

CHAPITRE II: Technique PCR ou Polymerase Chain Reaction

La technique PCR est une technique d'amplification génique *in vitro*. Elle a été mise au point en 1985 par l'équipe de Kary MULLIS qui a reçu le prix Nobel de chimie en 1993. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique, de séquence et de longueur définies.

2.1) Principe de la technique:

Elle est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase. On réalise **n** cycles d'amplification au cours desquels 2 amorces dirigent l'amplification de la séquence d'ADN qu'elles encadrent(**Fig.1**).

La PCR ou Polymérase Chain Reaction conduit à l'amplification *in-vitro* de plusieurs millions de fois une séquence spécifique d'acide nucléique qui peut être minoritaire voir très rare (10-2 pg). Elle exploite le processus de la réplication et fait appel, pour cela, sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, des amorces (ou primer) s'hybrident de part et d'autre de la séquence à amplifier. Cette configuration permet à l'ADN polymérase de répliquer les 2 monobrins dans le sens 5' vers 3' et ainsi aboutir à la synthèse de nouveaux ADN doubles brins.

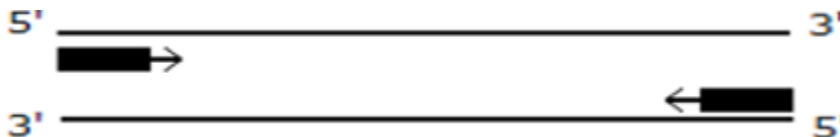


Figure1 : Suequence d'ADN

2.2. Réalisation de la PCR :

2.2.1. Composition du mélange réactionnel dans les micro tubes:

Le mélange s'effectuera toujours sur la glace et les différents éléments qui le composent seront placés dans l'ordre suivant dans les microtubes(**Fig.02**):

Le tampon, $MgCl_2$, les nucléotides, les amorces, l'enzyme (taq polymérase) et enfin l'ADN à amplifier(ADN matrice).

L'ADN à amplifier est chauffé à une température supérieure à sa Température (en pratique, environ 95°C) pour séparer les deux brins. Les éléments nécessaires à cette réplication sont présents dans le tube, à savoir :

1.Tampon

- 2. les ions magnésium(MgCl₂)** : à des concentrations de 0,5 à 2,5 mM, ils servent de stabilisateurs pour les nucléotides et activent l'enzyme.
- 3. les nucléotides triphosphates (dNTP)** : Au départ on utilisait des concentrations qui allaient jusqu'à 1,5 mM. Mais cette concentration cause des amplifications parasites dues aux erreurs de réplication. Les concentrations de 20 à 200 µM sont de plus en plus utilisées.
- 4. les amorces** : ces oligonucléotides(20 nucléotides) initient le travail de la Taq polymérase. Leur température est de 5°C de moins que la température d'hybridation. Généralement, ce sont les valeurs comprises entre 55 et 70°C qui donnent de bons résultats avec de concentrations de 0,1 à 0,2 µM.
- 5. l'enzyme Taq polymérase** : c'est une polymérase thermostable, extraite d'une bactérie *Thermus aquaticus*(Taq) des sources chaudes (80-90°C). D'autres enzymes thermorésistantes sont actuellement utilisées proviennent d'autres microorganismes telle que : la **pfu** extraite de *Pyrococcus furiosus*(Pfu).

2.2.2. Etapes de la PCR

La PCR s'effectue sur 3 étapes(**Fig.02**) :

Etape 1 La dénaturation thermique de l'ADN: : Une fois tous les éléments rassemblés, l'ADN à amplifier est chauffé(pendant 30 à une minute) jusqu'à 95°C, dite température de dénaturation. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la réplication, est dénaturé : les liaisons hydrogène ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C et les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténaire).

Etape 2 Hybridation des amorces : Le tube est refroidi à environ 50°C (température calculée en fonction de la séquence des amorces). Cette température va permettre l'hybridation des deux brins d'ADN avec les deux amorces.

Le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrans d'ADN est comprise entre 50°C et 65°C. Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires. Les amorces à courtes séquences monocaténaire complémentaires de régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique.

Etape 3 Extension des amorces(Elongation) : synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase.

Intervention de la taq polymérase (ADN polymérase) qui allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée. Cette étape s'effectue à une température de 72°C.

Remarque : les trois étapes forment un cycle. La PCR se fait entre 30 et 40 cycles.

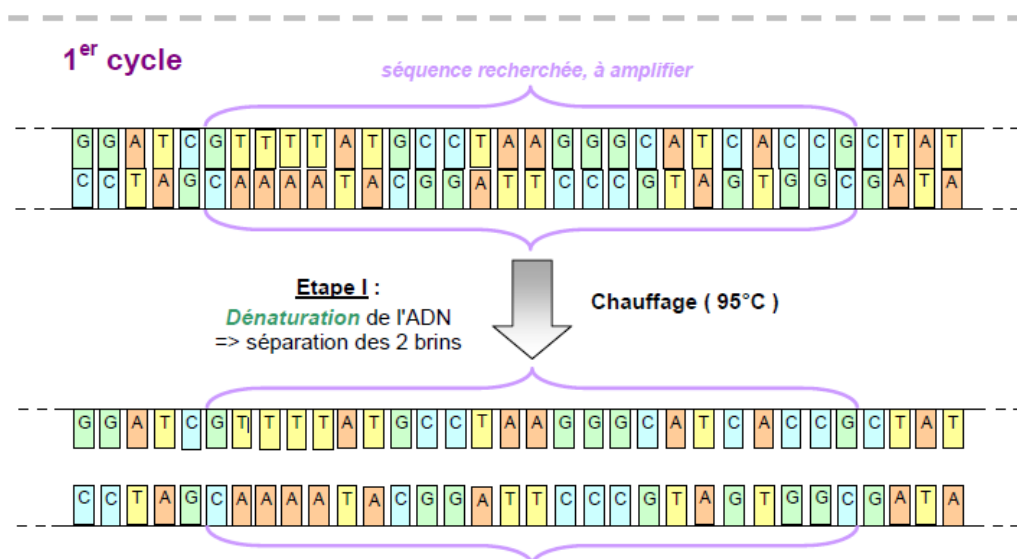
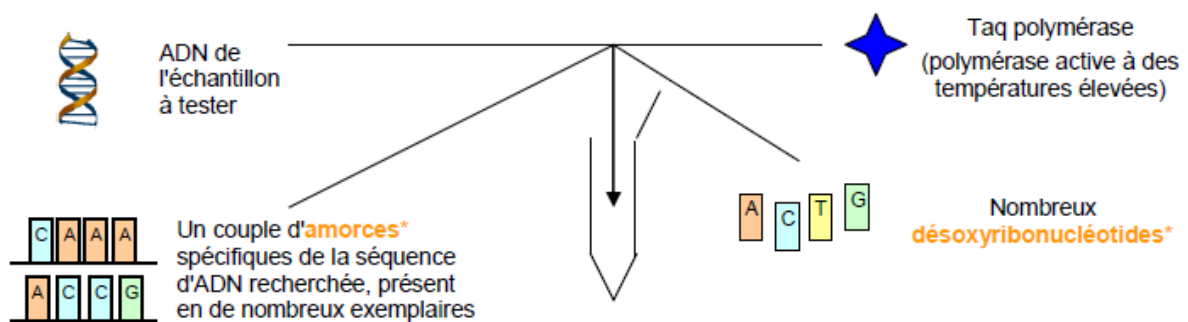
Au deuxième cycle: la quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins dont la taille est limitée par les 2 amorces font leur apparition.

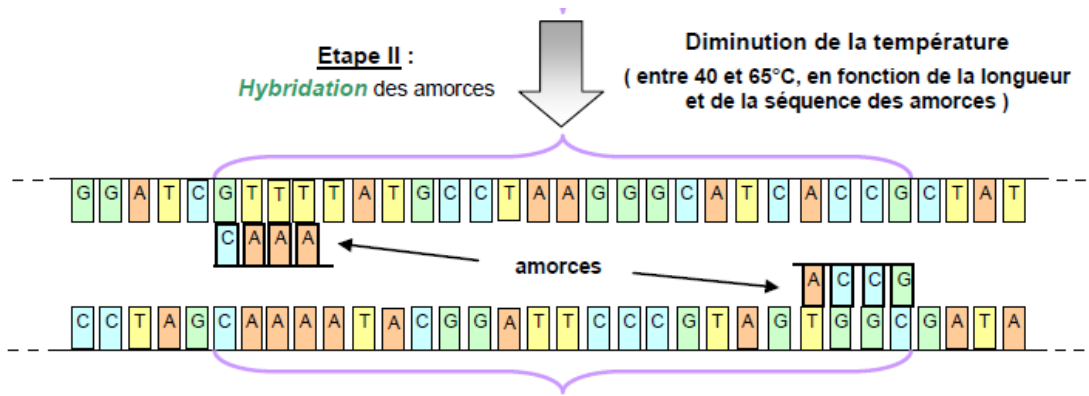
Au troisième cycle: Les premiers amplicons apparaissent (ADN double brins borné par les amorces correspondant au fragment d'ADN recherché).

En théorie, après n cycles, on augmente le nombre d'ADN intéressant de 2^n .

En pratique, le nombre de brins est limité à cause de la baisse de certains réactifs, l'augmentation de la viscosité du milieu et la baisse de l'activité de l'ADN polymérase thermostable.

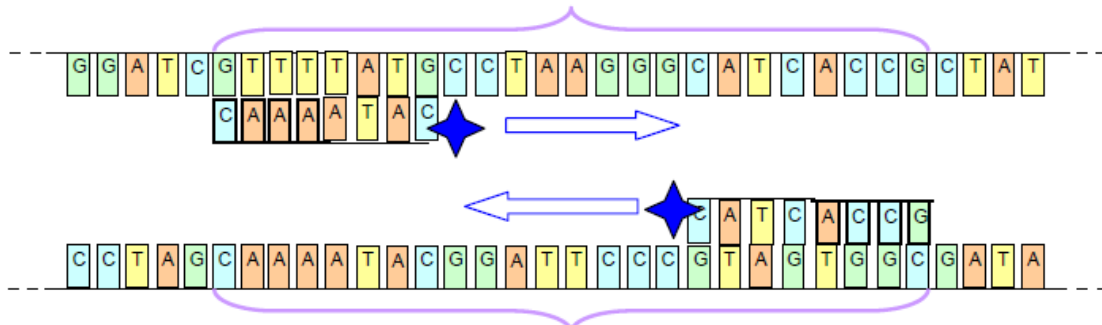
A l'issue de la PCR, on obtient des fragments de même taille correspondant à la distance en base qui sépare les amorces.



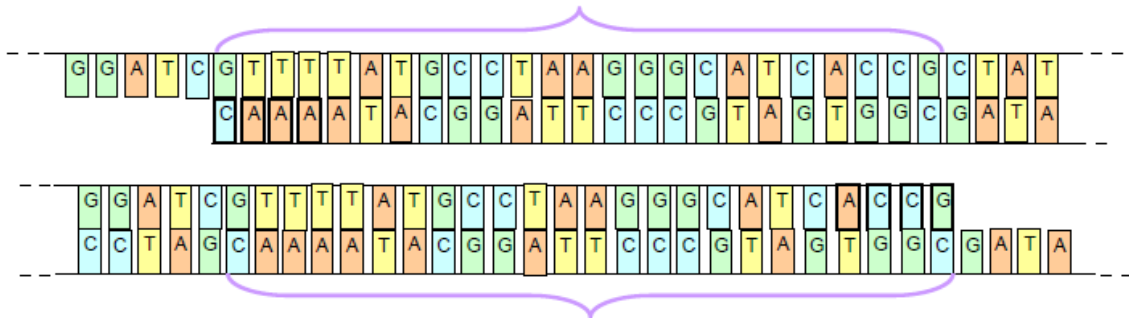


Etape III :
Elongation des brins d'ADN grâce à la
Taq polymérase à partir des deux amorces

Hausse de la température
 (72°C : **température optimale**
 pour l'action de la Taq polymérase)

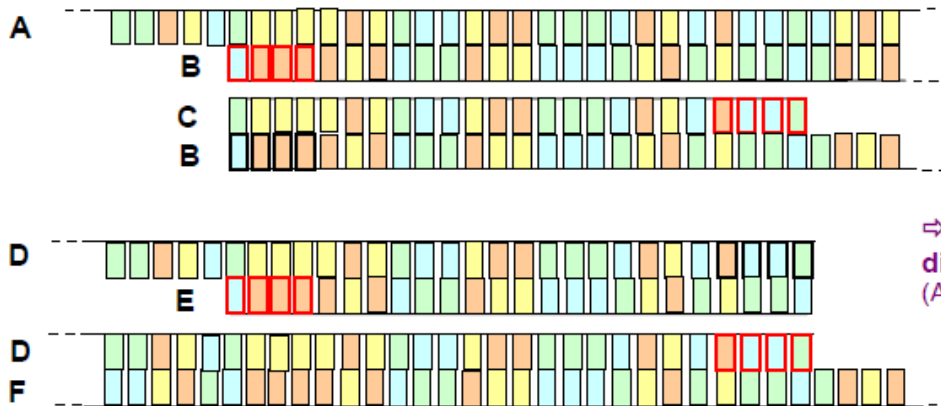


Résultat du 1^{er} cycle



Résultats du 2nd cycle
 (après les étapes I, II et III)

Remarque : le couple d'amorces
 du 2nd cycle est identique à
 celui du 1^{er}.
 Il est représenté de couleur
 différente pour faciliter la lecture
 du schéma

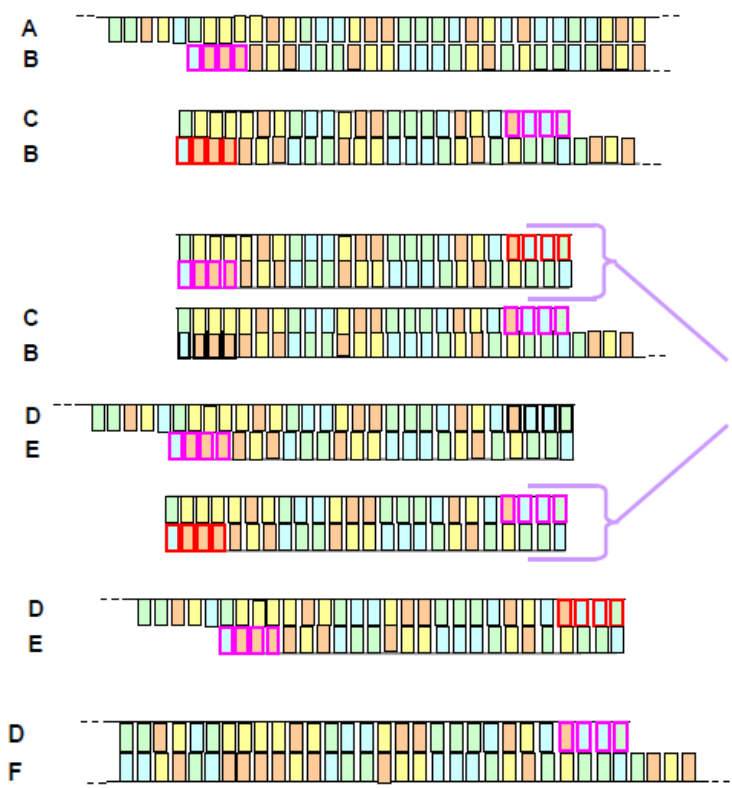


⇒ **6 brins d'ADN**
différents obtenus
 (A, B, C, D, E et F)

Résultats du 3^{ème} cycle
(après les étapes I, II et III)



Remarque : le couple d'amorces est toujours le même



Séquence cible d'ADN
= « amplicon »
(molécule d'ADN double brins
précisément définie à ses extrémités)

Au 4^{ème} cycle, l'amplicon devient majoritaire



Cycle de PCR répété de 20 à 50 fois

Figure2 : les étapes de la PCR

La technique PCR se réalise par le biais d'un appareil programmable appelé un **thermocycleur** dans lequel sont placés les microtubes contenant le mélange réactionnel. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide, elle ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles). La technique de la PCR comprend différentes variétés : RT-PCR(Réverse transcriptase PCR), PCR-quantitative en temps réel et PCR-semi-quantitative ou compétitive.

1)- La RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR)

La RT-PCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon(matrice) d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit grâce à une enzyme appelée **transcriptase inverse** des rétrovirus, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)(**Fig.3**). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR. La transcriptase inverse ou rétrotranscriptase (en anglais reverse transcriptase ou encore RT) est une enzyme utilisée par les rétrovirus et les rétrotransposons qui transcrivent l'information génétique des virus ou rétrotransposons de l'ARN en ADN, qui peut s'intégrer dans le génome de l'hôte.

Dans un premier temps, les ARN totaux sont extraits. Les ARNm sont isolés à partir des ARN totaux par chromatographie d'affinité grâce à des oligodT (oligonucléotide polyT), car les ARN messagers se caractérisent par une séquence polyA en 3'.

Puis , les ARNm sont soumis à la transcriptase inverse qui va générer une copie d'ADN complémentaire (ADNc) de chaque ARNm. À l'issue de la transcription inverse, les ARNm sont hydrolysés (traitement alcalin, RNase ou température).

Les étapes suivantes sont réalisées dans l'enceinte du thermocycleur. Les ADNc monocaténaire 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 bicaténaire en grande quantité.

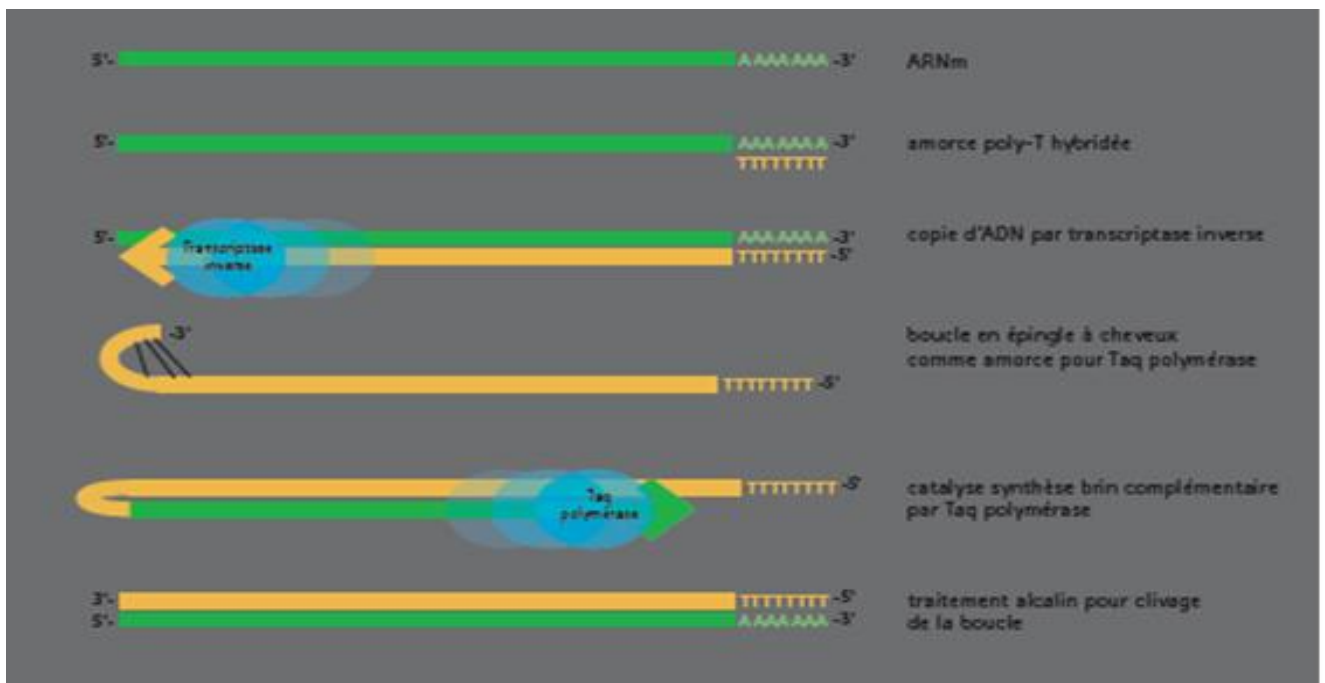


Figure3 : principe de la RT-PCR

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

Mise au point au milieu des années quatre-vingtdix, 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 l'extrémité 5' par un fluorochrome signal (**par exemple, la 6-carboxyfluoresceïne**), et sur l'extrémité 3' par un fluorochrome extincteur (quencher) (**par exemple, la 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'élongation (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. Or, pendant la phase d'élongation, la Taq polymérase, qui possède une activité nucléase 5'-3' intrinsèque, dégrade la sonde et donc libère le fluorochrome signal. Le taux de fluorescence alors libéré est proportionnel à la quantité de produits PCR générée à chaque cycle. Le thermocycleur est conçu de telle sorte que chaque échantillon (la PCR est réalisée généralement dans des plaques 96 puits) soit connecté à un système optique. Celui-ci comprend un émetteur laser connecté à une fibre optique.

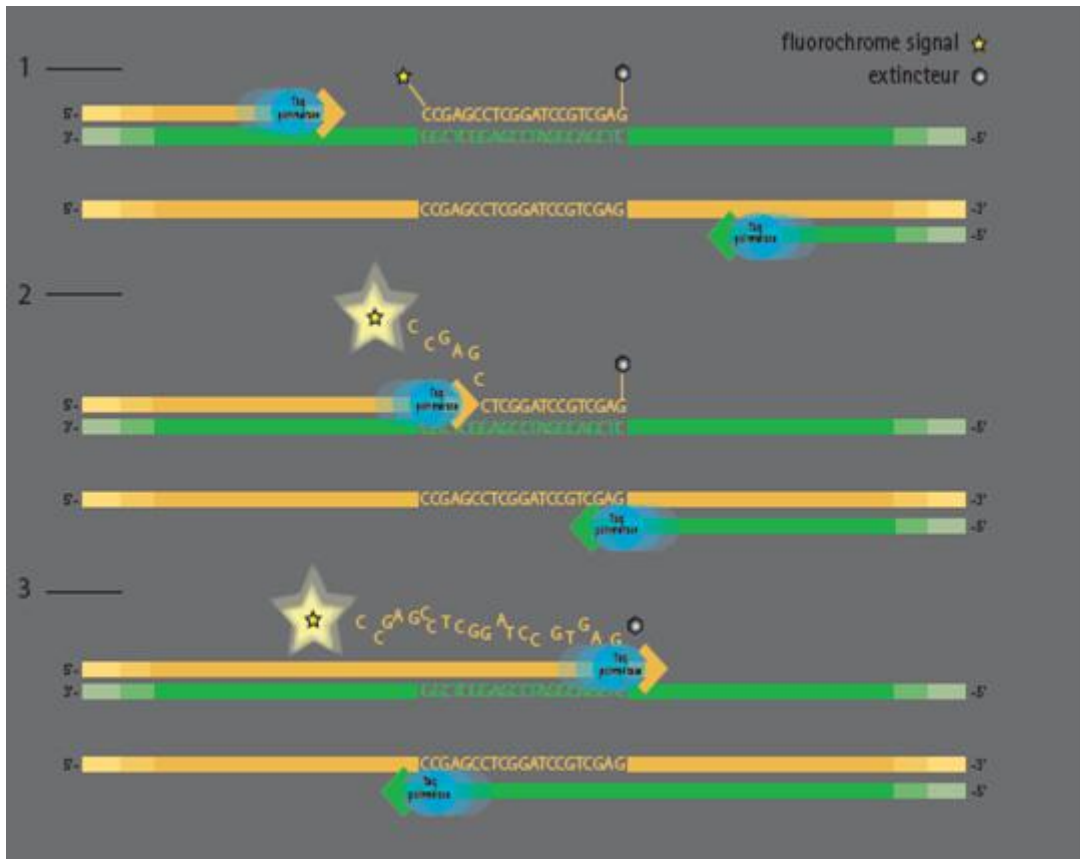


Figure4 : le principe de la PCR quantitative en temps réel

3)- PCR semi-quantitative ou compétitive

Il s'agit dans la plupart des cas de RT-PCR. Dans le cas de la PCR quantitative, le taux d'ARN ou d'ADN d'intérêt est mesuré en tant que quantité absolue. Dans les cas de PCR semi-quantitative ou de PCR compétitive, il s'agit de mesurer des quantités relatives grâce à des standards qui correspondent à des ARN ou plus rarement à des ADN. Ces standards peuvent être internes ou externes. Les standards externes peuvent être homologues ou hétérologues. Le standard est un ARN (plus rarement un ADN) qui est présent dans l'extrait d'ARN (standard interne) ou qui est rajouté en quantité connue dans le mélange réactionnel (standard externe). Le standard est amplifié en même temps que l'ARN d'intérêt. Il y a donc compétition entre l'amplification du standard et celle de l'ADN d'intérêt. Plus la quantité de standard est importante (il s'agit néanmoins que l'amplification soit toujours en phase exponentielle) moins l'ARN d'intérêt sera amplifié et donc plus sa quantité sera faible in fine. Bien sûr, la méthode d'analyse de l'échantillon PCR doit permettre de discriminer le standard par rapport à l'ARN d'intérêt d'une part et d'autre part d'évaluer la quantité relative d'ADN d'intérêt par comparaison avec la quantité de standard qui est connue.

2.3.Révélation des produits d'amplification:

Lorsque la quantité de produits d'amplification est suffisante, ceux-ci sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose. Cette électrophorèse permet de faire migrer les acides nucléiques au travers du gel additionné de BEt (Bromure d'éthyldium: produit intercalant qui

se glisse entre les bases des acides nucléiques faisant apparaître à la molécule d'ADN une fluorescence orange sous illumination par des UV courts (environ 30 nm)). La vitesse de migration étant dépendant de la masse de la molécule, donc du nombre de bases de l'ADN testé, la présence et la taille des amplicons peuvent être facilement vérifiable sur le gel.

2.4.Applications de PCR

Les applications de la PCR sont multiples. C'est une technique désormais incontournable en biologie cellulaire et moléculaire, Elle permet :

1-notamment en quelques heures le « clonage acellulaire » d'un fragment d'ADN grâce à un système automatisé, alors qu'il faut plusieurs jours avec les techniques standard de clonage moléculaire.

2- la PCR est largement utilisée à des fins de diagnostic pour détecter la présence d'une séquence d'ADN spécifique de tel ou tel organisme dans un fluide biologique.

3-Elle est aussi employée pour réaliser des empreintes génétiques, qu'il s'agisse de l'identification génétique d'une personne dans le cadre d'une enquête judiciaire, ou de l'identification de variétés animales, végétales ou microbiennes destinée à des tests de qualité alimentaire, de diagnostic ou de sélection variétale.

4- La PCR est encore indispensable à la réalisation d'un séquençage ou d'une mutagenèse dirigée.