

La Biologie Moléculaire



La Biologie Moléculaire PCR et RT-PCR

Au croisement de la génétique, de la biochimie et de la physique, la biologie moléculaire est une discipline scientifique dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire.

Le terme « biologie moléculaire » désigne également par extension l'ensemble des techniques de manipulations d'acides nucléiques (ADN, ARN), appelées aussi techniques de génie génétique.

Historique

La biologie moléculaire est apparue au XX^e siècle, à la suite de l'élaboration des lois de la génétique, de la découverte des chromosomes et de l'identification de l'ADN comme support de l'information génétique.

Polymerase Chain Reaction

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR (réaction de polymérisation en chaîne), est une technique de répliation ciblée (région spécifique) d'un acide nucléique.

Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'acide nucléique spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures, quantité suffisante pour permettre ensuite une détection.

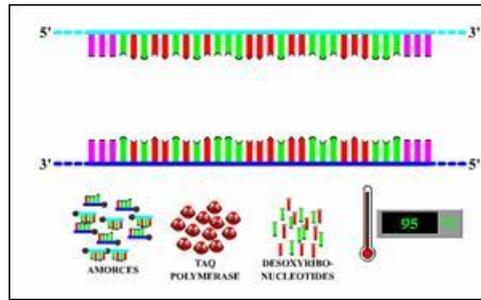
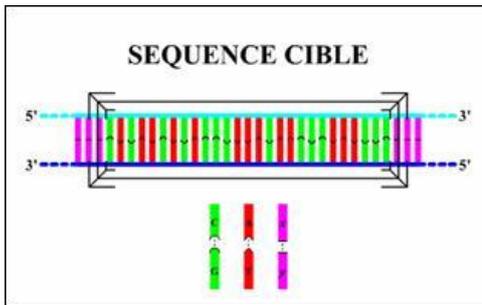
Imaginée par K. Mullis en 1985 (Prix Nobel dès 1993), la technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (Taq polymérase thermostable), qui permet une automatisation de la technique.

Principe de la PCR

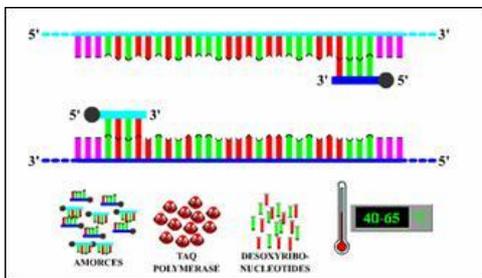
Le principe de la technique consiste à réaliser une succession de réactions de répliation d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces ou primers (séquences nucléotidiques courtes) qui définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier, des dNTP (bases nucléotidiques), et une enzyme.

Chaque réaction est constituée de trois étapes :

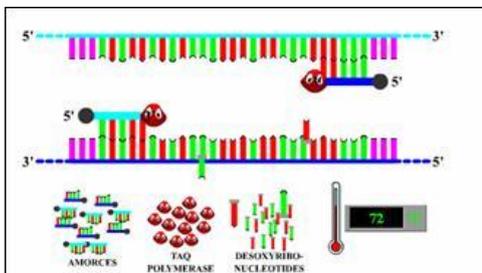
✧ Dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simple brin ;



✧ Hybridation des amorces de part et d'autre de la séquence à amplifier;



✧ Polymérisation du brin complémentaire.



A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin. L'astuce consiste à utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.

La PCR permet d'amplifier des fragments d'ADN ; pour les fragments d'ARN, une étape supplémentaire est nécessaire : la reverse transcription. Cette étape est réalisée à l'aide d'une enzyme (Reverse Transcriptase) qui copie le mono brin d'ARN en ADNc, ensuite la PCR proprement dite peut commencer ; on parle de RT-PCR.

Ces outils de biologie moléculaire sont très spécifiques et permettent de détecter de façon reproductible de très faibles quantités d'agents pathogènes (bactéries, virus, parasites) dans des prélèvements de nature variée.

Mise en œuvre au laboratoire

En pratique, les techniques de PCR et de RT-PCR, sont rarement réalisées à partir des matrices pures.

En effet, de nombreux composants présents dans les prélèvements peuvent inhiber la réaction. Afin d'éliminer une grande partie de ces inhibiteurs, une étape d'extraction des acides nucléiques est nécessaire.

❖ A Inovalys Angers, plusieurs principes d'extraction sont mis en œuvre :

- Extraction sur colonnes de silice



- Extraction à l'aide de billes magnétiques (système automatisé).



Les amplifications sont ensuite réalisées sur des appareils (thermocycleurs) pourvus de blocs chauffants, dans lesquels les cycles temps/températures sont contrôlés automatiquement.

❖ Inovalys Angers dispose actuellement d'un parc de 4 thermocycleurs.



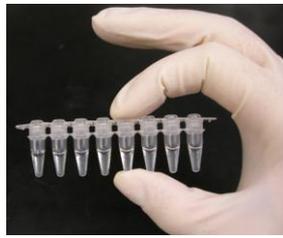
AbiPrism 2400



Abiprism 7000

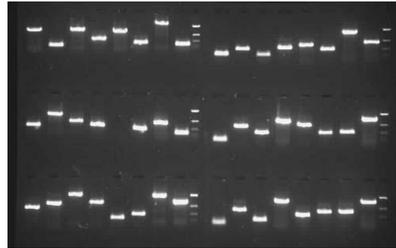


AbiPrism 7500 et 7500 fast

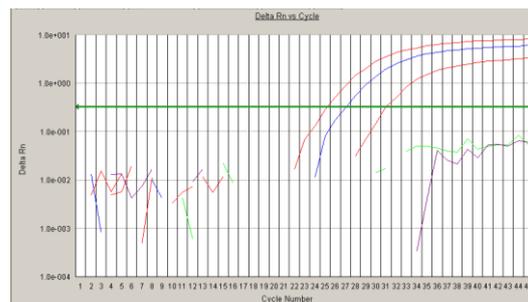


Les produits d'amplification issus de la réaction peuvent être mis en évidence :

✧ soit en fin de réaction (PCR conventionnelle), par électrophorèse sur gel et révélation à l'aide d'un agent intercalant, par exemple



✧ soit à chaque cycle (PCR temps réel), grâce à des sondes fluorescentes



Inovalys Angers utilise depuis plusieurs années la PCR en temps réel qui présente des avantages majeurs par rapport aux méthodes de PCR conventionnelle :

- ✧ Analyse quantitative des résultats si nécessaire
- ✧ Typage des souches en utilisant des sondes fluorescentes spécifiques
- ✧ Reproductibilité
- ✧ Sensibilité très importante
- ✧ Diminution du risque de contamination (*en raison de l'absence d'ouverture des tubes pour la détection*)
- ✧ Automatisation de l'analyse, donc gain de temps
- ✧ Réduction des déchets toxiques

Analyses réalisées Inovalys Angers

Le laboratoire réalise actuellement, par techniques PCR et RT-PCR, les recherches de : BVD, FCO (groupe, T1, T8), SBV, FQ (*Coxiella burnetti*) qualitative et quantitative, Chlamydomphila, Neospora, Toxoplasma, RSV, IBR, PI3, Paratuberculose, Anaplama, Mycoplasma bovis, Leptospires ...