

Biologie Moléculaire et Génie Génétique

Chapitre V : LA PCR POLYMERASE CHAIN REACTION

Dr. SELKA SARRA

Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté SNV-STU

Département de Biologie

Email: s.selka.sek@gmail.com

Chapitre V :

POLYMERASE CHAIN REACTION



I. Principe

- Permet d'amplifier de manière considérable la quantité d'ADN in vitro par voie **enzymatique**
- Elle nécessite de connaître les séquences des extrémités de la région à amplifier, et de les utiliser pour élaborer des **amorces nucléotidiques**.
- Après **fixation des amorces** sur leurs séquences cibles par **complémentarité**, la région d'ADN cible est **copiée** par incorporation de **désoxyribonucléotides libres** grâce à une enzyme **ADN polymérase thermostable**.
- La réaction, réalisée de façon automatique grâce à un thermocycleur.

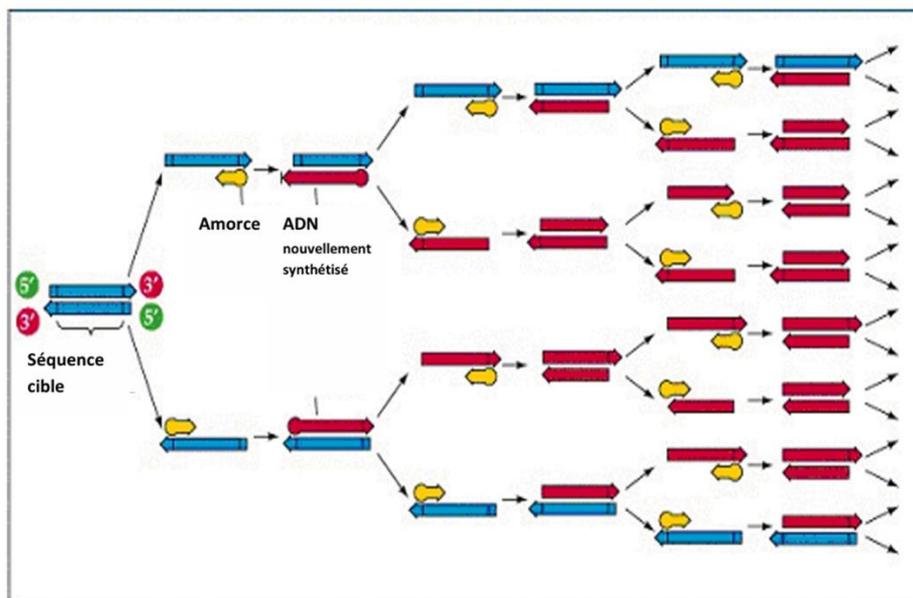


Fig.1 Le principe de la PCR

II. Les constituants

- **ADN matrice** : séquence d'ADN à amplifier
- **Amorces**
- **ADNpol: Taq pol**
- **Les dNTPs** (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

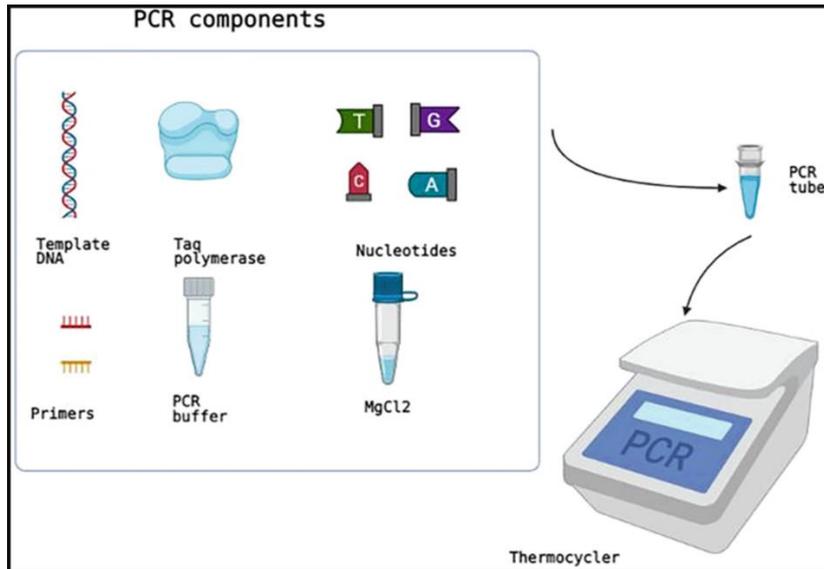


Fig.2 Les constituants de la PCR

1- Choix des amorces

Le choix des amorces, qui est évidemment crucial, pour définir et faire synthétiser les amorces, il faut en général connaître la séquence du fragment que l'on veut amplifier ; à partir de la séquence disponible, il faut déterminer les enchaînements nucléotidiques à partir desquels la polymérase pourra synthétiser les brins d'ADN.

Les amorces doivent :

- Être complémentaires des brins d'ADN existants
- Orientées dans le "bon" sens de façon à permettre la synthèse d'ADN de 5' en 3'.
- Avoir une absence de complémentarité entre amorce sens et l'amorce antisens.
- La teneur en bases guanine et cytosine (GC) doit être d'environ 40 à 60 %.
- Un contenu GC équilibré assure une liaison stable.

2- Types d'amorces

- **L'amorce sens / directe (forward)** : s'hybridant au brin 3' – 5' (brin antisens).
- **L'amorce antisens / inverse (reverse)** : s'hybridant au brin 5' – 3' (brin sens).

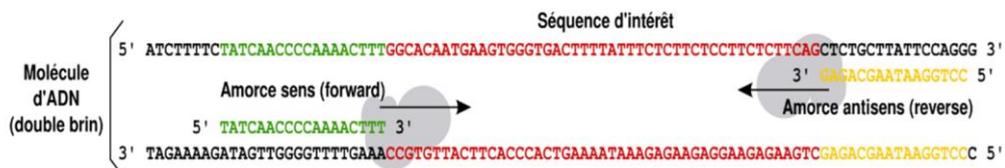
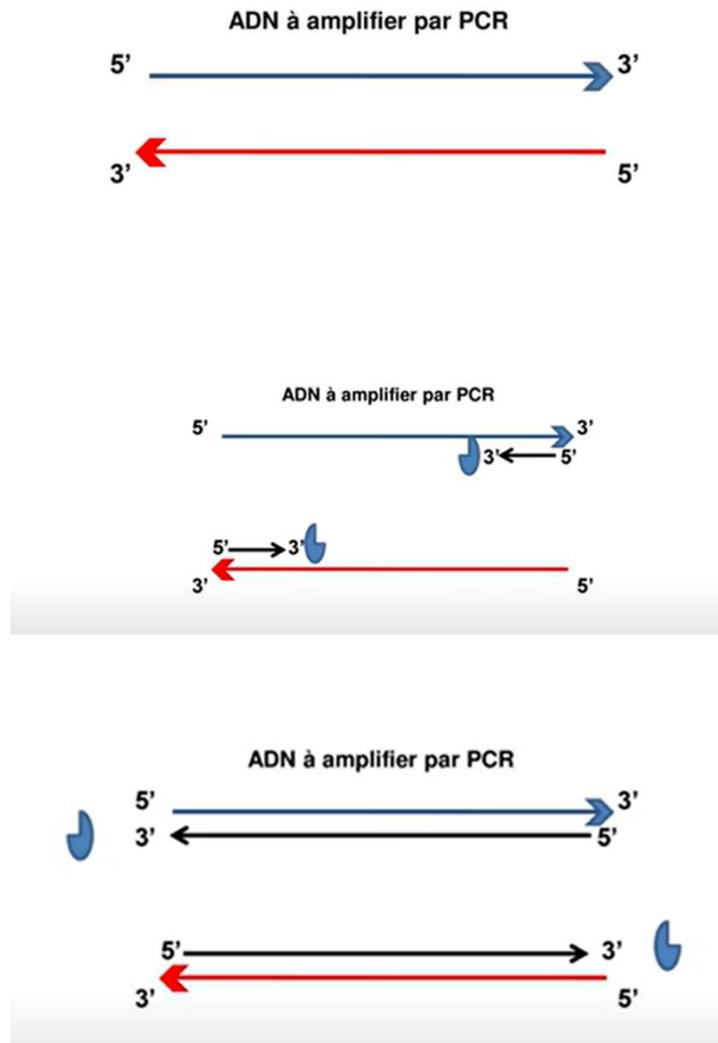


Fig.3 Hybridation des amorces sens et antisens

Exemple :



III. Technique :

Cette technique impose de connaitre la séquence des régions qui délimitent le segment d'ADN à amplifier ; des cycles successifs sont entrepris, chaque cycle comprenant :

- **La dénaturation** (92° à 95°C) : séparation des 2 brins de la double hélice qui peuvent être copier par l'ADN pol.
- **L'hybridation des amorces** (50 à 55°C) : l'une des amorces se fixe sur un brin d'ADN et la 2^{eme} sur l'autre.
- **L'élongation** (70° à 72°C) : extension des amorces avec ADN pol.

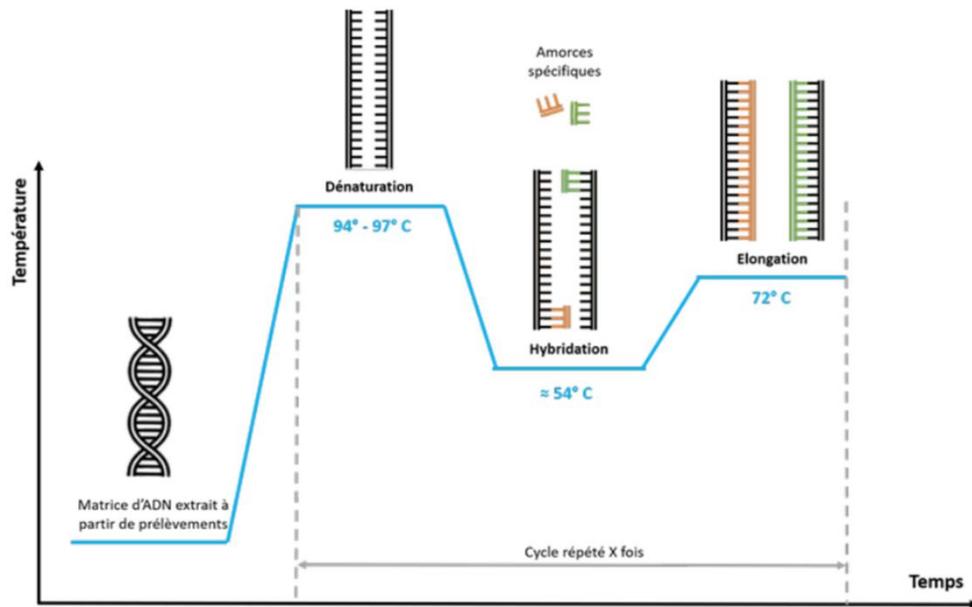


Fig.4 Technique de la PCR

IV. Les différents types de la PCR

- RT PCR

1 - Principe

C'est une PCR destinée à amplifier électivement et sous forme d'ADNc, un ARN spécifique issu d'un tissu supposé exprimer le gène d'intérêt.

● amplification à partir d'ARN : RT-PCR



2- But

Permet d'obtenir directement l'ADNc sans avoir besoin de préparer et trier une banque d'ADNc condition : connaître la séquence d'intérêt.

3- Constituants

- ARNm
- Les dNTPs
- La RT
- La Taq pol
- Les amorces

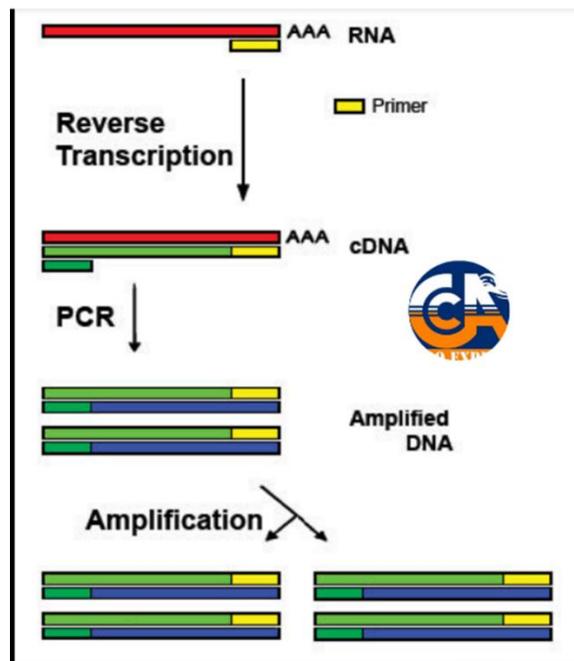


Fig.5 Principe de la RT PCR

- PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR) permet, parallèlement à l'amplification, la détection et la **quantification de l'ADN**, elle repose sur l'utilisation d'un **marqueur fluorescent**.

Cette quantification ne peut se faire avec précision que lors de la phase exponentielle de l'amplification (c'est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR).

- PCR multiplex

La détection de plusieurs séquences en une seule réaction (PCR multiplex) constitue la dernière avancée majeure de la technique, permet d'identifier simultanément plusieurs agents dans un même échantillon. L'intérêt est le gain de temps et l'économie de matériel.

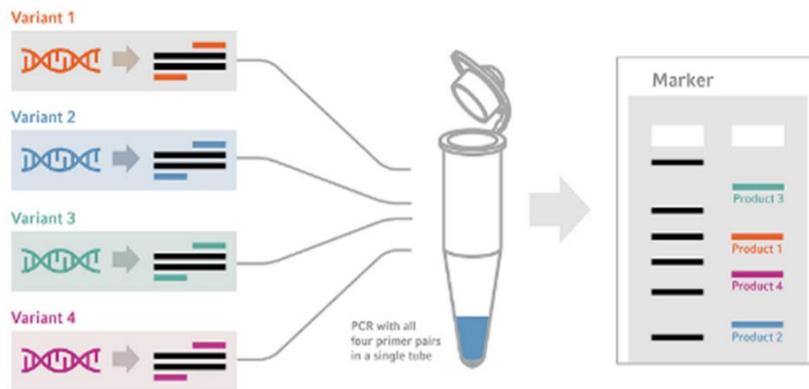


Fig.6 Principe de la PCR multiplex

V. Clonage des produits de PCR:

Le clonage des produits de PCR (réaction en chaîne par polymérase) est une technique de biologie moléculaire permettant d'insérer un fragment d'ADN amplifié dans un vecteur pour l'étudier ou l'utiliser dans d'autres applications. Voici les étapes principales du processus :

1. Préparation du produit PCR

- **Purification** : Les produits de PCR doivent être purifiés pour éliminer les enzymes, les amorces et les nucléotides libres qui pourraient interférer avec le clonage. Cela peut être fait avec des kits.

- **Analyse sur gel** : vérification de la taille du produit amplifié sur un gel d'agarose.

2. Choix du vecteur

Un vecteur est une molécule d'ADN capable de transporter le fragment d'intérêt dans une cellule hôte. Les vecteurs courants incluent :

Plasmides : Simples et largement utilisés.

Vecteurs viraux : Pour des applications nécessitant un transfert dans des cellules spécifiques.

Vecteurs de clonage spécialisés : Par exemple, pour des systèmes d'expression ou de mutagenèse.

3. Préparation du vecteur

- **Digestion enzymatique** : Si le fragment amplifié est généré avec des sites de restriction spécifiques, le vecteur doit être digéré avec les mêmes enzymes pour assurer une insertion compatible.

- **Déphosphorylation** : Les vecteurs digérés sont parfois traités avec des phosphatases pour prévenir la recircularisation.

4. Insertion du produit PCR

Selon la stratégie choisie, différentes approches sont possibles :

- **Clonage avec enzymes de restriction** : Utilisation de sites spécifiques pour l'insertion.

- **Ligation** : Le produit PCR et le vecteur sont mélangés en présence d'une ligase.

5. Transformation bactérienne

- **Introduction du vecteur recombinant dans une cellule hôte** (exp *E. coli*).

Les méthodes courantes incluent :

- Traitement chimique et choc thermique.
- Électroporation.

- **Sélection des colonies transformées** : Les cellules sont cultivées sur un milieu contenant un antibiotique ou un marqueur spécifique pour sélectionner les transformants portant le vecteur recombinant.

6. Vérification du clonage

- **PCR ou digestion de restriction** : Les colonies positives sont analysées pour confirmer la présence et l'orientation correcte du produit PCR inséré.

- **Séquençage** : Pour vérifier la fidélité de la séquence clonée, un séquençage est souvent effectué.

VI. Les applications de la PCR

Elle est très utilisée dès qu'il s'agit d'étudier des gènes c'est un outil important dans différentes domaines:

- **Les maladies héréditaires:** étude des mutations.
- **La recherche contre le cancer:** identification des mutations des oncogènes ou des gènes suppresseur de tumeur.
- **Les sciences médico-légales:** identification des individus par leur ADN (crime, catastrophe, associer des donneur d'organes à des receveurs, et en anthropologie)
- **Les biotechnologies:** dans la production des protéines recombinantes (insuline, hormone de croissance, vaccins).
- **La mutagenèse dirigée**
- **Les études paléontologiques** (fossiles : momies, plantes, animaux, ...etc.)
- **Le diagnostique microbiologique**
- **Le diagnostique moléculaire** : des maladies génétiques et infectieuses (surtout les cancers et les microorganismes difficilement cultivés Ex. virus ...etc.).

Références :

- Cours de Génie génétique: Dr Ghembaza Boublenza. L, Université de Tlemcen, Faculté SNV , Algérie.
- TD Techniques de séparation et d'analyse des acides nucléiques: ADN, ARN & PLASMIDES : Dr Leila Medraoui, Université de Rabat, Faculté des Sciences, Maroc.
- SUPPORT DE COURS de GENIE GENETIQUE: Dr. KHOUAJA Fattouma, Université DE LA MANOUBA, INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE SIDI THABET (ISBST), Tunisie.
- Polycopié de la matière de génie génétique incluant Les cours, les travaux dirigés et les travaux pratiques: Dr Fathi Berrabah, Université de Djelfa, Faculté SNV, Algérie .
- www.medatice-grenoble.fr chapitre 8 méthodes d'études en biologie moléculaire.
- LES OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE: Pr Belarbi-Amar N, Université Oran1 Ahmed Benbella, Faculté de Médecine, Département de médecine, Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Cytologie et Génétique cliniques, Algérie .
- Biologie Moléculaire et Génie Génétique: Dr. Nehal Fatima, Université de Chlef, FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, Département des Sciences Agronomiques et Biotechnologies, Algérie.