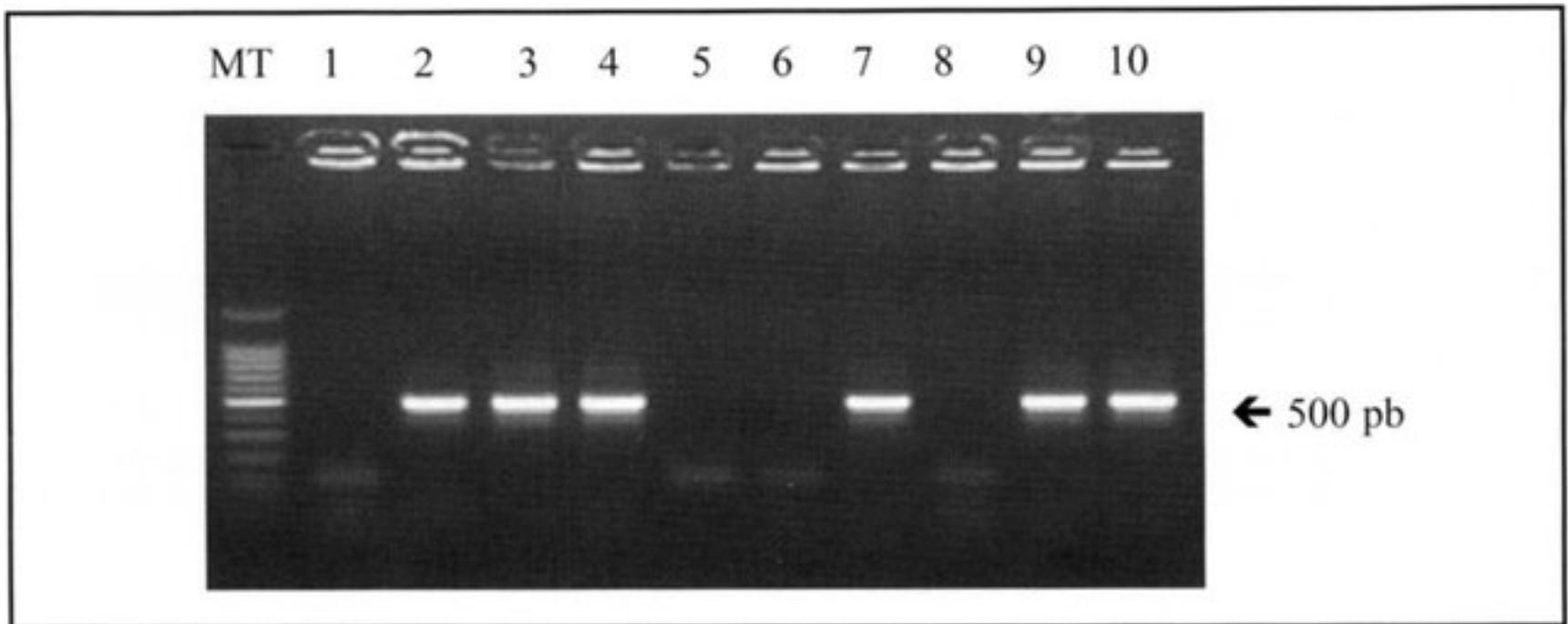


# *Techniques d'Analyse Moléculaire*

## **PCR (Polymerase Chain Reaction)**



Dr AMIROUCHE A.

Licence Biochimie (2020/2021)

# Chapitre 3

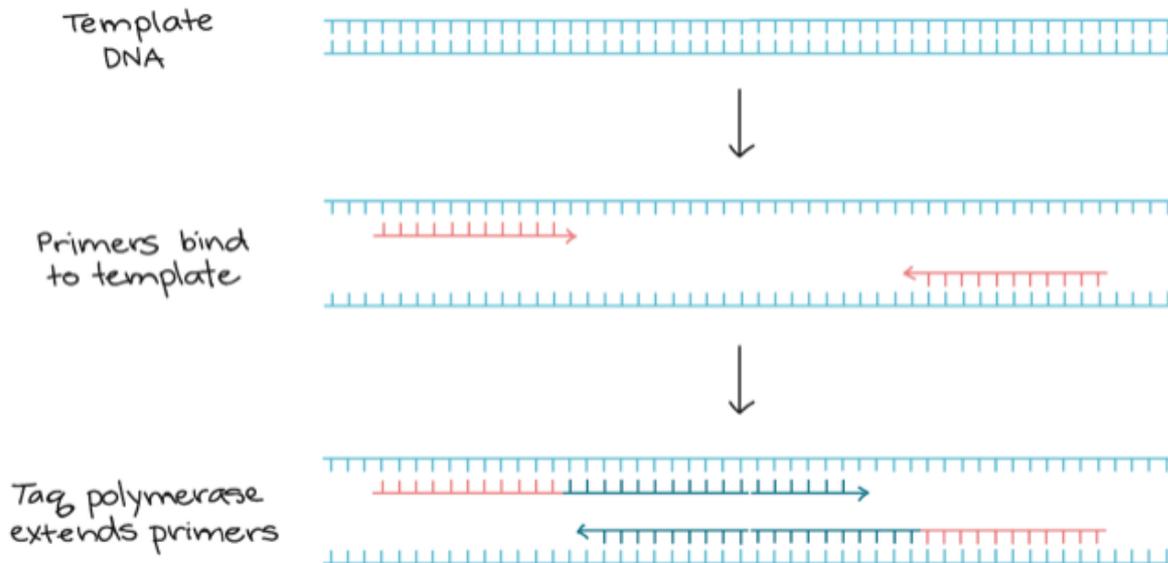
A-

3- 1 Principe

3- 2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

# But

La PCR permet donc d'obtenir par répliation in vitro de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait. L'ADN matriciel peut tout autant être de l'ADN génomique que de l'ADN complémentaire obtenu par RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN messagers, ou encore de l'ADN mitochondrial.



### **3-2 PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une réplification *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer à des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel). L'ADN extrait à partir d'un organisme ou d'un échantillon contenant des ADN d'origines diverses n'est pas directement analysable. Il contient une masse trop importante de séquences nucléotidiques.

Il convient donc d'isoler, de purifier la ou les séquences qui présentent un intérêt, qu'il s'agisse de la séquence d'un gène ou de séquences non codantes. À partir d'une telle masse de séquences que constitue l'ADN matriciel, la PCR peut donc sélectionner une ou plusieurs séquences déterminées et les amplifier par réplification à des dizaines de milliards de copies. La réaction terminée, la quantité extrêmement faible d'ADN matriciel contenue dans l'échantillon PCR n'aura pas varié. En revanche, la quantité de la ou des séquences amplifiées (l'ADN d'intérêt) sera très grande. La PCR permet donc d'amplifier un signal à partir d'un bruit de fond, il s'agit donc bien d'une méthode de clonage moléculaire, et cloner revient à purifier.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute):

A- Dénaturation de l'ADN.

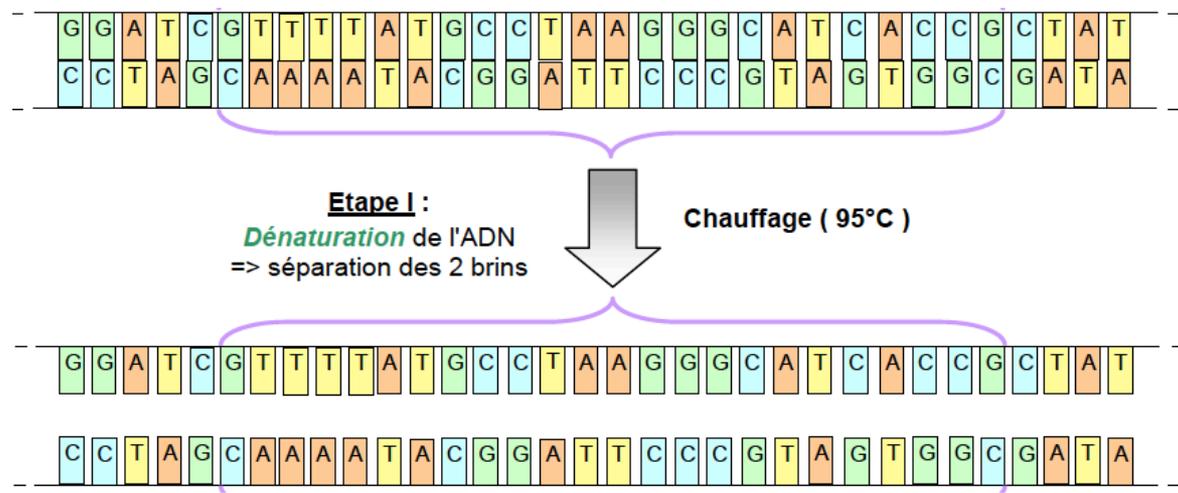
B- Hybridation

C- Élongation

Le cycle est répété un grand nombre de fois (35 à 45 cycles) pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible

### A- Dénaturation de l'ADN:

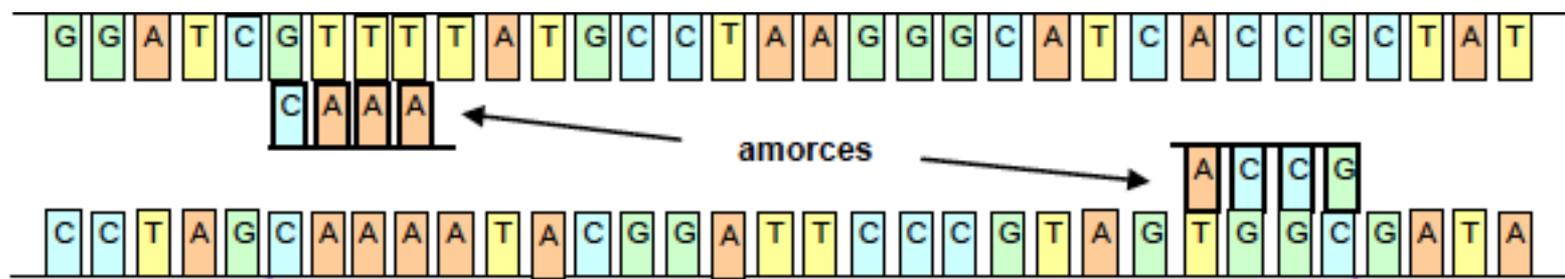
La première étape s'effectue à une température de 95°C pour séparer les deux brins qui le composent, les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténaire). À 95°C, l'ADN matriciel est dénaturé : toutes les liaisons hydrogène sont rompues et la dénaturation du DNA est complète



## B- L'hybridation :

La deuxième étape s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 70°C en fonction de la  $T_a$  (annealing temperature) , dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences monocaténaire complémentaires de régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. .

L'hybridation se fait à une température  $T_a$  (annealing temperature) qui sera définie selon la nature des amorces (voir plus loin le calcul de  $T_a$ ). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.



## **Température d'hybridation:**

Pour le choix de la température d'hybridation, il est souvent recommandé de se placer à une température inférieure de 4 - 5°C au Tm du couple d'amorce (si ce Tm est différent pour les 2 amorces, prendre le Tm le plus bas comme point de référence). Une autre approche plus empirique et qui donne souvent de bons résultats avec des amorces >20mers (50% GC) est de choisir comme point de départ une température d'hybridation de 54°C, si des amplifications non spécifiques sont observées augmenter alors par paliers de 2°C la température d'hybridation.

Cette température d'hybridation dépend de la séquence en bases des oligonucléotides amorces.

Elle est légèrement inférieure (environ de 5°C) au Tm qui est la température de demi-dénaturation. *(si les 2 oligonucléotides amorces ont des Tm différents, il faudra prendre le Tm le plus faible pour calculer la Ta, afin de favoriser l'hybridation des 2 amorces).*

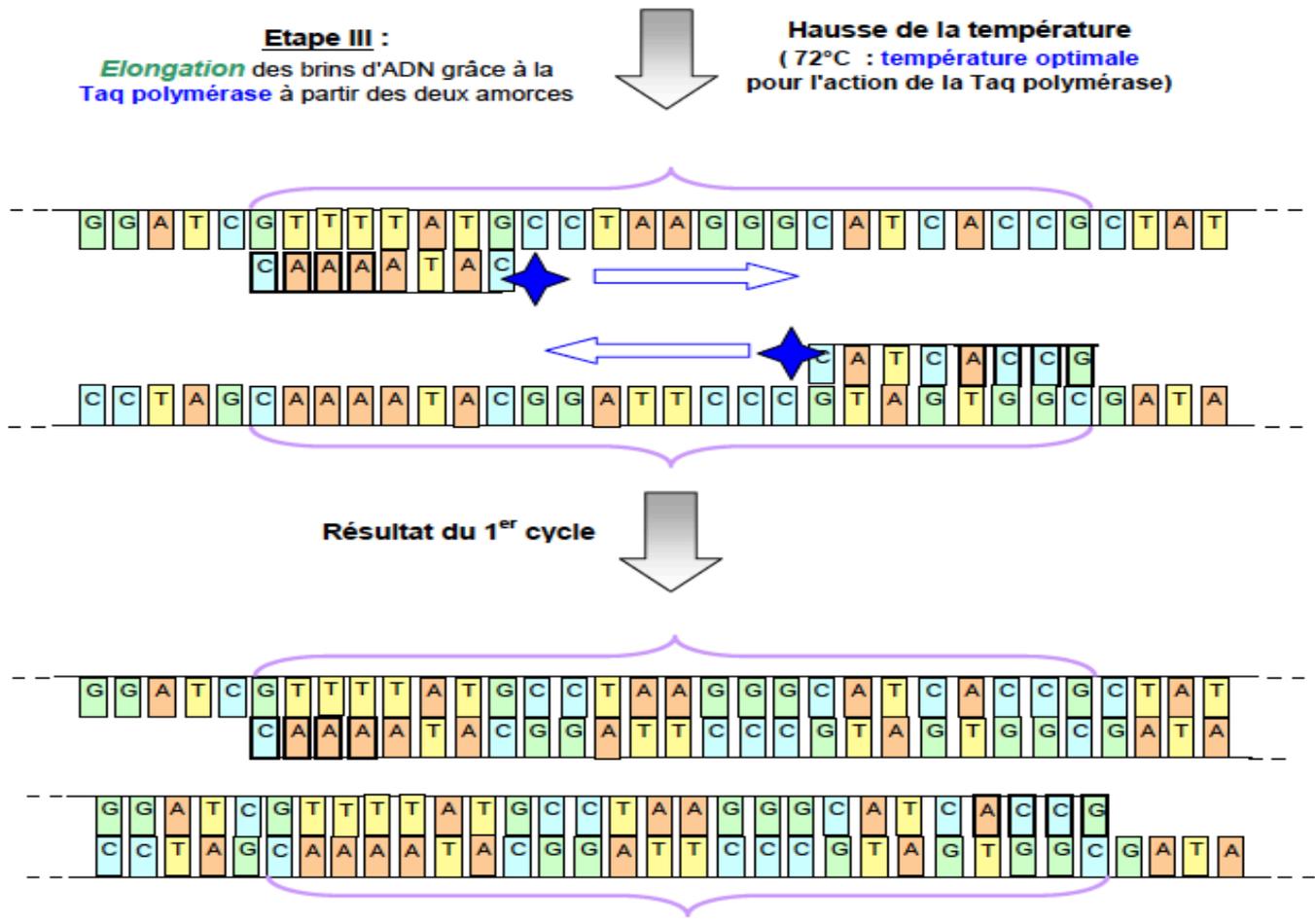
$$\mathbf{T_a = T_m - 5^{\circ}\text{C}}$$

$$\mathbf{T_m = 2 (A + T) + 4 (G + C)}$$

(où A, T, G et C sont respectivement le nombre de chacune de ces bases dans l'oligonucléotide amorce).

**C- Élongation:** Une fois les amorces fixées, l'ADN complémentaire est synthétisé par l'ADN-polymérase en utilisant les dNTP. Et le cycle recommence en dénaturant les deux brins à 95°C

...



Cette étape s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. À 72°C, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténaire amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées.

### Détection et analyse des produits PCR

Le produit d'une PCR est constitué d'un ou de plusieurs fragments d'ADN (la ou les séquences d'intérêt). La détection et l'analyse des produits peuvent être très rapidement réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (ou d'acrylamide). L'ADN est révélé par une coloration au bromure d'éthidium. Ainsi, les produits sont-ils visibles instantanément par transillumination aux ultraviolets (280 – 320 nm).

Exemple : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification de 500 pb obtenus par PCR classique

