

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**

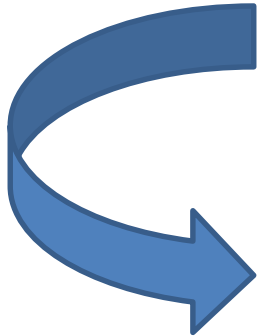
d'amplification

III-Types de PCR

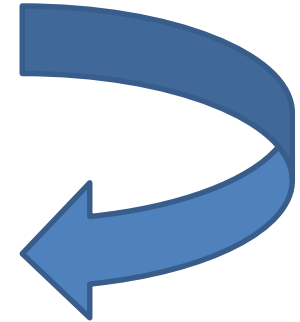
IV-Exploitation des produits PCR

V-Domains appliquant la PCR

Augmentation de la quantité d'un fragment d'ADN



Méthode in vivo
(Clonage moléculaire)

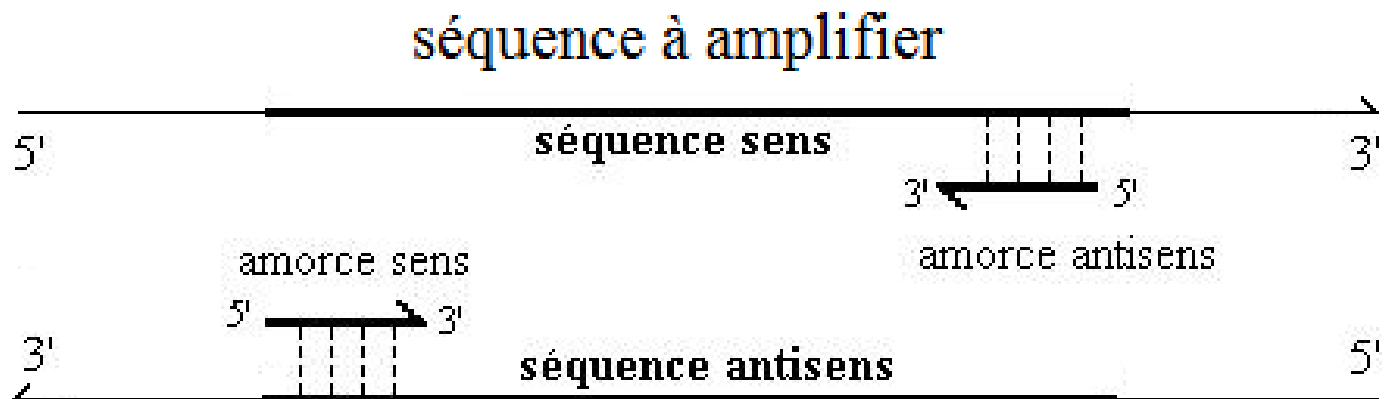


Méthode in vitro
(Copiage de la réplication
in vitro = PCR)

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)

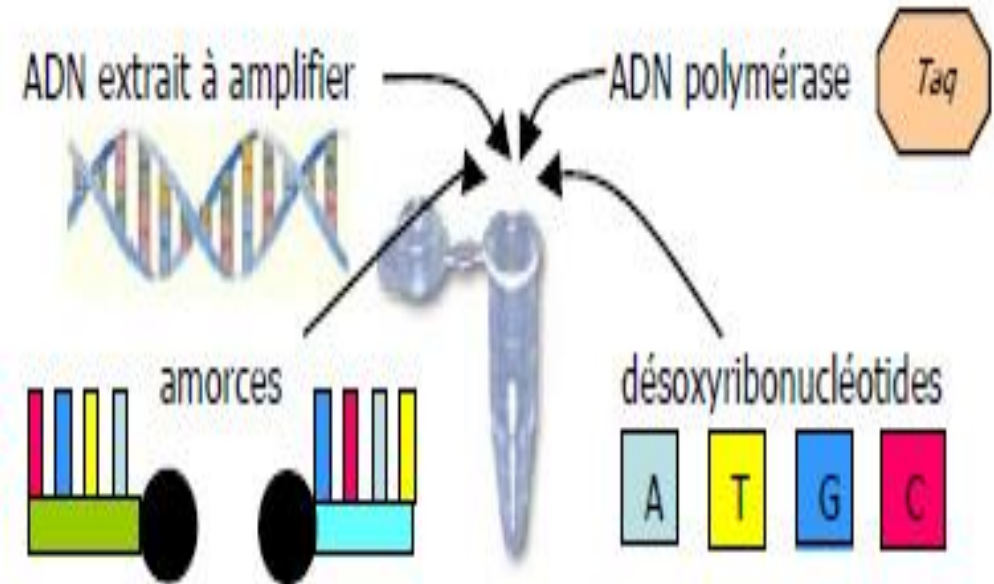


Réalisation pratique d'une PCR

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

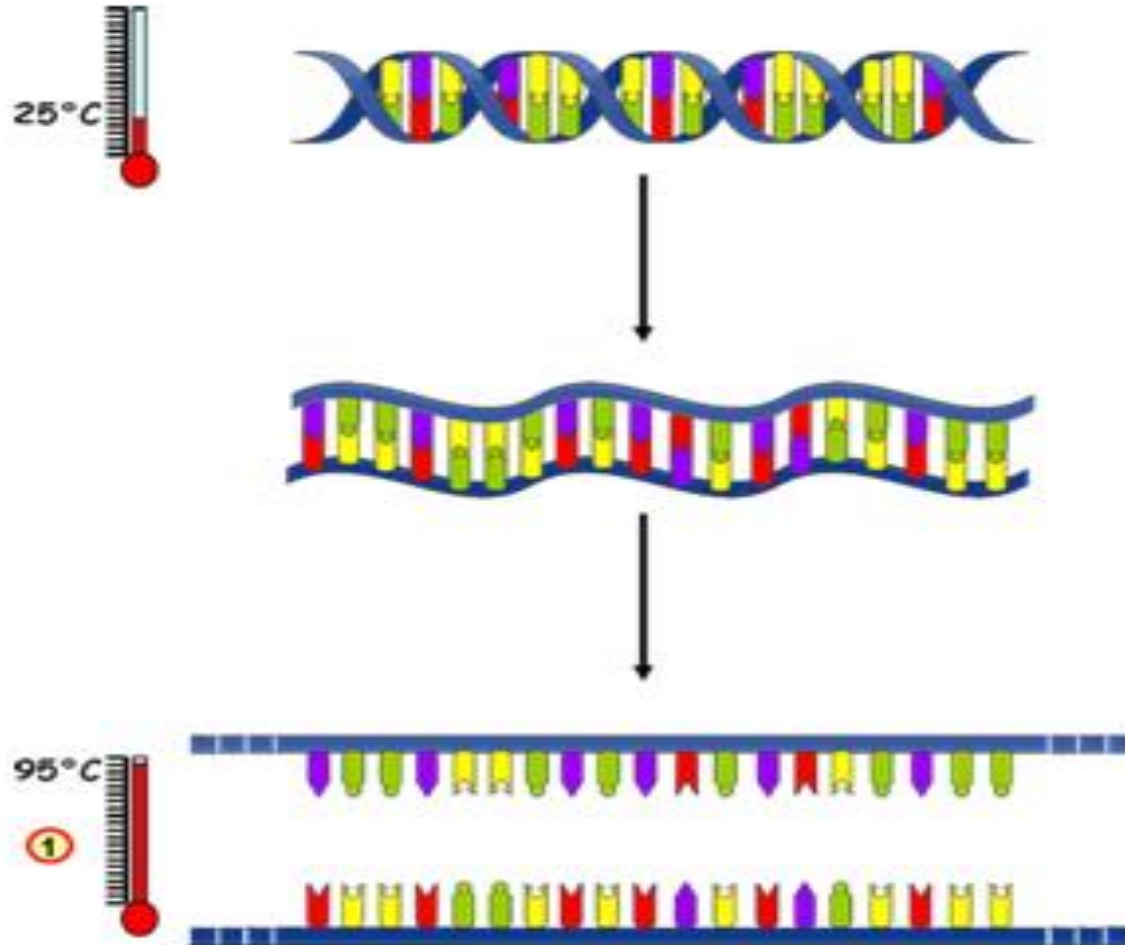
Phase d'extension

-70-72°C
- 1- 2mn

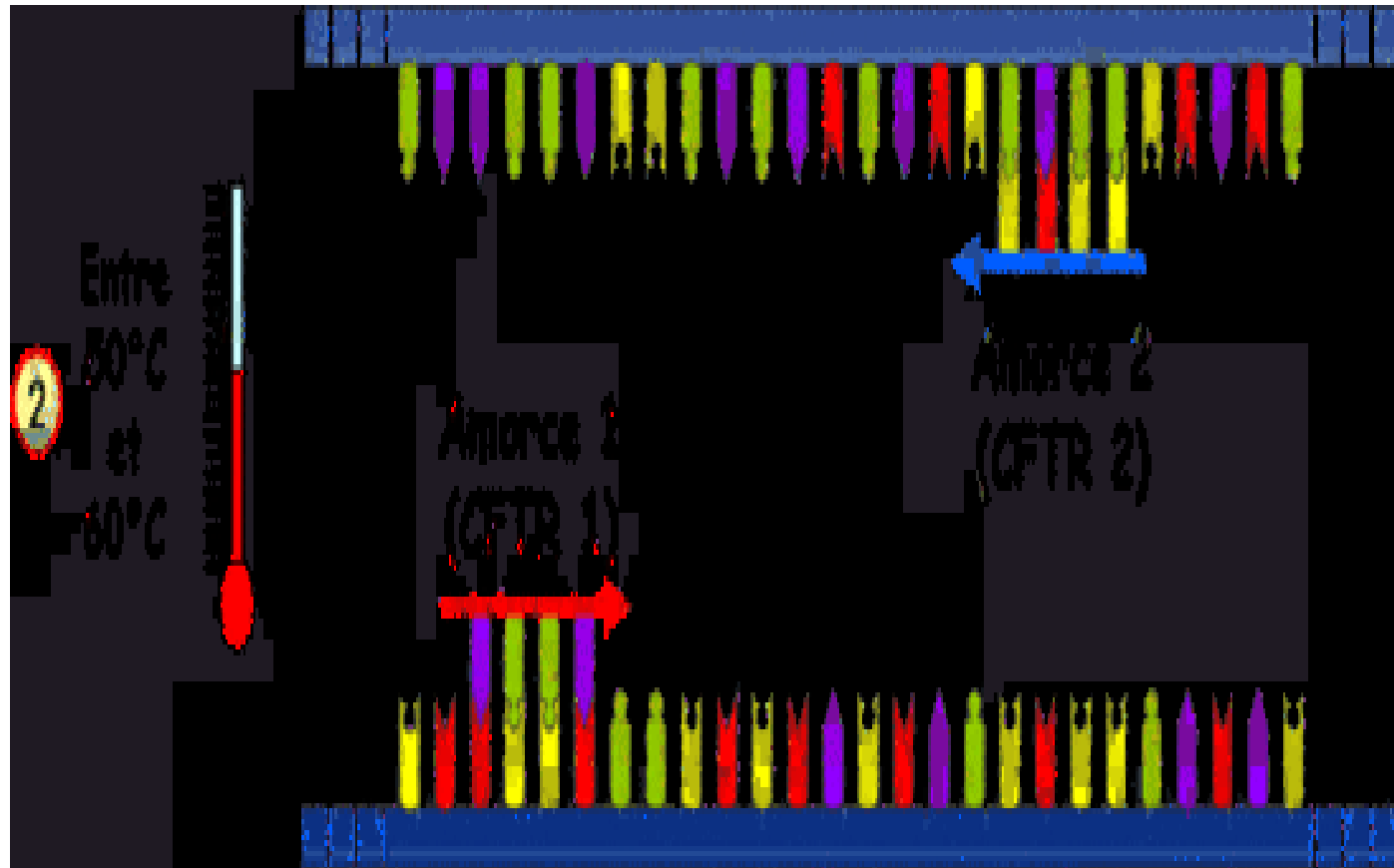
Phase d'hybridation

-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 MgCl₂ dépassant 2-3 mM, produit davantage de mésappariements.

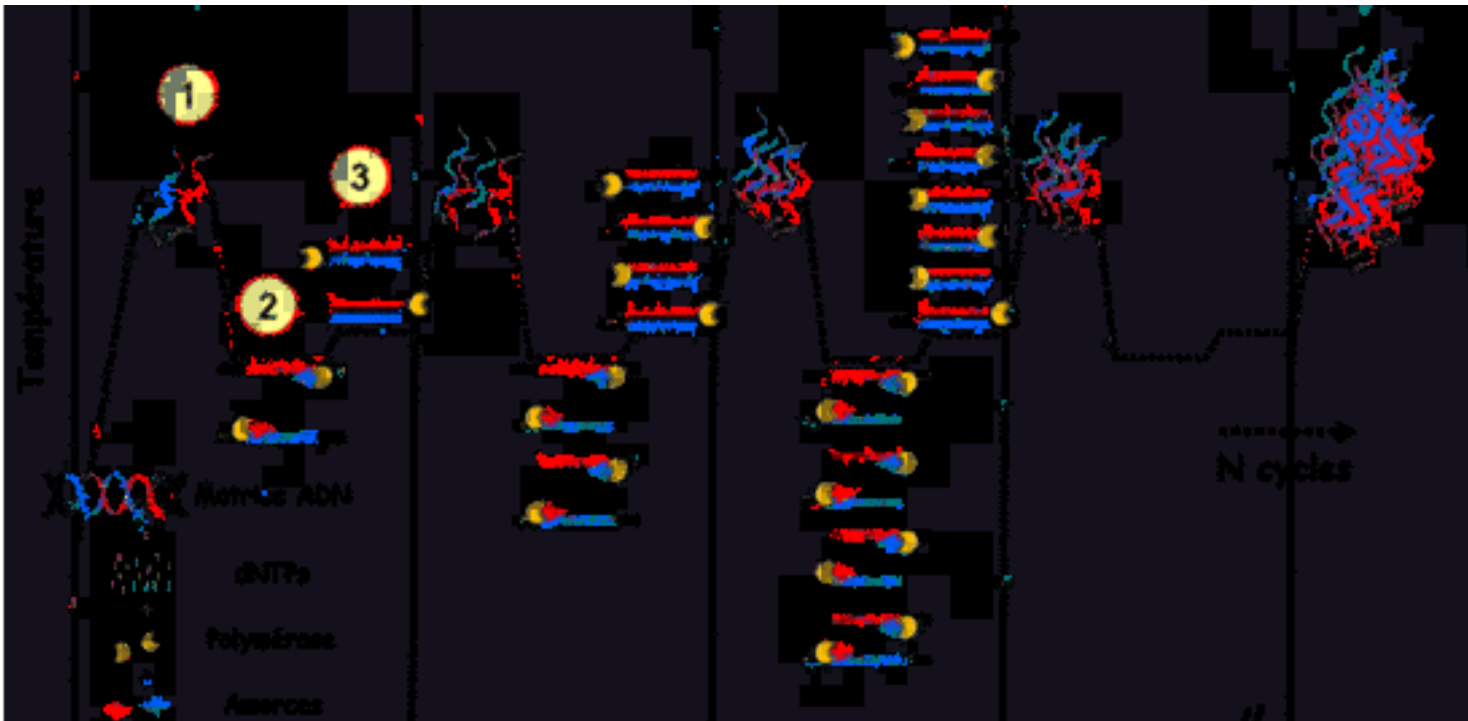
ADN amplifié

Nombre de fragments d'ADN amplifiés

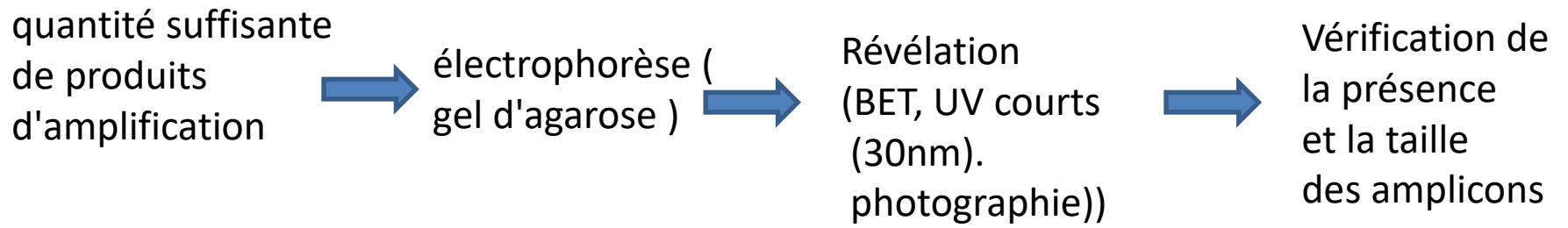
En théorie,
après n cycles



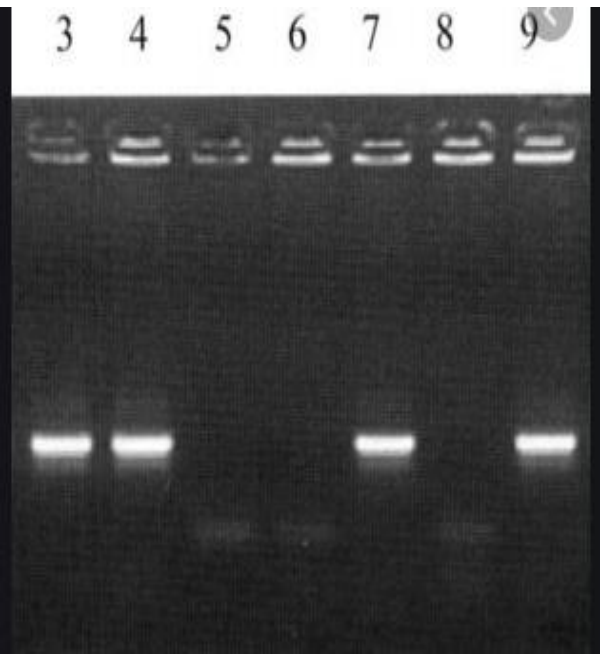
le nombre de fragments
d'ADN intéressant = 2^n



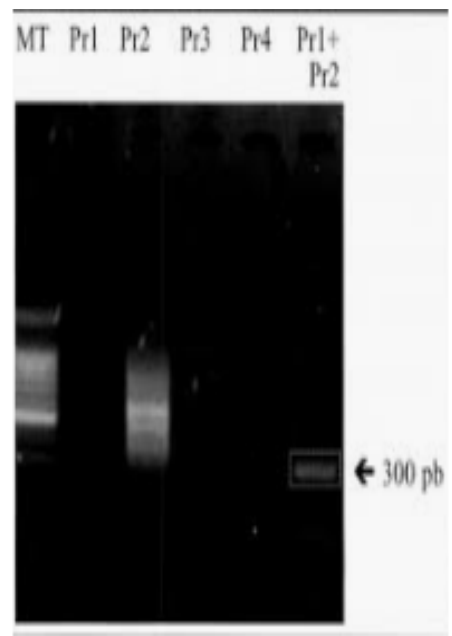
Révélation et vérification des produits d'amplification



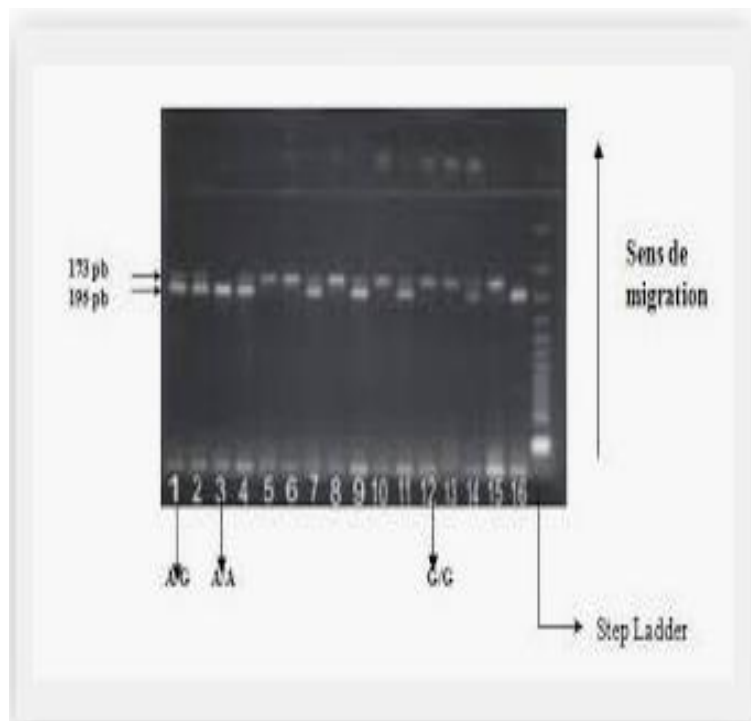
Exemple 1 : une seule bande



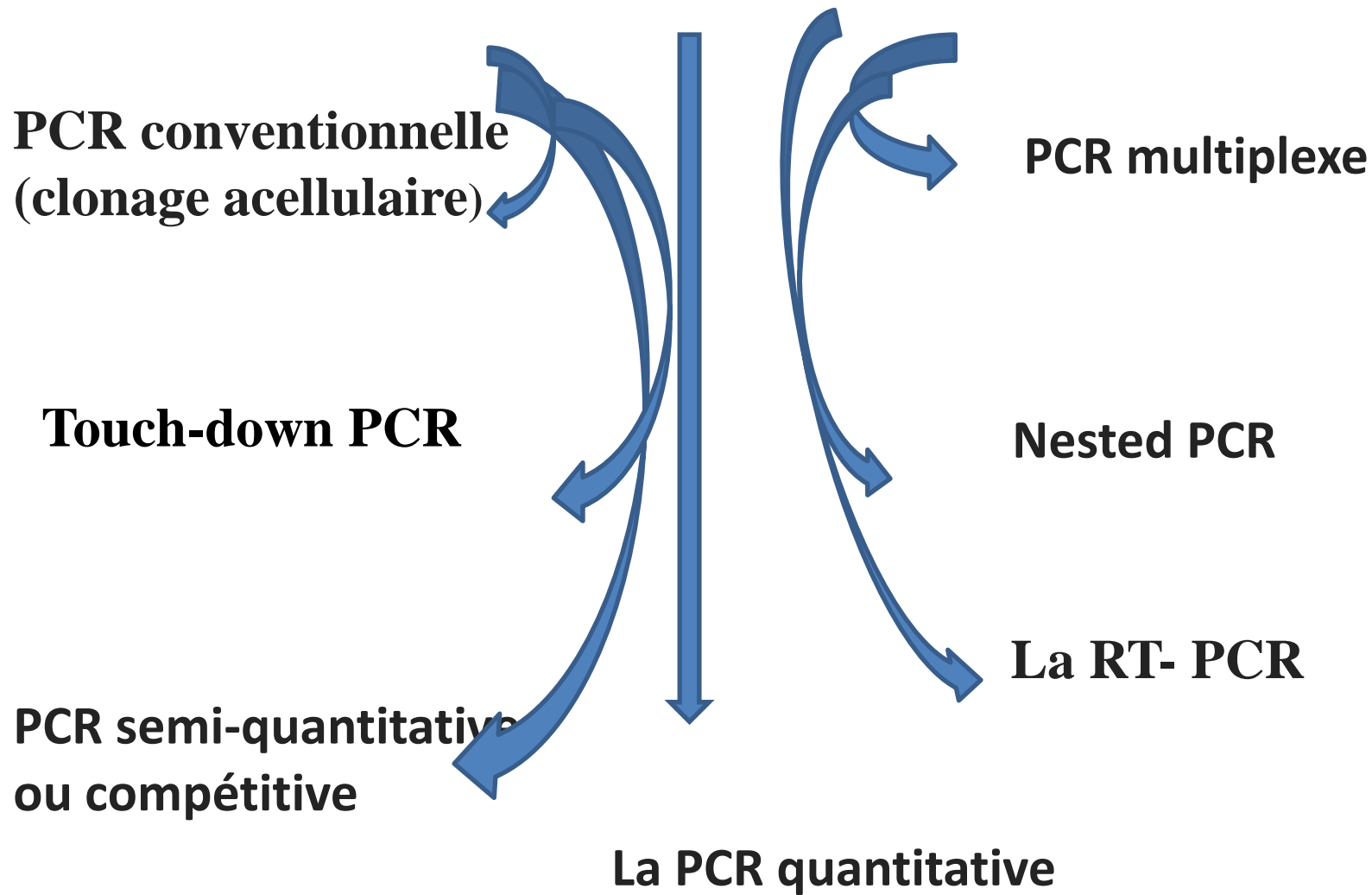
Exemple 2 : Présence de smires



Exemple 3 : Diversité



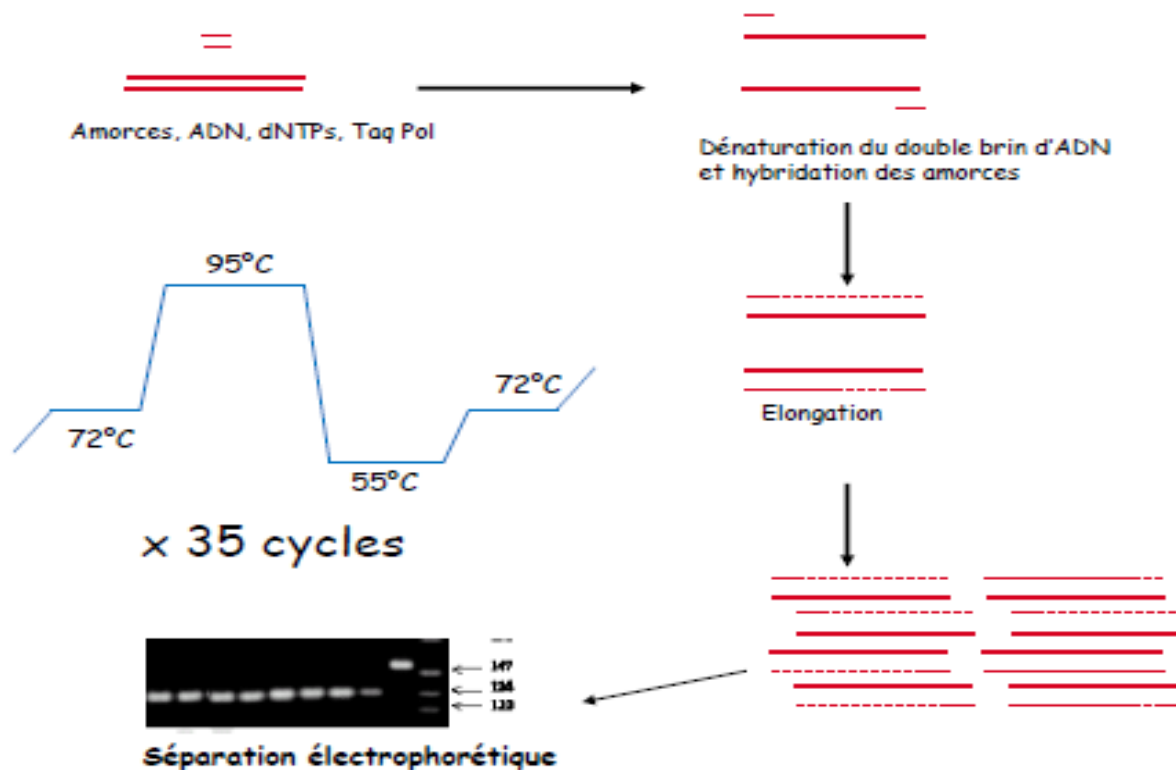
Types de PCR



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)

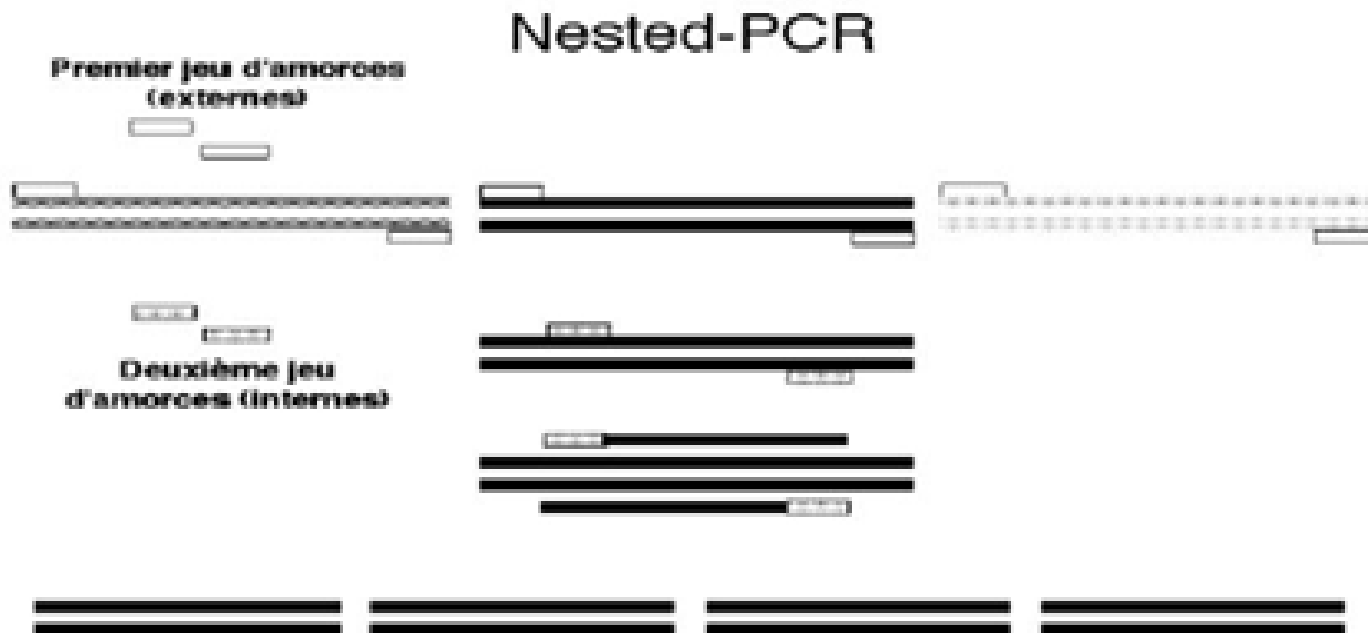


Deux couples d'amorces

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

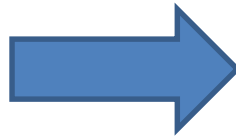
(PCR par essais)



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

Amplification spécifique

température d'hybridation
très haute lors des premiers
cycles

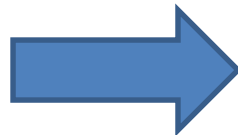


**Abaissement progressive
de la température**

(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



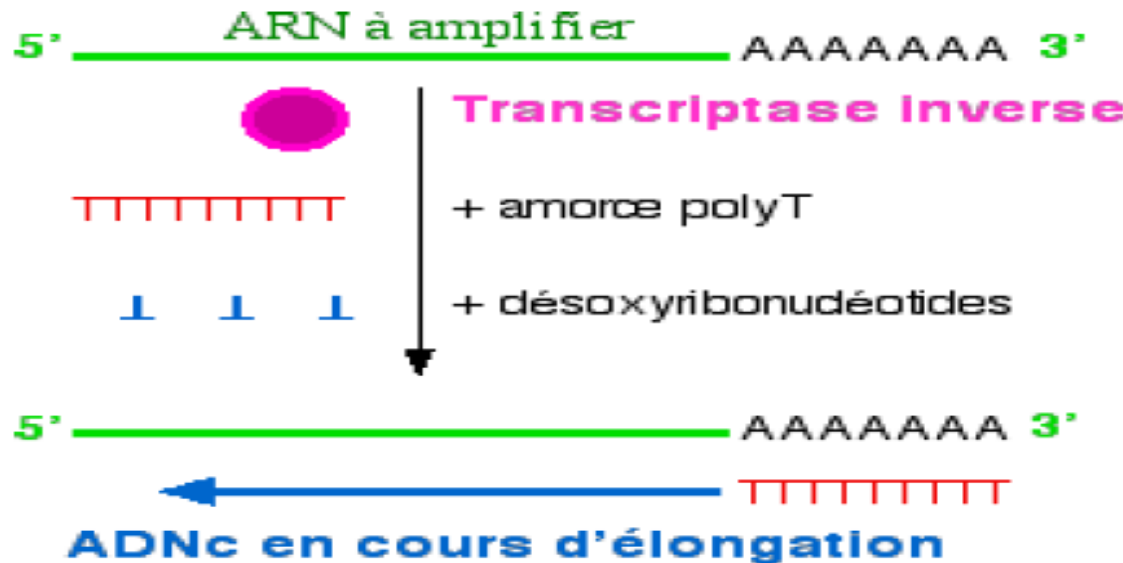
**N'ajouter un des produits réactionnel de la
PCR qu'après avoir atteint la température
des amorces pour éviter les compétions
et assurer une spécificité**

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

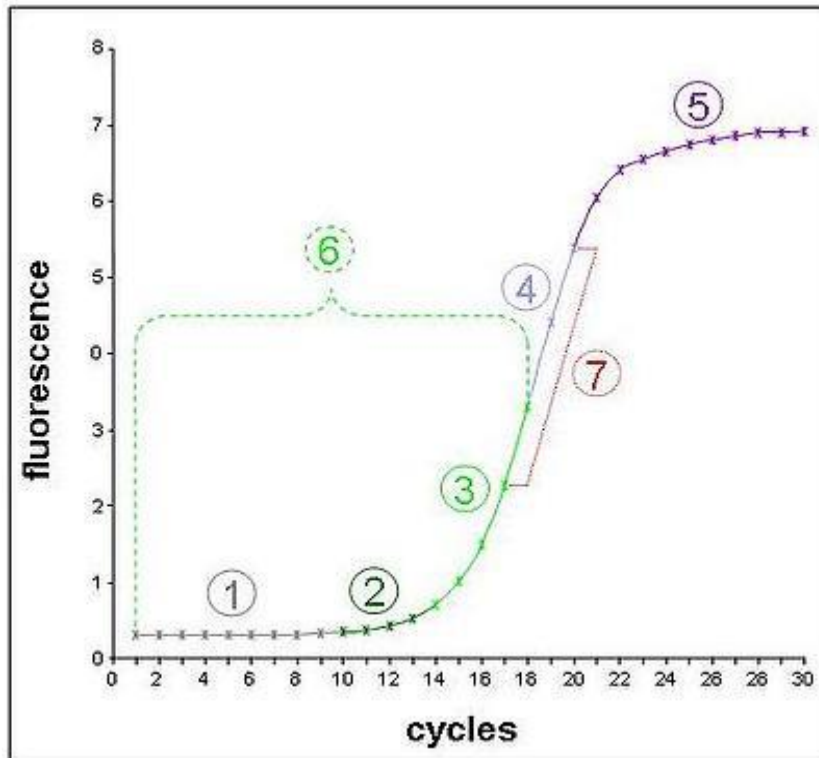
Tant que la sonde est fixée sur l'ADN, absence d'émission de fluorescence (l'extincteur empêche la fluorescence du signal), au cour de l'élongation, la TAQ polymérase (qui dégrade la sonde , fluorochrome signal est libre, le taux de fluorescence est libéré d'une façon proportionnel à la quantité du produit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

La PCR quantitative

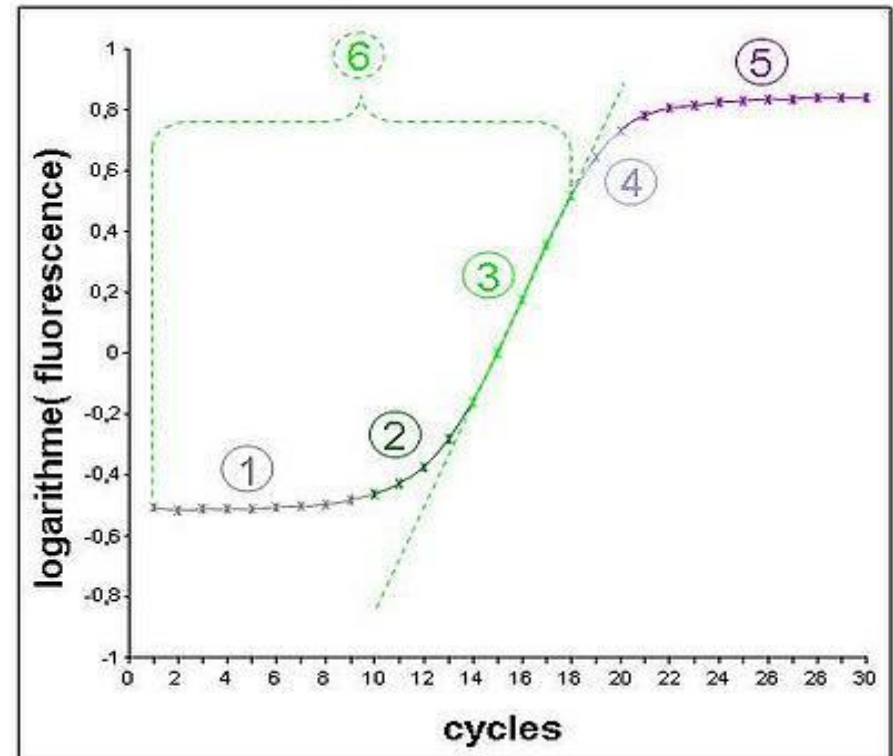
Cinétique complète
de la PCR



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

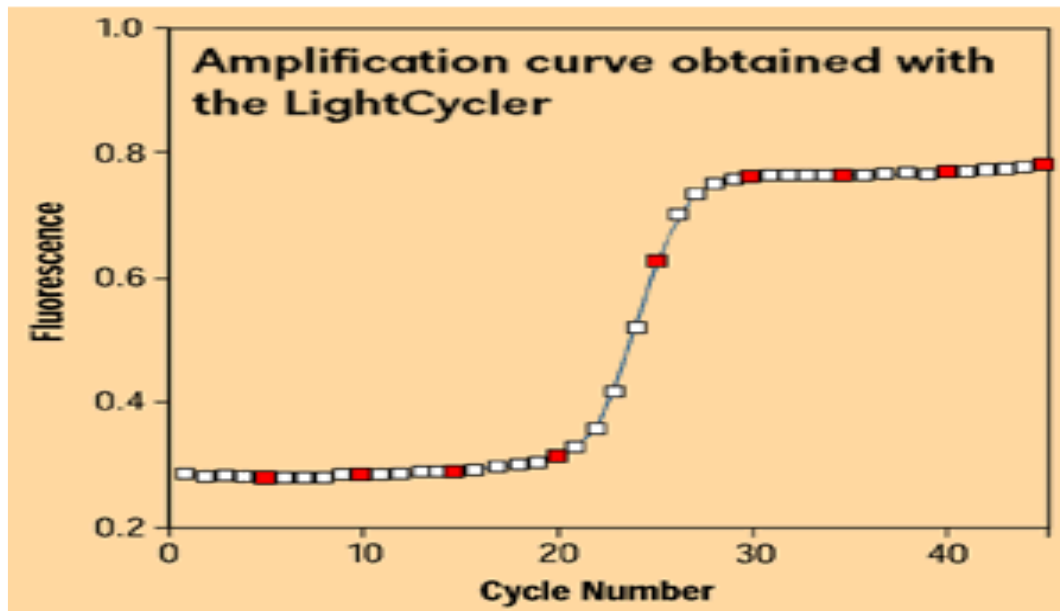
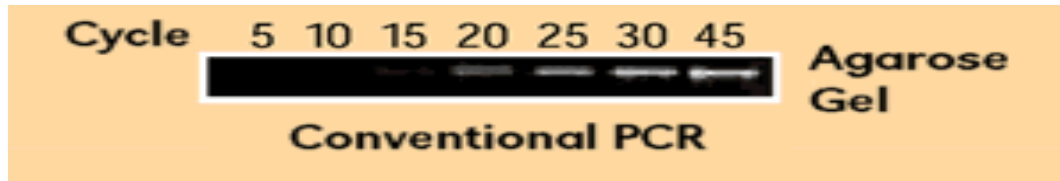
**Cinétique complète
de la PCR**



**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



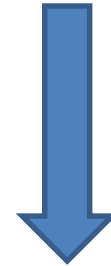
La PCR sur colonie (Colony PCR)



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