# Amplification in vitro des acides nucléiques PCR et RT-PCR :

**Historique :** Cette méthode de biologie moléculaire a été mise au point en 1985 par Kary Mullis, qui obtient pour ces travaux le prix Nobel de Chimie en 1993. Aujourd’hui, ce procédé révolutionnaire couplé à l’utilisation d’une ADN polymérase thermorésistante permet d’obtenir, sans clonage, une amplification considérable d’un fragment donné d’ADN.

**2. Principe :** La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l’étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d’une matrice d’ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l’amplification est donc exponentielle. Pour avoir réplication d’un ADN double brin, il faut agir en trois étapes.

1. Il faut dénaturer l’ADN pour obtenir des matrices simple brin : dénaturation.
2. Borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l’aide d’oligonucléotides amorces spécifiques : hybridation.
3. Réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin : polymérisation.

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l’activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil permet d’exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l’expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).



Figure 1: Réaction d’amplification d’ADN dans le thermocycleur et visualisation du produit de PCR par électrophorèse.

**3. Les amorces :**

Dans la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces est crucial. Elles vont avoir un double rôle : en s'hybridant à l'ADN matrice, elles délimitent la région d’ADN à amplifier (étape 2 du cycle) et avec leur extrémité 3' OH libre servir d’amorce pour l’ADN polymérase (étape 3 du cycle). Les oligonucléotides amorces s’hybrident aux extrémités de la séquence qui va être amplifiée, il faut donc connaître les séquences nucléotidiques des extrémités de la région ADN amplifiée. C'est en effet au niveau de ces extrémités que les oligonucléotides amorces vont s'hybrider. Pour faciliter le choix des séquences des deux amorces, des logiciels d’analyse de séquences permettent de vérifier les points suivants :

• des Tm comparables. Les oligonucléotides amorces doivent s’hybrider à l'ADN matrice dans les mêmes conditions de température • des séquences qui ne soient pas complémentaires entre elles (en particulier dans la région 3’)

Il est alors possible de faire synthétiser les deux oligonucléotides (d'une vingtaine de bases). La synthèse chimique d'ADN permet d'obtenir des oligonucléotides dont l'extrémité 5' n'est pas phosphorylée (5'OH) contrairement aux ADN naturels. Ainsi, tous les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont déphosphorylés à leurs extrémités 5'.

 **4. Les températures :** Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l’activité enzymatique :

• l’étape de dénaturation, est réalisée à environ 95°C, pour une dissociation complète des deux brins d’ADN.

 • l’étape d’hybridation se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l’appariement amorces / matrice est réalisé.

 • l’étape de polymérisation est à environ 72°C, température de « travail » de l’ADN polymérase thermorésistante utilisée. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d’ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3’OH libre des amorces hybridées.

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes, seule la température d’hybridation devra être calculée pour chaque nouvelle PCR. Cette température d’hybridation dépend de la composition en bases des oligonucléotides amorces. Elle est légèrement inférieure (environ de 5°C) au Tm qui est la température de demi-dénaturation. Pour calculer le Tm d’un oligonucléotide inférieur à 30 nucléotides, on utilise la relation suivante :

**Tm = 2 (A + T) + 4 (G + C)**

**(Où A, T, G et C sont respectivement le nombre de chacune de ces bases dans l’oligonucléotide).**

**5. L’ADN matriciel :**

En théorie une copie ADN de la séquence recherchée est suffisante pour avoir une amplification, il faut cependant tenir compte de la probabilité de « rencontre » des molécules d’ADN matrice avec les amorces. Dans la pratique plusieurs copies sont nécessaires pour avoir un résultat correct. Mais attention, la mauvaise qualité et/ou une quantité trop importante d’ADN matrice peut conduire à une amplification aspécifique, voire à une inhibition enzymatique. Il est possible d’expliquer cette inhibition par la présence de contaminants provenant de l’échantillon ou des réactifs utilisés dans les protocoles d’extraction d’ADN.

**6. L’ADN polymérase :**

Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées), comme par exemple Thermus aquaticus (Taq polymérase). De nos jours, les enzymes utilisées sont dites recombinantes, ce qui simplifie considérablement leur obtention, et leurs propriétés ont été largement modifiées pour les rendre plus efficaces et plus fidèles.

**7. Le tampon :** Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase (TrisHCl à pH basique 8,5 à 9). Il contient des cations bivalents Mg2+, cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents Mg2+ et de cations monovalents (K+ ou NH4 +) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l’ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN.

En pratique, la concentration en sel doit cependant rester compatible avec l’activité de l’ADN polymérase.

**8. Aspects quantitatifs de la réaction PCR :**

 Le nombre de cycle est défini par l’expérimentateur selon le degré d’amplification souhaité, dans la plupart des cas, ce nombre est d’environ 30. En théorie (et seulement en théorie!) il y a un facteur d’amplification de l’ordre de 230 soit un facteur d'un milliard. En pratique les conditions expérimentales évoluent au fur et à mesure de l’avancée des cycles, le rendement de la réaction de polymérisation évolue de même, on peut espérer obtenir avec 30 à 40 cycles, un facteur d’amplification de l’ordre de 105 à 106.

