

Qu'est-ce que la PCR ?



PCR : polymérase chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne. À partir d'échantillon peu abondant (ex: goutte de sang), cette technique permet de copier rapidement des séquences précises d'ADN en de très nombreux exemplaires. D'où son appellation de « photocopieuse ».

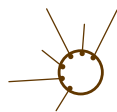
Utilisations de la PCR : analyse d'ADN en recherche, médecine (test diagnostique de maladie génétique, détection virale...), juridique (criminalistique, test de paternité), agroalimentaire (détection d'ingrédient, d'OGM), paléogénétique (ADN ancien ou fossile)...



1 Mélange des réactifs



• Échantillon d'ADN avec sa séquence cible, à recopier



L'ADN polymérase : enzyme qui reconnaît les amorces et assemble les nucléotides pour recopier l'ADN cible.



• Nucléotides (A, T, C, G)



• Les amorces : séquences d'ADN simple brin complémentaires de part et d'autre de la région à copier

2



Le mélange est soumis à des variations de températures rapides grâce au thermocycleur.

Il est programmé pour faire 20 à 40 cycles. Chaque cycle comprend 3 étapes.



Dénaturation : 94°C

Les brins d'ADN se séparent.



Hybridation : 40-50°C

Fixation des amorces aux fragments d'ADN



Élongation : 72°C

Synthèse d'ADN par l'ADN polymérase, qui se fixe aux amorces et assemble les nucléotides.



Les nucléotides s'assemblent par complémentarité : A face à T et C face à G.

3

Analyse des fragments obtenus par électrophorèse

Exemple du résultat d'un test de paternité

Exclusion



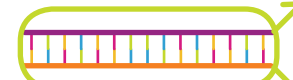
père présumé

mère

père présumé

mère

Copie d'ADN



À chaque cycle, le nombre de copies est doublé.

En 30 ou 40 cycles, on obtient des millions de copies de la séquence cible.

Limites de la technique :

- taille de la région cible limitée entre 100 et 8000 paires de bases

- s'il y a de l'ADN contaminant, même infime, dans l'échantillon, il est aussi amplifié et brouille les résultats.

Lire l'ADN: le séquençage

L'ADN est formé de brins complémentaires composés de 4 bases différentes A, T, C, G.

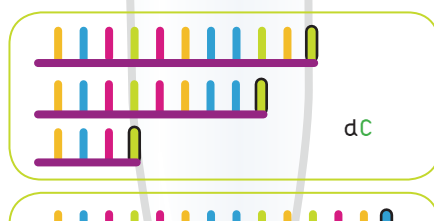
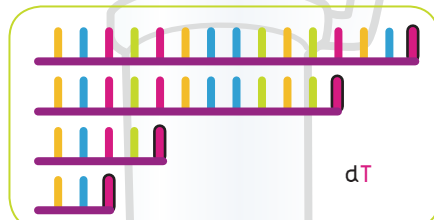
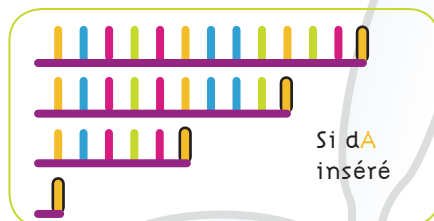
Séquencer un fragment d'ADN, consiste à déterminer l'ordre des bases A, T, G et C qui le constitue.



Pour séquencer le génome humain, les 3,2 milliards de paires de bases ont été découpées en fragments d'environ 500 à 800 paires de bases. Après avoir séquencé chaque fragment, le travail a consisté à les ordonner. Le consortium international pour le séquençage du génome humain réunissait 20 centres de séquençage dans six pays pendant plus de 10 ans (de 1990 à 2003).

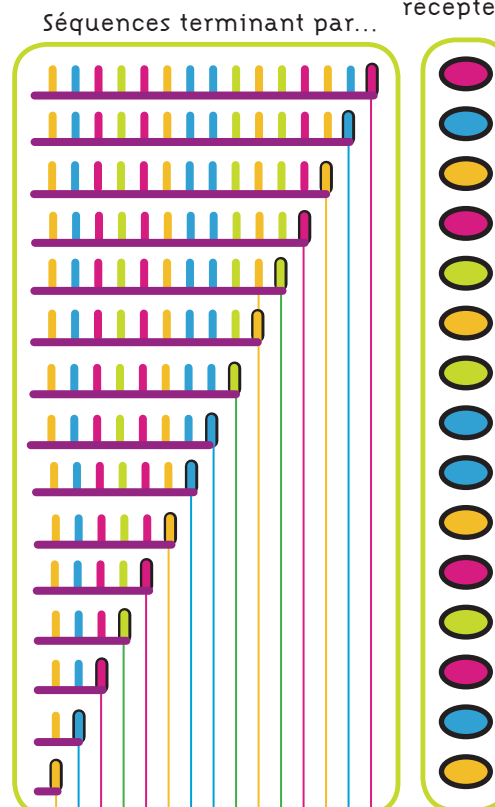
Réaction de polymérisation

(principe de la PCR) Si une base-stop est insérée, la synthèse du fragment est interrompue. À la fin des cycles, le mélange contient donc des fragments de tailles différentes.



3 Électrophorèse: migration des fragments en fonction de leur taille. Pour connaître le nom de la base-stop: détection de fluorescence (si jaune, c'est un dA...).

Lecture par photo-récepteur



La séquence est donc: A G T C T A G G C A C T A G T

1 Ingrédients de la réaction:

Principe de séquençage de l'ADN par la méthode de Sanger (1977) modernisée:



- Échantillon d'ADN avec la portion à séquencer (de 100 à 1000 paires de bases)

- Nucléotides (A, T, C, G)
- Polymérase
- Amorces

- En plus de la PCR: les didésoxynucléotides (bases-stop) qui empêcheront l'addition d'autres bases une fois incorporés. Ils sont marqués par un agent fluorescent, une couleur différente pour chaque base.



Limites de la technique : - entre 600 et 1000 paires de bases séquencées par réaction



ANALYSER L'ADN

La technique de PCR et le séquençage

Séquençage:

Les techniques de PCR et de séquençage utilisent le même principe: la réaction de polymérisation de l'ADN avec un enzyme, l'ADN polymérase.

1970: découverte d'une ADN polymérase par A. Kornberg (Nobel en 1959)

1977: premier ADN séquencé par la méthode de F. Sanger (Nobel en 1980 avec W. Gilbert)

1986: premier publication sur la PCR par K. Mullis (Nobel en 1993)



Généthon

ecole-adn@genethon.fr
01.69.47.11.70