

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel
Faculté des Sciences



دائرة الأحياء والكيمياء الحيوية
قسم الكيمياء الحيوية
والميكروبيولوجيا

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme
des Etudes Supérieures en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biochimie

Sujet :

La PCR, polymérase chain reaction, une biotechnique
qui a révolutionné la manipulation des gènes dont le potentiel
d'applications est quasi exponentiel

Présenté par :

BEKHBEKH Badis
KIOUDJ Moussa
MEROUANI Ali

Membres du Jury :

BOUTAGHANE Naima, présidente
BOUNAMOUS Azeddine, examinateur
Dr RECHRECHE Hocine, encadreur



Année 2005/06

Remerciements

Nous tenons à remercier tout particulièrement, notre encadreur, le Dr. RECHRECHE Hocine pour nous avoir confié un sujet si intéressant, touchant le domaine de Biologie Moléculaire. Nous lui somme extrêmement reconnaissant pour l'aide, les encouragements et les conseils qu'il nous sans cesse prodigués. Qu'il trouve, ici, l'expression de notre profond respect et notre sincère gratitude.

Nous tenons à remercier vivement tous les membres du Jury ainsi que l'ensemble de nos enseignants du département de Biochimie et Microbiologie.

Nos remerciements s'adressent également à tous les amis qui ont contribué de près ou de loin pour réaliser ce travail et créer une ambiance d'étude.

Enfin, nos remerciements vont aux membres de nos familles respectives pour leurs patience et encouragements indéfectibles de au long de nos parcours estudiantins.

Badis

Moussa

Ali

Table de matières

Chapitre I : Introduction	01
Chapitre II : Polymerase chain reaction ou PCR	
II-1. Invention de la PCR	05
II-2. Principe et étapes de PCR.....	06
II-2.1. Dénaturation.....	07
II-2.2. Hybridation.....	07
II-2.3. Elongation.....	07
II-3. Evolution de l'ADN au cours des premiers cycles	07
II-4. Déroulement d'une réaction de PCR.....	08
II-5. Facteurs déterminants de la PCR et son optimisation.....	09
II-5.1. Qualité, nature et quantité de l'ADN matriciel.....	10
II-5.2. Qualité et quantité des amorces.....	11
II-5.3. Tampons et concentration en ions.....	12
II-5.4. Température.....	12
II-5.5. ADN polymérase.....	13
II-6. Problèmes rencontrés lors d'une PCR.....	15
II-6.1. Contaminations par de l'ADN exogène.....	15
II-6.2. Amplifications parasites.....	16
Chapitre III : Les différentes variantes de la PCR	
III-1. RT-PCR.....	17
III-2. LA-PCR.....	18
III-3. PCR- <i>in situ</i>	19
III-4. Multiplex PCR.....	19
III-5. PCR emboîtée.....	20
III-6. PCR asymétrique.....	21
III-7. PCR quantitative.....	21
III-7.1. PCR en point final.....	21
III-7.2. PCR en temps réel.....	22
III-7.2.1. PCR par chimie TaqMan.....	23
III-7.2.2. PCR par SYBR Green.....	24
III-8. PCR sur colonie.....	24
III-9. TAIL-PCR.....	24
III-10. Touchdown PCR.....	25

Chapitre IV : Modélisations et quantifications du PCR	
IV-1. Cinétique mesurable de la PCR.....	26
IV-2. Efficacité de la PCR.....	26
IV-3. Le paramètre TC.....	28
Chapitre V : Les applications de la PCR	
V-1. Mutagenèse dirigée.....	29
V-2. Recherche d'ADN fossile et Paléogénétique.....	30
V-3. Détection des OGMs dans les produits agroalimentaires.....	33
V-3.1. Tests qualitatifs.....	34
V-3.2. Tests quantitatifs.....	35
V-4. Détection de mutations héréditaires.....	36
V-4.1. Mutations du gène CFTR (Mucoviscidose).....	36
V-4.2. Mutation de la Drépanocytose.....	38
V-4.3. Mutations du gène HFE (Hémochromatose).....	39
V-4.4. Mutations β -Thalassémiques.....	39
V-4.5. Mutation du gène FMR1 (Syndrome de l' X fragile).....	40
V-4.6. Myopathies de Duchenne et de Becker.....	41
V-5. Détection de mutations cancérogènes.....	42
V-6. Diagnostic de maladies virales : exemple du SIDA.....	43
V-7. Diagnostic de maladies bactériennes : exemple de la <i>Tuberculose</i>	44
V-8. Etude de liaisons génétiques.....	46
V-9. Empreintes génétiques et Médecine légale.....	47
V-10. Etudes phylogénétiques.....	50
V-11. Diagnostic anténatal.....	51
Chapitre VI : Conclusion générale.....	54

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.
ADNa : Acide Désoxyribonucléique ancien.
ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire.
ARN : Acide Ribonucléique.
ARNm : Acide Ribonucléique Messenger.
ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique.
ASO : Allele Specific Oligonucleotide.
CF : Cystic Fibrosis.
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator.
TC : TresholdCycle ou le cyle seuil.
DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne.
DMSO : Diméthylsulfoxyde.
dNTP : désoxyribonucléoside-5'-triphosphate.
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting.
FISH : Fluorescent In Situ Hybridization.
FMR1 : Fragile X Mental Retardation 1.
HIV : Virus d'Immunodéficience Humaine.
OGM : Organisme Génétiquement Modifiés.
PCR : polymerase chain reaction.
PTH : Hormone Parathyroïdienne.
PTT : Protein Truncation Test.
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism.
RT : Reverse transcriptase.
RT-PCR : Reverse Transcription PCR.
SERLEX : Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichement.
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise.
TAIL-PCR : Thermal asymmetric interlaced PCR.
Taq : Thermus aquaticus.
UMP : Uridine-5-monophosphate.
UNG : Uracile-N-glucosylase.
VNTR : Variable Number Tandem Repeat.
Kb : Kilobases.
kDa : Kilo Dalton.
Pb : Paires de bases.
°C : degrees Celsius.
min : minutes.
µl : Microlitre.
mg : Milligrammes.
ml : Millilitres.
mM: Millimolaires.
V : Volume.

Chapitre I :

Introduction

L'ADN est une macromolécule dont la structure tridimensionnelle a été résolue par les premiers travaux de diffraction aux rayons X de grande qualité sur les molécules hélicoïdales obtenus par Wilkin et Franklin au King's College de Londres en 1951 [1] et par l'étude sur la nature des liaisons chimiques de l'ADN réalisée par un groupe de chimistes travaillant dans le laboratoire de Todd, à Cambridge en Angleterre en 1952 [2]. Par la suite, toutes ces informations accumulées ont permis à Watson et Crick d'établir un modèle de la structure de l'ADN [3]. La découverte de la structure en double hélice amorça immédiatement un tournant important dans la manière employée par beaucoup de généticiens pour analyser leurs données. A partir de ce moment, le gène cessa d'être une entité mystérieuse dont l'étude ne pouvait être réalisable que par des expériences de croisement génétiques. Ainsi, le gène devint très vite un objet moléculaire réel, qui se prêtait à la réflexion chimique objective. Le problème fondamental de la réplication des gènes, qui restait si longtemps une énigme pour les généticiens, se trouvait résolu [4]. En effet, l'ADN est formé de deux brins entrelacés, de structure complémentaire, l'un servant de modèle à la formation de l'autre. Jacob et Monod jouèrent un rôle très important dans la naissance de la Biologie Moléculaire, le premier en participant à la découverte de la relation 'un gène, un enzyme', le second en décortiquant les bases moléculaires de la régulation des gènes. En dépit de leur relative étrangeté à la bourgeoisie universitaire et au mandarinat médical, ils réussirent à imposer la Biologie Moléculaire à la France de l'après-guerre, et ceci grâce au soutien financier de la Fondation Rockefeller et aux appuis politiques non négligeables acquis par leur participation à la résistance. Sur le plan administratif, leurs efforts aboutirent à une action concertée 'Biologie Moléculaire', lancée et financée par la Délégation à la Recherche Scientifique et Technique (DGRST) entre 1960 et 1970 [5]. Les résultats s'accumulèrent très vite sur le métabolisme d'*Escherichia coli* et de levure. Cependant, la tâche entreprise alors était immense puisque plusieurs milliers de réactions chimiques se déroulent plus ou moins simultanément au cours de la croissance d'un micro-organisme. On considérait dans les années 70 que le quart du travail était fait. Au cours de cette trentaine d'années, généticiens et biochimistes apprirent à travailler ensemble, au point qu'il n'y eut plus qu'une seule discipline, la Biologie Moléculaire [4].

La Biologie Moléculaire est une expression qui en elle-même n'est pas grande signification, mais qui maintenant consacrée par l'usage, et que l'on utilise dans le sens de "Biologie Moléculaire des gènes", elle consiste en effet à étudier la structure des gènes, leur expression et son contrôle. Elle entraîne donc à travailler essentiellement avec la molécule d'ADN, et de l'ARN [6], et grâce à la découverte des enzymes de restriction et autres outils de

Biologie Moléculaire signe le début de l'ère du "Génie Génétique" où en 1972, l'équipe de Berg utilise l'enzyme de restriction EcoRI pour obtenir *in vitro* une molécule d'ADN hybride qui contient à la fois l'ADN du virus SV40 et une variante du bactériophage λ , c'est la première recombinaison génétique réalisée *in vitro* [7]. Donc la découverte de nombreuses enzymes de restriction et la possibilité de recombiner l'ADN *in vitro* ont conduit à l'utilisation de petites molécules circulaires d'ADN, les plasmides. Les plasmides sont présents naturellement dans le cytoplasme des bactéries et sont répliqués en parallèle du chromosome bactérien. La bactérie, les tolère car ils portent en général un gène qui procure un avantage sélectif. On a depuis élaboré un grand nombre de plasmides artificiels, qui contiennent beaucoup de sites de restriction, et en général un ou deux gènes permettant de les sélectionner. Après insertion d'une séquence d'ADN particulière dans un plasmide (appelé aussi vecteur), celui-ci peut être introduit dans une bactérie (transformation), soit pour modifier son patrimoine génétique, soit pour obtenir un grand nombre d'exemplaires de cette séquence. Les plasmides et les autres vecteurs (cosmides, phages, virus modifiés, phagemides, etc) sont des moyens de transport d'un gène cible (étranger) dans une cellule hôte (clonage moléculaire) pour d'obtenir de nombreuses copies identiques d'un gène ou d'un fragment de gène (clones).

Mais, les systèmes de restriction permettent aux bactéries de vérifier l'origine de tout ADN pénétrant dans la cellule et de le détruire s'il est étranger [8]. Les endonucléases de restriction reconnaissent des séquences spécifiques dans cet ADN et le coupent en fragments, soit à des sites spécifiques soit de façon plus aléatoire. La cellule hôte doit bien sûr protéger son propre ADN des effets potentiellement létaux de son endonucléase de restriction et pour cela son ADN doit être modifié de façon appropriée. La modification s'effectue par méthylation de certaines bases d'un petit nombre de motifs de séquences dans l'ADN, qui sont les sites de reconnaissance par l'endonucléase de restriction [9]. Aussi, la technique de clonage est très coûteuse en temps et impliquent des étapes de clonage, puis de détection de séquences d'ADN spécifiques. En plus, il y a des risques encourus par le manipulateur des génomes bactériens ou viraux, en effet, en 1971, au moment même où l'on démarrait les premières expériences de clonage de gènes, des réserves commençaient à être formulées quant à la sécurité de ce type de manipulation. On s'inquiétait par exemple de propositions visant à cloner le génome de virus tumorigènes comme SV40 et de faire se répliquer les molécules recombinantes dans *E. coli*. Cette bactérie, présente dans l'intestin de chaque être humain, ne pouvait-elle pas se comporter comme un vecteur capable de véhiculer l'ADN responsable de cancers chez l'homme. En 1974, un article, paru dans la revue Science, invite les scientifiques qui envisagent d'utiliser la

méthodologie de l'ADN recombinant à suspendre leurs activités tant que l'on n'a pas une idée plus claire des risques courus. L'évolution de ces risques a été faite en 1975 par un groupe de plus de 100 biologistes moléculaires de renommée internationale réunis au centre de conférences d'Asilomar, près de Monterey, en Californie. Faute de savoir si un danger réel existe, il se dégage un consensus pour affirmer que certaines réglementations doivent être mises en place en matière de clonage d'ADN. Entre autres propositions, on recommande clairement que le clonage de l'ADN n'utilise que des bactéries génétiquement modifiées de telle sorte qu'elles ne puissent se multiplier en dehors des tubes à essais [10].

Peu après, les "recommandations d'Asilomar" sont passées en revue par un comité spécial mis en place par le National Institute of Health (NIH, Institut National de la santé américain). Dans son compte rendu, le comité fixe une ligne de conduite qui exclut de fait l'étude des gènes de virus tumorigènes du champ d'application de l'ADN recombinant. Ces recommandations sont officiellement cautionnées par le gouvernement et entrent en vigueur en 1976 sous le contrôle d'un comité consultatif pour l'ADN recombinant. Un aspect important et sans précédent de ces discussions sur la sécurité pendant la manipulation d'ADN recombinant est la participation aux débats d'intervenants non-scientifiques comme par exemple à Cambridge dans le Massachusetts. Ceci était un précédent qui a permis de continuer à impliquer des personnalités non scientifiques dans les discussions du RAC concernant les applications de ces techniques. En même temps que ces réglementations se mettaient en place aux États-Unis, des organismes analogues furent créés en Europe comme par exemple le Comité Consultatif pour les Manipulations Génétiques ou GMAG 'Genetic Manipulation Advisory group' au Royaume-Uni.

Beaucoup pensaient que les réglementations imposées par le NIH étaient excessives et même dans certains cas sans réels fondements scientifiques. Par exemple, les règles imposées pour le stockage des fragments d'ADN viraux étaient plus strictes que pour les virus infectieux entiers. De telles anomalies ont précipité une révision de ces règlements et de nouvelles recommandations concernant plus particulièrement la manipulation de virus animaux ont été émises à la fin de l'année 1977. Au fur et à mesure que le nombre d'expériences augmentait et que les données s'accumulaient, il devenait de plus en plus clair que les risques réels dus à l'ADN recombinant étaient extrêmement faibles. Des discussions menées tout au long de l'année 1978 ont conduit à la publication par le NIH de nouveaux règlements, moins restrictifs, qui ont pris effet en 1979 et qui autorisent le clonage de gènes de virus tumorigènes [11].

Depuis cette époque, la technologie de l'ADN recombinant, notamment le clonage moléculaire, a largement tenu ses promesses, en fournissant des outils largement utilisés par les biologistes et qui permettent une moisson de résultats dans tous les domaines de la Biologie, du contrôle de l'expression des gènes à l'étude de l'évolution. Cependant, l'une des difficultés majeures qui limitait les applications d'une telle technologie un nombre relativement restreint de gènes, était l'insuffisance des quantités disponibles d'ADN à étudier. En effet, dans de nombreux cas, la quantité et/ou la qualité de l'ADN disponible sont respectivement faible et médiocre et donc ne permettait pas de réaliser le clonage moléculaire du gène désiré. Cet obstacle majeur a pu être levé au début des années 80, grâce à la découverte d'une nouvelle technique ingénieuse qui a révolutionné la manipulation des gènes et accélérée l'essor de la Biologie Moléculaire de façon fulgurante. Cette technique appelée PCR pour 'polymerase chain reaction' ou la réaction de polymérisation en chaîne [12], a bouleversée la Biologie Moléculaire et s'est implantée rapidement dans les laboratoires, en permettant de produire de gigantesques quantités de séquences d'ADN spécifiques sans passer par une étape de clonage. En effet, grâce à cette technique, nous avons tellement appris à manipuler l'ADN recombinant que une nouvelle industrie, la Biotechnologie, est née de l'utilisation de ces mêmes outils et qui permet de produire médicaments et vaccins, améliorant les produits agroalimentaire. L'histoire de l'invention de cette technique illustre bien le rôle des petites entreprises dans l'invention de procédés innovants en biotechnologie et l'importance du relais par des multinationales.

Etant donné le nombre impressionnant des publications de qualité qui concerne le développement incessant de la technique PCR et de ses applications, il très difficile de faire une revue bibliographique exhaustive et complète. Néanmoins, dans notre travail, nous allons tenter d'aborder l'essentiel des différents aspects de cette technique, notamment ses applications diverses. Cet rapport bibliographique est organisé en cinq chapitres intitulés respectivement : une introduction, PCR, variantes de PCR, cinétique de PCR, applications de PCR et une conclusion.

Chapitre II :

Polymerase Chain Reaction ou PCR

II-1. Invention de la PCR

Kary Mullis, l'inventeur de la PCR et prix Nobel de Chimie 1993, travaillait en Californie chez Cetus, une petite société de service en biotechnologie, qui synthétise des sondes pour les laboratoires de la Biologie Moléculaire voisins de Berkeley. Il a eu l'idée de la PCR en 1983, en partant en week-end. De retour le lundi chez Cetus, il demanda à l'un des bibliothécaires de la société de réaliser une recherche bibliographique, afin de vérifier l'originalité de son idée. N'ayant rien trouvé dans la littérature, il vérifia des semaines durant, auprès de scientifiques, que personne n'avait entendu parlé d'une méthode similaire à la sienne sans convaincre de l'intérêt de son idée. La seule personne qui manifesta de l'enthousiasme fut l'agent de brevets de Cetus. Un an après, alors qu'il préparait le brevet de la PCR, il présenta son invention aux conseillers scientifiques de la société Cetus [13]. L'importance des royalties découlant de l'utilisation quotidienne de la PCR dans tous les laboratoires de la Biologie Moléculaire explique les attaques contre les brevets couvrant la PCR. Trois brevets, deux pour la méthode et une pour l'enzyme (Taq polymérase), furent déposés par la société Cetus à la fin des années 80. Les droits d'exploitation furent rachetés par la société suisse Hoffmann-Laroche en 1991 pour le montant exceptionnellement élevé de 300 millions de dollars. Cependant, en 1992, la firme suisse a du attaquer Dupont de Nemours pour contrefaçon des brevets de la PCR et obtint gain de cause devant les tribunaux aux USA. En octobre 1992, elle poursuivait la société américaine Promega pour contrefaçon de la Taq polymérase. Promega réagit en engageant une procédure légale contre la validité du brevet Hoffmann-Laroche. En Europe, la société suisse rencontra des problèmes qui, sans aller jusqu'au procès, n'en furent pas moins gênants. En 1993, six sociétés : Orion; Abbott; Rhône-Poulenc; Sanof-Diagnostics; Pasteur; Cisbio International et A appligène) engagèrent une procédure d'opposition devant l'office européen des brevets (OEB) pour contester les deux brevets PCR d' Hoffmann-Laroche. Elles soutenaient que la PCR ne fut pas inventée par Mullis en 1985, mais par le groupe de Khorana en 1970. En mars 1995, l'OEB repoussa ces revendications et les brevets de la PCR furent maintenus moyennant de légères modifications. Dans la foulée, Hoffmann-Laroche attaqua la société belge Organon Teknica pour infraction aux brevets sur la PCR appliquée à deux tests de détection du virus du SIDA. Tous ces procès répétés, entre ces différentes sociétés illustrent bien la pertinence et portée des applications de cette technique.

II-2. Principe et étapes de PCR

La PCR consiste en l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN dont les séquences délimitant ses extrémités sont connues, en utilisant de deux types d'amorces (oligonucléotides) spécifiques aux extrémités 5' (sens) et 3' (antisens) et d'une enzyme, l'ADN polymérase qui ne pouvait pas synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce [13, 14]. Elle permet de repérer et d'amplifier un fragment d'ADN ou un gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange, puis de le multiplier rapidement. La Figure 1, illustre bien le principe de la technique PCR.

La PCR repose sur une réaction d'amplification cyclique et chaque cycle est réalisé en trois étapes indispensables pour toute synthèse d'ADN qui sont la dénaturation, l'hybridation et l'élongation (figures 2 et 3). Ces trois étapes représentent un cycle et on peut répéter autant de fois que nécessaire ce cycle. Un premier cycle permet d'allonger autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles présents dans le tube, ils deviennent à leur tour des ADN cibles. Lors d'un deuxième cycle, la quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins dont la taille est limitée par les deux amorces font leur apparition. Au 3^{ème} cycle apparaissent les premiers amplicons, ADN double-brins bornés par les amorces, correspondant au fragment d'ADN recherché. La taille des fragments varie généralement de 50 à 2000 paires de bases (pb).

Au fil des cycles la quantité d'amplicons (ADN amplifié) va augmenter de façon exponentielle, elle est multipliée par deux à chaque cycle. On obtient, théoriquement 2^N copies pour N cycles. Dans la pratique, pour un rendement de 85%, une PCR de 30 cycles produit environ 1 000 000 copies (amplicons de la taille attendue). On peut encore exprimer les résultats en disant qu'au bout de N cycles, la quantité initiale A_0 d'ADN cible devient : $A_n = A_0 \times 2^n$. En théorie, après 20 cycles, il y a environ un million de copies, après 30 cycles environ un milliard de copies de la séquence d'ADN cible (figure 4). A température ambiante, généralement, l'ADN bicaténaire adopte sa conformation en double hélice, donc avant de commencer le premier cycle de PCR proprement dit, une étape de préchauffage à 95°C pendant 2 à 15 minutes est nécessaire, selon la composition de l'ADN à amplifier.

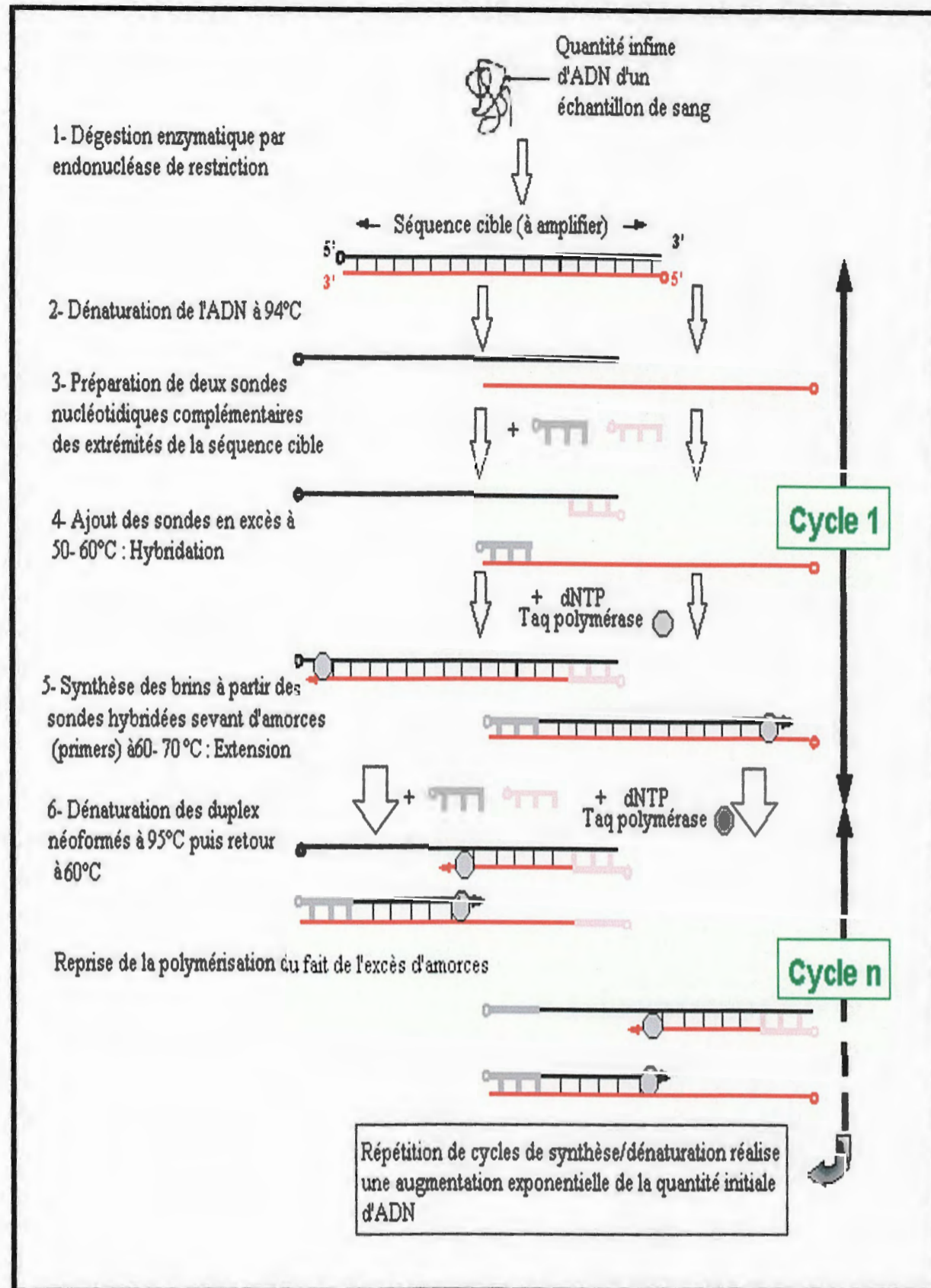


Figure 1. Schéma explicatif du mécanisme de PCR.

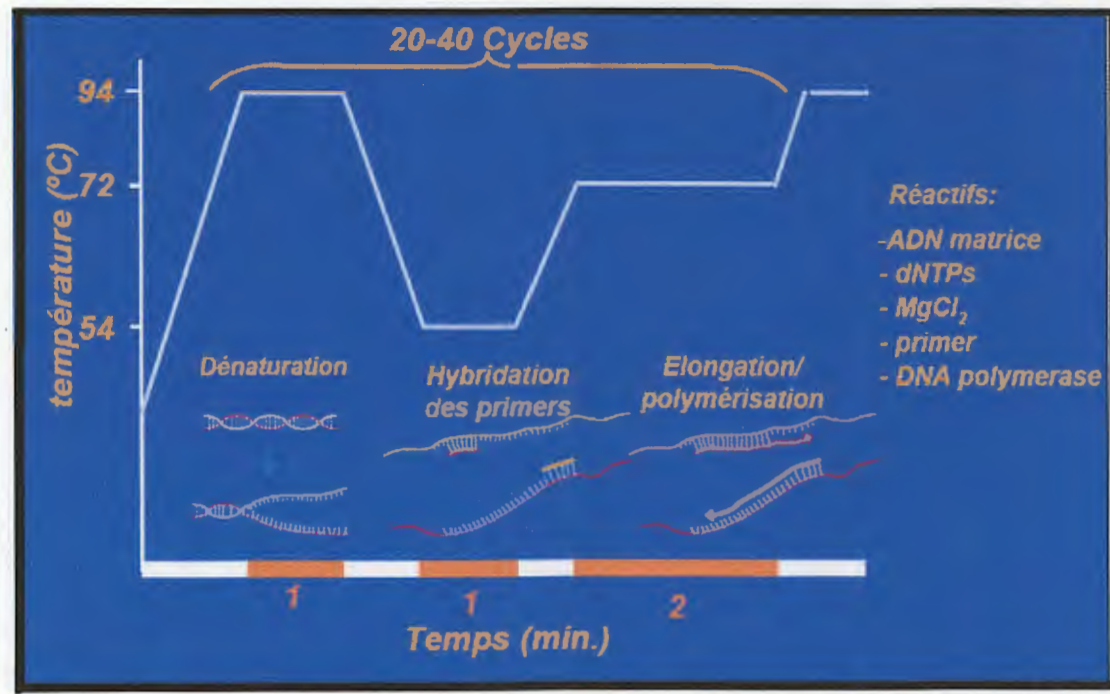


Figure 2. Etapes de PCR en fonction du temps.

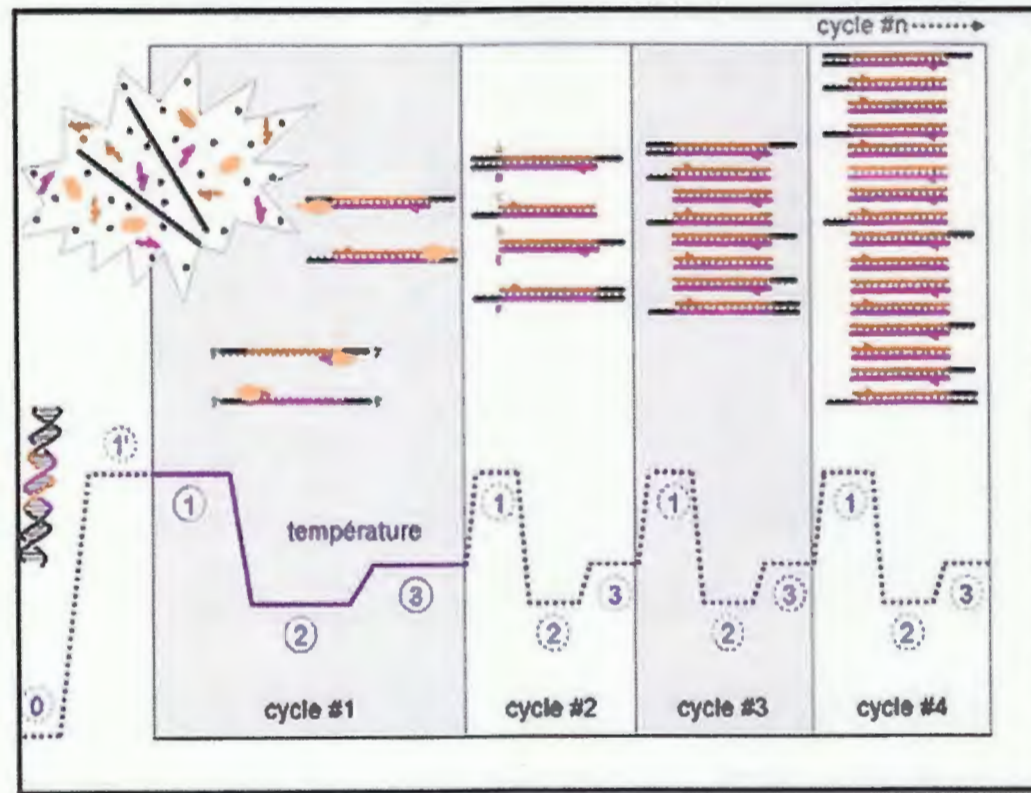


Figure 3. Evolution de la température et de la synthèse des différents brins d'ADN au cours des quatre premiers cycles de PCR. Chaque cycle est constitué de trois phases successives (1, 2 et 3).

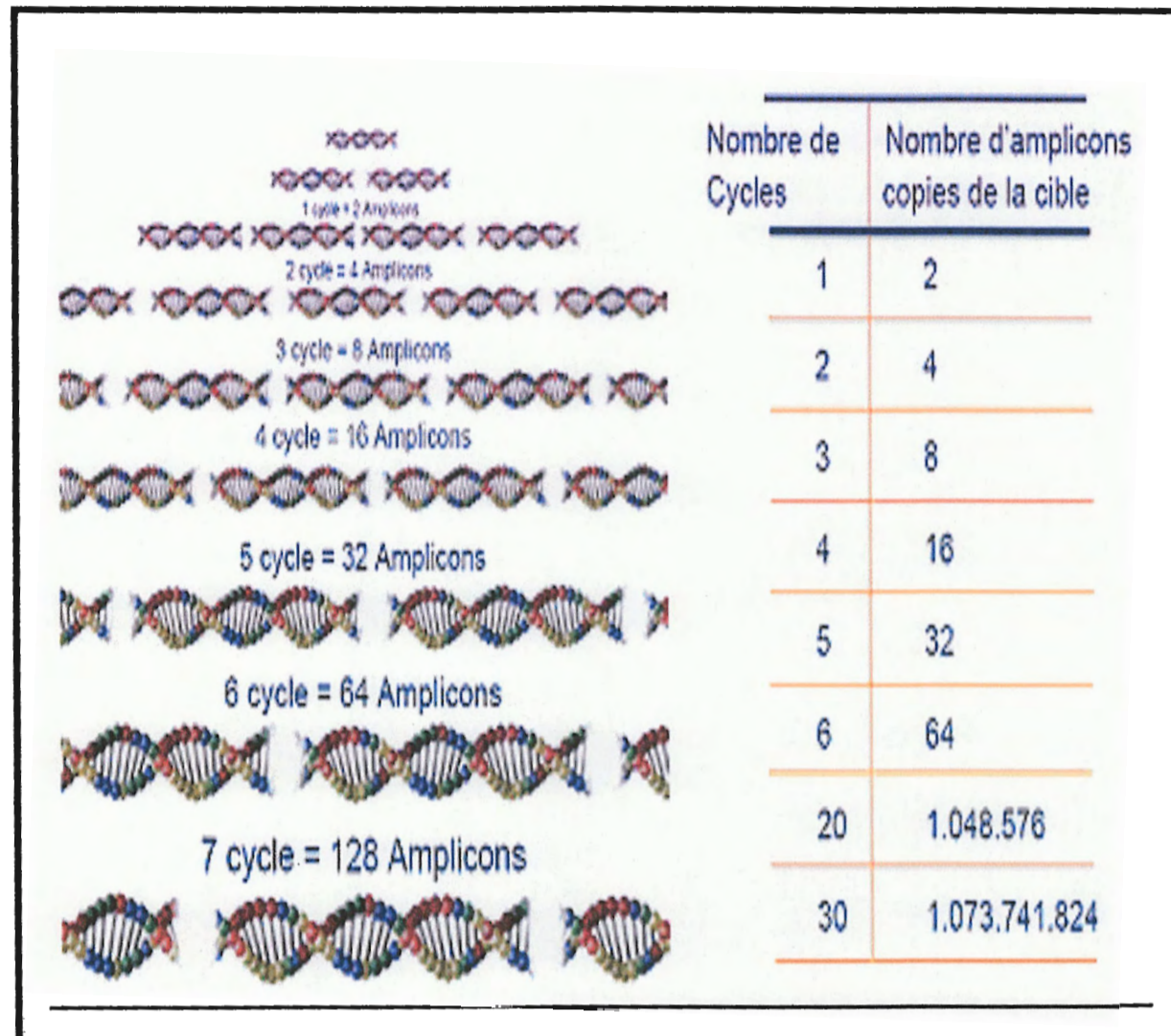


Figure 4. Amplification de l'ADN cible par PCR (augmentation exponentielle des amplicons).

II-2.1. Dénaturation

Cette étape (figure 2) permet de séparer les brins de l'ADN double hélice, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérase de type 'Hot start' [15] et de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (Transcriptase Inverse). La dénaturation est effectuée par chauffage à 95°C pendant quelques secondes à une minute, ce qui permet de déshybrider l'ADN, de décrocher les molécules d'ADN polymérase qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

II- 2.2. Hybridation

En général, cette étape est réalisée à une température entre 56-64°C pendant 2 à 60 secondes, elle permet aux amorces (sens et anti-sens) de s'hybrider à l'ADN matrice, grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable (figure 2). Peu d'ADN matrice peut s'hybrider avec son brin complémentaire, empêchant 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 supérieur de quelque degrés au T_m théorique des amorces, probablement parce qu'elles interagissent déjà avec les polymérase, qui stabiliseraient leur hybridation à l'ADN matrice.

II-2.3. Elongation

Cette étape permet à l'ADN polymérase d'allonger le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale, en général 72°C. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présent dans le milieu réactionnel en utilisant l'ADN à amplifier comme matrice (figure 2). La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon (4 à 120 secondes).

II-3. Evolution de l'ADN au cours des premiers cycles

L'évolution de l'amplification de l'ADN au cours des premiers cycles de PCR est montrée dans la figure 3. Dans le premier cycle lors de la phase1, l'ADN initial adopte une conformation linéaire (c'est à dire simple brin), les substrats (amorces, les dNTPs) et l'enzyme (ADN polymérase) sont en large excès et répartis de façon homogène dans la solution. Lors de la

phase 2, l'amorce sens s'apparie avec la séquence qui lui est complémentaire sur l'un des deux brins et l'amorce anti-sens se fixe sur l'autre brin. Ainsi deux polymérase peuvent interagir avec les deux complexes amorces/ADN matrice. Lors de la phase 3, les polymérase synthétisant les brins complémentaires, en parcourant les brins matriciels à partir de leurs extrémités 3' vers leurs extrémités 5' et s'arrêteront à la fin du cycle, tout en décrochant par l'action de température de l'étape de dénaturation du deuxième cycle. Les ADN néo-synthétisés sont donc précisément définis à leur extrémité 5', mais pas à leur extrémités 3' (parties noires, voir figure 3). 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'.

Les trois phases du second cycle se déroulent de la même manière que celle du premier cycle, sauf que deux polymérase arrivées au bout de leur ADN matrice se décrochent spontanément. À la fin de la phase 3, différents types de brins d'ADN sont formés (un brin d'ADN natif anti-sens, deux brins d'ADN sens précisément définis à leur extrémité 5' uniquement, un brin d'ADN anti-sens correspondant à l'amplicon, c'est-à-dire précisément définis à ses deux extrémités, deux brins d'ADN anti-sens précisément définis à leur extrémité 5' uniquement, un brin d'ADN sens correspondant à l'amplicon, c'est-à-dire précisément définis à ses deux extrémité et un brin d'ADN natif anti-sens).

Comme dans le premier cycle, à la fin de la phase 3 du second cycle, deux molécules d'ADN double brins correspondant à notre amplicon apparaissent. Les cycles suivants de troisième cycle amplifient exponentiellement la cible. Les brins d'ADN d'origine et les brins néosynthétisés de longueur variable ne représentent plus qu'une fraction négligeable de la région-cible amplifiée [16].

II-4. Déroulement d'une réaction de PCR

La PCR est une technique de laboratoire relativement simple à mettre en œuvre. Elle est aussi très souple et son champ d'applications est si étendu qu'il est difficile d'en donner un exemple standard. Le matériel de départ d'une PCR est de l'ADN qui contient la séquence à amplifier. Il n'est pas nécessaire d'isoler cette séquence car elle est délimitée par les amorces. La réaction ne nécessite qu'une faible quantité d'ADN et dans une expérience classique on utilise couramment moins d'un microgramme d'ADN génomique total. Nous verrons plus loin qu'il est même

possible d'utiliser la PCR pour amplifier une séquence à partir d'une seule molécule d'ADN. Les deux amorces oligonucléotidiques, l'ADN polymérase et un mélange des quatre nucléotides précurseurs sont ajoutés au tube contenant l'ADN. Le milieu réactionnel d'une PCR contient les ingrédients présentés dans le tableau 1 et son volume total est en généralement varie de 25 à 100 μ l selon le but recherché (analytique ou quantitatif). Le mélange obtenu ainsi sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un appareil appelé 'thermocycleur' [16].

Au départ, le mélange réactionnel est chauffé à une température d'environ 94°C pendant 5 minutes. À cette température, les molécules d'ADN double brin se séparent complètement pour fournir les simples brins servant de matrice à l'ADN polymérase. La température est ensuite abaissée pour permettre aux oligonucléotides de se fixer sur les séquences complémentaires. Cette étape d'hybridation des amorces est un paramètre essentiel dans la détermination de la spécificité de la PCR et tant les températures que la durée des hybridations dépendent de la séquence à amplifier. À la fin de cette étape on obtient des matrices d'ADN simple brin avec lesquelles sont hybridées les amorces pour l'ADN polymérase. Dans l'étape suivante, on élève la température jusqu'à 72°C, qu'est là température optimale pour le fonctionnement de l'enzyme stable à haute température qu'est la Taq polymérase. Cette température est maintenue pendant 1 minute pour permettre la synthèse de l'ADN.

À la fin de ces trois étapes, la température est de nouveau portée à 94°C, mais cette fois-ci pendant seulement 20 secondes de façon à ce que les courtes régions d'ADN double brin (constituées d'un brin initial et d'un brin nouvellement synthétisé) se séparent. Ces molécules monocaténaïres servant alors à leur tour de matrice pour une nouvelle synthèse. Le cycle de dénaturation (séparant les brins), d'hybridation des amorces et de synthèse par l'ADN polymérase est répété de 30 à 60 fois [13].

II-5. Facteurs déterminants de la PCR et son optimisation

Afin de parvenir à une amplification efficace et sélective du fragment d'ADN cible, les conditions dans laquelle la réaction de PCR se déroule doivent être préalablement optimisées. Etant donné que l'amplification de l'ADN génomique est soumise à plus de contraintes que celle

Substances	Quantités ou concentrations
Matrice : ADN génomique ou ADNc ou ARN	0,1-1 µg
Amorce 1	20 picomoles
Amorce 2	20 picomoles
Tampon : Tris -HCl	pH 8,3 (à 20° C) 20 mM
Mg C l ₂	1,5 mM
KC l	25 mM
dNTP : dATP, dCTP, GTP, dTTP	50 mM chacun
ADN polymérase : Taq Pol	2 unités
Huile minérale	Une couche

Tableau 1. Exemple du contenu du milieu réactionnel de la PCR.

de l'ADNc, il est pratique de considérer ici que le substrat de la réaction d'amplification est un ADN génomique.

II-5.1. Qualité, nature et quantité de l'ADN matriciel

La nature et l'origine de l'ADN, ainsi que le but recherché par son amplification conditionnent souvent le protocole utilisé pour préparer l'ADN à amplifier. Néanmoins, ce dernier doit être débarrassé de toutes les substances susceptibles d'inhiber la PCR. La Taq polymérase, enzyme thermorésistante, présente en effet des sensibilités variables à certains agents chimiques et biologiques. Ces inhibiteurs proviennent soit de l'échantillon, soit des réactifs utilisés dans les protocoles d'extraction et de conservation [17].

Si dans l'absolu, une copie du gène recherché est suffisante pour obtenir son amplification, dans la pratique plusieurs copies sont souvent nécessaires. La quantité utilisée d'ADN, peut influencer sur le résultat d'amplification, une quantité insuffisante d'ADN ne permettant pas d'obtenir d'amplification, alors qu'une quantité trop importante d'ADN peut conduire à la génération d'amplicons parasites.

Par ailleurs, lorsque l'ADN matrice est riche en bases GC qui sont difficiles à dénaturer, il est nécessaire d'utiliser des adjuvants tels que le DMSO, glycérol, détergents pour l'optimiser l'amplification. Ces réactifs améliorent la dénaturation de l'ADN matrice, en facilitant la rupture des liaisons hydrogènes reliant les brins d'ADN. Le DMSO est souvent utilisé à des concentrations finales de 5 à 10 % (v/v), mais il a été rapporté qu'à ces concentrations le DMSO inhibait l'activité de la Taq d'où la nécessité d'utiliser plus d'enzyme. Il en est de même pour le glycérol souvent utilisé à 5 %. La BSA utilisée à des concentrations de 0.2 à 0.8 µg/µl donne pour certains systèmes de bons résultats. Dernièrement, une nouvelle génération d'adjuvants ne présentant pas d'effet inhibiteur sur la Taq Polymérase a été développée pour l'amplifier des régions difficiles ou riches en GC [13].

Enfin, plusieurs applications de la manipulation des gènes nécessitent l'amplification de longs fragments d'ADN. La PCR classique ne fonctionne bien que pour amplifier de petits fragments. L'efficacité de l'amplification et par conséquent, la quantité du fragment amplifié diminue de façon significative pour des séquences de plus de 5 Kb. Cette diminution de rendement pour les fragments plus longs est due à une synthèse incomplète de la séquence à

amplifier, dont les produits ne peuvent plus servir de substrats pour les cycles de réaction suivants. Ceci se manifeste par l'apparition de bandes étirées, plutôt que discrètes, dans un gel d'électrophorèse. En 1994, deux groupes de recherche ont identifié les facteurs critiques pour la polymérisation thermostable de longs fragments [18, 19]. Le plus significatif d'entre eux est l'absence d'activité exonucléase de 3' vers 5' de la Taq polymérase. Il est probable que quand la Taq polymérase incorpore un dNTP incorrect, l'élongation ultérieure de la chaîne est fortement ralentie voire arrêtée complètement. La solution consiste à ajouter une seconde polymérase thermostable possédant une activité éditrice au mélange réactionnel.

II-5.2. Qualité et quantité des amorces

Lors de la mise au point d'une réaction de PCR, le choix des amorces est crucial, elles vont jouer un double rôle : elles délimitent la région d'ADN à amplifier (étape 2 du cycle) en s'hybridant à l'ADN matrice, et elles permettent d'amorcer la synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase (étape 3 du cycle) à partir de leur extrémité 3' OH libre [20].

C'est au niveau des extrémités de l'ADN à amplifier que les amorces vont s'hybrider il faut donc connaître les séquences nucléotidiques des extrémités de l'ADN à amplifier. Pour faciliter le choix des séquences des deux amorces, des logiciels d'analyse informatique de séquences permettent de vérifier que les amorces répondent à des critères tels que une longueur comprise entre 17 et 30 nucléotides, un contenu en GC proche de 50 %, absence de complémentarité entre les deux amorces, absence de répétitions d'un même nucléotide (plus que trois) et de structures secondaires et les deux amorces ne doivent pas présenter de séquence. Si les amorces correspondent à des séquences pauvres en GC, il convient de les allonger pour éviter des températures de fusion trop basses. La grande majorité des amorces conformes à ces règles donnent de bons résultats, bien que leur efficacité puisse varier d'une paire à l'autre, même dans des conditions de réaction optimisées [21]. 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 "dits" naturels. Ainsi, tous les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont déphosphorylés à leurs extrémités 5'.

II-5.3. Tampons et concentration en ions

L'un des tampon stock (10X) les plus communément utilisés est le tampon Tris-HCl 100 à 670 mM, pH 8,3 : qui sert à tamponner le milieu réactionnel au niveau optimal pour l'activité de la Taq DNA polymérase. Le pH du tampon Tris-HCl diminue significativement quand la température s'élève et sa valeur réelle oscille entre 6,8 et 7,8 pendant chaque cycle. Le tampon contient l'ion Mg^{2+} (50 à 300 mM $MgCl_2$) qui est un cofacteur essentiel de la Taq Polymérase. Ce cation bivalent interagit également avec les charges négatives de la chaîne d'ADN, limitant ainsi les forces de répulsion entre brins d'ADN et favorisant donc la stabilité de l'hybridation. Plus sa concentration est importante, plus l'hybridation est facilitée que celle-ci soit spécifique ou non. Une trop forte concentration peut alors conduire à une augmentation des signaux aspécifiques.

Aussi, il contient des cations monovalents comme K^+ et NH_4^+ (500 mM KCl ou 160 mM $(NH_4)_2SO_4$ capables d'interagir avec les charges négatives de l'ADN de la même manière que le Mg^{2+} . Dans les conditions de la PCR, les ions NH_4^+ , qui existent à la fois sous la forme d'ions ammonium et d'ammoniaque, peuvent interagir avec les liaisons hydrogènes. Cette interaction va piéger les liaisons hydrogènes faibles présentes dans les zones de mésappariement et ainsi défavoriser les hybridations non spécifiques. Dernièrement, il a été montré que l'utilisation combinée des deux ions monovalents K^+ et NH_4^+ permet de maintenir un ratio élevé entre hybridation spécifique et non spécifique pour une large fenêtre de température d'hybridation et de concentration de $MgCl_2$. Ceci a pour effet, de rendre l'activité de la Taq Polymérase moins dépendante de ces deux facteurs, ce qui réduit notablement les efforts d'optimisation [13].

II-5.4. Température

Une PCR commence généralement par un démarrage à chaud (hot strat) correspondant à la température de dénaturation, ce qui permet d'éviter les problèmes qui pourraient résulter quand le mélange réactionnel contenant l'ADN polymérase se trouve à une température plus basse. En effet, à des températures inférieures à la température d'hybridation de l'amorce (45 et 60°C), des appariements incorrects peuvent se produire et amorcer l'élongation par polymérase. De telles élongations stabilisent l'interaction de l'amorce avec des séquences non désirées. Une fois incorporée dans l'ADN synthétisé pendant le premier cycle, l'amorce sera hybridée efficacement dans les cycles suivants, avec comme conséquence l'amplification d'un produit parasite.

Une autre approche consiste à rendre la polymérase inactive à une température ambiante. Par exemple, en utilisant des anticorps contre la Taq polymérase, qui sont inactivés quand la température s'élève [22], ou encore à utiliser l'AmpliTaq Gold™, une Taq polymérase modifiée qui n'active qu'après chauffage à 95°C [15]; Une autre manière d'activer d'ADN polymérase Taq à température ambiante est la méthode SERLEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichement) dans laquelle la polymérase est inactivée réversiblement par son interaction avec des quantités nanomolaires d'un oligonucléotide 70-mère qui n'est qu'un piètre substrat pour la polymérisation et n'interfère pas avec les amorces d'amplification.

Les trois étapes constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique : dénaturation (à environ 95°C), hybridation (50 à 60°C), polymérisation (72°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces/matrice est réalisé, température de «travail» de l'ADN polymérase thermostable utilisée. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libres 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 amorces, elle est légèrement inférieure (environ de 5°C) au T_m qui est la température de demi dénaturation. À la fin de ces trois étapes du premier cycle, les cycles suivant sont réalisés par des changements cycliques de la température assurés par un thermocycleur (figure 5).

II- 5.5. ADN Polymérase

Au début, c'est l'ADN polymérase d'*E. coli* qui a été utilisée pour catalyser les réactions de PCR. Mais cette enzyme est sensible à la chaleur et se dénaturait à des températures élevées nécessaires pourtant pour séparer les brins d'ADN. Il fallait donc rajouter manuellement de l'enzyme à chaque cycle, ce qui était plutôt fastidieux. On a ensuite découvert et cela a représenté une avancée technique considérable, que des bactéries vivant dans des sources chaudes possédaient une ADN polymérase qui fonctionnait de façon optimale à haute température. Cette bactérie, *Thermus aquaticus*, vit dans des eaux dont la température avoisine les 75°C. Son ADN

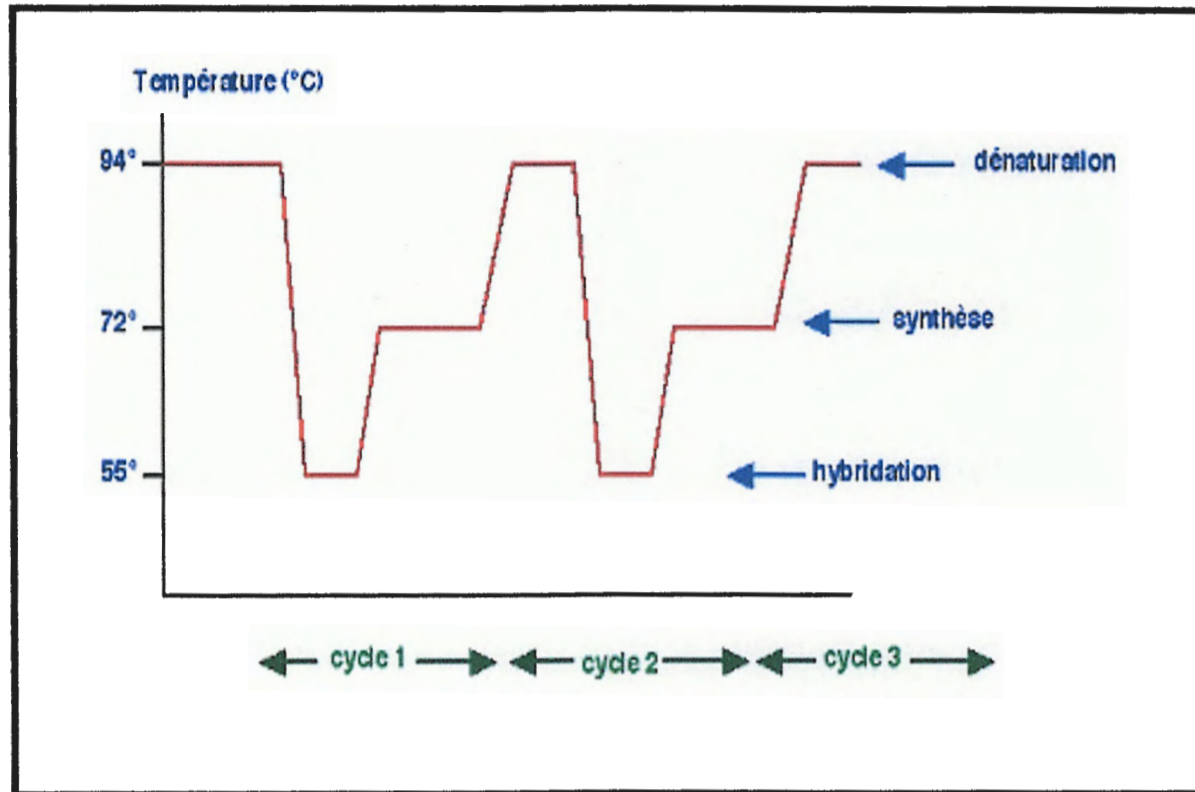


Figure 5. Evolution de la température au cours des cycles de la PCR.

polymérase (Taq polymérase) fonctionne de façon optimale à 72°C et reste raisonnablement stable jusqu'à 94°C. Elle peut donc être ajoutée juste avant le début de la réaction et fonctionne jusqu'à la fin du processus d'amplification. Cette avancée technologique a permis l'automatisation de la PCR [23]. Le tableau 2 résume les propriétés de la Taq polymérase.

L'utilisation de la Taq polymérase augmente aussi la spécificité et la sensibilité de la technique. Aux températures plus basses auxquelles fonctionne l'ADN polymérase de *E. coli*, les amorces peuvent s'hybrider avec des fragments d'ADN de séquences légèrement différentes. L'amplification occasionnelle de séquence flanquée d'amorces mal appariées et relativement proches sur deux brins opposés est possible dans ces conditions. Comme les séquences complémentaires correctes des amorces sont incluses dans les fragments synthétisés, on obtient une séquence non désirée mais dont les extrémités correspondent parfaitement aux amorces. Si de tels fragments synthétisés au cours des premiers cycles de la PCR, ils sont ensuite amplifiés efficacement. À l'opposé, les températures élevées, autorisées par l'utilisation de la polymérase Taq réduisent considérablement l'appariement des amorces avec des sites qui ne sont pas strictement complémentaires. La séquence à laquelle on s'intéresse est donc la seule à être amplifiée. La spécificité est encore améliorée par la méthode qui consiste à préchauffer. Tous les réactifs sauf un sont chauffés à 72°C avant d'ajouter le dernier, par exemple la polymérase Taq. Cette spécificité accrue simplifie l'analyse ultérieure des produits de la PCR. Le fragment amplifié peut facilement être repéré dans un gel coloré au bromure d'éthidium, dans la mesure où le bruit de fond que fourniraient les fragments non spécifiques a été éliminé. Le tableau suivant donne de quelques ADN polymérases et leurs sources (tableau 3).

Enfin, la Taq polymérase est dépourvue d'activité éditrice exonucléase de 3'→5', ce qui contribue à l'apparition d'erreurs dues à l'incorporation de nucléotides incorrects [24]. *In vitro*, elle n'est pas capable d'une telle activité éditrice et dans les conditions d'une PCR typique (température et concentration saline), l'enzyme fait une erreur environ tous les 2×10^4 nucléotides [25]. Pour remédier à ce problème, on a cherché d'autres ADN polymérases thermostables douées d'une plus grande fidélité, bien que l'ADN polymérase Taq demeure l'enzyme la plus utilisée en PCR. Pour certaines applications, particulièrement si l'ADN amplifié doit être cloné, il est important de vérifier la séquence du produit cloné pour déceler les

Nom	Fonction (origine)	Mode d'action et utilité
Taq pol	Polymérase (<i>thermophilus aquaticus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Activité ADN polymérase 5'/3' par allongement d'une amorce ADN/matrice ADN. - Thermostable, utilisée pour les cycles de PCR.

Tableau 2. Principales propriétés de la Taq polymérase.

ADN polymérase	Source
Tma	<i>Thermotoga maritima</i>
Deep Vent™	<i>Pyrococcus</i> sp
Tli	<i>Thermococcus litoralis</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>

Tableau 3. Sources d'ADN polymérases thermostables.

mutations qui auraient pu survenir pendant la PCR. La fidélité de la réaction d'amplification peut être contrôlée en clonant, puis en comparant les séquences de plusieurs molécules amplifiées indépendamment.

II-6. Problèmes rencontrés lors d'une PCR

II-6. 1. Contaminations par de l'ADN exogène

La puissance de la PCR est accompagnée souvent par des résultats indésirables et inattendus lorsque le milieu réactionnel de départ est contaminé, même de façon très mineure. Par exemple, dans le cas de détermination anténatale du sexe à partir du sang de la mère, on a trouvé un échantillon positif chez une femme qui n'était pas enceinte et qui servait donc de contrôle négatif. On a pu attribuer cet artefact à une contamination par de minuscules fragments de tissu provenant de la peau d'un laborantin. Il a donc été nécessaire que la préparation des échantillons et l'analyse soient réalisés par des hommes. Dans un autre cas, on a amplifié des séquences mitochondriales humaines avec un des spécimens de loup marsupial. Dans ce cas précis, il a été possible de mettre en évidence la contamination des produits de la PCR par une simple comparaison des séquences, mais la contamination d'ADN humain ancien par de l'ADN humain actuel sera beaucoup plus difficile à détecter. La contamination peut donc être un sérieux problème pour les applications médico-légales de la PCR. Des échantillons biologiques prélevés sur le lieu d'un crime sont rarement dans un état de pureté comparable à celui d'échantillons préparés en laboratoire [26].

Les produits de réactions précédentes sont des sources de contamination courantes. À la fin d'une expérience de PCR, le mélange réactionnel peut contenir jusqu'à 10^{13} fragments amplifiés et donc, de minuscules volumes comme les gouttelettes de l'aérosol provenant du cône d'une micropipette peuvent contenir un nombre important de fragments prêts à être amplifiés. Une solution simple aux problèmes de contamination est de séparer physiquement les produits utilisés avant et après l'amplification. Une autre manière astucieuse consiste à utiliser de l'uridine triphosphate à la place de la désoxythymidine et d'inclure dans le mélange réactionnel de l'uracile-N-glucosylase (UNG). Cette enzyme va détruire tout l'ADN contaminant provenant d'une réaction précédente car il contient de l'UMP. L'UNG est elle-même inactivée lors des étapes

de dénaturation par chauffage de la PCR suivante et les produits spécifiques de cette réaction peuvent donc s'accumuler. Il est toujours très important de faire des contrôles négatifs par chaque expérience de PCR afin de mettre en évidence une contamination éventuelle des réactifs par de l'ADN étranger [27].

II-6. 2. Amplifications parasites

Les amplifications parasites résultent de l'hybridation, par homologie, des amorces ailleurs qu'aux extrémités du fragment d'intérêt; c'est pourquoi il convient d'utiliser des amorces assez longues, pures (synthétisées chimiquement), présentant des températures de renaturation identiques (ou très proches) et les plus élevées possibles.

Pour réduire encore davantage l'amplification de produits parasites, on peut appliquer la stratégie des amorces emboîtées. Les produits d'une première PCR sont utilisés comme substrats dans une seconde amplification par PCR dans laquelle les amorces (ou l'une d'entre elles) s'hybrident à des sites internes de la séquence amplifiée par la première PCR. Comme la probabilité est faible que des produits parasites contiennent des séquences susceptibles de s'hybrider avec la deuxième paire d'amorces, la PCR avec amorces emboîtées amplifie sélectivement l'ADN d'intérêt [28].

Chapitre III :

Les différents variantes de la PCR

Il existe de nombreuses variantes de la PCR à la base de l'ensemble des technologies de l'ADN recombinant, parmi elles on peut citer :

III-1. RT-PCR

La RT-PCR ou 'Reverse Transcription PCR', est destinée à amplifier électivement, et sous forme d'un fragment d'ADN double brin, une séquence d'ARNm spécifique (séquence d'intérêt), à partir d'une population d'ARNm ou d'ARN total, extraite d'un tissu supposé exprimer le gène d'intérêt. Il s'agit d'une technique de seconde génération qui permet d'obtenir directement l'ADNc d'un messenger spécifique, sans avoir besoin de cribler une banque d'ADNc. Bien évidemment cela suppose que la séquence d'intérêt est déjà connue pour pouvoir définir les amorces de PCR [29]. Pour réaliser une RT-PCR, il faut extraire l'ARN et le recopier en ADNc simple brin, le transformer en ADNc double brin et l'amplifier par PCR.

La synthèse d'ADNc est catalysée par les transcriptases inverses. Ces enzymes sont des ADN polymérase ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire. Les transcriptases inverses sont issues de rétrovirus (Virus du Myéloblastome Aviaire 'AMV' et Virus de la Leucémie Murine 'Mo-MLV' ou 'Mu-LV') [30]. Comme toutes les ADN polymérase, les transcriptases inverses ne peuvent pas initier seules la synthèse d'un brin d'ADN, elles ont besoin d'une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre. Lorsque les ARN à amplifier sont polyadénylés en 3' (ARNm eucaryotes), l'amorce choisie peut être simplement une séquence polyT constituée d'une succession de désoxythymidines. Dans ce cas, tous les ARNm sont a priori copiés en ADNc (figure 6).

Selon les protocoles employés qui sont nombreux et variés, il est recommandé d'inhiber la réaction de transcription inverse et de détruire ou dénaturer l'hybride ARN/ADNc. Dans un premier temps, la Taq polymérase catalyse la synthèse du second brin d'ADNc en utilisant le premier brin comme matrice. Ensuite, la PCR permet d'amplifier le fragment d'ADNc [31]. Le produit final est un ADN double brin dont l'un des brins est complémentaire de l'ARN d'intérêt et l'autre brin a la même séquence que cet ARN d'intérêt (figure 7).

La RT-PCR peut être destinée pour doser la quantité d'un type d'ARN initialement présent dans un échantillon (RT-PCR quantitative). Ce terme est souvent employé abusivement pour désigner une RT suivie d'une PCR en temps réel (RT-qPCR serait alors plus indiqué). Très utilisée par la plupart des biologistes, elle soulève de vives polémiques quant à l'utilisation de

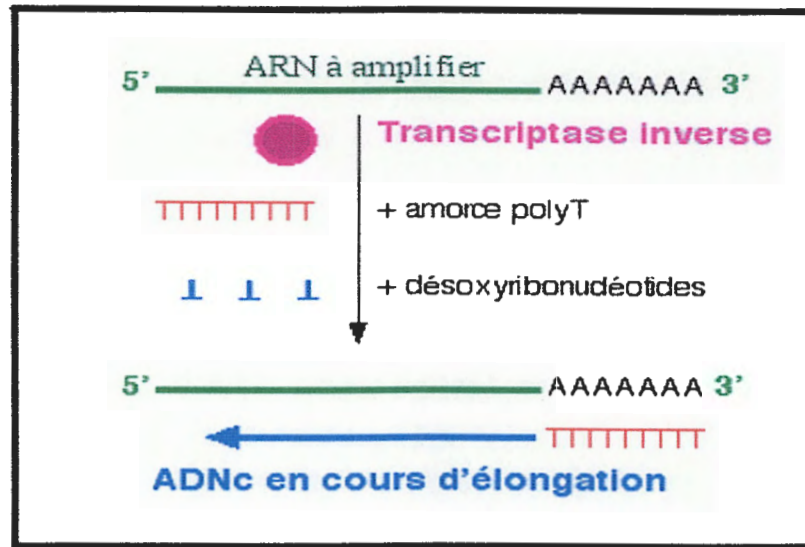


Figure 6. Synthèse d'ADNc par la transcriptase inverse.

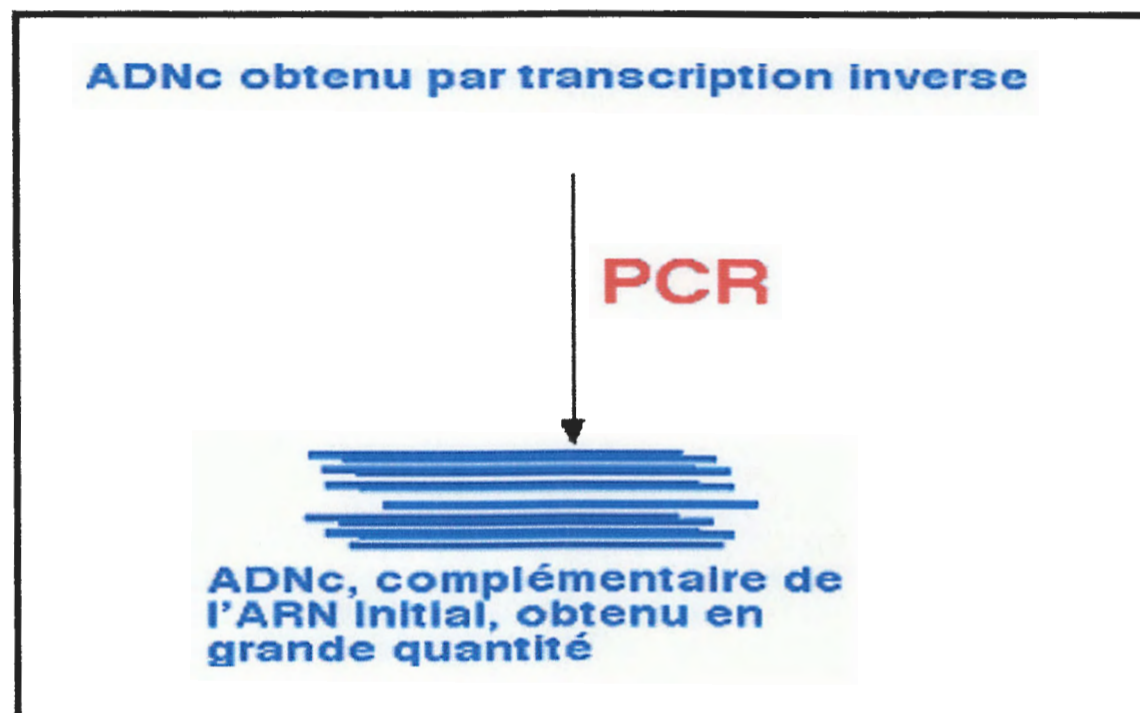


Figure 7. Amplification d'ADNc par PCR.

calibrateur externe ou interne (gène de ménage). A l'exception de certains protocoles complexes qui utilisent des calibreurs externes homologues compétitifs, elle ne permet qu'une quantification relative, destinée à mesurer la quantité d'un type d'ARN initialement présent dans un échantillon [22].

La Single cell RT-PCR ou RT-PCR sur cellule unique est une méthodologie qui permet d'étudier les transcrits d'une cellule unique, obtenue par patch-clamp, microdissection par le laser ou triage de cellules selon leur activité de fluorescence ou FACS (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 [32].

Enfin, la Single step RT-PCR ou RT-PCR à étape unique est un protocole dans lequel les réactifs des réactions de RT et de PCR sont mélangés afin que les deux étapes puissent se faire en même temps. Cela permet de réduire le risque de contamination ou d'inversion d'échantillons, 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 [33].

III-2. LA-PCR

Des changements dans les conditions de la réaction, comme une température plus basse et ou un pH plus élevé, diminuent la fréquence des lésions dans le substrat et permettent d'améliorer la performance de la polymérase [34]. Ces conditions de réaction, combinées à l'utilisation de deux ADN polymérases dont une possède une activité correctrice, augmentent considérablement le rendement de la PCR qui baptisée LA-PCR pour 'Long accurate PCR' ou PCR étendue. Cette amélioration résulte surtout de l'élimination par l'enzyme correctrice des bases mal appariées incorporées avec une assez haute fréquence par la Taq polymérase. Ces mélanges d'ADN polymérases ont permis d'amplifier des fragments d'ADN allant jusqu'à 22 kb directement à partir d'ADN génomique humain, d'amplifier la presque totalité des 16.6 kb du génome mitochondrial humain et les génomes entiers ou presque de plusieurs virus comme le phage λ [19]. Actuellement, plusieurs firmes fournissent des cocktails d'enzymes pour la PCR.

étendue, par exemple le système 'Taq plus Long PCR', commercialisé par Stratagene, qui combine la Taq polymérase et la polymérase thermostable *Pfu* qui possède une activité correctrice. La PCR étendue est particulièrement utilisée pour le diagnostic de maladies génétiques humaines résultant de répétitions de triplets, comme la dégénérescence spino-cérébelleuse de Friedreich [35].

III-3. PCR *in situ*

La PCR '*in situ*' permet d'identifier des petites séquences d'acides nucléiques (ADN, ARN) directement dans les cellules ou dans les tissus, en utilisant une sonde marquée (séquence complémentaire au gène cible) [36]. La sonde peut être un ADNc marqué par un radio-isotope ou un haptène (biotine, fluorescéine), une protéine est codée par un gène auquel correspond un ARNm [5]. Si la séquence de l'ARNm est connue, on peut le détecter ou le quantifier en synthétisant l'ADNc correspondant par une réaction de transcription inverse, cette méthodologie appelée la RT-PCR *in situ*. La PCR '*in situ*' est particulièrement utile en diagnostic '*in vivo*' (cellules en culture, biopsies), spécialement pour les virus à ADN ou à ARN (hépatite, herpes, ...).

L'analyse du caryotype '*in situ*' peut être réalisée à une échelle encore plus fine par PCR '*in situ*' qui permet, après décondensation partielle de l'ADN, d'amplifier un fragment d'intérêt du génome avant de tester son hybridation avec un oligonucléotide spécifique marquée. Mais la PCR '*in situ*' est le plus souvent utilisée en association avec la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) [37], une technique d'hybridation moléculaire qui utilise plusieurs sondes marquées, chacune par un fluorochrome différent, pour étudier des tissus ou des coupes, notamment pour mettre en évidence la présence d'ARNm ou viraux.

III-4. Multiplex PCR

La Multiplex PCR ou PCR multiplexe consiste à l'amplification simultanée de plusieurs séquences cibles (deux au moins) dans un même milieu réactionnel. C'est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois, généralement en ajoutant un couple d'amorce par type désiré [38]. Les produits de réaction 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 couplée 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 se marché très lucratif.

III-5. PCR emboîtée

C'est une PCR qui se déroule en deux étapes successives (deux PCR successives), en utilisant deux couples d'amorces différents (figure 8), ce qui permet d'obtenir une plus grande sensibilité et une meilleure spécificité. Les secondes amorces sont nichées, emboîtées, dans les premières d'où le terme *nested PCR*. L'analyse par électrophorèse des fragments obtenus par la première PCR, montre généralement une bande principale, mais également toute une série de petites bandes. Ceci provient du fait que les amorces peuvent s'apparier à diverses régions d'ADN par hybridation non spécifique [39]. Une deuxième PCR, pratiquée avec les mêmes amorces, amplifierait également ces artefacts, alors que des amorces différentes utilisées pendant la deuxième PCR permet une meilleure spécificité. Un couple d'amorces externes spécifiques des deux séquences bornant l'ADN à amplifier permet tout d'abord d'obtenir d'ADN amplifié, comme en PCR classique. Les fragments d'ADN obtenus (par exemple 258 pb) servent alors de matrice pour une seconde PCR en utilisant un deuxième couple d'amorces internes qui borne une région située à l'intérieur du fragment d'ADN obtenu par la première PCR (et donnera, dans l'exemple choisi ci-dessus, des fragments ayant par exemple 211 pb). Ainsi, on parle de PCR emboîtée ou *nested PCR*, car les deuxièmes amorces sont nichées, emboîtées dans les premières.

Cette technique de double PCR emboîtée permet donc à la fois une plus grande sensibilité et une plus grande spécificité. Ce type de technique est proposé par exemple la firme Cis bio pour la détection du virus de l'hépatite C, un virus ribonucléique. Étant donné que la virémie est relativement faible, l'ARN viral ne peut être détecté par hybridation directe, et une amplification doit être effectuée après l'obtention de l'ADNc correspondant à l'ARN (figure 9). Le faible rendement de la rétrotranscriptase est compensé grâce à une amplification d'ADNc par PCR emboîtée. Dans cet exemple, le premier couple d'amorces est biotinylé, tandis que le second est marqué à l' I^{125} . Les produits de PCR pourront donc être fixés sur un support recouvert d'avidine (l'avidine ayant une très forte affinité pour la biotine), et la radioactivité finalement mesurée [28].

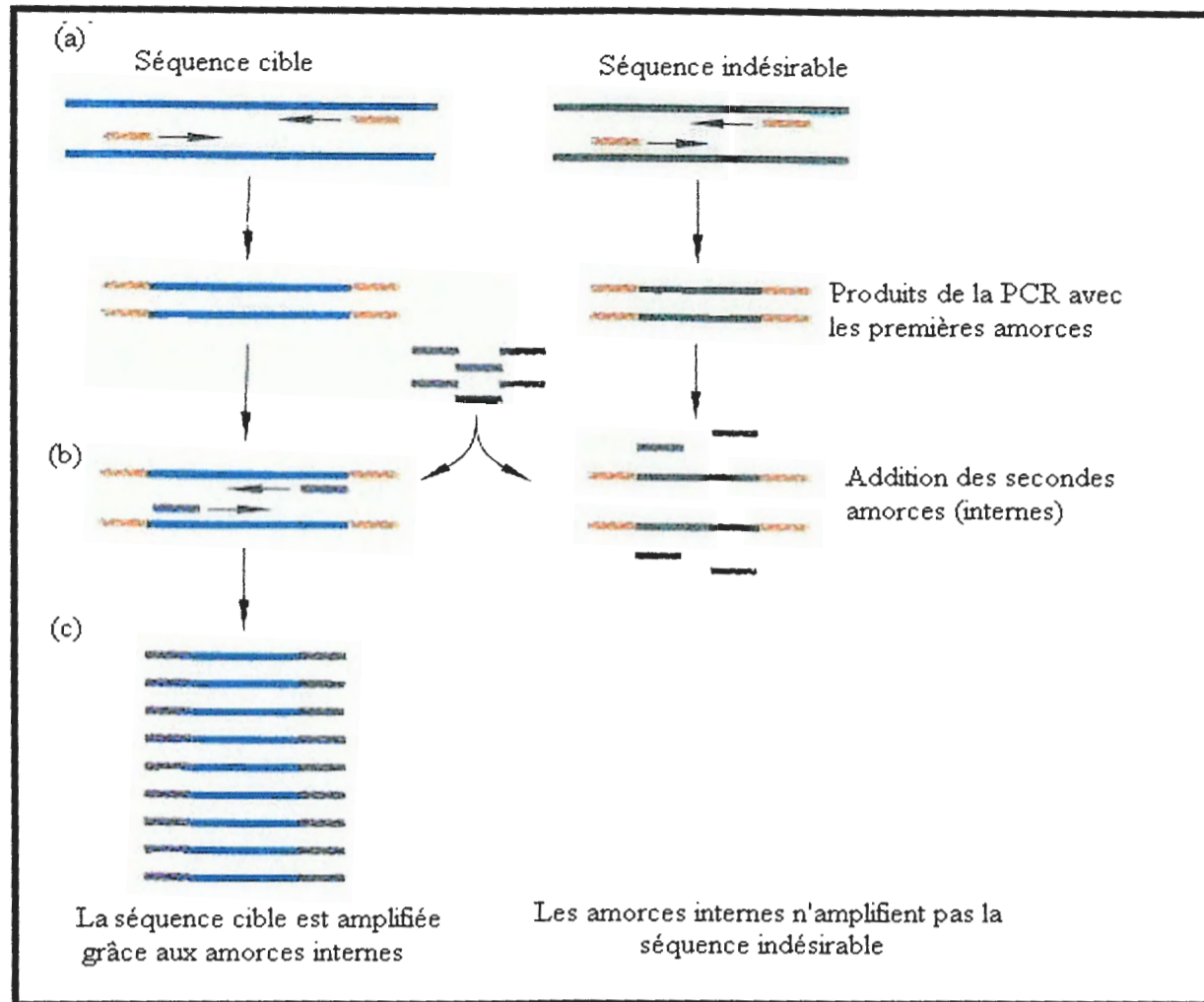


Figure 8. Principe de Nested PCR.

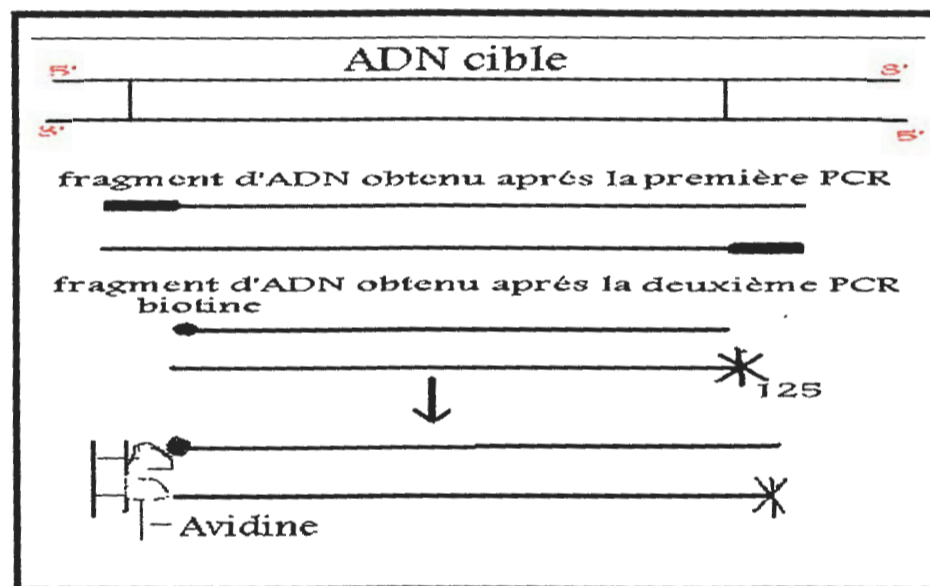


Figure 9. Nested PCR : exemple de détection de l'hépatite

III-6. PCR asymétrique

La PCR asymétrique est une technique qui permet de produire de l'ADN simple brin. Il s'agit d'un protocole de PCR standard à ceci près que la concentration respective des deux amorces diffère d'un facteur 100. De l'ADN double brin est donc synthétisé jusqu'à l'épuisement de l'amorce présente en concentration limitée (figure 10). La seconde amorce, continue de s'hybrider et d'amorcer la synthèse d'ADN, permettant ainsi la production d'un seul des deux brins. Même si le taux de production de cet ADN simple brin est linéaire plutôt qu'exponentiel, il s'en produit une quantité suffisante pour être séquencée [40].

III-7. PCR quantitative

Elle permet de mesurer la quantité d'ADN présente initialement. Le dosage d'une séquence d'ADN d'intérêt par PCR revient à estimer le nombre de ses copies contenues dans le échantillon au départ; une simple règle de trois suffira ensuite pour estimer à partir du volume testé par PCR sa quantité totale contenue dans le matériel biologique ou génomique étudié. On peut définir deux stratégies de PCR quantitative selon que le dosage est terminal, réalisé au terme de la PCR sur les quantités d'amplimères finales (PCR point finale), ou en temps réel, en cours de PCR. Ces deux types de stratégies sont illustrés par la PCR compétitive et par la PCR en chimie Taqman.

III-7.1. PCR en point final

Les différents types de PCR quantitative dite en point finale, mesurent les quantités d'amplicons par analyse d'image, après la PCR et électrophorèse sur capillaire ou sur gel d'agarose en présence d'agents intercalant de l'ADN. Parmi ces techniques quantitatives, la PCR compétitive permet de doser la quantité d'une séquence d'intérêt ou séquence cible au sein d'un échantillon biologique contenant une quantité connue d'ADN total. Son principe consiste à amplifier par PCR, conjointement et concurremment, des quantités croissantes de séquences cibles et une quantité fixe et connue d'une séquence étalon (séquence standard). Cette séquence standard correspond à la séquence cible, en général clonée dans un plasmide, et déletée ou augmentée d'une vingtaine de paires de bases. Les amorces d'amplification sont donc les mêmes et les quantités finales d'amplimères ne dépendront que des quantités initiales respectives de séquences cible et standard, faciles à séparer sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide du fait de la variation de longueur de ces deux séquences. Il suffit alors de repérer le puits de migration où les quantités d'amplimères sont égales, pour estimer la quantité de séquence cible

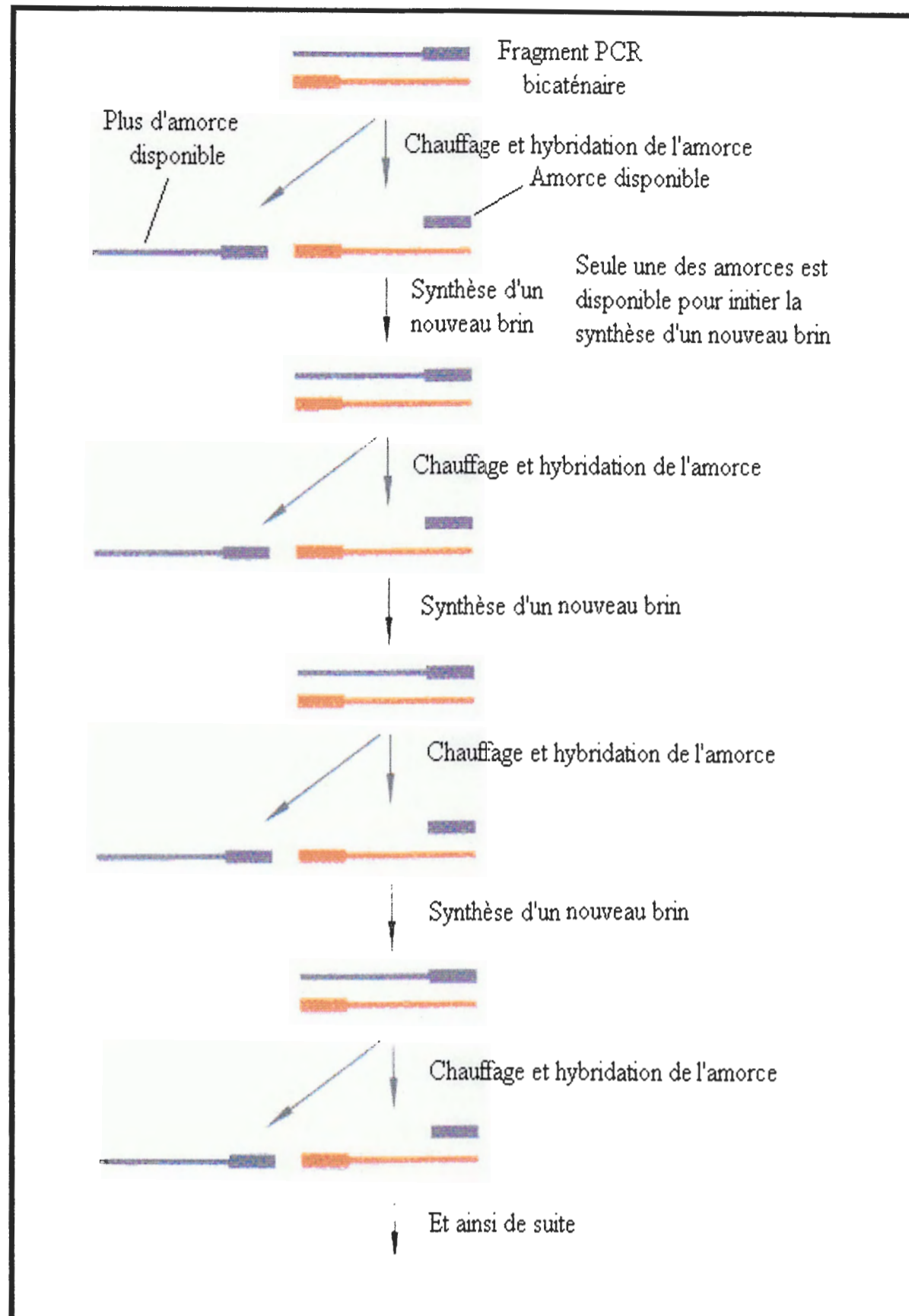


Figure10. PCR asymétrique il permet de produire des fragments simple brin.

dans l'échantillon, par la connaissance de la quantité de séquence standard co-amplifiée. Une simple règle de trois permettra de déterminer la quantité totale de l'échantillon biologique étudié, soit rapportée par génome de l'espèce transgénique. Bien évidemment, cette technique exige une bonne standardisation afin de définir des quantités d'ADN standard susceptibles d'encadrer avec précision la valeur de la dose de séquence cible.

III-7.2. PCR en temps réel

Les différents types de PCR quantitative dites en (temps réel) mesurent en continu les quantités d'amplicons pendant la PCR. La mesure de l'accroissement du nombre d'amplicons est assurée par la mesure de la fluorescence libérée par leur synthèse grâce à l'utilisation d'une sonde interne à l'amplicon (chimie TaqMan) ou par l'utilisation d'un agent liant à l'ADN de l'amplicon (méthode SybrGreen) [41].

Cette méthode quantitative permet de suivre en temps réel l'amplification élective d'une séquence et d'en déduire ainsi, compte tenu du nombre de cycles déjà réalisés, le nombre de séquences d'intérêt présentes initialement dans le tube.

Un premier problème soulevé par la PCR quantitative en temps réel provient du fait que la détection des amplimères suppose une quantité minimale qui n'est obtenue qu'après quelques cycles, chaque technique de détection des amplimères ayant un seuil de détection propre. À partir du moment où les amplimères sont détectables, il est théoriquement possible de mesurer l'accroissement exponentiel de leur nombre pendant quelques cycles avant que cet accroissement ne s'arrête en fin de PCR, quand des phénomènes d'inhibition ou de compétition limitent de manière importante l'efficacité des cycles. La fraction de la phase exponentielle efficace au dosage en temps réel sera donc limitée à quelques cycles et définit la fenêtre de détection.

Un deuxième problème soulevé par la PCR quantitative en temps réel est celui de la méthode de détection. Dans certaines circonstances particulières, il est possible d'interrompre la PCR, en un point de la fenêtre de détection, pour comparer les quantités d'amplimères d'une séquence d'intérêt à celles des séquences contrôles co-amplifiées. En effet, dans ce cas particulier, le rapport quantitatif entre les séquences d'intérêt et les séquences contrôle n'est pas trop déséquilibré et doit prendre des valeurs connues à l'avance, selon qu'il y a ou qu'il n'y a pas

trisomie. Dans la plupart des autres circonstances de dosage, la séquence d'intérêt est largement minoritaire vis-à-vis de toute autre séquence de contrôle de sorte que leur co-amplification aboutirait à une saturation de séquences contrôle avant même que le seuil de détection de la séquence d'intérêt soit atteint. Il est alors nécessaire de pouvoir doser en continu et avec précision l'accroissement du nombre d'amplimères de la séquence d'intérêt, sans co-amplification de séquences contrôles ou témoins. C'est ici que la chimie TaqMan prend tout son intérêt.

III-7.2.1. PCR par chimie TaqMan

Le mot (TaqMan) est dérivé des deux mots : Taq polymérase et de PacMan. En effet, la Taq polymérase possède une activité exonucléase 5'→3' permettant de dégrader tout oligonucléotide, se trouvant sur son passage. Le terme TaqMan est déposé et concerne la chimie 'TaqMan' ou la sonde 'TaqMan'. La chimie TaqMan est une PCR quantitative qui utilise une sonde spécifique oligonucléotidique (sonde TaqMan), marquée par deux fluorophores dont le premier est quenché par le second qui appelé 'reporter'. La dégradation de cette sonde au cours de chaque passage de la Taq polymérase sera accompagnée d'une augmentation de fluorescence du Reporter qui sera mesurée au cours de chaque cycle de PCR [42].

Le principe de cette chimie (figure 11) consiste à réaliser une PCR de la séquence d'intérêt en ajoutant aux deux amorces d'amplification, une sonde centrale, capable de s'hybrider à l'un des deux brins d'ADN. Cette sonde porte à son extrémité 5' un fluorochrome R (Reporter) dont l'émission est étouffée par l'action d'une autre molécule Q (Quencher), en raison d'un transfert d'énergie résultant de la proximité de R et Q (effet Förster). À chaque cycle de PCR, durant la phase d'amorçage, cette sonde centrale va s'hybrider sur l'un des deux brins. Puis, lors de la phase d'élongation d'une des amorces, la Taq polymérase va atteindre la sonde centrale, la déplacer puis l'hydrolyser du fait de son activité exonucléosique 5'→3'. Cette hydrolyse va libérer le nucléotide porteur de R qui, détaché de Q, va pouvoir alors émettre un signal de fluorescence. Ainsi à chaque amplification de la séquence d'intérêt, une molécule R est libérée de sorte que la mesure de la fluorescence émise depuis le tube de PCR, en temps réel, est une mesure stoechiométrique de la moitié de nombre d'amplimères déjà obtenus. Compte tenu du nombre de cycles déjà réalisés, on peut en déduire le nombre initial de copies de la séquence d'intérêt. La mesure de la fluorescence est assurée par un dispositif *in situ* dans l'amplificateur

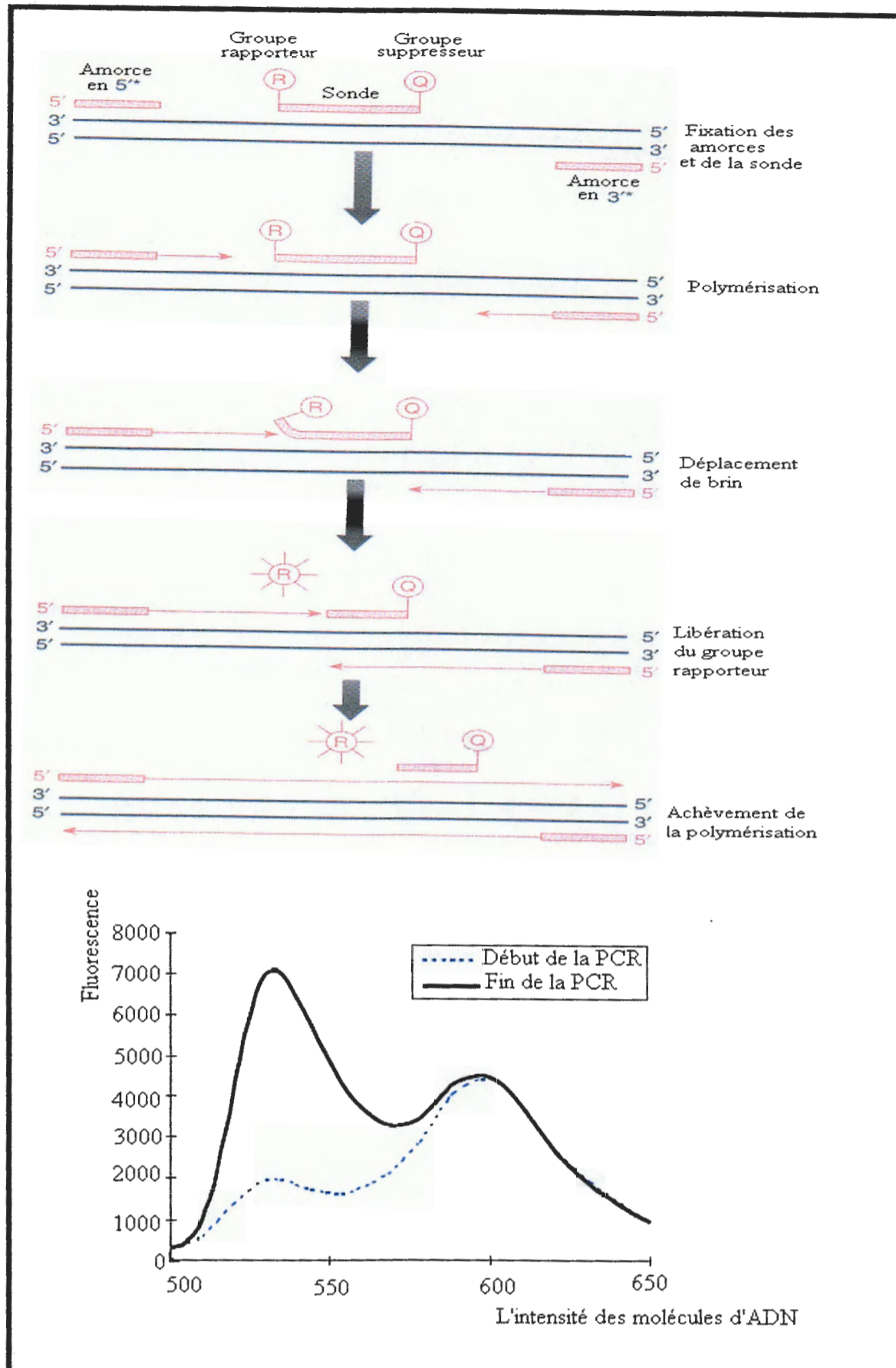


Figure 11. Principe de la PCR quantitative en chimie Taqman.

couplé avec un ordinateur qui trace le graphe d'accroissement des quantités d'amplimère et calcule la quantité initiale (figure 11).

III-7.2.2. PCR par SYBR Green

A la fin de l'année 1998, des kits pour la PCR quantitative utilisant des agents intercalant (SYBR Green I) ont été commercialisés par la société 'Molecular Probe' [43]. Le SYBR Green est colorant qui agit comme le bromure d'éthidium, en s'intercalant au niveau de double hélice d'ADN. Il ne devient fluorescent que s'il se lie à l'ADN double brin. Initialement vendu comme colorant pour gel, il s'est avéré compatible avec la PCR, il est possible d'inclure cette molécule à faible dose dans une PCR et suivre l'apparition des produits de PCR directement en mesurant la fluorescence dans la gamme d'émission du SYBR green I (intensité maximale : 550 nm) (figure 12).

Contrairement à la chimie Taqman, il n'est pas nécessaire de concevoir une sonde. En contrepartie, la fluorescence mesurée peut provenir de produit d'amplification non spécifique. Il convient donc de s'assurer de la spécificité des produits de PCR. Il est conseillé, par exemple, de faire migrer sur gel les produits de PCR afin de s'assurer que la taille du fragment amplifié est attendu.

III-8. PCR sur colonie

C'est une PCR employée pour vérifier l'intégration juste d'un transgène dans une colonie d'un clone bactérien, en utilisant des amorces complémentaires à l'ADN cloné ou à des régions l'encadrant. La taille du fragment d'ADN amplifié, révélera donc si le clonage est réussi ou pas (figure13). Cette méthode est fort intéressante, car elle peut être réalisée directement sur les colonies sans extraction préalable d'ADN. Toutefois, un contrôle de la séquence effectivement amplifiée reste une sage précaution [44].

III-9. TAIL-PCR

La TAIL-PCR 'Thermal asymmetric interlaced PCR' ou PCR à l'asymétrie thermique entrelacée est technique complexe basée sur des principes faisant appel à la PCR emboîtée, la PCR asymétrique par le T_m des amorces, la succession de plusieurs types de cycles favorisant l'hybridation de telle ou telle amorce et l'emploi d'amorces dégénérées. Le but est d'obtenir un

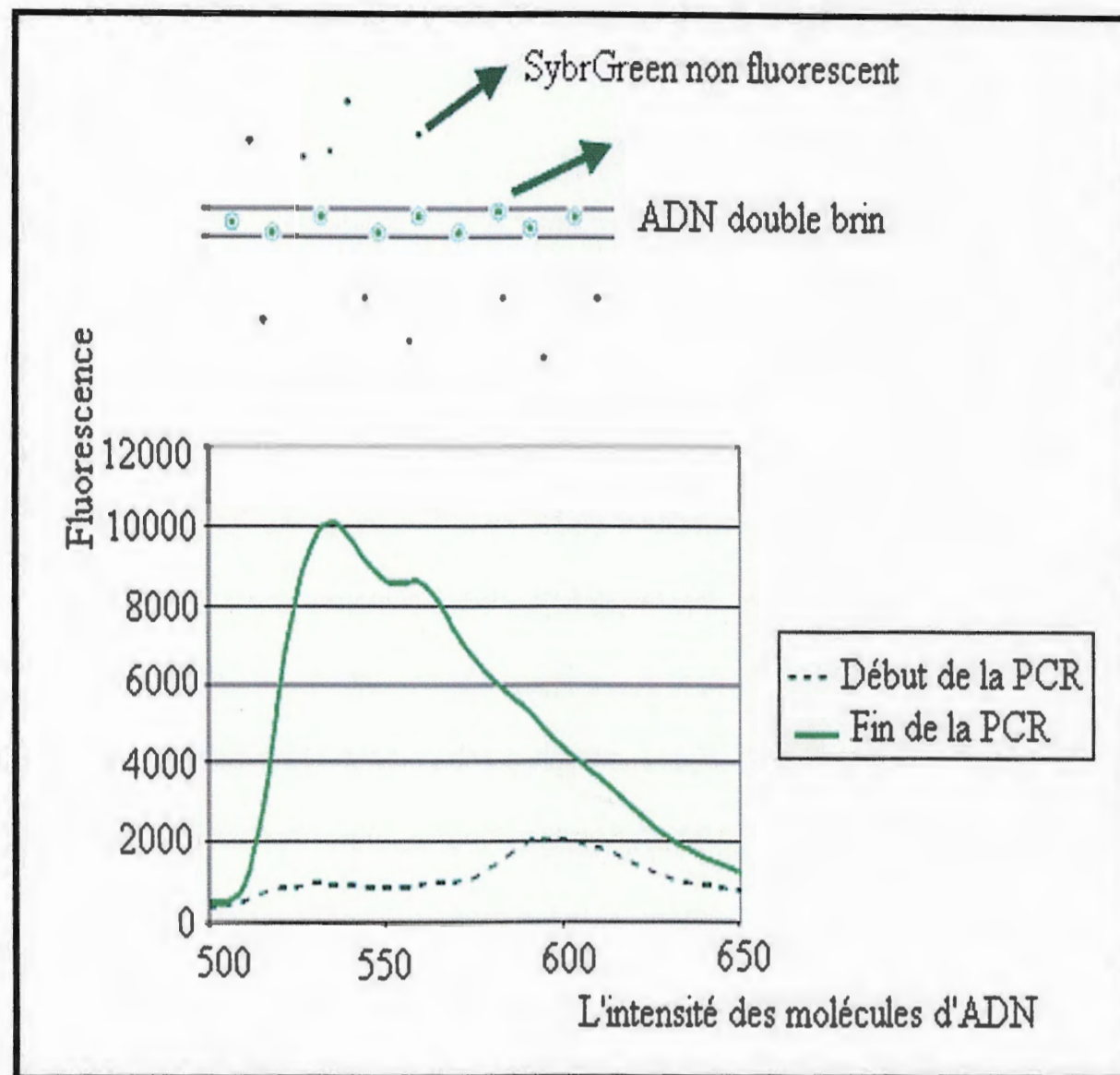


Figure 12. Principe de la quantification par SybrGreen.

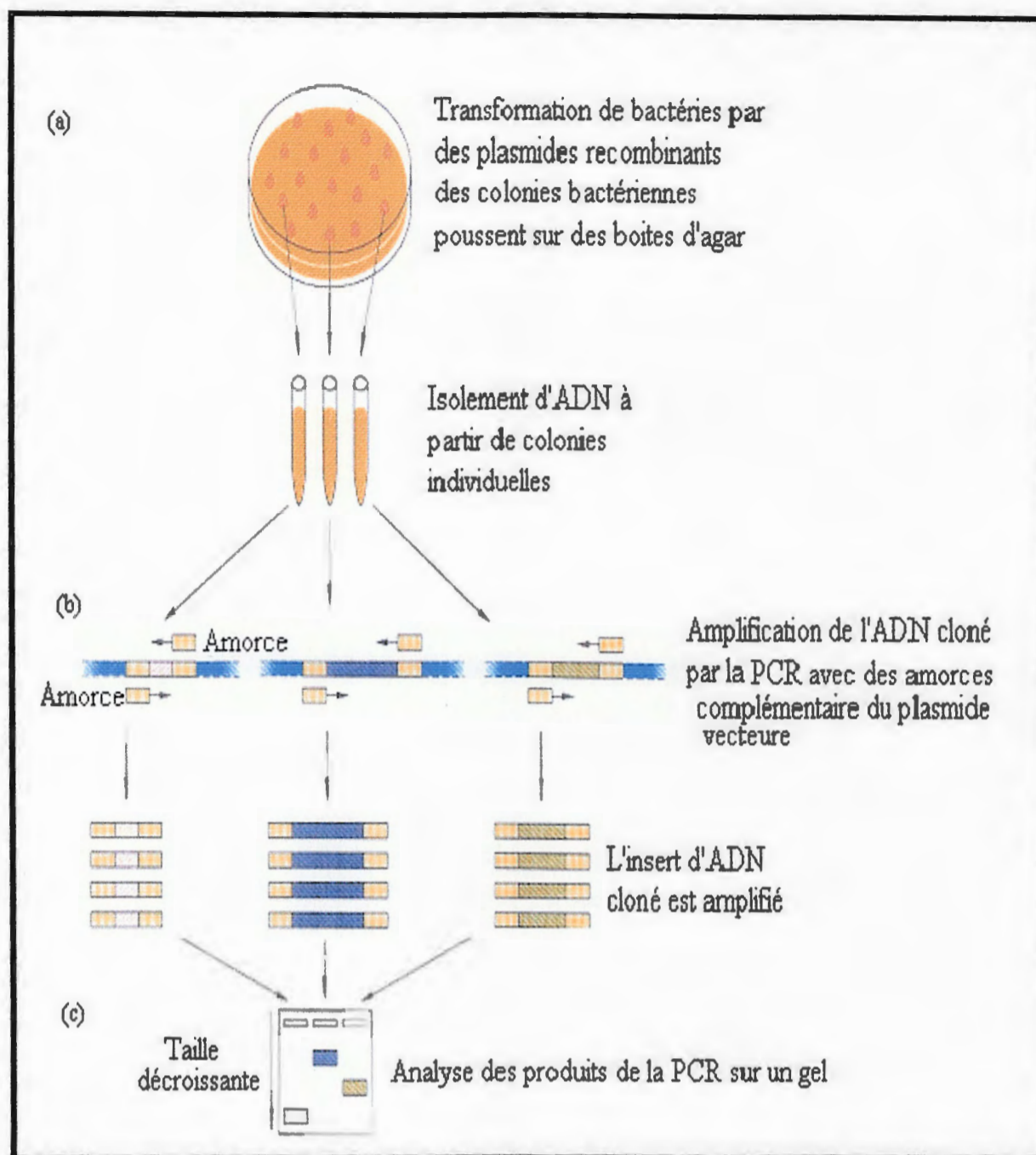


Figure 13. Amplification d'ADN cloné dans des vecteurs par PCR.

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 [45].

III-10. Touchdown PCR

La Touchdown PCR ou PCR par essais est un protocole utilisé pour amplifier des amplicons faiblement représenté et/ou subissant une compétition sur leurs amorces par des produits de pseudo-gène. Elle consiste à utiliser une température d'hybridation très haute lors des premiers cycles, afin d'assurer une forte stringence et donc une amplification spécifique. Une fois que l'amplicon devient majoritaire vis-à-vis de ses compétiteurs, la température d'hybridation est progressivement abaissée ce qui permet une meilleure efficacité de PCR. L'efficacité n'étant pas constante tout au long de la réaction, il est très difficile de pouvoir obtenir un résultat quantitatif sans biais [46].

Chapitre IV :

**Modélisation et quantification de la
PCR**

IV-1. Cinétique mesurable de la PCR

Il est pertinent d'étudier la cinétique mesurable d'une PCR, car des limitations technologiques rendent inaccessible les cycles précoces, et généralement une large portion de la partie exponentielle. Le profil apparent (mesurable) d'une PCR adopte plusieurs phases distinctes et plus ou moins développées en fonction du choix méthodologique (figure 14). Comme le montre schéma de gauche de figure 14, les 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. La courbe représente donc la cinétique d'amplification de l'ADN, cycle par cycle. Le schéma de droite de la figure 14, les valeurs de fluorescences précédentes ont été converti en logarithme décimal. Une cinétique de type exponentielle devrait donc être transformée en un segment de droite (segment quantifiable). Le niveau du bruit de fond de la fluorescence aspécifique du marqueur est très dépendant de la nature du marqueur et du soluté de l'échantillon. La zone où la mesure de fluorescence est biaisée par le bruit de fond 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. La zone de la cinétique en phase exponentielle et mesurable sans biais 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. La 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. Les 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 et de la qualité de fluorescence. La 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). La 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 [42].

IV-2. Efficacité de la PCR

L'avènement de la PCR en temps réel a mis en exergue que l'efficacité d'une réaction de PCR n'était pas toujours égale à deux. Cela signifie que sur l'ensemble des cycles considérés comme quantitatif, tous les brins matrices ne servent pas forcément à donner une copie complète de l'amplicon. Deux phénomènes en sont les principales causes. Premièrement, tous les brins matrices ne sont pas forcément liés par un complexe amorce/polymérase lors de la phase

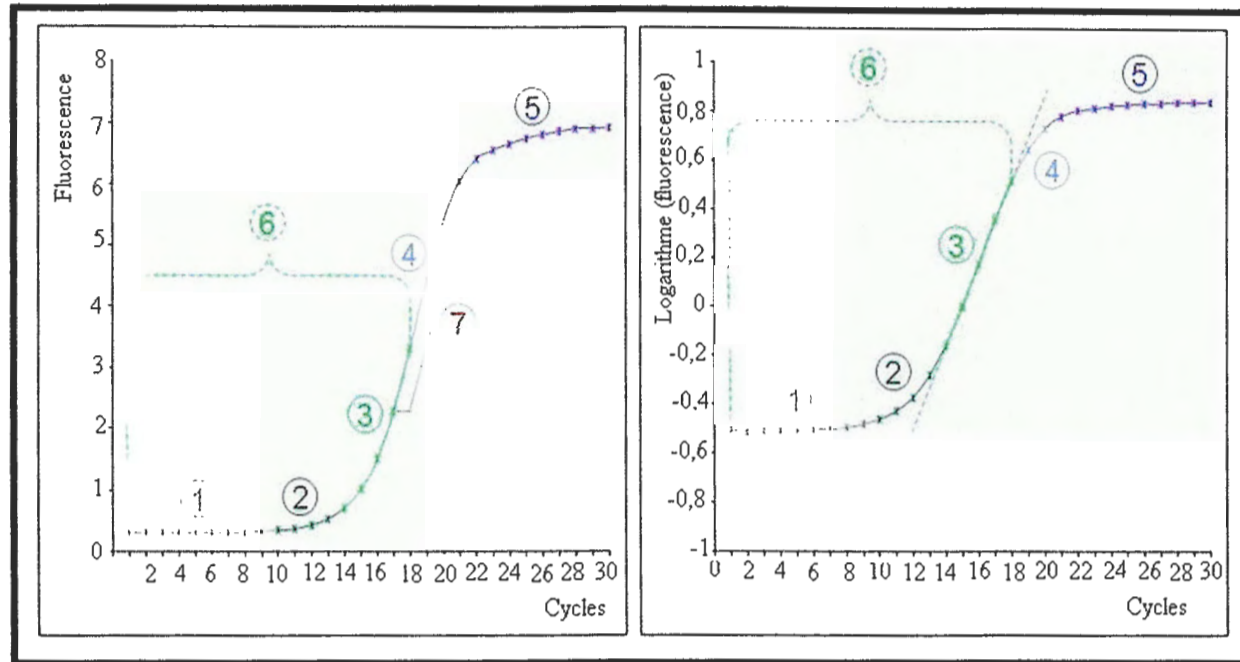


Figure 14. La cinétique mesurable d'une PCR.

d'hybridation. La probabilité d'amorçage peut être influencée par la température, l'auto-hybridation entre les amorces ou la compétition possible d'ADN non cible (par exemple un pseudo-gène), la longueur et la séquence des l'amorces, leur composition en nucléotide naturel ou modifié, leur concentration dans la solution et la composition ionique de cette dernière. Deuxièmement, 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 fixer sur lui.

L'efficacité est donc théoriquement inférieure ou égale à deux, mais certaines sources considèrent qu'elle est acceptable jusqu'à 2,3. 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 (E) utilisée (mesurée à chaque expérience ou non) est bien celle qui a eu cours dans l'échantillon à calibrer. Le terme efficacité peut aussi avoir deux significations selon les auteurs. Les premiers désignent l'ordre de l'exponentielle et l'équation de la cinétique s'écrit donc : $[ADN]_n = [ADN]_i \cdot E^n$; (E : efficacité, n : nombre de cycles, $[ADN]_i$: ADN Initial, $[ADN]_n$: quantité d'ADN après n cycles). Les seconds désignent la fraction de molécule d'ADN servant effectivement de matrice et l'équation devient alors : $[ADN]_n = [ADN]_i \cdot (1 + E)^n$. 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. Par exemple particulier. Si $E = 100\%$, à chaque cycle, le nombre de copies double : $[ADN]_n = [ADN]_i \cdot 2^n$. A partir du tronçon de la courbe correspondant à la phase exponentielle détectable (figure 14), il est théoriquement possible d'extrapoler le paramètre $[ADN]_{initial}$. Cependant, en pratique il n'est pas facile d'obtenir une telle courbe et encore moins une courbe dont l'unité de l'ordonnée soit en nombre de

copies. Il n'est alors pas possible d'en déduire directement le nombre de copies initiales, il faut impérativement inclure à chaque expérience des échantillons standards de concentration connue [42].

IV-3. Le paramètre TC

Au cours d'une réaction de PCR quantitative les données concernant la quantité du produit amplifié sont enregistrés en temps réel. La quantification repose sur la phase exponentielle, mais exploite un nouveau paramètre : le TC 'Threshold Cycle' c'est à dire le cycle seuil. La quantification par PCR en temps réel repose sur un nouveau principe dans lequel le 'quand' prend le dessus sur le 'combien'. En effet, si la quantité obtenue à la fin d'une PCR n'est pas toujours significative, seule la phase exponentielle est représentative du nombre de la copie initiale. C'est le moment où le signal sort du bruit de fond qui est significatif. Ce moment correspond à un certain nombre de cycles et est appelé TC [47]. Pour cela on définit un seuil (Threshold) correspondant à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle mais suffisamment élevées pour être au dessus du bruit de fond (figure 15). Pour deux quantités initiales différentes on obtiendra deux TC différents et la différence des TC sera proportionnelle au logarithme du rapport de ces quantités initiales : $TC_2 - TC_1 = \text{coefficient} \times \log N_2 / N_1$. Si des dilutions successives sont effectuées, il est possible d'obtenir des courbes d'amplification décalées successivement vers la droite et dont les TC sont successivement augmentés d'une valeur constante (figure 16).

Le principal avantage de la PCR en temps réel est le gain de temps. Il est ainsi plus facile d'étudier en parallèle des échantillons ayant des nombres de copies initiales très différents de l'ordre de plusieurs log sans avoir à faire des dilutions préliminaires. Pour obtenir des courbes d'amplification à l'aide d'un instrument tel que l'Applied Biosystem-7700, des chimies à base de molécules fluorescentes sont nécessaires. La quantification en passant par une valeur mathématique en nombre de TC permet donc d'obtenir des résultats fiables, mais n'est exploitable directement. Afin d'obtenir la quantité d'ADN initial, il va falloir réaliser de nouvelles transformations mathématiques qui nécessitent la connaissance de l'efficacité de PCR. Cette dernière est généralement déterminée grâce une gamme d'étalonnage.

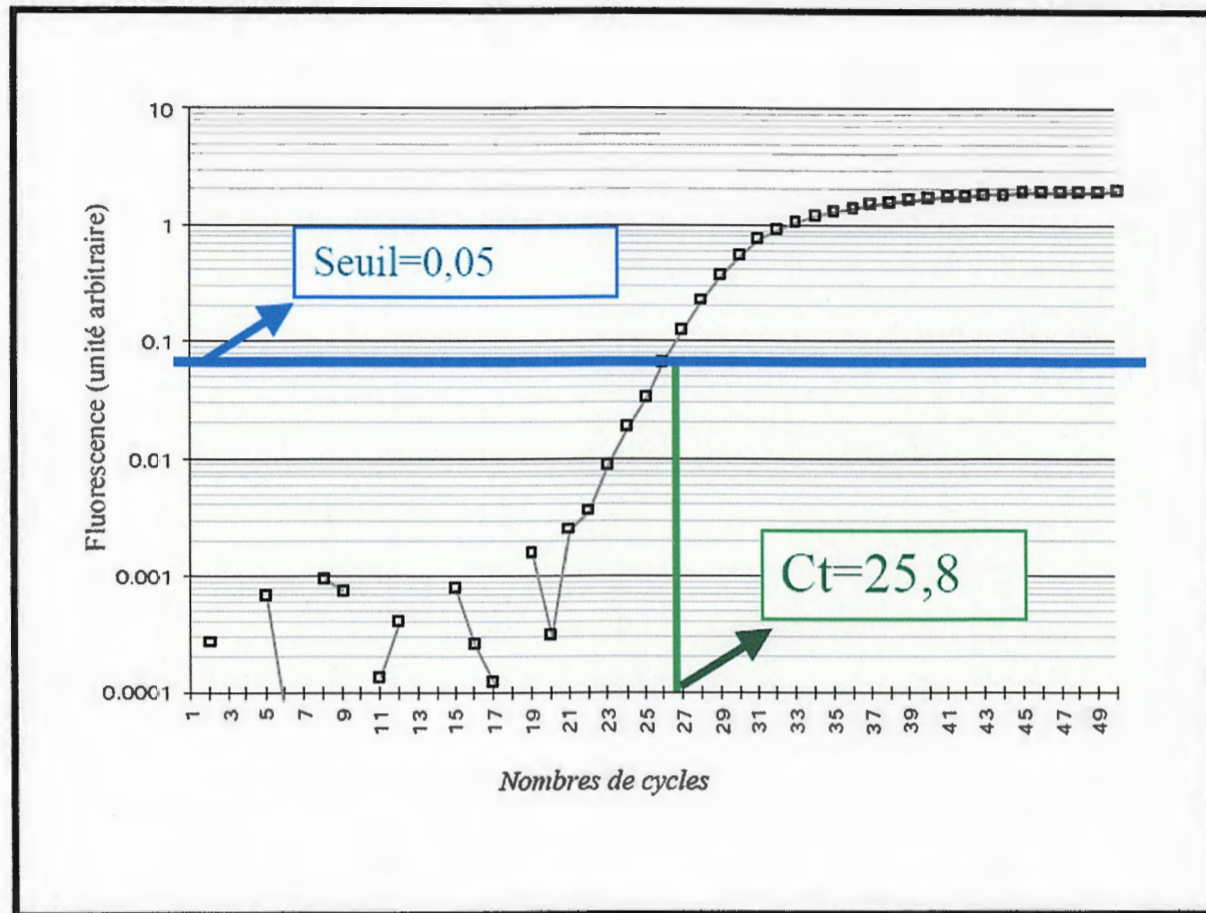


Figure 15. Principe du Ct.

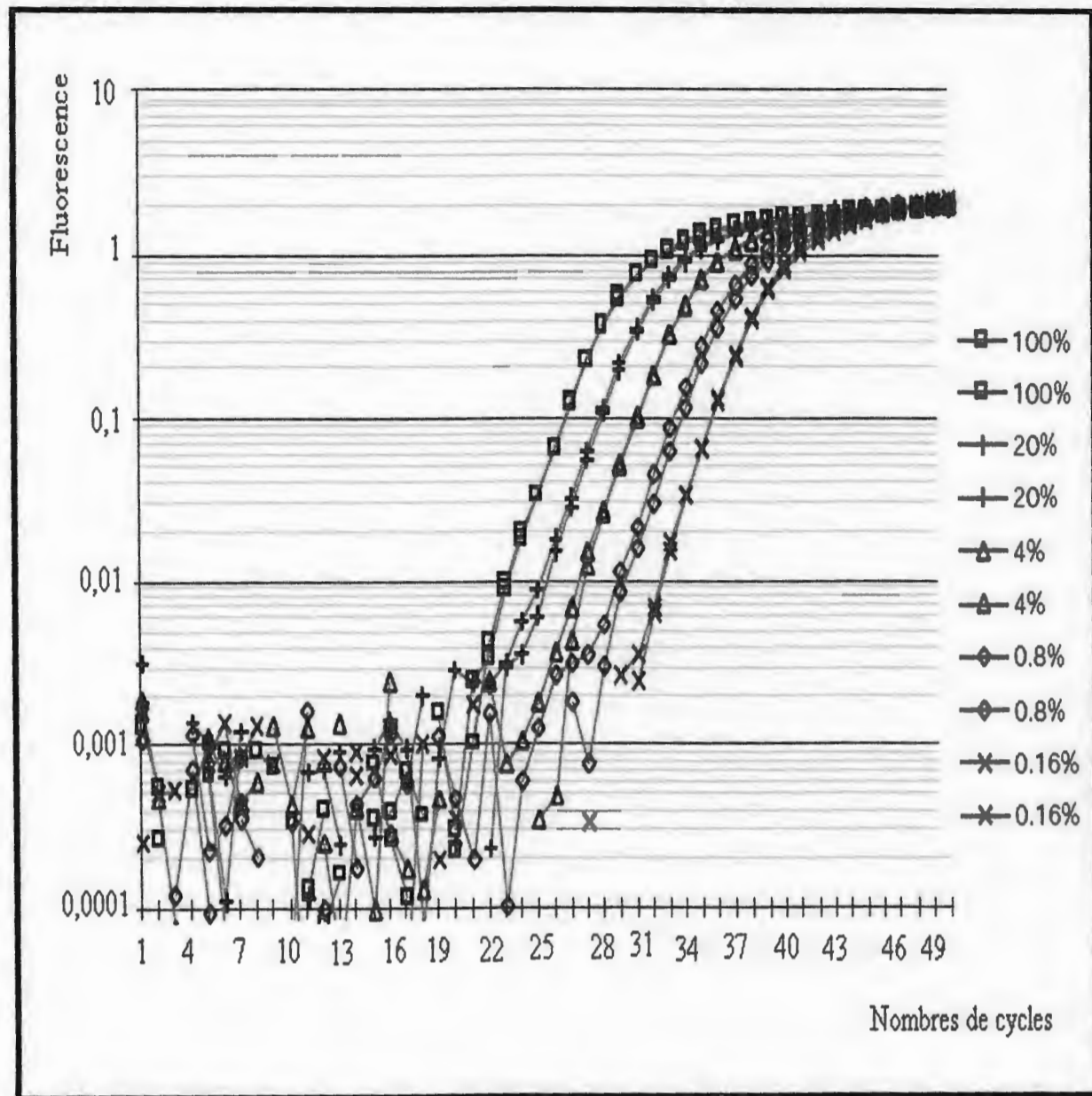


Figure 16. Représentation d'amplifications par PCR de 5 dilutions d'un ADNc de référence.

Chapitre V :

Les applications de la PCR

Les domaines d'applications des techniques de PCR sont aussi variables que nombreuses, ils vont de la recherche fondamentale (mutagenèse dirigée, séquençage d'ADN, puce ADN,...) à la recherche appliquée (diagnostic moléculaire de maladies, traçabilité de produits agroalimentaire). Cette biotechnique ingénieuse et robuste est un outil formidable simple d'utilisation et indispensable pour la mise point de toutes les approches ou biotechnologies basées sur les manipulations des gènes. Elle est à la base de l'ensemble des Biotechnologies et bio-industries faisant appel à l'usage de l'ADN recombinant et qui touchent pratiquement tous les aspects de notre vie quotidienne (Médecine et santé, criminalité, alimentation, pollution et Ecologie, archéologie...). Dans ce chapitre, nous tenterons d'aborder tout une panoplie des applications des différents types de PCR, qui est loin de là, n'est pas exhaustive.

V-1. Mutagenèse dirigée

Comme il a été mentionné précédemment, la PCR a révolutionnée la manipulation des gènes et permet le développement rapide de nombreuses techniques ingénieuses de la recherche fondamentale en Biologie Moléculaire et Cellulaire, parmi ces techniques on peut citer la mutagenèse dirigée. En 1986, les premiers développements de la PCR par Scharf et collaborateurs ont montré son potentiel pour la mutagenèse [48]. Des bases de l'amorce mal appariées avec la matrice initiale, sont incorporées dans la séquence qui sert de matrice pour les cycles suivants (figure 17). En 1988, Higuschi et collaborateurs [49] ont décrit une variante de la méthode originale qui permet d'introduire une mutation n'importe où dans la séquence d'un ADN amplifié par PCR. Les deux réactions primaires produisent deux fragments qui se chevauchent et qui contiennent la même mutation dans la région commune. Le chevauchement des séquences permet aux fragments d'être hybridés et l'un des deux hybrides formés est allongé par l'ADN polymérase pour donner un fragment double brin. L'autre hybride contient des extrémités 5' en retrait et comme il ne peut servir de substrat pour la polymérase, il est donc éliminé du mélange réactionnel. Tout comme dans la mutagenèse conventionnelle par prolongation d'amorces, il est aussi possible de créer des délétions et des insertions.

La méthode de Higuschi et collaborateurs nécessite quatre amorces et trios PCR différentes, les deux premiers PCR permettent d'amplifier les fragments chevauchants et la troisième PCR de les fusionner [49]. En 1990, Sarkar et Sommer ont décrit une nouvelle méthode plus simple qui utilise trois amorces seulement pour deux PCR [50]. Dans cette

méthode, le produit de la première PCR est utilisé comme amorce de grande taille pour la deuxième PCR. L'avantage de la mutagenèse par PCR est l'obtention de la mutation désirée à rendement avoisinant les 100 %, cependant, il y a deux inconvénients. Le premier est que le produit de la PCR doit normalement être intégré par ligature dans un vecteur, bien que Sarkar et Sommer aient pu produire directement une protéine mutante en utilisant un système couplé de transcription et de traduction *in vitro* [50]. Le second inconvénient, est que la fidélité de réplication de l'ADN par la Taq polymérase n'est pas très élevée. Ainsi, il est indispensable de séquencer le produit de la mutagenèse par PCR pour s'assurer de l'absence de mutations indésirables. Comme le montre la figure 18, l'utilisation des polymérases thermostables douées d'une meilleure fidélité représente une amélioration appréciable [51, 52].

V-2. Recherche d'ADN fossile et Paléogénétique

L'histoire de l'ADN ancien (ADNa) commence au milieu des années quatre-vingt lorsque deux équipes reportent consécutivement l'extraction d'ADN de fossiles. L'un était un animal disparu à jamais, depuis plus d'un siècle, le quagga [53], l'autre une momie égyptienne, datant du V^{ème} siècle avant Jésus-Christ [54]. Dans les deux cas, les fossiles avaient subi des traitements particuliers juste après leur mort pour minimiser leur dégradation. Bien souvent, s'il était présent, l'ADN restait à l'état de traces. Ainsi, le clonage moléculaire, la seule technique d'amplification de l'ADN alors disponible, par ailleurs très exigeante quant à la qualité et quantité de l'ADN, ne permettait pas d'extraire et d'étudier l'ADN de fossile. L'invention de PCR a donné de l'enthousiasme et un outil de prédilection pour travailler sur les séquences de l'ADN ancien et les études de paléogénétique ont été multipliées [55].

Les premières études se sont cantonnées à des fossiles d'âge relativement récent, allant de quelques centaines à quelques dizaines de milliers d'années. Mais, très vite, on a voulu défier la limite du temps et remonter jusqu'à des périodes très reculées. D'ailleurs, la découverte que des peptides pouvaient être conservés au-delà de quelques centaines de milliers d'années allait alimenter la course à la recherche de séquences d'ADN de plus en plus anciennes. On atteignait 17 millions d'années avec des feuilles de *Magnolia* sédimentées en milieu lacustre anoxique, puis 30-35 millions d'années avec divers insectes englués dans l'ambre; bientôt un os de dinosaure, vieux de 65 millions d'années défrayait la chronique [56].

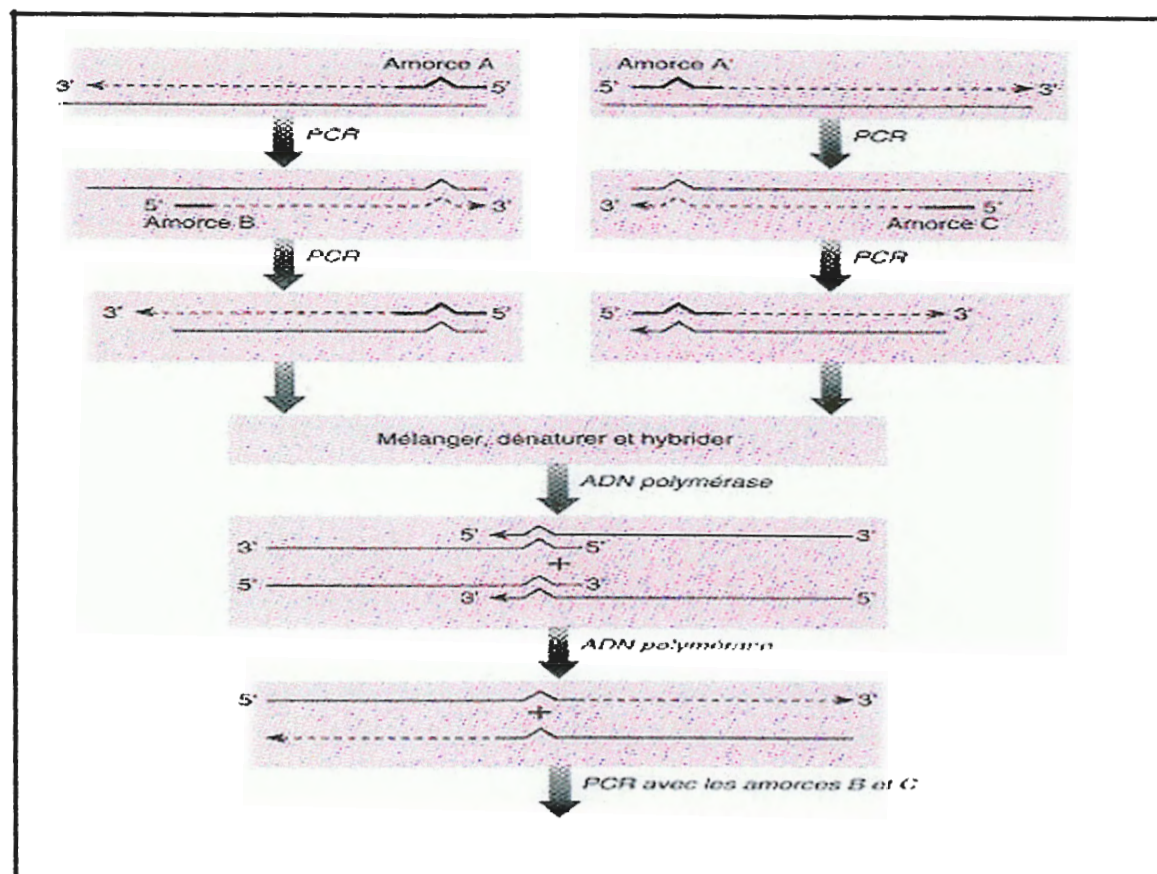


Figure 17. Mutagenèse dirigée par PCR

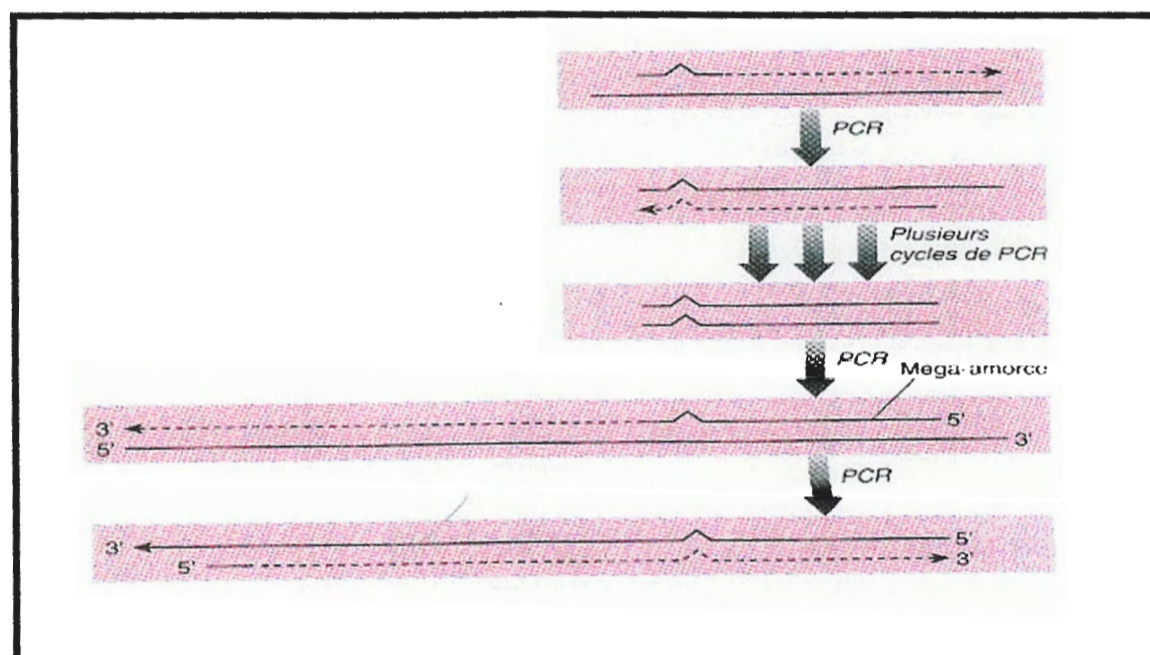


Figure 18. Mutagenèse dirigée par PCR avec méga-amorce

La sensibilité de la PCR avait permis d'amplifier les infimes vestiges d'ADN contenus dans ces fossiles vieux de plusieurs millions d'années, mais aussi elle avait co-amplifié des traces d'ADN moderne (un bien meilleur substrat). Il a donc fallu se rendre à l'évidence que l'ADN n'est pas éternel dans les fossiles. D'ailleurs, sur la base théorique de la demi-vie des molécules d'ADN en solution aqueuse, on estime que seules des conditions exceptionnelles permettent de préserver une information génétique au-delà de 50 à 100 mille ans. Seul le quaternaire récent peut donc être soumis à l'enquête paléogénétique, car les acides nucléiques sont soumis à toute une diversité de processus de dégradation. Par exemple, les tissus d'*Ötzi*, une momie fameuse de cinq mille ans retrouvée dans un glacier alpin, ne contiennent plus que l'équivalent de 10 à 20 génomes nucléaires par gramme de tissu, soit un million de fois moins que chez un organisme vivant. Bien qu'elles restent à l'état double brin, les traces d'ADN fossile (figure 19) sont excessivement fragmentées (100-200 pb); des bases nucléotidiques sont perdues par hydrolyse de liaisons N-glycosidiques et la nature chimique des bases restantes a pu être modifiée au cours du temps, par oxydation (8-oxo Guanine) et/ou par irradiation (photoproduits, 5-hydroxy 5-méthyl hydantoïne) [57]. L'ADN des fossiles est donc fragmenté, dégradé et chimiquement modifié, cette matrice n'est donc pas un substrat optimal pour la Taq polymérase (figure 19). Par exemple, l'existence de nicks sur les fragments anciens bloque l'élongation catalysée par la Taq polymérase. L'encombrement stérique lié à la présence de bases chimiques atypiques telles que les dimères de pyrimidines a le même effet. Mais puisque l'étape d'amplification des traces fossiles est indispensable compte tenu de la quantité d'ADN présent, il a fallu contourner un certain nombre de contraintes liées à des réactions de PCR réfractaires [58].

Une première difficulté peut venir de la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase, coextraits avec l'ADN. Ces inhibiteurs agissent en *trans*, puisque la simple dilution des produits d'extraction suffit généralement à abolir leur effet et que certains protocoles d'extraction réduisent leur copurification. On connaît peu de choses sur la nature de ces inhibiteurs, cependant, certains seraient des dérivés de constituants des tissus de l'organisme fossile, d'autres seraient des composants du sol (acides humiques, fulviques, tannins). Généralement, l'ajout de fortes concentrations en BSA (Bovine Serum Albumine) dans les réactifs de PCR (jusqu'à 1mg/ml) suffit à contenir ces effets inhibiteurs [58]. Une seconde difficulté provient de l'état particulièrement fragmenté de l'ADN fossile. Il arrive, lorsqu'on a un substrat dégradé, que le fragment amplifié soit d'une taille plus grande qu'attendue. En absence de contaminations, il

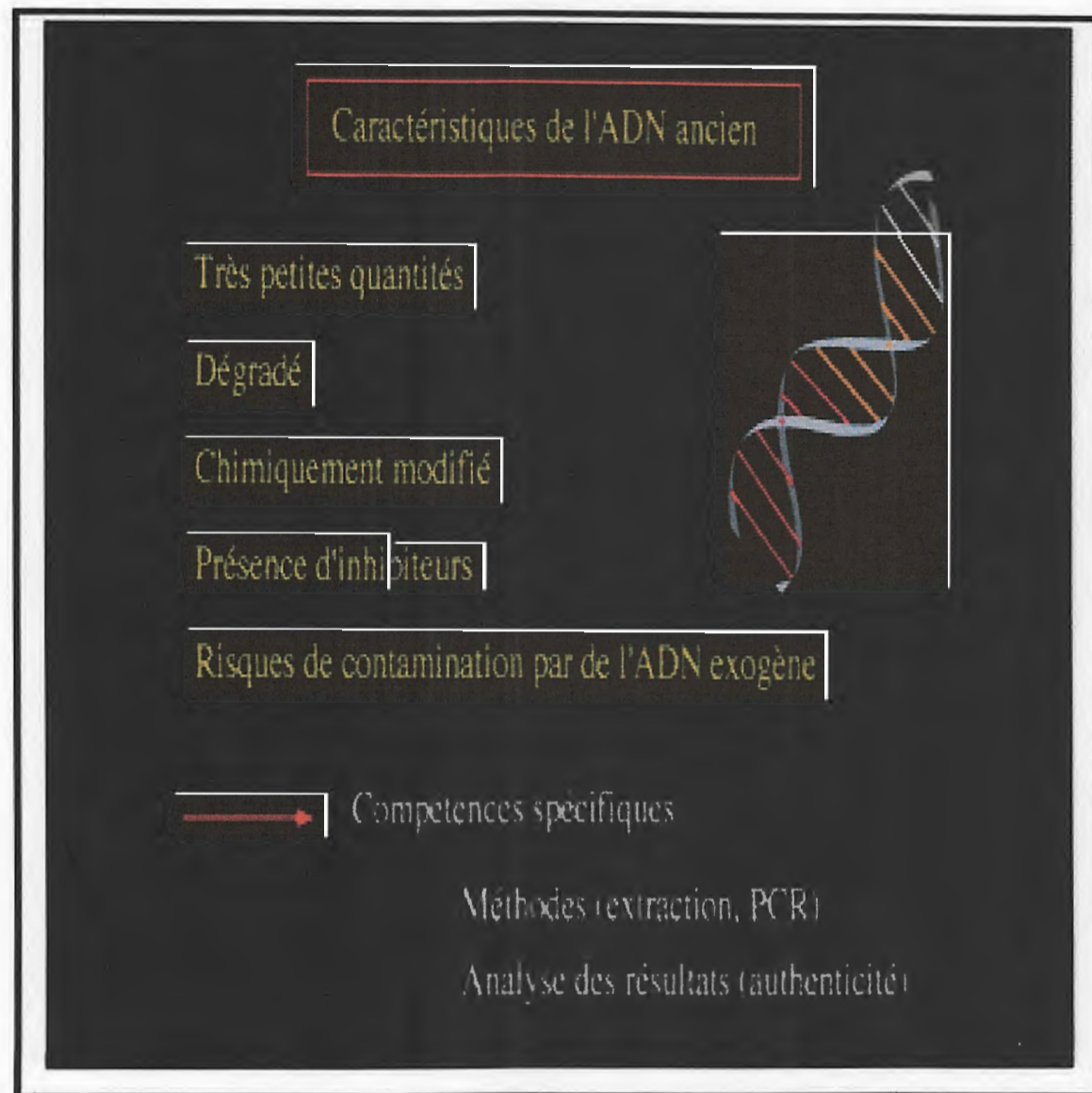


Figure 19. Caractéristiques de l'ADN ancien et conséquences.

s'agit d'amplicons chimères, produits lors des premiers cycles de PCR au cours desquels l'information présente en différents loci génétiques est recombinaisonnée aléatoirement [28].

L'ADN des fossiles n'étant présent qu'à l'état de traces dégradées, tout contaminant d'ADN moderne, est susceptible d'être préférentiellement amplifié au détriment de l'ADN ancien. Généralement, le choix d'amorces très spécifiques de l'espèce et du locus génétique à étudier permet de s'affranchir des contaminants. Cependant, si ce locus génétique est particulièrement conservé entre différents groupes, il n'est guère possible de recourir à des amorces d'amplification totalement spécifiques et, lorsqu'il s'agit d'hommes fossiles, il n'est point d'amorces qui s'affranchissent de la source principale de contamination, l'ADN des gens qui ont été au contact de l'échantillon. Dans ce cas, on établit alors le profil génétique de toute personne ayant été au contact avec le fossile, depuis les fouilles jusqu'au laboratoire, afin de remonter à tout événement de contamination éventuel [26].

Puisque la Taq polymérase ne possède aucun système de correction des erreurs d'élongation (DNA proofreading), tout mésappariement est conservé au cours de l'amplification. Si de telles erreurs sont peu fréquentes sur des substrats d'ADN moderne, elles sont toutes au contraire particulièrement générées lors de l'amplification des substrats anciens [25]. Les études de paléogénétique portant nécessairement sur des séquences courtes (100 à 200 pb), ont été développées pour contourner ces problèmes et authentifier les mutations observées. La première consiste à comparer les sites variables sur l'ADN à ceux d'espèces plus ou moins apparentées. Si un changement est observé au niveau d'un site très conservé, il est peu vraisemblable que la mutation amplifiée ait une réalité biologique. Ce raisonnement simple a permis de repérer que les deux mutations observées entre des segments du cytochrome oxydase du quagga et celui du zèbre des plaines étaient des artefacts puisque chez les Vertébrés les codons "mutés" du quagga étaient conservés du Xénope à l'Homme. Ces mutations faux-sens sont donc vraisemblablement post-mortelles du fait des modifications chimiques de l'ADN. Cependant, tous les marqueurs génétiques étudiés ne permettent pas d'aligner aussi fidèlement les séquences [53]. Une seconde méthode consiste alors à cloner systématiquement les produits d'amplification pour étudier la distribution des mutations dues aux erreurs de la Taq polymérase. La séquence majoritaire est ensuite retenue, car les mutations liées à l'activité de la polymérase sont aléatoires et qu'il est donc peu vraisemblable qu'elles affectent systématiquement les mêmes sites.

Les pulpes dentaires ont été mises à incuber à 50°C durant une nuit, dans 500µl de tampon Tris-HCL 10 mM pH 7.9 contenant de : EDTA 5mM, SDS 2%, acétate de sodium 0,3M, protéinase K 1mg/ml et 25 µl de protéinase K. Ensuite, un mélange 25/24/1 (V/V/V) de phénol/chloroforme/alcool isoamylique a été ajouté, suivie par centrifugée pendant 5 min à 3000 rpm, à température ambiante. L'ADN ancien contenu dans le surnageant, est purifié comme il est montré dans figure 20.

La PCR est réalisée dans volume finale de 10µl en plusieurs fois, en utilisant le thermocycleur T3 de BIOMETRA et le Kit AmpF-STR® Profiler Plus™ de Perking Elmer, selon recommandations du fabricant, seul le nombre de cycles a été modifié (37 cycles au lieu des 28). Après amplification, 2 µl de chaque réaction sont prélevés et analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 6%. Le premier puits du gel contient un marqueur de poids moléculaire qui permet d'estimer la taille des produits de PCR (tableau1). L'ADN est par la suite est séquencé afin de valider son identité, en utilisant le séquenceur d'ADN ABI Prism 373A d'Applied Biosystems [59].

V-3. Détection des OGMs dans les produits agroalimentaires

L'accumulation des connaissances scientifiques en Biologie Moléculaire, ont permis la création de première bactérie transgénique en 1973, du premier animale transgénique (souris) en 1981 et de la première plante transgénique en 1983. Une tomate transgénique présentant un retard dans sa maturation a été mise sur le marché aux États-Unis en 1994, alors que en l'Europe du maïs génétiquement modifié a vu le jour en 1997. Les récentes affaires de semences de soja, de colza et maïs, contaminées par des traces d'organisme génétiquement modifiés (OGM) [60].

Un OGM, organisme génétiquement modifié, est un organisme artificiel possédant un ou plusieurs caractères nouveaux suite à l'intégration de séquences génétiques particulières dans son génome. Tout être vivant génétiquement modifié ainsi que tout produit issu de ces êtres vivants sont dits OGM. Par exemple, la semence de soja modifié est un OGM, et le tourteau ou l'huile issue de sa transformation sont des produits dérivés d'OGM.

La détection d'un OGM dans des semences est très utile, car elles contiennent tous les éléments pour produire un organisme entier. Il est clair, en effet, que si un produit est transformé

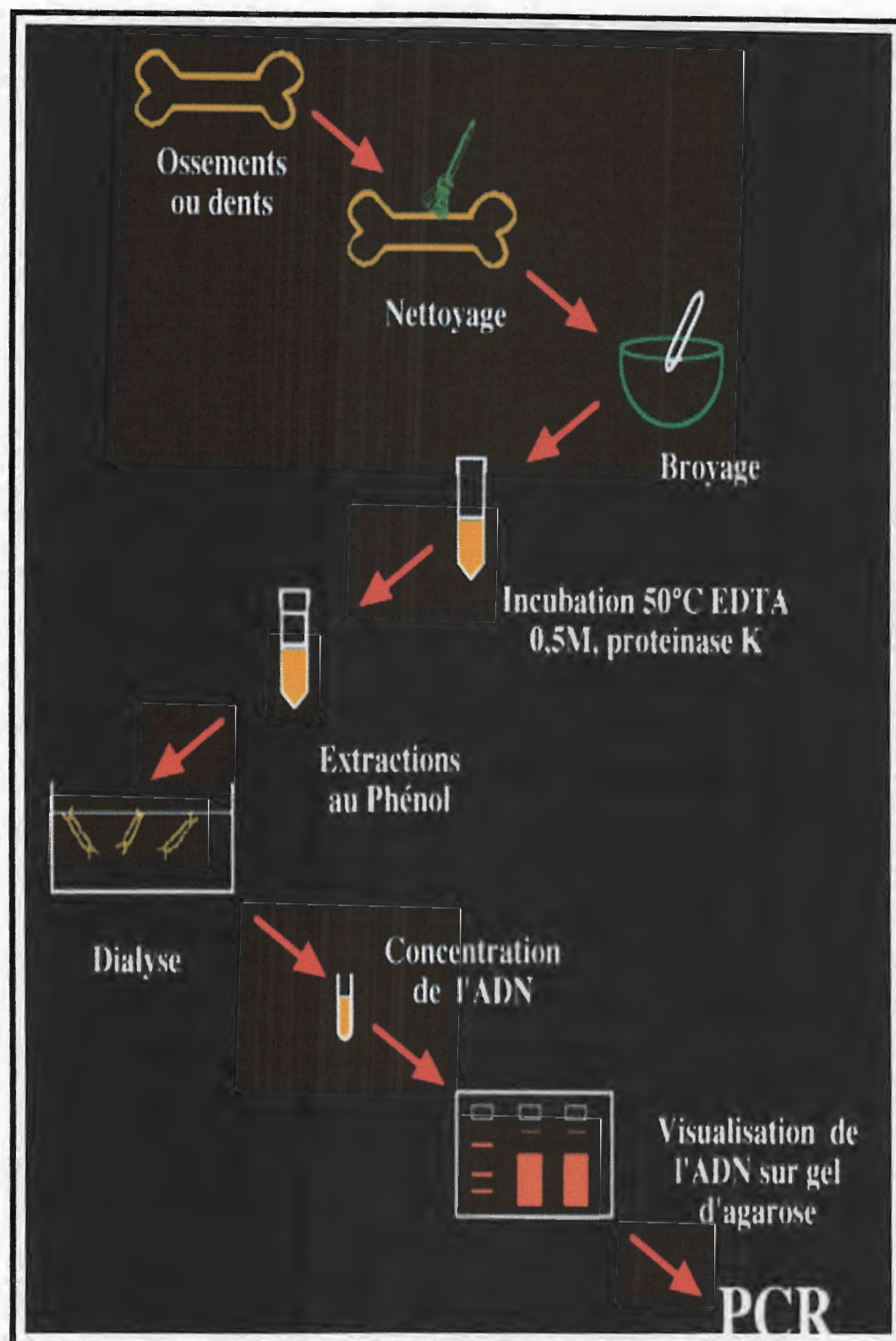


Figure 20. Principe de l'extraction puis de l'analyse d'un ADN ancien par PCR.

à partir d'une matière première génétiquement modifiée, celle-ci subira les mêmes modifications que toute autre matière première d'origine végétale. Le transgène intégré au génome d'un végétal sera donc soumis aux mêmes transformations que subissait tout l'ADN génomique [60].

Des variétés végétales issues du génie génétique sont aujourd'hui cultivées en Amérique et en Chine notamment. Les produits de récolte sont soumis aux voies normales de la filière agro-alimentaire pour la consommation en frais et la transformation, tant pour la consommation humaine que pour la consommation animale. Or, selon la réglementation sur les aliments nouveaux, ces produits devront être étiquetés, du moins tant qu'il ne pourra pas être admis que la transformation aboutit à un produit pur et exempt d'ADN [61]. La détection d'OGM ou de transgène dans les graines et les produits frais, est relativement simple, elle est basée sur l'utilisation de la PCR. Généralement, elle nécessite l'utilisation de l'ADN purifié [62], d'un couple d'amorces (oligonucléotides) qui permettent d'amplifier spécifiquement le fragment recherché et des standards de calibration (OGM témoins) pour faciliter l'interprétation des résultats (figure 21). Ces standards sont soit des extraits de semences, soit de l'ADN génomique ou plasmidique.

V-3.1. Tests qualitatifs

Ils sont fondés sur la capacité d'amplifier par PCR une séquence particulière d'une construction insérée dans un OGM. Selon les amorces utilisées, on peut [61]. Ils existent types de tests qui donnent différents résultats selon le but recherché. D'une part, ils indiquent simplement la présence d'OGM sans plus de précision. Ce type de tests utilise des amorces spécifiques des régions régulatrices P35S ou T qui variables entre les OGMs autorisés en Europe [63]. D'autre part, ils permettent d'identifier le type de construction présent dans l'OGM par l'amplification d'une partie de son transgène qui peut être identique dans des OGMs différents. Enfin, ils permettent d'identifier précisément l'OGM par amplification des fragments de bordure encore plus spécifiques que celles du transgène. A présent, seuls les laboratoires officiels disposent d'amorces de bordure pour quelques OGM. La modification de la directive 90/220 améliore les procédures de mise à disposition par les firmes de Biotechnologie de ces amorces de bordure ainsi que les standards nécessaires à l'analyse. Par ailleurs, un important programme européen a été mis en place pour développer des tests quantitatifs basés sur les fragments de bordure. Enfin. Il est utile de remarquer que la vérification de la présence d'un OGM non autorisé suppose la connaissance préalable de ses caractéristiques, la disponibilité d'amorces

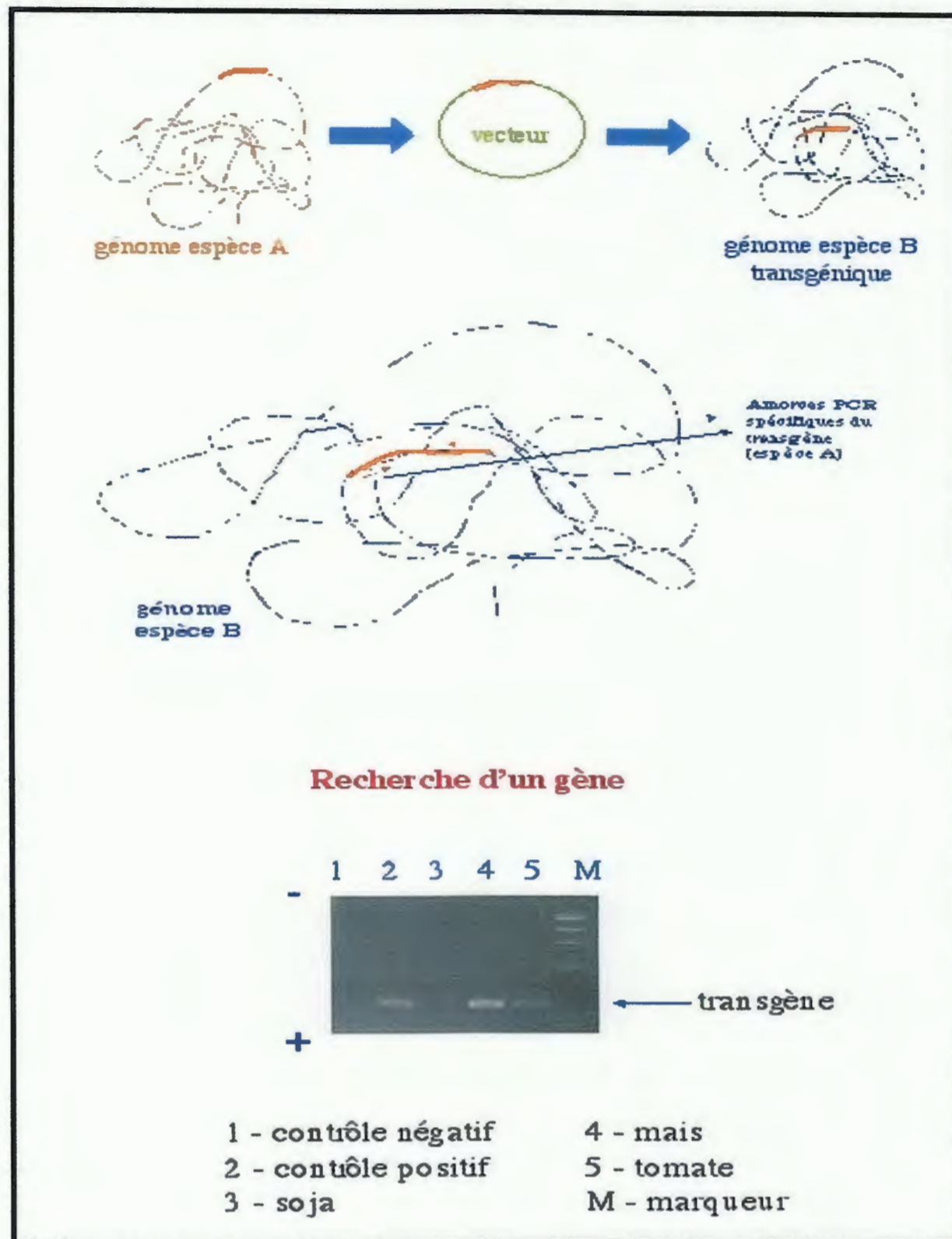


Figure 21. Détection des OGM par PCR.

spécifiques ainsi que d'un standard. Un répertoire international des outils analytiques est en cours d'élaboration et qui sera très utile pour effectuer ce type de recherche.

V-3.2. Tests quantitatifs

Ils permettent de déterminer le pourcentage d'un OGM présent dans un échantillon en estimant la quantité d'ADN cible par PCR et en la comparant avec une gamme étalon [64]. Le pourcentage d'un OGM dans un produit fini est défini par rapport à chaque espèce végétale. La détermination de la teneur en OGM d'une matrice se fait en deux étapes. La première vise à connaître le nombre de copies d'une cible d'ADN spécifique de l'espèce végétale. Cela suppose de disposer d'un certain nombre de variétés représentatives de la diversité mondiale de l'espèce considérée, afin de vérifier la conservation des séquences cibles et de leur nombre de copies. La seconde vise à déterminer pour le même échantillon le nombre de copies d'une cible d'ADN spécifiques du ou des OGMs de cette espèce présente. Les amorces utilisées pour le criblage (P35S) ne peuvent être utilisées pour la quantification que dans les produits purs c'est à dire contenant une seule espèce végétale et même un seul OGM car, par exemple, le nombre de copies P35S dans les différents OGMs issus du maïs n'est pas le même. Les amorces spécifiques de l'insert peuvent être utilisées en PCR quantitative dans un mélange tant qu'un autre OGM avec les mêmes séquences internes n'est pas autorisé au sein de l'UE. Seuls des tests basés sur les fragments de bordure permettent la quantification exacte dans les produits mixtes, pourvu que les OGM ne résultent pas d'un empilage de gène (gène stacking), c'est-à-dire d'un croisement entre deux OGMs préalablement autorisés.

Le rapport du nombre de copies d'OGM d'une même espèce végétale sur le nombre de copies spécifiques de l'espèce donne la teneur en OGM par espèce. La variabilité finale de la détection sera donc fonction de celle de chacun des tests PCR qui doivent avoir été optimisés. Pour déterminer le nombre de copies d'OGM d'une espèce végétale et le nombre de copies génome de cette même espèce, deux approches peuvent être envisagées.

L'utilisation des différents types de PCR en "point final" pour détecter les OGMs est basée sur la mesure des quantités d'amplicons par analyse d'images après une électrophorèse en gel d'agarose en présence d'agents intercalant de l'ADN ou après électrophorèse sur capillaire. La méthode de PCR compétitive a aussi été utilisée [64], mais a été progressivement remplacée par

les PCR quantitatives en temps réel, elle est encore utilisée pour savoir si la teneur en OGM est au-dessus ou en dessous d'un certain seuil. Les différents types de PCR quantitative dites en "temps réel" mesurent en continu les quantités d'amplicons pendant la PCR [47]. La mesure de l'accroissement du nombre d'amplicons est assurée par la mesure de la fluorescence libérée par leur synthèse grâce à l'utilisation d'une sonde interne à l'amplicon ou par l'utilisation d'un agent liant à l'ADN de l'amplicon. Cette méthode sensible et spécifique nécessite l'utilisation d'un appareil coûteux, néanmoins, elle est de plus en plus utilisée pour la quantification du pourcentage en OGM dans divers échantillons. Cependant, deux problèmes subsistent, d'une part, la difficulté d'obtention de l'ADN purifié en quantité et en taille suffisante à partir de ces produits transformés, afin de s'assurer que le transgène puisse être amplifiable, et avoir les informations nécessaires pour pouvoir l'amplifier d'autre part.

V-4. Détection de mutations héréditaires

Les mutations sont des accidents de copie des bases puriques ou pyrimidiques se produisant le plus souvent au cours de la réplication d'ADN. L'ADN nouvellement synthétisé n'est plus alors l'exacte réplique d'ADN parental. Des mutations sont à l'origine des cancers ou des dysfonctionnements héréditaires. Connaître la nature des mutations chez un patient est crucial aussi bien pour le diagnostic que pour la thérapie à envisager et la PCR s'est avérée être un outil irremplaçable pour cribler des gènes particuliers afin d'y détecter des mutations spécifiques.

V-4.1. Mutations du gène CFTR (Mucoviscidose)

La mucoviscidose est l'une des maladies héréditaires récessives autosomiques, elle est due à l'absence ou à un défaut fonctionnel d'un canal chlore nommé CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). Ce canal chlore, situé à la surface apicale des cellules tapissant les épithéliums est responsable de la sortie de l'ion chlorure de la cellule épithéliale et donc de l'équilibre ionique entre ces épithéliums et le milieu extérieur. Le CFTR est présent dans les cellules épithéliales glandulaires des canaux pancréatiques, biliaires, des cryptes intestinales, de l'arbre trachéo-bronchique, des tubules rénaux, de l'appareil génital et des glandes sudoripares. Le gène impliqué dans la mucoviscidose, appelé CFTR code pour la protéine CFTR, est constitué de 27 exons et 70% des porteurs du gène muté portent la même mutation, une délétion de trois paires de bases dans l'exon 10 (figure 22), ce qui conduit à la perte d'un acide aminé, Phénylalanine. A côté de cette mutation fréquente (Δ -F508), il existe plus de 1000 autres

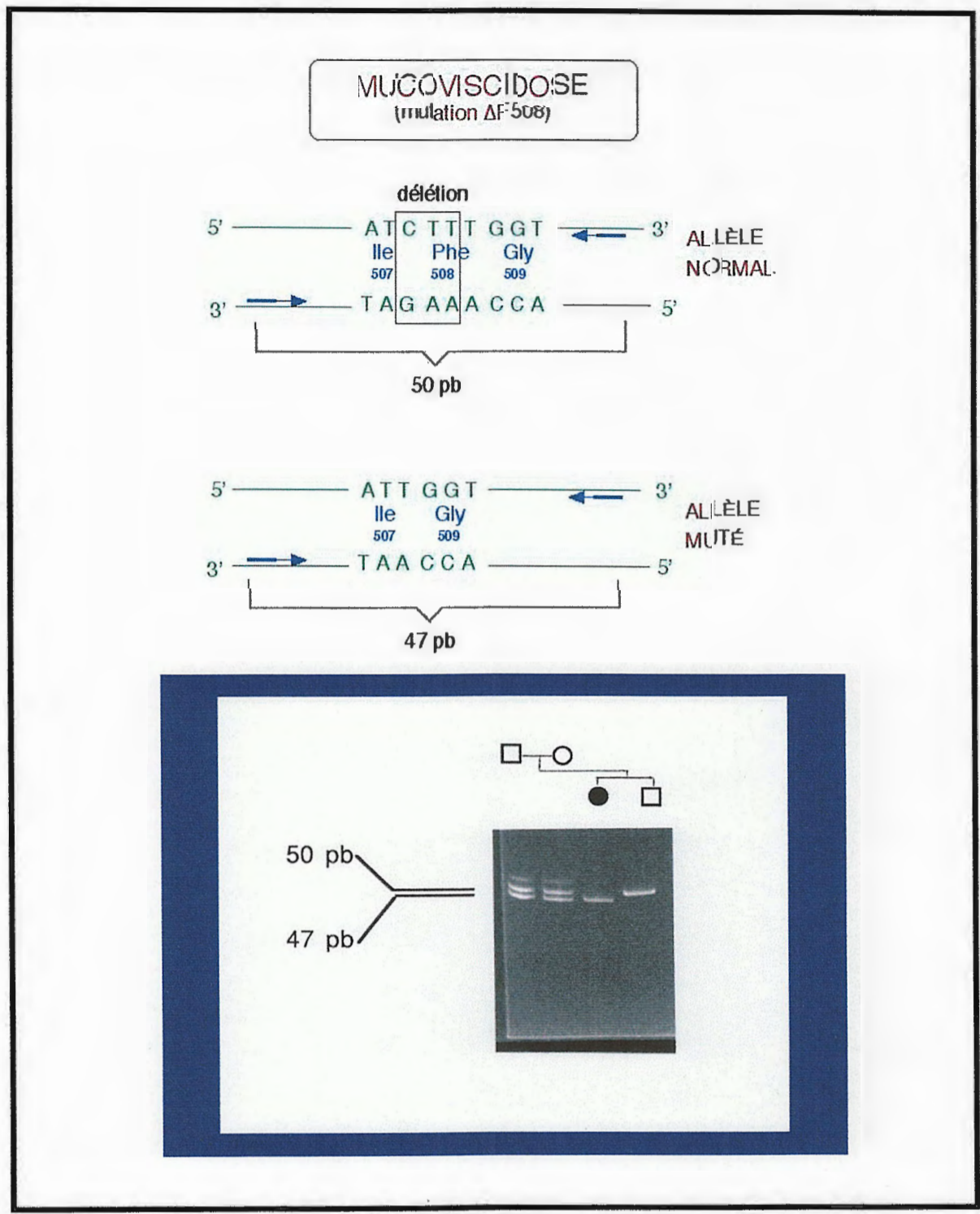


Figure 22. Détection de la mutation $\Delta F 508$ de mucoviscidose par PCR.

mutations pathogènes toutes assez rares, parfois retrouvées dans une seule famille dans le monde. Il existe également un grand nombre de séquences alléliques polymorphes sans conséquences pathologiques [65].

Le diagnostic moléculaire de la mucoviscidose est rendu difficile par la taille du gène (180 000 paires de bases dont 6500 de séquence codante), le nombre important d'exons et le nombre important de mutations. En effet, nous avons vu que la PCR permet d'amplifier des fragments d'ADN de petites tailles (quelques kilobases); il est donc nécessaire d'amplifier séparément chaque exon avant de l'analyser. La mutation Δ -F508 étant la plus fréquente des mutations, c'est celle-ci qui sera recherchée en première intention [66]. L'ADN du patient est extrait à partir d'un prélèvement de sang veineux ou de cellules trophoblastiques ou amniotiques dans le cas du diagnostic prénatal. La séquence du gène CFTR étant connue, il est possible de synthétiser deux amorces oligonucléotidiques de part et d'autre de la région de l'exon 10 où se trouve potentiellement la mutation Δ -F508, et une réaction de PCR permet l'amplification de cette région, que celle-ci soit normale ou mutée (figure 22). La distinction entre les trois génotypes possibles (N/N, Δ -F/N ou Δ -F/ Δ -F) peut être obtenue par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et visualisation des produits de PCR aux U.V.

Il existe dans l'exon 11 du gène CFTR une mutation relativement fréquente appelée G542 due à une substitution de la base G par T et conduisant à un arrêt de traduction (figure 23). Son diagnostic fait appel à la technique ASOH ou 'Allele Specific Oligonucleotide hybridation' qui consiste à détecter la présence ou l'absence d'une mutation ponctuelle en réalisant l'hybridation moléculaire entre la séquence à tester et deux sondes spécifiques, l'une de l'allèle normal et l'autre de l'allèle muté (figure 23). Si la sonde est suffisamment courte (20 nucléotides en général), elle ne pourra s'hybrider à la séquence du patient à tester que si celle-ci lui est parfaitement complémentaire. Ainsi, la sonde normale s'hybridera sur l'allèle normal mais pas sur l'allèle muté et la sonde mutée s'hybridera sur l'allèle muté mais pas sur l'allèle normal. L'hybridation par chacune des deux sondes permet donc de déterminer sans aucune ambiguïté le génotype du patient pour cette mutation au niveau du locus. Ces sondes sont marquées avec un traceur radioactif (P^{32}) ou chimioluminescent, afin de rendre repérable les hybrides par autoradiographie. En pratique, l'ADN du patient est amplifié par PCR au niveau de la région d'intérêt (exon 11 du gène CFTR); le produit de PCR est dénaturé, puis déposé en tâche (dot) sur une membrane de nylon. Après une étape dite de préhybridation au cours de laquelle la

membrane contenant l'ADN est mise dans les conditions de température, de PH et de salinité nécessaires à l'hybridation, celle-ci est réalisée en mettant en contact l'ADN et l'une des sondes. Lorsqu'une molécule d'ADN sonde rencontre sa cible (produit de PCR), la complémentarité des séquences permet la réassociation des deux molécules en une molécule double brin. Après une étape de lavages destinés à éliminer les molécules de sondes marquées qui ne se sont pas hybridées, la membrane est soumise à une autoradiographie qui va permettre la visualisation des taches où a eu lieu l'hybridation [66].

V-4.2. Mutation de la Drépanocytose

La drépanocytose, une anémie falciforme, est une maladie héréditaire récessive autosomique rare. La maladie est un syndrome hémolytique dû à un défaut de la chaîne β de l'hémoglobine. Elle se caractérise par une tendance des globules rouges à prendre une forme anormale en faucille lorsque la pression d'oxygène est basse. La destruction des globules rouges conduit à des anémies, des jaunisses, et des infarctus de différents tissus (osseux, pulmonaire...). La drépanocytose est due à une mutation ponctuelle au niveau du sixième codon du gène codant pour la chaîne β de l'hémoglobine; il s'agit d'une substitution A \rightarrow T changeant un acide aminé Glutamine (GAG) en Valine (GTG). Cette mutation conduit à la suppression d'un site de l'enzyme de restriction Bsu I, il est donc possible de mettre en évidence sa présence ou son absence par l'utilisation de cette enzyme [67].

En pratique, la région contenant ce site de restriction est amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique du patient à tester. Le produit de PCR est ensuite mis en présence de l'enzyme Bsu I. Le produit de digestion est finalement déposé sur un gel d'électrophorèse afin de séparer les fragments selon leurs tailles. Dans le cas où la mutation est présente (allèle BS), le site de restriction est supprimé et le fragment d'ADN est donc plus long comme la montre la figure 24. Un second site de restriction Bsu I, constant, sert de contrôle de digestion, l'absence du fragment C ou la présence d'un fragment de taille inattendue signifie que l'enzyme n'a pas fonctionné ou a fonctionné incomplètement, ce qui évidemment peut fausser le résultat du diagnostic [68].

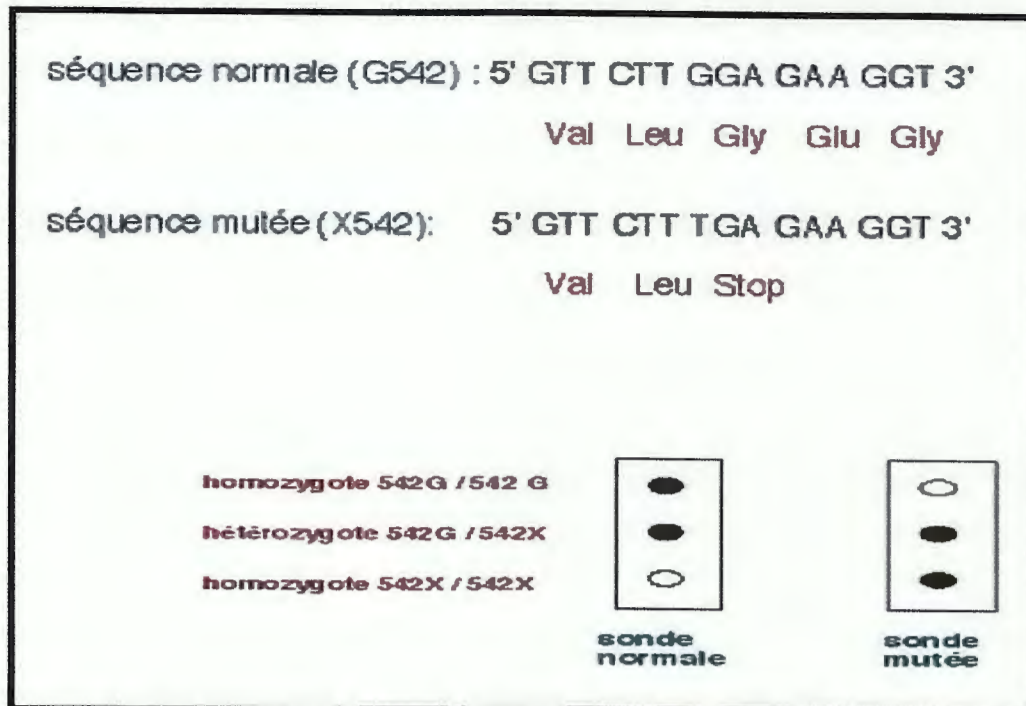


Figure 23. Détection de la mutation G542 de la mucoviscidose par PCR.

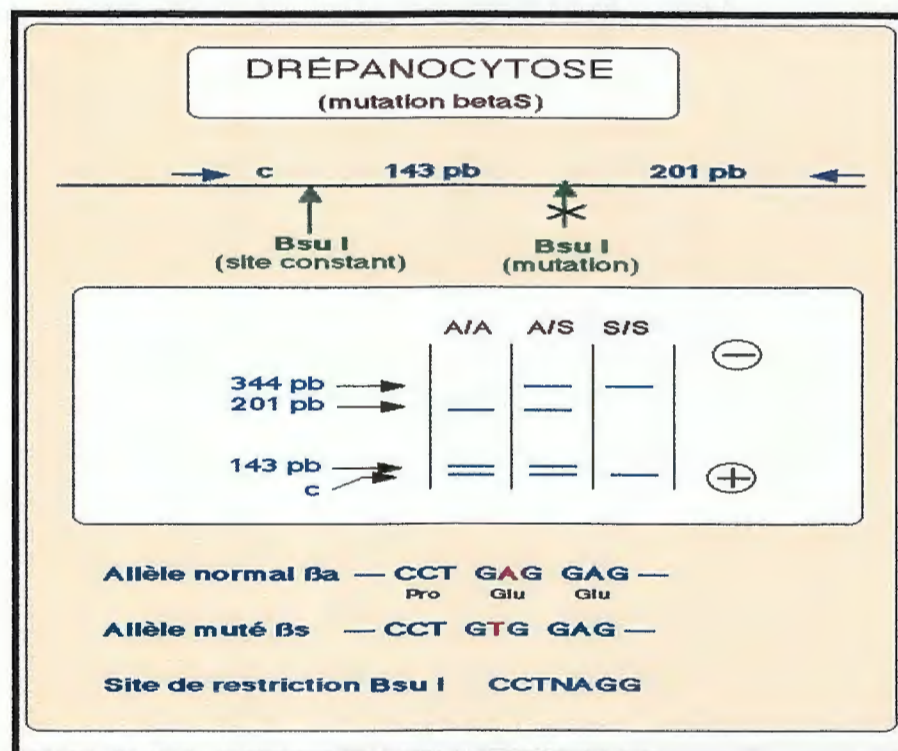


Figure 24. Détection de la mutation beta S de la drépanocytose par PCR.

V-4. 3. Mutations du gène HFE (Hémochromatose)

L'hémochromatose est la plus fréquente des maladies héréditaires puisqu'elle toucherait 0,3 à 0,4% des populations caucasiennes. L'hémochromatose, caractérisée par une hyperabsorption intestinale du fer, est une maladie d'apparition tardive [69]. La découverte des gènes HFE en 1996 et la mise en place d'un teste génétique simple ont considérablement bouleversé le diagnostic de cette maladie.

Le diagnostic moléculaire des mutations identifiées du gène HFE1 basé sur la PCR de restriction. La recherche de la mutation C282Y, localisée dans l'exon 4 du gène HFE et qui responsable de l'apparition d'un site de restriction Ras1. Une séquence de l'exon 4 recouvrant le site de la mutation est amplifiée par PCR à l'aide d'amorces situées de part et d'autre de cette région d'intérêt. L'amplimère correspondant à l'allèle normal (387 pb) présente un site de restriction unique pour l'enzyme de restriction Ras1 en position 247; l'allèle muté présente un site Ras1 supplémentaire. Après PCR, l'amplimère généré est soumis à l'action de Ras1 et l'analyse du profil de restriction après migration électrophorétique permet de définir le génotype de sujet.

La recherche de la mutation H63D, localisée dans l'exon 2 gène HFE, abolit un site de restriction pour l'enzyme Mbo1. Une séquence génomique de 208 pb recouvrant le site de la mutation est amplifiée par PCR et soumise à digestion par l'enzyme Mbo1. Un allèle normal donnera 2 fragments de 138 et 70 pb, alors que l'allèle muté aura la même taille que l'amplimère, soit 208 pb [70].

V-4.4. Mutations β -Thalassémiques

Les thalassémies sont des maladies liées à la synthèse anormale des chaînes de globine, elles sont dues à des mutations ponctuelles ou des délétions qui sont responsables d'anomalies de la transcription, de l'épissage des ARNm, de leur stabilité et de leur traduction. Les β -thalassémies sont caractérisées par un taux bas ou une absence totale de β -globine et plus de 50 mutations différentes ont été mises en évidence [71]. Le diagnostic moléculaire des β -thalassémies repose sur la recherche de mutations connues si le patient appartient à une zone géographique dans laquelle il est possible avec peu de mutations d'avoir une couverture suffisante (supérieure à 85-90 %) telle que l'Asie du Sud-Est [72].

Un certain nombre de tests de dépistage dédiés à un groupe de "mutations régionales" sont disponibles commercialement et sont fondés sur des techniques de PCR multiplexe, en utilisant des sondes oligonucléotidiques correspondant aux mutants présents dans la population et immobilisés sur une membrane.

Les mutations ponctuelles sont la cause la plus fréquente des β -thalassémies, cependant, il existe un certain nombre de cas dans lesquels il s'agit d'une délétion plus au moins grande du gène β -globine ou des gènes β et δ globine ou des gènes γ , δ et β . Le diagnostic de ces anomalies peut se faire par PCR si les bornes de la délétion sont suffisamment constantes pour qu'il soit possible de définir des couples d'amorces aux bordures des points de cassure ou bien par Southern blot.

V-4.5. Mutation du gène FMR1 (Syndrome de l' X fragile)

Le syndrome de l'X fragile est la cause la plus fréquente des retards mentaux héréditaires, après la trisomie 21, sa fréquence est de 1 garçon sur 4000 et 1 fille sur 7000. La maladie se caractérise par un retard mental, une dysmorphie faciale et une micro-orchidie chez le garçon pubère. À l'âge adulte, les patients peuvent avoir une activité professionnelle manuelle à condition d'être pris en charge par le milieu familial ou des structures adaptées. Le syndrome de l'X fragile se caractérise par une transmission dominante à pénétrance incomplète. Les mutations responsables du syndrome de l'X fragile est une amplification d'une séquence répétée de triplets CGG située dans la séquence 5' UTR du premier exon du gène FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) [73].

La plupart des laboratoires ont aussi développé une méthode utilisant la PCR afin de mesurer précisément sur un gel d'électrophorèse la taille des petites permutations, paramètre important dans la prédiction de la stabilité de la séquence (CGG) $_n$. La PCR constitue donc un outil complémentaire appréciable, mais qui ne peut remplacer complètement la technique de Southern Blot, notamment chez les filles. Dans le cas de ces dernières, on ne peut pas distinguer un allèle normal présent à l'état homozygote d'un allèle normal associé à un allèle muté non amplifiable par PCR. La PCR permet de reconnaître rapidement tous les garçons non atteints et 65 % des filles non atteintes [74]. Les produits de PCR sont marqués à l'aide d'un fluorochrome détectable par sa fluorescence émise lorsqu'il est excité par laser pendant leur passage devant la

fenêtre d'émission, en bas du gel d'électrophorèse d'un séquenceur automatique. La comigration de standards de poids moléculaire permet de déterminer la taille des produits de PCR et donc d'identifier les allèles.

V-4.6. Myopathies de Duchenne et de Becker

Les myopathies de Duchenne et de Bercker sont transmises selon un mode récessif lié au chromosome X. Cette maladie est la plus grave des myopathies, la prévalence à la naissance est d'environ 1 pour 3500 nouveau-nés de sexe masculin. La maladie a été individualisée par le Dr Guillaume Duchenne en 1860, elle est caractérisée par un léger retard dans l'apparition de la marche et les chutes sont fréquentes. Le gène de la dystrophine localisé sur le bras court du chromosome X en Xp21 contient 79 exons et code pour un transcrit musculaire principal de 14 kb. Le produit principal du gène, la dystrophine, a un poids moléculaire de 427 kDa et présente plusieurs promoteurs ayant des spécificités tissulaires différentes (lymphoblaste, cerveau, cervelet, rétine, rein, système nerveux périphérique) qui produisent des transcrits et des protéines de tailles et de fonctions différentes encore mal caractérisées [75].

Les méthodes génétiques telles que l'analyse de liaison dit RFLP sont très utiles pour diagnostiquer la DMD (Dystrophie Musculaire de Duchenne), mais les crossing-over sont la cause d'erreurs de diagnostic. La méthode la plus sûre de diagnostic basé sur l'ADN est la détermination physique de la mutation. La puissance du diagnostic par l'analyse directe de mutations chez les individus à risque est devenue évidente dans le cas de la DMD, avec l'apparition de sondes d'ADNc spécifiques [76]. Il est possible de tester les exons du gène pour des délétions ou d'autres anomalies en coupant l'ADN génomique avec une enzyme qui ne coupe pas dans les exons et en hybridant avec une sonde d'ADNc marquée. Alors que les premières sondes génomiques pour le gène DMD ne détectaient des mutations que chez 10% des patients seulement, 70% des patients DMD ont des délétions ou des duplications qui peuvent être décelées avec des sondes d'ADNc. Ces modifications structurales peuvent être facilement reconnues dans l'ADN d'un fœtus à risque, et la quantification précise des autoradiographies peut révéler la présence d'une moitié de la quantité normale d'exons chez une mère porteuse. Ces délétions sont désormais détectées grâce à la PCR multiplex [77]. Cette seule PCR permet de détecter jusqu'à 80% des patients portant une délétion du gène de la dystrophine. Ces réactions multiples ont également été réalisées avec le système de coloration. Dans ce cas, plusieurs régions du gène sont amplifiées et examinées simultanément. Les amorces utilisées sont choisies

de telle sorte que les différents produits d'amplification obtenus au sein d'une seule réaction aient des tailles différentes et soient donc facilement individualisés. Ainsi, en quatre réactions d'amplification multiplex, 44 exons peuvent être rapidement étudiés.

Environ un tiers des mutations responsables des myopathies de Duchenne et de Becker sont associés à des mutations qui conduisant presque toutes à des protéines tronquées, leur recherche peut être réalisée par un test particulièrement adapté au contexte mutationnel, le test PTT ou "Protein Truncation Test". Ainsi, en combinant une RT-PCR et un système de transcription/traduction *in vitro*, il est possible de valider des produits protéiques de taille anormale. Différents protocoles et couples d'amorces ont été rapportés, en général, il faut environ 10 réactions *in vitro* pour tester la conformité de toute la séquence codante du gène.

V-5. Détection de mutations cancérogènes

Le cancer est une maladie génétique complexe, et il n'est donc pas surprenant que les techniques de l'ADN recombinant sont employés pour son diagnostic. Actuellement, le dépistage de tumeurs repose sur leurs caractéristiques histologiques. Par exemple, des mutations de l'oncogène RAS ont été mises en évidence dans beaucoup de cancers humains. La PCR a été utilisée pour analyser le profil et la fréquence d'apparition de ces mutations dans les gènes RAS humains. Il a été possible, grâce à cette technique de cribler rapidement des échantillons provenant d'un grand nombre de patients et ainsi mettre en évidence diverses mutations du gène RAS dans différents lymphomes à caractère malin [78].

L'analyse génétique a des applications importantes pour un type de cancer de l'œil chez l'enfant, le rétinoblastome. La mutation qui en est responsable affecte un gène situé en position q14 du chromosome 13. Il existe une forme génétiquement transmissible de rétinoblastome dans laquelle une mutation affecte l'un des deux allèles du gène responsable de cette infection dans la lignée germinale. Ceci est maintenant possible en utilisant les techniques de PCR et de séquençage pour analyser les mutations dans les tissus normaux et cancéreux d'un individu souffrant de la maladie. L'amplification génique par la PCR de l'ADN a permis de détecter des mutations ponctuelles dans le gène du rétinoblastome et de suivre l'évolution de patients atteints de leucémies impliquant des translocations chromosomiques et ayant été traités [79].

L'amplification par la PCR est utilisée pour suivre des thérapies anti-cancéreuses, la possibilité de déceler des lésions génétiques caractéristiques de cellules tumorales est un outil de toute première importance pour les oncologistes qui essayent de déterminer si un patient traité pour une leucémie s'est bien débarrassé de toutes ses cellules malignes. En effet, le médecin décide d'interrompre le traitement à base de médicaments cytotoxiques ou par irradiation aussitôt que la tumeur est détruite et, au contraire, le reprendre au moindre signe de rechute. Certains cancers proviennent de translocations chromosomiques bien caractérisées. Par exemple, on a décelé une translocation entre les chromosomes 14 et 18 dans des lymphomes folliculaires (figure 25). En se servant de ces mutations comme marqueurs, il est possible de détecter la présence de cellules cancéreuses par une simple expérience de transfert de type Southern. Donc, un patient jugé sain peut malgré tout encore posséder un nombre significatif de cellules cancéreuses [80]. L'oncologue dispose d'un diagnostic beaucoup plus sensible grâce à la PCR, qui permet de déceler une seule cellule cancéreuse parmi un million de cellules saines, les deux amorces utilisées pour la PCR sont choisies de telle façon qu'elles correspondent chacune à une séquence adjacente au point de rupture des deux chromosomes. C'est donc uniquement dans les cellules ayant subi une translocation que la séquence située entre les amorces peut être amplifiée [81]. Une stratégie similaire a été mise au point pour détecter des leucémies en utilisant de l'ARNm comme matériel de départ. Comme la cellule contient beaucoup de copies d'ARNm correspondant à un gène donné, cette méthode a l'avantage de démarrer avec un matériel déjà amplifié par rapport à l'ADN génomique [82].

V-6. Diagnostic de maladies virales : exemple du SIDA

Les maladies virales sont connus depuis des milliers d'années puisque les caractères cliniques de la variole avaient été décrits par les chinois au environ l'année 2500 avant J-C. Au XX^e siècle, des progrès considérable ont été réalisés dans le domaine de la connaissance des virus et des infections virales permettant, il y a quelques dizaines d'années, d'envisager le diagnostic de ces infections ou, dans un sens plus large, d'effectuer des analyses de virologie médicale.

Le VIH possède un génome d'ARN qui est répliqué en passant par un intermédiaire d'ADN lorsque le virus a pénétré dans la cellule cible. C'est donc un rétrovirus qui a un cycle de vie semblable à celui des virus tumoraux. Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une grave maladie des cellules du système de défense immunitaire qui a comme conséquence,



Figure 25. Détection de cellules cancéreuses par PCR : lymphomes folliculaires.

chez l'homme, l'apparition d'une grande variété de manifestations cliniques telles que les infections opportunistes, diverses tumeurs malignes, troubles neurologiques. L'agent responsable du SIDA est un rétrovirus, virus à ARN, le virus d'immunodéficience humain ou HIV.

La méthode classique de détection de l'infection HIV est fondée sur la recherche, dans le sérum des sujets examinés, d'anticorps circulants dirigés contre les virus. Les antigènes utilisés dans cette analyse sont des protéines virales recombinantes et/ou synthétiques qui forment avec les anticorps du patient un complexe identifiable par une technique biochimique. En complément de cette méthode indirecte et souvent qualitative, les techniques d'amplification des acides nucléiques par PCR dosent directement l'ARNm virale et ne requièrent pas le développement d'une réponse immunitaire dirigée contre le VIH qui prend parfois plusieurs semaines et que cette méthode n'est pas très sensible [83].

Pour détecter de VIH, les amorces utilisées pour la PCR correspondent à des séquences virales et le test est fait sur de l'ADN extrait de cellules sanguines. Cette approche permet de détecter le virus intégré sous forme d'ADN dans le génome des cellules infectées. On estime que la présence d'ARN viral est le signe d'une entrée en activité du virus. Ce diagnostic peut être fait par PCR en utilisant des matrices d'ADNc obtenues par transcription inverse de l'ARN extrait de cellules infectées, la PCR étendue est particulièrement utilisée pour le diagnostic de VIH [84].

V-7. Diagnostic de maladies bactériennes : exemple du Tuberculose

La bactériologie clinique est l'étude des germes responsables d'infections chez l'homme. Ces infections peuvent être de nature diverse, respiratoire, digestive, urinaire, génitale, etc. La recherche des germes responsables de l'infection nécessite une démarche en plusieurs étapes, allant de l'isolement de la bactérie dans les produits pathologiques à l'identification de l'espèce bactérienne. Les méthodes de Biologie Moléculaire permettent dans certains cas des identifications plus rapides et plus précises. La recherche quantitative ou qualitative des acides nucléiques bactériens (ADN et ARN) directement dans le prélèvement clinique peut être effectuée. Cependant, pour les germes à croissance rapide, ce mode de détection reste limité à quelques laboratoires spécialisés.

La tuberculose est une maladie très répandue à l'échelle mondiale avec environ 10 millions de nouveaux cas par an. Sa forme pulmonaire est la plus fréquente et tue plus de personnes dans le monde que toutes les pathologies infectieuses microbiennes. Depuis de nombreuses années, le seul test rapide pour le diagnostic bactériologique de tuberculose a été l'examen microscopique des crachats par coloration de Ziehl-Neelsen. Sa spécificité est bonne, proche de 95%, mais sa sensibilité est faible (40- 60%), car les bacilles sont émis de façon intermittente ce qui rend indispensable la répétition des prélèvements. Lors d'un examen microscopique positif ou négatif, le diagnostic de certitude repose sur l'isolement en culture des mycobactéries à partir de prélèvements biologiques (crachats, tubages gastriques, urine, etc.) sur des milieux spéciaux. La sensibilité et la spécificité des cultures sont élevées. Le problème principal vient du délai de positivité des cultures qui varie selon la quantité de germes trouvés lors de l'examen direct entre 3 et 50 jours.

L'ADN mycobactérien est directement recherché dans le prélèvement respiratoire par PCR. Plusieurs trousseaux sont commercialisés en France, la sensibilité de cette méthode est fortement influencée par la richesse bacillaire du prélèvement. En terme de sensibilité, la détection de *M. tuberculosis* au sein des prélèvements reste moins performante que dans une culture cellulaire. Pour ces raisons, la place de la Biologie Moléculaire dans le diagnostic de tuberculose est encore un sujet de controverse [85].

La tuberculose est causée par une bactérie, *Mycobacterium tuberculosis*. Son diagnostic est difficile car les échantillons à analyser ne permettent pas toujours un diagnostic histologique. En fait, l'agent pathogène doit être mis en évidence après une culture et des tests de sensibilité aux antibiotiques, ce qui nécessite plusieurs semaines. C'est clairement une situation pour laquelle la PCR pourrait être d'un grand secours. Une expérience pilote d'amplification par la PCR a été réalisée, en utilisant des amorces correspondant à des séquences situées dans un gène hautement conservé dans toutes les espèces de mycobactéries. Le fragment d'ADN amplifié a ensuite été hybridé avec des sondes spécifiques de chaque espèce afin d'identifier celle qui était responsable de l'infection. Ce diagnostic basé sur la PCR s'est révélé être beaucoup plus rapide et beaucoup plus sensible que les tests conventionnels; le seuil de détection est de 10 bacilles par million de cellules eucaryotiques. Il est donc clair que des méthodes basées sur la PCR vont rapidement être développées à des fins de diagnostic en Microbiologie Clinique [86].

V-8. Etude de liaisons génétiques

L'analyse de la recombinaison entre gènes à la méiose est la méthode classique pour cartographier des gènes. La cartographie de gènes humains est très difficile, car les études de liaison génétique doivent être effectuées au sein de familles où le processus de reproduction ne peut être contrôlé et où la descendance est peu nombreuse. L'analyse par PCR des allèles portés par les spermatozoïdes offre la possibilité d'étudier les liaisons génétiques sur des cellules isolées. Un chromosome contenu dans un spermatozoïde est le produit d'une seule méiose, donc en examinant les loci deux par deux et en déterminant la fréquence de recombinaison entre eux, il devrait être possible de calculer la distances génétique entre ces deux loci. Pour les généticiens, examiner 1000 spermatozoïdes revient à étudier une famille qui aurait 1000 enfants. Cette estimation des distances génétiques concerne les chromosomes mâles et c'est un point qu'il faut noter lorsque l'on sait que, pour certains gènes, la fréquence de recombinaison varie selon que l'on a affaire à des méioses mâles ou femelles [87].

Une expérience préliminaire destinée à juger de la faisabilité de cette méthode a été faite sur des loci pour lesquels on connaissait déjà le taux de recombinaison (figure 26). Les loci choisis, celui de l'hormone parathyroïdienne (PTH) et celui de la globine (HBG2) sont situés, chez l'homme, sur le bras court du chromosome 11 et ont une fréquence de recombinaison, déterminée par l'analyse de familles, de 0,15. Pour cette expérience de PCR, 708 spermatozoïdes provenant de deux donneurs hétérozygotes aux deux loci ont été analysés. Les gènes ont été amplifiés et hybridés avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques des allèles différents afin de détecter les quatre produits possibles de la méiose. Il y a quelques complications supplémentaires d'ordre technique dont on doit tenir compte pour calculer la fréquence de recombinaison; en effet, il est par exemple possible que deux spermatozoïde se trouvent dans le même tube et un traitement statistique complexe des données est donc nécessaire. Néanmoins, la fréquence de recombinaison calculée pour cette expérience est de 0,16, donc en parfait accord avec la fréquence estimée à partir de l'analyse des familles. La combinaison de la PCR et de l'utilisation de sonde spécifique d'allèles devait constituer un outil de toute première importance pour la cartographie génétique à haute résolution, des chromosomes humains. Une des limitations actuelles est l'isolement de suffisamment de spermatozoïdes individuels pour permettre l'analyse, mais l'utilisation de trieurs de cellules à fluorescence devrait bientôt permettre de résoudre ce problème [88].

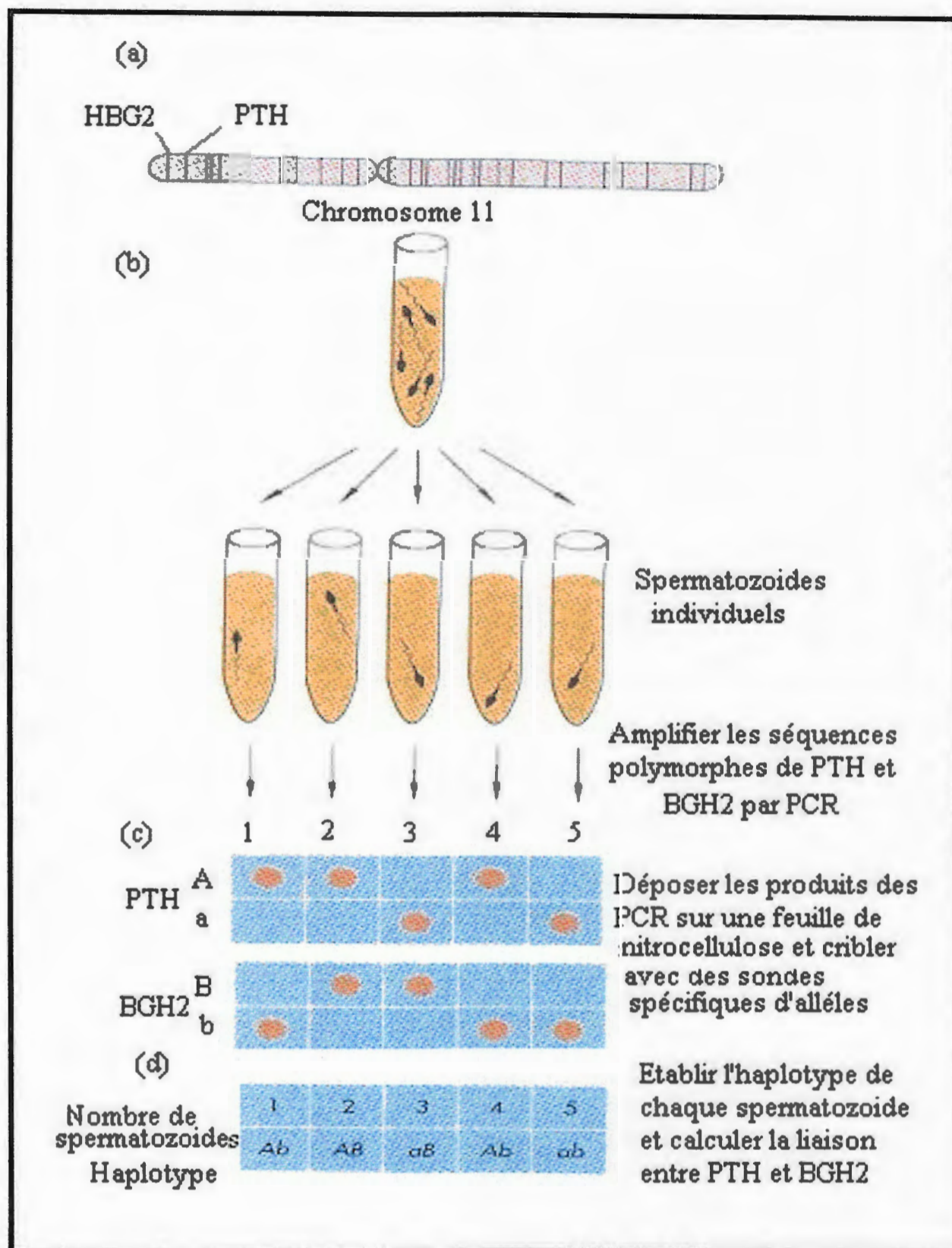


Figure 26. Etude de liaison génétique sur des spermatozoïdes par PCR.

V-9. Empreintes génétiques et Médecine légale

La médecine légale concerne la recherche et de l'identification des personnes à partir d'indices divers, de la caractérisation sur les scènes de crimes de traces biologiques ou chimiques, même les plus infimes, de l'établissement de la date du décès lors de la découverte d'un cadavre et ou encore de la détermination des liens de parentés dans les affaires de familles. Si ces indices biologiques sont exploitables depuis un peu plus d'un siècle à l'aide de méthodes essentiellement microscopiques, biochimiques et immunologiques, c'est beaucoup plus récemment qu'ils ont été mis à profit pour établir des empreintes génétiques, une méthode particulièrement précise d'identification issue des progrès de la Biologie Moléculaire. Cette technique dont le nom rappelle celui des empreintes digitales alors que son principe n'a rien à voir, a été introduite en criminalistique par un biologiste britannique, Alec Jeffreys, en 1985 [89]. L'information génétique d'un individu est unique car aucun autre membre de l'espèce ne possède la même combinaison de gènes codés dans l'ADN. En identifiant certaines séquences d'ADN propres à un individu et en les comparant à celles présentes dans l'ADN laissé sur les lieux d'un crime par son auteur, il est possible de disculper ou de confondre un suspect avec une très grande sûreté. L'analyse des séquences d'ADN répétées et non codantes dont le nombre de répétitions est propre à chaque individu. L'ADN est extrait des cellules laissées par le criminel sur les lieux du crime qui peuvent être des taches de sang, de sperme, des cellules buccales déposées par de la salive, des cheveux. La probabilité pour que deux personnes prises au hasard possèdent un allèle de même longueur est de 10^{-6} . Lors d'une identification, on utilise en moyenne cinq sondes successives ce qui amène la probabilité de tomber par hasard sur deux empreintes identiques à une chance sur plusieurs milliards. La technique a bénéficié de l'ut la PCR, réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN qui permet d'obtenir des quantités substantielles d'ADN à partir, en théorie, d'une seule molécule servant d'amorce. Si l'utilisation des empreintes génétiques n'a pas envoyé au rencard les méthodes plus anciennes de la police scientifique, elle leur apporte une précision inégalée dans l'identification des auteurs de crimes et dans la mise hors de cause des innocents.

Jusqu'à récemment, les techniques qui permettaient d'identifier les individus utilisaient le polymorphisme des protéines. Les isoenzymes étaient très utilisées dans le cas des cultures de cellules, et les groupes sanguins dans les problèmes légaux. Ils impliquent toute une série de tests et, bien qu'il soit possible de prouver de façon claire que deux échantillons sont différents, les tests sont rarement assez sensibles pour établir l'identité d'échantillons testés. La technique

appelée empreinte d'ADN peut résoudre ce problème. Cette technique repose sur l'analyse d'une batterie de loci polymorphes, choisis de sorte que la probabilité que deux échantillons d'ADN ayant le même haplotype proviennent de deux individus différents soit très faible. Les polymorphismes les plus utiles pour l'analyse médico-légale se trouvent aux loci appelés hypervariables [90].

Un locus hypervariable consiste en un nombre variable de séquences identiques placées en tandem. Lorsque l'ADN est digéré par une enzyme de restriction qui coupe les séquences flanquantes d'un locus hypervariable aussi appelé locus à nombre variable de répétitions en tandem (VNTR pour Variable Number Tandem Repeat), la longueur des fragments d'ADN produits chez différents individus dépend du nombre de répétitions à ce locus. Il y a de nombreux loci VNTR différents dans le génome, de sorte que profil des fragments des loci VNTR d'un individu est pratiquement unique [91].

Les premières sondes de loci hypervariables qui ont été utilisées pour identifier des individus étaient dérivées d'une répétition en tandem d'une séquence de 33 pb dans un intron du gène humain codant pour la myoglobine. Quand cette répétition a été utilisée comme sonde d'hybridation sur des transferts de type Southern humains, elle a permis de mettre en évidence la séquence originelle du gène de myoglobine et de nombreux autres fragments. La même répétition permet d'identifier des clones dans une banque humaine de cosmides, et l'analyse des séquences de ces clones montre qu'ils contiennent une séquence interne commune de 10 à 15 pb. Deux de ces clones qui détectent chacun une collection de fragments différents permettent de révéler entre 30 et 40 bandes, lorsqu'ils sont utilisés ensemble comme sondes sur des transfert de type Southern. La variabilité est telle que le profil des bandes est caractéristique d'un individu (à l'exception des jumeaux monozygotiques).

Ces premières sondes produisent des profils compliqués car elles s'hybrident avec des fragments appartenant à de nombreux loci VNTR différents d'un même individu. Une sonde spécifique d'un seul locus VNTR ne détecte qu'un ou deux fragments chez un individu. Cependant, la taille du fragment révélé à ce locus peut varier d'un individu à un autre de façon considérable; par exemple, l'une de ces sondes détecte un minimum de 77 allèles à un locus donné, le nombre de répétitions variant de 14 à plus de 500. Il existe de nombreuses autres

séquences répétées dans le génome, y compris les répétitions de dinucléotides (CA) et leurs compléments (GT). Ces répétitions (habituellement dénommées $[(C-A)_n(G-T)_n]$) sont présentes environ 100000 fois dans le génome humain (elles surviennent environ toutes les 50 à 100 kpb) et semblent distribuées de façon uniforme. La valeur de n varie entre 4 et 40, mais la plupart de ces blocs contiennent moins de 25 répétitions. Les répétitions $(C-A)_n(G-T)_n$ sont des marqueurs très utiles du fait de leur variabilité et parce qu'elles peuvent être analysées rapidement par amplification avec la PCR en utilisant des amorces correspondant aux séquences flanquantes. Le succès de l'utilisation de ces $(C-A)_n(G-T)_n$ a conduit à utiliser une série d'autre di-, tri- et tétranucléotides pour la cartographie [91].

Les sondes d'ADN ont rapidement été utilisées par les services de l'immigration pour déterminer si un garçon était le fils ou le neveu d'une femme qui affirmait être sa mère. Les tests classiques, utilisant le polymorphisme de 17 protéines, prouvaient que le garçon et la femme étaient parents, mais ne permettaient pas de déterminer leur degré de parenté de façon plus précise. Des échantillons d'ADN de la femme, de ces deux sœurs et des garçons ont donc été analysés. Malgré l'absence d'échantillon provenant du père (il y avait un doute sur la paternité), il a été possible de prouver que la femme et le garçon étaient apparentés et que le garçon était effectivement le fils de cette femme. L'utilisation de ces sondes pour résoudre ce type de problème a permis de réunir de nombreuses familles qui, sinon, seraient demeurées séparées.

La puissance de ces sondes pour établir l'identité dans un but légal est évidente. L'application pratique a été lancée quand on a montré que de l'ADN pouvait être isolé à partir de taches de sang séché ou de sperme dans des frottis vaginaux vieux de deux ans. On peut obtenir une quantité d'ADN suffisante pour faire un transfert de type Southern à partir de racines de cheveux fraîchement prélevés, mais on ne trouve que rarement sur le lieu d'un crime des cheveux prélevés dans de bonnes conditions. Cependant, la PCR peut permettre de récupérer l'ADN de cheveux coupés vieux de plusieurs mois, contenant moins de 1 ng d'ADN. Les polymorphismes de l'ADN mitochondrial et le gène HLA de classe II DQ α ont été analysés de cette façon. L'obtention de quantités suffisantes d'ADN intact à partir d'échantillons médico-légaux sera toujours un problème, et la PCR aura une importance considérable dans ce domaine. De principal problème posé par l'application de la PCR à des fins légales est le risque de contamination des échantillons, à la fois par d'autres ADN sur le lieu du crime, et par d'autres ADN amplifiés dans le laboratoire [92].

La puissance de l'analyse des empreintes d'ADN a été démontrée dans le tout premier cas de meurtre dans lequel elles ont été utilisées. Un homme avait été accusé de deux meurtres avec viol commis trois ans auparavant et avait fait une confession. Des échantillons de sperme du violeur étaient disponibles pour les deux attaques et une cartographie réalisée par Alex Jeffreys montra, comme la police l'avait supposé, que les deux meurtres avaient été commis par le même homme. Cependant, il apparut clairement que le suspect n'était pas le coupable. Ce résultat parut, de prime abord, incroyable, et la cartographie dut être refaite plusieurs fois avant que l'homme puisse être relâché. Le vrai meurtrier fut finalement pris, et son empreinte génomique confirma son identification [93].

En quelques années, la PCR a révolutionné les empreintes génétiques faisant gagner un facteur mille en sensibilité et ramenant les temps d'analyses à quelques heures (contre quelques jours par la technique de Southern). Mais toute situation a des avantages et des inconvénients: l'amplification est sujette aux risques de contamination et des procédures d'assurance qualité très strictes ont dû être mises en place pour s'assurer de la validité des résultats. L'étape d'extraction est la plus critique et nécessite une compétence particulière. L'ADN d'un cadavre putréfié n'est pas extrait par les mêmes techniques que celles qui sont utilisées pour un tube de sang de 5 ml prélevé fraîchement et stérilement. Une étape de quantification est nécessaire ensuite pour apporter la quantité idéale d'ADN dans l'amplification. La PCR est la plupart du temps réalisée grâce à des kits commerciaux, parfaitement optimisés, caractérisant jusqu'à 16 loci (VNTR ou STR) au cours d'une même réaction. La révélation de tels complexes n'est plus possible par les techniques classiques de séparation et de coloration et seule l'utilisation de séquenceurs automatiques (en gel de polyacrylamide ou par électrophorèse capillaire) avec lecture laser permet de différencier les régions co-amplifiées [94].

V-10. Etudes phylogénétiques

Les informations fournies par la génétique moléculaire sont de plus en plus utilisées dans l'étude de l'évolution pour déterminer le degré de parenté entre espèces et donc pour construire des arbres phylogénétiques similaires à ceux obtenus par des méthodes comparatives classiques. L'hypothèse de travail est que la divergence des espèces à partir d'un ancêtre commun est reflétée par le degré de divergence entre les séquences nucléotidiques des gènes et que la mesure de cette divergence nucléotidique peut être utilisée pour déterminer les liens de parenté entre différentes espèces. Les degrés d'homologie peuvent être mesurés de trois façons : en déterminant le degré

d'hybridation entre l'ADN total de différents individus, en comparant les séquences nucléotidiques d'un même gène dans des espèces différentes ou encore en comparant les gènes mitochondriaux. Ces derniers présentent l'avantage de ne être réarrangés durant la méiose et ils sont en outre caractérisés par une fréquence élevée de mutations ponctuelles, ce qui permet une analyse sur des temps relativement courts [95].

Le champ d'application des méthodes moléculaires est néanmoins limité par la nécessité de travailler avec des espèces vivantes dont on peut extraire l'ADN. Les liens de parenté entre organismes vivants peuvent donc être établis directement, mais les liens de parenté entre une espèce vivante et des organismes aujourd'hui disparus ne peuvent faire l'objet que d'hypothèses. Néanmoins, des échantillons de tissus provenant d'espèces rares ou éteintes conservés dans les musées à travers le monde constituent une source importante de matériel.

V-11. Diagnostic anténatal

Un des domaines dans lequel il est crucial de pouvoir effectuer une analyse génétique à partir d'un très petit nombre de cellules est le diagnostic anténatal. Dans le cas de désordres héréditaires liés au chromosome X et qui n'affectent que les individus mâles. La détermination du sexe est la première étape du diagnostic anténatal. L'identification du sexe masculin par l'analyse de l'ADN est possible car les individus mâles possèdent des séquences uniques situées sur le chromosome Y. Quelques unes de ces séquences sont répétées et donc, d'une certaine façon, déjà amplifiées par rapport aux autres gènes. Par exemple, la séquence DYZI longue de 3,5 kb est présente sur le chromosome Y à raison de 5000 copies environ. La PCR peut être utilisée pour amplifier un fragment de 149 pb présent dans la séquence DYZI et donc spécifique des individus mâles. Lors d'une expérience de détermination anténatale du sexe après une fécondation *in vitro*, les chercheurs ont réussi, en utilisant un micromanipulateur, à ôter une seule des 10 cellules de plusieurs embryons humains prêts à être réimplantés. La séquence DYZI de chacune des cellules extraites des embryons a été amplifiée par une PCR de 60 cycles. Un fragment amplifié n'a été obtenu que dans les cas de cellules provenant d'embryons mâles [96].

Cette méthode est actuellement utilisée en Biologie Clinique pour suivre des familles chez lesquelles il existe un risque de maladies héréditaires liées au chromosome X, et l'on implante alors chez la mère des embryons qui ont préalablement subi une biopsie (figure 27). La

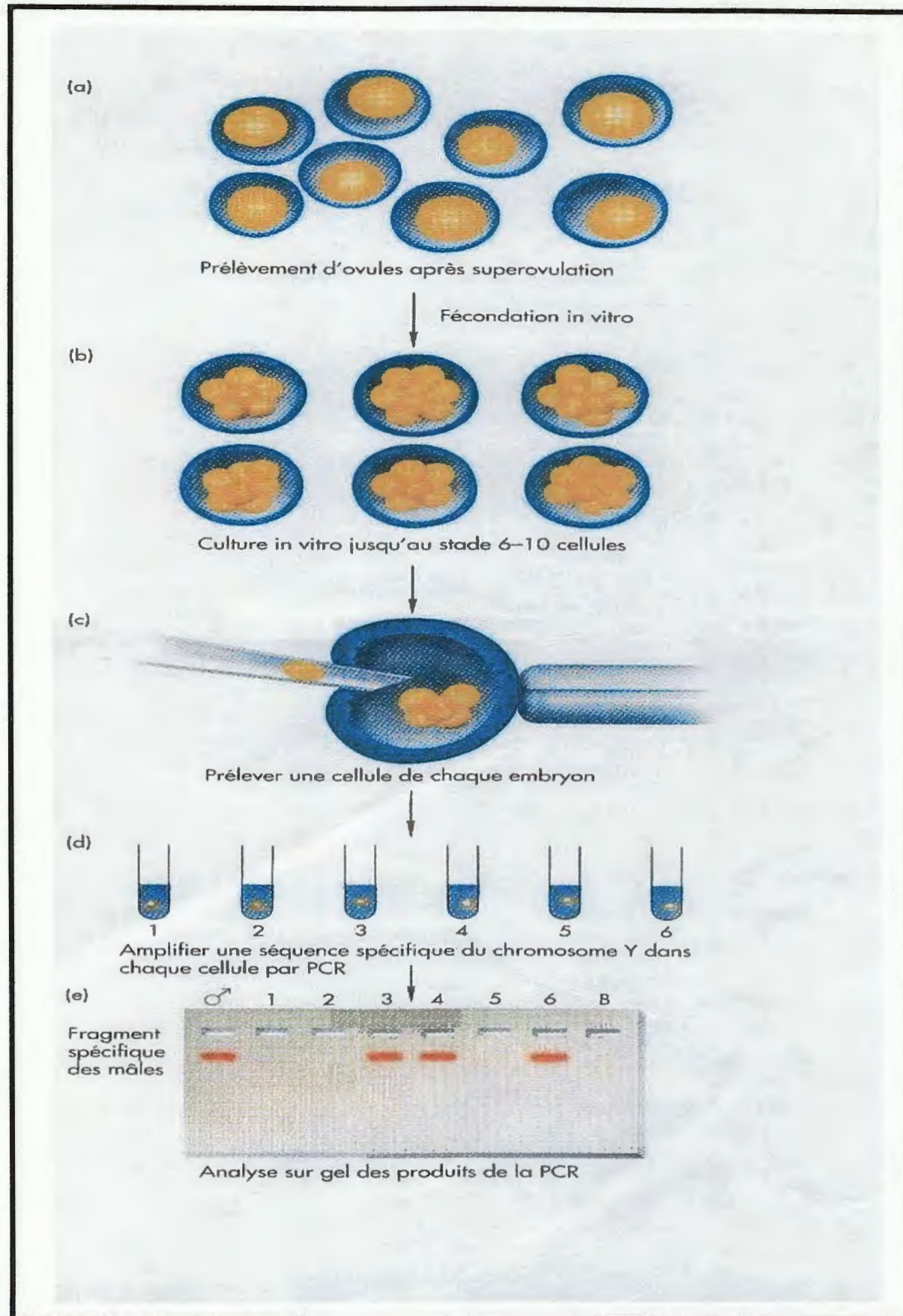


Figure 27. Diagnostic anténatal chez les embryons par PCR.

rapidité de la technique de PCR permet d'effectuer le même jour la biopsie, la détermination du sexe et la réimplantation de l'embryon. D'une façon générale, il y a un nombre suffisant d'embryon femelle pour que l'on puisse en transférer deux en même temps. Leur évolution est ensuite suivie en mesurant le niveau de la gonadotropine chorionique. Le sexe de ces fœtus est déterminé par l'analyse du caryotype des cellules villosités du chorion. À l'heure actuelle, cinq petites filles apparemment normales, sont nées grâce à ce procédé [97].

On sait que la PCR permet d'amplifier des séquences répétées présentes dans le génome d'une cellule embryonnaire, mais on peut aussi l'utiliser pour amplifier des gènes uniques impliqués dans des maladies héréditaires? Il n'a pas encore été possible de répondre directement à cette question. En fait, on a utilisé comme équivalent d'une cellule embryonnaire des ovocytes humains non fertilisés. Des séquences appartenant à deux gènes mutés responsables respectivement de la micoviscidose et de la myopathie de Duchenne, ont été amplifiées à partir de ces cellules et un fragment de la taille attendue a été mis en évidence dans les deux cas. Pour pouvoir déceler le fragment correspondant au gène de la micoviscidose, 80 cycles de PCR ont été nécessaires [98].

Il est possible de déterminer qu'un fœtus est de sexe mâle par l'analyse cytologique des cellules se trouvant dans la circulation sanguine périphérique de la mère. Cette technique est toutefois peu fiable, ce qui exclut son application pour la détermination anténatale du sexe d'un individu. On estime que le nombre de cellules fœtales mâles présentes dans la circulation maternelle est de l'ordre de 1 pour 70 000, mais nous avons vu que la PCR. Peut détecter l'existence de cellules, même dans ces très faibles proportions. Lors d'une étude, des échantillons sanguins ont été prélevés chez de femmes enceintes dès la neuvième semaine de gestation. L'ADN en a été extrait et un fragment de la séquence DYZI a été amplifié. Après 40 cycles d'amplification, un échantillon du mélange réactionnel a été soumis à 15 à 20 cycles supplémentaires. Les amorces utilisées pour cette seconde PCR sont situées entre les deux amorces précédemment utilisées. L'utilisation de deux jeux d'amorces quand l'on appelle des amorces emboîtées, permet de réduire significativement le risque d'amplifier une séquence indésirable lorsque l'on effectue un nombre élevé de cycles. La détermination du sexe des embryons s'est avérée correcte dans tous les cas. Le prélèvement de matériel fœtal, par biopsie des villosités chorioniques ou par amniocentèse comporte un risque faible mais néanmoins significatif, de provoquer l'avortement. L'utilisation de sang maternel pour la détermination du

sexé de l'embryon est donc clairement avantageuse, mais l'utilisation systématique de cette technique est une autre affaire. De très nombreuses précautions ont dû être prises pour éviter la contamination des échantillons par de l'ADN provenant d'individus mâle [99].

Chapitre VI :

Conclusion générale

La PCR a profondément marqué la Biologie Moléculaire, ses nombreuses variantes ont permis le développement rapide d'applications technologiques de la manipulations des gènes, aussi multiples que variées [100, 101]. L'une de ses applications a révolutionné le diagnostic moléculaire, la PCR présente de multiples avantages. Tout d'abord, elle nécessite très peu de matériel comme il a été mentionné précédemment, quelques nanogrammes d'ADN contenu d'un petit échantillon de sang ou de tissu sont suffisants pour le diagnostic par PCR. Ce dernier peut être fait à partir d'un échantillon microscopique de tissu foetal dans les maladies prénatales, et à partir de 200 µl de sang complet (hémophilie) ou de la moitié d'une villosité chorale (mucoviscidose). L'ADN peut également être obtenu à partir du sang prélevé sur les cartes de Guthrie qui sont utilisées pour le dépistage de la phénylcétonurie. Ces petits échantillons, prélevés par simple piqûre au talon, sont conservés sous forme de taches de sang séché. Ces échantillons sont une excellente source d'ADN pour le diagnostic par la PCR. Même un simple lavage buccal salin contient un nombre de cellules amplement suffisant pour l'amplification génique. Les cellules sont recueillies par centrifugation, lysées par un détergent, et ce lysat est utilisé directement sans purification supplémentaire pour la PCR. La simplicité de cette technique non invasive permet d'obtenir des échantillons d'ADN utilisables pour des programmes de dépistage sur une grande échelle de maladies génétiques fréquentes telles que la mucoviscidose. La PCR de restriction est aussi employée pour diagnostiquer les mutations qui se trouvant au niveau de sites de restriction comme c'est le cas pour la drépanocytose dont la mutation se trouve sur le site de restriction de l'enzyme Bsu I. Cette technique nécessite donc un prétraitement de l'ADN par l'enzyme concernée [68].

La PCR sert aussi à diagnostiquer certaines maladies, notamment infectieuses. En effet, pour reconnaître la présence d'un virus ou d'une bactérie chez un malade, il suffit de prélever un échantillon biologique puis d'amplifier une séquence génétique spécifique de l'agent infectieux. Quelques fragments d'ADN bactérien ou viral suffisent. Les infections à chlamydiae, le sida bénéficient déjà de ces recherches. La PCR est aussi utilisée pour diagnostic des hépatites (B, C et D) [102].

En médecine légale, la sensibilité extrême de la PCR est utilisée pour établir des profils d'ADN, l'application de la PCR est l'identification d'empreintes génétiques pour la recherche en paternité (ou maternité) ou lors d'une enquête criminelle en Médecine Légale, par la police

scientifique [103]. L'empreinte d'ADN est maintenant utilisée dans de nombreux pays. Au Royaume-Uni, elle est utilisée pour résoudre les problèmes de parenté dans plus de 3000 cas d'immigration chaque année. Elle y est maintenant également pleinement acceptée comme outil de médecine légale, et y est utilisée dans plusieurs milliers de cas chaque année. Aux Etats-Unis, les empreintes d'ADN ont fait l'objet d'un examen particulièrement minutieux devant les tribunaux. Il y a eu des objections quant à la qualité des preuves basées sur l'ADN qui ont été présentées dans certains cas, et aussi quant aux études des fréquences des allèles dans les populations, qui sous-tendent les calculs de probabilité d'une identité. Ce sont des discussions particulièrement importantes dans la mesure où les empreintes génétiques, et les preuves de nature scientifiques en général, ont un grand poids pour un jury. Malgré tout, le typage de l'ADN est une pièce à conviction extrêmement puissante qui peut aussi bien exonérer un innocent que confondre un coupable. Il ne fait aucun doute qu'il sera universellement accepté lorsque les problèmes pratiques et juridiques de son utilisation auront été résolus. Quelques pays envisagent la création de banques d'empreintes génétiques, en veillant aux mesures de sécurité et de confidentialité nécessaires. L'identification des gènes de vieillissement et de leur évolution chez l'animal est en cours.

Après le succès de Jurassic Park, pratiquement tout le monde est conscient des applications potentielles de la PCR dans les domaines de la paléontologie ou de l'archéologie, l'application des récentes techniques d'analyse en Biologie Moléculaire par PCR sur des ADN anciens, ADN de pièces paléontologiques ou archéologiques a créé la paléogénétique depuis 1984 [53]. Ainsi, ont été étudiés des insectes (ambre), des plantes fossiles, des momies, des animaux et des hommes conservés dans les cavernes, les tourbières et la glace [104, 105, 106]. Ces recherches très variées vont pouvoir affiner nos connaissances sur l'évolution, sur la phylogénèse améliorée des espèces, la génétique des populations, leurs migrations entre continents au paléolithique, l'origine parfois très ancienne de nos maladies contagieuses, comme de nos virus actuels (VIH). Mais l'analyse de l'ADN ancien étant directement liée, aux risques de contamination, à la dégradation du matériel génétique et à la difficulté de recueil des échantillons. Dans le domaine vétérinaire le diagnostic du virus de la diarrhée virale bovine (BVD), cette virus est également responsable de la maladie des muqueuses, fait actuellement l'objet de réflexions au niveau de la communauté vétérinaire et sanitaire.

La technique de PCR permet d'obtenir une détection sur l'ensemble du génome et moins dépendante des conditions de traitement, car l'ADN est une molécule relativement stable et

résistante à certains traitements thermiques et chimiques. La méthode de la PCR peut à son tour se diviser en deux fonctions. La première étant une méthode de détection pour déceler la présence d'un ADN génétiquement modifié et a recours à des amorces non spécifiques mais présentes dans la plupart des constructions génétiques végétales, et la deuxième stratégie permettant d'identifier un ADN d'origine OGM nécessite cette fois-ci des amorces spécifiques à chacune des constitutions génétiques possibles et connues [61].

D'autres applications récentes de la PCR concernent la thérapie génique qui utilise certains types de virus comme vecteurs. La titration des génomes viraux intégrés peut se faire par l'utilisation de la PCR quantitative de type Chimie TaqMan ou SYBRGreen, alors que la quantification de l'expression d'ARN du transgène est faite par la Reverse Transcription ou l'identification de séquence nucléotidique du vecteur dans le milieu ou dans la cellule.

Dans le monde de l'industrie agro-alimentaire, les produits fabriqués sont pour des raisons d'hygiène et de conservation, pasteurisés. Là encore, l'ADN initialement présent dans les aliments est dégradé et fragmenté du fait de conditions de pression et de température délétères. Mais avec la technique de PCR, on peut détecter des microorganismes pathogènes présents dans les aliments. Elle concerne les exigences générales relatives à l'amplification spécifique des séquences d'acide nucléique cible et à la détection et la confirmation de la nature de la séquence d'acide nucléique amplifiée, très récemment la PCR quantitative permet de détecter du campylobacter au niveau des produits alimentaires.

La résolution de l'hétérogénéité génétique d'espèces très apparentées d'insectes dépend de la sélection de marqueurs génétiques fiables obtenus à partir de spécimens représentatifs. Des travaux par PCR sur la variabilité génétique de neuf espèces de mouches noires appartenant au sous-genre *Psilopelmia* Enderlein, ont permis d'obtenir des informations et un schème de classification permettant de différencier les neuf espèces de *Psilopelmia* à l'étude.

Enfin, la PCR est une technique extraordinaire qui continue à se développer de façon rapide et constante, ses performances techniques (efficacité, spécificité, rendement, ...) ne cessent d'augmenter. Par exemple, récemment des chercheurs chinois ont pu réduire considérablement les réactions non spécifiques et amélioré ainsi l'efficacité de la PCR, en utilisant des nano-particules d'Or. Les puces ADN, une Nanobiotechnologie très récente qui

permettent l'étude systématique de l'expression des gènes, sont rendue performante par l'utilisation de la PCR (référence). Une Puce ADN est constituée d'une surface de verre ou de silicium d'environ 1cm^2 sur laquelle on peut greffer des milliers de séquences d'ADN complémentaires des gènes identifiés d'une cellule (figure 28). Sur ces séquences viennent se fixer par hybridation les sondes correspondant aux ARNm extraits de la cellule. Ces sondes étant marquées par des molécules fluorescentes, l'analyse de la surface de la puce par un dispositif optique sophistiqué couplé à un traitement informatique de l'image permet de repérer les hybridations et également le niveau d'expression de chaque gène proportionnel à l'intensité de la fluorescence. Cette méthode est simplifiée par la PCR qui permet de amplifier séquences à détectées [107].

Pour conclure, on peut dire que grâce à cette technique, nous avons tellement appris à manipuler l'ADN recombinant que une nouvelle industrie, la Biotechnologie, est née de l'utilisation de ces mêmes outils et qui permet de produire médicaments et vaccins, améliorant les produits agroalimentaire. L'histoire de l'invention de cette technique illustre bien le rôle des petites entreprises dans l'invention de procédés innovants en biotechnologies qui jouent et joueront des rôles de plus en plus important dans tous les aspects de notre vie.

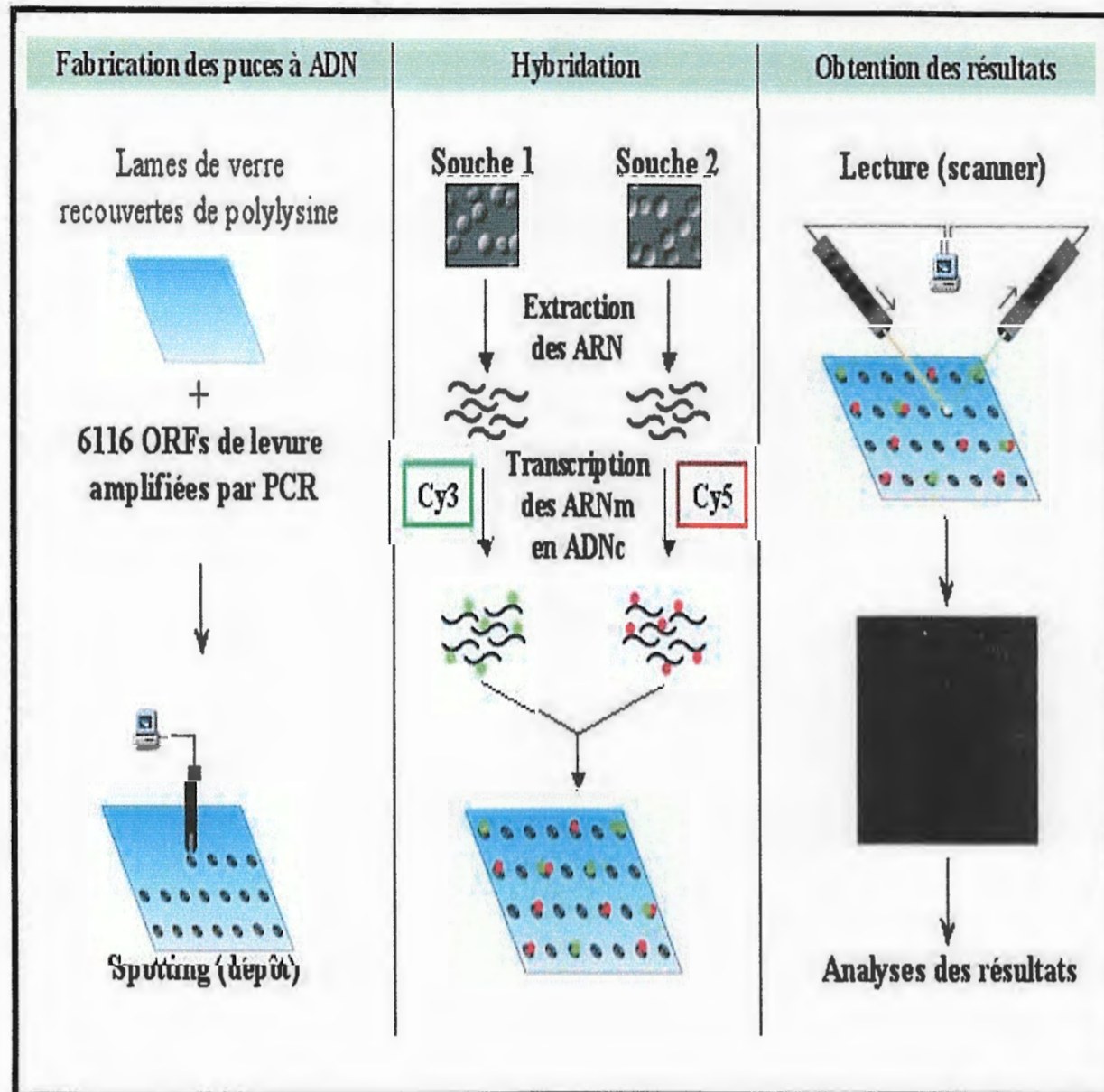


Figure 28. Schéma général du concept d'une puce ADN.

Bibliographie

1. Franklin R E and Gosling R G. Molecular configuration in sodium thymonucleate. (1953) *Nature*. 171, 740-741
2. Brown D M and Todd A R. Some observation on structure and chemical behaviour of the nucleic acids. (1952) *F. Chem. Soc. pt. 1*, 52-58
3. Watson J D and Crick F C. A structure for deoxyribose nucleic acid. (1953) *Nature*. 171, 737-738.
4. Crick F H C and Watson J D. The complementary structure of deoxyribonucleic acid. (1954) *Proc. Roy. Soc, A*. 223, 80-96.
5. Jacob Fr and Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. (1961) *Journal of molecular biology*. 3, 318-359.
6. Morgan R A and Anderson W E. Human gene therapy. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62, 191-217.
7. Berg P, Baltimore D, Boyer H W, Cohen S N, Davis R W, Hogness D S, Nathans D, Roblin R, Watson J D, Weissman S and Zinde N D. Potential biohazards of recombinant DNA molecules. (1974) *Science*. 185, 303.
8. Lederberg S and Massillon M. Degradation of non-replicating bacteriophage DNA in non-accepting cells. (1964) *J. Mol. Biol.* 8, 623-628.
9. Arbre W and Dussoix D. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage λ . (1962) *J. Mol. Biol.* 5, 18- 36.
10. Berg P, Baltimore D, Brenner S, Roblin R O and Singer M F. Asilomar conference on recombinant DNA molecules. (1974) *Science*. 188, 991-994.
11. Bolivar F, Rodrigues R L, Greene P J, Betlach M C, Heyneker H L, Boyer H W, Crosa J and Falkow S. Construction and characterization of new cloning vehicles, a multi-purpose cloning system. (1977) *Gene*. 2, 95-113.
12. Curtiss R, Inoue M, Pereira D, Hsu J C, Alexander L and Rock L. Construction in use of safer bacterial host strains for recombinant DNA research. In Scott W A and Werner R W, eds. *Molecular Cloning of Recombinant DNA : Proceedings of the Miami Winter Symposia*. (1977) Academic, New York. 13, 99-114.
13. Mullis K B and Faloona F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. (1987) *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
14. Mullis K B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. (1990) *Sci. Am.* 262, 56-65.

15. Birch D E. Simplified hot start PCR. (1996) *Nature*. **381**, 445-446.
16. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*, the polymerase chain reaction. (1986) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **51**, 263-273.
17. Golenberg E M, Bickel A, Weihs P. Effect of highly fragmented DNA on PCR. (1996) *Nucleic Acids Res*. **24**, 5026-5033.
18. Barnes W M. PCR amplification of up to 35 kbp DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci*. **91**, 2216- 2220.
19. Cheng S, Chang S Y, Gravitt P and Respass R. Long PCR. (1994) *Nature*. **369**, 684-685.
20. Lathe J. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data, theoretical and practical considerations. (1985) *F. Mol. Biol*. **183**, 1-12.
21. Frohman M A, Dush M K and Martin G. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts, amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **85**, 8998-9002.
22. Taylor G R and Logan W P. The polymerase chain reaction, new variations on an old theme. (1995) *Curr. Opin. Biotechnol*. **6**, 24-29.
23. Lawyer F C, Stoffel S, Saiki R and al. Isolation, characterization, and expression in *E.coli* of the DNA polymerase from *Thermus aquaticus*. (1989) *J. Biol. Chem*. **264**, 6427-6437.
24. Eckert K A and Kunkel T A. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. (1990) *Nucl. Acids Res*. **18**, 3739-3744.
25. Keohavong P and Thilly W G. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci*. **86**, 9253-9257.
26. Kwok S and Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. (1989) *Nature*. **339**, 237-238
27. Longo M C, Berninger M S and Hartley J L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. (1990) *Gene*. **93**, 125-128
28. Frohman M A and Martin G R. Rapid amplification of cDNA ends using nested primers. (1989) *Technique*. **1**, 165-170.
29. Takumi T. Use of PCR for cDNA library screening.(1997) *Methods Mol. Biol*. **67**, 339-344.

30. Gerard G F and Allesio J M. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. (1993) *Methods Mol. Biol.* **16**, 73 -94.
31. Ochman H, Gerber S A and Hartl D L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. (1998) *Genetics.* **120**, 621-625.
32. Nitsche E M, Moquin A, Adams P S and al. Differential display RT- PCR of total RNA from human foreskin fibroblasts for investigation of androgendependent gene expression. (1996) *Am. J. Med. Genet.* **63**, 231-238.
33. Grondahl B, Puppe W, Hoppe A and al. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infection by single- tube multiplex reverse transcription-PCR feasibility study. (1999) *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1-7.
34. Foord O S and Rose E A. Long-distance PCR. (1994) *PCR Methods Appl.* **3**, 149-161.
35. Lamont P J, Davis M B and Wood N W. Identification and sizing of the GAA trinucleotide repeat expansion of Friedreich's ataxia in 56 patients-clinical and genetic correlates. (1997) *Brain.* **120**, 673-680.
36. Madoz L, Mougin Ch, Bettinger D and Lab M. La PCR-*in situ*. *Biofutur.* (1996) **156**, le Technoscope.
37. Caruthers M N. Gene synthesis machine DNA chemistry and its uses. (1985) *Science.* **230**, 281-285.
38. Elnifro E M, Ashshi A M, Cooper R J and Klapper P E. Multiplex PCR optimization and application in diagnostic virology. (2000) *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 559-570.
39. Frohman M A and Martin G R. Rapid amplification of cDNA ends using nested primers. (1989) *Technique.* **1**, 165-170.
40. Gyllenstein U B and Erlich H A. Generation of single stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 7652- 7656.
41. Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S and Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. (1992) *Biotechnology.* **10**, 413-417.

42. Livak K J, Flood S J, Marmaro J, Giusti W and Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. (1995) *PCR methods Appl.* 4, 357-362.
43. Elyse Poitras et Alain Houde. La PCR en temps réel, principes et applications. (2002) *Reviews in Biology and Biotechnology*. Vol 2. 2, 2-11.
44. Liang W and Johnson J P, Rapid plasmid insert amplification with polymerase chain reaction. (1988) *Nuc. Acid Res.* 16, 3579.
45. Liu Y G, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. (1995) *Genomics*. 3, 674-681.
46. Osterrieder N, Hubert PH, Brandmuller C and Kaaden OR. A touchdown PCR for the differentiation of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) field strains from the modified live vaccine strain RacH. (1994) *J Virol Methods*. 50, 129-136.
47. Gachet E, Martin G G and al. detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR a brief review of methodologies available. (1999) *Trends in Food Science and Technology*. 9, 380-388
48. Scharf S J, Horn G T and Erlich H A. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequence. (1986) *Science*. 233, 1076-1078.
49. Higuchi R, Krummel B and Saiki R K. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments, study of protein and DNA interactions. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 7351-7367.
50. Sarkar N and Sommer S S. The megaprimer method of site-directed mutagenesis. (1990) *Biotechniques*. 8, 404-407.
51. Carillo N, Swenberg J and Skopek T. Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent™) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19, 4193-4198.
52. Lundberg K S, Shoemaker D D, Adams M W and al. High fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus Furiosus*. (1991) *Gene*. 108, 1-4.
53. Higuchi R, Bowman B, Freiburger B, Ryder O A and Wilson A C. DNA sequence from the quagga, an extinct member of the horse family. (1984) *Nature*. 312, 282-284.

54. Pääbo S. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. (1985) *Nature*. **314**, 644-645.
55. Pääbo S, Higuchi R G, and Wilson A C. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. (1989) *F. Biol. Chem.* **264**, 9709-9712.
56. Golenberg E M, Giannasi D E, Clegg M T, Smiley C J, Durbin M, Henderson D and Zurawski G. Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. (1990) *Nature*. **344**, 656-658.
57. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. (1993) *Nature*. **362**, 709-715.
58. Scholz M, Giddings I and Pusch C M. A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. (1998) *Anal Biochem.* **259**, 283-286.
59. Pääbo S. Ancient DNA, extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci.* **86**, 1939-1943.
60. Bertheau Y et Diolez A. Les aliments passés au crible. (1999) *Biofutur*. **192**, 28-32.
61. Bertheau Y. Détection et identification des OGM. (1998) *POUR*. **159**, 69-77.
62. Petit L, Baraige F, Balois A M, Bertheau Y and Fach P. Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. (2003) *Eur. Food Res and Technol.* **217**, 83-89.
63. Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, Pauwels J, Anklam E, Borschers T, Braunschweiger G, Busch U, Elklund E, Eriksen F D, Fagan J, Fellingner A, Gaugitsch H, Hayes D, Hertel C, Hortner H, Joudrier P, Kruse L, Miraglia M, Muller W, Philipp P, Popping B, Rentsch R and Wurtz A. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. (1997) *J. AOAC Int.* **82**, 923-928.
64. Larrick J W. The PCR technique quantitative PCR. (1997) *Biotechnics Books*, Eaton Publishing.
65. Welsh M et Smith A. La mucoviscidose. (1996) *Pour la Science*. **220**, 66-74.
66. Rosenstein B J and Cutting G R. The diagnosis of cystic fibrosis, a consensus statement. (1998) *J. Pediatr.* **132**, 589-595.
67. Orkin S H. Disorders of hemoglobin synthesis. In *the Molecular Basis of Blood Diseases*. Stamatoyannopoulos G, Nienhuis A W, Leder P, Majerus P W and Saunders W B. (1987) *Review*. 106-126.

68. Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A and Arnheim N. Enzymatic amplification of *B*-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. (1985) *Science*. **230**, 1350-1354.
69. Douabin V, Moirand R, Jouanolle A M, Brissot P, Le Gall J Y, Deugnier Y and David V. Polymorphisms in the HFE gene. (1999) *Hum. Hered.* **49**, 21-26.
70. Brissot P. Le diagnostic de l'hémochromatose à l'heure du test génétique. (2000) *La Presse médicale*. **8**.
71. Kazazian H H and Boehm C D. Molecular basis and prenatal diagnosis of *B*-thalassemia. (1988) *Blood*. **72**, 1107-1116.
72. Reiss J and Cooper D N. application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human genetic disease. (1990) *Hum. Genet.* **85**, 1-8.
73. Oudet C, Mornet E, Serre J L and al. Linkage disequilibrium between the fragile X mutation and two closely linked CA repeats suggests that fragile X chromosomes are derived from a small number of founder chromosomes. (1993) *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 297-304.
74. Eichler E E, Holden J A, Popovich B W, Reiss A L, Snow K, Thibodeau S N, Richards C S and al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. (1994) *Nature Genet.* **8**, 88-94.
75. Chelly J et Kaplan J C. La myopathie de Duchenne, du gène DMD à la dystrophine. (1988) *Médecinelsciences*. **4**, 141-150.
76. Darras B T, Koenig M, Kunkel L M and Frabcke U. Direct method for prenatal diagnosis and carrier detection in Duchenne/Becker muscular dystrophy using the entire dystrophin cDNA. (1988) *Am. F. Med. Genet.* **29**, 713-726.
77. Beggs A H, Koenig M, Boyce F M and Kunkel L M. Detection of 98% of DMD gene deletions by polymerase chain reaction. (1990) *Hum Genet.* **86**, 45-48.
78. Neri A, Knowles D M, Greco A, McCormick F and Dalla-Favera R. Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 9268-9272.
79. Yandell D W, Campbell T A, Dayton S H, Petersen R, Walton D, Little J B, McConkie-Rosell A, Buckley E G and Dryja T P. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene, their application to genetic counseling. (1989) *N. E. F. Med.* **321**, 1689-1695.

80. Lee M S, Chang K S, Cabanillas F, Freireich E J, Trujillo J M and Stass S A. Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. (1987) *Science*. **237**, 175-178.
81. Crescenzi M, Seto M, Herzig G P, Weiss P D, Griffith R C and Korsmeyer S J. Thermostable DNA polymerase chain amplification of t(14;18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 4869-4873.
82. Roth M S, Antin J H, Bingham E L and Ginsburg D. Detection of Philadelphia chromosome-positive cells by polymerase chain reaction following bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia. (1989) *Blood*. **74**, 882-885.
83. Lai-Goldman M, Lai E and Grody W W. Detection of human immunodeficiency virus infection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by DNA amplification. (1988) *Nucleic Acids Res.* Aug. **16**, 8191-8192.
84. Dittmar M T, Simmons G, Donaldson Y and al. Bio-logical characterization of human immunodeficiency virus type 1 clones derivad from different organs of an AIDS patient by long-range PCR. . (1997) *J. Virol.* **71**, 5140-5147
85. Honore-Bouakline S, Vincensini J P, Giacuzzo V, Lagrange P H and Herrmann J L. Rapid Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by PCR. Impact of Sample Preparation and DNA Extraction. (2003) *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2323-2329.
86. Rison-Noel A, Lecossier D, Nassif X, Gicquel B, Levy-Frebault V and Hance A J. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. (1989) *Lancet*. **1069-1071**.
87. Arnheim N, Li H and Cui X. PCR analysis of DNA sequences in single cells, single sperm gene mapping and genetic disease diagnosis. (1990) *Genomics*. **8**, 415-419.
88. Cui X, Li H, Goradia T M, Lange K, Kazazian H H, Galas D and Arnheim N. Single-sperm typing, determination of genetic distance between the γ -globin and parathyroid hormone loci by using the polymerase chain reaction and allele-specific oligomers. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 9389-9393.
89. Jeffreys A, Wilson V and Thein S L. Individual-specific fingerprints of human DNA. (1985) *Nature*. **316**, 76-79.

90. Jeffreys A J, Wilson V and Thein S L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. (1985) *Nature*. **314**, 67-73.
91. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E and White R. Variable number tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. (1987) *Science*. **235**, 1616-1622.
92. Weber J L and May P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. (1989) *Am J Hum. Genet.* **44**, 388-396.
93. Gill P, Jeffreys A G and Werrett D J. Forensic application of DNA fingerprints. (1985) *Nature*. **318**, 577-579.
94. Lander E S. DNA fingerprinting on trial. (1989) *Nature*. **339**, 501-505.
95. Gill P, Pavlov P L, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E and Sullivan K. Identification of the remains of the romanov family by DNA analysis. (1994) *Nature Genet.* **6**, 130-135.
96. Handyside A, Kontogianni E H, Hardy K and Winston R M L. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. (1990) *Nature*. **344**, 768-770.
97. Handyside A H, Pattinson J K, Penketh R J A, Delhanty J D A, Winston R M L and Tuddenham E G D. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. (1989) *Lancet*. 347-349.
98. Coutelle C, Williams C, Handyside K, Hardy K, Winston R and Williamson R. Genetic analysis of DNA from single human oocytes, a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. (1989) *Brit. Med. J.* **299**, 22-24.
99. Lo Y-M D, Patel P, Wainscoat J S, Campier M, Gillmer M D G and Fleming K A. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. (1989) *Lancet*. 1363-1365
100. Erlich H A. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. (1989). Stockton Press.
101. Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J and White T G. PCR Protocols. A Guide to methods and applications. (1990) Academic Press.
102. Tang Y W and Persing D H. Molecular detection and identification of microorganisms. (1999) *Manual of Clinical Microbiology*. **7**, 215-244.

- 103. Ludes B et Mangin P. Les empreintes génétiques en médecine légale. (1992) Technologie et Doc Lavoisier, Paris.**
- 104. Barriel V. L'ADN ancien. La science au présent. (1997) Encyclopedia Universalis. 135-139.**
- 105. Geigl E M. L'émergence de la paléogénétique. (1997) Biofutur. 164, 28-34.**
- 106. White T h. Les applications et l'avenir de la PCR. (1997) Biofutur, Technoscope. 171, 96-98.**
- 107. Lockhart and al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. (1996) Nature Biotechnology. 14, 1675-1680.**

Abstract

The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, invented in 1985 by Kary MULLIS, allowed scientists to make millions of copies of a scarce sample of DNA. It's a molecular biology technique which allows a small amount of the DNA molecules to be amplified many times, in an exponential manner. With more DNA available, analysis is made much easier. The technique has revolutionized many aspects of current research, including the diagnosis of genetic defects and the detection of the AIDS virus in human cells. The technique is also used by criminologists to link specific persons to samples of blood or hair via DNA comparison. PCR also affected evolutionary studies because large quantities of DNA can be manufactured from fossils containing but trace amounts. Briefly, we can say that the is necessary technique for all recombinant DNA biotechnologies.

Résumé

La technique de PCR ou "polymerase chain reaction", inventée en 1985 par Kary MULLIS, a permis aux scientifiques de produire des millions de copies d'ADN à partir de quantités infimes d'échantillons. C'est une technique de Biologie Moléculaire qui permet à des molécules d'ADN présentes en très faibles quantités d'être amplifiées de manière exponentielle. En effet, Il est plus facile de manipuler l'ADN recombinant, en présence de quantité abondante. La PCR a révolutionné beaucoup d'aspects de la recherche fondamentale et appliquée, y compris le diagnostic de maladies génétiques et du SIDA. Elle est aussi utilisée par les criminologues pour identifier des personnes suspectes, en utilisant des échantillons de sang ou des cheveux par comparaison d'ADN. La PCR a aussi été employée dans l'étude de l'évolution des espèces car elle permet l'obtention de grandes quantités d'ADN fossile. Bref, la PCR est une technique à tout faire, indispensable pour la mise en œuvre de toutes les biotechnologies de l'ADN recombinant.

ملخص

تقنية الـ PCR هي طريقة حديثة اكتشفت من طرف Kary B. Mullis سنة 1985 و تستعمل لتضخيم المادة الوراثية (ADN) انطلاقا من كمية قليلة جدا. هذه الطريقة فتحت مجالات كبيرة للبحث خاصة في ميدان تشخيص الأمراض الوراثية و السيدا. كما تستعمل من طرف علماء مختصين في الإجرام لربط أشخاص معينين بعينات الدم أو الشعر عن طريق مقارنة المادة الوراثية (ADN). وتستخدم هذه التقنية كذلك في دراسة تطور الأنواع، لأنه بواسطتها يتم الحصول على كمية كبيرة من الـ (AND) الحفري. وباختصار تقنية الـ PCR تعتبر ضرورية في الاستخدامات البيوتكنولوجية المتعلقة بالـ (AND) المرتبط.