

PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne, est un des éléments favoris de la boîte à outils des biologistes au laboratoire.

A la fois très simple et d'une grande élégance, elle permet d'amplifier des séquences d'acides nucléiques variés.

Avant de commencer

Comme toutes les sciences, la biologie à sa propre langue, donc pour se comprendre il nous faut défricher un peu le vocabulaire.

Voici quelques clefs :

-les acides nucléiques sont les supports de l'information génétique. Ils sont constitués de 4 briques universelles différentes nommées nucléotides (A, C, G et T/U). Agencées en séquence à brin unique (ARN) ou à double brin (ADN), ces briques représentent une information qui peut être copiée (c'est le principe de la PCR) ou bien décodée par une machinerie spécifique à base d'enzymes. Ces séquences parfois extrêmement longues sont fragiles et souvent enroulées de manière poussée sur elles-mêmes et autour de bobines protéiques.

-la dénaturation est un processus qui vise à linéariser au mieux les séquences d'acides nucléiques pour les rendre accessibles aux enzymes. Dans le cas des ADN double brins, ces derniers s'écartent partiellement en deux brins uniques reliés par quelques points (comme les anneaux d'une chaîne), donnant accès à chaque brin individuellement.

-l'appariement est le principe de complémentarité des 4 différents nucléotides dans les séquences double brin d'ADN. Il se fait d'un brin à l'autre entre nucléotides complémentaires qui se font face. C'est assez simple car il n'y a en fait qu'un appariement possible pour chaque nucléotide : le A avec le T, et le C avec le G ! Donc par exemple pour une courte séquence monobrin GATTACA, le brin complémentaire est CTAATGT.

-les enzymes sont des machines à base de protéines hyper-spécialisées, extrêmement efficaces et très diversifiées. Elles sont généralement spécifiques à un petit nombre de molécules (nommé substrat) sur lesquelles elles se fixent pour réaliser des opérations simples mais précises, avec un faible taux d'erreur. Par exemples elles peuvent tronçonner une molécule, en fusionner deux bout à bout, gérer du stockage, libérer de l'énergie, ou dans le cas de la TAQpolymérase qui nous intéresse ici, réaliser la copie d'une séquence.

-la TAQpolymérase est l'enzyme utilisée pour réaliser la PCR. Elle se lie spécifiquement aux séquences d'acides nucléiques monobrin et cherche à recréer le brin manquant.

Les étapes

En quoi consiste la PCR : une enzyme nommée polymérase va venir faire des très nombreuses copies d'une séquence modèle d'acides nucléiques.

On réalise plusieurs étapes à des températures différentes dans un appareil appelé thermocycleur. Le mélange réactionnel (Taq polymérase, Mg^{2+} et parfois $MgCl_2$, amorces, les 4 dNTP en excès (A, T, C, G) et l'extrait d'ADN cible, tampon réactionnel) est placé dans des microtubes et est soumis, plusieurs dizaines de fois, à des cycles successifs. Le thermocycleur permet la programmation de chaque étape des cycles. La réaction PCR dure quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).

Le nombre de cycles est typiquement inclus entre 25-35 cycles d'amplification. Plus on effectue de cycles, plus on augmente le risque d'avoir des contaminants au sein de la réaction. Il est donc conseillé d'effectuer le nombre minimum de cycles nécessaire afin de synthétiser la quantité de produit désirée.

Le protocole diffère en fonction du type de PCR à effectuer :

PCR classique :

1 : Étapes du cycle PCR

Dénaturation thermique de l'ADN à $95^{\circ}C$: permet de rompre les liaisons hydrogène afin d'obtenir des matrices simple brin.

Hybridation des amorces à $50^{\circ}C$ - $65^{\circ}C$: Les deux amorces contenues en large excès s'hybrident lorsqu'elles rencontrent les séquences complémentaires. La température permet aux liaisons de se reformer. Ainsi, plus la température d'hybridation est levée, plus l'hybridation est sélective et spécifique.

Élongation à $72^{\circ}C$. La Taq polymérase catalyse la réplication à partir des ADN monocaténaux amorcés de façon sélective (sélectivité qui découle du choix des amorces).

Exemple de conditions de cycles pour une Taq polymérase.

Étape	Température	Temps (min)	Cycles
Dénaturation initiale	$95^{\circ}C$	2	1
Dénaturation	$95^{\circ}C$	0,5 à 1	25 à 35

Hybridation	42°C à 65°C	0,5 à 1	-
Amplification	72°C	1	-
Amplification finale	72°C	5	1
Trempage	4°C	indéfini	1

2 : Électrophorèse sur gel d'agarose : Ce principe repose sur l'attraction des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Les acides nucléiques migrent plus ou moins loin à travers le gel en fonction de la masse des molécules (plus elles migrent loin plus elles sont petites car le maillage du gel se rétrécit plus on se rapproche du pôle +)

3 : Révélation : L'ADN est révélé par une coloration au Bromure d'éthidium ou un intercalant visible sous lampe UV (l'intercalant se lie aux acides nucléiques et émet une fluorescence)

PCR en temps réel :

À l'inverse du PCR classique, le PCR en temps réel permet une quantification plus précise grâce à une mesure de l'amplification tout au long de la réaction. On effectue la détection et la quantification de l'amplification à chaque fin de cycle grâce à un signal fluorescent, un intercalant des acides nucléiques (donc la valeur de la fluorescence est corrélée à la quantité de produit amplifié). Cette détection élimine le besoin d'électrophorèse sur gel, ce qui permet d'économiser du temps et de réduire le potentiel de contamination.

Vu que la formation de produit peut être détectée dans la phase exponentielle du PCR lorsque la réaction est la plus efficace, la quantification du matériel de départ est plus sensible et précise.

Comparaison PCR Classique et PCR temps réel

PCR classique	PCR en temps réel
Visualisation du produit amplifié par gel d'agarose après sa production	Visualisation du produit amplifié en temps réel (pendant l'amplification) grâce à un instrument de détection
Ne mesure pas précisément l'ADN ou ARN de départ	Permet de mesurer le nombre de copies d'ADN ou d'ARN de départ (d'où le nom de PCR "quantitatif")
Moins coûteux, ne nécessite pas d'instrument spécial	Plus coûteux, nécessite des instruments spéciaux
Principe basique de biologie moléculaire	Demande des compétences plus techniques

Facteurs pouvant affecter le succès de la technique de PCR :

- Quantité d'enzyme utilisée
- Erreur de pipettage.
- Concentration de magnésium (Mg^{2+})

Purification d'ADN :

Actuellement, l'analyse par multiplex et PCR en temps réel marque l'importance de la qualité de la purification de l'ADN.

Étapes de base de la purification ADN : Lyser, lier, rincer, éluer.

Lyse : perturbation des cellules ou tissus	<ul style="list-style-type: none">- Traitement enzymatique- Perturbation mécanique- Traitement à un détergent
Lyse : dénaturation ou inactivation des protéines	<ul style="list-style-type: none">- Détergents ioniques, chaleur, agents réducteurs, urée et guanidine- Protéases (ex : protéasine K)
Lyse : inactiver les nucléases endogènes	<ul style="list-style-type: none">- Agents perturbateurs (ex : EDTA)- Protéases (ex : protéasine K)
Lier et Rincer : séparer l'ADN *	<ul style="list-style-type: none">- Éliminer les autres acides nucléiques (ARN)- Éliminer les protéines, par extraction organique, grâce au sel, ou par liaison à un support solide (matrice de silice, colonnes d'échanges anioniques, particules magnétiques).

* Liaison et rinçage : techniques de séparation de l'ADN d'autres matériaux cellulaires.

Extraction organique : Lorsque du phénol ou une mixture de phénol/chloroforme est mélangée à un lysat cellulaire, deux phases se forment : une phase aqueuse et une phase organique. Les parts polaires de l'ADN et divisent dans la phase aqueuse, et les protéines dénaturées et d'autres débris cellulaires se divisent dans la phase organique

Extraction grâce au sel : Les sels déshydratent les protéines, ce qui les rendent moins hydrophiles et donc dénaturées. Les protéines dénaturées perdent de leur solubilité et précipitent, ces protéines dénaturées et les débris cellulaires sont extraits par centrifugation. Les sels sont typiquement utilisés dans des protocoles incluant du chlorure de sodium, potassium, acétate ou

acétate d'ammonium.

Par liaison à un support solide : La plupart des techniques de purification d'ADN sont basées sur la purification des lysats bruts par une liaison sélective à un support solide. Ces supports incluent matrice de silice, colonnes d'échanges anioniques, particules magnétiques. Généralement ces méthodes sont plus rapides et plus pratiques par rapport à d'autres techniques car elles ne requièrent pas de solvants organiques et peuvent être miniaturisées et automatisées.

Sources : Molecular biology, Lab Guide : Promega

Fiche Technique de la PCR

Définition

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant de copier et d'amplifier une séquence spécifique d'ADN de manière exponentielle.

Principe

La PCR repose sur l'utilisation de cycles répétitifs de dénaturation, d'hybridation et d'extension pour amplifier une séquence d'ADN cible.

Composants

- **ADN matrice:** Échantillon d'ADN contenant la séquence cible à amplifier.
- **Amorces:** Courtes séquences d'ADN complémentaires aux extrémités de la séquence cible.
- **dNTPs:** Nucléotides libres (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) nécessaires pour l'élongation.
- **ADN polymérase thermostable:** Enzyme qui synthétise le nouvel ADN, comme la Taq polymérase.
- **Tampon:** Maintient les conditions de pH et d'ions pour l'activité optimale de l'enzyme.
- **Ions magnésium (Mg^{2+}):** Co-facteur essentiel pour l'activité de l'ADN polymérase.

Étapes de la PCR

1. **Dénaturation (94-98°C):** Séparation des brins d'ADN double hélice en simples brins.
2. **Hybridation (50-65°C):** Liaison des amorces aux séquences complémentaires sur les brins d'ADN simple brin.
3. **Élongation (72°C):** Synthèse de nouveaux brins d'ADN par l'ADN polymérase en utilisant les dNTPs.

Cycle Typique de la PCR

Un cycle de PCR comprend les trois étapes ci-dessus et est répété généralement 25-35 fois.

Applications

- **Diagnostic médical:** Détection de pathogènes, mutations génétiques.
- **Recherche en génétique:** Clonage de gènes, étude de mutations.
- **Médecine légale:** Identification d'individus à partir de traces biologiques.
- **Études évolutives:** Comparaison de séquences génétiques entre espèces.

Schéma de la PCR

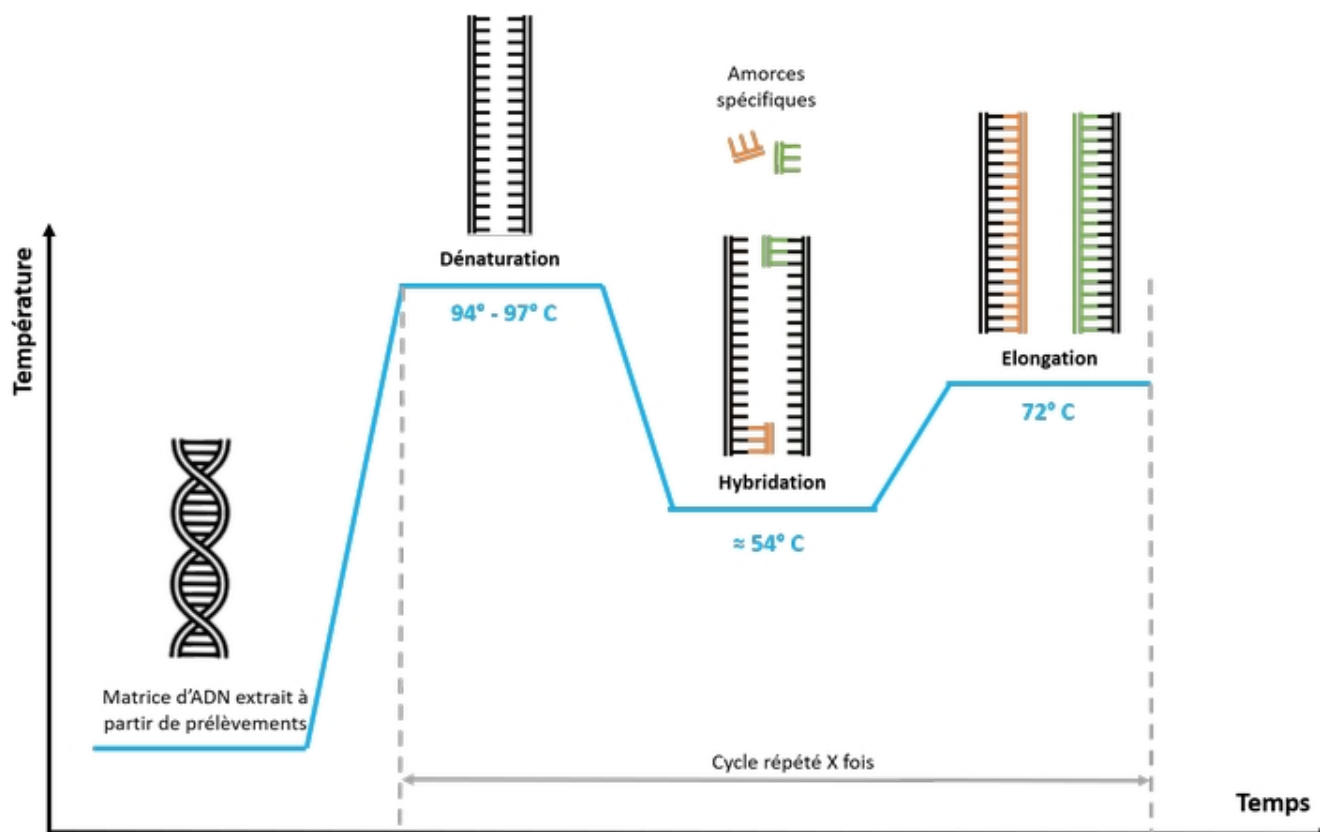


Tableau Résumé des Étapes de la PCR

Étape	Température (°C)	Durée	Description
Dénaturation	94-98	30 secondes	Séparation des brins d'ADN double brin
Hybridation	50-65	30 secondes	Liaison des amorces aux séquences cibles
Élongation	72	1 minute/kb	Synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase

Optimisation de la PCR

- **Température des amorces:** Ajustement pour une hybridation spécifique.

- **Concentration des composants:** Optimisation des dNTPs, amorces, et Mg^{2+} .
- **Nombre de cycles:** Adaptation en fonction de la quantité d'ADN initiale et de l'application.

Variantes de la PCR

- **qPCR (PCR en temps réel):** Quantification de l'ADN en temps réel.
- **RT-PCR:** Amplification de l'ADN complémentaire (cDNA) à partir de l'ARN.
- **PCR multiplex:** Amplification simultanée de plusieurs cibles dans un même échantillon.

Liens et Articles Scientifiques

1. Article de base sur la PCR: [Mullis et Faloona, 1987](#)
2. PCR en temps réel (qPCR): [Heid et al., 1996](#)
3. Applications médicales de la PCR: [Kalayjian et al., 1993](#)
4. Optimisation des conditions de PCR: [Dieffenbach et Dveksler, 1995](#)
5. Utilisation de la PCR en médecine légale: [Gill et al., 1985](#)

Revision #8

Created 2 February 2023 09:37:05 by Steve Hubert

Updated 25 July 2024 07:49:29 by Kernanec Alan