

# Réaction en chaîne par polymérase

Un article de Wikipédia, l'encyclopédie libre.

La **réaction en chaîne par polymérase** (**PCR** en anglais pour Polymerase Chain Reaction), est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier énormément le nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN (l'Amplicon), même si la quantité initiale est très faible (jusqu'à une copie). Cette technique est basée sur la combinaison de deux facteurs : Les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation « ADN double brins spécifique » des « **ADN polymérases ADN dépendantes thermostables** ». Les propriétés d'hybridation et de deshybridation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température. Ces éléments permettent de contrôler l'activité enzymatique grâce à des transitions de température (assurées par un thermocycleur) répétées de manière cyclique (cf. réaction en chaîne).

Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées), par exemple *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) ou encore *Pyrococcus furiosus* (Pfu polymérase), *Thermococcus litoralis* (Vent ou Tli polymérase), *Thermus thermophilus* (Tth 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, plus fidèles... En moins de dix ans, cette technique (*maintenant capable de faire plus d'un milliard de copie en moins d'une heure*) s'est imposée dans les laboratoires et a révolutionné la biologie moléculaire.

## Sommaire

- 1 Historique
- 2 Principe
  - 2.1 Les différentes étapes de la PCR
    - 2.1.1 Conditions natives (0 sur le schéma)
    - 2.1.2 Dénaturation initiale (1' sur le schéma)
    - 2.1.3 Phase de dénaturation (1 sur le schéma)
    - 2.1.4 Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (2 sur le schéma)
    - 2.1.5 Phase d'élongation (3 sur le schéma)
  - 2.2 Evolution de l'ADN au cours des 4 premiers cycles
    - 2.2.1 Cycle #1
    - 2.2.2 Cycle #2
    - 2.2.3 Cycle #3
    - 2.2.4 Cycle #4
    - 2.2.5 Cycles au delà de 4
- 3 Cinétique mesurable d'une PCR
- 4 Efficacité de la PCR
- 5 Techniques associées à la PCR
  - 5.1 Amplification hélicase-dépendante (HDA pour helicase-dependent amplification)
  - 5.2 Méta-PCR, (à compléter)
  - 5.3 PCR asymétrique (à compléter)
  - 5.4 PCR à asymétrie thermique entrelacée (TAIL-PCR pour Thermal asymmetric interlaced PCR)
  - 5.5 PCR emboîtée ou PCR gigogne (Nested PCR)
  - 5.6 PCR en gradient de température
  - 5.7 PCR en point final (end point PCR)
  - 5.8 PCR multiplexe (multiplex PCR)
  - 5.9 PCR en temps réel (Real-time PCR)
  - 5.10 PCR par essais (Touchdown PCR)
  - 5.11 PCR quantitative (q-PCR pour quantitative PCR)
  - 5.12 PCR sur colonie (Colony PCR)

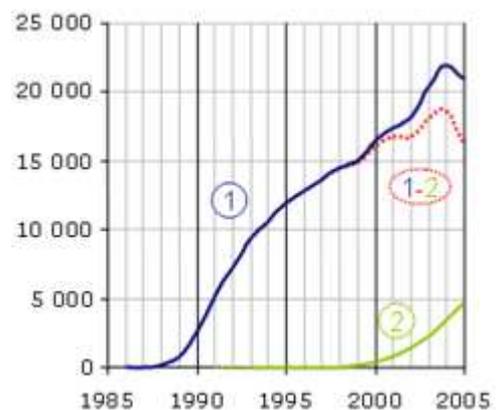
- 5.13 RT-PCR (RT-PCR pour Reverse Transcriptase PCR)
- 5.14 RT-PCR en une étape (single step RT-PCR)
- 5.15 RT-PCR in situ (in situ RT-PCR)
- 5.16 RT-PCR quantitative (qRT-PCR)
- 5.17 RT-PCR sur une cellule (single-cell RT-PCR)
- 5.18 Transcription inverse (RT pour Reverse Transcriptase)
- 5.19 TP-PCR (TP pour Triplet Repeat primed)
- 6 Autres techniques (à compléter)
- 7 Bibliographie
  - 7.1 Revues francophones :
  - 7.2 Articles anglophones :

## Historique

La PCR est une technologie qui a bouleversée la biologie moléculaire et s'est implantée très rapidement dans les laboratoires. En revanche, la PCR en temps réel a du attendre la mise sur le marché d'un certain nombre d'innovations technologiques avant de se développer et est encore considérée comme une méthodologie nouvelle. Le nombre d'article par année répondant aux mots clés (1) "**polymerase chain reaction**" et (2) "**real-time polymerase chain reaction**" sur le moteur de recherche PubMed

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>)

donne une assez bonne idée de leur importance dans le monde scientifique. Notez que la méthode n'est pas exempt de biais, par exemple quelques articles sont trouvés pour la PCR en temps réel en 1991 et 1992 (en pointillé) alors que son principe a été décrit en 1993. **La différence (1-2)** est représentative du poids de la PCR en point final, qui va probablement céder progressivement la place au temps réel.



Cette technique a largement évoluée depuis ces débuts. Parmi les évolutions les plus fondamentales, on retrouve :

- Le remplacement des fragments 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.
- La généralisation des thermocycleurs (un bon nombre d'ancienne expérimentation ont été réalisées avec trois bains-marie) a permis de rendre la PCR moins contraignante, plus reproductible et était un pré requis indispensable la plupart des applications nouvelles.
- L'invention de la PCR en temps réel qui permet de rendre la méthode quantitative et évite plusieurs étapes expérimentales contraignantes, telles l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'acquisition de fluorescence, la calibration de l'acquisition du signal, etc.

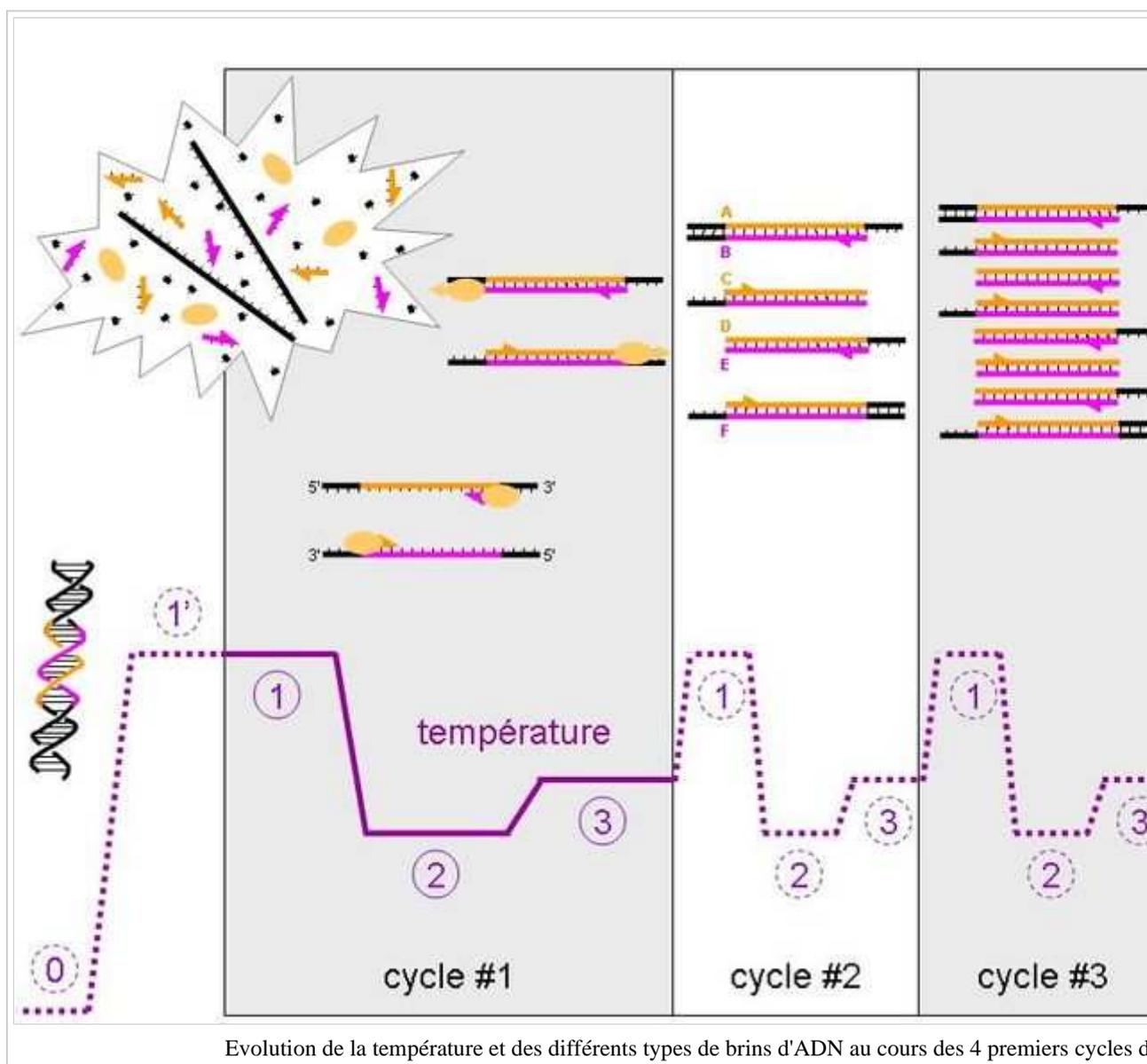
*Par soucis de clarté, les dates correspondent à la première publication sur le domaine et seul les premiers auteurs sont cités, les références complètes étant dans le chapitre "bibliographie". Ce choix permet en outre de limiter les polémiques telle le rôle de Rosalind Elsie Franklin dans la découverte de la structure de la double hélice d'ADN.*

- 1953 : Découverte de la structure en double hélice de l'ADN par James Dewey Watson, (prix Nobel de physiologie ou médecine en 1962).
- 1956 : Découverte de l'ADN polymérase ADN dépendante (ADN pol I) par Arthur Kornberg (prix Nobel de physiologie ou médecine en 1959).

- 1970 : Co-découverte indépendante de l'ADN polymérase ARN dépendante par Temin HM et Baltimore D (prix Nobel de physiologie ou médecine en 1975).
- 1986 : Première publication publique sur la PCR par Kary Mullis (prix Nobel de chimie en 1993).
- 1988 : Première PCR réalisé avec une ADN polymérase thermostable, provenant de *Thermus aquaticus*, par Saiki RK.
- 1991 : Première détection du produit de PCR par sonde (sonde d'hydrolyse) par Holland PM.
- 1992 : Invention de la PCR en temps réel par Higuchi R.
- 1995 : Première publication sur la TAIL-PCR par Liu YG
- 1996 : Mise au point des polymérases temporairement inactives et activables par la chaleur par Birch DE.
- 1997 : Mise en évidence de la variation de température "Tm dépendante" du SYBR green par Wittwer CT.
- 1997 : Première discrimination d'allèle grâce la courbe de fusion par Lay MJ.

## Principe

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. Sauf pour certaines méthodologies (par exemple l'utilisation de sondes d'hydrolyse), chaque cycle contient trois étapes détaillées ci-dessous. Par soucis de didactisme, nous allons considérer avoir dans l'exemple une efficacité de PCR de 100%.



## Les différentes étapes de la PCR

---

### Conditions natives (0 sur le schéma)

---

Cette étape se fait généralement à température ambiante. L'ADN bicaténaire adopte sa conformation en double hélice. Dans cet exemple, nous considérerons qu'il n'y a qu'une molécule initiale d'ADN double brin dans la solution, la zone colorée (rose et orange) correspondant à notre amplicon. Note, les ADN complémentaires issus de la transcription inverse sont généralement simple brin et adopteront alors de complexes conformations tridimensionnelles similaires à celle des ARN.

### Dénaturation initiale (1' sur le schéma)

---

Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95°C) est réalisée. Cette étape permet de : déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases de type « Hot start », de dénaturer d'autre enzyme qui pourraient être dans la solution (Transcriptase Inverse, Uracil-N-Glycosylase).

### Phase de dénaturation (1 sur le schéma)

---

Cette étape (généralement 0 à 1 minute à 95°C) permet déshybrider les ADN, de « décrocher » les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

### Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (2 sur le schéma)

---

Cette étape (généralement 2 à 60 secondes à 56-64°C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider avec leur brin complémentaire, ce qui empêcherait la fixation des amorces, car ces dernières sont bien plus courtes et en concentration bien plus importante. *Expérimentalement, il est constaté que la PCR marche même avec une phase d'hybridation supérieure de quelque degrés au Tm théorique des amorces, probablement parce qu'elles interagissent déjà avec les polymérases, qui stabiliseraient leur hybridation à l'ADN matrice.*

### Phase d'élongation (3 sur le schéma)

---

Cette étape (généralement 4 à 120 secondes à 72°C) permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présent dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon.

## Evolution de l'ADN au cours des 4 premiers cycles

---

### Cycle #1

---

- Lors de la phase 1, nous constatons que l'ADN initial a adopté une conformation « linéaire » (sans structure secondaire) et simple brin. Les amorces, les dNTPs et les polymérases sont en large excès et homogènement répartis dans la solution.
- Lors de la phase 2, une des amorces sens s'hybride avec sa séquence complémentaire sur le brin sens (en rose), une des amorces anti-sens se liant elle au brin anti-sens (en orange). Deux polymérase peuvent alors interagir avec les deux complexes amorces/ADN matrice.
- Lors de la phase 3, les polymérases parcourent leur brin matrice de son extrémité 3' vers son extrémité 5' tout en synthétisant le brin complémentaire. Elles s'arrêteront à la fin du cycle, décrochées par la phase de dénaturation du cycle suivant. Les ADN néo-synthétisés sont donc

précisément définis à leur extrémité 5' mais pas à leur extrémités 3' (parties noires). Les ADN sont alors bicaténaires sur une longueur plus ou moins importante.

A la fin de l'étape 3, nous avons alors deux brins d'ADN matrice et deux brins (un sens et un anti-sens) d'ADN précisément définis à leur extrémité 5' uniquement.

### Cycle #2

Les trois phases se déroulent de la même manière qu'au cycle #1, sauf que deux polymérases arrivées au bout de leur ADN matrice se décrochent spontanément. À la fin de la phase 3, nous obtenons tout les types d'ADN qui existeront lors de la PCR, soit :

- Un brin d'ADN natif anti-sens (A).
- deux brins d'ADN sens précisément définis à leur extrémité 5' uniquement (B).
- Un brin d'ADN anti-sens correspondant à l'amplicon, c'est-à-dire précisément définis à ses deux extrémités (C).
- deux brins d'ADN anti-sens précisément définis à leur extrémité 5' uniquement (D).
- Un brin d'ADN sens correspondant à l'amplicon, c'est-à-dire précisément définis à ses deux extrémités (E).
- Un brin d'ADN natif anti-sens (F).

### Cycle #3

Idem au cycle 2. A la fin de la phase 3, nous observons 1 brin de type A et F, 3 de B et D, et 4 de C et E. Nous observons l'apparition de deux molécules d'ADN double brins C-E qui correspond à notre amplicon.

### Cycle #4

Idem au cycle 2. A la fin de la phase 3, nous observons 1 brins de type A et F, 4 de B et D, et 11 de C et E. Nous observons que l'amplicon devient la combinaison majoritaire.

### Cycles au delà de 4

Si nous avons augmenté le nombre de cycle, nous aurions obtenu le tableau suivant :

**nombre de molécule de chaque type en fonction du cycle de PCR**

		cycle numéro :														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
type de molécule	<b>A</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<b>B</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	<b>C</b>	0	0	1	4	11	26	57	120	247	502	1013	2036	4083	8178	1636
	<b>D</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	<b>E</b>	0	0	1	4	11	26	57	120	247	502	1013	2036	4083	8178	1636
	<b>F</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

simple brin	nombre	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
	% amplicon	0,00	0,00	25,00	50,00	68,75	81,25	89,06	93,75	96,48	98,05	98,93	99,41	99,68	99,83	99,9
double brins	nombre	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384
	% amplicon	0,00	0,00	0,00	12,50	43,75	65,63	79,69	88,28	93,36	96,29	97,95	98,88	99,39	99,67	99,8

- Les molécules précisément définies à leur extrémité 5' uniquement (B et D) augmentent de manière linéaire (de 1 par cycle sauf si l'ADN natif se dégrade).
- Le nombre de molécules simple ou double brin augmente selon une exponentielle d'ordre 2.
- Les molécules contenant la séquence exacte à amplifier (C et E) apparaissent dès le deuxième cycle et augmente selon une suite arithmétique qui tend vers une exponentielle d'ordre 2 lorsque le nombre de cycle augmente. Notez que dès le dixième cycle, elles représentent près de 99% de l'ensemble.
- L'amplicon (les couples C-E) apparaît dès le troisième cycle et augmente selon une loi de même type que ces composants. Il représente près de 98% des molécules au dixième cycle, 99,91% au quinzième (*zone où les ADNc issus d'ARNm fortement exprimés commencent généralement à devenir détectable*).

Ces valeurs ont été obtenues en partant d'une seule molécule initiale d'ADN double brins, mais autrement, chaque matrice aurait subi le même processus. A un cycle donné, la quantité d'ADN dépend donc du nombre initial de matrice. En revanche, quelque soit sa concentration initiale, il est théoriquement possible d'obtenir n'importe quelle quantité en ajustant le nombre de cycle. La PCR est donc régit théoriquement par la loi :

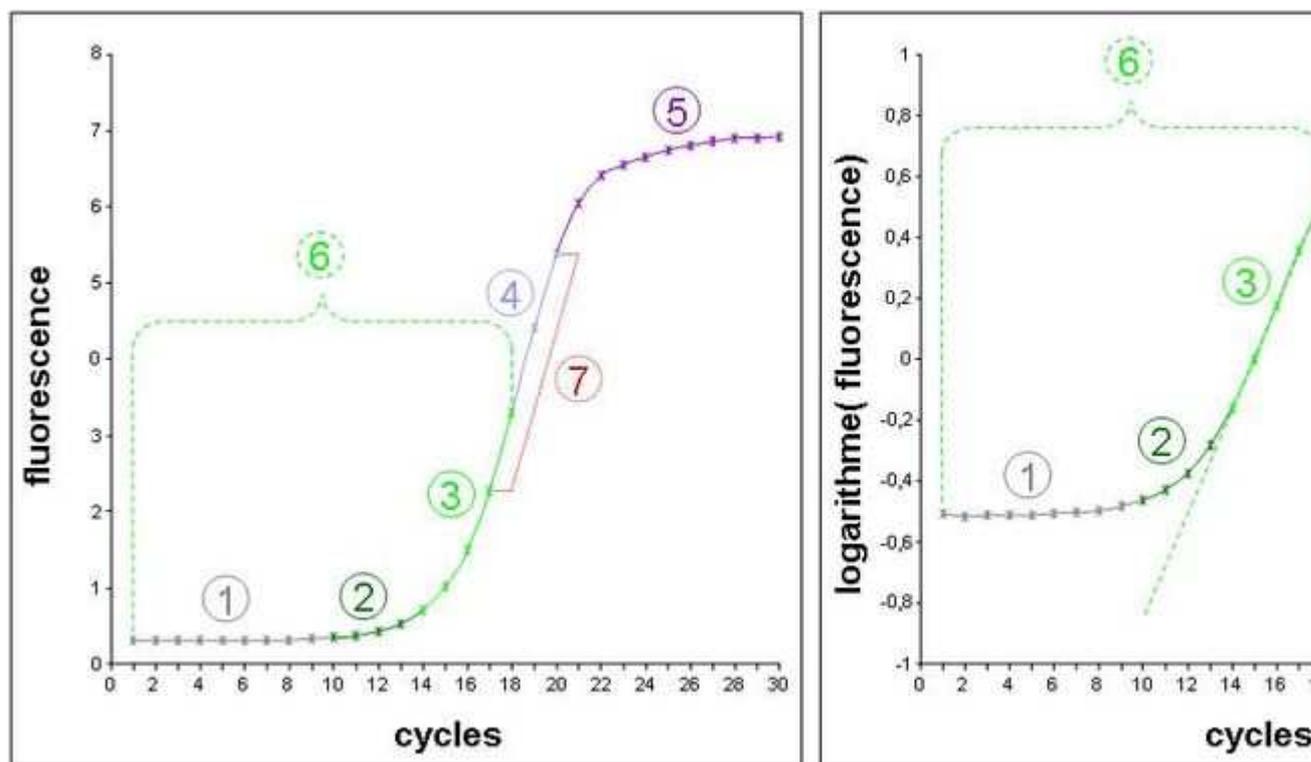
$$[ADN]_{cyclen} = [ADN]_{initiale} \times E^n$$

Mais la PCR est une réaction enzymatique complexe. Le produit est identique au substrat et peut venir inhiber l'enzyme, mais surtout, les réactifs secondaires (amorces, dNTP) peuvent commencer à manquer. La PCR ne peut donc avoir une loi d'amplification exponentielle que tant que **l'ADN matrice est le seul facteur limitant**. La réaction devient ensuite imprédictible et il est alors impossible de pouvoir comparer plusieurs échantillons entre eux sans un biais quantitatif plus ou moins significatif (voir l'article sur la PCR quantitative). Il est donc important de bien comprendre les différentes phases d'une cinétique de PCR.

Animation (<http://www.biomultimedia.net/archiv/pcr/pcr.htm>)

## Cinétique mesurable d'une PCR

Ce chapitre traite des cinétiques mesurables d'une PCR, car des limitations technologiques rendent inaccessible les cycles précoces, et généralement une large portion de la partie exponentielle. Son profil apparent (mesurable) adopte plusieurs phases distinctes, plus ou moins développées en fonction de choix méthodologiques.



- **Schéma de gauche** : données expérimentales d'une cinétique de PCR mesuré sur un thermocycleur en temps réel. La fluorescence émise par un intercalant de l'ADN est proportionnelle à la quantité d'ADN présent (cad majoritairement l'amplicon). La courbe représente donc la cinétique d'amplification de l'ADN cycle par cycle.
- **Schéma de droite** : les valeurs de fluorescences précédentes ont été converties en logarithme décimal. Une cinétique de type exponentielle devrait donc être transformée en un segment de droite (segment quantifiable).
- 1) Bruit de fond de la fluorescence aspécifique du marqueur. Son niveau est très dépendant de la nature du marqueur et du soluté de l'échantillon.
- 2) Zone où la mesure de fluorescence est biaisée par le bruit de fond. Elle se distingue aisément sur le schéma de droite car elle adopte un profil d'exponentielle, alors que les valeurs sont déjà dans un repère semi-logarithmique.
- 3) Zone de la cinétique en phase exponentielle et mesurable sans biais. Elle adopte dans le schéma de gauche l'apparence d'un segment de droite nommé **segment quantifiable**. Remarquez que dans cet exemple expérimental, il ne fait que 5 cycles.
- 4) Zone de la cinétique où la polymérase devient un facteur limitant. L'accumulation d'amplicon se fait alors de manière constante et devient linéaire sur le schéma de gauche.
- 5) Phases d'amortissement puis de plateau de la cinétique dues à l'apparition de facteurs limitants non constant (dNTP, fluorophore, etc.), de dégradation de l'activité enzymatique, de la qualité de fluorescence...
- 6) Phase de la cinétique qui répondait réellement à une loi exponentielle, mais seule la zone 3 est réellement exploitable (sauf pour le maxima de dérivé seconde en PCR en temps réel).
- 7) Zone linéaire sur le schéma de gauche. Une erreur classique en PCR en point final était de déterminer cette zone grâce à une gamme de cycle pour tenter de faire une mesure quantitative de l'ADNc initial à ce niveau.

## Efficacité de la PCR

L'avènement de la PCR en temps réel a mis en exergue que l'efficacité d'une réaction de PCR (généralement notée **E**) n'était pas toujours égale à deux. Cela signifie que sur l'ensemble des cycles considérés comme quantitatif (zone n° 6 de la cinétique), tous les brins matrices ne servent pas forcément à donner une copie complète de l'amplicon. Deux phénomènes en sont les principales causes :

- Tous les brins matrices ne sont pas forcément liés par un complexe amorce/polymérase lors de la phase d'hybridation. La probabilité d'amorçage peut être influencée par la température, la longueur et la séquence de l'amorce, sa composition en nucléotide naturel ou modifié, sa concentration dans la solution, la composition ionique de cette dernière, l'auto-hybridation entre les amorces ou la compétition possible d'ADN non cible (par exemple un pseudo-gène).
- Toutes les synthèses ne sont pas forcément complètes, notamment si la phase d'élongation est trop courte. Un brin incomplet à son extrémité 3' ne peut pas servir de matrice car l'amorce complémentaire ne peut pas se lier à lui.

Cette efficacité est donc théoriquement inférieure ou égal à deux mais certaines sources considèrent qu'elle est acceptable jusqu'à 2,3!

*Ce qui suit peut être un élément de controverse !*

L'auteur de ce chapitre n'a pour l'instant trouvé aucune source justifiant cette position. Il considère qu'il y a deux types d'explication possible :

- Une part significative (jusqu'à 30%) des brins d'ADN servent plusieurs fois de matrice pendant un cycle et cette proportion est conservée pendant toute la phase exponentielle. Donc pour chacune de ces matrices, un complexe amorce/polymérase s'est fixé une première fois, une synthèse complète a été effectuée, l'ADN double brin s'est déshybridé à une température extrêmement défavorable, un second complexe amorce/polymérase s'est fixé à une température probablement défavorable (étape d'élongation) et qu'une seconde synthèse complète a eut lieu.
- Un biais expérimental (dans un facteur de dilution par exemple) ou d'analyse mathématique (généralement commis par l'utilisation inappropriée d'outil d'optimisation présent dans le logiciel du thermocycleur) a été commis. Ces deux types de biais ont été plusieurs fois constatés.

La majorité des protocoles expérimentaux donne une efficacité de PCR entre 1,75 et 2. Deux écoles s'affrontent alors, avec des arguments expérimentaux à l'appui. L'une considère que cette efficacité est une constante pour chaque amplicon dans un protocole expérimental donné. L'autre estime qu'elle varie toujours significativement et qu'elle nécessite d'être constamment remesurée. Il convient de noter qu'il est très difficile de savoir si une variation d'une efficacité de PCR observée vient de la nature même de cette méthode, d'une variation dans le protocole expérimental (manque de reproductibilité des réactifs ou de la manipulation) ou d'une variation dans l'acquisition des données (variations de fluorescence, canaux de lecture différents, biais dans l'analyse mathématique). Il est également très ardu d'être certain que l'efficacité utilisée (mesurée à chaque expérience ou non) est bien celle qui a eut court dans l'échantillon à calibrer (voir la PCR quantitative).

Le terme efficacité peut aussi avoir deux significations selon les auteurs :

- Les premiers désignent l'ordre de l'exponentielle. L'équation de la cinétique s'écrit donc :

$$[ADN]_n = [ADN]_{initiale} x E^n$$

- Les seconds désignent la fraction de molécule d'ADN servant effectivement de matrice. L'équation devient alors :

$$[ADN]_n = [ADN]_{initiale} x (1 + E)^n$$

Notons que la deuxième formule facilite l'expression en pourcentage (en multipliant E par 100), mais que les deux concepts sont absolument identiques.

Cette efficacité de PCR est un élément fondamental à prendre en compte pour obtenir une mesure quantitative ou établir un protocole de PCR multiplexe, mais elle est généralement négligeable pour un résultat qualitatif ou en PCR en point final.

## Techniques associées à la PCR

*Les sigles et les noms en anglais sont donnés entre parenthèses.*

## **Amplification hélicase-dépendante (HDA pour helicase-dependent amplification)**

C'est une technique récente, proche de la PCR, où la désybridation induite par la température est assurée par une hélicase.

## **Méta-PCR, (à compléter)**

## **PCR asymétrique (à compléter)**

## **PCR à asymétrie thermique entrelacée (TAIL-PCR pour Thermal asymmetric interlaced PCR)**

Il s'agit de protocole complexe alliant les principes de la PCR emboîtée, de la PCR asymétrique par le  $T_m$  des amorces, la succession plusieurs type de cycle favorisant l'hybridation de telle ou telle amorce, et des amorces dégénérées. Le but est d'obtenir un amplicon final spécifique d'une séquence d'ADN dont seule une extrémité est connue généralement dans l'optique de séquencer la partie inconnue. Cette méthode est très utilisée pour la marche sur chromosome ou la caractérisation des séquences variables des immunoglobulines.

## **PCR emboîtée ou PCR gigogne (Nested PCR)**

C'est une PCR en deux étapes successives, avec deux couples d'amorce différents, le second liant des séquences situées à l'intérieur du premier amplicon. Cette technique était initialement utilisée pour réduire le risque de contamination (le produit final devait pouvoir interagir avec deux couples d'amorces, donc deux niveaux de spécificité). Elle est maintenant très utilisée par les virologues travaillant sur les virus à ARN qui peuvent avoir une haute mutabilité. Le premier couple d'amorce est conçu pour pouvoir accrocher les quelques parties stables du génome viral, le deuxième pour identifier le sous-type. Elle permet aussi une meilleure sensibilité du résultat.

## **PCR en gradient de température**

Il s'agit d'une technique aidant à la mise au point d'un nouveau protocole de PCR. Elle nécessite des thermocycleurs capables d'assurer des températures différentes, pour une même étape, aux différents échantillons. Elle est surtout utilisée pour optimiser l'étape d'hybridation, notamment en PCR multiplexe.

## **PCR en point final (end point PCR)**

Ce terme est apparu en opposition à la PCR en temps réel. Il désigne toutes les tentatives de quantification à partir du produit final d'une réaction de PCR.

## **PCR multiplexe (multiplex PCR)**

C'est un protocole destinée à amplifier plus d'un amplicon à la fois, généralement en ajoutant un couple d'amorce par type désiré. Les produits de PCR ne seront alors compétitifs que pour la polymérase, les dNTP et, éventuellement, le marqueur d'ADN. Il est également possible d'amplifier différent type d'ADN reconnu par un même couple d'amorce, tel les mimics. La PCR multiplexe peut se faire en point final (les produits de PCR étant usuellement différenciés par leur taille ou la présence d'un site de restriction) ou en temps réel (chaque produit étant mesuré par une sonde spécifique couplé à un fluorophore dont le spectre d'émission est différent des autres). Ses applications qualitatives sont nombreuses (détection de souche virale, de mutations, ...) mais son aspect quantitatif ne fait pas l'unanimité, malgré de fortes pressions industrielles pour ce marché

très lucratif.

### **PCR en temps réel (Real-time PCR)**

---

Véritable révolution dans l'utilisation de la PCR, cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet par son principe de faire des mesures quantitatives mais elle nécessite des thermocycleurs particuliers. Le nom le plus communément utilisé est la Q-PCR pour Quantitative PCR. Il ne faut surtout pas la confondre avec la RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

### **PCR par essais (Touchdown PCR)**

---

C'est un protocole utilisé pour amplifier de l'ADN faiblement représenté et/ou subissant une compétition sur leurs amorces par des produit de pseudo-gène. Il consiste à avoir une température d'hybridation très haute lors des premiers cycles afin d'assurer une forte stringence et donc une amplification spécifique. Une fois que la séquence d'intérêt devient majoritaire vis-à-vis de ses compétiteurs, la température d'hybridation est progressivement abaissée afin d'assurer une meilleure efficacité de PCR. L'efficacité n'étant pas constante tout au long de la réaction, il est très difficile (*impossible* ?) de pouvoir obtenir un résultat quantitatif sans biais. test

### **PCR quantitative (q-PCR pour quantitative PCR)**

---

La PCR permet d'obtenir des résultats quantitatif sur la quantité d'ADN initiale. Ce terme est aussi employé de manière abusive pour désigner la PCR en temps réel, car il est très difficile de pouvoir obtenir un résultat autre que qualitatif ou semi-quantitatif en PCR en point final, mais c'est faire abstraction de certaine expérience en PCR compétitive ou PCR radioactive.

### **PCR sur colonie (Colony PCR)**

---

C'est un protocole pour vérifier la correcte insertion d'un transgène dans une colonie de clone bactérien par PCR. Elle fut très utilisée lors de la construction des BAC dans les grands programmes de séquençage.

### **RT-PCR (RT-PCR pour Reverse Transcriptase PCR)**

---

C'est une technique associe une RT suivie d'une PCR. Elle permet de pouvoir séquencer, cloner ou mesurer un transcrit généralement très faiblement représenté. c'est pas complete.

### **RT-PCR en une étape (single step RT-PCR)**

---

C'est un protocole mélangeant les réactifs de RT et de PCR afin que les deux étapes puissent se faire sans avoir à ouvrir le tube. Cela permet de réduire le risque de contamination ou d'inversion d'échantillon mais il est plus difficile d'optimiser le milieu réactionnel pour chaque étape. Cela induit en outre un risque de biais pour normaliser l'étape de RT car cela implique d'utiliser la PCR multiplexe.

### **RT-PCR *in situ* (*in situ* RT-PCR)**

---

Cette méthodologie consiste à réaliser la RT-PCR non pas sur des molécules en solution mais sur des coupes histologiques. Bien que les résultats ne soit que semi-quantitifs, ils apportent en outre une information sur la localisation des transcrits dans le tissu.

### **RT-PCR quantitative (qRT-PCR)**

---

C'est une technique destinée à pouvoir quantifier la quantité d'un type d'ARN initialement présent dans un échantillon. Ce terme est souvent employé abusivement pour désigner une RT suivie d'une PCR en temps réel (RT-qPCR serait alors plus indiqué). Objectif principal de la plupart des biologistes, elle soulève de vives polémiques quant à l'utilisation de calibrateur externe ou interne (gène de ménage). A l'exception de complexes protocoles utilisant des calibrateurs externes homologues compétitifs, elle ne permet qu'une quantification relative.

### **RT-PCR sur une cellule (single-cell RT-PCR)**

---

Cette méthodologie permet d'étudier les transcrits d'une cellule unique, obtenue par patch-clamp, microdissection laser ou triage de cellule par activité de fluorescence (FACS en anglais pour Fluorescence activated cell sorting). Cette précision peut être nécessaire lorsque le tissu n'est pas homogène (cellules tumorales, feuilletts cellulaires bien différenciés, etc.) mais la quantification va devenir moins précise à cause d'une amplification des effets stochastiques et nécessite donc une multiplication des mesures.

### **Transcription inverse (RT pour Reverse Transcriptase)**

---

Cette technique permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse). Cet ADNc est généralement destiné à être amplifié par PCR (L'ADNc étant plus stable, il permet plus de liberté que les ARN pour les analyses suivantes) .

### **TP-PCR (TP pour Triplet Repeat primed)**

---

Cette variante complexe de la PCR a été mise au point par Jon Warner en 1996 et est utilisée dans les amplifications des gènes comportants des triplets répétés, comme dans le cas de la Dystrophie myotonique de Steinert. La combinaison PCR-Séquençage ne peut pas être utilisée dans ces cas car la Taq polymérase fait des erreurs de réplication.

### **Autres techniques (à compléter)**

- ARDRA
- Hybridation *in situ*
- LAMP
- Microarray
- Nasba
- Northern blot
- RACE-PCR
- RNase Protection Assay (RPA)
- Southern blot
- TMD
- ADN branché
- LCR

### **Bibliographie**

#### **Revue francophones :**

---

- Elyse Poitras et Alain Houde. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* (Canada). Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11

## Articles anglophones :

---

- Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. 1970. *Nature* 226, 1209–1211
- Birch DE. Simplified hot start PCR. 1996. *Nature*;381:445–6.
- Friedberg EC. The eureka enzyme: the discovery of DNA polymerase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb;7(2):143-7.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. 1992. *Biotechnology*;10:413–7.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'–3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. 1991. *Proc Natl Acad Sci U S A*;88:7276–80 (<http://www.pnas.org/cgi/reprint/88/16/7276>).
- Kornberg, A., Lehman, I. R., Bessman, M. J & Simms, E. S. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 1956. *Biochim. Biophys. Acta* 21, 197–198
- Lay MJ, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. 1997. *Clin Chem*;43:2262–7.
- Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. 1995. *Genomics.* Feb 10;25 (3):674-81.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
- Stoflet ES, Koeberl DD, Sarkar G, Sommer SS. Genomic amplification with transcript sequencing. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):491-4.
- Temin HM & Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. 1970. *Nature* 226, 1211–1213 (1970).
- Watson JD & Crick FC. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953 171, 737–738
- Warner JP et al. A general method for the detection of large CAG repeat expansions - *Journal of Medical Genetics*, December 1996, Vol. 33, No 12, pp. 1022 – 1026
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. 1997. *Biotechniques*;22:130–1, 134–8.



**Portail de la biologie cellulaire et moléculaire** – Accédez aux articles de Wikipédia concernant la biologie cellulaire et moléculaire.



**Portail de la biochimie** – Accédez aux articles de Wikipédia concernant la biochimie.

Récupérée de « [http://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9action\\_en\\_cha%C3%A9ne\\_par\\_polym%C3%A9rase](http://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9action_en_cha%C3%A9ne_par_polym%C3%A9rase) »

Catégories : Réaction en chaîne par polymérase • Biologie moléculaire • Technique de laboratoire

- 
- Dernière modification de cette page le 6 janvier 2007 à 21:18
  - Copyright : Tous les textes sont disponibles sous les termes de la GNU Free Documentation License. Wikipedia® est une marque déposée de la Wikimedia Foundation, Inc., œuvre de bienfaisance régie par le paragraphe 501(c)(3) du code fiscal des États-Unis.