

Techniques d'Analyses de Biologie Moléculaire

Dr. ZIADA-BOUCHAAR H.
MI Génétique moléculaire

Université Frères Mentouri
Constantine

2019-2020

La PCR (polymerase chain reaction)

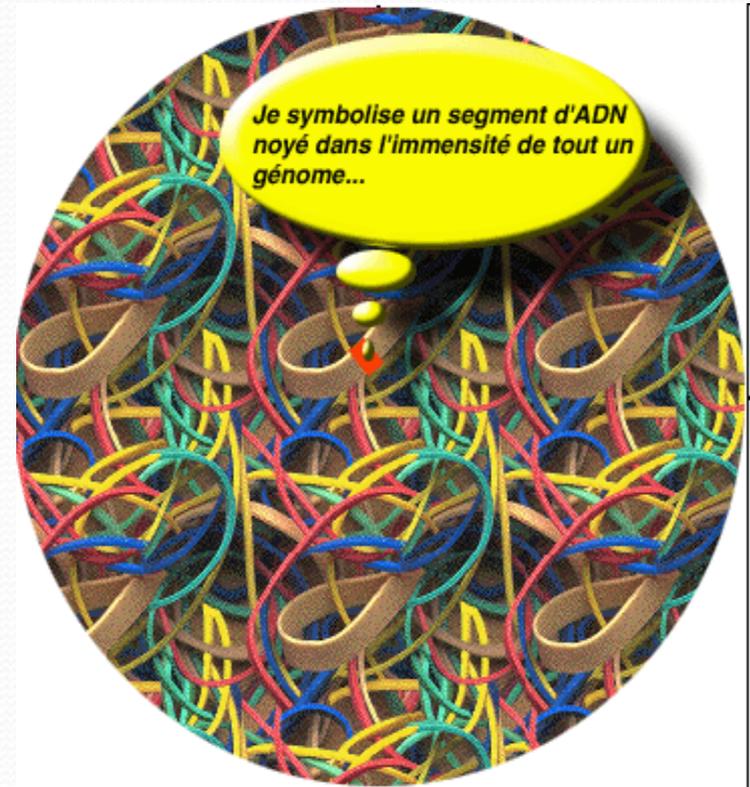


Le plan du cours:

- Introduction.
- Historique.
- Définition
- Principe de travail de la PCR
- Les étapes de la PCR
- les conditions et paramètres de la PCR.
- La réaction de la PCR
- Les applications de la PCR
- Les variantes de la PCR
- Les avantages et les inconvénients de la PCR.

- "chercher une aiguille dans une meule de foin" ?

Chercher à repérer un gène particulier dans un génome entier, qui en contient jusqu'à des centaines de milliers, c'est un peu comme chercher une aiguille dans une meule de foin.



- la technique de **PCR** permet de réaliser cet exploit
- **PCR** est l'abréviation de l'expression anglaise *Polymerase Chain Reaction* (le terme français équivalent, **Amplification en Chaîne par Polymérisation** ou **ACP**, est rarement utilisé).

Définition de la PCR:

- C'est une technique ingénieuse permet de **copier 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.
- Donc c'est une **technique de purification ou de clonage**.

PCR : HISTORIQUE



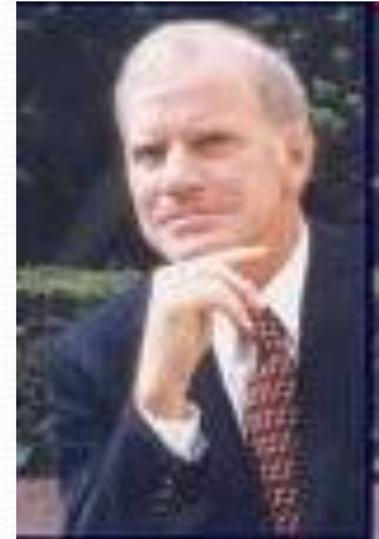
- **1983:** Dr. **Kary Mullis** a developper la PCR
- **1985:** premiere publication de la technologie PCR par la **Cetus Corporation** .
- **1993:** Dr. **Kary Mullis** , **Prix Nobel** de **chimie** pour avoir conçu la technologie **PCR** .





Historique:

- Elle a révolutionné beaucoup de domaines de recherche génétique
- Comme elle est devenue une technologie qui a bouleversé la biologie moléculaire et s'est implantée très rapidement dans les laboratoires (moins de 3ans)



Principe de la PCR:

- Le principe de la PCR s'agit de **réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN** qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température.

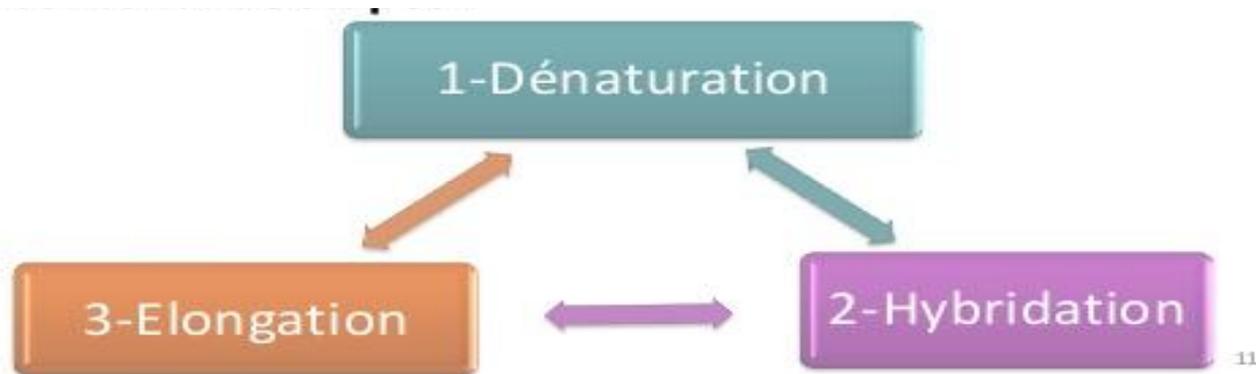
De plus, chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte.

- L'astuce consiste à utiliser les **produits de chaque étape de synthèse** comme matrices pour les étapes suivantes, au lieu de les séparer afin de ne réutiliser que la matrice originale. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.
- En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles. Et chaque cycle est composé de **3 étapes**.

Les étapes de la réaction PCR

▣ Pour avoir répliation d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes:

- (1) Il faut **dénaturer** l'ADN pour obtenir des matrices simple brin
- (2) **borner** et **amorcer** la répliation de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques
- (3) réaliser la réaction de **polymérisation** du brin complémentaire.



Les températures :

sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique :



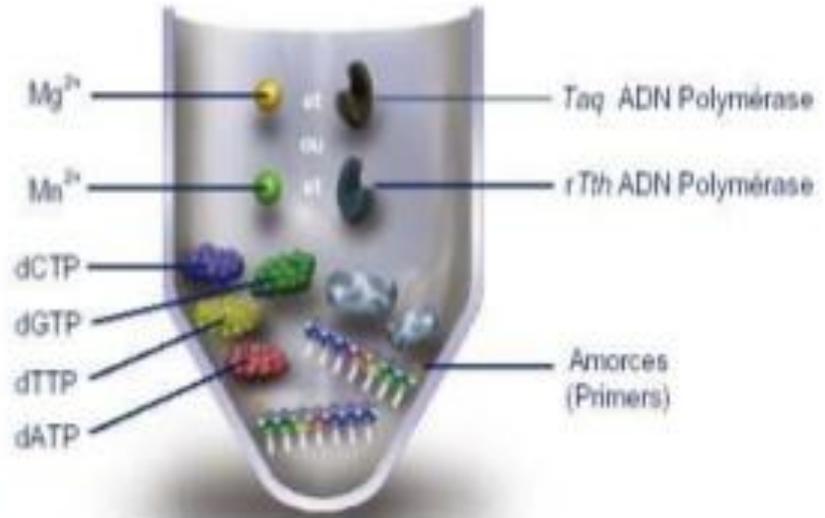
- l'étape de **dénaturation**, est réalisée à environ 95°C,
- l'étape d'**hybridation** se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C).
- l'étape de **polymérisation** est à environ 72°C, température de « travail » de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée.

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont **fixes**, seule la **température d'hybridation** devra **être calculée** pour chaque nouvelle PCR.

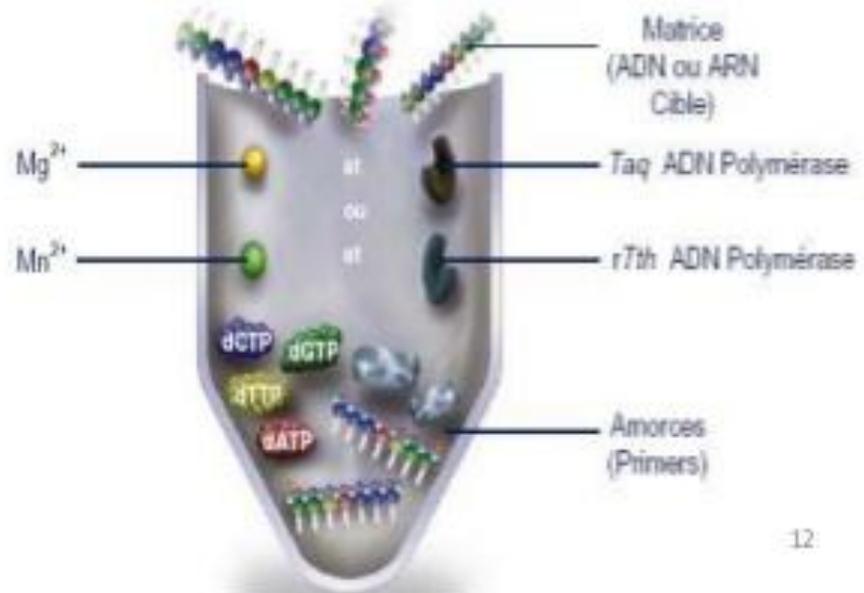
Cette température d'hybridation dépend de la composition en bases des oligonucléotides amorces

Milieux réactionnel :

- dNTP
- Magnésium
- ADN polymérase
- Deux types d'amorces



On ajoute en suite l'ADN extrait du milieu biologique à étudier au mix :



PCR

OPTIMISATION

Composants de la réaction et leur influence sur l'amplification :

l'enzyme: ADN
polymérase
thermostable

Température de
fusion

Les amorces sens
et anti sens

Agents chimiques

Magnésium :
MgCl₂

Ces deux derniers composants définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme

Conditions et paramètres de PCR

- **Amorces:**

le choix des amorces est crucial.

Elles vont avoir un **double rôle** :

- en s'**hybridant** à l'ADN matrice, elles **délimitent** la région d'ADN à amplifier et avec leur extrémité 3' OH libre servir d'amorce pour l'ADN polymérase (étape 3 du cycle).
- On les obtient grâce à la **synthèse chimique d'ADN** qui permet d'obtenir des oligonucléotides dont l'extrémité 5' n'est pas phosphorylée (5'OH) contrairement aux ADN "dits" naturels.



OPTIMISATION

Les amorces sens et anti sens

- Des **logiciels** permettent de définir rapidement des amorces dans une **séquence donné** : **Primer 3'** (logiciel libre disponible sur internet)
- <http://simgene.com/Primer3>
- **Taille** : 20 a 30 nucléotides
- **Amorces** : séquences **exactement complémentaires** du fragment a amplifier .
- **les séquences** des deux amorces du même couple doivent présenter le **maximum de divergences** et plus particulièrement à l'extrémité **3'** , afin d'éviter leur **hybridation**.
- Eviter la **présence d'autocomplémentarité** : hybridation de l'amorce sur elle-même .

OPTIMISATION

Les amorces sens et anti sens

- Composition en base; **riche à 50 - 60% GC**
les amorces devraient avoir des Tms équivalents (1°)

$$T_m = [(A+T) \times 2 \text{ °C}] + [(G+C) \times 4 \text{ °C}]$$

Formule aproximative , valable pour des amorces inferieurs a 25 nucléotides.

OPTIMISATION

l'enzyme: ADN polymérase thermostable

- ❖ Actuellement on utilise **la taq polymérase** « eubactéries » extraite de bactérie (*Thermus aquaticus*) vivant dans les sources chaudes.
- ❖ T° optimale = **72°** (70-75°)
- ❖ Capable de résister a **de fortes T°** ce qui a permis l'**automatisation** de la procédure.
- ❖ **La quantité l'enzyme:** 0,2-0,5... 1U (risque de bandes parasites , si la quantité est importante)
- ❖ Pas d'activité **exonucléasique 3' – 5'**.

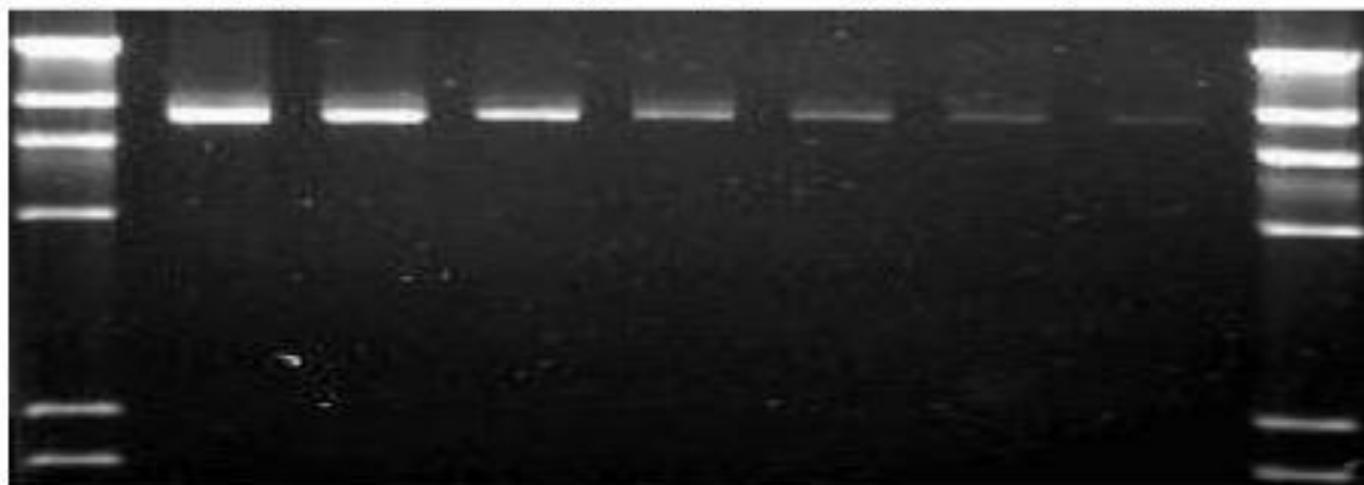
OPTIMISATION

Magnésium : MgCl₂

valeur comprise entre **1.5 mM** et **2 mM** le Mg²⁺ influence **l'activité de l'enzyme** , augmente la stabilisation du **double brin** et élève le **T_m**.

Pour **optimiser une PCR** il est nécessaire de faire une **gamme de MgCl₂**.

1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 mM



- **Les DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates**
(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Les dNTPs (**Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates**) sont des molécules de base, qui constituent l'**ADN**, utilisés par la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'**ADN** complémentaire.

ADN Matriciel:

- Avant la réaction de PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules, fossile...).
- Puis, cet extrait purifié en ADN, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en PCR.
- **En théorie une copie** ADN de la séquence recherchée est suffisante pour avoir une amplification.
- Mais Dans **la pratique plusieurs copies** sont nécessaires pour avoir un résultat correct. Mais attention, la mauvaise qualité et/ou une quantité trop importante d'ADN matriciel peut conduire à une amplification aspécifique.

OPTIMISATION

Agents chimiques

- **Le DMSO (2-10%)** (sulfoxyde diméthylrique) aide souvent l'amplification de fragments de + de 1kb.
- **La formamide (1-5%)** peut apparamment améliorer la spécificité de la PCR , diminue les amplifications parasites .
- **Le glycérol (2-10%)**, améliore l'amplification des échantillons (G+C) élevés et protège la Taq contre la dégradation par la chaleur.
- **Le polyéthylène glycol 6000 (5-15%)** peut être un additif utile quand la concentration de l'échantillon d'ADN est très basse , améliore l'efficacité d'amplification.

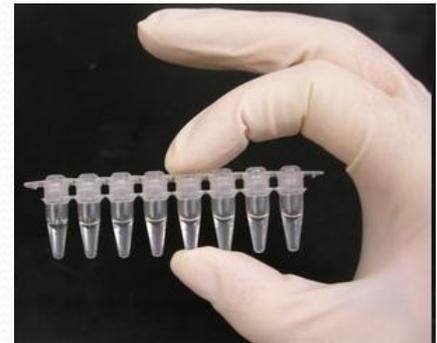
Le thermocycleur

- Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : **un thermocycleur**.
- Cet appareil permet d'exposer les tubes à des **températures choisies** et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).



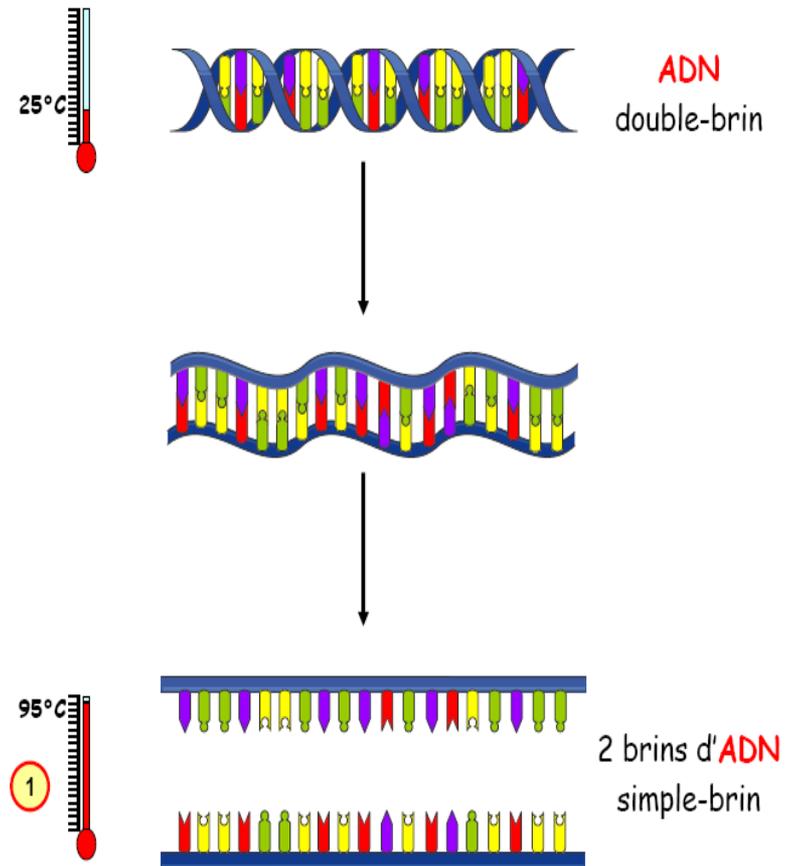
La réaction de la PCR

- Une PCR classique se déroule dans un petit tube lui même placé dans un thermocycleur.
- On met tous les « acteurs » de la PCR sont introduits dans le même tube. Il s'agit **de l'ADN à amplifier**, des oligonucléotides (**ou amorces**), spécifiques du segment d'ADN voulu, de la **Taq polymérase** et enfin du mélange des **quatre désoxyribonucléotides** constitutifs de l'ADN.
- Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN.
- Et le 1^{er} cycle commence avec ses 3 étapes



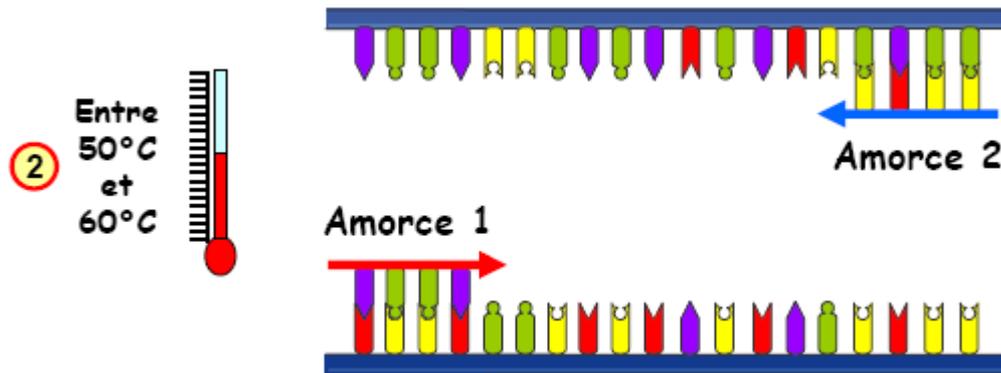
La dénaturation:

- La température dans le tube est réglée à 95°C .
- A cette température, les **liaisons faibles** qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont **rompues** pour donner deux simples brins d'ADN. Alors l'ADN se dénature



L'hybridation:

- la température est **descendue** à la température dite **d'hybridation**. Cette dernière est généralement comprise entre **50°C et 60°C** et elle est fonction de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) des amorces.
- Les **amorces reconnaissent et se fixent** à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On dit que :

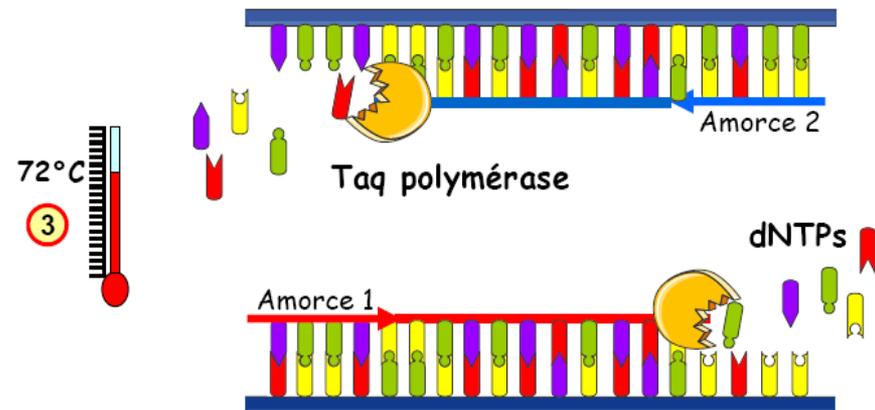


L'élongation:

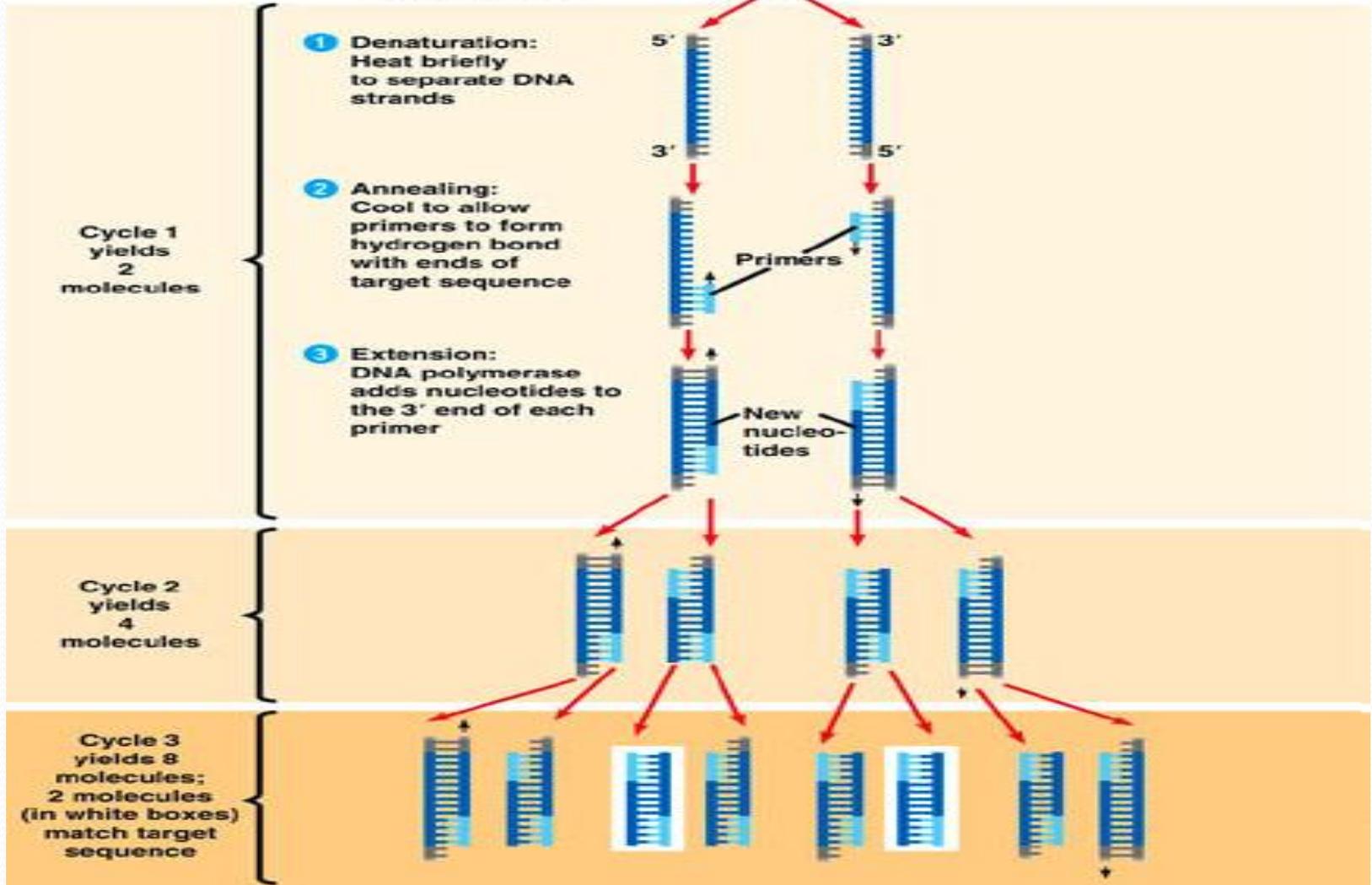
- Puis la température est réglée à **72°C**, température idéale pour l'activité de la Taq polymérase.
- Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ, à la **polymérisation** du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice.

La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice.

- **Mais on remarque** que la polymérisation ne s'arrête pas lorsque la copie est de la longueur souhaitée. La copie de l'ADN initial génère donc des copies plus longues que souhaité

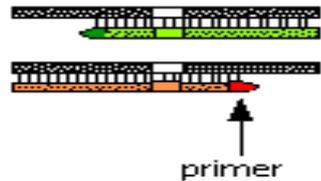
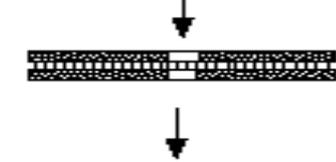


- Au cycle suivant, **les nouveaux fragments synthétisés servent à leur tour de matrice** pour la synthèse de nouveaux fragments d'ADN.
- En théorie, à la fin de chaque cycle la quantité d'ADN cible est doublée.
- Le premier cycle est fini et voilà qu'un nouveau cycle recommence. Cela se reproduira 30 fois (en fonction du protocole de PCR) comme vous pouvez le voir sur le schéma.
- A partir d'une copie d'ADN cible, on pourra donc obtenir 1 milliard de copie d'ADN cible.
- Les brins longs continuent leur accumulation de façon linéaire car ils ne sont générés qu'à partir de l'extension des amorces sur l'ADN initial. Or la quantité d'ADN initial est fixée au départ et n'évolue pas.
- Par contre, les brins courts apparus à la fin du troisième cycle s'accroissent de façon exponentielle car chaque brin nouvellement formé sert de matrice lors du cycle suivant. L'ADN court sera très largement majoritaire à la fin de la PCR.



POLYMERASE CHAIN REACTION

DNA region of interest.



primer

1. DNA is denatured. Primers attach to each strand. A new DNA strand is synthesized behind primers on each template strand.

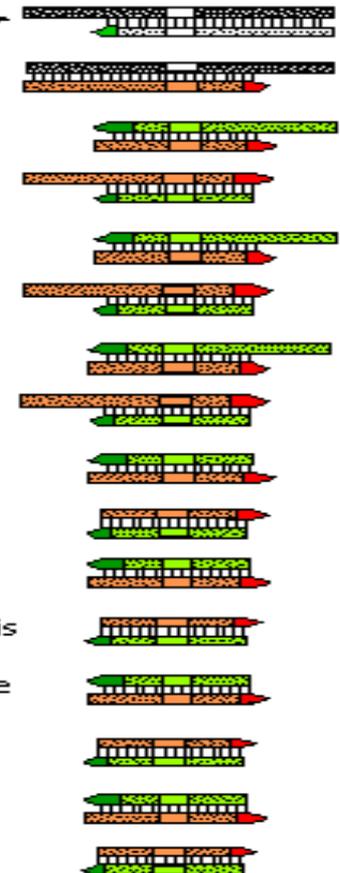


2. Another round: DNA is denatured, primers are attached, and the number of DNA strands are doubled.

3. Another round: DNA is denatured, primers are attached, and the number of DNA strands are doubled.



4. Another round: DNA is denatured, primers are attached, and the number of DNA strands are doubled.



5. Continued rounds of amplification swiftly produce large numbers of identical fragments. Each fragment contains the DNA region of interest.

Les applications de la PCR

- La PCR est très couramment utilisée dans de nombreux domaines: Ses champs d'application sont variés :
- **Biologie moléculaire:**
- Travaux de recherche fondamentale ou de multiples applications routinières. dans différents cadres pédagogiques ou biotechnologiques
- **Médecine:** pour diagnostiquer des maladies génétiques (**myopathie, mucoviscidose**, etc), diagnostic de maladies infectieuses: des infections virales (SIDA, Hépatite C, SRAS, corona)ou bactériennes (tuberculose) ou parasitaires (**toxoplasmose**), mais aussi d'anomalies génétiques : différentes mutations dans le cancer et autres affections.
- **En médecine légale:** pour identifier une personne par son empreinte génétique dans le cadre d'une enquête judiciaire,
- pour un test de paternité.

- **En agroalimentaire:** pour identifier des variétés ou des espèces végétales et animales, pour sélectionner de nouvelles variétés de fruits et légumes, comme la tomate
- pour le contrôle de la qualité des produits agroalimentaires, détecter la présence d'**OGM** dans un aliment par exemple.

- **En histoire:** pour des **études phylogénétiques** sur des squelettes fossiles (**ADN** fossile), rechercher les liens de parenté entre les individus.
- pour l'étude des migrations des populations humaines et animales (en Islande, les indiens d'Amérique),
- pour la détection d'infections virales, bactériennes et parasitaires sur des momies égyptiennes et andines (par exemple H-C Li et son équipe ont montré la présence du virus HTLV-1, à l'origine du **SIDA**, dans des momies de la Cordillère des Andes datant de plus de 1500 ans).

Les avantages et les inconvénients de la PCR:

- **Les avantages:**

- Pouvoir travailler sur une toute petite quantité de matériel biologique (sensibilité)
- Pouvoir travailler sur de l'ADN dégradé
- Pouvoir discriminer entre différentes cibles (spécificité)
- La rapidité
- La capacité d'analyse

- **Les inconvénients**

- Problèmes de contamination
- Problème de la présence d'inhibiteurs

Les variantes de la PCR

La **PCR quantitative** (ou QPCR), ou **PCR en temps réel**:

La PCR en temps réel (*Real-time PCR*) est une révolution dans l'utilisation de la PCR, cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet par son principe de faire des mesures quantitatives (expliquant l'appellation PCR quantitative, *qPCR*) mais elle nécessite des thermocycleurs particuliers.

historique

- 1992 : Russell Higuchi qui analyse la cinétique de la PCR « en temps réel »

Principe de la PCR en temps réel

- Amplification et détection synchronisée
- Système fermé, pas de manipulation post amplification, faible risque de contamination
- Basée sur détection d'un rapporteur fluorescent :
 - Génération de fluorescence :
 - Agent se liant à l'ADN double brin : SYBR Green I
 - Sondes marquées (FRET, Taqman, Molecular beacons)
 - Signal proportionnel à la quantité d'amplicons

Appareil utilisé:

- Se réalise dans un thermocycleur rapide couplé à un spectrofluorimètre piloté par un ordinateur exp :

LightCycler, Roche :



Thermocycleur modifié pour stimuler l'émission des échantillons par rayonnements UV

- Détection de la fluorescence par une caméra CCD (*charge-coupled device*)



La réaction

Master Mix

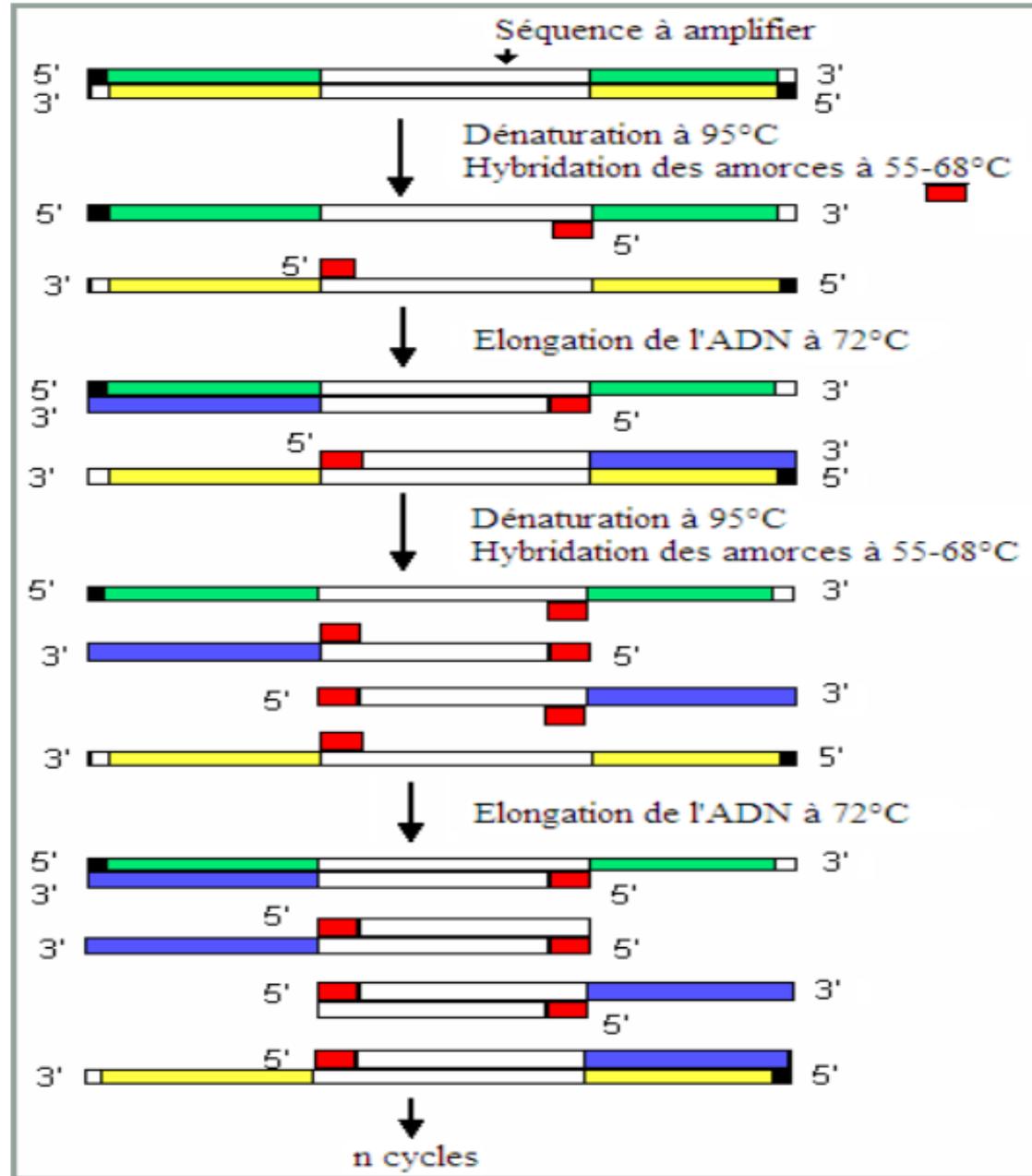
(Taq polymérase,
dNTPs, amorces,
MgCl₂, H₂O,
SYBR Green ou
sondes fluorescentes)

+

**ADN
à amplifier**

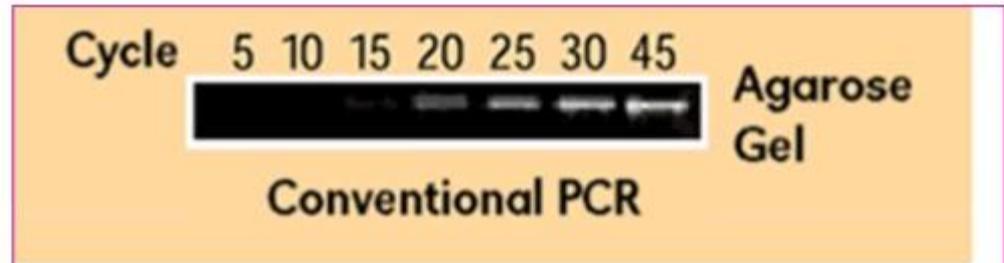
Etapes de PCR en temps réel

A la différence d'une PCR classique, la PCR en temps réel utilise une sonde fluorescente qui permet la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé en temps réel

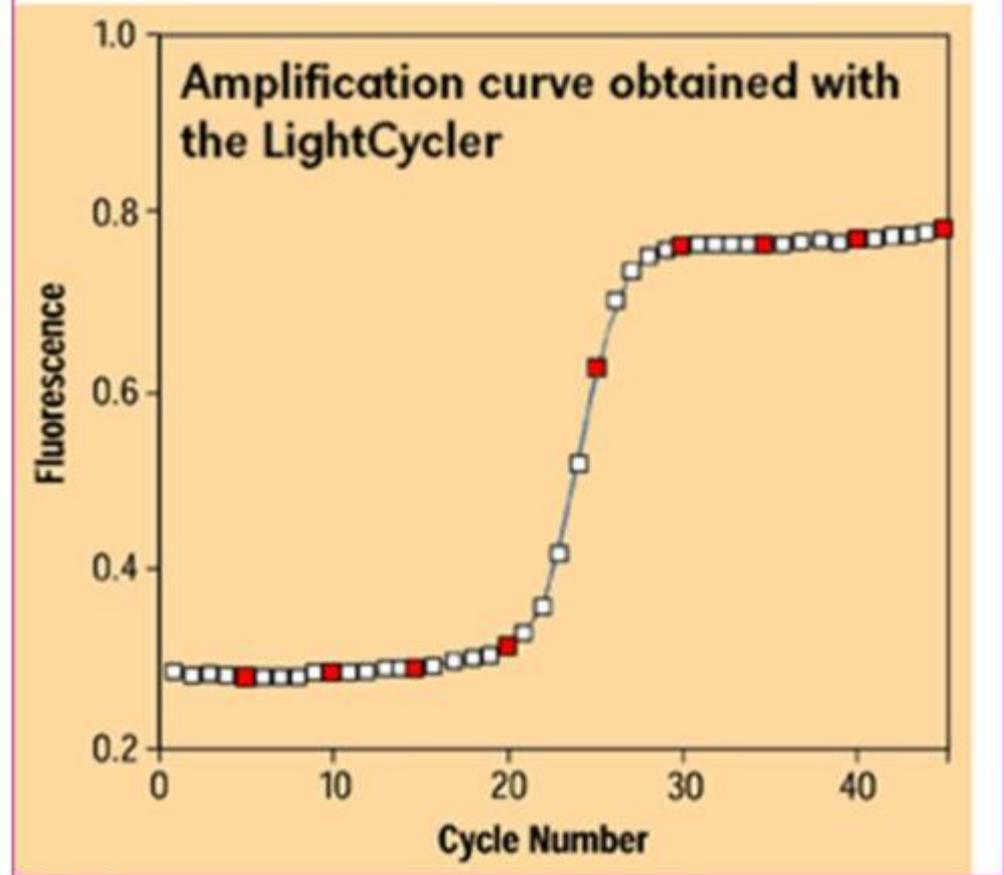


PCR et PCR en temps réel

PCR conventionnelle
Gel d'agarose



PCR temps réel
Le suivi
Courbe de fluorescence



Cinétique : 3 phases
initiation, exponentielle, plateau

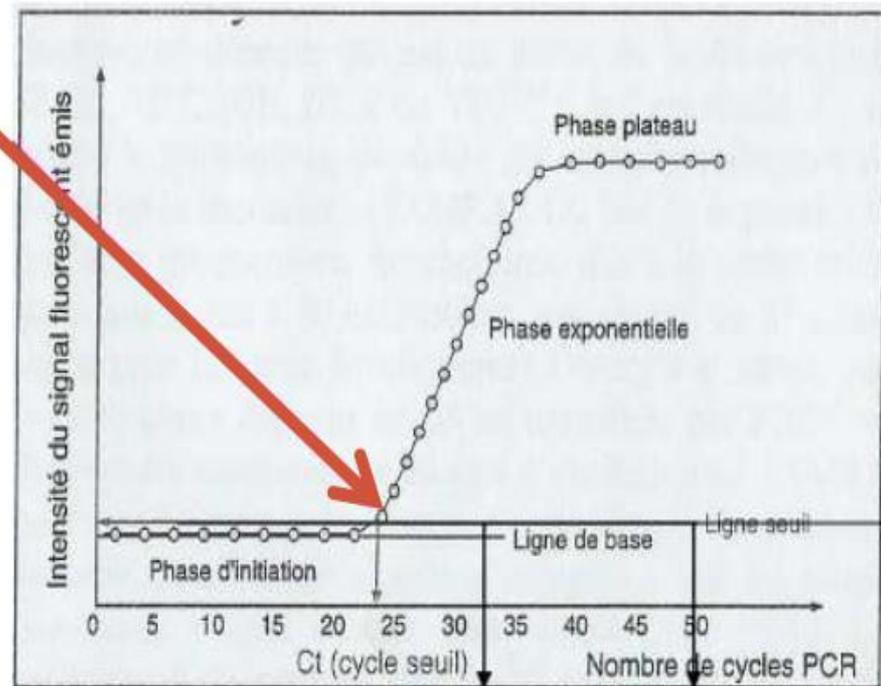
Construite à partir plusieurs points
d'amplification
(intensité fluorescence/nbre cycles)

QUANTIFICATION

- Ligne de base : bruit de fond de fluorescence
- Ligne seuil : au dessus de laquelle la variation de fluorescence suit une loi exponentielle
- **Cycle seuil** ou **Ct** ou **Cp** :

Point d'intersection de la courbe PCR avec la ligne seuil et qui est directement lié à la quantité de cible dans l'échantillon

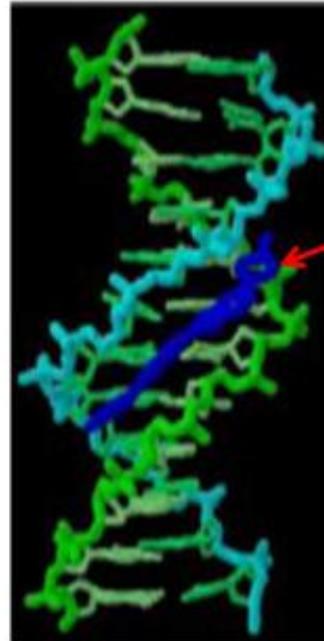
Nb de cycles d'amplification nécessaire pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif par rapport au bruit de fond (valeur seuil)



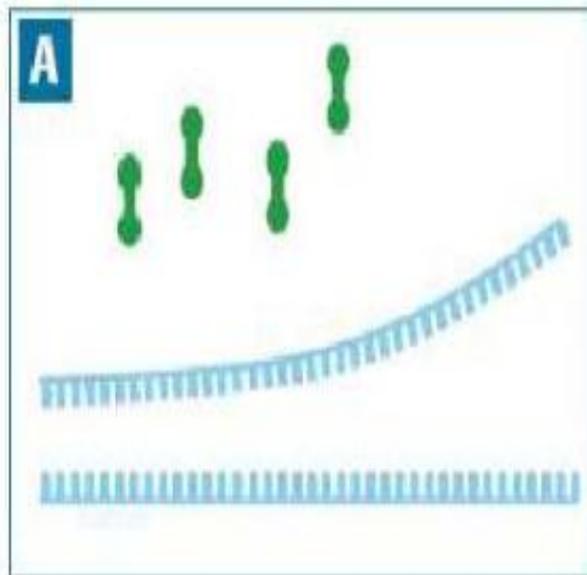
Génération de fluorescence au cours de l'amplification par :

1. Emission de fluorescence par un agent intercalant (ex : SybrGreen[®])
2. Fluorescence par transfert d'énergie de résonance (FRET)
3. Libération de fluorescence par :
 - l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase (ex : TaqMan[®])
 - l'hybridation d'une sonde (ex : Molecular Beacon[®])

1. Emission de fluorescence par un agent intercalant (ex : SybrGreen[®])

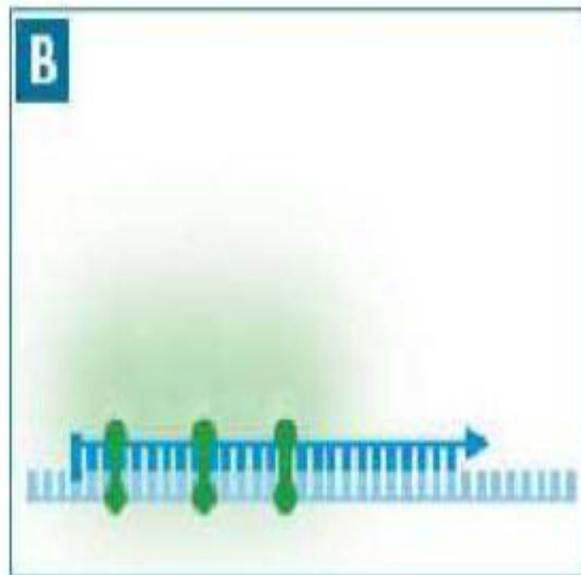


Le SybrGreen
est un
fluorophore
s'intercalant
dans le petit
sillon de
l'ADNdb



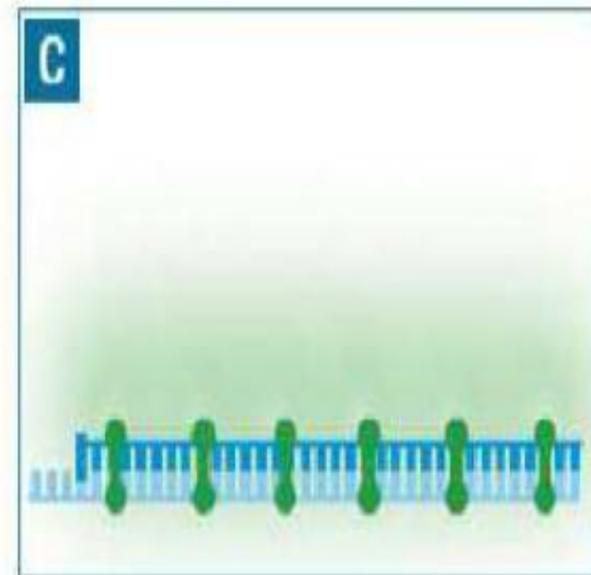
Dénaturation

Le SG I est libre dans le milieu et ne fluoresce pas



Hybridation

Le SG I peut s'intercaler dans la structure double brin, change de conformation et émet de la fluorescence



Fin d'élongation

Le SG I est totalement intercaler dans l'amplicon, proportionnalité entre la fluorescence émise et la quantité d'ADN.

- Se lie à ADN par mécanisme de liaison non défini, émission de fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin
 - En solution émet peu de fluorescence
 - Durant élongation, se fixe sur ADN double brin naissant entraînant augmentation de fluorescence ; émission décroît lorsque ADN est dénaturé à l'étape suivante
 - Émission de fluorescence mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation
 - Spécificité repose entièrement sur les amorces

Avantages et limites

Avantages

- Sensible pour les cultures bactérienne surtout
- Obtention des souches : analyse phénotypique, antibiogramme
- Large spectre d'infection mise en évidence
- Faible coût

Limites

- Micro-organismes à croissance lente et/ou difficile voire impossible (bactéries intracellulaires)
- Perte de viabilité durant le transport des prélèvements
- Traitement préalable par des antibiotiques

⇒ **Alternatives : méthodes moléculaires**

- Il ne faut surtout pas la confondre avec la RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*), on préférera donc les appellations PCR quantitative ou *qPCR*. Certaines expériences en PCR compétitive ou PCR radioactive permettent l'obtention de mesure quantitative exploitable.

La RT-PCR

La RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) est une technique qui associe une transcription inverse (RT) suivie d'une PCR.

Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse).

Cet ADNc est généralement destiné à être amplifié par PCR (l'ADNc étant plus stable, il permet plus de liberté que les ARN pour les analyses suivantes).

Reverse transcription- PCR .

- **PCR** : amplification de fragments d'ADN

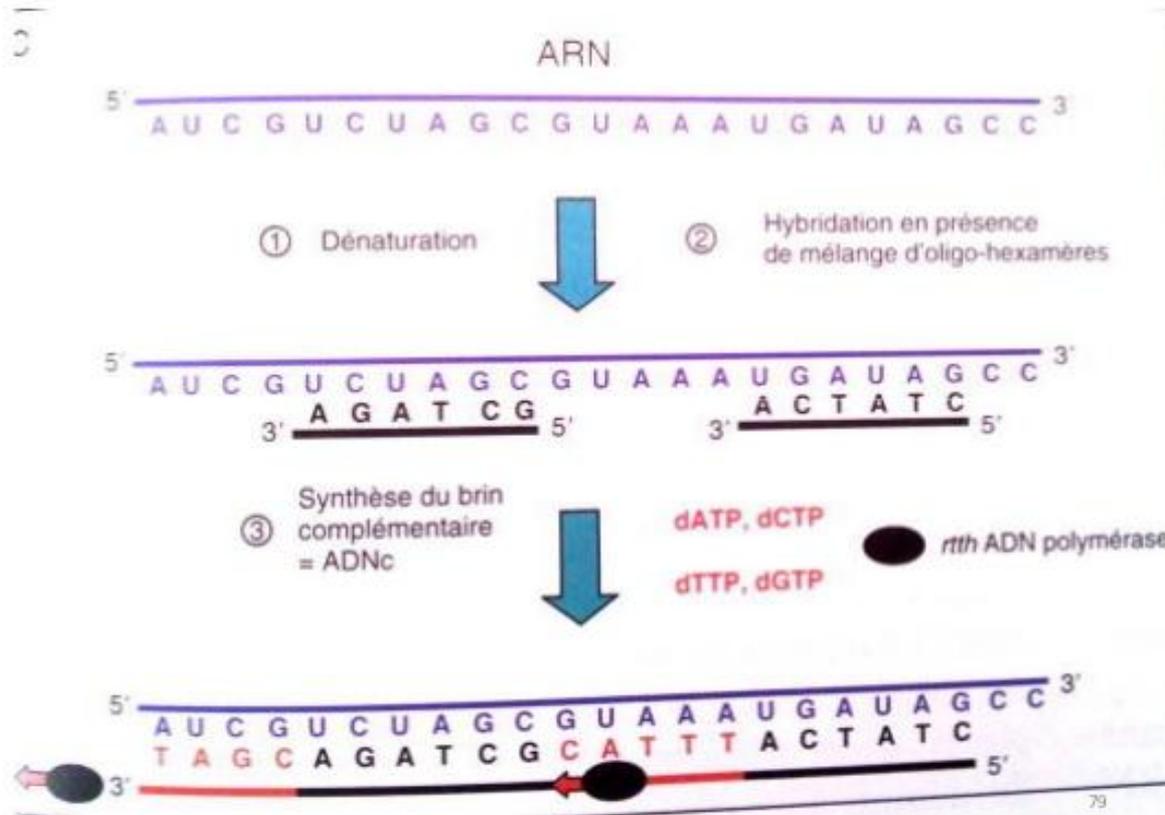
ARN --- reverse transcription ----- **ADN c** ---- **PCR**

L'ensemble des deux réaction : **RT- PCR**

Principe : une transcriptase inverse (**ADN polymérase ARN directed**) transforme l'ARN messenger , viral, ribosomal en ADN. Celui-ci pourra être amplifié par PCR.

La reverse transcriptase nécessite également la présence **d'amorces** hybridés a la cible .

Reverse transcription- PCR .



- La RT-PCR se déroule en deux phases. Une première phase correspond à la copie d'ARN messenger en ADN complémentaire (ADNc) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur le ADNc synthétisé.

.

- Dans la première phase, l'ARN messager à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul mARN auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme de ADNc simple brin), une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension.

- L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique.
La technique RT-PCR a permis de montrer que la transcription de tous les gènes s'effectuait dans tous les tissus et ceci même pour les gènes qui présentent une très grande spécificité tissulaire.

Reverse transcription- PCR

- Enzyme : **Tth polymérase** : **Thermus thermophilus polymérase** : ADN polymérase thermostable avec une activité reverse transcriptase intrinsèque : (**ARN 1kb**)

Activité ADN polymérase
Activité exonucléasique 5'-3'
Pas d'activité 3'-5' , Mg
Température optimale : 70 °C

Activité ADN polymérase
ARN directed ,
Mn(MnSo4)
Température optimale :
60 °C *

*60°C : déstabilisation de la structure secondaire des ARN ; meilleur rendement et hybridation plus spécifique .

Reverse transcription- PCR

- **Avantage** : Tth Polymérase : **un seul mix** , diminution du risque de contamination .
- **Limites** : lors de la contamination par de l'**ADN génomique** (une amplification **préférentielle** de l'ADN est possible)
- Traiter l'ARN avec **une Dnase**.
- **Emploie**:
 - détermination **qualitative** de l'expression d'un gène ARNm.
 - étude des rétrovirus (HIV)
 - suivie de cancer (RNA m unique)