

# La PCR

## I - Définition :

La PCR est un outil fondamental de la biologie moléculaire, permet de récupérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infini dans un mélange puis de le multiplier rapidement. La PCR a été décrite pour la première fois par Kary Mullis en 1983 et publié en 1985, par la suite elle a valu à Kary Mullis le prix Nobel de chimie en 1993.

## II-Principe :

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire, d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, un segment d'acides nucléiques doit s'y associer afin de servir d'amorce.

Cette amorce ou primer est un oligonucléotide de synthèse de 17 à 30 bases de longueur, et dont la séquence est complémentaire à celle du brin à amplifier permet de délimiter les bornes de la séquence à amplifier. L'association à l'ADN cible est suivie de son élongation par la polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN double brin.

La PCR consiste en une succession cyclique de 3 étapes :

Le milieu réactionnel tamponné comprend tous les éléments indispensables, les précurseurs nucléotidiques (ATP, dCTP, dTTP, dGTP), le cation  $Mg^{++}$  indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs, l'ADN polymérase et les amorces, à ce milieu est ajouté l'ADN extrait du milieu biologique à étudier.

### Première étape : Dénaturation thermique

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins en rompant les liaisons hydrogènes. L'ADN double brin est chauffé, à une température de l'ordre de 94 °C. Cette température est supérieure à la température de dénaturation ( $T_m$ ) de l'ADN passe alors sous forme simple brin. Ces brins servent de matrice au cours des cycles d'amplification.

### Deuxième étape : Hybridation de amorces ou annealing

Le milieu réactionnel est amené, à une température inférieure au  $T_m$  des amorces. Ce  $T_m$  est fonction de la séquence et est en général de l'ordre de 45 à 70 °C. Les amorces en large excès, s'hybrident à tout l'ADN simple brin comportant la séquence complémentaire.

### **Troisième étape : l'elongation et extension d'amorces**

Une ADN polymérase (la taq polymérase) allonge les amorces en y incorporant les désoxynucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle est hybridée.

La synthèse s'effectue dans le sens 5' → 3' à 72°C .Température optimale .A al fin du cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues.

UN nouveau cycle commence par l'étape de dénaturation, suivie successivement des étapes d'hybridation et d'extension .A chaque cycle correspond le doublement du nombre de copies de la séquence cible.

De manière générale 15 à 40 cycles sont effectués, générant un nombre considérable de copies de la séquence cible.

L'amplification est exponentielle .Le rendement de la réaction n'atteint jamais 100%.