**PCR**

**PCR** est l'abréviation de l’expression anglaise *Polymerase Chain Reaction*, le terme français équivalent, Amplification en Chaîne par Polymérisation, À partir d’un échantillon complexe et peu abondant (par exemple une goutte de sang), cette technique permet d’obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d’un segment précis d’ADN. Elle nécessite de connaitre la séquence des régions qui délimitent l’ADN à amplifier, ces séquences serviront à synthétiser des amorces spécifiques,

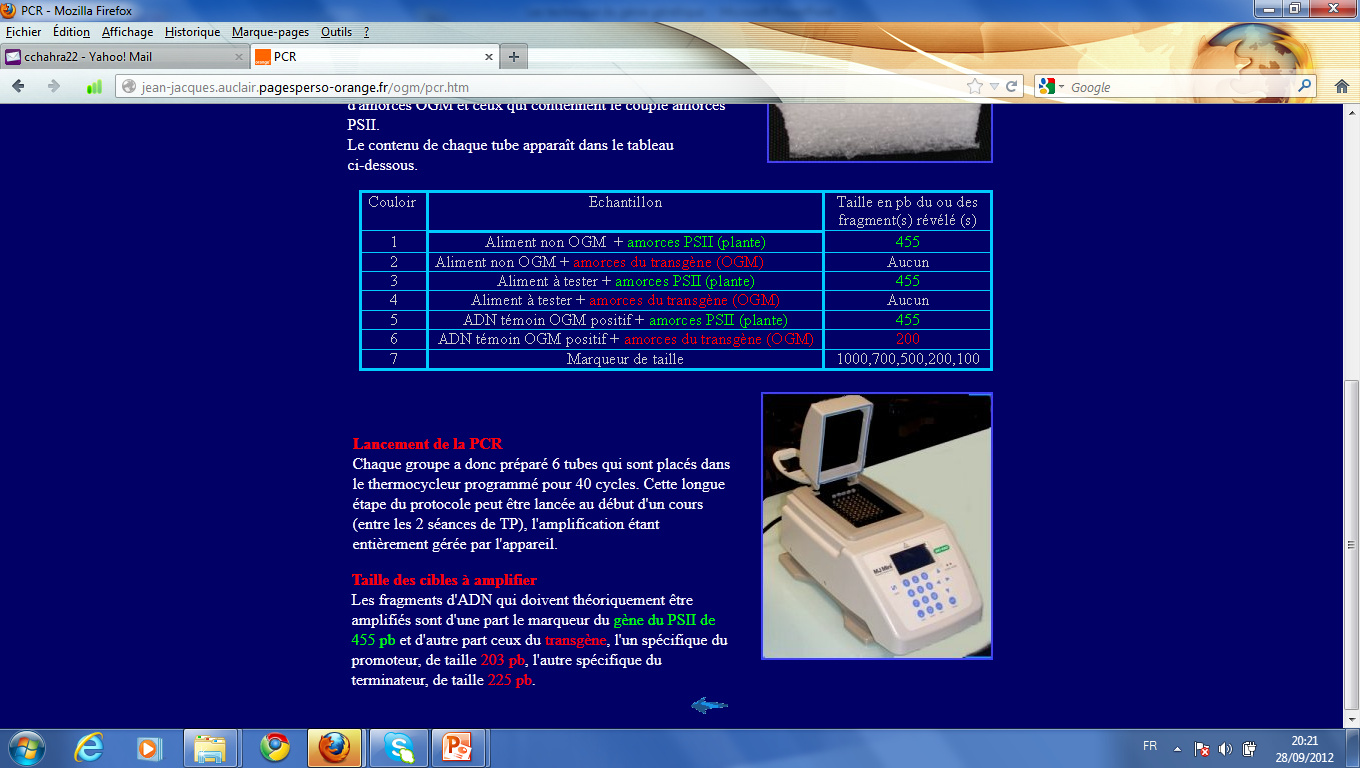
Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont très simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN.

Chaque réaction met en œuvre

* Deux amorces oligonucléotidiques.
* Les 4 nucléotides
* Une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq polymérase), qui permet une automatisation de la technique.

L'astuce consiste à utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes, au lieu de les séparer afin de ne réutiliser que la matrice originale. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.

Une PCR se déroule dans un petit tube lui-même placé dans un appareil programmable (la température et la durée) appelé thermocycleur



* Les étapes de la PCR
* Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes :

Avant la réaction, tous les éléments de la PCR sont introduits dans le même tube. Il s'agit de l'ADN à amplifier, des oligonucléotides (ou amorces) spécifiques du segment d'ADN voulu, de l'ADN polymérase (la Taq polymérase) et enfin du mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN. Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN**.**

**La dénaturation** : ou séparation des deux brins. Le thermomètre indique que le tube est à la température 95°C (30 seconds à 1 minute), a cette température, les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.

**L’hybridation:** L’hybridation des amorces sur l'ADN repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires. la temperature d’hybridation est calculée en fonction de la longueur et de la composition en bases nucléotidiques de la séquence des amorces.

**La température d’hybridation = Tm-5**

* + - **Oligonucléotide inférieur à 20 nt**

Tm (°C) = (A+T) x 2+(G+C) x4

* + - **Oligonucléotide supérieur à 20 nt**

Tm (°C) = [(A+T) x 2+(G+C) x4)]x[(1+(N-20) /20)]

**Recherche et optimisation des amorces pour la PCR**

* Les amorces doivent être spécifiques, stables et compatibles
* L’amorce doit s’hybrider avec une seule zone de l’ADN matrice
* L’amorce doit être spécifique du gène ou de l’espèce recherchée. Elle ne doit pas s’hybrider avec un ADN contaminant
* Les amorces ne doivent pas s’auto-hybrider ni s’hybrider entre elles ni former des structures en épingles à cheveux

**L’élongation :** Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides (présents dans le mélange en large excès) par l’intermédiaire de l’enzyme Taq polymérase résistante a la chaleur qui permet l’automatisation des différents cycles.

