

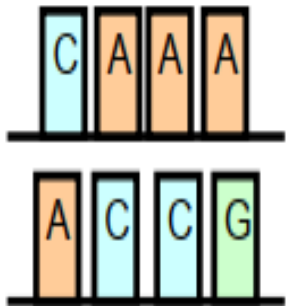
Principe de l'amplification par PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une **technique d'amplification d'ADN *in vitro***. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

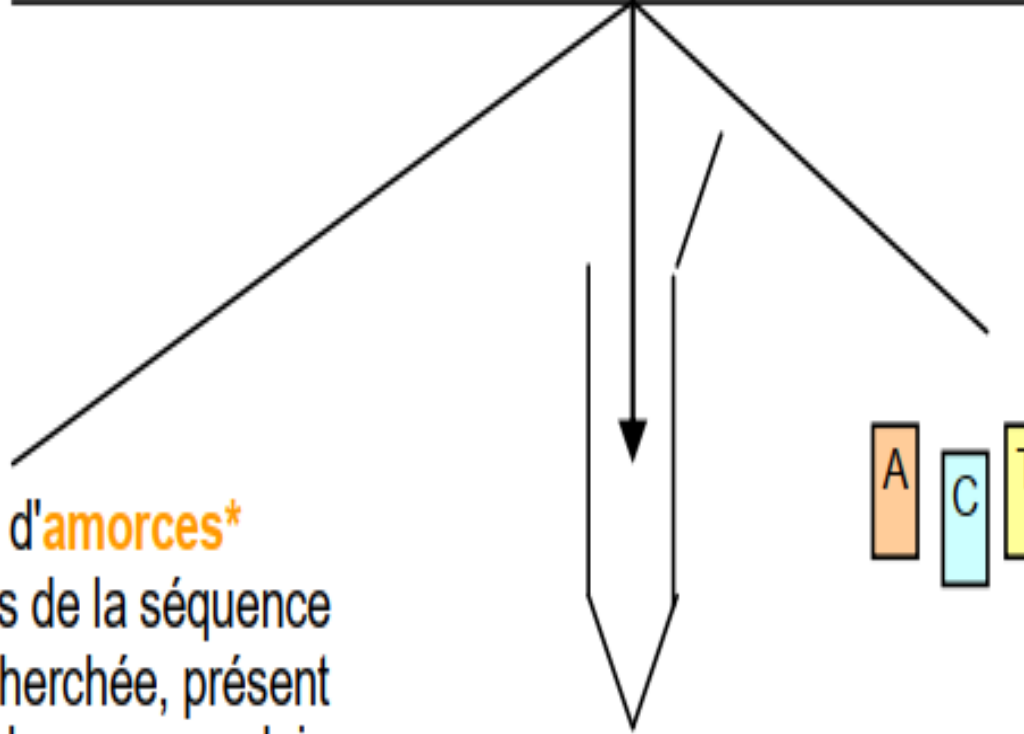
Chaque cycle de PCR est constitué de **trois étapes** : une **dénaturation** de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une **hybridation** des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une **élongation** grâce à l'action d'une **ADN polymérase***. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (la **durée d'un cycle** est de l'ordre de la **minute**).



ADN de
l'échantillon
à tester



Un couple d'**amorces***
spécifiques de la séquence
d'ADN recherchée, présent
en de nombreux exemplaires



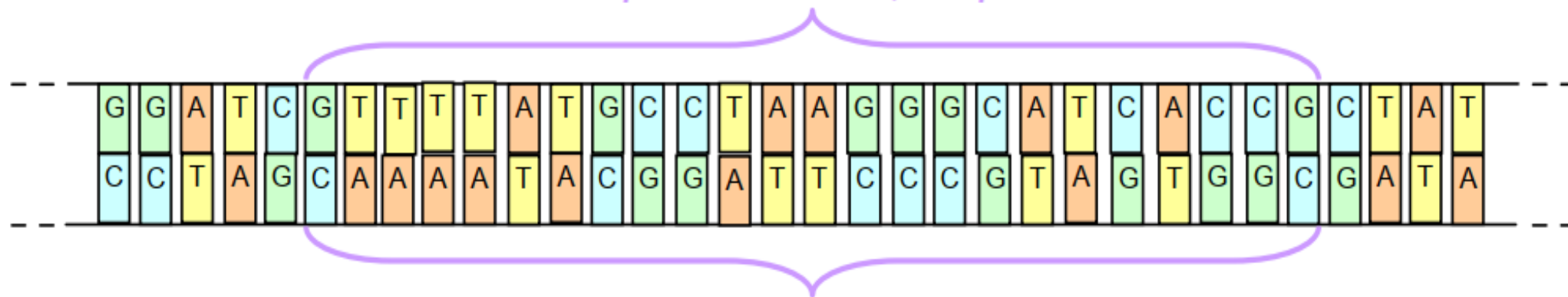
Taq polymérase
(polymérase active à des
températures élevées)



Nombreux
désoxyribonucléotides*

1^{er} cycle

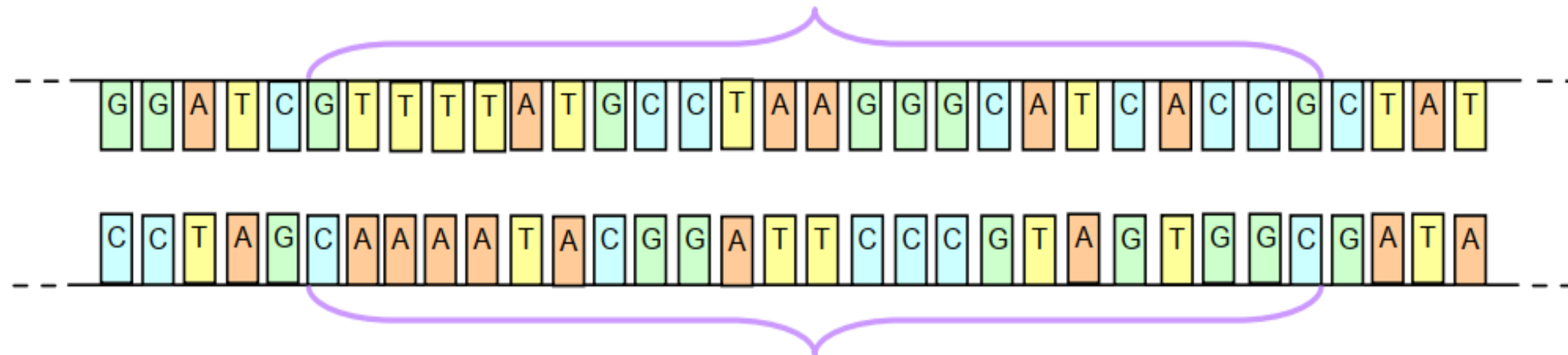
séquence recherchée, à amplifier



Etape I :

Dénaturation de l'ADN
=> séparation des 2 brins

Chauffage (95°C)

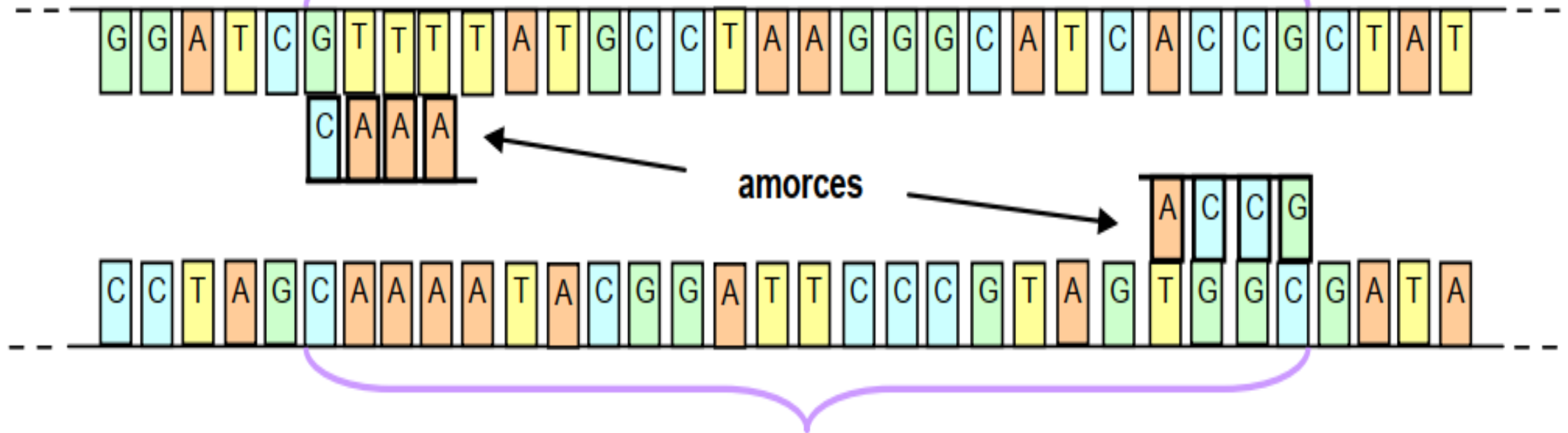


Etape II :

Hybridation des amorces

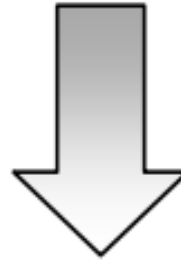
Diminution de la température

(entre 40 et 65°C, en fonction de la longueur
et de la séquence des amorces)

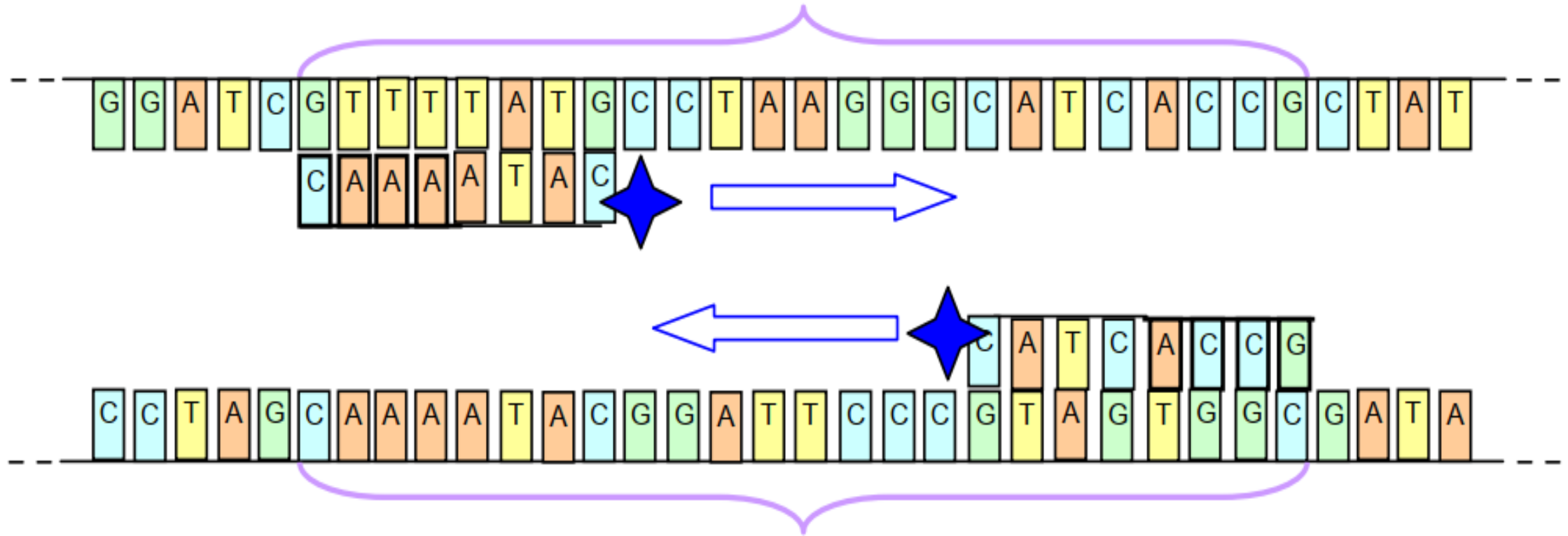


Etape III :

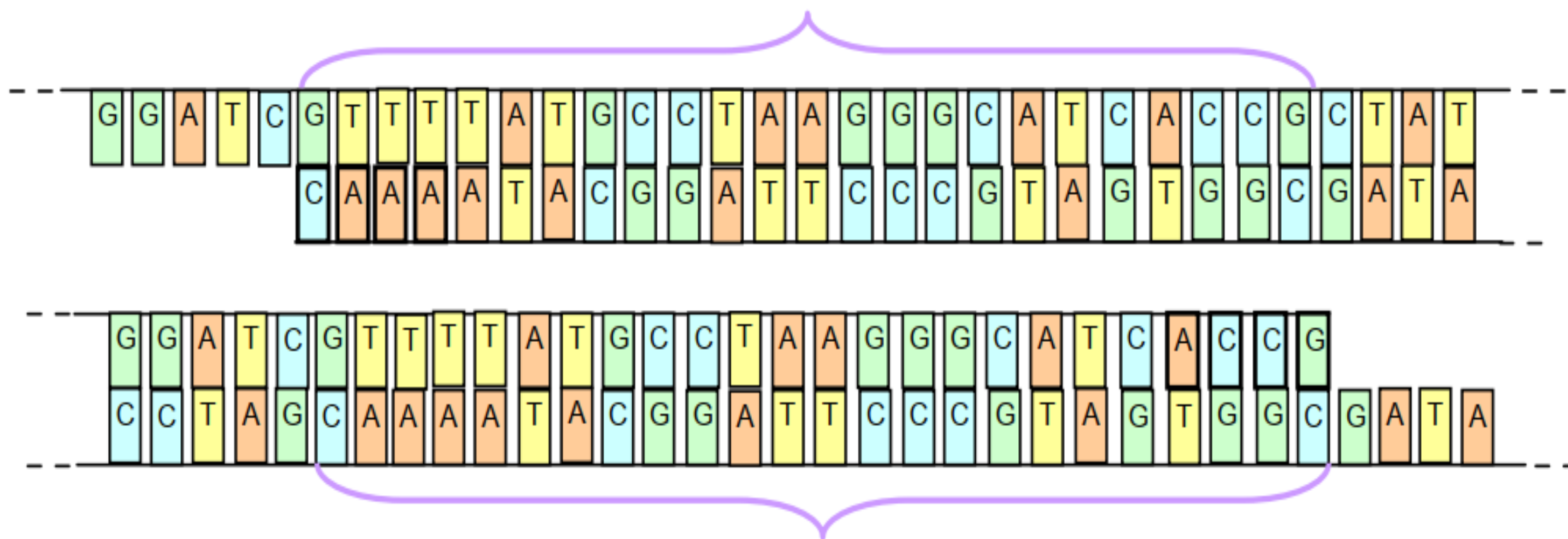
Elongation des brins d'ADN grâce à la **Taq polymérase** à partir des deux amorces



Hausse de la température
(72°C : **température optimale**
pour l'action de la Taq polymérase)

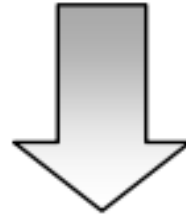


Résultat du 1^{er} cycle



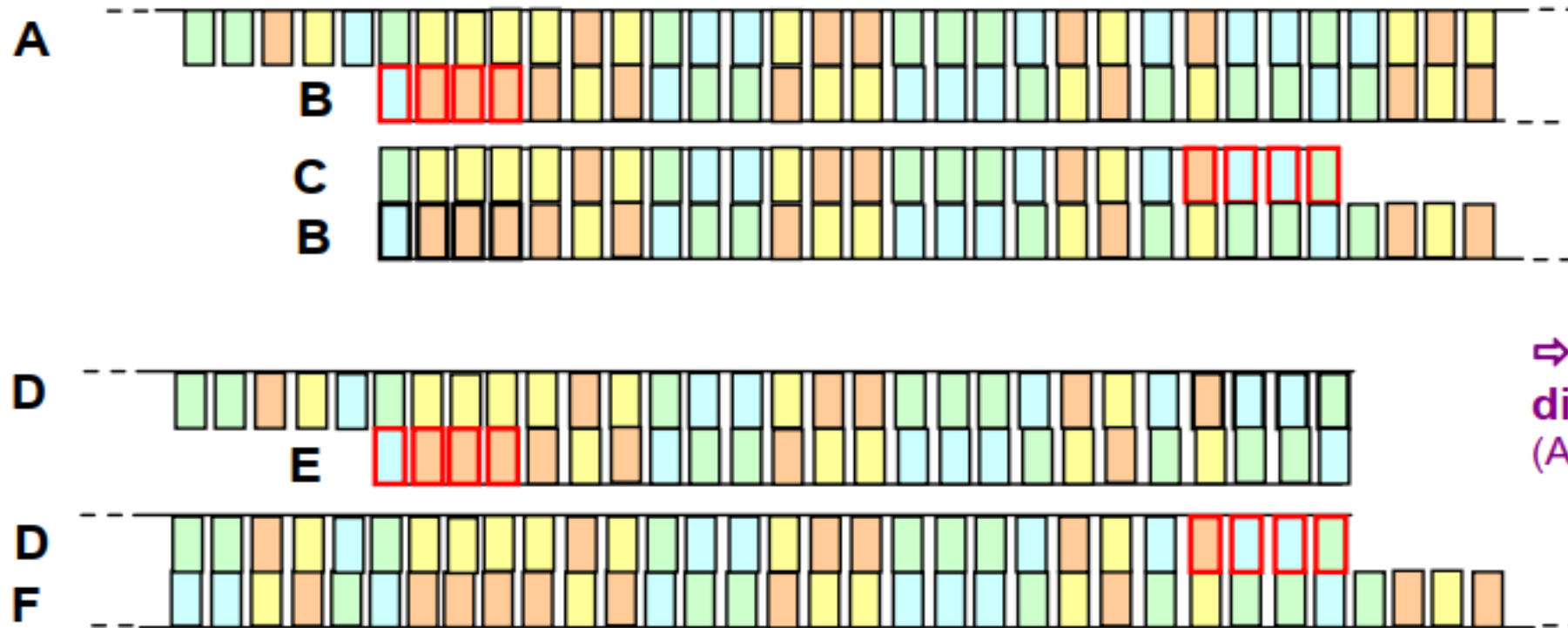
Résultats du 2nd cycle

(après les étapes I, II et III)



Remarque : le couple d'amorces du 2nd cycle est identique à celui du 1^{er}.

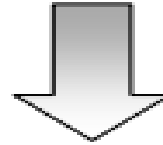
Il est représenté de couleur différente pour faciliter la lecture du schéma



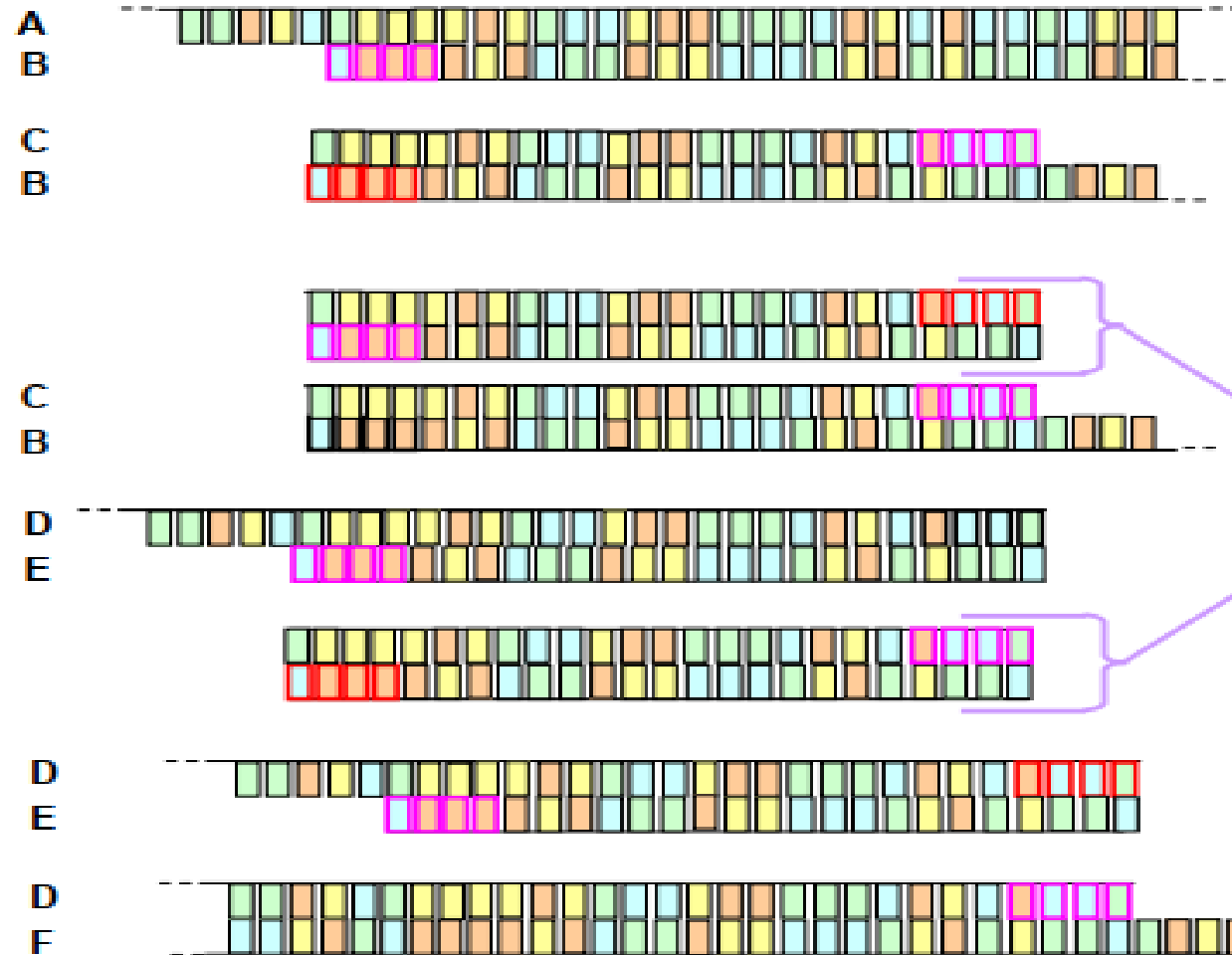
⇒ 6 brins d'ADN différents obtenus (A, B, C, D, E et F)

Résultats du 3^{ème} cycle

(après les étapes I, II et III)



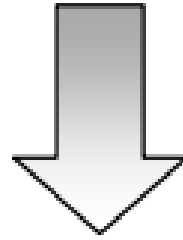
Remarque : le couple d'amorces est toujours le même



Séquence cible d'ADN

= « **amplicon** »

(molécule d'ADN double brins
précisément définie à ses extrémités)



Cycle de PCR répété de 20 à 50 fois

⇒ **n cycles de PCR** permettent en théorie de produire **2^n copies de la séquence ciblée (amplicon)**. Il est ainsi possible d'obtenir **plus d'un million de copies** de la séquence d'ADN recherchée **en une vingtaine de cycles**.



Risque de contamination de la PCR : au cours de l'expérience, il y a des risques d'introduction involontaire d'ADN dans le tube de réaction lors de son ouverture. Ceci peut conduire à de faux résultats positifs ou négatifs. Il est donc conseillé de réaliser les manipulations pré-PCR et post-PCR dans des pièces séparées.

Une méthode quantitative : la PCR en temps réel

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR en point final).

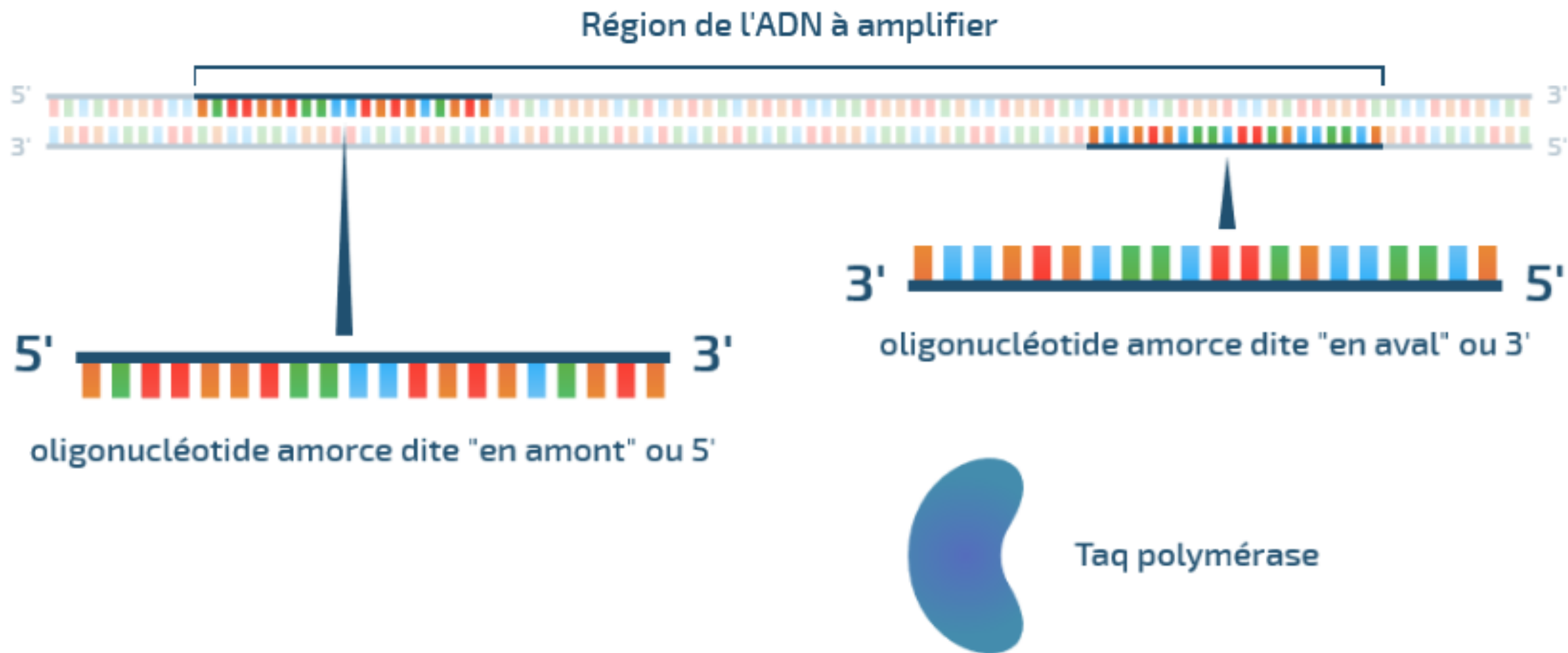
Des **sondes*** fluorescentes se fixent :

- ↳ soit sur l'ADN double brin (ex : Technologie SYBR)
- ↳ soit sur une séquence d'ADN précise (ex : Technologies Taqman et Beacon).

Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN.

La mesure de la fluorescence permet de déterminer "en temps réel" si le fragment recherché (amplicon) est effectivement présent – et donc amplifié – sans avoir besoin de faire une électrophorèse par exemple. De plus, la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR.

La quantité d'amplicons est corrélée à la quantité initiale d'ADN de la matrice originale, ce qui permet pour d'autres applications de « doser » la matrice originale (ex : virus).



La PCR (pour *Polymerase Chain Reaction*) permet d'obtenir un grand nombre de copies d'une région définie d'un ADN. C'est une réaction cyclique de polymérisation qui utilise un couple d'oligonucléotides amorces et une enzyme ADN polymérase thermostable (Taq polymérase).

Région de l'ADN à amplifier



Dans le mélange réactionnel en plus de l'ADN à "amplifier" (la matrice) il faut :

- un couple d'amorces oligonucléotidiques spécifique
- une ADN polymérase thermostable
- les quatre désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dGTP et dCTP)
- un tampon (TrisHCl, cations bivalents et monovalents)

Chaque cycle est une succession de 3 étapes :

- une **dénaturation** en simple brin de l'ADN
- l'**hybridation** des oligonucléotides amorces
- la **polymérisation** des brins inverses complémentaires des brins matrices

Région de l'ADN à amplifier



La **dénaturation** de l'ADN est réalisée à une température de 94 à 95°C. À cette température, les liaisons hydrogène, qui maintiennent l'ADN double brin, sont rompues. À la fin de cette étape, on obtient de l'ADN simple brin, prêt pour l'hybridation avec les oligonucléotides amorces.

Cycle 1

95 °C



Les séquences des oligonucléotides amorces sont choisies pour former les limites de la séquence ADN qui doit être amplifiée. Chaque oligonucléotide fait de 20 à 30 nucléotides environ.

L'**hybridation** des oligonucléotides amorces doit se faire à la même température d'hybridation (**T_a**), inférieure de 5 °C à la température de demi-dénaturation (**T_m**).

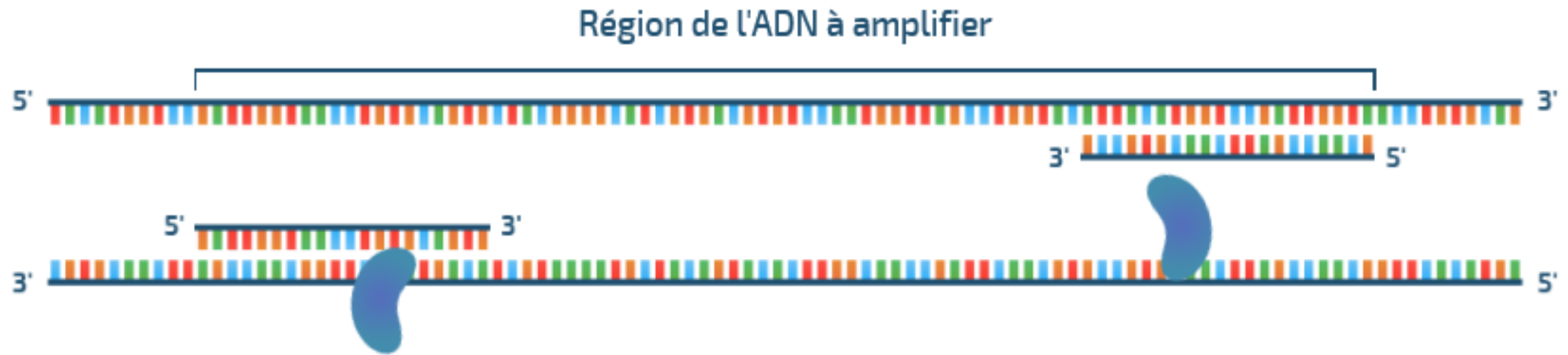
$$T_a = T_m - 5\text{ °C}$$

Nous rappelons que la T_m dépend de la composition en bases de la séquence ADN considérée, selon la formule suivante :

Cycle 1

T_a

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (C + G)$$



Pour réaliser une réaction de **polymérisation** en chaîne, l'ADN polymérase utilisée doit pouvoir résister aux passages répétés à haute température. La Taq polymérase issue d'un organisme thermophile est particulièrement indiquée pour les réactions PCR.

La température de polymérisation de cette Taq polymérase est de 72 °C. Comme toutes les ADN polymérase, elle effectue la polymérisation à partir de l'extrémité 3' OH libre d'une amorce dans le sens de synthèse, 5' vers 3'.

Cycle 1

72 °C

Région de l'ADN à amplifier

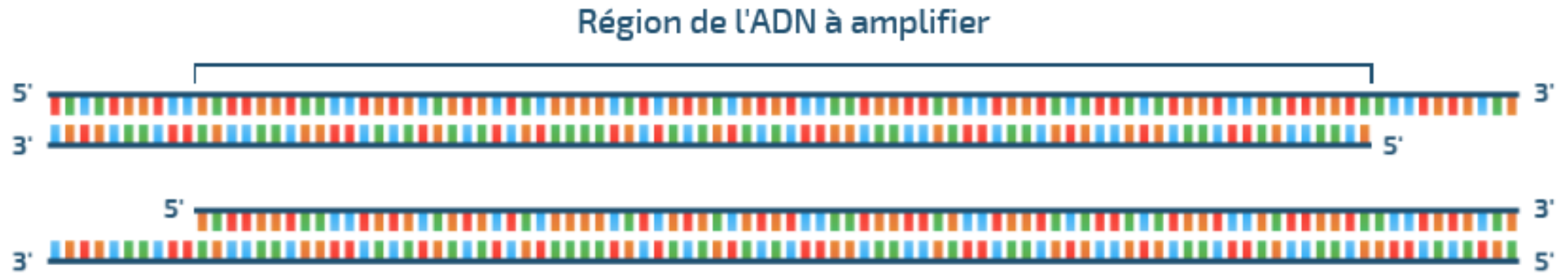


Pour réaliser une réaction de **polymérisation** en chaîne, l'ADN polymérase utilisée doit pouvoir résister aux passages répétés à haute température. La Taq polymérase issue d'un organisme thermophile est particulièrement indiquée pour les réactions PCR.

La température de polymérisation de cette Taq polymérase est de 72 °C. Comme toutes les ADN polymérase, elle effectue la polymérisation à partir de l'extrémité 3' OH libre d'une amorce dans le sens de synthèse, 5' vers 3'.

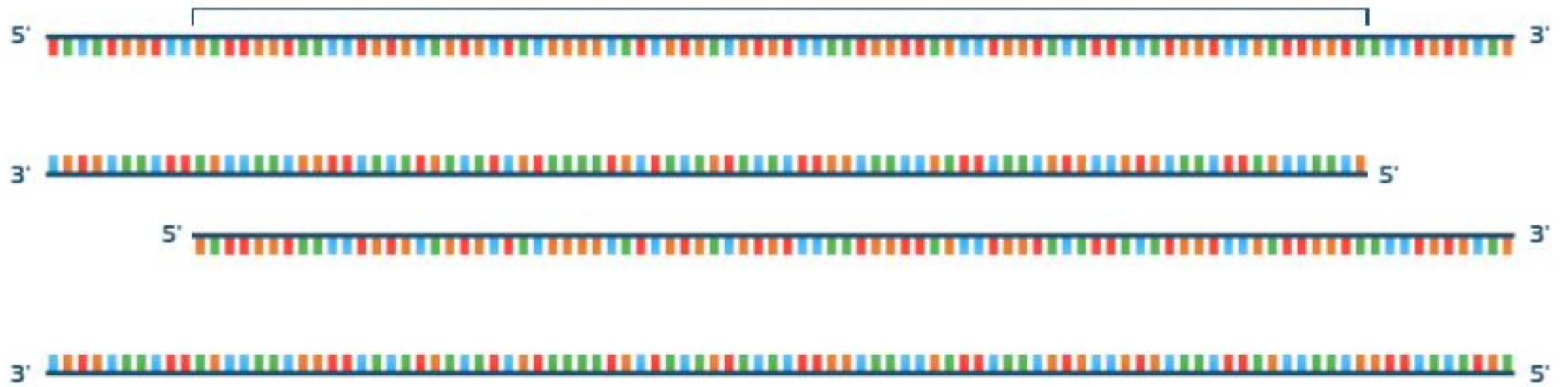
Cycle 1

72 °C



À l'issue du 1^{er} cycle de PCR, nous avons deux types de molécules d'ADN partiellement double brin nouvellement synthétisées. Mais aucun des brins d'ADN ne correspond à la taille attendue.
Un nouveau cycle PCR peut commencer.

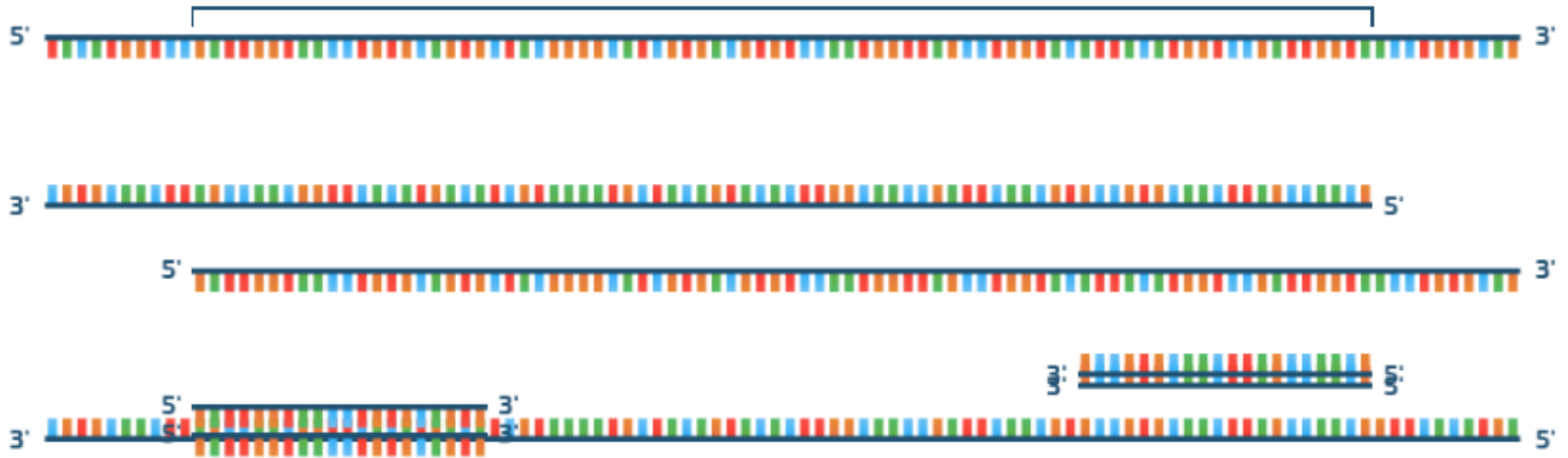
Fin du 1^{er} cycle



- Dénaturation

Cycle 2

95 °C

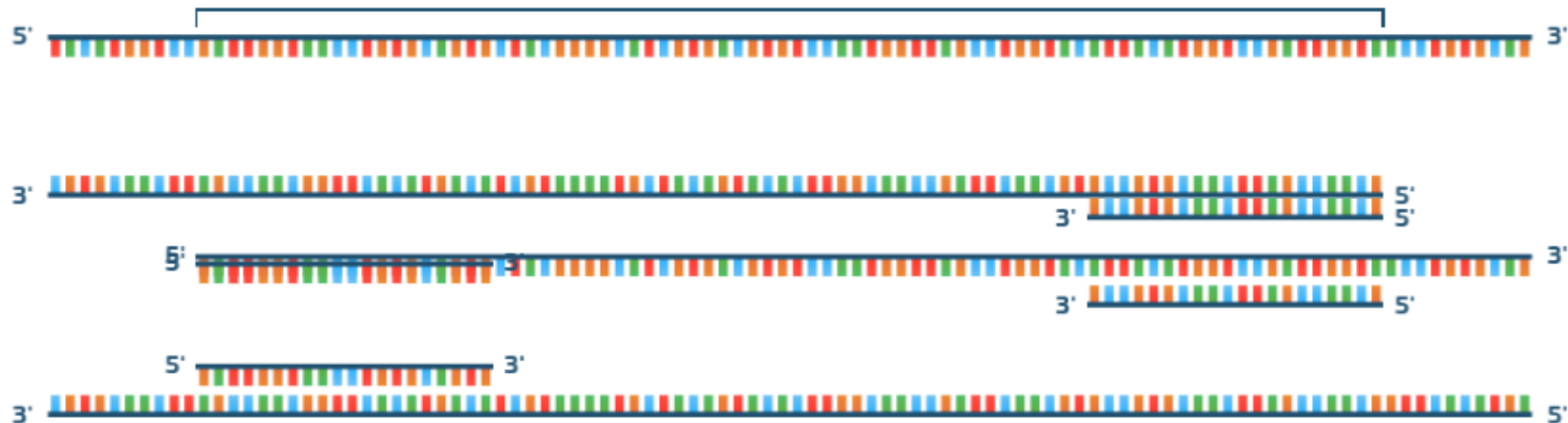


- Dénaturation

- Hybridation des oligonucléotides amorces

Cycle 2

Ta

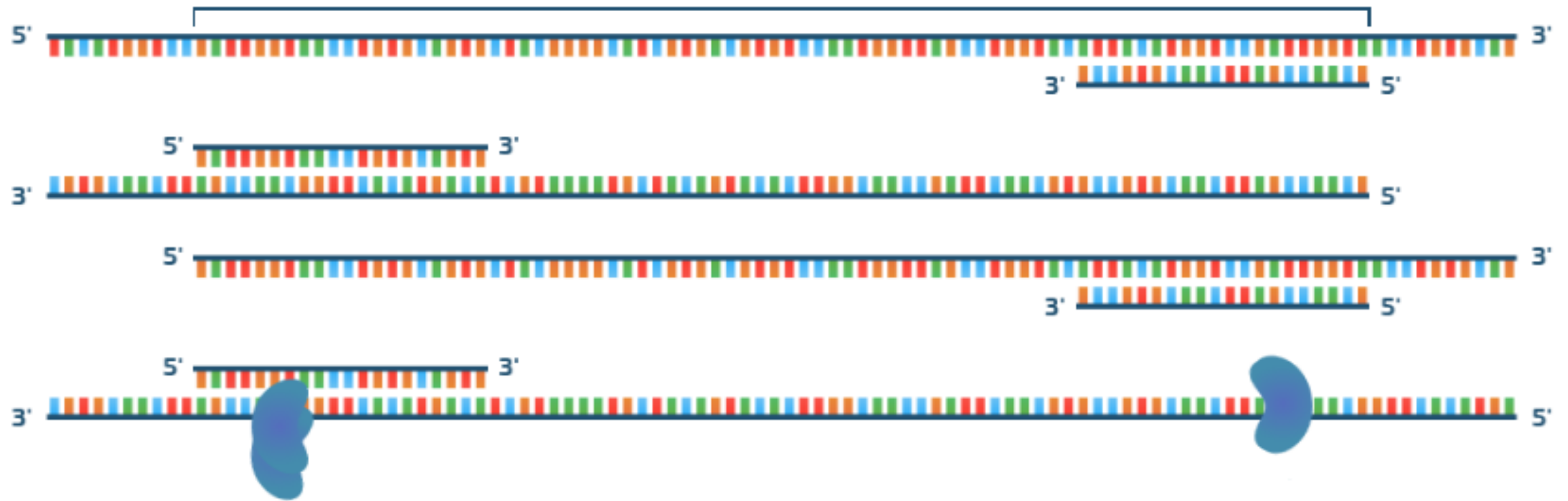


- Dénaturation

- Hybridation des oligonucléotides amorces

Cycle 2

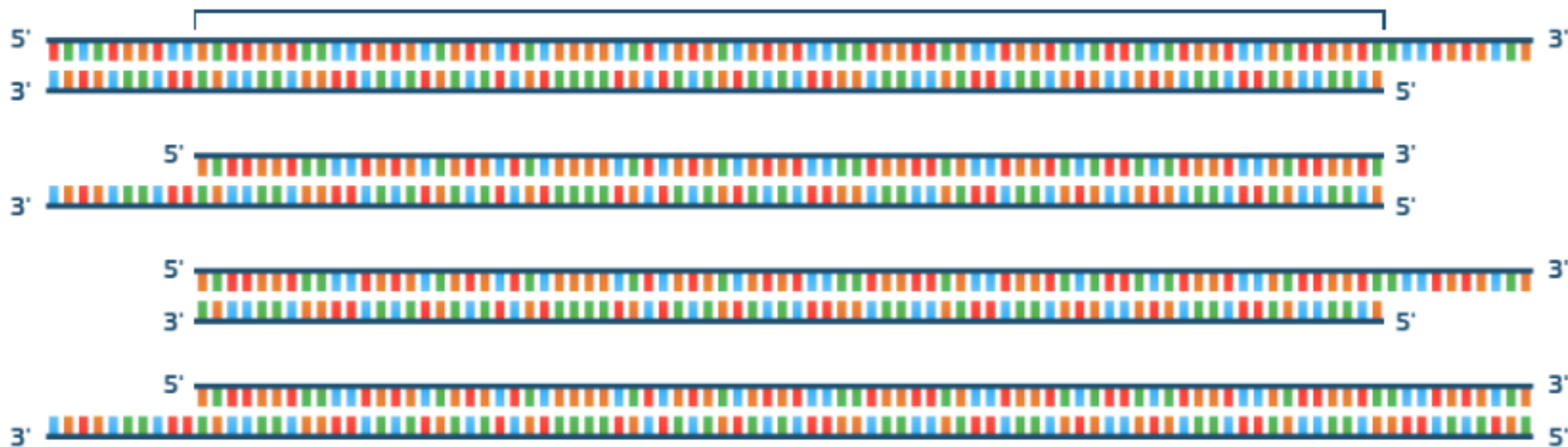
Ta



- Dénaturation
- Hybridation des oligonucléotides amorces
- Polymérisation

Cycle 2

72 °C



Après deux cycles de PCR nous n'avons toujours pas de fragment d'ADN double brin recherché.
Cependant, après la dénaturation du 3^e cycle, nous allons obtenir des brins matrice
(simple brin) qui correspondent à la taille attendue.

Fin du 2^e cycle



- Dénaturation

Cycle 3

95 °C



- Dénaturation

- Hybridation des oligonucléotides amorces

Cycle 3

Ta



Cycle 3

72 °C

- Dénaturation
- Hybridation des oligonucléotides amorces
- Polymérisation



Cycle 3

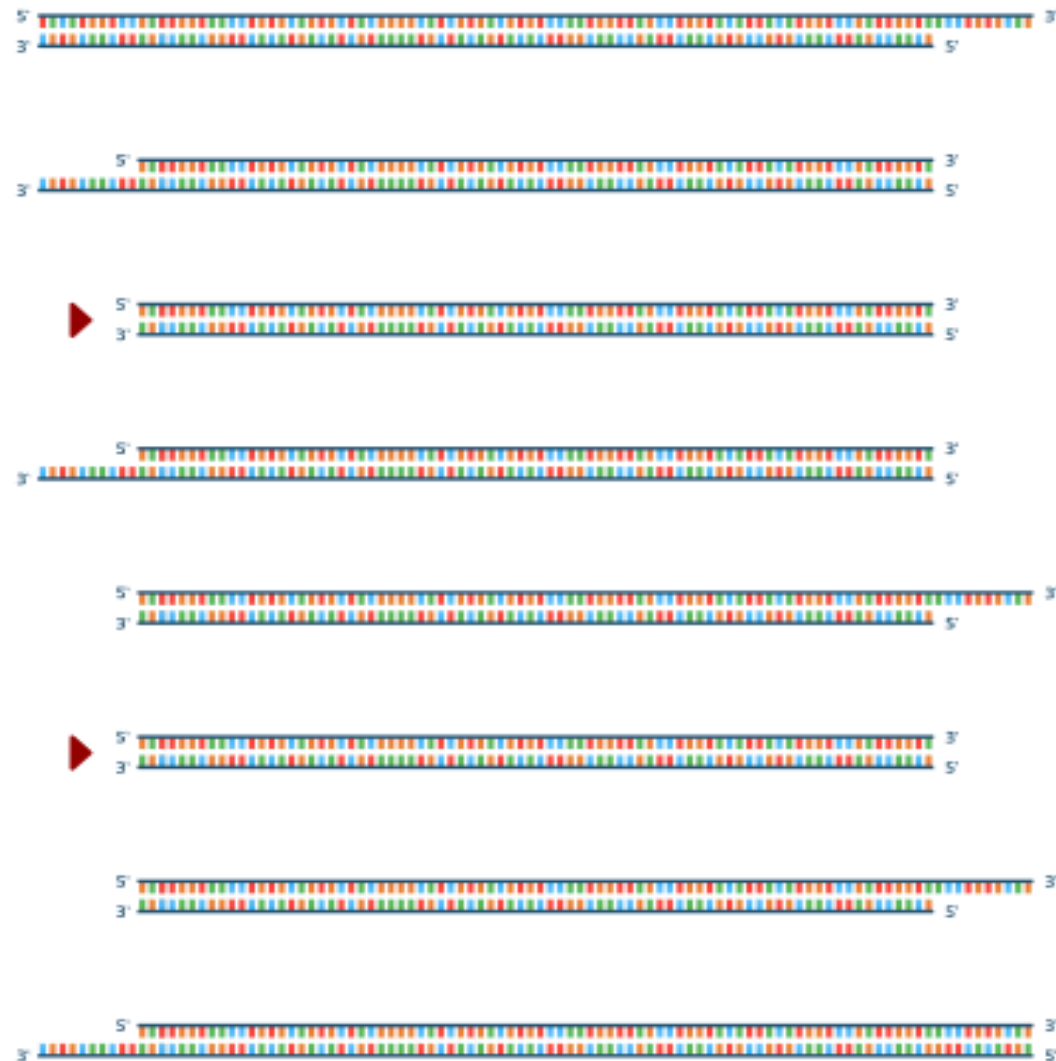
72 °C

- Dénaturation
- Hybridation des oligonucléotides amorces
- Polymérisation

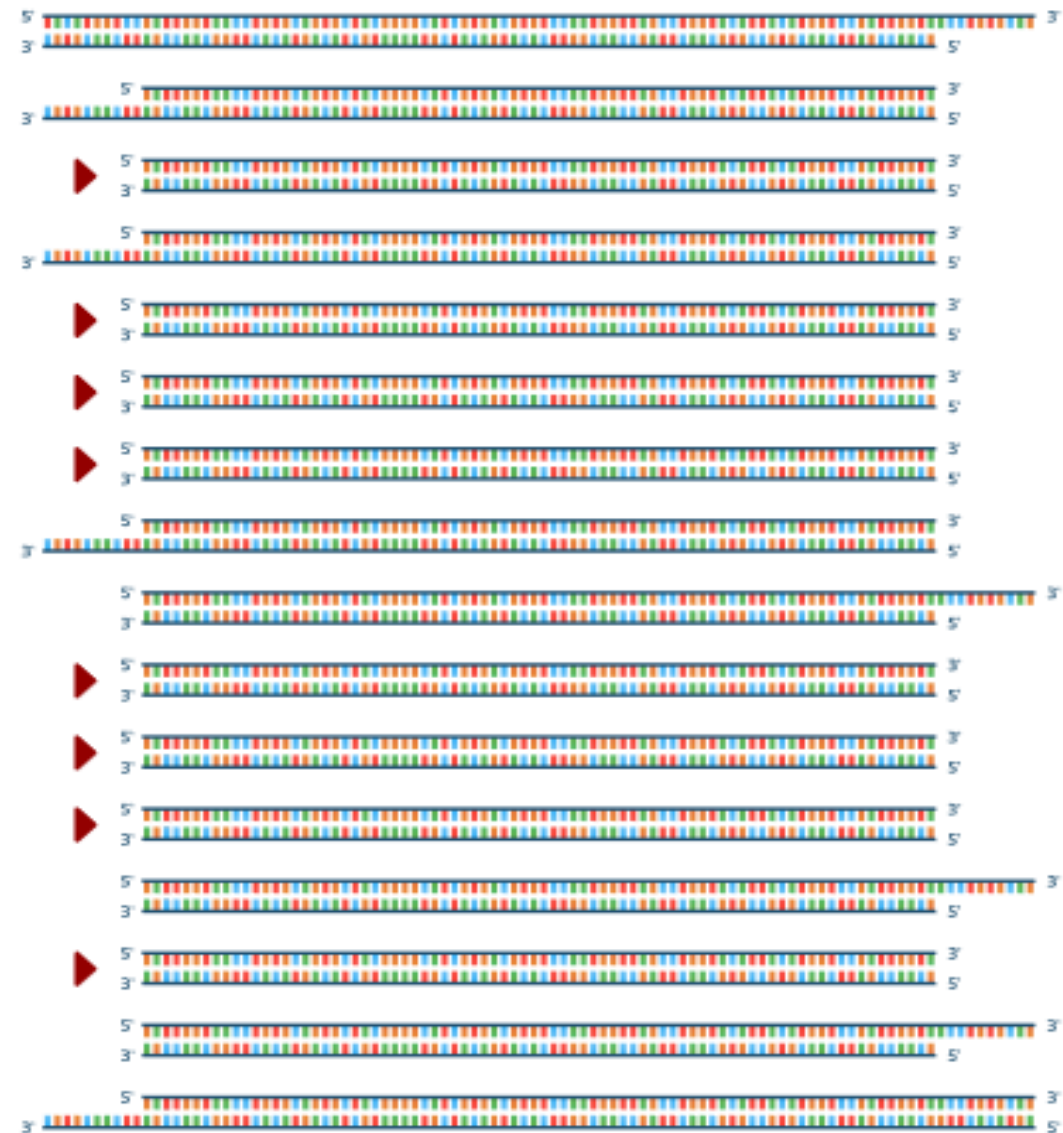


Fin du 3^e cycle

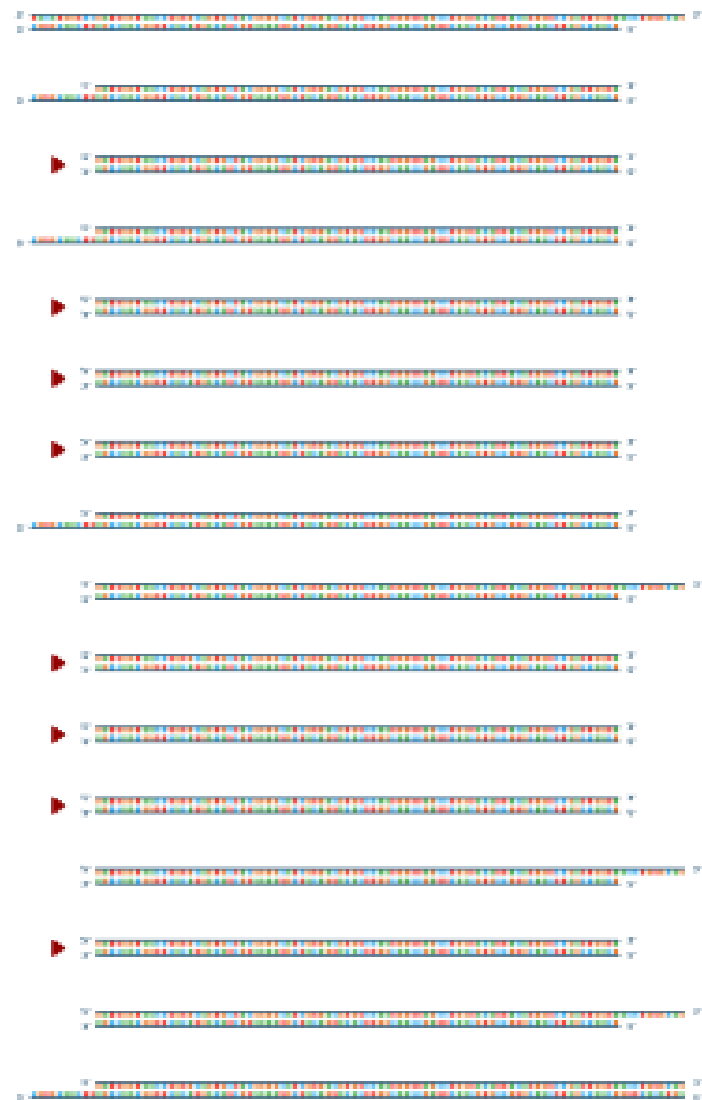
A la fin du 3^e cycle de PCR nous avons 2 molécules du fragment d'ADN double brin de la bonne taille (pour une molécule d'ADN de départ).
 Au cours des cycles suivants il va s'ensuivre une multiplication de ces molécules d'ADN qui suit une loi de croissance exponentielle.



3^e cycle



4^e cycle



4^e cycle



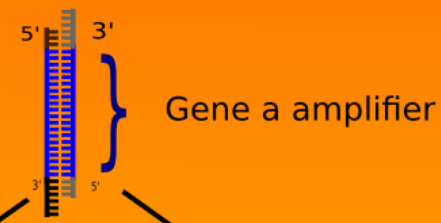
5^e cycle

L'amplification de l'ADN par la PCR

LÉGENDE

Cycle 1

1/ Dénaturation



2/ Hybridation



3/ Élongation



Cycle 2



Cycle 3

