

**Voie technologique**  
**Terminale STL spécialité**  
**Biotechnologies**

Voie générale  
Première générale  
spécialité SVT

# BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIES

Article de l'INSERM Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, 07 mai 2020,  
<https://presse.inserm.fr/tests-diagnostiques-et-tests-serologiques-quel-role-dans-la-lutte-contre-la-pandemie-de-covid-19/39379/>

## Tests diagnostiques et tests sérologiques : quel rôle dans la lutte contre la pandémie de Covid-19 ?

Nécessaires pour mieux appréhender l'exposition de la population française au SARS-CoV-2 depuis le début de l'épidémie, les tests sérologiques sont à distinguer des tests diagnostiques RT-PCR.



**Savez-vous différencier un test diagnostique et un test sérologique ?  
Quelles informations nous apportent-t-ils ?  
Sont-ils équivalents ?**



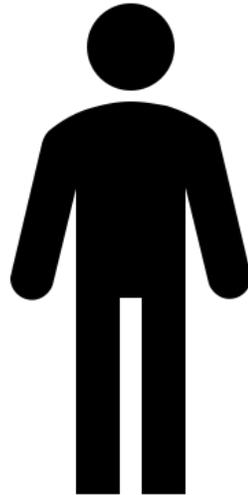
# DÉMARCHE TECHNOLOGIQUE : RÉPONDRE AU BESOIN DE TESTER LA PRÉSENCE DU VIRUS OU DE TESTER LA PRÉSENCE D'ANTICORPS

## Test diagnostique - PCR

→ Suis-je contaminé par le SARS-CoV-2 actuellement ?



Prélèvement nasopharyngé



Test immuno-  
ELISA

→ Recherche de  
SARS-CoV-2 dans le



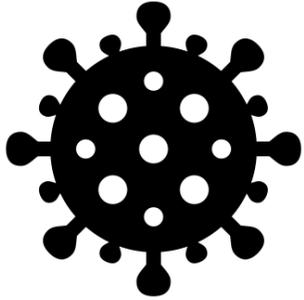
Prise de sang

Recherche des anticorps anti-SARS-CoV-2 dans le sérum du patient

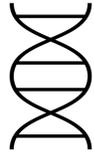
Que cherche-t-on dans le prélèvement nasopharyngé?

\* SARS-CoV-2 : *Severe Acute Respiratory Syndrome* (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) – CoronaVirus – 2

# QUE CHERCHE-T-ON DANS LE PRÉLÈVEMENT ?



L'ARN du virus est la trace recherchée

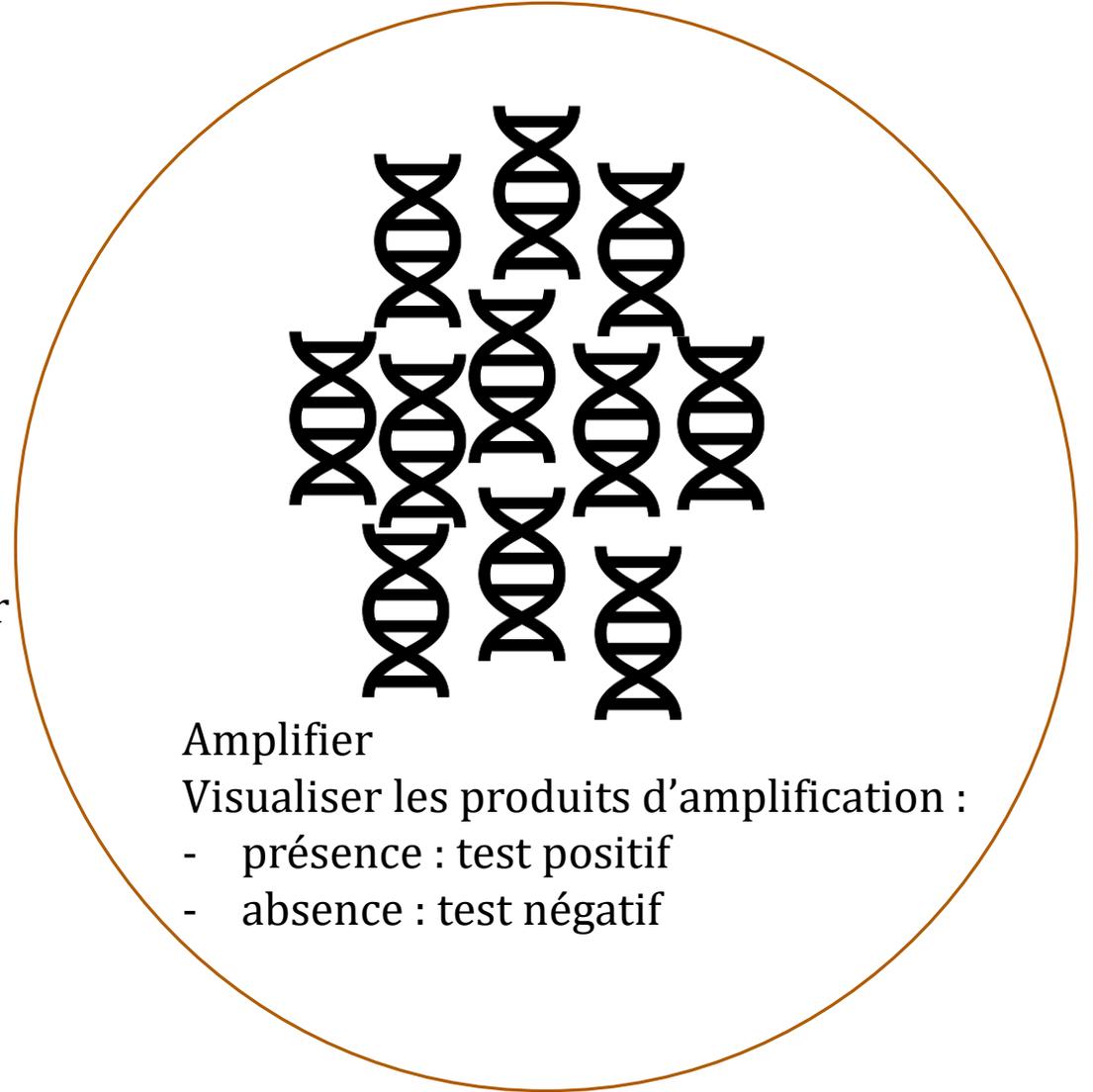


**RT PCR**



ADN obtenu à partir de l'ARN du virus

Mise en évidence de la présence du virus dans le prélèvement nasopharyngé



# STRUCTURE DE LA LEÇON



Présentation de la  
PCR



Procédure  
expérimentale



Analyse des  
résultats

*Question posée  
par les élèves*

# LA PCR :

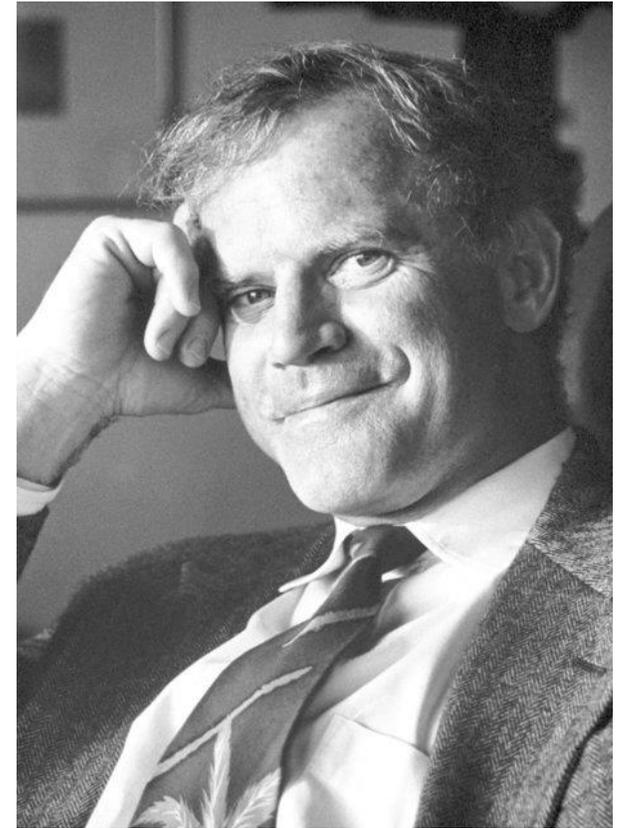
**PCR** : Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne

Mise au point par **le biochimiste Kary Mullis** (Prix Nobel de Chimie, 1993)

Méthode permettant l'amplification d'une séquence précise et ciblée d'une portion d'ADN.

Il existe aussi :

- La RT-PCR
- La PCR quantitative en temps réel (qPCR)
- Et plein d'autres...

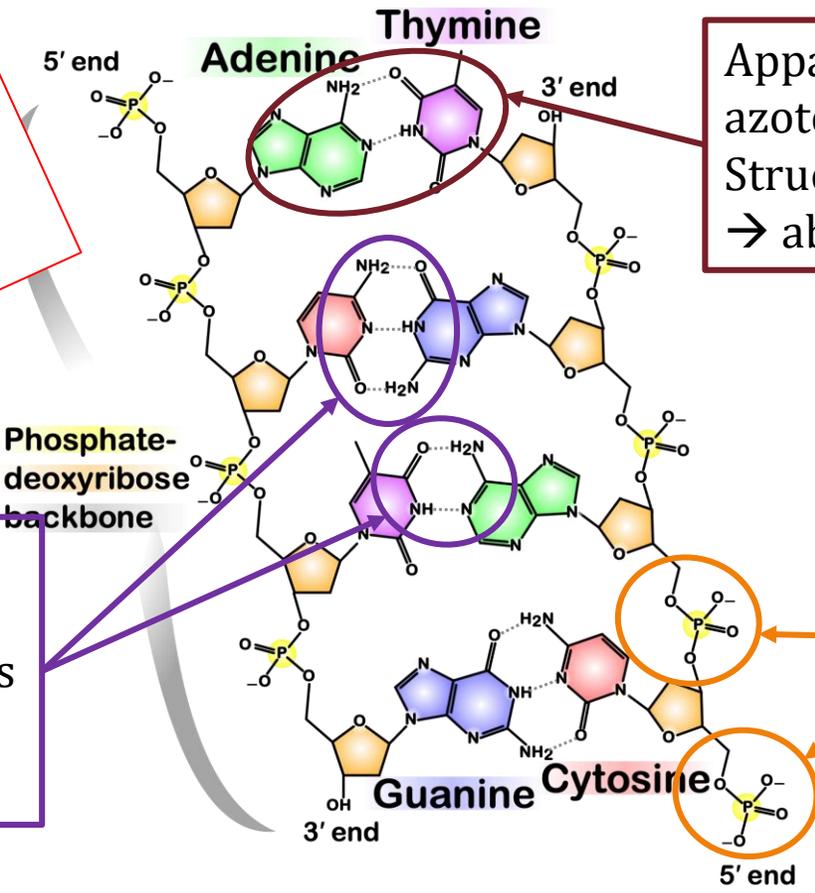


Kary Mullis,  
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/facts/>

**L'ADN est une biomolécule  
double brin chargée  
négativement**

Acide  
Déoxyribo  
Nucléique

interactions  
hydrogène :  
liaisons faibles  
dénaturées  
par la chaleur



Appariement des bases  
azotées  
Structure cyclique des bases  
→ absorption à 260 nm

groupement  
phosphate :  
O-

# LES ACTEURS DE LA PCR : ADN ET NUCLEOTIDES

Qu'est ce qui constitue la  
séquence d'ADN à  
amplifier ?  
Comment sont reliées les  
bases entre elles?

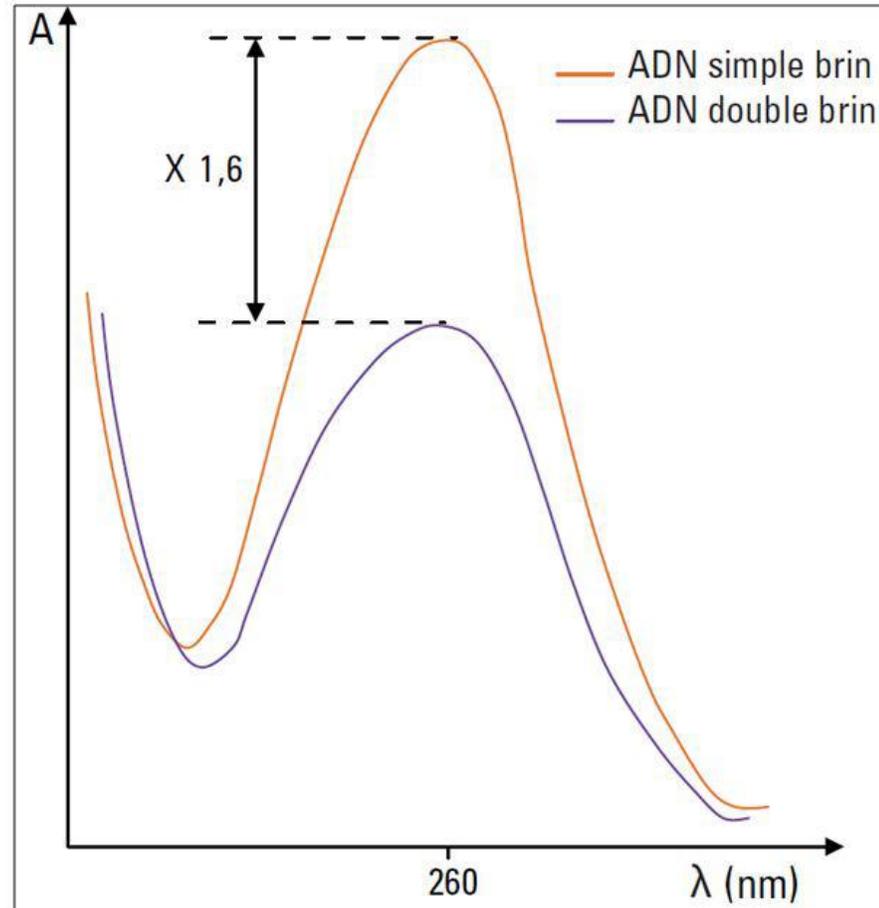
# LES PROPRIÉTÉS DE L'ADN EXPLOITÉES DANS LA PCR

## La dénaturation de l'ADN

$$\lambda_{\text{opt}} = 260\text{nm}$$

$$A_{\text{ADN double brin}} < A_{\text{ADN simple brin}}$$

→ effet hyperchrome



# LES PROPRIÉTÉS DE L'ADN EXPLOITÉES DANS LA PCR

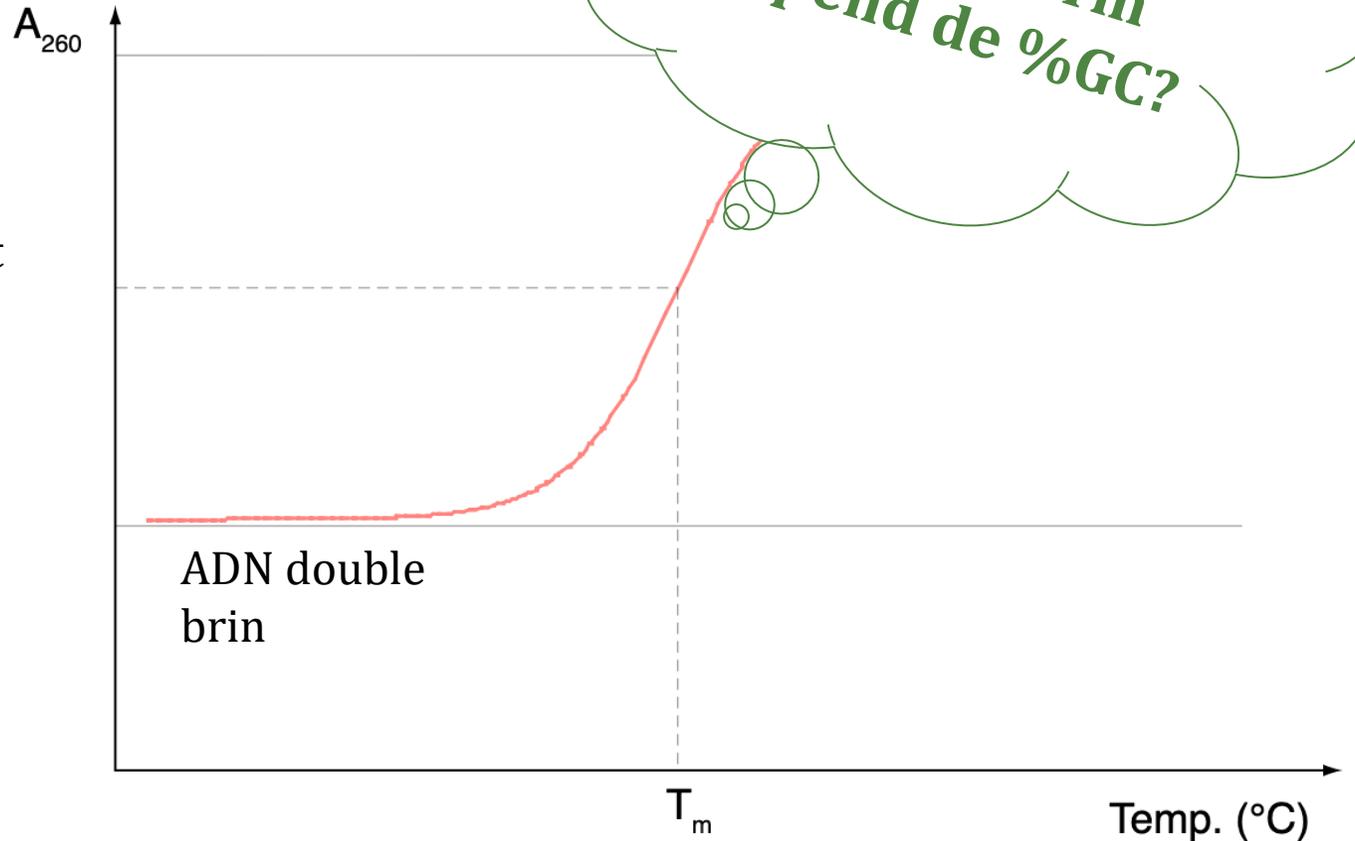
## La dénaturation de l'ADN

Quand on augmente progressivement la température

→ ouverture de la double hélice = dénaturation

$T_m$  : température de fusion  
(*m=melting*)

Température à laquelle 50% de l'ADN étudié est sous forme simple brin.



$T_m$  dépend notamment de :

- longueur du segment
- pourcentage de Guanine et de Cytosine (%GC)

# LES PROPRIÉTÉS DE L'ADN EXPLOITÉES DANS LA PCR

## La dénaturation de l'ADN

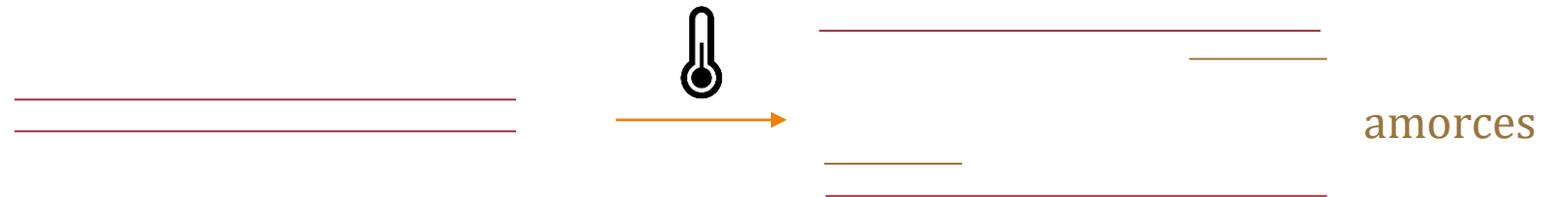
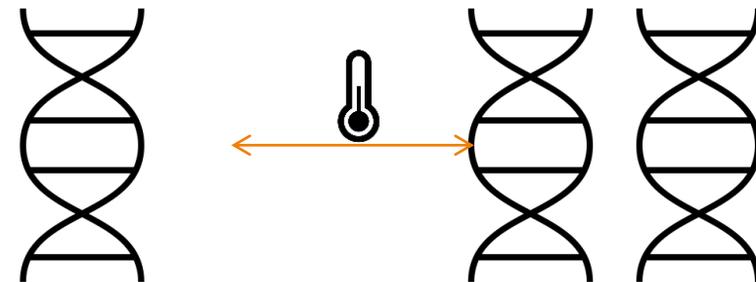
Quand on augmente progressivement la température

→ ouverture de la double hélice = dénaturation

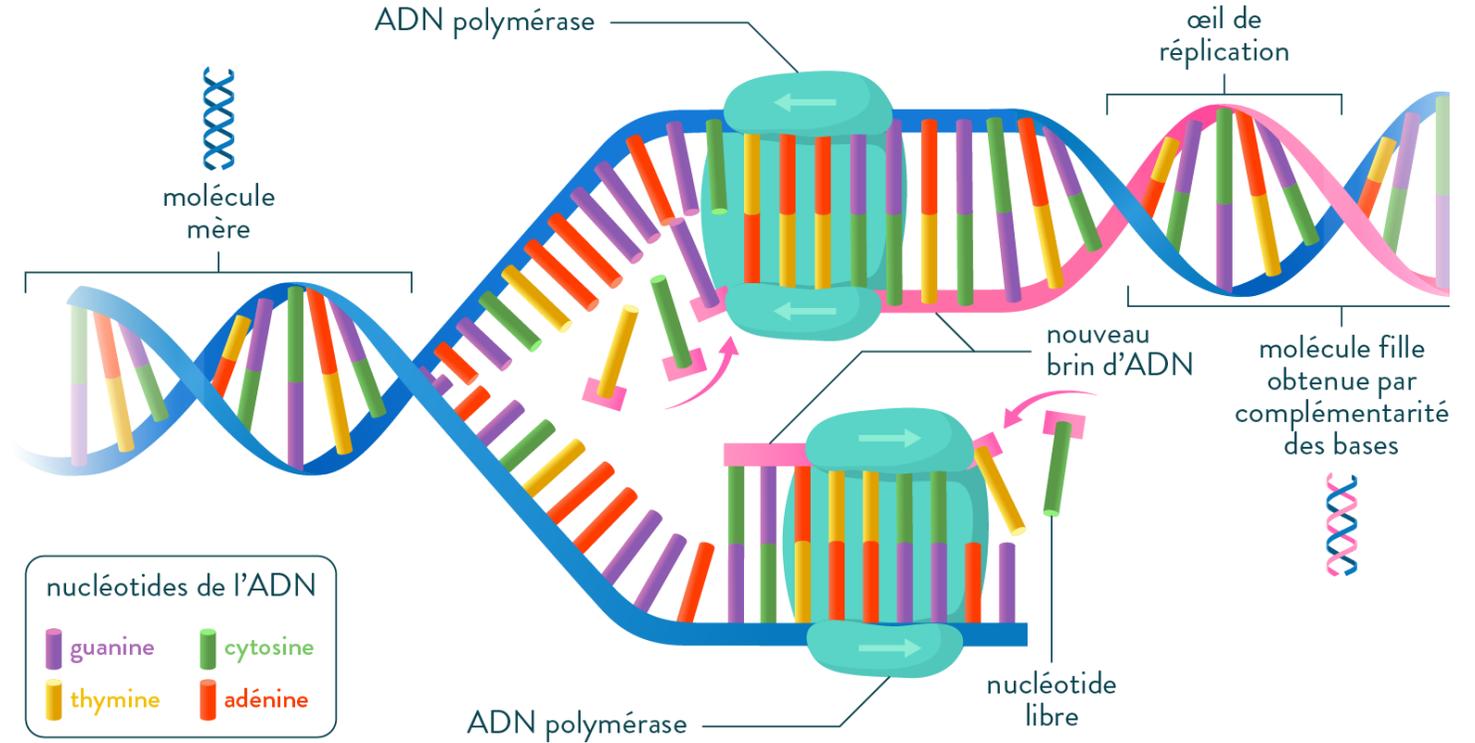
Quand on baisse doucement la température

→ les deux brins d'ADN se réassocient

Hybridation moléculaire



# LA REPLICATION DE L'ADN

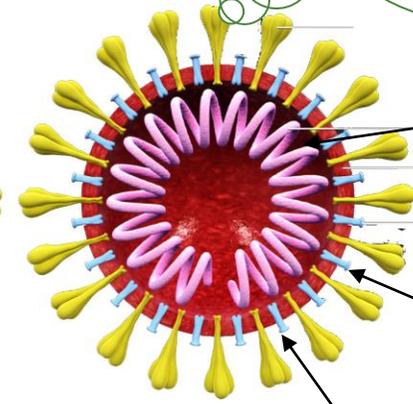
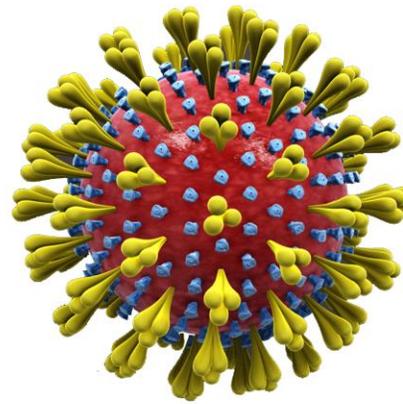
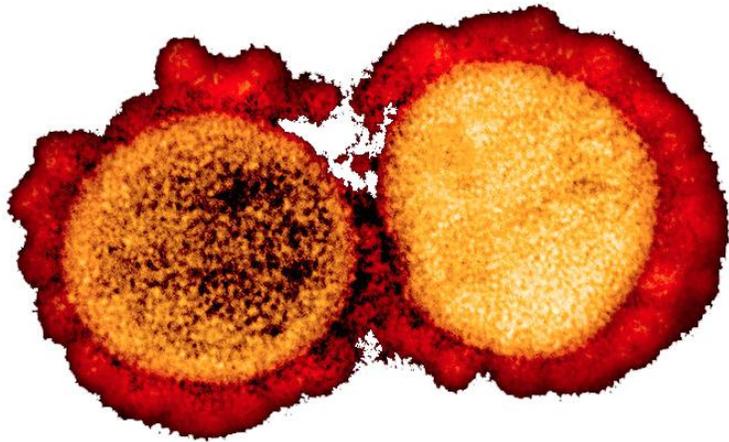


© SCHOOLMOUV

ADN polymérase ADN dépendante  
Synthèse d'un nouveau brin dans le sens 5' → 3'

La PCR utilise le principe de réplication semi-conservative de l'ADN des cellules vivantes.

# LE VIRUS SARS-COV-2 RESPONSABLE DE LA COVID 19



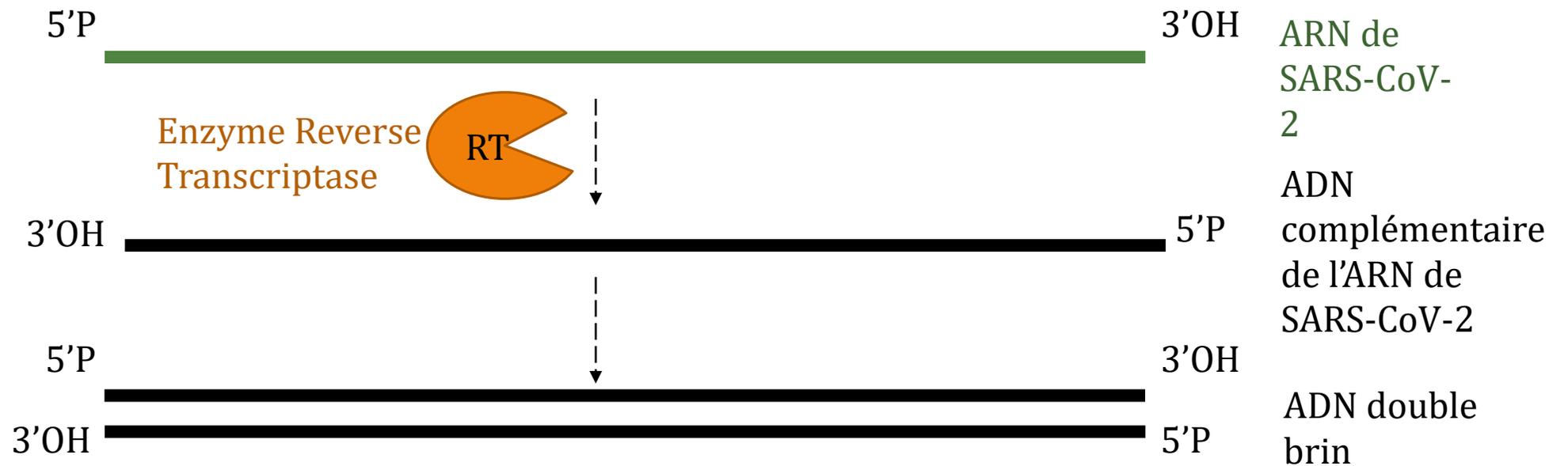
*Est-ce possible  
de faire une PCR  
sur de l'ARN ?*

Protéines de capsid  
N liées à l'ARN

Protéine de membrane

Hémagglutinine  
estérase HE

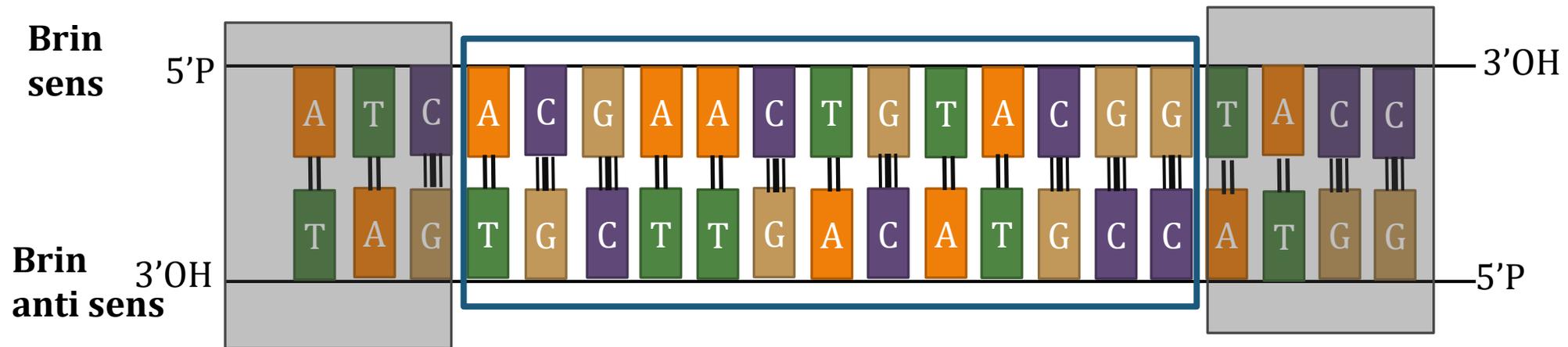
# RT-PCR



# LES ACTEURS DE LA PCR

La séquence d'ADN à amplifier : séquence génomique du virus SARS-CoV-2

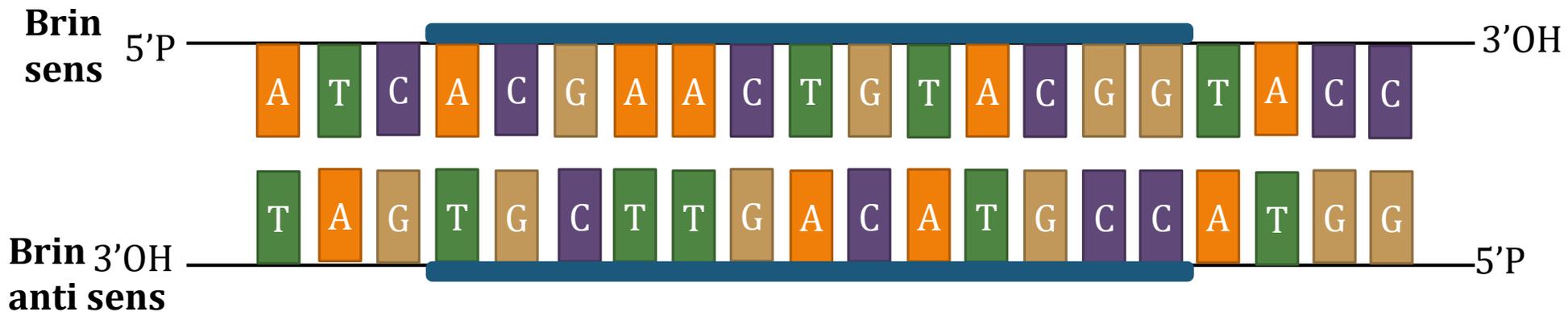
Région à amplifier – ADN matrice





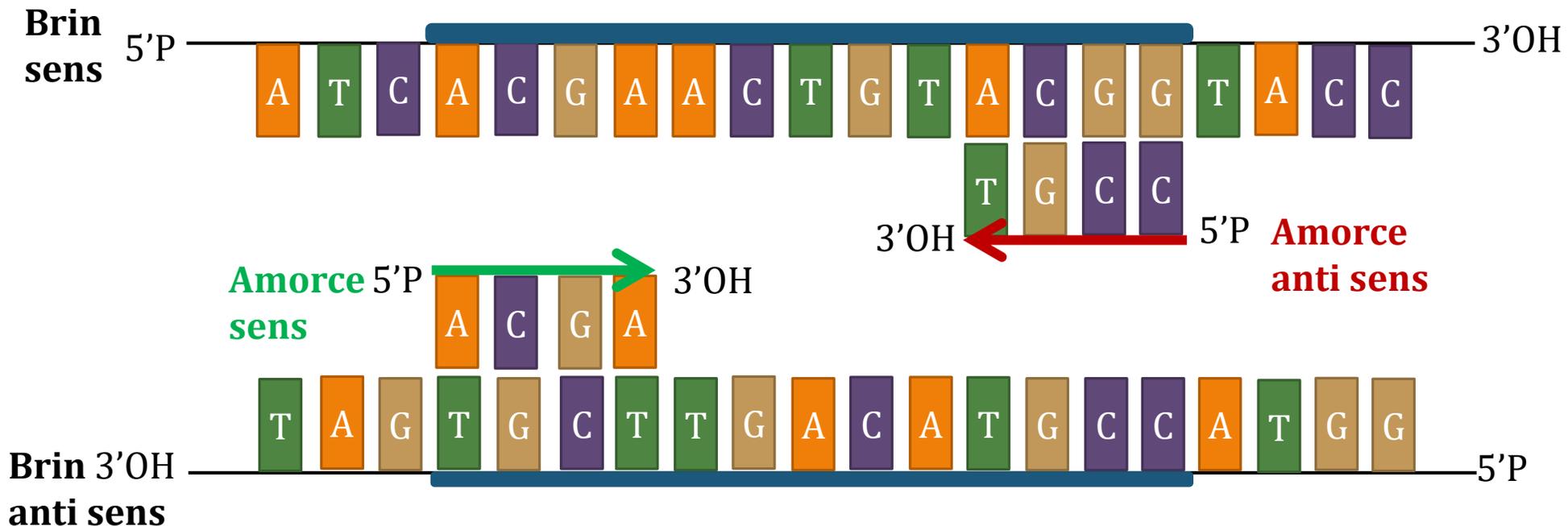
# LES ACTEURS DE LA PCR

**Deux amorces nucléotidiques** : oligonucléotides (fragments simples brins) de séquence complémentaire aux zones bordant la **région à amplifier**



# LES ACTEURS DE LA PCR

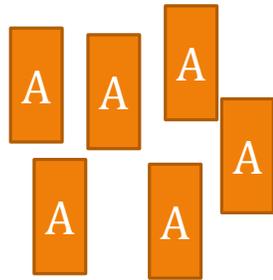
**Deux amorces nucléotidiques** : oligonucléotides (fragments simples brins) de séquence complémentaire aux zones bordant la **région à amplifier**



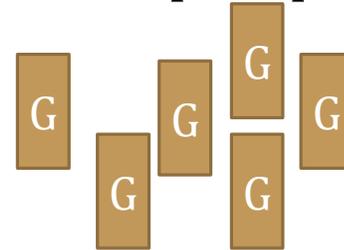
# LES ACTEURS DE LA PCR

**Des nucléotides en excès :**

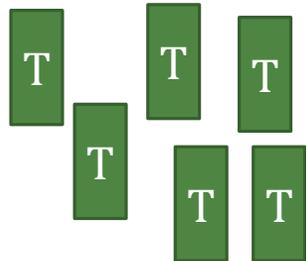
Adénosine triphosphate



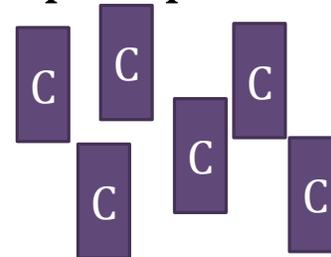
Guanosine triphosphate



Thymidine triphosphate



Cytidine triphosphate



# LES A LA PCR

D'où vient le nom de cette enzyme ?



Source chaude, habitat de *Thermus aquaticus*

Une enzyme de polymérisation

- Taq polymérase
- Pfu polymérase
- Tli polymérase...

Enzyme de polymérisation thermostable

Enzyme : Catalyseur biologique de nature protéique

- accélère une réaction chimique sans modifier l'équilibre final,
- se retrouve intact en fin de réaction

Polymérisation : copie d'une chaîne d'acide nucléique  
ADN → ADN

Thermostable : Fonctionne à des hautes températures (72°C pour *Taq pol*) et résiste à 95°C sans être détruite.

+ Mg<sup>2+</sup>

# LE THERMOCYCLEUR : UN APPAREIL ESSENTIEL

**Un appareil à PCR =  
Thermocycleur**

Plusieurs cycles de températures

94°C :

- dénaturation de l'ADN

72°C :

- élongation des brins d'ADN

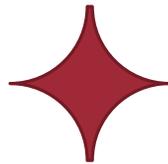
T<sub>m</sub> des amorces (50°C-60°C) :

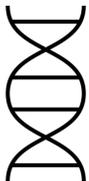
- hybridation des amorces sur les brins d'ADN dénaturés

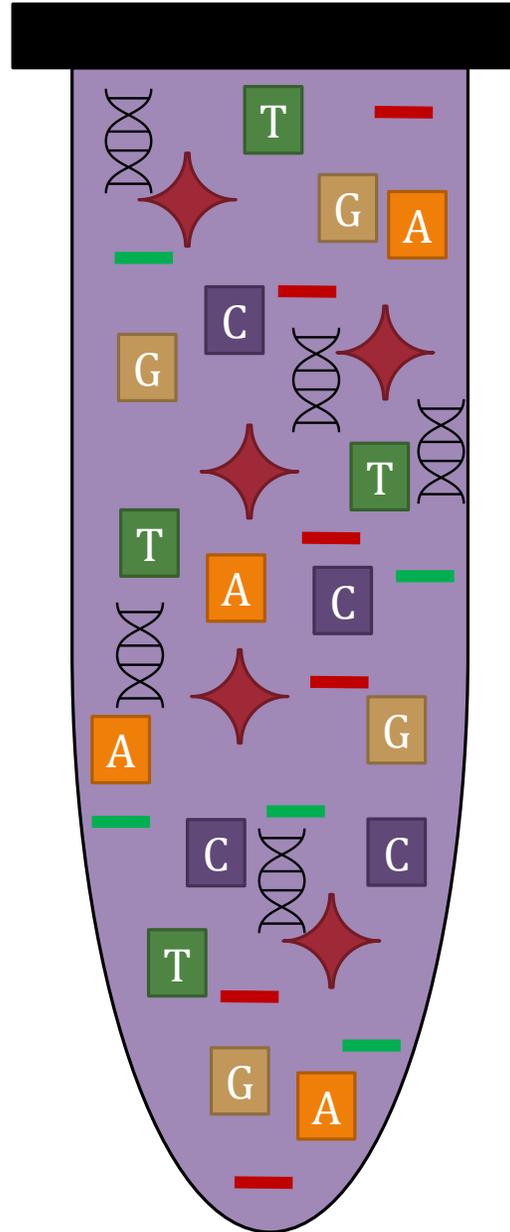


# MÉLANGE RÉACTIONNEL (MIX) PCR

Tampon à pH opt  
 $Mg^{2+}$

 Taq polymérase

 Séquence d'ADN à amplifier



Des nucléotides en excès

T G A C

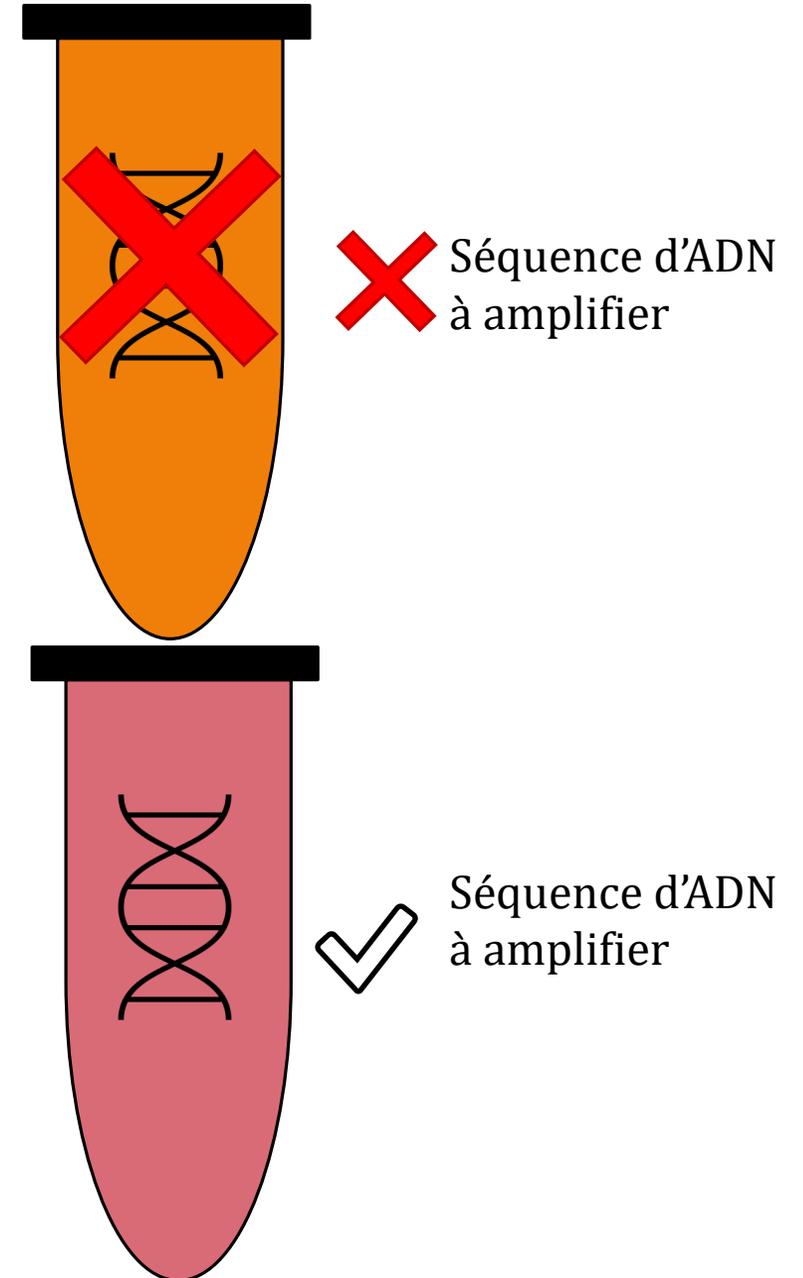
Des amorces nucléotidiques

**Amorce sens** 5'P → 3'OH

**Amorce anti sens** 3'OH ← 5'P

# ATTENTION AUX CONTAMINATIONS !

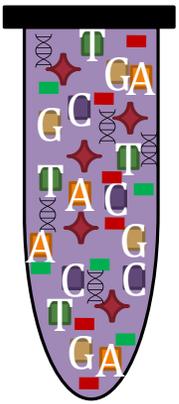
- ➔ Prendre soin de ne pas introduire d'ADN contaminant
  - ❑ Gants
  - ❑ Cônes avec filtre
  - ❑ Eau qualité biologie moléculaire (Eau BM)
  - ❑ Paillasse dédiée
- ➔ Témoin de non-contamination des réactifs
  - ❑ Eau BM à la place de l'ADN matrice
- ➔ Contrôle positif
  - ❑ de l'ADN complémentaire obtenu à partir de l'ARN de SARS-CoV-2





Bloc thermique

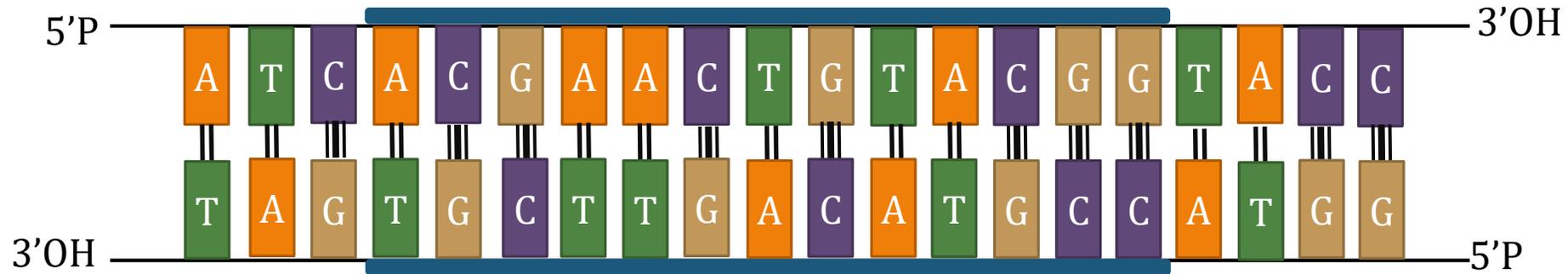
COMMENÇONS LA PCR...

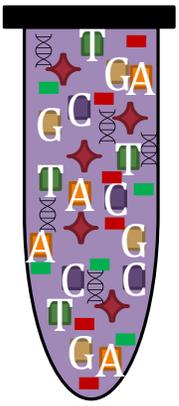


# 1<sup>ER</sup> CYCLE – ÉTAPE 1 94°C

Dénaturation de l'ADN –  
fusion de l'ADN à haute  
température

« Rupture » des interactions hydrogène entre les bases azotées.  
Les deux brins d'ADN se séparent.



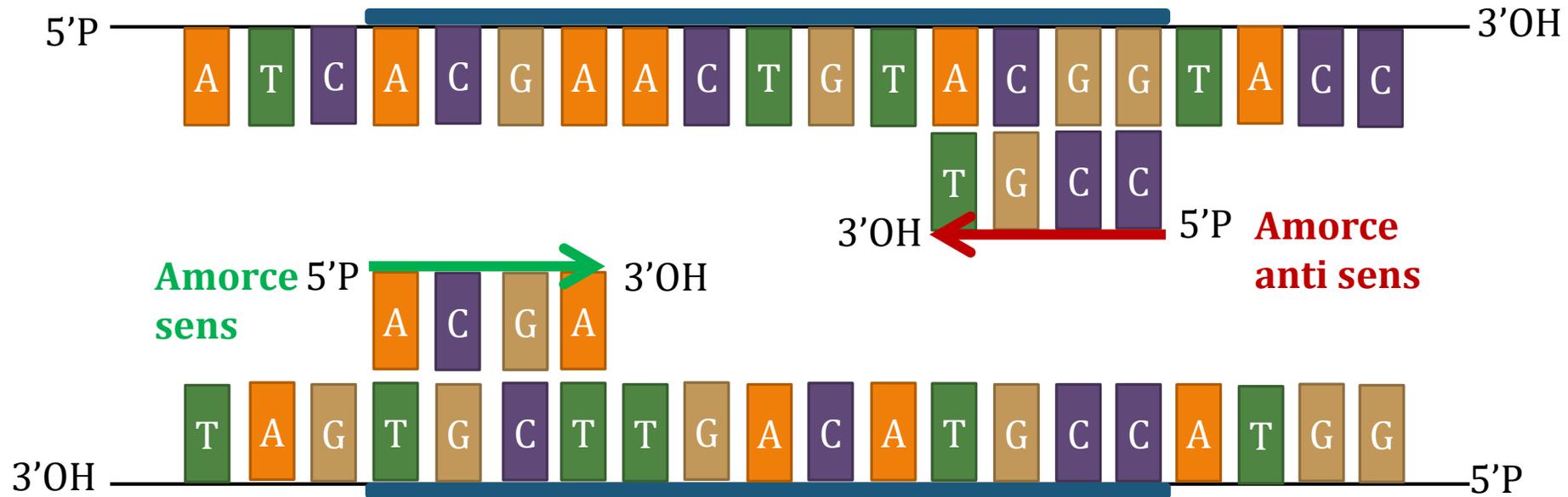


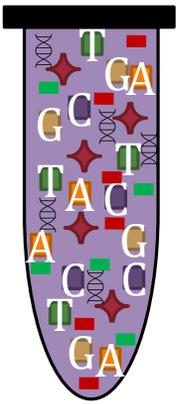
# 1<sup>ER</sup> CYCLE - ÉTAPE 2

50-60°C

Hybridation des amorces à T<sub>m</sub> des amorces

Hybridation spécifique des amorces avec leurs séquences complémentaires





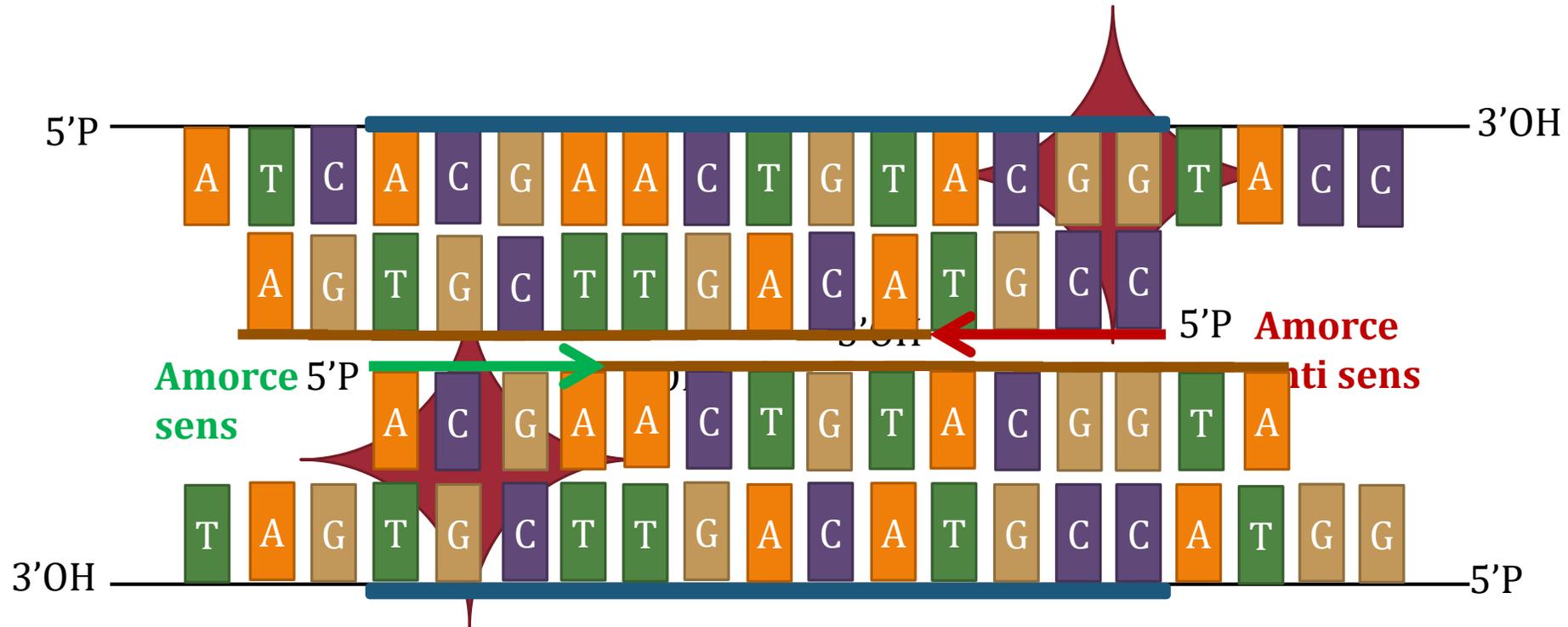
# 1<sup>ER</sup> CYCLE - ÉTAPE 3

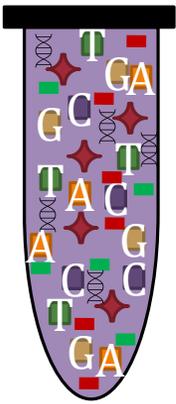


72°C

Élongation des brins

Taq polymérase allonge l'amorce de 5' en 3' et synthétise un nouveau brin en utilisant les brins matrices et les nucléotides en excès





# 1<sup>ER</sup> CYCLE - ÉTAPE 3



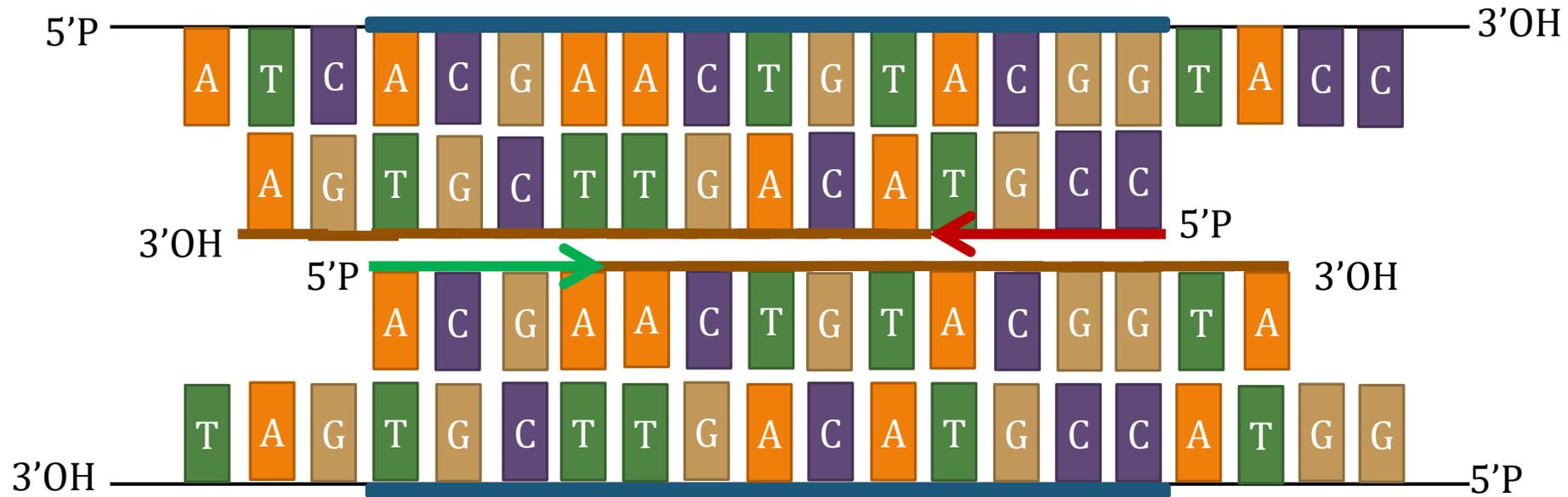
72°C

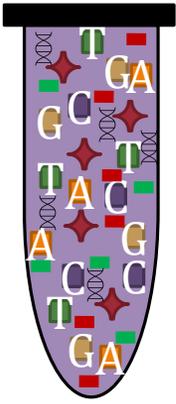
Élongation des brins

Taq polymérase allonge l'amorce de 5' en 3' et synthétise un nouveau brin en utilisant les brins matrices et les nucléotides en excès

**2 brins → 4 brins**

**Taille brins amplifiés > Taille séquence souhaitée**





# 2ÈME CYCLE - ÉTAPE 1



Dénaturation de l'ADN -  
fusion de l'ADN à haute  
température

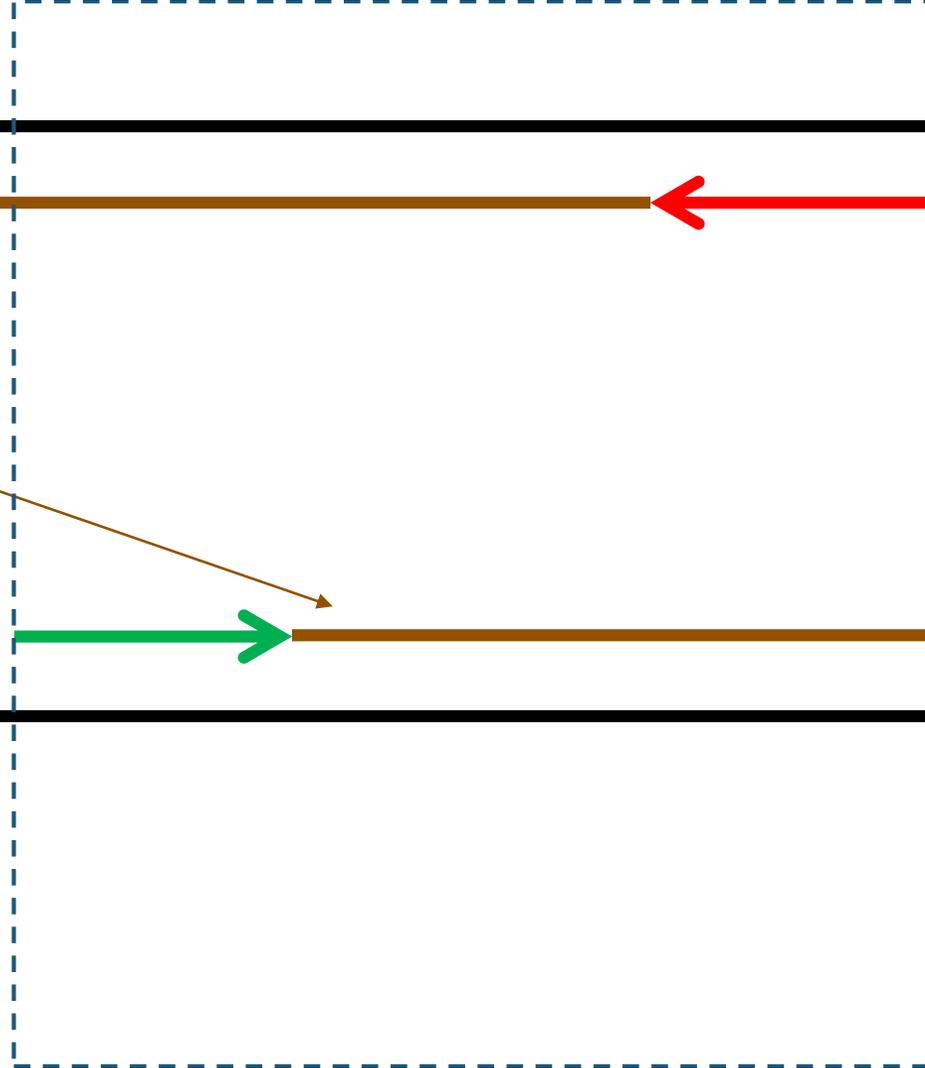
5'P ————— 3'OH

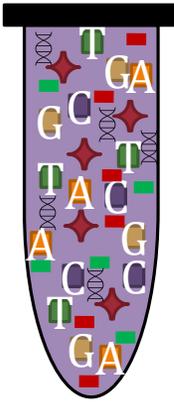
3'OH ————— 5'P

Synthèse de 2  
Fragments « longs »

5'P ————— 3'OH

3'OH ————— 5'P



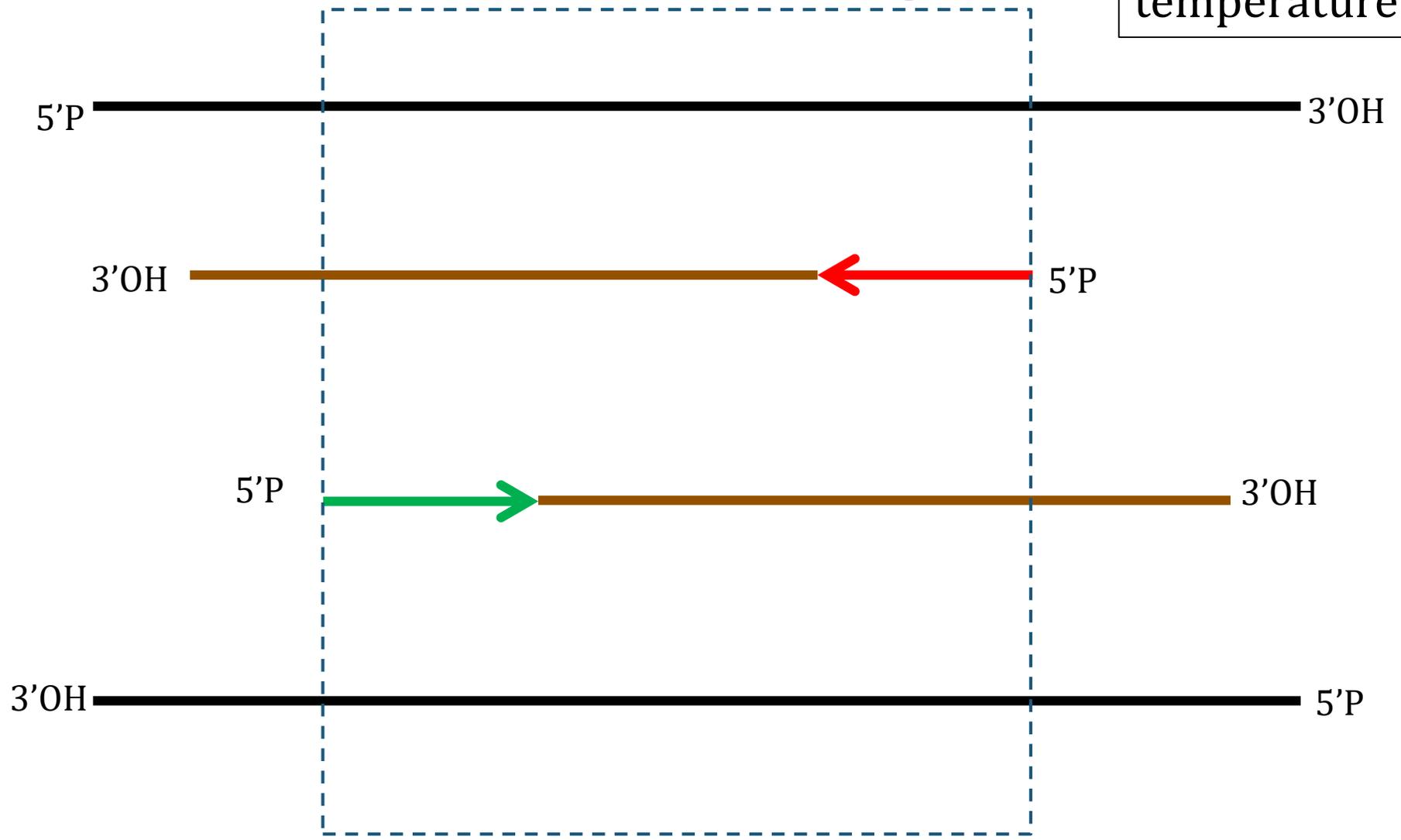


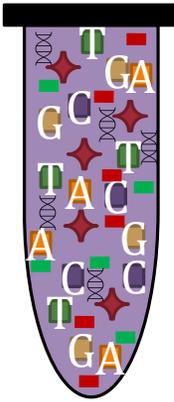
# 2<sup>ÈME</sup> CYCLE - ÉTAPE 1



94°C

Dénaturation de l'ADN -  
fusion de l'ADN à haute  
température



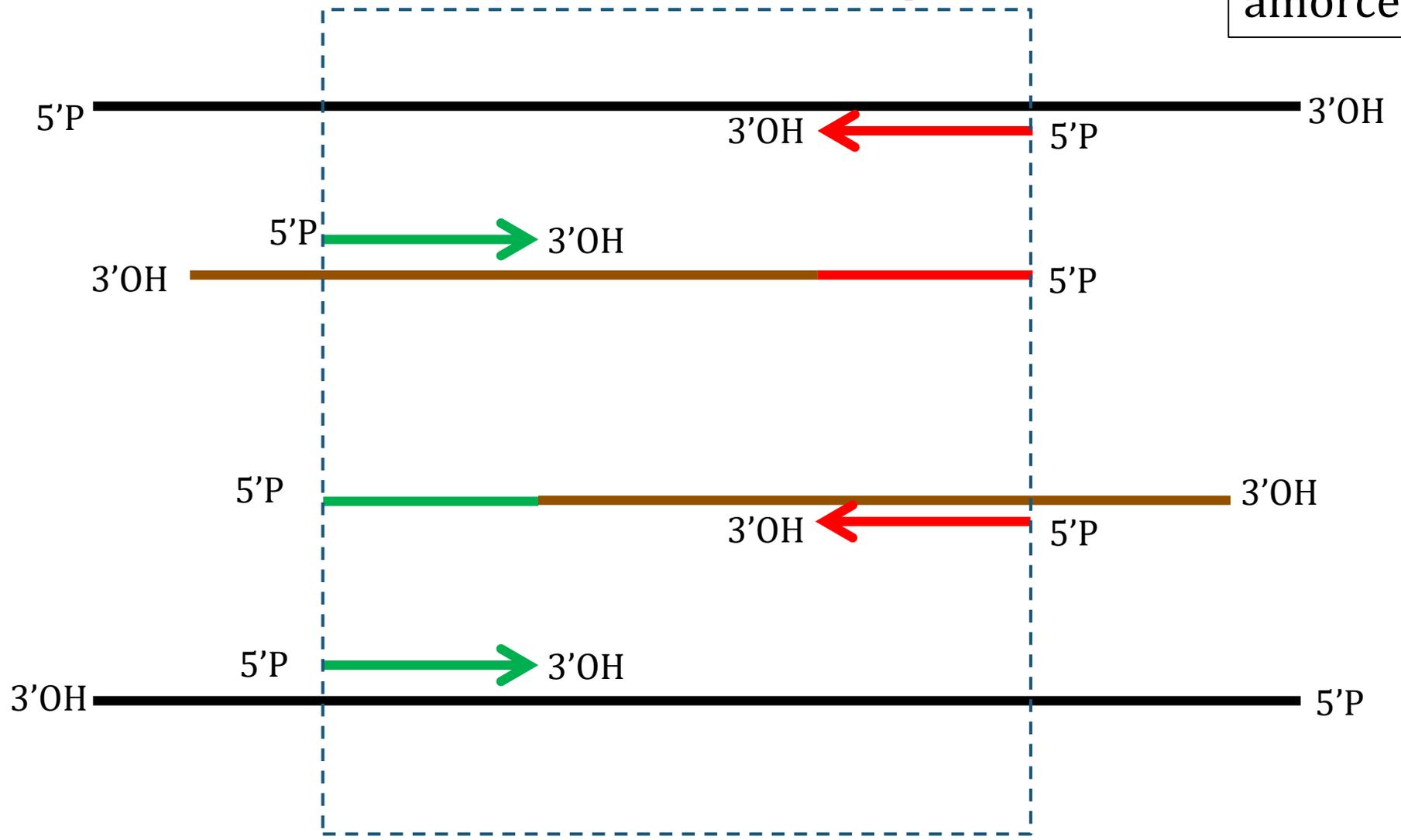


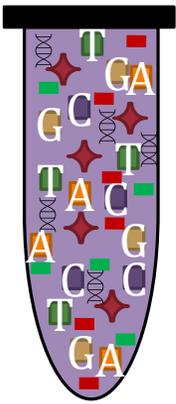
# 2ÈME CYCLE - ÉTAPE 2



50-60°C

Hybridation des amorces à Tm des amorces



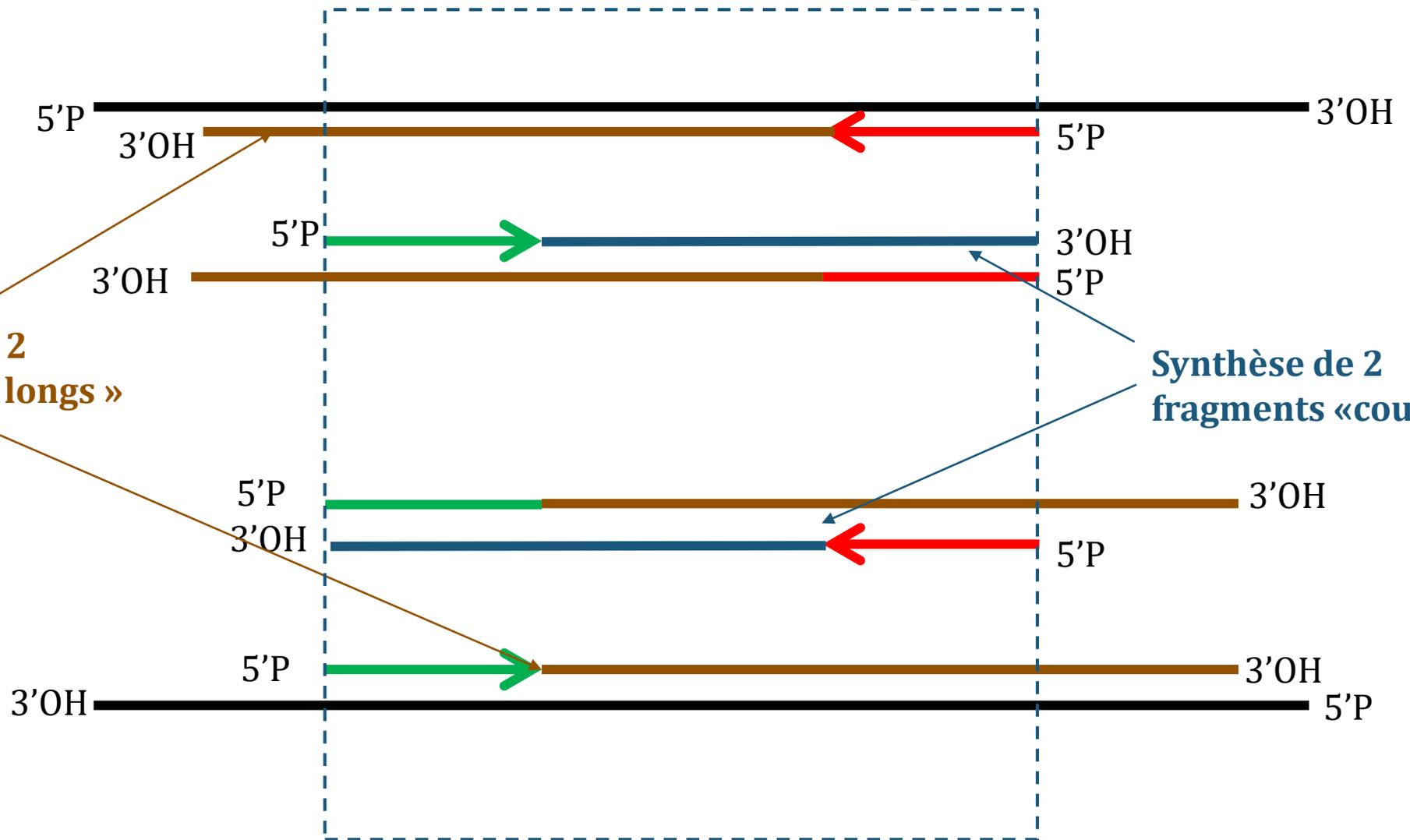


# 2ÈME CYCLE - ÉTAPE 3



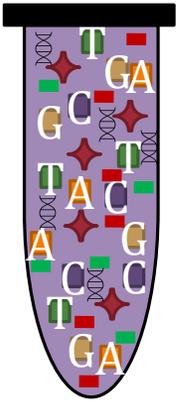
72°C

Élongation des brins



Synthèse de 2 fragments « longs »

Synthèse de 2 fragments « courts »

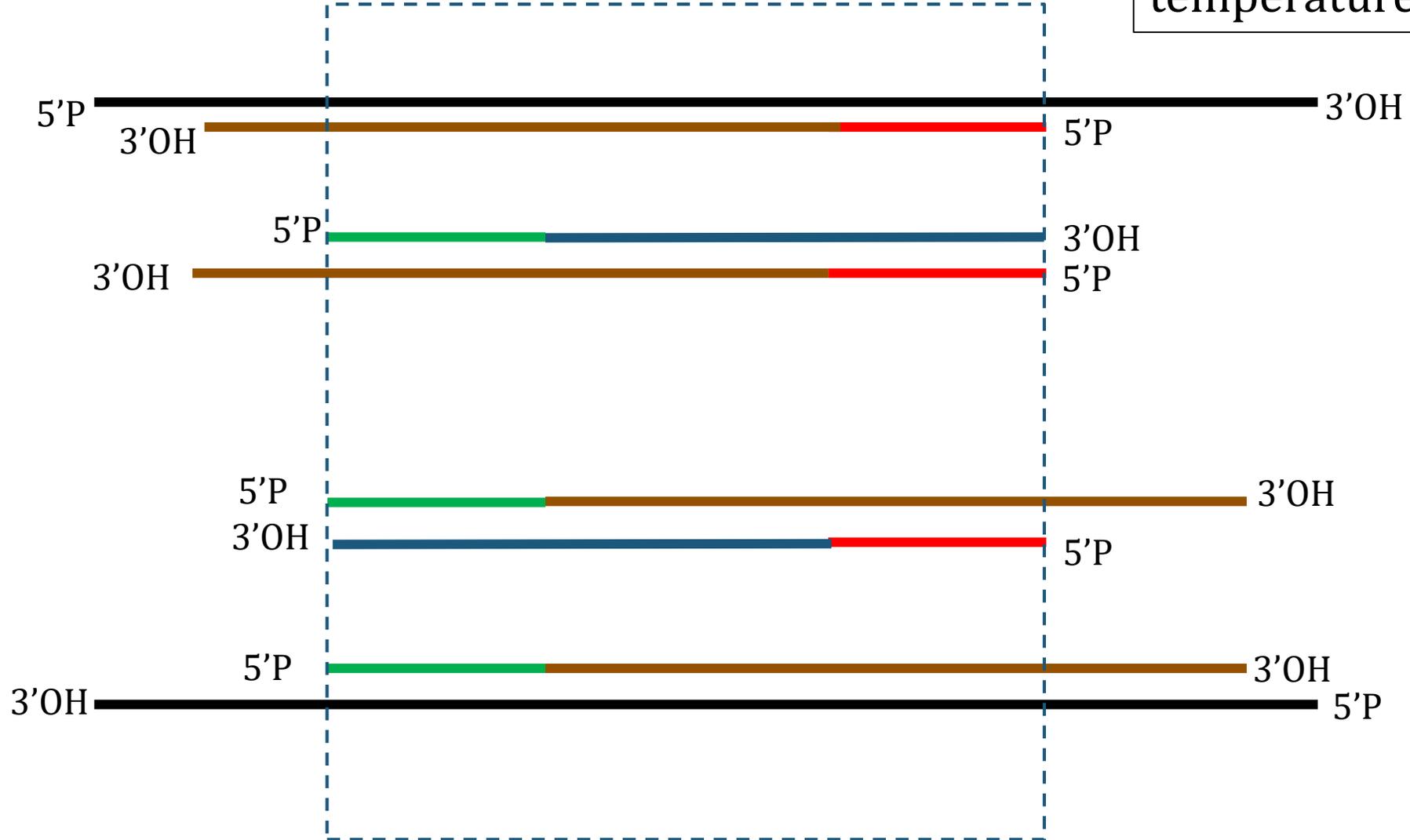


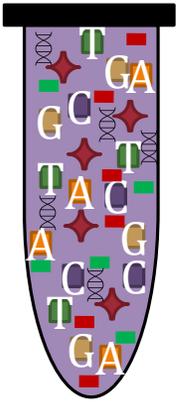
# 3ÈME CYCLE - ÉTAPE 1



94°C

Dénaturation de l'ADN -  
fusion de l'ADN à haute  
température



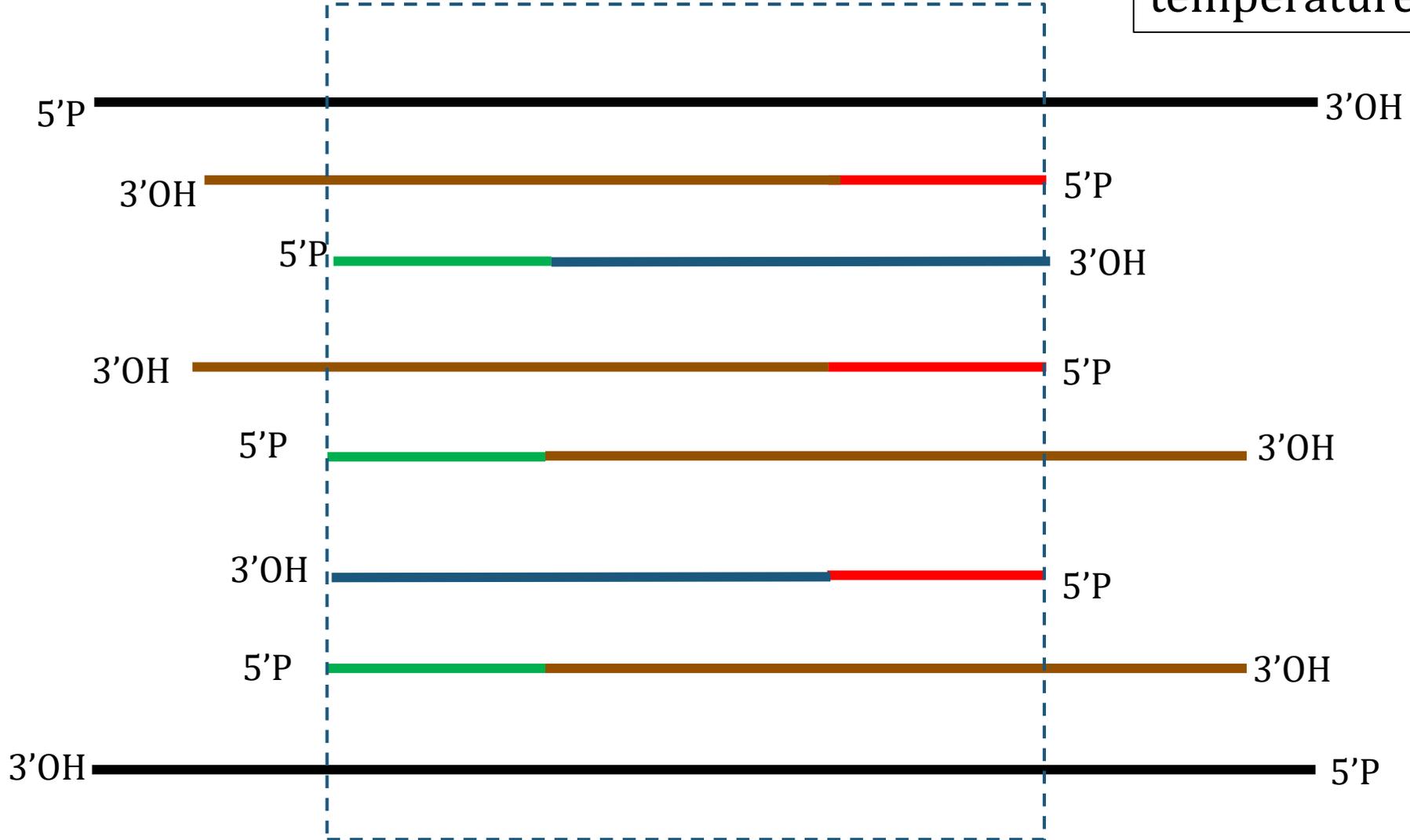


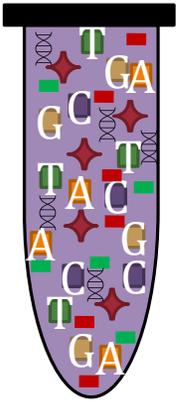
# 3ÈME CYCLE - ÉTAPE 1



94°C

Dénaturation de l'ADN -  
fusion de l'ADN à haute  
température



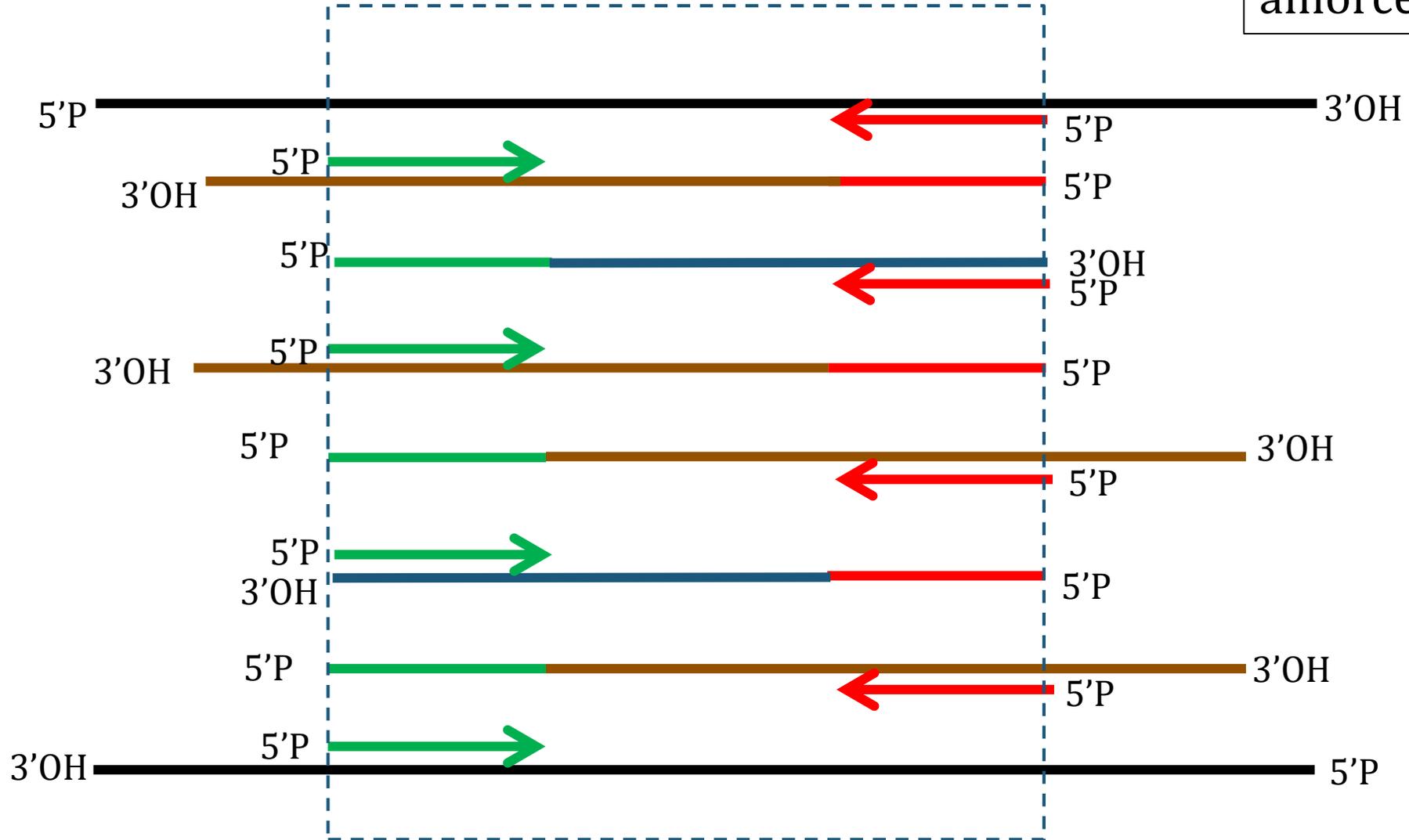


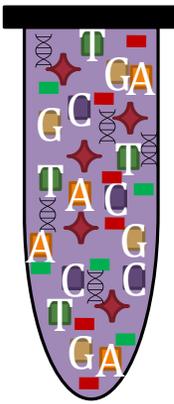
# 3ÈME CYCLE - ÉTAPE 2



50-60°C

Hybridation des amorces à Tm des amorces



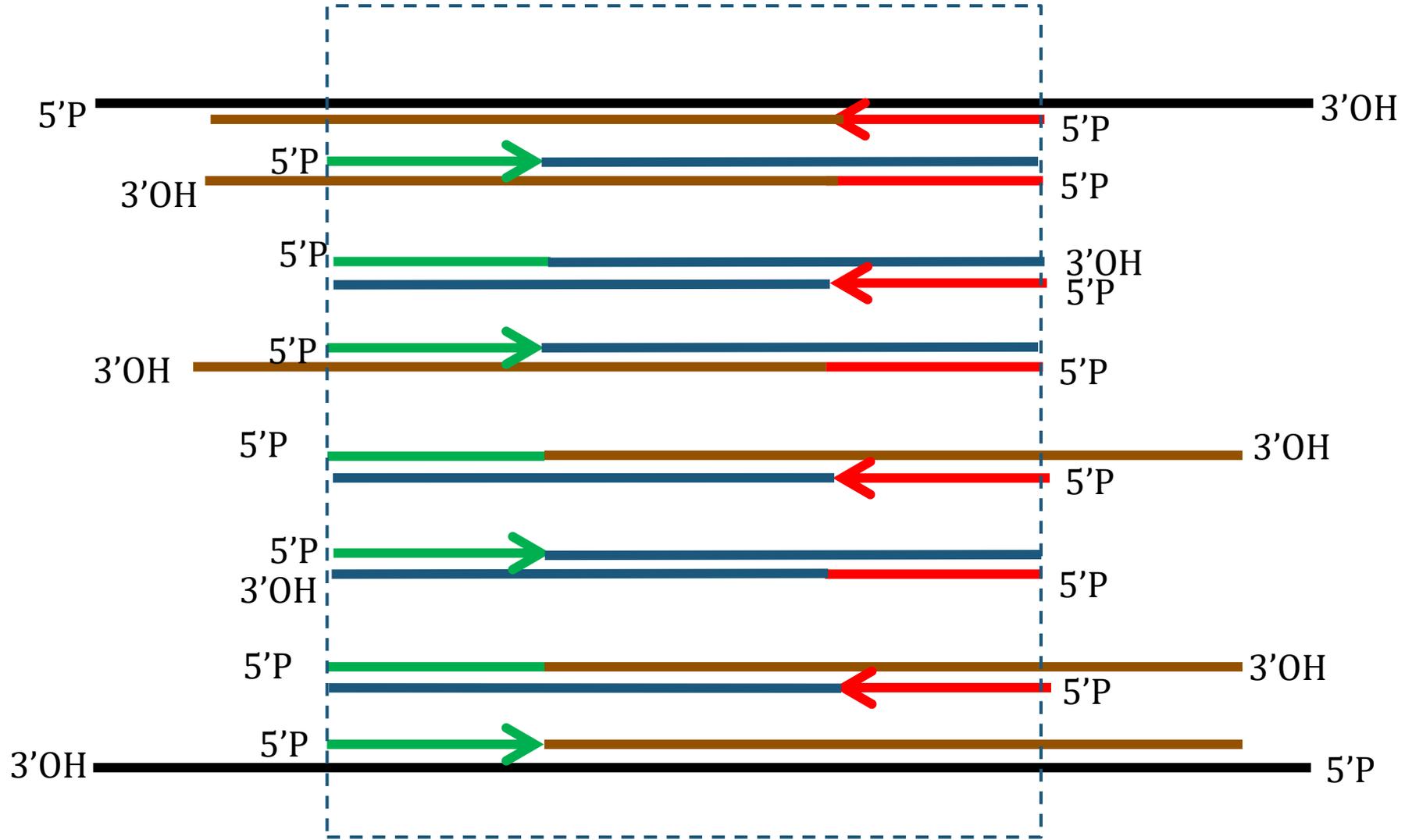


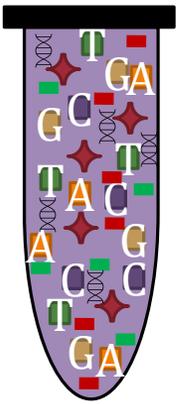
# 3ÈME CYCLE - ÉTAPE 3



72°C

Élongation des brins





# 3ÈME CYCLE - ÉTAPE 3

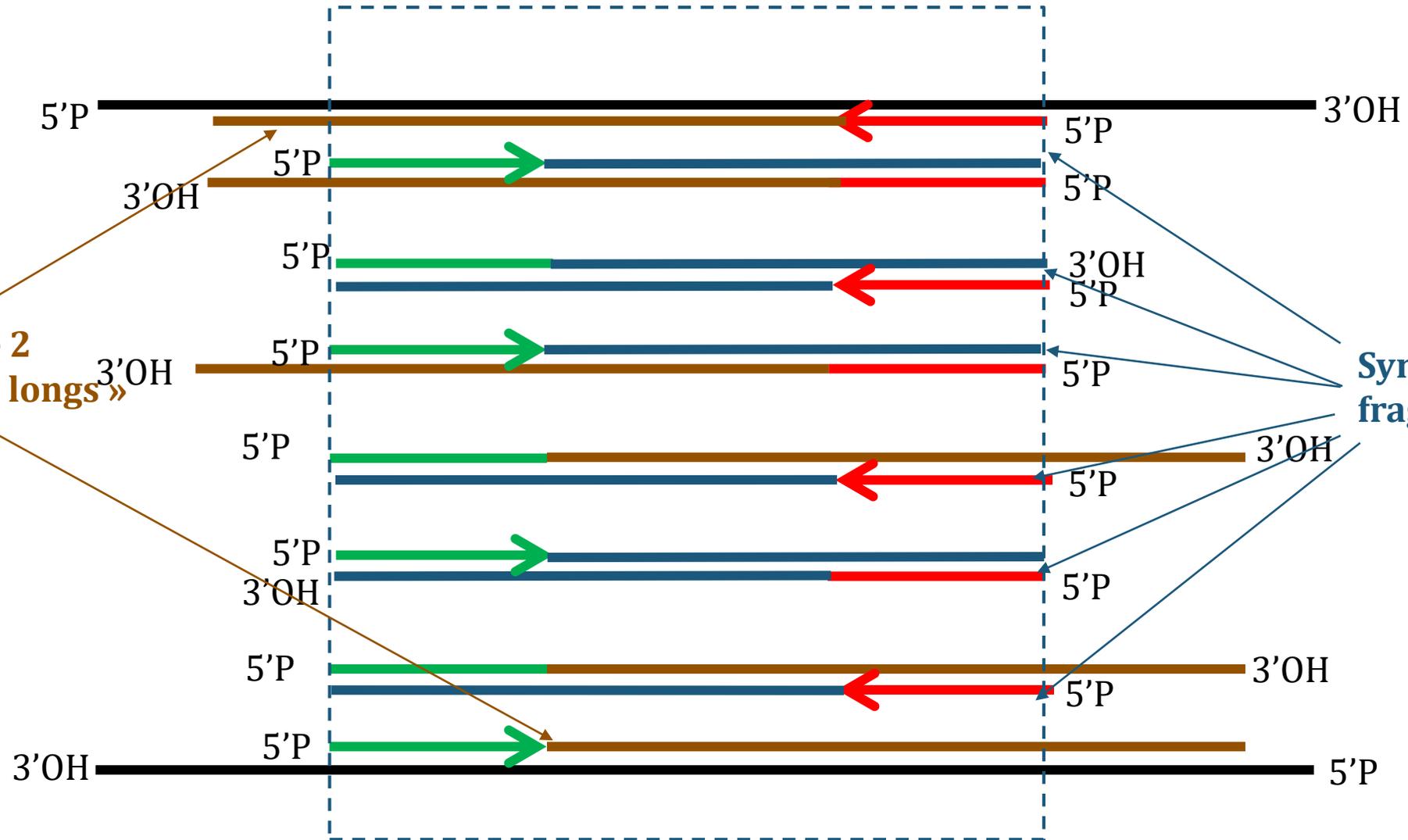


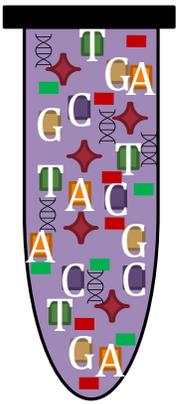
72°C

Élongation des brins

Synthèse de 2 fragments « longs »

Synthèse de 6 fragments « courts »





# 3ÈME CYCLE – ÉTAPE 3



72°C

Élongation des brins



2 amplicons : fragments d'ADN double brins dont la taille est celle de la séquence à amplifier.

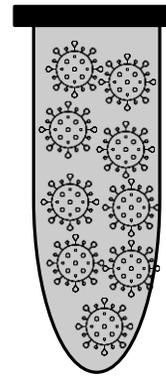
# QUID DU NOMBRE DE CYCLES ?

30 cycles (20 minutes)

→ Recherche de l'ARN de SARS-CoV-2

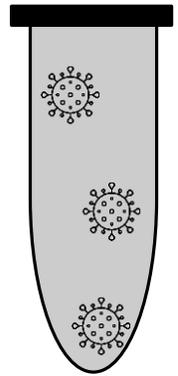
→ qRT-PCR

→ Établir un lien entre le nombre de cycles nécessaires pour atteindre un grand nombre de copie et la quantité d'ARN initialement présent.



Patient A

**Beaucoup** de virus  
Quantité initiale d'ARN  
**importante**

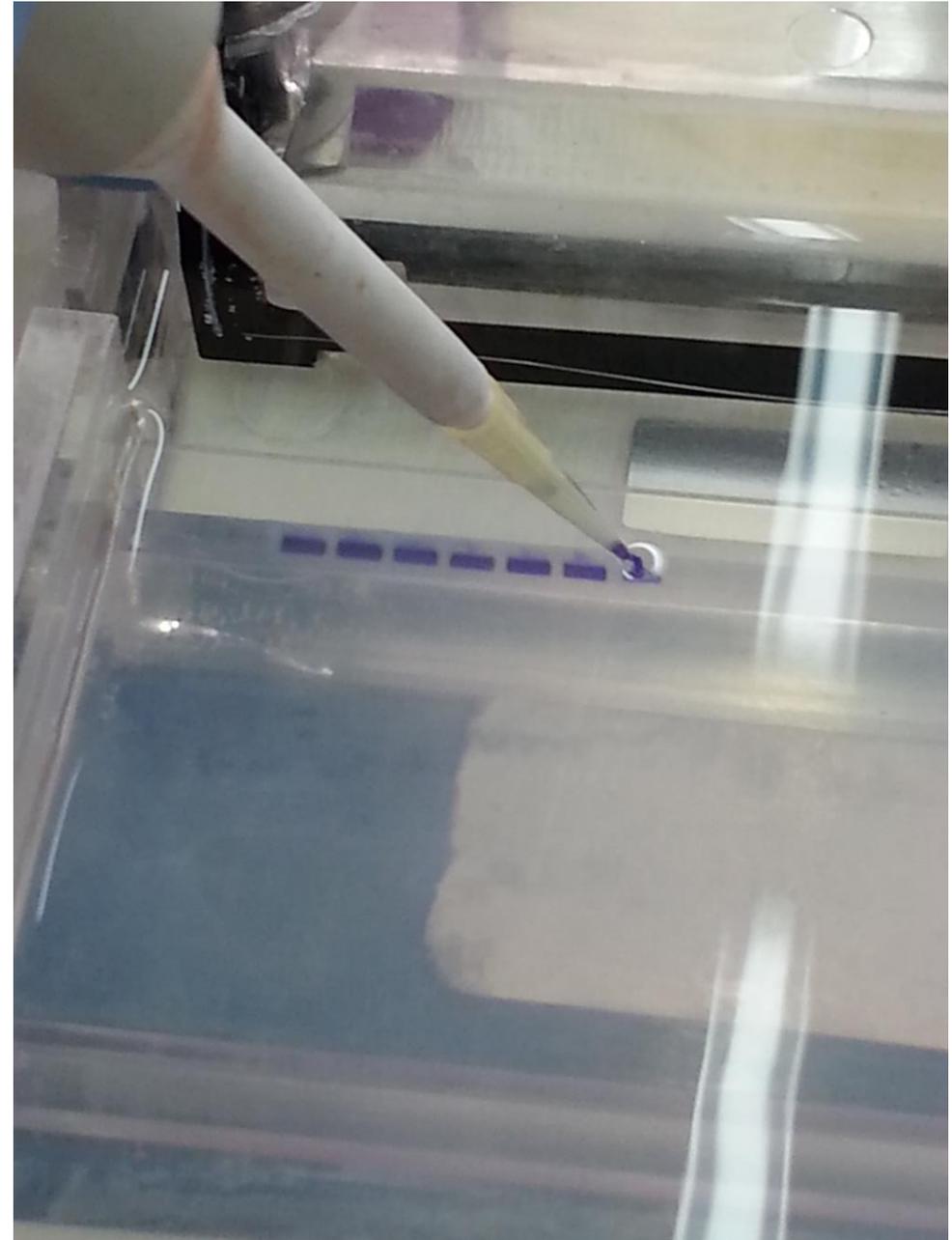
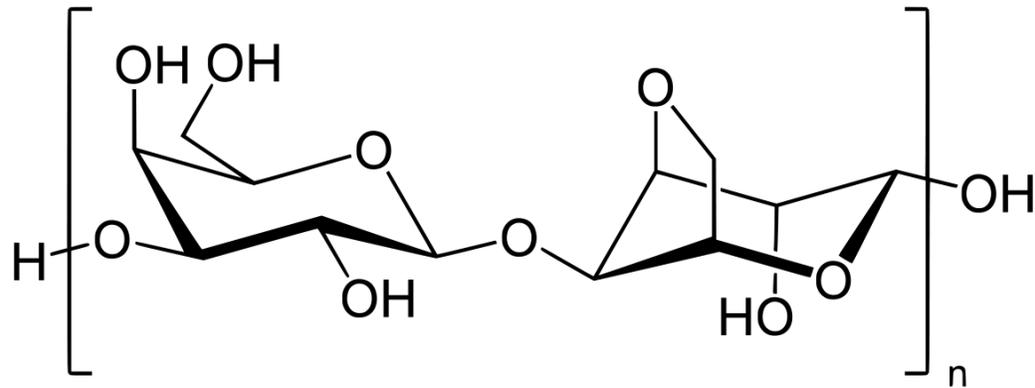


Patient B

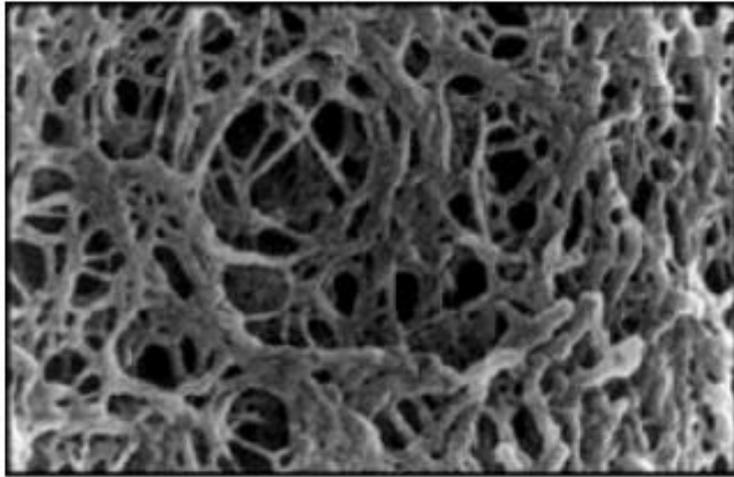
*Peu* de virus  
Quantité initiale d'ARN  
*faible*

# ELECTROPHORÈSE DES PRODUITS D'AMPLIFICATION EN GEL D'AGAROSE

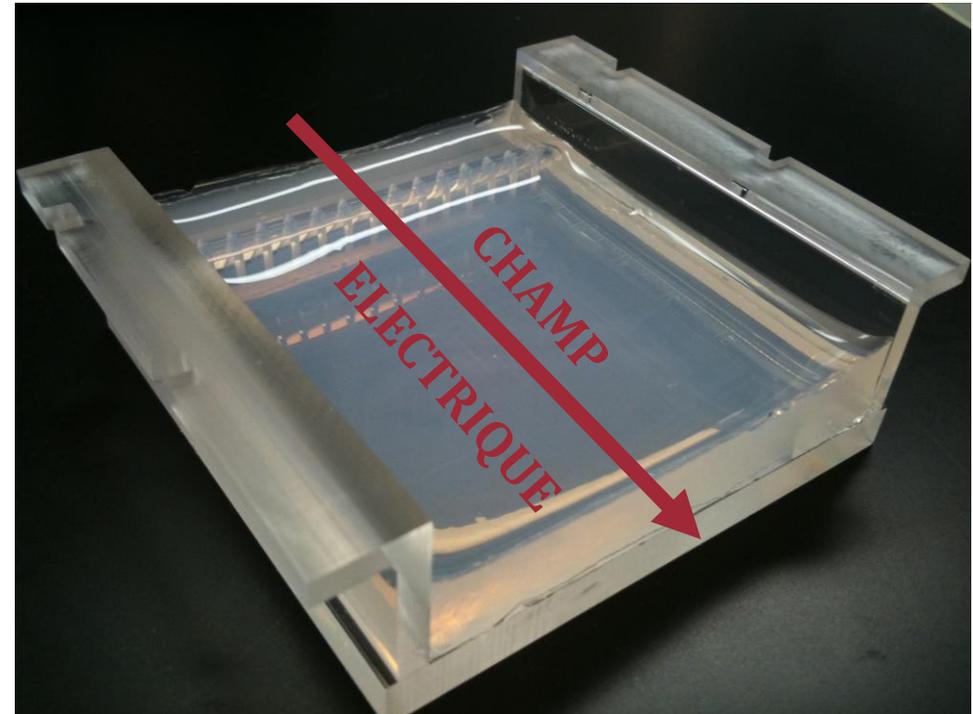
Au lycée : Détection des produits de PCR  
par électrophorèse sur gel d'Agarose



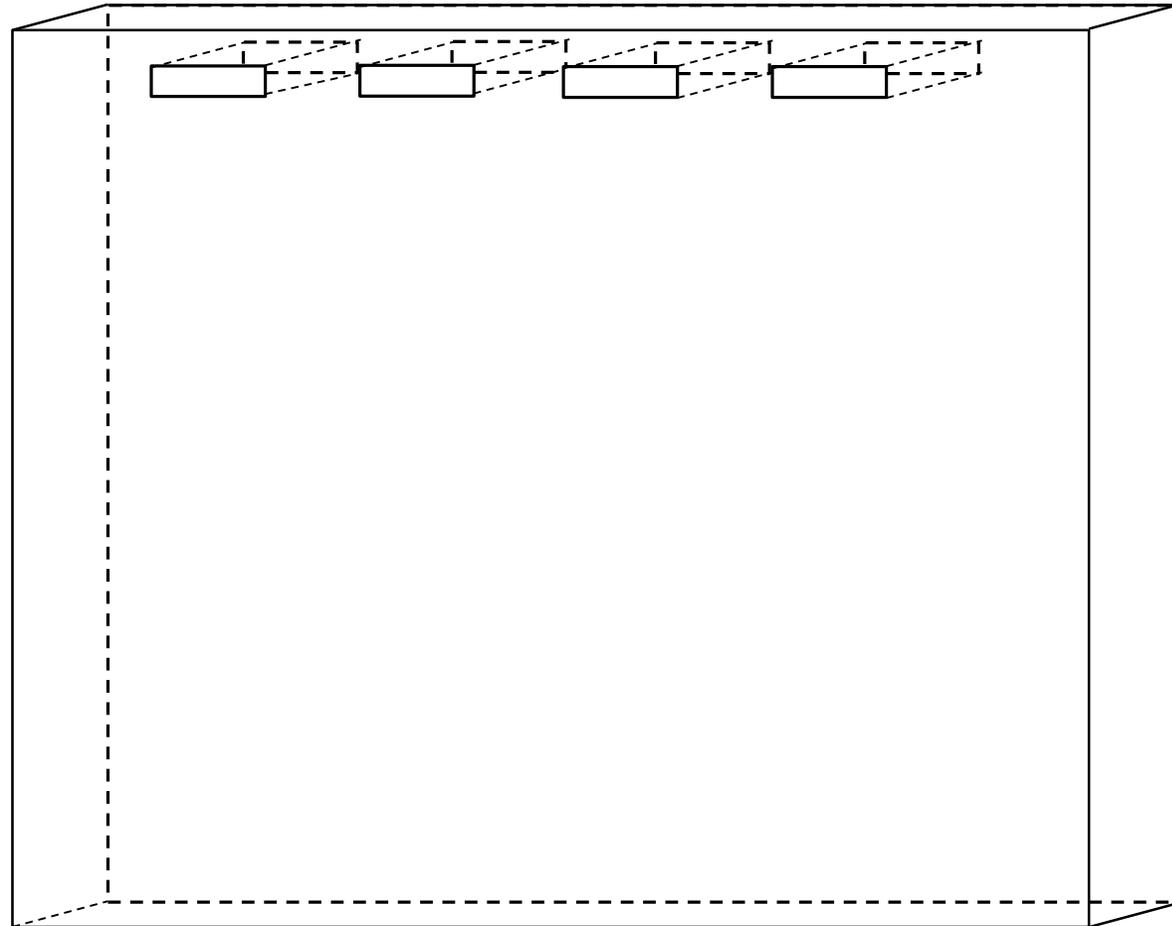
# ELECTROPHORÈSE DES PRODUITS D'AMPLIFICATION EN GEL D'AGAROSE



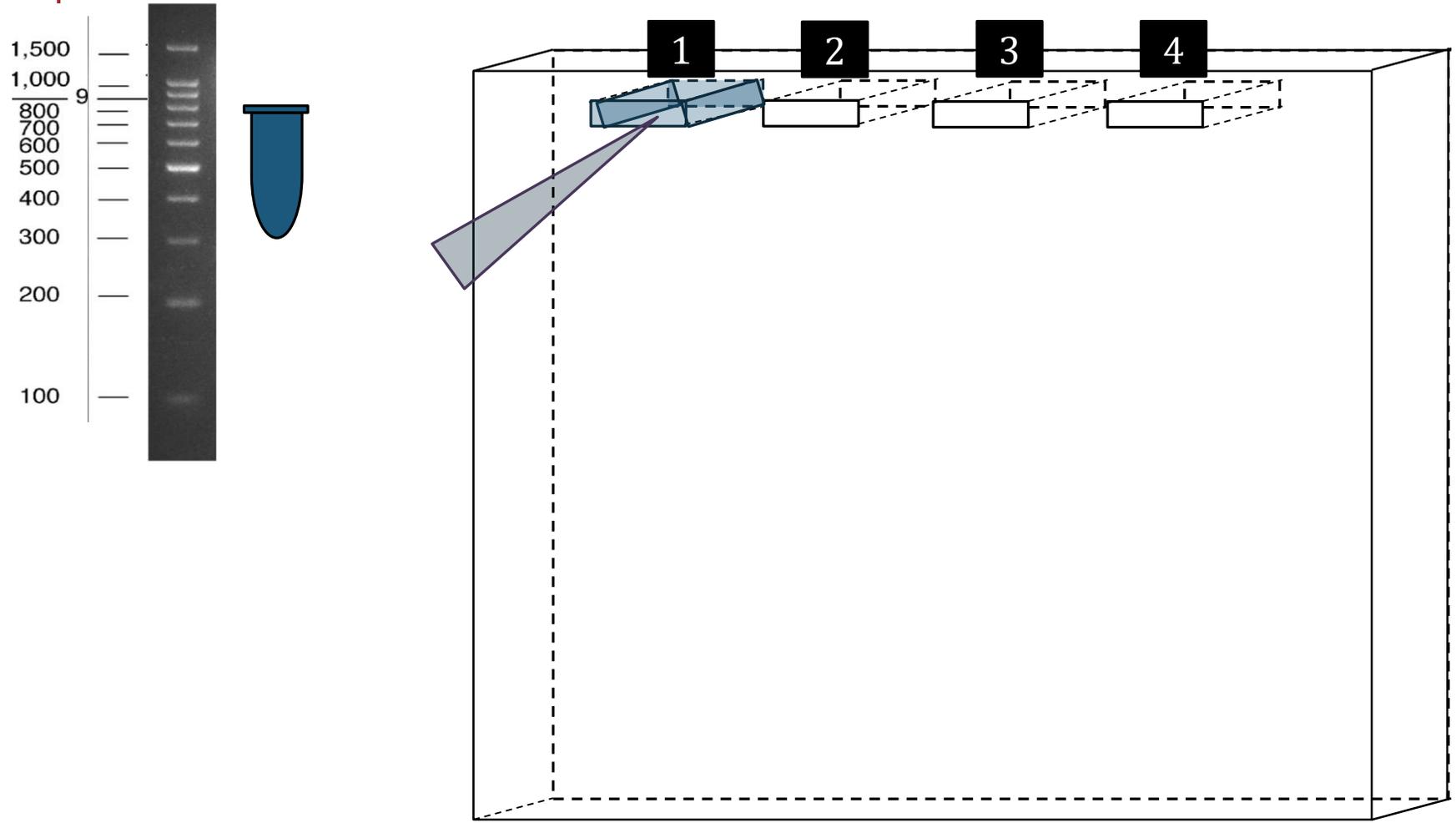
Agarose : maillage



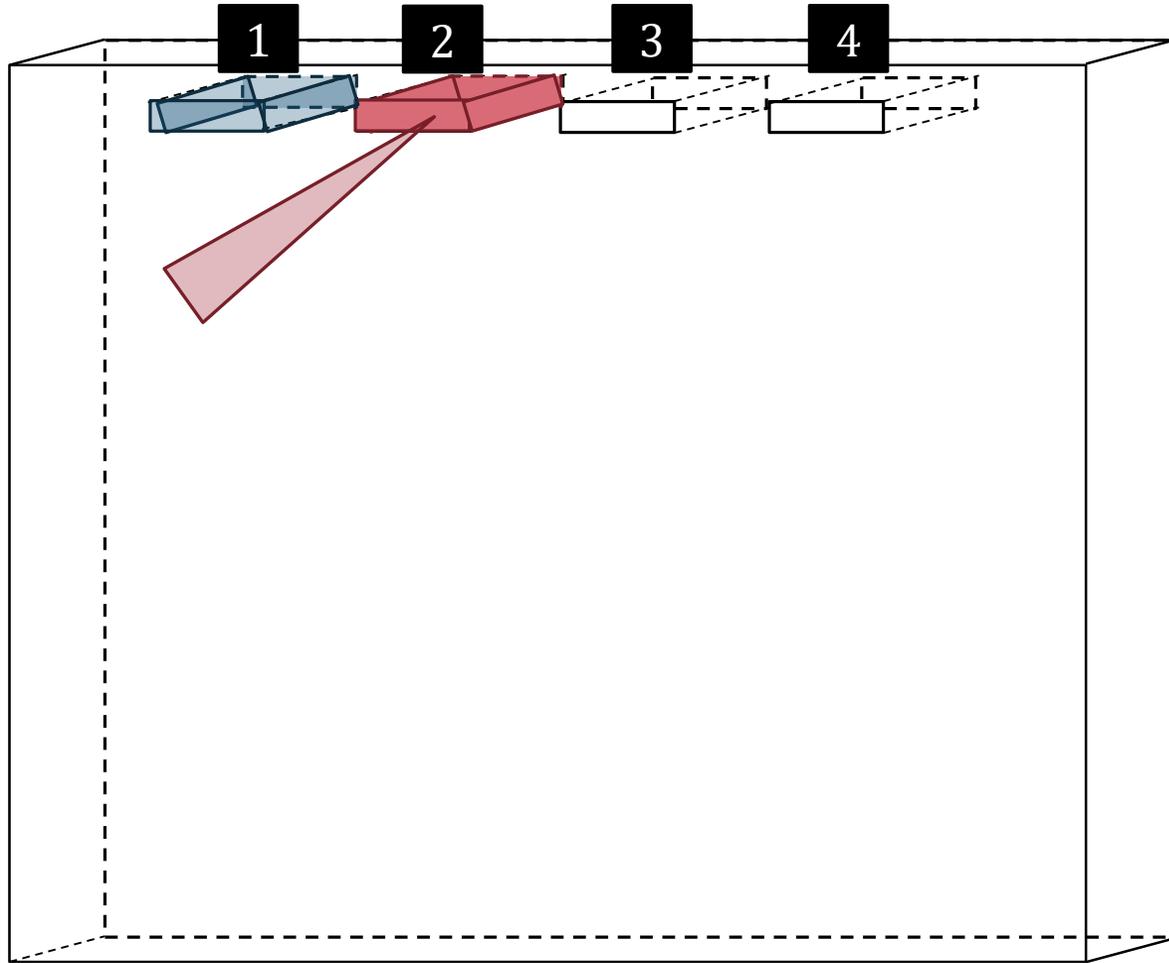
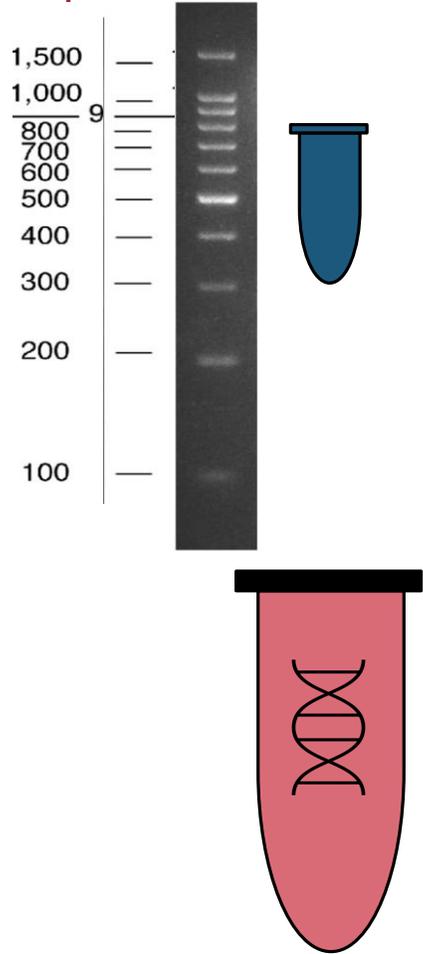
ELECTROPHORÈSE DES  
PRODUITS D'AMPLIFICATION EN  
GEL D'AGAROSE



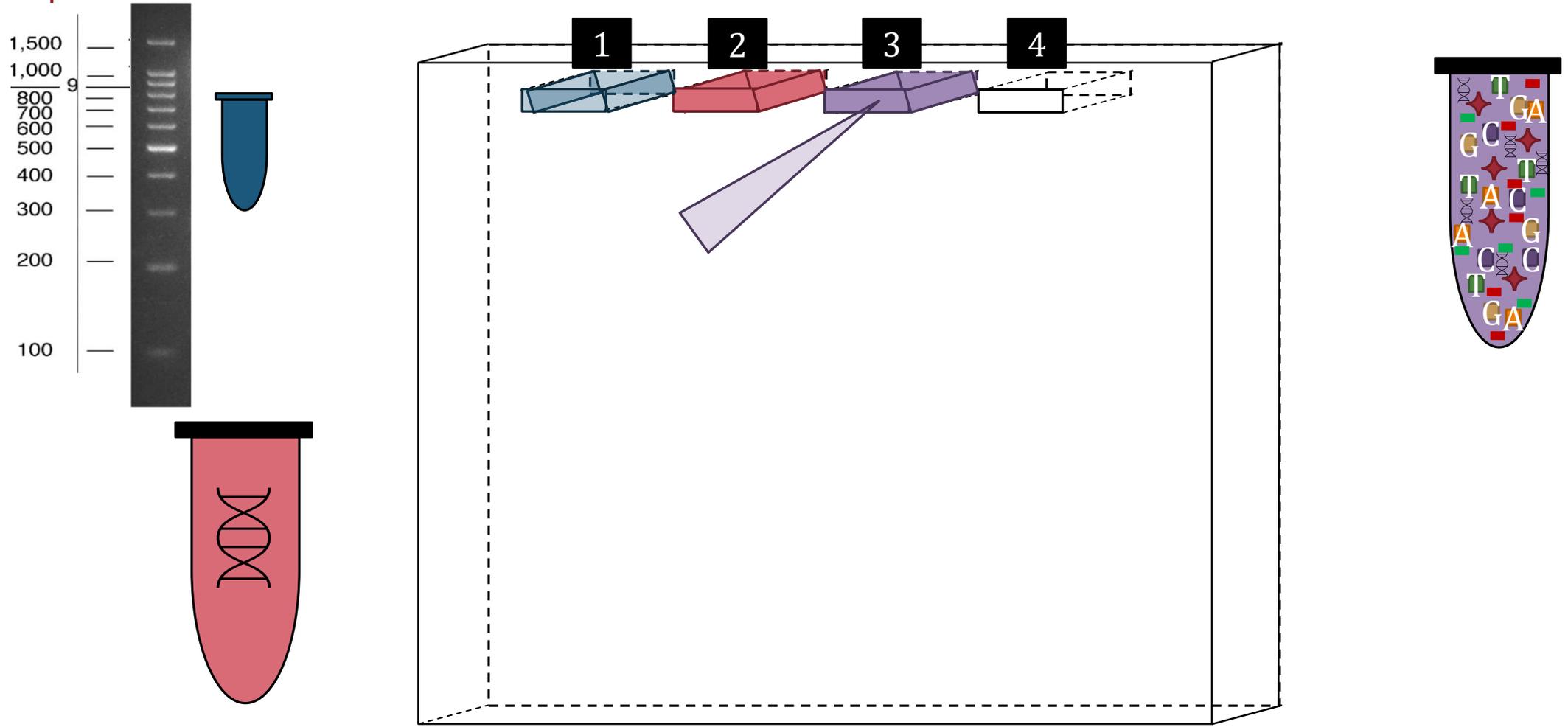
Puits	1	2	3	4
Dépôt	Marqueur de poids moléculaire			



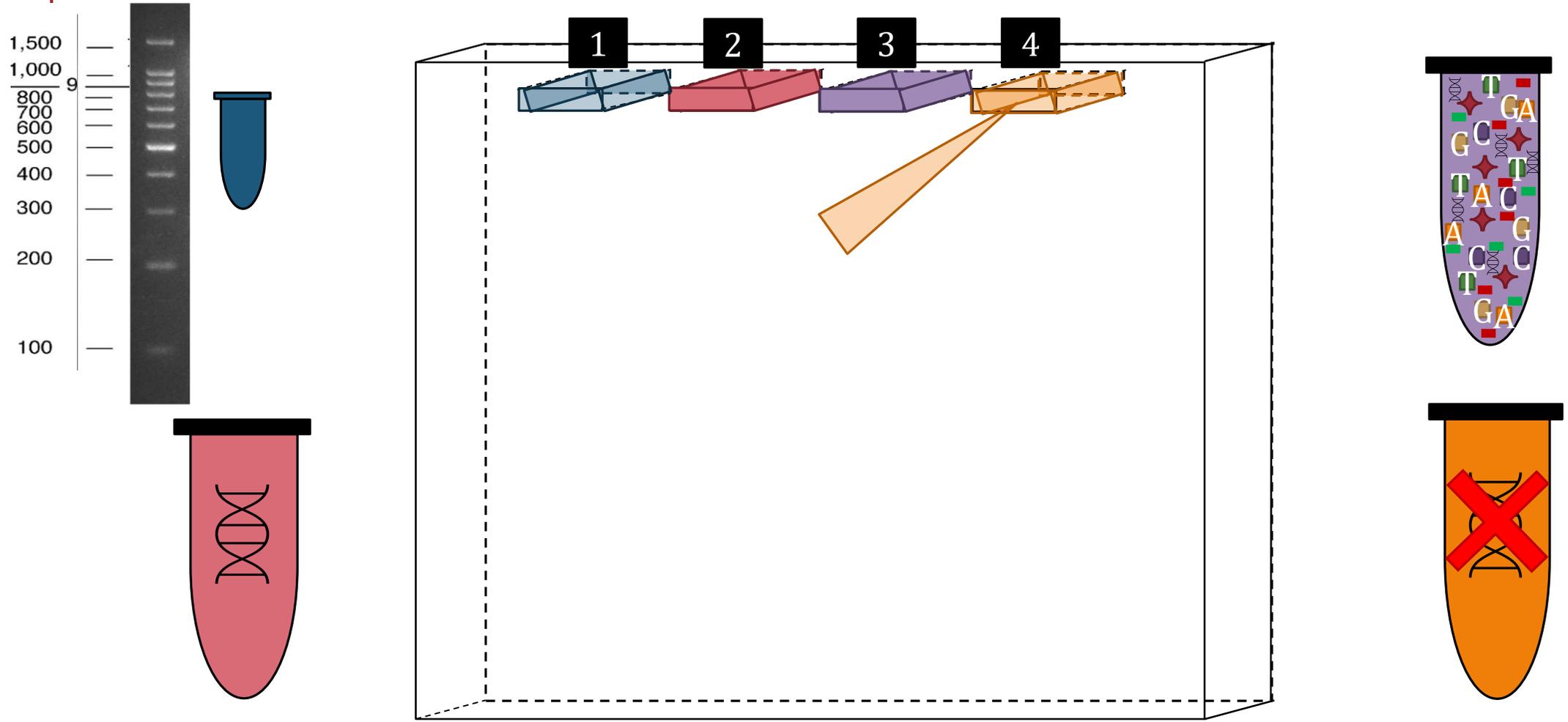
Puit	1	2	3	4
Dépôt	Marqueur de poids moléculaire	Contrôle positif		



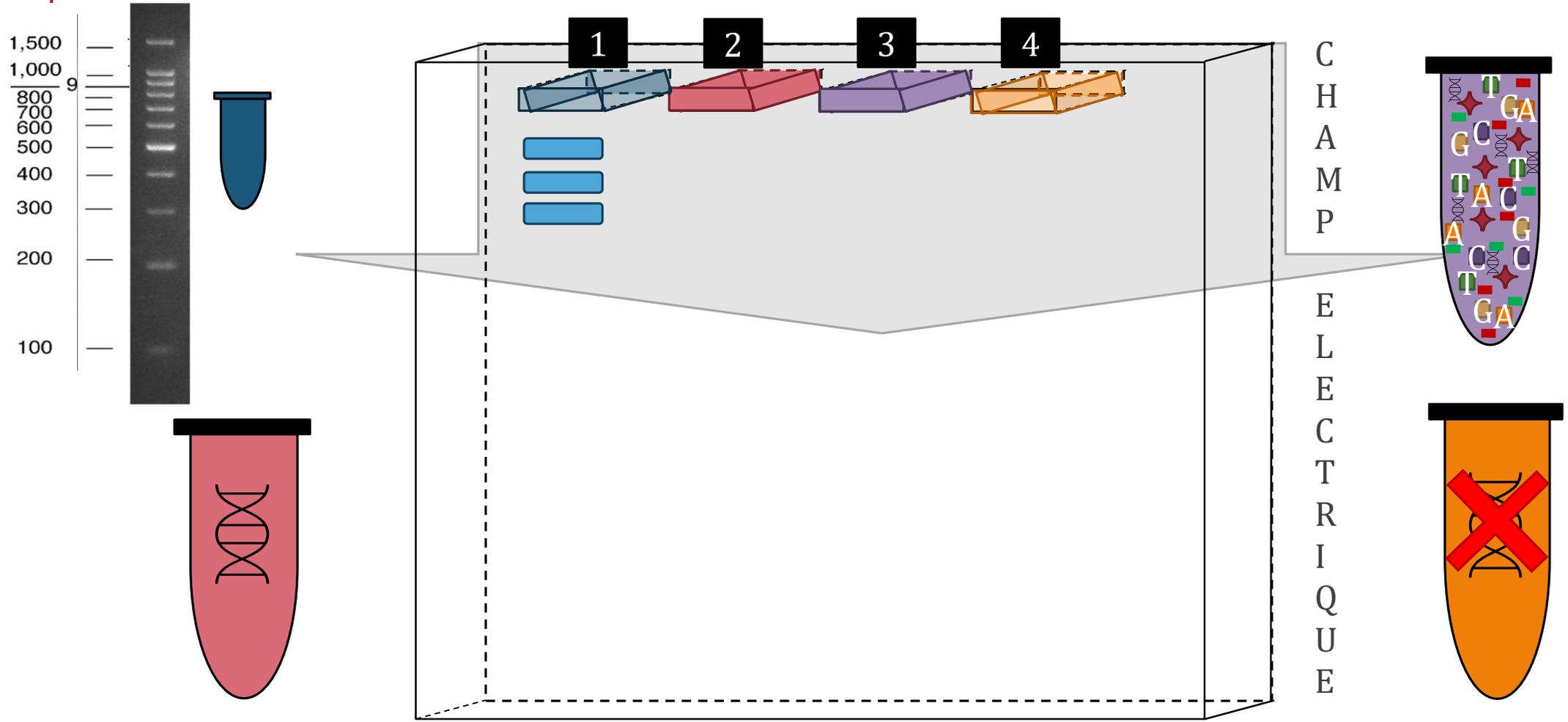
Puit	1	2	3	4
Dépôt	Marqueur de poids moléculaire	Contrôle positif	Test patient	



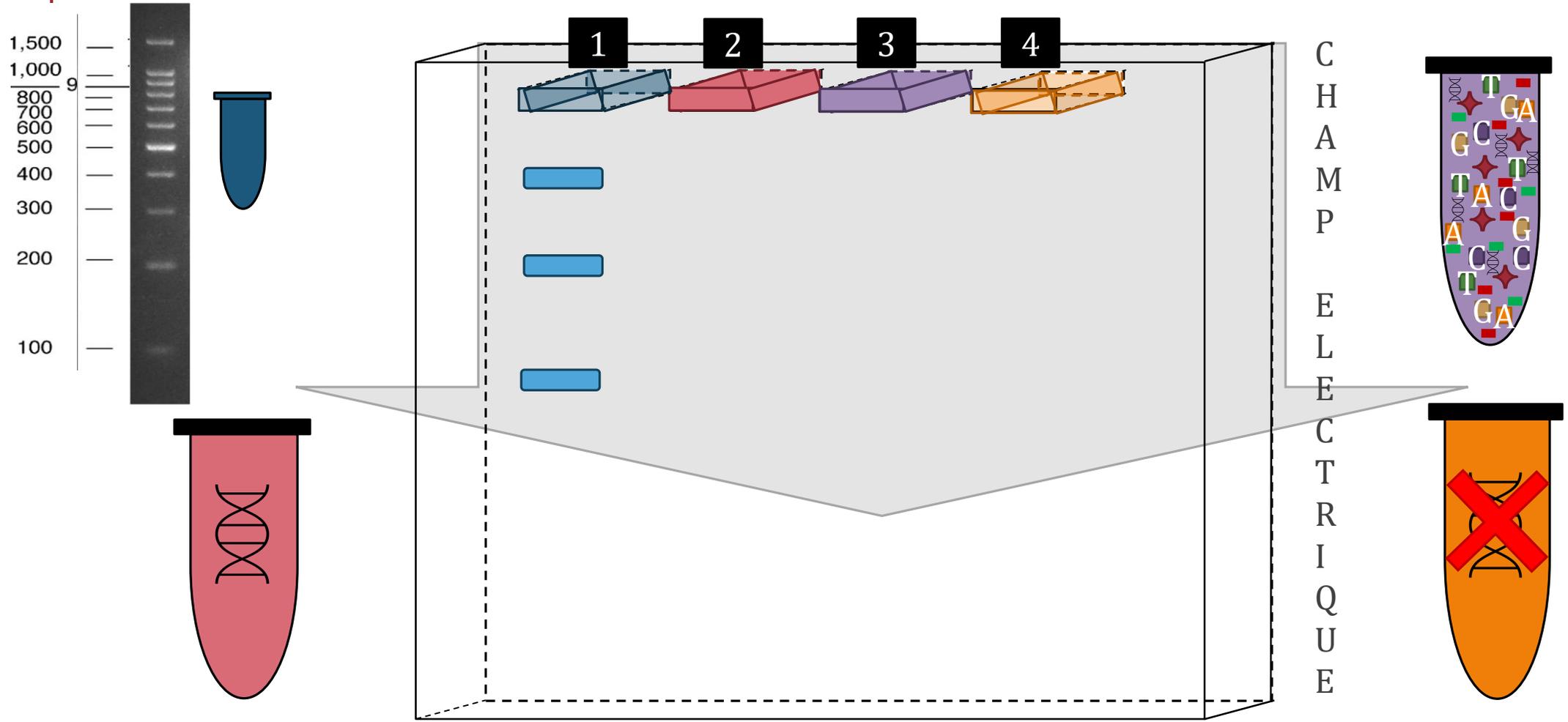
Puit	1	2	3	4
Dépôt	Marqueur de poids moléculaire	Contrôle positif	Test patient	Témoin négatif



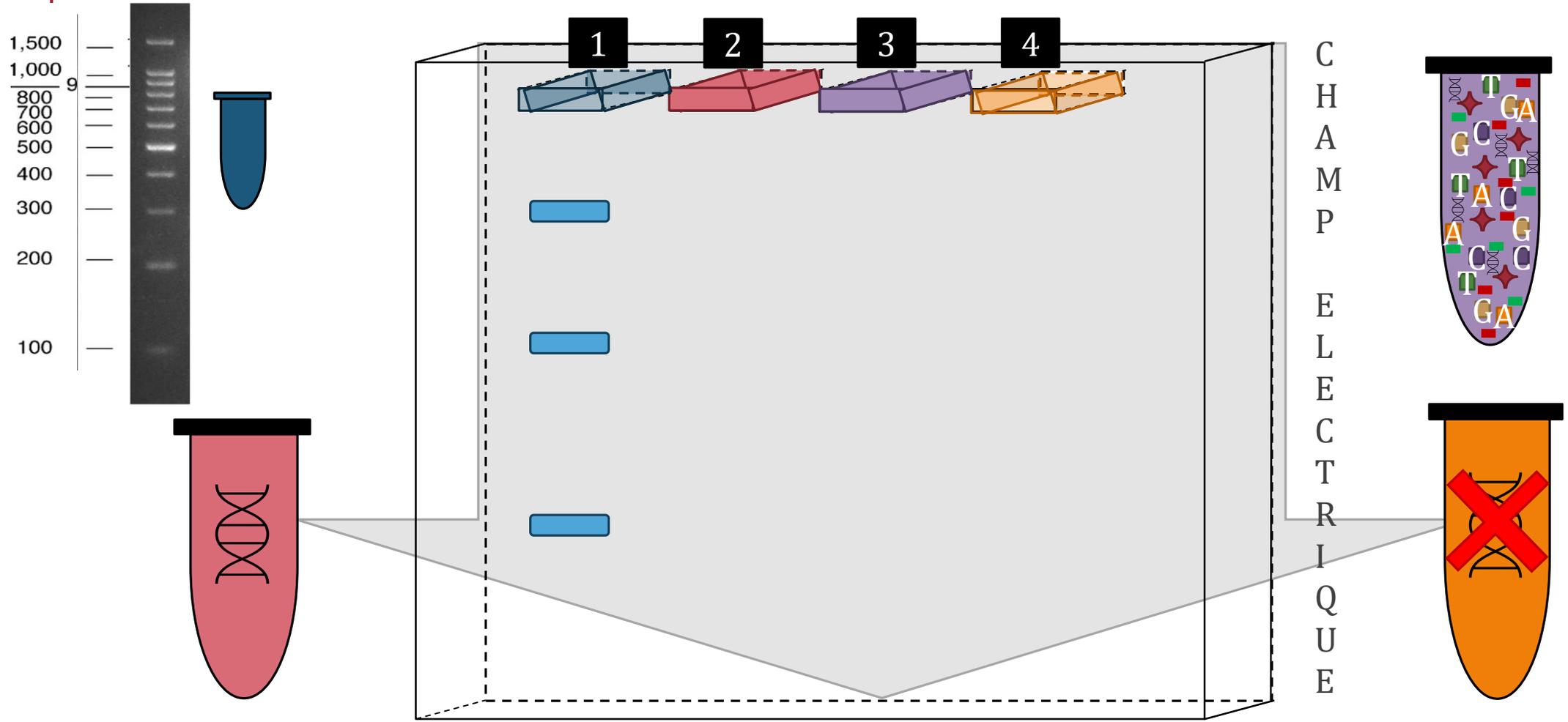
Puit	1	2	3	4
Dépôt	Marqueur de poids moléculaire	Contrôle positif	Test patient	Témoin négatif



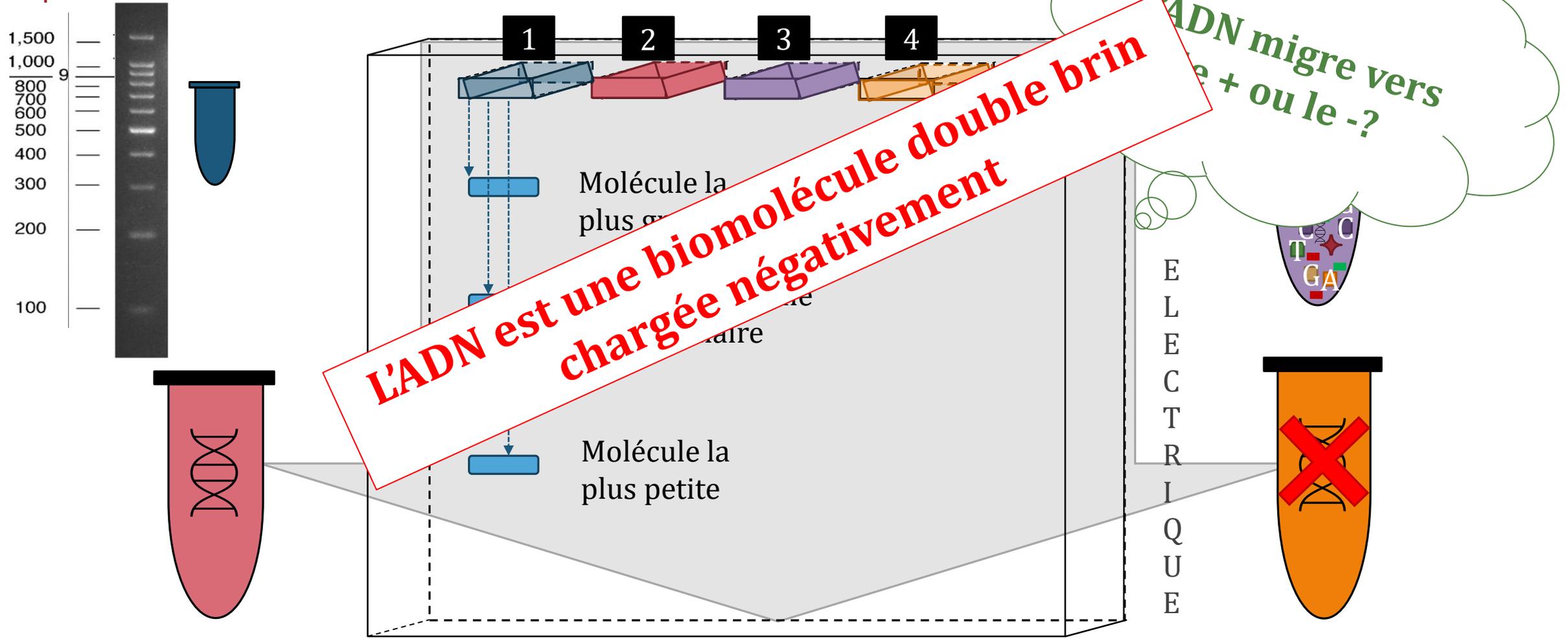
Puits	1	2	3	4
Dépôt	Marqueur de poids moléculaire	Contrôle positif	Test patient	Témoin négatif



Puits	1	2	3	4
Dépôt	Marqueur de poids moléculaire	Contrôle positif	Test patient	Témoin négatif



Puits	1	2	3	4
Dépôt	Marqueur de poids moléculaire	Contrôle positif	Test patient	Témoin négatif



**L'ADN est une biomolécule double brin chargée négativement**

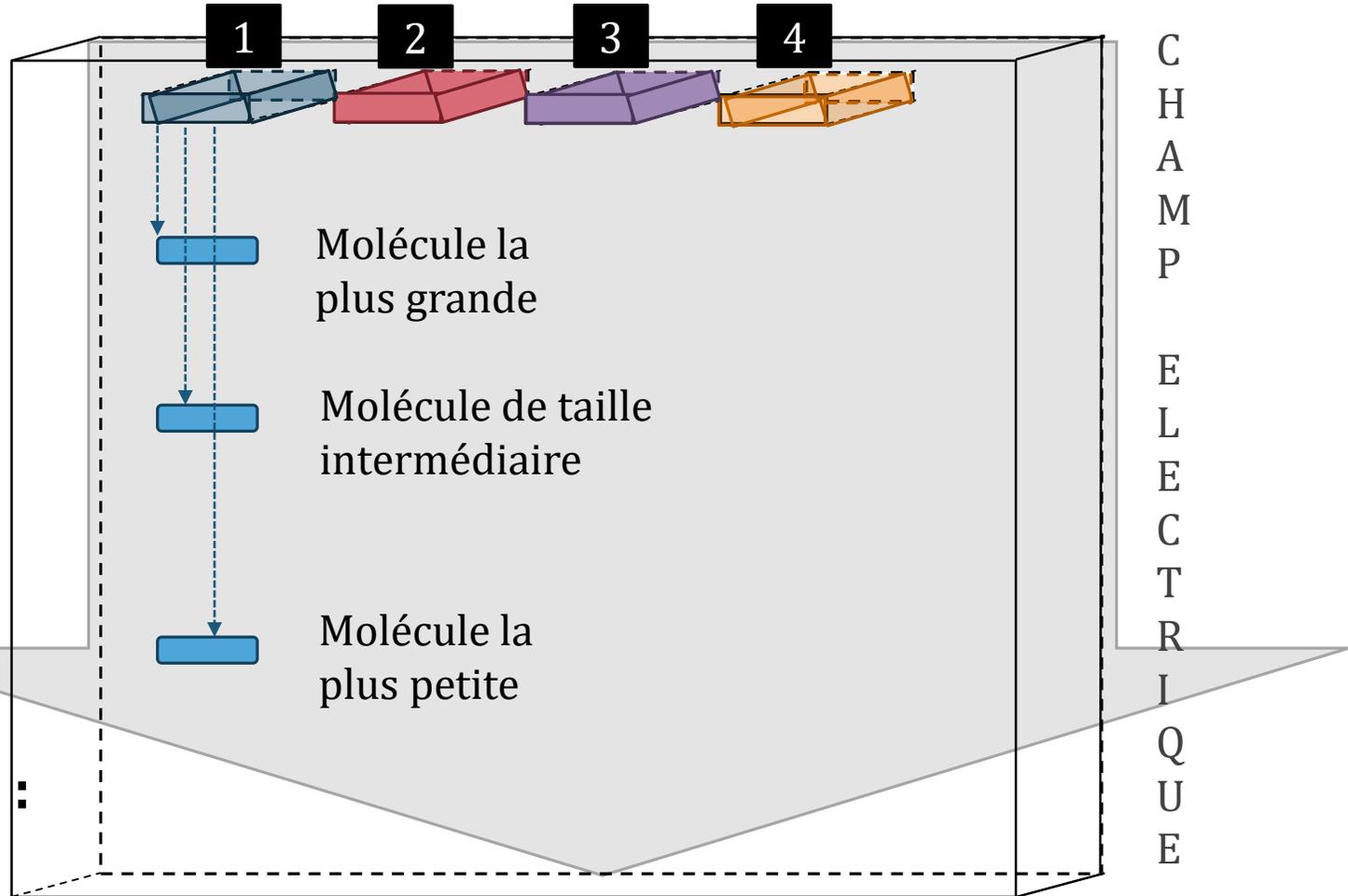
L'ADN migre vers le + ou le -?

ELECTRIQUE

Puits	1	2	3	4
Dépôt	Marqueur de poids moléculaire	Contrôle positif	Test patient	Témoin négatif

**Électrode - :  
Cathode**

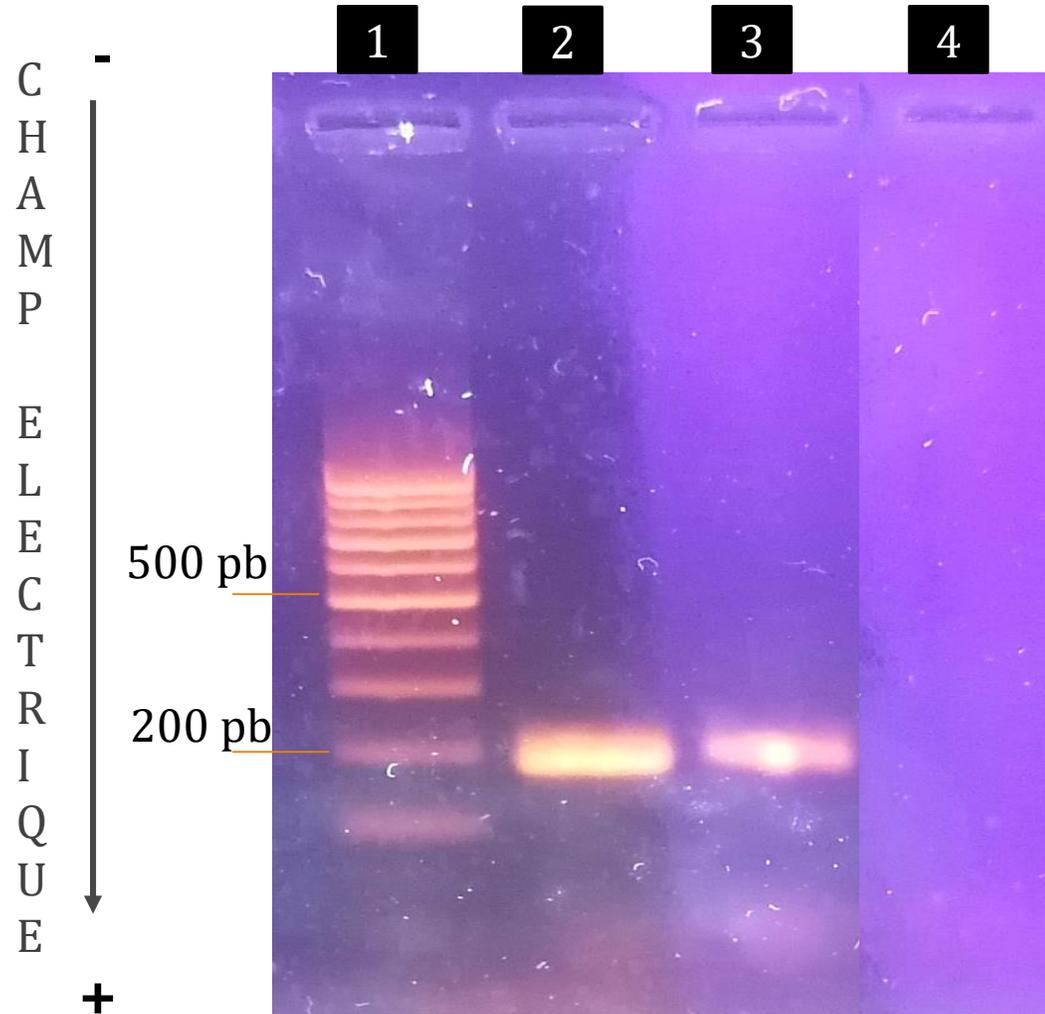
**Électrode + :  
Anode**



C  
H  
A  
M  
P  
  
E  
L  
E  
C  
T  
R  
I  
Q  
U  
E



Puits	1	2	3	4
Dépôt	Marqueur de poids moléculaire	Contrôle positif	Test patient	Témoin négatif



Analyse du contrôle positif :  
 Puit 2 : Bande à 200 pb  
 Amplification de la séquence cible  
 → Le contrôle positif est validé

Analyse du témoin négatif :  
 Puit 4 : Aucune bande visible  
 Pas de contamination des réactifs  
 → Le témoin négatif est validé

Analyse du résultat obtenu :  
 Puit 3 : Bande à 200 pb  
 Amplification de la séquence cible  
 → On retrouve des traces d'ARN de SARS-CoV-2 dans le prélèvement du patient.  
 → **La recherche de SARS-CoV-2 est positive**

# POINTS CRITIQUES ET CAUSES D'ERREUR

## Identification des tubes

- Critère de qualité d'une procédure

## Qualité du prélèvement nasopharyngé

- Faux positif ou faux négatif
- Date

## Pipetages de microvolumes

## Éviter les contaminations

- Faux positifs

## Réaliser les témoins

- Rôle
- Résultats attendus



[Cette photo](#)

[CC BY-SA](#)

ETES-VOUS PRÊT À ÊTRE  
TECHNICIEN DE LABORATOIRE  
D'ANALYSE MÉDICALE ?

→ Effectuer ou réceptionner des prélèvements et prendre en charge des analyses de biologie médicale

Profession réglementée

- BTS Analyses de Biologie Médicale
- BTS Biotechnologies
- BTS Bioanalyses et contrôle
- DUT Génie Biologique (ABB)



[Cette photo](#) par Auteur inconnu est soumise à la licence [CC BY-SA](#)

PRÉFÉREZ-VOUS ÊTRE TECHNICIEN  
DE LABORATOIRE EN RECHERCHE ET  
DÉVELOPPEMENT  
OU QUALITICIEN EN BIOINDUSTRIE ?

→ Produire des  
nouveaux réactifs

→ Rechercher des  
nouveaux vaccins...

➤ BTS Biotechnologies  
(Recherche)

➤ DUT Génie Biologique  
(ABB)

→ Assurer la qualité des  
bioproductions

➤ BTS Bioqualité

# SOURCES

**Lauréna Soubeyrand**, professeur de Biotechnologie BGB, auteur de cette ressource

**Caroline Bonnefoy**, inspectrice générale de l'éducation, du sport et de la recherche et **Claudine Schuster**, inspectrice d'académie-inspectrice pédagogique régionale, relectrices de cette ressource

Vidéos tournées au laboratoire du Lycée Paul Éluard par **Jeanne Manuali**

# SOURCES

Complété par :

Cézard F, *Biotechnologies en 27 fiches*, Dunod, 2<sup>ème</sup> édition

<http://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/lexique/hyperchrome/>

Article de l'INSERM, 07 mai 2020, <https://presse.inserm.fr/tests-diagnostiques-et-tests-serologiques-quel-role-dans-la-lutte-contre-la-pandemie-de-covid-19/39379/>

<http://biologie.univ-mrs.fr/masterBBSG/images/pdf/acides%20nucleiques.pdf>

# SOURCES

## Images :

<https://pxhere.com/fr/photo/1377646>

<https://www.flickr.com/photos/niaid/49645402917/lightbox/>

<http://sanfranciscosurgical.org/coronavirus-updates>

<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/facts/>

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide\\_d%C3%A9soxyribonucl%C3%A9ique](https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_d%C3%A9soxyribonucl%C3%A9ique)

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Two\\_percent\\_Agarose\\_Gel\\_in\\_Borate\\_Buffer\\_cast\\_in\\_a\\_Gel\\_Tray\\_\(Front,\\_angled\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Two_percent_Agarose_Gel_in_Borate_Buffer_cast_in_a_Gel_Tray_(Front,_angled).jpg)