

La PCR

Mlle Imane Smaili
SVI₄

Encadré par:
Responsable du cours de
Biologie Moléculaire
Pr. B. BELKADI





PLAN

1. Introduction
2. Définition
3. Principe
4. Les applications de la PCR



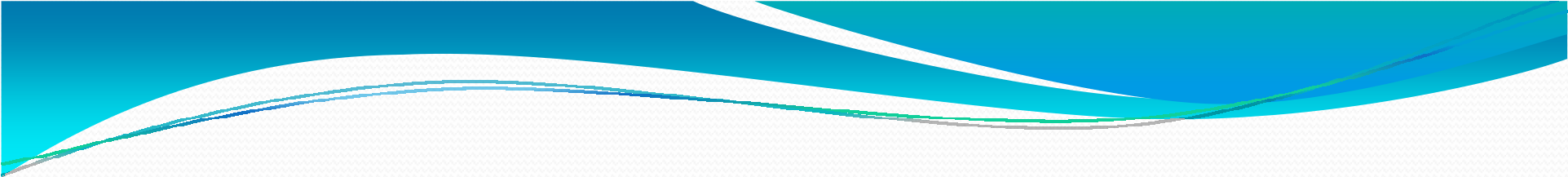
Introduction

- La PCR « Polymerase chain reaction » ou en français Amplification en chaine par polymérase .
- La paternité de découverte de la PCR a été disputée. Un scientifique norvégien, Kjell Kleppe, a décrit le principe de cette méthode dès 1971. Mais ce n'est qu'avec le travail du scientifique américain Kary Mullis que ce concept devient réalité.



Introduction

- En 1993, Kary Mullis est lauréat de la moitié du prix Nobel de chimie « pour des contributions au développement de méthodes en chimie de l'ADN, et pour son invention de la méthode de réaction en chaîne par polymérase » .
- L'autre moitié a été remise à Michael Smith un biochimiste canadien d'origine anglaise, pour la découverte de la mutagenèse dirigée (l'induction d'une ou plusieurs mutations dans un génome, de façon précise et volontaire.)



Introduction

- Cette technique a largement évolué depuis ses débuts. Parmi les évolutions les plus fondamentales, on retrouve :
 - Le remplacement du fragment de Klenow d'ADN polymérase I d'*E. coli* par une polymérase thermorésistante (initialement la Taq) qui évite de devoir remettre de l'enzyme à chaque cycle. Cette innovation permet un bond énorme vers l'automatisation et évite de devoir ouvrir le tube réactionnel, limitant considérablement le risque de contamination.

Définition

La PCR permet de recopier un segment d'ADN des million de fois et de le rendre visible, grâce à un appareil qui contrôle les changements de températures à différentes étapes de la réaction:

- Température de dénaturation
- Température d'hybridation
- Température d'extension

***Thermocycleur
(appareil qui
comporte une
enceinte où l'on
dépose les tubes
échantillons et
dans laquelle la
température peut
varier, très
rapidement et
précisément, de 0
à 100°C)***

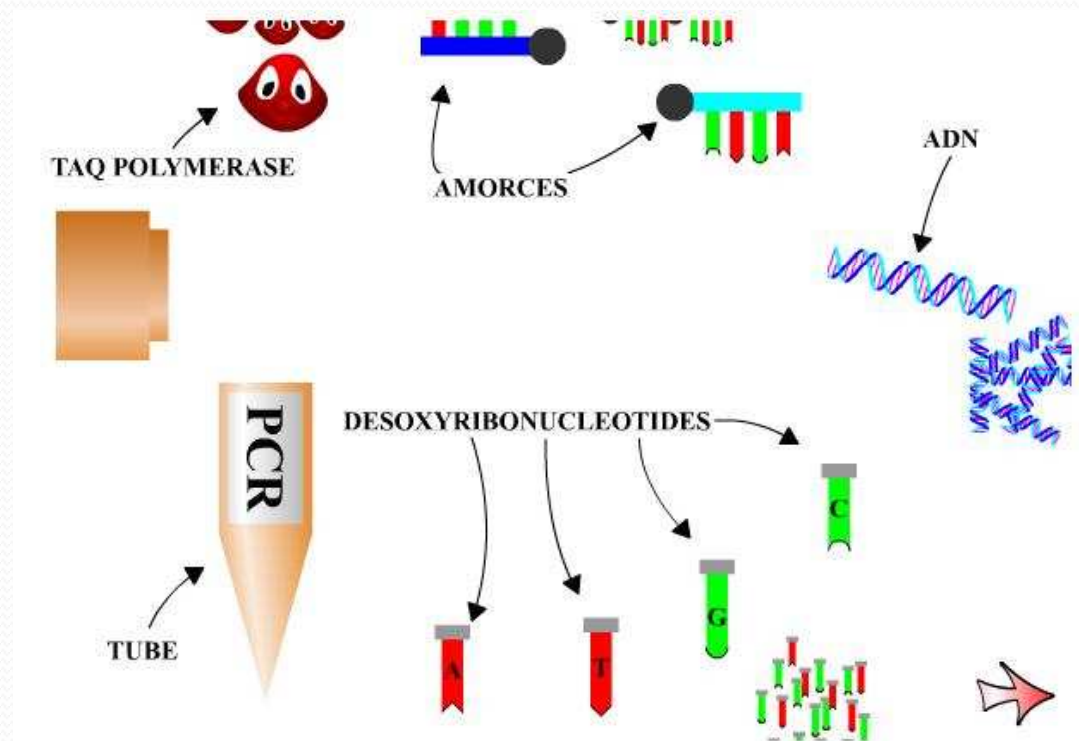


Principe

- Il s'agit de réaliser une succession de réaction d'une matrice double brin ADN, chaque réaction met en œuvre deux amorces dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre.
 - Basée sur le mécanisme de réplication de l'ADN
 - Polymérase thermostable
 - Répétition de cycles: amplification exponentielle

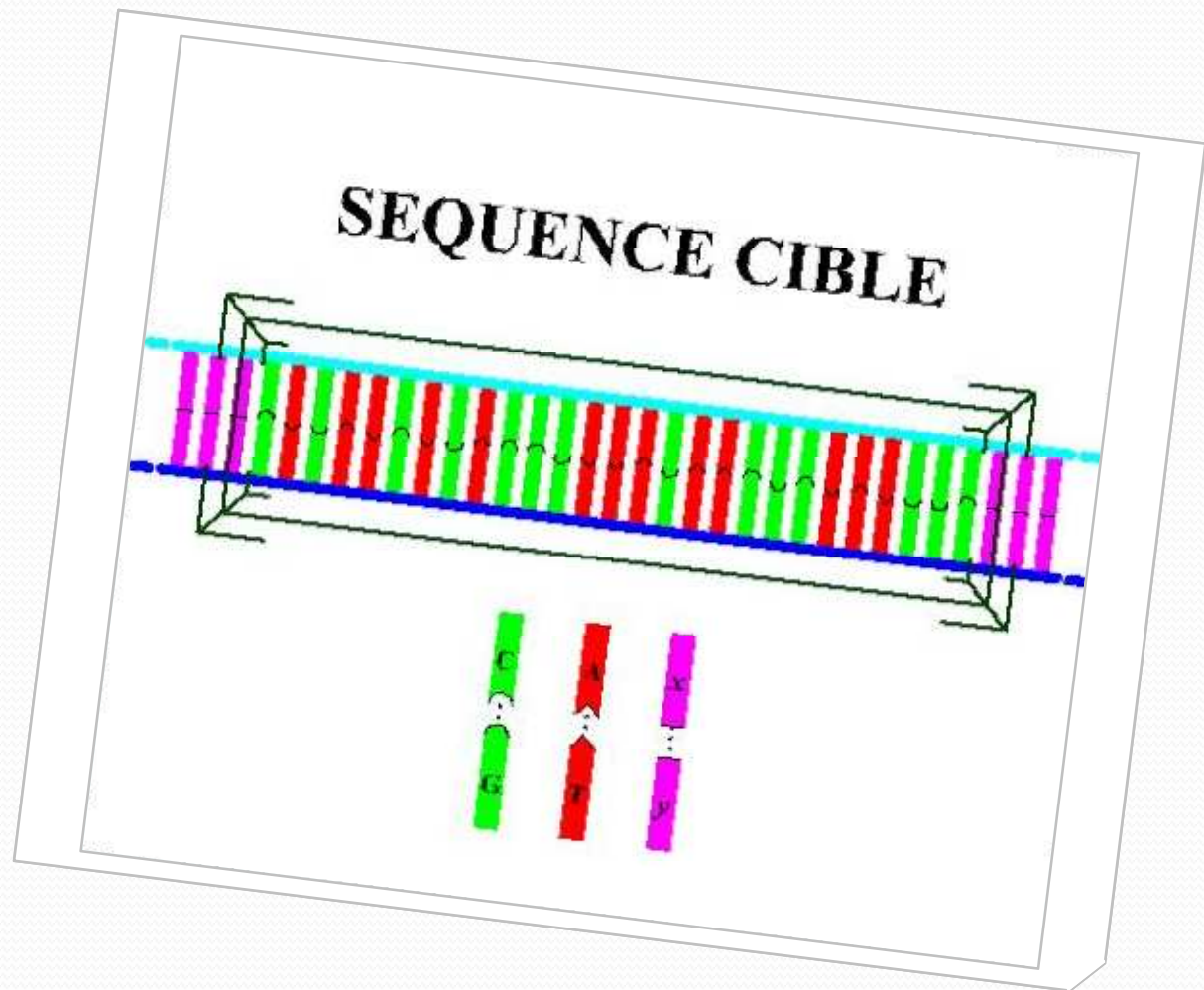
4 éléments sont nécessaires: Amorces, dNTPs, ADN, ADNpol

Les deux amorces 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.



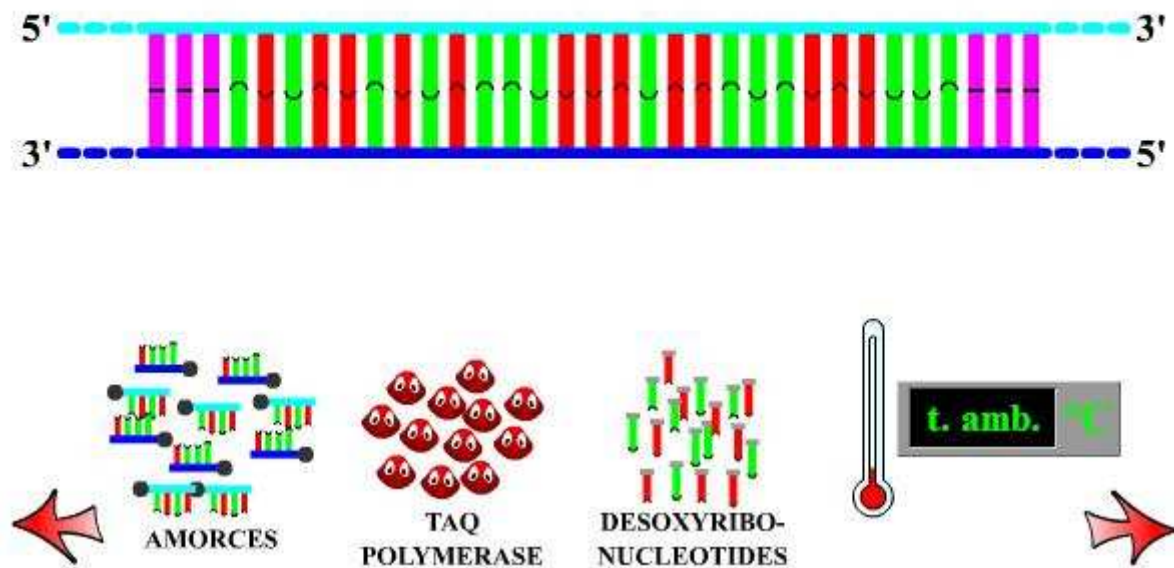
*Segment d'ADN
qui sera amplifié*

La séquence
cible représente
le segment
d'ADN qui sera
amplifié
(recopié de
nombreuses
fois)

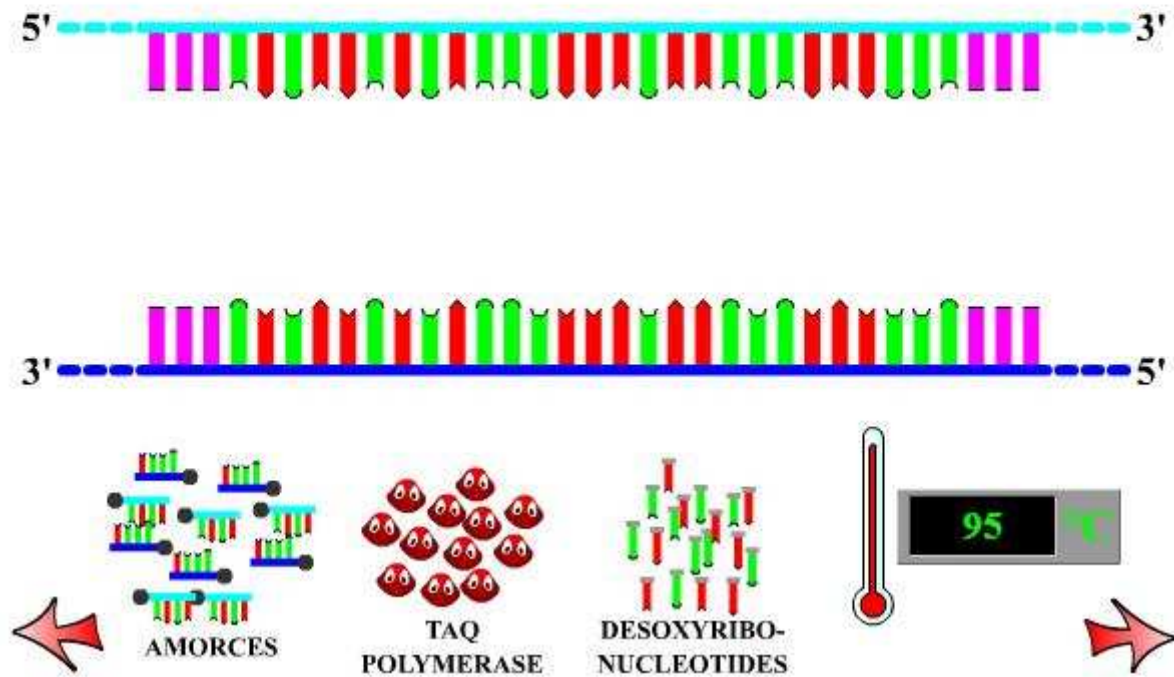


Premier cycle:

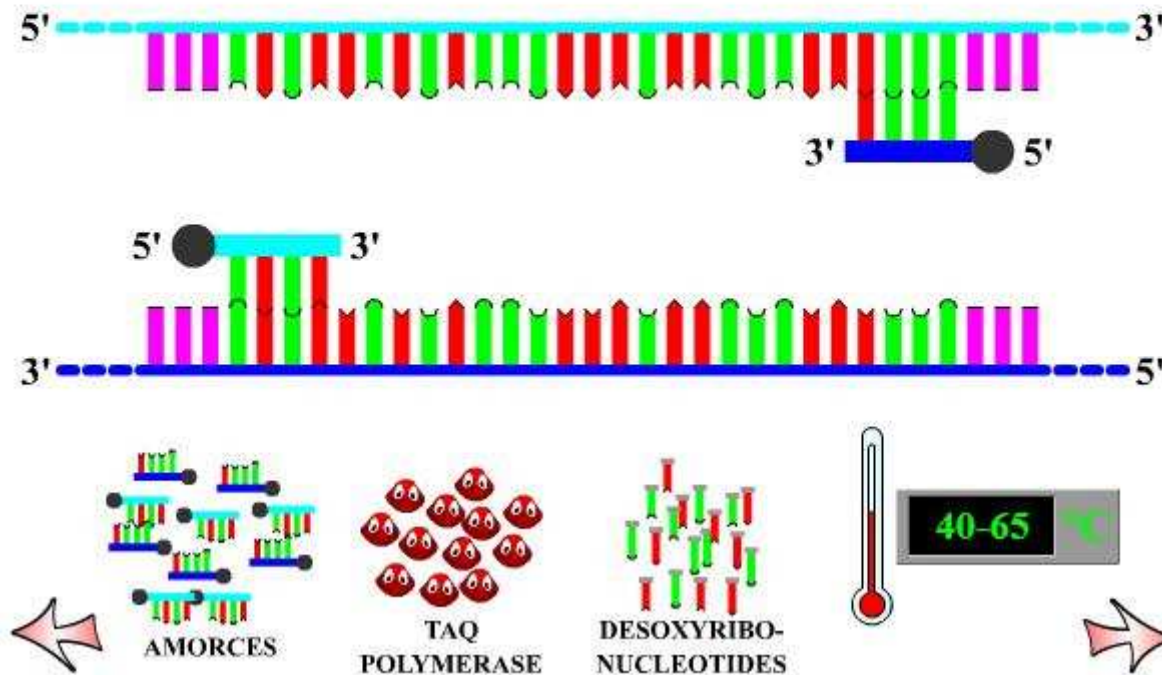
1 - DENATURATION



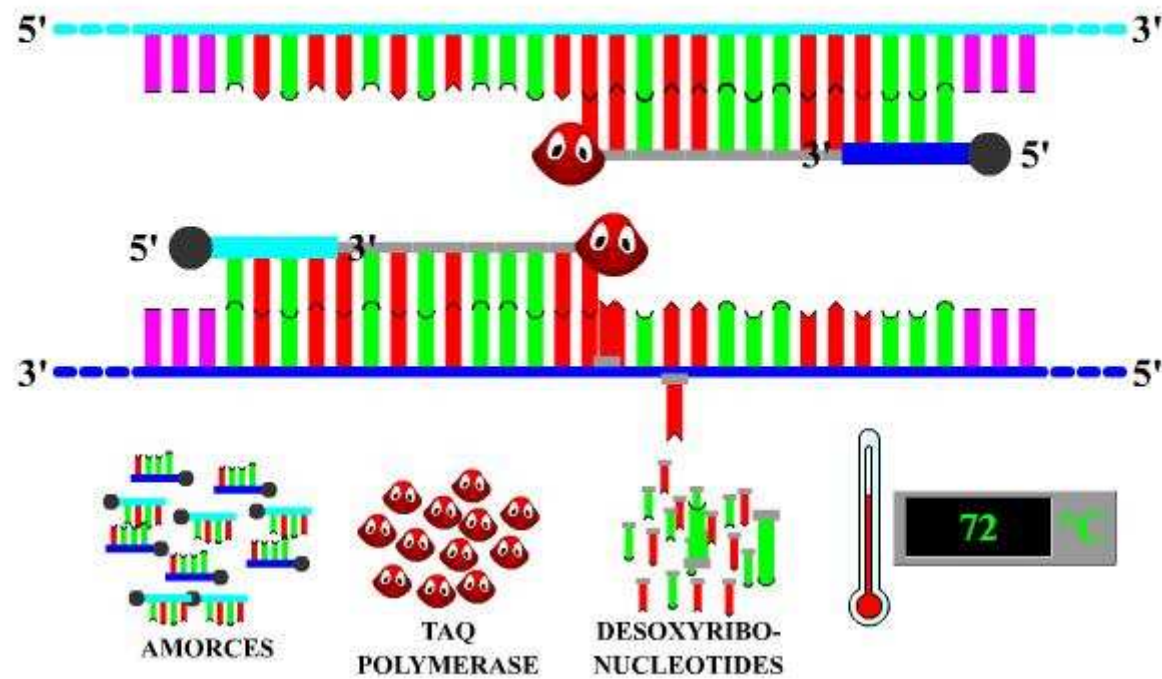
1 - DENATURATION



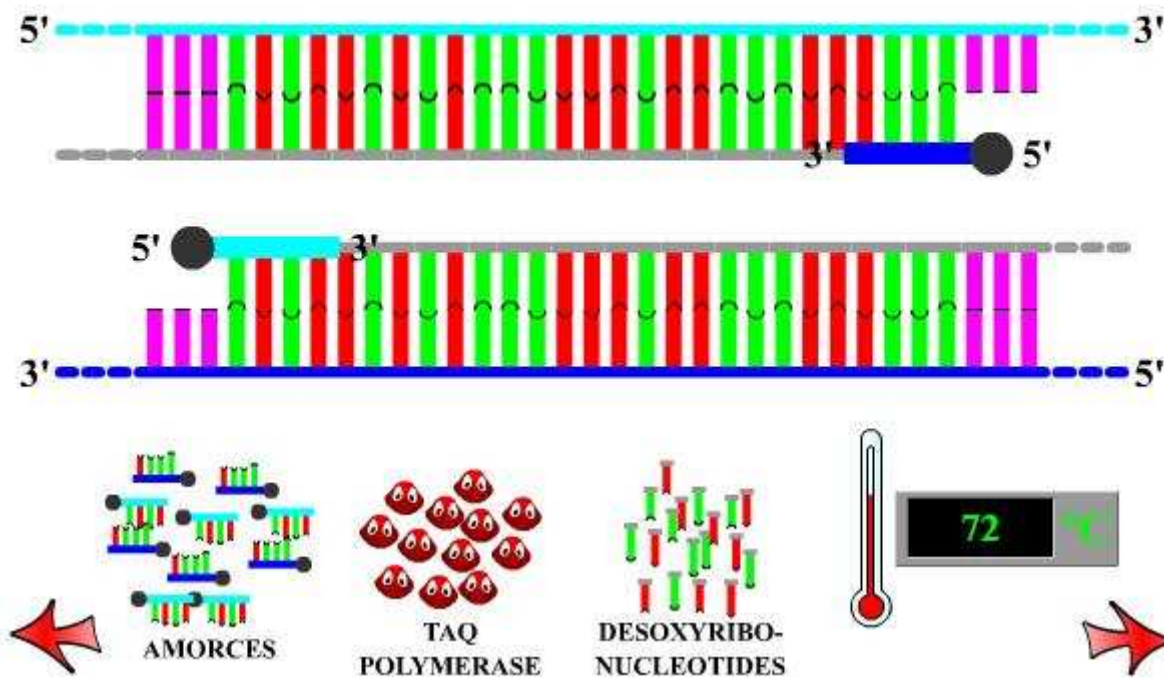
2 - HYBRIDATION



3 - ELONGATION

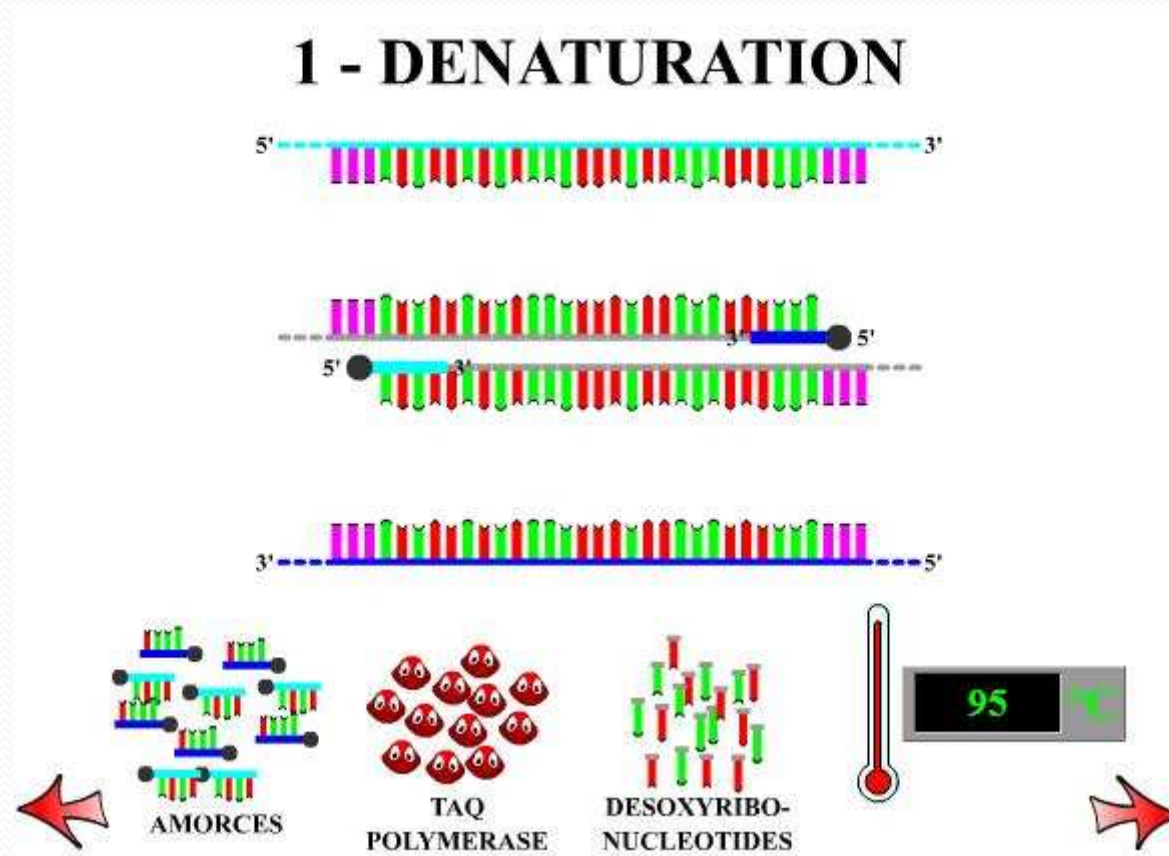


3 - ELONGATION



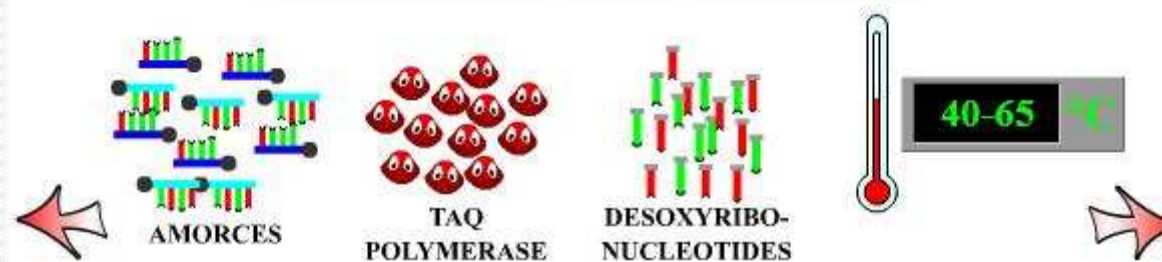
- 
- le nombre de brins obtenus à la fin du premier cycle est **le double** du nombre de brins initialement présents.

Deuxième cycle:

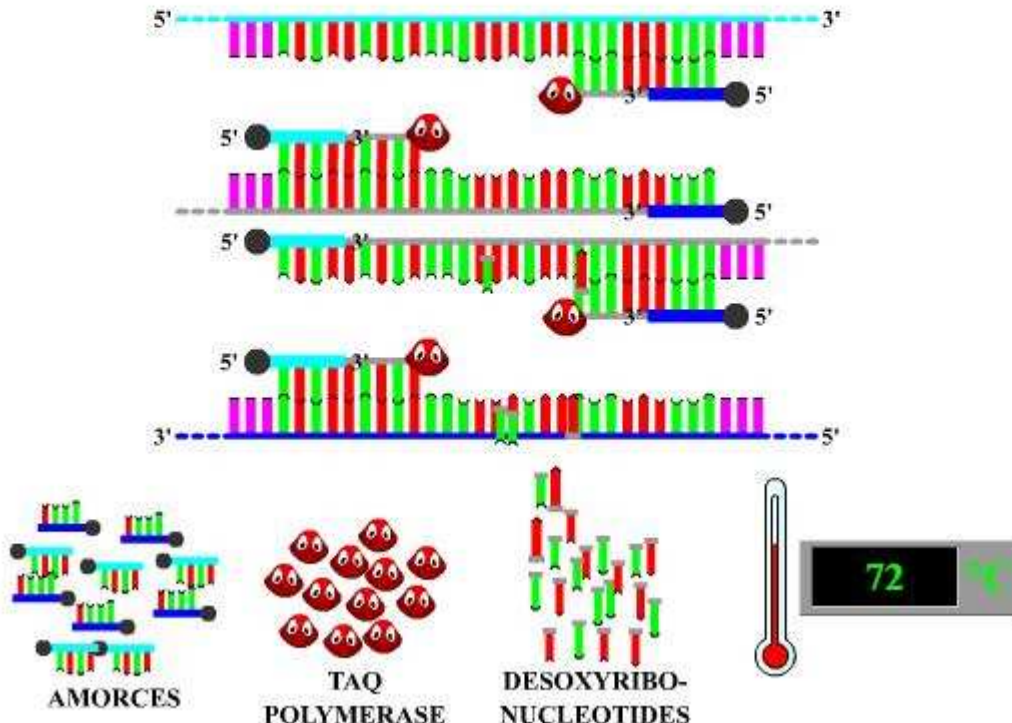


The diagram illustrates the three steps of DNA replication:

- Initiation:** A double-stranded DNA molecule is shown. The two strands are separated at a central point, forming a replication bubble. Two replication forks are created, moving outwards from the origin of replication. At each fork, a new DNA strand is synthesized. The leading strand is synthesized continuously towards the fork, while the lagging strand is synthesized discontinuously away from the fork as Okazaki fragments.
- Elongation:** The replication forks continue to move, and the DNA strands are extended. The leading strand continues to be synthesized continuously, while the lagging strand is synthesized in fragments. The diagram shows the growing DNA molecules with the leading strand being longer than the lagging strand.
- Termination:** The replication process ends when the two replication forks meet at the opposite end of the DNA molecule. The newly synthesized DNA molecules are now complete, each consisting of one original template strand and one newly synthesized strand. The diagram shows the final products of replication, which are two identical double-stranded DNA molecules.

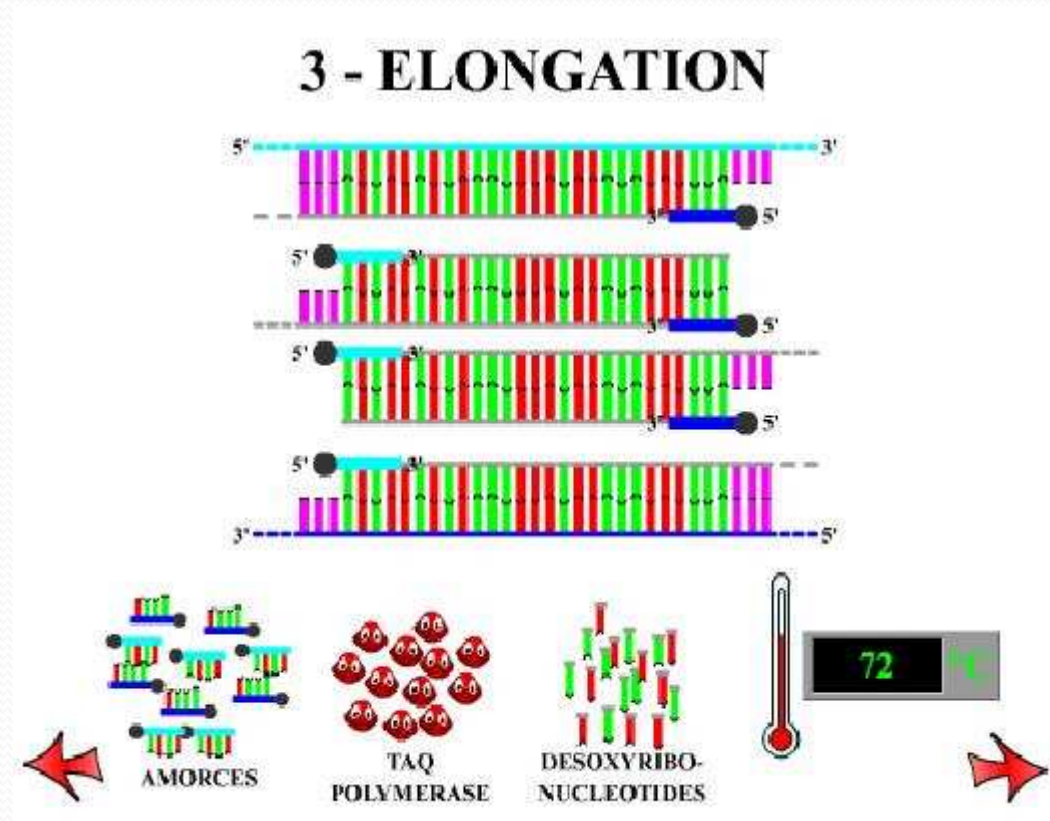


3 - ELONGATION



REMARQUE

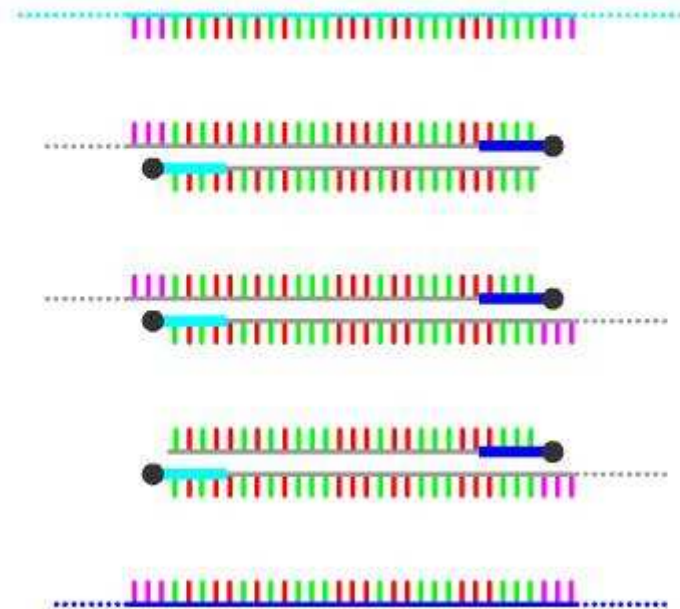
Remarquez que la polymérisation ne s'arrête pas lorsque la copie est de la longueur souhaitée. La copie de l'ADN initial génère donc des copies plus longues que souhaité.



- 
- La quantité d'ADN à la fin du second cycle est **multipliée par quatre**.
 - L'ADN initial est toujours présent mais il est devenu minoritaire par rapport à l'ADN synthétisé.
 - L'apparition des brins de longueur souhaitée **(ADN court)**.

Troisième cycle

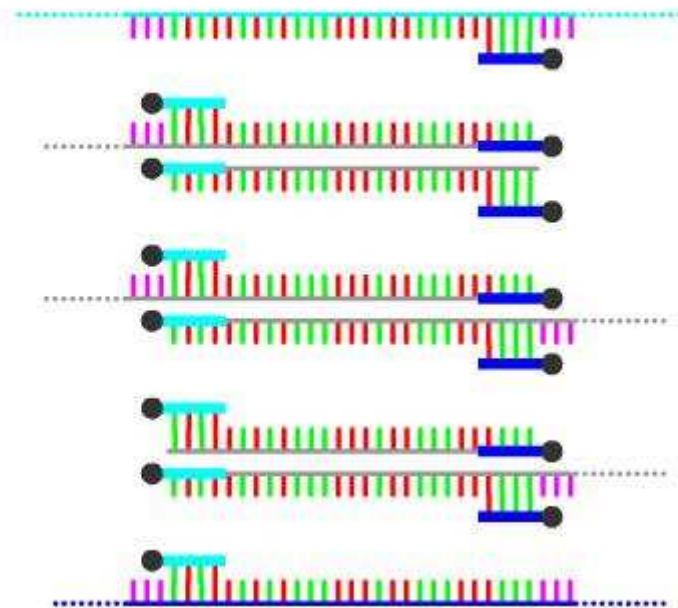
1 - DENATURATION



95 °C



2 - HYBRIDATION

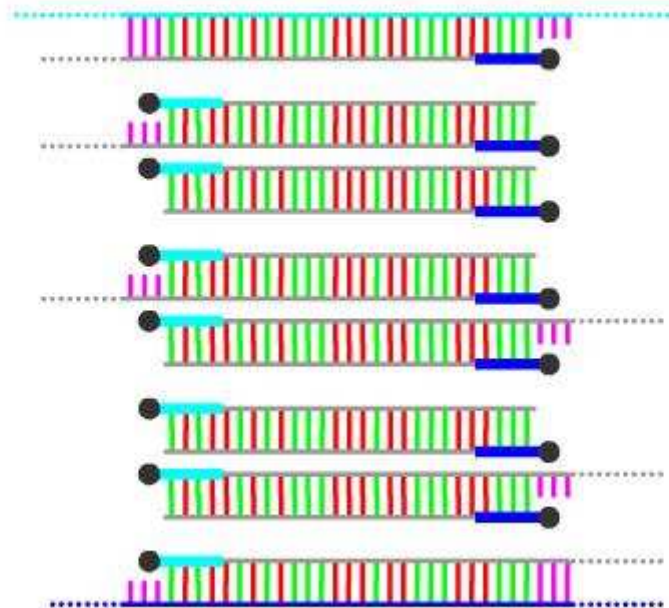


40-65

°C



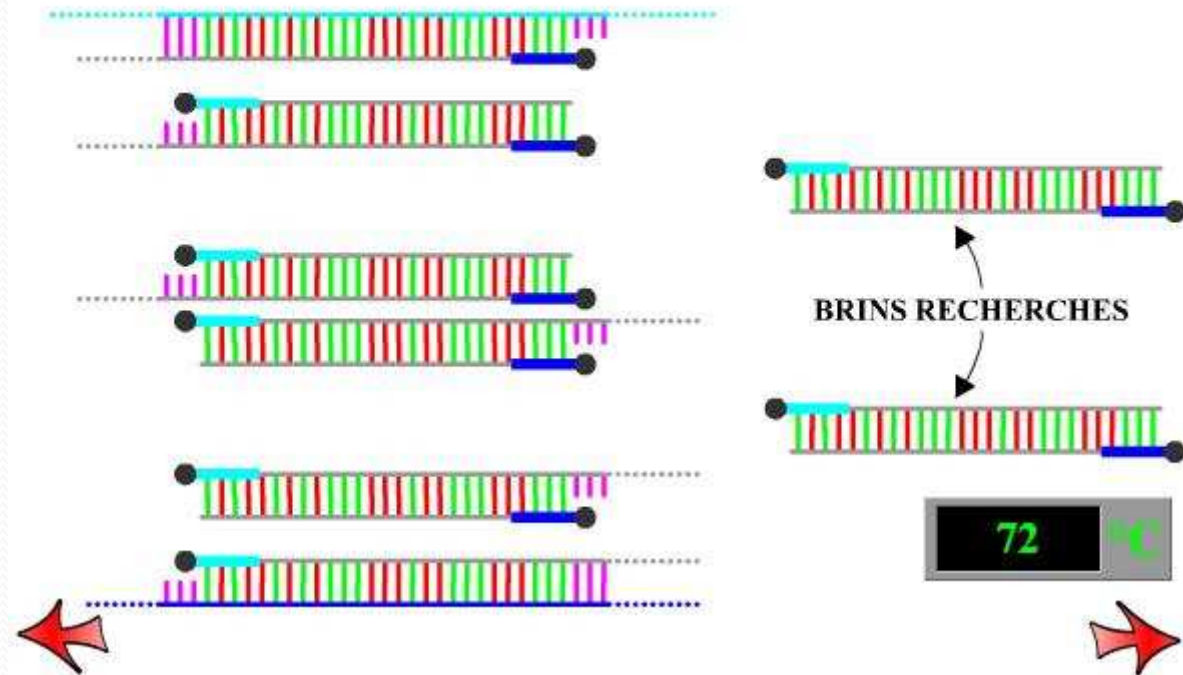
3 - ELONGATION



72 °C



3 - ELONGATION



- 
- A la fin du troisième cycle la quantité d'ADN a encore doublé. Elle est huit fois supérieure à la quantité d'ADN initiale et majoritairement de taille définie.

Les applications de la PCR

A. La recherche d'une pathologie:

- En parasitologie
- En bactériologie (ex : tuberculose)
- En virologie
- En oncologie (gènes impliqué dans la cancérogenèse) .

On met en évidence l'absence, ou la présence, dans le prélèvement d'un fragment d'ADN spécifique de l'agent causal.

Les applications de la PCR

B. Le diagnostic des maladies héréditaires **(diagnostic anténatal)**

- Identification sur un gène d'une mutation connue et identifiée (ex : mucoviscidose « maladie des mucus visqueux ») ou d'une délétion , responsables et caractéristiques de la maladie recherchée.

- La **mucoviscidose** est une maladie génétique, affectant les épithéliums glandulaires de nombreux organes. C'est une grave maladie qui touche notamment les poumons et entraîne de graves difficultés respiratoires.





Avant, une telle opération nécessitait impérativement :

- le clonage de la séquence.
- Son isolement.
- Son amplification dans une cellule hôte
- Sa purification.

Cette méthode extrêmement lourde et longue a été dès que possible **abandonnée au profit de la PCR.**



D'autres applications de la PCR

- Recherche d'OGM
- Détection de polymorphismes
- Séquençage
- Recherche de paternité



Grâce à son universalité, la PCR a conquis une place prépondérante en biologie moléculaire et concerne en particulier, tous les aspects de la biologie moléculaire appliquée à la médecine. Son apparition a représenté un progrès méthodologique décisif.

Merci pour
votre
attention 😊