

## Réaction en chaîne par polymérase

L'amplification en chaîne par polymérase (ACP) ou réaction de polymérisation en chaîne (PCR est l'abréviation anglaise de polymerase chain reaction, le sigle français ACP étant très rarement employé) ou encore test d'amplification des acides nucléiques (TAN au Canada francophone) est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*. Elle permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique (séquence spécifique d'ADN (l'Amplicon)) et d'amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides. On peut ainsi, par exemple, détecter la présence du VIH ou mesurer une charge virale (concentration du virus dans le plasma), des traces d'OGM (organismes génétiquement modifiés), ou encore des virus d'hépatites B, C et D.

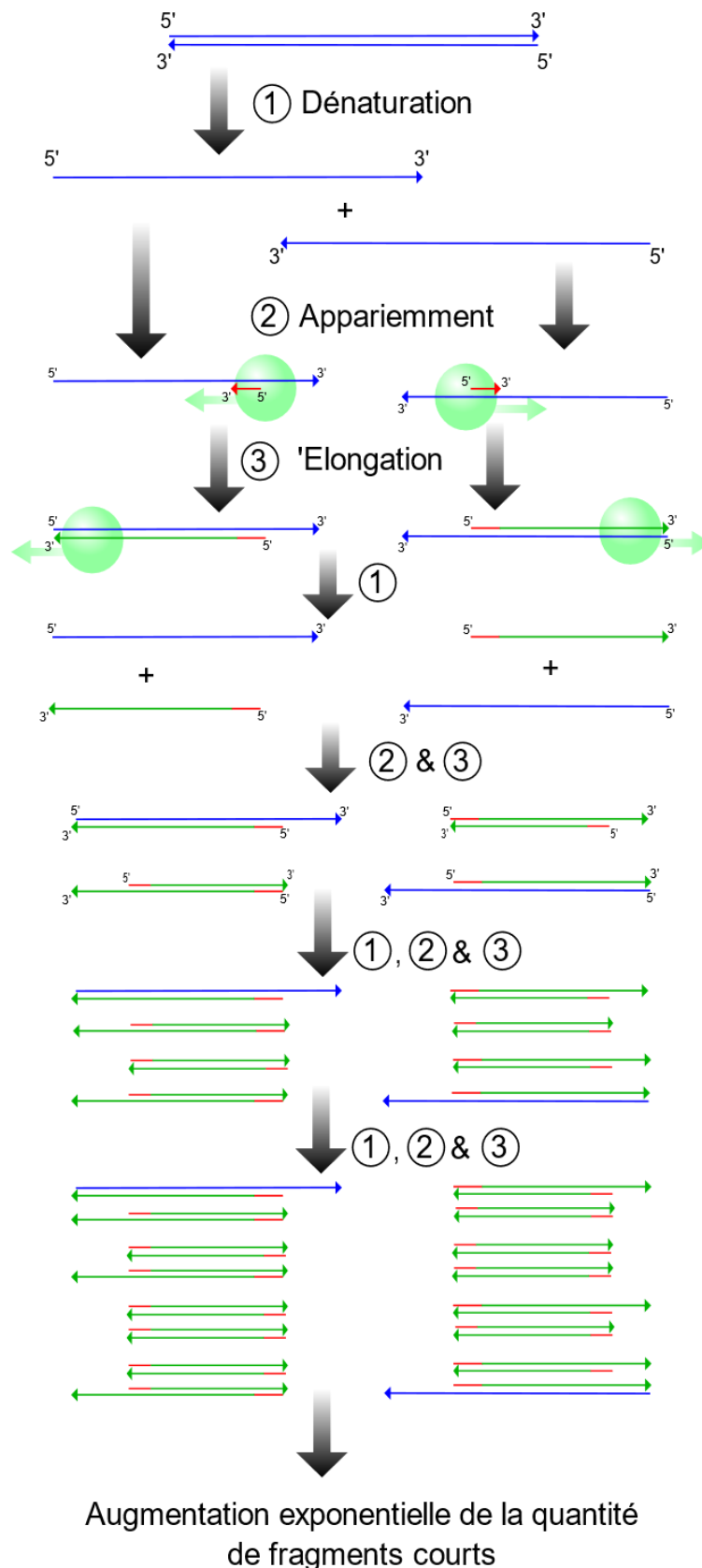
De plus en plus utilisée en criminalistique, cette technique se fonde sur la combinaison de deux facteurs:

- les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation spécifique à l'ADN double brin spécifique des ADN polymérases dépendantes à l'ADN thermostables ;
- les propriétés d'hybridation et de déshybridation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température.

Ces éléments permettent de contrôler l'activité enzymatique grâce à des transitions de température (assurées par un thermocycleur) répétées de manière cyclique (cf. réaction en chaîne).

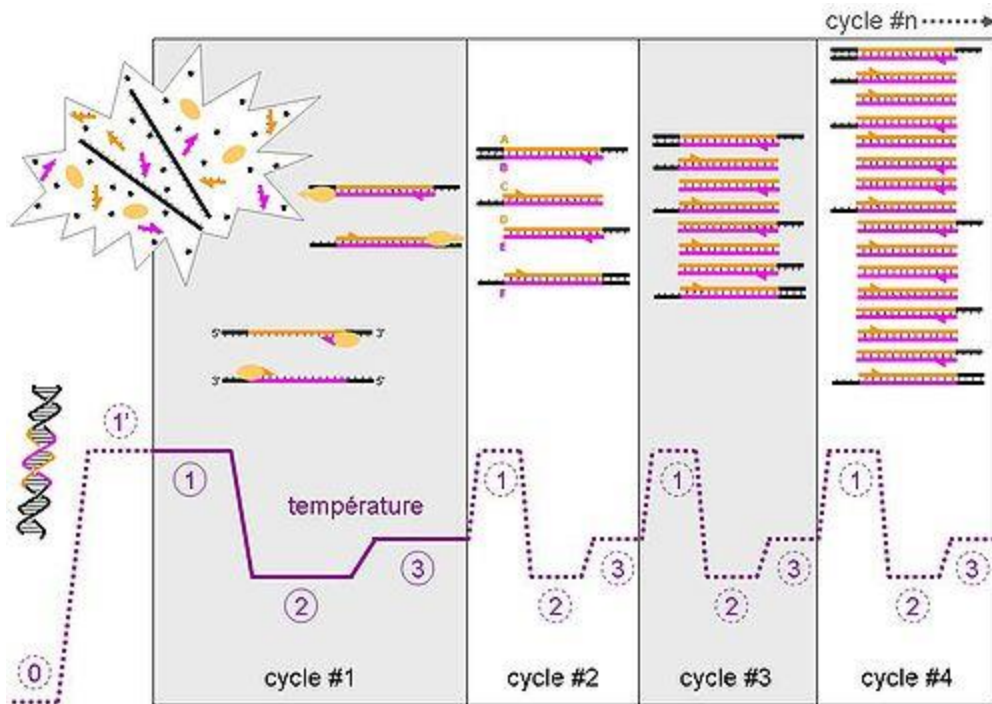
Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées), par exemple *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) ou encore *Pyrococcus furiosus* (Pfu polymérase), *Thermococcus litoralis* (Vent ou Tli polymérase), *Thermus thermophilus* (Tth polymérase). De nos jours, les enzymes utilisées sont dites recombinantes, ce qui simplifie considérablement leur obtention, et leurs propriétés ont été largement modifiées pour les rendre plus efficaces, plus fidèles.

En moins de dix ans, on a appris à faire plus d'un milliard de copies en moins d'une heure, ce qui a imposé la PCR dans les laboratoires en révolutionnant la biologie moléculaire. Elle n'est cependant pas fiable pour certaines sources d'échantillons (urine, crachats), peut-être en raison d'inhibiteurs de la Taq polymérase.



## Principe

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. Sauf pour certaines méthodologies (par exemple l'utilisation de sondes d'hydrolyse), chaque cycle contient trois étapes détaillées ci-dessous. Par souci de didactisme, nous allons considérer pour l'exemple qui suit une efficacité de PCR de 100 %.



Évolution de la température et des différents types de brins d'ADN au cours des 4 premiers cycles de la PCR

## Étapes de la PCR

### Conditions natives (0 sur le schéma)]

Cette étape se fait généralement à température ambiante. L'ADN bicaténaire adopte sa conformation en double hélice. Dans cet exemple, nous considérerons qu'il n'y a qu'une molécule initiale d'ADN double brin dans la solution, la zone colorée (rose et orange) correspondant à notre amplicon.

Note: les ADN complémentaires issus de la transcription inverse sont généralement simple brin et adopteront alors de complexes conformations tridimensionnelles similaires à celle des ARN.

### Dénaturation initiale (1' sur le schéma)

Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95 C) est réalisée. Cette étape permet de: déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires,

d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases de type « Hot start », de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (Transcriptase Inverse, Uracil-N-Glycosylase).

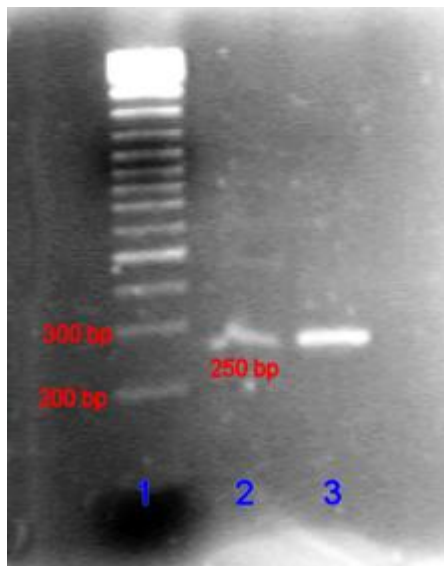
### **Phase de dénaturation (1 sur le schéma)**

Cette étape (généralement 0 à 1 minute à 95 C) permet de déshybrider les ADN, de «décrocher» les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

### **Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (2 sur le schéma)]**

Cette étape (généralement 2 à 60 secondes à 56–64 C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider (se lier) avec leur brin complémentaire, ce qui empêcherait la fixation des amorces, car ces dernières sont bien plus courtes et en concentration bien plus importante. *Expérimentalement, il est constaté que la PCR fonctionne même avec une phase d'hybridation avec une température supérieure de quelques degrés au  $T_m$  théorique des amorces, probablement parce qu'elles interagissent déjà avec les polymérases, qui stabiliseraient leur hybridation à l'ADN matrice.*

### **Caractéristiques des amorces**



Le produit de la PCR en concentration faible (bande 2) et élevée (bande 3) en comparaison avec le marqueur de poids moléculaire (bande 1) dans du gel d'agarose.

- Les séquences nucléotidiques des amorces doivent être spécifiques des séquences complémentaires de l'ADN simple-brin auxquelles elles vont s'apparier. La complémentarité parfaite n'étant par ailleurs pas obligatoire.

De plus la spécificité de la séquence est importante dans la mesure où celle-ci ne doit pas pouvoir s'apparier à une autre séquence de l'ADN que l'on souhaite répliquer.

- Les séquences des amorces doivent être choisies de sorte à minimiser les possibilités d'appariement entre elles. De même chaque amorce est choisie pour ne pas pouvoir former une structure secondaire.
- Le procédé même de la PCR reposant, entre autres, sur des équilibres thermodynamiques, les amorces doivent avoir des températures de fusion le plus proche possible, autrement dit le rapport entre les bases AT et GC des deux amorces ne doit pas être trop différent.

### **Phase d'élongation (3 sur le schéma)**

Cette étape (généralement 4 à 120 secondes à 72 °C) permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon.

### **Évolution de l'ADN au cours des quatre premiers cycles**

#### **Cycle n°1**

- Lors de la phase 1, nous constatons que l'ADN initial a adopté une conformation « linéaire » (sans structure secondaire) et simple brin. Les amorces, les dNTPs et les polymérases sont en large excès et répartis de façon homogène dans la solution.
- Lors de la phase 2, une des amorces sens s'hybride avec sa séquence complémentaire sur le brin anti-sens (en rose), une des amorces anti-sens se liant elle au brin sens (en orange). Deux polymérases peuvent alors interagir avec les deux complexes amorces/ADN matrice.
- Lors de la phase 3, les polymérases parcourent leur brin matrice de son extrémité 3' vers son extrémité 5' tout en synthétisant le brin complémentaire. Elles s'arrêteront à la fin du cycle, décrochées par la phase de dénaturation du cycle suivant. Les ADN néo-synthétisés sont donc précisément définis à leur extrémité 5' mais pas à leur extrémités 3' (parties noires). Les ADN sont alors bicaténares sur une longueur plus ou moins importante.

À la fin de l'étape 3, nous avons alors deux brins d'ADN matrice et deux brins (un sens et un anti-sens) d'ADN précisément définis à leur extrémité 5' uniquement.

#### **Cycle n°2**

Les trois phases se déroulent de la même manière qu'au cycle n°1, sauf que deux polymérases arrivées au bout de leur ADN matrice se décrochent spontanément. À la fin de la phase 3, nous obtenons tous les types d'ADN qui existeront lors de la PCR, soit :

- Un brin d'ADN natif sens (A).
- Deux brins d'ADN anti-sens précisément définis à leur extrémité 5' uniquement (B).
- Un brin d'ADN sens correspondant à l'amplicon, c'est-à-dire précisément défini à ses deux extrémités (C).
- Deux brins d'ADN sens précisément définis à leur extrémité 5' uniquement (D).
- Un brin d'ADN anti-sens correspondant à l'amplicon, c'est-à-dire précisément défini à ses deux extrémités (E).
- Un brin d'ADN natif anti-sens (F).

### **Cycle n° 3**

Idem au cycle 2. À la fin de la phase 3, nous observons 1 brin de type A et F, 3 de B et D, et 4 de C et E. Nous observons l'apparition de deux molécules d'ADN double brins C-E qui correspond à notre amplicon.

### **Cycle n°4**

Idem au cycle 3. À la fin de la phase 4, nous observons 1 brin de type A et F, 4 de B et D, et 11 de C et E. Nous observons que l'amplicon devient la combinaison majoritaire.