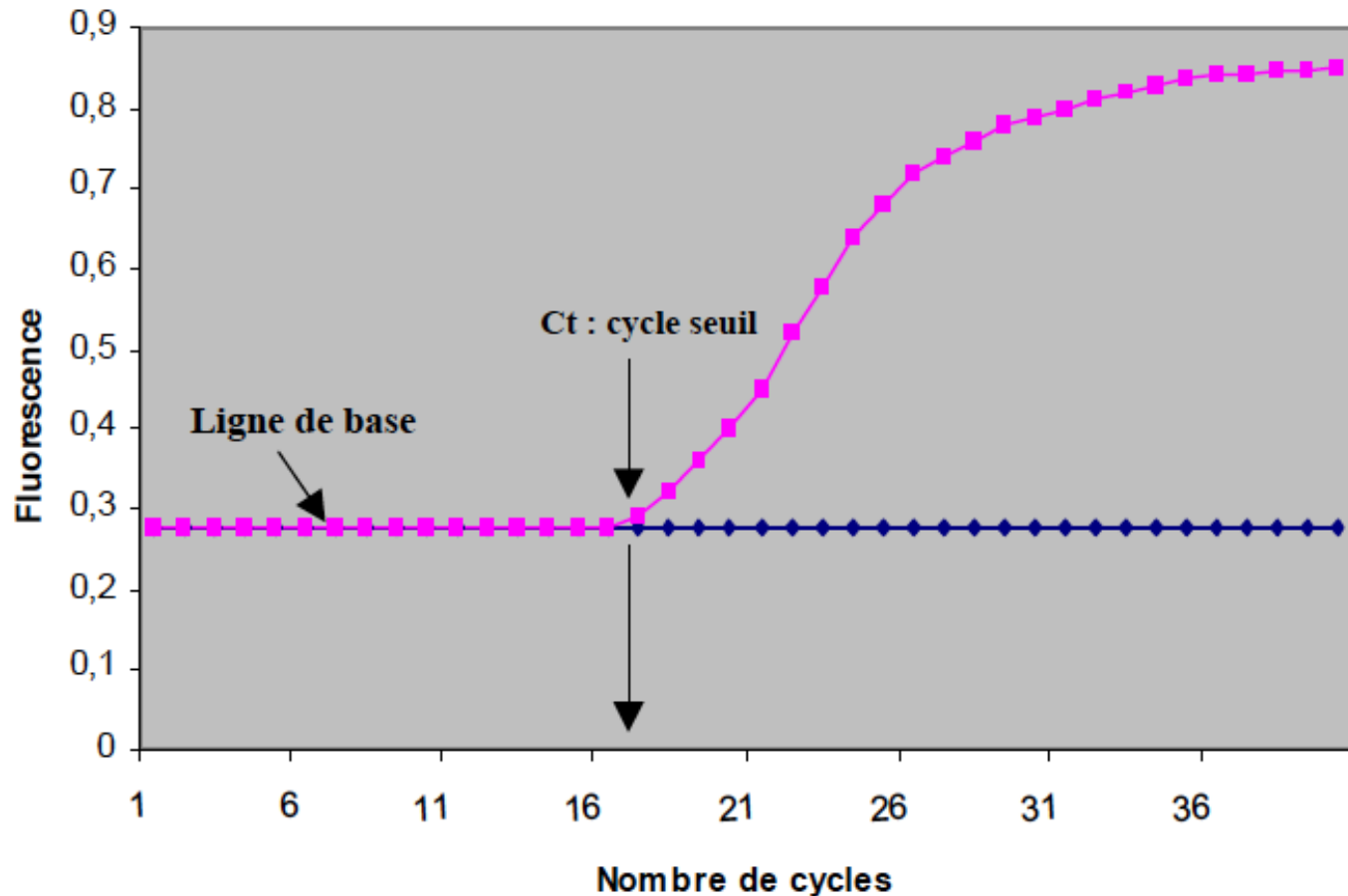


Techniques d'Analyse Moléculaire



Dr AMIROUCHE A.

Licence Biochimie (2020/2021)

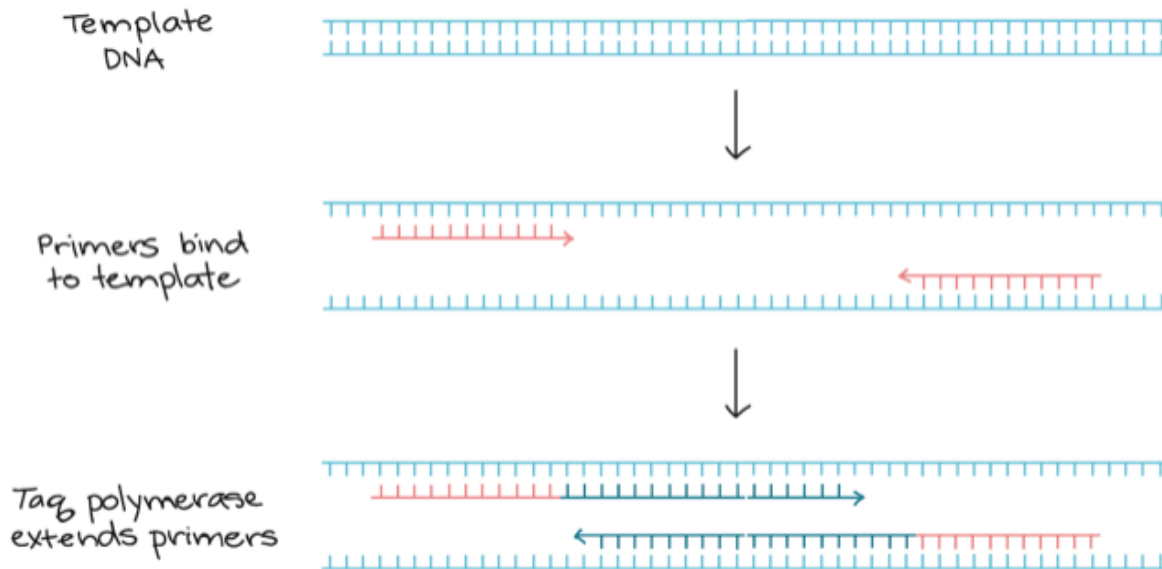
1 Principe

2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

3 RT-qPCR

But

La PCR permet donc d'obtenir par répliation in vitro de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait. L'ADN matriciel peut tout autant être de l'ADN génomique que de l'ADN complémentaire obtenu par RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN messagers, ou encore de l'ADN mitochondrial.



3-2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une réplification *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer à des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel). L'ADN extrait à partir d'un organisme ou d'un échantillon contenant des ADN d'origines diverses n'est pas directement analysable. Il contient une masse trop importante de séquences nucléotidiques.

Il convient donc d'isoler, de purifier la ou les séquences qui présentent un intérêt, qu'il s'agisse de la séquence d'un gène ou de séquences non codantes. À partir d'une telle masse de séquences que constitue l'ADN matriciel, la PCR peut donc sélectionner une ou plusieurs séquences déterminées et les amplifier par réplification à des dizaines de milliards de copies. La réaction terminée, la quantité extrêmement faible d'ADN matriciel contenue dans l'échantillon PCR n'aura pas varié. En revanche, la quantité de la ou des séquences amplifiées (l'ADN d'intérêt) sera très grande. La PCR permet donc d'amplifier un signal à partir d'un bruit de fond, il s'agit donc bien d'une méthode de clonage moléculaire, et cloner revient à purifier.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute):

A- Dénaturation de l'ADN.

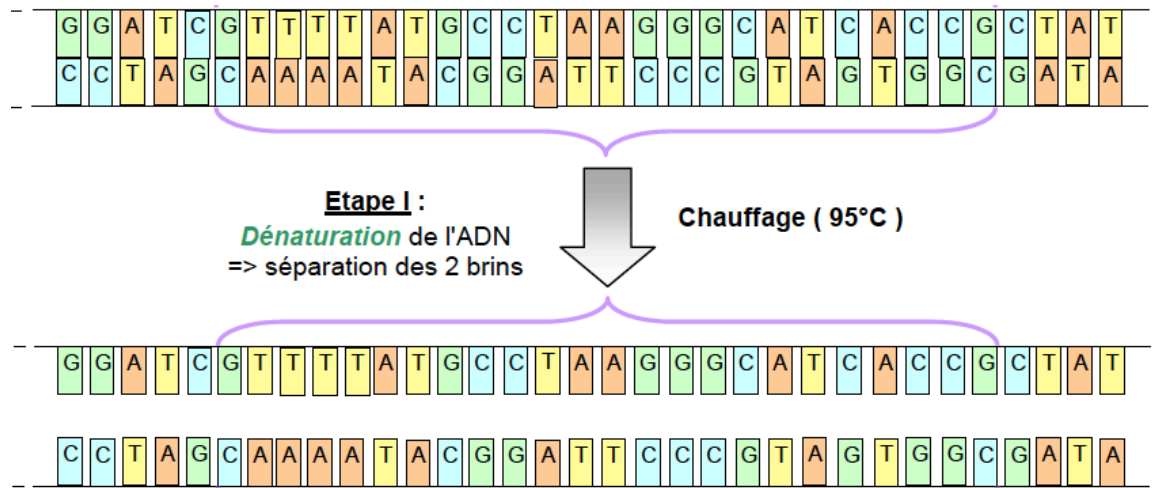
B- Hybridation

C- Élongation

Le cycle est répété un grand nombre de fois (35 à 45 cycles) pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible

A- Dénaturation de l'ADN:

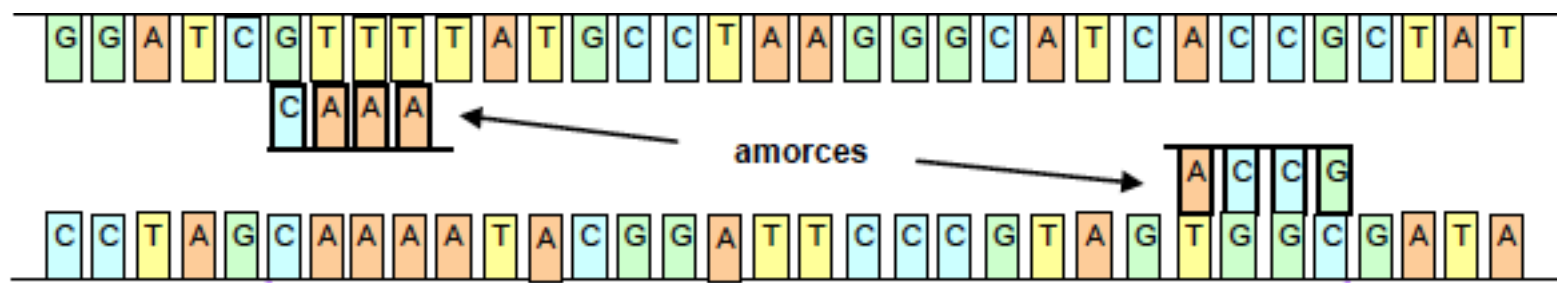
La première étape s'effectue à une température de 95°C pour séparer les deux brins qui le composent, les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténaire). À 95°C, l'ADN matriciel est dénaturé : toutes les liaisons hydrogène sont rompues et la dénaturation du DNA est complète



B- L'hybridation :

La deuxième étape s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 70°C en fonction de la T_a (annealing temperature) , dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences monocaténaire complémentaires de régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. .

L'hybridation se fait à une température T_a (annealing temperature) qui sera définie selon la nature des amorces (voir plus loin le calcul de T_a). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.



Température d'hybridation:

Pour le choix de la température d'hybridation, il est souvent recommandé de se placer à une température inférieure de 4 - 5°C au T_m du couple d'amorce (si ce T_m est différent pour les 2 amorces, prendre le T_m le plus bas comme point de référence). Une autre approche plus empirique et qui donne souvent de bons résultats avec des amorces >20mers (50% GC) est de choisir comme point de départ une température d'hybridation de 54°C, si des amplifications non spécifiques sont observées augmenter alors par paliers de 2°C la température d'hybridation.

Cette température d'hybridation dépend de la séquence en bases des oligonucléotides amorces.

Elle est légèrement inférieure (environ de 5°C) au T_m qui est la température de demi-dénaturation. *(si les 2 oligonucléotides amorces ont des T_m différents, il faudra prendre le T_m le plus faible pour calculer la T_a, afin de favoriser l'hybridation des 2 amorces).*

$$\mathbf{T_a = T_m - 5^\circ C}$$

$$\mathbf{T_m = 2 (A + T) + 4 (G + C)}$$

(où A, T, G et C sont respectivement le nombre de chacune de ces bases dans l'oligonucléotide amorce).

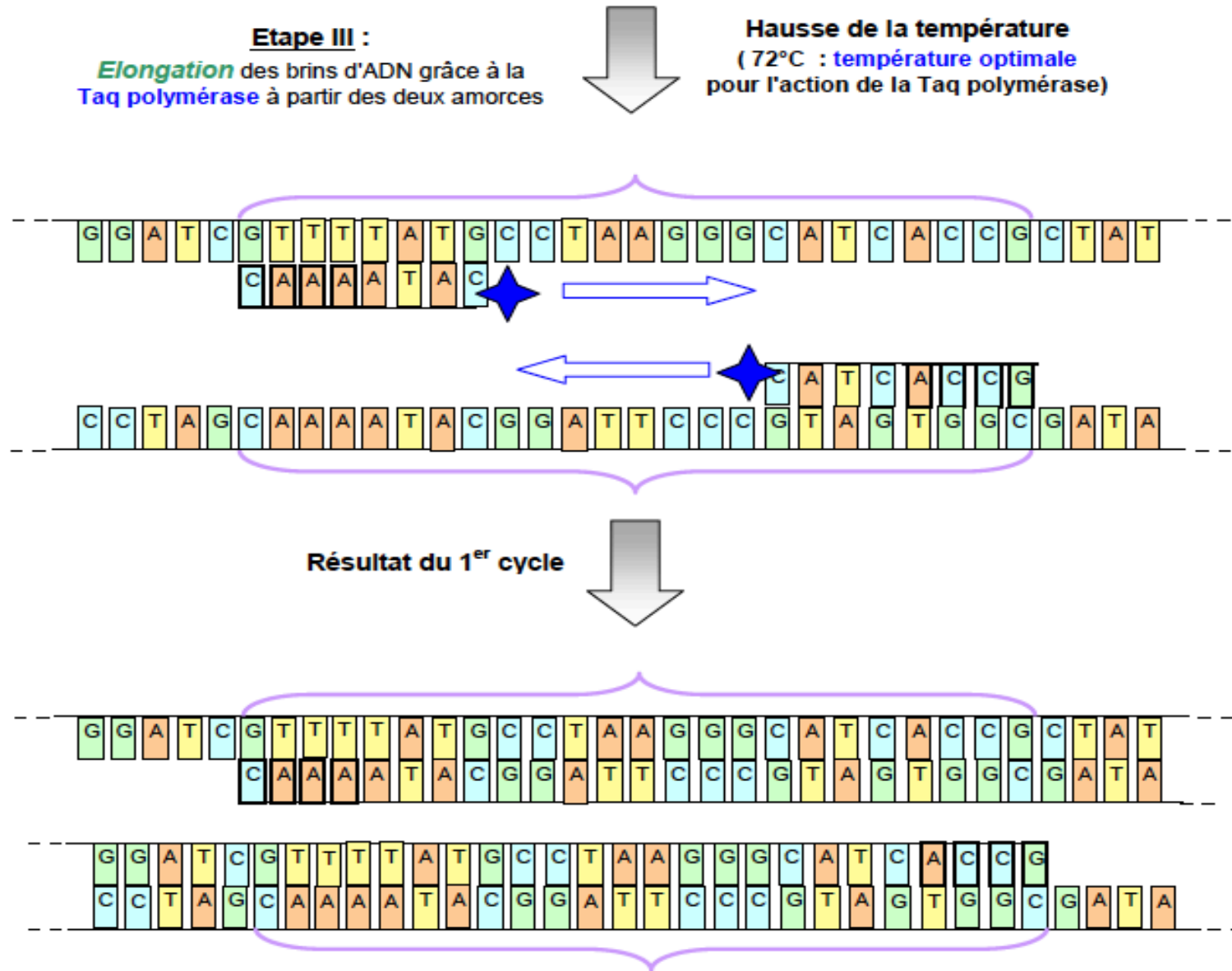
Hybridation amorce-matrice

Choix de la température

- T_m : t° où 50% de l'ADN est double brin
- Zone d'accrochage: de 13 à 25 nucléotides
- formule empirique $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$
- Température d'hybridation: $T_m - 4^\circ\text{C}$
- Un mésappariement est possible, mais pas n'importe où
- T_m baisse de 1 à $1,5^\circ\text{C}$ par % de non homologie

C- Élongation: Une fois les amorces fixées, l'ADN complémentaire est synthétisé par l'ADN-polymérase en utilisant les dNTP. Et le cycle recommence en dénaturant les deux brins à 95°C

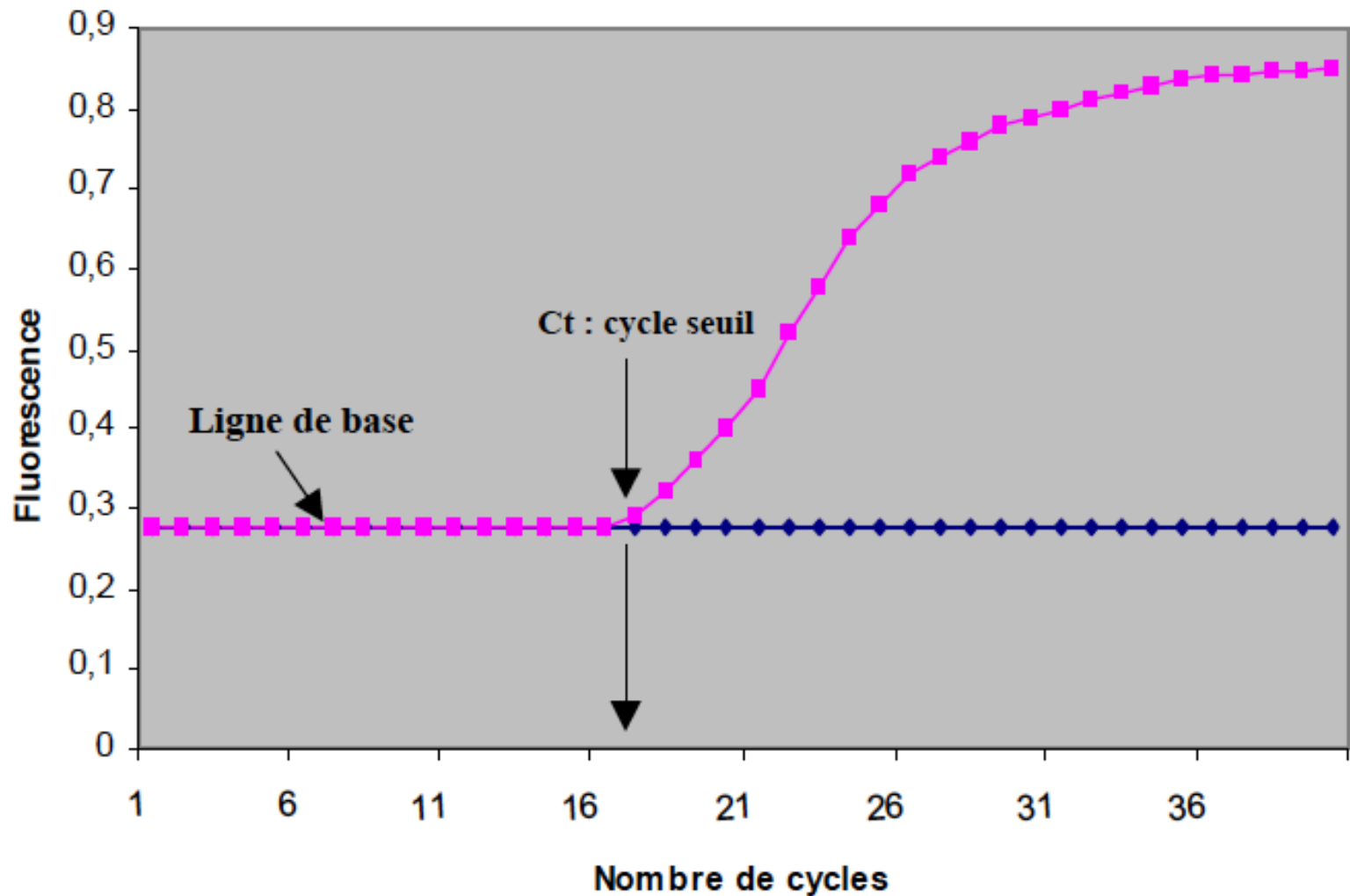
...



Cycle seuil (Threshold cycle)

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction (figure). Plus il y a de matrices (template) à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal

d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Gibson et al, 1996). Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues (Bustin, 2000)



Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base

De plus en plus des tests utilisant la technologie des balises moléculaires sont dessinés pour la détection et la quantification rapide d'agents pathogènes viraux, bactériens et parasitaires.

- Vet et al (1999) ont déjà proposé un système multiplexe qui permet la détection et la quantification simultanées des rétrovirus HIV-1, HIV-2, des virus lymphotrophiques-T humains de type I et de type II avec un seuil de détection de 10 copies de génome et Poddar (1999) pour la détection d'adénovirus.

- Des tests de détection ont aussi été mis au point pour *Salmonella* avec une sensibilité de 2 CFU par réaction de PCR en temps réel (Chen et al, 2000) et de 1 CFU/ml après 6 h d'enrichissement pour *Escherichia coli* O157:H7 à partir d'échantillons de lait cru et de jus de pomme (Fortin et al, 2001).

- Chez les parasites, un test de PCR en temps réel a été développé pour *Toxoplasma gondii* (Lin et al, 2000).

Application

La PCR en temps réel permet maintenant de réaliser des études plus fines d'expression génétique à partir de tissus ou de lignées cellulaires comme pour l'analyse quantitative de l'expression de différents gènes dans

- des études de modulation du cycle cellulaire avec des tissus exposés à des carcinogènes non génotoxiques,
- les analyses de promoteurs dans des lignées cellulaires avec le gène reporter de la chloramphénicol acétyl transférase,
- les études de modifications d'expression génétique dans les expériences rogues/réponses (drug/response),
- l'étude des ARNm variants résultant d'épissage alternatif (alternative splicing).

La PCR en temps réel s'avère aussi un outil puissant pour des études de génotypage à grande échelle comme pour le gène du récepteur d'oestrogène