

**U.N.V Mostfa Benboulaid Batna2**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département de Biochimie et de**  
**Microbiologie**

**Module : Techniques de Biologie**  
**Moléculaire**  
**Licence Biochimie appliquée**

# **Chapitre IV:**

# **Amplification d'un fragment d'ADN**

# **(Polymérase Chain Réaction = PCR)**

**Enseignant : Dr DEKKICHE. S**

# **Plan du cour**

**I- Augmentation de la quantité d'un fragment d'ADN**

**II-Polymérase Chain Réaction**

- Réalisation pratique d'une PCR**
- Cycles de la PCR**
- Thermo- cycleur et la Taq polymérase**
- Révélation et vérification des produits**

**d'amplification**

**III-Types de PCR**

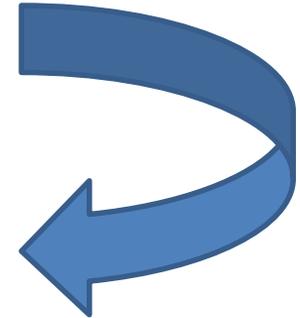
**IV-Exploitation des produits PCR**

**V-Domains appliquant la PCR**

# Augmentation de la quantité d'un fragment d'ADN



**Méthode in vivo**  
(Clonage moléculaire)

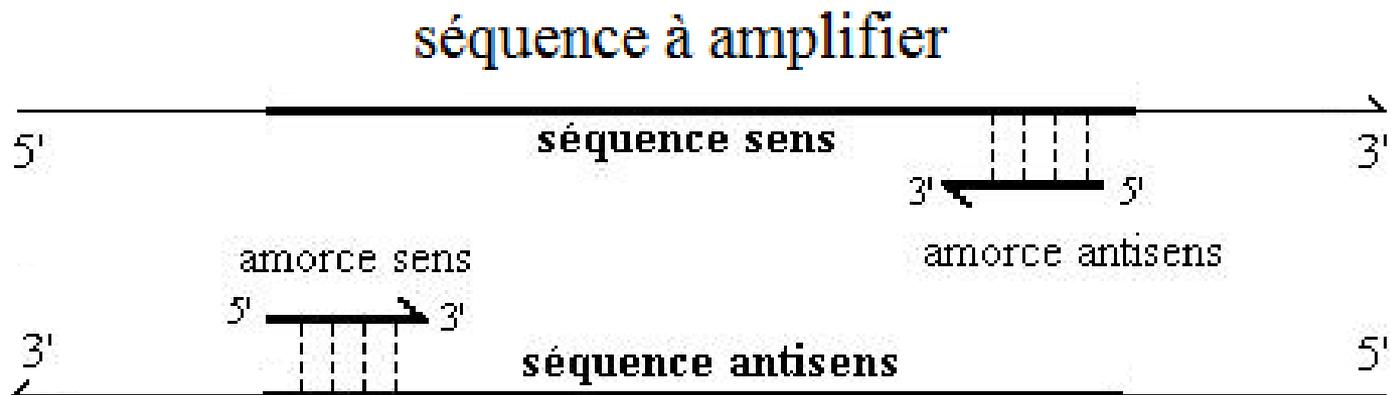


**Méthode in vitro**  
(Copiage de la réplication  
in vitro = PCR)

# Polymérase Chain Réaction = PCR

- Décrite en 1985 (K. Mullis et collaborateurs)
- Amplifie des séquences d'ADN de manière spécifiques
- augmente de manière considérable la quantité d'ADN
- une réaction en chaîne = Polymérase Chain Réaction ou PCR

**Savoir les séquences des extrémités de l'ADN à amplifier ( Production des amorces ).** Chacune des amorces servira pour amplifier un monobrin de l'ADN (double brin)

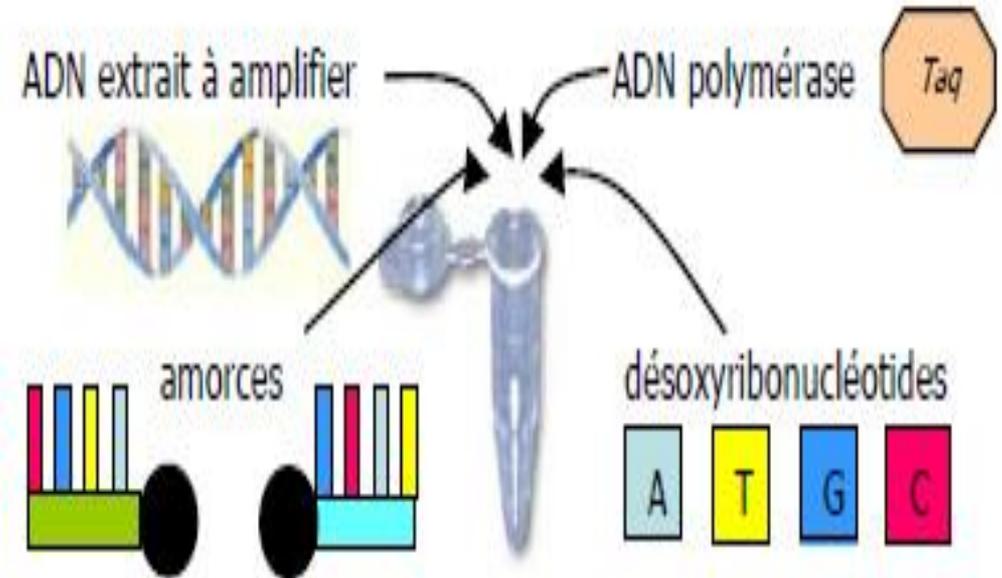


# Réalisation pratique d'une PCR

## Préparation de la solution de la PCR (mixe, milieu réactionnel)

- Matrices (les deux monobrin)
- amorces
- $Mg^{2+}$
- ADN polymérase
- Tampon (salinité et pH)
- dNTPs libres
- L'eau

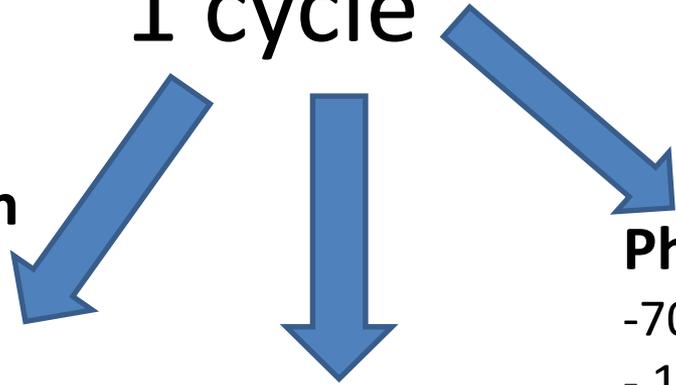
**NB:-** Témoin négatif  
- Témoin positif



# Cycles de la PCR

(25 à 40 cycles)

1 cycle



## Phase de dénaturation

-95-98°C

-30s et 1mn

## Phase d'extension

-70-72°C

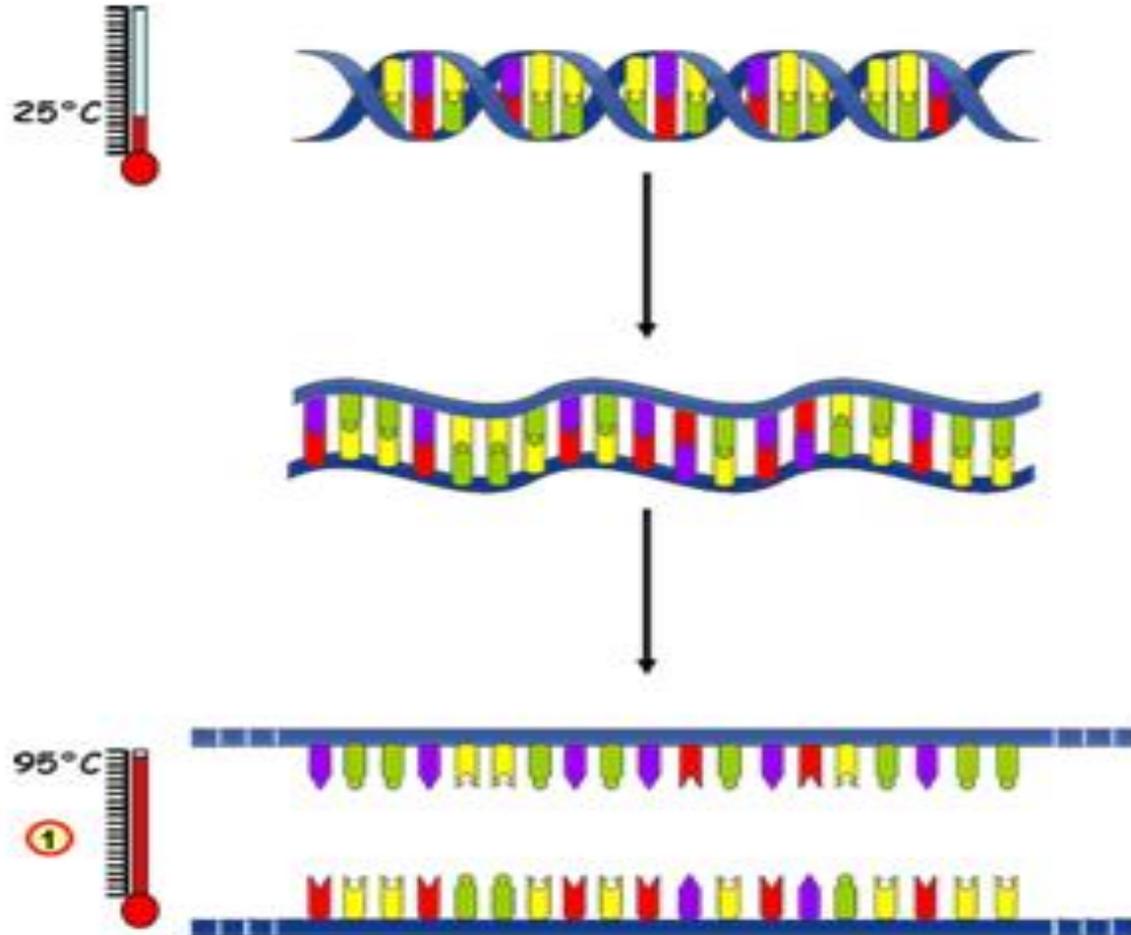
- 1- 2mn

## Phase d'hybridation

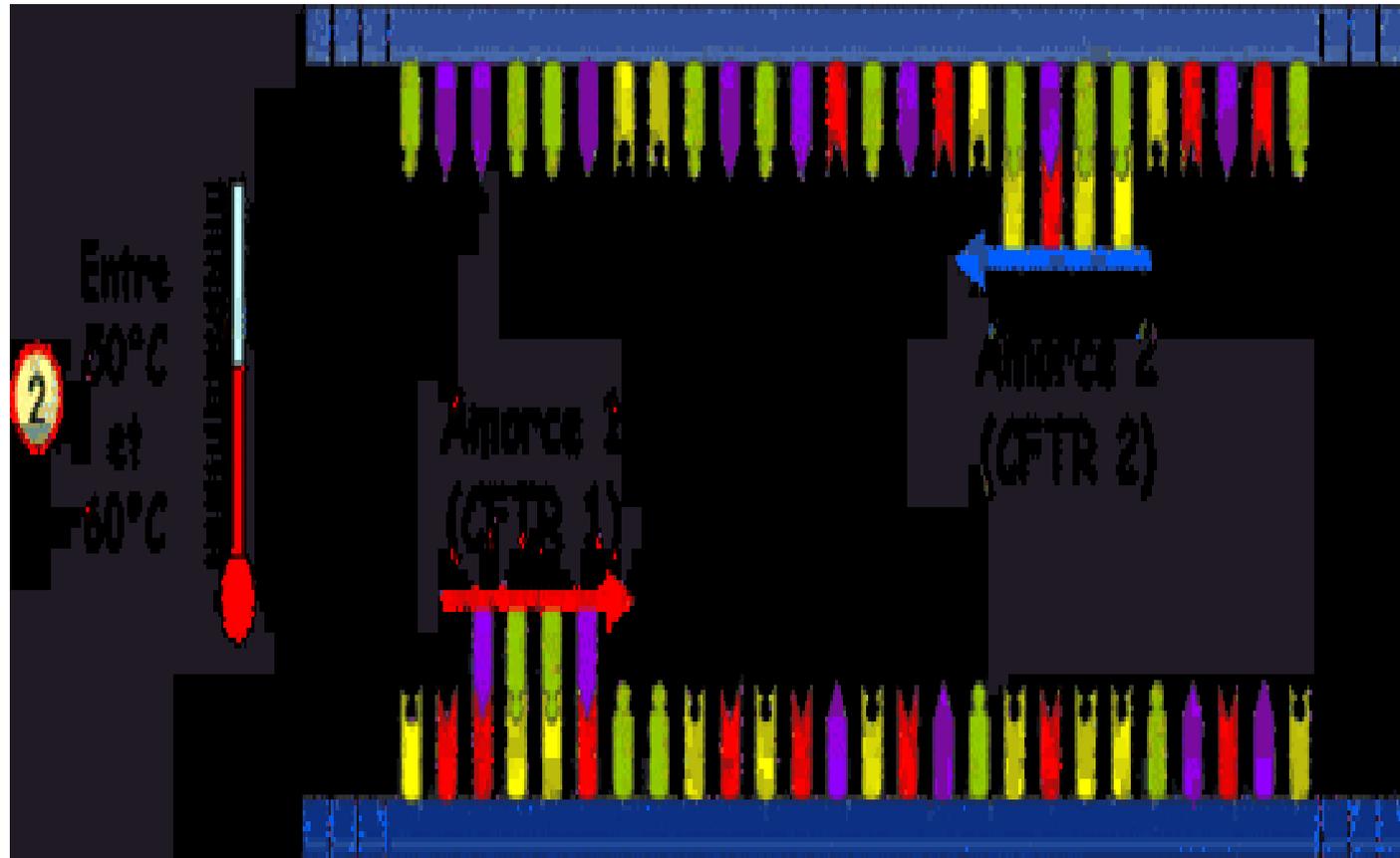
-40-70°C (selon le  $T_m$  des amorces)

-30s-1mn

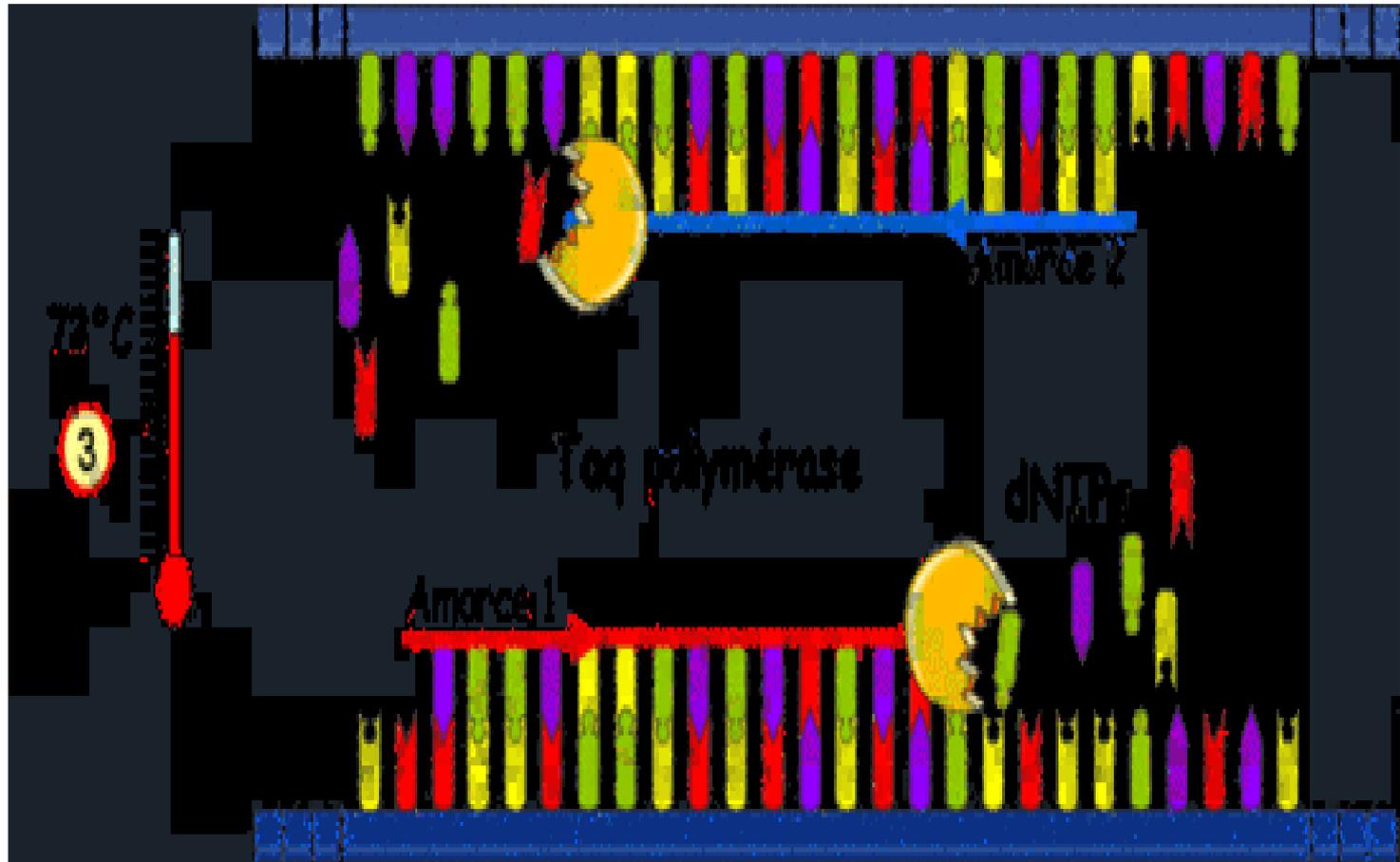
# Phase de dénaturation



# Phase d'hybridation



# Phase d'extension



# Thermo- cycleur et la Taq polymérase

(appareil de la PCR)

(polymérase de la PCR)



Bloc chauffant

Clavier pour la  
programmation  
des cycles

## Taq polymérase

(*Thermophilus aquaticus*):

- Thermostable
- résistante à l'ébullition
- active à 75-80 °C
- dépourvue d'activités d'édition
- inhibée par les ions phosphate
- une concentration en MgCl<sub>2</sub> dépassant 2-3 mM, produit davantage de mésappariements.

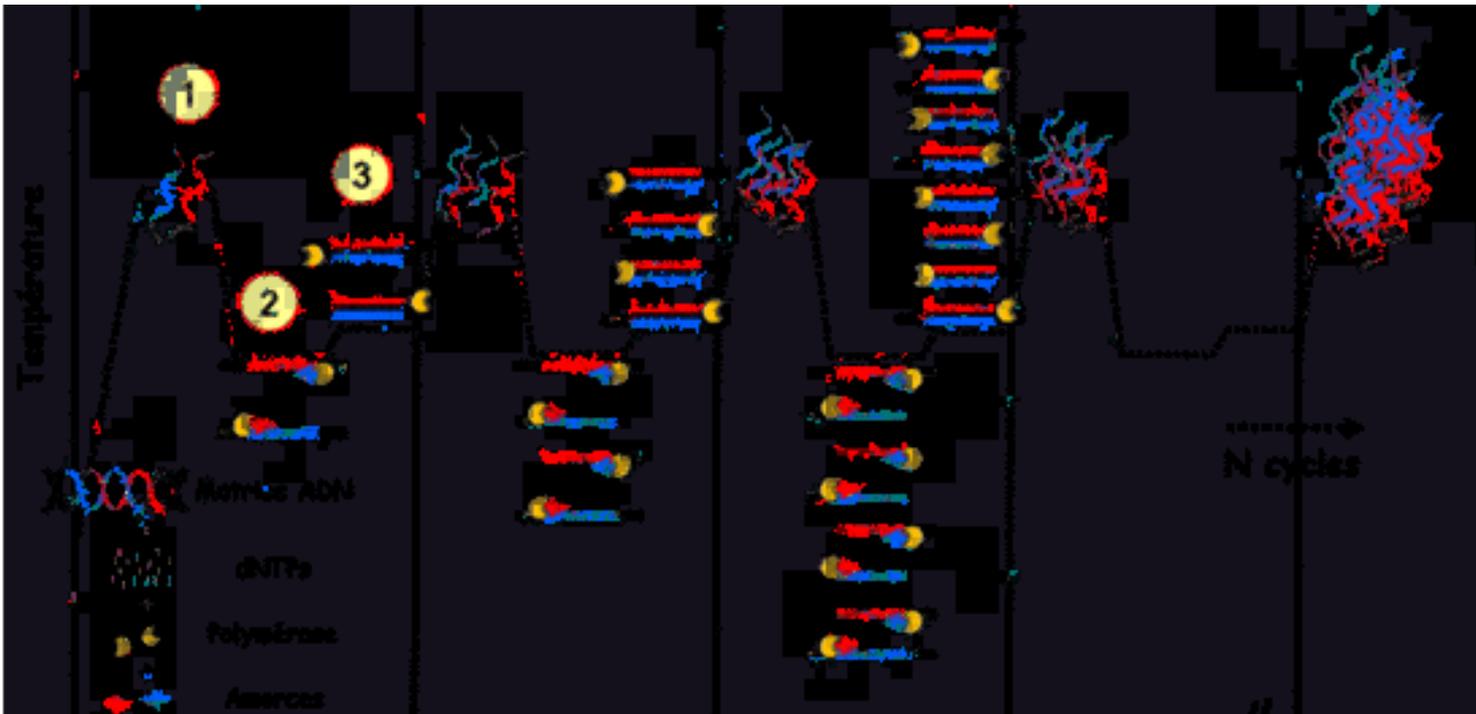
# ADN amplifié

## Nombre de fragments d'ADN amplifiés

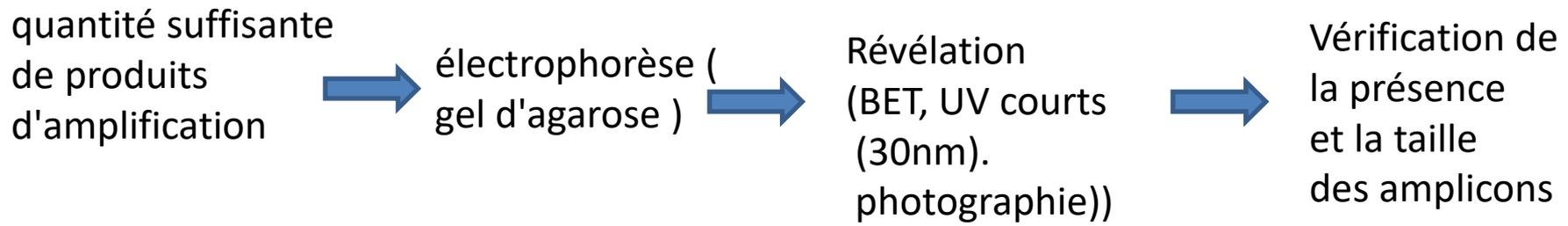
En théorie,  
après n cycles



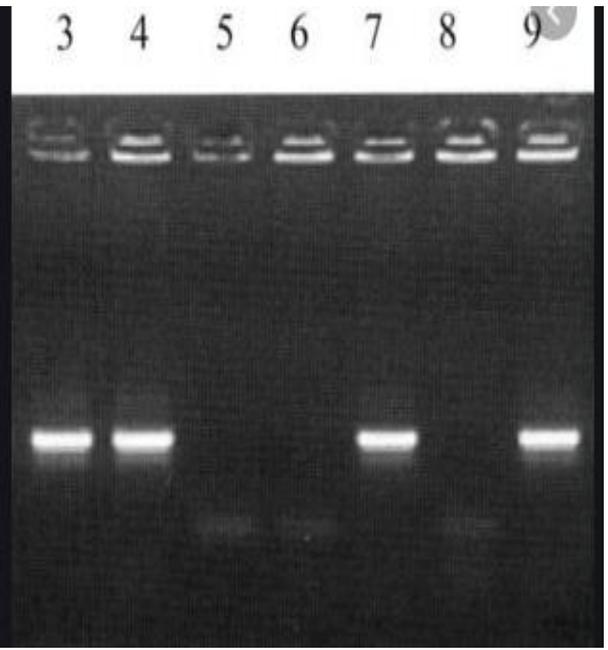
le nombre de fragments  
d'ADN intéressant =  $2^n$



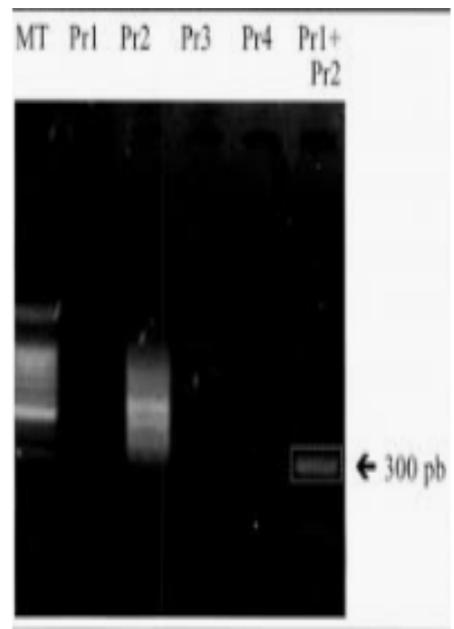
# Révélation et vérification des produits d'amplification



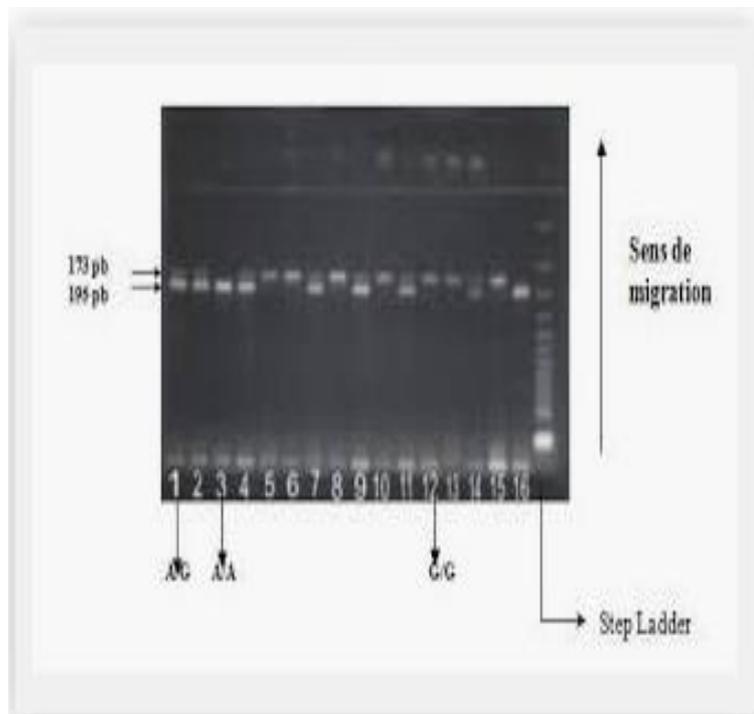
Exemple 1 : une seule bande



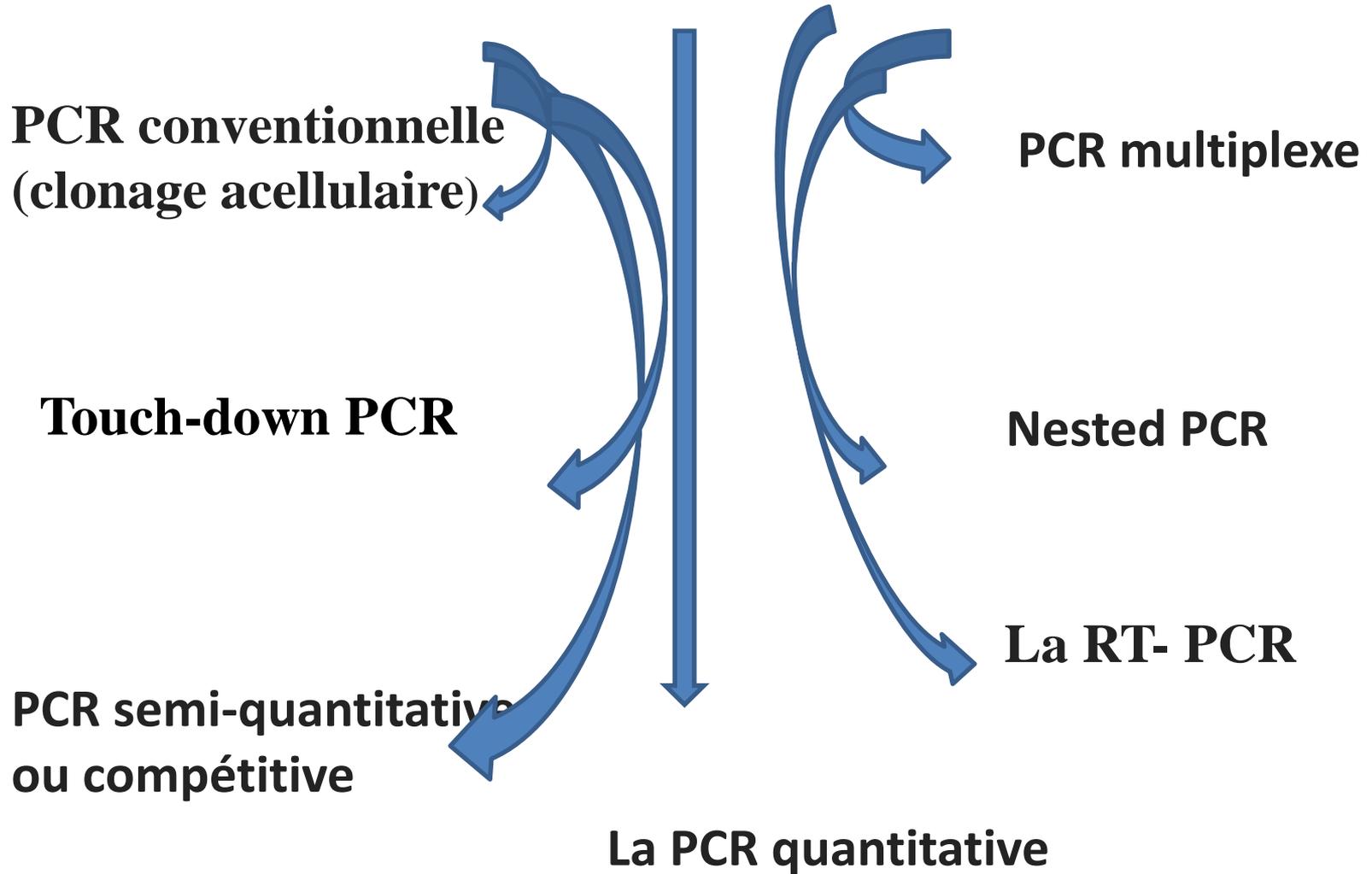
Exemple 2 : Présence de smires



Exemple 3 : Diversité



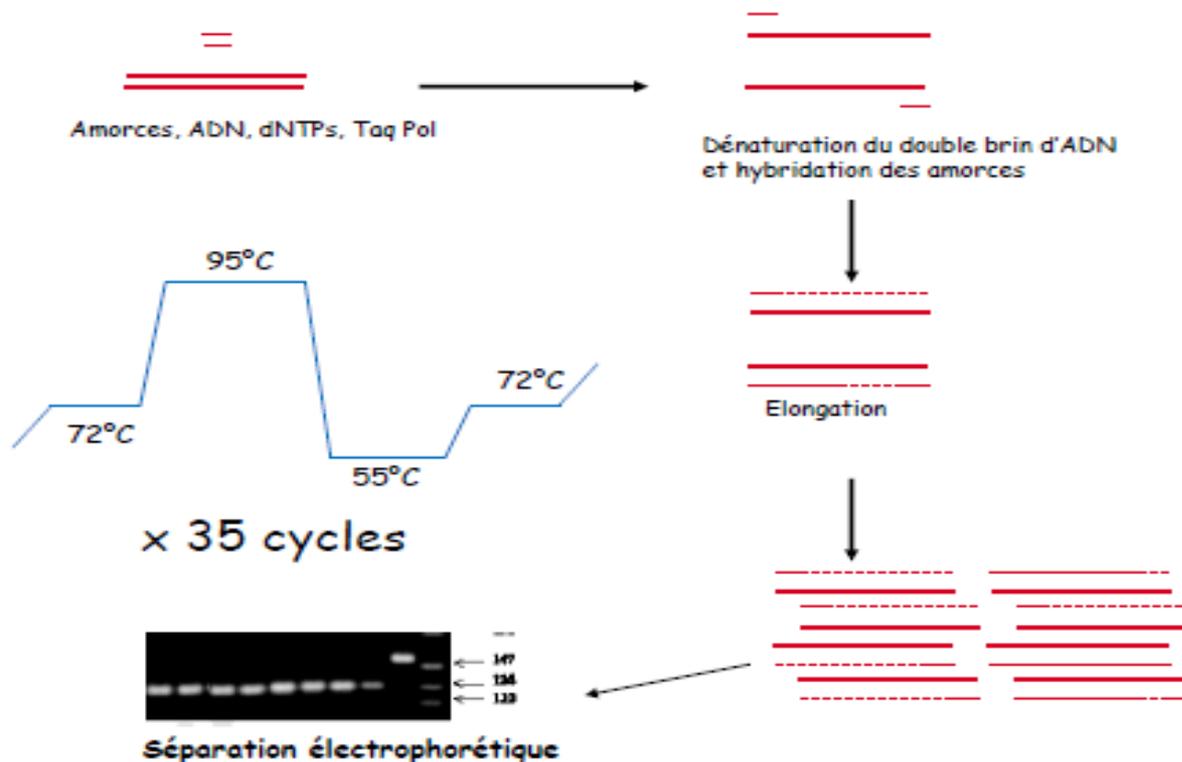
# Types de PCR



# PCR conventionnelle (clonage acellulaire)

Le choix de  
l'extrait d'ADN

Choix des  
deux amorces spécifiques



# PCR multiplexe

(au moins trois amorces par  
réaction de PCR)

**Introduction des différents  
couples d'amorces dans le  
même tube réactionnel**



**Les différents produits  
PCR sont mélangés  
dans le tube**



**Séparation par  
électrophorèse**

**Si les tailles sont :**  
-très proches ou  
-même,  
-se chevauchent



**Utilisation des amorces  
couplées à des fluor chromes  
de couleurs d'émission  
différentes**

# Nested PCR

(La PCR emboîtée, PCR gigogne ou PCR nichée)

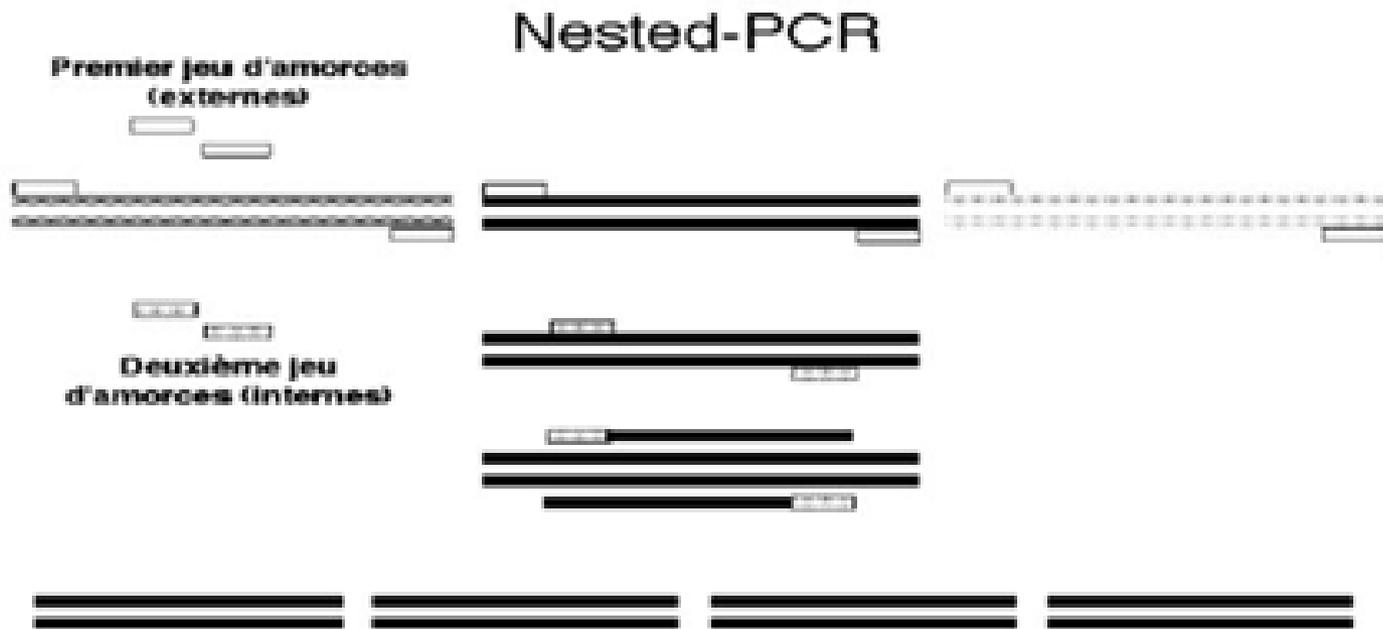


Deux couples d'amorces

**Le premier couple**  
définie le premier  
domaine (plus long)



**Le deuxième couple**  
se fixe sur des séquences situées  
à l'intérieur du premier amplicon



# Touch-down PCR

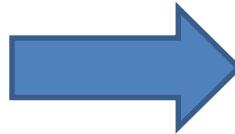
(PCR par essais)



**Amplifier de l'ADN faiblement représenté  
(Deux étapes)**

**Amplification spécifique**

température d'hybridation  
très haute lors des premiers  
cycles

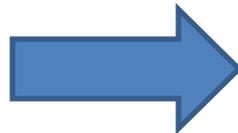


**Abaissement progressive  
de la température**

**(au moyen de  $-0,2^{\circ}\text{C}/\text{cycle}$ )**

Une fois la séquence d'intérêt  
devient majoritaire vis-à-vis de  
ses compétiteurs

**PCR Hot Start**



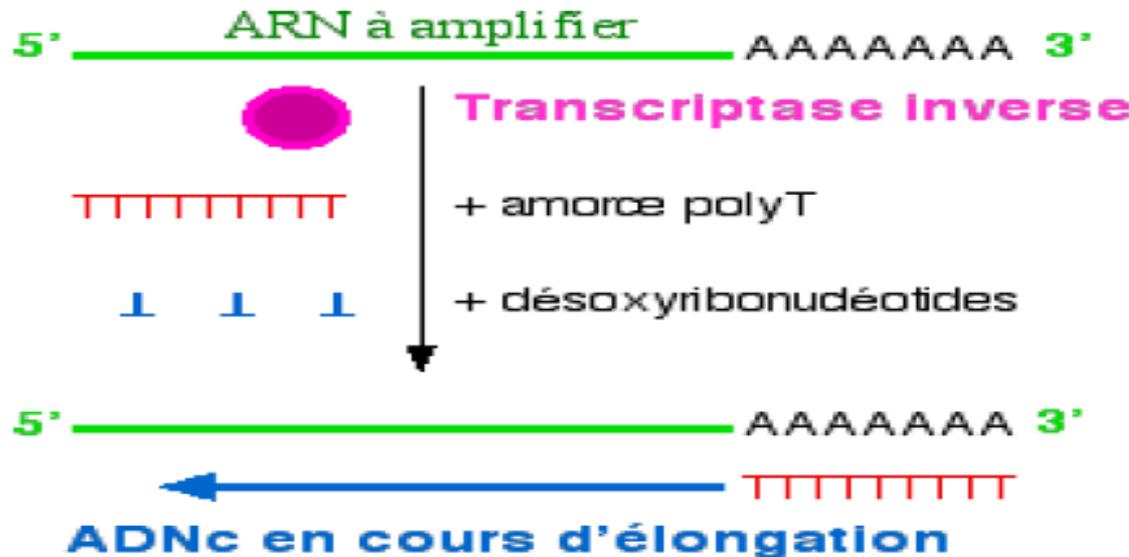
**N'ajouter un des produits réactionnel de la  
PCR qu'après avoir atteint la température  
des amorces pour éviter les compétions  
et assurer une spécificité**

# La RT-PCR (Reverse- Transcriptase PCR)

( Associe une transcription inverse (RT) avec une PCR  
méthode la plus sensible pour détecter et quantifier les ARN messagers)

-RT-PCR en deux étapes:

**Etape 1:** Transcription inverse d'un  
acide ribonucléique (ARN) en ADN  
complémentaire (ADNc)



**Etape 2: PCR**  
(Amplifier l'ADNc)

**RT-PCR en une étape**  
(single step RT-PCR)



un protocole mélangeant les  
réactifs de RT et de PCR

# La PCR quantitative

(PCR en temps réel = quantitative real-time PCR)

(Higuchi et al., 1992)



Mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (en temps réel) grâce à un marqueur fluorescent (détection du signal fluorescent qui est proportionnel au taux de l'ADN amplifié (d'intérêt) cycle par cycle)

## Etapes de réalisation

(points critiques)

### Préparation d'une sonde nucléotidique

-s'hybrider sélectivement avec l'ADN d'intérêt  
- montrer une (tm), supérieur a celle des amorces

### Marquage de la sonde

-extrémité '5 par un fluorochrome signal (6-Carboxy fluorescéine)  
-- extrimité '3 par un fluorochrome extincteur (6-Carboxy- tétraméthyl-rhodamine)

### Démarrage de la PCR

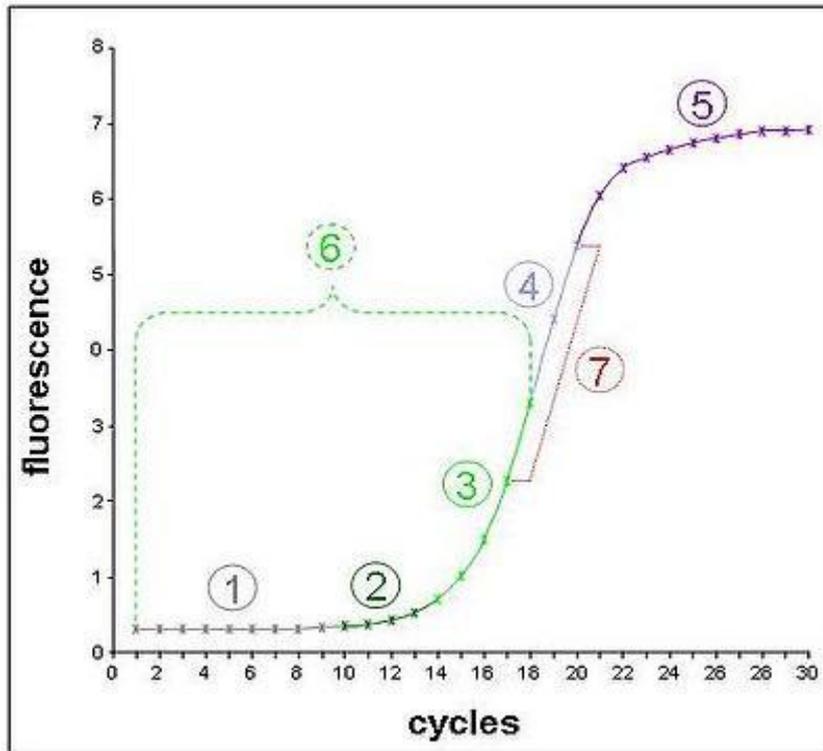
Tant que la sonde est fixée sur l'ADN, absence d'émission de fluorescence (l'extincteur empêche la fluorescence du signal), au cour de l'élongation, la TAQ polymérase (qui dégrade la sonde , fluorochrome signal est libre, le taux de fluorescence est libéré d'une façon proportionnel à la quantité du produit PCR généré chaque cycle

# La PCR quantitative

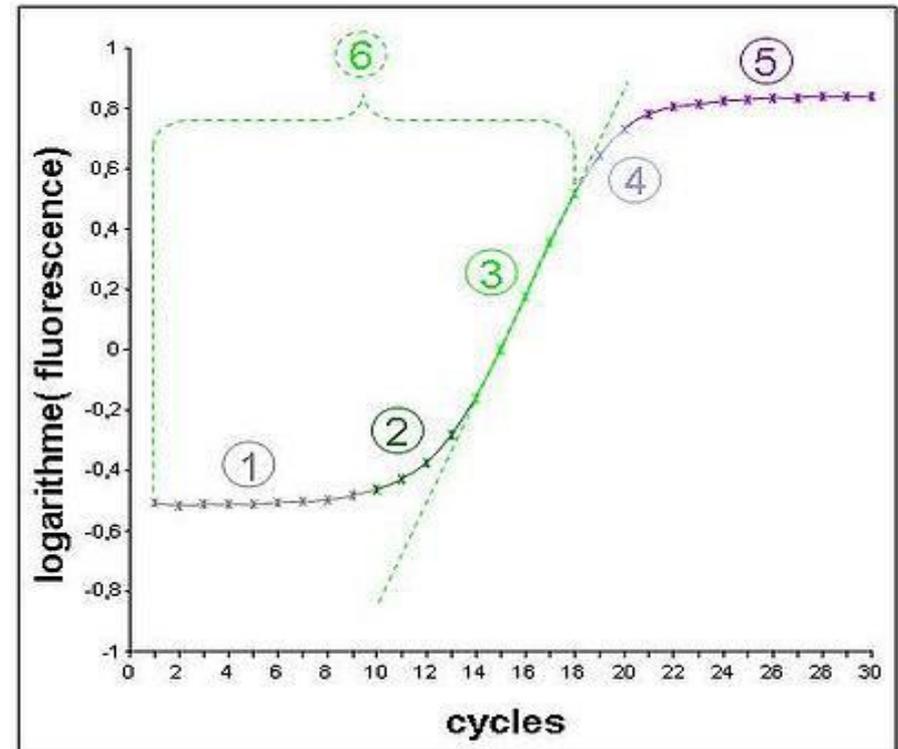
Cinétique complète  
de la PCR



quantification absolue  
ou relative de la quantité  
initiale d'ADN cible.



Cinétique d'amplification de l'ADN cycle par cycle (La fluorescence émise par un intercalant de l'ADN est proportionnelle à la quantité d'ADN présent)



Cinétique de type exponentiel  
(segment quantifiable, Les valeurs de  
fluorescence précédentes ont été  
converties en logarithme décimal)

# La PCR quantitative

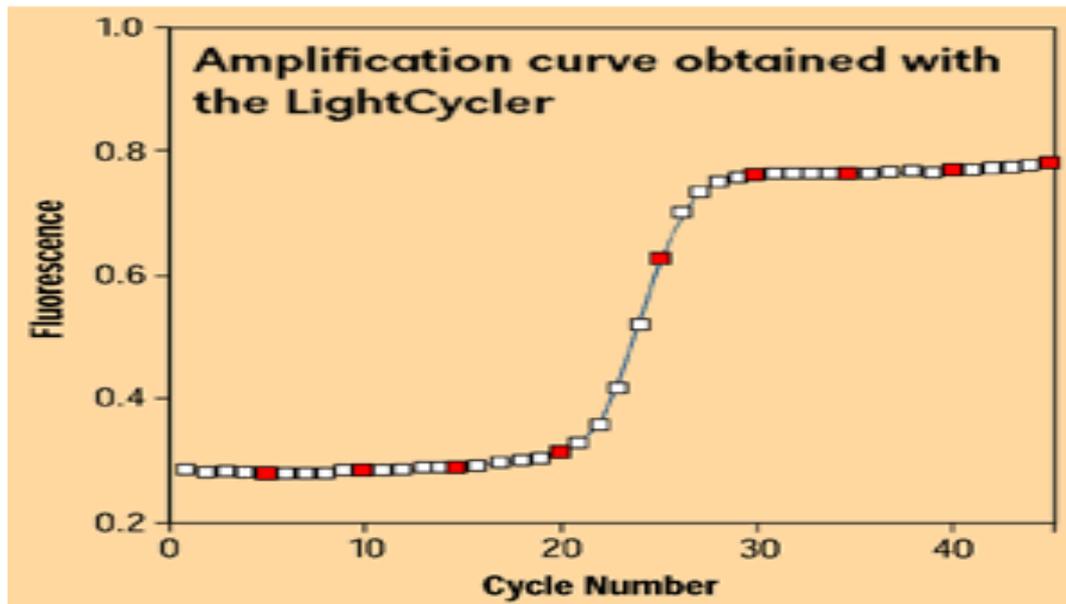
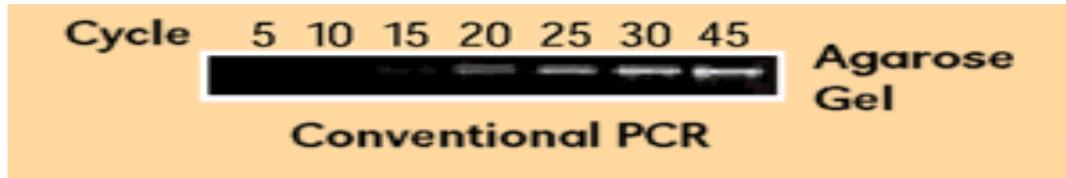
**Cinétique complète  
de la PCR**



**Totalité des cycles  
(3 phases)**



- la phase stationnaire
- la phase exponentielle
- Le plateau



# PCR semi-quantitative ou compétitive

taux d'AN d'intérêt est mesuré en tant que quantité absolue  
(Deux points essentiels)

**interruption de la PCR**  
en plusieurs cycles ( phase  
stationnaire, l'exponentielle  
ou au niveau du plateau

**Mesurer des quantités relatives**  
grâce à des standards (étalon), dont la  
quantité est connue et qui  
correspondent à des ARNs (ou plus  
rarement à des ADNs)  
**NB: discriminer le standard par rapport  
à l'ARN (ou l'ADN) d'intérêt (marquage)**

## Principe de quantification du produit PCR

- Compétition entre l'amplification du standard et celle de l'ADN d'intérêt
- Plus la quantité de standard est importante moins que l'ADN d'intérêt sera amplifié et sera donc en quantité faible
- L'arrêt de la réaction entre le 20e et le 30e cycle PCR et la comparaison entre les intensités lumineuses des produits PCR marqués au BET permettent d'estimer la quantité initiale d'ADN.

# Pratiques de la PCR



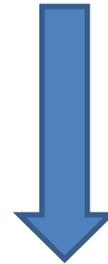
## La PCR sur colonie (Colony PCR)



Permet d'amplifier de façon simple de l'ADN de micro-organisme (bactéries, archées ou levures) en inoculant directement la colonie dans le milieu réactionnel de la PCR



## La PCR sur Acide nucléique pure



Extraction de l'ADN



PCR

# Exploitation des produits PCR et application dans différents domaines



**Détection des mutations**  
(notamment ponctuelle)

**Identification**  
(un fragment d'ADN  
ou un gène donné)

**Détection de la mutation ou l'identification via un produit PCR**



**Hybridation**

l'ADN (produit PCR)  
avec une sonde dont la  
séquence est connue)

**Migration**

**electrophorétique**

souvent associé a une  
digestion enzymatique (**RFLP**)

**séquençage de  
l'amplicon**

**Voir dans les chapitres suivants**

# Domaines appliquant la PCR

## Diagnostic des maladies

-**Maladies génétiques** (détecter des mutations)

### -**Maladies infectieuses**

-d'amplifier une séquence spécifique au pathogène a partir d'un prélèvement (SIDA (VIH))

### -**Cas des cancers**

-détecter une cellule cancéreuse pour un million de cellules normales).

-suivi des thérapies anticancéreuses

## Médecine légale

-test de paternité

-enquête judiciaire

## Application dans l'identification, la diversité et l'évolution

-Des espèces

-Des genres

-Des variétés

-Des individus

## En agroalimentaire

-Identifier et sélectionner des variétés ou des espèces végétales et animales

- contrôle de la qualité des produits