

La PCR en première SVT enseignement de spécialité

Ressources scientifiques

1. Définition :

La PCR (polymerase chain reaction) est une réaction biochimique de synthèse d'ADN, réalisée in vitro et de manière répétée ce qui permet d'amplifier en grande quantité un fragment d'ADN à partir d'une matrice d'ADN contenant ce fragment.

https://rnbio.upmc.fr/bio-mol_pcr1

2. Le principe de la PCR traditionnelle

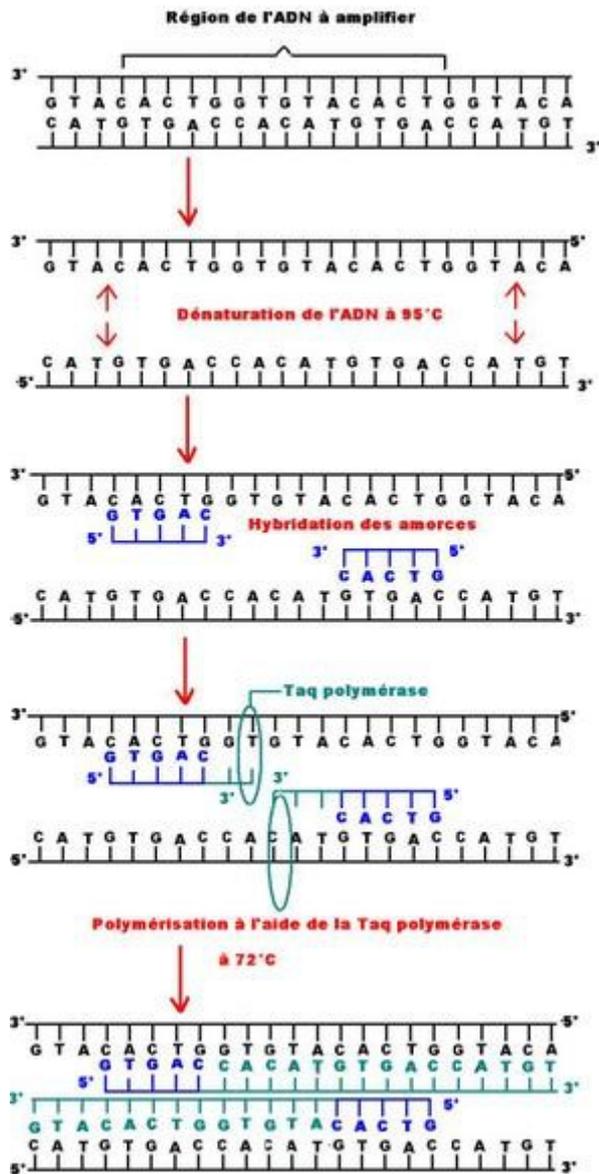
L'originalité de l'approche de PCR est que :

- Les deux brins du fragment d'ADN d'intérêt sont dupliqués simultanément, si bien qu'à l'issue d'un cycle de synthèse, le nombre de copies du fragment qui fait l'objet de l'amplification est multiplié par deux.
- Le processus de synthèse de l'ADN est répété plusieurs fois successivement ce qui permet, comme il y a duplication de l'ADN à l'issue de chaque cycle de synthèse, l'amplification exponentielle de l'ADN.

Les étapes de la réaction de PCR :

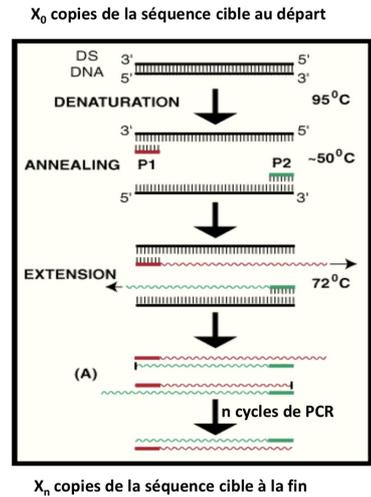
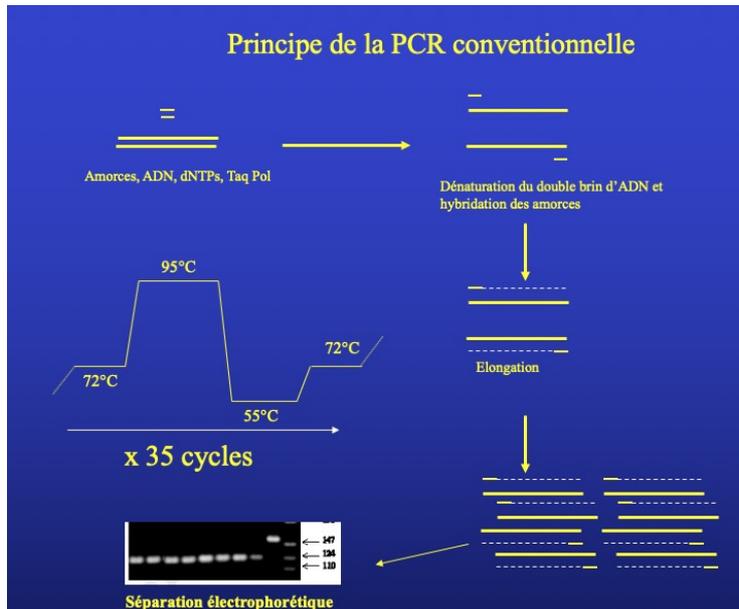
Une réaction de PCR se déroule par répétition successives des trois étapes suivantes :

1. Dénaturation de la matrice d'ADN (94°C, 30 secondes)
2. Hybridation de la matrice avec les amorces (la température d'hybridation est à définir au cas par cas, 30 secondes)
3. Polymérisation de l'ADN à partir des amorces et à l'image de la matrice (72°C, entre 30 secondes et 5 minutes selon la longueur du fragment qui est amplifié).
 - Les amorces. La PCR consiste en une polymérisation par une ADN polymérase. Comme l'ADN polymérase a toujours besoin d'amorces pour commencer la polymérisation, l'expérimentateur apporte deux amorces (une pour chaque brin), ce qui permet d'imposer le site de début de la polymérisation. Si l'amorce est suffisamment longue (typiquement, une vingtaine de nucléotides), sa spécificité est absolue (i.e. aucune autre séquence du génome ne peut avoir la même séquence)
 - Le cycle de polymérisation : La PCR est une réaction en chaîne, qui suit un cycle. A chaque cycle, l'ADN est dénaturé à 95°C, puis refroidi à 55°C. Les amorces peuvent se fixer. La polymérase effectue l'élongation, à l'issue de laquelle un nouveau cycle peut commencer. Chaque cycle multiplie le nombre de molécules d'ADN par 2. Au bout de 30 cycles, soit environ 2h, on a donc $2^{30} = 109$ molécules d'ADN
 - La polymérisation : Les polymérases de la plupart des organismes seraient dégradées par les hautes températures (pourtant nécessaires à la dénaturation de l'ADN) auxquelles elles seraient soumises lors de la PCR. L'originalité de la PCR est l'utilisation d'une polymérase extraite d'une bactérie vivant dans des sources thermales très chaudes, *Thermus aquaticus* (d'où le nom Taq-polymérase)



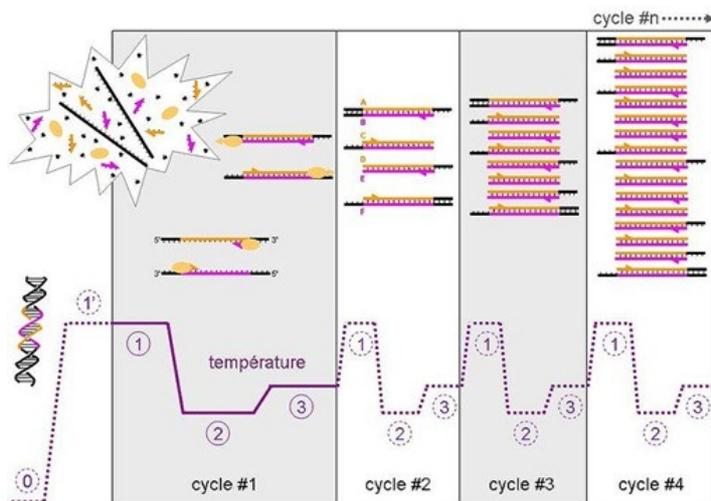
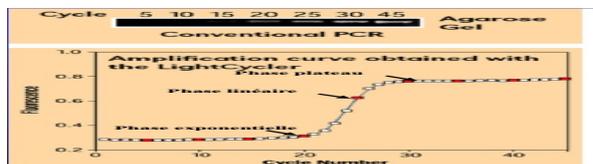
Cet enchaînement d'étapes qui constitue un cycle d'amplification est reproduit successivement de 20 à 50 fois.

Schéma d'un cycle d'amplification :



source inra

Résultats de la PCR traditionnelle



<https://www.oezratty.net/wordpress/2012/technologies-sequencage-genome-humain-2/>

Points de vigilance et modélisation des résultats de PCR

1. les amorces : le fragment d'ADN qui est amplifié est celui qui est physiquement délimité par des amorces d'oligonucléotides.

- Le choix des amorces est crucial et est entre les mains de l'expérimentateur
- => pour définir et faire synthétiser des amorces il faut connaître, en général, la séquence du fragment que l'on veut amplifier.
- Les amorces doivent être complémentaires des ADN existants et être orientées dans le bon sens (5' → 3')

2. La température d'hybridation des amorces :

- si la température est trop élevée, il n'y a pas d'hybridation avec la matrice
- Si la température est trop basse, l'hybridation peut se faire avec les séquences choisies mais aussi avec des séquences proches dans le gène à séquencer.

3. L'ADN polymérase utilisée est extraite des bactéries *thermus aquaticus* d'où le terme de Taq polymérase et d'amorces Taq.

3. La PCR en temps réel :

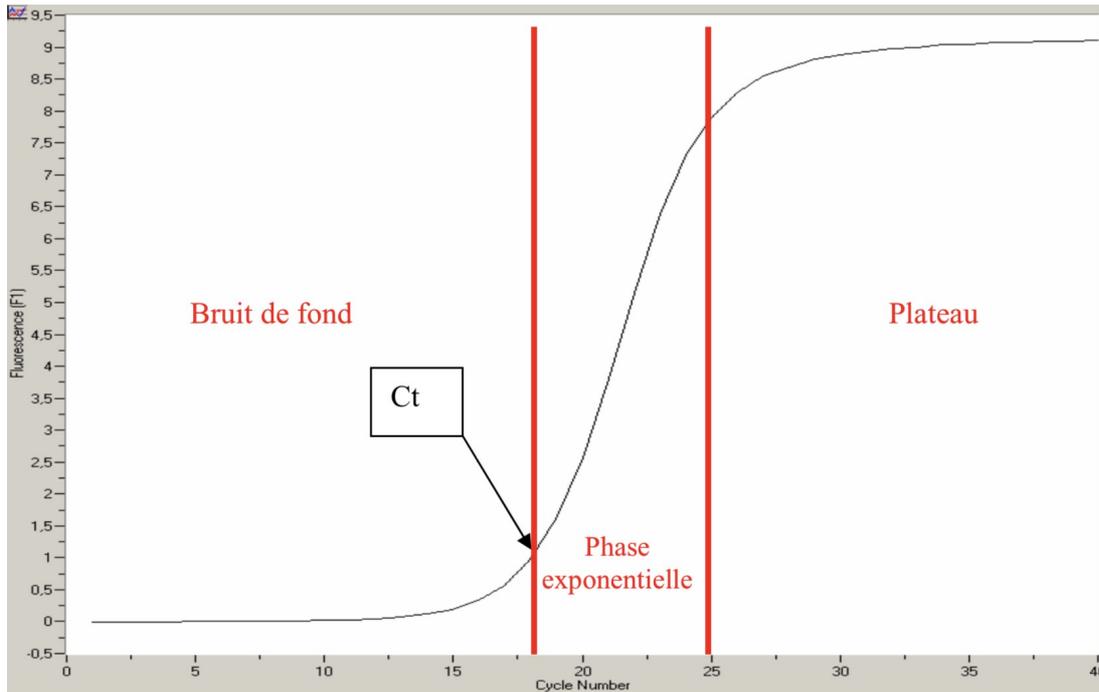
La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct et apparaît en début de phase exponentielle. Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est donc pas affectée par les éléments limitants identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique.

Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes :

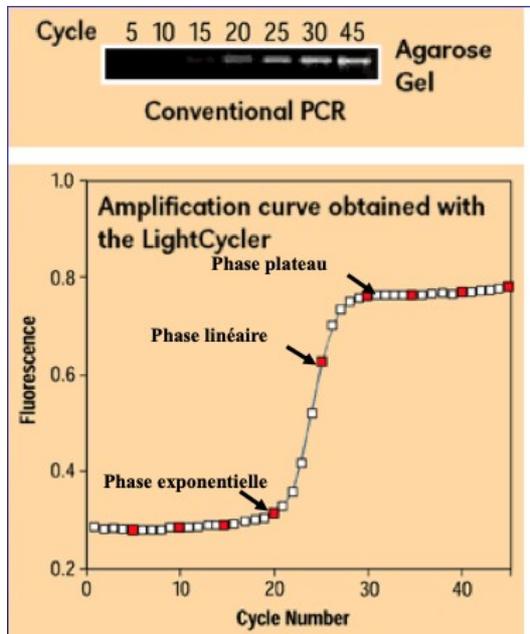
- Phase de bruit de fond : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée).
- Phase exponentielle: La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.
- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

<https://youtu.be/AZWLysiG3Rg>

<https://youtu.be/QIM6vdnL8TU>



PCR traditionnelle Vs PCR en temps réel
Résultats



<https://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-amplification-fragment-adn.html>

<https://youtu.be/JmveVAYKylk>

<https://youtu.be/iQsu3Kz9NYo>

5

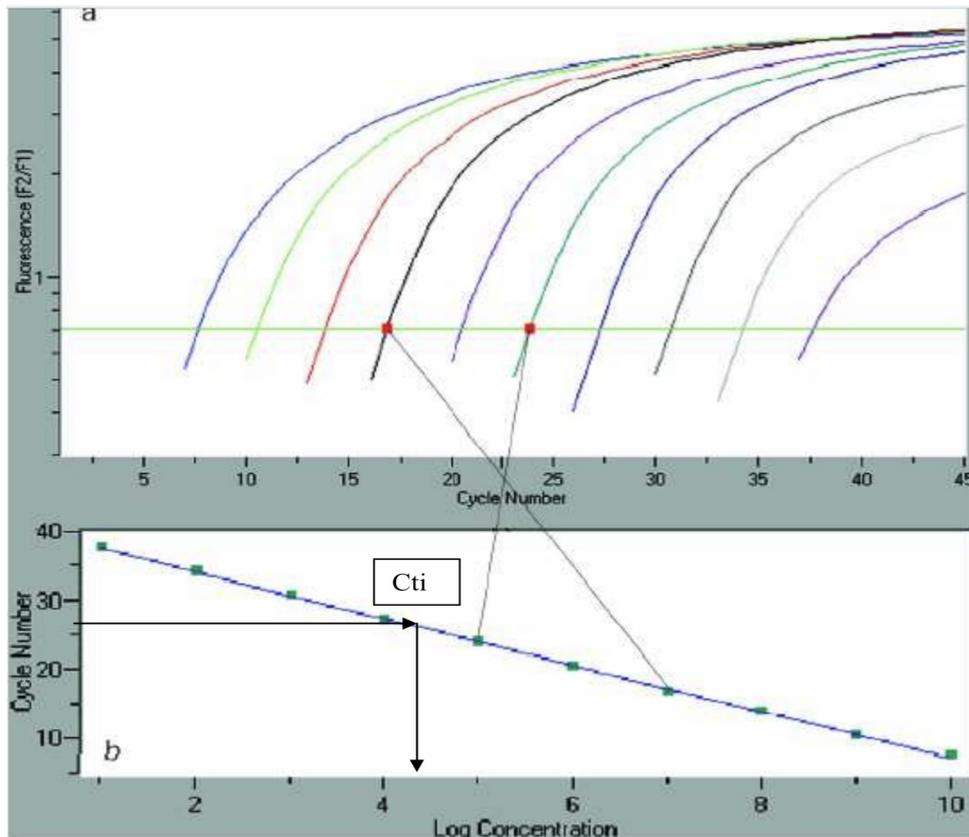
5

Les applications

La PCR a de multiples applications, notamment :

- Déterminer la présence d'une mutation dans le cas d'une maladie génétique, notamment en dépistage prénatal
- En recherche fondamentale, vérifier qu'un individu donné a le génotype désiré (génotypage)
- Détecter spécifiquement une bactérie lors d'une infection, en utilisant des amorces spécifiques d'un gène bactérien donné

4. Pour aller plus loin : mesurer l'efficacité de la PCR



Un échantillon standard a été dilué en série. Les Ct obtenus (points rouges) sont reportés en fonction des log des concentrations relatives du standard : on établit ainsi une droite standard (points verts de la fig. b). Le Ct obtenu à partir d'un échantillon inconnu (Cti) permettra, lorsqu'il sera reporté sur le droite, d'obtenir le log de la concentration en molécules cibles de cet échantillon.

La pente : représentée par $-(1/\log E)$.

La conversion « pente de courbe standard / efficacité PCR » est donnée par la relation : pente = $(1/\log E)$.

Ainsi :

une pente de 3.32 représente une efficacité de 100% ($E = 2$) ($1+Eff$). Une pente de 3.4 représente une efficacité de 97% ($E = 1.9$)

Une pente de 3.5 représente une efficacité de 93% ($E = 1.9$)

Une pente de 3.6 représente une efficacité de 90% ($E = 1.9$)

Une pente de 3.7 représente une efficacité de 86% ($E = 1.9$)

Une pente de 3.92 représente une efficacité de 80% ($E = 1.8$)

Vous avez la pente, vous voulez l'efficacité : utilisez la formule $E = 10^{-1/pente}$

Dans l'exemple ci-dessus, la pente de -3.7 correspond donc à une efficacité PCR de : $10^{-1/-3.7} = 1.86$ c'est à dire 86% d'efficacité PCR.

- le taux d'erreur (Error) : il correspond à l'écart entre les points expérimentaux et la droite de régression obtenue. C'est la somme des carrés des écarts à la moyenne.

On s'accorde un taux d'erreur de 0.2 (20%) sur une gamme dynamique de 4-5 logs.

Ici le taux d'erreur est de 11.5% sur une échelle dynamique de 4 logs (compris entre les Cp 23 à 38).

- le coefficient de corrélation r : il indique l'intensité de la liaison entre Cp et log base 10 des

concentrations initiales en molécules cibles. Plus la valeur de r est proche de 1 ou -1 et plus l'intensité de la liaison est forte.

Source : institut cochin