

Chapitre VI: Méthode De Biologie Moléculaire

VI. LA PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985. par Karry Mullis. C'est une technique d'amplification génique. c'est-à-dire qu'elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis. même présent en quantité infime dans un mélange. puis de le multiplier rapidement.

En effet. moins de 3 ans après sa mise au point. l'ensemble des laboratoires de biologie moléculaire l'utilisaient.

Le principe de la PCR

Le principe de la PCR consiste à utiliser. de manière répétitive, l'une des propriétés des ADN polymérase : celle de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce.

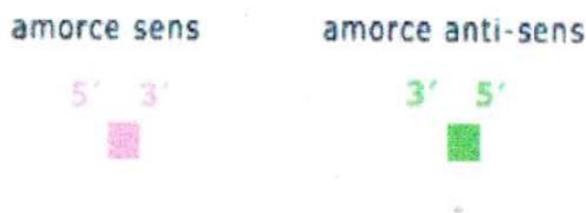
L'ADN

Généralement sous forme de double-brin, il contient le fragment à amplifier. Nous le représenterons comme ceci :



Deux amorces, sens et anti-sens

Ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.



Une enzyme

La Taq Polymerase (Taq Pol). une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa

température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C. ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

Taq

dGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.



La réaction

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

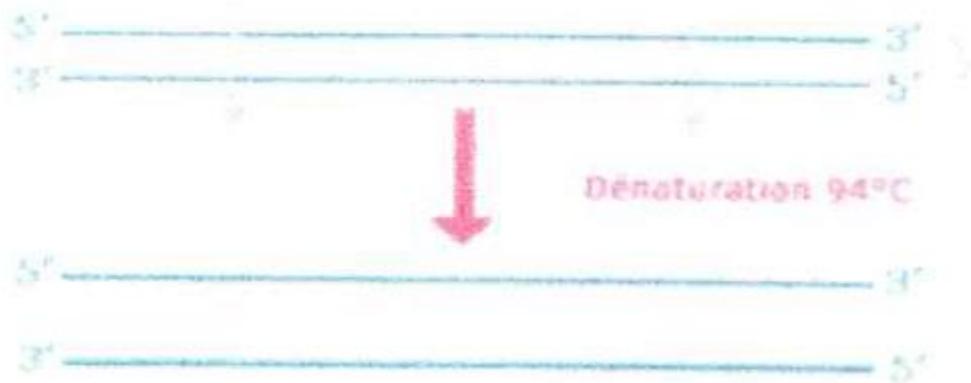
- Dénaturation
- Hybridation
- Elongation

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur.

Que se passe-t-il à chaque étape ?

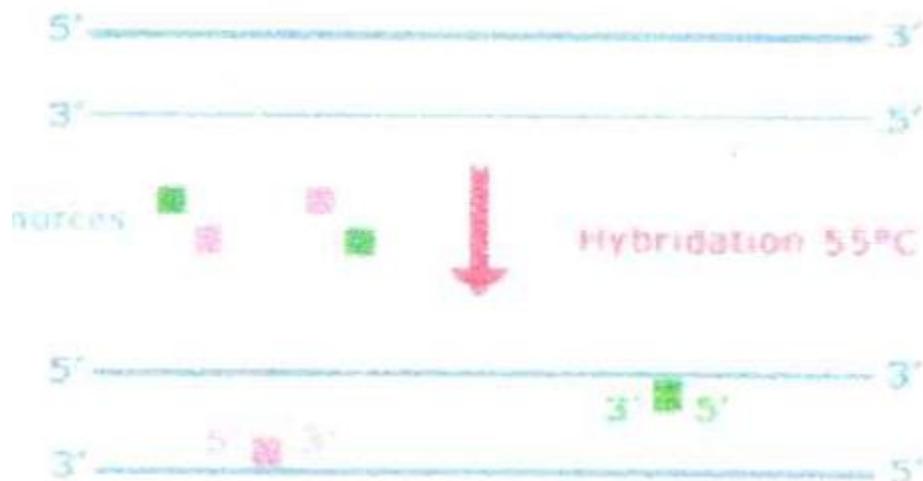
Dénaturation

Le tube est chauffé quelques secondes à 94°C. Les double-brins d'ADN se séparent. On dit alors que l'ADN est dénaturé.



Hybridation

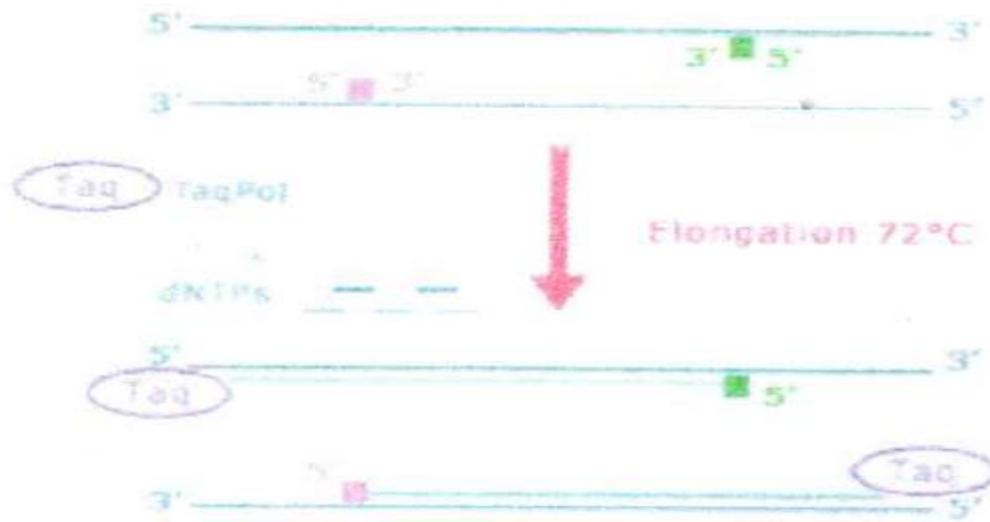
La température est rapidement abaissée à 55°C. Les amorces « reconnaissent » leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cibles. Elles s'hybrident chacune sur leur brin respectif. Cette étape dure une minute afin de laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement. L'ADN total plus long, n'aura pas le temps de se réhybrider.



Élongation

La température du tube est ensuite augmentée à 72°C. ce qui permet à la Taq Pol d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées. dans le sens 5' vers 3'. Les nucléotides ne sont pas incorporés de façon aléatoire mais en fonction de la séquence cible (nucléotide complémentaire). Cette étape dure | minute.

Un nouveau brin d'ADN, dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible. vient d'être synthétisé.



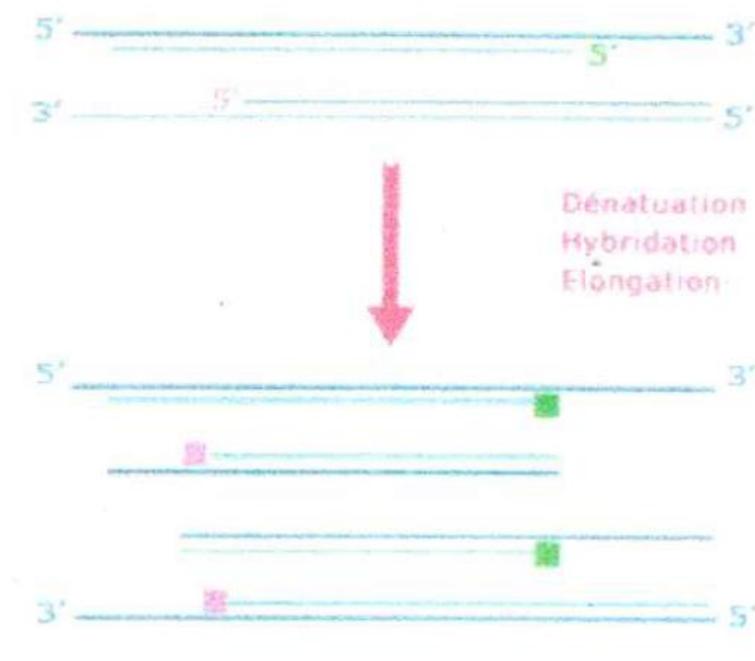
Que se passe-t-il à chaque cycle ?

Le premier cycle

Il a permis de synthétiser autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles présents dans le tube. Ils deviennent à leur tour des ADN cibles.

Le deuxième cycle

La quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins, dont la taille est limitée par les deux amorces font leur apparition.

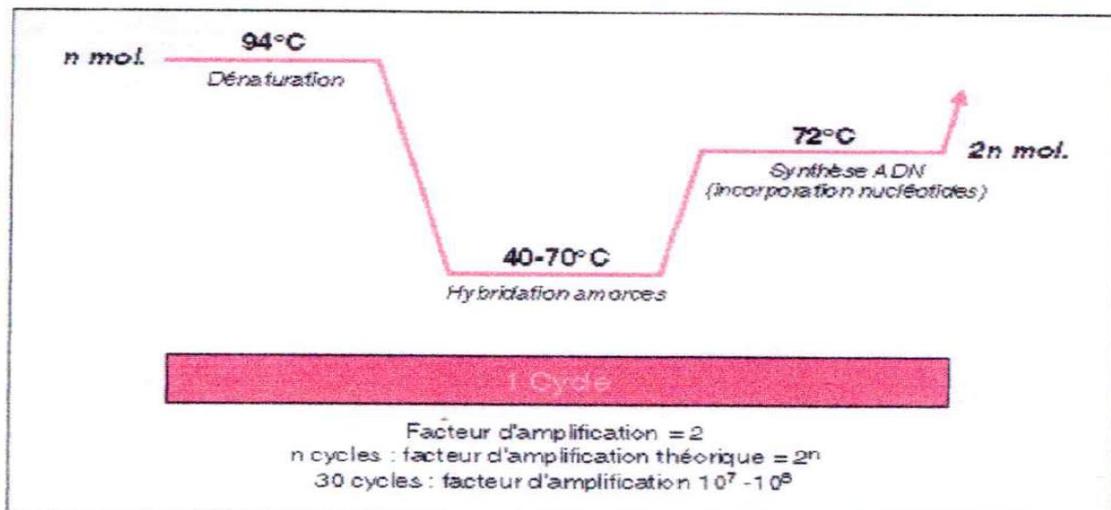


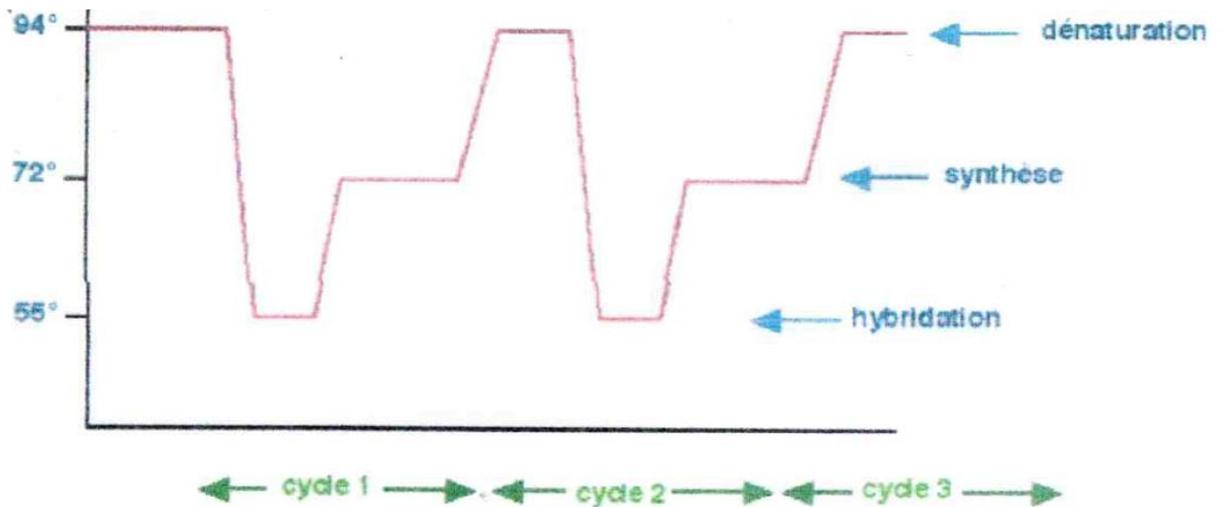
Le troisième cycle

Les premiers amplicons apparaissent. ADN double-brins bornés par les amorces, correspondant au fragment d'ADN recherché. La taille des fragments varie généralement de 50 paires de bases (pb) à 2 kilobases (Kb).



Au fil des cycles la quantité d'amplicons va augmenter de façon exponentielle. On obtient. En théorie 2^n copies pour n cycles. Dans la pratique. pour un rendement classique de 85%. une PCR de 30 cycles produit environ 10^9 copies (amplicons de taille attendue).





Comment visualiser les produits d'amplification ?

Leur quantité est suffisante pour être visualisée avec le Bromure d'Ethidium (BE). Produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques. Lorsqu'elle est intercalée. Cette molécule présente une fluorescence orange sous illumination par des UV courts (environ 300 nm).

Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose.

Cette électrophorèse permet de faire migrer les acides nucléiques au travers du gel additionné de BEt. La vitesse de migration étant dépendante de la masse moléculaire. donc du nombre de bases de l'ADN testé. la présence et la taille des amplicons pourront être vérifiées.