TP4 : PCR

(*Polymerase Chain Reaction* ou Réaction de Polymérisation en Chaîne)

- **But de TP :**

Décrire les étapes nécessaires à la PCR

- **Principe :**

La PCR est une méthode de Biologie Moléculaire mise au point en 1985 par Kary Mullis, elle permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Cette technique permet d'obtenir un nombre important (jusqu'à un million) de copies d'une séquence choisie d'ADN.

La PCR est une suite de cycles, qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température. De plus, chacun de ces paliers est caractérisé pas une réaction chimique distincte. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles.

- **Les acteurs de la PCR :**

1. L'ADN: Avant la réaction de PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules …). Puis, cet extrait purifié en ADN, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en PCR.

2. Les deux amorces: Ce sont des fragments courts d'ADN, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. La taille de ces amorces est généralement d'une vingtaine de désoxyribonucléotides. De plus, les amorces sont en très forte concentration par rapport à celle de l'ADN à amplifier.

3. Les DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP): Les dNTPs (Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates) sont des molécules de base, qui constituent l'ADN, utilisés par la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire.

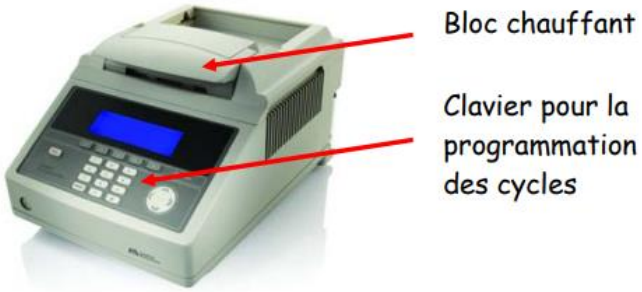
4. L'enzyme, Taq polymérase: L'enzyme utilisée est une polymérase, c'est-à-dire qu'elle peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce.

5. Le milieu réactionnel: Le milieu réactionnel de la PCR comporte l'ADN à amplifier, les dNTPs, les deux amorces, la Taq polymérase, un tampon et des ions magnésium (MgCl2). Ces deux derniers composants définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme.

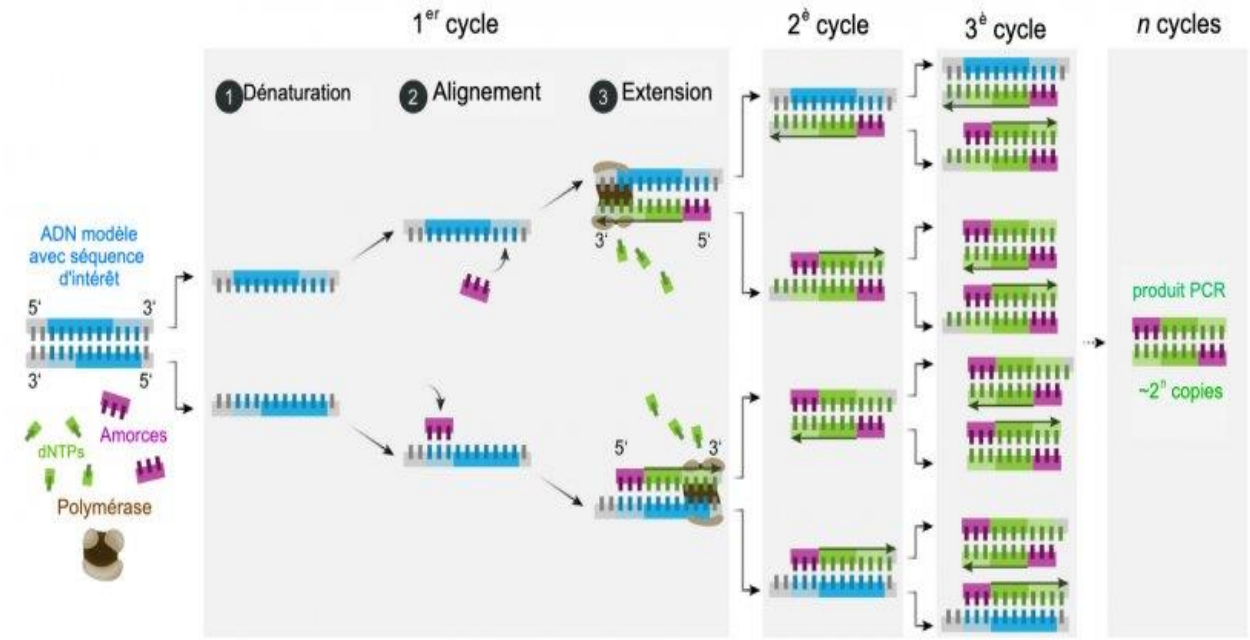
- **La réaction :**

La PCR est une technique automatisée. En effet, la réaction de PCR se fait dans un thermocycleur.

L'appareil contient un bloc chauffant où l'on insère les tubes contenant le mélange pour la réaction de PCR et où la température peut varier très rapidement et très précisément de 0°C à 100°C.

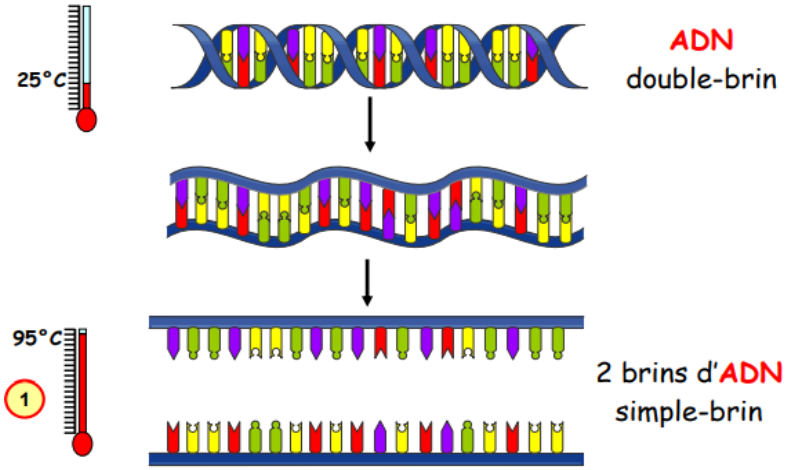


Le thermocycleur est alors programmé pour effectuer les différents cycles de la PCR. Ainsi, chaque cycle est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée, et d'une durée bien définie. Ces deux paramètres, température et temps, dépendent de la taille de la séquence à amplifier de la taille et de la composition en désoxyribonucléotides des amorces.
Chaque cycle est donc constitué de trois périodes différentes: 1. Dénaturation ; 2. Hybridation ; 3. Elongation



1. La dénaturation:

La température dans le tube est réglée à une température comprise entre 93 et 96°C. A ce moment-là, l'ADN se dénature. En effet, l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice, les liaisons hydrogène reliant les bases de chaque brin d'ADN étant instables à cette température. L'ADN double-brin est dénaturé en ADN simple brin.



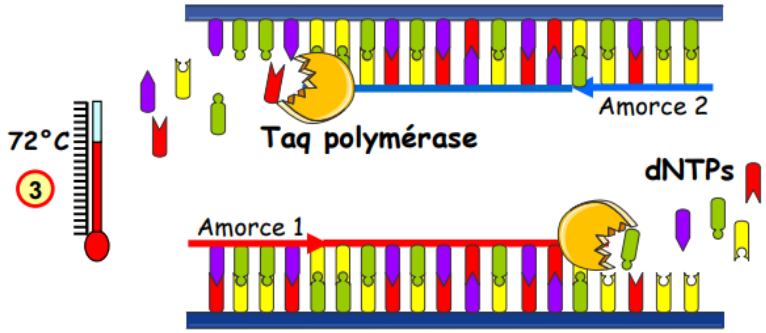
2. L'hybridation:

Ensuite la température est descendue à la température dite d'hybridation. Cette dernière est généralement comprise entre 50°C et 60°C et elle est fonction de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) des amorces. Les amorces reconnaissent

et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On dit que les amorces s'hybrident au brin d'ADN.

3. L'élongation:

Puis la température est réglée à 72°C, température idéale pour l'activité de la Taq polymérase. C'est une enzyme très spéciale, puisqu'elle est dite thermorésistante. En effet, sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des températures allant jusqu'à 100°C. Cette Taq polymérase est extraite d'une bactérie extrêmophile, *Thermus aquaticus*, qui ne vit que dans les sources chaudes.



Cette étape permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.

Au cycle suivant, les nouveaux fragments synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux fragments d'ADN. En théorie, à la fin de chaque cycle la quantité d'ADN cible est doublée.