

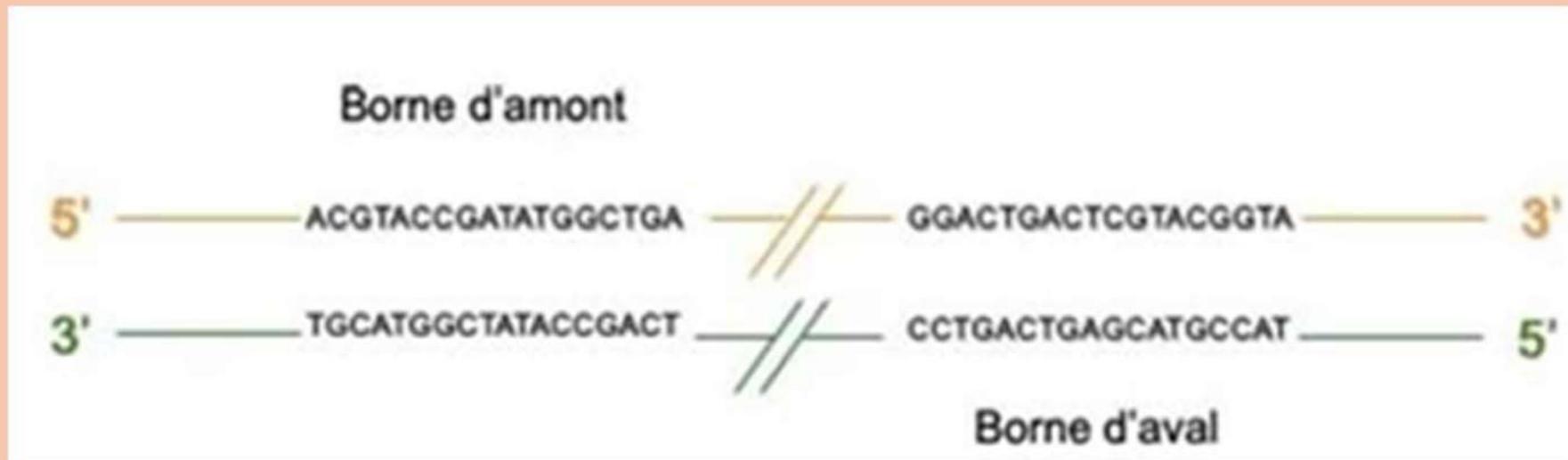
PCR et principes de biologie moléculaire

- Amplification en chaîne par la polymérase ou PCR (= polymerase chain reaction)
- 1985 par Kary Mullis
- = une technique de base dans un laboratoire de biologie moléculaire
- L'amplification spécifique de la région d'ADN que l'on veut étudier.
- C'est une technique extrêmement puissante car cette amplification du génome ne se fait qu'à partir de quelques microgrammes d'ADN génomiques extraits donc **d'une très petite quantité**
- la Taq (Thermophilus Aquaticus) DNA polymérase ou Taq Polymérase
- Cette polymérase a été identifiée dans la bactérie Thermophilus Aquaticus, bactérie (//!\ **bactérie et pas virus +++**), vivant dans les sources d'eau chaude. Contrairement à la majorité des protéines, cette enzyme est **capable de travailler à 95°C sans être dégradée ou dénaturée.**

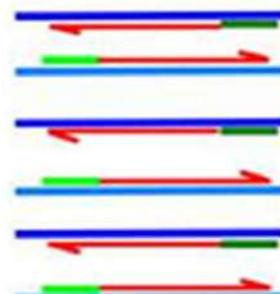
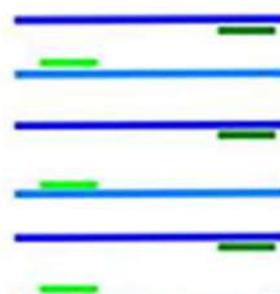
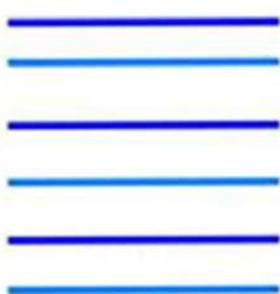
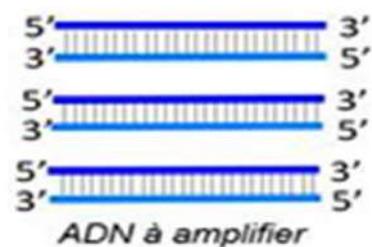
- Comme c'est une technique **+++ très sensible +++**, les risques de contamination sont **très grands+++**, notamment d'un échantillon à un autre.
- Lorsqu'on fait ce type de manipulations, il faut vraiment suivre un ordre et **+++ ne jamais revenir en arrière +++**

Les étapes de la PCR :

- On part d'un ADN double brin -> amplicon
- On amplifie généralement un fragment d'ADN de l'ordre de quelques centaines de pnb.



Amorce Sens
Amorce Reverse

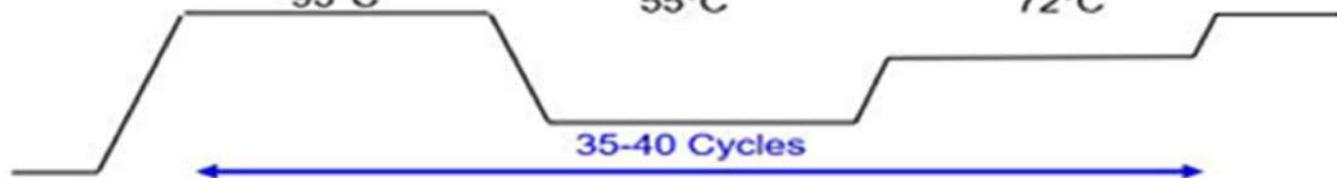


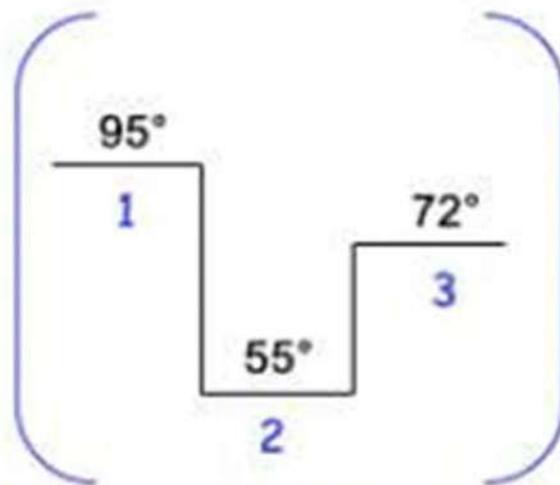
Dénaturation
95°C

Hybridation
55°C

Elongation
72°C

35-40 Cycles





X n cycles

Pour réaliser une PCR il faut mettre dans un
micro-tube :

?????

Pour réaliser une PCR il faut mettre dans un micro-tube :

- L'ADN du patient (100ng)
- 2 Amorces (Primers) : nécessaires pour le démarrage (amorces sens et reverse) et présentes un grand nombre de fois (elles sont en excès afin de pouvoir faire tous les cycles : il en faut en effet 1 par brin d'ADN à chaque cycle).
- Désoxynucléotides (dNTP)
- Tampon (contenant du $MgCl_2$), qui garde le pH neutre
- La Taq polymérase (enzyme)

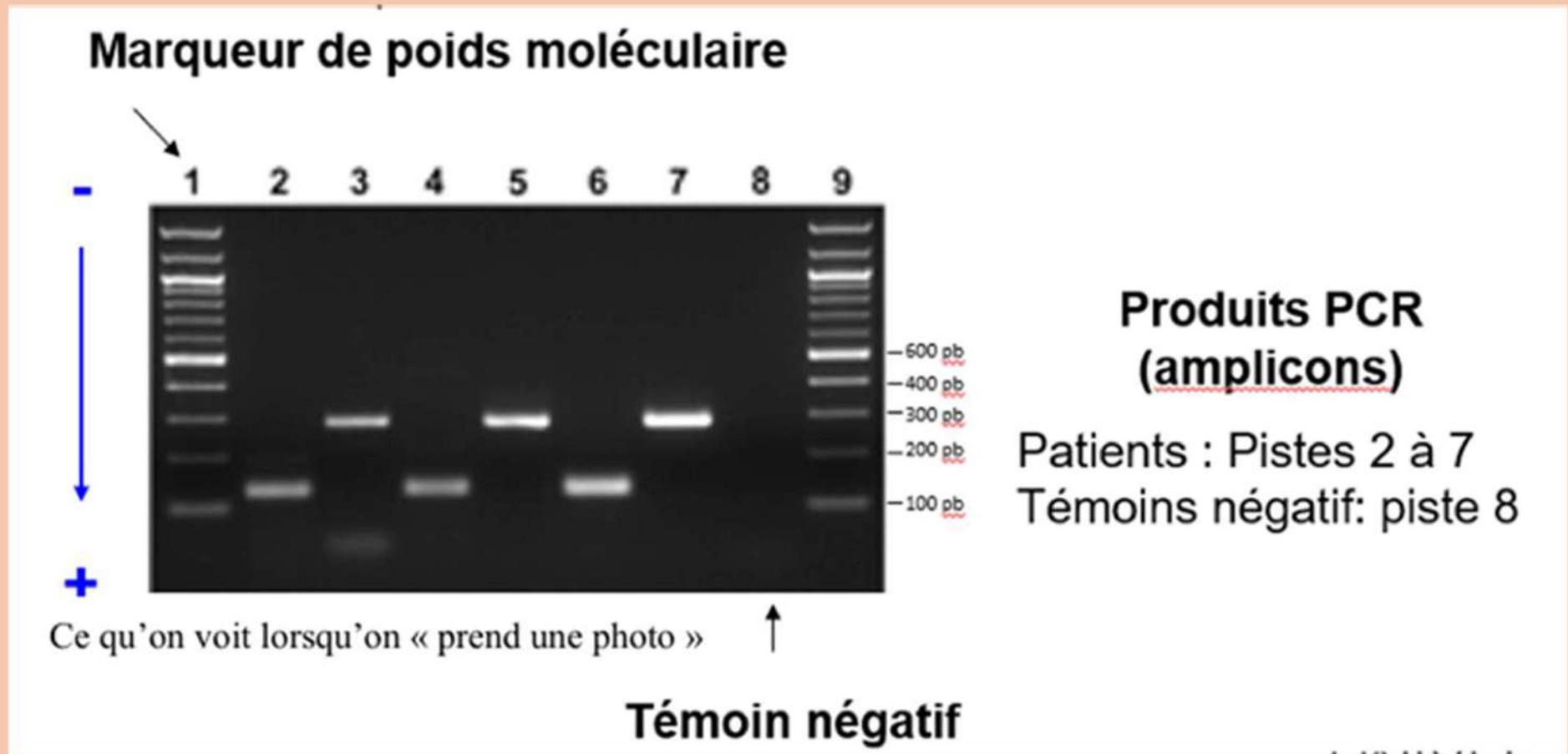


Circuit monodirectionnel :



ATTENTION : pièce de pré-mix : pièce dans laquelle on prépare nos tubes avec tous nos éléments **sauf l'ADN**

Gel analytique (électrophorèse) :



La digestion enzymatique :

Elle est possible grâce à des enzymes de Restriction, qui sont des endonucléases bactériennes, et qui coupent l'ADN double brin de manière très spécifique : elles vont reconnaître et couper une séquence d'ADN lorsqu'elles la reconnaissent.

C'est une coupure **reproductible et spécifique** d'une séquence nucléotidique.

On connaît aujourd'hui **plus de 500 enzymes de restriction différentes** qui reconnaissent donc des sites différents.

Il existe **3 types d'enzymes de restriction** que l'on différencie en fonction de leur manière de couper. Elles peuvent couper à distance ou non de la séquence nucléotidique reconnue et avec un mode de coupure différent.

On se sert principalement des **enzymes de restriction de type II** (dont EcoRI) :

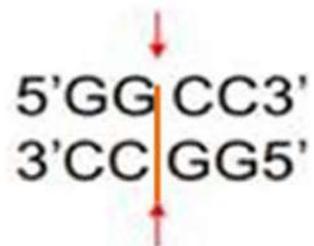
- Reconnaissance de 4 à 8 paires de bases
- L'enzyme coupe l'ADN au niveau de la séquence reconnue
- Les séquences reconnues sont dites **palindromiques** car elles sont lues dans les 2 sens : GG-AA

AA-GG

- On parle d'isoschizomères lorsque deux enzymes reconnaissent la même séquence mais qu'elles sont extraites de bactéries différentes.

Coupsures à bouts francs (blunt ends)

Haelll



5'GG
3'CC

+

CC3'
GG5'

Coupsures à bouts cohésifs (sticky ends)

EcoRI



5'G
3'CTTAA

+

AATTC3'
G5'

QCM 1 : A propos des principes de biologie moléculaire, indiquez la (les) proposition(s) exacte(s):

- A) La PCR réduit le nombre de nucléotides afin d'étudier un fragment d'ADN précis
- B) Le circuit de la PCR est bidirectionnel dans les salles 2, 3
- C) Les étapes sont dans l'ordre: dénaturation, fusion et élongation
- D) Les enzymes de répression coupent l'ADN de manière spécifique et reproductible
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

QCM 1 : A propos des principes de biologie moléculaire, indiquez la (les) proposition(s) exacte(s):

A) La PCR ~~réduit~~ le nombre de nucléotides afin d'étudier un fragment d'ADN précis

La PCR **AMPLIFIE** un petit fragment d'ADN (comme une photocopieuse qui imprime une page en beaucoup d'exemplaires)

B) Le circuit de la PCR est ~~bidirectionnel~~ dans les salles 2, 3

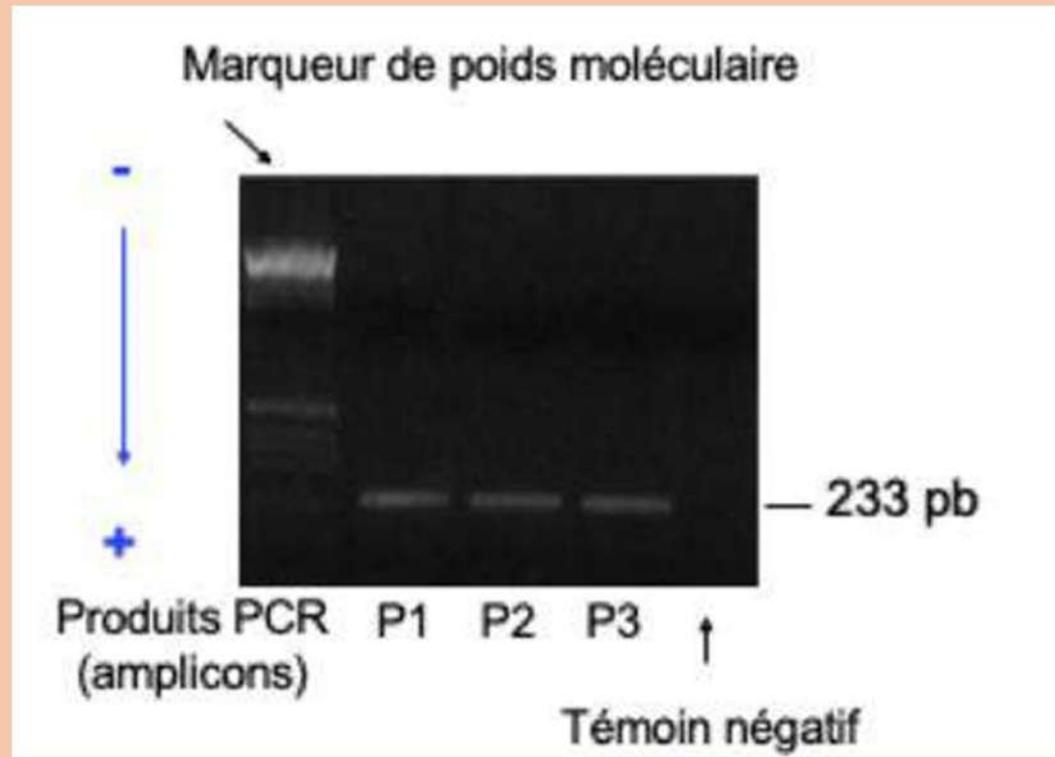
Le circuit est toujours **MONODIRECTIONNEL** car le risque de contamination est très élevé !

C) Les étapes sont dans l'ordre: dénaturation, ~~fusion~~ et élongation

Dénaturation -> HYDRIDATION -> Elongation

D) Les enzymes de **RESTRICTION**

E) Les propositions A, B, C et D sont fausses



Est-ce que ce test est interprétable ?

OUI, il n'y a rien dans la piste « témoin négatif » = pas de contamination = test interprétable !!