

# **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

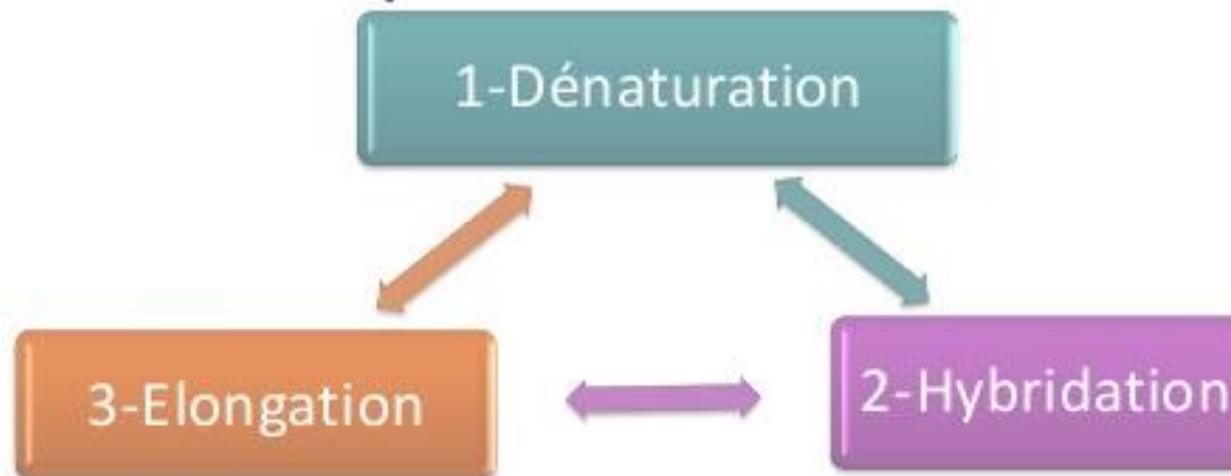
PCR CLASSIQUE

spécificité/sensibilité  
rapidité/possibilité de quantification

REAL TIME PCR« EN TEMPS »

# PCR classique

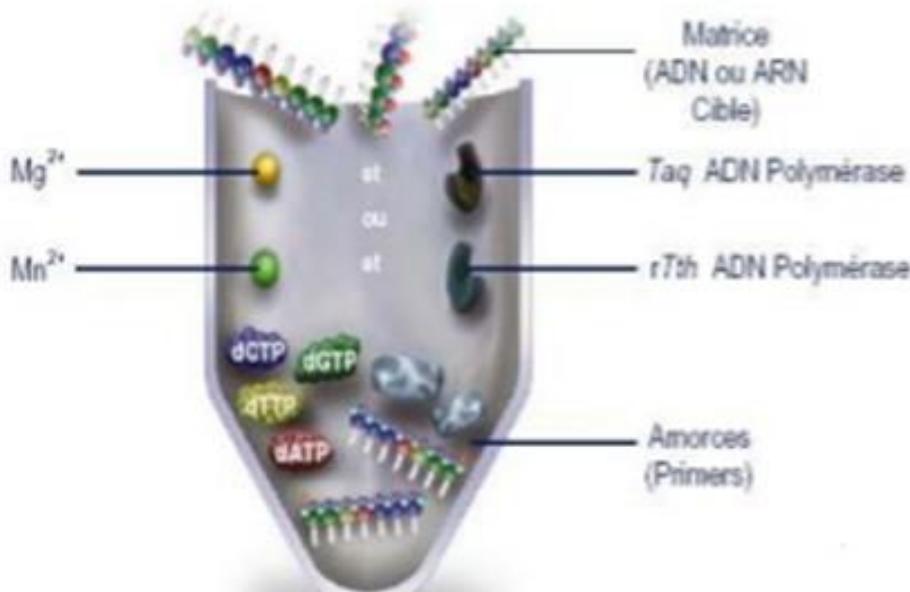
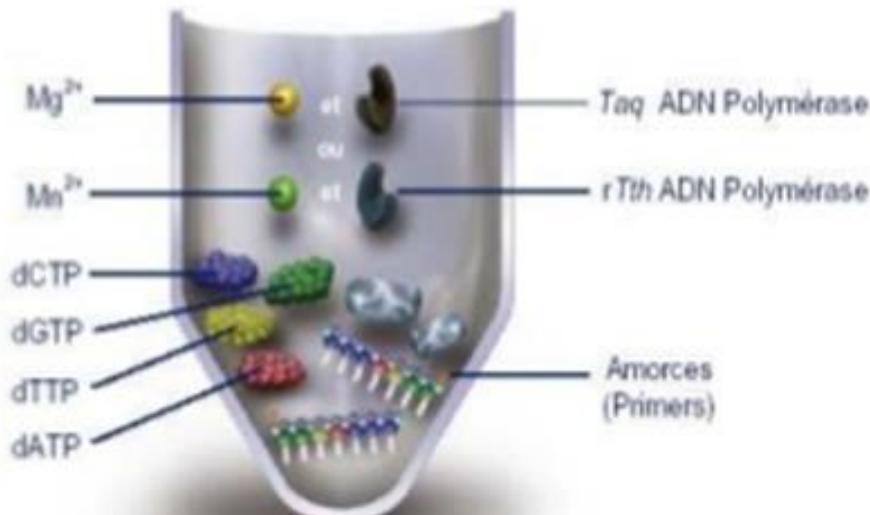
- Basé sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice .
- C'est est une succession de cycles, chaque cycle contenant 3 étapes :

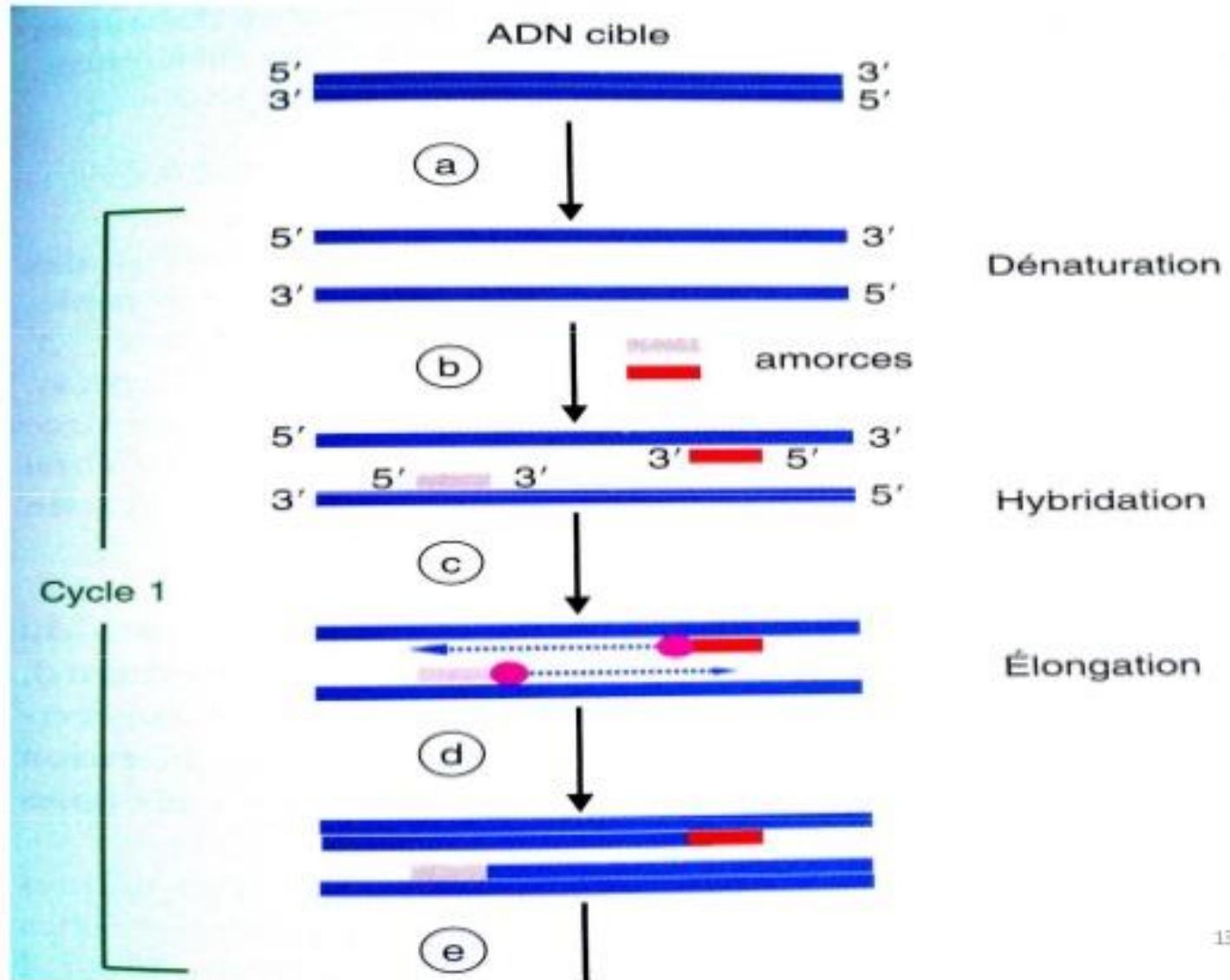


## Milieux réactionnel :

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

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

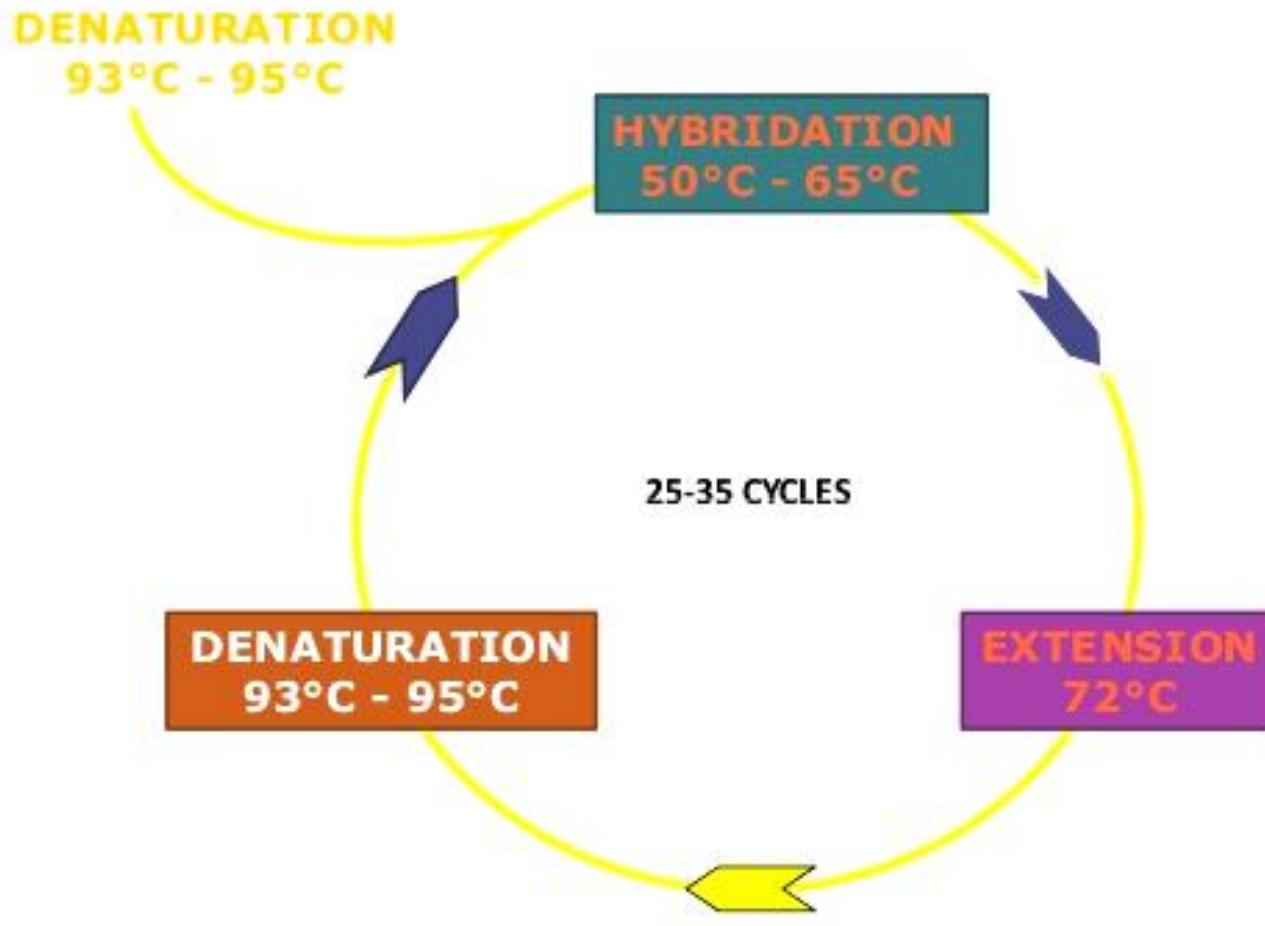


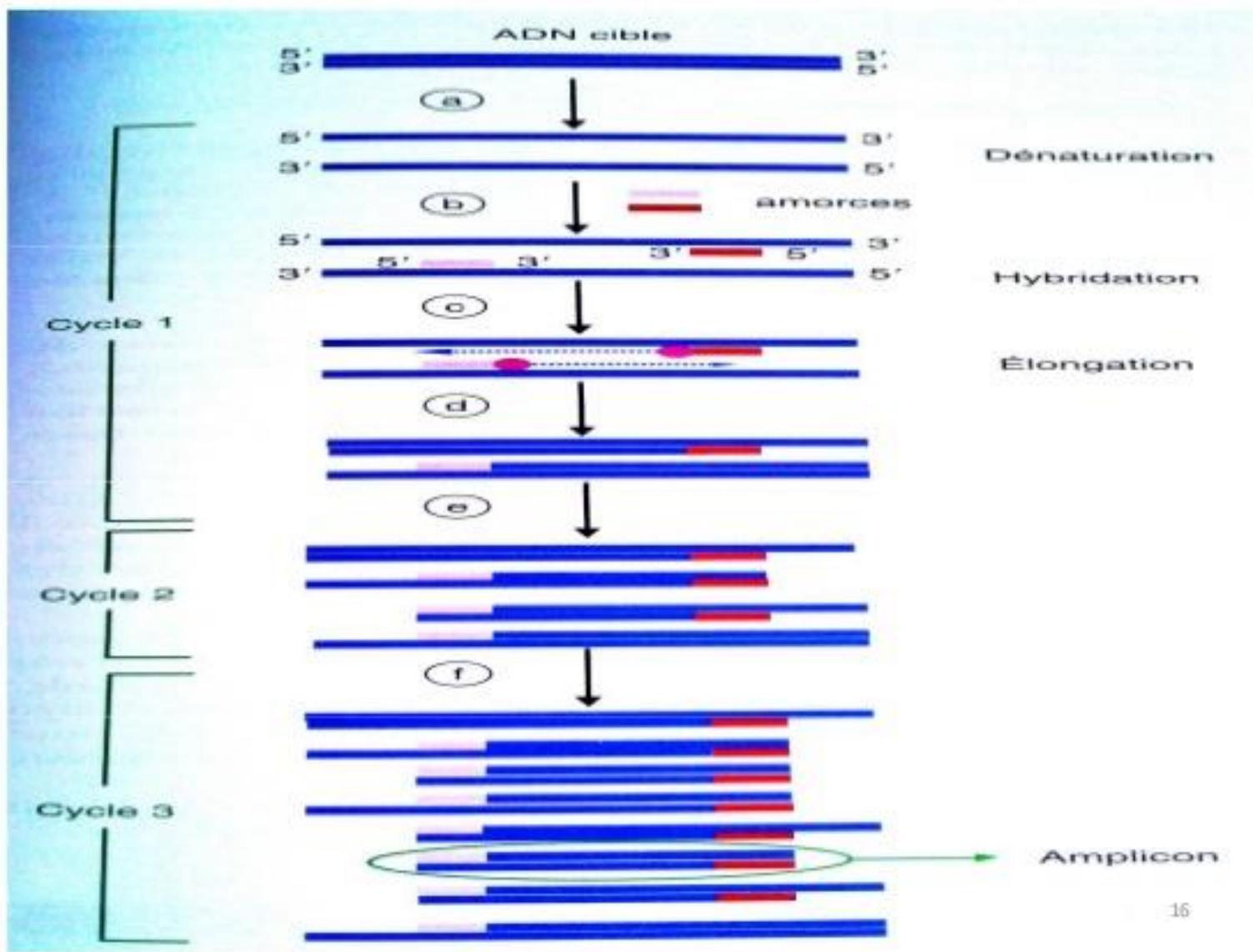


**1-Dénaturation thermique a 95 °C:** ( $95^{\circ}\text{C} > \text{TM de l'ADN}$ ) : rupture des liaisons hydrogènes et séparation des deux brins d'ADN pour donner deux ADN simple brins matrices .

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

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

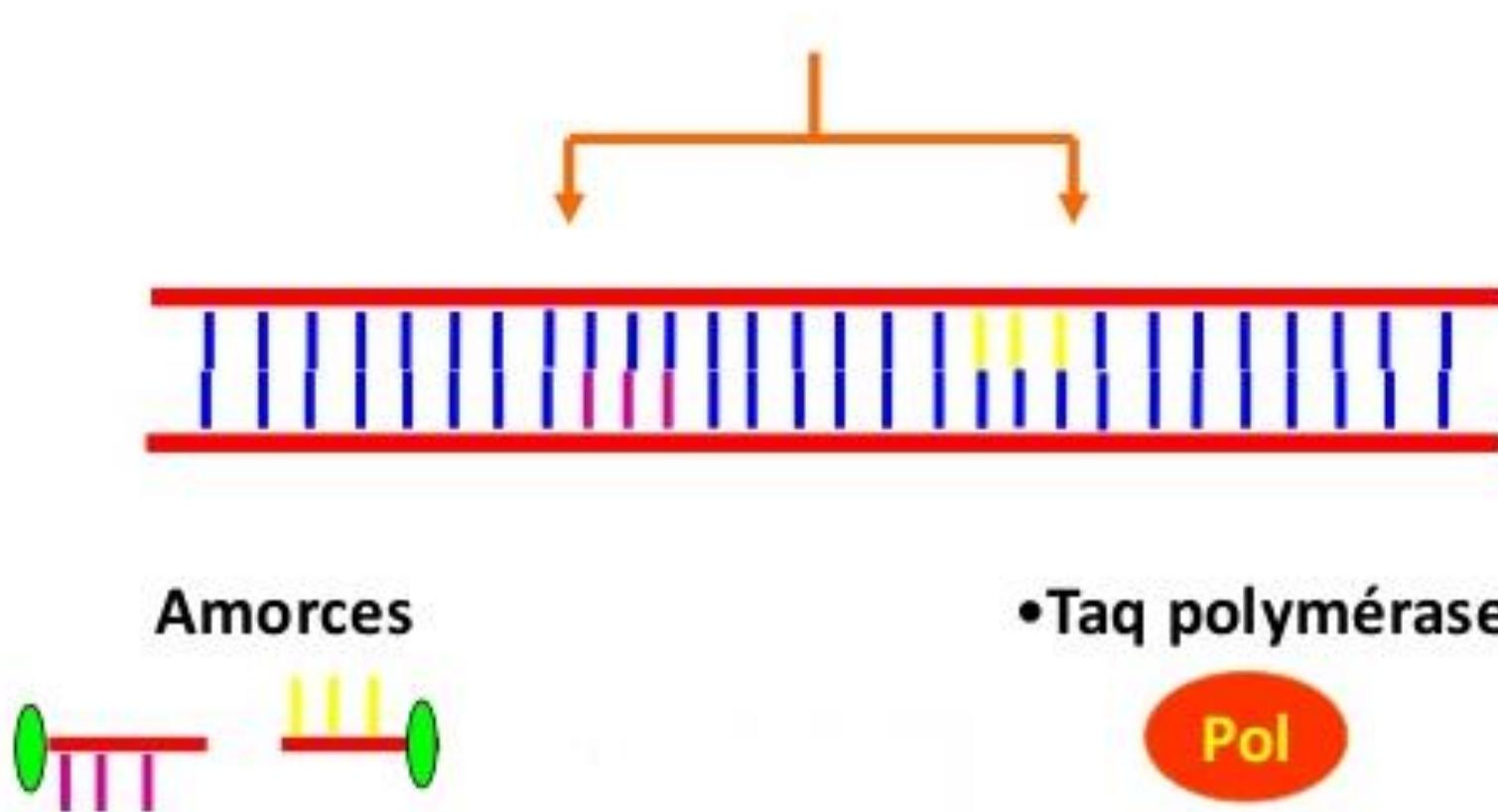




Déroulement de la réaction:

# 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



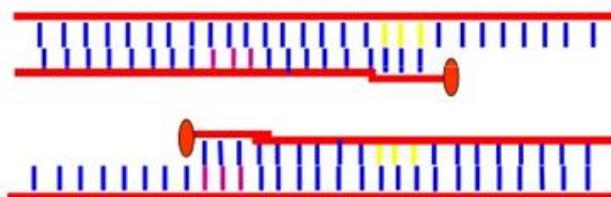
## Étape 3: Polymérisation

Température: 72°C

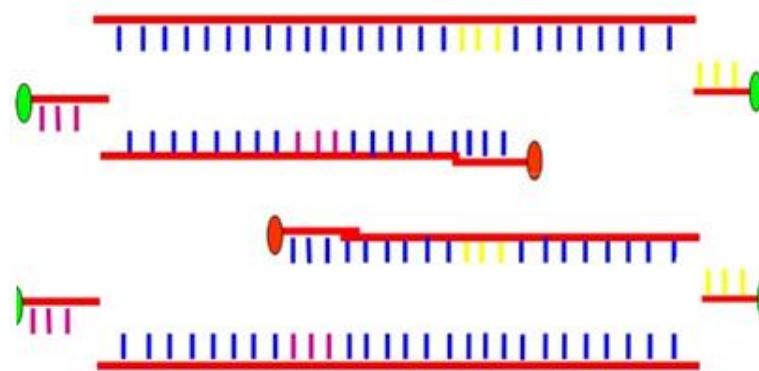
durée: 1 min

# Deuxième cycle

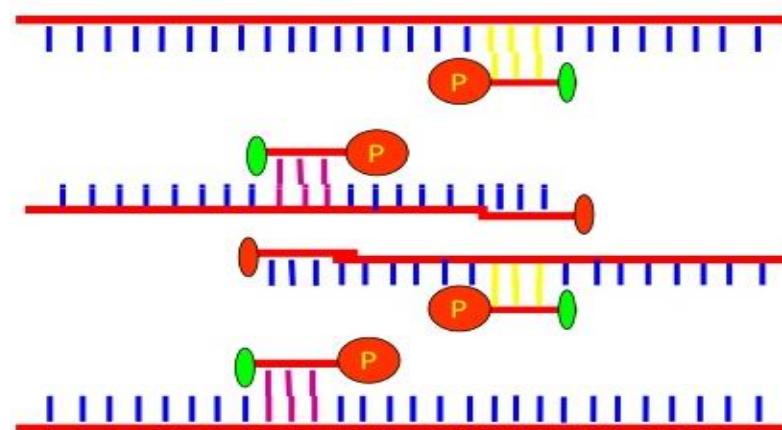
## Dénaturation



## Hybridation



## Polymérisation

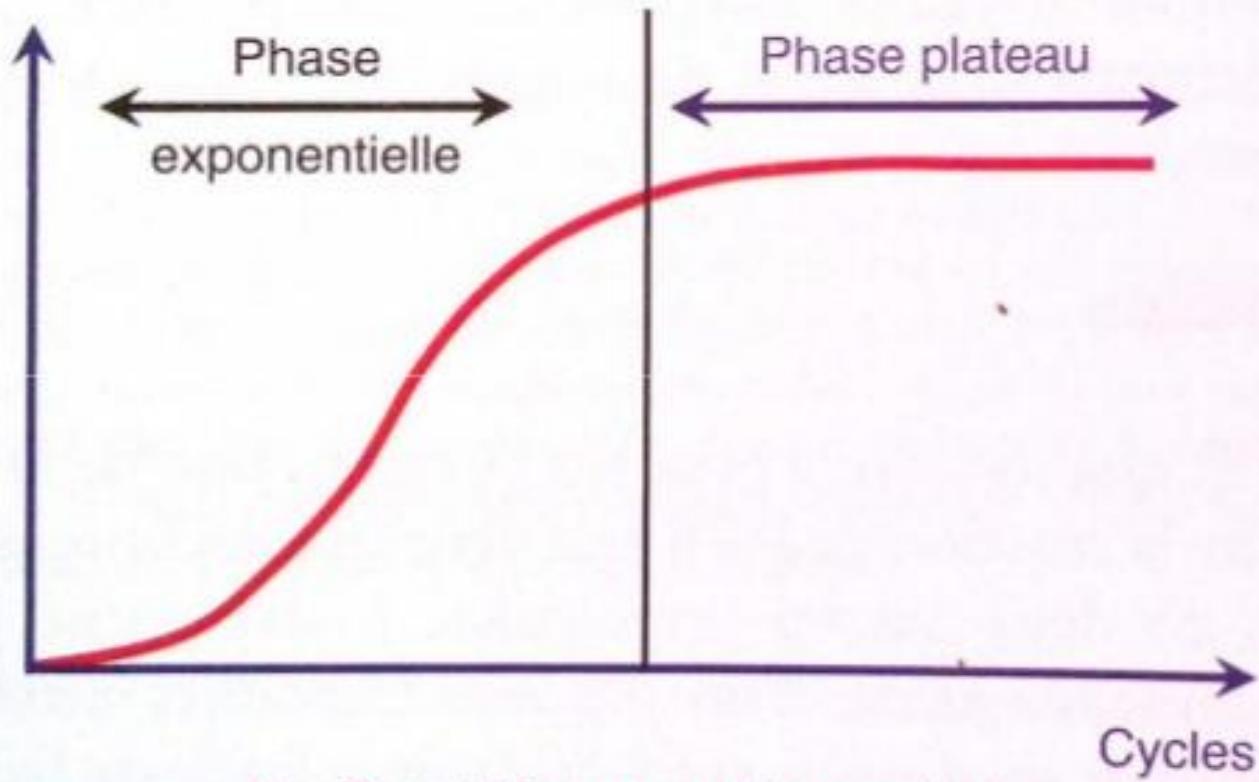


A chaque fois ,la **quantité d'ADN double** dans le tube.

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

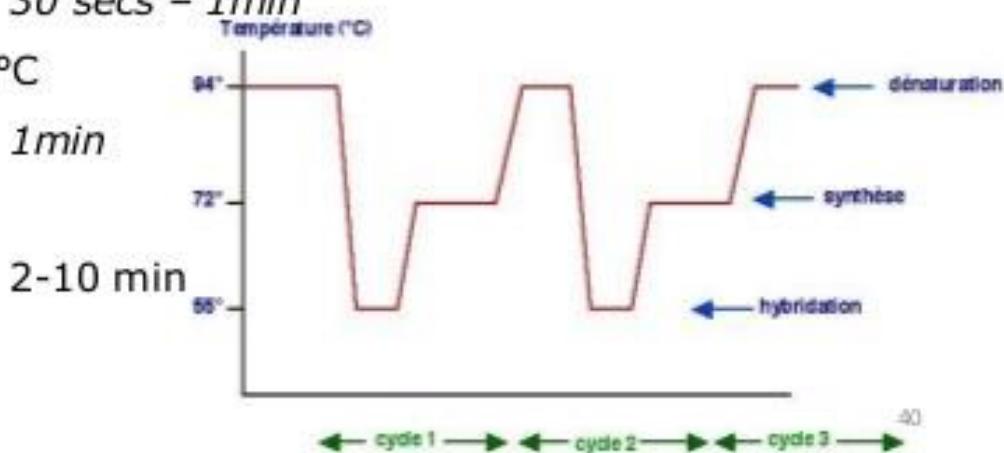
Hybridation; 50°C - 65°C

30 secs – 1min

Extension; 70°-75°C

X 25-35 cycles

Extension finale





## 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<sub>2</sub>

## OPTIMISATION

### l'enzyme: ADN polymérase thermostable

- ❖ Actuellement on utilise **la taq polymérase** « eubactéries » extraite de bactérie (*Thermus aquiticus*) vivant dans les sources chaudes.
- ❖  $T^\circ$  optimale =**72°** (70-75°)
- ❖ Capable de résister a **de fortes  $T^\circ$**  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 à 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°)

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

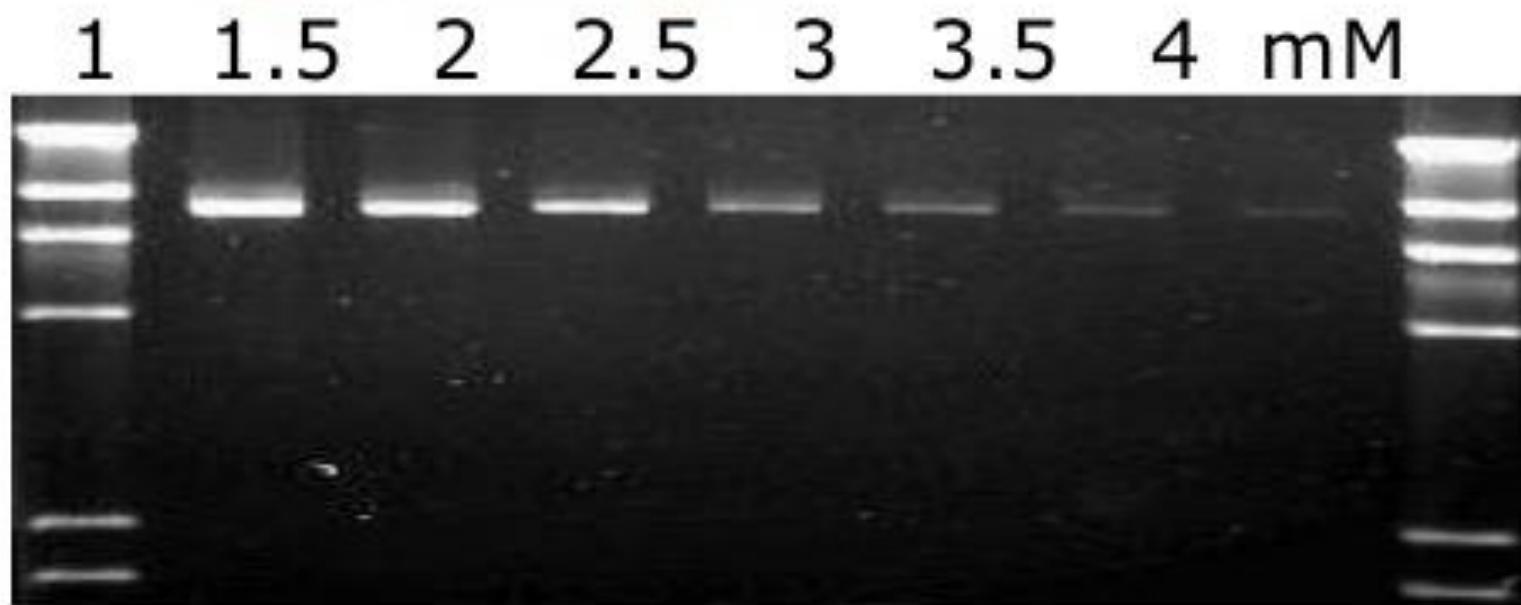
Formule approximative , valable pour des amorces inférieures a 25 nucléotides.

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

## Magnésium : MgCl<sub>2</sub>

valeur comprise entre 1.5 mM et 2 mM le Mg<sup>2+</sup> influence l'activité de l'enzyme , augmente la stabilisation du double brin et élève le Tm.

Pour optimiser une PCR il est nécessaire de faire une gamme de MgCl<sub>2</sub>.



## Température de fusion

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

## Agents chimiques

- **Le DMSO (2-10%)** (sulfoxyde diméthylique) 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 , ameliore 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'ya 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 amplifié:
  - elle ne doit pas être supérieur 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.

## 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 à un segment autre que la cible.
- ❖ Par ↑ T°: 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 mutations ponctuels :**  
se fait par hybridation des produits PCR avec des sondes oligo-nucléotidiques (technique du "DOT-BLOT")

**Maladies infectieuses :** détection d'ADN ou d'ARN viral  
*Neisseria gonorrhoea*  
*Chlamydia trachomatis*  
*HIV-1*

Introduction du produit PCR dans un vecteur: **clonage du produit PCR**

**Etude de l'expression des gènes**

**séquençage direct du produit PCR**

**Contamination de l'eau**

**DNA fingerprinting**

**Diagnostique de préimplantation :**  
fertilisation in vitro

**Cancérologie :** lorsque sous traitement ; les cellules cancéreuses ne sont plus détectables par les outils usuels . La PCR détecte les mutations distinctes présentes dans ces cellules cancéreuses

# Variantes de la PCR

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

## ***Reverse transcription- PCR .***

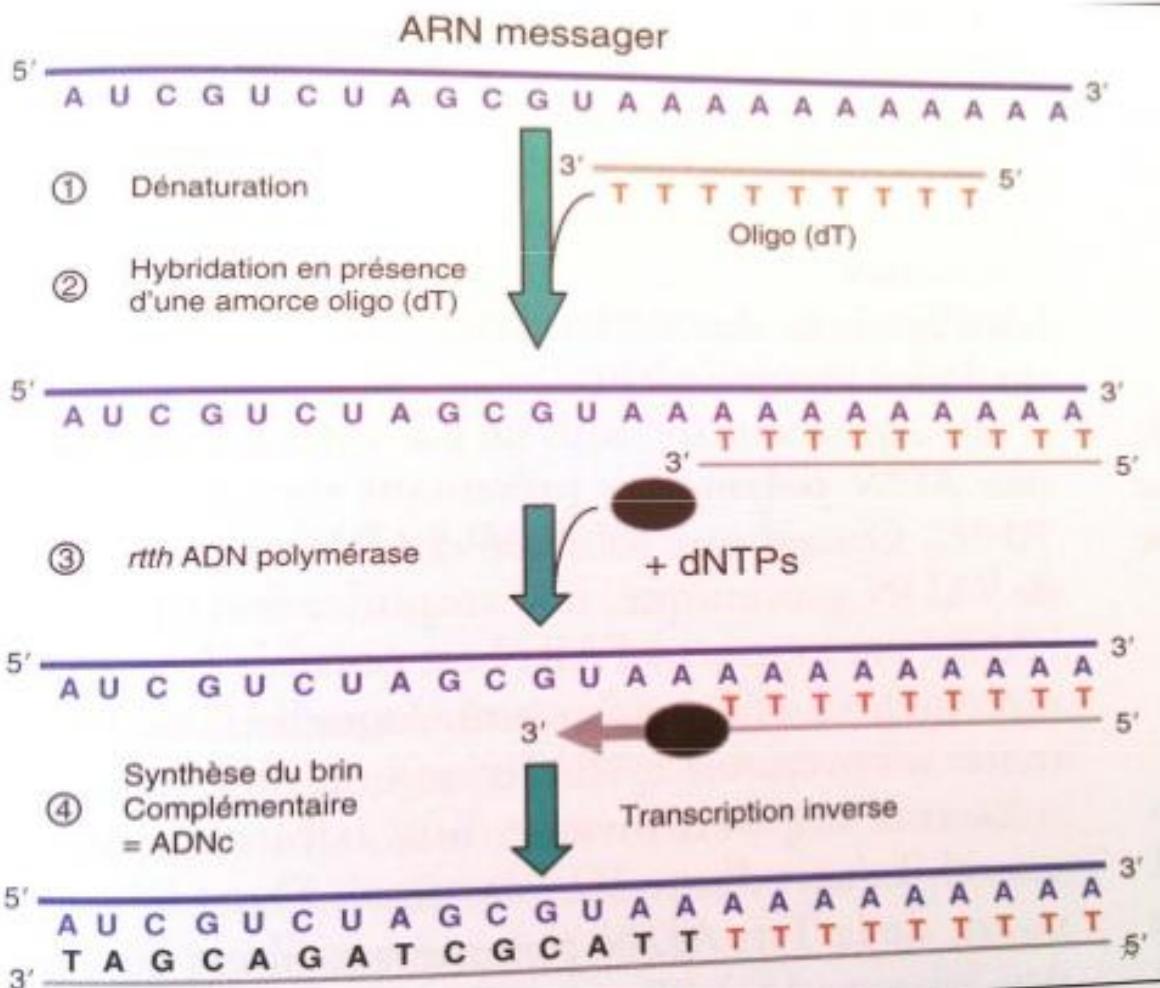
- **PCR** : amplification de fragments d'ADN  
**ARN** --- reverse transcription ----- **ADN c** ----- **PCR**

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

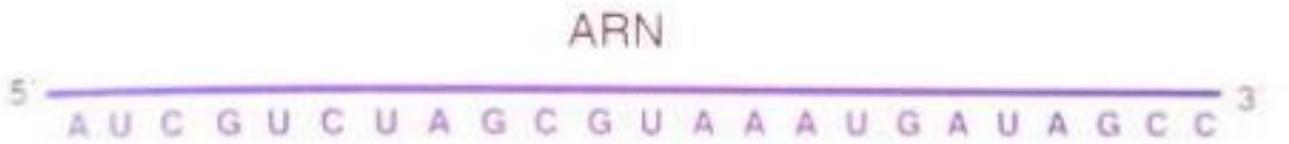
**Principe** : une transcriptase inverse (**ADN polymérase ARN directed**) transforme l'ARN messager , viral, ribosomal en ADN. Celui-ci pourra être amplifié par PCR.

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

- 1- amorces oligo dt: desoxythymidine seulement, utilisés pour la RT-PCR d'ARN m (toujours polyadenylé en 3')

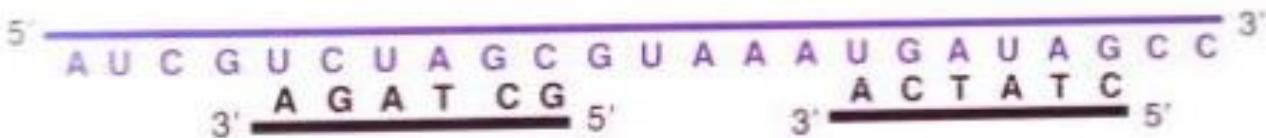


- **2-Amorces hexanucléotidiques randomisées :**  
Mélange d'amorces très courtes (**6 nucléotides**)  
comprenant toutes les séquences possibles  
pouvant composer un hexanucléotide :  $4^6 =$   
**4096** possibilités .  
- grande certitude que des oligonucléotides  
s'hybrideront à l'ARN pour servir d'amorce .
- **3- Amorces spécifiques .**



① Dénaturation

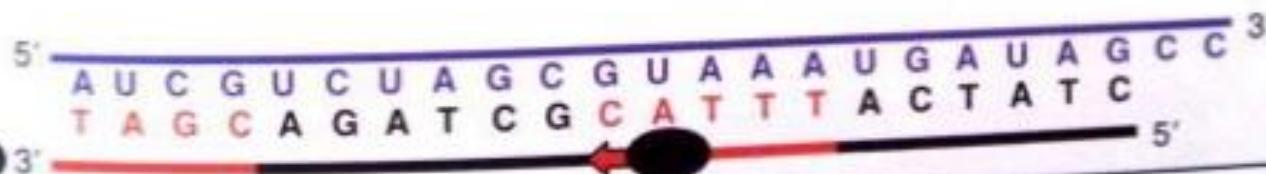
② Hybridation en présence de mélange d'oligo-hexamères



③ Synthèse du brin complémentaire  
= ADNc

dATP, dCTP  
dTTP, dGTP

rnth ADN polymérase



- 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

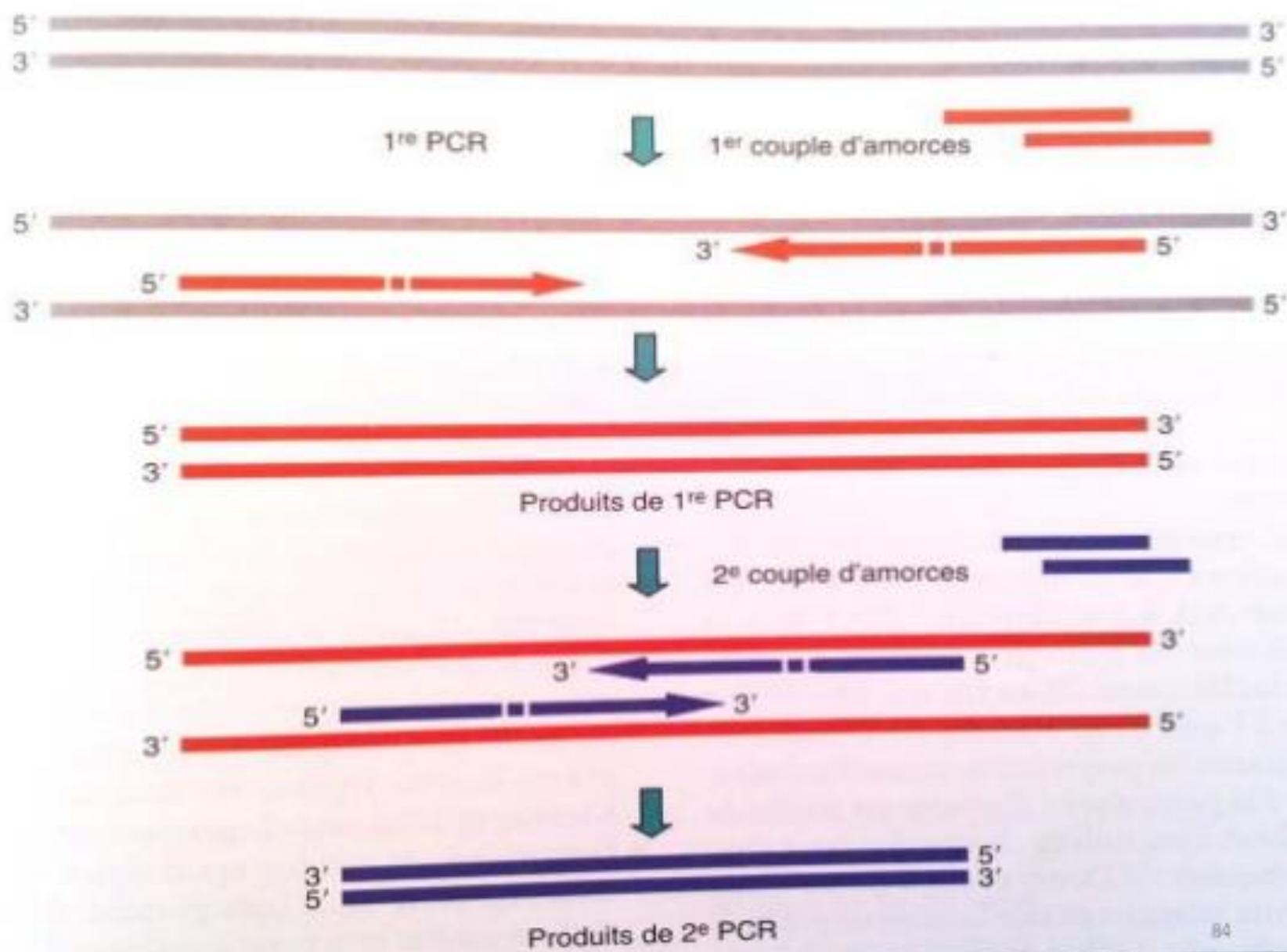
Activité ADN polymérase  
ARN directed ,  
Mn( MnSo4)  
Température optimale :  
60 °C \*

\*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 .



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

**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 a 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 **dystrophine2000Kb** : 9 couples d'amorces pour chercher des délétions .

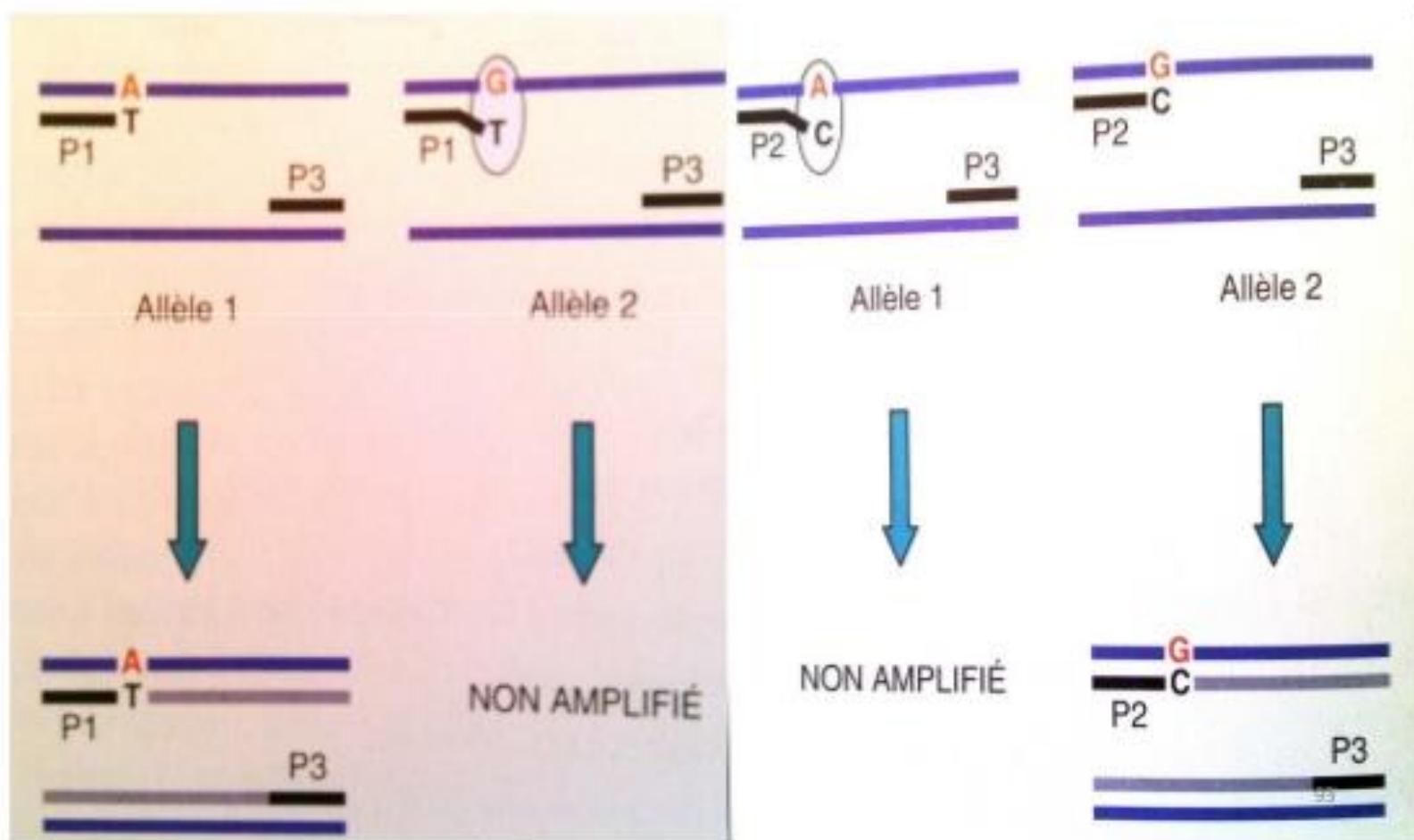
**Mise au point difficile .**

## **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 à profit** dans cette technique.

## Allèle spécifique PCR



**P1**- compatible- **allèle 1**

**P2**-compatible- **allele2**

**P1**--- mésappariement---**allele2**

**P2**---mésappariement---**allele1**

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**

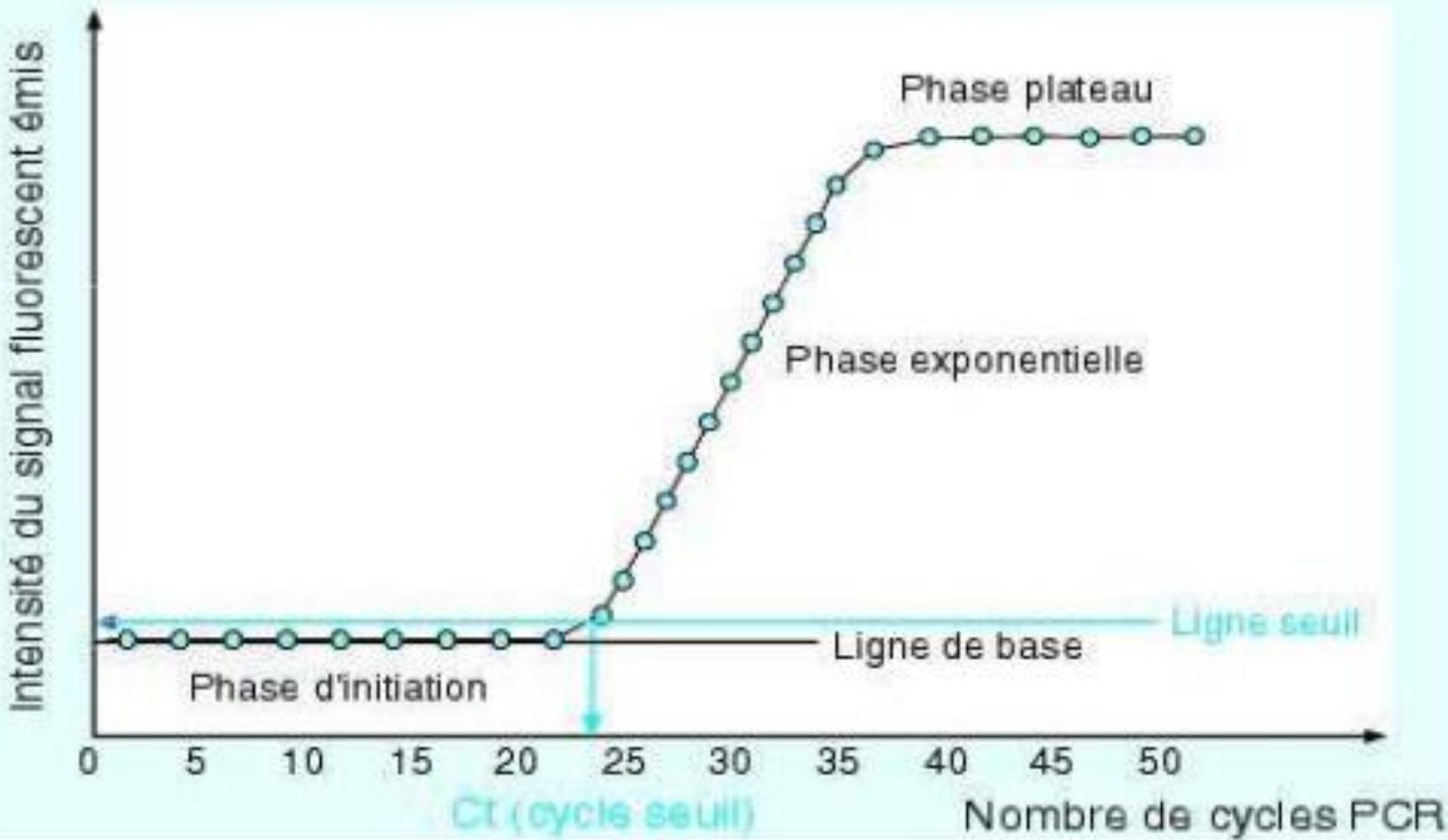
### *Principe*

**Détection et quantification** d'un signal **fluorescent** émis par un **fluorophore** dont l'intensité d'émission est **proportionnelle** à 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. *SYBR™ Green*

Sondes  
d'hybridation

- 1 seule sonde linéaire marqué en 5',3' ou les deux. *Sondes TaqMan™*
- 2 sondes linéaires (1-5 pb) marqués: 5',3' ou les deux *Sondes FRET™*
- 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

Traitemen<sup>t</sup> du  
signal

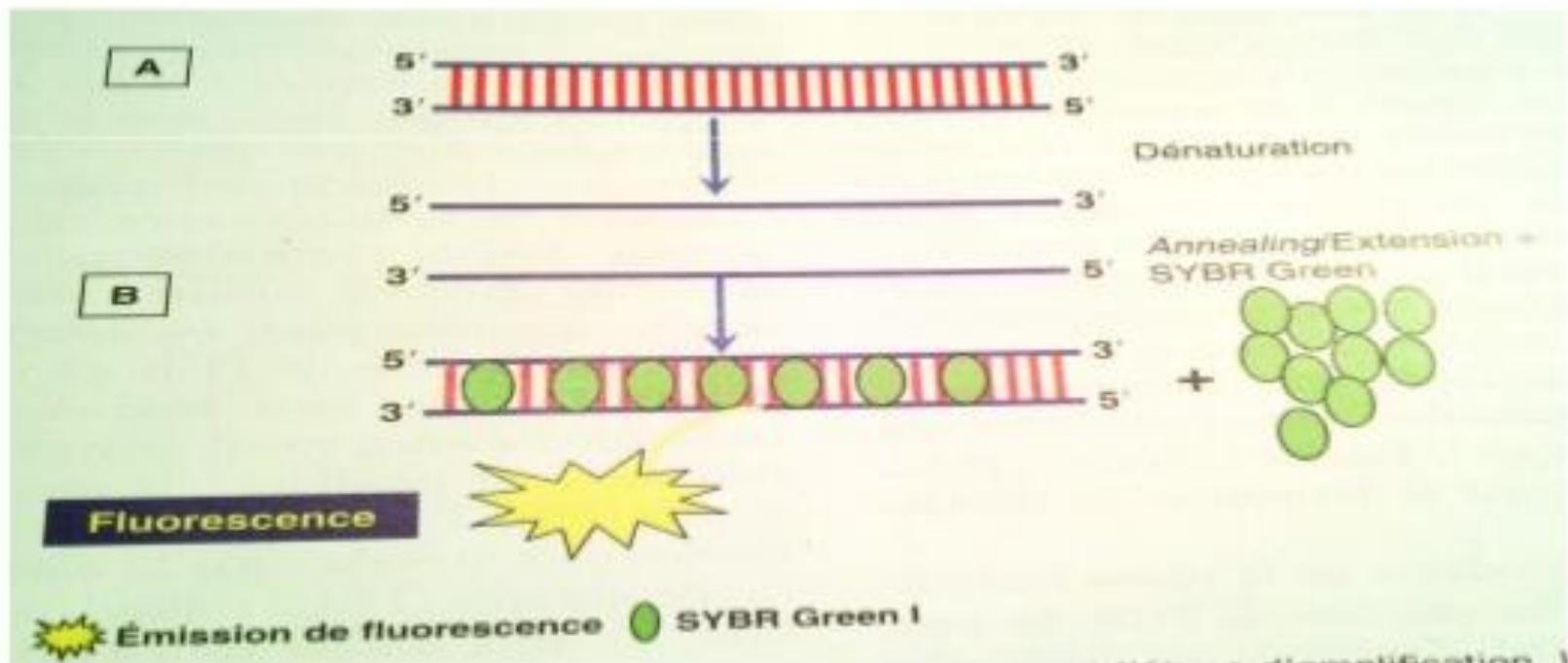
## *Appareillage*



*ABI Prism® 7900*

## ***SYBR™ 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™*

- 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™



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**

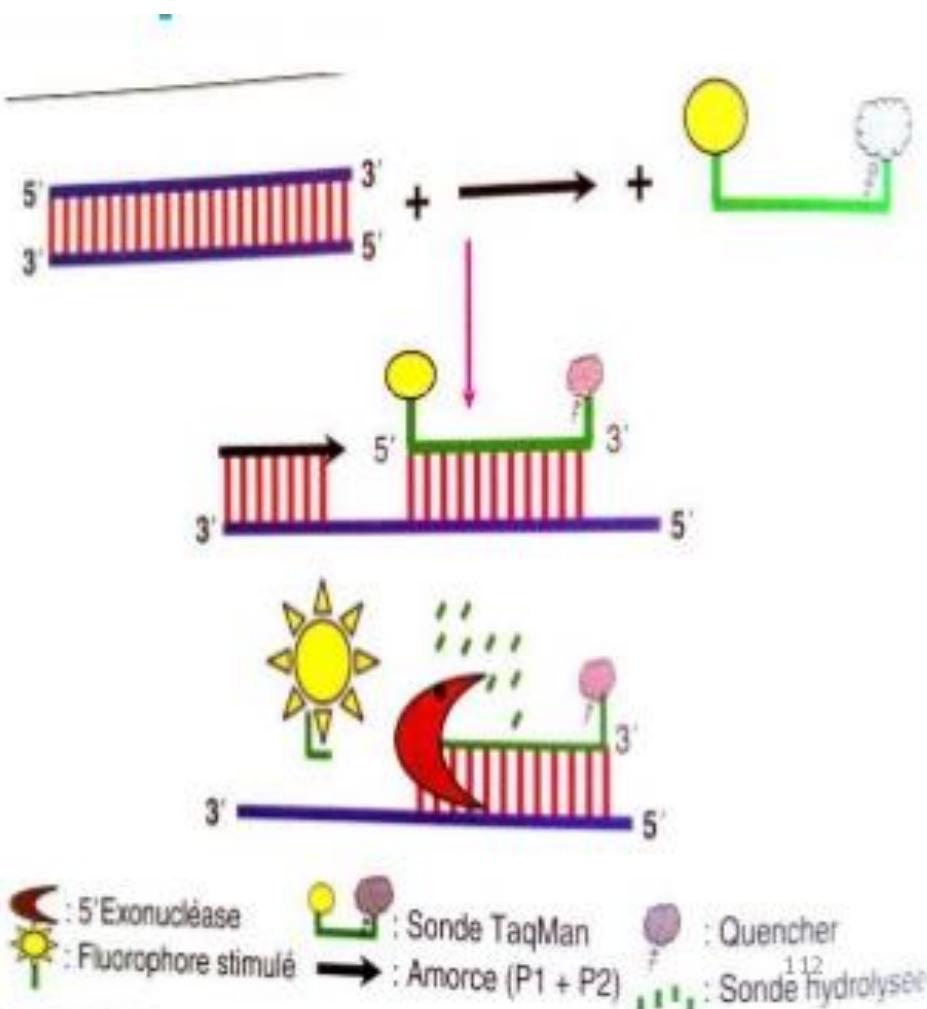
Sondes monobrin de 15 à 30 nucléotides, Complémentaire à la partie **centrale** de la cible.  $T_m > T_m$  amorces.

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

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

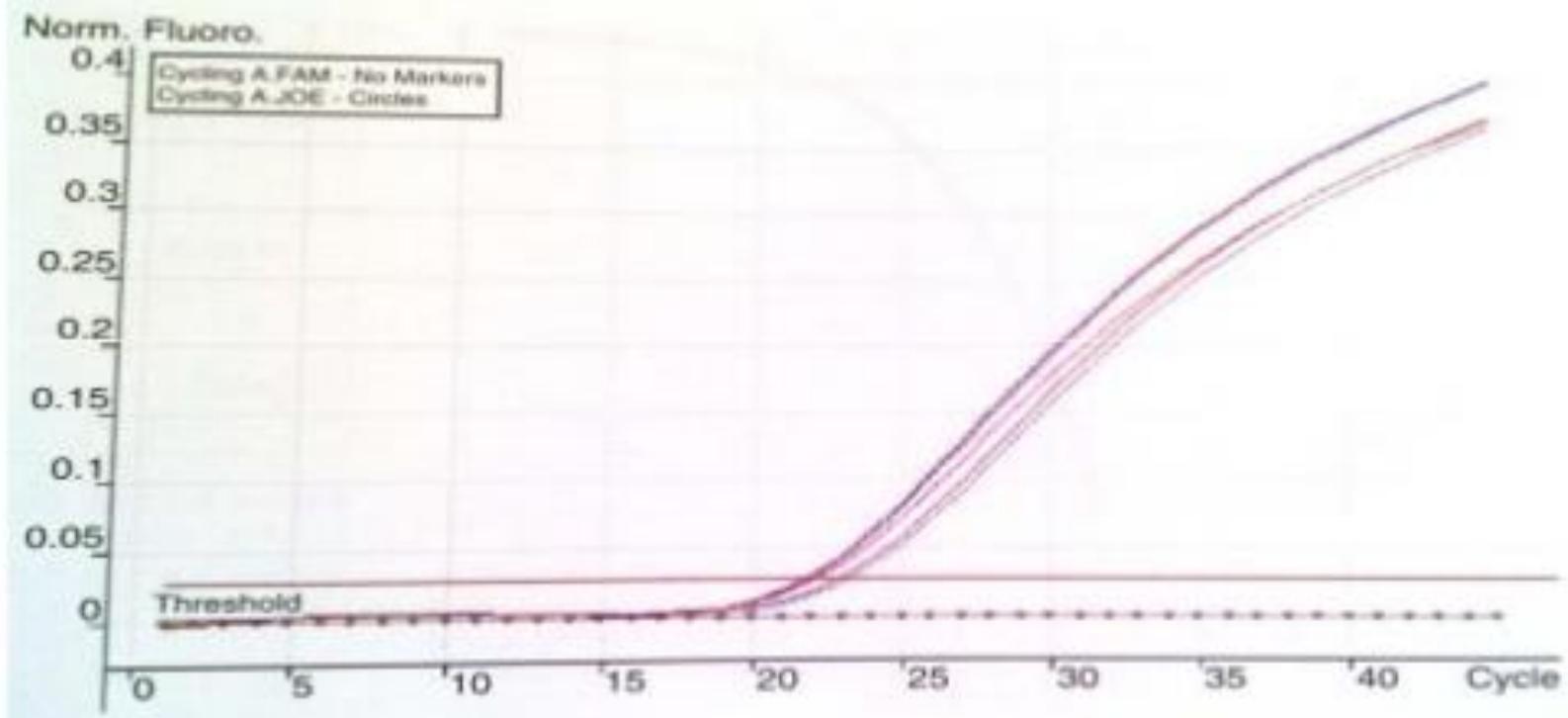
**Fluorophore** et **quencher** ne sont plus à des distances où le Transfert d'énergie est possible .

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



## *Sondes TaqMan™*

- La quantité de lumière émise ~  
quantité de sonde détruite ~ 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