

I. Thermocycleur PCR

1. Définition

Le **Thermocycleur PCR** (ou **cycleur thermique**, **machine PCR**, **amplificateur d'ADN**) est un appareil de laboratoire qui fournit un environnement thermiquement contrôlé pour les échantillons PCR. Il est conçu pour **automatiser** les cycles de chauffage et de refroidissement précis et répétés nécessaires à la réaction de PCR.

2. Principe de Fonctionnement (La PCR)

Le thermocycleur fonctionne en appliquant une série de changements de température précis et rapides pour exécuter les trois étapes de la PCR, permettant la fabrication exponentielle de séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques (jusqu'à 107 fois en quelques heures).

Le cycle de la PCR, qui est répété 30 à 45 fois, se compose de trois étapes principales :

1. Dénaturation : 95°C Chauffage du mélange réactionnel. Séparation (dénaturation) des deux brins de l'ADN matrice double brin.

2. Hybridation (*Annealing*) : 55–65°C Refroidissement du mélange. Les **amorces (*primers*)** se lient (s'hybrident) aux séquences complémentaires de l'ADN cible.

3. Élongation (*Extension*) : 72°C Augmentation de la température. L'enzyme **ADN polymérase** (ex: Taq polymérase) synthétise de nouveaux brins d'ADN, en partant de l'amorce.

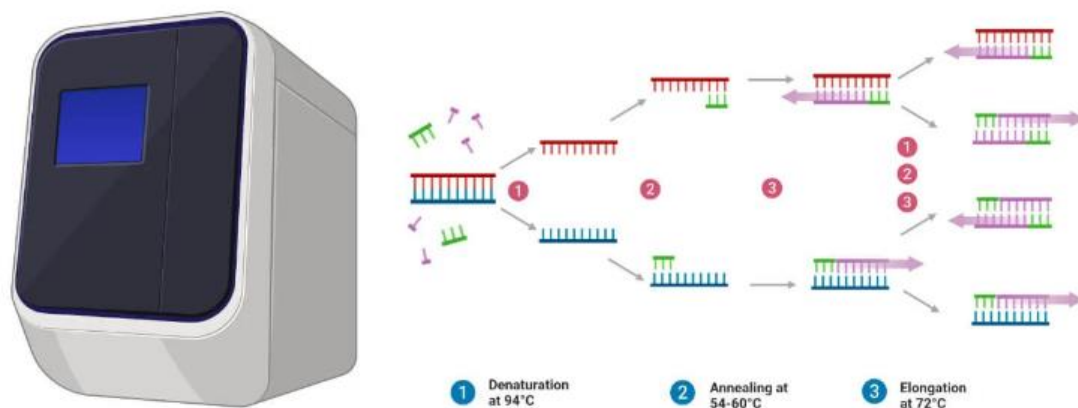


Fig.1. PCR machine. <https://microbenotes.com/>

3. Composants

Les thermocycleurs modernes possèdent plusieurs éléments essentiels :

Chapitre 10 : instrument d'analyse et de détection de L'ADN et ARN

- **Bloc de Réaction (*Heating Block*)** : Pièce dotée de puits où sont insérés les **tubes PCR à paroi fine** ou les **plaques (96, 384 puits)**, contenant le mélange réactionnel. Le bloc est chauffé et refroidi par le système Peltier.
- **Couvercle Chauffant (*Heated Lid*)** : Couvercle qui chauffe à une température supérieure à 100°C (souvent réglé à 105°C). Il applique une pression et empêche la **condensation** ou l'**évaporation** du mélange réactionnel dans le bouchon des tubes.
- **Interface de Contrôle** : Souvent un **écran tactile** ou un clavier, permettant de programmer, d'enregistrer jusqu'à 1000 protocoles et de lancer les cycles.
- **Fonctionnalités Avancées** : Certains modèles avancés offrent des blocs de température indépendants (VeriFlex™) ou des capacités de **gradient** pour optimiser les températures d'hybridation en une seule opération.
- **Connectivité** : Ports USB et/ou LAN pour le transfert de données, la connexion à des périphériques (souris/clavier), et l'utilisation de logiciels de pilotage.

4. Mode d'Utilisation

L'utilisation du thermocycleur est en grande partie automatisée après la préparation de l'échantillon.

- a) **Préparation de l'échantillon** : Le mélange réactionnel PCR (ADN matrice, amorces, ADN polymérase, dNTPs et tampons) est pipeté dans des tubes ou plaques **spécifiques à la PCR**.
- b) **Chargement** : Les tubes sont placés dans le bloc thermique en s'assurant qu'ils sont **correctement scellés** et distribués uniformément pour un chauffage égal.
- c) **Programmation** : L'utilisateur programme ou sélectionne un protocole enregistré via l'écran de contrôle. Le protocole définit :
 - La température et la durée de la dénaturation initiale (pour activer l'enzyme).
 - La température et la durée des cycles répétés (Dénaturation, Hybridation, Élongation).
 - Le nombre de cycles (entre 1 et 60).
 - La température et la durée de l'extension finale et du maintien à 4°C.

Chapitre 10 : instrument d'analyse et de détection de L'ADN et ARN

- d) **Lancement** : Le programme est lancé. Le thermocycleur automatise alors les changements de température avec une grande précision.
- e) **Récupération** : Une fois le programme terminé, l'utilisateur doit être **prudent** en récupérant les tubes, car les éléments de l'appareil (notamment le couvercle) peuvent être très chauds.

4. Maintenance et Précautions

Une maintenance appropriée et le respect des précautions sont essentiels pour la sécurité et la fiabilité des résultats.

- **Nettoyage** :
 - **Débrancher** l'appareil et le laisser **refroidir** avant toute intervention.
 - Nettoyer avec un tissu humide et légèrement savonneux, puis essuyer, sans utiliser de détergent abrasif ou de grande quantité d'eau.
 - S'assurer que le bloc chauffant est **propre** avant chaque utilisation. Nettoyer immédiatement les déversements de solution.
- **Précautions d'utilisation** :
 - Utiliser **uniquement** les tubes et plaques conçus pour le modèle de thermocycleur.
 - Manipuler le couvercle avec soin, car une chute peut l'endommager.
 - S'assurer que l'alimentation électrique est **stable**.
 - Éteindre l'appareil lorsqu'il n'est plus utilisé.
- **Sécurité** : Prendre les **précautions nécessaires pour éviter toute brûlure** lors de la récupération des échantillons, car la température du couvercle peut dépasser 100°C.

II. Séquenceurs

1. Définition du Séquenceur

Un séquenceur de laboratoire est un instrument conçu pour décoder des séquences moléculaires.

On trouve :

Chapitre 10 : instrument d'analyse et de détection de L'ADN et ARN

- a) **Séquenceur NGS (ADN/ARN) :** Un instrument de laboratoire révolutionnaire qui permet de **décoder rapidement de vastes génomes d'ADN ou d'ARN** à un coût nettement inférieur aux méthodes traditionnelles. Il s'agit d'un appareil essentiel en **biologie moléculaire** et en **génétique**.
- b) **Séquenceur de Protéines :** Un instrument combinant une réaction chimique (méthode d'Edman) avec une chromatographie liquide (HPLC) pour déterminer la séquence d'acides aminés des protéines et peptides.
- c) **Séquenceur de Mesure (Pression):** Un appareil modulaire utilisé dans l'industrie ou l'électronique pour réaliser des mesures de pression différentielle, permettant d'activer des vannes ou des injections d'air comprimé.

2. Principe de Fonctionnement

Le principe varie selon le type de séquenceur, mais la technologie la plus courante est le Séquençage de Nouvelle Génération (NGS).

A. Principe du Séquençage NGS

Le NGS repose sur une **approche en parallèle massif** :

- 1. **Préparation des fragments :** L'ADN ou l'ARN est fragmenté en millions de petits morceaux.
- 2. **Séquençage simultané :** L'appareil analyse **simultanément** ces millions de fragments d'acides nucléiques.
- 3. **Détection de bases :** Diverses technologies sont utilisées pour déterminer la séquence de base (A, T, C, G) :
 - **Détection Optique/Chimique :** Les bases sont ajoutées séquentiellement, et leur incorporation est détectée par un signal lumineux ou chimique.
 - **Séquençage à semi-conducteur :** Détecte le changement de **pH** causé par le relargage d'ions hydrogène lors de l'ajout d'un nucléotide à une chaîne d'ADN.

B. Principe du Séquençage de Protéines

- Il utilise la **méthode de dégradation d'Edman** combinée avec une technique de séparation comme la **Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)**. La méthode d'Edman retire et identifie un acide aminé à la fois à l'extrémité de la protéine.

3. Composants de l'Appareil

Chapitre 10 : instrument d'analyse et de détection de L'ADN et ARN

Les séquenceurs sont des systèmes sophistiqués, souvent modulaires et entièrement automatisés.

- **Matériel (Hardware) Robuste** : L'unité centrale qui abrite les composants de séquençage.
- **Système Robotique Intégré** : Pour l'automatisation complète de la préparation des échantillons, de la réaction de séquençage et du lavage (ex. : DNBSEQ-T20×2).
- **Composants d'Analyse (Optiques/Électroniques)** : Pour la détection des signaux (lumière, pH, etc.) générés pendant le séquençage.
- **Plateformes (Consommables)** : Puces de séquençage ou cellules de flux, souvent adaptées aux types d'échantillons (ADN, protéines, tissus).
- **Logiciel Intuitif** : Indispensable pour l'analyse des données. Ces logiciels gèrent l'interprétation des millions de lectures générées, le traçage des échantillons et la comparaison des séquences.
- **Systèmes de Température** : Notamment pour les modèles ultra-portables, assurant un contrôle thermique performant pour des analyses en temps réel fiables.

4. Mode d'Utilisation des Séquenceurs (NGS)

Le mode d'utilisation d'un séquenceur (ADN/ARN) suit généralement un flux de travail en trois grandes phases :

Phase 1 : Préparation des Échantillons (Pré-Séquençage)

Cette étape est cruciale et peut être gérée soit manuellement, soit par des systèmes robotiques intégrés (comme mentionné pour le DNBSEQ-T20×2) :

- a) **Extraction de l'Acide Nucléique** : L'ADN ou l'ARN est extrait de l'échantillon (cellules, tissus, sang, etc.).
- b) **Fragmentation** : L'acide nucléique est coupé en millions de **petits fragments**. Cette étape est nécessaire pour le séquençage en parallèle massif.
- c) **Préparation de la Librairie (Library Preparation)** : Des séquences d'ADN spécifiques (adaptateurs) sont ajoutées aux deux extrémités de chaque fragment. Ces adaptateurs sont essentiels pour que l'échantillon puisse se fixer à la puce de séquençage et pour identifier chaque échantillon (multiplexage).

Chapitre 10 : instrument d'analyse et de détection de L'ADN et ARN

- d) **Contrôle Qualité** : Les librairies sont vérifiées en termes de concentration et de taille avant d'être chargées dans l'appareil.

Phase 2 : Séquençage sur l'Appareil

C'est l'étape où le séquenceur entre en jeu. Le processus peut varier légèrement selon la technologie (détection de lumière, de pH, etc.).

- a) **Chargement de la Puce (Flow Cell)** : La librairie d'échantillons préparée est chargée sur une puce de séquençage. Les adaptateurs permettent aux fragments de se fixer à la surface de la puce.
- b) **Amplification (Clonal Amplification)** : Les fragments d'ADN fixés sont multipliés *in situ* pour créer des millions de **clusters** (groupes de copies identiques du fragment). Cette amplification est nécessaire pour que le signal de séquençage soit suffisamment fort pour être détecté.
- c) **Processus de Séquençage** :
- Des nucléotides modifiés (les briques A, T, C, G) sont ajoutés séquentiellement.
 - Le séquenceur détecte l'incorporation de chaque nucléotide dans la chaîne d'ADN en croissance. Par exemple, certains séquenceurs à semi-conducteurs détectent le **changement de pH** (libération d'un ion hydrogène) causé par l'incorporation d'une nouvelle base.
 - Cette détection est enregistrée pour chaque cluster.

Phase 3 : Analyse Bio-informatique

Comme mentionné, les séquenceurs génèrent des données massives. Cette phase est gérée par des **logiciels d'analyse de données** (souvent intégrés) :

- a) **Lecture des Données (Base Calling)** : Le logiciel convertit les signaux bruts (optiques ou chimiques) enregistrés par l'instrument en une séquence de bases (A, T, C, G).
- b) **Alignement** : Les millions de courtes séquences obtenues (les "lectures" ou *reads*) sont alignées et cartographiées sur un génome de référence (si connu).
- c) **Interprétation** : L'utilisateur final utilise les *pipelines de traitement des données optimisés* intégrés pour :

Chapitre 10 : instrument d'analyse et de détection de L'ADN et ARN

- Repérer des mutations.
- Déchiffrer des séquences d'ADN ou d'ARN.
- Analyser l'expression génétique (transcriptomique).

5. Maintenance de l'Appareil

La maintenance est cruciale pour assurer l'analyse précise et reproductible des résultats.

- **Propreté et Entretien** : L'encombrement réduit et la conception facilitent le nettoyage et l'entretien du système.
- **Support Spécialisé** : Les fabricants ou distributeurs proposent des services de maintenance sciences analytiques, ainsi que de la formation et du conseil pour garantir l'interprétation optimale des résultats.
- **Étalonnage et Qualification** : Des services de qualification et étalonnage sont nécessaires pour assurer la précision des mesures générées par l'instrument.
- **Systèmes Annexes** : La maintenance inclut également la vérification de la traçabilité intégrée des échantillons et le bon fonctionnement des systèmes de multiplexage d'échantillons.

<https://www.medicalexpo.fr/fabricant-medical/sequenceur-laboratoire-14081.html>

<https://www.htds.fr/sciences-analytiques/sciences-de-la-vie/analyses-moleculaires/sequenceurs/sequenceurs-ngs/>

<https://www.franceenvironnement.com/sous-rubrique/sequenceur>

<https://www.clinisciences.com/achat/cat-thermocycleurs-1654.html>