

# Polymerase Chain Réaction

Page facebook ; Domaine SNV : Biologie,Agronomie,Science Alimentaire,Ecologie

[www.facebook.com/DomaineSNV/](https://www.facebook.com/DomaineSNV/)

**Module : génie génétique**  
**Responsable de module**  
**M: HAMDOUCHE**

# INTRODUCTION

- **Biologie moléculaire** : problème quantitatif .
- **Techniques d'amplifications** (progrès très rapide dans le domaine de la biologie moléculaire ces **20 dernières** années)
- **Répétition de réplifications IN VITRO**
- **PCR** : en moins de **3ans après** sa description , tout les laboratoires de biologie moléculaire l'utilisait .



# AMPLIFICATION GENIQUE

Multiplication Exponentielle d'un  
fragment d'ADN cible

↓  
grande quantité de fragments identiques

# Amplification de cibles PCR

- Amplification **in vitro** d'une petite quantité d' **ADN cible**
- le produit de l'amplification fera l'objet de **tests ultérieurs**. (**Post PCR**)
- Méthode **simple, rapide, sensible** ,nécessitant des ingrédients simples et **quelques heures** de travail.
- Outil de base à **différentes techniques de biologie moléculaire**.



## PCR : HISTORIQUE

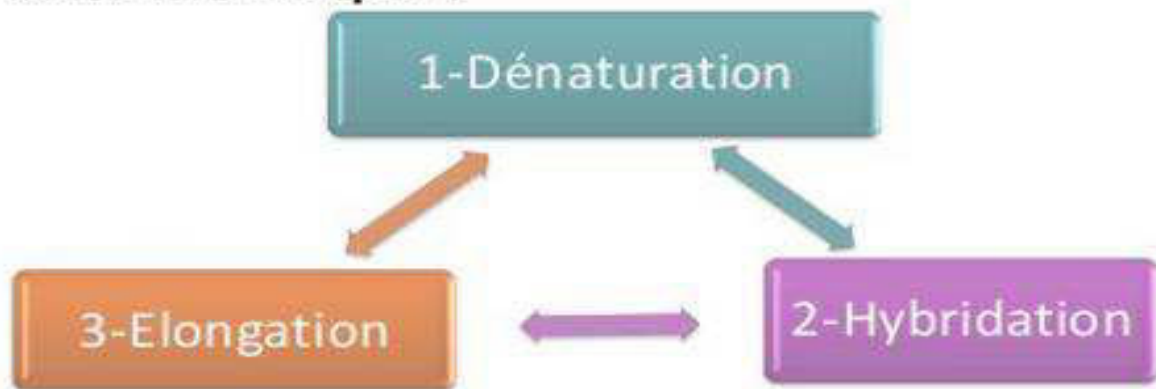


- **1983:** Dr. **Kary Mullis** a developper la PCR
- **1985:** premiere publication de la technologie PCR par la **Cetus Corporation**.
- **1993:** Dr. Kary Mullis , **Prix Nobel** de **chimie** pour avoir conçu la technologie **PCR**.



# PCR classique

- Basé sur la capacité de **l'ADN polymérase** à **synthétiser** le **brin complémentaire** d'un ADN servant de **matrice**.
- C'est est une succession de **cycles**, chaque cycle contenant **3etapes** :

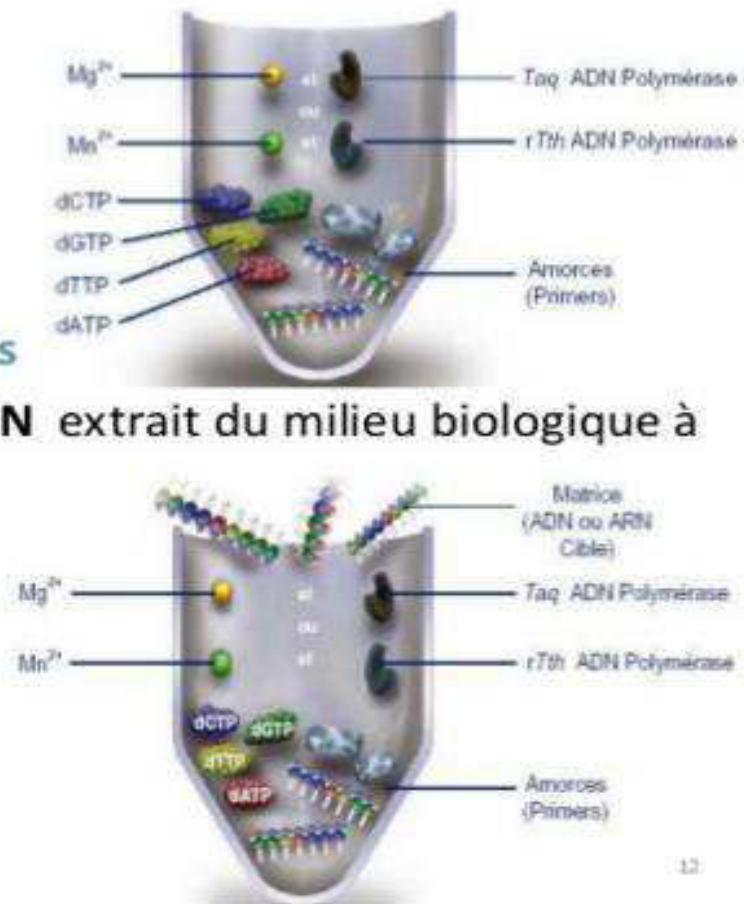


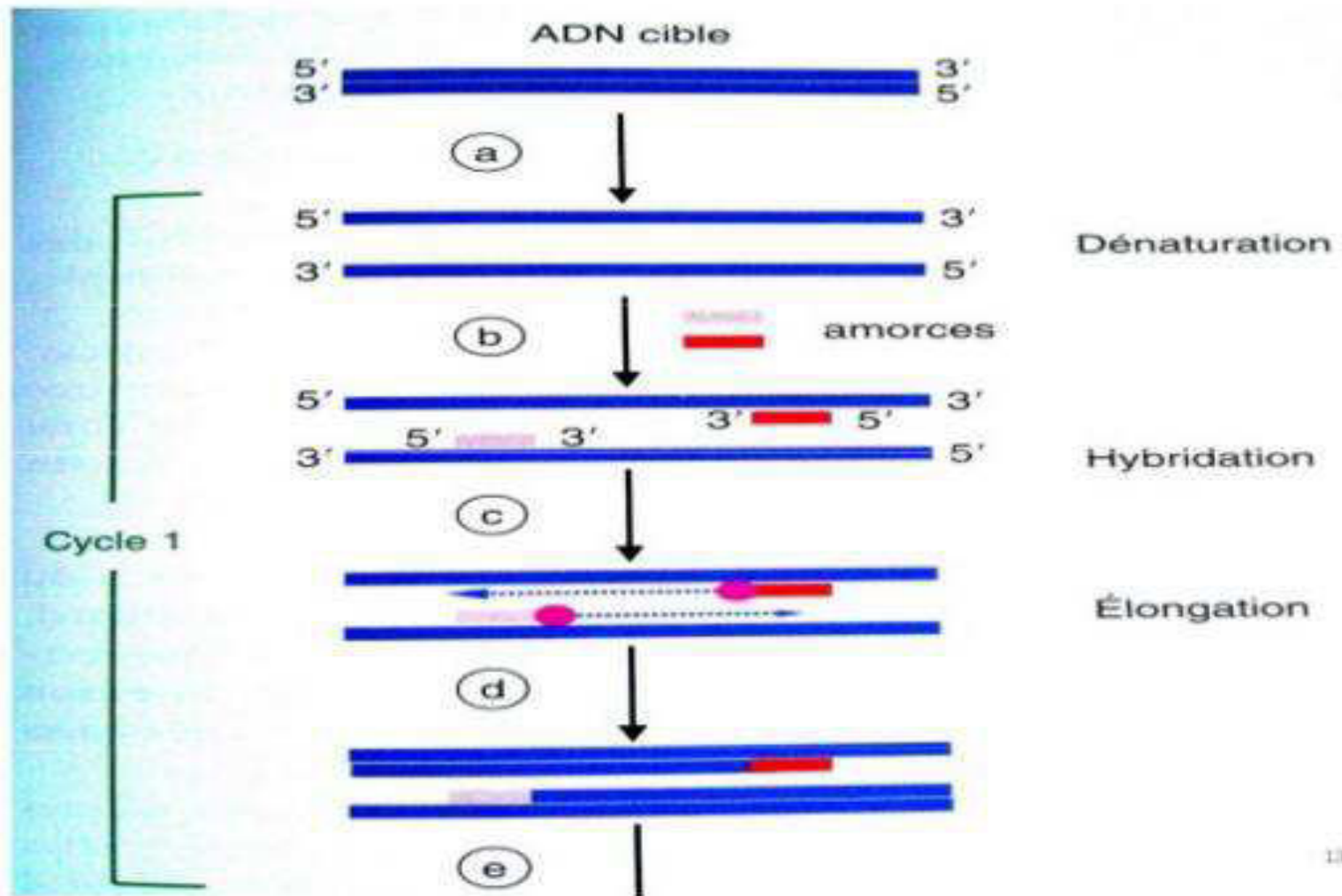


## Milieux réactionnel :

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

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







**1-Dénaturation thermique a 95 °C:** ( $95^{\circ}\text{C} > T_m$  de l'ADN) : rupture des liaisons hydrogènes et séparation des deux brins d'ADN pour donner deux ADN simple brins matrices .

**2- l'hybridation des amorces :** annealing : la température du milieu est amené a une  $T^{\circ}$  de ( $50 - 65^{\circ}$ )  $< T_m$  des amorces

**3- Elongation :** extension des amorces par la TAqpolymerase à  $72^{\circ}$  ,  $T^{\circ}$  optimal pour l'extension .

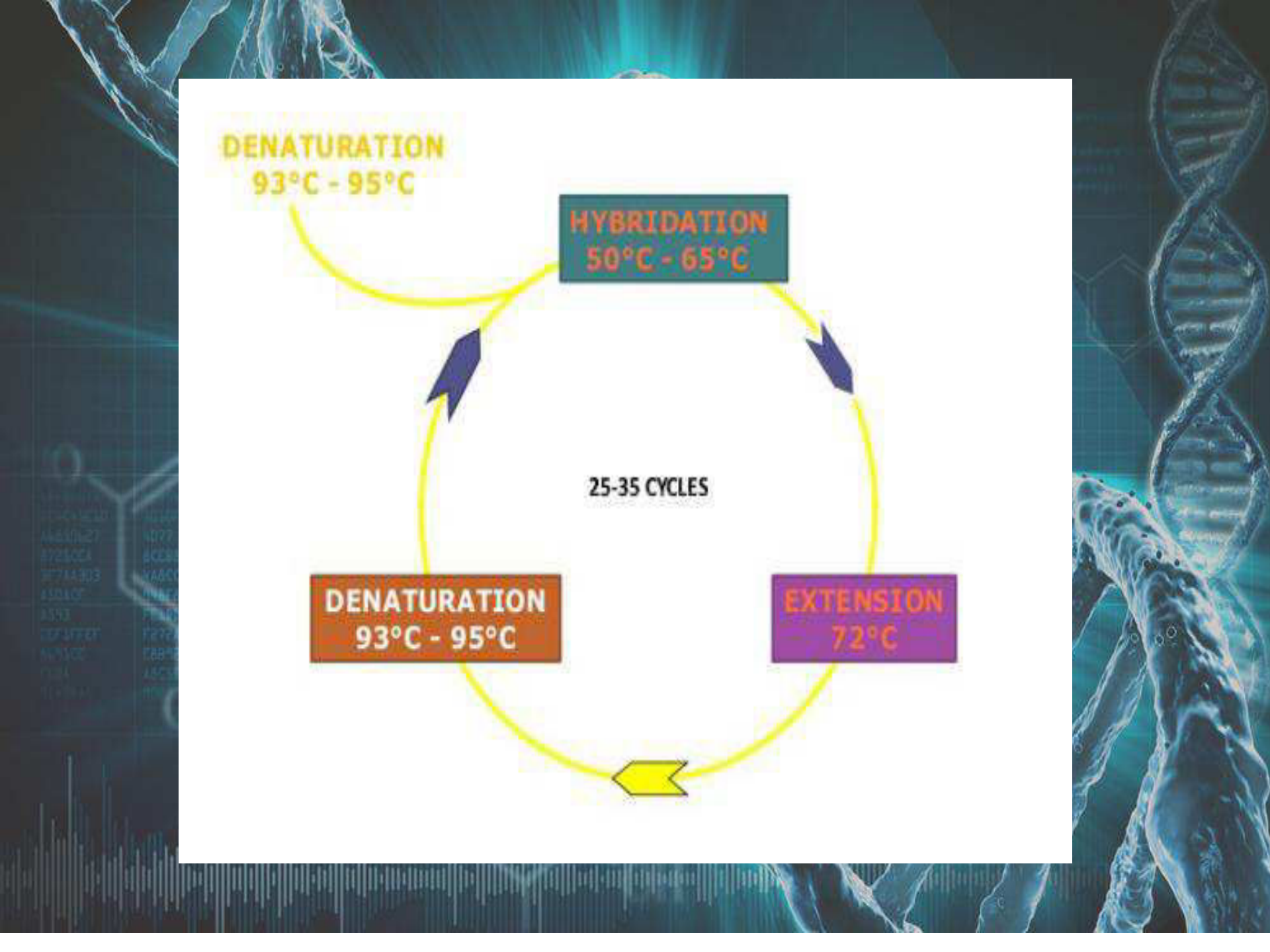
**DENATURATION**  
93°C - 95°C

**HYBRIDATION**  
50°C - 65°C

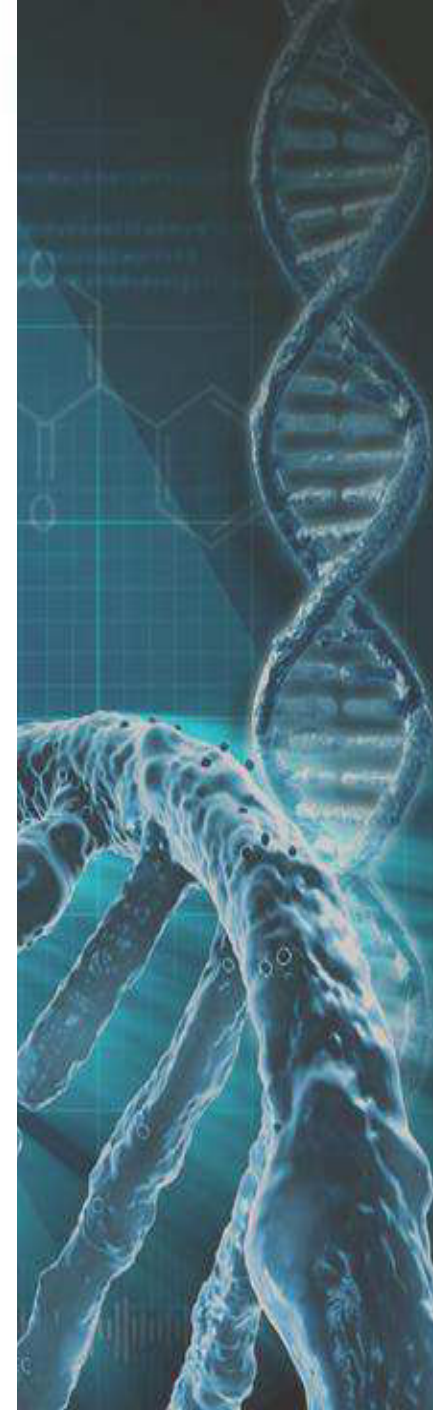
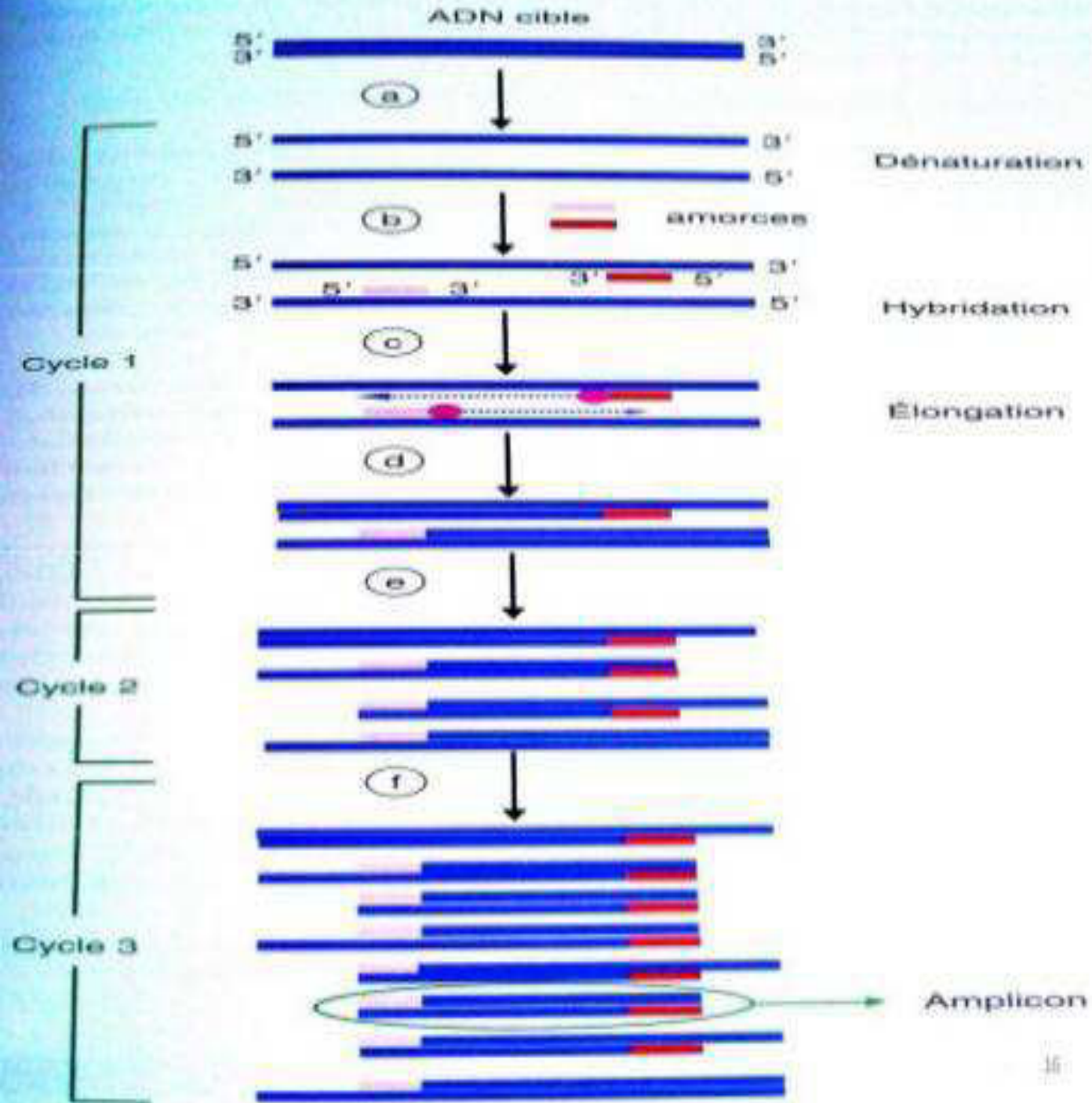
25-35 CYCLES

**DENATURATION**  
93°C - 95°C

**EXTENSION**  
72°C







Déroulement de la réaction:



A chaque fois ,la **quantité d'ADN double** dans le tube.

Une PCR de **n cycles** :  **$2^n$  copies**

**20 cycles** :  **$2^{20}=1\ 048\ 576$  copies**

**30cycles** :  **$2^{30}=1\ 073\ 741\ 824$  copies**

- Les **brins long** continuent leurs accumulation de **façon linéaire** (ils ne sont générés qu'à partir de l'extension des amorces sur l'ADN initial).
- Les **brins court** s'accumulent de **façon exponentielle** (il seront très largement majoritaire en fin de la PCR ).



## Eppendorf Mastercycler gradient thermocycleur





**Thermocycleur:** automate assurant la **variation de température rapide** entre des plateaux programmés , le nombre de fois requis .

### EXEMPLE DE PROGRAMMATION DES CYCLES

Dénaturation initiale 5 min à 94°C

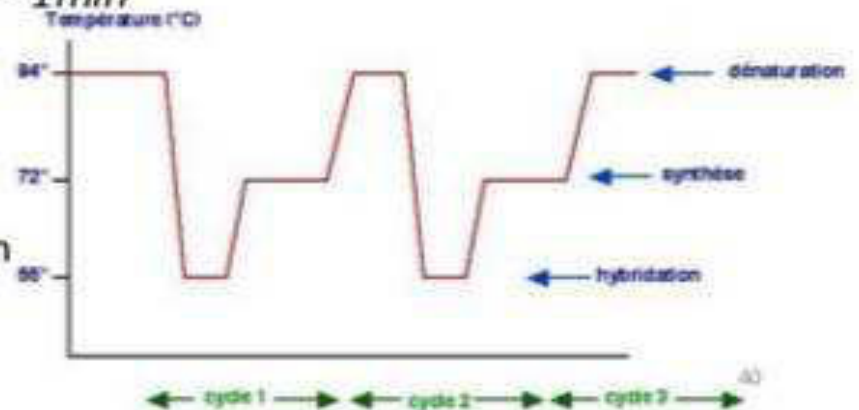
Dénaturation; 93°C - 95°C  
30 secs - 1min

Hybridation; 50°C - 65°C  
30 secs - 1min

Extension; 70°-75°C  
1min

X 25-35 cycles

Extension finale 2-10 min



# 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 :  
 $MgCl_2$



## 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

### l'enzyme: ADN polymérase thermostable

- la fidélité de l'activité enzymatique dépend de trois

Enzyme	Source	Optimum temp.°C	Fidelity
<u>rTth</u>	<u>T. thermophilus</u>	75-80	Low
<u>Pfu</u>	<u>Pyrococcus furiosus</u>	72-78	High
<u>Pwo</u>	<u>P. woesei</u>	60-65	High
<u>Deep Vent</u>	<u>Pyrococcus strain GB-D</u>	70-80	High



# OPTIMISATION

## Les amorces sens et anti sens

- Des **logiciels** permettent de définir rapidement des amorces dans une **séquence donnée** : **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

### Magnésium : $MgCl_2$

valeur comprise entre **1.5 mM** et **2 mM** le  $Mg^{2+}$   
influence l'**activité de l'enzyme** , augmente la  
stabilisation du **double brin** et élève le **Tm**.



## OPTIMISATION

### Agents chimiques

- **Le DMSO (2-10%)** (sulfoxyde diméthylque) aide souvent l'amplification de fragments de + de 1kb.
- **La formamide (1-5%)** peut apparemment 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.

### Contrôle négatif :

Un tube qui contient tout les éléments réactionnels sauf l'ADN : s'assurer qu'il n'ya pas de contamination



## limites

- A. **La taille de la séquence à amplifier:**
  - elle ne doit pas être supérieure à 3Kb
- B. **le nombre de copie de la cible :**
  - des amplification à partir d'une seule copie est réalisable mais **très difficilement**.
  - lorsque le nombre de copie de départ est faible , effectuer deux **PCR successives** plutôt que de multiplier le nombre de cycle
- C-**La PCR devient inefficace après 40-50 cycles** (la quantité du DNA ne change pas et atteint un plateau.

**Inconvénients**





# INCONVENIENTS

- ?

**LA  
CONTAMINATION**

**La détection  
d'inhibiteurs**

**Les amplifications  
parasites**

**Manque de  
fidélité de la Taq  
Polymérase**



## INCONVENIENTS LA CONTAMINATION

### Premier risque majeur permanent de la PCR

- La contamination d'un tube ne contenant pas la cible ( ADN/ARN) = **résultats faussement positifs** .
- la source majeure est **l'ADN amplifié** au cours des manipulation précédente surtout lors de **l'ouverture des tubes**.  
(projection dans l'atmosphère « aérosol »  
=contamination du matériel).



## INCONVENIENTS

### Les amplifications parasites

- c'est la possibilité que les amorces s'hybride a un segment autre que la cible.
- ❖ Par  $\uparrow T^{\circ}$ : progressivement jusqu'à ce que les bandes contaminantes disparaissent.
- ❖ Le formamide a faible concentration (il augmente la spécifié)

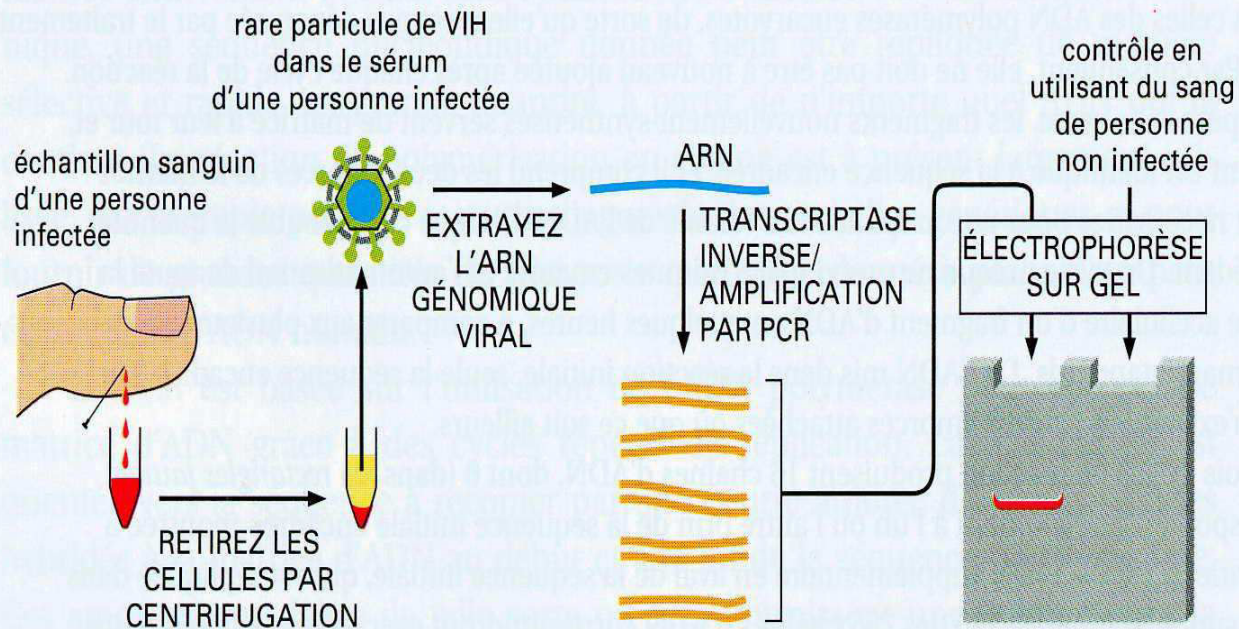
# applications de la technologie PCR

Détection des  
se fait par hyt  
avec des sond  
(technique du

Introduction d  
vecteur: clon

séquençage d

Diagnostic  
fertilisation in



présentes des ces cellules cancéreuses



## Variantes de la PCR

- ***Reverse transcription PCR .***
- *Nested PCR .*
- *PCR Multiplex .*
- *Allèle spécifique PCR .*

## PCR Multiplex

- **Principe:** amplification **simultanée** de plusieurs séquences cibles (**deux au moins**) dans un même tube d'amplification .
- Chaque amplification doit être **indépendante**:  
( **séquences cibles différentes / couples d'amorces différents**)

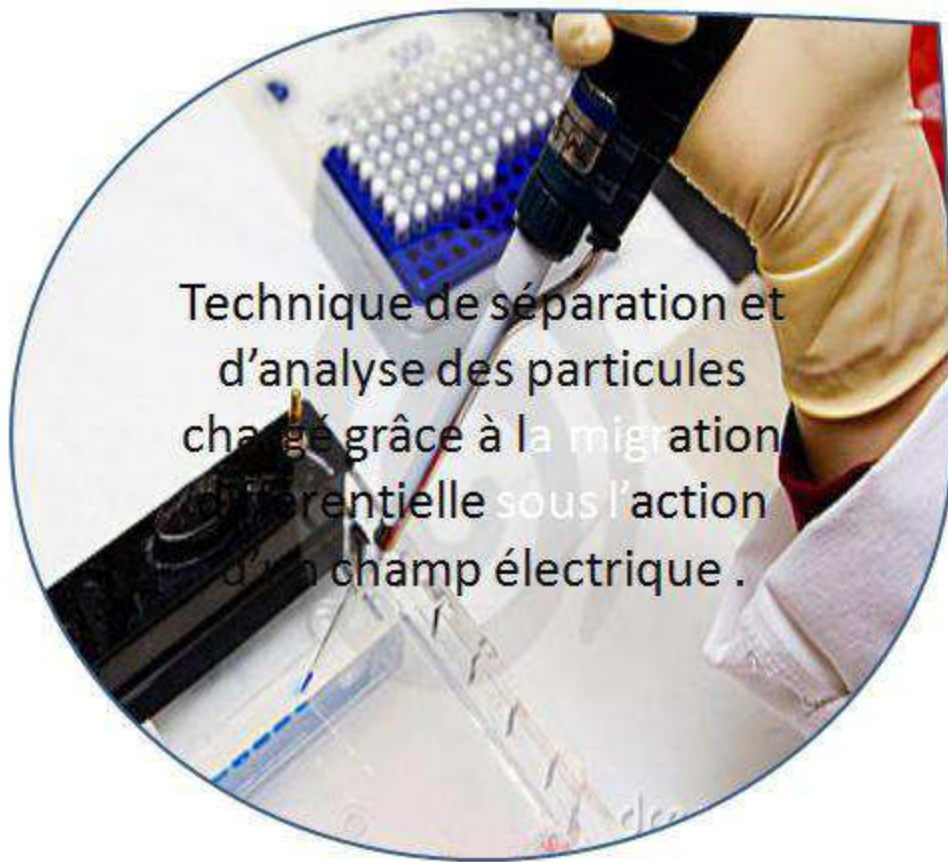
Les cibles doivent avoir **une taille** :

**peu différentes** (pour obtenir à peu près la **même efficacité**) mais **suffisamment différentes** (pour qu'on puisse les distinguer sur un gel d'agarose ,sauf si on réalise en post PCR une hybridation avec des sondes spécifiques)



# L'électrophorèse des acides nucléiques





Technique de séparation et d'analyse des particules chargée grâce à la migration différentielle sous l'action d'un champ électrique.

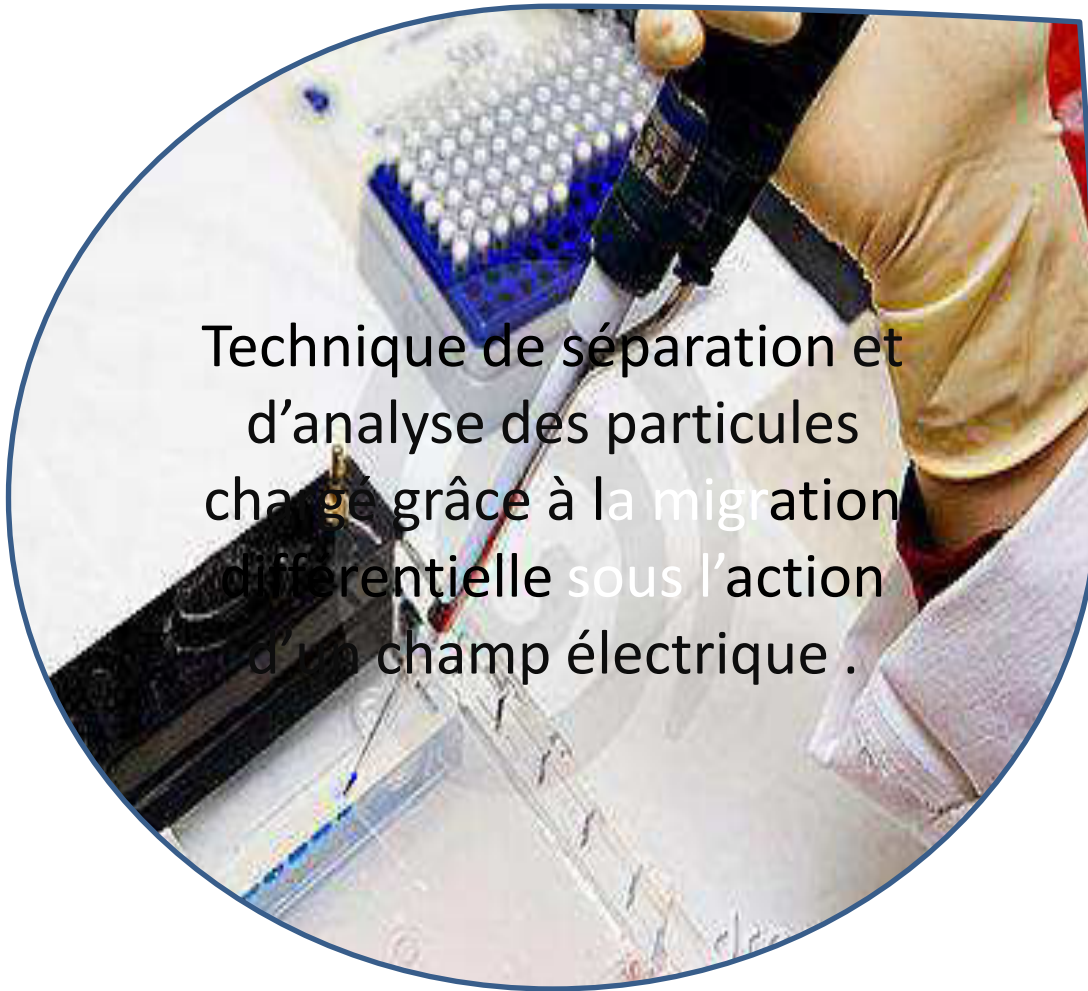
## Définition

L'électrophorèse est une technique permettant la séparation de molécules porteuses de charges électriques comme les acides aminés, les protéines, les acides nucléiques dont l'ADN...



# Définition

Technique de séparation et d'analyse des particules chargées grâce à la migration différentielle sous l'action d'un champ électrique .



# Histoire

Cette technique a été imaginée en **1892** par **S.E. Linder** et **H. Picton** qui sont inspirés des travaux d'Hermann Von Helmholtz sur l'électro-osmose. En effet, ce dernier constata qu'il était possible de déplacer des particules chargées sous l'effet d'un champ électrique.



## Principe

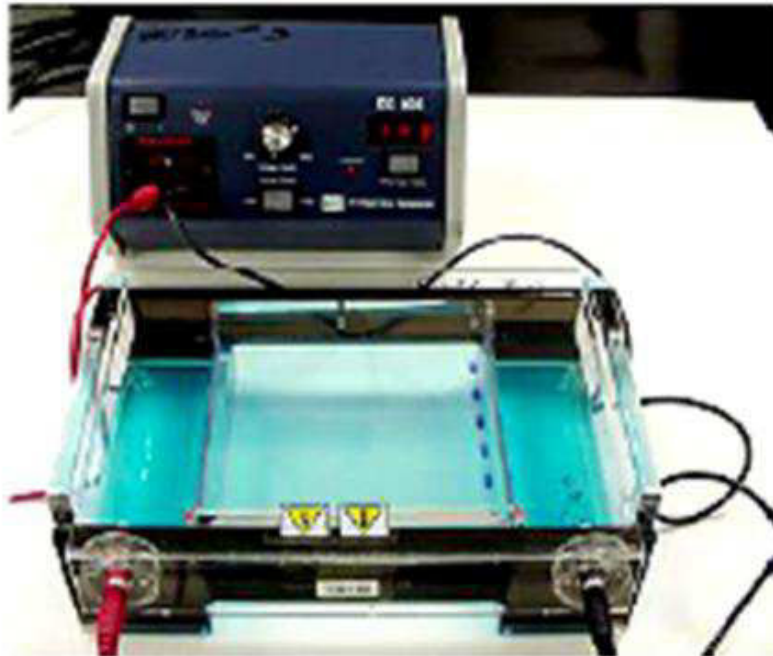


Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique ce qui entraîne la migration des molécules chargées. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules.

**But**

**Séparer, analyser ou purifier des  
acides nucléiques  
Déterminer la taille des fragments  
d'ADN inconnu**

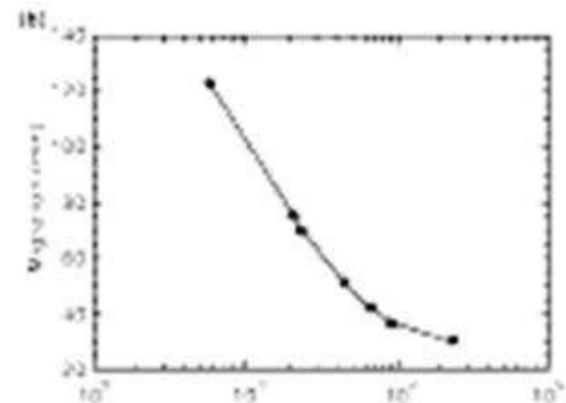




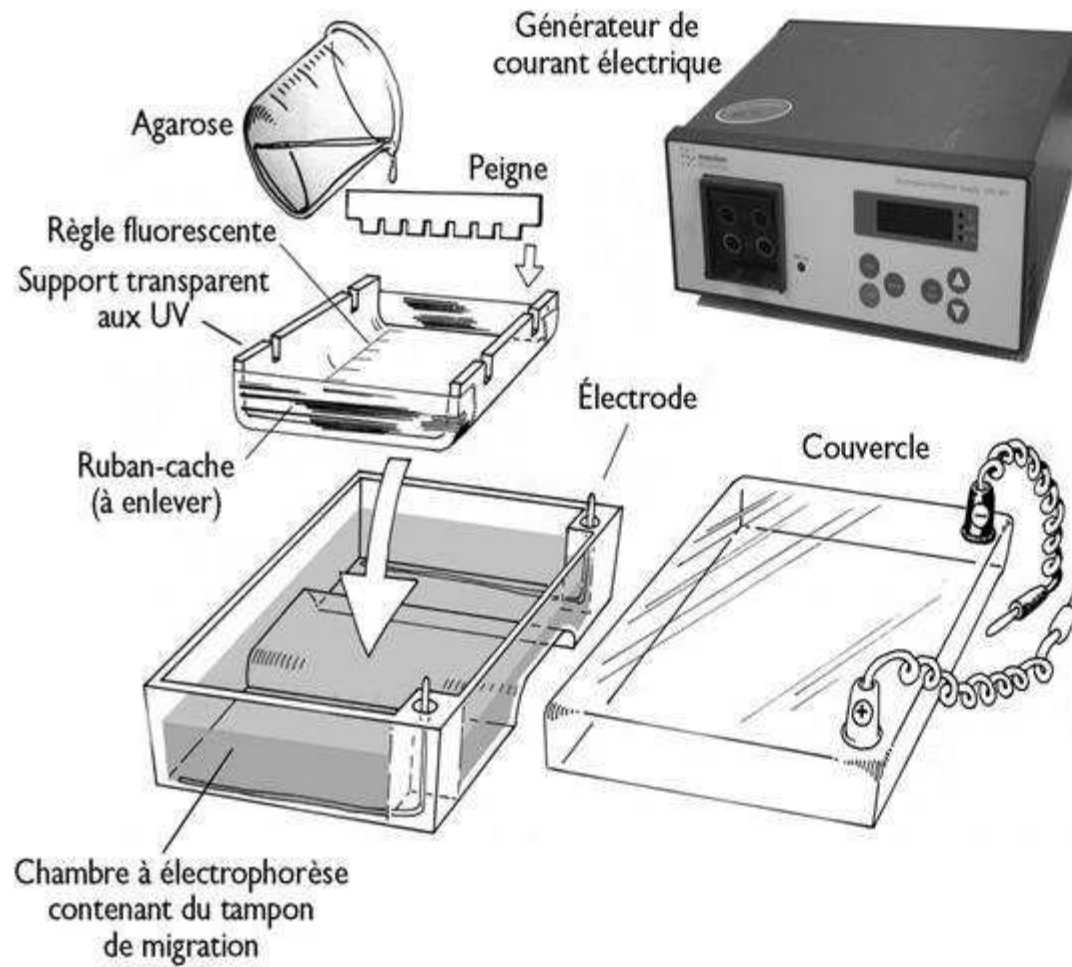
**L'ADN chargé (-) migre toujours vers le pôle + (anode)**

**L'ADN migre généralement en fonction de sa taille**

**Les pores du gel sont d'autant plus petit que le % en agarose ou en acrylamide est grand**



# Les matériels





1

## LES GELS UTILISÉS

- Pour les fragments d'ADN de taille (0,5-20kb)

2



5



- Pour les fragments de moins de 1000 paires de base

# Electrophorèse sur gel d'agarose

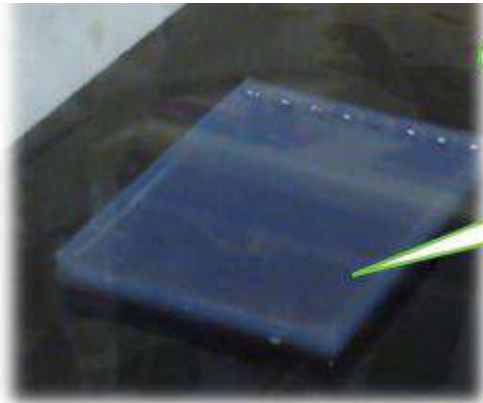
- ⌚ L'agarose = polymère à base d'agar purifié. Différentes puretés d'agarose sont disponibles. En général, d
- ⌚ L'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5% à 2% (poids/volume) et permet de séparer des molécules de très grande taille, principalement de l'ADN ou de l'ARN ;

**L'agarose, un colloïde naturel extrait d'une algue, est un polysaccharide linéaire (masse moléculaire moyenne : ~12 000 Da) ont de grands « pores »**



**Tableau 1.** Concentration de gel d'agarose recommandée pour différencier des molécules d'ADN linéaires

% d'agarose	Éventail de tailles d'ADN (bp)
0,75	10 000 – 15 000
1,0	500 – 10 000
1,25	300 – 5 000
1,5	200 – 4 000
2,0	100 – 2 500
2,5	50 – 1 000

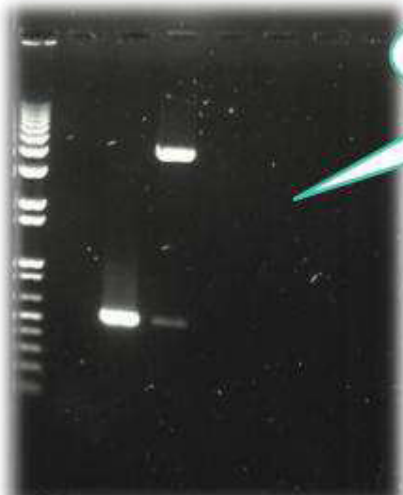


Un gel d'agarose avant éclairage sous ultraviolets

Le gel est exposé à des rayonnements ultraviolets, le BET colore l'ADN en une couleur rouge-orangée



Photographie du gel



Puits :

1. Echelle de marqueur de poids moléculaire (1kbplus)
2. vide,
3. Un produit de PCR d'une taille légèrement supérieure à 500 paires de bases
4. Fragment d'environ 4.5kb d'un Plasmide digéré par une enzyme de restriction

## Révélation de l'ADN

La méthode de détection de l'ADN dans les gels d'électrophorèse la plus utilisée est celle au Bromure d'éthidium.

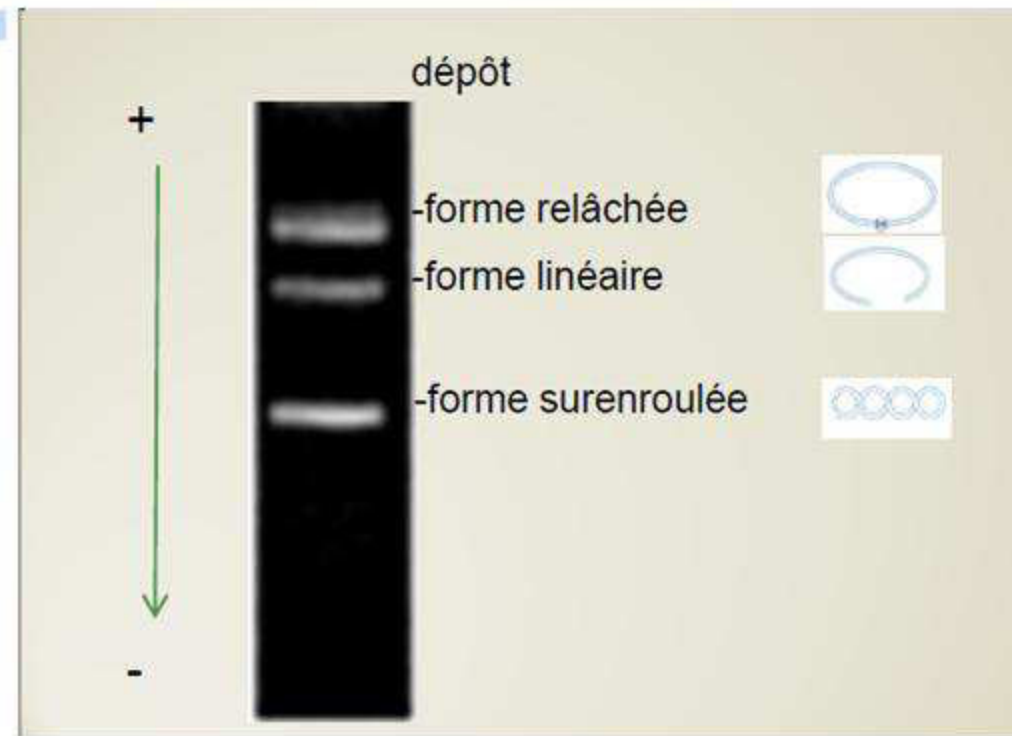
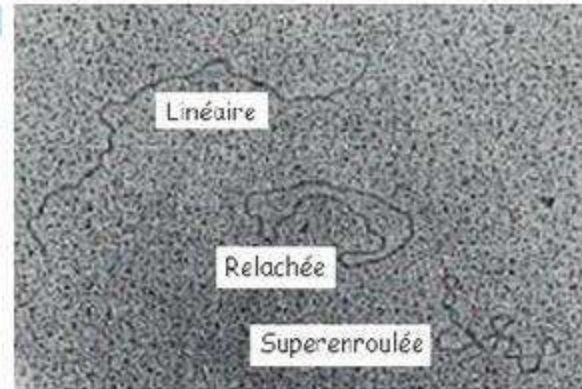
Le bromure d'éthidium (EtBr) = à la fois un agent intercalant et un fluorochrome.

Structure aromatique plane → s'intercaler entre les paires de bases → détorsion de la double hélice et émission de lumière (fluorescence) dans le rouge-orange lorsque le complexe ADN-EtBr est excité en lumière ultraviolette.



## Mobilité électrophorétique différente

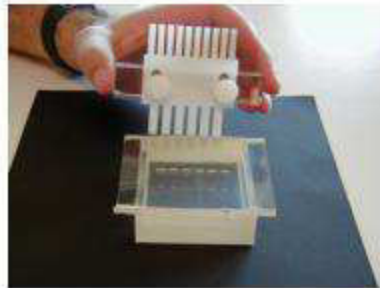
2



# Electrophorèse en gel d'agarose



Matériel nécessaire :  
Tampon d'échantillon  
Cuve  
Support + scotch  
Peigne  
Erlen (chauffage de l'agarose)

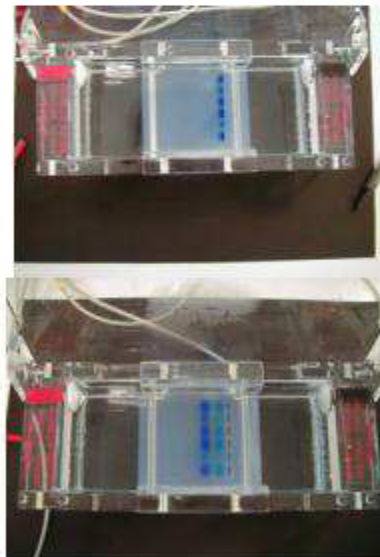


Dissolution de l'agarose à chaud  
Laisser refroidir  
Ajouter BET  
Pas de bulles !  
Cuve et agarose : mise en place du peigne.  
Prise en masse de l'agarose



Mise sous tension  
Cathode (-) et anode (+)  
Migration des molécules  
chargées positivement (cation)  
et négativement (anion).

ADN polyphosphate  
donc polyanion donc du - au +



Migration  
Bleu clair : Xylène Cyanol, ADN grande taille  
Bleu foncé : Bleu de Bromophénol, ADN petite taille, front de migration  
Variable selon % agar



Lecture sous UV : BET

