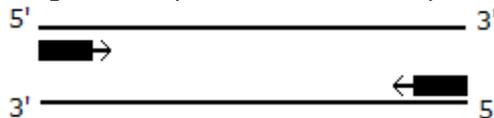


CHAPITRE V: La Technique PCR ou Polymerase Chain Reaction

La technique PCR est une technique d'amplification génique in vitro. Elle a été mise au point en 1985 par l'équipe de Kary MULLIS qui reçut le prix Nobel de chimie en 1993. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique, de séquence et de longueur définies.

I) Principe de la technique:

Elle est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN pol. On réalise n cycles d'amplification au cours desquels 2 amorces dirigent l'amplification de la séquence d'ADN qu'elles encadrent.



II) Choix de l'ADN pol:

Avant la découverte de la Taq pol: on utilisait la DNase I, Klenow ou la T4 pol, mais leur sensibilité à la chaleur nous contraignait à en rajouter après chaque dénaturation de l'ADN (par chauffage).

La Taq pol elle résiste à la chaleur et est optimale à 72°C. De plus, en pouvant travailler à haute température, on augmente la spécificité d'hybridation des amorces. En effet, à 37°C, le taux d'homologie est de 60-80% (beaucoup d'hybridation non spécifiques), tandis qu'à 72°C, il est >80%.

III) Les 3 étapes d'un cycle d'amplification:

- 1) Dénaturation de l'ADN à amplifier (94-95°C)
- 2) Hybridation des amorces (40 à 70 °C)
- 3) Elongation des amorces par la Taq pol (72°C)

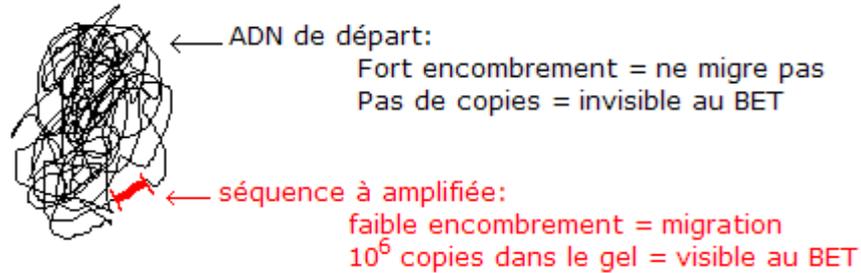
IV) Résultats:

- *Théorique*: 2^n copies à chaque cycle.
- *Réel*: 10^6 copies après 30 cycles (on atteint un plateau d'amplification car on épuise les composants de la réaction).

Une étape dure entre 30 sec et 1 min. Donc un cycle dur tout au plus 3 minutes.

- On obtient donc 10^6 copies en 90 min maxi.

Du fait que la taille de la séquence à amplifier est toujours plus faible que celle de l'ADN de départ, il est facile de les séparer par électrophorèse et comme la quantité de l'ADN amplifié est très importante, on peut directement la visualiser après coloration du gel d'agarose au BET.



V) Avantages:

1. simplicité et rapidité:

- thermo-cycleur automatisés, programmables et peu encombrants
- 10⁶ copies en 90 minutes

2. puissance:

- 1 séquence -> 10⁶ sans clonage.
- détection sans Southern

VI) Limites et inconvénients:

1. taille de la séquence à amplifier:

3 kb maximum.

2. nombre de copies de la cible:

ne doit pas être trop faible.

3. risque de contamination:

Du fait de sa sensibilité extrême, la PCR peut amplifier des molécules d'ADN étrangères suite à des contaminations.

- Il faut donc utiliser du matériel stérile jetable.
- On réalise des témoins négatifs: tube PCR + constituants réaction -sans séquence d'ADN à amplifier.

VII) Conclusion:

La PCR a détrôné le Southern qui n'est maintenant plus utilisé que dans le cas où la séquence de la cible n'est pas connue, car il est impossible alors de construire les amorces nécessaires à l'amplification.

VIII) Application pratique: diagnostic préimplantatoire:

Détection d'éventuelles anomalies génétiques dans une famille à risque avant implantation lors de fécondation in vitro.

1) fécondation in vitro:

Superovulation, ponction, ICS: injection d'un spermatozoïde dans l'ovocyte (microinjection).

2) développement des embryons:

Jusqu'au stade morula: 8 cellules.

3) prélèvement de 1 à 2 cellules sur ces embryons:

A ce stade, cela ne provoque pas l'arrêt du développement embryonnaire.

4) diagnostic en 12 à 24 heures:

→ PCR = recherche d'anomalie génétique

→ FISH = recherche d'anomalie chromosomique

5) décision

Si il n'y a aucune anomalie, transfert intra-utérin de plusieurs embryons.