

La PCR – l'outil qui a bouleversé la biologie moléculaire.

PCR signifie «polymerase chain reaction»

1° - Histoire de la PCR

Document 1 : L'histoire de la PCR

En 1969 Thomas Brock rapporte qu'il a isolé une bactérie *Thermus aquaticus* ou *Thermophilus aquaticus*, une bactérie thermophile trouvée dans une source du parc national de Yellowstone. Cette bactérie vit dans des eaux chaudes de 50° à 80°C.

Les sources hydrothermales sous-marines, les "fumeurs noirs", découvertes en 1977 sur les dorsales océaniques ont également permis des avancées en biologie moléculaire. Autour de ces fumeurs noirs se développent dans le noir total des écosystèmes sous-marins parfois à 2 000 m de profondeur.

Dans ces eaux profondes non éclairées, ce sont des bactéries thermophiles qui sont autotrophes, c'est à dire transforment la matière minérale en matière organique. Elles prolifèrent dans les eaux chaudes du « fumeur noir ». D'autres organismes s'en nourrissent et un réseau trophique (alimentaire) s'organise avec des vers filtreurs, crevettes, crabes, poissons...

- Visionnez le film « fumeur noirs ». Observez bien les valeurs données par les capteurs du sous-marin.
- Quel problème posent ces observations lorsqu'on les met en relation avec les mesures réalisées?

Les valeurs de températures observées sont supérieures à 100°. Des organismes peuvent se multiplier à des températures où normalement les protéines et en particulier les enzymes sont dénaturées.

Si des bactéries vivent à des températures voisines de 100° alors leurs protéines enzymes doivent rester fonctionnelles à ces températures. L'ADN polymérase de ces bactéries thermophiles est fonctionnel à plus de 100°

La première publication publique sur la PCR par Kary Mullis a eu lieu en 1986 (prix Nobel de chimie en 1993).

La première PCR réalisée avec une ADN polymérase thermostable, provenant de *Thermus aquaticus*, par Saiki RK a eu lieu en 1988.

2° - La technique de la PCR

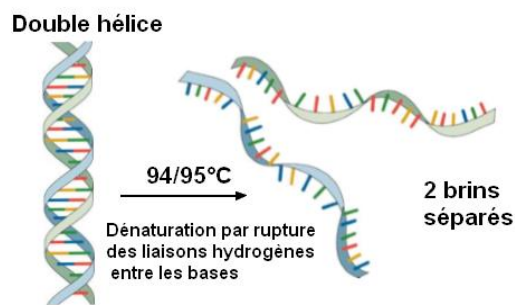
Document 2 : les étapes de la PCR

- La première étape de cette réaction (Figure 1) consiste en la dénaturation de l'ADN double brin qui sert de matrice. Pour se faire, la solution d'ADN est chauffée à une température proche de l'ébullition (94/95°C) ce qui permet de rompre les liaisons hydrogènes entre les bases et de séparer les deux brins d'ADN.
- La seconde étape consiste à appairer, de part et d'autre de la zone à amplifier, des amorces (= primers) qui sont de petites séquences d'ADN simple brin synthétique. Cette opération est simplement réalisée en abaissant suffisamment la température pour que cet appariement puisse être stable.
- La troisième et dernière étape consiste à se placer à la température optimale pour la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase (typiquement 72°C) pendant le temps nécessaire pour que cette dernière ait le temps de synthétiser la longueur d'ADN souhaitée.

Il faut fournir dans le milieu de réaction à 72°C, l'ADN matriciel, H₂O, MgCl₂, de la Taq polymérase et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon.

Un cycle de terminaison est réalisé lorsque les fragments à dupliquer sont de grande taille (> 1 kpb)

Ces étapes sont répétées au cours de cycles dont le nombre est fixé par l'expérimentateur. Un appareil appelé thermocycleur se charge de faire varier automatiquement la température du milieu ce qui permet une action automatisée de la Taq polymérase.



Un thermocycleur

Document 3 : Exemple de paramétrage d'un thermocycleur

Etape	Action	Température	Temps
Initiation	Dénaturation	98°C	5 minutes
Cycle de base x 40	Dénaturation	98°C	5 secondes
	Hybridation	72°C	25 secondes
	Polymérisation	72°C	25 secondes
Terminaison		72°C	1 minute

- Utilisez l'animation PCR 2 pour visualiser les différentes étapes de la réalisation de la PCR

- Indiquez comment est réalisé l'encadrement de la séquence à amplifier

L'encadrement est réalisé par des amorces ou primers qui sont courtes séquences d'ADN complémentaires des extrémités brins de la séquence à encadrer

- Quelle molécule amplifie la séquence d'ADN ?

C'est la Taq polymérase qui est une ADN polymérase qui réplique les brins d'ADN

- Quelle quantité de segments d'ADN d'intérêt (ou Amplicon) peut-on produire par la technique de la PCR en une heure si on utilise la configuration du thermocycleur ci-dessus.

Nombre de cycles	Nombre de copies cibles	Δ (=copies non cibles)	Total des copies
1	0	2	2
2	0	4	4
3	2	6	8
4	8	8	18
5	22	10	32
6	52	12	64
7	114	14	128
8	240	16	256

Les copies cibles (amplicons) n'apparaissent qu'au 3^{ème} cycle.

Le nombre d'amplicons formé avec n cycles est $A = 2^n - 2n$

Donc pour 40 cycles : $2^{40} - 80 = 1099511627776 - 80 = 1099511627696$ amplicons

3° - Réalisation d'une PCR

Document 4 : Les chromosomes X et Y

Les chromosomes X et Y sont les chromosomes sexuels.

Chez les mammifères et chez l'Homme en particulier, ils ne sont pas homologues sur leur plus grande partie. Ainsi, pour les gènes situés sur ces parties sans homologues sur X ou sans homologue sur Y, le sujet ne possède qu'un allèle de ces gènes. Il existe cependant sur X et Y certaines (petites) parties homologues, c'est à dire pour lesquelles les gènes de l'espèce possèdent deux allèles possibles.

Document 5 : Le gène de l'amélogénine

Ce gène code pour une protéine présente dans la composition de l'émail des dents.

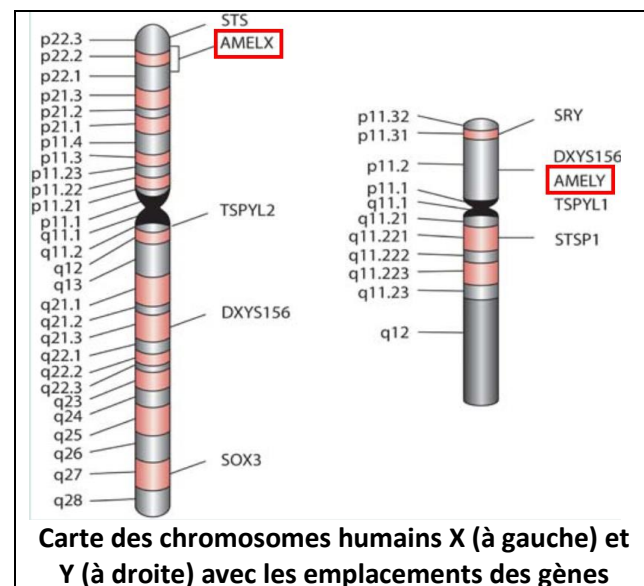
La protéine amélogénine exprimée à partir du gène est le composant majeur du développement de l'émail des mammifères, dans lequel elle représente environ 90% de la teneur en protéines. Cette protéine joue donc un rôle essentiel dans le développement de l'émail.

Le gène AMEL présente chez l'humain deux allèles localisés respectivement sur les chromosomes X et Y.

- Comparer les séquences AMEL-X et AMEL-Y (AMEL-X.edi et AMEL-Y.edi)

Les deux séquences AMEL-X et AMEL-Y ne sont pas identiques

Les deux séquences possèdent 72,32 % d'identité et 27,68 % de différences

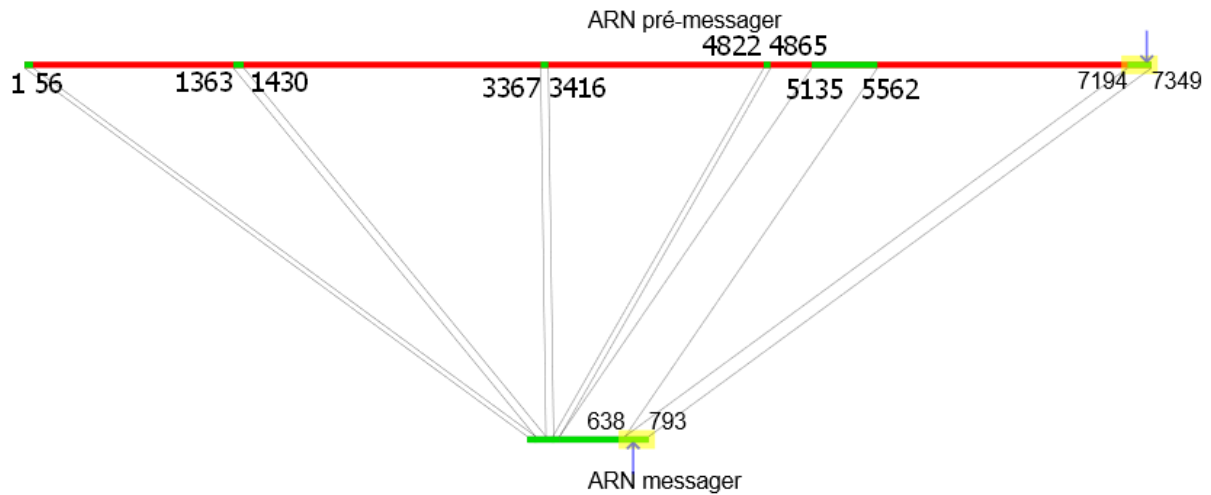


Carte des chromosomes humains X (à gauche) et Y (à droite) avec les emplacements des gènes

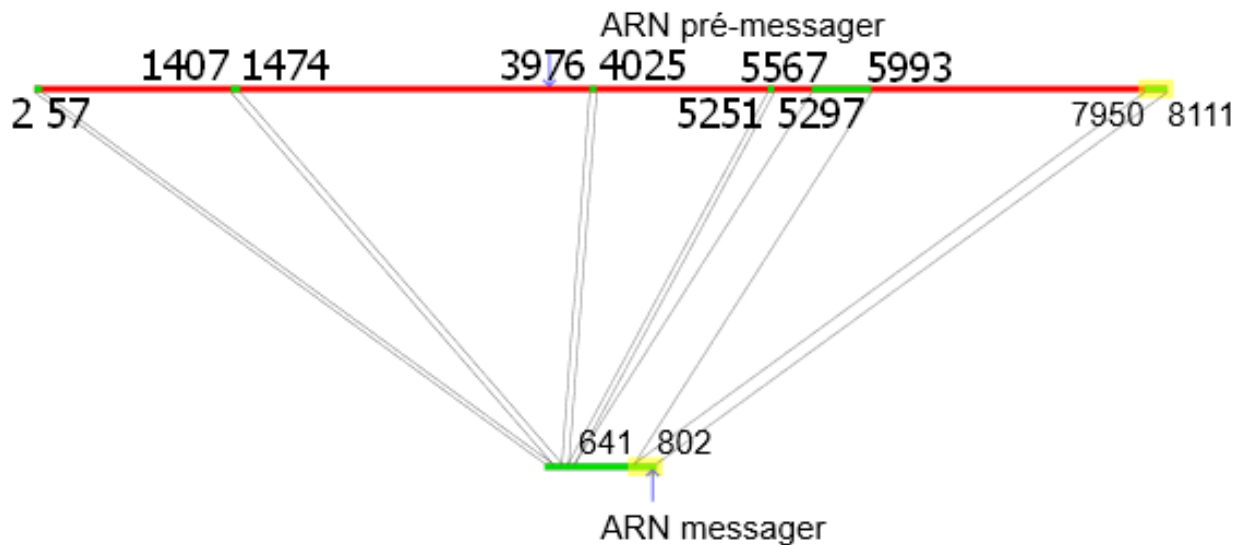
On a pu déterminer les séquences d'ARNm permettant d'exprimer l'amélogénine à partir de l'allèle AMEL-X et de l'Allèle AMEL-Y.

- Utiliser le logiciel DOTPLOTTER (MCNL, SVT, Biologie, Biologie moléculaire) et coller dans les fenêtres adéquates
 - les fichiers fournissant le brin d'ADN codant DNA-AMEL-X.txt, DNA-AMEL-Y.txt, pour AMEL-X et AMEL-Y
 - les fichiers RNAm-AMELX.txt, RNAm-AMEL-Y.txt fournissant l'ARNm permettant la synthèse de la protéine amélogénine.
- Indiquez le nombre d'exons et schématisez leur position dans les allèles AMEL-X et AMEL-Y.

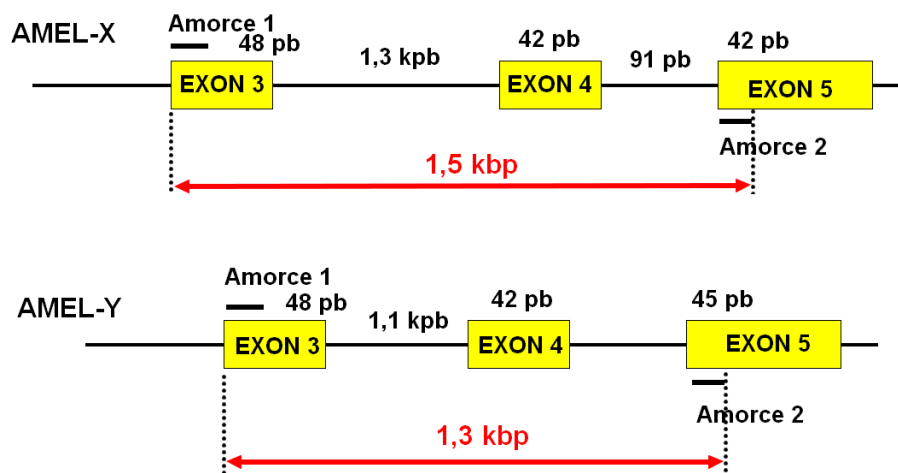
Pour AMEL-X : 6 exons (voir répartition)



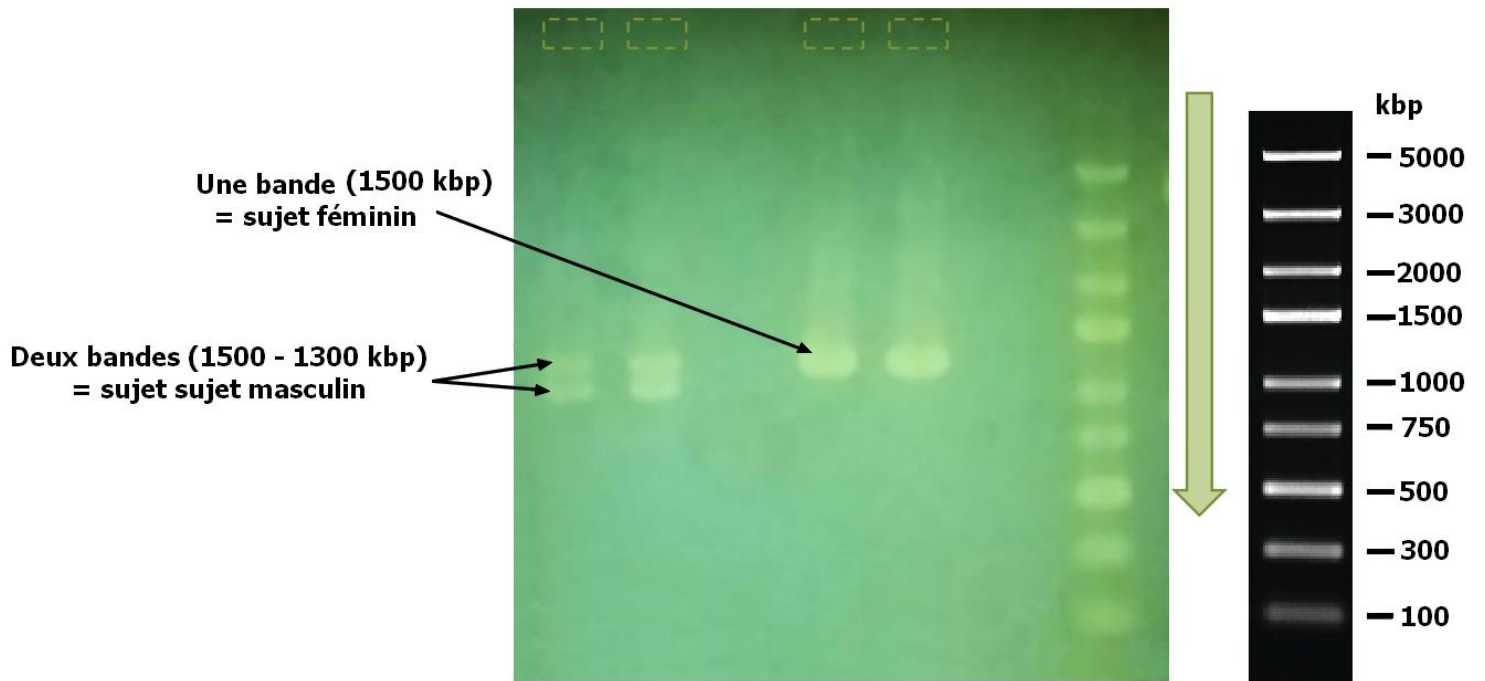
Pour AMEL-Y : 6 exons (voir répartition)



On souhaite réaliser l'amplification d'une séquence de AMEL-X et AMEL-Y en utilisant des amorces 1 et 2 encadrant un fragment du gène.



- Réalisez une PCR pour amplifier vos séquences d'allèles à l'origine de l'amélogénine (1 élève par binôme ou trinôme)
- Réalisez ensuite une électrophorèse sur gel des séquences amplifiées
- A partir des résultats obtenus par l'ensemble du groupe dégagez l'intérêt de cette technique pour la police scientifique ou en archéologie.



A partir d'un ADN extrait d'une scène de crime, d'un cadavre ou des restes humains contenant encore de l'ADN, on peut savoir si l'individu possède une seule séquence (1,5 kbp) ou 2 séquences (1,5 kbp et 1,3 kbp).

S'il n'y a qu'une seule séquence observable après amplification et électrophorèse, le sujet est de sexe féminin (XX)

S'il y a deux séquences observables après amplification et électrophorèse, le sujet est de sexe masculin (XY)

