

CHAPITRE III

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et variantes

AMPLIFICATION GENIQUE

Multiplication **Exponentielle** d'un
fragment **d'ADN cible**



grande quantité de **fragments identiques**
générés : **aisément détectées**

- pour obtenir un **signal amplifié** (faible
quantité de séquence d'ADN cible) on peut :

Amplifier l'ADN cible par PCR : 10^9
copies

Nombreuses techniques de diagnostic
reposent sur cette amplification

Amplification de la
sonde

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
- **1993:** Dr. Kary Mullis , **Prix Nobel** de **chimie** pour avoir conçu la technologie **PCR** .



Polymérase Chain Réaction

- **Chef de fil** des méthodes **d'amplification géniques**

PCR CLASSIQUE

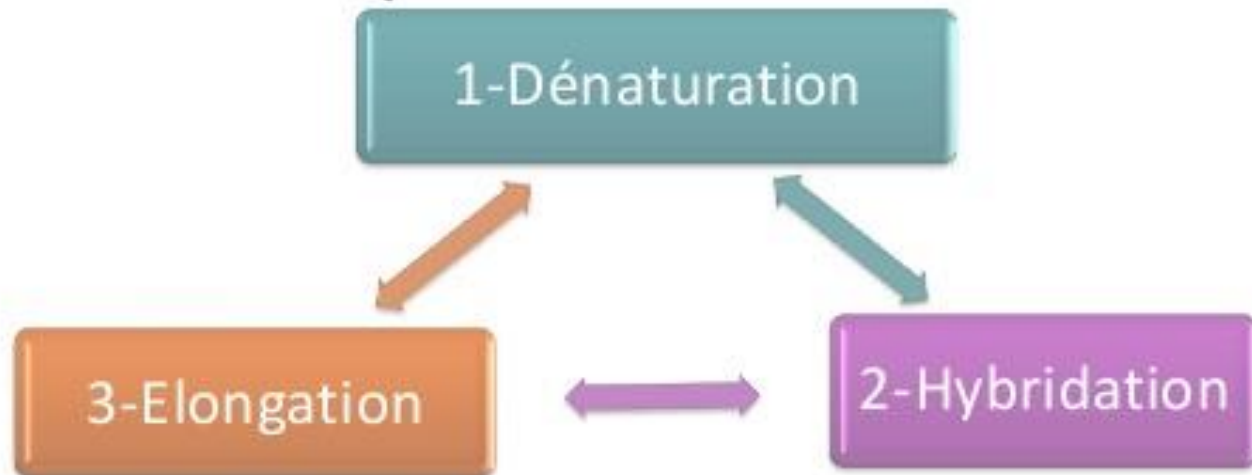
spécificité/sensibilité

rapidité/possibilité de quantification

REAL TIME PCR« EN TEMPS »

PCR classique

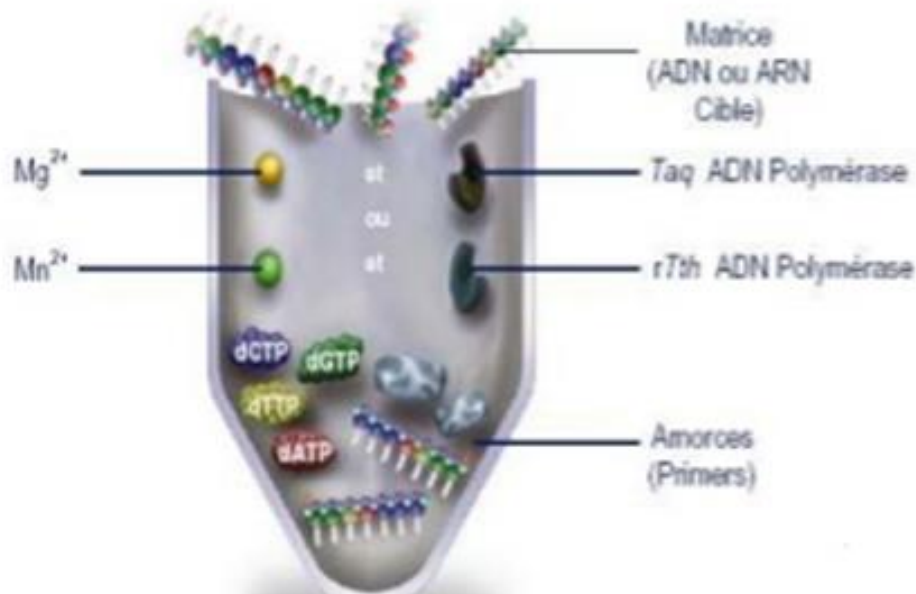
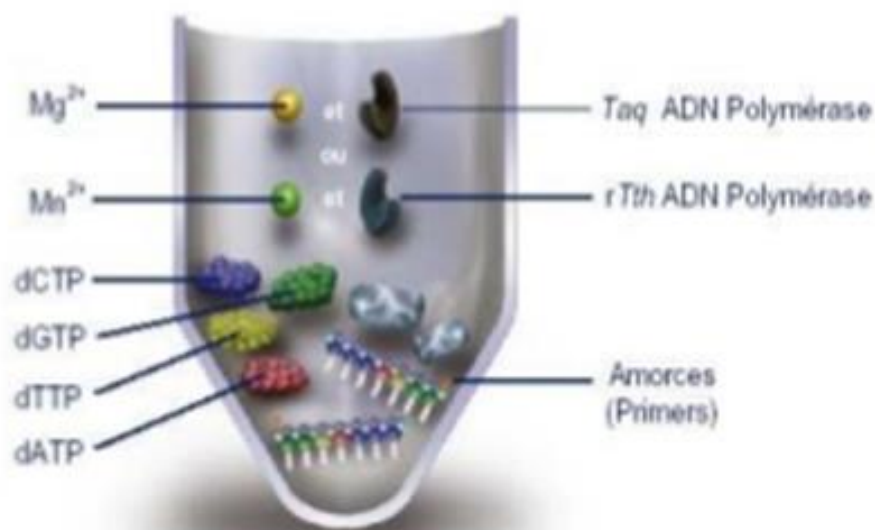
- Basé sur la capacité de **l'ADN polymérase** à **synthétiser** le **brin complémentaire** d'un ADN servant de **matrice**.
- C'est est une succession de **cycles**, chaque cycle contenant **3etapes** :

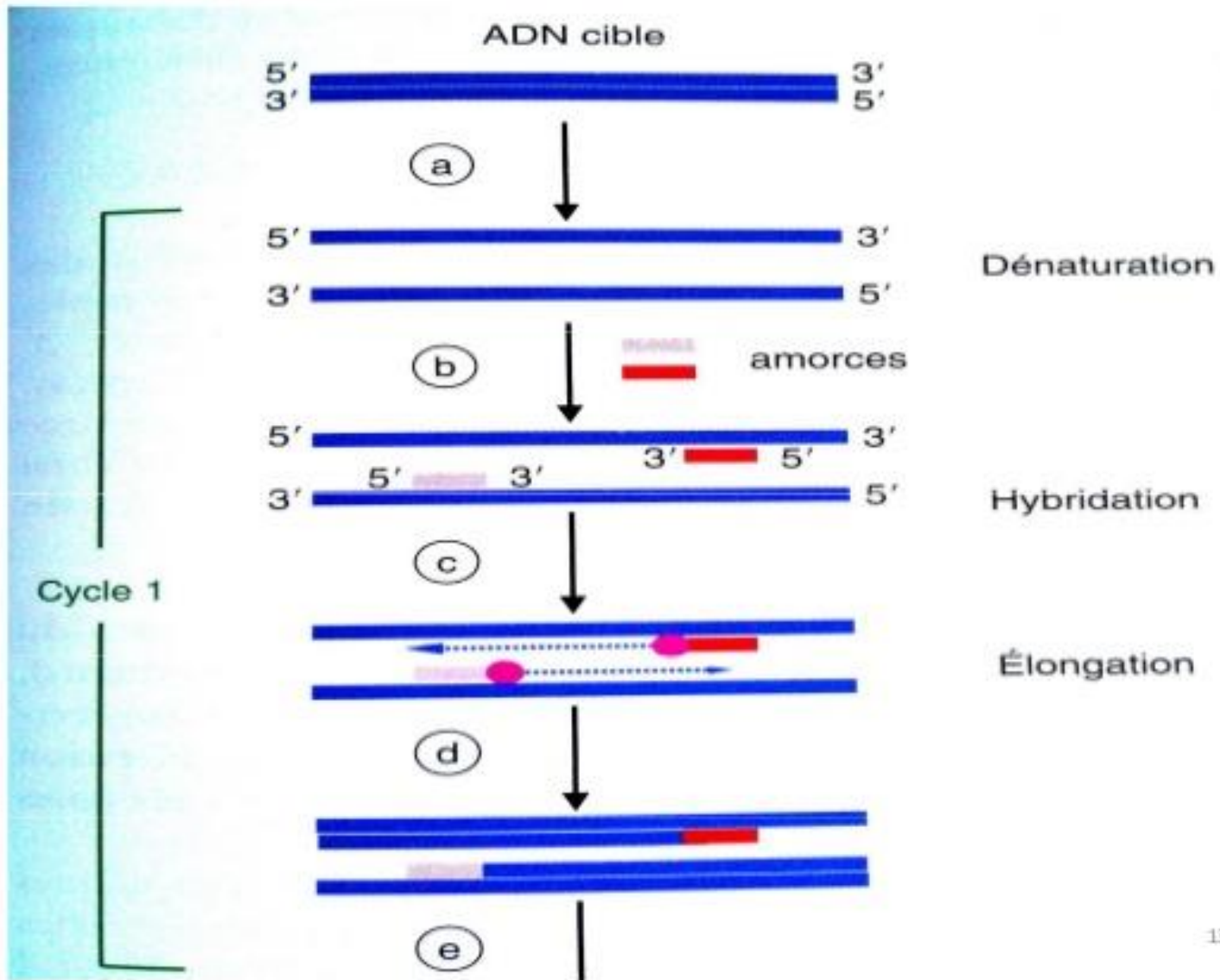


Milieux réactionnel :

- 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° de ($50 - 65^{\circ}$) $< T_m$ des amorces

3- Elongation : extension des amorces par la TAqpolymerase à 72° , T° optimal pour l'extension .

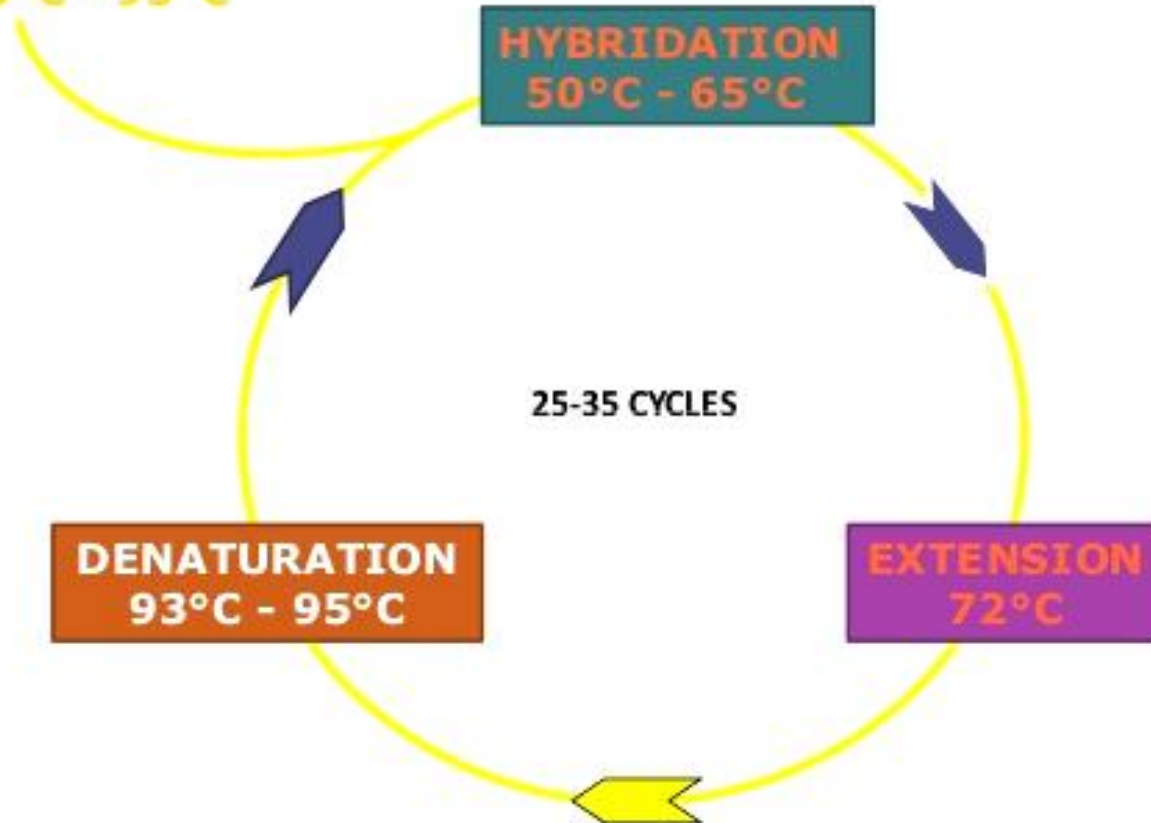
DENATURATION
93°C - 95°C

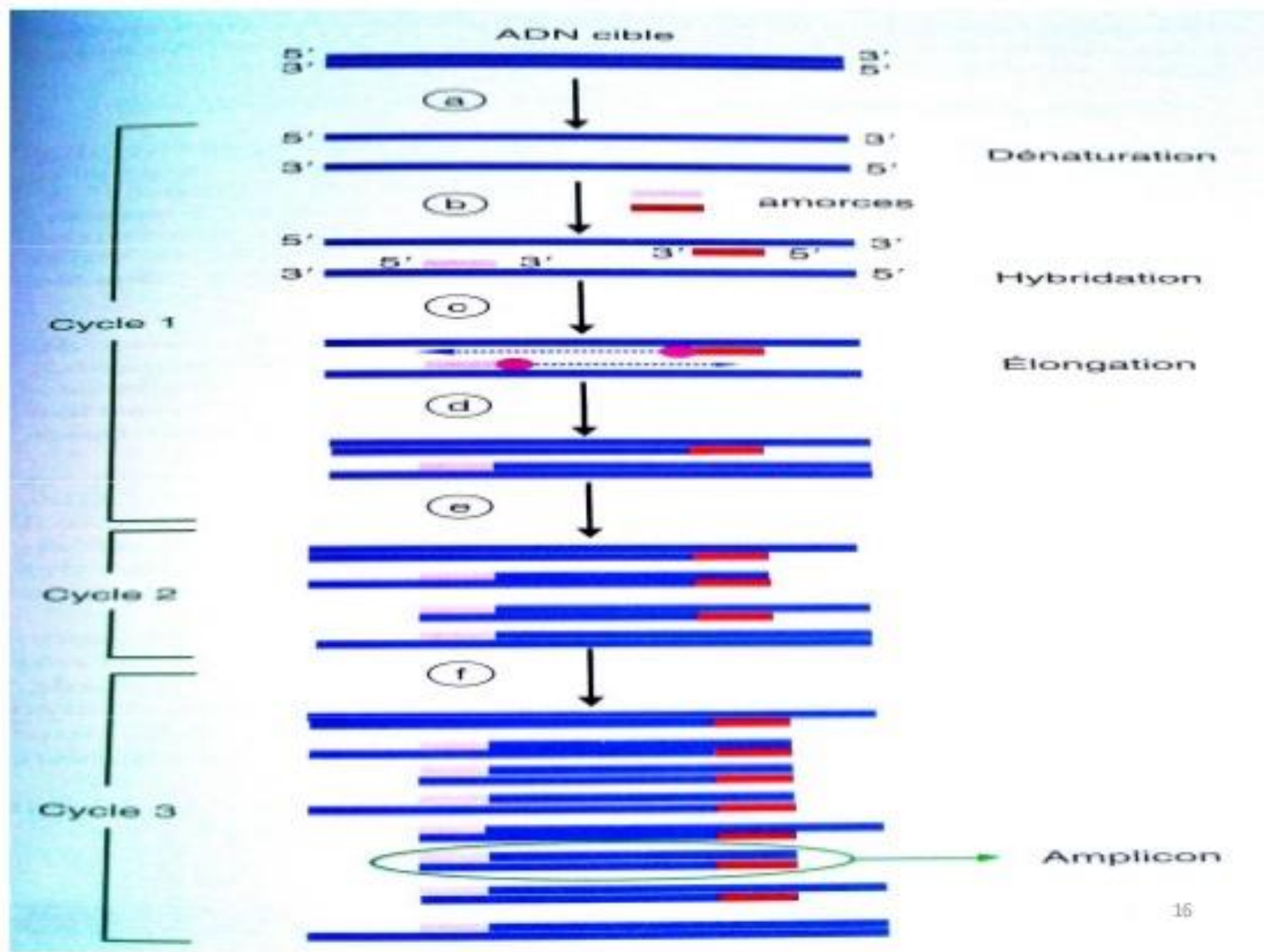
HYBRIDATION
50°C - 65°C

25-35 CYCLES

DENATURATION
93°C - 95°C

EXTENSION
72°C

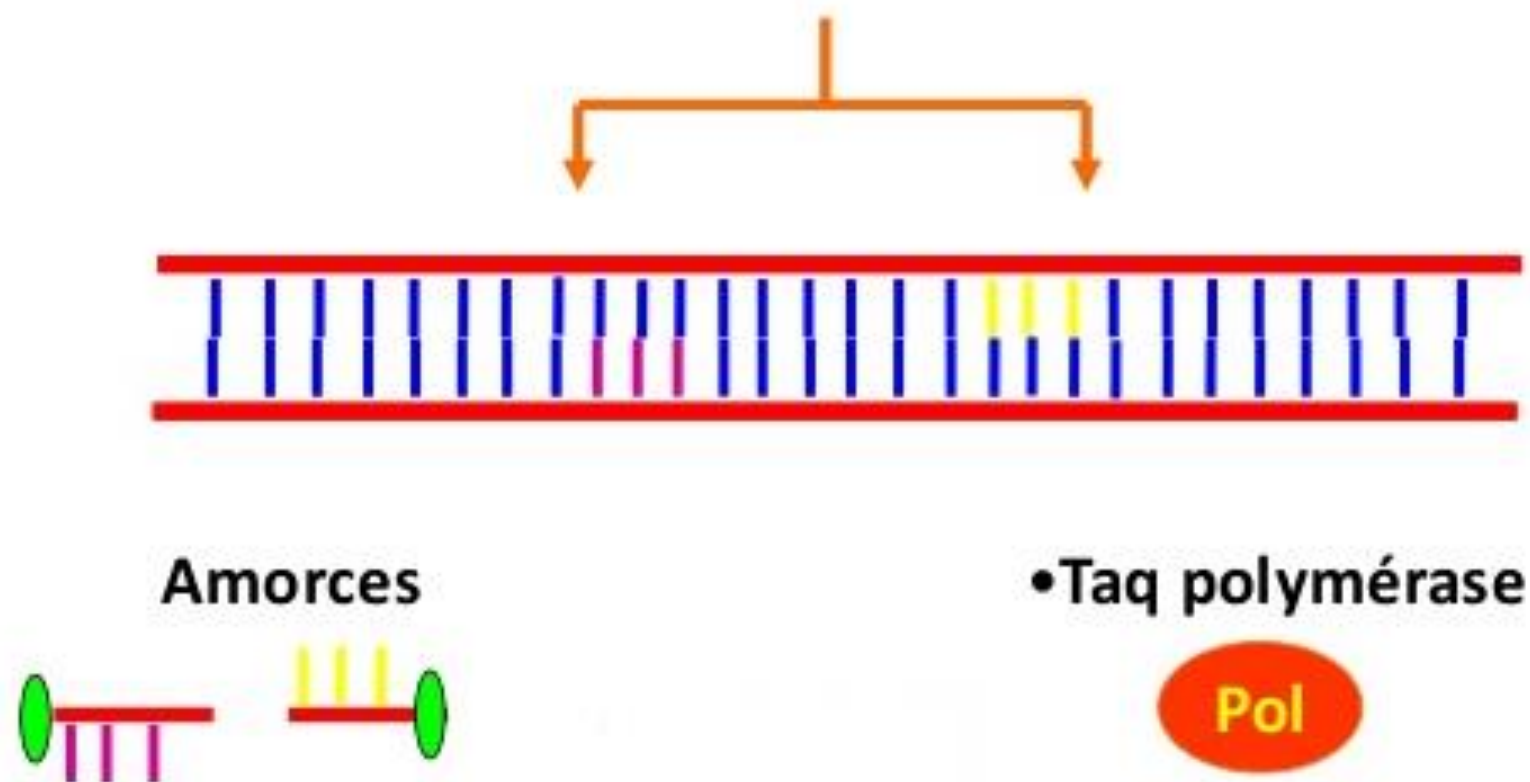




Déroulement de la réaction:

Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Les acteurs



Premier cycle

Étape 1: dénaturation

Température: 95°C

durée: 1 min

Étape 2: Hybridation

Séquence cible: ADN à amplifier



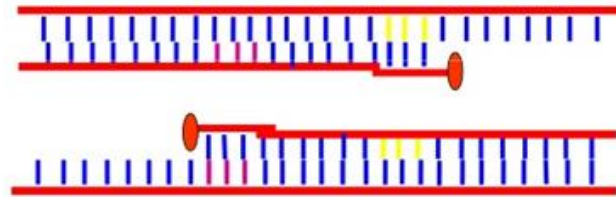
Étape 3: Polymérisation

Température: 72°C

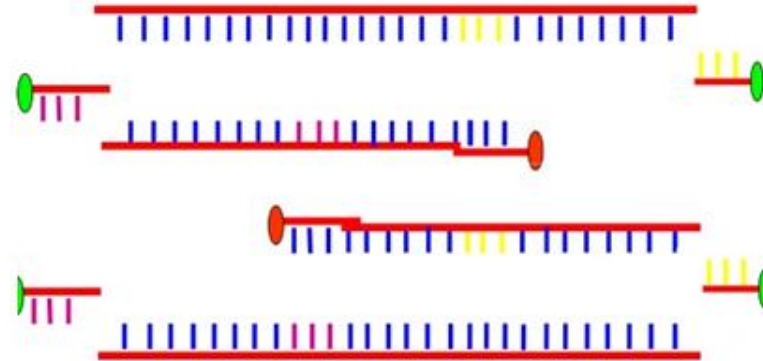
durée: 1 min

Deuxième cycle

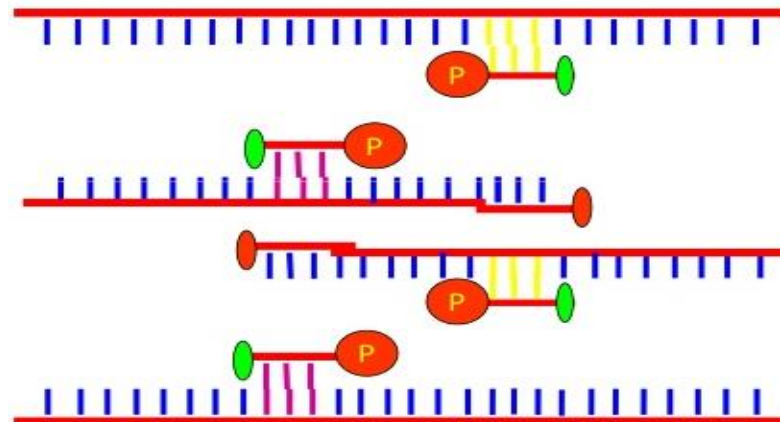
Dénaturation



Hybridation



Polymérisation

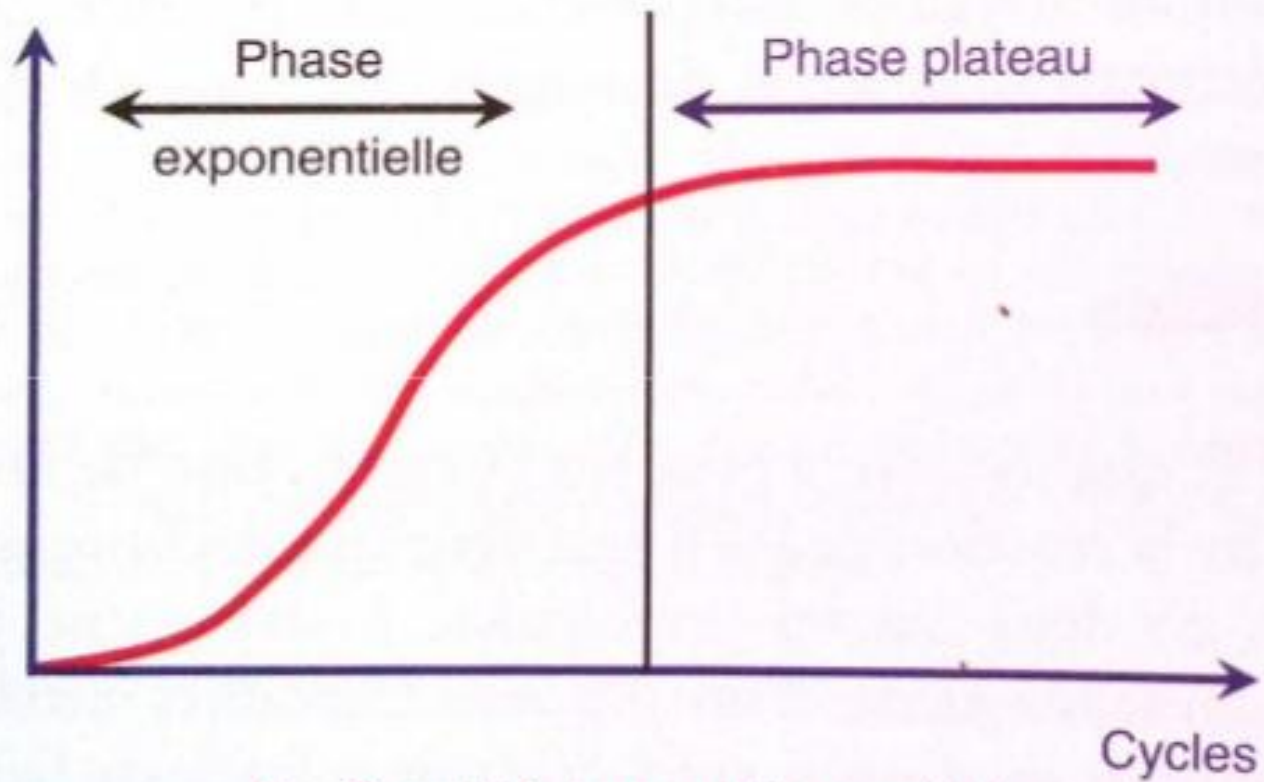


A chaque fois ,la **quantité d'ADN double** dans le tube.

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

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

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



N : Quantité de produits amplifiés

il est inutile d'augmenter le **nombre de cycle**, après 20 cycles l'amplification cesse d'être **exponentielle** et atteint un **plateau**:

- ❖ Dimerisation des amorces.
- ❖ l'apparition des **sous produits** de réaction ayant un pouvoir d' inhibition (pyrophosphate)
- ❖ **L'épuisement** et la **dénaturation** des composants de la réaction et la **compétition** entre les **amorces** et les **fragments d'ADN** amplifié qui peuvent s'hybrider **entre eux** plutôt qu'avec **les amorces**.

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

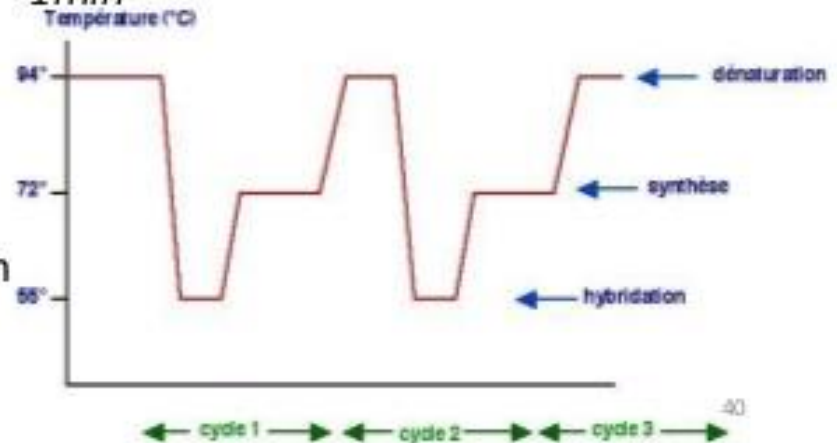
Dénaturation; 93°C - 95°C
30 secs – 1min

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

Extension; 70°-75°C
1min

X 25-35 cycles

Extension finale 2-10 min





PCR Classique

- Il en ressort de cette technique que la séquence à amplifier doit être **connue préalablement** (ou du moins au minimum les séquences d'hybridation des amorces)

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 aquiticus*) 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 5' – 3'**.

- la fidélité de l'activité enzymatique dépend de trois caractéristiques spécifiques:
 - la faculté de **sélection** des nucléotides.
 - la **discrimination** entre les **amorces** correctement ou incorrectement appariées.
 - La présence d'une activité **exonucléasique 3'-5'** associée , qui lui confère la capacité d'**exciser** un nucléotide incorrectement apparié en 3' d'une amorce.

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)
- **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 .

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 inférieurs à 25 nucléotides.

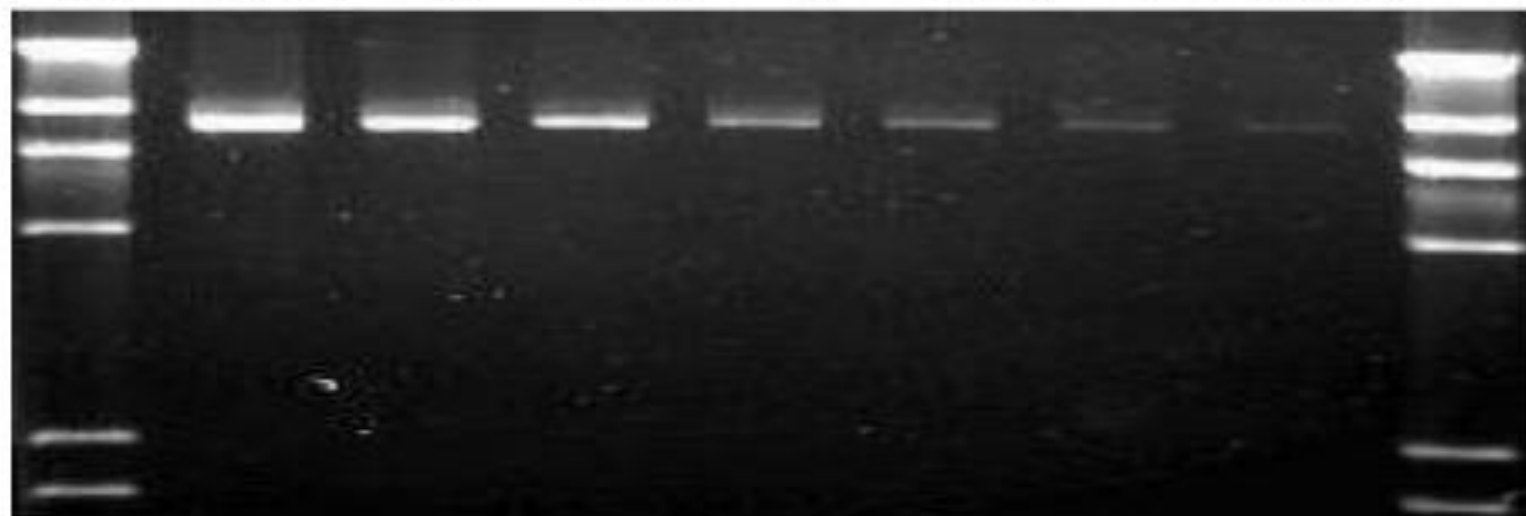
- **Evitez un T en 3' (mieux G ou C).**

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 **T_m** .

Pour **optimiser une PCR** il est nécessaire de faire une **gamme de MgCl_2** .

1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 mM



Température de fusion

- Le **T_m** des amorces doit être **suffisamment élevée** (**min 55°** si possible)
- Plus le T_m est élevée , moins le **risque d'hybridation non spécifique** des amorces est important .
- Différence entre les T_m des deux amorces doit être **inferieur 5°**

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.

contrôles

- Pour chaque série de PCR il convient d'utiliser **1 contrôle positif** et plusieurs **contrôles négatifs** .

- le contrôle positif :

- ADN témoin **connu** .

- le nombre de copies (**raisonnablement faible**) :
contrôler la **sensibilité** de la méthode .

Ex: **En infectiologie** : une amplification **négative** (**suspicion d' une inhibition de l'enzyme**)

le contrôle interne : fragment d'ADN identique a la cible(
diffère par une partie de la **séquence 20 Pb**)

les mêmes amorces sont utilisées (cible /contrôle interne)

le produit d'amplification sera analysé de manière
différentielle (**sondes spécifiques** : extrait /contrôle interne)

Contrôle négatif :

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

un tube contenant le mix réactionnel
+
ADN témoin non amplifiable par les amorces choisies



Vérifier la spécificité de la réaction

limites

A. La taille de la séquence à amplifier:

- elle ne doit pas être supérieur a 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.

INCONVENIENTS

Derrière une **très grande simplicité** , à la fois dans le **principe** et dans la **réalisation** , se cachent de nombreux **pièges** susceptibles d'entacher la valeur des résultats obtenus.

L'utilisation de la PCR impose:

Une organisation particulière des laboratoires.

Une connaissance de tous les écueils.

Une grande expérience.

Chaque résultat doit être validé !!!!

INCONVENIENTS

**LA
CONTAMINATION**

**La détection
d'inhibiteurs**

**Les amplifications
parasites**

**Manque de
fidélité de la Taq
Polymérase**

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).

détection d'inhibiteurs

Second problème inhérent a la PCR .

- Risque de **résultats faussement négatifs** : en particulier recherche **qualitative** de (**virus** /**germes**)
- **Agents** :
 - l'hème.
 - DMSO (> 10 %)
 - l'héparine .
 - certains milieux biologiques : urines /LCR : (inhibiteurs de nature inconnus)

Manque de fidélité de la Taq Polymerase

- les erreurs de réplication ne peuvent pas être surmontées ,
elles peuvent engendrer des **résultat erronés** lors de l'analyse des mutations **sous clonage** .
- **pour minimiser** : on détermine directement les séquences avant clonage.

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 spécificité)

applications de la technologie PCR

| | |
|---|--|
| <p>Détection des mutations ponctuels : se fait par hybridation des produits PCR avec des sondes oligo-nucléotidiques (technique du "DOT-BLOT")</p> | <p>Maladies infectieuses : détection d'ADN ou d'ARN viral <i>Neisseria gonorrhea</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>HIV-1</i></p> |
| <p>Introduction du produit PCR dans un vecteur: clonage du produit PCR</p> | <p>Etude de l'expression des gènes</p> |
| <p>séquençage direct du produit PCR</p> | <p>Contamination de l'eau</p> |
| | <p>DNA fingerprinting</p> |
| <p>Diagnostic de preimplantation : fertilisation in vitro</p> | <p>Cancérologie : lorsque sous traitement ; les cellules cancéreuses ne sont plus détectables par les outils usuels . La PCR détecte les mutation distinctes présentes des ces cellules cancéreuses</p> |

Variantes de la PCR

- *Reverse transcription* PCR
- *Nested* PCR
- PCR *multiplex*
- *Allèle spécifique* PCR

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 .

- **2-Amorces hexanucléotidiques randomisées :**

Mélange d'amorces très courtes (**6 nucléotides**)
comprenant toutes les séquences possibles
pouvant composer un hexanucléotides : $4^6 =$
4096 possibilités .

- grande certitude que des oligonucléotides
s'hybrideront a l'ARN pour servir d'amorce .

- **3- Amorces spécifiques .**

3

ARN

5' A U C G U C U A G C G U A A A U G A U A G C C 3'

① Dénaturation



② Hybridation en présence de mélange d'oligo-hexamères

5' A U C G U C U A G C G U A A A U G A U A G C C 3'

3' A G A T C G 5' 3' A C T A T C 5'

③ Synthèse du brin complémentaire = ADNc



dATP, dCTP

dTTP, dGTP

● *rtth* ADN polymérase

5' A U C G U C U A G C G U A A A U G A U A G C C 3'

3' T A G C A G A T C G C A T T T A C T A T C 5'

- 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 .**

- **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)

Nested PCR .

- **Principe:** le produit issu d'une première PCR est de nouveau amplifié a l'aide d'un **second couple** d'amorces.
- Ce couple s'hybrident a **une partie interne (nested /nichée)** de la séquence amplifiée .



1^{re} PCR



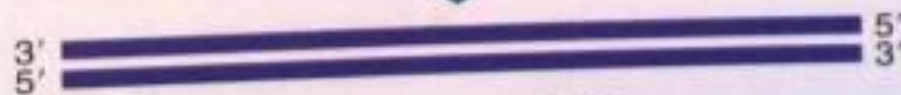
1^{er} couple d'amorces



Produits de 1^{re} PCR



2^e couple d'amorces



Produits de 2^e PCR

- **Sensibilité** : considérablement **augmentée**
deux PCR successive sont réalisés.

Spécificité : **accrue** :

deux couples d'amorces sont
utilisés .

limites : risque de **contamination** considérable
(ouvrir le tube afin d'ajouter le deuxième
couple d'amorces)

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)

Usages :

-Plusieurs cibles peuvent être détectées en même temps dans un seul tube :

trousse de détection de *C.trachomatis* /*N.gonorrhoeae*

-Analyse des **gènes de grande taille** :
gène de la **dystrophine 2000Kb** : 9 couples d'amorces pour chercher des délétions .

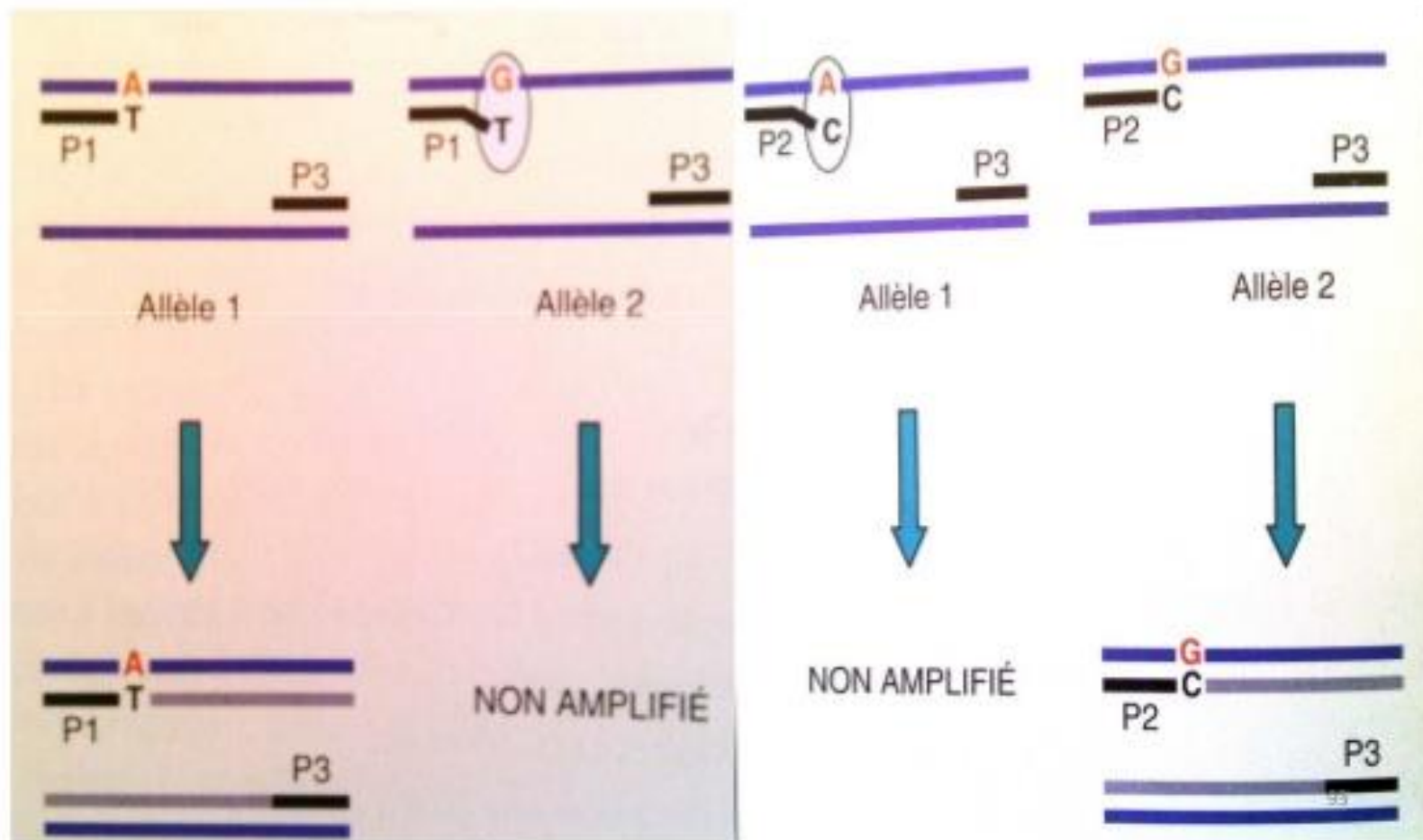
Mise au point difficile .

Allèle spécifique PCR

- Technique **intéressante** pour distinguer deux **allèles** ne différant que par **un, ou quelques nucléotides**:
 - Etude d'un **polymorphisme bi-allelique**
 - recherche **d'une mutation**.
- **Principe**:

un mésappariement **en 3'** du complexe **ADN cible** et **amorce** ralentie considérablement l'extension du duplex. Cette propriété est **mise a profit** dans cette technique.

Allèle spécifique PCR



P1- compatible- **allèle 1**

P2-compatible- **allèle2**

P1--- mésappariement---**allèle2**

P2---mésappariement---**allèle1**

En absence **de mésappariement** l'allèle cible sera **amplifié**.

En pratique: PCR sur **2 tubes** : (**P1**/P3) et (**P2**/P3)

| Sujet homozygote A/A | Sujet homozygote G/G | Sujet hétérozygote A/G |
|--|--|--|
| Tube P1/P3 : positif Tube P2/P3 : négatif | Tube P1/P3 : négatif Tube P2/P3 : positif | Tube P1/P3 : positif Tube P2/P3 : positif |

- la **PCR spécifique d'allèle** a été Supplanté par la **PCR en temps réel** qui est devenu la **méthode de référence** pour la discrimination d'allèles et pour l'étude du polymorphisme .

PCR EN TEMPS REEL

Avant : la mise en évidence des mutations était réalisé après la PCR classique .

Poste PCR : analyse des produits amplifiés (électrophorèse, chromatographie....)

La PCR en temps réel permet de combiner :
PCR + analyse de produit amplifié

PCR EN TEMPS REEL

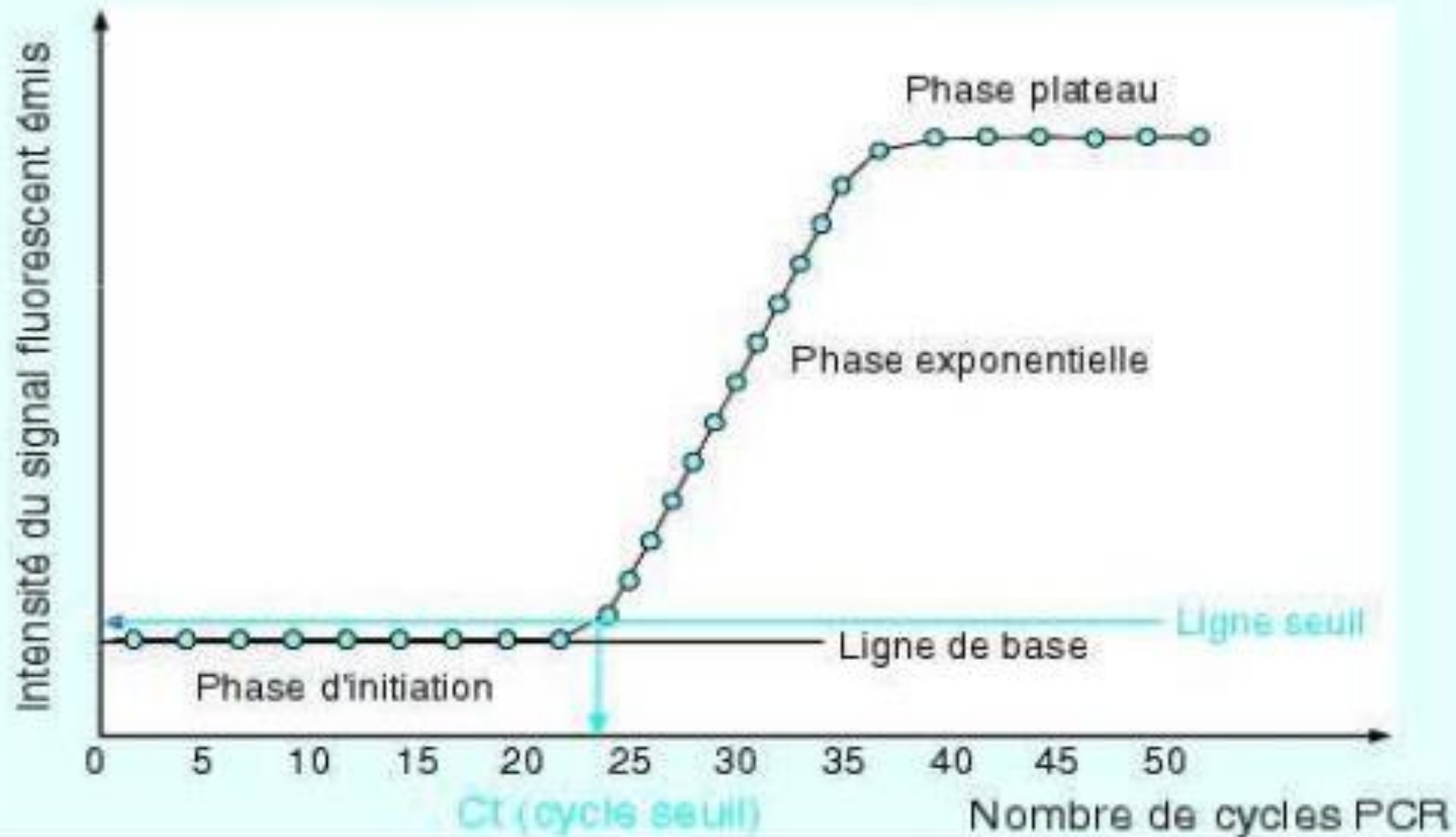
Principe

Détection et quantification d'un signal **fluorescent** émis par un **fluorophore** dont l'intensité d'émission est **proportionnelle** a la quantité de **produit amplifié** pendant la PCR.

PCR + Analyse ----- en une seule étape .

Permet le **suivie en temps réel** de toutes les étapes de PCR .

Principe



Avantages

- Grande **sensibilité** et **spécificité** .
- Grande Capacité de **multiplexage**.
- **Rapidité** d'amplification: **30 -60 mn (25-30cycles)** .
- Absence de manipulation **en post PCR** : risque de **contamination réduit** (les tubes sont évacués et détruits sans jamais avoir été ouverts: automates a **system fermé**)
- Permet l'analyse **qualitative** et **quantitative** .
- Analyse a **haut débit** .
- Contrôle rapide des T°, excellente **homogénéité** de T° **dans** et **entre** chaque tube.
- **Cout** : > PCR classique (gain de temps et de main-d'œuvre considérable)

Chimies de détections

Agents intercalant

- S'intercalent entre les deux hélices de l'ADN double brin. *SYBRTM Green*

Sondes d'hybridation

- 1 seule sonde linéaire marqué en 5',3' ou les deux. *Sondes TaqManTM*
- 2 sondes linéaires (1-5 pb) marqués: 5',3' ou les deux *Sondes FRETTM*
- Structure tige boucle : *balises moléculaires* .



Appareillage

- Différent par :
 - capacité** d'échantillonnage.
 - durée** des cycles.
 - capacité de **détection** des différentes chimies .

thermocycleur

Compartiment de
détection de la
fluorescence

Traitement du
signal

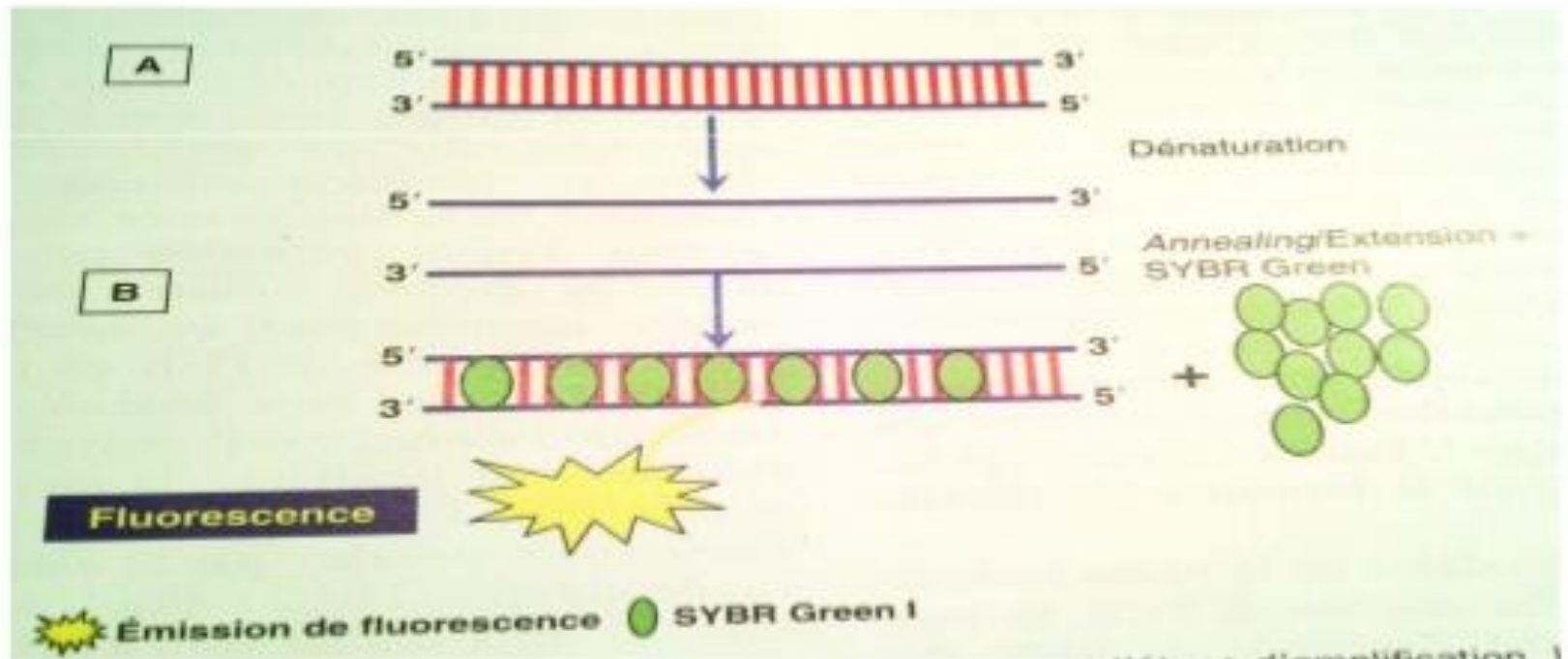
Appareillage



ABI Prism[®] 7900

SYBRTM Green

- Agent **intercalent**, se lie a l'ADN double brin.
- Une fois liée , **↑ du signal** fluorescent .



Principe: au cours de l'**hybridation** et l'**extension**:
le **SYBR Green** s'intercale et émet une
fluorescence.

La **fluorescence** chute après la **dénaturation** du
cycle suivant

Acquisition de **fluorescence** une fois /cycle (70-
90°C) .

*La quantité du signal suivie en PCR en temps réel
augmente proportionnellement au produit
amplifié formé (effet quantitatif)*

Sondes TaqMan TM

- **Première chimie** de **PCR en temps réel** , élaboré par la société **Perkin Elmer** « *Applied Biosystem* » pionnier dans le domaine de la PCR en temps réel .
- Chimie basé sur : transfert d'énergie par résonance : **FRET** (*Fluorescence Résonance Energy Transfert*)
- Sondes **très fréquemment** utilisés.

REM

Sondes TaqMan TM



Si une substance est susceptible **d'absorber** la lumière émise par un **fluorophore** est **suffisamment proche** (**quencher=extincteur**) le REM émis est absorbé par le **quencher** et aucune lumière n'est émise .

FRET : *Fluorescence Résonance Energy Transfert*

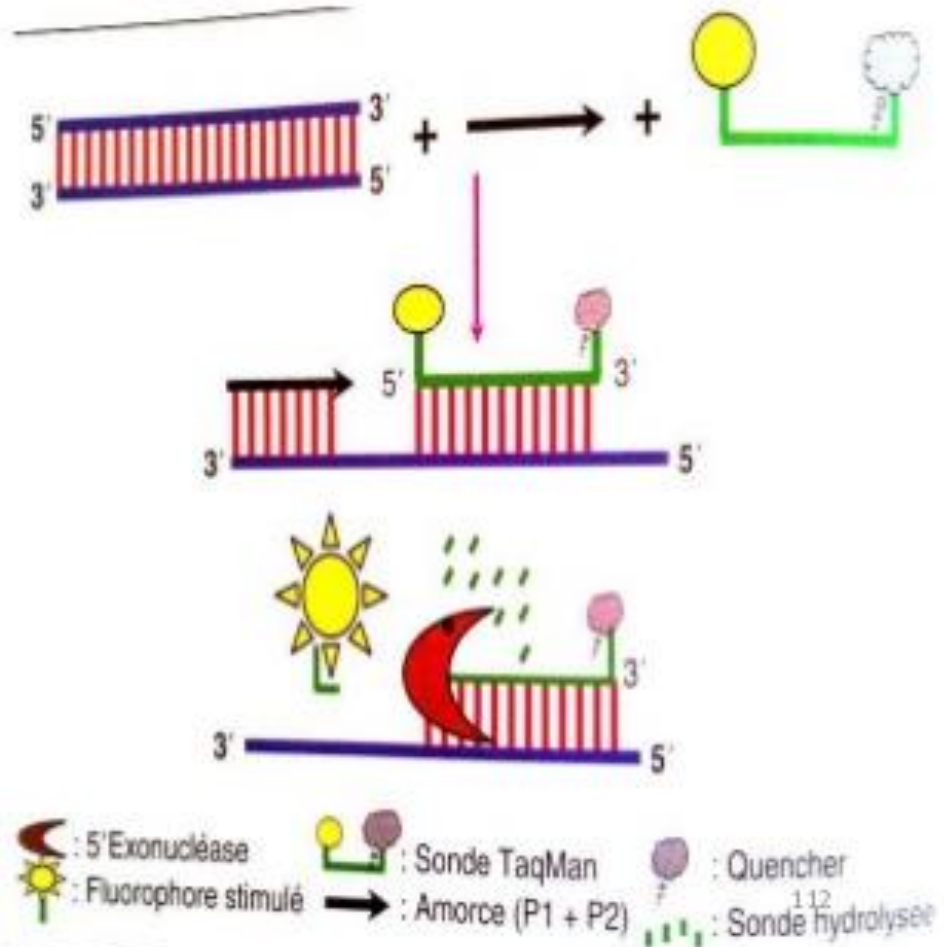
Sondes monobrin **de 15 a 30** nucléotides , Complémentaire a la partie **centrale** de la cible. $T_m > T_m$ amorces.

principe : **activité 5'-3' exo**
nucléase de la Taq Polymérase .

Lors de **l'élongation** la Taq Pol rencontre **la sonde** et la **détruit** (nom Taq Man /analogie jeux PacMan)

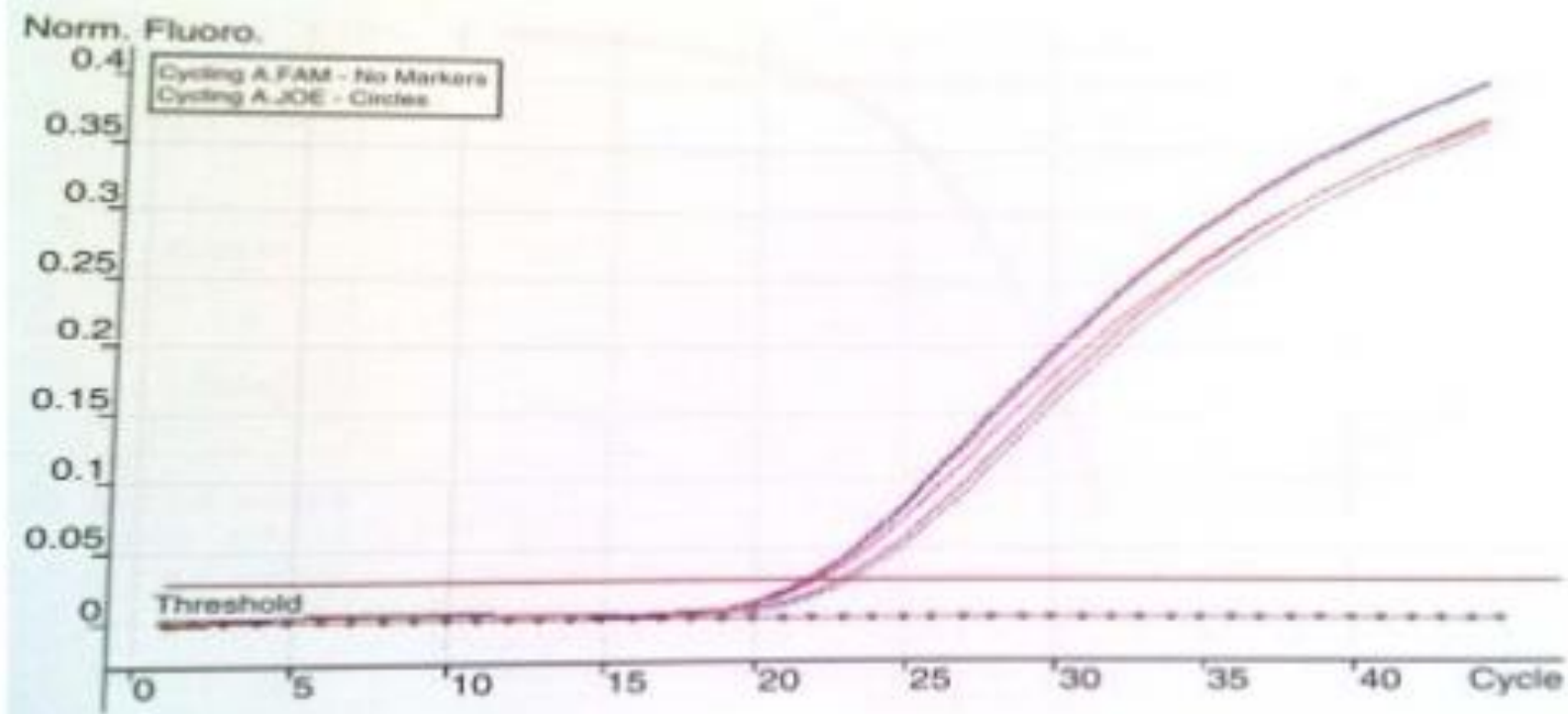
Fluorophore et **quencher** ne sont plus a des distances ou le Transfert d'énergie est possible .

Fluorophore excité--- émettre une lumière ---- **photomultiplicateur** .



Sondes TaqManTM

- La quantité de lumière émise \sim
quantité de sonde détruite \sim quantité
de produit de PCR synthétisé



*Aspect de la fluorescence après amplification par PCR en temps réel **Sondes TaqMan**
5 échantillons , chacun représenté par une couleur distincte*