

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N°:



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : MICRO MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Mémoire présenté pour l'obtention

Du diplôme de Master Académique

Par : Nouiri.I, Belarchaoui.H,

Ben belkhir.M

Intitulé

Polymerase Chain Reaction (PCR): Principes et Applications

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. Ariech M	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Dr. Guetouache M.	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Dr. Medjekal S.	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur

Année universitaire : 2024 /2025

Dédicace

Louange à dieu tout puissant qui m'a permis de voir ce jour tout attendu

Je dédie ce travail à:

- ✚ Mes parents, pour leur encouragement et leur soutien dans la vie, et à qui je dois mon succès et mon respect, **Abdelhamid** et ma chère mère, **Nouiri Razika**. Que Dieu les bénisse tous les deux.
- ✚ Mon mari : **Ali kouici**, qui m'a beaucoup aidée et m'a soutenue pour mener à bien ce travail.
- ✚ A mes filles : **Madjdoline** et **Nourssine**
- ✚ Mes chers frères : **Soufyane, Ishak** et **Salah**, qui m'ont toujours encouragée et soutenue.
- ✚ A mes chère soeure : **Ikram, Rahima**.

Toutes les personnes qui m'ont aidé dans ma vie.

Ibtissem

Dédicace

✚ À celle qui a mis le paradis sous ses pieds et a facilité les épreuves grâce à ses prières, à cette grande femme qui a toujours souhaité voir mes yeux briller en me voyant un jour comme celui-ci,

Ma chère mère

✚ À l'épine solide et aux rêves de mes jours, à ceux qui m'ont soutenu et qui ont été pour moi des sources dont je me suis désaltéré, aux meilleurs de mes jours et à la joie de mes yeux

Salah, Sousou, Lamia

✚ À tous ceux qui ont été un soutien et une aide sur ce chemin, aux amis fidèles et aux compagnons des années, aux personnes qui ont traversé des épreuves et des crises, à ceux qui m'ont comblé de leurs sentiments et de leurs conseils sincères :

Salah Diaa El-Din, Turquie Sanaa, Mohamed Abdel Rahman, Hafsa

✚ Je vous dédie tous ce succès, ce fruit de ma réussite que j'ai toujours souhaité. Aujourd'hui, j'ai achevé et complété le premier de ses fruits grâce à la grâce de Dieu, le Tout-Puissant. Celui qui dit 'je l'ai' l'obtient, et je l'ai, même si cela devait se faire contre son gré. Et je rends grâce à **Dieu**.

MANAL

Dédicace

✚ Après avoir prié et salué le Prophète élu, je commence mes paroles en remerciant Allah Tout-Puissant pour Sa bénédiction et Son soutien tout au long de mon parcours.

✚ J'adresse mes plus sincères remerciements et ma profonde gratitude à mes chers parents mon père **Reguig** et ma mère **Malika**, qui sont ma vie et mon pilier inébranlable à chaque étape. Merci pour leur amour inconditionnel et leur soutien indéfectible.

✚ Un remerciement spécial à mes chères frères et leurs femmes et leurs enfants, **Hamid, Said, Kamel, Zouhir, Ghani** et chère mes sœurs **Dalila, Ismahane** et leurs maris et leurs enfants granite qui ont été à mes côtés à chaque instant, ainsi qu'à mes frères, toujours présents pour m'encourager et me soutenir.

✚ Je n'oublie pas mes collègues dans ce travail, qui ont été bien plus que de simples collègues : de véritables sœurs avec qui j'ai partagé défis et réussites. Et bien sûr, mes merveilleuses camarades de promotion, vous avez été et resterez la plus belle promotion avec laquelle j'ai construit des souvenirs inoubliables.

✚ Je tiens également à exprimer ma gratitude à mes collègues dans la profession d'enseignement, qui ont grandement

✚ ontribué à développer mes compétences et ma foi en cette noble vocation. Merci pour votre coopération et votre soutien, car grâce à vous, la valeur du message que nous portons dans ce domaine est d'autant plus grande.

✚ Merci à vous tous ! Grâce à vous, ce voyage a été rempli de joie, de défis et de succès.

Henen

Remerciement

Nous remercions **Dieu** tout-puissant de nous avoir donné la santé et la volonté de commencer et de terminer cette thèse.

Ce travail n'aurait pas été aussi riche sans l'aide et la supervision du

✚ **Dr. Guetouache Mourad**, et nous le remercions pour la qualité exceptionnelle de sa supervision, sa patience, ses conseils avisés, son écoute active, sa rigueur et son dévouement durant la préparation de cette thèse, et nous n'aurions pas réussi à ce point sans ses conseils et son pouvoir de persuasion.

✚ Nos remerciements aux membres du jury, **Dr. Ariech Mounira Dr. Medjekal Samir**

✚ Nous vous remercions pour votre enseignement et pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail, et nous vous sommes très reconnaissants de l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

✚ Nous tenons également à remercier tous les membres du corps enseignant, de l'école primaire à l'enseignement supérieur, pour toutes les connaissances qu'ils nous ont transmises.

Enfin, nous remercions également toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Résumé :	i
Liste des abréviations :	ii
Liste des figures :	v
Liste des tableaux :	vii
Introduction :	1
Chapitre I. Fondements théoriques de la Pcr :	4
I.1. Historique :	4
I.2. Évolution des techniques de PCR :	4
I.3. Définition de la PCR :	5
I.4. Définition L'ADN :	5
I.5. Principe du PCR :	6
I.5.1. La dénaturation :	7
I.5.2. L'hybridation :	7
I.5.3. Élongation :	8
I.5.4. Taq polymérase :	8
I.6. Les conditions de réaction :	9
I.7. Détection et analyse du produit de la PCR :	10
I.8. Éléments nécessaires à la PCR :	11
I.8.1. Template DNA (modèle d'ADN) :	11
I.8.2. ADN polymérase :	12
I.8.3. Amorces:	13
I.8.4. Nucleotides (dNTPs) :	15
I.8.5. Tampon et ions (Mg^{2+}) :	16
I.8.6. Additifs ou cosolvants couramment utilisés comme amplificateurs de Pcr et concentrations finales recommandées.	18
Chapitre II. Techniques et variantes De La Pcr :	19

II.1. Aperçu des techniques moléculaires basées sur la technologie PCR :.....	19
II.1.1. Microsatellites :	19
II.1.1. SNP :.....	20
II.1.2. Polymorphisme d'amplification de la longueur des fragments (AFLP) :.....	21
II.1.3. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) :.....	22
II.1.4. Marqueurs de l'ADN mitochondrial :.....	22
II.2. PCR classique :.....	23
II.2.1. Composants de la PCR classique :	23
II.2.2. Mécanisme de la PCR classique:.....	23
II.2.3. Avantages de la PCR classique:	24
II.3. Applications PCR Classique :.....	24
II.3.1. Médecine Légale et Criminalistique :.....	24
II.3.2. Diagnostic Médical :.....	24
II.3.3. Analyse Génomique :	24
II.3.4. Clonage et Génie Génétique :.....	25
II.3.5. Tests de Paternité et Identité :.....	25
II.3.6. Biodiversité et Environnement :.....	25
II.3.7. Évolution et Paléontologie Moléculaire :.....	25
II.4. Variantes de la PCR :.....	25
II.4.1. PCR par transcriptase inverse :.....	25
II.4.2. PCR quantitative en temps réel :	26
II.4.3. PCR en temps réel :	27
II.4.4. PCR semi-quantitative ou compétitive :.....	28
II.4.5. PCR Multiplex :.....	30
II.4.6. PCR Emboîté :.....	32
II.5. Innovations récentes en PCR :.....	33
II.5.1. PCR a haute-fidélité :	33

II.5.2. PCR numérique :	35
II.5.3. Instruments :	38
II.5.4. Les avantages de la PCR numérique :	39
II.5.5. Applications dPCR :	40
II.5.6. PCR numérique MIQE :	45
II.6. Technologies de détection :	46
II.6.1. Agents se liant à l'ADN double brin (Double-Strand Ed DNA binding dyes: Light cycler assay) :	46
II.6.2. Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay) :	47
II.6.3. Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes) :	51
II.6.4. Balises moléculaires (sonde d'hybridation en épingle à cheveux: Molecular Beacons) :	51
II.6.5. Amorces scorpion (Scorpion primer : self-fluorescing amplicon) :	54
Chapitre III. Applications de la Pcr :	55
III.1. Diagnostic médical :	55
III.1.1. Principes et Applications en Virologie :	55
III.1.2. Principes et applications en mycologie et parasitologie :	57
III.1.3. Principes et applications en microbiologie :	58
III.1.4. Bactériologie :	59
III.1.5. Tests génétique et dépistage de maladies héréditaires :	60
III.2. Recherche scientifique :	63
III.2.1. Amplication de gènes d'intérêt :	63
III.2.2. Etude d'expression génétique :	66
III.3. Biotechnologie et industrie :	67
III.4. Médecine légale :	67
III.4.1. Analyse ADN dans les enquêtes criminelles :	68
III.4.2. Identification humaine :	76
Chapitre IV. L'appareil de Pcr :	77

IV.1. Composants d'un appareil de PCR :	77
IV.1.1. Bloc Chauffant (Thermal Block):	77
IV.1.2. Interface utilisateur (Interface utilisateur):	78
IV.1.3. Système de contrôle de température :	79
IV.1.4. Contrôle de la température du gradient :	80
IV.2. Fonctionnement de l'appareil :	82
IV.2.1. Programmation des cycles thermiques :	82
IV.2.2. Progrès des thermocycleur :	83
IV.2.3. Technologies de contrôle de la température :	85
IV.2.4. Suivi des réactions en temps réel (qPCR) :	87
IV.3. Types d'appareils de PCR :	88
IV.3.1. Appareils à usage général vs spécifiques :	88
IV.3.2. Innovations récentes (miniaturisation, portabilité) :	94
IV.4. Limitations et défis techniques :	98
IV.4.1. Contamination croisée :	98
IV.4.2. Sensibilité et spécificité des résultats :	100
Conclusion :	103
Références Bibliographiques :	104

ملخص :

تعد تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) من التقنيات الثورية في علم البيولوجيا الجزيئية، إذ تتيح تضخيم تسلسلات محددة من الحمض النووي بسرعة وبدقة عالية وحساسية كبيرة. ومنذ اكتشافها سنة 1983، شهدت هذه التقنية تطوراً ملحوظاً أدى إلى ظهور عدة أنواع مثلالكمي، الرقمي، و RT-PCR، لتناسب مع مختلف مجالات التحليل.

يقدم هذا البحث المبادئ الأساسية لتقنية PCR، والعناصر الضرورية لتنفيذها، وآلية عملها المعتمدة على ثلاث مراحل: التفكك، التهجين، والاستطالة. كما يستعرض أهم أنواع PCR التقنية ومميزاتها، بالإضافة إلى تطبيقاتها الواسعة في مجالات متنوعة مثل التشخيص الطبي، البحث العلمي، التكنولوجيا الحيوية، والطب الشرعي. وبفضل دقتها وسرعتها وقابليتها للتكيف، أصبحت تقنية PCR أداة لا غنى عنها في المختبرات الحديثة، ومع التقدم التكنولوجي المستمر، تزداد فعاليتها وانتشارها يوماً بعد يوم.

الكلمات المفتاحية:

تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)، الحمض النووي (DNA)، البيولوجيا الجزيئية، التشخيص الطبي، الطب الشرعي، PCR الكمي (qPCR)، PCR بالنسخ العكسي (RT-PCR).

Abstract:

The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a revolutionary technique in molecular biology, enabling the rapid, specific, and sensitive amplification of targeted DNA sequences. Since its discovery in 1983, PCR has undergone significant advancements, giving rise to various formats such as real-time PCR (qPCR), digital PCR (dPCR), and reverse transcription PCR (RT-PCR), tailored to diverse analytical needs.

This thesis outlines the fundamental principles of PCR, the key components required for its implementation, and its mechanism based on cycles of denaturation, annealing, and elongation. It also explores the main technical variants of PCR and their respective advantages. Furthermore, it highlights the wide-ranging applications of PCR in medical diagnostics, scientific research, biotechnology, and forensic science.

Thanks to its accuracy, speed, and adaptability, PCR has become an indispensable tool in modern laboratories. Technological advancements continue to enhance its performance, accessibility, and versatility.

Keywords:

PCR, DNA, Molecular Biology, Medical Diagnosis, Forensic Medicine, qPCR, RT-PCR.

Résumé :

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique révolutionnaire en biologie moléculaire, permettant l'amplification rapide, spécifique et sensible de séquences d'ADN. Depuis son invention en 1983, la PCR a connu une évolution considérable, donnant naissance à de nombreuses variantes telles que la PCR en temps réel, la PCR digitale, ou encore la RT-PCR, adaptées à divers contextes d'analyse.

Ce mémoire présente d'abord les principes fondamentaux de la PCR, les éléments nécessaires à sa mise en œuvre, ainsi que son mécanisme basé sur les cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation. Ensuite, il explore les principales variantes techniques de la PCR et leurs avantages spécifiques. Enfin, une large place est accordée à ses applications dans des domaines variés comme le diagnostic médical, la recherche scientifique, la biotechnologie, et la médecine légale.

Grâce à sa précision, sa rapidité et son adaptabilité, la PCR est aujourd'hui un outil indispensable dans les laboratoires modernes, et les avancées technologiques la rendent de plus en plus performante, accessible et polyvalente.

Mots clés :

PCR, ADN, Biologie moléculaire, Diagnostic médical, Médecine légale, qPCR, RT-PCR.

Liste des abréviations :

% : Pourcentage

(NH₄)₂SO₄ : Sulfate d'ammonium

°C : Degré Celsius

µl : Microlitre

ADN : Acide Désoxyribo nucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Adng : Acide Désoxyribonucléique Génomique

ARN: Acide ribonucléique

BSA: Bovine serum albumin

Ccd: Charge-Coupled Device

COVID-19: Coronavirus Disease 2019

dATP : désoxyadénosine triphosphate

dCTP : désoxycytidine triphosphate

dGTP : désoxyguanosine triphosphate

DHPLC : chromatographie liquide dénaturante à haute performance

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

dNTP : desoxy nucléotide triphosphate

dTTP : désoxythymidine triphosphate

dUTP : désoxyuridine triphosphate

g : gramme

HCl : Acide chlorhydrique

IHM: Interface Homme-Machine

Kg: kilogramme

L: Litre

LCD: Liquid Crystal Display

LED: Light Emitting Diode

Mg : Milligramme

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

ml : Millilitre

mm : Millimètre

PCR : Polymerase Chain Reaction

pg:picogram

pH : Potentiel hydrogène

qPCR : Polymerase Chain Reaction quantitative

RFU : Unités de fluorescence relative

RT-PCR : reverse transcriptional polymerase chain reaction

STR: Short Tandem Répétas

Taq: Thermus aquaticus

Tm: Temperature melting

U : Unité enzymatique

UDG : Uracile-DNA glycosylase

UNG : Uracil-N-Glycosylase

Liste des figures :

Figure 1: Molécule d'ADN.....	6
Figure 2: Comparaison des résultats de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) à l'aide d'un plasmide et d'une matrice d'ADN humain.	11
Figure 3: L'augmentation des quantités d'ADN polymérase peut améliorer le débit de la PCR.	13
Figure 4: Amplification par PCR d'un ADN.	15
Figure 5: Traitement à l'UDG pour la prévention de la contamination des amplicons PCR.....	16
Figure 6:: Fonction de l'ion magnésium dans le site actif de l'ADN polymérase.....	17
Figure 7: Effets des ions tampons sur la formation des duplex d'ADN.....	17
Figure 8: fidelio hot Start dna Polymerase – Pcr haute-fidélité.....	35
Figure 9:: Absolute Q Digital PCR système	39
Figure 10: Détection et détermination du nombre de copies relatif d'une mutation SNP	42
Figure 11: Essai de Droplet Digital™ PCR pour déterminer le CNV	42
Figure 12: Évaluation de l'ensemble amorce/sonde dans l'essai Droplet Digital™ PCR et qPCR....	44
Figure 13: Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes.....	48
Figure 14: Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay).....	50
Figure 15: Balises moléculaires (Molecular Beacons).. ..	53
Figure 16: Une étude de paternité basée sur trois locus génétiques	74
Figure 17: Illustration d'un cas de vol à main armée basée sur le profilage génétique ci-dessous...	74
Figure 18: L'appareil de PCR	77
Figure 19: Présentation schématique du protocole de PCR directe aviaire	79
Figure 20: Contrôle de la température par gradient	80
Figure 21: Programmation des cycles thermiques	82
Figure 22: Contrôle de la température par gradient d'un seul bloc avec des éléments de chauffage et de refroidissement à chaque extrémité.....	87
Figure 23: Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR.....	89
Figure 24: Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR.....	91

Figure 25: Mastercycler Eppendorf X50	93
Figure 26: MiniPCR.....	95
Figure 27: Portabilité des systèmes PCR.....	96
Figure 28: Abbott ID NOW	97
Figure 29: Cepheid GeneXpert Omni	98

Liste des tableaux :

Tableau 1: Recommandations générales sur la conception des amorces PCR.	14
Tableau 2: Additifs ou cosolvants couramment utilisés comme amplificateurs de PCR et concentrations finales recommandées.....	18
Tableau 3: Aspects clés du contrôle de la température de gradient.....	81
Tableau 4: Paramètres thermiques et objectifs des étapes d'un cycle de PCR.....	83
Tableau 5: Progrès en matière de thermocycleur	84

Introduction

Introduction :

La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) a été inventée par Mullis en 1983 et brevetée En 1985, Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, qui est une réplification in vitro de séquences d'ADN spécifiques.. Cette méthode peut générer des dizaines de milliards de copies d'un fragment d'ADN particulier (Par exemple, il est possible d'amplifier un fragment spécifique d'ADN — appelé séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible — à partir d'un extrait d'ADN servant de matrice, dans le but d'en obtenir un grand nombre de copies.). En effet, si la séquence d'intérêt est présente dans l'extrait d'ADN, il est possible de la répliquer sélectivement (on parle d'amplification) en très grand nombre d'amplification) en très grand nombre. La puissance de la PCR repose sur le fait que la quantité d'ADN matriciel n'est pas, en théorie, un facteur limitant.

On peut donc amplifier des séquences nucléotidiques à partir de quantités infinitésimales d'extrait d'ADN. La PCR est donc une technique de purification ou de clonage. L'ADN extrait d'un organisme ou d'un échantillon contenant des ADN d'origines diverses n'est pas directement analysable. Il contient de nombreuses masses de séquences nucléotidiques. Il est donc nécessaire d'isoler et de purifier la ou les séquences d'intérêt, qu'il s'agisse de la séquence d'un gène ou de séquences non codantes (introns, transposons, mini ou microsatellites). A partir de cette masse de séquences qui constitue l'ADN matrice, la PCR peut donc sélectionner une ou plusieurs séquences et les amplifier une ou plusieurs séquences et les amplifier par réplification à des dizaines de milliards de copies.

Une fois la réaction terminée, la quantité d'ADN matrice absente dans la région d'intérêt reste inchangée. Cependant, la quantité de séquences amplifiées (ADN d'intérêt) est très importante. La réaction en chaîne par polymérase (PCR), il s'agit donc d'une méthode de clonage moléculaire, et clonage est synonyme de pureté.

Les applications de la PCR sont nombreuses. C'est une technique désormais incontournable en biologie cellulaire et moléculaire. Elle permet, notamment en quelques heures, le "clonage acellulaire" d'un fragment d'ADN par un système automatisé, ce qui prend habituellement plusieurs jours avec les techniques standard de clonage moléculaire. D'autre part, la PCR est largement utilisée à des fins de diagnostic pour détecter la présence d'une séquence d'ADN spécifique de tel ou tel organisme dans un liquide biologique.

Elle est également utilisée pour produire des empreintes génétiques, que ce soit pour déterminer l'identité génétique d'un individu dans le cadre d'une enquête médico-légale, ou pour identifier

des espèces animales, végétales ou microbiennes à des fins de tests de qualité alimentaire, de diagnostic ou de sélection variétale. La réaction en chaîne par polymérase (PCR) demeure essentielle pour le séquençage ou la mutagenèse dirigée.

Enfin, on peut trouver différentes versions de la PCR telles que la PCR en temps réel, la PCR compétitive, la PCR in situ, la RT-PCR, etc. Actuellement, les développements révolutionnaires dans la recherche en biologie moléculaire s'appuient sur la technologie de réaction en chaîne par polymérase (PCR), qui fournit des produits adaptés et spécifiques, notamment dans le domaine de la caractérisation et de la conservation de la diversité génétique.

Parmi les autres applications potentielles de la technologie PCR, on peut citer, en premier lieu, le séquençage intégral des génomes des souches les plus significatives ; en second lieu, l'élaboration d'une technologie qui simplifie la détection des polymorphismes pour les emplacements génétiques dans le génome (comme les techniques de repérage de polymorphismes nucléotidiques simples) ; et en troisième lieu, l'innovation d'une technologie de puces à ADN pour favoriser la transcription à grande échelle. L'exploration de la biologie complexe pose un défi inédit qui demande l'utilisation d'une technologie moléculaire miniaturisée, rapide, dotée d'une importante capacité de mémoire informative, ainsi que de nouvelles applications pour le traitement des données et l'intégration d'éléments multidisciplinaires (Kadri, 2019).

Notre travail est divisé en quatre chapitres :

- Un premier Chapitre est intitulé Fondements théoriques de la PCR, Elle comprend les éléments suivants : Historique de la PCR, Principe de la PCR, Éléments nécessaires à la PCR.
- La deuxième Chapitre est intitulé Techniques et variantes de la PCR, Elle comprend les éléments suivants : PCR classique, Variantes de la PCR, Innovations récentes en PCR.
- La troisième Chapitre est intitulée Applications de la PCR, Elle comprend les éléments suivants : Diagnostic médical, Recherche scientifique, Biotechnologie et industrie, Médecine légale.
- La quatrième Chapitre est intitulée L'appareil de PCR, Elle comprend les éléments suivants : Composants d'un appareil de PCR, Fonctionnement de l'appareil, Types d'appareils de PCR, Limitations et défis techniques.

✚ Importance de la PCR dans la biologie moléculaire :

En biologie moléculaire, une des techniques les plus élémentaires, est la PCR : Polymerase Chain Reaction. La méthode PCR (Polymerase Chain Reaction) est utilisée dans le but d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Les réactions de PCR sont constituées de plusieurs « cycles PCR » permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin. Ainsi, les produits PCR obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle (HI-TECH, 2019).

✚ Objectifs du mémoire :

Objectif général : L'objectif principal de ce mémoire est de présenter, analyser et comprendre la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), en mettant en évidence son principe fondamental, ses différentes variantes techniques, ainsi que ses applications dans les Diagnostic médical, Recherche scientifique, Biotechnologie et industrie, Médecine légale.

Objectifs précis :

✓ **Expliquer le principe fondamental de la PCR :**

Détailler les phases clés du processus (dénaturation, hybridation, élongation), les composants indispensables (ADN matrice, amorces, Taq polymérase, dNTPs, tampon, etc.), et le rôle du thermocycleur.

✓ **Présenter les diverses variantes de la PCR :**

Étudier les types de PCR (PCR en temps réel, RT-PCR, PCR multiplex, PCR digitale, etc.), leurs particularités et leurs atouts suivant les contextes d'utilisation.

✓ **Analyser les principales applications de la PCR :**

Explorer ses usages dans :

- Le diagnostic médical
- La médecine légale
- La recherche scientifique
- Biotechnologie et industrie

✓ **Discuter des limites et des perspectives d'évolution de la technique PCR :**

Identifier les défis présents (erreurs d'amplification, contamination, coût, etc.) et les améliorations technologiques récentes (PCR ultra-rapide, automatisation, portabilité).

Chapitre I : Fondements

Théoriques De La PCR

Chapitre I. Fondements théoriques de la Pcr :

I.1. Historique :

Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR (polymérase Chain Réaction) en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. Ce système en « temps réel » utilisait le bromure d'éthidium comme agent intercalant dans chacune des réactions d'amplification et un thermocycleur modifié pour stimuler l'émission des échantillons par rayonnements UV. L'émission de la fluorescence était détectée à l'aide d'une caméra CCD (charge-couple devise). Une augmentation de l'émission de la fluorescence était observée lorsque le bromure d'éthidium se fixait à l'ADN double brin produit au cours de l'amplification. En traçant l'augmentation de l'émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles, le système produit des courbes d'amplification exhibant un schéma plus complet du processus de la PCR que la simple détermination d'amplicons (produits d'amplification) accumulés en fin d'amplification (Higuchi *et al.*, 1992).

I.2. Évolution des techniques de PCR :

La technologie PCR est marquée par de grandes évolutions :

- La généralisation des thermocycleurs a permis de rendre la PCR moins contraignante et plus reproductible. Elle est devenue un pré requis indispensable à la plupart des applications nouvelles.
- La première PCR a été réalisée en 1988 avec une ADN polymérase thermostable, provenant de *Thermusaquaticus* par Saiki RK (Saiki *et al.*, 1988).
- Le remplacement du fragment de klenow et ADN polymérase de l'*Escherichia coli* par polymérase thermorésistante (initialement le taq) qui évite de devoir remettre de l'enzyme à chaque cycle.
- En 1953, Watson et Crick découvrent que l'ADN contient deux brins et qu'ensemble, ils forment une double hélice. La même année, James Dewey, Watson et Francis Harry Compton découvrent la structure en double hélice de l'ADN.
- En 1956, Arthur Komboy découvre l'ADN polymérase ADN dépendante (ADN polymérase).
- En 1970, Temin HM et Baltimore D co-découvrent indépendamment l'ADN polymérase ARN dépendante.
- En 1986, Kary Mullis fait la première publication sur la PCR.

- En 1992, Higuruchi R invente la PCR en temps réel. Ceci facilite la méthode quantitative et évite plusieurs étapes expérimentales contraignantes, telles l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'acquisition de fluorescence, la calibration de l'acquisition du signal.
- En 1995, Yang Liu fait la première publication sur la taille-PCR.
- En 1996, la mise au point des polymérases temporairement inactives et activables a été faite par Lacholem et Birch DE.
- En 1997, Carl WITTEWER a mis en évidence de la variation de température T_M dépendant du SYBR green.
- En 1997, Lay MD a fait les premières discriminations d'allèle grâce à la courbe de fusion (DIARRA & Adama , 2013).

I.3. Définition de la PCR :

La PCR (Polymerase by Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire, d'amplification génique *in vitro*. Elle permet de copier en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard), une séquence d'ADN connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques pictogrammes).

En moins de dix ans, cette technique, maintenant capable de faire plus d'un milliard de copie en moins d'une heure, s'est imposée dans les laboratoires. Ainsi elle a révolutionné la biologie moléculaire (Holland *et al.*, 1991).

I.4. Définition L'ADN :

L'acide désoxyribonucléique est une macromolécule contenant l'ensemble de l'information génétique et est ainsi, le support de l'hérédité. Il permet de constituer le génome des êtres vivants et se transmet lors de la reproduction (Holland *et al.*, 1991).

Il se compose d'un sucre, d'une base azotée et d'un phosphate ; l'ensemble est appelé nucléotide. Le sucre et le phosphate forment le « squelette » de la molécule d'ADN tandis que les bases azotées se succèdent pour former le brin d'ADN.

Il existe deux types de bases azotées : les bases pyrimidiques (Cytosine et Thymine) et les bases puriques (Adénine et Guanine). La complémentarité des brins est possible grâce à la liaison entre l'adénine et la thymine (par deux ponts d'hydrogène) et entre la cytosine et la guanine (par 3 ponts d'hydrogène) donnant à l'ADN une structure alors bicaténaire (**Figure 1**). L'ADN est aussi hélicoïdal. Pour former cette double hélice, deux chaînes de nucléotides complémentaires s'enroulent autour du même axe. L'appariement des deux chaînes entre elles,

se font dans une position antiparallèle, c'est à dire que les 2 chaînes ont un sens inverse l'une par rapport à l'autre : Sens 5' → 3' et Anti sens 3' → 5'.



Figure 1: Molécule d'ADN (Edward *et al.*, 1994).

Les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation *in vitro*, spécifiques à l'ADN double brin sont assurées par l'ADN polymérase ADN dépendante thermostable.

Les propriétés de dénaturation et d'hybridation des brins complémentaires d'ADN sont assurées *in vitro* grâce à des transitions de température (assurées par un thermocycleur) répétées de manière cyclique lors de l'amplification

I.5. Principe du PCR :

La PCR permet d'obtenir, par réplication *in vitro*, de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait. L'ADN matrice peut être de l'ADN génomique ainsi que l'ADN complémentaire obtenu par RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN messager (ARN poly-A), ou encore l'ADN mitochondrial. Il s'agit d'une technique permettant d'obtenir de grandes quantités d'une séquence d'ADN spécifique à partir d'un échantillon d'ADN. Cette amplification est basée sur la réplication d'une matrice d'ADN double brin. Elle se décompose en trois phases :

Une phase de dénaturation, une phase d'hybridation avec des amorces et une phase d'élongation. Les produits de chaque étape de synthèse servent de matrice pour les étapes suivantes, ce qui permet d'obtenir une amplification exponentielle (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

La réaction en chaîne de la polymérase est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN (ADN matrice), la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Les tubes

contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température répétitifs plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur (appareil qui possède une enceinte où sont déposés les tubes échantillons et dans laquelle la température peut varier, très rapidement et précisément, de 0 à 100°C) (NCBI, 2008).

La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter » fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons 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 où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (Template). Plusieurs instruments de PCR en temps réel sont présentement sur le marché. Ces appareils utilisent généralement un système en tubes fermés et la quantification ne requiert aucune manipulation post amplification, ce qui minimise ou élimine les problèmes de contamination par les amplicons suite à la réaction de Prêt réduit le temps d'analyse (Bustin, 2000).

L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de secondes. Le processus de la PCR est subdivisé en trois étapes comme suit :

I.5.1. La dénaturation :

C'est la séparation des deux brins d'ADN, obtenue par élévation de la température.

La première période s'effectue à une température de 94°C, appelée dénaturation.

Température. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice lors de la réplication, est dénaturé : les liaisons hydrogène ne peuvent pas être maintenues à une température supérieure.

La réplication, est dénaturé : les liaisons hydrogène ne peuvent être maintenues à une température Supérieure à 80°C et l'ADN double brin est dénaturé en ADN simple brin (ADN simple brin). (ADN simple brin).

I.5.2. L'hybridation :

La deuxième étape est l'hybridation. Elle est réalisée à une température généralement entre 40 et 70°C, appelée température d'hybridation des amorces. La diminution de la Température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider.

Complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences monocaténares complémentaires de régions qui encadrent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que l'ADN matriciel à long brin.

L'ADN matriciel à long brin. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique.

Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique.

I.5.3. Élongation :

La troisième période se déroule à une température de 72°C, appelée température d'élongation.

D'élongation. C'est la synthèse du brin complémentaire. À 72°C, la Taq polymérase se lie aux ADN simple brin amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates présents dans l'ADN simple brin.

Désoxyribonucléosides triphosphates présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées. Au cours du cycle suivant, les fragments synthétisés en aval des amorces du cycle précédent sont à leur tour matriciels.

Et après quelques cycles, l'espèce prédominante correspond à la séquence d'ADN entre les régions où les amorces s'hybrident. Il faut 20 à 40 cycles pour synthétiser une quantité d'ADN analysable (environ 0,1 µg). Chaque cycle double théoriquement la quantité d'ADN présente dans le cycle précédent. Il est recommandé d'ajouter un dernier cycle d'élongation à 72°C, surtout lorsque la séquence d'intérêt est de grande taille (supérieure à 1 kilobase).

(Supérieure à 1 kilobase), à raison de 2 minutes par kilobase. La PCR permet d'amplifier des séquences dont la taille est inférieure à 6 kilobases. La réaction de PCR est extrêmement rapide, elle ne dure que quelques heures (2-3 heures pour une PCR de 30 cycles) (thermofisher, 2017).

I.5.4. Taq polymérase :

L'ADN polymérase permet la réplication. Nous utilisons une ADN polymérase purifiée ou clonée à partir d'une bactérie extrêmophile, *Thermusaquaticus*, qui vit dans les sources chaudes et résiste à des températures supérieures à 100°C. Cette polymérase (Taq polymérase) a la particularité remarquable de résister à des températures de l'ordre de 100°C, qui sont généralement suffisantes pour dénaturer la plupart des protéines. *Thermusaquaticus* trouve sa température de confort à 72°C, température optimale pour l'activité de sa polymérase (Lawyer *et al.*, 1989).

I.6. Les conditions de réaction :

Les volumes de milieu réactionnel varient entre 10 et 100 μ l. Il existe une multitude de formules de milieu réactionnel. Cependant, il est possible de définir une. Formule standard qui convient à la plupart des réactions de polymérisation. Cette formule a été choisie par la plupart des fabricants et fournisseurs, qui livrent d'ailleurs une solution tampon prête à l'emploi avec la Taq polymérase.

Solution tampon avec Taq polymérase prête à l'emploi. Concentrée 10 fois, sa formule est approximativement la suivante : 100 mM Tris-HCl, pH 9,0 ; 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl (NCBI, 2008).

Il est possible d'ajouter des détergents (Tween 20, Triton X-100) ou du glycérol afin d'augmenter les conditions de rigueur qui permettent d'obtenir des résultats satisfaisants. D'augmenter les conditions de rigueur qui rendent l'hybridation des amorces plus difficile et donc plus sélective. L'hybridation des amorces. Cette approche est généralement utilisée pour réduire le niveau d'amplifications non spécifiques dues à l'hybridation des amorces sur des séquences sans relation avec la séquence d'intérêt. On peut également réduire la concentration de KCl jusqu'à élimination ou augmenter la concentration de MgCl₂ (Thermo Fisher, 2015).

En effet, certaines paires d'amorces fonctionnent mieux avec des solutions enrichies en magnésium. Par contre, avec des concentrations élevées de dNTP, la concentration de magnésium doit être augmentée en raison de la présence de magnésium dans la solution. Magnésium doit être augmentée en raison des interactions stœchiométriques entre le magnésium et les dNTP.

Entre le magnésium et les dNTP qui réduisent la quantité de magnésium libre dans le milieu de réaction. Les dNTP (désoxyribonucléosides triphosphates) fournissent à la fois l'énergie et les nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN. Les nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN lors de la polymérisation en chaîne. Ils sont incorporés dans le milieu réactionnel en excès, soit environ 200 μ M finaux. Selon le volume de réaction choisi, la concentration en amorce peut varier entre 10 et 50 pmol par échantillon.

L'ADN matriciel peut provenir de n'importe quel organisme et même des matériaux biologiques complexes qui comprennent des ADN provenant de différents organismes. Mais pour garantir le succès d'une PCR, il faut Mais pour garantir le succès d'une PCR, il est nécessaire que la matrice d'ADN ne soit pas trop dégradée. Dégradée. Ce critère est évidemment d'autant plus crucial que la taille de la séquence d'intérêt est grande. D'intérêt est grande. Il est

également important que l'extrait d'ADN ne soit pas contaminé d'inhibiteurs de la réaction en chaîne de la polymérase (détergents, EDTA, phénol, protéines, etc.).

La quantité d'ADN matrice dans le milieu réactionnel initie la réaction d'amplification. Que la réaction d'amplification peut être réduite à une seule copie. La quantité maximale La quantité maximale ne peut en aucun cas dépasser 2 µg. En général, les quantités utilisées sont de l'ordre de 10 à 500 ng d'ADN matrice. La quantité de Taq polymérase par échantillon est généralement entre 1 et 3 unités. Le choix de la durée des cycles de température et du nombre de cycles dépend de la taille de l'échantillon. Nombre de cycles dépend de la taille de la séquence d'intérêt ainsi que de la taille et de la complémentarité des amorces. de la taille et de la complémentarité des amorces. Les durées doivent être réduites au minimum Les durées doivent être réduites au minimum, non seulement pour gagner du temps, mais aussi pour éviter le risque d'amplification non spécifique.

Pour la dénaturation et l'hybridation des amorces, 30 secondes suffisent généralement. Pour l'élongation, il faut compter 1 minute par kilobase d'ADN d'intérêt et 2 minutes par kilobase pour le cycle final de l'amplification. Kilobase pour le dernier cycle d'élongation. Le nombre de cycles, généralement compris entre 20 à 40, est inversement proportionnel à l'abondance de la matrice d'ADN (Mammedov *et al.*, 2008).

I.7. Détection et analyse du produit de la PCR :

Le produit d'une PCR consiste en un ou plusieurs fragments d'ADN (la ou les séquences d'intérêt). Ou les séquences d'intérêt). La détection et l'analyse des produits peuvent être très très rapidement par électrophorèse sur gel d'agarose (ou d'acrylamide). L'ADN est L'ADN est révélé par une coloration au bromure d'éthidium. Visible by ultraviolet Trans illumination (280–320 nm).

De très petits produits sont souvent visibles très près du front de migration sous la forme de bandes plus ou moins diffuses. Ils correspondent à des dimères d'amorces et parfois aux amorces elles-mêmes. Selon les conditions de la réaction, des fragments d'ADN non spécifiques peuvent être plus ou moins amplifiés, formant des bandes nettes ou « smear » (Su *et al.*, 1996), Sur les systèmes automatisés, on utilise désormais un analyseur de fragments. Cet appareil utilise le principe de l'électrophorèse capillaire. La détection des fragments est réalisée par une diode laser. Elle n'est possible que si la PCR est réalisée avec des amorces couplées à des fluorochromes (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

I.8. Éléments nécessaires à la PCR :

I.8.1. Template DNA (modèle d'ADN) :

Le succès de la PCR dépend d'un certain nombre de facteurs, les composants de la réaction jouant un rôle essentiel dans l'amplification. Les éléments clés à prendre en compte lors de la mise en place des réactions sont les composants PCR suivants, détaillés :

Une matrice PCR pour la réplication peut provenir de n'importe quelle source d'ADN, comme l'ADN génomique (ADNg), l'ADN complémentaire (ADNc) et l'ADN plasmidique. Néanmoins, la composition ou la complexité de l'ADN contribue aux quantités optimales d'entrée pour l'amplification PCR. Par exemple, 0,1-1 ng d'ADN plasmidique est suffisant, tandis que 5-50 ng d'ADNg peuvent être nécessaires comme quantité de départ dans une PCR de 50 μ l. Les quantités optimales de matrice peuvent également varier en fonction du type d'ADN polymérase utilisé ; une ADN polymérase conçue pour avoir une sensibilité plus élevée en raison de son affinité avec la matrice nécessitera moins d'ADN en entrée. L'optimisation de l'apport d'ADN est importante car des quantités plus élevées augmentent le risque d'amplification non spécifique tandis que des quantités plus faibles réduisent les rendements (**Figure 2**).

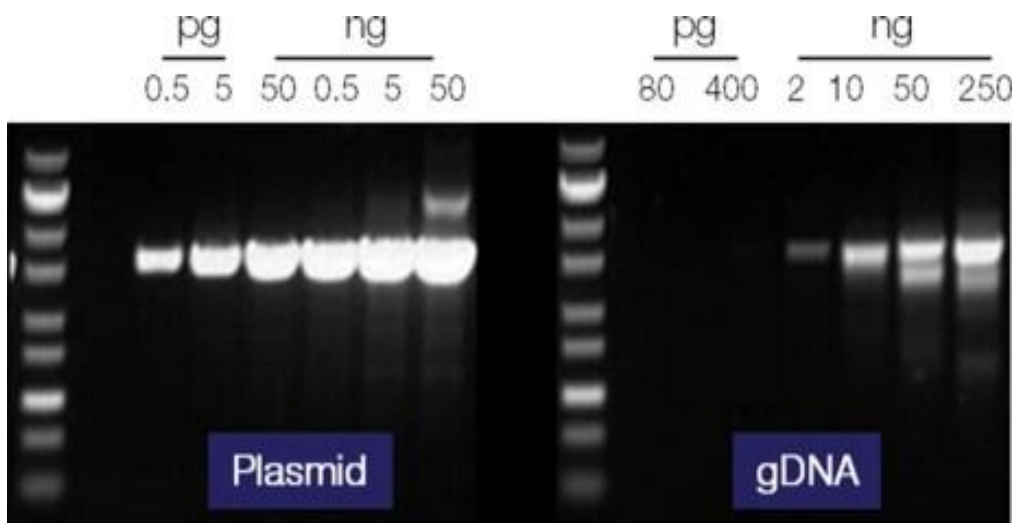


Figure 2: Comparaison des résultats de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) à l'aide d'un plasmide et d'une matrice d'ADN humain. La même ADN polymérase a été utilisée pour amplifier une séquence cible de 2 kb à partir de différentes quantités d'ADN d'entrée, dans les conditions recommandées (qiagen, 2013).

Parfois, les protocoles PCR peuvent demander l'entrée d'ADN en termes de nombre de copies, en particulier pour l'ADNg. Le calcul du nombre de copies dépend du nombre de molécules présentes, en moles d'ADN. En utilisant la constante d'Avogadro (L) et la masse molaire, le nombre de copies peut être calculé comme suit :

Nombre de copies = L x nombre de moles = L x (masse totale/masse molaire)

La masse molaire d'un brin d'ADN particulier est déterminée par sa taille ou son nombre total de bases (c'est-à-dire une combinaison de sa longueur et de sa nature monocaténaire ou bicaténaire). Pour des raisons de commodité et de simplicité, un outil en ligne est disponible pour calculer le nombre de copies à partir de la masse de l'ADN d'entrée.

En théorie, une seule copie d'ADN ou une seule cellule suffit pour l'amplification par PCR dans des conditions idéales. En pratique, cependant, l'efficacité de l'amplification d'une quantité spécifique de matrice dépend fortement des composants et des paramètres de la réaction, ainsi que de la sensibilité de l'ADN polymérase. En outre, l'ADN polymérase choisie doit être certifiée pour contrôler un faible niveau d'ADN résiduel, afin de minimiser les faux signaux dans la PCR.

Outre l'ADNg, l'ADNc et l'ADN plasmidique, il est également possible de réamplifier les produits de la PCR pour obtenir un rendement plus élevé de la cible. Bien que les produits non purifiés puissent être directement utilisés comme matrice, les composants de réaction entraînés, tels que les amorces, les dNTP, les sels et les sous-produits, peuvent avoir un effet négatif sur l'amplification. Pour éviter une telle inhibition, il est généralement recommandé de diluer la réaction dans l'eau avant la prochaine série de PCR. Pour obtenir les meilleurs résultats, les amplicons PCR doivent être purifiés avant d'être réamplifiés. Avec des kits de purification PCR optimisés, la procédure de nettoyage PCR peut être réalisée en 5 minutes seulement. (qiagen, 2013)

I.8.2. ADN polymérase :

Les ADN polymérases sont des acteurs essentiels de la réplication de l'ADN cible. L'ADN polymérase Taq est sans doute l'enzyme la plus connue utilisée pour la PCR - sa découverte a révolutionné la PCR. L'ADN polymérase Taq a une capacité thermique relativement élevée, avec une demi-vie d'environ 40 minutes à 95 °C. (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008), Elle incorpore les nucléotides à une vitesse d'environ 60 bases par seconde à 70 °C et peut amplifier des longueurs d'environ 5 kb, de sorte qu'elle convient à la PCR standard sans exigences particulières. De nos jours, de nouvelles générations d'ADN polymérase ont été conçues pour améliorer considérablement les performances de la PCR.

Dans une réaction typique de 50 µl, 1 à 2 unités d'ADN polymérase suffisent pour l'amplification de l'ADN cible. Toutefois, il peut être nécessaire d'ajuster les quantités d'enzymes en cas de modèles difficiles. Par exemple, lorsque des inhibiteurs sont présents dans l'échantillon d'ADN, l'augmentation de la quantité d'ADN polymérase peut améliorer les rendements de la

PCR. Cependant, des produits PCR non spécifiques peuvent apparaître avec des concentrations d'enzymes plus élevées (**Figure 3**).

Pour des applications plus spécialisées telles que le clonage par PCR, l'amplification longue et la PCR riche en GC, il est préférable d'utiliser des ADN polymérases plus performantes. Ces enzymes sont capables de générer des produits PCR moins erronés à partir de longues matrices en un temps plus court, avec de meilleurs rendements et une plus grande résistance aux inhibiteurs (en savoir plus sur les caractéristiques de l'ADN polymérase).

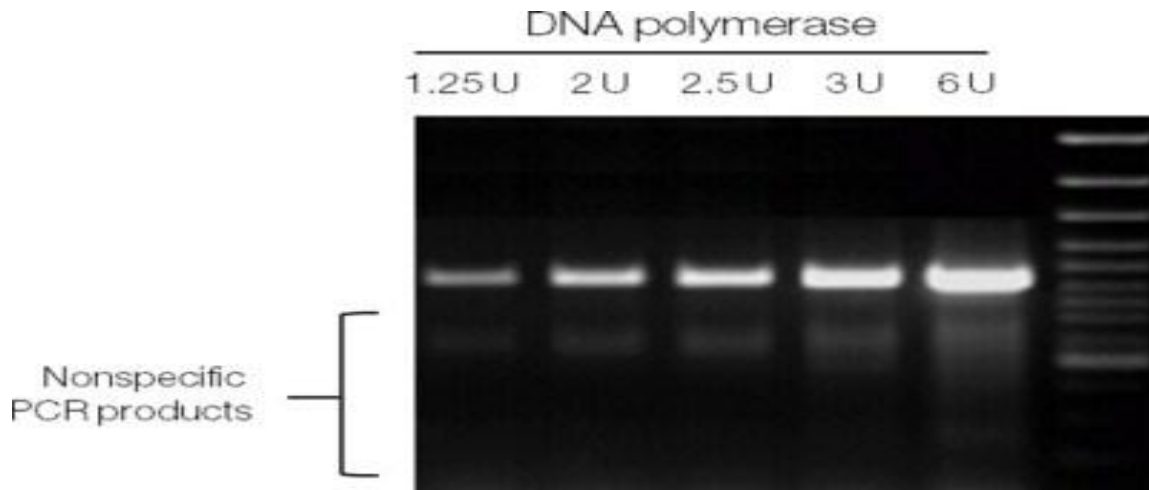


Figure 3: L'augmentation des quantités d'ADN polymérase peut améliorer le débit de la PCR, mais peut produire des amplicons non spécifiques. La bande supérieure représente l'amplicon PCR souhaité (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

I.8.3. Amorces:

Pour obtenir une amplification sélective de séquences nucléotidiques à partir d'un extrait d'ADN par PCR, il est essentiel de disposer d'au moins une paire d'oligonucléotides. Ces oligonucléotides, qui serviront d'amorces pour la réplication, sont synthétisés chimiquement et doivent présenter la meilleure complémentarité possible avec les deux extrémités de la séquence d'intérêt que l'on souhaite amplifier. L'une des amorces est conçue pour reconnaître complémentaiement une séquence située en amont du fragment 5'-3' de l'ADN d'intérêt ; l'autre pour reconnaître, toujours par complémentarité, une séquence située

En amont du brin complémentaire (3'-5') du même fragment d'ADN. Les amorces sont ADN simple brin dont l'hybridation sur les séquences flanquant la séquence d'intérêt permettra sa réplication de manière sélective. La taille des amorces est généralement entre 10 et 30 nucléotides afin de garantir une hybridation suffisamment spécifique sur les séquences d'intérêt de la matrice. sur les séquences d'intérêt de l'ADN matrice (Thermo Fisher, 2015).

Les amorces PCR sont des oligonucléotides synthétiques d'ADN d'environ 15 à 30 bases. Les amorces PCR sont conçues pour se lier (par complémentarité de séquence) aux séquences qui encadrent la région d'intérêt dans l'ADN matrice. Au cours de la PCR, l'ADN polymérase étend les amorces à partir de leurs extrémités 3'. Les sites de liaison des amorces doivent donc être uniques à proximité de la cible et présenter une homologie minimale avec d'autres séquences de l'ADN d'entrée afin de garantir l'amplification spécifique de la cible visée.

Outre l'homologie de séquence, les amorces doivent être conçues avec soin pour assurer la spécificité de l'amplification par PCR. Tout d'abord, les séquences d'amorces doivent posséder des températures de fusion (T_m) comprises entre 55 et 70 °C, les T_m des deux amorces devant se situer à moins de 5 °C l'une de l'autre. Tout aussi important, les amorces doivent être conçues sans complémentarité entre les amorces (en particulier à leurs extrémités 3') qui favorise leur recuit (c.-à-d. amorces-dimères), sans auto-complémentarité qui peut provoquer un auto-amorçage (c.-à-d. structures secondaires), ou sans répétitions directes qui peuvent créer un alignement imparfait avec la zone cible de la matrice.

En outre, la teneur en GC de l'amorce devrait idéalement être de 40 à 60 %, avec une distribution uniforme des bases C et G afin d'éviter les erreurs d'amorçage. De même, il ne doit pas y avoir plus de trois bases G ou C aux extrémités 3' des amorces, afin de minimiser l'amorçage non spécifique. En revanche, un nucléotide C ou G à l'extrémité 3' d'une amorce peut favoriser l'ancrage et l'extension de l'amorce (**Tableau 1**). Pour des raisons de commodité et de simplicité, un certain nombre d'outils en ligne sont disponibles pour concevoir et sélectionner de manière bioinformatique des séquences d'amorces optimales avec des paramètres définis (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Tableau 1: Recommandations générales sur la conception des amorces PCR.

Dos	À ne pas faire
15-30 nt long	Structure secondaire (complémentarités)
T_m 55-70°C (à 5°C près, pour deux amorces)	Répétitions directes
40-60% GC (avec une distribution uniforme)	Plus de trois G ou C à l'extrémité 3'
Un C ou un G à l'extrémité 3'	

I.8.4. Nucleotides (dNTPs) :

Les dNTP sont constitués de quatre nucléotides de base - dATP, dCTP, dGTP et dTTP - qui constituent les éléments de base des nouveaux brins d'ADN. Ces quatre nucléotides sont généralement ajoutés à la réaction PCR en quantités équimolaires pour une incorporation optimale des bases. Toutefois, dans certaines situations telles que la mutagenèse aléatoire par PCR, des concentrations déséquilibrées de dNTP sont intentionnellement fournies pour favoriser un degré plus élevé d'incorporation erronée par une ADN polymérase qui ne lit pas.

Dans les applications PCR courantes, la concentration finale recommandée de chaque dNTP est généralement de 0,2 mM. Des concentrations plus élevées peuvent être utiles dans certains cas, en particulier en présence de niveaux élevés de Mg^{2+} , car le Mg^{2+} se lie aux dNTP et réduit leur disponibilité pour l'incorporation. Cependant, des dNTP dépassant les concentrations optimales peuvent inhiber la PCR. Pour une incorporation efficace par l'ADN polymérase, les dNTP libres doivent être présents dans la réaction à une concentration non inférieure à 0,010-0,015 mM (leur K_m estimé) (**Figure 4**). Lors de l'utilisation d'ADN polymérases à lecture lente, la fidélité peut être améliorée en réduisant les concentrations de dNTP (0,01-0,05 mM), ainsi qu'en réduisant proportionnellement le Mg^{2+} (Longo *et al.*, 1990).

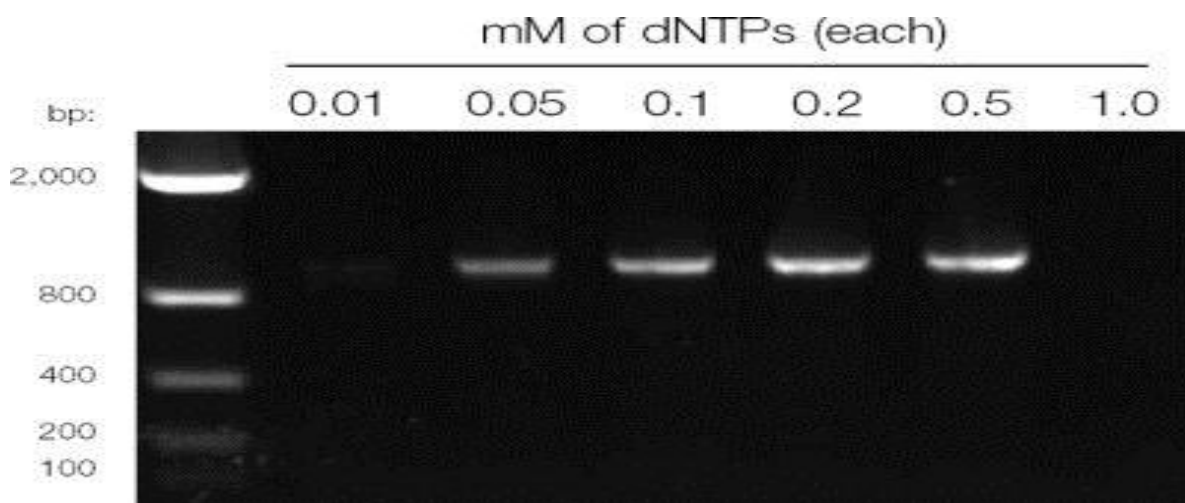


Figure 4: Amplification par PCR d'un ADN lambda de 1 kb avec différentes concentrations de dNTP. La concentration finale de $MgCl_2$ dans chaque réaction était de 4 mM (Longo *et al.*, 1990).

Dans certaines applications, les dNTP peuvent comprendre des nucléotides spéciaux.

Un exemple est la substitution du dTTP par le désoxyuridine triphosphate (dUTP), en conjonction avec un prétraitement à l'uracile ADN glycosylase (UDG), comme stratégie pour empêcher la contamination de la PCR (Longo *et al.*, 1990). L'UDG est une enzyme de réparation de l'ADN qui clive les brins d'ADN contenant de l'uracile. Le remplacement du dTTP par du

dUTP génère des produits PCR contenant de l'uracile. L'incubation des échantillons de réaction avec l'UDG avant d'initier la PCR élimine les amplicons de PCR contaminés par l'uracile, évitant ainsi les résultats faussement positifs dus aux produits de PCR contaminés (**Figure 5**).

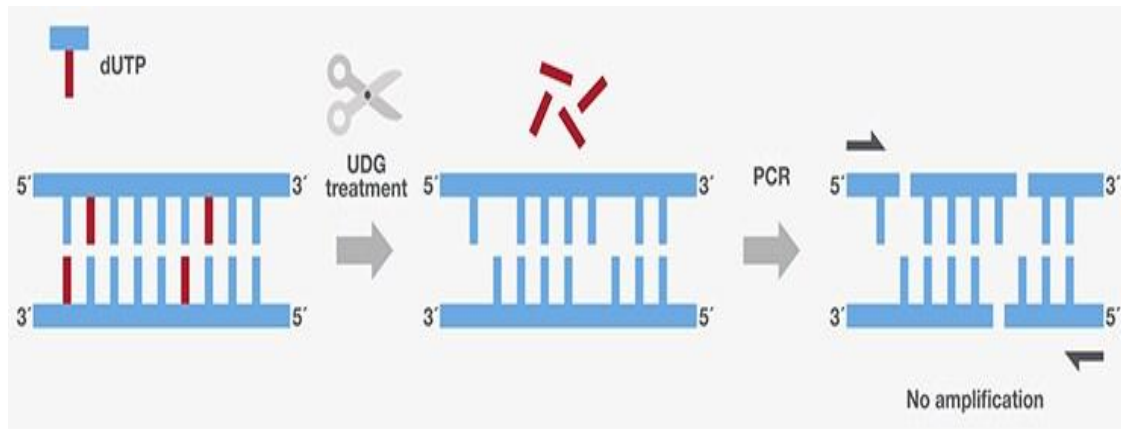


Figure 5: Traitement à l'UDG pour la prévention de la contamination des amplicons PCR. L'UDG clive les bases uracile (barres rouges) présentes dans les fragments d'ADN. Les brins d'ADN abasiques sont susceptibles d'être dégradés dans les conditions de la PCR et ne sont pas amplifiés lors de la PCR suivante (Slupphaug *et al.*, 1993).

Il y a quelques mises en garde à prendre en compte lors de l'utilisation du dUTP dans la PCR. Tout d'abord, la substitution du dTTP peut réduire l'efficacité et la sensibilité de la PCR. Ce problème peut être résolu en utilisant un rapport optimal entre le dTTP et le dUTP, de sorte que chaque molécule de produit PCR porte suffisamment de bases uracile pour un traitement UDG efficace sans interférer de manière spectaculaire avec l'efficacité de la PCR. Deuxièmement, bien que l'ADN polymérase Taq incorpore le dUTP pendant la synthèse de l'ADN, les ADN polymérases de relecture telles que Pfu ne peuvent tolérer le dUTP à moins qu'elles n'aient été spécialement modifiées pour l'incorporation de l'uracile.

Cette propriété est due à la présence d'une poche de liaison à l'uracile dans les ADN polymérases des archées, qui constitue un mécanisme de réparation de l'ADN (Slupphaug *et al.*, 1993).

De même, les dNTP modifiés tels que l'aminoallyl-dUTP, la fluorescéine-12-dUTP, le 5-bromo-dUTP et la biotine-11-dUTP sont couramment utilisés pour incorporer des étiquettes en vue d'expériences ultérieures. Comme pour le dUTP, l'ADN polymérase doit être capable d'incorporer des dNTP modifiés pour que la PCR soit réussie.

1.8.5. Tampon et ions (Mg^{2+}) :

Magnesium ion (Mg^{2+}) functions as a cofactor for activity of DNA polymerases by enabling incorporation of dNTPs during polymerization. The magnesium ions at the enzyme's active site

catalyze phosphodiester bond formation between the 3'-OH of a primer and the phosphate group of a dNTP (Figure 6).

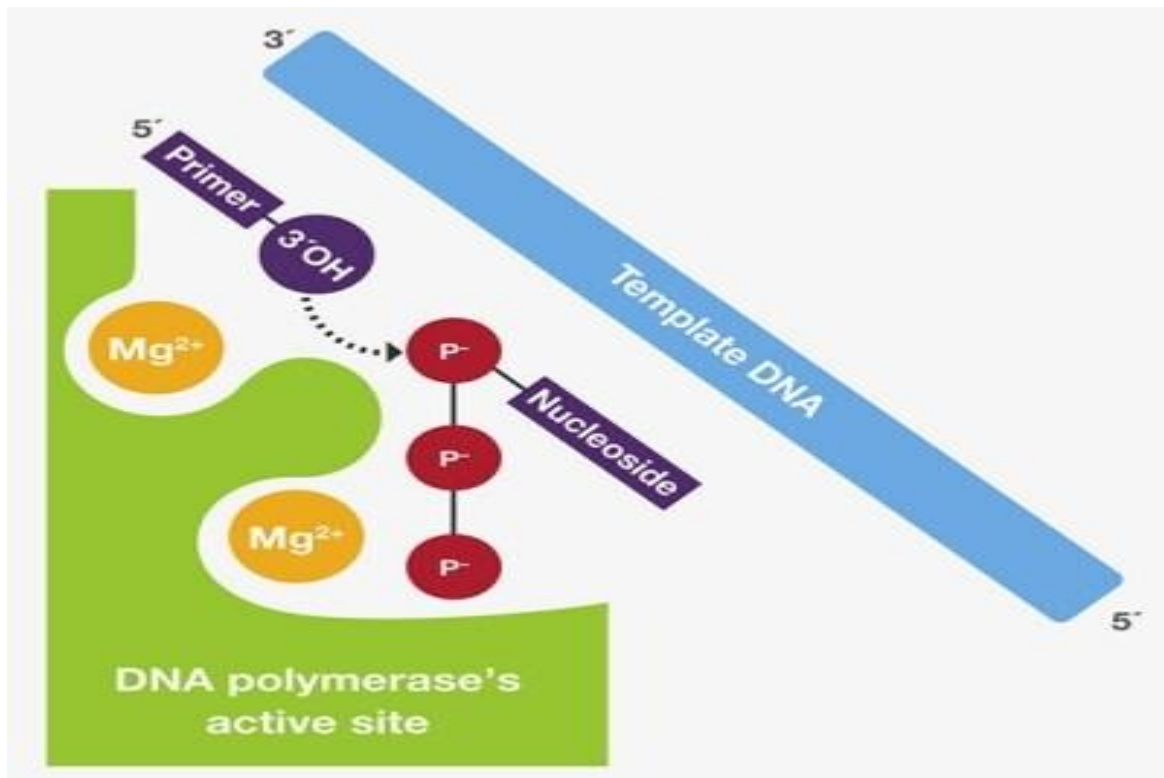


Figure 6: Fonction de l'ion magnésium dans le site actif de l'ADN polymérase. Mg²⁺ aide à coordonner l'interaction entre le 3'-OH d'une amorce et le groupe phosphate d'un dNTP entrant dans la polymérisation de l'ADN (Steitz, 1998).

In addition, Mg²⁺ facilitates formation of the complex between the primers and DNA templates by stabilizing negative charges on their phosphate backbones (Figure 7) (Steitz, 1998).

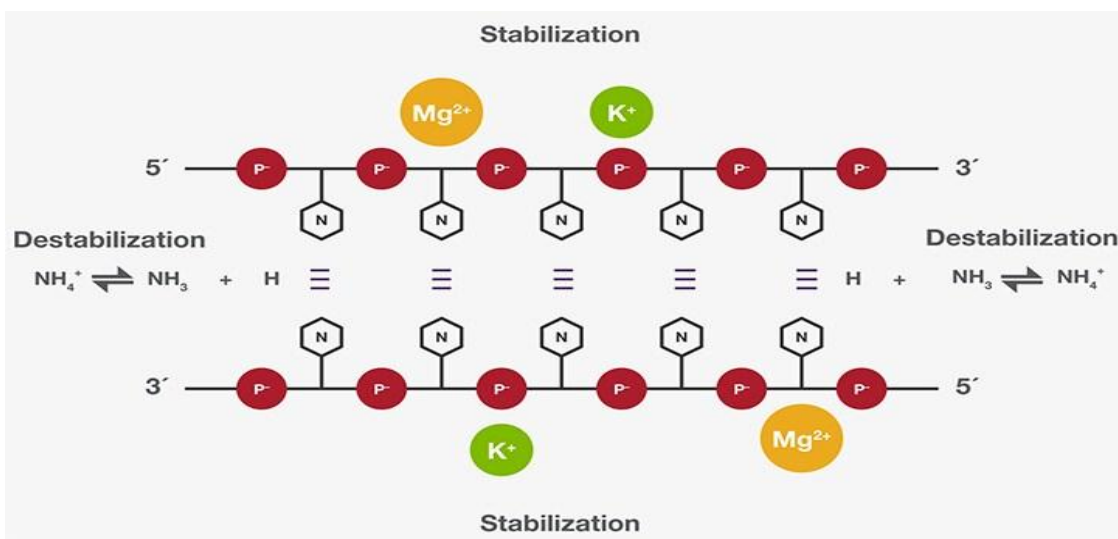


Figure 7: Effets des ions tampons sur la formation des duplex d'ADN. Les ions potassium et magnésium (K⁺ et Mg²⁺) se lient aux groupes phosphates (P-) du squelette de l'ADN et stabilisent la formation des duplex, tandis que l'ion ammonium (NH₄⁺) peut interagir avec les

liaisons hydrogène entre les bases (N) et déstabiliser la formation des duplex (Steitz, 1998).

Des performances plus robustes et reproductibles dans certaines circonstances. La concentration en magnésium doit souvent être optimisée pour maximiser le rendement de la PCR tout en maintenant la spécificité en raison de sa liaison aux dNTP, aux amorces, aux modèles d'ADN et à l'EDTA (s'il est présent).

Une concentration finale typique de Mg²⁺ dans la PCR se situe entre 1 et 4 mM, avec des incréments de titrage de 0,5 mM recommandés pour l'optimisation. De faibles concentrations de Mg²⁺ entraînent peu ou pas de produit PCR, en raison de l'activité réduite de la polymérase. En revanche, des concentrations élevées de Mg²⁺ produisent souvent des produits PCR non spécifiques en raison de la stabilité accrue des complexes amorce-modèle, ainsi qu'une augmentation des erreurs de réplication dues à une mauvaise incorporation des dNTP.

I.8.6. Additifs ou cosolvants couramment utilisés comme amplificateurs de Pcr et concentrations finales recommandées.

Tableau 2: Additifs ou cosolvants couramment utilisés comme amplificateurs de PCR et concentrations finales recommandées (Bartlett & Stirling , 2003).

Réactif	Concentrations finales types
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	1-10%
Glycerol	5–20%
Formamide	1.25–10%
Bovine serumalbumin (BSA)	10–100 µg/mL
Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	15–30 mM
Polyethylene glycol (PEG)	5–15%
Gelatin	0.01%
Nonionic detergents	(e.g., Tween 20, Triton X-100) 0.05–1%
N,N,N-trimethylglycine (betaine)	1–3 M

Chapitre II : Techniques
et Variantes De La Pcr

Chapitre II. Techniques et variantes De La Pcr :

II.1. Aperçu des techniques moléculaires basées sur la technologie PCR :

Les microsatellites sont extrêmement variables, sur un locus donné, ils affichent fréquemment de nombreux allèles distincts en termes de nombre de répétitions. Ils demeurent les points de référence choisis pour les recherches sur la diversité, l'analyse de paternité et la localisation des loci à effets quantitatifs (QTL), bien que cela puisse évoluer prochainement avec le développement de méthodes d'analyse SNP abordables. Les mini satellites possèdent les caractéristiques identiques aux microsatellites, toutefois les répétitions varient de dix à plusieurs centaines de paires de bases. On désigne souvent les micro et mini satellites par l'appellation de polymorphismes de nombre variable de répétitions en tandem (VNTR). Polymorphismes de longueur des fragments amplifiés (Kadri, 2019).

II.1.1. Microsatellites :

Les microsatellites sont désormais les marqueurs les plus utilisés dans les études de caractérisation génétique des Animaux d'élevage (Korbie & Mattick , 2008), Le taux de mutation élevé et la nature codominante favorisent l'estimation de la diversité intra et interrassiale

L'estimation de la diversité intra et interrassiale, et le mélange génétique entre les races, même si elles sont très proches. Le choix d'un modèle de mutation - modèle de mutation allélique infinie ou progressive - a posé des problèmes.

Le modèle de mutation infinie ou progressive des allèles pour l'analyse des données microsatellites. Toutefois, des études de simulation ont indiqué que le modèle de mutation d'allèle infini est généralement valable pour l'évaluation de la variabilité interrassiale. Généralement valable pour l'évaluation de la diversité interrassiale (Takezaki & Nei , 1996), Le faible nombre d'allèles par population et l'hétérozygotie observée et attendue sont les paramètres les plus couramment utilisés pour évaluer la diversité interrassiale.

Les plus couramment utilisés pour évaluer la diversité interrassiale. Les paramètres les plus simples pour évaluer là Les paramètres les plus simples pour évaluer la diversité interrassiale sont les indices de différenciation ou de fixation génétique. Plusieurs estimateur sont été proposés (par exemple, l'indice de fixation F_{ST} et la GST-glutathion S transférase), et le plus largement utilisé est le F_{ST} (Weir & Basten , 1990), qui mesure le degré de différenciation génétique des sous-populations par le calcul des variances standardisées des fréquences alléliques des populations.. La signification statistique est calculée pour les valeurs de F_{ST} entre les Paires de populations afin de tester l'hypothèse nulle de l'existence d'une sous-population.

Paires de populations pour tester l'hypothèse nulle d'un manque de différenciation génétique entre les populations et, par conséquent, la partition de la population. et, par conséquent, la répartition de la diversité génétique (Mburu *et al.*, 2003), Les données microsatellites sont également couramment utilisées pour évaluer les relations génétiques entre les populations et les sujets en estimant les distances génétiques (Beja-Pereira *et al.*, 2003).

par l'estimation des distances génétiques (Tapio *et al.*, 2005), La mesure de la distance génétique utilisée le plus souvent est la distance génétique standard de Nei., (Nei, 1972) Dans un autre cas, la Dans un autre cas, la distance de Cavalli-Sforza modifiée est recommandée (Tateno *et al.*, 1983), pour les populations les plus proches, où la dérive génétique est le principal facteur de différenciation génétique. La relation génétique entre les races est souvent visualisée par la reconstruction d'une phylogénie, le plus souvent à l'aide de la méthode le plus souvent à l'aide de la méthode "neighbor-joining" (Saitou & Nei , 1987), Cependant, le principal problème dans la reconstruction de l'arbre phylogénétique est que l'évolution des lignées est présumée non croisée, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas liées entre elles.

On présume que les lignées ne sont pas croisées, c'est-à-dire qu'elles peuvent diverger, mais ne peuvent en aucun cas résulter de croisements. Cette supposition ne s'applique guère aux animaux de ferme, car les nouvelles races résultent fréquemment d'hybridations entre plusieurs espèces.

Elles proviennent fréquemment de l'hybridation de deux ou plusieurs races ancestrales. L'observation du progrès des races Il faut donc interpréter l'évolution des races à travers la reconstruction phylogénétique avec une extrême prudence.

II.1.1. SNP :

Les polymorphismes de nucléotides simples (SNP) sont utilisés comme alternative aux microsatellites dans les études de diversité génétique. Plusieurs technologies sont disponibles pour détecter le type de marqueurs SNP (Syvänen, 2001), En tant que marqueurs bialléliques, les SNP ont une quantité d'informations relativement faible. Pour atteindre le niveau d'information d'un panel standard de 30 loci microsatellites, il faut utiliser de plus grandes quantités d'informations. Microsatellites, il faut utiliser des quantités plus importantes. Cependant, les technologies moléculaires en constante évolution moléculaires en constante évolution augmentent l'automatisation et réduisent le coût du typage des SNP, ce qui permettra probablement, dans un avenir proche, d'améliorer la qualité de l'information. Ce qui permettra probablement, dans un Avenir proche, l'analyse parallèle d'un grand nombre de marqueurs à un coût réduit. à un coût réduit. Dans cette perspective, des projets à grande échelle sont mis en

œuvre pour plusieurs espèces de bétail afin d'identifier des millions de SNP (Wong *et al.*, 2004), d'en valider plusieurs milliers et d'identifier des haplotypes chez les bovins. Milliers et d'identifier des haplotypes dans le génome. Comme pour les informations sur les séquences, SNP permettent une comparaison directe et une analyse conjointe de différentes expériences.

Il est probable que les SNP seront des indicateurs pertinents à exploiter ultérieurement dans les recherches sur la diversité génétique, étant donné qu'ils peuvent être aisément employés pour mesurer les variations fonctionnelles ou neutres. Toutefois, l'étape initiale de détection des SNP ou de choix des SNP à partir des bases de données est essentielle. Les bases de données sont essentielles. Différents protocoles expérimentaux, comme le séquençage, le polymorphisme de conformation simple brin (SSCP) ou la chromatographie liquide à haute performance dénaturante, peuvent être utilisés pour générer des SNP.

La chromatographie liquide dénaturante à haute performance (DHPLC) ou *in silico*, en alignant et en comparant plusieurs séquences provenant de la même région. Et la comparaison de séquences multiples de la même région à partir de bases de données publiques sur les génomes et les étiquettes d'expression séquentielle (EST). Si les données ont été obtenues de manière aléatoire, les estimateurs standard des paramètres génétiques des populations ne peuvent pas être appliqués.

Un exemple courant est celui des SNP initialement identifiés dans un petit échantillon (panel)

D'individus sont ensuite typés dans un échantillon plus large de chromosomes. En procédant de préférence de préférence un échantillonnage de SNP à des fréquences intermédiaires, un tel protocole affectera la distribution des fréquences alléliques. ce protocole affectera la distribution des fréquences des allèles par rapport aux valeurs probables d'un échantillon aléatoire (Nielsen & Signorovitch , 2003).

D'un échantillon aléatoire. Les SNP constituent un outil moderne dans le contexte des analyses génétiques de la population. Population ; cependant, il est nécessaire de développer des méthodes statistiques qui prendront Cependant, il est nécessaire de développer des méthodes statistiques qui prendront en compte chaque méthode d'exploitation des SNP et leurs emplacements (Clark *et al.*, 2005).

II.1.2. Polymorphisme d'amplification de la longueur des fragments (AFLP) :

Les AFLP sont des marqueurs bialléliques dominants (Vos *et al.*, 1995), Les variations sur de nombreux loci peuvent être simultanément pour détecter les variations d'un seul nucléotide dans des régions génomiques inconnues, où une régions génomiques inconnues, où une mutation

donnée peut souvent être présente dans des gènes fonctionnels indéterminés. Fonctionnels indéterminés. L'inconvénient est qu'elles présentent un mode d'hérédité dominant, ce qui réduit leur puissance lors des analyses génétiques de la population. Ce qui réduit leur puissance lors d'analyses génétiques de la population sur la diversité interraciale et la consanguinité. Cependant, les profils AFLP sont très instructifs dans l'évaluation des relations raciales (Ajmone-Marsan *et al.*, 2002) l'évaluation des relations raciales et des espèces apparentées (Buntjer *et al.*, 2002).

II.1.3. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) :

Les polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP) sont identifiés à l'aide enzymes de restriction qui ne coupent l'ADN qu'au niveau de "sites de restriction" spécifiques (par exemple, EcoRI coupe le site défini par la séquence du palindrome GAATTC). À l'heure actuelle, l'utilisation Actuellement, l'utilisation la plus courante des RFLP est la PCR en aval (PCR-RFLP) pour détecter les allèles dont la séquence diffère au niveau d'un site de restriction donné. Qui diffèrent en séquence à un site de restriction donné. Un fragment de gène est d'abord amplifié par PCR, puis exposé à une enzyme de restriction spécifique qui ne coupe que l'une des formes alléliques. Des formes alléliques. Les amplicons digérés sont généralement résolus par électrophorèse. Les microsatellites ou SSR (simple sequence repeats) ou STR (short tandem repeats) se composent de quelques nucléotides - une séquence d'ADN de 2 à 6 paires de bases - répétés plusieurs fois en tandem (p. ex. plusieurs fois en tandem (par exemple, CACACACACACACA). Ils sont répartis sur le génome eucaryotes.

Les microsatellites sont de taille relativement petite et sont donc faciles à identifier. Amplifié à l'aide de PCR d'ADN extrait de différentes sources, telles que le sang, les cheveux, la peau ou même les excréments, peau, ou même d'excréments. Les polymorphismes peuvent être visualisés sur un gel de séquençage. et la disponibilité de séquenceurs d'ADN automatisés permet l'analyse à haut débit d'un grand nombre d'échantillons d'un grand nombre d'échantillons (Jarne & Lagoda, 1996).

II.1.4. Marqueurs de l'ADN mitochondrial :

Les polymorphismes de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont été largement utilisés dans les analyses de la diversité phylogénétique et génétique. Analyses de la diversité phylogénétique et génétique. L'ADNmt haploïde transporté haploïde transporté par les mitochondries du cytoplasme cellulaire a un mode de transmission maternel (les animaux héritent de l'ADNmt).

(Les animaux héritent de l'ADNmt de leur mère et non de leur père) et un taux de mutation élevé ; il ne se recombine pas. Ces caractéristiques permettent aux biologistes de reconstruire les relations évolutives intra et interraciales en évaluant les schémas de mutation de l'ADNmt.

Les étiquettes d'ADNmt peuvent également constituer un moyen rapide de détecter l'hybridation entre les espèces et les sous-espèces d'élevage. entre les espèces et sous-espèces d'élevage. (Nijman *et al.*, 2003), Les polymorphismes dans la région hypervariable de la boucle D ou de la région de contrôle de l'ADNmt ont largement contribué à l'identification des ascendants sauvages des espèces domestiques. à l'identification des ascendants sauvages des espèces domestiques et à l'établissement de modèles géographiques de diversité génétique. Modèles géographiques de diversité génétique.

II.2. PCR classique :

La Réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une méthode biologique qui permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN. (Fred & Mullis, 1987) Cette amplification est réalisée grâce à des enzymes, comme la Taq polymérase, qui interagissent avec les amorces (primers) pour permettre la réplication des segments d'ADN ciblés.

II.2.1. Composants de la PCR classique :

- **ADN cible** : Il s'agit de la séquence d'ADN que l'on souhaite amplifier.
- **Amorces (Primers)** : Ce sont des séquences courtes d'ADN qui se lient aux régions proches du site cible pour initier la réplication.
- **dNTPs (nucléotides)** : Ce sont les unités de base de l'ADN, telles que l'adénosine, thymidine, **cytosine** et **guanine**, qui sont ajoutées pendant la réaction pour former la nouvelle chaîne d'ADN.
- **Taq polymérase** : Il s'agit de l'enzyme thermique provenant de la bactérie *Thermus aquaticus*, utilisée pour catalyser l'amplification de l'ADN.
- **Tampon (Buffer)** : Il contient des **ions magnésium (Mg²⁺)** qui permettent à l'enzyme de fonctionner efficacement dans des conditions spécifiques (Wilfinger *et al.*, 2001).

II.2.2. Mécanisme de la PCR classique:

La PCR passe par **trois étapes principales**:

Dénaturation : La température est élevée à **94-95°C**, ce qui permet de séparer les deux brins d'ADN.

Hybridation : La température est réduite à **50-65°C**, permettant aux **amorces** de se fixer aux brins d'ADN simples.

Élongation : À **72°C**, la Taq polymérase ajoute des **nucléotides** pour former un brin complémentaire au brin cible d'ADN (Saiki *et al.*, 1988).

II.2.3. Avantages de la PCR classique:

Rapidité : Le processus peut être achevé en quelques heures.

Sensibilité : La PCR permet la détection de très faibles quantités d'ADN.

Spécificité : Grâce aux amorces, la PCR amplifie uniquement la séquence cible dans un échantillon d'ADN (Mullis K. , 1990).

II.3. Applications PCR Classique :

II.3.1. Médecine Légale et Criminalistique :

La PCR classique est largement utilisée pour l'**identification génétique** dans les enquêtes criminelles. Elle permet d'amplifier de petites quantités d'ADN prélevées sur des scènes de crime, des échantillons de sang, de cheveux, ou d'autres preuves biologiques. Cela permet de **matcher** l'ADN trouvé sur une scène de crime avec des bases de données ADN pour identifier des suspects ou des victimes. Cette application est cruciale dans des cas où les échantillons sont très dégradés (Fred & Mullis, 1987).

II.3.2. Diagnostic Médical :

La PCR est utilisée pour détecter des **infections virales et bactériennes** dans des échantillons cliniques. Par exemple, la PCR est utilisée pour le **diagnostic de maladies infectieuses** telles que :

VIH/SIDA : Détection du virus du VIH en amplifiant des segments spécifiques de son ADN ou ARN.

Tuberculose : Amplification du gène spécifique de *Mycobacterium tuberculosis*.

Infections virales : Utilisée pour détecter des virus comme le **herpès, hépatite**, et le **COVID-19** (Mullis k. B., 1994).

II.3.3. Analyse Génomique :

La PCR classique est essentielle pour la **recherche en biologie moléculaire**. Elle permet de :

Amplifier des gènes d'intérêt pour les analyser en profondeur.

Étudier les **mutations génétiques** associées à des maladies héréditaires comme la **fibrose kystique**, ou des mutations dans des gènes de susceptibilité au cancer.

Identifier des **polymorphismes génétiques** dans des populations pour des études d'association gène-maladie (Saiki *et al.*, 1988).

II.3.4. Clonage et Génie Génétique :

La PCR est utilisée pour amplifier un gène ou une séquence spécifique d'ADN avant de l'insérer dans un **vecteur** (plasmide, virus) pour l'exprimer dans des **cellules hôtes**. Cela permet de produire des protéines recombinantes, de développer des traitements biologiques et d'étudier des fonctions génétiques spécifiques (Wilfinger *et al.*, 2001).

II.3.5. Tests de Paternité et Identité :

La PCR est couramment utilisée pour les **tests de paternité** et autres **tests de filiation**. En amplifiant et en comparant des séquences d'ADN spécifiques de la mère, du père, et de l'enfant, il est possible de confirmer ou d'infirmer une relation biologique (Fred & Mullis, 1987).

II.3.6. Biodiversité et Environnement :

Dans le domaine de l'écologie, la PCR est utilisée pour **identifier** et **quantifier** les espèces présentes dans un échantillon de sol, d'eau ou d'air. Par exemple, elle est utilisée pour analyser la **biodiversité** en amplifiant l'ADN des espèces présentes dans un environnement donné sans avoir besoin de les isoler physiquement. Cette technique est également utilisée pour détecter des **espèces envahissantes** ou des **pathogènes** dans les écosystèmes naturels.

II.3.7. Évolution et Paléontologie Moléculaire :

Les scientifiques utilisent la PCR pour étudier l'**ADN ancien**, même si les échantillons sont dégradés. Cela permet d'examiner des restes d'animaux ou d'humains fossiles pour reconstruire des **arbre phylogénétiques** et mieux comprendre l'évolution des espèces (Saiki *et al.*, 1988).

II.4. Variantes de la PCR :

II.4.1. PCR par transcriptase inverse :

Comme démontré dans le chapitre précédent, il peut s'avérer bénéfique d'isoler les ARNm afin de produire des duplicata d'ADNc. Cette réaction est facilitée par la transcriptase inverse du rétrovirus, qui produit l'ARNm à partir d'une matrice d'ARN en synthétisant une chaîne d'ADN. Dans une première étape, l'extraction des ARN totaux est effectuée. L'ARNm est séparé de l'ARN global par chromatographie d'affinité, en utilisant un oligodT (oligonucléotide polyT). Puisque les ARN messagers se distinguent par une séquence 3' polyA. Par la suite, les ARNm sont traités par la transcriptase inverse qui produira une réplique de l'ADN (ADNc) pour chaque ARNm. Suite à la transcription inverse, les ARNm subissent une hydrolyse (par un traitement alcalin, une RNase ou par augmentation de la température). Les étapes suivantes s'effectuent à l'intérieur du thermocycleur.

Les ADNc simple brin sont ensuite répliqués par l'ADN polymérase au cours d'un premier cycle. par l'ADN polymérase au cours d'un premier cycle de température (Freeman *et al.*, 1999), D'autres cycles sont répétés pour amplifier les ADNc double brin en grandes quantités. Dans un phénotype Dans un phénotype cellulaire donné, on estime que 10 à 15 000 gènes sont exprimés chez l'homme et la plupart des mammifères.

Il arrive que certains transcrits cellulaires soient exprimés en quelques centaines, voire des milliers de copies par cellule. Multiples par cellule, mais la plupart des transcrits correspondent à un nombre réduit de copies. Les profils d'expression des transcrits Les profils d'expression des transcrits connaissent des variations qualitatives ou quantitatives qui traduisent la dynamique biologique de la cellule. Ils illustrent la dynamique biologique de la cellule. La détection des variations d'expression dans un cadre physiologique ou pathologique spécifique peut ainsi offrir des renseignements de valeur sur le rôle des gènes et l'impact des facteurs de modulation sur leur expression, qu'ils soient physiologiques ou pathologiques. En ce qui concerne leur manifestation, qu'elle soit d'origine physiologique ou environnementale. Provenant de l'environnement. L'étude des changements dans l'expression des gènes associés à une maladie peut aboutir à l'identification de nouvelles cibles pour le traitement ou le diagnostic. En définitive, l'examen du profil d'expression des gènes contribue à approfondir notre compréhension des mécanismes de la physiologie cellulaire sur un plan fondamental (Rajeevan *et al.*, 2001).

II.4.2. PCR quantitative en temps réel :

Créée au cours des années 1980, la PCR quantitative offre la possibilité de mesurer la quantité d'ADN ou d'ARN spécifique dans un échantillon biologique. De l'ADN ou de l'ARN spécifique dans un prélèvement biologique. La technique repose sur l'identification d'un signal fluorescent généré en fonction de l'amplification du produit de la PCR à chaque cycle. Elle requiert un thermocycleur associé à un dispositif de détection optique qui évalue l'émission de fluorescence. De lecture optique qui évalue l'émission de fluorescence. Une sonde nucléotidique est fabriquée pour qu'elle puisse se lier de manière sélective au produit de la PCR.

Elle doit être capable de s'hybrider spécifiquement avec l'ADN ciblé entre les régions où se lient les amorces. L'endroit où se produisent les hybridations des amorces. Un fluorochrome (comme la 6-carboxyfluorescéine) est attaché à l'extrémité 5' de la sonde tandis qu'un quencher (comme la 6-carboxytetraméthyl rhodamine) est lié à l'extrémité 3'. Cette sonde doit avoir une température d'hybridation (T_m) plus élevée que celle des amorces pour garantir qu'elle s'hybride complètement lors de la phase d'élongation (paramètre crucial) (Nolan & Bustin, 2001).

Tant que les deux fluorochromes restent présents au niveau de la sonde, l'extincteur empêche la fluorescence du signal. Dans cette étape, la proximité du quencher et le signal induit une absence d'émission de fluorescence. Au cours de cette phase d'élongation, Taq polymérase, qui a une activité 5'-3' nucléase intrinsèque, dégrade la sonde et libère ainsi le signal fluorochrome.

Ainsi, le signal fluorochrome est sondé et libéré. La quantité de produits PCR générés à chaque cycle est proportionnelle au niveau de fluorescence. Chaque échantillon (habituellement, la PCR est effectuée dans des plaques de 96 puits) est raccordé à une sonde grâce à la conception du thermocycleur. Un système optique est connecté à 96 puits. Cela inclut un émetteur laser connecté à une fibre optique. À travers la fibre optique, le laser stimule le fluorochrome présent dans le mélange réactionnel de la PCR. L'appareil photo numérique relié à un ordinateur capte la fluorescence émise, qui est transmise via fibre optique. Le logiciel examine et enregistre les informations. La PCR quantitative est une technique présentant une spécificité et une sensibilité élevées. Caractéristique et sensibilité. Elle est extrêmement pertinente pour une multitude d'applications.

Une PCR traditionnelle ne donne que des informations qualitatives (détection ou non de l'ADN ciblé, purification de cet ADN). De manière pertinente, purification de cet ADN. Comme le suggère son appellation, la PCR quantitative offre une estimation plus précise de la quantité d'ADN ciblé. Permet de déterminer de manière plus précise la quantité d'ADN ciblé (ou d'ARN, puisque l'on peut effectuer une RT quantitative). puisque l'on peut effectuer une RT-PCR quantitative en utilisant le même appareil (Jochen & Alfred , 2003), En effet, elle est fréquemment employée à cette fin, notamment pour évaluer la charge virale, particulièrement dans le contexte de maladies infectieuses. Niveau de charge virale, en particulier dans les situations d'hépatite C ou de SIDA. Une des applications les plus remarquables est l'analyse de l'expression génique par la quantification des transcrits. Quantification des transcriptions.

II.4.3. PCR en temps réel :

La méthode d'amplification par polymérisation en chaîne (PCR) est une technique cruciale dans plusieurs champs de la biologie moléculaire et du diagnostic médical, permettant l'amplification de l'acide nucléique. La méthode standard implique deux phases distinctes :

L'élargissement d'un segment d'acide nucléique ciblé et l'examen du résultat de l'amplification par diverses techniques telles que l'électrophorèse, l'hybridation ou le séquençage du produit amplifié. Ces méthodes ont le mérite d'estimer la dimension des produits d'amplification, cependant, elles ne sont pas aptes à identifier des variations nucléotidiques

spécifiques (sauf dans le cas du séquençage). En outre, elles nécessitent un traitement additionnel des produits d'amplification, ce qui accroît les risques de contamination. Ces dernières années, la technologie PCR a rapidement évolué, notamment la PCR quantitative en temps réel (RT-PCR) qui s'est considérablement développée. Celle-ci permet l'amplification et la détection d'un fragment d'acide nucléique cible, en une seule étape, limitant les risques de contamination entre les différents prélèvements tout en permettant un gain de temps considérable (Mathys *et al.*, 2007).

Ainsi, cette méthode est extrêmement bénéfique pour des usages diagnostiques, certains résultats pouvant être obtenus en moins de soixante minutes. La RT-PCR utilise des sondes fluorescentes qui, lorsqu'elles se fixent à leur cible, connaissent une réorganisation conformationnelle et produisent une fluorescence dont l'intensité est directement liée au nombre d'amplicons. La RT-PCR est également notable pour sa sélectivité élevée, qui permet d'identifier la présence de l'acide nucléique cible à partir d'un échantillon contenant diverses autres molécules d'ADN (cellules hôtes, contaminants).

Différentes méthodes de détection des amplicons sont possibles : soit non spécifiques, comme le SYBR Green (BioRad) ; soit spécifiques, telles les sondes TaqMan (BioRad), Molecular Beacons ou FRET (Fluorescence Résonance Energy Transfer) (Mathys *et al.*, 2007, p. 206).

Dans la PCR en temps réel, l'accumulation de produits amplifiés est mesurée au fur et à mesure de la progression de la réaction. Au contraire, la PCR conventionnelle ne permet la détection des amplicons qu'en fin de réaction. La PCR en temps réel est un moyen avancé de quantifier l'ADN ou l'ARN en incorporant une sonde fluorescente dans la réaction (Elnifro *et al.*, 2000).

II.4.4. PCR semi-quantitative ou compétitive :

Dans la majorité des situations, il s'agit de la RT-PCR. En ce qui concerne la PCR quantitative, on évalue la quantité absolue de l'ARN ou de l'ADN ciblé. On mesure l'ADN d'intérêt en termes de quantité absolue. Dans le contexte de la PCR semi-quantitative ou compétitive, l'objectif est d'évaluer des quantités relatives grâce à des standards correspondant soit à l'ARN, soit à l'ADN. Des standards correspondant à l'ARN ou, plus rarement, à l'ADN. Dans la majorité des situations, il s'agit d'une RT-PCR. Ces étalons peuvent être de nature interne ou externe.

Les standards externes peuvent être homologues ou hétérologues. L'étalon est une molécule d'ARN (ou moins fréquemment, d'ADN) qui se trouve dans l'extrait d'ARN (appelé référence interne) ou qui est incorporée en une quantité mesurée. Présent dans l'échantillon d'ARN ou ajouté en quantité mesurée dans le mélange réactionnel (standard externe). L'amplification de l'étalon se fait simultanément avec celle de l'ARN ciblé. Simultanément

auARN d'intérêt. Il en résulte donc une concurrence entre l'intensification de l'étalon et celle de l'ADN de la référence et celle de l'ADN ciblé. Plus la quantité de l'étalon est importante, moins l'ARN d'intérêt sera amplifié, ce qui résulte en une faible quantité. Sera faible. Il est essentiel que la méthode d'analyse du prélèvement PCR permette de distinguer l'étalon de l'ARN ciblé d'une part, et d'autre part, d'estimer la quantité relative de l'ADN ciblé par rapport à la quantité connue de l'étalon. en comparaison avec la quantité d'étalon connue (Schmittgen & Livak, 2008), Les étalons internes sont des endogènes, correspondant à des gènes d'ARN dont l'expression est supposée constante (actine, bêta2-microglobuline, etc.) et qui sont présents dans la population de matrices d'ARN lors de la transcription inverse.

Un désavantage majeur de ces normes est qu'elles exigent l'emploi d'amorces différentes de celles employées pour l'ARN ciblé. L'amplification ayant une cinétique considérablement différente, il est extrêmement complexe, si ce n'est irréalisable, d'assurer une expression stable de l'ARN recherché. Les standards homologues d'ARN externes sont des ARN de synthèse qui possèdent les mêmes sites d'hybridation pour les amorces que l'ARN ciblé.

L'ARN ciblé et qui possède une séquence générale identique, avec une mutation mineure, se fixe sur les sites d'hybridation des amorces. Séquence globale, comportant une petite mutation, délétion ou insertion qui facilitera leur reconnaissance et quantification par rapport au signal produit par l'ARN ciblé. D'intérêt. Ces standards, d'un côté, permettent de mesurer la variabilité générée au niveau du RT et, de l'autre côté, assurent généralement une efficacité d'amplification similaire à celle de l'ARN ciblé. Ils offrent généralement la même capacité d'amplification que l'ARN cible, que ce soit lors de la RT ou de la PCR (Tse & Capeau, 2003).

Les standards d'ARN hétérologues externes sont des ARN exogènes et leur taux peut donc être contrôlé. Peut donc être contrôlé. Toutefois, contrairement aux étalons externes homologues, ils ont une efficacité d'amplification différente de celle de l'ARN d'intérêt. Dans le cas de la RT-PCR quantitative (PCR semi-quantitative), l'étalon consiste en une solution titrée d'ADN de séquence identique à celle de l'ADN d'intérêt. D'une solution titrée d'ADN de séquence identique à celle de l'ADN d'intérêt à quantifier. À quantifier. Une série de dilutions est effectuée, chacune étant utilisée pour l'amplification. Il s'agit alors de définir le nombre idéal de cycles à placer dans la phase exponentielle de la réaction. La phase exponentielle de la réaction tout en assurant une amplification efficace. Ensuite, chaque dilution d'ADN standard ainsi que l'ADN extrait de l'échantillon à quantifier sont soumis en parallèle. À quantifier sont soumis en parallèle à la réaction PCR. Une courbe standard est Une courbe standard est établie avec les dilutions 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

l'échantillon à quantifier. 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 homologues externes synthétiques sont Co-amplifiées, avec des quantités équivalentes d'ARN total (et donc une quantité équivalente du gène natif) (Yong-I & Alexandra, 2002), L'étalon entre en compétition avec l'ARN d'intérêt pour la polymérase et les amorces. Au fur et à mesure que la concentration de l'étalon augmente, le signal du gène d'intérêt diminue. Diminue. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire d'effectuer la PCR en phase exponentielle et les résultats présentent une bonne reproductibilité. Et les résultats présentent une bonne reproductibilité. Cependant, la méthode est lourde et ne permet pas de gérer de nombreux échantillons. et ne permet pas de gérer de nombreux échantillons simultanément (Chumming & Charles, 2004).

II.4.5. PCR Multiplex :

La réaction en chaîne de la polymérase multiple (PCR multiplex) est une biotechnologie avancée qui permet l'amplification de plusieurs cibles génétiques en une seule réaction, en utilisant plus d'une paire d'amorces dans la même réaction. Cette technique représente une amélioration significative par rapport à la PCR conventionnelle, en termes d'efficacité opérationnelle et de réduction du temps et des coûts associés au diagnostic et à l'analyse génétiques.

La technique repose sur les principes de base de la PCR, mais nécessite une conception minutieuse et une prise en compte stricte de la spécificité de chaque paire d'amorces afin d'éviter les interférences ou les interactions non spécifiques entre les différents composants.

Un contrôle minutieux des conditions de réaction, notamment des températures et des concentrations de réactifs, est essentiel pour garantir des résultats efficaces et précis (Henegariu *et al.*, 1997).

La PCR multiplex est largement utilisée dans de nombreux domaines d'application, notamment dans le diagnostic moléculaire des maladies infectieuses, permettant la détection simultanée de plusieurs agents pathogènes dans un seul échantillon, tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C. Cette technologie est également utilisée dans l'analyse génétique. Cette technologie est également utilisée dans l'analyse génétique pour détecter les mutations génétiques et les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP), en plus de ses applications importantes en médecine légale pour les empreintes ADN, et dans le contrôle des aliments et de l'environnement pour surveiller les micro-organismes importants pour la santé.

La technologie PCR multiplex se caractérise par sa grande efficacité dans l'analyse d'échantillons en quantités limitées et par sa capacité à fournir des résultats diagnostiques précis en peu de temps, ce qui en fait un outil essentiel dans les laboratoires de recherche et les laboratoires cliniques modernes (Markoulatos *et al.*, 2002).

Une autre variante de la PCR est appelée Multiplex. Il consiste à utiliser différentes paires d'amorces, chacun d'entre eux est spécifique à un autre virus. Si elles peuvent être détectées dans la même réaction de plusieurs pathogènes différentes, par exemple, différents virus respiratoires (Madrid Universidad, 2024).

Une PCR multiplex est utilisée pour amplifier et cibler plusieurs séquences d'ADN dans un seul puits de réaction. Cette variante de la PCR nécessite au moins deux sondes pouvant être distinguées les unes des autres et détectées simultanément (Elnifro *et al.*, 2000).

La PCR multiplex présente l'avantage de permettre, à partir du même échantillon, l'amplification de plusieurs séquences génomiques virales différentes (Plouzeau *et al.*, 2007). Il est particulièrement intéressant de rechercher simultanément les virus grippaux et le VRS car les épidémies surviennent le plus souvent de façon concomitante.

Un grand pas a été franchi lorsque la PCR a pu produire des amplicons de tailles différentes en même temps dans un tube. C'est ce qu'on appelle la PCR multiplex. Elle a été utilisée pour trouver des délétions dans le gène DMD, qui est énorme (Zhu *et al.*, 2020).

Le gène DMD se trouve sur le chromosome X. Ses mutations provoquent la dystrophie musculaire. Ses mutations provoquent la dystrophie musculaire chez les hommes. De nombreuses méthodes de diagnostic ont été basées sur cette idée. Le développement de la PCR a été excellent et des étapes importantes ont été franchies. La PCR s'est beaucoup développée depuis la découverte de l'ADN polymérase Taq par en 1976 jusqu'à l'introduction de Phusion dans les années 2000. Ces avancées technologiques en matière de PCR ont grandement aidé la génétique, la médecine et la biotechnologie (thermofisher, 2025). Comme la PCR continue de s'améliorer, nous pouvons nous attendre à de nouvelles découvertes. La PCR est utilisée dans les biosciences, les diagnostics et la médecine légale. Elle est utilisée dans les systèmes à haut débit et micro fluidique pour les tests sur le lieu de soins (Zhu *et al.*, 2020). La PCR par transcription inverse en temps réel est le meilleur choix pour diagnostiquer SARS-CoV-2.

La PCR permet une amplification de plus d'un milliard de fois de régions cibles spécifiques, ce qui en fait un instrument dans des applications telles que le clonage de gènes, le diagnostic de maladies infectieuses et le dépistage prénatal d'anomalies génétiques (Ghannam *et al.*, 2023). Les systèmes micro fluidiques ont rendu la PCR plus rapide et plus petite. Les

systèmes à base de gouttelettes sont utilisés pour les études sur les cellules uniques. Les systèmes basés sur des puces utilisent des matériaux tels que le silicium et le verre pour l'amplification de l'ADN.

Les systèmes hybrides utilisent de nouvelles méthodes de chauffage et de refroidissement pour la PCR. La PCR numérique est issue de la PCR traditionnelle et a rendu la PCR plus précise.

Elle a considérablement modifié les sciences biologiques en les rendant plus précises et plus utiles (Zhu *et al.*, 2020).

II.4.6. PCR Emboîté :

La PCR Emboîté est une méthode permettant d'améliorer la sensibilité et la spécificité impliquant deux jeux d'amorces et deux réactions PCR successives. Le premier ensemble d'amorces s'hybride avec des séquences en amont du deuxième ensemble d'amorces et le produit de la première amplification est utilisé comme matrice pour la deuxième PCR (Green & Sambrook, 2019).

Bien que la PCR est très sensible, parfois, il y a très peu d'ADN spécifique (ce que l'on veut détecter) dans l'échantillon à analyser, et vous devrez faire une deuxième amplification en utilisant le premier produit d'amplification comme un moule. Cette technique est appelée PCR nichée et emploie deux paires d'amorces, une externe et une interne à la première.

Une caractéristique de cette technique c'est qu'après la première amplification (20 cycles), le produit est dilué, et peut donc éliminer les inhibiteurs présents dans l'échantillon original. En revanche, a l'inconvénient que, besoin de plus de manutention, Il y a un risque accru de contamination avec l'ADN étrange (Madrid Universidad;, 2024).

La réaction en chaîne Emboîté de la polymérase (PCR) nichée est utilisée dans les situations où il est nécessaire d'augmenter la sensibilité et/ou la spécificité de la PCR, par exemple lorsqu'il s'agit d'amplifier un membre particulier d'une famille de gènes polymorphiques ou d'amplifier une copie d'ADNc d'un ARNm présent en très faible quantité dans un échantillon clinique contenant une population hétérogène de types de cellules.

La PCR nichée implique généralement deux réactions d'amplification séquentielles, chacune utilisant une paire d'amorces différente. Le produit de la première réaction d'amplification est utilisé comme modèle pour la deuxième PCR, qui est amorcée par des oligonucléotides placés à l'intérieur de la première paire d'amorces. L'utilisation de deux paires d'oligonucléotides permet d'effectuer un plus grand nombre de cycles, augmentant ainsi la

sensibilité de la PCR. L'amélioration de la spécificité de la réaction provient de la liaison de deux paires d'amorces distinctes au même modèle cible. La PCR imbriquée est une méthode efficace pour amplifier des segments de longs modèles, mais elle nécessite la connaissance de la séquence du modèle cible (Green & Sambrook, 2020).

II.4.6.1. Equipement :

Embouts barrières (pour micropipettes automatiques) Matériel d'électrophorèse sur gel (pour gels de polyacrylamide ou d'agarose) Tubes de micro centrifugeuse, 0,5 ml, à paroi mince (facultatif) Plaques de micro titration (facultatif) Pipette à déplacement positif Thermocycleur Un certain nombre de thermocycleurs programmables commercialisés par différentes sociétés commerciales (par exemple : Mastercycler, PTC-100 sont sous licence de Perkin Elmer pour être utilisés dans la PCR, Mastercycler, PTC-100 sont autorisés par Perkin Elmer à être utilisés pour la PCR. Le choix parmi ces instruments dépend de l'inclination du chercheur, du budget disponible et de la gamme d'utilisations de l'appareil. Avant d'acheter un thermocycleur, nous recommandons de solliciter autant d'avis que possible pour découvrir les avantages et les inconvénients des différentes machines. Cuire toute la verrerie pendant 6 heures à 150°C et stériliser à l'autoclave toute la verrerie en plastique (Green & Sambrook, 2020).

II.5. Innovations récentes en PCR :

II.5.1. PCR a haute-fidélité :

La PCR haute-fidélité est fréquemment utilisée pour le clonage et la mutagenèse. Cependant, les Taq polymérase standard ne peuvent pas être utilisées car elles font trop d'erreurs pendant l'amplification.

Le haute-fidélité PCR Enzyme Mix est un mélange unique d'ADN polymérase Taq et d'une ADN polymérase thermostable avec activité de relecture. Les deux enzymes génèrent en synergie des produits PCR plus longs avec un meilleur rendement et une fidélité quatre fois supérieure à celle de l'ADN polymérase Taq seule. Le mélange d'enzymes peut générer des amplicons allant jusqu'à 20 kb avec des modèles d'ADN viral et jusqu'à 10 kb avec des modèles d'ADN génomique. La génération de produits PCR aussi longs est souvent difficile avec un seul ADN polymérase (Zilinskiene , 2013).

Les ADN polymérase haute-fidélité sont importantes pour les applications pour lesquelles la séquence d'ADN doit être correcte après l'amplification. La fidélité de l'ADN polymérase réfère à sa capacité à insérer la bonne base au bon endroit pendant la réaction de PCR. Communément, le taux de mauvaises insertions de nucléotides est connu sous le nom de taux d'erreurs de l'ADN

polymérase. La PCR haute-fidélité nécessite une ADN polymérase avec un faible taux d'erreurs et permet un degré élevé de précision dans la réplication de l'ADN d'intérêt.

On distingue différents types d'ADN polymérases haute-fidélité dont la Pfu polymérase, une ADN polymérase naturellement fidèle grâce à son activité exonucléase 3'-5' ainsi que des ADN polymérases modifiées pour obtenir des capacités de fidélité supérieures.

Les modifications apportées aux ADN polymérases pour leur apporter une fidélité supérieure sont de différentes natures : modification génétique, modification chimique, mélange de plusieurs enzymes ...

La fidélité de la PCR est exprimée très souvent en taux d'erreur (ou taux de mutation) qui correspond à la fréquence de mutation (nucléotide(s) incorporé(s) erreur) par pair de base incorporée et par duplication. La fidélité de la PCR dépend essentiellement de l'ADN polymérase. Elle est également influencée par la composition du tampon de réaction comme par exemple les concentrations en magnésium et en dNTP, le pH, etc. Toutes les ADN polymérases peuvent incorporer des nucléotides inappropriés au cours d'une duplication, certaines peuvent les reconnaître, les enlever et les remplacer par les nucléotides corrects grâce à l'activité 3' – 5' exonucléase, également appelée l'activité de relecture (« proofreading »). La Taq ADN polymérase, n'ayant pas d'activité de relecture intrinsèque, introduit environ une erreur tous les 1 à 2 kilobases (kb). Les enzymes de PCR fidèle ont toutes une activité de relecture (**Figure 8**). (clinisciences, 2025).

II.5.1.1. Applications :

- Génération de produits PCR à des fins de clonage, d'expression, de mutagenèse dirigée.
- PCR à haut rendement.
- PCR à longue portée.
- RT-PCR (Zilinskiene , 2013).

II.5.1.2. La « Technologie LA » et les mélanges d'enzymes :

La « technologie là » est une technologie brevetée qui consiste à mélanger une Taq ADN polymérase avec, en faible quantité, une ADN polymérase thermostable ayant une activité de relecture (**Figure 8**). L'activité de relecture de la deuxième enzyme confère la fidélité au mélange sans compromettre sa processivité. L'amplification des longs fragments d'ADN et le rendement de PCR sont alors améliorés. La fidélité des mélanges d'enzyme est d'environ 6 à 10 fois supérieure à la Taq. Plusieurs mélanges d'enzymes bénéficiant de cette technologie sont disponibles sur le marché.

Des ADN polymérases thermostables avec une activité de relecture accrue ont été découvertes et sélectionnées au cours des dernières décennies (par exemple les ADN polymérases « *Pyrococcuslike* »). Fusionnées à un ou plusieurs cofacteurs telle qu'une protéine de fixation à l'ADN non spécifique d'une séquence (par exemple la *Sso7d* extrait du *Sulfolobus*), elles sont au moins 50 fois plus fidèle qu'une *Taq*. Ce sont des enzymes de PCR haute-fidélité. De plus elles sont très processives dont la vitesse d'élongation et le rendement sont nettement supérieurs à une *Taq*. Par exemple, une ADN polymérase de fusion peut amplifier à une vitesse entre 5 sec à 15 sec/kb. appartient à ces enzymes (Janice *et al.*, 1996).



Figure 8: fidelio hot Start dna Polymerase – Pcr haute-fidélité (clinisciences, 2025).

II.5.2. PCR numérique :

La PCR numérique est une méthode de PCR en point final qui est utilisée pour la quantification absolue et pour l'analyse de séquences minoritaires sur un fond de séquences majoritaires similaires, par exemple la quantification des mutations somatiques. Lors de l'utilisation de cette technique, l'échantillon est prélevé à une dilution limitante et le nombre de réactions positives et négatives est utilisé pour déterminer une mesure précise de la concentration de la cible.

Le concept de la PCR numérique (dPCR) a été conçu en 1992 par Sykes. (Sykes *et al.*, 1992), puis développé dans un format de réseau à l'échelle nanométrique par Kalinina en 1997 (Kalinina, 1997), L'un des moteurs de l'amélioration continue de la dPCR a été la démonstration par Vogelstein et Kinzler. (Vogelstein & Kinzler, 1999), que des mutations rares du gène KRAS pouvaient être détectées et quantifiées dans du matériel extrait de patients atteints de cancer colorectal. Vogelstein a dilué les échantillons de patients de manière à obtenir en moyenne une

molécule matrice pour deux puits d'une plaque de réaction. La séquence cible autour du site de mutation a été amplifiée, puis deux balises moléculaires (voir les méthodes de détection de la PCR quantitative et de la PCR numérique) ont été utilisées pour détecter les amplicons.

La première balise moléculaire était spécifique d'une région qui ne devait pas contenir de mutation et ce test a servi de contrôle positif de l'amplification par PCR. La deuxième balise moléculaire avait une étiquette de colorant différente et était spécifique de la séquence de type sauvage (WT). De cette manière, les réactions présentant un signal positif des deux étiquettes étaient censées être des WT et celles ne présentant que le contrôle positif étaient censées être des mutants. Comme tous les produits d'un puits devaient être homogènes à la suite de la dilution, une mesure précise du rapport mutant/WT a pu être effectuée. Ces expériences fournissent des exemples de dPCR réalisée dans des plaques standard à 96 puits, mais des options à plus haut débit ont été suggérées par d'autres, notamment Dressman (Dressman *et al.*, 2003), qui ont introduit le concept d'utilisation de billes d'émulsion pour la dPCR (aujourd'hui utilisées dans le système Bio-Rad QX100™ Droplet Digital™ PCR, dPCR™ et l'instrument RainDrop™ de Rain Dance Technologies). Dans un format alternatif, les réactions sont exécutées sur des circuits fluidiques intégrés (puces). Ces puces sont dotées de chambres et de vannes intégrées pour le partitionnement des échantillons et des réactifs de réaction.

Le premier système commercial de dPCR utilisant la technologie des puces, le Bio Mark™, a été lancé en 2006 par Fluidigm. Lors d'une PCR classique, la concentration finale de la matrice est proportionnelle au nombre de copies de départ et au nombre de cycles d'amplification. Une expérience d'un nombre donné de réactions est réalisée sur un seul échantillon et le résultat est une analyse de la taille des fragments ou, pour la PCR quantitative en temps réel (qPCR), l'analyse est une estimation de la concentration des séquences cibles dans la réaction, basée sur le nombre de cycles nécessaires pour atteindre un cycle de quantification (Cq). Lors de l'utilisation de la dPCR, l'échantillon est dilué et séparé en un grand nombre de chambres de réaction, de sorte que chaque partition contienne une ou aucune copie de la cible.

Le nombre de chambres de réaction ou de partitions varie selon les systèmes, de plusieurs milliers lors de l'utilisation du système QX100 de Bio-Rad à des millions lors de l'utilisation de l'approche Rain Drop™. La PCR est ensuite réalisée dans chaque partition et l'amplicon détecté à l'aide d'une étiquette fluorescente (voir les méthodes de détection de la qPCR et de la dPCR), de sorte que les données collectées sont une série de résultats positifs et négatifs. En théorie, un signal positif devrait provenir d'une partition qui contenait à l'origine une seule copie de la cible et un signal négatif (c'est-à-dire aucun signal) d'une partition qui ne contenait pas de matrice à l'origine. Toutefois, comme il est possible que certaines partitions contiennent plus d'une seule

copie du modèle, la dispersion de l'échantillon dans les partitions est considérée comme obéissant à une distribution de Poisson. En théorie, la dPCR peut être utilisée pour surmonter certaines des difficultés rencontrées lors de l'utilisation de la PCR conventionnelle.

Lors de l'utilisation de la dPCR, un échantillon est partitionné de manière à ce que les molécules d'acide nucléique individuelles de l'échantillon soient localisées dans de nombreuses régions distinctes et que la détection d'une cible ne dépende donc pas du nombre de cycles d'amplification. Cette approche permet une différenciation beaucoup plus sensible du changement de pli que celle offerte par la qPCR ; une qPCR bien optimisée peut différencier des changements de 1,5 fois au mieux, alors que la dPCR a été rapportée pour différencier 1,2 fois (Whale *et al.*, 2012). La dilution de l'échantillon en fait un outil utile pour étudier des séquences minoritaires par rapport à une majorité de séquences similaires mais différentes. Par exemple, la dPCR peut être utilisée pour détecter un polymorphisme somatique d'un seul nucléotide (SNP) à faible incidence par rapport à une forte concentration de séquences WT. En effet, lorsque l'échantillon total est dilué, la séquence rare est également diluée en une seule copie, de sorte qu'elle sera amplifiée en l'absence de concurrence de la séquence dominante. Beaucoup moins de partitions contiendront un positif pour le SNP rare que pour le WT, de sorte qu'il est possible d'effectuer une mesure précise du rapport entre les deux séquences.

La PCR numérique Technologie de dPCR repose sur le même principe que la PCR classique, à savoir la multiplication de fragments d'ADN par cycles thermiques. Il y a toutefois une grande différence dans la façon dont les échantillons sont traités. En fait, dans la PCR conventionnelle, les molécules d'ADN sont amplifiées en vrac, ce qui peut entraîner des incertitudes dans la quantification en raison de la variabilité du processus.

La dPCR, en revanche, partitionne l'échantillon en un grand nombre de compartiments, chacun contenant une molécule d'ADN cible ou non. Chaque compartiment subit ensuite le processus d'amplification individuellement. Après amplification, les compartiments sont analysés pour déterminer si l'ADN cible était présent ou absent. Cela permet alors une quantification absolue, contrairement à la PCR quantitative, qui nécessite des courbes standard pour estimer la concentration des échantillons.

La PCR numérique a révolutionné le domaine de la biologie moléculaire, remodelant fondamentalement le paysage de la quantification de l'ADN et de l'ARN. Elle est très sensible et peut détecter des cibles rares ou de faible abondance qu'il peut être difficile de quantifier avec précision à l'aide d'autres techniques. Un système de PCR numérique est un instrument de laboratoire avancé conçu pour réaliser des expériences de PCR numérique. Il divise l'échantillon en milliers, voire en millions, de minuscules partitions réactionnelles individuelles, chacune

contenant une quantité infime d'ADN ou d'ARN cible. Chaque partition subit une amplification PCR et la fluorescence ou le signal final est mesuré pour chaque partition individuellement.

Le logiciel détermine alors le nombre absolu de molécules cibles présentes dans l'échantillon original sans avoir recours à des courbes standard ou à des comparaisons relatives. (Mga-Technologies, 2025).

II.5.3. Instruments :

Bien que la dPCR soit une technologie relativement nouvelle, de nombreuses plateformes ont été développées dans le but de fournir de meilleurs outils pour des analyses telles que la détermination de la quantification absolue sans l'utilisation de normes, la détection de mutations génétiques rares à l'aide de systèmes multiplex et l'identification de petites différences de pli (<1,5) avec confiance entre les échantillons de diagnostic. D'une plateforme à l'autre, le concept général de la dPCR reste le même : l'ADN d'entrée est dilué pour générer des réactions à l'échelle nanométrique ou picométrique contenant 1 ou 0 copie du modèle. Les essais qPCR individuels ont lieu dans chaque gouttelette contenant la matrice, par opposition à une population groupée d'ADN cible (Vogelstein & Kinzler, 1999), Outre la sensibilité accrue de la détection des mutations alléliques rares et des mesures CNV, la quantification absolue des réactions positives peut être effectuée, en partie parce que les mesures dPCR ne dépendent pas des courbes standard ou des calibrages d'échantillons. D'autres caractéristiques peuvent être attribuées à la précision accrue de la quantification par dPCR, notamment la reproductibilité et l'homogénéité des gouttelettes générées ainsi que l'augmentation du nombre de réactions partitionnées analysées. (Pinheiro *et al.*, 2012).

Le type d'instrument choisi par l'utilisateur final dépend en fin de compte de l'application ou des applications spécifiques qui seront réalisées.

La PCR numérique est un outil indispensable dans un grand nombre de domaines, notamment la recherche génétique, les diagnostics cliniques, la surveillance de l'environnement et la sécurité alimentaire. Elle est particulièrement utile pour la détection de mutations génétiques rares, la quantification de la charge virale, l'analyse des variations du nombre de copies et l'évaluation des variations de l'expression des gènes. (**Figure 9**)



Figure 9: Absolute Q Digital PCR système (Thermo Fisher, 2015).

II.5.4. Les avantages de la PCR numérique :

II.5.4.1. Technologie de dPCR pour la détection précise de l'ADN Technologie de dPCR pour la détection précise de l'ADN :

Comme évoqué précédemment, cette méthode offre tout d'abord une quantification absolue de l'ADN ou de l'ARN sans avoir besoin d'établir des courbes standard. La complexité de l'analyse est ainsi réduite. La dPCR est aussi particulièrement sensible et précise. Plus concrètement, elle permet de détecter des différences minimales dans les niveaux d'ADN, même lorsqu'une faible proportion de molécules cibles est présente dans un échantillon complexe. Cela en fait bien sûr un outil de choix pour les applications nécessitant une détection ultra-sensible, comme la détection de mutations rares ou l'analyse d'échantillons avec une faible concentration d'ADN. Parmi les atouts de la dPCR, il y a également sa robustesse face aux inhibiteurs. Contrairement à la PCR classique, qui peut être affectée par des contaminants présents dans les échantillons, la partition des échantillons en petites unités dans la dPCR donne en effet la possibilité d'amplifier efficacement l'ADN, même en présence d'inhibiteurs. Cette technologie est enfin extrêmement utile pour les applications cliniques. En fait, elle permet de quantifier avec précision la charge virale, d'identifier des mutations génétiques et d'évaluer la réponse des patients à certains traitements. Cela confère alors une voie plus fiable pour les décisions thérapeutiques (Mga-Technologies, 2025).

II.5.4.2. Limites de l'instrument :

La PCR numérique offre de nombreux avantages par rapport à la qPCR. Ces avantages sont rendus possibles par le cloisonnement des réactions individuelles, ce qui permet d'enrichir l'amplification des allèles rares et à faible nombre de copies, tout en améliorant simultanément la précision et le pouvoir de quantification de la dPCR grâce à l'augmentation du nombre de réactions à l'échelle microscopique. La dPCR peut non seulement être utilisée pour mesurer les nombres absolus de copies, les CNV et les mutations alléliques rares, mais aussi pour quantifier l'ADN de faible quantité/de faible qualité (Pinheiro *et al.*, 2012), (Hindson *et al.*, 2011). Par exemple, lors de l'utilisation du séquençage de nouvelle génération, la quantification par dPCR permet d'éliminer la nécessité et le coût des analyses de titrage sur l'ADN d'entrée. Cela permet à son tour d'utiliser de plus petites quantités d'ADN d'entrée, minimisant ainsi la nécessité de l'étape de pré amplification apparemment biaisée couramment utilisée dans le séquençage de nouvelle génération (White *et al.*, 2009).

Cependant, dans certains cas, la pré amplification ne peut être évitée. Lorsque l'on travaille avec de l'ADN provenant d'une seule cellule ou lorsque l'ADN d'entrée est déjà à une faible concentration, l'amplification du génome entier peut être nécessaire avant de répartir l'échantillon en milliers de réactions. Il est important de noter que la pré amplification des échantillons d'ADN cible peut entraîner une amplification biaisée de l'ADN d'entrée, ce qui peut fausser les résultats de la dPCR. Il peut donc être nécessaire d'examiner si la méthode utilisée pour cette étape entraîne un biais d'amplification avant d'évaluer les nombres absolus de copies. En outre, il a été démontré que la structure de l'ADN affecte les mesures du nombre de copies dans l'analyse par dPCR. Cela est particulièrement vrai pour l'ADN plasmidique circularisé, qui doit par conséquent être linéarisé avant d'être utilisé dans les applications de dPCR.

L'un des inconvénients les plus évidents de la dPCR est le coût initial de l'équipement et les besoins permanents en consommables. De même, les instruments de qPCR sont plus courants dans les laboratoires et les chercheurs sont plus à l'aise avec cette plate-forme. Bien entendu, ce sont les applications souhaitées par l'utilisateur qui détermineront le type d'instrument nécessaire pour mener à bien ces études (Sanders *et al.*, 2011).

II.5.5. Applications dPCR :

Étant donné que les échantillons dPCR sont répartis dans des microréacteurs individuels, le nombre de partitions détermine la plage de sensibilité de la détection. La quantification repose sur le comptage du nombre de partitions positives au point final, par opposition aux cycles

D'amplification, et ne dépend donc pas fortement de l'efficacité de l'amplification. Pour tenir compte de la distribution aléatoire de l'ADN cible dans les partitions, le modèle statistique de Poisson est appliqué. (Sykes *et al.*, 1992), et une quantité absolue est calculée. La quantité de la séquence cible est généralement évaluée par rapport à une séquence de référence de quantité connue afin de déterminer une quantification relative. Les applications de la quantification absolue et relative de l'ADN cible comprennent la mesure des CNV, l'analyse des biomarqueurs et la détection d'événements rares. En outre, la transcription inverse peut être combinée à la dPCR pour mesurer les molécules d'ARN. Cette technique est utile pour la quantification de faibles concentrations de virus à partir d'un complexe, la transcription dans des cellules uniques et la transcription spécifique d'un allèle.

Les CNV sont des copies anormales de l'ADN dues à une délétion, une insertion ou un réarrangement et sont associées à la susceptibilité à la maladie (Shlien & Malkin, 2010), Dans le cancer, le nombre de copies de gènes est souvent augmenté et la réactivité des patients aux traitements médicamenteux est corrélée au nombre de copies. (Moroni *et al.*, 2005), De nombreuses méthodes ont été utilisées pour quantifier les CNV, notamment les réseaux SNP, le séquençage de nouvelle génération et la qPCR. Récemment, la dPCR s'est imposée comme un outil intéressant pour quantifier les biomarqueurs des patients en raison de la plus grande précision de la détermination du nombre de copies. La PCR numérique a été utilisée pour déterminer avec précision le CNV avec une résolution inférieure à $1 < 2$ (Whale *et al.*, 2012). Des sondes qPCR spécifiques améliorées par l'ajout de bases LNA peuvent être utilisées dans la dPCR pour discriminer et détecter la présence de variations SNP somatiques (**Figure 10**).

Les sondes sont conçues de telle sorte qu'une sonde spécifique de la mutation porte le fluorophore FAM et qu'une seconde sonde, spécifique de la séquence de type sauvage (WT), porte le fluorophore HEX. Les cibles d'ADN WT et SNP sont différenciées dans l'essai. Dans certains cas, des copies de gènes peuvent être « liées » sur le même allèle et, par conséquent, la CNV pourrait être sous-estimée (Sanders *et al.*, 2011). La duplication de gènes en tandem peut être résolue par digestion de l'ADN modèle avec une nucléase de restriction spécifique entourant la séquence cible (**Figure 11**) (Hindson *et al.*, 2011).

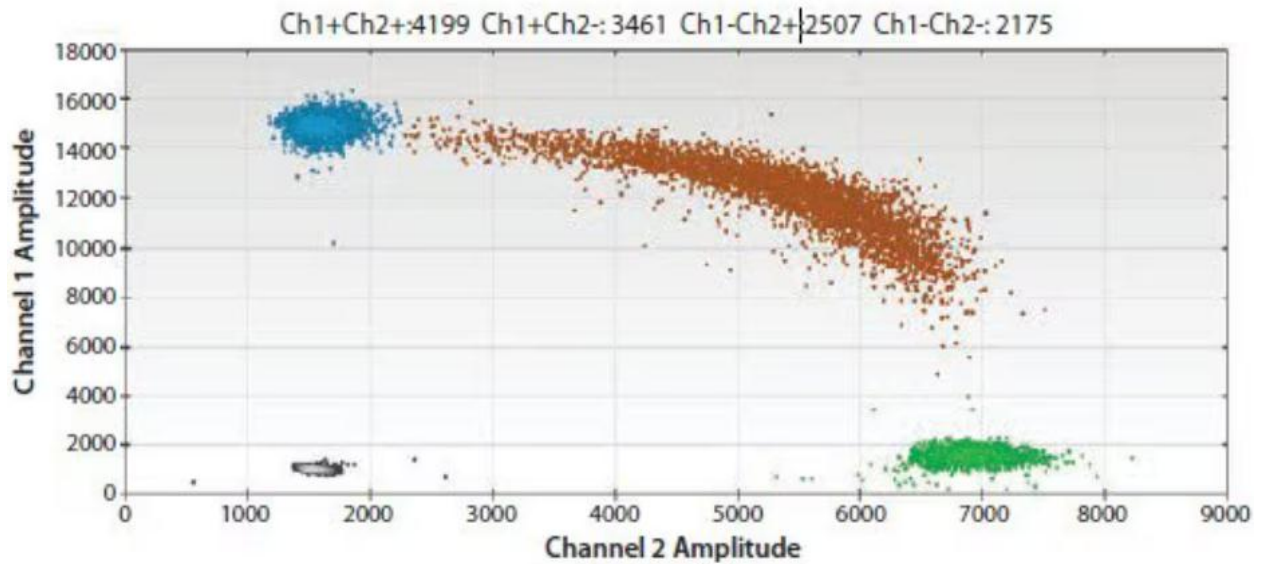


Figure 10:Détection et détermination du nombre de copies relatif d'une mutation SNP avec Droplet Digital™ PCR. Une sonde spécifique à la mutation a été préparée portant le colorant fluorescent FAM et la sonde pour la séquence non modifiée (type sauvage) (Whale *et al.*, 2012)

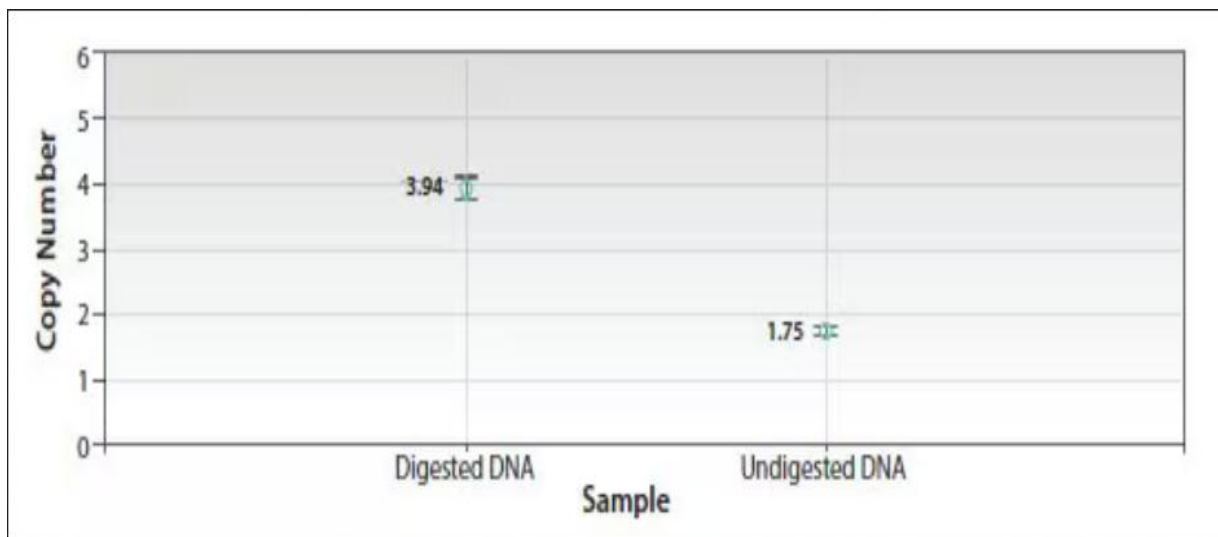


Figure 11:Essai de Droplet Digital™ PCR pour déterminer le CNV. L'ADN purifié et non digéré a été utilisé comme modèle pour quantifier le nombre de copies de gènes par rapport à la référence. Le même échantillon d'ADN a également été digéré avec un endonucléas restriction entourant la séquence cible pour élucider les copies liées de la séquence cible. Les barres d'erreur de Poisson sont indiquées (Hindson *et al.*, 2011).

La PCR numérique est utilisée pour quantifier une séquence d'ADN variante présente en arrière-plan d'une séquence WT abondante. Par exemple, les mutations somatiques spécifiques aux cancers peuvent être détectées lorsqu'elles sont présentes sur un fond de génotype normal dans des échantillons cliniques. La PCR quantitative est limitée à la détection de séquences mutantes présentes à 1 % ou plus. La PCR numérique offre un outil de détection sensible des copies rares grâce à l'effet de dilution de l'ADN cible mutant par rapport à l'ADN cible normal.

La plage dynamique de quantification est déterminée par la quantité d'ADN cible présente et le nombre de partitions évaluées. Les instruments disponibles varient en ce qui concerne la plage dynamique recommandée. Le système PCR Bio-Rad QX100™ Droplet Digital™ a été utilisé pour détecter avec précision un ADN mutant rare à partir de 100 000 fois WT. (Hindson *et al.*, 2011) et l'instrument RainDrop™ a été utilisé pour détecter une copie mutée à partir de 200 000 copies WT (Pekin *et al.*, 2011). Une évaluation typique des ensembles d'amorces/sondes à utiliser pour la détection d'événements rares consiste à titrer de l'ADN matrice contenant des SNP dans de l'ADN matrice WT, en réduisant la matrice contenant des SNP de moitié à chaque dilution. Un exemple d'expérience de ce type est présenté à la (**Figure 12**) un seul puits a permis la détection lorsque la fréquence de la séquence mutante était aussi faible qu'environ 1 sur 2,000. Alors que, par comparaison, la limite de détection de la qPCR était de 1 sur 10. La limite de détection de la dPCR peut être encore étendue en regroupant les données de plusieurs puits afin d'augmenter le nombre de partitions sans augmenter la concentration en SNP.

En raison de la quantité souvent limitée d'échantillons d'ADN disponibles pour le séquençage de la prochaine génération, les échantillons sont généralement amplifiés par PCR ou par amplification du génome entier. La quantification des molécules d'ADN après l'amplification est essentielle à la performance de l'essai de séquençage et peut être réalisée à l'aide de méthodes telles que la spectrophotométrie. Récemment, la capacité de la dPCR à quantifier l'ADN de manière absolue a été appliquée à la préparation des bibliothèques de séquençage de nouvelle génération. Un essai PCR à sonde fluorescente à matrice universelle a été mis au point, de sorte qu'une séquence spécifique à la sonde est conçue à l'extrémité d'une amorce PCR pour l'amplification de la bibliothèque. Ce test basé sur une sonde universelle peut être utilisé en conjonction avec la dPCR pour quantifier avec précision les molécules de la bibliothèque (Yuanli *et al.*, 2003).

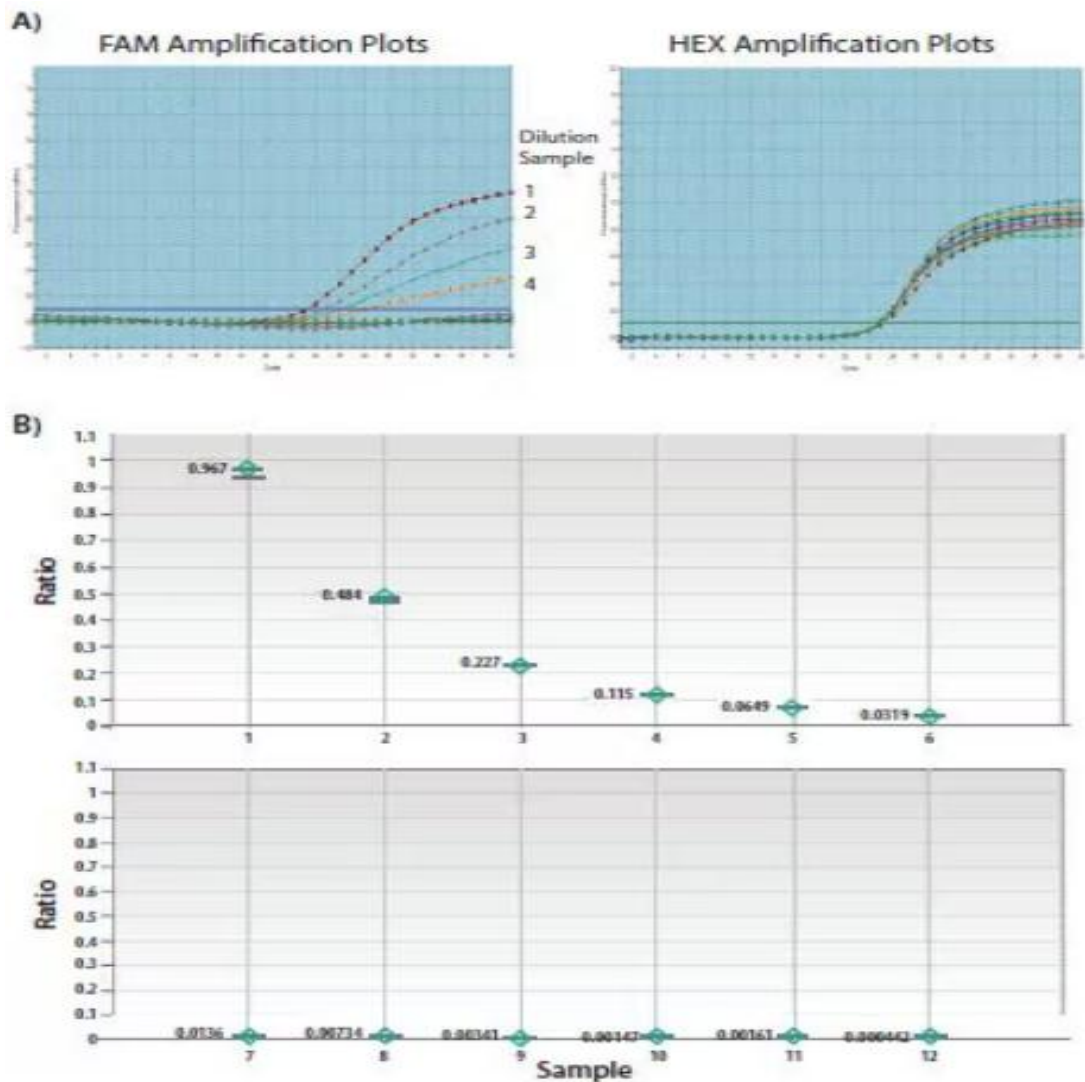


Figure 12:Évaluation de l'ensemble amorce/sonde dans l'essai Droplet Digital™ PCR et qPCR pour la détection d'événements rares. Une sonde spécifique à la mutation a été préparée avec le colorant fluorescent FAM et la sonde pour la séquence non modifiée (type sauvage) avec le fluorophore HEX. L'ADN matrice contenant un SNP a été titré dans l'ADN matrice de type sauvage afin d'évaluer la détection de la mutation SNP lorsqu'elle est présente dans un contexte de type sauvage abondant. La matrice contenant le SNP a été réduite de moitié à chaque dilution. A) L'ensemble amorce/sonde a été utilisé dans la qPCR avec l'ADN matrice titré en fonction de la mutation. B) L'ensemble amorce/sonde a été utilisé dans un seul puits de dPCR en gouttelettes avec de l'ADN testé pour la mutation. Le rapport entre les copies mutantes et les copies de type sauvage est indiqué. La PCR numérique a permis une détection lorsque la fréquence de la séquence mutante n'était que d'environ 1 sur 2 000, alors que la limite de détection de la qPCR était de 1 à 10. La limite de détection de la dPCR peut être encore étendue en agrégeant les données de plusieurs puits afin d'augmenter le nombre de partitions (Pekin *et al.*, 2011)

L'expression des gènes qui contrôlent l'activité cellulaire, y compris la différenciation cellulaire, varie entre les membres individuels des populations cellulaires et les mesures de la

population entière reflètent les valeurs moyennes²⁸. Bien qu'il soit préférable de mesurer la transcription.

Dans des cellules uniques, la quantité d'ARN présente est très faible, c'est-à-dire $<1\text{pg}$ ²⁹. Le flux de travail habituel pour l'analyse du transcriptome d'une cellule unique à l'aide de la qPCR nécessite une étape de pré amplification pour amplifier l'ADNc. En raison de sa gamme dynamique et de sa capacité à quantifier de faibles concentrations de matrice, la dPCR est une méthode appropriée pour l'analyse du transcriptome de cellules uniques sans avoir recours à la pré amplification.

II.5.6. PCR numérique MIQE :

Auparavant, les « Informations minimales pour la publication d'expériences de PCR quantitative en temps réel » (lignes directrices MIQE) (Bustin *et al.*, 2009), ont été publiées pour décrire les détails de la conception expérimentale qui sont considérés comme essentiels ou souhaitables pour la publication des résultats de la qPCR. L'ajout de la dPCR en tant que nouvel outil et l'introduction de plusieurs instruments de dPCR nécessitent l'élaboration de normes MIQE spécifiques à la dPCR. La norme MIQE pour la PCR numérique publiée (dMIQE) propose des éléments essentiels et souhaitables à prendre en compte pour la validité des données de la dPCR. Sous de nombreux aspects, y compris la conception et l'optimisation des amorces/sondes, les exigences de la dPCR sont similaires à celles de la qPCR.

Cependant, certaines propriétés sont spécifiquement pertinentes pour la dPCR. La moyenne des copies par partition et le volume de la partition sont variables et les valeurs sont nécessaires pour appliquer les statistiques de Poisson avec précision et doivent donc être indiquées. De même, le nombre de partitions à partir desquelles les résultats sont dérivés doit être documenté. Il est souhaitable d'inclure la variance et l'écart type du volume de la partition, tels que fournis par le fabricant de l'instrument. Il est essentiel d'indiquer le type et le traitement de l'ADN matrice utilisé dans l'expérience. L'ADN matrice est souvent pré amplifié ou digéré avec des enzymes de restriction. Ces méthodes et les contrôles correspondants doivent être indiqués. Il est souhaitable d'enregistrer les expériences d'optimisation, telles que le gradient de température et les déterminations du nombre de cycles.

Le volume d'échantillon nécessaire varie d'un instrument à l'autre et il est donc approprié et souhaitable de l'indiquer. Dans tous les rapports publiés, il est nécessaire d'indiquer les contrôles de réaction positive et négative ainsi que la variance calculée et les intervalles de confiance. La liste de contrôle dMIQE décrit les considérations et désigne chacune d'entre elles comme essentielle (E) ou souhaitable (D).

La dPCR étant une technologie relativement nouvelle, on peut espérer que l'adoption rapide des lignes directrices dMIQE permettra d'éviter la publication d'études réalisées sans les contrôles de qualité et les contrôles scientifiques appropriés (Huggett *et al.*, 2013).

II.6. Technologies de détection :

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe présentement quatre technologies principales : hydrolyse de sondes (Taqmanassay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (moléculaire Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers). (Wittwer *et al.*, 1997) ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité équivalente. Cependant, ces technologies présentent des différences au niveau de la spécificité (Bustin, 2000).

II.6.1. Agents se liant à l'ADN double brin (Double-Strand Ed DNA binding dyes: Light cycler assay) :

Les molécules qui se lient à l'ADN double brin peuvent être divisées en deux classes: les agents intercalant comme le bromure d'éthidium. (Higuchi *et al.*, 1992) le YO-PRO-1 le SYBR Green I et les agents se fixant au sillon mineur (minor groove binders) comme le Hoeschst 33258, Leur émission fluorescente augmente lorsque qu'ils sont liés à l'ADN double brin.

Pour être utilisés dans une réaction de PCR en temps réel, ces agents doivent rencontrer deux exigences : augmenter en fluorescence lorsque lié à l'ADN double brin et ne pas inhiber la réaction de PCR. Le SYBR Green I, dont le mécanisme de liaison n'est pas bien défini, est l'agent le plus fréquemment utilisé. Ses avantages sont qu'il est économique, facile à utiliser et possède plus de sensibilité que le bromure d'éthidium sans inhiber la réaction d'amplification. 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. **(Figure 13)** (Bustin, 2000).

La technologie basée sur le SYBR Green I ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur ses amorces Elle ne requiert donc aucune expertise particulière pour le design des sondes fluorescentes et n'est pas affectée par des mutations dans l'ADN cible qui influencent l'hybridation des sondes spécifiques Étant donné que le SYBR Green I se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, cette technologie présente une certaine versatilité puisque le même agent peut être utilisé pour détecter plus d'un produit d'amplification dans la même séquence réactionnelle (Nitsche et al., 2002).

Cette technologie présente aussi certains désavantages: 1 (étant donné que l'ADN double brin total émet des signaux, il devient impossible en cours de réaction de s'assurer de la spécificité des amplicons ou de discriminer les différents amplicons dans le cas de multiplexage; 2(le mauvais appariement (mis-primering), générant souvent des bandes d'ADN superflues observables sur gel d'électrophorèse, peut conduire à des faux positifs ou une surestimation de la quantification; 3(l'émission de fluorescence peut être biaisée par la masse moléculaire de l'ADN amplifié par amplicons plus long qui fixera davantage de molécules fluorescentes par rapport à un amplicons plus court dans lamée réaction (Bustin, 2000).

II.6.2. Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay) :

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) (ex. FAM : 6-carboxyfluorocein) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Lorsque stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe

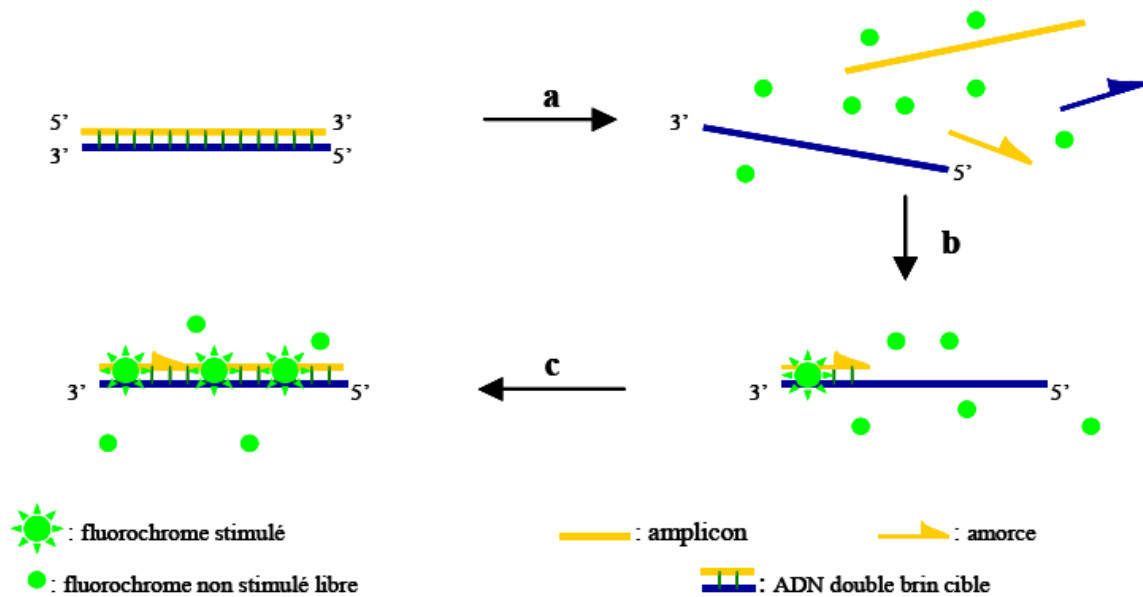


Figure 13: Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes: Light cycler assay) (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel (Bustin, 2000)

FRET (fluorescence résonance énergie Transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence (Nitsche et al., 2002). Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique.

Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (**Figure 14A**). Comme la Taq polymérase hydrolyse la sonde seulement lorsque celle-ci est hybridée à sa séquence complémentaire, les conditions de température de l'étape de polymérisation doivent être ajustées de façon à permettre à la sonde détectée hybridée durant cette étape. La majorité des sondes sont une température de dissociation.

(T_m) autour de 70°C ou de 5 à 10 °C plus élevée que les amorces. Par conséquent, la technologie Taqman utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62°C

assurant l'hybridation et la stabilité de la sonde durant l'extension. Ceci permet aussi une activité 5-exonucléasique maximale de la Taq polymérase mais, l'efficacité de l'activité dépolymérisation de l'enzyme sera légèrement réduite à cette température suboptimale.

Pour de longs amplicons, une étape d'hybridation/polymérisation plus longue ou encore une augmentation de la concentration en Mn^{2+} ou Mg^{2+} pourrait s'avérer nécessaire pour stabiliser l'hybridation de la sonde à sa séquence cible. Les principes à respecter dans le design des sondes Taqman sont aussi applicables aux autres sondes linéaires et comprennent comme règles générales : 1) une longueur de 20-40 nucléotides, 2) un contenu en G-C variant de 40-60%, 3) aucun patron de séquence répétée, 4) aucune séquence permettant une hybridation ou un chevauchement avec les amorces, 5) un A, un C ou un T à l'extrémité 5' parce qu'un G supprime la fluorescence de l'émetteur même après clivage et, 6) un T_m de 5 à 10 °C plus élevé que les amorces afin de s'assurer qu'elles s'hybrideront avant les amorces et qu'elles demeureront hybridées pendant l'étape combinée d'hybridation et de polymérisation (Nitsche et al., 2002).

Les sondes fluorescentes possèdent comme avantage par rapport aux agents se liant à l'ADN une spécificité accrue et une meilleure capacité de multiplexage. La spécificité d'hybridation entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces (primer-dimers). Des réactions multiplexes peuvent être élaborées en utilisant des fluorochromes émetteurs distincts liés à des sondes différentes dans une même réaction de PCR. La technologie Taqman est toutefois moins efficace et moins flexible que d'autres technologies en temps réel pour la détection de mutations spécifiques.

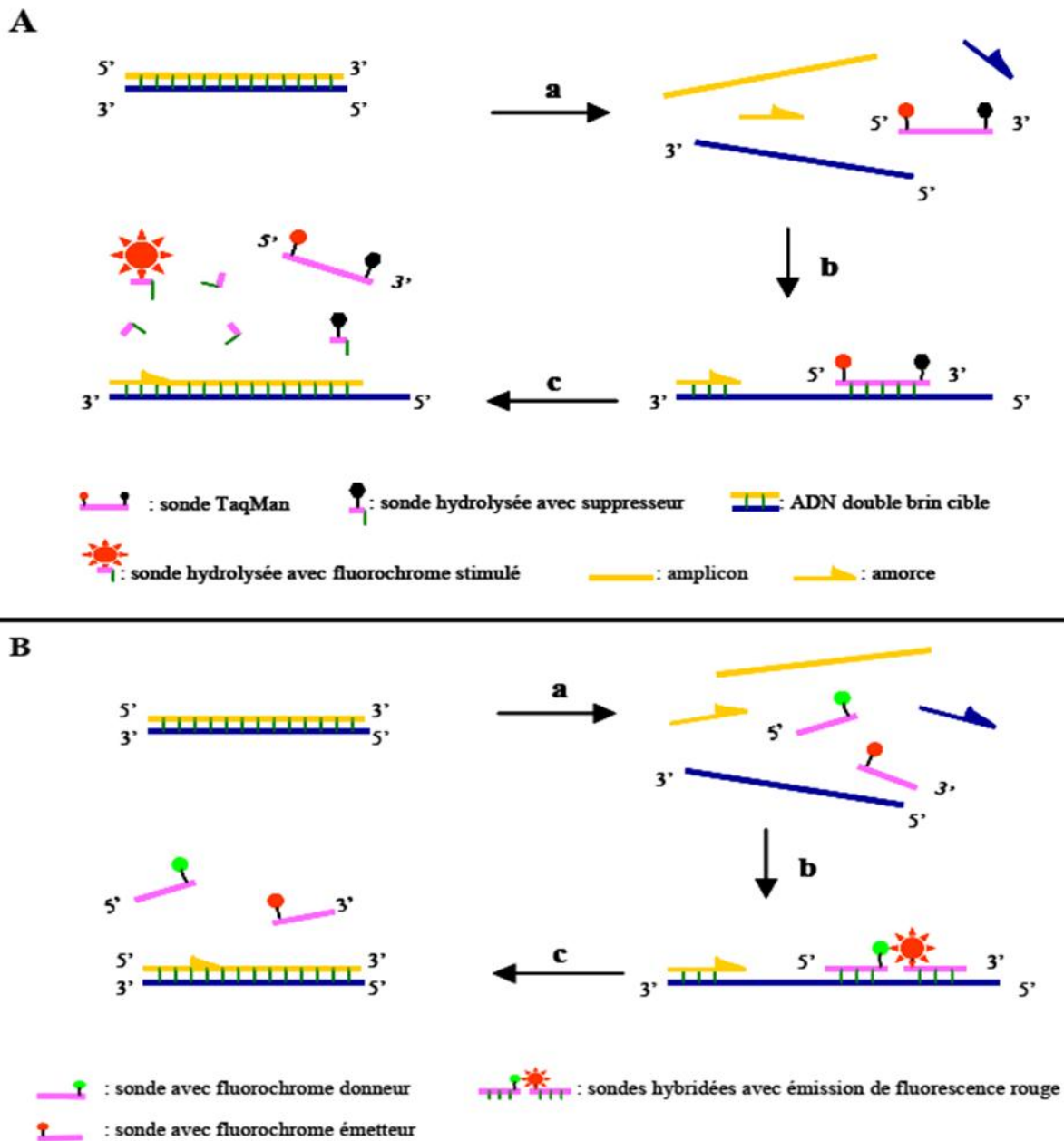


Figure 14:Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du supprimeur permettant ainsi l'émission de la fluorescence. **B:** Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes) (a) Durant l'étape de dénaturation, les deux sondes demeurent séparées et en solution. (b) À la température d'appariement, les sondes s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'émission de fluorescence rouge par le principe FRET. (c) Les sondes retournent libres en solution (Bustin, 2000)

La technologie Taqman est toutefois moins efficace et moins flexible que d'autres technologies en temps réel pour la détection de mutations spécifiques. (Bustin, 2000)

II.6.3. Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes) :

Cette technologie est aussi connue sous le nom de HybProbes et repose sur l'utilisation de deux sondes linéaires complémentaires à une séquence cible pour maximiser la spécificité du signal (Wittwer *et al.*, 1997). Une première sonde, bloquée à son extrémité 3' afin de prévenir son extension durant l'étape d'élongation, transporte en 3' un fluorochrome donneur (FITC) qui produit une lumière fluorescente verte lorsque excité par une source de lumière. Son spectre d'émission est plus large que celui du fluorochrome accepteur (Red 640 ou Red 705) attaché à l'extrémité 5' d'une seconde sonde. En solution, les deux sondes sont libres et séparées. Étant donné que le transfert d'énergie par le principe FRET dépend de la distance entre les deux fluorochromes, il en résulte alors seulement un bruit de fond de fluorescence verte émis par le fluorochrome donneur. Pendant l'étape d'hybridation, les deux sondes se fixent à leurs séquences cibles respectives localisées à moins de 10 nucléotides (Nitsche *et al.*, 2002), dans un arrangement en tête-à-queue.

La proximité des deux fluorochromes permet le transfert énergétique de la fluorescéine verte par le principe FRET au fluorochrome accepteur rouge et provoque son émission fluorescente. Pendant l'étape de polymérisation, les deux sondes retournent de façon indépendante en solution ce qui supprime l'émission de fluorescence rouge (**Figure14 b**). L'accroissement de la fluorescence rouge est proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé durant la réaction PCR et commence à diminuer lorsque la quantité d'amplicons produits devient suffisamment importante pour provoquer une compétition de l'ADN amplifié avec l'hybridation simultanée des 2 sondes sur l'ADN cible. Cette technologie possède donc une grande spécificité et permet aussi une grande flexibilité dans le design des sondes. De plus, comme les sondes ne sont pas hydrolysées, elles sont réutilisées à chacun des cycles (Bustin, 2000). En plus du fait que la séquence cible doit être localisée vers l'extrémité 3' de l'amplicons et que le T_m des deux sondes doit être similaire, les principes généraux dans le design des sondes Taqman sont applicables pour cette technologie.

II.6.4. Balises moléculaires (sonde d'hybridation en épingle à cheveux: Molecular Beacons) :

Une balise moléculaire est une sonde d'hybridation d'ADN en forme d'épingle à cheveux. La portion de la sonde qui compose la boucle est complémentaire à la séquence cible d'ADN. Le tronc de la balise moléculaire est formé de deux bras avec des séquences complémentaires (Tyagi & Kramer, 1996).

Un émetteur fluorescent (FAM, TAMRA, TET, ROX) est fixé à l'extrémité d'un des bras et un suppresseur (quencher) (4-4'-diméthylamino-phenylazo) - benzene: DABCYL) est fixé à l'extrémité de l'autre bras. Le suppresseur est un chromophore non-fluorescent qui dissipe en chaleur l'énergie du fluorochrome émetteur par le principe FRET. Les sondes libres adoptent en solution une structure en épingle à cheveux et le tronc maintient les bras ensemble pour une suppression efficace de l'émission de fluorescence. Pendant l'étape d'hybridation, lorsque la sonde rencontre une séquence qui lui est complémentaire, elle adopte une conformation transitoire qui force le tronc à se séparer libérant ainsi les 2 bras. La sonde s'hybride alors préférentiellement à sa séquence complémentaire cible sur la matrice.

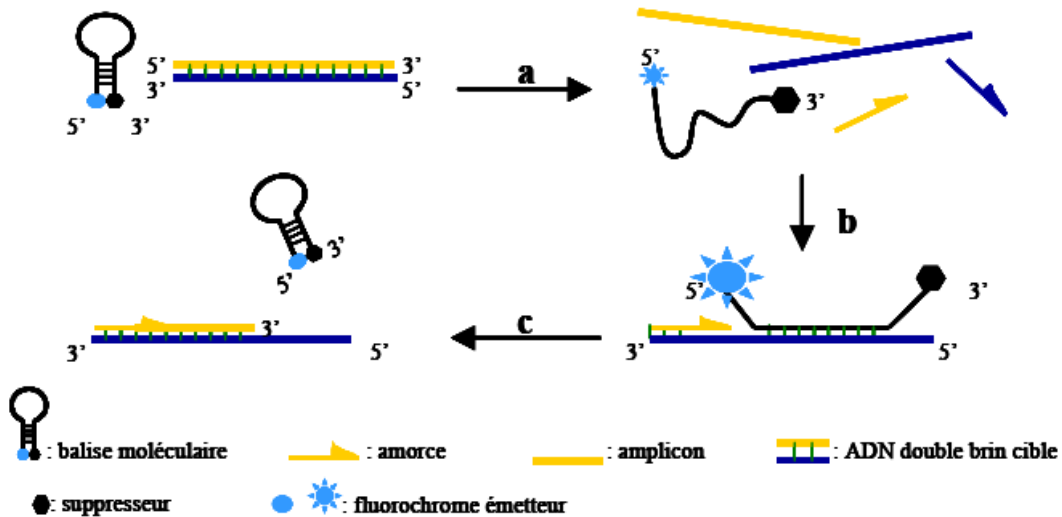
Dans cette conformation, le fluorochrome émetteur est éloigné de son suppresseur restaurant ainsi l'émission de fluorescence qui peut être détectée alors que les autres balises moléculaires demeurent en structure d'épingle à cheveux (position fermée).

Si la séquence d'ADN cible ne correspond pas parfaitement (mismatch) à la séquence de la balise moléculaire aucune hybridation et, par conséquent, aucune émission fluorescente ne survient. Ceci est principalement dû aux propriétés thermodynamiques de la structure de la balise moléculaire qui favorisent surtout la formation de l'épingle à cheveux sauf en cas d'hybridation parfaite des séquences. (Bustin, 2000), (**Figure 15 A**). La spécificité de cette technologie est telle qu'elle permet de détecter les différences de séquences au nucléotide près, ce qui peut être parfois difficile à réaliser avec les technologies de sondes linéaires (Marras *et al.*, 1999), Elle constitue donc une technologie efficace pour la détection et le criblage à grande échelle des SNPs (single nucléotide polymorphismes) (Mhlanga & Malmberg, 2001).

Les sondes sont dessinées pour demeurer intactes durant la réaction d'amplification et doivent se réhybrider à la cible à chaque cycle pour mesurer le signal constituant ainsi un autre avantage par rapport aux sondes Taqman hydrolysées à chaque cycle. Le désavantage le plus important associé à l'utilisation des balises moléculaires est le design des sondes d'hybridation. Un design optimal du tronc des balises moléculaires est crucial. Avec un design non adéquat, le tronc pourrait adopter une conformation différente qui éloignerait le fluorochrome émetteur de l'environnement immédiat du suppresseur résultant ainsi en une population de sondes mal supprimées et un bruit de fond important. En contrepartie, si les forces d'hybridation du tronc (dépendantes de la longueur et de la composition des séquences complémentaires des bras) sont trop importantes, elles peuvent interférer avec l'hybridation de la balise moléculaire à sa séquence complémentaire cible et l'émission de fluorescence. Un profil de dénaturation thermique précis de chacune des balises moléculaires doit être établi pour déterminer les caractéristiques de dissociation (melting) des bras. Plusieurs variantes de cette Technologie

comme les Sunrise primers (maintenant sous appellation commerciale Amplifluor™ hairpin primers) (Myakishev *et al.*, 2001), les cyclicons et les amorces scorpion et (Mhlanga & Malmberg, 2001), ont été proposées pour la détection d'acides nucléiques spécifiques dans des solutions homogènes. solutions homogènes.

A



B

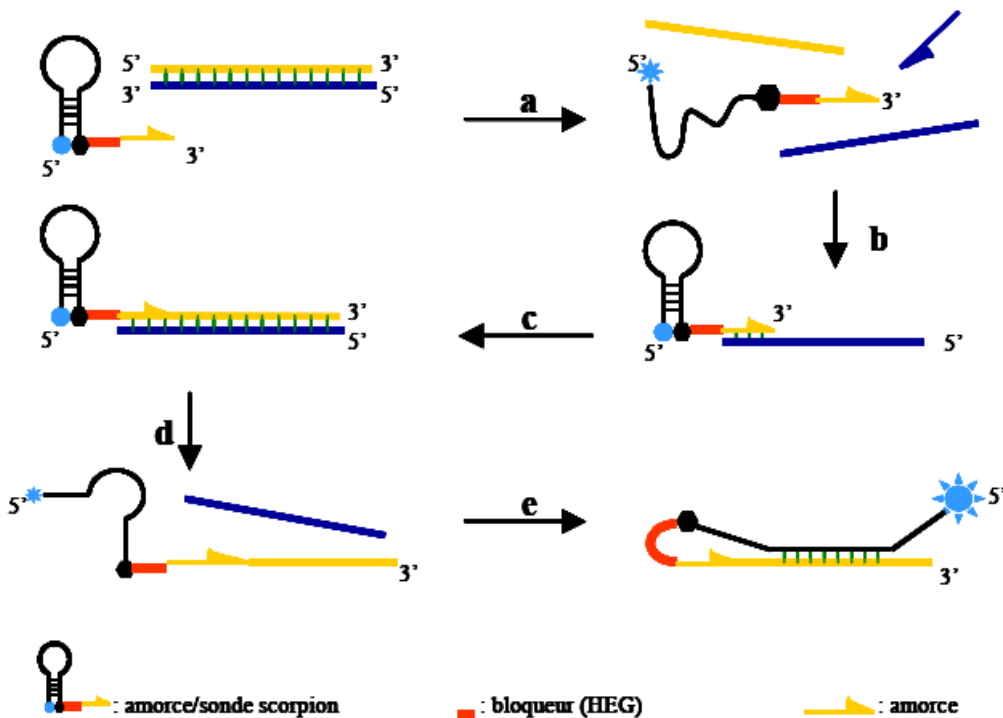


Figure 15: Balises moléculaires (Molecular Beacons). (a) Durant l'étape de dénaturation, la balise moléculaire est sous forme relaxée et libre en solution mais la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. (b) Lorsque la sonde s'hybride à sa séquence cible, le fluorochrome émetteur est suffisamment éloigné de son supprimeur pour permettre l'émission de fluorescence. (c) À l'étape de polymérisation, la balise moléculaire retourne en solution sous forme d'épingle à cheveux. B: Amorces scorpion (Scorpion primer).

(a) Durant l'étape de dénaturation, la balise moléculaire est sous forme relaxée et libre en solution mais la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. (b) L'amorce scorpion se fixe à sa séquence complémentaire cible. (c) Polymérisation du brin complémentaire. (d) Dénaturation des brins d'ADN. (e) Hybridation de la séquence complémentaire de la partie balise moléculaire à sa séquence cible permettant l'émission de fluorescence (Bustin, 2000).

II.6.5. Amorces scorpion (Scorpion primer : self-fluorescing amplicon) :

Les amorces scorpion représentent une variante de la technologie des balises moléculaires. Les fluorochromes et la sonde (partie balise moléculaire) sont intégrés à même l'amplicon de façon irréversible durant l'amplification par PCR. Le design d'une amorce/sonde scorpion est pratiquement similaire à celui des balises moléculaires. L'ajout d'une molécule d'hexéthylène glycol (HEG), aussi appelé bloqueur (stopper), est nécessaire pour empêcher la réplication de la balise moléculaire par l'ADN polymérase pendant la réaction de PCR. Le HEG est donc situé après le fluorochrome supresseur et est suivi d'une région amorce. Le fluorochrome émetteur porté en 5' de la région balise moléculaire peut être le FAM ou le ROX et le supresseur est normalement le rouge de méthyl. La région amorce du scorpion permet donc d'intégrer la balise moléculaire dans le nouvel amplicon pendant la réaction de PCR. La boucle de l'épingle à cheveux est dessinée dans le but de permettre l'hybridation de la sonde à sa séquence complémentaire cible située sur l'amplicon (**Figure 15B**). Cette hybridation force l'épingle à cheveux à changer de conformation permettant ainsi l'émission de fluorescence. (Whitcombe *et al.*, 1999), rapportent que la technologie amorce/sonde scorpion est généralement plus efficace que les technologies Taqman et balises moléculaires, particulièrement dans un programme de PCR possédant des cycles très courts.

Chapitre III: Applications

De La Pcr

Chapitre III. Applications de la Pcr :

III.1. Diagnostic médical :

Les techniques moléculaires modernes ont révolutionné l'identification et la caractérisation des micro-organismes dans divers domaines du diagnostic médical, notamment la virologie, la mycologie, la parasitologie, la microbiologie et la dentisterie. La réaction en chaîne par polymérase (PCR), l'une de ces techniques, a apporté des avantages considérables et favorisé des progrès scientifiques majeurs. La PCR est une technique efficace pour identifier rapidement les agents infectieux, y compris ceux difficiles à cultiver. Complémentaire à la PCR conventionnelle, la PCR en temps réel s'est imposée comme une avancée technologique majeure, jouant un rôle de plus en plus important dans le diagnostic clinique et les études de laboratoire. Capable de fournir des résultats à la fois qualitatifs et quantitatifs, la PCR en temps réel s'est imposée comme une méthode rapide et précise. Cette revue de la littérature examine les applications cliniques et les perspectives des tests PCR conventionnels et en temps réel dans divers domaines médicaux, en soulignant leurs principales utilisations et avancées (Regina & Klein, 2009).

III.1.1. Principes et Applications en Virologie :

Les progrès récents en biologie moléculaire ont permis la détection et l'analyse précises des acides nucléiques viraux. Des méthodes telles que la réaction en chaîne par polymérase (PCR) facilitent l'amplification de séquences spécifiques d'intérêt. Les avancées technologiques dans les systèmes de détection de séquences génétiques ont également permis une caractérisation complète des virus, notamment les sous-types, les génotypes, les variations, les mutations et les profils de résistance génotypique. (Nitsche *et al.*, 2002), Le développement de la PCR en temps réel a facilité non seulement la détection, mais aussi l'amplification des produits de PCR, faisant de cette technique un outil particulièrement performant pour quantifier un large éventail de séquences virales et généralement plus précis que les autres méthodes quantitatives. Elle permet également une détection qualitative, avec des résultats automatisés pour la quantification et la classification des acides nucléiques viraux. Ce domaine de recherche connaît une croissance rapide, avec de nombreux exemples publiés de détection et de quantification de régions virales spécifiques (Hodinka, 1998).

L'introduction des techniques moléculaires a grandement amélioré le diagnostic de nombreux virus et le suivi des thérapies antivirales, notamment le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) (Schuurman & Descamps, 1996), le virus de l'hépatite B (VHB) et le cytomégalo virus humain (VHC). Cette méthode a également conduit au développement de tests d'amplification pour la quasi-totalité des virus humains, y compris ceux faciles à cultiver comme le HSV-1 et le HSV-2 (virus de l'herpès simplex de types 1 et 2) (Espy *et al.*, 2000).

Les techniques moléculaires modernes offrent de nombreux avantages, notamment dans les contextes où la culture virale conventionnelle est impossible. L'intégration de la biologie moléculaire au diagnostic clinique a réduit le recours à la culture virale. L'automatisation des procédures d'extraction et de détection, combinée à un contrôle qualité rigoureux, devrait convaincre la communauté clinique de l'importance du diagnostic moléculaire en virologie. La capacité à exclure une infection virale permet d'éviter des soins inutiles, tels que l'utilisation d'antibiotiques ou d'antiviraux puissants, et contribue à réduire les coûts pour les patients. Ces méthodes sont donc essentielles à la mise en œuvre de protocoles thérapeutiques optimaux (Nitsche *et al.*, 2002).

L'utilisation de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel est particulièrement utile pour le dépistage des virus responsables de maladies infectieuses. La plupart des expériences publiées démontrent une détection accrue des virus grâce à cette technique, ce qui la rend fondamentale dans de nombreux domaines de la virologie. Cette technique est particulièrement appréciée pour sa capacité à détecter rapidement les variants viraux et leurs syndromes associés (Furuta & Ohtani, 2001). De plus, sa capacité à identifier les acides nucléiques viraux en une seule réaction la rend indispensable dans les études épidémiologiques. L'utilisation de nouveaux réactifs a amélioré la discrimination des génotypes viraux en une seule réaction, offrant une méthode alternative de détection des virus basée sur l'analyse des taux de morbidité et de mortalité.

Historiquement, le diagnostic des infections virales était limité par les coûts élevés, le temps de laboratoire et le besoin de personnel hautement qualifié en culture cellulaire. De plus, la sensibilité limitée et la croissance lente des virus en cultures artificielles posaient des défis importants. La réaction en chaîne par polymérase (PCR) a révolutionné la détection virale, rendant de nombreux diagnostics plus rapides et plus précis (Speers, 2006).

III.1.2. Principes et applications en mycologie et parasitologie :

La capacité à identifier précisément les micro-organismes est essentielle à tous les aspects de l'épidémiologie et du diagnostic fongiques. En phytopathologie, l'identification précoce des agents pathogènes est essentielle à leur reconnaissance (Maccartney & Foster, 2003).

Au cours de la dernière décennie, des progrès significatifs ont été réalisés dans le diagnostic moléculaire des champignons grâce à la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR). Contrairement aux techniques conventionnelles, le test PCR peut être réalisé directement sur des échantillons et isolé sans culture. Cette méthode, rapide et très précise, facilite la détection d'ADN fongique résiduel dans les échantillons environnementaux avant l'apparition des symptômes, permettant ainsi la mise en œuvre précoce de mesures de lutte contre la maladie. Le test PCR peut être réalisé en routine sans nécessiter de compétences spécialisées pour analyser les résultats.

Cette technique peut également fournir des données quantitatives plus précises, apportant des informations complémentaires essentielles à la prise de décision et à l'évaluation de l'efficacité des agents antifongiques en lutte biologique. Introduite au milieu des années 1980, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) s'est imposée comme une pierre angulaire de la technologie de l'ADN et a ouvert la voie au développement de nombreuses techniques connexes. Elle se caractérise par sa capacité à identifier de grandes quantités d'ADN amplifié à partir d'une ou de quelques séquences d'amorces. La PCR conventionnelle ne permet pas une identification quantitative, mais uniquement qualitative. Elle a été utilisée pour localiser, surveiller et identifier des champignons à partir d'une large gamme d'échantillons environnementaux et constitue le cœur du diagnostic moléculaire fongique (Atkins & Clark, 2004).

La PCR *in situ* en fluorescence utilise des sondes ou des amorces fluorescentes pour localiser les champignons dans des échantillons environnementaux semi-perméables et fixes. Un microscope confocal (est un type de microscope qui utilise un système de focalisation pour créer des images de très haute résolution, avec une très faible profondeur de champ) est utilisé pour détecter la fluorescence des sondes ou des amorces. Cette méthode permet l'identification directe de l'organisme dans l'échantillon et révèle sa distribution spatiale, ses interactions avec l'hôte et ses interactions avec d'autres organismes. Beach, Simon et Bago ont utilisé la PCR *in situ* en fluorescence pour localiser les sites d'infection causés par des champignons mycorhiziens filamenteux. Les applications de la PCR sont illimitées (Bago *et al.*, 1998), Elle peut être utilisée pour étudier une espèce spécifique ou des groupes de communautés entiers (Dahllof, 2002).

Pneumocystis jirovecii (anciennement *Pneumocystis carinii*) peut provoquer une pneumonie grave chez les personnes infectées par le VIH ou immunodéprimées. Cependant, le diagnostic se limite à l'examen microscopique d'échantillons respiratoires. L'utilisation de colorants est généralement nécessaire pour identifier *Pneumocystis jirovecii* par microscopie. L'immunofluorescence est plus sensible que ces colorants, mais elle est plus coûteuse et nécessite une infrastructure spécialisée. La réaction en chaîne par polymérase (PCR) présente une sensibilité accrue, en particulier chez les patients séronégatifs pour le VIH, et peut donc s'avérer très utile. La PCR a une spécificité limitée ; cependant, en raison de la prévalence de ce micro-organisme, il peut être identifié par PCR même en l'absence de maladie (Helweg-Larsen & Jensen, 2002).

Une autre application de la PCR en mycologie est l'identification des infections à *Aspergillus ssp.* Chez les patients atteints de neutropénie. Le diagnostic de cette affection est extrêmement complexe en raison de la sensibilité limitée de la technique de culture et de la difficulté d'obtenir des échantillons de tissus pathologiques chez les personnes présentant une faible numération plaquettaire. Une intervention rapide est essentielle pour optimiser les résultats. La PCR peut réduire le délai nécessaire à un diagnostic définitif (Williamson & Leeming, 2000), La PCR en temps réel a été utilisée pour évaluer avec précision le nombre de micro-organismes pathogènes, facilitant ainsi les décisions concernant la prise en charge des infections fongiques et l'évaluation de leurs effets. Les méthodes moléculaires facilitent le diagnostic parasitologique. De nombreux parasites ne peuvent pas être cultivés en laboratoire, et le diagnostic repose principalement sur la sérologie et la microscopie, qui sont relativement moins sensibles. La microscopie reste une méthode de diagnostic du paludisme ; cependant, sa sensibilité accrue permet à la réaction en chaîne par polymérase (PCR) de détecter cette maladie même dans des conditions difficiles. Différentes espèces de *Plasmodium* peuvent également être détectées dans différents états d'infection, ce qui peut entraver leur identification microscopique (Speers *et al.*, 2003).

III.1.3. Principes et applications en microbiologie :

L'identification des agents pathogènes microbiens dans les laboratoires de microbiologie clinique repose sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) conventionnelle, une méthode utilisée depuis plus de dix ans. Cependant, pour diverses raisons, cette méthode se limite à l'identification des micro-organismes à croissance lente ou non cultivables. La plupart des tests PCR conventionnels comportent plusieurs étapes et nécessitent donc des connaissances approfondies. Ces tests nécessitent souvent du temps et des techniques de culture, ce qui augmente les coûts.

La PCR conventionnelle utilise également un système de réaction ouvert et est plus sensible à la contamination par de l'ADN étranger amplifié. Des tests PCR standard ont été développés pour *Bacillus anthracis* (Bell *et al.*, 2002), et pour le virus variolique. Cependant, leur validation clinique est entravée par le manque d'échantillons de patients. La PCR en temps réel a des implications importantes et immédiates pour les tests diagnostiques dans les laboratoires de microbiologie clinique. Grâce à sa sensibilité améliorée, sa simplicité d'utilisation et sa rapidité, cette technique représente une option intéressante pour l'identification des micro-organismes chez l'homme (Chaitanya & Breslin, 2018).

III.1.4. Bactériologie :

Un large éventail d'infections, généralement associées à des taux élevés de morbidité et de mortalité, sont attribuées aux bactéries anaérobies. Bien que diverses espèces de ces bactéries soient couramment identifiées dans diverses infections, les données indiquent qu'un certain nombre de ces micro-organismes cliniquement importants restent mal caractérisés en raison des limites des techniques bactériologiques anaérobies traditionnelles et des tests phénotypiques. Selon des recherches récentes, 50 à 75 % des bactéries anaérobies sont correctement caractérisées, et 27 % des laboratoires ont déclaré ne jamais les avoir identifiées. (Andrews *et al.*, 1996). Cela est principalement dû à la complexité, au coût et au temps considérable de l'identification traditionnelle. Elle est également peu fiable en raison de son recours à une taxonomie obsolète. Les méthodes de détection moléculaire constituent une approche efficace pour identifier ces micro-organismes dans les relations hôte-parasite, permettant des classifications taxonomiques plus claires de pathogènes spécifiques. Par conséquent, le génotypage est de plus en plus utilisé pour caractériser les microbes. Les génotypes sont plus précis, plus faciles à quantifier et à standardiser entre les espèces que les marqueurs phénotypiques traditionnels.

Les méthodes de détection moléculaire constituent une approche efficace pour identifier ces micro-organismes dans les relations hôte-parasite, permettant des classifications taxonomiques plus claires de pathogènes spécifiques. Par conséquent, le génotypage est de plus en plus utilisé pour caractériser les microbes. Les génotypes sont plus précis, plus faciles à quantifier et à standardiser entre espèces que les marqueurs phénotypiques traditionnels. Au cours de la dernière décennie, le diagnostic bactérien moléculaire a connu des avancées significatives, notamment la découverte révolutionnaire de la réaction en chaîne par polymérase (PCR). La PCR en temps réel, une technologie relativement récente, est utilisée pour identifier et quantifier les bactéries anaérobies. Elle permet d'amplifier l'ADN et d'identifier et de valider des

séquences spécifiques de micro-organismes. Chaque cycle en temps réel offre également une sensibilité accrue (Yang & Rothman, 2004).

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été utilisée pour détecter des bactéries du tractus génital, telles que *Lactobacillus*, *Gardnerella vaginalis* et *Mycoplasma hominis* (Zariffard *et al.*, 2002). Dans une autre étude, (Aliyu & Ibrahim, 2014), a identifié *Fusobacterium necrophorum* comme une cause de pharyngite aiguë. Plusieurs études utilisent la PCR en temps réel pour caractériser les communautés bactériennes intestinales humaines. L'identification des infections causées par certaines bactéries a grandement bénéficié de la détection moléculaire. Nombre de ces bactéries posent des problèmes de santé publique, comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Bordetella pertussis* (Werrett *et al.*, 1985).

Les méthodes de tests moléculaires présentent l'avantage de réduire les longs délais d'exécution, qui peuvent s'étendre sur plusieurs jours, voire plusieurs semaines, et permettent une détection et un traitement plus rapides dès les premiers stades. Des tests commerciaux sont disponibles pour *Mycobacterium tuberculosis*, le complexe *H. avium*, *C. trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* (Yang & Rothman, 2004).

Grâce à leur sensibilité accrue, l'utilisation de techniques moléculaires pour identifier les bactéries sexuellement transmissibles a augmenté le taux de cas confirmés en laboratoire de maladies causées par ces bactéries. Les tests de santé sexuelle traditionnels nécessitent un spéculum vaginal pour les femmes et un écouvillon urétral pour les hommes. Ces tests nécessitent un équipement spécialisé et peuvent être source d'inconfort et de gêne. La détection moléculaire est une technique non invasive qui renforce la confiance et réduit l'inconfort. Les tests moléculaires couvrent également divers agents infectieux liés à la reproduction, tels que *Chlamydia trachomatis* (Speers, 2006).

III.1.5. Tests génétique et dépistage de maladies héréditaires :

III.1.5.1. Maladie parodontale :

Codage des micro-organismes présents, même à l'état de traces. La méthode de réaction en chaîne par polymérase (PCR) permet l'amplification de l'ADN bactérien ciblé à partir des poches parodontales, permettant ainsi une identification précise des principales espèces pathogènes telles que *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*. Contrairement aux méthodes conventionnelles, la PCR réduit considérablement le risque de faux positifs en évitant les réactions croisées entre espèces similaires. De plus, la PCR permet de

dépister plusieurs agents pathogènes dans un seul échantillon, simplifiant ainsi le diagnostic, la planification du traitement et le suivi de l'évolution des maladies parodontales. Cette section met en évidence les avantages de la PCR pour l'identification des agents pathogènes responsables des maladies parodontales. Un résumé et une explication des points clés sont fournis ci-dessous :

❖ **Efficacité de la PCR (réaction en chaîne par polymérase):**

Elle a été décrite comme la technique la plus simple et la plus rapide pour identifier les agents infectieux dans les échantillons cliniques, surpassant les méthodes traditionnelles.

❖ **Avantage de la culture bactérienne :**

À l'opposé des méthodes de culture microbiologique accompagnées d'analyses biochimiques, la PCR est plus simple à mettre en œuvre et moins gourmande en temps.

❖ **Sensibilité et spécificité :**

Elle offre d'excellentes limites de détection (permettant d'identifier des traces d'ADN pathogène) et réduit les réactions croisées, c'est-à-dire les faux positifs dus à l'ADN de bactéries similaires. En résumé, la PCR est progressivement devenue la technique privilégiée pour identifier les bactéries responsables de la parodontite, en raison de sa rapidité, de sa précision et de sa facilité d'application en milieu clinique. Barra et Slotts (1977) ont exploré l'implication potentielle de divers virus humains dans les maladies parodontales. Ils ont mené des recherches pour détecter la présence du cytomégalo virus humain (HCMV), du virus d'Epstein-Barr de types 1 et 2 (EBV 1 et 2), du virus de l'herpès simplex (HSV), du virus du papillome humain (HPV) et du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans le liquide crânien de personnes atteintes de diverses formes de maladies parodontales. Ces virus ont été détectés par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Des recherches ont démontré la présence de ces virus dans des cas avancés de lésions parodontales chez l'adulte (Saygun *et al.*, 2002), La présence du HCMV a été confirmée à plusieurs reprises dans les échantillons. Les chercheurs ont décrit ces premiers travaux comme une avancée majeure dans la compréhension des processus moléculaires impliqués dans la pathogenèse de *Porphyromonas gingivalis* en milieu buccal. Grâce à la réaction en chaîne par polymérase (PCR), ils ont pu mesurer avec précision l'expression des gènes malins dans des échantillons cliniques, facilitant ainsi une relation plus directe entre la présence de *Porphyromonas gingivalis*, son activité génétique et la gravité des lésions parodontales.

En étudiant l'expression des facteurs de virulence de *Porphyromonas gingivalis* dans le contexte de la parodontite, Shelburne (Shelburne & Gleason, 2002), a modifié les techniques de

quantification et d'activation génique, les conduisant à utiliser la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qRT-PCR) pour examiner l'expression génique in vivo dans la bouche de *P. gingivalis* anaérobie. Ils ont donc présenté des résultats préliminaires obtenus par PCR en temps réel, en se concentrant sur un ensemble sélectionné de facteurs de virulence. De plus, Matto (Matto *et al.*, 1998), a comparé l'efficacité de cette méthode de PCR pour détecter *P. gingivalis* à partir d'échantillons de salive à celle de cultures bactériennes (Sakamoto & Takeuchi, 2001), Ils ont également utilisé la PCR pour identifier et caractériser *Treponema socranskii*, un microbe associé aux maladies parodontales et responsable de gingivites chez les enfants et les adultes. Leurs recherches ont montré que la réaction en chaîne par polymérase (PCR) offre une capacité de détection trois fois supérieure dans la salive par rapport à la culture. De plus, *T. socranskii* s'est avéré plus abondant dans les échantillons de plaque sous-gingivale que dans les échantillons de salive.

Français La recherche a démontré la faisabilité de la détection d'Actinobacillus actinomycetemcomitans par réaction en chaîne par polymérase (PCR), mettant en évidence des profils distincts selon les groupes étudiés : 70 % chez les personnes atteintes de maladie parodontale contre 19 % chez les personnes en bonne santé. Ces études ont également démontré que la PCR offre une sensibilité et une spécificité supérieures aux techniques d'implants dentaires conventionnelles (Tran & Rudney, 1999), Okada. (Okada *et al.*, 2000) La PCR a été utilisée pour détecter la présence d'A. actinomycetemcomitans et de *P. gingivalis* dans des échantillons de plaque dentaire prélevés sur des brosses à dents d'enfants. Les observations ont révélé que ces bactéries sont rarement détectées dans la bouche des enfants en bonne santé. En 2001, des chercheurs ont également identifié la présence de *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *B. forsythus*, *T. denticola* et *C. rectus* dans les maladies parodontales. La PCR en temps réel est une technique sensible, précise et efficace pour quantifier les bactéries. Grâce aux systèmes TaqMan, Lyons et ses collègues (Lyons *et al.*, 2000), ont pu quantifier *P. gingivalis* ainsi que le nombre total de bactéries dans la plaque dentaire, sans avoir recours à des cultures. Cette technique leur a également permis d'évaluer la proportion de *P. gingivalis* dans les échantillons de Sakamoto (Sakamoto & Takeuchi, 2001), ont comparé l'efficacité de la PCR conventionnelle, de la PCR en temps réel et des techniques de culture pour identifier et quantifier les bactéries parodontales, telles que A. actinomycetemcomitans, *B. forsythus*, *P. gingivalis*, *T. denticola* et *T. socranskii*, dans la salive et les biofilms sous-gingivaux.

Une excellente concordance a été observée entre les résultats obtenus par PCR conventionnelle et par PCR en temps réel pour tous les échantillons de salive. La PCR en temps réel s'est avérée

plus efficace en simplifiant considérablement le processus tout en permettant une identification précise des bactéries à partir d'un échantillon bactérien complexe.

Les bactéries parodontales ont été plus fréquemment observées dans la salive que dans la plaque sous-gingivale. Cette découverte suggère que les tests salivaires pourraient être aussi efficaces, voire plus efficaces, que les tests de plaque sous-gingivale pour identifier et quantifier les bactéries parodontales en bouche. De plus, la méthode de réaction en chaîne par polymérase (PCR) a radicalement changé notre compréhension des agents pathogènes associés aux maladies parodontales. Elle permet non seulement d'identifier les agents pathogènes connus, mais contribue également de manière significative à la découverte de nouveaux micro-organismes associés à ces maladies (Kim Y *et al.*, 2002), En ce sens, la PCR s'impose comme l'outil privilégié pour le diagnostic microbiologique des maladies parodontales (Santos *et al.*, 2004).

III.2. Recherche scientifique :

La PCR est une méthode qui offre la possibilité d'amplifier spécifiquement un segment d'ADN ou d'ARN pouvant aller jusqu'à 2 000 paires de bases. Elle s'appuie sur des phases répétées d'élongation enzymatique d'amorces oligonucléotidiques, effectuées en présence de précurseurs de l'ADN et d'une ADN polymérase thermostable, provenant de la bactérie *Thermus aquaticus* (Taq polymérase). Les amorces sont élaborées pour saisir la séquence ciblée, et l'élongation se réalise dans des sens inverses, ce qui facilite la production de centaines de milliers d'exemplaires de cette séquence en quelques heures. Il s'agit d'une méthode de clonage moléculaire particulièrement efficace. La PCR, à la fois simple, judicieuse et efficace, offre la capacité de repérer une séquence spécifique à partir de l'ADN ou de l'ARN d'une seule cellule. Elle est actuellement fréquemment employée en biologie moléculaire, tant sur le plan fondamental qu'appliqué, et prend de plus en plus d'importance dans le diagnostic moléculaire.

III.2.1. Amplication de gènes d'intérêt :

III.2.1.1. Les apports de l'amplification par PCR : une nouvelle méthode de clonage de l'ADN :

Bien que le clonage d'ADN conventionnel ait surmonté certains défis techniques initiaux, il reste une procédure complexe et longue, principalement réservée aux laboratoires de recherche. Cette technique consiste à isoler l'ADN chromosomique des cellules nucléées, puis à le fragmenter à l'aide d'endonucléases spécifiques (enzymes de restriction), produisant des millions de fragments de tailles variables. Ces fragments sont ensuite incorporés individuellement dans une autre molécule. Les molécules d'ADN recombinant, produites par combinaison de fragments d'origines

différentes, sont ensuite introduites dans des bactéries. Après avoir été isolées sur boîtes de Pétri, les colonies bactériennes obtenues correspondent à un certain nombre de clones qui doivent être analysés pour identifier le candidat approprié.

III.2.1.2. Cependant, dans de nombreuses situations, cette méthode est aujourd'hui avantageusement remplacée par la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) :

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) permet le clonage enzymatique d'une séquence d'ADN spécifique en laboratoire. Grâce à cette méthode, le clonage peut être réalisé en quelques heures, contre plusieurs jours, voire plusieurs semaines, avec les techniques traditionnelles. Il s'agit d'un avantage considérable, notamment en termes de rapidité des tests diagnostiques.

III.2.1.3. L'amplification d'une séquence rare par PCR facilite également sa détection à l'aide de sondes, qu'elles soient radioactives ou non :

Le fragment amplifié peut ensuite être analysé de manière conventionnelle comme s'il s'agissait d'un fragment cloné, profitant ainsi de la disponibilité rapide et en grande quantité de la séquence d'ADN cible.

❖ **Pourquoi procéder à l'amplification de l'ADN ?**

Le génome humain haploïde renferme approximativement 3 milliards (3×10^9) de paires de bases. Ainsi, un segment de 300 paires de bases ne constitue qu'une infime partie du génome (approximativement 1 pour 10 millions). La PCR permet d'amplifier une séquence de quelques centaines de nucléotides jusqu'à un million de fois. Par conséquent, à partir d'un microgramme d'ADN total, il est possible d'obtenir un microgramme du fragment cible amplifié en quelques heures.

Les méthodes contemporaines d'amplification de l'ADN ou de l'ARN permettent une analyse précise des cellules nucléées dérivées de différents échantillons biologiques. Environ 7 pictogrammes (pg) d'ADN sont contenus dans une cellule humaine. Pour comparaison, une goutte de sang contient approximativement 1,5 microgramme (μg), une goutte de sperme peut contenir jusqu'à 10 μg , alors qu'un Les techniques classiques d'analyse, telles que le Southern blot, requièrent un minimum de 5 μg d'ADN, restreignant ainsi leur application à des échantillons plutôt abondants. Néanmoins, grâce aux méthodes d'amplification, il est possible d'utiliser des traces infimes : une simple goutte de sang ou de sperme, voire quelques cellules de la muqueuse buccale détachées, suffisent pour mener à bien des analyses d'une grande sensibilité. Un cheveu peut contenir entre 0,3 pg (s'il a été tiré) et 0,0001 pg (s'il est tombé de manière naturelle). Ces progrès permettent de nombreuses applications, y compris le dépistage

génétique, l'identification individuelle, la détection de séquences à l'échelle unicellulaire ou encore les bilans oncologiques pour détecter la présence de cellules cancéreuses. Elles occupent aussi une place prépondérante dans le domaine de la médecine légale et de la criminalistique. Toutefois, cette sensibilité aiguë amplifie les dangers d'erreurs associés à la contamination des échantillons, que ce soit avant ou durant les analyses. Il est donc crucial de mettre en place des procédures strictes pour assurer la crédibilité des résultats.

Matrices d'ADN simple brin : Il s'agit de brins monocaténares d'ADN, utilisés comme références pour la synthèse de l'ADN complémentaire. Ces amorces sont indispensables à l'amplification de la séquence cible.

Allongement des amorces par polymérisation enzymatique : Les amorces, qui sont de courts segments d'ADN (généralement de 20 à 25 nucléotides), s'hybrident à l'ADN cible et ne servent de points de départ pour la polymérisation de nouveaux brins d'ADN.

Taq polymérase, une enzyme qui ajoute des nucléotides pour compléter la séquence.

Réplication exponentielle : Chaque cycle de PCR double la quantité de produit amplifié. Par conséquent, après plusieurs cycles, on obtient une grande quantité de la séquence cible d'ADN.

Taq polymérase : Il s'agit d'une enzyme provenant de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*. Elle est résistante aux températures élevées nécessaires pour dénaturer l'ADN, ce qui permet à la PCR d'être effectuée à des températures élevées sans que l'enzyme ne soit détruite.

Amorces spécifiques : Les amorces sont de brèves chaînes d'ADN qui correspondent aux séquences délimitant la région cible. La longueur du fragment amplifié est déterminée par leur spécificité.

Température et cycles : La réaction se déroule en plusieurs étapes, chaque étape nécessitant une température spécifique :

Dénaturation : Température élevée (environ 94-98°C) pour séparer les deux brins de l'ADN.

Hybridation des amorces : Température plus basse (environ 50-65°C) pour permettre aux amorces de se fixer sur les brins d'ADN complémentaires.

Extension/élongation : Température d'environ 75°C, optimale pour l'activité de la Taq polymérase, qui synthétise les nouveaux brins d'ADN.

Automates de PCR : Ces appareils automatisent le processus en régulant précisément les températures et la durée de chaque étape, ce qui permet une amplification reproductible et efficace de l'ADN.

En résumé, ce passage décrit un processus clé de la PCR, qui est largement utilisé en biologie moléculaire pour multiplier de petites quantités d'ADN et ainsi permettre des analyses plus approfondies.

III.2.2. Etude d'expression génétique :

III.2.2.1. Le diagnostic des maladies génétiques :

Les méthodes décrites ci-dessus, après amplification d'un locus spécifique, permettent de distinguer différents allèles, normaux ou délétères, et parfois même d'identifier les mutations impliquées. Grâce à sa rapidité et à sa grande sensibilité, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est particulièrement adaptée aux analyses individuelles ainsi qu'au dépistage à grande échelle. De plus en plus de tests de diagnostic prénatal pour les maladies monogéniques reposent actuellement sur cette technique, notamment pour les maladies où le gène responsable est impliqué.

Lorsque le gène responsable de certaines maladies héréditaires, telles que la drépanocytose, la thalassémie, l'hémophilie, la dystrophie musculaire de Duchenne et la mucoviscidose, est clairement identifié ou que sa localisation chromosomique est connue, une analyse peut être réalisée. Dans le cas de petits gènes, des mutations ponctuelles ou certaines délétions peuvent être directement détectées. En revanche, le gène de la dystrophine, associé à la dystrophie musculaire de Duchenne, est assez volumineux (environ 2 000 kilobases), ce qui complique l'analyse directe des délétions. Pour surmonter cette difficulté, une méthode d'amplification appelée réaction en chaîne par polymérase multiplex (PCR) est utilisée. Cette méthode permet l'amplification simultanée de plusieurs régions susceptibles de contenir une délétion.

Pour surmonter cette difficulté, une méthode d'amplification appelée PCR (amplification en chaîne par polymérase multiplexe) est utilisée. Cette méthode permet l'amplification simultanée de plusieurs régions susceptibles de contenir une délétion. À l'aide d'un ensemble spécifique d'amorces générant des fragments d'ADN de tailles variables, l'électrophorèse détecte l'absence ou l'altération de bandes spécifiques, indiquant la présence d'une délétion (Chamberlain, 1988). Lorsque les mutations ne peuvent être identifiées directement, la présence d'un gène anormal peut être inférée grâce à l'analyse de marqueurs génétiques, tels que les RFLP. Dans ce cas, une région d'ADN contenant un site de restriction polymorphe est amplifiée, et les produits d'amplification sont analysés après digestion enzymatique (Chamberlain & Gibbs, 1988). Des avancées technologiques récentes ont permis d'analyser l'ADN d'une seule cellule, ouvrant ainsi la voie au diagnostic préimplantatoire sur des embryons obtenus par fécondation in vitro. Par

exemple, le sexe d'un embryon peut être déterminé en identifiant la présence du chromosome Y dans une cellule unique prélevée au stade 6 à 10 cellules. De plus, Holding et Monk (Feldman & Williamson, 1988), ont pu identifier une bêta-thalassémie chez un embryon de souris préimplantatoire en amplifiant l'ADN des blastomères (Handyside & Pattinson, 1989).

III.3. Biotechnologie et industrie :

Le domaine des biotechnologies connaît une transformation radicale grâce au criblage à haut débit, à une précision accrue et à l'intégration de la réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (Q-PCR) aux systèmes automatisés. Dans ce domaine, la Q-PCR est utilisée dans de nombreuses applications, notamment dans les domaines liés à la biosécurité et au suivi de la stabilité génétique. Ces applications comprennent : (a) l'analyse de la bio distribution des vecteurs de thérapie génique chez l'animal ; (b) la détermination de la quantité d'ADN résiduel dans les produits thérapeutiques finaux ; (c) la détection d'acides nucléiques d'origine virale ou bactérienne dans les banques de cellules et les produits finis contaminés ; (d) la mesure de l'efficacité des étapes d'élimination des virus dans les études de validation des procédés ; (e) la détection précise et spécifique de l'activité de la transcriptase inverse rétrovirale dans les vaccins ; et (f) l'évaluation du nombre de copies de transgènes pour le suivi de la stabilité génétique pendant la production. Les méthodes de validation des tests Q-PCR sont conformes aux recommandations ICH Q2A. Le document « Validation des méthodes d'analyse : définitions et terminologie », daté du 1er juin 1995, a également été révisé.

III.4. Médecine légale :

L'identification génétique, découverte par Alec Jeffreys en 1985, consiste à identifier un individu par l'examen des polymorphismes de l'ADN. Cette approche s'appuie sur la recherche comparative ou l'analyse d'arbres généalogiques. Grâce aux techniques d'amplification génique, cette identification est devenue plus rapide et plus efficace, même avec de très petites quantités d'ADN ou des échantillons dégradés. En criminalistique, cette identification est utilisée pour identifier les auteurs de crimes de sang ou d'agressions sexuelles à partir de traces biologiques, ainsi que pour établir des liens familiaux ou identifier des cadavres. Aujourd'hui, ces techniques sont couramment utilisées dans de nombreuses enquêtes policières. L'identification génétique des individus en criminalistique et en médecine légale est l'une des avancées les plus significatives de ces trois dernières décennies. Elle permet aujourd'hui de résoudre de nombreuses affaires judiciaires et de réexaminer avec précision d'anciens dossiers. Ces progrès ont été rendus possibles par les techniques d'amplification génique, notamment la réaction en chaîne par

polymérase (PCR), qui a révolutionné ce domaine. Ces techniques permettent une analyse rapide à partir de très petites quantités d'ADN, même dégradé.

En France, seules les analyses portant sur l'ADN non codant sont autorisées, sauf dérogation dans certaines affaires judiciaires spécifiques. Dans ces cas exceptionnels, des analyses peuvent être ordonnées afin de déterminer le phénotype ou l'origine bio-géographique de l'individu à l'origine d'une trace biologique [Arrêt de la chambre criminelle de la Cour de cassation n° 3280 du 25 juin 2014 (n°13-87.493)]. Grâce aux techniques d'amplification génique, il est possible d'étudier des séquences microsatellites ainsi que des mutations ponctuelles (SNP - Single Nucléotide Polymorphisme) sur l'ADN. Ces analyses fournissent des informations sur des caractéristiques telles que la couleur des yeux, de la peau ou des cheveux, ainsi que sur l'âge approximatif et les origines géographiques de l'individu.

III.4.1. Analyse ADN dans les enquêtes criminelles :

III.4.1.1. Principe de l'amplification génique :

Initialement, les méthodes d'amplification génique utilisaient le fragment de Klenow de l'ADN polymérase d'*Escherichia coli* pour étendre les séquences d'ADN après hybridation d'amorces. Cependant, cette enzyme était inactivée par les températures élevées requises pour dénaturer les brins d'ADN, nécessitant son ajout à chaque cycle de la réaction (Andrews *et al.*, 1996) Cette limitation a été surmontée avec l'introduction en 1988 de la Taq polymérase, une ADN polymérase thermorésistante extraite de *Thermus aquaticus* et capable de supporter ces températures élevées. Cela a permis le développement de l'amplification cyclique automatisée base de la PCR moderne (Saiki *et al.*, 1988).

III.4.1.2. L'amplification génique (PCR) :

En laboratoire, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) imite le processus naturel de réplication de l'ADN observé lors de la division cellulaire. L'ADN polymérase est utilisé pour amplifier une séquence d'ADN préalablement isolée d'un échantillon biologique. Ce processus se déroule en plusieurs étapes, similaires à celles de la réplication naturelle de l'ADN :

Dénaturation : séparation des deux brins complémentaires de l'ADN double brin par élévation de la température

Hybridation (ou appariement) : fixation de deux amorces oligonucléotidiques sur les brins dénaturés, permettant le démarrage de la synthèse d'un nouvel ADN par complémentarité des bases.

La phase d'élongation facilite la synthèse de nouveaux brins d'ADN complémentaires à la séquence originale. Ainsi, les brins synthétisés sont des copies exactes des brins originaux présents dans l'échantillon. Ce processus, qui comprend la dénaturation, l'hybridation et l'élongation, est répété 25 à 35 fois selon la qualité de l'échantillon. Au cours de ces cycles, les brins nouvellement produits servent de matrice à l'ADN polymérase.

La région à amplifier est initialement identifiée sur la molécule d'ADN à l'aide de courtes séquences poly nucléotidiques appelées amorces, qui servent de point de départ à la synthèse des premiers brins complémentaires. En criminalistique, les séquences cibles sont sélectionnées pour leur fort polymorphisme au sein de la population. Cette forte variabilité confère aux marqueurs moléculaires un haut pouvoir discriminant, permettant d'identifier avec une quasi-certitude l'individu représentant l'origine de l'artefact biologique.

III.4.1.3. Le matériel utilisé :

Les analyses biologiques peuvent être réalisées sur divers tissus corporels contenant des cellules nucléées, tels que les cellules buccales, les cheveux et les poils, ainsi que sur des tissus tels que les muscles, la peau, les organes, les os et les dents. Des prélèvements par écouvillonnage peuvent également être effectués sur diverses surfaces (sols, murs, outils et casques) ou directement sur la peau, par exemple pour recueillir des traces de morsure. Les traces de contact peuvent également être examinées sur divers objets tels que des couteaux, des armes à feu, des munitions, des gants ou des tissus cutanés, notamment après une strangulation. Ces substrats peuvent contenir des cellules, notamment d'origine cutanée, qui précipite au contact. Envie d'une version plus concise ou plus détaillée ? L'extraction d'ADN commence par la séparation des cellules de leur milieu d'origine (tâches de sang, sperme, échantillons de tissus, écouvillons ou autres matériaux).

Ces cellules sont ensuite lysées à l'aide d'une solution contenant des détergents tels que le Triton 100 ou le dodécyl sulfate de sodium (SDS), qui dénaturent les protéines. Les protéines sont ensuite digérées par la protéinase K. Une fois l'ADN libéré, il est extrait et purifié du milieu réactionnel à l'aide de colonnes de silice ou de membranes de filtration, telles que les micro filtres Millipore-Amicon, qui retiennent l'ADN tout en éliminant les impuretés et les résidus protéiques. L'ADN est ensuite lavé et élué, puis réintroduit dans la solution pour amplification.

III.4.1.4. Les profils génétiques avant l'introduction de l'amplification génique ou PCR :

L'analyse du polymorphisme de l'ADN en criminalistique a été décrite pour la première fois par Jeffreys. (Jeffreys *et al.*, 1985), **Le polymorphisme identifié par Jeffreys** reposait sur la présence de séquences répétées en tandem sur les deux brins d'ADN, réparties dans tout le génome. Chaque unité répétée contient des dizaines de nucléotides, et ces séquences peuvent atteindre une longueur de 100 nucléotides. Ce type de polymorphisme, caractérisé par un nombre variable de répétitions en tandem, est appelé VNTR (nombre variable de répétitions en tandem) (Du Chesne *et al.*, 1993).

Ce type de polymorphisme est détecté à l'aide d'enzymes de restriction, qui découpent la molécule d'ADN en fragments en fonction de la présence de séquences spécifiques appelées sites de coupure. Les fragments obtenus sont ensuite analysés en fonction de leur taille, ce qui permet de comparer l'ADN d'un échantillon inconnu à celui d'un suspect ou d'une victime. Les polymorphismes observés résultent de modifications de la séquence d'ADN, telles que des différences dans le nombre de répétitions, de délétions, d'insertions ou de substitutions. Ces changements ont modifié les sites de restriction et, par conséquent, la longueur des fragments obtenus. Le site de restriction correspond à la séquence exacte où l'enzyme coupe l'ADN.

La séquence identifiée par *Jeffreys* fut alors appelée « mini-séquence », par opposition aux séquences plus longues, appelées « séquences », qui étaient au cœur des recherches de l'époque. *Jeffreys* isola ensuite d'autres séquences de répétitions en tandem, toutes présentant un motif de répétition nucléotidique central. Les séquences obtenues, après traitement par des enzymes de restriction, furent détectées à l'aide de sondes multimètres marquées au phospho-32, qui s'hybridèrent avec toutes les régions répétées présentant le même motif nucléotidique dans la molécule d'ADN. Ces résultats se présentèrent sous la forme de multiples bandes visibles sur les radiographies. La détection de fragments d'ADN avec ces sondes permit de localiser précisément ces bandes sur les radiographies, de comparer leur emplacement et leur taille, et donc d'analyser les caractéristiques génétiques des échantillons biologiques. Cependant, l'analyse de ces images resta... L'interprétation des images était difficile, en partie en raison du risque de contamination bactérienne des échantillons, ce qui nuisait à la clarté des résultats. D'après la description des petites séquences satellites par *Jeffreys*, (Jeffreys *et al.*, 1985), de petites séquences satellites, caractérisées par une unité répétée plus courte que la petite unité satellite, ont été identifiées. Ces séquences répétées, composées de 2 à 7 nucléotides, sont appelées courtes répétitions en tandem (STR) (Du Chesne *et al.*, 1993).

Au cours des années 1980, les progrès de la biologie moléculaire ont conduit au développement de sondes unicellulaires capables d'examiner une séquence polymorphe à la fois. Ces sondes utilisaient la même méthode que la précédente, mais éliminaient l'inconvénient de devoir surveiller plusieurs bandes en parallèle. Ces sondes unicellulaires permettaient une analyse plus précise et une meilleure interprétation des autoradio gramme. Elles ont rapidement remplacé les sondes multicellulaires décrites par *Jeffreys* en 1987. Avant l'introduction de la réaction en chaîne par polymérase (PCR), les techniques de détection de ces séquences répétitives reposaient sur la digestion enzymatique par des enzymes de restriction, ce qui permettait d'isoler les fragments d'intérêt (tels que les VNTR ou les microsatellites).

Ces fragments étaient ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, en fonction de leur taille. Une fois séparés, les fragments d'ADN étaient transférés sur une membrane de nylon à l'aide d'un tampon de transfert de gel, ce qui permettait leur transfert du gel à la membrane où ils étaient immobilisés. Ce procédé de transfert sur membrane de nylon est connu sous le nom de technique de Southern blot) (Raphaël & Franco, 2006). Les fragments d'ADN recherchés étaient ensuite détectés à l'aide de sondes radioactives, remplacées depuis par des méthodes non radioactives, telles que les techniques colorimétriques utilisant la digoxigénine.

III.4.1.5. L'utilisation de la polymérisation en chaîne en criminalistique et en médecine légale :

S'appuyant sur les premières descriptions de cette méthode par *Mullis* et *Valona*, ce sont *Saiki* et ses collègues **qui en ont introduit l'application en criminalistique en 1988** (Brinkmann & Gill, 1997) grâce à une enzyme spécifique : l'ADN polymérase, plus précisément la Taq polymérase. Cette méthode repose sur l'utilisation de cette enzyme après coupure des deux brins d'ADN par une enzyme de restriction. La Taq polymérase permet ensuite la synthèse de nouvelles molécules d'ADN à partir des fragments initiaux présents dans l'échantillon analysé. La formation de nouvel ADN se produit par l'incorporation de nucléotides dans le milieu réactionnel, que l'enzyme lie ensuite selon le schéma de séquence de l'ADN à analyser. Cette avancée technologique a été rendue possible par la découverte de la Taq polymérase, capable de rester active même à des températures élevées de 95 à 100 °C, températures nécessaires à la dénaturation de l'ADN.

L'un des principaux avantages de cette technique d'amplification génique, depuis sa création, est sa capacité à analyser de très petites quantités d'ADN, lui permettant de fonctionner même avec de très petits fragments d'ADN, souvent présents malgré la dégradation de la molécule. Le premier test commercialisé reposait sur l'amplification d'une séquence présente

dans le complexe majeur d'histocompatibilité humain de classe II, appelée HLA-DQ-alpha, située sur le chromosome 6. Ce polymorphisme a été démontré à l'aide de bandelettes de nylon, sur lesquelles les huit allèles amplifiés ont été transférés après électrophorèse. Le kit HLA-DQ-alpha a permis de distinguer six allèles du gène HLA-DQA1 grâce à des sondes spécifiques, sélectionnées en fonction des échantillons d'ADN à analyser. De plus, des kits multi-marqueurs (PM) ont été développés pour étudier cinq gènes polymorphes, chacun contenant deux ou trois allèles. L'identification des allèles a été réalisée par colorimétrie avec des amorces marquées à la biotine (Raphaël & Franco, 2006).

Cette approche a ensuite été étendue à l'étude des marqueurs STR (courtes répétitions en tandem), caractérisés par des séquences répétitives allant jusqu'à 6 paires de bases, avec un fragment amplifié généralement inférieur à 500 paires de bases. L'étude de ces marqueurs après amplification génique s'est avérée être la méthode privilégiée, remplaçant les techniques utilisant des enzymes de restriction. L'amplification par Taq polymérase a facilité l'amplification directe de l'ADN extrait. La nomenclature des fragments polymorphes de ces loci ou allèles STR est déterminée par le nombre d'unités répétées qu'ils contiennent (Kayser, M, 2017), Des analyses multiplex de ces marqueurs ont ensuite été développées, permettant l'acquisition de plusieurs STR lors d'une seule analyse d'amplification génique.

Avec l'avènement des technologies de séquençage, ces analyses ont été automatisées grâce à l'utilisation de colorants spécifiques pour marquer les fragments d'ADN obtenus. Les tests d'amplification génique multiplex reposent sur l'identification de la région d'ADN à amplifier à l'aide d'une paire d'amorces dont les séquences nucléotidiques sont complémentaires de la région cible, incorporées dans un mélange de réactifs. Pour amplifier simultanément plusieurs régions d'ADN, il suffit de combiner plusieurs paires d'amorces, chacune spécifique à une région spécifique.

L'amplification simultanée de plusieurs régions d'ADN est appelée amplification génique multiplex, ou réaction en chaîne par polymérase (PCR) multiplex. La détection de différents marqueurs par des machines de séquençage automatisées repose sur l'utilisation de colorants fluorescents et de différentes amorces d'amplification. La première machine commercialisée en 1995 était l'ABI Prism 310 d'Applied Biosystems.

Concernant l'interprétation, bien que chaque STR analysé séparément ait un pouvoir d'identification limité, leur analyse combinée via de multiples interactions permet de produire un profil ADN avec une probabilité extrêmement faible de trouver un autre individu non apparenté présentant le même profil, à l'échelle mondiale. Ces techniques ont également permis d'analyser

les polymorphismes de l'ADN mitochondrial, en particulier dans les régions hypervariables HV1 et HV2. L'ADN mitochondrial étant transmis par la mère, le pouvoir d'identification de ces marqueurs est inférieur à celui de l'ADN nucléaire. Ces techniques ont également été utilisées pour analyser les régions répétitives du chromosome Y, permettant ainsi l'étude d'un mélange d'ADN mâle et femelle, notamment lorsque la quantité d'ADN mâle est très faible. Des kits spécialisés étaient disponibles pour l'analyse polymorphique des marqueurs polymorphes, utilisant des colorants fluorescents et des amorces spécifiquement conçus pour l'hybridation avec le chromosome Y.

III.4.1.6. Les applications de la génétique en médecine légale :

À ses débuts en criminalistique et en criminologie, cette méthode était principalement utilisée pour identifier les auteurs de crimes violents, tels que les meurtres ou les agressions sexuelles, à partir de traces biologiques découvertes sur les scènes de crime ou sur les corps des victimes. Elle était également utilisée pour établir des liens familiaux et identifier des corps non identifiés. Depuis lors, le profilage génétique est fréquemment utilisé, sur instruction des juges, dans de nombreuses enquêtes judiciaires nécessitant l'identification d'un suspect ou d'une victime à partir de preuves biologiques. Cette méthode permet d'examiner les traces de contact, telles que celles trouvées sur des armes ou des munitions, en multipliant d'infimes quantités d'ADN présentes sur les objets en question, facilitant ainsi la production de l'empreinte génétique de la personne qui a délivré l'empreinte.

Cependant, l'un des principaux inconvénients de cette technique est sa forte réactivité à la contamination par de l'ADN non lié à l'affaire. Cela peut se produire lors du recueil de preuves sur les scènes de crime, chez les suspects ou les victimes, lors du transport des échantillons vers le laboratoire, ou même lors de leur manipulation en laboratoire. De plus, certains inhibiteurs, tels que les acides humiques ou fulviques présents dans le sol, ainsi que les colorants du cuir, peuvent entraver l'amplification de l'ADN. L'interprétation des résultats consiste à comparer les profils génétiques obtenus après amplification STR entre des traces biologiques ou des échantillons prélevés sur des taches biologiques (sang, sperme, écouillons d'armes, etc.) et ceux prélevés sur un écouillon de joue, qui recueille des cellules de la joue d'un suspect ou d'une victime (**Figure 16 et Figure 17**).

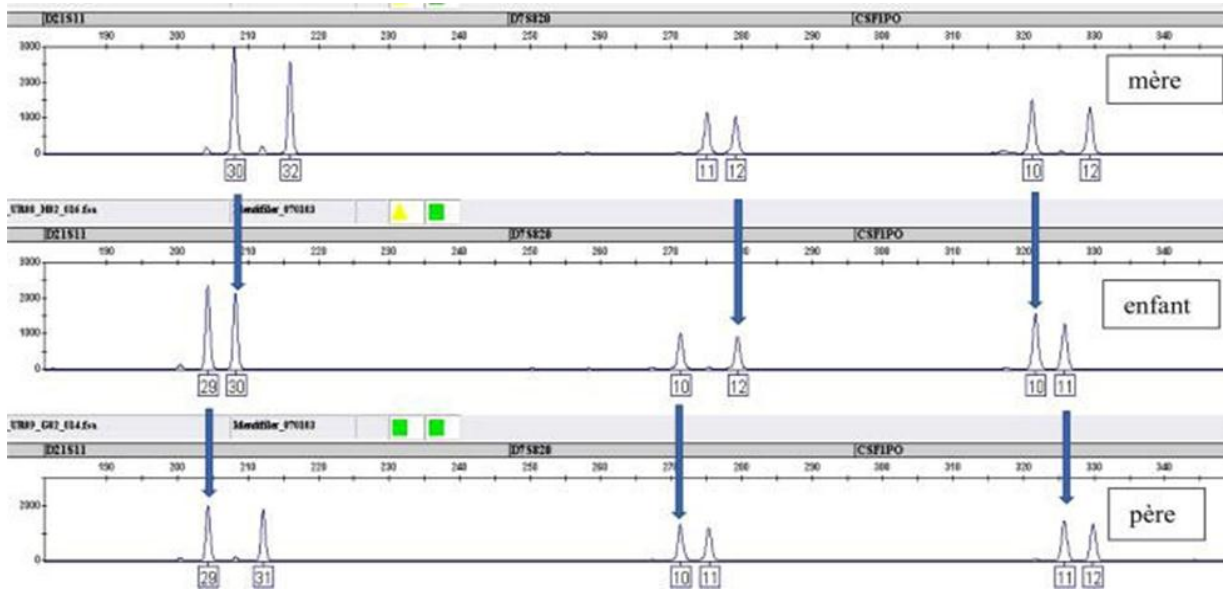


Figure 16: Une étude de paternité basée sur trois locus génétiques (D21S11, D7S820, CSF1PO) est présentée à travers les profils génétiques ci-dessous. Pour le locus D21S11, l'enfant a hérité de l'allèle 30 de la mère et de l'allèle 29 du père. Pour le locus D7S820, l'enfant a hérité de l'allèle 12 de la mère et de l'allèle 10 du père. Enfin, pour le locus CSF1PO, l'enfant a hérité de l'allèle 10 de la mère et de l'allèle 11 du père (Kayser, 2015).

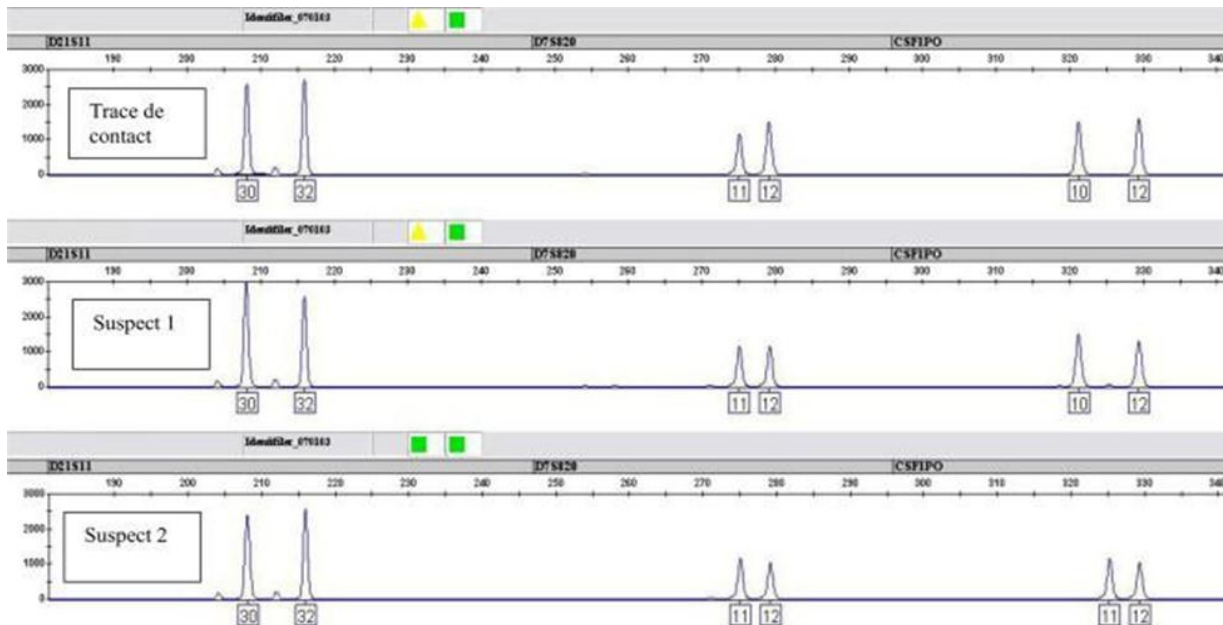


Figure 17: Illustration d'un cas de vol à main armée basée sur le profilage génétique ci-dessous. La trace de contact révèle les allèles 30 et 32 au niveau du gène D21S11, ce qui correspond aux profils des suspects 1 et 2. Au niveau du gène D7S820, les allèles 11 et 12 retrouvés dans la trace pourraient correspondre aux deux suspects. En revanche, pour le gène CSF1PO, les allèles 10 et 12 ne sont détectés que pour le suspect 1, tandis que le suspect 2 est exclu en raison de l'absence de l'allèle 11 (Kayser, 2015).

Si les allèles du suspect pour les marqueurs génétiques testés ne correspondent pas à ceux de l'échantillon biologique, il est conclu à l'absence d'identité entre les deux échantillons d'ADN, ce qui entraîne l'exclusion définitive. En revanche, si les marqueurs génétiques correspondent, l'inclusion de l'individu est envisagée. Cependant, l'importance de cette inclusion et son potentiel de condamnation dépendent de la prévalence des allèles en question au sein de la population générale. Cette évaluation repose sur une méthode bayésienne de présentation statistique des résultats (Kayser, 2015).

Depuis l'introduction des techniques d'amplification génique en criminalistique et en criminologie, les progrès de la connaissance de l'ADN ont permis l'analyse de nouvelles séquences appelées polymorphismes nucléotidiques simples (SNP). Ces variations génétiques correspondent à des différences au niveau d'un seul nucléotide à un endroit précis du génome et varient d'un individu à l'autre. Ainsi, chaque SNP constitue un polymorphisme de séquence. Ces SNP sont répartis uniformément dans le génome humain, apparaissant en moyenne tous les 500 nucléotides. Le polymorphisme individuel de chaque SNP est relativement faible, avec seulement quatre allèles possibles, dont seulement deux sont généralement présents dans la population.

Cependant, bien que ce faible polymorphisme limite la capacité d'identifier un SNP unique, l'analyse multiplex, qui consiste à examiner dix, voire cent SNP simultanément lors d'une seule réaction, offre un pouvoir discriminant significatif en criminalistique. De plus, le séquençage complet a ouvert la voie à la possibilité d'identifier un SNP unique. Le génome humain offre de nouvelles perspectives pour prédire des caractéristiques morphologiques telles que la couleur des yeux, des cheveux, de la peau, ou encore l'origine biogéographique. Par conséquent, de nombreuses études ont été menées ciblant des gènes candidats, conduisant au développement de kits d'analyse personnalisés (Vidaki & Kayser, 2018).

Toutefois, ces techniques, qui utilisent des régions codantes de l'ADN, ne sont autorisées en France que sous certaines conditions. En effet, l'identification d'un individu par ses caractéristiques génétiques est encadrée par le décret n° 2000-413 du 18 mai 2000. Selon son article R53-13, les analyses d'empreintes génétiques ne peuvent porter que sur les parties non codantes de l'ADN, à l'exception de la partie relative au marqueur de sexe. Ainsi, l'utilisation de régions d'ADN contenant des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) codant pour des caractéristiques phénotypiques a été rendue possible par l'arrêt n° 3280 de la chambre criminelle de la Cour de cassation du 25 juin 2014 (n° 13-87.493). Cette décision stipule qu'une analyse visant uniquement à révéler les caractéristiques morphologiques apparentes d'un auteur inconnu, à partir de l'ADN retrouvé sur les lieux du crime, et dans le seul but de faciliter son

identification, n'est pas incompatible avec les dispositions du Code civil (articles 16-10, 16-11 et 16-12). En effet, ces dispositions visent à protéger le corps humain, mais l'analyse porte ici naturellement sur un matériel biologique distinct. Par extension, cette disposition permet également la recherche de polymorphismes nucléotidiques simples associés à l'origine biogéographique d'un individu, à condition que cela s'inscrive dans le cadre établi par la jurisprudence.

III.4.2. Identification humaine :

La description initiale de Jeffreys en 1985 a facilité l'émergence de la technologie d'identification génétique individuelle, que Gill et son équipe ont rapidement appliquée à la criminalistique la même année. Ces méthodes ont connu des avancées significatives, notamment avec l'introduction de la technologie d'amplification génique en criminalistique. Ce développement permet l'analyse d'échantillons biologiques décomposés contenant de très faibles quantités d'ADN.

L'identification d'individus par des méthodes de biologie moléculaire est fréquemment pratiquée en criminalistique et en sciences forensiques. Ces analyses permettent de vérifier ou d'infirmer certains aspects d'une enquête criminelle et de déterminer si un suspect peut être exclu ou lié au crime, sur la base de preuves biologiques découvertes sur une scène de crime ou sur une personne blessée.

Cependant, un inconvénient majeur de cette approche est le risque de contamination par de l'ADN non lié à l'enquête (pouvant provenir, par exemple, d'enquêteurs ou de techniciens de laboratoire), ce qui nécessite l'application de protocoles de qualité très stricts. Un biologiste qualifié est chargé d'interpréter les résultats, en tenant compte de la quantité et de la qualité de l'ADN présent dans l'échantillon, ainsi que de la prévalence des marqueurs génétiques examinés dans la population générale.

Chapitre IV : L'appareil

De Pcr

Chapitre IV. L'appareil de Pcr :

IV.1. Composants d'un appareil de PCR :

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) repose non seulement sur des réactifs chimiques spécifiques, mais aussi sur l'utilisation d'un équipement spécialisé, un thermocycleur. Cet équipement est essentiel pour établir les conditions thermiques nécessaires au fonctionnement de la PCR, simulant des cycles thermiques séquentiels et précis. La fiabilité, la rapidité et la précision de la PCR sur site dépendent largement de ses performances. Cette section explore en détail les composants de base d'un thermocycleur, son fonctionnement et les techniques qu'il utilise pour répondre aux exigences modernes des laboratoires de biologie moléculaire (*Figure 18*).



Figure 18:L'appareil de Pcr (medicalexpo, 2014).

IV.1.1. Bloc Chauffant (Thermal Block):

Le bloc chauffant est le cœur du thermocycleur. Il est généralement fabriqué en aluminium ou en argent pour assurer une excellente conductivité thermique. Ce bloc contient des puits dans lesquels sont insérés les tubes contenant les mélanges réactionnels. Certains modèles sont équipés de blocs gradués, permettant d'appliquer des températures légèrement différentes à différentes zones du bloc, ce qui est utile pour optimiser les conditions de réaction (Weier &

Gray, 1988), Le bloc est conçu pour assurer l'uniformité thermique de tous les échantillons. Cela garantit des résultats fiables pour chaque utilisateur, quel que soit le nombre de tubes ou l'emplacement des échantillons (Laboratories, Bio-Rad, 2019).

IV.1.2. Interface utilisateur (Interface utilisateur) :

- ✚ **Fonction** : Fournir des informations en temps réel sur la progression du programme PCR (température actuelle, durée restante, nombre de cycles).
- ✚ **Approche centrée utilisateur** : Facilite la surveillance continue du processus et la prise de décisions immédiates en cas de défaillance

L'interface utilisateur (ou interface homme-machine, IHM) désigne l'ensemble des éléments (physiques et logiciels) permettant à l'utilisateur d'interagir avec un appareil de PCR (amplification en chaîne par polymérase). Cela comprend principalement l'écran, les menus de navigation, les boutons physiques ou tactiles, et parfois la communication à distance via un logiciel (Scientific, Thermo Fisher, 2020).

IV.1.2.1. Composantes principales :

- ✚ **Écran d'affichage (souvent LCD ou LED)** : Affiche en temps réel les températures en cours, la phase du cycle (dénaturation, hybridation, élongation), le temps restant, et le nombre de cycles réalisés/souhaités. Permet aussi d'afficher des messages d'erreur, des alertes ou des résultats intermédiaires.

✚ **Menu de programmation :**

- Interface intuitive où l'utilisateur peut configurer :
 - ✓ Les températures de chaque étape
 - ✓ Les durées spécifiques
 - ✓ Le nombre de cycles
 - ✓ Les pauses programmées
- Certains appareils incluent des protocoles pré-enregistrés pour faciliter l'usage.

✚ **Boutons de navigation ou écran tactile :**

Permettent de sélectionner, valider ou modifier les paramètres.

Dans les modèles récents, ces boutons sont remplacés par des interfaces tactiles multilingues.

✚ **Ports de communication (USB, Ethernet, Wi-Fi) :**

Pour sauvegarder les données, transférer des résultats vers un ordinateur, ou contrôler l'appareil à distance via logiciel. (Systems, 2018).

IV.1.3. Système de contrôle de température :

Le contrôle précis de la température est assuré par des modules thermoélectriques, souvent basés sur l'effet Peltier. Ces modules permettent des transitions rapides entre les températures requises pour chaque étape du processus de PCR. Des capteurs de température internes garantissent une grande précision, essentielle à l'efficacité de chaque cycle (**Figure 19**).

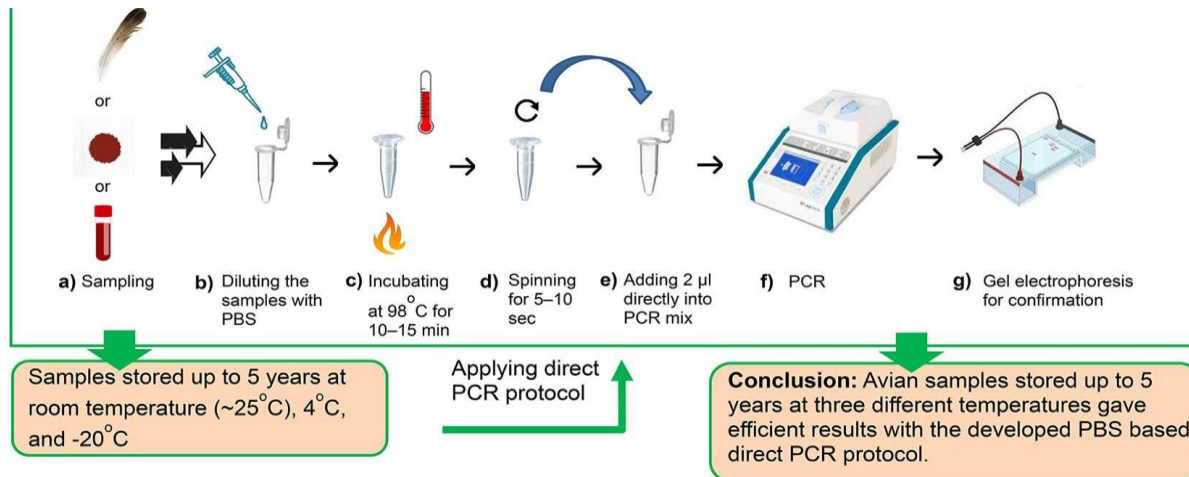


Figure 19:Présentation schématique du protocole de PCR directe aviaire (Aslam *et al.*, 2023)

La température joue un rôle essentiel dans l'efficacité de la PCR, en affectant plusieurs aspects du :

✚ Processus d'amplification :

✚ Température d'extension :

Température de dénaturation : La température élevée (généralement 94-96 °C) utilisée lors de l'étape de dénaturation est nécessaire pour séparer l'ADN double brin en brins simples. Un chauffage insuffisant peut entraîner une dénaturation incomplète, réduisant ainsi la disponibilité des matrices simple brin pour la liaison des amorces. En revanche, des températures extrêmement élevées ou un chauffage prolongé peuvent entraîner une dénaturation incomplète. Cependant, des températures extrêmement élevées ou un chauffage prolongé peuvent endommager l'ADN et inactiver l'enzyme polymérase, réduisant ainsi l'efficacité globale. Cela réduit l'efficacité globale.

Température d'hybridation : Il s'agit probablement de l'étape la plus critique pour l'efficacité de la PCR. La température d'hybridation optimale est généralement inférieure de 3 à 5 °C à la température de fusion (T_m) des amorces. Cette température se situe généralement entre 50 et 65 °C. Une température d'hybridation trop élevée peut empêcher la

liaison des amorces, ce qui entraîne de faibles rendements. À l'inverse, une température trop basse peut entraîner une liaison non spécifique, conduisant à des résultats indésirables.

La température optimale pour l'activité de l'ADN polymérase (généralement 72 °C pour la Taq polymérase) affecte la vitesse et la précision de la synthèse de l'ADN. Des températures d'extension sous-optimales peuvent entraîner une amplification incomplète ou incorrecte.

Températures de cyclage :

Des changements de température rapides et précis entre les étapes sont essentiels à la PCR. Les thermocycleur modernes sont capables de chauffer et de refroidir rapidement les échantillons, avec des augmentations de température pouvant atteindre 3,5 °C/s. Ce cycle rapide permet d'éviter l'enchevêtrement prématuré des brins d'ADN et garantit des conditions optimales à chaque étape du processus de PCR. En optimisant soigneusement ces étapes thermodépendantes, les chercheurs peuvent améliorer considérablement l'efficacité, la spécificité et le rendement de la PCR. Des techniques telles que la PCR tactile, qui abaisse progressivement la température d'hybridation au fil des cycles, peuvent encore améliorer la spécificité et l'efficacité en favorisant la formation d'hybrides amorce-matrice optimaux (Srinivas, 2024).

IV.1.4. Contrôle de la température du gradient :



Figure 20: Contrôle de la température par gradient (Srinivas, 2024).

Le contrôle de la température par gradient est une fonction essentielle des thermocycleur PCR modernes qui permet aux chercheurs d'optimiser les températures de recuit pour plusieurs

ensembles d'amorces simultanément (**Figure 20**). D'optimiser les températures de recuit pour plusieurs jeux d'amorces simultanément. Cette technologie permet de créer un gradient de température à travers le bloc thermique. Cette technologie permet de créer un gradient de température à travers le bloc thermique, chaque colonne ou rangée étant maintenue à une température différente pendant l'étape de recuit. Chaque colonne ou rangée est maintenue à une température différente pendant l'étape de recuit. Les principaux aspects du contrôle du gradient de température sont les suivants. (**Tableau 3**)

Tableau 3: Aspects clés du contrôle de la température de gradient

Fonctionnalité	Description
Plage de température	Typiquement 15-30°C à travers le bloc
Nombre de zones	8 à 12 zones de température, selon le modèle
Résolution	Peut résoudre des différences de température de l'ordre de 0,1°C
Optimisation	Permet de tester plusieurs températures de recuit en une seule fois

La fonction de gradient simplifie considérablement l'optimisation de la PCR en permettant aux chercheurs de :

- 1- Déterminer les températures optimales de recuit pour les nouvelles séries d'amorces
- 2- Optimiser simultanément plusieurs paires d'amorces ayant des températures de fusion différentes
- 3- Identifier les conditions permettant d'accroître la spécificité et le rendement

Les technologies de gradient avancées, telles que le système VeriFlex Block, utilisent plusieurs blocs Peltier indépendants au lieu d'un seul bloc de gradient. Cette conception permet un contrôle plus précis de la température et la création de véritables gradients linéaires. Lors de l'utilisation de la PCR en gradient pour l'optimisation :

- 1- Définir une plage de température autour de la température de recuit théorique (généralement $\pm 5-10^\circ\text{C}$).
- 2- Effectuer la PCR avec des échantillons identiques à travers le gradient.
- 3- Analyser les résultats pour identifier la température produisant la spécificité et le rendement les plus élevés.

Par exemple, une étude peut utiliser un gradient de 55°C à 65°C pour optimiser un protocole PCR. Les résultats

Les résultats pourraient montrer que la paire d'amorces A s'amplifie de manière optimale entre 64 et 66 °C, tandis que la paire B fonctionne mieux entre 58 et 60 °C.

Fonctionne mieux entre 58 et 60°C.

La PCR en gradient peut également être utilisée pour optimiser d'autres paramètres, tels que la concentration de MgCl₂ ou la température de dénaturation, en combinant les paramètres de la PCR en gradient avec ceux de la PCR.

Température de dénaturation, en combinant le gradient de température avec des concentrations variables entre les rangs.

Malgré les avantages considérables de la technologie du gradient, il convient de noter que tous les thermocycleur n'offrent pas les mêmes performances. Certains appareils peuvent être confrontés à des limitations liées à la constance ou à la précision de la température le long du gradient. Il est essentiel que les chercheurs examinent attentivement les spécifications et les performances des thermocycleur à gradient afin de s'assurer qu'ils sont adaptés aux besoins spécifiques de leurs applications (Srinivas, 2024).

IV.2. Fonctionnement de l'appareil :

IV.2.1. Programmation des cycles thermiques :

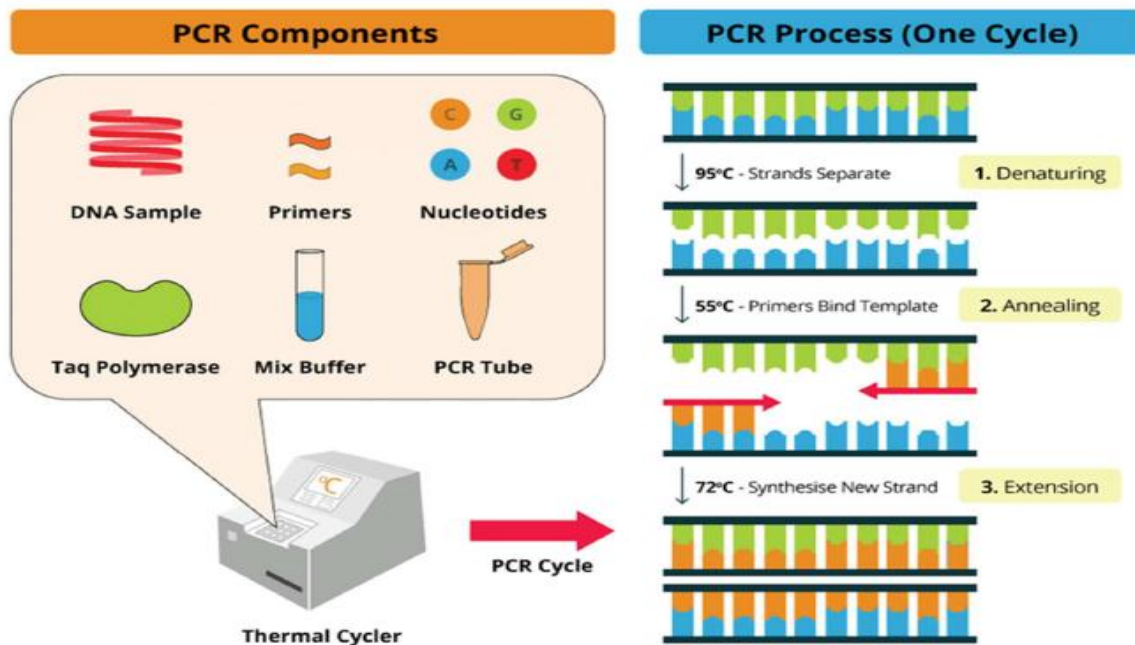


Figure 21: Programmation des cycles thermiques (Srinivas, 2024).

Le cycle thermique est un processus fondamental de la PCR qui implique des cycles répétés de chauffage et de refroidissement afin d'amplifier l'ADN. (Figure 21)

Amplifier l'ADN. Le processus se compose de trois phases principales : dénaturation, recuit et extension. Voici une de chaque phase et de son rôle dans l'amplification de l'ADN (**Tableau 4**)

Tableau 4: Paramètres thermiques et objectifs des étapes d'un cycle de PCR

Phase	Température	Durée	Objectif
Dénaturation	94-96 °C	20-30 secondes	Séparation de l'ADN double brin en simple brin
Recuit	50-65 °C	20-40 secondes	Permet aux amorces de se lier à des séquences d'ADN complémentaires
Extension	72 °C	1-2 minutes	Permet à l'ADN polymérase de synthétiser de nouveaux brins d'ADN nouveaux brins

IV.2.2. Progrès des thermocycleur :

Le processus du cycle thermique répète généralement ces étapes de 20 à 40 fois, ce qui conduit à une amplification de la séquence d'ADN cible. Amplification SI de la séquence d'ADN cible. Des facteurs tels que la longueur de la séquence d'ADN, la composition de l'initiative et le type d'ADN peuvent affecter les températures et les temps spécifiés. Facteurs pour considérer la longueur de la séquence d'ADN, la composition de l'initiative et le type de polymérase utilisé. Pendant le processus de décomposition, une température élevée est une brisé les liaisons hydrogène entre les paires de règles, permettant le double séquençage d'ADN par division en chaînes simples.

Il est nécessaire de subjuguer la matrice d'ADN aux initiatives et à la polymérase au cours de cette étape. Sur les initiatives et la polymérase. La phase de génération améliore l'association des initiatives avec ses séries supplémentaires sur l'ADN monochrome. Séquences supplémentaires sur le modèle d'ADN monochrome. La température de cette étape est généralement inférieure au degré de fusion de départ de 5 à 10 ° C Les dispositifs de réaction de PCR modernes (PCR), également appelés dispositifs de recyclage thermique, sont également attribués par ce processus en organisant la température et la durée de chaque étape avec précision.

En ajustant la température et le temps de chaque étape avec précision. Ces appareils sont capables de chauffer et de refroidir rapidement les échantillons, certains atteignent des taux de chauffage allant jusqu'à 3,5 ° C. L'efficacité du cycle thermique peut être améliorée. Des facteurs tels que la masse thermique des récipients de réaction, la taille du mélange réactionnel et les

performances du dispositif de recyclage thermique peuvent affecter l'efficacité du cycle thermique.

La performance fondamentale du dispositif de recyclage thermique. L'amélioration de ces éléments peut améliorer l'amplification plus rapide et plus efficace. Il est important d'indiquer l'existence de versions du processus de recyclage thermique standard, conditionné à l'air pour des applications spécifiques. Par exemple, certaines procédures peuvent inclure une étape de corruption initiale étendue ou une étape d'extension finale étendue.

La formation est terminée. Dans certains scénarios, des protocoles d'interaction bipolaire polymérase sont également utilisés, ce qui combine des étapes de génération et d'extension. Ces protocoles sont également utilisés dans certains cas.

Il est essentiel de comprendre le processus du cycle thermique pour assurer le succès des expériences de polymérase en série et l'exploration et la réparation des erreurs lorsqu'ils apparaissent. En contrôlant les températures, les temps et le nombre de cours, les experts peuvent améliorer la réaction de polymérase en série. En ajustant le nombre de cours, les scientifiques peuvent contrôler avec précision les réactions de l'interaction de la polymérase en série pour convenir à différents types d'ADN et d'objectifs de recherche expérimentale (Srinivas, 2024).

Les thermocycleur ont connu des développements importants depuis sa présentation, ce qui améliore l'efficacité, la vitesse et la diversité de la PCR. Efficacité, vitesse et diversité de la PCR. Les principaux développements de la technologie de recyclage thermique sont les suivants :

Tableau 5: Progrès en matière de thermocycleur	
Avancement	Description
Chauffage/refroidissement à effet Peltier	Contrôle précis de la température à l'aide d'éléments thermoélectriques, permettant des cycles rapides et une meilleure uniformité de la température
Technologie du gradient	Permet de tester simultanément plusieurs températures de recuit sur l'ensemble du bloc d'échantillons. d'échantillons, optimisant ainsi les conditions de liaison des amorces
Systèmes de rampes rapides	Transitions de température à grande vitesse, réduisant la durée totale des cycles de plusieurs heures à moins d'une heure pour certains protocoles
Interfaces à écran tactile	Programmation et contrôle conviviaux des cycles de PCR grâce à des écrans graphiques intuitifs
Surveillance à distance	Connectivité Wi-Fi permettant aux chercheurs de suivre les progrès de la PCR à partir d'appareils mobiles

Blocs interchangeables	Flexibilité pour s'adapter à différents formats de tubes/plaques et volumes de réaction
Miniaturisation	Développement de thermocycleurs portables et alimentés par batterie pour une utilisation sur le terrain
Intégration à la qPCR	Combinaison d'un cycle thermique et d'une détection par fluorescence en temps réel pour une l'analyse quantitative

Ces développements ont considérablement renforcé les performances de la PCR et l'efficacité du processus de travail. La dernière génération offre des cours plus rapides, un réchauffement / refroidissement homogène et une flexibilité accrue dans la planification de la planification. L'utilisation de la technologie des gradients par les chercheurs facilite l'amélioration des conditions de PCR, tandis que les fonctions de surveillance augmentent à distance la productivité du laboratoire. La progression de la miniaturisation a créé des outils de PCR compacts, qui étend les possibilités d'utiliser cette technologie au diagnostic clinique et à la recherche sur le terrain. De plus, l'intégration du cycle thermique et la détection du temps réel ont été autour de la PCR quantitative, fournissant une évaluation précise de la mobilité de l'amputation AMDN (Srinivas, 2024).

IV.2.3. Technologies de contrôle de la température :

La gestion de la température est un élément crucial lors de la PCR, étant donné que des cycles exacts de chauffage et de refroidissement sont indispensables pour une amplification efficace de l'ADN. Ils sont indispensables pour réussir l'amplification de l'ADN. Les dispositifs de thermocyclage contemporains mettent en œuvre différentes technologies afin d'assurer un contrôle exact et homogène de la température dans les puits d'échantillons :

IV.2.3.1. Systèmes à base de Peltier :

- Utilisation d'éléments thermoélectriques pour un chauffage et un refroidissement rapides
- Assurer un contrôle précis de la température à $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$
- Permettent des transitions de température rapides, réduisant ainsi la durée totale des cycles.
- Couramment utilisés dans les thermocycleurs de paillasse

IV.2.3.2. Contrôle actif des tubes :

- Mesure la température réelle du mélange réactionnel pendant la PCR
- Permet de réduire le temps de séjour des programmes PCR, augmentant ainsi l'efficacité.
- Peut réduire le temps d'exécution total jusqu'à 50 % par rapport aux protocoles standard

IV.2.3.3. Technologie VeriFlex Block :

- Utilise 3-6 blocs Peltier indépendants
- Permet un contrôle plus précis de plusieurs zones de température
- Permet d'obtenir de véritables gradients de température linéaires pendant les expériences d'optimisation
- Offre une meilleure résolution des petites différences de température (jusqu'à 0,1°C)

IV.2.3.4. Systèmes aériens :

- Utilise de l'air chauffé pour le contrôle de la température
- Peut effectuer 40 cycles PCR en seulement 30 minutes
- Transitions de température plus rapides par rapport aux systèmes à base de blocs

IV.2.3.5. Technologie de gradient :

- Permet de tester simultanément plusieurs températures de recuit
- Facilite l'optimisation rapide des conditions de PCR
- Peut résoudre des différences de température aussi faibles que 0,1°C dans le bloc d'échantillons

IV.2.3.6. Systèmes micro fluidiques :

- Utiliser des canaux miniaturisés pour un transfert de chaleur rapide
- Permettent des cycles plus rapides grâce à la réduction de la masse thermique
- Utilisé dans certains dispositifs PCR portables et de soins sur place

✚ Ces technologies avancées de contrôle de la température ont considérablement amélioré les performances de la PCR en améliorant la précision de la température, en réduisant la durée des cycles et en permettant une optimisation plus efficace des protocoles. L'optimisation du protocole. Le choix de la technologie dépend de l'application spécifique. Des facteurs tels que la vitesse, la précision et le débit d'échantillons influençant la sélection d'un thermocycleur approprié. Thermocycleur approprié.

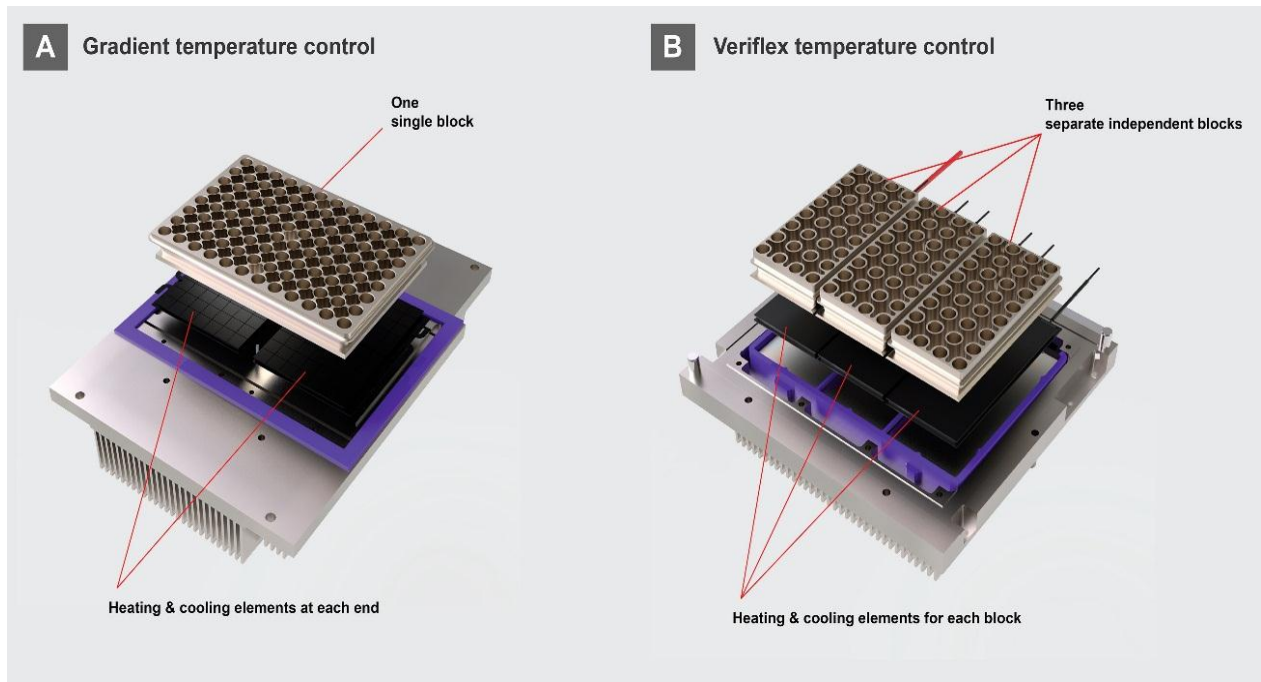


Figure 22: Contrôle de la température par gradient d'un seul bloc avec des éléments de chauffage et de refroidissement à chaque extrémité. (B) Bloc VeriFlex d'Applied Biosystèmes avec un contrôle de la température "meilleur que le gradient", comprenant trois blocs (Thermo Fisher, 2015).

Étant donné que le recuit des amorces sur la séquence cible est essentiel pour obtenir des résultats PCR satisfaisants, la température de l'étape de recuit doit souvent être optimisée. Pour examiner simultanément différentes températures, des blocs thermiques à gradient ont été mis au point, qui sont conçus pour permettre de régler les températures basses et élevées souhaitées autour du point de recuit théorique aux deux extrémités d'un seul bloc métallique (**Figure 22 A**). Une technologie "meilleure que le gradient" a été mise au point, dans laquelle des blocs métalliques séparés et isolés remplacent un seul bloc (**Figure 22 B**). Cela permet un contrôle plus précis de la température pour une optimisation plus rapide.

Outre la technologie des blocs, les algorithmes de contrôle des températures des échantillons se sont améliorés au fil des ans. Des modèles mathématiques complexes sont appliqués pour une régulation plus précise des températures des blocs afin d'obtenir un chauffage et un refroidissement uniformes des échantillons PCR. Cette innovation implique de mesurer la température des échantillons eux-mêmes, en plus de la température du bloc thermique (Srinivas, 2024)

IV.2.4. Suivi des réactions en temps réel (qPCR) :

La qPCR, ou PCR quantitative en temps réel, offre la possibilité de surveiller l'amplification de l'ADN au fur et à mesure de sa progression. Ceci est accompli par le biais de

systèmes optiques intégrés qui identifient la fluorescence produite par des sondes ou des colorants particuliers. Cette technologie offre la possibilité de non seulement identifier l'ADN, mais également de le mesurer avec une précision élevée en temps réel.

Le bloc de PCR en temps réel, aussi connu sous le nom de bloc thermique pour qPCR, représente une avancée du traditionnel bloc thermique employé dans la PCR classique. Il maintient les fonctionnalités de contrôle thermique essentielles, tout en ajoutant un mécanisme de détection optique qui autorise une observation en direct de l'amplification de l'ADN au fil des cycles.

IV.2.4.1. Structure du bloc thermique en qPCR :

a. Fonction thermique :

Identique à un bloc thermique classique : cycles de dénaturation, hybridation et élongation.

Maintien d'une température homogène et stable, avec rampes de chauffage/refroidissement rapides ($\geq 3-5$ °C/s).

Adapté à des plaques optiquement transparentes (souvent à 96 ou 384 puits) pour permettre la lecture optique.

b. Système de détection optique intégré :

Composé d'un module d'excitation (LED ou laser) et d'un détecteur (photomultiplicateur ou caméra CCD).

Le système envoie une lumière à une longueur d'onde spécifique, qui excite un fluorophore présent dans le mélange réactionnel.

La fluorescence émise est captée à chaque cycle, analysée et convertie en valeur de fluorescence relative (RFU) (Kubista, 2006).

IV.3. Types d'appareils de PCR :

IV.3.1. Appareils à usage général vs spécifiques :

Les équipements de PCR polyvalents sont fréquemment employés dans les laboratoires de biologie moléculaire pour diverses applications, y compris le diagnostic médical, l'investigation génétique et l'identification des agents pathogènes. Ces dispositifs autorisent l'exécution de PCR standard et de PCR en temps réel (qPCR), grâce à leur agencement adaptable et leur aptitude à un échantillonnage élevé.

IV.3.1.1. Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR:



Figure 23: Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (Schmid, 2012)

 **Description :**

Le système CFX96 Touch est un système de détection PCR en temps réel puissant, précis et flexible. **(Figure 23)** Cet instrument PCR en temps réel à six canaux (cinq couleurs et un canal FRET) combine des technologies optiques avancées avec un contrôle précis de la température pour fournir une détection sensible et fiable pour les réactions uniques ou multiplex. Configurez rapidement des analyses et surveillez les traces d'amplification en temps réel sur l'écran tactile LCD intégré, ou utilisez le logiciel CFX Maestro inclus pour planifier facilement et intuitivement votre expérience et analyser les résultats à partir d'un ordinateur connecté. Avec une détection de cible maximale de cinq, des performances inégalées du contrôleur de température, une fonctionnalité autonome inégalée et un logiciel puissant mais facile à utiliser, le système tactile CFX96 est conçu pour faire progresser votre qPCR. Vitesse de chauffage maximale : 5 °C/sec. Vitesse de chauffage moyenne : 3,3 °C/sec. Température du couvercle : Chauffé à 105°C. Plage de température : 0-100°C. Précision de la température (à 90°C) : $\pm 0,2^\circ\text{C}$. Homogénéité de la température (à 90 °C) : $\pm 0,4^\circ\text{C}$, en 10 secondes / probablement. Plage de fonctionnement du gradient : 30 – 100 °C. Plage programmable de gradient : 1 – 24°C. Excitation : 6 LED filtrées. Détection : 6 photodiodes filtrées. Plage de longueurs d'onde d'excitation/émission : 450 à 730 nm Sensibilité : Détecte 1 copie de la séquence cible dans l'ADN génomique humain. Plage dynamique : 10 ordres de grandeur. Temps de balayage pour tous les canaux : 12 secondes Temps de balayage pour FAM/SYBR Green uniquement : 3

secondes Volume d'échantillon : 1 à 50 µl (10 à 25 µl recommandés). Dimensions (LxPxH) : 330 x 460 x 360 mm Poids : 21 kg (Schmid, 2012).

 **Applications :**

- Quantification de l'expression génique
- Détection de mutations
- Diagnostic clinique

 **Principales caractéristiques et avantages**

Avec le système de détection PCR en temps réel CFX96 Touch, vous pouvez :

- Mettre en place votre système rapidement - installation facile et optique calibrée en usine
- Minimiser l'utilisation d'échantillons et de réactifs - multiplexage jusqu'à 5 cibles avec des volumes d'échantillons aussi faibles que 10 µl
- Optimisation des réactions en une seule fois - fonction de gradient thermique
- Analyser les données plus rapidement - visualiser toutes les données en une seule fois et exporter uniquement les données dont vous avez besoin dans le format que vous souhaitez.
- Utiliser des outils d'analyse de données avancés - expression génique normalisée à l'aide du logiciel CFX Maestro
- Configurez le système en fonction de vos besoins - utilisez-le sans ordinateur, utilisez jusqu'à 4 systèmes à partir d'un seul ordinateur ou intégrez-le au CFX Automation System II pour un débit plus élevé.
- Combinez le système CFX96 Touch avec les normes de bonnes pratiques de laboratoire - utilisez le logiciel CFX Maestro, Security Edition pour la collecte et l'analyse des données afin de simplifier la conformité avec les réglementations américaines FDA 21 CFR (Bio-Rad Laboratories., 2012).

IV.3.1.2. Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR:

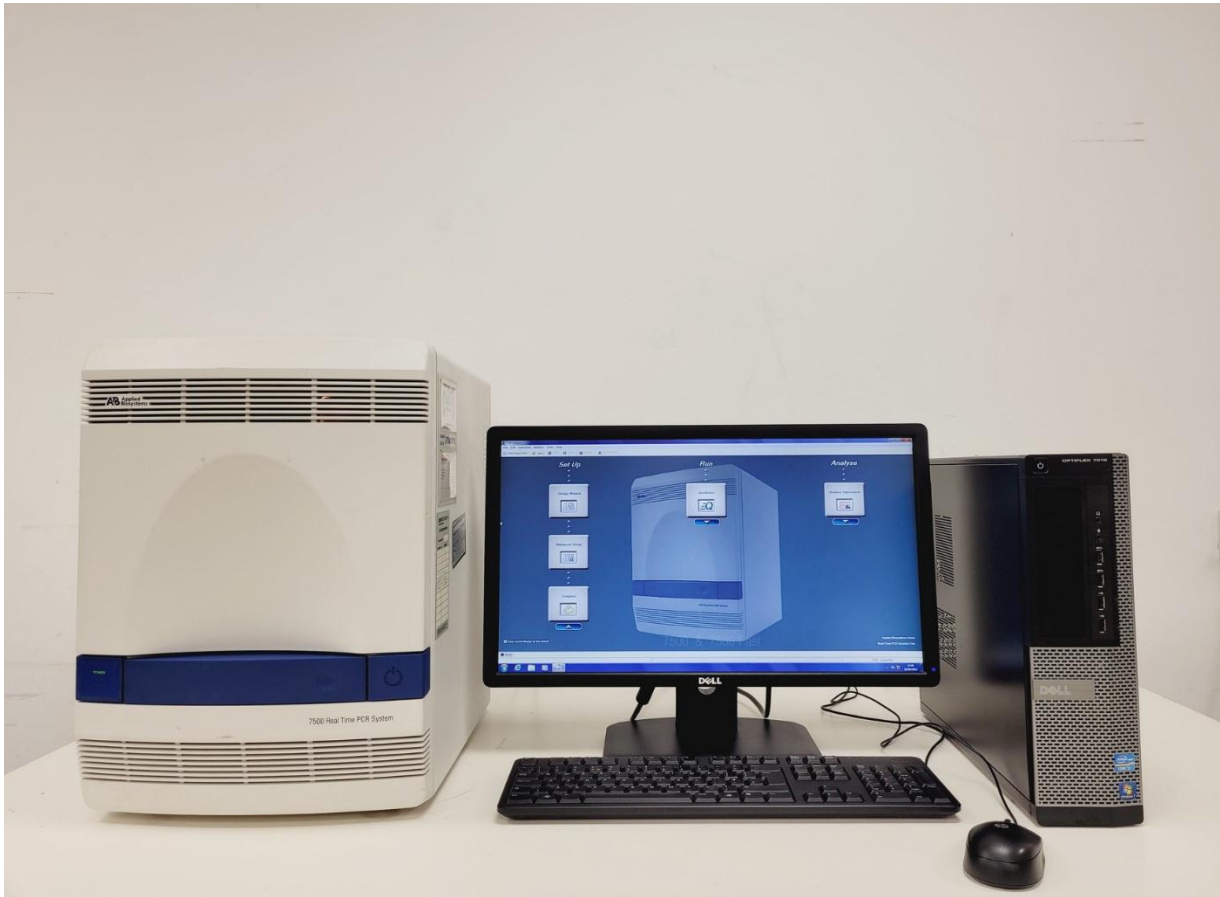


Figure 24: Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific;, 2006).

Description :

Le 7500 Real-Time PCR System d'Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) est un appareil de PCR en temps réel fiable et robuste, capable de détecter plusieurs cibles dans une seule réaction grâce à sa technologie TaqMan®. Il offre une version Fast pour accélérer les cycles PCR, ce qui est utile en environnement clinique. Son optique fixe et sa calibration automatique en font un outil de diagnostic précis. **(Figure 24)**

Le système 7500 de PCR en temps réel est une plate-forme puissante pour les laboratoires qui exigent des performances supérieures et une polyvalence maximale en matière de colorants. Ce système est une plateforme sophistiquée pour les utilisateurs qui exigent des capacités étendues et une polyvalence maximale. La plateforme de troisième génération est dotée d'un système optique innovant qui améliore la sensibilité et vous permet d'accéder à une plus large gamme de fluorophores. La capacité d'excitation variable permet une plus grande sensibilité pour les colorants de plus grande longueur d'onde (rouge).

- Le système optique spécialisé permet un étalonnage facile et précis pour les nouveaux colorants sans nécessiter l'ajout de nouveaux jeux de filtres.

- L'algorithme avancé de multi-composition minimise la diaphonie spectrale - supérieur pour le multiplexage.
- Le logiciel convivial comprend des assistants de configuration des plaques, des capacités de visualisation des données multi plaques et des outils d'analyse avancés pour rendre le traitement des données simple et direct (Thermo Fisher Scientific;, 2006).

 **Soutient de nombreuses applications :**

Les applications comprennent l'analyse de l'expression génique, la quantification des pathogènes, le génotypage SNP, les essais isothermes et +/- utilisant des contrôles positifs internes. Pour faciliter bon nombre de ces applications, Applied Biosystems® propose des tests TaqMan préformulés, prêts à l'emploi, dont la qualité a été testée et qui sont destinés à être utilisés avec le système 7500 (Thermo Fisher Scientific;, 2006).

 **Applications :**

- Tests COVID-19
- Détection de pathogènes
- Études d'expression génétique

IV.3.1.3. Mastercycler Eppendorf X50 :



Figure 25: Mastercycler Eppendorf X50 (Eppendorf, 2017).

Description :

Le Mastercycler X50 d'Eppendorf est un thermocycleur innovant destiné aux applications de PCR classiques. Il se distingue par une technologie avancée de rampes de température rapides (jusqu'à 10 °C/s) et la possibilité d'utiliser des gradients de température, ce qui permet d'optimiser les conditions de réaction. L'écran tactile couleur et la connectivité en réseau facilitent son intégration dans des laboratoires modernes (**Figure 25**).

Le nouveau Mastercycler X50 combine avec élégance vitesse, flexibilité et facilité d'utilisation. Avec son écran tactile intuitif offrant une commande précise du bout des doigts, le thermocycleur PCR MC X50 permet une optimisation facile de la PCR dans la recherche avancée en biologie moléculaire et une standardisation fiable des applications PCR de routine. Il est également parfaitement adapté aux besoins du NGS.

Applications :

- Optimisation de protocoles PCR
- Amplification d'ADN génomique

- Études de mutagenèse dirigée (Eppendorf, 2017).

IV.3.2. Innovations récentes (miniaturisation, portabilité) :

Avec l'essor des besoins en diagnostics rapides et décentralisés, la technologie PCR a connu une transformation majeure au cours de la dernière décennie. Deux axes clés d'innovation se sont distingués : la miniaturisation des systèmes PCR et leur portabilité, ouvrant la voie à des diagnostics plus accessibles, rapides et réalisables en dehors des laboratoires conventionnels.

IV.3.2.1. Miniaturisation des appareils PCR :

La miniaturisation vise à concevoir des appareils de plus petite taille, tout en conservant leur efficacité et leur précision. Ces systèmes utilisent souvent des micro puces (lab. On-a-chip) ou des cartouches à usage unique, et consomment des volumes réduits de réactifs (quelques microlitres seulement) (**Figure 26**).

Exemples :

- **MiniPCR :**
 - ✓ Appareil compact (taille d'un livre)
 - ✓ Utilisé dans l'éducation, les missions sur le terrain et même dans l'espace (NASA)
 - ✓ Connecté via USB à un ordinateur pour programmation
- **MicPCR (Bio Molecular systèmes) :**
 - ✓ Hautement portable, avec 48 puits
 - ✓ Analyse rapide en 40 minutes

Avantages :

- ✓ Gain d'espace en laboratoire
- ✓ Réduction du coût par test
- ✓ Utilisation dans des contextes mobiles (Huitao *et al.*, 2009).



Figure 26:MiniPCR (Biomeme, 2014).

IV.3.2.2. Portabilité des systèmes PCR :

La portabilité vise à rendre les appareils PCR autonomes, légers et facilement transportables, pouvant être utilisés sur le terrain (point-of-care, POC) sans infrastructure complexe. (Figure 27)

✚ Caractéristiques principales :

- ✓ Fonctionnement via batterie rechargeable ou port USB
- ✓ Résultats en temps quasi réel (10 à 30 minutes)
- ✓ Interfaces connectées à des smartphones ou tablettes
- ✓ Utilisation par du personnel non expert

Exemples marquants :

- **Biomeme Franklin :**

PCR portable à 3 canaux, connectée à un smartphone. Conçue pour des analyses sur le terrain, notamment dans les régions à ressources limitées, Utilisé pour la détection du SARS-CoV-2, Ebola, grippe, etc (Biomeme, 2014).



Figure 27:Portabilité des systèmes PCR (globalpointofcare, 2023).

IV.3.2.3. Abbott ID NOW :

Plateforme d'analyse moléculaire isotherme (rapide mais différente de la PCR conventionnelle) utilisée massivement pour les tests COVID-19 dans les cliniques et aéroports (Figure 28)

+ Caractéristiques principales :

- Résultats en 6 à 12 minutes
- Technologie d'amplification isotherme
- Utilisation en point de soin (POC)
- Détection de diverses maladies infectieuses (globalpointofcare, 2023).



Figure 28: Abbott ID NOW (Niemz et al., 2011).

IV.3.2.4. Cepheid GeneXpert Omni :

- Solution portable pour milieux à faibles ressources.
- Intègre extraction, amplification et détection dans une cartouche unique. (Figure29)

✚ Avantages :

- ✓ Diagnostic in situ, même dans des zones rurales ou isolées.
- ✓ Temps de réponse réduit.
- ✓ Moins besoin de personnel spécialisé.
- ✓ Autonomie : fonctionne sur batterie, idéal pour les zones sans accès fiable à l'électricité.
- ✓ Simplicité d'utilisation : interface intuitive nécessitant une formation minimale.
- ✓ Polyvalence : utilise les mêmes cartouches que les autres systèmes GeneXpert, permettant une large gamme de tests.
- ✓ Connectivité : transmission des résultats en temps réel pour une prise de décision rapide (Niemz et al., 2011).



Figure 29:Cepheid GeneXpert Omni (Cepheid;, 2015).

+ Applications

Le GeneXpert Omni est particulièrement adapté pour :

- ✓ Le diagnostic rapide de maladies infectieuses telles que la tuberculose, le VIH, la grippe et le COVID-19
- ✓ Les environnements à ressources limitées ou éloignés
- ✓ Les situations d'urgence sanitaire nécessitant une réponse rapide (Cepheid;, 2015).

IV.4. Limitations et défis techniques :

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique de biologie moléculaire puissante permettant l'amplification ciblée de fragments d'ADN. Malgré son efficacité remarquable, cette méthode présente certaines limites techniques notables, dont les plus critiques sont le risque de contamination croisée et les défis liés à la sensibilité et à la spécificité des résultats.

IV.4.1. Contamination croisée :

La contamination croisée est l'un des problèmes majeurs rencontrés en PCR, en raison de l'extrême sensibilité de cette technique. Même une infime quantité d'ADN étranger, souvent issue d'amplifications précédentes (amplicons), peut entraîner un faux positif. Ces contaminations peuvent provenir :

- ✓ Des aérosols générés lors de l'ouverture des tubes post-amplification,
- ✓ D'un mauvais usage du matériel (pipettes, pointes, gants),
- ✓ Ou encore de la présence de résidus d'ADN dans l'environnement de travail.

Pour limiter ces risques, plusieurs stratégies sont recommandées :

- ✓ Séparation stricte des zones de préparation, d'extraction et d'amplification,

- ✓ Utilisation de pointes filtrantes stériles et de consommables jetables,
- ✓ Mise en place de contrôles négatifs dans chaque série de réactions,
- ✓ application de traitements enzymatiques comme l'UNG (Uracil-N-Glycosylase) qui permet d'éliminer les produits d'amplification antérieurs contenant de l'uracile (Kwok & Higuchi, 1989).

IV.4.1.1. Stratégies de prévention et de contrôle :

Pour limiter au maximum le risque de contamination croisée, plusieurs pratiques sont recommandées :

- Séparation stricte des zones de travail : La création de zones dédiées pour l'extraction de l'ADN, la préparation des réactifs, et la PCR elle-même est essentielle. Chaque étape doit être réalisée dans une zone isolée pour éviter la contamination croisée (Wilson, 1997).

- Utilisation d'équipements et de consommables à usage unique : L'adoption de pointes filtrantes pour les pipettes, ainsi que des réactifs et des consommables jetables, limite les risques de contamination (Mackay I. , 2004).

- Contrôles négatifs (négative controls) : Inclure des contrôles négatifs dans chaque expérience PCR est une pratique standard pour détecter toute contamination préexistante dans les réactifs ou dans l'environnement.

- Traitement avec des enzymes décontaminantes : L'utilisation d'enzymes comme l'UNG (Uracil-N-Glycosylase) qui détruit l'ADN amplifié antérieur contenant de l'uracile (un composant spécifique des amplicons), est un moyen efficace d'éliminer les produits d'amplification précédents qui pourraient contaminer les nouvelles réactions (Kwok & Higuchi, 1989).

- Nettoyage rigoureux du matériel : Il est impératif de nettoyer fréquemment les surfaces et les équipements avec des solutions de décontamination spécifiques (ex. : hypochlorite de sodium, éthanol à 70%) pour éviter la propagation des traces d'ADN.

IV.4.1.2. Technologies avancées pour minimiser la contamination :

Des technologies comme la PCR en temps réel (qPCR) et la PCR multiplexe peuvent également réduire les risques de contamination croisée. En effet, la qPCR utilise des sondes spécifiques qui diminuent les risques de réaction avec des fragments d'ADN non ciblés, et la PCR multiplexe permet de traiter plusieurs cibles dans une même réaction, réduisant ainsi le nombre total d'expériences nécessaires (Bustin *et al.*, 2009).

IV.4.2. Sensibilité et spécificité des résultats :

La PCR est reconnue pour sa sensibilité exceptionnelle, pouvant détecter un seul exemplaire d'une séquence génétique cible. Cette capacité est cruciale en diagnostic précoce ou dans la détection d'agents pathogènes à faible abondance. Cependant, une trop grande sensibilité accroît également le risque de détection de contaminations sans importance biologique ou clinique (Altman & Bland, 1994).

En parallèle, la spécificité désigne la capacité des amorces à cibler exclusivement le fragment d'ADN d'intérêt sans amplification non spécifique. Un manque de spécificité peut conduire à des faux positifs ou des résultats peu fiables, surtout dans les échantillons complexes (environnementaux, cliniques) (Bustin *et al.*, 2009).

Les principaux facteurs influençant ces paramètres sont :

- La qualité du design des amorces (absence d'homologie croisée),
- La température d'hybridation (optimisation de l'annealing),
- Le choix de l'ADN polymérase et la composition du mélange réactionnel

Des techniques comme la **PCR nichée (nested PCR)** ou la **PCR quantitative en temps réel (qPCR)**, combinées à des sondes spécifiques (probes), permettent de renforcer à la fois la sensibilité et la spécificité (Mackay I. , 2004).

IV.4.2.1. Sensibilité (Sensibilité de la PCR) :

La sensibilité d'un test PCR fait référence à sa capacité à détecter correctement les échantillons contenant la cible d'ADN. Autrement dit, c'est la probabilité que le test identifie une présence réelle d'ADN spécifique dans un échantillon, ce qui est essentiel dans le cadre de la détection précoce d'infections ou d'agents pathogènes en faible quantité.

Haute sensibilité : Une PCR hautement sensible permet de détecter des quantités minimales de l'ADN cible, ce qui est crucial pour diagnostiquer des infections lors des premières étapes où l'ADN pathogène est présent en très faible abondance.

Faux négatifs : Une sensibilité faible peut entraîner des faux négatifs, c'est-à-dire des échantillons contenant la cible d'ADN, mais que le test n'identifie pas correctement. Cela est particulièrement problématique dans des contextes cliniques, car des patients infectés peuvent ne pas être diagnostiqués à temps (Bustin *et al.*, 2009).

L'optimisation de la qualité des amorces, des conditions d'amplification (température, durée), et des réactifs de qualité sont des éléments clés pour maximiser la sensibilité de la PCR.

IV.4.2.2. Spécificité (Spécificité de la PCR) :

La spécificité, en revanche, fait référence à la capacité du test PCR à cibler uniquement l'ADN d'intérêt, sans amplificateur d'autres séquences non spécifiques. Une PCR spécifique ne doit amplifier que la séquence cible d'ADN sans générer d'amplifications non désirées, ce qui minimise le risque de faux positifs.

Haute spécificité : Une PCR très spécifique identifie uniquement la séquence d'ADN d'intérêt parmi un ensemble complexe de séquences. Cela est particulièrement important pour éviter les résultats erronés dans les tests diagnostiques où des contaminations ou des variations génétiques peuvent induire de fausses identifications.

Faux positifs : Des problèmes de spécificité peuvent entraîner des faux positifs, où des produits amplifiés proviennent d'ADN non cible (par exemple, ADN d'une contamination ou d'une séquence génétiquement similaire) (Mackay I. , 2004).

L'optimisation de la conception des amorces (qui ne doivent pas se lier à des séquences non spécifiques), la température d'hybridation et l'utilisation de sondes spécifiques sont des stratégies pour améliorer la spécificité de la PCR.

IV.4.2.3. Interdépendance entre sensibilité et spécificité :

Il est essentiel de comprendre que la sensibilité et la spécificité sont souvent en compromis. Augmenter la sensibilité peut parfois réduire la spécificité et vice versa. Par exemple

Sensibilité élevée : Une PCR très sensible peut détecter même des quantités infimes de cible, mais au prix d'une augmentation de la probabilité de détecter également des séquences non spécifiques, ce qui peut diminuer la spécificité.

Spécificité élevée : Inversement, une PCR hautement spécifique peut manquer des séquences d'ADN à faible abondance, ce qui réduit la sensibilité.

Cela nécessite souvent un ajustement des conditions expérimentales et un design précis des amorces pour obtenir un équilibre optimal entre ces deux paramètres . (Wilson, 1997)

IV.4.2.4. Amélioration de la sensibilité et de la spécificité :

Des approches avancées comme la PCR quantitative en temps réel (qPCR) ou la PCR nichée (nested PCR) peuvent renforcer à la fois la sensibilité et la spécificité. Ces méthodes permettent d'amplifier des séquences plus spécifiquement et de quantifier la cible d'ADN en temps réel, ce qui améliore les performances globales des tests PCR.

L'utilisation de sondes fluorescentes dans la qPCR permet de détecter spécifiquement la cible, offrant ainsi une meilleure précision en termes de spécificité et de sensibilité par rapport à la PCR classique (Bustin *et al.*, 2009).

Conclusion

Conclusion :

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) s'est imposée comme une technique incontournable en biologie moléculaire. Elle permet, grâce à sa sensibilité et sa spécificité, d'amplifier des séquences précises d'ADN en très grande quantité, rendant possible une multitude d'applications dans divers domaines.

Au cours de ce travail, nous avons exploré les fondements théoriques de la PCR, ses variantes techniques telles que la qPCR ou la PCR digitale, ainsi que ses nombreuses applications, notamment dans les domaines du diagnostic médical, de la recherche scientifique, de la biotechnologie et de la médecine légale.

L'analyse de ces éléments a permis de mettre en lumière l'évolution rapide de cette technologie, son adaptation aux besoins modernes de la science, ainsi que les défis qu'elle continue de poser, tels que les risques de contamination, les coûts élevés ou la nécessité d'une expertise technique.

En conclusion, la PCR est une technologie puissante, en constante amélioration, qui ouvre des perspectives prometteuses pour la recherche et la médecine de demain. Son avenir s'annonce encore plus prometteur grâce aux progrès en matière de miniaturisation, d'automatisation et de portabilité des appareils, rendant la PCR toujours plus accessible et efficace.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques :

- Ajmone-Marsan, P., Negrini, R., Milanese, E., & Bozzi. (2002). Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by biallelic AFLP markers. *Animal Genetics*, 33, 280-286.
- Aliyu, A., & Ibrahim, M. (2014). GC-MS ANALYSIS OF PAVETTA CORYMBOSA LIPOPHILIC EXTRACT AND ITS. *Ife Journal of Science*, 19(2), 363.
- Altman, D., & Bland, J. (1994). Diagnostic tests 1. *Sensitivity and specificity BMJ*, 6943(1552), 308.
- Andrews, J., Brown, D., & Wise, R. (1996). Enquête sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens au Royaume-Uni. *J. Antimicrob. Chemother*, 37(1), 187-188.
- Aslam , M., Naeem , F., Seher, R., & Shehzad , W. (2023). Effect of storage temperature and duration on direct PCR amplification of various feather types and DBS matrices. *Gene*, 854(147116). Récupéré sur <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.147116>
- Atkins, S., & Clark, I. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet*, 45(1), 3–15.
- Bago, B., Piche, Y., & Simon, L. (1998). PCR in situ amorcée par fluorescence dans les mycorhizes arbusculaires. *Mycol. Res*, 10(12), 1540-1544.
- Bartlett, J., & Stirling , D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *In: Methods in molecular biology*, 2, 334.
- Beja-Pereira, A., Alexandrino, P., & Bessa, I. (2003). Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: A historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *Journal of Heredity*, 94, 243-250.
- Bell, C. A., Uhl, J., & Hadfield, T. (2002). Detection of Bacillus anthracis DNA by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 40(8), 2897–2002.
- Biomeme. (2014). *Biomeme. (n.d.). Franklin Mobile qPCR Thermocycler*. Consulté le 4 29, 2025
- Bio-Rad Laboratories. (2012). *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System*. Retrieved from. Consulté le 04 28, 2025, sur <https://www.bio-rad.com/en-dz/product/cfx96-touch-real-time-pcr-detection-system?ID=LJB1YU15>

- Brinkmann, B., & Gill, P. (1997). Considérations du groupe européen de profilage ADN (EDNAP) sur la nomenclature des STR. *Forensic Science International*, 87, 185–192.
- Buntjer, J., Otsen, M., Nijman, I., & Kuiper, M. (2002). Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting. *Heredity*, 88, 46-51.
- Bustin. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169-193.
- Bustin, S., Benes, V., Garson, J., & Hellemans, J. (2009, 04 01). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(04), 611-622.
- Cepheid;. (2015). *World's First "Go-Anywhere" Molecular Diagnostic System Unveiled at AACC*. Consulté le 5 1, 2025, sur <https://cepheid.mediaroom.com/2015-07-28-Worlds-First-Go-Anywhere-Molecular-Diagnostic-System-Unveiled-at-AACC>
- Chaitanya, L., & Breslin, K. (2018). Le système HIrisPlex-S pour la prédiction de la couleur des yeux, des cheveux et de la peau à partir de l'ADN : présentation et validation pour une utilisation médico-légale. *Forensic Science International: Genetics*, 35, 123–135.
- Chamberlain, J., & Gibbs. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic acids research*, 16(23), 11141–11156.
- Chumming, D., & Charles, R. (2004). Quantitative analysis of nucleic acids—The last few years of progress. *Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 1-10.
- Clark, A., Hubisz, M., Bustamante, C., & Williamson, S. (2005). Ascertainment bias in studies of human genomewide polymorphism. *Genome Research*, 15, 1496-1502.
- clinisciences. (2025, 04 07). *Réactifs et instruments pour l'immunologieADN polymérase haute-fidélité classiques*. Récupéré sur www.clinisciences.com: <https://www.clinisciences.com/achat/cat-adn-polymerases-haute-fidelite-3485.html>
- Dahllof, I. (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol*, 13(3), 213–217.
- DIARRA, & Adama , S. (2013). Étude comparative de la PCR classique et de la PCR en temps. 23.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., & Kinzler, K. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), 8817-8822.

- Du Chesne, A., Rand, S., & Brinkmann, B. (1993). Analyse rétrospective des traces biologiques à Southern, E.M. (1975). Méthode de détection de séquences spécifiques d'ADN parmi des fragments séparés par électrophorèse sur gel. *Molecular Biology*, 98, 503–517.
- Edward, U., Muller, A., Hammerschmidts, S., & Gerardy, S. (1994). Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Molecular Microbiology*, 14, 141-149.
- Elnifro, E., Ashshi, A., Cooper, R., & Klapper, P. (2000, 10). PCR multiplex : optimisation et application en virologie diagnostique. *Clin Microbiol Rev*, 4, 559-570.
- Eppendorf. (2017). *Mastercycler X50 – PCR Thermal Cycler Technical Note*. Retrieved from. Consulté le 04 28, 2025, sur https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/251334/Technical-Note_Eppendorf_MastercyclerX50.pdf
- Espy, M., Uhl, j., & Mitchell, P. (2000). Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *J. Microbiol*, 38(2), 795–799.
- Feldman, G. L., & Williamson, R. (1988). Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by DNA amplification for detection of KM-19 polymorphism. 2(8602), 102.
- Fred, A., & Mullis, K. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350. Récupéré sur [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6).
- Freeman, W., Walker, S., & Vrana, K. (1999). Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *BioTechniques*, 26, 112-122. 124-125.
- Furuta, Y., & Ohtani, F. (2001). Quantification de l'ADN du virus varicelle-zona chez les patients atteints du syndrome de Ramsay-Hunt et du zona sine herpète. *J. Clin. Microbiol*, 39(8), 2856-2859.
- Ghannam, Mousa, G., Varacallo, & Matthew, A. (2023, 07). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. *Penn Highlands Healthcare System*.
- globalpointofcare. (2023, 4 29). *ID NOW COVID-19 2.0*. Récupéré sur <https://www.globalpointofcare.abbott/fr/fr/product-details/id-now-covid-19-ww.html>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020, 05 23). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Univ BMC and Medical Libraries*, 175.
- Green, M., & Sambrook, J. (2019, 02). Réaction en chaîne par polymérase (PCR) imbriquée. *Protocole Harb de printemps froid*.

- Handyside, A., & Pattinson, J. (1989). Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet*, *1*(8634), 347–349.
- Helweg-Larsen, J., & Jensen, J. S. (2002). Detection of Pneumocystis DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia- a case control study. *BMC Infect. Dis*, *25*(2), 28.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., & Vanc, R. (1997). Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, *23*(3), 504.
- Higuchi, R. D., Higuchi, R., Dollinger, G., & Walsh, P. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA. *sequences*, *10*, 413-417.
- Hindson, B., Ness, K., Masquelier, D., & Belgrader, P. (2011, 10 28). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry*, *83*(23), 8604-8610.
- HI-TECH. (2019). *htds.fr*. Consulté le 04 13, 2025, sur <https://www.htds.fr/>: <https://www.htds.fr/sciences-analytiques/sciences-de-la-vie/analyses-moleculaires/pcr/>
- Hodinka, R. (1998). The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. *Clin. Diagn. Virol*, *10*(1), 25–47.
- Holland, P., Adramson, R., Watson, R., & Gelfand, D. (1991). Detection of specific polymerase chain product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of thermos aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, *88*, 7276-80.
- Huggett, J., Foy, C., Benes, V., Emslie, K., & Garson, J. (2013, 06 01). The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *59*(6), 892-902.
- Huitao, L., Yingying, W., Feng, L., & Yuan, G. (2009, 4). Microfluidic DNA amplification – A review. *Analytica Chimica Acta*, *638*(2), 88-93. Récupéré sur [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267009002232](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267009002232)
- Janice, C., Jeffery, C., Braman, & Holly, H. (1996, 06). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, *24*(18), 1-3. Récupéré sur <https://yris.ozyme.fr/fr/techozyme13-conseils-pcr-haute-fidelite>
- Jarne, P., & Lagoda, P. (1996). *from molecules to populations and back Tree* (Vol. 11).
- Jeffreys, A., Wilson, V., & Swee, L. (1985). Identification de régions « minisatellites » hautement variables dans l'ADN humain. *Nature*, *314*, 67–73.

- Jochen, W., & Alfred, P. (2003). *Real time polymerase chain reaction*. (Vol. 4). Chembiochem.
- Kadri, K. (2019). Polymerase chain reaction (PCR): Principle and applications. *Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science*, 17, 1.
- Kalinina, O. (1997, 05 01). Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. *Nucleic Acids Research*, 25(10), 1999-2004.
- Kayser, M. (2017). Utilisation médico-légale de l'ADN du chromosome Y : un aperçu général. *Human Genetics*, 136, 621–635.
- Kayser, M. (2015). Phénotypage ADN en médecine légale. *Forensic Science International: Genetics*, 18, 33–48.
- Kim Y, Y., Flynn, T., Donoff, R., & Wong, D. (2002). The gene: the polymerase chain reaction and its clinical application. *J. Oral Maxillofac. Surg*, 60(7), 808–815.
- Korbie, D., & Mattick, J. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3, 1452-1456.
- Kubista, M. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95–125.
- Kwok, S., & Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *339(6221)*, 237–238. Récupéré sur 1989.
- Laboratories, Bio-Rad. (2019). *CFX Maestro Software Guide for Real-Time PCR Detection Systems (Version 2.0)*. Bio-Rad. Récupéré sur <https://www.bio-rad.com/>.
- Lawyer, F., Stoffel, S., Saiki, R., & Myambo, K. (1989). Gelfand DH. Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from Thermus aquaticus. *Biological Chemistry*, 6427-6437.
- Longo, M., Berninger, M., & Hartley, J. (1990, 09). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 39(1), 125–128.
- Lyons, S. R., Griffen, A. L., & Leys, E. (2000). Quantitative real-time PCR for Porphyromonas gingivalis and total bacteria. *J. Clin. Microbiol*, 38(6), 2362–2365.
- Maccartney, H., & Foster, S. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest. Manag. Sci*, 59(2), 129–142.
- Mackay, I. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 190–212.

- Madrid Universidad;. (2024, 08). Récupéré sur https://www.ucm.es/data/cont/docs/1462-2017-10-18-3.3%20Variations%20PCR_fr.pdf
- Mammedov, T., Pienaar, E., Whitney, S., & TerMaat, J. (2008, 12). A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational Biology and Chemistry*, 32, 452-457.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1(16), 47-51.
- Marras, S. A., Kramer, F. R., & Tyagi, S. (1999). Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons. *Genetic Analysis*, 14, 151-156.
- Mathys, V., Lefèvre, P., Fontaine, V., Dehem, M., & P, Y. (2007, 9). La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. *Biologie moléculaire*, 9(3), 205.
- Matto, J., Saarela, M., & Alauusua, S. (1998). Detection of Porphyromonas gingivalis from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. *J. Clin. Microbiol*, 36(1), 157-160.
- Mburu, D., Ochieng, J., Kuria, S., & Jianlin, H. (2003). Genetic diversity and relationships of indigenous Kenyan camel. 34, 26-32.
- medicalexp. (2014, 04 20). <https://www.medicalexp.fr>. Récupéré sur <https://www.medicalexp.fr/prod/ependorf-se/product-68382-445552.html>
- Mga-Technologies. (2025). <https://www.mga-technologies.fr>. Consulté le 04 08, 2025, sur <https://www.mga-technologies.fr/pcr-numerique-digital-technologie-dpcr/>
- Mhlanga, M. M., & Malmberg, L. (2001). Using molecular beacons to detect single nucleotide polymorphisms with real-time PCR. 25, 463-471.
- Moroni, M., Veronese, S., Benvenuti, S., & Marrapese, G. (2005). Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *The Lancet Oncology*, 6(5), 279-286.
- Mullis, K. (1990, 04). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *SCIENTIFIC AMERICAN*, 262(4), 61.
- Mullis, k. B. (1994). *The polymerase chain reaction* (Vol. 41).
- Myakishev, M., Khripin, Y. H., & Hamer, D. (2001). High-throughput SNP Genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Research*, 11, 163-169.

- NCBI. (2008). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Récupéré sur National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr>
- Nei, M. (1972). *Genetic distance between populations* (éd. The American Naturalist, Vol. 106).
- Nielsen, R., & Signorovitch, J. (2003). Correcting for ascertainment biases when analyzing SNP data: Applications to the estimation of linkage disequilibrium. *Theoretical Population Biology*, 63, 245-255.
- Niemz, A., Ferguson, T., & Boyle, D. (2011). Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends in Biotechnology*, 5, 240–250.
- Nijman, I., Otsen, M., Verkaar, E., & de Ruijter, C. (2003). Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA satellite DNA AFLP and microsatellites. *Heredity*, 90, 10-16.
- Nitsche, A., Mackay, I., & Arden, K. (2002). Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 1292-1305.
- Nolan, T., & Bustin, S. (2001). of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Methods*, 25, 386-401.
- Okada, M., Hayashi, F., & Nagasaka, N. (2000). Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J. Clin. Periodontol.*, 27(10), 763–768.
- Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J., Le Corre, D., & Mazutis, L. (2011). Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip*, 11(13), 2156.
- Pelt-Verkuil, E., Belkum, A., & John, P. H. (2008). *A brief comparison between in vivo DNA replication and in vitro PCR* (éd. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification). Netherlands: Springer.
- Pinheiro, L., Coleman, V., Hindson, C., & Herrmann, J. (2012). Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Analytical Chemistry*, 84(2), 1003-1011.
- Plouzeau, C., Paccalin, M., & Beby-Defaux, A. (2007, 11). Diagnostic et surveillance épidémiologique des infections grippales et à virus respiratoire syncytial : intérêt de la PCR multiplex. *Diagnosis and epidemiological surveillance of influenza and respiratory syncytial virus infections: interest of multiplex PC. Médecine et Maladies Infectieuses*, 37(11), 729.

- qiagen. (2013). *QIAquick PCR Purification Kit pour le nettoyage par PCR*. Consulté le 04 20, 2025, sur www.qiagen.com/fr: <https://www.qiagen.com/fr-us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit>
- Rajeevan , M., Vernon , S., & Unger , N. (2001). Validation of array-based gene expression profiles by real-time kinetic) RT-PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 3, 26-31.
- Raphaël, C., & Franco, T. (2006). *Preuve par l'ADN : La génétique au service de la justice la génétique au service de la justice*. Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes. Sciences Forensiques.
- Regina, M., & Klein. (2009, 3). Ocorrência de Staphylococcus aureus e detecção por PCR multiplex de genes de enterotoxinas clássicas em queijo e derivados cárneos. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 145-148.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., & Scharf, S. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491.
- Saitou, N., & Nei , M. (1987). The neighbor- joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Sakamoto, M., & Takeuchi, Y. (2001). Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiology and immunology*, 45(1), 39-44.
- Sanders, R., Huggett, J., Bushell, C., & Cowen, S. (2011, 03 30). Evaluation of Digital PCR for Absolute DNA Quantification. *Analytical Chemistry*, 83(17), 6474-6484.
- Santos, C., Sakai, V., & Machado, M. (2004). Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J. Appl. Oral Sci*, 12(1), 1–11.
- Saygun, I., Sahin, S., & Ozdemir, A. (2002). Detection of human viruses in patients with chronic periodontitis and the relationship between viruses and clinical parameters1437–1443. *J. Periodontol*, 73(12), 1437–1443.
- Schmid, C. (2012, 04 20). *labexchange*. Récupéré sur shop.labexchange.com/fr: https://shop.labexchange.com/fr/bio-rad-cfx96-touch-real-time-pcr-systembio-rad-cf.html?srsltid=AfmBOooe_AmPq2PBhkWuoX4seKdVrRLZNSmW5ybYyPbjCi95V30-EWz7
- Schmittgen, T., & Livak, K. (2008). *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method* (Vol. 3). Nature Protocols.

- Schuurman, R., & Descamps, D. (1996). Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol*, 34(12), 3016–3022.
- Scientific, Thermo Fisher. (2020). *User Interface Design in Real-Time PCR Instruments*. Récupéré sur <https://www.thermofisher.com>.
- Shelburne, C., & Gleason, R. M. (2002). Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Porphyromonas gingivalis* gene expression in vivo. *J. Microbiol. Meth*, 49(2), 147–156.
- Shlien, A., & Malkin, D. (2010). Copy number variations and cancer susceptibility. *Current Opinion in Oncology*, 22(1), 55-63.
- Slupphaug, G., Alseth, I., & Eftedal, I. (1993). Low incorporation of dUMP by some thermostable DNA polymerases may limit their use in PCR amplifications. *Anal Biochem*, 211(1), 164–169.
- Speers. (2006). Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. *Clin. Biochem. Rev*, 27(1), 39–50.
- Speers, D. J., Ryan, S., Harnett, G., & Chidlow, G. (2003). Diagnosis of malaria aided by polymerase chain reaction in two cases with low-level parasitaemia. *Inter. Med. J*, 33(12), 613–615.
- Srinivas, s. (2024). PCR Technique: Innovations in Molecular Biology. FREELANCE RESEARCH REVIEWER.
- Steitz, T. (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature*, 391(6664), 231–232.
- Su, X., Wu, Y., Sifri, C., & Wellems, T. (1996, 4 15). Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. *Nucleic Acids Research*, 24, 1574-1575.
- Sykes, P., Neoh, J., & Brisco, M. J. (1992). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*, 13, 444-449.
- Systems, R. M. (2018). *User Manual: LightCycler 96 Instrument – Interface and Usability Features (Rev. B)*. Roche Diagnostics. Récupéré sur <https://lifescience.roche.com>.
- Syvänen, A. (2001). Accessing genetic variation genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics.*, 2, 930-941.

- Takezaki, N., & Nei, M. (1996). *Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA* (éd. Genetics, Vol. 144).
- Tapio, M., Tapio, I., Grislis, Z., Holm, L., & Jeppsson, S. (2005). Native breeds demonstrate high contributions to the molecular variation in northern European sheep. *Molecular Ecology*, *14*, 3951-3963.
- Tateno, Y., Nei, M., & Tajima, F. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Molecular Evolution*, *19*, 153-170.
- Thermo Fisher. (2015). *Primer Design Tips & Tools*. Récupéré sur www.thermofisher.com: <http://www.thermofisher.com/ca/en/home/>
- Thermo Fisher Scientific;. (2006). *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System*. Retrieved from. Consulté le 04 28, 2025, sur <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4351104>
- thermofisher. (2025, 04 07). *The History of PCR*. Récupéré sur <https://www.thermofisher.com/dz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/history-pcr.html>
- thermofisher;. (2017). *PCR Optimization: Reaction Conditions and Components*. Récupéré sur applied biosystems: https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042520.pdf
- Tran, S. D., & Rudney, J. D. (1999). Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primer for simultaneous detection. *J. Clin. Microbiol*, *37*(11), 3504–3508.
- Tse, C., & Capeau, J. (2003). Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annale de Biologie Clinique*, *61*, 279-293.
- Tyagi, S., & Kramer, F. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, *14*, 303-308.
- Vidaki, A., & Kayser, M. (2018). Avancées récentes, méthodologies et perspectives en épigénétique appliquée à la médecine légale. *Forensic Science International: Genetics*, *37*, 180–195.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. (1999). Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(16), 9236-9241.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., & Reijans, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-1444.
- Weier, H., & Gray, J. (1988). A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *Mary Ann Liebert, Inc*, 7(6), 441.
- Weir, B., & Basten, C. (1990). *Sampling strategies for distances between DNA sequences* (éd. Biometrics., Vol. 46).
- Werrett, D., Gill, P., & Jeffreys, A. (1985). Utilisation des empreintes génétiques de l'ADN en médecine légale. *Nature*, 318, 577-579.
- Whale, A., Huggett, J., Cowen, S., Speirs, V., & Shaw, J. (2012, 06 1). Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Research*, 40(11), 82.
- Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S., & Brown, T. (1999). Detection of PCR products using self probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology*, 17, 804-807.
- White, R., Blainey, P., Fan, H., & Quake, S. (2009, 11 19). Erratum to: Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC Genomics*, 10(01).
- Wilfinger, W., Mackey, K., & Wilfinger, L. (2001). *The PCR Protocols Handbook*. Humana Press.
- Williamson, E. M., & Leeming J.P, J. P. (2000). Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. *Br. J. Haematol.*, 108(1), 132-139.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3741-3751.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., & Moss, A. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22, 130-138.
- Wong, G., Liu, B., Wang, J., Zhang, Y., Yang, X., & Zhang, Z. (2004). A genetic variation map for chicken with 2.8 million singlenucleotide polymorphisms. *Nature*.
- Yang, S., & Rothman, R. E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect. Dis*, 4(6), 337-348.

- Yong-l, O., & Alexandra, I. (2002). Quantitative real-time PCR: A critique of method and practical considerations. *Hematology*, 7, 59-67.
- Yuanli, Z., Dabing, Z., Wenquan, L., & Jianqun, C. (2003, 10 15). A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe. *Nucleic Acids Research*, 31(20), 123. Récupéré sur <https://doi.org/10.1093/nar/gng123>
- Zariffard, M., Saifuddin, M., Sha, B., & Spear, G. (2002). Détection d'organismes liés à la vaginose bactérienne par PCR en temps réel pour Lactobacilli, Gardnerella vaginalis et Mycoplasma hominis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 34(4), 277-281.
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., & Laššáková, S. (2020). PCR Past, Present and Future. *BioTechniques*, 4(69), 317–325.
- Zilinskiene , J. (2013). *High Fidelity PCR Enzyme Mix*. Thermo Fisher Scientific Inc. Récupéré sur www.thermoscientific.com/onebio

ملخص: تعد تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) من التقنيات الثورية في علم البيولوجيا الجزيئية، إذ تتيح تضخيم تسلسلات محددة من الحمض النووي بسرعة وبدقة عالية وحساسية كبيرة. ومنذ اكتشافها سنة 1983، شهدت هذه التقنية تطوراً ملحوظاً أدى إلى ظهور عدة أنواع مثلاً الكمي، الرقمي، و RT-PCR، لتناسب مع مختلف مجالات التحليل.

يقدم هذا البحث المبادئ الأساسية لتقنية PCR، والعناصر الضرورية لتنفيذها، وآلية عملها المعتمدة على ثلاث مراحل: التفكك، التهجين والاستطالة. كما يستعرض أهم أنواع PCR التقنية ومميزاتها، بالإضافة إلى تطبيقاتها الواسعة في مجالات متنوعة مثل التشخيص الطبي، البحث العلمي، التكنولوجيا الحيوية، والطب الشرعي.

وبفضل دقتها وسرعتها وقابليتها للتكيف، أصبحت تقنية PCR أداة لا غنى عنها في المختبرات الحديثة، ومع التقدم التكنولوجي المستمر، تزداد فعاليتها وانتشارها يوماً بعد يوم.

الكلمات المفتاحية: تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)، الحمض النووي (DNA)، البيولوجيا الجزيئية، التشخيص الطبي، الطب الشرعي، PCR الكمي، PCR بالنسخ العكسي.

Abstract: The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a revolutionary technique in molecular biology, enabling the rapid, specific, and sensitive amplification of targeted DNA sequences. Since its discovery in 1983, PCR has undergone significant advancements, giving rise to various formats such as real-time PCR (qPCR), digital PCR (dPCR), and reverse transcription PCR (RT-PCR), tailored to diverse analytical needs.

This thesis outlines the fundamental principles of PCR, the key components required for its implementation, and its mechanism based on cycles of denaturation, annealing, and elongation. It also explores the main technical variants of PCR and their respective advantages. Furthermore, it highlights the wide-ranging applications of PCR in medical diagnostics, scientific research, biotechnology, and forensic science.

Thanks to its accuracy, speed, and adaptability, PCR has become an indispensable tool in modern laboratories. Technological advancements continue to enhance its performance, accessibility, and versatility.

Keywords:

PCR, DNA, Molecular Biology, Medical Diagnosis, Forensic Medicine, RT-PCR.

Résumé : La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique révolutionnaire en biologie moléculaire, permettant l'amplification rapide, spécifique et sensible de séquences d'ADN. Depuis son invention en 1983, la PCR a connu une évolution considérable, donnant naissance à de nombreuses variantes telles que la PCR en temps réel, la PCR digitale, ou encore la RT-PCR, adaptées à divers contextes d'analyse.

Ce mémoire présente d'abord les principes fondamentaux de la PCR, les éléments nécessaires à sa mise en œuvre, ainsi que son mécanisme basé sur les cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation. Ensuite, il explore les principales variantes techniques de la PCR et leurs avantages spécifiques. Enfin, une large place est accordée à ses applications dans des domaines variés comme le diagnostic médical, la recherche scientifique, la biotechnologie, et la médecine légale.

Grâce à sa précision, sa rapidité et son adaptabilité, la PCR est aujourd'hui un outil indispensable dans les laboratoires modernes, et les avancées technologiques la rendent de plus en plus performante, accessible et polyvalente.

Mots clés : PCR, ADN, Biologie moléculaire, Diagnostic médical, Médecine légale, RT-PCR.