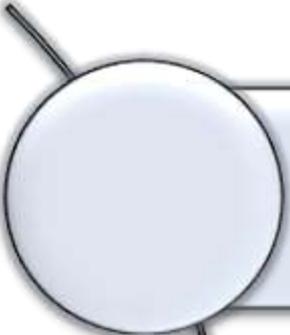


Master: Agroalimentaire et contrôle de qualité
Master: Microbiologie appliquée

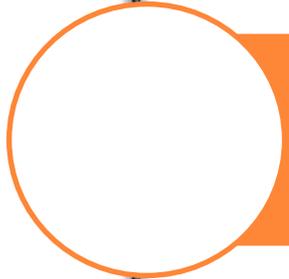
UEF4:
Méthodes moléculaires et contrôle de
qualité
« Techniques de contrôle moléculaire »

Dr Alioua S
2019/2020

PROGRAMME



Chapitre 1: Rappel sur les différents microorganismes responsables des toxi-infections alimentaires



Chapitre 2: Analyses immunologiques



Chapitres 3: techniques d'hybridation moléculaire et technique PCR



CHAPITRES 3

Technique PCR Et Techniques D'hybridation Moléculaire



TECHNIQUE PCR



DÉFINITION

- La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR (ou encore ACP pour Amplification en Chaîne par Polymérase), est une technique de répllication ciblée in vitro.
- Elle a été créée en 1983 par Dr Kary MULLIS (Prix Nobel de chimie en 1993)
- Aujourd'hui c'est une technique incontournable et couramment utilisée en routine dans les laboratoires.



- **P (polymerase):** la seule enzyme utilisée dans cette réaction est l'ADN Polymérase.
- **C (Chain):** le produit de la première réaction devient le substrat de la suivante, et ainsi de suite.
- **R (Reaction):** les composants de la réaction:
 - ✓ ADN cible
 - ✓ Amorces
 - ✓ dNTPs
 - ✓ ADN polymérase
 - ✓ Ions Mg^{2+}
 - ✓ Solution tampon



- Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie.
- L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures. C'est, généralement suffisant pour une utilisation ultérieure.



- La PCR se base sur le principe suivant :
 - Connaître d'abord les fragments (18 à 30 nucléotides) qui encadrent la séquence d'ADN à amplifier.
 - Synthèse de séquences complémentaires à ces fragments : ce sont les amorces oligonucléotidiques.
 - L'ADN polymérase commence la synthèse des brins complémentaires grâce aux amorces et le nombre de copies de la séquence d'ADN est doublé pour chaque réplication.



LES ACTEURS DE LA PCR

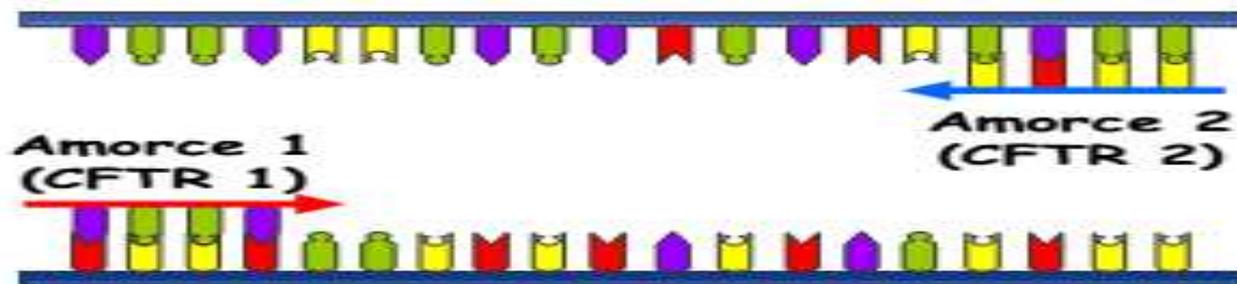
1. L'ADN

- Avant la réaction de **PCR**, l'**ADN** est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules...).
- Puis, cet extrait purifié en **ADN**, contenant le fragment d'**ADN** que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en **PCR**.



2. Les deux amorces

- Ce sont des fragments courts d' **ADN**, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d' **ADN**.
- Les **amorces** sont choisies de façon à encadrer la séquence d' **ADN** à amplifier. La taille de ces amorces est généralement d'une vingtaine de **désoxyribonucléotides**. De plus, les **amorces** sont en très forte concentration par rapport à celle de l'**ADN** à amplifier.



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

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

4. L'enzyme, Taq polymérase

- L'enzyme utilisée est une polymérase, c'est-à-dire qu'elle peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une **amorce**.



5. Le milieu réactionnel

- Le milieu réactionnel de la **PCR** comporte l'**ADN** à amplifier, les **dNTPs**, les deux **amorces**, la Taq polymérase, un tampon et des ions magnésium ($MgCl_2$).
- Ces deux derniers composants définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'**enzyme**.



LA REACTION

- La **PCR** est une technique automatisée.
- En effet, la réaction de **PCR** se fait dans un thermocycleur.
- L'appareil contient un bloc chauffant où l'on insère les tubes contenant notre mélange pour la réaction de **PCR** et où la température peut varier très rapidement et très précisément de 0°C à 100°C.



- Le thermocycleur est alors programmé pour effectuer les différents cycles de la **PCR**.
 - Ainsi, chaque cycle est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée, et d'une durée bien définie.
 - Ces deux paramètres, température et temps, dépendent de la taille de la séquence à amplifier de la taille et de la composition en **désoxyribonucléotides** des amorces
- 



Bloc chauffant

Clavier pour la
programmation
des cycles

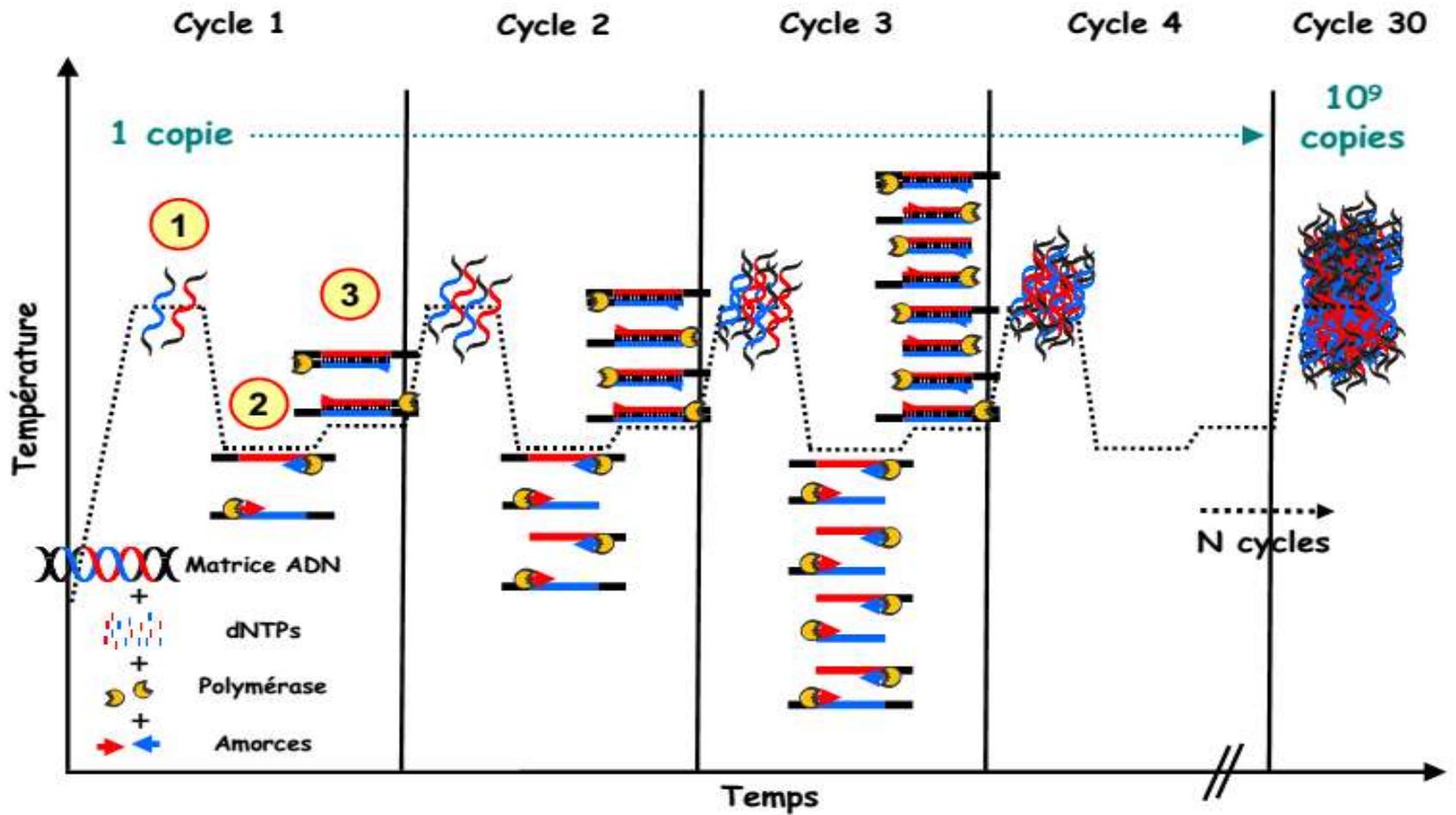


ETAPES DE LA RÉACTION

- La PCR se fait en trois étapes qui constituent un cycle, répété pendant un certain temps
 - Dénaturation
 - Hybridation
 - Elongation
- Le temps, la température et le nombre de cycle sont des facteurs qui déterminent le résultat de la PCR , ainsi on les modifiant nous pouvons optimiser la réaction



Schéma de la PCR



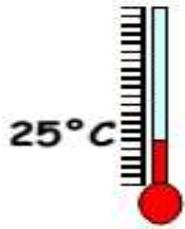
- 1** Dénaturation
- 2** Hybridation
- 3** Elongation



1- La dénaturation:

- La température dans le tube est réglée à 95°C. A ce moment là, l'**ADN** se dénature.
- En effet, l'**ADN** perd sa structure caractéristique en double hélice, les liaisons hydrogène reliant les bases de chaque brin d'**ADN** étant instables à cette température.
- L'**ADN** double-brin (2 brins) est dénaturé en **ADN** simple brin (1 brin).

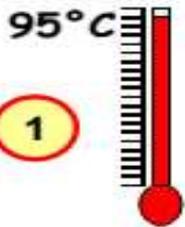
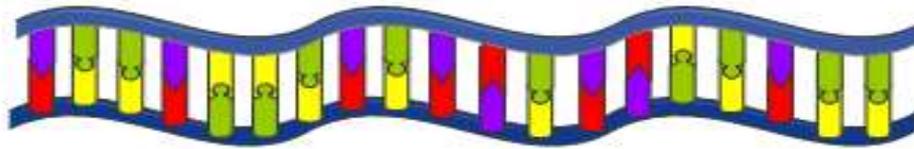




25°C

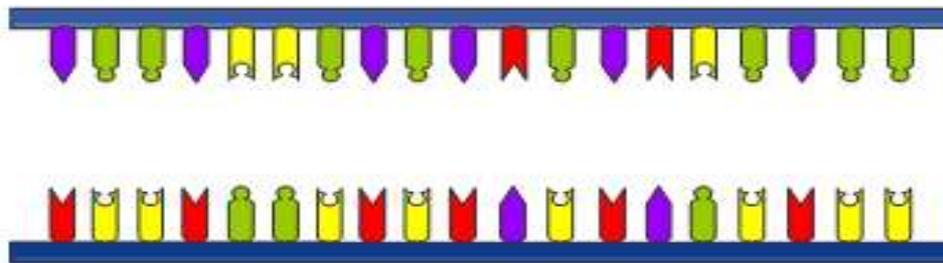


ADN
double-brin



95°C

1



2 brins d'**ADN**
simple-brin

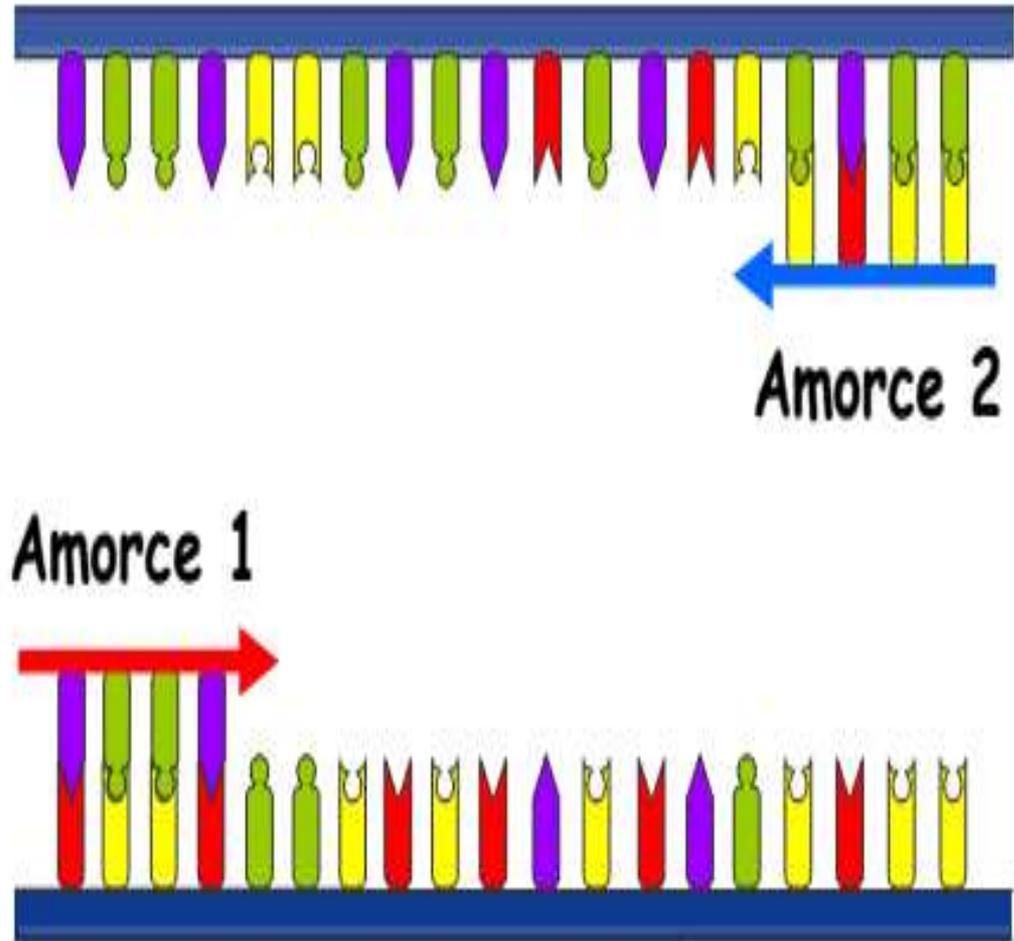
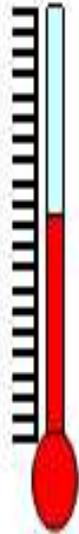
2- L'hybridation:

- Ensuite 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 les amorces s'hybrident au brin d'ADN.



2

Entre
50°C
et
60°C



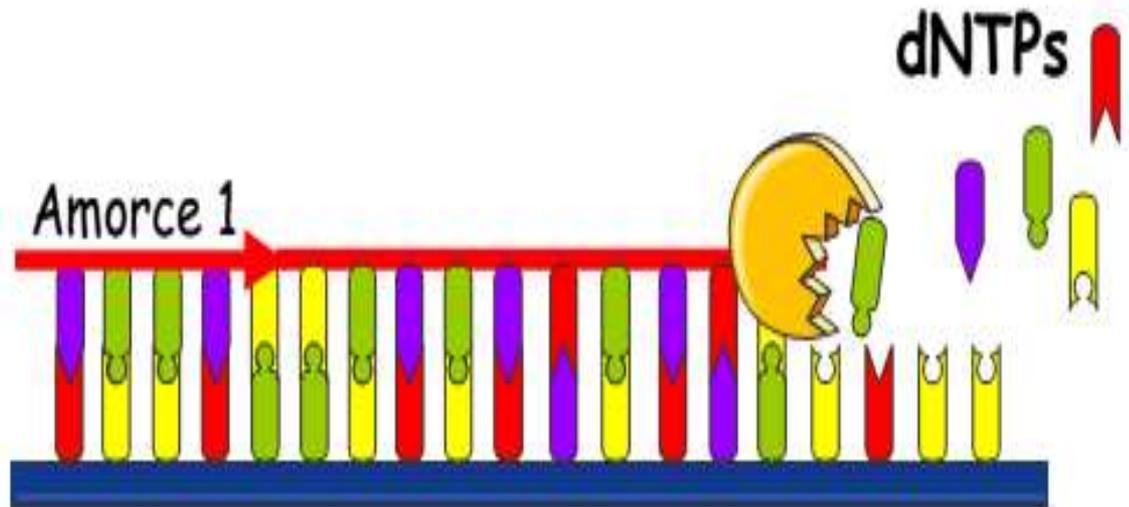
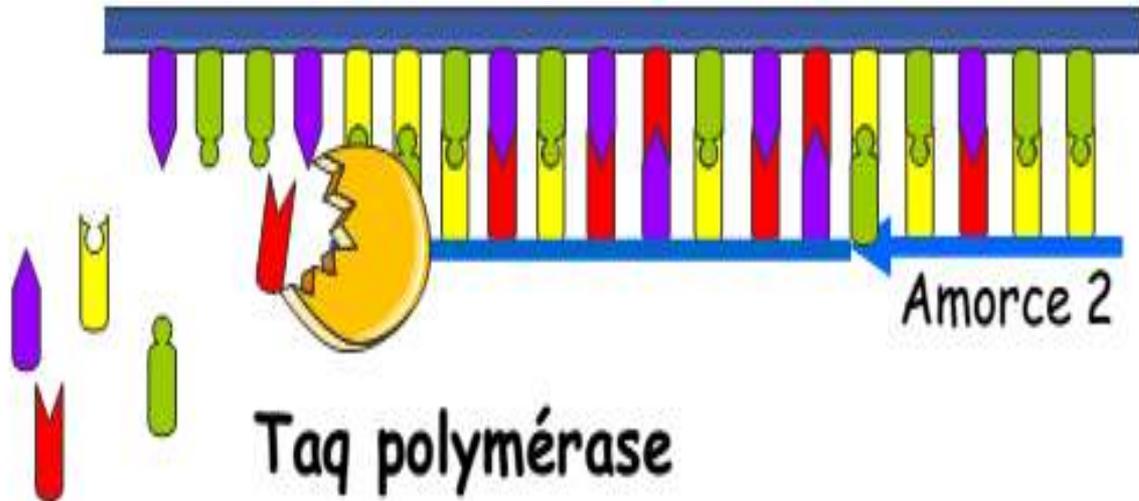
3- L'élongation:

- Puis la température est réglée à 72°C, température idéale pour l'activité de la Taq polymérase. C'est une enzyme très spéciale, puisqu'elle est dite thermorésistante.
- En effet, sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des températures allant jusqu'à 100°C.
- Cette étape permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux **dNTPs** libres présents dans le milieu réactionnel.



72°C

3



- 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.



DOMAINES D'APPLICATION DE LA PCR

- **Recherche fondamentale:** (dépistage de mutation, découverte de médicament, classification des organismes, génotypage, archéologie moléculaire, épidémiologie moléculaire, bioinformatique...)
- **Recherche appliquée :** (appariement génétique, détection des agents pathogènes, diagnostic prénatal, empreinte génétique, thérapie génique...)



Application 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.



○ Exemple: Détection d'OGM dans les aliments

- Un **OGM** est un organisme génétique modifié. C'est un organisme dont le patrimoine génétique a été modifié par ajout d'un **gène** ou plusieurs **gènes** particuliers, conférant ainsi à l'organisme de nouvelles caractéristiques (par exemple le **gène** de résistance à un herbicide ou à un parasite). Ces **gènes** ajoutés sont appelés des transgènes.
- Des laboratoires se sont spécialisés dans la recherche d'**OGM** dans de nombreux produits à la base de notre alimentation (maïs, soja, farine, semoule, gluten, corn flakes, amidons et dérivés, extrait protéique, sirop de glucose, lait de soja, tourteau, lécithine, etc ...).



- Après avoir extrait l'**ADN** des produits ils font plusieurs **PCR** en utilisant différents couple d'**amorces** spécifiques pour un transgène connu.
- Si le transgène n'est pas présent dans le produit, les **amorces** ne s'hybrident pas sur l'**ADN** et la **PCR** est négative.
- Au contraire, si le transgène est présent, il sera détectable par l'obtention d'un produit d'amplification et la **PCR** est positive.



LIMITATION

- la PCR est un processus d'amplification exponentielle de l'ADN. Cependant, il y a deux limitations:
- Les constituants présents dans le mélange réactionnel sont en quantité finie.
- L'efficacité de la duplication n'est pas toujours totale. Il peut ainsi arriver qu'une proportion faible mais constante des amorces ne s'hybrident pas avec la matrice d'ADN à chaque étape d'hybridation des amorces (choix d'amorce, température d'hybridation)



TYPES DE PCR

- Nested PCR
- In situ PCR
- Multiplex PCR
- RT-PCR
- Real-time PCR
- Random primer PCR





la rapidité et la facilité d'utilisation, la sensibilité, la spécificité et la robustesse de la PCR ont révolutionné la biologie moléculaire et ont fait de la PCR la technique la plus largement utilisée et la plus redoutable avec un large spectre d'applications de recherche et de diagnostic.

