

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

ENQUETE SUR LA PRATIQUE DE LA PCR EN ALGERIE

Présenté par : TOBAL Ammar

Soutenu le : 15 / 06 /2016

Devant le jury composé de:

- Président : BAAZIZI R. Maitre assistante A (ENSV)
- Promoteur : MIMOUNE N. Maitre assistante A (ENSV)
- Examineur 1: BOUZID R. Maitre de conférences A (ENSV)
- Examineur 2 : HACHEMI A. Maitre assistante A (ENSV)

Année universitaire : 2015/2016

Résumé

La PCR est une technique nouvelle qui a bouleversé totalement le domaine de la biologie moléculaire, et qui s'évolue sans cesse dès le début de son apparition. En Algérie, très peu de données sont disponibles concernant l'utilisation de cette technique. De ce fait, l'objectif de cette étude est de réaliser une enquête en moyen d'un questionnaire, pour but : de développer les connaissances sur la pratique de la PCR, plus particulièrement dans les Centres d'analyse en Algérie, tout en évaluant l'avancement de la PCR dans notre pays par rapport aux autres.

Les résultats obtenus montrent que:

Le plus grand effectif quel que soit les demandes ou les tests réalisés est au niveau de l'hôpital El-Kattar (Alger), avec 750 tests effectués par mois et une réponse de 62.5% par rapport aux demandes. Vient ensuite les autres Centres d'analyses avec des valeurs faibles par rapport au précédent.

Dans le domaine vétérinaire, nous avons établi cette enquête dans l'INMV dont les résultats étaient comme suite :

- L'Institut se limite à l'application de la PCR uniquement en virologie
- N'effectue que 30 tests par mois par rapport aux 245 demandes d'analyse soit 12.24%.

Nous pouvons conclure que l'application de la PCR en Algérie est très étroite en comparaison avec d'autres pays dans le monde.

A la fin, pour fertiliser la progression de cette technique en Algérie, il faut faciliter l'accès avec des formations adéquates par le biais d'encourager les scientifiques théoriquement, moyennement et financement.

Abstract

PCR is a new technique that changed completely the field of molecular biology, and is constantly evolving from the beginning of his appearance. In Algeria, few data are available regarding the use of this technique. Therefore, the objective of this study is to conduct a survey using a questionnaire, aim: to develop knowledge on the practice of PCR, especially in the analytical centers in Algeria, while evaluating the progress of PCR in our country compared to others.

The results obtained show that:

The largest effective whatever the realized applications or test is at the El-Kattar Hospital (Algiers), with 750 tests per month and a 62.5% response compared to requests. Then comes the other centers of analysis with low values from the previous.

In the veterinary field, we established the survey in INMV whose results were as following:

- The Institute is limited to the application of the PCR only in virology.
- Do that perform 30 tests per month compared to 245 requests for analysis is 12.24 %.

We can conclude that the application of PCR in Algeria is very narrow in comparison with other countries in the world.

At the end, to fertilize the growth of this technique in Algeria, we must facilitate access to appropriate training through encouraging scientific theory, medium and financing.

الملخص

PCR هو تقنية جديدة التي غيرت تماما مجال البيولوجيا الجزيئي ويتطور باستمرار من بداية ظهوره. في الجزائر، تتوفر بعض البيانات المتعلقة باستخدام هذه التقنية. ولذلك، فإن الهدف من هذه الدراسة هو إجراء مسح باستخدام الاستبيان، والهدف لتطوير المعرفة على ممارسة PCR، وخاصة في المراكز التحليلية في الجزائر، في حين أن تقييم تقدم PCR في بلادنا مقارنة مع الآخرين.

وتظهر النتائج أن:

أكبر فعالية بغض النظر عن التطبيقات أدركت أو الاختبار هو في مستشفى شرم كتر (الجزائر العاصمة)، مع 750 الاختبارات في شهر واستجابة 62.5٪ مقارنة مع الطلبات. ثم يأتي غيرها من مراكز التحليل مع القيم المنخفضة من السابق.

في مجال الطب البيطري، أنشأنا المسح في INMV التي كانت على النحو التالي النتائج:

-المعهد يقتصر على تطبيق PCR فقط في علم الفيروسات

-هل الذي ينفذ 30 الاختبارات شهريا مقارنة مع 245 طلبات للتحليل هي 12.24٪

يمكننا أن نستنتج أن تطبيق PCR في الجزائر، فهي ضيقة جدا بالمقارنة مع بلدان أخرى في العالم.

في النهاية، لتسميد نمو هذه التقنية في الجزائر، لا بد لنا من تسهيل الحصول على التدريب المناسب من خلال تشجيع نظرية علمية قو المتوسط والتمويل.

Remerciement

- Je tiens a remercié avant tout ma promotrice **Mme Mimoune Nora** qui m'a encadré et aidé tout le long de se parcours pour la réalisation de se mémoire je tiens a lui exprimé ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciement pour tout son temps et tous ces efforts qu'elle a consacré pour la réalisation de se projets. Je vous suis sincèrement reconnaissent
- Je remercie également **Dr BAAZIZI R.** de nous avoir fait honneur de sa présence comme président de notre jury. Tous mes remerciements
- Je remercie le **Dr BOUZID R.**et **HACHEMI A.** d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail. Remerciement respectueux
- Je tiens également a remercie la directrice du laboratoire de l'INMV de m'avoir fournit les informations nécessaires à ma recherche et d'avoir répondu a mes questionnaires. Tous mes sincères remerciements
- Je tiens aussi a remercié **Dr Tazir** maître assistant au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Mustapha Bacha de m'avoir renseigné et répondu a mes questions qui m'ont servie dans ma recherche. Remerciement chaleureux
- Tout mes remerciement a la directrice du laboratoire de l'hôpital d'El KETTAR pour m'avoir aidé dans mon questionnaire et d'avoir pris le temps de répondre à mes questions
- Je tiens également a remercié tout ceux qui m'ont aidé et soutenus tout au long de se parcours de près ou de loin et plus particulièrement à celle qui était à mes côtés aux moments difficiles, **Anaïs.**

Je remercie et dédis se travail à

- Aux 2 personnes les plus chers a mon cœur, ***ma mère et mon père*** qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont toujours soutenus dans toutes les épreuves de la vie et qui ont tout sacrifié pour que je ne manque jamais de rien, je leur doit toute ma réussite
- A mes très chers frères ***Fateh, Ihab, Rayan*** et à ma merveilleuse petite sœur ***Amira***
- Je remercie également tout les membres de ma famille sans exception
- A mes chers amis qui m'ont accompagné tout le long de l'année ***Hassen, Abdou el bouraka, Hicham, Sidou, Yahya, Zohir, Ghanou, Kacimou, Amine, Djeloul, Lawid, charafou, Djalil, Hakou, Zahrou, Fares, Nasser.....***

La liste des tableaux

1- Caractéristiques de certaines ADN polymérases utilisées pour la PCR.....	18
2- Comparaison de la taille du génome de certaines espèces végétales et copies correspondantes du génome dans une quantité définie d'ADN	36
3- Contrôles à introduire dans les tests basés sur la PCR.....	37
4- Germes et molécules les plus fréquemment recherchés par PCR.....	45
5- Rapport mensuel de l'utilisation de PCR au niveau des structures visitées.....	49
6- Nombre de tests effectués/mois par rapport aux demandes.....	51

La liste des figures

Figure1 : structure de l'ADN

Figure2 : ADN cible

Figure3 : La première étape de la PCR à 95°C : la dénaturation

Figure4 : La seconde étape de la PCR : l'hybridation

Figure5 : La troisième étape de la PCR : l'élongation

Figure6 : Résultat après le deuxième cycle de PCR

Figure7 : Résultat après le troisième cycle de PCR

Figure8 : Les étapes de l'amplification PCR

Figure9 : L'amplification exponentielle de l'ADN dans la PCR

Figure10 : Profil de cycles de température PCR

Figure11 : principe de la PCR en temps réel

Figure12 : technique LAMP

Figure 13 : principe de la RT-PCR

Figure 14 : Réaction à l'uracile-ADN glycosylase

Figure15 : Southern blot sur produits d'amplification par PCR

Figure16 : RFLP sur produits d'amplification par PCR

Figure17 : Détection de mésappariements sur produits d'amplification par PCR

Figure18 : Pourcentage du Nombre de tests effectués par mois dans les différents Centres d'analyse sur la Wilaya d'Alger

Figure19 : Nombre de demandes relatif à la réalisation des tests de PCR au niveau des structures d'analyse visitées

Figure20 : Nombre de tests effectués selon les demandes dans les différents Centres d'analyse et tests effectués en réponse à ces demandes

Figure21 : Biorad : thermocycleur pour PCR en point final

Figure22 : Biorad cfx 96 : pour la PCR en temps réel

Figure23 : M2000 abbot , PCR en système fermé utilisé pour les hépatites virales

Figure24 : Cobas Ampli Prep-Taq Han : pour PCR en temps réel

Figure25 : Sacace : pour PCR en point final

Figure26 : A7500 : pour PCR conventionnelle et en temps réel

Les abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

Taq : Extraite de la bactérie thermophile thermus aquaticus

BET : Bromure d'éthidium

NTP : Nucléotides

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARNm : Acide ribonucléique messenger

qPCR : Quantitative PCR

RT-PCR : Reverse transcription-PCR

CCD : Combinaison camera détection

FACS : pour Fluorescence activated cell sorting

L'ep-PCR : error prone-PCR

UTP : Uridine tri phosphate

UNG : Uracile-N-Glycosilase

RFLP : restriction fragment length polymorphism

VIH : virus de l'immunodéficience humain

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

Sommaire

Introduction générale

Partie Bibliographique

I-	Définition et Historique.....	p03
II-	Principe	p04
	II-1. Le milieu réactionnel.....	p04
	a- ADN cible.....	p04
	b- Les réactifs.....	p07
	II-2. Etapes de la réaction.....	p07
	a- La dénaturation.....	p08
	b- L'hybridation.....	p08
	c- L'élongation.....	p09
	II-3. Conséquence et cycles suivants.....	p10
III-	Application de la PCR.....	p14
	III-1. Application indirecte.....	p14
	III-2. Application directe.....	p15
	III-3. Thermocycleurs classiques.....	p18
IV-	PCR Spécialisée.....	p20
	IV-1. PCR Nichée.....	p20
	a- Avantage.....	p20
	b- Inconvénient.....	p20
	IV-2. PCR Multiplex.....	p21
	IV-3. PCR en temps réel.....	p21
	a- Avantage.....	p22
	IV-4. Technique LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).....	p23
	a- Avantage.....	p24
	b- Inconvénient.....	p24

IV-5. La RT-PCR	p26
V- Autres types de PCR	p29
V-1. La RT-PCR in situ	p29
V-2. La RT-PCR sur une cellule	p29
V-3. La TP-PCR	p29
V-4. La PCR sur colonie	p30
V-5. L'ep-PCR	p30
VI- La PCR dans la pratique	p30
VI-1. Méthodes physiques de prévention	p31
a- Equipements de laboratoire	p31
b- Manipulation des échantillons	p32
VI-2. Méthodes biochimiques de prévention	p33
a-Uracile-ADN glycolase	p33
b-DNase I, exonucléase III	p34
c-Préparation du mélange pour la réaction PCR (mastermix)	p35
VII- Contrôles	p36
VII.1- Contrôles positifs	p37
VII.2- Contrôles négatifs	p38
VIII- La PCR appliquée au diagnostic	p38
VIII-1. Maladies Génétiques	p38
VIII-2. Maladies Infectieuses	p41

Partie expérimentale

I- Matériels et Méthodes	p43
II- Résultats, analyses et discussions	p44
III- Conclusion et recommandations	p57

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La molécule d'ADN doit sa pérennité et la transmission de l'information qu'elle contient au fil des divisions cellulaires à un mécanisme hautement complexe et très reproductible qu'est la réplication (ou duplication). Ce phénomène universel est très spécifique à la fois chez les organismes eucaryotes et procaryotes. Il assure une fidèle duplication du support de l'information génétique qu'est la molécule d'ADN.

Ce mécanisme hautement complexe implique une machinerie enzymatique très spécifique indispensable au processus de la vie des cellules.

Cependant, au cours de la vie de la cellule, l'ADN est soumis à de nombreuses modifications comme des lésions et des mutations (deux phénomènes distincts) qui modifient la fidélité de réplication.

Pour pallier à ces perturbations, les cellules possèdent en complément des systèmes de réparation qui permettent la plupart du temps de rétablir l'information génétique originelle lors de la réplication.

Plusieurs chapitres vont distinguer les modes de la transmission de l'information génétique :

- Le mécanisme moléculaire de la réplication ;
- La réplication chez les procaryotes ;
- La réplication chez les eucaryotes ;
- le système de réparation (www.ecol-ADN.com).

La mise au point de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) par K. Mullis et ses collaborateurs en 1985 a révolutionné la biologie moléculaire et la médecine moléculaire (Saiki et al, 1985). La réaction de polymérisation en chaîne est une technique *in vitro* utilisée pour amplifier à l'aide d'enzymes une région déterminée de l'ADN qui se trouve entre deux régions de séquence ADN connue. Alors qu'autrefois seules de très petites quantités d'un gène spécifique pouvaient être obtenues, la PCR permet maintenant d'amplifier même une seule copie de gène à un million d'exemplaires en quelques heures.

Les techniques PCR sont devenues essentielles pour beaucoup de procédures communes, telles que le clonage de fragments d'ADN spécifiques, la détection et l'identification de gènes à des fins de diagnostic et en médecine légale ainsi que dans la recherche sur les modes d'expression génique.

Plus récemment, la PCR a permis l'exploration de nouveaux domaines, tels que le contrôle de l'authenticité de denrées alimentaires, la présence d'ADN génétiquement modifié et la contamination microbiologique (JRC, module06-PCR- M. Somma, M. Querci ; page 04).

En Algérie très peu de connaissances actuellement disponible sur la pratique de la PCR, ainsi que sur son utilisation dans les différents domaines et surtout dans le domaine de la médecine vétérinaire.

De ce fait notre présent travail avait comme objectif général, d'apporter une contribution à la connaissance les pratiques de la PCR dans les différents centres d'analyse en Algérie.

LA PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Définition et historique

La PCR (Polymerase Chain Reaction, - réaction en chaîne par polymerase) est une réaction biologique moléculaire *in vitro* d'amplification génétique. C'est une technique qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) spécifique et de longueur définie.

L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en une centaine de minutes. Ainsi, à partir d'échantillons où l'analyse de brins d'ADN est difficile (voir impossible) en raison d'une faible quantité, cette réaction amplifie ces brins et facilite leurs analyses et détectations. Cette réaction est basée sur des cycles thermiques, typiquement une trentaine, composés de trois étapes : La dénaturation de l'ADN à environ 95°C, l'hybridation à 50°C et l'élongation à 72°C. (K. Mullis, F. Faloon, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn et H. Erlich, 1986), (R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, E. Higuchi, G. Horn, K. Mullis et H. Erlich, 1988).

Cette technique d'amplification a été mise au point en 1986 par K. Mullis (K. Mullis, F. Faloon, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn et H. Erlich, 1986), qui a obtenu le prix Nobel de Chimie pour ses travaux en 1993. Il faut savoir qu'avant cette découverte, la méthode d'amplification était assez longue. Auparavant, une telle opération nécessitait impérativement le clonage de la séquence ADN, son isolement, son amplification dans une cellule hôte et sa purification. Cette méthode, plutôt lourde, a été abandonnée, dès que possible, au profit de la PCR qui a certainement connu le développement le plus spectaculaire et le plus rapide dans l'histoire de la biologie.

En effet, 2 ans plus tard est réalisée par R.K. Saiki (R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, E. Higuchi, G. Horn, K. Mullis et H. Erlich, 1988), la première réaction de PCR avec une enzyme thermostable : la Taq (extraite de la bactérie thermophile *thermus aquaticus*) qui permet une « automatisation » de la technique. Jusqu'alors, les enzymes classiques étaient détruites à l'étape de dénaturation. L'ouverture des tubes et l'ajout d'enzymes à chaque cycle de PCR étaient nécessaires ce qui induisait de fortes possibilités de contamination. Depuis les travaux de R.K. Saiki et l'utilisation de la Taq Polymérase comme enzyme pour l'étape d'élongation, la réaction de PCR a connu un essor considérable et est aujourd'hui une technique incontournable dans les laboratoires biologiques et médicaux.

Les nombreux travaux, concernant cette réaction, ont mené 4 ans plus tard, en 1992, à la réalisation de la première réaction de PCR en temps réel, aussi nommée PCR quantitative, par R. Higuchi (R. Higuchi, G. Dollinger, P. Walsh et R. Griffith, 1992). Les séquences d'ADN spécifiques sont détectées en même temps que la réaction, en temps réel. Dans cette étude (R. Higuchi, G. Dollinger, 1992), cette amélioration nécessite l'ajout de bromure d'éthidium (BET) qui fluoresce en présence de doubles brins d'ADN. Une augmentation de la fluorescence dans le tube réactionnel indique alors une amplification positive. Celle-ci peut alors être surveillée facilement, au fil de l'eau, afin de suivre sa progression. Cette capacité à amplifier simultanément des séquences d'ADN spécifiques et à détecter le produit de l'amplification a permis de simplifier et d'accélérer tout le protocole expérimental.

Depuis tous ces travaux, des industriels ont commercialisé des systèmes automatisés capables de réaliser autant de cycles de PCR que l'utilisateur le souhaite. Ces systèmes, appelés thermocycleurs, sont nombreux et courants dans les laboratoires biologiques.

Plusieurs dizaines voire centaines de réaction peuvent être réalisées en parallèle pour des dimensions de l'appareil de l'ordre du décimètre et des prix raisonnables ce qui en fait un appareil incontournable.

II- Principes

Dans cette partie, nous allons présenter le principe de la PCR. Comme nous l'avons vu, l'objectif de cette réaction est d'amplifier des doubles brins d'ADN. La première étape sera de séparer la double hélice en deux monobrans d'ADN. La suite de la réaction consiste à compléter, ou plutôt synthétiser ces deux monobrans grâce à la complémentarité des bases pour former deux nouvelles doubles hélices. Nous commencerons par présenter la composition de l'ADN avant d'exposer rapidement les différents acteurs de la réaction. Nous expliquerons ensuite les trois étapes thermiques de la PCR.

II-1. Le milieu réactionnel

a- ADN cible :

Tout d'abord, définissons l'ADN (Acide DesoxyriboNucléique). Il s'agit d'une molécule très longue composée d'une succession de nucléotides et présente dans toute cellule vivante.

Elle code l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. La structure de l'ADN, présentée à la Figure 1, est formée de deux brins complémentaires enroulés en hélice que nous nommerons souvent double hélice.

Les brins sont constitués de désoxyribonucléotides. Ces derniers font partie de la famille des nucléotides. Nous les appellerons ainsi dans la suite. Ces nucléotides sont en fait l'unité élémentaire de l'ADN. Chacun d'entre eux est constitué de trois parties : un groupe phosphate lié à un résidu désoxyribose lui-même lié à une base azotée (Figure 2). Il existe quatre bases azotées (l'adénine notée A, la thymine notée T, la guanine notée G et la cytosine notée C) ce qui induit quatre nucléotides pour l'ADN :

- ☐ Le dAMP dont la base azotée est l'adénine
- ☐ Le dGMP dont la base azotée est la guanine
- ☐ Le TMP dont la base azotée est la thymine
- ☐ Le dCMP dont la base azotée est la cytosine

Pour plus de transparence, nous indiquerons ces nucléotides par l'abréviation d'NTP, qui est l'appellation courante du mélange des quatre nucléotides. L'ordre des nucléotides est très précis et correspond à l'information génétique. Les bases constituant les nucléotides sont complémentaires et s'associent par paires avec des liaisons hydrogènes de faible énergie :

- ☐ L'adénine avec la thymine (A-T) et inversement (T-A)
- ☐ La guanine avec la cytosine (G-C) et inversement (C-G)

Il y a deux liaisons hydrogènes entre A et T et trois liaisons entre G et C (J. Watson et F. Crick, 1953).

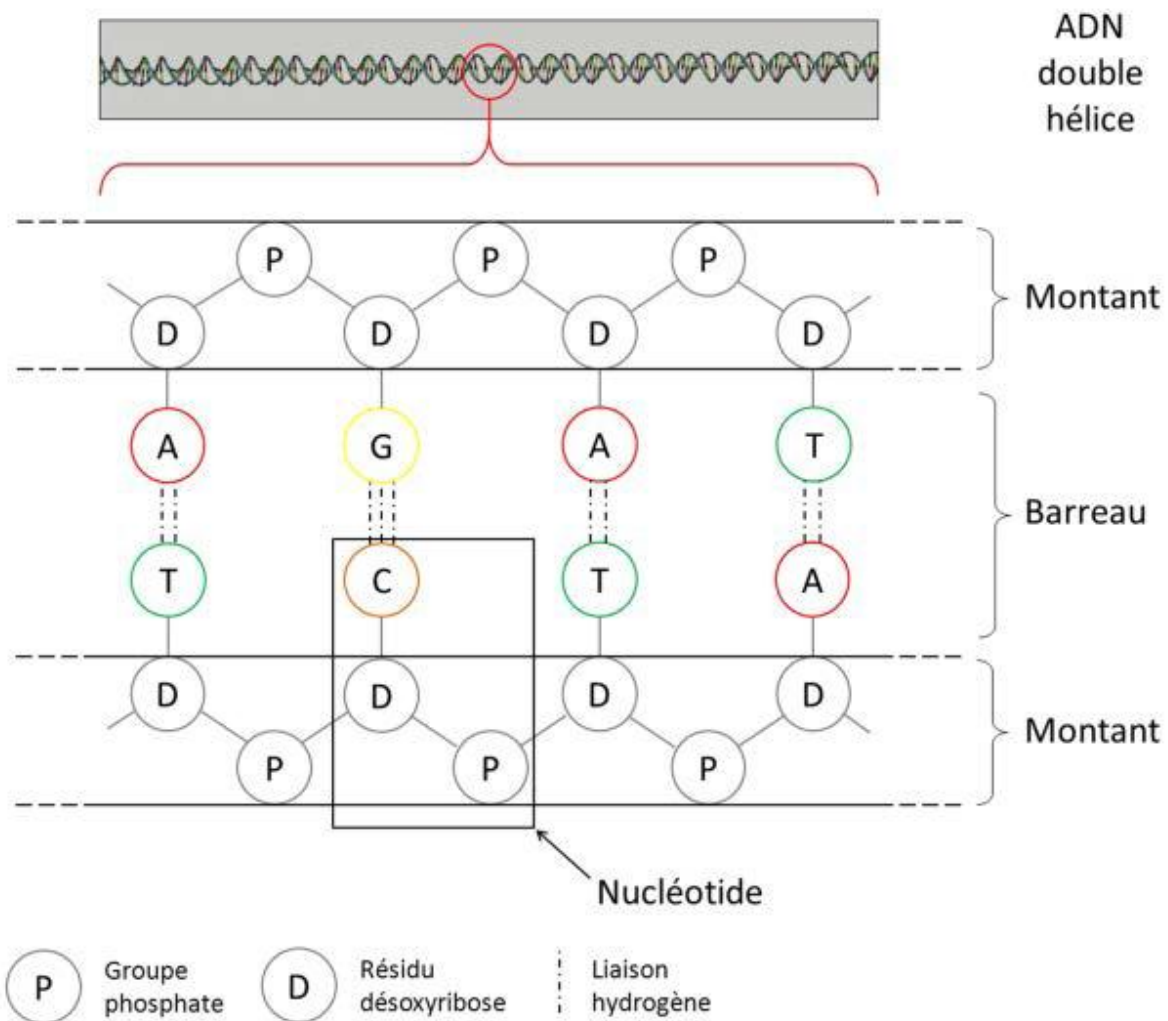


Figure 1 : structure de l'ADN (J. Watson et F. Crick, 1953)

Les nucléotides sont reliés ensemble grâce à des liaisons impliquant un groupe phosphate (Figure 2) que nous appellerons des liaisons 5'-3' phosphodiester. Pour fabriquer un brin d'ADN, il suffit donc de combiner des nucléotides en les reliant par ce type de liaisons. Pour d'avantage de transparence dans les futures figures, nous ne représenterons plus les groupes phosphates, les groupes désoxyriboses et les liaisons hydrogènes.

L'ADN que l'utilisateur souhaite amplifier est appelé ADN cible (Figure 2). Ce dernier représente un fragment d'un double brin d'ADN et est constitué d'une centaine de paires de bases à plusieurs milliers. La Figure 2 représente un double brin d'ADN et une séquence cible.

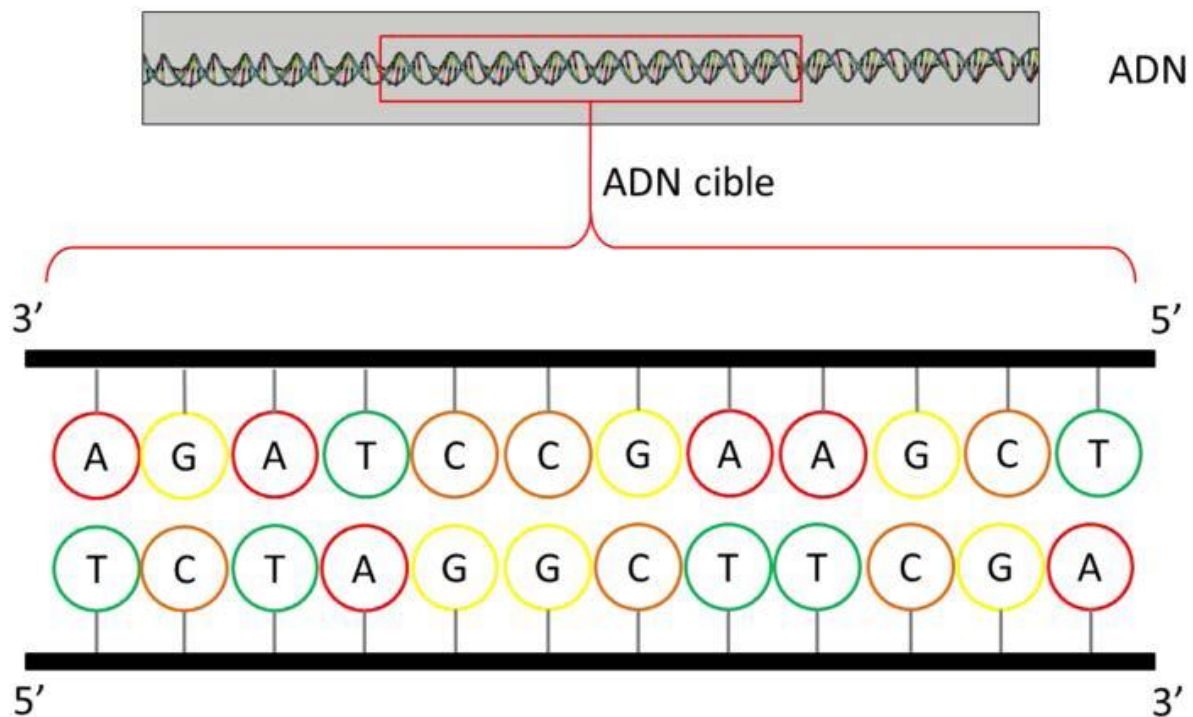


Figure 2 : ADN cible (J. Watson et F. Crick, 1953)

Les brins d'ADN sont orientés dans le sens 5' vers 3' comme le montre la Figure 2 en raison de notations liées à la géométrie du désoxyribose. Deux brins d'une double hélice sont complémentaires et antiparallèles. D'une manière plus simple, ils sont assemblés tête bêche : l'extrémité 5' de l'un est liée avec l'extrémité 3' de l'autre et inversement comme le montre la Figure 2.

b- Les réactifs

D'autres réactifs sont nécessaires à la réalisation de la PCR. Les amorces, l'enzyme Taq et les désoxyribonucléotides sont les principaux acteurs de la réaction. Nous allons expliquer leurs rôles dans la prochaine partie, en parallèle de la présentation des différentes étapes de la réaction.

II-2. Etapes de la réaction

La réaction de PCR s'effectue par cycle de températures. Trois étapes par cycle sont nécessaires pour doubler la quantité initiale d'ADN : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Une figure représentera chaque étape de la réaction.

a- La dénaturation

La première étape consiste à séparer la double hélice d'ADN en deux monobrans en rompant les liaisons hydrogènes entre les bases complémentaires de l'ADN. Pour cela, le mélange réactionnel est simplement échauffé à une température de 92°C ce qui sépare les deux brins de l'ADN source (Figure 3).

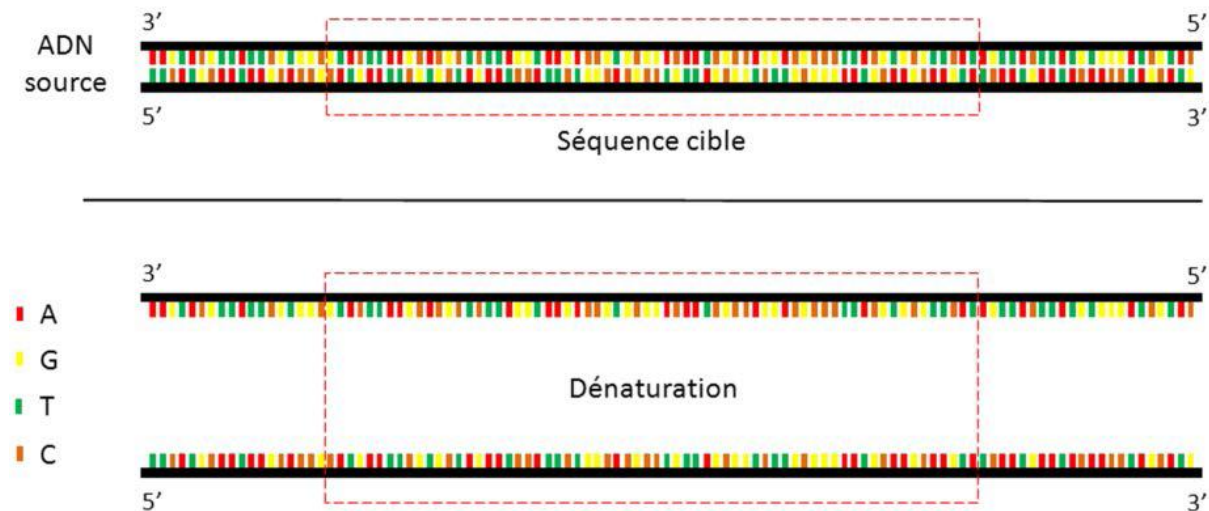


Figure 3 : La première étape de la PCR à 95°C : la dénaturation (J. Watson et F. Crick, 1953)

b- L'hybridation

La seconde étape est l'hybridation de l'amorce sur les brins d'ADN. Les amorces sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases organisées en fonction des séquences d'ADN à dupliquer. Elles sont un fragment complémentaire de l'ADN cible comme le présente la Figure 4. Les amorces s'hybrident aux monobrans d'ADN grâce à la complémentarité des bases et délimitent la région d'ADN à amplifier. Comme leur nom l'indique, elles servent d'amorce pour la synthèse du brin. Leur extrémité 3', de liaison (OH) libre, sert de point de départ pour la copie du brin d'ADN cible par l'enzyme (étape suivante). Le choix des amorces est donc primordial pour la réalisation de la réaction de PCR et est fonction de la séquence d'ADN cible à dupliquer. La température d'hybridation est constante et est choisie en fonction des amorces, généralement entre 50 et 60°C.

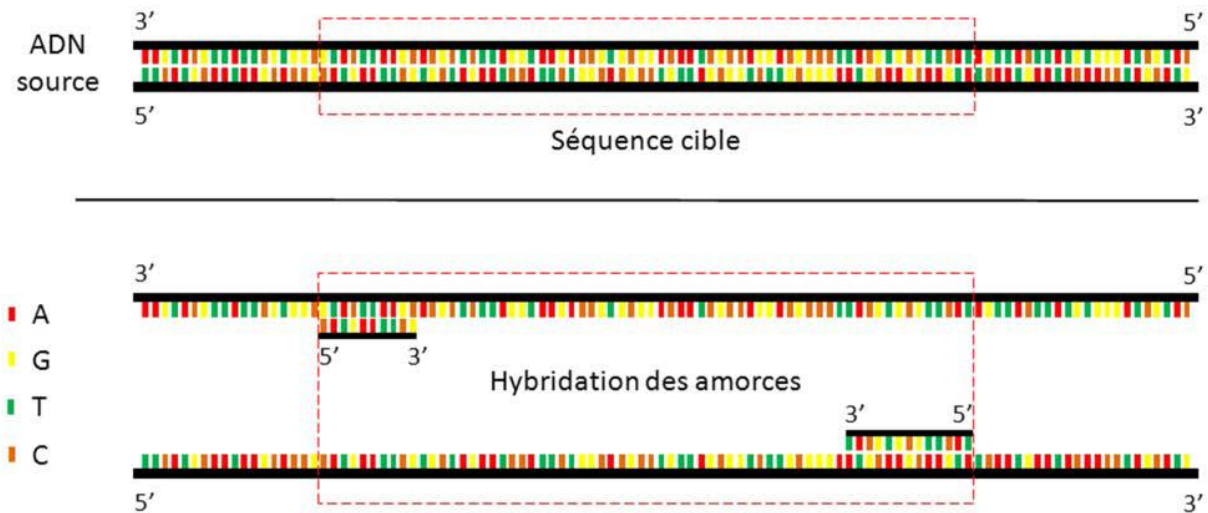


Figure 4 : La seconde étape de la PCR : l'hybridation. La température dépend des amorces et est généralement comprise entre 50 et 60 °C (J. Watson et F. Crick, 1953)

c- L'élongation

La troisième étape est celle d'élongation. Maintenant que le point de départ est fixé par l'étape d'hybridation de l'amorce, il reste à synthétiser la suite du monobrin pour former deux doubles brins. La Taq polymérase est une enzyme capable de synthétiser l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Les enzymes utilisées en PCR sont extraites de bactéries vivant naturellement à des températures élevées comme les sources hydrothermales. Cette particularité est nécessaire car l'enzyme doit pouvoir résister aux passages successifs à la température la plus élevée, celle de dénaturation. Les premières enzymes polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile résistante à des températures élevées comme par exemple la Taq polymerase, la Pfu polymérase, la Tli polymérase ou encore la Tth polymérase.

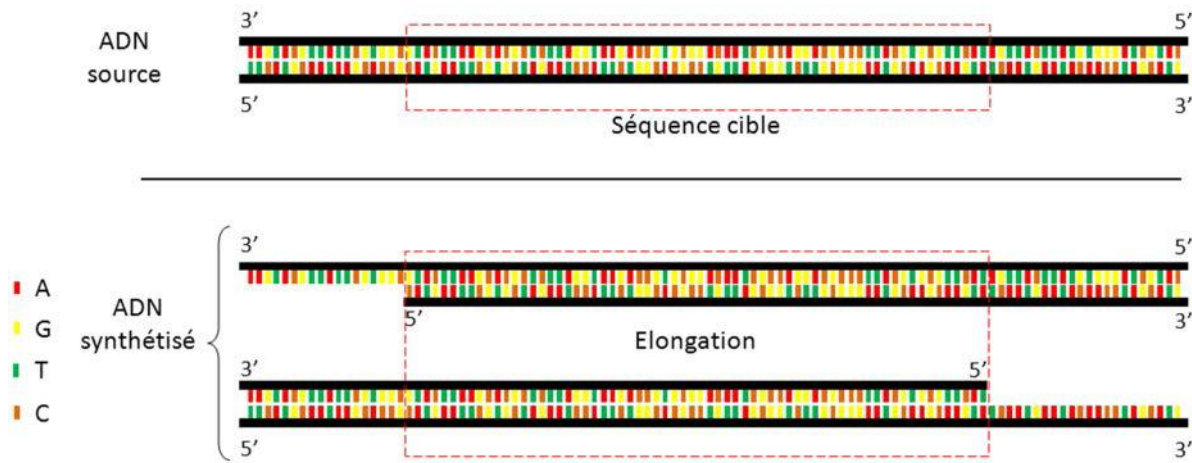


Figure 5 : La troisième étape de la PCR : l'élongation (J. Watson et F. Crick, 1953)

Pour synthétiser la suite du monobrin (Figure 5), l'enzyme a besoin de nucléotides. Ces derniers sont placés en excès dans la solution de réaction et l'enzyme va « piocher » les différents nucléotides nécessaires à la recombinaison du brin d'ADN. Cette étape intervient à une température fonction de l'enzyme utilisée. La durée de l'étape dépend de la taille de l'ADN cible à dupliquer et de la vitesse de synthèse de l'enzyme. Typiquement, avec la Taq polymérase, la température optimale est 72°C et l'ordre de grandeur classique retenu est de 30 secondes pour la copie de 1000 paires de base.

II-3. Conséquence et cycles suivants

Après un cycle de PCR, nous remarquons qu'à partir d'une double hélice d'ADN, sont synthétisées deux doubles hélices (Figure 5). Cependant, la taille de celles synthétisées ne correspondent pas à la taille de la séquence cible. En effet, si l'on sait où l'enzyme commence à travailler (à partir de l'amorce) on ne sait pas encore où elle s'arrête. Au cycle suivant, nous obtenons les doubles hélices présentées à la Figure 6. Comme nous pouvons l'observer, nous n'obtenons toujours pas les séquences ADN attendues. Ce n'est qu'à partir du troisième cycle que les premières doubles hélices spécifiques apparaissent. En effet, les séquences sont présentées à la Figure 7 et les deux cercles rouges nous indiquent les deux doubles hélices synthétisées correspondantes à la séquence cible. A la fin du quatrième cycle, nous obtenons quatre séquences cibles synthétisées, puis 8 au cinquième cycle, 16 au sixième cycle etc... Au cours des cycles suivants, il s'ensuit une multiplication des séquences cibles qui obéit à une loi exponentielle alors que les séquences synthétisées non spécifiques suivent une loi de multiplication linéaire (2 au premier cycle, 4 au second, 6 au troisième, 8 au quatrième...).

La proportion de séquences cibles synthétisées dépasse ainsi rapidement celle des séquences non spécifiques. L'avantage de la réaction est que les séquences nouvellement créées servent de support de synthèse pour le cycle suivant.

La PCR est donc une réaction biologique « puissante » qui permet, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'obtenir une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN.

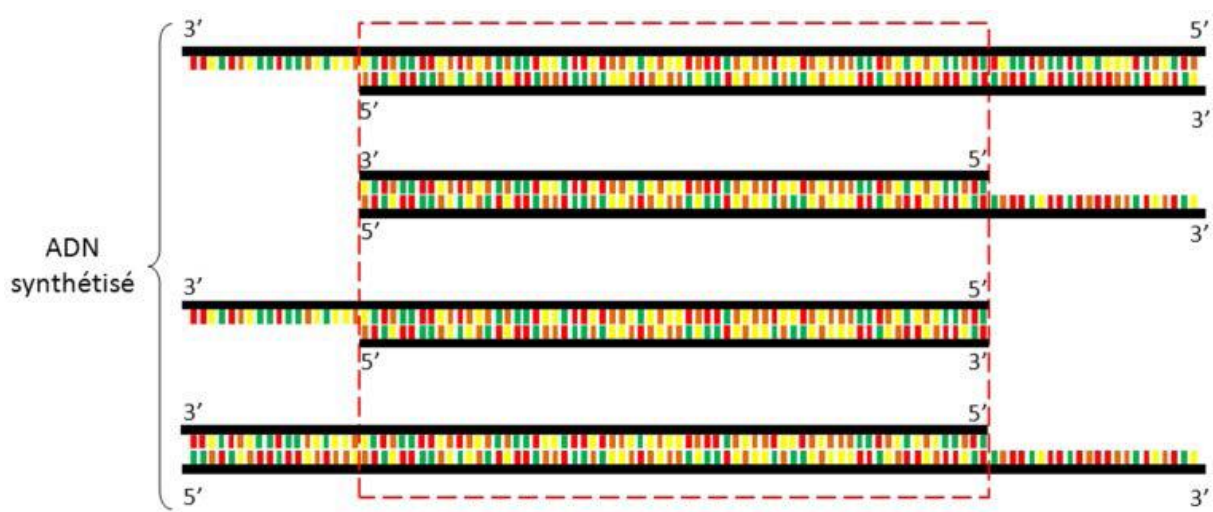


Figure 6 : Résultat après le deuxième cycle de PCR. L'encadré rouge pointillé correspond à la séquence cible (J. Watson et F. Crick, 1953)

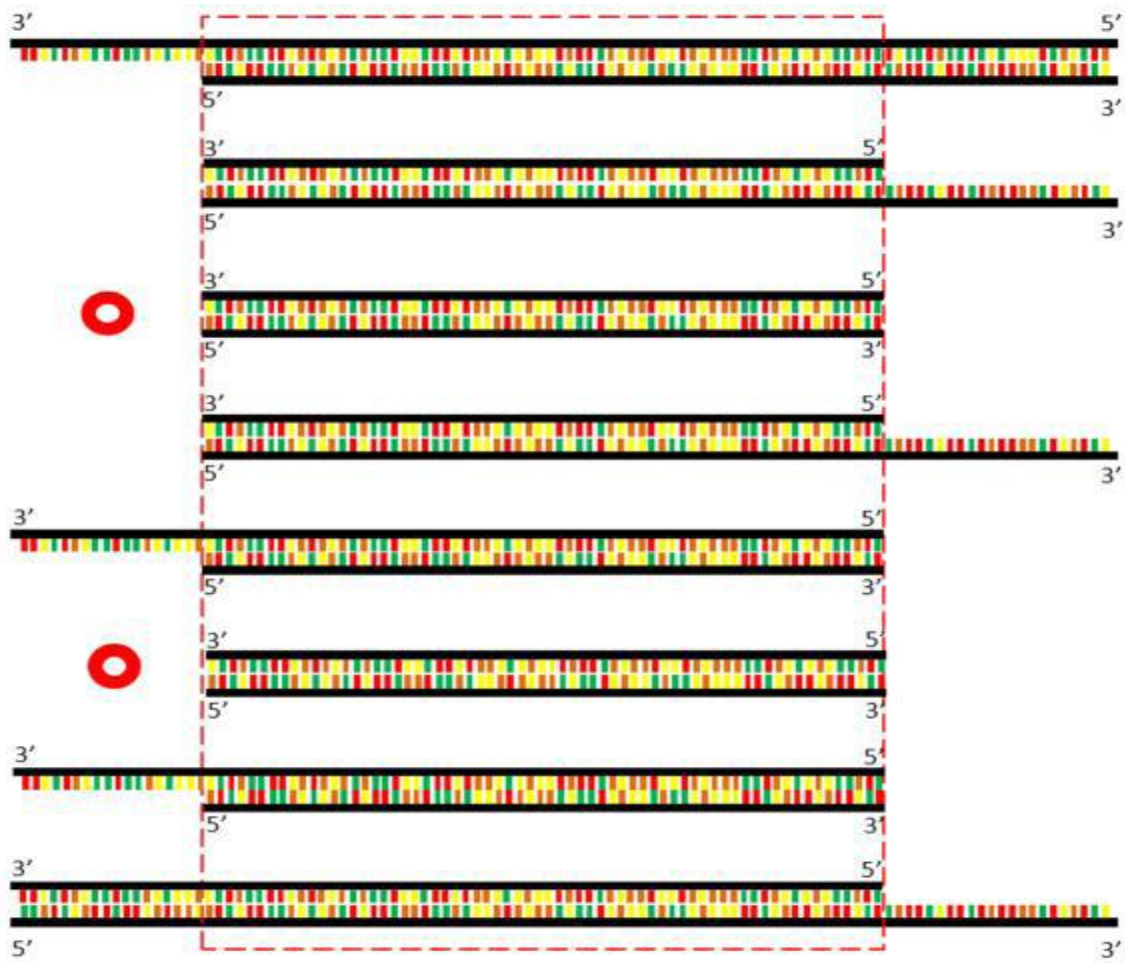


Figure 7 : Résultat après le troisième cycle de PCR. L'encadré pointillé rouge correspond à la séquence cible (J. Watson et F. Crick, 1953)

Récapitulatif

30 - 40 cycles of 3 steps :

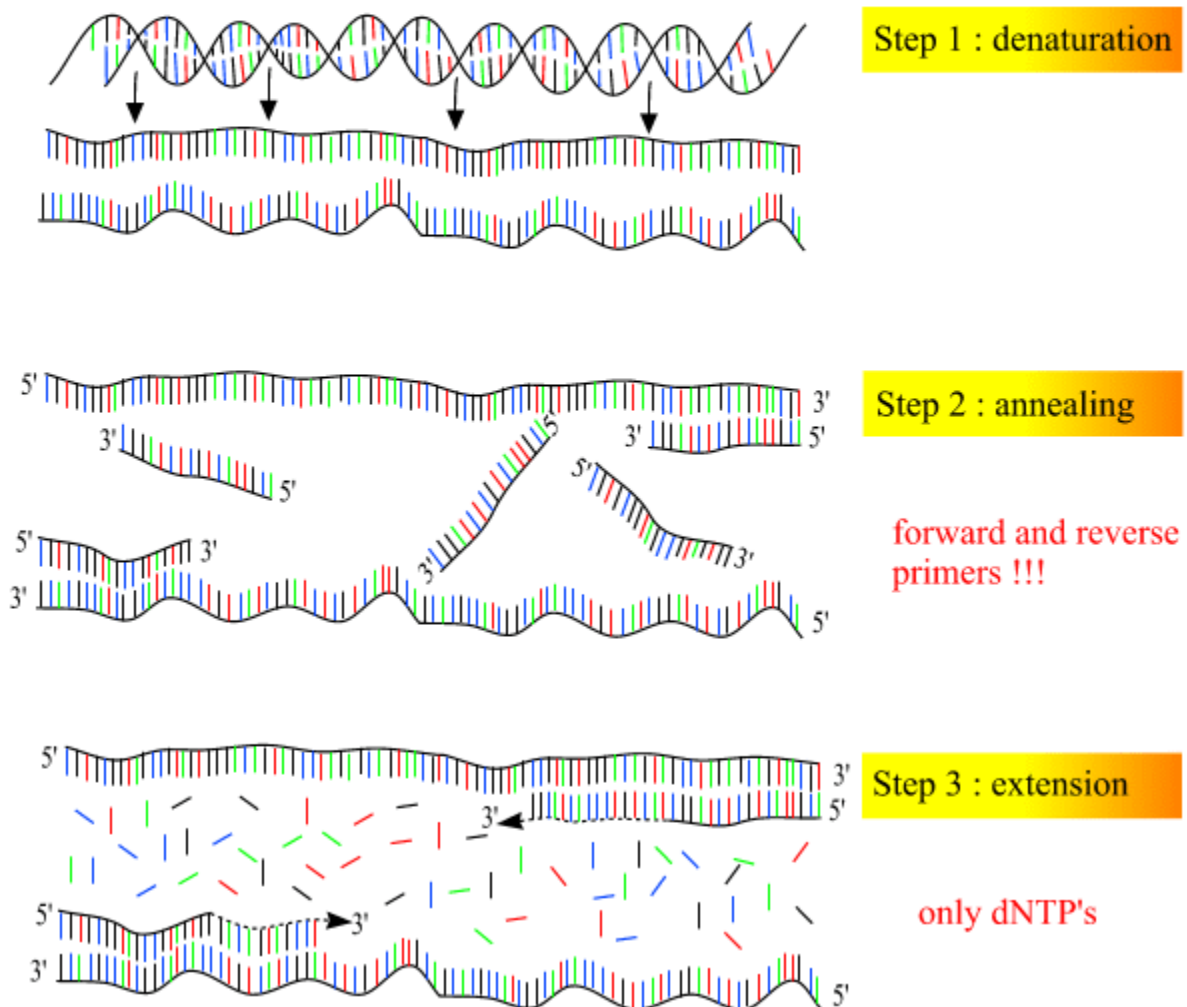


Figure 8 : Les étapes de l'amplification PCR (Andy Vierstraete, 1999)

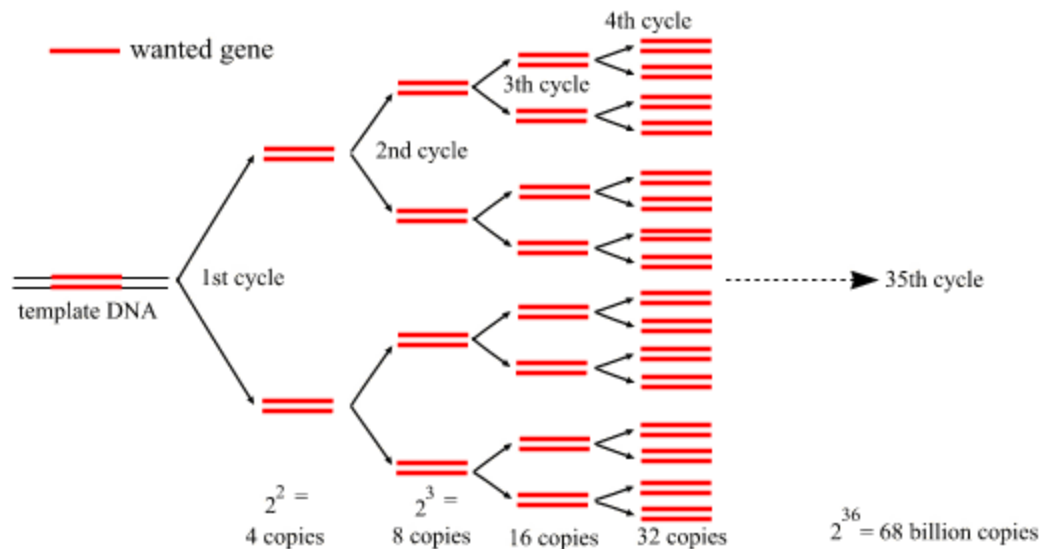


Figure 9 : L'amplification exponentielle de l'ADN dans la PCR (Andy Vierstraete, 1999)

III- Application de la PCR

Il serait difficile de citer tous les domaines d'applications de la PCR, tellement il en existe. Dans tous les cas, cette réaction consiste à rendre décelable, et de ce fait analysable, de l'ADN souvent présent à l'état de traces dans les échantillons. La PCR n'a donc pas d'applications directes en soi mais est nécessaire avant la détection et l'analyse d'échantillons. La PCR est donc indispensable dans de nombreux domaines tels que le diagnostic virologique, le diagnostic prénatal, le clonage acellulaire, la médecine légale, l'oncologie, la criminologie, le séquençage... (M. Rahman, M. Uddin, R. Sultana, A. Moue et M. Setu, 2013) (M. Joshi et D. J., 2010). Nous pouvons décomposer l'utilisation de la PCR en deux grandes parties :

- Application directe : la PCR est utilisée de manière autonome à des fins d'analyses grâce à sa spécificité d'amplification évoquée auparavant.
- Application indirecte : la réaction sert uniquement d'étape d'amplification au sein d'un protocole complet.

III-1. Application indirecte

La réaction de PCR est très utilisée dans les applications de séquençage. En effet, le protocole peut être modifié pour obtenir finalement une gamme de fragments d'ADN. Cette dernière est

fonction de la séquence complète du brin original ce qui permet, en outre, la détection de mutations comme en médecine légale ou encore les tests de paternité (J. Weber, 2005). La PCR trouve aussi des applications dans la mutation pour étudier par exemple la fonction d'un gène.

La mutation peut être introduite dans le gène par l'intermédiaire d'amorces mutées ou par des enzymes polymérases induisant des erreurs lors de la synthèse de l'ADN.

La PCR est aussi utile pour cloner des gènes. En effet, la séquence cible peut être amplifiée puis insérée dans un « vecteur », comme par exemple les plasmides, lui-même inséré dans un organisme. Ce dernier devient alors un organisme génétiquement modifié et va exprimer le gène cible ce qui permet une meilleure étude du gène. De plus, les organismes génétiquement modifiés sont aujourd'hui très utilisés pour produire des produits biologiques tels que des médicaments.

III-2. Application directe

Au-delà de la simple amplification d'ADN spécifique, des étapes antérieures et postérieures peuvent s'intégrer à la PCR ce qui la rend très attractive. En effet, la PCR couplée à la transcription inverse (RT-PCR pour Reverse Transcriptase PCR) est une technique qui amplifie de l'ADN complémentaire (ADNc) issue d'une transcription inverse d'acides ribonucléiques messagers (ARNm) contenus dans des cellules. La multiplication de l'ADNc permet, après analyse, de détecter la présence du gène cible et de déterminer son expression dans les cellules étudiées. D'autres parts, les ARNm sont présents en plus grand nombre dans une cellule que l'ADN génomique présent à hauteur d'une seule copie. La transcription inverse de l'ARNm en ADNc permet alors une plus grande quantité de départ et donc une plus grande sensibilité de cette technique pour détecter des gènes précis.

La PCR quantitative est l'application la plus élémentaire de la PCR. Elle consiste simplement à évaluer les produits de l'amplification. Il existe plusieurs techniques de PCR quantitative telles que la PCR en point final ou la PCR en temps réel.

La PCR en point final est la première technique quantitative qui a vu le jour. Elle est généralement effectuée par ajout, suite à la réaction, de produits qui fluorescent lorsqu'ils sont fixés sur des doubles hélices d'ADN comme le Bromure d'ETHyidium (BET) par exemple. La

mesure peut être réalisée directement par fluorescence induite par laser (R. Higuchi, G. Dollinger, P. Walsh et R. Griffiths, 1992), ou plus communément par migration de l'ADN amplifié sur gel d'agarose ce qui permet, en plus de la quantification, une vérification de la taille de l'ADN dupliqué.

La PCR en temps réel (ou PCR quantitative : qPCR) est une technique plus récente que la précédente. Comme son nom l'indique, elle a l'avantage de suivre en temps réel et à chaque cycle de la réaction, l'évolution de la quantité d'ADN amplifiée. La cinétique de la PCR présente deux caractéristiques : l'amplification n'est pas exponentielle pendant toute la durée de la réaction et la quantité finale d'ADN amplifié n'est pas proportionnelle à la quantité initiale d'ADN. Un des avantages majeur de la PCR en temps réel est qu'elle permet d'obtenir une quantification absolue ou relative de la quantité initiale d'ADN cible (ou ARN dans le cas d'une RT-PCR en temps réel) ce qui était très difficile à obtenir avec une PCR en point final. Le suivi de la réaction est réalisé ici aussi par mesure de fluorescence et l'est généralement avec des séquences ADN plutôt courtes de l'ordre de grandeur d'une centaine de paires de bases. Les fluorophores utilisés peuvent être spécifiques ou non de la séquence d'ADN ciblée. Concernant les non spécifiques, le plus utilisé est le SybrGreen (H. Rye, S. Yue, D. Wemmer, M. Quesada, R. Haugland, R. Mathies, G et A. laser, 1992), qui fluoresce fortement lorsqu'il est intercalé dans des doubles hélices d'ADN. D'autres marqueurs existent comme le BET, déjà cité, mais le SybrGreen présente par exemple une sensibilité dix fois supérieure à celle du BET. Ce type de marqueur est bien compatible avec la réaction de PCR pour détecter une séquence cible. En effet, la spécificité de la réaction, et donc de la détection, est garantie par le choix des amorces.

Pour une double spécificité, des marqueurs spécifiques à l'ADN cible existent tels que les sondes d'hybridation, les sondes d'hydrolyses, les sondes « molecular beacons », les sondes scorpions...avec des modes de fonctionnement différents. Nous n'allons pas tous les détailler mais nous allons cependant présenter l'une des plus connues.

Les sondes d'hybridation sont composées d'un oligonucléotide complémentaire à la séquence que l'utilisateur souhaite amplifier. A l'extrémité 5' se trouve un fluorophore, appelé « reporter » et en 3' par un autre type de fluorophore appelé « quencher ». Le spectre d'émission du « reporter » chevauche celui d'excitation du « quencher » (P. Holland, R. Abramson, R. Watson, R. Saiki et D. Gelfand, 1992). L'émission du « reporter » est

initialement atténuée par la proximité du « quencher ». Lors de la phase d'hybridation pendant la réaction de PCR, la sonde se lie au monobrin d'ADN. Pendant l'étape d'élongation du monobrin, l'ADN polymérase dégrade la sonde ce qui induit la séparation du « quencher » et du « reporter ». Les deux fluorophores n'étant plus liés ensemble, l'émission du « reporter » sera observable. L'augmentation du signal est proportionnelle au nombre de copies des séquences AD spécifiques. Un exemple de sonde d'hybridation bien connue est la sonde Taqman (C. Heid, J. Stevens, K. Livak et P. Williams, 1996). Cette méthode de quantification par marqueurs spécifiques présente un double niveau de spécificité et assure une sécurité supplémentaire quant à l'ADN amplifié. En effet, le choix des amorces permet de sélectionner l'ADN cible à amplifier et le marqueur spécifique ne fluoresce qu'en présence de l'ADN cible. De plus, il est possible, dans un même milieu réactionnel, d'amplifier différentes séquences ADN et de repérer indépendamment le résultat de chaque duplication à l'aide de fluorophores émettant à des longueurs d'onde différentes.

Avec les propriétés de multiplexage de la PCR quantitative, nous amplifions souvent le gène d'intérêt avec un gène de référence dont le niveau d'expression est connu dans l'échantillon. Il est ainsi possible de mesurer l'expression du gène cible. Cette technique permet de déterminer, par exemple, si une personne est porteuse ou non d'un gène de prédisposition à une maladie telle que les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 du cancer du sein héréditaire chez la femme (c. Heid, J. Stevens, K. Livak et P, 1996). Un autre exemple dans le domaine médical est la détection de l'infection de cellule par un virus tel que le VIH. La PCR est aujourd'hui reconnue par une grande majorité des agences sanitaires pour tester la qualité de la nourriture. Elle présente les avantages de rapidité et d'un faible coût si nous la comparons aux méthodes traditionnelles de culture de bactéries. Elle est, par exemple, utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour déceler la présence de bactéries pathogènes telles que la *Salmonella enterica* et l'*E.Coli*.

Tableau 1 : Caractéristiques de certaines ADN polymérases utilisées pour la PCR (C. Heid, J. Stevens, K. Livak et P. Williams, 1996)

	<i>Taq</i> / AmpliTaq®	Vent™	Deep- Vent™	<i>Pfu</i>	<i>Tth</i>	UITma™
Source	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermococcus litoralis</i>	<i>Pyrococcus GB-D</i>	<i>Pyrococcus Furiosus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
Application	<i>Taq</i> : AmpliTaq naturelle: pour génie génétique	Pour génie génétique	Pour génie génétique	Naturelle	Pour génie génétique	Pour génie génétique
T _{1/2} d'activité à 95 °C (mn)	40	1380	400	>120	20	>50 ^a
Activité exonucléase 5'→3'	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non
Activité exonucléase 3'→5'	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Processivité	50-60	?	7	?	30-40	?
Vitesse d'extension (nt/s)	75	?	>80	60	>33	?
Extrémités d'ADN résultantes	3'A	>95 % franches	>95 % franches	?	3'A	franches
PM en kDa	94	?	?	92	94	70

III-3. Thermocycleurs classiques

Les premières réactions de PCR étaient réalisées dans des bains-marie en transférant les tubes de réactions entre trois cuves stabilisées en température ce qui représente une tâche chronophage et répétitive. Le premier thermocycleur a été développé par la société Peci en 1987 avec, comme système chauffant, un module à effet Peltier régulé en tension de manière automatique pour contrôler la température ainsi que les durées des étapes. De nos jours, la plupart des thermocycleurs fonctionnent toujours sur ce principe.

Neuf ans plus tard, en 1996, est commercialisé le premier appareil de PCR quantitative en temps réel par la société Applied Biosystems : le ABI7700. De nombreux systèmes commerciaux de PCR en temps réel naissent alors dont la majorité est consacrée à l'analyse à haut débit avec des plaques contenant typiquement 25 à 384 puits. L'élément chauffant est toujours à base de Peltier, les puits sont éclairés par un laser ou une combinaison de lampes à large spectre et de filtres et des barrettes CCD assurent la détection.

Parallèlement, de nouveaux systèmes plus flexibles apparaissent, au détriment du haut débit, avec des techniques originales d'échauffement, de manipulation de liquides ou de détection. Citons le Corbett Rotor Gene (commercialisé par la société Qiagen) qui centrifuge les tubes et les échauffent par flux d'air induisant une parfaite uniformité thermique. Notons aussi le Light Cycler commercialisé par Roche et développé par Idaho Technologies (C. Wittwer, K. Ririe, R. Andrew, D. David, R. Gundry et U. Balis, 1997).

Le système est réalisé à partir de capillaires de 20 à 100 μ l installés dans un module tournant et chauffés aussi par flux d'air ce qui permet d'obtenir des vitesses d'échauffement et de refroidissement de l'ordre de 20°C.s⁻¹ et de réduire les temps de réaction à une trentaine de minutes contre plus de deux heures pour les thermocycleurs classiques.

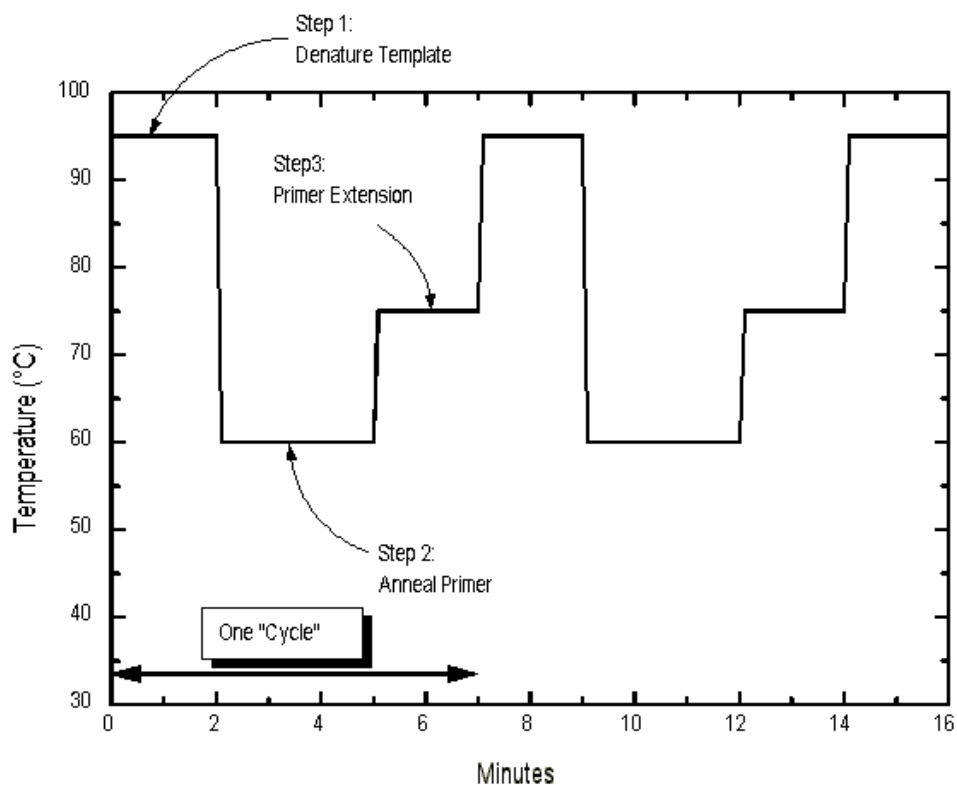


Figure 10 : Profil de cycles de température PCR (C. Wittwer, K. Ririe, R. Andrew, D. David, R. Gundry et U. Balis, 1997).

IV- PCR spécialisée

Outre l'amplification d'une séquence d'ADN cible par les procédures PCR habituelles déjà décrites, plusieurs types spécialisés de PCR ont été mis au point pour des applications spécifiques.

IV-1. PCR nichée

Des séries d'amorces successives peuvent être utilisées pour améliorer le rendement PCR de la séquence d'ADN cible (Newton et Graham, 1994). La PCR nichée est effectuée en 15 à 30 cycles avec une série d'amorces, puis en 15 à 30 cycles supplémentaires avec une deuxième série d'amorces, pour une région interne du premier produit ADN amplifié. Ainsi, le plus grand fragment produit lors des premiers cycles de la PCR est utilisé comme matrice pour la seconde PCR. La PCR nichée peut augmenter considérablement la sensibilité et la spécificité de l'amplification de l'ADN. La spécificité est particulièrement améliorée parce que cette technique élimine presque toujours tout faux produit d'amplification non spécifique.

Cela est dû au fait qu'après la première PCR il est peu probable que les produits non spécifiques soient suffisamment complémentaires des amorces successives pour pouvoir servir de matrice pour une amplification supplémentaire, la séquence cible désirée étant dès lors amplifiée préférentiellement. Toutefois, le risque accru de contamination est un inconvénient de cette sensibilité extrême et l'exécution de ces PCR doit avoir lieu avec le plus grand soin, particulièrement en laboratoire diagnostique (Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D, 1983).

a- Avantage

Est très sensible.

b- Inconvénients

Cette méthode présente un risque accru de contamination. La réalisation de deux PCR successives rend impossible la quantification de l'ADN amplifié.

Comme toutes les PCR, cette technique met en évidence l'ADN recherché mais ne prouve pas que cet organisme soit encore vivant et responsable des symptômes. Cette technique manque de sensibilité pour détecter *T. annae* et *B. gibsoni* souche californienne.

IV-2. PCR multiplex

Alors que la PCR standard utilise généralement une paire d'amorces pour amplifier une séquence spécifique, la PCR multiplex utilise des paires multiples d'amorces pour amplifier simultanément un grand nombre de séquences. La présence de nombreuses amorces PCR dans un seul tube pourrait poser beaucoup de problèmes, tels que la formation accrue de produits PCR mésamorçés, de dimères d'amorce et la discrimination d'amplification de fragments d'ADN plus longs (Atlas et Bey, 1994).

Pour ce type d'amplification PCR, on choisit des amorces ayant des températures d'hybridation semblables. Les longueurs des produits amplifiés devraient être semblables; de grandes différences de longueur des ADN cibles favoriseront l'amplification de la cible courte par rapport à la cible longue, ce qui aboutit à des différences de rendement de produits amplifiés. En outre, les tampons utilisés pour la PCR multiplex contiennent la polymérase *Taq*, qui diminue la compétition entre les amplicons et la discrimination de fragments d'ADN plus longs pendant la PCR multiplex. Les produits de la PCR multiplex peuvent subir une hybridation supplémentaire avec une sonde spécifique du gène pour vérification. (Atlas, R.M. and Bej, A.K, 1994).

IV-3. PCR en temps réel

Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'impliquons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle.

Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Lorsque suivi en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation et

l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. Conséquemment, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000, Matsuu et al., 2005).

a- Avantages

Comparée aux PCR conventionnelles, cette méthode permet de réaliser une analyse quantitative des résultats. Comme cette technique comprend généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post- amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont fortement réduits.

Comme les autres techniques d'amplification génomiques, cette méthode présente également une grande spécificité.

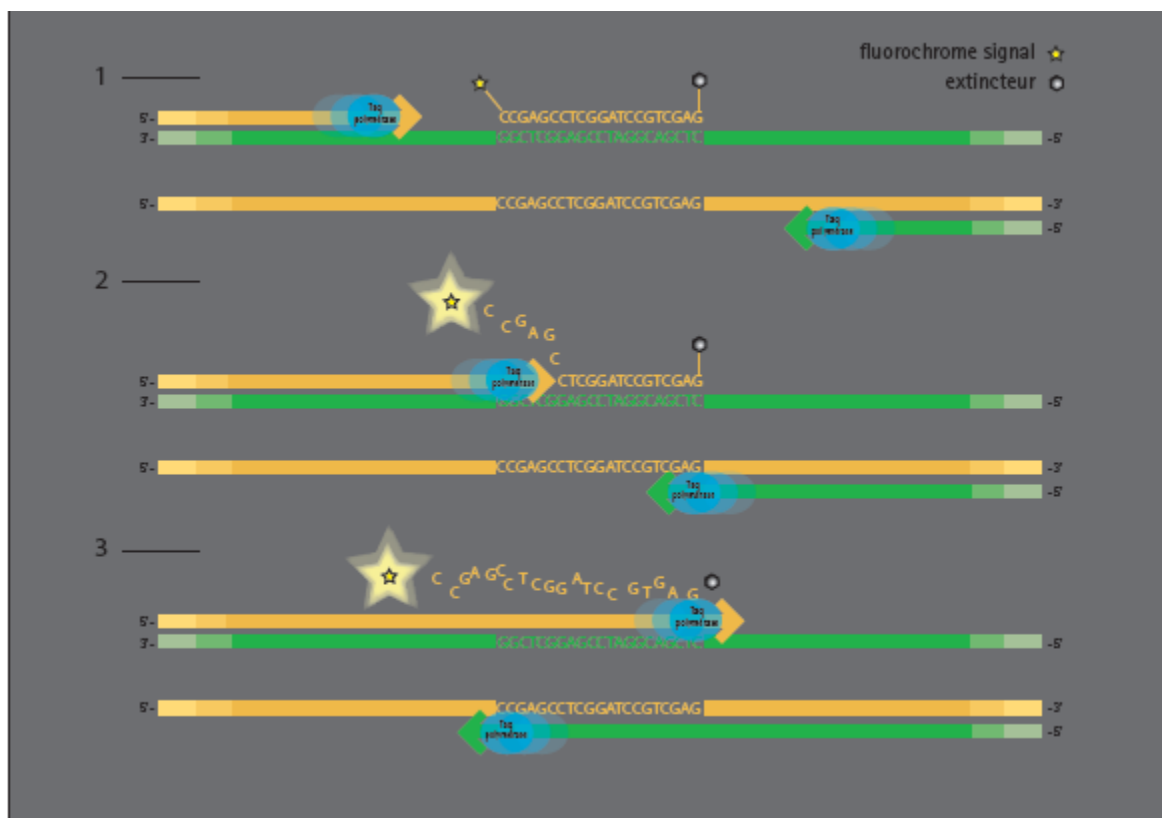


Figure11 : principe de la PCR en temps réel (Bustin, 2000, Matsuu et al, 2005).

IV-4. Technique LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)

À la différence des techniques expliquées ci-dessus, cette amplification d'ADN se réalise à température constante. Elle a été développée par Notomi et *al.* en 2000.

La particularité de cette technique est permise par les amorces. En effet, elles présentent une partie spécifique d'un ADN cible et une partie comportant une séquence palindromique, permettant à cette amorce d'adopter une structure en « épingle à cheveux ».

Les parties spécifiques encadrent une région d'ADN cible longue de quelques centaines de paires de bases (David et Turlotte, 1998).

On chauffe brièvement l'ADN cible, en présence des amorces et de l'ADN polymérase puis on place le tube dans un bain marie à environ 60°C pendant 3 minutes. Les amorces s'hybrident à l'ADN cible et l'ADN polymérase commence l'élongation d'un nouveau brin à partir des amorces. On chauffe très brièvement une deuxième et dernière fois à 100°C, le brin néosynthétisé se dissocie alors et sert à son tour de cible à une nouvelle amorce, qui va servir à synthétiser un nouveau brin (Figure11).

A partir de cette étape, la réaction a lieu à température constante. Une amorce se fixe sur le brin néosynthétisé et un autre brin est polymérisé. Arrivée à la région en épingle à cheveux, l'enzyme déplace le brin correspondant à la région palindromique et continue la polymérisation.

A la température de 50°C, on obtient rapidement un équilibre entre la forme linéaire de l'ADN néoformé et une forme avec deux épingles à cheveux. L'une des deux régions en épingle à cheveux possède une extrémité 3' libre qui peut servir d'amorce pour l'ADN polymérase, elle synthétise alors un nouveau brin et déplace le brin complémentaire, jusqu'à ce qu'il se détache. La réaction se poursuit ensuite de cette façon (Notonomi et al, 2000).

a- Avantages

Cette méthode possède une spécificité identique à l'amplification par cycle thermique mais est trois fois plus rapide, et est plus simple à réaliser. Sa sensibilité est égale à celle de la PCR et se situe autour de 0,0005%. (Ikdaï et al., 2004). Enfin, il a été rapporté récemment que la LAMP avait une bien meilleure sensibilité que celle de la PCR pour amplifier de l'ADN présent sur du papier filtre (Alhassan et al., 2007). Ceci serait dû à des composants sanguins, comme la myoglobine ou certaines immunoglobulines G, qui inactivent l'ADN polymérase utilisée dans technique de PCR standard mais qui n'inhibent pas la Bst polymérase utilisée dans la technique LAMP (Grab et al. 2005).

b- Inconvénients

Tout comme pour la PCR, en raison de l'extrême sensibilité de cette technique, il faut prendre les précautions d'usages pour éviter les contaminations lors de la préparation de l'ADN.

La température à laquelle se déroule l'amplification dépend des amorces, car il faut obtenir un équilibre entre la forme linéaire et celle en épingle à cheveux des brins synthétisés. Il faut donc trouver la température idéale pour chaque type d'amorce. Enfin, cette méthode est coûteuse.

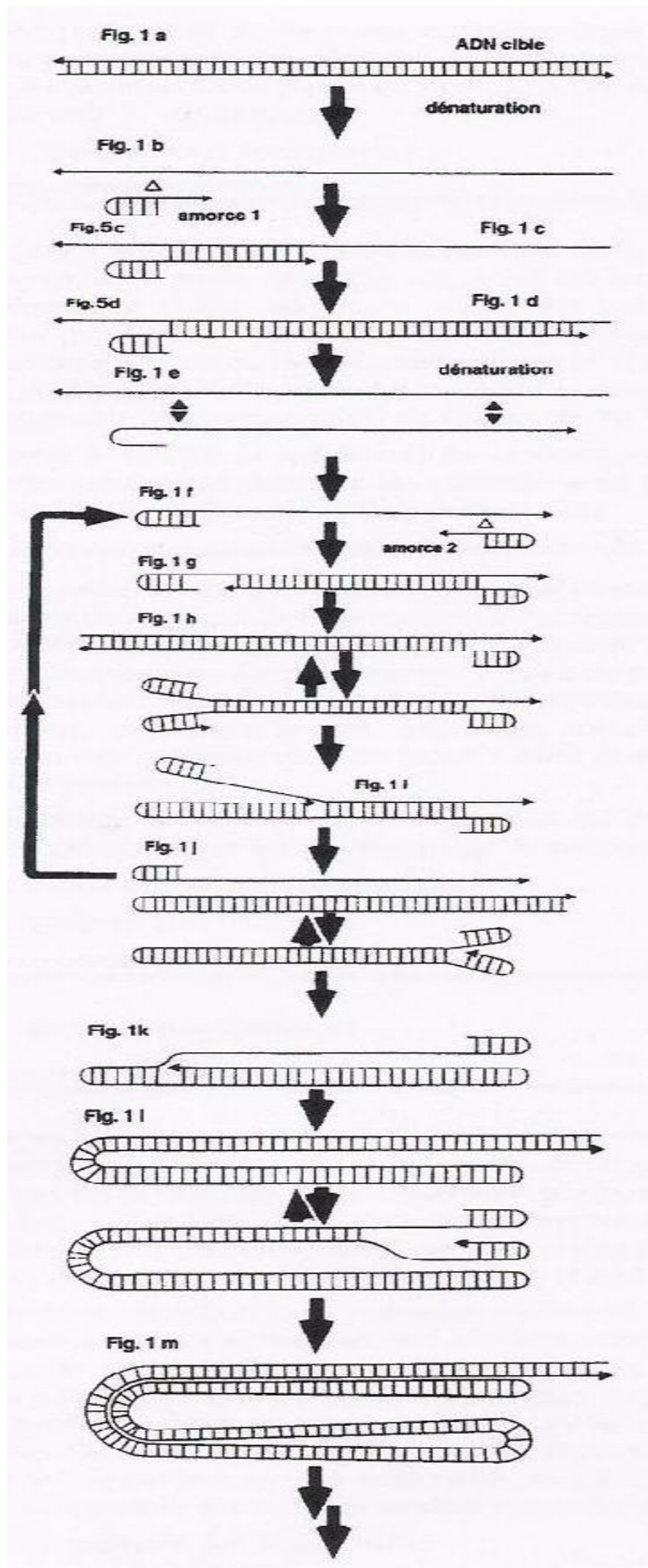


Figure12 : technique LAMP (Grab *et al*, 2005)

IV-5. La RT-PCR

Cette réaction est catalysée par la transcriptase inverse des rétrovirus (reverse transcriptase) qui synthétise une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ARN.

Dans un premier temps, les ARN totaux sont extraits. Les ARNm sont isolés à partir des ARN totaux par chromatographie d'affinité grâce à des oligodT (oligonucléotide polyT), car les ARN messagers se caractérisent par une séquence polyA en 3'. Puis, les ARNm sont soumis à la transcriptase inverse qui va générer une copie d'ADN (ADNc) de chaque ARNm. À l'issue de la transcription inverse, les ARNm sont hydrolysés (traitement alcalin, RNase ou température). Les étapes suivantes sont réalisées dans l'enceinte du thermocycleur. Les ADNc monocaténares sont alors répliqués par l'ADN polymérase au cours d'un premier cycle de température. D'autres cycles sont réitérés afin d'amplifier les ADNc bicaténares en grande quantité.

Dans un phénotype cellulaire donné, on estime que 10 à 15 000 gènes sont exprimés chez l'homme et la plupart des mammifères. Certains transcrits cellulaires sont exprimés à quelques centaines voire quelques milliers de copies par cellule, mais la majorité des transcrits représente un faible nombre de copies. Les profils d'expression des transcrits connaissent des variations qualitatives ou quantitatives qui reflètent la dynamique biologique de la cellule. L'identification des variations d'expression de gènes dans un contexte physiologique ou pathologique donné peut donc apporter des informations précieuses concernant la fonction des gènes et l'influence de facteurs de modulation de leur expression, qu'ils soient physiologiques ou d'origine environnementale. L'analyse des variations d'expression de gènes impliqués dans une pathologie peut orienter vers de nouvelles cibles thérapeutiques ou de diagnostic. Enfin, d'un point de vue fondamental, étudier le profil d'expression de gènes permet d'avancer dans la compréhension des mécanismes de physiologie cellulaire (www.ecol-ADN.com).

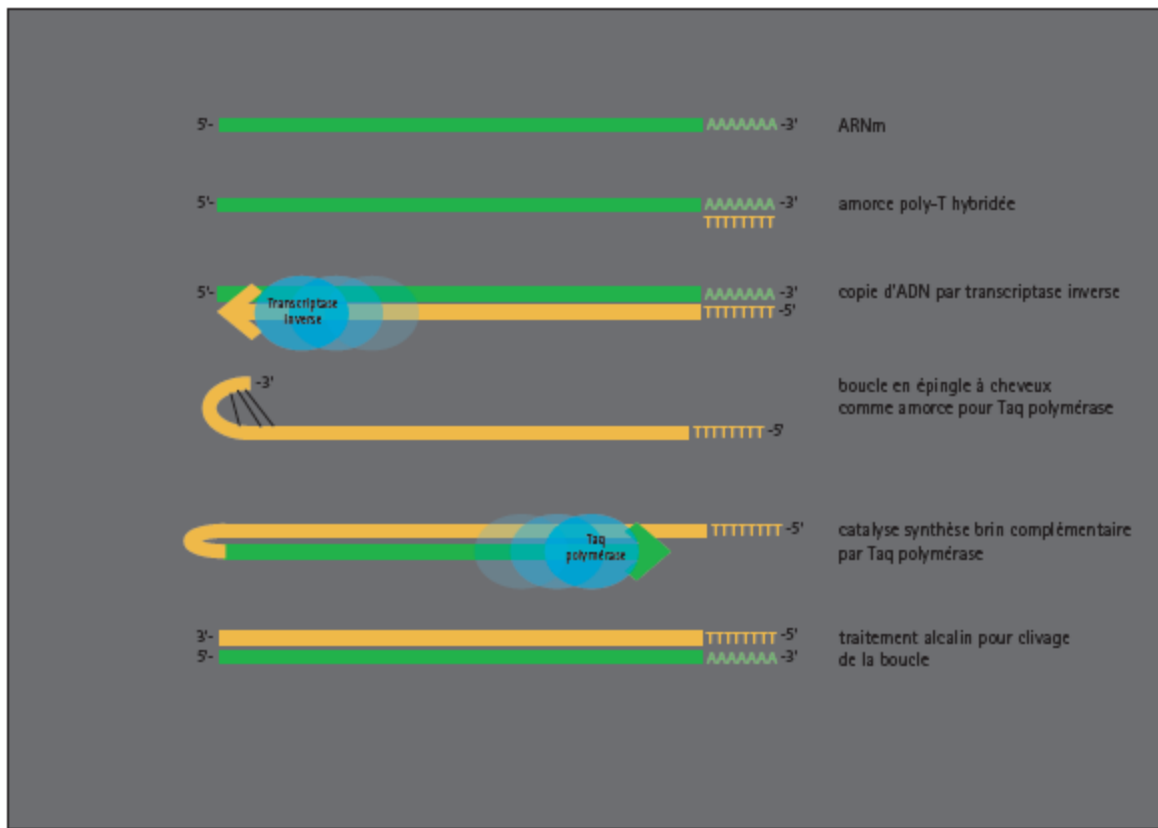


Figure 13 : principe de la RT-PCR (www.ecol-ADN.com)

Il s'agit dans la plupart des cas de RT-PCR. Dans le cas de la PCR quantitative, le taux d'ARN ou d'ADN d'intérêt est mesuré en tant que quantité absolue. Dans les cas de PCR semi-quantitative ou de PCR compétitive, il s'agit de mesurer des quantités relatives grâce à des standards qui correspondent à des ARN ou plus rarement à des ADN. Ces standards peuvent être internes ou externes. Les standards externes peuvent être homologues ou hétérologues. Le standard est un ARN (plus rarement un ADN) qui est présent dans l'extrait d'ARN (standard interne) ou qui est rajouté en quantité connue dans le mélange réactionnel (standard externe). Le standard est amplifié en même temps que l'ARN d'intérêt. Il y a donc compétition entre l'amplification du standard et celle de l'ADN d'intérêt. Plus la quantité de standard est importante (il s'agit néanmoins que l'amplification soit toujours en phase exponentielle) moins l'ARN d'intérêt sera amplifié et donc plus sa quantité sera faible *in fine*. Bien sûr, la méthode d'analyse de l'échantillon PCR doit permettre de discriminer le standard par rapport à l'ARN d'intérêt d'une part et d'autre part d'évaluer la quantité relative d'ADN d'intérêt par comparaison avec la quantité de standard qui est connue.

Les standard internes sont des ARN endogènes, correspondant aux ARN de gènes dont l'expression est présumée constante (actine, bêta2-microglobuline...) et qui sont présents au

sein de la population d'ARN matrices lors de la transcription inverse. Ces standards présentent un désavantage majeur : ils nécessitent l'emploi d'amorces différentes de celles qui sont utilisées pour l'ARN d'intérêt. Les cinétiques d'amplification sont donc sensiblement différentes et il est très difficile voire impossible de garantir une expression constante entre différents échantillons.

Les standards d'ARN externes homologues sont des ARN synthétiques qui partagent les mêmes sites d'hybridation des amorces que l'ARN d'intérêt et qui possèdent la même séquence globale, à une légère mutation, délétion ou insertion près qui vont permettre l'identification et la quantification de celui-ci par rapport au signal rendu par l'ARN d'intérêt. Ces standards permettent d'une part d'apprécier la variabilité introduite au niveau de la RT et, d'autre part, présentent globalement la même efficacité d'amplification que l'ARN d'intérêt que ce soit au niveau de la RT ou de la PCR.

Les standards d'ARN externes hétérologues sont des ARN exogènes et leur taux peut donc être contrôlé. Ils présentent toutefois, à la différence des standards externes homologues une efficacité d'amplification différente comparée à celle de l'ARN d'intérêt.

Dans le cas de la RT-PCR quantitative (PCR semi-quantitative), le standard consiste en une solution titrée d'ADN de séquence identique à celle de l'ADN d'intérêt à quantifier. Une série de dilution est réalisée, chacune étant utilisée pour une amplification. Il s'agit ensuite de définir le nombre idéal de cycles pour se placer dans la phase exponentielle de la réaction tout en s'assurant d'une amplification efficace. Ensuite, chaque dilution d'ADN standard ainsi que l'ADN extrait de l'échantillon à quantifier sont soumis en parallèle à la réaction de PCR. Une courbe étalon est établie avec les dilutions de standards [signal = f (concentration)]. Connaissant la valeur du signal mesuré sur l'échantillon à quantifier, le nombre de copies correspondant peut être extrapolé à partir de la courbe.

Dans le cas de la PCR compétitive, une série de dilutions d'ARN standard externe homologue synthétique est co-amplifiée avec des quantités équivalentes d'ARN total (et donc une quantité équivalente du gène natif). Le standard entre en compétition avec l'ARN d'intérêt vis-à-vis de la polymérase et des amorces. Plus la concentration en standard augmente, plus le signal du gène d'intérêt diminue. Ici, la PCR n'a pas besoin d'être réalisée en phase exponentielle et les résultats présentent une correcte reproductibilité. Cependant la méthode

est lourde et ne permet pas de gérer beaucoup d'échantillons simultanément (www.ecol-ADN.com).

V- Autres types de PCR

V-1. La RT-PCR in situ

La RT-PCR in situ est une méthodologie consiste à réaliser la RT-PCR non pas sur des molécules en solution mais sur des coupes histologiques. Bien que les résultats ne soient que semi-quantitatifs, ils apportent en outre une information sur la localisation des transcrits dans le tissu (Cirino et al, 2003) (Lebech AM, 2002) (F. David et E. Turlotte, 1998).

V-2. La RT-PCR sur une cellule

La RT-PCR sur une cellule (single-cell RT-PCR) est une méthodologie qui permet d'étudier les transcrits d'une cellule unique, obtenue par patch-clamp, microdissection laser ou triage de cellules par activité de fluorescence (FACS en anglais pour Fluorescence activated cell sorting). Cette précision peut être nécessaire lorsque le tissu n'est pas homogène (cellules tumorales, feuillets 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 (Cirino et al, 2003) (Lebech AM, 2002) (F. David et E. Turlotte, 1998).

V-3. La TP-PCR

La TP-PCR (TP pour Triplet Repeat primed), une variante complexe de la PCR, a été mise au point par Jon Warner en 1996 et est utilisée dans les amplifications des gènes comportant des triplets répétés, comme dans le cas de la Dystrophie myotonique de Steinert. La combinaison PCR-Séquençage ne peut pas être utilisée dans ces cas car la Taq polymérase fait des erreurs de réplication (Cirino et al, 2003) (Lebech AM, 2002) (F. David et E. Turlotte, 1998).

V-4. La PCR sur colonie

La PCR sur colonie (Colony PCR) est un protocole qui permet d'amplifier de façon simple de l'ADN de micro-organisme (bactéries, archées ou levures) en inoculant directement la colonie dans le milieu réactionnel de la PCR. Durant les premières étapes de dénaturation, les cellules sont lysées et leur ADN est libéré dans le milieu réactionnel. L'ADN ainsi libéré peut alors servir de matrice. La PCR sur colonie est utilisée notamment pour vérifier l'efficacité d'une transgénèse. Elle fut très utilisée lors de la construction des BAC dans les grands programmes de séquençage. La PCR sur colonie est largement utilisée en recherche microbiologique afin de caractériser sur le plan phylogénétique les souches étudiées (Cirino et al, 2003) (Lebech AM, 2002) (F. David et E. Turlotte, 1998).

V-5. L'ep-PCR

L'ep-PCR permet d'introduire des erreurs dans la séquence copiée par la polymérase. Cette technique peut être utilisée par exemple pour créer un grand nombre de mutants qui seront ensuite sélectionnés (évolution dirigée). La polymérase utilisée (la Taq polymérase est naturellement moins fidèle que les polymérases classiques en PCR) et des conditions particulières (fortes concentrations en $MgCl_2$ ou ajout de $MnCl_2$) permettent d'augmenter le taux d'erreurs (Cirino et al, 2003) (Lebech AM, 2002) (F. David et E. Turlotte, 1998).

VI- La PCR dans la pratique

Comme déjà indiqué dans les sections précédentes, la PCR est une puissante technique analytique et préparatoire qui est largement utilisée. Cependant, en raison de la nature de cette procédure, des traces de contaminants de l'ADN pourraient servir de matrices, ce qui conduirait à l'amplification du mauvais acide nucléique cible (faux positifs). Par conséquent, il est essentiel d'effectuer l'amplification PCR dans un environnement exempt d'ADN. Les zones de travail physiquement séparées et dotées d'équipements spécialisés réduisent le risque de contamination. Le respect strict des exigences en matière de décontamination (décontamination des acides nucléiques, prévention des aérosols, etc.) est la condition préalable la plus importante pour réduire au maximum le taux de faux positifs. La contamination PCR peut provenir de plusieurs sources:

- paillasse de laboratoire, équipements et dispositifs de pipetage, qui peuvent être contaminés par des préparations ADN précédentes ou par des fragments de restriction épurés.
- contamination croisée entre échantillons.
- produits d'amplifications PCR précédentes.

Cette section contient un certain nombre de recommandations, le but étant de définir les exigences habituelles pour l'établissement et l'entretien d'un environnement propre pour tout système de dosage basé sur la PCR, indépendamment du nombre d'échantillons traités (Roth et al, 1997).

VI-1. Méthodes physiques de prévention

a- Équipements de laboratoire :

Afin d'éviter une contamination, des zones de travail physiquement séparées devront être établies de la manière suivante :

- Zone de préparation des échantillons Cette pièce consiste en une zone où ont lieu toutes les étapes précédant l'amplification de l'ADN matrice (par exemple, isolement et purification de l'ADN).
- Zone de préparation de la PCR Cette pièce «propre» est consacrée aux procédures de préparation de la PCR (par exemple, mastermix, dilution des amorces, etc.).
- Zone post-PCR La zone est consacrée à l'amplification de la séquence d'ADN cible ainsi qu'à la détection et à l'analyse des produits PCR.

En outre, il convient de respecter les règles générales suivantes :

- Toutes les pièces doivent contenir des équipements spécialisés (tabliers, gants, réactifs et fournitures).

- Les réactifs et appareils doivent être étiquetés avec indication du contenu et de la date de préparation.
- Utiliser un système de flux unidirectionnel, c'est-à-dire ne jamais transférer des matières, des échantillons ou des équipements des zones post-PCR vers les zones pré-PCR.
- Utiliser des tubes PCR jetables qui sont exempts de DNase et de RNase.
- Utiliser des embouts de pipette spéciaux résistants aux aérosols et un ensemble de pipettes réservé exclusivement à la PCR, de préférence des pipettes à déplacement positif.
- Si possible, préparer la PCR sous une hotte d'aspiration équipée d'un éclairage UV. Sous la hotte d'aspiration, placer une microcentrifugeuse et des gants jetables utilisés uniquement pour la PCR.
- Laver périodiquement les paillasse et les étagères à l'eau de Javel à 10 %, puis à l'éthanol à 70 %. (Roth, A., Mauch, H. and Göbel, U, 1997).

b- Manipulation des échantillons

- Toujours utiliser des techniques stériles et porter des gants neufs lors du travail dans les zones décrites précédemment. Changer les gants fréquemment, particulièrement si on suspecte qu'ils ont été contaminés par des solutions contenant l'ADN matrice.
- Toujours utiliser des ustensiles en verre/plastique et des pipettes neufs ou stérilisés pour la préparation des réactifs PCR et de l'ADN matrice.
- Stériliser à l'autoclave tous les réactifs et solutions qui peuvent subir ce traitement sans problème pour leur performance. Bien sûr, les amorces, les dNTP et l'ADN polymérase *Taq* ne devront pas être stérilisés à l'autoclave.

- Avoir à disposition son propre ensemble de réactifs et de solutions PCR qui ne sont utilisés que pour la PCR, et stocker ces réactifs en petites parties aliquotes.
- Lors du pipetage d'ADN, éviter de créer des aérosols qui peuvent transporter des contaminants.
- Toujours prévoir des réactions de contrôle, par exemple un contrôle négatif («pas d'ADN») qui contient tous les composants de la réaction sauf l'ADN matrice, et un contrôle positif qui a été utilisé avec succès dans des PCR antérieures (Sambrook, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T, 1989) (Sharrocks, A.D, 1994).

VI-2. Méthodes biochimiques de prévention

a- Uracile-ADN glycosylase

La PCR peut amplifier un milliard de fois une seule molécule. Par conséquent, même des quantités infimes d'un contaminant peuvent être amplifiées et conduire à un faux positif. Ces contaminants sont souvent des produits d'amplifications PCR antérieures (contamination par transfert). C'est pourquoi des méthodes permettant d'éviter cette contamination ont été mises au point.

Une méthode couramment utilisée consiste à substituer le dUTP au dTTP pendant l'amplification PCR pour produire de l'ADN contenant de l'uracile (U-ADN) (Longo et al, 1990). Le traitement des mélanges PCR par l'uracile-ADN glycosylase (UNG) avant l'amplification PCR, suivi du clivage des polynucléotides pyrimidine à haute température (95 °C) dans des conditions alcalines (pendant l'étape de dénaturation initiale) débarrassera l'échantillon de l'U-ADN contaminant. (Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, E.H., Kawashima, M.J., Johnson, K.I., and Wallace, R.B.1981).

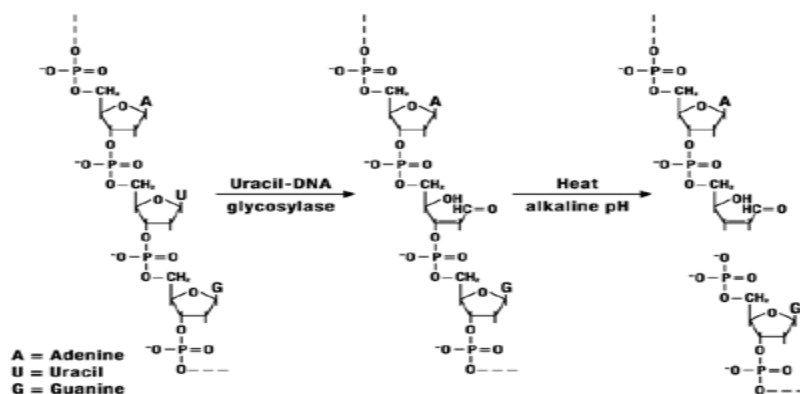


Figure 14 : Réaction à l'uracile-ADN glycosylase (Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, E.H., Kawashima, M.J., Johnson, K.I., and Wallace, R.B, 1981).

Cette méthode exige bien sûr que toutes les PCR dans le laboratoire soient effectuées avec le dUTP au lieu du dTTP. Remarques concernant l'utilisation de produits PCR contenant du dUTP dans les applications en aval:

- les performances des produits PCR contenant du dUTP sont aussi bonnes que celles des produits contenant du dTTP lorsqu'ils sont utilisés comme cibles d'hybridation ou comme matrices pour le séquençage didésoxy.
- les produits PCR contenant du dUTP peuvent être clonés directement s'ils sont transformés en hôtes bactériens reconnaissant l'UNG.
- un substrat contenant du dUTP est aisément digéré par certaines enzymes de restriction courantes (EcoR I et BamH I, par exemple), tandis que d'autres présentent une activité réduite (Hpa I, Hind II, Hind III, par exemple) sur ces substrats.
- l'utilisation d'ADN contenant du dUTP n'est pas recommandée pour les études sur la fixation des protéines ou les interactions ADN-protéines.

b- DNase I, exonucléase III

D'autres méthodes biochimiques sont basées sur le traitement de l'ADN contaminé par la DNase I, l'exonucléase III ou par une enzyme de restriction contenant une séquence de reconnaissance dans l'ADN cible.

Cependant, en raison des strictes conditions de réaction exigées, ces enzymes présentent l'inconvénient de réduire l'efficacité de l'amplification PCR (Watson, D.J., Hopkins, N. Roberts, J., Steitz, J. and Weiner, A, 1988).

c- Préparation du mélange pour la réaction PCR (mastermix)

Les composants réactifs essentiels pour la PCR sont l'eau, le tampon de réaction, une ADN polymérase thermostable, des amorces d'oligonucléotides, des désoxynucléotides (dNTP), de l'ADN matrice (cible) et des ions magnésium (Mg^{2+}).

En général, tous les réactifs (sauf l'ADN matrice) sont mélangés dans un seul tube en quantités suffisantes pour le nombre de réactions à effectuer (mastermix). Le mastermix est ensuite réparti en parties aliquotes dans plusieurs tubes et l'ADN matrice est ajouté.

L'utilisation d'une solution mastermix réduit le risque de contamination et améliore la performance de la réaction PCR pour les raisons suivantes:

- une qualité uniforme de la solution est garantie pour tous les réactifs pour une série d'analyses.
- le risque de contamination du parent et des solutions résultantes est réduit.
- de plus grands volumes peuvent être prélevés par pipette.
- les pipetages sont moins nombreux, ce qui fait gagner du temps.

Le succès de l'amplification de la région d'intérêt dépend de la quantité et de la qualité de l'ADN matrice. La quantité de matrice nécessaire dépend de la complexité de l'échantillon d'ADN. Étant donné que la taille du génome nucléaire varie d'un organisme à l'autre, la concentration en ADN doit être maintenue constante (généralement 10 ng/ μ l).

Au Tableau2 figure une comparaison de la taille du génome d'espèces végétales fréquemment utilisées dans la transformation de plantes et du nombre correspondant de copies du génome dans une quantité définie d'ADN.

Par exemple, dans un plasmide de 4 kb contenant un insert de 1 kb, 25 % de l'ADN de départ constituent la cible d'intérêt. Inversement, un gène de 1 kb dans le génome du maïs (5×10^9 pb) représente approximativement 0,00002 % de l'ADN de départ.

Environ 1 000 000 plus d'ADN génomique de maïs est nécessaire pour maintenir le même nombre de copies cibles par réaction. Pour des résultats optimisés, plus de 104 copies de la séquence cible doivent être utilisées comme matrice initiale pour obtenir un signal en 25–30 cycles (Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N, 1985).

Tableau 2 : Comparaison de la taille du génome de certaines espèces végétales et copies correspondantes du génome dans une quantité définie d'ADN (Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N, 1985).

Échantillon	Taille du génome	Copies du génome dans 1 µg d'ADN	Copies du génome dans 1 ng d'ADN
Maïs	5×10^9 pb	$1,85 \times 10^5$	185
Soja	$1,55 \times 10^9$ pb	$5,98 \times 10^5$	598
Tabac	$3,8 \times 10^9$ pb	$2,43 \times 10^5$	245
Riz	4×10^8 pb	$2,31 \times 10^6$	2 310

VII- Contrôles

Comme indiqué dans la section précédente, on trouve des sources potentielles de contamination partout dans le laboratoire. Les échantillons, le personnel du laboratoire, la climatisation, les équipements et les réactifs peuvent tous être une source de contamination. Parmi les agents contaminants, on peut citer les suivants:

* Contamination par transfert d'ADN cible amplifié lors de PCR antérieures.

* Contamination croisée entre échantillons, ce qui conduit au transfert d'ADN cible d'un échantillon à l'autre.

* ADN génomique de préparations d'échantillons antérieures.

* produits de dégradation de réactions de décontamination.

Alors que les trois premières formes de contamination produisent des faux positifs, le dernier type conduit à des faux négatifs. Cette forme de contamination, observée pour la première fois par Niederhauser et collaborateurs en 1994, provoque l'inhibition des réactions PCR (Niederhauser et al, 1994). En fait, la décontamination selon la méthode UNG favorise la formation de complexes avec les amorces.

Pour obtenir des résultats fiables, des contrôles tant positifs que négatifs doivent toujours être utilisés pendant une réaction PCR. Le Tableau 3 indique quelques-uns des contrôles les plus couramment utilisés pour assurer la performance des procédures d'amplification d'acide nucléique.

Tableau3 : Contrôles à introduire dans les tests basés sur la PCR (Niederhauser et al, 1994)

Contrôle	Méthode
Contamination des réactifs par l'ADN cible	Contrôle négatif sans ADN matrice (seulement mastermix)
Spécificité de la réaction	Contrôles pour trouver les produits secondaires et non spécifiques
Développement et sensibilité de la réaction	Contrôles positifs/négatifs pour vérifier que les conditions et les rendements désirés sont obtenus
Intégrité du mélange PCR	Contrôle positif pour l'ADN

VII-1. Contrôles positifs

L'efficacité de l'extraction de l'ADN et de son amplification doit être vérifiée au moyen de contrôles positifs. Idéalement, les limites de détection devraient être données en tant

qu'équivalents génomiques, ce qui permettrait la production de contrôles à sensibilité définie, avec de petits nombres de copies. En règle générale, il faut disposer d'une préparation de référence contenant une concentration connue de l'ADN cible à l'étude.

VII-2. Contrôles négatifs

Une contamination (transfert de produits ou acides nucléiques amplifiés) peut se produire pendant l'isolement et la purification de l'ADN cible, ainsi que pendant la préparation du mélange de la réaction d'amplification. Il est donc nécessaire d'ajouter un contrôle négatif au mélange de la réaction d'amplification (Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B. Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N, 1985).

VIII- La PCR appliquée au diagnostic

La PCR représente un fabuleux outil de diagnostic. Elle est déjà très utilisée dans la détection de maladies génétiques. L'amplification de tout ou partie d'un gène responsable d'une maladie génétique permet de révéler la ou les mutations délétères, leurs positions, leurs tailles et leurs natures. On peut ainsi détecter des délétions, des inversions, des insertions et même des mutations ponctuelles, soit grâce à une analyse directe des produits PCR par électrophorèse, soit en combinant la PCR à d'autres techniques. Mais la PCR peut encore être employée pour détecter des maladies infectieuses (virales, bactériennes, parasitaires...), comme c'est déjà le cas pour le SIDA, l'hépatite C, ou les infections à chlamydia. Même si d'autres outils de diagnostic sont efficaces pour détecter ces maladies, la PCR présente l'énorme avantage de produire des résultats très fiables et rapides à partir d'échantillons biologiques infimes dans lesquels la présence du pathogène n'est pas toujours décelable selon les autres techniques.

VIII-1. Maladies génétiques

Dans le cadre des maladies génétiques, il s'agit de détecter une mutation sur la séquence d'un gène. Plusieurs cas de figure se présentent. Les plus simples concernent les insertions et délétions. Dans ces cas, la mutation se manifeste par la modification de la taille du gène ou d'une partie du gène. Dans la mesure où la mutation est connue, décrite, il suffit donc d'amplifier tout ou partie du gène. S'agissant d'une insertion, le produit PCR issu de l'ADN d'un malade est plus long que celui qui est issu d'une personne saine. Une délétion présente un résultat contraire. L'analyse des produits PCR par électrophorèse, et donc l'évaluation de

leur taille, conduit directement au diagnostic. La détection d'inversions et de mutations ponctuelles s'avère plus délicate. La différence de taille entre ADN sain et malade est nulle dans le cas d'une inversion, quasi-nulle dans le cas d'une mutation ponctuelle. On ne peut donc plus retenir le critère de taille des produits PCR pour aboutir au résultat. Il faut donc recourir à des techniques complémentaires à la PCR. Trois approches peuvent être retenues, le southern blot, le RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou la détection de mismatch. Le southern blot consiste à hybrider sur le produit PCR une sonde oligonucléotidique marquée, grâce à un isotope radioactif ou un fluorochrome, dont la séquence est complémentaire et donc spécifique de celle qui correspond à la mutation. Cette stratégie est bien adaptée aux cas d'inversion. Le RFLP permet de détecter les inversions comme les mutations ponctuelles. Il met en jeu une enzyme de restriction capable d'hydrolyser le produit PCR au niveau de la séquence où se situe la mutation. Cette approche n'est possible que si un site de restriction est effectivement présent sur cette séquence, qu'il s'agisse de l'allèle muté ou de l'allèle sauvage. L'enzyme de restriction hydrolyse donc soit le produit PCR issu de l'ADN sain soit celui qui est issu de l'ADN malade. À partir de ces produits PCR, on obtient ainsi soit un soit deux fragments d'ADN qui sont ensuite révélés par électrophorèse. La détection de mismatch est, comme le RFLP, adaptée aux inversions et aux mutations ponctuelles. Le produit PCR issu de l'ADN du patient (ADN échantillon) est mélangé au produit PCR issu de l'ADN d'une personne saine (ADN de référence). Ce mélange est ensuite dénaturé par la température puis réhybridé. Si l'ADN échantillon est muté, les appariements entre ADN échantillon et ADN de référence seront incomplets au niveau de la mutation. Les mésappariements (mismatch) concernent une seule paire de base dans le cas d'une mutation ponctuelle, plusieurs paires de bases dans le cas d'une inversion. Ces mésappariements sont ensuite dégradés grâce à la nucléase S1, enzyme qui ne dégrade que les ADN monocaténaire. Une autre solution consiste à cliver les mésappariements par voie chimique (tetroxyde d'osmium, puis pipéridine), mais elle convient plutôt aux mutations ponctuelles. En résumé, la mutation induit un mésappariement au niveau duquel un clivage, enzymatique ou chimique, conduit à la génération de deux fragments à partir d'un produit PCR unique. Ces fragments sont analysés par électrophorèse.

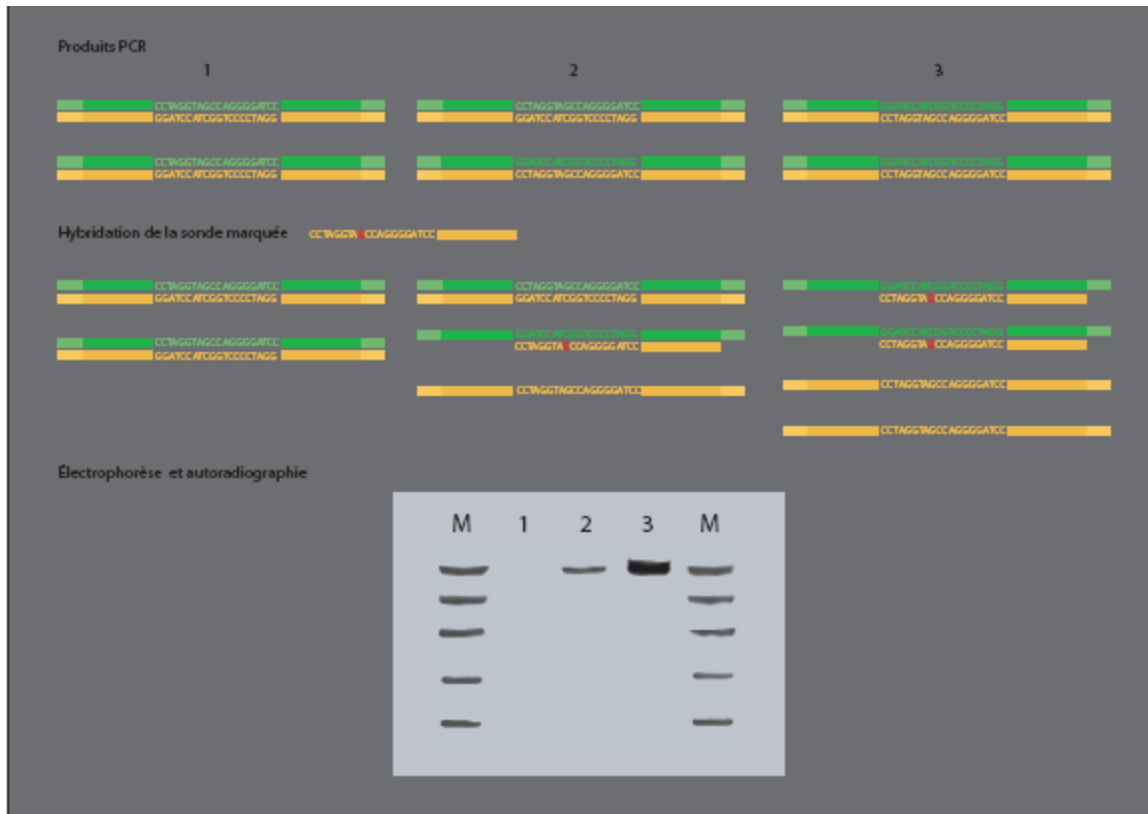


Figure15 : Southern blot sur produits d'amplification par PCR (www.ecol-ADN.com)

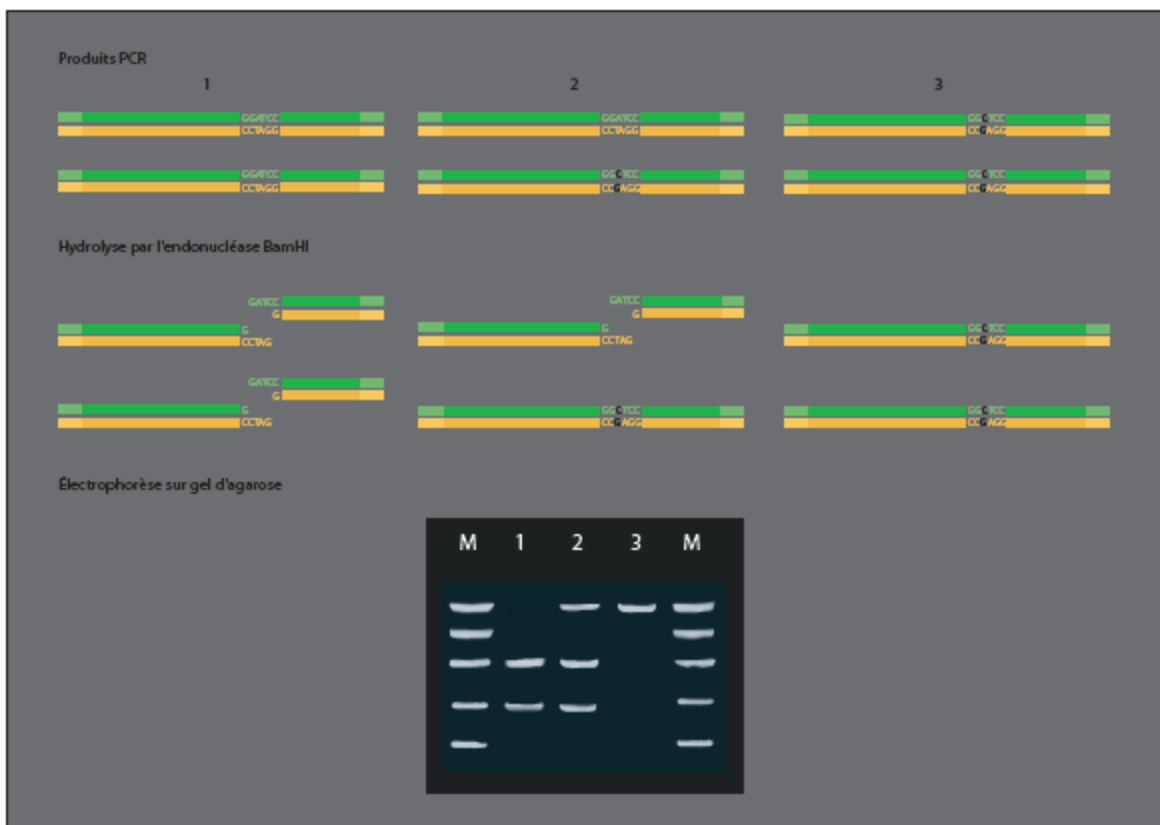


Figure16 : RFLP sur produits d'amplification par PCR (www.ecol-ADN.com)

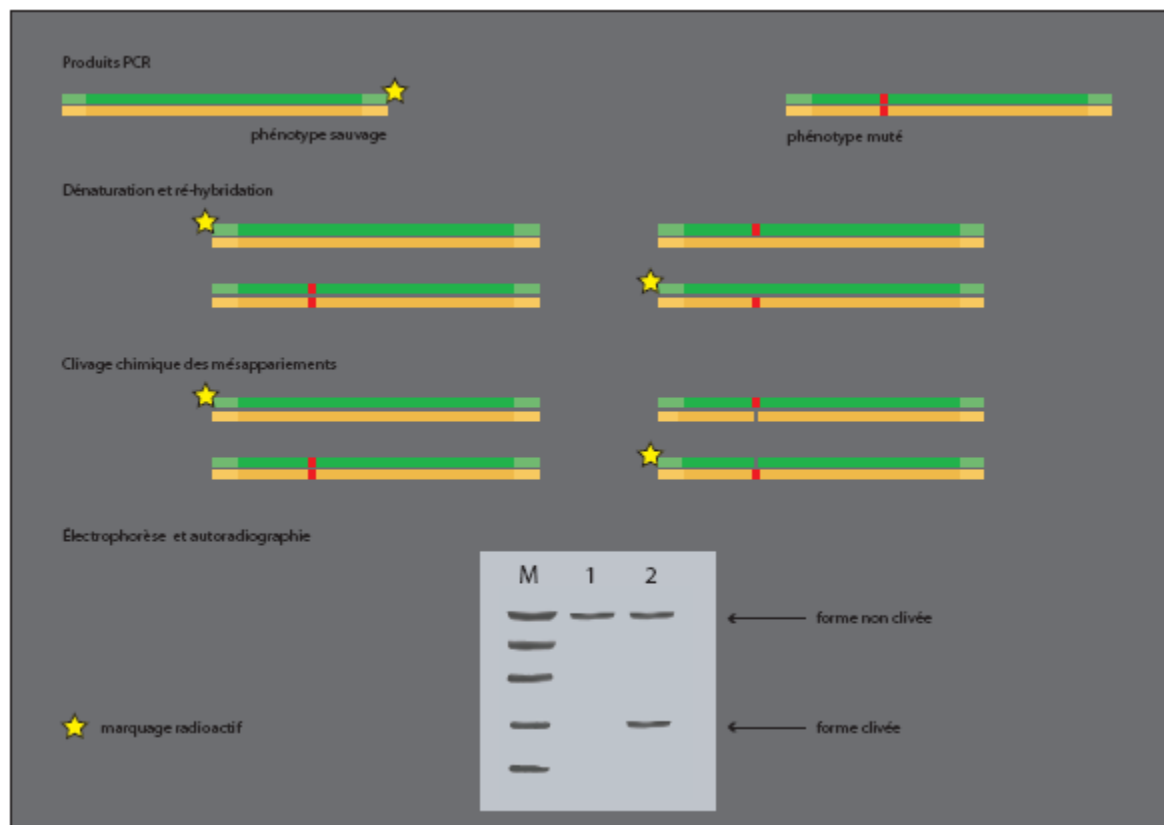


Figure17 : Détection de mésappariements sur produits d'amplification par PCR
(www.ecol-ADN.com)

VIII-2. Maladies infectieuses

La contamination par des virus ou des microorganismes (bactéries, parasites...) se traduit obligatoirement par la présence de leur matériel génétique dans tout ou partie de l'organisme infecté. La PCR est donc un outil d'autant plus performant pour détecter la présence d'un pathogène dans un échantillon biologique que sa sensibilité et sa spécificité sont très grandes. La performance du diagnostic par PCR repose essentiellement sur un critère : le choix des amorces susceptibles d'amplifier de façon très sélective une séquence de l'ADN du virus ou du microorganisme. L'ADN matriciel, d'autre part, doit être extrait à partir d'un tissu dans lequel le microorganisme est présent. Il suffit donc d'amplifier une séquence spécifique du pathogène à partir d'un prélèvement réalisé sur le patient et d'analyser le produit PCR par électrophorèse. La taille du fragment d'ADN amplifié, qui doit être conforme à la taille attendue, garantit la fiabilité du résultat et donc du diagnostic.

Dans le cas du dépistage du SIDA (VIH), par exemple, les tests de routine reposent sur la méthode ELISA qui consiste à détecter les anticorps anti-VIH ou encore des antigènes viraux dans le sérum des patients par une technique de type immuno-assay. Cette méthode, assez fiable et peu coûteuse, présente néanmoins quelques inconvénients. Les faux positifs sont assez fréquents à cause d'immuno-réactivités croisées. Les échantillons positifs font donc l'objet d'un test de contrôle par une autre technique de routine, le western blot. Reste le problème des séropositifs qui ne sont pas porteurs du virus, comme les enfants dont la mère est malade du SIDA. Le sang de ces nouveau-nés contient généralement des anticorps anti-VIH d'origine maternelle et ils sont donc séropositifs. En revanche, ils ne sont pas forcément porteurs du virus. Dans ce type de cas, le diagnostic par PCR s'avère pertinent. La méthode consiste à amplifier une séquence spécifique du provirus à partir d'un extrait de lymphocytes. Le même principe est employé pour la détection du toxoplasme chez les nouveaux-nés dont la mère est porteuse.

Il est bien sûr possible de diagnostiquer le SIDA par RT-PCR en recherchant l'ARN viral dans le sérum des patients. Des méthodes quantitatives ou semi-quantitatives sont au point qui permettent en outre d'évaluer la charge virale (www.ecol-ADN.com).

LA PARTIE EXPERIMENTALE

I- Matériel et méthodes

Notre étude est basée sur un simple questionnaire qui consiste à enquêter sur l'utilisation et la mise en marche de la technique de PCR dans plusieurs structures hospitalières et même dans le domaine vétérinaire en Algérie pour but :

- D'informer le lecteur que cette technique moderne est réellement existe en Algérie.
- D'enrichir nos connaissances sur les différentes utilisations de cette technique.
- De développer certaines suggestions pour élargir le champ d'utilisation de la PCR en Algérie.
- De comparer entre l'application de cette technique en Algérie avec celle usée ailleurs, plutôt dans les pays développés.
- D'évaluer la progression de la PCR en Algérie.

Un questionnaire (en cinq questions) est distribué sur trois structures qui sont :

- L'hôpital Mustapha Bacha-Alger- (précisément le service de Microbiologie).
- L'hôpital El-Kattar (le service de Biochimie).
- L'Institut National de la Médecine Vétérinaire (INMV).

Les questions portent sur les différents types de PCR utilisés au sein des structures déjà citées, les germes et ou les molécules les plus fréquemment recherchées lors des tests (bactéries, virus ou autres), le nombre des tests effectués par mois, la fiabilité des résultats obtenus avec la marge d'erreur commise et enfin la date de la mise en marche du PCR dans ces structures. (Questionnaire en annexe1).

Les réponses recueillies sont évaluées tout en les comparant avec le nombre total des demandes d'analyse et avec certaines applications de la PCR dans différents continents.

On a permis aussi de prendre quelques photos des appareils utilisés pour réaliser cette technique.

L'exploitation des résultats est réalisée par différentes méthodes de calculs et de schémas au moyen de l'Excel.

II- Résultats, analyses et discussions

Analyse et saisie des réponses aux questionnaires et discussion :

1- D'après les responsables des structures qu'on a visitées, les types de PCR généralement appliqués en Algérie sont :

- PCR en temps réel
- PCR conventionnelle
- PCR en point final

Bien que ces types présentent beaucoup de progrès et d'avantages, mais il existe pleins d'autres types associés au PCR tels que :

- RT-PCR, qui n'a pas besoin d'être réalisée en phase exponentielle et les résultats présentent une correcte reproductibilité (www.ecol-ADN.com).
- PCR nichée, qu'elle présente une très grande sensibilité, et des séries d'amorces successives peuvent être utilisées pour améliorer le rendement PCR de la séquence d'ADN cible (Newton et Graham, 1994).
- PCR multiplex, qui utilise des paires multiples d'amorces pour amplifier simultanément un grand nombre de séquences (Atlas et Bey, 1994).
- Technique LAMP qui permet de réaliser l'amplification de l'ADN à température ambiante (Notomi et *al.* en 2000).

Par conséquent et sans citer les autres types, on constate que les types de PCR appliqués restent limités en comparant avec d'autres pays surtout les continents développées qui demeurent à la hauteur en ce qui concerne l'avancement scientifique.

2- Les répliquions sur les germes et les molécules les plus fréquemment recherchés lors des tests sont cités au tableau 4.

Tableau 4 : Germes et molécules les plus fréquemment recherchés par PCR

germes et molécules structures	Bactéries	Virus	Autres
Hôpital El-Kattar	—	ARN (HIV) ARN (HCV) ADN (HBV)	—
Hôpital Mustapha Bacha	Staphylocoque Pseudomonas Campylobacter	HCV HBV HIV	Mutation du à l'antibiothérapie
L'Institut National de la Médecine Vétérinaire (INMV)	—	Influenza New Castle Bleu Tongue Fièvre Aphteuse Rift Valley Fever Clavelée Echtyma contagieuse IBR BVD-MD Leucose Peste des petits ruminants	—

- On note dans les structures hospitalières, ils appliquent souvent cette technique pour exploiter certaines maladies virales telles que :
 - Le virus de l'hépatite C par l'amplification de l'ARN en usant le processus en temps réel.

- Le virus de l'hépatite B par l'amplification de l'ADN en utilisant le même processus et /ou la technique conventionnelle.
- Le virus de l'immunodéficience (SIDA) par l'amplification de l'ARN en appliquant la PCR en temps réel.
- Pour les bactéries, ils se limitent à la recherche :
 - Les staphylocoques qui provoquent des atteintes systémiques et purulentes.
 - Les Pseudomonas qui provoquent des atteintes respiratoires, cutanées, génitales et surtout des infections nosocomiales dans les structures hospitalières.
 - Les Campylobacter, responsables des intoxications alimentaires surtout.
- On affirme aussi que cette technique est appliquée pour le diagnostic de certaines mutations dues à l'antibiothérapie afin d'éviter les résistances seulement au service de la microbiologie à l'hôpital Mustapha Bacha.
- A l'INMV, l'usage de la PCR se limite uniquement en faveur de diagnostiquer les maladies virales telles que :
 - L'influenza
 - La maladie de New Castle
 - La Blue Tongue
 - La fièvre aphteuse
 - West Nile
 - Rift Valley Fever
 - La Clavelée
 - L'Ecthyma contagieuse
 - La rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR)
 - La maladie des muqueuses (BVD-MD)
 - La leucose
 - La peste des petits ruminants
- D'après ces suites, on déduit que la PCR en Algérie se limite généralement pour exploiter l'ADN et ou l'ARN virale, par contre la PCR a beaucoup d'autres utilisations comme :
- A- Dans le domaine bactériologique,** on cite quelques exemples :
 - *Gordonia sputi*, responsable d'une bactériémie grave (Harle J-R, Roux V, Raoult D, 2009).

- *Kytococcus schroeteri*, agent responsable d'une endocardite (Roux V, Thuny F, Riberi A, Casalta JP, 2008).
- *Actinomyces massiliensis*, isolé à partir d'une culture de sang d'un malade (Roux V, Raoult D, 2009).
- *Helcobacillus massiliensis*, nouvelle espèce présentée dans la famille des Dermatobactériacé qui provoque des atteints cutanées (Aldrovandi N, Raoult D, Roux V, 2009)
- Quantification par PCR en temps réel et identification génétique des souches d'helicobacteries gastriques chez les chiens atteints de troubles digestives (HAPPONEN, I., LINDEN J., WESTERMARK, E, 2000).

B- En parasitologie :

- Mise au point d'une PCR en temps réel pour le diagnostic de kératites à *Acanthamoeba* spp. (Rivière D, Szczebara F, Berjeaud J, Héchard Y, 2006).
- Utilisation de la PCR directe et PCR-ELISA sur les trypanosomes pathogènes du bétail (Bajyana Songa K, Hamers-Casterman Hammers R., Pholpark M. et aL, 1987).
- L'amplification génique (PCR) pour diagnostiquer les piroplasmoses canines. (ANO H, MAKIMURA S, HARASAWA R, 2001).

C- En virologie :

- La PCR permet la détection et le typage des entérovirus directement à partir de produits pathologiques ou d'échantillons environnementaux (Abzug, MJ. 2014).
- Développement d'une PCR en temps réel pour la détection des brucella et relations avec le genre *ochrobactrum* (Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, Editors, 1988).

D- En biologie végétale comme :

- Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue "Lactuca sativa". (Kesseli RV, Paran I, Michelmore RW 1994)

E- Dans les maladies génétiques :

- La détection des mutations sur la séquence d'un gène.

Nous avons cité ces exploitations afin qu'on illustre que les autres pays sont arrivés à un niveau plus développé en ce qui concerne la PCR, par contre nos structures l'appliquent dans un cadre très étroit, et cela peut être dû aux facteurs suivants :

- Manque de personnel formé.
- Raréfaction des appareils pour la PCR.
- Titre onéreux des réactifs, dispositifs et l'appareil pour cette technique.
- D'autres raisons méritent une attention comme l'ignorance chez la plus part des gens qui veulent diagnostiquer, soit dans le cadre médical soit dans le domaine de la médecine vétérinaire.

3- Analyse et interprétation du nombre de tests de PCR effectués par mois :

Le tableau suivant élucide le nombre de tests/mois réalisés au niveau des structures visitées.

Tableau 5 : Rapport mensuel de l'utilisation de PCR au niveau des structures visitées.

Centre d'Analyse	INMV	Hôpital Mustapha Bacha		Hôpital El-Kattar
		Virologie	Bactériologie	
Tests / Mois	30	50	30	750

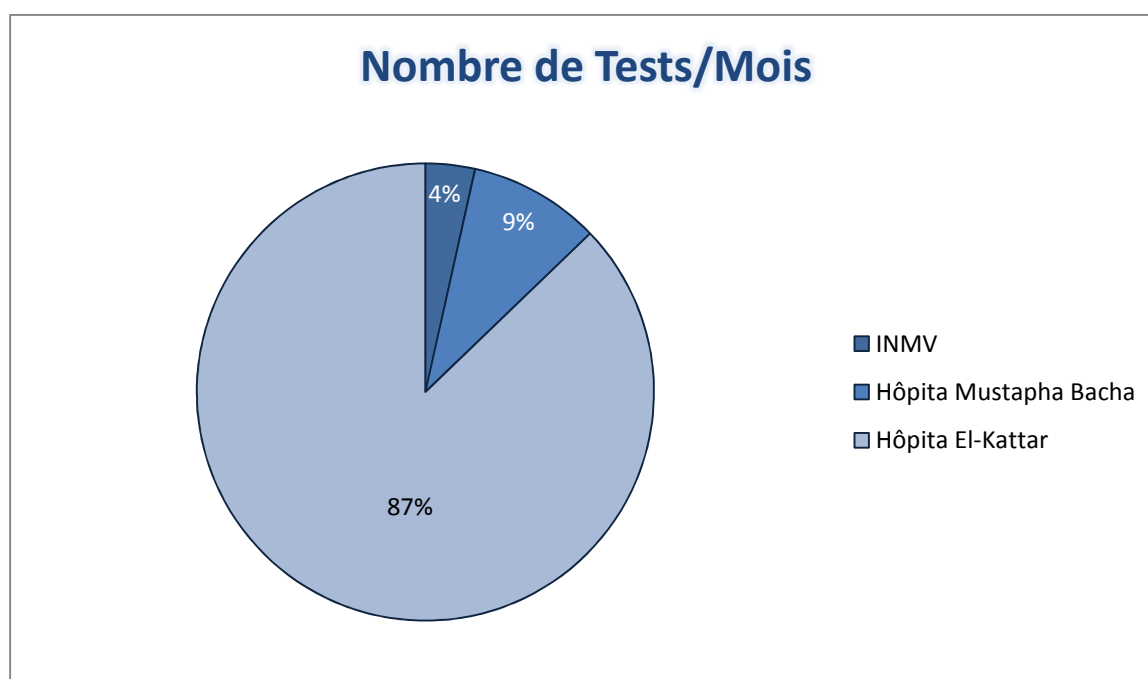


Figure18 : Pourcentage du Nombre de tests effectués par mois dans les différents Centres d'analyse sur la Wilaya d'Alger.

- La plus grande portion désigne les tests effectués au niveau de l'Hôpital d'EL-Kattar qui représente 87% des tests totaux effectués par mois ; soit 860 ; dont 750 pour cet Hôpital qui est énorme en comparaison aux autres Centres d'analyses.

- En seconde position, les tests effectués par l'hôpital Mustapha Bacha qui représente 9% du total soit 80 Tests/mois dont 50 sont des Tests Virologiques et 30 sont des tests Bactériologiques.
- En dernier lieu, l'INMV (Institut National de Médecine Vétérinaire) représente la portion la plus petite qui est de 4% des tests totaux par mois soit uniquement 30/mois.

4- Analyse et discussion du nombre des tests effectués par mois par rapport aux demandes :

A- Nombre de demande/mois :

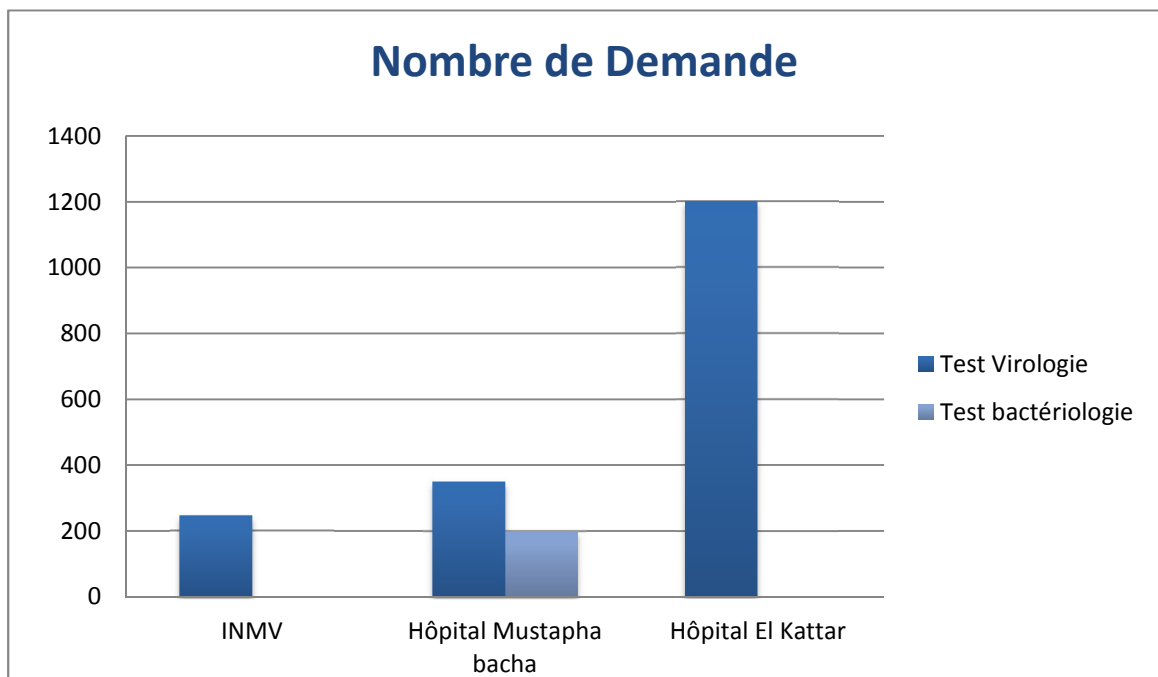


Figure19 : Nombre de demandes relatif à la réalisation des tests de PCR au niveau des structures d'analyse visitées.

- Le premier représente le nombre de demande sollicité par l'INMV (Institut National de la Médecine Vétérinaire) qui est de 245 Demande.

- Le deuxième représente le nombre de demandes sollicité par l'Hôpital Mustapha Bacha qui est désigné par 2 valeurs, 350 Demandes pour les tests virologiques et 200 Demandes pour les tests bactériologiques.
- Le dernier concerne celui de l'hôpital d'El-Kattar avec le plus grand effectif qui est de 1200 Demande.

B- Nombre de tests effectués par rapport aux demandes :

Le tableau qui suit présente le rapport entre le nombre des tests effectués avec le nombre de demande.

Tableau7 : Nombre de tests effectués/mois par rapport aux demandes

Centre d'Analyse	INMV	Hôpital Mustapha Bacha		Hôpital El Kattar
		Virologie	Bactériologie	
Test / Mois	30	50	30	750
Nombre de demande	245	350	200	1200
Test effectué/ demande	12.24%	14.28%	15%	62.5%

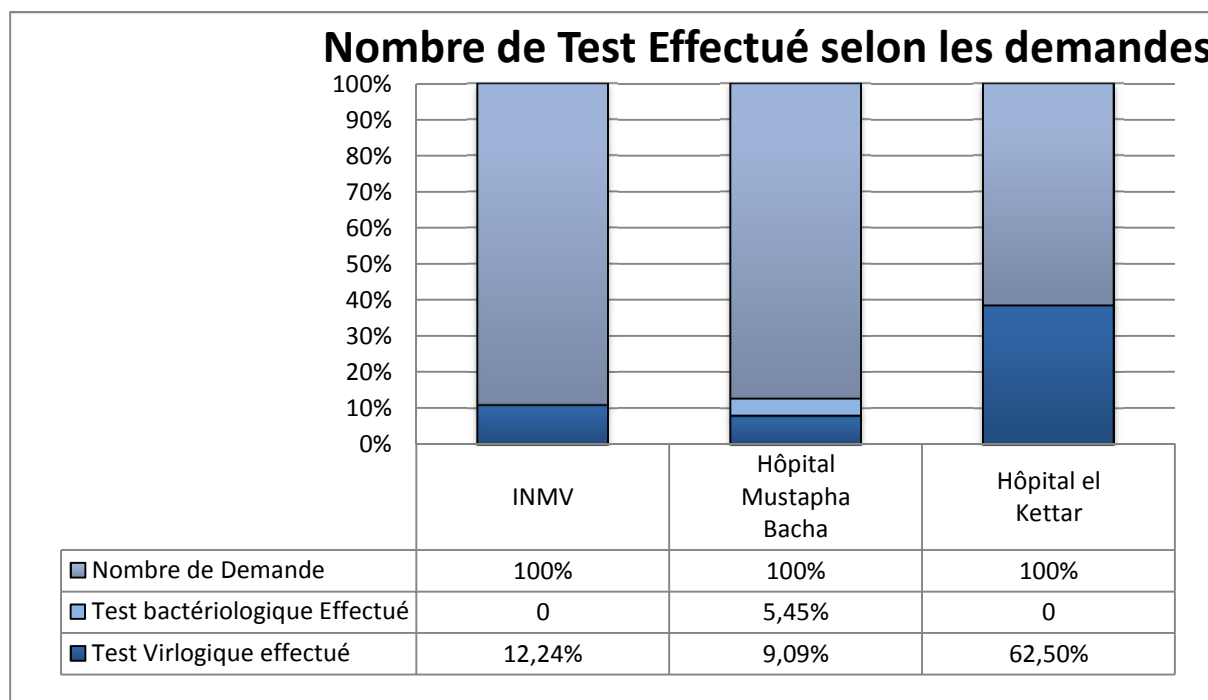


Figure20 : Nombre de tests effectués selon les demandes dans les différents Centres d'analyse et tests effectués en réponse à ces demandes (Le nombre de demandé est représenté par la valeur total soit 100%) :

- Le premier histogramme empilé représente les tests effectués en réponse aux demandes sollicitées au niveau de l'INMV (Institut National de Médecine Vétérinaire) et qui sont de 12.24% soit 30 tests pour 245 demandes.
- Le deuxième histogramme empilé représente les tests effectués en réponse aux demandes sollicitées au niveau de l'Hôpital Mustapha et qui sont de 14,54% soit 80 tests pour 550 demande au total avec 50 pour les tests virologiques (9.09%) et 30 pour les tests bactériologiques (5.45%) en comparaison aux demandes totales (550 demandes au niveau de l'Hôpital Mustapha Bacha) ; ou bien 14.28% pour les tests virologiques soit 50 tests pour 350 demandes de test virologique et 15% pour les tests bactériologiques soit 30 tests pour 200 demandes de tests bactériologiques.
- Le Troisième histogramme empilé représente les tests effectués en réponse aux demandes sollicitées au niveau de l'hôpital d'El Kattar et qui sont de 62.50% soit 750 tests pour 1200 demandes, donc il y'a une réponse à plus de la moitié des demandes.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage par rapport aux demandes reste insuffisant à cause du manque d'appareil, du titre onéreux du test et du recule scientifique en Algérie comme nous l'avons déjà mentionné. En revanche, on peut dire que cela reste tout de même un bon départ vers des progrès et l'encouragement d'introduire de nouvelles techniques modernes afin de réaliser les diagnostics dans les différents domaines soit médical, biologique et vétérinaire.

5- Les réponses sur la fiabilité des résultats

- Tant cette technique est moderne, avec la spécificité élevée allant jusqu'à 100%, on peut affirmer que la marge d'erreur est négligeable.
- On cite aussi que les résultats sont interprétés en fonction de contrôles de qualité :
 - Contrôles internes d'extraction.
 - Contrôles d'amplification.
 - Contrôles positifs et négatifs.

6- La date de mise en marche du PCR

- Hôpital El-Kattar : depuis 2004 dont la technique en temps réel est débutée en 2010
- Hôpital Mustapha Bacha : depuis 2005
- INMV : depuis 2006

Ce qui confirme que la PCR en Algérie est une technique nouvelle pour le domaine de diagnostic, alors que le principe de la PCR a été décrit en 1985.

(www.Wikipédia.com)

7- Les photos des appareils (thermocycleurs) utilisés en Algérie :

A- Thermocycleur pour PCR en point final (Mustapha Bacha) :

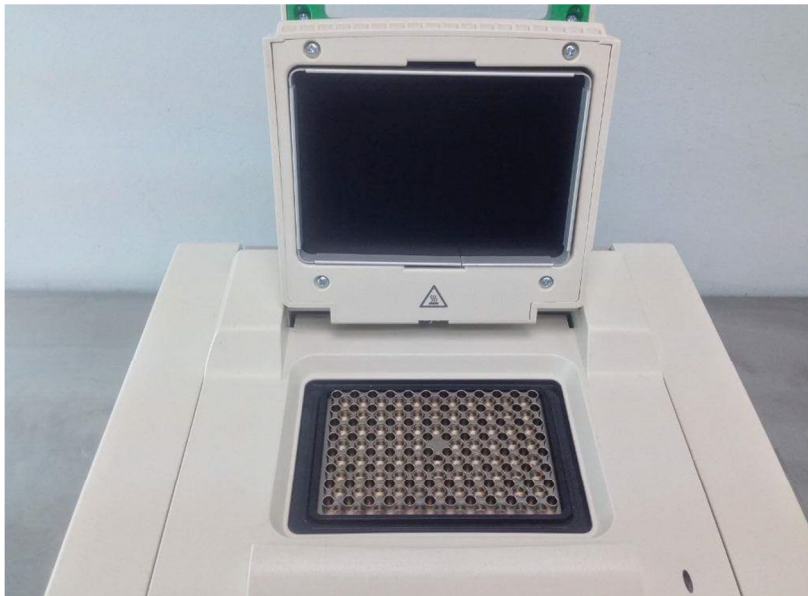


Figure21 : Biorad : thermocycleur pour PCR en point final

B- Thermocycleur pour PCR en temps réel (Mustapha Bacha) :



Figure22 : Biorad cfx 96 : pour la PCR en temps réel

C- Thermocycleur pour PCR en système fermé (Mustapha Bacha) :



Figure23 : M2000 abbot , PCR en système fermé utilisé pour les hépatites virales

D- Thermocycleurs utilisé à l'hôpital El-Kattar :



Figure24 : Cobas Ampli Prep-Taq Han : pour PCR en temps réel



Figure25 : Sacace : pour PCR en point final

E- Thermocycleur pour les tests de virologie à l'INMV :

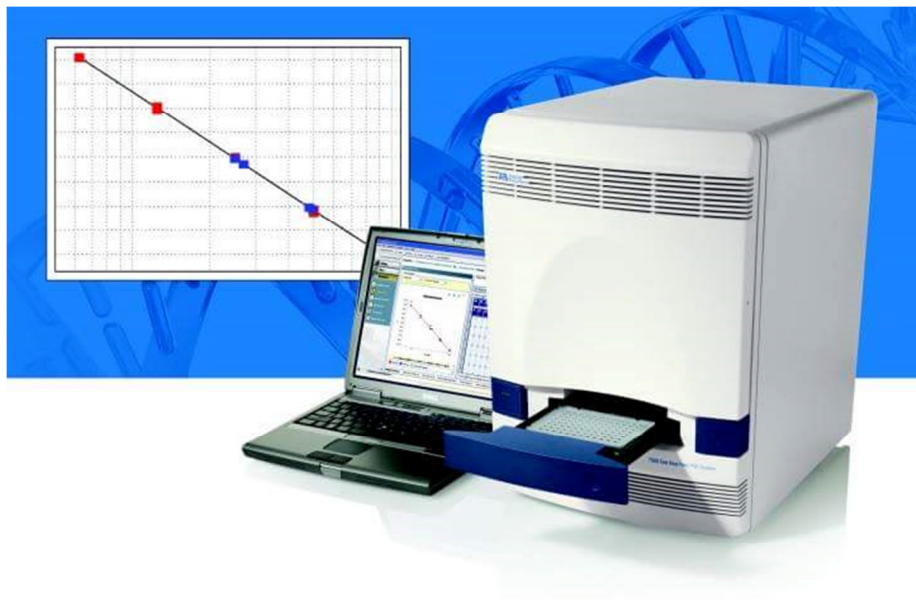


Figure26 : A7500 : pour PCR conventionnelle et en temps réel

III- Conclusions et recommandations

- La biologie moléculaire est apparue au XXe siècle, à la suite de l'élaboration des lois de la génétique, de la découverte des chromosomes et de l'identification de l'ADN comme support de l'information génétique.
- La PCR est une technologie qui a bouleversé la biologie moléculaire, et s'est implanté rapidement dans les laboratoires, surtout la PCR en temps réel qui est considérée comme une méthodologie impressionnante et nouvelle.
- Pour l'interprétation des résultats, il faut rester vigilant car de nombreuses études sont encore nécessaires pour définir le seuil de positivité traduisant une signification pathologique.
- La PCR met en évidence d'une part la grande sensibilité de celle-ci par rapport aux méthodes microscopiques et d'autres parts la possibilité d'analyser de grands échantillons. Toutefois son coût et son caractère laborieux restent les inconvénients majeurs.
- L'introduction de la PCR en Algérie depuis 2004 reste un point puissant pour renforcer le domaine de diagnostic dans toutes les domaines concernées soit médicales, biologie végétales, vétérinaires ou légales.
- L'application de la PCR en Algérie s'attarde modéré par rapport aux laboratoires mondiaux, et qui se limite surtout dans le diagnostic en virologie espérant la modernisation plutôt le progrès et l'élargissement en ce qui concerne ce domaine de recherche dans la biologie moléculaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.,1983.** Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York.
- 2- **Atlas, R.M. and Bej, A.K,1994.** Polymerase Chain Reaction. In: Gerhardt, P.,Murrey, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R., (Eds.) Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 418–435.
- 3- **C. Heid, J. Stevens, K. Livak et P. Williams, 1996.** «Real time quantitative PCR», Genome research, vol. 6, pp. 780-789.
- 4- **C. Heid, J. Stevens, K. Livak et P. Williams, 1996.** «Real time quantitative PCR», Genome research, vol. 6, pp. 986-994.
- 5- **C. Heid, J. Stevens, K. Livak et P. Williams, 1996.** «Real time quantitative PCR», Genome research, vol. 6, pp. 715-783.
- 6- **C. Wittwer, K. Ririe, R. Andrew, D. David, R. Gundry, U. Balis, 1997.** «The lightcycler : a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control», Biotechniques, vol. 22, pp. 176-181.
- 7- **Cirino et al, 2003** « Generating Mutant Libraries Using Error-Prone PCR »], Methods in Molecular Biology, volume 231.
- 8- **Cirino et al, 2003** « Generating Mutant Libraries Using Error-Prone PCR »], Methods in Molecular Biology, volume 220.
- 9- **F. David et E. Turlotte, 1998.** « An Isothermal Amplification Method », Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences, vol. 321, p. 909-914.
- 10- **H. Rye, S. Yue, D. Wemmer, M. Quesada, R. Haugland, R. Mathies, G et A. lazer, 1992.** «Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanines dyes : properties and applications», Nucleic acids research, vol. 20, pp. 2803-2812, 1992.

- 11- **J. Watson et F. Crick, 1953.** «Molecular structure of nucleic acids», *Nature*, vol. 171, pp. 737-738.
- 12- **J. Weber, 2005.** Nouvelle méthode de détection de mutations inconnues - applications au diagnostic génétique, Thèse de doctorat de l'Université Paris.
- 13- **K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn et H. Erlich, 1986.** «Specific enzymatic Amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction», *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biologie*, pp. 279-280.
- 14- **K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn et H. Erlich, 1986.** «Specific enzymatic Amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction», *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biologie*, pp. 263-273, 1986.
- 15- **Lebech AM, 2002.** “Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification” ; *APMIS Suppl.* (105):1-40.
- 16- **M. Joshi et D. J, 2010.** «Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles And Application», *International Journal of Biomedical Research*, vol. 1, pp. 81-97.
- 17- **M. Rahman, M. Uddin, R. Sultana, A. Moue et M. Setu, 2013.** «Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review», *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, vol. 4, pp. 30-36.
- 18- **P. Holland, R. Abramson, R. Watson, R. Saiki et D. Gelfand, 1992.** «Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *thermus aquaticus* DNA polymerase», *Clinical chemistry*, vol. 38, pp. 462-463.
- 19- **R. Higuchi, G. Dollinger, P. Walsh et R. Griffith, 1992.** «Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences», *Bio/Technology*, vol. 10, pp. 413-417.
- 20- **R. Higuchi, G. Dollinger, P. Walsh et R. Griffiths,** «Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences», *Biotechnology*, vol. 10, pp. 420-428.

- 21- **R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, E. Higuchi, G. Horn, K. Mullis et H. Erlich, 1988.** «Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase», Science, vol. 239, pp. 487-491.
- 22- **www.ecol-ADN.com**
- 23- **<http://fr.wikipedia.org/>,2006.** Reaction en chaine par polymerase. Wikipedia France.
- 24- **Roth, A., Mauch, H. and Göbel, U, 1997.** Nucleic Acid Amplification Techniques – Recommendations for Employing Molecular Methods in Diagnostic Routine Microbiology Laboratories and Measures for Internal Quality Assurance. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 25- **Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989.** In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (Eds.) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, chapter 14.
- 26- **harrocks, A.D, 1994.** The design of primers for PCR. In: Griffin, H.G. and Griffin, A.M (Eds.) PCR Technology: Current Innovations. London: CRC Press, pp. 5–11.
- 27- **Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, E.H., Kawashima, M.J., Johnson, K.I., and Wallace, R.B, 1981.** Using Purified Genes. In ICN-UCLA Symp. Developmental Biology, Vol. 23, Brown, D.D. Ed., Academic Press, New York, 1981, 683.
- 28- **Watson, D.J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J. and Weiner, A, 1988.** Molecular Biology of the Gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., New York.
- 29- **Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N, 1985.** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230, 1350.

ANNEXES



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

École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

Questionnaire

- 1- Quels sont les différents types de PCR utilisés ?

- 2- Quels sont les germes ou molécules les plus fréquemment recherchés lors des tests ?

Bactérie :

Virus :

Autres :

- 3- Quel est le nombre de tests effectués par mois ?

- 4- Quel est la fiabilité des résultats obtenus et quel est la marge d'erreur commise ?

5- Depuis quand cette technique est-elle mise en marche dans votre service

6- quelques photos des thermocycleurs