

# PCR - Polymerase Chain Reaction



## Coût

30 - 60 €\*  
\*par pathogène

## Délai

1 à 2 jours\*  
\*délai de réponse du laboratoire :  
8 à 15 jours ouvrés

## Fiabilité

4,5\*  
\*établie selon une échelle relative  
en fonction des autres techniques

## AVANTAGES

- Quantification parfois possible
- Détection d'agent pathogène avant l'apparition des symptômes

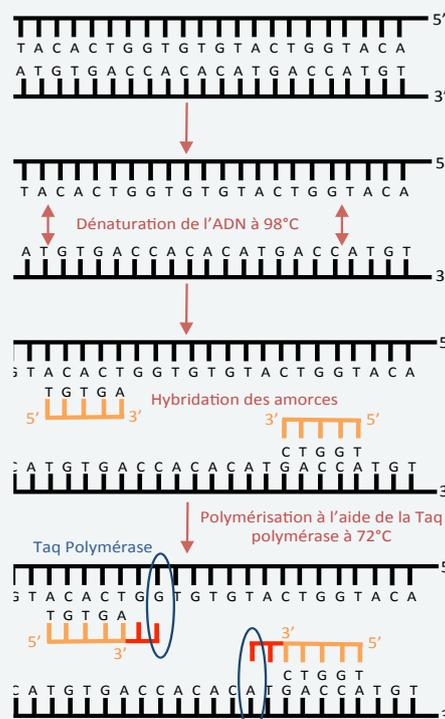
## INCONVÉNIENTS

- Détection d'ADN/ARN libre (cellules lysées, organismes mort)
- Prix pouvant être plus élevé pour certains micro-organismes
- Risque de contamination par d'autres ADN/ARN

## PRINCIPE

C'est une technique permettant de détecter un agent pathogène responsable de la maladie. La présence d'un organisme cible se traduit dans cette méthode par l'amplification spécifique d'un ou plusieurs marqueurs moléculaires (ADN/ARN). La PCR permet la détection d'une séquence cible d'ADN ou d'ARN d'un virus, d'une bactérie ou d'un champignon phytopathogène recherché. La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) repose sur l'amplification spécifique d'une séquence d'acide nucléique *in vitro*.

Chaque cycle de PCR s'effectue en 3 étapes : dénaturation thermique de l'ADN à 95°C, hybridation des amorces à 50-65°C, élongation à 72°C.



## Protocole de prélèvement des échantillons

- Prélever les organes suspectés malades ou des échantillons de sol et les stocker dans des sachets
- Annoter soigneusement les sacs individuellement
- Conserver au frais (4°C) et envoyer le plus vite possible (dans les 24h suivant le prélèvement)
- Préférer un envoi en début de semaine, par transporteur rapide, pour éviter le stockage durant le weekend

Contactez un laboratoire proposant ce service pour déterminer le type d'échantillon (nombre, nature...), le meilleur moment de prélèvement et les informations complémentaires à envoyer (état de la parcelle, itinéraires techniques...)

# PCR - Polymerase Chain Reaction

## Différents types de PCR

- La PCR en temps réel est basée sur une PCR classique mais une mesure de l'amplification est réalisée tout au long de la réaction d'où le terme « en temps réel ». Elle est pseudo-quantitative contrairement à la PCR classique.
- La RT-PCR permet de travailler à partir d'ARN qui est rétrotranscrit par une transcriptase inverse en ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est utilisé pour réaliser une PCR .

### PCR

1. Cycle PCR
  - Dénaturation thermique de l'ADN à 95°C.
  - Hybridation des amorces à 50°C-65°C
  - Elongation à 72°C
2. Electrophorèse
3. Révélation UV

### PCR en temps réel

1. Cycle PCR
  - Dénaturation thermique de l'ADN à 95°C.
  - Hybridation des amorces à 50°C-65°C
  - Elongation à 72°C
2. Révélation en temps réel par une sonde fluorescente
3. Résultats et quantification

### RT-PCR

1. Transcription inverse :  
ARN en ADNc
2. Cycle PCR
  - Dénaturation thermique de l'ADN à 95°C.
  - Hybridation des amorces à 50°C-65°C
  - Elongation à 72°C
3. Electrophorèse
4. Révélation UV

## Révélation des produits d'amplification de la PCR

La révélation est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide. Elle peut également se faire par émission de fluorescence. L'ADN était révélé historiquement par une coloration au bromure d'éthidium. Aujourd'hui, l'agent intercalant le plus utilisé est le SYBR Safe.

Cette étape de la PCR repose sur la migration des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. La séparation est réalisée lors du passage de l'amplicon (produits de l'amplification) dans un gel d'agarose ou d'acrylamide. Les acides nucléiques migrent à travers le gel avec des vitesses différentes selon le poids de la molécule.

## Révélation en temps réel

La révélation d'une PCR en temps réel est réalisé grâce à une courbe de fluorescence. La valeur de la fluorescence est corrélée à la quantité de produit amplifié. La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification par un signal fluorescent. Il en existe 2 groupes : les agents intercalants (bromure d'éthidium et SYBR®Green) et les sondes (Taqman, FRET, Molecular Beacons, Scorpion).