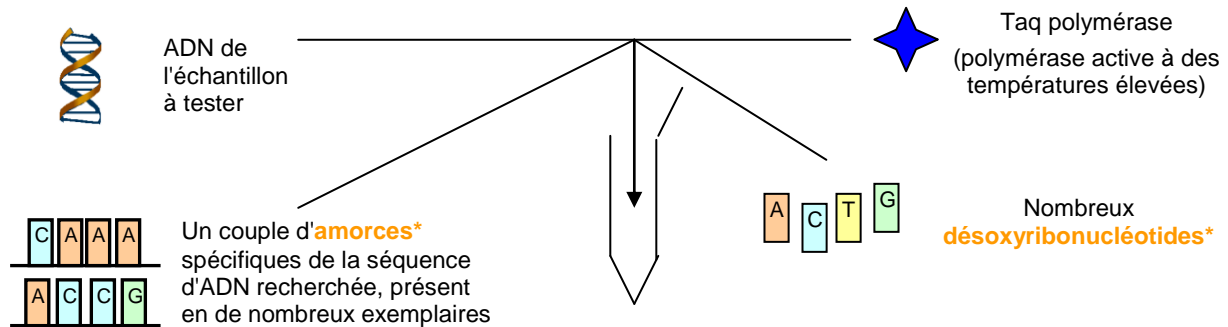


Principe de l'amplification par PCR

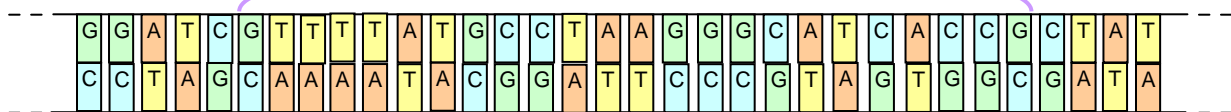
La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une **technique d'amplification d'ADN *in vitro***. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

Chaque cycle de PCR est constitué de **trois étapes** : une **dénaturation** de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une **hybridation** des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une **élongation** grâce à l'action d'une **ADN polymérase***. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (la **durée d'un cycle** est de l'ordre de la **minute**).



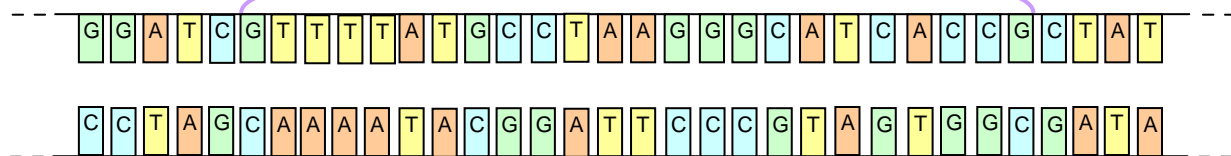
1^{er} cycle

séquence recherchée, à amplifier



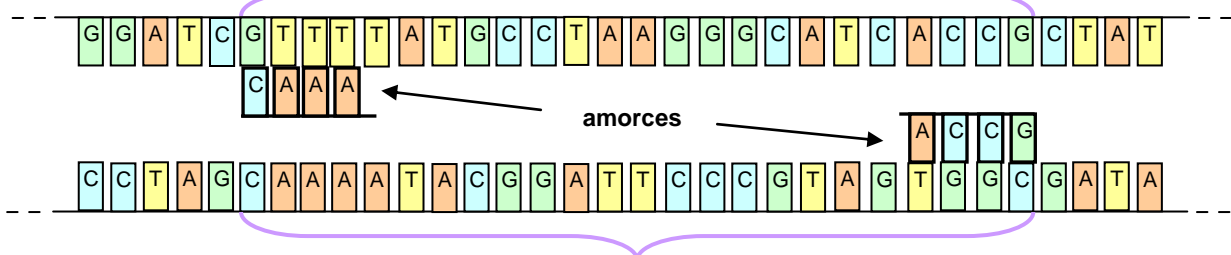
Etape I :
Dénaturation de l'ADN
=> séparation des 2 brins

Chauffage (95°C)



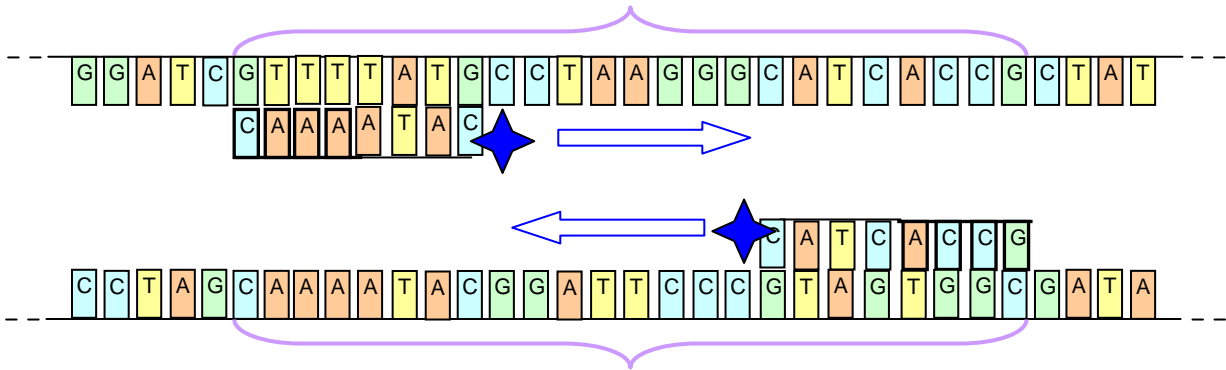
Etape II :
Hybridation des amorces

Diminution de la température
(entre 40 et 65°C, en fonction de la longueur
et de la séquence des amorces)

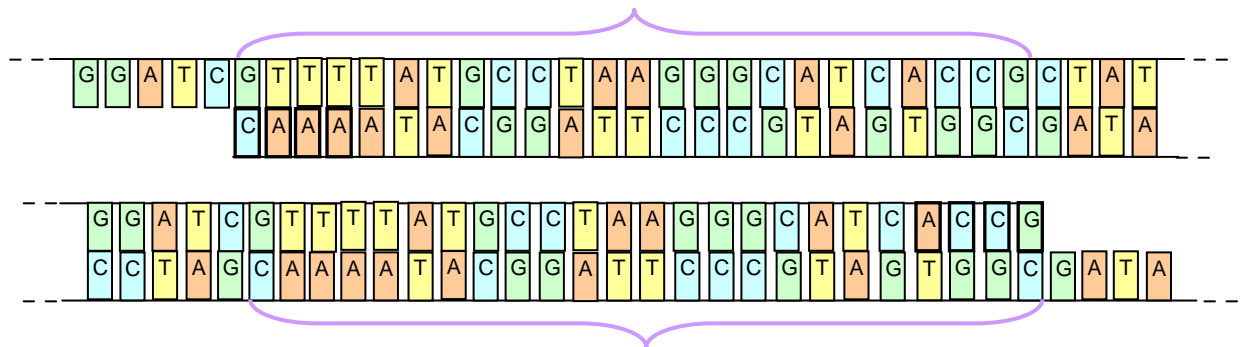


Etape III :
Elongation des brins d'ADN grâce à la
Taq polymérase à partir des deux amorces

Hausse de la température
 (72°C : **température optimale**
 pour l'action de la Taq polymérase)



Résultat du 1^{er} cycle

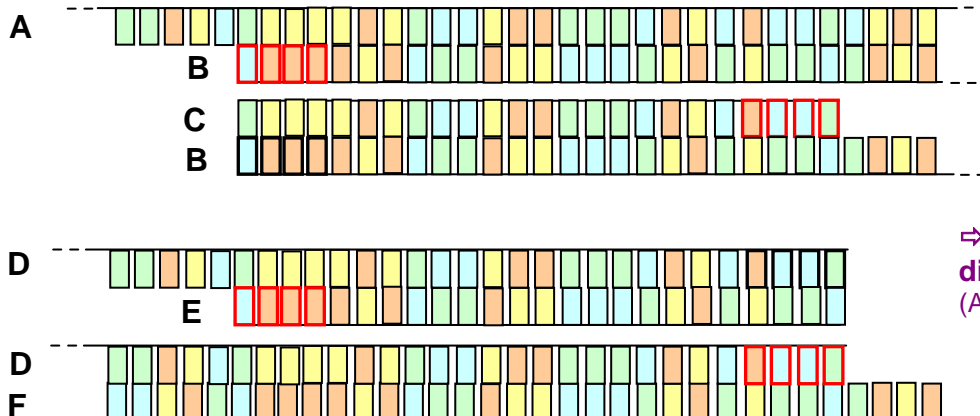


Résultats du 2nd cycle

(après les étapes I, II et III)

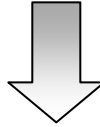
Remarque : le couple d'amorces
 du 2nd cycle est identique à
 celui du 1^{er}.

Il est représenté de couleur
 différente pour faciliter la lecture
 du schéma

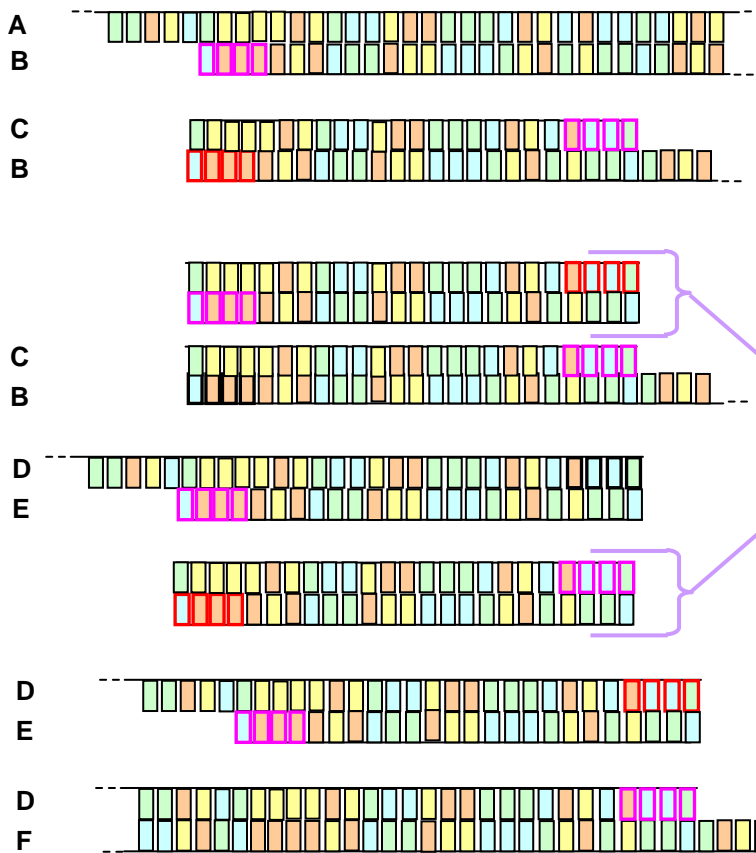


⇒ 6 brins d'ADN
 différents obtenus
 (A, B, C, D, E et F)

Résultats du 3^{ème} cycle (après les étapes I, II et III)



Remarque : le couple d'amorces est toujours le même

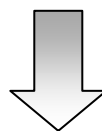


Séquence cible d'ADN

= « **amplicon** »

(molécule d'ADN double brins précisément définie à ses extrémités)

Au 4^{ème} cycle, l'amplicon devient majoritaire



■ ■ ■

Cycle de PCR répété de 20 à 50 fois

⇒ n cycles de PCR permettent en théorie de produire 2^n copies de la séquence ciblée (amplicon). Il est ainsi possible d'obtenir **plus d'un million de copies** de la séquence d'ADN recherchée **en une vingtaine de cycles**.



Risque de contamination de la PCR : au cours de l'expérience, il y a des risques d'introduction involontaire d'ADN dans le tube de réaction lors de son ouverture. Ceci peut conduire à de faux résultats positifs ou négatifs. Il est donc conseillé de réaliser les manipulations pré-PCR et post-PCR dans des pièces séparées.

Une méthode quantitative : la PCR en temps réel

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR en point final).

Des **sondes*** fluorescentes se fixent :

- ↳ soit sur l'ADN double brin (ex : Technologie SYBR)
- ↳ soit sur une séquence d'ADN précise (ex : Technologies Taqman et Beacon).

Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN.

La mesure de la fluorescence permet de déterminer "en temps réel" si le fragment recherché (amplicon) est effectivement présent – et donc amplifié – sans avoir besoin de faire une électrophorèse par exemple. De plus, la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR.

La quantité d'amplicons est corrélée à la quantité initiale d'ADN de la matrice originale, ce qui permet pour d'autres applications de « doser » la matrice originale (ex : virus).

Bibliographie

Asensio Gil L. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. Trends in Food Science & Technology **18** (11) : 558-566.

Poitras E. et Houde A. (2002). La PCR en temps réel : principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnologie. **2** (2): 2-11.

<http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/presentation.htm>

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/index.htm>

<http://www.creatis.insa-lyon.fr/~bagory/documents/La%20PCR%20et%20RT-PCR%20quantitative%20temps-reel.pdf>