

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
خميس مليانة -جامعة جيلالي بونعامة
UNIVERSITE DE DJILALI BOUNAAMA-KHEMIS MILIANA
كلية علوم الطبيعة والحياة و علوم الأرض
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
قسم العلوم البيولوجية
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES

**MODULE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENIE GENITIQUE
DESTINE AUX ETUDIANTS DE LA LICENCE MICROPBIOLOGIE**

Présenté par : Pr. GUETARNI H.

Année universitaire 2024-2025

Contenu de la matière:

Partie I : Biologie moléculaire :

1. Expression de l'information génétique: synthèse protéique (Transcription, Traduction).
2. Régulation de l'expression génique : Régulation transcriptionnelle, Régulation traductionnelle.
3. Techniques de base de la biologie moléculaire : - préparation des acides nucléiques (extraction et purification) - séparations des acides nucléiques (électrophorèse sur gel d'agarose, en champ pulsé,...). détection, caractérisation et identification des acides nucléiques (transfert sur membrane, marquage, hybridation...). - Le séquençage de l'ADN. - amplification *in vitro* des acides nucléiques (PCR, RT (reverse-transcriptase)- PCR ...).

Partie II : génie génétique :

1. clonage *in vivo* :

1.1. Éléments nécessaires au clonage : l'ADN à cloner, enzymes de restriction, enzymes de ligation, les vecteurs de clonage, leur construction et leurs caractéristiques, les cellules hôte.

1.2. Les étapes du clonage : construction du vecteur, insertion de l'ADN à cloner, transformation des bactéries, sélection des recombinants, analyse des recombinants.

2. Technologie de l'ADN recombinant : Synthèse de protéines recombinantes, ADNc et vecteurs d'expression. Exemple de production de protéine par *E. coli* et par *Saccharomyces cerevisiae*.

Introduction:

- Selon Michel Morange, la biologie moléculaire est "l'ensemble des techniques et découvertes qui ont permis l'analyse moléculaire des processus les plus intimes du vivant, de ceux qui en assurent la pérennité et la reproduction"

I. Expression de l'information génétique

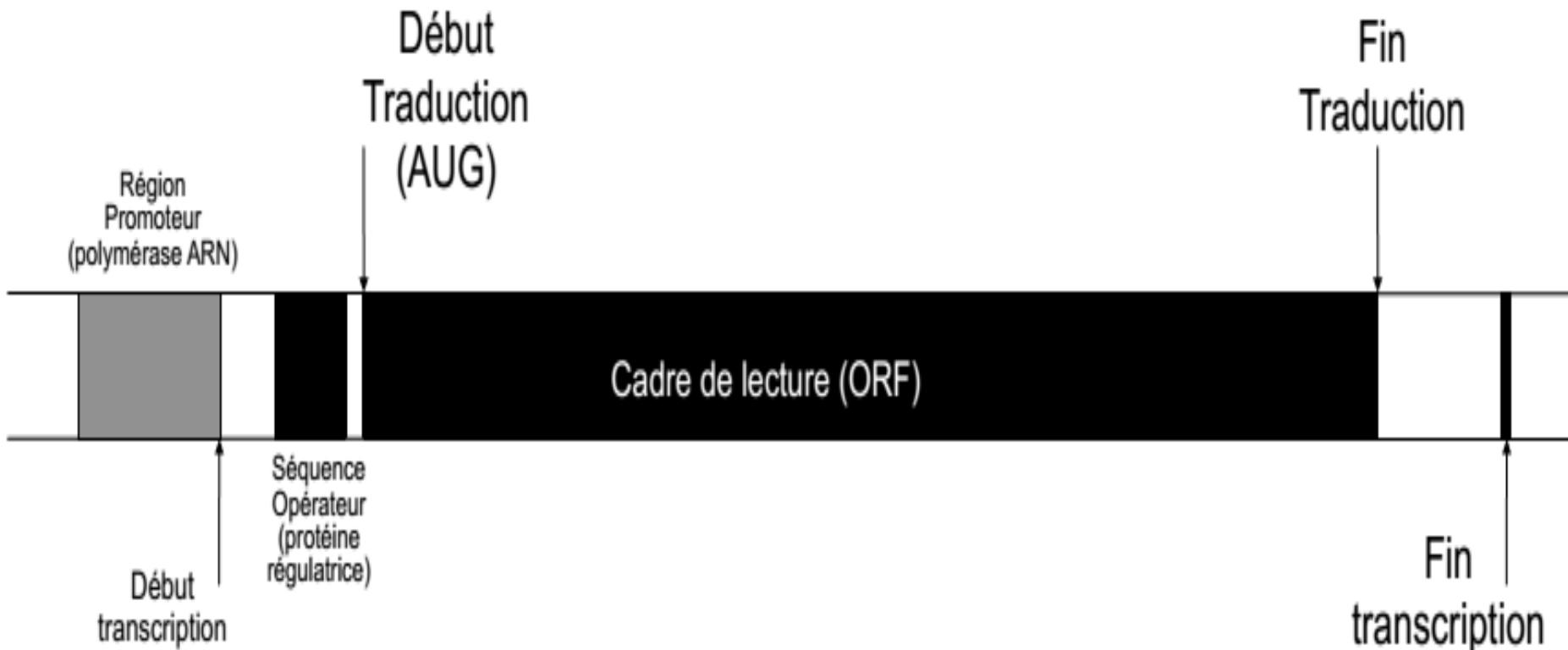
1. Synthèse protéique

- La synthèse des protéines comprend deux étapes: la transcription et la traduction.
- Les bactéries forment, avec les archées, le groupe des procaryotes.
- Le matériel génétique des bactéries est présent dans le cytoplasme ainsi que de plasmides.
- Un gène détient dans sa séquence nucléotidique, l'information permettant la synthèse d'un polypeptide. caractérisé par sa séquence d'acides aminés.

- Les gènes bactériens ne présentent pas d'introns.
- Les différents gènes codant pour les protéines d'un même mécanisme cellulaire peuvent être regroupés sous la forme d'un opéron.
- Un opéron est un ensemble de gènes qui sont transcrits ensemble, sous la forme d'un ARNm unique qui porte plusieurs sites de fixation du ribosome, ce qui permettra la traduction des différentes protéines codées par cette ARNm. On parle d'ARNm polycistronique.

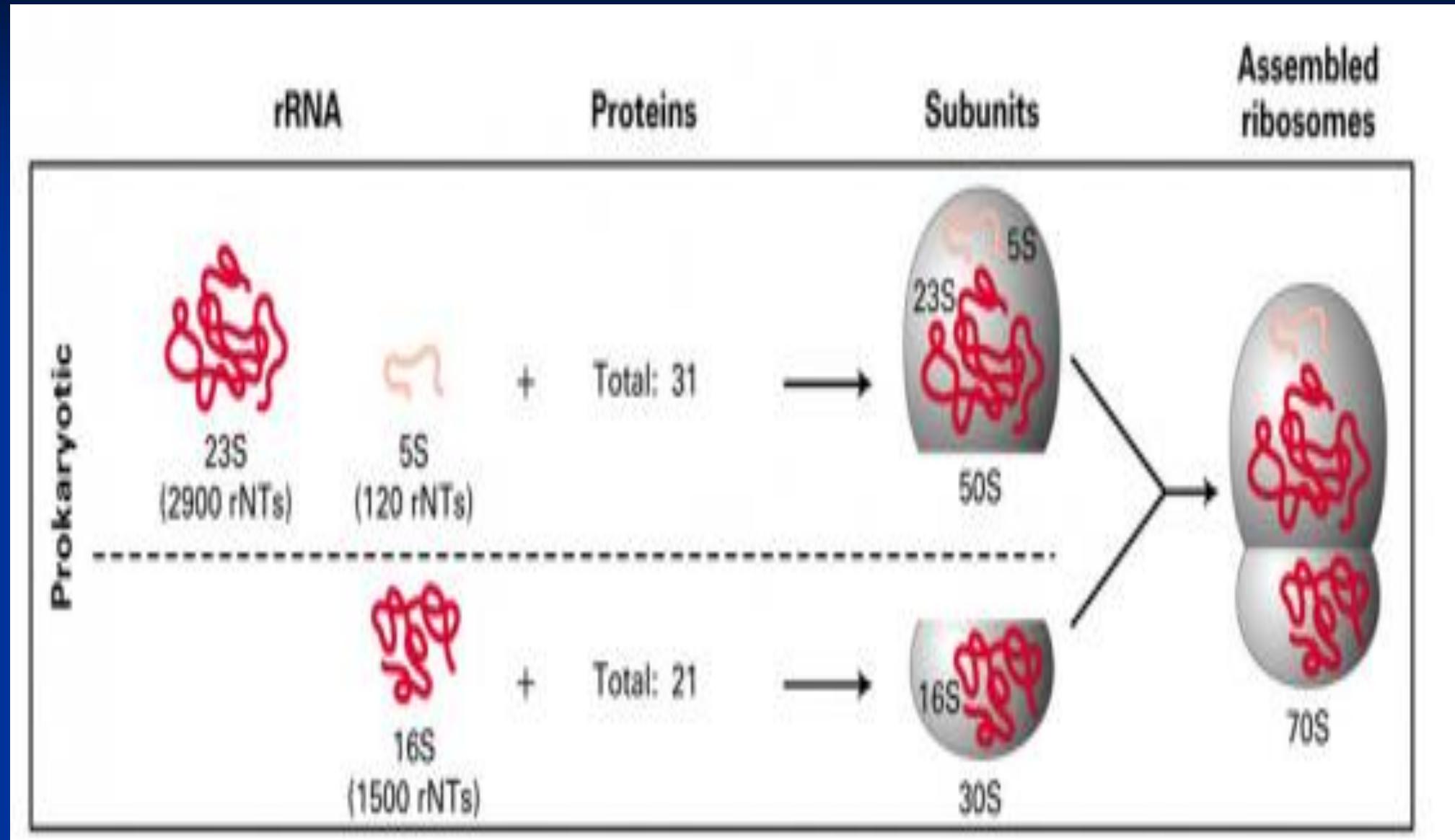
Structure des gènes :

- Structure simple.
- Début et fin des régions à transcrire et à traduire.
- Séquences courtes des ponctuations.
- Les régions en amont et en aval de l'ORF (Open Reading Frame) (cadre de lecture) sont respectivement appelées régions 5' et 3' non-traduites (5'UTR et 3'UTR; UTR = UnTranslated Region).



■ Transcription :

- Pour chaque gène, un seul brin de l'ADN est transcrit. La synthèse de l'ARN est catalysée par l'ARN polymérase (5'->3').
- >90% des gènes possèdent des signaux spécifiques de terminaison appelés terminateurs intrinsèques.
- 1) inclusion d'un palindrome (5'-CGGATG | CATCCG-3') et
- 2) six U à la suite du palindrome.

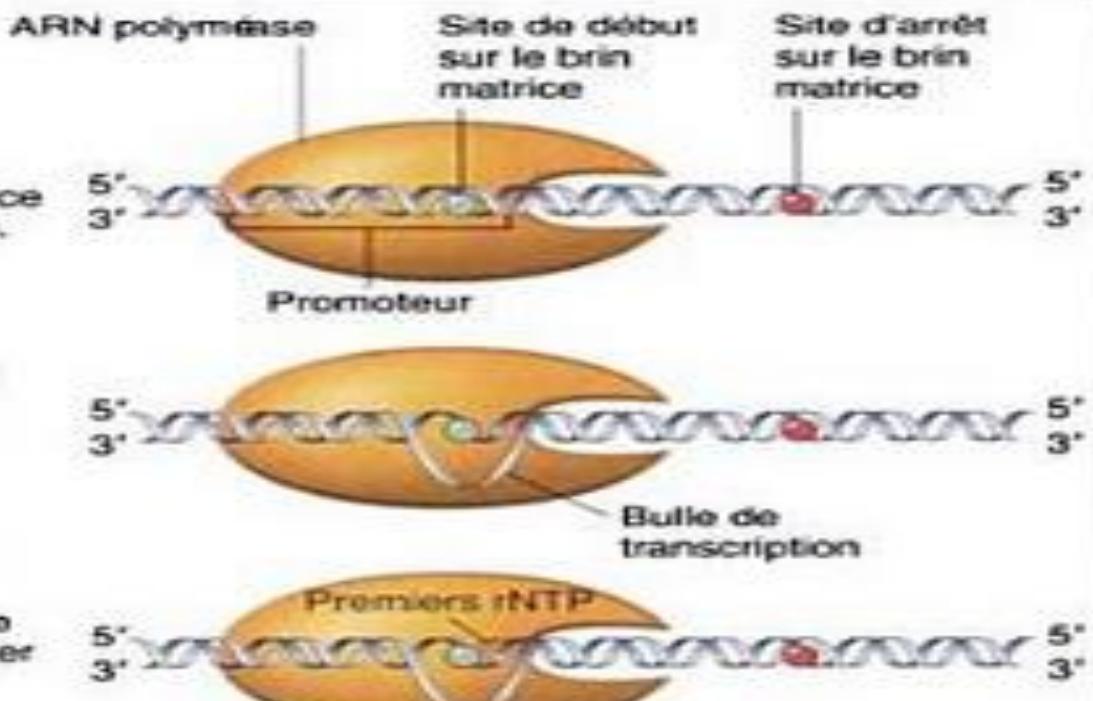


- ARNr est le constituant principal des ribosomes (complexe ribonucléoprotéique) servant à la traduction de l'information génétique codée sur un ARNm.
- Chez les procaryotes la grande sous unité ribosomique 50S contient les ARNr suivants :
 - ARNr 23S ;
 - ARNr 5S.
- La petite Sous unité 30S contient que l'ARNr 16 avec au moins 21 protéines.

- La transcription permet de copier l'ADN en ARNm. Elle est réalisée grâce à l'ARN polymérase.
- C'est une protéine ADN dépendante, multimérique possédant les sous-unités α , β , β' et σ . Elle est présente sous deux formes l'enzyme-cœur ($\alpha\beta\beta'$) et l'holoenzyme ($\alpha\beta\beta'\sigma$). Les ARN polymérases ne nécessitent pas d'amorce et ne possèdent pas d'activité exo-nucléasique.
- Chez *E.coli*, une seule ARN-polymérase catalyse la synthèse de tous les ARN de la cellule.

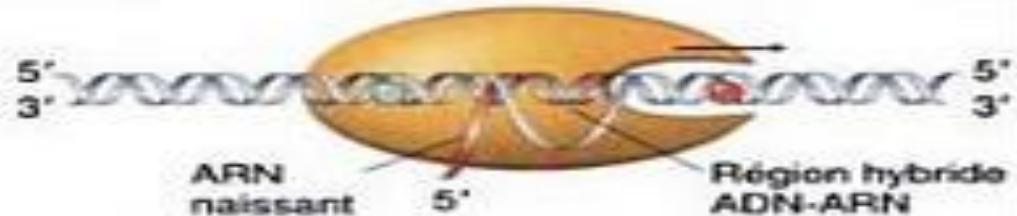
INITIATION

- 1 La polymérase se fixe à la séquence promotrice dans l'ADN double brin.
- Complexe fermé -
- 2 La polymérase sépare les deux brins d'ADN près du site de début de la transcription, formant une bulle de transcription.
- Complexe ouvert -
- 3 La polymérase catalyse la liaison phosphodiester entre les deux premiers rNTP.



ÉLONGATION

- 4 La polymérase avance dans le sens 3' → 5' du brin matrice, séparant les deux brins d'ADN et ajoutant des rNTP à l'ARN naissant.



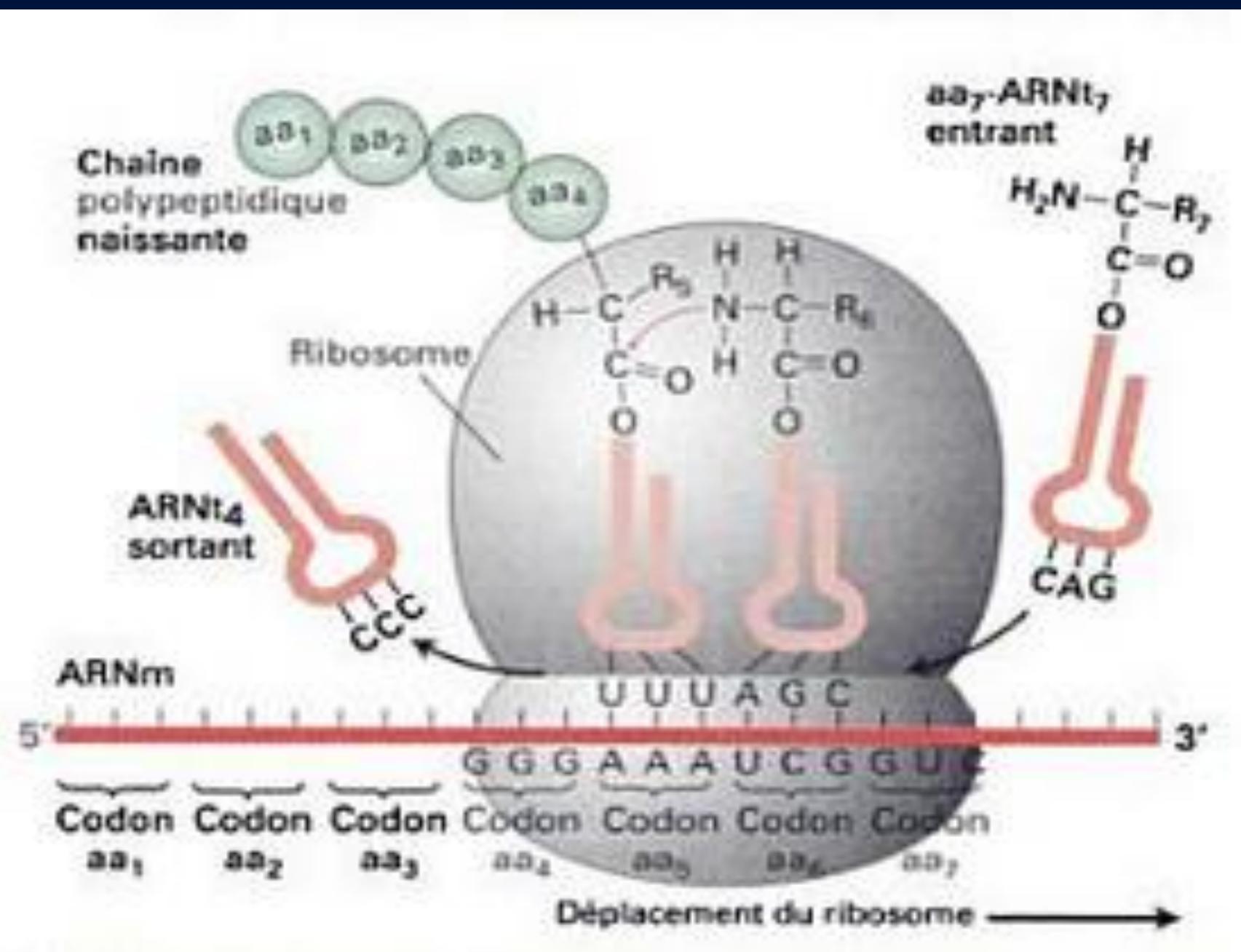
TERMINAISON

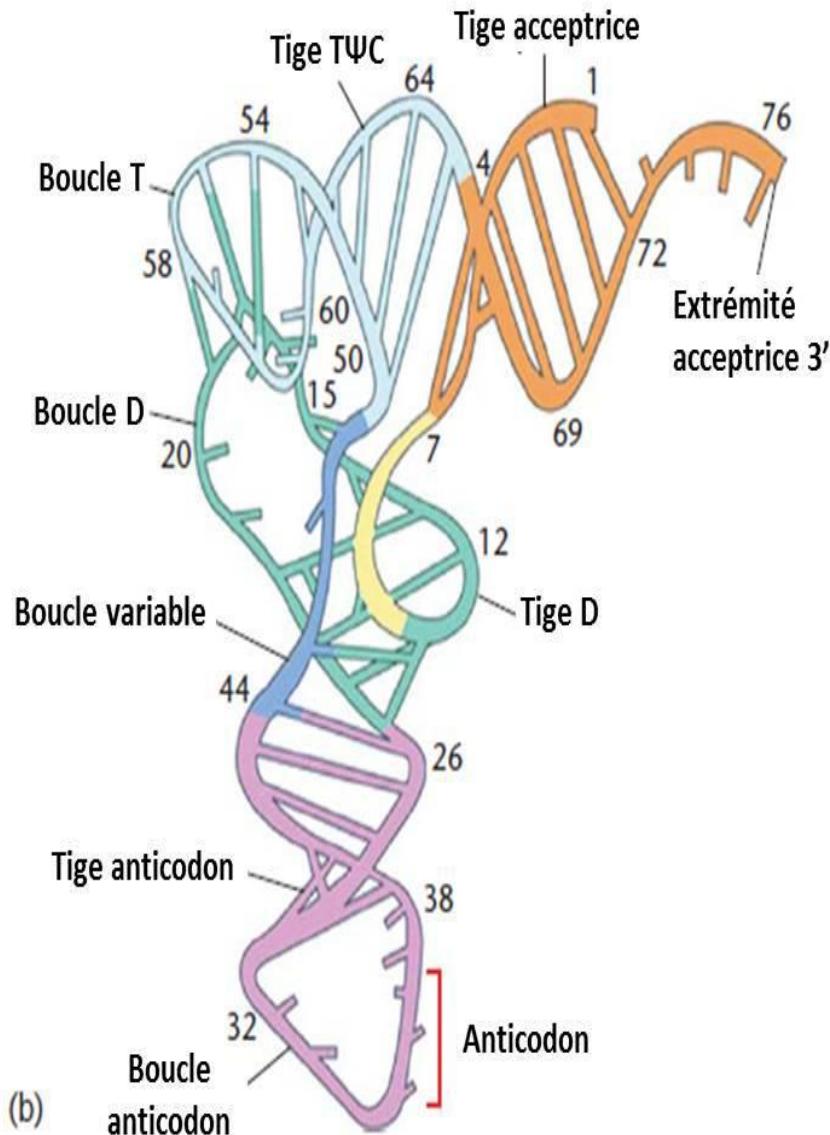
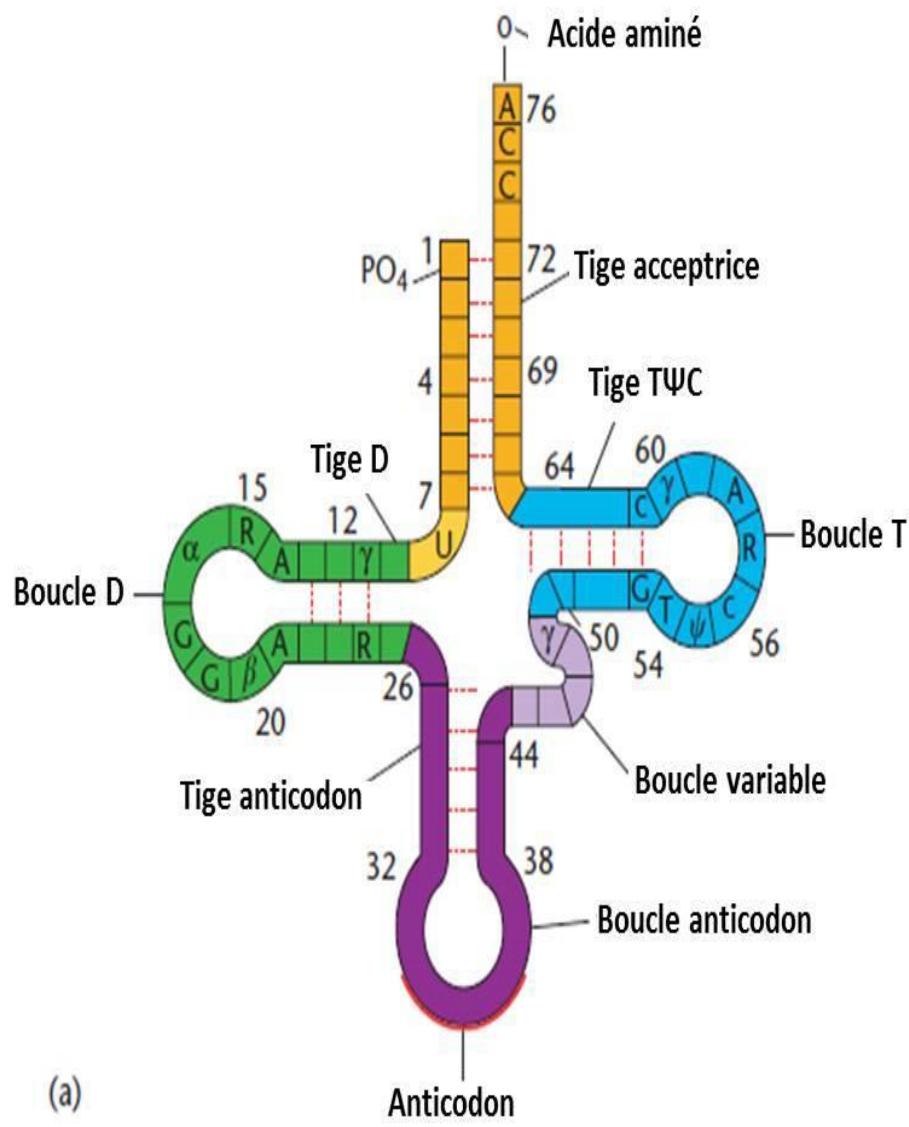
- 5 Au niveau du site d'arrêt de la transcription, la polymérase libère l'ARN terminé et se dissocie de l'ADN



■ Traduction :

- L'ARN m est traduit en protéine par l'action conjuguée de l'ARN de transfert et du ribosome qui est constitué de nombreuses protéines et de deux molécules principales d'ARN ribosomal (appariement entre les anticodons des ARNt et les codons complémentaires dans l'ARNm).
- La formation d'une liaison peptidique entre le groupement aminé N de l'aa-ARNt entrant et du C carboxy-terminal sur la chaîne protéique naissante est catalysée par l'un des ARNt

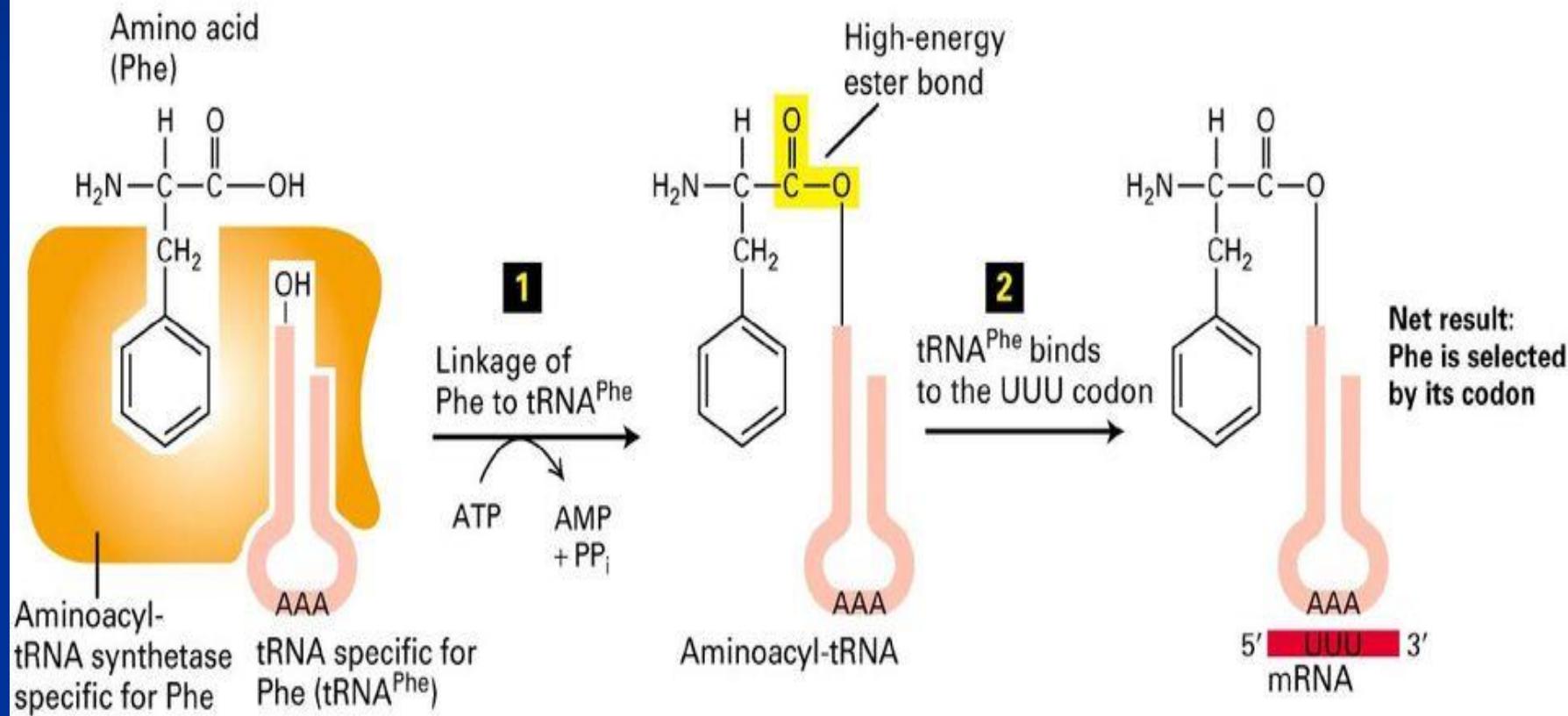




Structure d'un ARN de transfert (ARNt): (a) Diagramme de la structure secondaire d'un ARNt schématiquement représentée en forme de trèfle. Les bases universellement conservées sont indiquées par le numéro de leur position. (b) Structure tridimensionnelle en forme de L adoptée par l'ARNt lorsque la tige D se replie sur la tige TΨC

- La traduction correspond au décodage de l'information portée par l'ARNm en protéines, grâce au code génétique.
- La traduction a lieu au niveau des ribosomes par des ARNt chargés avec les AA correspondants. La fixation des ARNt se fait par reconnaissance moléculaire entre le triplet de nucléotides de l'ARNm (codon) et le triplet de l'ARNt (anti-codon). On peut distinguer 3 étapes successives: l'initiation, l'elongation et la terminaison.

Exemple: ARNt-Phénylalanine



- Tous les ARNt se replient en une conformation à quatre tiges appariées et trois boucles. Les séquences CCA à l'extrémité 3' est présente également dans tous les ARNt
- la liaison d'Aa au A en 3' produit un aminoacyl-ARNt. Une partie des résidus A, C, G et U est modifiée dans la plupart des ARNt (encadré)
- la dihydrouridine (D) est presque toujours présente dans la boucle D : de même la ribothymidine (T) et la pseudouridine (Ψ) sont presque toujours présents dans la boucle T Ψ CG

- Le processus de décodage en deux étapes, pour traduire les séquences d'acides nucléiques de l'ARNm en séquences d'acides aminés dans les protéines : une aminoacyl-ARNt synthétase couple d'abord un acide aminé spécifique par une liaison ester riche en énergie à l'hydroxyle 2' ou 3' de l'adénosine terminale dans l'ARNt correspondant
- Une séquence de trois bases des ARNt(anticodon) s'apparie ensuite avec un codon dans l'ARN m spécifiant l'acide aminé attaché

Gln
(*Paramecium* et
Tetrahymena)

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

Thr
(mitochondries
des levures)

Ser (*Candida*)

Met
(mitochondries
des levures et
animaux)

Cys (*Euplotes*)

Trp
(*Blespharima* et
mitochondries)

Stop
(Mitochondries
des mammifères)

- Le code génétique est l'ensemble des règles qui permettent de transcrire et de traduire l'information génétique en ARN, puis en protéines.
- Le code des bactéries est identique à celui de l'ensemble des êtres vivants, selon le principe de l'universalité du code génétique.

II. Régulation de l'expression génétique:

- La régulation de l'expression des gènes= Pour répondre aux conditions changeantes de l'environnement immédiat.
- La régulation génétique est un moyen pour la cellule de développer des mécanismes qui lui permettent de réprimer les gènes qui codent pour des protéines inutiles et de les activer au moment où ils deviennent nécessaires.
- Deux modes de régulation de l'expression d'un gène cible par une molécule régulatrice :
 - 1- d'une façon positive : l'interaction déclenche la transcription du gène.
 - 2- d'une façon négative : l'interaction empêche la transcription du gène.

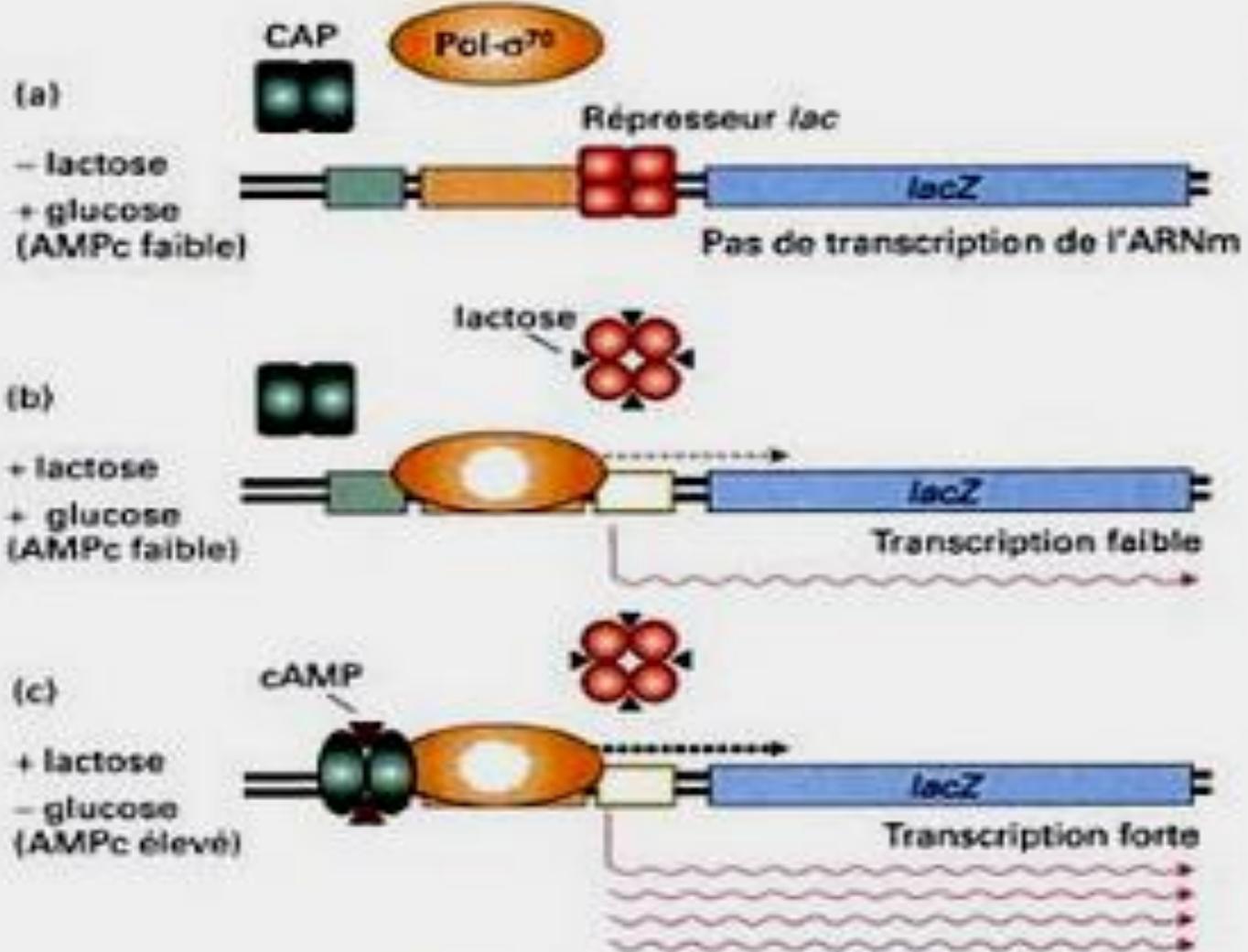
La régulation de la transcription à partir de l'opéron lac *d'E.coli* :

- La région de contrôle de la transcription constituée de 100 pb (paire de base) comprend trois régions de fixation pour des protéines :
 - le site CAP(catabolite Activator protein), qui fixe la protéine activatrice des catabolites, le promoteur lac auquel se fixe le complexe ARN polymérase et l'opérateur lac, qui fixe le répresseur lac.

-en absence de lactose, très peu d'ARNm de lac sont produits car le répresseur lac se fixe à l'opérateur, inhibant ainsi l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase

-en présence de glucose et de lactose, le répresseur lac fixe du lactose et se dissocie de l'opérateur, ce qui permet à l'ARN polymérase d'initier la transcription à un taux faible

-La transcription maximale de l'opéron lac a lieu en présence de lactose et en l'absence de glucose. Dans cette situation, l'AMPc augmente en réponse à la concentration faible de glucose et forme le complexe CAP-AMPc, qui se fixe au site CAP, au niveau duquel il interagit avec l'ARN polymérase pour stimuler le taux d'initiation de la transcription



III. Techniques de base de la biologie moléculaire

1. Extraction des acides nucléiques

- Quel que soit l'échantillon, prélèvement ou culture bactérienne pure, l'ADN doit dans un premier temps en être extrait avant de procéder aux tests moléculaires.
- Le rendement d'extraction est le reflet d'une purification optimale de l'ADN bactérien en évitant une destruction de cet ADN.

- L'extraction repose donc sur un compromis entre des **moyens agressifs** d'extraction de l'ADN à partir d'un mélange complexe comprenant les constituants biologiques des tissus et des bactéries et une **préservation** de l'intégrité de cet ADN ciblé.
- Le rendement d'extraction va être aussi bien lié au type de tissu prélevé qu'aux types de bactéries présentes.
- L'extraction se déroule en deux phases :
 - la lyse du tissu collecté;
 - la purification de l'ADN à partir du mélange de lyse;

- Plusieurs types de lyse peuvent être utilisés seuls ou combinés :
 - lyse mécanique par broyage à l'aide de billes, de Potter, d'ultrasons ;
 - lyse thermique au bain marie en eau bouillante ou au micro ondes;
- Les méthodes de purification des acides nucléiques sont généralement des combinaisons de deux ou plusieurs des techniques: extraction/précipitation, chromatographie, centrifugation.
 - lyse chimique à l'aide de sodium-dodécyl-sulfate (SDS) ou de Chelex® (agents chélateurs) ;
 - lyse enzymatique à l'aide de protéinase K, de lysozyme. La lyse mécanique par broyage et la lyse enzymatique par protéinase K sont les plus utilisées.

2. Séparation des acides nucléiques par électrophorèse en gel:

- Séparation des molécules d'ADN selon leur taille.
- Préparation de gel (qlqs mm):
- Verser entre deux plaques de verre, une solution d'agarose fondu ou d'acrylamide.
- Polymérisation de l'agar ou de l'acrylamide en polyacrylamide (réseau).
- les grands fragments d'ADN= dans des gels d'agarose, les petits dans des gels de polyacrylamide.
- le mélange de fragments d'ADN charge dans une rigole au sommet du gel,

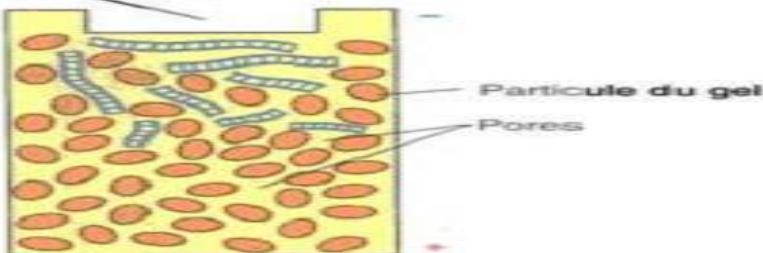
- appliquer une différence de potentiel entre deux extrémités du gel;
- Les fragments d'ADN migrent vers le pole positif, pour former des bandes visibles après autoradiographie (radio-isotopes), sinon par coloration au moyen d'une substance fluorescente.

Fragments de restriction d'un ADN

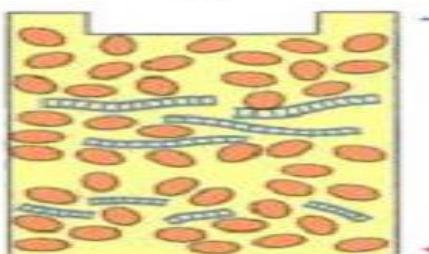


Déposer le mélange dans la fente d'un gel d'agarose ou de poly-acrylamide.
Appliquer un champ électrique

Rigole

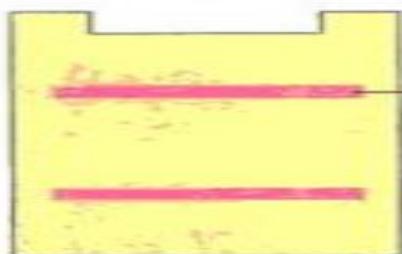


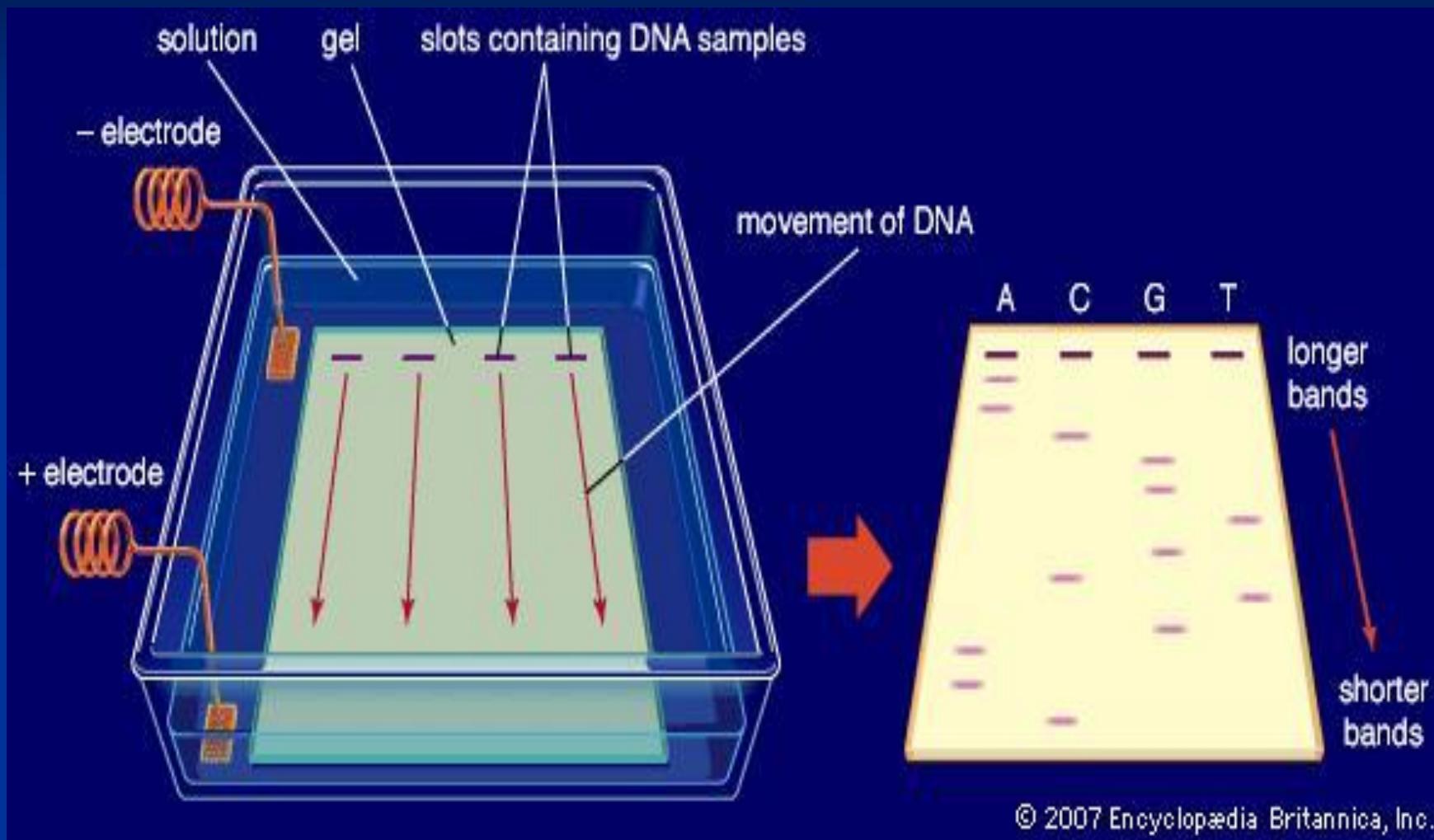
Les molécules se glissent dans les pores du gel à une vitesse inversement proportionnelle à la longueur de leur chaîne



Soumettre à autoradiographie ou incuber en présence d'un colorant fluorescent

Signal révélant la bande d'ADN





© 2007 Encyclopædia Britannica, Inc.

3. Electrophorèse en gel sous champ pulsé sépare les grandes molécules d'ADN

- Les gels d'électrophorèse ne résolvent que des fragments d'ADN de 20 kb au plus;
- L'électrophorèse en gel sous champ pulsé permet de séparer de plus grands ADN.
- Méthode: des grands ADN placés dans un champ électrique; migrent parallèlement à la direction du champ et s'étirent en longueur;
- Quand on coupe le courant: les molécules se rétracter en pelote aléatoire.
- Les longues molécules se rétractent moins que les petites dans le nouveau champ.
- Ce renversement répété du sens du champ finit par éloigner de plus en plus les unes des autres les molécules d'ADN de grande taille.

4. Détection, identification et caractérisation des acides nucléiques

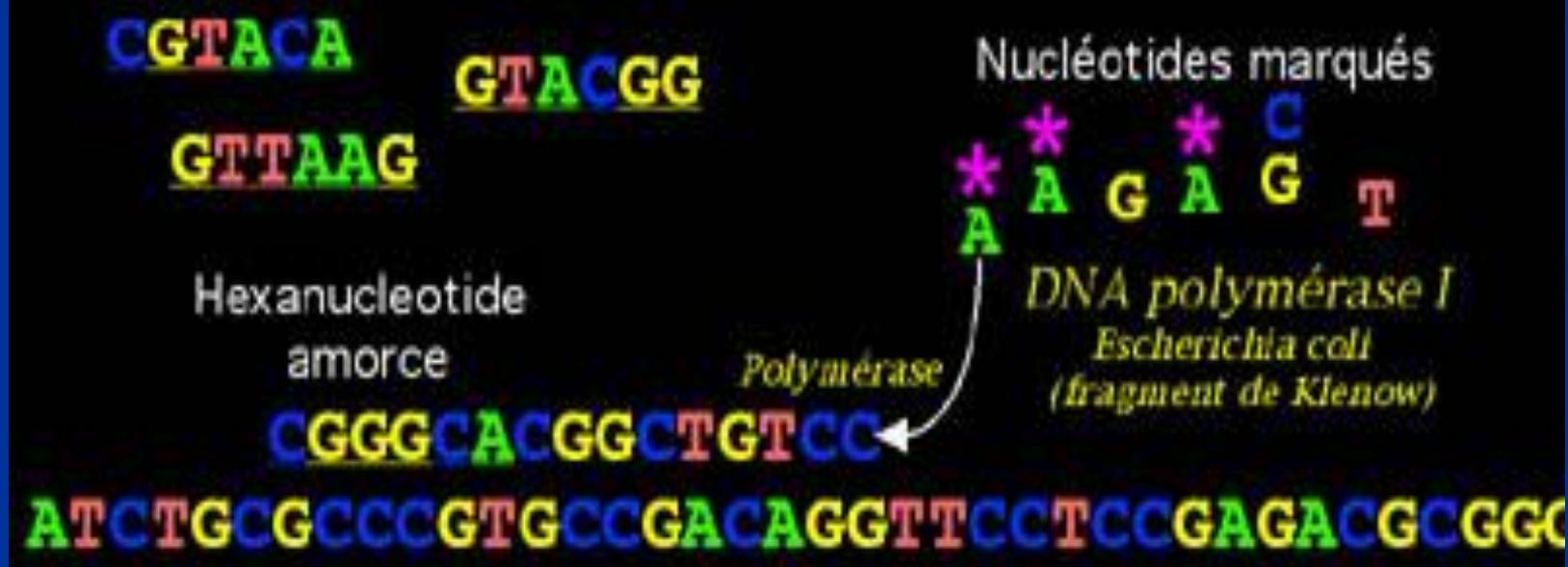
4. 1. Marquage et suivi des acides nucléiques:

- Le marquage: dans toutes les techniques qui utilisent une sonde (hybridation, northern,...).
- Marquage dit « **chaud** »: isotopes radioactifs (le p32)
- Marquages «**froids**»: des molécules aux propriétés fluorescentes, luminescentes.

a. Les sondes double brins:

- Marquage par amorçage au hasard (Random Priming):
- Southern et Northen Blot: les deux brins d'ADN de la sonde sont préalablement séparés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal. Puis, on ajoute un mélange d'oligonucléotides de synthèse. Ces oligonucléotides vont s'hybrider avec la sonde. Ces oligonucléotides fixés vont servir d'amorces au fragment de l'ADN.

Random priming (Amorçage aléatoire)



- -Marquage en 3': marquage aux extrémités.
- *avec une ADN pol. : fragment de Klenow, T4 ADN pol., Taq pol., transcriptase reverse.
- *avec une exonucléase
- *avec une terminal transférase
- L'ADN peut être marqué à son extrémité 5'' à l'aide d'une kinase (la T4 polynucléotide kinase extraite d'*E. coli* infecté par le bactériophage T4).
- - Marquage par translation de coupure (Nick Translation) : marquage à l'intérieur utilise deux enzymes :
- *DNase I pour générer quelques coupures simple brin dans le fragment d'intérêt
- *DNA pol.I pour dégrader l'ADN dans le sens 5'-3' au niveau de ces coupures et repolymériser en présence d'un nucléotide chaud (radioactif).
- Les désoxynucléosides triphosphates utilisés sont marqués en position alpha au 32P.

4.2. Marquages froids:

■ Fluorescence:

- Absorption d'énergie lumineuse par une molécule (fluorochrome);
- Passage à l'état de molécule excitée;
- Relaxation partielle avec perte de chaleur par échange avec le milieu ambiant
- Retour à l'état fondamental par émission lumineuse = spectre de fluorescence

■ Colorimétrie:

Colorants : biotine, fluoresceine

Exemple : l'ADN cible est fixé sur une membrane et les sondes sont biotinylées. La détection est réalisée par ajout d'un complexe streptavidine-HRP (Horse Radish peroxidase ou Peroxydase de Raifort), l'enzyme permettant l'oxydation d'un chromogène. La mesure du signal est réalisée par colorimétrie

□ Chimioluminescence:

- La chimioluminescence se produit au cours d'une réaction chimique lorsque l'excès d'énergie est libéré sous forme de lumière.
- De nombreuses réactions produisent ce phénomène et chacune émet une lumière de longueur d'onde spécifique, et d'intensité proportionnelle à la quantité de molécules réactives présentes.

4.3. Dénaturation de l'ADN et Hybridation moléculaire:

- **Dénaturation de l'ADN:**
- L'augmentation lente de la température (jusqu'à 94°C) d'une solution d'ADN rompt les liaisons hydrogènes entre les bases et sépare les 2 brins: on parle de dénaturation.
- Elle peut être suivie par mesure de l'absorption de la lumière UV (densité optique) à 260 nm.

- La température qui provoque la dénaturation de la moitié des molécules d'ADN est appelée température de fusion ou Tm (melting temperature).
- Il est possible de mesurer directement la température de fusion d'un ADN double brin en mesurant l'augmentation de l'absorbance de la solution à 260 nm en fonction de la température.
- $Tm = 2x(A+T) + 4x(G+C)$
A partir de N = 20, on corrige d'un multiplicateur proportionnel à la longueur au-delà de ce chiffre : $1 + [(N-20)/20]$.

$$Tm = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C) \times (1 + [(N-20)/20])$$

- **Renaturation ou l'hybridation:**
- Le refroidissement lent de la solution d'ADN dénaturé amène les brins complémentaires à se réassocier pour donner à nouveau une double hélice: c'est la renaturation ou l'hybridation. Cette réassociation peut aussi s'effectuer entre ADN et ARN donnant des hybrides ADN /ARN.
- L'hybridation moléculaire désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex.
- La formation et la stabilité des duplex dépendent de nombreux facteurs en plus de la composition en bases : longueur des duplex, complexité de la séquence.

▪ Sondes nucléotidiques

- Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Cette réaction sonde-fragment correspond à une réaction d'hybridation moléculaire.
- Une sonde nucléotidique peut être soit une séquence d'ADN ou d'ARN monobrin. Sa taille est très variable: oligonucléotide de 20 à 30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides. La sonde est complémentaire et antiparallèle du fragment recherché.

4.4. Séquençage d'ADN

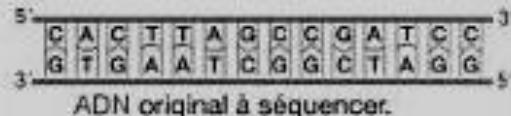
- Le séquençage consiste à déterminer l'enchaînement linéaire des nucléotides d'un fragment d'ADN
- ou, de façon plus générale, d'un génome. Son histoire débute en 1977 lorsque Maxam et Gilbert
- développent une technique basée sur le marquage radioactif de fragments et leur coupure sélective
- par dégradation chimique. En parallèle, Sanger aborde une tout autre approche.

▪ Séquençage Sanger:

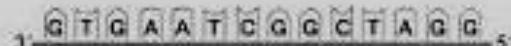
- La même année, Sanger base sa technique de séquençage sur une synthèse enzymatique des fragments d'ADN après leur amplification par clonage. Il utilise la propriété qu'ont les ADN polymérases de synthétiser un brin complémentaire d'un brin matrice en présence de dNTPs.
- Il ajoute à ce milieu des ddNTPs marqués par fluorescence; ceux-ci servent de terminateurs d'elongation de façon aléatoire dans la réaction. En faisant migrer sur gel de polyacrylamide les fragments de différentes tailles alors obtenus, il a pu en lire la séquence.

- Depuis, le séquençage Sanger a été automatisé: les premières machines utilisant des gels de polyacrylamide ont rapidement été supplantées par les séquenceurs capillaires. Cette technologie, principalement représentée par le 3230 DNA Analyzer de Applied Biosystems (maintenant Life Technologies) depuis sa commercialisation en 2002, est maintenant considérée comme la première génération du séquençage haut-débit et a permis de déchiffrer le génome humain.
- On utilise des amorces marquées (*dye primers*) ou des nucléotides marqués (*dye terminators*).

1 Fragment d'ADN inconnu isolé



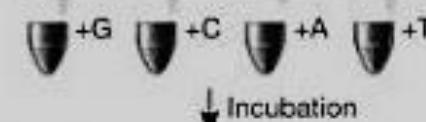
2 L'ADN est dénaturé pour donner une matrice simple brin.



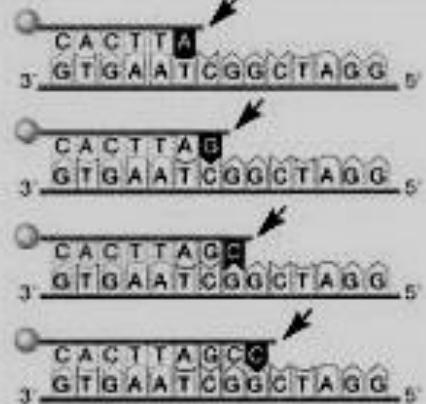
3 Une molécule amorce spécifique marquée s'hybride avec le brin d'ADN.



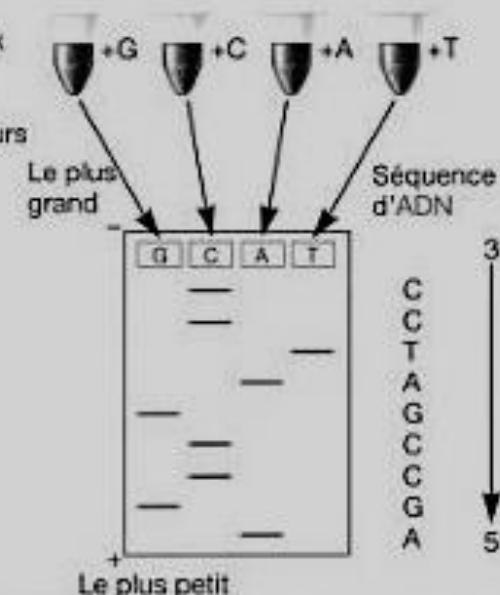
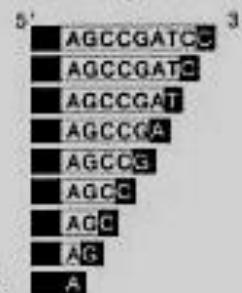
4 On ajoute l'ADN polymérase et un mélange des nucléotides normaux (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). Les ddA, ddG, ddC et ddT sont introduits dans des tubes de réaction séparés avec les nucléotides normaux. Les ddnucléotides sont marqués avec des types de traceurs qui permettent leur visualisation.



5 Les brins nouvellement répliqués se terminent à l'endroit de l'addition d'un ddnucléotide.



6 Représentation schématique de toutes les positions possibles d'un nucléotide marqué, sur le fragment.



7 La migration sur un gel des mélanges de réaction, dans quatre pistes différentes, sépare leurs fragments par taille et par type de nucléotide. La lecture de bas en haut, base par base, donne la séquence correcte.

(a)

—GCGACAT—

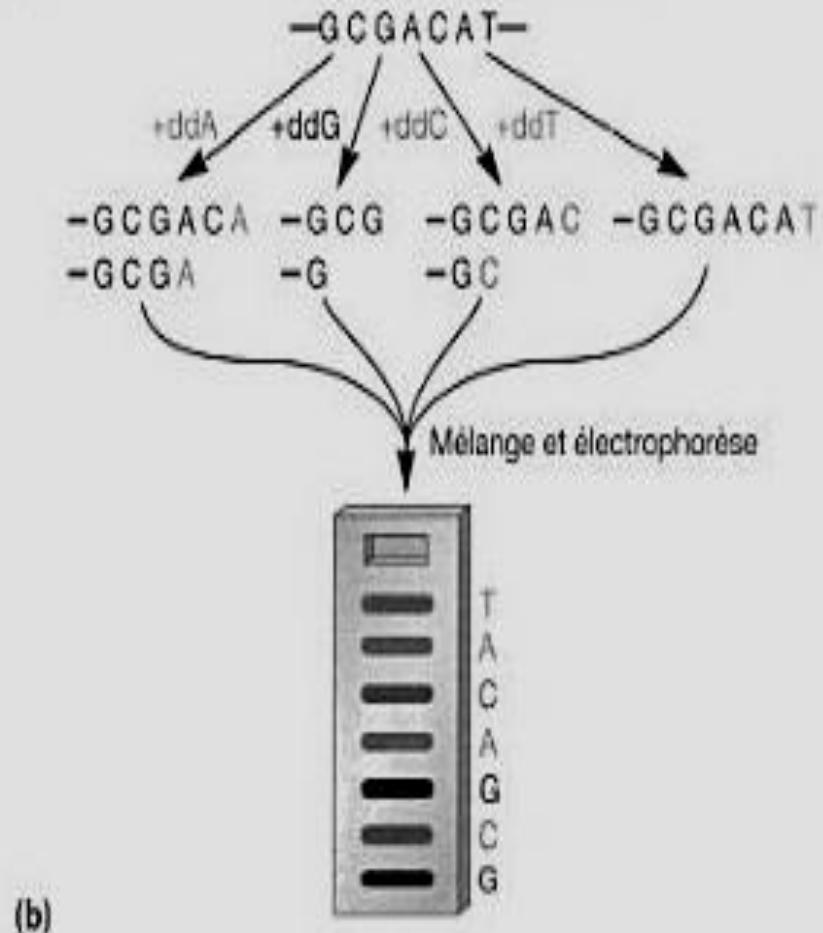
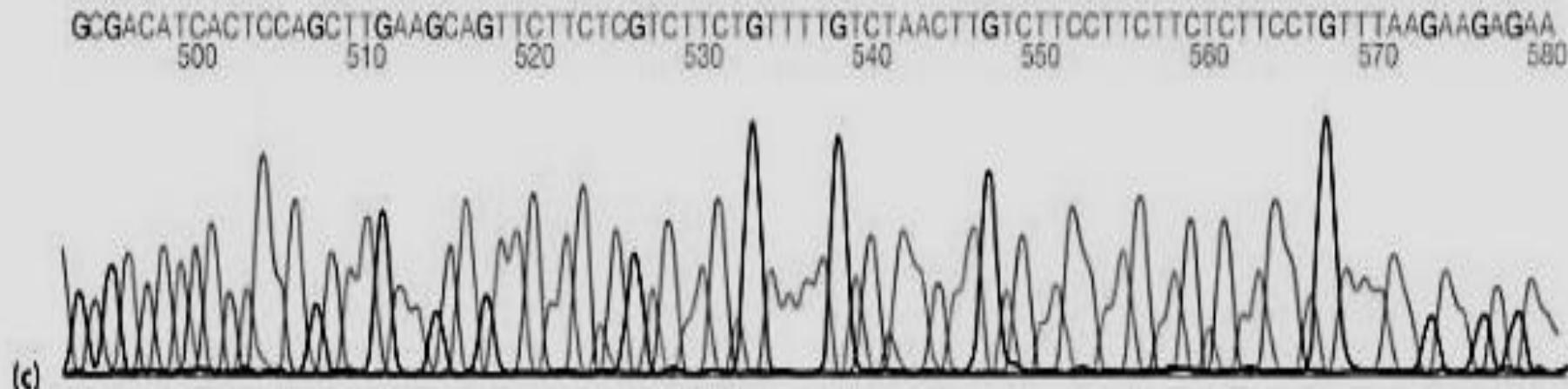


Figure La méthode de séquençage de l'ADN de Sanger.
(a) Les étapes 1-6 sont les mêmes que le séquençage soit manuel ou automatisé. L'étape (7) montre la préparation d'un gel pour le séquençage manuel, utilisant des dNTP radioactifs. **(b)** Portion d'un cycle de séquençage automatisé. Ici les ddNTP sont marqués par des colorants fluorescents.
(c) Données obtenues par un cycle de séquençage automatisé. La figure montre les bases 493 à 580.



4.5. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

- **Amplification de l'ADN bactérien:**
 - L'amplification est une technique de biologie moléculaire très utilisée en microbiologie. Elle permet, à partir d'une simple molécule d'acide nucléique d'obtenir des quantités suffisamment importantes de matériel cible afin de pouvoir l'analyser par différentes techniques.
 - Actuellement, la technique de PCR est la plus utilisée pour amplifier de l'ADN bactérien.

■ Historique:

- La PCR a été mise au point en 1985 par Kary Mullis, la technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation (vers 1988), d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq polymérase) (*Thermus aquaticus*), qui permet une automatisation de la technique.

- **Définition:**

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR (ou encore ACP pour Amplification en Chaîne par Polymérase), est une technique de réplication ciblée *in vitro*.

Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures.

▪ **Principes de la PCR**

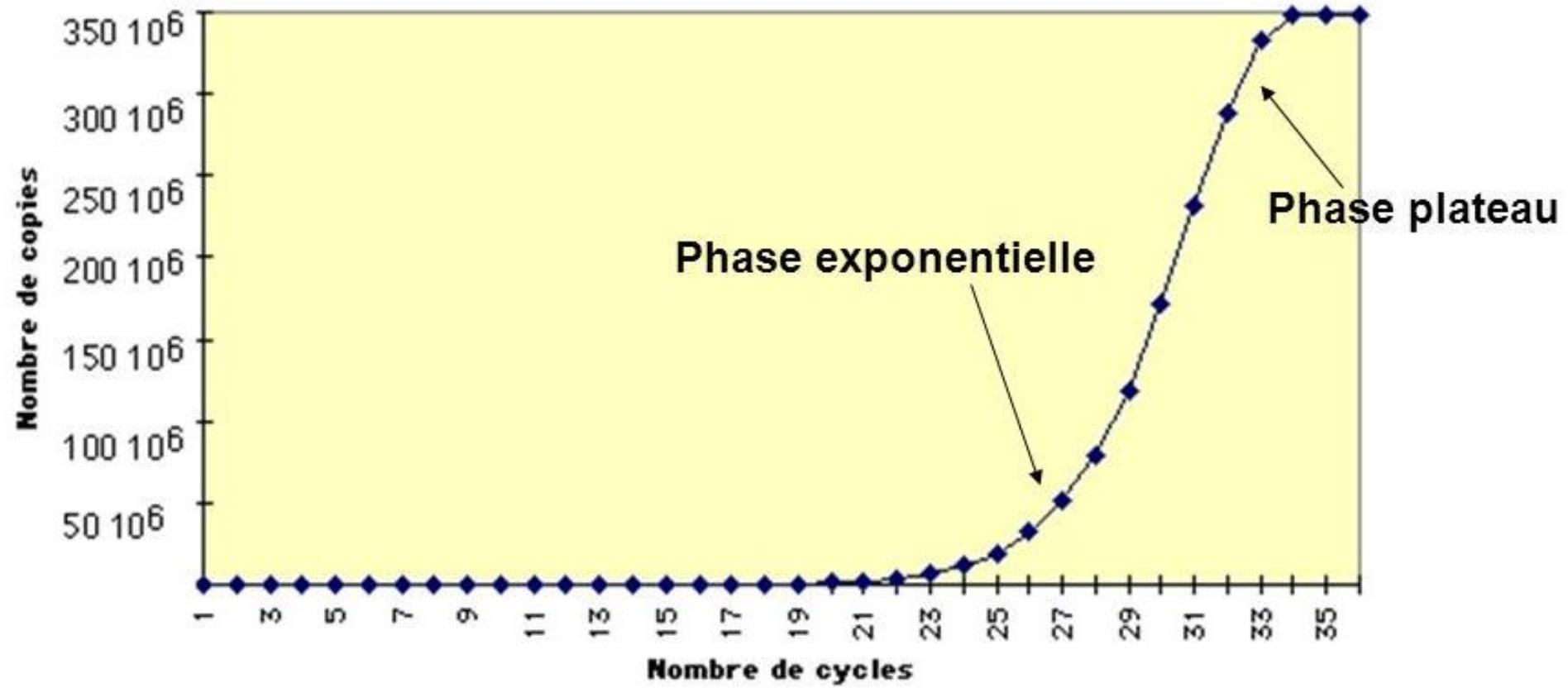
La PCR repose principalement sur trois éléments :

- le chauffage d'un ADN double brin jusqu'à au moins 90 °C permettant de le séparer en deux simples brins (étape de dénaturation) ;
- après le chauffage et une séparation de l'ADN double brin en simples brins, un refroidissement progressif permettant une hybridation entre des séquences complémentaires (étape d'hybridation des amorces) ;
- la propriété de recopiage d'un brin cible à partir d'une amorce complémentaire hybridée sur le brin grâce à des ADN polymérasées, enzymes thermostables (étape d'elongation).

- Dans un tube, on mettra en contact l'ADN cible, deux amorces en quantité suffisante, des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) ainsi que de l'ADN polymérase, le tout dans un tampon assurant un pH stable (**Tris(trishydroxyméthylaminom éthane)**, HCl à pH basique 8,5 à 9) contenant des cations bivalents Mg²⁺, cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation.
- Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température répétés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur.



La courbe de la PCR



- **Dénaturation de la matrice:**
 - Au cours de la dénaturation, le double brin s'ouvre pour donner de l'ADN monocaténaire.
 - Les deux chaînes complémentaires sont séparées par une augmentation de température. C'est ce qu'on appelle la dénaturation.
 - Pour obtenir la dénaturation de l'ADN, on augmente généralement la température à environ 93 – 96 °C. De cette façon, les fortes liaisons H sont rompues et le nombre de bases non appariées augmente.
 - La réaction est complète lorsque tout l'ADN bicaténaire est devenu de l'ADN monocaténaire.

- **Hybridation des amorces:**
- L'hybridation, ou réhybridation, des brins d'ADN a lieu à une température plus basse (généralement 55 – 65 °C). Une fois que la température est abaissée, les deux chaînes complémentaires d'ADN monocaténaire se reformeront en une molécule d'ADN bicaténaire. Au cours de cette phase, les amorces se déplacent librement et des liaisons ioniques sont constamment formées et rompues entre l'amorce monocaténaire et la matrice monocaténaire.

▪ Extension des amorces:

- Les amorces sont étendues sur la séquence cible en utilisant une ADN polymérase en présence de dNTP, ce qui aboutit à une duplication du matériel cible de départ (T^o =ADN polymérase Taq est 72 °C).
- Les bases sont couplées à l'amorce du côté 3'.
- La durée des étapes d'extension des amorces peut être augmentée si la région de l'ADN à amplifier est longue; cependant, pour la majorité des réactions PCR, une durée d'extension de 1 minute est suffisante pour obtenir une extension complète.

L'amplification, en tant que nombre final de copies de la séquence cible, est exprimée par l'équation suivante:

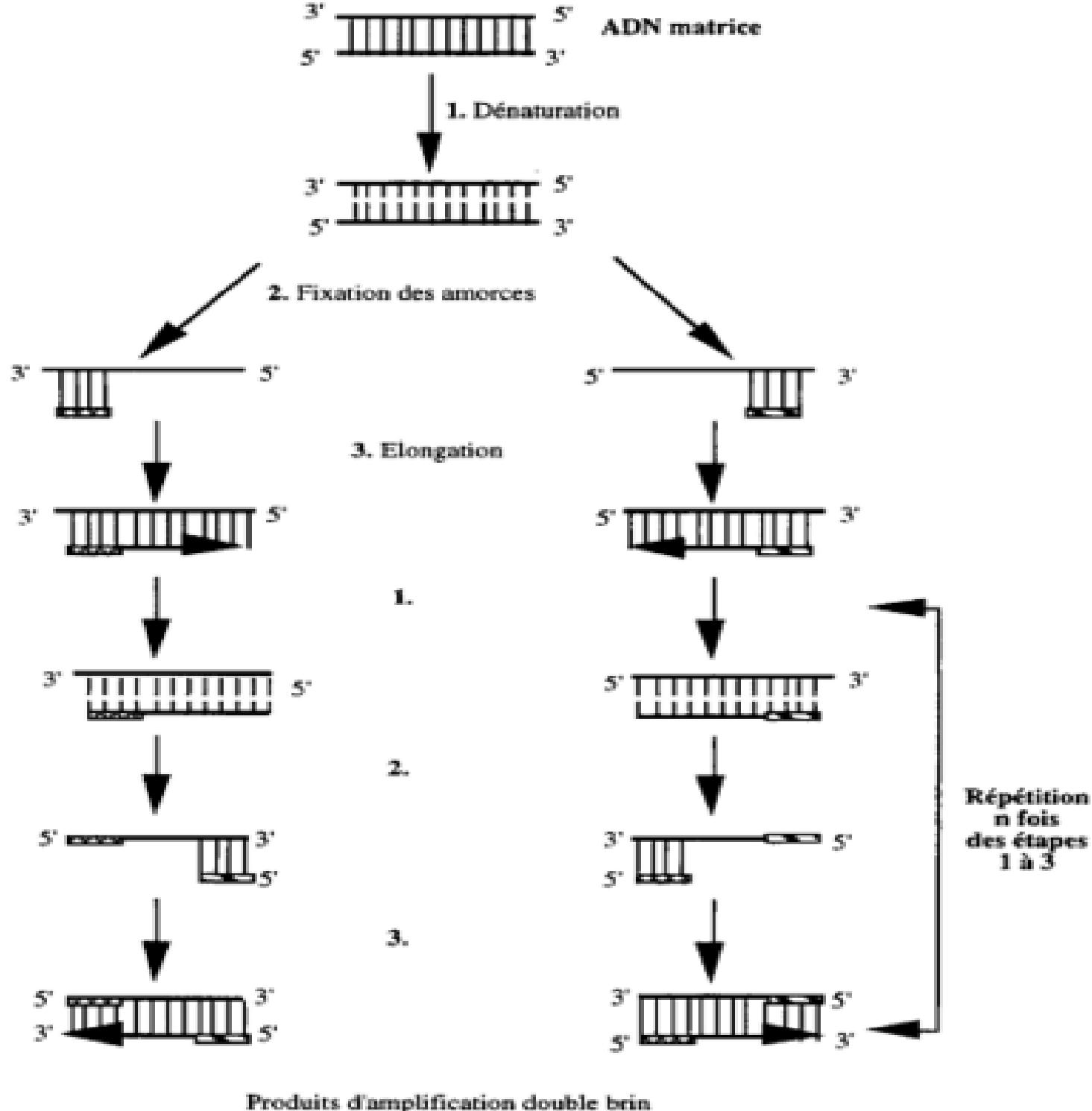
$$(2^n - 2^N)x$$

N= nombre de cycles,

2n= le premier produit obtenu après le premier cycle et le deuxième produit obtenu après le deuxième cycle,

X= le nombre de copies de la matrice originelle.

Après 20 cycles de PCR, il y aura une amplification d'un facteur de 2^{20} , en supposant une efficacité de 100 % pendant chaque cycle.



4.6. RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR):

- Extraire les ARNm pour générer ensuite des copies d'ADNc (ADN complémentaire). Cette réaction est catalysée par la transcriptase inverse des rétrovirus qui synthétise une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ARN.
- Les ADNc monocaténaires sont alors répliqués par l'ADN polymérase au cours d'un premier cycle de température. D'autres cycles sont réitérés afin d'amplifier les ADNc bicaténaires en grande quantité.

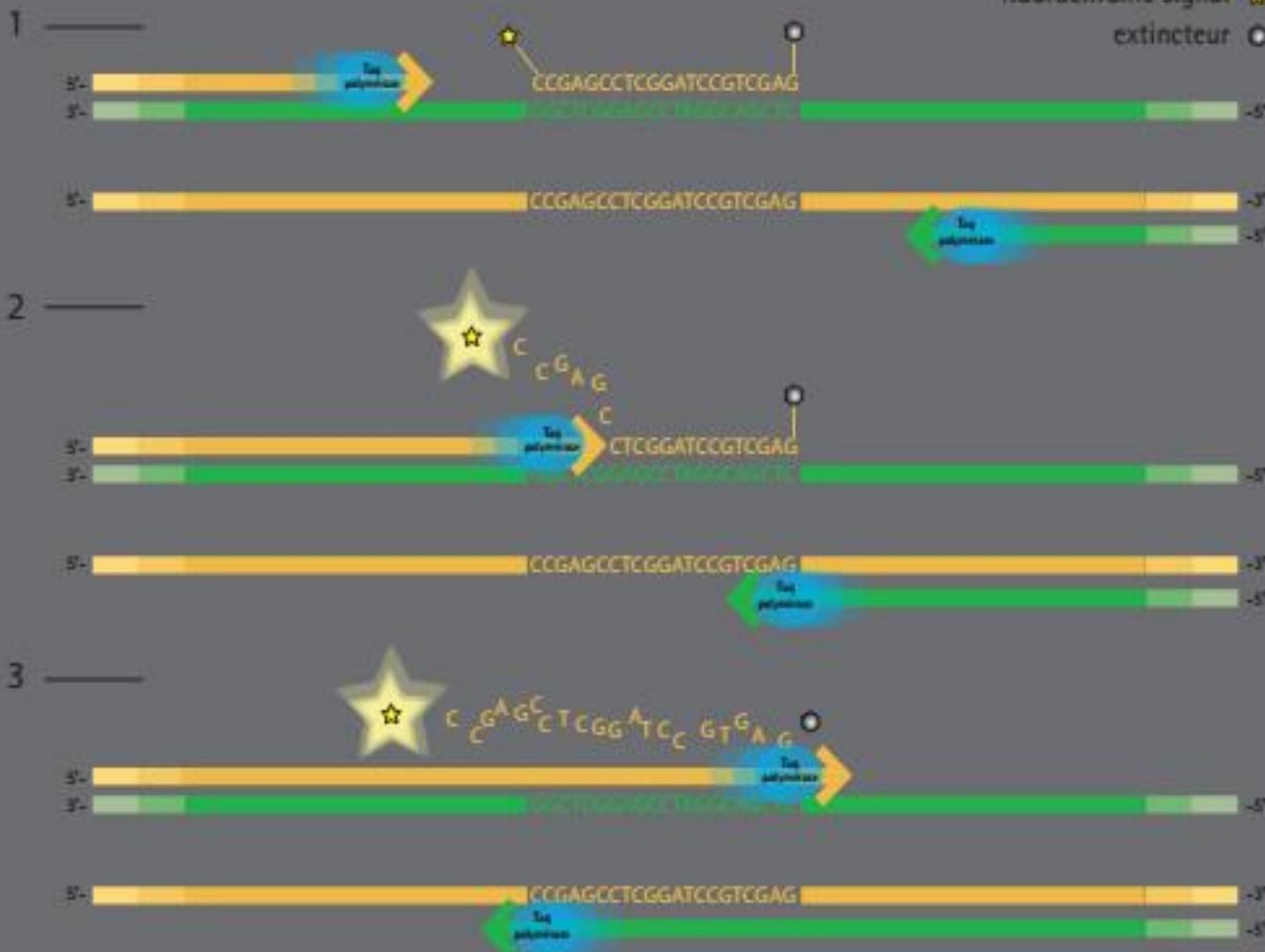
4.7. PCR quantitative en temps réel (Quantitative real-time PCR):

- La PCR quantitative permet de déterminer le taux d'ADN ou d'ARN spécifiques dans un échantillon biologique. La méthode est basée sur la détection d'un signal fluorescent qui est produit de façon proportionnelle à l'amplification du produit PCR, cycle après cycle. Elle nécessite un thermocycleur couplé à un système de lecture optique qui mesure une émission de fluorescence.
- Une sonde nucléotidique est synthétisée de telle sorte qu'elle puisse s'hybrider sélectivement à l'ADN d'intérêt, entre les séquences où les amorces s'hybrident.

- La sonde est marquée sur 5' par un fluorochrome signal (ex: 6-carboxyfluoresceine), et sur 3' par un fluorochrome extincteur (quencher) (ex: 6-carboxy-tétraméthyl-rhodamine).
- Cette sonde doit montrer une température d'hybridation (T_m) supérieure à celle des amorces afin qu'elle s'hybride à 100 % pendant la phase d'elongation (paramètre critique).
- Tant que les deux fluorochromes restent présents au niveau de la sonde, l'extincteur empêche la fluorescence du signal. En fait, la proximité de l'extincteur et du signal induit une absence d'émission de fluorescence.
- Pendant la phase d'elongation, la Taq polymérase dégrade la sonde et libère le fluorochrome signal.
- Le taux de fluorescence alors libéré est proportionnel à la quantité de produits PCR générée à chaque cycle.

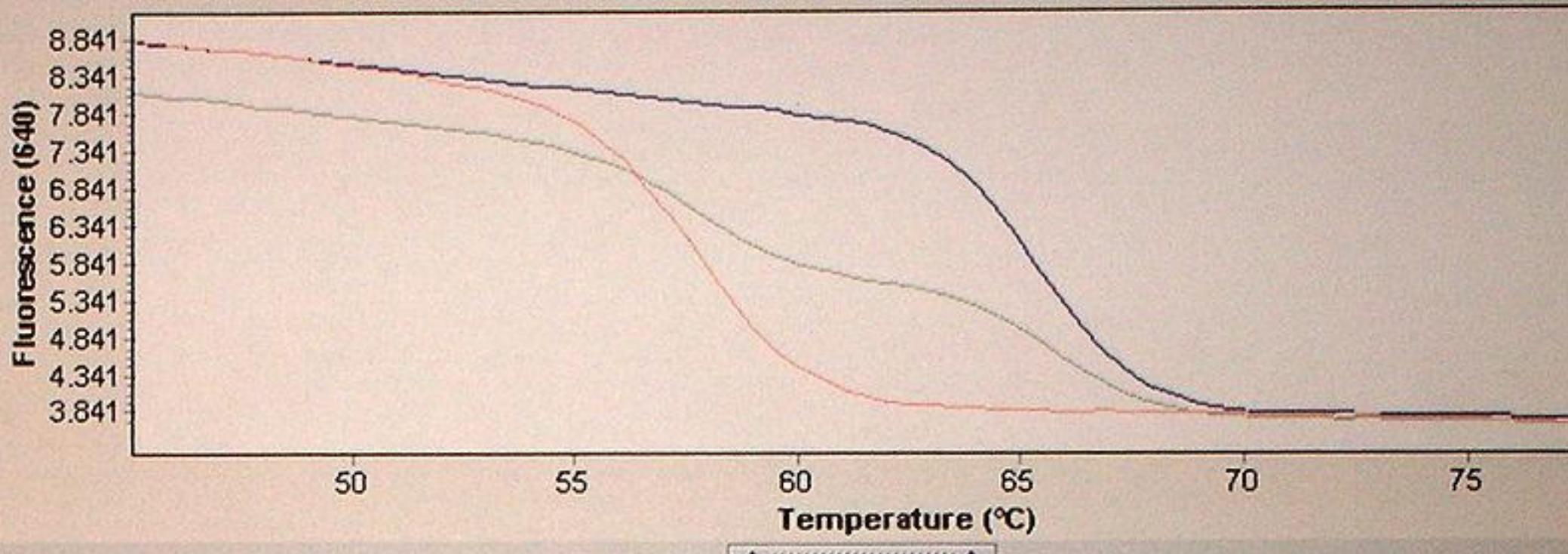
fluorochrome Signal

extincteur

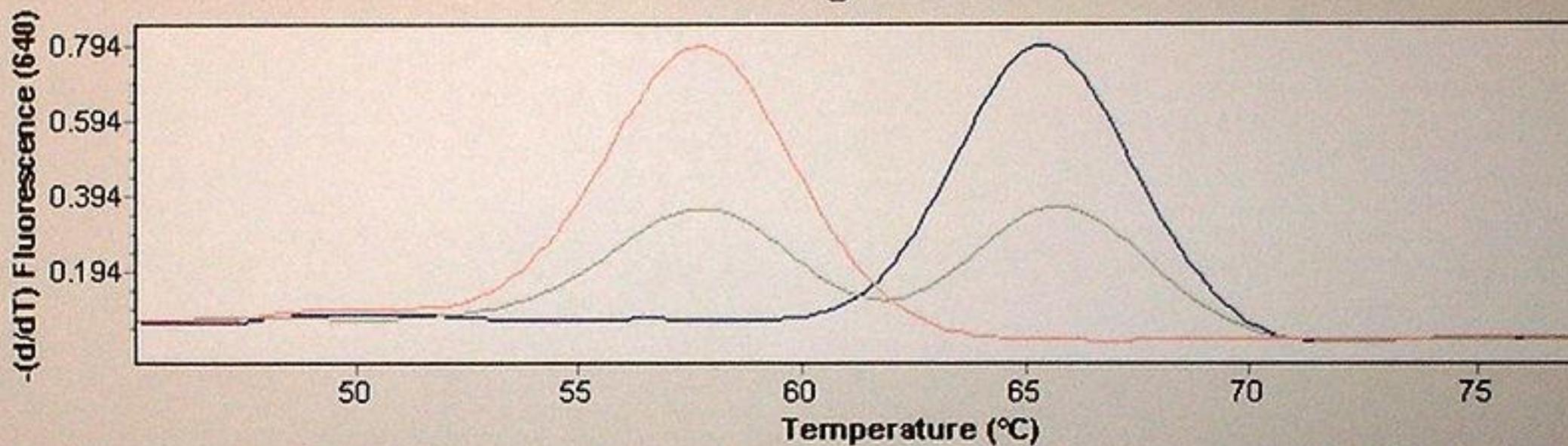


- Une **courbe de fusion** en PCR en temps réel est une étape programmée supplémentaire à la fin des cycles d'amplification.
- vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié.
- Si la courbe est polymodale, les résultats doivent être interprétés avec prudence ou l'expérience doit être recommencée avec d'autres amorces plus spécifiques.
- Si la courbe est unimodale, le calcul de la dérivé primaire de celle-ci donne une courbe en cloche dont l'abscisse du maximum est le Tm du produit de la PCR (amplicon).

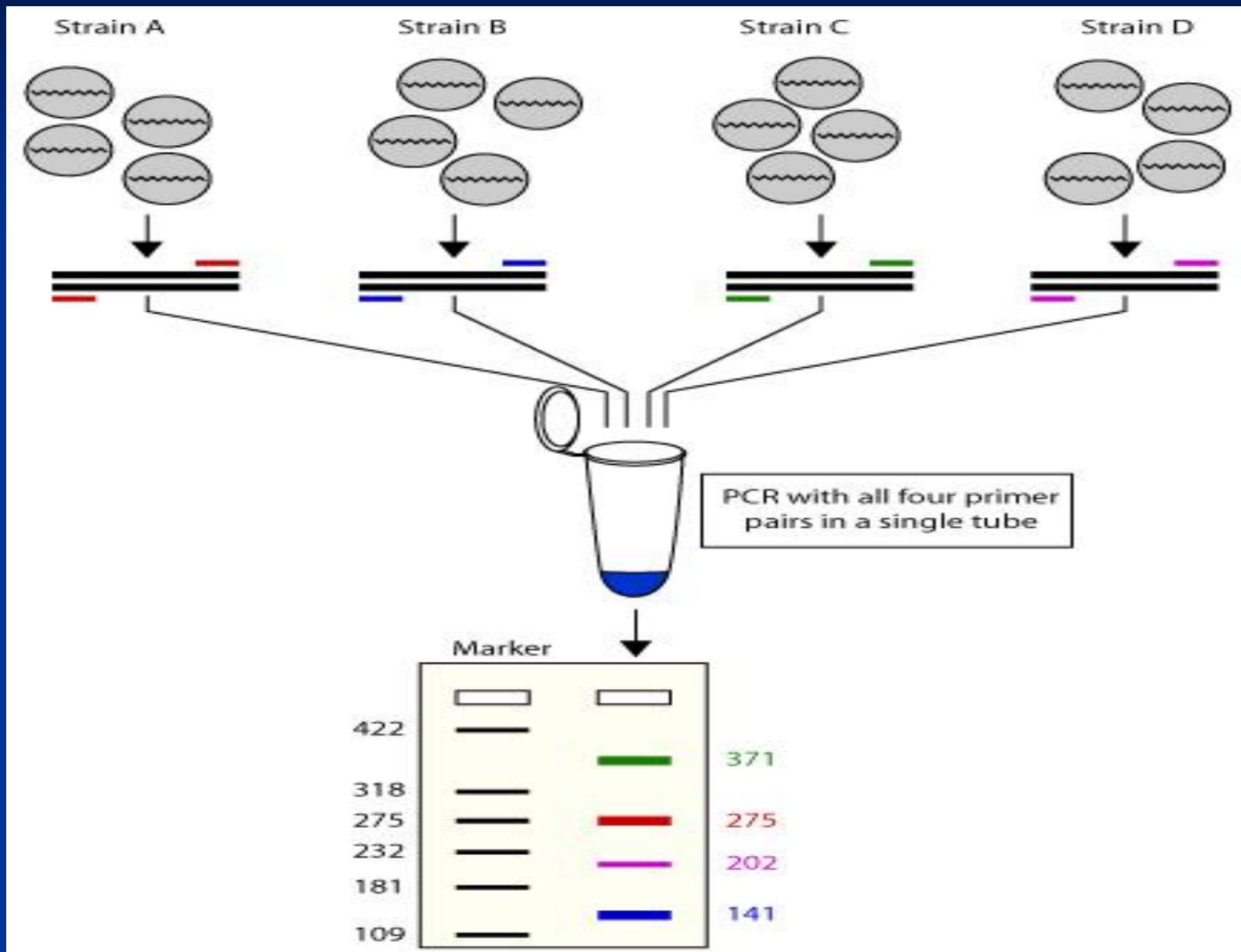
Melting Curves



Melting Peaks



4.8. PCR multiplexe



4.9. Méthodes de détection:

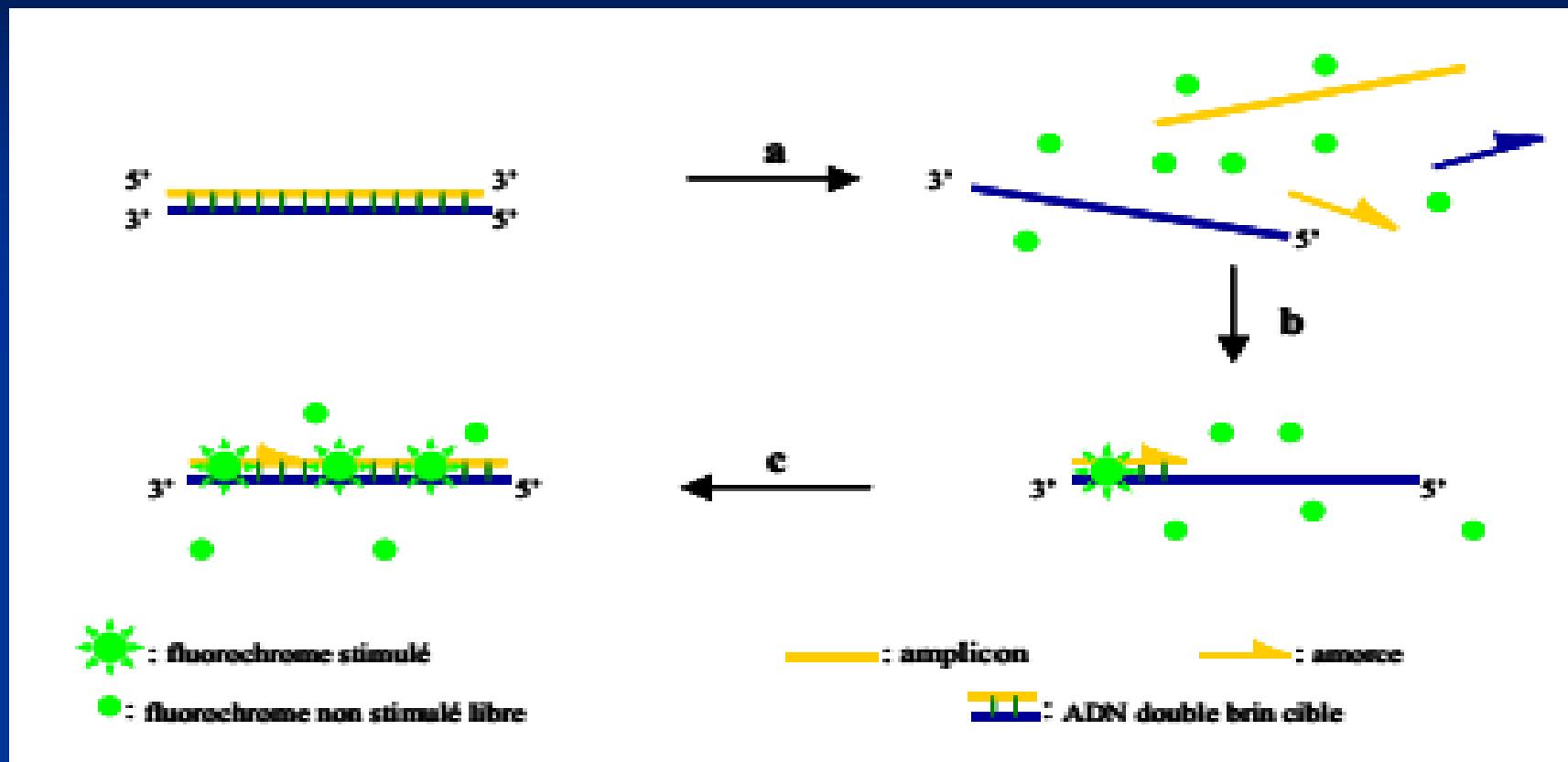


Fig: Agents se liant à l'ADN double brin . (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel.

4.10. Sondes:

➤ Taqman ou hydrolyse de sondes:

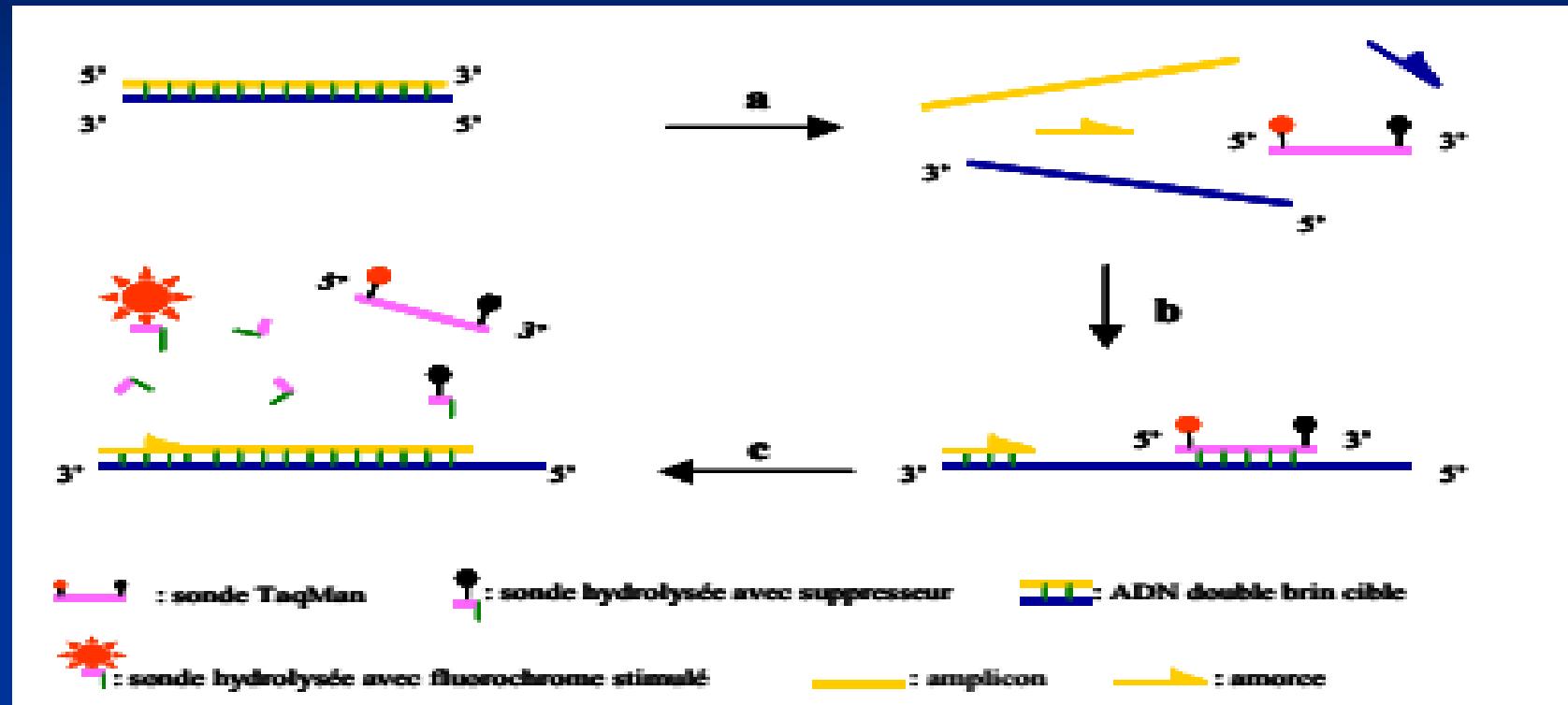


Fig: *Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)* (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

4.11. HybProbes (FRET) ou hybridation de 2 sondes

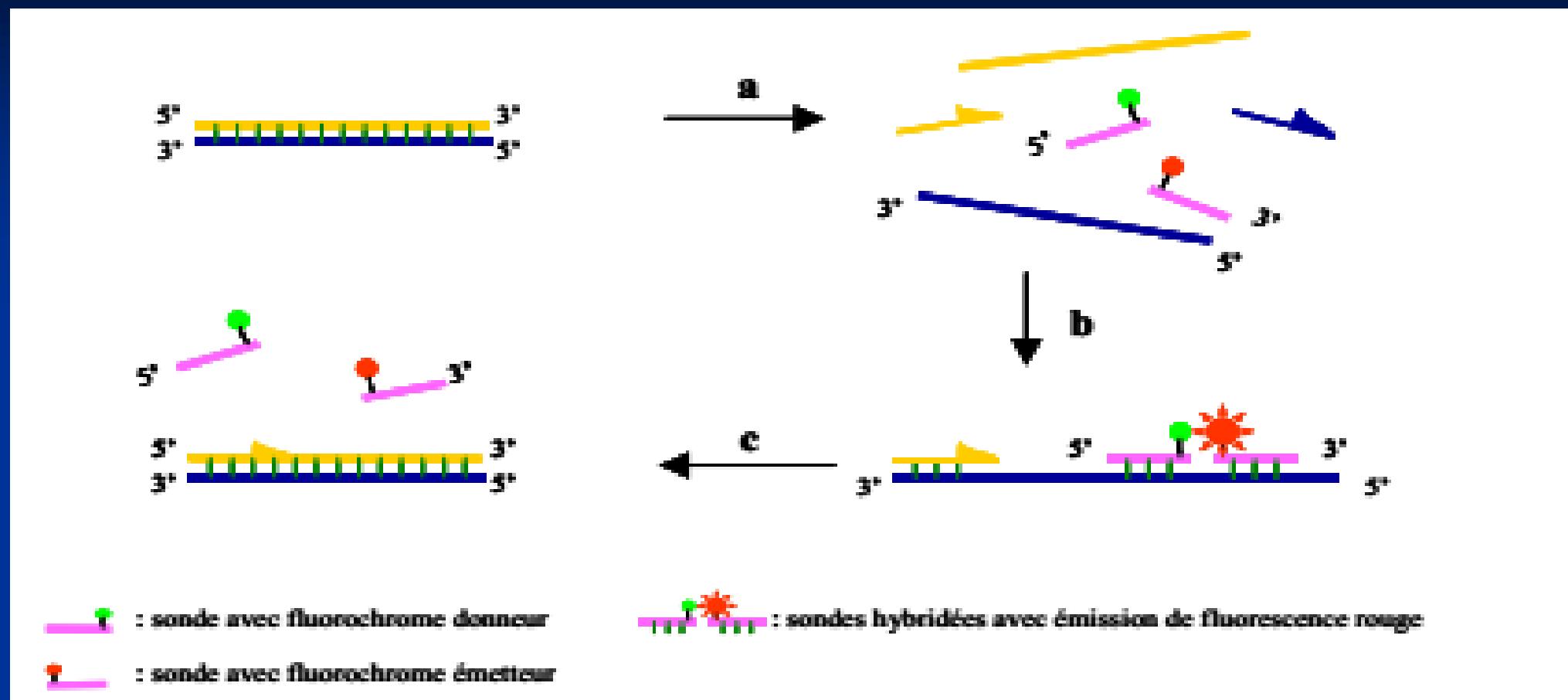


Fig.: *Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)* (a) Durant l'étape de dénaturation, les deux sondes demeurent séparées et en solution. (b) À la température d'appariement, les sondes s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'émission de fluorescence rouge par le principe FRET. (c) Les sondes retournent libres en solution.