**Amplification d’acides nucléiques**

**Amplification d’ADN : PCR**

**Réaction de base**

On ajoute dans un tube de l'ADN qui sert de matrice, deux oligonucléotides hybridant sur chacun des deux brins de l'ADN, une polymérase thermostable et les 4 desoxynucléotides triphosphates.

On chauffe le tube à 95°C, les deux brins d'ADN se séparent.

On abaisse la température en dessous du Tm des deux oligonucléotides, ils s'hybrident à l'ADN. L'hybridation est concentration dépendante, comme la concentration des deux oligonucléotides est beaucoup plus élevée que la concentration de l'ADN, l'hybridation des oligonucléotides aura lieu alors que l'hybridation de l'ADN n'aura pas le temps de se faire.

On élève ensuite la température à 72°C, température de fonctionnement de l’ADN polymérase.

L’ADN néoformé peut servir de matrice pour un nouveau cycle, si on répète cette alternance de température une quarantaine de fois, la région située entre les deux oligonucléotides présente en une seule copie au début de l'expérience se retrouvera en 240 soit 1012copies à la fin de l'expérience.

Comme la polymérisation a toujours lieu de 5' vers 3', les brins matrices issus de la polymérisation sont bornés en 5' et en 3' par les oligonucléotides (en 3') ou leurs séquences complémentaires (en 5'). On obtiendra donc un fragment d'ADN de longueur égale à la distance les séparant et à laquelle il faut ajouter à taille des deux oligonucléotides qui font partie du produit amplifié. Les fragments non bornés, provenant de la polymérisation sur l'ADN de départ n'ont pas une croissance exponentielle mais linéaire, (2 x 40) et leur quantité sera rapidement négligeable au cours des cycles successifs.

**Les composantes du milieu réactionnel**

**Mg2+**: Les cations et plus particulièrement le magnésium influencent l’hybridation des amorces. Les ions magnésium se lient aux groupements chargés négativement (groupements phosphate du squelette) et ainsi diminuent les forces de répulsion entre l’amorce et la matrice. Si la concentration en magnésium est trop faible, il n’y a pas d’hybridation, si la concentration est trop forte, il y a diminution de la spécificité. D’une manière générale le magnésium est utilisé entre 1 et 5 mM.

Le Mg2+est indispensable à la reconnaissance des dNTP et de la matrice par l’enzyme.

**Amorces** : la concentration des amorces influence la spécificité et l’efficacité de l’amplification. Une concentration trop élevée diminue la spécificité et une concentration trop faible diminue l’efficacité de l’amplification. Les amorces sont souvent utilisées aux alentours de 1 µM.

**Solvant organiques** : L’addition de solvants organiques miscibles tels que le DMSO (0,8 M), la bétaine (0,3 M) , le polyéthylène glycol, le glycérol ou la formamide est souvent utilisé pour augmenter la spécificité ou le rendement de la réaction principalement pour les régions riches en GC. Le plus efficace serait le tetramethylene sulfoxide (0,5 M). Ces solvants organiques agiraient en se liant aux sillons mineur et majeur de l’ADN ce qui déstabiliserait la double hélice.

**Comment amplifier de grands fragments ?**

La Taq DNA polymérase est rapide mais fait des erreurs. Lorsqu'il y a une erreur de synthèse, elle reste bloquée et l'amplification ne peut pas continuer. Le risque d'erreur étant proportionnel à la longueur du fragment, les grands fragments (> 2 kb) sont difficiles à obtenir.

Les ADN polymérases ayant une activité de correction (3'-5' exonucléase) sont peu rapides et l'amplification des grands fragments se fait mal.

Le problème a été résolu en mélangeant les deux types de polymérases et ainsi des fragments de 10-20 kb peuvent être obtenus (Barnes, 1994).

Les ADN polymérases ayant une activité correctrice sont inhibées par le dUTP qui est produit lors de l’amplification par désamination oxydative du dCTP. Une solution consiste à ajouter une dUTPase au mélange réactionnel.

**Comment diminuer les erreurs lors de la polymérisation ?**

La technique est d’utiliser une ADN polymérase pourvue d’une activité 3’-5’ exonucléasique.

Toutefois la plupart de ces polymérases sont moins performantes que la Taq DNA polymérase. On effectuera donc un mélange de Taq et d’une polymérase pourvue d’activité correctrice, suivant la concentration respective des deux enzymes, on privilégiera soit l’amplification, soit la fidélité.

**Comment éviter les amorçages au hasard ?**

Pour que les amplifications soient spécifiques, il faut que l'hybridation des amorces ne se fasse qu'au niveau de la séquence désirée.

Pour ce faire, on choisit des amorces assez longues, d'au moins 18 nucléotides et on fait l'hybridation a une température proche du Tm (Tm-5°C).

Toutefois même dans ces conditions, on peut observer des amplifications qui ne correspondent pas à la séquence désirée. Elles peuvent provenir d'une hybridation à température ambiante suivie par une polymérisation lors de la préparation du mélange réactionnel.

Pour éviter ces amplifications non spécifiques, il faut donc éviter la polymérisation lors de la préparation de l'échantillon. Plusieurs techniques ont été développées et ont pris le nom de "hot start".

- le plus simple est de faire toutes les manipulations à 4°C (dans la glace) de façon à bloquer la polymérase puis à ne mettre les échantillons dans le thermocycleur que lorsqu'il a atteint la température de dénaturation (95°C).

- On peut aussi ajouter tous les composants de la PCR dans le tube à l’exception de la polymérase, effectuer une première étape de dénaturation, redescendre la température au Tm et ajouter la polymérase.

- Une deuxième technique consiste à incorporer dans le mélange réactionnel un inhibiteur de la polymérase thermolabile. Avant la dénaturation, la polymérase sera inactive, par contre après la première dénaturation, l'inhibiteur sera dénaturé et donc inefficace. Cet inhibiteur est un anticorps, qui bloque l'activité et qui est dénaturé par la chaleur.

Des hybridations non spécifiques peuvent aussi se produire pendant la réaction de PCR. Dans ce cas on augmente la température d’hybridation pour chercher la température qui permet une hybridation efficace des amorces sans hybridation non spécifique. On peut aussi utiliser une protéine commercialisée par Invitrogen qui diminue les hybridations non spécifiques.

**Comment obtenir un seul des deux brins ?**

Une première méthode consiste à faire une PCR asymétrique, en utilisant une des deux amorces à faible concentration et l’autre à forte concentration. Au début de l’amplification la PCR se fera normalement, les deux brins seront amplifiés. Puis avec l’épuisement d’une des deux amorces, un seul des deux brins sera synthétisé.

Une deuxième méthode consiste à utiliser une amorce modifiée, comportant un phosporothioate. Cette modification rend l’ADN résistant à la digestion par une exonucléase. Après l’amplification, le produit est digéré par une exonucléase, le brin portant l’amorce modifiée est protégée.

**Comment éviter les pollutions par les produits d'une amplification précédente ?**

La réaction de PCR peut amplifier une seule molécule plus d'un milliard de fois, ainsi les contaminants sont facilement amplifiables. Ces contaminants sont souvent des résidus des amplifications précédentes qui sont présents par exemple dans le corps des pipettes.

- On peut utiliser des pipettes à déplacement positif ou des pointes à filtre ou pour éviter le passage des molécules du corps de la pipette au mélange réactionnel.

- On peut utiliser des jeux de pipette différents, un jeu pour la préparation des réactions et un jeu pour l’analyse des produits de la réaction.

**Comment détecter les produits d'amplification ?**

**- Electrophorèse**

La technique la plus simple est de faire un gel d'électrophorèse révélé au bromure d’éthidium. Cette méthode permet de contrôler la spécificité de l’amplification, de vérifier que le produit de l’amplification correspond bien à la taille attendue.

**- Molecular beacons**

On peut utiliser des oligonucléotides ayant à leurs extrémités deux séquences complémentaires.

Cet oligonucléotide adopte donc une structure en tige-boucle. A l'extrémité de la tige, il y a un fluorophore et un quencher qui se retrouvent à proximité si bien que les photons émis par le fluorophore sont absorbés par le quencher. En présence d'une séquence cible, la sonde se dénature, et le fluorophore se retrouve éloigné du quencher et la sonde émet de la fluorescence.

Cette méthode permet de quantifier le produit de la réaction : un fluorimètre est incorporé à l'appareil PCR, il permet de suivre l'amplification au cours de la réaction.



**Comment amplifier un fragment d’ADN rare ?**

Lorsqu’une séquence est très faiblement représentée dans la réaction de PCR, on n’observe généralement pas de produit d’amplification après dépôt sur un gel d’électrophorèse.

On peut alors faire une deuxième PCR avec le produit de la première, mais pour éviter d’amplifier les produits non spécifiques, on utilise des amorces internes, on dit alors qu’on fait des PCR emboîtées ou « nested PCR ».

**Amplification d’ARN**

Le principe de la méthode consiste à synthétiser à partir d’un ARN particulier un fragment d’ADN contenant un promoteur du phage T7 en 5’.

Une fois cet ADN obtenu, l’ARN polymérase T7 synthétisera des ARN qui à leur tour serviront de matrice à la synthèse d’ADNc comportant le promoteur.

On a donc une amplification en chaîne, les produits de la réaction servant de substrat pour les amplifications suivantes. Cette méthode à pris le nom de NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification).

On ajoute dans un tube

- L’ARN,

- les 4 désoxyribonucléotides

- les 4 ribonucléotides

- deux oligonucléotides flanquant la séquence à amplifier

- Une reverse transcriptase

- Une RNase H

- Une ARN polymérase T7

L’oligonucléotide sens comportant en 5’ la séquence du promoteur de l’ARN polymérase T7 s’hybride à l’ARN cible, et un premier brin de ADNc est synthétisé par la reverse transcriptase. On obtient donc un hétéroduplex, ADN-ARN substrat de la RNase H qui dégrade l’ARN hybridé.

A partir de l’ADNc simple brin sur lequel l’amorce sens peut s’hybrider, la reverse transcriptase synthétise le second brin d’ADN, bien que la matrice ne soit pas de l’ARN. On obtient un ADNc double brin avec un promoteur de la T7 RNA polymérase à une extrémité.

L’ARN polymérase T7 synthétise donc un ARN à partir de cette nouvelle matrice.

Avantage de la méthode:

- L’amplification est très rapide puisque la T7 RNA polymérase fabrique de 10 à 100 copies par cycle

- L’ADN n’est pas amplifié puisqu’il n’y a pas d’étape de dénaturation.

