5 - Analysis of Human Genetic Variations Using DNA Sequencing.** In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Edited by Jalali M, Saldanha FYL, Jalali M. Boston: Academic Press; 2017: 77-98 (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00005-9>).
- Segarra J, Ahyerre C, Bailly G, Chauvet É, Favre D, Huille M, Jean T, Metz F, Piètre E, Proch C: **Nucléotides et acides nucléiques** In *Biologie BCPST1 - Programme 2021*. ELLIPSES; 2023: 463 (<https://books.google.dz/books?id=YBu1EAAAQBAJ>).
- Tagu D, Moussard C: **Principes des techniques de biologie moléculaire: 2e édition, revue et augmentée.** Science Publishers ; 2006 (<https://books.google.dz/books?id=woBtjTLCJBMC>).
- Voet D, Voet JG, Domenjoud L: **Structures covalentes des protéines et des acides nucléiques** In *Biochimie De Boeck*; 2016: 163-209 (<https://books.google.dz/books?id=BvNFDgAAQBAJ>).